

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Dexon™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、この様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。

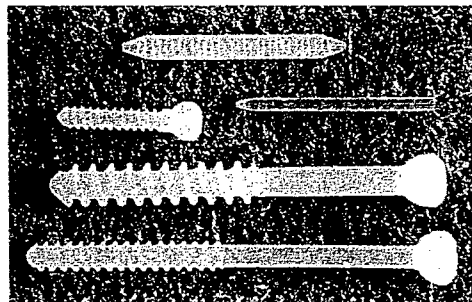


図3 ポリ乳酸製の骨固定ピン

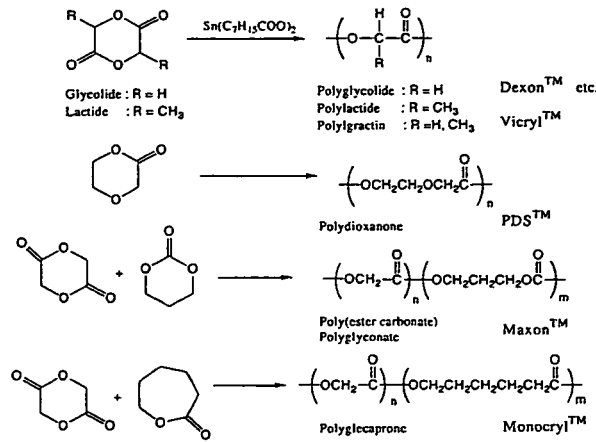


図4 さまざまな外科用縫合糸の構造

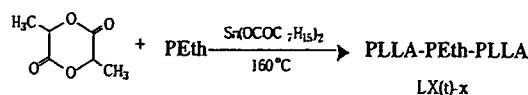
3 機能性ポリ乳酸誘導体

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—

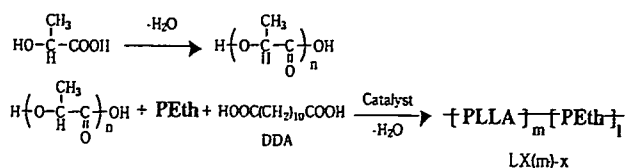
BSE 問題など、コラーゲンの医療分野での利用が制限されつつある状況のなかで、コラーゲンが有する優れた生体適合性を合成材料で再現することは重要な課題である。我々のグループでは、コラーゲンゲル製人工真皮の代替となる機能性 PLA 誘導体の開発を進めてきた。まず、細胞がマトリックス内部で増殖できる環境を与えるためには、含水ゲルであることが重要であると考へ、PLA セグメントとポリエチレングリコール (PEG) セグメントからなるマルチブロック共重合体の新規合成方法を開発した (図5)⁶⁾。ここでは、生体内での蓄積性を回避できる分子量 20000 の PEG を利用した。所定量のデカンジカルボン酸を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	$\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$
	PPG	$\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2)_y\text{H}$
	Pluronic F68	$\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x(\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2)_y(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$

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（図6）。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7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。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の複合材

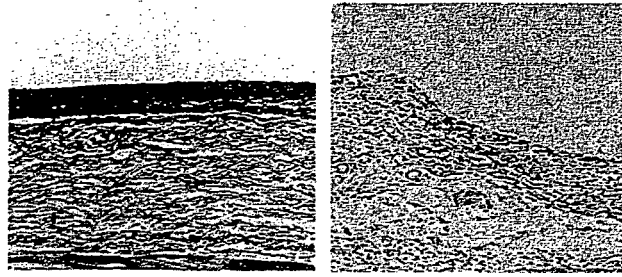


図6 ラット皮下2週埋入後の組織反応
(左: PLLA, 右: マルチブロック共重合体)

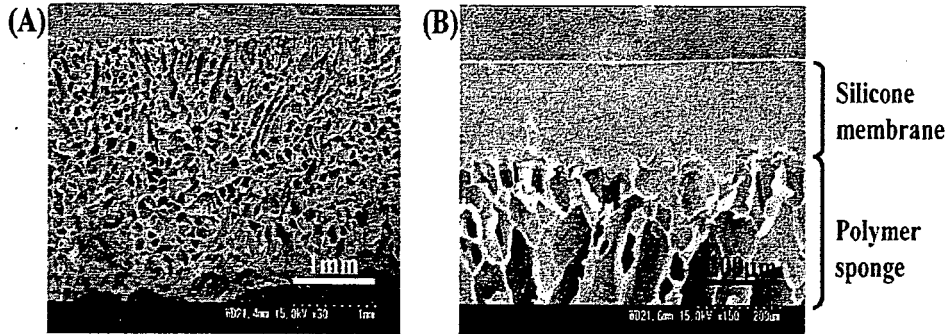


図7 マルチブロック共重合体スポンジとシリコン薄膜からなる、完全合成型人工皮膚のSEM写真

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⁸⁾。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(-) マウスの大腿部に注入し、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。

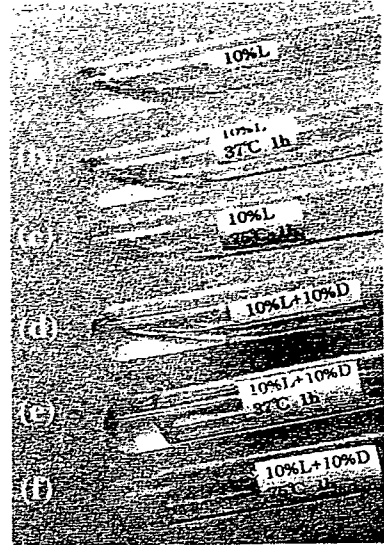


図 8 L 体ミセル懸濁液 (a) は 37 度ではゲル化しない (b) が、L 体・D 体混合ミセル溶液 (d) は、ステレオコンプレックス形成に基づいて、37 度でゲル化する (e)

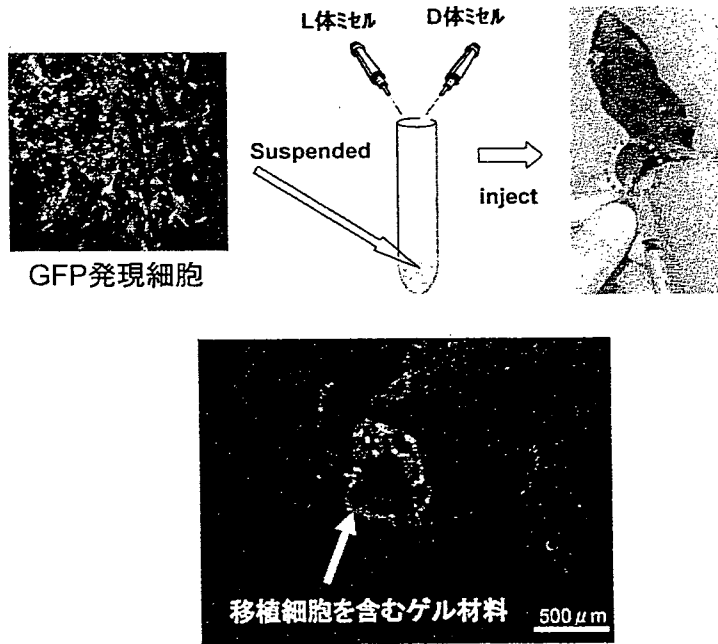


図 9 緑色蛍光タンパクを発現する細胞の移植実験

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ーラーメイド移植によって、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1000 Gy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(図11)、さらに、残存DNAを測定したところ、300 Gy以上の照射で大幅に減少した(図12)。

一方、作製した脱細胞組織の破断強度並びに弾性率は、もとの組織とほぼ同程度であった。すなわち、300 Gy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。

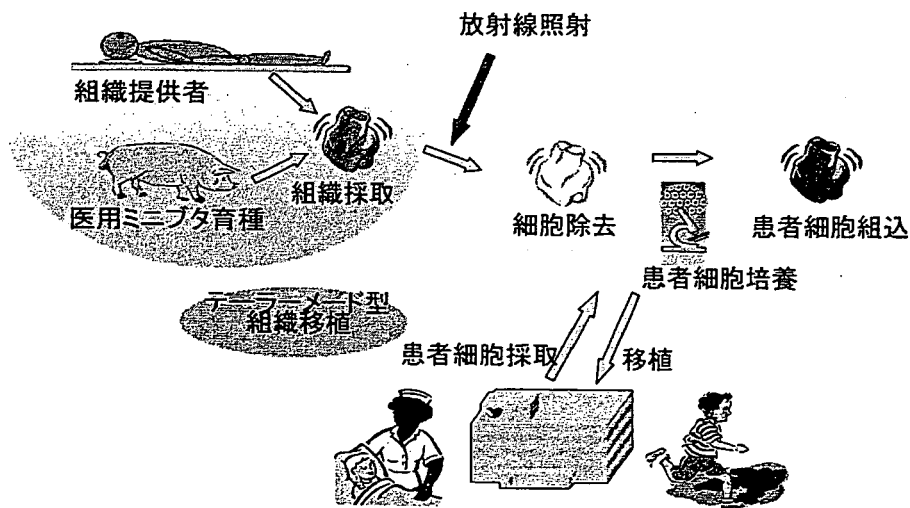


図10 テーラーメイド型組織移植

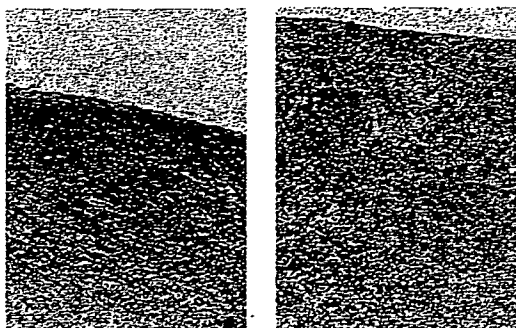


図 11 ガンマ線照射 (10kGy) 及び洗浄処理によって脱細胞化したブタ心臓弁組織 (左: 処理前, 右: 処理後)

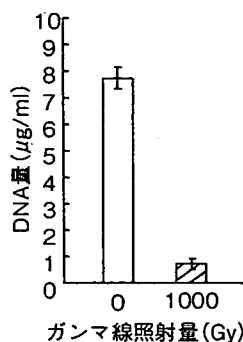


図 12 ガンマ線照射及び洗浄処理によって細胞を除去したブタ血管組織の残存 DNA 量

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

本研究は、原子力試験研究費、厚生労働省循環器病研究委託費（18指-2）および京都ナノテク事業創成クラスター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, アイビーシー出版), 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)

CMC779-2019797797-CA

再生医療工学の技術

監修 ◆ 役 義人

ology
technology
Medicine

CMC779-2019797797-CA

再生医療工学の技術

監修 ◆ 役 義人



9784882319375



1923047038005

ISBN978-4-88231-937-5
C3047 ¥3800E

定価(本体3,800円十税) (B0830)

CMC

CMC

通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。また、HSE問題をさっかかけに、ウシ心臓の使用は控えられつつある。

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展開されたことにより、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⁾。新聞にはヒツジを用いた実験で、末梢血管網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移植することによって、再生医療心臓弁を作成した。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、細胞を移植することで *in vitro* で弁全体を組織工学的的に作成し、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、さらにレシビエントの自己血管内皮細胞を移植している。

4 心臓弁

藤里俊哉¹⁾、北村穂一郎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をあわせて1999年において年間8千人以上にとり、80%が機械弁、残り20%が異種生体弁である。また、米国胸外科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、判明しているものうち約50%が機械弁、45%が異種生体弁、3%が心臓弁、残り約1%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、主にバイロイカト-ボン製の2枚の半月形弁葉をもった二葉弁である。従来、弁葉部分の構造上の問題から弁閉後の圧差差が無視できない大きさで、心臓膨らみや手術に影響を与えたとされてきたが、最近、弁葉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重なる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、尿管陰症をきたす頻度も高くなる。また、ワーファリンが腫瘍形成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、ブタ心臓があるいはウシ心臓を免疫拒絶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きたが、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いるが、若年者では5-10年程度の耐久性は少なく、

* 1 Toshiya 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

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³⁾。一方、英国リーズ大学の Ingham らのグループは種々の濃度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、弁の外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。我々が生体組織を凍んだのは、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水性人工材料で成形することが容易でないこと、および多孔質などの生体吸水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。ミニブタの大動脈弁から静脈処理によって採取した自己内皮細胞を2週間培養槽後に播種し、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1mm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、コラーゲン繊維および弾性繊維の陥内含有量と配列状態はほとんど変化なく、弁葉の厚さに

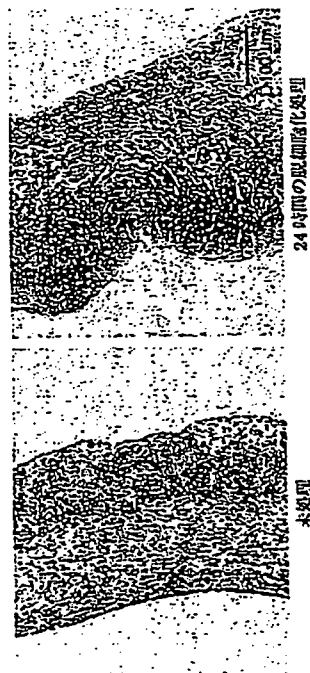


図1 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の組織断面

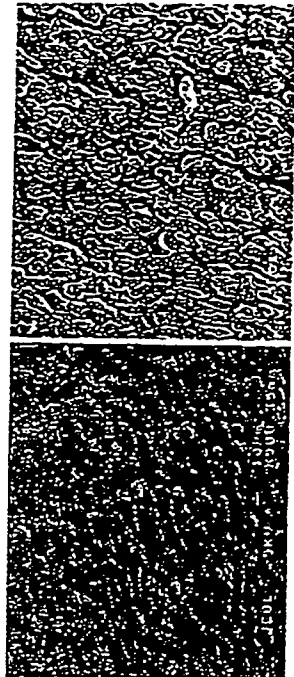


図2 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の断面

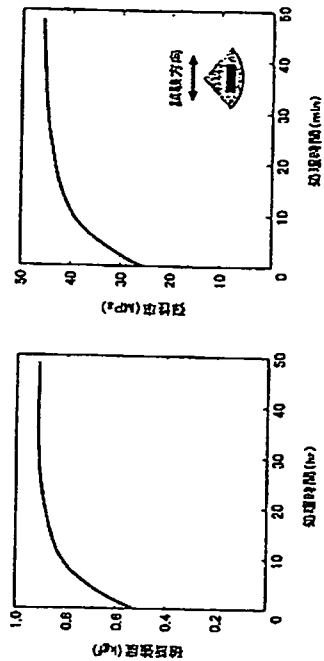


図3 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の生体力学特性



図4 ミニブタに1ヶ月間移植された再生区部心臓弁

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題も容易で、内皮細胞用培養地で簡単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、血管内皮細胞ではば覆われたものの、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。新調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。大動脈弁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、いくつも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。バイオリアクター装置を用いた細胞播種法の報告が参考となるが¹⁰⁾、弁葉部、弁葉基部、血管壁部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るためには、作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。

や異種生体弁に取って代わる日も近いと値する。

謝 辞

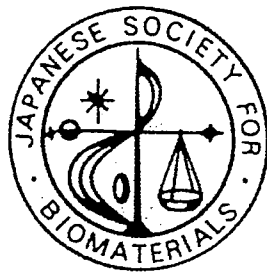
我々の研究の一部は、厚生労働省医学生命科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (H12-再生-005) 並びに新調副研究委員研究事業 (13 公一 1) の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herdon T, Spurling JS, Moran A, Lion 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, Brauer 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): II164-8.
- 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, Howitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Olierunshaw 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, Timko A, Moliss RR, Pothig 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, Flamang 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.

バイオマテリアル -生体材料-

Journal of Japanese Society for Biomaterials



Vol.26
2008. JANUARY No.

1

Offprint

Title

Name

Department

Institution

Address

Postal Code

City

Country

Phone

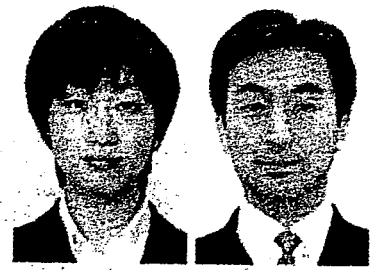
Fax

JJISB

日本バイオマテリアル学会

**Journal of Japanese Society
for Biomaterials**

血液の細胞：宿敵か救世主か



江橋 具^(*1) 山岡哲二^(*2)

JJSB

Cells in the blood: friends or foes?

Blood transports oxygen and nutrients to the whole body and plays an important role in the immune system. Blood is therefore the huge internal organ with two extremely important functions for sustaining lives. It has been the biggest problem in biomaterial research to control the blood compatibility. So far, various artificial materials that substitutes the blood elements have been studied. Recently, various stem cells were discovered in the blood, and researchers started to use these cells as a tool for treating various diseases.

血液は、細胞の活動に必須な酸素と要素を体の隅々へと運搬し、さらに、外來の異物に対する生体防御反応の重要な役割を担っている。すなわち、生命維持のためにきわめて重要な二つの機能を持つ最大の臓器ともいえる。合成材料に対する血液の反応を制御することが、これまでのバイオマテリアル研究の最大の課題であり、その戦いはいまだにつづいている。さらに、血液を構成している成分を代替する人工材料も積極的に研究されてきた。一方、血中にさまざまな幹細胞が発見され、これらを治療用のツール、すなわち、ある意味でのバイオマテリアルとして利用する研究もはじまっている。

Tomo Ehashi^{*1)}, Tetsuji Yamuoka^{*2)}

Key words: 人工血液、血液適合性、幹細胞移植、がん免疫療法、再生医療

バイオマテリアル研究は、長年、血液と戦いつづけてきた。この戦いはいまだ終結をみず、多くの研究者がいまも立ち向かう難題である。体外循環、人工血管、人工肺などの人工臓器、あるいはバイオセンサーなどに用いられるマテリアルも、血液との接触が必須であり、血液凝固反応をいかに制御するかに力を尽くしてきたわけである。

本稿では、まず血液やその構成成分である血球についての基本的事項について概説し、血球にまつわる臨床応用を目指した“血液をつくる研究”と“血液を使う研究”について紹介する。

血液

1. 成分

成人の血液量は体重の6～8%であり、全身の組織と器官への酸素や栄養素の運搬と熱配分を行うという、生命の恒常性を保つために最も重要な働きを担っている。一方では、生体内に異物が混入した際、血中に含まれる細胞(血球)がこれを除去する、生体防御反応というダイナミックな挙動も示す。血液は、液性成分と細胞性成分(血球)からなる(図1)。

血球の大部分を占める赤血球は、直径がおおよそ7μmで、枝を持たないお皿のような形の細胞である。細胞中の蛋白の95%は、グロビン蛋白と鉄イオンを含むヘム蛋白からなるヘモグロビンが占める。このヘモグロビンにより酸素と二酸化炭素の運搬を行う。

生体防御を担う白血球は、顆粒球(さらに好塩基球、好酸球、好中球に分別)、単球、ならびにリンパ球に分類できる。体内で炎症が起こると、炎症部位に生じた多層網などにひきつけられて好中球が集積し、炎症に対する反応が開始する。好酸球は、後述の血液凝固に関与するフィブリン形成部位に集合す

*1 Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター 研究所再生医療部

【略歴】江橋 具：1999年 筑波大学第二学群生物学碩学卒業。2001年 同院科学研究科修士課程修了。2005年 同院人間総合科学研究科博士課程修了。博士(生物学)。専門：再生医療、趣味：ゴルフ、料理、筋トレ

*2 Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター 研究所生体工学部

【略歴】山岡 哲二：1986年 京都大学工学部高分子学科卒業。1991年 同大学院工学研究科博士後期課程単位指導認定工学博士。同年国立循環器病センター研究所実験治療開発部流動研究員。1992年 京都工業繊維大学繊維学部高分子学科助手。1995年 同講師。1996年 米国マサチューセッツ大学各院研究員。2002年 京都工業繊維大学繊維学部高分子学科助教授。2004年 国立循環器病センター 研究所先進医療工学センター生体工学部部長。現在に至る。1995年 高分子研究奨励賞。2002年 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞。専門：医用高分子、再生医学。趣味：存心こつ法(こと)

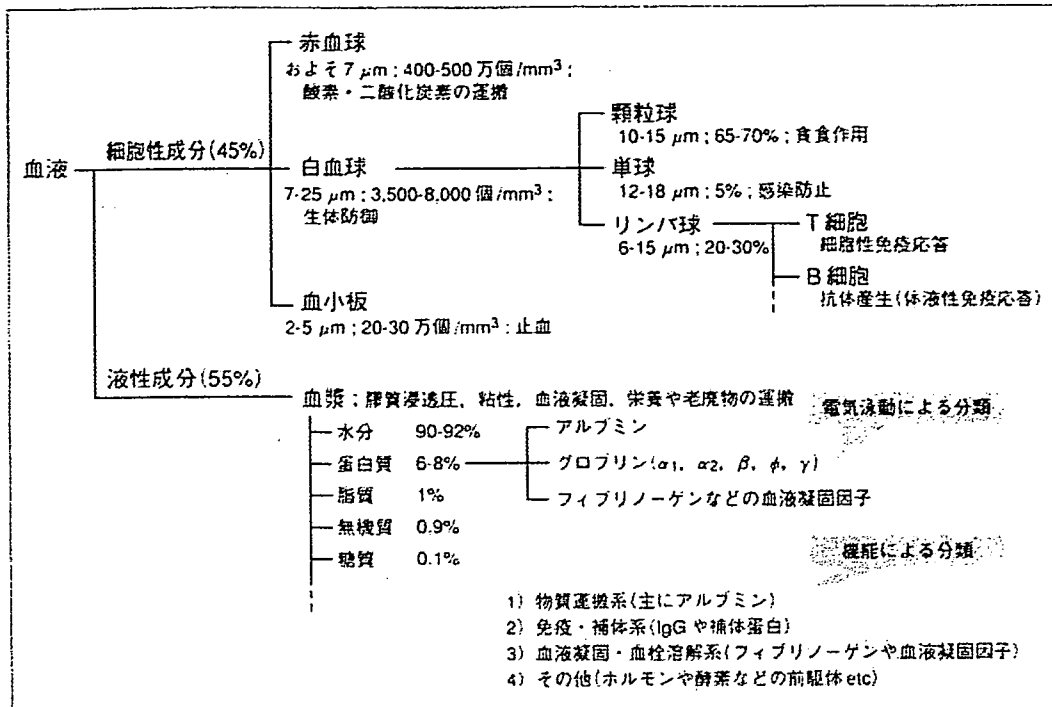


図1 血液の成分

る性質があるなど、それぞれの役割は大きく異なる。

単球は、感染部位や炎症部位の血管から漏れ出て組織へ移行し、組織マクロファージとよばれる細胞になる。マクロファージは、細菌や小さな異物を食食する性質がある。マクロファージに食食された細菌や異物は、細胞内の酵素により消化されて体外へと排出される。人工関節などのバイオマテリアルから生じる小さな材料片を処分するのもこのマクロファージであり、バイオマテリアルが引き起こす炎症の一つの原因である。

リンパ球は、さらにT細胞とB細胞に分類される。まず、T細胞は、組織および血中のリンパ球の60~70%と、B細胞よりはやや多い細胞で、細胞自身が異物を認識することで排除機構が引き起こされる。一方、B細胞は、抗体産生細胞の前駆細胞であり、抗原による刺激でさらに分化し、異物を攻撃するための抗体を産生する細胞へと成熟する。

最後に述べる血小板は、骨髓中の巨核球の細胞体からちぎれるように分離して血流に放出されたものであるため、通常の細胞と比較するとかなり小さく、核を持たない細胞である。血管壁が傷害を受けると、血小板が接着・凝集した血小板血栓を形成して物理

的に止血を行う。また、血小板は、傷害部に接着する過程で、後述の血液凝固を触媒的に促進する働きを持っている。

血漿は水と電解質の無機成分と、糖や脂質と血漿蛋白により構成される。血漿蛋白の60%を占めるのはアルブミンであり、血液の浸透圧を調整したり、イオンやビタミンあるいは薬剤などの外来物質を吸着して運搬したりする。さらに、組織にアミノ酸を供給するなど、多岐にわたる機能を持つ。別の血漿蛋白で、生体防御機構に大きく貢献する免疫グロブリンについては、のちほど詳しく述べる。その他、血液凝固因子や生体防御にも関与する補体系蛋白など、さまざまな可溶性成分が存在する。

2. 血液凝固

血液凝固には、内因性凝固と外因系凝固があるが、バイオマテリアルの観点からすると、内因性凝固が重要である。内因性凝固とは、血流量が低下したときや、ガラスのような陰性荷電を持った表面(異物)やコラーゲンなどと血液が接触したときに、高分子キニノーゲンとプレカリクレインとの協同的な反応により、血液凝固因子の一つ、第Ⅲ因子が活性化さ

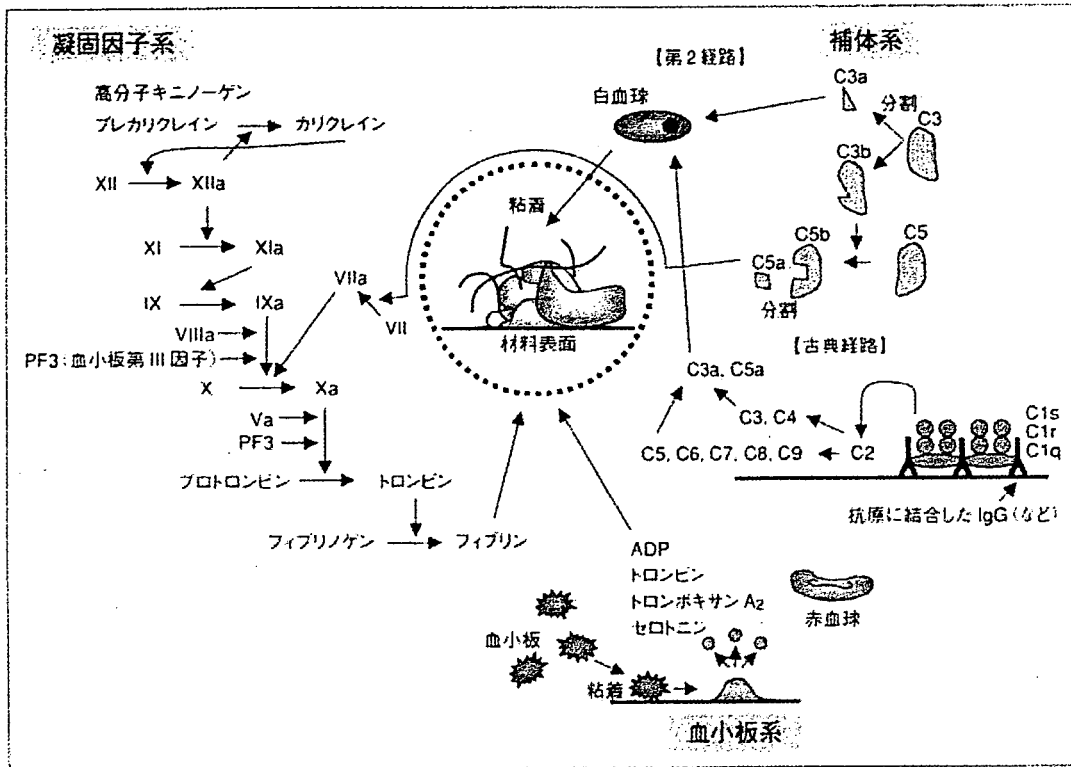


図2 血液凝固反応の機序

(石原一彦・他：バイオマテリアルサイエンス，東京化学同人，2003)

れることにより引き起こされる。その後、図2に示したカスケードでつぎつぎと別の血液凝固因子を活性化し、最終的には血中蛋白のトロンピンが、フィブリノーゲンをフィブリンに転換して、生成されたフィブリン網により血液が凝固する。

一方、活性化された血液凝固因子の一部は、血中の補体成分をも活性化する。補体を介する血液凝固は、異物への白血球粘着を促進することもあり、生体防御反応として重要な役割を持つ。

3. 免疫

生体の“外側”と“内側”との境界は、体表層を覆う角質や、精膜で形成され、これらの境界を越えて組織内に侵入してきた細胞やウイルスなどの異物は、生体の免疫反応により速やかに排除される必要がある。

免疫反応に関与する血球は、白血球である。異物、すなわち非自己の物質を排除するシステムは、二通りある。一つは、非特異的な反応であり、くしゃみや鼻水など、生体内に侵入しようとする微生物などを物理的に体外へと排出するシステムや、生体内に

侵入した異物がマクロファージの貪食作用により破壊されるシステムで、数時間以内の短期間に起こる反応である。もう一方は、獲得免疫反応とよばれ、こちらは生体内に侵入した異物に対して特異的に働き、異物侵入後、数日以上時間をかけて攻撃する反応である。バイオマテリアルが抗原性のある異物と認識された場合には、この獲得免疫反応が引き起こされる。

たとえば、ウイルス感染の場合、まずマクロファージにより貪食されて断片化される(図3)。その後、マクロファージ表面にある主要組織適合遺伝子複合体抗原(MHC 抗原: major histocompatibility complex)とよばれる蛋白質に結合して、細胞外へと提示されると、この情報は、ヘルパーT細胞のT細胞レセプターにより受け取られる。するとT細胞は活性化され、インターロイキンやインターフェロンなどのサイトカインを放出する。これらのサイトカインは、マクロファージを活性化してさらに貪食作用を高めるとともに、キラーT細胞に作用し、この細胞により異物が破壊、排除される。

一方、ヘルパーT細胞から放出されたサイトカイン

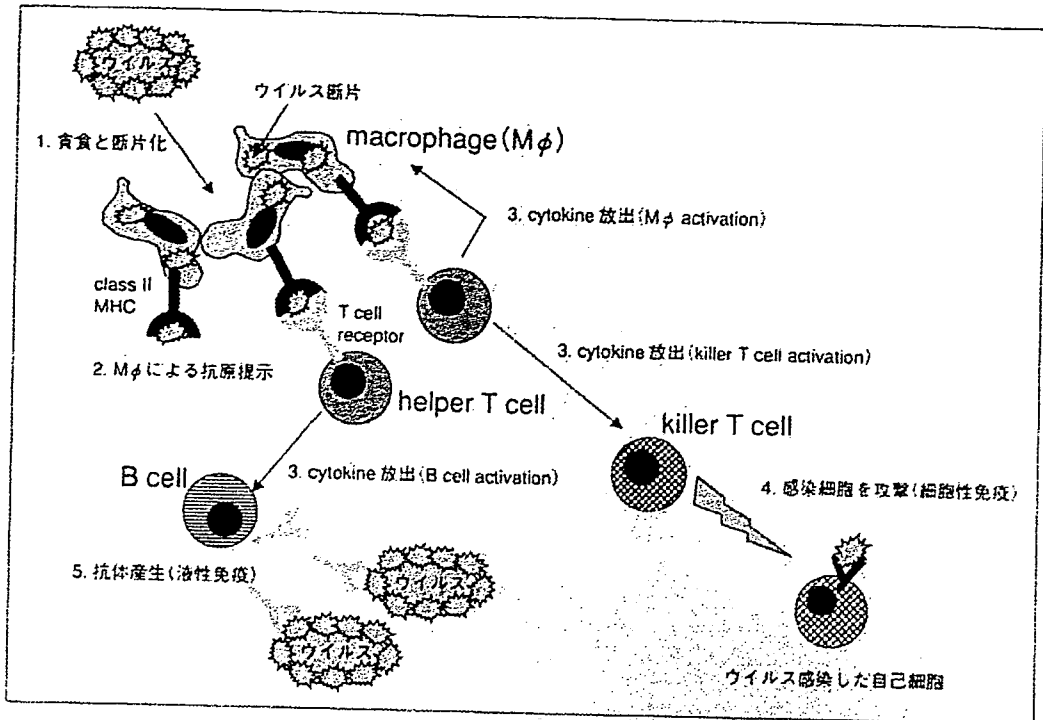


図3 異物に対する免疫応答反応

ンは、B細胞にも作用し、B細胞の増殖や分化を促すとともに、この細胞による抗体産生を誘導する。また、増殖・分化の過程で、機能細胞にまで成熟しなかった一部のリンパ球は、記憶細胞として生存しつづける。つぎに同じ抗原が体内に侵入した際には、この記憶細胞から成熟して抗体が産生されるために、一度目よりも速やかに免疫応答が起こる。また、抗原刺激がつづいた場合の過剰反応はしばしば自己細胞をも損傷する可能性があるため、サプレッサーT細胞が過剰なリンパ球の増殖を抑制することで、自己組織を保護する。

血液の細胞をつくる

生体から大量に血液が失われたときには輸血処置が行われるが、輸血用のヒト保存血は、しばしば不足し、また、感染の危険性もある。

そこで、これらの問題を克服するために、人工血液や人工血球などの代替血液の開発が試みられている。人工血漿は、血液中の蛋白以外の成分、すなわち電解質溶液ともいえ、最も単純なものとしては生理食塩水があるが、血中滞留性は低い。そこで、血

漿増量剤としては高分子量で適切な速度で体外に排泄されるうえ、生体に対する安全性も高いデキストランが臨床応用されている¹⁾。

1. 人工赤血球

酸素の供給は生命の存続のために必要不可欠である。酸素供給を目的とした人工血液は、化学合成物質であるパーフルオロカーボン(PFC)とヘモグロビン蛋白を含む半人工的なものがある(図4)。

PFCは、水の約20倍の酸素(40 vol.%)を溶解できる液体である。液体中であるにもかかわらず、動物はこの中で1時間もの間、生存し、その後、通常的环境下に戻しても正常に生活することができる²⁾。しかし、PFCの問題点は、水と相溶しないために、乳化して体内に投与しなくてはならないこと、また、酸素との結合能力が高すぎるために末梢組織における酸素放出が不十分な点である。

しかしながら、PFCを利用したFluosol DAをはじめ、多くの臨床例が検討されてきた。一方、酸素飽和度に応じて酸素の吸着と解離を効率よく行うヘモグロビン蛋白を赤血球から分離して人工血液に利用する試みも行われてきた。赤血球から単離するこ

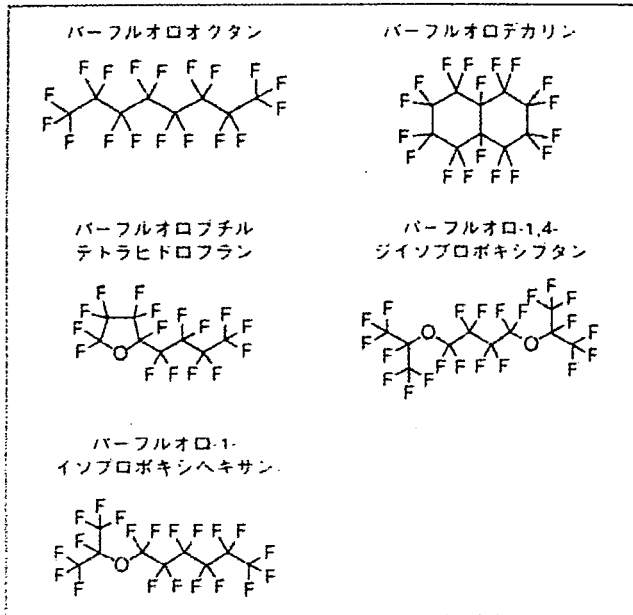


図4 人工血液に利用されるパーフルオロカーボン

とにより、生体での拒絶反応を抑制できるようになったものの、酸素の放出効率が低下したり血中半減期が短縮される欠点もある。そこで、ヘモグロビンを化学修飾したり、ポリエチレングリコールを結合させることで、血中から排出されにくくする工夫が行われた。近年では、高純度のヘモグロビンを高濃度に溶解した溶液をリボソームに内包させた人工赤血球の開発が進行している。国内ではテルモのTRM645があり、この保存期間は2年と長く、近く実用化が期待されている。これまでの動物を利用した研究では、持続的にTRM645を注入した結果、生体から分離した赤血球を注入した場合と同程度に生体機能を維持できたことから、今後、大量の輸血が必要となった場合の保存血不足を解消できるだろう。

2. 人工血小板

血小板は24時間程度しか保存できず、凍結血小板やフリーズドライした血小板を利用する試みがある。しかし、感染などは避けられず、血小板代替物や人工血小板の開発が進められてきた。これらは、ヒト血小板からさらに分裂させた小胞体 (particles derived from human platelet)、あるいは血小板表面レセプターやそれらのリガンドである血液凝固因子、フィブリノーゲンなどを有する小胞体の作製で、

フィブリノーゲンや凝固因子をコートした高分子を用いた研究では、血小板減少症を改善できたことも報告されている。

同様の目的で、血液凝固因子を遺伝子操作により作製する試みもある。しかし、生体内で機能する血液凝固因子を作製するためには、翻訳後修飾のカルボキシル化が重要であることから、遺伝子組換えをさせる細胞として、哺乳類細胞を宿主細胞としなくてはならない。また、第Ⅷ因子はおよそ300 kDaもある分子量の大きな蛋白で、これもまた、翻訳後のグリコシル化が必要である。現在までに、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子、第Ⅻ因子などは、すでに合成法が完成しており、血友病患者の治療用として認可されている。

血液の細胞を使う

生きた細胞を利用した再生医療のための細胞を採取できる組織として、皮膚、粘膜、骨髄、脂肪組織と並んで、血液も有望である。採取された細胞は、そのまま利用される場合もあるが、培養系で増殖させたり、活性化させたり、遺伝子改変させたり、また、分化誘導させたあとに移植される場合もある。成熟細胞を、生体外で機能を維持したまま増殖させることは通常困難であるが、近年、多くの組織幹細胞が見いだされ、有用な細胞の入手が容易になりつつある。さらに、成人の体細胞をリプログラミングする手法が報告されて話題をよんでいるiPS細胞も、細胞ソースとして期待されている。

1. 成分輸血

従来の全血輸血に対して、最近では、成分輸血も一般的になりつつある。成分輸血は、献血された血液を遠心操作により、赤血球、血小板、血漿などの成分に分けて、必要な成分のみを輸血する方法で、輸血量を減少させられるために患者の心臓への負担が軽い利点がある。かつては、輸血液に含まれるリンパ球が患者の体細胞を異物として認識して攻撃する反応(移植片対宿主病: graft versus host disease)による死亡例が多くあったが、輸血液に放射線を照射することによりほぼ安全性が確保されている。

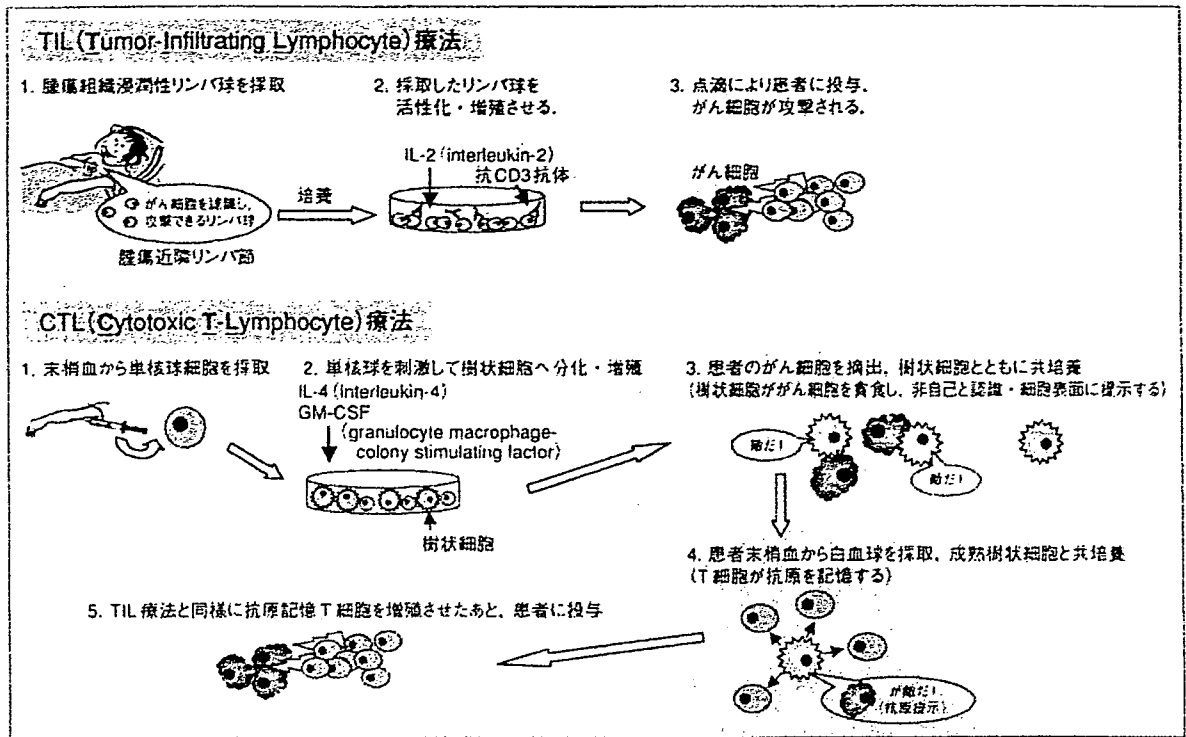


図5 T細胞を利用したがん治療法

2. CTL療法とTIL療法

がん治療のためのワクチン療法については、60年以上もの研究が行われているにもかかわらず、治療法として浸透しているわけではない。患者の白血球を利用する治療法のCTL (cytotoxic T-lymphocyte) 療法は、がんの治療に採り入れられている手法である(図5)。これは、患者の血液から分離したリンパ球のうち、キラーT細胞とよばれる細胞分画を、培養系で増幅するとともに、患者のがん細胞を標的とするように教育したのち、患者の血液に移植する方法である。この方法は、特異性の高い攻撃により、殺傷力は強い。

しかし、一つのT細胞は1種類のがん細胞抗原部位しか記憶することができない。さらに、患者の体内で転移したがん細胞は転移先の組織で抗原を変化させる。CTL療法の最大の問題点は、がん細胞の組織転移時に起こる抗原の変化に対応できないことにある。このCTL療法の短所を改善する試みも盛んに研究されており、T細胞の利用に加え、ワクチン療法を組み合わせる手法が開発されつつある。

類似の手法として、腫瘍組織浸潤リンパ球

(TIL: tumor-infiltrating lymphocyte)療法がある(図5)。腫瘍組織から分離したリンパ球を、インターロイキン2などのリンフォカインで増殖させて、活性化させたあとに患者に再移植する手法であり、CTL療法と並んで期待されている細胞移植療法である。

3. 細胞移植による再生医療

血球をつくる主な場所は骨髄である。骨髄には造血幹細胞(HSC: hematopoietic stem cell)とよばれる、増殖能が高く、それぞれの血球への分化能を持つ細胞群が存在する²⁾。この細胞群を細胞表面抗原により分離し、培養して増殖させ、サイトカインなどの刺激因子により目的とする血球へ分化させたのち、患者の体内へ戻す試みが行われている。患者自身の造血幹細胞を利用することにより、他人の血液から分離した血球を利用する際の危険性を回避できるとともに、ドナーの不足も解消できる。

一方、体内を循環する血液(末梢血)に血管内皮前駆細胞(EPC: endothelial progenitor cell)が存在することが発見された³⁾。それまで、生体の微小血管形成には、血管を構成する血管内皮細胞が増殖して新た

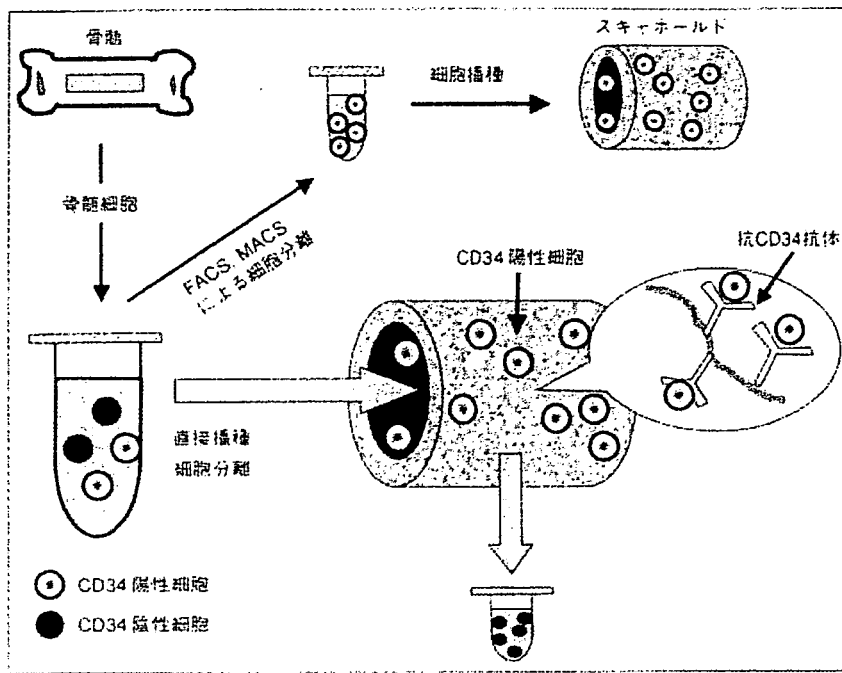


図6
幹細胞特異的吸着能を有する
再生型人工血管スキャホールド

な血管を構築する。血管新生という概念が考えられてきたが、末梢血のEPCが発見されて以来、末梢血にあるEPCが血管を必要とする場所に集結・増殖して新たに血管を形成するという、発生時期のプロセスが成体でも認められるようになった。このEPCは、骨髓と末梢血に存在し、通常はほぼ平衡状態を保っているが、生体内の虚血部位で産生されるサイトカインや増殖因子などにより、骨髓から末梢血へリクルートされ、虚血部位での血管形成を誘導することがわかっている。

近年、EPCに関連する研究が幅広く行われており、臨床の場での応用とその有用性が注目を集めている。まず、動物を用いた研究では、閉塞性動脈硬化症やパーキンソン病などの下肢虚血患者に対する治療、あるいは心筋虚血に対する治療として、自家EPC移植が試みられ、良好な結果が報告されている。それに伴い、最近では各国で臨床試験が行われるようになり、患者末梢血へのEPCの動因を向上させるための因子を投与したのち、EPCを採取して、患部に局所的にEPCを移植することにより、虚血部の血流回復が報告されている。

これらの血管再生能力を有する細胞群は、今後、再生医療で重要な役割を演じるであろう。1990年代より、骨髓細胞を播種した再生型人工血管の有用性

に関する研究結果が報告され、現在までに東京女子医科大学のグループが、骨髓細胞を利用した再生型人工血管の臨床応用を進めている。

筆者らの研究室では、ポリ乳酸(PLA)製のスキャホールドを利用した血管再生の研究を進めてきた。しかしながら、側鎖に官能基を持たないPLAなどの表面修飾反応は容易でないため、筆者らは、表面のみをアルカリで加水分解することでカルボキシル基を導入したあとに、幹細胞表面のCD34に対する抗体を固定化した、イス骨髓細胞をこの抗CD34固定化スキャホールドに播種したところ、効率よくCD34陽性細胞をトラップすることが明らかとなった(図6)。この機能性スキャホールドは、*in vivo*において、末梢血中のCD34陽性の機能細胞をリクルートすることで、速やかな血管組織への再構築を誘導できると期待して検討を重ねている。

おわりに

生体にはわたって、常に新しく産生されつづける血液の特徴を利用した新たな再生医療の展開が期待できる。人工赤血球や人工血小板など血液の代替材料の開発のみでなく、成分輸血など血液成分の利用、がんに対する血液中の免疫細胞の利用、さまざまな