

マイクロファイバーが生成した。さらにマイクロファイバーを積層することによりマイクロファブリックが得られた。図 9 は PCL(1250)(80)PDO と PCL(1250)(71)BDA のミ

クロファイバーを積層して得られるマイクロファイバーファブリックの FE-SEM 像である。いずれもピンセットでつまみ上げられる程度の不織布が得られている。

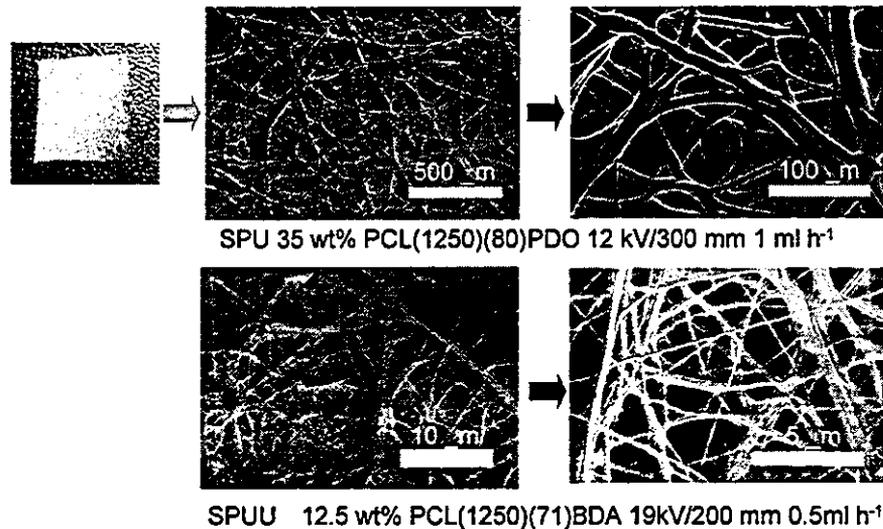


図9 PCL(1250)(80)PDOとPCL(1250)(71)BDAのマイクロファイバーを積層して得られるマイクロファイバーファブリックのFE-SEM像

D. 考察

本研究で用いた LDI は非対称分子であるのでハードセグメントは結晶化せず、鎖延長剤がジオールの場合、室温付近に T_g を、ジアミンの場合、100℃付近に T_g を示した。ジアミンの場合、ある組成で PCL の結晶化が阻害されており、実用的な物性を得るためにはジアミンでの鎖延長が必要不可欠である。また分解速度やマイクロファイバーの特性も鎖延長剤の種類に大きく依存した。特に活性汚泥中での BOD 分解試験により、SPU および SPUU が生分解性を示すことが明らかになった。

E. 結論

LDI をジイソシアナート成分として導入した新規ポリウレタン系生分解性エラストマーの合成し、物性の最適化に成功した。さらに ESD によりマイクロファイバーや不織布が調製

可能であることを明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 高原 淳、山本 和弥、和田信一郎. 天然無機ナノファイバー「イモゴライト」、ナノファイバーテクノロジーを用いた高度産業発掘戦略」(梶原、谷岡、片岡、小池、高原編) CMC、443-452 (2004).
2. K. Yamamoto, H. Otsuka, A. Takahara, Preparation of Polymer Nanohybrid via in situ Synthesis of Inorganic Nanofiber in Polymer Solution, Trans. Mater. Res. Jpn. 2004, 29: 149-152.
3. N. Hosaka, K. Tanaka, H. Otsuka and A. Takahara, Influence of the Addition of Silsesquioxane on the Dewetting Behavior of Polystyrene Thin Film, Composite

Interfaces, 2004, 11: 297-306.

4. T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, A. Takahara, Physicochemical Properties and Bio-degradation of Segmented Polyurethane and Poly(urethane-urea) Derived from Lysine-Based Diisocyanate, *Trans. Mater. Res. Jpn.*, 2004, 29: 2873-2876.
5. A. Takahara, M. Hadano, T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, Characterization of Novel Bio-degradable Segmented Polyurethanes Prepared from Amino-acid Based Diisocyanate, *Macromol. Symp.* in press.

2. 学会発表

- 1) 山口智弘、大塚英幸、木戸秋悟、松田武久、高原 淳、エレクトロスプレーデポジション法による生分解性セグメント化ポリウレタンおよびセグメント化ポリウレタンウレミアマイクロファイバーの調製、第 33 回九大生体材料・力学研究会、九州大学、2004 年 3 月
- 2) 山口智弘、大塚英幸、木戸秋 悟、松田武久、高原 淳、生分解性セグメント化ポリウレタンおよびセグメント化ポリウレタンウレアの特性解析とマイクロファイバーの調製、第 53 回高分子学会年次大会、神戸国際会議場（神戸市）、2004 年 5 月
- 3) A. Takahara, Preparation of Bio-degradable Segmented Polyurethanes and Polyurethaneureas from Lysine-Based Diisocyanate, 8th World Conference on Biodegradable Polymers and Plastics, Seoul, Korea, June, 2004
- 4) A. Takahara, M. Hadano, T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, Characterization of Novel Bio-degradable

Segmented Polyurethanes and Polyurethaneureas from Amino-acid Based Diisocyanate, 40th IUPAC International Symposium on Macromolecules (MACRO 2004), Paris, France, July, 2004

- 5) 波多野 道子、山口 智弘、大塚 英幸、木戸秋 悟、松田 武久、高原 淳、アミノ酸由来のジイソシアナートを用いたセグメント化ポリウレタンマイクロファイバーの調製、第 41 回化学関連支部九州大会、北九州国際会議場、2004 年 7 月
- 6) 波多野 道子、山口 智弘、大塚 英幸、木戸秋 悟、松田 武久、高原 淳、生分解性セグメント化ポリウレタンの分子鎖凝集構造と分解挙動、第 53 回高分子討論会、北海道大学、2004 年 9 月
- 7) 波多野 道子、山口 智弘、大塚 英幸、木戸秋 悟、松田 武久、高原 淳、リジンジイソシアナートを用いた生分解性セグメント化ポリウレタンの凝集構造と物性評価、平成 16 年度繊維学会秋季研究発表会、熊本大学、2004 年 9 月
- 8) 波多野 道子、山口 智弘、大塚 英幸、青井 啓悟、佐々木 園、高原 淳、アミノ酸由来のジイソシアナートを用いた生分解性セグメント化ポリウレタンの凝集構造と分解挙動の評価、ポリウレタンフォーラム・高分子学会九州支部フォーラム「ポリウレタンを考える VI」、長崎大学、長崎県長崎市文教町、2005 年 2 月
- 9) 波多野 道子、山口 智弘、大塚 英幸、木戸秋 悟、松田 武久、青井 啓悟、高原 淳、リジンジイソシアナートを用いた環境調和型ポリウレタンの合成とその特性解析、第 5 回 GSC シンポジウム、学術総合センター・一橋記念講堂、2005 年 3 月

F. 知的財産の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

感温性人工細胞外マトリックスの応用：
温度応答性高分子化合物を用いたターゲット細胞の
培養下 *in situ* 選別回収

分担研究者 高松 洋（九州大学工学研究院機械科学部門教授）

研究要旨：幹細胞および前駆細胞の研究では、多くの培養細胞の中から数少ない特定の細胞のみを選別回収する必要がある。本研究では、細胞を懸濁液状態から遠心分離やフローサイトメトリーなどで回収するのではなく、温度応答性の高分子化合物を培養基材とするディッシュに培養した細胞を、顕微鏡下で観察しながら回収する方法の開発を行った。その結果、任意の単一細胞および相互接着細胞を、高い確率でほぼ 30 秒以内に回収することが可能になった。

A. 研究目的

本研究は、下限臨界共溶温度（LCST）以下では水溶性を示し、その温度以上では水中に析出するという温度応答性の相分離特性を有する高分子化合物を利用して、顕微鏡下でのその場観察により細胞の選別回収を行う方法およびデバイスを開発することを目的とする。この方法では、高分子化合物をコーティングした温度応答性ディッシュを使用する。このディッシュに細胞を培養し、37℃に保持したまま顕微鏡下で観察しながらターゲットを決定する。そして、その底面を冷却することによって脱着した細胞をマイクロピペットで回収する。このような方法が実現できれば、培養状態での細胞形態による細胞判別ができ、その細胞を確実に回収することが可能になる。

また、トリプシン等のタンパク質分解酵素を用いないため、ターゲット細胞とその周囲のニッシュ細胞との細胞間接着を保持したまま細胞塊の回収ができるようになる。

この新しい方法の実現には、以下の技術的課題を克服する必要がある。

- (1) 細胞の接着性を有し、かつ冷却による脱着が容易な温度応答性の高分子化合物が、均一で適当な厚さにコーティングされたディッシュの作成。
- (2) 顕微鏡の視野を遮らずにディッシュ底面の局所冷却が可能なコンパクトな温調局所冷却デバイスの開発。20 倍対物レンズで観察するためには、超長作動レンズを用いたとしても、ディッシュ底面から対物レンズまでの隙間 7mm 以内に冷却機構を収める必要がある。

る。

本研究では、上記条件を満足するディッシュおよびデバイスの作製を行ったうえで、培養細胞のその場観察選別回収を行った。

B. 研究方法

実験試料

温度応答性ディッシュに対する細胞の接着・脱着特性および細胞の選別回収のいずれにおいてもマウスの繊維芽細胞株 3T3 を用いた。

温度応答性高分子化合物

下限臨界共溶温度が約 31℃のポリ(イソプロピルアクリルアミド) (Poly (N-isopropylacrylamide): PNIPAAm) およびそれをグラフト化した下限臨界共溶温度 34℃の PNIPAAm 化ゼラチンの混合物を用いた。

コーティングディッシュ

φ22mm の丸型カバーガラス表面に PNIPAAm および PNIPAAm ゼラチンの混合水溶液を滴下し、スピンコーティングを行った。その後、外径 22mm、内径 20mm、高さ 4mm のリング状のポリカーボネイト製の枠を培地用の堰としてカバーガラスに接着し、ディッシュ様の構造とした。

細胞の接着・脱着特性の評価

最適コーティング条件は、細胞の接着および冷却による脱着特性により決定した。方法は以下のとおりである。35mm プラスチックディッシュの中にコーティングディッシュを入れ、細胞を密度 1×10^4 cells/cm² で播種して

約 18 時間培養した。そして、ディッシュを 37℃の MEM で軽く洗浄し、浮遊細胞を除去した後、37℃下で培養状態を観察、記録した。その後、5℃のサーモプレートで 10 分間冷却した後、ディッシュを再び MEM で軽く洗浄して観察、記録した。

コーティング条件の検討

はじめに、コーティングに用いる水溶液濃度の検討を行った。細胞接着性が低い PNIPAAm 水溶液を用い、PNIPAAm の質量分率が 2%、4%、6%、8%、10%の 5 通りの場合についてスピンコーティングを行った。そして、PNIPAAm 層の一樣コーティングにより細胞の接着伸展が認められなくなる条件を探索した。

次に、PNIPAAm および PNIPAAm ゼラチンの混合比の検討を行った。上述の実験結果に基づき、PNIPAAm と PNIPAAm ゼラチンの総量の質量分率が 6%の水溶液を用いて、PNIPAAm ゼラチンの質量分率が 0%、10%、25%、50%、100%の 5 通りの組成についてコーティングを行った。そして、細胞の接着・脱着特性より最適コーティング条件を決定した。

温調・局所冷却デバイス

ディッシュの温度調節および局所冷却には顕微鏡ステージ用のサーモプレート (MATS-505R30, ニコンインステック) を利用した (図 1)。37℃に保った透明の導電ガラス製ヒータ (厚さ 0.5mm) の上にディッシュを載せ、ガラスの中央部に設けられたφ1mm の孔に向

かって冷却ガスを噴射し、ディッシュ底面を冷却した。冷却ガス（窒素ガス）は外径 1mm、内径 0.6mm のガラス管に導入され、出口より斜め上方の孔に向かって噴射される。ガラス管出口近傍の冷却ガスの温度は、 $\phi 0.25\text{mm}$ の T 型シース熱電対で測定した。なお、サーモプレートの下面は、中央の穴の部分を除いて厚さ 1mm のゴムシートで断熱した。

冷却特性

底面の中央および 1mm、2mm、3mm 離れた計 4 箇所には $\phi 0.12\text{mm}$ の K 熱電対素線を接着したディッシュを作成した。所定の量の培地を入れたこのディッシュを細胞の回収実験と全く同様の手順で温調・局所冷却デバイス上に置き、冷却過程での温度変化を記録した。また、上記のディッシュを用いて、細胞の培養、ディッシュの取出しからデバイスへのセッティング、選別回収の一連の作業中の温度変化も測定し、ディッシュ底面の温度が、作業の途中で許容温度以下に低下していないかどうかのチェックも行った。

細胞の選別回収

コーティング条件に関する実験結果に基づき、50%PNIPAAm ゼラチン-50%PNIPAAm をコーティング層とするディッシュを用いて細胞の選別回収実験を行った。細胞を密度 5×10^3 cells/cm² で播種し、約 18 時間培養した後、回収実験を行った。37°C に保った温調・局所冷却デバイスにディッシュを載せ、顕微鏡ステージに取り付けた X-Y 2 軸ハンドルを用いてターゲットの細胞を顕微鏡視野の中心に移

動した。その後、冷却を開始し、顕微鏡で観察しながら脱着する細胞をマイクロピペットを用いて吸引した。なお、液の吸引にはシリンジポンプを用いた。細胞の回収の様子は CCD カメラで観察しデジタルビデオに記録した。

C. 研究成果及び考察

PNIPAAm コーティングの結果

本研究で用いたカバーガラスに細胞を培養すると、細胞は接着伸展した（図 2(a)）。このカバーガラスに濃度 4% の PNIPAAm 水溶液をスピンコーティングすると、ガラス表面で培養した場合に比べて伸展の程度はやや劣るものの、細胞は接着した（図 2(b)）。これに対し、PNIPAAm 水溶液の濃度が 6% 以上の場合には細胞の接着が認められなかった（図 2(c)）。したがって、ガラスの全面に PNIPAAm のコーティング層を形成するには、PNIPAAm 濃度が 6% 以上でなければならないことが明らかになった。

PNIPAAm と PNIPAAm ゼラチンの最適混合比

細胞を 18 時間培養したディッシュを MEM で洗浄した後、およびそのディッシュ底面全体を冷却した後の細胞の様子を観察した結果を図 3 に示す。100% PNIPAAm の場合には細胞の接着性が低く、細胞の形態は球状のままであったが（図 3(a)左）、PNIPAAm ゼラチンが 10% 以上の場合には細胞は伸展接着した（図 3 (b)左, (c)左, (d)左）。一方、冷却後は、50% PNIPAAm ゼラチンの場合には細胞が球

状になる（図 3(c)右）のに対し，その他の場合には冷却前とほとんど状態が変わらなかった（図 3(a)右, (b)右, (c)右）。

図 4 は上記のような観察結果に基づいて計数した冷却前後の接着細胞数を PNIPAAm ゼラチンの質量分率に対して示している。100% PNIPAAm の場合には接着した細胞数が最も少なく，PNIPAAm ゼラチンの混合比の増加とともに接着性が増加し，25% PNIPAAm ゼラチンの場合に細胞の接着数は最大になった。一方，PNIPAAm ゼラチンの割合が 10%以下および 100%では冷却しても細胞の脱着がほとんどなく，冷却後の細胞数の減少は 50% PNIPAAm ゼラチンの場合に最大であった。以上の結果より，本研究の目的には 50% PNIPAAm-50% PNIPAAm ゼラチンが最適であることが明らかになった。

細胞の選別回収結果

図 5 に単一細胞の回収の様子を示す。この例を含めて，ほとんどの場合に，冷却開始後 15~30s でターゲット細胞の回収に成功した。脱着に長時間要したこれまでの結果では，脱着した細胞が球状に近い形になって回収されたのに対し，本実験の場合には，細胞が元の形態に近い状態で回収される様子が観察された。細胞回収に要する時間がこれまでの 1/10 ~1/20 になり，大幅な技術の改善が認められた。また，相互接着した 2 個の細胞の同時回収も自在に行うことができた（図 6）。

ディッシュ底面の冷却特性

細胞の培養から選別回収までの一連の作業

中に，ディッシュの底面温度が LCST 以下になっていないことを確認した。

図 7 は冷却過程におけるディッシュ底面の温度変化の例を示している。中心部および 1mm 離れた点ではほぼ同様な温度変化を示し，冷却ガスの噴射開始から 23 秒の間に約 24℃まで 10℃程度低下した。一方，中心から 2mm および 3mm 離れた点における 23 秒後の温度は，それぞれ約 27℃および 29℃であった。したがって，細胞の回収に要する 20s 程度の間に，少なくとも半径 3mm 程度の領域ではコーティング層が培地中に溶出した可能性が高い。また，冷却終了後も，温度が完全に元まで回復していないことが明らかになった。

今後の課題

上述のように，冷却終了後でもディッシュ底面の温度が LCST 以下になっている可能性があることが明らかになった。これは，同じディッシュの複数箇所から細胞の回収ができなかったことを意味している。したがって，温調デバイスの設定温度を上げることにより，ディッシュ底面の温度回復を確実にする必要はある。また，選別回収実験において，細胞が明らかに脱着しているにもかかわらず，回収ができなかった場合があった。この原因は，細胞の吸引法にあると考えられ，吸引デバイスの改良が望まれる。さらに，回収した細胞を効率よく再放出できる方法を開発して，細胞の選別，回収，純化が容易に行える技術を確立する必要がある。

D. 結論

細胞の接着と冷却による脱着特性に優れた感温性高分子化合物が、ほぼ一様にコーティングされた温度応答性ディッシュの作成に成功した。そのディッシュを用いて、細胞を顕微鏡下で選別し、ターゲット細胞または細胞塊のみを回収することが可能になった。細胞の回収に要する時間は 15～30 秒であり、十分実用的なレベルであると考えられる。

E. 研究発表：

学会発表

- 1) 高松洋, 岡野博幸, 福田優子, 松田武久, 感温性ゼラチンを用いた細胞の培養下選別回収法, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 2005.1.
- 2) H. Takamatsu, H. Okano, Y. Fukuda, T. Matsuda, A New Method for In-Situ Harvesting of a Target Cell, ASME 2005 Summer Bioengineering Conference, 2005.6.

F. 知的財産の出願・登録状況：なし

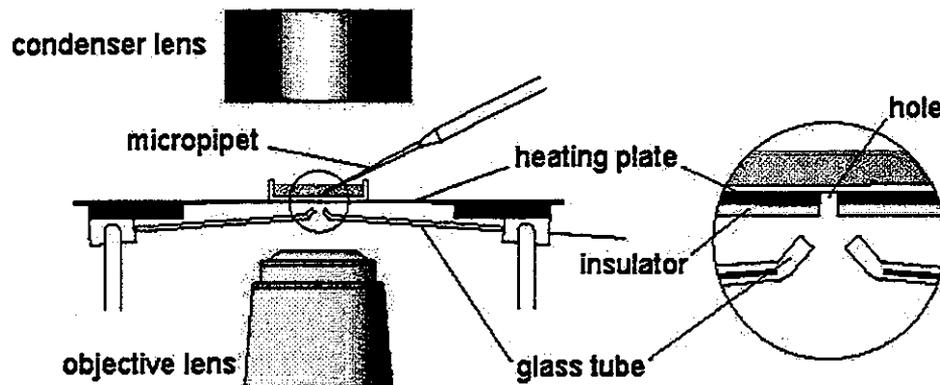
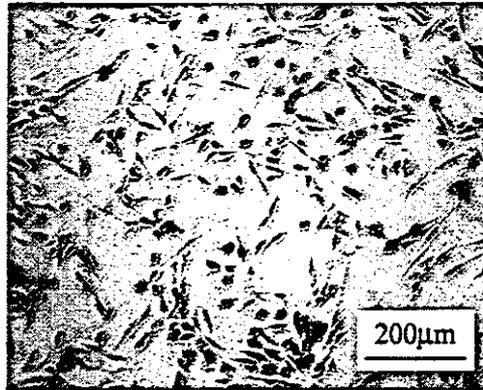
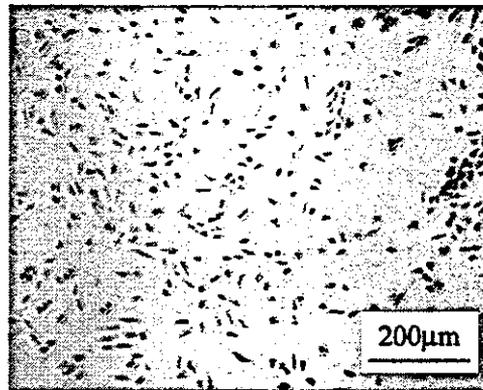


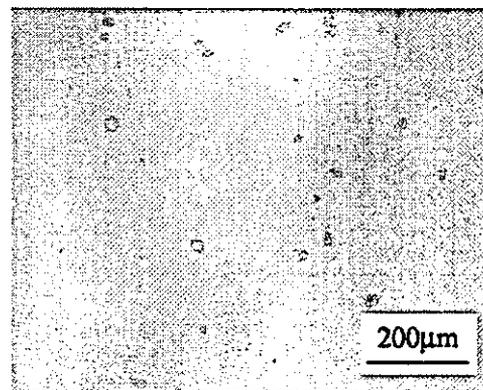
図1 デバイスの概略



(a) ガラス表面



(b) 4% PNIPAAm コーティング



(c) 6% PNIPAAm コーティング

図2 細胞の接着に及ぼす PNIPAAm 水溶液濃度の影響



(a) 100% PNIPAAm



(b) 90% PNIPAAm / 10% PNIPAAmゼラチン



(c) 50% PNIPAAm / 50% PNIPAAmゼラチン



(c) 50% PNIPAAm / 50% PNIPAAmゼラチン

図3 18時間培養後および冷却後の細胞の接着状態

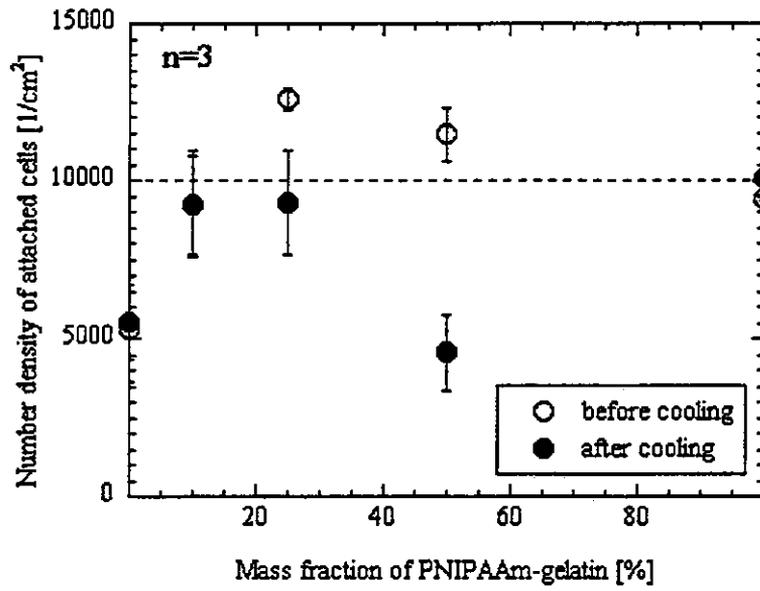


図4 細胞の接着・脱着特性に及ぼすPNIPAAmおよびPNIPAAmゼラチンの混合比の影響

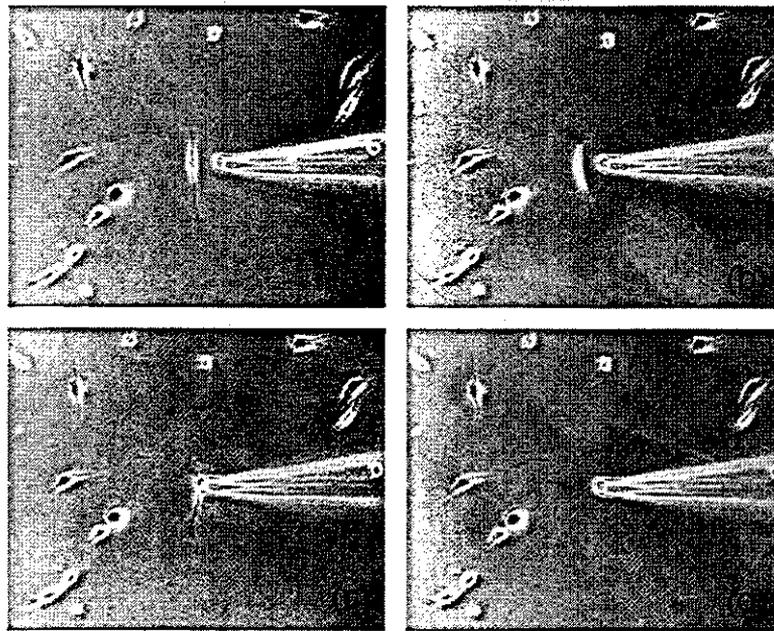


図5 単一細胞の回収の様子

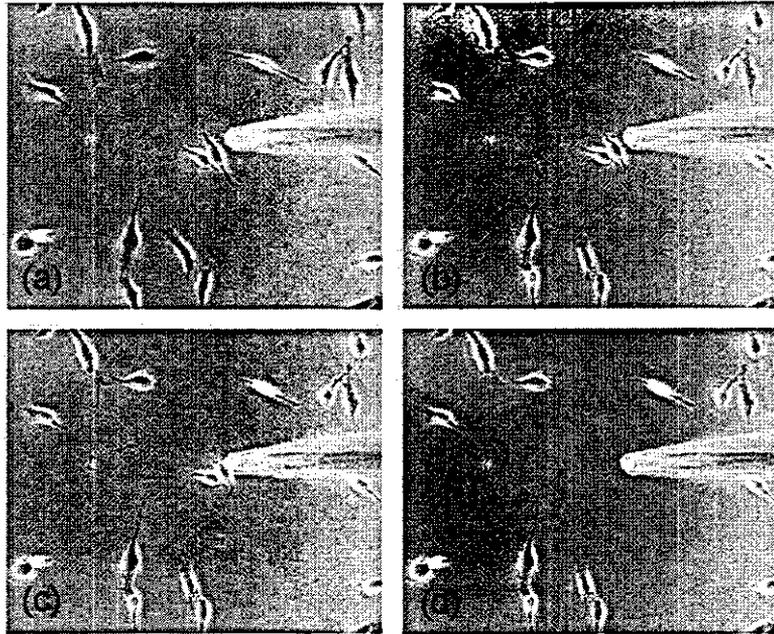


図6 相互接着細胞の回収の様子

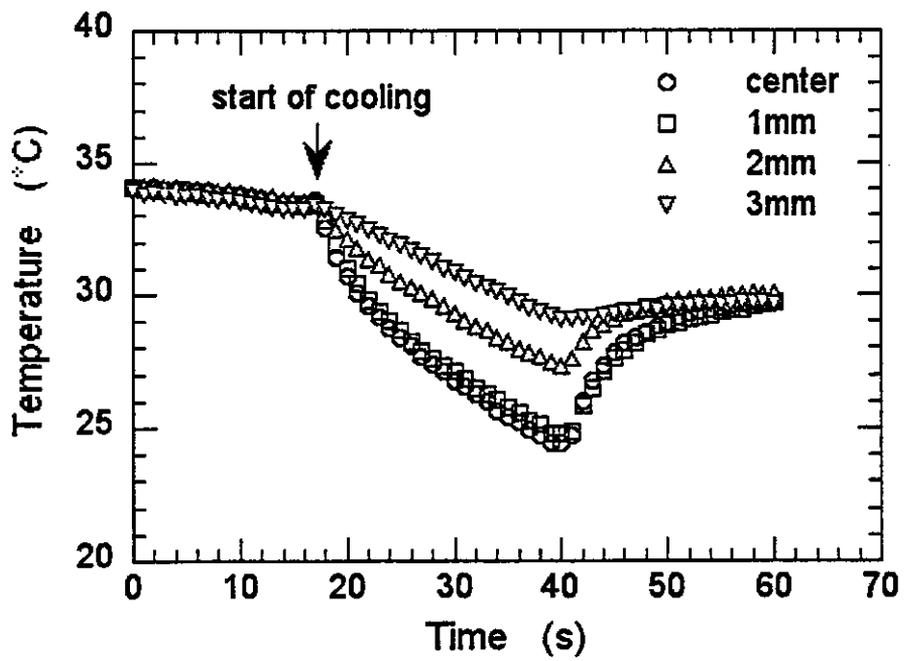


図7 ディッシュ底面の温度変化

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

軟骨組織工学に関する研究

分担研究者 岩本 幸英（九州大学大学院医学研究院整形外科教授）

研究要旨：我々は細胞単独で比較的大きな立体構造体を作成し患部に移植する、新規のセルデリバリーシステムを開発した。今回、家兎骨軟骨欠損モデルに未分化間葉系幹細胞を自家移植したところ、良好な硝子軟骨と軟骨下骨の再生が得られた。本システムは、特別なバイオマテリアルや、成長因子、遺伝子導入などを必要とせず、自己由来の未分化な幹細胞のみで骨や軟骨が再生可能であり、安全面、費用の面において臨床応用に有用であると思われる。

A. 研究目的

近年、臓器の再生を目的として、細胞を患部に移植する方法が盛んに研究され、一部では臨床応用されている。特に関節軟骨は一度損傷すると自己修復する能力が乏しいため、軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いた細胞移植の試みが数多くなされている。

現在広く行われている細胞移植の手法は、細胞を培養液で懸濁し、経静脈的もしくは、患部に直接注入する方法で行われている。しかし、関節の場合、移植された細胞液が移植部位から関節腔内に漏出する危険性が問題点として指摘されている。このため、生体材料を細胞のキャリア（=担体もしくは足場）として患部に移植するセルデリバリーシステムの開発が重要であるとされ、軟骨再生にも臨床応用が始まっている。そのキャリアとしての素材には牛由来のコラーゲンゲルや、生体分解性高分子ポリマーなど、近年進歩の著しい生体材料が使用されている。しかし、異種動物由来の生体材料には未知の感染症の危険性が存在し、生体分解性ポリマーも分解時の毒性などの副作用の危険性が存在し、臨床応用には安全性の証明が強く求められている。

我々は発生学の観点から細胞の自然凝集を応用して、細胞だけでほぼ任意の形状の立体構造体を作成する方法を開発した。正常細胞の場合、直径1mm以上の大きさを持つ細胞の自然凝集体は通常得られない。我々はあらかじめ任意の形状に加工したチャンパー内に細胞凝集体を多数入れて培養することにより、チャンパーの形状に沿った比較的大型の構造体を作成することに成功した。（図1）

本研究では、関節軟骨の再生を目的として、家兎骨軟骨欠損モデルを用いて、骨髄由来の未分化間葉系幹細胞を円柱状の細胞プラグを作成し、自家移植を行った。

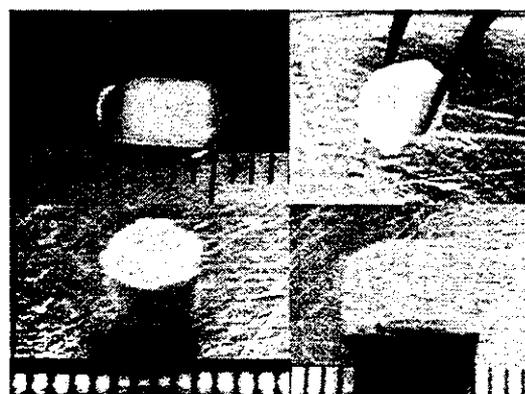


図1：細胞だけで作成した構造体；
円柱と立方体に成形

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学動物実験施設における倫理委員会の承認を得ており、静脈麻酔及び局所麻酔を併用して動物への苦痛を与えないよう最大限配慮した。

B. 研究方法

成熟した日本白色家兎50羽を用いた。腸骨骨髓より採取した間葉系幹細胞を培養・増殖した。この細胞を用いて直径4.8mm、厚さ4mmの円柱状の未分化間葉系幹細胞プラグを作成した。家兎大腿膝蓋骨溝に作成した骨軟骨欠損部にプラグの自家移植を行い、1週間ギプス固定を行った。術後3、6、12週に屠殺し、組織学的評価及びマイクロCT (以下 μ CT)

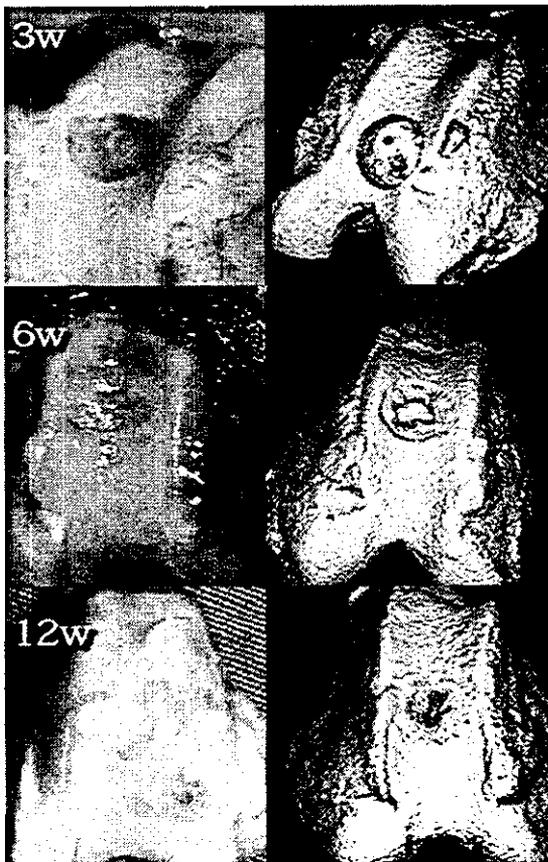


図2：術後の関節面(左)及び軟骨下骨(右； μ CT)；6週で移植関節面は軟骨で再生されており、 μ CTにて軟骨下骨の再生が移植部辺縁から中心に向かっている。

を用いて骨化の状態を評価した。また、移植された細胞を追跡するため、10羽のウサギには、蛍光色素を各細胞に取り込ませたプラグを移植した。

C. 研究成果

移植後の経過とともに、周囲の健全部から連続性をもって移植部中心に向うII型コラーゲンを主体とした硝子軟骨の出現と、それに引き続く内軟骨性骨化を認めた。軟骨レベルでは硝子軟骨の出現後は内軟骨骨化を認めなかった。(図2、図3) μ CTでも週の経過とともに軟骨下骨レベルでの中心への骨化を認めたが、軟骨層への骨化は認めなかった。

(図4) 移植直後は高い細胞密度であったが、経過と共に健全部と同等の細胞密度となった。(図5)

蛍光色素は修復軟骨、軟骨下骨で検出され、移植された幹細胞そのものが生着し、軟骨、骨とそれぞれ分化したことが確認された。

(図6) 再生された軟骨は触診レベルでは周囲の正常軟骨と同程度の堅さと滑らかさをもっていた。

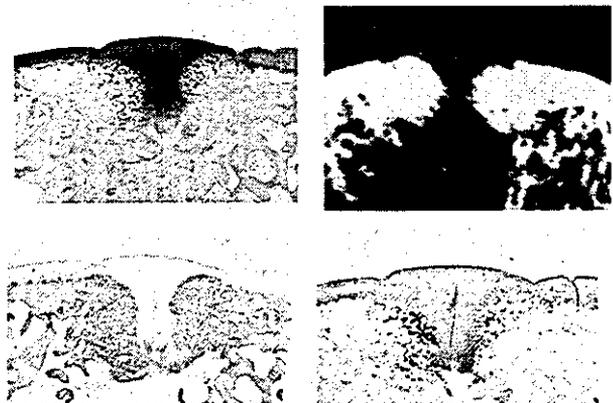


図3：移植後6週：A；Safranin O/Alcian Blue B； μ CT, C；抗I型コラーゲン免疫染色 D；抗II型コラーゲン免疫染色

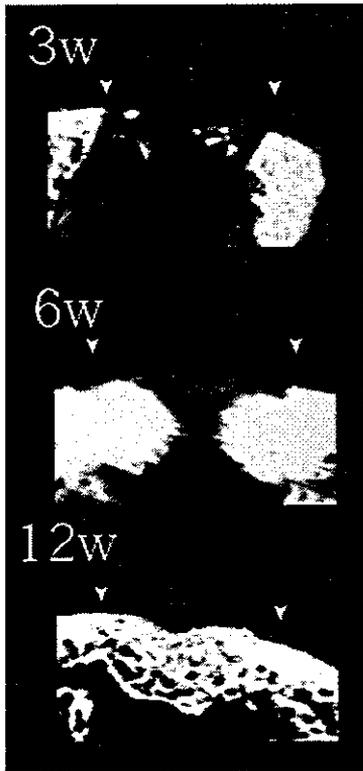


図4：移植部の経時的変化（ μ CT）
軟骨層には骨化が及んでいない。
矢印は境界部

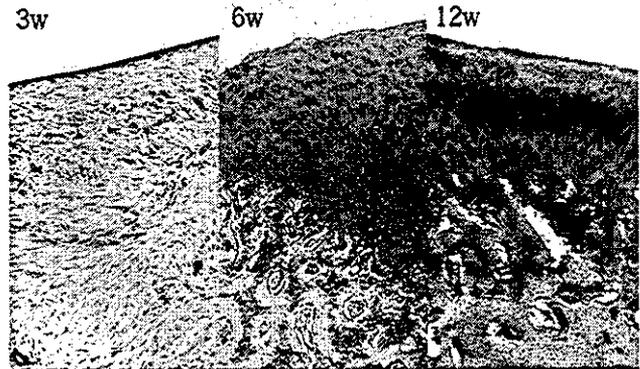


図5：細胞密度の変化(Safranin O/Fast Green)；軟骨レベルでは週の経過と共に細胞密度が正常軟骨レベルまで低下しており、正常と同様に細胞が柱状に再配列されている。

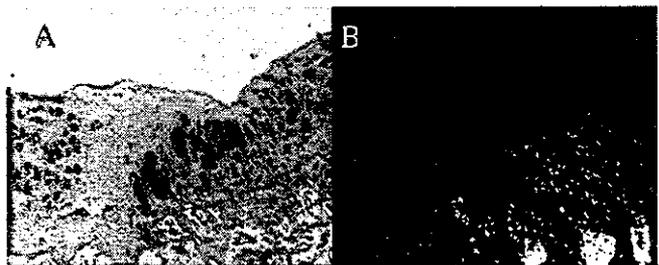


図6：移植後6週：健全部(左側)と移植部(右側)の境界領域。A；Safranin O/Fast Green B；共焦点レーザー顕微鏡。細胞の蛍光色素の発現を認め、移植した幹細胞が生着し軟骨と骨に分化した事が確認できた。

D. 考察

我々以外にも、軟骨細胞だけで構造体を作成する方法 (scaffold-free system) が報告されている。本法は他の scaffold-free system と異なり、成人の軟骨全層よりも厚みを持たせた 5mm 以上の細胞プラグが一週間以内と比較的短期間で作成可能である。他の Scaffold-free system は、in vitro での一ヶ月以上の長期培養によって厚みが 2mm 程度の立体構造体を作成するが、彼らは軟骨細胞の産生する細胞外マトリックスを主体として構造体を作成する。そのため、体外で産生された新規細胞外マトリックスに阻害され、移植された組織と母床との間の結合が不十分で脱落したとの報告もある。関節軟骨の再生医療において、移植組

織と母床との結合に関しては重要な問題点とされている。我々のシステムでは、未分化な幹細胞同士の結合によって形成された構造体を移植するため、軟骨と同時に軟骨下骨も再生され、良好な結合が得られるものと考えられた。初期のギプス固定が十分であれば、組織の脱落はみられなかった。また、多くの骨軟骨欠損モデルの動物実験の報告において、移植後 12 週以上の長期経過と共に、再生軟骨の底部が骨化し、菲薄化した軟骨になることが問題となっており、臨床応用では、軟骨下骨も含んだ深い軟骨欠損の症例には細胞移植は不相当とされていた。我々の動物実験の結果では 24 週を経過しても再生軟骨はほぼ健全部と同等の厚みを保っており、骨軟骨欠

損の臨床応用にも用いることができると考えられた。

また、臨床応用だけでなく、骨・軟骨の再生における分子生物学的解析にもアッセイ系として本システムは有用であると思われた。さらに間葉系幹細胞は、骨・軟骨・脂肪以外にも、心筋、血管、肝臓など幅広い組織に分化可能と相次いで報告され、本セルデリバリーシステムの応用範囲が広がる可能性がある。

E. 結論

事前に十分な量の細胞があれば、短期間で移植可能なプラグが作成可能であり、遺伝子や成長因子などを用いなくても硝子軟骨が再生可能であり、安全面、コストの面で臨床応用に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 松田秀一、岩本幸英：軟骨欠損修復の現況。骨・関節・靭帯 2001, 14:797-800.
2. 松田秀一、岩本幸英：間葉系幹細胞を用いた軟骨再生。最新医学 2002, 57: 75-79.
3. 田仲和宏、岩本幸英。軟骨コラーゲン遺伝子の発現制御機構。Connective Tissue, 2002, 34: 147-155.
4. S. Matsuda, H. Miura, R. Nagamine, K. Urabe, T. Mawatari, Y. Iwamoto. A Comparison of Rotational Landmarks in the Distal Femur and the Tibial Shaft. Clin Orthop 2003, 414: 183-188.
5. R. Nagamine, K. Miyanishi, H. Miura, K. Urabe, S. Matsuda, Y. Iwamoto. Medial torsion of the tibia in Japanese patients with osteoarthritis of the knee. Clin. Orthop. Related Res. 2003, 408: 218-224.

6. T. Kawano, H. Miura, T. Mawatari, T. Moro-oka, Y. Nakanishi, H. Higaki, Y. Iwamoto. Mechanical effects of the Intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipids on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism, 2003, 48(7): 1923-1929.
7. A. Matsuo, T. Shuto, G. Hirata, H. Satoh, Y. Matsumoto, Z. Hongpu, Y. Iwamoto. Antiinflammatory and chondroprotective effects of the Aminobisphosphonete incadronate (YM175) in Adjuvant induced arthritis. J. Rheumatology, 2003, 30(6): 1280-1290.
8. K. Okazaki, S. Jingushi, T. Ikenoue, K. Urabe, K. Sakai, Y. Iwamoto. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. J. Orthop. Res. 2003, 21: 511-520.
9. 田仲和宏、岩本幸英。境界領域 知っておきたい 軟骨コラーゲン遺伝子の転写調節因子に関する研究。臨床整形外科 2003, 38巻7号, 916-918.
10. 首藤敏秀, 岩本幸英。RAにおける骨軟骨破壊のメカニズム。九州リウマチ 2003, 22: 6-10.
11. 田仲和宏, 岩本幸英 (その1)。CRYBP 1 と NT 2/FPM 315。整形外科 2003, 54(1), 68.
12. 田仲和宏、岩本幸英。CRYBP1 と NT2/FPM315 (その2), 整形外科, 2003, 54(2): 202.
13. S. Matsuda, H. Miura, R. Nagamine, T. Mawatari, M. Tokunaga, R. Nabeyama, Y.

Iwamoto, Anatomical Analysis of the Femoral Condyle in Normal and Osteoarthritic Knees. J Orthop Res 2004, 22:104-109.

2. 学会発表

- 1) K. Nakayama, S. Matsuda, K. Tanaka, H. Mizuchi, Y. Iwamoto, IN VIVO STUDY OF SCAFFOLD FREE MESENCHYMAL STEM CELL PLUG FOR CARTILAGE REPAIR, The 5th bi-annual meeting of International Cartilage Repair Society (May 26-29, 2004, Gent, Belgium)
- 2) K. Nakayama, S. Matsuda, K. Tanaka, Y. Iwamoto, SCAFFOLD FREE MESENCHYMAL STEM CELL PLUG FOR AUTOLOGOUS REPAIR OF OSTEO-CHONDRAL DEFECT IN RABBIT, 5th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of Canada, U.S.A., Japan and Europe (October 10 - 13, 2004, Alberta, Canada)
- 3) 中山功一、松田秀一、田仲和宏、岩本幸英, 細胞単独からなる骨軟骨様プラグの作成, 第17回日本軟骨代謝学会 (2004, 3, 12-13 東京)
- 4) 中山功一、松田秀一、田仲和宏、水内秀城、岩本幸英, 細胞単独からなる間葉系幹細胞プラグを用いた軟骨再生, 第36回日本結合織学会 (2004, 6, 3-4, 福岡)
- 5) 中山功一、松田秀一、田仲和宏、岩本幸英, 細胞単独からなる自家骨髄間葉系幹細胞プラグを用いた軟骨の再生, 第23回日本運動器移植・再生医学研究会 (2004, 9, 18, 岡山)

G. 知的財産の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

膵癌切除後の局所再発を防止するための新しい治療戦略： 組織工学的手法による局所薬剤持続投与システムの開発

分担研究者 田中 雅夫（九州大学大学院医学研究院臨床腫瘍外科教授）

研究要旨：外科切除を受けた膵癌患者の主な死因は局所再発と肝転移である。我々は、膵癌切除後の局所再発を防止することを目的として、組織工学的手法によって膵癌切除部位に薬剤を運搬するための幾つかのデバイスを開発した。この全てのデバイスは手術時に、腫瘍切除部位に使用して薬剤を散布するものであり、主に4つのシステムから成り立っている。

- (1) 生物活性物質リザーバー：薬剤、蛋白質、遺伝子改変ウィルスなどを持続放出可能な組織固着性の薬剤含有光硬化性ゼラチン
- (2) サイトカインバリアー：外科切除部位の組織にサイトカインが浸透することを阻止する抗サイトカイン抗体を固着させた組織固着性の光硬化性ゼラチン
- (3) 遺伝子導入細胞シート：非常に高価な治療用蛋白質を持続的に放出するように遺伝子導入した細胞シート
- (4) 経皮的持続薬剤注入用デバイス：薬剤を持続投与可能で、不要時に術創から容易に抜去可能な経皮的薬剤投与デバイス

これらの4つのシステムによって、膵癌の局所再発を防止することが可能になると期待される。

A. 研究目的

外科的切除は局所にとどまり遠隔転移のない膵癌に対する第1選択でありもっとも効果的な治療法である。門脈合併切除のような拡大切除が積極的に実施されてきたが、外科切除後の膵癌患者の生存率はいまだ非常に低い（8 - 25%）。理由の一つとして膵癌細胞は非常に早期から膵外の神経節やリンパ管へ浸潤転移しており、たとえ完全切除したとしてもしばしば膵臓床（後腹膜腔）への遺残が認められ、高い頻度で早期の局所再発が認められるためである。局所再発を減らす目的で、補助療法として術中放射線照射が施行されているが、その効果はいまだ議論の途中である。一旦局所再発すると、再発腫瘍は体内の深部

に存在し、生物学的にも化学療法や放射線療法に対し抵抗性があるため、その治療は極めて困難である。局所再発を防ぐ上でもっとも効果的な治療開始タイミングは、遺残癌細胞が腫瘍塊へと成長する前、すなわち切除術が終了した正にその時である。

術後遺残癌細胞の周辺環境を考えると、術創からは炎症性もしくは組織再生のためにさまざまなサイトカインが産生され、その発現量が上昇しているが、これは癌細胞にとっては非常に好ましい環境となっている。すなわち外科的侵襲によって腫瘍切除後の組織から産生され、局所や腹腔内に放出されるサイトカイン、たとえばhepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF),

basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF)などは癌細胞の増殖、遊走、浸潤、さらに腫瘍への血管新生を促進し、その結果として局所再発や転移を引き起こす。このことはよく知られた腫瘍の再発シナリオである。

癌細胞の進展を押さえるために大きく2つの治療戦略がある。一つはサイトカインに対するアンタゴニストもしくは抗サイトカイン抗体を使用した細胞増殖抑制療法、もう一つは抗悪性腫瘍薬や放射線を使用した細胞破壊療法である。細胞増殖抑制療法のゴールは癌細胞の増殖、遊走、浸潤、さらに腫瘍の血管新生を抑制し、これにより休眠状態を作り出すことである。一方で細胞破壊療法のねらいは腫瘍塊の目に見える縮小である。どちらの療法で使用される薬であれ、ほとんどの薬剤は経口か静脈注射の違いはあるが全身投与されている。しかしながら完全治癒はほとんど見られず、いくつもの有害事象が報告されている。

有害な副作用を起こさないように最小の全身投与をする一方で、その本来の薬理作用を増強させるという目的で、我々はいくつかの経組織的局所投与システムを考案し作成した。それらはすべて術中に使用するために、切除部にしっかりと張り付くか固定されるように作成し、術後直ちに切除面に使用可能である。組織を通しての局所投与システム群は標的組織での薬剤濃度の上昇と、全身臓器での相対的な薬剤濃度の低下という観点において明確な優位性を持っており、それゆえ薬剤の治療効果を増強し全身的な副作用は軽減させることが出来る。

本研究では HGF antagonist である NK4 は細胞増殖抑制薬剤として使用した。HGF は癌間質相互作用において重要な役割を演じてお

り、しばしば腫瘍細胞で過剰発現している HGF レセプターの c-Met と結合することで強力なスキャタリングファクターとして働く。NK4 は、HGF の α -ドメインに存在する N-ターミナル及び4つのクリングルからなり、c-Met と結合はするがリン酸化は引き起こさない。それゆえ HGF の作用である分裂、遊走、形態変化などを阻害する。さらに NK4 は VEGF や bFGF, HGF が引き起こす血管内皮細胞の成長や遊走を阻害することにより血管新生阻害因子としても働く。一方で細胞殺傷性薬剤としてゲムシタピン(GEM)を使用した。GEM は ribonucleotide reductase を阻害し、DNA 間の協調を崩すことにより DNA 合成を阻害するが、腫瘍に対してはもっとも効果的な薬剤である。いくつかの治験において GEM は暴露時間に比例して殺細胞効果を増加させることが報告されている。

この報告書は、本研究期間における腫瘍の局所再発を防止するための我々の治療戦略について総括するものである。

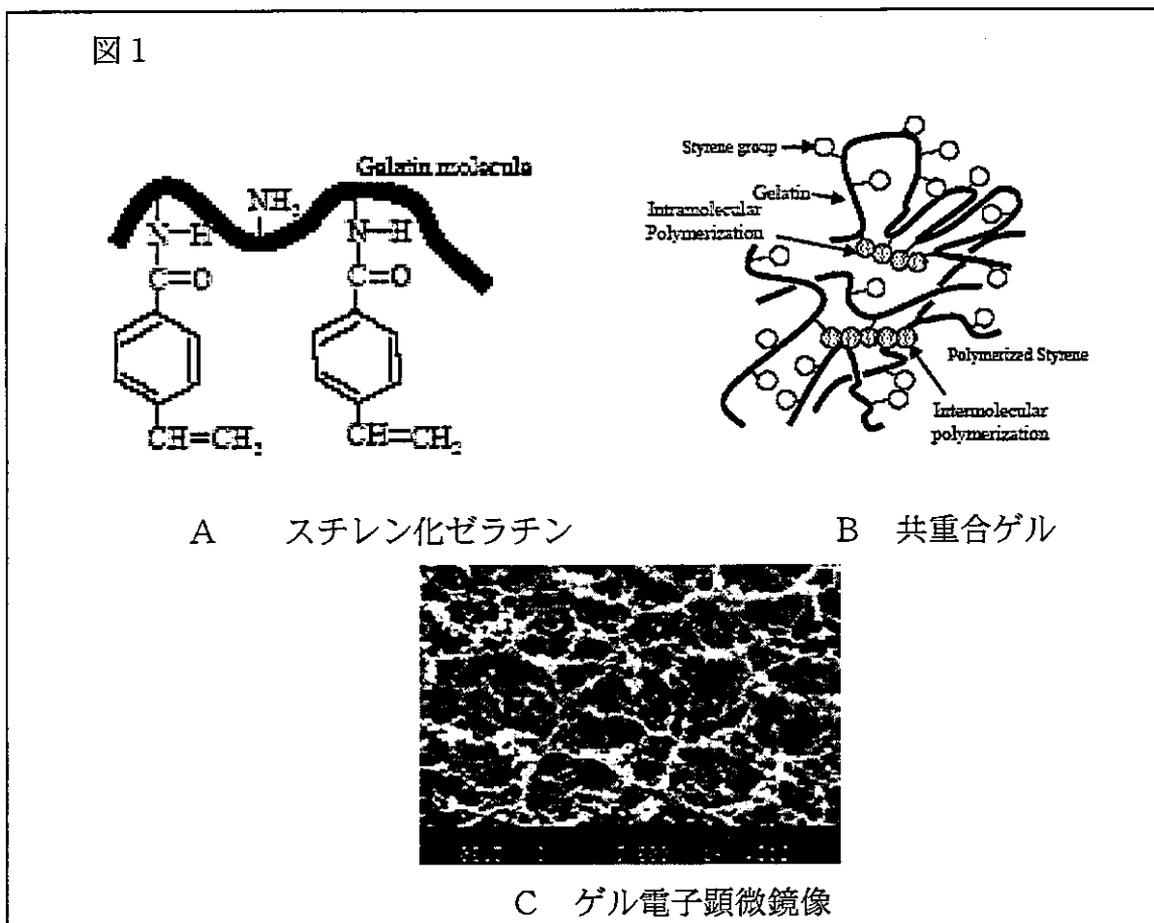
B. 研究方法と成果

薬剤含有光硬化性ゼラチンゲル

このシステムは切除部に張り付けることが出来るように、局所で形成可能なゼラチン状の物質であり、含包した薬剤や蛋白質、遺伝子改変ウイルスなどを標的組織に徐放可能な生物活性物質として開発した。この特殊な用途に答えるためにそのシステムは以下のような特徴を備える必要がある。(1) 可視光線照射による迅速な液状からゲルへの転換 (2) 強固な組織への固着 (3) 容易な組織への薬剤移行 (4) 生体分解及び生体吸収 (5) 炎症反応が極めて軽微であること。この条件を達成するために、部分的にスチレングループから誘導されている光学高分子化合ゼラチン (ST-gelatin 図 1 A) に薬剤を

含有して局所でゲル化できる物質(図1 B)として使用した。ST-gelatin は我々が独自に動脈からの出血を予防する目的で可視光線凝

固組織固着ゲルとして作製したものであり、本質的に高い組織接着性を持ちほとんど生体反応を起こさず毒性はみられない。

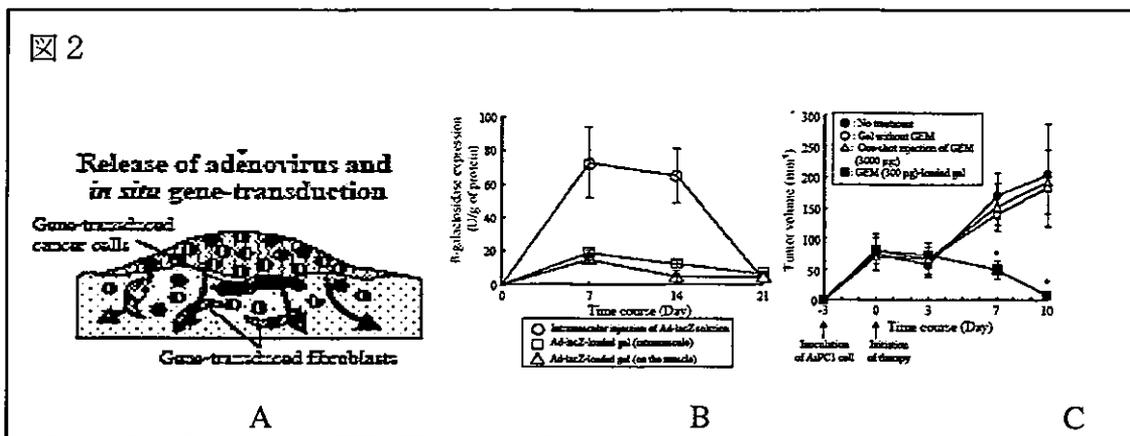


ST-gelatin に、可溶性のカルボキシル化カンファキノンと薬剤を混入し、これを腫瘍切除部位に塗布した後に可視光を照射すると3分でゲルができる。可視光を照射して作製したスチレン化ゼラチンの顕微鏡像を図1 C に示している。カンファキノンは長年にわたり歯科領域で臨床応用されている安全な物質であり、可視光も同様に使用されている。ST-gelatin とカンファキノンの濃度を調整し、あるいは可視光の強さや照射時間を変えることによって、ゲルの粘稠度や薬剤の徐放時間、組織接着力、生体分解時間などを容易に制御することが可能である。

このゲルを用いて NK4 蛋白を腫瘍切除後の腫瘍床に徐放できるシステムを作製した。徐

放量や徐放時間はスチレン化ゼラチンの濃度を変えることで自在に調節できる。NK4 の分子量 (64000g/mol) に相当するアルブミンをモデルとしてゲルの徐放作用を検討すると、アルブミンはゲル作製後早い時期に多くがゲルから分泌され、その後徐々に徐放量が減少してくる。このゲルをラットの肝表面におき可視光を照射すると、実験開始後3日目までモデル物質のアルブミンは肝から内部にまで浸透していることが判明した。しかし、現在のところ NK4 蛋白はコスト面から実際の臨床には使用できないために、アデノウイルスを用いた徐放システムを構築する必要が生じた。

図 2



アデノNK4を光硬化性ゼラチンとともに腫切除後の組織に使用するシステムについて、図2Aに模式的に示している。この場合、アデノNK4はゼラチンゲルから徐々に組織へ浸透して組織内の線維芽細胞などの細胞に感染する。感染した細胞は高濃度のNK4蛋白を周囲組織へ放出し、腫瘍細胞の浸潤・遊走を阻止するとともに、癌組織の血管新生を阻害して癌の発育を阻止することができ。しかし、in vivoにおいてAd-lacZを用いてβガラクトシダーゼの徐放効果を検討してみると、ゲルを筋肉組織内あるいは組織上に用いた場合には、直接Ad-lacZを注入した場合のような放出が起こらないことが判明した(図2B)。これはアデノウイルスベクターがゲルから組織内に浸透するためには大きすぎるためであると思われた。そこで、ウイルスベクターよりも小さな物質であり、腫瘍に特異的に強い制癌作用をもつGEMをゲル内にいれ、徐放効果を検討した。GEMのモデル物質としてほぼ同じ分子量のrhodamineを用いた検討では、光硬化性ゼラチンからrhodamineが10日間にわたり徐放されることが判明し、また実際にin vivoの検討でも図2Cに示すようにゲルとGEMの併用によって強い抗腫瘍効果があることが示された。したがって、この方法は臨床的にも効果が期待されるシステムであるが、逆にoverdoseによる副作用や、薬

剤を局所に再注入できないことなどの幾つかの問題点もまだ残されている。

サイトカインバリアー

外科的に癌を切除すると腹腔内にHGFなどの多量のサイトカインが放出され、これが遺残癌細胞に到達して作用し、癌細胞の遊走・浸潤をもたらすと考えられる。この時、光硬化性ゼラチンゲルから抗サイトカイン抗体を徐放させると、遊離抗体によりサイトカインが中和され、静細胞状態cytostatic stateをもたらすことができる。サイトカインバリアーの概念は図3に示すように、抗体が遊離しないようにゲル内に固定し、その固定化抗体により標的組織へのサイトカインの浸透を抑制することにより癌細胞を静細胞状態とするものである。可視光にて抗体分子を共重合させるために抗体へのスチレン基の導入が必要であるが、これは4ピニル安息香酸とWSCの縮合剤を用いて行うことができる。スチレン化抗体とスチレン化ゼラチンの混合液を光開裂剤であるカンファキノン存在下で可視光照射させると、スチレン基同士が重合し共重合ゲルが形成される。ローダミンアルブミンを抗原として用い抗原がゲル内へどのように浸透していくかを調べると、抗体包埋ゲルではゲル表面から深部への経時的な浸透は同等であるが、共重合ゲルではそれらに比べ特に早期で浸透が抑制される傾向があった。抗HGF