

P-085 脱細胞化角膜の組織適合性評価

橋本 良秀¹, 松本 誠一^{1,2}, 佐々木秀次^{2,3}, 望月 學²,
藤里 俊哉¹, 木村 剛^{1,4}, 小林 尚俊^{1,5}, 岸田 晶夫¹
¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²東京医科歯科大学医学部附属病院眼科, ³物質・材料研究機構生体材料センター, ⁴大阪工業大学医工学研究センター

【背景・目的】従来、代替角膜として高分子材料を用いた人工角膜の開発が行われているが、生体物性などの相違から接合部での融解に伴う脱落が報告されている。近年、角膜再生において再生医療技術の有効性が示され、角膜全層の再生が期待されている。しかしながら、角膜の約90%を占める実質部の再生には至っていない。我々は、角膜実質部として生体より細胞を除去した脱細胞化角膜の開発と有効性を検討している。本研究では、脱細胞化角膜の組織適合性について検討したので報告する。【方法】成体ブタ眼球から角膜を採取した。超高压圧印加装置を用いた10,000気圧の超高压圧印加による細胞破壊、及び振盪洗浄による細胞残渣除去を行った。脱細胞化を組織学的観察、残存DNA、GAG定量により評価した。また、示差走査熱量分析、電子顕微鏡観察により組織の微細構造変化を検討した。日本白色家兎の左眼角膜にポケットを作製し、未処理角膜移植群、脱細胞化角膜移植群に分け、透明性、炎症反応など比較検討を行った。【結果・考察】超高压処理した角膜では、完全な細胞除去が達成され、コラーゲン線維の配向も維持されていた。ウサギへの異種移植において、未処理角膜では新生血管が多数観察され、拒絶反応が惹起された。一方、脱細胞化角膜では、軽微な炎症反応を認めたと、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。以上より脱細胞化角膜の移植用角膜としての有用性が示唆された。

P-165 力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製

村越 彩子¹, 木村 剛¹, 松本 誠一¹, 藤里 俊哉², 岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所分子制御分野, ²大阪工業大学医工学研究センター

【総言】

我々は、バイオスキャフォールドの調製法として、圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣等を除去する超高压水圧処理法を考案し、脱細胞化組織の調製を検討している。これまでの移植試験では、早期の内皮化、及び、内臓肥厚抑制を報告した。また、脱細胞化血管調製時における圧力印加条件により、ECM線維間の空隙を変化できることを報告した。これは、力学特性と細胞浸潤性を変化させると考えられ、本研究では、移植材料として重要な力学特性について検討した。

【方法】

成体ブタの大動脈から10mm×15mmの血管試料を調製した。冷間等方圧加圧装置（株）神戸製鋼所）を用いて、様々な初期温度、変圧速度、圧力印加時間にて10000気圧の超高压水圧を印加した。組成の異なる洗浄液による所定の時間の浸透洗浄により細胞残渣等を除去した。処理標本の組織断面を光顕観察、透過型電顕観察にて細胞除去、組織構造を評価した。力学試験にて、超高压処理による力学特性の変化を評価した。

【結果・考察】

超高压処理を用いた脱細胞化処理は、圧力印加条件（初期温度、昇圧・保持・減圧時間）の異なる条件で超高压水圧を印加し、所定期間にて洗浄を行った。圧力印加条件によらず、完全な脱細胞化処理がなされた。力学特性は、条件に依存して変化した。超高压印加条件を調製することで、特に弾性率の異なる血管組織スキャフォールドの調製ができることが示唆された。

P-167 血管組織の新規脱細胞化処理法の検討

玉井 克明¹, 藤里 俊哉², 岸田 晶夫³, 山岡 哲二¹

¹国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部, ²大阪工業大学, ³東京医科歯科大学

【総言】脱細胞化組織を用いた再生型移植では、移植後にレシピエントの細胞が浸潤することで、自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。我々は、超高压脱細胞化処理法を開発し、動物実験によってその有効性を検討してきた。本方法においては、超高压印加処理後に、PBSをベースとする洗浄液で細胞残渣を取り除くことで良好な脱細胞化が可能であることを明らかにしてきた。今回、さらなる、細胞除去方法の隔離を目指し、新たな洗浄方法を模索した。【方法】実験動物としてLewis rat(donor用)、SD rat(recipient用)を使用した。ラット下行大動脈を採取し、超高压印加処理を施した。処理を施した血管を、PBSや増地による処理の他、生体分子と接触させる等の手法により細胞除去を施した。所定時間処理後、脱細胞化度合いをDNA定量および組織学的に検討した。【結果】本処理工程の最適化により、超高压印加処理後の組織から脱核が完全に達成できていた。また、細胞残渣を従来の洗浄液で取り除いたものより、血管構造が保持されていることから、その強度を検討するとともに、現在、DNA定量により定量的評価を進めている。さらに、超高压処理を施していないnative血管についても同様の処理による脱細胞化効率の検討を進めている。

P-166 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生

寺田 堂彦¹, 澤田 和也², 緒方 裕之¹, 平工 香織¹, 鎌田和加子¹, 吉田 謙一¹, 松本 誠一³, 藤里 俊哉¹, 岸田 晶夫¹, 山岡 哲二¹, 中谷 武嗣¹

¹大阪工業大学工学部生体医工学科, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学, ⁴国立循環器病センター, ⁵東京医科歯科大学

現在、臨床においては年間約5万本もの人工血管が使用されている。しかしながら、成長機能の欠如から小児患者への適用には問題が残されており、再生型人工血管の開発が依然として望まれている。我々は再生型人工血管の開発を目的とし、ブタ大動脈組織を由来とするバイオスキャフォールドに関する研究を行った。血管組織試料としてブタ大動脈（ジャパンファーム）を用いた。120度C、24時間の熱脱水架橋を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリプシン緩衝液（0.57 μg/ml; CaCl₂ 10 mM; Na₂CO₃ 0.02%; pH 8.37度C）中で72時間振盪処理を行い、エラスチンを分解除去した。その後、エタノール（80 v% 37度C; 72時間）処理によってリン脂質を抽出除去した。作製した脱エラスチン化動脈組織を用いて同種ミニブタへの置換移植実験を行った結果、移植期間3ヶ月の時点でグラフトに増殖および石灰化は認められず、無数のレシピエント由来平滑筋細胞の浸潤が確認された。6ヶ月ではグラフト内にわずかに石灰化が認められた。MTC染色では、6ヶ月でエラスチン線維の再形成は認められなかった。弾性線維の豊富な動脈組織の再生には、さらに長期経過の観察が必要であると考えられる。本方法により作製されたグラフトは再細胞化能と石灰化抑制効果を有しており、再生型バイオスキャフォールドとしての有効性が示された。

P-186 電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み

北 孝之¹, 近藤 英雄², 寺田 堂彦², 山崎 健一², 橋本 成広², 藤里 俊哉²

¹大阪工業大学工学部電子情報通信工学科, ²大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ³ヒューマンサイエンス振興財団

【緒言】患者のQOLの向上のために再生医療技術を応用した培養筋に関する研究が活発に行われているが、培養過程に伴う培養筋の成熟度を非破壊的に評価する方法は確立されていない。そこで我々は体脂肪率の測定などに用いられている電気インピーダンス法に着目し、培養筋成熟度の定量評価方法としての有用性を検討するため、骨格筋の構造の変化と電気インピーダンスとの関係を調べた。

【実験方法】組織構造の変化が電気インピーダンスに及ぼす影響を調べるため、生後約6ヶ月、体重約100 kgの食用豚大腰筋より採取した骨格筋を試験片とし、コラゲナーゼ処理を施した酵素処理群と未処理の対象群を準備した。電気インピーダンス測定はケミカルインピーダンスメータを使用した。測定は空气中、室温環境下で行い、得られたデータをPCに保存後、解析を行った。電気インピーダンス測定後、試験片の含水率を調べた。また、万能試験機を用いて引張試験を行い、試験片の力学的強度を評価した。

【結果および考察】対象群に比べて酵素処理群の含水率は高く、電気インピーダンスは低い傾向が見られた。引張試験を行った結果、対象群に比べて酵素処理群の接線剛性は低い傾向が見られた。これらのことから電気インピーダンス法を用いて水分状態を調べることにより骨格筋の構造の変化を推定することが可能であり、培養筋成熟度の評価方法として有用であることが示唆された。

P-187 ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養

奈良 雅尚¹, 山崎 健一¹, 寺田 堂彦², 澤田 和也², 近藤 英雄², 橋本 成広², 藤里 俊哉²

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学総合生活学科

【緒言】生体の筋組織は出力対重量比が大きく、アクチュエータとして優れた特性を有する。培養した筋細胞をアクチュエータとして使用するためには、筋組織と同様に筋細胞を高密度に集積させ、一方向に配向させる必要がある。そこで、培養筋を作製するためのスキヤフォールドとして繊維-ゲル複合体に着目した。繊維-ゲル複合体は繊維そのものが強度を有しており、ある程度大きさを制御することが可能である。さらに、繊維に沿って細胞が配向すると期待される。これらのことから、本研究では繊維-ゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養を行い、スキヤフォールドとしての有用性を評価した。【方法】繊維にはポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上にコラーゲンゲルを形成した。マウス横紋筋由来の株化細胞であるC2C12細胞を播種し、10%ウシ胎児血清と抗生物質を含むHG-DMEMで培養した。分化誘導してから1週間後に電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮動態を調べた。【結果および考察】スキヤフォールド上で細胞が増殖し、筋管細胞に分化している様子が見られた。入力電圧30 V_{p-p}、周波数1 Hz、パルス幅10 msecの電気パルスを培養液中に印加したところ、培養筋が周波数に同期して収縮する様子が観察された。電気パルスによって収縮弛緩したことから、繊維-ゲル複合体は培養筋のスキヤフォールドとして有用であることが示唆された。

P-188 脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養

山崎 健一, 寺田 堂彦, 奈良 雅尚, 近藤 英雄, 橋本 成広, 藤里 俊哉

大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

【目的】我々はこれまで、脱エラスチン化生体組織を用いて、筋芽細胞を培養してきた。脱エラスチン化生体組織は形状の制御が比較的容易で、強度がコラーゲンゲルに比べて高いという利点がある。しかし、培養筋を占める細胞外基質質量が多く、筋の収縮を妨げることが危惧される。一方、コラーゲンゲルは細胞外基質の割合が脱エラスチン化生体組織に比べて少ないが、強度が弱いなどの欠点がある。そこで、互いの利点を生かすために、脱エラスチン化生体組織-コラーゲンゲル複合体を作製し、培養筋としての機能を評価した。【方法】脱エラスチン化生体組織をケルシュナー鋼線に固定し、2つの脱エラスチン化生体組織の間にC2C12細胞を包埋したコラーゲンゲルを形成した。10%牛胎児血清を含むDMEMで3日間培養した後、C2C12細胞の分化を促進させるため7%馬血清を含むDMEMで6日間培養した。培養後、電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮弛緩動態を観察した。【結果】培養9日後、ゲルが脱エラスチン化生体組織を覆うように収縮した。電気パルス刺激を与えたところ、培養筋が周期的に収縮弛緩した。【結論】今回用いた複合体scaffoldは培養筋の足場として有用であることが示唆された。今後は強度や収縮力を脱エラスチン化生体組織のみの場合と比較して、詳しく検討する予定である。

P-189 骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発

赤土 和也¹, 山崎 健一², 出谷 耕¹, 中尾 誠², 吉浦 昌彦², 藤里 俊哉¹, 筒井 博司²

¹大阪工業大学大学院工学研究科機械工学専攻, ²大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ³大阪工業大学工学部機械工学科

【目的】骨格筋をアクチュエータとしてとらえるならば, 人工的なアクチュエータでは得られないフレキシビリティと高効率なエネルギー変換が可能になる。骨格筋は, 多くの筋細胞が融合した筋線維の束から成り, 大きな収縮力を発揮する。そこで, 筋芽細胞から培養をスタートし, 機械刺激負荷による細胞の配向性について評価した。

【方法】筋芽細胞を包埋したコラーゲンゲルに機械刺激を負荷する装置を作製した。刺激駆動部には圧電バイモルフを使用し, 印加する電圧の波形を制御することで, 任意の刺激を負荷することを可能とした。C2C12細胞を包埋したゲルは全長12mmであり, 増殖培地から分化培地に変えた4日目から7日間, 機械刺激を負荷した。圧電バイモルフの印加電圧波形は, 0.5Hzの台形波を印加し, ゲルに12[mN]の荷重で伸展と弛緩を繰り返す動きを負荷して培養した。装置上でゲル包埋し負荷せずに培養したものをcontrolとした。

【結果】HE染色の結果, 機械刺激を負荷したことにより, 骨格筋細胞が刺激方向に配向した。また, パルス電圧負荷により, 培養筋が収縮弛緩した。一方, controlの方では, 配向は見られなかった。

【結論】機械刺激を与えることは, 骨格筋細胞の配向性を与えることにおいて有効であることが示唆された。(本研究は, 文部科学省学術フロンティア推進事業「培養筋の医工学応用」のプロジェクトの一環として遂行された。)

P-191 細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定

西山 慶子¹, 川北 悠介¹, 林 宏行², 山崎 健一³, 宇戸 禎仁³, 近藤 英雄¹, 橋本 成広³, 藤里 俊哉³

¹大阪工業大学工学部電子情報通工学科, ²大阪工業大学大学院工学研究科電気電子工学専攻, ³大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

【目的】生体筋は, 体内で絶えず電気的刺激を受けていることから, 筋細胞の培養や培養筋の維持には電気的刺激が必要であると考えられる。電気刺激を与えながら細胞を培養する際, 外部から電圧を入力した時の培養液中および培養組織中を流れる電流の大きさ, 波形および方向を明確にしておく必要があると考えられる。本研究では2次元培養を想定し, 電圧を印加したときの培養液中の電位分布を測定した。【方法】実験には60mmコラーゲンコートディッシュを使用した。大きさ4mm×17mmの白金平板を互に向かい合うように培養液中に設置した。培養液にはHEPES, 10%FBSおよび抗生物質を含むDMEMを用いた。先端1μmのガラス管内に白金線を挿入し, KClでガラス管内を浸した電極を測定電極として用いた。白金板を介して培養液中に大きさ10V, パルス幅10 msec, 周波数1 Hzのパルス電圧を印加し, ガラス電極で負極に対する培養液中の電位を測定した。【結果】白金平板電極間においては, 陽極から陰極に進むにつれ, 電位が低下し, その低下傾向は電極からの距離と線形関係であった。また, 電極範囲内においても, 電極中央部と端部では電位の低下傾向に違いが見られた。【結論】2次元培養において, 細胞に電流刺激する場合, 電極の形状が刺激条件に大きく影響することがわかり, 実験では電極中央の細胞の挙動を観る必要があることが示唆された。

P-190 電界に対する培養筋管細胞の異方性

林 宏行¹, 山崎 健一¹, 小林 裕之¹, 宇戸 禎仁², 近藤 英雄¹, 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²大阪工業大学大学院工学研究科電気電子工学専攻

【緒言】我々は小型, 省電力なアクチュエータ作製を目指し, 培養した筋芽細胞から作製した培養筋をアクチュエータとして使用する試みを進めている。培養筋のアクチュエータ化のためには培養筋を構成する筋管細胞の収縮を制御する必要がある。現在, 筋管細胞の収縮を電気パルスで制御する試みが報告されているが, その刺激条件と筋管細胞の収縮との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では培養筋の収縮を制御するため, 電気パルスの刺激の方向性について検討した。【方法】筋芽細胞としてマウス横紋筋由来単化細胞C2C12を使用した。C2C12細胞を筋管細胞へ分化させた後, 培養液にパルス電圧を印加した。筋管細胞の収縮に及ぼす電界方向の影響を調べるため, 筋管細胞の長軸方向と平行 (Parallel) および垂直 (Vertical) に電界を加えた。周波数を1 Hzとして, パルス幅および刺激回路中に流れる電流を変化させ, 筋管細胞が収縮し始めるときの値を調べた。そしてパルス幅と電流の関係から基電流とクロナキシーを求めた。【結果および考察】Parallelのときは, Verticalより基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは, 筋管細胞には電界に対する異方性があり, 筋管細胞と平行方向に電界を生じさせることで, 低いエネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

P-211 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討

近藤 英雄¹, 北 孝之², 寺田 堂彦^{1,3}, 山崎 健一¹,
橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²大阪工業大学工学部電子情報通信工学科, ³ヒューマンサイエンス振興財団

【緒言】我々は電気インピーダンス法を用いて再生組織の成熟度を定量的に評価する試みを行っているが、生体組織の電気インピーダンスにおける基礎的な検討や機序の解明に関する報告例は少ない。そこで、調製が容易である生体高分子ゲルを擬似生体組織とし、電気インピーダンス法の詳細な検討を行うことが機序解明における一助となると考えた。従って本研究は、生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法のより詳細な検討を行うことを目的とした。

【実験方法】生体高分子ゲルとしてゼラチンを使用した。60℃に加熱した生理食塩水にゼラチン粉末を加え、濃度の異なるゼラチン溶液を作製した。完全に溶解したのを確認した後、自作の型に流しこみ4℃で12時間冷却した。ゲル化したのを確認した後、電気インピーダンス測定を行った。得られたデータをPCに保存後、Cole-Cole plotによりデータ解析を行った。また、万能試験機を用いて圧縮試験を行いゲル強度を測定した。

【結果および考察】周波数の変化に伴い生体高分子ゲルの電気インピーダンスは変化し、典型的な円弧の軌跡が得られた。含水率の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた。また、塩濃度の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた。よって、本研究で得られた生体高分子ゲルの電気インピーダンスは、電解質溶液の水分状態に依存することが示された。

Workshop in Warsaw university of technology, April 1,2008

Title :

Research activities of Biofunctional materials group

- **Nanofiber scaffold for early neovascularization**
 - *Nanofiber sponge scaffold
collaborate with Tokyo University
 - *Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers

- **Challenge to develop the reliable artificial corneal stroma**
 - ***Study on PVA based artificial cornea**
Collaborate with Keio University, Tokyo dental university
 - ***Decellularization of cornea using ultra-high hydrostatic pressure treatment for corneal scaffold**
collaborate with Tokyo Medical & Dental University

ワルシャワ工科大学でのワークショップ

演題：高次機能生体材料グループの研究活動

早期血管化のためのナノファイバー足場

*ナノファイバースポンジ（東京大学との共同研究）

*配向したマイクロナノファイバーに対する細胞接着の定量的評価

信頼性の高い人工角膜実質の開発を目指して

*PVAを基材とした人工角膜の研究

*超高静水圧を利用した脱細胞化角膜足場材料

に関して報告した。

Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea

Hisatoshi Kobayashi

*Biomaterials Center, National Institute for Materials Science.
1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, JAPAN
KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp*

In the past 60 years, several groups have attempted to develop reliable artificial cornea, but still not yet developed completely satisfactory level. In general, clinically available synthetic devices do not support an intact epithelium, which poses a risk of microbial infection or protrusion of the prosthesis. Previously we have found that the immobilization of Type I collagen on the poly(vinyl alcohol)(PVA) hydrogel disc was effective in supporting adhesion and growth of the corneal epithelium and stroma cell in vitro. And this was very stable and highly compatible in the corneal stroma. But the durability of the produced corneal epithelium layer on the PVA-disc in vivo has some problem. The epithelium on the PVA hydrogel discs could not produce basement membrane in vivo. We concluded the permeability of nutrition and some biological factors are not achieving the enough level in the shape of hydrogel disc structure. It is thought that stroma of cornea forms a clear frame because fibril of collagen forms standardized cancelli. The ideal structure seems to produce the sufficient permeability as well as the transparency. Currently, we try to make the mimic structure of the natural corneal stroma by utilizing the nanomaterials and nanotechnology(bottom up approach) and decellularization from porcine cornea by using ultra high pressure treatment(top down approach). In this presentation, recent outcomes from both approaches will be presented.

Acknowledgement: (A part of) This work is supported by Research Promotion Bureau, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), and the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Novel Decellularization Technique of the Cornea using Ultra-high Hydrostatic Pressure

Yoshihide Hashimoto^{1,2}, Seiich Funamoto^{1,2}, Syuji Sasaki³, Manabu Mochizuki³, Tsuyoshi Kimura^{1,2},
Toshiya Fujisato⁴, Hisatoshi Kobayashi^{1,2}, Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Biomaterials Center, National Institute for Material Science, Tsukuba, Japan

³Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan

⁴Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction

Corneal transplantation is an established transplant surgery to reverse blindness due to corneal injuries and diseases, such as corneal dystrophy, bullous keratopathy and corneal scarring. The success rate is high compared to other forms of tissue transplantation, but many complications, such as infection, immune rejection and graft failure, still occur. Also, an absolute shortage of donor corneas has been a major problem in many countries. To overcome these problems, artificial corneas have been studied as alternatives [1]. Various biocompatible polymer materials have been investigated, some of which were recently approved by the FDA and clinical test data is accumulating. However, it has often been reported that such implants fail to significantly connect to corneal tissue and the recipient corneal cells do not expand on or in these materials, resulting in the extrusion of them through melting around the prosthetic rim [2].

We investigated the possibility of decellularized cornea as a novel artificial bio-cornea, which the cells and antigens are removed to diminish the host immune reaction but the biological structure is remained. In this study, we prepared some acellular cornea using ultra-high hydrostatic pressure (UHP) method, and then carried out the preliminary animal study of the decellularized cornea.

Materials and methods

Tissues.

Corneas were dissected out of oculars of freshly killed mature pigs and washed in phosphate-buffer saline (PBS) containing antibiotics and 3.5 % w/v dextran.

Decellularization of corneas by UHP method.

The corneas were pressurized at 10,000 atm at 10 °C for 10 min using a high-pressure machine (Kobe Steel Ltd.), washed by continuous shaking in an EGM-2 medium containing DNase I, antibiotics and 3.5 % w/v dextran at 37°C for 72hours, and then subjected to histological study (H-E staining).

Biochemistry.

Decellularized corneas were analyzed quantitatively by biochemical assays for residual DNA and GAG.

Characterization of decellularized cornea.

Decellularized corneas were investigated characteristics such as the transmittance, swelling ratio, strength.

Preliminary animal implantation study.

To examine the biocompatibility of decellularized cornea, they were implanted in rabbit corneal stroma. The animals were sacrificed at 8 weeks after implantation.

Results and Discussion

By H-E staining, the complete removal of epithelial and stromal cells was confirmed in all of the pressurized corneas. The super-structure of collagen fibrils were relatively maintained after the UHP decellularization. Also, when the decellularized porcine cornea was implanted in a rabbit cornea, vascularization and inflammatory reaction were not observed, suggesting the decellularized cornea obtained through the UHP method could be useful as a corneal scaffold for tissue regeneration. From these result, it suggested that this method could be used as one of decellularization method of the other tissues or organs.

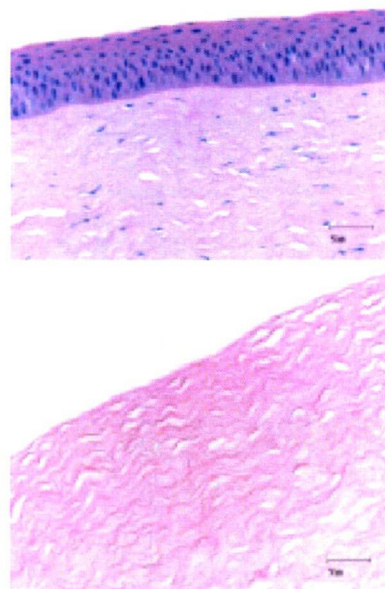


Figure. 1 H-E staining of native and decellularized cornea by UHP treatment.

Conclusion

We have successfully developed a corneal decellularization method that uses UHP technology. The superstructure of the acellular cornea was relatively preserved. This decellularization method appears to be a promising contribution with regard to corneal replacement and tissue engineering of the cornea.

References

1. Chirila TV et al. *Jpn J Ophthalmol*, 49, S1, 2005.
2. Xie RZ et al. *Bioscience Reports*; 21, 513, 2001.
3. Scott JE and Bosworth TR. *J Biochem.*, 270, 491, 1990.

Ultra-structure analysis of decellularization of cornea using ultra-high hydrostatical pressurization treatment

Shinya Hattori,¹ Tsuyoshi Kimura,² Chiaki Yoshikawa,¹ Seiichi Funamoto,² Yoshihide Hashimoto,² Shunji Sasaki,³ Manabu Mochizuki,³ Kwangwoo Nam,² Toshiya Fujisato,^{4,5} Soichiro Kitamura,⁴ Akio Kishida,¹ Takako Honda,¹ Hisatoshi Kobayashi^{1,2*}

¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba 305-0044, Japan

²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo medical and Dental University, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-0062, Japan

³Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo, Tokyo 113-8510, Japan

⁴National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁵Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Asahi, Osaka 535-8585, Japan

e-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

Introduction

In order to recover from corneal blindness, corneal transplant surgery is needed. But, tissue transplantation has many problems, such as infection and immune rejection. Moreover, donor shortage of corneas has been a major problem in many countries. So, artificial corneas were studied by various approaches. Synthetic biocompatible polymers, such as polymethyl methacrylate, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), and poly(vinyl alcohol) were tested for artificial cornea. Unfortunately, implanted materials were finally excreted. Some reports suggest that corneal tissue was regenerated through a combination of cornea cells and collagen scaffold [1]. But reported collagen scaffold has low mechanical strength, so not adequate for clinical applications. Acellular cornea scaffold seems to natural cornea same structure without host cells and antigen molecules. Therefore, acellular cornea scaffold was expected to infiltrate the donor cells into the scaffold and regenerate the tissues. Generally decellularization were undergone using detergents, such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS) [2] and sodium deoxycholate. However, detergent decellularization need wash out process because of its cytotoxicologies and washing process may be denatured biological properties. Therefore, we made acellular cornea scaffold using ultra-high pressure (UHP) method without detergents [3]. Our objective of this study is to investigate the ultrastructural difference of acellular corneas between UHP method and detergents methods

Materials and Methods

Cornea preparation: Entire porcine corneas were explanted from the oculars and washed with phosphate-buffer saline (PBS) containing penicillin (100 units/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml). The corneas were then stored in PBS containing antibiotics and dextran (3.5% w/v) at 4°C until the experiments.

Decellularization of corneas by the chemical method:

1% w/v solutions of Triton X-100 and of SDS were prepared. The cornea was immersed in one of these at 37°C for 24 hours, washed with PBS containing penicillin (100 units/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) for 24 hours. **Decellularization of corneas by the**

pressurization method: The corneas were pressurized at 4,000 or 10,000 atm at 10 or 30°C for 10 min using a high-pressure machine (Kobe Steel Ltd.), washed by continuous shaking in an EGM-2 medium containing DNase I (0.2 mg/ml), antibiotics and 3.5 % w/v dextran at 37°C under 5% CO₂, 95% air for 72 hours.

Ultrastructure of decellularized corneas: After decellularization, each cornea was fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide. After fixation, tissues were embedded with epoxy resin. 80nm thickness sections were obtained. Cutting sections were observed using transmission electron microscopy (LEO922, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, England).

Results and Discussion

Ultrastructural properties of decellularized corneas made by UHP method were resembled with natural cornea (Fig.1). Collagen bundles were observed by TEM picture. In addition, there were no host cells in the UHP decellularized cornea. On the other hand, microstructural properties of detergents decellularized corneas were far from natural cornea (Fig.1). No collagen bundles were in it. The results indicated that UHP decellularized cornea might be had a potential ability for the scaffold to regenerate cornea tissue. More detail informations are now collecting.

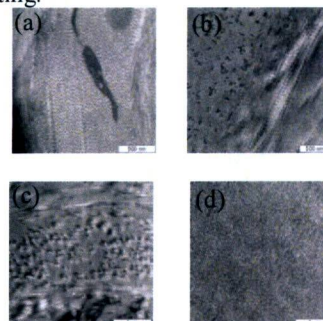


Figure.1 TEM photographs of intact and decellularized cornea. 10000 atm UHP corneas have collagen bundles: (a) intact cornea, (b) at 10000 atm for 10 min. (c) at 10000 atm for 30 min. (d) SDS detergents

Acknowledgements:

This work is supported by Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) Japan and Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Japan.

References:

1. Orwin EJ, Hubel A, Tissue Engineering: 6: 307-319, 2000
2. Grauss RW, Hazekamp MG, Vliet S, Gittenberger AC, DeRuiter MC, J Thorac Cardiovasc Surg: 10: 1346-1358, 2004
3. Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kimura S, Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. : p.83-94, 2005

Preparation and Characterization of Collagen Gel Designed for Tissue Membrane

Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction: The construction of an extracellular matrix (ECM) using collagen has been performed by many researchers worldwide. Ever since Weinberg and Bell succeeded in preparing a blood vessel using collagen [1], diverse approaches using collagen gel to prepare an ECM had been executed. To use a collagen gel as a biomaterial, prevention of thrombus formation, and reinforcement of physical and biological properties is required. In this study, a novel cross-linking technique using ethanol/water co-solvent with *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) is introduced. 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer, a well-known material for its blood compatibility [2], was immobilized on the collagen gel to develop a mechanically reinforced and biocompatible collagen hybrid gel [3]. With the EDC/NHS cross-linked collagen gel and the polymer-collagen hybrid gel, the physical and biological property was characterized so as to apply the collagen gel as a new type of tissue membrane.

Materials and Methods: Collagen film was fabricated ($l=0.018\text{mm}$) and was cross-linked with EDC and NHS in ethanol/water co-solvent series (0%→100%) for 24 hrs at 4°C to prepare an intrahelically cross-linked collagen gel (EN gel). Poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) was cross-linked with collagen film using EDC and NHS in ethanol/water co-solvent series (0%→100%) ethanol:water=3:7 for 24 hours at 4°C to make a MPC-immobilized collagen gel (MiC gel) [4]. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning electron microscope (SEM) was used to characterize the surface of the hybrid gel. Swelling ratio, free amine group analysis, and mechanical test was used to characterize the cross-linking efficiency. Biological behavior was observed using cell adhesion test *in vitro* and tissue compatibility *in vivo*. Collagen gel that is intrahelically cross-linked with EDC and NHS (EN gel), and that is inter-microfibrillar cross-linked with glutaraldehyde (G-gel) was prepared by conventional method [5] to compare the physical and biological property of the collagen gel.

Results and discussion: In ethanol/water co-solvent, the

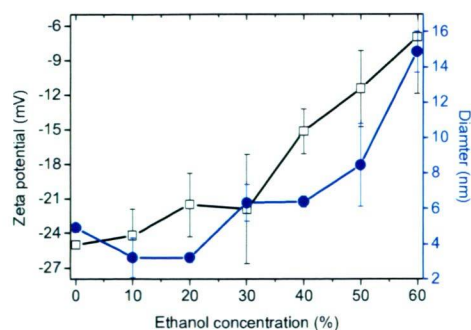


Figure 1. The zeta potential and the diameter change of the PMA according to the ethanol concentration.

triple helix of the collagen did not denature. We found out that the triple helix, indicating that the collagen gel would retain its original property after the cross-linking. ON the other hand, the polymer changed according to the ethanol concentration. The electronegativity of the polymer would shift toward neutral state as the ethanol concentration increases. This is because the carboxylate anions would turn into carboxyl group, which is neutral. It is known that the ethanol would prevent the hydrolysis of EDC, but since the reactivity of the EDC is higher with carboxylate anion, it is very important to obtain the balance between the hydrolysis of EDC and the protonation of carboxylate anions.

Comparing the reacted amine group contents between EN gel and MiC gel, the cross-linking rate was slightly higher for EN gel. The highest cross-linking rate was shown when ethanol 30% co-solvent was used for EN gel and MiC gel. The strain-stress curve result showed that the viscoelastic behavior, or J-curve, appeared for the physically stabilized gel (Uc gel) and the EN gel, while the MiC gel showed brittle plastic behavior. This implies that the polymer-microfibril cross-linking is not a surface immobilization. The highest reacted amine group was recorded for G-gel. This is because the inter-microfibrillar cross-link could be achieved.

We chose EN gel and MiC gel which was prepared in ethanol 30% co-solvent to observe the biological property of the collagen gels. The adhesion of the cell had decreased by the polymer cross-linking. Simple intrahelical cross-linking can also provide the decrease in the cell adhesion, but it did not suppress the proliferation of the cell. In the case of MiC gel, both cell adhesion and proliferation was suppressed. *In vivo* test, the chronic inflammatory reaction and capsulation for Uc gel and glutaraldehyde cross-linked collagen gel had occurred, but no significant inflammatory reaction for EN gel and MiC gel. In the short term and the long term, the capsule layer around EN gel and MiC gel shows the formation of the fibroblast and new collagen fibrils. This implies that the gel possesses inert property against the living tissue, prohibiting acute and chronic inflammatory reaction.

Conclusions: The high rate of MPC polymer was cross-linked with collagen microfibrils to make a collagen/polymer hybrid gel. It was stable in the harsh environment. The mechanical strength increased by the cross-linked network. Possession of MPC polymer on the surface suppressed the adhesion of the cell *in vitro* and inflammatory reaction *in vivo*. Using this technique, it is possible to prepare a tissue membrane which is stable and anti-inflammatory.

References: [1] Weinberg CB and Bell A. Science, 231, 397, 1986. [2] Ishihara K. Sci Technol Adv Mater, 1, 131, 2000. [3] Nam K et al. Biomaterials, 27, 1, 2007. [4] Nam K et al. 36th Iyokobunshi Symposium, 79, 2007. [5] Olde Damink LHH et al. Biomaterials, 17, 765, 1996.

Preparation of Decellularized Bone using Ultra-High Hydrostatic Pressure for Scaffold of Tissue Regeneration

Seiichi Funamoto¹, Yoshihide Hashimoto¹, Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Toshiya Fujisato², Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the development of scaffolds, which provide the physical support for adhesion and expansion of cells that can regenerate the lost of diseased tissue. Recently, several scaffolds consisting of synthetic materials have been mainly studied [1-5]. However, it is difficult to actualize the same shape and structure as the biological tissue. As another approach for preparing resemble natural scaffold, there are decellularized tissues in which the cells and antigen molecules are removed to reduce the host immune response. The dcellularized tissue should be considered to have the same structure and composition as the natural tissue and the regeneration within the scaffold is expected to be modulated by newly cells. In the present study, we have demonstrated the preparation of decellularized bone using UHP technology[6] for tissue engineered bone.

Material and Method

The porcine costa was cut cylindrically ($\Phi 6 \times 5$ mm). The femur was shaped cubically ($4 \times 4 \times 4$ mm). They were washed in PBS containing 5% (v/v) penicillin/streptomycin. They were transferred to sterile plastic package filled with PBS and then pressed hydrostatically at 10,000 atm, and 25 °C for 10 min using high pressure machine (Kobe steel Co. Ltd., Kobe, Japan) to disrupt the cells in them. The decellularization and alternation of micro-structure in bone during UHP processing were investigated by histological study and SEM observation. The adhesion and expansion of cells reseeded on the acellularized bone culture was examined in vitro. Also, the biocompatibility test of the dcellularized bone was carried out in vivo.

Result and discussion

The HE staining of dcellularized costa and femur prepared by UHP treatment showed cell free completely. Rat mesenchymal stem cells were reseeded on the decellularized bone in vitro. After cultivation for 3 days, SEM observation revealed that the reseeded cells were adhered on the surface of the decellularized bone in the outside and the inside of bone. In order to examine the biocompatibility of them, the dcellularized bone was implanted in rats. The animals were sacrificed at 6 months after implantation. Isolated tissue was examined by histological staining. Red blood cell and collagen fibers were observed in implanted bone tissue. But inflammatory cells were not observed in implanted bone tissue.

This study described the successful decellularization of bone using ultra high pressure technology. HE staining and SEM observation confirmed the complete removal of cells in bone treated by UHP processing. The significant adhesion and expansion of cells reseeded on the acellular

bone was also confirmed without the cytotoxicity. It is expected to utilize the decellularized bone as culture matrices because the detergents, which are generally cytotoxic remaining in tissue scaffold, were not used at all in this procedure. The inhibition of immune reaction was exhibited for the decellularized bone by UHP treatment.

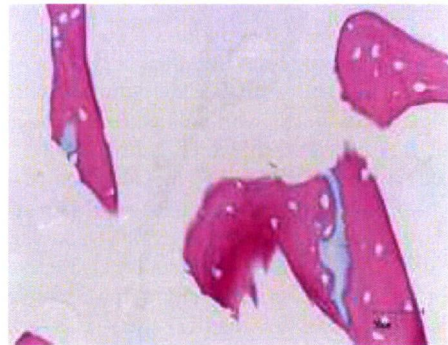
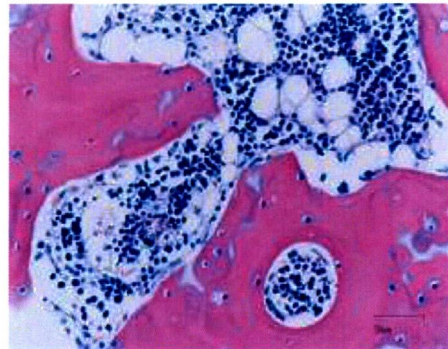


Figure 1. HE stainings of native and decellularized costa bone and bone marrow by UHP treatment

Conclusion

We have successfully developed a bone decellularization method that uses UHP technology. Histological observation confirmed the complete removal of cells in bone treated by UHP processing. Also Red blood cell and collagen fibers were observed in implanted bone tissue. But inflammatory cells were not observed in implanted bone tissue. These results suggest the utility of dcellularized bone for tissue regeneration

Reference

1. Middleton, JC. et al. *Biomaterials*, **21**, 2335–2346, 2000.
2. Ameer, GA. et al. *J Orthop. Res.*, **20**, 16-19, 2002.
3. Ji, Y. et al. *Biomaterials*, **27**, 3782-3792, 2006.
4. Lee, SJ. et al. *Biomaterials*, **27**, 3466-3472, 2006.
5. Chen, G. et al. *Macromolecular Bioscience*, **2**, 67-77, 2002.
6. Fujisato, T. et al. *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*, Springer, pp83-94, 2005

Controlling Cross-linking Rate of Decellularized Blood Vessel using Collagen Coupling Reaction Technique

Kwangwoo Nam¹, Ayako Murakoshi¹, Tsuyoshi Kimura¹, and Toshiya Fujisato², and Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction: Constructing an engineered tissue for cell culture has been a major interest in bioscaffold field. Bioscaffold shows toxicity, and shrinkage when culturing the cell, and it is mechanically weak. Furthermore, calcification is also reported [1]. Recently, we found out that the cross-linking of collagen microfibrils using *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) coupling reaction technique may alter the physical and biological property [2]. The cross-linking is significant when ethanol/water co-solvent is used as a coupling reaction solvent instead of aqueous solution. In this study, we report on physical and biological affect of cross-linking of decellularized tissue, which was obtained from ultra high pressure method, to prepare a bioscaffold [3]. Furthermore, we cross-linked an anticoagulant polymer [2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer], which is known for its good hemocompatibility [4] with the decellularized tissue, to obtain a polymer-cross-linked bioscaffold.

Methods: Decellularized blood vessel tissue was obtained by ultra high-pressure method [3]. EDC and NHS were added into the ethanol/water co-solvent (ethanol concentration 10, 30, 50%, and 70%) with the decellularized tissue. Then the cross-linking was continued for 24 hours at 4°C. The cross-linked tissue was cleansed for 24 hours in water and ethanol, respectively to obtain a cross-linked bioscaffold (E-scaf). The amount of cross-linked portion of each tissue was estimated by measuring the reacted amount of amine group and the carboxyl groups.

The decellularized tissue was cross-linked with MPC polymer [poly(MPC-co-methacrylic acid), PMA] at the ethanol 30% aqueous solution. MPC was pre-activated with EDC in 30% of ethanol aqueous solution and was cross-linked with decellularized tissue to obtain a polymer-cross-linked bioscaffold (P-scaf). With these bioscaffold, we investigated the structure and cross-linking structure of the bioscaffold. Furthermore, physical property and biological property of the bioscaffolds were characterized.

Results/Discussion: The cross-linking of the decellularized tissue showed that there is mild increase in the cross-linking rate when ethanol concentration increases. For the E-scaf, the highest cross-linking rate was shown when the ethanol concentration was 30%. The further increase in the ethanol concentration ($\geq 40\%$) showed gradual decrease in the cross-linking rate. This is because the carboxyl group of aspartic and glutamic acid residues is less reactive in high ethanol concentration. After cross-linking, there still remains high amount of unreacted amine groups and carboxyl groups in the tissue. The further increases in the amide bond can be achieved when the tissue is re-cross-linked with EDC and NHS [2]. The mechanical strength showed that high or low cross-linking rate does not alter tissue's viscoelasticity

significantly. However, when the blood vessel tissue is pulled longitudinally, the elongational modulus increased approximately 1.5~2 times of that of original blood vessel tissue. For P-scaf, it showed that the amine groups that took part in the cross-linking procedure was lower than that of E-scaf. However, its mechanical strength was increased, reaching 3.5 times higher elongational modulus compared to that of original tissue. This indicates that the network between the collagen and the polymer is very strong, but does not plasticize the tissue.

The cross-linking prohibited the tissue from shrinking in high temperature. When the tissue was inserted into the oven (80°C), the sudden shrinkage breaks out. In the case of E-scaf and P-scaf, no shrinkage had occurred. Morphology of the tissue observed with SEM showed that after cross-linking, the pores of the tissue are becoming smaller and forms much ordered layered-structure.

The strong network prohibits the degradability caused by the collagenase. The strong network is protecting the bioscaffold from degradation. After 2 weeks in the collagenase aqueous solutions, original tissue lost its original shape, while E-scaf and P-scaf maintained its shape.

We evaluated the toxicity of the tissue before and after cross-linking. It showed that the cross-linking of tissue does not induce any toxicity. This was same for the one that was cross-linked with PMA. The existence of methacrylic acid moiety was thought to cause toxicity, but it did not. This implies that it is safe to use the tissue that is cross-linked with PMA.

The tissue was inserted into the rate subcutaneously and was collected after 2 and 8 weeks. The decellularized tissue was highly calcified, but the calcification was reduced for E-scaf. The P-scaf showed the lowest calcification, and the calcified location was located deep inside the tissue. This indicates that the polymer cross-linking had occurred not with only collagen, but also elastin, and the elastin is not damaged using the cross-linking process. Furthermore, there was almost no inflammatory reaction after implantation, indicating that the both E-scaf and P-scaf was compatible with the living tissue.

Conclusions: By controlling the cross-linking rate, we could obtain a bioscaffold that has stronger mechanical strength with safe biological property. Although some calcification was observed, it was very mimic, indicating that this bioscaffold is compatible with the living tissue.

References:

- [1] Wissink MJB et al. *Biomaterials* 22, 151, 2001.
- [2] Nam K et al. *Macromol. Biosci.* Accepted.
- [3] Fujisato T. et al. *Cardiovascular Regeneration therapies using tissue Engineering approaches.* Berlin, Springer, 2005.
- [4] Ishihara K. *Sci Technol Adv Mater*, 1, 131, 2000.

Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue using Ultra High Pressurization

Ayako Murakoshi¹, Seiichi Funamoto¹, Toshiya Fujisato², Takeshi Nakatani³, Souichiro Kitamura³, Tsuyoshi Kimura¹
Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

³National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Introduction: The decellularized tissues have been researched for utilization as a regenerative bio-scaffold. Generally, decellularization was executed by chemical and biological processes using detergents and enzymes. However, problems, such as ECM denaturation and the cell cytotoxicity caused by the residual reagents, have been reported. We have been developing a novel physical decellularization method using ultra high pressure (UHP) technology. This technique involves the hydrostatic ultra high pressurization, which disrupts the cells inside and outside of the tissue. The cell debris can be eliminated by the simple washing process, producing a clean decellularized tissue. We already reported the excellent recellularization of the decellularized valve after the allotransplantation. [1]

In this study, we investigated the affect of the UHP method to the conformation, and the structure of the collagen, and the mechanical property of the decellularized vessel.

Materials and Methods: At first, we examined the UHP treatment protocols among the selected candidates (the starting temperature; 5, 10, 15, 20, 25, 30 °C, and the pressurizing rate; 666, 1000, 2000, 5000 MPa/min.). We ascertained the temperature change during the treatments and the freezing points at each pressure so as to optimize the UHP protocol. Secondly, we compared our the UHP method with other researchers' methods [2]-[4] about the efficacy of decellularization and the influence on the biological tissues. The treated tissue sections were assessed following hematoxylin and eosin staining and TEM microscopy. The residual DNA was quantified within the tissues. The mechanical properties of the treated tissues were measured about the ultimate tensile strength, the failure strain, the elastic modulus of elastin, and the elastic modulus of collagen. Thirdly, the influence of temperature on ECM was investigated by the circular dichroism spectrum of collagens which were treated by the UHP method, and the incubations at the several temperature (5, 30, 37, 50 °C)

Results/Discussion: We evaluated the UHP method (the starting temperature; 30 °C, the pressurizing rate; 666 MPa/min.) as the optimized method for processing decellularized tissues. Hematoxylin and eosin staining of the UHP treated tissue sections demonstrated that no cell fragments were remained within the tissue. DNA assay test demonstrated that the UHP method could eliminate the residual DNA within the treated tissues under the detection limit. The elastic modulus of elastin was decreased, but other properties were well maintained. The CD spectrum of collagen treated by UHP was almost consistent with the spectrum of non-treated collagen.

We previously reported that the UHP method could certainly decellularized all of the cells and residual DNA from the arterial tissues. In this study, the

optimization of UHP treatment could well soften the influence on the biological and biochemical properties of biological tissues by the temperature. Before optimization, the spaces between collagen fibrils in the center of tissues opened more significantly. The bundles and the triple-helical structure of collagen were often broken. After optimization, the influence was softened and the structure of collagen fibrils was well maintained. The triple-helical structure of collagen was also well sustained. The optimized UHP method also improved to keep the mechanical properties. The elastic modulus of elastin was a little weakened, but it is enough appropriate for the cardiovascular alternative.

Conclusion: This study has successfully developed the porcine arterial scaffold not to influence any biological property, which is decellularized using UHP. We showed that the optimized UHP method was able to not only decellularized completely from the elastic tissues such as aorta, but also maintain the structure and biological property of tissues. Future work will apply the assessment for recellularization on the UHP treated scaffold.

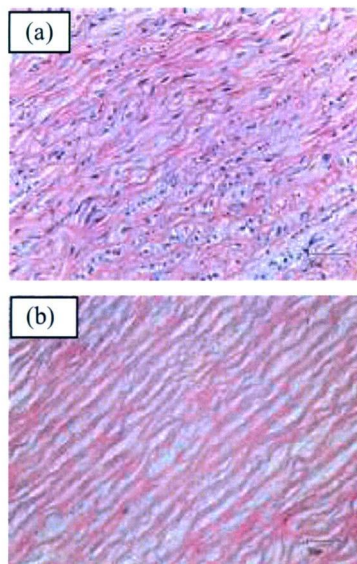


Fig. Hematoxylin and eosin staining paraffin-embedded sections of arterial scaffolds. (a)non-treated (b)optimized UHP treated.

References:

- [1] Fujisato T. *et al. Cardiovascular Regeneration Therapies using Tissue Engineering approaches*. Berlin, Springer, 2005.
- [2] Bader A. *et al. European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **14**, 279–284, 1998.
- [3] Grauss R.W. *et al. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **126**, 2003-2010, 2003.
- [4] Korrosis S. A. *et al. The Journal of Heart Valve Disease* **14**, 408-422, 2005.

Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma

Hisatoshi Kobayashi,^{1,2} Takako Honda¹, Chiaki Yoshikawa¹, Shinya Hattori¹

¹ Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1, Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan

² Institute of biomaterials and bioengineering, Tokyo medical & Dental University, 2-3-10, Kanda-Surugadai, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-0062, Japan

E-mail: kobayashi.hisatoshi@nims.go.jp

Introduction

In the past 60 years, several groups have attempted to develop reliable artificial cornea, but still not yet developed completely satisfactory level. In general, clinically available synthetic devices do not support an intact epithelium, which poses a risk of microbial infection or protrusion of the prosthesis. Previously we have found that the immobilization of Type I collagen on the poly(vinyl alcohol)(PVA) hydrogel disc was effective in supporting adhesion and growth of the corneal epithelium and stroma cell in vitro. And this was very stable and highly compatible in the corneal stroma. But the durability of the produced corneal epithelium layer on the PVA-disc in vivo has some problem [1-2]. The epithelium on the PVA hydrogel discs could not produce basement membrane in vivo. We concluded the permeability of nutrition and some biological factors are not achieving the enough level in the shape of hydrogel disc structure. It is thought that stroma of cornea forms a clear frame because fibril of collagen forms standardized cancelli. The ideal structure seems to produce the sufficient permeability as well as the transparency. Currently, we try to make the mimic structure of the natural corneal stroma by utilizing the nanomaterials and nanotechnology. In this paper, we prepared the one direction oriented PVA nanofibers by using the electro spinning method and modified the surface to give an surface affinity towards corneal stroma cells and checked the cell-nanofiber interactions.

Materials and Methods

PVA powder (Mw. 77,000, 99.9% saponification, purchased from Wako Pure Chemical Industries, LTD) was dissolved in water. **Electrospinning:**

Electrospinning are performed based on previous reported condition by LL.Wu et al [3] with some modification. Applied potential is 25kV, the PVA solution was adjusted at 5wt % and its flow rate was controlled at 10mL/hour by syringe pump (Model '11' Plus, Harvard apparatus Inc. Massachusetts U.S.). The distance between nozzle and collector was 25cm. Aligned PVA nanofibers were produced between the specially prepared two-separated collectors. This material is dried overnight in a vacuum at room temperature. After drying, materials were used for further experiments. **Surface modification:** the PVA nanofibers were used to the modification reaction. Isocyanate groups were first introduced onto the surface by the reaction between the surface OH groups of the PVA and the isocyanate group of hexamethylene diisocyanate(HMDI). 10wt% HMDI/toluene with 0.07vol% di-n-butyl-tin dilaurate was prepared under the nitrogen purged condition and the prepared substrates were added in the solution and gently stirred for 40 minutes at room temperature.

After the reaction, the activated PVA was rinsed with

acetone to remove the residual HMDI. All the process was done under the nitrogen gas blow condition. The surface activated PVA immersed in the type I collagen solution (0.5mg/ml) to immobilize the collagen on the surface of the PVA. **Scanning electron microscopy:** Scanning electron micrographs were obtained with scanning electron microscopy (JSM-5600LV, JEOL, Tokyo Japan). **Cell culture:** To evaluate the nanofibers-cells interaction and the cell behavior, primary rabbit corneal stroma cells was used. Cells are seeded to materials at a density of 4.77×10^4 cells/cm² (SEM observations). To prepare the samples, cells are fixed by 4% glutaraldehyde solution and lyophilization with *t*-butanol. Cell morphology and nanofibers alignment were evaluated microscopically.

Results and Discussion

Average diameter of the PVA fiber is about 700nm at dry condition and about 1000nm at wet condition. The property was kept after the collagen modification process. The collagen immobilized PVA nanofibers can support primary rabbit corneal stroma cells adhesion. The PVA nanofibers we prepared have enough tenacity to support corneal stroma cells, and the cells aligned to the same direction of the nanofibers substrate as shown in Fig.1. The aligned cells were also proliferated well on the surface of nanofibers keeping the cell alignment. In this stage, we were able to control the stroma cell alignment, but still not confirmed the collagen synthesis of the aligned cells. In the future study, long term cell culture will be performed in the medium containing 5% ascorbic acid to enhance the collagen synthesis of the stroma cells and check the produced collagen alignment.

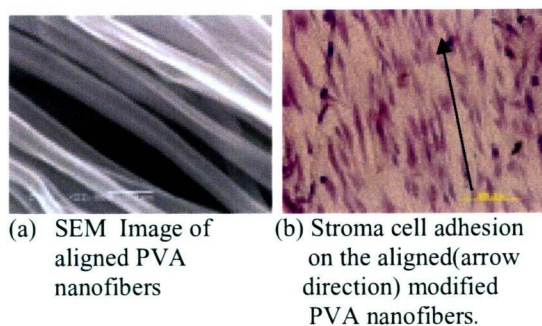


Fig.1 SEM and Light microscopic observation of (a) the Aligned modified PVA nanofibers and (b) corneal stroma cell adhesion; 2days after seeding on the nanofibers.

References:

1. Miyashita H, Shimmura H, Kobayashi H, et al., J Biomed Mater Res B: 76B: 56-63, 2006
2. Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H. et al, J Biomed Mater Res B: 81B: 201-206, 2007
3. Wu LL, Yuan XY, Sheng J, J. MEMBRANE SCIENCE: 250: 167-173, 2005

14) 組織膜を目指したコラーゲンゲルの作製と生物学的特性検討 III

(東京医歯大生材研, JST-CREST) ○南 広祐、木村 剛、岸田 晶夫

E-mail: bloodnam.fm@tmd.ac.jp

TEL: 03-5280-8029 FAX: 03-5280-8029

【緒論】 従来より、コラーゲンを生体組織膜として利用するため、コラーゲンの架橋およびポリマー修飾による物性および生物学的特性の改善に関する研究が多く行われている。本研究グループでは 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) と *N*-hydroxysuccinimide (NHS) を用いて優秀な血液適合性を示す 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC) ポリマーをコラーゲンゲルに架橋したリン脂質ポリマー/コラーゲンハイブリッドゲルを作製した。しかしながら、EDC/NHS 架橋およびポリマー修飾は水溶液中で修飾させるため、EDC が加水分解され、低架橋率となる問題がある。¹⁾

前回、エタノール濃度変化による EDC/NHS 架橋効果に関して発表した。コラーゲンはエタノール 30%水溶液条件で最適なトリプルヘリックス内部架橋条件を述べた。²⁾ これは、MPC ポリマー/コラーゲン間架橋条件でも同じ挙動を示すことから、EDC/NHS を架橋剤として使用してコラーゲンゲルを作製するときは、カルボキシル基の陰イオンと EDC の加水分解のバランスがもっとも重要であることを見出した。³⁾ 本研究では、最大の架橋効率を示したエタノール 30%水溶液で架橋したコラーゲンゲルの機械的な物性と生物学的特性について報告する。

【実験】 コラーゲン 2wt%水溶液からコラーゲンフィルムを調製した。コラーゲンフィルムを EDC と NHS を含有するエタノール 30%水溶液中に浸漬し、24 時間架橋させ、コラーゲンゲルを得た (EN ゲル)¹⁾。MPC ポリマーをコラーゲンゲルと修飾させるため、カルボキシル基を有する poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) をエタノール 30%水溶液中で EDC と NHS と反応させ PMA のカルボキシル基を活性化させた。その後、コラーゲンゲルを加え 4°C で 24 時間反応させ MPC と架橋されたコラーゲンゲル (MPC-immobilized Collagen gel: MiC ゲル) を得た。さらに PMA の固定化過程を再度行い MPC の含有率の高いリン脂質/コラーゲンハイブリッドゲル (MPC-doubled Collagen gel: MdC ゲル) を作製した。また、架橋剤による影響を調べるため、グルタルアルデヒドを用いてコラーゲンゲル架橋を行い G-ゲルを得た。架橋されていないコラーゲンゲル (Uc-ゲル)、EN ゲル、MiC ゲル、MdC ゲル、G-ゲルの化学的特性と力学物性と表面分析等により検討し、トリプルヘリックス内、トリプルヘリックス間架橋、そして PMA との架橋によるコラーゲンゲルの特性を評価した。さらに、細胞接着実験と動物移植実験によりコラーゲンゲルの生物学特性を検討した。

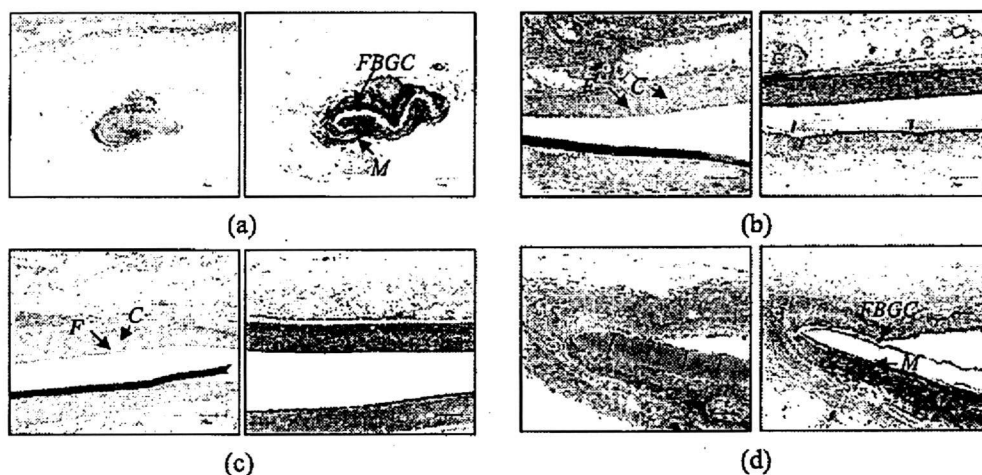
【結果と考察】 各コラーゲンゲルの自由アミン基を測定し、架橋率を計算した。その結果、EN ゲルの場合約 50%、MiC ゲルは約 60%、そして MdC ゲルは約 70%の架橋効率を示した。PMA を再架橋することにより、もっとも高い架橋率が得られることを確認した。また、3 度目の PMA 架橋は効果がなかったことから、PMA とコラーゲン間の最大架橋率は 70%であると考えられる。

コラーゲンゲルの生体分解性についてコラゲナーゼを用いて調べた。その結果、化学的架橋による安定性が確認された。Uc-ゲルは 24 時間以内に完全分解したものの、化学的に架橋されたコラーゲンゲルは遅い分解性を示した。特に、MiC ゲルと MdC ゲルの場合、コラゲナーゼ溶液中で 7 日間反応させても分解しなかった。これは、分子間架橋がコラゲナーゼによるトリプルヘリックス切断を防ぐ効果によるものであり、切断されたトリプルヘリックスがあっても、分子間架橋およびトリプルヘリックス間架橋によりコラーゲン構造は守られると言える。

Uc-ゲル、トリプルヘリックス内部架橋 (EN ゲル)、トリプルヘリックス間架橋 (G-ゲル) による機械的物性の変化を調べた結果、Uc-ゲルが最低物性を有することを確認した。化学的架橋の場合、線形粘弾性挙動を示した。これは、トリプルヘリックスの架橋による効果であると考えられる。また、G-ゲルと EN ゲルの機械的な物性を比べた結果、トリプルヘリックス間架橋がトリプルヘリックス内

部架橋より強いことが分かった。MiC ゲルと MdC ゲルの場合、人工ポリマーとの同様、線形粘弾性挙動を示したうえ、他のゲルより機械的物性が増加したことが明らかとなった。MiC ゲルと MdC ゲルの機械的な物性はほぼ同じであった。

表面での PMA の濃度の増加によりタンパク質の吸着と接着細胞数が減少した。これは、表面での MPC がタンパク質の吸着と細胞の接着を抑制したからである。MiC と MdC ゲルの表面に接着した細胞の形態は全部球形であった。これは PMA 表面と細胞間相互作用が弱いことを示しており、MPCポリマーの細胞接着抑制特性に起因するからである。⁴⁾ 動物移植実験結果、移植 2 週間後では、Uc-ゲルと G-ゲルの周辺組織には炎症反応によるマクロファージと異物巨細胞の生成が認められた。一方、ENゲル、MiC ゲル、MdC ゲルの周辺には炎症反応が見られず、繊維細胞と新たなコラーゲン組織の生成が確認された。これは、生体が異物としてこのゲルの認識していないことを示しており、また、これらのゲルとの組織間相互作用が存在するので、細胞の非接着による死滅がなかったからであると考えられる。移植 8 週間後では、架橋されたコラーゲンゲルはほぼ分解せずに、体中で膜として残っていた(Figure 1)。この時、MiC ゲルと MdC ゲルの周辺のコラーゲン組織は 2 週間後と比べもっと厚くなっており、Ucゲルと G-ゲルの場合炎症反応が続いていることが分かった。



F: fibroblast, C: new collagen layer, FBGC: foreign body giant cell, M: macrophage

Figure 1. H-E and RM-4 stained collagen gels after 8 weeks of subcutaneous implantation in rats. (a) Uc-gel, (b) EN gel, (c) MiC gel, and (d) G-gel. The images on the right side are H-E stained gels and those on the left side are RM-4 stained gels.

【結論】 コラーゲンゲルは化学的架橋により安定性が増加し、コラーゲナーゼによる生体分解性が低下した。また、コラーゲン架橋法による機械的な物性の変化を確認した。コラーゲン架橋はタンパク質吸着性と細胞接着性に影響を与えると思われる。PMA との架橋は、ゲルの機械的な物性を大幅に増加されるとともに、細胞との弱い相互作用が起し、細胞の増殖を防ぐ効果を誘発する。生体内に移植した場合、マクロファージ生成などの炎症反応が抑制され、早く治癒段階に入ることを発見した。

【謝辞】 本研究の一部は、この研究は独立行政法人科学技術振興機構、CREST(71082665)の補助を受けて行われた。

【参考文献】 1) K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, *Biomaterials*, 2007, 28, 3153-3162. 2) K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, 第36回医用高分子シンポジウム, 2007, 36, 79-80. 3) K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, *Macromol. Biosci.*, 2008, 8, 32-36. 4) J. Watanabe and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 1797-1802.

(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所) ○船本 誠一

[橋本 良秀・東京医科歯科大学、佐々木 秀次・東京医科歯科大学眼科、
 本田貴子・物質材料研究機構、服部晋也・物質材料研究機構、
 望月 学・東京医科歯科大学眼科、藤里 俊哉・大阪工業大学、
 木村 剛・東京医科歯科大学、小林 尚俊・物質材料研究機構、
 岸田 晶夫・東京医科歯科大学]

E-mail funamoto.fn@tmd.ac.jp

電話 03-5280-8110 FAX 03-5280-8029

【緒言】

角膜移植は重篤な角膜疾患において有効な治療法の一つである。現在、角膜移植術を要する患者は、世界中で 1000 万人以上と推定されているが、実際に角膜移植を受けている患者数は年間 12 万人に不足しており、多くの国で提供眼球不足が大きな問題となっている。

このような問題の抜本的解決策として、高分子材料を用いた人工角膜の開発および再生医療技術による角膜再生が検討されている。前者は、従来より、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (PHEMA)、ポリビニルアルコール (PVA) などが試みられているが、生体組織と人工材料の接着性が悪いことや材料と生体組織との機械的コンプライアンスの不一致により発生するメカニカルストレスで、接合部での角膜実質融解による人工角膜の脱落が報告されている。一方、角膜再生においては、*in vitro* で角膜様組織の構築が報告され、上皮細胞シートによる角膜上皮再生も臨床応用されており、細胞工学からのアプローチによる再生医療技術の有用性が示されつつある。しかしながら、これら細胞の足場となる角膜実質部としては、コラーゲンやフィブリンゲルなどが用いられており、これらは生体角膜に比べ脆弱かつ構造も大きく異なることが挙げられる。角膜は、コラーゲン線維が格子状に高次に配列することにより透明性を維持している組織であり、角膜実質部としては高次の組織構造が要求される。そこで、生体に類似した物性と構造を有する脱細胞化組織に着目した。脱細胞化組織は、生体組織から細胞を除去した後、残存する細胞外マトリックスを指す。本研究では、種々の手法による脱細胞化角膜の作製と眼科用足場材料としての可能性について検討した。

【実験】

成体ブタ眼球の角膜輪部に沿ってサージカルナイフで切開し、角膜を採取した。その後 3.5 % w/v Dextran を含む PBS (DEX/PBS) で洗浄した。界面活性剤による角膜の脱細胞化法は、1 % w/v TritonX-100 およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を調製した。角膜を浸漬し、37°C にて 24 時間の振盪処理を行った。続いて、DEX/PBS による振盪洗浄を 48 時間行った。超高压処理による方法は、冷間等方加圧装置, Dr. CHEF ((株)神戸製鋼所) を用い、10°C または 30°C にて 10,000 気圧の超高压印加処理 (UHP) を 10 分間行った後、直ちに 3.5 % w/v Dextran、0.2 mg/ml DNase I を含む洗浄培地 (DEX/EBM) による振盪洗浄を 72 時間行い、細胞残渣を除去した。それぞれの方法で得られた脱細胞化角膜組織に

対して組織学的評価と力学的評価を行ない、超高压処理角膜では動物実験も検討した。

【結果と考察】

角膜の脱細胞化と組織学的評価において界面活性剤による脱細胞化処理では、不透明な角膜が得られた。H-E染色では、膨潤によるコラーゲン線維間隙の拡大および配向の乱れが観察された。また、角膜上皮細胞、角膜実質細胞も残存していた。

超高压処理による角膜の脱細胞化においては、白濁した角膜が得られた。H-E染色においては、コラーゲン線維の配向は維持されており、角膜上皮細胞および角膜実質細胞が完全に除去された。

力学特性評価では、未処理角膜の応力-歪曲線は、生体組織に特有であるJカーブであった。界面活性剤による脱細胞化角膜は歪率が高く、応力-歪曲線の変化が顕著であった。一方、超高压処理による脱細胞化角膜では、歪率は未処理と同程度であり、Jカーブに類似した応力-歪曲線が得られた。また、弾性率においても、未処理と意な差は示されず、力学強度に大きな変化は認められなかった。

動物実験においては、未処理角膜で移植後1週間経過した頃から血管の誘導が観察され、2週間後では、移植角膜片が混濁し始めた。8週間後、移植片部位に多数の新生血管が観察され、免疫反応の惹起が認められた。一方、脱細胞角膜移植では、移植後1週間経過した頃から、移植片が透明になり始め、2週間後では、移植片は完全に透明化した。8週間後においても、透明性は維持されており、新生血管の誘導は観察されなかった。

これらのことより細胞化角膜は、生体角膜に類似した構造を有しており、かつ、ドナー細胞を完全に除去することにより免疫反応の惹起を抑制することが可能であった。また、移植後、角膜組織の透明性が回復が観察された。これは角膜内皮細胞によるポンプ機能によるものと考えられる。以上より、脱細胞化角膜の眼科用足場材料としての可能性が示唆された。

この研究は厚生労働省科学研究費補助金により行われた。

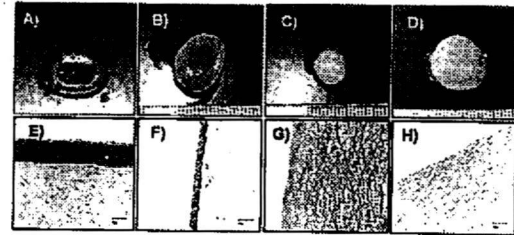


図1 未処理角膜と脱細胞化角膜
A・E) 未処理、B・F) TritonX-100、C・G) SDS、D・H) 10°C/UHP

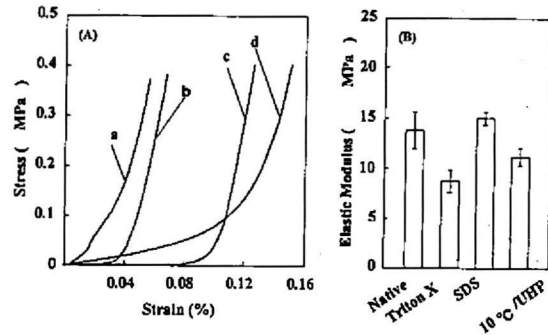


図2 脱細胞化角膜の力学特性
a 10°C/UHP、b 未処理 c SDS、d TritonX-100

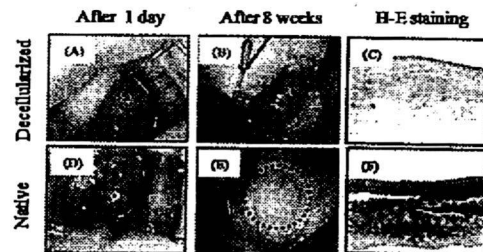


図3 日本白色兎への移植

角膜再生用スキャフォールドの開発と機能評価

東医歯大生材研¹・東医歯大眼科²・物材機構生材セ³・阪工大院工⁴ ○橋本良秀^{1,3}、船本誠一^{1,3}、
佐々木秀次²、望月學²、服部晋也³、藤里俊哉⁴、木村剛^{1,3}、小林尚俊³、岸田晶夫¹

【緒言】近年、角膜移植技術の向上によりその成功率は90%を超えるが、圧倒的なドナー不足が大きな問題である。このような問題の抜本的解決策として、合成高分子材料を用いた人工角膜の開発および再生医療技術による角膜再生が検討されている。前者ではポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (PHEMA)、ポリビニルアルコール (PVA)などの透明で生体不活性な素材を用いた試みがなされている。しかしながら、生体組織と人工材料の接着性、形状のミスマッチおよび組織との機械的コンプライアンスが一致していないために生じるメカニカルストレスなどによって、局所のタンパク質分解酵素が活性化し、縫合部での実質融解による人工角膜の脱落が報告されている。後者では角膜上皮疾患に由来する症例に対する治療として、角膜上皮シート移植や角膜輪部の幹細胞移植などが行われ、良好な成績を収めている。しかし、角膜実質部の疾患においては適応とならず、角膜の約90%を占める角膜実質部の再生に関しては、未だ達成されていない。本研究では、界面活性剤法と超高压処理法を用いた脱細胞化角膜の開発と移植用角膜としての可能性を検討した。

【実験】成体ブタの眼球から角膜を採取した。界面活性剤としては、TritonX-100、SDSを用いた。各々の1w/v%溶液に角膜を浸漬し、24時間振盪処理した。続いて、DEX/PBSによる振盪洗浄を48時間行った。一方、冷間等方加圧装置(株)神戸製鋼所を用い、10℃または30℃にて10,000気圧の超高压印加を10分間行い、細胞を破壊した。続いて、3.5% Dextran、0.2mg/ml DNaseIを含む洗浄培地(DEX/EBM)による振盪洗浄を行うことで組織内細胞を除去した。脱細胞化を組織学的観察、残存DNA、残存GAGの定量により評価した。電子顕微鏡観察により組織の微細構造変化について検討した。膨張率、透過率、力学強度測定により特性評価を行った。日本白色家兎を用いた動物実験により脱細胞化角膜の透明性、炎症反応について検討した。

Preparation and characterization of decellularized corneal scaffold

Yoshihide HASHIMOTO,^{1,3} Seiichi FUNAMOTO,^{1,3} Syuji SASAKI,² Manabu MOCHIZUKI,² Shinya HATTORI,³ Toshiya FUJISATO,⁴ Tsuyoshi KIMURA,^{1,3} Hisatoshi KOBAYASHI,³ and Akio KISHIDA¹ (¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, JAPAN, ²Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, ³Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, ⁴Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology)
Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: kishida_fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra-high pressure/ decellularization

Abstract: We investigated the decellularization of porcine cornea by two methods; detergent method and ultra-high pressure (UHP) method. The incomplete removal of cells was confirmed in detergent method. On the other hand, For H-E staining of the cornea decellularized with the UHP method, the complete removal of corneal cells and maintenance of the superstructure of collagen fibrils were confirmed. These results indicate that the decellularized cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for regeneration.

【結果・考察】

TritonX-100 による脱細胞化処理では、未処理の約 5 倍に膨潤した不透明な角膜が得られた。H-E 染色では、膨潤によるコラーゲン線維間隙の拡大および配向の乱れが観察された。また、角膜上皮細胞、角膜実質細胞も残存していた。SDS による脱細胞化処理では、TritonX-100 に比べて、膨潤は抑制されたが、白濁および角膜の融解によるサイズの縮小が観察された。H-E 染色では、コラーゲン線維間隙の拡大と配向の大きな乱れ、角膜実質細胞の残渣が確認された。超高压処理による角膜の脱細胞化において、10、30℃にて 10,000 気圧の高圧印加を施した。処理温度に依らず、いずれも白濁した角膜が得られ、若干の膨潤が認められた。また、H-E 染色では、コラーゲン線維の配向は維持されており、角膜上皮細胞および角膜実質細胞が完全に除去された。しかしながら、30℃で超高压処理した角膜では、コラーゲン線維間隙の拡大が観察された。

脱細胞化処理後の角膜に残存する DNA と GAG の定量結果を Fig. 2A, B に示す。界面活性剤による脱細胞化角膜では、残存 DNA 量が減少した。一方、超高压処理による脱細胞化角膜では、検出限界の残存 DNA 量であり、完全な細胞除去が示された。また、TritonX-100、SDS および 30℃/UHP による脱細胞化角膜では、未処理に比べ、残存 GAG 量が減少したが、10℃/UHP による脱細胞化角膜では、残存 GAG 量に変化は認められなかった。動物実験において、未処理角膜では移植後 1 週間経過した頃から血管の誘導が観察され、2 週間後では、移植片が混濁し始めた。8 週間後、移植片部位に多数の新生血管が観察され、免疫反応の惹起が認められた。一方、脱細胞化角膜では、移植後 1 週間経過した頃から移植片が透明になり始め、2 週間後では、移植片が完全に透明化した。

8 週間後においても、透明性は維持されており、新生血管の誘導は観察されなかった。以上の結果より、脱細胞化角膜の移植用角膜としての可能性が示唆された。

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金により行われた。

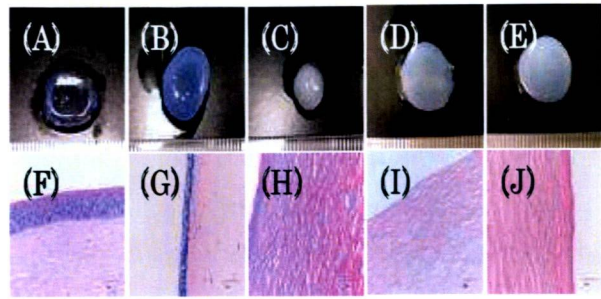


Fig 1 Photographs and H-E staining of (A), (F) non-treatment cornea, (B), (G) the cornea decellularized with Triton X-100, (C), (H) the cornea decellularized with SDS, (D), (I) the cornea decellularized by UHP at 30℃ and (E), (J) the cornea decellularized by UHP at 10℃.

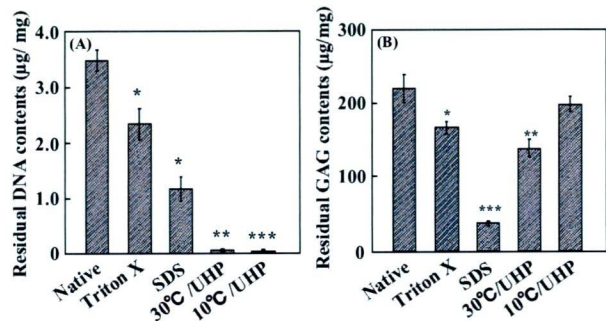


Fig. 2 Quantification analysis of (A) residual DNA contents, (B) residual GAG contents in the corneas treated under various conditions. (*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001).

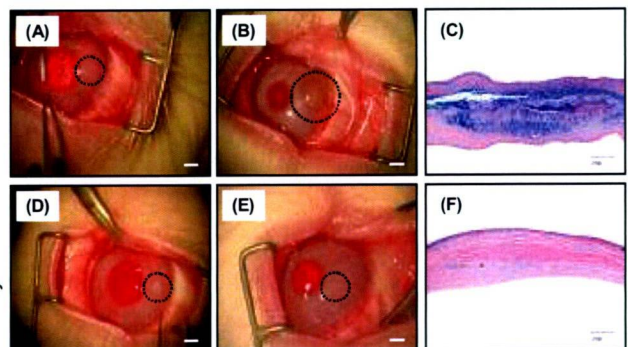


Fig. 3 Photographs and H-E staining of the non-treated (upper) and decellularized (lower) corneas implanted in rabbit eye after immediately (A), (D) and eight weeks (B, C, E, F). Scale bar 2mm (A, B, D, E), 50µm (C, F).