

2 再生医療

2.1 歴史

1988年に、米国のシンポジウムのタイトルとしてTissue Engineering（組織工学）という用語が初めて使用された。大きな損傷を受けた組織や器官（臓器）は、もはや正常に自然修復されることはなく、その治療は、人工臓器や臓器移植に頼ることとなる。従来の人工臓器では、材料に対する生体反応の制御が不十分であり、また、臓器移植ではドナー不足や免疫反応による拒絶反応に加えて倫理的な問題が残る。そこで、組織工学の検討が始まり、1980年頃、皮膚組織の再建が試みられた。フィーダーレイヤーなる細胞層の上で表皮組織が重層化することを利用して表皮シートが作製され、続いて、真皮の再生や、コラーゲンゲルと線維芽細胞、表皮細胞を組み合わせた皮膚の再生が相次いで報告された。1993年、R. Langerらは、スキヤホールド（Scaffold、足場材料）と呼ばれるポリグリコール酸（PGA）不織布に軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な軟骨の再生が誘導できること、さらに、この手法が、肝臓、腸、尿管、骨などへ展開できる可能性を示唆した¹⁾。再生が困難と考えられていた軟骨組織を対象にしたことと、異所的な組織の再構築に成功したことで、組織工学は世界的な注目を集めた。さらに、ヒト胚性幹細胞の単離が報告され、組織幹細胞が続々と発見されると、組織工学の最大の問題であった細胞源の問題が解決すると期待され、ますます研究が盛んになった。

2.2 再生医療

近年注目されている再生医療は、再生医工学と細胞移植に大別できる（図1）。再生医工学の中心は、生分解性マトリックスに細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略であり、上述の組織工学と同等の概念である（図1-②、③）。スキヤホールド材料は、細胞増殖のための接着足場として機能し、細胞が増殖し組織が構築されるとともに分解吸収されることが期待されている。

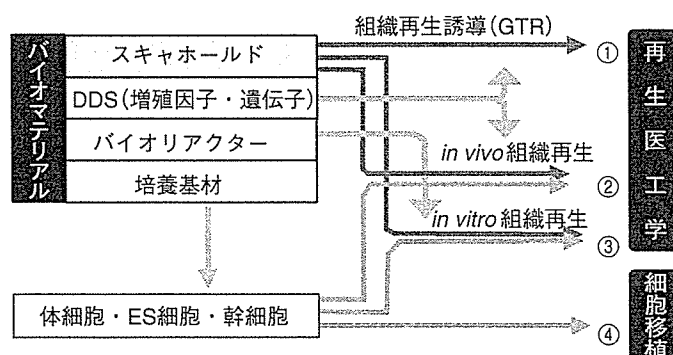


図1 再生医療の戦略

図1の①は、スキャホールドのみを使って、*in vivo*で、組織再生を試みる戦略であり、組織再生誘導法（GTR, Guided Tissue Regeneration）と呼ばれる。例えば図2のように、断裂した末梢神経を生体吸収性チューブでつなぐことで、ある期間、末梢神経が再生する空間を確保することで、神経細胞の再生を妨げる周囲組織の浸潤を防ぐことができる。また、図1の④に示した細胞移植は、マトリックスを利用することなく体外に取り出した細胞を欠損部位に注入することで治療効果をねらう方法である。1994年に、患者の膝関節から採取した軟骨細胞を増幅し、その細胞分散液を膝関節の軟骨欠損部に注入することで、関節軟骨が再生できることが示された。最近では、自己の幹細胞などを移植することによる心疾患の治療、あるいは、ドーパミン分泌細胞を移植することによるパーキンソン病の治療などが報告されている

2.3 生体吸収性スキャホールド材料

再生医工学の一つの重要要素である生体吸収性材料（生分解性材料）は、その由来により天然

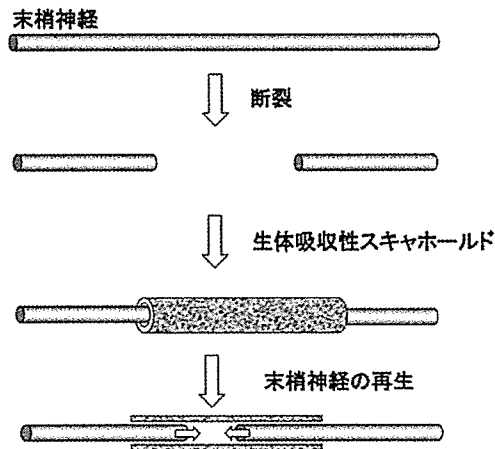


図2 GTRによる組織再生

表1 種々の生分解性高分子

天然高分子	1. 植物産生	1.1 多糖	デンプン・アルギン酸
	2. 動物産生	2.1 多糖	キチン・キトサン・ヒアルロン酸
	3. 微生物産生	2.2 タンパク質	コラーゲン・血漿アルブミン
合成高分子		3.1 ポリエステル	ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)
		3.2 多糖	ヒアルロン酸
	1. 脂肪族	1.1 重縮合系	ポリブチレンサクシネート
	ポリエステル	1.2 ポリラクチド類	ポリグリコール酸・ポリ乳酸
		1.3 ポリラクトン類	ポリ(ε-カプロラクトン)
		1.4 その他	ポリブチレンテレフタレート・アジペート
	2. ポリオール		ポリビニルアルコール(低分子量体)
3. ポリカーボネート		ポリエステルカーボネート	
4. その他		ポリ酸無水物・ポリシアノアクリレート	
			ポリオルソエステル・ポリフォスファゼン

高分子と合成高分子とに分けられる(表1)²⁾。天然高分子に対しては、生体自身が分解酵素を用意していることが多く、酵素分解型生分解性材料として利用できる。酵素分解型の場合、分解速度がきわめて速いために架橋などの化学処理が必要となる欠点があり、また、生体由来の免疫原性などの問題も懸念される。一方、セルロースやデキストランのように、対応する分解酵素が生体内にない場合や結晶性が高い場合には、極めて分解速度は遅く、例えば、酸化再生セルロースのように化学修飾して³⁾、生分解性の癒着防止膜⁴⁾や止血剤⁵⁾として臨床応用されている。いずれにしても、その安全性確保と分解速度の調節は容易ではなく、これらの材料の代替となる合成材料に対する期待が高い。

合成高分子の場合、モノマー単位の化学構造とその結合様式で生体分解性を調節することが出来る(表1)。さまざまな脂肪族ポリエステルが開発されているが、生体内で完全に水と二酸化炭素に代謝され、かつ、十分な力学強度と適度な分解速度を有する、PLAやPGAに代表されるポリ- α -ヒドロキシ酸の誘導体が最も有望である。その応用範囲は多岐にわたり、例えば、高分子量で高強度のポリ-L-乳酸(PLLA)は生分解性の骨プレートや骨固定ピンとして応用されている(図3)。高い強度を得るために、光学純度の極めて高いPLLAから高い結晶化度のロッドを調製した後に、切削により成形加工されており、顔面や骨頭の骨折など、比較的荷重の小さな部位では十分に使用可能である。グリコリドやラクチドを他の環状モノマーと共重合体することで得られる柔軟な共重合体は、吸収性の外科用縫合糸として用いられている(図4)。合成の生分解性縫合糸としては1962年にアメリカンシアナミド社がPGA繊維を開発し、1970年にDexonTMとして上市し、その後、次々と開発が進んだ。

しかしながら、再生医工学用材料としての利用を目指した場合、このような特性のみでは十分とは言えず、さらに、高い機能性を有したPLA系誘導体が期待されている。次項では、我々のグループが進めている、PLA製人工皮膚材料と、PLA系温度応答性ゲル化材料(インジェクタブルスキャホールド)に関して紹介する。

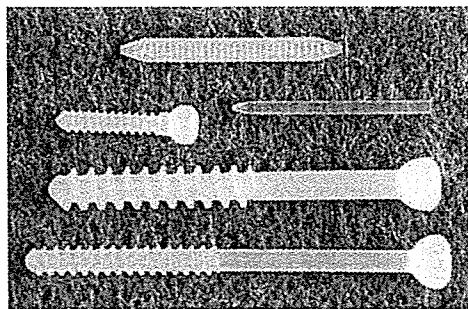


図3 ポリ乳酸製の骨固定ピン

第1章 医療用バイオベースマテリアル

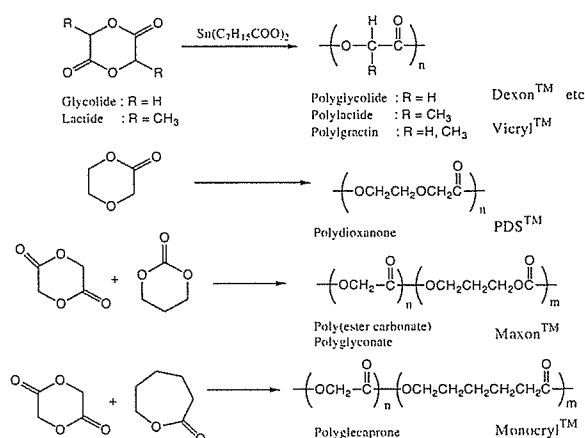


図4 さまざまな外科用縫合糸の構造

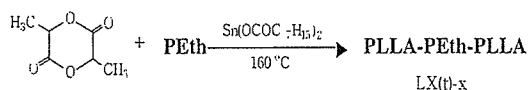
3 機能性ポリ乳酸誘導體

3.1 人工皮膚—ポリ乳酸系ハイドロゲル／ハイドロキシアパタイト複合体—

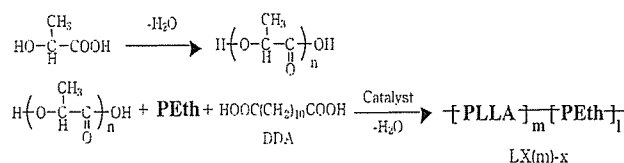
狂牛病問題の影響で、コラーゲンの医療分野での利用が制限されつつある状況のなかで、コラーゲンが有する優れた生体適合性を合成材料で再現することは重要な課題である。我々のグループでは、コラーゲン製人工真皮の代替となる機能性PLA誘導體の開発を進めてきた。まず、細胞がマトリックス内部で増殖できる環境を与えるためには、含水ゲルであることが重要であると考え、PLAセグメントとポリエチレングリコール(PEG)セグメントからなるマルチブロック共重合体の新規合成方法を開発した(図5)⁶⁾。ここでは、生体内での蓄積性を回避できる分子量20000のPEGを利用した。所定量のデカンジカルボン酸を系中の水酸基とカルボキシル基を等モル量に調節するために添加し、さらに、ジフェニルエーテルを溶媒とした環流により脱水重縮合を加速させた。得られたマルチブロック共重合体のPEG組成は3～87%であり、何れの分子量も約10万であった。すなわち、マルチブロック共重合体の開発により、PLA-PEG-PLAトリブロック共重合体ではPEG組成の上昇とともに分子量が低下するという欠点を克服したことになる。なぜなら、PEGの組成が3～87%のトリブロック共重合体の理論分子量は、PEGの分子量が20000の場合、67万～2.3万となる。逆に考えれば、成形加工が可能な分子量10万程度を確保するには、PEG組成は20%が上限と云うことである。このマルチブロック共重合体の開発により、速い分解速度と含水性を有しながらも市販の外科用縫合糸と同等の初期破断強度を有する強い材料が調製でき、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなど様々な形状でスキャホールドとしての利用が可能となった。

マルチブロック共重合体のバルク内の構造は、その組成比に応じたマイクロ相分離構造を有する

Synthesis of Triblock Copolymers



Synthesis of Multiblock Copolymers



PEth :	PEG	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\text{H}$
	PPG	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{O}\right)_y-\text{H}$
	Pluronic F68	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\left(\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{O}\right)_y-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\text{H}$

図5 従来型のトリブロック共重合体（上）とマルチブロック共重合体（下）の合成スキーム

ことがDSC測定およびX線散乱より確認されている。PEGドメイン中に隔離されたPLAドメインを生分解性架橋点として、PEG成分が膨潤するために、これまでにない生分解性ハイドロゲルを形成する。PEG組成の上昇とともに含水率が上昇し、含水率の向上とともに *in vivo* 組織反応は飛躍的にマイルドになり、ほとんどカプセル化も認められず、また炎症細胞の浸潤も有意に抑制されていた。我々は、このバイオイナートなPLA/PEGマルチブロック共重合体ハイドロゲルに対して軟組織親和性を付与することで人工皮膚への応用を進めた。

ハイドロキシアパタイト (HAp) は、骨再生用マトリックスとしてのみならず、軟組織との親和性も古くから知られている。我々は、上述のマルチブロック共重合体ハイドロゲルに組織親和性を付与するために、交互浸漬法⁷⁾を用いてマルチブロック共重合体ハイドロゲル/HAp複合体を作製した。交互浸漬サイクル数とともにHApが析出し、さらに、PEGドメインを33%含有するために膨潤率が高いLE(m)-33の場合、ゲル内部でもHApが析出していることがEPMA分析の結果から確認された。図6は、マルチブロック共重合体の凍結乾燥により作製したスポンジ構造に対してHApを複合化し、さらに、シリコン薄膜を重層した構造の人工真皮の断面SEM写真である。ラット皮膚全層欠損モデルに対する移植試験を行い、所定期間後に組織修復性と拘縮の程度を定量化した結果、炎症反応は極めてマイルドであり、カプセル化も軽微であった(図7)。また、周囲組織が速やかに浸潤することで皮膚組織の再生を誘導することが明らかとなった。これらの優れた組織修復性は、多孔質材料の微細孔内への組織の浸潤のみならず、ハイドロゲルマトリックス中への周囲細胞の進入現象が大きく影響している。この速やかな皮膚組織修復は、治癒に伴う組織の拘縮を有効に抑制した。何れの指標も、ポリ乳酸スポンジとコラーゲンと

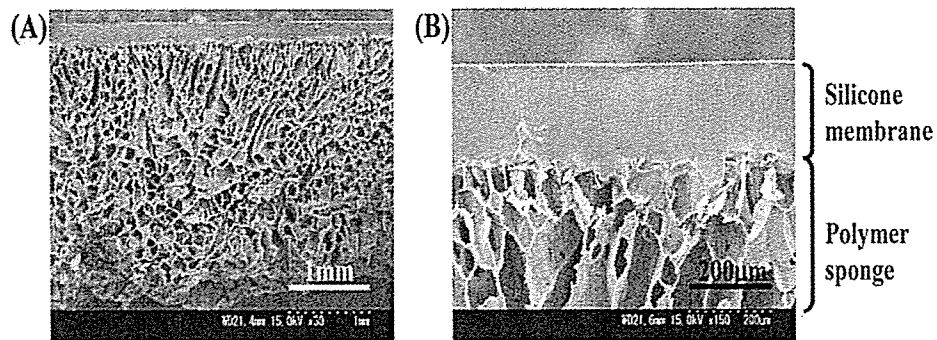


図6 マルチブロック共重合体スポンジとシリコン薄膜からなる、完全合成型人工皮膚のSEM写真

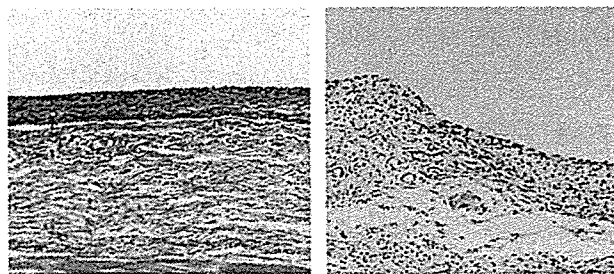


図7 ラット皮下2週埋入後の組織反応

の複合材料をしのぐ特性であり、このマルチブロック共重合体ハイドロゲルスポンジ/HAp 複合体は、その柔軟な特性とマイルドな炎症反応を併せもつ皮膚組織修復材料として期待される。

3.2 細胞移植用インジェクタブルスキャホールド

近年、心筋梗塞部位への細胞移植などによる著効が報告されているが、移植した細胞を患部へ効率的に送達（固定）することは容易ではなく、細胞生着率は10%以下との報告もある。そこで、移植細胞を懸濁させるマトリックスとしてインジェクタブルスキャホールドが注目されている。インジェクタブルスキャホールドとは、生体外では溶液であり、患部に適応された後に何らかの刺激によりゲル化（固化）する相転移材料である。我々のグループでは、ポリ-L-乳酸（PLLA）、あるいはポリ-D-乳酸（PDLA）と、PEGとのABA型トリブロックコポリマーを利用して、低温では液状で32℃以上でゲル状に相転移するインジェクタブルスキャホールドの開発に成功した⁹⁾。まず、PLLA-PEG-PLLA トリブロック共重合体を水系中に分散してPLLAコアとPEGコロナからなる高分子ミセル（L体ミセル）を作製する。同様にPDLA-PEG-PDLA からD体ミセルを調製した。両者の10%懸濁液を混合し（図8，d），37℃で処理すると透明なゲル状に変化した（図8，e）。このような相転移現象は、L体ミセルのみの懸濁液では観察されない

こと（図8，a-c），および，X線散乱解析の結果から，この相転移現象が PLLA と PDLA とのステレオコンプレックス形成に基づいてミセル間に架橋が生じるためであることが明らかとなっている。このインジェクタブルゲルは，生体内で分解される PLA と生体内非蓄積性である PEG のみからなる，含水率 90 % の完全生体吸収性のインジェクタブルスキャホールドである。

このゲルが細胞毒性を有さないこと，および，細胞の生存と増殖を許容するかを見当するために，緑色蛍光（GFP）発現マウス繊維芽細胞の移植実験を行った。L 体・D 体ミセル混合液に所定数の GFP 発現細胞を添加した懸濁液を，GFP（-）マウス的大腿部に注入し，所定時間後に移植細胞の様子を蛍光顕微鏡下にて確認した（図9）。その結果，ゲル中で細胞は正常に蛍光を発し，その毒性の低さと，細胞移植用インジェクタブル材料として機能することが実証された。

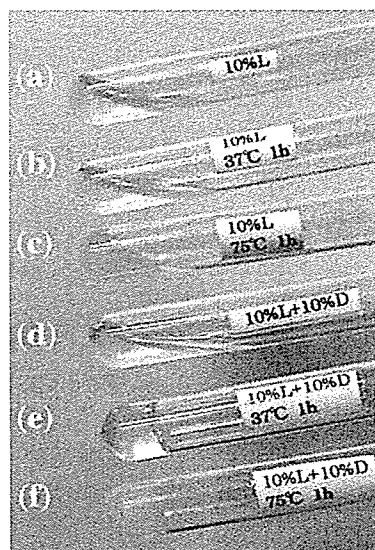


図8 L 体ミセル懸濁液 (a) は 37 度ではゲル化しない (b) が，L 体・D 体混合ミセル溶液 (d) は，ステレオコンプレックス形成に基づいて，37 度でゲル化する (e)

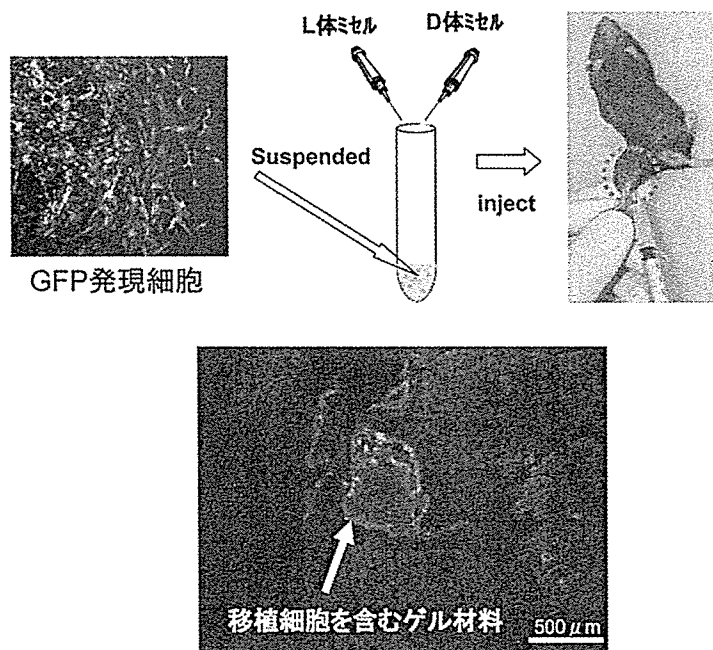


図9 緑色蛍光タンパクを発現する細胞の移植実験

4 生体組織の利用

医療分野におけるバイオベース材料の究極の利用は臓器移植ではないだろうか。現代の技術では、完全な臓器を作製することは不可能であり、多孔質スキャホールドを利用した再生医工学では、3次元構造を有する組織や器官への応用は容易ではない。そこで、我々は、さらに機能性に富んだスキャホールドとして、生体組織から細胞を除去して生体スキャフォールドとして利用するアプローチを試みている。ヒトあるいは動物から採取した心臓弁から、放射線照射及び洗浄処理によって細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去した脱細胞化組織は、移植後に自己細胞が侵入することでリモデリングされ、自己組織化されると期待される。さらに、この脱細胞化スキャフォールドに、*in vitro*において患者の自己細胞を播種するテラーメード移植によって、より早期の自己化を獲得できると考えられる（図10）。

生後4ヶ月、体重約10kgのクラウン系ミニブタから清潔下にて下行大動脈を採取し、PBSによる洗浄後、PBSを満たした滅菌容器に封入して、10、30、100、300、あるいは1000Gyのガンマ線を照射して約2週間洗浄した。ガンマ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、照射線量が増えるにつれて洗浄後組織内の核の残存が減少し、さらに、残存DNAを測定したところ、100あるいは300Gy以上の照射では大幅に減少した（図11）。種々のガンマ線量による組織脱細胞化の基礎的検討を残存DNA定量試験、力学試験にて行った。

一方、作製した脱細胞組織の破断強度並びに弾性率は、もとの組織とはほぼ同程度であった。すなわち、300Gy以上のガンマ線を照射後、洗浄処理することによって、細胞外マトリックスの

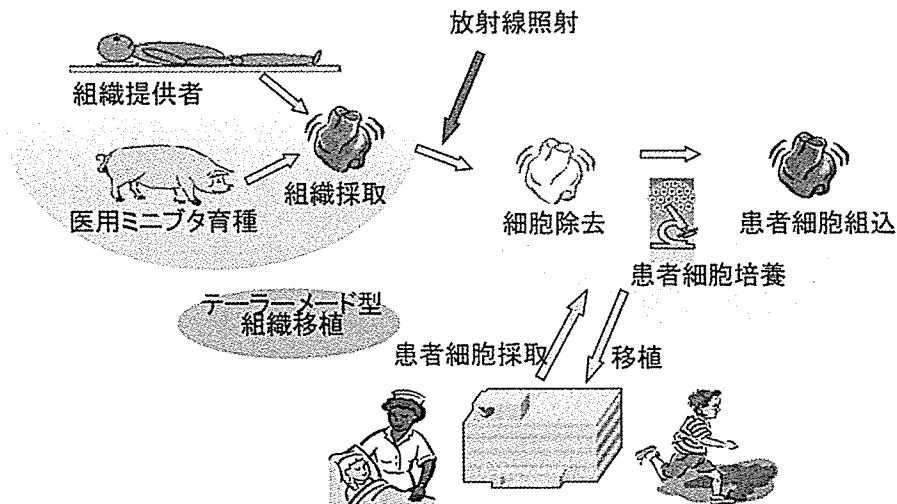


図10 テラーメード型組織移

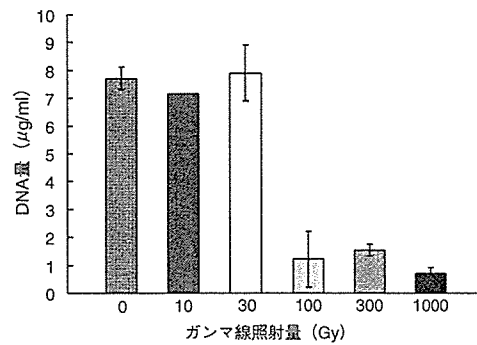


図11 ガンマ線照射及び洗浄処理によって細胞除去したブタ血管組織の残存 DNA 量

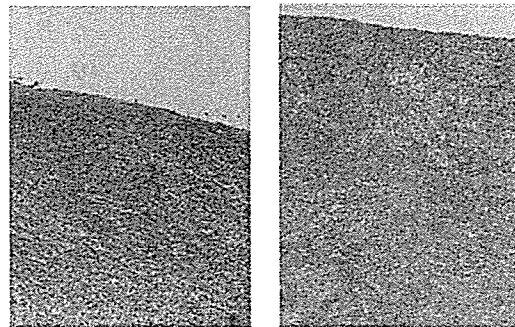


図12 ガンマ線照射 (10kGy) 及び洗浄処理によって脱細胞化したブタ心臓弁組織 (左: 処理前、右: 処理後)

特性を保持したままで、循環器系組織内の細胞はほぼ完全に除去できる。

Wister ラット (7 週令) の皮下部位に上記脱細胞化ミニブタ大動脈を埋入し、2 週間後に取り出して組織学的検討を行った。脱細胞化ミニブタ大動脈の場合では、血管新生が認められず、さらに、マクロファージ陽性を示す CD 68 陽性細胞数が優位に抑制されており、脱細胞組織のマイルドな炎症反応が証明された。上述したように、生体由来であるが故に懸念されるウイルスや感染性物質も、放射線処理により回避できる可能性も高く、今後、安全かつ優れた組織親和性を有するスキャホールド材料として期待できる。

5 おわりに

これまでに生分解性と分解生成物の安全性が確認されてきた PLA や PGA のみならず、生体由来の物質の高い機能性は計り知れない。今後も、様々な合成手技や化学修飾法を開発することで、その機能性はさらに向上するであろう。生物学的に優れた細胞外マトリックスの働きを少し

でも再現できる機能性マトリックスにより、今後の組織再生医工学は新たなステージを迎えることとなる。

謝辞

本研究の一部は、原子力試験研究費（H15-17）の補助により行われた。

文 献

- 1) R. Langer J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920-6(1993)
- 2) 木村良晴, 山岡哲二, 生分解性高分子の基礎と応用 (筏 義人編著, アイピーシー出版), pp 7-63 (1999)
- 3) 筏 義人, 生体材料学, 産業図書, (1994)
- 4) Nishimura, K., Bieniarz, A., Nakamura, R., diZerega, G. S., *Jpn. J. Surg.*, 13, 159-163 (1983)
- 5) Lason, B. Nisell, H., Grandberg, I., *Acta Chir. Scand.*, 144, 375-381 (1978)
- 6) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 37, 1513-1521 (1999)
- 7) Taguchi, T, Kishida, A, Akashi, M, *J Biomater Sci Polym Edn*, 10: 331-339. (1999)
- 8) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208 (2001)

4 心臓弁

藤里俊哉*¹, 北村惣一郎*²

4.1 はじめに

日本人工臓器学会の調査によると、我が国で心臓弁膜症によって置換術を受けた患者は大動脈弁と僧帽弁あわせて1999年において年間8千人以上にのぼり、80%が機械弁、残り20%が異種生体弁である。また、米国胸部外科学会の調査によると、大動脈弁置換術は1997年において年間約9千人であり、判明しているもののうち約50%が機械弁、45%が異種生体弁、3%が同種弁、残りが自己弁である。術前診断や術中の体外循環技術の向上などもあり、大動脈弁置換術における死亡率は1998年において約4%とされている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある心臓弁置換術ではあるが、現在、どのような問題があり、これらを解決するために再生医療心臓弁にはどのような特性が要求されるのであろうか。まず、心臓弁置換術の現状について述べた後、現在、開発されつつある再生医療心臓弁の動向、そしてその将来展望について述べる。

4.2 心臓弁置換術の現状

現在用いられている機械弁は、主にパイロライトカーボン製の2枚の半月板弁葉をもった二葉弁である。従来、弁座部分の構造上の問題から弁前後の圧較差が無視できない大きさで、心機能や予後に影響を与えるとされてきたが、最近、弁座部分の改良によって有効弁口面積を広くしたものが開発され、弁輪が狭小の症例においても通常の弁置換術で対応可能である。また、独特の弁葉作動音を減少させたものも開発されている。機械弁はすでに十分な耐久性と血行動態を得ているが、依然として抗血栓性の問題は解決されていない。抗凝固のため、術後は生涯にわたり厳重なワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症をきたす頻度も高くなる。また、ワーファリンが催奇形性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できないという問題もある。

異種生体弁は、ブタ心臓弁あるいはウシ心臓を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、後述の同種弁の成功をきっかけにステントを用いないステントレス異種生体弁が導入され、耐久性の向上が期待されている。異種生体弁は抗凝固性に優れてはいるが、若年者では5~10年程度の耐久性しかなく、

*1 Toshia Fujisato 国立循環器病センター研究所 再生医療部 研究員

*2 Soichiro Kitamura 国立循環器病センター 総長

通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。また、BSE問題をきっかけに、ウシ心膜の使用は控えられる傾向にある。

欧米では1985年頃から、我が国でも、近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことにより、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。これは、機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性が優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者では比較的早期に機能不全をきたす症例も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されている。若年者に有効とされる Ross 手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が少なくない。以上のように、再生医療心臓弁に求められる特性として、抗凝固性、耐久性、成長性などが挙げられよう。

4.3 再生医療心臓弁の世界的動向

マサチューセッツ工科大学の Langer や Vacanti らによって提唱された組織工学の手法は、すでに米国で細胞を組み込んだ人工皮膚として製品化されている。同様の手法を用いた再生医療人工弁が、1995年以降、彼らのグループから報告されている¹⁾。新潟からはヒツジを用いた実験で、末梢血管壁の細切によって血管内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞を分離した後に8~10週間培養し、ポリグリコール酸製のシート状メッシュ上にまず線維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を播種することによって、再生医療心臓弁葉を作成した。ヒツジの肺動脈弁の一葉を再生医療心臓弁葉で置換したところ、6週後には正常組織と同様の組織が再生し、9週以降は力学特性も正常組織と同等であったと報告している²⁾。最近、彼らは弁葉だけでなく、三葉を有するバルサルバ洞付きの心臓弁組織 scaffold を開発し、細胞を播種することで *in vitro* で弁全体を組織工学的に作成し、臨床応用を開始する計画である。このような生体吸収性 scaffold を用いた再生医療心臓弁は、韓国ソウル大学などからも報告されている³⁾。

一方、米国の CryoLife 社は1992年から米国政府の補助を受けて動物組織から細胞を除去した異種組織移植法の研究開発に取り組み、詳細を明らかにしていないが、SynerGraft と称する細胞除去方法を発表している。同社は1999年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生医療心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している⁴⁾。

ドイツ・ハノーバー医科大学の Haverich らのグループは、1998年から CryoLife 社と同様に異種生体弁から動物由来細胞を除去し、さらにレシピエントの自己血管内皮細胞を播種している。

彼らは界面活性剤である Triton X-100 やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている⁵⁾。一方、英国リーズ大学の Ingham らのグループは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している⁶⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らのグループはヒツジを用いた 6 ヶ月間の動物実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種すると、弁の変形も石灰化も見られなかったと報告しており⁷⁾、臨床使用を開始している。

4.4 我々の最新成果の紹介

我々は 2000 年から、Haverich らの方法を対照として、脱細胞化した異種生体弁を用いた再生医療研究を開始した。我々が生体組織を選んだのは、以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁のような複雑な形状を吸収性人工材料で造形することが容易でないこと、およびポリ乳酸などの生体吸収性人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性をもたせるのが難しいと考えたためである。ミニブタあるいは食用ブタ肺動脈弁を採取し、Triton X-100 溶液に浸漬して脱細胞化処理した。脱細胞化処理による生体力学特性への影響は力学試験機で測定した。ミニブタの大腿動脈から酵素処理によって採取した自己内皮細胞を 2 週間培養増殖後に播種し、2 日後に右心バイパス下にて肺動脈弁置換術を施行した。心エコーと圧測定による血行動態測定後に移植弁組織を摘出し、免疫染色などによって組織学的所見を検討した。

24 時間の無細胞化処理によって表面から 1 mm 以内の組織内細胞を除去できた (図 1)。組織表面の血管内皮細胞は破壊されていたが、完全に脱落することはなく、他の物理的方法の併用が必要であった (図 2)。また、Triton X-100 は細胞毒性を示すため、組織から除去して細胞を播種するためには 2 週間以上の洗浄を要した。脱細胞化処理によって強度・弾性率ともに増加したが、コラーゲン線維および弾性繊維の層内含有量と配列状態はほとんど変化なく、弁葉の厚さに

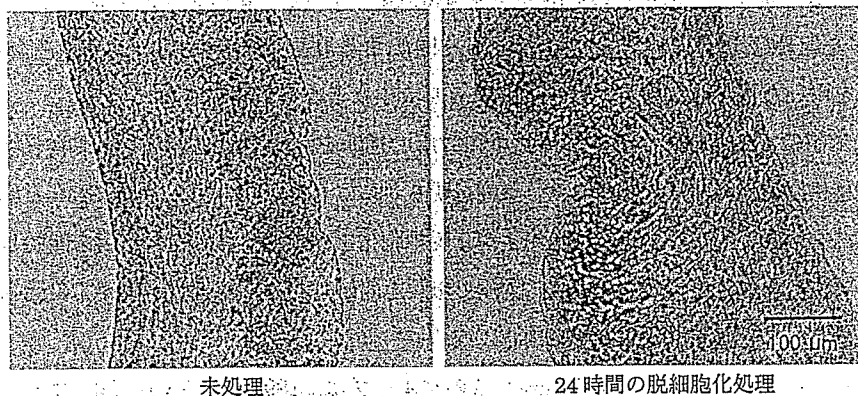
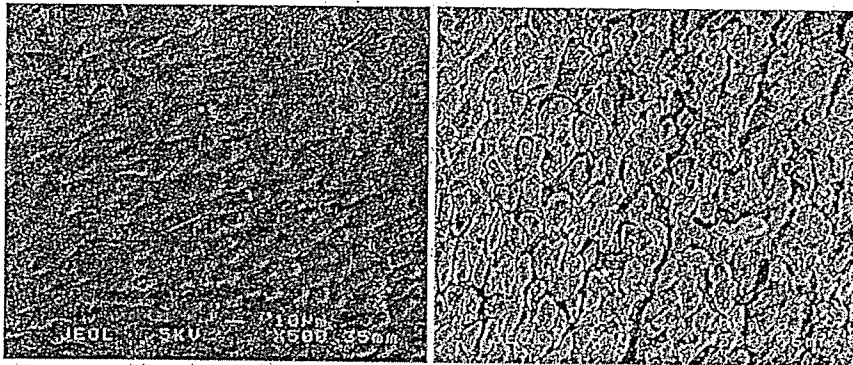


図 1 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の組織断面



未処理 24時間の脱細胞化処理

図2 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の表面

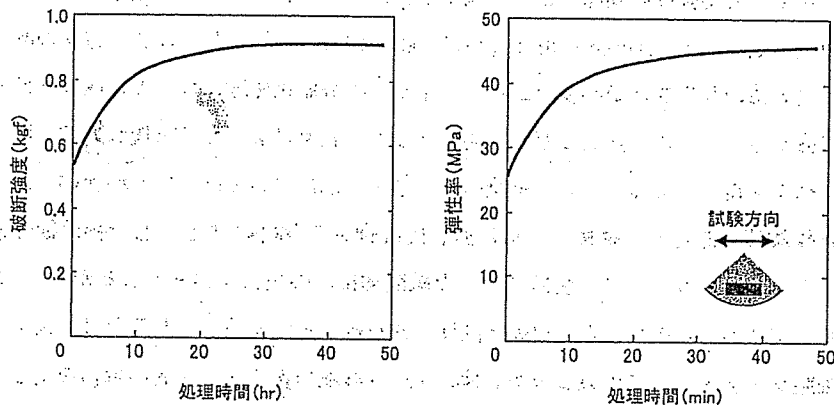
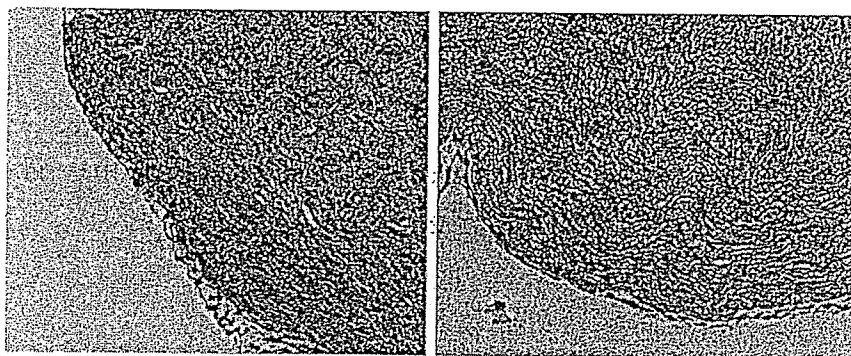


図3 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の生体力学特性



自己細胞を播種した心臓弁 細胞を播種しない心臓弁

図4 ミニブタに1ヶ月間移植された再生医療心臓弁

も変化は見られなかったため、置換術への影響はないと考えている(図3)。ミニブタ血管内皮細胞は分離も容易で、内皮細胞用培地で平易に増殖させることができ、静置下での培養で弁葉表面に内皮細胞を播種できた。ミニブタへの移植実験では術後1ヶ月においても良好な弁機能を示しており、自己内皮細胞を播種した再生医療弁では表面が完全に血管内皮細胞で覆われるとともに、組織内部への細胞浸潤も見られたのに対し、細胞を播種しないものでは、血管内皮細胞でほぼ覆われたものの、組織内への細胞浸潤はわずかであった(図4)。

4.5 問題点と将来展望

以上のように、現在、再生医療心臓弁の scaffold には生体吸収性材料と脱細胞化生体組織とが研究されているが、現時点ではどちらが優れているかを見極めることは困難である。新岡らの再生医療心臓弁および CryoLife 社の SynerGraft とともに、肺動脈弁では良好な結果が得られているが、大動脈弁では力学強度の問題などから満足な結果が得られていないと報告されている。大動脈位での血圧に耐えうる scaffold を得るために、吸収性材料の材質および造形方法の改良、あるいは細胞除去方法の改良などが必要であろう。また、脱細胞化処理については組織深部の細胞除去、動物組織からのウイルス除去などが課題であるが、我々はまったく新規な方法を開発しており、有望な結果を得つつある。一方、細胞の組み込み方法については、いくつかのグループは平滑筋細胞と線維芽細胞を先に播種し、後に血管内皮細胞を(播種)することで複数種の細胞を組み込んでいる。バイオリクター装置を用いた細胞播種法の報告が参考となるが⁸⁾、弁葉部、弁葉基部、血管壁部のそれぞれに正常組織と同様に複数種の細胞を組み込むことは容易でないと思われる。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担をできるだけ下げするためには、骨髄細胞あるいは末梢血幹細胞などの利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP 基準に適合した細胞プロセッシング設備の設置も必要となる。

すでにいくつかの研究グループは臨床応用を始めつつある。いずれ、再生医療心臓弁が機械弁や異種生体弁に取って代わる日も近いと信ずる。

謝 辞

我々の研究の一部は、厚生労働省厚生科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業(H12-再生-005)並びに循環器病研究委託費事業(13公-1)の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 Apr; 119 (4 Pt 1): 732-40.
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 Nov 1; 94 (9 Suppl): III164-8.
- 3) Kim WG, Cho SK, Kang MC, Lee TY, Park JK. Tissue-engineered heart valve leaflets: an animal study. *Int J Artif Organs* 2001 Sep; 24 (9): 642-8.
- 4) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 87-92.
- 5) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50-5.
- 6) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000; 10 (2): 83-124.
- 7) Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 93-8.
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001 Feb; 7 (1): 9-22.

繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤田和也・寺田堂彦・藤里俊哉

1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維=衣料品”のイメージが強いことに変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げる事が出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用化しようとする研究例である。

2. 研究背景

我々の体内に疾病組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、パイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

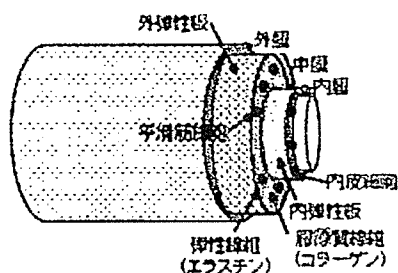
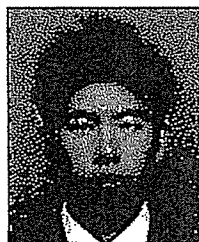


図1 血管構造の概略図



DOHIKO TERADA
大阪工業大学 工学部 博士研究員
博士(工学)
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1
〈専門〉高分子材料加工
〈趣味〉読書



KAZUYA SAWADA
大阪成蹊短期大学 総合生活学科
准教授 博士(工学)
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62
Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579
E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp
〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学
〈趣味〉スキー、旅行



TOSHIYA FUJISATO
大阪工業大学 工学部 教授 工学博士
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1
Tel: 06-6954-4746
E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp
〈専門〉再生医学、組織工学
〈趣味〉旅行計画

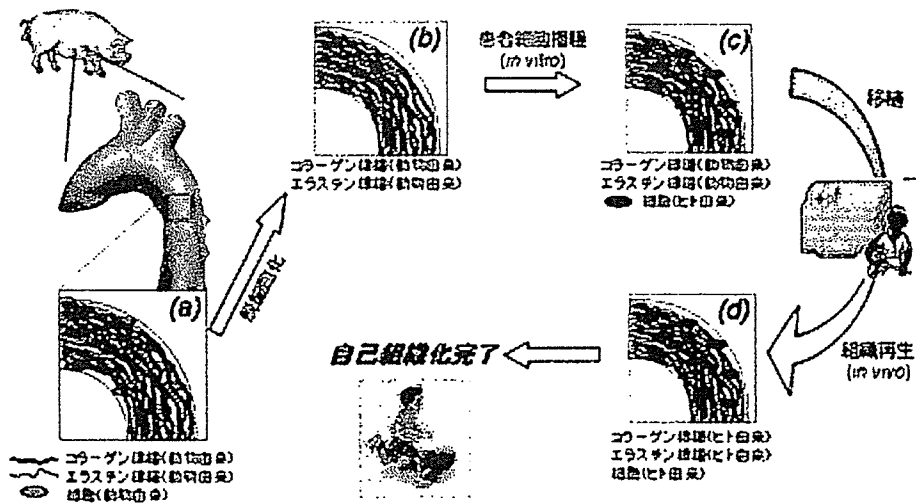


図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては繊維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、替わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組織化が完了する。

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くするためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

3. 生体線維の洗浄手法

— 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果を高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤はSDSやTritonX-100が主であり、最適洗浄効果を考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

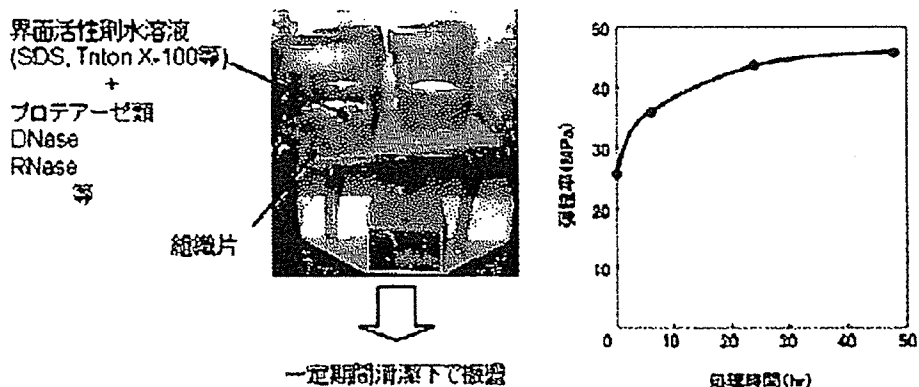


図3 界面活性剤による脱細胞化 (左: 洗浄手法 右: 処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これも実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な“すすぎ洗い”をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残されていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

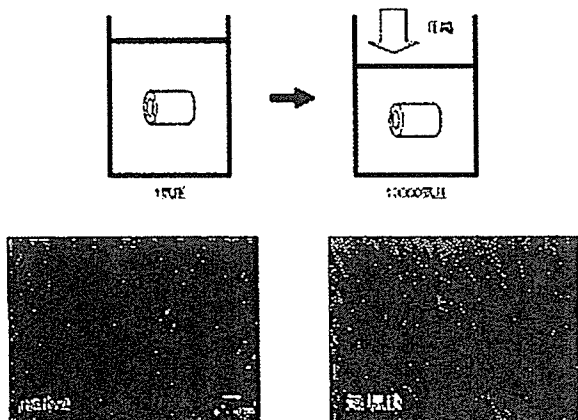


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウイルス(PERV)の残存もPCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

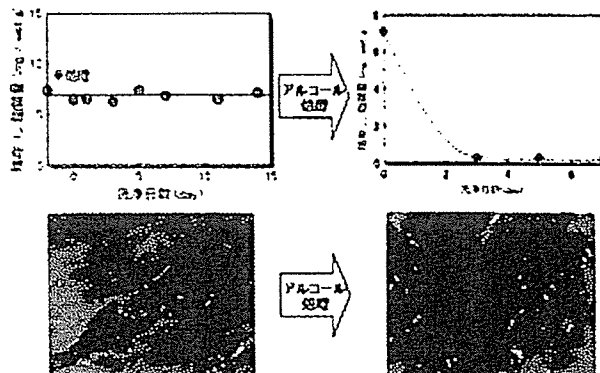


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化 (上段: 定量分析結果 下段: TEM 観察結果)

臨界流体抽出は、既に製薬・食品分野で広く実用化されており、今も新たな応用化分野が広がっている。超臨界流体の最大の特徴は、圧力制御により媒体の誘電率を連続的に変化させることが可能な点である。つまり、単一媒体にもかかわらず、圧力変化のみで複数の溶媒特性を引き出すことが可能になる。誘電率変化の程度は媒体により異なるが、適切な媒体選択により複数の目的物質を選択的に抽出することが可能になる。現在、抽出において最も実用化例の多い媒体はCO₂である。本研究チームにおいてもCO₂を媒体の有力候補として検討している。超臨界CO₂の脱細胞化への利用における利点は幾つかある。その一つは、高い安全性である。脱細胞処理後、大気圧下に戻すことにより、CO₂は自然拡散し、組織内に残存することは無い。従って、毒性等の生体への危険性は無視出来る。もちろん、CO₂以外にも気体又は揮発性の高い液体を用いた場合でも同様である。また、CO₂に限っては臨界条件が温和なため、蛋白質が変性し難い条件で処理可能である。さらに、処理後の組織は、半乾燥または絶乾状態で得られ、長期保存が可能になる。次に、超臨界流体の持つ高い拡散性は、液体に比べ組織深部への浸透をはるかに容易にする。従って、溶液洗浄に比べ処理時間を著しく短縮出来る可能性を有する。以上より、同法での細胞抽出が可能であれば、従来法を凌駕する優れた脱細胞化手法と成り得る。

図6は、実際に超臨界CO₂を用いて処理を行った組織の処理前後のHE染色結果を示している。同図が示すように、CO₂単独では如何なる圧力領域でも効果的な細胞抽出は出来ていない。CO₂の場合、圧力変化に伴う誘電率変化の割合は比較的小さいことから、極性の高い細胞成分を溶解抽出することが困難なようである。しかしながら、極性を上げるためのエントレーナを少量添加した場合、抽出効果の大きな改善が見られる。エントレーナの存在により、混合流体は細胞抽出可能な溶媒特性へと変化している。特筆すべきは処理時間の短縮であり、この写真は15分処理の効果を示している。脱細胞効果を得るため、超高压印加法では3週間、界面活性剤溶液洗浄でも数日間という期間を要したが、本法での15分間という時間は画期的な短縮である。一方、リン脂質の除去については完全除去には至っていないが、ある程度高い効果が得られることを確認している。現在、単一工程での完全除去を達成するための検討を進めている。

ここで紹介した結果は、CO₂とエントレーナの系であるが、現在他の媒体を単独を用いた場合の効果も検討している。今後、動物実験へ向けての最適媒体及び処理条件の決

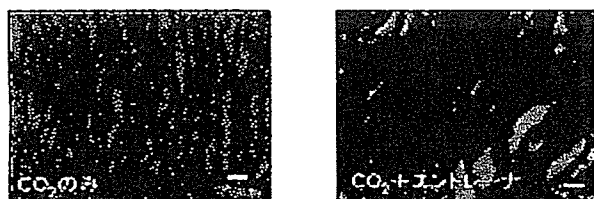


図6 超臨界二酸化炭素処理血管のHE染色比較

定が待たれる。

6. 防石灰化手段と血管の形態安定加工

ここまでは、脱細胞化手段についての紹介を行った。脱細胞化は、移植後急性の免疫反応を抑制することと密接に関連している。一方、実際の症例においては、移植後長期での移植組織の石灰化問題が存在する。残念ながら、石灰化の明確な機序については、現在も不明である。しかし、様々な要因が報告されており、その一つが上述の細胞膜リン脂質の残存である。他方、線維組織であるエラスチンの変性に起因するという報告も多い。本研究チームでも以前よりその機序について詳細な検討を重ねて来た。その結果、それらの単一要因ではなく、複合されて石灰化に繋がるという考えを持っている。従って、石灰化を誘引する可能性全てを消去することが、結果的に問題解決の近道であると考えている。そこで、脱細胞とは別要因である、エラスチン線維の変性に着目した検討結果を合わせて紹介する。

本研究手法を含め、組織に対し人為的(化学的又は物理的)処理を行えば、不可逆的にそれらの立体構造にミクロな歪みが生じる。我々も、機器分析により線維の立体構造に変性が生じることを確認している。エラスチン線維の変性を指摘する研究者は、このミクロな変性を挙げている。実際、石灰化部位はエラスチン線維に沿って生じる例が多い。ここで、同じ線維組織であるコラーゲンの変性が、石灰化と無関係とは断言出来ない。しかし、興味深いことに、実際の症例ではコラーゲン線維に沿った石灰化は殆ど見られない。さて、線維組織の変性であるが、現実問題として多少の変性無くして人為的処理を施すことは不可能である。そこで、単純な発想であるが、要因であるエラスチン線維を除去しコラーゲン線維のみの構造体にすれば、石灰化を抑制出来るかも知れない。

図7は、コラーゲン線維とエラスチン線維を区別するため、血管組織にElastica van Gieson (EVG)染色を行った例を示している。左図で濃く染色された線維がエラスチン、薄く写っている線維がコラーゲンである。エラスチン線維はコラーゲン線維と異なり、弾性に富み著しい伸張性を有する。その結果、常にストレスのかかる生体組織を柔軟に変形させ、耐久性を維持している。既に、エラスチン線維のみを選択的に除去する技術は幾つか報告されている。しかし、単純にそれを行うと別の問題が生じる。図8中央はエラスチンを除去した血管組織を示しているが、弾性の無くなった組織は、その構造が維持できない程度に変形する。



図7 血管組織のEVG染色写真
(左: native組織 右: エラスチン除去組織)