

図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては線維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、代わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くすためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

### 3. 生体線維の洗浄手法

#### — 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果を高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤はSDSやTritonX-100が主であり、最適洗浄効果を考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

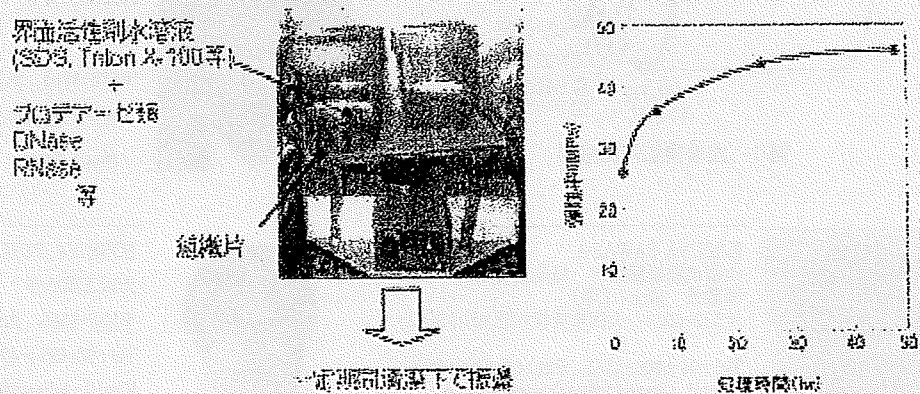


図3 界面活性剤による脱細胞化  
(左：洗浄手法 右：処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これも実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な“すすぎ洗い”をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残されていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

#### 4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin (HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウイルス (PERV) の残存も PCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

#### 5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

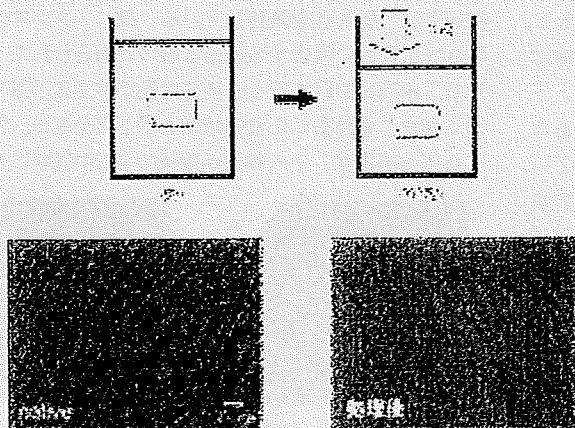


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

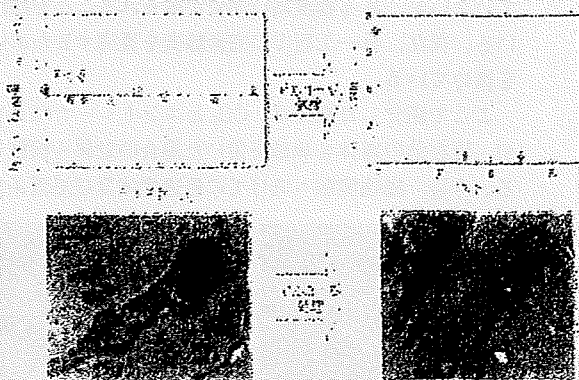


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化 (上段: 定量分析結果 下段: TEM 観察結果)

臨界流体抽出は、既に製薬・食品分野で広く実用化されており、今も新たな応用化分野が広がっている。超臨界流体の最大の特徴は、圧力制御により媒体の誘電率を連続的に変化させることが可能な点である。つまり、単一媒体にもかかわらず、圧力変化のみで複数の溶媒特性を引き出すことが可能になる。誘電率変化の程度は媒体により異なるが、適切な媒体選択により複数の目的物質を選択的に抽出することが可能になる。現在、抽出において最も実用化例の多い媒体はCO<sub>2</sub>である。本研究チームにおいてもCO<sub>2</sub>を媒体の有力候補として検討している。超臨界CO<sub>2</sub>の脱細胞化への利用における利点は幾つかある。その一つは、高い安全性である。脱細胞処理後、大気圧下に戻すことにより、CO<sub>2</sub>は自然拡散し、組織内に残存することは無い。従って、毒性等の生体への危険性は無視出来る。もちろん、CO<sub>2</sub>以外にも気体又は揮発性の高い液体を用いた場合でも同様である。また、CO<sub>2</sub>に限っては臨界条件が温和なため、蛋白質が変性し難い条件で処理可能である。さらに、処理後の組織は、半乾燥または絶乾状態で得られ、長期保存が可能になる。次に、超臨界流体の持つ高い拡散性は、液体に比べ組織深部への浸透をはるかに容易にする。従って、溶液洗浄に比べ処理時間を著しく短縮出来る可能性を有する。以上より、同法での細胞抽出が可能であれば、従来法を凌駕する優れた脱細胞化手法と成り得る。

図6は、実際に超臨界CO<sub>2</sub>を用いて処理を行った組織の処理前後のHE染色結果を示している。同図が示すように、CO<sub>2</sub>単独では如何なる圧力領域でも効果的な細胞抽出は出来ていない。CO<sub>2</sub>の場合、圧力変化に伴う誘電率変化の割合は比較的小さいことから、極性の高い細胞成分を溶解抽出することが困難なようである。しかしながら、極性を上げるためのエントレーナを少量添加した場合、抽出効果の大きな改善が見られる。エントレーナの存在により、混合流体は細胞抽出可能な溶媒特性へと変化している。特筆すべきは処理時間の短縮であり、この写真は15分処理の効果を示している。脱細胞効果を得るため、超高压印加法では3週間、界面活性剤溶液洗浄でも数日間という期間を要したが、本法での15分間という時間は画期的な短縮である。一方、リン脂質の除去については完全除去には至っていないが、ある程度高い効果が得られることを確認している。現在、単一工程での完全除去を達成するための検討を進めている。

ここで紹介した結果は、CO<sub>2</sub>とエントレーナの系であるが、現在他の媒体を単独を用いた場合の効果も検討している。今後、動物実験へ向けての最適媒体及び処理条件の決

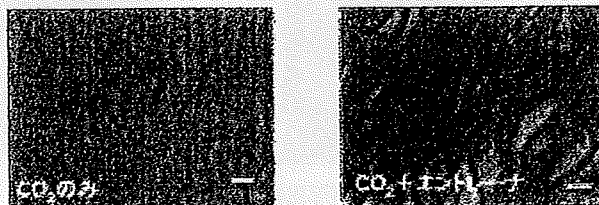


図6 超臨界二酸化炭素処理血管のHE染色比較

定が待たれる。

## 6. 防石灰化手段と血管の形態安定加工

ここまでは、脱細胞化手段についての紹介を行った。脱細胞化は、移植後急性の免疫反応を抑制することと密接に関連している。一方、実際の症例においては、移植後長期での移植組織の石灰化問題が存在する。残念ながら、石灰化の明確な機序については、現在も不明である。しかし、様々な要因が報告されており、その一つが上述の細胞膜リン脂質の残存である。他方、線維組織であるエラスチンの変性に起因するという報告も多い。本研究チームでも以前よりその機序について詳細な検討を重ねて来た。その結果、それらの単一要因ではなく、複合されて石灰化に繋がるという考えを持っている。従って、石灰化を誘引する可能性全てを消去することが、結果的に問題解決の近道であると考えている。そこで、脱細胞とは別要因である、エラスチン線維の変性に着目した検討結果を合わせて紹介する。

本研究手法を含め、組織に対し人為的(化学的又は物理的)処理を行えば、不可逆的にそれらの立体構造にミクロな歪みが生じる。我々も、機器分析により線維の立体構造に変性が生じることを確認している。エラスチン線維の変性を指摘する研究者は、このミクロな変性を挙げている。実際、石灰化部位はエラスチン線維に沿って生じる例が多い。ここで、同じ線維組織であるコラーゲンの変性が、石灰化と無関係とは断言出来ない。しかし、興味深いことに、実際の症例ではコラーゲン線維に沿った石灰化は殆ど見られない。さて、線維組織の変性であるが、現実問題として多少の変性無くして人為的処理を施すことは不可能である。そこで、単純な発想であるが、要因であるエラスチン線維を除去しコラーゲン線維のみの構造体にすれば、石灰化を抑制出来るかも知れない。

図7は、コラーゲン線維とエラスチン線維を区別するため、血管組織にElastica van Gieson (EVG)染色を行った例を示している。左図で濃く染色された線維がエラスチン、薄く写っている線維がコラーゲンである。エラスチン線維はコラーゲン線維と異なり、弾性に富み著しい伸張性を有する。その結果、常にストレスのかかる生体組織を柔軟に変形させ、耐久性を維持している。既に、エラスチン線維のみを選択的に除去する技術は幾つか報告されている。しかし、単純にそれを行うと別の問題が生じる。図8中央はエラスチンを除去した血管組織を示しているが、弾性の無くなった組織は、その構造が維持できない程度に変形する。

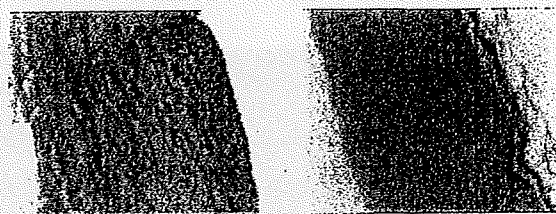
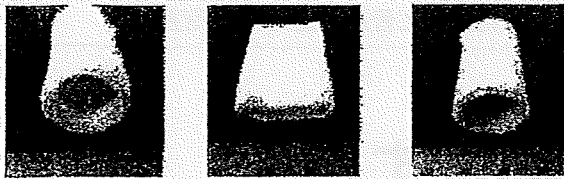


図7 血管組織のEVG染色写真  
(左: native組織 右: エラスチン除去組織)



コラーゲン線維  
エラスチン線維

コラーゲン線維のみ

コラーゲン線維のみ

図8 線維組織と形状変化  
(左: native 中: エラスチン除去  
右: 形態安定加工+エラスチン除去)

もちろん、力学強度測定を行うと、それが著しく低下する。そこで、コラーゲン線維のみでも形態を維持することが出来るよう、組織に対し形態安定加工を施す。衣類の形態安定加工は古くから行われているが、同様のことを生体組織に行うわけである。医用応用であること、および生体吸収性を考慮すれば、用いる薬剤や手法に工夫が必要であるが、原理は衣用と同じである。図7右の写真は、エラスチン線維が除去された血管のEVG染色結果である。同図左の写真と比較し、エラスチン線維が染色されていない。一方、残されたコラーゲン線維はそのまま維持されており、エラスチン線維のみが分解除去されている。また、図8右の写真は形態安定加工が施されたコラーゲン線維からなる血管である。コラーゲン線維のみであるにもかかわらず、血管の立体構造が維持されている。このコラーゲン線維血管の力学強度を評価した結果、破断強度に関しては native のそれと大差がないことも確認された。この様に、エラスチン線維を除去し、かつ力学強度を維持した構造体を形成することが出来た。そこで、この組織の石灰化抑制効果を評価するため、一定期間ラットの皮下へ組織を移植し、評価を行った。図9は、皮下移植した組織を12週間後に取り出し、石灰化評価のための von Kossa 染色を行った結果を示している。左写真は、native 血管をそのまま皮下移植した場合であり、明らかな石灰化が認められる。それに対し、右写真が示すように、エラスチン線維を除去した血管では

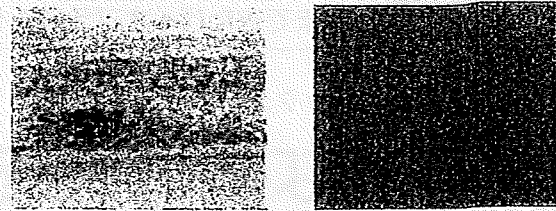


図9 ラットの皮下へ移植した血管組織の von Kossa 染色写真(12週)  
(左: native 組織 右: 脱エラスチン組織)

石灰化が認められない。同様に行った他の組織の一部で軽度の石灰化が認められた例もあるが、native に比べ明らかな有効性が確かめられた。上記のように、石灰化は複数の要因が重なることで生じると考えられ、今後さらに夫々の要因を詳細に評価していくことが必要となる。

## 7. おわりに

生体内の線維と衣料用の繊維は全く異なるものと考えるのが通常であろう。実際、コラーゲン線維やエラスチン線維を、衣料用品に応用するという発想はない。“細くて長い”という表現で共通しているだけかも知れないが、実際に病理で評価される組織染色と繊維の染色は同じ原理である。また、本稿で述べた洗浄や加工についても、原理は何れも共通である。素材が共通していれば、結果的に加工技術の原理も共通するに至って当然かも知れない。しかし、全く内容の異なる分野でそれぞれ独自に開発されてきた技術が、結果的に基本原理が共通であったという点で筆者は興味深さを覚えている。本稿で紹介した内容については、欧米では既に臨床治験に入っている例もある。極めて優れた繊維科学の技術を有する我が国において、両分野の技術融合を加速させれば、技術開発の大きな飛躍に繋がるのではないだろうか。“医療の線維”と“衣料の繊維”、語呂合わせのように見えるかも知れないが、その根底概念が共通していることを最後に強調したい。

## 第21回キチン・キトサンシンポジウム

主催：日本キチン・キトサン学会  
共催：日本化学会、日本生化学会、日本生物工学会  
協賛：(社)繊維学会ほか  
日時：平成19年7月26日(木)~27日(金)  
場所：神戸国際会議場(神戸市中央区港島中町6-9-1)  
<http://www.kcva.or.jp/kcc/icck/>  
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。  
〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31  
産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門バイオ  
ベースポリマーグループ(羽羽誠一)  
TEL: 072-751-9522 FAX: 072-751-9628  
E-mail: chitin@m.aist.go.jp <http://www.jbcc.jp/>

## 第55回レオロジー討論会

主催：日本レオロジー学会、日本バイオレオロジー学会  
共催：金沢大学、日本材料学会、プラスチック成形加工学会  
協賛：(社)繊維学会ほか  
日時：平成19年11月1日(木)~3日(土)  
場所：金沢大学角間キャンパス南地区 自然科学本館  
(〒920-1192 金沢市角間町)  
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/access/images/kakumal.pdf>  
講演申込締切：平成19年8月10日(金)  
要旨集原稿提出締切：平成19年10月1日(月)  
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。  
〒600-8815 京都市下京区中堂寺粟田町93番地  
京都市サーチパーク内 (社)日本レオロジー学会  
TEL: 075-315-8687 FAX: 075-315-8688  
E-mail: member@srj.or.jp

[事例・トピックス]

# 新たな機能性を発揮する 再生医療スキャホールド

国立循環器病センター研究所 山岡 哲二\*

ポリグリコール酸スキャホールドに始まり、さまざまな工学システムが再生医療を実現させてきた。また、最近、細胞移植によるすばらしい臨床成果が相次いで報告されている。細胞特異性や組織再生支援性、あるいは生体内ゲル化学挙動など、新たな機能性スキャホールドが再生医療のさらなる発展を支える。

## はじめに

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な問題が残る。そこで、この欠損した組織を修復する工学技術が精力的に検討され、皮膚の細胞をシート状に培養した培養表皮や、コラーゲンなどと複合化した人工皮膚の研究が精力的に進められた。

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、さまざまな組織を対象にした研究が始まった。1993年、米国MITのR. Langer教授らは、スキャホールド(Scaffold, 足場材料)と呼んだポリグリコール酸(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

\*やまおか てつじ：生体工学部 部長  
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1  
☎06-6833-5012(内2637) FAX：06-6835-5476  
E-mail：yamtet@ri.ncvc.go.jp

可能性を示唆した”。その後、日本では「再生医療」として知られるようになり、海外でもRegenerative Medicineという英語が使われるようになっていく。

生体由来の材料、特に細胞外マトリックス(ECM)の成分が、スキャホールド材料として、細胞接着のみではなく、細胞の分化や増殖にも有利と考えられている。それに対して、ポリ乳酸(PLA)やPGAは、力学強度に優れ、感染などの心配もなく、縫合糸や骨固定ピン等として安全性が確保されているいっぽうで、必ずしも組織親和性に優れるわけではない。

本稿では、PLAを成分とする新たな機能性スキャホールド材料の合成とその特性について紹介させて頂く。

## いろいろな再生医療

現在の再生医療は、再生医工学と細胞移植に大別できる(図1)。再生医工学の始まりは、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。生体吸収性のPLAやPGA(図2)を不織布やスポンジ状に成形し、軟骨細胞などのさまざまな細胞を播種して、生体内(*in vivo*; 図1-②)、あるいは3次元培養システムを用いて(*in*

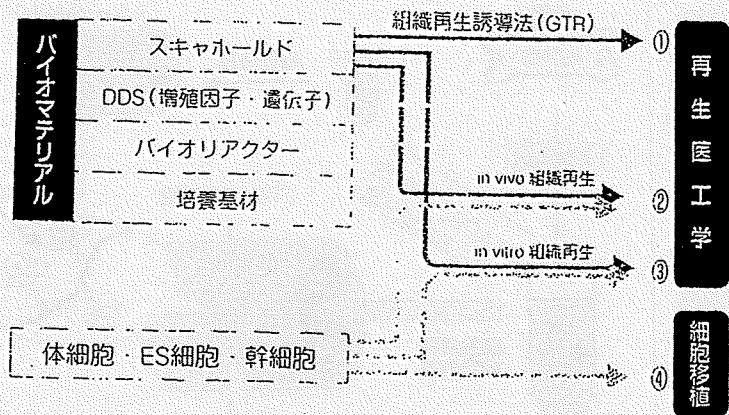


図1 再生医療の戦略

*in vitro*; 図1-(3)組織の再生を図る。いっぽう、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ことによって、末梢神経が再生する空間を確保するなど、組織再生誘導法(GTR、Guided Tissue Regeneration)と呼ばれる。これまでに両組織や顎堤への検討が進んでいる。

また、図1の(2)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。

特に患者自身の幹細胞や、最近世界的に注目されているiPS細胞(皮膚の細胞から遺伝子操作により作製された細胞でさまざまな細胞に分化する能力を有する)を利用した場合、安全性も高く、認可等の問題も少ないことから、現在、最も臨床化が期待されている再生医療である。いろいろな幹細胞を用いた心疾患の治療、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が精力的に検討されている。

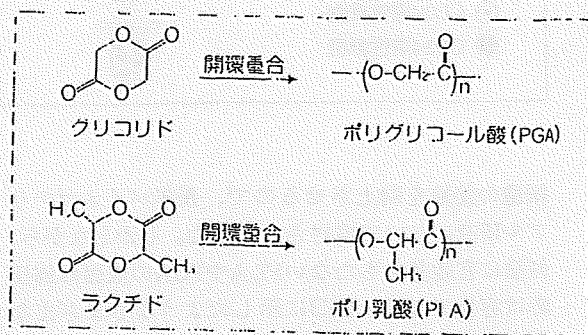


図2 ポリグリコール酸とポリ乳酸の開環重合

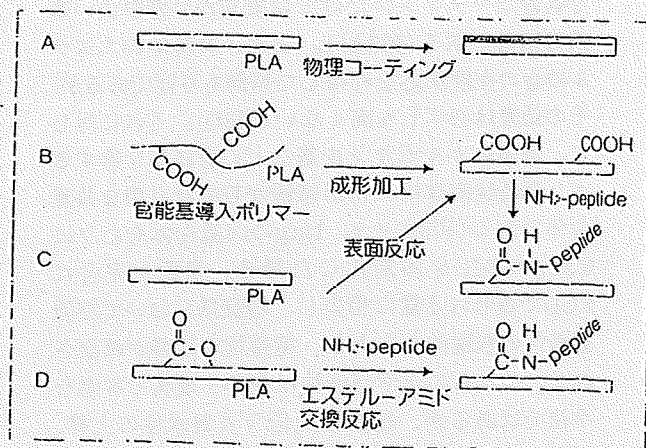


図3 ポリ乳酸の表面修飾

### ポリ乳酸の表面修飾

細胞親和性に優れる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吸収性材料が検討されている。特にRGD配列は、多くの

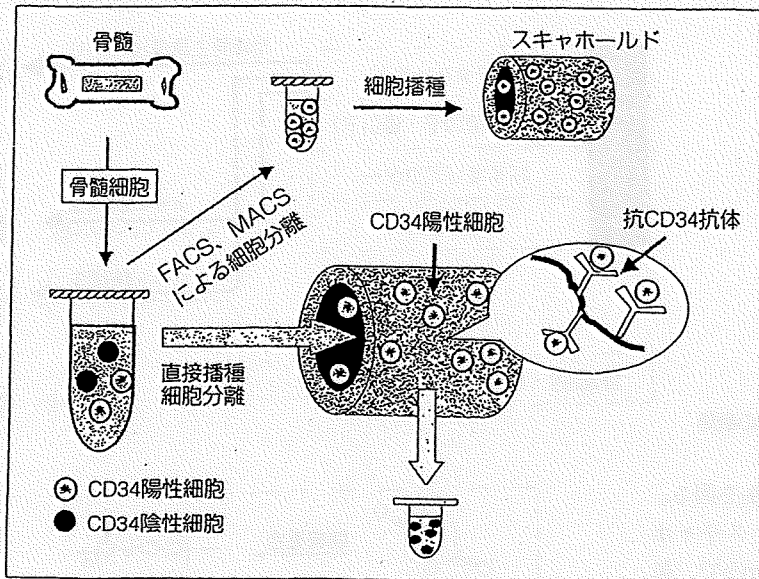


図4  
幹細胞特異的吸着能を有する再生型人工血管スキャホールド

細胞の接着を向上させるので、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3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3A)<sup>2)</sup>。また、材料中のエステル結合の交換反応を利用した修飾も可能であるが、その効率は必ずしも高くない(図3D)。それに対して、側鎖にカルボキシル基などの官能基を有するポリ乳酸誘導体は、化学修飾が可能な有用な共重合体である(図3B)<sup>3)-5)</sup>。1mgの共重合体あたりに6.3 $\mu$ gのRGDを固定化した場合、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に有効な手法ではあるが、結晶性の低下と親水性の上昇、さらに分解速度の著しい上昇など、そのバルク特性も大きく変化する。

そこでわれわれは、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、その化学修飾を可能にした(図3C)<sup>6)</sup>。その応用として、ポリ乳酸表面に抗CD34抗体を固定化した血管再生用スキ

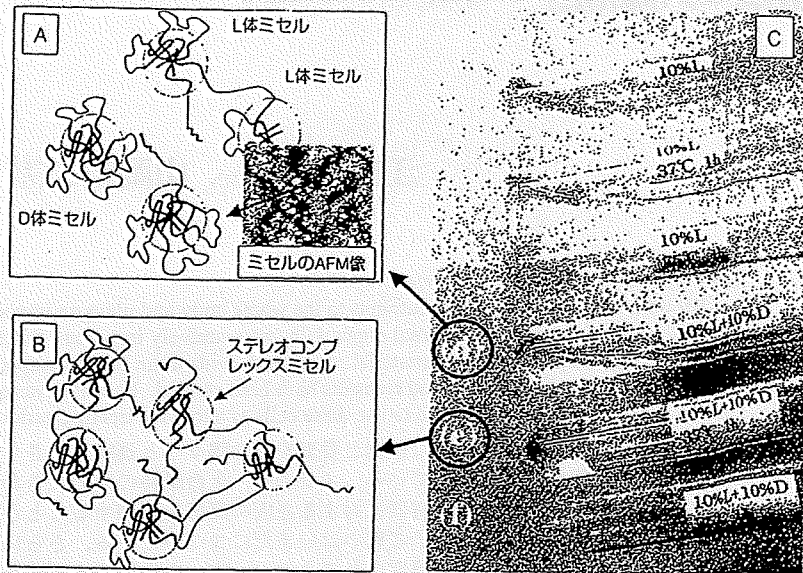
ャホールドを開発し、東京女子医科大学のグループ<sup>7)</sup>と共同で、修飾ポリ乳酸スキャホールドに対する、CD34陽性の造血系幹細胞の特異的吸着に関して研究を進めている。

骨髄細胞中にはCD34陽性幹細胞は2%程度しか存在せず、これらの貴重な細胞源を効率よく吸着できるスキャホールドが血管再生に有効と考えられる(図4)。CD34陽性のモデル培養細胞が効率よくこのスキャホールドに接着し、また、イヌより採取した骨髄細胞を循環型バイオリクターシステムを利用して通液したところ、CD34陽性細胞をスキャホールド表面に効率よく集積させることにも成功している。

### 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において、移植細胞を効率よく患部にとどめるのは容易ではない。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、われわれは、PLAとポリエチレングリコール(PEG)

図5  
L体ミセルとD体ミセルの混合懸濁液は、温度に回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



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、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの作製に成功した。

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。

われわれは、京都工芸繊維大学 木村良晴教授らとの共同研究で、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(図5A)を混合した時、加温により、隣接するL体ミセルとD体ミセルが融合してステレオコンプレックスミセルを形成させることで(図5B)、系全体をゲル化させることに成功した<sup>6)</sup>。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(図5C)。

得られたゲル中で細胞が長期生存することも確認され、マウスを用いた細胞移植実験でも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た。

### おわりに

生体を工学的に操作する組織工学が始まっている、次々と新たな課題が噴出してきている。最

も単純かと思われる細胞移植でさえも、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、発生学の進歩が確実に再生医療の実現に貢献しつつある今、工学技術が再生医療臨床化の律速になることがないように、精進しなくてはならない。

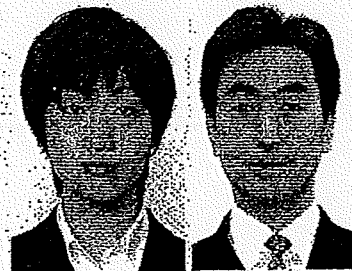
### 引用論文

- 1) R. Langer, J. P. Vacanti: *Science*, 260(5110), 920-6(1993)
- 2) H. Shin, S. Jo, A.G. Mikos: *Biomaterials*, 24, 4353-4364 (2003).
- 3) J. Mauduit, M. Boustta, M. Vert: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7, 207-20 (1995).
- 4) Y. Kimura, K. Shirotani, H. Yamane, T. Kitao: *Polymer*, 34(8), 1741-1748(1993).
- 5) T. Yamaoka, Y. Hotta, K. Kobayashi, Y. Kimura: *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 265-271(1999).
- 6) 山岡哲二、竹部義之、木村良晴: *高分子論文集*, 55(6), 328-333(1998).
- 7) 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)
- 8) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura: *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208(2001)





# 血液の細胞：宿敵か救世主か



江橋 具<sup>\*1)</sup> (写真左), 山岡哲二<sup>\*2)</sup> (右)

JJSB

*Cells in the blood: friends or foes?*

Blood transports oxygen and nutrients to the whole body and plays an important role in the immune system. Blood is therefore the huge internal organ with two extremely important functions for sustaining lives. It has been the biggest problem in biomaterial research to control the blood compatibility. So far, various artificial materials that substitute the blood elements have been studied. Recently, various stem cells were discovered in the blood, and researchers started to use these cells as a tool for treating various diseases.

血液は、細胞の活動に必要な酸素と要素を体の隅々へと運搬し、さらに、外来の異物に対する生体防御反応の重要な役割を担っている。すなわち、生命維持のためにきわめて重要な二つの機能を持つ最大の臓器ともいえる。合成材料に対する血液の反応を制御することが、これまでのバイオマテリアル研究の最大の課題であり、その戦いはいまだにつづいている。さらに、血液を構成している成分を代替する人工材料も精力的に研究されてきた。一方、血中にさまざまな幹細胞が発見され、これらを治療用のツール、すなわち、ある意味でのバイオマテリアルとして利用する研究もはじまっている。

Tomo Ehashi<sup>\*1)</sup>, Teisuji Yamaoka<sup>\*2)</sup>

Key words: 人工血液, 血液適合性, 幹細胞移植, がん免疫療法, 再生医療

バイオマテリアル研究は、長年、血液と戦いつづけてきた。この戦いはいまだ終結をみず、多くの研究者がいまも立ち向かう難題である。体外循環、人工血管、人工肺などの人工臓器、あるいはバイオセンサーなどに用いられる材料も、血液との接触が必須であり、血液凝固反応をいかに制御するかに力を尽くしてきたわけである。

本稿では、まず血液やその構成成分である血球についての基本的事項について概説し、血球にまつわる臨床応用を目指した“血液をつくる研究”と“血液を使う研究”について紹介する。

## 血液

### 1. 成分

成人の血液量は体重の6~8%であり、全身の組織と器官への酸素や栄養素の運搬と熱配分を行うという、生命の恒常性を保つために最も重要な働きを担っている。一方では、生体内に異物が混入した際、血中に含まれる細胞(血球)がこれを除去する、生体防御反応というダイナミックな挙動も示す。血液は、液性成分と細胞性成分(血球)からなる(図1)。

血球の大部分を占める赤血球は、直径がおおよそ7 $\mu\text{m}$ で、核を持たないお皿のような形の細胞である。細胞中の蛋白の95%は、グロビン蛋白と鉄イオンを含むヘム蛋白からなるヘモグロビンが占める。このヘモグロビンにより酸素と二酸化炭素の運搬を行う。

生体防御を担う白血球は、顆粒球(さらに好塩基球, 好酸球, 好中球に分別), 単球, ならびにリンパ球に分類できる。体内で炎症が起こると、炎症部位に生じた多糖類などにひきつけられて好中球が集積し、炎症に対する反応が開始する。好酸球は、後述の血液凝固に関与するフィブリン形成部位に集合す

\*1) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター研究所再生医療部  
[略歴](江橋 具) 1999年 筑波大学第二学群生物学類卒業。2001年 同 医科学研究科修士課程修了。2005年 同 人間総合科学研究科博士課程修了, 博士(医学)。専門: 医工学, 再生医療。趣味: テニス, 料理, 筋トレ

\*2) Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 国立循環器病センター研究所生体工学部  
[略歴](山岡哲二) 1986年 京都大学工学部高分子学科卒業。1991年 同 大学院工学研究科博士後期課程単位指導認定(工学博士)。同年 国立循環器病センター研究所実験治療開発部流動研究員。1992年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科助手。1995年 同 講師。1996年 米国マサチューセッツ大学客員研究員。2002年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科助教授。2004年 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, 現在に至る。1995年 高分子研究奨励賞。2002年 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞。専門: 医用高分子, 再生医工学。趣味: 呑むこと話すこと

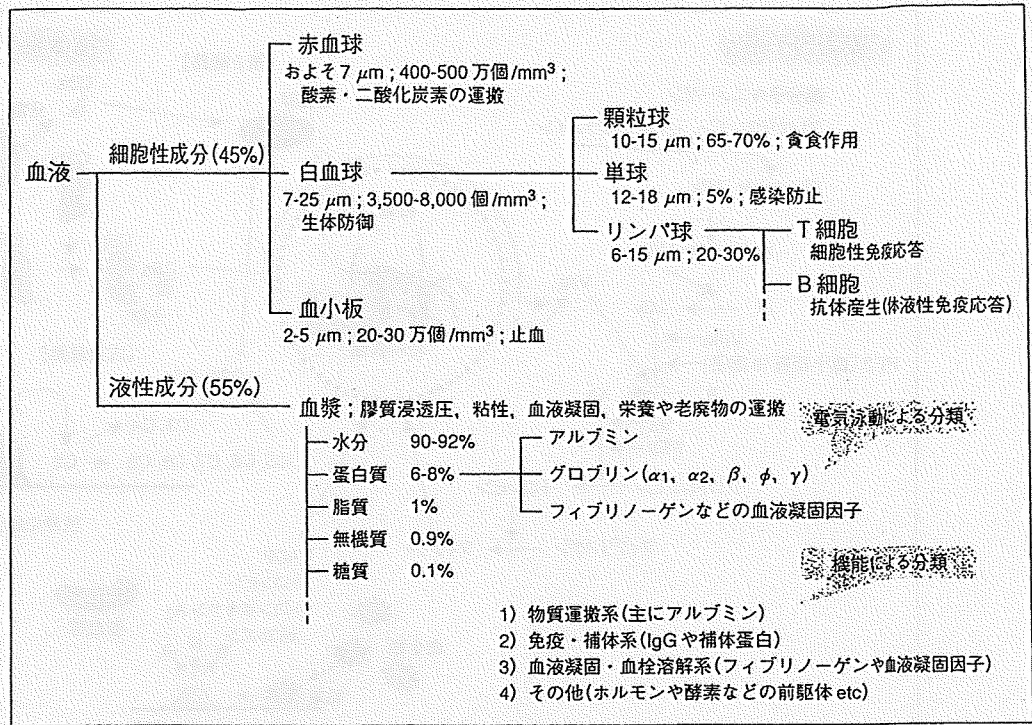


図1 血液の成分

る性質があるなど、それぞれの役割は大きく異なる。

単球は、感染部位や炎症部位の血管から漏れ出て組織へ移行し、組織マクロファージとよばれる細胞になる。マクロファージは、細菌や小さな異物を貪食する性質がある。マクロファージに貪食された細菌や異物は、細胞内の酵素により消化されて体外へと排出される。人工関節などのバイオマテリアルから生じる小さな材料片を処分するのもこのマクロファージであり、バイオマテリアルが引き起こす炎症の一つの原因である。

リンパ球は、さらにT細胞とB細胞に分類される。まず、T細胞は、組織および血中のリンパ球の60~70%と、B細胞よりはやや多い細胞で、細胞自身が異物を認識することで排除機構が引き起こされる。一方、B細胞は、抗体産生細胞の前駆細胞であり、抗原による刺激でさらに分化し、異物を攻撃するための抗体を産生する細胞へと成熟する。

最後に述べる血小板は、骨髄中の巨核球の細胞体からちぎれるように分離して血流に放出されたものであるため、通常の細胞と比較するとかなり小さく、核を持たない細胞である。血管壁が傷害を受けると、血小板が接着・凝集した血小板血栓を形成して物理

的に止血を行う。また、血小板は、傷害部に接する過程で、後述の血液凝固を触媒的に促進する働きを持っている。

血漿は水と電解質の無機成分と、糖や脂質と血蛋白により構成される。血漿蛋白の60%を占めるはアルブミンであり、血液の浸透圧を調整したイオンやビタミンあるいは薬剤などの外来物質を着して運搬したりする。さらに、組織にアミノ酸供給するなど、多岐にわたる機能を持つ。別の血蛋白で、生体防御機構に大きく貢献する免疫グロブリンについては、のちほど詳しく述べる。その他、血液凝固因子や生体防御にも関与する補体系蛋白などさまざまな可溶性成分が存在する。

## 2. 血液凝固

血液凝固には、内因性凝固と外因系凝固があるバイオマテリアルの観点からすると、内因性凝固重要である。内因性凝固とは、血流量が低下しきや、ガラスのような陰性荷電を持った表面(異やコラーゲンなどと血液が接触したときに、高キニノーゲンとプレカリクレインとの協同的な)により、血液凝固因子の一つ、第VII因子が活性

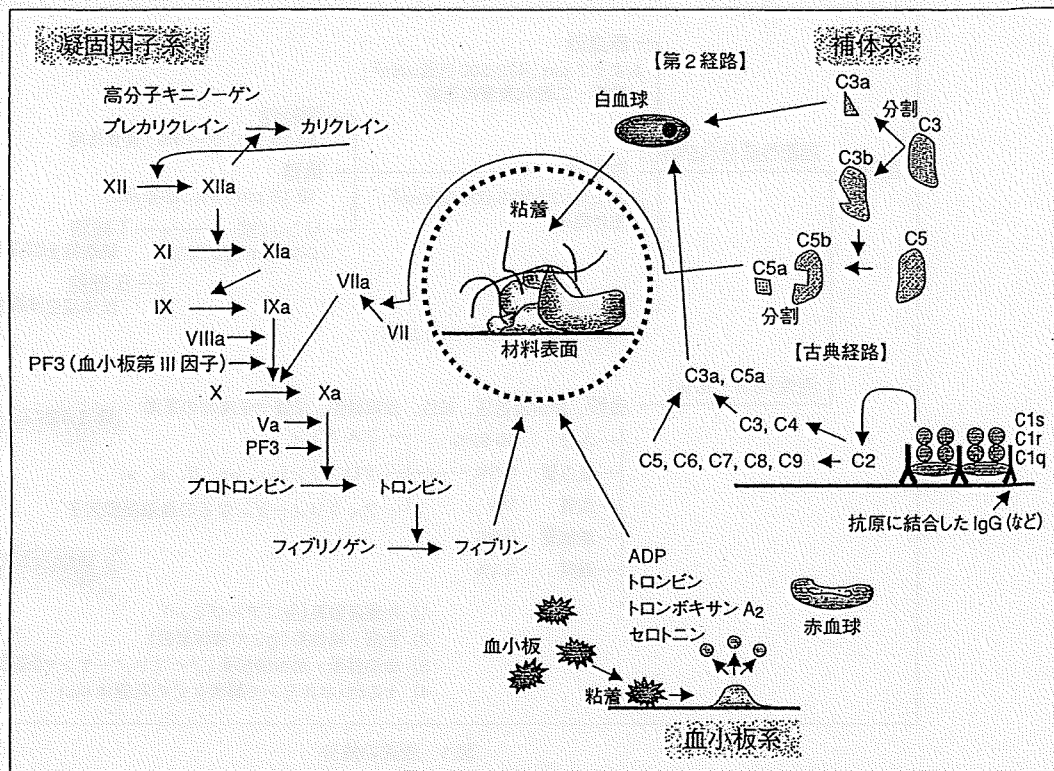


図2 血液凝固反応の機序  
(石原一彦・他：バイオマテリアルサイエンス、東京化学同人、2003)

れることにより引き起こされる。その後、図2に示したカスケードでつぎつぎと別の血液凝固因子を活性化し、最終的には血中蛋白のトロンビンが、フィブリノーゲンをフィブリンに転換して、生成されたフィブリン網により血液が凝固する。

一方、活性化された血液凝固因子の一部は、血中の補体成分をも活性化する。補体を介する血液凝固は、異物への白血球粘着を促進することもあり、生体防御反応として重要な役割を持つ。

### 3. 免疫

生体の“外側”と“内側”との境界は、体表層を覆う角質や、粘膜で形成され、これらの境界を越えて組織内に侵入してきた細胞やウイルスなどの異物は、生体の免疫反応により速やかに排除される必要がある。

免疫反応に関与する血球は、白血球である。異物、すなわち非自己の物質を排除するシステムは、二通りある。一つは、非特異的な反応であり、くしゃみや鼻水など、生体内に侵入しようとする微生物などを物理的に体外へと排出するシステムや、生体内に

侵入した異物がマクロファージの貪食作用により破壊されるシステムで、数時間以内の短期間に起こる反応である。もう一方は、獲得免疫反応とよばれ、こちらは生体内に侵入した異物に対して特異的に働き、異物侵入後、数日以上時間をかけて攻撃する反応である。バイオマテリアルが抗原性のある異物と認識された場合には、この獲得免疫反応が引き起こされる。

たとえば、ウイルス感染の場合、まずマクロファージにより貪食されて断片化される(図3)。その後、マクロファージ表面にある主要組織適合遺伝子複合体抗原(MHC 抗原: major histocompatibility complex)とよばれる蛋白質に結合して、細胞外へと提示されると、この情報は、ヘルパーT細胞のT細胞レセプターにより受け取られる。するとT細胞は活性化され、インターロイキンやインターフェロンなどのサイトカインを放出する。これらのサイトカインは、マクロファージを活性化してさらに貪食作用を高めるとともに、キラーT細胞に作用し、この細胞により異物が破壊、排除される。

一方、ヘルパーT細胞から放出されたサイトカイン

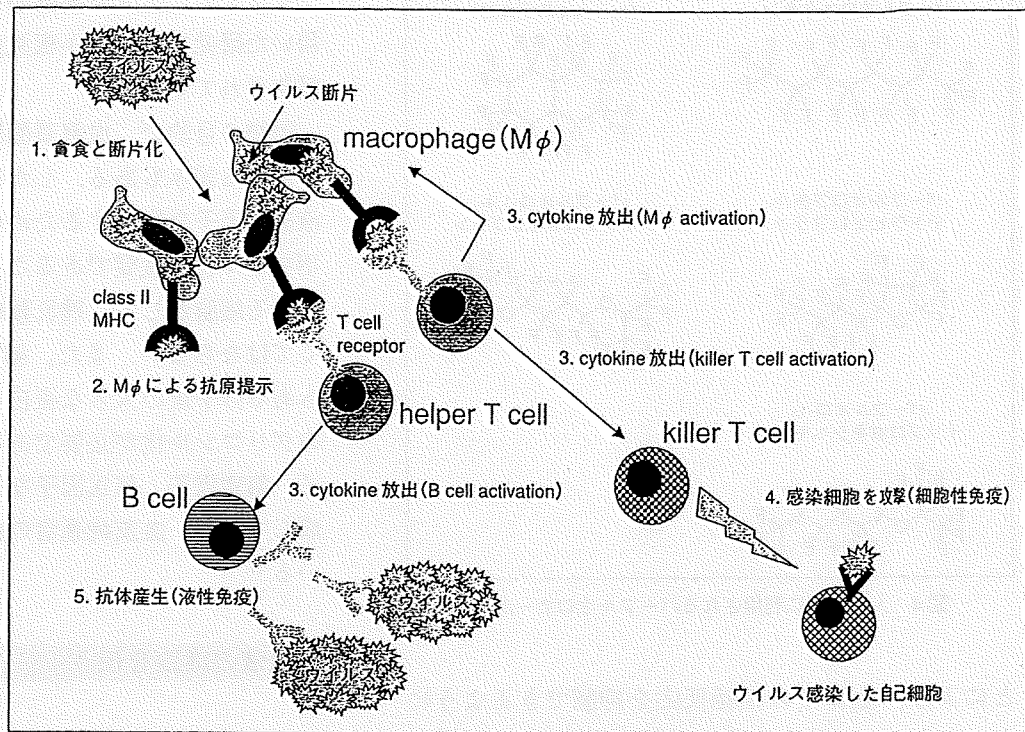


図3 異物に対する免疫応答反応

ンは、B細胞にも作用し、B細胞の増殖や分化を促すとともに、この細胞による抗体産生を誘導する。また、増殖・分化の過程で、機能細胞にまで成熟しなかった一部のリンパ球は、記憶細胞として生存しつづける。つぎに同じ抗原が体内に侵入した際には、この記憶細胞から成熟して抗体が産生されるために、一度目よりも速やかに免疫応答が起こる。また、抗原刺激がつづいた場合の過剰反応はしばしば自己細胞をも損傷する場合があるため、サプレッサーT細胞が過剰なリンパ球の増殖を抑制することで、自己組織を保護する。

### 血液の細胞をつくる

生体から大量に血液が失われたときには輸血処置が行われるが、輸血用のヒト保存血は、しばしば不足し、また、感染の危険性もある。

そこで、これらの問題を克服するために、人工血液や人工血球などの代替血液の開発が試みられている。人工血漿は、血液中の蛋白以外の成分、すなわち電解質溶液ともいえ、最も単純なものとしては生理食塩水があるが、血中滞留性は低い。そこで、血

漿増量剤としては高分子量で適切な速度で体外に泄されるうえ、生体に対する安全性も高いデキスランが臨床応用されている<sup>1)</sup>。

### 1. 人工赤血球

酸素の供給は生命の存続のために必要不可欠である。酸素供給を目的とした人工血液は、化学合成質であるパーフルオロカーボン(PFC)とヘモグロビンを含む半人工的なものがある(図4)。

PFCは、水の約20倍の酸素(40 vol.%)を溶解する液体である。液体中であるにもかかわらず、動はこの中で1時間もの間、生存し、その後、通常環境下に戻しても正常に生活することができる。しかし、PFCの問題点は、水と相溶しないために、化して体内に投与しなくてはならないこと、また酸素との結合能力が高すぎるために末梢組織における酸素放出が不十分な点である。

しかしながら、PFCを利用したFluosol DAをはじめ、多くの臨床例が検討されてきた。一方、酸素飽和度に応じて酸素の吸着と解離を効率よく行うモグロビン蛋白を赤血球から分離して人工血液に用いる試みも行われてきた。赤血球から単離する

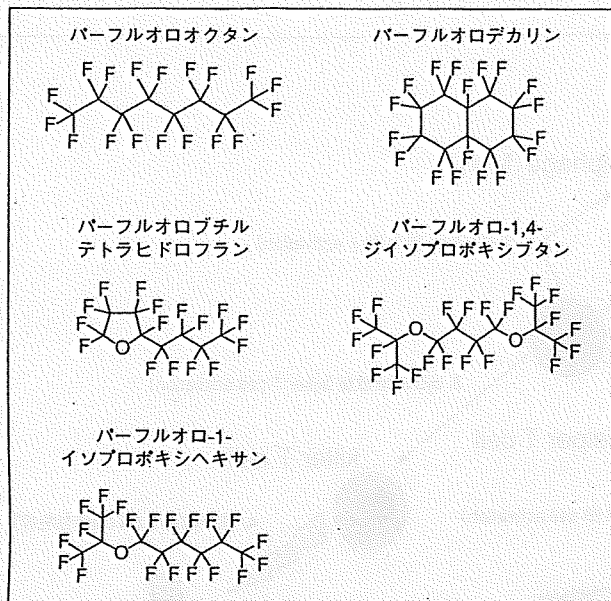


図4 人工血液に利用されるパーフルオロカーボン

とにより、生体での拒絶反応を抑制できるようになったものの、酸素の放出効率が低下したり血中半減期が短縮される欠点もある。そこで、ヘモグロビンを化学修飾したり、ポリエチレングリコールを結合させることで、血中から排出されにくくする工夫が行われた<sup>3)</sup>。近年では、高純度のヘモグロビンを高濃度に溶解した溶液をリポソームに内包させた人工赤血球の開発が進行している。国内ではテルモのTRM645があり、この保存期間は2年と長く、近く実用化が期待されている。これまでの動物を利用した研究では、持続的にTRM645を注入した結果、生体から分離した赤血球を注入した場合と同程度に生体機能を維持できたことから、今後、大量の輸血が必要となった場合の保存血不足を解消できるだろう<sup>4)</sup>。

## 2. 人工血小板

血小板は24時間程度しか保存できず、凍結血小板やフリーズドライした血小板を利用する試みがある<sup>5)</sup>。しかし、感染などは避けられず、血小板代替物や人工血小板の開発が進められてきた。これらは、ヒト血小板からさらに分裂させた小胞体 (particles derived from human platelet)、あるいは血小板表面レセプターやそれらのリガンドである血液凝固因子、フィブリノーゲンなどを有する小胞体の作製で、

フィブリノーゲンや凝固因子をコートした高分子を用いた研究では、血小板減少症を改善できたことも報告されている<sup>6)</sup>。

同様の目的で、血液凝固因子を遺伝子操作により作製する試みもある。しかし、生体内で機能する血液凝固因子を作製するためには、翻訳後修飾のカルボキシル化が重要であることから、遺伝子組換えをさせる細胞として、哺乳類細胞を宿主細胞としなくてはならない。また、第Ⅷ因子はおよそ300 kDaもある分子量の大きな蛋白で、これもまた、翻訳後のグリコシル化が必要である。現在までに、第Ⅶ因子、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子などは、すでに合成法が完成しており、血友病患者の治療用として認可されている<sup>7)</sup>。

## 血液の細胞を使う

生きた細胞を利用した再生医療のための細胞を採取できる組織として、皮膚、粘膜、骨髄、脂肪組織と並んで、血液も有望である。採取された細胞は、そのまま利用される場合もあるが、培養系で増殖させたり、活性化させたり、遺伝子改変させたり、また、分化誘導させたあとに移植される場合もある。成熟細胞を、生体外で機能を維持したまま増殖させることは通常困難であるが、近年、多くの組織幹細胞が見いだされ、有用な細胞の入手が容易になりつつある。さらに、成人の体細胞をリプログラミングする手法が報告されて話題をよんでいるiPS細胞<sup>8)</sup>、細胞ソースとして期待されている。

### 1. 成分輸血

従来の全血輸血に対して、最近では、成分輸血も一般的になりつつある。成分輸血は、献血された血液を遠心操作により、赤血球、血小板、血漿などの成分に分けて、必要な成分のみを輸血する方法で、輸液量を減少させられるために患者の心臓への負担が軽い利点がある。かつては、輸血液に含まれるリンパ球が患者の体細胞を異物として認識して攻撃する反応(移植片対宿主病: graft versus host disease)による死亡例が多くあったが、輸血液に放射線を照射することによりほぼ安全性が確保されている。

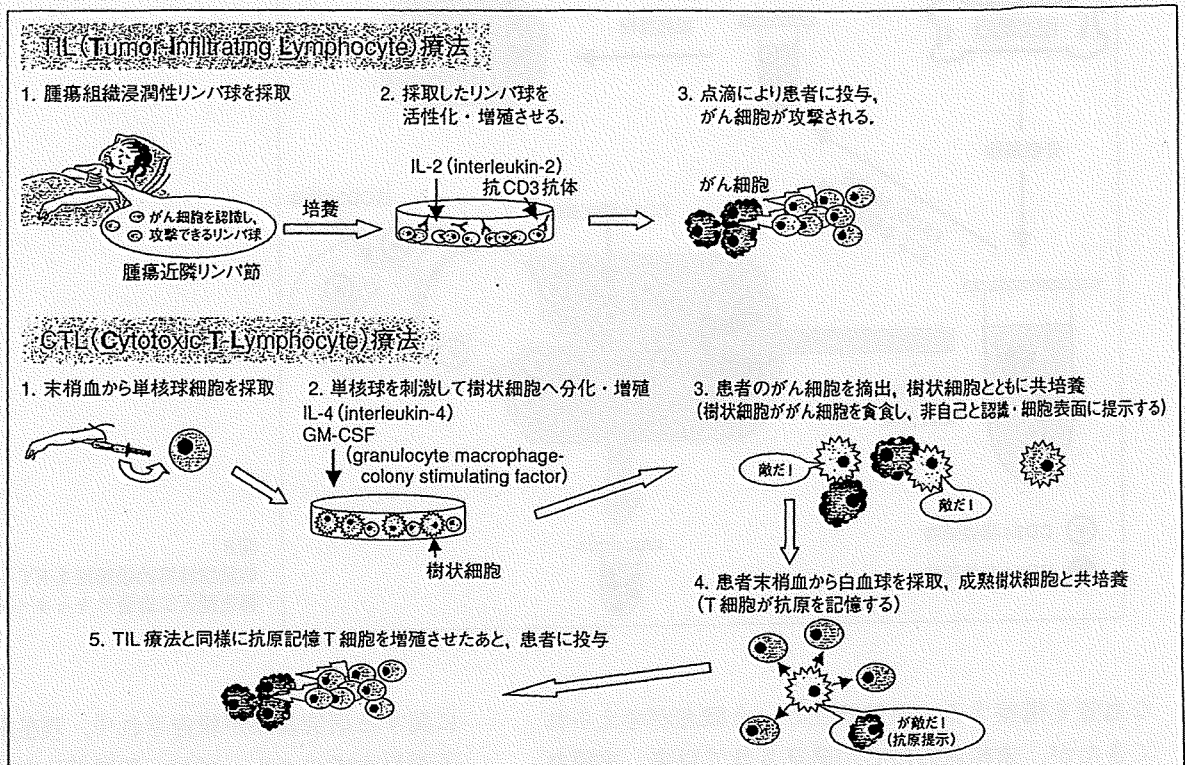


図5 T細胞を利用したがん治療法

## 2. CTL療法とTIL療法

がん治療のためのワクチン療法については、60年以上もの研究が行われているにもかかわらず、治療法として浸透しているわけではない。患者の白血球を利用する治療法のCTL (cytotoxic T-lymphocyte) 療法は、がんの治療に採り入れられている手法である(図5)。これは、患者の血液から分離したリンパ球のうち、キラーT細胞とよばれる細胞分画を、培養系で増幅するとともに、患者のがん細胞を標的とするように教育したのち、患者の血液に移植する方法である。この方法は、特異性の高い攻撃により、殺傷力は強い。

しかし、一つのT細胞は1種類のがん細胞抗原部位しか記憶することができない。さらに、患者の体内で転移したがん細胞は転移先の組織で抗原を変化させる。CTL療法の最大の問題点は、がん細胞の組織転移時に起こる抗原の変化に対応できないことにある。このCTL療法の短所を改善する試みも盛んに研究されており、T細胞の利用に加え、ワクチン療法を組み合わせる手法が開発されつつある。

類似の手法として、腫瘍組織浸潤リンパ球

(TIL: tumor-infiltrating lymphocyte) 療法がある(図5)。腫瘍組織から分離したリンパ球を、インターロイキン2などのリンフォカインで増殖させて、活性化させたあとに患者に再移植する手法であり、CTL療法と並んで期待されている細胞移植療法である。

## 3. 細胞移植による再生医療

血球をつくる主な場所は骨髄である。骨髄には造血幹細胞(HSC: hematopoietic stem cell)とよばれる、増殖能が高く、それぞれの血球への分化能を持つ細胞群が存在する<sup>9)</sup>。この細胞群を細胞表面抗原により分離し、培養して増殖させ、サイトカインなどの刺激因子により目的とする血球へ分化させたのち、患者の体内へ戻す試みが行われている。患者自身の造血幹細胞を利用することにより、他人の血液から分離した血球を利用する際の危険性を回避できるとともに、ドナーの不足も解消できる。

一方、体内を循環する血液(末梢血)に血管内皮前駆細胞(EPC: endothelial progenitor cell)が存在することが発見された<sup>10)</sup>。それまで、生体の微小血管形成には、血管を構成する血管内皮細胞が増殖して新た

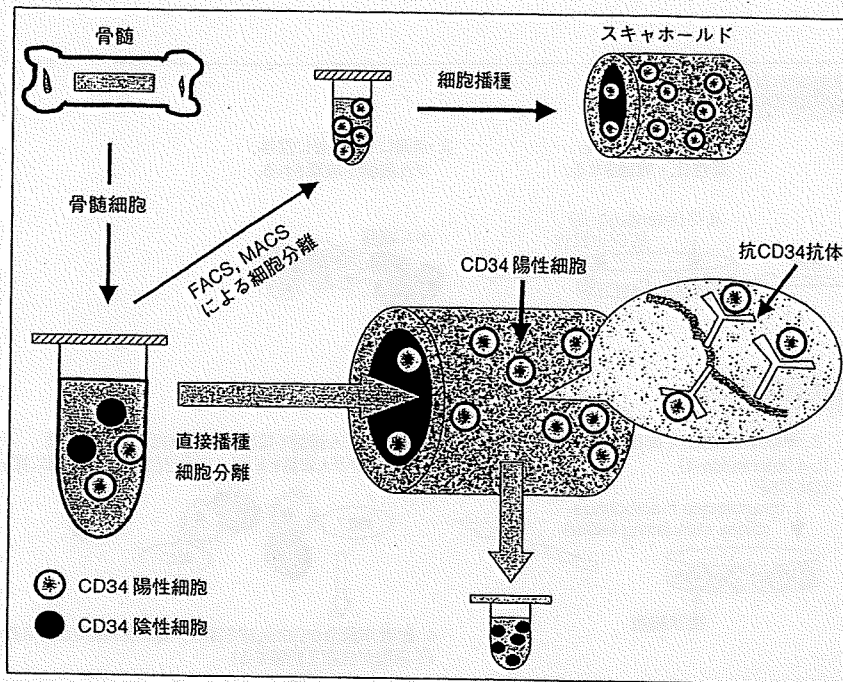


図6 幹細胞特異的吸着能を有する再生型人工血管スキャホールド

な血管を構築する、血管新生という概念が考えられてきたが、末梢血のEPCが発見されて以来、末梢血にあるEPCが血管を必要とする場所に集結・増殖して新たに血管を形成するという、発生時期のプロセスが成体でも認められるようになった。このEPCは、骨髄と末梢血に存在し、通常はほぼ平衡状態を保っているが、生体内の虚血部位で産生されるサイトカインや増殖因子などにより、骨髄から末梢血へリクルートされ、虚血部位での血管形成を誘導することがわかっている<sup>11)</sup>。

近年、EPCに関連する研究が幅広く行われており、臨床の場での応用とその有用性が注目を集めている。まず、動物を用いた研究では、閉塞性動脈硬化症やバジャー病などの下肢虚血患者に対する治療、あるいは心筋虚血に対する治療として、自家EPC移植が試みられ、良好な結果が報告されている<sup>12)</sup>。それに伴い、最近では各国で臨床試験が行われるようになり、患者末梢血へのEPCの動因を向上させるための因子を投与したのち、EPCを採取して、患部に局所的にEPCを移植することにより、虚血部の血流回復が報告されている。

これらの血管再生能力を有する細胞群は、今後、再生医療で重要な役割を演じるであろう。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<sup>13)</sup>、現在までに東京女子医科大学のグループが、骨髄細胞を利用した再生型人工血管の臨床応用を進めている<sup>14)</sup>。

筆者らの研究室では、ポリ乳酸(PLA)製のスキャホールドを利用した血管再生の研究を進めてきた。しかしながら、側鎖に官能基を持たないPLAなどの表面修飾反応は容易でないため、筆者らは、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たあとに<sup>15)</sup>、幹細胞表面のCD34に対する抗体を固定化した。イヌ骨髄細胞をこの抗CD34固定化スキャホールドに播種したところ、効率よくCD34陽性細胞をトラップすることが明らかとなった(図6)。この機能性スキャホールドは、*in vivo*において、末梢血中のCD34陽性の機能細胞をリクルートすることで、速やかな血管組織への再構築を誘導できると期待して検討を重ねている。

#### おわりに

生涯にわたって、常に新しく産生されつづける血液の特徴を利用した新たな再生医療の展開が期待できる。人工赤血球や人工血小板など血液の代替材料の開発のみでなく、成分輸血など血液成分の利用、がんに対する血液中の免疫細胞の利用、さまざまな

組織の再生を目指した血液の細胞の利用など、新たな領域がつつぎと見いだされている。バイオマテリアル研究の血液との戦いが終結する気配はまったくない。

#### 文 献

- 1) Bowman HW : Clinical evaluation of dextran as a plasma volume expander. *J Am Med Assoc* 1953, 153 : 24-26.
- 2) Sciqest 52 : 24, 1979.
- 3) Keipert PE, Chang TM : Pyridoxylated polyhemoglobin as a red cell substitute for resuscitation of lethal hemorrhagic shock in conscious rats. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1985, 13 : 1-15.
- 4) 野上弥志郎, 木下 学, 高瀬凡平, 服部秀美, 庄野 聡・他 : 致死性出血性ショックに対する人工血液輸血の救命効果と生体に及ぼす影響. *人工臓器* 2006, 35 : S-155.
- 5) Bode AP, Fischer TH : Lyophilized platelets : fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007, 35 : 125-133.
- 6) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H et al. : Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGP1a/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306 : 256-260.
- 7) Kim HW, Greenburg AG : Toward 21<sup>st</sup> century blood component replacement therapeutics : artificial oxygen carriers, platelet substitutes, recombinant clotting factors, and others. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006, 34 : 537-550.
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K et al. : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2007, Published on line Nov 30.
- 9) Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M et al. : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997, 90 : 5002-5012.
- 10) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R et al. : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275 : 964-967.
- 11) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C et al. : Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999, 85 : 221-228.
- 12) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JJ, Uchida S et al. : Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001, 103 : 634-637.
- 13) 山岡哲二, 竹部義之, 木村良晴 : 高分子論文集 1998, 55 : 328-333.
- 14) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A : Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med* 1996, 2 : 32-34.
- 15) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M et al. : Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005, 129 : 1330-1338.



## Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response

Tang H. Ying<sup>a,b</sup>, Daisuke Ishii<sup>c</sup>, Atsushi Mahara<sup>d</sup>, Sunao Murakami<sup>d</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>d</sup>, Kumar Sudesh<sup>a,b</sup>, Razip Samian<sup>b</sup>, Masahiro Fujita<sup>a,\*</sup>, Mizuo Maeda<sup>a</sup>, Tadahisa Iwata<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Bioengineering Laboratory, RIKEN Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

<sup>b</sup> School of Biological Science, Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia

<sup>c</sup> Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>d</sup> Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Received 10 September 2007; accepted 24 November 2007

Available online 21 December 2007

### Abstract

Polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers of poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-5mol%-(*R*)-3-hydroxyhexanoate], poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-7mol%-4-hydroxybutyrate] and poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-97mol%-4-hydroxybutyrate] were electrospun to fabricate scaffolds with enhanced biocompatibility and bioabsorption. Subcutaneous implantation of the fibers in rats was performed to investigate their bioabsorption behavior and tissue response. The fibers before and after the *in vivo* experiments were characterized using gel permeation chromatography scanning electron microscopy, X-ray diffraction and tensile test. Histological evaluation was also performed to determine the tissue response. The structures and properties of the electrospun PHA copolymers were compared with those of the electrospun poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate]. The content and type of the second monomer and the diameter of fiber significantly influence the bioabsorption. The tissue response was found to improve with the high content of 4-hydroxybutyrate.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Electrospun fiber; Polyhydroxyalkanoate; Tissue response; Bioabsorption

### 1. Introduction

In response to the growing demand in the field of tissue engineering, the number of polyhydroxyalkanoates (PHAs) currently under evaluation as biomaterial has expanded to five, that is, poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] [P(3HB)], poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)], poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate] [P(3HB-*co*-4HB)], poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-(*R*)-3-hydroxyvalerate] [P(3HB-*co*-3HV)] and poly[(*R*)-3-hydroxyoctanoate-*co*-(*R*)-3-hydroxyhexanoate]

[P(3HO-*co*-3HHx)] [1]. To date, PHA and its composites are thought to have good potentials as emerging materials for medical devices such as sutures, bone plates, surgical meshes and cardiovascular patches, just to name a few [2]. A recent major breakthrough for PHA as a new class of biomaterial is the clearance obtained from the Food and Drug Administration of the United States of America for the use of P(4HB)-derived Tephaflex<sup>®</sup> absorbable suture [3].

PHAs are a family of biopolyesters produced by numerous bacteria as intracellular carbon and energy compound under unfavorable growth conditions such as limitation of nitrogen, phosphorus, oxygen or magnesium in the presence of excess supply of carbon source [4–6]. PHAs are particularly attractive because they are bioabsorbable and biocompatible. The metalolism and excretion of some monomers incorporated into PHA

\* Corresponding author. Tel.: +81 48 467 9312; fax: +81 48 462 4658.

\*\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 7888; fax: +81 3 5841 1304.

E-mail addresses: [mfujita@riken.jp](mailto:mfujita@riken.jp) (M. Fujita), [atiwata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:atiwata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp) (T. Iwata).

are well understood. For example, the monomeric component of P(3HB), (*R*)-3-hydroxybutanoic acid (3HB), is a ketone body present at concentrations of 3–10 mg per 100 mL blood in healthy adults [1,7]. The monomeric component of P(4HB), 4-hydroxybutanoic acid (4HB), can also be found widely distributed in the brain, kidney, heart, liver, lung and muscle of the mammalian body [8]. Furthermore, the hydroxyl acids released during PHA *in vivo* breakdown are found to be considerably less acidic and less inflammatory than many currently used synthetic absorbable polymers such as poly(lactic acid) (PLA) [9]. P(3HB) has, however, limited application due to its high brittleness, poor processability and slow degradation [10]. Therefore, researches in this field of interest had shown great progress over the past 20 years and it is now possible to design and synthesize various kinds of PHA (reviewed in Ref. [11]) to overcome the inferior properties of P(3HB).

New polymer processing approaches are in demand to create degradable porous scaffolds that can support the hierarchical structures of many tissues ranging between 0.1 and 1.0 mm [12]. Electrospinning has emerged as one of the methods offering simplicity and versatility in preparing such biomaterials [13]. Electrospun biomaterials facilitate better cell attachment and perfusion due to very high surface area-to-volume ratio and high porosity. Improved cellular response is also suggested because the morphology and architecture of electrospun structure are similar to those of some extracellular matrix (ECM) [14]. In addition, electrospinning may provide an alternative method to produce fibrous materials with improved mechanical properties compared to solid-walled equivalents [15].

Thus, in this study, we used electrospinning to develop scaffolds of fibrous PHA copolymers; P(3HB-*co*-5mol%-3HHx), P(3HB-*co*-7mol%-4HB) and P(3HB-*co*-97mol%-4HB) (Fig. 1), in aim of achieving enhanced biocompatibility, mechanical properties and bioabsorption. We also describe here the characterization and effects of sterilization on the physical properties of the electrospun PHA copolymers. Our study is the first to do a detailed comparison on the bioabsorption rate and the tissue response of electrospun PHA copolymers containing 3HB, 3HHx and 4HB monomers implanted subcutaneously in rat model.

## 2. Materials and methods

### 2.1. PHA synthesis

P(3HB-*co*-97mol%-4HB) was biosynthesized by *Delftia acidovorans* (formerly known as *Comamonas acidovorans*) using glucose and 1,4-butanediol as carbon sources, according to the method described in Ref. [16]. P(3HB-*co*-7mol%-4HB) was kindly provided by Dr. Toshihisa Tanaka of RIKEN Institute, Japan. The *in vitro* toxicity of P(3HB-*co*-4HB) derived from *D. acidovorans* has been determined recently [17]. P(3HB) and P(3HB-*co*-5mol%-3HHx) supplied by ICI Biopol and P&G, respectively, were purified before use. Briefly, the purification of the P(3HB) and P(3HB-*co*-5mol%-3HHx) was performed by dissolving the polymers in chloroform followed by precipitation in excess hexane and filtration.

### 2.2. Fabrication of fibrous implant and electrospinning

Each polymer solution of 1 wt% concentration was prepared by dissolving 100 mg of the polymer in 9900 mg of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

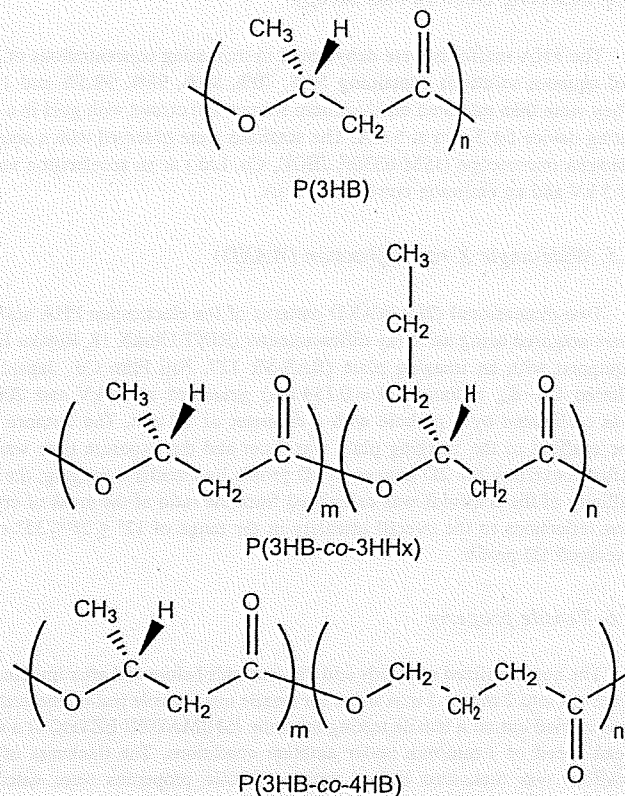


Fig. 1. Chemical structures of PHAs used in this study.

(HFIP). Electrospinning was performed using Esprayer ES-2000 (Fuence, Co. Ltd., Japan). The polymer solution was placed in a 1-mL glass syringe with an inner needle diameter of 0.5 mm. The syringe was set vertically at the support of the electrospinning device and the solution was extruded at a constant rate of 40  $\mu\text{l min}^{-1}$ . A positive voltage of 15 kV was applied at a distance of 20 cm between the needle tip and the copper collecting plate. The jet current was in the range of 38.3–38.7  $\mu\text{A}$  and the collecting time was approximately 8 h. For effective collection of the electrospun fibers, a square fiber-collecting area (3 cm  $\times$  3 cm) was created on the copper plate by covering the rest of the plate with a non-conductive plastic. A sheet of aluminum foil was used to cover the collection area to ease the recovery of fibrous matrix from the copper plate. Each electrospun PHA scaffold was then cut into two different dimensions: 1 cm  $\times$  1 cm and 1 cm  $\times$  3 cm, respectively. All scaffolds were sterilized overnight with ethylene oxide (EtO) at 40  $^{\circ}\text{C}$  before implantation in rat.

### 2.3. Subcutaneous implantation in rat and retrieval

Four 12-week-old male Wistar rats were used for implanting the PHA scaffolds; two for scaffolds measuring 1 cm  $\times$  1 cm while the remaining two for scaffolds measuring 1 cm  $\times$  3 cm. The animals were cared for in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences, approved by the Physiological Society of Japan. All experiment protocols had been reviewed and approved by the Animal Subjects Committee of the National Cardiovascular Center, Osaka, Japan. The rats were first injected with anesthetic before implanting the scaffolds. The 1 cm  $\times$  1 cm scaffolds were implanted subcutaneously at one side of the backbone while the 1 cm  $\times$  3 cm scaffolds were implanted subcutaneously at the backbone. The grouping of the rats was based on the duration of observation for 4 and 12 weeks. Upon explantation, the scaffolds measuring 1 cm  $\times$  1 cm were stored in 2.5% glutaraldehyde solution until further analysis by SEM. The retrieved 1 cm  $\times$  3 cm scaffolds were treated with 1.25 wt% trypsin to remove the surrounding tissues. They were then kept in tubes containing phosphate buffered saline (PBS) until further use.

## 2.4. Scanning electron microscopy

The PHA scaffolds were dehydrated in increasing concentrations of ethanol aqueous solutions containing 50%, 70%, 90%, 95%, 99.5% and 100%. They were then mounted on aluminum stumps and coated with gold in a sputtering device for 3 min at 5 mA. The scaffolds were observed with a scanning electron microscope (JSM-6330F, JEOL, Co. Ltd.) at an acceleration voltage of 5 kV and an emission current of 12  $\mu$ A.

## 2.5. Wide-angle X-ray diffraction (WAXD)

Two-dimensional (2D) WAXD patterns of the electrospun PHA scaffolds were acquired using an X-ray diffractometer (RINT UltraX 18, Rigaku Japan) equipped with an imaging plate (BAS-SR 127, Fuji Film Co., Japan). Ni-filtered Cu-K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.154$  nm) generated at 40 kV and 200 mA was collimated by a pinhole with a diameter of 1.0 mm. The distance from the scaffold to the imaging plate was 5 cm and the exposure time was 6 h. After converting the 2D images to 1D profile by circular-averaging, the crystallinity of the scaffolds was calculated from the ratio of the areas of crystalline reflections to the overall intensity in the range of  $12^\circ \leq 2\theta \leq 35^\circ$  of the averaged 1D profile.

## 2.6. Tensile property

The non-sterilized scaffolds and the scaffolds before and after implantation were cut into 2 mm  $\times$  5 mm strips for tensile test. Tensile test on the scaffolds was carried out on a tensile testing machine (SHIMADZU EZTest) at a cross-head speed of 1 mm/min under ambient conditions. The thickness of each scaffold was measured before testing. Tensile properties were calculated from the stress–strain curves as means of two measurements.

## 2.7. Gel permeation chromatography (GPC) analysis

The molecular weight of the scaffolds was measured with gel permeation chromatography at 40  $^\circ$ C, using a Shimadzu 10A GPC system equipped with a 10A refractive index detector and Shodex K-806M and K-802 columns. Chloroform was used as the eluant at a flow rate of 1.0 ml min $^{-1}$ . The calibration curve was prepared by using polystyrene standards with narrow polydispersity.

## 2.8. In vitro degradation evaluation

Each of the 1 cm  $\times$  3 cm sterilized scaffold was immersed in 10 mL phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 in sterilized capped containers. These containers were then incubated at 37  $^\circ$ C without agitation. After 4 and 12 weeks, the scaffolds were recovered and characterized by SEM, tensile test, GPC and WAXD.

## 2.9. Histological observation

The surrounding tissues were excised together with the electrospun PHA scaffolds and fixed with 2.5% glutaraldehyde solution. A small piece of the tissue was then embedded in paraffin before subjecting it to microtome sectioning. Hematoxylin and eosin (HE) were used for staining the tissues. The tissue response to the scaffolds was evaluated from the coloration observed with a phase-contrast microscope.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Morphological changes of electrospun PHA scaffolds

The retrieved electrospun PHA scaffolds showed various changes in appearances after subcutaneous implantation

(Fig. 2). After 4 weeks, both the electrospun P(3HB) and P(3HB-co-5mol%-3HHx) remained in their initial form. The electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) was fragmented into large pieces while the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) shrunk and became thinner. Even after 12 weeks, the electrospun P(3HB) showed no morphological change. However, significant changes were observed for the other three electrospun PHA copolymers. The degree of degradation increased in the order of P(3HB-co-5mol%-3HHx), P(3HB-co-7mol%-4HB), and P(3HB-co-97mol%-4HB). The electrospun P(3HB-co-5mol%-3HHx) displayed crevices on its surface while the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) was degraded into small fragments. Only a small piece of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) scaffold was retrieved, indicating enhanced bioabsorption of this 4HB-rich copolymer.

To have a better understanding on the progress of biodegradation at a fiber scale, SEM was used to observe the morphological changes of the fibers of all the electrospun PHA scaffolds. SEM revealed that all the as-spun scaffolds consist of randomly oriented fibers (Figs. 3 and 4). Further morphological feature is that the fibers fuse together. Namely, the electrospun fibers organize into a three-dimensional network. This is probably because the solvent (HFIP) evaporation was incomplete when the fibers were deposited on the collector plate. The width of the fiber between the junctions was quite uniform. The width decreased in the order of P(3HB)  $\approx$  P(3HB-co-5mol%-3HHx) (520 nm)  $>$  P(3HB-co-97mol%-4HB) (220 nm)  $>$  P(3HB-co-7mol%-4HB) (190 nm). It has been reported that the width increases proportionally with the molecular weight of the polymer [18]. This is because higher degree of chain entanglement due to high molecular weight is assumed to make it harder for the electrostatic forces to pull or extend individual chains [19]. Accordingly, the matrix of the electrospun P(3HB) and P(3HB-co-5mol%-3HHx) consisted of larger fibers compared to the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) because of their high molecular weight (Table 1).

Interestingly, only the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) formed fibers with irregular shapes with intermittent spindle like beads on string (Fig. 4A). Possibly the formation of the beaded P(3HB-co-7mol%-4HB) fibers is the result of low net charge density. Previous studies have shown that high net charge density favors the formation of bead-free fibers [20,21]. According to Ref. [20], the net charge density is inversely proportional to the mass of dry polymer (i.e. mass of scaffolds collected from electrospinning), if the other experimental conditions such as jet current, collecting time and polymer concentration are the same. The net charge density decreases in the order of P(3HB-co-5mol%-3HHx) (105 C/l)  $>$  P(3HB) (1002 C/l)  $>$  P(3HB-co-97mol%-4HB) (77 C/l)  $>$  P(3HB-co-7mol%-4HB) (484 C/l). In this study, the P(3HB-co-7mol%-4HB) scaffold had the highest collected mass.

After sterilization, the morphologies observed for the electrospun P(3HB), P(3HB-co-5mol%-3HHx) and P(3HB-co-7mol%-4HB) remained unchanged (Figs. 3 and 4). The matrix of P(3HB-co-97mol%-4HB), however, became less porous

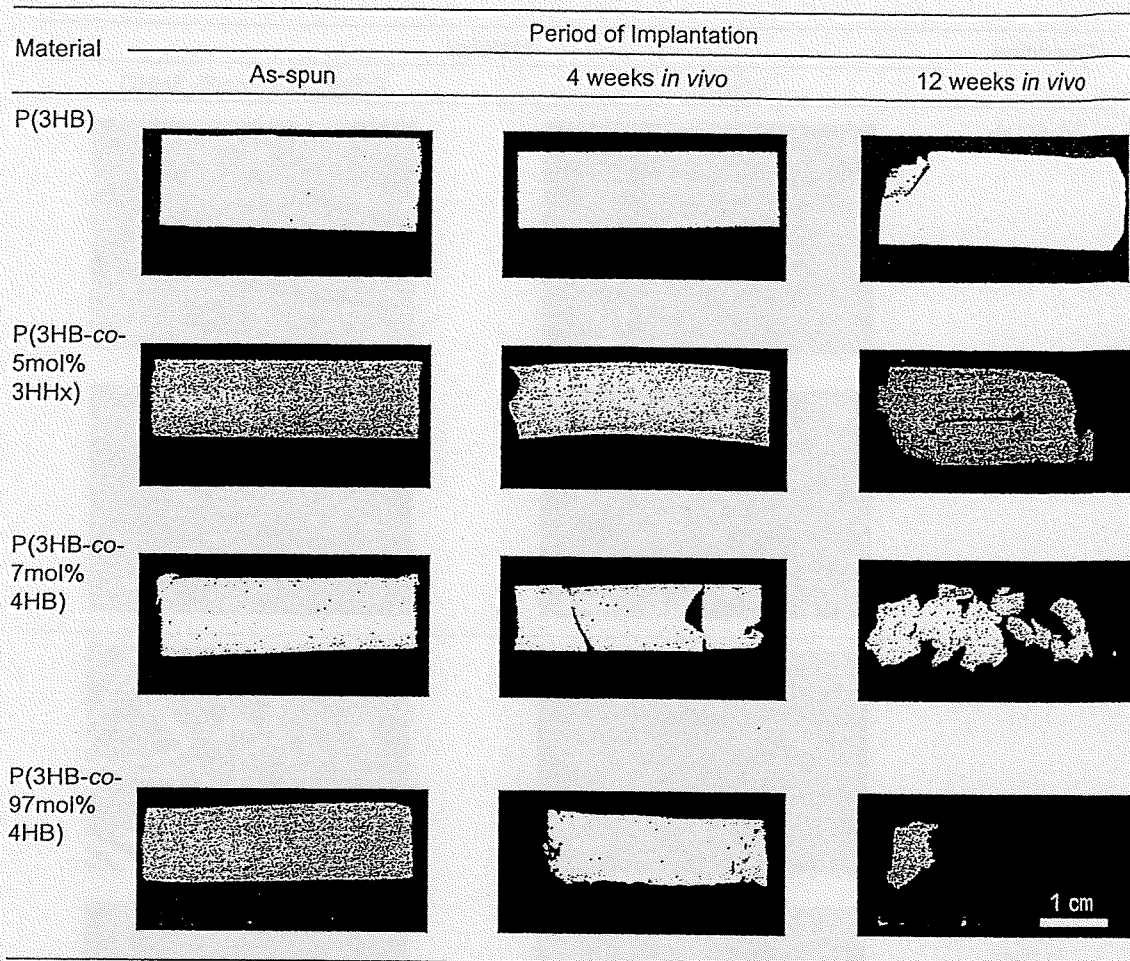


Fig. 2. Physical appearance of the electrospun PHA scaffolds before and after 4 and 12 weeks of subcutaneous implantation in rat.

(Fig. 4B2). The temperature (40 °C) of the EtO sterilization is close to the melting temperature of P(3HB-co-97mol%-4HB) ( $T_m = 47$  °C), and thus led to the fusing of some fibers to each other.

### 3.1.1. *In vivo* study

In SEM, only the remaining scaffolds that could be retrieved from rat after the *in vivo* experiments were observed. Nevertheless, such observations provided the information on the morphological changes by implantation. For the P(3HB) and P(3HB-co-5mol%-3HHx) scaffolds, no remarkable change in their appearances by implantation during the period investigated here was observed (Fig. 3). This result is in good agreement with the macro-scale observation, as shown in Fig. 2. On the other hand, the fibers of the copolymers with 4HB unit were influenced by the implantation. At 4 weeks of implantation, the fibers of P(3HB-co-97mol%-4HB) showed fragmentation (Fig. 4B3). After 12 weeks, surface erosion became more evident as the density of the fibers decreased remarkably due to fragmentation of the fibers to shorter segments. The progression of bioabsorption was also evidenced by the formation of pores on the surface of these fibers as indicated by the arrow in Fig. 4B4. These evidences

indicate that the existence of 4HB monomer units enhances the degradability, or the bioabsorption of PHA.

After 4 and 12 weeks, the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) fibers appeared to have swollen (Fig. 4B3 and B4). A slight decrease in the fiber density was also observed for the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) (Fig. 4A4) at week 12. Previous studies have demonstrated that fibers of electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), poly(D,L-lactic acid) and poly(butylene succinate) which were highly amorphous showed swelling after immersion in PBS [22–24]. Hence, it is possible that the swelling of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) fibers occurred due to the penetration of water into their amorphous regions.

### 3.1.2. *In vitro* study

SEM showed that there was no evidence of degradation on the surface of all the electrospun PHA scaffolds after 4 weeks of immersion in PBS (Figs. 3 and 4). All samples retrieved at 12 weeks also revealed that their structural integrities were maintained. This is because PHA hardly undergoes hydrolysis at pH value around neutrality. Similar to the observations for the *in vivo* study, the fibers of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) also demonstrated swelling.