

図 34 10[gf](1回目)

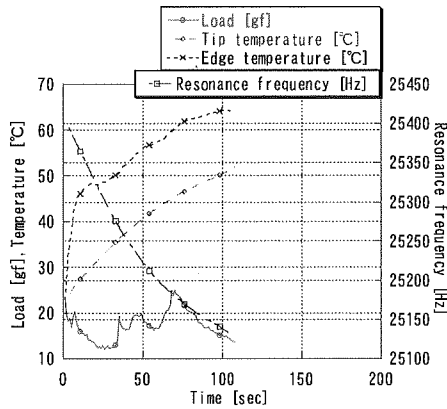


図 35 10[gf](2回目)

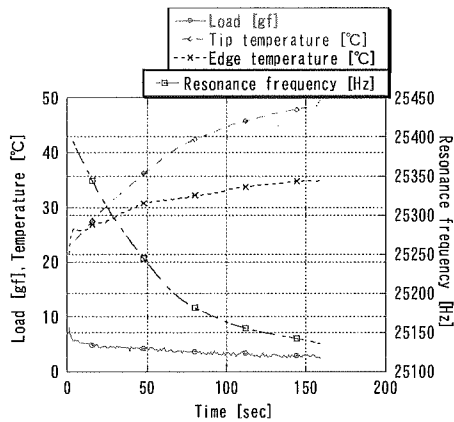


図 36 10[gf](3回目)

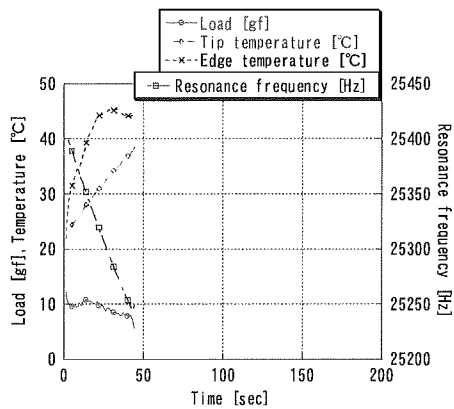


図 37 20[gf](1回目)

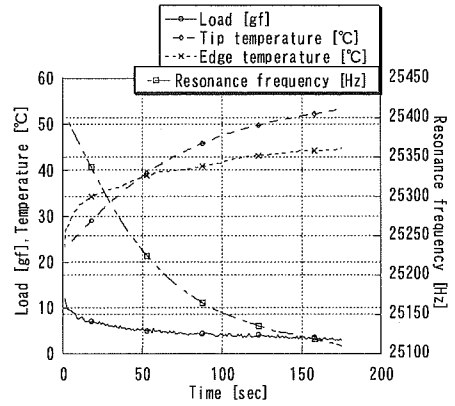


図 38 20[gf](2回目)

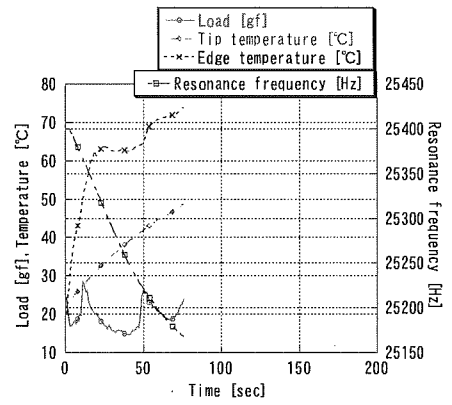


図 39 20[gf](3回目)

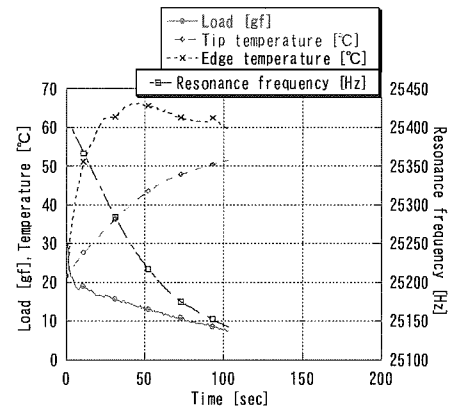


図 40 50[gf](1回目)

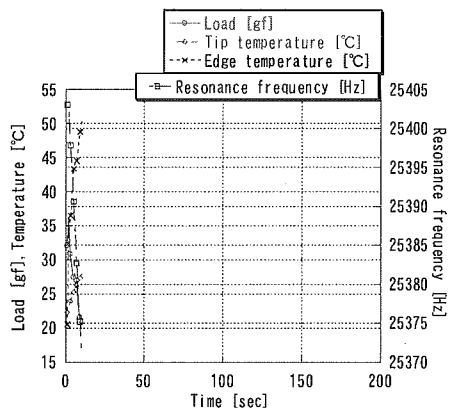


図 41 50[gf](2回目)

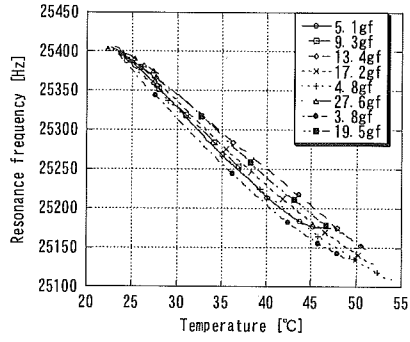


図 42 チップ平均温度と共振周波数の関係

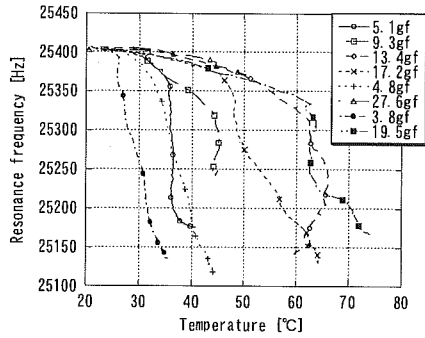


図 43 刃先平均温度と共振周波数の関係

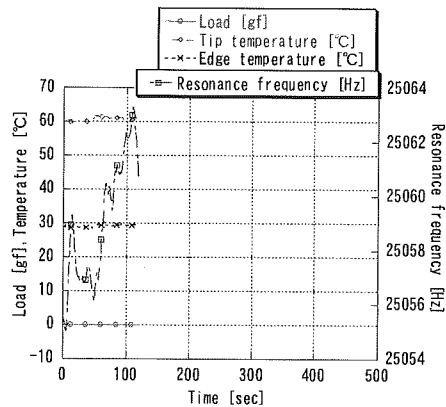


図 44 荷重温度周波数推移(0[gf])

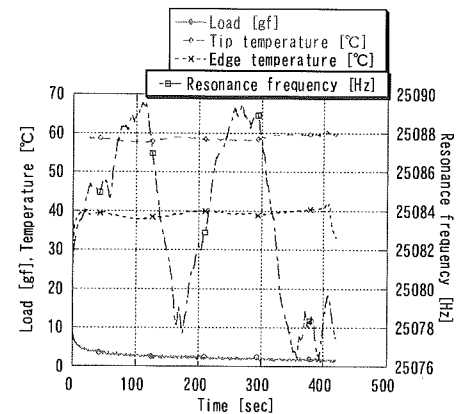


図 45 荷重温度周波数推移(2.5[gf])

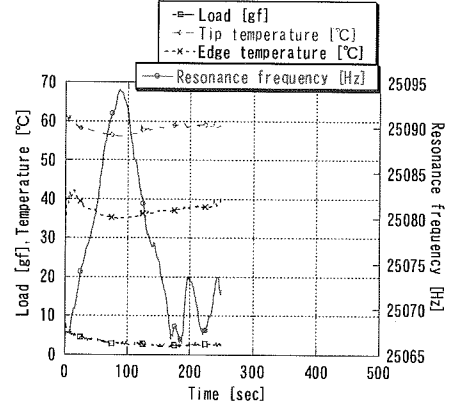


図 46 荷重温度周波数推移(3.2[gf])

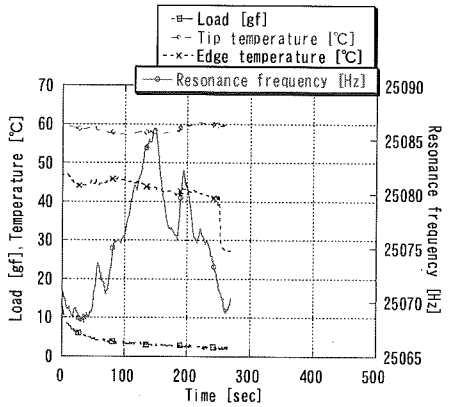


図 47 荷重温度周波数推移(3.7[gf])

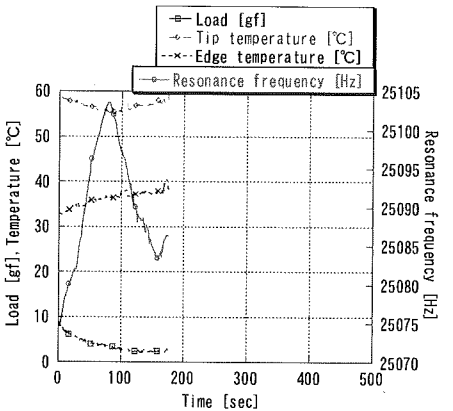


図 48 荷重温度周波数推移(3.8[gf])

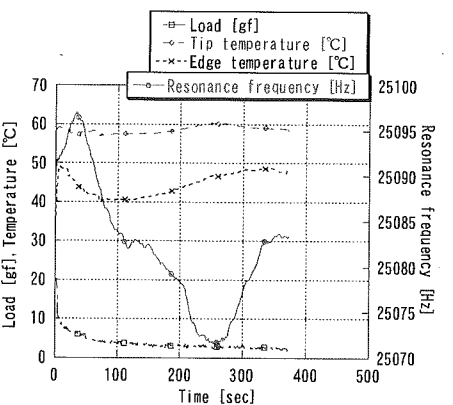


図 49 荷重温度周波数推移(3.9[gf])

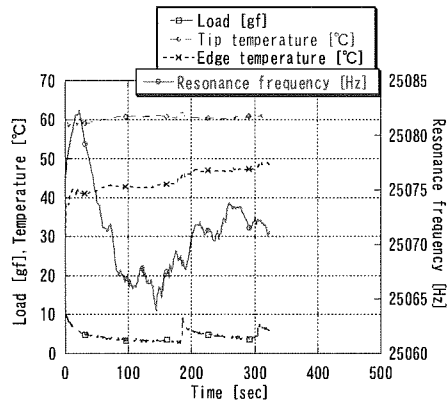


図 50 荷重温度周波数推移(4.5[gf])

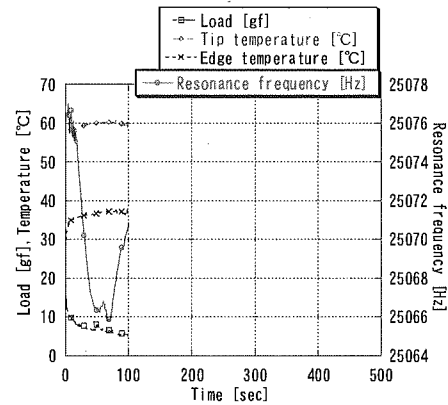


図 51 荷重温度周波数推移(7.3[gf])

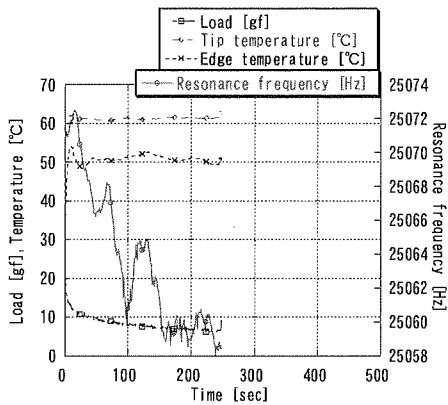


図 52 荷重温度周波数推移(8.4[gf])

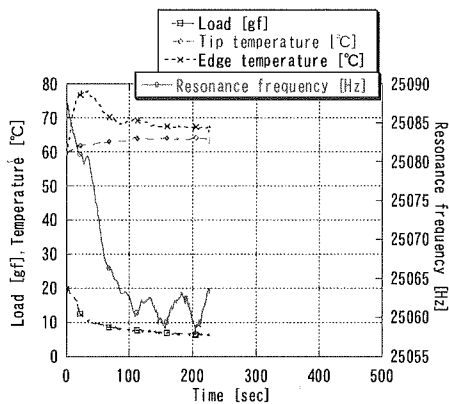


図 53 荷重温度周波数推移(8.8[gf])

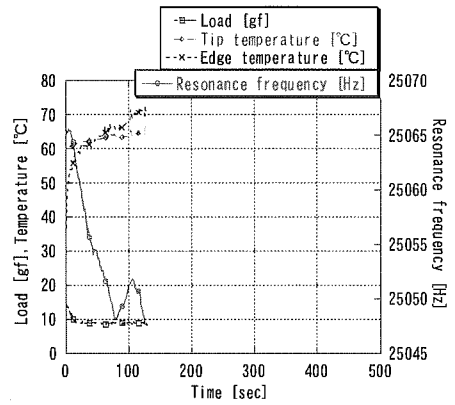


図 54 荷重温度周波数推移(9.3[gf])

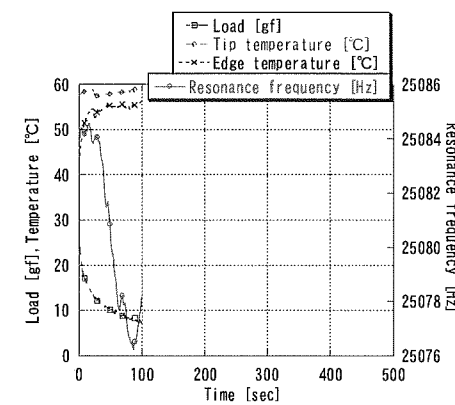


図 55 荷重温度周波数推移(11.5[gf])

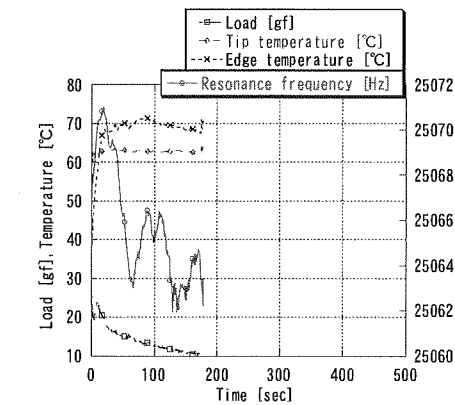


図 56 荷重温度周波数推移(14.3[gf])

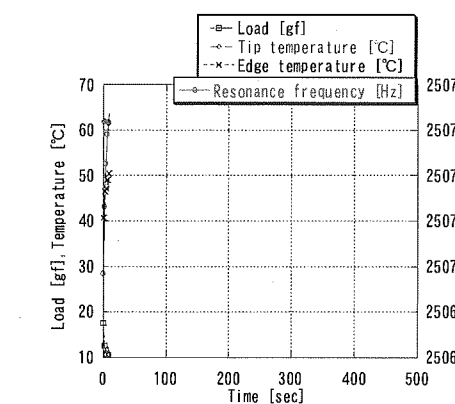


図 57 荷重温度周波数推移(14.8[gf])

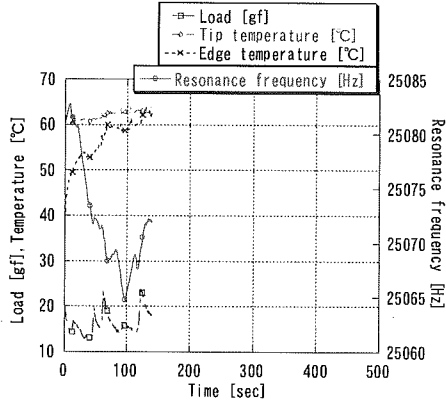


図 58 荷重温度周波数推移(16.4[gf])

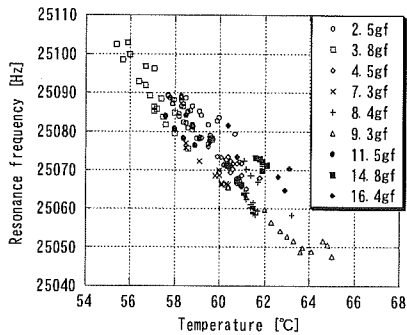


図 59 チップ平均温度と共振周波数の関係

C. 5 温度制御実験

C. 5. 1 無負荷温度制御実験

チップ平均温度推移を図 60 に示す。P 制御の際の目標温度は 40 [°C] とした。

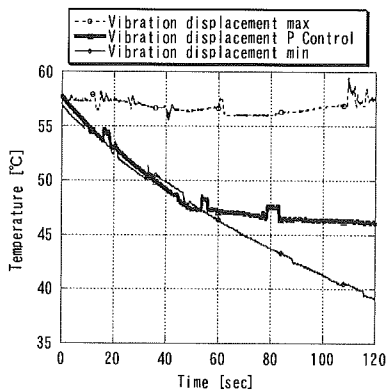


図 60 温度推移

C. 5. 2 振動振幅比例制御実験

チップ平均温度推移を図 61 に示す。チップ平均温度は 3 回目が一番高く、1 回目と 2 回目はほぼ同温度であった。刃先平均温度推移を図 62 に示す。1 回目が一番高く、2 回目は温度が約 55 [°C] に上昇した後約 45 [°C] まで下がった。3 回目は 1

回目、2 回目と比較して温度が低いところで安定した。共振周波数推移を図 63 に示す。1 回目は上限共振周波数より常に高かった。2 回目は一部上限共振周波数より高くなった。3 回目は常に上限共振周波数と下限共振周波数の間であった。振動振幅制御電圧推移を図 64 に示す。0 [%] のとき 0.47 [V] で 100 [%] のとき 0.69 [V] である。1 回目は常に 100 [%] であった。2 回目は一部 100 [%] であった。3 回目は常に 0 [%] と 100 [%] の間であった。

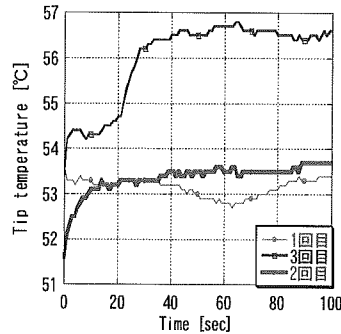


図 61 チップ平均温度推移

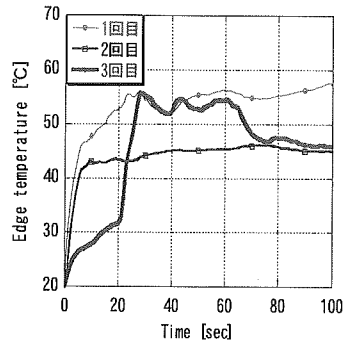


図 62 刃先平均温度推移

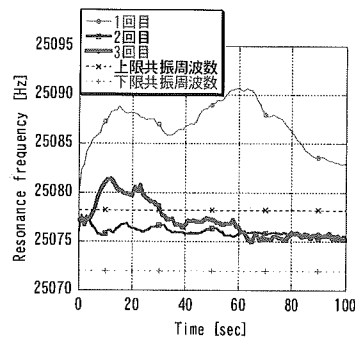


図 63 共振周波数推移

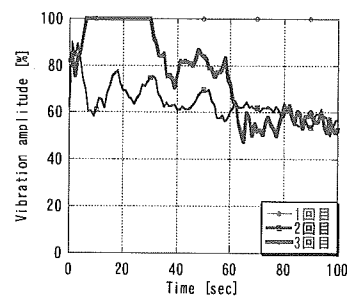


図 64 振動振幅推移

D. 考察

押し付け荷重が無い場合の温度と動作周波数の関係を調べる実験の結果より、チップ温度に対する共振周波数の変化割合がほぼ一定なので、共振周波数を測定することによりチップ温度をある範囲に推定出来る可能性があると考える。

また、押し付け荷重がある場合の温度と動作周波数の関係を調べる実験では、予熱なしの状態を実験を開始すると、チップ平均温度と共振周波数の関係と刃先平均温度と共振周波数の関係より、超音波メスチップの平均温度が常温のとき、刃先を試料に当てると刃先の平均温度が上昇するが、刃先温度以上にチップ中腹(節部分)温度が上昇するため、共振周波数に対する刃先温度、軸方向刃先荷重の影響は小さいことが分かった。そこで、超音波メス制御による手術支援を行うためには、あらかじめチップ中腹温度を安定状態にしておくことが必要だと考える。

超音波メスを予熱した状態から、超音波メスを試料に押し付けた場合、刃先の温度が上昇するとチップ平均温度も上昇し、刃先の温度が下降するとチップ平均温度も下降するという結果が得られた。この結果により、共振周波数よりチップ平均温度を推定し、そこからさらに刃先の温度を推定できる可能性を確認した。また、16.4[gf]以下の軽負荷状態では負荷が共振周波数に影響をほとんど与えないと考える。

比例制御実験により、超音波メスの温度をある一定以上にしないような制御が可能であることが分かった。今回、押し付け荷重と温度上昇の関連を検討したが、対象とする試料が肉片のように柔らかい場合、試料のばらつきもあり、押し付け力と対象物に埋め込まれる割合は必ずしも比例しなかった。温度上昇は押し付け荷重だけでなく、超音波メス先端が試料に囲まれている程度も関係する可能性もあり、生体組織を損傷せずに接着可能とする制御方式確立のためには、今後さらに検討が必要である。

E. 結論

本研究では、生体組織を損傷せずに接着可能なナノ振動装置制御方式の開発の端緒として、クイックタッチ術式を実現するような超音波メス制御方式について検討した。温度に対するTi-6Al-4Vのヤング率、密度の変化、ヤング率と密度より固体の音速を求め、波長一定を条件に音速から共振周波数を求める方法の考案、共振周波数測定回路、

水平方向与圧装置、垂直方向与圧装置の製作、超音波メス無負荷現象観察システム、超音波メス現象観察システム、超音波メス振動振幅測定システムの構築をした。構築したシステムを用いて、以下のことを明らかにした。

- ・クイックタッチ時における超音波メス刃先の上昇温度を計測し、クイックタッチ時には60度以下に温度上昇が抑えられていた。
- ・共振周波数を利用する超音波メス刃先の温度推定方法を提案し、刃先温度と共振周波数の関係を検証した。
- ・共振周波数をもとに振動振幅を調節することで、刃先温度制御が可能であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

	著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	岸田晶夫	生体適合性評価法	樋口亜紺	医療用マテリアルと機能膜	シーエムシー出版	東京	2005	51-60
2	岸田晶夫	人工心臓膜	樋口亜紺	医療用マテリアルと機能膜	シーエムシー出版	東京	2005	82-88
3	樋上哲哉	冠動脈外科のKnack & Pitfalls 2. グraftの準備 2) 内胸動脈(ITA)	竹内靖夫	心臓外科Knack & Pitfalls 冠動脈外科の要点と盲点	文光堂	東京	2005	96-99
4	樋上哲哉	冠動脈外科のKnack & Pitfalls 2. グraftの準備 2) 内胸動脈(ITA) one point ITAの長所と短所 or/with 使用法と吻合のコツ	竹内靖夫	心臓外科Knack & Pitfalls 冠動脈外科の要点と盲点	文光堂	東京	2005	100
5	樋上哲哉	冠動脈外科のKnack & Pitfalls 2. グraftの準備 6) composite graft の適応と作成 one point ハーモニックカルペルの使い方	竹内靖夫	心臓外科Knack & Pitfalls 冠動脈外科の要点と盲点	文光堂	東京	2005	101

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
6	岸田晶夫、木村剛、 草間淳、石丸正臣、 増澤徹、藤里俊哉	微小振動による細胞の接着 制御の検討	平成17年度織 維学会年次大会	60(2)	41	2005
7	A. Kishida, T. Kimura, T. Furuzono, T. Fujisato, T. Masuzawa	NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING	4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society		L II	2005

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
8	岸田晶夫	医療デバイス開発における 医用高分子	第23回医用高 分子研究会講座		38-41	2005
9	能田高行、増澤徹、 樋上哲哉、岸田晶夫、 佐藤裕一郎	Quick touch 術式効果の工 学的評価と超音波メス制御 方式の検討	第3回生活支援 工学系学会連合 大会		42	2005
10	増澤徹、草間淳、 木村孝之、柴田隆行、 岸田晶夫、木村剛	ナノ微小振動と細胞	第3回生活支援 工学系学会連合 大会		80	2005
11	濱口宗志、能田高行、 加藤綾子、岸田晶夫、 木村剛、樋上哲哉、 増澤徹	超音波メス制御による手術 支援に関する研究	ライフサポート 学会 人と福祉 を支える技術フ ォーラム		8	2006
12	伊藤由樹子、 大富美智子、草間淳、 増澤徹、南広祐、 木村剛、藤里俊哉、 岸田晶夫	細胞機能制御を目指した 種々の細胞への機械的微小 振動に関する研究	日本再生医療学 会総会	5(19)	219	2006
13	J. Kusama, T. Kimura, T. Shibata, A. Kishida, T. Masuzawa	Cell function control by nano vibrations	Proceedings of The First International Student Conference at Ibaraki University		211-214	2005
14	T. Shibata, Y. Makita, T. Masuzawa, A. Kishida, E. Makino, T. Mineta	Development of bio-microdevice actuated by piezoelectric thin film for cell culture	5th euspen International Conference		777-780	2005
15	吉田典央、柴田隆行、 水上良明、堀内宰、 増澤徹、岸田晶夫、 峯田貴、牧野英司	細胞機能制御のための圧電 駆動型バイオマイクロデバ イスの開発	2005年精密工学 会秋期学術講演 会		87-88	2005
16	伊藤圭介、柴田隆行、 水上良明、堀内宰、 増澤徹、峯田貴、 牧野英司	オンチップ細胞サージェリ ーシステムのためのナノニ ードルアレイの開発ーシリ コンのドライエッチングの 評価ー	2005年精密工学 会秋期学術講演 会		93-94	2005

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
17	高橋洋一、柴田隆行、水上良明、堀内宰、増澤徹、峯田貴、牧野英司	ニッケル電鍍金型を用いたマイクロプリント技術の開発	2005年精密工学会秋期学術講演会		117-118	2005
18	吉田典央、柴田隆行、堀内宰、増澤徹、岸田晶夫	細胞機能制御のためのMEM細胞加振デバイスの開発	電気学会研究会ーリニアドライブ研究会ー		57-60	2005
19	樋上哲哉	21世紀の冠動脈バイパス術 2. off-pump CABG (OPCAB) を検証する OPCAB 時代における各種グラフトの特徴と採取法	HEART nursing	18 (3)	301-306	2005
20	K. Takasaki, T. Kimura, T. Masuzawa	Development of two-dimensional magnetic sensors for characteraization of magnetic levitated motors	Proceedings of The First International Student Conference at Ibaraki University		219-222	2005
21	高崎慶吾、木村孝之、増澤徹	モーターの制御を目的とした二次元集積化磁気センサ読み出し速度の向上に関する研究	平成 17 年度 電気学会東京支部茨城支所研究発表会		75	2005
22	高崎慶吾、木村孝之、増澤徹	磁気浮上モーターの特性評価を目的とした二次元磁気センサの計測	電気学会研究会ーリニアドライブ研究会ー		35-38	2005
23	樋上哲哉、花田智樹、本多 祐、今井健介、清水弘治、金築一摩、坪島顕司、西尾 渉	Total arterial graft による冠血行再建術の問題点 -All in-situ grafting の功罪-	第 35 回日本心臓血管外科学会学術総会		173	2005
24	樋上哲哉	CABG における RITA の最大有効活用法と ITA sequential bypass のツボ	第 35 回日本心臓血管外科学会学術総会		148	2005
25	Asakawa T, Funakubo A, Fukunaga K, Taga I, Higami T, Kawamura T, Fukui Y	Development Of An Implantable Oxygenator With Cross Flow Pump	51th ASAIO (American Society for Artificial nternal Organs)			2005

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
26	Taga I, Funakubo A, Higami T, Kawamura T, Fukui Y	Study On Evaluation Of Artificial Implantable Lung Design	51th ASAIO (American Society for Artificial nternal Organs)			2005

第3章 生体適合性評価法

岸田晶夫*

1 はじめに

医用材料の基本条件¹⁻³⁾は、最小限の生体機能代行性と生体安全性（非毒性）、および生体適合性の3つである。前2者は不可欠条件であり、今日のほとんどすべての材料はこれらの最低レベルを満足している。一方、生体適合性は必ずしも必須ではない。優れた特性を持っている材料でも、生体適合性が不十分なために医療に応用できない場合もあると言われ、これまでに多くの研究が行われてきた。しかしながら、今日では医用材料の生体適合性についての議論は拡散している感がある。これは開発される医療材料が、従来の汎用的なものからより合目的なものに特化されているためである。このような現状をふまえて、生体適合性についての考え方から新しい評価法について紹介する。

2 生体-材料間の反応と生体適合性

医療用材料（バイオマテリアル）は、損傷あるいは失われた組織の機能を代行・改善するためには、生体内に設置されたり、チューブと連結されて生体外で器官の機能代行をしたりする。バイオマテリアルを用いるためには、それが生体内であれ生体外であれ、最初に生体組織を傷つけなければならない。生体組織が傷つけられる、または破壊されると、周辺の細胞は創傷治癒反応を開始する。創傷への急性反応は炎症反応である。白血球は創傷部位において、侵襲と感染に対して防御反応を起こす。損傷組織によって放出される化学メディエータが白血球を集合させ、炎症反応の引き金となる。炎症のこの第1段階は急性炎症と呼ばれる。この段階にかかわる白血球の大部分は好中球である。次の第2段階は慢性炎症である。単球と呼ばれる白血球は炎症部位に移動し、成熟してマクロファージとなる。治癒に不利な異物反応がなく、さらに感染が全くない場合には、炎症反応は軽微なものとなる。その後、創傷治癒が開始され肉芽組織が形成される。移植されたバイオマテリアルがマクロファージと異物巨細胞で覆われるようになるとき、一般的には肉芽組織形成から線維組織による被包化が進行し、最終的にカプセル化によって周辺組織と隔

* Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

離される。肉芽組織やカプセル化などの創傷治癒部が形成される程度は、周囲の組織と注入される材料、その表面特性、および細胞の再生能に依存する。この正常な治癒過程が進行する場合、生体内に移植されたバイオマテリアルを「生体適合性である」と呼ぶことができる。一方、材料の化学的、物理的特性あるいは移植部位での材料の動きによって慢性炎症が引き起こされる可能性もある。それらの反応は細胞の損傷をもたらすので、炎症反応のための引き金が引き続けられ、その結果、炎症が持続する。このように、「生体適合性」は材料と生体組織の間の反応を決定するための用語であり、かつ生体システムとバイオマテリアルの相互作用の結果であると説明される。

3 生体適合性の定義

生体適合性は定義が難しいが、通常、「材料が特定の用途について、適切な宿主反応の範囲内で効果を発揮する能力のこと」と定義されている⁴⁾。また、他の表現では、「生体に対して全影響を与えない（少なくとも観察している時間範囲内で）物質は生体適合性である」と表される⁵⁾。また、我々がどのようにバイオマテリアルを使用したいかによって、バイオマテリアルの生体適合性の定義は異なる。「細胞接着性」について例をあげれば、バイオマテリアルが組織に植えつけられるのであるなら、そのバイオマテリアルに対して細胞が接着し、増殖できることが生体適合性の要件であると考えられる。一方、血液に接触するのであれば、血液細胞が接着しないことが生体適合性の要件である場合と、早期に内皮細胞の接着と増殖が必要である場合の相反する特性のいずれもが生体適合性の要件となる場合もある。他の見方をすると、バイオマテリアルと組織界面が使用されている期間内で安定しているとき、そのバイオマテリアルは生体適合性であると言える。界面（インターフェイス）が不安定であると、刺激、炎症、損傷、免疫源性、発癌源性、毒性、変異源性または発癌性などの反応の惹起が懸念され、そのバイオマテリアルは「生体非適合性である」と定義される。このように種々の生体適合性についての考え方があり、その評価法・試験法については、それぞれの状況に応じたものを選択する必要がある。

4 生体適合性試験法

一般に、細胞や器官などで構成される生体システムと関連して用いられるいずれの分子、材料、またデバイス（機器）も、臨床応用する前に生体システムへの効果を試験しなければならない。実際に市販される（されている）バイオマテリアルに関しては、生物学的適合性の試験は高度に規制されている。しかしながら、この試験では「生体適合性」という単語は「無毒性」と同じ高

で使用される。一般に、生体適合性試験を実行するための方法のガイドラインが、ASTM 特別部会 F04 や国際標準化機構 (ISO) の第 194 技術部会 (TC194) による規格の中で議論されている。ISO 10993 規格に基づいて、米国の食品医薬品局 (FDA) は米国とヨーロッパでの主な試験法を統一した。また、日本の当局は医療機器の毒物学的な試験試行のための国際向けガイドラインを発行している。このドキュメントは Medical Materials の Basic Biological Tests と Devices 3 のための Guidelines として非公式の翻訳で利用可能である⁶⁾。それは ISO 10993 と構成と内容について共通部分をもっている⁷⁾。

試験法としては、生体外 (*in vitro*) と生体内 (*in vivo*) で評価する二法がある。通常は *in vitro* 試験から実施する。いくつかの試験法で、材料と細胞が直接に接触した状態で試験される。直接接触法の利点は、簡便であり、生体内移植において細胞が材料に接触している状況のための最高のモデルであるということである。他の試験法では、材料は最初に液体で抽出され、その抽出液について試験される。用いられる状況 (臨床) または材料の特質によって、使用される抽出法は異なっている。一般に、2 種の溶媒 (1 つは極性溶媒、もう 1 つは非極性溶媒) が使用される。これらの試験は、細胞毒性、免疫系への刺激 (特にアレルギー)、慢性炎症の惹起、血液と血液成分への影響、および変異源性と腫瘍形成を含む遺伝因子への効果について検討するようにデザインされている。

In vitro 試験で問題がなかった場合は、続いて *in vivo* 試験が必要である。これは動物を用いて安全性評価と機能評価を行うものである。硬組織バイオマテリアル (人工関節や人工骨) を試験するためには、試験に必要な十分量の緻密骨を得るために犬や羊が必要になる。他のバイオマテリアルに関しては、初期の通常の移植部位は皮下である。マウス、ネズミおよびモルモットを使用し、線維性カプセルの厚さ、バイオマテリアル周辺の炎症などが調査される。また、安全性評価に特化した生物学的安全性評価は、すべての新しいバイオマテリアルで必要であり、これまでに用いられているバイオマテリアルでも新しい目的で使用される場合は必要となる。

5 生体適合性試験の新局面

バイオマテリアル-生体組織間の相互作用はさまざまな疾病の状態と治療に関連している。最近、バイオマテリアル-生体組織間の相互作用は、再生医工学や生体工学と呼ばれる領域で注目されている。この領域では、バイオマテリアルは、恒久的足場材料、生体内分解性足場材料、ドラッグデリバリー用デバイス、およびバリアー材料として利用される。生体適合性の研究の先端領域では、研究者は生体適合性の新局面に直面する。バイオマテリアルが生体内でどのように動くかを知ることができれば、生体適合性の分子論的な背景が明らかになり、これを基盤に新しい

バイオマテリアルを設計することができるかと期待できる。生体とバイオマテリアルの相互作用を分子レベルで理解するために、分子生物学の成果を利用した新しい評価法が提案されている。下に、これらの新しい技術の一端を紹介する。

材料と生体との相互作用は大別すると次のように分類できる。分子レベル（界面物性）、タンパク質レベル（吸着および変性）、細胞レベル（接着、増殖、機能発現）および生体レベル（動物実験）の4つである。多くの研究のうち、材料に生理活性物質（タンパク質やペプチド）を結合させた材料についての生体との相互作用、いわゆる特異的な相互作用の研究は一応の成果をあげているが、大多数の材料で問題となる非特異的相互作用を主とする細胞の認識については、細胞の接着や形態変化などの初歩的な評価にとどまっている。

生体との相互作用を検討する一手法として、材料表面上への細胞の接着・増殖について観察する方法がある。これは表面の物理化学的性質が細胞接着や増殖におよぼす影響を、表面処理技術を用いて種々の表面性状の材料を調製し、細胞を播種して接着細胞数の計測や形態を観察して材料のおよぼす影響を明らかにしようとするものである。これまでに、細胞の接着・増殖について大まかに材料表面の物理化学的特性で整理できることが明らかになっているが、一方で例外的な結果が得られる場合もあり、結果の解釈が困難なことも多い。生理学的な立場からは、細胞接着はフィブロネクチンなどの接着タンパク質を仲介して説明される。一方、それらの接着タンパク質に依存しない細胞接着も存在している。いわゆる無血清培養における細胞培養はすべてその通りであるが、接着性タンパク質の存在しない環境でも細胞は多種多様な接着を行う。それらはいわゆる「非特異的相互作用」として説明されていた。「非特異的相互作用」とは、物理化学的相互作用が代表的なもので、例えば同じ表面自由エネルギーの材料であれば、同じタンパク質の吸着量、細胞接着を示すというものである。これはコロイド科学的な解釈であり、接着の初期（30分～120分）では比較的適合する。しかし、必ずしも表面自由エネルギーで整理できるとは限らず、その場合には他の非特異的相互作用の影響（例えば電荷など）を組み合わせ、現象の説明を行っている。

このような「非特異的相互作用」を理解するためには単純な表面を作成して細胞の反応を調べる必要がある。しかし、表面自由エネルギーを一定にして電荷量を変化させるなどの改質は非常に難しい。一方、材料ではなく細胞に着目すると、細胞が材料をどのように認識しているかを直接調べた例はほとんどない。細胞の反応を接着や増殖などのマクロな解析だけでなく、最新の細胞生物学の手法を用いてミクロな反応を検討できれば、生体側の材料認識のメカニズムを明らかにできる可能性がある。それを用いて材料設計の指針を得られれば、新規材料設計も容易に行える。細胞が材料と接触すると、情報収集（レセプターの活性化）-状況認識（細胞内カスケードの活性化）-対応策策定（転写因子活性化）-対応準備（転写・タンパク質合成）-対応策実施（タ

タンパク質機能発現・接着)の一連の反応が細胞内で起こる。細胞の接着や増殖というのは最終の応答実施段階を観察しているわけであるが、その前段階の情報についての研究はほとんどない。ここでは材料と生体との相互作用のうち、特に非特異的相互作用について、細胞内の細胞の遺伝子レベルで理解することを目的とした評価法を検討した。

6 遺伝子発現評価について

材料に対する細胞の反応を遺伝子発現で評価するためにはいろいろな手法が考えられる。直接に発現遺伝子を知るにはノーザンブロット法が適している。しかし、ノーザンブロット法は大量の細胞を必要とするため、大表面積の細胞接着用材料が必要である。材料開発のための基礎検討には、簡便に大量のサンプルを処理できることを第一に考える必要がある。このような条件に適合する逆転写酵素を用いたポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR 法) による遺伝子発現評価法を用いた。

PCR 法は Polymerase Chain Reaction の略で、Mullis らによって 1985 年に発表された技法である⁹⁾。PCR の原理は DNA ポリメラーゼ反応を利用した DNA の増幅反応の繰り返しであり、DNA の熱変性、プライマーとのアニーリングおよび伸長反応を 1 サイクルとして、この DNA ポリメラーゼ反応を n 回繰り返すことで 2^n 倍に DNA を増幅する。このため非常に高感度であり、極微量のサンプルからでも検出が可能である。mRNA 発現を PCR 法によって解析するには、mRNA を逆転写酵素で変換した cDNA を鋳型にする。この方法は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法と呼ばれる^{9~11)}。

また、解析対象としては、熱ショックタンパク質 (Heat-Shock-Protein (HSP)) に注目した。HSP は、生物がそれぞれの育成温度より高温の環境にさらされると (熱ショック) 特異的に発現量が多くなる一群のタンパク質として発見された。しかしその後、熱ショックばかりでなく、遷移金属・酸化的ストレス・生体内での虚血・炎症・分化誘導試薬などのさまざまなストレス因子によっても誘導されることがわかり、より一般的にストレスタンパク質と呼ばれている。HSP には多くの種類があり、その分子量に由来した命名がされている。HSP70 は最も一般的な HSP であり、熱ショックをはじめとするさまざまなストレスに対応して発現する。HSP47 は近年、細胞接着や組織修復に重要な役割を果たしているコラーゲンの特異的分子シャペロンであることが明らかにされた。これらの HSP はそれぞれの刺激に対して迅速に発現されることから、材料と接触した細胞の応答を見積るために有用と考えた。

7 HSP mRNA 発現評価^{12~17)}

HSP 発現評価では、HeLa 細胞を用い、種々の材料上の播種した HSP 遺伝子の発現を解析した。図 1 に各高分子材料上で 24 時間培養後の HSP70B の相対的な発現量を示す。HSP70B のようなストレスに対する細胞の応答の指標を表す最も一般的な熱ショックタンパク質である HSP70B の発現量は組織培養用ポリスチレン (TCPS, No.7) を境として発現量に大きな差異が生じており、TCPS より親水性の材料では発現が大きく誘導され、ポリエチレン (PE)、シリコン膜 (SilasticTM)、フッ素系高分子 (6F) などの疎水性の高い材料では TCPS とほぼ同程度の発現量を示した。

これより HSP70B は親水・疎水の異なる材料に対して、それぞれ異なる発現挙動を示すことが分かる。TCPS 上に接着した細胞に熱処理 (45°C, 20min) した場合の発現量と比較する。親水性の材料に接着した細胞は、熱処理時と同程度の刺激を受けていることがわかる。また、疎水性の材料では TCPS や疎水性の材料と比較して細胞の接着数は少ないにも関わらず、細胞に対して HSP70B 発現の刺激を与えていると考えられる。さらに細胞接着数 (性) と HSP70B の発現結果を比較すると、NaSS-g-PE (p-styrenesulfonic acid sodium salt (NaSS) を表面グラフト重合した PE) と TCPS、ナイロンと疎水性材料 (PE, SilasticTM, 6F) は同じような細胞接着数を示しているにも関わらず、HSP70B 発現挙動には明らかな差異がみられ、両者の間に相関関係は見られなかった¹²⁾。

このように高分子材料に接着・接触した細胞の HSP 発現評価では、疎水性の材料で発現が低

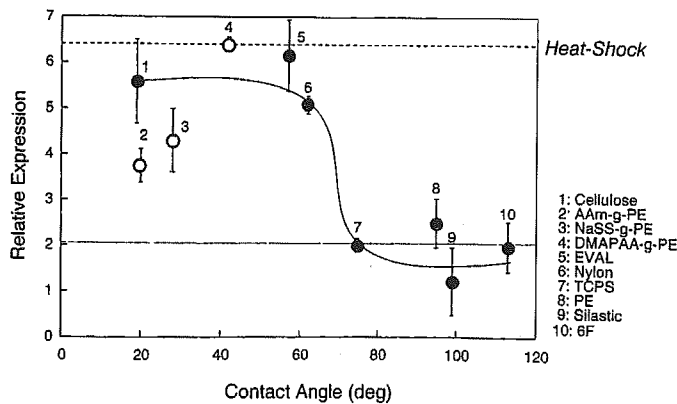


図 1 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in HeLa S3 cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S. D., n = 3)

● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

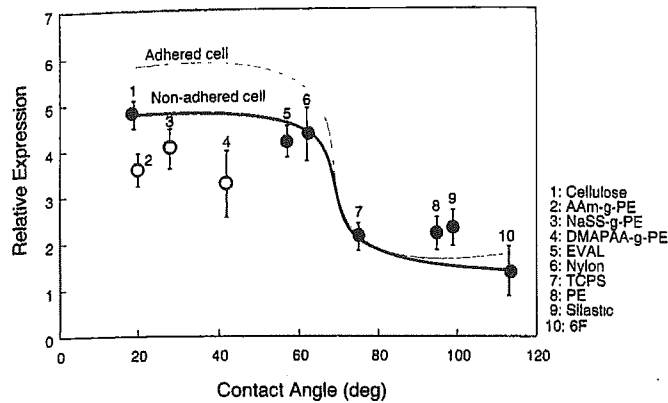


図2 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in non-adhered cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S.D., n=3)
 ● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

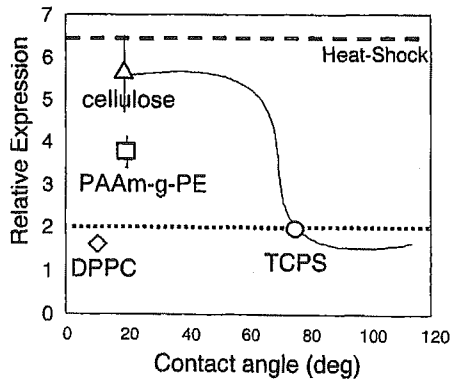
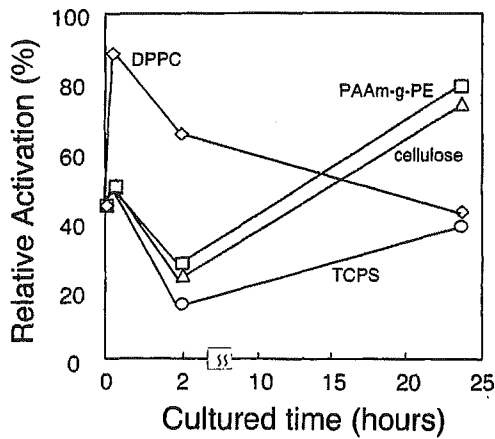
親水性の材料で発現が高い結果が得られた。しかし、これら一連のHSP発現のシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸脱着などが動的な環境に置かれ、材料表面と直接接したり離れたりを繰り返し、周りの環境が刻々と変化していることが刺激になっているとも考えられる。同様の考察が由井らによって報告されている¹⁸⁾。これより、材料上の吸着タンパク質と同様に、材料表面の物理化学的性質もHSP発現に直接的な役割を果たしていると考えられる。

また、同じ時間だけ材料と接触していても接着しない細胞が存在する。特に非電荷親水性材料では大多数の細胞が接着していない。これらの非接着細胞のHSP70BのmRNA発現を調べた結果が図2である。一見して、接着細胞と同様の傾向を示していることが分かる。すなわちHSP70B遺伝子の発現と細胞接着は直接には関係がなく、細胞は材料に触れただけでも認識を行っていることになる。

図1, 2では材料の水濡れ性(対水接触角)で材料を整理しているので、物理化学的性質がHSP70B遺伝子発現のパラメータのように思われる。表面自由エネルギーでHSP70B遺伝子の発現が制御されているならば、これはある種の特異的相互作用と考えることもできる。事実は単純ではないだろうが、このような材料の性質が複数の非特異的相互作用を同時に発揮するのであれば、ここで観察された細胞の反応もそれぞれの材料に対して特異的なものと考えられることを著者らは提案している。

8 転写因子発現評価¹⁹⁾

上記のような仮説を確かめるため、mRNA発現より早期の細胞反応を解析するために転写因子に注目した。代表的な転写因子であるNF- κ Bは、外界刺激を受けた際の一次反応のスイッチとして機能していると考えられており、細胞と材料の相互作用解析に有用であると考えられた。図3にNF- κ B発現の時間変化を示す。脂質(DPPC)膜上では初期に発現が見られるが、その後減少し、正常レベルに戻る。一方、脂質膜と同じ親水性表面であるセルロースやアクリルアミドグラフト表面では、経時的に発現量が増加していることが分かる。この結果から、同じ親水性表面を持つ材料でもそれを構成する分子種の違いにより、生体反応が異なることが示され



PAAm-g-PE
 TCPS DPPC cellulose
 Evaluation of HSP70B mRNA expression

図3 Gel shift assay of NF- κ B in HeLa cells adhered to various surfaces.
 (□) PAAm-g-PE, (○) TCPS, (◇) DPPC, (△) cellulose

第3章 生体適合性評価法

高分子材料に接着・接触した細胞のHSP発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性材料で発現が高い結果が得られた。一方、同じ親水性材料でも脂質膜と他の高分子では細胞の反応が異なることがNF- κ B発現評価から示された。これらのシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸脱着などが動的環境におかれ、材料表面と直接に接することや、周囲の環境が刻々と変化していることが刺激になっているとも考えられる。今後、より詳細な検討が必要である。

9 おわりに

遺伝子発現評価および転写因子発現評価の他にも細胞機能発現によって生体適合性の指標とすべし試みが報告されている^{20, 21)}。これは材料に接触した細胞が細胞-細胞間連絡のためのギャップジャンクションを形成するか否かによって判定するものである。遺伝子およびタンパク質を用いたこれらの新しい方法が、生体内での適合性とどのように相関しているかはこれからの研究の積み重ねが必要である。そのためには、ゲノム、プロテオーム解析の進展による情報を常に参照し、また動物を用いた適切な評価系を構築する努力が必要である。非毒性が最低の必要条件で満たした医用材料について「生体適合性」がそれに加わる日が遠からず来ると考えられる。わが国医用材料・バイオマテリアルを国際的に通用するものにするために不断の努力が必要である。

文 献

- 筏義人, バイオマテリアル-人工臓器へのアプローチ, 日刊工業新聞社 (1988)
筏義人, 医用高分子材料, 共立出版 (1989)
D. F. Williams ed. Fundamental Aspects of Biocompatibility, Vols. I, II, CRC Press, Boca Raton (1981)
D. F. Williams, Definitions in Biomaterials, Elsevier, Amsterdam (1987)
J. H. Boss, Biomaterials and Bioengineering Handbook, D. L. Weiss (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (2000)
Guidelines for Basic Biological Tests of A Medical Materials and Devices. Unofficial translation of Japanese guideline.
<http://www.iso.ch/iso/en/ISOOnline.frontpage>,

医療用マテリアルと機能膜

<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/05/001.html>

- 8) K. Mullis, and F. Fallona, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 155 (1987)
- 9) D. A. Rappolee, C. A. Brenner, R. Schultz, D. Mark, and Z. Werb, *Science*, **241**, 1823 (1988)
- 10) 石川冬木, *実験医学*, **8**, 1117 (1990)
- 11) 船渡忠男, 刀祢毅, 宮地勇夫, 石森章, *臨床病理*, **41**, 197 (1993)
- 12) A. Kishida, S. Kato, K. Ohmura, K. Sugimura, M. Akashi, *Biomaterials*, **17**, 1301 (1996)
- 13) S. Kato, T. Akagi, A. Kishida, K. Sugimura, M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **8**, 809 (1997)
- 14) S. Kato, T. Akagi, A. Kishida, K. Sugimura, M. Akashi, *Biomaterials*, **19**, 821 (1998)
- 15) A. Kishida, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, *et al.*, *Chem. Lett.*, 1267 (1999)
- 16) S. Kato, T. Akagi, K. Sugimura, A. Kishida, M. Akashi, *Biomaterials*, **21**, 521 (2000)
- 17) S. Kato, A. Kishida, M. Akashi, I. Maruyama, *J. Biomater. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **11**, 333 (2000)
- 18) N. Yui, K. Suzuki, T. Okano, Y. Sakurai, C. Ishikawa, K. Fujimoto, and H. Kawaguchi, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **7**, 253 (1995)
- 19) A. Kishida, T. Matsuyama, I. Kitajima, I. Maruyama, M. Akashi, *Biomaterials*, **22**, 541 (2001)
- 20) R. Nakaoka, T. Tsuchiya, K. Kato, Y. Ikada, A. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 391 (1997)
- 21) T. Tsuchiya, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **11**, 947 (2000)

第3章 人工心臓膜

岸田晶夫*

1 はじめに

心臓移植はこれまでに世界で6万例以上が実施されており、また我が国でも致死性の心疾患の治療法として、成功を納めつつある。世界での例では80%以上の人が1年以上、半数の人が9年以上生存するなど高い成績を残している。しかし、日本だけでなく欧米でもドナー（提供者）の不足が問題となっており、また移植実施時期を決めることもできないなどの問題もある。これらを解決する手段として人工心臓が考案され、心臓移植に代わり得るシステムの開発が進められている。人工心臓については長年の研究が続けられており、我が国もその開発の一翼を担っている。これまでの開発の過程や臨床応用について、素材の一つである膜素材の観点から紹介する。

2 人工心臓と血液ポンプ

心臓の機能は、全身の血行を制御することである。この機能を代行するためには血液（液体）を輸送するためのデバイスが必要であり、これらは「(血液)ポンプ」と呼ばれている。一般的な開心術では、回転するローラーがその円周上に配置されたチューブをしごくことによってチューブ内の血液を送り出す「回転ローラー式血液ポンプ」が用いられている。ローラー式血液ポンプは取り扱いが簡単で広く用いられているが、血液に与える損傷が大きく、また体外に取り出す血液量も多いため長期の循環に用いることはできない。人工心臓は開心術のような数時間でなく、より長期の血液循環維持を目的とした血液ポンプシステムの総称である。すなわち、人工心臓は、血液ポンプ、心臓弁（無い場合もある：後述）、駆動装置、制御装置などから構成されており、材料工学、電気電子工学、情報工学、流体力学、機械工学などの工学技術が結集されている。狭義では血液ポンプを指して人工心臓と呼称する場合もある。

* Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授