

表5.2 日本で市販されている透析器の主な膜素材

天然高分子	再生セルロース 銅アンモニアレーヨン けん化セルロース 改質セルロース ポリエチレングラフトセルロース
合成高分子	ポリアクリロニトリル ポリメチルメタクリレート エチレンビニルアルコール共重合体 ポリスルホン ポリアミド

リスルホン多孔性中空糸膜が次第に利用されてきている。

日本は世界で最も血液透析患者が多いといわれている。その理由は腎臓移植数が少ないことと、透析患者の予後が世界一高いことにある。必然的に長期透析患者数も増え、さまざまな合併症の予防と治療を目的として透析器の性能と生体適合性の改善が図られてきた。現在、最も大きな問題は血液適合性である。血液は異物である透析膜との接触により自己防衛反応を起こし、血液成分が膜に付着、凝固する（血栓反応）。透析時には抗凝固剤のヘパリンが使用され、マクロ的には血栓形成が阻止されるものの、透析終了後の膜表面には白血球、血小板などの血球の粘着が観察される。血液成分の付着は膜の素材に加えて、血液流量、透析器のデザイン、透析器の滅菌法など多くの条件が影響する。またヘパリンの長期使用による副作用が報告されており、できるだけ少量のヘパリンで透析を行うためにはまず材料自身の抗血栓性を改善しなければならない。理想的な抗血栓性材料の開発は人工臓器創製における重要な課題であり、大きな力を注ぐ必要がある。

5.3.2 人工心臓

人工心臓は心臓手術後の補助、急性心筋梗塞の際の補助、心臓移植へのつなぎとしての補助、代行として1980年代から臨床応用されている。補助人工心臓ポンプの形式は図5.2に示したもののうち、ダイアフラム（diaphragm）型、サック（sac）型が一般的で、血液の流入出部に逆流防止用の人工弁が装着されており、空気圧により血液の拍出を行う。

心臓は血液と接触する面積が大きく、繰り返し疲労強度が要求されるため、素材としては抗血栓性と同時に、機械的耐久性を兼ね備えたものが必要となる。人

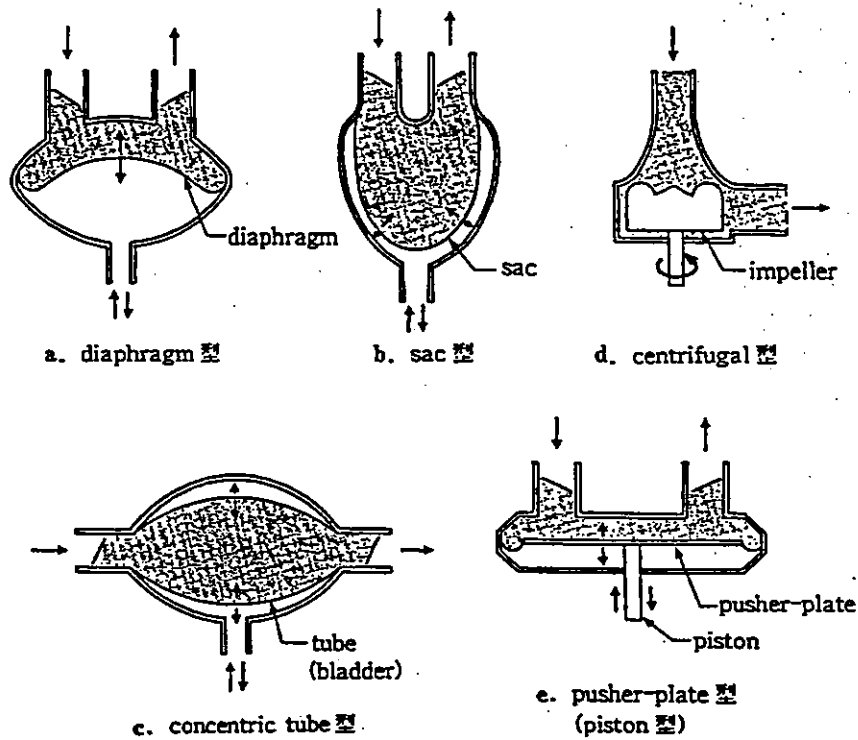


図5.2 臨床応用されている補助人工心臓の形式
(人工臓器1992, 中山書店, 1992より)

工心臓の本格的な研究は1957年アメリカ・クリーブランド病院においてKolffと阿久津によってポリ塩化ビニルを材料として始められ、その後シリコンゴム、天然ゴム、ダクロンなどが検討された。セグメント化ポリウレタンウレアになって初めて長期使用が可能となり、現在臨床ではこれが主流となっている。

図5.3にセグメント化ポリウレタンウレアの一般的構造を示す。柔軟性に富んだポリエーテルを主とするソフトセグメントとウレタンおよびウレア結合から構成されるハードセグメントとのマルチブロック共重合体で、通常ハードセグメント部分は分子間水素結合により凝集してクラスターを形成し、これがソフトセグメントのマトリックス中に分散した結晶/非晶型のマイクロ相分離構造をとる。特にR=—[(CH₂)₄—]のBiomer[®]は抗血栓性と耐久性にすぐれており、その後も含フッ素セグメントポリウレタンやセグメント化ポリウレタン-ポリジメチルシ

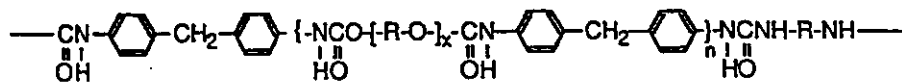


図5.3 セグメント化ポリウレタンウレアの構造式

ロキサン共重合体など比較的抗血栓性のある材料が開発されている。

人工心臓でも最大の問題は材料の抗血栓性である。血栓は拍動流ポンプでは人工弁、ポンプの継ぎ目など、遠心ポンプでは羽根や回転軸の軸受けなどによくできる。つまり血栓形成を促進する因子は材料表面の化学的組成、構造以外に流体力学的要素が大きく関係するので、安全でしかも長期間使用できる人工心臓の作製にはさまざまな技術、材料、医学、薬学の専門的な観点からのアプローチを統合して開発されていかなければならない。

5.3.3 抗血栓性材料

血液と直接接触して使用されるバイオマテリアルの抗血栓性化の試みは、1960年初頭より展開され多くの研究がなされている。血液は電解質イオン、水などの低分子、タンパク質、赤血球、白血球、リンパ球、血小板などの細胞を含んでいる。材料が血液と接触すると、その直後に材料表面にタンパク質が吸着する。その後血小板、リンパ球、マクロファージなどの細胞レベルの反応が続いて起こり、血栓形成、炎症、貪食などの細胞レベルの反応が起きる。材料表面の構造に応じて吸着するタンパク質の量、コンフォメーション変化、配向、分布などが変化し、これにより自己防御反応を引き起こすので、バイオマテリアルを設計する場合にはタンパク質の吸着挙動について詳細に検討する必要がある。

実際の抗血栓性材料の表面作製には図 5.4 に示すような三つのアプローチがある。

a. 偽内膜形成型材料 この種の材料は、適度な血栓形成によって血栓膜を材料表面に作り、この血栓膜を足場として内皮細胞を増殖させ、血管の内腔面と類似した構造にしたものである。現在臨床では延伸ポリテトラフルオロエチレン（ゴアテックス、ダクロン）が用いられている。内径 6~30 mm の範囲で利用されているが、6 mm 以下の動脈と静脈では初期血栓で血管が閉塞し、偽内膜

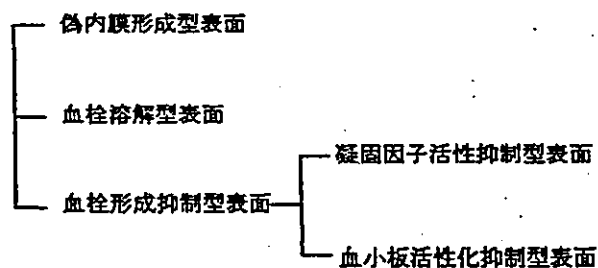


図 5.4 抗血栓性材料の分類

形成に至らない、という欠点がある。

b. 血栓溶解型材料 血栓を溶解するウロキナーゼやストレプトキナーゼなどの酵素を材料表面に固定化することで、形成された血栓を溶解し抗血栓性を獲得する。血栓形成反応に比べ溶解反応の速度が小さいこと、固定化による酵素活性の低減などの課題がある。

c. 血栓形成抑制型材料 血小板や凝固因子の活性化を抑制する機能をもつ血栓形成抑制型材料には、生理活性物質を用いるものと用いないものがある。前者は血液凝固因子を阻害するヘパリンや、血小板の凝集を抑制するプロスタサイクリンなどを表面に固定化したものである。一方、後者は表面構造により血小板、血漿タンパク質の物理吸着を抑制し、血栓形成を防ぐ表面である。特に親水性のポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)と疎水性のポリスチレン(PSt)のブロックコポリマーは各セグメントが相分離してマイクロドメイン構造を形成し、このドメイン幅が25 nmのときにすぐれた血液適合性を示すことがわかっている。図5.5に示すように、材料表面に吸着、接触した血小板の活性化の抑制は血漿タンパク質がマイクロドメインに沿って吸着することによるものと考えられている。アルブミンは選択的に親水性ドメインに、 γ -グロブリンは疎水性ドメインに吸着して、血小板の膜タンパク質の動きが制御される。内径3 mm、長さ70 cmの小口径人工血管をイヌの頸動脈に埋め込むと、1年以上にわたって血栓形成が完全に抑制された。このとき、マイクロドメイン化表面は単分子層のタンパク質吸着で長期に安定化される、というきわめて興味深い結果が得

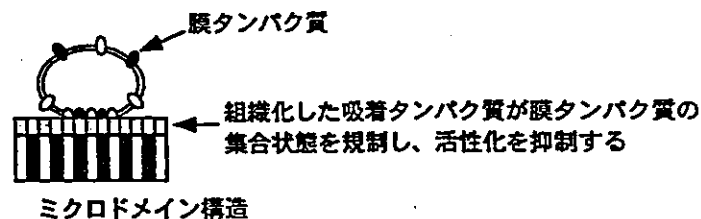
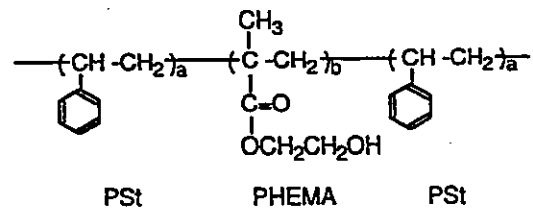


図5.5 PSt-PHEMA-PStブロックコポリマーの構造とその表面における細胞との相互作用

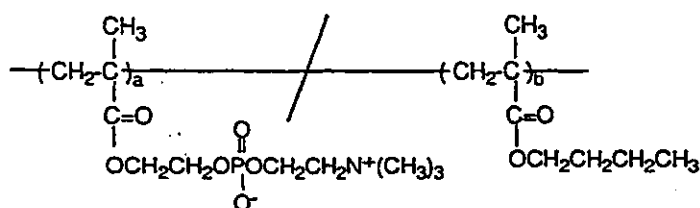


図 5.6 ポリ (MPC-co-BMA) 共重合体の構造式

られている。

リン脂質極性基をポリマー側鎖に導入した2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) と *n*-ブチルメタクリレート (BMA) のコポリマー表面では、血小板の粘着が著しく抑制されることが報告されている (図 5.6)。このポリマーをセグメント化ポリウレタンとブレンドして内径 2 mm の人工血管を作製し、ウサギ頸動脈に埋め込んだところ 5 日間閉塞せずに抗血栓性を示したことが報告されている。このような材料表面の抗血栓性の発現を、表面における水の構造から考察されている。材料中の極性官能基と水分子は水素結合を介して相互作用する。このとき、水分子が強く相互作用して束縛されるとこの水は冷却しても凍らない (不凍水)。一方、分子運動が束縛されない水 (自由水) は 0°C で凍る。さらに、ある程度相互作用して束縛されるが冷却下 -60°C 付近で凍る中間水が存在する。材料によってこれら 3 種類の水の組成が異なることが知られている MPC ポリマー表面の抗血栓性の発現に、水の構造が影響することが明らかにされつつある。さらなる詳細な抗血栓性発現機構が今後解明されることが望まれている。

最近、ポリ (2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) 表面とポリ (MEA-HEMA) 共重合体がすぐれた抗血栓性を示すことが報告された。血小板の粘着や形態変化がほとんど生じなかった表面での水の構造を調べたところ、0°C で凍る水、-60°C 程度で凍る水、凍らない水のうち、-60°C で凍る中間水の組成が多いことが示された。おそらく、中間水の表面近傍での組織化が吸着タンパク質の変性を抑制し、その後に生起する細胞の粘着を抑制するとともに粘着細胞の形態変化を抑制したものと考えられる。先に示した PHEMA-PSSt-PHEMA をコーティングした血管をイヌの頸動脈に移植した場合でも吸着タンパクの変性は生起していなかったことから、PMEA や PMPC の系でみられたように界面での水の構造が関与して抗血栓性が発現している可能性が示唆され、今後より詳細な

解析が望まれる。

5.3.4 ハイブリッド型人工臓器

人工材料のみで生体を模倣し、人工臓器を創製するにはさまざまなハードルがある。そこで天然あるいは合成の高分子をマトリックスとし、細胞や生体組織をこの中に組み合わせて利用するハイブリッド型人工臓器の研究が進められている。生体の軟組織を形成しているコラーゲンやグルコサミノグリカン（ムコ多糖）は60～80%の水を有する生体ヒドロゲルであり、多細胞生物の細胞はこのゲル状の細胞外マトリックス（extracellular matrix；ECM）に包括されて機能を維持している。そこで生体組織をゲル上、またはゲル内で培養・増殖させ、人工皮膚、人工肝臓、人工膵臓として体表面、あるいは体内に移植するという試みがなされている。高分子マトリックスにはコラーゲンやポリペプチドなど天然高分子、合成高分子との複合体が多く用いられている。

a. 人工皮膚 広範な熱傷では、創傷部位から体液が漏出すると同時に、感染の可能性がきわめて高くなり、早期に皮膚を再生することが望ましい。この治療法として、コラーゲンゲルとコンドロイチン硫酸の複合体を患部に貼付し、このマトリックスに自己の皮膚細胞を誘導、増殖させるという方法がある。この複合体は細胞が増殖して組織化するため生体と一体化する。被覆材にはシリコーン膜が用いられ、水分などの蒸発を防ぐと同時に細菌感染を防止している。さらにこの複体内に表皮の基底細胞を播種した改良型も報告されている。一方、表皮細胞を生体外で培養し、移植する方法もある。表皮細胞は単独では培養が困難であるが、あらかじめ線維芽細胞を培養したコラーゲン上では増殖し、人工皮膚を構築できる。一部は、治療目的で利用されるまでに至っている。このように生体外でハイブリッド組織を構築する技術はこれからの医療においてますます重要となってきた。

b. 人工膵臓 膵臓は胃の背面にあり、膵頭部は外分泌性の細胞群が消化酵素を腸管に分泌して消化促進を行う一方、膵尾部では血糖値の適正な制御を行うインスリン、グルカゴンのようなホルモンを分泌する。特に膵尾部の機能が著しく低下すると高血糖となり、生体に種々の障害が起こる。そこで、血糖値を測定し、それに合わせたインスリンの自己注射を行う方法が一般的にとられている。しかし、この方法では血糖値の厳密な制御は難しく、インスリンの過剰投与による低血糖のために、昏睡状態に陥ったり、場合によっては生命の維持に危険

を及ぼす。そこで、動物の膵臓細胞を移植する手法が検討されている。臓器移植に伴う拒絶反応を回避するために、高分子ゲルで細胞を被覆し免疫隔離する方法が追究されている。膵臓内のランゲルハンス氏島細胞は血糖値を制御しており、とりわけ血糖値を降下させるインスリンを分泌して血糖値を一定に保っている。そこでアルギン酸ナトリウムやアガロースゲルビーズ中にランゲルハンス氏島細胞を封入したハイブリッド型人工膵臓が開発され検討されている。ゲル表面の物質透過性とビーズの大きさを精密に制御し、免疫細胞や抗体を回避しつつ、血糖値の変化に応答し、直ちに至適量のインスリンを放出することができる。実際、糖尿病のマウス腹腔内に移植するとインスリンが放出され、血糖値は正常値に復帰し、1年以上にわたって血糖値が適正範囲内に保持されていることが報告されている。このような、ハイブリッド型人工臓器は、代謝型の人工臓器として生体中できわめて重要な役割を担うものとなる。このシステムが実現すると、現在インスリンの自己注射を余儀なくされているI型糖尿病患者の福音となることは想像にかたくない。このハイブリッド型人工膵臓は今後実現に向けて大きく展開しようとしている。

c. 人工肝臓 現在、急性肝不全患者の究極的な治療は肝移植しか方法がない。しかし、移植に適応できる肝臓は圧倒的に少なく、わが国では近親者からの生体肝移植に頼っているのが現状である。急性肝不全が起こると、生体の解毒や代謝機能が著しく低下し、種々のタンパク質など生命維持に重要な物質が不足し、生命の維持が困難となる。そこで、急性肝不全患者の治療の目的で、従来は、動物の肝臓に患者の血管を接続して、肝機能を代替させる、あるいは肝細胞を移植する、という方法が研究されていたが、手技の複雑さや免疫機能による移植細胞の機能や絶対数が低減してしまうため、現在は、短期間内だけ用いられるハイブリッド型人工肝臓が研究されている。このシステムでは、中空糸やスポンジ状の担体表面にブタなどの肝細胞を生着させたモジュールを体外循環システムに接続して用い、肝細胞の解毒機能や代謝機能を利用して血液浄化を図る。しかしながら、これらの場合、細胞が単層で接着していたり、ゲルなどにより物質透過性が阻害されてしまうために肝細胞自体の活性が短期間内に著しく低下してしまい、数時間から数日以内での使用しかできないのが実情である。肝細胞の形態と機能の発現の関係を考慮し、より分化した形態を維持したまま培養できるシステムが検討され、今後さらに高機能性のハイブリッド型人工肝臓が創製されるこ

とが期待される。

d. これからのハイブリッド型人工臓器“組織工学” 近年、多種類の細胞の相互作用、生体組織、器官の成り立ちを研究し、さらには組織、器官を再構築して医療に用いようとする組織工学 (tissue engineering) が注目されてきている。細胞は秩序をもって組織化され臓器を形成し、それによって初めて高度な機能を発現する。そこで二次元平面で細胞接着領域と非接着領域を設計することにより、任意のパターンを有する細胞組織体を形成したり、光リソグラフィ技術を利用してさまざまなパターン化表面が作製され、細胞の接着、組織化の過程について検討されている。この手法は新しい共培養システムと同時に人工神経との関連から興味もたれている。

これまでに組織工学的手法で作製された器官・組織は、主に生分解性の天然、あるいは合成高分子をマトリックスとし、この表面上、あるいは内部に目的とする細胞を培養、増殖させ、これを患部に移植するという方法がとられている。この手法で、アメリカの研究者がヒトの耳介構造の生分解性マトリックスに軟骨細胞を播種・増殖させネズミの背中に移植した写真を発表し、世界にセンセーションを起こしたのは記憶に新しい。実際、ポリ(乳酸-グリコール酸)やポリ(乳酸-ε-カプロラクトン)のような分解性合成高分子で管状の多孔性マトリックスを作製し、ここに患者の血管細胞を播種してマトリックス上で成長させ、これを患部に移植する治療が考案され、臨床試験されている。この方法では、マトリックスは体内で分解、消失する一方、培養された細胞や組織は生体内の環境に適合して他の組織でみられるのと同等の血管組織を形成する。例えば小児の治療に用いると、従来の人工血管では患者の成長に合わせてより太い人工血管に移植する手術が必要となるが、組織工学的に作製された血管は小児の成長に合わせて自身も成長する血管となり、成長に合わせた手術は不要となるので患者のQOLの向上という点からも福音となる。現在は三次元プリンタを用い、任意の形に生分解性ポリマーを“印刷”してマトリックスを作製する、という技術も登場し、種々の組織構築が検討されている。しかしながら、この方法で作成している組織の多くは、血管組織をほとんど必要としない組織であり、生体の多くの組織・器官のように代謝機能を司る組織・臓器を作製するのはきわめて難しい。

培養された細胞を移植などの目的で培養皿表面から脱着・回収する場合、物理的に剝離したり、キレート剤やタンパク質分解酵素を用いて細胞-基材表面間の

結合を切り離さなければならない。しかし、この操作によって組織化された細胞はばらばらになり、回収できたとしても細胞表面のタンパク質構造の破壊のために細胞の機能は低下してしまう。そこで、温度によって32°Cを境に親水性/疎水性が変化する高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm, 図5.7) を基材表面に電子線重合法によりナノメートルオーダーの厚みを制御してグラフトしたインテリジェント培養皿が開発された。一般的に細胞は比較的疎水性表面に接着し、親水性の高い表面には接着しないことが知られている。PIPAAm 表面は細胞培養温度の37°Cでは比較的疎水性を示し、細胞は接着・伸展・増殖する。PIPAAm 表面は室温では親水性になるので、培養した細胞を

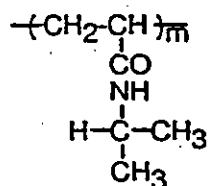


図5.7 ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) の構造式

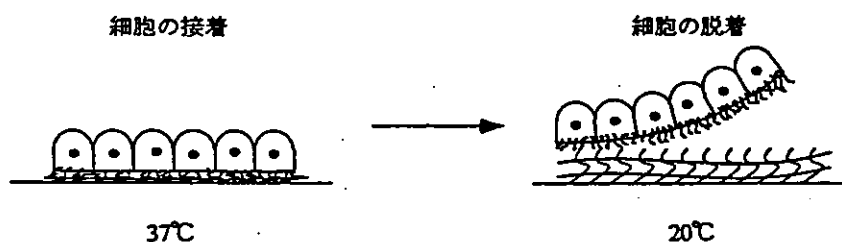


図5.8 (a) 細胞シート工学に基づく PIPAAm 培養皿からの培養細胞の細胞シートの脱着・回収

37°Cでは比較的疎水性表面となり細胞が培養できる。低温にすると細胞外マトリックスを細胞側に残してシート状で細胞を脱着・回収できる。

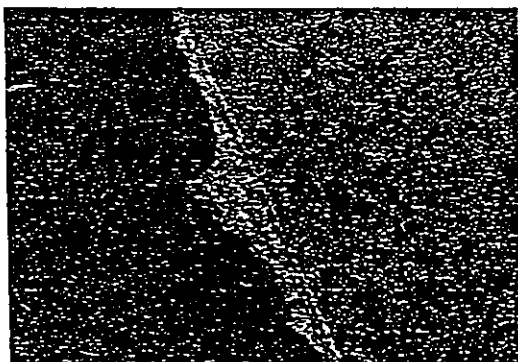


図5.8 (b) PIPAAm 培養皿から低温処理によりシート状で脱着する血管内皮細胞
写真右側より細胞がシート状で培養皿表面より剥離している。

20°Cに静置すると細胞が細胞-細胞間の結合を保持したままシート状で表面から剝離する(図5.8)。このように、温度変化によって回収した血管内皮細胞培養シートをラット背部の全層皮膚欠損部と植皮片との間に移植したところ、植皮片内の血管新生を有意に亢進する効果が認められている。心筋細胞からなる細胞シートを重層化すると、互いに協調して自律的に拍動する。この拍動シートを心不全モデルのネズミ心臓に移植すると、ネズミの心機能が亢進することを見出し、組織工学による心臓の再生が可能であることが示唆された。また最近、肝実質細胞と内皮細胞を別々に PIPAAm 培養皿上で培養し、低温処理により回収した細胞シートを重ね合わせることで肝小葉のモデルを実現し、初めて共培養によって肝細胞の長期培養化を達成している。このような技術は組織構造を備えたハイブリッド型人工臓器の新手法として、今後の発展に大きな期待が寄せられている。

5.4 高分子製剤・ドラッグデリバリーシステム

薬物による病気治療は天然物からの抽出物や化学合成物の開発とともに進歩、変化してきている。通常投与された薬物の血中濃度は図5.9 Aのように薬物投与直後に急激に上昇し、代謝、排泄されて次第に減少するという、鋸歯状に変化し、有効濃度範囲に保つのは難しい。そこで治療有効濃度を保つためには頻回投与が必要となる。しかし、薬物によっては治療域が非常に狭く、投与量によって容易に毒性域に入ってしまう。さらに薬物が十分に吸収されなかったり、アレル

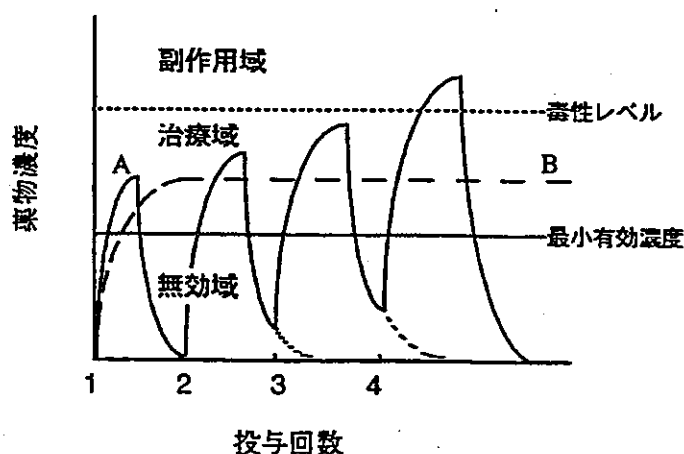


図5.9 薬物の血中濃度変化
A: 従来の投与法, B: 理想的な投与法.

ギー反応が生起したりするなどの副作用発現がしばしば問題となる。薬物が治療域内の濃度で一定に放出できる、あるいは、必要な部位だけに、必要なときに、必要なだけ投与できれば副作用を大きく軽減できるだけでなく、安全な薬物治療が可能となる。このような製剤、治療の概念をドラッグデリバリーシステム (drug delivery systems ; DDS, 薬物送達システム) といい、近年活発に研究されている。例えば高分子マトリックスに薬を分散、あるいは内包し、これを一定速度で放出する技術や拡散の制御、浸透圧の制御が検討されている。現在では薬物の血中濃度を一定に保つ徐放性の制御だけでなく、病巣部位に選択的に薬剤を運搬したり、特定の時間だけ薬物を放出する、時空間的制御に基づくターゲティングについて多くの研究が展開されている。高分子材料はゲルやカプセルなどのマクロなレベルだけでなく、薬物を自己免疫反応から回避させるため、あるいは腫瘍への特異的な結合反応を引き起こすためのマイクロ分子として利用されている。

5.4.1 徐放性の制御

薬物の血中濃度を一定に保つための徐放性製剤は、薬物を生体に不活性な隔離膜内に内包するリザーバ型 (reservoir device) と、薬物がマトリックス内に均一に溶解、あるいは分散したモノリシック型 (monolithic device) とがある。

リザーバ型では、内包した薬物濃度が飽和している場合、薬物放出の駆動力である膜内外での薬物濃度差をほぼ一定に保つことができるのでゼロ次放出となる。内包した薬物濃度が飽和していない場合には、経時的に内包した薬物濃度が低下し、膜内外での薬物濃度差が小さくなるために薬物放出は指数関数的に減少し、一次放出になる。

一方、モノリシック型では、リザーバ型で薬物の制御放出に問題となる隔離膜のピンホールや膜厚の不均質さなどの問題が起こらない。薬物がマトリックス内に溶解するには、薬物とマトリックスの物性が大きく影響する。薬物が分散したデバイスの場合、マトリックス内の薬物含量により、放出挙動が変化する。0~5%程度の場合は薬物のマトリックス内への溶解とマトリックス表面への拡散により薬物が放出される。5~20%のときは、外液が薬物を放出した後の微小空孔内に浸入し、薬物放出に影響する。この効果は薬物含量が20%以上になると顕著で、薬物が抜けた空孔が連続したチャンネルになり、薬物のほとんどはこのチャンネルを通して放出される。チャンネル内に満たされた溶液中への薬物の溶解性と拡散性が放出速度を決定する。

5.4.2 刺激に応答した薬物放出制御

薬物放出の On-Off 制御を実現するにはリモートコントロールが可能なシステムの構築が必要であり、薬・工・医学の境界をこえた領域で製剤の開発が行われている。この製剤は、病気によって生じるシグナルを検知し (sensor)、シグナルの大きさを判断し (processor)、至適量の薬物を放出して治療を行い (effector)、さらに体が正常に戻ることを検知して放出を停止するオートフィードバックシステムをもつ。また、生体内で発生するシグナルだけでなく、外部から熱、電流、超音波などの物理信号を与え、薬物放出制御を可能とするシステムが考案されている。

高分子ゲル中の物質透過性はゲルの含水率が高くなるほど上昇するので、ゲルの膨潤度を体内のシグナルによって変化させることができれば内包した薬物の放出制御ができる。ここではさまざまなシグナルに応答する DDS ゲルについて紹介する。

a. 化学物質に応答するシステム (図 5.10) 化学物質に応答して薬物放出をするシステムとして最も代表的なものはグルコース応答型インスリン放出システムである。ゲル内部にグルコースオキシダーゼ (GOD) を固定化し、グルコースの酸化反応に伴う pH 変化に応答したゲルの膨潤度の違いにより、インスリンの放出制御ができる。また GOD を固定化したポリアクリルアミド膜とニコチンアミド基を有する酸化還元膜を組み合わせたシステムも考案されている。これは酵素反応により生じた過酸化水素が酸化還元膜中のニコチンアミド基を酸化し、膜中に正電荷を生成してゲルを膨潤させ、インスリンを放出する。グルコース濃度が下がれば放出量は少なくなる。

酵素はゲルから漏出すると生体中で免疫反応を誘導する可能性のあるタンパク質であるので、酵素を用いることなくグルコース濃度に応答してインスリンを放出するシステムが検討されている。多価アルコールとボロン酸は水中で可逆的にコンプレックスを形成する。フェニルボロン酸基を有する水溶性合成高分子はポリビニルアルコール (PVA) とボロン酸基と水酸基を介してコンプレックスを形成する。このコンプレックスはグルコースの存在により置換反応を起こして解離するため、グルコース濃度に応答してインスリンを放出できる。最近、温度応答性高分子ゲルにフェニルボロン酸を導入し、一定温度でグルコース濃度に応答してゲルの膨潤を変化させ内包したインスリンを放出するシステムも考案されて

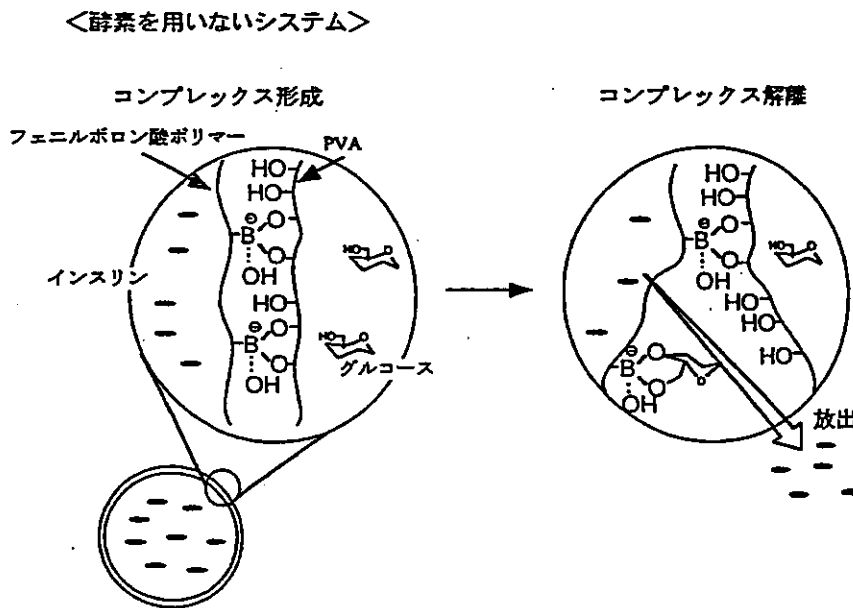
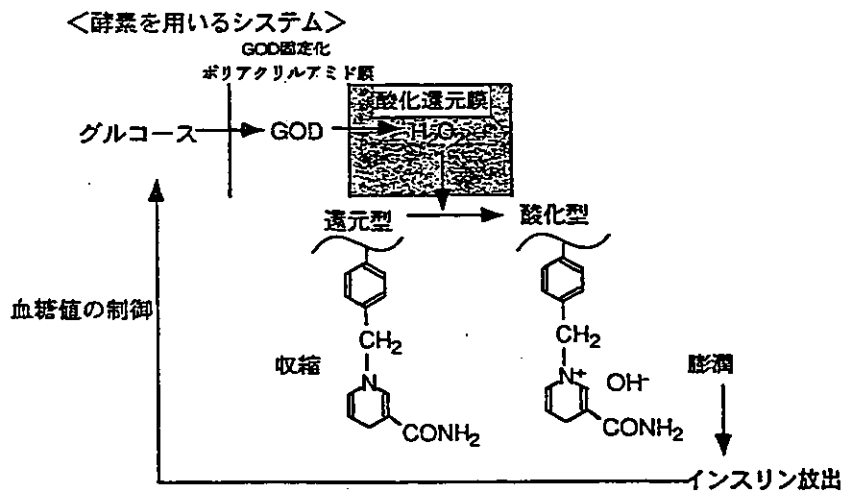


図 5.10 グルコースに応答する DDS システム

いる。このゲルでは、グルコース濃度が低下するとゲルの収縮が起こりインスリンの放出を完全に停止させる緻密な収縮層が形成される。これによりインスリンの On-Off 放出制御が行えることが示されている。

b. pH に応答するシステム 経口投与される薬物は pH が酸性から中性、弱アルカリ性へと変化する消化管を通過しなければならない。またこの間、さまざまな消化酵素や消化管内容物と接触する。特にポリペプチドは胃の低 pH 領域で不活性化してしまうため小腸まで到達できるのはごく微量である。またイン

ドメタシンなどの抗炎症剤は胃への副作用が大きいいため、小腸での選択的吸収が望まれる。そこで pH に応答する薬物放出システムが考案された。pH 応答性ゲルはアクリル酸やアミノエチルメタクリレートなどのイオン性モノマーを導入することによって得られる。例えばアクリル酸を導入したゲルでは低 pH でカルボキシル基のプロトン化により解離が抑制され収縮して薬物放出を抑制し、高 pH ではカルボキシル基の解離により膨潤して薬物が放出される。

c. 温度に応答するシステム ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) ゲルを用いると、薬物放出を温度により On-Off 制御できる。PIPAAm ゲルは低温ではポリマー鎖が水和しているが 32°C 以上の高温では脱水和して収縮するので温度変化に対して大きな膨潤度変化が生じる。疎水性のブチルメタクリレート (BMA) を共重合させると、高温に変化させたときにゲルの表面で緻密なゲルの収縮層 (スキン層) が形成され、ゲル内部の水の放出をも停止させることができる。このゲルの薬物放出挙動を温度変化させながら調べると、ゲルが膨潤している 10°C では薬物の透過性が高くなり薬物が放出され、ゲルが収縮する 30°C で放出が停止する。On 状態から Off 状態になるとき、ゲルの

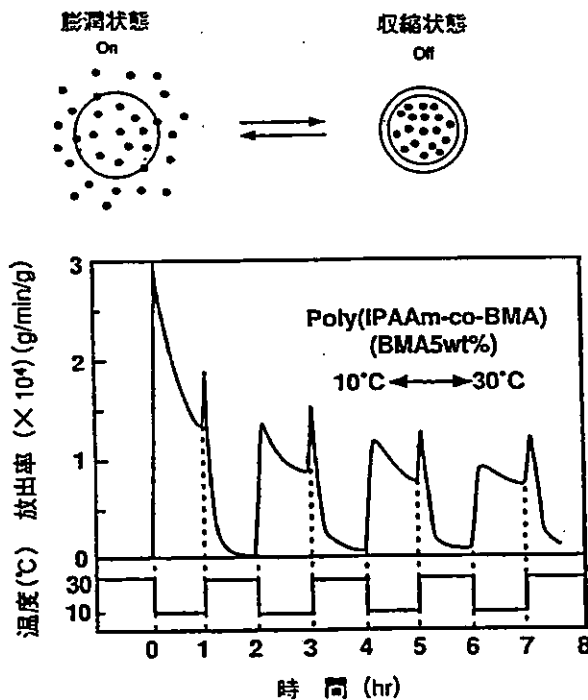
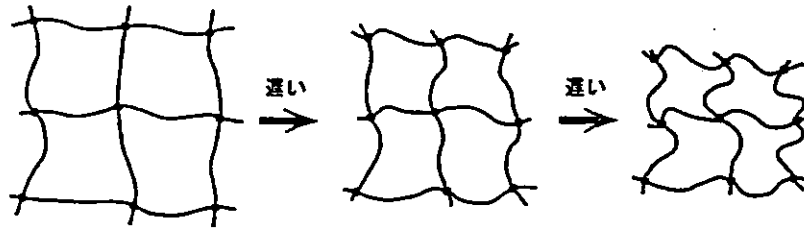


図 5.11 10~30°Cの温度変化に対する PIPAAm ゲルからのインドメタシンの放出挙動 (ゲルの機械的強度を上げるために *n*-ブチルメタクリレート (BMA) を共重合した)

従来型ゲル



グラフト型ゲル

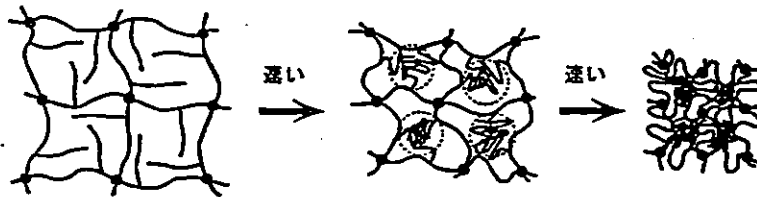


図 5.12 グラフト型の分子構築を有する PIPAAm ゲルの素早い収縮メカニズム

収縮に伴う大きな体積変化が起こり、ゲル表面から急激に薬物が絞り出され (squeezing 効果)、非透過性のスキン層が形成されて放出は停止する。再び温度を下げて On 状態になると薬物が放出され、パルス型放出パターンを示す (図 5.11)。

またゲル網目の分子構造を設計することにより速度制御できることが明らかにされている。PIPAAm の自由末端鎖を PIPAAm ゲルの主鎖にグラフトすると、PIPAAm 自由末端鎖の素早い脱水・凝集変化が起こりゲルの収縮を加速できる (図 5.12)。自由末端鎖は、運動性の高い自由末端を有するので、両末端を架橋点で固定された網目の収縮に先立って、急激に脱水して凝集する。これに伴い自由末端鎖間に強い疎水性相互作用が働き、ゲル内部の凝集力が増大することにより、ゲル全体が素早く収縮すると考えられる。この変化には自由末端 PIPAAm 鎖の分子鎖長がきわめて重要で、分子量が低いと大きな凝集力は得られず、ゲルはゆっくりと収縮変化する。このようにゲルの分子設計により新しいパルス型投与が実現可能となってきた。

解熱剤への応用を考えると、体温の上昇に伴い薬物が放出されるシステムはきわめて効果的である。アクリルアミド-ブチルメタクリレート共重合ゲルとアクリル酸ゲルとからなる交互侵入網目 (IPN) ゲルは、低温でアクリルアミドとア

クリル酸の水素結合形成によりゲルが収縮する一方、高温では水素結合の解離によりゲルが膨潤し、低温側で Off、高温側で On となる薬物放出システムを実現できる。

そのほかにも電場や磁場などの物理刺激に应答して素早い形態変化を起こすゲルを利用すれば、生体外部からの刺激でパルス型薬物投与が可能となる。

5.4.3 ターゲティング

薬剤の吸収効率、臓器集積性、作用時間、選択的活性発現などの体内挙動を改善するために天然高分子や合成高分子で薬剤を化学修飾したり、非共有結合で内包することがある。このような高分子は病巣部位まで薬剤が安定に運ばれるためのキャリアーとしての働きや標的指向性をもつ。高分子自体が薬理活性をもつものもあれば、環境や外部のシグナルに応じて機能を発現するものもある。

a. 特異性を有するターゲティング/ミサイルドラッグ 病巣に選択的に薬物を作用させる標的指向性を有する薬剤をミサイルドラッグという。腫瘍抗原に対する抗体、腫瘍細胞表面の糖鎖に対するレクチン、レセプターに対する特異的糖鎖など、高い特異性を利用してこれらを薬物に結合させた複合体が開発されている。この手法は、一時“魔法の弾丸”と呼ばれ、夢の治療法として期待されていた。しかし、白血球やマクロファージなどの細胞に貪食されたり、標的部位に達する前に正常細胞や正常組織に移行してしまい、期待したほどの効果を得ることができなかつたり、腫瘍の抗原性が頻繁に変化したり、複合体に対する抗体が出現するなどの諸問題があがっている。

b. 高分子ミセル ミサイルドラッグで問題となった正常組織での副作用や非効率性を改善するために、近年、正常細胞や正常組織への移行を最小限にする必要性が高まっている。一方では炎症部位において血管壁の透過性が亢進している一方、高分子が蓄積しやすいことが報告されている (EPR 効果, enhanced permeability and retention effect)。非特異的な相互作用を最小にして体内に長く停留できれば、この EPR 効果を利用した DDS が可能となる。これを達成するには製剤の血中滞留時間の延長と、腎糸球体からのろ過を免れるための適切なサイズが重要なファクターとなる。そこで体内動態を分子サイズ、粒子の電荷、粒子表面の性質 (油・水親和性など) により規定する試みが行われ、リポソームや、高分子ミセルなどが考案されている。

リポソームはリン脂質集合体からできており親水性の薬剤を内水層に、疎水性

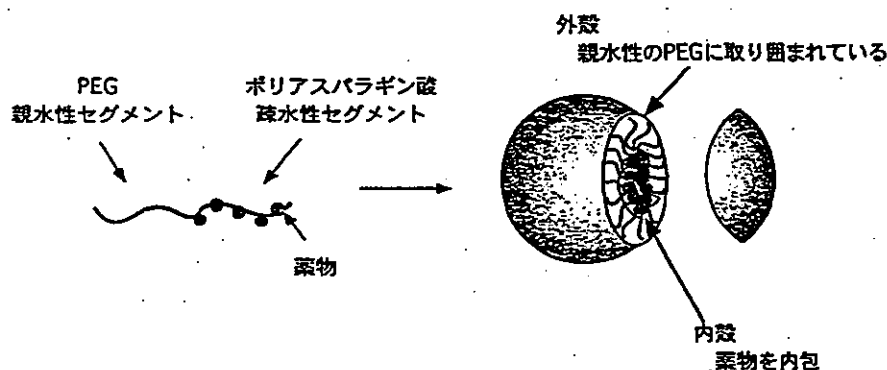


図 5.13 高分子ミセルの構造

薬剤を脂質二重層内にそれぞれ包含できる。しかし構造的に弱く、肝臓に取り込まれやすいので、各種臓器に対するキャリアーとしては難しい問題を抱えている。最近では、リン脂質の組成を変化させてより安定なリポソームを作製する試みや、親水性で生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) を導入し、生体内安定性を高める試みが検討されている。

一方、PEG とポリアスパラギン酸からなる高分子ミセルは疎水性の薬物を物理的、あるいは化学結合を介して内包し、PEG の親水性鎖がまわりを取り囲んだナノオーダーの粒子構造をもち、かさ高い分子となるだけでなく、PEG 自身が低濃度で生物学的に比較的非活性である (図 5.13)。実際、抗癌剤のアドリアマイシンを内包した高分子ミセルは肝臓や脾臓に移行しにくく、大腸癌などを治療できることが確認されている。これは固形癌に対する EPR 効果がうまく活用されていることを示している。外殻となる PEG に機能性分子を賦与してさらにターゲティング能を高めることも可能であり、これからの高分子医薬として期待が大きい。

バイオマテリアルの研究はこれからの医療を支えるといっても過言ではない。多くの優秀な人材、長い年月、費用が必要であるが、なによりも医学・工学・薬学・化学・生物学などの関連諸科学分野の領域をこえた知識や技術の融合と集学的なアプローチが必要である。このような観点からバイオマテリアルの開発が活発に推進され、新しい人工臓器、再生医療、ドラッグデリバリーシステム、バイオテクノロジーがさらに開拓されていくことを期待したい。

Regeneration of Cardiomyocytes from Bone Marrow Stem Cells and Application to Cell Transplantation Therapy

Keiichi Fukuda

Introduction

Although heart transplantation is the ultimate therapy for the treatment of severe heart failure, it has not been widely examined, because it requires donor hearts, and the inadequate supply of donor hearts is often a major problem everywhere in the world. As a result, the current challenge in cardiology is how to reserve pump failure by cell transplantation or regenerative medicine. Recent studies have shown that transplanted fetal cardiomyocytes can survive in heart scar tissue and that the transplanted cells limit scar expansion and prevent post-infarction heart failure. Transplantation of cultured cardiomyocytes into damaged myocardium has been proposed as a future method of treating heart failure,^{1,2} but this revolutionary concept remains unfeasible in clinical settings because of the difficulty of obtaining donor fetal hearts. A cardiomyogenic cell line has long been awaited, and such a line might be capable of substituting for fetal cardiomyocytes in this therapy.

A number of studies have demonstrated that cardiomyocytes can differentiate from various multipotent stem cells, including embryonic stem (ES) cells³ and embryonic carcinoma (EC) cells.⁴ ES cells are an attractive cell source in regenerative medicine, but because the transplanted ES cells are allogeneic, the recipients must take immunodepressant drugs throughout their lives. Use of these reagents impairs the quality of life of the recipients, and transplantation of undifferentiated ES cells often causes teratocarcinoma. In addition, the establishment of human ES cells involves ethical problems and is not allowed in every country. Because of these circumstances, the regeneration of cardiomyocytes from adult autologous stem cells has long been awaited.

Recent reports have demonstrated the existence of pluripotent stem cells in adult tissues. Roy et al reported the existence of neural stem cells in the brain that can differentiate into neurons, oligodendrocytes, and astrocytes in vitro.⁵ Marrow stromal cells have been shown to possess many characteristics of mesenchymal stem cells,⁶ and pluripotent progenitor marrow stromal cells can differentiate into various types of cell types, including osteoblasts,^{7,8} myocytes,⁹ adipocytes, tenocytes, and chondroblasts.¹⁰ We recently reported the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes after exposure to 5-azacytidine and the establishment of cell line CMG (cardiomyogenic) that differentiates into cardiomyocytes in vitro.¹¹

CMG cells exhibit spontaneous beating and express atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), and they may provide a useful and powerful tool for cardiomyocyte transplantation after further characterization of their cardiomyocyte phenotype.

This chapter describes the characteristics of bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes and discusses the possibility of using them for cardiovascular tissue engineering. The expression and function of α_1 , β_1 , and β_2 -adrenergic receptors and muscarinic M_1 and M_2 receptors in CMG cells is also described, because these receptors play a critical role in modulating cardiac function.¹²

Does the Heart Have its Own Stem Cell Compartment?

It is well known that skeletal muscle cells contains own stem cells, called "satellite cells". Satellite cells can both proliferate by cell division and differentiate into skeletal muscle cells, and the differentiated skeletal muscle cells can fuse to form myotubes. By contrast, fetal cardiomyocytes can proliferate by cell division, but they undergo terminal differentiation and stop dividing after birth. A number of studies have reported that cardiomyocytes increase in size by cell hypertrophy, not by cell hyperplasia. To our knowledge there have been no reports of the presence of satellite-cell-like cardiac stem cells in the heart. Beitrani et al recently reported that human cardiomyocytes express Ki67, a marker of cell division, and the M phase of the nucleus of the cardiomyocytes was observed in the border zone area of recent myocardial infarction in autopsied hearts.¹³ These findings suggested that only a very few adult cardiomyocytes can divide after the terminal differentiation. Although their findings were very interesting, these cells were insufficient to improve cardiac function, since the population of these cells was very small.

Mesenchymal Marrow Stem Cells as a Possible Source of Cardiomyocytes: The Cardiomyogenic (CMG) Cell?

Figure 1 shows the classification of the stem cell system of adults.¹⁴ Bone marrow stromal cells were previously used as a feeder layer to culture hematopoietic stem cells, and are known

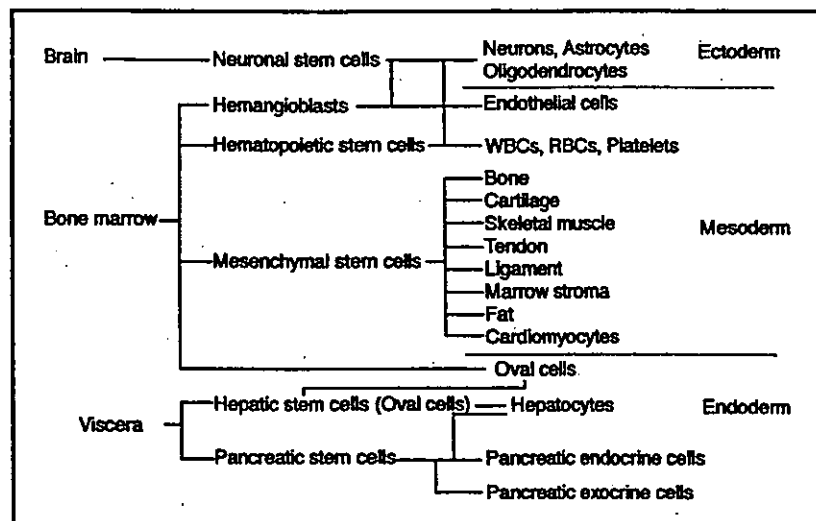


Figure 1. Classification of pluripotent stem cells in adult tissues. Bone marrow contains several kinds of stem cells. Mesenchymal stem cells may differentiate into various mesoderm-derived cells, such as osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, skeletal muscle cells and cardiomyocytes.

to be of mesodermal origin and produce various cytokines and growth factors. In late 1990s, a number of papers reported that bone marrow stromal cells contain multipotent stem cells for non-hematopoietic tissues, called "marrow mesenchymal stem cells", that could differentiate into osteoblasts, chondroblasts, and adipocytes. All of these cells were known to be of mesodermal origin. If mesenchymal stem cells are multipotent, we hypothesized that they might have the ability to differentiate into cardiomyocytes and instituted this study. We also thought that bone marrow cells could be obtained from patients themselves and that autologous cells would not be rejected after cell transplantation.

Method of Establishing Bone-Marrow Derived Cardiomyocytes

Female C3H/He mice were anesthetized with ether, their femora were excised, and bone marrow cells were collected. The procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of Keio University. Primary culture of the marrow cells was performed according to Dexter's method. Cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 20% fetal bovine serum and penicillin (100 µg/ml)/streptomycin (250 ng/ml)/ amphotericin B at 33°C in humid air containing 5% CO₂. After a series of passages, the attached marrow stromal cells became homogeneous and were devoid of hematopoietic cells. The marrow stromal cells basically did not require co-culture with blood stem cells. Immortalized cells were obtained by frequent subculture for more than 4 months. Cell lines from different dishes were subcloned by limiting dilution. To induce cell differentiation, cells were treated with 3 µmol/L of 5-azacytidine for 24 hours. Subclones that included spontaneously beating cells were screened by microscopic observation (first screening), and cells surrounding spontaneous beating cells were subcloned with cloning syringes. Subcloned cells were maintained, exposed to 5-azacytidine again for 24 hours, and clones that showed spontaneous beating most frequently were screened (second screening). The clonal cell line thus obtained was named the CMG cell.

As a result of repeated rounds of limiting dilution, we succeeded in isolating 192 single clones, several of which differentiated into cardiomyocytes and showed spontaneous beating. The experiments were reproducible, but the percentage of cells that differentiated into cardiomyocyte differentiation was specific to each clone. Phase-contrast photography and/or immunostaining with anti-sarcomeric myosin antibodies were used to identify the morphological changes in the CMG cells. CMG cells showed a fibroblast-like morphology before 5-azacytidine treatment (0 week), and this phenotype was retained through repeated subculturing under non-stimulating conditions. After 5-azacytidine treatment, however, the morphology of the cells gradually changed (Fig. 2). Approximately 30% of the CMG cells gradually increased in size at 1 week, and they formed ball-like appearance, or had lengthened in one direction to exhibit a stick-like morphology. They connected with adjoining cells after 2 weeks and had formed myotube-like structures at 3 weeks. The differentiated CMG myotubes maintained the cardiomyocyte phenotype and beat vigorously for at least 8 weeks after the final 5-azacytidine treatment and did not de-differentiate.¹¹ Most of the other non-myocytes had an adipocyte-like appearance.

Regenerated Cardiomyocytes Display a Fetal Ventricular Phenotype

Various cardiac contractile protein isoforms are differentially expressed in cardiomyocytes at different developmental stages and in different chambers. At around the time of birth there is a developmental switch in the ventricular muscle of small mammals from expression of β -myosin heavy chain (MHC), which is the predominant fetal form, to expression of α -MHC. There is also a developmental switch from expression of α -skeletal actin, which is the predominant fetal and neonatal form, to that of α -cardiac actin, the predominant adult form. We investigated the contractile protein isoforms of bone marrow-derived CMG cells to characterize their phenotype as cardiomyocytes. Table 1 summarizes the results. Fetal, neonatal, and adult ventricle and atrium were used as controls.¹⁴ Expression of both α - and β -MHC was detected in differentiated CMG cells by RT-PCR, but β -MHC

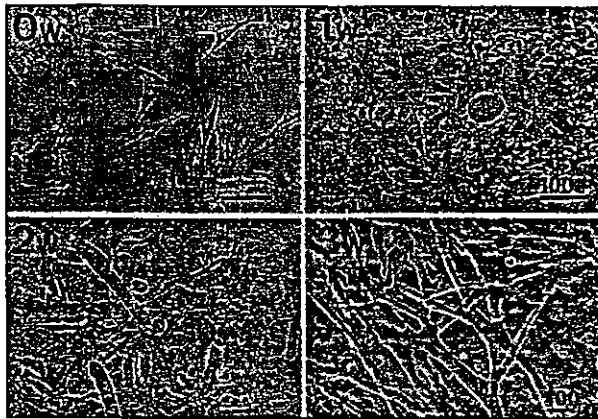


Figure 2. Phase-contrast photographs of cardiomyogenic (CMG) cells before and after 5-azacytidine treatment. Upper left: CMG cells have a fibroblast-like morphology before 5-azacytidine treatment (0 week). Upper right: One week after treatment, some cells gradually increased in size, and developed a ball-like or stick-like appearance. These cells began spontaneous beating thereafter. Lower left: Two weeks after treatment, the ball-like or stick-like cells connected to adjoining cells, and began to form myotube-like structures. Lower right: Three weeks after treatment. Bars indicate 100 μ m.

expression was overwhelmingly greater than that of α -MHC. CMG cells expressed both α -cardiac and α -skeletal actin, but the α -skeletal actin gene was expressed at markedly higher levels than the α -cardiac actin gene. Interestingly, CMG cells expressed the myosin light chain (MLC)-2v gene, but not the MLC-2a gene. MLC-2v is specifically expressed in ventricular cells, while MLC-2a is specifically expressed in atrial cells. Skeletal muscle cells do not express either α -MHC or MLC-2v. These results indicated that differentiated CMG cells possess the specific phenotype of the fetal ventricular cardiomyocytes.¹¹

CMG Cells Have a Cardiomyocyte-Like Ultrastructure

Representative transmission electron micrographs are shown in Figure 3. A longitudinal section of the differentiated CMG myotubes clearly revealed the typical striation and pale-staining pattern of the sarcomeres.¹¹ CMG myotube nuclei were positioned in the center of the cell, not beneath the sarcolemma. The most conspicuous feature of the differentiated CMG myotubes was the presence of membrane-bound dense secretory granules measuring 70-130 nm in diameter. They were thought to be atrial granules, and were especially concentrated in the juxtanuclear cytoplasm, but some were also located near the sarcolemma. These

findings indicated that the CMG cells possessed cardiomyocyte-like rather than skeletal muscle ultrastructure.

Developmental Stage of Undifferentiated and Differentiated CMG Cells

Various cardiac specific transcription factors have been cloned, and their genes are serially expressed in the developing heart during myogenesis and morphogenesis. Figure 4 shows the time course of the expression of cardiomyocyte-specific transcription factors in fetal developing heart and CMG cells. The genes coding Nkx2.5¹⁵ (homeobox type transcription factor specifically expressed beginning in the early developing heart), GATA4¹⁶ (GATA-motif-binding Zinc finger type transcription factor expressed beginning in the early stage developing heart), HAND1/2 (basic HLH type transcription factor expressed in the heart and autonomic nervous system), and MEF2-B/C¹⁷ (muscle enhancement factor: a MADS box family transcription factor expressed in the myocytes) were expressed in the early stage of heart development, and MEF2A and MEF2-D in the middle stage. The CMG cells already expressed GATA4, TEF-1¹⁸ (transcription enhancement factor 2), Nkx2.5, HAND, and MEF2-C before exposure to 5-azacytidine, and they expressed MEF2-A and MEF2-D after exposure to 5-azacytidine. This pattern of gene expression in CMG cells was similar to that of developing cardiomyocytes in vivo,¹¹ and indicated that the developmental stage of the undifferentiated CMG cells is close to that of cardiomyoblasts or the early stages of heart development. We estimated that the stage of differentiation of the CMG cells lies between the cardiomyocyte-progenitor stage and the differentiated cardiomyocyte stage.

Serial Changes in Action Potential Shape in CMG Cells Simulate Those of Fetal Ventricular Cardiomyocytes in Vivo

CMG cells exhibit at least two types of distinguishable morphological action potentials: sinus-node-like potentials (Fig. 5A) and ventricular myocyte-like potentials (Fig. 5B).¹¹ The cardiomyocyte-like action potential recorded from these spontaneous beating cells is characterized by:

- 1) a relatively long action potential duration or plateau,
- 2) a relatively shallow resting membrane potential, and
- 3) a pacemaker-like late diastolic slow depolarization. Peak-and-dome-like morphology was observed in ventricular-myocyte-like cells. Figure 5C shows the time course of the percentages of the sinus node-like and ventricular-myocyte-like action potentials. All action potentials recorded from CMG cells until 3 weeks were sinus-node-like action potential. The

Table 1. Isoforms of the Contractile Proteins in Differentiated CMG Cells

Developmental Stage	Atrium			Ventricle		
	Fetus	Adult	Fetus	Neonate	Adult	CMG
α -actin	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac
myosin heavy chain	$\alpha>\beta$	α	$\beta>\alpha$	$\alpha>\beta$	α	$\beta>\alpha$
myosin light chain	2a	2a	2v	2v	2v	2v