

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆宇	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	839
KH61060	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	岸田晶夫	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸	……	979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充	……	1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志	……	1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人	……	1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄	……	1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文	……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋	……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治	……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫	……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達	……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子	……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲	……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一	……	1115

## 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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

### 研究要旨

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の開発を目的とした。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高機能化することができ、新規な再生医療用素材として広範な応用が期待できる。まず、本研究の基盤技術である超高静水圧処理による脱細胞化組織の調製について、超高静水圧処理の最適化を検討した。種々の超高静水圧処理条件にて脱細胞化した組織の組織学、力学的、分子生物学的な解析を行った結果、超高圧印加プロファイルのうち、印加速度および温度が生体組織の組織構造が大きく影響することが明らかとなり、30度下での低速加圧条件が組織構造にダメージを与えずに脱細胞化できることが示された。また、得られた脱細胞化組織をエタノールにて処理することで石灰化の要因と考えられるリン脂質が除去でき、その力学強度も移植には影響ない程度であった。超高静水圧印加処理による細菌除去については、7000気圧以上にて細菌除去が可能であることが示された。さらに、超高静水圧印加処理によるウイルス除去については、ブタのゲノムに組み込まれているPERV配列の残存をPCR測定にて検討した結果、残存するPERVのDNA量は洗浄の進行とともに減少し、最終的には、増幅回数を増加させても検出出来ないレベルにまで減少した。次に、生物由来素材を用いたスキャフォールドの作製について、コラーゲン素材を中心に作製したマトリクスを用いて、*in vitro*、*in vivo*での検討を行った。ブタ皮膚コラーゲン溶液から作製したコラーゲン繊維を不織布に加工し、熱架橋後、ヘパリンを含有し、架橋コラーゲン製人工血管を作製した。作製した血管をクラウン系ミニブタ下行大動脈に、左側開胸、単純遮断下にて置換移植した。経過は良好で、死亡例はなかった。また、上記の生物由来スキャフォールドへの機能性分子の複合化を目的にいくつかの修飾法について検討した。複合化する機能性分子としては、抗血栓性付与のために細胞のリン脂質構造を模倣したMPCポリマー、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である。コラーゲンへのMPCポリマーの修飾については、コラーゲンをEDC/NHSにて化学的に架橋し、さらにEDC/NHSにて活性化したMPCポリマーを化学的に修飾した。得られたコラーゲンは、従来のコラーゲンに比べて力学強度が上昇し、その成形性も上昇し、コラーゲナーゼによる分解抑制も示された。これらの効果は、MPCポリマー分子の修飾を繰り返すことにより向上した。また、MPCポリマーがコラーゲン表面に存在することからMPC分子の修飾効果により細胞接着が抑制され、ラット皮下埋入試験においても良好な生体適合性が示された。また、デキストランを用いることで、脱細胞化組織の膨張・構造変性が抑制されることが示され、ハイドロキシアパタイトを用いることで素材の細胞接着性の向上が示された。さらに、プラスミドベクターを修飾した脱細胞化組織への再細胞化においては、細胞への遺伝子導入が示された。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学生体材料工学研究所  
岸田晶夫
- (2) 国立循環器病センター研究所  
藤里俊哉
- (3) 国立循環器病センター研究所  
高野 久輝
- (4) 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、新しい加工法の開発を目的とした。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

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

最適化について検討した。脱細胞化についての最適条件を探索するため、ミニブタの大動脈を用いて、超高静水圧印加法での種々のプロトコールに脱細胞化を検討した。具体的には、超高圧の印加速度、温度を変え、また、洗浄期間を変えて脱細胞化処理を行った後、HE染色、TEM、力学試験により評価し、最適条件を探索した。

2) 超高静水圧印加法による脂質・細菌・ウイルス除去について検討した。脂質の除去については以下の様に行った。食用ブタ心臓の心室筋を厚さ 1.6mm の板状にスライスし、超高静水圧印加処理を行い、組織内の細胞を破壊した。このときの処理条件は、980MPa (10,000atm) の圧力を 10 分間、10°C の温度で行った。高圧処理後、組織に残存した細胞成分を除去するために洗浄を行った後、HE染色を行って組織学的に脱細胞されているかを観察した。さらに引張り試験を行って、作製したスキャフォールドの力学特性を未処理の生体組織と比較した。また、脂質定量を行うため、クロロホルム：メタノール混合溶媒中で、ホモジナイザーによって組織を粉碎し、リン脂質を抽出した。これをリン脂質C-テストワコー（和光純薬）を含む水溶液と混合し、比色定量によって定量した。超高静水圧印加法による細菌除去については、ミニブタ組織を上記と同様に脱細胞化したのち、培養液に浸漬して 37°C で培養し、細菌培養試験を行った。ウイルス除去については、組織内に存在する PERV を PCR 法によって測定した。組織から DNA を抽出し、PERV 配列に対するプライマーを用いて PERV の DNA を増幅後、PCR 産物を電気泳動して観察した。

3) 生物由来素材を用いたスキャフォールドの作製について検討した。コラーゲン素材を中心に作製したマトリクスを用いて、in vitro、in vivo での評価を行った。具体的には、ブタ皮膚コラーゲン溶液から作製したコラーゲン繊維を不織布に加工した。熱架橋後、ヘパリン (640IU/cm<sup>3</sup>) を含有するコラーゲン溶液を含浸させながら管状に加工することで、長さ約 2.5cm、内径約 7mm の架橋コラーゲン製人工血管を作製した。作製した血管を、生後 3ヶ月 (体重約 5kg) のクラウン系ミニブタ (株) ジャパンファーム) 下行大動脈に、左側開胸、単純遮断下にて置換移植した。ヘパリン含有した人工血管と、含有しない人工血管とで比較検討した。所定期間経過後、移植した人工血管を摘出し、大きさ等の所見を調べた後、組織切片を作製した。HE染色の他、抗vWF免疫化学染色によって血管内皮細胞を、抗αSMA免疫化学染色によって平滑筋細胞を染色した。石灰化は von Kossa 染色によって評価した。

4) 上記の生物由来スキャフォールドへの機能性分子の複合化を目的にその修飾法について検討した。複合化する機能性分子としては、抗血栓性付与のために細胞のリン脂質構造を模倣したMP Cポリマー、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である。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した。機能性分子複合化スキャフォールドの機能については、培養細胞を用いた *in vitro* での評価およびラットを用いた *in vivo* での評価を行った。

#### (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った。当該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とともに、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ように努めた。

### C. 研究結果

我々が開発した超高静水圧印加法の最適条件について検討した。本研究の脱細胞化法は、以下2つのプロセスからなる。(1) 超高静水圧印加処理 (2) 連続振盪による洗浄処理である。まず、圧力印加法の検討を行った。超高圧処理装置(Dr. CHEF; (株)神戸製鋼所)を用いて行った。圧力印加速度と処理開始時の試料槽内の温度設定が重要であり、圧力変動時の温度変化は、昇圧に伴い上昇し、降圧に伴い低下する。加圧完了時に最高温度、減圧完了時に最低温度になる。圧力印加速度が早いほど、温度上昇、温度低下の変化量が大きくなった。また、処理開始時の温度設定の影響も見られ、開始時の設定温度が高いと、加圧完了時の温度が生体組織の熱変性温度となった。また、低いと、減圧完了時の温度が氷点下になり、組織内の水分が凝結を起こし、組織構造が損傷されると考えられた。そこで、印加中の温度変化が組織サンプルに損傷を与えないように、最適条件の検討を検討した。まず始めに、超高圧処理装置について圧力印加処理時の操作条件の最適化を行った。圧力印加速度と処理開始温度それぞれについて、いくつかの候補条件を設定し、その組み合わせで行い、温度プロフィールを検討した。更に、試料槽内に入るサンプルの総体積が温度変化に影響についても

検討した。開始温度として10、15、

20、25°Cを、圧力印加速度を毎分当たり、666、1000、2000atmで行った。圧力印加速度666 atm/分、1,000 atm/分の速度条件は、一次的な温度変化を見せ、最高温度は加圧完了時の温度であった。これに対して、2,000 atm/分では、約850気圧の時に最高温度に至り、その後、僅かではあるが温度が下がった。最低温度は3条件とも全て減圧完了時の温度であった。圧力印加速度が早いほど温度上昇速度・下降速度ともに速くなり、その結果、最高温度が高く、最低温度が低くなった。また、処理開始温度を変化させても温度変化の勾配が変わることはなく、開始温度が高いほど、最高温度が高く、処理開始温度が低いほど、最低温度も低かった。サンプル数の違いによる温度変化の違いは、サンプル数1個の条件で、4個の条件より温度変化が大きくなった。この違いは、圧力印加速度が早い程顕著に見られた。

以上の結果をまとめると、超高圧印加装置(Dr. CHEF)を用いた超高静水圧印加処理では、処理開始温度・圧力印加速度・試料槽内に入れる固体サンプルの総体積量が、料槽内の温度変化に影響することが分かった。上記の現象について、生体組織を用いて検証するためブタ大動脈を用いた検討した。処理時の温度プロフィールの最適条件探索の指標として以下3つの項目を挙げた。(1) 圧力変動時、および、超高圧維持時、全ての処理時において、各圧力条件下の水の氷点を下回らないこと、(2) 最高温度が生体組織を熱変性させる温度にまで上昇しないことで、本実験では、40°C以上にならないことが目安とする、(3) 圧力変動時の温度変化が急激にならないことである。生体組織を構成するタンパク質やリン脂質の中には、融点が室温程度の分子があり、それらの分子が急激な液化や固化を起こして、組織構造に構造異常を生じさせるためである。上記の条件を常に満たしていたのは、処理開始温度10/15/20/25°Cの中では、処理開始温度25°C/圧力印加速度2,000 atm/分で行った時の試料槽上層部の温度プロフィールだけだった。さらに、圧力印加速度666 atm/分の条件は、圧力変動時の温度変化が緩やかだったので、圧力印加速度は変えず、処理開始温度のみを30°Cに変更した。25°Cの条件より、圧力変動時の温度変化もほとんど見られなかった。したがって、①処理開始温度:30°C 圧力印加速度:666 atm/分②超高圧維持:10,000気圧/10分間で行う条件が最適条件であると結論した。

次に、前処理について検討した。前処理液、浸漬期間についての種々の組み合わせについて、比較検討を行った。前処理では、生体組織の滅菌効果をも加味した細胞洗浄操作を目的とし、超高圧処理後の洗浄操作は、超高静水圧印加処理により細胞が破壊

されて、断片化した核酸成分や、露出した細胞質など、残渣を組織外に流出させることを目的としている。ブタ大動脈をサンプルとした。前処理液には、PBS(-)、1%PEG3300 溶液、1%PEG8000 溶液、TX 溶液(界面活性剤・核酸分解酵素を含む)を用いた。また、超高压処理後の洗浄液による洗浄期間を1/8/10/15 日間で設けて、洗浄期間が細胞除去への影響を検討した。ヘマトシキリン・エオジン(以下、HE)染色標本を作製し、評価を行った。評価としては、青紫色の細胞核成分が存在しないときを完全な脱細胞化(評価 A)として、以下順に、細胞除去率を、A~E の 5 段階 (A:completely eliminated B:almost all eliminated C:most debris in the middle remained D:only few in the edge eliminated E:almost all remained)で評価した。洗浄期間 1 日間では、各条件ともに、ほとんど全ての細胞が残存していた(評価 E)。期間が長くなるほど細胞除去率に前処理液の影響が現れた。PBS(-)では、洗浄期間が長くなるほど細胞除去がよくなされた。8、10 日間では、組織末端の細胞がほぼ全て除去されていたが、深部の細胞はほとんど全て残っていた。15 日間では、深部の細胞がやや除去されていたが、完全除去には至らなかった。PEG3300 の条件では、PBS(-)よりも細胞除去率が悪かった。8、10 日間では、PBS(-)の条件と同じく組織末端の細胞はよく除去され、深部の細胞は少し除去されていた。15 日間でも、深部の細胞はほとんど残っていた。PEG8000 の条件は、PEG3300 の条件よりも更に細胞除去率が劣っていた。8、10 日間でも組織末端の細胞が少し残っていて、深部の細胞はほとんど除去されていなかった。15 日間でも、深部の細胞の残存率が高かった。以上のことから、いずれの洗浄液も、洗浄期間の延長に伴う除去効果は上昇されたが、完全な脱細胞化には至らなかった。一方、TX 溶液の細胞除去率が最も高かった。8 日間で、組織深部の細胞がほぼ完全に除去され、10 日間以上で、細胞が完全に除去されていたのが確認できた。次に、超高压印加プロトコールと洗浄機関の影響を検討した。評価は HE 染色にて行った。コントロールとして、ブタ大動脈サンプルに全く処理を加えない未処理サンプルと、超高压処理を行ったサンプルと同じく前処理のみ施行したサンプルを用意した。未処理サンプルは細胞が充填しており、また細胞骨格成分であるコラーゲン線維が密に並んでいるのが観察された。前処理のみ施行したサンプルでは、組織末端の細胞が抜けており、前処理だけでも細胞除去がされていた。コラーゲン線維は未処理サンプルに比べ、緩みが生じているのが観察された。緩みが大きい箇所ほど、よく細胞が除去されていた。これを受けて、各条件に関して細胞除去率と、組織変性度に焦点を中てて観察、評価を行っ

た。細胞除去率について、完全な脱細胞化を評価 A として、以下順に、細胞除去率を、A~E の 5 段階 (A:completely eliminated B:almost all eliminated C:most debris in the middle remained D:only few in the edge eliminated E:almost all remained)で評価し、また、組織変性度について、未処理サンプルと同程度に構造を保持していたものを評価++++として、以下順に、5 段階(++++: retained native completely ++++: retained mostly ++: denatured frequently ++: denatured mostly +: denatured intensely)で評価した。超高压処理を行った HE 標本について、各圧力処理条件による脱細胞化率の違いは見られなかった。サンプルによっては組織深部に僅かな細胞の残渣が存在したが、多くのサンプルでは、洗浄期間 8 日間で完全な細胞除去がなされていた。この細胞除去率の違いに圧力条件による効果は観察できず、個体差によるものだと思われる。しかし、細胞骨格の変性について、各圧力条件で違いが観察された。特に、コラーゲン線維の変性と損傷は顕著な違いがあった。洗浄期間が長いほど、組織変性度が高く、特にコラーゲン線維の緩みが大きくなっていった。処理開始温度 10°C/圧力印加速度 2,000 atm/分による組織変性度は、各条件の中で、組織構造の変化と損傷が最も大きかった。コラーゲン線維の三重らせん構造に緩みが生じて、穴のように開いた箇所が点在した。組織末端ほど緩みが大きかった。さらに、線維一本一本に亀裂が生じ、線維が切断されている箇所、線維がぼろぼろになっている箇所が沢山存在した。処理開始温度 25°C/圧力印加速度 2,000 atm/分による組織変性度は、上述と同程度で、コラーゲン線維間の緩みが大きく、組織末端は更に緩みが大きかった。しかし、コラーゲン線維一本一本については、はかかなりぼろぼろだったが、亀裂はやや少なかった。処理開始温度 10°C/圧力印加速度 1,000 atm/分による組織変性度は、構造の緩みは上述の条件よりもやや穏やかだった。コラーゲン線維は、ぼろぼろになっている程度が穏やかで、亀裂も少なかった。処理開始温度 25°C/圧力印加速度 1,000 atm/分による組織変性度は、上記と同程度だった。このサンプルは、コラーゲン線維の亀裂が多く、損傷が大きかった。処理開始温度 10°C/圧力印加速度 666 atm/分による組織変性度は、明らかに構造の緩みが小さく、深部の線維は密に並んでいた。コラーゲン線維の亀裂も少なく、ぼろぼろになっている程度も小さかった。処理開始温度 25°C/圧力印加速度 666 atm/分)による組織変性度は、10°Cと同様に構造の緩みが小さく、組織末端の緩みは深部よりも僅かに緩んでいる程度だった。コラーゲン線維の亀裂は僅かであった。処理開始温度 30°C/圧力印加速度 666 atm/分は、最も組織維持が良か

った。組織変性はほとんどなく、構造の緩みも僅かしか生じておらず、穴のように開いた箇所がほとんどなく、コラーゲン線維間の構造が良く保持されていた。組織末端と深部を比較してもほとんど違いがなかった。コラーゲン線維の亀裂はほとんどなく、ぼろぼろになっている程度も僅かで、一番穏やかだった。以上をまとめると、30°Cで開始し、緩やかな圧力変化の条件がコラーゲン構造維持に最適であることが分かった。さらに新洗浄法として、洗浄液I、II、IIIの3種類の溶液を用いて、リン脂質の除去を目指し、種々の期間の洗浄を行った。洗浄0日間(旧洗浄0日間/新 I-0日間・II-3日間・III-3日間)では、組織変性度に違いは見られなかった。細胞除去率は旧洗浄法では組織末端の細胞が僅かに除去されていた。洗浄3日間(旧 洗浄3日間/新 I-3日間・II-3日間・III-3日間)では、細胞除去率・組織変性度に違いが観察され、細胞除去率については、旧洗浄法では組織末端の細胞しか除去されていなかったのに対して、新洗浄法では、組織末端の細胞は全て除去されていた。また、深部の細胞も、細胞骨格に僅かに細胞残渣の付着が観察されたが、ほとんどの細胞の除去が確認できた。組織変性度についても、旧洗浄法も、組織骨格の保持がよくなされていたが、新洗浄法のほうがコラーゲン線維の緩みもほとんどなく、骨格保持の程度がより高かった。また、合計洗浄期間が近い場合、すなわち、旧洗浄法の8日間の洗浄と、新洗浄法の9日間の場合では、新洗浄法の細胞除去率が旧洗浄法より高かった。洗浄14日間でも、細胞除去率・組織変性度に違いが観察された。細胞除去率は、旧洗浄法では、組織深部に僅かに細胞残渣が観察された。新洗浄法では、組織深部に至るまで、全ての細胞の除去を確認できた。組織変性度は、旧・新洗浄法ともに、細胞骨格の保持が極めて高くされていたが、新洗浄法の組織末端に僅かに緩みが生じていた。旧洗浄法よりも長い洗浄期間が影響したと考えられる。以上の実験により、各処理において、有限数の候補からの最適化を行うことはできた。

次に、組織適合性試験として、ラット背部皮下へのインプラント実験を行った。種々のプロトコールにて処理したブタ大動脈をサンプルとして用いた。

1週間の結果では、コントロールとして埋植した未処理サンプル、前処理のみ施行したサンプルは、ブタ組織サンプルの周辺に大量の免疫系細胞が存在した。前処理のみ施行したサンプルは、未処理サンプルより免疫系細胞の量が若干少なかった。組織末端のコラーゲン線維の端から、免疫系細胞の浸潤が確認された。組織構造の緩みが大きいほど、この浸潤の程度が大きかった。また、組織中の損傷や亀裂が生じていた部分には、大量の免疫系細胞が集まっ

ていた。血管新生もよくなされていた、サンプル周辺に沢山の微小血管が観察された。組織の境界部でブタ組織のコラーゲン線維が溶解されていた。境界部の細胞骨格は、損傷が激しく、線維がぼろぼろになっていた。両方のサンプルで埋植の有無により、決定的に違ったことがあった。埋植しないサンプルでは両方とも組織中に細胞が充填していたのに対して、埋植したサンプルでは、大量の細胞が抜けていた。未処理サンプルには、僅かに細胞の残渣が存在していたが、前処理のみ施行したサンプルでは、ほぼ全ての細胞残渣まで除去されていた。おそらく、未処理・前処理のみ施行したサンプルは、他サンプルを脱細胞化処理している期間中、PBS(-)溶液で保存していたためだと考えられる。脱細胞化を行ったサンプルでは、洗浄期間の有無に関わらず、未処理サンプル、前処理のみ施行したサンプルと比較して、免疫系細胞の量が明らかに少なかった。しかし、組織に損傷、亀裂が生じた部分には、コントロールと同様、大量の免疫系細胞が集まっていた。脱細胞化組織間での比較は、顕微鏡観察では差異はなかった。血管新生の程度も、コントロールと比較すると、若干少なかった。組織末端はコントロールと同様に、損傷が激しく、ぼろぼろだった。また、埋植の有無によるブタ組織内の細胞量の違いは、脱細胞化組織でも顕著だった。埋植をしないサンプルのうち、洗浄期間を設けないサンプルは、組織末端の細胞が僅かにしか除去されない。だが、埋植したサンプルは、ほぼ全ての細胞が除去されていた。脱細胞化サンプルについて、洗浄期間の有無によって、組織周辺に集まる免疫系細胞の量の差はなかった。ブタ組織中の細胞の量も同様にほぼ全て除去されていた。埋植しない洗浄期間8日間のサンプルは、組織末端のコラーゲン線維に緩みが生じていたが、埋植すると緩みが軽減されていた。次に4週後の結果では、全てのサンプルにおいて、免疫系細胞がブタ脱細胞化組織によく集積されていた。埋植1週間のサンプルと比較すると、免疫系細胞の集積の広がりには狭くなっていた。免疫系細胞の量は同程度で、密に組織に集まっているのが観察された。また、組織末端の緩みの大きい箇所から、免疫系細胞がよく浸潤しており、浸潤の程度は1週間のサンプルより、より深部近くまで到達していた。未処理・前処理のみ施行したサンプルは、両方とも血管新生の程度が増していた。新生した血管も埋植1週間のサンプルより口径が大きくなっていた。脱細胞化を行ったサンプルは、埋入1週間のサンプルと比較して、免疫系細胞の量が減少していた。最適ではない超高压印加条件で行った脱細胞化組織でも、埋植期間に組織末端の緩みが軽減されていたのが観察された。軽減の程度は同程度であった。ブタ由来の細胞はほぼ完全に除去され

ていた。また、埋入1週間のサンプルよりコラーゲン線維の損傷が激しく、亀裂が沢山入り、線維自体もひどくぼろぼろだった。洗浄期間で比較すると、免疫系細胞の量・血管新生の程度も同程度だった。ブタ組織サンプルの洗浄期間で生じる緩みもかなり軽減されていた。最適でない超高压印加条件で処理を行うと、コラーゲン線維間の緩みが大きくなったが、埋植期間後、末端から深部にかけて生じるはずの隙間がなく、線維間が密になっていた。免疫系細胞の浸潤は、有意差があり、洗浄8日間のサンプルの組織では、0日間のサンプルよりも中央部での浸潤の程度が大きかった。この浸潤のために、洗浄8日間のサンプルでは、ブタ組織の中央部が割れているものが多かった。

以上の結果をまとめると、最適化した超高压印加条件は、生体組織に対し、物理学的・組織学的に影響が少ないことを証明した。本実験では、同条件が免疫学的にも良い効果をもたらすかについて検証した。ブタ脱細胞化組織のラット皮下埋入試験を行った結果、脱細胞化組織で、有意な炎症反応の軽減が観察された。通常、異種動物間の置換移植は、超急性な免疫応答により、激しい拒絶反応を起こして、移植片が脱落してしまう。だが、本実験では、免疫系細胞が組織周辺に集積する程度の穏やかな免疫応答で、埋入期間4週間経過後も組織が脱落せず、むしろ、よく生着していた。脱細胞化処理の免疫応答抑制の効果が高いことが示唆された。ただし、未処理サンプル、前処理サンプルについては、免疫応答が予想よりずっと低かったことが問題として残る。特に、未処理サンプルは予想に反して脱落されなかった。原因として、ラットへの皮下埋植試験を脱細胞化組織と同時に行うため、脱細胞化処理期間中、未処理サンプル・前処理のみ施行したサンプルは約10日間PBS(-)溶液に浸漬させていたためだと考えられる。浸漬期間の間に、PBS(-)溶液の洗浄効果が組織に作用したのではないかと推測される。埋入試験によって観察されたこととして注目すべき点が3つあった。まず、埋植によって、異種移植片中の細胞が除去された。次に、脱細胞化処理によって生じた組織骨格の緩みが、ラットへの埋入期間に軽減された。さらに、洗浄期間を設けたサンプルのほうが、免疫系細胞の浸潤度が高かった。埋植による移植片中の細胞が除去される現象は、前述のように、埋植試験を行うまでの保存期間、PBS(-)溶液に浸漬させていたことが原因の一つだと考えられる。PBS(-)溶液を前処理液に用いたところ、有意な細胞除去効果が認められた結果からも推測される。また、同種間で埋植試験を行ったところ、移植片組織内の細胞がレシピエント組織内でアポトーシスを起こした、という報告がある。このとき、マクロファージとT細胞

が関与し、移植組織由来の細胞がアポトーシスを起こすようである。本実験の結果にも関係があると推測される。洗浄期間を設けたサンプルのほうが免疫系細胞の浸潤度が高かったのは、洗浄期間により組織強度が弱くなったことが考えられる。酵素溶液・界面活性剤を用いた脱細胞化法では、長く浸漬時間を取ると細胞骨格の変性を引き起こす、という報告がある。特に、細胞外マトリックスの主要成分である、エラスチンとコラーゲンに損傷が大きく、損傷による組織への影響も高い。エラスチンが損傷を受けることにより、組織の伸縮性が低下し、堅さが上昇し、コラーゲン線維が伸びてしまう。この変性によりコラーゲン線維が損傷を起こし、結果として炎症反応を誘起させる。洗浄期間が20日間の新洗浄法で行ったサンプルで、超高压印加条件の違いが組織への影響に大きく現れたことから推測される。今回は異種動物間の埋植試験を行ったが、脱細胞化処理が免疫反応を有意に抑制することが確認できた。脱細胞化組織のin vivoでの評価において、MHC I・II抗原を除去したことで免疫性の低下が見られるのではないかと、リン脂質・コレステロールの除去が、免疫反応(石灰化)の抑制に対して更なる効果を示すという報告もある。また、コラーゲンやエラスチンを始めとする細胞骨格成分の損傷・変性が免疫反応を誘起するとも言われている。

次に、食用ブタ心臓の心室筋を厚さ1.6mmの板状にスライスし、超高压静水圧印加処理を行い、組織内の細胞を破壊した。圧処理後、組織に残存した細胞成分を除去するために洗浄を行った後、HE染色を行って組織学的に脱細胞されているかを観察した。さらに引張り試験を行って、作製したスキャフォールドの力学特性を未処理の生体組織と比較した。細胞処理した組織のHE染色では、いずれの処理条件においても組織内の細胞核は染色されず、細胞は残留していないことが確認された。また、組織内の空隙率も比較的高いことがわかった。引張り試験を行った結果、超高压印加時にエタノールを用いた場合には、施圧直後の破断荷重はコントロールやPBS(-)を用いた場合の2倍以上に上昇したが、洗浄処理後はいずれもほぼ同等の値であった。施圧直後の弾性率は、施圧時にエタノールを用いた場合にコントロールやPBS(-)を用いたものより4倍以上高かったにもかかわらず、洗浄処理後は、施圧時に80%エタノールを用いたものが、コントロールとほぼ同等の値を示した。施圧後の組織洗浄におけるエタノール処理条件による弾性率への影響については、エタノール処理の有無にかかわらず、施圧直後の弾性率よりも3倍以上高い値を示し、未処理の組織よりも上昇していることがわかった。以上の結果から、作製したスキャフォールドは未処理の組織よりも弾性率

が上昇する傾向が見られたものの、高い空隙率を保持していることや生体内での引張りにも耐えうる十分な強度を維持していることから、再生型筋組織を構築するための細胞の足場として利用できる可能性が示唆された。当初の想定では、出来る限り生体に類似する組織が必要であろうと考え、脱細胞化処理の条件をマイルドなものに設定していた。しかし、動物移植実験の結果から、残存するリン脂質によって石灰化の生じる症例が、特に大動脈組織で顕著に認められ、脱細胞化処理条件の見直しが迫られた。そこで、超高圧印加処理に、リン脂質を溶解するアルコール処理を加えて、リン脂質の除去を行った。アルコール処理によって、生体力学特性の変化が憂慮されたが、本研究から、移植には影響ない程度であろうと考えられる。

超高静水圧印加処理による細菌除去については、ブタ大動脈を種々の圧力にて加圧処理したのち、細胞培養培地にてインキュベートした。7000気圧以上の加圧処理にて滅菌効果があることがわかった。

PERVの除去については、一般に超高圧処理がエンベロープ型ウイルスに対して7,000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。DNAは組織を細切し、溶媒抽出法にて抽出した。DNA量は洗浄の進行とともに減少していることが分かる。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。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。

生物由来素材を用いたスキャフォールドの作製について検討した。ブタ皮膚コラーゲン溶液から作製したコラーゲン繊維を不織布に加工した。熱架橋後、ヘパリン(640IU/cm<sup>3</sup>)を含有するコラーゲン溶液を含浸させながら管状に加工することで、長さ約2.5cm、内径約7mmの架橋コラーゲン製人工血管を作製した。作製した血管を、生後3ヶ月(体重約5kg)のクラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)下行大動脈に、左側開胸、単純遮断下にて置換移植した。ヘパリン含有した人工血管と、含有しない人工血管とで比較検討した。いずれの群とも経過は良好で、死亡例はなかった。移植1ヶ月後に試料を摘

出したところ、ヘパリン含有群では、人工血管周囲に瘤が認められたが、ヘパリン非含有群では認められなかった。移植3ヶ月後では、ヘパリン含有群でも瘤は縮小していた。組織学的に観察したところ、瘤内には赤血球成分にて満たされており、血腫であることがわかった。一方、ヘパリン非含有人工血管では、移植3ヶ月後では内腔は血管内皮細胞で覆われ、組織内部には平滑筋細胞の浸潤が認められた。石灰化は、全く認められなかった。しかしながら、人工血管中央部では狭窄傾向が認められ、内径が縮小していた。

上記の生物由来スキャフォールドへの機能性分子の複合化を目的にその修飾法について検討した。コラーゲン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コポリマーは良好な生体適合性を持っており、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おり、製品化もなされている。PMAは、多くのカルボキシル基を有しており、コラーゲンのアミン基と結合させ、PMA-コラーゲンを調整することができる。EDS/NHSに活性化されたPMAをコラーゲン溶液中にて反応させたところ、得られたPMA-コラーゲンの機械的な物性は非常に弱く、一般的なコラーゲンとあまり変化がなかった。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、EDS/NHSにて活性化されたPMAとMBS緩衝溶液に入れてPMA-コラーゲン(PMAOゲル)を調整した。また、未架橋ゲ

ルを EDC と NHS にて架橋した E/N ゲルも作製し、さらに、E/N ゲルに活性化した PMA と反応させた PMA ゲル (PMA1 ゲル) を得た。未架橋ゲルでは水中で容易に溶解したが、得られた PMA 複合化ゲルは溶解せず、膨潤した。また、未架橋ゲルは半透明であったが PMA0 ゲル、PMA1 ゲルは透明であり、溶液の pH 変化に対しても安定性が維持された非常に強いゲルであった。これらの物性評価を種々の解析法にて行った。まず、X 線光電子分光解析法を使って PMA の複合化を確認した。リン由来のピークは PMA0 ゲル、PMA1 ゲルにて認められたが、未架橋ゲルと E/N ゲルでは認められず、PMA が複合化されていると考えられる。走査電子顕微鏡でゲルの表面観察した結果、未架橋ゲルでは凸凹が見られ、E/N ゲル、PMA0 ゲル、PMA1 ゲルでは平らな表面であった。PMA0 ゲル、PMA1 ゲルの断面では、内部に多孔性構造を有し、外部に緻密構造を有した層分離構造であったことから PMA がコラーゲンゲルの表面に複合化されていることが明らかとなった。PMA 導入による物性の変化を引張り実験にて検討を行った。E/N ゲルの場合、コラーゲン繊維はネットワークを形成し、ゲルの物性が增加された。しかしながら、コラーゲンを構成している  $\alpha$ -ヘリックス間の架橋でしかないため、力学的物性の増加には限界があると考えられる。PMA を固定化した場合には PMA 鎖によってコラーゲン繊維間の架橋が形成されるためさらなる強度のゲルが得られた。また、引張強度は PMA1 ゲルの場合、未架橋ゲルに比べ約 12.8 倍であった。コラーゲナーゼによる生分解性を調べた結果、架橋度が上がると共に分解が遅くなった。コラーゲナーゼはヘリックスを切断する。PMA の固定化は水の吸収を抑制し、コラーゲナーゼの浸透を防ぐ効果があると考えられ、コラーゲナーゼが吸収されてヘリックスが分解された場合でも PMA とコラーゲンの間の結合が維持され、分解速度は遅くなると考えられる。これは低い膨潤度と緻密なネットワーク形成により、コラーゲナーゼがゲル中に浸透し難いからであること意味する。細胞接着実験について検討した結果、PMA ゲルの場合に細胞接着の有意な抑制が見られた。以上の結果より、非細胞接着性表面を有するコラーゲン材料が得られた。

上記の手法を改良するため、以下の検討を行った。中性の水溶性条件 (2-morpholinoethane sulfonic acid, MES buffer) でコラーゲンの架橋およびポリマー修飾では EDC を用いていたが、水の中での架橋、特にポリマー修飾の効率が低い短点があった。EDC の場合、加水分解速度が速く、EDC の加水分解をコントロールが困難であるためと考えられる。そこで、pH 調節と NHS を用いた架橋およびポリマー修飾率の向上を目的に種々の検討を行った。pH 調節と NHS の使用は EDC の加水分解を防ぎ、カルボキシル基とア

ミン基間反応を誘導してアミド結合を生じられる。しかしながら、EDC の加水分解の速度は遅くなったものの、架橋反応の上昇にはあまり影響しなかった。そこで、エタノールと水の混合溶媒での EDC 架橋およびポリマー修飾を検討した。エタノールは無毒性であり、EDC の加水分解抑制効果に着目した。これまで、エタノールと水の混合溶媒での EDC 架橋は報告されているが、架橋率のコントロールに関する研究は報告されていない。しかし、コラーゲンの構造は疎水条件では親水条件とは異なり、 $\alpha$ -ヘリックスの中で疎水部分が外側に向けられコラーゲン構造が逆転する恐れがある。つまり、カルボキシル基とアミン基の反応のための EDC 架橋には適当でない。これを防ぐためにはエタノールと水の割合のバランスを調べて、最高架橋率の条件を探る必要がある。

エタノールと水の混合溶媒を使って EDC/NHS によるコラーゲンゲルの架橋率のコントロールについて検討した。具体的には、エタノールと水の割合を調節し、最高架橋率の条件を検討した。また、EDC と NHS の割合、架橋反応の時間依存性についても検討し、EDC によるコラーゲン最高架橋率を探索した。コラーゲン表面へのポリマー修飾条件も同様に検討した。MPC ポリマーをコラーゲンゲルに固定化したリン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルを種々の条件にて作製した。本研究では架橋密度と固定化された poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) の濃度を高めたリン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルを作製し、その物性と生物学的物性への影響を解析し、コラーゲンを基盤とする新しい生体材料としての可能性を検討した。

まず、エタノールと水の混合溶媒がコラーゲンに与える影響について調べた。コラーゲンは純粋なエタノール下では硬くなる。これは、コラーゲン繊維が全部脱水化してしまい、コラーゲン構造が逆転し、 $\alpha$ -ヘリックス中での親水性と疎水性ペプチドの位置に変化が起きて変性するからである。しかしながら、水との混合によってその脱水程度をコントロールすれば、コラーゲンの変性も防ぐことも可能である。実際、架橋されていないコラーゲンゲルはエタノールモル濃度 (NA) が 0.27 以下では解けてしてしまう。これは水による解離が原因であり、またコラーゲン構造の相逆転が行われていないため、 $\alpha$ -ヘリックスが吸水効果によってランダムコイル化するからである。結局、EDC を使って架橋できる反応は NA が 0.27 以下であることを示している。エタノール濃度が増加すると、架橋率も上昇する。これは、EDC の加水分解が遅くなって架橋反応に参加することを意味する。架橋率は NA=0.1 (エタノール 30% v/v) の時に最高値に到達し、その後低下することを見出した。これは、エタノールによる  $\alpha$ -ヘリックスの

相逆転と EDC の加水分解の一番よいバランスを持つポイントであると考えられる。EDC の場合、エタノールの条件では架橋を進めるが、水が存在する限り EDC の加水分解は避けられない。コラーゲンの場合、水の条件で  $\alpha$ -ヘリックス構造を維持するが、エタノール存在は  $\alpha$ -ヘリックスを相逆転して架橋を邪魔する。コラーゲン構造を維持しながら EDC の加水分解を防ぎ、架橋を進めるエタノールと水のバランスが一番よい条件は  $NA=0.1$  であると思われる。膨潤度の場合、 $NA=0.4$ (エタノール 70% v/v)以上では突然 1000%以上膨潤した。これはコラーゲンヘリックスの構造変化によるものの、中まで EDC による架橋反応が行われていないためであると思われる。このゲルを水に戻したら架橋されていない  $\alpha$ -ヘリックスが全部ランダムコイル化して膨潤したと考えられる。架橋度と架橋時間に関係があるかを調べるために反応時間を 72 時間まで延ばしてコラーゲンゲルを架橋した。その結果、コラーゲンゲルの架橋反応は 12 時間までは進めることが分かった。 $NA=0.1$  の条件では約 12 時間程度の加水分解防止効果あると考えられる。EDC は NHS が存在する時、30 分から 4 時間以内に加水分解起こると知られている。エタノールの導入は EDC の加水分解を確実に防ぐ効果があると思われる。しかしながら、まだカルボキシル基、EDC と NHS の比率によって架橋率が変化する可能性は十分ある。それは、カルボキシル基と EDC 間反応の場合、カルボキシル : EDC の比率は基本的に 1 : 5 以上にする必要があるのである。NHS の役割も非常に重要であって、EDC で置換されたカルボキシル基と反応し、NHS-カルボキシル基を形成した後、アミン基と反応する。つまり、いくら EDC の加水分解を防ぐことができあっても、カルボキシルを活性化に失敗したり、アミン基と反応しない限り、架橋反応は起こらないと考えられる。EDC : NHS : カルボキシル基の比率が 10 : 10 : 1 の時一番架橋が進められた。これは、やはり EDC と NHS が十分エタノール/水溶媒に存在しないと架橋反応は起こらないことを示している。リン脂質ポリマーは、 $NA=0.4$  以上(エタノール 70%、v/v)では沈殿してしまう。これはリン脂質のモル分率に関係なく全部沈殿してしまった。その結果、ポリマー修飾実験はすべて  $NA=0.3$  の以下で行われた。ポリマー修飾実験結果、 $NA=0.1$  で架橋率が最高であることが分かった。表面に存在するリン脂質基の量を調べた結果、 $NA=0.1$  のリン原子濃度が 0.88 になった。もし、 $\alpha$ -ヘリックスポリマー間架橋に失敗し、 $\alpha$ -ヘリックス内部架橋だけ起こったらリン基が見つけなかったはずである。最低自由アミン基のポイントと最高リン基量のポイントが一致することはこの修飾方法を使えば  $\alpha$ -ヘリックスポリマー間分子間架橋をう

まく起こすことができると考えられる。原子間力顕微鏡 (AFM) を使用しコラーゲンゲルの表面を分析した結果、ポリマー修飾したコラーゲンゲルの表面は非常に荒れている。自由アミン基は  $NA=0.1$  で PMA30 を使った時より低かったが、リン基量上がらず低下した。これは PMA90 を使った場合、PMA90 のカルボキシル基だけではなく、 $\alpha$ -ヘリックスのカルボキシルとも反応したことを記している。結局、ポリマー修飾の場合はポリマーと反応しなかつた EDC がコラーゲンと反応し、 $\alpha$ -ヘリックス内部架橋を起こすと考えられる。まだ 40% くらいの未反応アミン基に注目した。同じポリマー修飾方法を繰り返して、残ったアミン基を再び反応させ、ポリマー修飾率の上昇を目指した。再修飾過程により架橋密度を上昇された。上述した水系での反応と比べるとエタノールを添加した場合、架橋効率と就職率が上昇したことが分かった。特に、PMA30 を再び修飾したときは Sibarani らが得たデータと殆ど一致する。物理的に接着した MPC-ポリウレタン表面に近い量のリン基が表面に存在することを意味する。しかしながら、同じ PMA 量を再反応させたにもかかわらず、架橋率とリン基の量を 2 倍低下させられなかった。これは、表面に多く存在するポリマーの密度に関係すると思われる。ポリマー密度が高くなるとともに、反応場所 (reaction site) が少なくなると、反応が難しくなると考えられる。しかしながら、 $\alpha$ -ヘリックス内部架橋は起こらない。これは、PMA90 を使って再修飾した場合、確実に見える。PMA90 を再修飾した時架橋率とリン基量には変化が見られなかった。これは、EDC/NHS によるヘリックス内部架橋はポリマー修飾の時には起こらないことを示している。これを証明するために、Mdc-0 を EDC/NHS 架橋してみた。その結果、 $\alpha$ -ヘリックス内部架橋が起こり、自由アミン基の低下が見られた。コラーゲンゲルの表面は細胞接着性が高い。これは、コラーゲンのヘリックスを構成しているペプチドと細胞間化学的結合 (RGD 結合) が起こりやすいためである。EDC 架橋およびリン脂質ポリマーを修飾した場合、この RGD 結合を防ぎ、細胞接着を阻止する効果が得られる。特にリン脂質ポリマーのような分子運動性 (chain mobility) が大きい分子が表面に存在する場合は細胞接着を弱める。48 時間後の細胞接着性は、48 時間後ポリマー修飾コラーゲンゲルに接着した細胞の数はグルタルアルデヒドで架橋したコラーゲンゲル (G-gel) に接着した数より多いが、24 時間と 48 時間接着した細胞の数はあまり変わらなかったことが分かった。これは、細胞の細胞接着を完全に防げないことを意味する。接着した細胞の形態は、Uc ゲルと EN ゲルの表面に接着した細胞はゲルの表面と強い相互作用を起こし、扁平化した。一方、MiC、

MdC ゲルの表面には全部丸だった。これは PMA 表面と細胞間相互作用が弱いことを示している。顕微鏡で観察された細胞は全部光っていった。これは、細胞がこの表面の上で問題なく生きていることを意味する。コラーゲンをラットの皮膚の下に移植し、4週間後石灰化と炎症反応を調べた。その結果、皮膚の下に移植したコラーゲンは石灰化と炎症を起こさないことが判明した。コラーゲンの場合、ゲルを周りの組織に吸収されるが、ポリマー修飾したコラーゲンの場合、ゲルの形が変わらなかった。架橋されていないコラーゲンの場合、石灰化が起こらなかった。一般的に脱細胞化した組織は石灰化が起こると知られている。しかし、このコラーゲンは石灰化を起こすこともなく、ゆっくり分解が起こった。ポリマー修飾したコラーゲンの場合、細胞の接着を防ぐ効果があるため、カプセル化の恐れがあったものの、実際は表面に接着された細胞が観察された。接着した細胞は弱い接着力のため、短編試料を作る時にゲルから組織が剥がされた。これから、ポリマー修飾したコラーゲンは毒性を発現することもなく人体の中に炎症反応も起こすこともなく、安全に移植できると考えられる。

また、無機物質の修飾について、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り、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、昨年度は、HAp 結晶の微粒子を材料表面に結合することを発案した。具体的には、高分子基材にシルク繊維を用い、アルコキシシリ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 ナノ粒子を固定化する。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査した。その結果、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伸び接着している様子も確認できている。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製した。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。上記の結果から HAp と高分子材料との複合化の有用性が示されたことから、新たな高分子材料との複合化を行った。高分子材料としては生体適合性に優れた高分子であるポリビニルアルコール (PVA) を用いた。PVA は水素結合を介してハイドロゲルが作製される。本研究で脱細胞化に用いている超高静水圧印加法は、ハイドロゲル作製においても利用できる。そこで、超高静水圧法を用いてハイドロゲルと HAp との複合化を行った。種々の濃度の PVA 水溶液と HAp 溶液を混合し、超高圧処理を行うことで、PVA-HAp ハイドロゲルを得た。まず、PVA 単独の結果である。高濃度 PVA 溶液 (5%以上) への超高圧処理においては白色のハイドロゲルが得られ、PVA 溶液の濃度上昇に伴うハイドロゲルの力学的強度の向上が示された。これは、濃度上昇に伴う PVA 分子の増加により架橋領域が増加したためと考えられる。次に、HAp との複合化である。PVA 単独の場合と同様に、白色のハイドロゲルが得られ、濃度上昇に伴う力学的強度の向上も示された。得られたハイドロゲルを SEM 観察した結果、その表面での HAp の存在が確認され、また、ハイドロゲルの切断面の観察から、内部での HAp の存在が確認できた。生体適合性を検討するため、得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を検討した。細胞としては、ラット骨髄細胞を用いた。細胞播種5時間後では、ナノ HAp 粒子を含有しない PVA ハイドロゲルに比べ、HAp/PVA ハイドロゲルでの接着細胞数の有意な増加が認められた。また、後者においては、48時間培養後で十分な細胞の伸展が認められた。上述の HAp 複合化シルク繊維と同様に、HAp 複合化による高機能性の獲得が示された。また、さらなる高機能化として、DNA の複合化を行った。PVA と DNA の混合系においても超高静水圧処理を施した結果、PVA ハイドロゲルと同様に白色のハイドロゲルが得られた。DNA の複合化を確認するため、青色の DNA 染色剤で得られたハイドロゲルを染色した。その結果、PVA/DNA ハイドロゲルでは、青色に染色されたハイドロゲルが得られ、PVA ハイドロゲルの場合にはほとんど染色されなかったことから、DNA が複合化されたハイドロゲルが得られたと言える。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。

#### D・E. 考察・結論

本研究では、開発した生物由来材料は、の生体適合性などについて詳細に検討した結果、in vitro、in vivo において良好な結果であった。これらは、生物組織由来であることから、物性的に優れて性質を有しており、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。脱細胞化組織とコーゲン製材料の2種の基盤材料をもとに、今後も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
- 7) A. Korematsu, T. Furuzono, A. Kishida, Synthesis of block copolymers containing chain-controlled aramid and fluorethylene segments, *Macromol Mater Eng*, 290, pp.66-71, 2005.
- 8) T.Furuzono, D. Walsh, S.Yasuda, J.Tanaka, A.Kishida, Preparation of plated  $\beta$ -tricalcium phosphate containing of hydroxyapatite for use in bonded inorganic-organic composites, *J.Mater. Sci. Lett.*, 40(9-10), 2595-2597, 2005
- 9) T.Furuzono, S.Yasuda, J.Tanaka, A.Kishida, Unique preparation method of self-assembled spherical particles consisting of hydroxyapatite nanocrystals modified by amino groups, *J. Mater. Sci. Lett.*, 40(9-10), 2627-2629, 2005
- 10) 岸田晶夫、生体適合性評価法、樋口亜紺編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
- 11) 岸田晶夫、人工心臓膜、樋口亜紺編 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
- 12) 古蘭勉、岸田晶夫、再生医療：ナノアパタイト、*Bio Industry*、22 (5)、54-59、2005
- 13) 岸田晶夫、生体材料の遺伝子発現による評価、材料の化学と工学、日本材料学会、42(4)、18-22、2005
- 14) 岸田晶夫、藤里俊哉、再生医療用材料、再生医療-日本再生医療学会雑誌、4(4)、70-77、2005
- 15) 岸田晶夫、再生医療のための脱細胞化生物組織（バイオスキャフォールド）、生体材料工学研究所年報、39、9-12、2005
- 16) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Fujisato T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. Bone marrow cell-seeded biodegradable polymeric scaffold enhances angiogenesis and improves function of the infarcted heart. *Circ J* 2005; 69(9): 850-7.
- 17) 菅 理晴、藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣。ブタ組織の脱細胞化。移植 2005; 40(5): 441-4
- 18) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida. Influence of cross-linking on physicochemical and biological properties of collagen-phospholipid hybrid gel, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 2006, 31,

- 19) Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology, *Molecular Therapy*, 2006, 13, Suppl1, S75
- 20) Masahiro Okada, Syoji Yasuda, Tsuyoshi Kimura, Mitsunobu Iwasaki, Seishiro Ito, Akio Kishida and Tsutomu Furuzono, Optimization of amino group density on surfaces of titanium dioxide nanoparticles covalently bonded to a silicone substrate for antibacterial and cell adhesion activities, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 76A, 95-101,
- 21) Chiaki Yoshikawa, Atsushi Goto, Yoshinobu Tsujii, Takeshi Fukuda, Tsuyoshi Kimura, Kazuya Yamamoto, and Akio Kishida, Protein Repellency of Well-Defined, Concentrated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Brushes by the Size-Exclusion Effect, *Macromolecules*, 2006, 39, 2284-2290
- 22) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gel, *Biomaterials*, 2007, 28, 1-8
- 23) 木村剛、古藺勉、岸田晶夫、遺伝子導入におけるセラミック材料ーリン酸カルシウムを中心にして、先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー「ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料、技術、方法論の新たな展開」、原島秀吉、田畑泰彦編、メディカルドゥ、遺伝子MOOK 5号、2006、pp75-78
- 24) 木村剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、岸田晶夫、小林尚俊、人工角膜としての脱細胞化角膜の創製、*生体材料工学研究所年報*、40、16-19、2007
- 25) Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiya Moritan, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds with ultra high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery, *J. Artif. Organs*, in press
- 26) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, *Biomaterials*, in press, Online published 14 March 2007
- 27) 山岡哲二、木村良晴、藤里俊哉、医療用バイ

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 藤里俊哉、山岡哲二、中谷武嗣、北村惣一郎、生体組織マトリックスへの細胞播種方法、特許出願 2005-180344。2005年6月21日。
  - 2) 岸田晶夫、木村剛、南広祐、ゲル及び該ゲルからなる医療用材料。特許出願 2005-222296。平成17年7月29日
  - 3) 藤里俊哉、寺田堂彦、澤田和也、中谷武嗣。超臨界二酸化炭素による移植用生体組織の脱細胞化処理。特許出願 2005-296067。2005年10月21日。
  - 4) 藤里俊哉、寺田堂彦、澤田和也、中谷武嗣。生物由来スキャフォールドの作製方法。特許出願 2005-299590。2005年11月19日。
  - 5) 藤里俊哉、寺田堂彦、澤田和也、中谷武嗣。生物由来スキャフォールドの作製方法。特許出願 2006-207384。2006年7月31日。
  - 6) 黒岩貴文、湊谷謙司、船本誠一、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、笹山典久、白数昭雄、高野久輝、鳴海敏行、森反俊幸。人工血管。特許出願 2006-215239。2006年8月8日
  - 7) 藤里俊哉、染川将太、戸川祐一、江橋 具、中谷武嗣、向田嘉宏、宇田川晴英。無針注射器を用いた細胞播種法。特許出願 2007-47829。2007年2月27日
  - 8) 岸田晶夫、木村 剛、小林尚俊、藤里俊哉。脱細胞化軟組織の調製方法、移植片、及び培養部材。特許出願 2007-61025。2007年3月9日
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル(小伝馬町駅前)4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社