

## 脱細胞化処理による角膜実質の微細線維構造の変化に関する研究

物材機構生体セ<sup>1</sup>・東医歯大生材研<sup>2</sup>・物材機構国際ナノアーキテクトニクス研<sup>3</sup>・東医歯大医<sup>4</sup>・国立循環器病セ<sup>5</sup>・阪工大工<sup>6</sup> ○服部晋也<sup>1</sup>・木村剛<sup>2</sup>・吉川千晶<sup>3</sup>・松本誠一<sup>2</sup>・橋本良秀<sup>2</sup>・佐々木秀次<sup>4</sup>・望月學<sup>4</sup>・南広祐<sup>2</sup>・藤里俊哉<sup>5,6</sup>・北村惣一郎<sup>5</sup>・岸田晶夫<sup>2</sup>・本田貴子<sup>1</sup>・小林尚俊<sup>1</sup>

**【緒言】** 正常角膜実質の細胞外基質は横行したコラーゲン線維で構成されるため、角膜実質層の再生には、正常角膜実質同等の横行した構造が必要であると考えている。近年、脱細胞化の技術を用いて、組織再生の足場材料として用いる試みがなされている。一般的な脱細胞化は界面活性剤や薬剤を用いて行われるが、組織内への薬剤の残存などによる細胞毒性などの問題がある。そこで、脱細胞化の方法として超高静水圧印加（UHP）処理を採用した。UHP処理を施した組織は、界面活性剤による脱細胞化の際に問題となる細菌、ウイルスおよび免疫反応を引き起こすような抗原が除去され、細胞毒性はないと考えられる。脱細胞化後の角膜は主に実質部の細胞外基質であるコラーゲンで構成されており、微細線維構造が正常角膜実質部に近い状態のまま保持されていれば角膜実質再生足場材料となりえる可能性を保持している。そこでUHP法により作成した脱細胞化角膜実質の超微細線維構造の変化を調査し、角膜実質再生足場材料となりえるかを検討した。

**【実験】** ブタから採取した角膜を洗浄後、冷間等方加圧装置（(株)神戸製鋼）を用いて10000 atmの高圧を10℃および30℃の条件化で10分印加し、0.2mg/mlのDNase I、3.5%デキストランおよび抗生物質を含むEGM-2培地に浸漬し、37℃、5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で72時間洗浄した。構造変化の比較対象物として界面活性剤による脱細胞化も行った。UHPと同じくブタから採取した角膜を洗浄後、1% Triton-Xおよびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）に37℃で24時間浸漬後、抗生物質を含むPBSで洗浄した。脱細胞化処理後の検体は2.5%グルタルアルデヒドで固定後、1%オスミウム酸で後固定し、エポキシ樹脂に包埋し、透過電子顕微鏡にて観察した。

**【結果と考察】** 界面活性剤で処理した角膜はコラーゲン線維構造の乱れおよび細胞様構造物の残存が認められた。一方のUHP処理による脱細胞化角膜では、界面活性剤を用いた脱細胞化と比較するとより正常角膜に近い線維構造を保持していた。このことからUHPによる角膜脱細胞化では、処理に伴うコラーゲン線維の変性は界面活性剤を用いた処理より軽度であることが示唆され、UHPによる脱細胞化処理を施した角膜組織は角膜実質再生の足場材料となりうる構造を保持していることが明らかになった。

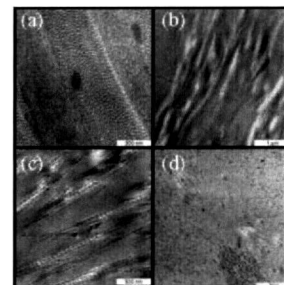


Figure 1 TEM images of decellularized cornea (a) Native cornea, (b) UHP at 10°C, (c) UHP at 30°C, (d) Triton-X

### Ultrastructural changes of corneal stroma after decellularization

Shinya HATTORI<sup>1</sup>, Tsuyoshi KIMURA<sup>2</sup>, Chiaki YOSHIKAWA<sup>3</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>2</sup>, Yoshihide HASHIMOTO<sup>2</sup>, Shuji SASAKI<sup>4</sup>, Manabu MOCHIZUKI<sup>4</sup>, Kwangwoo NAM<sup>2</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>5,6</sup>, Soichiro KITAMURA<sup>5</sup>, Akio KISHIDA<sup>2</sup>, Takako HONDA<sup>1</sup>, Hisatoshi KOBAYASHI<sup>1</sup> (Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-2-1, Sengen, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, <sup>2</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, JAPAN, <sup>3</sup>International Center for Materials and Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo, Tokyo, JAPAN, <sup>5</sup>National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, JAPAN, <sup>6</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Akashi, Osaka, JAPAN)

<sup>1</sup>Tel:+81-29-851-3354(ext.4495), Fax:+81-29-860-4715, E-mail:Hisatoshi.KOBAYASHI@nims.go.jp

**Key Word:** artificial cornea / decellularization / ultrastructure

**Abstract:** To recover from the corneal blindness, corneal transplantation is needed. However, donor shortage is the problem. Then, to fabricate artificial cornea is important. Recently, decellularized tissues are used for tissue regenerative scaffold. We performed ultra high hydrostatical pressurization (UHP) treatment to get decellularized cornea. After this treatment, aligned collagen structure of corneal stroma was maintained compared with detergents decellularization method. According to our results, UHP treated decellularized cornea can be a good scaffold for regeneration of corneal stroma.

(東京医歯大生材研, JST-CREST)○南 広祐、木村 剛、岸田 晶夫

【緒論】コラーゲンは人体組織を構成するポリペプチドであり、優れた生体適合性を有するため、種々なバイオマテリアル分野に広く応用されている。具体的には、コラーゲンをコーティングしたディッシュ、コラーゲンスキャフォード、およびコラーゲングルなどがある。コラーゲンは機械的物性が弱いため、一般的に化学的架橋法を利用し、機械的物性を調節することが多い。

今まで、本研究グループは 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。<sup>1,2)</sup> しかし、コラーゲン架橋効果に関する研究は、トリプルヘリックス内部架橋にとどまり、トリプルヘリックス間架橋が起こす架橋効果についての研究はまだ進めていない。本研究では、トリプルヘリックス内部架橋、トリプルヘリックス間架橋、ヘリックス-ポリマー間架橋によるコラーゲンゲルの物性と生物学的特性を調べ、各架橋がコラーゲンゲルに与える影響に関して発表する。

【実験】コラーゲン 2wt%水溶液から透明なコラーゲンフィルムを調製した。トリプルヘリックス内部架橋の影響を調べるため、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、コラーゲングルを得た (EN ゲル)<sup>1)</sup>。また、トリプルヘリックス間架橋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アミン基間架橋を行い、G-ゲルを得た。カルボキシル間架橋を行うため、1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) を pH4.5 で 120 時間架橋剤として使い Ba-ゲルを得た。また、BDDGE を用いてコラーゲンを pH9.0 で 120 時間架橋し、Bb-ゲルを作製した。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

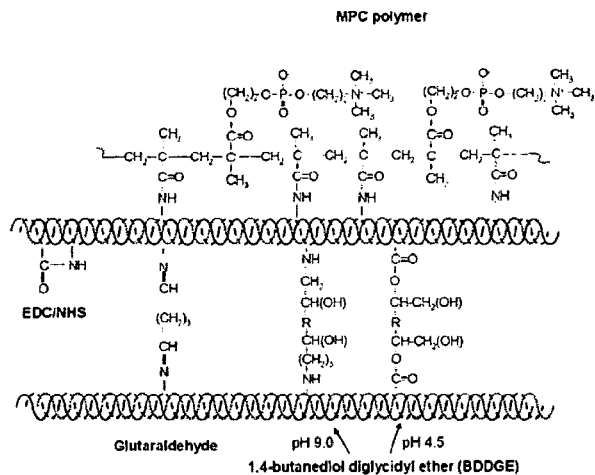


Fig 1. Schematic preparation scheme of the preparation of the collagen gels by respective cross-linkers and polymers.

#### How would collagen gel structure affect the physical and biological properties?

Kwangwoo NAM<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi KIMURA<sup>1,2</sup>, and Akio KISHIDA<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Division of Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>2</sup>JST-CREST)

TEL: 03-5280-8156 FAX: 03-5280-8029 E-mail: bloodnam.fm@tmd.ac.jp

**Key Word:** collagen / viscoelasticity / in vivo test

**Abstract:** Collagen gel was prepared by immobilizing phospholipids polymer using various cross-linkers. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) was used for the amide intrahelical cross-linking, 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) was used for carboxyl-carboxyl interhelical cross-linking, and glutaraldehyde was used for the amide-amine interhelical cross-linking. For the polymer-collagen cross-linking, [poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-co-methacrylic acid) (PMA)] was adopted. The mechanical cross-linking and the stability varied according to the cross-linking method. The collagen gel with polymer was the most stabilized while the physically cross-linked collagen gel was the weakest of all. The addition of PMA decreases the amount of adsorbed protein and adhered cells. The morphology of the cells on the PMA-immobilized collagen gel's surface was round indicating that the cell-surface interaction is weak.

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。コラーゲン架橋構造を Fig. 1 に示した。物理的に架橋されたコラーゲンゲル(Uc-ゲル)、トリプルヘリックス内部架橋ゲル(ENゲル)、トリプルヘリックス間架橋ゲル(G-ゲル、Ba-ゲル、Bb-ゲル)、ヘリックス-ポリマー間架橋ゲル(MiC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】** 走査電子顕微鏡でゲルの表面観察した結果、全てのゲルは非孔性であることを確認した。破断面は、Ba-ゲルと Bb-ゲル以外は全て多孔性構造を有することが明らかとなった。また、架橋はコラーゲンゲルの内部形体を緻密化されることが分かった。各コラーゲンゲルの自由アミン基と自由カルボキシル基を測定し、架橋率を計算した (Fig. 2)。その結果、G-ゲルと Ba-ゲルのトリプルヘリックス間架橋が最高架橋率を示した。

コラーゲンゲルの生体分解性についてコラー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。トリプルヘリックス内およびトリプルヘリックス間架橋はトリプルヘリックス切断されても、架橋によりコラーゲンゲル構造は維持されると言える。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、Ba-ゲル、Bb-ゲル) によるゲルの機械的物性の変化を調べた。その結果、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、トリプルヘリックス内部と、トリプルヘリックス間架橋によるゲルの機械的物性を比べた結果、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することが明らかとなった。

トリプルヘリックス内部架橋によるタンパク質吸着性と細胞接着性は少し低下したものの、細胞の増殖には影響しなかった。一方、トリプルヘリックス間架橋はタンパク質吸着性と細胞接着性を急激に低下させることが分かった。これは、トリプルヘリックス間架橋の高い架橋率と架橋剤の毒性による影響であると考えられる。MiCゲルの場合、細胞が接着したものの、細胞の増殖は抑えられた。これは、架橋した MPC ポリマーの機能が発現することであると考えられる。<sup>2,3)</sup>In vivo での実験データも発表当日行う予定である。

**【結論】** 架橋によるコラーゲンゲルの構造変化は、架橋法によって物性と生物学的特性に異なる影響を与えた。トリプルヘリックス内部架橋はコラーゲンゲルの毒性を抑える特徴を有する。トリプルヘリックス間架橋はコラーゲンゲルの機械的物性を増加させるものの、毒性が現れる。ポリマーとの架橋は物性の増加を誘発するとともに、ポリマーの機能を発現させることが可能である。

**【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, *Macromol. Biosci.*, **2008**, 8, 32-36.
- 3) J. Watanabe and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1797-1802.

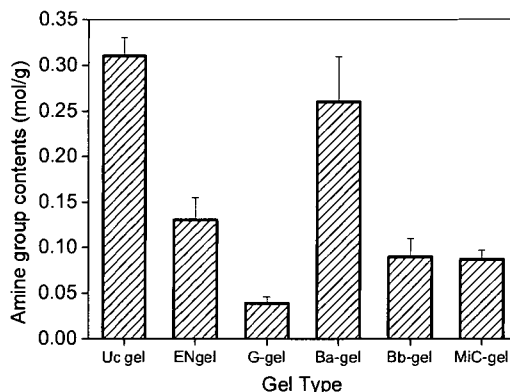


Fig 2. Amine group contents of the collagen gels prepared by respective methods.

**Structure evaluation of Porcine Cornea Decellularized by Ultra High Hydrostatical Pressurization**

Hisatoshi Kobayashi<sup>1</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>2</sup>, Seiichi Funamoto<sup>2</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>2</sup>, Syuji Sasaki<sup>2</sup>, Manabu Mochizuki<sup>2</sup>, Shinnya Hattori<sup>1</sup>, Takako Honda<sup>1</sup>, Toshiya Fujisato<sup>3</sup>, Akio Kishida<sup>2</sup>

1. National Institute for Materials Science (NIMS), 1-2-1 Sengen, Tsukuba 305-0047, Japan 2. Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062, Japan 3. Osaka Institute of Technology, Osaka 535-8585, Japan

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

**Introduction:** The success rate of a corneal transplantation is high compared to other forms of tissue transplantation, but many complications still occur. Also, an absolute shortage of donor corneas has been an important problem in many countries. Artificial corneas have been studied as alternatives in order to overcome these problems. 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. We made acellular cornea scaffold using ultra-high pressure (UHP) method without detergents. Our objective of this study is to investigate the structural difference of acellular corneas between UHP method and current methods. **Materials and Methods: Decellularization of corneas:** The corneas were pressurized at 4,000 or 10,000 atm at 10 or 30°C for

10 min using a high-pressure machine, 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% CO<sub>2</sub>, 95% air for 72 hours. **Ultra-structure of decellularization 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. **Results and Discussion:** Ultrastructural properties of decellularized corneas made by UHP method were resembled with natural cornea. Collagen bundles were observed by TEM. In addition, there were no host cells in the UHP decellularized cornea. On the other hand, microstructural properties of SDS decellularized corneas were far from natural cornea. 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. The results of 6 month implantation will be presented.

Posters

Tissue Engineering / Regenerative Medicine - Soft Tissue

---

**STRUCTURAL FEATURES OF DECELLULARIZED CORNEA USING ULTRA HIGH HYDROSTATIC PRESSURIZATION METHOD.**

Shinya Hattori<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>3</sup>, Chiaki Yoshikawa<sup>4</sup>, Seiichi Funamoto<sup>3</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>3</sup>, Shuji Sasaki<sup>5</sup>, Toshiya Fujisato<sup>6</sup>, Takako Honda<sup>1,2</sup>, Akio Kishida<sup>3</sup> and Hisatoshi Kobayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan,

<sup>2</sup>Japan Health Sciences Foundation, Tokyo, Japan,

<sup>3</sup>Institute of Biomaterials Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan,

<sup>4</sup>International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan,

<sup>5</sup>Tokyo Medical and Dental University Hospital Faculty of Medicine, Tokyo, Japan,

<sup>6</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan.

Donor shortage of corneal transplantation is big problem for the person who has some corneal illness. Recently, decellularized tissues are studied for tissue regenerative scaffold. Decellularized tissues seem to have a native tissue alike structure without host cell, genes or virus and antigen molecules. Therefore, decellularized tissues have a possibility to be a good scaffold. In general decellularization was performed using chemical detergents such as sodium dodecyl sulfate (SDS) [1] or Triton-X. However, according to detergents decellularization procedure, some important biological properties might be denatured. So, we fabricated decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressurization (UHP) method [2]. Our objective of this study is to compare the structural difference between UHP and detergents decellularization. Porcine corneas were washed using 100 units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin supplied phosphate buffered saline (PBS). Until decellularization treatment, corneas were preserved in 3.5% w/v dextran containing PBS solution described above. Detergents decellularization was performed using 1 % w/v solution of SDS and Triton-X. UHP method was done using a high-pressure machine (Kobe Steel, Ltd., Kobe, Japan). Using this machine 10000 atm pressure were applied to corneas at 10°C and 30°C. After decellularization, each specimen was fixed and embedded for histological observations. Conventional histological observation and ultra structural analysis using electron microscopy were done. According to our results, structural deformation was more severe in detergents method rather than UHP method. Our results showed that decellularized cornea made by UHP method might be had a possibility to be a scaffold for corneal regeneration. More details will be presented and discussed.

## Posters

### Tissue Engineering / Regenerative Medicine - Soft Tissue

---

#### EVALUATION OF DECELLULARIZED CORNEA MADE BY ULTRA HIGH HYDROSTATIC PRESSURIZATION METHOD AS A SCAFFOLD FOR CORNEAL STROMA

Takako Honda<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>3</sup>, Chiaki Yoshikawa<sup>4</sup>, Seichi Funamoto<sup>5</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>3</sup>, Shuji Sasaki<sup>5</sup>, Toshiya Fujisato<sup>6</sup>, Shinya Hattori<sup>1,2</sup>, Akio Kishida<sup>3</sup> and Hisatoshi Kobayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan, <sup>2</sup>Japan Health Science Foundation, Tokyo, Japan,

<sup>3</sup>Institute of Biomaterials Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan,

<sup>4</sup>International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan,

<sup>5</sup>Tokyo Medical and Dental University Hospital Faculty of Medicine, Tokyo, Japan,

<sup>6</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan.

Cornea is avascular tissues so that it has very poor self-regenerative abilities. Therefore, corneal transplantation is needed when injury or illness had occurred at cornea. However, many patients are waiting for transplantation because of donor shortage. Thus, many kinds of artificial corneas had been studied. Unfortunately, there has not been established to regenerate the corneal stromal portion. Recently, decellularized tissues are attempted for tissue regenerative scaffold. Decellularized tissues have a native tissues resembled structure without host cells and antigens. So, decellularized tissues are expected to be good scaffolds. We made decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressurization (UHP) method. This method is much safe than detergents decellularization because of no risk for residues of chemicals. In this study, we evaluate the UHP treated decellularized cornea including animal implantation test using rabbits

Porcine cornea was washed using 100 units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin supplied phosphate buffered saline (PBS). Until pressurization, corneas were preserved in 3.5% w/v dextran containing PBS solution described above. Then, Corneas were pressurized at 10000 atm for 10 minutes at 10°C and 30°C using high pressure machine (Kobe Steel Ltd, Kobe, Japan). After pressurization, each cornea were washed by 0.2 mg/ml DNase I, 100 unit/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 3.5% dextran containing EGM-2 medium with shaking at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. Fabricated decellularized corneas were implanted in rabbit corneal stromal site making small pocket. At 6 month after implantation, implanted cornea was still visually clean and there were no neovascularisation and inflammatory response. The details of this study will be presented and discussed.

## P3-06 超高压を利用した PVA-ヘパリン複合体の調製と評価

(東医歯大 生材研<sup>1</sup>・大工大<sup>2</sup>) ○根岸淳<sup>1</sup>・木村剛<sup>1</sup>・  
南広祐<sup>1</sup>・藤里俊哉<sup>2</sup>・岸田晶夫<sup>1</sup>

### 1. 緒言

ゲル担体を用いた薬剤徐放システムは数多くの研究例があり、ゲル作製方法には架橋剤を使用した化学ゲル、水素結合などによる物理ゲルに大別される。化学ゲルでは架橋剤による生体への影響が懸念されるため、本研究では超高压印加 (Ultra High Pressure :UHP) を利用して物理ゲルを作製した。UHP 処理法、凍結融解反復法 (Freeze-Thawing :F/T) を用いてヘパリン含有ポリビニルアルコール (PVA) ハイドロゲルを作製し、ヘパリンの放出挙動、ATⅢ活性の評価を行った。

### 2. 実験

アクリル製の型 (10×10×1.5mm) に溶解した PVA 溶液とヘパリンの混合溶液を流し込み、UHP 処理 (10,000atm、加圧 5 分、保持 10 分、減圧 5 分) を行い UHP ゲル、F/T 処理 (凍結 2 時間、融解 30 分、8cycle) を行い F/T ゲルを作製した。UHP 処理中の温度 (10℃、25℃、50℃) により 3 種類の UHP ゲルを作製し、UHP 温度による放出挙動の変化を検討した。放出挙動はゲルを PBS に浸漬し、ヘパリン溶出量をトルイジンブルー法により決定した。UHP 処理、F/T 処理のヘパリンの抗血栓性への影響評価のために、各処理を施したヘパリン溶液の ATⅢ活性を評価した。

### 3. 結果と考察

F/T ゲルからのヘパリンの放出は 72 時間後からほぼ 0 であったが、UHP ゲルからは 72 時間後以降もヘパリンが放出され 504 時間後も放出が確認された。UHP 処理温度別では、50℃で作製したゲルが 10℃、25℃で作製したゲルに比べ放出速度が速かった。UHP 処理、F/T 処理、オートクレーブ等のゲル作製手順による ATⅢ活性の変化はなく、作製したゲルから放出されたヘパリンは抗血栓性を維持していると考えられる。

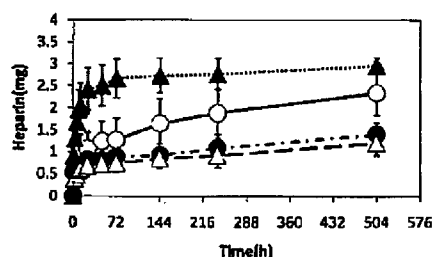


Fig.1. Cumulative release of heparin from PVA hydrogel.

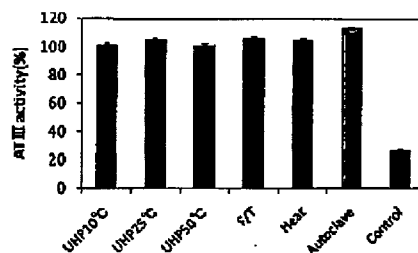


Fig.2. ATⅢ activity of various treatments.

## Fabrication and Evaluation of PVA-Heparin Complex by Ultra High Pressure Method

Jun Negishi<sup>1</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>1</sup>, Kwangwoo Nam<sup>1</sup>, Toshiya Fujisato<sup>2</sup>, Akio Kishida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tokyo Medical and Dental University, Institute of Biomaterials and Bioengineering, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. <sup>2</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585 Japan.

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida.fm@tmd.ac.jp



## 高圧印加処理を用いた脱細胞化による人工角膜開発の試み

(ヒューマンサイエンス振興財団) ○服部晋也、本田貴子  
 (東医歯大生材研) 木村剛、船本誠一、橋本良秀、岸田晶夫  
 (東医歯大病院眼科) 佐々木秀次、望月學  
 (大工大工学研究科) 藤里俊哉  
 (物材機構 MANA) 吉川千晶  
 (物材機構生体材料センター) 小林尚俊

### 1. 緒言

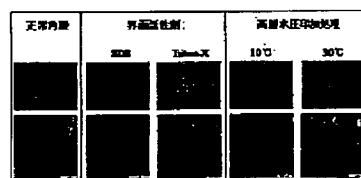
角膜移植を希望する患者に対するドナーの数が不足しているため、すぐれた人工角膜の開発が待ち望まれている。角膜上皮、内皮の再生技術は確立されつつあるが角膜実質再生技術は開発されていない。近年、脱細胞化組織の再生足場材料としての応用が試みられている。Fujisatoらは組織に高静水圧を印加して脱細胞化することに成功した<sup>1)</sup>。本法は、一般的な界面活性剤を用いた脱細胞化と比較し、安全性が高く、組織構成成分の損出の少ない方法である。我々は、本法を用いた脱細胞化角膜実質の調整を行い、界面活性剤処理角膜との処理後の組織構成成分の変化を比較し、より脱細胞化させた角膜の処理後の組織構成成分の変化を比較し、角膜実質組織再生の足場材料になりえるかを評価した。

### 2. 実験

豚の角膜を採取し、界面活性剤による脱細胞化処理は 1%ドデシル硫酸ナトリウムおよび TritonX-100®に採取した角膜を 37°Cで 24 時間浸漬した。高静水圧印加処理による脱細胞化は高圧印加処理装置 (神戸製鋼、神戸) を用いて採取した角膜に 10000atm の高圧を 10°Cおよび 30°Cにて 10 分間印加した。脱細胞化処理後の検体は光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて組織学的な評価を行った。

### 3. 結果と考察

界面活性剤脱細胞化では、角膜組織内での細胞の残存およびコラーゲン線維の微細構造の乱れが観察された。高静水圧印加処理脱細胞化では、コラーゲン線維の微細構造がより残存していることが明らかになった。我々の結果は高静水圧印加処理脱細胞化角膜が角膜実質再生足場材料になりえる可能性を示している。



脱細胞化角膜の組織学的評価。マゼンタ/トリクロム染色(上段)およびTEM像(下段)

高静水圧印加処理による脱細胞化角膜ではコラーゲン線維の微細構造が界面活性剤に比べて残存している。

この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。

1. Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kimura S. Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. 83-94. 2003

## Decellularized cornea made by ultra high hydrostatic pressurization for artificial cornea.

○Shinya Hattori<sup>1</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>2</sup>, Chiaki Yoshikawa<sup>3</sup>, Seiichi Funamoto<sup>2</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>2</sup>, Shuji Sasaki<sup>4</sup>, Manabu Mochizuki<sup>4</sup>, Toshiya Fujisato<sup>5</sup>, Takako Honda<sup>1</sup>, Akio Kishida<sup>2</sup>, and Hisatoshi Kobayashi<sup>6</sup>,  
 1.Japan Health Sciences Foundation, 2.Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 3.International Center for Materials Nanoarchitectonics, 4.Tokyo Medical and Dental University Hospital Faculty of Medicine, 5.Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 6.Biomaterials Center, National Institute for Materials Science 1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

(ヒューマンサイエンス振興財団) ○本田貴子、服部晋也、  
(物材機構、国際ナノアーキテクニクス研究拠点) 吉川千晶、  
(物材機構、生体材料センター) 小林尚俊

### 1. 緒言

角膜上皮疾患に由来する症例に対する新しい医療として角膜上皮シートの移植や角膜輪部のステムセル移植などが試みられ良好な成績を収めているが、実質再生の研究も進められているが未だ臨床に足る材料は開発されていない。これまで我々は、ポリビニルアルコールハイドロゲルを基材とした人工角膜に関する研究を行い報告してきた<sup>1-3)</sup>が、生体内における形成上皮の長期安定性は必ずしも満足のゆくものではなかった。本法では水晶体レンズやコンタクトレンズ等で臨床実績のある素材としてのPMMAをナノファイバー化して、PVAナノファイバーと比較することで角膜再生足場材料としての可能性を検討したので報告する。

### 2. 実験

サンプル調整 1) ナノファイバーの調整 PVA:PVA(重合度2000、鹼化度99.5%)を5%水溶液を用い、エレクトロスピンニング法(電圧:25kV、送液量10mL/hour、電極間距離25cm)でシートを作製した。PMMA:PMMA10%DMF溶液を調整し、エレクトロスピンニング法(電圧:12KV、送液量5.4mL/hour、電極間距離30cm)で作製した。PVAナノファイバーへのコラーゲン固定化反応は文献1に従った。2) 細胞接着、増殖、分化に関する検討:家兎角膜上皮細胞及び実質様細胞を用いた。接着、増殖試験に関しては、上皮細胞、実質細胞をPMMAナノファイバーシートおよび固定化PVAナノファイバーシートに播種し(4-6 x 10<sup>4</sup> cells/well)その付着、増殖状態を組織学的に検討した。また、上皮の分化能をエアリフトカルチャーにて確認した。

### 3. 結果と考察

コラーゲンによる表面修飾を行ったPVAファイバー上では角膜上皮細胞の接着、伸展および分化が認められた。一方、今回の条件ではPMMAファイバー上では角膜上皮細胞の接着、進展などは認められなかった。PMMAを角膜再生足場材料とするには、線維密度、表面改質などのさらなる検討が必要である。



コラーゲン修飾PVAファイバー(左)およびPMMAファイバー(右)上での角膜上皮細胞の接着

PMMAファイバー上では角膜上皮細胞の積極な接着が認められない。

この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。

1) H.Kobayashi, et.al.(2004), Trans.MRS-J,29(6), 2897-2900

2) H.Kobayashi, M.Kato, T.Taguchi, et.al., Mater. Sci. & Eng.,C, 24,(2004), p729-735

3) H.Miyashita, S.Shimmura, H.Kobayashi, et.al, J.Biomed.Mater.Res.B, 76,(2006), p56-63

## Development of artificial corneal stroma using nanofiber fabrics.

○Takako Honda<sup>1</sup>, Shinya Hattori<sup>1</sup>, Chiaki Yoshikawa<sup>2</sup>, and Hisatoshi Kobayashi<sup>3</sup>

1:Japan Health Sciences Foundation,

2:International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

3:Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki305-0044, Japan

Kobayashi.hisatoshi@nims.go.jp

## Challenge to develop reliable corneal stroma through tissue engineering approaches

Hisatoshi Kobayashi

*Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1, Namiki, Tsukuba  
305-0044, Japan  
kobayashi.hisatoshi@nims.go.jp*

### Abstract:

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 as well as the technique of decellularization of allograft of natural corneal. In this talk, I would like to share our previous results and most recent result of our trials, for example, nanofibers approach and decellularization of porcine cornea.

**BTEB-2008**

IIT Kharagpur, India

## O-017 移植用角膜組織作製のための脱細胞化処理方法の検討と in vivo 評価

東京医科歯科大学生体材料工学研究所<sup>1)</sup>, 東京医科歯科大学眼科<sup>2)</sup>, 物質・材料研究機構生体材料センター<sup>3)</sup>, 大阪工業大学<sup>4)</sup>

船本誠一<sup>1)</sup>, 佐々木秀次<sup>2)</sup>, 橋本良秀<sup>1)</sup>, 服部晋也<sup>3)</sup>, 本田貴子<sup>3)</sup>, 望月 学<sup>2)</sup>, 藤里俊哉<sup>4)</sup>, 木村 剛<sup>1)</sup>, 小林尚俊<sup>3)</sup>, 岸田晶夫<sup>1)</sup>

【目的】角膜移植は円錐角膜や角膜の外傷などの角膜疾患において有効な治療法の一つである。しかし日本では、提供角膜が不足により年間 5000 人いる患者のうち 1/3 しか移植術を受けることができないのが現状である。この解決策として、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技術の確立が検討されている。人工角膜においては、移植後の脱落や感染等の問題があり長期間に有効なものはまだ開発されていない。一方、角膜再生では上皮細胞シートによる角膜上皮再生が臨床応用されつつあり、その有用性が示されている。しかし、これら細胞の足場となる角膜実質においては、臨床応用されているものはまだない。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。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】成体ブタ眼球から角膜を採取した。界面活性剤による脱細胞化法は、1% TritonX-100 および SDS 溶液を調製し、37℃ にて 24 時間処理を行った。超高压処理方法は、10℃ にて 10,000 気圧の超高压印加処理を 10 分間行った後、振盪洗浄を 72 時間行い細胞残渣を除去した。これらの方法で得られた脱細胞化角膜組織に対して組織学・生化学的評価を行ない、超高压処理角膜では動物実験も検討した。【結果と考察】界面活性剤処理では、不透明な角膜が得られ、H-E 染色において組織内の細胞の残存が見られた。超高压処理では、白濁した角膜が得られたが H-E 染色では、組織内の細胞は完全に除去できていた。動物実験では、未処理組織移植において、8 週間後には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 2 週間後で移植片は完全に透明化した。8 週間経過後も、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、組織内細胞の完全除去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、移植組織の透明性の回復も観察された。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。

## O-018 細胞シート工学を用いた 3 次元培養における間葉系幹細胞の分化

東京女子医科大学大学院医学研究科先端生命医科学専攻<sup>1)</sup>, 慶応義塾大学医学部心臓病先進治療学講座<sup>2)</sup>, 国立成育医療センター生殖医療研究部<sup>3)</sup>

松田和希<sup>1)</sup>, 原口裕次<sup>1)</sup>, 清水達也<sup>1)</sup>, 三好俊一郎<sup>2)</sup>, 梅澤明弘<sup>3)</sup>, 岡野光夫<sup>1)</sup>

【目的】機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、その機能の再生を図るために生体内外で細胞を用いて構築した 3 次元組織による再生治療が臨床応用され始めている。その組織の多くは生体吸収性高分子を細胞の支持体を用いるが、この手法では個々の細胞を生体組織・臓器と同じ環境に配置することが困難である。また、3 次元再生組織内ではその環境が細胞の分化・誘導に大きな影響を与えることが考えられるが詳細な解析は行われていない。本研究では、細胞シート工学の手法により、支持体を使用せずに細胞シートを直接積層化することで生体同様の細胞密度の高い組織を作製し、この 3 次元組織中での細胞の分化について解析を行った。細胞ソースとして、自己からの採取が可能で、多能性を持つ間葉系幹細胞に着目した。

【方法】ヒト子宮内膜由来間葉系幹細胞 (EMSCs) を温度応答性培養皿に播種し、37℃ で 4 日間培養した。コンフルエントになった EMSCs をタンパク分解酵素を使わずに、温度降下処理のみで細胞シートとして回収した。回収した細胞シートを 1~6 層に積層化し、セルカルチャーインサート上で 1, 3, 5 日間培養した。各細胞に特異的な抗体を用いた免疫組織学的検討や細胞が産生するプロテオグリカンの定量を ELISA 法を用いて行なった。

【結果】HE 染色切片像において、4 層以上の積層化細胞シートの主に中層部で軟骨細胞様の細胞が認められた。軟骨細胞が特異的に発現する細胞外基質である 2 型コラーゲンで免疫染色をしたところ、培養 1 日目の 3 層以上の積層化細胞シートに発現が認められ、4 層以上に強い発現が認められた。また、培養 3, 5 日目では 1 層から 6 層のすべての積層化細胞シートが陽性を示した。積層化細胞シート中の硫酸化グリコサミノグリカンの定量は、1, 2 層は培養期間によらずほぼ一定であったが、3 層以上では培養期間に伴い増加した。

【結論】4 層以上の厚い積層化細胞シートにおいては、間葉系幹細胞は培養 1 日で軟骨細胞に分化する。細胞シートの積層化により細胞密度の高い 3 次元組織を作製することで、間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化が促進されたものと考えられる。

## Decellularization of Porcine Cornea by Ultra-high Pressurization and In Vivo Study

Akio Kishida,<sup>1</sup> Tsuyoshi Kimura,<sup>1,2</sup> Seiichi Funamoto,<sup>1,2</sup> Yoshihide Hashimoto,<sup>1,2</sup> Kwangwoo Nam,<sup>1</sup> Syuji Sasaki,<sup>3</sup> Manabu Mochizuki,<sup>3</sup> Toshiya Fujisato,<sup>4</sup> Hisatoshi Kobayashi,<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan

<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

<sup>4</sup> Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute Technology, Suita, Osaka, Japan

### Introduction

The corneal transplantation is useful, but an absolute shortage of donor corneas has been an important problem worldwide [1]. In order to overcome this problem, many types of synthetic biocompatible polymer materials have been investigated, however, it has often been reported that such alternatives fail to significantly connect to corneal tissue [2]. It is believed that these materials do not sufficiently match the cornea material physically, chemically or biologically. Therefore, the development of materials more similar to a natural cornea is required. Recently, it is reported that acellular tissue, in which the cells and antigens are removed to diminish the host immune reaction but the biological structure is remained, is investigated for regenerative medicine. In many cases, acellular tissues are prepared by chemical and biological methods, such as detergents and enzyme. In the present study, we investigated a physical decellularization method of cornea using ultra-high pressurization (UHP).

### Materials and Methods

Porcine cornea was explanted from the oculars. The cornea was pressurized at 10,000 atmospheres (atm) at 30°C for 10 min using a high-pressure machine (Kobe Steel Ltd.), washed by with cell culture medium containing DNase I, antibiotics at 37°C for 72 hours. The obtained corneas were subjected to histological study (H-E staining). Also, the transparency, thickness and mechanical strength of them were examined. Also, the quantitative analysis of DNA contents in the decellularized corneas was performed. As the primary animal implant test, the acellular porcine cornea was implanted into a rabbit cornea. After several weeks, the rabbit was sacrificed and the rabbit cornea including acellular porcine was subjected by H-E staining.

### Results and Discussion

The UHP method consists of the cell rupture by hydrostatical pressurization and the removal of the disrupted cellular components during washing process with

a cell culture medium. When a porcine cornea was hydrostatically pressed at 10,000 atm at 30°C for 10 min, the cornea was cloud. After washing process, the slightly swollen cornea was obtained. For H-E staining of the decellularized cornea, it was observed that there was no cell. In order to confirm the removal of cell from the decellularized cornea, the amount of DNA in the decellularized cornea was measured quantitatively. The DNA content was significantly decreased. The superstructure of collagen fibrils was maintained relatively although the distance between the collagen fibrils was slightly larger than the non-treated cornea because the decellularized cornea was swollen during the washing process.

As a primary animal implant trial, the acellular porcine cornea was implanted into a rabbit cornea. Although the cloud acellular cornea was observed just after implantation, the transparency of the acellular cornea increased gradually, and then it was invisible to the naked eye after several weeks.

### Conclusions

We have successfully developed the acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as an artificial cornea.

### References

1. World Health Organization. Report of Consultation Meeting on Transplantation with National Health Authorities in the Western Pacific Region. 2006: 1-63.
2. Xie, R.Z., Stretton, S. and Sweeney, D.F. Bioscience Reports, 21, 513-536, 2001

### Acknowledgments

This work was supported in part by translational research, and Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and by the Ministry of Health, Labor and Welfare.

## 高圧印加処理を用いた脱細胞化角膜の構造解析

Structural analysis of decellularized cornea prepared by ultra-high hydrostatic pressurization method.

○服部晋也<sup>1</sup>, 木村剛<sup>2</sup>, 船本誠一<sup>2</sup>, 橋本良秀<sup>2</sup>, 佐々木秀次<sup>3</sup>, 望月學<sup>3</sup>, 藤里俊哉<sup>4</sup>, 本田貴子<sup>1</sup>, 岸田晶夫<sup>2</sup>, 小林尚俊<sup>5</sup>

1. ヒューマンサイエンス振興財団, 2. 東京医科歯科大学、生体材料工学研究所, 3. 東京医科歯科大学、眼科学教室, 4. 大阪工業大学、工学研究科, 5. 物質材料研究機構、生体材料センター

○Shinya Hattori<sup>1</sup>, Tsuyoshi Kimura<sup>2</sup>, Seiichi Funamoto<sup>2</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>2</sup>, Shuji Sasaki<sup>2</sup>, Manabu Mochizuki<sup>2</sup>, Toshiya Fujisato<sup>2</sup>, Takako Honda<sup>2</sup>, Akio Kishida<sup>2</sup>, Hisatoshi Kobayashi<sup>2</sup>

1. Japan Health Sciences Foundation, 2. Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 3. Tokyo Medical and Dental University Hospital Faculty of Medicine, 4. Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5. Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 6. Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

## 1. 概要

我々は、一般的な脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞よりも生体に対して安全である高静水圧印加 (UHP) による脱細胞化角膜の創成に成功した。本研究の目的は UHP 法により創成した脱細胞化角膜が角膜実質層の再生足場材料に適応できるかを評価することにある。

## 2. 序論

角膜の損傷および疾患で、正常な視覚を失った患者に対しては角膜移植術が施される。しかしながら、角膜移植に際しても免疫拒絶による移植物の脱落など問題が多い。その上、角膜移植におけるドナー不足は日本のみならず世界中で問題になっている。それ故に人工角膜に関してはさまざまな研究者が様々なアプローチで作成を試みている。角膜は角膜上皮、ボーマン膜、角膜実質、デスメ膜および角膜内皮の5層よりなる透明な組織である。今までに、角膜上皮の再生に関しては角膜上皮細胞シートや角膜輪部のステムセル移植が試みられ良好な成績を収めているが、角膜実質の再生に関してはいまだ臨床に足る材料開発には至っていない。角膜実質は線維の走行角度が異なるコラーゲン線維束が整然と交互に配列し、その線維間に角膜実質細胞が存在する特殊な組織構造をとっている。この構造は角膜の透明性に関与しており、角膜実質再生にはこの構造を再生することが必要不可欠である。

近年、脱細胞化組織を組織再生の足場材料として用いる試みがなされている。一般的な脱細胞化法は Triton-X やドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤を用いて行われているが、薬液の残存などによる細胞毒性などのリスクを完全に回避することは難しい。我々は脱細胞化法としてより安全かつ組織構成成分の損失の少ない高静水圧印加 (UHP) による脱細胞化法を角膜に施し、脱細胞化角膜を作成することに成功した。<sup>1)</sup> 脱細胞化した角膜は角膜実質のコラーゲン線維のみ残存する構造物となり、脱細胞化後の角膜組織内のコラーゲン線維の微細構造が保持されていればより良い角膜実質の再生足場材料になると考えている。そこで本研究では UHP による脱細胞化角膜の微細構造変化を調査することにより、角膜実質足場材料としてふさわしいものであるかを評価した。

## 3. 材料と方法

豚の角膜を採取し、界面活性剤による脱細胞化処理は 1% ドデシル硫酸ナトリウムおよび TritonX-100<sup>®</sup> に採取した角膜を 37℃ で 24 時間浸漬した。高静水圧印加処理による脱細胞化は高圧印加処理装置 (神戸製鋼、神戸) を用いて採取した角膜

に 10000atm の高圧を 10℃ および 30℃ にて 10 分間印加した。脱細胞化処理後の検体は光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて組織学的な評価および示差走査熱分析および円偏光 2 色性スペクトルなどを用いてのコラーゲンの高次構造変化に対する評価を行った。

## 4. 結果および考察

UHP による脱細胞化角膜組織内では界面活性剤を用いた脱細胞化角膜よりも正常に近い組織構造を呈しており、コラーゲン線維束の残存も確認された。界面活性剤を用いた脱細胞化角膜ではコラーゲン線維束の著しい乱れおよび細胞の残渣のような構造物が観察され、脱細胞化も完全にはされていないことが明らかになった。また、示差走査熱分析および円偏光 2 色性スペクトルの結果からも UHP による脱細胞化角膜内のコラーゲン線維の高次構造に著しい変化が生じていないことが示された。これらの結果から UHP を用いた脱細胞化角膜は角膜実質再生の足場材料として用いることができる可能性が示された。

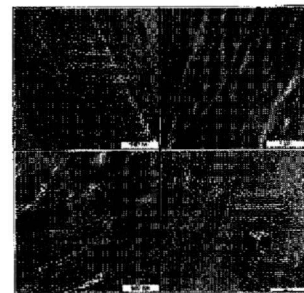


Fig.1 正常および脱細胞化角膜の TEM 像  
正常角膜 (左上)、10℃、UHP による脱細胞化角膜 (右上)  
30℃、UHP による脱細胞化角膜 (左下)、Triton-X (右下)

## 5. 参考文献

[1] Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kimura S, Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. JSME Bioengineering Conference and Seminar, 83-94, 2005

## 6. 謝辞

この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。

## 高分子ファイバーを用いた人工角膜開発の試み Development of artificial corneal stroma using polymer fibers.

○本田貴子<sup>1</sup>, 服部晋也<sup>1</sup>, 吉川千晶<sup>2</sup>, 小林尚俊<sup>3</sup>

1. ヒューマンサイエンス振興財団, 2. 物質材料研究機構、国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点, 3. 物質材料研究機構、生体材料センター

○Takako Honda<sup>1</sup>, Shinya Hattori<sup>2</sup>, Chiaki Yoshikawa<sup>2</sup> and Hisatoshi Kobayashi<sup>3</sup>

1. Japan Health Sciences Foundation, 2. International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science 3. Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

### 1. 概要

角膜実質再生の研究は進められているが未だ臨床に足る材料は開発されていない。そこで我々は眼内レンズやコンタクトレンズで臨床的に生体適合性が示されている PMMA を基材としたファイバー構造体が角膜実質再生の足場材料になりえるかを評価した。

### 2. 序論

角膜は、上皮、ボーマン膜、実質、デスメ膜および内皮の5層により形成され、正常な視覚を保持するために必要不可欠な組織である。角膜は無血管組織であるが故に自己再生能力が低く、損傷の際には角膜移植が行われるが、ドナー不足が続いており、優れた人工角膜の開発が望まれている。現在までに角膜上皮の再生に効果的ないくつかの方法が報告されているが、角膜実質の再生足場材料として満足のいくパフォーマンスを示す材料はあまり報告されていない。

我々は、今までにポリビニルアルコール (PVA) より作成したハイドロゲルの表面にコラーゲンを固定化することによって角膜上皮および実質細胞の接着、増殖を促進させることに成功した。<sup>1-3)</sup> また、コラーゲンを固定化した PVA ゲルをウサギ角膜実質内に移植したところ、術後1年を経過しても周辺組織に炎症反応などを起こさず優れた生体適合性があることも示してきた。しかしながら、術後1年を経過してもゲル内への細胞浸潤は認められず、且つ、PVA ゲル移植部上方に形成された上皮組織は薄く、正常組織とは異なる組織像が認められた。この現象は、ゲルが存在することで栄養および生体因子などの物質の透過性が低いためだと考えた。

そこで、より良い栄養および物質の透過性を得るために、エレクトロスピンニング法により PVA 水溶液よりファイバー状の構造体を創成することに成功した。また、スピンニング条件を最適化することにより、方向のそろったファイバー不織布を作成することも成功した。角膜実質は方向のそろったコラーゲン線維が交互に走行しており、方向のそろったファイバー不織布はより正常な角膜実質を模倣した材料となりえる。しかしながら、PVA という基材は生体内に埋植した際に、生体組織に石灰化を引き起こす可能性がある。そこで、コンタクトレンズや眼内レンズに使用され、臨床的に生体適合性が示されているポリメチルメタクリレート (PMMA) を用いて、ファイバー不織布を作成し、人工角膜の基材材料になりえるかを評価した。

### 3. 材料と方法

**ナノファイバーの調整:** PMMA (Sigma) を 10w% になるようにジメチルホルムアミド (Wako) に溶解し、エレクトロスピンニング法 (電圧: 26.5kV、送液量 3mL/hour、電極間距離 18cm) で不織布を作製した。

**PMMA ファイバーへのフィブロネクチンのコーティング:**

作成した不織布は 0.5mg/ml のフィブロネクチン (Sigma) 水溶液に室温で1時間浸漬し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄した。

**細胞接着、増殖、分化に関する検討:** 家兎角膜上皮細胞及び実質細胞を用いた。接着、増殖試験に関しては、上皮細胞、実質細胞を PMMA ファイバー不織布およびフィブロネクチンコーティング PMMA ファイバー不織布に播種し ( $1-2 \times 10^5$  cells/well) その付着、増殖状態を組織学的に検討した。

### 4. 結果

フィブロネクチンをコートしない PMMA ファイバー上で角膜実質細胞を培養した結果、培養後 24 時間の段階で、細胞は PMMA ファイバー上に接着はするが、同時に細胞同士も接着し凝集塊を形成していた。一方、フィブロネクチンをコートした PMMA ファイバー上では培養後 24 時間の段階で、フィブロネクチンをコートしない PMMA ファイバーよりも細胞の接着および伸展が促進されていた。さらに、培養後 5 日および 7 日の長期培養においても角膜実質細胞の接着および伸展が認められ、一部の細胞では分裂像も観察された。

### 5. 結論

PMMA ファイバー不織布をフィブロネクチンコーティングすることによって、角膜上皮および角膜実質細胞の接着、伸展、増殖能を向上させることに成功した。今後、ファイバー径やファイバーの配行など精密に制御された構造体を作成することができれば、PMMA ファイバーは人工角膜の基材材料になりえることが示唆された。

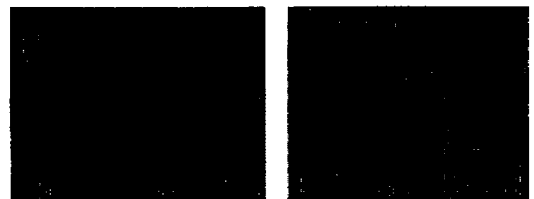


Fig. 1: PMMA ファイバー上の角膜実質細胞、播種後 24 時間  
左: フィブロネクチンコートなし PMMA ファイバー  
右: フィブロネクチンコート PMMA ファイバー

### 6. 参考文献

- 1) H. Kobayashi, et. al., Trans. MRS-J, (2004) 29(6), 2897-
- 2) H. Kobayashi, M. Kato, T. Taguchi, et. al., Mater. Sci. & Eng., C, 24, (2004), p729-735
- 3) H. Miyashita, S. Shimmura, H. Kobayashi, et. al., J. Biomed. Mater. Res, B, 76, (2006), p56-63

## O-01-6 脱細胞化技術を用いた移植・再生医療用角膜の開発

船本誠一<sup>1</sup>、佐々木秀次<sup>2</sup>、橋本良秀<sup>1</sup>、服部晋也<sup>3</sup>、  
本田貴子<sup>3</sup>、望月 学<sup>5</sup>、藤里俊哉<sup>1,4</sup>、木村 剛<sup>1,4</sup>、  
小林尚俊<sup>3</sup>、岸田晶夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、<sup>2</sup>東京都立広尾病院 眼科、<sup>3</sup>物質・材料研究機構 生体材料センター、<sup>4</sup>大阪工業大学大学院 工学研究科、<sup>5</sup>東京医科歯科大学 眼科

【目的】組織学的手法を用いた角膜の再生は、透明性を失った角膜の修復や、角膜移植の材料開発として応用が期待されている。これまでに、種々の人工角膜の開発が行なわれているが、生物物性の相違などから良好な結果は得られていない。そのため、角膜全層の再生が期待されている。しかしながら、角膜上皮においては再生技術が確立されつつあるが、角膜の約90%を占める実質部の再生には未だ至っていない。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。超高压印加装置を用いて10,000気圧の超高压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。脱細胞化組織の評価としては、組織学的観察、残存DNAの定量、電子顕微鏡観察等を行なった。さらに、日本白色家兎を用いた移植実験を行ない角膜実質の透明性、炎症反応などを比較検討した。【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。移植実験では、未処理角膜においては拒絶反応が観察された。一方、脱細胞化角膜では、軽微な炎症反応を認めたが、透明性を維持しつつ周囲組織に定着し、長期実験においても安定した結果が得られた。以上より脱細胞化角膜の移植・再生医療用角膜としての有用性が示唆された。



## P-082 超高压を利用した脱細胞化小口径血管グラフトの作製と評価

根岸 淳<sup>1</sup>, 船本誠一<sup>1</sup>, 木村 剛<sup>1</sup>, 藤里俊哉<sup>2</sup>,  
樋上哲哉<sup>3</sup>, 岸田晶夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, <sup>2</sup>大阪工業大学 工学部 生体医工学科, <sup>3</sup>札幌医科大学 医学部 第二外科

【目的】中・大口径の人工血管において、生体血管の構造特性や機能を有した材料が用いられているが、小口径血管では、種々の研究が行われているが、未だ満足できるものは開発されていない。近年、組織工学的技術の進歩により、組織の構築や再生が行われている。その中で、我々は脱細胞化技術に着目した。脱細胞化組織は、生体由来の構造を維持し、組織・再生医療での利用が期待できる。調整法としては、界面活性剤法、超高静水圧印加法などが検討されており、良好な結果が報告されている。本研究では、超高静水圧印加法により脱細胞化小口径血管を作製し、足場材料としての基礎検討を行った。【方法】ブタ頸動脈を購入し、血管周囲の脂肪を除去した。その後、超高静水圧印加法により脱細胞化小口径血管を調整した。脱細胞化組織の評価として、組織学的評価、力学試験による物性評価を行うことで、脱細胞化小口径血管の応用可能性を検討した。【結果と考察】兆構成水圧印加法により頸動脈からの細胞除去が可能であった。また、従来の界面活性剤法より高い細胞除去効率を有していることが確認された。組織学的評価では、脱細胞化処理による構造変化が抑制されていることが観察された。しかし、力学的評価より、脱細胞化による物性変化が認められたが、生体内での使用が可能な力学的強度を有していることが確認された。以上より、脱細胞化小口径血管の人工血管としての応用可能性が示唆された。

## ワークショップ WS-5

脱細胞化技術を用いた異種角膜組織からの移植・再生医療用角膜の開発

船本誠一<sup>1) 3)</sup>、佐々木 秀次<sup>2)</sup>、橋本良秀<sup>1)</sup>、服部晋也<sup>3)</sup>、本田貴子<sup>3)</sup>、藤里俊哉<sup>4)</sup>、望月 学<sup>5)</sup>、木村剛<sup>1)</sup>、小林尚俊<sup>3)</sup>、岸田晶夫<sup>1)</sup>

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) 東京都立広尾病院 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 工学部、5) 東京医科歯科大学 医学部附属病院 眼科

【目的】組織工学的手法を用いた角膜組織の構築技術は、透明性を失った角膜の修復や、不足している角膜移植の材料開発として注目されている。現在までに、失明に陥る角膜疾患の治療材料の1つとして、種々の人工角膜の開発が行なわれてきたが、生体物性の相違などから臨床使用において満足のいく結果は得られていない。そのため、角膜全層の再生が期待されており、角膜上皮においては再生技術が確立されつつあるが、角膜の約90%を占める実質部の再生には未だ至っていない。そこで、角膜実質部としてブタ角膜組織より細胞を除去した脱細胞化角膜の開発とその有効性を検討した。

【方法】成体ブタ眼球から角膜を採取した。超高圧印加装置を用いて10,000気圧の超高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。脱細胞化組織の評価は、組織学的観察、残存DNAの定量、電子顕微鏡観察等で行なった。さらに、日本白色家兎を用いた異種移植実験を行ない角膜実質の透明性および炎症反応などを検討した。

【結果・考察】超高圧処理した角膜では、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。移植実験では、未処理角膜においては拒絶反応が観察された。一方、脱細胞化角膜では、軽微な炎症反応を認めたが、透明性を維持しつつ周囲組織に定着し、長期実験においても安定した結果が得られた。以上より脱細胞化角膜の移植・再生医療用角膜としての有用性が示唆された。

[Print this Page](#)

1 Genetics and Gene Expression  
2 Development

3 Physiology and Pathology  
4 Processing and Perception

5 Inflammation, Infection, and Ischemia

6 Degenerations, Dystrophies, and Death

7 Repair, Regeneration, and Restoration

8 Imaging and Other Methods  
9 Diagnosis and Treatment

## Presentation Abstract

Program#/Poster#: 1509/A419

Abstract Title: **Novel Scaffold for Artificial Cornea Prepared by Decellularization of Cornea Using Ultra-high Hydrostatical Pressurization Treatment**

Presentation Start/End Time: Monday, May 04, 2009, 8:30 AM -10:15 AM

Location: Hall B/C

Reviewing Code: 175 corneal reconstruction - CO

Author Block: *S. Sasaki*<sup>1,2</sup>, *S. Funamoto*<sup>3</sup>, *Y. Hashimoto*<sup>3</sup>, *T. Kimura*<sup>3</sup>, *T. Honda*<sup>4</sup>, *S. Hattori*<sup>4</sup>, *H. Kobayashi*<sup>4,3</sup>, *A. Kishida*<sup>3</sup>, *M. Mochizuki*<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departments of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Hiroo Hospital, Shibuya-ku Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Keywords: 485 cornea: stroma and keratocytes, 738 transplantation

Abstract Body: **Purpose:** To evaluate the biocompatibility of corneal stroma prepared by decellularization of cornea using ultra-high hydrostatical pressurization (UHP) treatment. **Methods:** Porcine corneal stroma was decellularized by the ultra-high hydrostatical pressure method. Hematoxylin-eosin (H-E) staining was performed to confirm the removal of the corneal cells. Then a 6-mm-diameter decellularized porcine corneal stromal disc was implanted into rabbit corneal pocket with a 2-mm-diameter window. Six months later, the rabbit eye was enucleated to examine the inflammation and the progress of the rabbit epithelium over the porcine corneal stromal disc. **Results:** Complete removal of cells was confirmed by histopathological examination in UHP-decellularized corneal stroma. Only little inflammation was observed when UHP-decellularized porcine corneal stroma was implanted into rabbit corneal pocket. Surprisingly, it was covered with rabbit corneal epithelium. **Conclusions:** UHP-decellularized corneal stroma has extremely high biocompatibility and is a possible candidate of corneal scaffold for artificial cornea.

Commercial Relationships: **S. Sasaki**, None; **S. Funamoto**, None; **Y. Hashimoto**, None; **T. Kimura**, None; **T. Honda**, None; **S. Hattori**, None; **H. Kobayashi**, None; **A. Kishida**, None; **M. Mochizuki**, None.

Support: Grants-in-Aid 1700503

## Construction of a Collagen Matrix Designed for Regeneration of Physical and Biological Property of Native ECM

K. Nam<sup>1,2</sup>, T. Kimura<sup>1,2</sup>, S. Funamoto<sup>1</sup>, A. Kishida<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-Surugadai 2-3-10, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

<sup>2</sup>Japan Science and Technology Agency, CREST, Sanbancho 5, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

Keywords: collagen; *in vivo*; tissue engineering, extracellular matrix

### Introduction

Application of collagen matrix for the regenerative medicine starts from regenerating the physical and biological properties of native extracellular matrix (ECM). However, the regeneration of properties of ECM has not been succeeded yet. Structurally, the collagen matrices such as collagen gel or sponge, which is often used in the regenerative medicine, is different from that of native ECM. This makes it difficult to regenerate the physical and biological properties of native ECM. In this study, we report on preparation and characterization of the collagen matrix which possesses the similar structure to that of native ECM using fibrillogenesis technique (Gross and Kirk, 1958).

### Materials and Method

Bovine collagen type I aqueous solution (KOKEN, Japan) was used to prepare a collagen matrix. The collagen aqueous solution was inserted into a dialysis cassette and was put into the NaCl 0.9wt% aqueous solution to execute fibrillogenesis of collagen. After 24 hrs, the dialysis cassette was taken out from the aqueous solution and the collagen matrix was obtained (wet collagen matrix). This collagen matrix was air-dried for 48 hrs to obtain a dried collagen matrix (dry collagen matrix). The dry collagen matrix was put into water before executing characterization. The physical and biological characterization of the collagen matrices was executed in order to confirm a collagen matrix structure which resembles that of native ECM.

### Results and Discussion

The collagen aqueous solution would precipitate in NaCl 0.9wt% aqueous solution due to the fibrillogenesis. The SEM image of the wet collagen matrices showed that the matrix is consisted of microfibrils entangled with each other. The microfibrils possesses fibril band with thickness of approximately 67nm, which implies that regulated *D*-periodicity was obtained. This result is important in the aspect

that unregulated *D*-periodicity may cause the cardiovascular-related diseases (Starborg *et al.*, 2008). In the case of dry collagen matrix, the microlayers, which is thought to be formed by the slow evaporation was shown. The regulated *D*-periodicity was observed, implying that the air drying process did not affect the microstructure of the collagen matrix. This macrolayer of the dry collagen matrix was similar to that of native ECM (Figure. 1).

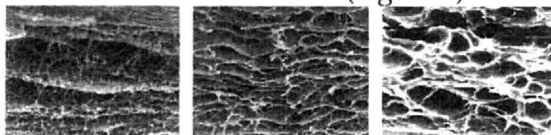


Figure 1. (From right) SEM images of a dry collagen matrix, a native ECM, and a collagen gel.

The mechanical strength of the dry collagen matrix showed that toughness can be achieved. The chemically cross-linked collagen shows rigid and brittle elongational modulus. In the case of dry collagen matrix, the elongation modulus increased approximately 9 times compared to that with collagen gel. Since the cross-linker was not used, the strain % was extended approximately 2 times from that of cross-linked collagen gel. The collagen matrices were degraded by collagenase, implying that the toughness is not due to the cross-linking, but it is the specific character of microfibrils. We will be reporting on biological properties of collagen matrix *in vitro* and *in vivo*.

### Conclusion

The construction of a collagen matrix which possesses the structural resemblance to the native ECM was successful. The physical property of the collagen matrix was much tougher than that of collagen gel, due to the formation of the microfibrils.

Gross, J., Kirk, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 355-360.

Starborg, T., Lu, Y., Meadows, R.S., Kadler, K.E., Holmes, D.F. (2008). *Methods.* 45, 53-64.