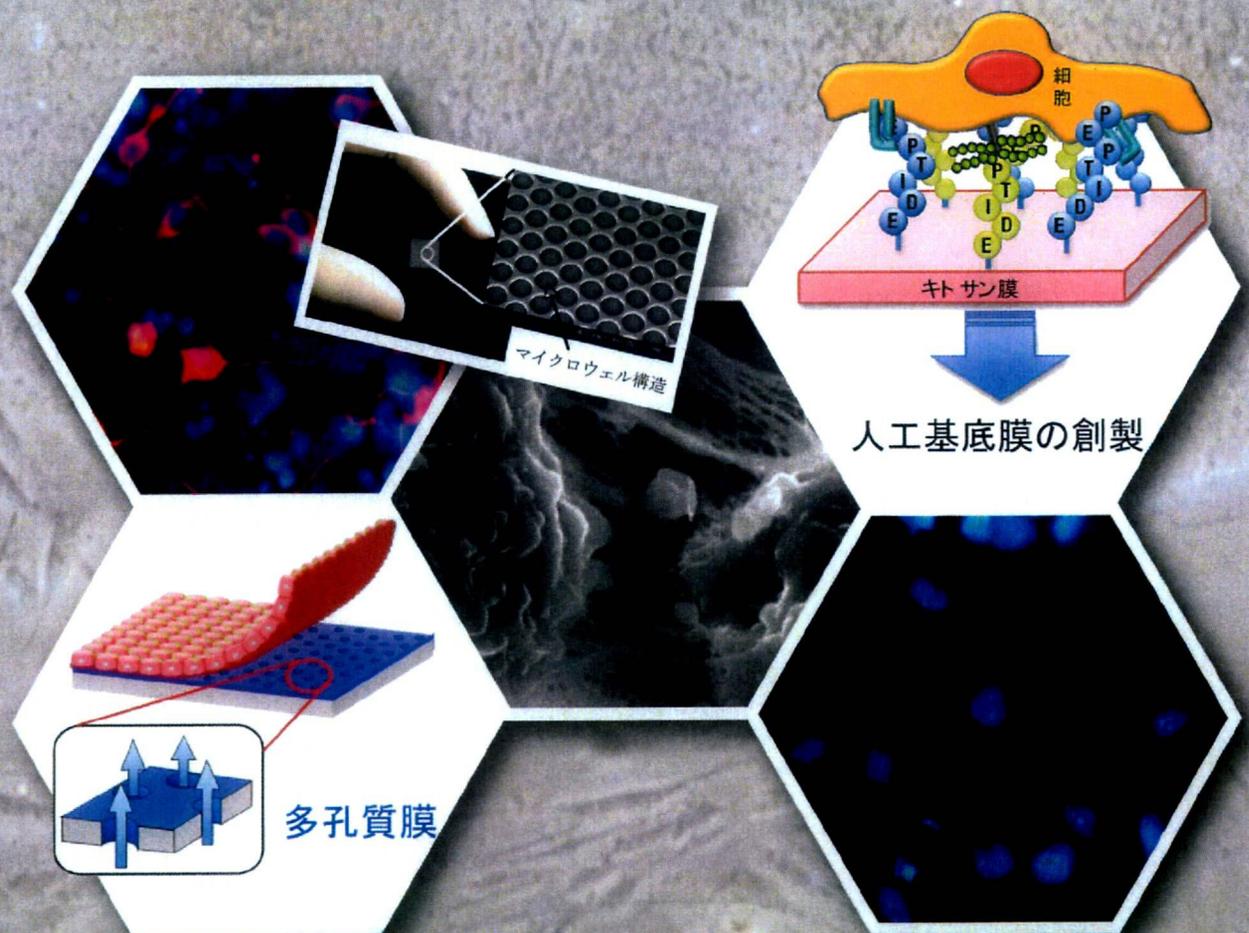


ますます重要になる 細胞周辺環境(細胞ニッチ)の 最新科学技術

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)



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、基礎的な技術的に絞った。

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¹⁾。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収めているが、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 surface 改質	<ul style="list-style-type: none"> ・コーティング [生体分子, 高分子 (単層, 交互吸着)] ・形状・凹凸 (ポリッシング, 微粒子配列化)
物理化学的 surface 改質	<ul style="list-style-type: none"> ・紫外線照射 ・ガンマ線照射 ・イオンビーム照射 ・プラズマ処理
化学的 surface 改質	<ul style="list-style-type: none"> ・生物分子固定化 ・高分子グラフト ・相分離 (結晶・非晶, パターニング)

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 surface 改質技術について記述する。

1. 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²⁾³⁾。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⁴⁾⁵⁾。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应用されている。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

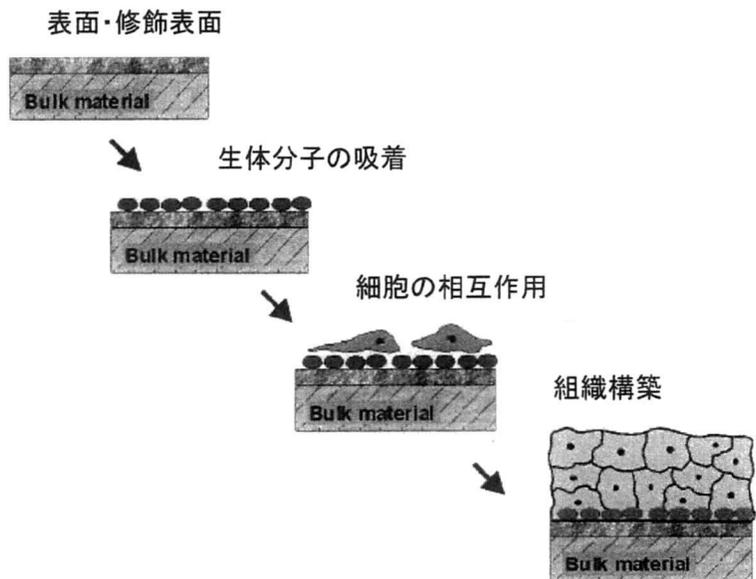
触する場合には、血液凝固反応や補体の活性化などの酵素反応が起こり、長期的には仮性内膜が形成される。臨床に用いられる医用材料や人工臓器の場合には、軟組織・硬組織のいずれの組織に用いられる場合にも、まず血液と接触して血漿タンパク質が吸着し、マクロファージが浸潤して炎症反応が起こり、その後治癒過程に移行する。人工臓器などの医療デバイスだけでな

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⁶⁾。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⁷⁾。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"> • 特異的相互作用のための官能基の導入 • 表面自由エネルギーの制御 • 親水性あるいは疎水性の制御 • 化学的不活化 • 表面架橋の導入 • 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 • 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 • 表面電気伝導性の制御 • 表面潤滑性
<ul style="list-style-type: none"> • タンパク質の吸着制御（量、配向、変性など） • 細胞接着および細胞増殖の制御 • 細胞機能（タンパク質発現、活性化、分化など）の制御

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、それぞれに異なった 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⁸⁾。ポリイオンコンプレックス表面へのアルブミンの吸着⁹⁾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¹⁰⁾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^{10) 11)}の影響や吸着タンパク質の構造変化も起こる^{12) 13)}。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

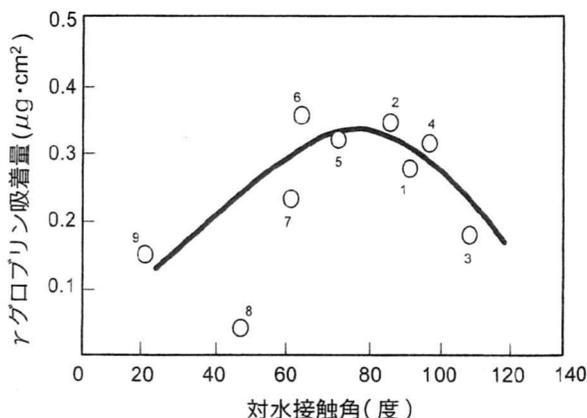
細胞周辺環境材料にとって最も重要な機能が細胞

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¹⁶⁾。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^{17)・19)}、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^{20)・21)}。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)、また細胞表層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

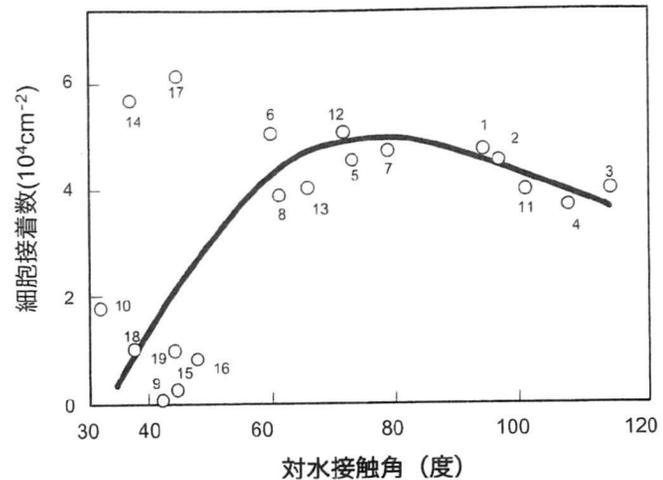
高エネルギーな放射光を照射して表面の結合を乖離させたり、分子を脱離させたりして活性点を生成させ、そこに異なる分子を結合させる方法である。多くは酸化反応であり、親水化が達成される。

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²²⁾。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、

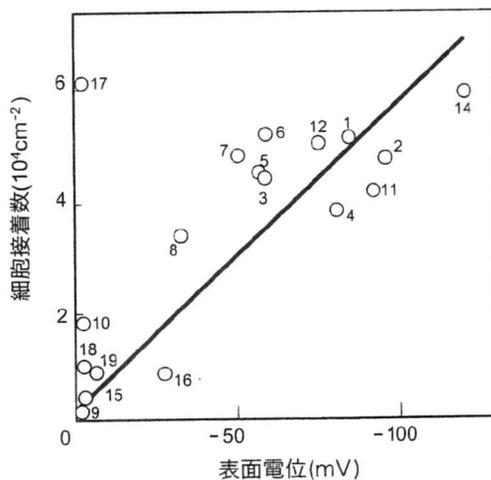
①素材表面の反応性官能基を利用してカップリング反応によって水溶性高分子を結びつける方法、および②材料表面に重合開始基のパーオキシド基を生成させて、水溶性ビニルモノマーのグラフト重合反応を行うなどの高分子グラフト反応が用いられる。①の方法は材料表面が水酸基やアミノ基などの官能基を有するこ

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. ポリメチルメタクリレート 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

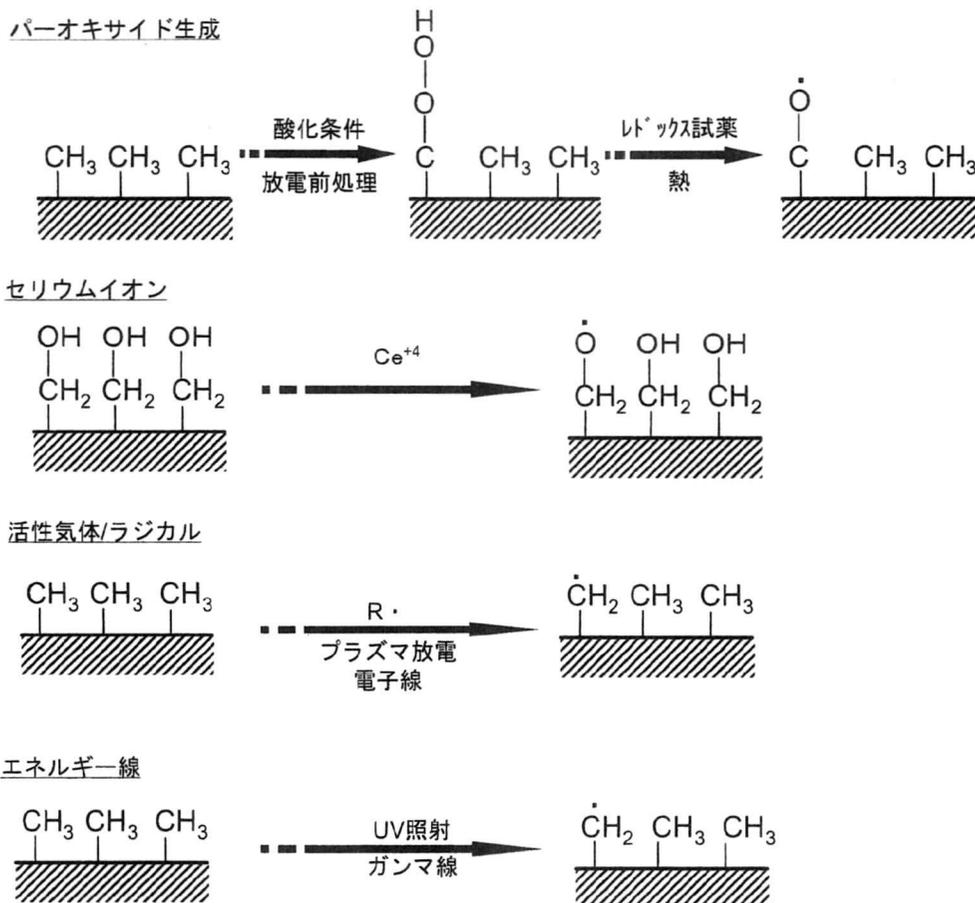
図④ L929細胞の接着に及ぼす材料のゼータ電位の影響



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²³⁾。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5 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²⁴⁾。⑪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5)、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^{25)~27)}。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²⁶⁾。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。彼らは、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²⁷⁾。親水性マクロマーを用いる表面改質法が森らによって開発された²⁸⁾。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^{28)~30)}。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さ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³⁰⁾。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³¹⁾。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³²⁾。

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³³⁾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^{35) 36)}。

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^{37) 38)}。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^{39) 40)}。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収めていることを報告している⁴¹⁾。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⁴²⁾。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) Munr 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長
- 2004年 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

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

Advanced Bio/Medical Devices
and Equipments for Health Care

監修：三林浩二

Supervisor : Kohji Mitsubayashi

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

第12章 再生医療デバイス

岸田晶夫*

1 はじめに

再生医療 (Regenerative Medicine) は1970年代より行われている人工皮膚の研究に端を発し、1992年のLangerとVacantiによる「Tissue Engineering (組織工学)」の概念の発表で研究領域として確立した¹⁾。この時点では、新しい医療技術の可能性として認知されていたが、その後、1998年のヒトES細胞の開発によってBig Scienceの仲間入りを果たした。もともと組織工学および再生医療の基本的な考えは、組織および臓器が破綻しておこる重篤な疾患について、臓器移植、人工臓器の適用が不可能なものの治療法と考えられていたが、昨今では、高QOLあるいは医療従事者の負担減などの新しい考えを取り入れて発展している。

「再生医療デバイス」という表現については、2通りの解釈が存在する。1つは、再生医療を支えるデバイスであり、もう1つは再生医療技術によって作成されたデバイスである。現在はこれらの解釈が混同されて私用されているが、再生医療の普及とともに整理されてゆくものと考えられる。本稿では双方について紹介するとともに、再生医療製品としてすでに臨床応用されており、将来性も期待されている動物由来組織の応用について、筆者の取り組みを中心に紹介する。

2 再生医療技術の現状について

現在の再生医療については、ひとことでは言い表すことができないほど多様な考え方、方法論、および技術が提案されている。大まかではあるが、まとめると図1のようになる。これらを簡単に紹介する。

2.1 細胞移植

細胞を単独で使用する方法は「細胞移植」と呼ばれ、広義では白血病治療のための骨髄移植を含めるが、一般的には末梢循環改善や心筋機能回復を目的として、自己幹細胞を注入する技術である。

* Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

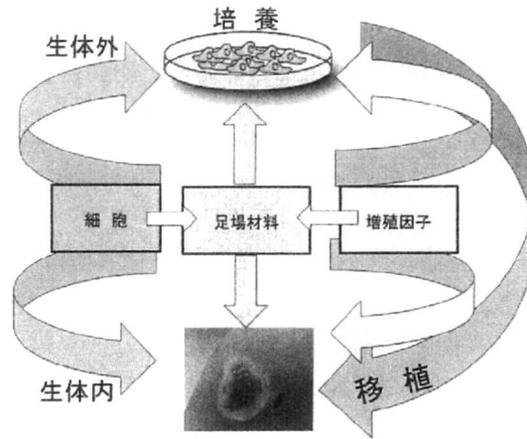


図1

2.2 細胞単独での組織再構築

細胞シート工学に代表される、細胞自身が産生するタンパク質による基底膜あるいはマトリクスを利用する技術である。

2.3 足場材料 (Scaffold: スキャフォールド) を用いる技術

足場材料を用いる技術にはいくつかのバリエーションがある。

① 足場材料をそのまま移植するもの

生体組織からの細胞浸潤とそれによる組織再構築を期待するもの。細胞を使用しないために、安全性が高く、また技術的にも容易である。

② 足場材料に細胞を播種して直ちに使用するもの

手術室で患者から細胞を取り出し、足場材料に播種した後に直ちに生体内に埋めこむ。幹細胞を選別したり、接着を促すために数時間、培養したりする場合もある。いずれの場合にも、足場材料自身が細胞を含まないため、①の技術同様に、臨床応用までの過程が短い、安全性が比較的高い、などの特徴がある。

③ 足場材料に細胞播種して生体外で組織再構築を行うもの

患者から取り出した細胞あるいはES細胞およびiPS細胞のような幹細胞を組み込み、生体外で長期間培養することによって、ある程度組織構築をすすめたものを治療用途に用いるもの。生体外で培養するために、高度な安全環境、輸送・取り扱いの技術、細胞の品質チェックなど、様々な制約が生じる。生体内に用いられた時点で機能を発揮することが期待でき、また組織構築の過程が患者の状態によらないため、比較的均質な成果を挙げることができると期待されている。

2.4 成長因子について

成長因子は、細胞、足場材料と並ぶ再生医療の三要素の一つである。広義の再生医療には、成長因子のみの投与による微小循環再構築なども含まれるが、本稿では省略する。詳細は他書を参照されたい²⁾。

3 再生医療を支えるデバイス

再生医療は研究開発の当初から、種々のデバイスによる支援を受けてきた。多くの先進医療がそうであるように、再生医療の発展は、周辺技術の発展と密接に関連しており、現在でも日々進化を続けている。本稿では工学技術による支援デバイスについては簡単に紹介するにとどめる。

3.1 細胞分別装置

再生医療において最も注目されている要素は細胞である。ヒトES細胞が報告されるまでは、多くの研究者が成人組織からの細胞の調達を考えていた。繊維芽細胞、軟骨細胞や肝細胞などは比較的容易に得られ、培養法などが研究されていた。しかし、研究室レベルで必要な細胞数と、治療に必要な細胞数では1000倍以上違っており、それだけ細胞を増殖させることは、細胞の変異や品質管理の点で問題があり、また肝細胞など増殖そのものが困難なものもあった。幹細胞はその問題解決に有効であることは予想されていたが、培養法も確立されておらず、また分化制御そのものが先端科学であった。その後、生体内で組織・臓器の修復を行っている細胞があるのではないかと発表が相次ぎ、「成体幹細胞」という概念が提案され、血管内皮前駆細胞などが発見され³⁾、治療に用いられるようになった。ES細胞やiPS細胞は成体のほとんどの細胞に分化できる多能性を有しており、理論上ではうまく分化を制御することによって、必要な細胞を必要だけ得ることができる。これらの細胞の取り扱いを可能にした技術が細胞分別装置である。フローサイトメーター、セルソーターと呼ばれる一連の装置は、細胞を蛍光物質でマーキングし、マークの有無によって細胞を高速に分別および分取する。現在では、多色での染色による詳細な分別や超高速分別、細胞へのダメージを減ずるものなど種々の装置が登場している。また、蛍光物質の代わりに磁気ビーズでマーキングし、磁力で分別する装置は、分別したい細胞の種別が明確な場合には、非常に有力な手段である。

3.2 バイオリアクター

足場材料に細胞を組み込んだだけでは、細胞は接着しているのみで、機能を発揮していない。これを生体内環境を模した雰囲気中で培養することによって、細胞が機能を発現し、組織を構築す

あるいはマトリク

使用しないために、

に埋めこむ。幹細胞
の場合にも、足場
の、安全性が比較的

を組み込み、生体外
用途に用いるもの。生
品質チェックなど、様
でき、また組織構築の
と期待されている。

ることができる。これを実現する装置がバイオリクターである。従前のバイオリクターは、例えば醸造のための発酵装置などを指し、医療用途のバイオリクターは、細胞の大量培養を目的としたものであった。再生医療の概念が提唱されて以来、バイオリクターは発展を続け、今日では、細胞、足場材料、成長因子につぐ、再生医療の第4の因子と呼ばれるようになってきている。細胞を生育させる目的で、現状でも回転フラスコ型のバイオリクターも使用されているが、現在、注目を集めているものが、生体内環境を忠実に再現できる装置である。例えば、膝関節軟骨の再構築のためにヒトの歩行時の圧力付加を再現できるもの⁴⁾、心臓再生のために拍動流によって培養するもの⁵⁾、角膜上皮再生のために気液境界面での培養を可能にしたものなど、目的に応じた高機能な装置が開発されている。

3.3 足場材料

(1) 足場材料の背景

ヒトを始め、生物は「組織」によって形作られている。皮膚や内臓は「軟組織」、骨や歯は「硬組織」という。組織工学は、生物を形作っている組織を工学的に再生することを目的としている。具体的には、生物を形作っている骨や耳や鼻のような組織を人間の手で作りに上げることを目的としている。上述した Langer と Vacanti らの例を用いて説明すると、まず、体の中で分解・吸収されるプラスチックを加工して多孔質体にし、これを人間の耳の形に削り出す。ここに、体の中で耳の形を作っている軟骨の細胞を播種する。すると軟骨細胞は耳の形の多孔質体に接着し、増殖して軟骨を作る準備を始める。これをヌードマウスの背中に手術で埋植すると、宿主からの栄養供給をうけて軟骨細胞は軟骨を作り出す。その過程でプラスチックは分解してしまい、軟骨細胞と軟骨からなる組織が生成する。これを取り出して移植すると、ヌードマウスの細胞はヒトの免疫系によって速やかに排除され、患者の耳が再生することになる。軟骨細胞だけをマウスに植えても軟骨は生成するものの、耳の形を自ら形作ることはない。これは軟骨細胞には軟骨を作り出す能力はあるが、耳の形を作り上げる能力が欠けているためである。軟骨細胞を耳の形の材料に接着させ、形状についての情報をあらかじめ設定しておき、再生が終わる頃には材料は分解・吸収されて消失しており、この過程を建築になぞらえて形状の情報を与える材料を「足場材料 (Scaffold)」とよぶ。

(2) 足場材料に必要な性質

細胞足場材料に必要な性質は次のようなものである。①生体内分解性：体の中で分解して消失する特性である。素材自体だけでなく、分解して生成する化合物も生体にとって安全なものではない。この特性が足場材料に必須であるかどうかは、まだ議論が残されている。分解性が必要であるとの根拠は、多くの材料は生体内で異物反応を引き起こしたり、物性の不一致に

よって破断あるいは
きる材料が開発さ
の組織のうち、力
という疑問が示さ
度の維持を両立さ
編み物状など種々
に形状を維持する
して増殖できる特

(3) 足場材料の

① 生分解性合
生体内で分解・
の共重合体である
性を有している。
る。細胞接着性
れている。

② コラーゲ

医療用コラー
ゲ質である。特
のはI型コラー

よって破断あるいは過度の生体反応を引き起こしたりする、というものである。それらを解決できる材料が開発されたとき、この特性は再考される可能性がある。また、最近の研究では、生体の組織のうち、力のかかる部分の再生については、分解性の材料では耐えきれないのではないか、という疑問が示されている。そこで分解性材料と非分解性材料を組み合わせ、組織の再生と強度の維持を両立させる試みもある。②成形性：細胞足場材料として用いる場合には、スポンジ状、編み物状など種々の形状に加工する。細胞が内部まで入り込みやすく、また体の中に入れたときに形状を維持するための加工が可能な特性が必要である。③細胞接着性：播種された細胞が接着して増殖できる特性である。

(3) 足場材料の例

① 生分解性合成高分子

生体内で分解・吸収されるプラスチックの代表は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸およびそれらの共重合体である(図2)。これらは脂肪族ポリエステルとよばれ、分解性を有し、優れた加工性を有している。フィルムや繊維を得ることができ、既に吸収性縫合糸として臨床応用されている。細胞接着性については特に優れているわけではなく、細胞接着性を高める研究も盛んに行われている。

② コラーゲン

医療用コラーゲンは、ブタあるいはウシから抽出されたものである。生体軟組織の主要タンパク質である。特徴的な3本鎖の構造をとり、13ほどのタイプが知られている。最も普遍的なものI型コラーゲンで、血管内皮の基底膜はIV型コラーゲンと、組織ごとにタイプの偏在がある。

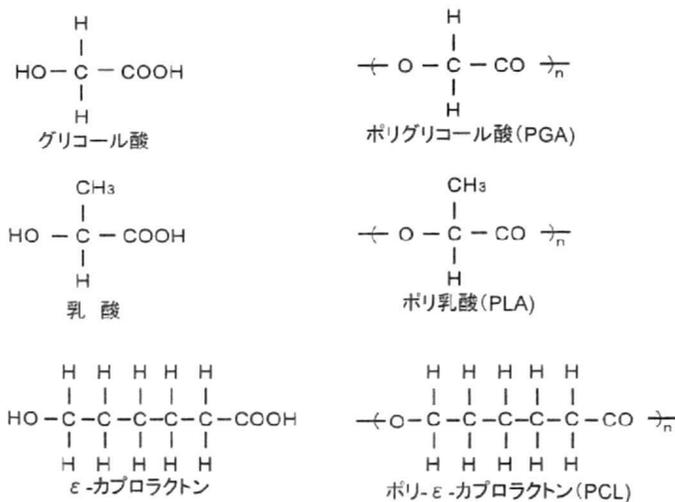


図2

現在の技術では抽出されたコラーゲンを再度、生体組織のような弾力に富んでしかも高い強度を有する材料にくみ上げることができない。架橋剤を用いて分子を強制的に結合させることはできるが、しなやかさが失われて生体との力学的適合性を失う。強度に問題があるものの、コラーゲンは優れた細胞接着性やそのほかの生理活性を有している。細胞接着性が足りないときや、高い強度が必要ない場合に使用される。人工皮膚などで、すでに臨床にも用いられている。最近では、狂牛病問題のために動物由来材料であるコラーゲンの利用については縮小する傾向にあるが、有効な代替品がないことが問題である。

③ ハイドロキシアパタイト

ハイドロキシアパタイトはカルシウムとリン酸からなる無機材料で、生体中には骨の成分として存在する。粉末や板状、スポンジ状に加工されて用いられる。ハイドロキシアパタイトは、骨の誘導活性があることが知られており、骨の再生には有効であるが欠点もある。硬くてもろいので成形加工が困難であり、また大きな力のかかる箇所には使いにくい。一方、ハイドロキシアパタイトは、骨だけでなく皮膚などの軟組織にも非常によく接着することが知られている。この性質を利用して、軟組織の足場材料としての応用が研究されている⁶⁾。

④ 生体組織

足場材料は、再生したい組織の形に成形して用いる必要がある。耳や皮膚、軟骨などは単純な構造であるが、体の中には心臓弁のように複雑な構造の組織もある。また、人工物で作成した足場材料は、多くが生体よりも硬く、物理的なミスマッチにより機能が発揮できないだけでなく、生体に悪影響を与える場合もある。これらの問題点を解決する方法として、動物（主にブタやウシ）や亡くなった方から提供されたヒト組織から、細胞を除去（脱細胞）して用いる方法が開発されている。生体組織とほとんど変わらない物性を有していることが特徴で、細胞を組み込むあるいはそのままの状態で行われている。生体組織はこれまでも化学処理（架橋）されたものが臨床応用されているが、細胞による再生が起こらないため、10年程度で機能不全を起こすことが知られており、脱細胞化組織はそれらよりも優れた成績を上げることが期待されている。

4 再生医療デバイスとしての脱細胞化組織

上で紹介した脱細胞化組織については、すでに血管⁷⁾、皮膚⁸⁾、心臓弁⁹⁾など種々のものが臨床応用されている。それらは、細胞の組み込みを前提としていないため、認可などの手続きが容易であり、これまでの成績が優れているため、他の組織に波及する可能性も高い。ここでは、筆者らがや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および応用について紹介する。

4.1 研究開

新しいバイ
いて十分に
すでに既存
合あるいは
生医療とそ
我が国で
ン製の機械
用されてい
億円に達す
を含めても
れる人工臓
機械弁は
のは一生の
圧較差が大
くしたもの
い。抗凝薬
に血栓が
また、ワー
異種生
点から、
すると
tentによ
化等によ
は5~10
以上の高
欧米で
で、死体
異種生体
ら、提供
手術で
て再建

4.1 研究開発の位置づけ

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、筆者らがを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。

我が国では年間約9千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¹⁰⁾。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。術前診断や術中の体外循環技術の向上等もあり、置換術による死亡率は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年代初頭の实用化以来、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。これまでに弁座部分の構造上、弁前後の圧較差が大きく、心機能や予後に影響を与えるとされてきたが、改良によって有効弁口面積を広くし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、生涯にわたり嚴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、米国心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、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が優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者に有効とされる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、異種生体弁とは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。また、競合品が存在しないために欧米と比較して価格が高く設定されており、我が国の医療における安全保障の観点からも、日本発の技術開発による日本製の安全な代用弁の登場が望まれている。このような背景を基盤として、我々は研究戦略を構築している。

4.2 テーラーメイド生体組織による再生医療—心臓弁を例に—

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 年から脱細胞化ブタ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¹¹⁾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、代わりにレシビエントの自己血管内皮細胞を播種する動物実験を行い、界面活性剤である TritonX-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¹²⁾。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¹³⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らはヒツジを用いた 6 ヶ月間の実験で、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¹⁴⁾。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。

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、TritonX-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 1 mm 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。また、細胞毒性を示す TritonX-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 3)。この方法は、媒体液中に組織を浸漬し、ピストンによって媒体液を圧縮することで圧力を印加す

る方法であり、
ブリッジマン
等での高压技術(理, 加工, 殺菌合)をバックボ合等)により、
パク質変性)が
母や芽胞をもた
エンベローブを
気圧を超えるま

4.3 超高压筋

清潔下にて
処理(4℃, 1
ことができた
スチン線維が
て力学特性へ
脱細胞化
動脈を同所
ずれの個体
を抽出した

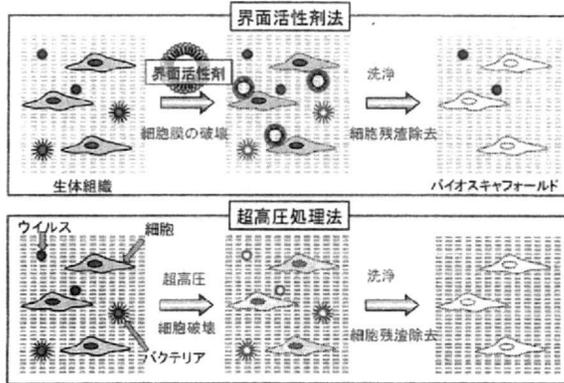


図3

る方法であり、組織の形状が維持されたまま高い圧力を加えることができる。

ブリッジマン（1882～1961）が高圧物理学を開拓して以来、無機・有機化学、医療、食品分野等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。生体中の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・水素結合等）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。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5000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¹⁵⁾。このように6000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。

4.3 超高压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10000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。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。力学特性を検討したところ、超高压処理において力学特性への影響が見られなかった。

脱細胞化生体組織の再生医療用足場材料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。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4に示す。移植1ヶ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てい

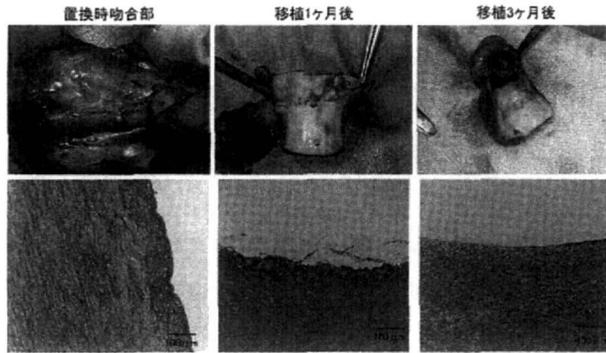


図4

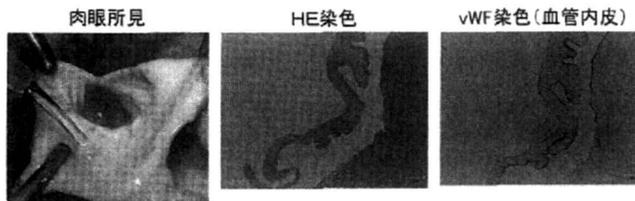


図5 脱細胞化ブタ肺動脈弁の同所性移植実験 (6ヶ月後)

ることがわかった。移植3ヶ月後では、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。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選別し、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。

また、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にわたる(6ヶ月以上)良好な開存が得られており(図5)、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ヶ月までは良好な再生が得られるが、6ヶ月を過ぎる頃から、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、および残存細胞膜成分(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し、現在、長期埋植動物実験を継続している。

4.4 超高压脱細胞
超高压水圧印加の組織を用いて、気管、心膜、皮膚らのうち、超高压角膜移植は円錐日本では、提供角が移植術を受ける発展途上国の方もある。この解膜再生技術^{17,18)}後の脱落や感染膜再生では、温生が臨床応用さ実質においてはる脱細胞化組織性について検討成体ブタ眼SDS溶液を調整の超高压印加処方法で得られた脱細胞化ブタ角界面活性剤組織内の細胞の死では、組織内の移植すると、8た(図7)。一問経過後も、細胞化角膜は、反応の惹起をより、脱細胞

4.4 超高压脱細胞化法の角膜組織への応用

超高压静水压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、心膜、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顕著であっ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。また、角膜移植が必要な患者は先進国よりも発展途上国の方が多く、全世界での角膜移植適応患者数は100万人に達するとのWHOの報告もある。この解決策として、高分子材料を用いた人工角膜の開発¹⁶⁾および再生医療技術による角膜再生技術^{17,18)}が検討されている。高分子製人工角膜は米国に於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、臨床に應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10000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、細胞残渣を除去した。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・生化学的評価を行ない、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6)。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7)。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。これらのことより脱細胞化角膜は、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。