

してポリウレタン基材の表面にあらかじめコーティングしておき、その上にさらに固定化させたい目的とする高分子、例えば、ポリ(*N*-ビニルピロリドン)をコーティングし、紫外光照射することで目的高分子を固定化させている⁶⁾。この方法は接着層が基材と目的高分子の両者に光架橋反応できるため、固定させる高分子種に特に制約はなく汎用性の高い界面設計法といえる。

一方、固定化を目的とする高分子の中にあらかじめフェニルアジドを導入しておくこと、耐久性にすぐれ、かつ微細加工性を有する界面設計が可能となる。このためにアジドスチレンと各種ビニルモノマーとのラジカル共重合反応によって、親水性や疎水性など物性の異なる種々の光反応性高分子が分子設計されている⁷⁾。この光反応性高分子中のアジドスチレンの共重合比を高くすると一般に光反応効率が高くなるが、高分子の物性を保持させるため、アジドスチレン部の共重合比は約10mol%以下に調整されている。また、親水性高分子を合成する別の方法としてポリエチレングリコール(PEG)を主鎖に用いて末端にフェニルアジド基を導入することも行われている。これら光反応性の親水性高分子を基材表面にコーティングした後に紫外光を照射すると、照射領域のみが親水性化される。また、疎水性の光反応性高分子を用いると逆に照射領域のみが疎水性化される。このように、光反応性高分子を分子設計することで任意の物性を基材表面に容易に付与することが可能であり、またフォトマスクなどで照射領域を規制することによって親水-疎水パターン化回路などが自由に設計されている。この回路は細胞の2次元パターン組織体を作製する基材として利用されており、さらに、神経細胞のパターン化によって神経回路網の作製などへの応用も検討されている⁸⁾。また、フェニルアジドと同様に光照射によってラジカル発生能を有するベンゾフェノンやジチオカルバメートなどの光反応性化合物も同様な光固定化に利用されている。

5 ハイドロゲルの表面固定化による界面設計

ハイドロゲルは高い含水率を有するため、その表面ではタンパク質の吸着や細胞の接着がおこりにくい。従って、短期使用目的のデバイスの表面を生体適合化するのに適しているといえる。医療目的でハイドロゲルを光反応で作成する代表的な方法として、エオシンやアセトフェノンなどの光ラジカル重合開始剤が用いられ、主にPEGをベースとするジアクリレート体の3次元架橋が行われている。このシステムを用いてHubbellらは、創傷治癒促進剤への応用を検討している。そこでは、血管内腔の損傷部位で光ゲル形成させ、皮膜化することで、バルーンカテーテルやステントを用いた経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の血栓形成と内膜肥厚の抑制への有効性を示している⁹⁾。

一方、光ラジカル発生基を側鎖に有する光反応性高分子を利用すると、ハイドロゲルの形成と同時にバイオマテリアル表面上に固定化させることが可能である。例えば、ポリ(*N,N*-ジメ

チルアクリルアミド) などの水溶性高分子と光ラジカル発生基との複合体を基材表面にサブmm以下の厚さでコーティングしておく、光照射によって光反応性基に発生したラジカルの再結合が分子間で起こり、ハイドロゲルが形成されると同時に、基材との界面においては、連鎖移動によって基材表面に発生したラジカルと水溶性高分子側鎖のラジカルとの再結合が起こり、生成したハイドロゲルが基材表面に固定化される¹⁰⁾。ここで、コーティング層内にあらかじめ薬物を混合させておくと、生成したゲルの内部に薬物を包埋させることができる。

また、ハイドロゲルを生体内吸収性とするために、コラーゲンの熱変性体であるゼラチンを主鎖に用いてその側鎖にベンゾフェノン基を導入した光反応性ゼラチンが合成されている¹¹⁾。この光反応性ゼラチンは小口径人工血管やステントグラフトの界面機能化材料として利用されている。両デバイスとも内腔の血液接触界面では抗血栓性が要求される。そのために、光反応性ゼラチンをコーティングする際にヘパリンやウロキナーゼなどを混合させておき、光形成されるゼラチンハイドロゲル内にそれらを包埋させている¹²⁾。一方、外側面には使用目的部位の要求に応じた機能を発揮する薬物が包埋されている。例えば、人工血管では、内腔面の内皮化を促進させることを目的として血管内皮増殖因子 (VEGF) の包埋が行われている¹³⁾。また、ステントグラフトを用いた狭窄病変の血管形成術においては、平滑筋細胞の増殖抑制を目的として免疫抑制剤として知られているFK506や細胞外マトリックス分解酵素阻害剤 (MMPI) などを、プラークの安定化・縮退化のためにはスタチンの包埋が検討されている¹⁴⁾。さらに、動脈瘤を閉鎖治療する場合には、瘤内での組織形成の促進を目的としてb-FGFなどの細胞成長因子が包埋されている。可視光に吸収帯域を有するキサンテン系色素を光ラジカル発生基として導入すると、可視光照射によってハイドロゲルを固定化させることも可能である。

高分子どうしのラジカル再結合反応によってハイドロゲルを作製する方法は、高分子上に発生したラジカルどうしが出会う必要があり、また、不均化反応などによってラジカルが消失する可能性も有るため、必ずしも効率の良いゲル化方法とはいえない。そこで、光照射によって発生したラジカルを開始点としてラジカル重合によってゲルを固定化させる方法が考案された。そのための要素材料として、ゼラチンの側鎖にラジカル重合性基であるスチレン基を多数導入したスチレン化ゼラチン (ゼラチンマクロマー) が分子設計された¹⁵⁾。また、重合開始剤には歯科領域における光重合レジンの開始剤として実用化されているカンファキノンが選択された。これらの混合水溶液に歯科用のハロゲンランプからの青色光を照射すると、1分間ほどでゲルを生成した。可視光は紫外光に比べて物質透過性が極端に高いため、cmオーダーの立体光造形も可能であった。照射波長を400~500nmに制限して、さらに光量を低下させれば可視光に伴う熱の影響はほぼ無視できる。従って、紫外光硬化に比べて包埋物に与える障害性を大幅に低減させることができる。その結果、薬物以外にも、タンパク質やアデノウイルス、細胞

などをハイドロゲル内にほぼ非侵襲で包埋させることが可能となっている。薬物を包埋させた場合、用いる光反応性高分子内の光反応性基の導入量や照射時間を変化させると、ハイドロゲル内の架橋量が調節できるので、ハイドロゲルからの薬物の放出挙動を制御することができる。

この方法を利用して、血管壁内への遺伝子導入デバイスへの応用が試みられている。すなわち、このスチレン化ゼラチンにLacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを混合させて、ステントのストラット表面に光コーティングされた¹⁶⁾。これを兔の頸動脈に留置すると、1ヵ月間にわたってLacZ遺伝子の発現が認められた。これはゲル内に包埋されたアデノウイルスがゲルの分解に伴って徐々に放出され、長期間にわたる持続的な遺伝子発現が起こったためと考えられる。また、このゼラチンマクロマーは細胞を包埋させることができるので、組織再生医療の分野において、*in situ* 硬化性の軟骨再生用のスキャホールド材、さらに組織接着剤への応用が検討されている。

6 光表面リビンググラフト重合による界面の3次元設計

高分子基材に高強度の紫外線を照射すると、 γ 線やグロー放電、コロナ放電処理した場合と同様に基材表面にパーオキサイドなどの高反応性基が生成する。従来この生成した高反応性種をラジカル重合開始種として表面グラフト重合が行われ、表面改質法として利用されてきた。しかし、この場合、複雑な形状を有するデバイスの内面を均質に、あるいは限定した特定部位のみを修飾することは困難である。また、高強度の紫外光照射などは基材内部の損傷や物性変化を伴う場合もある。さらに、一般にラジカルは多くのビニルモノマーの高分子化に有効な重合法であるが、フリーラジカルを連鎖てい伝体とする連鎖反応機構で進行するため、通常高分子表面への精密構造設計は極めて困難である。

ジチオカルバメートは、1980年代初めに大津らによって開発された光ラジカル重合開始剤の一種であり、これを用いるとスチレンやメタクリル酸メチルなどのビニルモノマーの光重合が見かけ上リビングラジカル重合機構で進行し、照射条件によってラジカル生長が制御できることが報告されている¹⁷⁾。このジチオカルバメートは重合開始剤 (*initiator*)、連鎖移動剤 (*transfer agent*)、停止剤 (*terminator*) として機能することから、イニファタ (*iniferter*) と名付けられている。イニファタの一種であるベンジルジチオカルバメートに紫外光を照射すると、ベンジル炭素と硫黄間の結合が可逆的に解離され、ベンジルラジカル ($\text{Ph-CH}_2\cdot$) とジチオカルバミルラジカル ($\cdot\text{SCSNEt}_2$) が生成する。ここで、ベンジルラジカルのみがビニルモノマーの重合開始剤として機能し、重合末端では常にジチオカルバミルラジカルによるキャッピングが起こる。従って、光照射時にのみモノマーを重合させることができ、照射条件 (強度, 時間) や溶液条件 (モノマー濃度, モノマー/開始剤比) を選択すれば多くのモノマーに対してリビング

的にラジカル重合を進行させることができる。つまり、重合鎖長は照射時間によって、鎖の成分はモノマーの組成によって、また重合領域は照射領域によって規制することが可能であり、バイオマテリアル界面の3次元での精密設計に応用されている。

基材としてジチオカルバメート基を側鎖に有するポリスチレンのコーティング膜を用いて、モノマー溶液中で紫外光照射を行うと、基材表面に導入されたジチオカルバミル基から重合が起こる。水晶発振子 (QCM) 上で行うと、グラフト重合は光の照射時のみに限定して起こり、重合量はモノマー濃度と照射強度の増大に伴って増大し、さらに、重合速度はモノマーのQ値が約0.8で極大値をとることが報告されている¹⁹⁾。従って、モノマー種に応じて重合挙動のある程度推定することができる。

照射領域はフォトマスクなどでサブミクロンレベルの精度で容易に規制することができるため、任意の微細領域のみで光重合を起こさせることができる。これを利用してWardらは、光リソグラフ技術を組み合わせることで、5~80ミクロン幅の構造物を作製している¹⁹⁾。また、照射領域を段階的に横にずらせながらモノマー種を変化させて照射を繰り返すと、領域ごとに連続的に物性の異なる高分子鎖をグラフトすることが可能であり、異種高分子鎖のグラフトパターン表面が作製された²⁰⁾。デバイスの生体適合性は最表面層の性状と形状に依存することが知られており、目的に応じた生体適合性を獲得するためには適切な性状を有する高分子種を選択する必要がある。マイクロパターン化表面では微細領域ごとに化学組成を任意に変化させることが可能である。従って、タンパク質や細胞との相互作用の表面化学依存性を一度に同じ条件下で評価することができる。このパターン化表面を利用してAndersonらは、細胞応答性に関して表面化学依存性を調べており、マクロファージのアポトーシスは非イオン性、またはアニオン性の親水性表面において増加することなどが明らかにされ、医療デバイスの表面化学の最適化設計が検討されている²¹⁾。また、照射量を調節することでグラフト重合のZ軸、つまり高さ方向の制御が可能である。例えば、一定時間毎に照射領域を段階的に、あるいは連続的に拡大させることで、それぞれ数十ナノメートルの段差を有する階段状の構造物や、高低差が数百ナノメートルのスロープ状の3次元構造物が作製されている。その他、グラフト鎖の密度や表面ブロック化 (積層化) も実現されている²²⁾。

一方、イニファタのマルチ化とグラフト鎖長の制御能を組み合わせることによってグラフト鎖の分岐度と鎖長を自由に設計することが可能となり、多分岐型グラフト鎖が作製されている²³⁾。すなわち、基材表面に導入したジチオカルバミル基から光重合させる際にコモノマーとしてクロロメチルスチレンを共重合させておく。幹として形成されたグラフト鎖の側鎖に導入されたクロライド基は容易にジチオカルバミル基に置換できる。この後、先と同様に光共重合とジチオカルバミル化を繰り返すことで、枝さらに小枝となる分岐グラフト鎖が逐次的に形

成される。この方法を用いてデバイス表面を加工すれば、グラフト鎖の空間密度を自在に設計できることから、血液や体液中の蛋白質等の吸着を大幅に抑制し、細胞非接着性を長期間維持させることができると期待される。

また、この光ブロックイニフアタ重合を溶液系で進めることによって、表面吸着剤の分子設計が行われている。PEGの末端からスチレンを重合すれば組成比が厳密に調整された親水-疎水ブロック共重合体が得られる²⁴⁾。これをバイオマテリアル表面に吸着させると、親水性のブラシ表面が容易に得られ、タンパク質の吸着や細胞の接着は大幅に抑制された。また、イニフアタに細胞膜の構成成分であるフォスファチジルコリン(PC)基を長鎖アルキルを介して導入し、次いで親水性-疎水性モノマーの順でグラフト重合すれば、PC基を末端に有する親水-疎水ブロック共重合体が得られた²⁵⁾。これを吸着させると、長鎖アルキル鎖の自己組織化にともなってPC基の配列による疑似細胞膜表面が得られた。また、ヘパリンやゼラチンに感温性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)をグラフトすることで、それぞれに感温性が付与されている。両者ともに水溶液からの温度変化によってマテリアル表面に吸着させることができ、前者の場合は抗血栓性表面、後者の場合は細胞接着性表面として機能している²⁶⁾。一方、可視光を用いて、複雑な形状をした医療デバイスの内面(血液接触面)を修飾する方法が開発されている。すなわち、先に示したカンファキノンを内面に含浸させておくと、デバイスの外面からの可視光照射によって内面でグラフト重合させることを可能としている²⁷⁾。

7 レーザーアブレーションを利用した界面設計

エキシマレーザーは紫外域に発振波長を有する紫外光レーザーであり、組み合わせるガス種(主に希ガスとハロゲン)の種類によって発振波長を紫外域で段階的に調節することができる。代表的なKrFレーザーの場合、発振波長は248nmであり、114kcal/molの光子エネルギーを有する。この値は炭素単結合(約80 kcal/mol)や炭素-水素結合(約98 kcal/mol)より高く、被照射物がレーザー発振波長域に吸収帯を有すればこれらの分子間結合を一光子吸収により切断することが可能である。また、ArFレーザーは193 nmで発振し、148 kcal/molの光子エネルギーを有する。これは炭素二重結合の結合エネルギー(約145 kcal/mol)に相当する。従って、エキシマレーザーによる加工は光化学反応により主として非熱過程により進行できる。また、レーザー光のパルス幅は10~20ns程度であるが、ピーク出力は数十メガワットと極めて高い。

このエキシマレーザーをある一定のしきい値(通常100mJ程度)以上の高出力で高分子マテリアルの表面に照射すると、アブレーションと呼ばれる吸収熱による蒸発や多光子吸収によるプラズマ発光と衝撃音を伴った固体表面層の爆発的な剥離が起こる。アブレーションによる加工の一般的な特徴として、①高精度の寸法安定性を有すること、ならびに②加工部およびその

周囲に熱的な影響をほとんど与えず、加工跡に焼け焦げや溶融跡を残さないこと、などがあげられる。近年、このアブレーションは医療分野において眼科、胸部血管外科、歯科、整形外科など様々な領域で生体組織の形成・加工法として応用が検討されている。特に眼科領域では、すでに近視や乱視の矯正を目的とした角膜切開や角膜移植に応用されている。著者らは、人工血管やカバーステントの基材として用いているセグメント化ポリウレタン製薄膜の多孔質化設計の手段として利用している¹³⁻¹⁶⁾。また、CVD (Chemical Vapor Deposition) の技術を応用してアブレーションによって飛散した高分子片をマテリアル表面で補足することによって高分子の転写を行っている。転写はレーザーの照射領域に限定されるため、レーザー光を絞ることによってミクロンレベルでの微細加工性が得られている²⁸⁾。

一方、エキシマレーザー光をアブレーションが起こるしきい値以下の低エネルギーで照射すると高分子表面の改質を行うことが可能である。側鎖に水酸基やアミノ基などの官能基を有する高分子に照射すると吸光係数の低い主鎖の結合は開裂されず、側鎖に局在化した光吸収が起こり官能基のみを選択的に除去できる²⁹⁾。また、除去時には高分子表面にラジカルなどの反応性種が生成するので、これを利用すると種々のガス性低分子を高分子表面に導入、または表面重合させることが可能である。一方、逆にガス性低分子をレーザー光分解させ高分子表面に導入させることも可能である。矢部らは、レーザー照射で生じるヒドラジンの活性種を利用してテフロン表面へのアミノ基の導入を行っており、親水性と接着性を向上させている³⁰⁾。

8 おわりに

ここで記したように、光反応を利用したバイオマテリアルの界面創製は、主に治療デバイスの表面設計のための方法として開発されてきた。そこでは、光有機合成化学の分野において開発されてきた様々な光反応性化合物が目的に応じて選択され、マイクロレベルでの位置的な選択性に加えて、ナノレベルでの量的な制御を伴って、任意の生理活性物質や有機化合物、高分子を固定化する(グラフト化、レーザー転写など)、成長させる(グラフト重合など)、あるいは削除する(レーザーアブレーションなど)ことなどが可能となっている。現在の医療においては、従来の開頭や開腹を伴う標準的外科手術から、内視鏡下手術やX線透視下で行う血管内手術を含む経皮的手術へと、低侵襲治療が先端医療の1つとして開発され、患者のQuality of Life (QOL) をより高く保つ治療技術が提供されている。血管内治療においては、皮膚に開けた針穴ほどの切開創を通して、ほぼ全身の血管病変(狭窄、瘤、奇形)を対象として扱うことが可能となりつつある。そのために、口径がわずか数mm以下の細い血管の中を自由に操作することのできるマイクロカテーテルなどの血管内治療デバイスが開発されている。今後、血管内治療のさらなる推進のためには、治療デバイスのより小型化・高集積化・多機能化が要求さ

れている。また、ナノテクノロジーに基づく超微細精密構造化の波は、医療分野においてはナノメディシンとして展開され、医用マイクロマシンの開発などの大きな推進力となっている。光反応を用いた超精密創製技術は、バイオマテリアルの生体との接触界面の構造や物性をマイクロ・ナノレベルで厳密に制御できる可能性があるため、上記のマイクロ構造化された治療デバイスの実現化に大きく貢献するものと期待される。

文 献

- 1) Sugawara T *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 29, 1047-1052 (1995).
- 2) Chung TW *et al.*, *Biomaterials*, 23, 4803-4809 (2002).
- 3) Ito Y *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3598-3601 (1996).
- 4) van der Heiden AP *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 37, 282-290 (1997).
- 5) Hengsakul M *et al.*, *Bioconjug Chem*, 7, 249-254 (1996).
- 6) Wetzels GM *et al.*, *Biomaterials*, 20, 1879-1887 (1999).
- 7) Sugawara T *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 29, 749-756 (1995).
- 8) Matsuda T *et al.*, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 38, M243-M247 (1992).
- 9) Hubbell JA *et al.*, *Polym Prepr*, 34, 846-847 (1993).
- 10) Nakayama Y *et al.*, *ASAIO J*, 39, M754-M757 (1993).
- 11) Nakayama Y *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 48, 511-521 (1999).
- 12) Doi K *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 31, 27-33 (1996).
- 13) Masuda S *et al.*, *ASAIO J*, 43, M530-M534 (1997).
- 14) Nakayama Y *et al.*, *Cardiovasc Rad Med*, 4, 77-82 (2003).
- 15) 中山泰秀他, *人工臓器*, 4, S-84 (2000).
- 16) Nakayama Y *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 57, 559-566 (2001).
- 17) Otsu T *et al.*, *Makromol Chem Rapid Commun*, 3, 127 (1982).
- 18) Nakayama Y *et al.*, *Macromolecules*, 32, 5405-5410 (1999).
- 19) Ward JH *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 56, 351-360 (2001).
- 20) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 15, 2080-2088 (1999).
- 21) Brodbeck WG *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3598-3601 (1996).
- 22) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 15, 5560-5566 (1999).
- 23) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 18, 2601-2606 (2002).
- 24) Nakayama Y *et al.*, *Biomaterials*, 20, 963-970 (1999).
- 25) Matsuda T *et al.*, *Biomaterials*, 24, 4517-4527 (2003).
- 26) Ohya S *et al.*, *Biomacromolecules*, 2, 856-863, (2001). Morikawa N *et al.*, *J Biomater Sci Polym Ed*, 13, 167-183 (2002).
- 27) Nakayama Y *et al.*, *Trans MRS Jpn*, 25, 923-926 (2000).
- 28) Nakayama Y *et al.*, *J Appl Phy*, 80, 505-508 (1996).
- 29) 中山泰秀他, *人工臓器*, 24, 74-78 (1995).
- 30) Niino *et al.*, *Appl Phys Lett*, 63, 3527 (1993).

Reprint from

H. Mori, H. Matsuda (Eds.)
**Cardiovascular Regeneration Therapies
Using Tissue Engineering Approaches**

© Springer-Verlag Tokyo 2005
Printed in Japan. Not for Sale.

 Springer

Biotube Technology for a Novel Tissue-Engineered Blood Vessels

Hatsue Ishibashi-Ueda¹ and Yasuhide Nakayama²

¹Department of Pathology, National Cardiovascular Center Hospital, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

²Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Summary. Autologous tubular tissues as small caliber vascular prostheses were created in vivo using tissue engineering. We named them "Biotubes". The six kinds of polymeric rods made of polyethylene (PE), poly-fluoroacetate (PFA), poly-methyl methacrylate (PMMA), segmented polyurethane (PU), polyvinyl chloride (PVC) and silicone (Si) as a mold were embedded in the dorsal skin of six of New Zealand White rabbits. Biotubes were formed after 1 month by fibrous tissue encapsulation around the polymeric implant except PFA. None of the Biotubes were ruptured when a hydrostatic pressure was applied up to 200 mmHg. The wall thickness of the Biotubes ranged from 50 to 200 μm depending on the implant materials in the order PFA<PVC<PMMA <PU<PE. The tissue mostly consisted of fibroblasts and collagen-rich extracellular matrices. The tissue created by Si rod was relatively firm and inelastic and the one created by PMMA was relatively soft. For PMMA, PE and PVC the stiffness parameter (β value; one of the indexes for compliance) of the Biotubes was similar to those of the human coronary, femoral and carotid arteries, respectively. Biotubes, autologous tubular tissues, can be applied for use as small caliber vessels and are ideal prostheses because of avoidance of immunological rejection.

Keywords. Graft prosthesis, Tissue engineering, Autologous transplant, Small caliber vessel

Introduction

In vivo, the encapsulation of foreign materials by own fibrous tissue has been well documented as a biological reaction of self-defense system since the 1930's. Peirce et al. attempted to utilize capsular tissues as artificial vascular vessels (Knott I, et al. 1973, Peirce EC II, 1953). Sparks et al. examined the clinical application of grafts consisting of a combination of capsular tissues and Dacron tubes in the latter half of the 1960's (Hallin RW and Sweetman WR 1976, Sparks CH, 1972). Recently, Campbell et al. studied capsular tubular tissues obtained by implantation of silicone rods into animal peritoneal cavities (Campbell JH, et al. 1999). Tubular tissues possessed a wall with several layers of myofibroblasts and collagen-rich extracellular matrices covered with a single layer of peritoneal mesothelium. By inverting the tubular tissues, mesothelial cells became internal lining cells within tubes like endothelial cells. Autotransplantation of these tubes as grafts resulted in high patency for several months, suggesting the possible application of capsular tissue prosthesis for arteries.

The patency rate of small caliber artificial grafts is much worse than medium to large diameter artificial grafts because of thrombosis in the early stage and of neointimal hyperplasia in the chronic stage. Among the many factors determining the patency of small caliber artificial grafts, the compliance mismatch between the native artery and grafts has been discussed as a major detrimental factor of graft failure (Abott WH, et al. 1987, Kinley CE and Marble AE 1980, Pevic EC II, et al. 1992, Stewart SF and Lyman DJ 1992).

In this study, the mechanical properties of the tubular tissues were investigated for small caliber blood vessels. Various polymeric rods were implanted in subcutaneum of the dorsal skin of rabbits. Then, own tubular tissues by encapsulation were obtained and we called them "Biotubes". The mechanical properties including pressure resistance, pulse followability and compliance of the Biotubes were measured after histological analysis of their components. The designs of the matrix including luminal surface, mechanics and shape of the Biotubes were discussed.

Methods and Results

Preparation of Biotubes

Nine New Zealand White rabbits, weighing 2.0 to 2.5 kg, according to the Principles of Laboratory Animal Care (formulated by the National Society for Medical Research) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication, No. 56-23, revised 1985) were used as hosts. Six kinds of polymers with rod shape (length; 20 mm, diameter; 3 mm) were placed in the subcutaneous layer of dorsum of rabbits. The polymer materials were polyethylene (PE), poly-fluoroacetate (PFA), poly-methyl methacrylate (PMMA), segmented polyurethane (PU), polyvinyl chloride (PVC) and silicone (Si). The coating thickness was 50 μm . At 1 month after insertion, rods were found to be encapsulated by a membranous tissue in the subcutaneum of rabbits (Fig. 1a, 1b). After 3 months, all implants were still covered with membranous capsular tissues. We called these autologous capsular tissues "Biotubes".



Fig. 1. (a): "Biotube", which was formed by implantation of the PMMA for 1 month in rabbit dorsal skin. (b): A photomicrograph of a cross section of the PMMA tube obtained after 3-months implantation

Histological Examination

The explanted Biotubes were fixed in 10 % buffered formalin solution and embedded in paraffin. Tissue cross sections were stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation (Fig. 1b, 2). The wall thickness of the Biotubes was approximately 70 μm one month after implantation of Si, PVC, and PFA rods. In cases of PU or PMMA implants the wall showed 100-150 μm in thickness (Fig. 2). The capsules by the PE implant revealed the thickest wall (approximately 200 μm). For PMMA, PVC, and PE, the wall thickness increased by 1.5 to 2 fold after 3-month (Fig 3). The Biotube walls around the PFA showed sparse collagen with fibroblasts. Regarding the Si rod, the Biotube wall was thin but contained collagen fibers with sparse fibroblast. The walls around PMMA, PU and PVC rods were of a moderate thickness and contained relatively thick collagen fibers. The Biotubes that formed around the PU, PE and PVC bases showed numerous inflammatory cell infiltrations such as lymphocytes. Especially in the tubular tissues of PE and PU, foreign body giant cells were also observed. The capsular wall of PE rod showed 200 μm in thickness but almost no regular mesh structure of collagen fibers.

Immunohistochemistry was also performed to identify the muscular component of the Biotubes. Vimentin, a mesenchymal tissue marker, was positive for all tubular tissues around the various rods after 1- and 3-month implantation. α -smooth muscle actin was intensely positive for all tubular tissues after 3 months. Desmin as a cytoskeleton of matured muscle was negative in all tubular tissues after 1 and 3 months. A small number of macrophages (RAM 11), were observed in the tubular tissues of PU, PFA and PMMA after 3-month of implantation.

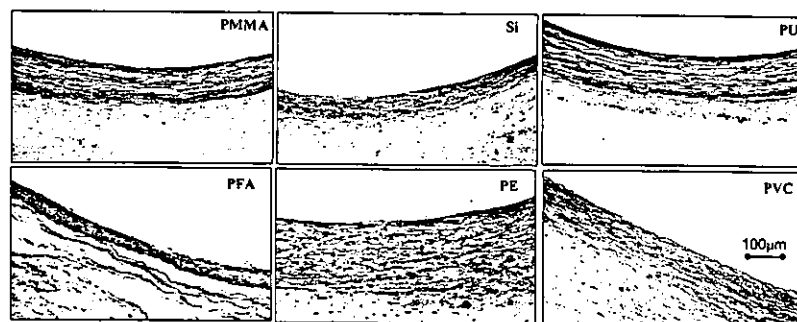


Fig. 2. Photomicrographs of cross sections of the Biotubes, They were formed by 3 months implantation of six kinds of polymer rods in the rabbit skin (hematoxylin and eosin stain)

Mechanical Properties of the Biotubes

The luminal pressure-diameter relationship was determined using an apparatus designed by Takamizawa and Hayashi (Takamizawa K and Hayashi K 1987). Changes in the outer diameter of the Biotubes were measured. None of the Biotubes ruptured even after 200 mmHg of inner pressure after 1 month of implantation. The Biotubes around Si rod became slightly dilated when exposed to water at low pressure but did not change significantly with high pressure (about 20 mmHg or higher). In contrast, the Biotube formed around the PMMA rod became dilated at low-pressure ranges and gradually increased with pressure up to a high range, indicating "J"-shaped curves. The dilatation rate of the outer diameter at a water pressure of 200 mmHg was about 5 % for Si and about 25 % for PMMA.

Repeated water pressure loadings, range of 0 to 200mmHg, were investigated in the PMMA Biotube rods. The external diameter of the PMMA Biotube was about 2.7 mm before loading and dilated to about 3 mm after loading at several 10 mmHg water pressure and thereafter continuously dilated slowly with an increase in inner load reaching about 3.2 mm at 200 mmHg. Changes in the outer diameter luminal pressure were basically the same with repeated pressure loadings in the lumen (Fig 3).

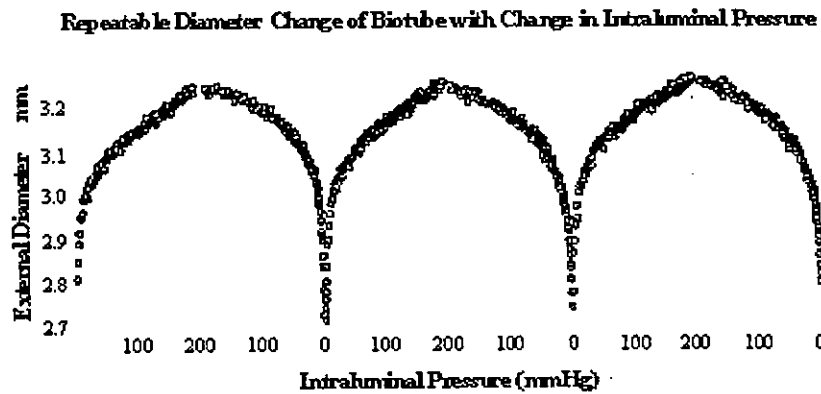


Fig. 3. External diameter changes in loading and removing of water pressure in range of 0 to 200 mmHg to the lumen of the Biotube around the PMMA rod after 3 months of implantation

The compliance of the tube was determined by the stiffness parameter (β) as defined by Hayashi et al., (Hayashi K, et al. 1980, Hayashi K and Nakamura T 1985) which is described according to the following equation:

$$\ln(P/P_s) = \beta(D/D_s - 1)$$

where P, P_s, D and D_s denote luminal pressure, standard pressure (100 mmHg in this study), external diameter and diameter at the pressure P_s, respectively. The relationship between logarithmic value of the relative pressure and relative outer diameter was obtained from the relationship between outer diameter and luminal pressure. After 1-month of implantation, the highest β value was obtained from the Si Biotube and the β value decreased in the order of PMMA, PE and PVC (Fig 4). The Biotube around the PMMA rod exhibited the β value resembling that of the human coronary artery whilst the β values of the Biotubes formed around PE and PVC bases were similar to those of the human femoral and common carotid arteries, respectively.

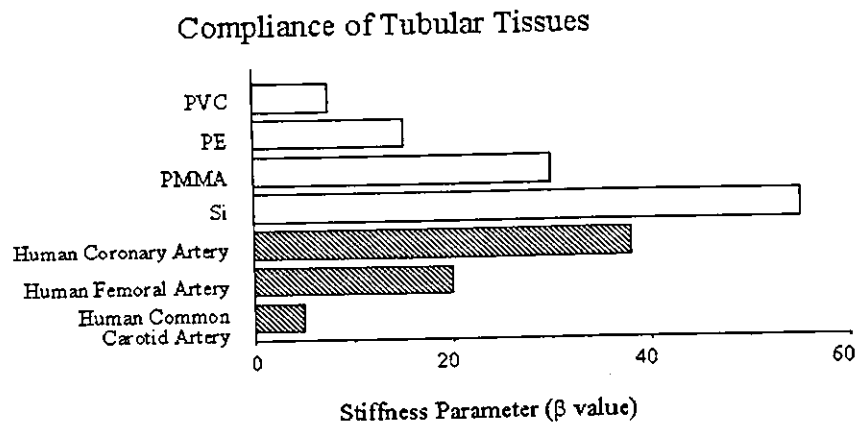


Fig. 4. The stiffness parameters (β values) of the Biotubes by 1 month of implantation. The Biotubes formed around the PMMA, PE, and PVC rods exhibited a β value close to those of the human coronary artery, the human femoral artery, and common carotid artery, respectively

Discussion

Considering immune responses among tissue or organ transplants, grafts are better if they consist simply of own self tissues. For example, autografts such as a great saphenous vein, an internal thoracic artery, and a radial artery are used for conventional aorto-coronary bypass operations.

However, it is sometimes difficult to obtain a sufficient amount of grafts or healthy grafts due to the patient's limited supply of vessels.

Larger caliber grafts vessels, with more than 5 mm in diameter, are usually composed of artificial materials such as Dacron fabrics or expanded poly-tetrafluoroethylene (ePTFE). Small caliber artificial grafts, however, may occlude within a short period after implantation by thrombosis. Therefore, the development of hybrid type artificial blood vessels combining artificial and biological materials is expected. The layered hybrid vessels resembling biological vascular walls have been developed *in vitro*. (Ishibashi K and Matsuda T 1994, Matsuda T and Miwa H 1995, Miwa H and Matsuda T 1994). The invented hybrid vessels with 4 mm in diameter showed high patency after 1-year of autotransplantation in a canine carotid artery. Other hybrid grafts prepared by seeding and culturing cells from the own great saphenous vein in a polylactic acid tubular sponge, have successfully been used in reconstruction of the pulmonary artery in humans (Hibino N, et al. 2003, Shin'oka T, et al. 2001, Shin'oka T, et al. 1998). Recently, it has been proposed that the preparation of various hybrid artificial vessels could be achieved by *in vitro* tissue engineering techniques using stem cells, including endothelial progenitor cells (Asahara T and Isner JM 2002, Isner JM, et al. 2001) and ES cells (Nishikawa S 1997, Yamashita et al. 2000), as a cell source (Kaushal S, et al. 2001, Shirota T, et al. 2003).

For patency of artificial blood vessels, particularly those with a small caliber (5 mm or less in diameter), the following factors are required. 1) Resistance to blood pressure, 2) antithrombotic properties to avoid thrombotic occlusion in the early stage of implantation, and 3) mechanical compatibility including compliance matching and pulse follow-ability to avoid occlusion in the chronic stage. We aimed to develop small caliber artificial blood vessels for a clinical application that have high patency in combination of the tubular tissue preparation technique and *in vivo* tissue engineering (Nakayama Y, et al. 2004). Biotubes consist of own self cells and extracellular matrices, which is similar to autotransplantation. Therefore, immunological rejections to the tubular tissue may be avoided. Moreover, the tissue may grow after transplantation in the body. In this study, various polymeric rods as a mold were implanted in the skin to form own tissue tubes. The materials used for the polymeric rods were PMMA, PU, PVC, PE and Si, all of which are hydrophilic, and PFA, which is water-repellent, and all are currently used as biomaterials. None of the Biotubes ruptured with 200-mmHg inner pressures except for tissue created by PFA. The walls of the Biotube by PFA showed sparse collagen fibers with numerous inflammatory cells, without capsularization (Fig. 2). In the tube that formed around PU, inflammatory cell infiltration was noted. Although PU

is used as a tissue compatible material for artificial hearts (Zdrahala RJ and Zdrahala IJ 1999), when transplanted as an artificial vessel, granulation is often recognized (Seifalian AM, et al. 2003, Sonoda H, et al. 2003). PU is considered to have a strong tissue response. A dense collagen mesh structure was formed around Si. The wall thickness of the Biotubes after 1-month of implantation decreased in the order of PE>PU>PMMA>PVC>Si>PFA and increased with transplantation period apart from PFA, PU, and Si.

The Si base tubular tissue as a graft strengthened with Dacron has been attempted for arterial bypass in the lower limbs clinically (Hallin RW and Sweetman WR 1976, Sparks CH, 1972). The tubular tissue showed vascular function at an early stage of the transplantation. However, the grafts were occluded within a short period in most cases because of lack of endothelialization. It has recently been reported that mesothelial cells were arranged on the luminal surface of tubular tissue obtained using Si bases (Campbell JH, et al. 1999). The patency rate was high, about 70 %, after 2-month of transplantation in animal experiments.

The stiffness parameter (β) is one of the indexes for compliance of blood vessels and indicates the mechanical property under physiological blood pressure (Hayashi K, et al. 1980, Hayashi K and Nakamura T 1985). Lower values in the β value indicate the material is soft and flexible. Within the polymers used in this study, the β value decreased in the order of Si>PMMA>PE>PVC. The Biotubes that formed around Si were relatively firm and inflexible, while the Biotubes that formed around PMMA were elastic within a low-pressure range and less extensible at a high-pressure range, showing a mechanical property similar to that of biological arteries. The relationship between intraluminal pressure and external diameter showed a 'J'-shaped curve, similar to genuine arteries. The Biotube obtained after one month by PMMA, PE and PVC exhibited compliance similar to that of the human coronary artery, human femoral artery and human carotid artery, respectively. Selection of specific rod materials and embedding period allow the design of artificial blood vessels with matching mechanical properties to that of genuine vessels. This matching is expected to prevent intimal hyperplasia causing luminal occlusion in the chronic stage. Biotubes are expected to grow with the patient blood vessels and are ideal vascular grafts. Furthermore, it is possible to design specific mechanics and it is easy to match the host's vascular shapes. We are planning to establish the Biotube preparation method that combines surface design as described above and demonstrate the usefulness of Biotubes as small caliber artificial blood vessels by animal transplantation experiments. These results will be reported in near future.

References

- Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF (1987) Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg* 5:376-382
- Asahara T, Isner JM (2002) Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 11:171-178
- Campbell JH, Efendy JE, Campbell GR (1999) Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 85:1173-1178
- Hallin RW, Sweetman WR (1976) The sparks' mandril graft. A seven year follow-up of mandril grafts placed by Charles H. Sparks and his associates. *Am J Surg* 132:221-223
- Hayashi K, Handa H, Nagasawa S, Okumura A, Moritake K, (1980) Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomech* 13:175-184
- Hayashi K, Nakamura T (1985) Material test system for the evaluation of mechanical properties of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 19:133-144
- Hibino N, Shin'oka T, Kurosawa H (2003) Long-term histologic findings in pulmonary arteries reconstruction with autologous pericardium. *N Engl J Med* 348:865-867
- Ishibashi K, Matsuda T (1994) Reconstruction of a hybrid vascular grafts hierarchically layered with three cell types. *ASAIO J* 40:M284-M290
- Isner JM, Kaka C, Kawamoto A, Asahara T (2001) Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann NY Acad Sci* 953:75-84
- Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Brischoff J, Mayer JE Jr (2001) Fabrication small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7:1035-1040
- Kinley CE, Marble AE (1980) Compliance: a continuing problem with vascular grafts. *J Cardiovasc Surg* 21:163-170
- Kott I, Peirce EC II, Mitty HA, Geller SA, Jacobson JH II (1973) The tissue tube as a vascular prosthesis. *Arch Surg* 106:206-207
- Matsuda T, Miwa H (1995) A hybrid vascular model biomimicking the hierarchic structure of arterial wall: neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110:988-997
- Miwa H, Matsuda T (1994) An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prosthesis. *J Vasc Surg* 19:658-667
- Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K (2004) In vivo Tissue-engineered Small Caliber Arterial Graft Prosthesis Consisting of Autologous Tissue (Biotube). *Cell Transplantation* (in press)
- Nishikawa S (1997) Embryonic stem cells as a source of hematopoietic and vascular endothelial cells in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 100:S102-S104

- Peirce EC II (1953) Autologous tissue tubes for aortic grafts in dogs. *Surgery* 33:648-657
- Pevec WC, Darling RC, L'Italien GJ, Abbott WM (1992) Femoropopliteal reconstruction with knitted, non-velour Dacron versus expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 16:60-65
- Seifalian AM, Salacinski HJ, Tiwari A, Edwards A, Bowald S, Hamilton G (2003) In vivo biostability of a poly (carbonate-urea) urethane graft. *Biomaterials* 24:2549-2557
- Shin'oka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE (1998) Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:536-545, discussion:545-546
- Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y (2001) Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344:532-533
- Shirota T, He H, Yasui H, Matsuda T (2003) Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabricated processing. *Tissue Eng* 9:127-136
- Sonoda H, Takamizawa K, Nakayama Y, Yasui H, Matsuda T (2003) Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation. *J Biomed Mater Res* 65A:170-181
- Sparks CH (1972) Silicone mandril method of femoropopliteal artery bypass. Clinical experience and surgical technics. *Am J Surg* 124:244-249
- Stewart SF, Lyman DJ (1992) Effects of a vascular graft/natural artery compliance mismatch on pulsatile flow. *J Biomech* 25:297-310
- Takamizawa K, Hayashi K (1987) Stain energy density function and uniform strain hypothesis for arterial mechanics. *J Biomech* 20:7-17
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000) Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96
- Zdrachala RJ, Zdrachala IJ (1999) Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 14:67-90

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)

Human Embryonic Stem Cells

近藤 靖^{*1}, 鈴木 豊^{*2}, 仁藤新治^{*3}

2003年、京都大学再生医科学研究所で国内初のヒトES細胞が3株樹立され、国産のヒトES細胞株の分配体制も整った。今後、国内のヒトES細胞研究は一層盛んになるものと思われる。本稿では、ヒトES細胞をとりまく研究の現況や今後の課題について、特に再生医療への応用の観点から概説してみたい。

1. はじめに

ES細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) は、胚の初期段階である胚盤胞の内部細胞塊から分離される特殊な細胞であり、未分化状態を保持したまま分裂増殖して無限に自らのコピーを作り出せる能力 (自己複製能) と体を構成するあらゆる細胞に分化する能力 (多能性) とを併せもつ。

ES細胞は1981年にマウスで初めて試験管内で増殖できる細胞株として樹立されて以来^{1, 2)}、分化・発生機構を解明するための基礎研究材料として、また遺伝子改変技術を応用した遺伝子の機能解析や疾患モデル作製のための研究ツールとして分子生物学の分野で広く利用されてきた。そして現在までに、マウス以外のさまざまな動物種でもES細胞の樹立が報告されてきている。霊長類に関しては、1995年にアカゲザルとコモンマーモセットからES細胞が樹立されたのが最初であり^{3, 4)}、その後筆者らも、カニクイザルからのES

細胞の樹立に成功している⁵⁾。

ヒトES細胞としては、1998年11月、米国ウィスコンシン州立大学のトムソンらによってその樹立がなされ、科学雑誌『Science』に掲載されたのが最初となる⁶⁾。この発表により、それまで一般の人にはあまり馴染みのなかったES細胞という言葉が一躍、“市民権”を得ることになり、以来、再生医療の切り札として関心を集め、各国の多くの施設でヒトES細胞を用いた研究が盛んに進められている。

2. ヒトES細胞

ヒトES細胞株はマウスES細胞株と比較していくつかの相違点がある。形態的には、マウスに比べてコロニー形態が扁平である (写真1)。マウスES細胞を未分化のまま培養・維持するためには、LIF (leukemia inhibitory factor) を培養液に添加しなければならないが、LIFにはヒトES細胞を維持する効果が認められていない。ま

^{*1}Yasushi Kondo 田辺製薬(株) 先端医学研究所 主任研究員

^{*2}Yutaka Suzuki 田辺製薬(株) 先端医学研究所 研究員

^{*3}Shinji Nito 田辺製薬(株) 先端医学研究所 所長

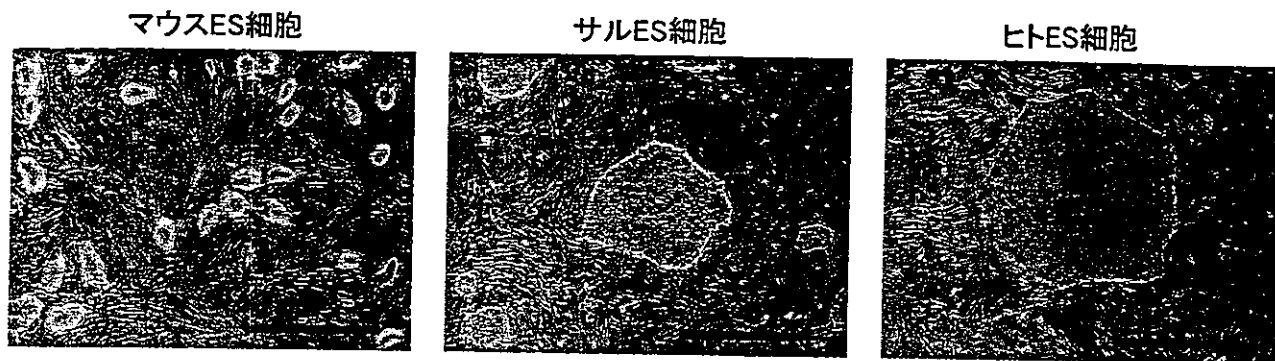


写真1 ES細胞コロニー形態の比較 (カラー写真参照)
(Scale Bar は 1 mm)

表1 ヒトES細胞株の樹立機関と所有細胞株数

樹立機関	細胞株数
Wisconsin Alumni Research Foundation (米国ウイスコンシン州 Madison)	5
California 大学 (米国カリフォルニア州 San Francisco)	2
CyThera 社 (米国カリフォルニア州 San Diego)	9
Geron Corporation (米国カリフォルニア州 Menlo Park)	7
BresaGen 社 (豪州・米国支店はジョージア州 Athenes)	4
ES Cell International 社 (豪州 Melbourne)	6
Technion-Israel Institute of Technology (イスラエル Haifa)	4
Reliance Life Sciences (インド Mumbai)	7
Pochon CHA University (韓国 Seoul)	2
Maria Biotech 社 (韓国 Seoul)	3
Seoul National University (韓国 Seoul)	1
Cellartis 社 (スウェーデン Goteborg)	3
Karolinska Institute (スウェーデン Stockholm)	6
Goteborg 大学 (スウェーデン Goteborg)	16

米国 NIH の資料より

た ES 細胞の細胞表面マーカーである SSEA (stage specific embryonic antigen) や TRA-1 (tumor rejection antigen-1) 等の発現パターンも、ヒトとマウスでは異なっている。これらの差異は、ヒトとマウスでは胚体組織や胚体外組織の構造など、胚発生の過程で異なる面があることに起因するのかもしれない。筆者らはカニクイザル ES 細胞の樹立に成功しているが⁵⁾、サルの ES 細胞は、形態、培養条件、マーカー分子の発現パターンなど、ヒト ES 細胞のものとはほぼ一致している。

ヒト ES 細胞に関する各国の考え方は、その作製を認めていないドイツのような国から、ヒトのクローン胚研究までもを認めるイギリスまでさ

まざまである。NIH (National Institutes of Health; アメリカ) が公表した資料によると、アメリカ、オーストラリア、スウェーデン、インド、イスラエル、韓国の 6 か国・14 機関の企業や大学で分離された 75 株のヒト ES 細胞がリストされている (表 1)。アメリカではヒト胚作製や、ヒト胚を破壊、廃棄し、故意に傷つけ、または死に至らしめる研究に対して連邦資金を支出することを禁じており、ヒト ES 細胞の樹立やクローン技術による胚の作製も禁止の対象に含まれている。実際にトムソンらは公的資金には頼らず、米ジェロン社が提供した民間資金を利用して ES 細胞の樹立に成功しており、これをきっかけにアメ