

脱細胞化肝臓の作製条件最適化法の確立

趙, 宰庸

<https://doi.org/10.15017/2534412>

出版情報：九州大学, 2019, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

氏 名 : 趙 宰庸

論 文 名 : 脱細胞化肝臓の作製条件最適化法の確立

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

重篤な肝疾患（肝不全等）の根治療法は肝移植のみであるが、慢性的なドナー不足が問題となっている。この問題を解決するため、ドナー肝臓の代替となる移植可能な肝グラフトの開発が望まれている。肝臓は多岐にわたる機能を担っている肝実質細胞（肝細胞）で主に構成されおり、酸素要求性が高いことが知られている。つまり、肝組織を構築するためには酸素供給が重要であり、優れた物質交換を実現する細胞足場が必須である。これらの背景から、肝臓の細胞成分を除去することによって得られる脱細胞化肝臓を足場として用い、移植用肝グラフトを再構築する研究が行われている。脱細胞化肝臓は、肝臓本来の緻密な血管構造や細胞外マトリックス成分を保持していることから、微細構造の再現と培養肝細胞の機能維持に有用である。よって、脱細胞化肝臓に血管内皮細胞や肝細胞等を播種し、移植可能な肝グラフトを再構築することでドナー肝臓の代替となり得る。さらに、脱細胞化肝臓の作製に血液型や長時間の虚血等の理由で肝移植に適合しなかった肝臓を利用し得ることから、ドナー不足の解決が期待されている。

脱細胞化臓器の作製は主に界面活性剤を使用しており、多くの界面活性剤の種類の中、Triton X-100、SDS による脱細胞化が古くから行われてきた。しかしながら、これまでの報告では、界面活性剤の種類や濃度の至適条件は確立されていない。例えば、高濃度の界面活性剤で処理した脱細胞化肝臓は、緻密な血管構造の崩壊や ECM 成分の変性等が問題となっている。肝臓本来の構造を維持しつつ細胞成分を完全に除去するためには界面活性剤の至適条件を定めることが重要であるにもかかわらず、その探索に臓器そのものを用いることはヒト臓器の入手の困難さを踏まえると現実的でない。これらのことから、ハイスループットに至適条件を決定する手法が求められている。

本論文では、界面活性剤による細胞の破碎と輸送現象に着目し、界面活性剤の種類・濃度の閾値（上限濃度と下限濃度）を効率的かつ迅速に決定する方法を確立して脱細胞化肝臓の作製条件を最適化した。まず、細胞や肝組織片（肝スライス）を用いて細胞を破碎しつつ肝構造を維持可能な界面活性剤の種類、上限・下限濃度等の至適条件を決定する手法を編み出した。さらに、至適条件で肝臓を脱細胞化し、細胞成分を完全に除去しつつ緻密な血管構造を維持した脱細胞化肝臓を作製した。

第 1 章では、細胞足場基材である脱細胞化肝臓の作製法を最適化する必要性を臨床の観点から述べた。また、本研究の目的や位置付け、及び本論文の構成を述べた。

第 2 章では、肝臓の機能や構造、及び肝疾患に対する治療法について示した。続いて、既往の脱細胞化肝臓の作製法について必要な知識や情報を示した。

第 3 章では、完全に細胞を破碎可能な界面活性剤の濃度決定手法の確立を目指した。ヒト・ラットの初代肝細胞を界面活性剤溶液に分散させ、細胞膜タンパク質や脂質とのミセル化で細胞を破

碎し、溶液中に溶出したタンパク質量から破碎した細胞を定量評価して界面活性剤の濃度を明らかにした。本手法により、臓器を用いることなく脱細胞化に必要な界面活性剤の濃度を効率的に決定し得た。

第 4 章では、脱細胞化肝臓の骨格の保持が可能な界面活性剤の濃度、及び各種界面活性剤の細胞破碎効果を高める溶媒条件決定手法の確立を目指した。肝組織片（肝スライス）を界面活性剤溶液に浸漬させ、組織収縮（肝組織構造の崩壊）を評価し、組織の収縮が確認されない界面活性剤の濃度を決定した。また、界面活性剤のミセルの性質が変わる条件である濃度、温度、緩衝液組成、pH、イオン強度を変化させた溶媒に界面活性剤を添加しそれを用いて脱細胞化肝スライスを作製することでより効果的な溶媒の選定を試みた。

第 5 章では、最適な条件下での脱細胞化肝臓の作製を目指した。第 3 章及び第 4 章で検討した界面活性剤の濃度、並びに界面活性剤の効果を高める溶媒を踏まえ、最適な界面活性剤条件でラット肝臓を灌流処理して脱細胞化肝臓を作製した。また、ラットの肝臓内での界面活性剤の灌流速度が脱細胞化肝臓の作製に及ぼす影響を明らかにすることによって、ネイティブ肝臓の構造と類似した脱細胞化肝臓を作製し得た。

第 6 章では、本論文のまとめと今後の展望を示した。

〔作成要領〕

1. 用紙はA4判上質紙を使用すること。
2. 原則として、文字サイズ10.5ポイントとする。
3. 左右2センチ，上下2.5センチ程度をあげ，ページ数は記入しないこと。
4. 要旨は2,000字程度にまとめること。
(英文の場合は，2ページ以内にまとめること。)
5. 図表・図式等は随意に使用のこと。
6. ワードプロ浄書すること（手書きする場合は楷書体）。
この様式で提出された書類は，「九州大学博士学位論文内容の要旨及び審査結果の要旨」
の原稿として写真印刷するので，鮮明な原稿をクリップ止めで提出すること。