

130 Different Host Responses to Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds for Tissue Engineering

Tomo Ehashi^{1,2} and Tetsuji Yamaoka^{1,2*}

¹*Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute;*

²*JST-CREST; 5-7-1, Fujishiro-dai Suita, Osaka, Japan*

Host response to biomaterials significantly affect on the tissue regeneration by scaffold implantation. It is well known that chronic inflammation and material encapsulation severely disturb functional cell infiltration and reconstruction of proper tissue. However, it is unknown which early host responses can be useful for predicting successful tissue regeneration. To investigate their relationship, two kinds of biodegradable materials were implanted subcutaneously in rats. High molecular weight PLLA discs or PLLA/PEG block copolymer discs were used as hydrophobic or hydrophilic material, respectively. The encapsulation thickness, number of migrated neutrophils, and cytokine expression levels around the material were evaluated for one month. Encapsulation thickness around the hydrophobic disc was remarkably higher than that around hydrophilic disc. Neutrophil migration to hydrophobic disc was constantly increased during the experimental period, although transient increase during 1 week after implantation was observed at hydrophobic disc. Four types of cytokines associated with promotion or inhibition of inflammation or wound healing were evaluated by realtime PCR. All types of cytokine around hydrophilic disc were significantly low, and the material is thought to be less recognized by host immunity. In the case of hydrophobic material implantation, both pro-wound healing/pro inflammation and anti-wound healing/anti inflammation type cytokines were highly expressed during 1 week after operation. Such cytokine expression pattern may be related to hydrophobic material-induced encapsulation and constant neutrophil migration which disturb tissue regeneration. Therefore, successful regeneration can be predicted by early expressions of anti wound healing/pro inflammation or pro-wound healing/anti inflammation type cytokine, and material modification is needed to induce such cytokine expressions.

246 Novel Approach for Artificial Cornea Using Decellularized Cornea Prepared by Ultra High Hydrostatic Pressure.

Hisatoshi Kobayashi,^{1*} Shinya Hattori,^{1,5} Seiichi Funamoto,² Yoshihide Hashimoto,² Tsuyoshi Kimura,² Shuji Sasaki,³ Manabu Mochizuki,³ Toshiya Fujisato,⁴ Takako Honda,^{1,5} and Akio Kishida²
¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Ibaraki Japan, ²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, ³Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, ⁴Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan, ⁵Japan Health Science Foundation, Tokyo, Japan
(*KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp)

To recover from corneal blindness, corneal transplantation is the most ongoing method at present day. However, many patients who have corneal trouble are waiting for corneal transplantation because of donor shortage. Therefore, artificial corneas have been studied based on various materials and concepts. Unfortunately, each artificial cornea has respective problems. Especially, there are no artificial corneas that can regenerate the corneal stromal portion. Recently, decellularized tissues are attempted to use for tissue regenerative scaffold. Decellularized tissues are free from cells and antigens so that immune rejection risk will be suppressed. Moreover, if structure of extracellular matrix can keep after decellularization process, it will be a good scaffold. Thus, we successfully fabricated a decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressure. This novel method is more safety than general method using detergents because of no risk for residues of chemicals. In this study, we investigated in vitro features of our decellularized cornea and in vivo performance. Porcine cornea was decellularized using ultra high hydrostatic pressure. After decellularization, treated corneas were examined using histological technique. Light and electron microscopy revealed that there were no cells in decellularized cornea and collagen structure in corneal stroma was maintained comparatively. For in vivo examination, 6 mm disc of decellularized cornea was made and implanted into rabbit corneal pocket with a 2 mm diameter epithelium defect. Six month after implantation, there were only few inflammation around the implanted area with newly formed epithelium above the epithelium defect site. Details will be presented and discussed.

356 Preparation and Evaluation of Acellular Small-diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method

Jun Negishi,¹ Seiichi Funamoto,¹ Tsuyoshi Kimura,¹ Toshiya Fujisato,² Tetsuya Higami,³ and Akio Kishida^{1,*}

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

²Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585 Japan

³Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine, South 1, West 16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan

(*kishida.fm@tmd.ac.jp)

Small-diameter vascular grafting is commonly performed surgical procedure for coronary bypass operation and dialysis shunt. The candidates of graft, are autogenous vessels, allogenic vessels and artificial vascular grafts, however these grafts have some problems such as necessary invasive treatment, deficiency in supply and lack of blood compatibility. So, the development of more riskless grafts is eagerly anticipated. We have reported the preparation of decellularized tissues by ultra high pressure (UHP) method. UHP method is a novel decellularized technology which accomplished the high efficiency of decellularization and sterilization effect (microorganisms are killed at 3,000 atm and almost all viruses are inactivated at 6,000 atm). Using the UHP study, we already reported that decellularization of cornea which tissue can't decellularize for detergent method. In this study, we prepared a decellularized small-diameter vessel from porcine tissue using UHP method. Porcine carotids were pressurized at 10,000 atm and 30°C for 10 min, and then immersed in culture medium containing DNase I, antibiotics for 14 days and 80% ethanol for 3 days to remove the cellular debris. The decellularized carotids were evaluated by histological study (H-E staining, EVG staining), DNA quantification, protein quantification, SEM observation and mechanical test. The decellularization was archived and the ECM structures of carotids were maintained in decellularized vessels by UHP. The mechanical property of the decellularized carotid tissue did not change throughout the process. These results indicate that the decellularized carotid by UHP method would be useful as small-diameter vascular graft for regeneration.

357 Capillary Network Tissue Engineering using Decellularized Rat Liver Bioscaffold

Yusuke Ago¹, Seiichi Funamoto¹, Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Akio Kishida^{1,*}

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

(*kishida.fm@tmd.ac.jp)

Blood supplying is one of the key factors for realizing the large-scale tissue and organ regeneration. One strategy is the use of acellular tissues which have capillary network by nature. In this study, we tried to use the decellularized liver as the capillary network matrix for nutrient and oxygen supply. The decellularizing condition and capillary network were studied.

Rat liver including its portal vein and inferior vena cava pedicle were surgically obtained from 10 weeks-old male Wistar rats by median laparotomy. Portal vein and inferior vena cava pedicle were cannulated with indwelling needle and flushed with phosphate-buffered saline (PBS) containing penicillin-streptomycin, heparin. For decellularization, the isolated rat liver was perfused with PBS containing sodium deoxycholate. The decellularization was confirmed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The 3D structure images of its capillary networks were analyzed by microCT scanning using oypalomin®300 as contrast medium.

By changing perfusing condition, the decellularized liver was prepared successfully. MicroCT analysis and the HE staining revealed that the capillary network was easily damaged by decellularization process. Under the optimal condition, the 3D structure of capillary network could be maintained, and it seemed to be possible to perfuse nutrients to surrounding tissues.

1064 Engineering Collagen Matrix to Regenerate Similar Physical and Biological Property of Native ECM

Kwangwoo Nam,^{1,2} Tsuyoshi Kimura,^{1,2} Seiichi Funamoto,^{1,2} Akio Kishida^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062, Japan

²Japan Science and Technology Agency, CREST, Tokyo 102-0075, Japan (*bloodnam_fm@tmd.ac.jp)

Most of collagen matrix which is being used in tissue engineering and regenerative medicine is gel or sponge. This type of collagen matrix is good *in vitro* cell culture, but cannot be directly used in our body, for its high inflammatory response and poor mechanical property performance. Our goal is to prepare an artificial extracellular matrix (ECM) which possesses the same physical and biological property as that of native ECM. As a first step for constructing an artificial ECM, we tried to prepare a collagen matrix with similar structure of native ECM. To achieve this goal, we executed fibrillogenesis of collagen triple helix in 0.9wt% NaCl and 0.02M Na₂HPO₄ aqueous solution using dialysis cassette. The resulting collagen matrix was composed of microfibrils which regulated *D*-periodicity. However, the collagen matrix prepared in this manner showed low mechanical strength and high swelling ratio. To make the collagen matrix much stronger, we executed air-drying to obtain a tougher collagen matrix (dry collagen matrix) which possesses viscoelastic property and high Young's modulus. The dry collagen matrix was composed of microlayers formed by the slow water evaporation. The collagen matrix showed bioinert property *in vivo*, implying that it is not recognized as the foreign substance. These results indicate that the constructing of a collagen matrix which possesses the resembling structure to that of native ECM would be able to lead us to apply the collagen in tissue engineering and regenerative medicine where the tough mechanical strength is required.

Preparation and Characterization of Collagen/Phospholipid Polymer Hybrid Gel Designed for Artificial Cornea

K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida

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

Introduction: To use a collagen gel for artificial cornea, reinforcement of physical and biological properties is required, since it is impossible to directly apply the collagen gel to an eye. We have developed a novel method to prepare an artificial cornea using a transparent collagen film. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) was used as cross-linker and ethanol/water co-solvent was used for the reaction solvent [1]. To increase the mechanical strength and to make the artificial cornea bioinert, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer, a well-known material for its blood compatibility [2], was immobilized on the collagen film-type gel. The physical and biological properties of this gel were characterized in order to investigate the possible application of the collagen gel as a new type of artificial cornea.

Materials and Methods: A transparent collagen film was fabricated ($t=0.018\text{mm}$) and was cross-linked with EDC and NHS in ethanol/water co-solvent (30% ethanol, v/v) for 24 hrs at 4°C to prepare an intrahelically cross-linked collagen film-type gel (EN gel) [3]. Poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) was cross-linked with collagen film using EDC and NHS in ethanol/water co-solvent (30% ethanol, v/v) for 24 hours at 4°C to make a MPC-immobilized collagen gel (MiC gel). 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*.

Results and discussion: EN gel and MiC gel remained transparent after the preparation procedure. In the ethanol/water co-solvent, the triple helix of the collagen did not denature. These imply that addition of ethanol would not affect the structure of the triple helix. This is because the tertiary structure of the collagen would not be affected by monohydric alcohols [1]. The cross-linking ratio was characterized by calculating the reacted amine group contents (%). Both EN gel and MiC gel showed 2-fold increase in the cross-linking ratio compared to that prepared in pH-controlled aqueous solutions. This is because the ethanol would prevent the hydrolysis of EDC and the protonation of the carboxylate anions of collagen can be prevented.

The SEM image of EN gel showed that the surface is very smooth and non-porous, while the fracture surface is porous. In the case of MiC gel, the porous structure of the fractured surface would disappear, implying that the collagen-PMA is actually blended. It is thought that the PMA has diffused into the collagen film during the cross-linking procedure.

The mechanical strength of the EN gel and MiC gel showed that the collagen gels would become brittle by the cross-linking. The strain rate for the collagen film

(stabilized in alkaline pH aqueous solution) was approximately 30%, while that for EN gel and MiC gel was less than 15%. The Young's modulus increased for the cross-linked collagen gels and showed tough behavior. This is because the cross-linking between the triple helices for EN gel and cross-linking with PMA for MiC gel has brought the brittleness of the collagen gel.

The biological property of the collagen gels was observed *in vitro* and *in vivo*. The adhesion of the cell had decreased by the polymer cross-linking, indicating that intrahelical cross-linking can suppress the cell adhesion [4]. However, it did not suppress the proliferation of the cell. For MiC gel, both cell adhesion and proliferation was suppressed due to the existence of MPC head groups [2]. The lowest cell adhesion was observed for glutaraldehyde cross-linked collagen gel (G-gel), but this was revealed to be caused by the toxicity of the glutaraldehyde. When the gels were implanted subcutaneously in rats, the chronic inflammatory response and encapsulation for collagen film and G-gel had occurred, but no significant inflammatory response for EN gel until 8 weeks of implantation and MiC gel until 24 weeks of implantation was observed (Figure 1). This implies that the MiC gel possesses bioinert property against the living tissue, which prohibited acute and chronic inflammatory reaction.

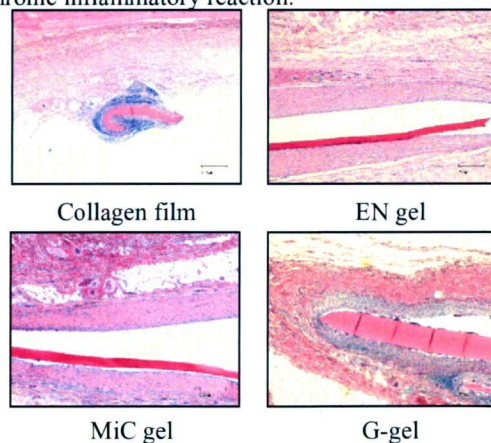


Figure 1. hematoxylin and eosin (H-E) stained histological images of the respective collagen gel after 8 weeks of implantation.

Conclusions: The high rate of MPC polymer was cross-linked with collagen microfibrils to make a transparent collagen/polymer hybrid gel. 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* making the collagen/polymer hybrid gel bioinert and suitable for artificial cornea.

References: [1] Nam K *et al.* Macromol Biosci, 8, 32, 2008. [2] Ishihara K. Sci Technol Adv Mater, 1, 131, 2000. [3] Nam K *et al.* Biomaterials, 27, 1, 2007. [4] Nam K *et al.*, Biomaterials 28, 3153, 2007.

Analysis of Host Response against Different Surface Materials for Tissue Regeneration

Tomo Ehashi^{1,2}, Tetsuji Yamaoka^{1,2*}

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, ²JST-CREST

Introduction: Host body response against scaffold biomaterials in soft tissue regeneration is different from the response against microorganisms or virus. Non specific adsorption of protein on a biomaterial surface is the most critical factor for material rejection. Host responses such as monocyte migration or collagen deposition have been investigated using some kinds of biomaterial, which surface hardly adsorb humoral proteins. However, details of responses have unsolved. It is important for successful tissue regeneration to analyse host response and to design host response-regulative scaffold. In this study, therefore, biodegradable materials were adopted as hydrophobic or hydrophilic surface biomaterials, and early host responses were investigated.

Material and Method: Poly lactic acid (PLLA) polymer and PLLA copolymerized with polyethylene glycol (PLLA/PEG) were used as hydrophobic and hydrophilic surface material, respectively. Disc shaped materials ($\phi = 6$ mm, 200-500 μm thickness) were implanted subcutaneously in rats. The implanted materials with surrounding tissue were resected up to 1 month postoperation, and the encapsulation thickness and migrated neutrophils were evaluated. Four kinds of cytokine expressions (IL-1 β , IL-6, IL-10, and TGF β) were analysed using realtime PCR.

Results: Encapsulation thickness around PLLA was significantly higher than that of PLLA gel. Number of migrated neutrophil around the PLLA increased during 1 month after operation, although the number around PLLA/PEG was higher at 1 week than 1 month postoperation. Expression pattern of four cytokines which relate to inflammation and wound healing were used to analyse expression patterns corresponding to material surface chemistry. In PLLA/PEG surrounding tissue, these cytokines scarcely expressed. On the other hands, IL-1 β and IL-10 expressed during 1 week after operation in PLLA surrounding tissue, and these expressions dramatically decreased afterwards.

Discussion: Excessive material encapsulation and long-term neutrophil migration disturb tissue regeneration. Considering from these points, PLLA/PEG is expected to be more optimal material than PLLA. However, relation between the cytokine expression pattern and tissue regeneration could not be elucidated. Thus, analysis of diverse cytokine and chemokine expressions will be needed to find the regulatory factors which induce successful tissue regeneration.

P-114 Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat

Sachiro Kakinoki^{1, 2}, Sho Uchida^{1, 3}, Tomo Ehashi^{1, 2}, Akira Murakami³ and Tetsuji Yamaoka^{1, 2}

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan, ³Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

Autologous nerve graft has been used for treating injured nerve regeneration. However, the extraction of normal nerve lead to permanent loss of the donor nerve function, and size mismatch between the injured nerve and the graft nerve dimension is also a important problem. Therefore, artificial nerve conduits are widely accepted to bridge the gap between severed nerve stumps as an alternative for nerve transplantation. Poly (L-lactic acid) (PLA) is widely used as the substrate of nerve conduits because of its excellent biodegradability, shaping and molding properties. However, the biological activities are not inherent in PLA.

In the present experiments, amphiphilic conjugates composed of oligo (lactic acid) (OLA; 26 mers) and AG73 (RKRLQVQLSIRT) which is known to promote neurite outgrowth were used to functionalize the surface of PLA conduits. First, OLA was synthesized by direct poly condensation of lactic acid. Then AG73 was synthesized by Fmoc solid phase procedure, and OLA-AG73 conjugate was obtained by the condensation of OLA with the N-terminal of AG73. PLA/OLA-AG73 conduits (length=10 mm, inner diameter= 1.0 mm) were prepared by electrospinning procedure and implanted to the 10 mm gap of the rat peripheral nerve, and then, the immunohistochemical analysis and electrophysiological evaluation were performed after 6 months. The results suggested that the PLA/OLA-AG73 conduit enhances the nerve regeneration in comparison with PLA conduit.

[1] Weeks, BS., Nomizu, M., Ramachandran, RS., Yamada, Y., Kleinman, HK., (1998) *Exp Cell Res.*, **243**, 375-382.

[2] Kakinoki, S., Uchida, S., Ehashi, T., Murakami, A., Yamaoka, T., (2009) *Peptide Science* 2008, pp449-450.

24pmP5-2-23

石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良

○江橋 具¹⁾²⁾、佐合 満¹⁾³⁾、森反 俊幸³⁾、湊谷 健司⁴⁾、岸田 晶夫⁵⁾、藤里 俊哉¹⁾⁶⁾、山岡 哲二¹⁾²⁾、北村 惣一郎⁴⁾

¹⁾国立循環器病センター 研究所 生体工学部、²⁾JST-CREST、³⁾鈴鹿医療科学大学、

⁴⁾国立循環器病センター、⁵⁾東京医科歯科大学、⁶⁾大阪工業大学

小児領域の重篤な血管疾患に対しては、体の成長に伴って太くなる血管径に追従する、生体由来組織の移植が望ましい。我々は、超高静水圧印加処理を用いて生体由来脱細胞化血管を作製し、ブタ移植実験を重ねてきた。さらには、小児患者に顕著にみられる、血管壁の石灰化を解決する必要がある。そこで本研究は、術後の石灰化を軽減できる脱細胞化血管を開発することを目的とし、従来の脱細胞化処理法のうち、施圧時の浸漬溶液と洗浄液を検討し、石灰化抑制に及ぼす効果を調べた。このとき、石灰化の原因の一つの可能性のあるリン酸イオンを含まない溶液を使用した。ブタ大動脈壁を、PBS または生理食塩水に浸漬し、980 MPa の圧力を 10 分間施圧して細胞を破壊した。その後、細胞残渣を除去するため、PBS、あるいはリン酸を含まない数種類の溶液中でおよそ 3 週間振盪した。処理後の血管は、組織学的観察や SDS-PAGE により、残存した細胞とタンパク質の構造や成分を、各溶液間で比較した。さらに、用いた溶液が石灰化に及ぼす影響を調べるため、ラット皮下移植を行い、マイクロ CT スキャンや原子吸光度計による、組織内の石灰化量を計測した。その結果、溶液に生理食塩水を用いた場合には、良好に脱細胞化できただけでなく、皮下移植後 2 ヶ月以上経っても石灰化はほとんど認められなかった。今後、ブタ大動脈移植実験により、さらなる検証を進める必要がある。

24日
G
会場

24pmP5-2-25

脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索

○根岸 淳¹⁾、船本 誠一¹⁾、木村 剛¹⁾、藤里 俊哉²⁾、樋上 哲哉³⁾、岸田 晶夫¹⁾

¹⁾東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、²⁾大阪工業大学 工学部 生体医工学科、

³⁾札幌医科大学 第二外科

【目的】現在使用されている人工血管は、大・中口径のものは良好な結果が得られているが、小口径では未だに満足できるものは開発されていない。人工血管の研究は、合成高分子、タンパク再構築や脱細胞化など様々な方法で行われている。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、本研究では、超高静水圧印加法と界面活性剤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、血管周囲の脂肪を除去し、超高静水圧印加法と界面活性剤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い、脱細胞化小口径血管グラフトの応用可能性を検討した。【結果と考察】超高静水圧印加法、界面活性剤法により頸動脈からの細胞除去が可能であった。また、超高静水圧印加法は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、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。

24日
G
会場

25amO-23-1

電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度推定の試み

○近藤 英雄¹⁾、寺田 堂彦¹⁾²⁾、山崎 健一¹⁾、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⁾ヒューマンサイエンス振興財団

緒言：脱細胞化血管組織は再生型人工血管としての有用性が報告されており、その臨床化を実現する為には提供する組織の品質管理を確実にこなわなければならない。特に、脱細胞工程におけるドナー細胞の除去状況を非破壊的に調べる検査技術の確立は安全性の確保を行なう意味でも必要とされている。本研究は生体組織構造の推定手法として用いられている電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度の推定技術を提案し、その有用性を調べることを目的とした。実験方法：生後約6ヶ月の食用豚下行大動脈（東京芝浦臓器株式会社より購入）を熱架橋により固定化処理を行なった後、エラスターゼ処理によりエラスチン線維を分解除去した。エラスターゼ処理時間の異なる試験片を作製し、電気インピーダンス測定を行った。また、組織学的評価および生化学的評価を行い、残存細胞数と電気インピーダンスとの関係を調べた。結果および考察：酵素処理時間に伴い動脈組織の電気インピーダンスは低下し、24時間以上から平衡状態に達する傾向が見られた。組織学的評価を行った所、酵素処理24時間以上の動脈組織内に弾性線維の存在は確認されず、ドナー細胞の存在は確認されなかった。以上より、動脈組織の電気インピーダンスは組織内部の構造を捉えており、電気インピーダンス法を用いて動脈組織の構造変化に伴う脱細胞度の推定手法に応用出来る事が示唆された。

25日
D
会場

14) 生体組織類似構造を有するコラーゲン構造体の作製と物理的及び 生物学的特性検討

(¹東医歯大材研、²JST-CREST)○南 広祐^{1,2}、木村 剛^{1,2}、船本 誠一¹、岸田 晶夫^{1,2}

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

TEL: 03-5280-8156 FAX: 03-5280-8028

【緒論】 バイオマテリアルとして広く用いられているコラーゲンは人体組織の基本構成物質であり、優れた生物学的特性を有するため、種々な形で作製され人工臓器および組織工学分野で応用された。しかし、まだ、コラーゲンをを用いて生体組織の物理的・生物学的機能を再現することは困難である。その理由はコラーゲン特有の性質、分子間架橋構造の制御の不能にある。本研究では、生体組織と同じ物理的・生物学的機能を再現させ、人工臓器および組織工学分野で応用可能な新規バイオマテリアルを設計するために細胞外マトリクスの構造と表面特性に注目した。細胞外マトリクス構造は生体内での微小環境を構成する最も重要な要素であり、材料の生体組織構造や表面特性は生物学的機能と関連性があると報告されている[1,2]。

本研究グループでは、生体組織と同じ物理的・生物学的機能の再現を目的とし、水溶液中でのコラーゲン線維化 (fibrillogenesis、Figure 1) を利用し[3]、細胞外マトリクスと類似構造を有するコラーゲン構造体を作製した。本研究では、コラーゲン構造体を用いて、コラーゲン構造と物理的特性-生物学的特性の関係性に調べ、生体組織の機能を再現性よく使用目的に合致させた新規人工組織体として応用可能性を検討した。

【実験】 コラーゲン 0.5wt%と 2wt%水溶液を用意し、透析カセットの中に注入(3mL)した後、4℃で NaCl/Na₂HPO₄ 水溶液に入れ、反応させた。24 時間後、透析カセットを水で安定させた後(37℃)、コラーゲン構造体を透析カセットから出し、コラーゲン構造体(F-Coll)を得た。より緻密な構造を有するコラーゲン構造体を得るため、F-Collを48時間自然乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、薄い膜のようなコラーゲン構造体(T-Coll)を得た。コラーゲン構造体と比べるために、コラーゲン2wt%水溶液から作製したコラーゲンフィルムを pH7.4 の水溶液に入れ、24 時間安定させた(コラーゲングル)。また、架橋されたコラーゲングルを作製するために、1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)と N-hydroxysuccinimide (NHS)を用いてコラーゲンフィルムを架橋した(ENゲル)[4]。コラーゲン構造体、コラーゲングル、そしてENゲルを用いて表面特性、物理的特性と生物学的特性を調べた。

コラーゲン構造体の構造観察は、走査型電子顕微鏡(SEM)と原子間力顕微鏡(AFM)を用いて行った。コラーゲン構造体の膨潤度、収縮挙動、コラーゲナーゼによる生分解性を測定し、コラーゲングルと EN ゲルと比較した。また、機械的な物性を測定するために、引張試験機を用いて T-Coll、コラーゲングル、そして EN ゲル粘単性とヤング率を測定した。

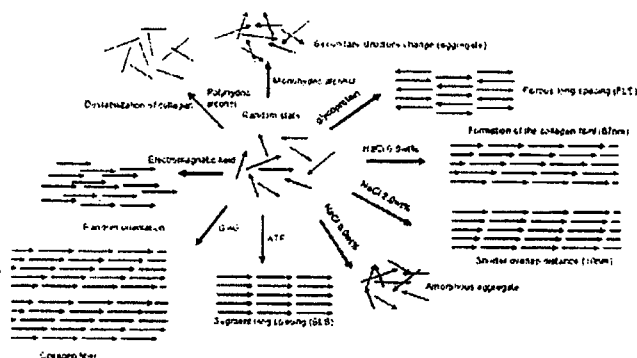


Figure 1. Schematic image of collagen fibrillogenesis and aggregation behavior in diverse solutions.

コラーゲン構造体とコラーゲングルでの細胞挙動を調べるため、L929 細胞を用いて *in vitro* 実験を行った。また、コラーゲン構造体の生体内での炎症反応を調べるため、コラーゲン構造体をラットに移植し、2週間と8週間の生体反応を観察した。

【結果と考察】 本研究グループで作製された F-coll は水溶液中で安定であり、加水分解することもなかった。表面はコラーゲン線維で構成されており (Figure 2(a))、AFM で確認した結果、フィブリルバンドが観察された。これは、NaCl と Na_2HPO_4 にとる自己組織化の影響である。また、HCl が除去され、ゲル化するため、体組織と類維構造を有する安定なコラーゲン構造体が得られる。しかし、F-Coll は高含水率を有するため、低機械的な物性を示す。

T-Coll は F-Coll と比べ、緻密な繊維構造を有するため、低膨潤度を有する (Figure 2(b))。フィブリルバンドも維持されており、乾燥による変性は見られなかった (Figure 3)。機械的物性を測定した結果、高い機械的物性と粘弾性を同時に有することが分かった (Figure 4)。コラーゲルゲルの場合、低機械的物性と粘弾性を有する。また、EN ゲルの場合、コラーゲルゲルと比較し、高い機械的物性を有しているものの、架橋効果により粘弾性を失う。これは、緻密なコラーゲン線維化による効果であり、また、低膨潤度を有するためであると考えられる。

コラーゲン線維の形成により、コラーゲン構造体の収縮温度に変化が生じた。コラーゲルゲルの場合、収縮温度が約 45°C であるものの、F-Coll は 55°C 、T-Coll は約 65°C である。これは、温度によるコラーゲントリプルヘリックスの変性には高いエネルギーを要求することを示す。しかし、コラーゲナーゼによる生分解性はコラーゲルゲルと比べ、大きな差は見られなかった。これは、コラーゲン構造体内のコラーゲントリプルヘリックス構造は維持されていることと化学的に架橋されていないを示している。これは、機械的な物性の増加は線維化による現象であることを意味する。

F-Coll と T-Coll の *in vitro* 実験結果と動物移植実験結果についても報告する。

【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 の補助を受けて行われた。

【参考文献】

- [1] R. Warren Sands and D.J. Mooney, *Curr. Opin. Biotech.* 2007, 18, 448. [2] C. Yip, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 961, 109. [3] J. Gross and D. Kirk, *J. Biol. Chem.* 1958, 233, 355. [4] K. Nam et al., *Acta Biomater.* In press.

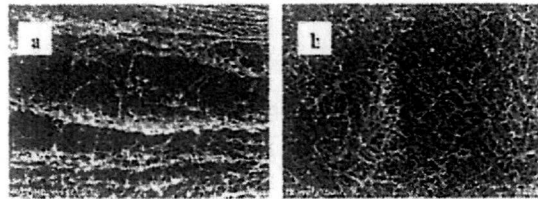


Figure 2. SEM images of collagen matrices. (a) T-Coll and (b) F-Coll.

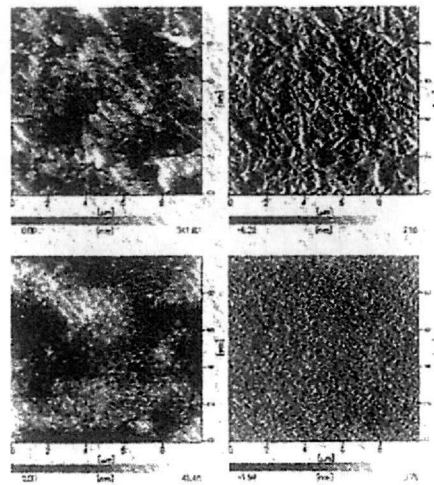


Figure 3. AFM images of collagen matrices (T-Coll, upper) and collagen gel (below).

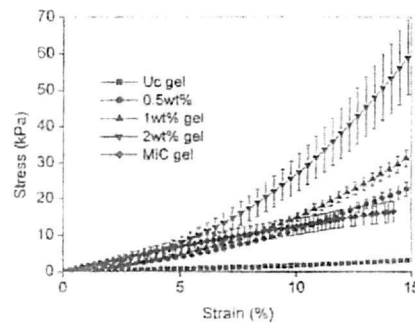


Figure 4. The stress-strain curve for the physically crosslinked gel, chemically crosslinked gel, and T-Coll.

15) 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の有用性

(ヒューマンサイエンス振興財団、物質材料研究機構) ○服部晋也
〔船本誠一・東京医科歯科大学、橋本良秀・東京医科歯科大学、
木村剛・東京医科歯科大学、佐々木秀次、東京医科歯科大学眼科、
望月學・東京医科歯科大学眼科、
本田貴子・物質材料研究機構、藤里俊哉・大阪工業大学
岸田晶夫・東京医科歯科大学、小林尚俊・物質材料研究機構〕
e-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp
電話 029-860-4495 FAX 029-859-2247

【緒言】

角膜移植希望患者に対するドナーの数が世界的に不足しており、さらに、角膜移植を行っても、免疫拒絶による移植物の脱落などのリスクがあるために、人工角膜の開発や再生医療技術による角膜再生が検討されている。現在では上皮細胞シートを用いた角膜上皮再生など臨床応用に達している技術もある一方、角膜実質部を再生させる技術はいまだ臨床に足るものが完成されていない。角膜実質部は整然と一方向に配行した線維から成る線維束が格子状に配列するきわめて精密で特殊な組織構造をとっており、この組織構造が角膜の透明性に深く関与していると考えられている。それ故に角膜実質再生を目指す材料には正常角膜実質が持つ複雑な構造に類似した構造を有することが望ましい。そこで我々は正常組織より細胞成分を排除し、得られた細胞外基質を組織代替物として用いる脱細胞化法に着目し、角膜実質再生の材料として用いることができるのではないかと考えた。一般的な組織の脱細胞化には界面活性剤を用いた処理が施されることが多いが、処理後の薬剤の残存による細胞毒性などのリスクがある。我々はより生体にとって安全な超高静水圧印加処理による脱細胞化組織の作成に成功した¹⁾。この方法で脱細胞化した角膜は組織構造の変化を抑えたまま脱細胞することが可能で、処理後の組織は白濁するものの、ウサギ角膜実質内に移植した後、経時的な脱細胞化組織の透明性の回復が認められた。本研究では、超高圧印加処理により作成した脱細胞化角膜のより詳細な微細構造評価および、より臨床応用に近い動物実験を通し、角膜再生のための足場材料としての有用性を検討した。

【実験】

角膜は成体ブタ眼球（東京芝浦臓器、東京）の角膜輪部に沿って眼科用メスで切開し、採取した。得られた角膜は3.5% w/v Dextran（東京化成工業、東京）、100 units/ml penicilin および0.1 mg/ml streptomycin を含むPBS（DEX/PBS）にて洗浄した。界面活性剤による脱細胞化は1% w/v Triton-X 100（Sigma、東京）およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（Wako、大阪）に採取角膜を浸漬し、37℃にて24時間振盪処理を行い、DEX/PBSにて48時間、振盪洗浄を行った。超高圧印加処理（UHP）による脱細胞化法では、冷間等方加圧装置（Dr. CHEF、神戸製鋼）を用いて、10℃において10000気圧の超高圧印加処理を10分間行った後、直ちに3.5% w/v Dextran 0.2 mg/ml DNase I、100 units/ml penicilin および0.1 mg/ml streptomycin を含むEGM-2培地（三光純薬、茨城）にて37℃、72時間、振盪洗浄を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角膜は超微細構造変化を調査するためにエポキシ樹脂に組織を包埋後、70nmの超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡（LEO-922、

Carl Zeiss, Germany) で観察した。また、UHP を用いて作成した脱細胞角膜に関してはウサギ角膜上皮に直径 2mm の上皮欠損を作成し、その下部の角膜実質に直径 6mm の脱細胞化角膜を移植する実験を行い術後 6 ヶ月における組織学的な評価を行った。

【結果とまとめ】

通常の組織学的検討を行った結果でも、界面活性剤を用いて脱細胞を行った角膜組織では細胞の残存が確認されて、Triton-X 100 ではコラーゲン線維間の間隙増大、SDS では、著しい膨潤が起こり、角膜としての形状維持が難しいほどに変性していることが伺われた。今回の超微細構造の調査により、Triton-X-100 で脱細胞を施した角膜組織はコラーゲン線維の直径は一定であったが同一線維束内でのコラーゲン線維の走行方向の乱れ、コラーゲン線維束間の間隙の拡大および細胞残渣のような構造物が観察され、SDS を用いての脱細胞化角膜ではコラーゲン線維束の構造は著しく破壊されている上に、細胞残渣のような構造物が観察され、組織学的検討結果と同じく、十分な脱細胞がなされぬまま組織構造が破壊されていることが分かった。一方の UHP を用いて脱細胞化を施した角膜では、通常の組織観察ではコラーゲン線維の走行の大きな乱れや細胞成分は観察されなかった。超微細構造評価においても、角膜実質内での線維束内でのコラーゲン線維の走行方向の乱れおよびコラーゲン線維束間の間隙は界面活性剤を用いて脱細胞化を施した組織よりも軽度で正常組織に近い組織構造を呈し、且つ細胞残渣のような構造物は観察されなかった。よって UHP を用いて脱細胞化処理を行った角膜組織は超微細レベルにおいても組織の構造を維持しつつ完全な脱細胞を行えることが明らかとなった。

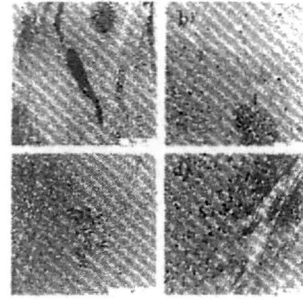


図1 脱細胞化処理後の角膜の超微細構造
a) 正常角膜 b) Triton-X 100
c) SDS d) UHP

ウサギ角膜上皮に 2mm の欠損を作成し、その下部に直径 6mm の UHP により作成した脱細胞化角膜を移植した実験では、3羽中 2羽で術後の血管侵入など、顕著な炎症反応は起こらなかった。上皮組織欠損部は術後 2 週の段階ではほぼ新生上皮組織によって覆われ、術後 8 週の段階では移植した脱細胞化角膜はほぼ透明になっていた。術後 6 ヶ月においても、周辺組織に炎症などの反応は見られず、正常組織に近い組織構造を呈していた。

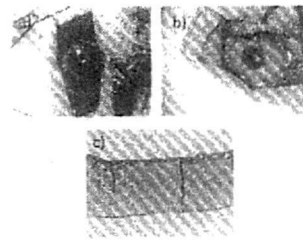


図2 コラーゲンの移植実験
a) 移植直後 b) 術後2か月
c) 術後6か月におけるPAS染色

これらの結果から、UHP を用いて作成した脱細胞化角膜は、超微細レベルにおいても正常角膜に類似した組織構造を保持しつつ完全な脱細胞化が行われ、且つ、上皮の再生も材料上になされたことから UHP による脱細胞化角膜の角膜再生のための足場材料としての有用性が示された。

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。

【参考文献】

1) Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S, Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. 2005.

高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み - 高次構造の組織反応に及ぼす影響を中心に -

ヒューマンサイエンス振興財団¹・物材機構生体セ²・東医歯大生材研³

東医歯大眼科⁴・阪工大院工⁵

○服部晋也^{1,2}・松本誠一³・橋本良秀³・木村剛³・佐々木秀次⁴・望月學⁴

本田貴子^{1,2}・藤里俊哉⁵・岸田晶夫³・小林尚俊²

[緒言] 角膜実質部の精密なコラーゲン線維束の組織構造は角膜の透明性に深く関与するため、角膜実質再生を目指す材料には正常角膜実質が持つ複雑な構造に類似した構造を有することが望ましい。我々は一般的な界面活性剤を用いた脱細胞化よりも生体にとって安全な超高静水圧印加処理 (UHP) による脱細胞化組織の作成に成功した¹⁾。この方法で脱細胞化した角膜は処理後の組織構造変化が界面活性剤で脱細胞したものよりも抑えられていることが微細構造の調査により判明した。本研究では、UHPにより作成した脱細胞化角膜を、角膜上皮を欠損させたウサギ角膜に移植することにより、高次構造を維持した脱細胞化角膜が組織再生反応に与える影響を調査した。

[実験] ブタの眼球より角膜を採取し、洗浄後、冷間等方加圧装置 (神戸製鋼、神戸) を用いて、10℃において10000気圧の超高圧印加処理を10分間行った後、直ちにDNase I、デキストランおよび抗生物質を含むEGM-2培地にて37℃、72時間、振盪洗浄を行った。得られた脱細胞角膜は、ウサギ角膜上皮に直径2mmの上皮欠損を作成し、その下部の角膜実質に直径6mmの脱細胞化角膜を移植する実験を行い術後の経時観察を行うとともに術後6ヶ月においての組織学的な評価を行った。なお上皮の再生状況を確認するためにフローレス試験紙 (昭和薬品化工、東京) を用いて観察した。

[結果と考察] 移植手術を行った3検体のうち2羽においては、術後の移植体内への血管侵入など顕著な炎症反応を認めず、術後2週の段階で上皮欠損部位は新生上皮組織によって覆われた。術後8週の段階では移植した脱細胞化角膜はほぼ透明になっていた。術後6ヶ月においても、周辺組織に炎症などの反応は見られず、正常組織に近い組織構造を呈していた。残りの血管侵入が生じた検体においても、術後6ヶ月までに血管が完全に消退することはなかったが、グラフト内の血管進入部以外の部位では経時的な透明性の回復を認め、術後6ヶ月においてはわずかに残存している血管侵入部以外は非常に高い透明性を示していた。これらの結果から、UHPを用いて作成した高次の組織構造が保たれた脱細胞化角膜は術後早期より材料上への上皮組織再生、透明性の回復が達成でき、且つ術後その再生組織が維持されることが示され、臨床応用可能な材料である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。

[1] Fujisato T. et al. Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. 2005.

Evaluation of decellularized cornea prepared by ultra-high hydrostatic pressure for clinical use . -Influence of the higher order structure to histological responses-

Shinya HATTORI^{1,2}, Seiichi FUNAMOTO³, Yoshihide HASHIMOTO³, Tsuyoshi KIMURA³, Shuji SASAKI⁴, Manabu MOCHIZUKI⁴, Takako HONDA^{1,2}, Toshiya FUJISATO⁵, Akio KISHIDA³, Hisatoshi KOBAYASHI²
(¹Japan health sciences foundation, 13-4 Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo, JAPAN, ²Biomaterials center, National Institute for Materials Science, 1-2-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, ³Institute for biomaterials and bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chuo-ku, Tokyo Japan, ⁴Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo, Tokyo, Japan, ⁵Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Akashi, Osaka, Japan)

²Tel: +81-29-860-4495, Fax: +81-29-860-4715, E-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

Key Word: Artificial cornea, decellularized tissue, ultra-high hydrostatic pressure

Abstract: Using ultra-high hydrostatic pressure, decellularization of cornea was accomplished with low structural deformation rather than detergent decellularization. This material may be a good scaffold for corneal stroma. In this study, we evaluate the influence of the higher order structure to histological responses using animal implantation model.

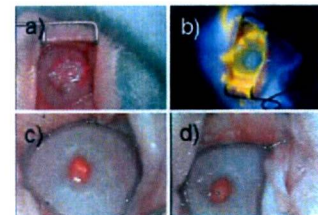


Figure 1 Gross observation of operated animals
1 Immediately after operation
2 Two weeks after operation
3 Eight weeks after operation
4 Six months after operation

種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析

東医歯大生材研¹・大工大生医工²・物材生体セ³○木村剛^{1,3}・橋本良秀^{1,3}・船本誠一^{1,3}・南広祐¹・藤里俊哉²・小林尚俊³・岸田晶夫^{1,3}

【緒言】細胞の足場となるスキャフォールドの調製には、コラーゲンやポリ乳酸などの高分子を3次元にビルドアップする手法と生体由来組織から細胞のみを除去した残存マトリックス（脱細胞化組織）を用いる方法がある。我々は、脱細胞化組織が生体特有の微小環境を有する点に着目し、超高压印加により細胞を破壊し洗浄により残渣を除去する超高压脱細胞化法を開発した。本手法は、従来の界面活性剤洗浄法に比して細胞毒性が低く、また、細胞外マトリックスの変性抑制が可能である。本研究では、種々の超高压脱細胞化組織（骨・骨髄、角膜、血管）での細胞培養と細胞機能解析を行った。

【実験】生体ブタ由来の大腿骨・骨髄、角膜、大動脈を用い、超高压処理（10000気圧、15分間）を施した後、所定時間の洗浄処理により脱細胞化組織を得た。また、界面活性剤洗浄法によっても脱細胞化組織を調製した。得られた脱細胞化組織のヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色、SEM観察、DNA定量により脱細胞化を確認した。脱細胞化組織上に様々な細胞（MC3TC-E1、HUVEC、ラット由来骨髄細胞、神経細胞など）を播種し、ギムザ染色、SEM観察、顕微鏡観察により細胞形態、細胞接着性を評価し、DNA定量により細胞増殖性を評価した。

【結果】超高压脱細胞化法では、いずれの組織においても、超高压印加条件・洗浄条件を最適化することで生体構造を維持した脱細胞化が可能であった。一方、界面活性剤洗浄法では、十分に脱細胞化されない組織、脱細胞化されても生体構造が維持されない組織があった。得られた脱細胞化組織への細胞播種では、いずれの超高压脱細胞化組織においても良好な細胞接着が確認できた。一例として、超高压脱細胞化血管の内皮側にHUVECの播種した場合、ギムザ染色、H-E染色、SEM観察により血管内皮側の表面全面への単層状態での接着と増殖が確認できた。一方、界面活性剤法では、十分に細胞が接着されない場合や細胞毒性が示される場合があり、残存した界面活性剤が細胞接着に影響したと考えられる。細胞の増殖性については、用いる脱細胞化組織と細胞との組み合わせによって異なる増殖挙動が示された。また、脱細胞化法の違いによっても細胞増殖挙動に違いが示された。細胞分化については、培養シャーレ上での分化誘導に比して、超高压脱細胞化組織上における効率良い分化が示される場合もあった。以上の結果について、詳細に発表する。

【謝辞】本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金の助成を受けて行われた。

Cell culture on various decellularized tissues prepared by ultra-high hydrostatic pressure processing

Tsuyoshi KIMURA^{1,3}, Yoshihide HASHIMOTO¹, Seiichi FUNAMOTO^{1,3}, Kwangwoo NAM¹, Hisatoshi KOBAYASHI³, Toshiya FUJISATO² and Akio KISHIDA¹.

(¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, ² Osaka Institute of Technology, ³ National Institute for Materials Science), Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Words: decellularized tissue / high pressure / cell culture

Abstract: Various tissues, such as bone/bone marrow, cornea and vessel, were decellularized by ultra-high hydrostatic pressure treatment. The decellularization of them was confirmed by H-E staining, SEM observation and DNA quantification. The several cultured cells, such as MC3TC-E1, HUVEC, rat BMC and NSC, were seeded on the decellularized tissues. The cellular functions, such as adhesive, proliferation and differentiation, were investigated.

生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製

(東京医歯大生材研, JST-CREST) ○南 広祐^{1,2}, 船本 誠¹, 木村 剛^{1,2}, 岸田 晶夫^{1,2}

E-mail: bloodnam_fm@tmd.ac.jp

TEL: 03-5280-8156 FAX: 03-5280-8028

【結論】 バイオマテリアルとして広く用いられているコラーゲンは人体組織の基本構成物質であり、優れた生物学的特性を有するため、種々な形で作製され人工臓器および組織工学分野で応用された。しかし、角膜、腱、心膜など、まだ、コラーゲンをを用いて達成できていない構造体がある。その理由はコラーゲン特有の性質、分子間架橋構造の制御の不能にある。本研究では、生体組織と同じ物理的・生物学的機能を再現させ、人工臓器および組織工学分野で応用可能な新規バイオマテリアルを設計するために細胞外マトリクスの構造と表面特性に注目した。細胞外マトリクス構造は生体内での微小環境を構成する最も重要な要素であり、材料の生体組織構造や表面特性は生物学的機能と関連性があると報告されている[1,2]。

本研究グループでは、生体組織と同じ物理的・生物学的機能の再現を目的とし、Figure 1 に示したような水溶液中での塩とグリコサミノグリカンによるコラーゲン線維化 (fibrillogenesis) を利用し[3]、細胞外マトリクスと類似構造を有するコラーゲン構造体を作製した。本研究では、コラーゲン構造体を用いて、コラーゲン構造と物理的特性-生物学的特性の関係性に調べ、生体組織の機能を有するコラーゲンマトリクスを、再現性よく使用目的に合致させた新規人工組織体として応用可能性を検討した。

【実験】 コラーゲン 0.5wt%と 2wt%水溶液を用意し、透析カセットの中に注入(3mL)した後、4℃でNaCl/Na₂HPO₄水溶液に入れ、反応させた。24 時間後、透析カセットを水で安定させた後(37℃)、コラーゲン構造体を透析カセットから出し、コラーゲン構造体(F-Coll)を得た。より緻密な構造を有するコラーゲン構造体を得るため、F-Collを48時間自然乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、薄い膜のようなコラーゲン構造体(T-Coll)を得た。コラーゲン構造体と比べるために、コラーゲン2wt%水溶液から作製したコラーゲンフィルムをpH7.4の水溶液に入れ、24時間安定させた(コラーゲングル)。また、架橋されたコラーゲングルを作製するために、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)とN-hydroxysuccinimide (NHS)を用いてコラーゲンフィルムを架橋した(ENゲル)[4]。コラーゲン構造体、コラーゲングル、そしてENゲルを用いて表面特性、物理的特性と生物学的特性を調べた。

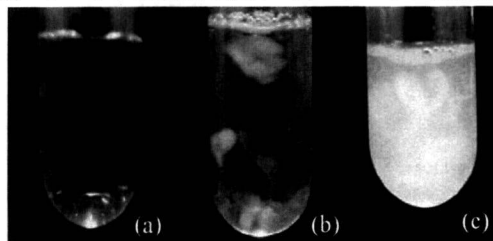


Figure 1. The collagen aqueous solution (a) and fibrillized collagen aqueous solutions in (b) NaCl/Na₂HPO₄ aqueous solution and (c) heparin aqueous solution.

Preparation of collagen matrix possessing properties of native tissue

Kwangwoo NAM^{1,2}, Seiichi Funamoto¹, Tsuyoshi KIMURA^{1,2}, and Akio KISHIDA^{1,2}¹Division of Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²JST-CREST)

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

Key Word: collagen / elasticity / in vivo study

Abstract: To prepare an artificial extracellular matrix (ECM) which possesses the same physical and biological properties as that of native ECM, we executed fibrillogenesis of collagen molecules in NaCl and Na₂HPO₄ aqueous solution using dialysis cassette. The resulting collagen matrix was composed of microfibrils with regulated D-periodicity. The Young's modulus was shown to be much tougher than that of conventional collagen gel, which is consists of triple helix aggregates. The in vivo study using subcutaneous implanted to rats showed that the collagen matrix would be bioinert, while the conventional collagen gel showed high degree of inflammatory response. These results imply that it is possible to control the physical and biological properties of collagen matrix by mimicking the native tissue structure via fibrillogenesis.

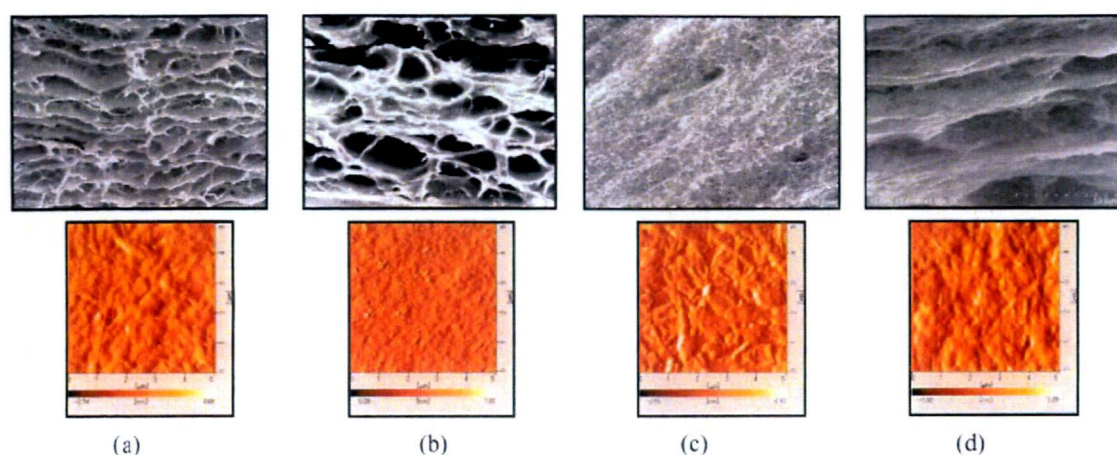


Figure 2. SEM images and AFM images of (a) native tissue, (b) collagen gel, (c) F-Coll, and (d) T-Coll.

コラーゲン構造体の構造観察は、走査型電子顕微鏡(SEM) 原子間力顕微鏡(AFM)を用いて行った。コラーゲン構造体の膨潤度、収縮挙動、コラゲナーゼによる生分解性を測定し、コラーゲンゲルと EN ゲルと比較した。また、機械的な物性を測定するために、引張試験機を用いて T-Coll、コラーゲンゲル、そして EN ゲル粘単性とヤング率を測定した。コラーゲン構造体とコラーゲンゲル炎症反応を調べるために、コラーゲン構造体をラットに移植 2 週間と 8 週間の生体反応を観察した。

【結果と考察】 本研究グループで作製された F-Coll は水溶液で安定であり、加水分解することもなかった。表面はコラーゲン線維で構成されており(Figure 2)、AFM で確認した結果、フィブリルバンドが観察された。これは、NaCl と Na_2HPO_4 にとる自己組織化の影響である。また、HCl が除去され、ゲル化するため、体組織と類似構造を有する安定なコラーゲン構造体が得られる。

T-Coll は F-Coll と比べ、緻密な繊維構造を有するため、低膨潤度を有する。フィブリルバンドも維持されており、乾燥による変性は見られなかった(Figure 2(d))。機械的物性を測定した結果、高い機械的物性と粘単性を同時に有することが分かった。コラーゲンゲルの場合、低機械的物性と粘単性を有する。また、EN ゲルの場合、コラーゲンゲルと比較し、高い機械的物性を有しているものの、架橋効果により粘単性を失う。これは、緻密なコラーゲン線維化による効果であり、また、低膨潤度を有するためであると考えられる。

F-Coll と T-Coll の動物移植実験結果、コラーゲンゲルの場合、炎症反応が確認されたものの(Figure 3(b))、生体組織と F-Coll、T-Coll では炎症反応が確認されていなかった(Figure 3(a),(c),(d))。また、T-Coll を移植した場合、カプセル化とマトリクスの分解が抑えられることも発見した。これは、コラーゲン構造に起因すると考えられ、3 次構造と 4 次構造制御により、生体反応をコントロールが可能であることを示唆しているとともに、生体組織類似構造を作製することにより、生体組織と近い物理的特性と生物学特性を発現させると考えられる。

【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の補助を受けて行われた。

【参考文献】 [1] R. Warren Sands and D.J. Mooney, *Curr. Opin. Biotech.* 2007, **18**, 448. [2] C. Yip, *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2002, **961**, 109. [3] J. Gross and D. Kirk, *J. Biol. Chem.* 1958, **233**, 355. [4] K. Nam et al., *Acta Biomater.* In press.

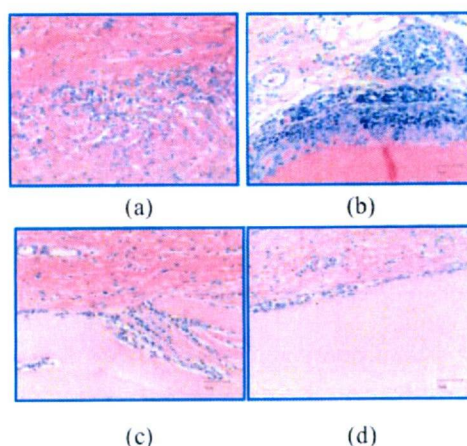


Figure 3. H-E stained histological images of (a) cornea, (b) collagen gel, (c) F-coll, and (d) T-Coll after 8 weeks.

高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料

物材機構¹, ヒューマンサイエンス振興財団², 東京医科歯科生材研³, 東京医科歯科眼科⁴, 大工大院工⁵,
 ○小林尚俊¹, 服部晋也², 本田貴子², 船本誠一³, 佐々木秀次⁴, 橋本良秀³, 藤里俊哉⁵, 寺田堂彦¹, 木村
 剛³, 望月學⁴, 岸田晶夫³

【緒言】 角膜が受傷したとき、角膜機能は代替角膜を使用して回復することができる。現在の治療における第一選択は角膜移植である。しかし、日本では、毎年施行される角膜移植の数は2000を下回る程度であり、慢性的なドナー不足の状態が続いており、未治療患者を角膜疾患に由来する失明から救うためには、信頼性の高い代替角膜の開発が望まれている。これまで開発されてきた人工角膜は、PMMA、ポリカーボネート、シリコン、PHEMA、PVAなどの合成高分子をレンズ状に成形してその辺縁部位に組織との固着を確保する多孔体等を具備する形状のデバイスが開発され一部臨床に使用されている。しかし、長期的な生体適合性が不十分で術後数年のうちに組織からの脱落、感染等の問題が発生するケースが散見されるのが現状である。角膜の生理を考えると、物質の透過性に制約を持つこのような材料系での長期安定に機能するデバイスの創生にはパラダイムシフトが必要である。この背景に基づき、組織再生技術を基盤としたハイブリッド型の人工角膜の開発の試みや角膜再生の試みがなされることとなったが、未だ信頼できるデバイス及び技術の開発には至っていない。

角膜は透明な無血管組織で、上皮、ポーマン膜、実質、デスメ膜、内皮から構成される視覚に特化したユニークなナノ・マイクロ構造を有している。角膜全体の厚みの約95%を占める実質は、コラーゲン繊維、ルーミカンに代表される糖タンパク質、角膜実質細胞から主に構成され、数十ミクロンの厚みの層が積層された構造体である。同一層内のコラーゲン繊維は高度に配向し、隣接層の間ではコラーゲン繊維の方向は直交するような特殊な高次構造を持ち、この構造があたかも光の回折格子の如く振舞うため角膜は透明であると考えられている。角膜代替物の開発を考えると、生体内部に長期安定に存在でき、材料の透明性と眼圧に抗する機械的な強さを得るためには、角膜のもつナノ・マイクロ構造を模倣することがひとつの選択肢となる。我々は、現在ボトムアップ手法(ナノファイバーの高次構造化)とトップダウン的な手法(高次構造を維持したまま生体角膜の細胞成分を除去して作製する手

Nanofiber based scaffolds for corneal stromal regeneration

Hisatoshi KOBAYASHI¹, Shinya Hattori², Takako Honda², Tsuyoshi Kimura³, Seiichi Funamoto³, Yoshihide Hashimoto³, Akio Kishida³, Shunji Sasaki⁴, Manabu Mochizuki⁴, Toshiya Fujisato⁵ (¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-2-1, Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan ²Japan Health Sciences Foundation, ³Institute of Biomaterials and Bioengineering, ⁴Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, ⁵Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology)

Tel: +81-29-860-4495, Fax: +81-29-859-2247, E-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

Key Word: Nanofiber/Nanocomposite/Sponge/Scaffold/Vascularization

Abstract: In general, living body is constructed by various nanomaterials under the precisely controlled condition. Therefore, we believe the best way to achieve the longtime biocompatibility of the medical devices would be mimic the living bodies feature. Nanofibers mimics for natural ECM made from biocompatible polymers seem to have good potential to apply medical area. From this consequence, we are aiming to develop reliable artificial stroma constructed from nanofibers. Top down approach(Natural corneal based scaffolds) and bottom up approach(build up from nanofibers) are under investigation. In this talk, the importance of the 3D structure constructed from nanofibers will be discussed using the recent outcome of the both trials.

法) 双方から信頼性の高い角膜代替材料の開発を行なっている。本報では、それぞれの研究から得られた実験事実に基づき、代替角膜として使用される材料の具備すべき特性を討論する。

【実験】

1) ボトムアップ的材料開発: ナノファイバーからの組上げ型で角膜類似構造を作り上げるため、電界紡糸法を利用してPVA ナノファイバーを調整し、その後の実験に供した。ナノファイバーの調整法: PVAサンプルは、PVA(重合度2000、鹸化度99.5%)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)を用いてシートを作製した。コレクター部分を工夫することでランダム不織布と繊維配向を有するシートを作製した。PVAナノファイバーへのコラーゲン固定化反応は文献1、2に従った。

2) トップダウン的材料開発: 生体角膜に類似した物性と構造を有する脱細胞化角膜組織を作製した。作製法: 成体ブタ角膜を3.5% w/v Dextranを含むPBS (DEX/PBS)で洗浄した後、冷間等方加圧装置, Dr. CHEF (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、細胞残渣を除去し作製した。

3) 細胞接着、増殖、分化、組織反応に関する検討: 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、実質細胞をサンプルに播種し(4-6 x 10⁴ 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2週間後のエアリフトカルチャーにて確認した。また、脱細胞化角膜に関しては、家兎への埋入を行い経時的变化を観察した。

【結果及び考察】

PVAナノファイバー材料特性の検討結果: コンタクトレンズに使用されるような通常のゲル構造体に比較すると、ファイバー高次構造体では間隙が大きいため物質の透過性が向上した。このため、栄養成分や水分の供給障害が起こらず角膜のデシケーションなどを起こすリスクが低く、長期安定的に生体で機能する可能性が示された。光学特性: ランダムな構造を持つ不織布より配向構造を持つシートが光の散乱を抑制した結果可視光の透過性が高くなった。今回使用したPVAのファイバー径は数百ナノメートルと比較的太いため、未だ実用域に達す透明性は確保されていない。更なるファイバーの細線化と構造の均一化を図る必要がある。配向シート上に播種した実質細胞は、繊維配向の向きに伸展、配列した接着する様子が観察され、角膜を模倣したシートの積層構造を作製して1ヶ月の培養を行なった後も積層構造内の実質細胞の生存が確認され、PVAナノファイバーと細胞を組み合わせるハイブリッドタイプの角膜実質の可能性が示唆されている。PVAナノファイバーシート上へは、角膜上皮細胞の良好な接着、増殖も確認されるとともにエアリフトによる分化誘導の結果、多層上皮化が達成された。一方、脱細胞化角膜組織では、TEM観察の結果、超高压処理を行なった後も角膜の高次構造は良く維持されていた。家兎角膜内への試料埋入を行なった結果、角膜内皮細胞の脱水機能の正常化に伴い、白濁していた組織が透明化することが確認された。この結果は、角膜の積層高次化構造を維持することの重要性を証明する結果と考えられる。ボトムアップ的であれトップダウン的であれ、角膜組織の持つ高次構造を模倣した材料、デバイス設計の重要性が示された。

【謝辞】本研究は、文部科学省科研費補助金および厚生労働省科研費補助金の業務の一環として行われた。

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

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