

昨年度まで、界面活性剤法および超高压処理法による脱細胞化角膜の調製に関する詳細な検討を行った。界面活性剤法では、十分な脱細胞化がなされず、また、組織構造が変性した。一方の超高压処理法では、完全な脱細胞化と組織構造の維持が確認できた。さらに、得られた超高压脱細胞化角膜の *in vivo* 異種移植実験として、ウサギ角膜にブタ脱細胞化角膜を埋入（ポケット式）し、長期の移植観察を行った。移植後の早期において顕著な免疫反応は認められず、埋入 2-3 週間後には透明状態となり、さらに約 1 年後でも透明性は維持されていた。組織学的評価から、埋入組織はほぼ完全な状態で存在し、埋入組織へのレシピエント細胞の浸潤は認められなかった。

本年度は、超高压脱細胞化角膜の生体適合性を詳細に検討するため、超高压脱細胞化角膜のブタマウス間異種異所性移植を行い、その免疫応答の違いを比較することにより、異種脱細胞化組織の移植時における生体内反応を病理学的・免疫学的観点から検討した。

## B. 研究方法

### 〔移植角膜片および角膜懸濁液の調製〕

食用ブタ眼球から厚さ 2~3 mm の角膜を取り出し、直径 6 mm と直径 8 mm の円盤状の角膜片をトレパンで打ち抜いた。直径 6 mm の角膜片はマウス皮下移植片用とし、直径 8 mm の角膜片はマウス尾静脈注射に用いる角膜懸濁液および 2 次免疫として使用した。

### 〔脱細胞化処理角膜の作製〕

超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する超高压処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10℃、10000 気圧、10 分間の超高静水压を施した後、角膜用洗浄培地で 3 日間振盪洗浄を行った。

### 〔未処理角膜の作製〕

未処理角膜に対しても高压印加（10℃、5000 気圧、5 分間）することにより滅菌処理を施した。

### 〔尾静脈注射用角膜懸濁液の調製〕

直径 8 mm の脱細胞化角膜片・未処理角膜片 1 枚に対し、300  $\mu$ l の生理食塩水を加え、それぞれを 5cm 試験管に入れてホモジナイズした。直径 12 mm のシャフトを用いて氷冷しながら 20000 回転/分で 30 秒×4 回程度行い、その後直径 5.5 mm のシャフトを用いて同様に 20000 回転/分で 30 秒×4 回程度行った。27G の針で注射できるように調製

した。

### 〔移植手術〕

移植実験には 6 週齢の C57BL/6J マウス（雄）を用いた。ネンブタール原液を生理食塩水で 10 倍希釈し、10%ネンブタール溶液を調製した。10%ネンブタール溶液 0.3ml を腹腔内注射して麻酔し、背側頸部に長さ 1 cm 程度の切開線を入れた。その後尾側に向かって皮下組織を長さ 3cm ほど剥離して進み、そこへ移植片を 1 匹につき 1 個留置し、切開線を 2 針縫合した。

### 〔マウス尾静脈注射〕

10%ネンブタール溶液 0.3ml を腹腔内注射して麻酔をかけ、尾静脈より 27G 針を用いて、脱細胞化角膜組織懸濁液または未処理角膜組織懸濁液をそれぞれ 0.2ml 注射した。

### 〔HE 染色〕

移植後 3 時間・2 日・7 日・14 日で移植片を皮膚とともに 10%ネンブタール溶液 0.4ml で麻酔後に摘出し、パラフィン固定後切片を HE 染色した。

### 〔リンパ節サイズの比較〕

移植片摘出と同時に腋下リンパ節を摘出した。炎症反応の程度を観察するために、脱細胞化組織を移植したものと未処理組織を移植したものでリンパ節の大きさを比較した。

### 〔免疫細胞増殖活性試験〕

#### 脾細胞採取

脱細胞化角膜および未処理角膜を用いて作製した角膜懸濁液を尾静脈注射した。14 日後にそれぞれの脾臓を取り出し、セルストレーナー（BD 社 メッシュサイズ 40  $\mu$ m）を用いて脾細胞を単離した。培地には T 細胞用培地（RPMI1690+10% FCS+ペニシリン&ストレプトマイシン）を用いた。ACK lysis buffer を加えて溶血させ赤血球を除いて遠心後、沈殿している赤血球以外の脾細胞に再び T 細胞用培地を加えた。これを脾細胞懸濁液とした。

#### 2 次免疫および脾細胞培養

細胞濃度を調整したそれぞれの脾細胞懸濁液を 1ml ずつ、24 穴プレート 2 穴に播いた。一方にはコントロールとして 0.2ml の T 細胞用培地を加え、もう一方には 1 次免疫した組織と同じ処理を加えた組織約 2mg を眼科剪刀で細断したものに、T 細胞用培地を加えた 2 次免疫用液 0.2ml を加えた。その後 37℃5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて 3 日間培養した。

#### チミジン取り込み量測定

3 日間の培養後、放射線で標識したチミジンを加え、その翌日に取り込み量を測定した。

[培養上清中サイトカイン量測定]

2次免疫後、その上清を採取し含まれているサイトカイン(IL-2,IL-4,IL-5,TNF- $\alpha$ ,IFN- $\gamma$ )の蛋白量をBD社Mouse BD CBA キット Mouse Th1/Th2 Cytokine kitを用いて測定した。

[培養脾細胞中 mRNA 発現量の比較]

免疫細胞増殖活性試験と同様に用意した培養1日後および3日後の脾細胞からmRNAを抽出した。これをPrimer Express (Applied Biosystems社)で設計したプライマーを用いてリアルタイムRT-PCRにかけ、IL-1 $\beta$ ,IL-2,TNF- $\alpha$ ,IFN- $\gamma$ ,TNF- $\beta$ のmRNA発現量を比較した。PCR条件は、初期変性95°C30秒1サイクル・PCR反応95°C5秒60°C31秒40サイクル・95°C15秒60°C30秒95°C15秒1サイクルである。用いたプライマーの配列は表3に示したとおりである。

(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、各省庁および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、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて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努めた。

## C. 研究結果

[HE染色]

超高压脱細胞化ブタ角膜のマウス皮下への異種異所性移植後7,14日のHE染色結果を図1に示す。ここでは、炎症性細胞のリンパ球・好酸球・マクロファージ、非炎症性細胞の線維芽細胞を観察した。移植片周辺へ遊走・浸潤する炎症性細胞は未処理組織では多く(図1C,D)、脱細胞化組織では非炎症性細胞が早期から多く見られた(図1A,B)。

[リンパ節サイズの比較]

未処理角膜、脱細胞化角膜の移植後のリンパ節腫は増大していたが、未処理角膜に比べ脱細胞化角膜にてその程度は低いものであった(図2)。

[免疫細胞増殖活性試験]

2次免疫後の脾細胞のチミジン取り込み量を、コントロール脾細胞による取り込み量で除した

値を用いて比較した。脱細胞化組織で2次免疫をした場合にて、未処理組織によって2次免疫した場合に比べて脾細胞の増殖活性が有意に抑えられていた(図3)。2次免疫時の細胞観察では、脱細胞化組織で免疫した脾細胞ではアグリゲーション像は視野あたり1群程度であったが、未処理組織で免疫した脾細胞では視野あたりに2~5群程度と多く、また1群あたりのサイズも大きかった(図4)。

[培養脾細胞中のサイトカイン mRNA 発現量]

未感作脾細胞をコントロールとし、脱細胞化角膜、未処理角膜それぞれにて免疫した脾細胞から抽出されたサイトカイン mRNA 発現量を比較した。両者ともコントロールに比べて発現量が増加し、免疫応答が生じていることがわかったが、脱細胞化組織と未処理組織の有意な差異は認められなかった。

[培養液上清中のサイトカイン量]

キットを用いて標識した上清中の5種のサイトカイン量をFACSにて測定した。それぞれのサイトカインが産生されていることがわかったが、脱細胞化組織で免疫した場合と未処理組織で免疫した場合での有意な差異は認められなかった。

## D. 考察

HE染色やリンパ節サイズの程度、細胞増殖活性試験の結果より、脱細胞化角膜の移植片は未処理角膜移植片に比べて移植時の免疫応答の惹起を抑制することが明らかとなった。また、脱細胞化組織はレシピエント由来の非炎症性細胞浸潤が多く観察され、早期の組織再構築が期待できる。さらに、図2の未処理角膜移植片との比較により、脱細胞化角膜は免疫抗原性をほとんど有さないことが分かった。

以上より、超高压を用いた脱細胞化角膜では免疫抗原となる成分が取り除かれているために炎症反応が減弱、あるいは早期消退するため、再生医療用足場として高い機能を早期に発揮でき、さらに抗原提示を行わないため移植片は生体内反応において長期に安定であると考えられる。

今後の展望として、免疫系に関与するサイトカインの発現や産生に関してより詳細な分析を行い、上記の考察を確実にする必要があると思われる。

## E. まとめ

生体組織から細胞を除去した脱細胞化角膜を超高圧処理法により調製し、in vivo 異種異所性移植試験により生体適合性について検討した。脱細胞化角膜では、免疫応答の惹起を抑制することが明らかとなった。また、脱細胞化組織はレシピエント由来の非炎症性細胞浸潤が多く観察されたことから、早期の組織再構築が期待される。以上の結果から、超高圧脱細胞化角膜の再生型角膜としての応用が期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). Shuji Sasaki, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Takako Honda, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Manabu Mochizuki, In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas, *Molecular Vision*, 15, 2022-2028, 2009.
- 2). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent, *Acta Biomaterialia*, 6, 403-408, 2010.
- 3). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels, *Acta Biomaterialia*, 6, 409-417, 2010.
- 4). Seiichi Funamoto, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Ayako Murakoshi, Yoshihide Hashimoto, Kazuo Niwaya, Soichiro Kitamura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials*, 31, 3590-3595, 2010.
- 5). Yoshihide Hashimoto, Seiichi Funamoto, Shuji Sasaki, Takako Honda, Shinya Hattori, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Manabu Mochizuki, Toshiya Fujisato, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue

engineering, *Biomaterials*, 31, 3941-3948, 2010.

### 2. 学会発表

- 1). Shuji Sasaki, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Takako Honda, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Manabu Mochizuki, Novel Scaffold for Artificial Cornea Prepared by Decellularization of Cornea Using Ultra-high Hydrostatic Pressurization Treatment, ARVO 2009 Annual Meeting, 2009
- 2). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Construction of a Collagen Matrix Designed for Regeneration of Physical and Biological Property of Native ECM, 8th international Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers-FBPS2009 Program and Abstract Book, O40, 2009
- 3). Hisatoshi Kobayashi, Shinya Hattori, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Shuji Sasaki, Manabu Mochizuki, Toshiya Fujisato, Takako Honda, Akio Kishida, Novel Approach for Artificial Cornea Using Decellularized Cornea Prepared by Ultra High Hydrostatic Pressure, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S75, 2009
- 4). Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Tetsuya Higami, Akio Kishida, Preparation and Evaluation of Acellular Small-diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S100, 2009
- 5). Yusuke Ago, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Akio Kishida, Capillary Network Tissue Engineering Using Decellularized Rat Liver Bioscaffold, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S100, 2009
- 6). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Engineering Collagen Matrix to Regenerate Similar Physical and Biological Property of Native ECM, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S277, 2009
- 7). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and Characterization of Collagen/Phospholipid Polymer Hybrid Gel Designed for Artificial Cornea, 22nd European Conference on Biomaterials (ESB) The annual

conference of the European Society for Biomaterials Abstract CD, P1, 2009

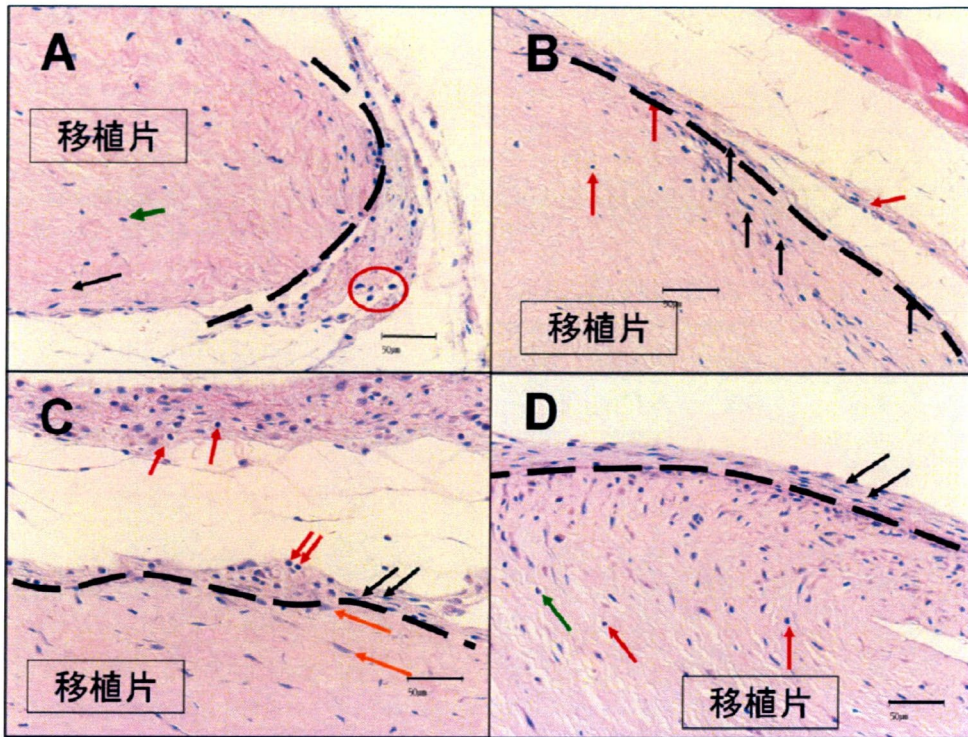
- 8). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 藤里俊哉, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索, 生体医工学, 47(Supp 1), 262, 2009
- 9). 南広祐, 木村剛, 船本誠一, 岸田晶夫, 生体組織類似構造を有するコラーゲン構造体の作製と物理的及び生物学的特性検討, 第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 57-58, 2009
- 10). 服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月学, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊, 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の有用性, 第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 59-60, 2009
- 11). 服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月肇, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊, 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み, Polymer Preprints, Japan, 58(2), 4866, 2009
- 12). 木村剛, 橋本良秀, 船本誠一, 南広祐, 藤里俊哉, 小林尚俊, 岸田晶夫, 種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析, Polymer Preprints, Japan, 58(2), 4874, 2009
- 13). 南広祐, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫, 生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製, Polymer Preprints, Japan, 58(2), 5062-5063, 2009
- 14). 小林尚俊, 服部晋也, 本田貴子, 船本誠一, 佐々木秀次, 橋本良秀, 藤里俊哉, 寺田堂彦, 木村剛, 望月豊, 岸田晶夫, 高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料, Polymer Preprints, Japan, 58(2), 5088-8089, 2009
- 15). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 藤里俊哉, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 脱細胞化口径人工血管の調製, 人工臓器, 38(2), S-95, 2009
- 16). 橋本良秀, 船本誠一, 佐々木秀次, 望月学, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫, 脱細胞化角膜実質を用いた再生型人工角膜の開発と機能評価, 第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 263, 2009
- 17). 根岸淳, 木村剛, 南広祐, 藤里俊哉, 岸田晶

夫, ヘパリン含有PVA人工血管の創製, 第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 381, 2009

- 18). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価, 再生医療, 9(Suppl), 175, 2010
- 19). 橋本良秀, 佐々木秀次, 船本誠一, 望月学, 本田貴子, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫, 脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み, 再生医療, 9(Suppl), 242, 2010

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



凡例

↑ リンパ球   
 ↑ 線維芽細胞   
 ↑ 好酸球   
 ↑ マクロファージ

図 1. 脱細胞化角膜移植後の HE 染色写真 (×200)  
 A: 脱細胞化角膜移植後 7 日      B: 脱細胞化角膜移植後 14 日  
 C: 未処理角膜移植後 7 日      D: 未処理角膜移植後 14 日

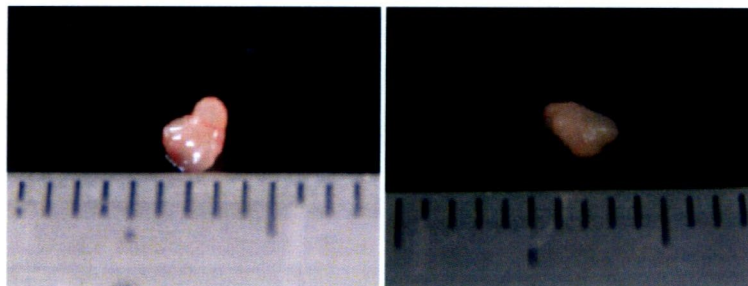


図 2. 角膜皮下移植後のリンパ節腫 (左: 脱細胞化角膜、右: 未処理角膜) 14 日後

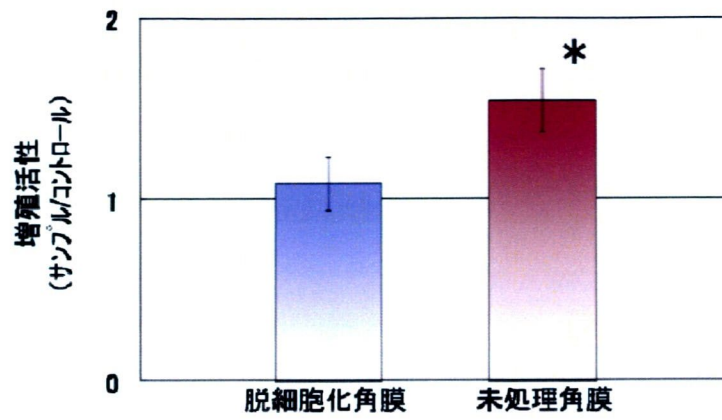


図 3. 免疫細胞増殖試験

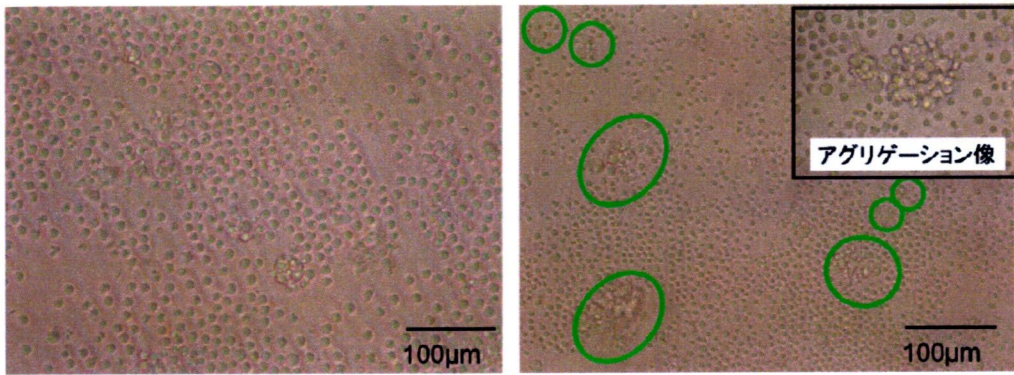


図 4. 培養細胞形態観察 (左：脱細胞化角膜感作、右：未処理角膜感作)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岸田晶夫	第2章 細胞周辺環境のための材料加工・利用技術 1.材料表面修飾(化学的・生物的)	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術	株式会社 メディカルドゥ	大阪	2009	90-96
岸田晶夫	第12章 再生医療デバイス	監修：三林浩二	バイオテクノロジーシリーズ ヘルスケアとバイオ医療のための先端デバイス機器	シーエムシー出版	東京	2009	131-143

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Sasaki, S. Funamoto, Y. Hashimoto, T. Kimura, T. Honda, S. Hattori, H. Kobayashi, A. Kishida, M. Mochizuki	In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas	Molecular Vision	15	2022-2028	2009
A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka	Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components	Journal of Artificial Organs	12	111-117	2009
D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata	In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers	Biomacromolecules	10(2)	237-242	2009
S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka	Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates	The Japanese Peptide Society		449-450	2009
Tanaka, H., Ogino, H., Matsuda, H., Minatoya, K., Sasaki, N.	Long-term outcome of aortic valve sparing procedures in connective tissue disorders	Jap J Thor Sur	62 (11)	978-981	2009

Kataoka, Y., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Higashi, M., Morii, I., Kawamura, A., Ishibashi-Ueda, H., Otsuka, Y.	Oppression of left main trunk due to pseudoaneurysm with graft detachment in patients with Behçet disease previously treated by Bentall procedure	Circulation	119 (21)	2858-2859	2009
Tochii, M., Ogino, H., Matsuda, H., Minatoya, K., Sasaki, H., Kitamura, S.	Is prompt surgical treatment of an abdominal aortic aneurysm justified for someone in their eighties?	Ann Thor Cardiovasc Sur	15 (1)	23-30	2009
藤里俊哉	Tissue Engineeringによる心臓弁	Circulation Up-to-Date	4(4)	470-8	2009
藤里俊哉	バイオメカニクス	人工臓器	38 (3)	162-4	2009
K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, , ,	Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water cosolvent	Acta Biomaterialia	6	403-408	2010
K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida	Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels	Acta Biomaterialia	6	409-417	2010
S. Funamoto, K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, S. Kitamura, T. Fujisato, A. Kishida	The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels	Biomaterials	31	3590-3595	2010
Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki, T. Honda, S. Hattori, K. Nam, T. Kimura, M. Mochizuki, T. Fujisato, H. Kobayashi, A. Kishida	Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering	Biomaterials	31	3941-3948	2010
S. Kakinoki and T. Yamamoto	Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence,	Acta Biomater	6	1925-1930	2010



Minatoya, K., Ogino, H., Matsuda, H., Sasaki, H., Tanaka, H., Kobayashi, J., Yagihara, T., Kitamura, S.	Is conventional aortic arch surgery justifiable in octogenarians?	J Thor Cardiovasc Sur	139 (3)	641-645	2010
Matsuda, H., Fukuda, T., Iritani, O., Nakazawa, T., Tanaka, H., Sasaki, H., Minatoya, K., Ogino, H.	Spinal Cord Injury is Not Negligible after TEVAR for Lower Descending Aorta	Eur. J Vasc Endovasc Sur	39 (2)	179-186	2010
Morisaki, H., Akutsu, K., Ogino, H., Kondo, N., Yamanaka, I., Tsutsumi, Y., Yoshimuta, T., Morisaki, T.	Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD).	Hum mutat	30 (10),	1406-1411	2010
A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka	A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins,	Tissue Engineering			In press
T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, T. Moritan, and T. Yamaoka	Periferal nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve	J. Biomat. Sci. Pol. Ed			In press

#### 学会

Shuji Sasaki, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Takako Honda, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Manabu Mochizuki,	Novel Scaffold for Artificial Cornea Prepared by Decellularization of Cornea Using Ultra-high Hydrostatical Pressurization Treatment	ARVO2009			2009
Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida	Construction of a Collagen Matrix Designed for Regeneration of Physical and Biological Property of Native ECM	8th international Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers-FBPS2009 Program and Abstract Book		O40	2009
T. Ehashi, T. Yamaoka	Different Host Responses To Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds For Tissue Engineering	TERMIS 2nd World Congress Abstract		S51	2009

Hisatoshi Kobayashi, Shinya Hattori, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Shuji Sasaki, Manabu Mochizuki, Toshiya Fujisato, Takako Honda, Akio Kishida	Novel Approach for Artificial Cornea Using Decellularized Cornea Prepared by Ultra High Hydrostatic Pressure	TERMIS 2nd World Congress Abstract		S75	2009
Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Tetsuya Higami, Akio Kishida	Preparation and Evaluation of Acellular Small-diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method	TERMIS 2nd World Congress Abstract		S100	2009
Yusuke Ago, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Akio Kishida	Capillary Network Tissue Engineering Using Decellularized Rat Liver Bioscaffold	TERMIS 2nd World Congress Abstract		S100	2009
Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida	Engineering Collagen Matrix to Regenerate Similar Physical and Biological Property of Native ECM	TERMIS 2nd World Congress Abstract		S277	2009
Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	Preparation and Characterization of Collagen/Phospholipid Polymer Hybrid Gel Designed for Artificial Cornea	The annual conference of the European Society for Biomaterials Abstract CD		P1	2009
T. Ehashi, T. Yamaoka	Analysis of Host Response against Different Surface Materials for Tissue Regeneration	国際シンポジウム "Immune Regulation: Present and Future"		87	2009
S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, T. Yamaoka,	Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat	第46回ペプチド討論会		158	2009
江橋 具、西垣戸麻美、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二	脱細胞化神経を用いた損傷神経の再生	生体医工学	47 (Suppl)	126	2009
江橋具、佐合満、森反俊幸、湊谷健司、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二、北村惣一郎	石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良	生体医工学	47 (Suppl)	261	2009
根岸淳、船本誠一、木村剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫	脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索	生体医工学	47 (Suppl)	262	2009
近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、藤里俊哉	電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度推定の試み	生体医工学	47 (Suppl)	289	2009
南広祐、木村剛、船本誠一、岸田晶夫	生体組織類似構造を有するコラーゲン構造体の作製と物理的及び生物学的特性検討	第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集		57-58	2009

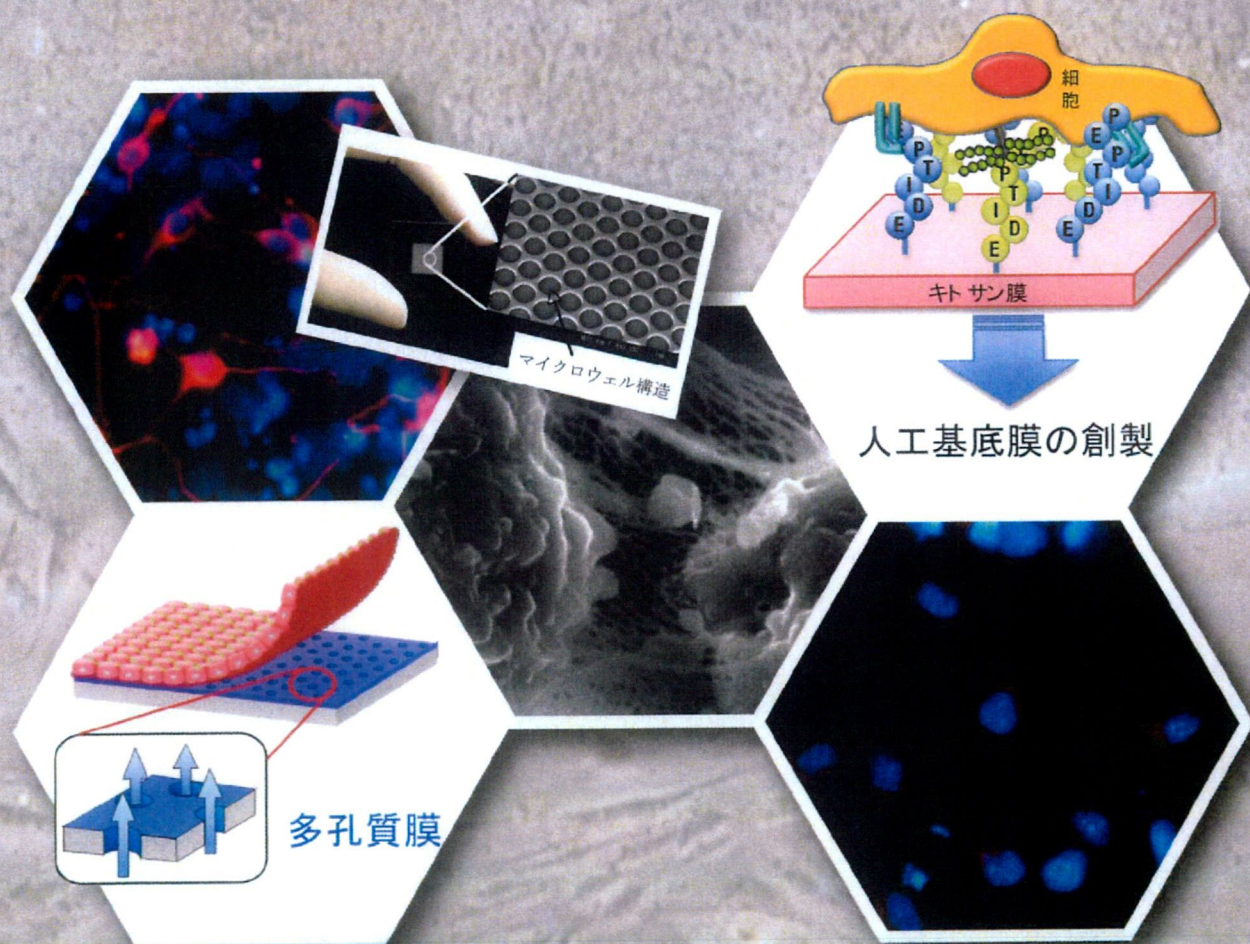
服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月学, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊	高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の有用性	第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集		59-60	2009
服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月学, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊	高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み	Polymer Preprints, Japan	58(2)	4866	2009
木村剛, 橋本良秀, 船本誠一, 南広祐, 藤里俊哉, 小林尚俊, 岸田晶夫	種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析	Polymer Preprints, Japan	58(2)	4874	2009
南広祐, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫	生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製	Polymer Preprints, Japan	58(2)	5062-5063	2009
小林尚俊, 服部晋也, 本田貴子, 船本誠一, 佐々木秀次, 橋本良秀, 藤里俊哉, 寺田堂彦, 木村剛, 望月学, 岸田晶夫	高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料	Polymer Preprints, Japan	58(2)	5088-5089	2009
岸田晶夫	脱細胞化組織等の生態由来人工臓器の基礎と現状について	人工臓器	38(2)	S-59	2009
湊谷謙司, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 山岡哲二	界面活性剤フリーの脱細胞弁・血管の臨床化に向けて	人工臓器	38(2)	S-59	2009
根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 藤里俊哉, 樋上哲哉, 岸田晶夫	脱細胞化口径人工血管の調製	人工臓器	38(2)	S-95	2009
江橋 具, 白井 航, 多嶋佑介, 神村共住, 山岡哲二	パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析	人工臓器	38(2)	S-106	2009
橋本良秀, 船本誠一, 佐々木秀次, 望月学, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫	脱細胞化角膜実質を用いた再生型人工角膜の開発と機能評価	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		263	2009
江橋 具, 竹村太郎, 箕輪貴司, 花方信孝, 小林尚俊, 山岡哲二,	スキャフォールド材料に対する生体応答の遺伝子網羅的解析	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		274	2009
田中聖也, 柿木佐知朗, 藤里俊哉, 山岡哲二,	$\beta$ -シート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		325	2009
山口晴加, 鈴木彩香, 佐合 満, 朝本康太, 江橋 具, 森反俊幸, 藤里俊哉, 山岡哲二	脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		374	2009
鈴木彩香, 山口春加, 江橋具, 森反俊幸, 岸田晶夫, 藤里俊哉, 山岡哲二	血管組織の脱細胞操作における不要タンパク成分の除去	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		377	2009
根岸淳, 木村剛, 南広祐, 藤里俊哉, 岸田晶夫	ヘパリン含有PVA人工血管の創製	第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		381	2009

根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 樋上哲哉, 岸田晶夫	小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価	再生医療	9(Suppl)	175	2010
山岡哲二, 湊谷謙司, 田中裕史, 山口晴加, 黒川理世, 森反俊幸, 中谷武嗣, 藤里俊哉	脱細胞化血管に対する石灰化評価とその抑制法	再生医療	9(Suppl)	175	2010
橋本良秀, 佐々木秀次, 船本誠一, 望月学, 本田貴子, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫	脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み	再生医療	9(Suppl)	242	2010
黒川理世, 寺田堂彦, 山岡哲二, 藤里俊哉	脱細胞血管のin vitroでの内皮化	再生医療	9(Suppl)	311	2010
船本誠一, 西岡 宏, 吉田謙一, 菊池正博, 小林泰彦, 藤里俊哉, 山岡哲二, 岸田晶夫	$\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理と移植評価	第13回日本異種移植研究会プログラム・抄録集		12	2010
藤里俊哉	クラウン系ミニブタを用いた血管・心臓弁再生の試み	鹿児島大学発先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト抄録集		15	2010

# ますます重要になる 細胞周辺環境(細胞ニッチ)の 最新科学技術

細胞の**生存、増殖、機能**のコントロールから**創薬研究、再生医療**まで

【編集】田畑泰彦(京都大学再生医科学研究所教授)



株式会社メディカルドゥ

### 1. 材料表面修飾（化学的・生物的）

岸田 晶夫

#### 要旨

細胞が最初に材料を認識するのはその表面である。表面の機能を意図した材料開発は一般に困難であるため、適切な物理特性を有する材料表面を改質する方法論が一般的である。表面改質のためには、細胞と表面との相互作用を理解する必要がある。本稿では、材料が生体環境に置かれた場合に起こる種々のプロセスについて概説し、実際の表面改質について紹介する。表面改質については1980年代に詳細な検討が行われており、技術としては汎用化しているものが多いため、基礎的な技術に的を絞った。

#### キーワード

タンパク質吸着、接触角、静電的相互作用、細胞接着、接着タンパク質、表面自由エネルギー、高分子グラフト、多相系高分子、マイクロ相分離、タンパク質固定化、ハイドロキシアパタイト

#### ❖ はじめに

「材料」は金属、セラミックス、高分子の3種に大別できる。現時点で「細胞周辺材料」として用いられている材料は限られているが、今後、この領域の発展とともに用いられる材料の種類も拡大してゆくと考えられるため、本稿では特に基盤材料の範囲を限定せずに記述する。ある材料が細胞周辺材料として用いられる場合に必要なのは、その材料が細胞と接触する場が生体内か生体外であるかによって異なる。これら両者の場に共通して必要なのは、細胞に対する非毒性である。毒性の原因には、材料自身からの溶出物や分解産物によるものが多く、これは直接生体に悪影響を及ぼすために、生体と接触して用いられる医療機器の場合には薬事法によってガイドラインが示されている<sup>1)</sup>。一方、その他の機能などについては法律的な規制もなく、また臨床家や研究者の間でもいろいろに意見が分かれている。すなわち、タンパク質吸着性・非吸着性、細胞接着性・非接着性などは当該材料が用いられる場面によって異なる。

これまでに医療機器に用いられてきた材料については、多くが構造的な機能を主眼に開発されており、表

面の機能については、これを欠いているものがほとんどである。しかしながら、現実には多くの材料が医療機器として用いられている。これは、表面の機能が不必要であるということではなく、材料科学の立ち遅れを別の手段によって補っているに過ぎない。補助人工心臓、人工肺、人工腎臓など多くの人工臓器が臨床応用されて多大な成果を取っているが、これらの人工臓器は材料表面の特性である抗血栓性を欠いているため、抗凝固剤を使用して血栓の生成を防いでいる。この抗凝固剤の過剰な使用は時として人の命を奪うことがあるので、人工臓器の適用が制限されたり、使用中の管理が複雑になったりする。このように、医療機器に表面の機能性を付与することは、医療デバイスや人工臓器の開発・適用における重要な問題となっている。再生医療についても、細胞の採取、細胞培養、スキャホールドへの組み込み、バイオリクターでの培養など種々の材料と接触し、表面からの影響を受ける場面は数多い。また、生体外での発生学や細胞生物学などの基礎研究にとっても、今後、三次元化などの必要性の増大により材料との相互作用を意識せざるを得なくなると考えられる。

材料の表面を改質する試みは大きく分けて2つの方

表① バイオマテリアルの表面改質

物理的表面改質	<ul style="list-style-type: none"> <li>・コーティング [生体分子, 高分子 (単層, 交互吸着)]</li> <li>・形状・凹凸 (ポリッシング, 微粒子配列化)</li> </ul>
物理化学的表面改質	<ul style="list-style-type: none"> <li>・紫外線照射</li> <li>・ガンマ線照射</li> <li>・イオンビーム照射</li> <li>・プラズマ処理</li> </ul>
化学的表面改質	<ul style="list-style-type: none"> <li>・生物分子固定化</li> <li>・高分子グラフト</li> <li>・相分離 (結晶・非晶, パターニング)</li> </ul>

法がある。1つは材料のバルクの特性を損なうことなく表面を変化させるための表面修飾であり、もう1つはバルク材料を目的の表面特性が得られるように設計する方法である。表面修飾法には表①に示すような方法がある。本稿では、主として化学的および物理化学的表面改質技術について記述する。

## I. 細胞周辺環境材料と生体成分との相互作用

細胞周辺環境材料は材質・形状など多岐にわたっており、また使用される目的によって相互作用する生体成分もそれぞれに異なる<sup>2)3)</sup>。金属やセラミックスは歯科材料、整形外科材料として臨床応用されており、それぞれに生体組織との接着性などが機能を発揮するために必要である<sup>4)5)</sup>。特に、セラミックスについては骨結合性の観点から、その界面での反応が詳細に調べられている。これらは他稿を参照してほしい。一方、生体成分との相互作用について研究例が多いのは高分子材料である。物性のコントロールが容易で、他種類の素材が提供できるなどの特色があるため多方面に応用されている。ここでは、表面修飾の基礎として、高分子を例に挙げて材料と生体成分の相互作用について概説する。

図①に示すように一般に材料が生体と接触した場合、初めにタンパク質、次に細胞成分との相互作用が起こる。長期にわたって生体と接触する場合には、材料周辺での創傷治癒過程を経て生体組織と接触する。人工血管など血液と接

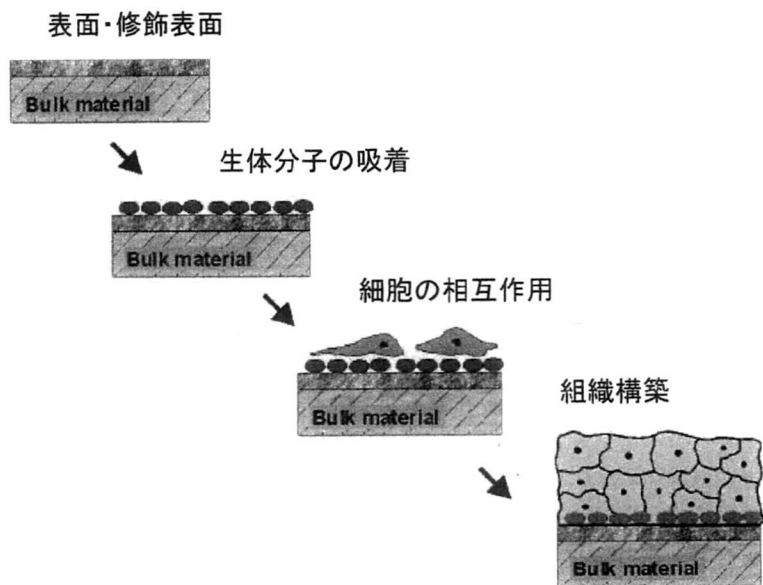
触する場合には、血液凝固反応や補体の活性化などの酵素反応が起こり、長期的には仮性内膜が形成される。臨床に用いられる医用材料や人工臓器の場合には、軟組織・硬組織のいずれの組織に用いられる場合にも、まず血液と接触して血漿タンパク質が吸着し、マクロファージが浸潤して炎症反応が起こり、その後治癒過程に移行する。人工臓器などの医療デバイスだけで

なく、細胞周辺環境材料の性能を決定する大きな要因が表面物性であり、なかでもタンパク質吸着性および組織接着性が重要である(表②)。ここでは、材料と生体が接触した場合の比較的初期における相互作用について説明する。

### 1. タンパク質との相互作用

材料へのタンパク質吸着を支配する基本因子には表面自由エネルギー、材料の表面電荷がある。タンパク質吸着を物理化学的に解析する試みが行われている<sup>6)</sup>。これはコロイド化学における付着の理論を適用し、タンパク質をコロイド(バイオコロイド)と捉える考え方である。図②に種々の材料への免疫グロブリンの吸着挙動を示す<sup>7)</sup>。材料表面とタンパク質の界面自由エネルギーと接着仕事の解析によれば、このようなパラボリックな吸着挙動は理論曲線とよく一致することが

図① 材料表面と生体との相互作用



表② 細胞周辺環境としての表面改質の目的

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 特異的相互作用のための官能基の導入</li> <li>• 表面自由エネルギーの制御</li> <li>• 親水性あるいは疎水性の制御</li> <li>• 化学的不活化</li> <li>• 表面架橋の導入</li> <li>• 弱い結合層（主として酸化物などの低分子）またはコンタミネーションの除去</li> <li>• 表面結晶性もしくは表面粗さを増加、あるいは減少させることによって表面形状を変化</li> <li>• 表面電気伝導性の制御</li> <li>• 表面潤滑性</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• タンパク質の吸着制御（量、配向、変性など）</li> <li>• 細胞接着および細胞増殖の制御</li> <li>• 細胞機能（タンパク質発現、活性化、分化など）の制御</li> </ul>

明らかになっている。すなわち、親水性表面と疎水性表面においてはタンパク質吸着が抑制され、対水接触角70度付近で最大値をとる。この考え方は現在においても医用材料の分子設計における指導的原理の1つであり、タンパク質吸着の初期においては実際の現象とよく一致する。

静電的相互作用はタンパク質吸着現象において遠距離相互作用として働く。したがって、材料表面の電荷はタンパク質吸着の初期において大きな影響を及ぼすが、生体に存在するタンパク質は数多く、それぞれに異なるpKaを有している。また、どのタンパク質においてもその表面にはそれぞれのアミノ酸組成による正電荷および負電荷を有する残基が存在し、複雑な構造を有しているため、統一的な研究は少ない<sup>8)</sup>。ポリイオンコンプレックス表面へのアルブミンの吸着<sup>9)</sup>および各種の物質の単層表面へのリゾチームの吸着の研究<sup>10)</sup>では、同荷電のタンパク質と材料では初期吸着速度が小さく、反対荷電の組み合わせの場合には吸着量・吸着速度ともに大きくなるが示されている。

しかし、これらの物理化学的な観点より分子設計され合成されてきた高分子はタンパク質吸着制御に必ずしも成功したとはいえない。これらの概念は、タンパク質吸着の初期過程の解釈には有効であるものの、動的な状態にある血液中や培養液中においてタンパク質吸着が生じた後については、材料表面が高分子の化学構造で規定できなくなるため現象との不一致が生じてくる。さらに吸着したタンパク質の種類が時間とともに変化するいわゆるVroman効果<sup>10)11)</sup>の影響や吸着タンパク質の構造変化も起こる<sup>12)13)</sup>。これらの現象をすべて説明・予測できるような物理化学的解釈はなく、応用をめざす材料設計の障害となっている。

## 2. 細胞との相互作用

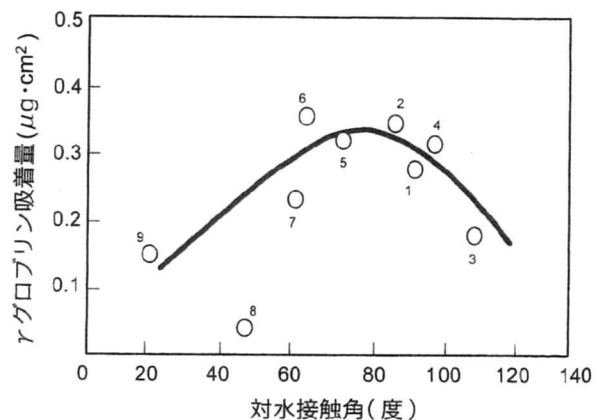
細胞周辺環境材料にとって最も重要な機能が細胞

接着性の制御である。細胞接着に関してはタンパク質吸着が支配的になる場合が多い。すなわち、接着活性を有するタンパク質が吸着した場合には接着が促進され、非接着性のタンパク質が吸着した場合には阻害される。細胞の基質への接着に関しては接着性タンパク質の材料への吸着が生理的メカニズムとして存在する。一方、細胞も一種の生体コロイドと考えられ、物理化学的現象として理解することもできる。

### (1) 接着タンパク質の関与

接着依存性細胞は一般的にフィブロネクチン、フィブリノーゲン、コラーゲンなどの接着性タンパク質を介して基質に接着する。これらのタンパク質には細胞接着をつかさどるリガンド配列が存在し、アミノ酸の記号を用いてRGD配列（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸の配列）と呼ばれている<sup>10)</sup>。これらの配列を有するタンパク質の吸着量に依存して細胞接着は制御

図② 種々の材料表面へのγグロブリンの吸着



1. ポリエチレン
2. ポリプロピレン
3. テフロン
4. シリコン
5. ポリスチレン
6. ポリエチレンテレフタレート
7. エチレン-ビニルアルコール共重合体
8. ポリビニルアルコール
9. セルロース



されるため<sup>17)・19)</sup>、タンパク質吸着制御が直接に細胞接着制御に結びつく場合が多い。接着した細胞は、伸展・移動しながら増殖する。

## (2) 物理化学的考察

細胞-基質間の相互作用については接着初期にかぎってタンパク質と同様の物理化学的解釈が成立する<sup>20)・21)</sup>。すなわち、表面自由エネルギーによる解釈では界面自由エネルギーによる接着の最大値が存在し(図③)、また細胞表面は一般にシアル酸などによって負に帯電していることから、タンパク質が存在しない場合には、正電荷を有する表面には高い接着性を示し、負電荷を有する表面にはポテンシャルエネルギー障壁の存在により接着は阻害あるいは不安定になる。一方、タンパク質が培養液中に存在する場合には、電荷に対するタンパク質の吸着が細胞接着を制御するため電位の高い表面に接着する現象がみられる(図④)。

## II. 化学的表面修飾法

上記で示したように、タンパク質吸着あるいは細胞接着を制御するためには、表面の物理化学的特性を変化させることが考えられる。

### 1. エネルギー照射による親水性化

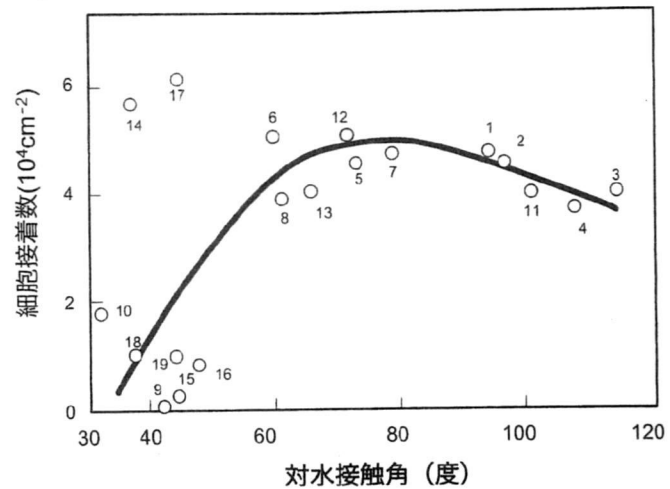
高エネルギーな放射光を照射して表面の結合を乖離させたり、分子を脱離させたりして活性点を生成させ、そこに異なる分子を結合させる方法である。多くは酸化反応であり、親水化が達成される。

### 2. 高分子グラフト反応

タンパク質を吸着させない水和層形成による抗血栓性表面は、Andradeらによって提唱された<sup>22)</sup>。これは血管内壁がハイドロゲル構造を有していることに基づいている。水和溶解鎖を表面に形成させる技術には、

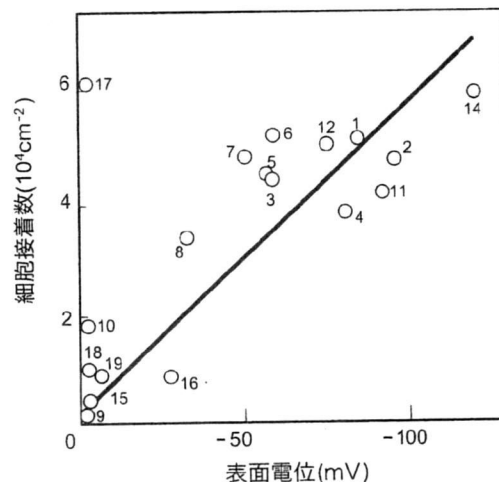
①素材表面の反応性官能基を利用してカップリング反応によって水溶性高分子を結びつける方法、および②材料表面に重合開始基のパーオキサイド基を生成させて、水溶性ビニルモノマーのグラフト重合反応を行うなどの高分子グラフト反応が用いられる。①の方法は材料表面が水酸基やアミノ基などの官能基を有するこ

図③ 種々の表面上へのL929細胞の接着(60分後)



1. ポリエチレン 2. ポリプロピレン 3. テフロン 4. 4フッ化ポリエチレン  
5. 6フッ化ポリプロピレン共重合体 6. ポリエチレンテレフタレート  
7. ナイロン6,6 8. エチレン-ビニルアルコール共重合体 9. ポリビニルアルコール 10. セルロース 11. シリコン  
12. ポリスチレン 13. 培養用プラスチックシート 14. ガラス 15. ポリアクリルアミド-グラフト化ポリエチレン 16. ポリアクリル酸-グラフト化ポリエチレン  
17. フィブロンectin固定化ポリエチレン 18. コラーゲン固定化ポリエチレン 19. アルブミン固定化ポリエチレン

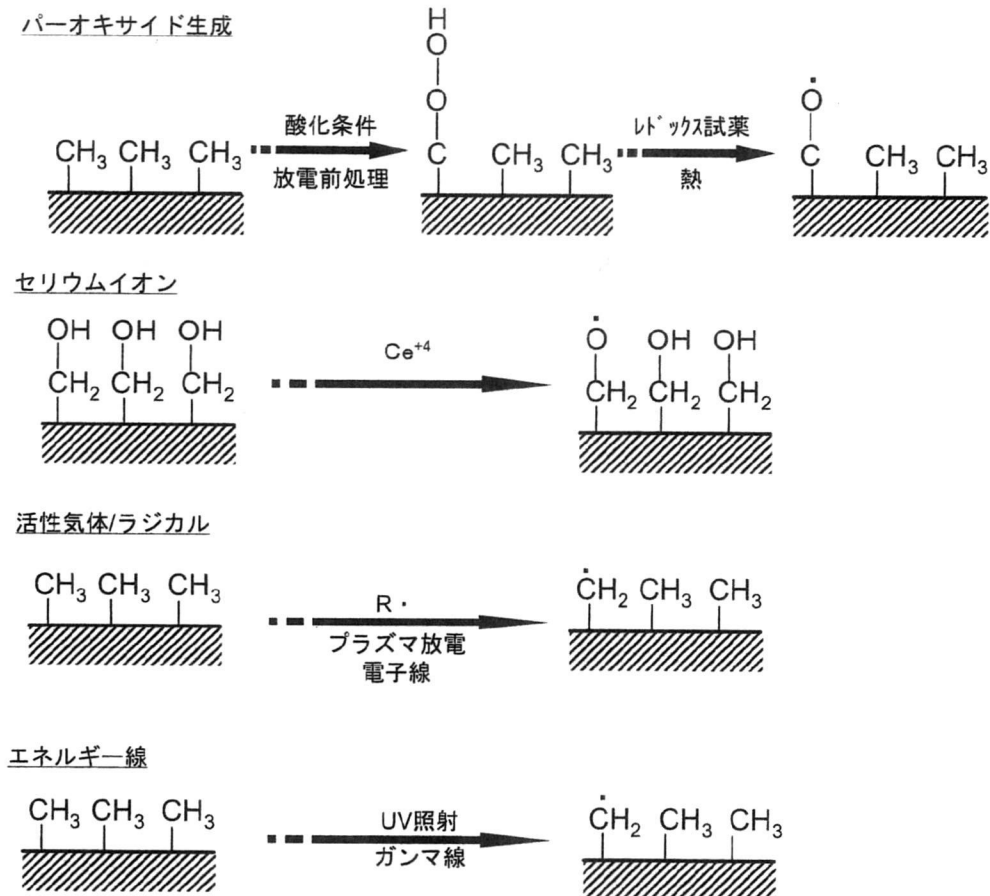
図④ L929細胞の接着に及ぼす材料のゼータ電位の影響



サンプルコードは図②を参照のこと

とが必要である。例えば、エチレンビニルアルコール共重合体の水酸基をジイソシアナートでウレタン化し、この未反応末端イソシアナート基を有するスペーサーを利用してデキストラン、ポリビニルアルコール、アルブミンやゼラチンが化学固定できる<sup>23)</sup>。また、セルロース表面の水酸基にポリエチレングリコール(PEG)

図6 高分子材料表面への反応性活性種の導入法



の末端カルボン酸物をエステル結合でグラフトすることもできる<sup>24)</sup>。②の方法は、ガンマ線、電子線、イオンビームなどを前照射して分子を切断してラジカルを生じさせて、空気中の酸素の付加反応によってパーオキシド基を形成させ(図6)，ついで水溶性モノマーをラジカルグラフト重合する方法である<sup>25)~27)</sup>。前処理方法には、①ガンマ線処理、②電子線処理、③コロナ放電処理、④グロー放電処理、⑤イオンビーム処理などがある。このうち、①②は表面層だけでなくバルク層にも処理が及ぶが、③~⑤特にグロー放電処理は表面層に局限した処理方法である。ガンマ線前処理法によるグラフト重合は、林らによって詳細な検討が行われた<sup>26)</sup>。種々の水溶性モノマーのうちアクリルアミドは良好な抗血栓性を与えるが、ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレートなどは、顕著な抗血栓性の向上がみられない。従らは、放電処理による表面グラフト重合を行い、タンパク質の吸着が少なく、脱

着が容易であることを報告している<sup>27)</sup>。親水性マクローマーを用いる表面改質法が森らによって開発された<sup>28)</sup>。これは、メトキシポリエチレングリコールを側鎖に有するメタクリレートマクローマーをポリ塩化ビニルやポリアクリロニトリルに光反応を用いてグラフト重合して合成される。グラフト率の増加およびPEGの重合度の増加とともに含水率は増加し、血小板および血漿タンパク質の吸着も大幅に抑制される。この例のように、表面水和層の形成にはPEG鎖がよく用いられる<sup>28)~30)</sup>。PEG層のタンパク質吸着阻止効果については、表面にグラフト化されることによる排除体積効果やマイクロな運動がタンパク質の接近を妨げるとの説明がなされている。

### 3. 多相系高分子による表面設計

ホモポリマーによる均一材料表面による生体機能性獲得は、1970年代半ばまでに均一材料のみではなしえないことが結論づけられ、2種類以上の異なるポリ

マー鎖を有するいわゆる多相系高分子材料の研究が盛んになった。多相系材料として最初に見出され、かつ実際に人工臓器に使用されているポリマーはセグメント化ポリウレタンである。この材料は、エラストマーとしての優れた弾性係数に加えて、高い耐疲労性を示し人工心臓用の素材に要求される機能の1つを十分満たす<sup>30)</sup>。この特性は、分子中のハードセグメントが凝集してクラスターを作り、それがソフトセグメントの連続相に分散した構造をとるマイクロ相分離構造によって発現されている。Lymanらの研究では、ソフトセグメントの主成分であるポリエーテルの鎖長を変えると血液適合性も大幅に変化し、最適値が存在する<sup>31)</sup>。ポリエーテルとしては、比較的疎水性のポリテトラメチレングリコール (PTMG) がよく用いられるが、他にわずかに親水性度の強いポリプロピレングリコール (PPG) や、極めて親水性の高い PEG によって親水性表面を形成することもできる。PEG などの親水性のポリエーテルをベースとするセグメント化ポリウレタンでは、界面張力が極めて小さく、また表面電位もほぼ 0 であり、水和された PEG の溶解鎖が界面に濃縮された構造をとっている可能性が示唆された。

アルブミンを選択的に吸着する表面を作製し、材料と血液との直接接触を回避する、いわゆる passivation 機構による抗血栓性を目的として、ポリウレタンの表面化学修飾によって長鎖アルキル基を導入し、アルブミンのもつ疎水ポケットと相互作用させてアルブミンの大量吸着を可能にする方法が開発された<sup>32)</sup>。

セグメント化ポリウレタンの他のポリマーとして HEMA-ST (スチレン) -HEMA や HEMA-PDMS-HEMA からなるブロック共重合体<sup>33)</sup> などが開発されている。これらは、親水性・疎水性の2相からなるマイクロ相分離構造を有し、この構造によって血液中のタンパク質を安定な状態で吸着させ、高い血液適合性を実現すると説明されている。これらの2相構造ドメインの大きさは 20 ~ 30nm であると報告されている。これらのモルフォロジー効果による抗血栓性の機構については、片岡らによって詳細に検討された<sup>35)36)</sup>。

#### 4. 生理活性物質の固定化

生体の組織を構築している線維芽細胞に親和性の高い表面を作製し、軟組織接着性を実現する試みが行わ

れている。日野らは、シリコン表面上にコラーゲンをコーティングした材料を作製し、このコラーゲンコーティング材料をウサギの皮下にインプラントし、6週間後には組織と材料の間は新生コラーゲン線維によって強く接着していることを見出した<sup>37)38)</sup>。また、コラーゲンを共有結合で材料表面に固定した報告もある。岡田らはシリコン表面にアクリル酸をグラフト重合してカルボキシル基を導入し、カルボジイミド法でタンパク質中のアミノ基と結合させた<sup>39)40)</sup>。この方法で、コラーゲンを 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、フィブロネクチンを 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、ゼラチンを 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  固定化できた。これらをウサギの組織にインプラントして引き抜き力を測定したところ、コラーゲンを固定化したものが最も大きな引き抜き力を示した。また、同じ方法でスポンジ状の材料にコラーゲンを固定化した経皮デバイスを作製してインプラント実験を行ったところ、上皮のダウングロウスもみられず、また感染の発生も少なかった。また、青木らはハイドロキシアパタイトより作製した経皮デバイスが良好な成績を取めていることを報告している<sup>41)</sup>。この場合もハイドロキシアパタイトと線維芽細胞や生体組織との親和性が高いことが重要である。古菌らは、ハイドロキシアパタイトの高い弾性率を軟組織に適合させるため、表面改質した高分子表面に骨成分であるハイドロキシアパタイトの微粒子を固定化し、素材の物性を損なわずに高い軟組織結合性が実現できることを示した<sup>42)</sup>。このように、軟組織接着性材料を作製するには、①死腔を生ぜず上皮のダウングロウスを起こさないために、線維芽細胞が付着しやすい表面であること、これは表面形状だけでなく、軟組織の易動性に適合できるバルク特性も必要である、②十分な接着強度を得るために接触面積が大きいこと、の2点が重要である。

#### ❖ おわりに

工業用として開発された、いわば出来合いの材料を、高度な細胞周辺環境材料として応用するためには表面修飾が必須である。しかし、表面改質技術の進展には細胞生物学からの情報のフィードバックが必要であり、細胞生物学者と材料工学者の密接な協力が必要である。本稿がその一助になれば幸いである。

参考文献

- 1) 新薬事法研究会監修:よくわかる改正薬事法,薬事日報社,2005.
- 2) 高分子学会編:高分子機能材料シリーズ9 医療機能材料,21-106,共立出版,1990.
- 3) 嶋村三郎,寺田 弘,他編:生体コロイドII,777-818,広川書店,1990.
- 4) Kieswetter KK, Schwartz Z, et al: Crit Rev Oral Biol Med 7, 329-345, 1996.
- 5) Hallab NJ, et al: J Long-Term Effects Med Implants 5, 209-231, 1995.
- 6) Andrade JD, ed: Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers Vol 2, Protein Adsorption, 1, Plenum Press, 1985.
- 7) Tamada Y, Ikada Y: Polymers in Medicine II (Chiellini E, Giusti P, et al eds), 101-115, Plenum Press, 1986.
- 8) MacRitchie F: Adv Protein Chem 32, 283-326, 1978.
- 9) 赤池敏宏,桜井靖久,他:高分子論文集 36, 217-222, 1979.
- 10) Bernath FR, Vieth WR: Biotechnol Bioeng 14, 737-752, 1972.
- 11) Leonard EF, Vroman L: J Biomater Sci Polym Ed 3, 95-107, 1991.
- 12) Vroman L, Leonard EF, eds: Ann NY Acad Sci 283, 1997.
- 13) McMillin CR, Walton AG: J Colloid Interface Sci 48, 345-349, 1974.
- 14) Walton AG, Maenpa FC: J Colloid Interface Sci 72, 265-278, 1979.
- 15) Sordequist ME, Walton AG: J Colloid Interface Sci 75, 386-397, 1980.
- 16) Pierschbacher MD, Rouslahti E: Nature 309, 30-33, 1984.
- 17) 今西幸男,他: Polymer Preprints Japan 37, 705, 1986.
- 18) Matsuda T, et al: Trans ASAIO 35, 677-679, 1986.
- 19) Matsuda T, et al: ASAIO J 36, M294-M296, 1990.
- 20) Grinnell F, et al: Biochem Med 7, 87-90, 1973.
- 21) Maroudas NG: Nature 244, 353-354, 1973.
- 22) Andrade JD: Med Istrm 7, 110-119, 1973.
- 23) Ikada Y: Adv Polym Sci 57, 103-140, 1984.
- 24) Corretge E, et al: Polymers in Medicine III (Migliaresi C, et al eds), 61-72, Elsevier, 1988.
- 25) Hoffman AS: Adv Polym Sci 57, 142-157, 1984.
- 26) 林 和子,他:生体材料 1, 59-63, 1983.
- 27) Ikada Y, et al: J Biomed Mater Res 15, 697-718, 1981.
- 28) 森 有一,他:人工臓器 11, 971-975, 1982.
- 29) Sa da Costa V, et al: J Colloid Interface Sci 76, 594-596, 1980.
- 30) Leckboand D, Sheth S, et al: J Biomater Sci Polym Ed 10, 1125-1147, 1999.
- 31) 鶴田禎二:医用材料と生体(今西幸男 他編), 262-298, 講談社サイエンティフィク, 1982.
- 32) Lyman DL, Knuston K, et al: Trans ASAIO 21, 49-53, 1975.
- 33) Munn MS, Eberhart RC, et al: ASAIO J 6, 65-69, 1983.
- 34) Okano T, Shimada M, et al: Adv Biomaterilas 3, 445-452, 1982.
- 35) Kataoka K, et al: Makromol Chem Suppl 9, 53-58, 1985.
- 36) Kataoka K, Tsuruta T, et al: Eur Polym J 19, 979-984, 1983.
- 37) Hino T, et al: Biocompatibility of Tissue Analogs (Williams DF ed), 71-75, CRC Press, 1985.
- 38) Shimizu Y, et al: Biomed Med Dev Art Organs 5, 49-54, 1977.
- 39) Okada T, Ikada Y, et al: Biomaterials and Clinical Application, 465-472, Elsevier, 1987.
- 40) Okada T, Ikada Y, et al: Poly Mater Sci Eng 59, 548-552, 1988.
- 41) 青木秀希,他:人工臓器 13, 1121-1134, 1984.
- 42) Korematsu A, Furuzono T, et al: J Mater Sci Mater Med 16, 67-71, 2005.

岸田晶夫

プロフィール

- 1983年 京都大学工学部高分子化学科卒業
- 1985年 同大学院工学研究科高分子化学専攻修士課程修了
- 1988年 同博士後期課程単位取得後退学  
ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員  
(国立衛生試験所)
- 1989年 京都大学医用高分子研究センター研修員  
京都大学工学博士
- 1990年 国立循環器病センター研究所生体工学部室員
- 1992年 鹿児島大学工学部助手
- 1994年 同助教授
- 1999年 国立循環器病センター研究所生体工学部部长
- 2004年 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授