

平成15年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

# 目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子LST-1およびLST-2導入肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓組織の開発	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

## 生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 療品部  
研究者 土屋 利江

研究要旨 多糖類のヒト関節軟骨細胞 (HC) 増殖・分化促進効果と神経突起伸展効果、軟骨力学試験指標開発、酸素透過レンズは眼コネキシン消失防御、複合化人工血管開発、Type I, II と化学修飾コラーゲン多孔体と抗原性低減化体の開発、Cx32 遺伝子導入ヒト肝細胞株の開発を行った。

### 分担研究者

- (1) 鐘淵化学工業株式会社 ライフサイエンス RD センター 増田茂樹
- (2) テルモ(株) 研究開発センター 片倉健男
- (3) 株式会社 高研 高研バイオサイエンス研究所 阿蘇 雄
- (4) 株式会社 メニコン 総合研究所 今安正樹
- (5) 宇部興産株式会社 高分子研究所 (千葉) 坂井正宗
- (6) 生化学工業株式会社 中央研究所 荻谷 豊

### A. 研究目的

21 世紀の新医療技術として細胞工学に基づく人工臓器、医療機器の研究開発が進められているが、これらで使用される最適な材料は未だ少ない。本研究では、材料設計、可溶性因子、力学的刺激等に着眼して、力学的に強度のあるバイオ軟骨を創製と評価指標を明らかにする。

強度に関連した指標、分化機能維持に重要な指標、生体適合性に関連した指標を明確にし、有用で簡便かつ精度の高い評価指標を開発選択し、臨床の場においても使用に耐えることのできるバイオ軟骨を創製することを目的としている。また、分化指標とその機能維持に重要なコネキシン (Cx) 機能評価もおこなう。ヒト肝細胞株にコネキシン遺伝子 (Cx26, Cx32, Cx43) を導入し、肝機能を亢進した肝細胞株を開発する。

更に、新たな薬理活性を有する多糖類を検索し、医療機器による不具合事象を抑止できる新規材料開発を行う。具体的には、ヘパリン (Hep) につき、各種化学修飾を施して抗凝固作用を低減化した複数の Hep 誘導体を調製し、中枢神経疾患や脊椎損傷の治療法開発の礎となる神経突起進展促進活性に関する

評価を行うことを目的とする。

眼組織に反復使用されるコンタクトレンズの長期的安全性を評価するためには、指標を確立することを目的とした。具体的には、ラット眼コンタクトレンズを製作し、長期間連続装用後、角膜上皮細胞の細胞間連絡機能に及ぼす影響について検討した。

人工血管など優れた特性をもつインプラント材料として、生体内で安全性に優れたシリコンの機能化と構造体の試作・評価を実施した。

アテロコラーゲンは種々の形状に調製する技術が確立しているが、細胞の形態的な維持に関与している Type 別や化学修飾コラーゲン及びそれらを複合化した製品は無く、骨格材料と成り得るか等については殆ど検討がなされていない。3次元コラーゲン原料に Type II や化学修飾コラーゲンを混合し、マトリックスの形状と細胞培養特性について評価する。

コラーゲンやゼラチンは、近年ウシ海綿状脳症と異種蛋白アレルギー発症のリスクがある。アレルギーに関して、系統的な処理を行ったコラーゲン、ゼラチンからスポンジシートを作製し、生体への反応性を調べ、再生医療基材としての適用指標を設けることを目的とする。

### B. 研究方法

#### ヒト軟骨細胞実験

**材料:** ヒアルロン酸 (HA) は、細菌由来を使用した。コンドロイチン硫酸 (CS) 2 種を使用した。

**ヒト軟骨細胞:** 三光純薬より購入した。

**軟骨細胞の培養:** 静的微小集積培養法では、 $4 \times 10^5$  cells/20 $\mu$ L medium を 24-well のマイクロプレートにスポットし接着させ、4 種類の CS と HA (0.5 mg/mL) を添加し 4 週間培養した。動的培養法では、ガラス瓶の内部のコラーゲンハニカムスキャホールド上に軟骨細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/20 $\mu$ L medium) を播種

し、CS と HA を添加して 4 週間培養した。

**細胞増殖測定** : alamar blue 染色によって細胞の増殖を測定した。

**細胞の分化測定** : プロテオグリカンを alcian blue 溶液で染色する方法で行った。

**RT-PCR** : コラーゲンタイプ II と aggrecan の 2 つのプロテオグリカンについてその mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。

#### ヒト肝細胞実験

**ヒト肝臓細胞株** : HepG2 は理研の細胞バンクより入手した。

**遺伝子導入** : ヒトの Cx plasmid DNA は pTARGET™ Vector を用いて作り、FuGENE6 遺伝子導入剤を用いて HepG2 に Plasmid DNA の導入を行った後、G418 によって選択し、Cx32-transfected Clone を得た。対照として、empty vector、hCx26 と hCx43 遺伝子導入した Clone も作製した。

**RT-PCR:TRIzol** で mRNA を抽出し、First-Strand cDNA synthesis kit で cDNA を合成し、hCx32 と hCx26 の primers を用いて RT-PCR 法で HepG2 と Vector、Cx26、Cx43 の各遺伝子を導入した細胞について比較した。

**免疫染色** : 発現している Cx32 タンパク質の細胞内局在性を VECTASTAIN ABC kit を用いて調べた。

**細胞間連絡機能評価法** : ルシフェルイエロー蛍光色素がギャップ結合細胞間連絡により移行した距離により機能を測定した。(scrape-loading dye transfer assay:SLDT)

**肝機能** : 肝機能の合成機能のアルブミン分泌量と解毒機能のアンモニア代謝機能を検討した。

**支持体としての 3 次元マトリックス** PLGA 連通型の三次元マトリックスを得た。粒子径でポアサイズ(孔径)を調節し、プロシティー(空隙率)は 90%又は 87.5%とした。PLGA より紡錘型(ハニカム様)の三次元マトリックスを得た。プロシティーは 96%となるように調製した。 $\gamma$ 線滅菌(25 k Gy)またはエチレンオキシドを用いて滅菌を行った。三次元マトリックスの品質を安定化させることや、不均一性を持った製品を調製する目的で織布型の支持体の試作を行った。PLGA を 145°C で溶融押出により、25~35  $\mu$ m 径のフィラメントを得た。

**細胞採取及び培養** ウシの関節軟骨細胞は、子牛の後肢より採取、ヤギ関節軟骨細胞は、ウシと同様後肢関節軟骨より分離した。ウサギ骨髄由来細胞は麻酔下で骨髄穿刺針を用いて腸骨より採取した。採取された骨髄液は培養され、シャーレ付着細胞を分取した。分取した細胞 105~107 個を支持体(約 1cm<sup>2</sup>)に播種し、軽い攪拌(旋回)で培養し、機械的強度の変動を評価した。また培養前後のモジュール(支持体に細胞を播種したもの)を被験動物へ埋植し有効性

について評価した。

**支持体への播種性検討** 蛍光物質で標識した細胞を厚み 3mm の支持体の上部から播種し、経時的に細胞の挙動を観察した。

**機械的強度測定** 機械的強度の測定項目として compressive modulus, aggregate (equilibrium) modulus, dynamic stiffness (elasticity, viscosity), poisson's ratio, streaming potential, permeability, shear modulus, tear strength 等を選定した。測定は Stable Micro System 社製 Texture Analyser TA-XT2i, HAAKE 社製 Reo Stress RS150 及び Seiko Instruments 社製 EXSTAR 6000 をベースに、加電流装置(北斗電工社製 Arbitrary Function Generator HB-105, GPIB Potentiostat /Galvanostat HA-501G)、電極等を作成し測定に用いた。

**組織学的評価** 被験動物から被験部位(後肢関節部分)を取り出し、EDTA を用いた脱灰を行った。固定後、薄切組織片をヘマトキシリン-エオシン(HE)染色、サフラン-0 染色、アルシアンブルー染色を実施した。

**各種 Hep 誘導体の作製** 出発材料としてヘパリンナトリウム(Hep·Na)塩を用いた。過ヨウ素酸で酸化処理してウロン酸残基の C-2/C-3 間の単結合を解裂させ両端に生成したアルデヒド基を水素化ホウ素ナトリウムによって還元し、過ヨウ素酸酸化還元ヘパリン(OR-ヘパリンと略称)を得た。OR-ヘパリンに対し 2-O-脱硫酸化反応を施すことにより過ヨウ素酸酸化還元 2-O-脱硫酸化ヘパリン(OR2DSH と略称)を得た。アミノ糖の O-6 位の硫酸基のみを特異的かつ段階的に脱離させた Hep 誘導体(6-O-脱硫酸化 Hep; 6DSH と略称)、ウロン酸の O-2 位の硫酸基のみを特異的に脱離させた Hep 誘導体(2-O-脱硫酸化 Hep; 2DSH と略称)及びアミノ糖の N-2 位の硫酸基のみを特異的に脱離させた後、同部位をアセチル化した Hep 誘導体(N-脱硫酸化 N-再アセチル化 Hep; NDSNAc-ヘパリンと略称)、完全に脱硫酸化した後 N-再アセチル化したヘパリン(CDSNAc-ヘパリンと略称)、及び完全に脱硫酸化した後 N-再硫酸化したヘパリン(CDSNS-ヘパリン)なども調製した。これらにつき不飽和二糖分析した。

**神経突起伸展促進活性の in vitro アッセイ** 妊娠 17 日目の Wistar ラット胎児を摘出し、大脳皮質を切り出し、カミソリ刃でスライスした。これに PBS 添加して遠心しイクスプラントを沈殿を得た。硫酸フリーDMEM 添加して緩やかに攪拌し均一化した後、500  $\mu$ l ごと 24 ウェルのマイクロタイタープレートに分注した。培養後、100  $\mu$ l の上清を取り除き、その後 50  $\mu$ l の GAG 試料を含む PMS と 50  $\mu$ l の 400  $\mu$ M のソディウムクロレートを含む硫酸フリーDMEM をそれぞれ添加し、2 日間の培養後、グルタルアル

デヒド固定、洗浄、ギムザ染色を行った。光学顕微鏡観察を行い、神経突起を進展させているイクスプラントの割合を数値化した。

**ラットコンタクトレンズ装用試験** Wistar 系ラット（5～7週令）の眼球にソフトコンタクトレンズ（メニコンソフト MA）及びハードコンタクトレンズ（メニコン Z）を準備した。ラットの右眼にコンタクトレンズを装用し、左眼は非装用対照とした。装用期間は 24 時間または 7 日間とした。装用期間終了後、眼球を摘出し、角膜を 1%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製した。凍結切片を冷アセトンで処理し、一次抗体には ZO-1（タイト結合構成タンパク質）、デスモグレイン 1+2（デスモゾーム構成タンパク質）、コネキシン 43（ギャップ結合構成タンパク質）に対する抗体を使用した。観察にはレーザー共焦点顕微鏡と蛍光顕微鏡を使用。

**コラーゲン材料の複合化** 構造体が作成可能な 1%アテロコラーゲン酸性溶液（以下 AC）に 1%Type II コラーゲン溶液を混合し、中和した。構造体を観察後、細胞を播種し観察した。サクシニル化アテロコラーゲン（以下 SAC）を用いて同様に混合し、中和後得られた構造体を観察した。

**コラーゲン材料の埋入試験** 線維化アテロコラーゲン(Fiber atelocollagen; FC)、熱変性アテロコラーゲン(Heat denatured atelocollagen; HAC)、ウシ骨由来アルカリ処理ゼラチン(bovine gelatin)、ブタ皮膚由来酸処理ゼラチン(swine gelatin)及びキトサン(Chitosan)の 5 種類の材料を用いてスポンジシートを作製し、各試料をウサギ背皮下に埋入した。3 週間経過後、同一の試料を同一個所に再度埋入した。埋入前(0 W)、3 週間、再埋入 2 週間(5 W)に血中抗体価の測定、スポンジシートの残存性及び組織の観察を実施した。

**スポンジシートの調製** 繊維化コラーゲン(FC)；0.5%アテロコラーゲン酸性溶液を中和後、3 加温し線維形成させた。線維は遠心回収した。線維化コラーゲンを 2 等分し、一方に架橋剤を 50ul 加えた後、よく攪拌し、線維を分散させシャーレに流し込み、凍結乾燥してスポンジシートを得た。熱変性コラーゲン(HAC)；線維化コラーゲンを 60℃、30 分間加熱し、HAC とした後、架橋剤を 50 ul 加え攪拌し、シャーレに流し凍結乾燥してスポンジシートを得た。ブタ皮膚由来酸処理ゼラチン(swine gelatin)；ウシ骨由来アルカリ処理ゼラチン(bovine gelatin)；各粉末約 190 mg を秤り取り、加熱溶解し、架橋剤を加え攪拌し、シャーレに流し凍結乾燥しスポンジシートを得た。キトサン(chitosan)についてもスポンジシートを作製した。EOG 滅菌を行い、使用前に十分な脱ガスを行った。

**ウサギ皮下へのスポンジシートの埋入** 各スポンジ

シート 4 等分して 1 羽のウサギの背部皮下 4ヶ所に埋入した。即ち 1 羽あたり約 38mg 主成分を含む試料を投与し、1 種に 2 羽のウサギを使用した。

#### **抗体価測定用抗原固相化プレートの作製**

**FC 固相化プレートの作製** 線維化コラーゲンを炭酸 buffer pH 9.6 に加え終濃度 10 ug/ml 溶液を調製した。本抗原溶液を吸引除去後 blocking solution を分注し、室温でインキュベートし、Blocking solution を吸引除去後、2 時間減圧乾燥し、FC 固相化プレートとした。

**HAC 固相化プレートの作製** 前記と同様の方法でウシ HAC 固相化プレートを作製した。ブタ皮膚由来酸処理ゼラチン(swine gelatin)固相化プレート、ウシ骨由来アルカリ処理ゼラチン(bovine gelatin)固相化プレート、キトサン固相化プレートについても、50 mM 炭酸 buffer pH 9.6 に抗原濃度を 10 ug/ml とするように調製し、前記と同様の方法で作製した。

**抗体価測定用試料の調製** ウサギ耳静脈または耳動脈より 21G の採血針を用いてシリンジ採血した。分離した血清は保存用チューブに入れた。各血清 100 ul を取り、900 ul の PBS-1% BSA pH7.4 に添加し、10 倍希釈した。さらに PBS-1% BSA pH7.4 で倍々希釈し、段階希釈した血清を抗体価測定用試料とした。

**抗体価の測定** 本報告書においては、抗体価(当該抗体の濃度の大小)を、測定された特定希釈倍率のウサ血清の吸光度と定義し、試料間の比較を行った。

**組織観察** 5 W 経過後、スポンジシートの目視判定による残存性及び埋入個所周辺での組織反応の有無を確認した。また、スポンジシートを含む部分を切開し、中性緩衝ホルマリンで固定後、HE 染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験に使用した市販ヒト軟骨細胞、市販ヒト皮膚繊維芽細胞については、研究方法・倫理面での適切性について、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会に申請し、承認を得ている。実験動物の取り扱いについては、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて行った。

### **C. 研究結果**

#### **ヒト軟骨細胞**

**軟骨再生重量** 新しく形成した軟骨の実際の重量を測定した。その結果、4 週間の培養で、CS-A 16kDa, CS-C 34kDa, HA 810kDa, HA 1680kDa 処理によって Control に比べて有意に増加した。

**細胞増殖測定** 静的培養では、CS-A 16kDa, HA 810kDa, HA 1680kDa 処理によって Control に比べ細胞増殖が促進。動的培養でも Control に比べ 1.3、1.2、1.5 倍、細胞増殖が有意に促進された。

細胞の分化 静的培養では、HA 1680kDa 処理によって Control に比べて細胞の分化が有意に抑制された。他の 3 種類は分化への影響はなかった。動的培養では CS-A 16kDa, HA 810kDa, HA 1680kDa 処理によって Control の 1.4、2.1、2.4 倍、細胞分化が促進。細胞外マトリックス遺伝子の発現 静的培養では、コラーゲンタイプ II と aggrecan の遺伝子発現が観察された。動的培養では、aggrecan の遺伝子は全てほぼ同等な発現がみられたが、コラーゲンタイプ II 遺伝子は Control に比べ多糖で処理したものが低い傾向があった。静的・動的両培養下でコラーゲンタイプ II と aggrecan の遺伝子を共に発現していた。

#### ヒト肝細胞

RT-PCR 法で HepG2 と Vector, Cx26, Cx43 の各遺伝子を導入した細胞について比較した。HepG2、Vector 導入した細胞と比べ、Cx32 遺伝子導入した細胞は Cx32 mRNA の発現量が高いことを確認できた。一方、Cx32 遺伝子導入した細胞は Cx26 と Cx43 mRNA の発現は変化せず、HepG2 と同レベルであった。

更に GJIC 機能を SLDT 方法で評価し、GJIC 機能も Cx32 遺伝子導入した細胞において最も高かった。HepG2 と比べ、Vector 導入した細胞においては GJIC 機能が 1.5 倍ほど高く、Cx32 遺伝子導入した場合には GJIC 機能が 3 倍ほど高くなった。

次に、Cx32 タンパク質の細胞内局在性を免疫染色法で調べた。Cx32 遺伝子導入した細胞は細胞-細胞膜間に Cx32 たんぱく質が存在していることを見出した。Cx32 導入した細胞ではアルブミン分泌量とアンモニア代謝機能が高いことが明らかになった。

主なコネキシンである Cx26、Cx32、Cx43 遺伝子をそれぞれ HepG2 細胞に導入した。その結果、Cx32 遺伝子を導入した場合のみ、アンモニア除去能とアルブミン産生量の増加を認めた。

支持体としての 3 次元マトリックス PLGA を基材とした粒子径および製造方法の異なる三次元マトリックスを用いて性能を検討した。250  $\mu\text{m}$  以上のポアサイズ連通型のマトリックスでは直ちに、全体に蛍光が観察され、全体に細胞が分布した。細胞播種マトリックスを静置や、培地中では、細胞の漏出が確認され、ポアサイズが大きいほど顕著であった。

力学的評価 凍結乾燥法で作成したマトリックスに軟骨細胞を播種培養し、経時的にマトリックスの形状及び強度を測定したところ、compressive modulus, aggregate (equilibrium) modulus, dynamic stiffness (elasticity) 及び形状において大きな変動を観察した。細胞播種直後での elasticity は 10Mpa 以下であったが、培養に伴い上昇し、培養 10 日目には 50Mpa まで上昇した。compressive modulus も急激に上昇した。培養をさらに継続すると、elasticity は低下し、培養 3 週間後には播種直後のマ

トリックスより低値となった。

Viscosity 及び aggregate (equilibrium) modulus には培養による大きな変動は観察されなかった。

組織学評価 軟骨細胞及び骨髄由来細胞を播種したモジュールを被験動物に戻し、埋植 3 ヶ月後に修復の評価を行った。被験動物としてヤギ及びウサギを用い試験したところ良好な軟骨修復が観察された。組織学的評価に軟骨様組織を示す、サフラニン-O 染色陽性像及びアルシアンブルー染色陽性像が認められ、胞外マトリックス産生及び欠損部分修復が認められた。

アッセイに用いた各種 H e p 誘導体 出発材料としては、ヘパリンナトリウム (Hep・Na) 塩を用いた。ヘパリンを過ヨウ素酸で酸化処理後、過ヨウ素酸酸化還元ヘパリン (OR-ヘパリンと略称) を得た。OR-ヘパリンから過ヨウ素酸酸化還元 2-0-脱硫酸化ヘパリン (OR2DSH と略称) を得た。アミノ糖の O-6 位の硫酸基を脱離させた H e p 誘導体 (6-0-脱硫酸化 Hep ; 6DSH と略称)、ウロン酸の O-2 位の硫酸基を脱離させた H e p 誘導体 (2-0-脱硫酸化 Hep ; 2DSH と略称) アミノ糖の N-2 位の硫酸基を脱離させアセチル化した H e p 誘導体 (N-脱硫酸化 N-再アセチル化 Hep ; NDSNAc-ヘパリンと略称)、完全脱硫酸化後 N-再アセチル化したヘパリン (CDSNAc-ヘパリンと略称)、及び完全脱硫酸化後 N-再硫酸化したヘパリン (CDSNS-ヘパリン) などを調製した。

神経突起伸展促進活性の in vitro アッセイ 妊娠 17 日目の Wistar ラットから胎児を摘出し、大脳皮質を切り出した。10 匹分の大脳皮質を集めたところでこれらをカミソリの刃で縦横に細かくスライスした。これに PBS を添加して遠心分離を行いイクスプラントを沈殿として得た。この沈殿に硫酸フリー DMEM を添加して緩やかに攪拌し均一化した後、500  $\mu\text{l}$  ごとに分け 24 ウェルのマイクロタイタープレートに分注した。2 時間の培養の後、100  $\mu\text{l}$  の上液を取り除き、その後 50  $\mu\text{l}$  の GAG 試料を含む PMS と 50  $\mu\text{l}$  の 400  $\mu\text{M}$  のソディウムクロレートを含む硫酸フリー DMEM をそれぞれ添加した。2 日間の培養の後、グルタルアルデヒドで固定、洗浄の後、ギムザ溶液で染色を行った。全視野内のイクスプラントの数に対する神経突起を進展させているイクスプラントの割合を数値化した。

#### コンタクトレンズ装用ラット眼組織の Cx 蛋白消失

ラット用コンタクトレンズはラット角膜上で良好な動きを示し、装用 24 時間後のコンタクトレンズ残存率は、メニコン Z で 100%、メニコンソフト MA で約 70%であった。すべてのコンタクトレンズ装用眼において、装用 24 時間後及び 7 日後の前眼部に肉眼で容易に識別できる眼障害は認められなかった。

非装用対照眼の角膜上皮細胞層に存在するタイト

結合構成タンパク質 Z0-1 を免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。角膜上皮最表層細胞間で、Z0-1 が直線的に発現しているのが観察された。一方、メニコンソフト MA を 24 時間装用した角膜では、Z0-1 の配列が乱れている像が観察された。また、メニコン Z を 7 日間装用した角膜での Z0-1 の形態は対照の非装用眼と差がなかった。非装用対照眼の角膜上皮細胞層に存在するデスモゾーム構成タンパク質デスモグレインを観察した。角膜上皮翼状細胞間で発現しているのが観察された。このデスモグレインの発現は、メニコンソフト MA の 24 時間装用眼及びメニコン Z の 7 日間装用眼でも、対照眼との間に差を認めなかった。

非装用対照眼の角膜上皮細胞層に存在するギャップ結合構成タンパク質コネキシン 43 は、角膜上皮基底細胞間でドット状に発現しているのが観察された。一方、メニコンソフト MA を 24 時間装用した角膜では、コネキシン 43 のドットが著しく減少しているのが観察された。また、メニコン Z を 7 日間装用した角膜でのコネキシン 43 の形態は対照の非装用眼と差がなかった。

**複合化人工血管の開発** メディカルグレードのシリコンを用い、人工血管との複合化によるデバイス化を検討した。また、シリコンと生理活性物質との複合体の形成による機能化を検討した。基礎検討として、シート及び人工血管のシールド材として適用したものを試作した。シートは、ポリスチレン製の容器にシリコン原液を流延し、減圧により脱泡した後 70℃ に加熱し、24 時間の硬化を行なった。また、合成繊維製人工血管に含浸させたものを同様に、硬化処理し、シールド材としての評価を行なった。シート及び人工血管とのコンポジットについて問題なく作成できた。特性を評価したところ、人工血管基材との複合化により、強度は大幅に向上した。また、縫合強度の指標である針かけ強度も大幅に増大し、また繊維のほつれについても改善が見られた。透水性は、未被覆のものが約 300[mL/cm<sup>2</sup>/min・120mmHg・H<sub>2</sub>O・37℃]であったのに対し、被覆後は 0 であった。人工血管とシリコンとの複合化は、強度面の向上が著しく、また透水性の低減に有効と考えられた。しかしながら、人工血管のシールド材としては、被覆が厚くなりすぎるため、手触りや操作性、柔軟性に難があった。これは硬化前のシリコンが粘稠であり、コーティング性に乏しいため、被覆が厚くなるためと考えられた。被覆層の厚さは平均 0.7mm であった。また、得られた表面はきわめて平滑であり、細胞組織との接着性に乏しいと考えられた。より生体適合性に優れた表面の作成を目標に、多孔質のシリコン被覆の作成を検討した。多孔体樹脂の作成法には種々のものが知られているが、

シリコンの特性から、造孔剤 (poregen) を用いた方法が好ましいと思われた。造孔剤として、塩化ナトリウムを粉砕の後、ふるい分けにより、50 μm 以下の粒径に揃えたものを用いた。乾燥空気下で、シリコン 9 部 (重量) に対し、塩化ナトリウム粉末 1 部を加え、攪拌・混合し、多孔シリコン原液を調製した。その後、コーティング処理を行なったが、粒子を多量に含むため、さらに粘稠性が増し、均一な被覆処理が困難であった。種々検討した結果、n-ヘキサンを添加し、希釈した液を用いて被覆した後、溶剤を蒸発させ、加熱及び凝固を行なうことで薄く均一な被覆が可能となった。硬化後、蒸留水中に浸漬し、塩化ナトリウムを溶出・除去し、多孔体を得た。このようにして得られた、多孔体シリコンシールドグラフトについて評価した結果、被覆厚さは 0.5mm 前後と大きく変わらなかったが、柔軟性はきわめて向上した。また、透水性はかわらず 0 であり、シールド性も十分であることが示された。さらに、より一層の機能化を目指し、シリコンと、生体適合性物質であるヒドロキシアパタイト及び生理活性物質であるヘパリンとの複合化を検討した。ヒドロキシアパタイトは、(株) 宇部マテリアルズより提供された高純度品粉体を用いた。ヘパリン Na は、和光純薬工業 (株) より購入した。ヒドロキシアパタイトとの複合化に関しては、上述の方法と同様の方法で実施した。親水性のヒドロキシアパタイトと、親油性 (疎水性) のシリコン原液との混合は困難であったが、粒子径が 10 μm 以下の二次凝集の少ないヒドロキシアパタイト粉体を用いたところ、均一な懸濁液が得られた。

これを n-ヘキサンにより希釈し、前述と同様、人工血管への被覆処理を行なった。溶媒の除去と加熱硬化後、評価を行なった。混合比率を変化させ、性状を検討したが、ヒドロキシアパタイトが 20wt% を超えると、硬化後に十分な強度が得られないことがわかった。樹脂層が不連続になるためと考えられた。ヒドロキシアパタイトの含有量は、10wt% 程度が良好と思われた。この表面を走査型電子顕微鏡などにより観察したところ、粒子を混合したにも関わらずきわめて平滑ではあり、また透水性もゼロであった。人工血管の被覆材として興味深い特性と考えられた。さらに、細胞の分化・増殖に有効な生理活性物質であるヘパリンと、シリコンとの複合化についても検討した。ヘパリンは水以外の溶媒に溶解しないため、溶液として混合することは極めて困難である。実際にヘパリン水溶液とシリコンとの混合を試したところ、シリコン中で水滴状となって分離し、均一な懸濁液とはならなかった。また、粉体を混合した場合、沈澱してしまい均一に混合できなかった。n-ヘキサンにより希釈した場合、沈澱はより顕著で

あった。種々検討した結果、ハンディホモジナイザーを用いた、粘稠なままでの分散・懸濁処理が有効であった。得られたペースト状の懸濁液を、同様に人工血管に被覆・硬化処理し、評価した。また、ポリスチレン製容器に流延し硬化処理させ、シートを得た。結果、表面はいずれも平滑であった。これを蒸留水に浸漬しておくことで、ヘパリンの流出が見られた。流出後は多孔体となった。表面での残留ヘパリンを評価した。ヘパリンに含まれる硫酸基のようなアニオン性基と結合し呈色する色素である、トルイジンブルーを用いて染色を行なったところ、2週間の洗浄後もヘパリンが残存していることが確認された。

**コラーゲンの複合化** Type II コラーゲンの割合が増えるにつれハニカム構造体のポアサイズが大きくなった。Type II の混合比率が 25%以上になると上面より底面まで通過する明確な孔が見られなくなり、より複雑な構造の孔になった。また、Type II のみで作成した際には、不規則な大きな孔になった。Type II の線維が太い事に由来すると考えられた。また、コラーゲンの線維形状も細胞の足場としては重要な意味があると考えられる。このハニカム構造体に ATDC 5 細胞を用いて培養試験を実施した。本細胞は表皮細胞様の形態を示し、軟骨細胞に分化すると言われている。細胞の接着性については、AC の割合が高いほうが良く、Type II コラーゲンの割合が高くなるにつれて減少する傾向が見られた。

**埋入による修飾コラーゲンの炎症と抗原性** No. 6 のウサギを除いて、何れのスポンジシートを埋入したウサギについても、抗体価の明確な上昇は、確認されなかった。各スポンジシートの初回埋入 5 週間後の目視判定による残存性及び埋入個所周辺での組織反応の有無を示した。すべてのスポンジシートが埋入個所で残存していた。キトサンからなるスポンジシートを埋入したウサギ (No. 6, No. 12) では、強い組織反応が確認された。しかしながら、その他のスポンジシートを埋入したウサギでは、埋入個所周辺の組織には、特に変化は認められなかった。

#### D. 考察

軟骨細胞の増殖や分化についての基本的なメカニズムを明確にすることは、関節の疾患に罹患した患者のより良い処置のための新しい生物学的な治療の発達のために必須である。動的培養条件下では分子量の違うヒアルロン酸処理によって細胞あたりの分化活性が促進した。以上のことから、ヒト関節軟骨細胞へのヒアルロン酸処理の効果は静的培養条件下よりも動的培養条件下でより顕著に見られることがわかった。コンドロイチン硫酸は、その分子量や構造のみならず培養条件によってもヒト関節軟骨細胞の

増殖分化活性にきわめて重要な影響を与えていることがわかった。HepG2 細胞ではギャップジャンク ション依存性細胞間情報伝達 (GJIC) 機能が欠陥であり、肝機能も初代肝細胞と比べ低い。In Vivo、肝実質細胞に本来 Cx26 及び Cx32 が発現しており、肝小葉に Cx26 は門脈域から逡減的に発現し、一方、Cx32 は恒常的に発現している

Cx32 遺伝子導入ヒト肝ガン細胞株 HepG2 は、肝機能障害のある患者の治療に利用可能な体外循環型モジュールに使用すれば、従来の HepG2 単独利用に比べて、有効性や持続期間において、格段と優れた性能を発揮できる。

マトリックスとして生分解性高分子化合物である PLGA (75:25) を用いたが、製造工程において PLGA 製マトリックスに応力が残り、培養時に PLGA が収縮することが観察された。そのため培養開始直後より支持体の収縮が収まるまでの 2 週間は、力学的強度が急激に増加し、加水分解に伴ない強度が低下する。このようにバイオ軟骨の力学的評価においては使用するマトリックスの特性に注意する必要がある。

培養とともに収縮などを示す支持体を用いる場合、軟骨モジュールに力学的評価をそのまま適用することは問題があるように思われる。但し、強度を元々保有しないマトリックスを使用した場合、マトリックスが分解し強度的に無視できる状態になった場合及び生体内に埋植されマトリックスが消失した場合 (有効性評価) においては重要な評価方法であるといえる。

簡便な力学的評価方法として indentation 法があり、装置も開発販売されている。有効性試験等において使用することが可能かどうかについて検討を加えた。市販ハンディタイプの 3 機種について試験を行うとともに、比較検討した。それぞれの機種の実験原理は異なり、測定結果の数値も各装置固有のものであった。また測定における手技により、数値が大きく変動する等の問題が認められ、有効な装置自体を作成する必要性が示唆された。

電気学的評価結果より streaming potential, permeability が算出されているが、測定には電極を使用しているため、リード線との接合部分が機械的振動に弱く、断線の危険性が高い等の問題点が明らかになった。

被験動物を用いた埋植試験において良好な結果が得られたが、試験系の改良を検討する必要がある。関節軟骨への埋植手術を行う為にはある程度大きな関節を確保できないと実施は困難である。そのためには、大動物を使用する方がよいのではあるが、被験動物数の確保及び飼育施設 (飼育管理も含め) の確保が必要となる。今回はそのような観点からウサギ及びヤギを使用した。ウサギは軟骨欠損 (損傷) にお



いても自然治癒しやすいと言われていることより、自然治癒が生じない欠損サイズを選択した。ヤギや大動物を被験動物として用いる場合は関節の固定に注意する必要がある。固定が十分でないと、術後すぐに被験動物が歩行を開始し、軟骨モジュール及び周辺軟骨に悪影響を与える可能性がある。

ヘパリンやヘパラン硫酸が神経突起伸展にどのように関わっているかの生理的メカニズムはまだ完全には解明されていないが、bFGF、HGF、NGF、IGF-Iなどが強い神経突起伸展促進活性を有していることが分かっている。

非装用対照眼の角膜上皮細胞層に存在するタイト結合構成タンパク質 ZO-1 を免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。角膜上皮最表層細胞間で、ZO-1 が直線的に発現しているのが観察された。一方、メニコンソフト MA を 24 時間装用した角膜では、ZO-1 の配列が乱れている像が観察された。また、メニコン Z を 7 日間装用した角膜での ZO-1 の形態は対照の非装用眼と差がなかった。

非装用対照眼の角膜上皮細胞層に存在するギャップ結合構成タンパク質コネキシン 43 を観察した。角膜上皮基底細胞間でドット状に発現しているのが観察された。一方、メニコンソフト MA を 24 時間装用した角膜では、コネキシン 43 のドットが著しく減少しているのが観察された。また、メニコン Z を 7 日間装用した角膜でのコネキシン 43 の形態は対照の非装用眼と差がなかった。

シリコーンの人工血管被覆材、あるいは細胞・組織培養の足場材料としての利用を目的とし、機能化を検討した。結果、通常の被覆では形状あるいは力学特性的に難があったが、多孔質とすることで大幅な改善が見られた。

アテロコラーゲンに異なるタイプのコラーゲンまたは化学修飾コラーゲンを添加した場合、どのような構造体が作成できるか検討した。基本的に、アテロコラーゲンの比率が高い場合、表面から底面に孔が通ったハニカム構造体が観察された。線維化アテロコラーゲン(FC)、熱変性アテロコラーゲン(HAC)、ウシ骨由来アルカリ処理ゼラチン(bovine gelatin)、ブタ皮膚由来酸処理ゼラチン(swine gelatin)、キトサンの 5 種類の試料を用いてスポンジシートを作製し、各試料をウサギの背の皮下に埋入した。当該物質に対するウサギ血中の抗体価は、いずれのスポンジシートを埋入したウサギでも、明確な上昇は認められなかった。No. 6 のウサギの抗体価の上昇は、下肢の壊死の影響によるものと考えられた。スポンジシートに十分な架橋が施されたことにより、埋入された個所での分解速度が、遅くなり、時間あたりの抗原量そのものが小さくなっていったとも考えられた。

## E. 結論

ヒト関節軟骨細胞へのヒアルロン酸処理の効果は静的培養条件下よりも動的培養条件下でより顕著に見られた。また、分子量及び構造が違うコンドロイチン硫酸は、培養条件によって異なる影響を与えていた。HepG2 は Cx32 遺伝子の導入によって、Cx32 蛋白質が細胞膜へ局在性を改善し、ギャップ結合依存性細胞間情報伝達も促進され、更に、肝機能であるアルブミン分泌量とアンモニア除去能も亢進していることが判明した。バイオ軟骨の力学的評価系を立ち上げることを行った。

10  $\mu\text{g/ml}$  の OR2DSH がクロレイト存在下でも神経突起伸展を回復させた。OR2DSH の強い神経突起伸展促進活性は、Idoa  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4Glcns(6S) 単位及び C-2/C-3 で解裂したウロン酸残基の両者がシナジェティックに作用している結果ではないかと推定された。

角膜上皮細胞の ZO-1 とコネキシン 43 は、コンタクトレンズが角膜に及ぼす影響の評価するための有用な指標になることが判明した。

シリコーンを基材として用い、機能化することで、生体環境下でも長期にわたり安定な生体適合性基材を得ることを検討した。

人工血管基材との複合化を行なった結果、複合化により機械的強度に顕著な改善が見られた。

線維化アテロコラーゲン(FC)、熱変性アテロコラーゲン(HAC)、ウシ骨由来アルカリ処理ゼラチン(bovine gelatin)、ブタ皮膚由来酸処理ゼラチン(swine gelatin)、キトサンの 5 種類の材料につき、架橋剤を使用して残存性の高いスポンジシートを調製し、抗原性が認められる材料に関しても、架橋等の処理を行うことにより、抗原決定基の変性、あるいは抗原決定基のマスキングにより抗原性の低減が可能であると推測された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 土屋利江「図解 再生医療工学」第 7 章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後」を分担執筆 (2004)印刷中
2. 土屋利江「医療材料・医療機器の安全性と生体適合性」を編集 (2003. 11)
3. 土屋利江 細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について、高分子、53 巻、3 月号 (2004) 144-146
4. 土屋利江 細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について、再生医療 3 巻、2 月号 (2004) 107-110
5. Nagahata, M, Tsuchiya, T. et. al. A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked

- enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
6. Matsuoka A., Tsuchiya T. Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film. *J. Biomed. Mater. Res.* in press.
  7. 柳楽 勤、土屋利江、メカニカルストレスに対する細胞応答の分子機構、生体物理刺激と生体反応、フジテクノシステム 印刷中
  8. Tsuchiya T., A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products., *ASTM* in press.
  9. Katakura Y, Nakata E, Tabira Y, Miura T, Teruya K, Tsuchiya T, Shirahata S, Decreased tumorigenicity in Vivo When Transforming Growth Factor  $\beta$  Treatment Causes Cancer Cell Senescence, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 815-821, (2003).
  10. Ahmed S and T Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, accepted.
  11. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
  - 12 Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell technology*, in press
  13. Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T, Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. *Animal cell technology*, in press
  14. Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T, A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 307, 80-85
  15. Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A, Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J. Biomed Mater Res*, 2003, 64A, 439-446
  16. Isama K, T Toshie, Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 2003, 24, 3303-3309
  17. Taizo Sumide and Toshie Tsuchiya, Effect of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, 2003, 64B, 57-64
  18. 土屋利江、生分解性高分子材料の軟骨分化機能等への影響、バイオインダストリー、2002, 7, 30-37
  19. Toshie Tsuchiya, Masamune Sakai, Hiroyuki Ikeda, Tadahiko Mashino and Yasmin Banu, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell Technology*, accepted.
  20. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, A remarkable increase of the mechanical strength of the human articular chondrocytes cultured with hyaluronic acid using honey-comb scaffold under the dynamic conditions. submitted.
  21. Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Effects of Multipurpose Solutions (MPS) for Hydrogel Contact Lenses on Gap-Junctional Intercellular Communication (GJIC) in Rabbit Corneal Keratocytes. *J. Biomed Mater. Res, PartB: Appl Biomater* 2003, 64B, 57-64

## 2. 学会発表

1. 土屋利江：「医療機器及び細胞組織医療製品の安全性・有効性の基本的な考え方」2<sup>nd</sup> BMC-NIMS シンポジウム 平成16年3月 つくば
2. 土屋利江：「再生医療のための細胞の評価と標準化」第4回分子・細胞医療におけるME研究会 平成16年2月 東京
3. Toshie Tsuchiya : Standards and guidelines for the second development of the medical devices and tissue engineered products. High-level workshop on international standards for medical technologies 2004. Feb. Geneva, Switzerland
4. 土屋利江：「医療機器、医療材料の安全性と GLP について」日中シンポジウム 平成16年2月 北京、中国
5. 土屋利江：「再生医療実用化への課題」第3回再生医療学会総会「再生医療フォーラム」平成16年3月 幕張
6. 土屋利江：「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」第3回再生医療学会総会パネルディスカッション 平成16年3月 幕張
7. 土屋利江：「細胞間連絡結合機能の評価」第3回再生医療学会 NEDO サテライトシンポジウム 平成16年3月 幕張

8. 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ子：コラーゲンスポンジを用いたバイオヒト皮膚モデルにおけるHIV-1検出法の検討 第17回日本エイズ学会 平成15年11月
9. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya : Effect of the catalyst used in the biodegradable polymers on chondrogenesis of human articular cartilage 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張
10. 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操：陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞及びヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張
11. 澤田留美、土屋利江、伊藤友実、松田良枝、松岡厚子：ヒト幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究(1) 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張
12. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya : Studies on the different tumorigenic activities of PLLA between two strains of mice 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張
13. Jun Yang, Toshie Tsuchiya : Enhancement of E-cadherin expression and liver functions of HepG2 in alginate gel 第3回再生医療学会総会 平成16年3月 幕張
14. 松岡厚子、配島由二、長谷川千恵、土屋利江：医療材料関連物質による核内倍加の誘発 第32回日本環境変異原学会 平成15年11月 津
15. Sadami Tsutsumi and Toshie Tsuchiya: Recent Japanese regulations for tissue engineered medical products and trials for evaluation of their mechanical properties. 2<sup>nd</sup> Japanese-Swiss Workshop on Biomaterials 2003. 11. Tsukuba
16. 土屋利江：「組織工学材料と細胞組織医療機器の標準化：国際的な動向とわが国の現在・近未来について」 第3回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 平成15年9月 札幌
17. 伊佐間和郎、配島由二、土屋利江：ガンマ線照射コラーゲンの骨芽細胞に及ぼす影響 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
18. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya : The different effects of PLLA plates on surrounded tissues between two strains of mice 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
19. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Sadami Tsutsumi : Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with two types of hyaluronic acid 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
20. 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操：陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構抗進効果 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
21. バヌーナスリン、土屋利江：起源の異なるヒアルロン酸のヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼす相反する効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
22. 柳楽勤、スーザンマチュー、山越葉子、土屋利江：正常ヒト皮膚繊維が細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に及ぼす温度応答性ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの促進効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
23. 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操：陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
24. 土屋利江：医療機器に関連した薬事法改正と有効性・安全性・品質確保の考え方について 第133回日本金属学会 2003年秋季大会 平成15年10月 札幌

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2001-311484/ギャップ機能亢進剤/土屋利江・荻谷 豊

特願 2001-311485/ギャップ機能抑制剤/土屋利江・荻谷 豊

特願 2002-78407/宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法/土屋利江・坂井正宗・池田博之

特願 2003-8855/ギャップ機能抑制剤/土屋利江・荻谷 豊

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

---

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社