

銭谷 勉	高解像度定量ピンホールSPECTイメージング—小動物から臨床へ—	映像情報Medical	40	1210-15	2008
銭谷 勉	SPECTイメージング	遺伝子医学MOOK9号「分子イメージング技術」	—	75-81	2008
飯田 秀博	特集/分子イメージング時代の画像解析・データ解析の新しい視点-特集のねらい-New Image Processing Technologies for Clinical and Pre-clinical Molecular Imaging	Med Imag Tech	T26	1-2	2008
林 拓也	神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握	循環器病研究の進歩	48	79-86	2008
Mano A	Which factors predict the recovery of natural heart function after insertion of a left ventricular assist system?	Journal of Heart and Lung Transplantation	27	869-874	2008
Miyata S	Heparin-induced thrombocytopenia clinical studies and the efficacy of argatroban in Japan	Semin Thromb Hemost	34	37-47	2008
Morimoto Y	Hemostatic management during oral surgery in patients with a left-ventricular assist system undergoing high-level anticoagulant therapy: efficacy of low molecular weight heparin	Surg J Oral Maxillofac	66	568-571	2008
小林奈歩	心臓移植適応について検討した患者の予後—院内臓器移植医学的適応症例検討会に小児科から提示した症例—	日本小児循環器学会雑誌	24	628-635	2008

中谷武嗣	補助人工心臓の現状と今後の展望	呼吸と循環	56	377-382	2008
中谷武嗣	循環動態維持を目的とした薬物療法と補助循環法	ICUとCCU	31	1061-1067	2008
中谷武嗣	対外設置型補助人工心臓 -東洋紡補助人工心臓-	Clinical Engineering	19	618-622	2008
中谷武嗣	心不全の機械的補助最前線	Current Therapy	26	955-958	2008
中谷武嗣	心臓移植における保存法	移植	43	336-341	2008
橘 洋一	展望 心臓疾患における幹細胞移植治療の現状とその追跡法	ISOTPOE NEWS	649	2-7	2008
山岡哲二	最近の進歩 「細胞移植と分子イメージング」	人工臓器	37(3)	179-181	2008
A. Miskon	Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate	Tissue Engineering	15(3)	345-353	2009
A. Miskon	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	In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers	Biomacromolecules	10(2)	237-242	2009
T.Hashimoto	Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression	Chemistry Letter	38(7)	718-719	2009

T. Hashimoto	Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier	Polymer Degradation and Stability	94(9)	1349-1353	2009
A. Mahara	Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling	Biotechnology Progress	26(2)	441-447	2010
A. Miskon	A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins.	Tissue Engineering	in press	—	2010
A. Mahara	Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column	Biomaterials	31	4231-4237	2010
T. Ehashi	Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve	J. Biomat. Sci. Pol. Ed.	in press	—	2010
Y. Tachibana	Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking	Contrast Media and Molecular Imaging	in press	—	2010
Jeong-Hun Kang	Liver-targeted siRNA delivery by polyethyleneimine (PEI)-pullulan carrier	Bioorganic & Medicinal Chemistry	18	3946-3950	2010
Koshino K	Development of motion correction technique for cardiac <sup>15</sup> O-water PET study using an optical motion tracking system	Ann Nucl Med	24	1-11	2010
Yamamoto A	Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats	Radiological Physics and Technology	2	13-21	2009

Kudomi N	A physiological model for recirculation of water correction in	J Cereb Blood Flow Metab	29	355-64	2009
銭谷勉	小動物の高解像度SPECTイメージング	Isotope News	—	7-9	2009
Iwanishi K	Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method	Ann Nucl Med	23	363-71	2009
Ikoma Y	Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [ <sup>11</sup> C]raclopride	Neuroimage	47	1639-48	2009
Iwanishi K	Evaluation of utility of asymmetric indexed for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction	Ann Nucl Med	23	533-9	2009
Kudomi N	Parametric renal blood flow imaging using [ <sup>15</sup> O]H <sub>2</sub> O and PET	Eur J Nucl Med Mol Imaging	36	683-91	2009
Temma T	Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable <sup>15</sup> O-O <sub>2</sub>	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37	377-85	2009
Ikoma Y	Measurement of Density and Affinity for Dopamine D <sub>2</sub> Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [ <sup>11</sup> C]raclopride	J Cereb Blood Flow Metab	In Press	—	2009
Nakatani T	Heart Transplantation	Circ J	73	A-55-A-60	2009

Mano A	Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation	J Heart Lung Transplant	28	428-433	2009
中谷武嗣	心臓移植と待機患者への治療	内科	103	521-525	2009
中谷武嗣	心臓	移植 2009	44	S119-S121	2009
中谷武嗣	わが国における心臓移植でのエベロリムスの現状	今日の移植	22	674-678	2009
S. Kakinoki	Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligomers (Lactic Acid) Conjugates	The Japanese Peptide Society	—	449-450	2009
S. Kakinoki	Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence	Acta Biomater	in press	—	2009

# 第1章 医療用バイオベースマテリアル

山岡哲二\*1, 木村良晴\*2, 藤里俊哉\*3

## 1 はじめに

本章で取り扱うバイオベースマテリアルの医療用途では、環境調和やゼロエミッションを気にすることはなく、あらゆるエネルギーを惜しみなく注ぎ込んで、最高の性能（治療効果）と安全性を確保することが目的である。20年以上ものあいだ、ポリ乳酸（PLA）の応用分野として外科用縫合糸が際だっていた。性能と安全性が達成されれば、高額であっても十分な付加価値としては、認められるからである。では、医療分野で用いる場合、“バイオベース”であることは、どのような印象であろうか。生体由来だから安心、あるいは、自然環境に存在しているから安心、とは限らない。様々な毒素や、ウイルス、プリオンなど、生命を奪う危険性は自然界に多くある。そのような環境の中で、人類は安全なバイオベースマテリアルを選択して医療に利用してきた。紀元前5世紀頃にはエジプトに歯科医がいたようで、このころの義歯らしきものが実際に出土している。我が国においても、江戸時代には実用に耐える木製義歯が存在していた。また、外科用縫合糸として絹糸が利用されたのは11世紀のことである。羊腸や牛腸が縫合糸として利用された歴史は古く1800年代に優れた滅菌法が開発されて、カットガットと呼ばれる羊や牛の腸の漿膜に撚りをかけた生体吸収性縫合糸が実用されるに至った。まさに、医療用バイオベースマテリアルである。

近年、さまざまなバイオベースの材料を組織再生の足場（スキャホールド）として利用する再生医療が注目を集めている。本章では、再生医療で主要な働きをするスキャホールド材料として検討されている生体吸収性材料について、PLAなどの化学合成材料と、動物組織そのものを用いる生体スキャホールドについて紹介する。

---

\* 1 Tetsuji Yamaoka 国立循環器病センター研究所 生体工学部 部長

\* 2 Yoshiharu Kimura 京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 生体分子工学部門 教授  
バイオベースマテリアル研究センター長

\* 3 Toshiya Fujisato 国立循環器病センター研究所 再生医療部 室長

## 2 再生医療

### 2.1 歴史

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。大きな損傷を受けた組織や器官（臓器）は、もはや正常に自然修復されることはなく、その治療は、人工臓器や臓器移植に頼ることとなる。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問題が残る。そこで、組織工学の検討が始まり、1980年頃、皮膚組織の再建が試みられた。フィーダーレイヤー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。1993年、R. Langerらは、スキヤホールド（Scaffold、足場材料）と呼ばれるポリグリコール酸（PGA）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<sup>1)</sup>。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と、異所的な組織の再構築に成功したことで、組織工学は世界的な注目を集めた。さらに、ヒト胚性幹細胞の単離が報告され、組織幹細胞が続々と発見されると、組織工学の最大の問題であった細胞源の問題が解決すると期待され、ますます研究が盛んになった。

### 2.2 再生医療

近年注目されている再生医療は、再生医工学と細胞移植に大別できる（図1）。再生医工学の中心は、生分解性マトリックスに細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略であり、上述の組織工学と同等の概念である（図1-②、③）。スキヤホールド材料は、細胞増殖のための接着足場として機能し、細胞が増殖して組織が構築されるとともに分解吸収される。

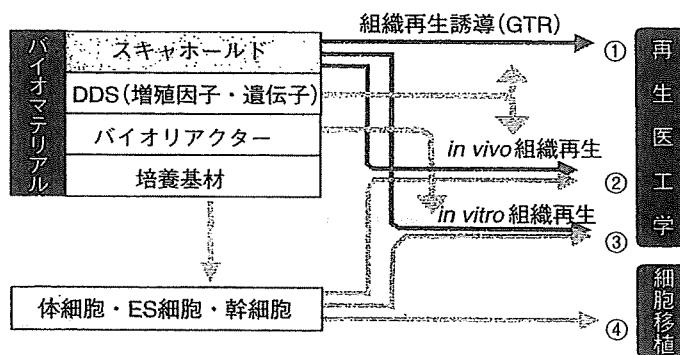


図1 再生医療の戦略

図1の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り、組織再生誘導法（GTR, Guided Tissue Regeneration）と呼ばれる。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ぎ、ある期間、末梢神経が再生する空間を確保することで、神経細胞の再生を妨げる周囲組織の浸潤を防ぐことができる。また、図1の④に示した細胞移植は、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。最近では、自己の幹細胞などを移植することによる心疾患の治療、あるいは、ドーパミン分泌細胞を移植することによるパーキンソン病の治療などが報告されている

2.3 生体吸収性スキャホールド材料

再生医工学の一つの重要要素である生体吸収性材料（生分解性材料）は、その由来により天然

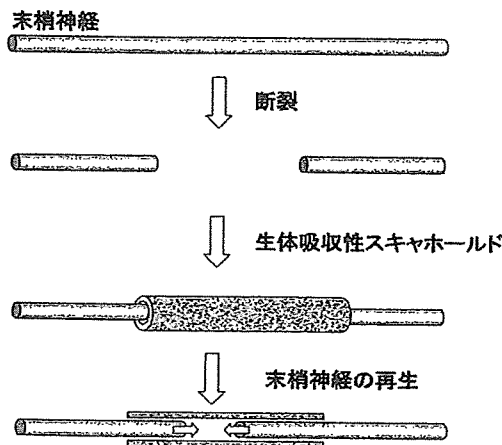


図2 GTRによる組織再生

表1 種々の生分解性高分子

天然高分子	1. 植物産生	1.1 多糖	デンプン・アルギン酸
	2. 動物産生	2.1 多糖	キチン・キトサン・ヒアルロン酸
		2.2 タンパク質	コラーゲン・血漿アルブミン
	3. 微生物産生	3.1 ポリエステル	ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)
		3.2 多糖	ヒアルロン酸
合成高分子	1. 脂肪族 ポリエステル	1.1 重縮合系	ポリブチレンサクシネート
		1.2 ポリラクトド類	ポリグリコール酸・ポリ乳酸
		1.3 ポリラクトン類	ポリ(ε-カプロラクトン)
		1.4 その他	ポリブチレンテレフタレート・アジペート
	2. ポリオール		ポリビニルアルコール(低分子量体)
	3. ポリカーボネート		ポリエステルカーボネート
	4. その他		ポリ酸無水物・ポリシアノアクリレート
			ポリオルソエステル・ポリフォスファゼン



高分子と合成高分子とに分けられる(表1)<sup>2)</sup>。天然高分子に対しては、生体自身が分解酵素を用意していることが多く、酵素分解型生分解性材料として利用できる。酵素分解型の場合、分解速度がきわめて速いために架橋などの化学処理が必要となる欠点があり、また、生体由来の免疫原性などの問題も懸念される。一方、セルロースやデキストランのように、対応する分解酵素が生体内にない場合や結晶性が高い場合には、極めて分解速度は遅く、例えば、酸化再生セルロースのように化学修飾して<sup>3)</sup>、生分解性の癒着防止膜<sup>4)</sup>や止血剤<sup>5)</sup>として臨床応用されている。いずれにしても、その安全性確保と分解速度の調節は容易ではなく、これらの材料の代替となる合成材料に対する期待が高い。

合成高分子の場合、モノマー単位の化学構造とその結合様式で生体分解性を調節することが出来る(表1)。さまざまな脂肪族ポリエステルが開発されているが、生体内で完全に水と二酸化炭素に代謝され、かつ、十分な力学強度と適度な分解速度を有する、PLAやPGAに代表されるポリ- $\alpha$ -ヒドロキシ酸の誘導体が最も有望である。その応用範囲は多岐にわたり、例えば、高分子量で高強度のポリ-L-乳酸(PLLA)は生分解性の骨プレートや骨固定ピンとして応用されている(図3)。高い強度を得るために、光学純度の極めて高いPLLAから高い結晶化度のロッドを調製した後に、切削により成形加工されており、顔面や骨頭の骨折など、比較的荷重の小さな部位では十分に使用可能である。グリコリドやラクチドを他の環状モノマーと共重合体することで得られる柔軟な共重合体は、吸収性の外科用縫合糸として用いられている(図4)。合成の生分解性縫合糸としては1962年にアメリカンシアナミド社がPGA繊維を開発し、1970年にDexon<sup>TM</sup>として上市し、その後、次々と開発が進んだ。

しかしながら、再生医工学用材料としての利用を目指した場合、このような特性のみでは十分とは言えず、さらに、高い機能性を有したPLA系誘導体が期待されている。次項では、我々のグループで進めている、PLA製人工皮膚材料と、PLA系温度応答性ゲル化材料(インジェクタブルスキャホールド)に関して紹介する。

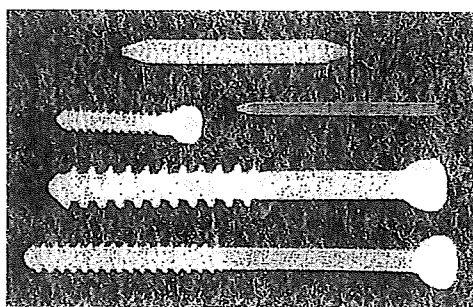


図3 ポリ乳酸製の骨固定ピン

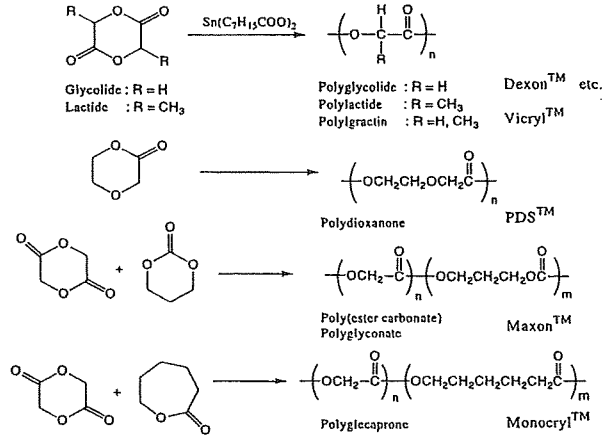


図4 さまざまな外科用縫合糸の構造

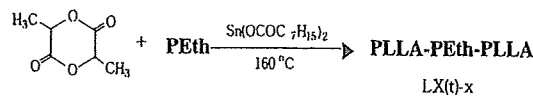
### 3 機能性ポリ乳酸誘導體

#### 3.1 人工皮膚—ポリ乳酸系ハイドロゲル/ハイドロキシアパタイト複合体—

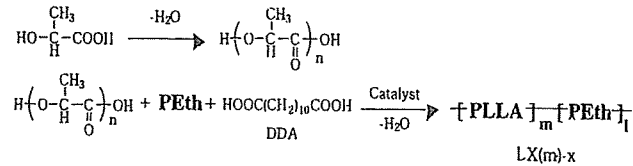
BSE 問題など、コラーゲンの医療分野での利用が制限されつつある状況のなかで、コラーゲンが有する優れた生体適合性を合成材料で再現することは重要な課題である。我々のグループでは、コラーゲンゲル製人工真皮の代替となる機能性 PLA 誘導體の開発を進めてきた。まず、細胞がマトリックス内部で増殖できる環境を与えるためには、含水ゲルであることが重要であると考へ、PLA セグメントとポリエチレングリコール (PEG) セグメントからなるマルチブロック共重合体の新規合成方法を開発した (図5)<sup>6)</sup>。ここでは、生体内での蓄積性を回避できる分子量 20000 の PEG を利用した。所定量のデカンジカルボン酸を系中の水酸基とカルボキシル基を等モル量に調節するために添加し、さらに、ジフェニルエーテルを溶媒とした環流により脱水重縮合を加速させた。得られたマルチブロック共重合体の PEG 組成は 3 ~ 87 % であり、何れの分子量も約 10 万であった。すなわち、マルチブロック共重合体の開発により、PLA-PEG-PLA トリブロック共重合体では PEG 組成の上昇とともに分子量が低下するという欠点を克服したことになる。なぜなら、PEG の組成が 3 ~ 87 % のトリブロック共重合体の理論分子量は、PEG の分子量が 20000 の場合、67 万 ~ 2.3 万となる。逆に考えれば、成形加工が可能な分子量 10 万程度を確保するには、PEG 組成は 20 % が上限と云うことである。このマルチブロック共重合体の開発により、速い分解速度と含水性を有しながらも市販の外科用縫合糸と同等の初期破断強度を有する強い材料が調製でき、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなど様々な形状でスキャホールドとしての利用が可能となった。

マルチブロック共重合体のバルク内の構造は、その組成比に応じたマイクロ相分離構造を有する

Synthesis of Triblock Copolymers



Synthesis of Multiblock Copolymers



PEth :	PEG	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\text{H}$
	PPG	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{O}\right)_y-\text{H}$
	Pluronic F68	$\text{HO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\left(\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{O}\right)_y-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_x-\text{H}$

図5 従来型のトリブロック共重合体（上）とマルチブロック共重合体（下）の合成スキーム

ことが DSC 測定および X 線散乱より確認されている。PEG ドメイン中に隔離された PLA ドメインを生分解性架橋点として、PEG 成分が膨潤するために、これまでにない生分解性水ゲルを形成する。PEG 組成の上昇とともに含水率が上昇し、含水率の向上とともに *in vivo* 組織反応は飛躍的にマイルドになり、ほとんどカプセル化も認められず、また炎症細胞の浸潤も有意に抑制されていた (図6)。我々は、このバイオイナートな PLA/PEG マルチブロック共重合体水ゲルに対して軟組織親和性を付与することで人工皮膚への応用を進めた。

ハイドロキシアパタイト (HAp) は、骨再生用マトリックスとしてのみならず、軟組織との親和性も古くから知られている。我々は、上述のマルチブロック共重合体水ゲルに組織親和性を付与するために、交互浸漬法<sup>7)</sup>を用いてマルチブロック共重合体水ゲル/HAp 複合体を作製した。交互浸漬サイクル数とともに HAp が析出し、さらに、PEG ドメインを 33% 含有するために膨潤率が高い LE(m)-33 の場合、ゲル内部でも HAp が析出していることが EPMA 分析の結果から確認された。図7は、マルチブロック共重合体の凍結乾燥により作製したスポンジ構造に対して HAp を複合化し、さらに、シリコン薄膜を重層した構造の人工真皮の断面 SEM 写真である。ラット皮膚全層欠損モデルに対する移植試験を行い、所定期間後に組織修復性と拘縮の程度を定量化した結果、炎症反応は極めてマイルドであり、カプセル化も軽微であった。また、周囲組織が速やかに浸潤することで皮膚組織の再生を誘導することが明かとなった。これらの優れた組織修復性は、多孔質材料の微細孔内への組織の浸潤のみならず、水ゲルマトリックス中への周囲細胞の進入現象が大きく影響している。この速やかな皮膚組織修復は、治癒に伴う組織の拘縮を有効に抑制した。何れの指標も、ポリ乳酸スポンジとコラーゲンの複合材

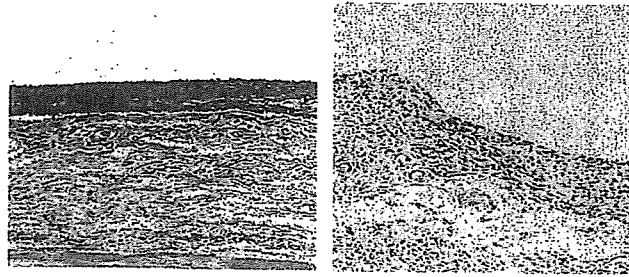


図6 ラット皮下2週埋入後の組織反応  
(左: PLLA, 右: マルチブロック共重合体)

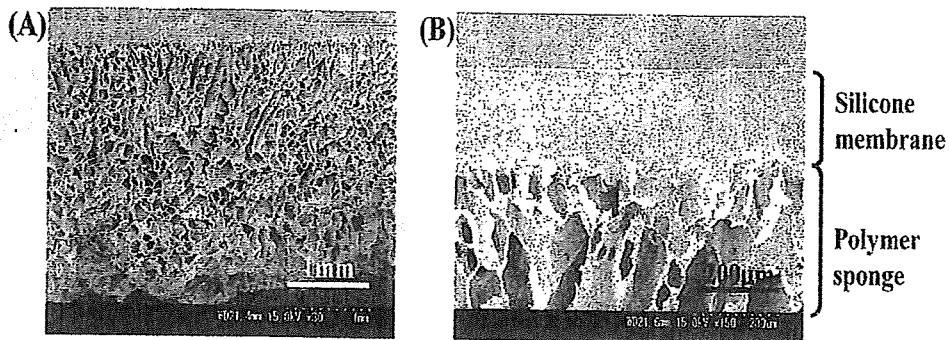


図7 マルチブロック共重合体スポンジとシリコン薄膜からなる、  
完全合成型人工皮膚のSEM写真

料をしのぐ特性であり、このマルチブロック共重合体ハイドロゲルスポンジ/HAp複合体は、その柔軟な特性とマイルドな炎症反応を併せもつ皮膚組織修復材料として期待される。

### 3.2 細胞移植用インジェクタブルスキャホールド

近年、心筋梗塞部位への細胞移植などによる著効が報告されているが、移植した細胞を患部へ効率的に送達（固定）することは容易ではなく、細胞生着率は10%以下との報告もある。そこで、移植細胞を懸濁させるマトリックスとしてインジェクタブルスキャホールドが注目されている。インジェクタブルスキャホールドとは、生体外では溶液であり、患部に適応された後に何らかの刺激によりゲル化（固化）する相転移材料である。我々のグループでは、ポリ-L-乳酸（PLLA）、あるいはポリ-D-乳酸（PDLA）と、PEGとのABA型トリブロックコポリマーを利用して、低温では液状で32℃以上でゲル状に相転移するインジェクタブルスキャホールドの開発に成功した<sup>9)</sup>。まず、PLLA-PEG-PLLAトリブロック共重合体を水系中に分散してPLLAコアとPEGコロナからなる高分子ミセル（L体ミセル）を作製する。同様にPDLA-PEG-PDLAからD体ミセルを調製した。両者の10%懸濁液を混合し（図8, d）、37℃で処理すると透明なゲル

状に変化した (図 8, e)。このような相転移現象は, L 体ミセルのみの懸濁液では観察されないこと (図 8, a-c), および, X 線散乱解析の結果から, この相転移現象が PLLA と PDLA とのステレオコンプレックス形成に基づいてミセル間に架橋が生じるためであることが明らかとなっている。このインジェクタブルゲルは, 生体内で分解される PLA と生体内非蓄積性である PEG のみからなる, 含水率 90 % の完全生体吸収性のインジェクタブルスキャホールドである。

このゲルが細胞毒性を有さないこと, および, 細胞の生存と増殖を許容するかを見当するために, 緑色蛍光 (GFP) 発現マウス繊維芽細胞の移植実験を行った。L 体・D 体ミセル混合液に所定数の GFP 発現細胞を添加した懸濁液を, GFP(-) マウスの大腿部に注入し, 所定時間後に移植細胞の様子を蛍光顕微鏡下にて確認した (図 9)。その結果, ゲル中で細胞は正常に蛍光を発し, その毒性の低さと, 細胞移植用インジェクタブル材料として機能することが実証された。

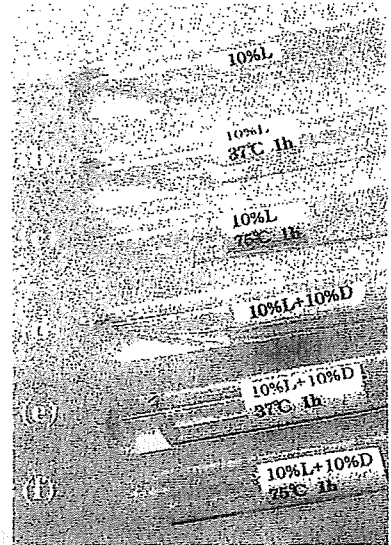


図 8 L 体ミセル懸濁液 (a) は 37 度ではゲル化しない (b) が, L 体・D 体混合ミセル溶液 (d) は, ステレオコンプレックス形成に基づいて, 37 度でゲル化する (e)

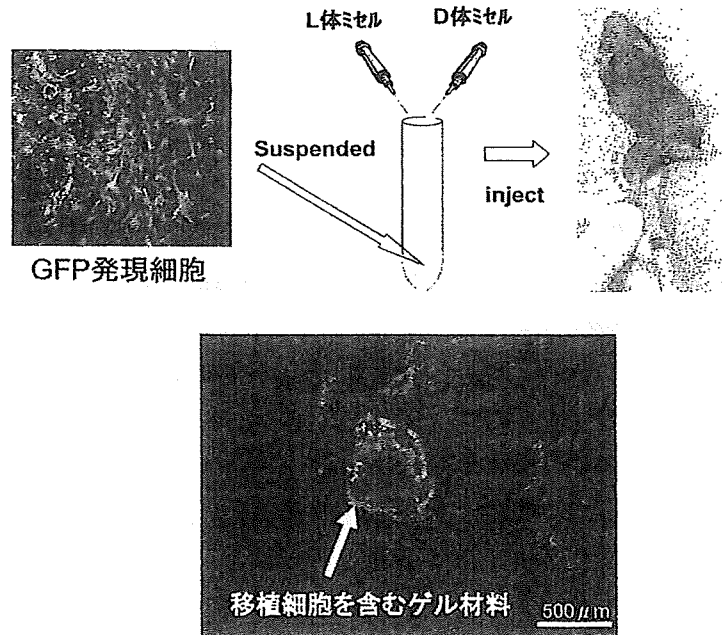


図 9 緑色蛍光タンパクを発現する細胞の移植実験

#### 4 生体組織の利用

医療分野におけるバイオベース材料の究極の利用は臓器移植ではないだろうか。現代の技術では、完全な臓器を作製することは不可能であり、多孔質スキャホールドを利用した再生医工学では、3次元構造を有する組織や器官への応用は容易ではない。そこで、我々は、さらに機能性に富んだスキャホールドとして、生体組織から細胞を除去して生体スキャフォールドとして利用するアプローチを試みている。ヒトあるいは動物から採取した心臓弁から、放射線照射及び洗浄処理によって細胞成分や細菌、ウイルス、DNAを完全に除去した脱細胞化組織は、移植後に自己細胞が侵入することでリモデリングされ、自己組織化されると期待される。さらに、この脱細胞化スキャフォールドに、*in vitro*において患者の自己細胞を播種するテーラーメイド移植によって、より早期の自己化を獲得できると考えられる(図10)。

生後4ヶ月、体重約10kgのクラウン系ミニブタから清潔下にて下行大動脈を採取し、PBSによる洗浄後、PBSを満した滅菌容器に封入して、10, 30, 100, 300, あるいは1000 Gyのガンマ線を照射して約2週間洗浄した。ガンマ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、照射線量が増えるにつれて洗浄後組織内の核の残存が減少し(図11)、さらに、残存DNAを測定したところ、300 Gy以上の照射で大幅に減少した(図12)。

一方、作製した脱細胞組織の破断強度並びに弾性率は、もとの組織とほぼ同程度であった。すなわち、300 Gy以上のガンマ線を照射後、洗浄処理することによって、細胞外マトリックスの特性を保持したままで、循環器系組織内の細胞はほぼ完全に除去できる。

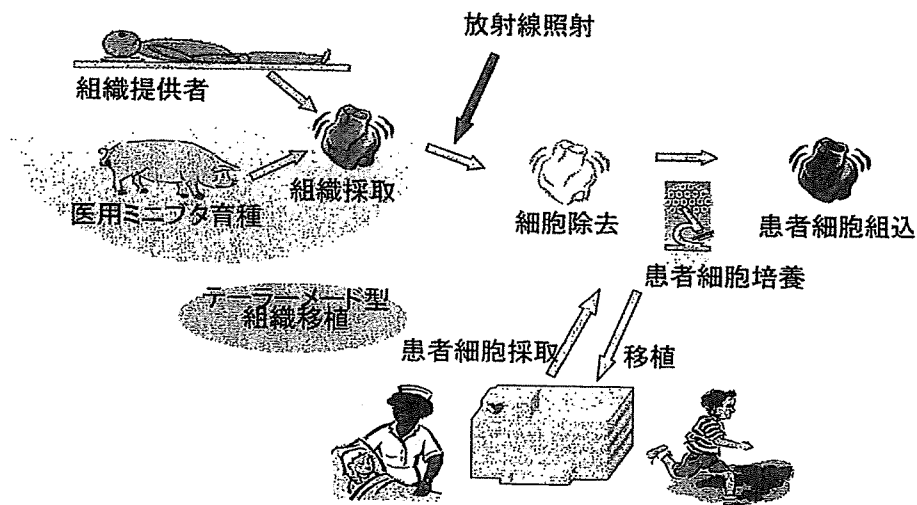


図10 テーラーメイド型組織移植

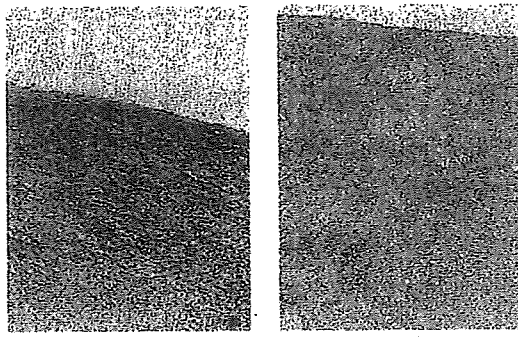


図11 ガンマ線照射 (10kGy) 及び洗浄処理によって脱細胞化したブタ心臓弁組織  
(左:処理前, 右:処理後)

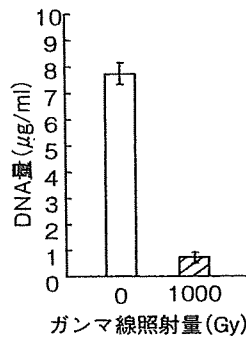


図12 ガンマ線照射及び洗浄処理によって細胞を除去したブタ血管組織の残存 DNA 量

Wister ラット (7週令) の皮下部位に上記脱細胞化ミニブタ大動脈を埋入し, 2週間後に取り出して組織学的検討を行った。脱細胞化ミニブタ大動脈の場合では, 血管新生が認められず, さらに, マクロファージ陽性を示す CD 68 陽性細胞数が優位に抑制されており, 脱細胞組織のマイルドな炎症反応が証明された。上述したように, 生体由来であるが故に懸念されるウイルスや感染性物質も, 放射線処理により回避できる可能性も高く, 今後, 安全かつ優れた組織親和性を有するスキャホールド材料として期待できる。

## 5 おわりに

これまでに生分解性と分解生成物の安全性が確認されてきた PLA や PGA のみならず, 生体由来の物質の高い機能性は計り知れない。今後も, 様々な合成手技や化学修飾法を開発することで, その機能性はさらに向上するであろう。生物学的に優れた細胞外マトリックスの働きを少しでも再現できる機能性マトリックスにより, 今後の組織再生医工学は新たなステージを迎えるこ

ととなる。

謝辞

本研究は、原子力試験研究費、厚生労働省循環器病研究委託費（18指一2）および京都ナノテク事業創成クラスターの補助により行われた。

文 献

- 1) R. Langer, J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920-6 (1993)
- 2) 木村良晴, 山岡哲二, 生分解性高分子の基礎と応用 (筏 義人編著, アイピーシー出版), pp 7-63 (1999)
- 3) 筏 義人, 生体材料学, 産業図書 (1994)
- 4) Nishimura, K., Bieniarz, A., Nakamura, R., diZerega, G. S., *Jpn. J. Surg.*, 13, 159-163 (1983)
- 5) Lason, B., Nisell, H., Grandberg, I., *Acta Chir. Scand.*, 144, 375-381 (1978)
- 6) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 37, 1513-1521 (1999)
- 7) Taguchi, T., Kishida, A., Akashi, M., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 10, 331-339 (1999)
- 8) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208 (2001)



## 細胞移植療法へ向けての工学的アプローチ

山岡哲二, 馬原 淳, 橋 洋一

### はじめに

人工的に組織を修復しようとする試みの歴史は古く、特に1980年頃から皮膚組織の再建が精力的に進められたり。Greenらは、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を作製することに成功し<sup>1)</sup>、皮膚組織を再生する試みが相次いで報告された<sup>2)</sup>。そして1988年、米国では、これらの研究を統合した新たな分野としてTissue Engineering (組織工学) が生まれた。その後、我が国では“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てきている。表皮シートの報告から26年たった本年の7月、我が国では初めて、培養表皮の製造販売が認可されるに至った。よう

— Key word —

細胞移植療法  
細胞トラッキング  
MRI  
幹細胞  
細胞分離

Engineering approaches for the cell transplantation therapy

Tetsuji Yamaoka, Atsushi Mahara, Yoichi Tachibana :  
Department of Biomedical Engineering,  
Advanced Medical Engineering Center,  
National Cardiovascular Center Research Institute  
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

循環器病研究の進歩 Vol.XXVIII No.1 2007

やく再生医療を実現する時代が到来したわけであるが、それぞれの再生医療戦略の臨床化は、未だ多くの困難に直面している。

### I. 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用い、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、骨などに展開できる可能性を示唆した<sup>3)</sup>。さらに1998年には、ヒトES細胞の単離が報告され<sup>4)</sup>、その後も続々と組織幹細胞が発見された。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。

工学的要素と細胞成分からなる再生医療を、著者なりに整理すると、図1のようになる<sup>5)</sup>。工学的要素として、スキャホールドの開発、生理活性物質送達システム (DDS)、三次元培養バイオリアクター、さらには、様々な細胞分離培養基材などの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はいるが、体細胞、ES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。特に患者本人から採取できる間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell : MSC) や、脂肪幹細胞の分化誘導に関して研究が進んでいる。

生体吸収性高分子の不織布やコラーゲン多

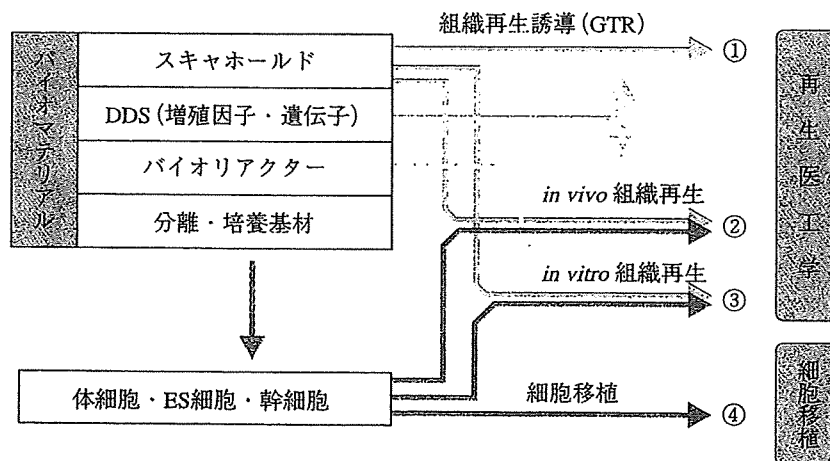
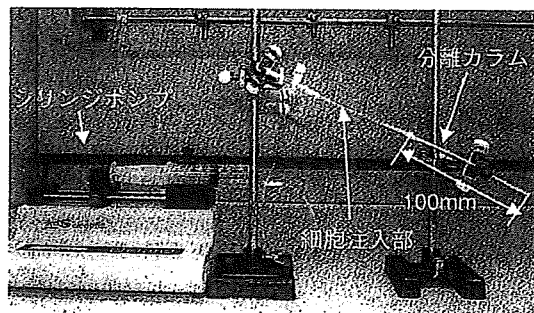


図1. 再生医療の戦略 (文献6より引用改変)

孔質体をスキャホールドとして使い、細胞を播種した後の組織再生を生体に委ねる *in vivo* 組織再生 (図1②) では、内在性の増殖因子の存在や、毛細血管の新生による酸素や栄養素の供給のために、効率良い組織再生が期待できる。さらに、播種細胞が幹細胞の場合には、*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も期待できる。一方、*in vitro* 組織再生では、常に再生組織を準備できるために、工業的に大きな期待が寄せられている。しかし、内部 (深部) の細胞が壊死することも多く、三次元での細胞播種・増殖・機能亢進を目指した様々なバイオリアクターが報告されている<sup>7-10)</sup>。また、図1の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。例えば、断裂した末梢神経を生体吸収性チューブでつなぐ手法で、組織再生誘導法 (Guided Tissue Regeneration : GTR) とも呼ばれ<sup>11-13)</sup>、歯周組織<sup>14)</sup> や顎堤への検討が進んでいる。

一方、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狙う



カラム長=10cm, カラム内径=0.5mm  
カラム傾斜角=20°  
細胞:  $2 \times 10^6$  cells/mL, 50 $\mu$ L inject  
流速 (フラクション1-5) = 50 $\mu$ L/min  
流速 (フラクション6-10) 600 $\mu$ L/min  
フラクション体積 = 12.5 $\mu$ L/フラクション  
図2. 新たに設計した細胞分離カラム

方法である。臨床という意味で最も進んでいるのが、この細胞移植ではないだろうか。特に自己細胞移植では認可などの問題も少なく、さらに、幹細胞を移植することによる優れた効果が心疾患<sup>15)</sup> やパーキンソン病<sup>16)</sup> の治療において報告されている。しかしながら、これらの先進的手法が、一般的な治療法とな

細胞ローリング

$$\frac{dN_b}{dt} = \underbrace{k_f \cdot N_{l_0} \cdot N_a}_{\text{forward}} - \underbrace{N_b \cdot [k_r^0 \cdot \exp(\gamma \cdot F_b / k_b \cdot T)]}_{\text{reverse}}$$

$N_b$ : 結合体の密度  
 $k_f$ : 結合速度定数  
 $N_{l_0}$ : リガンド密度  
 $N_a$ : 接触領域内にあるフリーのレセプター密度  
 $k_r^0$ : 解離速度定数  
 $\gamma$ : Characteristic structural length

$F_b$  (force per bond)  $\propto \frac{\partial v_f(s)}{\partial s}$   
 $k_b$ : ボルツマン定数  
 $T$ : 絶対温度

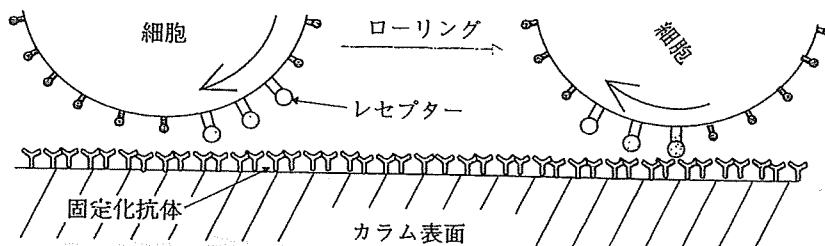


図3. 細胞ローリングの理論  
 (Daniel A. Hammer and Douglas A. Lauffenburger, Biophys. J., 52, 475-487 (1987))

るには解決しなくてはならない課題もまだまだ多い。

本稿では、我々が進めている、細胞移植療法を実現するための新たな工学的システムの開発について紹介する。

## II. 新しい原理に基づく細胞分離カラム

MSCは、細胞移植における有力な細胞ソースとして注目されている。しかし、均一なMSCを組織から単離することは難しい。一般的に骨髄などの組織からMSCを単離する簡便な手法としては、付着系細胞を分離する手法や密度勾配遠心法が用いられている。さらに細胞表面マーカーに基づく分離法としては、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) 法、あるいはMACS (磁気ビーズ) 法が挙げられる。しかしながら、得られる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、我々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。細胞は基板上に高密度で固定化された抗体と相互作用するので、周囲の液体を強制的に流すと、細胞は基板上を転がる。このように基板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<sup>1)</sup>、この現象を応用した細胞分離カラムである(図2)。抗体を高密度で導入するために、シリコンチューブ(内径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。Hammerらは、流体中における細胞表面レセプターと固定化リガンドとの連続的な脱着反応について、数学的な知見からそのメカニズムを解析している(図3)。この式の第1項に記述されているように、脱着反応におけるリガンド-レセプター間の複合体形成は、細胞表面レセプター密度に依存することが示唆されてい

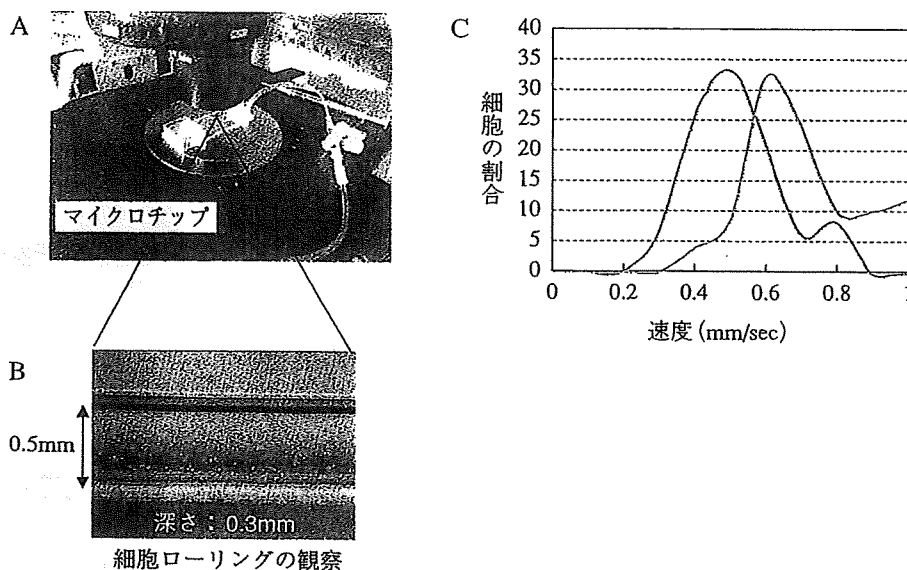


図4. マイクロ流路中 (B) を移動するKG-1a細胞 (Cの青) とHL60細胞 (Cの赤) の速度分布

る。つまり、レセプター密度が高い細胞が流体中においてリガンド固定化基板上をローリングする場合、多くの複合体形成が誘起されるため、ローリング速度に大きく影響を与える<sup>18)</sup>。すなわち、この新規カラムに、ヘテロなポピュレーションを有する細胞懸濁液をアプライすると、細胞表面マーカー密度が高い細胞ほど、遅れて溶出する。また、この手法では、抗体などで細胞を染色する必要がなく、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い。

図4は、CD34陽性株KG-1a細胞と陰性株HL-60細胞を、抗CD34抗体固定化表面でローリングさせたときのローリング速度を実測した結果である。この実験では、マイクロチップ底面に抗体を配列して細胞を流し、その移動速度を高速撮影により評価した。その結果、KG-1a細胞の移動速度は、HL60と比較して30%程度抑制されていることが明らかとなった。このカラムを用いて、

C57BL/6マウスの大腿骨から採取した骨髓細胞中の接着性細胞(粗精製MSC細胞を含んでいると考えられている)の分離を行った。その結果、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、その溶出時間はCD34抗原密度に依存していることが証明された<sup>19)</sup>。さらに、得られた各フラクション中の細胞に対して骨芽細胞への分化を誘導したところ、あるCD34密度を有する細胞フラクションで最も高い分化マーカー遺伝子の発現が確認された。すなわち、ある密度で目的表面マーカーを有する細胞群のみ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単離することが可能となった。

### Ⅲ. 細胞トラッキング

細胞移植療法のメカニズムは、未だ不明な部分が多い。すなわち、組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖により機能が回