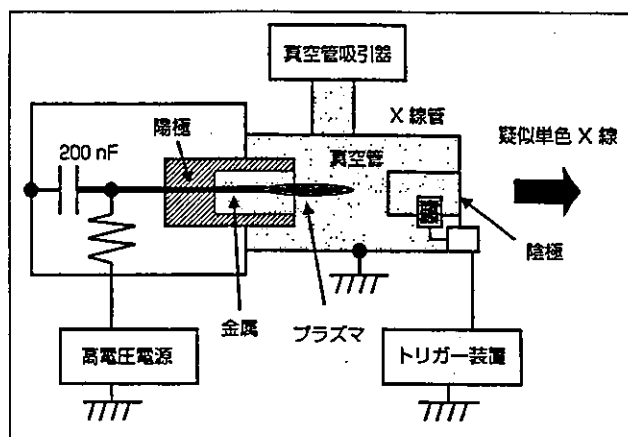


高電圧電源を用い50～60kVまで充電し、トリガ装置による印加によりX線管内へ放電される時に、陽極のターゲット金属が気化され、疑似単色X線が発生される。

図Ⅲ-76 プラズマX線装置の概略



ある。この装置の空間分解能は $25\ \mu\text{m}$ で、さらに感度は放送用CCDカメラの60～100倍の感度を持つ。現段階では $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の血管の描出を確認している。本装置は、臨床応用の対象として、末梢動脈閉塞症に対する血管再生療法の効果判定を念頭においている。すなわち、体厚10cm程度の下肢血管造影に応用する。この普及型単色X線装置では、放射光を線源とした場合とは異なり、心血管系など厚い被写体を撮影することはできない。

c. プラズマX線

プラズマX線の性質は高輝度でシャープなK系列特性X線で、SN比が非常に高い特徴がある。プラズマX線発生装置の原理は図に示すように、コンデンサーに50～60kV程度まで充電し、トリガ電圧の印加でX線管に放電する。放電された陽極側の金属は管電流により気化され、弱電離線状プラズマの成長とともに特性X線が発生する(図Ⅲ-76)。ヨードのK吸収端である 33.3keV 近傍の単色に近いX線を得たい場合には、ターゲットとしてCe(原子番号58)を選択すれば 34.566keV にピークを有する特性X線が得られる。こうして得られたX線は、そのターゲット特性の疑似単色X線が得られるので、光子量を減少させるような金属フィルターなどの操作を必要としない。このプラズマX線装置は前述の普及型X線装置に比べ高輝度であり、人体のような比較的厚い被写体も通過することができる³⁾。

4. 検出法

a. 高解像度・高感度蛍光体

本微小血管造影法では浜松ホトニクス製のファイバオプティックプレート(FOS)(Gd₂O₂S(Tb)またはCsI(Tl))を用いてX線透亮像を可視光線に変換し、HARPカメラで撮影する。FOSは数ミクロン径のガラスファイバを数千万本束ねた光学デバイスに、X線シンチレータを付加したX線イメージングデバイスである。蛍光体のみを堆

積しているため膜厚を薄くでき、光の拡散を小さくすることができ高解像度 (50 μm (20 ラインペア)) となる。また、蛍光体だけを堆積させ不純物を含まない高密度と微細な柱状結晶構造は、光ファイバに似た微細かつ緻密な構造が減光を大幅に削減し高感度を保てる。

b. HARP 法

CCD を用いたハイビジョンカメラでは、画素あたりの光子数が減少し感度が低下してしまうため、高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。アバランシェ型ハイビジョン用撮影管は高解像度で、高感度の撮影が可能であり、その構造は非セレン膜で構成された光伝導電層を有し、高電圧操作下で電子なだれ現象が生じ、実効量子効率が数百倍の光電変換をすることができる。NHK の開発したモノクロ新 super-HARP カメラは、25 μm 非セレン膜の構造を持ち、CCD カメラより 100 倍以上の感度を持ち合せている⁵⁾。

5. 症例提示

a. 放射光を用いた微小血管造影

ウサギ虚血肢の血管再生モデルを用いた、放射光施設での実験で血管径 100 μm 以下の血管が鮮明に描出されているのがわかる (図 III-77)。DNA は体内に投与すると、DNA 分解酵素の働きにより可及的速やかに分解されてその効果が失われてしまう。そこで著者らは、ゼラチンハイドロゲル (GHG) と DNA の複合体を形成し再生

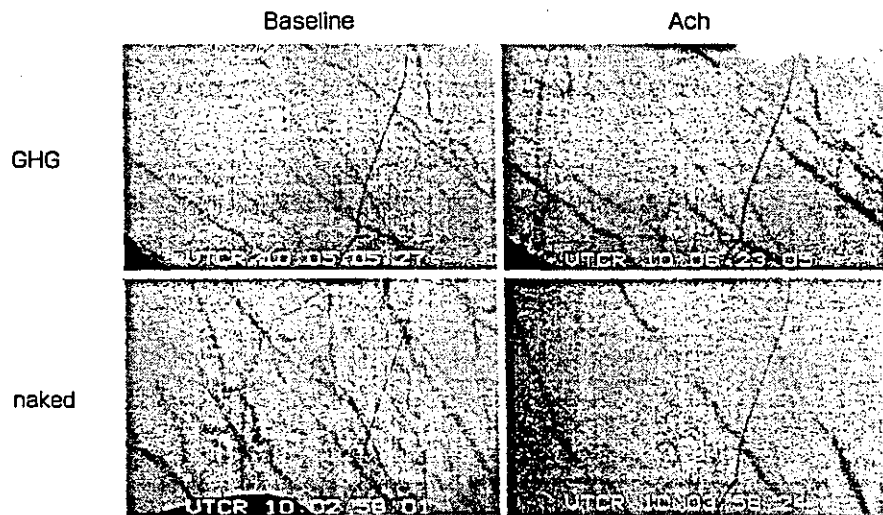


図 III-77 放射光を用いた微小血管の描出と血管機能の評価方法

再生治療により新生された血管径 100 μm 以下の血管が描出されている。GHG・VEGF 複合体投与群ではアセチルコリン (Ach) 投与にて Baseline と比べ、血管の拡張と血管数の増加を認めるが (図上)、DNA 単独群 (naked) では血管の拡張と増加は認められない (図下)。

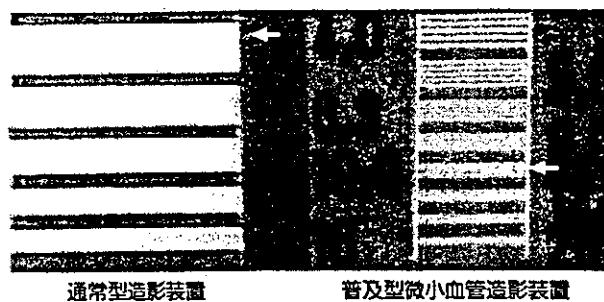
効果を徐放することにより、血管がより成熟度を増すかどうか微小血管造影法を用い検討した。DNAには血管成長因子であるVEGFを使用し、対象としてVEGF単独群、GHG・VEGF複合体群に血管再生治療を施行した。血管成熟度の評価方法はアセチルコリンの血管内投与による血管の反応性を用いた。結果はDNA単独群では血管の反応性は認めなかったが、GHG・VEGF複合体群では血管が拡張し、血管数が増加した(図Ⅲ-77)。

b. 普及型単色X線装置を用いた微小血管造影

微小血管撮影を通常の血管造影装置と普及型単色X線装置の比較を提示する。テストチャートとファントムを用い、両装置の空間解像度と微小血管の描出を検討した。テストチャートによる解像度は、通常型の造影装置は $250\ \mu\text{m}$ (2ラインペア)、普及型単色X線装置は $50\ \mu\text{m}$ (10ラインペア)であった(図Ⅲ-78)。単色X線装置の画像では、イヌ冠動脈の中隔枝が末梢まで分岐するたびに血管径が減ることが観察できるが(図Ⅲ-79右)、通常型X線装置の画像では血管端がぼやけて、分岐に伴う血管径の減少を確認できないので(図Ⅲ-79左)、微小血管の評価には不向きである。

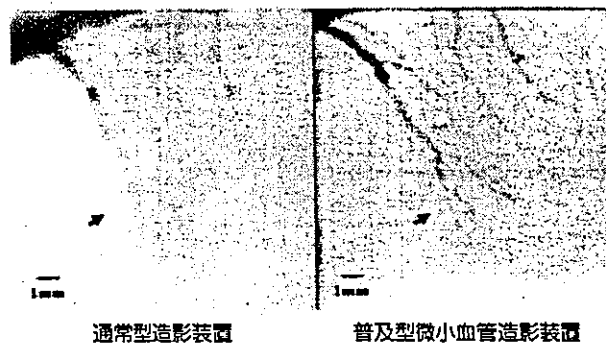
ポリキャピラリーによるX線平行化の効果を検討した。X線を平行化しない画像では、被写体を検出器から離すと血管端がぼやける。一方、キャピラリーによりX線を平行化すると、被写体を検出器から離れた場合でも血管両端の歪みがなく微小血管の描出をさらに向上させる(図Ⅲ-80)。

チャートを用いた図左の通常型血管造影装置の解像度は $250\ \mu\text{m}$ (2ラインペア)、図右の普及型微小血管造影装置の解像度は $50\ \mu\text{m}$ (10ラインペア)を示す。



図Ⅲ-78 チャートによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較

イヌ冠動脈にヨードマイクロスフィア(直径 $25\ \mu\text{m}$)を詰めて結紮したファントムを用い、撮影した。図左は通常型血管造影装置で撮影したものであり、冠動脈末梢側はぼやけてしまっているが、図右の普及型微小血管造影装置で撮影したファントムは末梢まで血管を追うことができる。



図Ⅲ-79 イヌ冠動脈ファントムによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較



キャピラリーなし

キャピラリーあり

図Ⅲ-80 キャピラリーによる平行化の効果

イヌ冠動脈ファントムを検出器から15cm離れた状態で撮影した。血管は分岐すると血管径が小さくなるが、平行化していない図左の血管は分岐することに血管径が細くならないが、右のキャピラリーで平行化した場合には、分岐ごとに血管径が細くなるのが観察できる。

6. まとめ

再生医療が注目されているにもかかわらず、臨床において再生血管を可視化して評価する方法は確立されておらず、臨床症状の改善が唯一の治療評価となっているのが現状である。微小血管造影法の可及的速やかな普及化が期待されている。また、微小血管造影法は病理学的診断方法とは異なり、治療前後で血管の変化を検討することができ、臨床応用に有用と考えられる。さらに、動脈硬化・糖尿病などによる微小血管疾患、悪性腫瘍などの早期診断にも発展していく可能性も有する。本稿では、再生血管の評価方法として、微小血管造影法に必要な要素と放射光および普及型微小血管造影装置について概説した。

[知久正明・西上和宏・佐藤英一・盛 英三]

参考文献

- 1) Tateishi-Yuyama E, et al. : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360 : 427-435, 2002.
- 2) Mori H, et al. : Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation*, 89 : 863-871, 1994.
- 3) Sato E, et al. : Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-xray laser generator. *SPIE*, 4662 : 538-548, 2002.
- 4) Tanioka K, et al. : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 1656 : 1-12, 1992.
- 5) Kubota M, et al. : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcast.*, 42 : 251-258, 1996.

2. 遺伝子を用いた再生医療

1)ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞
-遺伝子ハイブリッド治療への応用

藤井隆文・永谷憲歳・徳永宜之・神田宗武・福山直人
田中越郎・田畑泰彦・浅原孝之・盛 英三

重症虚血性心疾患，難治性閉塞性動脈硬化症などでは，これまでの観血的治療法では十分な効果が得られない症例も多く認められる．遺伝子，細胞を用いた血管新生療法が，これからの新しい治療法の核として期待されているが，これらの導入法の開発が今後の大きな課題である．われわれは遺伝子を格子構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ，この複合体を貪食能を有する細胞に導入する方法を開発した．これにより，従来の非ウイルス性ベクター法よりも生体内での遺伝子発現期間が延長した．機能遺伝子，貪食細胞によるハイブリッド治療は，補完的な血管新生を実現すると考えられる．

はじめに

近年の遺伝子治療に関する進歩は目覚ましいものがある．本法は臨床応用に大きな期待が寄せられている治療法のひとつである．

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに，悪性腫瘍，自己免疫疾患に対して遺伝子治療の臨床応用が開始され，その後循環器領域においても1994年に米国のタフツ大学で血管内皮増殖因子 VEGF 遺伝子を用いた下肢血管閉塞患者に対する遺伝子治療の臨床試験が行われた¹⁾．現在行われている遺伝子治療は，欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療法から，生体の治癒力を補う目的の治療にも拡大されて施行されている．

血管床の再生をめざした
遺伝子治療法の現状

遺伝子導入法としては，ベクターと呼ばれる運

び屋を用いるのが一般的だがウイルスを用いる方法と非ウイルス性の方法の2通りがある．前者はアデノウイルスやレトロウイルスなどを用いた方法があり，導入効率が高いという利点はあるが，バイオハザードが課題である．それに比べてプラスミド直接投与方法に代表される非ウイルス法は，導入効率は劣るが，安全操作が簡便である．しかしこの方法は投与したプラスミドDNAが細胞へ導入される前に生体内に存在する核酸分解酵素により分解される可能性が生じる．従って十分な治療効果のためには，大量の遺伝子が必要である．さらに現在でも遺伝子導入法には技術的な問題が多く残されており，特にウイルスベクターの安全性の問題，標的細胞への遺伝子導入効率の問題など数多くあり，臨床適用も限られている²⁾．

近年の遺伝子治療の進歩により遺伝子の欠損，変異に関わらず，サイトカイン，血管新生因子などの生体作用物質を投与することにより，著明な治療効果が報告されている．

Key Words

ハイブリッド治療，生分解性ゼラチン，マクロファージ，血管内皮前駆細胞，ベクター，VEGF，FGF，Cell-based gene therapy，Angiogenesis，Vasculogenesis

表① これまで行われてきた主な Cell based gene therapy

報告者	Cell	Gene	対象	導入部位	目的
1 Plautz, G. et al ¹⁾	SMCs (smooth muscle cell)	β -galactosidase	動脈硬化	腸骨動脈	組み換え遺伝子による血管病変の治癒
2 Forough, R. et al ²⁾	SMCs (smooth muscle cell)	TIMP-1	閉塞血管	内頸動脈	内皮細胞の過形成を防ぐ
3 Chen, L et al ³⁾	SMCs (smooth muscle cell)	ectNOS	閉塞血管	内頸動脈	内皮の寛容性を増大し、血管内腔の拡張の制御
4 Osborne, W.R.A. et al ⁴⁾	SMCs (smooth muscle cell)	Epn	内頸動脈	内頸動脈	赤血球の増加
5 Nabel, E. et al ⁵⁾	Endothelial cell	recombinant DNA	閉塞血管	腸骨動脈	血栓溶解、血管新生、成長因子の発現
6 Mesina, L. et al ⁶⁾	Endothelial cell	lac Z	虚血四肢	大腸動脈	付着前への内皮細胞の導入
7 Wilson, J. et al ⁷⁾	Endothelial cell	lac Z	動脈硬化症	グラフト	動脈硬化症の治療
8 Dichek, D.A. et al ⁸⁾	Endothelial cell	TPA, a-UPA	人工血管グラフト	大腸動脈、内シヤント	抗血栓効果
9 Flugelman, M.Y. et al ⁹⁾	Endothelial cell	tPA	ステント	ステント	血栓溶解
10 Koh, G.Y. et al ¹⁰⁾	skeletal myoblast	TGF- β	心筋	心筋	心筋での組み換え分子の長期間発現
11 Barr, E. et al ¹¹⁾	myoblast	human growth hormone	正常下肢	下腿筋肉	閉塞前への安定したタンパク導入
12 Lee, R.J. et al ¹²⁾	myoblast	VEGF	正常心筋	左心室	血管新生に誘導された血管新生因子の発現が必要
13 Yau, T.M. et al ¹³⁾	myocardial cell	VEGF	虚血心筋	心筋虚血部	血管新生
14 Suzuki, K. et al ¹⁴⁾	skeletal myoblast	VEGF	虚血心筋	心筋虚血部	血管新生、血管拡張
15 Lu, Y. et al ¹⁵⁾	bioartificial muscle	VEGF	虚血四肢	虚血四肢	血管新生・タンパク産生
16 Campbell, A.L.M. et al ¹⁶⁾	SMCs (smooth muscle cell)	VEGF	肺高血圧症	内頸動脈	肺高血圧症の遅延を防ぐ・右室リモデリングの改善
17 Iwaguro, H. et al ¹⁷⁾	EPCs	VEGF	虚血四肢	尾静脈	血管新生・血栓改善

よりよい血管新生療法には有用な血管新生因子が必要であり、導入する血管新生因子としてこれまでに FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor)^{[18][19][20]}, HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) などが報告されている²¹⁾。

1992年、Baffourら²¹⁾により家兎の下肢虚血モデルに対しFGF-2を導入することではじめて血管新生因子を用いた血管新生療法が報告された。その後もVEGFを用いた血管新生療法の有効性が報告されたが、これらは遺伝子導入ではなく直接タンパクを導入するものであった。ヒトへの臨床応用を考えると大量のタンパク質の精製に莫大なコストがかかる。そのため血管新生因子のプラスミドを血管内あるいは虚血部に投与する遺伝子治療が考えられた。

これら血管新生因子は血管内皮細胞増殖作用だけでなく様々な生物活性作用も有する。しかしながらこれらの血管新生因子が実際の生体における血管新生時にどのように関与しているかわかっていない。

最近の研究では血管新生因子の発現による血管新生^{[22][23]}の過程が明らかになりつつあり、VEGFの過剰発現により腫瘍形成や血管透過性の

高い新生血管の発育などが報告されている。正常な血管新生と成熟した血管の発育には細胞の型と分子のバランスが必要であるというWell-tempered vesselの概念²⁴⁾が提唱されており、そのためには相互に調節しあった血管新生因子、細胞や遺伝子を組み合わせたハイブリッド治療²⁵⁾が必要となってくると考えられる。生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入療法は、*in vitro*での細胞内への遺伝子導入を非ウイルスベクターで高効率に行うことができ、両親媒性ベクターとして血管内投与の可能な非侵襲性治療が期待できる優れた方法であり、さらに治療効果に関連する機能を有する複数の因子を導入することで細胞の作用と遺伝子の作用の相乗効果のみならず、それぞれの補完性も合わせ持った治療が可能となるであろう。

II. Cell-based gene therapy²⁶⁾

Cell-basedの遺伝子導入療法は、遺伝子の発現期間の延長を通じてwell-tempered vesselの形成に役立つ可能性がある²⁷⁾。1991年にPlautzら²⁸⁾によりはじめてCell-basedの遺伝子導入が行われ、それ以降平滑筋や内皮細胞を用いた遺伝子導入が報告されてきた。その目的は遺伝子単独導入療法に比べて、より安定した、また長期の遺伝子発現



である。その目的のために種々の細胞を遺伝子発現の基地 (base) として用いる。細胞内ではDNA分解酵素による遺伝子の分解は極めて限られており、一方、遺伝子の転写からタンパクの発現にいたる全ての機構が整えられている。これらの理由から *ex vivo* で細胞内に遺伝子を導入し、この細胞を生体内に投与するという cell-based gene therapy¹¹⁾⁻²⁵⁾ が行われるようになった。

表①に示すようにbaseとして用いられる細胞としては内皮細胞¹³⁾⁻¹⁷⁾、骨格筋細胞¹⁹⁾⁻²³⁾、平滑筋細胞⁹⁾⁻¹²⁾などが報告されている。遺伝子治療の標的器官は心臓、肺、下肢などである。導入される遺伝子はVEGFなどの血管新生因子²⁰⁾⁻²⁵⁾、GFPなどのマーカー遺伝子⁹⁾、その他の遺伝子(TIMP-1²⁶⁾、t-PA⁷⁾、ecNOS¹¹⁾)などが報告されている。

Cell-basedの遺伝子導入の利点は、

- (1) 障害血管へ選択的な遺伝子導入を行うために、人工血管やステントのコーティングとして細胞を用いる。全身投与の手段としても用いられる可能性を有する。
- (2) 遺伝学的に細胞を比較的均一な集団として発育させることができる。
- (3) 遺伝子の導入、発現が確実に行われる。
- (4) ベクターに対する免疫、炎症反応が少ない、などである。

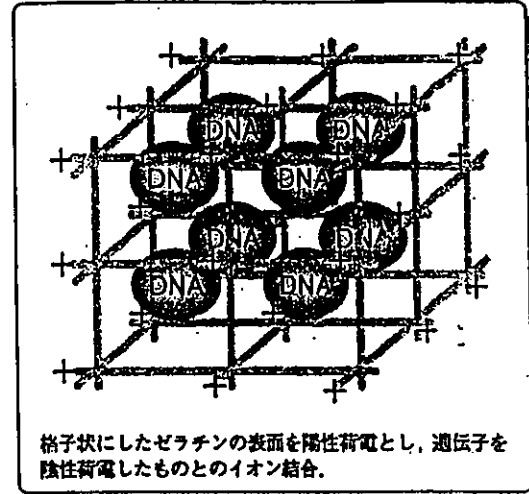
逆に、

- (1) 発現に遅れが伴う。
- (2) 採取、植え込みに別の過程が必要である。
- (3) 同系の細胞が必要である。
- (4) 培養中に細胞の表現型の変化が起こる、などの欠点もある。

遺伝子導入の標的細胞として当初血管系、平滑筋細胞と内皮細胞を使って行われた。血管内皮細胞は局所での血管の状態を調節し全身への遺伝子投与という可能性を持っている。

Plautz⁹⁾ らによる平滑筋細胞にβ-galactosidaseを遺伝子導入した研究を皮切りに、いくつかの研

図① 生分解性ゼラチンの格子構造—遺伝子結合



究が行われた。Forough¹⁰⁾ らはTIMP-1を導入し内膜の過形成を減少させ、Chen¹¹⁾ らはeNOSを導入することにより血管のリモデリング、血管径の拡張を起こさせた。さらにはエリスロポイエチンの導入による赤血球の増加、血管新生などへの可能性に研究も行われた。

内皮細胞は微小血管のネットワークに接着するので、骨格筋の血管床なども遺伝子投与のレシピエントとなる利点を持っている。

内皮細胞への遺伝子導入¹³⁾⁻¹⁵⁾ は、全身への遺伝子投与の手段として始められ、グラフト¹⁶⁾ や、t-PAを導入したステントへの細胞-遺伝子導入¹⁷⁾ なども行われた。

しかし、ほとんどのCell-based gene therapyの場合、細胞の役割は、基地・baseとしての機能であり細胞自体による治療効果は一部を除いて考慮されていなかった。また大部分の遺伝子を導入した細胞は血管内投与で用いることはできなかった。細胞塊が血管を閉塞する危険性があるためである。そのため胸、腹部の主要臓器への投与はかなりの侵襲を伴うこととなる。

III.ゼラチンを用いた遺伝子細胞ハイブリッド治療

本治療法は以下のような特徴を有する。

- (1) cellがbaseとしてだけでなく治療要素としての働きを持つ

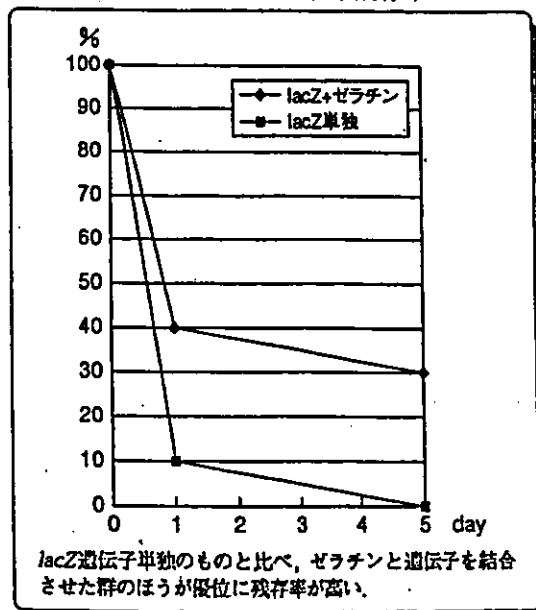
- (2)血管内投与が可能である
 - (3)ex vivoでの導入効果が高い
- などの点で、従来のcell-based gene therapyよりも優れている。

このハイブリッド治療を実現するkeyとなる物質がゼラチンである(図①)。

ゼラチンの特徴として、

- (1)陽性に帯電しているのに陰性に帯電している種々の物質(核酸やタンパク質)をイオン結合することができる。
- (2)構造が三次元格子状なので結合物質をゲル内部に保護することにより分解酵素の影響を受けにくくする。
- (3)ゼラチンであるため生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を放出する。
- (4)その分解速度は架橋度を変えることにより自由に調節できる。
- (5)ゼラチン-遺伝子複合体は食食細胞(血管内皮前駆細胞^[10]、単球、マクロファージ)などに容易に食食される。
- (6)食食細胞内で高率に遺伝子を発現する。などが挙げられる。

図② 生体内におけるlacZ遺伝子残存率



その構造や表面電荷を変えることが容易であることから²⁰⁾、われわれはゼラチンを遺伝子の担体として利用することを着想した。そこでゼラチンの構造を格子状にしてその表面電荷を陽性とする事で陰性荷電した遺伝子とイオン結合させ、ゼラチン-遺伝子複合体を作成した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を飛躍的に延長させることに成功し(図②)、遺伝子の発現率も従来の遺伝子の単独投与と比較して約10倍の増加が認められた(図③)²¹⁾。

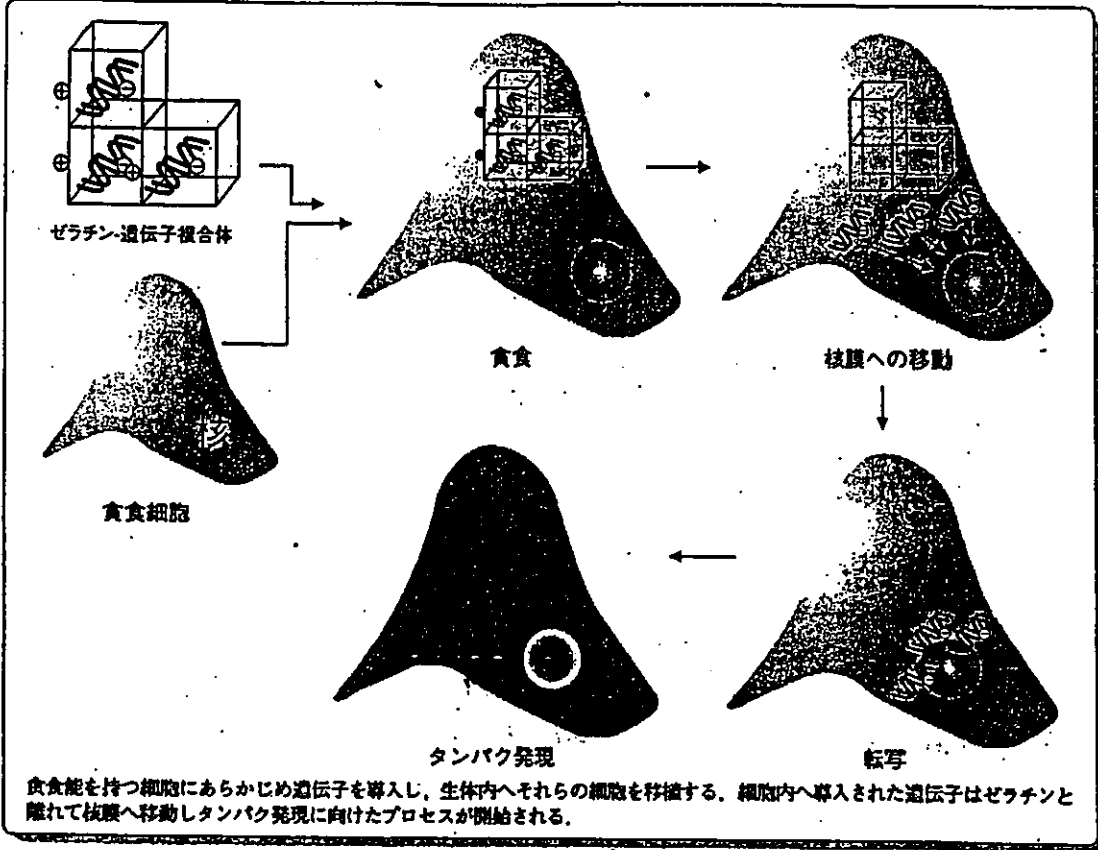
本法の優れた点は、ウイルスベクターを用いないため感染の危険性が少ないことに加えて、移植したマクロファージや単球が走化性によって障害部位に特異的に集まるため遺伝子の導入効率が高まること、また標的組織へ凝集したこれらの細胞が導入された遺伝子をもとにタンパク質を合成することである。

われわれが考案したゼラチンを用いた細胞内遺伝子導入法は、食食能をもつ細胞であれば基本的

図③ 生分解性ゼラチン-lacZ



図④ 貪食細胞によるゼラチン-遺伝子複合体の取り込み



応用編

II章 再生医療とDDS

に適用可能であると考えられる。従って、貪食能を有する血管内皮細胞、マクロファージなどにあらかじめ遺伝子を導入して生体内へ細胞移植すれば、血管新生能力、標的細胞への遊走能に加えて導入した遺伝子による血管新生作用の相乗効果が期待される。下肢虚血モデルに対する治療法としては、機能強化の目的で血管内皮前駆細胞へ VEGF の遺伝子を導入して投与方法が報告され良好な成績が報告されている。(図④)

さらにわれわれは、血管内皮前駆細胞の有する血管新生作用と補完的な作用を有する遺伝子を導入することで、より成熟した血管床を再構築することをめざしており、難治性の循環障害である心筋梗塞、慢性閉塞性動脈硬化症、原発性肺高血圧症の治療に適用できないかと考えた。原発性肺高血圧症は何らかの原因により肺血管抵抗の上昇が起こり、その結果として右心不全が生じる病態であり、血管内皮細胞の機能不全が本病態の要因である可能性が指摘されており、現在の治療法とし

ては血管拡張物質である NO、プロスタサイクリン、アドレノメデュリンの治療効果が確認されている。

現在われわれはこれらの遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞を用い、ラットの肺高血圧症モデルに対する細胞移植治療の効果を検討中であるが良好な成果を上げている²⁾。

おわりに

以上よりゼラチンを用いた遺伝子導入による血管新生療法は、徐放化による持続発現のみならず、遺伝子・細胞それぞれの機能を生かした方法であるといえる。従来法に比べて、安全性、侵襲に関しても優れていると考えられるが、今後は遺伝子導入効率の改善はもとより、遺伝子の発現部位や発現時期を制御する技術も必要であろう。機能的により成熟した組織や器官の再生を可能とするには複数の細胞や遺伝子を組み合わせるハイブリッ

ド治療が必要であり、生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法がヒトへの臨床応用へ向けてさらなる改善が必要となる。

● 関連研究Web site

www.ncvc.go.jp/
 国立循環器病センター
<http://www.nacos.com/jshc/>
 日本組織細胞化学会
<http://new.nacos.com/jscb/>
 日本細胞生物学会
<http://jtca.urmin.jp/>
 日本組織培養学会

用語解説

1. 血管形成 (vasculogenesis) 未分化な細胞 (血管内皮前駆細胞) が in site (目的地) にて増殖、分化し血管を構成する過程。
2. VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮成長因子) 受容体が内皮細胞に発現するサイトカインで、血管周囲の細胞から産生・分泌される。血管内皮細胞を特異的に増殖させ、血管透過性を亢進させる活性をもつ。ヒト組織中に最も豊富にある VEGF165 はヘパリン結合性の分泌型糖タンパク質である。
3. 血管新生 (angiogenesis) 既存血管の血管内皮細胞が増殖および遊走して成立する成熟個体の血管形成。
4. 血管内皮前駆細胞 末梢血液中に存在する骨髄由来の細胞で、血管内皮細胞に分化可能な血液細胞として発見される。抗原性などから、胎児期に存在する angioblast に近い細胞と推察されている。生体の血管形成に血液中から患部に集積する。

▶▶ 参考文献

- 1) Isner JM, Pieczek A, et al: Lancet 348, 370-374, 1996.
- 2) Yang Y, Trinchieri G, et al: Nat Med 1, 890-893, 1995.
- 3) Gospodarowicz D, Brown KD, et al: J Cell Biol 77, 774-778, 1978.
- 4) Keck PJ, Hauser SD, et al: Science 246, 1309-1312, 1989.
- 5) Baffour R, Berman J, et al: J Vasc Surg 16, 181-191, 1992.
- 6) Blau HM, Banfi A, et al: Nat Med 7, 532-534, 2001.
- 7) 福山直人, 笠原啓史 他: 循環器科 51, 259-263, 2002.
- 8) Kullo JI, Simari DR, et al: Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 196-207, 1999.
- 9) Plautz G, Nabel EG, et al: Circulation 83, 578-583, 1991.

- 10) Forough R, Koyama N, et al: Circ Res 79, 812-820, 1996.
- 11) Chen L, Daum G, et al: Circ Res 82, 862-870, 1998.
- 12) Osborne WR, Ramesh N, et al: Proc Natl Acad Sci USA 92, 8055-8058, 1995.
- 13) Nabel EG, Plautz G, et al: Science 244, 1342-1344, 1989.
- 14) Messina LM, Podrazik RM, et al: Proc Natl Acad Sci USA 89, 12018-12022, 1992.
- 15) Wilson JM, Birinyi LK, et al: Science 244, 1344-1346, 1989.
- 16) Dichek DA, Anderson J, et al: Circulation 93, 301-309, 1996.
- 17) Flugelman MY, Virmani R, et al: Circ Res 70, 348-354, 1992.
- 18) Koh GY, Kim S-J, et al: The J Clinical Investigation 95, 114-121, 1995.
- 19) Barr E, Leiden JM, et al: Science 254, 1507-1509, 1991.
- 20) Lee RJ, Springer ML, et al: Circulation 102, 898-901, 2000.
- 21) Yau TM, Fung k, et al: Circulation 104(suppl I), I-218-I-222, 2001.
- 22) Suzuki K, Murtuza B, et al: Circulation 104(suppl I), I-207-I-212, 2001.
- 23) Lu Y, Shansky J, et al: Circulation 104, 594-599, 2001.
- 24) Campbell AIM, Zhao Y, et al: Circulation 104, 2242-2248, 2001.
- 25) Iwaguro H, Yamaguchi J, et al: Circulation 105, 732-738, 2002.
- 26) Tabata Y, Ikada Y: J Pharm 39, 698-704, 1987.
- 27) Kasahara H, Tanaka E, et al: Journal of the American College of Cardiology, in press.
- 28) Nagaya N, Horio T, et al: Circulation 106(suppl II), II-496, 2002.

▶▶ 参考図書

- BME vol 16. No. 2 特集 再生医療と ME の接点. 2002.
- 循環器科 vol 51, No.3 循環器内科学における先進治療. 2002.

藤井隆文 (ふじいたかふみ)

(国立循環器病センター 研究所心臓生理部)

1997年 岡山大学医学部卒業

岡山大学医学部心臓血管外科入局

1999年 兵庫済生院心臓血管外科

2000年 社会保険広島市民病院心臓血管外科

2001年 国立病院岡山医療センター心臓血管外科

2002年 国立循環器病センター 研究所心臓生理部



再生医療の未来

3. 尿路の再生医療

3.1 はじめに

尿路を構成する臓器・組織（腎臓、尿管、膀胱および尿道）の機能的欠損は、種々の悪性腫瘍、先天奇形、代謝疾患や神経障害などさまざまな疾患によって引き起こされる。現在臨床では、人工臓器、移植あるいは再建を上手に導入して治療を行っている。例えば、末期腎不全に対しては腎臓移植、透析療法（人工臓器）でその機能の一部を代替し、下部尿路の機能欠損に対しては自己組織の一部を使用して機能再建を行っている。

膀胱の機能は、低圧で多量の尿を貯留し、必要に応じてこれを排出し膀胱を空にすることである。膀胱壁の線維化、膀胱の異常収縮、膀胱を支配する神経の機能不全は、低コンプライアンス、高圧の膀胱の原因となる。膀胱機能異常を来す疾患としては、先天性疾患（後部尿道弁、膀胱外反症、尿道上裂）、外傷（損傷、頰回の膀胱内操作）、炎症（慢性膀胱炎、間質性膀胱炎、膀胱結核）、放射線障害、機能的拘縮（神経因性膀胱、特発性不安定膀胱）などがある。これらの疾患を原因として尿路感染症、尿失禁、腎障害、腎不全などを引き起こすため、消化管などを用いた膀胱拡大術などの外科的処置が必要となる。また、膀胱の悪性腫瘍などに対する膀胱摘出手術後はQOLが著しく低下するため、最近では代用膀胱の再建が行われるようになってきている。一方、自己の腸管を使用する下部尿路再建では、感染症、結石の形成、代謝異常、癌の発生など未解決の問題を多く抱えている¹⁾。

1990年代になると生体内や培養系で体の組織構造を再生させる、いわゆる tissue engineering (組織工学) が Langer と Vacanti によって提唱された²⁾。組織工学は新たな機能的組織を造るための細胞やマトリックスを扱う、細胞生物学と材料工学が統合した先端医療テクノロジー分野である。特に、皮膚、眼、軟骨、血管、神経などの領域で研究が進んでいる。このような背景の中で、尿路の組織工学も従来の治療法の欠点を克服する新たな手法として注目されている。最近では、ハーバード大学の Atala らによる積極的な研究により、一部で臨床試験が開始されている。本稿では下部尿路、特に膀胱の再生医療研究の最近の動向を概説するとともに、我々のグループが系統的に追求している細胞シート工学技術を利用した尿路再建の新しい再生治療としての可能性について述べたい。

3.2 尿路再建の歴史

尿管、膀胱、尿道の機能不全に対する再建には、さまざまな組織やバイオマテリアル（人工材料・天然材料など）が古くから用いられている。この項では主に、膀胱再建に利用されたバイオマテリアルの歴史について述べる。膀胱再建時、補填材料に求められる機能は水密性、尿中物質の非透過性、物理的強度、生体適合性、非感染性、非結石形成性などである。補填材料としてはこれまでに、筋膜 (Neuhof ら:1917)、皮膚 (Draper and Stark:1956)、保存膀胱 (Tsuji ら:1961)、硬膜 (Kelami:1971)、大網 (Goldstein ら:1967)、消化管 (Leong and Ong:1972)、腹膜 (Hutschenreiter ら:1978)、心外膜 (Kambic ら:1992) などの生体由来の材料や、ゼラチンスポンジ (Tsuji ら:1967)、シリコン (Bogash ら:1960)、ポリビニルアルコール (Kudish ら:1957, Ulm and Lo:1959)、テフロン (Bona and De Gresti:1966) などの人工材料が試されてきた。しかし注目したいのは、これらの材料は機械的、構造的、あるいは生物学的適合性の問題により、水腎症、腎盂腎炎、腹膜炎、膿瘍の形成、結石の形成を起こし、いずれも失敗に終わっていることである³⁾。Taguchi ら⁴⁾が防水加工した和紙を用いて13人の患者に対し膀胱拡大術を施行したところ、和紙に沿って肉芽組織が再生し、和紙は後日膀胱内から内視鏡で除去したと報告している。Goya⁵⁾は expanded polytetrafluoroethylene (E-PTFE) グラフトを用いてイヌの膀胱を拡大し、後日 E-PTFE グラフトが膀胱内に脱落すると報告している。これらの報告から、非吸収性の人工材料は生体適合性が悪く、反応性の肉芽の形成が起こり、グラフトが外へ排出されるように生体が反応することがわかる。現在では、人工材料に対しても生体材料と同様の生体吸収性が求められる。

1980年代に入ると消化管など、自己組織の一部を利用した尿路再建術が次々と報告され、臨床の現場に普及した。これにより、尿路の補填材料に関する研究は一時的に下火になった。膀胱拡大術では胃利用膀胱拡大術 (Adams ら:1988)、尿管利用膀胱拡大術 (Churchill ら:1993)、seromuscular patch (Gonzalez ら:1995) などの手技が開発され、代用膀胱では Kock pouch (Skinner ら:1984)、Indiana pouch (Rowland ら:1987)、ileal neobladder (Hautmann ら:1988) などの

手術手技が確立された。

1990年代になると腸管を使用した尿路再建や代用尿路の成績と同時に、代謝性アシドーシス（アルカローシス）、電解質異常、粘液の産生、尿路感染症、結石の形成などさまざまな合併症が報告されるようになった⁹⁾。さらに電解質異常やアシドーシスは骨代謝異常を起こすため、小児の成長障害につながる可能性も指摘されている。また、消化管を使用した膀胱拡大術や代用膀胱は多くの場合、自己導尿や定期的な洗浄といったメンテナンスが必要である。以上のように、消化管が尿路の再建材料として十分に適切でないことが次第に明らかにされた。このような状況の中で、生体吸収性材料や細胞を用いた組織工学の概念⁹⁾が提唱されると、一気に膀胱再生に関する研究が盛んになった。組織工学による膀胱再建は従来の再建方法の欠点を補い、機能的な組織を再生することが期待できたからである。事実、この10年間に多くの施設から動物を用いた膀胱再生の研究が報告され、一部の施設では臨床試験を開始するにあたり、新しい治療法として組織工学が世界的な注目を集めるに至っている。

3.3 細胞を用いない膀胱再生技術

近年、膀胱再生研究の中心となっているのは、生体由来のコラーゲンを主体とした無細胞グラフトである。これらのグラフトを用いて膀胱を拡大すると、自己膀胱の上皮細胞や平滑筋細胞がグラフトに進入し、増殖する。進入した細胞は新たにマトリックスを産生し、それと同時にグラフトが吸収され、新たな膀胱壁が再生される。代表的な生体由来の無細胞グラフトは、小腸粘膜下層（small intestinal submucosa : SIS）グラフトと膀胱無細胞間質（bladder acellular matrix : BAM）グラフトがある。

3.3.1 小腸粘膜下層（small intestinal submucosa : SIS）グラフト

SISは、主にブタの小腸内腔から粘膜を、外壁から漿膜と筋層を機械的に取り除いて作製される、コラーゲン成分に富んだ厚さ約0.1mmの無細胞グラフトである。抗原性はほとんどなく、bFGF、VEGF、TGF β などの増殖因子が残留していることがこの材料の特徴とされている。すでにSISはCook Biotechnology社よりSurgisisTMとして市販され（図8.3.1）、膀胱再建以外に大動脈、大静脈、心臓、靭帯、皮膚などの再生に利用されている⁹⁾。泌尿器科領域の臨床では、スリング手術の吊り上げ材料として米国で使用されている⁹⁾。SISを用いた膀胱再生研究は、1995年のKroppらの

報告に始まった⁹⁾。イヌを用いた膀胱拡大術モデルでは術後1ヵ月ですでに粘膜層、粘膜下層、平滑筋層が再生し、15ヵ月後でも良好に機能したと報告している⁹⁾。一方で、SISグラフトが収縮や石灰化を起こし膀胱の補填材料として適切でないとする報告も見られる¹⁰⁾。一口にSISといっても各施設により作製方法が異なり、ドナーとなるブタの年齢、SISの採取部位（空腸、回腸）、単層性か多層性か、滅菌の方法などがその再生能に影響している可能性がある¹¹⁾。

3.3.2 膀胱無細胞間質（bladder acellular matrix : BAM）グラフト

BAMは、膀胱組織から機械的あるいは水酸化ナトリウム、デオキシコール酸、SDS、DNA（RNA）分解酵素などを用いて化学的に細胞成分を取り除くことによって作製される（図8.3.2）。BAMを用いた膀胱再生モデルは、Sutherlandらの報告に始まった¹²⁾。大動物実験モデルにおいても粘膜、筋層の再生が確認された^{13,14)}。しかし、いずれも正常膀胱にBAMを移植したモデルであり、術後の膀胱機能の回復が再生組織によるものかどうかは明確にされていない。BAMやSISのような無細胞マトリックスは、宿主の膀胱から上皮細胞や平滑筋細胞が入っていく最適な足場としての空間を提供し、膀胱組織を再生する。しかし、より大きなグラフトほど組織の再生より先にグラフトの吸収が起こり、結果的にグラフトの収縮が起こる。最近、この問題を解決する大変興味深い報告がされた。Kanematsuら¹⁵⁾は、凍結乾燥したBAM（図8.3.2）にbFGFを添加することによって、膀胱組織再生時のグラフト収縮を予防し、再生組織内への血管新生を促すことを見出した。また、正常膀胱だけでなく病的膀胱におけるBAMを用いた組織再生の可能性も検討され始めた¹⁶⁾。

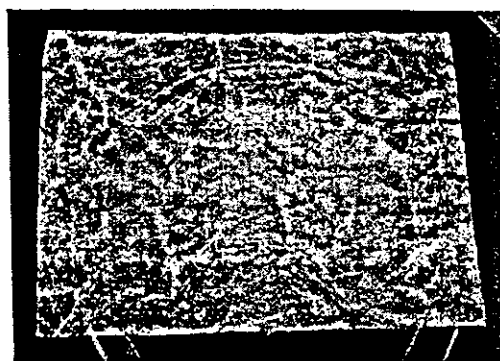


図8.3.1 小腸粘膜下層（SIS）グラフト
Cook社製のSIS(SurgisisTM)。大きさは5×7cm。凍結乾燥処理され、EOG滅菌されている。http://www.cooksis.com/ 参照。

3.4 細胞を用いた膀胱再生技術

3.4.1 培養細胞と足場の組み合わせによる膀胱再生

正常細胞の培養技術の進歩に伴い、無細胞のグラフトだけでなく培養細胞を用いた組織再生が盛んになってきた。培養細胞とそれをデリバリーする足場の組み合わせによって、さまざまな組織再生が可能となる。ポストンこども病院の Atala らのグループは、生体吸収性合成高分子である polyglycolic acid (PGA) や BAM といった足場に培養した膀胱細胞を組み合わせ、さらに *in vitro* で培養することにより、マトリックス単独で膀胱再生するよりも容量が大きく、機能的で線維化の少ない膀胱が再生すると報告している^{17,18)}。彼らの研究では、約 1cm² の膀胱生検検体から分離した膀胱の上皮細胞と平滑筋細胞を別々に *in vitro* で培養し増殖させ、あらかじめ膀胱の形をした polyglycolic acid (PGA) の足場を作製し、その内面に上皮細胞、外面に平滑筋細胞を各々播種し、一定期間培養した。その後、このグラフトを膀胱全摘した宿主に再度移植した。移植片は、血液の供給を確保するため大網で包む。移植後 11 ヶ月までにポリマーは吸収され、移植された新膀胱は尿を貯留するための正常の容量とコンプライアンス、宿主由来の神経組織の増生、そして正常な組織学的構造を有していたことを報告している¹⁸⁾。この結果は組織工学の成果として世界的な注目

を集めた。しかしながら、再生した膀胱組織の細胞が宿主由来なのか培養細胞由来なのかは明らかでなく、詳細な再生様式の解明は今後の課題となっている。ポストンこども病院では同様の方法で臨床試験をしており、その結果の詳細が待たれている。

3.4.2 フィブリンゲルによる細胞播種技術

フィブリンゲルは手術時の止血材料としてすでに広く臨床で使用されている。また、組織の接着や創傷治癒を促すとも考えられている。このフィブリンゲルが、細胞移植の担体として尿路再生の領域でも使用され始めた。Schoeller ら¹⁹⁾は、フィブリンゲルを用いた大変ユニークな方法で膀胱の補填材料を作製した。まず、ラットの鼠径部の下腹壁血管上にシリコンブロックを挿入することでブロック周囲に囊状の皮膜を形成したのち、ブロックを取り出しその内部にフィブリンゲルを担体とした尿路上皮細胞を播種した。囊状の皮膜内には尿路上皮が生着し、血管柄付きのグラフトとして膀胱を拡大することに成功した。Bach ら²⁰⁾はシリコンチューブを皮下に装入し、管状の皮膜を形成し、同様の方法で尿道様の構造を再生した。フィブリンゲルは細胞の担体や細胞播種の足場として有用であると考えられている。

3.5 細胞シート工学技術による尿路再生

前述のように従来の組織工学は、合成、もしくは生体由来の足場を単独または細胞を播種して移植する方法が世界的に主流となり、研究が進められている。これに対し、我々は足場を用いずに細胞をシート状で培養皿から剥離、移動、操作し、積層・重層化することによって組織構造を再構築する「細胞シート工学」を系統的に追究している。生体吸収性の足場を用いて組織を再構成する場合、足場上で培養した細胞や生体より進入した細胞が合成分泌するコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) の沈着とともに、生体吸収性の足場が分解・吸収される。この過程において必要以上の ECM の沈着、炎症や組織の収縮などが惹起される場合が多い。したがって、軟骨組織や骨組織など生体でも比較的細胞成分が少なく、ECM に富む組織の再生は可能であるが、肝臓、腎臓など細胞成分や血管の非常に多い組織の再生は難しいと考えられている。一方、我々の進める細胞シート工学技術では、培養皿上で目的の細胞を培養し、十分に増殖した時点で細胞を非侵襲的にシート状 (細胞シート) で回収し、利用する。回収された細胞シートは多くの細胞成分から構成され、細胞が分泌した接着タンパクなどの ECM を

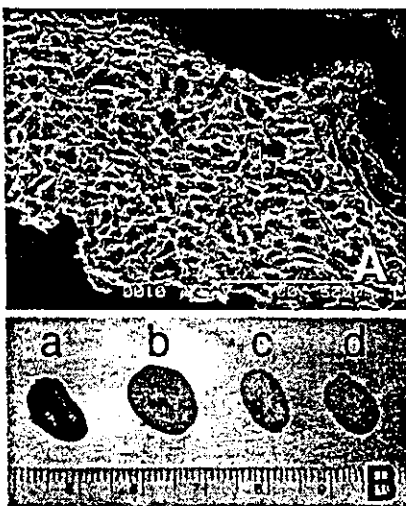


図 8.3.2 膀胱無細胞 (BAM) グラフト (京都大学、兼松明弘氏提供)

- A: ラットの膀胱無細胞グラフトの走査型電子顕微鏡像。
 B: BAM 製作過程の肉眼的所見。摘出したラットの膀胱 (a)、
 脱細胞処理された BAM (b)、凍結乾燥した BAM (c)、成長因子含浸後の BAM (d)。

細胞シートの片面に、構造・機能を保持して残っている。細胞シートを単独もしくは生体外で積層化して用いることによって、構造のみならず機能的な結合を実現し、三次元組織再生を可能としている。この細胞シートを作製するための中核的技術となっているのが、温度応答性培養表面である。

3.5.1 温度応答性培養表面

代表的な温度応答性高分子であり、下限臨界溶液温度 (LCST) を 32°C に持つポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (以下 PIPAAm) を表面に共有結合的に固定化した温度応答性培養皿は、Okano らによって 1980 年代末に開発された細胞培養デバイスである。市販の細胞培養皿上にモノマー溶液を展開し、電子線重合を用いて培養皿表面にポリマーを固定化する。固定化されたポリマーの厚さは非常に薄く、わずか 30nm である。温度応答性培養皿の表面は、37°C では細胞培養用ポリスチレン製培養皿と同程度の弱い疎水性を示し、種々の細胞が接着・増殖する。細胞が能動的に接着・伸展した後に培養皿全体の温度を LCST 以下に下げると、温度応答性培養皿表面は弱疎水性から親水性に変化し、いかなるタンパク分解酵素も用いることなく、細胞は伸展形態から球状に変化しながら培養皿から脱着し、細胞の膜タンパクは温存される (図 8.3.3)。

3.5.2 細胞シートによる組織再生

温度応答性培養皿上で細胞を培養し、コンフルエントになった後に低温処理を行うと、全細胞が細胞-細胞間接着を保ったまま 1 枚のシートとして回収される (図 8.3.4)。タンパク分解酵素 (トリプシン、ディスパーゼなど) や二価カチオンキレーターを用いた従来の細胞回収方法では、細胞-細胞間接着タンパクや細胞基質間接着タンパクを分解して細胞を回収するのに対し、低温処理という極めて非侵襲的な方法で細胞

シートを回収できる^{21,22)}。回収された細胞シートの底面にはフィブロネクチンやインテグリンといった接着タンパクが温存されており、あたかもスコッチテープのような細胞シートを得ることができる。この細胞シートは他の培養皿表面や生体の移植部位に移動させると容易に接着させることができる²³⁾。

すでにこの細胞シート工学技術を用いた表皮移植、角膜移植の臨床応用が、大阪大学眼科の西田らとの共同研究で成功している。さらに我々は、温度応答性培養皿を用いて作製した細胞シートを積層する新しい培養技術を追究している。例えば、心筋細胞を温度応答性培養皿で培養した後、温度を下げて心筋シートを回収し、これを積層化することで、それぞれの細胞シートが同期して拍動する心筋様組織を世界に先駆けて再生することに成功している²⁴⁾。

3.5.3 尿路上皮細胞シートを用いた膀胱再生

我々は、現行の消化管を用いた膀胱再建では合併症が消化管の粘膜に起因していることに着目し、消化管粘膜を尿路上皮で置き換えることを試みている。消化管の粘膜を切除しただけの漿膜筋層グラフトを用いた膀胱再建は、1950 年代にすでに試みられている。しかしながら、漿膜筋層グラフト単独では粘膜層切除の影響や切除面の尿への接触などが原因となり、グラフトが収縮してしまう。一方、細胞培養技術や組織工学技術の進歩により、漿膜筋層グラフトに尿路上皮を再構築する試みが最近いくつか報告されている。これらの報告では尿路上皮細胞のアリバリーに合成高分子、コラーゲン膜、フィブリンゲルといった足場を利用するのに対し、我々は温度応答性培養皿を用いて培養尿路上皮細胞シート (図 8.3.5) を作製し²⁵⁾、漿膜筋層グラ

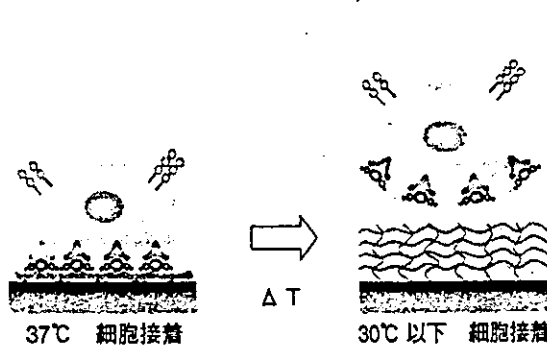


図 8.3.3 温度応答性培養表面

温度応答性高分子を固定化した温度応答性培養表面は 37°C では細胞接着分子が吸着するため細胞が接着できるが、30°C 以下では細胞接着分子の脱着が生じ、細胞を非侵襲的に回収できる。

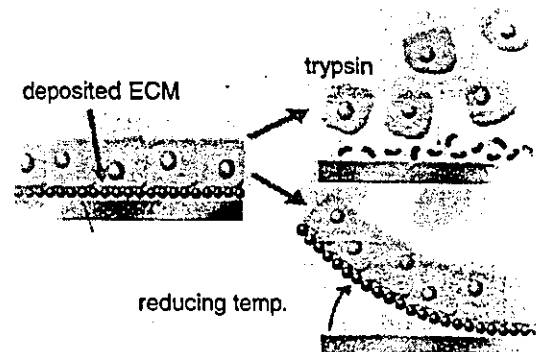


図 8.3.4 細胞-細胞間接着を維持したまま脱着する細胞シート。トリプシン処理では細胞がばらばらになって回収されるが、低温処理による回収では、細胞底面に細胞外マトリックスを保持したまま全細胞が 1 枚のシートとして脱着する。

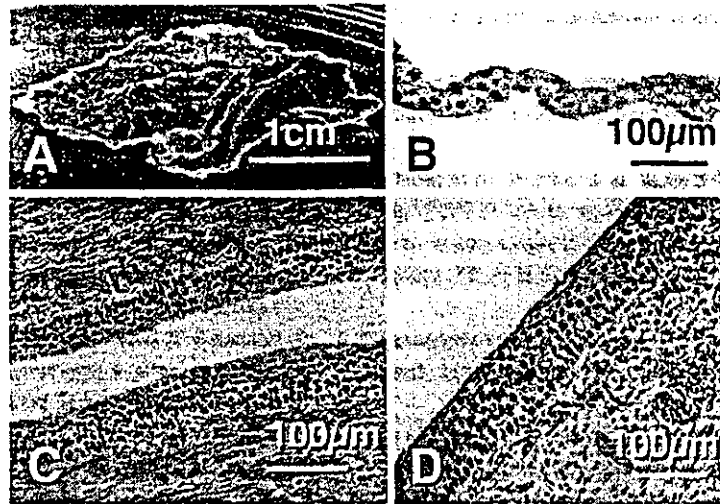


図 8.3.5 細胞シート工学的手法による膀胱再建

A: 温度応答性培養皿より低温処理のみで回収した培養尿路上皮細胞シート。B: 同 HE 染色。C: 正常尿管の尿路上皮細胞 HE 染色。D: 消化管平滑筋層上に培養尿路上皮シートを移植することによって再生した尿路上皮細胞層 HE 染色。

フト上に直接貼り付けることによる粘膜切除面上の尿路上皮の再生に成功した。

移植した尿路上皮シートは消化管平滑筋層上で再構成され、重層化し、極めて尿路上皮に似た形態を示した(図 8.3.5)。また腺上皮などの消化管由来の上皮再生は見られなかった。*in vitro* で作製された再生組織の多くは生体移植時に血行や神経の再建が問題になるが、この尿路上皮層と消化管の平滑筋層を併せ持ったグラフトは消化管由来の血行や神経も温存されており、現行の手術方法で対応できるので、より早期の臨床応用が可能であると考えている。現在、大動物実験を中心に研究を進めている。

3.6 尿道の再生・再建

尿道下裂や尿道狭窄に対する組織工学技術を用いた再建・再生も試みられており、一部では臨床応用の成績も出始めている。動物実験では、生体吸収性合成高分子、SIS、大動脈や膀胱を無細胞化したグラフトを用いて部分的に尿道を再建することに成功している。さらに De Filippo らは、ウサギに長さ 1cm の全周性尿道欠損を作製しチューブ状に形成した BAM を用いて尿道を置換するモデルにおいて、BAM 単独では尿道狭窄を来してしまうが、置換前に膀胱の細胞を BAM に播種することによって良好な結果を得たと報告している²⁰⁾。最近、成人の尿道狭窄に対してヒトの膀胱粘膜下組織を無細胞化したグラフトを用いて尿道形成を

行った成績が報告された²¹⁾。28 人の患者に 1.5 ~ 16 cm の無細胞化グラフトを onlay fashion で移植し、24 人で狭窄が改善した。無細胞化グラフトの尿道形成に対する有用性が、臨床的にも確認された報告である。

3.7 まとめ

組織工学技術を用いた尿路再生の研究が盛んになって約 10 年が経過した。この間、米国の研究機関が中心となってさまざまな尿路再生の方法が試みられてきたが、未だに臨床応用に至っていない。これまで行われた研究の多くは、あくまで現象を捉えているにすぎず、再生の詳細なメカニズムはほとんどわかっていない。今後、尿路の再生医療が本当に有用なものとして確立されるためには、尿路の発生、組織修復、尿路を構成する細胞の三次元構築と、その機能発現などに関する基礎的研究をさらに積み重ねる必要がある。この領域は、これから益々の発展が期待でき、今後の再生医療の確立に貢献するものと確信している。

文献

- 1) Hensle TW, Dean GE: Complications of urinary tract reconstruction. *Urol Clin North Am* 18: 755-764, 1991
- 2) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993
- 3) Gleason MJ, Griffith DP: The use of alloplastic bio-

- materials in bladder substitution. *J Urol* 148: 1377-1382, 1992
- 4) Taguchi H, Ishizuka E, Saito K: Cystoplasty by regeneration of the bladder. *J Urol* 118: 752-756, 1977
 - 5) Goya N: E-PTFE graft as a urinary tract prosthesis. First report: the change of the E-PTFE graft and bladder wall after partial replacement of the bladder wall. *日本泌尿器科学会雑誌* 77: 813-821, 1986
 - 6) Cheng EY, Kropp BP: Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications. *World J Urol* 18: 26-30, 2000
 - 7) Colvert JR 3rd, Kropp BP, Cheng EY, et al: The use of small intestinal submucosa as an off-the-shelf urethral sling material for pediatric urinary incontinence. *J Urol* 168: 1872-1875, discussion 1875-1876, 2002
 - 8) Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, et al: Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology* 46: 396-400, 1995
 - 9) Kropp BP, Rippey MK, Badylak SF, et al: Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol* 155: 2098-2104, 1996
 - 10) Paterson RF, Lifshitz DA, Beck SD, et al: Multilayered small intestinal submucosa is inferior to autologous bowel for laparoscopic bladder augmentation. *J Urol* 168: 2253-2257, 2002
 - 11) Metwalli AR, Colvert JR 3rd, Kropp BP: Tissue engineering in urology: where are we going? *Curr Urol Rep* 4: 156-163, 2003
 - 12) Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, et al: Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol* 156: 571-577, 1996
 - 13) Reddy PP, Barrieras DJ, Wilson G, et al: Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allografts in a porcine model. *J Urol* 164: 936-941, 2000
 - 14) Probst M, Piechota HJ, Dahya R, et al: Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int* 85: 362-371, 2000
 - 15) Kanematsu A, Yamamoto S, Noguchi T, et al: Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. *J Urol* 2003 (in press)
 - 16) Cayan S, Chermansky C, Schlote N, et al: The bladder acellular matrix graft in a rat chemical cystitis model: functional and histologic evaluation. *J Urol* 168: 798-804, 2002
 - 17) Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, et al: Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 51: 221-225, 1998
 - 18) Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, et al: De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 17: 149-155, 1999
 - 19) Schoeller T, Lille S, Stenzl A, et al: Bladder reconstruction using a prevascularized capsular tissue seeded with urothelial cells. *J Urol* 165: 980-985, 2001
 - 20) Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, et al: Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng* 7: 45-53, 2001
 - 21) Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, et al: Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 54: 37-46, 2001
 - 22) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al: Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng* 7: 473-480, 2001
 - 23) Hirose M, Kwon OH, Yamato M, et al: Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 1: 377-381, 2000
 - 24) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90: e40, 2002
 - 25) Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al: Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Eng* 2003 (in press)
 - 26) de Filippo RE, Yoo JJ, Atala A: Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol* 168: 1789-1792, discussion 1792-1783, 2002
 - 27) El-Kassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, et al: Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol* 169: 170-173, discussion 173, 2003
(白柳慶之、岡野光夫)

5

生命医療材料

5.1 生体適合性

5.1.1 はじめに

現代医療の進歩は新生児の生存率を向上させ、人間の平均寿命を著しく伸ばしていると同時に健康を通じた生活の質的向上に大きく貢献している。これは抗生物質をはじめとする各種のすぐれた医薬品に加えて、各種医療用機械・器具および材料の開発によっていることはいうまでもない。医学・薬学に加え理工学の知識と技術を融合させた生命医工学は医療現場の近代化とハイテク化に大きな役割を果たしており、21世紀に向かってその役割はますます大きくなってきている。治療や診断に利用する材料は、生体や細胞などの生体要素と直接、あるいは間接的に接触するという意味で特殊であり、このような材料を“バイオマテリアル (biomaterials)”と呼んでいる。バイオマテリアルには金属、セラミックス、高分子など人工的に作られた材料と、多糖類、タンパク質、核酸などの生体高分子材料とがある。なかでも高分子材料はその機能設計や分子設計のデザインの多様性に応えられる材料として今後の発展が期待される材料である。バイオマテリアルと定義される範囲は広く、また分類方法もいろいろあるが、本章では用途別に注射器やカテーテルなどの“医療用具”，生体機能の補助，代行を行う“人工臓器”，診断，治療のための“高分子製剤・ドラッグデリバリーシステム”の三つに分類し，それぞれについて解説する。

5.1.2 バイオマテリアルの必須条件

機能を喪失，損失した臓器・組織の機能を代替する人工システムを人工臓器という。現在，われわれの体のさまざまな臓器・組織が人工臓器の対象となっており，その高度な機能を実現する主役としてバイオマテリアルの発展が期待され，

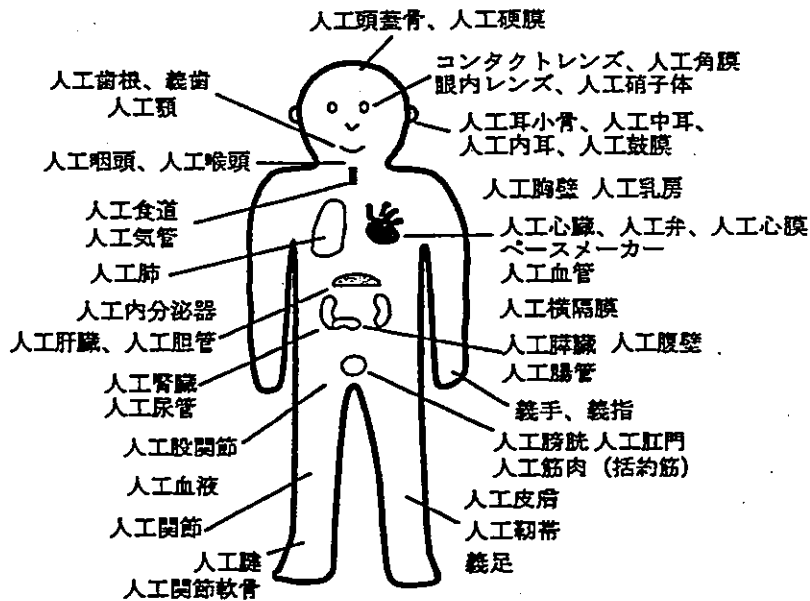


図 5.1 現在臨床応用、研究開発されている人工臓器

多面的な研究が推進されている (図 5.1)。

われわれの体は細胞-組織-器官という階層構造で精密に組み立てられ、各パーツが神経回路によって脳からの情報を受け、相互作用しながら機能し、生命を維持している。生体は本来自分以外のものを異物として認識し、自己防衛反応によりそれを排除する。したがってコンピュータが故障したときに破損したパーツをただ取り替えるのとは異なり、生体の一部の機能が失われたときにはそれを代替する機能と同時に生命全体と協調、適合するものを探さることが必要となり、機能を復活させるには広範な観点からの考慮が必要である。ではどのような材料が必要とされているのだろうか。

第一にバイオマテリアルは生体内、生体表面、生体要素と直接的・間接的に接触するため、生体にとって安全でなくてはならない。いかに生体と協調して同化・適合する材料を作り出すかが重要となる。すなわち材料が生体と接触して安全に利用されるための“生体適合性 (biocompatibility)”が必要となる。第二に効果を出すための“機能性”が必要である。代替する器官や組織、システム、また使用期間によってさまざまな機能が要求される。例えばフィルム性、ゴム弾性、機械的強度などの材料に起因する機能と、光透過性、物質透過性、ガス交換性、分子認識機能性など生体機能に代替可能なさまざまな機能が追究されてい

る。つまり生体適合性と機能性を兼ね備えていることがバイオマテリアルの必須条件となる。とりわけ使用目的、生体との接触部位、期間により個々のニーズにあわせた材料設計が必要となるため、材料の合成・物性に加えて生命科学、医学、薬学からの集学的なアプローチがきわめて重要となってきた。

5.2 医療器具

医療現場で目にする医療器具にはプラスチック製の注射筒をはじめ高分子材料が多い。その大部分は個別包装で滅菌されており、使い捨て（ディスポーザブル）医療器具である（表5.1）。ポリプロピレンやポリスチレン製の注射筒や点滴筒の使用は洗浄や滅菌の手間や費用を削減し、低コストであるうえに安全であるので、国内では1963年より発売、普及している。また輸血用バッグは1973年よりエチレン-酢酸ビニル共重合体（EVA）製のものが滅菌性のよさにより使用されている。またガラスボトルより軽く、落としても割れないなどの種々のメリ

表5.1 ディスポーザブル医療用器具に使用されている主な高分子材料*

医療用器具の種類	ポリ塩化ビニル	ポリエチレン	エチレン酢酸ビニル共重合体	ポリプロピレン	ポリカーボネート	ポリウレタン	ポリスチレン	シリコーン樹脂	ポリメチルメタクリレート	ポリテトラフルオロエチレン	ポリエチレンテレフタレート	ナイロン	ポリスルホン	ABS樹脂	ポリアセタール
注射筒				○			○								
注射針	○			○											
採血針	○	○		○	○										○
透析用留置針	○			○	○			○		○			○		○
留置針				○	○					○					
輸液セット	○	○		○	○					○			○		○
輸液・輸血フィルター	○			○						○	○		○	○	
血液バッグ	○	○	○	○	○										
チューブ・カテーテル	○	○		○		○		○		○			○		
透析器ハウジング		○		○		○	○								
透析器用中空糸			○						○				○	○	
体外循環用血液回路	○	○	○	○	○										○
人工血管										○	○				
手術用手袋	○	○													

ットがある。このように高分子材料が多くの医療器具に使われるのは素材の種類が豊富で、その多彩な性質を利用できること、またさまざまな成形加工が可能であること、安価で大量生産できるために使い捨てを可能にし、安全に利用できることに起因している。プラスチック製医療器具の品質は、鉛、カドミウムなどの有害重金属、フタル酸エステル、塩化ビニルモノマーなどの毒性問題が起きたことにより、現在では物性、材質、有害物質の溶出、および生体組織に与える影響について安全性が検討され、よりよい製品開発が目指されている。

5.3 人工臓器/臓器再生への挑戦

人工臓器は狭義には内臓の人工代替物をさすが、近年、生体の組織、器官、臓器のいずれでもそれを代行するならば人工臓器と呼ぶ傾向にある。本章では現在臨床応用されている代表的な人工臓器とその材料、また研究開発途上にある材料について紹介する。

5.3.1 人工腎臓

わが国では、現在約17万人の慢性腎不全患者を週3回の血液透析で治療するために用いられる人工腎臓が、最も多く利用されている人工臓器の一つである。腎臓は動脈血を糸球体でろ過し、水・電解質の調節、尿素などタンパク質代謝産物の排出、薬物の排出、血圧の調節、赤血球数の調節、ビタミンDの活性化などを行っている。この腎臓機能が低下すると代謝産物の排泄が不十分となり、体内に水や尿素が蓄積してしまう。人工的に血液中の代謝物を除去するために、人工腎臓による人工透析が必要となる。実際には血液を一時的に体外循環させ、病因物質を除去してからその浄化済み血液を体内に戻す（血液浄化療法）。体外に取り出した血液は長さ20～30 cm、外径約5 cmの円筒形透析器に送られる。透析器内には内径が約200 μm 、膜厚10～50 μm の中空糸が約1万本束ねられており、総膜面積は1～2 m^2 にもなる。この半透膜中空糸を介して物質分離・ろ過の機能を代替する。現在市販されている膜素材を表5.2に示した。セルロース膜は結晶性部分と非晶性部分が適度に混じりあっており、溶質透過性と水透過性のバランスがよく、吸水状態でも力学的強度を保っている。また γ 線照射や熱処理による滅菌にも耐えられることから、長年セルロース系の膜素材が主流であった。しかしセルロース膜を透過できない微量の代謝産物が明らかにされ、さらに免疫に関与する補体の活性化と白血球数の一時的減少が起こることから、現在が