

氏 名	うえ だ ゆう いちろう 上 田 勇 一 郎
学 位 の 種 類	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2395 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	工 学 研 究 科 高 分 子 化 学 専 攻
学位論文題目	Application of Tissue Engineering with Xenogenic Cells and Tissues for Regenerative Medicine (異種動物由来細胞および組織の再生医療への組織工学的利用法)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 田 博 夫 教 授 田 畑 泰 彦 教 授 大 嶋 正 裕

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、異種動物細胞および組織の再生医療への応用を目指した組織工学研究、すなわちブタ肝細胞を用いたバイオ人工肝臓 (BAL) に関する研究成果をまとめた第 1 部と、ブタ心臓弁を用いた代用心臓弁に関する研究結果をまとめた第 2 部とからなる。

第 1 部第 1 章では、ブタ肝細胞を透析器モジュールの中空糸内に封入することでヒト全血の灌流が可能な BAL を作製し、その機能評価を行った。本 BAL システムでは、ブタ肝細胞のみを充填することで高密度封入を可能にし、また、患者全血を比較的高速で灌流できるため BAL 内ブタ肝細胞に十分な酵素供給を行なえる等の利点がある。本システムの作製には、ブタ麻酔より BAL による治療開始までに、3 時間程度しか要さないことも大きな利点である。このことは特に急を要する劇症肝不全患者の治療においては重要な点と考えられる。試作した BAL を 48 時間にわたり *in vitro* 全血灌流培養を行ない、解毒機能評価のため薬物負荷試験を行った。この実験結果より、48 時間後においても解毒能を保持し、中空糸内のブタ肝細胞は血液内補体の攻撃を受けることなく生存していることが確認された。また、*in vitro* 評価とは別に肝細胞を含まない BAL 内血栓形成と血液に与える影響を観察した結果、モジュール内の血栓形成も極めて僅かであり、また、BAL モジュールが血液性状に与える影響が小さいことを明らかにした。

第 2 章では、BAL の新しい機能評価法として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を検討した結果をまとめた。薬物負荷により評価できる肝細胞機能の数は限られており、新しい機能評価法の確立が強く望まれている。BAL モジュールに封入したブタ肝細胞のチトクロム P-450 系酵素の mRNA 発現量とリドカイン負荷試験により評価した BAL の解毒能とはよく相関しており、RT-PCR 法が BAL の機能評価法として有効であることを示した。

第 3 章では、BAL の肝不全患者の治療機器としての有効性について薬物動態学的考察を行った結果をまとめた。その要点は、世界の多くの研究グループによって血漿灌流型 BAL が開発されているが、肝細胞への酸素供給、解毒速度、操作の簡便さなどの多くの点で全血灌流型 BAL の方が有利であること、自然肝臓で高速に解毒されているアンモニア等を効率よく BAL で解毒するためには患者と BAL 間を高速で環流する必要があること、血中半減期の長いタンパクを BAL で供給するには長時間の BAL 使用が必要であること、さらに、いかなる条件下でも BAL による有効な治療を行うためには肝細胞が数百 g 封入された BAL が必要であることが示された。

第 2 部第 4 章では、細胞外基質のみからなる代用弁の作製方法について研究した結果をまとめた。移植時に問題となっているグルタルアルデヒド架橋ブタ心臓弁の石灰化を防ぐため、その原因と考えられている細胞を構成している物質の抽出 (脱細胞処理) を行った。ブタ心臓弁を組織工学分心臓弁の基礎として選択した理由は、その解剖学および生体力学的見地より非常にヒトと似た特性を有しているためである。陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムと非イオン性界面活性剤である Triton X-100 を用いてブタ心臓弁の脱細胞化処理を行うことで、ブタ心臓弁から細胞および細胞構成成分はほぼ完全に除去されていることが、組織染色、透過型電子顕微鏡観察、およびタンパク質電気泳動などの結果から示され

た。脱細胞処理弁の形態は弁を構成する主成分であるコラーゲンとエラスチンなどの細胞外基質により保持されていた。脱細胞を施した心臓弁片をウサギの皮下に2週間埋入させた後の免疫染色の結果、免疫拒絶を回避していることも示された。このことから心臓弁組織から免疫反応の主な原因と考えられる異種細胞由来タンパク質を取り除くことにも成功したと考えられる。

第5章では、脱細胞処理を行なったブタ心臓弁の力学的特性や耐久性の評価を行なった研究成果をまとめた。弁葉の促進摩耗試験では1億回開閉後においても形状の変化は観察されなかった。弁性能試験および一軸性引張り試験ではグルタルアルデヒドで架橋が施されたブタ心臓弁よりもより新鮮弁に近い挙動を示した。また、脱細胞処理を行なった弁細胞の熱変性温度を示差熱分析装置にて計測したところ、ブタ新鮮弁との違いは観察されなかった。これらのことから、ドデシル硫酸ナトリウムと Triton X-100 を用いてブタ心臓弁の脱細胞処理を行っても、弁の力学的特性および耐久性は維持されていることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、人工物のみで作製された従来の人工臓器または医療用デバイスの機能が限られていることを鑑み、より高度な機能を代替するための方策として、生体由来の材料、さらに生細胞を用いた医療用具を開発する組織工学研究、すなわち、ブタ肝細胞を用いたバイオ人工肝臓（BAL）に関する研究およびブタ心臓弁を用いた代用心臓弁に関する研究の結果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. ブタ肝細胞を透析器モジュールの中空糸内に封入することでヒト全血の灌流が可能なBALを作製し、その機能評価を行った。ブタ肝細胞のみを充填することで高密度封入を実現した。また、血漿分離器を回路内に含まないことから比較的高速で患者血液を灌流でき、さらに、BAL内ブタ肝細胞への十分な酸素供給を可能にした。全血灌流培養48時間後においてもBALは解毒能を保持していた。肝細胞を含まないBALシステムを正常犬に接続したところ、モジュールが血液性状に与える影響が小さいことを明らかにした。

2. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法を用いて評価したブタ肝細胞内のチトクロムP-450系酵素のmRNA発現量は、リドカイン負荷試験によって評価したBALの解毒能とよく関連しており、RT-PCR法がBAL機能評価法として有効であることを示した。

3. 世界の多くの研究グループによって血漿灌流型BALの開発が進められているが、本論文における薬物動態学的考察から、肝細胞への酸素供給、解毒速度、操作の簡便さなどの多くの点で全血灌流型BALの方が有利であることが示された。また、いかなる条件下でBALの灌流を行おうとも、肝不全患者へ有効な治療を行うためには、肝細胞が数百g封入されたBALを用いる必要があることを示した。

4. 陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムと非イオン性界面活性剤である Triton X-100 を用いてブタ心臓弁の脱細胞化処理を行うことで、細胞外基質のみからなる代用弁の作製に成功した。

5. 脱細胞処理を行なったブタ心臓弁の力学的特性ならびに耐久性の評価を行った結果、弁葉の促進摩耗試験では1億回開閉後においても形状の変化は認められなかった。弁性能試験、示差熱分析および一軸性引張り試験では、従来のグルタルアルデヒドで架橋されたブタ心臓弁より、新鮮弁に近い挙動を示した。

本論文は、組織工学的に作製した高分子材料と異種動物細胞および組織の複合体の再生医療への応用の可能性を示すもので、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年12月25日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。