

1. PET・SPECTによる分子イメージング

4) SPECTイメージング

銭谷 勉・渡部浩司・飯田秀博

PETやSPECTなどの核医学的診断法は、トレーサー標識技術（リガンド、ナノ粒子、ペプチド、タンパクの放射性同位元素による標識）と解析技術の融合により、病態生理学や病態生化学的な変化を非侵襲・高感度かつ高精度で観察することができ、実験小動物から臨床まで応用可能な分子イメージング手法である。本稿で紹介するSPECT装置はPET装置に比べ感度の点で劣るが、標識薬剤の供給が商業ベースで整備されており、安価で手軽に検査が実施できるため臨床の場で広く普及している。本稿では、標準的なSPECT装置の構成を概説したうえで、それぞれの用途に特化した様々なSPECT装置を紹介する。さらに、当研究グループが開発したSPECTでの定量的機能画像の解析技術について述べる。

はじめに

近年、生体内分子動態を臓器の多細胞構築を有した状態で把握したり、遺伝子発現や制御を発生・分化・再生の各段階で追跡するニーズが高まってきている。そのための新しい方法論として提案されたのが「生体内分子の挙動を画像化する技術」、すなわち分子イメージングである。ただし、分子イメージング自身の起源は、陽電子断層撮像法（positron emission tomography : PET）や単一光子断層撮像法（single photon emission computed tomography : SPECT）などに代表される核医学からきており、それ自体は非常に歴史が古い。近年、小動物用PET, SPECTの進歩, magnetic resonance imaging (MRI), 光学イメージングの急速な発展, 新しいプローブの開発などが相まって、それらの複合技術的な観念として分子イメージングという分野が

発展してきた。

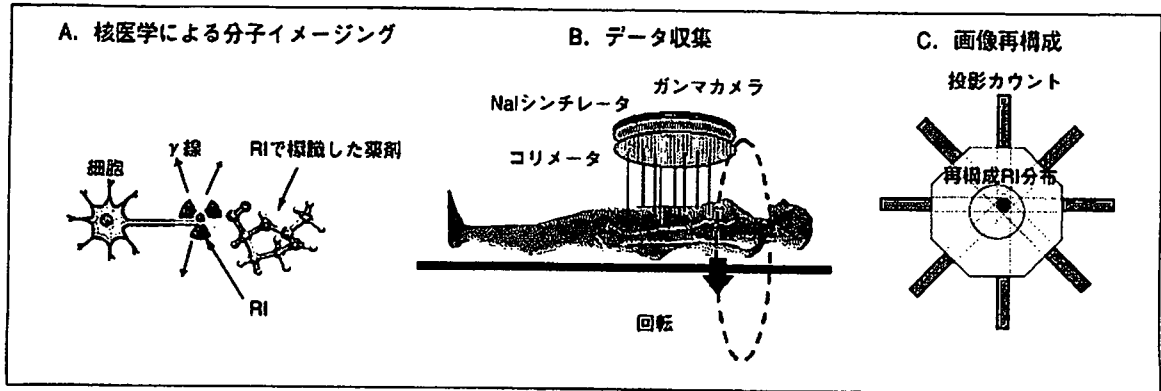
放射性同位元素（radioisotope : RI）を用いるPET, SPECTなどの核医学的手法は、非侵襲的な生体内のトレーサー追跡技術の中でも高い感度を有し、かつトレーサーの集積量に比例した信号強度を提示するため、定量的な評価が可能である。また、トレーサーの設計に依存して、組織や細胞レベルの生理機能から、遺伝子発現やペプチド、タンパクの動態および受容体分布などの分子機能までを「同一の手段」で可視化・評価できることから、分子イメージング技術として注目されている（図1A）。

本稿で紹介するSPECTはPETに比べ定量性や感度の点で劣るが、使用する放射性薬剤の半減期が長いので、薬剤供給が商業ベースで整備されており、PETのようにサイクロトロンや合成装置などの大掛かりな設備を必要としないので、安価で手

key words

核医学, 放射性同位元素, トレーサー, SPECT, コリメータ, 2核種同時収集, 画像再構成, 半導体検出器, 心臓専用SPECT装置, モバイル型ガンマカメラ, SPECT-CT, SPECT/PET, 定量的SPECT画像再構成, 血流量定量

図1 SPECTの概念図



軽に検査が実施できる。また近年、高血圧や高脂血症などの循環器疾患に関与する遺伝子が明らかになってきており、疾患発現に先行する病態生理の把握が重要になる。このとき、安静時のみの組織血流量や基質代謝量に加えて、種々の生理的・薬理的な賦活に対する反応性、例えば血管反応性や代謝自動調節能などが指標になると考えられている。これらの診断にはSPECTが利用でき、すでに定性的なイメージング評価法が多くの臨床診断および臨床研究などに利用されている。

PETとともに分子イメージング技術の主流となりつつあるSPECTであるが、小動物用SPECTに関する説明は別稿の「動物用PET/SPECT (82～87頁参照)」に譲るとして、本稿では主に臨床の場で発展してきたSPECTの技術的な側面について概説する。

I. SPECT装置

SPECT装置は、患者用ベッド、ガンマカメラおよびこれを患者の周りを回転させるためのガントリーから構成される。SPECTは1個の γ 線を放出して壊変する単一光子放出核種をRIとして用い、これで標識した放射性薬剤を体内に投与し、目的の臓器や組織に集まったRIから放出される γ 線を体外のガンマカメラが体の周りを回転しながら捉える(図1B)。収集した多方向からの投影データを画像再構成して、放射能濃度の三次元分布が得られる(図1C)。

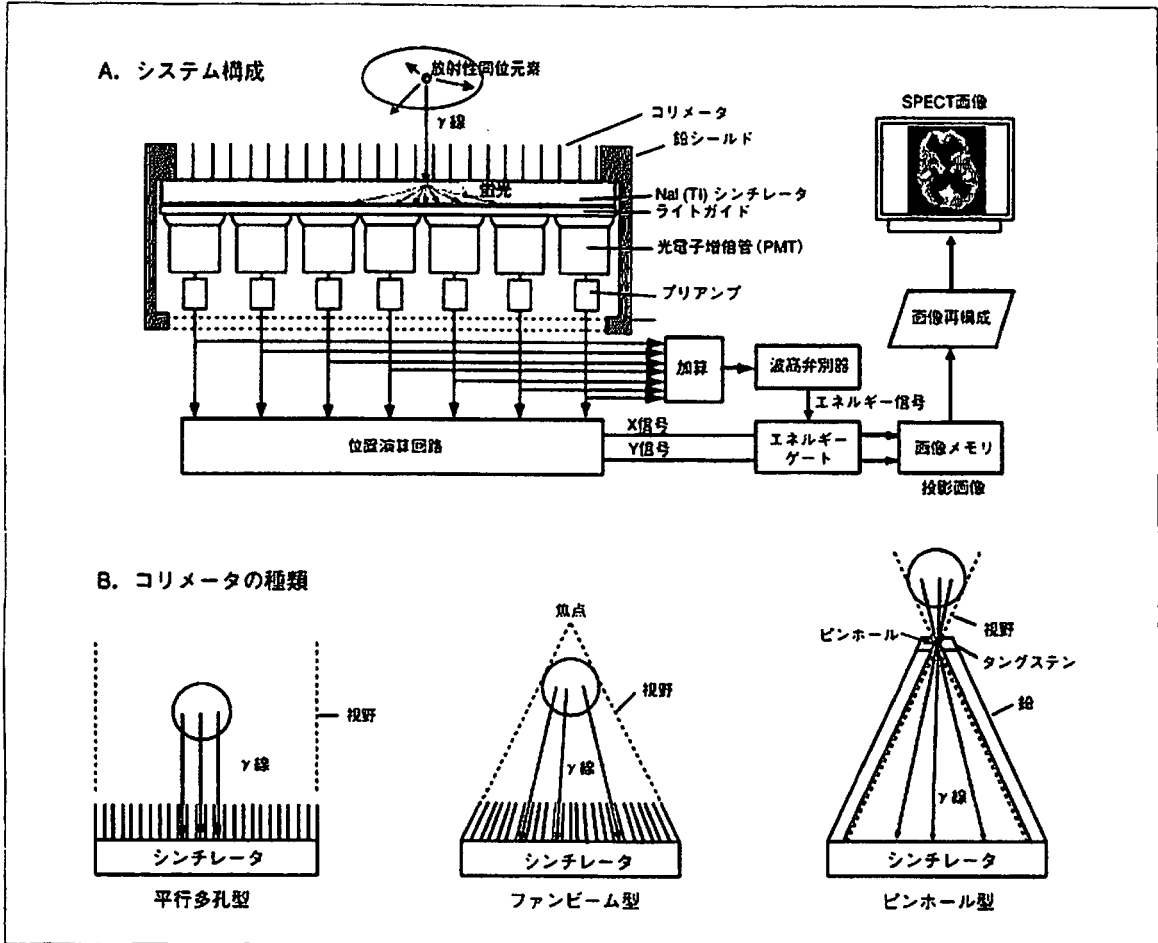
1. システム構成

SPECT装置の構成を図2Aに示す。SPECTでは、検出器の前に装着されたコリメータによって、 γ 線の飛来方向が特定される。シンチレータに入射した γ 線は、光電効果などの相互作用により吸収され、吸収エネルギーに比例した蛍光を発生する。蛍光は光電子増倍管群で検出され、出力信号強度は蛍光位置からの距離に依存し、後段の位置演算回路により蛍光発光位置が計算される。また、すべての光電子増倍管の出力を加算して作られたエネルギー信号は、波高弁別器で評価され、設定されたエネルギーウインドウ内であれば、 γ 線の位置に対応した画像のマトリックスのカウントを1だけ増加させる。設定した時間内に蓄積されたカウントが1枚の投影画像となる。

2. コリメータ形状と用途

コリメータ形状は用途に応じて、平行多孔型、ファンビーム型、ピンホール型などがある(図2B)。最も一般的な平行多孔型は、心筋などの体幹部のような広い有効視野を必要とする場合に使用される。解像度は10mm前後である。ファンビーム型は、比較的小さな臓器を拡大撮像するために使用され、頭部撮像などに有効である。ピンホール型は、被写体をピンホールに近づけることで拡大像が得られるため、1mm以下の超高解像度撮像が可能で、甲状腺などの体表に近い小さな臓器や、マウスやラットなどの小動物の撮像に効果的である。小動物用SPECT装置はピンホール型を用いたものが主流である。

図2 SPECT装置



3. 画像再構成

収集された投影データは、画像再構成され SPECT 画像が得られる。現在の SPECT 画像再構成法は、解析的なフィルター補正逆投影法 (filtered back-projection: FBP) と統計学に基づく逐次近似手法の OSEM (ordered subset expectation maximization) 法に大別できる。OSEM 法²⁾はノイズ抑制効果があり、FBP 法でみられる線状アーチファクトが少ない。また、被写体内での吸収や散乱、解像度低下など画質を劣化させる物理現象や幾何学を画像再構成過程に容易に組み込むことができ、定量性に関わる補正が可能である。

4. 2核種同時収集

PET の場合、対象とする放射性薬剤はすべて 511keV の γ 線を放出するので、複数の薬剤の弁別

を行うのは困難である。一方、表 1 のように SPECT では使用する核種によって特定のエネルギーの γ 線をもつので、複数の核種を同時に投与して同時に複数の核種のデータ収集も可能である。例えば、 ^{201}Tl (70keV) と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (140keV)、 ^{201}Tl (70keV) と $^{113\text{m}}\text{In}$ (159keV) などの組み合わせが可能である。

II. 様々な SPECT 装置

前項では汎用的な SPECT 装置について述べたが、半導体検出器を利用したものや用途に特化した専用装置も開発されている。本項では、様々な SPECT 装置を紹介する。

1. 半導体検出器

半導体素子を用いた検出器は、エネルギー分解能、空間分解能、計数率特性に優れ、シンチレー

表① SPECT検査に使用される代表的な放射性核種

Isotope	Energy	Half life	Tracer	Application
^{99m} Tc	140 keV	6.01 hr	MDP/HMDP	bone scan
			MIBI	myocardial perfusion
			tetrofosmin	myocardial perfusion
			TRODAT	dopamine transporter
²⁰¹ Tl	70 keV	72.9 hr	TlCl	myocardial perfusion
¹²³ I	159 keV	13.3 hr	BMIPP	beta-oxidation
			MIBG	sympathetic
			β -CIT	dopamine transporter
			Iomazenil	benzodiazepine receptor
¹³¹ I	364 keV	8.04 day		thyroid
⁶⁷ Ga	93, 185, 300 keV	3.26 day	citrate	tumor

タの代替として研究されてきたが、均一な半導体結晶を大量に製造することが難しかったため歩留まりが悪く、しかも高価であったためなかなか普及しなかった。近年、製造技術が向上し、均一性および生産性が改善され、製品として普及しつつある。半導体の材料としては、CdZnTe (CZT) や CdTe が使用されている。光電子増倍管を使用しないことと、付属の電子回路の集積化により、小型・軽量化が可能である。現在ではポータブル用や小動物用 SPECT として半導体検出器を用いたものが製品化されている。

2. モバイル型ガンマカメラ

Digirad 社は、光電子増倍管の代わりに半導体センサーのフォトダイオードを使用することによって、周辺のデッドスペースをなくした有効視野 20×20cm の小型軽量ガンマカメラを開発した。乳房腫瘍のセンチネルリンパ節などの近接撮像に有効である。キャスターでの移動が可能で、手術室などで使用できる。また、心臓検査用の回転椅子を組み合わせて心臓 SPECT 画像を得ることもできる。

3. 心臓専用 SPECT 装置

心臓検査専用の小型検出器を用いた SPECT 装置が開発されている。患者はリクライニングシートに座って、リラックスした状態で検査が受けられる。D-SPECT は縦長の CZT 検出器 10 個が胸囲を半周囲うように固定配置されて、個々が心臓を向くように独立に制御される。解像度は一般の SPECT 装置の 2 倍で、高感度ゆえ、心筋 SPECT 画像が約 3

分で収集可能である。

4. ハイブリッド装置

SPECT-CT 装置は、1つのガントリー内にガンマカメラと X 線 CT ユニットが搭載されており、1回の検査で SPECT 画像と X 線 CT 画像を得ることができる。2つの利点があり、1つは X 線 CT 画像からの吸収マップを用いて SPECT 画像の吸収補正ができること、もう1つは X 線 CT からの解剖学的画像を SPECT 画像に重ね合わせることで RI 集積部位の同定が容易にできることである。

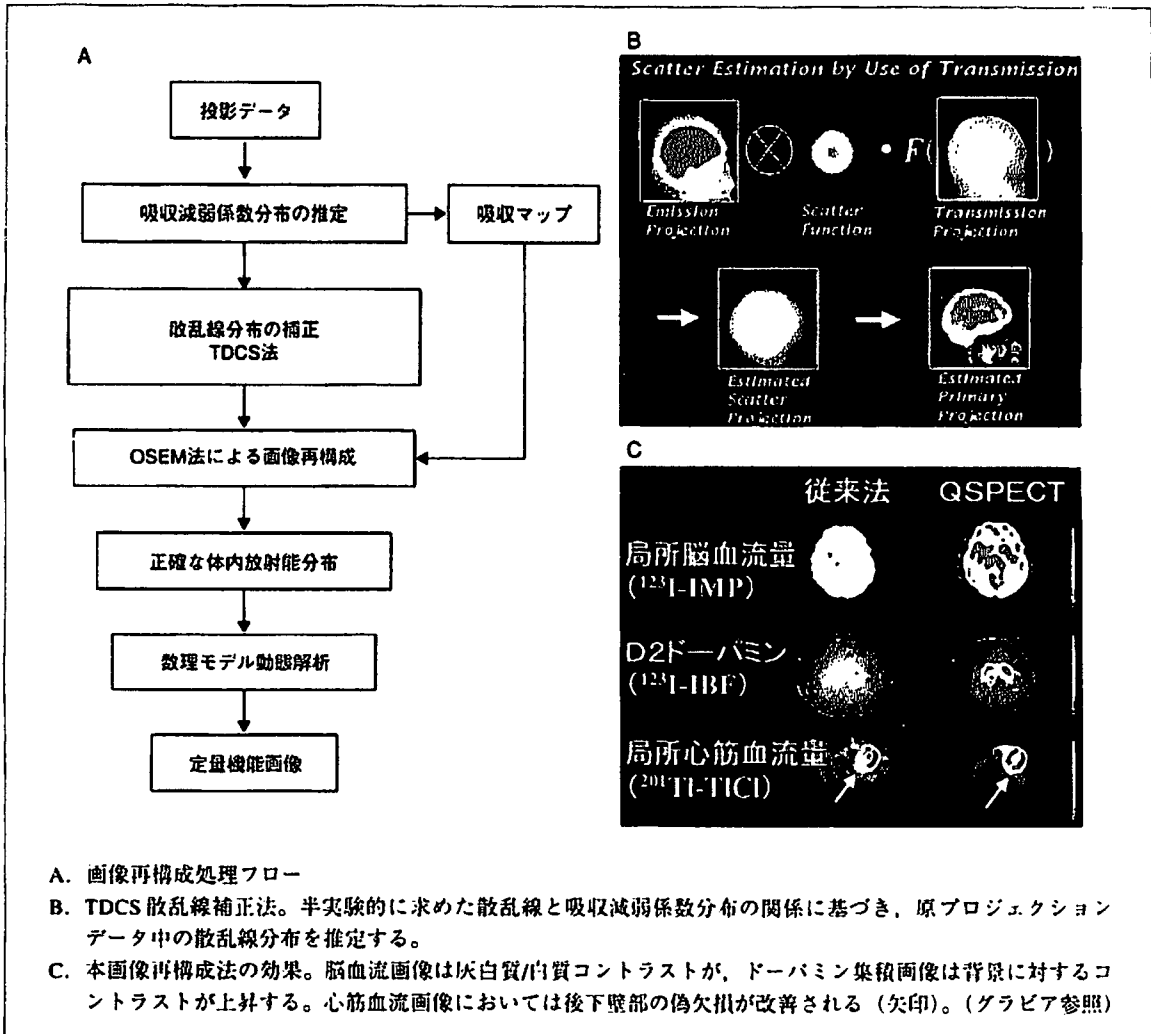
また、比較的半減期が長く (109 分)、輸送が可能な ¹⁸F-FDG による腫瘍イメージングの普及により、ポジトロン核種が撮像可能な SPECT/PET 兼用装置も開発されている。シンチレータは高エネルギー用に通常よりも厚いものが用いられている。^{99m}Tc (140keV) と FDG (511keV) などの同時検査が可能である。

Ⅲ. 定量的 SPECT 画像再構成および解析技術

SPECT は装置構成が単純であり、機器の個体差はほぼ画像再構成ソフトウェアに依存する。したがって、画像再構成ソフトウェアさえ標準化できれば臨床画像の標準化は比較的容易である。SPECT 装置はすでに多くの施設 (国内だけで 1000 施設、2600 台) で稼動しており、定量化・標準化が実現できれば大規模な臨床試験が可能となる。

当研究グループでは、従来は困難とされていた SPECT 画像診断において PET 同様に脳・心筋の機

図3 定量的SPECT画像再構成



能画像の定量化に成功した。投影データの散乱線分布の補正を行い、これを吸収補正を組み込んだOSEM法で画像再構成することで、正確な体内放射能分布が得られる(図3A)。また、散乱線補正を図3Bに示す transmission-dependent convolution subtraction (TDCS) 法を用いることにより、散乱線補正を行わない従来法のSPECT画像再構成と比べて、画像の定量精度およびコントラストを顕著に改善することができる(図3C)。

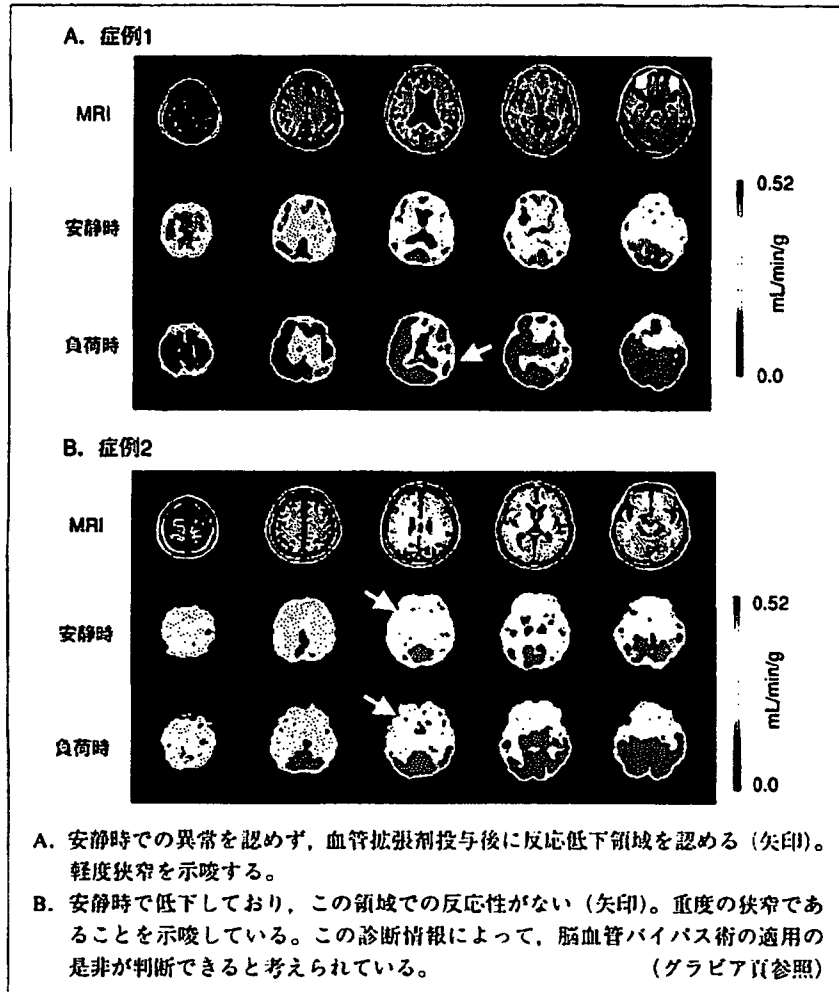
生理機能を定量的に評価するには、トレーサーの挙動を数理モデル化して、その挙動を解析する必要がある。SPECT製剤では、局所組織血流量、

脂肪酸代謝およびこれらの血管壁透過係数や種々の受容体結合能などの生理・生化学的パラメータが推定できる。

局所脳血流量定量では、¹³³Xe、¹²³I-iodoamphetamine (IMP)、^{99m}Tc-HMPAO、^{99m}Tc-bicisate (ECD)などがトレーサーとして使用される。なかでも、¹²³I-IMPを用いたARG法²³⁾(IMPARG法)は脳からの緩やかな洗い出しをよく補正し、広い血流領域で定量が可能である²⁴⁾。また、1点採血による簡便な検査が可能なることから多くの施設で利用されてきた。

脳血流や心筋血流だけでなく血管反応性は血管

図4 ^{125}I -IMPを使って得た安静時と血管拡張剤投与後の脳血流画像の例



病変の早期診断・早期治療につながる重要な指標であることから、このIMPARG法を利用した、1回の検査で安静時と血管拡張剤投与後の局所血流量および血管反応性を定量評価するDual Table ARG法が開発された⁷⁾。当研究グループが開発したQSPECTは、上記の定量的画像再構成法とDual Table ARG法を組み合わせたソフトウェアであり、施設や装置に依存しない絶対定量値が得られるため、施設を超えた多施設での新規治療法の臨床評価法として期待されている。図4は実施例である。

おわりに

本稿で紹介したSPECT技術は小動物イメージングにも同様に利用できる。実験小動物から臨床まで統一的な核医学手法によって、血流などの生理的機能から種々の受容体、遺伝子発現、ペプチド・タンパクなどの疾患関連物質の体内動態までを観察できる分子イメージングの創薬・再生医療への貢献は、今後さらに高まることが期待される。

用語解説

1. ARG法：autoradiography法の略称。1回のSPECT撮影と1回の動脈採血によって局所脳血流量を求める

方法。

参考文献

- 1) Zeniya T, Watabe, et al : Eur J Nucl Med Mol Imaging 31, 1166-1172, 2004.
- 2) 横井孝司：日放線技会誌 57, 523-529, 2001.
- 3) 森 一見：新医療 3月号, 76-78, 2006.
- 4) Fukuchi K, Sago M, et al : J Nucl Med 41, 919-925,

2000.

- 5) Iida H, Narita Y, et al : J Nucl Med 39, 181-189, 1998.
- 6) Iida H, Itoh H, et al : J Nucl Med 35, 2019-2030, 1994.
- 7) Kim KM, Watabe H, et al : Neuroimage 33, 1126-1135, 2006.

参考文献

- *放射線技術学シリーズ核医学検査技術学，日本放射線技術学会 監，大西英雄，松本政典 他，オーム社，2002.
- *放射線医療技術学叢書(19) SPECT画像技術の基礎，日本放射線技術学会核医学分科会 編，日本放射線技術学会，2001.
- *最新臨床核医学(改訂第3版)，久田欣一 監，利波紀久，久保敦司 編，金原出版，1999.

鎌谷 勉

1991年 山形大学工学部情報工学科卒業

1993年 山形大学大学院工学研究科情報工学専攻修士課程修了

株式会社日立メディコ(～1999年)

2001年 日本学術振興会特別研究員(～2002年)

2002年 山形大学大学院理工学研究科システム情報工学専攻博士後期課程修了

国立循環器病センター研究所放射線医学部(医薬品模倣派遣研究員)

2006年 国立循環器病センター研究所先進医工学センター放射線医学部特任研究員

参考文献

- ・放射線利用技術データベース
<http://www.rada.or.jp/database/home4/normal/html-docs/index.html>



バイオプラ最前線

ポリ乳酸をベースにした 再生医療用バイオマテリアル

国立循環器病センター研究所 生体工学部 部長
山岡 哲二

1. はじめに

ポリ乳酸(PLA)をはじめとするポリ α ヒドロキシ酸は、体内や自然界で適当な期間で加水分解されるために、さまざまな応用範囲が検討され、一部の医用材料として実用化されてきた。近年、その価格が劇的に安くなり、汎用高分子としても利用が検討される一方、医療分野においては、再生医療の発展とともにさらに高次の機能性付与が望まれている。再生医療とは「生体や細胞が本来備えている再生能力や治癒能力を利用した治療法」などと説明されるが、実際には再生能力や治癒能力を利用していない治療法はないので、あまりよい説明ではない。再生医療の“再生”という用語のルーツは日本にある。1996年、日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業に“再生医工学”という分野が立てられた。プロジェクトリーダーであった京大生体医療工学研究センターの篠義人教授(現 奈良県立医科大学教授)によると、概念的には、後述する組織工学(Tissue Engineering)であったようだ。その“再生”は十分な市民権を得て、今では海外でもRegenerative Medicineという用語が一般的である。

2. 生体吸収性医用材料

生体における機能性を追求するなら生体由来の材料、特に細胞外マトリックス(ECM)の成分が有効であろう。細胞接着のみではなく、細胞の分化や増殖にもさまざまな影響をもつと考えられている。これら天然由来の材料に対しては生体内にその分解酵素が存在することが多いので、優れた分解性材料となり、コラーゲンの組織親和性に代表されるような生物学的機能性をも期待できる。生体由来材料であっても¹⁾、セルロースやデキストラン、あるいは絹(フィブリン)のように対応する分解酵素が生体内にない場合や、結晶性が高く加水分解速度

が極めて小さい場合もある。この場合、化学修飾により吸収速度を上昇させるなどの検討が進められ²⁾、例えば酸化再生セルロース製の癒着防止膜³⁾や止血剤⁴⁾が臨床応用されている。一方、合成高分子の場合にはモノマー単位の化学構造とその結合様式によって、非酵素的加水分解速度が一義的に決定される。PLAやポリグリコール酸(PGA)、あるいはその共重合体などの生体内での加水分解速度が、多くの疾患の治療に要する期間にうまく適合するために、縫合糸・骨固定ピン・組織再生スキャホールドなどの医療用途が検討されてきた。

私たちのグループでは、再生医療を支援する工学技術の開発を目指して、PLAを一成分とする機能性スキャホールドの開発を進めてきた。従来のスキャホールドの多くは、組織の接合や隔離、あるいは空間の確保など物理的機能の利用にとどまっておき、生体材料として特異的かつ優れた機能性を発揮しているわけではない。本稿では、ポリ乳酸をベースとしたいくつかの共重合体の合成とその機能性について、紹介させていきたい。

3. 再生医療

組織や器官が大きな損傷を受けると正常に修復されることはない。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、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。さらに1993年、R. Langerらはスキャホールド(Scaffold、足場材料)と呼ばれたPGAの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(図1)⁵⁾。実はこのようなマトリックと細胞とを融合させるアイデアは、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにし

て検討されていた。フィーダーレイヤー (Feeder Layer) 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。その後、上述の軟骨再生へと展開され、さらに1988年にはヒト胚性幹細胞の単離が報告され、その後も続々と組織幹細胞が発見されると、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題が解決するとの期待がふくらみ、ますます研究は盛んになった。

現在の再生医療を内容的に整理すると図1ようになる。まず、再生医療は再生医学と細胞移植に大別できる。再生医学の中心は、生分解性マトリックス(スキャホールド)に細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略である(図1-②、③)。上述の例では、スキャホールドとして、PGA不織布やコラーゲン多孔質体が使われている。図1の①は、スキャホールドのみを使って、組織再生を試みる戦略である。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、末梢神経が再生する空間を確保するこの手法は組織再生誘導法(GTR: Guided Tissue Regeneration)と呼ばれる。これまでに、歯周組織や顎堤への検討が進んでいる。

また、図1の④の細胞移植は、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。彼らの手法では軟骨再生の場を確保するために創部を骨膜でカバーしており、外科的手法によるGTR効果も組み合わせられている。現在、最も進んでいるのがこの細胞治療ということもできる。特に自己細胞移植では、認可などの問題も少ないことから臨床研究、および医師主導型の治験システムへのアプローチも進められ、間葉系幹細胞や骨格筋細胞を移植することによる心疾患の治療、あるいは同様のアプローチによるパーキンソン病の治療なども精力的に検討されている。

4. ポリ乳酸のバルク特性制御

生体内で吸収されるという性質の反面、ポリ乳酸の優れた力学特性は魅力的な特徴である。高分子量・高光学純度・高強度のポリ-L-乳酸(PLLA)が生体吸収性の骨固定ピンとして応用されている(図3)^{6,7)}。また、グリコリドやラクチドを他の環状モノマーと共重合させて、結晶性を低下させることで得られる柔軟なランダム共重合体が吸収性の外科用縫合糸として

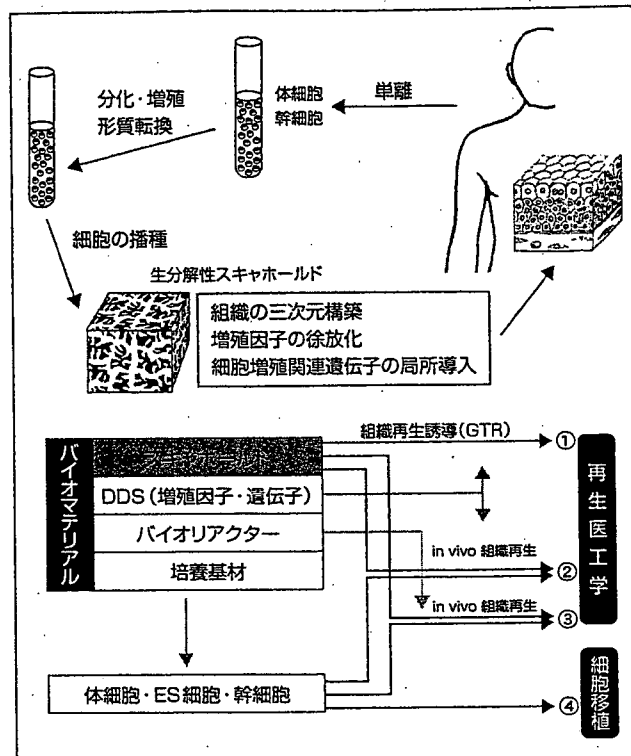


図1 再生医療の戦略

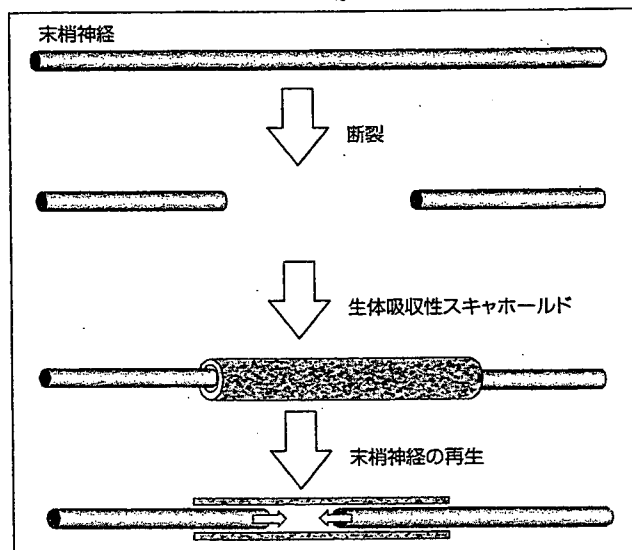


図2 GTRによる組織再生

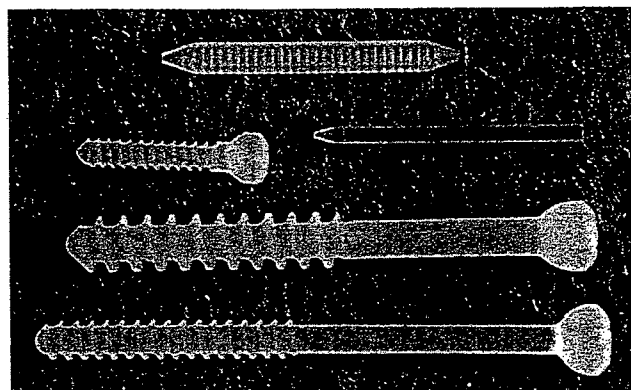


図3 ポリ-L-乳酸製の生体吸収性骨固定ピン

用いられている^{8,9)}。すなわち結晶化度を制御することによる物理的な性質の最適化が図られている。一方、再生医学では、スポンジや不織布などの多孔質体がスキャホールドとして利用されてきたが、高い疎水性のために水分を多く含む軟組織との親和性には問題があった。一方、軟骨再生や皮膚組織再生において、含水性のコラーゲンゲルをスキャホールドとして利用する有効性がよく知られている。図4は、従来のポリ乳酸スキャホールドのような疎水性スキャホールドと、含水性スキャホールドに対する組織再生の違いについて示した。いずれの場合にも、スキャホールド表面の細胞親和性が確保できれば、多孔質構造中へ細胞が侵入する。従って、3次元組織構築のために、さまざまな多孔質スキャホールドが開発されてきた。一方、含水性のスキャホールドにおいて高い組織親和性が達成された場合に周囲細胞がマトリックス内部へと浸潤することがある。

このような場合には早期の組織置換・組織再生が期待できる。これに対して疎水性が高いPLAでは、加水分解によってバルク体積が減少して間隙が拡大するステップが律速であるために、生体の治癒能力を十分にいかしきれない。スキャホールドの分解速度を上げて細胞増殖速度に一致させる努力がなされているが、これは容易ではなく、やはり生体側のアプローチにより組織が再生するというメカニズムが望ましい。

我々は、PLAと水溶性ポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体を開発し、高親水性かつコラーゲンゲルのように組織再生を誘導するスキャホールド材料として研究してきた^{10, 11)}。一般的には、上述のトリブロック共重合体はPEG末端の水酸基を開始点とするラクチドの開環重合により合成される。PEG組成が高いトリブロック共重合体は、薬物担体や上述のような細胞移植材料として有用であるが、フィルムや繊維あるいはスポンジなどのバルク材料として利用する場合には問題がある。目的とする材料に要求される3つの条件を以下に示した。

- 十分な力学的強度を得るためには、100,000程度の分子量が必要。
- PEGの分子量が、腎臓から排泄される20,000程度以下であることが必要。
- 十分な含水性を達成するためには、数十%以上のPEG組成が必要。

これら3つの条件はトリブロック体では達成不可能であり、(AB)_n型マルチブロック共重合体が必須となる(図5)。オリゴ乳酸とPEGを直接縮すために、所定量のデカンジカルボン酸を添加し、さらにジフェニルエーテルを溶媒として環流した。

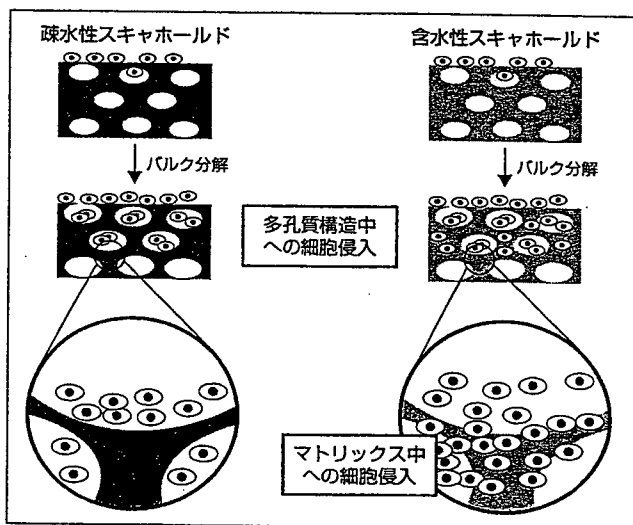


図4 含水性スキャホールドの能動的組織誘導

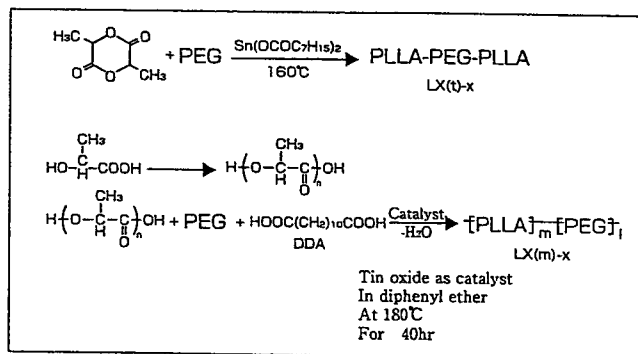


図5 ポリ乳酸-ポリエーテルマルチブロック共重合体の合成法

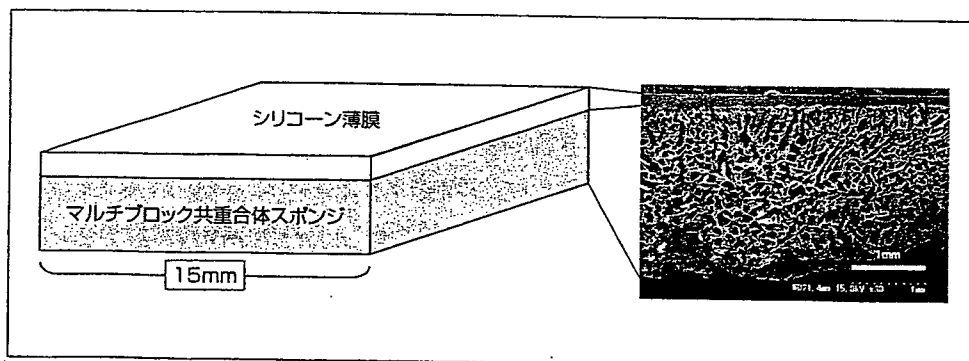


図6 マルチブロック共重合体をベースにした人工皮膚

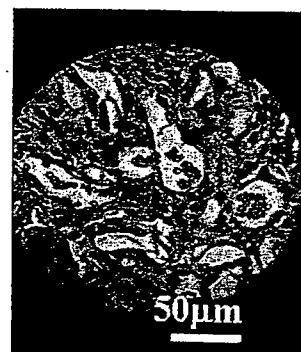


図7 再建した皮膚組織の組織切片

PEG組成の上昇と共に共重合体の分子量が低下するトリブロック共重合体とは異なり、マルチブロック共重合体ではPEG組成に関係なく高分子量を合成することができた。さらに速い分解速度と親水性表面を有しながらも十分な初期破断強度を有する繊維、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなどを調製することが可能となった。PEG組成の上昇とともに、含水率が上昇し、ラット皮下に埋入実験においてカプセル化反応が極めて軽微であることが明らかとなった¹²⁾。これらの含水性マルチブロック共重合体をベースに、田口らにより報告された交互浸漬法によって、ハイドロキシアパタイトとのコンポジットを調整し生

体吸収性多孔質創傷被覆材を作製した(図6)¹³⁾。結果の一例を図7に示すが、埋入1ヵ月ではほぼ完全に組織再生が完了し、毛細血管網も構築された。この所見は、コラーゲンをベースにした比較実験とほぼ同等の組織浸潤性であった。

5. ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾

細胞親和性に優れる合成スキャホールドの一例として、細胞接着性ペプチドを結合させたハイドロゲルが検討されている^{14,15)}。特にRGD配列は、多くの細胞の接着を向上させるために、長年バイオマテリアル研究において検討されてきた。しかしながら、側鎖に官能基をもたないPLAやPGAの表面修飾反応は容易でなく、図8に示したようなさまざまな修飾法が試みられている。

多くの活性ペプチドは水溶性に富むので、単純な物理コーティングだけでは安定かつ効率よい修飾は困難である(図8A)¹⁶⁾。それに対して、図9に示したように保護官能基を側鎖に有する環状モノマーをラクチドやグリコリドと共重合することにより得られる、官能基導入型の誘導体は非常に有用な共重合体である(図8B)。例えば、ベンジルマロラクトナート(図9-1)からポリβリンゴ酸(図9-2)が¹⁷⁾、また、マライドジベンジルエステル(図9-3)からはポリαリンゴ酸が合成できる。我々のグループでは、リンゴ酸とグリコール酸の環状二量体モノマー(BMD、図9-7)の開環重合によりαリンゴ酸とグリコール酸の共重合体(図9-8)を得た^{18,19)}。少量のBMDとL-ラクチドを共重合した後に脱保護すると、側鎖にカルボキシル基を有し、親水性、高い分解速度、および十分な強度を兼ね備えたポリ乳酸誘導体を得られる。10モル%のリンゴ酸単位を含む共重合体の側鎖にカルボジイミド法によりRGDトリペプチドを化学固定したところ、1mgの共重合体当たり6.3μgのRGDを固定化することができた。これは、基材表面が完全にRGDで覆われる量に相当し、培養系において細胞接着性の飛躍的な向上と、増殖性の改善が確認された。これらの化学修飾法は極めて確実で有効な手法ではあるが、カルボキシル基や、アミノ基といった官能基を主鎖に導入すると、結晶性の低下と、親水性の上昇、さらに、おそらくは自己触媒作用により、分解速度が著しく上昇し、力学的強度の低下も懸念される。

そこで、我々は、ポリ乳酸不織布やポリ乳酸スポンジの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、さらに生理活性ペプチドや、タンパク質を固定化することに成功し(図8C)²⁰⁾、その応用として血管再生について検討してきた。1990年代より、骨髄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²¹⁾、現在までに東京女子

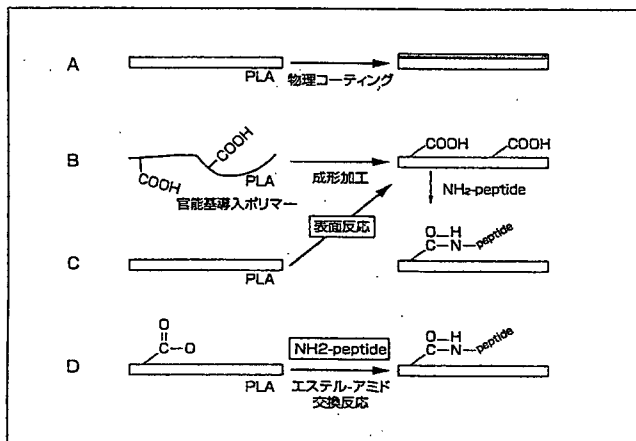


図8 ポリ乳酸の表面装飾

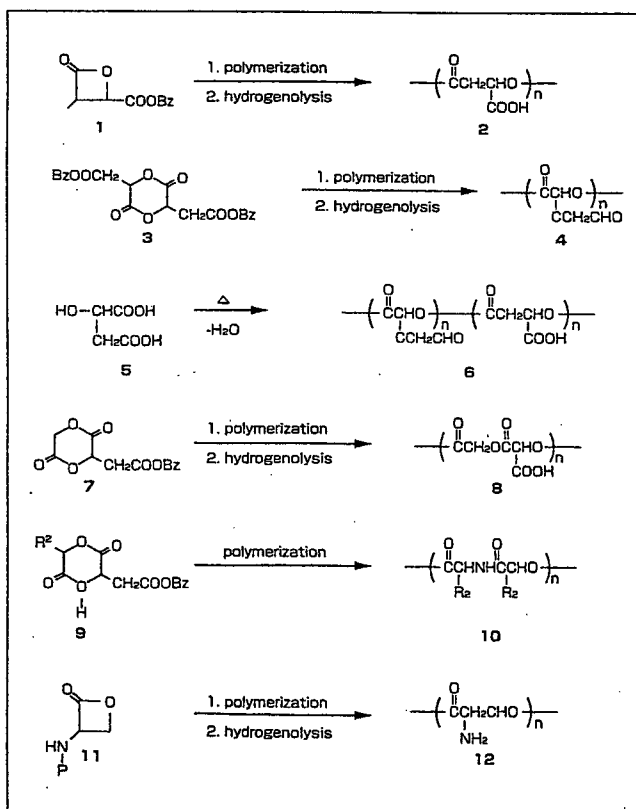


図9 側鎖を有するポリ乳酸誘導体の合成

医科大学のグループは、骨髄細胞を利用した再生型人工血管の優れた成績を報告している²⁾。患者本人の細胞の利用については、免疫応答などをあまり考慮しなくてよいので、将来的に極めて有望な治療法である。特定の細胞を単離することなく採取した骨髄細胞を再生術に使用する手法のほかに、採取した骨髄細胞から接着性の高い細胞群(間葉系幹細胞が多く含まれている)を用いる手法がある。しかしながら骨髄細胞中には幹細胞は2%程度しか存在せず、その効率は必ずしも満足できない。さらに、フローサイトメーター(FACS)やマグネティックビーズ(MACS)を用いて、細胞表面マーカータンパクの有無によるセレクションの技術が用いられているが、細胞生存率の低下と、操作の煩雑さという問題点が残る。そこで、我々のグループでは、東京女子医科大学との共同で、図10に示したように骨髄細胞中のCD34陽性細胞のみを特異的に吸着する多孔質スキャホールドとして、スキャホールド材料表面に抗CD34抗体を固定化した多孔質体を作製した。これを、循環型バイリアクターシステムにセットし、イヌより採取した骨髄細胞を通液したところ、CD34陽性細胞がスキャホールド表面に効率よく集積するという結果を得ている。

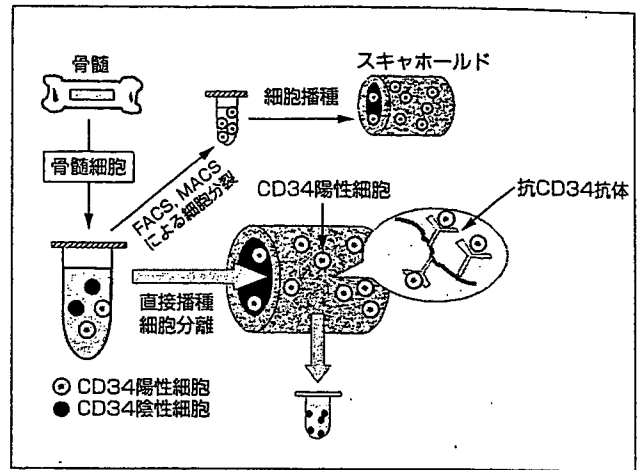


図10 幹細胞特異的吸着能を有する再生人工血管スキャホールド

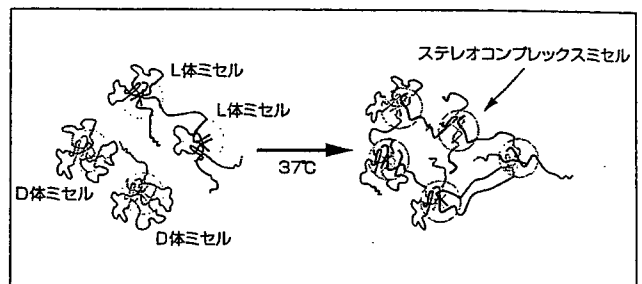


図11 L体ミセルとD体ミセルの混合懸濁液は、温度に反応してゲル化するインジェクタブルスキャホールドとなることを見いだした

6. インジェクタブルスキャホールド

図1の④に示した細胞移植術が大きな注目を集めていることは上述の通りであるが、実際に細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、細胞を効率よく患部に留められないという問題がある。すなわち、注入した懸濁液が組織外に漏れだすことが多い。そこで、細胞注入を支援する材料として、体内で、水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料(インジェクタブルスキャホールド)が注目されている。従来、光反応性基や、化学反応性基、あるいはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーを応用することでインジェクタブルスキャホールドが開発されてきたが体内での安全性が十分に確保されているとはいえない。そこで我々は、PLAとPEGという、生体内での利用実績に優れた2つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発を進めた。

まず、PLA-PEG-PLAトリブロック共重合体が、水中ではPLAコアとPEGコロナ(外層)からなるミセルを形成することは1980年代から知られている。我々の研究グループは、京都工芸繊維大学 木村良晴教授との共同研究の中で、いろいろなミセルをAFMで観察していた時、ある条件を満たしたミセルが、加熱処理によってナノ繊維構造に変化することを偶然見

いだした²⁾。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセル同士が相互作用(コアを形成するポリ乳酸部分がコロナ構造を形成するPEG層を乗り越えて融合)する必要がある。そこでPLLAからなるミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸からなるミセル(D体ミセル)の分散液を混合した(図11)。なぜなら、加熱により隣接するL体ミセルとD体ミセルが融合すると、ステレオコンプレックスミセルが形成すると考えられるからである。その結果、図11に示すように3次元架橋構造が成長しゲル化するという仕組みである。相転移温度を体温付近に調節するためにポリ乳酸セグメント、およびPEGセグメントの分子量や量組成比を最適化した。ポリ乳酸のステレオコンプレックスが、ホモ結晶に比べて融点が約50℃も高い安定な構造であることも、ゲル化を促進して安定化することに寄与すると考えられる。

実際に、共重合組成などを調節して37℃でゲル化することに成功したインジェクタブルスキャホールドの写真を図12に示した。X線散乱測定により温度上昇とともにステレオコンプレックス結晶が成長するとともに、ゲル形成現象が進行することが確認された。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないために、細胞生存率を下げるこ

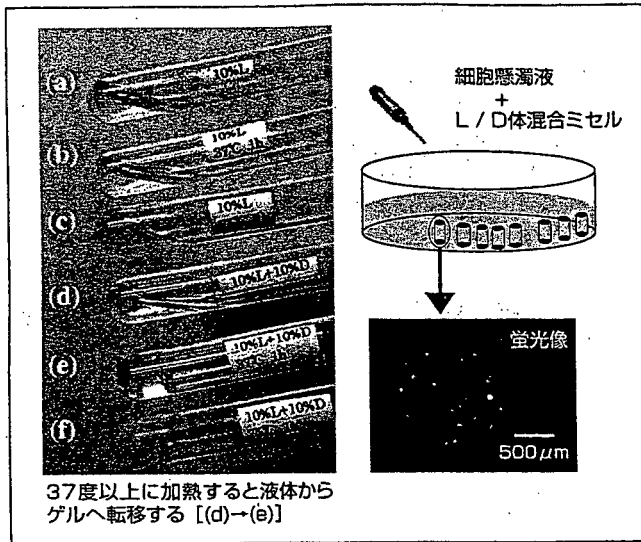


図12 PLA-PEGインジェクタブルスキャホールドに封入されたGFP発現細胞は、ゲル中でも生存できることが蛍光顕微鏡で確認できる

なく対象部位に細胞を注入できる材料と考えられる。混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク)組換えマウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、アガロースゲル中で昇温ゲル化させた3日後にも、細胞は正常な携帯とGFP発現機能を維持していることがわかる(図12)。現在、GFP(-)マウスへの同種同形移植モデルシステムにおいても細胞の安定した移植効率と、移植細胞の生存と機能維持が確認されている。

7. さいごに

“再生医工学”、すなわち「生体や細胞が本来備えている再生能力や治療能力を利用した治療法」は、単純明快で容易に実現できそうに思われたかも知れない。しかしながら、実際に生体を工学的に操作しようと試みて約30年。次々と課題が噴出してきている。最も単純かと思われる自己細胞移植でさえも、まだまだ解決すべき技術的問題が多い。分子生物学や、細胞生物学、発生学の発達により、移植すべき細胞のパリテーションが完了する日は遠くないと予想される。その時、工学技術の遅れが再生医療の臨床化を妨げるようなことがあってはならない。

謝辞

本研究の一部は、文部科学研究費補助金基盤研究(B)、文部科学省京都地区知的クラスター創成事業京都ナノテク事業創成クラスター、および厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業ナノメディスン研究からのご援助を頂いた。ここに心から謝意を表すものである。

引用論文

- 1) 木村良晴、山岡哲三、生分解性高分子の基礎と応用(佐義人編著、アイビエーション出版)、7-63(1999)
- 2) 山岡哲三、岩田博夫、Tissue Engineeringにおける生分解性スキャホールド細胞、32(9)、23-26(2000)
- 3) 藤巻隆、針谷慧彰、成型加工、5(1)、26-41(1993)
- 4) A. J. Domb, C.F. Gallardo, P. Langer, *Macromolecules*, 1989, 22, 3200-3204
- 5) R. Langer, J. P. Vacanti, *Science*, 260(5110), 920-6(1993)
- 6) J. Mauduit, E. Peroux, M. Vert, *J. Biomed Mater. Res.*, 30, 201-207(1996)
- 7) Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada, *J. Biomed Mater. Res.*, 30, 553-558(1996)
- 8) R.E. Johnson, L.A. Lanaski, V. Gupta, M.J. Griffen, H.T. Gaud, T.E. Needham, H. Zia, *J. Controlled Release*, 17, 61-67(1991)
- 9) N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, B. Jerome, P. Teyssie, *Pharm. Res.*, 11, 1479-1484(1994)
- 10) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 37, 1513-1521(1999)
- 11) A. El-Salmawy, T. Kitagawa, I. K. Ko, A. Murakami, Y. Kimura, T. Yamaoka, and H. Iwata, *J. Artificial Organs*, 8, 245-251(2005)
- 12) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Fujisato, C. W. Lee, T. Tsuji, T. Ohta, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Biomed Mater. Res.*, 54(4), 470-479(2001)
- 13) T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 10, 331-339(1999)
- 14) J.A. Rowley, D.J. Mooney, *J. Biomed Mater. Res.*, 60, 217-223(2002)
- 15) D.L. Hernandez, J.A. Hubbell, *J. Biomed Mater. Res.*, 39, 266-276(1998)
- 16) H. Shin, S. Jo, A.G. Mikos, *Biomaterials*, 24, 4353-4364(2003)
- 17) J. Mauduit, M. Boustta, M. Vert, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 7, 207-20(1995)
- 18) Y. Kimura, K. Shirogami, H. Yamane, T. Kitao, *Polymer*, 34(8), 1741-1748(1993)
- 19) T. Yamaoka, Y. Hotta, K. Kobayashi, Y. Kimura, *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 265-271(1999)
- 20) 山岡哲三、竹部義之、木村良晴、高分子論文集、55(6)、328-333(1998)
- 21) Y. Noishiki, Y. Tomizawa, Y. Yamane, A. Matsumoto, *Nat. Med.*, Jan. 2(1), 32-4(1996)
- 22) T. Shin'oka, G. Matsumura, N. Hibino, Y. Naito, M. Watanabe, T. Konuma, T. Sakamoto, M. Nagatsu, H. Kurosawa, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Jun. 129(6), 1330-8 Links(2005)
- 23) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208(2001)

再生医療への工学的アプローチ

山岡 哲二

1. はじめに

再生医療とは、「生体や細胞が備えている再生能力を利用した治療法」、あるいは、「生体の治癒能力を利用した治療法」とでも説明できるだろうか。しかし、再生能力や治癒能力を利用していない治療法はないので、あまりよい説明とはいえない。実は、「再生」という用語のルーツは日本にある。1996年、京都大学生体医療工学研究センターの筏義人教授（現 奈良県立医科大学教授）が、日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業に“再生医工学”という分野を立ち上げた。筏教授によると、“再生医工学”の意味するところは、当時注目され始めていた組織工学 (Tissue Engineering) であったそう¹⁾。

すり傷や切り傷は時間とともに治癒するが、組織や器官が大きな損傷を受けると、もはや正常に修復されることはない。そこで、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにして生体組織を操作する研究が盛んになった。すなわち、フィーダーレイヤー (Feeder Layer) なる細胞層の上で表皮組織を重層化させて表皮シートが作製され²⁾、次に、コラーゲンゲルなどをマトリックスとして利用して、そこに線維芽細胞や表皮細胞を播種・培養することで皮膚組織を再生する試みが相次いで報告された³⁾。そして、1988年、米国では、これらの研究を統合し新たな分野へと拡張すべく、Tissue Engineering (組織工学) という名のシンポジウムが開催されるに至った。先に記したように、この組織工学が、わが国では“再生”医療と姿を変えて市民権を得ることとなり、現在では、海外でも Regenerative Medicine という英語が一般的に使われるようになった。



Tetsuji YAMAOKA 国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部 (565-8565 吹田市藤白台 5-7-1)・部長、博士(工学)。1991年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了。専門は再生医工学。

Biomedical Engineering for Regenerative Medicine

このように、再生医工学 (組織工学) は、細胞増殖の足場となる工学的な足場材料 (スキャホールド: Scaffold) と細胞とを2大要素として研究が進んできた。しかし、分子生物学や細胞生物学の進歩とともに、さまざまな要素、たとえば、細胞増殖因子や、分化誘導因子、胚性幹細胞 (ES細胞) や、組織幹細胞などを巻き込んで、再生医療という広い分野として成長してきた。そのために、再生医療における工学の役割も、ますます多様化している。

2. 再生医療

1993年、R. Langerらは、ポリグリコール酸 (PGA) の不織布をスキャホールドとして使い、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⁴⁾。この研究が、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や、異所的な組織の再構築に成功したことで、組織工学が注目を集める契機となり、その後、軟骨再生などを中心に、研究は全世界へと広がった。さらに1988年には、ヒトES細胞の単離が報告され⁵⁾、その後も続々と組織幹細胞が発見された。これらの幹細胞は、さまざまな細胞に分化できる多能性を有していることから、発生生物学的視点からその分化誘導技術の研究が進むとともに、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題の解決策としても期待された。

ますます広がる再生医療を、筆者なりに整理すると図1のようになる⁶⁾。再生医療は、工学的要素と細胞成分からなる。工学的要素として、スキャホールドの開発以外に、生理活性物質送達システム (DDS)、三次元培養バイオリクター、さらには、さまざまな細胞分離培養基材など、これまで、高分子学会や日本バイオマテリアル学会で開発研究されてきた工学的要素技術が投入されている。また、細胞成分としては、その安全性、純度、倫理的問題など、臨床化のための課題も多く残されているが、体細胞、ES

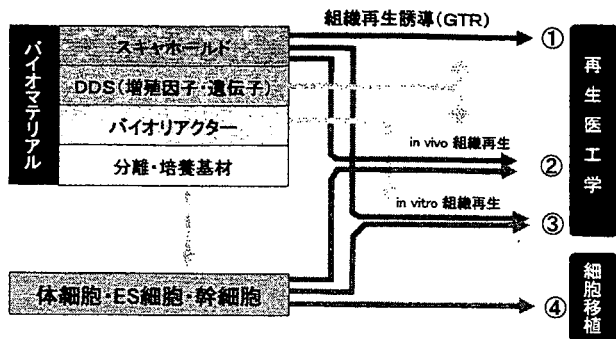


図1 再生医療の戦略 (バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人)

細胞, 組織幹細胞など, 多くの優れた細胞ソースに期待がかかっている。

患者からの採取が容易なためにもっとも広く検討されている間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) の *in vitro* 分化誘導に関しては世界中で研究が進んでいる。たとえば, 非接触的に血管内皮細胞と共培養することで血管平滑筋様の表現型を呈することが報告されている⁷⁾。さらには, ビトロネクチン, ラミニン, フィブロネクチン, 合成ポリアミノ酸などのマトリックス上での骨形成誘導形⁸⁾, あるいは, 神経細胞⁹⁾や軟骨細胞¹⁰⁾への分化効率も向上する。一方, 生体内で細胞を取り巻く細胞外マトリックス (ECM) に存在するシグナル分子で修飾した合成スキャホールド上での幹細胞の分化と増殖誘導も精力的に検討されているが^{11)~14)}, いまだ十分に制御することは容易ではない。

また, 再生医療の治療戦略は, 再生医工学と細胞移植に大別できる (図1)¹⁾。再生医工学の中心は, 生分解性スキャホールドに細胞を播種して組織再生を狙う戦略である (図1-②, ③)。上述の人工軟骨や, 人工皮膚の場合には, ポリグリコール酸不織布やコラーゲン多孔質体が使われている。また, 生体非吸収性の人工血管の内腔に血管内皮細胞を播種した従来のハイブリッド型人工血管に代わり, 現在では生体吸収性のスキャホールドに血管内皮細胞を播種する再生型血管の研究が盛んである¹⁵⁾。

スキャホールドに細胞を播種した後の組織再生を, 主に生体内で進める *in vivo* 組織再生 (図1-②) では, 内在性の増殖因子の存在や, 周囲毛細血管床による酸素や栄養素の供給により, 効率よい組織再生が期待できる。さらに, 細胞源として MSC を利用する場合には, *in vivo* 組織再生が有効である。なぜなら, 分化させることなく幹細胞をスキャホールドに播種しても, *in vivo* に埋入することで, 幹細胞が周囲の微小環境に相応しい細胞へと分化誘導することが期待できるからである。たとえば, 骨髄細胞を直接播種した小口径再生型人工血管において, 内膜・中膜・外膜の再生と, 8週間にわたる開存が報告されている¹⁶⁾。

一方, バイオリアクターと呼ばれる三次元培養装置の中で組織の再生を目指す *in vitro* 組織再生では, 常に再生組

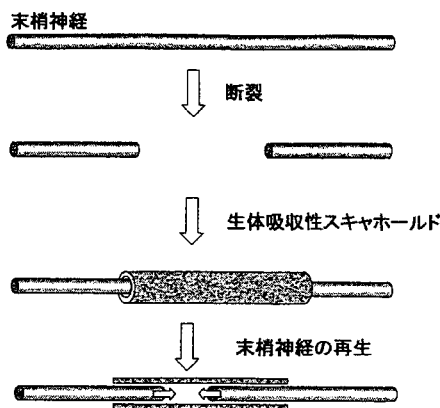


図2 GTRによる神経再生

織を準備して緊急の場合にも対応できる可能性があり, 工業的に大きな期待が寄せられている。スキャホールド材料としては, ポリ乳酸などの合成材料, コラーゲンなどの生体由来材料, アパタイトなどの無機材料など, あらゆる生体吸収性材料の多孔質体が利用されている。三次元スキャホールドの場合, 表層付近に付着した細胞には十分に増殖可能な培養条件が提供されるが, 内部の細胞には溶存酸素および栄養素の不足が起こり, 多くの場合, 細胞が壊死する。そこで, 三次元での細胞増殖のみならず, 細胞の播種, さらには, 細胞の機能亢進も広く検討されている。たとえば, 一般的な振とう培養法では, 厚さ 2 mm 程度の軟骨組織を形成するのが限界とされており, スピナーフラスコ^{17), 18)}など, さまざまなバイオリアクターが検討されている。Freed らは, ローラー培養装置型バイオリアクターの内筒と外筒の回転速度を制御することによって「模擬微小重力環境」をつくりだし, 効率よい靭帯組織の再生を達成した^{19), 20)}。筆者らは, さらに効率よい *in vitro* 組織再生のために, 多孔質体スキャホールドの内部に強制的に培地を送液する還流型バイオリアクターを開発した²¹⁾。培地の還流条件の最適化により, 細胞の播種効率はほぼ 100%とすることが可能であり, また, 細胞増殖速度の向上のみならず, コラーゲン産生などの細胞の機能性も有意に更新することが明らかとなっている。これらの技術により, *in vitro* 法により作製した再生組織の産業化が期待されているもの²²⁾, ヒト細胞の利用に関する倫理的問題など解決すべき大きな課題もある。

図1-①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る。たとえば図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手法で, 組織再生誘導法 (GTR: Guided Tissue Regeneration) と呼ばれる^{23)~25)}。このスキャホールドがなければ, 周囲組織が入り込み, 神経細胞の再生を妨げられる。これまでに, 歯周組織²⁶⁾や顎堤への検討が進んでいる。

図1-④の細胞移植は, 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。彼らの手法では、軟骨再生の場を確保するために欠損部に骨膜でふたをしており、外科的手法によるGTR効果も組み合わされている²⁷⁾。臨床という意味でもっとも進んでいるのが、この細胞移植ではないだろうか。とくに自己細胞移植では、認可等の問題が小さいことから、臨床研究、および、医師主導型の治験システムへのアプローチが比較的容易で、間葉系幹細胞や骨格筋細胞を移植することによる心疾患²⁸⁾やパーキンソン病²⁹⁾の治療などが報告されている。患者自身の細胞を取りだして患者自身に移植するのならば、工学の出番がないようにも思えるが、そんなことはない。取りだした細胞をクリーンな環境で培養するためには、安全性を確保されたセルプロセッシングセンター(CPC)と呼ばれる施設内で、効率よく大量培養する工学技術が要求される。また、そのほかにも多くの高分子科学技術が必要である。本稿では、筆者らの研究室で進めているテーマを中心に、いくつかの工学的アプローチについて紹介する。

3. 新しい原理に基づく細胞分離カラム

MSCは、組織再生治療を実現化するためにもっとも有力な細胞ソースとして着目されているが、骨髄細胞からMSCのみを単離することは容易ではない。一般的にMSCを含む細胞群を単離する手法としては、骨髄細胞中の付着系細胞を分離する手法、密度勾配遠心法、抗体などで蛍光標識した後にそれを指標としてセルソーターという機械で分離する手法(FACS)(Fluorescence Activated Cell Sorter)、あるいはMACS(磁気ビーズ法)などがあげられる。しかしながら、これらの手法で単離した細胞群には多くのサブポピュレーションが含まれており、均一なMSCを単離することは困難である。さらに、抗体や化学試薬が単離した細胞懸濁液に混入するために、さらなる細胞の洗浄精製も必要である。このような問題を解決するために、筆者らは、平面基板上に抗体を配列した細胞分離システムを開発した(図3)。基盤に固定化された抗体密度が一定の場合、細胞がこの基板上を転がる速度は、細胞表面マーカーの密度に依存すると考えらる。このように基材上を細胞が転がる現象は、炎症部位などに白血球が集積する際に血管内壁で起こる白血球ローリング現象として知られており³⁰⁾、この現象を応用した細胞分離カラムである。この手法では、抗体などで細胞を染色する必要はなく、密度勾配メディウムなども利用しないために、溶出してきた細胞懸濁液への異物混入はなく、迅速に目的の表面マーカー密度を有する細胞群を分離できる。

抗体を高密度で導入するために、シリコンチューブ(内

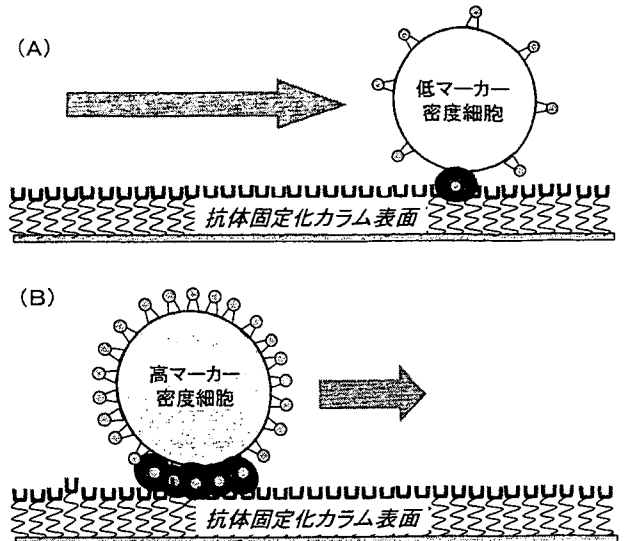


図3 細胞表面マーカー密度の低い細胞(A)は、高い細胞より(B)ローリング速度が大きい

径0.5mm)内腔にポリアクリル酸のグラフト鎖を導入し、カルボジイミド法により抗CD34抗体を固定化した。このカラムを用いて、C57BL/6マウス的大腿骨から採取した骨髄細胞中の接着性細胞(SMCを含んでいると考えられる)の分離を行ったところ、抗CD34抗体固定化カラムに通液した場合にのみ、溶出時間が遅延するフラクションが確認され、さらに、細胞溶出時間が細胞表面CD34抗原密度に依存していることが証明された³¹⁾。さらに、得られた各フラクション中の細胞に対して骨髄細胞への分化誘導をかけたところ、あるCD34密度を有する細胞フラクションでもっとも高いマーカーmRNAの発現が確認された。すなわち、目的とするマーカーの有無で細胞を分離するのではなく、ある密度で目的マーカーを有する細胞群を回収できる本細胞分離カラムを用いることで、分化能力の高い細胞フラクションを効率よく単離することができる可能性が示唆された。

4. インジェクタブルスキャホールド

細胞移植療法において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、細胞を効率よく患部にとどめておくことは難しい。そこで、細胞注入を支援する材料として、体内で、水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料(インジェクタブルスキャホールド)が注目されている。従来から、光反応性基や、化学反応性基、あるいは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーが利用されてきたが、いずれも、その生体内での安全性が確保されているとはいえない。筆者らは、京都工芸繊維大学の木村良晴教授との共同研究により、ポリ乳酸(PLA)とポリエチレングリコール(PEG)という、生体内での利用実績に優れる二つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発に成功した³²⁾。

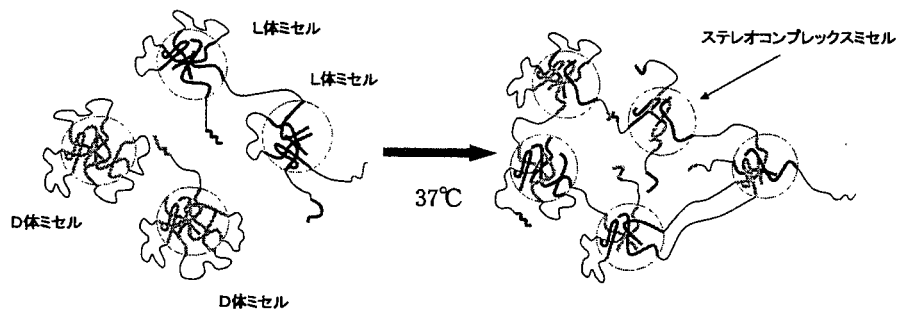


図4 L体ミセルとD体ミセルの混合懸濁液は、温度に应答してゲル化するインジェクタブルスキャホールドとなることを見いだした

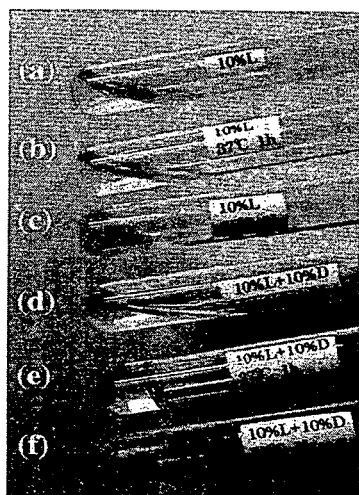


図5 L体ミセルとD体ミセル混合液(d)は、37度で加温することで透明なゲルに転移する(e)。それに対して、L体ミセルのみの分散液(a)は、75度で白濁はするが、ゲル化には至らない。

PLA-PEG-PLA トリブロック共重合体が、水中ではPLA コアとPEG コロナ(外層)からなるミセルを形成することは1980年代から知られている。筆者らは、ある条件を満たしたミセルが、加熱処理によってナノ繊維構造に変化することを見いだした。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセルどうしで分子の組み替わりが起こる(コアを形成するポリ乳酸部分がPEG層を乗り越えて結晶化する)必要がある。一方、ポリ乳酸の結晶構造には、ポリ-L-乳酸(あるいはポリ-D-乳酸)からなるホモ結晶のほかに、ポリ-L-乳酸とポリ-D-乳酸の1:1混合物からなり、熱的に安定なステレオコンプレックス結晶が存在する。そこで、ポリ-L-乳酸-PEG-ポリ-L-乳酸ミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸-PEG-ポリ-D-乳酸ミセル(D体ミセル)の分散液を混合することを考えた(図4左)。こうすれば、隣接するミセル間で組み替わりが起こった際には、加熱に安定なステレオコンプレックスミセルへと転移し、その結果、図3右に示すように三次元架橋構造が成長してゲル化すると考えた。

実際に、共重合組成などを最適化して37°C以上でゲル化することに成功したインジェクタブルスキャホールドの写真を図5に示した。X線散乱測定により、温度上昇によりステレオコンプレックス結晶が成長するとともにゲル形

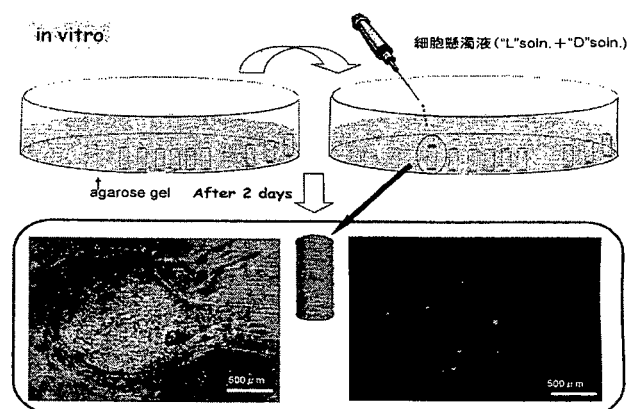


図6 L体ミセル、および、D体ミセル混合液に対して、GFP 遺伝子組み換え細胞を混合し、ゲル化する様子と、ゲル中で細胞が生存する様子を、*in vitro* 細胞移植モデル実験で検討した光学写真

成が進行することも確認されている。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないために、このゲルに封入した培養細胞は、その細胞生存率を下げることなく長期にわたって培養が可能であることが示された。さらに、混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク質)組換マウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、GFP(-)マウスへの同種移植モデルシステムにおいて、*in vivo*での移植細胞の生存と機能維持も確認された(図6)。このシステムは、従来のインジェクタブルスキャホールドのような光架橋性化合物などを用いることなく、安全性に優れた生体分解吸収性高分子のみを利用し、その結晶構造の転移現象のみに基づいた低毒性のインジェクタブルスキャホールドであり、現在、疾患モデルラットを用いた細胞移植治療実験を進めている。

5. 細胞トラッキング

心筋梗塞やバージャー病をはじめとして、さまざまな疾患に対する治療法として細胞移植が検討され、実際に、臨床の有効性も報告されている²⁹⁾。しかしながら、その組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖によるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエント(移植を受けた患者)が反応することで

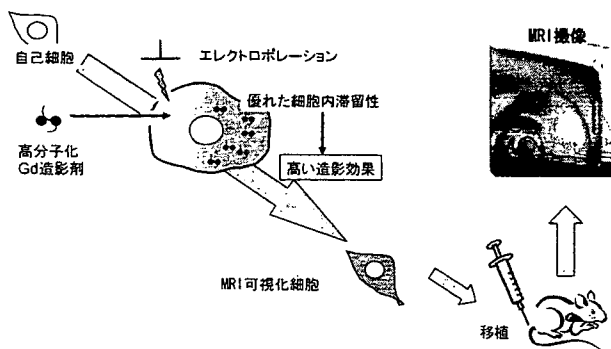


図7 高分子化ガドリニウム造影剤による細胞ラベル技術

治癒したパラクライン効果によるものかは不明である。なぜなら、自家細胞移植や同種細胞移植では移植した細胞の機能どころか、その細胞自身を免疫染色で見分けることさえも不可能なためである。さらに、動物を犠牲死させる必要もある。上述した GFP マウスの細胞を GFP (-) マウスに移植して *in vivo* 蛍光イメージング装置で追跡することは可能だが、ラット程度の小動物が限界である。このように、細胞移植治療による治癒過程を経時的に追跡・評価ができない現状では、細胞移植治療自体の効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

そこで、筆者らは、移植細胞を MRI で経時的に追跡することが可能であれば、細胞移植治療の評価に大きく貢献すると考え、新規な細胞標識用 MRI 造影剤の開発を国立循環器病センター研究所放射線医学部飯田秀博部長らと共同で開始した。この目的を達成するには、移植細胞の細胞質内に長期間安定に磁気活性な分子（ガドリニウム錯体など）を滞留させる技術が必須となる。さらに、細胞の増殖や機能発現を妨げることなく、細胞が死滅したときには、この造影剤が速やかに体外へ排泄されることが必要である。図7に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子(●)の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、高分子キャリアーを用いた。この高分子化により、細胞滞留性は向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではない。そこで、細胞に電氣的ショックを加えるエレクトロポレーションなどの手法を選択し、細胞内に高分子化造影剤を送達した。このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤を送達することが可能となった³³⁾。樹立系培養細胞、および、ラット間葉系幹細胞を、本造影剤にて標識したところ、その細胞増殖性は、コントロールと同程度であり、かつ、10日間にわたって、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかった。このことより、1年程度は、移植細胞を MRI により追跡できる性能を有していると考えられる。本造影剤により、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、細胞移植数を最低限に抑えることにより、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させ

るための定量的指標を得ることが可能になると期待される。

6. おわりに

ヒト細胞を利用した再生医療は魅力的であるが、ヒト細胞の利用に対する安全性確保、レギュレーション、あるいは、倫理的問題の解決にはまだまだ時間がかかりそうである。ES細胞を用いたとしても、他家細胞であることには代わりはなく同様の問題がある。複数の施設で臨床研究が行われ始めた自己細胞移植療法においても、その安全性と確実性を担保して、その治療効果を高めて現実のものとするためには、従来の技術やコンセプトの改良だけでなく、あらゆる方面からの工学的アプローチへのチャレンジが必要である。

謝辞 本研究の一部は、文部科学研究費補助金基盤研究(B)、文部科学省京都地区知的クラスター創成事業京都ナノテク事業創成クラスター、および、厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業ナノメディシン研究からのご援助をいただいた。ここに心から謝意を表するものである。

文 献

- 1) 筏 義人 (編): 再生医工学, 化学同人, 2001
- 2) H. Green, O. Kehinde, J. Thomas: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5665 (1979)
- 3) E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle, T. Nakatsuji: *Science*, **211**, 1052 (1981)
- 4) R. Langer and J. P. Vacanti: *Science*, **260**, 920 (1993)
- 5) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones: *Science*, **282**, 1145 (1998)
- 6) 石原一彦, 畑中研一, 山崎哲二, 大矢裕一 (著): バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人, 2003
- 7) S. G. Ball, A. C. Shuttleworth, C. M. Kielty: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 714 (2004)
- 8) A. K. Kundu, A. J. Putnam: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 347 (2006)
- 9) L. Qian, W. M. Saltzman: *Biomaterials*, **25**, 1331 (2004)
- 10) F. Djouad, B. Delorme, M. Maurice, C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Pence, F. Canovas, P. Charbord, D. Noel, C. Jorgensen: *Arthritis Res. Ther.*, **9**, R33 (2007)
- 11) G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp: *Science*, **303**, 1352 (2004)
- 12) L. Y. Santiago, R. W. Nowak, J. Peter Rubin, K. G. Marra: *Biomaterials*, **27**, 2962 (2006)
- 13) J. Gao, Y. M. Kin, H. Coe, B. Zern, B. Sheppard, Y. Wang: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 16681 (2006)
- 14) F. Gelanin, A. Lomander, A. L. Vescovi, S. J. Ahang: *Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 424 (2007)
- 15) J. M. Heyligers, C. H. Arts, H. J. Verhagen, P. G. de Groot, F. L. Moll: *Ann. Vasc. Surg.*, **19**, 448 (2005)
- 16) S.-W. Cho, S. H. Lim, I.-K. Kim, Y. S. Hong, S.-S. Kim, K. J. Yoo, H.-Y. Park, Y. Jang, B. C. Chang, C. Y. Choi, K.-C. Hwang, B.-S. Kim: *Ann. Surg.*, **241**, 506 (2005)
- 17) R. L. Carrier, M. Papadaki, M. Rupnick, F. J. Schoen, N.

- Bursac, R. Langer, L. E. Freed: *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 580 (1999)
- 18) L. E. Freed, J. C. Marquis, G. Vunjak-Novakovic: *J. Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 605 (1994)
 - 19) L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **33**, 15 (1998)
 - 20) G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A. J. Grodzinsky, R. Langer, and L. E. Freed: *J. Orthopaed. Res.*, **17**, 130 (1999)
 - 21) T. Kitagawa, T. Yamaoka, R. Iwase, A. Murakami: *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 947 (2006)
 - 22) L. Soletti, A. Nieponice, J. Guan, J. J. Stankus, W. R. Wagner, D. A. Vorp: *Biomaterials*, **27**, 4863 (2006)
 - 23) S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring, H. Rylander: *J. Clin. Periodontol.*, **9**, 290 (1982)
 - 24) M. Chaouat, C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet, D. Letourneur: *Biomaterials*, **27**, 5546 (2006)
 - 25) M. J. Moore, J. A. Friedman, E. B. Lewellyn, S. M. Mantila, A. J. Krych, S. Ameenuddin, A. M. Knight, L. Lu, B. L. Currier, R. J. Spinner, R. W. Marsh, A. J. Windebank, M. J. Yaszemski: *Biomaterials*, **27**, 419 (2006)
 - 26) I. G. Needleman, H. V. Worthington, E. Giedrys-Leeper, R. J. Tucker: *Cochrane Database Syst. Rev.*, **19**, CD001724 (2006)
 - 27) M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson: *New Engl. J. Med.*, **331**, 889 (1994)
 - 28) H. Iwasaki, A. Kawamoto, M. Ishikawa, A. Oyamada, S. Nakamori, H. Nishimura, K. Sadamoto, M. Horii, T. Matsumoto, S. Murasawa, T. Shibata, S. Suehiro, T. Asahara: *Circulation*, **113**, 1311 (2006)
 - 29) S. W. Kim, H. Han, G. T. Chae, S. H. Lee, S. Bo, J. H. Yoon, Y. S. Lee, K. S. Lee, H. K. Park, K. S. Kang: *Stem Cell*, **24**, 1620 (2006)
 - 30) U. H. von Andrian, J. D. Chambers, L. M. McEvoy, R. F. Bargatze, K. E. Arfors, E. C. Butcher: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7538 (1991)
 - 31) 山岡哲二ほか: 細胞の分取方法, および当該方法に用いる基材, 特願 2005-324162
 - 32) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura: *Macromol. Biosci.*, **1**, 204 (2001)
 - 33) Y. Tachibana, J. Enmi, T. Iida, T. Yamaoka: Abstract for SFB 2007 Annual Meeting, p. 94 (2007)

Radial Flow Type Bioreactor for Bioartificial Liver Assist System Using PTFE Non-Woven Fabric Coated with Poly-amino Acid Urethane Copolymer

Azizi Miskon,^{1,3} Noriko Sasaki,² Tetsuji Yamaoka,¹ Hiroshi Uyama,³ Makoto Kodama^{*2,4}

Summary: Recently, various types of hybrid bioartificial liver using the porcine hepatocytes have been widely studied but their clinical usage is limited by various difficulties. One of the most efficient bioreactor is the radial flow system equipped with silicon oxygenator. Here, our bioreactor system provides the oxygenator and the radial flow of medium that supplies the nutrient efficiently. The adhesion and growth of the cultured hepatocytes are greatly improved by using polytetrafluoroethylene (PTFE) non-woven fabrics coated with poly-amino acid urethane copolymer (PAU). Its functional activities were established after being kept for one week at the high value in this bioreactor system. These results indicate that, PTFE non-woven fabric and radial flow technique is proven to be the best bioreactor for a hybrid artificial liver support system (HALS).

Keywords: adhesion; HALS; poly-amino acid urethane copolymer (PAU); porcine hepatocytes; tissue engineering

Introduction

The hybrid artificial liver support system (HALS) is expected to become an effective treatment as bridge for patients with severe liver failure, who are waiting for liver transplantation.^[1] Various types of HALS using cultured hepatocytes have been tested by animal model, and the results of these experiments show that it is not easy to maintain the liver specific function of hepatocytes during operating the HALS.^[2–6]

Only a few groups have performed clinical trials using a hollow fiber bioreactor type HALS, which has the advantage of immunisolation from xenogenic hepatocytes.^[7–9] However this model has some difficulties in building scale-up, the hollow fiber bioreactor or a conventional packed-bed bioreactor may suffer from stacking of hepatocytes upon each other and the weak flow of culture medium that may cause cell death.

A radial flow bioreactor has been proposed and further investigated in order to resolve these problems. This bioreactor consists of a vertically extended cylindrical PTFE non-woven fabric coated with PAU scaffold through which the culture medium flows continuously from periphery towards the central axis. The radial flow will generate a beneficial concentration gradient of oxygen and nutrients, while preventing excessive stresses and buildup of waste products. In addition, PAU is the block copolymer that consists of a small amount of poly (γ -methyl-L-glutamate) (PMLG)

¹ Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita City, Fujishirodai 5-7-1, 565-8565 Japan

E-mail: azizi@ri.ncvc.go.jp

² Tissue Engineering Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki 305-8561, Japan

³ Department of Chemical Engineering, Osaka University, Suita-shi Yamadaoka 2-1, 565-0871, Japan

⁴ Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu, Kitakyushu City, Fukuoka 808-0196, Japan