



ポリ乳酸をベースにした 再生医療用バイオマテリアル

国立循環器病センター研究所 生体工学部 部長
山岡 哲二



1. はじめに

ポリ乳酸(PLA)をはじめとするポリ α ヒドロキシ酸は、体内や自然界で適当な期間で加水分解されるために、さまざまな応用範囲が検討され、一部の医用材料として実用化されてきた。近年、その価格が劇的に安くなり、汎用高分子としても利用が検討される一方、医療分野においては、再生医療の発展とともにさらに高次の機能性付与が望まれている。再生医療とは「生体や細胞が本来備えている再生能力や治療能力を利用した治療法」などと説明されるが、実際には再生能力や治療能力を利用していない治療法はないので、あまりよい説明ではない。再生医療の“再生”という用語のルーツは日本にある。1996年、日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業に“再生医工学”という分野が立てられた。プロジェクトリーダーであった京大生体医療工学研究センターの篠義人教授(現 奈良県立医科大学教授)によると、概念的には、後述する組織工学(Tissue Engineering)であったようだ。その“再生”は十分な市民権を得て、今では海外でもRegenerative Medicineという用語が一般的である。



2. 生体吸収性医用材料

生体における機能性を追求するなら生体由来の材料、特に細胞外マトリックス(ECM)の成分が有効であろう。細胞接着のみではなく、細胞の分化や増殖にもさまざまな影響をもつと考えられている。これら天然由来の材料に対しては生体内にその分解酵素が存在することが多いので、優れた分解性材料となり、コラーゲンの組織親和性に代表されるような生物学的機能性をも期待できる。生体由来材料であっても¹⁾、セルロースやデキストラン、あるいは絹(フィブリン)のように対応する分解酵素が生体内にない場合や、結晶性が高く加水分解速度

が極めて小さい場合もある。この場合、化学修飾により吸収速度を上昇させるなどの検討が進められ²⁾、例えば酸化再生セルロース製の癒着防止膜³⁾や止血剤⁴⁾が臨床応用されている。一方、合成高分子の場合にはモノマー単位の化学構造とその結合様式によって、非酵素的加水分解速度が一義的に決定される。PLAやポリグリコール酸(PGA)、あるいはその共重合体などの生体内での加水分解速度が、多くの疾患の治療に要する期間にうまく適合するために、縫合糸・骨固定ピン・組織再生スキャホールドなどの医療用途が検討されてきた。

私たちのグループでは、再生医療を支援する工学技術の開発を目指して、PLAを一成分とする機能性スキャホールドの開発を進めてきた。従来のスキャホールドの多くは、組織の接合や隔離、あるいは空間の確保など物理的機能の利用にとどまっておき、生体材料として特異的かつ優れた機能性を発揮しているわけではない。本稿では、ポリ乳酸をベースとしたいくつかの共重合体の合成とその機能性について、紹介させて頂きたい。



3. 再生医療

組織や器官が大きな損傷を受けると正常に修復されることはない。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、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。さらに1993年、R. Langerらはスキャホールド(Scaffold、足場材料)と呼ばれた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(図1)⁵⁾。実はこのようなマトリックス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。フィーダーレイヤー (Feeder Layer) 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。その後、上述の軟骨再生へと展開され、さらに1988年にはヒト胚性幹細胞の単離が報告され、その後も続々と組織幹細胞が発見されると、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題が解決するとの期待がふくらみ、ますます研究は盛んになった。

現在の再生医療を内容的に整理すると図1ようになる。まず、再生医療は再生医工学と細胞移植に大別できる。再生医工学の中心は、生分解性マトリックス(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)。上述の例では、スキャホールドとして、PGA不織布やコラーゲン多孔質体が使われている。図1の①は、スキャホールドのみを使って、組織再生を試みる戦略である。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ぐことで、末梢神経が再生する空間を確保するこの手法は組織再生誘導法(GTR: Guided Tissue Regeneration)と呼ばれる。これまでに、歯周組織や顎堤への検討が進んでいる。

また、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。彼らの手法では軟骨再生の場を確保するために創部を骨膜でカバーしており、外科的手法によるGTR効果も組み合わされている。現在、最も進んでいるのがこの細胞治療ということもできる。特に自己細胞移植では、認可などの問題も少ないことから臨床研究、および医師主導型の治験システムへのアプローチが進められ、間葉系幹細胞や骨格筋細胞を移植することによる心疾患の治療、あるいは同様のアプローチによるパーキンソン病の治療なども精力的に検討されている。

4. ポリ乳酸のバルク特性制御

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ている(図3)。^{6,7)} また、グリコリドやラクチドを他の環状モノマーと共重合させて、結晶性を低下させることで得られる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

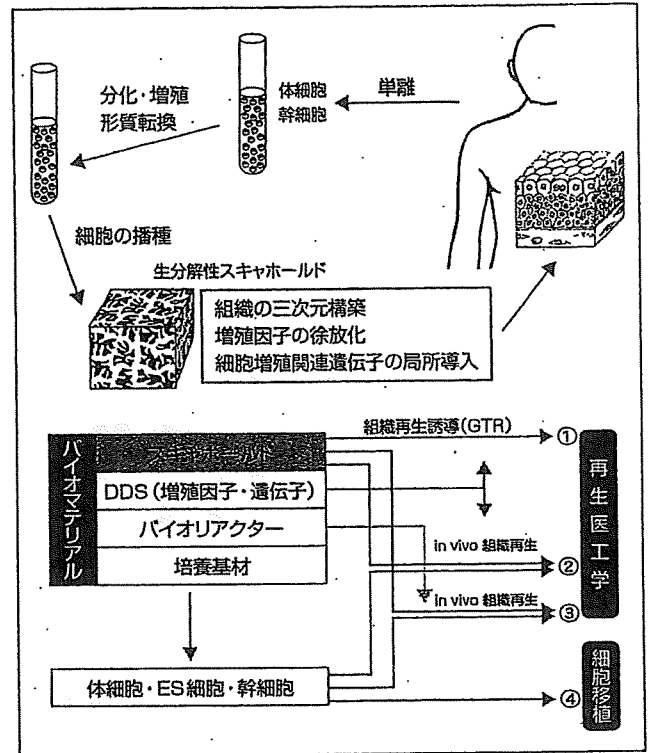


図1 再生医療の戦略

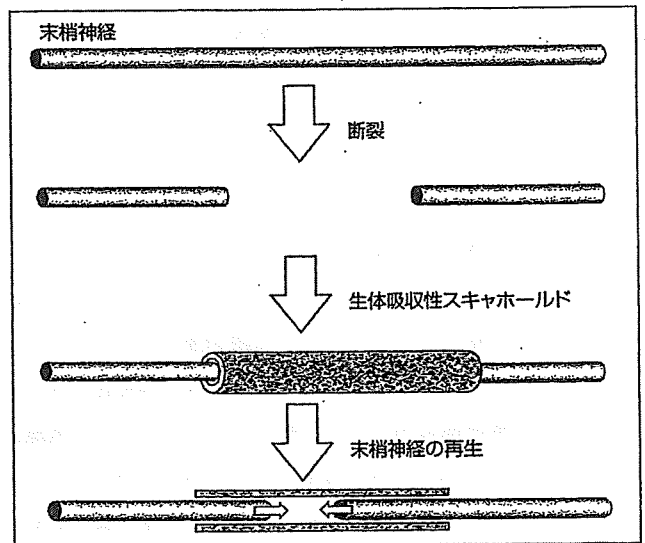


図2 GTRによる組織再生

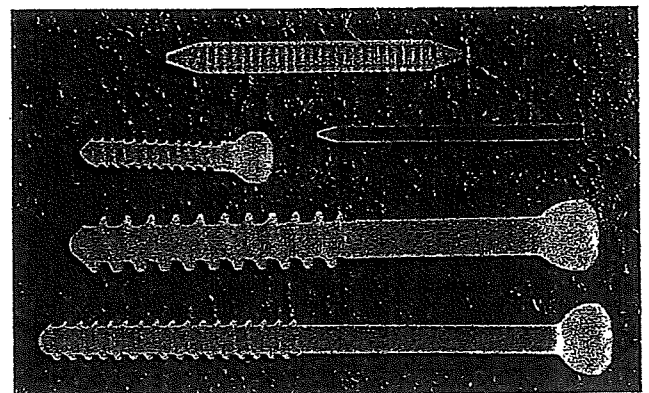


図3 ポリ-L-乳酸製の生体吸収性骨固定ピン

用いられている^{8,9)}。すなわち結晶化度を制御することによる物理的な性質の最適化が図られている。一方、再生医工学では、スポンジや不織布などの多孔質体がスキャホールドとして利用されてきたが、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、軟骨再生や皮膚組織再生において、含水性のコラーゲンをスキャホールドとして利用する有効性がよく知られている。図4は、従来のポリ乳酸スキャホールドのような疎水性スキャホールドと、含水性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。いずれの場合にも、スキャホールド表面の細胞親和性が確保できれば、多孔質構造中へ細胞が侵入する。従って、3次元組織構築のために、さまざまな多孔質スキャホールドが開発されてきた。一方、含水性のスキャホールドにおいて高い組織親和性が達成された場合に周囲細胞がマトリクス内部へと浸潤することができる。

このような場合には早期の組織置換・組織再生が期待できる。これに対して疎水性が高いPLAでは、加水分解によってバルク体積が減少して間隙が拡大するステップが律速であるために、生体の治癒能力を十分にいかしきれない。スキャホールドの分解速度を上げて細胞増殖速度に一致させる努力がなされているが、これは容易ではなく、やはり生体側のアプローチにより組織が再生するというメカニズムが望ましい。

我々は、PLAと水溶性ポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体を開発し、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^{10,11)}。一般的には、上述のトリブロック共重合体はPEG末端の水酸基を開始点とするラクチドの開環重合により合成される。PEG組成が高いトリブロック共重合体は、薬物担体や上述のような細胞移植材料として有用であるが、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。
- PEG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PEG組成が必要。

これら3つの条件はトリブロック体では達成不可能であり、(AB)_n型マルチブロック共重合体が必須となる(図5)。オリゴ乳酸とPEGを直接縮するのために、所定量のデカンジカルボン酸を添加し、さらにジフェニルエーテルを溶媒として環流した。

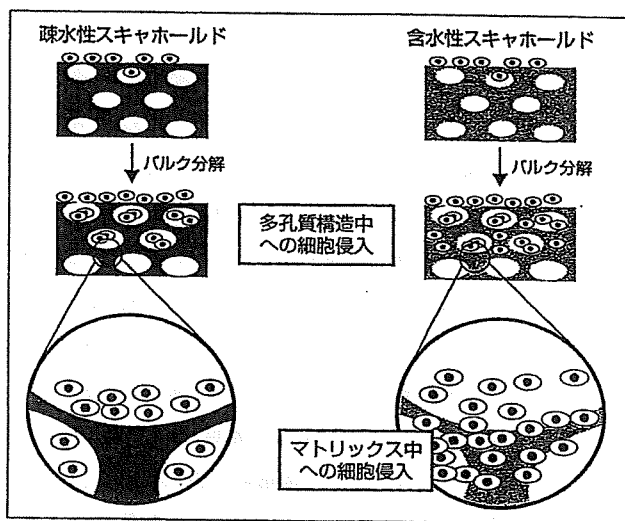


図4 含水性スキャホールドの能動的組織誘導

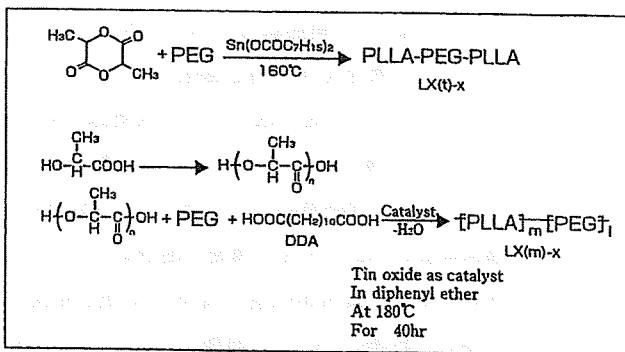


図5 ポリ乳酸-ポリエーテルマルチブロック共重合体の合成法

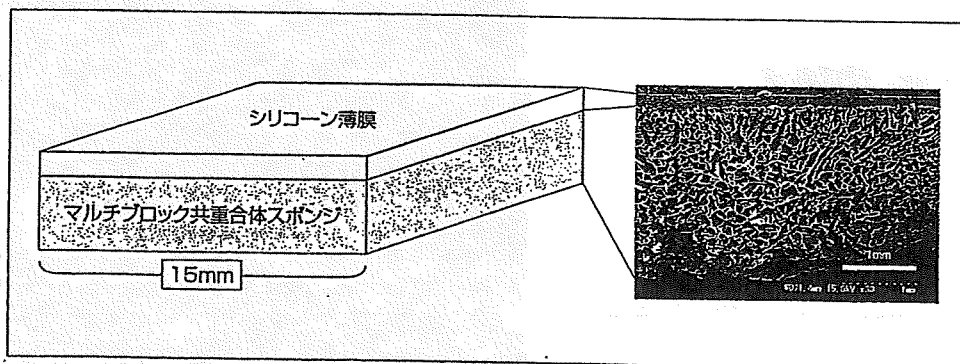


図6 マルチブロック共重合体をベースにした人工皮膚

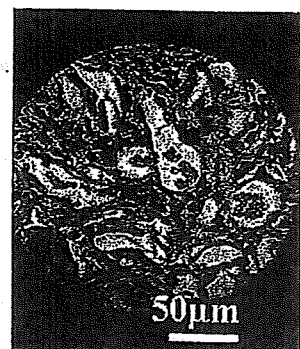


図7 再建した皮膚組織の組織切片

PEG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とは異なり、マルチブロック共重合体ではPEG組成に関係なく高分子量を合成することができた。さらに速い分解速度と親水性表面を有しながらも十分な初期破断強度を有する繊維、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなどを調製することが可能となった。PEG組成の上昇とともに、含水率が上昇し、ラット皮下に埋入実験においてカプセル化反応が極めて軽微であることが明らかとなった¹²⁾。これらの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によって、ハイドロキシアパタイトとのコンポジットを調整し生

体吸収性多孔質創傷被覆材を作製した(図6)¹³⁾。結果の一例を図7に示すが、埋入1ヵ月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た。この所見は、コラーゲンをベースにした比較実験とほぼ同等の組織浸潤性であった。

5. ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾

細胞親和性に優れた合成スキャホールドの一例として、細胞接着性ペプチドを結合させたハイドロゲルが検討されている^{14,15)}。特にRGD配列は、多くの細胞の接着を向上させるために、長年バイオマテリアル研究において検討されてきた。しかしながら、側鎖に官能基をもたないPLAやPGAの表面修飾反応は容易でなく、図8に示したようなさまざまな修飾法が試みられている。

多くの活性ペプチドは水溶性に富むので、単純な物理コーティングだけでは安定かつ効率よい修飾は困難である(図8A)¹⁶⁾。それに対して、図9に示したように保護官能基を側鎖に有する環状モノマーをラクチドやグリコリドと共重合することにより得られる、官能基導入型の誘導体は非常に有用な共重合体である(図8B)。例えば、ベンジルマロラクトナート(図9-1)からポリβリンゴ酸(図9-2)¹⁷⁾、また、マライドジベンジルエステル(図9-3)からはポリαリンゴ酸が合成できる。我々のグループでは、リンゴ酸とグリコール酸の環状二量体モノマー(BMD、図9-7)の開環重合によりαリンゴ酸とグリコール酸の共重合体(図9-8)を得た^{18,19)}。少量のBMDとL-ラクチドを共重合した後に脱保護すると、側鎖にカルボキシル基を有し、親水性、高い分解速度、および十分な強度を兼ね備えたポリ乳酸誘導体が得られる。10モル%のリンゴ酸単位を含む共重合体の側鎖にカルボジイミド法によりRGDトリペプチドを化学固定したところ、1mgの共重合体当たり6.3μgのRGDを固定化することができた。これは、基材表面が完全にRGDで覆われる量に相当し、培養系において細胞接着性の飛躍的な向上と、増殖性の改善が確認された。これらの化学修飾法は極めて確実で有効な手法ではあるが、カルボキシル基や、アミノ基といった官能基を主鎖に導入すると、結晶性の低下と、親水性の上昇、さらに、おそらくは自己触媒作用により、分解速度が著しく上昇し、力学的強度の低下も懸念される。

そこで、我々は、ポリ乳酸不織布やポリ乳酸スポンジの表面のみをアルカリで加水分解することで、カルボキシル基を導入し、さらに生理活性ペプチドや、タンパク質を固定化することに成功し(図8C)²⁰⁾、その応用として血管再生について検討してきた。1990年代より、骨髄細胞を播種した再生型人工血管の有用性に関する研究結果が報告され²¹⁾、現在までに東京女子

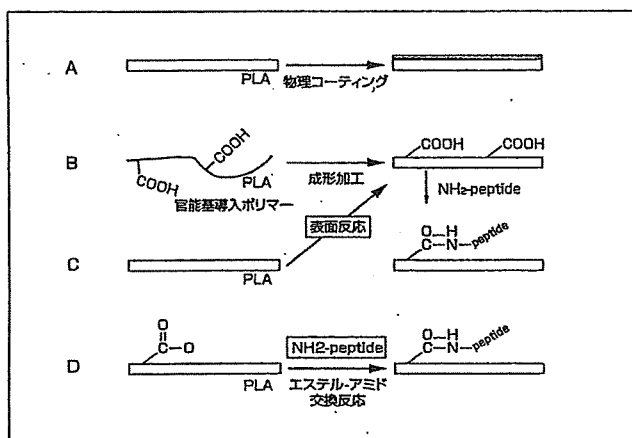


図8 ポリ乳酸の表面修飾

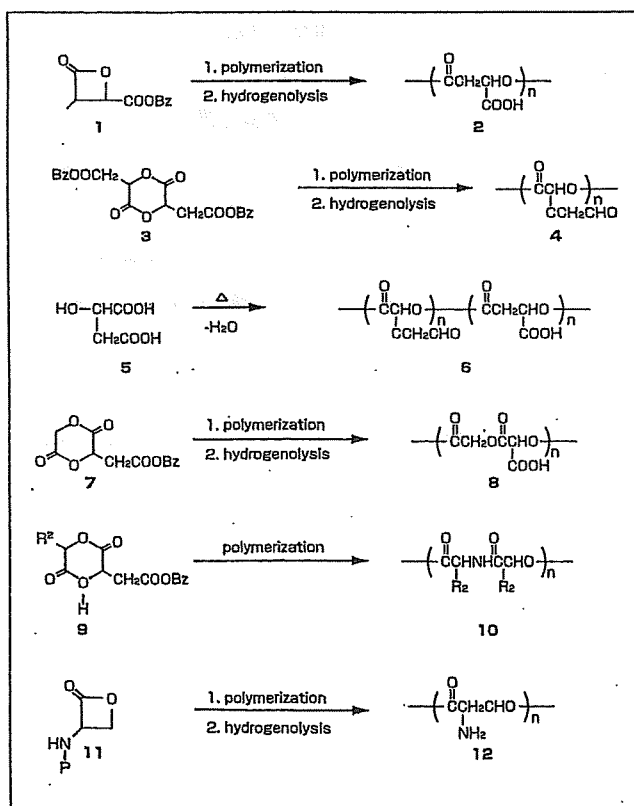


図9 側鎖を有するポリ乳酸誘導体の合成

医科大学のグループは、骨髄細胞を利用した再生型人工血管の優れた成績を報告している²⁰⁾。患者本人の細胞の利用については、免疫応答などをあまり考慮しなくてよいので、将来的に極めて有望な治療法である。特定の細胞を単離することなく採取した骨髄細胞を再生術に使用する手法のほかに、採取した骨髄細胞から接着性の高い細胞群(間葉系幹細胞が多く含まれている)を用いる手法がある。しかしながら骨髄細胞中には幹細胞は2%程度しか存在せず、その効率は必ずしも満足できない。さらに、フローサイトメーター(FACS)やマグネティックビーズ(MACS)を用いて、細胞表面マーカータンパクの有無によるセレクションの技術が用いられているが、細胞生存率の低下と、操作の煩雑さという問題点が残る。そこで、我々のグループでは、東京女子医科大学との共同で、図10に示したように骨髄細胞中のCD34陽性細胞のみを特異的に吸着する多孔質スキャホールドとして、スキャホールド材料表面に抗CD34抗体を固定化した多孔質体を作製した。これを、循環型バイオリクターシステムにセットし、イヌより採取した骨髄細胞を通液したところ、CD34陽性細胞がスキャホールド表面に効率よく集積するという結果を得ている。

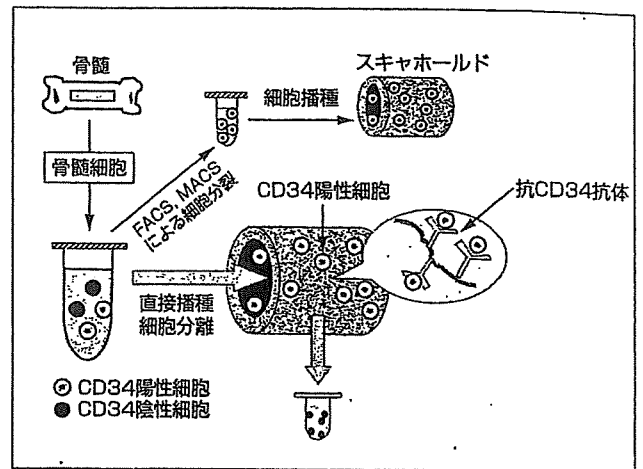


図10 幹細胞特異的吸着能を有する再生人工血管スキャホールド

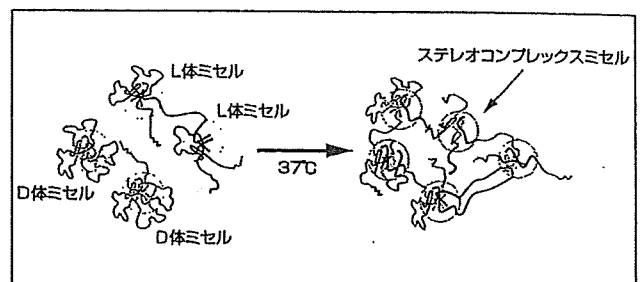


図11 L体ミセルとD体ミセルの混合懸濁液は、温度にตอบสนองしてゲル化するインジェクタブルスキャホールドとなることを見いだした

6. インジェクタブルスキャホールド

図1の④に示した細胞移植術が大きな注目を集めていることは上述の通りであるが、実際に細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、細胞を効率よく患部に留められないという問題がある。すなわち、注入した懸濁液が組織外に漏れだすことが多い。そこで、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生体吸収性材料(インジェクタブルスキャホールド)が注目されている。従来、光反応性基や、化学反応性基、あるいはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーを応用することでインジェクタブルスキャホールドが開発されてきたが体内での安全性が十分に確保されているとはいえない。そこで我々は、PLAとPEGという、生体内での利用実績に優れた2つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発を進めた。

まず、PLA-PEG-PLAトリブロック共重合体が、水中ではPLAコアとPEGコロナ(外層)からなるミセルを形成することは1980年代から知られている。我々の研究グループは、京都工芸繊維大学 木村良晴教授らとの共同研究の中で、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

いだした²¹⁾。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PLLA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)の分散液を混合した(図11)。なぜなら、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すると考えられるからである。その結果、図11に示すように3次元架橋構造が成長しゲル化するという仕組みである。相転移温度を体温付近に調節するためにポリ乳酸セグメント、およびPEGセグメントの分子量や量組成比を最適化した。ポリ乳酸のステレオコンプレックスが、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12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とともに、ゲル形成現象が進行することが確認された。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

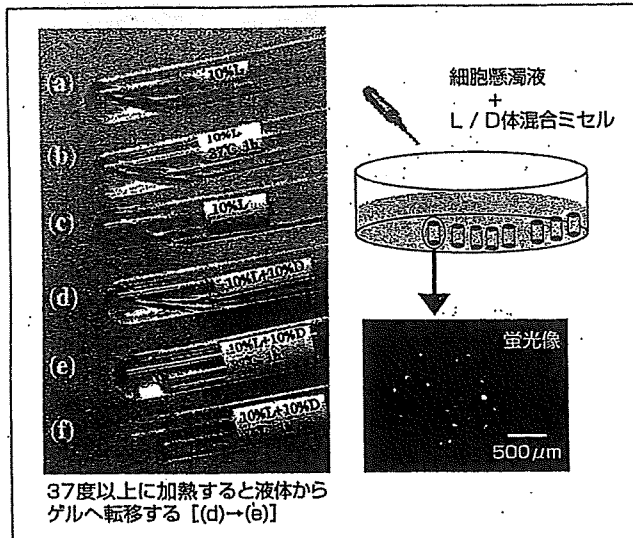


図12 PLA-PEGインジェクタブルスキャホールドに封入されたGFP発現細胞は、ゲル中でも生存できることが蛍光顕微鏡で確認できる

なく対象部位に細胞を注入できる材料と考えられる。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発現機能を維持していることがわかる(図12)。現在、GFP(-)マウスへの同種同形移植モデルシステムにおいても細胞の安定した移植効率と、移植細胞の生存と機能維持が確認されている。

7. さいごに

“再生医工学”、すなわち「生体や細胞が本来備えている再生能力や治療能力を利用した治療法」は、単純明快で容易に実現できそうに思われたかも知れない。しかしながら、実際に生体を工学的に操作しようと試みて約30年。次々と課題が噴出してきている。最も単純かと思われる自己細胞移植でさえも、まだまだ解決すべき技術的問題が多い。分子生物学や、細胞生物学、発生学の発達により、移植すべき細胞のパリテーションが完了する日は遠くないと予想される。その時、工学技術の遅れが再生医療の臨床化を妨げるようなことがあってはならない。

謝辞

本研究の一部は、文部科学研究費補助金基盤研究(B)、文部科学省京都地区知的クラスター創成事業京都ナノテク事業創成クラスター、および厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業ナノメディスン研究からのご援助を頂いた。ここに心から謝意を表すものである。

引用論文

- 1) 木村良晴, 山岡哲三, 生分解性高分子の基礎と応用(佐藤久編著, アドバンス出版) 7-63(1999)
- 2) 山岡哲三, 岩田博夫, Tissue Engineeringにおける生分解性スキャホールド細胞, 32(9) 23-26(2000)
- 3) 藤巻隆, 針谷豊彰, 成型加工, 5(7) 26-41(1993)
- 4) A.J. Domb, C.F. Gallardo, R. Langer, *Macromolecules*, 1989, 22, 3200-3204
- 5) R. Langer, J.P. Vacanti, *Science*, 260(5110), 920-6(1993)
- 6) J. Mauduit, E. Peroux, M. Vert, *J. Biomed. Mater. Res.*, 30, 201-207(1996)
- 7) Y. Ikada, Y. Shikihama, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada, *J. Biomed. Mater. Res.*, 30, 553-558(1996)
- 8) 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)
- 9) N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, B. Jerome, P. Teyssie, *Pharm. Res.*, 11, 1479-1484(1994)
- 10) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 37, 1513-1521(1999)
- 11) A. El-Salmawy, T. Kitagawa, K. Ko, A. Murakami, Y. Kimura, T. Yamaoka, and H. Iwata, *J. Artificial Organs*, 8, 245-251(2005)
- 12) 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)
- 13) T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 10, 331-339(1999)
- 14) J.A. Rowley, D.J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.*, 60, 217-223(2002)
- 15) D.L. Herm, J.A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 266-276(1998)
- 16) H. Shin, S. Jo, A.G. Mikos, *Biomaterials*, 24, 4353-4364(2003)
- 17) J. Mauduit, M. Boussit, M. Vert, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7, 207-20(1995)
- 18) Y. Kimura, K. Shirota, H. Yamane, T. Kitao, *Polymer*, 34(8), 1741-1748(1993)
- 19) T. Yamaoka, Y. Hotta, K. Kobayashi, Y. Kimura, *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 265-271(1999)
- 20) 山岡哲三, 竹部義之, 木村良晴, 高分子論文集, 55(6), 328-333(1998)
- 21) Y. Noishiki, Y. Tomizawa, Y. Yamane, A. Matsumoto, *Nat. Med. Jan.*, 2(1), 32-4(1996)
- 22) T. Shin'oka, G. Matsumura, N. Hibino, Y. Naito, M. Watanabe, T. Konuma, T. Sakamoto, M. Nagatsu, H. Kurosawa, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Jun., 129(6), 1330-8 Links(2005)
- 23) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208(2001)

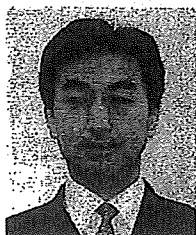
再生医療への工学的アプローチ

山岡 哲二

1. はじめに

再生医療とは、「生体や細胞が備えている再生能力を利用した治療法」、あるいは、「生体の治癒能力を利用した治療法」とでも説明できるだろうか。しかし、再生能力や治癒能力を利用していない治療法はないので、あまりよい説明とはいえない。実は、「再生」という用語のルーツは日本にある。1996年、京都大学生体医療工学研究センターの筏 義人教授（現 奈良県立医科大学教授）が、日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業に“再生医工学”という分野を立ち上げた。筏教授によると、“再生医工学”の意味するところは、当時注目され始めていた組織工学 (Tissue Engineering) であったそう¹⁾。

すり傷や切り傷は時間とともに治癒するが、組織や器官が大きな損傷を受けると、もはや正常に修復されることはない。そこで、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにして生体組織を操作する研究が盛んになった。すなわち、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が作製され²⁾、次に、コラーゲンなどをマトリックスとして利用して、そこに線維芽細胞や表皮細胞を播種・培養することで皮膚組織を再生する試みが相次いで報告された³⁾。そして、1988年、米国では、これらの研究を統合し新たな分野へと拡張すべく、Tissue Engineering (組織工学) という名のシンポジウムが開催されるに至った。先に記したように、この組織工学が、わが国では“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た。



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 (565-8565 吹田市藤白台 5-7-1)・部長、博士(工学)、1991年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了。専門は再生医工学。

Biomedical Engineering for Regenerative Medicine

このように、再生医工学 (組織工学) は、細胞増殖の足場となる工学的な足場材料 (スキャホールド: Scaffold) と細胞とを2大要素として研究が進んできた。しかし、分子生物学や細胞生物学の進歩とともに、さまざまな要素、たとえば、細胞増殖因子や、分化誘導因子、胚性幹細胞 (ES細胞) や、組織幹細胞などを巻き込んで、再生医療はという広い分野として成長してきた。そのために、再生医療における工学の役割も、ますます多様化している。

2. 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、骨などへ展開できる可能性を示唆した⁴⁾。この研究が、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や、異所的な組織の再構築に成功したことで、組織工学が注目を集める契機となり、その後、軟骨再生などを中心に、研究は全世界へと広がった。さらに1988年には、ヒトES細胞の単離が報告され⁵⁾、その後も続々と組織幹細胞が発見された。これらの幹細胞は、さまざまな細胞に分化できる多能性を有していることから、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。

ますます広がる再生医療を、筆者なりに整理すると図1のようになる⁶⁾。再生医療は、工学的要素と細胞成分からなる。工学的要素として、スキャホールドの開発以外に、生理活性物質送達システム (DDS)、三次元培養バイオリクター、さらには、さまざまな細胞分離培養基材など、これまで、高分子学会や日本バイオマテリアル学会で開発研究されてきた工学的要素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

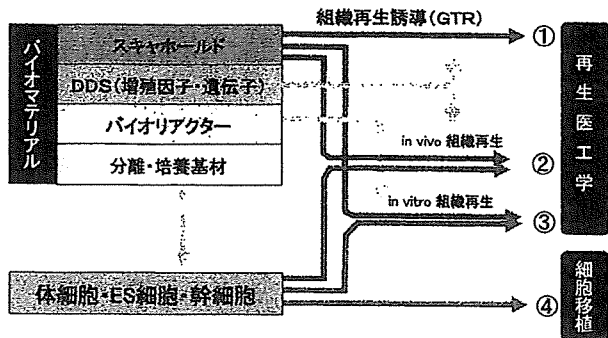


図1 再生医療の戦略 (バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人)

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。

患者からの採取が容易なためにもっとも広く検討されている間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) の *in vitro* 分化誘導に関しては世界中で研究が進んでいる。たとえば, 非接触的に血管内皮細胞と共培養することで血管平滑筋様の表現型を呈することが報告されている⁷⁾。さらには, ビトロネクチン, ラミニン, フィブロネクチン, 合成ポリアミノ酸などのマトリックス上での骨形成誘導形⁸⁾, あるいは, 神経細胞⁹⁾や軟骨細胞¹⁰⁾への分化効率も向上する。一方, 生体内で細胞を取り巻く細胞外マトリックス (ECM) に存在するシグナル分子で修飾した合成スキャホールド上での幹細胞の分化と増殖誘導も精力的に検討されているが^{11)~14)}, いまだ十分に制御することは容易ではない。

また, 再生医療の治療戦略は, 再生医工学と細胞移植に大別できる (図1)¹⁾。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戦略である (図1-②, ③)。上述の人工軟骨や, 人工皮膚の場合には, ポリグリコール酸不織布やコラーゲン多孔質体が使われている。また, 生体非吸収性の人工血管の内腔に血管内皮細胞を播種した従来のハイブリッド型人工血管に代わり, 現在では生体吸収性のスキャホールドに血管内皮細胞を播種する再生型血管の研究が盛んである¹⁵⁾。

スキャホールドに細胞を播種した後の組織再生を, 主に生体内で進める *in vivo* 組織再生 (図1-②) では, 内在性の増殖因子の存在や, 周囲毛細血管床による酸素や栄養素の供給により, 効率よい組織再生が期待できる。さらに, 細胞源として MSC を利用する場合には, *in vivo* 組織再生が有効である。なぜなら, 分化させることなく幹細胞をスキャホールドに播種しても, *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が期待できるからである。たとえば, 骨髄細胞を直接播種した小口径再生型人工血管において, 内膜・中膜・外膜の再生と, 8週間にわたる開存が報告されている¹⁶⁾。

一方, バイオリアクターと呼ばれる三次元培養装置の中で組織の再生を目指す *in vitro* 組織再生では, 常に再生組

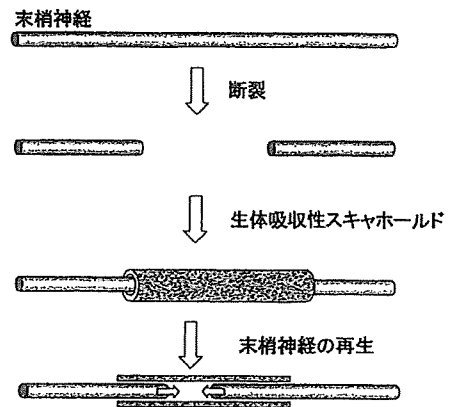


図2 GTRによる神経再生

織を準備して緊急の場合にも対応できる可能性があり, 工業的に大きな期待が寄せられている。スキャホールド材料としては, ポリ乳酸などの合成材料, コラーゲンなどの生体由来材料, アパタイトなどの無機材料など, あらゆる生体吸収性材料の多孔質体が利用されている。三次元スキャホールドの場合, 表層付近に付着した細胞には十分に増殖可能な培養条件が提供されるが, 内部の細胞には溶存酸素および栄養素の不足が起こり, 多くの場合, 細胞が壊死する。そこで, 三次元での細胞増殖のみならず, 細胞の播種, さらには, 細胞の機能亢進も広く検討されている。たとえば, 一般的な振とう培養法では, 厚さ 2 mm 程度の軟骨組織を形成するのが限界とされており, スピナーフラスコ^{17), 18)}など, さまざまなバイオリアクターが検討されている。Freedらは, ローラー培養装置型バイオリアクターの内筒と外筒の回転速度を制御することによって「模擬微小重力環境」をつくりだし, 効率よい靱帯組織の再生を達成した^{19), 20)}。筆者らは, さらに効率よい *in vitro* 組織再生のために, 多孔質体スキャホールドの内部に強制的に培地を送液する還流型バイオリアクターを開発した²¹⁾。培地の還流条件の最適化により, 細胞の播種効率ほぼ 100%とすることが可能であり, また, 細胞増殖速度の向上のみならず, コラーゲン産生などの細胞の機能性も有意に更新することが明らかとなっている。これらの技術により, *in vitro* 法により作製した再生組織の産業化が期待されているもの²²⁾, ヒト細胞の利用に関する倫理的問題など解決すべき大きな課題もある。

図1-①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。たとえば図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ぐことで, ある期間, 末梢神経が再生する空間を確保する手法で, 組織再生誘導法 (GTR: Guided Tissue Regeneration) と呼ばれる^{23)~25)}。このスキャホールドがなければ, 周囲組織が入り込み, 神経細胞の再生を妨げられる。これまでに, 歯周組織²⁶⁾や顎堤への検討が進んでいる。

図1-④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。彼らの手法では、軟骨再生の場を確保するために欠損部に骨膜でふたをしており、外科的手法によるGTR効果も組み合わされている²⁷⁾。臨床という意味でもっとも進んでいるのが、この細胞移植ではないだろうか。とくに自己細胞移植では、認可等の問題が小さいことから、臨床研究、および、医師主導型の治験システムへのアプローチが比較的容易で、間葉系幹細胞や骨格筋細胞を移植することによる心疾患²⁸⁾やパーキンソン病²⁹⁾の治療などが報告されている。患者自身の細胞を取りだして患者自身に移植するのならば、工学の出番がないようにも思えるが、そんなことはない。取りだした細胞をクリーンな環境で培養するためには、安全性を確保されたセルプロセッシングセンター(CPC)と呼ばれる施設内で、効率よく大量培養する工学技術が要求される。また、そのほかにも多くの高分子科学技術が必要である。本稿では、筆者らの研究室で進めているテーマを中心に、いくつかの工学的アプローチについて紹介する。

3. 新しい原理に基づく細胞分離カラム

MSCは、組織再生治療を実現化するためにもっとも有力な細胞ソースとして着目されているが、骨髄細胞からMSCのみを単離することは容易ではない。一般的にMSCを含む細胞群を単離する手法としては、骨髄細胞中の付着系細胞を分離する手法、密度勾配遠心法、抗体などで蛍光標識した後にそれを指標としてセルソーターという機械で分離する手法(FACS)(Fluorescence Activated Cell Sorter)、あるいはMACS(磁気ビーズ法)などがあげられる。しかしながら、これらの手法で単離した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、筆者らは、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(図3)。基盤に固定化された抗体密度が一定の場合、細胞がこの基板上を転がる速度は、細胞表面マーカーの密度に依存すると考えらる。このように基材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³⁰⁾、この現象を応用した細胞分離カラムである。この手法では、抗体などで細胞を染色する必要はなく、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く、迅速に目的の表面マーカー密度を有する細胞群を分離できる。

抗体を高密度で導入するために、シリコンチューブ(内

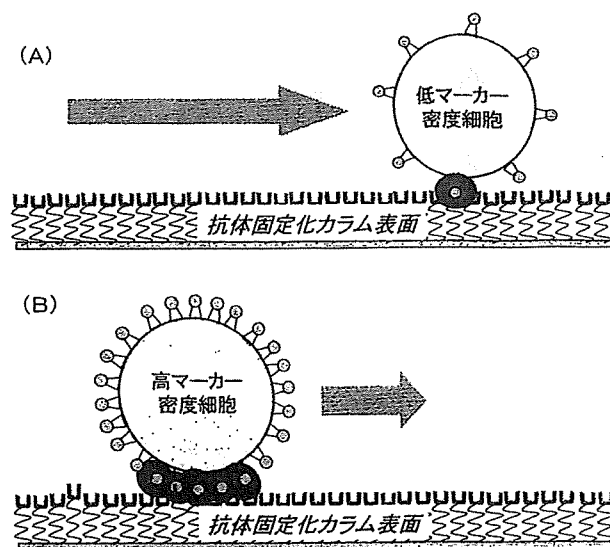


図3 細胞表面マーカー密度の低い細胞(A)は、高い細胞より(B)ローリング速度が大きい

径0.5 mm) 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。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髄細胞中の接着性細胞(SMCを含んでいると考えられる)の分離を行ったところ、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、さらに、細胞溶出時間が細胞表面CD34抗原密度に依存していることが証明された³¹⁾。さらに、得られた各フラクション中の細胞に対して骨細胞への分化誘導をかけたところ、あるCD34密度を有する細胞フラクションでもっとも高いマーカーmRNAの発現が確認された。すなわち、目的とするマーカーの有無で細胞を分離するのではなく、ある密度で目的マーカーを有する細胞群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効率よく単離することができる可能性が示唆された。

4. インジェクタブルスキャホールド

細胞移植療法において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、細胞を効率よく患部にとどめておくことは難しい。そこで、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生体吸収性材料(インジェクタブルスキャホールド)が注目されている。従来から、光反応性基や、化学反応性基、あるいは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーが利用されてきたが、いずれも、その生体内での安全性が確保されているとはいえない。筆者らは、京都工芸繊維大学の木村良晴教授との共同研究により、ポリ乳酸(PLA)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た二つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発に成功した³²⁾。

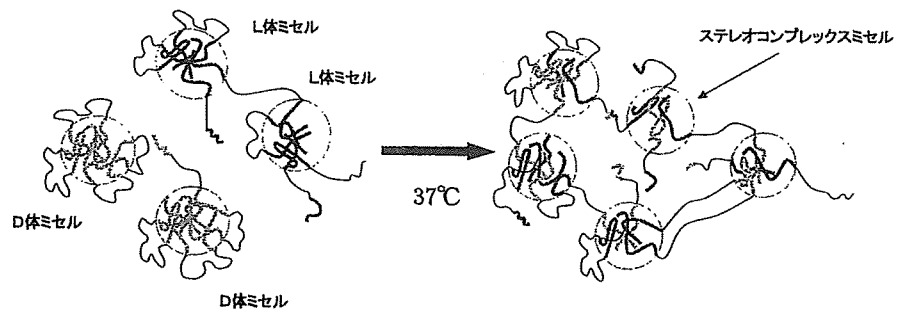


図4 L体ミセルとD体ミセルの混合懸濁液は、温度に応答してゲル化するインジェクタブルスキャホールドとなることを見いだした

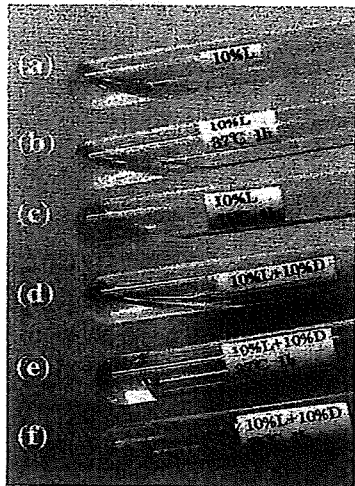


図5 L体ミセルとD体ミセル混合液(d)は、37度で加温することで透明なゲルに転移する(e)。それに対して、L体ミセルのみの分散液(a)は、75度で白濁はするが、ゲル化には至らない。

PLA-PEG-PLA トリブロック共重合体が、水中ではPLA コアと PEG コロナ (外層) からなるミセルを形成することは1980年代から知られている。筆者らは、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見いだした。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセルどうしで分子の組み替わりが起こる(コアを形成するポリ乳酸部分がPEG層を乗り越えて結晶化する)必要がある。一方、ポリ乳酸の結晶構造には、ポリ-L-乳酸(あるいはポリ-D-乳酸)からなるホモ結晶のほか、ポリ-L-乳酸とポリ-D-乳酸の1:1混合物からなり、熱的に安定なステレオコンプレックス結晶が存在する。そこで、ポリ-L-乳酸-PEG-ポリ-L-乳酸ミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸-PEG-ポリ-D-乳酸ミセル(D体ミセル)の分散液を混合することを考えた(図4左)。こうすれば、隣接するミセル間で組み替わりが起こった際には、加熱に安定なステレオコンプレックスミセルへと転移し、その結果、図3右に示すように三次元架橋構造が成長してゲル化すると考えた。

実際に、共重合組成などを最適化して37°C以上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5に示した。X線散乱測定により、温度上昇によりステレオコンプレックス結晶が成長するとともにゲル形

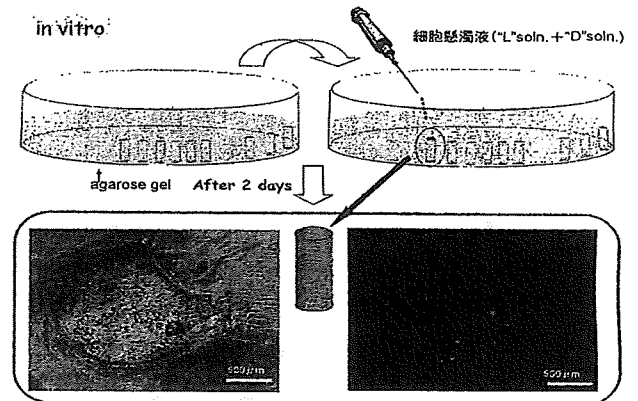


図6 L体ミセル、および、D体ミセル混合液に対して、GFP 遺伝子組み換え細胞を混合し、ゲル化する様子と、ゲル中で細胞が生存する様子を、*in vitro* 細胞移植モデル実験で検討した光学写真

成が進行することも確認されている。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、このゲルに封入した培養細胞は、その細胞生存率を下げることなく長期にわたって培養が可能であることが示された。さらに、混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク質)組換えマウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、GFP(-)マウスへの同種移植モデルシステムにおいて、*in vivo*での移植細胞の生存と機能維持も確認された(図6)。このシステムは、従来のインジェクタブルスキャホールドのような光架橋性化合物などを用いることなく、安全性に優れた生体分解吸収性高分子のみを利用し、その結晶構造の転移現象のみに基づいた低毒性のインジェクタブルスキャホールドであり、現在、疾患モデルラットを用いた細胞移植治療実験を進めている。

5. 細胞トラッキング

心筋梗塞やパーキンソン病をはじめとして、さまざまな疾患に対する治療法として細胞移植が検討され、実際に、臨床的有効性も報告されている²⁹⁾。しかしながら、その組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖によるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエント(移植を受けた患者)が反応することで

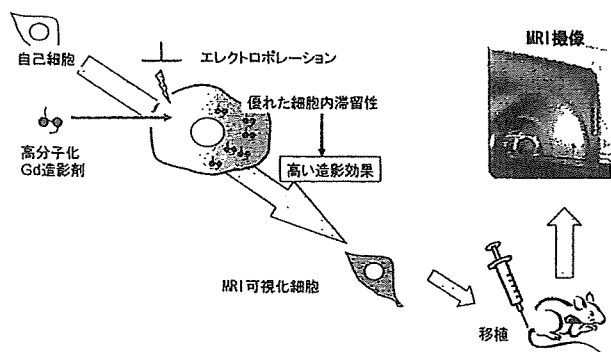


図7 高分子化ガドリニウム造影剤による細胞ラベル技術

治癒したパラクライン効果によるものかは不明である。なぜなら、自家細胞移植や同種細胞移植では移植した細胞の機能どころか、その細胞自身を免疫染色で見分けることさえも不可能なためである。さらに、動物を犠牲死させる必要もある。上述した GFP マウスの細胞を GFP (-) マウスに移植して *in vivo* 蛍光イメージング装置で追跡することは可能だが、ラット程度の小動物が限界である。このように、細胞移植治療による治癒過程を経時的に追跡・評価ができない現状では、細胞移植治療自体の効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

そこで、筆者らは、移植細胞を MRI で経時的に追跡することが可能であれば、細胞移植治療の評価に大きく貢献すると考え、新規な細胞標識用 MRI 造影剤の開発を国立循環器病センター研究所放射線医学部飯田秀博部長らと共同で開始した。この目的を達成するには、移植細胞の細胞質内に長期間安定に磁気活性な分子（ガドリニウム錯体など）を滞留させる技術が必須となる。さらに、細胞の増殖や機能発現を妨げることなく、細胞が死滅したときには、この造影剤が速やかに体外へ排泄されることが必要である。図7に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子（●）の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、高分子キャリアーを用いた。この高分子化により、細胞滞留性は向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではない。そこで、細胞に電氣的ショックを加えるエレクトロポレーションなどの手法を選択し、細胞内に高分子化造影剤を送達した。このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤を送達することが可能となった³⁹⁾。樹立系培養細胞、および、ラット間葉系幹細胞を、本造影剤にて標識したところ、その細胞増殖性は、コントロールと同程度であり、かつ、10日間にわたって、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかった。このことより、1年程度は、移植細胞を MRI により追跡できる性能を有していると考えられる。本造影剤により、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、細胞移植数を最低限に抑えることにより、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させ

るための定量的指標を得ることが可能になると期待される。

6. おわりに

ヒト細胞を利用した再生医療は魅力的であるが、ヒト細胞の利用に対する安全性確保、レギュレーション、あるいは、倫理的問題の解決にはまだまだ時間がかかりそうである。ES細胞を用いたとしても、他家細胞であることには代わりはなく同様の問題がある。複数の施設で臨床研究が行われ始めた自己細胞移植療法においても、その安全性と確実性を担保して、その治療効果を高めて現実のものとするためには、従来の技術やコンセプトの改良だけでなく、あらゆる方面からの工学的アプローチへのチャレンジが必要である。

謝辞 本研究の一部は、文部科学研究費補助金基盤研究(B)、文部科学省京都地区知的クラスター創成事業京都ナノテク事業創成クラスター、および、厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業ナノメディシン研究からのご援助をいただいた。ここに心から謝意を表するものである。

文 献

- 1) 筏 義人 (編): 再生医工学, 化学同人, 2001
- 2) H. Green, O. Kehinde, J. Thomas: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5665 (1979)
- 3) E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle, T. Nakatsuji: *Science*, **211**, 1052 (1981)
- 4) R. Langer and J. P. Vacanti: *Science*, **260**, 920 (1993)
- 5) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones: *Science*, **282**, 1145 (1998)
- 6) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 大矢裕一 (著): バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人, 2003
- 7) S. G. Ball, A. C. Shuttleworth, C. M. Kielty: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 714 (2004)
- 8) A. K. Kundu, A. J. Putnam: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 347 (2006)
- 9) L. Qian, W. M. Saltzman: *Biomaterials*, **25**, 1331 (2004)
- 10) F. Djouad, B. Delorme, M. Maurice, C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Plesce, F. Canovas, P. Charbord, D. Noel, C. Jorgensen: *Arthritis Res. Ther.*, **9**, R33 (2007)
- 11) G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp: *Science*, **303**, 1352 (2004)
- 12) L. Y. Santiago, R. W. Nowak, J. Peter Rubin, K. G. Marra: *Biomaterials*, **27**, 2962 (2006)
- 13) J. Gao, Y. M. Kin, H. Coe, B. Zern, B. Sheppard, Y. Wang: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 16681 (2006)
- 14) F. Gelanin, A. Lomander, A. L. Vescovi, S. J. Ahang: *Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 424 (2007)
- 15) J. M. Heyligers, C. H. Arts, H. J. Verhagen, P. G. de Groot, F. L. Moll: *Ann. Vasc. Surg.*, **19**, 448 (2005)
- 16) S.-W. Cho, S. H. Lim, I.-K. Kim, Y. S. Hong, S.-S. Kim, K. J. Yoo, H.-Y. Park, Y. Jang, B. C. Chang, C. Y. Choi, K.-C. Hwang, B.-S. Kim: *Ann. Surgery*, **241**, 506 (2005)
- 17) R. L. Carrier, M. Papadaki, M. Rupnick, F. J. Schoen, N.

- Bursac, R. Langer, L. E. Freed: *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 580 (1999)
- 18) L. E. Freed, J. C. Marquis, G. Vunjak-Novakovic: *J. Biotechnol. Bioeng.*, 43, 605 (1994)
 - 19) L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 33, 15 (1998)
 - 20) G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A. J. Grodzinsky, R. Langer, and L. E. Freed: *J. Orthopaed. Res.*, 17, 130 (1999)
 - 21) T. Kitagawa, T. Yamaoka, R. Iwase, A. Murakami: *Biotechnol. Bioeng.*, 93, 947 (2006)
 - 22) L. Soletti, A. Nieponice, J. Guan, J. J. Stankus, W. R. Wagner, D. A. Vorp: *Biomaterials*, 27, 4863 (2006)
 - 23) S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring, H. Rylander: *J. Clin. Periodontol.*, 9, 290 (1982)
 - 24) M. Chaouat, C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet, D. Letourneur: *Biomaterials*, 27, 5546 (2006)
 - 25) M. J. Moore, J. A. Friedman, E. B. Lewellyn, S. M. Mantila, A. J. Krych, S. Ameenuddin, A. M. Knight, L. Lu, B. L. Currier, R. J. Spinner, R. W. Marsh, A. J. Windebank, M. J. Yaszemski: *Biomaterials*, 27, 419 (2006)
 - 26) I. G. Neddleman, H. V. Worthington, E. Giedrys-Leeper, R. J. Tucker: *Cochrane Database Syst. Rev.*, 19, CD001724 (2006)
 - 27) M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson: *New Engl. J. Med.*, 331, 889 (1994)
 - 28) H. Iwasaki, A. Kawamoto, M. Ishikawa, A. Oyamada, S. Nakamori, H. Nishimura, K. Sadamoto, M. Horii, T. Matsumoto, S. Murasawa, T. Shibata, S. Suehiro, T. Asahara: *Circulation*, 113, 1311 (2006)
 - 29) 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)
 - 30) U. H. von Andrian, J. D. Chambers, L. M. McEvoy, R. F. Bargatze, K. E. Arfors, E. C. Butcher: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 7538 (1991)
 - 31) 山岡哲二ほか: 細胞の分取方法, および当該方法に用いる基材, 特願 2005-324162
 - 32) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura: *Macromol. Biosci.*, 1, 204 (2001)
 - 33) Y. Tachibana, J. Ennmi, T. Iida, T. Yamaoka: Abstract for SFB 2007 Annual Meeting, p. 94 (2007)

Radial Flow Type Bioreactor for Bioartificial Liver Assist System Using PTFE Non-Woven Fabric Coated with Poly-amino Acid Urethane Copolymer

Azizi Miskon,^{1,3} Noriko Sasaki,² Tetsuji Yamaoka,¹ Hiroshi Uyama,³ Makoto Kodama^{*2,4}

Summary: Recently, various types of hybrid bioartificial liver using the porcine hepatocytes have been widely studied but their clinical usage is limited by various difficulties. One of the most efficient bioreactor is the radial flow system equipped with silicon oxygenator. Here, our bioreactor system provides the oxygenator and the radial flow of medium that supplies the nutrient efficiently. The adhesion and growth of the cultured hepatocytes are greatly improved by using polytetrafluoroethylene (PTFE) non-woven fabrics coated with poly-amino acid urethane copolymer (PAU). Its functional activities were established after being kept for one week at the high value in this bioreactor system. These results indicate that, PTFE non-woven fabric and radial flow technique is proven to be the best bioreactor for a hybrid artificial liver support system (HALS).

Keywords: adhesion; HALS; poly-amino acid urethane copolymer (PAU); porcine hepatocytes; tissue engineering

Introduction

The hybrid artificial liver support system (HALS) is expected to become an effective treatment as bridge for patients with severe liver failure, who are waiting for liver transplantation.^[1] Various types of HALS using cultured hepatocytes have been tested by animal model, and the results of these experiments show that it is not easy to maintain the liver specific function of hepatocytes during operating the HALS.^[2–6]

Only a few groups have performed clinical trials using a hollow fiber bioreactor type HALS, which has the advantage of immunisolation from xenogenic hepatocytes.^[7–9] However this model has some difficulties in building scale-up, the hollow fiber bioreactor or a conventional packed-bed bioreactor may suffer from stacking of hepatocytes upon each other and the weak flow of culture medium that may cause cell death.

A radial flow bioreactor has been proposed and further investigated in order to resolve these problems. This bioreactor consists of a vertically extended cylindrical PTFE non-woven fabric coated with PAU scaffold through which the culture medium flows continuously from periphery towards the central axis. The radial flow will generate a beneficial concentration gradient of oxygen and nutrients, while preventing excessive stresses and buildup of waste products. In addition, PAU is the block copolymer that consists of a small amount of poly (γ -methyl-L-glutamate) (PMLG)

¹ Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita City, Fujishirodai 5-7-1, 565-8565 Japan
E-mail: azizi@ri.ncvc.go.jp

² Tissue Engineering Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki 305-8561, Japan

³ Department of Chemical Engineering, Osaka University, Suita-shi Yamadaoka 2-1, 565-0871, Japan

⁴ Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu, Kitakyushu City, Fukuoka 808-0196, Japan

and the polyurethane. The urethane segments are hydrophobic and also actively interact with the other hydrophobic materials such as PTFE, and the PMLG segments with the α -helix structure that possess the cytocompatibility. Furthermore, PAU has been firmly coated onto the PTFE fiber and acts as an artificial extracellular matrix. Thus, the radial flow bioreactor system with PTFE non-woven fabric coated with PAU is good for high density and large-scale cell cultured with long-term viability.

In this study, the hepatocytes were isolated from slaughtered porcine, so as to be cultured in the radial flow bioreactor system for HALS. The effectiveness of this system regarding on the activity and maintenance of the hepatocytes functions were examined.

Materials and Methods

Isolation of Hepatocytes

By using our method, hepatocytes were isolated from a lobe (about 84 g) of liver of slaughtered adult pig by perfusion technique utilizing dispase and collagenase. The total amount of over 2.6×10^9 hepatocytes were routinely obtained from a lobe. Hepatocytes of more than 90% viability, determined by trypan blue exclusion method were used for the experiments.

Perfusion Culture in Radial Flow Bioreactor System

Perfusion culture experiments were performed in a radial flow bioreactor system at 37 °C. The culture medium was composed of WE medium supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (Sigma, USA), 0.01 $\mu\text{mol/l}$ insulin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), 0.2 $\mu\text{mol/l}$ dexamethasone (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), 5 $\mu\text{g/l}$ epidermal growth factor (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), 10^5 U/l penicillin (Sigma, USA), 0.1 g/l streptomycin (Sigma, USA) and 1.5 mmol/l L-ascorbic acid phosphate

(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan).

Figure 1 shows the schematic diagram of a radial flow bioreactor system. The radial flow bioreactor consists of a PTFE non-woven fabric coated with PAU and hollow fiber. Hepatocytes suspension (2.0×10^9 in 50 ml) was inoculated into a medium-preparative tank, and then the medium was perfused to the bioreactor from the medium-preparative tank at a flow rate of 17 ml/min for 10 minutes. Subsequently, the medium was circulated at 84.2 ml/min during the culture experiments. A mixed gas containing air, oxygen and carbon dioxide was introduced into the medium-preparative tank through a control equipment and computer to maintain pH value at 7.3 and diluted oxygen (DO) at 313 $\mu\text{mol/l}$. The medium exchange was performed every day throughout the culture period.

Measurement of Hepatocytes Functions

Ammonium Metabolism Rate and Albumin Secretion Rate

To assess the ammonium metabolism of the cultured hepatocytes, 1 mmol/l NH_4Cl was supplemented into the medium after the medium exchange. Ammonium concentration was measured at 0, 3, and 6 hours after ammonium-loading using a commercially available kit (AMICHEKTM meter; Arkray Factory Inc., Japan). The medium sample was taken before and after the exchange of medium for albumin secretion measure. Albumin secretion was measured by enzyme-linked immunoabsorbant assay, (ELISA).

Glucose Consumption Rate and Oxygen Consumption Rate

The glucose level was analyzed with a commercially available assay kit (glucose C2 test Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). The oxygen uptake rate was estimated by measuring DO at the inlet (medium-conditional vessel, Figure 1 (7)) and the outlet (between 10 and 11 in Figure 1) of the cell adhesive radial flow bioreactor. Measured DO data was recorded by the computer (5, in Figure 1).

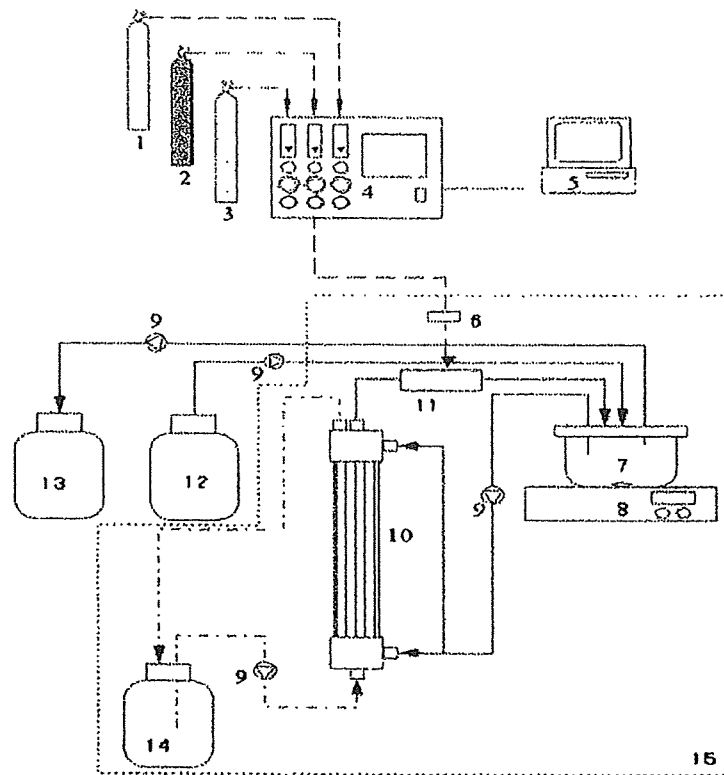


Figure 1.

A schematic diagram of radial flow bioreactor for artificial liver assists system.(1) CO₂ bomb (2) O₂ bomb (3) Air bomb (4) Control equipment (5) Computer (6) Membrane-filter (7) Conditioning vessel (8) Stirrer (9) Peristaltic pump (10) Radial flow bioreactor module (11) Silicone module (12) Fresh medium tank (13) Spent medium tank (14) Plasma bottle (15) Incubator.

Scanning Electron Micrograph (SEM)

Hepatocytes attached on the culture PAU coated PTFE were fixed with 2.5% glutaraldehyde, and dehydrated with graded ethanol (50, 60, 70, 80, 90, 95 and 99.5%). The specimens after critical point drying with carbon dioxide (Drier EMITECH K-850; Meiwa Shoji Co., Ltd., Japan) were coated with palladium by sputtering (plasma multi coater PMC-5000, Meiwa Shoji Co., Ltd., Japan) and then were subjected to SEM observation (SM-300, Topcon Co., Japan).

Histological Study

After electrophysiological study, the transverse section (2 μm thick) from scaffold was taken. The section was stained with hematoxylin & eosin (H&E) staining, as well as azan staining to demonstrate esophageal carcinoma tissue group and was examined

by light microscopy (DMR, Leica Co., Japan).

Results

Ammonium Metabolism Rate and Albumin Secretion Rate

The ammonium metabolizing activity and secreting albumin activity of the hepatocytes were established after being kept for one week at the high value in the bioreactor system as shown in Figure 2 and Figure 3.

The hepatocyte functions showed stable ammonium metabolic rate 75.8 μmol/reactor/h to 132.4 μmol/reactor/h and stable albumin secretion rate; 8.6~24.3 mg/reactor/h after 1 week.

Glucose Consumption Rate and Oxygen Consumption Rate

The glucose consumption rate has been increasing from 0.16 g/reactor/day to 0.73 g/

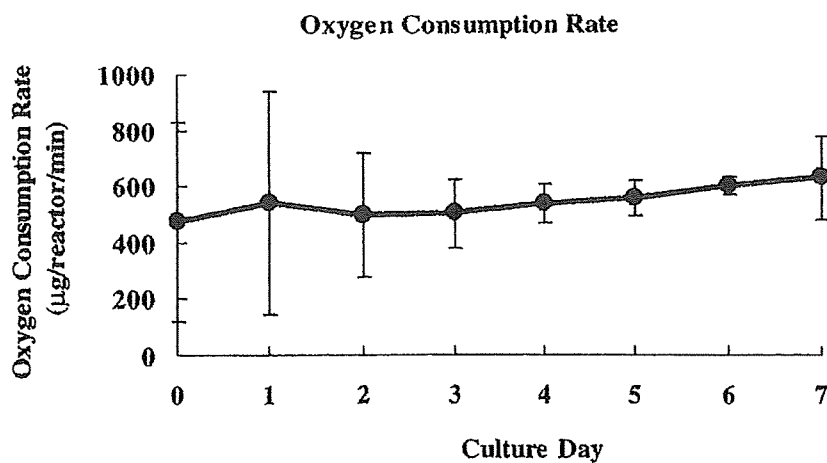


Figure 5.

Mean oxygen consumption rate of the hepatocytes cultured in radial flow bioreactor for 7 days.

SEM and Histological Observation

Figure 6 shows the SEM observation of PTFE non-woven fabric homogeneously coated with PAU before the perfusion culture experiment. The porous structure of PTFE non-woven fabric is maintained and the fabric is changed into hydrophilic and cell adhesive one. Figure 7 shows the SEM observation of the hepatocytes cultured in the radial flow bioreactor after 7 days of culture experiment. Large amount of hepatocytes were aggregated, and adhered onto the surface of PTFE coated with PAU. In addition, the hepatocytes were covered with extracellular matrix (ECM)-like layer.

These were proven by H&E and Azan staining as shown in Figure 8. H&E staining pictures show many hepatocyte cells. Azan staining pictures show the existence of connective tissue including collagen.

Discussion

In this study, the activities of ammonia metabolism of hepatocytes were significantly 200 times higher than that of hepatocytes cultured in radial flow bioreactor consists of porous glass bead micro-carriers that we have conducted earlier

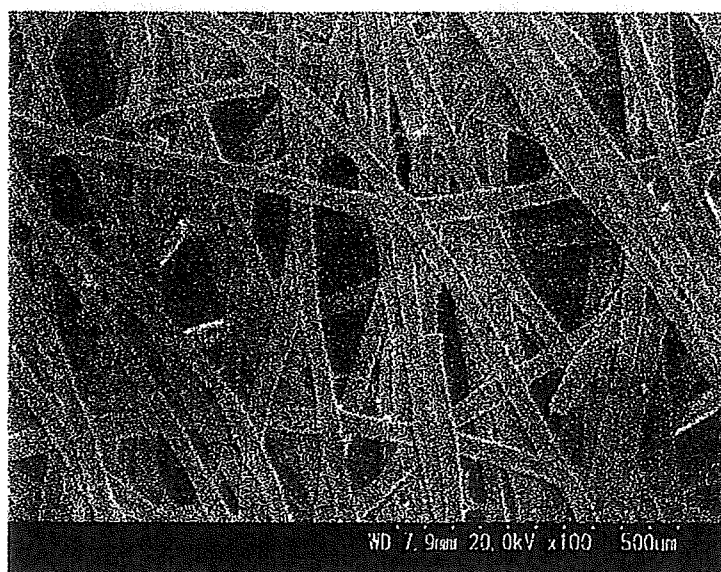


Figure 6.

SEM micrograph of PTFE coated with PAU ($\times 100$).

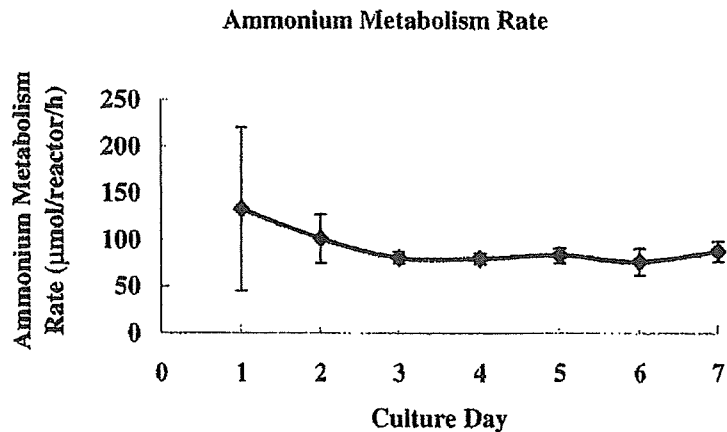


Figure 2. Mean ammonium metabolic rate of the hepatocytes cultured in radial flow for 7 days.

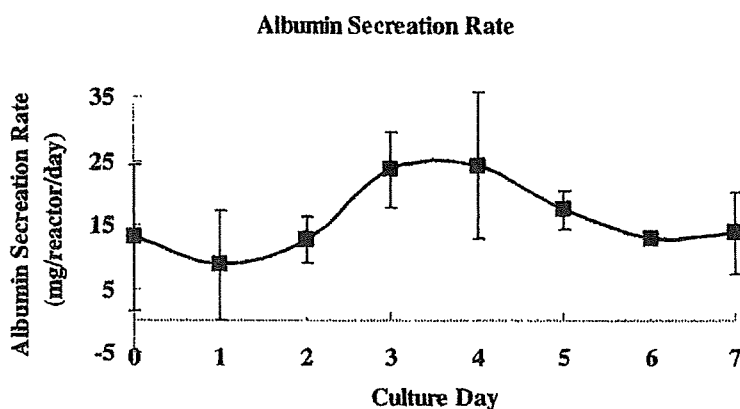


Figure 3. Mean albumin secretion rate of the hepatocytes cultured in radial flow bioreactor for 7 days.

reactor/day as shown in Figure 4, whilst the oxygen consumption rate has also been increasing from 475 µg/reactor/min to 630 µg/reactor/min as shown in Figure 5. These

results indicate that hepatocytes proliferate properly with the increasing of respiration rate and energy produced during 7 days culture.

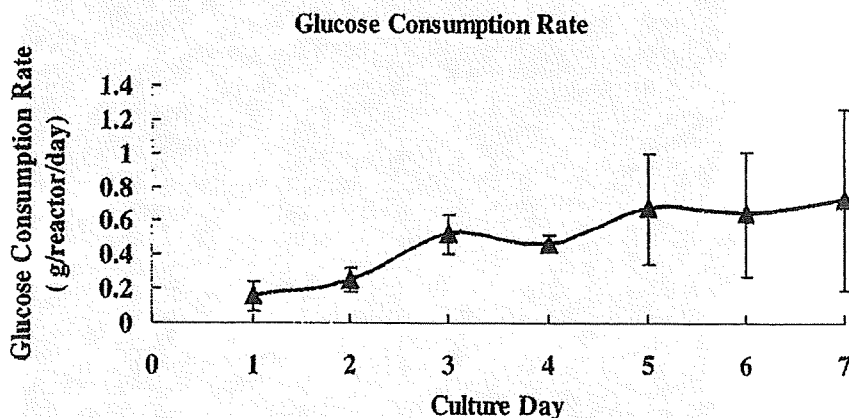
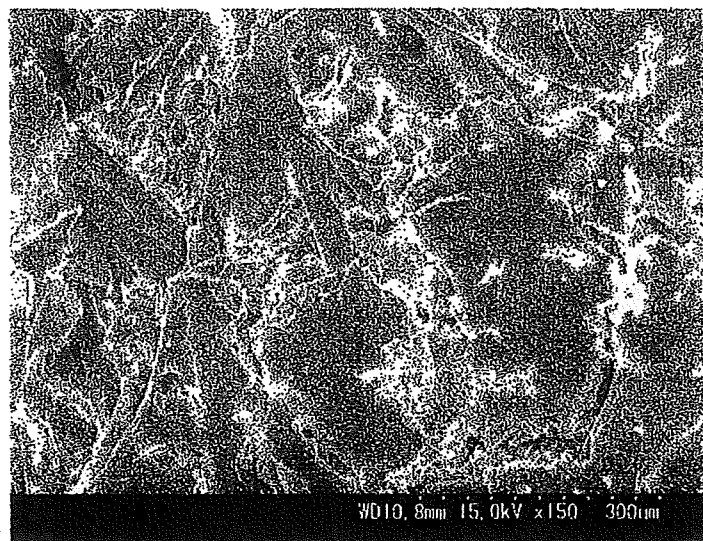
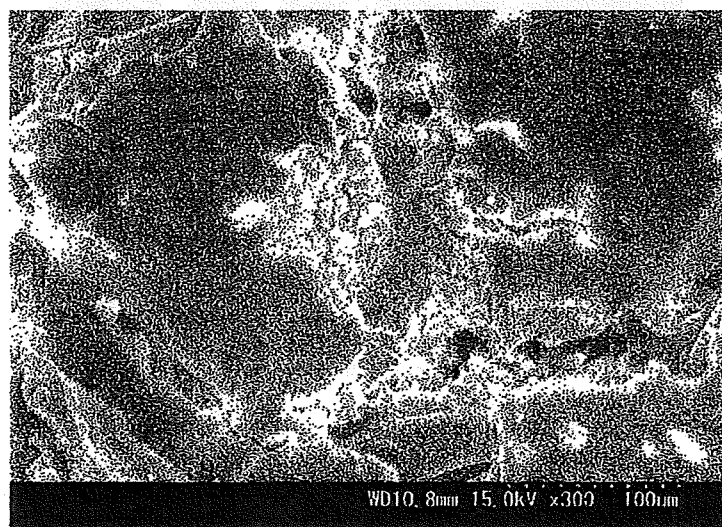


Figure 4. Mean glucose consumption rate of the hepatocytes cultured in radial flow bioreactor for 7 days.



(a) (x150)



(b) (x300)

Figure 7. SEM micrograph of cultured in radial flow bioreactor. (a) (x150), (b) (x300).

(data not shown). This result suggests that by enhancing the immobilized hepatocytes on the PTFE non-woven fabric coated with PAU may also enhances the functional activities of hepatocytes as shown in Figure 2 and Figure 3. Uchida et al.^[27,28] had demonstrated that coating with PAU hydrophobic PTFE been changed to hydrophilic PTFE but still maintaining the porous structure. PAU consists of the block copolymer segments of urethane, with a small amount of PMLG at the center of the copolymer chain, where most of the PMLG accumulate at both terminals of the copolymer chain. The urethane segments have good adhesion to other materials, and the

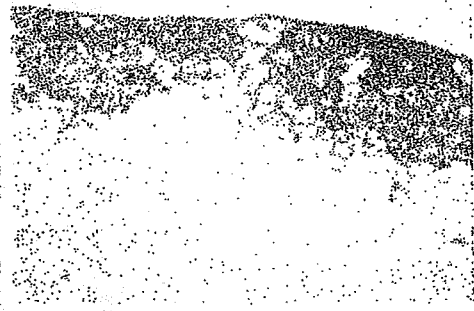
PMLG segments have the α -helix structure of protein which posses the high cytocompatibility as shown in Figure 7 and 8.

HALS needs sufficient oxygen supply, which is so different from other artificial organs.^[10–19] To overcome this problem, radial flow with porous hepatocytes-immobilizing is effective for HALS.^[20–26] From this study, radial flow of medium supply and PAU coated PTFE non-woven fabric scaffold is a good combination for HALS as shown in Figure 4 and Figure 5. The oxygen consumption as well as the glucose consumption rate increased and the hepatocytes were covered with ECM, look-like nature liver tissue even after 7 days

H&E staining

Azan staining

x 200



x 400

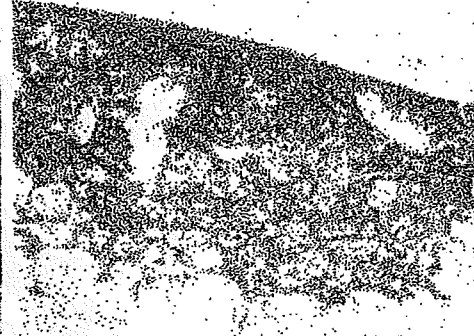
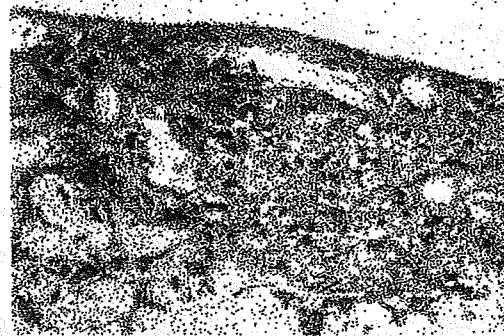


Figure 8.

H&E staining and azan staining of cultured in radial flow bioreactor.

cultured in this projected bioreactor. However, we need to do pre-clinical experiment on animal before any clinical use.

Acknowledgements: We thank Ms Sachiyo Fujinobu for outstanding technical assistant and to Tun Hussein Onn Collage University of Technology Malaysia for funding Mr. Azizi Miskon for his Masters and PhD at Kyushu Institute of Technology and Osaka University.

- [1] T. Hui, J. Rozga, A. A. Demetriou, Bioartificial liver support. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* **2001**, *8*, 1–15.
- [2] J. Rozga, M. D. Holzman, M. S. Ro, D. W. Griffin, D. F. Neuzil, T. Gloegio, A. D. Moscioni, A. A. Demetriou, Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann. Surg.* **1993**, *217*, 509–511.
- [3] K. Naruse, Y. Sakai, I. Nagashima, G. X. Jiang, M. Suzuki, T. Muto, Development of a new bioartificial liver module filled with porcine hepaocyte immobilized on non-woven fabric. *Int. J. Artificial Organs* **1996**, *19*, 347–352.
- [4] K. Naruse, Y. Sakai, I. Nagashima, G. X. Jiang, M. Suzuki, T. Muto, Comparison of porcine hepatocyte spheroids and single hepatocytes in the non-woven fabric bioartificial liver module. *Int. J. Artif. Organ* **1996**, *19*, 605–609.
- [5] T. Kimura, H. Kurosawa, M. Nishizawa, Y. Omura, N. Tokunaga, Y. Ogata, Y. Amano, A novel polyurethane membrane enables a bioartificial liver with a

fixed-bed to immobilize hepatocytes at high cell density. *Jpn. J. Artif. Organs* **1999**, *28*, 475–479 (in Japanese).

- [6] T. Sajiki, H. Iwata, H. J. Paek, T. Tosha, S. Fujita, Y. Ueda, Y. G. Park, B. Zhu, S. Satoh, I. Ikai, Y. Yamaoka, Y. Ikada, Morphologic studies of hepatocytes entrapped in hollow fibers of a bioartificial liver. *ASAIOJ* **2000**, *46*, 49–5.
- [7] J. Rozga, L. Podesta, E. Lepage, A. D. Morsiani, A. Hoffman, L. Sher, F. Villamil, G. Woolf, M. Megrath, L. Kong, H. Rosen, T. Lanman, J. Vierling, L. Makokawa, A. A. Demitrou, A bioartificial liver to treat fulminant hepatic failure. *Ann. Surg.* **1994**, *219*, 538–546.
- [8] N. L. Sussman, G. T. Gislason, C. A. Conlin, J. H. Kelly, The hepatic extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif. Organs* **1994**, *18*, 390–396.
- [9] A. J. Ellis, R. D. Hughes, J. A. Wendon, J. Dunne, P. G. Langley, J. H. Kelly, G. T. Gislason, N. L. Sussman, R. Williams, Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver. *Hepatology* **1996**, *24*, 1446–1451.
- [10] A. Rotem, M. Toner, S. Bhatia, B. D. Foy, R. G. Tompkins, M. L. Yarmush, Oxygen is a factor determining in vitro tissue assembly: effects on attachment and spreading of hepatocytes. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 654–660.
- [11] B. D. Foy, J. Lee, J. Morgan, M. Toner, R. G. Tompkins, M. L. Yarmush, Optimization of hepatocyte attachment to microcarriers: importance of oxygen. *Biotechnology Bioeng.* **1993**, *42*, 579–588.

- [12] G. A. Ledezma, A. Folch, S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, M. Toner, Numerical model of fluid flow and oxygen transport in a radial-flow microchannel containing hepatocytes. *J. Biomech. Eng.* 1999, 121(1), 58–64.
- [13] P. D. Hay, A. R. Veitch, J. D. Gaylor, Oxygen transfer in a convection-enhanced hollow fiber bioartificial liver. *Artif. Organs* 2001, 25(2), 119–130.
- [14] M. Nishikawa, J. Uchio, M. Matsushita, M. Takahashi, K. Taguchi, M. Koike, H. Kamachi, H. Kon, Optimal oxygen tension conditions for functioning cultured hepatocytes in vitro. *Artif. Organs* 1996, 20(2), 169–177.
- [15] A. W. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M. L. Yarmush, M. Toner, Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 73(5), 379–89.
- [16] P. D. Hay, A. R. Veitch, J. D. Gaylor, Oxygen transfer in a convection-enhanced hollow fiber bioartificial liver. *Artif. Organs* 2001, 25(2), 119–130.
- [17] K. Yanagi, N. Ohsima, Improvement of metabolic performance of cultured hepatocytes by high oxygen tension in the atmosphere. *Artif. Organs* 2001, 25(1), 1525–1594.
- [18] I. Jasmund, A. Langsch, R. Simmoteit, A. Bader, Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18(4), 839–846.
- [19] R. E. McClelland, J. M. MacDonald, R. N. Cogger, Modelling O₂ transport within engineered hepatic devices. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 82(1), 12–27.
- [20] J. C. Gerlach, K. Zellinger, A. Grebe, G. Puhl, G. Pless, I. Sauer, A. Grunwald, N. Schnoy, C. Muller, P. Neuhaus, Recovery of preservation-injured primary human hepatocytes and nonparenchymal cells to tissulike structures in large-scale bioreactors for liver support: an initial transmission electron microscopy study. *J. Invest. Surg.* 2003, 16(2), 83–92.
- [21] H. Iwata, Y. Ueda, Pharmacokinetic considerations in development of a bioartificial liver. *Clin. Pharmacokinet.*
- [22] M. Maruyama, T. Totsugawa, T. Kunieda, T. Okitsu, N. Shibata, M. Takesue, Y. Kurabayashi, M. Oshita, S. Nakaji, M. Kodama, N. Tanaka, N. Kobayashi, Hepatocyte Isolation and transplantation in the pig. *Cell Transplant* 2003, 26(2), 593–8.
- [23] C. Mischiati, A. C. Puviani, M. Brogli, S. Guarniero, A. Sereni, L. Breda, D. Ricci, D. Galavotti, E. Morsiani, R. Gambari, Modulation of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) gene expression in isolated porcine hepatocytes perfused within a radial-flow bioreactor after low-temperature storing. *Int. J. Artif. Organs* 2003, 26(2), 139–48.
- [24] T. H. Yang, H. Miyoshi, N. Ohshima, Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocytes culture in porous scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55(3), 397–86.
- [25] S. Nagamori, S. Hasumura, T. Matsuura, H. Alzaki, M. Kawada, Developments in bioartificial liver research: concepts, performance, and applications. *J. Gastroenterol.* 2003, 35, 493–503.
- [26] T. H. Yang, H. Miyoshi, N. Ohshima, Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocytes culture in porous scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55(3), 379–386.
- [27] S. Uchida et al. New copolymers of amino acid and urethane (PAU) in which a polyurethane is combined with poly(g-methyl-L-glutamate)(PMLG); are synthesized. *J. Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1999, 37, 383–389.
- [28] A new vascular prosthesis coated with polyamino-acid urethane copolymer (PAU) to enhance endothelialization. *Wiley Periodicals* 2001 10.1002/jbm.10137