

通帯は60歳以上の高齢者への適用とされる。また、BSE問題をきっかけに、ウシ心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整備されたことにより、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。これは、機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性で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⁹⁾。新聞にはヒトジを用いた実験で、本精血管壁の細切によって血管内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞を分離した後に8-10週間培養し、ポリグリコール複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。ヒトジの肺動脈弁の一葉を再生医療心臓弁で置換したところ、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⁹⁾。最近、彼らは弁葉だけでなく、三葉を有するノバルサルパ付きの心臓弁組織 scaffold を開発し、細胞を播種することで *in vitro* で弁全体を組織工学的に作成し、臨床応用を開始する計画である。このような生体吸収性 scaffold を用いた再生医療心臓弁は、韓国ソウル大学などからも報告されている⁹⁾。

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⁹⁾。

ドイツ・ハノーバー大学医科大学の 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播種している。

4 心臓弁

藤原俊成¹⁾、北村忍一郎²⁾

4.1 はじめに

日本人工臓器学会の調査によると、我が国で心臓弁置換を受けた患者は人工動脈弁と僧帽弁あわせて1999年において年間8千人以上にのぼり、80%が機械弁、残り20%が異種生体弁である。また、米国胸外科学会の調査によると、大動脈弁置換術は1997年において年間約9千人であり、判明しているものうち約50%が機械弁、45%が異種生体弁、3%が同種弁、残りが自己弁である。術前診断や術中の体外循環技術の向上などもあり、大動脈弁置換術における死亡率は1998年において約4%とされている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある心臓弁置換術ではあるが、現在、どのような問題があり、これ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だろうか。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、主にバイロイットカーボン製の2枚の半月版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前後の圧較差が無視できない大きさで、心臓弁や弁葉に影響を与えるとされてきたが、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有しているが、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いワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症をきたす頻度も高くなる。また、ワーファリンが腫瘍形成を有することから、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、ブク心臓弁あるいはウシ心臓弁を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、後述の同種弁の成功をきっかけにステントを用いないステン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年程度の耐久性は乏しく、

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

* 2 Seichiro 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⁹⁾。一方、英国リーズ大学の Ingham らのグループは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している¹⁰⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らのグループはヒツジを用いた6ヶ月間の動物実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種すると、弁の変形も石灰化も見られなかったと報告しており¹¹⁾、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、脱細胞化した英種生体弁を用いた再生医療研究を開始した。我々が生体組織を選んだのは、以前から凍結保存(同種弁)の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁のような複雑な形状を吸収性人工材料で造形することが容易でないこと、およびポリ乳酸などの生体吸収性人工材料は生体よりも硬いため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で測定した。ミニブタの大動脈弁から酵素処理によって採取した自己内皮細胞を2週間培養槽内で播種し、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査した。

24日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は細胞活性を示すため、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、弾性率ともに増大したが、コラーゲン繊維および弾性繊維の層内含有量と配列状態はほとんど変化なく、弁葉の厚さに

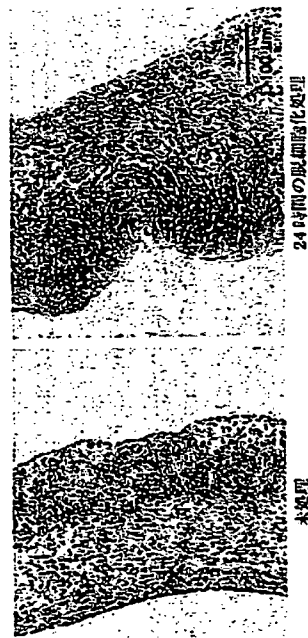


図1 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の組織断面

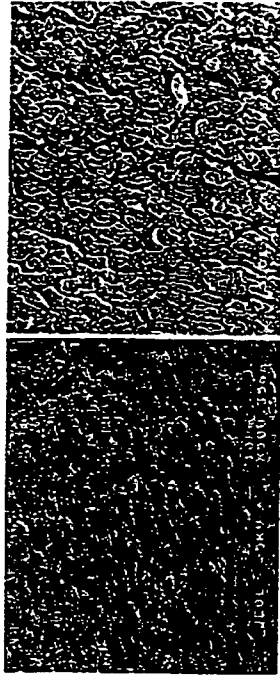


図2 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の表面

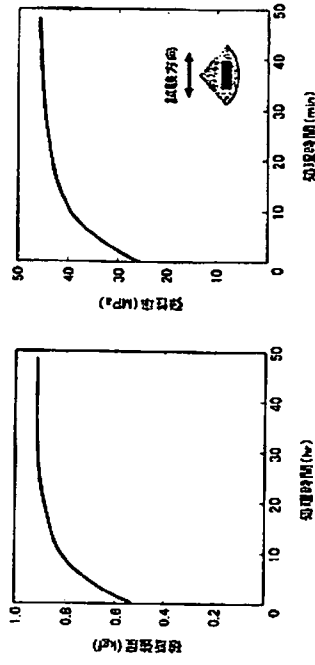


図3 Triton X-100によって脱細胞化された心臓弁葉の生体力学特性



図4 ミニブタに1ヶ月間移植された心臓弁

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能も容易で、内皮細胞用培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透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、組織内への細胞浸透はわずかであった (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。新聞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、いくつかのグループは平滑筋細胞と線維芽細胞を先に播種し、後に血管内皮細胞を (播種) することで複数種の細胞を組み込んでいく。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⁹⁾、弁葉部、弁葉基部、血管壁部のそれぞれに正常組織と同様に複数種の細胞を組み込むことは容易でないと思われる。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担をできるだけ下げるためには、骨髄細胞あるいは末梢血管細胞などの利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP 基準に適合した細胞プロセッシング設備の設置も必要となる。

すでにいくつかの研究グループは臨床応用を始めており、再生医療心臓弁が移植弁や異種生体弁に取って代わる日も近いと信ずる。

謝 辞

我々の研究の一部は、厚生労働省再生科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (H12-再生-005) 並びに新薬開発研究委託事業 (13公一1) の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Stock UA, Nogushima M, Khalil PN, Nollert GD, Horden T, Sperling 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, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 Nov 1; 94 (9 Suppl): II1164-8.
- 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, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 87-92.
- 5) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertelching H, Timke A, Moliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50-5.
- 6) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000; 10 (2): 83-124.
- 7) Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 93-8.
- 8) Zoltinger J, Landeen LK, Alexander HC, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001 Feb; 7 (1): 9-22.

新材料・新素材シリーズ

次世代医療のための高分子材料工学

*Polymeric Biomaterial Engineering for
Future Medicine*

監修：秋吉一成，岸田晶夫

Supervisor : Kazunari Akiyoshi, Akio Kishida

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

6 バイオ材料としての脱細胞化生体組織

岸田晶夫*¹、藤里俊哉*²

6.1 はじめに

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い心臓弁、小口径血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は、生体内分解吸収性の合成高分子材料を用いて研究されている。しかし、これら既存の材料は例えば3次元加工が困難である、物性が生体のものとは大きく異なるなどの欠点が指摘されている。これらを解決するための方法として、生体組織から免疫反応の主体となる細胞成分を除去し、残存したコラーゲンを主成分とする組織を医用材料として用いる新しい試みが報告されている。ここでは、筆者らが行っている新しい処理法を用いた脱細胞化生体組織の調整法及び応用について紹介する。

6.2 研究の背景

新しいバイオ材料、特に再生医療に関わる材料の開発については、その必然性や位置づけについて十分に考慮する必要がある。その主たる理由は、再生医療が適用となる疾患の治療法には、すでに既存の技術が適用されていることが多く、新しく開発される再生医療技術は、これらの競合あるいは共存する必要があるためである。具体的な例として、筆者らが行っている心臓弁の再生医療とそれに用いる脱細胞化生体組織に関して紹介する。

わが国では年間約9000件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてバイロライトカーボン製の機械弁が80%、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁が20%使用されている¹⁾。世界中では年間約30万件の置換術が施行されており、その市場規模は約1000億円に達する。置換術による死亡率は、術前診断や術中の体外循環技術の向上等もあって、再置換術を含めても2%程度であり、比較的安定した成績となっている。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人工弁ではあるが、未だ種々の問題点が存在する。

機械弁は1960年代初頭の実用化以来、形状や材質の改良が重ねられ、現在使用されているものは一生の使用に耐えられる物理的強度を有している。従来、弁座部分の構造上、弁前後の圧差差が大きく、心機能や予後に影響を与えたとされてきたが、改良によって有効弁口面積を広くし

*1 Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

*2 Toshiya Fujisato 大阪工業大学 工学部 教授

次世代医療のための高分子材料工学

たものが開発されている。しかし、機械弁では依然として抗血栓性の問題が解決されていない。抗凝固のため、生涯にわたり厳重なワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症を来す頻度も高くなる。また、ワーファリンが催奇形性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できない。

異種生体弁も1960年代後半の登場以来、抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、特に最近では使用例が増えている。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、ステントを用いないステントレス異種生体弁が導入されている。しかし、異種生体弁は依然、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15～20年程度の耐久性を有するが、若年者では5～10年程度の耐久性しか有せず、米国内臓病学会及び心臓病協会のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。

欧米では1980年代半ばから、わが国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、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。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で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多い。

以上のようなことから、自己弁と同等の抗凝固性、耐久性、成長性などを兼ね備えた次世代型の代用弁の開発が求められており、この目的に沿って再生型の心臓弁の研究が行われている。また社会的な要請として、機械弁、異種生体弁ともほぼ全量が輸入品であり、BSE問題を契機とした厚生労働省のGMP基準の改定に伴い、生体弁の輸入が一時停止するといった事態も生じている。わが国の医療における安全保障の観点からも、わが国発の技術開発によるわが国製の安全な代用弁の登場が望まれている。

6.3 テーラーメイド生体組織による再生医療—心臓弁を例に—

再生医療の成功例として報告されることの多い血管再生療法では、患部に血管新生因子等の薬物あるいは細胞を直接注入する。しかし、代用心臓弁は組織置換であるため、自己組織再生の足場となるべき土台（スキヤフォールド）が必要となる。現在、心臓弁に関して研究されているスキヤフォールド材料としては、吸収性縫合糸等で利用されているポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工材料と、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去した脱

細胞化マトリックスとがある。

人工材料製スキュフォールドを用いた代表例として新聞らの報告がある。ヒツジを用いた実験で、ポリグリコール酸製のシート状メッシュスキュフォールドに末梢血管壁の細切によって得た血管内皮細胞、平滑筋細胞、及び線維芽細胞を、まず線維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を播種することで、再生型心臓弁葉を作成した。ヒツジの肺動脈弁の1葉を再生医療心臓弁葉と置換したところ、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⁾

脱細胞化生体組織を用いた先駆例としては、米国CryoLife社によるSynerGraft心臓弁がある。1999年から脱細胞化ブク大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生型心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数カ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³⁾が、移植後に破断の生じた例も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学のHaverichらは、1998年より異種生体弁から動物由来細胞を除去し、代わりにレシピエントの自己血管内皮細胞を播種する動物実験を行っている。彼らは界面活性剤であるTriton X-100やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている⁴⁾。英国リーズ大学のInghamらは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDSが最も細胞除去に適していると報告している⁵⁾。また、ドイツ・フンボルト大学のKonertzらはヒツジを用いた6カ月間の実験で、脱細胞化ブク肺動脈弁に自己内皮細胞を播種することで弁の変形や石灰化も見られなかったと報告しており、臨床使用も開始している⁶⁾。彼らの開発した心臓弁は、ドイツのベンチャー企業AutoTissue社から2006年に市販が開始され、これまでに400例以上の治療を実施したと報告されている。

筆者らは2000年から、脱細胞化した生体弁に患者自身の細胞を組み込むテーラード心臓弁の開発を開始した。生物組織を選んだのは、以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁の複雑な形状を人工材料で造形することが容易でないこと、及び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持たせるのが難しいと考えたためである。免疫反応の主因を成すドナー由来細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化スキュフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する代用弁が創製できると期待できる(図1)。このためには、完全な脱細胞化処理法の開発が重要である。

6.4 脱細胞化法の検討

前述のように、ほとんどのグループは界面活性剤やタンパク分解酵素等の薬液処理によって細胞を除去している。筆者らは当初、Triton X-100溶液による界面活性剤浸漬処理を検討した。その結果、厚さ数百 μm の弁葉内においては処理6時間後には細胞核は染色されなくなったが、

弁葉基部の組織内細胞の核は処理24時間後でも表面から1mm以遠の組織深部では染色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた(図3中)。また、細胞毒性を示すTriton X-100を洗浄除去するために数週間以上の時間を要し、その間における生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要であった。そこで我々は、より完全な細胞除去法について検討し、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発した(図2)。

6.5 高压処理について

自然界における状態変換因子は「圧力」と「熱」の2つであり、それぞれ独立に物質の状態を変化させることができる。ブリッジマン(1882-1961)が高压物理学を開拓して以来、無機・有

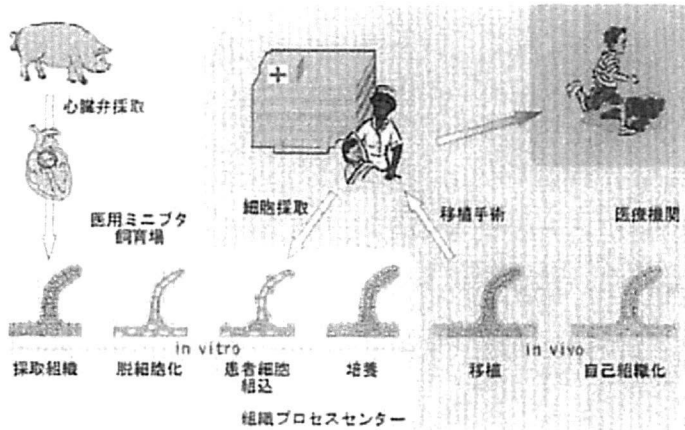


図1 生物組織スキャフォールドを用いたテララーメード心臓弁

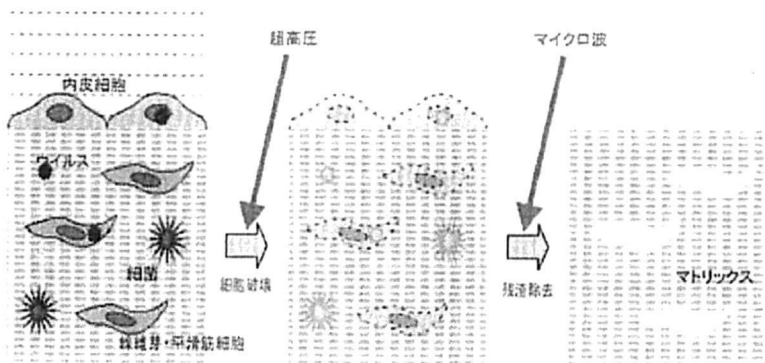


図2 超高压処理を用いた脱細胞化処理法

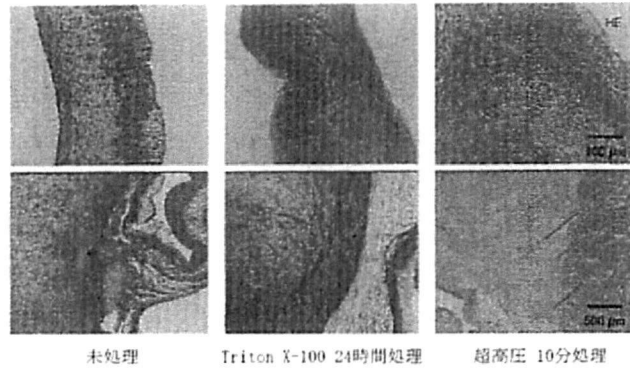


図3 脱細胞化処理された心臓弁の組織断面
(上：弁葉，下：弁基部)

機化学、医療、食品分野などでの高圧技術の利用が進んでいる。特に、食品分野においては、風味、栄養分の損失がなく、調理、加工、殺菌、保存できるとして注目されている。卵への圧力処理では、4,000気圧で温泉卵のように黄身が凝固し、白身が半ゲル状となり、6,000気圧で黄身、白身とも凝固する。卵に限らずタンパク質は、アミド結合（共有結合）をバックボーンに、弱い相互作用である非共有結合（疎水性相互作用・イオン結合・水素結合など）により、多様な高次構造を有する。圧力処理によってタンパク質の高次構造の変化（タンパク質変性）が誘起されるため、状態が変化する。加圧卵は加熱卵と比較し、風味、舌触りが優れ、プロテアーゼによる消化性が良く、ビタミンの損失もない。これは、温度をかけずに加圧するときは、共有結合の生成や破壊を起こすようなエネルギーを与えていないためである。また、微生物への圧力印加も行われており、酵母や芽胞をもたない細菌は5,000気圧の処理で細胞膜が破壊され、殺菌される。さらにHIV等のエンベロープを持つウイルスは6000気圧の処理でほぼ完全に不活化される⁷⁾。このように、6,000気圧を超える超高压状態ではほぼ全ての生物が死滅し、圧力技術の殺菌効果が注目されている。

6.6 脱細胞化生体組織の生体内埋植

清潔下にて摘出したミニブタ心臓より肺動脈弁を採取し、低温下にて10,000気圧の超高压印加処理（4℃、10分間）を行い、続いて洗浄処理したところ、組織深部まで完全に細胞を除去することができた（図2右）。EVG染色したところ、超高压処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。また、常在菌にてあらかじめ感染させた試料を脱細胞化処理したところ、界面活性剤処理では感染が除去できなかったが、超高压処理では脱細胞化に加えて滅菌効果も併せ持つことが確認された。力学特性を検討したところ、界

面活性剤浸漬処理では、処理時間に伴って強度、弾性率とも増加する傾向を示したが、超高压処理では力学特性への影響が見られなかった(図4)。

脱細胞化生体組織の再生医療用スキャフォールドとしての機能を検討するために、脱細胞したミニブタ大動脈を同所性にミニブタの下行大動脈に移植し、左心系大血管での有効性について検討した。作製した脱細胞化血管を、クラウン系ミニブタ(柳ジャパンファーム)下行大動脈に、左側開胸、単純遮断下にて置換移植した。所定期間経過後、移植した人工血管を摘出し、大きさ等の所見を調べた後、組織切片を作製した。HE染色の他、抗vWF免疫化学染色によって血管内皮細胞を、抗 α SMA免疫化学染色によって平滑筋細胞を染色した。石灰化はvon Kossa染色によって評価した。

いずれの個体も経過は良好で、死亡例はなかった。摘出組織像を図5に示す。移植1カ月後に試料を摘出したところ、血栓の付着はほとんど見られず、血管内面は内皮細胞様の細胞で覆われ

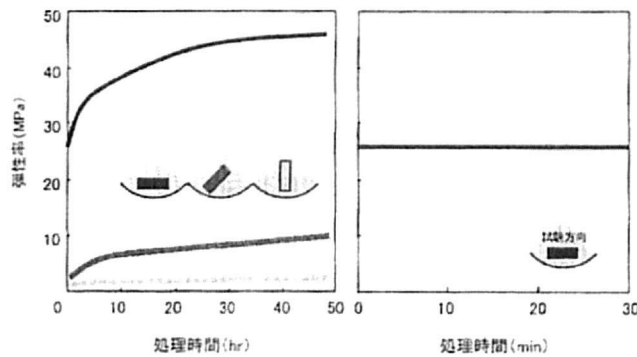


図4 脱細胞化処理された心臓弁葉の生体力学特性 (左: Triton X-100, 右: 超高压)

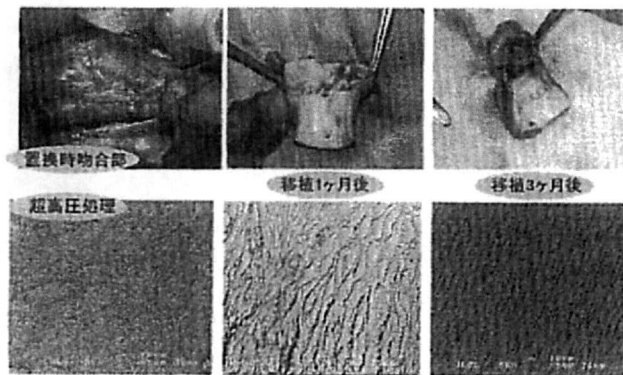


図5 大動脈移植組織の内面(肉眼所見とSEM観察)

ていることがわかった。移植3カ月後では、血栓は全く観察されず、また内面は内皮細胞と思われる細胞によって完全に被覆されており、肉眼的にも内皮特有の光沢面が観察された。免疫染色組織切片を観察したところ、移植後1カ月では、細胞浸潤は血管内面付近に限定されており、内面付近に抗vWF抗体と抗 α SMA抗体に陽性である細胞が混在している像が観察された。これが移植後3カ月後になると、細胞浸潤は血管壁内部まで進行し、さらに抗vWF抗体陽性の細胞は血管内面に、抗 α SMA抗体陽性細胞は中膜層にそれぞれ局在していた。これらの結果より、脱細胞化血管においては、おそらく血液内に存在する血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cell：EPC）もしくは骨髄細胞が脱細胞化血管内面に局在化し、血管壁と相互作用することによって分化が進行して、血管組織を再構築したのではないかと考えている。この仮説が成立するのであれば、脱細胞化組織は未成熟の細胞をリクルートし、局所で分化を完成させることによって組織再生を行うような、高い機能を有していることとなり、単純な足場以上の効果を発現する高機能材料としての展開も期待できる。

本項では省略するが、脱細胞化血管組織においては、肺動脈系（静脈系）においては血管再生について高い再現性と長期（6カ月以上）にわたる良好な開存が得られており、臨床応用も視野に入れた研究を行っている。一方、大動脈系（動脈系）においては、3カ月までは良好な再生が

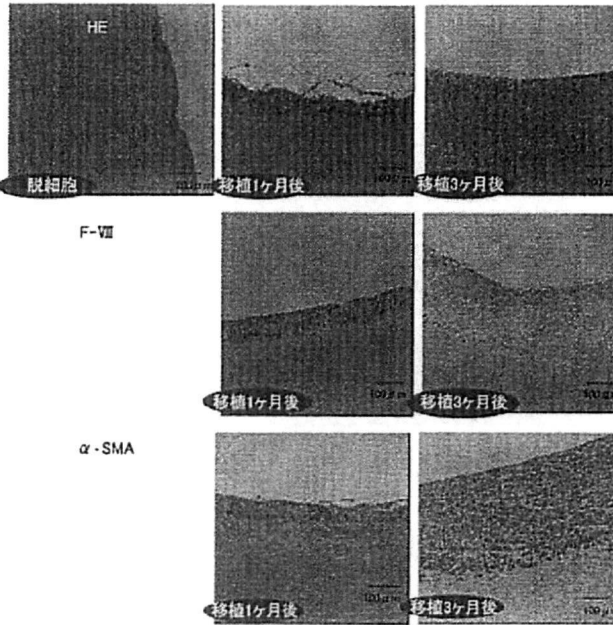


図6 大動脈移植組織の組織切片像

得られるが、6カ月を過ぎる頃から、石灰化や内膜肥厚が観察される場合が生じてくる。これらの原因として、血管組織を構成するタンパク質の変性、細胞成分の残存などが考えられる。これらを解決するために、超高压処理法の詳細な条件設定、血管壁からのエラスチン（弾性タンパク質）の除去、洗浄液の検討、及び残存細胞膜成分（脂質）の除去等の検討を行った結果、大動脈組織における石灰化等の問題もほぼ解決にいたり、現在、長期埋植動物実験を継続している。

6.7 超高压脱細胞化法の他の組織への応用

筆者らが開発した超高压水圧印加法による細胞除去技術の他の組織への応用について検討した。ミニブタの種々の組織を用いて、それぞれの組織からの脱細胞化について検討した。対象とした組織は、心筋、気管、心臓、皮膚、軟骨、骨、靭帯、腱などの組織と、肺、肝、腎、脾などの臓器である。これらのうち、超高压処理法の特徴が生きた脱細胞化組織として、角膜を取り上げて紹介する。

角膜移植は円錐角膜や角膜の外傷などの角膜疾患において有効な治療法の一つである。しかし日本では、提供角膜が不足により、年間5,000人いると言われている移植適応患者のうち1/3しか移植術を受けることができないのが現状である。この解決策として、高分子材料を用いた人工角膜の開発および再生医療技術による角膜再生技術の確立が検討されている。高分子製人工角膜は米国において実用化されているが、移植後の脱落や感染等の問題があり、長期間有効なものはまだ存在しないのが現状である。一方、角膜再生では、温度応答性培養皿、羊膜、及びコラーゲン膜を用いた細胞シートによる角膜上皮再生が臨床応用されつつあり、その有用性が示されている。しかし、これら細胞の足場となる角膜実質においては、臨床に適用できるものはまだない。そこで、生体に類似した物性と構造を有する脱細胞化組織に着目し、種々の手法による脱細胞化角膜の作製と眼科用足場材料としての可能性について検討した。

成体ブタ眼球から角膜を採取し、界面活性剤による脱細胞化法は1% TritonX-100およびSDS溶液を調製し、37℃にて24時間処理を行った。超高压処理方法は、10℃にて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行った後、振盪洗浄を72時間行い、細胞残液を除去した。これらの方法で得られた脱細胞化角膜組織に対して組織学・生化学的評価を行い、超高压処理角膜では脱細胞化ブタ角膜組織のウサギへの異種組織移植の動物実験も行った。

界面活性剤処理では、いずれの場合においても不透明な角膜が得られ、H-E染色において組織内の細胞の残存が確認された（図7）。超高压処理でも白濁した角膜が得られたが、H-E染色では、組織内の細胞は完全に除去されていた。ウサギ眼への移植実験では、未処理のブタ角膜を移植すると、8週間後には移植片部位に多数の新生血管が観察され、免疫反応の惹起が認められた（図8）。一方、脱細胞化ブタ角膜移植では、移植2週間後で移植片は完全に透明化した。8週

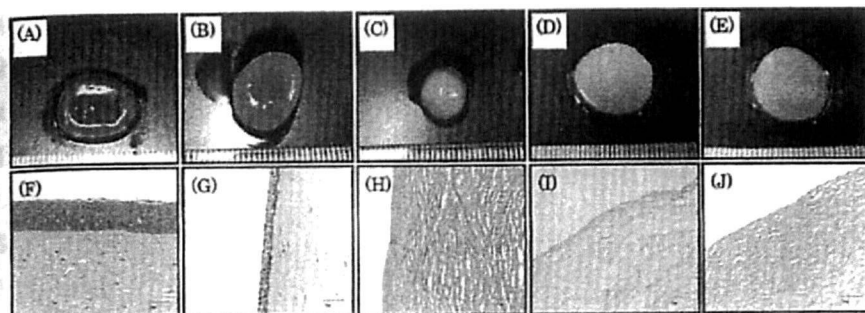


図7 種々の脱細胞化角膜の肉眼所見と組織切片像

(A), (F)：未処理。(B), (G)：TritonX-100による脱細胞化角膜。(C), (H)：SDSによる脱細胞化角膜。(D), (I)：超高压処理による脱細胞化角膜(30℃)。(E), (J)：超高压処理による脱細胞化角膜(10℃)。Scale bar 50µm。

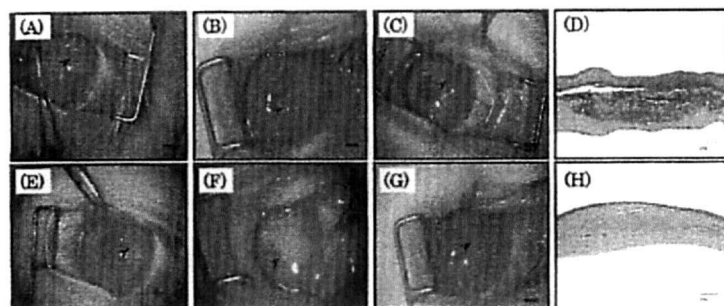


図8 角膜移植片の肉眼所見と組織切片

上段：未処理角膜，下段：脱細胞化角膜。(A), (E)：移植直後。(B), (F)：4週間後。(C), (D), (G), (H)：8週間後。矢印は移植部位を示す。Scale bar 2mm (A-G), 50µm (D, H)。

間経過後も、透明性は維持されており、新生血管の誘導は観察されなかった。これらのことより、細胞化角膜は生体角膜に類似した構造を有しており、かつ、組織内細胞の完全除去により免疫反応の惹起を抑制することが可能であった。また、移植組織の透明性の回復が観察された。以上より、脱細胞化角膜の眼科用足場材料としての可能性が示唆された。

6.8 将来展望

未だ長期間にわたって満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。一方、ブタやウシ等の生物由来の医療用素材も古くから使用されてきたが、最近のBSE及びCJD問題を契機とし

て、使用が制限あるいは禁止されつつある。生物組織スキャフォールドではドナー由来の抗原性を減弱する必要があり、かつ動物由来の場合は未知の感染性やレトロウイルス等の除去が必須である。超高压処理による脱細胞化ではウイルスも不活化できることから、極めて高い安全性が確保できると考えている。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、患者の負担を軽減するためには、骨髄細胞あるいは末梢血幹細胞等の利用が有効であろう。将来的にはiPS細胞にも期待できる。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である。生物組織の提供動物としての安全な医用ミニブタ育種、並びに採取から移植後までを追跡するトレーサビリティ確保を含め、テーラーメイド型移植システムを確立して早期の臨床応用を目指したいと考えている。

謝辞

共同研究者の国立循環器病センター心臓血管外科沼田智医師、庭屋和夫医師、臓器移植部中谷武嗣部長、研究所生体工学部山岡哲二部長及び北村惣一郎名誉総長に感謝します。また、角膜の研究については、物質材料研究機構生体材料センター小林尚俊グループディレクター、東京医科歯科大学眼科望月学教授、佐々木修司医師（現東京都立広尾病院）に感謝します。所属研究室の寺田博士、木村剛助教、南広祐特任助教ならびに協力していただいた学生諸氏に感謝します。この研究の一部は、厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費事業、NEDO地域コンソーシアム及び日本学術振興会科学研究費補助金の補助を受けて行われました。

文 献

- 1) 日本人工臓器学会レジストリー委員会、人工臓器のレジストリー2000、人工臓器、30 (suppl) (2001)
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr., Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model, *Circulation*, 94 (9 Suppl), II164-8 (1996 Nov. 1)
- 3) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF, Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 13 (4 Suppl 1), 87-92 (2001 Oct)
- 4) Teebken OE, Puschmann C, Aper T, Haverich A, Mertsching H., Tissue-engineered bioprosthesis venous valve: a long-term study in sheep, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 25 (4), 305-12 (2003 Apr)

第1章 先端医療用ナノ・マイクロ構造材料

- 5) Korossis SA, Fisher J, Ingham E., Cardiac valve replacement: a bioengineering approach, *Biomed. Mater. Eng.*, 10 (2), 83-124 (2000)
- 6) Dohmen PM, Lembecke A, Hotz II, Kivelitz D, Konertz WF., Ross operation with a tissue-engineered heart valve, *Ann. Thorac. Surg.*, 74 (5), 1438-42 (2002 Nov)
- 7) 鈴木敦士, 林 力丸編, 高圧生物科学と高圧技術, さんえい出版, 京都 (1997)
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B., Development and characterization of tissue-engineered aortic valves, *Tissue. Eng.*, 7 (1), 9-22 (2001 Feb)
- 9) Laube HR, Matthaus M., A new semi-automatic endothelial cell seeding technique for biological prosthetic heart valves, *Int. J. Artif. Organs.*, 24 (4), 243-6 (2001 Apr)

Materials Series

堂山昌男
小川恵一 北田正弘
監修

田中 順三
角田 方衛 編
立石 哲也

バイオマテリアル

材料と生体の相互作用



内田老鶴圃

4.1 高分子材料の定義

高分子材料は、われわれの生活になくはならない材料である。その多くはプラスチックと呼称されている。高分子材料には、安価、軽量、丈夫のような肯定的な側面がある。他方、高分子材料には、燃えると健康に有害なダイオキシンを発生する／経年劣化するので長期使用に耐えない／いつまでも分解せず残存するので環境を破壊する、のような否定的な側面がある。高分子材料のこれらの特徴は、金属材料やセラミック材料にはない特徴である。

高分子材料はバイオマテリアルとしても多量に使用されている。その用途は、使い捨て注射器から人工心臓まで広範囲に及ぶ。

高分子 (polymer, ポリマー) とは、“大きな分子量を持つ分子” という意味である。分子量 10,000 以上の分子もしくは分子の結合数(重合度)100 以上の分子が高分子である。と専門家の間で考えられている。高分子に対する英語は、(high) polymer あるいは macromolecule と表現される。この考えに従えば、ガラスも高分子である。しかし、通常高分子材料と記述する場合には、主鎖あるいは側鎖に有機物を含むものを指し、純粋なガラスのような無機材料については、高分子材料として扱わない場合が多い。ここでも、高分子材料は有機高分子材料と同義に取り扱う。

4.2 高分子材料の分類

高分子材料は、天然高分子材料と合成高分子材料に分類できる。天然高分子

4.4 日常生活に密着している高分子材料

4.4.1 衣類用高分子材料

衣料には、古くから天然高分子繊維が用いられてきた。素材は、木材などの構成成分であるセルロース(天然繊維素)からつくられた繊維である。セルロースは、天然の高分子である。1938年ナイロンの工業化によって、初めて合成繊維が衣類の素材に用いられた。その後、ポリエステルやアクリルのような合成繊維が衣類の素材として用いられるようになった。

繊維工業は、先進国の重化学工業の象徴的分野であるが、量的には発展途上国にその地位を奪われつつある。わが国の繊維工業では、先端機能繊維の開発で世界をリードしている。例えば、抗菌性繊維・アイロン不要の防皺加工された繊維・湿度制御を可能にする複合繊維・水を浄化する中空糸膜・眼鏡拭きや空気浄化に用いられている超極細繊維のような特徴のある素材が次々と開発されている。

4.4.2 構造物用および電気機器用高分子材料

高分子は、軽くて丈夫で、自然界では容易に分解²²⁾しない。この特性は、材料としての長所になることが多い。一方、高分子は、耐熱性が低い、変形しやすい、経年劣化する。これらの性質は短所になることが多い。コンクリートや鉄鋼材料と違って、高分子材料は住宅やビルのような大型構造物の荷重を支える用途には適さない。しかし、壁、扉、雨樋、床、カーペット、カーテン、パイプのような部材に用いられている。

通常の高分子材料の強度が低いという欠点を補うために、高分子系複合材料や高強度高分子材料の開発が進められている。例えば、不飽和ポリエステル・エポキシ・ポリイミドのようなマトリックスとガラス繊維・カーボン繊維・ポロン繊維のような強化材を組み合わせた繊維強化複合材料が、開発されている。これらは、ボート、漁船、潜水艇、戦闘機のような高比強度(引張強さを

²²⁾ 分解: 高分子に対する分解は、金属に対する腐食と同義である。習慣として、高分子は腐食する、あるいは金属は分解するとはいわない。

比重で割った値)が必要な構造材料として使われている。高強度高分子材料は、アラミド繊維(商標名ケブラー)やカーボン繊維として知られており、前者は防弾チョッキ、後者はゴルフクラブのシャフト部分に使用されている。これらは、高強度鋼と比較して、引張強さが約1.5倍、重量当たりの強度(比強度)で5倍の強度を有する。

電気機器においては、その絶縁性と高比強度を生かしてコンピュータ、テレビ、オーディオ機器のケースなどに用いられている。自動車産業においては、タイヤ、シート、スポンジ、ダッシュボード、バンパー、内装部品などに広く用いられている。

4.4.3 情報関連製品用高分子材料

磁性体や光を用いた情報記録媒体は、近年、著しい進歩を遂げている。ポリエステルフィルムのような高分子が、IDカード・磁気テープ・フロッピーディスク用の磁気記録媒体として/最近ではCD・DVD用の光記録媒体として、ベース材料に使用されている。また、ガラス製光ファイバーと並んでポリアクリル酸が用いられている。薄型テレビのような液晶ディスプレイの中心素材にも液晶分子を配列させるような機能を有する高分子膜が用いられている。

4.4.4 シート用高分子材料

食品や日用品を包装するためのシート用材料に、高分子が用いられている。このシートには、酸素を通さない/油成分により変形しない/水分を逃さない/電圧に加熱に耐える、などの特性が要求される。そのために、複数の高分子素材を貼り合わせた複合フィルムが用いられる場合が多い。また、スーパーマーケットなどで使用されている持ち帰り用袋には、ポリエチレンが使用されてきたが、近年環境問題を考慮して、澱粉を混入させた自然崩壊性袋が用いられる。

ほかに、釣り糸やPETボトル用素材も高分子である。これらの分解耐性は高いので、回収して再処理を行う必要がある。接着剤(家庭用から飛行機用

材料は、文字どおり天然から得られる高分子材料である。歴史的には、麻・羊毛・絹・綿のような衣料用繊維のことを指す。また、天然ゴムも天然高分子材料である。

当初の合成高分子の開発の動機は、これらの天然高分子材料を人工的に合成的手法で得ることであった。今から60年ほど前に開発されたナイロンが、当時日本の花形輸出品であった絹糸に大打撃を与えた事例は、象徴的である。絹はナイロンに駆逐され、近年では特殊品としてしか用いられていない。一方、綿は現在でも、衣料品用原料として多く用いられている。それは、天然綿の代わりになる合成繊維が開発されていないからである。

繊維用合成高分子材料として最も多く生産されているのは、ポリエチレンテレフタレート (poly(ethyleneterephthalate) : PET) である。PET 繊維はいわゆる

表 4-1 臨床で用いられている主な高分子材料。

分類	高分子材料の種類
ディスパーザブル製品 注射器 カテーテル 血液バッグ 輸液バッグ 縫合糸	ポリプロピレン ポリ塩化ビニル, シリコーン ポリ塩化ビニル ポリ塩化ビニル ナイロン, 絹, ポリグリコール酸
体外使用人工臓器 人工腎臓(透析器) 中空糸 ハウジング 人工肺 人工関節 人工弁 人工心臓 人工血管 人工韧带 眼内レンズ コンタクトレンズ 顔歯(うし)充填材	再生セルロース, ポリスルフォン, ポリアクリロニトリル ポリカーボネート ポリプロピレン, ポリエチレン, シリコーン ポリエチレン(超高分子量) バイロライトカーボン ポリウレタン ポリエチレンテレフタレート, ポリテトラフルオロエチレン ポリエチレンテレフタレート ポリメチルメタクリレート ポリメチルメタクリレート(ハードコンタクト) ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(ソフトコンタクト) ポリメチルメタクリレート誘導体

ポリエチレン	$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリプロピレン	$\text{-(CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリ塩化ビニル	$\text{-(CH}_2\text{-CH(Cl)-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリメチルメタクリレート	$\text{-(CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)(COOCH}_3\text{)-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリスルフォン	$\text{-(C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{)}_n\text{-}$
ポリアクリロニトリル	$\text{-(CH}_2\text{-CH(CN)-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)	$\text{-(CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)(COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH)-CH}_2\text{)}_n\text{-}$
ポリエチレンテレフタレート	$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-CO-C}_6\text{H}_4\text{-O)}_n\text{-}$
ポリグリコール酸	$\text{-(O-CH}_2\text{-CO)}_n\text{-}$
ポリ乳酸	$\text{-(O-CH}_2\text{-CO)}_n\text{-}$
シリコーン	$\text{-(Si-O)}_n\text{-}$
ポリカーボネート	$\text{-(O-C}_6\text{H}_4\text{-CO-C}_6\text{H}_4\text{-O)}_n\text{-}$
ポリエチレングリコール	$\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-}$
ポリプロピレングリコール	$\text{-(CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-O)}_n\text{-}$

図 4-1 生体用高分子材料の化学構造式。

るポリエステル繊維として知られており、医療用にも広く用いられている。当初、PETは合成繊維を旨指して開発された。しかし、現在では、繊維の形態以外に、シート・容器のような形態でも幅広く用いられている。繊維以外で用いられている合成高分子を合成樹脂と呼称することがある。これは、有機溶媒に溶解する／加熱すると溶解する／松ヤニのような天然樹脂に類似している、という特性に由来する。

生体用高分子材料として、天然高分子材料と合成高分子材料の両者が使用されている。大部分の合成高分子材料については、バイオマテリアルとしての可能性が探索されている。現在用いられている生体用高分子材料と用途を表4-1に、そしてそれらの構造式を図4-1に示す。

4.3 高分子材料の呼称法

高分子材料を取り扱う際に混乱を招く要因として、その呼称法がある。上にも示したように、ポリエチレンテレフタレートはポリエステルとも呼ばれ、この両者の区別がつかずに混乱する場面が多い。ここで高分子材料の呼称法を整理しておく(表4-2)。

表4-2 高分子材料の呼称法の整理。

結合法-合成法、総括	物質名	製品名、商標名の例
ポリオレフィン	ポリエチレン	-
ポリエステル	ポリプロピレン	Marlex, Mesh, Prolene
ポリウレタン	ポリエチレンテレフタレート	-
脂肪族ポリアミド	-	Pellethane, Tecollex
芳香族ポリアミド	-	Nylon
シリコーン	ポリジメチルシロキサン	Kevlar
-	ポリテトラフルオロエチレン	Silastic
アクリル樹脂	ポリメチルメタクリレート	Teflon, Goretex
スチロール樹脂	ポリスチレン	-

4.3.1 構成成分を主体とした呼称

この呼称法は最も多く使われている。出発物質である単量体^{*1}の名称に“ポリ”をつけたものが多い。ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリ塩化ビニルなどである。これらは、名称だけで化学式が判明する。

4.3.2 結合法、合成法などの総称

出発物質である単量体を連結するための化学構造をもとに、その構造を持つ高分子を総称する場合がある。ある結合で連結された構造を持つものについて、その結合名に「ポリ」の接頭語をつける場合が多い。例えば、ポリエステル、ポリウレタン、ポリアミド、ポリペプチド、ポリオレフィン、ポリサッカライドである。また、代表的な素材の名称がそのまま、それらの派生物を代表して使われている場合もある。例えば、スチロール樹脂、アクリル樹脂、シリコーンである。

これらの呼称については、素材を表す総称であることを踏まえて取り扱うことが重要である。例えば、ポリエステルとは一般にはPETを指すことが多いが、生分解性高分子はその大部分が脂肪族ポリエステルと呼ばれており、両者の特性には大きな違いがある。

4.3.3 商標

現在、一般的に知られている特定の高分子材料を指す商標には、テフロン、ゴアテックス、ナイロン、ケブラー、ノーマックス、サイラスティックなどがある。ナイロンはすでに脂肪族ポリアミドの総称としても使用されているが、もともとはデュポン社の商標である。またゴアテックスは、延伸ポリテトラフルオロエチレン(テフロン)のことである。いずれもデュポン社の商標であり、混同しないように注意してほしい。

*1 単量体：何種あるいは異種分子と反応して高分子を形成することができる低分子化合物のこと。モノマー(monomer)と呼ぶ。