

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、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いなければならない。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、発熱源性、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

第3章 生体適合性評価法

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 特別委員会 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きた。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方法を統一した。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 Directives 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 と構造的な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動物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。これは動物を用いた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が必要であり、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働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。以下に、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）、バク質レベル（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（生体実験）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挙げているが、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うであるが、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が得られれば、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

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増殖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されていない。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、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 遺伝子の発現を調べた。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、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を生じており、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℃, 20min) した場合の発現量と比較すると、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) を表面にアクリルアミド重合した 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

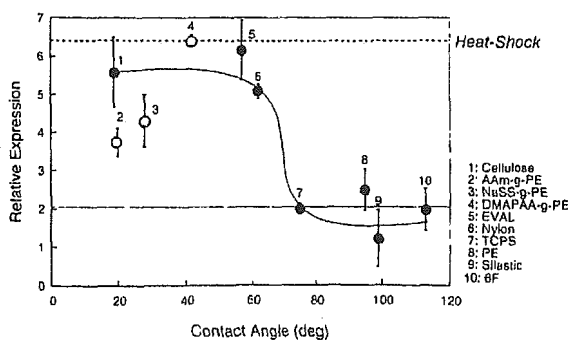


図 1 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in HeLa S3 cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S. D., n = 3)
 ● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

第3章 生体適合性評価法

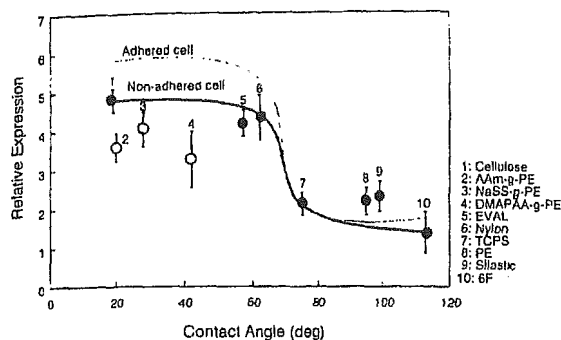


図2 Evaluation of HSP 70B mRNA expression in non-adhered cells as a standard of β -actin by RT-PCR method. (mean \pm S.D., n=3)
 ● : Solid Surfaces ○ : Grafted Surfaces

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す、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¹⁶⁾。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

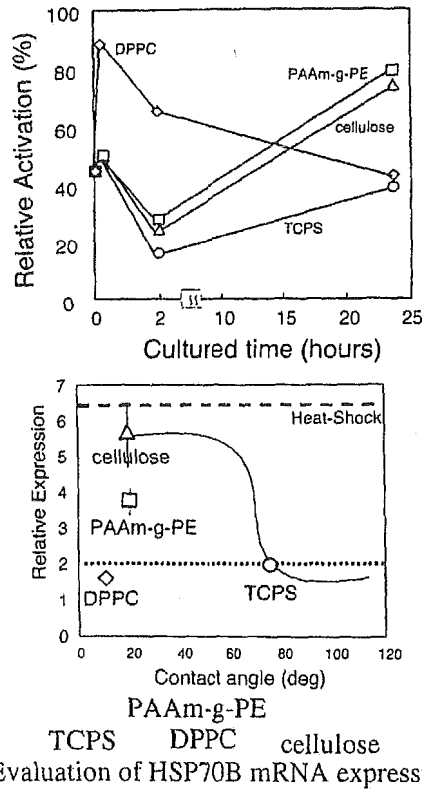


図3 Gel shift assay of NF- κ B in HeLa cells adhered to various surfaces.
 (□) PAAm-g-PE, (○) TCPS, (◇) DPPC, (△) cellulose

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形式が報告されている^{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関連しているかはこれからの研究の重点が必要である。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あっ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はなく、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

3. 人工心臓の分類

人工心臓には多くの分類法がある。まず、患者の心臓を取り去るか否かによって、二つに分けられる。心臓の働きが落ち、重い心不全となった患者の心臓を取り除き、同所性に埋め込んで心臓の働きを代行する「全置換型人工心臓 (total artificial heart : TAH)」と、重症の心不全になった患者の心臓はそのまま残し、その働きを助ける「補助人工心臓 (ventricular assist system (VAS) あるいは～device (VAD))」である。VASもしくはVADは主として左心室を補助するものが多く、この場合 Left ventricular assist system (LVAS) あるいは～device (LVAD) と

また、用いるポンプの型によってもいくつかの種類がある。図1に示すように、大きく分ける。生体の心臓と同じように鼓動を生じる「拍動型」と、拍動を生じない「無拍動型」の2つがある。拍動型の場合、体積変化を生じるための仕組みと血流の方向を定める弁からなっており、ポンプを2つに分割する膜が、一方の空間の圧力変化により他方の空間の血液を弁によって定められた方向に押し出すことでポンプとしての機能を果たす。このタイプには「ダイアフラム型」「サック型」「チューブ型」「プッシャープレート型」などがある。さらに、これらの体積変化を駆動する方式によって「空気圧方式」、「電気-機械方式」および「電気-流体方式」に分類される。「空気圧方式」は、空気圧の差を利用して膜やチューブを動かし、血液を送り出す。「電気-機械方式」は、モーターの回転運動を往復運動に変えて血液の拍出を行う。この方式には電磁石を利用して往復運動を作り出す「ソレノイド駆動法」もある。「電気-流体方式」は、電動ポンプによる油圧で動作させる。用いるオイルとしてはシリコンオイルなどが使用される。一

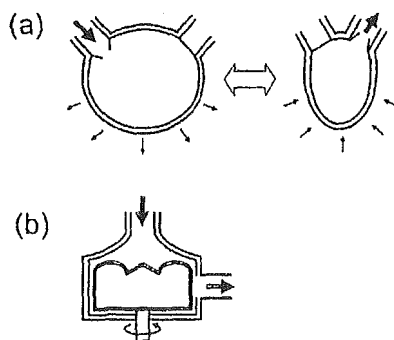


図1 (a)拍動型血液ポンプの概念図
(b)無拍動型血液ポンプの概念図

方、無拍動型の場合、回転するらせん型スクリューによる「軸流ポンプ型」と、フィン付きローターが回転し、遠心力によって円周方向のポートから外部に血液を送り出す「遠心型」がある。無拍動型では人工弁が必要ないので、拍動がなく、さらに小型化が可能である。

血液ポンプが設置される位置による分類法もある。血液ポンプだけでなく、駆動部、制御部およびバッテリーなどすべてのシステムを体内に埋め込み、電気エネルギーを外部からアンテナで供給しバッテリーに充電させる仕組みを備え、体の内外をつなぐものが何もない「完全埋め込み型」、バッテリーなど一部を体外に置くものそれらを体に携帯できる「携帯型」、血液ポンプだけを埋め込んでその他のシステムは体外に置く「体外設置型」がある。完全埋め込み型以外は、生体の内と外をつなぐデバイスが必要であり、これを「経皮デバイス」という。人工心臓のこれまでの臨床例では、経皮部からの感染が原因で循環補助ができなくなる場合が非常に多く、優れた経皮デバイスの開発が望まれている。

4 開発の歴史^{1, 2)}

1957年に日本の阿久津博士と米国のコルフ博士によって、米国において「全置換型人工心臓」の動物実験が行われた。翌年には米国のクセロー博士が「補助人工心臓」の実験を行った。1962年には、ローラーポンプを用いた左心室の補助が行われ、1963年には、補助人工心臓による左心室補助の臨床応用が行われた。また、全置換型人工心臓は1969年、心不全の患者に対し、心臓移植が実施できるまでの期間を補助する“ブリッジ”（つなぎ）として臨床応用が開始された。これが現実的な臨床応用となったのは、1980年代に開発されたジャービク博士のJarvik-7型である。この最初の試みは620日間の補助に成功したが、最終的には患者の体内のポンプユニットと体外の駆動ユニットをつなぐデバイスを通したバクテリアによる感染症が原因で終結した。そして、1988年には電気駆動の完全埋込型人工心臓の研究がAbiomed社で開始され、2001年にFDAはAbioCor™の臨床応用を承認した。これは患者と体外のコンポーネントを結ぶチューブ類がない、完全な埋込型の人工心臓である。この人工心臓の血液接触部分であるダイアフラム膜と心臓弁はポリウレタンエラストマーであるAngioflex™で作られている。さらに、2004年にはJarvik-7から発展したCardioWest TAHがFDAから認可を受け臨床への応用が始まっている。補助人工心臓も軸流ポンプの改良型であるJarvik-2000型が臨床試験の段階である。

我が国においては、1970年代後半から本格的に人工心臓の開発が進められ、1980年代初頭には「東大型（日本ゼオン-アイシン）」と「国循環型（東洋紡）」の臨床応用が心臓手術後の心不全の患者を対象に開始された。その後、両タイプとも1986～1988年に臨床応用する試験が行われ、1990年に製造承認を得て本格的な臨床応用が開始され現在に至っている。国循環型はダイアフラ

東大はサック型のいずれも拍動型のポンプである。また、米国で開発された携帯型の拍動型補助人工心臓の「NovaCor™」「HeartMate™」も臨床試験が行われ、優れた成績を収めている。NovaCor™はソレノイド駆動プッシャープレート型、HeartMate™はプッシャープレート血液ポンプを用いた空気圧駆動装置体外設置型とモーター駆動携帯型の2種がある。これらに加え、現在、テルモ株式会社の「DuraHeart™」とサンメディカル株式会社の「EvaHeart™」が臨床試験の段階に入っている。これら2種の国産補助人工心臓はいずれも遠心ポンプである。

5. 人工心臓膜について

人工心臓のうち膜部分が存在するのは拍動型のものであり、いずれもダイアフラムが該当する。ほとんどの拍動型人工心臓の血液接触部分の材質は、ポリウレタンである。ポリウレタンは、原料のイソシアナートとアミンの種類によってさまざまなものが合成できる。その中でも、抗血栓性に優れたセグメント化ポリウレタン（SPU）が人工心臓用に用いられている³⁾。これらは、表面特性を考慮して分子設計された医用材料の実例である。図2にこれまで開発されてきた医療用ポリウレタンの構造を示す。中にはすでに開発が終了しているものもあるが、SPUの構造の一端を示すものとして参考として記載する。これらのポリウレタンは、表面組成が不均質で、異種のドメインが分散するモルフォロジーを有する特徴的な表面層を有している。このようなネロ構造が、抗血栓性を発現するには、血漿タンパク質の迅速な吸着層形成による界面不浄化が寄与していると言われている。ホモポリマーによる均一材料表面での抗血栓性獲得は、1970年代半ばまでに均一材料のみではなし得ないことが結論づけられ、それに代わる新しい概念として提案された2種類以上の異なるポリマー鎖を有する、いわゆる多相性高分子材料の考えに基づいている。SPUはエラストマーとしての優れた弾性係数に加えて高い耐疲労性を示し、人工心臓用の素材に要求される機能の1つを充分満たす⁴⁾。この特性は、分子中のハードセグメントが凝集してクラスターを作り、それがソフトセグメントの連続相に分散した構造をとるミクロ相分離構造によって発現されている（図3）。Lymanらの研究では、ソフトセグメントの主成分であるポリエーテルの鎖長を変えると血液適合性も大幅に変化し、最適値が存在する⁵⁾。同様の結果が、村山らによっても報告されている⁶⁾。ポリエーテルとしては、比較的疎水性のポリテトラメチレングリコールがよく用いられるが、他にわずかに親水性度の強いポリプロピレングリコール（PPG）⁵⁾や、極めて親水性の高いポリエチレングリコール（PEG）によって親水性表面が形成される^{7, 8)}。一方、両末端にアミノ基や水酸基を有する反応性ポリジメチルシロキサン（PDMS）をソフト成分として使用すると、PTMGよりも強い疎水性のセグメント化ポリウレタ

第3章 人工心臓膜

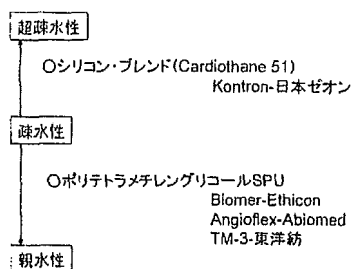


図4 親水性から疎水性までのセグメント化ポリウレタンの分類

が合成できる。また、A-B-Aブロック型のポリエーテル (PEG-PPG-PEG) や PEG-PDMS-PEG を用いることができる。PEG などの親水性のポリエーテルをベースとするセグメント化ポリウレタンでは、界面張力が極めて小さく、またゼータ電位もほぼゼロであり、水和された PEG の溶解鎖が界面に濃縮された構造をとっている可能性が示唆され、血液適合性の発現が期待された。しかしながら図4に市販レベルのSPUを表面特性にまとめたが、これを見て明らかのように、疎水的なSPUが実用的であることがわかる。これは分子間凝集による強度の保持については、疎水的なブロックのほうが有利であるためであると考えられる。上で述べた親水的なSPUについては、表面とバルクにおける分子の局在のコントロールが困難なため、血液など水中においては親水的ブロックに水分が進入し、全体の強度を低下させることが問題となっている。強度を必要としない部分への応用は可能であるが、繰り返し疲労に対する耐久性が要求される人工心臓用ダイアフラム膜への応用については、分子レベルでの改良が必要であると考えられる。

SPUの研究は1980年代に数多くの報告がなされ、多種多様なSPUが一般用、工業用に应用された。医療用途としては、これまでにあげたSPUが人工血管や人工心臓用として検討し続けられ、そのうちのいくつかは、現在、人工心臓用として用いられている。しかし、人工心臓用SPUの研究は現在では沈静化しており、部分的な改良が続けられている状況である。これは、これまでに開発されたSPUが一定の性能を有していることと、超長期の応用の実例が少ないために、人工心臓用膜に対する要求よりも、ポンプデザインや血液状態維持のための内科療法の併用などの効果の判定に主眼が移っているためと考えられる。しかしながら、人工心臓の研究の現場では、抗血栓性および血液適合性などの材料に対する要求は依然として高く、材料研究者の期待が望まれている。

6 おわりに

人工臓の開発は、世界的な状況では臨床応用段階に移行しつつあり、技術的な成熟度は一定のレベルに達している。そのために、人工臓の個々の要素（ポンプや制御など）についての基礎研究については一段落している状況であるが、現在の臨床応用の成果が積み重ねられるにつれて、さらに高機能的な性能が要求されることは必須である。このうち、血液ポンプについては、TAHの半永久的使用に耐える耐久性と血液適合性が、また心筋再生などの再生医療技術との併用として低侵襲補助のためのポンプなどへの関心が高まっている。これまでに多相系医用材料の開発など、人工臓が医用材料研究に与える目標値は研究の発展を促進してきた。人工臓の臨床成績の動向について、今後の進展が注目される。

文 献

- 1) J. G. Copeland, F. A. Arabia, P. H. Tsau, P. E. Nolan, D. McClellan, R. G. Smith, M. J. Slepian, *Cardiol Clin*, 21, 101 (2003)
- 2) F. A. Arabia, J. G. Copeland, R. G. Smith, M. Banchy, B. Foy, R. Kormos, A. Tector, J. Long, W. Dembitsky, M. Carrier, W. Keon, A. Pavie, D. Duveau, *Artif Organs*, 23, 204 (1999)
- 3) M. C. Belanger, Y. Marois, R. Roy, Y. Mehri, E. Wagner, Z. Zhang, M. W. King, M. Yang, C. Hahn, R. Guidoin, *Artif Organs*, 24, 879 (2000)
- 4) 鶴田禎二 (今西幸男, 櫻井靖久, 妹尾学, 竹本喜一編), 医用材料と生体, 講談社サイエンスティフィク, 262 (1982)
- 5) D. J. Lyman, K. Knuston, B. McNeil, *Trans. ASAIO*, 21, 49 (1975)
- 6) 村山健, 生体材料, 2, 25 (1984)
- 7) V. Sa da Costa, D. B-Pussell, E. W. Salzman, E. W. Merrill, *J. Colloid Interface Sci.*, 80, 445 (1980)
- 8) T. Matsuda, T. Akutsu, *ACS Preprints*, 48, 48 (1983)

not only in DNA condensing but also in maintaining the relaxed state of the polyplexes, which allows them to release DNA, as described later (Arigita et al. 1999; Kanath et al. 2003; Ruponen et al. 1999).

The other role of cationic polymers is to protect DNA from degradation by DNases existing in the body, which is one of the biggest objectives of the gene delivery system. Polyplexes of PEI, PLL, and polyamidoamine (PAMAM) dendrimer showed significant resistance against nuclease actions compared with free DNA. Protective interactive noncondensing (PINC) polymers, such as poly(*N*-vinyl pyrrolidone) (PVP) and PVA, form flexible polyplexes with DNA via hydrogen bonds (Mumper et al. 1998). Molecular modeling confirmed that PVP was located in the major groove of DNA. These PINC polymers protect DNA from nucleases and enhance intracellular uptake by interactions between the hydrophobic surface of polyplexes and the cell membrane. However, the strong protecting ability of the carriers does not necessarily lead to high levels of gene expression. Indeed, inverse effects between nuclease resistance and the rate of interexchange reactions of polyplexes (described in detail later) has been pointed out (Seymour 1997).

In the case of conventional polymeric drugs, the parent drug would simply be released from the carrier polymer by hydrolysis of the chemical bonds followed by diffusion into cells or to the site of action (Kopecek and Pohl 1988). In contrast, in the case of the gene delivery system, DNA molecules are diffuse with difficulty because of their huge molecular weights. Thus, carrier polymers continue to play an important role in the interaction with cell surfaces, in intracellular trafficking, and in transcription of transgene in the nucleus. In this chapter, the chemical structure, function, and mechanisms of various polymeric non-viral carriers for use in gene delivery systems in mammalian cells, *in vitro* and *in vivo*, are reviewed.

2 Various Polymeric Carriers

About 70% of the gene therapeutic protocols available to date are based on viral vectors (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Despite their high efficiency *in vitro*, clinical trials are often limited by several concerns, e.g., toxicity, immunogenicity, inflammatory properties, the limited size of the DNA, production and packing problems, and the high cost. In addition, an overwhelming immune reaction against adenovirus occurred in a patient at Pennsylvania University in 1999 (Marshall 2000, 1999) and a leukemia-like disease were reported in a French patient in 2002 (Marshall 2002; Kaiser 2003). As a result, non-viral vector-mediated systems have become of interest, because they are much safer, more cost-effective, and easier to manufacture than viral vector systems.

Some of the reasons for the few clinical trials using non-viral gene vectors are their toxicity (Choi et al. 1998), low transgene expression, and the tendency of the carrier/DNA complexes to aggregate in the blood (Dash et al. 1999). In addition, the detailed mechanisms of transgene expression following non-viral carrier-based gene transfer are not yet clear. The efficacy of transgene expression has been found to be clearly affected by the chemical structure of the cationic carriers, which indicates that the characteristics of the non-viral vectors would alter the efficacy of some process, such as internalization in cells and transgene expression.

2.1 Chemical Structure

The synthetic vectors described above are depicted in Fig. 1. All of them possess cationic charges and form PICs based on electrostatic interactions, but their transfection efficacies are quite different and depend on the chemical structure, charge density, and molecular weight of the polycation. For example, poly(L-arginine) and poly(L-lysine) are known to form complexes with quite different features (Liquier et al. 1975), and recently the former were found to lead to much higher levels of gene expression.

We have reported that polycations having abundant side-chain hydroxyl groups (or amide groups), such as poly(vinyl alcohol) dimethylaminoacetal (PVA3), are effective carriers with low cytotoxicity. Although the role of the hydroxyl or amide groups is still uncertain, they seem to strongly and effectively maintain the hydrophilic nature of the formed complexes thus preventing compaction of the complexes and ultimately allowing their dissociation. The methylene group length of the polyburene (PB) main chain (Fig. 1) also change the hydrophilic/hydrophobic balance (Aubin et al. 1994; Mita et al. 1977). The charge density of the polycations is the other important factors. In a comparison of DEAE-dextrans with different cationic group densities ranging from 20 to 55%, both transfection efficiency and cytotoxicity greatly decreased with decreased cationic group densities (Fig. 2). Other polycations, such as chitosan (Lee et al. 1998), polyethyleneimine (Godbey et al. 1999b; Pollard et al. 1998; Demeneix et al. 1998), and cationic polymethacrylate derivatives (van de Wetering et al. 1998;

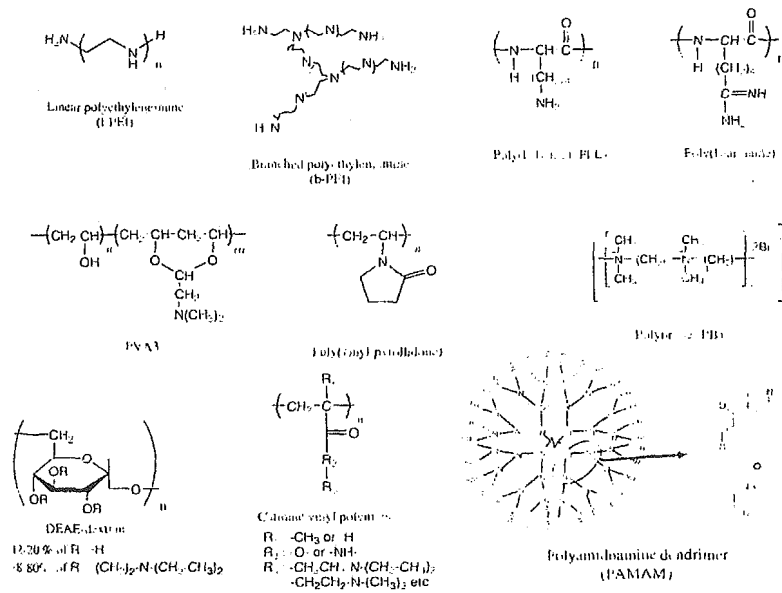


Fig. 1. Chemical structures of polycation-type non-viral gene carriers