

新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発

所属 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
研究者 岸田 晶夫

研究要旨 生物由来素材を再生医療用 Scaffold として用いるために、新しい脱細胞技術の開発、および新しい加工法および修飾法による高機能化の検討を行い、さらに動物実験を用いた評価を還元することによって、詳細な検討を行った。

分担研究者

- (1) 国立循環器病センター研究所
高野久輝、藤里俊哉
- (2) ニプロ株式会社総合研究所
白数昭雄

A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い心臓弁、小口径血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は、生体内分解吸収性の合成材料が用いられている。しかし、既存の材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きく異なる。これらを解決するために、申請者らは新しい処理法による脱細胞化生物組織および生物素材の積極的な応用を試みている。本研究では、優れた力学特性を有する生物由来組織の高機能化を実現するための、新しい加工法について検討を行う。これにより、複雑な構造でも造形する必要がなく、あるいは生体と同等の力学特性を有する再生医療用素材を、特別な化学薬品を用いることなく高機能化することができる。新規な再生医療用素材として広範な応用が期待できる。

本研究は、①既存の生体素材を高度に機能化できる、②国産化あるいは輸出も可能な高度な処理法、③既存の製品と比較して大幅な低価格化が可能、④新規な再生医療用 Scaffold の提供、⑤移植医療の普及による医療費の圧縮が可能、などが必要性および期待される成果として挙げられる。このうち、製品

化に関しては、国内に生物素材を加工できる企業が少なく、採取動物の管理、GMP 対応の製造プラント設計から品質管理まで幅広い検討が必要である。このため、それぞれの分野で高い技術を有するニプロ株式会社と共同体制をとり、ベンチャー企業設立を視野に入れた研究開発を行う。これにより、わが国に高機能生物由来材料を取り扱う拠点を形成し、欧米にはライセンス化、東南アジアには技術供与をもって、国際的な医療技術向上に貢献することを目標としている。

B. 研究方法

基盤生体組織スキャフォールド作成

1) 我々が新規に開発した超高静水圧印加及び低温マイクロ波照射法による細胞除去技術の処理条件の最適化を行う。ミニブタの種々の組織を用いて、それぞれの組織からの脱細胞化についての最適条件を検索する。対象とする組織は、心筋、心臓弁、血管、気管、心膜、皮膚、軟骨、骨、靭帯、腱などの組織と、肺、肝、腎、脾などの臓器である。特に心臓弁、血管に注目し、動物実験を行って、その有用性を検証する。

2) 生物由来素材を用いたスキャフォールドを作製する。分解性と力学特性を考慮して、コラーゲンを主体としたマトリクスを作製する。具体的な目的として、内径 1-2mm の小口径人工血管を開発する。動物実験を想定し、サイズ、物性などについて最適化を行う。

機能性分子複合化技術の検討

1) 上記のスキャフォールドへの機能性分子の複合化について検討する。複合化する機能性分子として、抗血栓性付与のためにデキストラン、ポリエチレングリコール、およびヘパリン、また細胞接着性のために血清タンパク質、ハイドロキシアパタイト、さ

らに遺伝子発現のためにプラスミドベクターを複合化する。複合化の条件について、物理化学的な評価を行い、物性、安定性、再現性について検討する。
2) 機能性分子複合化スキャフォールドの機能について、細胞を用いた *in vitro* 評価およびラットを用いた *in vivo* 評価を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)、及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行う。国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤を用い動物の苦痛の軽減に努める。また、実験計画を綿密に練ることにより、不必要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成する。

C. 研究結果

脱細胞化組織・生物由来材料を修飾するための方法論には二つの考え方がある。一つは血液凝固を抑制するために抗血液凝固性を有する物質で修飾する方法、もう一つは細胞接着性および血液凝固性物質で修飾するものである。ここでは、その双方の考え方に基づいた修飾法について検討した。

まず、細胞非接着性架橋剤の開発について検討した。コラーゲングルや脱細胞化組織の表面は細胞接着性であり、また血液凝固性である。これらで小口径人工血管を実現するためには、なんらかの抗凝固的な因子を組み込む必要がある。またコラーゲングルは脆弱であるため、血圧のかかる部位に用いる血管を作製するためには架橋が必要である。これは脱細胞化組織にも適用される事柄であり、これまでに種々の架橋剤を用いて血管や心臓弁が作製されているが、その多くは架橋剤の疎水性のために、長期の埋植に於いて石灰化が生じることが問題となっている。これに対処し得る新しい架橋法として、生体適合性高分子であるリン脂質ポリマーを一成分とする水溶性高分子を介してコラーゲンを架橋する方法論を開発した。

コラーゲンの架橋方法には様々な方法があるものの、細胞脱着用バイオマトリクスの構築はいまだ困難である。これまでの架橋方法は有機溶媒を使い、3日以上洗浄処理が必要である。架橋剤を直接コラーゲンに加えた時、架橋剤の特有の毒性の問題もあり、大部分の架橋は実際にスキャフォールドや薬物送達システムに適用されたため、十分な機械的物性が得られない。

ここでは生体適合性高分子としてリン脂質ポリマーである 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリ

ルコリン (MPC) ユニットを有する Poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) を使用し、コラーゲンとの架橋を行った

MPC コポリマーは優秀な生体適合性を持っているため、人工臓器用材料と細胞培養用マトリクスとして使われている。PMA には多くのカルボキシル基が含まれているので、カルボキシル基とコラーゲンのアミン基を結合させ、PMA-コラーゲングルを調整するのが可能である。この方法で出来上がった PMA-コラーゲングルの機械的な物性は非常に弱く、一般的なコラーゲングルとあまり変わらなかった。

そこで、コラーゲン水溶液に変わってコラーゲンフィルムを作り、活性化された PMA の MES 緩衝溶液に入れて PMA-コラーゲングルを調整した。フィルムを架橋してゲル化する方法は Yoshizato ら、Olde Damink らにより導入されたが、水の条件でポリマーと架橋した前例は始めてである。これにより、半透明なコラーゲンフィルムと違って透明で、溶液の pH を変えても安定性を維持し、非常に強いゲルが形成された。今後、フィルムから出来上がった PMA-コラーゲングルを使い、コラゲナーゼに対する溶解実験、細胞接着実験、抗血全実験、*in vivo* 実験を行う予定である。

次に、ハイドロキシアパタイト (HAp) 複合化について基礎検討を行った。柔軟性を有する生体由来材料や高分子材料と HAp を複合化することによって、HAp の高い細胞接着性と生体に近い物性の二つの特性を同時に実現できると考えられる。HAp の生体材料としてのすぐれた特性を生体内で維持するためには容易に溶解しない高い結晶化度が必要であるし、安定した性能を発揮するためには材料表面に表出する結晶面の制御も重要である。このような課題を克服する方法として、HAp 結晶の微粒子を材料表面に結合することが考えられる。この際、全体の物理特性を変化させず、さらに HAp に夜表面被覆率を出来るだけ高く保つためには、HAp 微粒子のサイズを小さくすればよい。我々はこのように目的に適合する、生体内で溶解しにくい HAp ナノ焼結体を開発し、さらにこれを生体由来材料や高分子と複合化させる技術を開発している。これは具体的には、次の二つのキーテクノロジーからなる。

① ナノ HAp 単結晶体の調製と形態制御

② 共有結合による複合化の条件設定

HAp ナノ粒子の粒径と形態制御については、独自にマイクロエマルジョン法を改良して、ロツド状構造体を成したナノスケールにて粒径制御可能な HAp 単結晶体の合成法を提案している。HAp 焼結体表面に存在する水酸基と共有結合で結合する反応性基として、アルコキシシリル基およびイソシアネート基が知られている。我々は高分子基材にアルコキシシ

シル基およびイソシアネート基を末端に有するモノマーをグラフト重合し、そのグラフト鎖を足場に HAp ナノ粒子を固定化している。ここでは高分子基材にシルク繊維を用いている。HAp ナノ粒子の表面被覆状態は、単一粒子から数個の粒子が凝集した状態で結合している。これは HAp ナノ粒子が単結晶体であり、一粒子内に陰性および陽性の面を有して凝集しやすい性質のためである。複合体の生物学的特性は、線維芽細胞を用いた培養試験およびラット皮下への埋植試験により調べている。マウス線維芽細胞 (L929 細胞) を HAp 複合シルク繊維上に播種し、培養後の未処理シルク繊維との違いを SEM 観察した。HAp 複合化シルク繊維上では、十分な細胞接着性が認められている。さらに、高倍率で観察すると HAp ナノ粒子上に細胞から微小突起が延び接着している様子も確認できる。具体的な医療材料の応用として、生体の内外を連絡する経皮デバイスを想定して実験を行っている。HAp 複合化シルク繊維を、あらかじめ中心静脈カテーテル用に設計したシリコンラバー製ボタンの表面に植毛することにより、セラミック経皮ボタンを作成した。製造された経皮ボタンは、白色状で表面特性はセラミックスそのものでありながら、しなやかさを有していた。また、この経皮ボタンを 3 カ月、ウサギ背部に経皮的にインプラントしたが、皮膚組織は隙間なくボタンに密着し、外観からは大きな炎症は認められず、優れた成績をあげている。

生物由来材料や高分子とアパタイトの複合化は、いずれの場合でもナノレベルでの考察が必要である。特に無機結晶と材料の分子レベルでの相互作用や結合法がマクロレベルでの特性に大きな影響を与える。再生医療用スキャフォールドとして、アパタイト複合体の研究は今後ますます重要性を増してゆくと思われる。

本研究では、ミニブタから取り出した心臓弁や血管からドナー細胞を除去し、さらに細菌・ウイルスを除去することによって、高度な安全性を有した異種組織の移植技術を確立する。ここでは超高压処理による脱細胞化の精緻化を図るため、細胞膜成分である脂質分子の除去と、ウイルス除去について検討した。

異種組織移植については、細胞の機能保持の問題がないために、容易に応用が可能であると考えられるが、現実に臨床応用されている異種組織は高度な化学処理が施されており、生体組織特有の力学的特性を喪失している場合も多い。近年、これを改良し、より生体に近い物性を保った組織の開発が試みられている。この新しい移植用組織については、長期の

生体適合性、拒絶反応の有無については不明である。ここでは脱細胞化組織の石灰化および免疫反応の起点となる可能性のある、細胞膜リン脂質の除去法を検討し、脱細胞化異種組織の生体適合性向上のための、新しい脱細胞化技術について検討を行った。

また、移植組織のドナーとしては遺伝系統が明確であり、遺伝子変異が少ないと考えられるミニブタを想定している。このミニブタは遺伝的に PERV ウイルスに感染しており (ゲノムに組み込まれている)、その安全性については、養豚作業者にこれまで感染例がないことなどから問題ないと考えられているが、感染性の可能性を最小限にするための方策が望まれている。異種臓器移植などを目指して開発されている遺伝子改変ブタの組織を用いる方法があるが、ここでは脱細胞化の際して PERV ウイルスおよびそのゲノムの除去について検討した。遺伝子改変ブタが作出できた際には、その組織を用いることによって二重の安全性が確保できることが期待できる。

以下に、脂質除去とウイルス除去について報告する。

まず、従来の PowerGraft 法と未処理の血管とを残存リン脂質量について比較したところ、いずれの試料中のリン脂質量に顕著な差はみられなかった。また、洗浄日数 (14days) に伴う血管の残存リン脂質の定量をおこなった。これにより、PowerGraft 法では洗浄日数が増加しても細胞膜に由来するリン脂質量は減少しないことがわかった。この結果から、従来の洗浄法では脱細胞化組織中のリン脂質は除去されず、長期の埋入に際して石灰化の起点となる可能性あり、さらに異種組織による拒絶反応を惹起する可能性も考えられた。

そこで、これまでの PowerGraft 法の特徴を損なわず、リン脂質の除去を効率的に行う新しい方法について検討した。新しい洗浄液を用いることで、リン脂質の選択的除去が可能であると予想し、種々の洗浄液を用いて、残存リン脂質量を指標に検討した。その結果、生体に安全で、PowerGraft 生体組織の特性を変化させない洗浄液を見出した。新処理法によって残存リン脂質量は 3 分の 1 以下に減少させることが出来た。条件を最適化することにより、さらに残存量を減少させることも期待できる。この結果より PowerGraft は新処理によってリン脂質は減少できたが、未処理血管を新処理した試料と比較するとリン脂質の除去量に差がみられた。これは PowerGraft の処理過程で超高压 (10,000atm) を印加することにより、リン脂質とタンパク質との相互作用が増加した可能性が挙げられる。そこで、透過型顕微鏡 (TEM) にて評価した

未処理とそれを新処理した場合について比較すると、新処理した場合には丸く写る核と黒く細胞を覆って写る細胞膜が除去されていた。超高压処理を行った後に新処理によって脂質除去を行った試料についての TEM 像をより明らかなように、未処理像と比較すると、核および細胞質の密度が低下しており、脱細胞の効果が観察できる。しかしながら、新処理によって未処理組織では核の内容物および細胞質が除去されているのに比較して、大部分の核および細胞質の内容物が残存していることが分かる。詳しく観察すると細胞膜は連続性を保っておらず、超高压処理によって破壊されているものと考えられた。一方、他の部位では完全に細胞の内容物が除去されている箇所も見受けられることから、超高压の条件をより詳細に検討することで、細胞成分の完全除去が出来るのではないかと考えている。また、脂質膜については、超高压処理によって、脂質分子同士が複雑に交差して絡み合い、溶解に対する耐性が上がることが報告されている。このような効果から、洗浄の効果が低減しているものと考えられた。

PERV ウイルスの除去については、一般に超高压処理がエンベロープ型ウイルスに対して 7000 気圧以上で不活化が可能であることが報告されており、その効果が期待できる。ここではゲノムに組み込まれている PERV ウイルス配列の残存によって、組織再生後に宿主細胞（ヒト細胞）が遺伝子変異を誘発しないようにするために、DNA 成分の除去とゲノム配列の残存について検討した。

脱細胞化処理後に洗浄した場合の洗浄期間と残存 DNA 量の関係を検討した。DNA は組織を細切し、溶媒抽出法にて抽出した。その結果、DNA 量は洗浄の進行とともに減少していることが分かった。約 1 週間で洗浄効果は低くなるが、漸次減少している。残存している DNA について、PERV 配列を対象としたプライマーを用いて PCR 反応を行った。その結果、未処理の組織からは PERV 配列が検出できるが、脱細胞化処理（PowerGraft 法）の組織からはその配列が検出できないことが明らかになった。これは増幅回数を増加させても同じであった。これにより、残存 DNA はわずかながら残っているものの PERV 配列はなく、それらはゲノム DNA の断片であると考えられる。

一方、もし超高压処理によって DNA が変性しており、これによって PCR 反応にかからないのであれば、生体内埋食後の安全性について疑念が残る。そこで、モデル DNA を用いて、超高压による変性あるいは DNA 複製反応性について調べた。

まず、高次構造の変化について円偏光二色性 (CD) スペクトルを用いて検討した。その結果、超高压処理によって DNA の高次構造が変化していることが分

かった。この結果から、DNA が本来の反応性を失って、長期に残存するあるいは PCR 等の従来の検出法で活性が測定できないことが懸念された。そこで、DNA 分解酵素による分解反応性について調べた。その結果、若干ながら酵素分解に対する耐性が向上している傾向が観察されるが、大きな変化ではない。洗浄液中には DNA 分解酵素も含有されているため、組織中の DNA は超高压処理後に於いても分解され断片化されるものと考えられる。また、超高压処理後の DNA が生理活性を発揮するかについて無細胞系による蛋白質合成反応によって検討した。これにより、超高压処理後の DNA は構造が変化しているが、酵素や蛋白質合成については、その機能は変化なく、PCR 反応についても正常に機能するものと考えられる。従って、超高压脱細胞化処理後の組織抽出液中に PERV 配列が見いだせなかったことは、変性 DNA によって検出ができなかったためでなく、ゲノム DNA が除去されているためであると考えられた。

新処理法によって超高压処理による脱細胞化組織の物性変化を起こさず、残存リン脂質量を減少させる技術を開発した。これを用いることによって、石灰化だけでなく異種反応の制御も可能であると期待される。次年度に動物を用いて検討する予定である。

また、ウイルス除去について詳細に検討した結果、内在性レトロウイルス (PERV) の除去について超高压処理を用いた我々の方法は有効であり、検出限界以下まで除去できることが明らかになった。また、その根拠として、DNA を用いたモデル系に於いて、超高压処理が構造変化をもたらすものの、生物的反応性には変化がなく、よって、PCR 反応の結果は残存 DNA の量を間接的に表したものであると結論できた。

また、本研究では、再生医療の方法論により、血管再生に最も適切である足場材料を選定し、これを用いて小口径人工血管を作製することを目的とする。コラーゲンを用いた人工血管の開発についてはこれまでも種々の報告があり、それらの技術と重ならない新規な方法論を創出するために、従前の技術を精査し、また血管再生に必要な要素（機能）を抽出して組み込むことを主眼とした。

生体適合性材料の中でも、生体を構成する主要なタンパク質であるコラーゲンは、特に生体適合性、組織再生、細胞増殖等に関し優れた効果を持ち合わせている為、種々に処理され調製された医療用コラーゲン製基材が、医療分野の、特に外科的処置並びに外傷の治療に有用な素材として知られている。

これらのコラーゲンを用いた医療用材料器具の製造においては、動物や人の組織を直接処理して、組織の形状を維持したまま、主にコラーゲン質のみを

そのまま利用したり、さらにこれを後加工したりする場合もある。しかし、これらは使い勝手の良い医療用具の形状や剤形として、任意に加工する事が難しい上、加工されたコラーゲン質は脆弱であったり、コラーゲンの抗原性発現部位がそのまま残された状態であったりする為に問題があった。

そこで、医療用材料器具に使用するコラーゲンは、主として原料である動物から、酸、アルカリ、中性等の条件下で酵素などにより抽出し、粘調なコラーゲン溶液またはこの溶液を乾燥させた固体の状態として得る方法が一般的に用いられるようになった。また更に、ペプシン処理を施すことによって抗原性発現部位を除去し、体内または体表面に移植した際に抗原性が無い、より医療基材に好適なコラーゲン(アテロコラーゲン)を得る方法も用いられている。

このようにして得られたコラーゲン溶液から、医療用基材を製造する方法としては、コラーゲン溶液を凍結乾燥して、スポンジ状の基材を製造する方法や、コラーゲン溶液を湿式または乾式紡糸法で紡糸し、繊維状の基材を製造する方法など種々の方法が知られている。

コラーゲン溶液を湿式または乾式紡糸法で紡糸し、繊維状の基材を製造する方法の一例として、コラーゲン物質をアミン類、アルカリおよび硫酸ソーダを使用する方法により分子状に水中に可溶化し、得られたコラーゲン水溶液を紡糸原液として紡糸コラーゲン繊維を生成し、ステープル長に切断して耐水処理するかまたは耐水処理してから切断してコラーゲン繊維ステープルとし、次いで乾式法または湿式法により不織布状に形成することを特徴とする、外科用創傷被覆材の製造方法が知られている。

さらに、コラーゲン水溶液をエタノール等の親水性有機溶媒中に吐出し、コラーゲンを糸状に成形し、槽底部に沈降しスラリー化したコラーゲンを取り出して、コラーゲン糸の積層構造物を作製する方法が知られている。

しかし、このような従来方法で得られるコラーゲン不織布を用いて人工血管を製造した場合、コラーゲン繊維ステープルや親水性有機溶媒中へのコラーゲン吐出物の分散を均一にすることが実質的に不可能であるため、部分的に強度が弱い部分が発生する、あるいは均一な厚みを持った不織布が得られない等の問題があった。

また、従来の製造法では、コラーゲン不織布の製造工程において、一旦コラーゲンの糸状物をステープル状に切断したり、スラリー化したコラーゲンを取り出す等の煩雑な作業が必要であり、工業的生産が困難であった。

そこで、縫合に耐える適度な強度を有し、かつ生体内分解性の高い、生体適合性材料からなる人工血

管の開発が切望されており、本発明はそのような人工血管の提供を課題とする。本発明はこのような課題に鑑みてなされたものであり、コラーゲンが均一に分散された不織布を用いることによって、強度的に十分耐えうる人工血管を得ることができる。

ここで我々が開発を目指した人工血管は、

(1) コラーゲン糸状物が複数本ほぼ平行に配列した層状物を、コラーゲン糸状物の配列方向が互いに角度をなすように複数重ね、接着されたコラーゲン不織布を、管状に成型し、強度を担保する。

(2) コラーゲン不織布を生分解性物質あるいは抗血栓性材料でコーティングする。

(3) 最内層に、コラーゲン製平滑フィルム層を形成させる。

ここで用いるコラーゲン糸状物とは、コラーゲンからなる、通常の糸のように柔軟性を有する巻き取り可能な繊維状体で、約10~200 μ m程度のほぼ均一な外径を有している。このコラーゲン糸状物を複数本、ほぼ平行に配列して層状物に加工する。コラーゲン糸状物の間隔は、約0~1mmである。また、生体の血管を模倣して、糸状物の配列方向が互いに角度をなすように配置する。これにより、縦方向の伸張と直径方向および円周方向のいずれの伸張に対してもコラーゲン糸自体の応力が対応するため、強度の保持に遊離である。この配列方法の角度と間隔を工夫することによって、中口径から小口径の人工血管に対応できる管状構造が作製できる。

管状に成型する他の方法として、コラーゲン不織布を管状に積層する技術についても検討した。管の内側から積層をはじめ、外側へコラーゲン不織布が積層された構造に成型する。不織布は等方的に応力に対応するので、コラーゲン不織布のみからなる人工血管は適度な物性を有しているといえる。さらに、最内層に平滑フィルム層を有しているものも作製した。平滑フィルム層によって人工血管の内腔面を平滑にすることは、白血球や血小板等の血球成分の付着、さらにはタンパク等の血液成分の付着が続くことによって生ずる血液凝固を防止する層(抗血栓層)として有効であると考えられる。平滑フィルム層は生分解性物質で構成される。生分解性物質としては、コラーゲンやヒアルロン酸等が挙げられる。さらに、平滑フィルム層による平滑層だけでは、血液と接触する最内層を完全に抗血栓性に改善することはできないため、平滑フィルム層に抗血栓性材料を塗布することも可能である。抗血栓性材料としては、ヘパリン、低分子ヘパリン、ワーファリンやメシル酸ナファモスタット等が挙げられ、取り扱いや保存安定性の面から、我々はヘパリンを選択した。また、抗血小板薬として、血小板の粘着、凝集を抑制することにより、血栓形成を予防する効果のあるアスピリ

ン等の塗布も可能である。

コラーゲン不織布は、コラーゲン糸状物を複数本ほぼ平行に配列した層状物を、コラーゲン糸状物の配列方向が角度をなすように複数重ね、接着することによって作製した。各層状物は、コラーゲン糸状物を複数本ほぼ平行に配列することによって形成される。層状物は、コラーゲン糸状物の配列方向が互いに角度をなすように複数重ねられる。具体的な積層方法の一例としては、疎水性材料からなる平板上にコラーゲン糸状物を複数本ほぼ平行に配置し、さらにその配置された糸状物と角度をなすように、コラーゲン糸状物を複数本ほぼ平行に配置する方法が挙げられる。

層状物の接着には種々の方法を用いることが出来る。例えば、コラーゲン糸状物が、湿式紡糸法において生成された乾燥前（湿潤状態にある）の糸状物である場合や、生分解性物質の溶液でコーティングされたコラーゲン糸状物である場合等のように、コラーゲン糸状物がそれ自体で接着性を有する場合は、コラーゲン糸状物が複数本ほぼ平行に配列されてなる層状物を積層後、乾燥処理を施すことによって、接着することができる。また、コラーゲン糸状物が、紡糸後に乾燥、架橋処理等を施した糸状物である場合は、積層後、生分解性物質（例えば、生分解性ポリマー）の溶液を不織布上に噴霧もしくは含浸し、乾燥処理を施すことによって接着する。

本研究においてコラーゲン不織布の材料として用いられるコラーゲン糸状物は、可溶化されたコラーゲン溶液を紡糸原液として紡糸されたものである。特に可溶化処理と同時にコラーゲンの抗原決定基であるテロペプチドの除去処理が施されているアテロコラーゲンを主として用いた。コラーゲンのタイプとしては強度や入手の容易さからI型が好適であるが、必要に応じてIV型も用いた。

可溶化されたコラーゲン溶液の溶媒として、塩酸の希酸溶液を用いる。溶解時と紡糸時では、やや紡糸時にアルカリ側に調節した方が糸が得やすい。また、コラーゲン溶液の濃度は、約5～7%であり、かなり粘度が高くなる。このため、溶液は作り置きせずに、要事調整とし、また温度管理およびpH管理を厳密にする必要がある。

湿式紡糸法としては、親水性有機溶媒を使用する方法、架橋剤を使用する方法など様々な方法が挙げられる。中でも特に親水性有機溶媒を用いて紡糸されたコラーゲン糸状物が物理特性も優れており適している。コラーゲン溶液をノズル等から連続的に親水性有機溶媒等の脱溶媒剤の充填された浴槽中に吐出し、脱水及び凝固させることによりコラーゲン糸状物が得られる。用いる親水性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノールなどである。これら

を、約30%の水溶液として用い、42℃程度で行われ、一連の脱水および凝固による処理時間は約4～5秒である。

上記方法で得られるコラーゲン不織布は、必要によりさらに種々の物理的または化学的架橋処理を施して用いる。この架橋処理により、生体内に移植された際に分解・吸収される時間を、未架橋の場合と比較して飛躍的に遅延させることが可能となり、また物理的強度も向上する。したがって、コラーゲン不織布を生体の欠損部を補填または補綴する場合に、組織の再生を完了するまでの期間、体内で必要な膜強度を維持することが可能となる。我々が検討した架橋方法は、物理的方法として、 γ 線照射、紫外線照射、電子線照射、プラズマ照射、熱脱水反応による架橋処理などであり、化学的方法としては、アルデヒド類、エポキシ類、カルボジイミド類、イソシアネート類などとの反応であった。このうち、あたらしい架橋法として、リン脂質ポリマーを用いた方法が、共同研究者である岸田（主任研究者）らによって検討されており、特性を見極めた上で本研究にも導入する。

コラーゲン不織布に生分解性物質でコーティングを施す方法の一例としてはバインダー処理が挙げられる。バインダー処理とは、不織布に、溶液状の材料を含浸させた後、適当な乾燥方法で乾燥を行い、不織布中の糸状物同士の結合を補強する処理である。溶液状の材料は、生分解性物質の水溶液であることが好ましい。このバインダー処理によりコラーゲン不織布は膜状に成形され、未処理の不織布よりもはるかに物理的強度が向上し、従って縫合強度も格段に向上する。ただし、バインダー処理を行う際には、コラーゲン不織布に前もって架橋処理を施しておく必要がある。

コラーゲン不織布から人工血管を作製する方法としては、例えば、コラーゲン不織布を円柱またはチューブの側面に繰り返し巻きつけて、コラーゲン不織布が積層された人工血管を得る方法を用いた。テフロンなど撥水性の高い材料の円柱にコラーゲン不織布を、接着剤にコラーゲン溶液を用いて巻きつける。縫合強度は、コラーゲン不織布を巻きつける回数、あるいはコラーゲン不織布を作製する際の層状物の積層数、つまりコラーゲン糸状物の全積層回数を多くすることにより制御することが可能である。例えば、血管置換術で破断や引き裂かれることによって血液が漏血し、死に直結する可能性がある場合には、巻きつけ回数を増やすことにより、十分な縫合強度を得ることができる。逆に神経補填などにおいて外れない程度の縫合強度が必要な場合は、巻きつけ回数を少なくすることによってその必要な縫合強度が得られる。このようにしてコラーゲン不織布

を円柱またはチューブの側面に巻きつけて作製された人工血管は、その後乾燥させ、架橋処理を施して加工する。

次に内面コートを行う。生分解性物質からなる平滑フィルム層を内面に形成させる。コラーゲン溶液を紡糸する際に使用する親水性有機溶媒の濃度を下げ、含水率の高い状態でコラーゲン糸状物を紡糸し、吸着水に半溶解した状態のコラーゲン糸状物を円柱またはチューブに巻きつける。糸状物は互いに融合することによってフィルム状となり、これを乾燥してフィルム層を作製することができる。この半溶解状態で巻きつけることができるコラーゲン糸状物の適切な含水率は、15～30%である。また、低濃度のコラーゲン溶液を管状の鋳型に流し込み凍結乾燥させ、スポンジ状のチューブを作製した後、コラーゲン溶液を調製する際に使用した溶媒等に一定時間浸し、引き上げる。スポンジ状のチューブは吸着溶液に溶解し、フィルム状となり、これを乾燥して平滑フィルム層を作製することもできる。

この方法をとさらに単純な管状の人工血管だけでなく、複雑な分岐を有するものも作成可能である。まず、あらかじめ目的とする人工血管の鋳型(雌)を作製しておく。鋳型の素材はポリフッ化エチレン系繊維等の撥水性の高い材料が適切である。鋳型には穴を開けておく。

次に、この鋳型にコラーゲン不織布を封入し、穴から生分解性ポリマー溶液を注ぎ込み、乾燥させることにより、目的とする複雑な形状の人工血管が得られる。

ここで開発した人工血管は、コラーゲンが元来持ち合わせている、生体内および体表面における分解性および吸収性を有し、毒性もほとんどなく、医療目的等で人間や動物に安全に使用できる。

本研究においては、移植用或いは再生医療用人工血管を主眼に開発を行っているが、この技術を用いて、同様の他の用途に用いることができる。例えば、組織工学分野・再生医療分野における補填および補綴目的で体内に移植される、ステント、人工神経チャンネル、人工気管、人工食道、人工尿管等である。また、接着性細胞等の各種細胞を体外で培養するための基材(細胞培養基材)としても利用できる。上記移植用基材上で、あらかじめ繊維芽細胞、軟骨細胞等の体組織を形成する細胞を常法に従って一定期間培養し、人工血管等の移植用基材の形状に細胞を増殖させて組織を形成した後に、体内へ移植することもできれば、生体外再構築型の再生医療のための重要な材料として有用である。さらに、各種成長因子、薬剤、ベクター等を含浸させ、ドラッグデリバリーシステム担体、徐放性薬剤用担体、遺伝子治療用担体等としての応用することが出来る。

この人工血管は乾燥状態で保存し、使用時に生理食塩水等に浸して含水状態とする。その状態における、直径方向への伸展について調べた。人工血管を圧力トランスデューサー付きの生理食塩水で満たされた回路に設置し、圧力をかけながら直径方向の変化を CCD カメラを用いて撮影し、観察時の圧力を横軸にプロットした。その結果、外径(3.8mm)から圧力付加により伸展しているが、その傾きは直線的であり、合成樹脂と同様の物性を有していることが分かった。すなわち、非常に硬い素材であることが分かる。動脈圧に耐えるために、どれくらいの物性が必要かがまだ不明であるため、動物埋入試験のために強度の高いものを作製したためである。

本文中に示したように、この人工血管は作製時に種々の条件を変化させることで、壁厚、強度、柔軟性について変化させることが可能であり、動物実験の結果を考察しながら、目的に沿った人工血管を作製する。

E. 結果

本研究で開発した生物由来材料は、移植に優れた縫合強度を有している。また、生物組織由来であるため、物性的に優れており、また宿主の細胞が内部に入り込んで、再構築を行うことにより、欠損部位にて血管内皮細胞や線維芽細胞などの血管細胞の再生を促進する効果が優れていると期待できる。脱細胞化組織とコラーゲン製材料の2種の基盤材料をもとに、機能分子の複合化および動物実験などの結果を踏まえて、臨床応用可能な再生医療用 Scaffold としての応用について検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuzono T, Kishida A, Tanaka J, Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery, *J Mater Sci. Mater Med.*, 15, pp.19-23, 2004.
- 2) Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A, Novel PVA-DNA nanoparticle prepared by ultra high pressure technology for gene delivery, *Mater Sci Eng C*. 24, pp. 797-801, 2004.
- 3) Furuzono T, Yasuda S, Kimura T, Tanaka J, Kishida A, Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion of a 3D scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device. *J. Artif. Org.* 7(3), pp.137-144,

2004.

- 4) A. Korematsu, T. Furuzono, S. Yasuda, J. Tanaka, A. Kishida, Nano-scaled hydroxyapatite/ polymer composite II. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(2-(o-[1-methyl propylideneamino] carboxyamino)ethyl methacrylate)-grafted silk fibroin fibers through covalent linkage. *J. Mater. Sci.* 39, (9), pp.3221-3225, 2004.
- 5) Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Yin M, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Preparation and recellularization of tissue engineered bioscaffold for heart valve replacement. in Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches. pp.83-94, 2004, Springer-Verlag.
- 6) Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S., Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved allograft. *J Heart Valve Dis*, 13(5), p984-990, 2004

2. 学会発表

- 1) T. Furuzono, S. Yasuda, A. Korematsu, J. Tanaka, A. Kishida, Thin Coating of Nano-Scaled Hydroxyapatite Crystals on Polymer Fibres Through Covalent Linkage for Development of A Biocompatible Material for Soft Tissue, 7th World Biomaterials Congress, p305、シドニー
- 2) A. Kishida, A. Okuno, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, Y. Kitamura, H. Yoshizawa, T. Kimura, T. Furuzono, Preparation of DNA-Polymer composite via Hydrogen Bond Using Ultra High Pressure, 7th World Biomaterials Congress, P35、シドニー
- 3) 古菌勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、細胞スカフォールドとしてのナノセラミックス複合材料の特性、第53回高分子年次大会、p2149、神戸国際会議場
- 4) 木村剛、古菌勉、宮崎幸造、奥野暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、北村吉朗、吉澤秀和、岸田晶夫、超高压技術を用いた水素結合性高分子-薬物集合体の開発、第20回日本 DDS 学会、p288、京王プラザホテル
- 5) 古菌勉、岡田正弘、木村剛、安田昌司、西謙一、宇山親雄、岩崎光伸、伊藤征司郎、岸田晶夫、新規アミノ酸化チタン・シリコ

- ーン複合体の細胞接着性と抗菌性の最適化、第53回高分子討論会、p5186、北海道大学
- 6) 六雄伸吾、吉澤秀和、北村吉朗、山元和哉、古菌勉、岸田晶夫、超高压処理により調製した薬物内包 PVA ゲルの徐放挙動、第53回高分子討論会、p4177、北海道大学
- 7) 木村剛、古菌勉、奥野暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、水素結合性複合体の生医学応用における超高压印加効果、第42回日本人工臓器学会大会、pS-205、京王プラザホテル
- 8) 岸田晶夫、藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、沼田智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅理晴、中谷武嗣、北村惣一郎、血行再建における人工臓器と再生医療、第42回日本人工臓器学会大会、pS-12、京王プラザホテル
- 9) 古菌勉、岡田正弘、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、ナノセラミックス複合化によるボタン型経皮デバイスの開発、第42回日本人工臓器学会大会、pS-29、京王プラザホテル
- 10) 岡田正弘、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、古菌勉、界面複合化を目指したリン酸カルシウム微粒子の形態制御、JST H16 年度シンポジウム、p68、日本科学未来館
- 11) 岸田晶夫、医療用材料の動向と新技術、第13回ポリマー材料フォーラム、p9-10、名古屋国際会議場
- 12) 岡田正弘、芹澤武、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、古菌勉、基板上でのナノアパタイト単結晶を用いた界面複合化法の精密制御、日本バイオマテリアルシンポジウム2004、p170、つくば国際会議場
- 13) A. Kishida, T. Kimura, K. Miyazaki, M. Ishimaru, M. Uetake, N. Kusakari, T. Masuzawa, A. Okuno, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, T. Furuzono, T. Fujisato, Cellular and Tissue Engineering with Nanotechnology, Artificial Organs and Biomaterials with Nanotechnology, p10-11、アルカディア市谷
- 14) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、超高压処理による安全な再生型移植組織、第7回日本組織工学会、p99、砂防会館
- 15) 木村剛、古菌勉、宮崎幸造、奥野暁、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、水素結合を介した遺伝子ベクター開発における超高压技術応用、第53回高分子討論会、p4304-4305、北海道大学
- 16) 岸田晶夫、藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、

沼田智、湊谷謙司、庭屋和夫、菅理晴、中谷武嗣、北村惣一郎、血行再建における人工臓器と再生医療、第42回日本人工臓器学会大会、pS-12、京王プラザホテル

17) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、湊谷謙司、庭屋和夫、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎、超高压による脱細胞化生体組織、第42回日本人工臓器学会大会、pS-134、京王プラザホテル

18) 藤里俊哉、吉田謙一、西岡宏、殷猛、山崎祥子、澤田和也、湊谷謙司、庭屋和夫、菅理晴、岸田晶夫、中谷武嗣、北村惣一郎、超高压処理による脱細胞化生体組織：パワーグラフト、日本バイオマテリアルシンポジウム2004、p92、つくば国際会議場

19) 殷猛、山崎祥子、湊谷謙司、笹山典久、吉田謙一、西岡宏、藤里俊哉、岸田晶夫、白数昭雄、中谷武嗣、服部博行、高野久輝、コーゲン製人工血管のミニブタ大動脈への置換移植、日本再生医療学会総会、p208、大阪国際会議場

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
出願準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし