

用語解説

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

方法。

参考文献

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

2000.

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

図表

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

銭谷 勉

1991年 山形大学工学部情報工学科卒業

1993年 山形大学大学院工学研究科情報工学専攻修士課程修了

株式会社日立メディコ(～1999年)

2001年 日本学術振興会特別研究員(～2002年)

2002年 山形大学大学院理工学研究科システム情報工学専攻博士後期課程修了

国立循環器病センター研究所放射線医学部(医薬品機構派遣研究員)

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

参考文献

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

5 幹細胞分離法とポピュレーション解析

馬原 淳*¹, 山岡哲二*²

5.1 はじめに

次世代医療として着目されている再生医療は、生体の細胞や組織が有している再生能力を人為的に利用して、失われた機能や構造の再生を促す治療法である。細胞ソースとしては、患者自身から採取した間葉系幹細胞などの自己幹細胞が広く検討され、その臨床利用も始まっている。このような再生医療がさらに一般的な治療法となるためには、安全性が担保された均一な幹細胞ポピュレーションの調製が必須であり、組織の中でさまざまな細胞と混在している幹細胞を、未分化状態を維持したまま効率的に分離することが求められる。さらに、これらの体性幹細胞、あるいは、近年注目されているES細胞やiPS細胞を体外で目的の細胞に分化させて利用する場合には、分化誘導の過程でさまざまな分化ステージの細胞が出現するために、ここでも、均一な細胞ポピュレーションのみを抽出する必要がある。つまり幹細胞の単離・分離法は、再生医療の治療効果の向上や安全性を担保するためにも極めて重要な操作となる。本項では再生医療で利用が期待されている幹細胞の分離法に焦点を絞り、その現状と最新の研究成果について紹介する。

5.2 再生医療における幹細胞

幹細胞研究の急速な発展は、再生医療や細胞移植治療の可能性を大きく広げた。1998年 Thomsonらにより報告されたヒトES細胞樹立¹⁾、1999年のPittengerらによる間葉系幹細胞の分離と分化能についての報告²⁾、2002年のVerfaillieらによる間葉系幹細胞の可塑性についての発見³⁾、2007年Yamanakaらによる人工多能性幹細胞(iPS)の作製の成功⁴⁾は、再生医療における細胞ソースの可能性として大きなインパクトを与えた。しかし、分子生物学分野における幹細胞の発見や分化に関する研究成果は、直ちに再生医療へと応用できるものではない。組織から採取した幹細胞を移植細胞ソースとして利用する場合、副作用がなく安定な治療効果を達成するためには、その純度、分化の均一性、感染の可能性を十分に考慮する必要がある。表1には種々の幹細胞の特徴を示した。未分化な細胞であれば種々の疾患に対して応用することができ、その中でも、自家細胞移植は最も安全性が担保しやすいものと考えられている。

*1 Atsushi Mahara 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
室員

*2 Tetsuji Yamaoka 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部
部長

表1 幹細胞ソースとしての特徴

分化度	細胞	利点	欠点
未分化 ↓ 細胞の分化度 ↓ 成熟	胚性幹細胞	多分化能 倫理的問題の回避	テラトーマ形成 倫理的な問題
	人工多能性幹細胞		テラトーマ形成
	間葉系幹細胞	組織より採取可能 自家移植が可能	単離・同定が困難
	造血幹細胞		分化できる組織が限定

5.2.1 胚性幹細胞 (ES細胞)

1998年、ThomsonらのグループはヒトES細胞の樹立を報告した¹⁾。胚盤胞に形成される細胞塊から作製されるES細胞は、神経系細胞⁵⁾、血球系細胞⁶⁾、心筋細胞^{7, 8)}などさまざまな組織細胞へと分化が可能である。しかし、ES細胞の移植を考えた場合、分化能力が高い反面、目的以外の組織細胞へ分化する可能性も含まれており、奇形腫（テラトーマ）形成の危険性が危惧されている。このことから、ES細胞を試験管内で目的組織へと分化させてから移植する必要がある。また、ES細胞は受精卵より形成される胚盤胞から調製されるため、免疫拒絶や倫理的問題も指摘されている。

5.2.2 人工多能性幹細胞 (iPS細胞)

Yamanakaらのグループによって、ヒト繊維芽細胞に対して4つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を発現させることでES細胞様の未分化な幹細胞へとリプログラミングできることが報告された⁴⁾。作製された細胞はiPS細胞として報告され、遺伝子の発現パターンや成熟細胞への分化、テラトーマ形成といったES細胞特有の性質をiPS細胞も有していることが示されている。その後、ガン関連遺伝子であるMycの発現を必要としなくてもiPS細胞を作製できることが同グループより報告されている⁹⁾。細胞移植ではテラトーマ形成が問題となるものの、患者自身の繊維芽細胞から幹細胞が作製可能であることから、倫理的問題をクリアできる技術として期待されている。

5.2.3 間葉系幹細胞 (MSC)

Pittengerらのグループにより1999年に報告されたMSCに関する研究²⁾では、骨髄中に含ま

第3章 細胞機能解析技術

ヘテロな細胞の中から目的の機能を有する細胞ポピュレーションを分けるための「細胞分離」である。組織幹細胞は細胞外マトリックスや他の成熟細胞とともに存在しているため、細胞成分を組織より採取し、その後幹細胞ポピュレーションを分離する必要がある。固形の臓器や組織から細胞を採取する場合、酵素や機械的切断により細胞懸濁液を調製する必要があるが、血液や骨髄などの液体組織では、吸引により比較的簡単に細胞懸濁液を調製できる。MSCは骨髄だけでなく脂肪組織にも存在することが報告されているが、患者から簡便に採取が可能な骨髄由来のMSCは細胞移植における有力な細胞ソースであろう。

最も重要なステップは、細胞懸濁液から移植に必要な細胞ポピュレーションのみを分離することであり、さまざまな手法が開発されている。目的の細胞ポピュレーションを分離するための細胞分離法を表2にまとめた。分離する場合の指標としては、細胞の物理的性質に基づくものと、生物学的性質に基づくものに分類されている¹⁶⁾。また、細胞を分離する形式としてDigital型とContinuous型に分類した。Digital型とは、特定の指標に着目してヘテロな細胞懸濁液から1つの細胞ポピュレーションを分離する手法である。密度勾配遠心により採取される単核球細胞や、細胞表面マーカーの有無で磁気ビーズ法により分離される細胞ポピュレーションも、Digital型分離法として分類できる。これに対してContinuous型分離法とは、特定の指標に着目してその連続的な物理量により複数の細胞ポピュレーションを分離する手法である。この手法の研究例は少ないものの、連続磁場中において磁気ビーズで標識された細胞を標識量の違いに基づいて分離するデバイスや、細胞の電気的性質の違いにより細胞を分離する方法も報告されている。

表2 細胞分離技術

指 標	Force field	Type	名 称	内 容
物理的性質 (細胞の大きさ、 比重など)	Centrifugal	Digital	密度勾配遠心分離	単核球成分の分離
	Adhesion	Digital	Adhesion population	接着細胞分画の分離
	Electronic	Continuous	DEP (Dielectrophoresis)	電場の中で誘電率の違いによる分離
Digital		FACS (Fluorescence activated cell sorting)	表面抗原を蛍光ビーズで標識して分離	
生物学的性質 (表面マーカー)	Magnetic	Continuous	DMFF (Dipole Magnet Flow Fraction)	磁場の中で標識に基づく細胞分離
		Digital	MACS (Magnetic activated cell sorting)	表面抗原を磁気ビーズで標識して分離
	Hydrodynamic	Continuous	Column system	リガンド固定化界面で細胞ローリングにより特定のマーカー密度をもつ細胞を分離
Digital		Membrane	分離膜で特定の細胞を分離	

ーションを分離するものである。同様のメカニズムとして、Changらの報告でもマイクロ流路内に配置した柱にリガンドを固定化し、細胞を流すことでリガンドと結合した細胞を分離できることが報告されている²⁷⁾。このような手法は、特定の細胞を基材上に補足することで分離を達成するため、Digital型分離法として分類することができる。

これに対して筆者らのグループでは、固定化リガンドと細胞表面マーカーとの連続的な相互作用を利用して細胞ポピュレーションを分離する手法を開発している。これは、Hydrodynamicsにより細胞をリガンド固定化界面へ流すことでリガンドと特異的に結合した細胞がshear stressを受け回転運動（ローリング）し、細胞表面レセプター量に応じた細胞分離が達成されるものである。このローリング速度は表面レセプター量に応じて変化するため、Continuous型の細胞分離として分類することができる。詳細は後述する。

他にも、FACSを利用してHoechst 33342の染色挙動から分離されるSP (side population) 細胞を採取して幹細胞を分離する方法がある。細胞の表面マーカーが同定されているHSC, EPCの場合では、比較的容易に均一な細胞ポピュレーションを分離することが可能となる。しかしMSCの場合では、未分化度が高くさまざまな表面マーカーの発現が報告されているにも関わらずコンセンサスな結果が得られていない。成熟した細胞の場合では特定の表面マーカーの発現の有無により細胞ポピュレーションが規定されるが、未分化な細胞の場合、表面マーカーの発現量は連続的に変化するものと思われる。MSCやHSCにおいてCD34の発現は、*in vitro*の培養期間や個体の年齢によって一定に発現しないことを示すデータも報告されている^{28, 29)}。このような観点から筆者らのグループでは、細胞表面マーカーの発現量に応じて連続的に細胞ポピュレーションを分離可能な細胞分離カラムシステムの開発を進めている。

5.4 細胞分離カラムの開発

これまでに筆者らのグループでは、表面マーカー発現量に応じて細胞を分離する細胞分離システムを開発している。これは表面マーカーに対する抗体を平面基板上へ固定化し、検体となる細胞をローリングさせることで、細胞表面マーカーと固定化抗体との相互作用を誘起し目的細胞ポピュレーションを分離する。この相互作用は、血管内で炎症部位付近に白血球が集積する場合に観察される白血球ローリング現象として知られており³⁰⁾、セレクチンとの相互作用により白血球のローリング速度は著しく減少する^{31, 32)}。この原理を応用してGreenbergらは、表面マーカーの有無によるローリング速度の差を利用して細胞分離する手法を報告している³³⁾。また、Langerらは平面基板上へリガンドを2次元に固定化し、作製したパターン化リガンド上で細胞ローリングさせることにより目的の細胞ポピュレーションを分離するマイクロチップを開発して

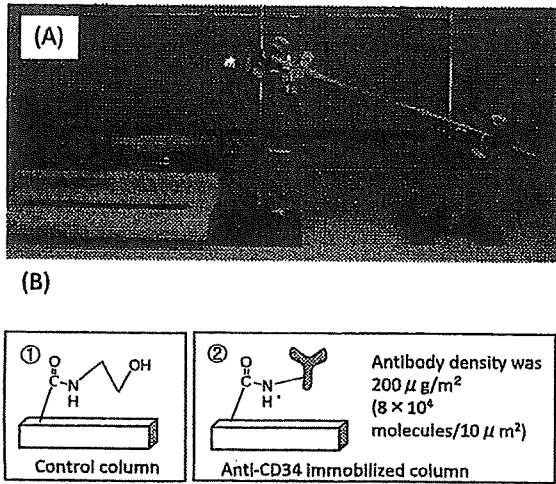


図2 (A) 細胞分離カラムシステムの外観
(B) 分離カラムの構造 (①コントロールカラム, ②抗体固定化カラム)

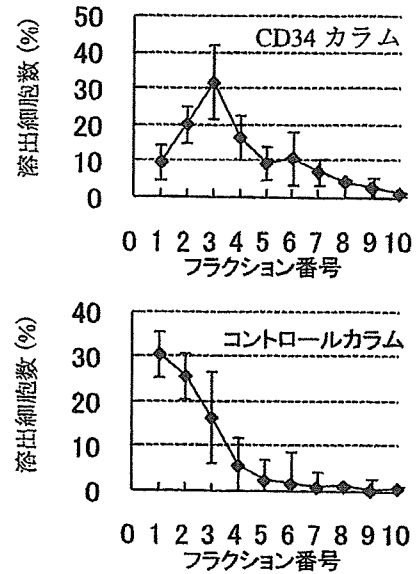


図3 マウス由来MSCを抗CD34抗体修飾細胞分離カラムにより溶出させた時のプロファイル

5.5 おわりに

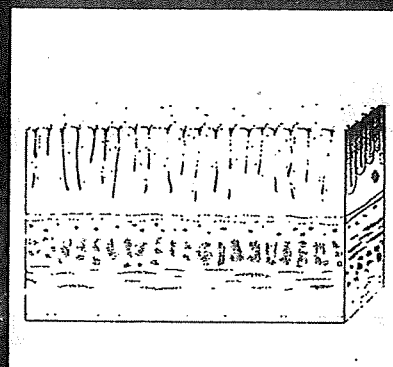
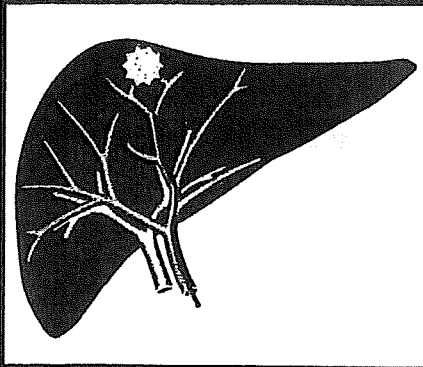
細胞懸濁液から幹細胞を分離する場合、大きく分けて2つのアプローチが存在しているものと考えている。1つは高純度で均一なMSCを分離する手法、2つ目としてはMSC成分を含む細胞ポピュレーションを分離する手法である。MSCの機能やその性質を本質的に理解するためには、高純度で得られたMSCを用いて分化能や表面マーカーの発現量を詳細に検討する必要がある。一方で、MSCによる治療効果を検討する場合、大量のMSCが必要となるので、簡便な操作により大量に細胞を分離できることが望まれる。今後、治療メカニズムの検証や安全で効率的な移植治療法の実現化を目指すためにも組織再生を担う幹細胞を高純度で分離できるデバイスの開発や新たな分離メカニズムの開発はますます重要になるものと思われる。

文 献

- 1) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, **282**, 1145 (1998)
- 2) M. F. Pittenger *et al.*, *Science*, **284**, 143 (1999)
- 3) Y. Jiang *et al.*, *Nature*, **418**, 41 (2002)
- 4) K. Takahashi, *Cell*, **131**, 861 (2007)

第3章 細胞機能解析技術

- 39) D. A. Hammer *et al.*, *Biophys. J.*, 63, 35 (1992)
- 40) C. C. Roberts *et al.*, *Biophys. J.*, 58, 841 (1990)



ビジュアル版

3大疾病の 教科書

がん・心臓病・
脳卒中を
ストップ！

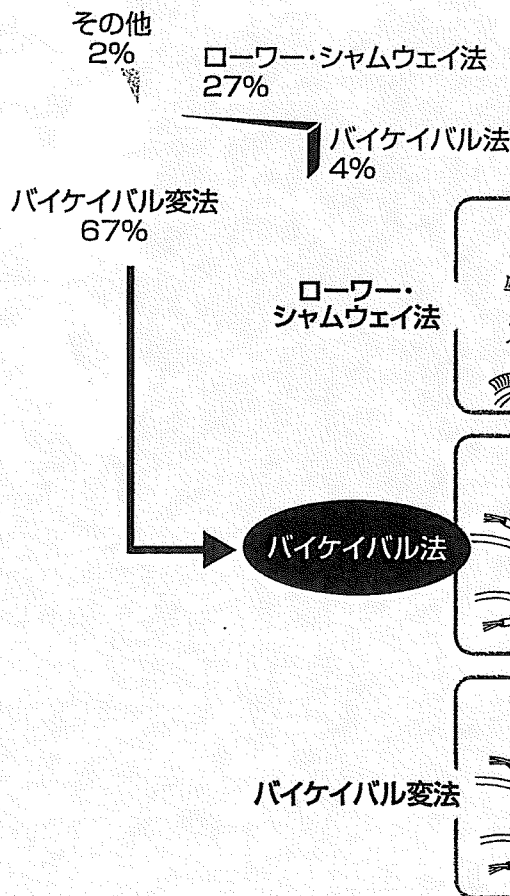
心臓移植医療

49例の心臓移植が7施設で行われている

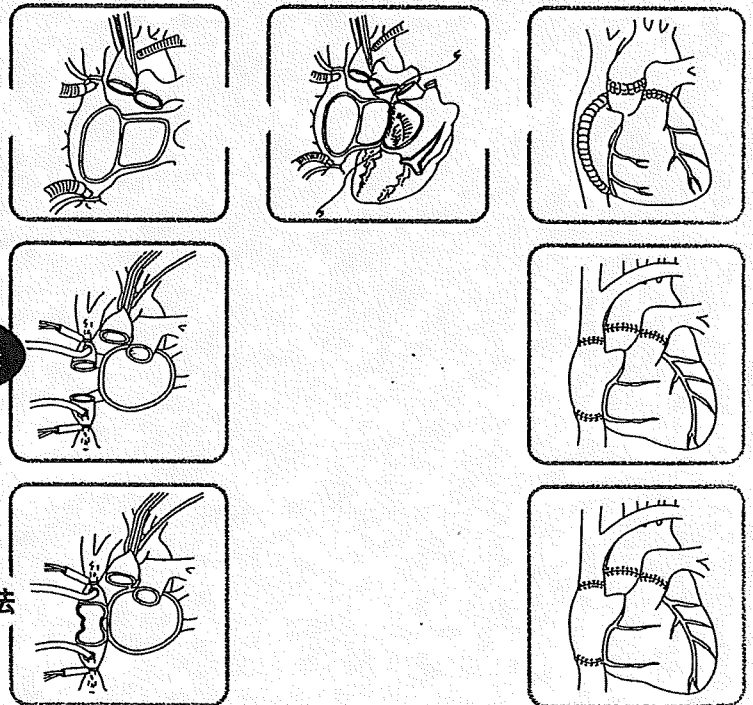
心臓の機能が著しく低下し、内科的あるいは外科的治療に反応しない重症の心不全になると、心臓機能の機械的な補助や置換が必要となります。このため、人工心臓や心臓移植の研究から臨床応用が進められてきました。心臓移植では脳死体からの臓器提供がなされるときに、受け手側との血液型や体格などが適合した場合に行われます。1967年に第1例目が南アフリカで行われ、以後種々の検討が行われ、1980年代からは欧米において重症心不全に対する治療選択のひとつとして受け入れられ、年間4000例以上行われるよ

うになりました。現在では提供数に応じて3000例程度施行されています。わが国では1997年に臓器移植法が制定され、1999年に第1例目が施行されてからこれまでに49例の心臓移植が7施設で行われており、施行数は少ないもののその成績は国際レジストリーよりも良好となっています。心臓移植は、一生免疫抑制剤を服用する必要があり、定期的な検査が必要ですが、適合者があれば新生児から成人まで行うことができます。

わが国における心臓移植手術

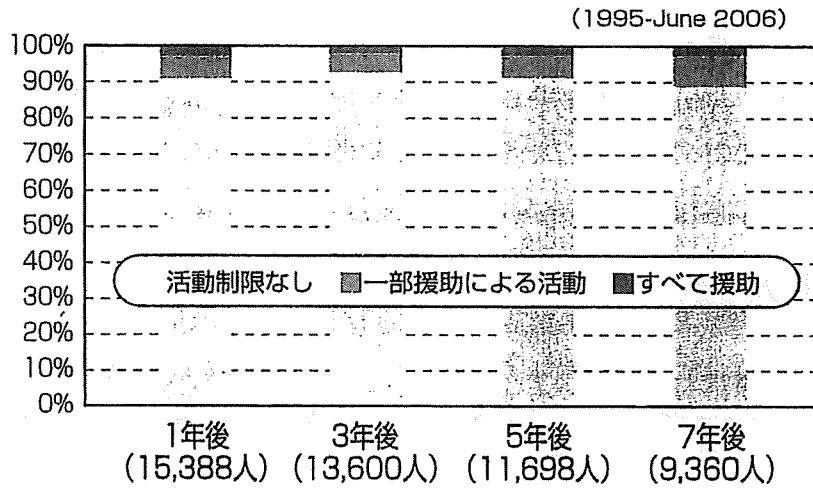


レシピエントの手術では、ドナーとレシピエントの両心房で吻合を行なうローワー・シャムウェイ法と、上・下大静脈で吻合するバイケイバル法があります。また、バイケイバル法を行う際に、レシピエントの右房後壁の一部を温存して上・下大静脈で吻合するバイケイバル変法が国立循環器病センターで開発されました。現在わが国ではこのバイケイバル変法が最も多く行われています。



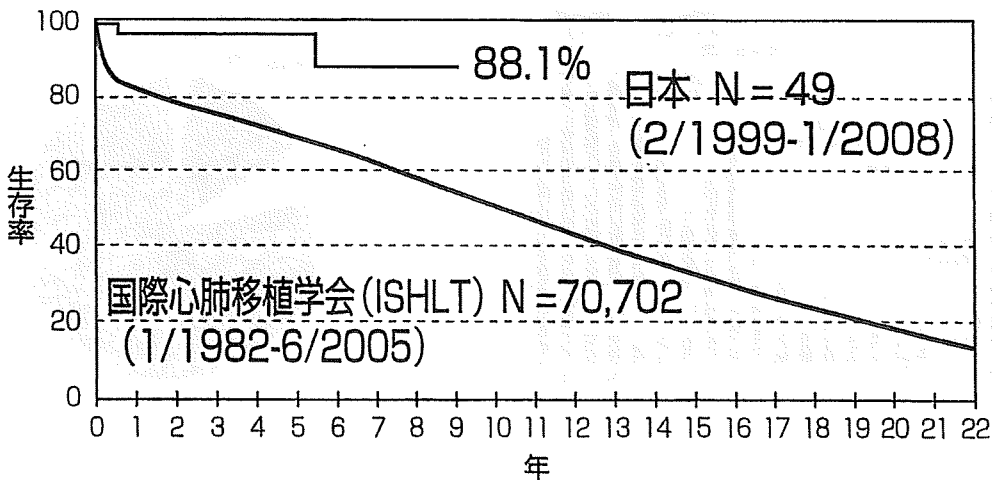
移植後の活動制限

米国における心臓移植後の身体活動に関する移植後7年までの調査において、90%前後の人々が活動制限なしの生活を送っています。



出典：J Heart Lung Transplant 2007;26: 769-781

世界および日本における心臓移植の累積生存率



出典：ISHLTのデータ/J Heart Lung Transplant 2007;26: 769-781
日本心臓移植研究会報告 移植 2007;42: 427-429より改変

人工心臓

人工心臓の開発は続けられ、より性能の高いものを目指している

心臓の機能が著しく低下し、内科的あるいは外科的治療に反応しない重症の心不全になると、心臓機能の機械的な補助や置換が必要となります。このため、人工心臓や心臓移植の研究から臨床応用が進められてきました。

人工心臓には、自然心臓を摘出してとりかえる「全置換型人工心臓」と、自然心臓を残してその近くに設置して機能の100%までの代行を行う

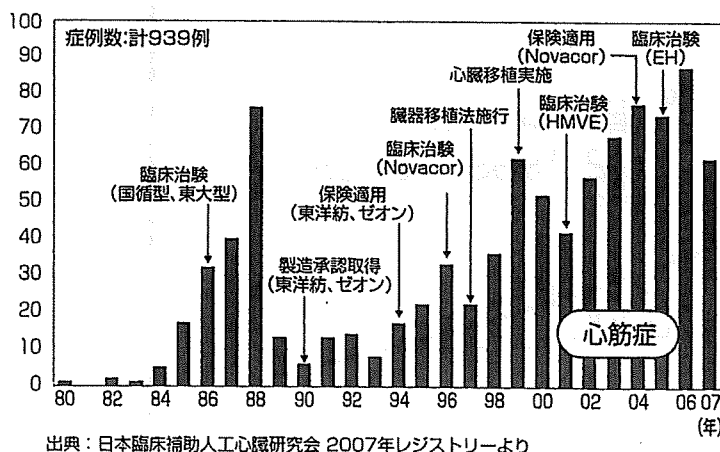
「補助人工心臓」があります。両者の開発、臨床応用が行われていますが、現状では植込み携帯型の「補助人工心臓」の開発・臨床応用が主に行なわれています。また、これまでは自然心臓と同じように拍動をもったシステムが主体でしたが、小型化や長期安定した機能が期待できる「無拍動流ポンプ」を用いた血液ポンプの開発・臨床応用が積極的に進められています。

わが国の現状

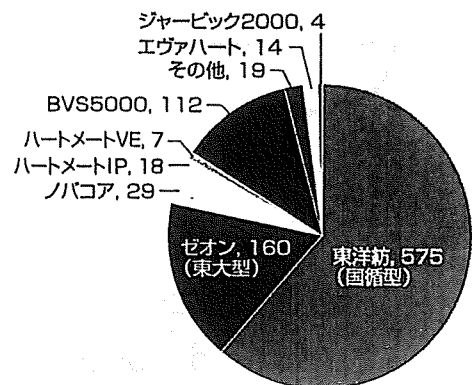
わが国では、1980年に東京大学型補助人工心臓が、また1982年に国立循環器病センター型補助人工心臓が臨床応用されました。その後、それぞれ日本ゼオン・アイシン精機製(東京大学型)、東洋紡製(国立循環器病センター型)として1986年に治験が開始されました。両者とも世界に先駆け

て1990年に製造承認を得、1994年には急性心不全に対する適応に対し、健康保険が適用されるようになりました。また、1992年からは心臓移植の対象となる心筋症に対しても適応されるようになり、現在では半数程度が心筋症への適応となり、東洋紡型が最も多く用いられています。

年次別補助人工心臓適用症例数の推移



血液ポンプ別症例数



補助人工心臓適応患者の生存率

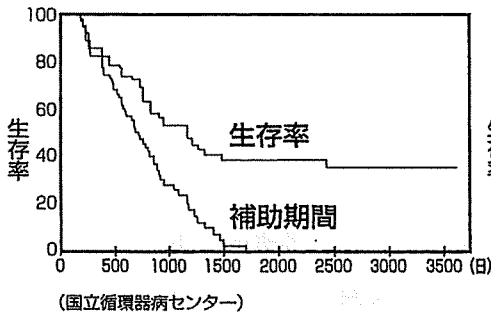
東洋紡製左室脱血方式の左心補助人工心臓を心臓移植対象者に装着した症例においては、最長の補助期間は3年11ヶ月ですが、心臓移植あるいは補助人工心臓装着により自己心臓機能が改善し離脱することで、長期生存が得られており、国立循環器病センターでの5年生存率は38.9%となっています。また、米国では心臓移植適応と

ならない末期心不全患者さんを対象に、体内植込み型左心補助人工心臓（LVAS）のハートメイトVEと、最大の内科的治療の成績を比較する二重盲検試験が行われ、LVAS装着患者さんの成績が良好でした。この結果より、2003年秋には、ハートメイトVEが心臓移植の適応とならない末期心不全患者さんに対するポンプ装着下日常生活への復帰をめざす

機器として認められました。わが国においても、長期在宅治療を目指したLVASの適応について検討が進められています。

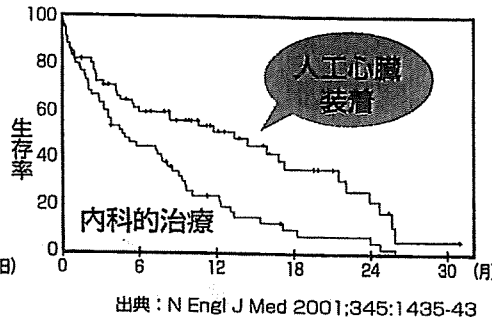
■心臓移植の対象となる患者

東洋紡製左室脱血方式の左心補助人工心臓症例



■心臓移植の対象とならない患者

体内植込み型左心補助人工心臓（ハートメイトVE）症例と内科的治療症例の比較



長期使用目的で用いられる補助人工心臓

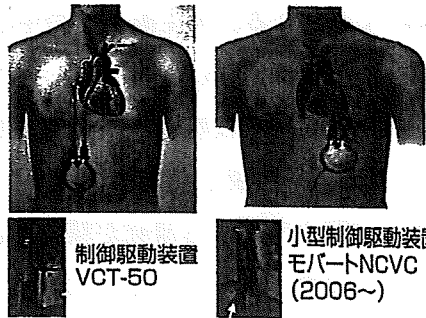
ノバコアLVASは2004年から心臓移植施設における移植登録待機例での適応に対し、健康保険が適用されるようになりました。しかし、治験から8年を経過し、用いるバッテリーが旧式となったため提供が受けられなくなり、新たな適応ができなくなりました。新しい人工心臓としてわが国で

は2種の遠心ポンプを用いた無拍動流体体内設置携帯型LVASの開発が進められており、エヴァハートはわが国で治験が開始され、デュラハートは欧州での治験が終わり、現在わが国での治験準備中です。また、米国で開発された軸流血液ポンプジャービック2000がわが国に導入されており、現在治験準備が進められています。

拍動流体外設置型LVAS

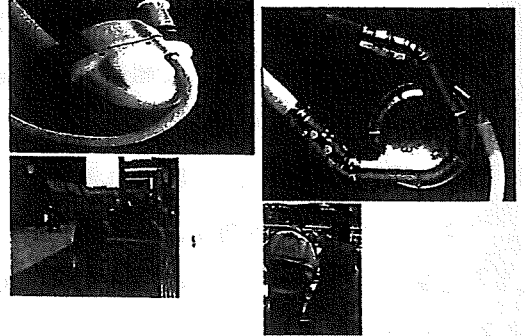
〈東洋紡製国産型〉

左房脱血方式(1982～) 左室脱血方式(1999～)



拍動流体体内設置携帯型LVAS

ノバコアLVAS ハートメイトVE LVAS

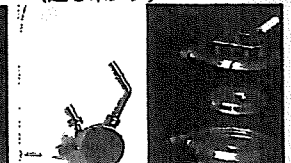
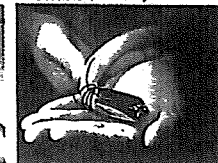
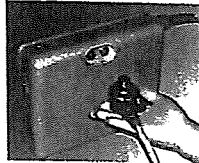


無拍動流体体内設置携帯型LVAS

サンメディカル社
エヴァハート
(遠心ポンプ)

ジャービック2000
(軸流ポンプ)

テルモ社
デュラハート
(遠心ポンプ)



新しい人工臓器

第6項 再生医療用スキャホールドゲル

はじめに

近年、ES細胞や様々な組織幹細胞の発見に続いてiPS細胞の作製が報告され、その分化や増殖に関する生化学的・細胞生物学的、あるいは、分子生物学的進歩がめざましい。これらの有用細胞をいかにして組織や臓器へと導くかが、再生医療成功のための鍵となると期待され、様々なスキャホールド材料の開発が進められている。生体内では、多様な細胞外マトリックス(Extra Cellular Matrix)により、細胞の接着や3次元配置のみならず、その分化や増殖をも精密にコントロールされている。これらのECMの機能性は、特異的なアミノ酸配列などによる生物学的活性のみならず、その力学的特性や含水特性にも大きく関与している。本項では、再生医療における、いくつかの含水性合成スキャホールドについて紹介する。

1 再生医療

1993年、R. Langerらは、スキャホールド(Scaffold, 足場材料)と呼ばれるポリグリコール酸(PGA)の不織布に軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な軟骨の再生が誘導できること、さらに、この手法が、肝臓、腸、尿管、骨などへ展開できる可能性を示唆した¹⁾。その後、1996年以降、我が国では“再生医工学”という領域として発展した。このような、マトリックと細胞とを融合させるアイデアは、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにして検討されていた。コラーゲンゲルと線維芽細胞や表皮細胞を組み合わせた皮膚の再生が次々と報告された。

その後の研究の進歩とともに、ますます再生医療の手法は広がりを見せてきた。その戦略を図1に整理した。まず、再生医工学と細胞移植に大別される。再生医工学の中心は、生分解性スキャホールドに細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略である(図1-②、③)。これに対して、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は、組織再生誘導法(GTR, Guided Tissue Regeneration)と呼ばれる(図1-①)。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ことで、ある期間、末梢神経が再生する空間を確保する研究が精力的に進められた。また、多孔質のコラーゲンスポンジが人工真皮として開発され、*in vivo*での真皮再生が報告されている。初期に利用されたポリグリコール酸やポリ乳酸のスポンジや不織布などの多孔質体をスキャホールドとして利用する場合で、その高い疎水性のために水分を多く含む軟組織との親和性には問題があった。一方、含水性のコラーゲンゲルをスキャホールドとして用いた場合は、ECMが有する優れた組織親和性を発揮する。図2には、ポリグリコール酸のような疎水性スキャホールドと、コラーゲンスキャホールドに対する組織再生の違いについて示した。ポリグリコール酸や

ポリ乳酸などの場合でも表面の細胞親和性が確保できれば、多孔質構造中へと細胞が侵入してマトリックス表面に細胞が接着する(図 2A)。しかしながら、疎水性が高い PLA では、加水分解によってバルク体積が減少して、その結果大きくなった空隙部分で細胞が増殖するというステップが律速であるために、生体の治癒能力を十分に生かしきれない。それに対して、コラーゲンなどの含水性のスキャホールドにおいては、含水特性と生体分解性、さらに、高い組織親和性のために、周囲細胞がバルク内部へと浸潤することで極めて速やかな組織置換・組織再生が期待できる(図 2B)。近年、生体由来材料に対する感染などが懸念され化学合成材料に期待が寄せられている。実際に、合成材料でハイドロゲルを作成することは容易であるが、一般的な化学合成材料表面には細胞が接着できず、その結果、細胞増殖さえも抑制されてしまうために、組織再生は期待できない(図 2C)。すなわち、組織親和性(細胞接着性)に加えて、含水性をも併せもつ化学合成ハイドロゲルを開発することが有用である。

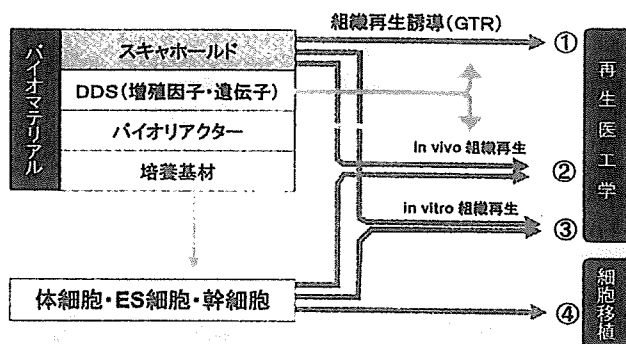


図 1 再生医療の戦略

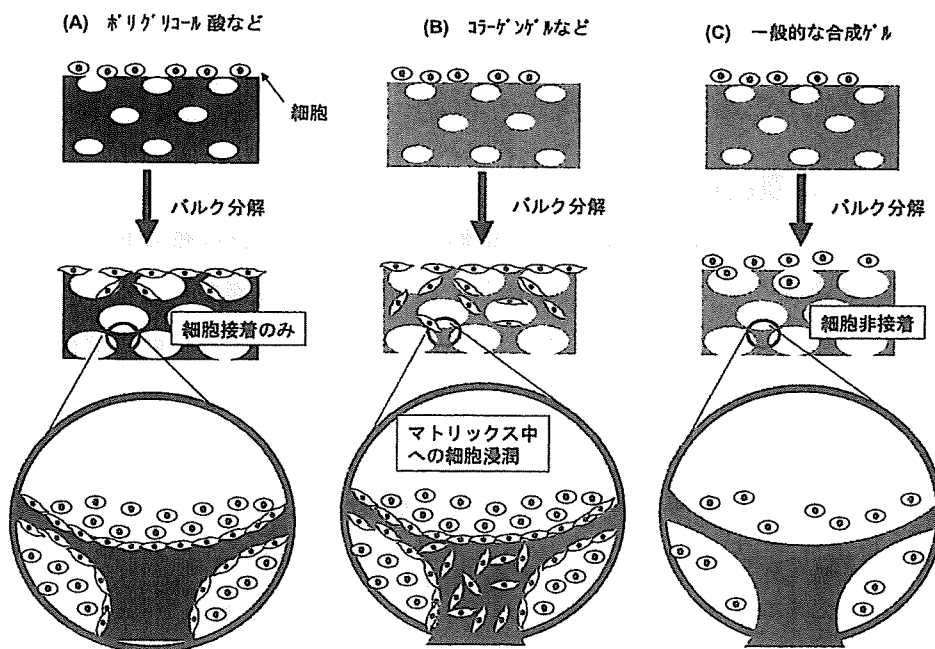


図 2 含水性スキャホールドの能動的組織誘導

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、幹細胞や体細胞などを欠損部位に注入する方法である。近年、様々な細胞ソースが見い出された結果、この細胞移植に対する期待が大きく、臨床化も急速に進んでいる。特に自己幹細胞を移植することによる心疾患²⁾やパーキンソン病³⁾の治療において優れた効果が報告されている。しかし、これらの先進的手法が、一般的な治療法となるには解決しなくてはならない課題もまだまだ多い。疾患部位に直接細胞を注入するために、生体内深部や複雑な形状の疾患領域に対しても、低侵襲的に治療を行うことができるが、細胞懸濁液を組織中に注入した場合の細胞の生着率は極めて低く、その結果、治療効果が十分に発揮されない。そこで、なんらかの外部刺激によってゲル化するような材料がインジェクタブルスキャホールドとして注目を集めている(図3)。従来は光硬化性が広く研究されたが、我々は、さらに毒性の引く材料を用いて温度応答的にゲル化するインジェクタブルスキャホールドの研究を進めてきた。以下、これらのマトリックスゲルについて紹介する。

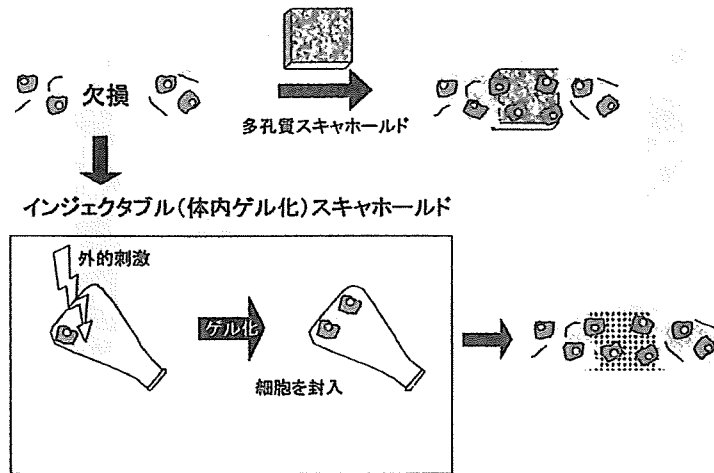


図3 生体内刺激によりゲル化する含水性スキャホールド

2 マルチブロック共重合体ゲル

生体内で吸収されるという性質の反面、ポリ乳酸の優れた力学特性は魅力的な特徴である。高分子量・高光学純度・高強度のポリ-L-乳酸(PLLA)が生体吸収性の骨固定ピンとして応用され^{4,5)}、他の環状モノマーと共重合体させた柔軟なランダム共重合体が吸収性の外科用縫合糸として用いられてきた^{6,7)}。これらの材料の安全性が高いことから、多孔質体に成形されてスキャホールドとして用いられてきたが、前述のごとく含水性を付与することが大切である。

ポリ乳酸などに含水性を付与する一般的な手法は、親水性ポリエーテルの両末端の水酸基を開始点とするラクチドの開環重合によるトリブロック共重合体の合成である(図4)。1984年、ポリ乳酸-ポリエチレングリコール-ポリ乳酸トリブロック共重合体が初めて報告された。その後、

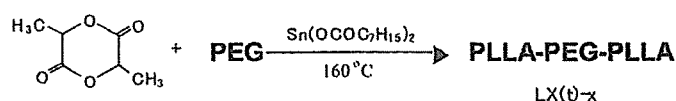
ポリエーテル組成が比較的高いトリブロック共重合体が薬物担体として利用され、1992年以降その論文数は爆発的に増加した。しかしながら、力学強度を要求されない薬物担体としては有用であるが、組織再生スキャホールドとして用いるには大きな問題があり、我々は、高親水性かつコラーゲンゲルのように組織再生を誘導するスキャホールド材料として研究してきた^{8,9)}。

一般的には、フィルムや繊維あるいはスポンジなどのバルク材料として利用する場合には、問題がある。目的とする材料に要求される3つの条件を以下に示した。

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

これら3つの条件を満たす共重合体を考えると、トリブロック共重合体の限界が見えてくる。例えば、分子量20,000のPEGを使用して、分子量が100,000の共重合体を作製するには、PLA-PEG-PLAの各ブロックの分子量は、40,000-20,000-40,000となり、PEG組成は20%となる。さらなる親水化を目指してPEG組成を上昇させるには、PLAの分子量を低下させて、15,000-20,000-15,000(総分子量=50,000、PEGの分子量=20,000、PEG組成=40%)とするか、あるいは、PEGの分子量を上げて例えば、30,000-40,000-30,000(総分子量=100,000、PEGの分子量=40,000、PEG組成=40%)とするしか手段はない。すなわち、上記の第一条件、あるいは、第三条件が満たせなくなり、トリブロック共重合体法では目的の材料合成は不可能であり、(ポリ乳酸-ポリエーテル)_n型マルチブロック共重合体が有用となる(図4)⁸⁾。

トリブロック共重合体の合成法



マルチブロック共重合体の合成法

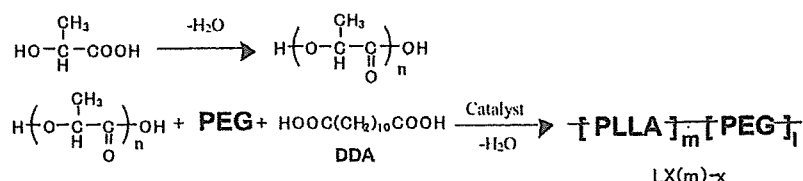


図4 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の合成法

得られたマルチブロック共重合体のポリエーテル組成と分子量との関係を図5に示した。ポリエーテル組成の上昇と共に共重合体の分子量が低下するトリブロック共重合体(●印)とは異なり、マルチブロック共重合体(○印)では、ポリエーテル組成に関係なく分子量100,000以上を突

現していることがわかる。そのために、速い分解速度と親水性表面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利用できる材料となった。さらに、図6には、これらのブロック共重合体の含水特性の結果を示した。ポリエーテル組成が87%の場合には自重の5倍の含水性を有し、ラット皮下への埋入実験において、カプセル化反応が極めて軽微であるというバイオイナートナ特性を引き出すことが証明された⁹⁾。

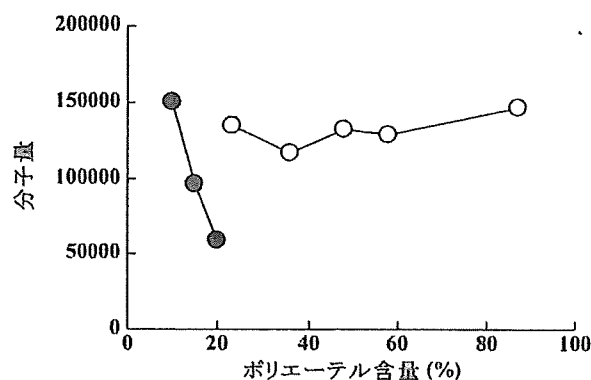


図5 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の組成と分子量の関係

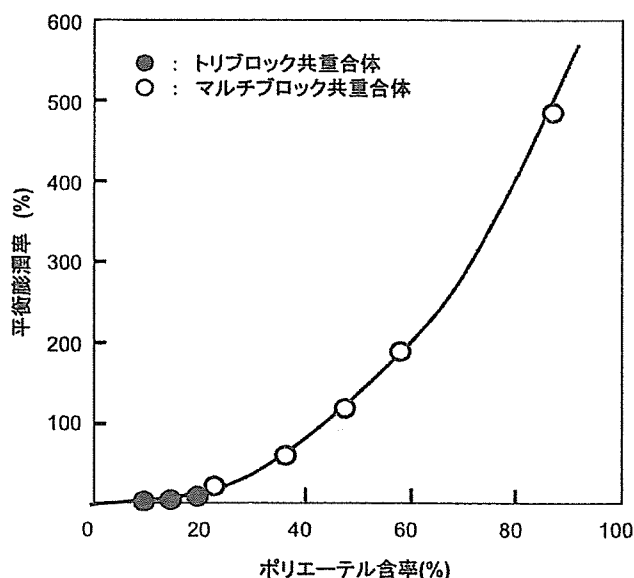


図6 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の組成と平衡膨潤率の関係

次に、前述したように含水性に加えて細胞接着性を付与する必要がある。我々は、コラーゲンなどの生体由来材料とのコンポジットや、化学修飾法による新規物質の導入は、その医療応用開発速度を遅くすると考え、無機物質とのコンポジットを進めた。すなわち、含水性マルチブロック共重合体をベースに、田口らにより報告された交互浸漬法¹⁰⁾によって、無機微細結晶とのコン

ポジット材料を調整し、生体吸収性多孔質創傷被覆材を作製した(図7A)。ラット皮膚前奏欠損モデルへの適応1ヶ月の所見では、ほぼ完全に組織再生が完了し、毛細血管網も構築されている(図7B)。この所見は、コラーゲンをベースにした比較実験に匹敵する組織浸潤性であり、今後のさらなる物性最適化により、完全合成の含水性人工真皮として期待される。

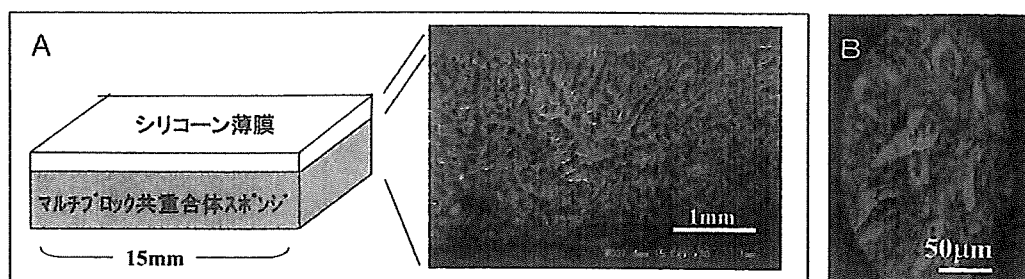


図7 マルチブロック共重合体多孔質体をベースにした人工皮膚(A)と in vivo 組織再生(B)

3 温度応答性ゲル化スキャホールド

臨床化が大いに期待される幹細胞移植術であるが、細胞注入を支援する材料として、体内で水溶液から含水ゲルへ変化するインジェクタブルスキャホールドが注目されている。我々は、体温付近にLCSTを有するポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を多糖側鎖にグラフト重合した、くし形共重合体を合成し、25度で溶液でありながら37度に昇温するとゲル化するインジェクタブルスキャホールドを開発した。しかしながら、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)は生体内で分解も吸収もされず、必ずしも最適な材料ではない。そこで、新たな試みとして、ポリ乳酸とポリエチレングリコール(PEG)という、生体内での利用実績に優れる2つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性を実現させる検討を進めた。

図4に示したようなトリブロック共重合体が水中で形成する、いろいろなミセルをAFMで観察していた時、ある条件を満たしたミセルが、加熱処理によってナノ繊維構造に変化することを、偶然、見出した¹¹⁾。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセル同士が相互作用(コアを形成するポリ乳酸部分が、コロナ構造を形成するPEG層を乗り越えて融合)する必要がある。そこで、ポリ-L-乳酸からなるミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸からなるミセル(D体ミセル)の分散液を混合することを発案した(図8A)。というのも、加熱により隣接するL体ミセルとD体ミセルが融合すると、ステレオコンプレックスミセルが形成し、その結果、図8Bに示すように3次元架橋構造が成長してゲル化するというアイデアである。ポリ乳酸のステレオコンプレックスは、ホモ結晶に比べて融点が約50℃も高い安定な構造であることも、ゲル化を促進して安定化することに寄与すると考えられる。実際に、共重合組成などを調節して37℃でゲル化することに成功したインジェクタブルスキャホールドの写真を図9に示した。X線散乱測定により、温度

上昇とともにステレオコンプレックス結晶が成長することでゲル化することも証明された。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないために、細胞生存率を下げることなく、対象部位に細胞を注入できる材料となる。混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク)組換えマウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、アガロースゲル中で昇温ゲル化させた3日後にも、細胞は正常な携帯とGFP発現機能を維持することが確認され、移植細胞の生存期間や治療効果について、現在検討を続けている。

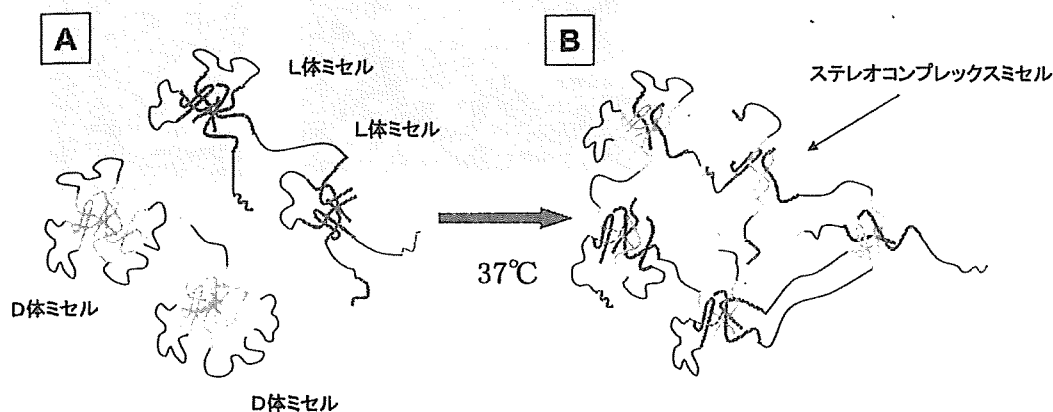


図8 L体ミセルとD体ミセルの混合液は、加温によりゲル化し、細胞移植用のインジェクタブルスキャホールドとなる

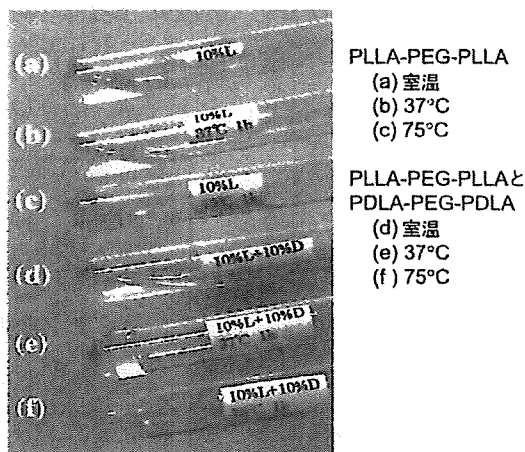


図9 L体ミセルとD体ミセル混合液(d)は、37度に加温することで透明なゲルに転移する(e)。それに対して、L体ミセルのみの分散液(a)は75度で白濁はするがゲル化には至らない

おわりに

再生医療の研究が進むとともに、得られた有用細胞を組織や臓器へと3次元構築する困難さが明らかになり、また、もっとも単純と思われる自己細胞移植でさえ多くの問題が浮上している。ますます加速する幹細胞研究に後れを取らないように、工学技術の開発研究を進めなくてはならない。

参考文献

- 1) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920-926 (1993)
- 2) Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura, H. Mori, *Nat. Med.*, 12 (4), 459 (2006)
- 3) S. W. Kim, H. Han, G. T. Chae, S. H. Lee, S. Bo, J. H. Yoon, Y. S. Lee, K. S. Lee, H. K. Park, K. S. Kang, *Stem Cell*, 24, 1620 (2006)
- 4) J. Mauduit, E. Perous, M. Vert : *J Biomed Mater Res*, 30, 201-207 (1996)
- 5) Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada : *J Biomed Mater Res*, 30, 553-558. (1996)
- 6) R.E. Johnson, L.A. Lanaski, V. Gupta, M.J. Griffen, H.T. Gaud, T.E. Needham, H. Zia : *J Controlled Release*, 17, 61-67 (1991)
- 7) N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, R. Jerome, P. Teyssie : *Pharm Res*, 11, 1479-1484 (1994)
- 8) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura : *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 37, 1513-1521 (1999)
- 9) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Fujisato, C. W. Lee, T. Tsuji, T. Ohta, A. Murakami, and Y. Kimura : *J. Biomed. Mater. Res.*, 54 (4), 470-479 (2001)
- 10) T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi : *J Biomater Sci Polym Edn*, 10, 331-339 (1999)
- 11) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208 (2001)