繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤 田 和 也・寺 田 堂 彦・藤 里 俊 哉

1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維＝衣料品”のイメージが強いことには変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げる事が出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用化しようとする研究例である。

2. 研究背景

我々の体内に疾病組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、パイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

図1 血管構造の概略図

DOHIKO TERADA

大阪工業大学 工学部 博士研究員
博士(工学)

〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1

〈専門〉高分子材料加工

〈趣味〉読書

KAZUYA SAWADA

大阪成蹊短期大学 総合生活学科
准教授 博士(工学)
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62

Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579

E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp

〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学

〈趣味〉スキー、旅行

TOSHIYA FUJISATO

大阪工業大学 工学部 教授 工学博士

〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1

Tel: 06-6954-4746

E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp

〈専門〉再生医工学、組織工学

〈趣味〉旅行計画

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繊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る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. 超高静水压印加法

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、超高静水压印加処理を考案した。これは、試料に対しおおよそ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、内在性レトロウィルス(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、既に製菓・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CO₂である。本研究チームにおいてもCO₂を媒体の有力候補として検討している。超臨界CO₂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、CO₂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、CO₂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、CO₂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、従来法を陵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CO₂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、CO₂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。CO₂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、超高圧印加法では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、CO₂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)

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す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。“医療の繊維”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(相羽誠一)
TEL: 072-751-9522 FAX: 072-751-9628
E-mail: chitin@m.aist.go.jp <http://www.jscc.jp/>

第55回レオロジー討論会

主 催：日本レオロジー学会、日本バイオリオロジー学会
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栗田町 93 番地
京都リサーチパーク内 (社)日本レオロジー学会
TEL: 075-315-8687 FAX: 075-315-8688
E-mail: member@srj.or.jp