

学位論文題名

Preparation of biopolymer gels using organic acid derivative and development of medical devices

(有機酸誘導体による生体高分子ゲルの合成と医療デバイスの開発)

学位論文内容の要旨

現在、組織再生用の足場材料などの医療デバイスには、グルタルアルデヒド、エポキシ化合物などの化学合成された架橋剤が用いられている。これらの架橋剤は、生体または細胞に対し高い毒性を示し、生体内において分解されないため、用途や使用量が制限されている。そのため、生体親和性の高い架橋剤の開発が求められている。そこで、本研究においては、それら問題点を改善すべき架橋剤の合成を行い、その機能評価および医療デバイスとしての用途展開について検討を行うこととした。

生体内代謝系で代謝されるような架橋剤の提供を行うにあたり、着目したものが、複数のカルボキシル基を有する生体内分子である。一例として、生体内代謝回路であるクエン酸回路に着目してみると、トリ、もしくはジカルボキシル構造をなす、クエン酸、リンゴ酸などの生体低分子が含まれている。これら生体低分子であるクエン酸のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) で修飾・活性化を行えば、生体親和性の高い架橋剤が提供できるのではないかと考えられる。そこで、クエン酸誘導体 (CAD) である架橋剤の合成を行った。また、合成した CAD およびゼラチンを用いて調製されるゼラチンゲルについて、物性評価を行った (第1章)。

クエン酸回路内のジカルボキシル体であるリンゴ酸にスクシンイミジル基を導入した架橋剤 (Malic Acid Derivative : MAD) を合成し、コラーゲンを架橋して得られるゲルの物性評価および CAD との比較を行った。MAD および CAD により調製したコラーゲンゲルの膨潤度測定を行った結果、過剰量の CAD により架橋したゲルの膨潤度は増加していく傾向が確認された。一方、過剰量の MAD により架橋したゲルは CAD に見られたような膨潤度の増加は確認されなかった。これは、CAD の活性エステルが1点もしくは2点のみ反応したものがゲル内に残存しているためだと考えられる。一方、MAD に関しては、1点のみの反応は起こらないと考えられる。この結果から MAD と CAD には、架橋反応において違いがあることが明らかとなった (第2章)。

心筋梗塞などの原因となる虚血性心疾患の治療法として、薬剤溶出性ステント (DES) が使用されている。DES により再狭窄の大幅な改善が見られるものの、薬剤溶出後に残存する高分子マトリックスにより、炎症反応、血栓形成、さらにステント表面の内皮化が起きないといった問題が報告されている。そのため、内皮細胞の接着に優れ、抗血栓性を示すマトリックスの開発が求められている。そこで、DES 用分解性マトリックスの開発を行うため、クエン酸から合成した架橋

剤 (CAD) とコラーゲンを用いて調製されるゲルについて、含水率測定などの物性評価および細胞接着試験、抗血栓性評価を行った。その結果、CAD により架橋したコラーゲンゲルは細胞接着性と抗血栓性を併せ持つ分解性マトリックスとなりうる可能性が確認された (第 3 章)。

2 官能性架橋剤である MAD、市販架橋剤である EDC (1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、GA(グルタルアルデヒド)とコラーゲンを用いて調製されるゲルについて、物性評価、細胞培養試験を行った。L929 細胞を用いた架橋剤の細胞毒性試験の結果より、IC50 を求めたところ、MAD:0.5 mg/mL、EDC:0.05 mg/mL、GA:0.005mg/mL であることから、MAD の細胞毒性は、GA の 1/100、EDC の 1/10 であり、細胞毒性が非常に低いことが確認された。また、コラーゲンゲル中に残存する残存アミノ基量を測定した結果、MAD に関しては、理論量付近において残存アミノ基の消失が認められた。一方、EDC、GA により架橋したゲルの場合、これらを理論量の 2 倍以上加えた条件でも残存アミノ基の消失は認められなかった。これは、架橋反応の際に起きる副反応の影響と考えられる。さらに、細胞培養試験を行った結果、MAD により架橋したコラーゲンゲル上における細胞増殖能は、市販架橋剤にて調製したコラーゲンゲルと比較して優れていることが明らかとなった。以上の結果より、MAD は、市販架橋剤である GA、EDC と比べて細胞毒性が非常に低く、また、アミノ基との架橋反応性にも優れていることから細胞培養用の足場材料の精密設計に適した架橋剤であることが明らかになった (第 4 章)。

組織接着剤は、縫合糸に代わる組織の癒合方法として臨床で使用されている。しかし、これまでの組織接着剤は、接着力は強いが毒性が高い、毒性は低いが接着力は弱いなどの問題を抱えている。これらの問題点を解決するため、CAD を用いた新規な組織接着剤の開発を行った。ブタ組織 (もも肉) を用いた CAD を硬化成分、コラーゲンを接着成分とする 2 液混合系接着剤の接着強度測定の結果、その接着力は従来、臨床で用いられている接着剤である GRF グルー (アルデヒド-ゼラチン系接着剤) に匹敵する強度を示した。また、細胞毒性試験 (L929 線維芽細胞) を行った結果、CAD の毒性は、GRF グルーに比べて 1/10 以下であることが明らかとなった。以上の結果より、本研究において、高い接着力と低い毒性を併せ持つ従来品に代わるような新規組織接着剤の開発が行われた (第 5 章)。

本論文で開発した有機酸誘導体である CAD および MAD は、従来使用されているグルタルアルデヒド、エポキシ化合物などの化学合成された架橋剤と比べて、生体親和性に優れた架橋剤であることが明らかとされた。また、有機酸誘導体は、細胞培養用足場材料、組織接着剤などの医療デバイスへの用途展開が可能である材料であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一

副 査 教 授 遠 藤 俊 徳

副 査 教 授 覚 知 豊 次 (工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Preparation of biopolymer gels using organic acid derivative and development of medical devices

(有機酸誘導体による生体高分子ゲルの合成と医療デバイスの開発)

現在、組織再生用の足場材料などの医療デバイスには、グルタルアルデヒド、エポキシ化合物などの化学合成された架橋剤が用いられている。これらの架橋剤は、生体または細胞に対し高い毒性を示し、生体内において分解されないため、用途や使用量が制限されている。そのため、生体親和性の高い架橋剤の開発が求められている。そこで、本研究においては、それら問題点を改善すべき架橋剤の合成を行い、その機能評価および医療デバイスとしての用途展開について検討を行った。

生体内代謝系で代謝されるような架橋剤の提供を行うにあたり、着目したものが、複数のカルボキシル基を有する生体内分子である。一例として、生体内代謝回路であるクエン酸回路に着目してみると、トリ、もしくはジカルボキシル構造をなす、クエン酸、リンゴ酸などの生体低分子が含まれている。これら生体低分子であるクエン酸のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) で修飾・活性化を行えば、生体親和性の高い架橋剤が提供できるのではないかと考えられる。そこで、クエン酸誘導体 (CAD) である架橋剤の合成を行った。また、合成した CAD およびゼラチンを用いて調製されるゼラチンゲルについて、物性評価を行った (第1章)。

クエン酸回路内のジカルボキシル体であるリンゴ酸にスクシンイミジル基を導入した架橋剤 (Malic Acid Derivative : MAD) を合成し、コラーゲンを架橋して得られるゲルの物性評価および CAD との比較を行った。MAD および CAD により調製したコラーゲンゲルの膨潤度測定を行った結果、過剰量の CAD により架橋したゲルの膨潤度は増加していく傾向が確認された。一方、過剰量の MAD により架橋したゲルは CAD に見られたような膨潤度の増加は確認されなかった。これは、CAD の活性エステルが1点もしくは2点のみ反応したものがゲル内に残存しているためだと考えられる。一方、MAD に関しては、1点のみの反応は起こらないと考えられる。この結果から MAD と CAD には、架橋反応において違いがあることが明らかとなった (第2章)。

心筋梗塞などの原因となる虚血性心疾患の治療法として、薬剤溶出性ステント (DES) が使用されている。DES により再狭窄の大幅な改善が見られるものの、薬剤溶出後に残存する高分子マトリックスにより、炎症反応、血栓形成、さらにステント表面の内皮化が起きないといった問題が報告されている。そのため、内皮細胞の接着に優れ、抗血栓性を示すマトリックスの開発が求められている。そこで、DES 用分解性マトリックスの開発を行うため、クエン酸から合成

した架橋剤 (CAD) とコラーゲンをを用いて調製されるゲルについて、含水率測定などの物性評価および細胞接着試験、抗血栓性評価を行った。その結果、CAD により架橋したコラーゲンゲルは細胞接着性と抗血栓性を併せ持つ分解性マトリックスとなりうる可能性が確認された (第3章)。

2 官能性架橋剤である MAD、市販架橋剤である EDC (1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、GA (グルタルアルデヒド) とコラーゲンをを用いて調製されるゲルについて、物性評価、細胞培養試験を行った。L929 細胞を用いた架橋剤の細胞毒性試験の結果より、IC50 を求めたところ、MAD:0.5 mg/mL、EDC:0.05 mg/mL、GA:0.005mg/mL であることから、MAD の細胞毒性は、GA の 1/100、EDC の 1/10 であり、細胞毒性が非常に低いことが確認された。また、コラーゲンゲル中に残存する残存アミノ基量を測定した結果、MAD に関しては、理論量付近において残存アミノ基の消失が認められた。一方、EDC、GA により架橋したゲルの場合、これらを理論量の 2 倍以上加えた条件でも残存アミノ基の消失は認められなかった。これは、架橋反応の際に起きる副反応の影響と考えられる。さらに、細胞培養試験を行った結果、MAD により架橋したコラーゲンゲル上における細胞増殖能は、市販架橋剤にて調製したコラーゲンゲルと比較して優れていることが明らかとなった。以上の結果より、MAD は、市販架橋剤である GA、EDC と比べて細胞毒性が非常に低く、また、アミノ基との架橋反応性にも優れていることから細胞培養用の足場材料の精密設計に適した架橋剤であることが明らかになった (第4章)。

組織接着剤は、縫合糸に代わる組織の癒合方法として臨床で使用されている。しかし、これまでの組織接着剤は、接着力は強いが毒性が高い、毒性は低いが接着力は弱いなどの問題を抱えている。これらの問題点を解決するため、CAD を用いた新規な組織接着剤の開発を行った。ブタ組織 (もも肉) を用いた CAD を硬化成分、コラーゲンを接着成分とする 2 液混合系接着剤の接着強度測定の結果、その接着力は従来、臨床で用いられている接着剤である GRF グルー (アルデヒド-ゼラチン系接着剤) に匹敵する強度を示した。また、細胞毒性試験 (L929 繊維芽細胞) を行った結果、CAD の毒性は、GRF グルーに比べて 1/10 以下であることが明らかとなった。以上の結果より、本研究において、高い接着力と低い毒性を併せ持つ従来品に代わるような新規組織接着剤の開発が行われた (第5章)。

本論文で開発した有機酸誘導体である CAD および MAD は、従来使用されているグルタルアルデヒド、エポキシ化合物などの化学合成された架橋剤と比べて、生体親和性に優れた架橋剤であることが明らかとされた。また、有機酸誘導体は、細胞培養用足場材料、組織接着剤などの医療デバイスへの用途展開が可能である材料であることが示唆された。

これを要するに、著者は、組織再生用の足場材料などの医療デバイスについて、生体親和性の高い架橋剤に関する新知見を得たものであり、再生医工学とくに生体材料工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。