

## 生体力学場に感応する骨格基材の加工技術と再生医療

松田, 武久  
九州大学大学院医学研究院医用工学分野

<https://doi.org/10.15017/19297>

---

出版情報：福岡醫學雑誌. 96 (6), pp.287-289, 2005-06-25. 福岡医学会  
バージョン：  
権利関係：

## 生体力学場に感応する骨格基材の加工技術と再生医療

九州大学大学院医学研究院医用工学分野

松田 武久

### はじめに

生体組織・臓器を構成している細胞は、多かれ少かれ生体の内在的な、或いは外的な力学的ストレスを受け、これによって細胞・組織の恒常性を維持していることが、この10年間で明らかにされつつある。一般に、細胞はストレスにさらされると、それに対して的確に適応して形態形成と機能発現をし、過度のストレスの場合には、破綻死する。この中でも力学的ストレスは物理的な力として細胞や生体が受ける刺激であり、摩擦力、ずり応力 (shear stress)、伸展応力、圧縮応力、経壁圧力である。細胞は、内外に生じた力による変形に対して、それに適応するように (応力を小さく、エネルギー損失を最小にするように) 自らの形を変える能力を持っているので、細胞は応力を感知してその情報を形に変換していると言える。細胞にとって力学的環境要因は大切な外的情報の一つであり、どのように感知して (メカノセンサの存在)、どのような応答プログラム (シグナル伝達) が整備・配置されているのかは、この10年間の細胞生物学、特に血管内皮細胞の研究分野で明らかにされつつある。

力学的ストレスは、物理的な力のベクトルおよびスカラー量およびその加重時間プロファイル (繰り返し、持続あるいは間歇性) によって細胞機能の発現 (増殖・分化・アポトーシス) が起こり、遺伝子レベルの変化が生じる。また、細胞単体のみならず、同種細胞の局所的集合化と階層性サブ組織化、さらに組織全体としての形および超微細構造に大きな変化をもたらす。細胞外マトリックス分子はベクトル方向への配向と集合による超分子構造体形成が起こる<sup>1)2)</sup>。

従って、細胞を主役とする組織工学では、対象とする臓器が生体内で受ける力学場の強度に対応して迅速に変形でき、除重によって速やかに原形に復元出来る力学的細胞外環境場の設計が重要である。即ち、力学ストレス場に感知し、細胞の形

態と機能および細胞外マトリックスのレベルおよび組織レベルでの高次構造化を具体化する骨格基材 (Mechano-active Scaffold) の設計が組織工学の基盤とみなせる。このような生体力学場に感応する骨格基材の要求条件として、

- 1) 力学刺激に対して破損・破壊しない力学的性質を有する。
- 2) 繰り返し又は間歇的に受ける力学ストレスに感応して迅速に伸縮および復元できる基材。
- 3) 長期間の耐久性および耐ストレスの力学的特性がある。
- 4) 対象とする臓器によっては、生体内リモデリングによる正常組織の再生と同調して、骨格基材は分解・吸収され消滅する。

力学的ストレス場が最もかかる硬組織として骨と歯、一方、軟組織として動脈、軟骨および靭帯である。本稿では、動脈血管および軟骨組織に限定して、まずこれらの組織の生体力学場の特徴を述べ、ついで筆者の研究グループの骨格基材の成型加工のアプローチを紹介したい。

### 1. 血管組織工学

#### バイオメカニックスを考慮した人工骨格

力学的適合性に関しては生体血管壁のコンプライアンスに一致するような人工骨格 (Scaffold) の設計が重要である。宿主血管と人工血管の管径の圧依存性が異なれば (Compliance Mismatching)、人工血管内における局所的な血流の乱れ、および吻合部における宿主組織側に応力集中による組織損傷が起こることが実験的にも理論的にも知られている。前者においては血栓形成、後者においては内膜肥厚を誘引するものと議論されている。生体内において拍動流によるストレスを宿主生体血管と同様に感受して一心拍毎に管径を生体血管のそれと同調して変化できれば、少なくともバイオメカニックスの観点からは理想的な人工血管の開発につながるものといえる。生体の圧・管相関はいわゆる“Jカーブ”を呈し、低圧領域ではよく拡張し、生理的圧領域では圧は管径の増大と共にほぼ指数関数的に増大し、より高圧領域では管径の圧力依存性は極めて小さくなる (図2)。一方、臨床に用いられている人工血管は剛直であり、管径の圧力依存性は生体血管と比べると極めて小さ

い。一方、内膜肥厚の原因となる SMC の増殖は繰り返し伸縮する基材上で培養すると大幅に抑制され、また増殖型から収縮型へ形質変換が誘致されることを著者らは明らかにしている。このように力学的適合性の付与は正常な組織形成に重要な課題と言える。

#### (1) エキシマ・レーザ微細孔加工<sup>3)4)</sup>

この“J”カーブの実現に向けての我々のアプローチを紹介する。一心拍毎の血管壁の伸展に追従できる力学設計は材料にセグメント化ポリウレタン（人工心臓に用いられているエラストマーで柔軟性と対疲労性は実証されている）の薄膜を用い、エキシマ・レーザで微細孔を多数あけることによって、生体とのコンプライアンスを一致（Compliance Matching, 力学的適合性）させた。EC と SMC の階層ハイブリッド組織の外側からこの微細加工したフィルムを巻いて縫合して動脈に移植すると、拍動圧に充分感応して拍動し、また微細孔を通じて外側からの組織侵入（細胞交通性）が大幅に促進された。この人工骨格を用いたハイブリッド血管は内膜肥厚を起こすことなく、長期に安定した組織を形成した。しかしながら、整理的血圧領域では Compliance Matching したが、低圧領域での管径の拡張を実現できていなかった。

Jカーブを特徴とする血圧-径関係を有する構造体設計は単一の構造体（従来の市販の人工血管）では達成できず、生体と同様な複合構造を考慮する必要があると考えられる。セグメント化ポリウレタンフィルムの材質、膜厚および微細孔および溝密度を変えることによって単筒での血圧-径曲線を求め、また、二筒モデルを作製し、生体類似の Jカーブとコンプライアンス等の力学的設計の可能性を考案した。多孔および溝構造は CAD で制御した炭酸ガスレーザ装置を用いて作製した。単筒の場合には、薄膜化、多孔質化および溝構造を付与することによってコンプライアンスは極めて高くなり、生体血管と同様な値を達成できたが、高圧領域で伸長するエラストマー特有の逆 Jカーブが得られた。一方、大きなコンプライアンスを有する外筒と比較的小さなコンプライアンスを有する外筒の二筒モデルではこれらの二筒が高圧領域で重なり Jカーブが実現できた。これらの力学的特性はそれぞれの円筒の力学的性質および外径

によって決定され、同軸二筒モデルが力学的適合性を忠実に実現できる設計原理の一つであると言える。

#### (2) 高電界紡糸加工<sup>5)~7)</sup>

一方、マイクロからナノファイバーのメッシュは高電界紡糸 (electrospinning 技術によって作製出来る。古くは 100 年前にその技術の可能性は示唆されていたが、この数年、科学技術のナノ技術への傾斜とともに見直されている。直流高電圧(約 10~20 KV) を金属紡糸口（私共の場合は注射針）にかけると、ポリマー溶液が対極（負電荷）の金属コレクターに連続的に断裂することなく飛行するもので、対極に引き付けられるにつれて溶液の径は細くなり (single jet: ミクロンスケール)、また飛行中に溶液が蒸発するにつれて、single jet の表面正荷電密度が急激に上昇し、ファイバーは分岐 (instable jet の形成) してコレクターにナノスケールのファイバーが蓄積してメッシュを形成する。ファイバー径およびファイバー密度は操作条件や溶液性状によって制御できる。人工血管作製に関しては、自作装置によって、高速で回転し、且つ長軸方向に移動できる金属マンドレル上にセグメント化ポリウレタン溶液を用いてメッシュを集積させると、高密度のナノメッシュからなる筒状体が形成できる。高速回転すると、ナノメッシュは円周方向に配向し、また沸点が高い液体を低沸点溶液に少量添加すると、ファイバーは接地してからも接触ファイバーの接触部位で融合 (fusion) し、架橋点となり、物性に大きく影響する。図 7 に内圧・径相関を示した。高速回転によるファイバーの配向および高沸点の溶媒添加は圧依存性を小さくする。生体血管と同様な“しなやかさ”を有する小口径人工血管が作製できることになる。

## 2. 軟骨組織工学

関節軟骨は硝子軟骨で構成されており、細胞外マトリックスとして主として II 型コラーゲンにいくつかのコラーゲン (IX および XI 型) とヒアルロン酸、そして軟骨型プロテオグリカン、アグリカンによって構成されている。硝子軟骨の細胞外マトリックスの特徴は、大きな圧縮力が加わっても、大きく変形することがないこと、また表面層は極めて小さい摩擦係数を有する表面を形成している。

軟骨細胞 (chondrocyte) は柱状配列を有するラクネ構造体の中に存在し、血管網は全くない。圧縮によって変形するものの、緻密な細胞外環境からの水の押出しによる drug force とそれに細胞外マトリックスの糖鎖の静電反発力がバランスして大きな復元力を有している。軟骨細胞をゲル(例えば、コラーゲン、アガロース)の中に包埋し、これに圧縮応力を間断的に加えると、硫酸化プロテオグリカンおよびII型コラーゲンの産生能(いずれも分化型形質マーカー)が上昇するが、I型コラーゲン(脱分化形質マーカー)の産性能は低下することが報告されている。軟骨組織工学では、脱分化した細胞を用いて上記の組織の再生をさせることになる。出来るだけ早期に再分化させ、増殖能を抑制し、正常軟骨の細胞外マトリックスを、圧縮応力に感応する骨格基材を用いて再構築することが望ましい。このように圧縮応力は形質変換の促進と正常組織の細胞外環境の整備に必須であるが、このような細胞・マトリックスレベルに加え、復元力をもった組織形態が必要である。圧縮力に骨格基材が耐えられず破壊される場合は圧縮された状態で復元できない。復元力が不十分の場合も同様である。また、一度の大きな圧縮力以外でも繰り返し受けることによって圧縮破壊、および復元力低下によって、同様な不完全な軟骨再生となるので、理想的には、耐久性のある mechano-active scaffold が必要となる。

#### (1) 感温性ゼラチンの骨格基材<sup>8)9)</sup>

ゼラチンに感温性ポリマー「ポリ(N-インプロピルアクリルアミド)」をグラフト重合した感温性ゼラチンは34°C以上では水より析出してゲルを作り、それ以下では水に完全に溶解する。chondrocyte と一緒に常温で混ぜ、患部に注射すると直ちに細胞を包埋したゲルが形成することになる(injectable scaffold)。形成時は極めて軟いゲルである。自作した装置を用いて120秒間2.5 KPaで加重をかけると、ゲルは大幅に圧縮され、その後除重すると、僅かな復元しかなかった。一方、生軟骨組織は小さな変形と完全な復元がみられた。上記のハイブリッド軟骨を12週間まで培養すると培養期間と共に変形量が大幅に減少し、且つ復元量が増加した。これと同調してII型コラーゲンおよび硫酸化プロテオグリカンが主成分となり、また細胞周期は、ほぼG1/G0停止期になり、再分

化したと言える。巨視的にも半透明の硝子軟骨が再生した。生体外で充分成熟したハイブリッド組織を欠損部に埋植し、生組織との間隙を感温性ゼラチンで充填することにより、軟骨再生が大幅に促進された。

#### (2) 微細孔生分解性骨格基材

生分解性で且つ分解生成物が非毒性であり、且つエストマーである。ポリ(カプロラクトン-乳酸)共重合体(等モル組成:PLCL)を有機溶媒に溶かし、これに粒径のそろった塩の粉末を混ぜ、造膜した後、熱水中で脱塩すると連通孔(孔径約100ミクロン)の微細孔のスポンジが形成する。塩の粉末量によって孔密度80%~95%までのスポンジを作製し、これに水中で上記と同様に負荷・除重テストをすると、孔密度の低下と共に変形量が少なくなり、また復元量が増大し、正常軟骨組織と同様な機械的性質を示した。また繰り返し荷重/除重サイクルを行うと、孔密度が大きいの程、永久変形量は増大した。孔密度80%のPLCLをもちいて間断的に荷重刷ると、軟骨組織の再生が促進された。

#### おわりに

対象とする生体組織に加えられる内省的力学的ストレスは細胞レベルおよび組織レベルの形態形成、機能発現およびマトリックスの産生、超分子構造化に大きな効果を与える。従って、物理的な力の生物学的意義と理解(mechanobiology)および生体力学場に感応する骨格基材(mechano-active scaffold)の設計は再生医学において工学技術者の知識と技術が駆使できる重要な課題と言える。

#### 参考文献

- 1) 松田武久: バイオ人工血管のメカニクスとモデリング. 血管医学 5: 49-58, 2004.
- 2) 松田武久: 生体力学場に感応する骨格基材の加工技術と再生医療. 日本再生医療学会雑誌 14: 15-25, 2005.
- 3) Sonoda H, Takamizawa K, Nakayama Y, Yasui H, Matsuda T: Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: Design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication. J Biomed Mater Res 55: 266-276, 2001.
- 4) Sonoda H, Takamizawa K, Nakayama Y,

- Yasui H, Matsuda T: Coaxial Double-Tubular Compliant Arterial Graft Prosthesis: Time-Dependent Morphogenesis and Compliance Changes after Implantation. *J Biomed Mater Res* 65A: 170-181, 2003.
- 5) Kidoaki S, I. K. Kwon, Matsuda T: Mesoscopic spatial designs of nano- and micron-fiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* 26: 37-46, 2005.
  - 6) Matsuda T, Ihara M, I. K. Kwon, Takamizawa K, Kidoaki S: Rechnical Note Mechano-Active Scaffold Design of Small-Diameter Artificial Graft made of Electrospun Segmented Polyurethane Fabrics, *J Biomater Res* 73A: 125-131, 2005.
  - 7) I. K. Kwon, Kidoaki S, Matsuda T: Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolymers: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 26: 3239-3939, 2005.
  - 8) Ibusuki S, Fujii Y, Iwamoto Y, Matsuda T: Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: fabrication and in vitro performances. *Tissue Eng* 9: 371-384, 2003.
  - 9) Ibusuki S, Iwamoto Y, Matsuda T: System engineered cartilage using Poly (*N*-isopropylacrylamide)-grafted gelatin as *in situ* formable scaffold: *in vivo* performances. *Tissue Eng* 9: 1133-1142, 2003.