

氏 名	かね 兼 まつ 松 あき 明 ひろ 弘
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2674 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor. (外因性増殖因子の徐放を併用した脱細胞化膀胱マトリクスによる膀胱再生に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 開 祐 司 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】 今日一般的に行われている腸管を利用した膀胱再建手術には代謝障害や粘液産生などの様々な臨床的問題があり、膀胱組織そのものの再生の必要性が認識されている。生物由来の脱細胞化材料を用いた膀胱修復方法についての報告はこれまでに多数あり、その優れた修復能は内因性の増殖因子の残存によると考えられている。そこで脱細胞化膀胱マトリクス (bladder acellular matrix, 以下BAM) を外因性の細胞増殖因子の担体として用いた膀胱修復方法を開発し、その有効性を検討した。

【方法】 250-300 g のラット膀胱を多段階処理により脱細胞化した後に凍結乾燥を加え、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, 以下bFGF) 水溶液で再含水してbFGFを徐放するBAMを作製した。脱細胞後のBAMの構成成分の分析はHE染色, Elastica van Gisson 染色, およびラミニン, IV型コラーゲン, ヘパラン硫酸に対する免疫染色により行った。この材料について、放射ラベル化したbFGFを用いてまず各種水溶液内でのbFGFの放出を検討した。次にマウスの背部皮下に同じ材料を埋入してbFGFの生体内での経時的な減衰を評価するとともに、放射ラベル化したBAMの皮下組織内での分解を同様の方法で検討した。更に、同じ皮下モデルを用いて、BAMから放出されたbFGFの生理活性を、皮下組織内でのVEGF誘導量指標として評価した。最後に、10週齢の雌Wistarラットの膀胱の三分の二を切除し、BAMをグラフトとして用いてパッチ修復した。グラフトにはbFGFを低, 中, 高濃度で含んだものを用い, bFGFを含まないBAMで修復した群をコントロールとして, bFGFの添加が組織修復に与える効果を検討した。4, 12週目に膀胱内圧測定, 最大膀胱容量時のグラフトサイズの測定, HE染色および血管内皮と平滑筋のマーカーについての組織学的検討を, また12週目の群については組織槽内での再生部分の収縮実験を行った。

【結果】 BAMには構成型コラーゲンに加えて, ラミニンやIV型コラーゲンなどの基底膜成分が豊富に含まれていたが, ヘパラン硫酸についてはほとんど残留が認められなかった。BAMに含浸されたbFGFは, PBSや尿などの水溶液中においても60%以上が72時間以上消失することなくBAMの中に保持されていた。マウスの皮下において, 水溶液投与されたbFGFの放射活性は48時間以内に消失したのに対して, BAMに含浸させたbFGFでは約4週間にわたって徐々にその減衰を認めた。bFGFの放射性活性の減衰曲線はBAMの分解曲線とはほぼ一致しており, bFGFはBAMの分解に従って局所的に放出されていると考えられた。皮下においてBAMから放出されたbFGFは2週間以上にわたってその生理活性である肉芽形成と血管新生作用を示した。膀胱パッチ修復モデルでは, 4週目の時点でグラフトに含浸したbFGFの濃度に依存してグラフト内への血管新生の増加とグラフトサイズ縮小の抑制効果が認められた。いずれの群でも12週目において平滑筋の再生が形態的, 機能的に確認されたが, この時点ではグラフトサイズに有意差は認められなかった。

【結論】 この徐放システムはBAMの主要な構成要素であるコラーゲンとbFGFはとの相互作用を利用したものと考えられた。BAMは外因性のbFGFの徐放担体として生体内で機能し, これを膀胱修復材料として使用することによってグラフト上への新生血管の誘導が促進され, 短期的ではあるがグラフトの収縮が抑制された。長期的には, bFGF単独の添加によ

りグラフト上での理想的な膀胱組織の再生は得られなかったが、この方法により至適な増殖因子の組み合わせの解析が今後可能となると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文は膀胱の脱細胞化マトリクスが外因性の塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）の徐放担体として機能する新しい膀胱修復方法を示したものである。

今日一般的に行われている消化管を利用した膀胱再建手術には様々な臨床的問題があり、膀胱組織そのものの再生の必要性は高い。そこで申請者らは脱細胞化した膀胱の細胞外マトリクスを外因性の細胞増殖因子の担体とした膀胱修復法を開発し、その有効性を検討した。

まず、bFGFを含有したマトリクス材料をマウスの背部皮下へ埋入したモデルで徐放能の検討が行われ、bFGFが材料の分解に伴って徐放され、その生理活性である肉芽形成と血管新生作用を2週間以上にわたって保持していることが示された。

次に、bFGFを様々な濃度で含んだマトリクス材料をグラフトとして用いた膀胱修復モデルについて、術後4週目の時点でbFGFの濃度に依存してグラフト内への血管新生の増加とグラフトサイズ縮小の抑制効果を報告している。長期的には、bFGF単独では理想的な膀胱組織の再生は得られなかったが、この方法によって今後至適な増殖因子の組み合わせの解析が可能となりうると結論されている。

本研究で示された方法は、膀胱以外にも数多くの臓器について、またbFGF以外の様々な増殖因子について適用が可能であり、今後の臓器再建や再生テクノロジーの進歩に寄与するところが多い。

したがって、本研究は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年12月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。