

細胞および臓器の保存技術に関する研究

吉田, 梢

<https://hdl.handle.net/2324/4475087>

出版情報：九州大学, 2020, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 吉田 梢

論 文 名 : 細胞および臓器の保存技術に関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

細胞や臓器などの生物試料は医療や生命現象の解明などの幅広い分野で用いられており、その安定供給が求められている。つまり、それらの最適化された保存技術の開発が重要である。本論文では、細胞および臓器の保存技術開発を目的として、生物の基本単位である細胞とその高次構造である臓器それぞれに対して保存法の確立を行った。「生物試料の形態や性質を維持し、あるべき姿を維持する」保存を目指すため、細胞に関しては凍結保存後の機能低下が課題となっている肝細胞を対象とし、凍結保護剤であるトレハロースの添加法の最適化と細胞膜を保護する新規凍結保護剤（オレイルトレハロース）の創出とその有効性評価を行った。一方、臓器においては酸素要求性が高く機能維持が困難な肝臓を対象とし、肝臓の酸素要求を満たす酸素供給システムの構築によって、肝機能を維持する肝臓灌流保存の実現を目指した。最後に、細胞の凍結保存技術と灌流技術を融合し、肝臓の半永久的な保存を可能とする肝臓凍結の実現可能性を示した。つまり、本研究では新規保護物質の開発や保護物質の供給手法を検討し、細胞から臓器に及ぶ生物試料の体系だった保存技術を開発した。

第1章では、本研究の背景について述べ、本研究の目的を明らかにした。

第2章では、細胞および臓器の保存技術に関する既往の研究について述べ、研究上必要な知見や課題を明らかにした。

第3章では細胞凍結保存に取り組み、細胞膜非透過性凍結保護剤であるトレハロースを用いた肝細胞凍結法を提案した。トレハロースは優れた氷晶形成抑制効果とタンパク質安定化効果を有しているが、細胞に対して浸透圧ストレスを生じる。本章では、トレハロースが細胞に与える浸透圧ストレスの評価法を確立し、さらに浸透圧による障害を与えない低濃度のトレハロースにおいて氷晶形状を微細化させることを発見した。その結果、凍結保存後の肝細胞の細胞数および肝機能を向上させることに成功した。

第4章では細胞凍結保存に取り組み、凍結保存中の損傷から細胞膜を保護するために、細胞膜との積極的な相互作用と細胞保護効果の両方を備えた新規凍結保護剤（オレイルトレハロース）を開発した。オレイルトレハロースは細胞膜に挿入することで、第3章で述べたようなトレハロースの細胞保護効果を細胞膜付近で発揮させることが可能であった。さらに、オレイル基は細胞膜の流動性に影響を与え、凍結によって引き起こされる細胞膜流動性の低下を抑制することが可能であり、細胞に対して凍結保護耐性を付与することに成功した。その結果、凍結保存後の肝細胞の細胞数お

よび肝機能を向上させることが可能であった。加えて、第 3 章で最適化した添加濃度のトレハロースとオレイルトレハロースを共に凍結保護剤として用いた場合、凍結保存後の細胞形態や肝機能が著しく向上し、細胞膜と細胞外液の両方から細胞を保護する相加効果が得られた。

第 5 章では臓器灌流保存に取り組み、肝グラフト保存における保存温度を最適化するために、肝臓の酸素要求を満たす肝臓灌流保存システムを構築した。その結果、肝臓への酸素供給が十分である場合、肝グラフト保存における最適保存温度は、体内の活発な代謝活性が維持される正常体温であることが明らかとなった。その後、肝臓内の灌流液送達効率を向上させるために、体内の肝臓形状と門脈との位置関係を再現する形状保持型を作製した。その結果、肝臓のアンモニア代謝速度が上昇し、肝臓内への物質送達効率の向上が示唆された。つまり本章では、保存システムにおいて酸素供給や灌流液流速、肝臓内の液流れなどに代表される体内環境を模倣することの重要性を示し、その結果体内同様の活発な代謝活性を維持した保存を行うことで肝グラフトの質が向上することを示した。

第 6 章では臓器凍結保存に取り組み、第 3 章と第 4 章で確立した細胞凍結技術と第 5 章で開発した肝臓灌流システムを融合し、肝臓凍結保存技術を開発した。まず、臓器凍結保存における液置換や凍結解凍、生存率評価法などを構築した。その後、凍結保護剤の添加・除去濃度を段階的に変化させることで肝臓にかかる浸透圧ストレスを軽減しつつ体内の臓器形状を保持する支持型によって凍結保護剤を臓器全体に供給する凍結保存液の置換方法を開発した。その結果、ジメチルスルホキシドおよびトレハロースを用いた肝臓凍結保存によって凍結保存後の生存率が向上し、肝臓凍結保存の実現可能性を示した。

第 7 章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の成果に基づいて今後の展望を述べた。