

肝組織培養への応用を目指した酸素生成培養基材の 調製と酸素生成能の定量解析

励, 騰暢

<https://hdl.handle.net/2324/7443279>

出版情報 : Kyushu University, 2025, 博士 (システム生命科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



令和 7 年度博士論文

肝組織培養への応用を目指した酸素生成
培養基材の調製と酸素生成能の定量解析

令和 8 年 1 月

指導教員 水本博 准教授

九州大学 大学院システム生命科学府
システム生命科学専攻

励 騰暢

目次

第1章 緒言	1
1.1 本研究の背景と目的	1
1.2 本研究の方針	4
1.3 本研究のオリジナリティ	7
1.4 本論文の構成	8
第2章 既往の研究	10
2.1 組織工学 (TISSUE ENGINEERING)	10
2.1.1 組織工学における足場材料	10
2.1.2 血管化組織の構築	14
2.1.3 三次元細胞培養技術	15
2.2 肝臓組織工学の現状	17
2.2.1 肝臓とは	17
2.2.2 肝臓の構造	17
2.2.3 肝臓の機能特性	18
2.2.4 急性肝不全 (ALF) とバイオ人工肝臓 (BAL) の現状	20
2.2.5 肝組織構築の試み	21
2.4 酸素生成バイオマテリアル	24
2.4.1 無機過氧化物系酸素生成マテリアル	24
2.4.2 パーフフルオロカーボン (PFC) 系酸素運搬材料	26
2.4.3 ハイドロゲル封入型酸素生成システム	26
2.4.4 新規酸素生成材料と複合応用	27
第3章 酸素生成コラーゲンゲルの作製と評価	28
3.1 本章の目的及び概要	28
3.2 酸素生成コラーゲンゲルの作製	29
3.2.1 酸素放出原理	29
3.2.2 作製方法	29
3.2.3 過酸化カルシウム濃度の表記法	30
3.3 酸素生成コラーゲンゲルの特性評価	32
3.3.1 本節の目的	32
3.3.2 実験方法	32
3.3.3 実験結果	35
3.3.4 考察	37
3.3.5 本節のまとめ	39
3.4 本章のまとめ	40
第4章 酸素生成能の定量的解析	41
4.1 本章の目的及び概要	41
4.2 実験方法	42

4.2.1 閉鎖系での酸素放出速度測定	42
4.2.2 肝細胞単層培養モデルの実施	42
4.3 実験結果と考察	46
4.3.1 培養可能細胞密度の閾値	46
4.3.2 酸素生成コラーゲンゲルの酸素放出速度から k_{La} の実験的決定	47
4.3.3 12 ウェルプレートにおける培養可能細胞密度の閾値	49
4.3.4 ゲル上細胞の形態観察	51
4.3.5 肝細胞生存率変化と肝特異機能評価	52
4.3.6 酸素生成コラーゲンゲルを用いた三次元培養と in vivo 応用展望	54
4.4 本章のまとめ	56
第 5 章 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアの作製と肝組織構築への試み	57
5.1 本章の目的及び概要	57
5.2 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアの作製と評価	58
5.2.1 本節の目的	58
5.2.2 実験方法	58
5.2.3 実験結果	60
5.2.4 考察	64
5.2.5 今節のまとめ	68
5.3 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアを用いた三次元肝組織構築への試み	69
5.3.1 本節の目的	69
5.3.2 実験方法	69
5.3.3 実験結果	72
5.3.4 考察	75
5.3.5 今節のまとめ	77
5.4 本章のまとめ	78
第 6 章 総括	79
6.1 本論文のまとめ	79
6.2 今後の課題と展望	81
参考文献	83
謝辞	94

第1章 緒言

1.1 本研究の背景と目的

現在、病気や事故による臓器の損傷に対する効果的な治療法は臓器移植のみである。現在、移植を希望し、日本臓器移植ネットワークに登録されている患者数は、約 15,000 人である。一方、脳死あるいは心停止後の臓器提供によって実施される移植件数は年間約 400 件であり、登録者のわずか 2~3%の人しか移植を受けることができていないというのが現状である。加えて、臓器移植には移植後の拒絶反応という問題も存在する。そのため、臓器移植に代わる治療法の開発が望まれている。

そこで近年では、培養細胞を積極的に利用することで組織本来の機能を提供し、欠損した臓器・組織及びその機能を再生するという再生医療が注目されている。再生医療の実現化において、細胞が本来の機能を果たすことが重要である。そのようなアプローチとして、Vacanti, Langer らによって提唱された組織工学 (Tissue Engineering) が注目されている。組織工学とは細胞・増殖因子・足場材料を組み合わせることで組織様構造体を構築する概念である¹⁻³。種々の臓器をターゲットとして研究が進められている。一方、現在 *in vitro* において培養維持が可能な細胞組織は薄いシート状や細胞密度の低い組織など酸素・栄養要求性が低いものに限定されている。これに対し、肝組織など多くの細胞数かつ高い細胞密度が求められる組織では酸素や栄養要求性が高く、*in vitro* において組織の形成や長期培養維持する培養技術がいまだ確立されていない。これらの高密度かつ十分な大きさの組織の培養技術は組織工学における解決すべき課題となっている⁴。特に酸素は枯渇しやすい因子であり、これは構築した組織体を移植した際にも問題となる⁵。血管構造を持たない培養組織では、酸素の供給は組織表面からの分子拡散に依存し、細胞は血管から約 200 μm 以上離れてしまうと酸素不足の状態に陥る。酸素不足に陥ると、細胞の死滅や組織の壊死が引き起こされる。したがって、厚さ数百 μm を超える組織体では、組織体内部に十分な酸素を供給することが困難となり、組織体中心部の細胞が死滅してしまう⁶。それ故、移植可能な、実用的な大きさを有した培養組織を作製するためには、酸素を組織内部の細胞にまで供給することができる毛細血管網構造の構築が必要不可欠である。組織培養過程において、多くの研究者は培養組織内の微小血管ネットワークの構築に取り組んでいるが^{7,8}、それが十分に機能するまでに要する時間的スケールは大きな課題である。移植組織内にあらかじめ微小血管網を構築しても、移植後直ちに宿主組織の血管と接続されるわけではない。組織移植後から完全な血管融合および宿主血管からの十分な血液供給を受けるまでに、数日~2週間程度のタイムラグが報告されている^{9,10}。一方、細胞が消費する基質の律速因子である酸素は供給が止まると数分~数時間で枯渇し、移植組織は無酸素または低酸素状態に晒される。こうした時間スケールの乖離を克服する酸素供給経路を確立しなければ、微小血管ネットワークはその機能を果たし得ない。その検討過程において、移植後の宿主血管接続に要する時間スケールと、

細胞の酸素要求に対する時間スケールのギャップの大きな隔たりを踏まえ、酸素供給に関する一時的な代替手段の確立の必要性を認識するに至った。そこで、酸素生成バイオマテリアル（Oxygen generation biomaterials, OGBs）は移植組織への酸素の持続的かつ局所的な送達を提供するための足場材料としての使用が期待されている（Fig. 1.1）OGBsに関する研究例については第2章既往の研究で紹介する。

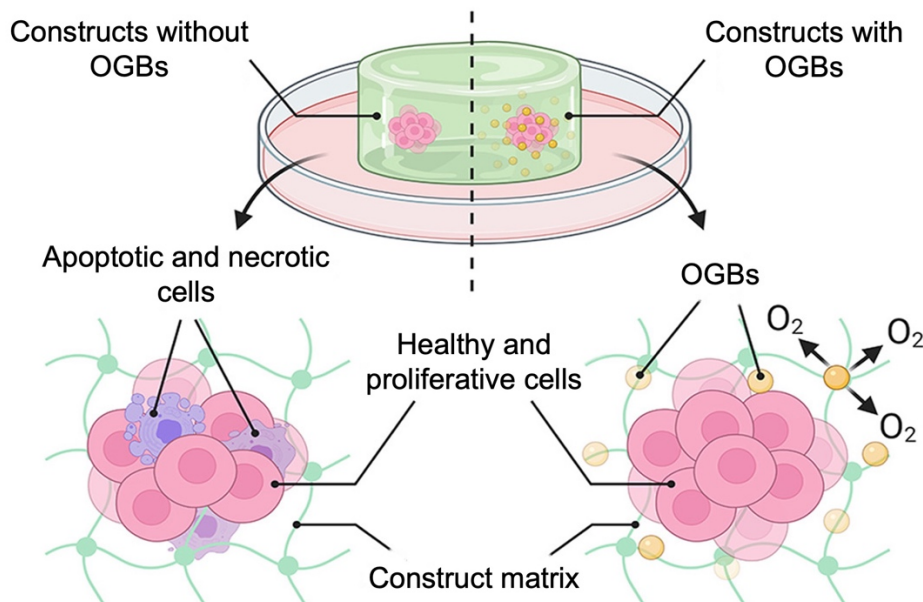


Fig. 1.1 A schematic diagram illustrating how oxygen-producing biomaterials enhance tissue viability by supplying oxygen during the cultivation process

これらの革新的な OGBs は、長期的な酸素供給能および細胞生存性の向上に寄与することが期待されている。しかし、その酸素放出速度（Oxygen generation rate, OGR）に関する定量的な研究は依然として不足している。細胞への十分な酸素供給を保証するためには、(i) OGBs により生成する総酸素量が培養期間中の酸素需要を満たすこと、(ii) OGBs の OGR が細胞の酸素消費速度（Oxygen uptake rate, OUR）に等しいかそれを上回ること、という2つの条件を同時に満たす必要がある。現在の研究の多くは主に前者の条件に焦点を当てており、OGR が細胞の生存に及ぼす影響を十分に考慮していない。この課題を克服し、組織工学分野における OGBs の有効性を評価するためには、より包括的な評価アプローチが求められる。

本研究では、OGBs を用いた肝細胞培養における OGR と OUR とのバランスに着目し、肝細胞培養時の酸素供給条件の最適化を目指した。ここで、酸素供給速度が過剰で培養系内に未消費の酸素が存在すると、活性酸素種（Reactive oxygen species, ROS）の過剰生成による酸化ストレスが発生し、タンパク質、脂質、DNA 等の細胞構成成分を損傷する¹¹。修復不能な損傷を受けた細胞はアポトーシス（プログラム細胞死）を誘導し、この現象は「酸素毒性」または「高酸素血症」と称される。すなわち、OGBs からの酸素供給は、細胞の需要を

満たすだけでなく、過剰にならないように制御されている必要がある。酸素放出の制御制御法として、(1) 生分解性高分子中に過酸化物を封入することによる徐放化（マイクロカプセル化）¹²⁻¹⁴ と、(2) 修飾ヘモグロビンの導入による生成酸素の一時的な貯蔵、といった戦略が有効とされている¹⁵。

本研究では、酸素放出を制御するために、ゼラチンマイクロスフェア（Gelatin microsphere, GMS）に注目した。この酸素放出制御可能な過酸化物封入微粒子を肝組織間に充填することにより、組織内部に効率的かつ持続的な酸素供給経路を構築でき、組織移植から宿主血管への接続期間における細胞存続率の向上が期待される。本研究は酸素放出制御可能な微粒子を酸素源とした移植可能な肝組織体を構築し、肝再生医療への応用価値を評価することを目的とする。

1.2 本研究の方針

前述の通り、現在血管化組織が宿主血管と連結される過程において、細胞に十分な酸素を供給できる有効な酸素供給戦略の確立が求められている。既往の研究では、組織への局所的な酸素供給を可能にする OGBs が多く開発されており、低酸素環境の組織培養問題を一定程度解決してきた。しかしながら、これらの研究の多くは、OGBs による酸素供給の総量が培養中の細胞の酸素需要を満たすかどうかに重点が置かれており、OGR と細胞の OUR とのバランスに関する評価は未だ不十分である。これにより、細胞の質や活性の低下、さらにはアポトーシスの誘発といった問題が生じる可能性がある。したがって、これらの条件を満たすためには、OGBs の OGR を評価するためのシステム構築が必要であり、それは OGR の定量的測定およびその速度条件下で培養可能な細胞量を逆検証法により明らかにすることによって実現されるものである。

そこで本研究では、過酸化物の水解反応に伴う酸素放出に着目し、細胞培養で広く用いられている過酸化カルシウム (Calcium peroxide, CPO) を酸素発生源として選択した。CPO は高純度の試薬が市販されており、かつ反応速度が速いことから、酸素供給材料として有用である^{16,17}。本研究では、CPO を細胞外マトリックス (Extracellular matrix, ECM) を模倣したコラーゲングル中に封入し、最も基本的な OGBs の一つとして位置づけた。まず、開放系においてこの酸素生成コラーゲングル (Oxygen generation collagen gel, oxy CG) の酸素放出期間を測定するとともに、培養期間中の pH 変動および中間産物である過酸化水素濃度の推移を評価した。これにより、細胞培養過程において持続的に酸素を供給しつつ、細胞に対する毒性を生じない条件を検証した。

OGBs の酸素供給能を定量的に評価するためには、閉鎖系における OGR の測定が必要である。本研究では閉鎖系で得られた OGR を基に一連の計算を行い、特定の OGR において理論上培養可能な細胞密度の閾値を算出した。さらに、oxy CG の表面に播種する肝細胞数を系統的に変化させ、一定期間培養後の細胞生存率および肝臓特異的機能を評価することで、二次元培養条件下におけるこの OGR ベースの定量解析法の妥当性を検証した (Fig. 1.2)。

上記の酸素供給能力の定量分析法は、OGR と OUR を比較し、OGR が OUR 以上であるかを評価基準とすることで、OGBs が細胞に十分な酸素を供給しているかどうかを新たな視点から判断できる。一方で、酸素放出の初期バーストは細胞障害を惹起することが広く知られており^{11,18}、OGBs の酸素供給は制御された放出である必要がある。本研究では、CPO をゼラチン中に封入し、W/O エマルション法により酸素生成ゼラチンマイクロスフェアを作製し、その酸素放出特性と物理的特性を評価した。この GMS は培養過程において細胞へ効率的かつ持続的な酸素供給を行うキャリアとして機能することが期待される。

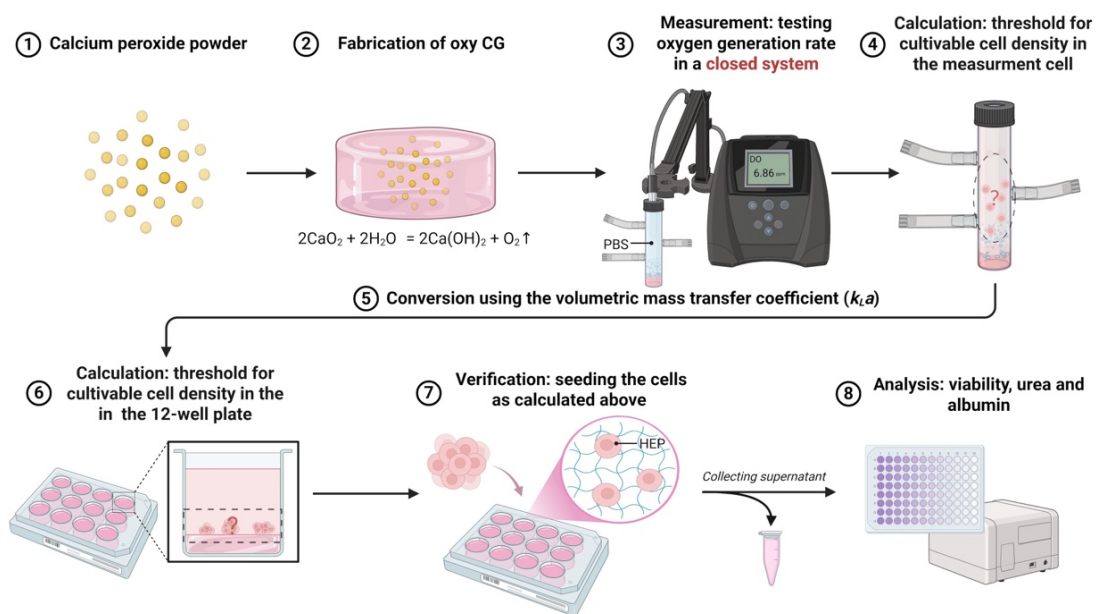


Fig. 1.2 A schematic illustration describing the process for quantitatively analyzing the oxygen generation ability of oxygen-generating collagen gel (oxy CG)

三次元培養へ応用した際の有効性を検証するため、本研究では高機能かつ高細胞密度を兼ね備えた球状微組織体（オルガノイド）からなる厚みのある組織構築に焦点を当てた。ラット初代肝細胞を旋回培養することで、短時間で肝細胞スフェロイドを形成させると、その細胞密度は生体肝組織に近い超高細胞密度状態に達する。肝細胞スフェロイドにおける組織中細胞への栄養・酸素供給はスフェロイド表面からの分子拡散に依存するため、直径 $150\ \mu\text{m}$ 以上のスフェロイドでは中心部細胞が壊死してしまう^{19,20}。本研究では、高密度厚組織の構築を目的として、直径 $150\ \mu\text{m}$ 以下の肝細胞スフェロイドを構成単位とし、これらを蓄積させる際に酸素生成 GMS を遠心沈降法により均一に組織内部へ分散させた。このボトムアップ型の組織自己組織化手法は、GMS を肝細胞スフェロイド間に介在させることで、組織内部に酸素供給源を内在化させ、局所的な低酸素環境の改善を図った（Fig. 1.3）。

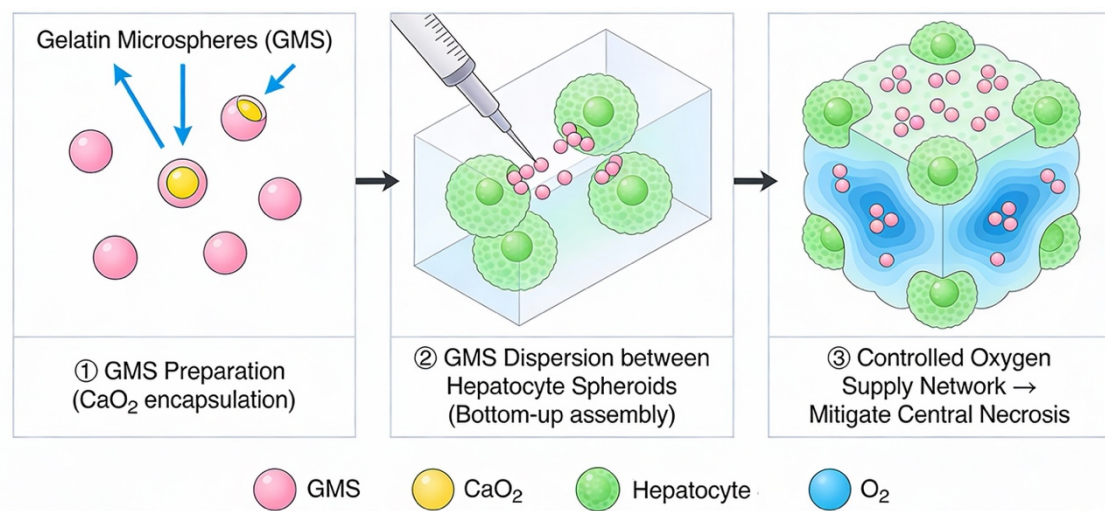


Fig. 1.3 Gelatin microspheres (GMS) integration for controlled oxygen delivery in bottom-up tissue construction.

上述の通り、本研究では、まず OGR に基づく OGBs の酸素供給能の定量解析法を新たに確立し、これを三次元細胞培養モデルに適用した。さらに、カプセル化した CPO をこの組織モデルに導入することで、移植に資するポテンシャルを有する肝組織体の構築を試みた。

1.3 本研究のオリジナリティ

本研究のオリジナリティを以下に示す。

[1] 酸素生成コラーゲンゲルの作製とその酸素生成能の定量的解析

OGBs の評価指標として、従来十分に検討されてこなかった OGR と OUR のバランスに着目し、これを定量的に解析する評価系を構築した点にある。既存の OGBs に関する多くの報告では、酸素供給の総量が細胞の酸素需要を満たすかどうかの主眼が置かれてきたのに対し、本研究では、CPO 封入 oxy CG をモデルとし、閉鎖系における OGR を測定することにより、酸素移動容量係数 (k_{La}) を算出した。次に、 k_{La} を用いて特定の OGR 下で理論上培養可能な細胞密度の閾値 (X_{thr}) を求めた。この閾値の妥当性を検証するため、ゲル上での単層培養により、肝細胞生存率と肝特異的機能を指標として OGR と細胞活力の対応関係を実験的に明らかにした点が本研究のオリジナリティである。すなわち、本研究は、OGBs が肝細胞生存に十分な酸素を供給し得るかどうかを、「 $OGR \geq OUR$ 」という観点から定量的に評価しうる新たな解析枠組みを提示しており、将来的な血管化組織の設計指針や、高密度三次元培養系における酸素供給戦略の最適化に資する基盤的知見を提供するものである。

[2] 酸素生成マイクロスフェアによる三次元肝組織構築：放出速度制御と細胞密度予測手法の確立

酸素放出能に基づく定量的解析により、OGBs の OGR は細胞の OUR を上回る必要があることが明らかとなった。しかしながら、過度に高い OGR は ROS の局所的蓄積を引き起こし、細胞障害を誘発する可能性がある。このため、本研究では酸素の初期バースト放出を抑制するため、過酸化カルシウムをゼラチン微粒子に封入し、W/O エマルション法により酸素生成 GMS を調製し、OGR と OUR の動的平衡を最適化した。さらに、二次元培養条件での理論枠組みを三次元培養体系に拡張し、事前に最適培養細胞密度を予測する手法を確立した。これらの理論的・データの裏付けの下、肝組織の三次元培養を実施した。具体的に、遠心沈降法により肝細胞スフェロイドと酸素放出微粒子を均一に混合し、高密度で厚みのある肝組織構造を構築した。この複合組織は局所低酸素状態の改善を実現すると共に、実験により「 $OGR \geq OUR$ 」の理論が三次元培養条件下で実証可能であることを証明した。本手法は、今後の酸素放出材料の多角的評価戦略および三次元組織培養の供酸素技術開発に広範な応用可能性をもたらすものである。

1.4 本論文の構成

本論文は以下のような構成になっている。

第1章では、本研究の背景として再生医療技術開発における組織工学の背景を述べると共に、血管化移植組織と宿主血管が接続するまでに酸素供給手法の開発と再定義の必要性を示し、それを踏まえた上で本研究の目的を示した。また、本研究のオリジナリティについて示し、本研究の位置づけを明確にした。

第2章では、はじめに組織工学の概要を述べ、組織構築における足場材料、血管化組織の構築などの手法を概観した。次に、本研究の対象臓器である肝臓について概説し、肝臓組織工学の現状をまとめるとともに、肝組織構築の試みと未解決課題を示した。最後に、OGBsの開発と応用例について紹介した。

第3章では、はじめにCPOを含有するoxy CGを調製した。開放系において、調製したゲルの酸素放出時間を測定した。また、pH変化およびCPOの加水分解中間体である過酸化水素濃度の測定も実施した。その結果、CPOの添加によりゲルの酸素放出時間が延長されることが確認され、培養系のpH値に明らかな変動は認められなかった。また、カタラーゼ添加により過酸化水素濃度が低いレベルに抑制され、この酸素生成ゲルが迅速に調製可能で安定かつ高効率なOGBsとして、細胞培養への応用可能性を示した。

第4章では、はじめに第3章で作製したoxy CGを閉鎖系でOGRを測定し、その結果から k_{La} 値を算出した。次に、得られた k_{La} 値を用いて、二次元培養系における培養可能な細胞密度の閾値を算出した。続いて、初代ラット肝細胞を酸素生成コラーゲル上で単層培養し、異なる細胞密度における細胞生存率および肝臓特異的機能を評価することで、算出した閾値の妥当性を検証した。さらに、本方法の三次元培養系への適用可能性について検討し、OGRベースの定量解析法が今後の肝組織工学ならびに培養条件最適化研究において有用な基盤となる可能性を示した。

第5章では、はじめにW/Oエマルション法を用いてCPOを封入したGMSを作製し、その酸素放出特性および物理的特性を評価した。その結果、CPOをカプセル化することで酸素の初期バーストが著しく抑制され、酸素放出時間の延長が確認された。このGMSがコアシェル構造を持ち、外殻表面に多数の細孔が分布していることが確認された。さらに、第4章で確立した酸素生成能の定量解析法を用いて、本酸素放出微粒子が三次元培養における実行可能性を理論的に検証した。続いて、旋回培養により肝細胞スフェロイドを作製し、酸素放出GMSと混合することで移植可能な肝組織体を構築し、その性能評価を行った。in vitro

培養過程の検討から、この GMS は組織体内部の局所的な低酸素環境を改善し、肝細胞の生存率および肝特異機能の向上に寄与することが示された。これらの結果より、CPO 封入酸素放出 GMS は、酸素供給の時間制御と安全性の両立を可能にする OGBs として、肝再生医療への応用に有望であることが示唆された。

第6章では、本研究のまとめとして総括及び今後の課題と展望を述べた。

第2章 既往の研究

2.1 組織工学 (Tissue Engineering)

組織や臓器の欠損あるいは機能不全は、生命維持の観点から極めて重大な課題の一つである。Langer らは、臓器や組織の喪失・機能不全が医療における最も頻度が高く、破壊的で、かつ医療費の観点からも大きな問題であると指摘し、それに対する解決策として組織工学という新たな概念を提唱した³。組織工学 (Tissue Engineering) は、生物学と工学の知見を統合することにより、障害を受けた組織機能を代替し得る機能的構造体の創出を目的とした学際的研究分野である。組織工学においては、細胞、足場材料、増殖因子の三要素が中心的役割を担っており、これらを適切に組み合わせることで、生体機能を有する組織や臓器を構築し得ると考えられている²¹。さらに、その実現には生物学および工学に加えて、医学、薬学などを含む異分野間の連携研究が不可欠であるとされている。組織工学は、細胞培養をはじめとする基礎的手法を医療へ応用する枠組みとして再生医療の一領域と位置づけられており、再生医療実現に向けた新たなアプローチとして近年とくに注目を集めている²²。

本節では、組織工学における三要素に加え、組織に栄養および酸素を供給するうえで重要となる血管網の構築と、その構築手法に関する既往の研究について概説する。

2.1.1 組織工学における足場材料

組織工学分野において、足場材料は細胞に多様な刺激を与える重要な役割を担う。本項では、機能性肝組織構築のための指針・知見を得ることを目的とし、組織工学における足場材料の役割、足場材料の形状および機械的特性、既報の足場材料について概説する。

2.1.1.1 足場材料の役割

組織工学において足場材料 (Scaffold materials) は、細胞の接着、増殖、分化を支える三次元構造体として不可欠な役割を果たす。これらは生体外で組織再生環境を再現し、損傷組織の修復を促進する基盤を提供する²³。足場材料の主な役割は、物理的・化学的・生物学的支持に分類され、それぞれが細胞挙動を精密に制御する。以下では、これらを分類して詳細に概説する。

まず、物理的役割として、足場は機械的安定性と空間構造を提供し、細胞の形態形成を導く。多孔質構造 (孔径 100-300 μm 程度) が栄養・酸素・廃棄物の拡散を確保し、低酸素環境を防ぐ²⁴。例えば、電界紡糸法によるナノファイバー足場は、高表面積で細胞接着点を増大させ、細胞外マトリクス (ECM) 様の繊維配列を模倣する。これにより、肝細胞などの高密度培養で中心部壊死を抑制可能。また、剛性制御 (例: 軟骨向け 10 kPa、骨向け MPa オーダー) がメカノトランスダクションを介し、幹細胞分化を誘導する²⁵。

次に、化学的役割では、材料組成がシグナル分子の提示を担う。天然由来のコラーゲンやゼラチンは RGD 配列を有し、インテグリン結合を促進して細胞生存率を向上させる²⁶。合成ポリマー (PCL、PLA) では、表面修飾により増殖因子 (VEGF、FGF) やサイトカインを徐放し、血管新生を制御²⁷。特に、本研究に関連する酸素生成材料 (CPO 封入ゲル) は、化学反応による酸素供給で低酸素課題を解決し、pH 安定化も兼ねる。

最後に、生物学的役割は、動的相互作用を通じて組織成熟を加速する。生分解性足場は酵素分解により空間を解放し、新 ECM 沈積を促す²⁸。ハイブリッド設計 (ハイドロゲル + マイクロキャリア) では、細胞-材料間シグナリングが強化され、高密度スフェロイド積層に適応²⁹。これら役割の統合により、足場は単なる支持体を超え、機能的組織構築の触媒となる。

2.1.1.2 足場材料に求められる設計要件

組織工学における足場材料 (スキャフォールド) の設計は、細胞の接着・増殖・分化を促進しつつ、生体内の複雑な微小環境を模倣する多面的な要件を満たすことが求められる。主要な要件として、(1) 生体適合性 (Biocompatibility)、(2) 生分解性・吸収性 (Biodegradability)、(3) 適切な機械的強度 (Mechanical properties)、(4) 多孔構造と拡散性 (Porosity and Permeability) が挙げられる。これらの特性は相互に関連し、足場の機能性を決定づける³⁰⁻³³。

生体適合性は、足場材料が宿主組織に炎症反応や免疫拒絶を引き起こさず、細胞の正常な応答を誘導する基盤である。天然由来材料 (コラーゲンやヒアルロン酸など) は、ECM に類似した RGD 配列などの接着モチーフを有するため優位だが、合成高分子では表面修飾 (例: プラズマ処理やペプチド固定) により同等の適合性を付与可能である。近年、脱細胞化組織由来足場が注目され、内在化された成長因子が細胞分化を促進し、感染骨再生モデルで高い適合性を示した報告がある³⁴。

生分解性は、再生組織の成熟過程に同期して足場が徐々に分解・吸収されることを意味し、長期的な組織置換を可能とする。分解速度は材料組成や架橋密度で制御され、例えば PLA 系ポリマーは数ヶ月、PGA は数週間で分解する。分解生成物 (乳酸など) の酸性化による pH 低下を防ぐため、炭酸カルシウムなどの緩衝材を複合化する戦略が有効である³⁵。不適切な分解速度は機械的崩壊や組織炎症を招くため、in vitro/in vivo での長期評価が不可欠である。

機械的強度は、対象組織の力学的環境に適合する必要がある。骨再生では圧縮強度 10-30 MPa 以上、心筋組織では弾性率 10-50 kPa が求められる。多孔質構造導入による強度低下を補うため、ナノ強化材 (ハイドロキシアパタイトなど) やオークセチック設計が用いられ、Kang らの研究で複合構造が従来比 2 倍の強度向上を示した²⁵。

多孔構造は、孔径 (細胞浸潤用 100-400 μm 、血管新生用 20-100 μm) と孔隙率 (>80%) がカギで、栄養・酸素拡散と細胞移行を規定する。連通性確保のため、三次元プリンティングや凍結乾燥が活用され、孔径最適化により骨形成が顕著に向上した^{24,36}。これら要件の統合

設計により、足場は静的構造体から動的微小環境提供体へ進化し、肝組織工学を含む再生医療の実用化を加速させる。

2.1.1.3 天然由来足場と合成高分子足場

組織工学における足場材料は、天然由来高分子と合成高分子に大別され、それぞれの特性を活かした応用が進められている³⁷。天然由来足場は、ECM と類似した生体適合性と細胞接着性を有し、細胞の増殖・分化を促進するが、機械的強度や分解速度の制御に課題がある。一方、合成高分子足場は物性設計の柔軟性が高いものの、細胞応答については天然材料に劣る場合があるため、ハイブリッド化が有効な解決策として注目されている³⁸。

天然由来足場の代表例として、コラーゲン、ゼラチン、キトサン、フィブリン、ヒアルロン酸などが挙げられる。これらは生体内に存在する成分を模倣し、RGD 配列などの細胞接着モチーフを内在するため、良好な細胞接着・浸潤性を示す³⁹。例えば、I型コラーゲンが骨・皮膚組織工学で広く用いられ、細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性向上やミネラルライゼーションを誘導するが、免疫原性やバッチ間変動が問題視されている⁴⁰。ゼラチンはコラーゲン由来の低コスト素材として、肝細胞培養基質に適し、W/O エマルション法によるマイクロスフェア化で酸素供給キャリアとしても機能する⁴¹。キトサンは抗菌性と生分解性を併せ持ち、骨再生でハイドロキシアパタイト (HA) と複合化され、孔径 50-300 μm の多孔構造で細胞増殖を促進する⁴²。

合成高分子足場は、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリ (乳酸-グリコール酸共重合体) (PLGA)、ポリカプロラクトン (PCL)、ポリエチレングリコール (PEG) などが主流である。これらは三次元プリンティングや凍結乾燥で微細孔制御が可能で、分解速度を分子量や共重合比で調整できる利点がある^{36,43-45}。PLGA は FDA 承認素材として骨・軟骨再生に用いられ、弾性率 10-50 MPa のスキャフォールドで機械的安定性を確保するが、疎水性ゆえの細胞接着不良を PEG やコラーゲン表面修飾で改善する⁴⁶。PCL は柔軟性が高く、心筋・血管組織に適するが、分解が遅い欠点を天然高分子とのブレンドで補う⁴⁷。

ハイブリッド足場として、ゼラチン-PLGA 複合やコラーゲン-PCL スポンジが開発され、肝組織工学では酸素拡散性向上と高密度細胞配置を実現する⁴⁸。これにより、天然素材の生物活性を合成素材の安定性で補完し、移植用厚組織構築への道が開かれている。

三者の比較を Table 2.1 に示す³⁸。

Table 2.1 Different natural polymers used as scaffolds for wound healing applications³⁸

Types	Polymers	Advantages	disadvantages
<i>Natural polymer base scaffold</i>	Cellulose, Alginate, Agar, Chitin, Hyaluronic acid, Dextran, Starch, Collagen, Fibronectin, Gelatin, Elastin, Silk, Keratin, Fibrin	• Biocompatibility • Non-toxicity • Easy availability • Cost-effective	• Poor mechanical properties • Low reproducibility due to variations in composition
<i>Synthetic polymer base scaffold</i>	Polyethylene glycol (PEG), Poly- β -hydroxybutyrate (PHB), Poly propylenefumarate (PPF), Polycaprolactone (PCL), Poly hydroxyortho esters, Poly vinyl alcohol (PVA), Polyurethane (PU), Poly methyl methacrylate (PMMA), Polystyrene (PS) Polyethylene terephthalate (PET), Polyethersulfone (PES)	• Mechanically stable • Ease of modification • Consistent reproducibility due to uniform chemical composition	• Lack of cell adhesion sites • Less biocompatible • Expensive
<i>Hybrid scaffold</i>	PCL Collagen, PCL/Collagen/Titanium oxide, hEnSCs/PCL/Collagen, PEO/Chitosan/Collagen, PEO/Chitosan, PLLA/Chitosan, Pullulan/Collage, Collagen/elastin, Chitosan/Silk, Silk/Gelatin/Alginate, AgNPs/Chitosan, Carboxyethyl, chitosan/PVA, Silk fibroin/hyaluronic acid/sodium, alginat	• Increased mechanical strength • Good tensile strength • Regulated biocompatibility, degradation rates, cytotoxicity and thermostability	• Non-facile fabrication methods • Often require sophisticated instruments • Expensive

2.1.2 血管化組織の構築

血管化組織の構築は、組織工学における最大の課題の一つであり、厚みのある組織の酸素・栄養供給を確保するための多様なアプローチが開発されている。本節では、これらを主に(1)血管新生因子を用いたアプローチ、(2)足場材料の微細構造最適化、(3)細胞ベースの事前血管化の3つに分類し、最近の進展を概観する⁴⁹。

2.1.2.1 血管新生因子を用いたアプローチ

血管新生因子を用いたアプローチは、組織工学における血管化促進の古典的かつ有効な戦略であり、主に血管内皮増殖因子 (VEGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) などの生理活性ペプチドを足場材料に封入・徐放させることで、宿主由来内皮細胞 (EC) の増殖・遊走・管腔形成を誘導する⁵⁰。これらの因子は、移植後早期に局所的な血管新生を活性化し、厚組織内の低酸素環境を緩和する点で優位性を有するが、遊離型投与では半減期の短さとオフターゲット効果が課題であるため、制御放出システムの開発が活発化している^{51,52}。

VEGF は血管新生の中心因子として最も広く用いられ、PLGA マイクロスフェアやハイドロゲルへの封入により、2-4 週間持続的な放出が実現され、*in vivo* 骨欠損モデルで血管密度を 2-3 倍向上させた報告がある²⁷。例えば、多孔質チタンスキャフォールドに VEGF を熱応答性コラーゲンハイドロゲルでコーティングした系では、移植後 6 週で骨統合力が有意に向上し、Micro-CT 解析で灌流回復が確認された⁵³。FGF-2 や PDGF とのデュアルリリースは、初期血管形成後の成熟化を促進し、異常血管の抑制に寄与する⁵⁴。

最近の進展として、遺伝子活性化スキャフォールド (Gene-activated scaffolds) が注目され、pVEGF をペプチドナノ粒子で封入したハイドロゲルは、内皮細胞の管形成を 48 時間持続的に強化し、線維芽細胞とのクロストークで血管様構造を安定化した^{27,55}。ナノファイバーやリポソームを用いたマイクロ流体デバイスも、用量依存的な放出 (10-100 ng/mL) を可能とし、肝組織工学を含む軟組織再生で有効性が示唆されている^{56,57}。しかし、過剰発現による腫瘍形成リスクや免疫応答の管理が残課題であり、次世代では空間的・時間的制御 (例: 光応答性システム) が求められる⁵⁸。

2.1.2.2 足場材料の微細構造最適化

足場材料の微細構造最適化は、血管新生を物理的・力学的シグナルにより誘導する戦略として、近年注目を集めている。具体的には、剛性勾配、異方性ナノファイバー配列、多孔構造の階層化、および中空チャネル設計が、内皮細胞の整列・管腔形成、ならびに宿主血管の浸潤を促進する⁵⁹。これらのアプローチは、外部刺激との統合により、移植後早期の灌流回復を実現する可能性を有する。

剛性制御においては、基質剛性を 7 kPa (静脈模倣) 対 128 kPa (動脈模倣) の勾配に設計することで、内皮前駆細胞 (EPC) の Ras/Mek 経路依存的な動脈-静脈分化が誘導され、硬

い基質で EphrinB2 発現の上昇、細胞移動性向上および管状構造形成能が観察された⁶⁰。さらに、5-50 kPa の連続勾配基質は内皮細胞の集団移動と血管様管形成を誘導し、FAs 動態変化を介して VE-cadherin 局在を最適化、機能的ルーメン構造の迅速形成を達成した⁶¹。これらの知見は、剛性勾配が血管網の空間的組織化を物理的に誘導する有効性を示し、肝組織工学の厚組織構築に応用可能である。

多孔構造の最適化においては、連通孔径 100-300 μm の階層多孔体が、栄養拡散と血管侵入を両立させる。三次元プリンティングによる精密制御で、40-150 μm の立方体/球状孔構造は、*in vivo* で血管密度を最大化した⁶²。さらに、中空チャンネル内蔵ハイドロゲルデバイスは、ナノ多孔壁を介した血流灌流により、肝細胞の生存率を向上させ、*in vivo* で動脈血供給を可能とした⁶³。これらの成果は、肝組織工学における厚組織構築に向けた基盤を提供する。

2.1.2.3 細胞ベースの事前血管化

細胞ベースの事前血管化は、EC を支持細胞と共培養し、移植前に機能的微小血管網を *in vitro* で構築する手法であり、迅速な宿主血管とのアナストモシスを可能とする⁶⁴。このアプローチでは、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と間質細胞の共培養が主流であり、スキャフォールド内でルーメン構造を形成させることで、移植後即時灌流を実現する。*in vivo* 評価において、事前血管化スキャフォールドは 7 日以内に宿主動脈・静脈との接続を達成し、組織存続率を有意に向上させた。

共培養系の最適化として、EC と間葉系幹細胞 (MSC) の比率調整や培養条件制御が重要である。例えば、骨髓由来間葉系幹細胞 (BMSC) と EC をフィブリンゲル/PLGA マイクロスフェア複合体に播種した系では、7 日培養で毛細血管様構造が微小球間隙を貫通し、*in vivo* 骨欠損モデルで酸素供給改善と骨再生促進が確認された⁶⁵。MSC 由来の分泌因子 (VEGF や bFGF) が EC の管形成を促進し、血管様構造の安定性を向上させる機序が示された⁶⁶。具体的には、HUVEC と骨髓由来 MSC の三次元共培養で MSC が VEGF を産生し、EC の生存率と管形成能を高め、7 日以内に機能的ネットワークを構築した。また、コラーゲンゲル中での MSC と EC 共培養は迅速なルーメン形成を誘導し、心筋様グラフトの収縮機能を維持した⁶⁷。これらは肝組織工学の高密度構築に有用である。

in vivo 事前血管化の代表として、動静脈 (AV) ループモデルが挙げられ、脂肪由来微小血管フラグメント (MVF) をスキャフォールドに播種することで血管化速度を加速する。AV ループ設置後、MVF がループ由来微小血管と急速に連結し、移植後数日で灌流可能な組織を形成した⁶⁸。本手法は一期的手術を可能とし、大規模欠損修復への応用が期待されるが、免疫適合性とスケーラビリティの向上が今後の課題である。

2.1.3 三次元細胞培養技術

組織工学における三次元細胞培養技術は、従来の二次元培養では再現しにくい生体内微小環境を模倣し、細胞間相互作用や ECM の影響を考慮した立体構造形成を可能にするもの

である。これにより、細胞の分化、増殖、機能維持が向上し、薬剤スクリーニングや組織再生応用での信頼性が高まる。特に、スフェロイドを基本単位とした培養は、細胞の自己凝集により自然な球状構造を形成し、酸素・栄養拡散勾配を伴う *in vivo* 様環境を提供する⁶⁹⁻⁷¹。

三次元培養の手法は、主にスキャフォールドフリー法とスキャフォールドベース法に大別される。スキャフォールドフリー法では、ハンギングドロップや超低接着プレートを用いて細胞が自発的にスフェロイドを形成し、ECM 産生を促進する利点がある。一方、スキャフォールドベース法は、ハイドロゲルやコラーゲンなどのバイオマテリアルに細胞を埋め込み、機械的安定性と空間制御を確保する。これらの手法は、組織工学で厚みのある組織構築に不可欠であり、二次元培養と比較して細胞の薬剤応答性や代謝活性が顕著に向上することが報告されている^{72,73}。

肝細胞のような高酸素要求性細胞の三次元培養では、低酸素による中心部壊死が課題となる。スフェロイド径を 150 μm 以内に制御することで拡散限界を克服し、機能維持が可能となる⁶⁹。本研究では、このスフェロイドを単位として酸素生成微粒子を均一分散させ、厚みのある肝組織体を構築するアプローチを採用した。これにより、内部低酸素を緩和し、肝特異的機能（アルブミン分泌、尿素合成、CYP 活性）を長期間維持できる。

さらに、三次元培養の進展として、バイオプリンティングやマイクロ流体デバイスとの統合が挙げられる。これらはスフェロイドの精密配置や血管様構造の導入を可能にし、多細胞共培養による複雑組織模倣を加速させる⁷⁴。日本国内外の研究では、微小重力環境下でのスフェロイド形成が細胞生存率を向上させ、組織工学のスケラビリティを高める可能性が示唆されている⁷⁵。

三次元細胞培養技術は、足場材料や血管化戦略と連携することで、臨床応用に向けた高機能組織の開発を推進する。今後、酸素供給最適化と自動化培養系の確立が、移植可能肝組織の実現に寄与すると思われる。

2.2 肝臓組織工学の現状

本研究では、厚みのある肝組織の対象として肝臓組織に着目した。現在、日本において脳死下肝移植の待機登録者は約 560 人（2025 年 9 月現在）である。一方、年間実施数は 60-90 例程度に留まり、深刻なドナー不足が顕在化している（JOT date, 2025）。生体肝移植も年間約 400 例実施されるが、ドナー負担と適合性問題が課題である（厚生労働省臓器移植状況報告, 2025）。このため、培養肝細胞を用いて患者の肝機能を補助・回復させる再生医療技術の開発が急務とされている。

肝再生医療実現のため、肝細胞の細胞源（初代・iPSC 由来）、三次元培養法（スフェロイド・オルガノイド）、足場材料、血管化戦略など多岐にわたる研究が進められている⁷⁶。本節では、肝臓の構造・機能・急性肝不全・バイオ人工臓器を概説した上で、報告された肝組織構築の試みを分類してまとめる。

2.2.1 肝臓とは

肝臓は人体最大の内臓器官であり、体重の約 1.5-2%を占め、主に解毒、糖・脂質代謝、蛋白質合成、胆汁産生などの多岐にわたる機能を担う。門脈と肝動脈から栄養豊富な血液を受け、中央静脈へ排出する二重血流系を有し、1 分間あたり約 1.5 L の血液を処理する。この高い代謝能は、肝実質細胞の極めて発現密度と微小環境の最適化に依存する。

肝臓は人体最大の内臓器官であり、成人では体重の約 1.5-2%（1.2-1.5 kg）を占め、右葉と左葉に大別される楔状構造を呈する。門脈血（75%）と肝動脈血（25%）からなる二重血流系を受け、1 分間あたり約 1.5 L の血液を処理し、全心拍出量の約 25%を占める。この高い灌流能は、解毒、糖・脂質代謝、タンパク質合成、胆汁産生、ビタミン・鉄貯蔵、免疫監視などの多岐にわたる機能を支える。肝実質細胞（Hepatocytes）が全体の 80%を構成し、非実質細胞と協調して微小環境を維持する。損傷耐性が高く、再生能に優れるが、慢性疾患（肝硬変、肝臓）で機能不全に至る⁷⁷⁻⁸⁰。

2.2.2 肝臓の構造

肝臓の基本構造単位は肝小葉であり、横断面が六角形の柱状構造を呈する。小葉中心に位置する中央静脈（Central vein）から放射状に肝細胞索（Plates of hepatocytes）が広がり、肝類洞（Hepatic sinusoids）が肝細胞索の間を網目状に走行する。類洞内皮細胞（LSECs）はフェネストレーションを持ち、ディッセ腔（Space of Disse）を介して肝実質細胞と物質交換を行う。非実質細胞として星細胞（Hepatic stellate cells: HSCs）がディッセ腔に存在し、ビタミン A 貯蔵と線維化応答を担う一方、クッパー細胞（Kupffer cells: KCs）は類洞内で貪食（Phagocytosis）・免疫機能を果たす⁸¹。

小葉周辺の門脈三つ組（Portal triad）には門脈の枝、肝動脈の枝、胆管が集約され、胆汁はヘリング管（Canals of Hering, CoH）を経て総肝管へ流出する。この門脈-中心静脈軸に沿

った代謝ゾネーション (Metabolic zonation: zone 1-3) が酸素・栄養勾配を形成し、解毒・糖新生能の局所差異を生む。これらの微細構造再現が肝組織工学の核心課題である。

2.2.3 肝臓の機能特性

肝臓の主な機能は以下の通りである：(1)炭水化物・脂質・タンパク質代謝、(2)薬物・毒素解毒、(3)胆汁産生・排泄、(4)血漿タンパク質・凝固因子合成、(5)ビタミン・ミネラル貯蔵、(6)免疫監視・貪食作用、(7)ホルモン代謝・不活性化、(8)再生・修復能。本項では、これらの機能をそれぞれ述べる。

2.2.3.1 代謝機能 (炭水化物・脂質・タンパク質)

肝実質細胞は炭水化物代謝の中心として、グリコーゲン合成 (Glycogenesis) と分解 (Glycogenolysis) を制御し、血糖恒常性を維持する。空腹時は zone 1 で糖新生 (Gluconeogenesis: PEPCK, G6PC 高発現) が主導され、グルコース産生を担う。一方、餐后では zone 3 でグリコーゲン合成が優位となり、グルコース過剰を貯蔵する。このゾネーションは酸素・栄養勾配と Wnt/ β -catenin シグナルにより形成され、グルカゴン刺激で活性化

する。脂質代謝では、zone 1 で脂肪酸 β 酸化 (Fatty acid β -oxidation) が主で、CPT1・ACOX 酵素が高発現し、ケトン体産生を促進する。対照的に zone 3 では脂質合成 (Lipogenesis: SREBP1, FASN) が優位で、脂肪酸・コレステロール産生、VLDL 組立・分泌を司る。この二重性は栄養状態に応じた柔軟性を与え、NAFLD では zone 3 脂質蓄積が病態基盤となる。

タンパク質代謝はアミノ酸脱アミノ化と尿素回路 (Urea cycle) を経て窒素廃棄物进行处理し、主に zone 1 で実行される。CPS1・OTC 等の酵素がアンモニアを尿素へ変換、血中アンモニアを維持する。過剰アミノ酸は糖新生基質となり、代謝連動性を示す。これらの代謝機能は肝組織工学で再現が求められ、高密度培養時のゾネーション模倣が肝特異機能向上の鍵である。

2.2.3.2 解毒・薬物代謝機能

肝臓は体内の主要な解毒器官として、血液中に含まれる薬物や毒素、内生代謝産物の代謝と排泄を担う。これらの機能は主に肝実質細胞において、Phase I および Phase II の酵素系によって段階的に実行される。Phase I ではシトクロム P450 (CYP) 酵素群が酸化・還元反応を通じ、疎水性の薬物や化学物質を親水性の代謝物に変換し、解毒過程を開始する。特に CYP3A4、CYP2E1 は、薬物代謝における主要な役割を果たし、その発現は肝小葉の zone 3 (中心静脈周辺) で高いことが知られる。

Phase II は、Phase I で変換された中間代謝物を抱合 (Conjugation) 反応によりより親水的にし、それにより排泄しやすくする過程である。主な抱合系酵素には UDP-グルクロン酸転

移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素 (SULT) やグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) があり、これらの活性は肝組織において広く分布し、様々な官能基付加により毒性を低減させる。

また、肝臓はアンモニアの解毒機構として尿素回路を備え、高度に酸素依存的なこの過程は主に zone 1 (門脈周辺) で活性化される。アンモニアが毒性を持つことから、迅速な解毒は生体恒常性維持に不可欠であり、尿素回路の酵素群であるカルバモイルリン酸合成酵素 (CPS1) やオルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) がこの反応を駆動する。

肝臓の薬物代謝能は個人差が大きく、遺伝子多型で CYP 酵素活性が変動するほか、慢性肝疾患では代謝機能が低下し薬効や副作用に影響を与える⁸²。このため肝組織工学においては、薬物代謝酵素の局在性や活性の再現が臨床応用の鍵である。また、肝臓モデルは新薬の安全性評価や代謝予測において不可欠なプラットフォームとなっている。

このように肝臓の解毒・薬物代謝機能は多段階で精巧に制御され、高い局所性と代謝多様性を有する。組織工学においても、これらの機能を忠実に模倣できるモデル構築が求められている。

2.2.3.3 胆汁産生・排泄機能

肝臓は1日あたり 600-1200 mL の胆汁を産生し、コレステロール、胆汁酸、ビリルビン、レシチンからなるこの分泌物は小腸での脂肪消化・脂溶性ビタミン吸収を促進する。胆汁酸合成は古典的経路 (Classic pathway: 90%以上) と代替経路 (Alternative pathway) に大別され、古典的経路では zone 1 の CYP7A1 (Cholesterol 7 α -hydroxylase) が律速段階でコレステロールを 7 α -ヒドロキシコレステロールへ変換する。代替経路は CYP27A1 と CYP7B1 が主導し、主に CDCA を生成する。

合成された胆汁酸は FXR (Farnesoid X receptor) 負帰還制御を受け、SHP 誘導により CYP7A1 転写を抑制する。肝細胞の基底側から胆小管 (Bile canaliculi) へは BSEP (Bile salt export pump) が能動輸送し、胆汁として総肝管へ流出、総胆管・胆嚢経由で十二指腸へ排出される。腸肝循環 (Enterohepatic circulation) により 95% が再吸収され、BA プールを維持する。この機構障害は胆汁うっ滞・肝障害を招き、組織工学では胆汁流動再現が肝機能評価の指標となる。

2.2.3.4 合成・貯蔵・免疫機能

肝臓は血漿タンパク質合成の主要器官であり、アルブミン (血漿浸透圧・運搬機能)、凝固因子 (II,V,VII,IX,X,XIII、フィブリノゲン)、抗凝固因子 (アンチトロンビン、プロテイン C/S)、補体系 (C3,C4) を産生し、全凝固因子の 90% 以上を供給する。これらの合成は肝実質細胞で実行され、慢性肝疾患では低下し出血傾向を生む。

貯蔵機能ではグリコーゲン (総量 75-100g、体重比 5-10%)、脂質、鉄 (フェリチンとして 600-1000mg)、ビタミン (A: 90%、B12、D、E、K)、銅を蓄積し、栄養欠乏時のバッファーとなる。鉄はトランスフェリン受容体を介し過剰蓄積で酸化ストレスを招く。

免疫機能はクッパー細胞が担い、類洞内で病原体貪食、抗原提示、サイトカイン産生により腸由来細菌を 90%除去する。LSECs との協調で免疫寛容を維持するが、感染時は炎症応答を増強できる。

2.2.3.5 ホルモン代謝・再生機能

肝臓は循環ホルモンの不活性化・代謝の主要器官であり、インスリン (IDE 酵素による分解)、甲状腺ホルモン ($T_4 \rightarrow T_3$ 変換)、性ホルモン (エストロゲン・テストステロン 17β -HSD 代謝) を処理し、内分泌平衡を維持する。エストロゲン欠乏は肝インスリン抵抗性を誘導し、脂質蓄積を促進する。

再生機能は驚異的で、部分肝切除後 72 時間以内に IL-6 (クッパー細胞由来) が即時遺伝子発現を誘導、HGF (星細胞由来) が肝細胞増殖を駆動、EGFR シグナルが G1/S 移行を促進し、2 週間で完全回復する⁸³。TNF- α /IL-6 軸が初期炎症応答を介し、Wnt/ β -catenin が終末分化抑制を行う。この耐損傷性は組織工学の基盤だが、重度損傷で線維化移行する。

2.2.4 急性肝不全 (ALF) とバイオ人工肝臓 (BAL) の現状

ALF は致死率 50-80%を呈する重篤疾患であり、肝移植以外の有効治療が限定的である中、BAL がブリッジ療法として開発が進められている。本節では ALF の臨床的課題と BAL の現状を概観する。

2.2.4.1 ALF の病態・予後

ALF はウイルス感染、薬剤性肝障害、自己免疫疾患など多様な原因で肝細胞が急激に壊死し、肝機能が短期間で失われる重篤な症状を呈する疾患である。病態ではアンモニア蓄積による肝性脳症や凝固系異常、黄疸、代謝性アシドーシス等が進行し、致死率は高い。予後改善には迅速な肝移植が必要とされるが、移植用ドナーの不足が大きな課題となっている。代替として BAL の開発が進められているが、未だ確立途上の治療法である

2.2.4.2 BAL の基本構造と機序

体外循環式肝支持装置として、肝細胞をバイオリアクターに固定し、患者血漿を循環させるハイブリッド型が主流である。基本構造は、細胞担体 (多孔質マイクロキャリア、平膜、ホロー繊維)、バイオリアクター (流動床型またはパッキングベッド型)、血漿分画装置からなり、肝細胞が担体に接着・増殖して機能発揮する。

機序は、解毒 (アンモニア・ビリルビン除去: Phase I/II 酵素)、合成 (アルブミン・凝固因子産生)、代謝支持 (グルコース恒常性)、炎症抑制 (サイトカイン吸収) を担う。患者血漿がバイオリアクターを通過し、肝細胞と物質交換、透析併用で低分子毒素除去を行う。

BAL は移植ブリッジとして機能するが、細胞源 (ブタ/ヒト iPS 由来) の免疫性・スケールが課題である。

2.2.4.3 BAL 開発の現状と課題

BAL 開発は 1990 年代初頭の ELAD (Extracorporeal liver assist device: ヒト HepG2 細胞使用) から始まり、2000 年代に MARS (Molecular adsorbent recirculating system: 非生物型) とのハイブリッド化が試みられた。2010 年代には SRBAL (Spheroid reservoir bioartificial liver: ブタ肝細胞オルガノイド使用) が ALF ブタモデルで生存延長を確認した⁸⁴。

最近では新規バイオ人工肝臓デバイスである HepatiCan が単回使用バイオカートリッジとアルギン酸封入肝スフェロイド (AELS) を採用、流動床バイオリアクターで質量移動を最適化し、臨床スケール試験でアンモニア除去率向上を示した⁸⁵。

課題は異種免疫拒絶 (ブタ細胞使用時)、細胞機能の短期持続 (24-72 時間)、スケールアップ (10^{11} 個細胞必要)、免疫抑制薬併用時の安全性である。今後、ヒト iPS 細胞と免疫寛容化が鍵となる。

2.2.5 肝組織構築の試み

肝組織工学は、ドナー不足解消に向け異所性移植や BALBAL 用ユニットとしての厚組織構築を目的とし、多様なアプローチが展開されているが、内部酸素供給不足と血管化未熟が最大の課題である (2.1.3 「三次元細胞培養技術」で述べたように)。本節では、これら既往手法を分類し、特に肝スフェロイドを構成単位とした高密度組織構築を中心に、バイオプリンティング、脱細胞化肝臓法、iPS オルガノイド等の現状を概観する。これにより、本研究の酸素内在化戦略との連続性を明らかにする。

2.2.5.1 スフェロイドベースの肝組織積層

スフェロイドベースの肝組織積層は、ハンギングドロップ法や超低接着プレートによるスキュフォールドフリー形成、またはコラーゲンハイドロゲルを用いたスキュフォールドベース法で調製した肝細胞スフェロイドを積層・融合させる手法である⁸⁶。高酸素要求性肝細胞では拡散限界により中心部壊死が生じやすいため、スフェロイド径を $150\mu\text{m}$ 以内に制御し、旋回培養やマイクロウェルで生体肝細胞密度 ($1\sim 2 \times 10^8 \text{ cells/mL}$) に近づけることが重要である。このサイズ制御により、単層培養比でアルブミン産生・尿素合成・CYP 活性が 5-10 倍向上する。

積層手法として、遠心分離やバイオリアクター内詰め合わせが用いられ、スフェロイド同士の間で ECM 産生を促進して融合組織を形成する。本研究室では、HUVEC 被覆スフェロイドを中空糸に充填すると、9 日で血管網が形成され、灌流可能組織が得られた⁸⁷。

課題は融合時の機能低下とスケールアップだが、内皮細胞共培養で血管前駆化を併用することで解決が期待される⁸⁸。このアプローチは異所性肝や BAL ユニットに適する。

2.2.5.2 バイオプリンティングによる構造再現

バイオ三次元プリンティングは、スキャフォールドフリーの肝スフェロイドを精密配置し、肝小葉様構造（肝細胞索・肝類洞・門脈三つ組）を再現する手法として注目される⁸⁹。株式会社サイフューズの剣山式（Kenzan method）では、患者自身の細胞や iPS 細胞由来の細胞などから得られた小さいなスフェロイド（直径約 0.5mm）を剣山のように多数並んだ微細な針に穿刺・固定する手法である。これらのスフェロイドは 3～7 日以内に融合し、厚さ 1mm のミニ肝臓を形成する⁹⁰。

押出型バイオプリンティングでは、GelMA/135ACG バイオインクを用いて肝細胞と間質細胞をハニカム構造でプリントした。硬度勾配により細胞整列・移動を誘導し、肝芽様組織を構築した⁹¹。HepG2/NIH3T3 細胞との共培養によりアルブミン分泌が増強され、界面で細胞間相互作用が観察された。

2.2.5.3 脱細胞化肝臓法

脱細胞化肝臓法（Decellularized liver scaffold）は、廃棄されたブタ、ラット、ヒトの肝臓から界面活性剤（SDS/トリトン X-100）を用いて細胞成分を除去し、生物由来の ECM スキャフォールドを残す技術である。血管網（門脈、肝動脈、胆管樹）、肝小葉構造、成長因子（HGF、VEGF）は保持され、肝細胞の再細胞化による機能回復を目指す。Ijima らはラットの右葉を脱細胞化した後、門脈からヒト初代肝細胞を注入し、6 時間の灌流により高密度な再細胞化を実現した。さらに HE 染色により細胞の密集した分布を確認した⁹²。

再細胞化では、門脈と肝動脈経路を通じて肝細胞を注入し、内皮細胞と組み合わせて血管内皮の再生を促進する。マウスモデルでは、再細胞化スキャフォールドは 2 週間のアルブミン生成と尿素合成能力を維持し、灌流実験により酸素消費能力を有することが示された⁹³。ヒト肝葉の脱細胞化処理では、HepG2/LX2 細胞を細胞外マトリックス立方体に再播種し、21 日後に Ki67 陽性増殖及び間質細胞から肝細胞への転分化が観察された⁹⁴。

その利点は、生体肝臓の複雑な構造と血管連通性を保持していることで、生体肝移植ユニットや異所移植に適している。しかし、再細胞化効率（20-50%）、免疫原性、非実質細胞の再現性、コンタミネーションなどの課題が残っている。ブタ肝臓の脱細胞化後にヒト iPS 肝細胞を注入する試みでは、短期的な機能回復は確認されたものの、大規模生産と長期生存は依然として今後の焦点である。

2.2.5.4 iPS オルガノイドと複合組織化

iPS オルガノイド技術は、hiPSC 由来の肝前駆細胞、内皮細胞、間葉系細胞を三次元共培養することで、自己組織化により肝小葉様構造を形成させる。新たな肝臓オルガノイド（Blood vessel incorporated liver organoid, BVLO）では、hiPSC 由来の未分化平滑筋細胞と内皮細胞を培養して人工血管を形成し、肝前駆細胞の層状構造と共培養することで、3 週間以内に血管周囲に CK19 陽性の胆管様構造を誘導する。透過型電子顕微鏡（TEM）観察により微絨毛とタイトジャンクション構造を確認し、Rho123 排出及び CFTR 活性により分泌機能

を検証した。移植後、当該器官は宿主胆管と正常に接続し、胆汁うっ滞モデルにおいて動物の生存期間を顕著に延長した⁹⁵。

複合組織化プロセスにおいて、複数の肝芽が融合することでセンチメートル規模の拡大を実現し、血管-胆管ネットワークを再構築する。TGF β /Notch シグナル経路は血管-胆管相互作用を制御し、JAG1 遺伝子のノックアウトは胆管形成を抑制する（同上）。大阪大学の気液界面培養技術（IMALI 法）は、肝類洞内皮前駆細胞（Liver sinusoidal endothelial progenitor, iLSEP）の添加により肝洞様構造を再構築し、FVIII 分泌レベルを向上させる。また血友病モデルへの移植において出血症状を改善する⁹⁶。

2.4 酸素生成バイオマテリアル

ここでは、組織工学に利用可能な酸素生成試薬、酸素生成バイオマテリアル (OGBs) を開発するための主なアプローチについて紹介する。OGBs は、固体過酸化物質や過酸化水素、パーフルオロカーボンなどの酸素供給源を高分子マトリックスに組み込み、低酸素環境下の細胞生存・機能維持を目的とした材料体系である。組織工学では、移植直後の無血管期（または宿主血管との未連結の段階）における一時的な酸素欠乏を補う手段として注目されており、本節では、酸素生成源の種類に基づき、その特徴と応用例を概説する。

2.4.1 無機過酸化物質系酸素生成マテリアル

過酸化水素などの液体過酸化物質は、分解される際に水と酸素に分離することに注目され、これまで酸素放出材料として多くの報告例が挙げられている。Hinkelbein ら³⁷は H_2O_2 による体内酸素化の試みが、 H_2O_2 を腸内に注入することによって検証されてきた。しかし、大量の酸素を無秩序に発生させることによる酸素塞栓の問題があるため、この方法はあまり発展しておらず、少なくとも報告されていない。また、数日から数週間という期間、酸素を要求し続ける細胞に対し、酸素を供給することを踏まえると、1日を待たずして全てが分解される過酸化水素は酸素放出材料としては不十分であった。

続いて注目された材料であり、現在最も調査が進んでいる固体酸素供給材料は過酸化カルシウム (Calcium peroxide, CPO)、過酸化マグネシウム (Magnesium peroxide, MPO) および過炭酸ナトリウム (Sodium percarbonate, SPC) である。Abdi、Wang ら³⁹は、温度、濃度、pH、および触媒など他の要因を変更することにより、酸素放出期間を調節可能であることを示した。それらの反応式は共通に $\text{PO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{P}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2$ であり、 H_2O_2 濃度管理が毒性回避の鍵となる。本小節では、CPO、MPO、SPC の3種類を分類する。これらの材料は反応速度、中間生成物の毒性、持続性に差異があり、封入技術との組み合わせにより制御が可能である。本小節では各材料の酸素放出特性と生物学的応用について概説する。

2.4.1.1 過酸化カルシウム

CPO は無機過酸化物質系酸素発生材料として、最も実用性が高い。理論酸素含有量 20.9 wt% と市販の高純度特性により、この材料は三次元組織工学分野で広く採用されている。PLA/CPO 複合フィラメント (1.5-9 wt%) を用いた FDM 技術による骨スキャフォールドでは、6 wt% 添加時に最大酸素放出量 (0.00007 mg/L/日、14 日持続放出) と増強された気孔率を示し、低酸素環境下における骨芽細胞の生存率と抗菌性を著しく向上させた。走査型電子顕微鏡 (SEM) により、CPO ナノ粒子が PLA マトリックス中に均一に分散していることが確認された。X 線回折 (XRD) 分析では結晶構造が維持されていることが確認された⁹⁷。

肝組織応用では、メタクリル化ヒアルロン酸 (Methacrylated hyaluronic acid, MeHA) /CPO ハイドロゲルが iPSC 由来肝細胞シートを多層化し、酸素放出で低酸素ストレスを緩和、

HGF/VEGF/Alb 発現向上とアルブミン分泌を促進し、7日で溶存酸素 6.6 mg/L を維持、シート厚 33 μm を確保した⁹⁸。

創傷治癒分野では、オバアルブミン/CPO スキャフォールドが 15 日間の持続的放出により血管新生を促進することが確認され、過酸化水素酵素併用により H_2O_2 分解効率が向上した。CPO は Ca^{2+} 供給による骨格・心筋再生促進の相乗効果も有するが、pH 上昇抑制が今後の研究課題である⁹⁹。

2.4.1.2 過酸化マグネシウム

MPO は CPO に比べて溶解度が低く（酸素含有量 15-20 wt%）、酸素を徐放する特性を持つ長期培養に適した無機過酸化物である。三次元プリント PCL/nHA/MGO₂/PDA 複合スキャフォールドにより、低酸素腫瘍微小環境下で 3 週間超の持続酸素放出を実現し、近赤外光照射により光熱療法効果を増強、HSP60 発現抑制を通じて骨肉腫細胞のアポトーシスを誘導した。ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて腫瘍抑制と骨再生を同期的に達成し、 μCT 解析により骨体積率の有意な向上を確認した¹⁰⁰。

創傷治癒領域における応用として、三次元プリントした PCL/ β -TCP/MGO スキャフォールドは低酸素環境下において骨髄間質幹細胞（BMSC）の生存率を著しく向上させ、Runx2 および OCN の発現を増強した。さらに、MPO は Mg^{2+} を介して PI3K/AKT 経路を活性化し、相乗効果をもたらした¹⁰¹。

2.4.1.3 過炭酸ナトリウム

SPC は、 $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$ の結晶構造を持ち、加水分解で急速に酸素を生成するバースト型無機過酸化物（酸素含量 37 wt%）である。この特性により、短期間で高濃度の酸素供給が可能となる。CPO と比較すると、初期酸素放出速度が顕著に向上していることが報告されている。低酸素条件下でのバイオ三次元プリンティング筋組織モデルにおいては、カタラーゼを併用することで細胞生存率を改善できることが示されており、例えば 1 mg/mL の SPC と 20 U のカタラーゼを組み合わせることにより、筋細胞の分化促進効果が確認されている¹⁰²。

PCL/SPC 電界紡糸ナノファイバー（過炭酸ナトリウム添加）が糖尿病性慢性創傷ラットモデルで HIF-1 α 発現増強、血管新生促進、再上皮化加速を示し、10 日間酸素持続放出を確認した。CAM アッセイで血管密度 2 倍向上、組織学的にコンパクト ECM 形成を観察した¹⁰³。

キトサン/過炭酸ナトリウムハイドロゲルはポリウレタン（PU）コーティングで 21 日持続放出、pH 安定化により細胞毒性低減、糖尿病創傷で治癒時間短縮を示した。SPC は低コスト・低環境負荷の利点を持つが、急激な放出制御が課題であり、カタラーゼと親水性バリアの組み合わせで効果的に解決できる。

2.4.2 パーフルオロカーボン（PFC）系酸素運搬材料

パーフルオロカーボンは高い酸素溶解能（50 vol%超）を有し、物理的拡散により可逆的に酸素を供給する液体型材料で、過酸化水素系に比し H_2O_2 毒性低減が利点である。特にパーフルオロオクチルブロミド（PFOB）とパーフルオロ-15-クラウンエーテル（PFCE）は一般的な液体 PFC である。特にフッ素 MRI におけるナノエマルジョンのコア材料として用いられる。PFOB や PFCE をナノエマルジョンやマイクロ粒子に封入し、腫瘍・虚血組織への酸素運搬に応用される。組織工学では、PLGA-PFCE ナノ粒子（半径 150-200 nm、PFC 含量 20-60 wt%）が連続流マイクロ流体法で高効率生産され、低酸素 HeLa 細胞培養で生存率向上を示した¹⁰⁴。

組織工学では、アルギン酸ナトリウム/PFOB エマルジョンビーズが肝細胞の三次元培養において低酸素環境下での生存率と代謝活性（グルコース消費量）の向上、ならびに 7 日間の持続的な酸素供給を確認した¹⁰⁵。パーフルオロトリブチルアミン（PFTBA）を補充したフィブリン/スロンビンハイドロゲルに中胚葉系幹細胞（MSC）を懸濁させ、皮下異所移植、橈骨欠損、脊椎融合モデルで評価した。結果として、PFTBA 群では骨形成量が 2.5 倍増加し、細胞生存率が向上、骨体積は 1.4 倍増加した。アルギン酸塩マトリックスではないが、合成酸素キャリア強化型ゲルは hMSC の骨形成能を著しく促進し、強化された体内異所性骨形成効果を示した¹⁰⁶。PFC ナノエマルジョンは腫瘍低酸素改善により T 細胞活性化、免疫療法増強も報告されている¹⁰⁷。

2.4.3 ハイドロゲル封入型酸素生成システム

ハイドロゲル封入型酸素生成システムは、無機過酸化水素微粒子をアルギン酸ナトリウム、GelMA、キトサン等の親水性マトリックスに分散封入し、水分接触を制御して持続的な酸素放出を実現する代表的な手法である。W/O エマルジョン法や静電紡糸法で微粒子化した後、UV 架橋やイオン交差連結で三次元足場を形成し、低酸素環境下での細胞生存率向上と分化促進が報告されている。CPO-アルギン酸ナトリウムハイドロゲルは二相性 H_2O_2 放出（初期バースト後緩やかに減衰）で腫瘍治療効果を示し、ROS 生成制御により細胞毒性を最小化した¹⁰⁸。

骨再生において、PCL 強化 GelMA/ CaO_2 マイクロ粒子スキャフォールドは低酸素環境下で骨芽細胞分化を誘導し、5 週間持続的な酸素放出（2%低酸素チャンバー条件下）により *in vivo* で重要サイズの骨欠損修復を達成した。血管新生と骨形成の相乗効果を確認した¹⁰⁹。心筋組織工学では、GelMA/PCL- CaO_2 複合体が心筋細胞の代謝活性向上とアポトーシス抑制、5 週間の低酸素環境下での LDH 活性最小化を示した¹¹⁰。

肝細胞培養において、PLGA/CPO マイクロ粒子は HIF-1 α の発現を抑制し、細胞機能の維持に寄与することが報告されている。また、カタラーゼを添加することで H_2O_2 の分解効率を向上させることが可能である。この手法は、封入材料の多様性という利点を有する一方で、膨潤挙動の制御および pH 安定化に関する課題が依然として残されている。

2.4.4 新規酸素生成材料と複合応用

新規酸素生成材料と複合応用では、2025 年ノーベル賞を受賞した北川進教授が開発した金属有機骨格 (MOF) や光熱応答性系、ガス調節マイクロカプセルが注目され、過酸化物・PFC とのハイブリッドで多機能足場を実現する。MOF は多孔質構造で酸素貯蔵・イオン放出を制御し、骨再生において優れた生体適合性を示している。凍結乾燥法により MOF-801 をゼラチンに複合化 (圧縮強度 15MPa) した結果、ヒト骨肉腫細胞(MG-63)の石灰化促進、アルカリホスファターゼ活性の上昇、およびフマル酸/ジルコニウムイオンの持続的放出が確認された¹¹¹。

光熱応答プラットフォームは、近赤外光照射 (NIR) で温度上昇を誘導し、CPO の加水分解を加速する酸素生成システムである。Li らはポリドーパミン-ヒアルロン酸 (PDA-HA) ハイドロゲルに CPO-ICG@LA@MnO₂ ナノ粒子を封入し、創傷治癒促進を報告した。808 nm NIR 照射 (1.0 W/cm²) で HA 融解 (44°C) を引き起こし、CPO の加水分解を制御、持続的 O₂ 放出と ¹O₂ (一重項酸素、活性酸素の一種) 生成を実現、初期炎症抑制に寄与した。ラット全層皮膚欠損モデルで NIR 併用群が 10 日で創傷完全閉鎖 (治癒率 99%)、HE/Masson 染色でコラーゲン沈着・組織修復優位、TNF- α 陽性 M1 マクロファージ減少・TGF- β 陽性 M2 増加を確認した。本手法は酸素供給と抗炎症の相乗効果を示し、慢性創傷治療に有用である¹¹²。

ガス調節マイクロカプセルは、グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼを封入することで局所的な低酸素勾配を生成し、オルガノイドの形態形成を制御する。GelMA/PDA カプセル (酵素濃度 40 mg/mL) は腸管オルガノイドにおいて空間血管新生を誘導し、腫瘍球体では HIF-1 α を抑制した。肝線維化モデルでは CAT 活性の回復により H₂O₂ 分解を促進した¹¹³。

これらの知見は本研究におけるマイクロスフェア分散の新たな設計指針を提供する。

第3章 酸素生成コラーゲングルの作製と評価

3.1 本章の目的及び概要

既往の研究によれば、内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドの集合体による三次元肝組織構築は、構成細胞の生存維持および肝特異的機能向上に顕著な効果を示す。一方で、組織中心部の細胞生存性および内皮細胞ネットワークの秩序的構築が確認されているものの、構築肝組織体（厚さ 330 μm ）中心部では酸素拡散限界（100～150 μm ）により細胞の低酸素性アポトーシスが生じ、肝機能再現可能な血管構造の内部構築には至っていない¹¹⁴。さらに、血管化に成功した組織体であっても、移植直後に宿主血管と即時連結するわけではなく、数日～2週間程度の時間差が生じ、この期間中移植組織内部は依然として低酸素環境に曝露される。したがって、この時間スケールの相違を克服する一時的な酸素供給経路を確立しなければ、微小血管ネットワークの機能を果たすことは困難である。本研究では、移植後の宿主血管連結に要する時間スケールと細胞酸素要求時間スケールの乖離を考慮し、酸素供給に関する一時的な代替手段の確立の必要性を認識するに至った。

本章では、細胞に対し一時的に酸素供給可能な培養基材の開発を目的とした。その目的達成のために、細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンを主体としたハイドロゲルに対し、一時的に酸素を放出する媒体として過酸化カルシウム (CPO) に着目し、CPO 含有酸素生成コラーゲングル (oxy CG) の調製を行った。そして、以下に示す3つの観点から調製した酸素生成ハイドロゲルの特性を評価した結果、迅速に調製可能で安定かつ高効率な酸素生成バイオマテリアル (OGBs) として、細胞培養への応用可能性を有することが確認された。

(一) oxy CG の酸素放出持続時間の測定

異なる濃度の CPO を含むコラーゲングルを調製する条件下で、開放系で酸素放出の持続時間を評価し、細胞培養における応用可能性を検討する。

(二) oxy CG を用いた無細胞培養系における pH 変動の測定

CPO が水と接触して加水分解を起こすと、副産物として水酸化カルシウムが生成される。これは培地の pH 上昇をもたらす可能性がある。細胞への影響を調べるため、pH を経時的に測定した。

(三) oxy CG が産生する過酸化水素濃度の測定

CPO が水と接触し、加水分解される際に中間体として生成される過酸化水素は細胞傷害性を示すため、その濃度を経時的に測定し、細胞へ与える影響を考察する。

3.2 酸素生成コラーゲングルの作製

3.2.1 酸素放出原理

本研究では酸素の発生材料として CPO を用いた。CPO は、水と接触することで中間体である過酸化水素を経由し、最終的には水と酸素を生成することができる酸素発生材料である (Fig. 3.1)。

中間体として生成される過酸化水素は細胞毒性を有する。そこで本研究では細胞毒性を抑制するために、過酸化水素を分解する反応を促進する触媒としてカタラーゼ (Catalase) を使用した。

本研究では、コラーゲングル (Collagen gel, CG) の高い含水率および多孔質特性を活用し、CPO 粉末をコラーゲングル内部に均一分散させた。水分子の拡散によって CPO 粒子表面で反応が進行し、ゲル内部から外部に向けて酸素濃度勾配が形成される。また、この反応は単純であり、CPO の添加量を変えることで放出される酸素量を容易に制御できる。

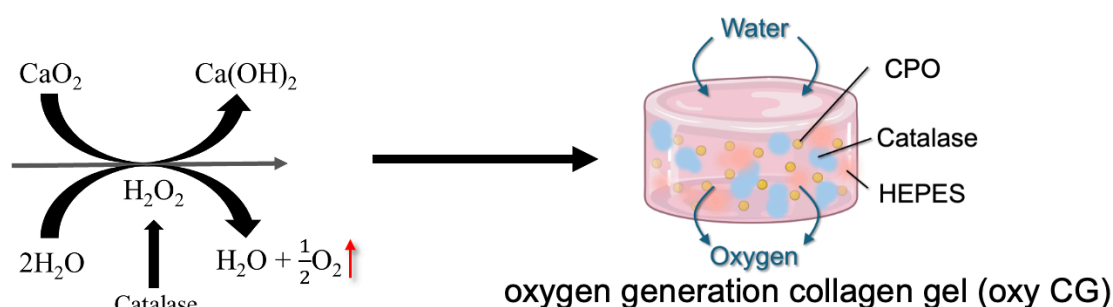


Fig. 3.1 Schematic of oxygen generation from calcium peroxide when exposed to water. After water diffusion in the collagen gel, calcium peroxide dissociates into its ions and hydrogen peroxide. Then hydrogen peroxide decomposes to oxygen and water

3.2.2 作製方法

以下は oxy CG の調製方法における具体的な原料を示す。

<使用した試薬>

- Cellmatrix typeI-A.....新田ゼラチン
- 10× concentrated MEM-Hank's culture medium.....新田ゼラチン
- Reconstitution buffer.....新田ゼラチン
- Calcium peroxide, typically 65%.....関東化学
- Catalase, bovine liver derived (2700 unit/mg).....東京化成工業
- HEPES 生化学用緩衝剤.....同仁化学研究所
- CMF-PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate-buffered saline, PBS(-)) : Table 3.1 に示す組成で調製した。

Table 3.1 Composition of phosphate buffer solution without Ca^{2+} and Mg^{2+}

Composition	g/L	mmol/L
NaCl	8.0	136.89
KCl	0.2	2.68
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	8.10
Na_2HPO_4	1.15	8.10
KH_2PO_4	0.2	1.47

以下に示す方法で CPO を、コラーゲンコーティングに用いる Cellmatrix ベースコラーゲングルに導入し分散させることによって、CPO 含有コラーゲンを調製した。

<作製方法>

1. Catalase/PBS 溶液の調製

カタラーゼ粉末 4 mg を 45 mL の PBS に溶解し、濃度 30 unit/mL となるよう調製した後、30 分間攪拌した。続いてシリンジフィルターを用いてろ過滅菌を行った。

2. CPO/HEPES バッファー溶液の調製

使用する CPO は秤量後、クリーンベンチ中にて 30 分間の UV 滅菌を行った。滅菌済みの CPO を無菌環境下において 10 ml HEPES バッファー (pH7.4、HEPES 濃度 30 mM) に所定の濃度で混和し、30 分攪拌を行った。

3. 酸素生成コラーゲンの作製

例えば、酸素放出特性を測定するために、2 mL の oxy CG を調製するには、まず 1 mL の cellmatrix type I-A、0.125 mL の 10×concentrated medium、0.125 mL の reconstitution buffer を氷上で順次混合し、コラーゲングル原液 (CG) とする。次に (2) で調製した CPO/HEPES バッファー溶液 0.5 mL、(1) で調製した Catalase/PBS 溶液 0.25 mL を加えた (CG、CPO、catalase 溶液の体積比は 5:2:1 である)。全ての作業はゲル化が進行しないよう、氷冷下で実施し、また混和は CPO の分解による酸素放出以外の酸素が入らないよう十分注意しながら行った。

3.2.3 過酸化カルシウム濃度の表記法

ここに、調製した oxy CG 中の CPO 濃度について計算方法を記載する。作製手順に示したように、CPO は HEPES バッファーに一度溶解させ、その後コラーゲングル溶液に添加した。そこで、oxy CG 中の CPO 含有量は Eq. (1) により算出される。

$$\text{CPO}(w/v\%) = \left(\frac{W}{V}\right) \div 4 \times 100 \cdots (1)$$

ここで、 W はCPO粉末の重量 (mg)、 V はHEPESバッファの体積 (mL)を示す。例えば、oxy CG(0.01)を作製する際には、4 mg のCPOを秤量する必要がある。なお、oxy CGの括弧内の数字は、当該oxy CGにおけるCPOの質量体積パーセント (w/v%)を表すものである。

3.3 酸素生成コラーゲングルの特性評価

3.3.1 本節の目的

組織培養過程における局所低酸素環境の改善を目的として、3.2 では酸素放出ハイドロゲルを開発した。本材料は、新田ゼラチン社製 Cellmatrix 基コラーゲングルをスキャフォールドとし、酸素放出成分および過酸化水素分解促進酵素であるカタラーゼを添加したものである。コラーゲングル固有の特性（高含水率、多孔質構造、温度上昇に伴うゲル化）を保持しており、組織工学応用に適している。本節では、酸素放出持続時間、培養過程における pH 変動、過酸化水素濃度の 3 つの観点から、本酸素生成ハイドロゲルの本研究後続実験への適用性を評価する。

3.3.2 実験方法

3.3.2.1 開放系での酸素放出持続時間測定

溶存酸素濃度の測定は、測定用セルと隔膜式ガルバニ電極型溶存酸素 (DO) センサー (InPro 6800, Mettler Toledo, Japan) で構成される測定システムで行われる。経時的な計測を実施するため、DO センサーはプロセスコントローラー (EPC-1000, EYELA, Japan) と接続し、出力結果は PC 上に監視・記録した (Fig. 3.2)。本実験では、酸素生成能を確認するため、異なる濃度の CPO を含む 3 種類のハイドロゲル、すなわち oxy CG(0.01)、oxy CG(0.1)、および CPO を含まない対照群 oxy CG(0)を使用した。測定セルに付随した 3 本のガラス管のうち、上部 1 本にエアフィルターを取り付け系内に周囲雰囲気下と平衡状態を実現する開放系とした (Fig. 3.3)。測定セル底部に、3.2.2 節に記述された方法により作製した各条件下の oxy CG (1 mL) を加え、37 °C、5% CO₂ 雰囲気下のインキュベータ内で 25 分間静置してゲル化させた。その後、ゲルの上に 5% O₂ インキュベータ内で平衡処理した PBS 溶液 (2 mL) を添加し、oxy CG から発生した酸素を上層 PBS に溶解させた。DO センサーを PBS 中心部に設置し、37 °C、5% O₂、5% CO₂ 雰囲気下で初期 0.5 h から 168 h まで DO 濃度を継続的にモニタリングした。

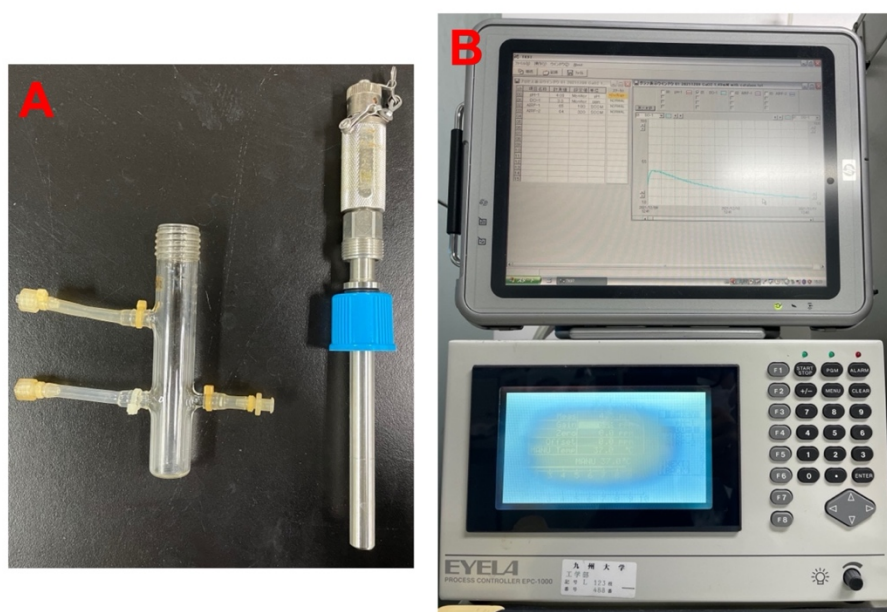


Fig. 3.2 Dissolved oxygen measurement device consisting of (A) a measuring cell and dissolved oxygen sensor, and (B) a process controller connected to a PC.

Open system

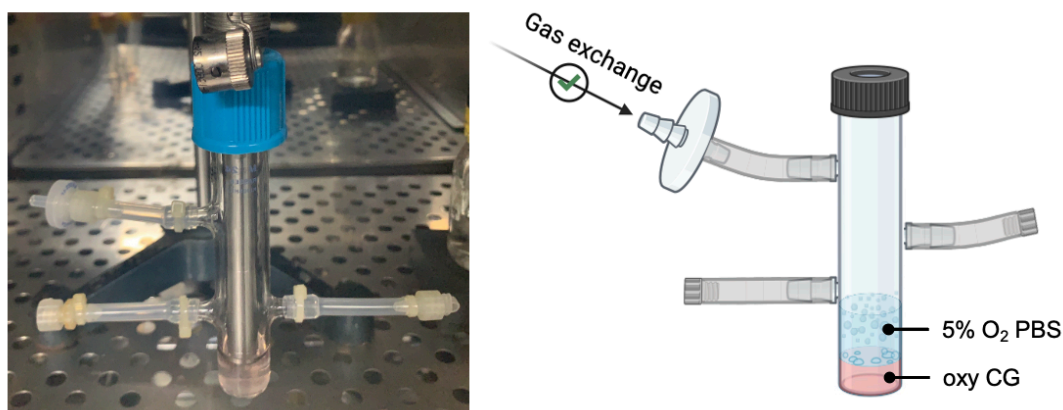


Fig. 3.3 Dissolved oxygen measurement device in an open system (left) and schematic of the device used to evaluate oxygen release period (right)

3.3.2.2 無細胞培養系における pH 変動測定

CPO の加水分解により水酸化物イオンが生成され、局所的な pH 環境に影響を与える可能性がある。したがって、pH 安定性を評価するため、12 ウェルプレートのウェルに 3.2.2 節に示す方法により作製した 3 条件の oxy CG を 1 mL ずつ加え、25 分間ゲル化後に Table 3.2 に示す肝細胞培養培地 (D-HDM) を 1.5 mL 加えた。0~48 時間の培養期間中、指定した時間点で培地を少量ずつ定期的に採取し、コンパクト pH メーター (LAQUA twin B-71X, Horiba, Kyoto, Japan) を用いて pH 値を測定した。

Table 3.2 Components of hepatocyte culture medium (D-HDM).

Component	Concentration	
DMEM	13.5	g/L
EGF	50	μg/L
Insulin	10	mg/L
Hydrocortisone	7.5	mg/L
Proline	60	mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1	μM
H ₂ SeO ₅	3	pM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	50	pM
Linoleic acid	50	μg/L
Penicillin	0.0588	mg/L
Streptomycin	100	mg/L
NaHCO ₃	3.7	g/L
HEPES	5.985	dg/L

3.3.2.3 過酸化水素濃度測定

oxy CG から中間体として生成される過酸化水素濃度を測定するため、「Cell Biolabs」社の「OxiSelect Hydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit」を使用した。oxy CG(0.01)および oxy CG(0.1)について、カタラーゼ添加の有無を含む4条件を設定し、各条件のゲルを所定の方法で3 mL 作製した後、48 ウェルプレートに400 μL ずつ分注・ゲル化させ、滅菌2次水400 μL を重層してインキュベータ内で培養した。サンプリング時間ごとにプレートを分けて準備し、実験開始後1、24、48、72、96 時間に各ウェルから上清2次水を回収して1.5 mL チューブに移し、速やかにディープフリーザーで凍結保存した。これらのサンプルを用いて化水素濃度を定量した (Fig. 3.4)。

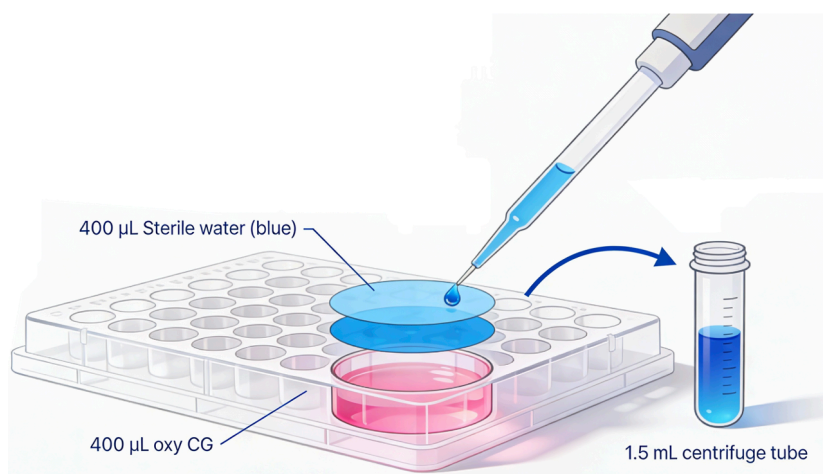


Fig. 3.4 Schematic diagram of sample preparation for hydrogen peroxide determination

3.3.3 実験結果

3.3.3.1 酸素放出持続時間

3.3.2.1 に示した隔膜式ガルバニ電極型 DO センサーを用いた手法で開放系条件下における酸素放出時間を測定した。測定システムは開放系であるため、最終的に上層 PBS 中の DO 濃度は 5% O₂・5% CO₂ インキュベーター内の平衡酸素濃度 (1.63 ppm) に収束する。しかし、種々の干渉要因により、最終 DO 濃度が 1.63 ppm に正確に到達しない場合があるため、全データを線形補間処理により補正し、処理後データを Fig. 3.5 に示した。その結果、oxy CG 中の CPO 添加量の増加に伴い、酸素放出時間および総放出量がいずれも有意に増大することが確認された。具体的に、DO 濃度は測定開始直後に急速に上昇し、数時間以内に最大値に到達した。Oxy CG(0.01)では最大約 5.5 mg/L、oxy CG(0.1)では最大約 12 mg/L を示した。その後、DO 濃度は徐々に低下し、最終的には環境酸素濃度 (5% O₂) に近づいた。酸素放出の持続時間は、oxy CG(0.01)で約 50 時間、oxy CG(0.1)では約 70 時間まで延長された。

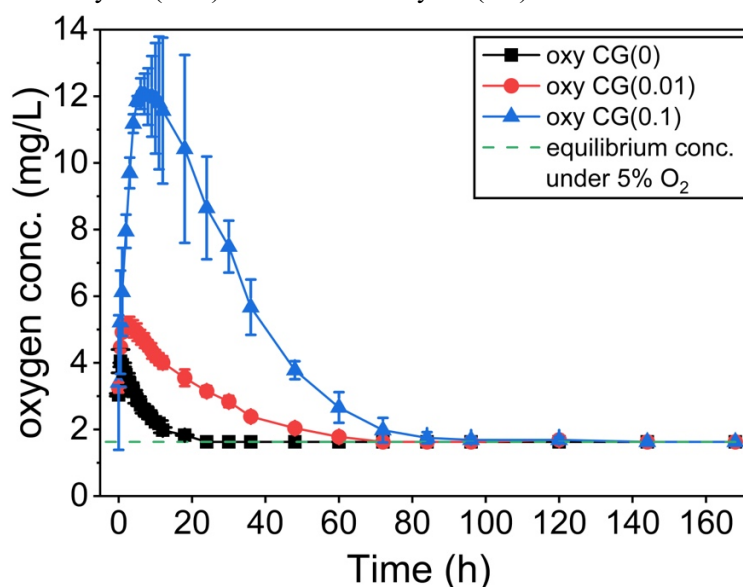


Fig. 3.5 Time-dependent changes in dissolved oxygen concentration generated by oxy CG in an open system at 37 °C, 5% O₂, 5% CO₂. Data are presented as mean ± SD (n = 3).

3.3.3.2 無細胞培養系における pH 変動

各条件における pH の経時変化を Fig. 3.6 に示す。その結果、培養開始後最初の 3 時間以内に全群で pH 上昇が観察され、特に oxy CG(0.1)では pH が 7.6 まで上昇した。その後、各群で pH が徐々に低下し、最終的に安定化した。また、全体の経時変化曲線から、oxy CG(0.01)と CPO 添加なしの oxy CG(0)間に有意差は認められなかった。

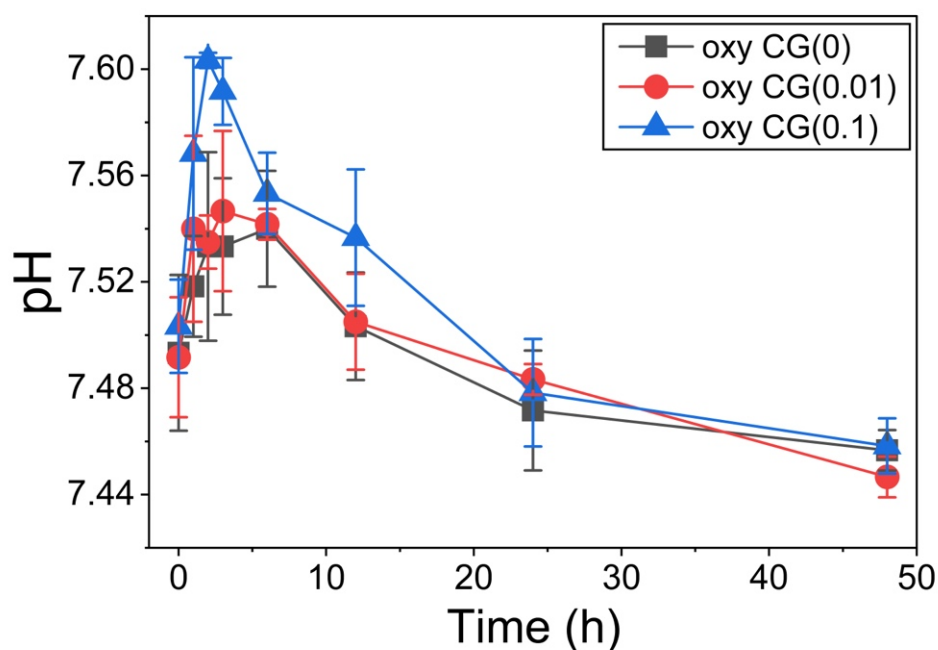


Fig. 3.6 Time-dependent changes in culture medium pH in a cell-free system over 48 h. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

3.3.3.3 過酸化水素濃度変化

各条件においてコラーゲンゲルから放出された過酸化水素の累積濃度の比較を Fig. 3.7 に示す。異なる CPO 濃度の二つの酸素放出ハイドロゲル系において、カタラーゼの添加が過酸化水素濃度に及ぼす影響をそれぞれ測定した。結果から、カタラーゼを添加すると、残存する過酸化水素濃度が顕著に低下し、低濃度に抑制されることが明らかとなった。また、過酸化水素濃度は時間の経過とともに持続的に蓄積し、カタラーゼを添加していない対照群では約 48 時間後にピークに達したのに対し、カタラーゼを添加した実験群では約 12 時間後に濃度ピークが示された。

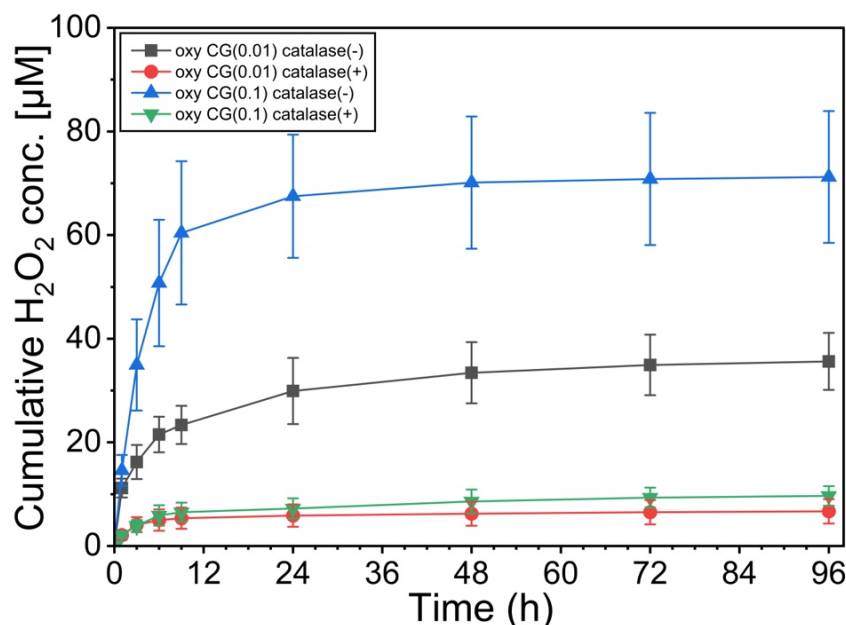


Fig. 3.7 Cumulative hydrogen peroxide released by oxy CG under different conditions over 96 h. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 4).

3.3.4 考察

3.3.4.1 酸素放出持続時間

酸素放出持続時間については、CPO の加水分解反応に依存した放出機構と、ゲル内に担持された CPO 量との関係から解釈できる。CPO は水と反応して段階的に過酸化水素および酸素を生成するため、単位体積当たりの CPO 量が増加すると、反応に供される有効な過酸化物量が増え、その結果として総酸素放出量および放出持続時間が延長する傾向がある。実際、CPO 含有量を段階的に変化した酸素生成スキャフォールドでは、CPO 含有量の増加に伴い溶存酸素濃度のピーク値と酸素放出持続期間がいずれも増大することが報告されており、本研究の oxy CG における濃度依存的な挙動と整合する⁹⁷。

次に、得られた DO 変化曲線を肝組織内の生理的酸素環境と比較すると、oxy CG(0.01) と oxy CG(0.1) の適用場面の違いが明確となる。健常肝では、門脈域から中心静脈域にかけて酸素分圧が空間的に勾配を形成し、その範囲は 4~14% O₂ (溶存酸素換算で約 1.3~4.6 mg/L) と報告されている¹¹⁵。この点を踏まえると、oxy CG(0.01) では酸素放出初期において DO 濃度がほぼ肝細胞にとって至適とされる範囲内に収まり、かつ大きなピークを示さないことから、生理的な肝類洞環境に近い「緩やかな酸素補給」を実現できていると解釈できる。一方、oxy CG(0.1) では酸素の初期バストが存在するため、DO 濃度が初期の長い期間にわたり生理的範囲外で維持される点に注意が必要である。未消費の残存する酸素は活性酸素種を誘発し、細胞にダメージを与える可能性がある¹¹。さらに、CPO を高濃度で

含有した系では、初期バーストにより DO 濃度が 180%飽和近くまで上昇した後、急速に低下する現象が報告されており¹⁷、本研究における oxy CG(0.1)の初期挙動とも整合する。以上より、肝細胞の短期培養においては、肝内酸素分布に近い DO レベルを安定的に供給できる oxy CG(0.01)がより適しており、oxy CG(0.1)は長時間で高い酸素要求が生じる状況への応用可能性が示唆される。

3.3.4.2 無細胞培養系における pH 変動

本無細胞培養系における pH 変動は、まず測定手順に起因するアーティファクトの影響を考慮する必要がある。pH 測定では、少量の培地サンプルを頻回に採取するため、その都度培養系を 5% CO₂ インキュベーター外に取り出す操作が生じる。培養開始直後のようにサンプリング間隔が短い条件では、培地が CO₂ 平衡状態から繰り返し逸脱することで、炭酸水素緩衝系による pH 緩衝が十分に働かず、一時的なアルカリシフトとして観察される pH 上昇が強調されたと解釈できる。一方で、測定間隔が延長し培養時間が経過するにつれて、各群とも pH が徐々に安定化していることから、インキュベーター内での CO₂ 平衡回復に伴い、この操作起因の pH 変動の影響は次第に軽減されたと推察される。

また、本系では oxy CG および培地の双方に HEPES 緩衝液が含まれており、これが CO₂ 依存性の炭酸水素緩衝に加えて pH 変動を抑制する役割を果たしていると考えられる。HEPES は pH 7.0 前後で高い緩衝能を示すことが知られており、CPO の加水分解により一過性に pH が上昇しても、時間経過とともに緩衝作用と CO₂ 平衡の回復によって pH が生理的範囲へと収束した可能性が高い。肝細胞の至適 pH として 7.0~7.4 が報告されていることを踏まえると¹¹⁶、測定操作の影響を除外した場合、oxy CG(0.01)は対照の oxy CG(0)と同等の pH 環境を維持しうることから、短期培養においては CPO 添加による pH リスクがほとんどない条件と評価できる。一方、oxy CG(0.1)では初期に相対的なアルカリ化がみられるものの、時間とともに CPO の加水分解反応が進行し尽くすことで pH 変動が収束し、最終的に肝細胞生存に許容される範囲内に落ち着くと考えられる。そのため、CPO 由来の pH 上昇が時間とともに緩和されるという挙動を前提とすれば、oxy CG(0.1)条件は長期培養において、酸素供給能と pH 環境の両面からバランスの取れた条件として機能しうると解釈される。

3.3.4.3 過酸化水素濃度変化

過酸化水素濃度変化の観点からは、カタラーゼ添加が CPO 由来 H₂O₂ の動態を大きく書き換えている点が重要である。カタラーゼは H₂O₂ を速やかに水と酸素へ分解するため、ゲル内および培地中に蓄積する H₂O₂ 濃度が顕著に抑制され、その結果、全観察期間を通じてごく低濃度に維持されたと考えられる。一般に肝細胞や類洞内皮細胞では、数十 μM 以下の H₂O₂ は内因性シグナルとして許容される¹¹⁷。一方、50–100 μM を超えると機能障害や細胞死が時間依存的に増悪することが報告されており、本系で得られた「カタラーゼ

添加下での低レベル維持」は、毒性リスクを実質的に回避しつつ酸素生成のみを利用できる条件と位置づけられる。

一方、カタラーゼ非添加系では、CPO の加水分解に伴い H_2O_2 が持続的に生成・蓄積し、約 48 時間でピークに達していることから、一定時間以降は肝細胞に対する酸化ストレス源となりうる。実際、培養ヒト肝細胞では、 $200\ \mu\text{M}$ 程度の H_2O_2 を 24 時間負荷することでアポトーシス誘導やカスパーゼ活性化が顕著となることが示されている¹¹⁸。これらの知見を踏まえると、CPO 濃度が高い条件 (oxy CG(0.1)) ほどカタラーゼ併用の意義は大きく、 H_2O_2 ピークを早期に低いレベルで打ち切ることで、酸素供給の利点を維持しつつ、長期培養における ROS 依存性の細胞障害を抑制できると解釈される。すなわち、本結果は「CPO 濃度にかかわらずカタラーゼ併用が必須である」こと、特に高濃度 CPO 条件では酸素生成能と安全性の両立に不可欠な設計要素であることを示している。

3.3.5 本節のまとめ

oxy CG(0.01)と oxy CG(0.1)の特性を総合すると、それぞれ異なる時間スケールの培養ニーズに応じた適用可能性が示された。本検討では、酸素放出持続時間、無細胞培養系における pH 変動、および過酸化水素濃度変化の三点から安全性と有効性を評価した。その結果、oxy CG(0.01)は DO レベルが肝内生理域に近く、pH 変動が小さく、過酸化水素濃度も低レベルに抑制されることから、短期培養において肝細胞に過度な負荷を与えず緩やかな酸素供給を行う条件として適しているといえる。一方、oxy CG(0.1)は CPO 含有量に依存して総酸素放出量と放出持続時間が増大することから、長時間にわたり高い酸素需要が生じる場面に対して一定の有用性が期待される。ただし、酸素放出の初期バーストが生じ、DO が生理的範囲を超えやすいこと、さらに酸素放出持続時間は現在開発されている OGBs と比べて大きな差がある。このため実際の応用価値は制限され、酸素バーストと ROS 誘導リスクを十分に制御する設計が不可欠である。

3.4 本章のまとめ

本章では以下の事項を示した。

1. 酸素生成コラーゲンゲルの調製と特性評価

異なる CPO 濃度 (oxy CG(0.01)、oxy CG(0.1)) のハイドロゲルを調製し、溶存酸素濃度、pH 変動、過酸化水素濃度の時系列変化を無細胞系で評価した。その結果、CPO 含有量依存的に酸素放出持続時間が延長され、カタラーゼ添加により H_2O_2 蓄積が抑制され低濃度に維持された。pH 変動は主に測定操作に起因するもので、HEPES と CO_2 の緩衝により安定化が確認された。

2. oxy CG(0.01)の短期培養適性

oxy CG(0.01)は DO 濃度が肝内生理域 (1.3-4.6 mg/L) に近く、pH および H_2O_2 濃度も対照群 oxy CG(0)と同等に安定した。初期に大きな酸素バーストを示さず、肝細胞至適 pH (7.0-7.4) を維持できることから、移植前短期培養における緩やかな酸素補給材として適していることが示された。

3. oxy CG(0.1)の長期培養可能性と課題

oxy CG(0.1)は CPO の含有量を高めることにより、総酸素放出量と酸素放出持続時間を向上させ、長時間の酸素供給ニーズを満たす。しかし、初期バーストによる DO 過飽和 (ROS 誘発リスク) と酸素放出持続時間の不足が課題である。カタラーゼ併用により H_2O_2 毒性を抑制可能であり、培養条件最適化により安全性向上が期待される。

4. oxy CG の応用展望

本評価により、oxy CG は迅速調製可能で安定した酸素生成特性を示し、肝組織工学における暫定酸素供給材としての実用性が確認された。oxy CG(0.01)は短期、oxy CG(0.1)は長期用途に使い分け可能であるが、細胞共培養系での機能性・安全性検証、および移植後宿主血管連結までの酸素供給持続性確認が必要である。

第4章 酸素生成能の定量的解析

4.1 本章の目的及び概要

今までの酸素生成バイオマテリアルは長期的な酸素供給能および細胞生存性向上に寄与することが明らかとなっているが、酸素放出速度（Oxygen generation rate, OGR）に関する定量的研究は依然として不足しており、細胞生存に必要な酸素供給の十分性を判断することは困難である。細胞への十分な酸素供給を保証するためには、(i) OGBs により生成する総酸素量が培養期間中の酸素需要を満たすこと、(ii) OGR が細胞の酸素消費速度（Oxygen uptake rate, OUR）に等しいかそれを上回ること、という2条件を同時に満たす必要があるが、現在の研究の多くは主に前者に焦点を当てており、OGR の細胞生存への影響を十分考慮していない。第3章で確認したように、短期培養に適した oxy CG(0.01)は生理的溶存酸素（DO）域を維持し pH/H₂O₂ リスクが低いいため、本章ではこれを用いて酸素生成能の定量的解析を実施する。

具体的には、(1) 閉鎖系で OGR の測定、(2) 酸素移動容量係数 (k_La) の算出、(3) 特定培養条件での培養可能細胞密度閾値 (X_{thr}) の決定、(4) 12 ウェルプレート上で異なる細胞密度の肝細胞播種による生存率および肝特異的機能（尿素合成とアルブミン分泌）評価を行う（Fig. 1.2）。これにより、OGR を基盤とした酸素生成能の定量的解析法の妥当性を検証し、肝組織工学における実用的応用性を明らかにする。

4.2 実験方法

4.2.1 閉鎖系での酸素放出速度測定

3.3.2.1 節と同様の装置を用いて、今度は測定系を閉鎖系として 12 時間の OGR の測定を行った (Fig. 4.1)。この時、ガラス管内全てを 5% O₂ インキュベーターで平衡処理した PBS 溶液で満たした。このような閉鎖系での実験により、酸素生成コラーゲンゲル (oxy CG) から放出された酸素は全て系内の PBS に溶解し、溶存酸素濃度は上昇を続け、ある一定の値で収束すると考えられる。異なる CPO 含有量の oxy CG の OGR を測定するため、以下の実験群を設定した：oxy CG(0.005)、oxy CG(0.01)、oxy CG(0.05)、oxy CG(0.1)、およびカタラーゼなしの oxy CG(0.01)。

Closed system

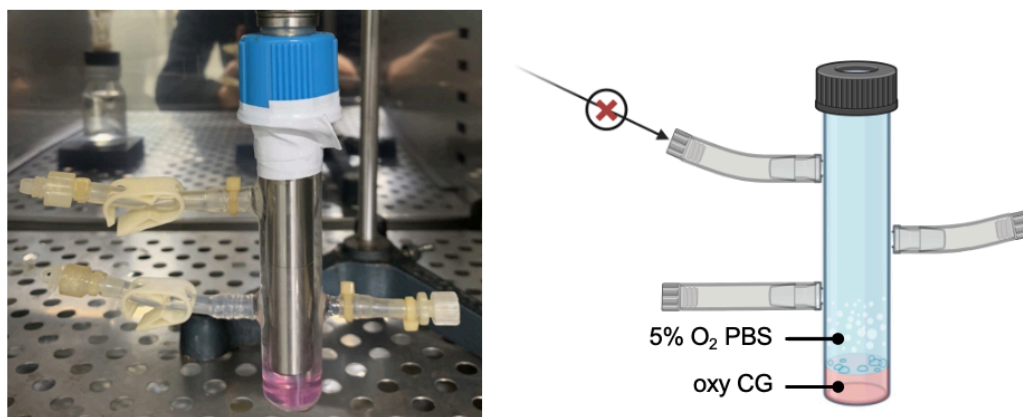


Fig. 4.1 Dissolved oxygen measurement device in a closed system (left) and schematic of the device used to evaluate oxygen release rate (right)

4.2.2 肝細胞単層培養モデルの実施

4.2.2.1 ラット初代肝細胞の調製

全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の承認を受け、また九州大学動物実験規則に基づいて実施した。

実験動物には、6-8 週齢のオスの Wistar/ST ラット（九動または日本 SLC）を使用し、ラット初代肝細胞の調製方法に関する手法は平成 29 年卒業奥平氏の博士論文を参考した。以下に詳細を示す。

(一) 初代ラット肝実質細胞調製（二段階コラーゲナーゼ灌流法）

1969 年に Berry と Friend によって灌流法 (perfusion method) が発表され、その後、Seglen および Ingebrechtsen と Wagle らにより改良法が報告された。なかでも Seglen は、分離条件について詳細な検討を行い、再現性、収率、生存率ともに高い肝細胞調製法を確立した。今

回使用した方法は、Seglen らや中村らの方法を改良したものである。基本的には Seglen の方法に従って行っている。Seglen ら¹¹⁹は、門脈からのカニューレーション後において肝臓全体を体から切りはずし、Miller 型の灌流装置を使う方法であるが、門脈へのカニューレーション後において心臓下の大静脈を半切し、in situ でコラゲナーゼを流して肝細胞を分離する方法を用いた (Fig. 4.2)。これによって、灌流装置を使わず、基本的にはペリスタポンプと先端にカニューレを取り付けたシリコンチューブだけからなるごく簡単な装置で細胞分離が行える。詳細を以下に示す。

(二) 手術器具の準備

カニューレ(17G)、縛り紐(ラット固定用)、ピンセット 2 本、腹切りばさみ、小はさみ、縫合糸、スプーン、ガラスシャーレ、メス 2 本、ガーゼ、孔径 45 μ m 金属メッシュ、300mL ビーカー 2 個

(三) 前灌流用緩衝液とコラゲナーゼ溶液

細胞調製の際、肝臓組織を分散し、単離するために、門脈からカテーテルを介して前灌流用緩衝液とコラゲナーゼ液を肝臓に灌流させる。前灌流用緩衝液は脱血、凝固抑制と細胞結合因子(Ca²⁺など)の除去に用い、コラゲナーゼ液は組織分散を効果的に行うために用いる。組成を Table 4.1 に示す。

(四) 細胞調製手順

- (1) ラットを透明ケースに入れ、イソフルランを用いて全身麻酔をした。
- (2) 麻酔後、ラットを手術台に固定し、腹部を 70%エタノールで消毒後、腹切りはさみで開腹し、腸を右側に寄せて門脈を露出させた。
- (3) ピンセットを用いて門脈に縫合糸をかけ、ループを作り、門脈を半切した。
- (4) 門脈の半切部に 17G カニューレを迅速に挿入し、縫合糸で固定した。
- (5) 直ちに心臓下の大静脈を半切した。
- (6) 37 °Cに保温した Table 4.1 左に示す成分で調製した前灌流用緩衝液をペリスタポンプにより、肝臓が脱血するまで流速 20~30 mL/min で流した (100~150 mL 程度)。
- (7) 脱血後、150 mL の 37 °Cコラゲナーゼ溶液に切り替え、流速 10-15 mL/min で肝臓内部がペースト状になるまで灌流した。
- (8) 肝臓を周りの組織から切り離し、スプーンを用いてガラスシャーレに移した。
- (9) 肝臓をクリーンベンチに持ち込み、肝細胞培養培地 (D-HDM) を加え、メスで細切した。
- (10) D-HDM を加えながらペースト状の肝細胞懸濁液をガーゼで濾過した。
- (11) さらに D-HDM を加えながら金属メッシュ (目開き 45 μ m) によって濾過した。
- (12) 肝実質細胞と肝非実質細胞に分離するために、60 $\times$ g で 90 s 遠心分離を行い、上清を除去後、D-HDM で再懸濁を 3 回繰り返した。
- (13) 最後の遠心・再懸濁後、懸濁液量を 10~15 mL に調整し、0.1 mL をサンプリングして、血球計算盤で細胞数と生存率を測定した。具体的には以下に示す。

生細胞数計数法

トリパンブルー粉末 0.3 g を Table 3.1 に示す CMF-PBS 溶液 100 mL に溶解し、これを染色液とした。トリパンブルー液は、細胞膜構造が破壊されている死細胞は細胞内が青く染色されるが、膜構造が強固である生細胞は染色されない。細胞懸濁液：培地：トリパンブルー液を 1:6:3 の比率で 10 倍希釈し、生細胞と死細胞を染め分けたあと、倒立型位相差顕微鏡を用いて生細胞数及び死細胞数を計数することにより生存率を求めた。本研究では生存率が 85 %以上のものを実験に用いた。

Table 4.1 Components of pre-perfusion buffer and collagenase solution

Component	Pre-perfusion buffer [g/L]	Collagenase solution [g/L]
NaCl	8	8
KCl	0.4	0.4
CaCl ₂	-	0.56
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.078	0.078
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
Collagenase	-	0.5
Trypsin inhibitor	-	0.05
EGTA	0.19	-
NaHCO ₃	0.35	0.35
Glucose	0.9	-
Penicillin	0.0588	0.0588
Streptomycin	0.1	0.1

4.2.2.2 ゲル上肝細胞単層培養

4.2.2.1 にて調製した肝細胞を D-HDM 培地に懸濁し、氷上で保存した。12 孔プレートをあらかじめ冷蔵庫で 30 分間予冷しておくことで、コラーゲンゲルの温度上昇による早期ゲル化を防止し、細胞がウェル底面に均一に広がることを保証する。3.2.2 節に記載の手法に従い、各ウェル中に oxy CG 1 mL を調製後、37°C 培養箱中で 25 分間インキュベートしてゲル化させた。細胞を oxy CG 表面に均一に単層播種するため、播種前に各ウェル上部に D-HDM 培地 0.5 mL を添加した。次いで肝細胞を各ウェルに均一に播種し、培地 1 mL 当たり 5.0×10^5 cells（具体的な細胞密度算出法は 4.3.3 節に参照）の密度を閾値群（Threshold）として設定した。oxy CG(0.01)の培養可能細胞密度閾値を検証するため、低濃度群（Low） 2.5×10^5 cells/mL、高濃度群（High） 7.5×10^5 cells/mL を設定し、oxy CG(0)に 5.0×10^5 cells/mL を対照群（Control）とした。CPO からの酸素供給のみを行うため、培地を 1% O₂ 培養箱で 24 時間脱酸素処理後、低酸素条件（1% O₂）下 6 時間培養した。位相差顕微鏡にて 0 時間お

および6時間時のoxy CG上細胞形態を撮影した。培養1、2、3、6時間後に上澄みを0.5 mLチューブに回収し、-20℃で保存して後続解析に供した。

4.2.2.3 細胞生存率の評価

本研究では、細胞生存率の評価指標として乳酸脱水素酵素（LDH）を用いた。細胞が死んで細胞膜が壊れると、細胞質に豊富に含まれるLDHが培養液中に漏れ出す（放出される）ため、その放出量を測定することで細胞死の程度、つまり細胞生存率の低さを評価できる。LDH活性の測定にはCytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いたが、キット添付プロトコールそのままではなく、本実験系に適合するよう測定条件を一部改変して使用した。

具体的には、100%細胞死条件を示す「高コントロール」を作製するため、 2.5×10^6 、 5.0×10^6 、 7.5×10^6 cells/mLの3種類の細胞懸濁液100 μ Lに対し、lysis buffer 10 μ Lを添加し、37℃インキュベーター中で30分間培養して全細胞を溶解・死亡させた。その後、1.5 mLチューブに培地1.4 mLを加えて混和し、遠心分離（60 $\times$ g, 90 s）によって細胞残渣を除去し、得られた上清を-20℃で保存した。各実験群（4.2.2.2節で述べたように）で回収された培地中LDH活性をこの高コントロールと比較することで、条件ごとの相対的な細胞生存率を算出した。

4.2.2.4 肝特異機能評価

(一) 尿素合成活性測定

本検討では解毒能の指標として尿素合成能を評価した。尿素合成は、肝細胞がアンモニアを原料としてオルニチン回路を介して尿素へ変換する過程であり、肝特異的機能の重要な指標である。肝機能が低下すると尿素合成能が減弱し、血中アンモニア濃度の上昇を招く。

培地中の尿素濃度はQuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)を用いて比色法にて定量した。具体的には、4.2.2.2節に回収された上清液を試薬（Reagent AとReagent Bの混合液）と混合し、室温で50分間反応させた後、吸光度（430 nm）をマイクロプレートリーダーにて測定し、スタンダードより6時間培養ときの尿素合成速度を算出した。

(二) アルブミン分泌活性測定

本検討では、タンパク質合成能の指標としてアルブミン分泌活性を評価した。アルブミンは肝細胞が特異的に産生する主要な血漿タンパク質であり、肝機能の成熟度および維持能を示す代表的なマーカーである。肝機能が低下するとアルブミン合成能が減弱し、低アルブミン血症を呈する。本研究では、4.2.2.2に示す培養系で回収した培地中のアルブミン濃度を酵素免疫測定法（ELISA）により定量し、検量線を用いて6時間培養時の分泌速度を算出した。

4.3 実験結果と考察

4.3.1 培養可能細胞密度の閾値

培養培地中における酸素の溶解度は、グルコース等の他の成分に比して著しく低い。この特性は全体的な酸素供給に直接影響し、細胞増殖や代謝に決定的な役割を果たす¹²⁰。OGBsは、この制限を克服するための制御された酸素源として培養細胞に応用されてきた。OGBsは酸素を生成し、これが培地に溶解した後拡散により細胞へ供給される。この過程において、OGBsで生成された全酸素量が培地へ移行するため、OGRは酸素移動速度（Oxygen transfer rate, OTR）と等価である。

OGBsにおいてOTRは細胞生存および機能維持に決定的なパラメータであり、制御されたOGRの維持が最適培養環境の構築に不可欠である。酸素濃度不足は低酸素状態を、過剰は酸化ストレスを招くため、酸素濃度変化速度はOTRとOURの差に等しく、Eq. (2)で示される通りである。

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (2)$$

OTRは生物系における気相から液相への酸素移動速度を表し、Eq. (3)で記述される。

$$OTR = k_L a (C^* - C) \quad (3)$$

ここで、 $k_L a$ は酸素移動容量係数 (h^{-1})、 C^* は平衡溶存酸素濃度 (mol/m^3)、 C は培地中のDO濃度 (mol/m^3) である。

一方、OURは培養細胞によるDO消費速度を示す指標であり、Eq. (4)で表される。

$$OUR = Q_{O_2} \cdot X \quad (4)$$

ここで Q_{O_2} は比酸素消費速度 ($\text{mol/cell} \cdot \text{h}$)、 X は生物系における細胞密度 (cell/m^3) である。

定常状態ではOURとOTRが等しくなり、Eq. (5)に示すように、方程式左辺の酸素生成が右辺の酸素消費と平衡する。

$$k_L a (C^* - C) = Q_{O_2} X \quad (5)$$

上記の式に基づくと、 Q_{O_2} は細胞種によって決定される一方、 C^* は環境温度変動の影響を常に受ける。さらに、 k_La は閉鎖系における OGBs を用いた OGR の実験を通じて決定できる。したがって、特定の培養条件下では、 $C = 0$ の時に理論上の最大酸素移動速度が発生する。この時点で、培養可能な細胞密度の閾値は Eq. (6) を用いて推定できる。ただし、この値は他の全ての培養条件が最適に維持されている場合にのみ達成可能である。

$$X_{thr} = \frac{k_LaC^*}{Q_{O_2}} \quad (6)$$

4.3.2 酸素生成コラーゲンゲルの酸素放出速度から k_La の実験的決定

k_La 算出法は、標準的かつ広く知られた手法に着想を得たものである¹²⁰。 k_La 値は、4.2.1 節に記載の閉鎖系において DO 濃度変化を測定後、プロセスコントローラに記録された DO 濃度上昇曲線において、二つの規定時点間の DO 瞬時応答を解析することにより算出した。

無細胞培養系 ($OUR = 0$) では、DO 濃度曲線に対する接線の傾き (dC/dt) が OTR または OGR を表す。よって、Eq. (2) より Eq. (7) が導出される。

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR = k_La(C^* - C) - 0 = k_La(C^* - C) \quad (7)$$

Eq. (7) を初期条件 $t = 0$ および $C = C_0$ で積分すると、Eq. (8) が得られる。

$$\ln \frac{C^* - C}{C^* - C_0} = -k_Lat \quad (8)$$

ここで、 C は DO 濃度 (時間 t で測定) (mol/m^3)、 C_0 は $t = 0$ における DO 濃度、 t は実験時間 (h) を表す。

k_La 値の算出のため、5% O_2 の PBS で充填した閉鎖系を用い、異なる CPO 濃度の oxy CG の DO 濃度の経時変化を測定した。oxy CG(0.01) を例に挙げると、CPO が PBS と接触した直後から DO 濃度が徐々に上昇し、CPO の完全消費後には DO 濃度がプラトー状態に達し、それ以上の上昇は観察されなかった (Fig. 4.2)。

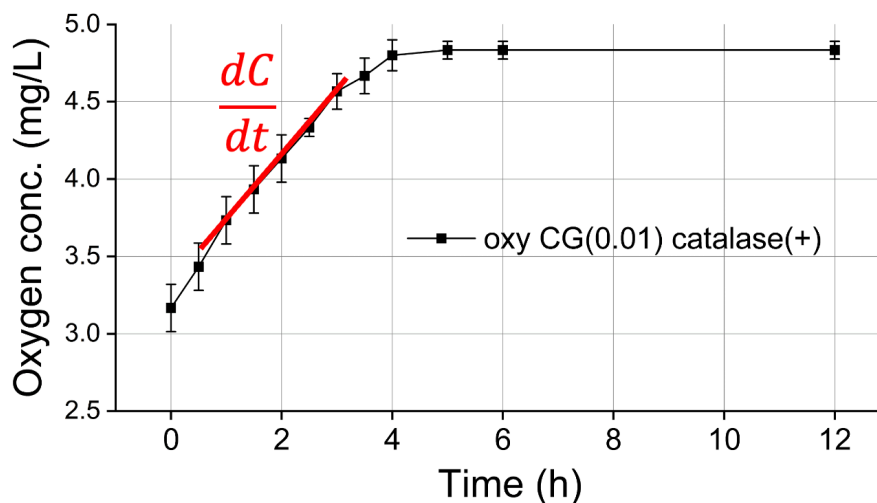


Fig. 4.2 Time-dependent changes in dissolved oxygen concentration generated by oxy CG(0.01) in a closed system at 37 °C. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

その後、 $\ln\{(C^* - C_t)/(C^* - C_0)\}$ を時間 t に対してプロットしたところ、直線関係が得られた (Fig. 4.3)。これらの線形回帰直線の傾きは、 $-k_L a$ を表し、oxy CG の OGR を定量化するものである。Table 4.2 に要約した通り、 $k_L a$ 値は CPO 含有量の増加に伴い上昇した。この傾向は、oxy CG 中の CPO 濃度が高いほど酸素供給能が有効に向上することを示している。特に、カタラーゼなしの対照群では $k_L a$ 値が有意に低く、これはカタラーゼが過酸化水素分解を促進する触媒的役割を果たし、OGR を向上させることに反映している。カタラーゼの欠如はこの反応を遅らせ、oxy CG の全体的な酸素生成能を低下させた。これらの結果は、CPO 含有量およびカタラーゼ添加が酸素放出特性の制御に決定的な影響を及ぼすことを明らかにした。

Table 4.2 Estimated $k_L a$ values at different CPO concentrations and with or without the addition of catalase.

	Catalase (+)				Catalase (-)
CPO (w/v%)	0.005	0.01	0.05	0.1	0.01
$k_L a$ (h ⁻¹)	8.80×10^{-2}	1.50×10^{-1}	1.36	2.10	5.56×10^{-2}

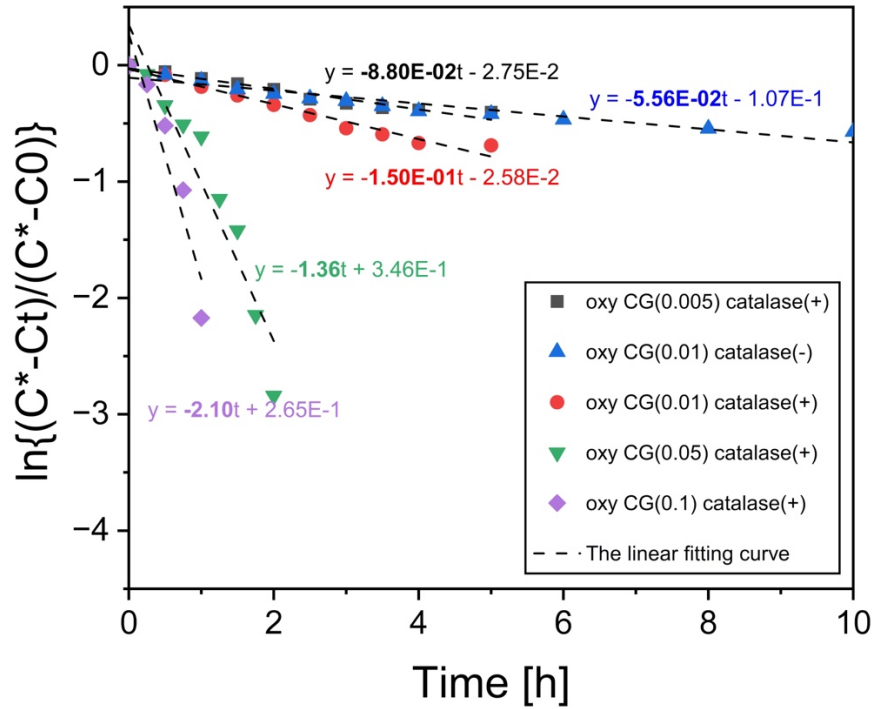


Fig. 4.3 Scatter plot with linear fit ($y = at + b$) for estimating k_{La} values according to Eq. (8)

4.3.3 12 ウェルプレートにおける培養可能細胞密度の閾値

実験的に k_{La} 値を決定した後、Eq. (6)を用いて理論的な培養可能細胞密度閾値を算出した。37℃、5% CO₂、低酸素条件下のインキュベーター内で、酸素放出特性測定に使用した測定セル内にて肝細胞を培養すると仮定した (Fig. 1.2)。細胞好気呼吸に必要な酸素は oxy CG(0.01)により供給される。1 atm 時の飽和溶存酸素濃度は 6.86 mg/L であったが、本研究では培養環境の CO₂濃度を考慮し、 C^* を 0.95 atm 相当の 6.517 mg/L とした。

まず、全てのパラメータを SI 単位に変換した：

$$k_{La} \text{ of oxy CG(0.01)} = 1.5 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1};$$

$$C^*: 6.517 \text{ mg/L} = 0.204 \text{ mol/m}^3;$$

$$Q_{O_2} \text{ of PRHs: } 1.44 \times 10^{-12} \text{ mol/cell} \cdot \text{h}_0. \quad ^{121}$$

この場合、培養可能細胞密度の閾値は Eq. (9)に示す通り推定された。

$$X_{Meas-thr} = \frac{k_{La} C^*}{Q_{O_2}} = \frac{1.5 \times 10^{-1} \times 0.204}{1.44 \times 10^{-12}} = 2.12 \times 10^{10} \text{ cells/m}^3 \quad (9)$$

この式から、測定セル内での肝細胞培養において、培養可能細胞密度は $2.12 \times 10^{10} \text{ cells/m}^3$ に達しうる閾値であることが示される。

しかし、測定セル内で多条件細胞培養実験を行うことは現実的ではない。そこで、12 ウェルプレートを用いた単層培養により培養可能細胞密度閾値を算出可能と仮定した。これは12 ウェルプレートが多様な培養条件での細胞培養を容易に実現できるためである (Fig. 1.2)。

C^* と Q_{O_2} は特定の培養条件下で一定であったため、変動は $k_L a$ 値の観点から考慮する必要がある。酸素移動容量係数 $k_L a$ は Eq. (10)に示すように2つの要素から構成される：

$$k_L a = k_L \cdot a \quad (10)$$

ここで k_L は液境膜物質移動係数 ($m \cdot h^{-1}$) であり、気液界面を介した分子拡散速度を記述するパラメータである。 a は単位体積当たり気液接触面積すなわち比表面積 (m^{-1}) を表す。

比表面積 a は培養容器の形状・サイズにより決定される定数であり、Eq. (11)で表すことができる：

$$a = \frac{A}{V} \quad (11)$$

ここで、 A は気液接触面積 (測定セル： A_1 ；12 ウェルプレート： A_2) であり、 V は培養培地の体積 (測定セル： V_1 ；12 ウェルプレート： V_2) である。

このようにして、測定セルにおける a_1 を12 ウェルプレート上の単層培養における a_2 に変換することで、 $k_L a_2$ を決定することができた。これにより、培養可能な細胞密度の閾値を算出することが可能となった。

両容器の寸法値は全て SI 単位に変換した：

$$A_1 = 1.767 \times 10^{-4} \text{ m}^2;$$

$$V_1 = 1.2 \times 10^{-5} \text{ m}^3;$$

$$A_2 = 3.5 \times 10^{-4} \text{ m}^2;$$

12 ウェルプレートにおける培養可能細胞密度の閾値は Eq. (12)で表される：

$$\begin{aligned} X_{2D-thr} &= X_{3D-thr} \cdot \frac{V_2}{A_2} = \frac{k_L a_2 C^*}{Q_{O_2}} \cdot \frac{V_2}{A_2} = \frac{k_L \cdot a_1 \cdot \frac{a_2}{a_1} C^*}{Q_{O_2}} \cdot \frac{V_2}{A_2} = \frac{k_L \cdot a_1 \cdot \frac{A_2}{V_2} \cdot \frac{V_1}{A_1} C^*}{Q_{O_2}} \cdot \frac{V_2}{A_2} \\ &= \frac{k_L a_1 C^*}{Q_{O_2}} \cdot \frac{V_1}{A_1} = X_{Meas-thr} \cdot \frac{V_1}{A_1} = 1.44 \times 10^9 \text{ cells/m}^2 \quad (12) \end{aligned}$$

Eq. (12)は、単層培養における培養可能な細胞密度の閾値が 12 ウェルプレート の寸法に依存せず、 k_{La} を決定するために使用される測定セルのみに関連することを示している。この値を細胞培養実験によりさらに検証するため、12 孔プレート 1 ウェル当たりの培養可能細胞数閾値を Eq. (13)により算出した。

$$N_{2D-thr} = X_{2D-thr} \cdot A_2 = 1.44 \times 10^9 \times 3.5 \times 10^{-4} = 5.04 \times 10^5 \text{ cells (13)}$$

算出された閾値によると、低酸素条件下で酸素供給を oxy CG(0.01)に限定した場合、12 ウェルプレート 1 ウェル当たりの肝細胞播種密度上限は約 $5.04 \times 10^5 \text{ cells}$ であった。この閾値を超えると、細胞の酸素要求量 (OUR) を満たすのに十分な酸素供給量 (OGR) が得られなくなる。

4.3.4 ゲル上細胞の形態観察

この閾値を実験的に検証し、酸素供給制限の影響を解明するため、4.2.2.2 節に示す手法に従い、低酸素条件 (1% O_2) 下で 12 ウェルプレートを用いた単層細胞培養実験を実施し、ゲル上肝細胞の形態学的観察を行った。その結果、低酸素条件下で oxy CG 上に培養した肝細胞は、0~6 時間において顕著な形態学的変化を示さなかった。次いで、正常酸素環境下で普通のコラーゲンゲル (CG) 上に 6 時間点で培養した細胞形態像を陽性対照としたが、低酸素培養条件細胞と比較しても形態学的変化は検出されなかった (Fig. 4.4)。これらの所見は、6 時間培養期間において oxy CG が早期細胞形態に測定可能な刺激効果を及ぼさないことを示唆している。

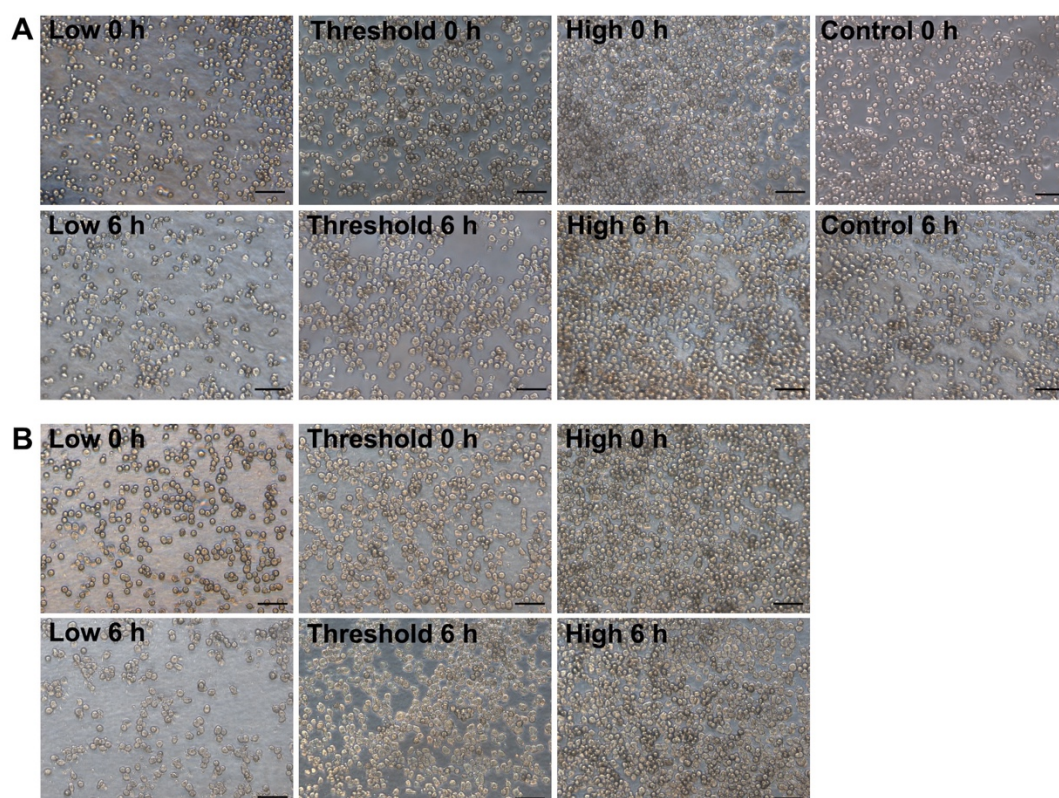


Fig. 4.4 Morphological images of PRHs during culture (scale bar: 100 μ m). (A) Cells cultured on oxy CG under different conditions at both 0 and 6 h in a hypoxic environment. Low: 2.5×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); threshold: 5.0×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); high: 7.5×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); control: 5.0×10^5 cells cultured on oxy CG(0). (B) Cells cultured on the standard collagen gel under different conditions at both 0 and 6 h in a normoxic environment. Low: cell density of 2.5×10^5 ; threshold: cell density of 5.0×10^5 ; high: cell density of 7.5×10^5

4.3.5 肝細胞生存率変化と肝特異機能評価

4.2.2.3 節に示す手法に従い、12 ウェルプレート単層培養における細胞生存率を測定し、培養時間経過に伴う変化を評価した (Fig. 4.5A)。全培養系において細胞生存率は培養時間延長に伴い低下した。この低下は低酸素条件下での酸素供給不足に起因し、肝細胞生存率の減衰を反映している。“Threshold”と“Control”を比較すると、培養3時間後において oxy CG は細胞への酸素供給により生存率を有意に向上させた。最も重要な点として、細胞密度が12 ウェルプレートにおける培養可能細胞密度の閾値を超えた場合、3時間培養時の生存率が他の2群に比べて著しく低下したことであった。6時間培養後には生存率が $52.4 \pm 2.9\%$ まで低下したことが確認された。この低下は、高濃度群において培養期間全体を通じて OGR が細胞の OUR を下回り続けた結果、最終的に細胞死を引き起こしたことに起因する。漏洩 LDH を生存率指標として用いる場合、タイムラグが生じるため、低酸素状態が発生しても

細胞はすぐに死滅せず、徐々に死んでいく。したがって培養時間の経過とともに、この群の細胞生存率は他の二群との差を次第に拡大し、三日目に至っては顕著な差異を示した。この知見の検証のため、各条件の培養6時間後における尿素合成能 (Fig. 4.5B) およびアルブミン分泌能 (Fig. 4.5C) を測定し、肝特異的機能を評価した。結果は生存率と一致し、十分な酸素供給速度では高い肝細胞が肝特異的機能を維持したのに対し、酸素供給速度不足の高細胞密度群では機能障害が生じた。これらの結果は、先ほどに算出した培養可能細胞密度理論閾値の妥当性を支持するものである。

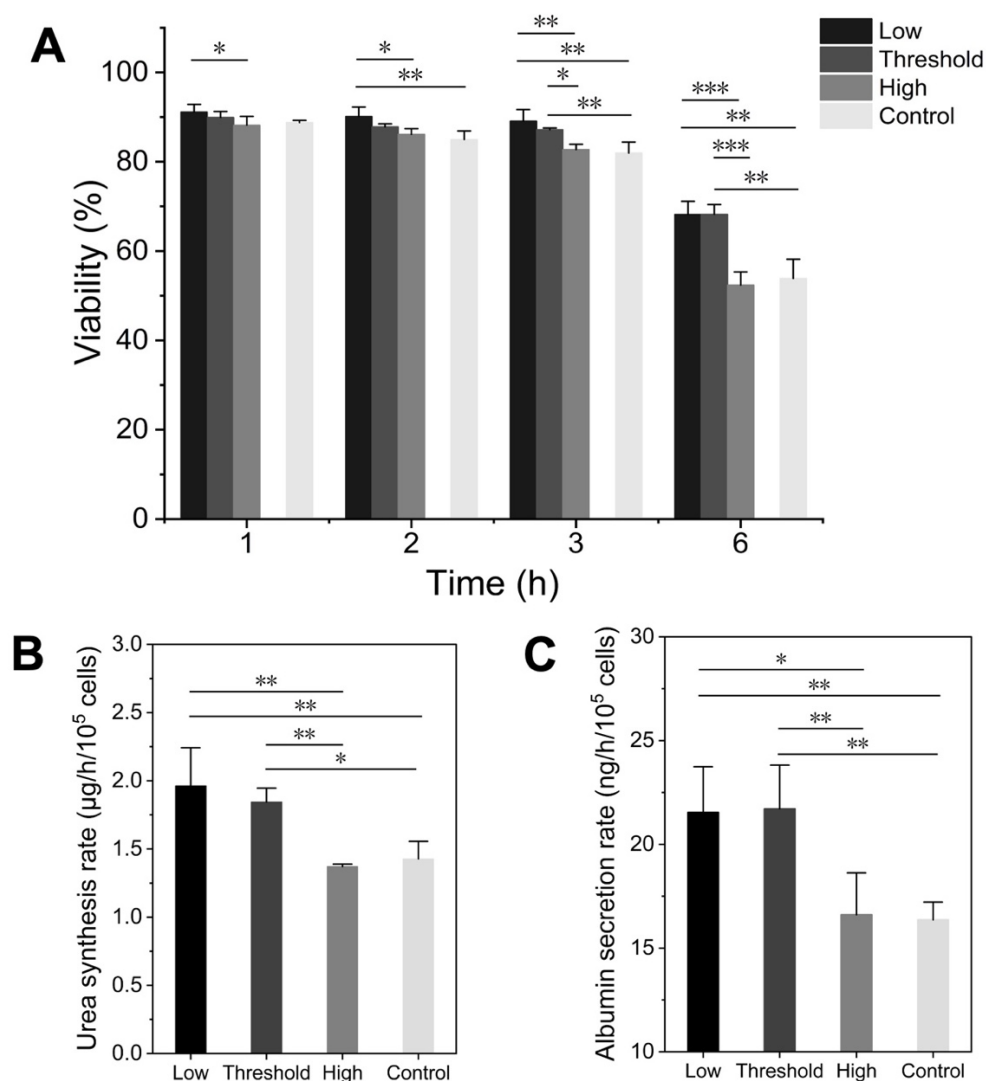


Fig. 4.5 (A) Viability of primary rat hepatocytes cultured under hypoxic conditions over a 0-6 h period. (B) Urea synthesis and (C) albumin secretion rates of hepatocytes cultured under hypoxic conditions at 6 h. Low: 2.5×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); Threshold: 5.0×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); High: 7.5×10^5 cells cultured on oxy CG(0.01); Control: 5.0×10^5 cells cultured on oxy CG(0). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$**

4.3.6 酸素生成コラーゲンをを用いた三次元培養と *in vivo* 応用展望

本章では、培養可能な細胞密度の閾値を体系的に確立し、調製した oxy CG を用いて二次元培養系で OGR ベース定量分析法の妥当性を検証したが、実際の組織工学応用では、より厚い三次元組織構造体や生体内環境において細胞の生存率を維持する必要があることを認識することが重要である。三次元培養系では、酸素拡散がはるかに大きな課題となる。ゲル-培地界面から離れた位置にある細胞は重度の低酸素状態に陥りやすく、これが組織全体の機能を損なう可能性がある。

機能的血管網が存在しない場合、組織厚は一般に 100~200 μm に制限され、それを超えると、酸素欠乏が生存と組織統合の重大な障壁となる。例えば、奥平ら¹¹⁴は、多層スフェロイドを用いたボトムアップ法による紐状肝組織の構築において約 330 μm の厚さを達成したが、組織中心部で顕著な細胞死が生じ、酸素浸透不足が明らかとなった。これらの知見は、厚組織における酸素供給戦略の拡張が喫緊の課題であることを示している。

有望なアプローチとして、本研究で開発した oxy CG を三次元構成に組み込むことが挙げられる。例えば、肝細胞スフェロイドを oxy CG マトリックス内に直接封入することで、組織全体にわたる局所的酸素放出を実現可能である (Fig. 4.6A)。また、カプセル化酸素キャリア (マイクロスフェアなど) を肝細胞スフェロイド間に分散配置し、bottom-up 組織構築を行うことで、栄養・酸素豊富な周辺部から遠い領域の低酸素ストレスを緩和し、中心壊死を抑制できる (Fig. 4.6B)。この戦略を OGR に基づく閾値解析と組み合わせれば、三次元組織における培養可能細胞密度の定量的予測も可能となり、臨床的に有用な厚みを持つ構造体の合理的な設計を導くことができる。

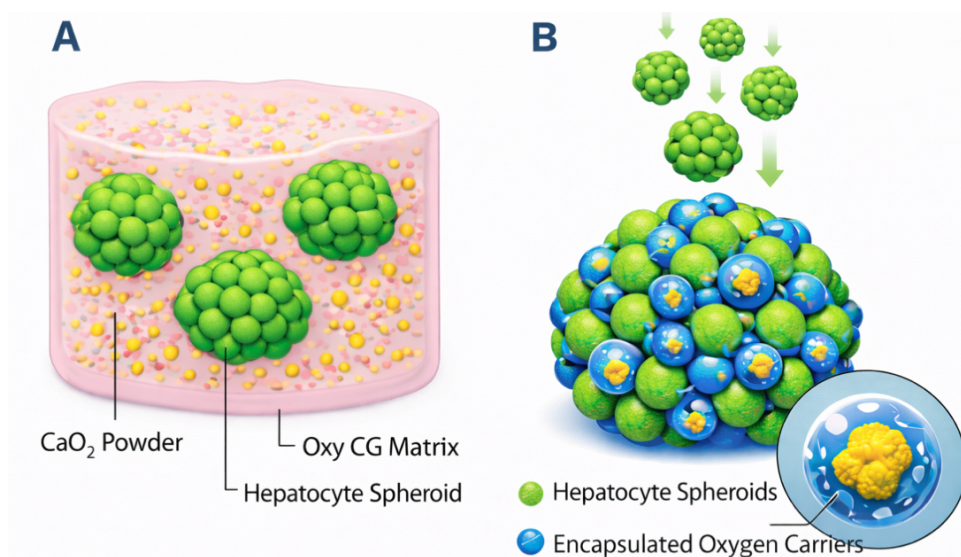


Fig. 4.6 Schematic illustration of 3D oxygen delivery strategies in hepatic tissue engineering.

(A) Direct encapsulation of hepatocyte spheroids within oxy CG matrix for uniform tissue oxygenation. (B) Dispersed configuration of Encapsulated oxygen carrier between hepatocyte spheroids using bottom-up assembly to mitigate central necrosis

これらの手法は *in vivo* 組織工学応用にも適応可能である。移植グラフトは宿主血管の浸潤・灌流に至るまで必然的に低酸素期を経験するため、移植された **oxy CG** またはカプセル型酸素キャリアの **OGR** が細胞酸素消費を上回ることを確保することが組織生存維持に不可欠である。したがって、二次元培養系で検証された **OGR** に基づく設計原則は、三次元培養系および事前血管化・血管化 *in vivo* モデルにおける酸素生成戦略の最適化に向けた重要な基盤を提供する。

4.4 本章のまとめ

本研究は、組織工学における酸素供給の決定的課題に取り組み、CPO を封入した oxy CG を開発し、その酸素生成能を定量評価する枠組みを確立することで、組織工学における酸素供給という重大な課題を解決した。OGR を測定し k_{La} を導出することで、特定培養条件下で培養可能な細胞密度に関する理論的閾値を算出し、肝細胞培養実験を通じて検証した。oxy CG は低酸素状態で持続的な酸素供給を実現し、予測範囲内（12 ウェルプレート 1 ウェルあたり $\leq 5.04 \times 10^5$ cells）で細胞生存率と肝臓特異的機能を維持した。また、三次元構造体における拡散の限界を指摘し、生理的酸素レベルを維持する戦略について論じた。これらの知見は、低酸素状態や酸化ストレスを防止するため、総酸素供給量と酸素供給速度の両立が不可欠であることを明らかにし、この定量的枠組みが肝臓組織工学の進展に有用なツールとなることを示した。

今後の研究課題として、本手法を動的三次元培養系および in vivo モデルへ拡張し、組織工学の応用設計をさらに最適化することが期待される。

第5章 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアの作製と肝組織構築への試み

5.1 本章の目的及び概要

第4章では、酸素生成バイオマテリアル（OGBs）の細胞生存への酸素供給能を評価する新たな基準を確立した。即ち、酸素放出速度（OGR）と酸素消費速度（OUR）の比較により、 $OGR \geq OUR$ を充足条件とし、系統的細胞実験により理論の妥当性を検証した。一方、第3章で示した通り、コラーゲングルに大量の過酸化カルシウム（CPO）を封入するだけでは、酸素初期バーストを引き起こし、細胞損傷を招く。これはOGR超過により培地中に未消費酸素が蓄積し、活性酸素種を誘発、酸化ストレスを介してタンパク質・脂質・DNA等の細胞構成成分を損傷するためである。したがって、OGBsには制御放出が不可欠であり、(1) 過酸化物を生分解性高分子に封入して徐放化（マイクロカプセル化）を実現する方法と、(2) 修飾ヘモグロ빈を導入して酸素を短期貯蔵する方法の二つの戦略が有効であることが確認されている。本研究では、W/O エマルション法を用いて、CPO をゼラチンにマイクロカプセル化し、酸素生成ゼラチンマイクロスフェア（GMS）を作製した。その物理的特性と酸素放出特性を評価した。

さらに、第4章で確立した酸素生成能定量解析法を二次元モデルから三次元モデルへ拡張適用し、本酸素生成GMSの三次元培養における実行可能性を理論的に算出した。この三次元モデルの実用検証として、旋回培養により肝細胞スフェロイドを調製し、酸素生成GMSと混合後、遠心沈降法により微粒子を組織体内に均一分散させた。これにより酸素源の内在化を実現し、局所的な低酸素環境を改善することを目的とした。本組織構築法は、生体に近い高密度・高機能性の厚みのある三次元肝組織を作製できるだけでなく、従来の酸素供給技術の限界を突破した。in vitro 培養結果から、酸素放出マイクロビーズは肝細胞の生存率向上と肝特異的機能（アルブミン分泌や尿素合成など）の促進に寄与し、組織体内部（特に中心部）の局所的な低酸素環境を改善することが示された。この多次元戦略は三次元細胞培養の酸素供給技術の発展を促進し、組織工学と再生医療分野に新たな応用可能性を開拓する。

5.2 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアの作製と評価

5.2.1 本節の目的

OGBs の開発において、無制御の酸素バースト放出は ROS 誘発と細胞毒性を招く課題として指摘されており、制御放出手法の開発が求められている。本節では、W/O エマルジョン法により CPO を GMS に埋め込み、酸素放出特性および物理的特性の 2 観点から評価することで、本材料の後続実験への適用性を検証する。具体的には、(1) 酸素放出特性（酸素放出持続時間、OGR）、(2) 粒径分布と形態観察の物理的特性評価を行う。これにより、マイクロカプセル化が酸素バースト抑制と持続放出実現に有効であることを明らかにし、第4章理論枠組みの三次元拡張の妥当性を確認する。本 GMS は、カプセル化により水接触制御と酸素拡散調節が可能であり、組織工学材料としての基礎特性を解明する。

5.2.2 実験方法

5.2.2.1 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアの作製

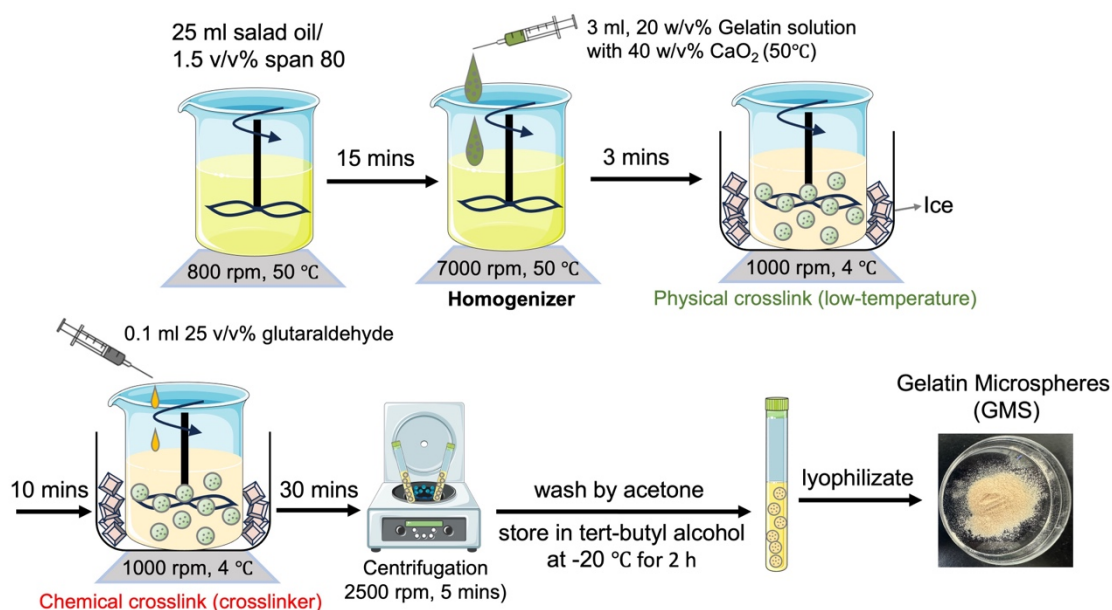


Fig. 5.1 Schematic diagram illustrating the preparation process for oxygen-generating microspheres (GMS) via the W/O emulsion method

酸素生成 GMS は、既報の GMS 調製に広く用いられている「W/O 型エマルジョン法」を参考に作製した¹²²。まず、市販大豆油を用いた油相として、ビーカー内に大豆油 25 mL と二次水 5 mL を加え、50 °C の恒温槽で 15 分間予熱した。次に、25 mL の油相に界面活性剤として Span 80 (sorbitan monooleate, wako) 0.375 mL (1.5 v/v%) を添加し、50 °C で 10 分間攪拌して均一な W/O エマルジョン形成に適した油相を調製した。

一方、水相として、ゼラチン粉末 1 g (20 w/v%) (sigma) を二次水 5 mL に加え、55 °C で 5 分間攪拌して完全溶解させた。続いて、CPO 粉末 2 g (40 wt%) をゼラチン溶液に加え、ダマの残らないよう十分に分散させた。調製した油相 25 mL をあらかじめ 50 mL チューブに移し、水相 3 mL を添加した後、ホモジナイザーを用いて 50 °C・7000 rpm・3 分間乳化攪拌し、CPO 含有ゼラチンエマルション滴をマイクロスフェア化した。得られたエマルションをビーカーに移し、氷上で冷却しながら 1000 rpm で 10 分間攪拌することで、ゼラチン相をゲル化させた。

ゲル化後、架橋剤として 25 v/v% グルタルアルデヒド溶液 (和光純薬) 0.1 mL (最終濃度 0.1 v/v%) を 25 mL エマルションに滴下しながら攪拌し、氷上で 30 分間架橋反応を行った。架橋後のエマルションを 50 mL チューブに回収し、2500 rpm・5 分・4 °C で遠心分離して上清油相を除去した。残渣にアセトンを加えて総量 15 mL とし、十分に懸濁したのち、ろ紙付き吸引ロートに移してアセトン 50 mL で徐々に洗浄し、油分除去および脱水を行った。その後、得られた湿潤 GMS をディッシュ内で約 3 mL の tert-ブチルアルコール (和光純薬) で再懸濁し (揮発性・毒性に留意しマスク等を着用)、-80 °C ディープフリーザーで 2 時間以上凍結した。その後、-47 °C・11 Pa 条件の凍結乾燥機 (FDU-1200, EYELA, Japan) で 24 時間フリーズドライを行い、粉末状の GMS を得た (Fig. 5.1)。この処理により、GMS は水分を完全に除去され、保存安定性の高い粉末形態に変換された。続いて、目開き 100 μ m の金属メッシュにより粒径選別を行い、均一な粒径分布を確保した。最後に、常温でデシケーター内に収容して湿気吸収を防止し、長期保存に適した状態で保管した。

本手法は、食品グレード油とゼラチンを用いた W/O エマルション・グルタルアルデヒド架橋プロセスであり、既報の GMS 調製法と同様に、粒子形状の均一性と高い再現性を有するとともに、生分解性マトリックス内に CPO を効率的に封入できる点に特徴を有する。

5.2.2.2 酸素放出特性

3.2.2 節に記載の CPO 含有酸素生成コラーゲングル (oxy CG-CPO) の作製法と同様の手順で、CPO 粉末の代わりに GMS を用い、酸素放出特性評価用の GMS 含有酸素生成コラーゲングル (oxy CG-GMS) を作製した。マイクロカプセル化による CPO 封入が酸素放出の初期バーストを抑制し、酸素の持続的放出を促進する効果を検証するため、コラーゲングル中の CPO 濃度は 0.1 w/v% とした。

なお、凍結乾燥後の GMS は表面疎水性が高く凝集しやすい性質を持つため、使用前に正確に称量した後、直ちに 0.5 mL HEPES バッファーに加え、小さなスプーンで攪拌して完全に液中に分散させた。その後、コラーゲングル (CG) : GMS : カタラーゼ溶液の体積比 5 : 2 : 1 で混合し、ゲル化処理を行った。この手法により、GMS の均一分散が確保され、安定した酸素放出特性の評価が可能となった。

(一) 開放系での酸素放出持続時間測定

3.3.2.1 と同様の方法で、GMS を封入したコラーゲンゲルの酸素放出持続時間を測定した。

(二) 閉鎖系での酸素放出速度測定

4.2.1 と同様の方法で、GMS を封入したコラーゲンゲルの OGR を測定した。

5.2.2.3 位相差顕微鏡による GMS の形態観察と粒径分布測定

デシケーターに保存していた GMS を二次水に懸濁し、顕微鏡にて観察・撮影した。得られた画像に対し ImageJ を用いて粒径測定を実施し、粒径分布を求めた。

5.2.2.4 ホロトモグラフィー技術による GMS 構造解析

ホロトモグラフィー顕微鏡 (HT-1, TomoCube) を用い、Mach-Zehnder 干渉計原理に基づく非侵襲的三次元屈折率 (RI) トモグラフィーを実施した。GMS を二次水に懸濁し、マイクロ流路セルに導入後、試料にコヒーレントレーザー光でホログラムを非接触検出した。位相シフトアルゴリズムにより各ボクセル RI 値を再構成した。その内部構造を解析するため、ゼラチン外殻と CPO 核の RI 差を閾値化し、RI によるマッピング画像を生成した。

5.2.2.5 走査型電子顕微鏡 (SEM) による GMS の形態観察

SEM 観察のため、GMS をカーボンテープ上に固定し、白金スputタリング (5 nm) で導電処理後、加速電圧 15 kV の走査電子顕微鏡 (JCM-7000, JEOL, Japan) にて表面形態を解析した。

5.2.3 実験結果

5.2.3.1 酸素放出持続時間

3.3.2.1 に示した隔膜式ガルバニ電極型 DO センサーを用いて、開放系条件下におけるコラーゲンゲル上 PBS 中の DO 濃度の経時変化を測定し、GMS 封入条件と CPO 粉末分散条件を比較した (Fig. 5.2)。CPO 粉末を直接分散した oxy CG-CPO では、測定初期に DO が急峻に上昇し、20 時間前後で約 12 mg/L に達する明瞭な初期バーストが観察され、その後急速に減衰して約 70 時間で平衡レベルに戻った。一方、同一 CPO 含有量で GMS として封入した oxy CG-GMS では、DO 上昇速度が緩やかとなり、ピーク値は約 10 mg/L と低減しつつ、酸素放出が 120 時間付近まで持続した。

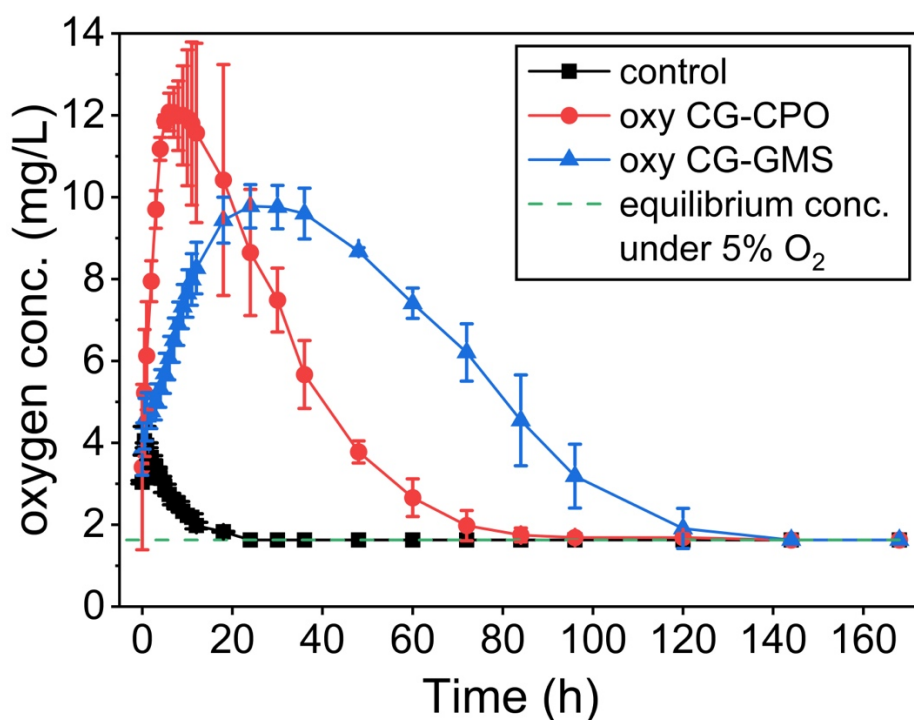


Fig. 5.2 Time-course profiles of dissolved oxygen concentration in collagen gels containing CPO powder or GMS in an open system at 37 °C, 5% O₂, 5% CO₂. Data are presented as mean ± SD (n = 3)

5.2.3.2 酸素放出速度

4.2.1 節に示した手法に従い、閉鎖系条件下で oxy CG-GMS 条件におけるゲル上部の PBS 溶液中 DO 濃度の経時変化を測定し、OGR を算出した。その後、4.3.2 節に示した手順に基づき、得られた DO 時系列データを式 $\ln\{(C^*-C_t)/(C^*-C_0)\}$ と時間 t の関係に変換し、直線近似を行うことで酸素移動容量係数 (k_{La}) を求めた (Fig. 5.3)。その結果、oxy CG-GMS の k_{La} は $5.05 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ となり、先に別節で測定した CPO 粉末分散条件 (oxy CG-CPO) の k_{La} は 2.10 h^{-1} と比較して、OGR および瞬時の酸素供給能がおおよそ 1/4 に低下することが明らかとなった。

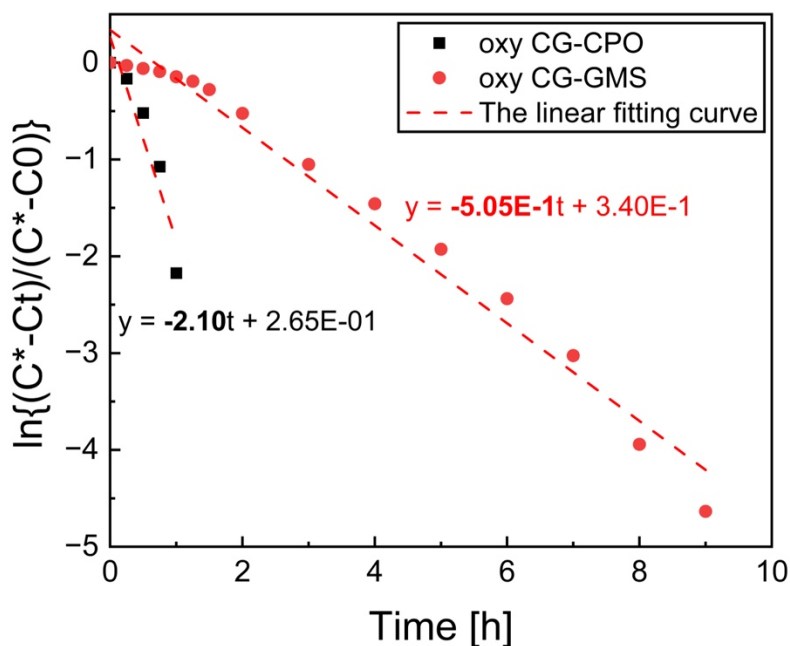


Fig. 5.3 Estimating of the volumetric oxygen transfer coefficient ($k_L a$) of oxy CG in a closed system via linearized dissolved oxygen profiles

5.2.3.3 位相差顕微鏡による GMS の形態的特徴と粒径分布

Fig. 5.4 は、W/O エマルション法を用いて作製した CPO 封入 GMS および非封入 GMS の形態を示している。観察された GMS は平面画像において円形構造を示し、CPO 封入後もその形状が保持されていることが確認された。両者の比較により、CPO 封入 GMS では外殻内部に多数の黒色粒子が包み込まれていることが明瞭に観察され、コアシェル構造様の形態が示唆された。ただし、平面画像のみでは立体構造の確認が不十分であるため、球状コアシェル構造の存在を検証するには三次元観察が必要である。さらに、粒径分布解析の結果、平均粒径は $34.95 \mu\text{m}$ であった (Fig. 5.5)。

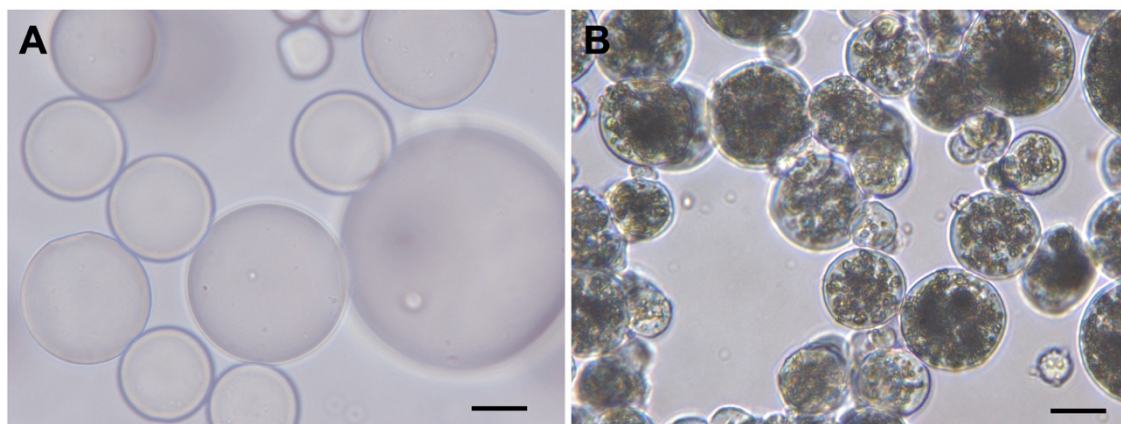


Fig. 5.4 Morphological observation of GMS under optical microscopy: (A) without calcium peroxide, (B) with calcium peroxide (scale bar: $20 \mu\text{m}$)

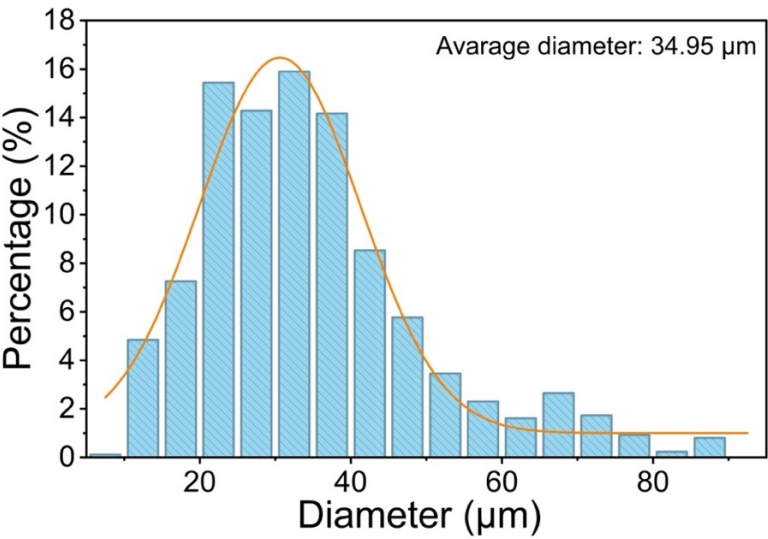


Fig. 5.5 Particle size distribution of GMS

5.2.3.4 ホロトモグラフィー技術による GMS 構造の特徴

ホロトモグラフィー顕微鏡を用いて取得した三次元 RI トモグラムから、GMS 内部構造の RI マッピング画像を再構成した (Fig. 5.6A)。HT-1 は多方向から取得したホログラムを基にボクセルごとの RI 分布を再構成する光学位相トモグラフィー装置であり、得られた RI ボリュームデータを閾値処理および疑似カラーで表示することで、外層のゼラチン相 (青) と内側の CPO 相 (黄) を分離可視化した。Fig. 5.6B は RI 分布図に基づいて作成したコアシェル構造の概念図である。RI 分析の結果、青色領域 (ゼラチン) の RI は 1.339~1.360 の範囲で分布し、黄色領域 (CPO) の RI は 1.365~1.390 の範囲で分布していた (Fig. 5.6C)。

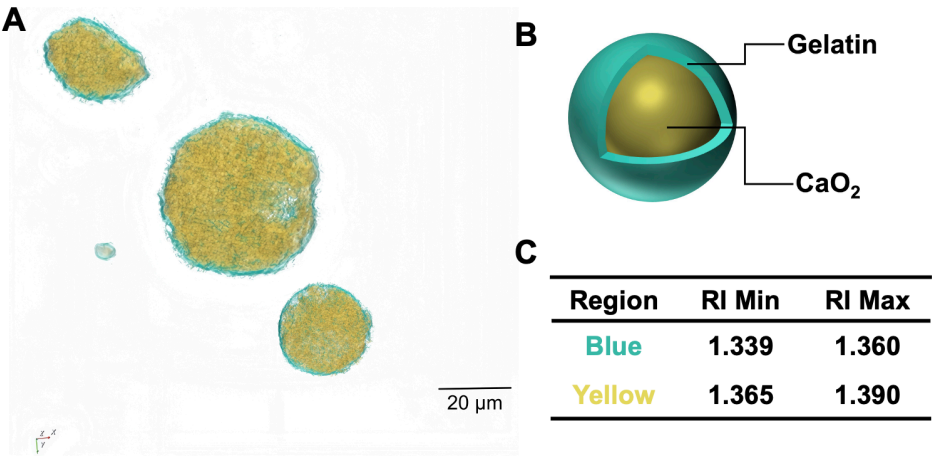


Fig. 5.6 (A) The RI mapping image captured via holographic microscopy reveals that GMS exhibit a core-shell structure. (B) Schematic illustration of GMS. (C) RI difference between the blue and yellow regions.

5.2.3.5 SEMで観察されたGMSの形態的特徴

SEM観察の結果、GMSは全体として良好な球状形態を示し、200～400倍像（Fig. 5.7a, b）において比較的均一な粒径分布で分散していることが確認された。高倍率像（Fig. 5.7c）では、表面が滑らかな被膜ではなく、ザラザラした形態を示した。さらに3000倍像（Fig. 5.7d）では数百nm～数 μm 程度の細孔が外殻全体に分布している様子が観察された。

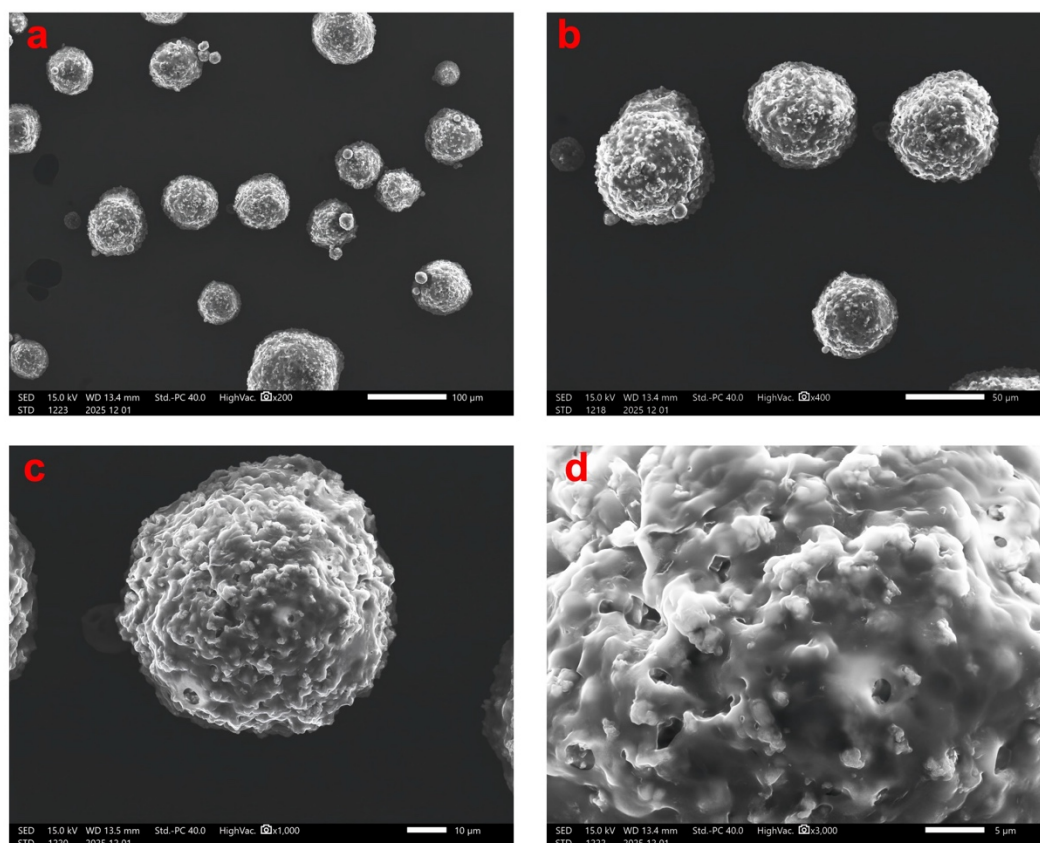


Fig. 5.7 Morphology and microstructure of GMS were observed via SEM under a magnification of (a) 200 $\times$, (b) 400 $\times$, (c) 1000 $\times$ and (d) 3000 $\times$

5.2.4 考察

5.2.4.1 コアシェル構造と微細孔を有する外殻による酸素放出特性の最適化

本節の結果を総合すると、CPOを直接ゲルに分散させる方式から、GMSにカプセル化して利用する方式へと設計を変更したことにより、酸素放出特性が質的に改善されたことが明らかとなった。開放系では、同一CPO含有量にもかかわらず、CPO粉末分散型oxy CG-CPOが急峻な初期バーストと約70 hでの放出終了を示したのに対し、oxy CG-GMSではピークDO濃度が低く抑えられつつ、放出期間が約120 hまで延長された。このことは、高DO暴露リスクの低減と放出時間の延長という、第3章で指摘された「初期バーストによる毒性」と「長期培養への適用制限」という二つの課題を同時に緩和しうることを示している。

閉鎖系での OGR 解析では、DO プロファイルの線形化から算出した k_La が、oxy CG-GMS が oxy CG-CPO と比較して約 1/4 に低下していることが確認された。これは、GMS 外殻が CPO への水拡散を緩和し、OGR を穏やかに制御していることを示唆している。第4章で構築した「OGR $\geq$ OUR」の理論枠組みと組み合わせれば、この k_La 値を用いて三次元培養系における培養可能細胞密度の閾値 (X_{thr}) を計算することが可能であり、これにより oxy CG-GMS の三次元培養系への理論的拡張性を検証する。

形態観察の結果も、この放出制御メカニズムを裏付ける。位相差顕微鏡では、CPO 封入の有無にかかわらず GMS が良好な球状形態を保ち、CPO 封入 GMS では内部に高コントラスト領域が認められ、コアシェル構造様の形態が示唆された。粒径分布から平均粒径約 35 μm が得られ、肝細胞スケールに近い微小酸素源として三次元構造内へ均一分散しやすいサイズであることが分かった。

SEM およびホログラフィック顕微鏡観察から、ゼラチンシェルは連通孔を有する構造であり、低 RI の外層と高 RI の内層が明瞭に分離した二相構造を示した。CPO を封入した PCL あるいは GMS でも、多孔質外殻が水侵入と CPO 分解を制御し、初期バーストを抑えた持続的酸素放出に寄与することが報告されており、本研究で得られた結果は、放出制御メカニズムとして妥当である^{14,123}。

総じて、GMS はコアシェル構造と微細孔を有する外殻により水拡散と反応速度を調節し、その結果として OGR と k_La を低下させながら酸素放出持続時間を延長する「時間制御型酸素源」として機能しうることが示された。この特性は、理論解析を三次元培養系へ展開する際の基盤パラメータを提供するものであり、後続節で扱う厚みを有する肝組織内部への酸素源内在化戦略の妥当性を支持する。

5.2.4.2 三次元培養系への理論的拡張性

GMS 封入条件により OGR が大きく低下したことから、CPO と水との直接的な接触が抑制され、その結果として酸素放出の持続時間が延長されていると考えられる。一方で、第4章で示したように、OGR が OUR を下回る場合には、細胞内酸素分圧の低下に伴う細胞活性の低下や機能障害が生じるため、単に放出速度を低下させればよいわけではない。したがって、oxy CG-GMS を三次元培養系に適用するにあたっては、その酸素供給能力に見合った培養可能細胞密度の閾値を事前に推定しておくことが重要となる。

第4章で検証した二次元培養系における OGR と OUR の関係に基づく理論枠組みは、酸素放出特性と細胞密度の対応関係を定量的に評価できることが示されており、この枠組みを oxy CG-GMS の k_La 値に拡張適用することで、三次元培養条件下における許容細胞密度の閾値を算出することが可能である。以下では、この理論モデルを三次元組織スケールへ展開する手順と前提条件について述べることで、oxy CG-GMS を用いた三次元培養系への応用範囲を大きく広げうること、さらに OGBs を三次元培養に用いる際の事前自己評価（セルフチェック）ツールとしての実現可能性を論証する。

三次元培養環境における OGBs の挙動を理論的に評価するため、本研究で開発した oxy CG を三次元構造へ組み込んだ条件を想定した。具体的には、肝細胞スフェロイドを oxy CG マトリックス内に直接埋入し、構築体全体にわたる局所的な供酸素を実現する方法、あるいは bottom-up 型の組織自組織化プロセスにおいて、GMS を肝細胞スフェロイド間に介在させる方法が考えられる。これらのアプローチにより、細胞スフェロイドと酸素生成ゲルが一体化した組織-ゲル複合三次元構造が形成され、組織中心部に位置する細胞であっても拡散距離制限を受けずに十分な酸素供給を確保できる。すなわち、二次元単層培養ではゲル表面から培地方向へ酸素が拡散していたのに対し、三次元スフェロイド系では Fig. 5.8 に示すように、スフェロイド周囲を取り囲む酸素放出マトリックスからスフェロイド表面を介して内部へと酸素が浸透していくモデルとなる。



Fig. 5.8 Schematic representation of converting the 2D measuring system to a 3D spheroid–oxy CG culture model for estimating the cultivable cell density threshold. (* the size of hepatocyte spheroid will be shown in Section 5.3.3.1)

三次元培養系においても閾値細胞密度は Eq. (6)により算出可能であり、その理論枠組みは 12 ウェルプレート単層培養系と同一である。すなわち比表面積 a (a_3 = 肝細胞スフェロイドの表面積 A_3 : 体積 V_3) による表面積-体積変換を適用する。

まず、以下のパラメータを SI 単位に変換した：

測定用セルの寸法値 (4.3.3 節)：

$$A_1^* = 1.767 \times 10^{-4} \text{ m}^2;$$

$$V_1^* = 1.20 \times 10^{-5} \text{ m}^3;$$

測定用セルの比表面積 a_1^* は Eq. (14) で表される。

$$a_1^* = \frac{A_1^*}{V_1^*} = 14.725 \text{ m}^{-1} (14)$$

肝細胞スフェロイド直径：約 76 μm (5.3.3.1 節に示す)

$$A_3 = 1.81 \times 10^{-8} \text{ m}^2;$$

$$V_3 = 2.30 \times 10^{-13} \text{ m}^3;$$

肝細胞スフェロイドの比表面積 a_3 は Eq. (15) で表される。

$$a_3 = \frac{A_3}{V_3} = 7.87 \times 10^4 \text{ m}^{-1} (15)$$

測定用セルにおける oxy CG-GMS の $k_L a_1^*$ は $5.05 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、三次元培養系における oxy CG-GMS の $k_L a_3$ は Eq. (16) で表される。

$$k_L a_3 = k_L a_1^* \cdot \frac{a_3}{a_1^*} = 2700 \text{ m}^{-1} (15)$$

このとき、三次元培養系における培養可能細胞密度の閾値は Eq. (16) で表される：

$$X_{3D-thr} = \frac{k_L a_3 C^*}{Q_{O_2}} = 3.82 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3 (12)$$

以上で算出した値は、肝細胞スフェロイド周囲が酸素放出マトリックスで充填された場合に、スフェロイド内部で許容される細胞密度を示す理論上の上限値を意味する。このため、次段階として、得られた閾値と実際の肝細胞スフェロイドにおける細胞密度を比較し、oxy CG-GMS を三次元培養系に適用した際の酸素供給能が理論的に妥当な範囲にあるかを検証する必要がある。これにより、その実験的実行可能性に対する理論的根拠を提供する。

本研究室では、肝細胞スフェロイドの形成に EZ SPHERE プレートおよび旋回培養法の 2 種類を用いており、その詳細な違いについては 5.3.3.1 節で後述する。EZ SPHERE を用いた場合、約 110 個の肝細胞から構成される平均直径 112 μm のスフェロイドが得られ、この幾

何学的条件よりスフェロイド内部の細胞密度は約 1.5×10^{14} cells/m³ と算出される。一方、先ほど算出した oxy CG-GMS の三次元培養条件における培養可能細胞密度の閾値は 3.82×10^{14} cells/m³ であるのに対し、実際のスフェロイド細胞密度はこの理論値を十分に下回っている。したがって、oxy CG-GMS を適用した三次元養系では「OGR $\geq$ OUR」の関係が成立し、第4章で示した理論枠組みに照らしても酸素供給能力の不足によって肝細胞が失活するリスクは低いと考えられる。このことは、oxy CG-GMS が三次元肝細胞スフェロイド培養において、少なくとも酸素供給の観点からは理論的に妥当な設計であることを示している。

5.2.5 今節のまとめ

本節では、CPO を酸素源とする酸素生成 GMS の作製法を確立し、その構造的特徴と酸素放出特性を総合的に評価するとともに、第4章で構築した理論枠組みを用いて三次元培養系への応用可能性を検討した。まず、W/O エマルション法および架橋反応を用いることで、CPO をゼラチンマトリックス内に封入した GMS を再現性高く調製できることを示し、顕微鏡観察および屈折率マッピングにより、球状形態・コアシェル構造・微細孔を有する外殻という本材料特有の形態学的特徴を明らかにした。

次に、開放系および閉鎖系における酸素放出挙動を解析し、GMS へのカプセル化が従来の CPO 粉末分散型コラーゲンゲルと比べて酸素生成速度を緩和しつつ放出時間を延長する、いわば「時間制御型酸素源」として機能することを示した。これにより、第3章で課題となった初期バーストと長期培養への適用制限を同時に緩和しうる設計指針を提示したことになる。

さらに、閉鎖系測定から得られた体積酸素移動係数 k_{La} を第4章で確立した OGR $\geq$ OUR 基準に組み込み、肝細胞スフェロイド周囲を oxy CG-GMS で充填した三次元培養モデルに適用することで、三次元環境下における培養可能細胞密度の理論閾値を導出した。その上で、この閾値を実際のスフェロイド細胞密度と比較することで、oxy CG-GMS を用いた三次元培養系では理論的に酸素供給が許容範囲内にあり、酸素不足による細胞失活リスクが低いことを示した。

総じて、本節は GMS の作製・構造・酸素放出特性を一貫した枠組みで整理し、第4章の二次元モデルを三次元培養系へ拡張する際のキー・パラメータとして k_{La} を位置付けたうえで、oxy CG-GMS が三次元組織構築に適用可能な OGBs であることを理論的に裏付ける役割を果たしている。

5.3 酸素生成ゼラチンマイクロスフェアを用いた三次元肝組織構築への試み

5.3.1 本節の目的

本節では、第5章前半で作製した酸素生成GMSの物理的特性および酸素放出特性を踏まえ、それを実際の三次元肝組織構築へ応用することを目的とする。具体的には、旋回培養を用いて肝細胞スフェロイドを形成し、これをoxy CG-GMSと組み合わせることで、酸素源を内在化した三次元肝組織様構造体を作製する。さらに、第4章で確立した酸素生成能定量解析法（OGR $\geq$ OUR 基準）を三次元系に拡張した理論モデルに基づき、本構築法における酸素供給能と細胞密度の整合性を検証する。

また、本節では、oxy CG-GMSを導入した三次元肝組織において、局所的な低酸素環境がどの程度緩和されるかを、肝細胞の生存率および肝特異的機能（アルブミン分泌、尿素合成）を指標として評価する。これにより、GMSによる酸素源の内在化が、従来の外部供給型酸素供給技術と比較して、厚みのある高密度三次元肝組織に対してどの程度有効に機能するかを明らかにすることを目指す。最終的に、本節での検討を通じて、酸素生成マイクロスフェアを用いた三次元肝組織構築戦略の有用性と限界を整理し、組織工学および再生医療への実装に向けた実験的基盤を提示する。

5.3.2 実験方法

5.3.2.1 肝細胞スフェロイドの作製

本研究では、酸素生成GMSを内在化した三次元肝組織を構築するための前提として、まず均一な肝細胞スフェロイドを安定に作製する必要がある。本節では、その作製法として、EZ SPHEREという6ウェルプレート（IWAKI）を用いたウェル内自己集合法と、浮遊旋回培養による懸濁培養法の二手法を検討対象とした。両者は足場非依存的にスフェロイドを形成できる点で共通する一方で、スフェロイド1個当たりの細胞数、直径、サイズ分布の均一性、形成効率などに差異を持つ可能性がある。本小節では、それぞれの培養条件と操作手順を概説し、得られた肝細胞スフェロイドのサイズ・形態・回収率を比較することで、後続のoxy CG-GMSとの三次元共培養実験に最適なスフェロイド作製プロトコルを選定することを目的とする。

(一) EZ SPHEREによる肝細胞スフェロイドの作製

EZ SPHEREは、培養底面に口径約400～500 μm 、深さ約100～200 μm の微細な窪み（マイクロウェル）を隙間なく均一に有しており、その表面にはタンパク質低接着コートが施されている。そのため、細胞を播種するとマイクロウェル内に細胞が収まり、一つのマイクロウェルに対し一つのスフェロイドを形成することが可能である。本実験で使用した

EZSPHERE 6 ウェルプレートは1 ウェル当たり約 2700 個のマイクロウェルを有しており、均一なスフェロイドを約 2700 個作製可能である。まず、4.2.2.1 に示した方法で初代ラット肝細胞を調製し、肝細胞懸濁液を 110 cells/microwell となるように調整し、各ウェルに D-HDM 培地 500 μ L を添加したのち、細胞懸濁液 2 mL を播種した。播種後、プレートをインキュベーター内に放置し、マイクロウェル内で細胞が均一に分布するよう数回軽く揺動してから、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 2 日間静置培養を行い、スフェロイドを形成させた。培養後、ピペットを用いて肝細胞スフェロイドを吸引し、目開き 45 μ m のメッシュ上に滴下した。さらに、CMF-PBS 1 mL を用いて 1 ウェルを 2 回洗浄し、残存スフェロイドも同様にメッシュ上に濾過したのち、メッシュを裏返して D-HDM 培地で洗い流し、スフェロイドを 15 mL チューブに回収した。顕微鏡下でウェル内にスフェロイドが残っていないことを確認した後、チューブを 60 $\times$ g、90 s で遠心分離し上清を除去した。最後に D-HDM 培地を用いて 8 ml まで再懸濁し、後続の実験に供した。

(二) 浮遊旋回培養による肝細胞スフェロイド作製および粒径分布の測定

浮遊旋回培養による肝細胞スフェロイドの作製には、非接着性 6 ウェルプレートを用いた懸濁培養法を採用した。まず初代ラット肝細胞を分離し、肝細胞懸濁液を 5.0×10^5 cells/mL となるよう調整した。次に、培養面積 9.6 cm²/well の 6 well プレート各ウェルに肝細胞懸濁液 1.5 mL を播種し、プレートを水平円運動式ロータリーシェーカー上に設置して 80 rpm で浮遊旋回培養を行った。培養は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で実施し、2 日間後にスフェロイド形成を確認した。

肝細胞スフェロイド回収する前に、6 ウェルプレート中のスフェロイドを位相差顕微鏡で観察、撮影した。撮影した画像を Q-Capture Pro 7 を用いて粒径を測定し、粒径分布を求めた。

スフェロイドの回収に際しては、EZ SPHERE による肝細胞スフェロイド作製時と同様の手順を基本としつつ、目開き 150 μ m および 45 μ m の金属メッシュを組み合わせた二段階ろ過によりサイズ分画と洗浄を行った。具体的には、形成された肝細胞スフェロイド懸濁液を順次メッシュ上に滴下してトラップし、培地で洗浄した後、メッシュから洗い落とすことで目的サイズのスフェロイドを回収した。最終的に得られた肝細胞スフェロイドは 8 ml まで再懸濁され、以降の解析および共培養実験に供した。

5.3.2.2 肝細胞スフェロイドの細胞数測定

肝細胞スフェロイドの細胞数は、核数計測法を用いて算出した。まず、スフェロイド懸濁液 0.5 mL を 2 本分採取し、それぞれを 60 $\times$ g、90 s で遠心分離して上清を除去した。得られたペレットにクエン酸溶液 400 μ L を加えて自立型スクリーキャップチューブに移し、ホモジナイザー (10000 rpm、3 min) で十分に分散させた。さらに、ホモジナイザーのシャフト部をクエン酸 200 μ L で 3 回洗浄し、洗浄液を同一チューブに回収した後、ボルテック

スで均一に混和した。次いで、100 μ L のサンプルと等量の細胞処理試薬 Reagent B (ChemoMetec) を添加して懸濁液の pH を中性に調整し、NucleoCassette (Chemometric) に吸引してヨウ化プロピジウムと反応させ、核を蛍光標識した。最後に、カセットを NucleoCounter (Chemometric) にセットして懸濁液中の核数を測定し、初代ラット肝細胞では二核細胞が一定割合 (1.45) 存在することを考慮して、測定された核数を 1.45 で除することでスフェロイド中の細胞数を算出した。

5.3.2.3

培養系におけるモデル化した肝組織の構築

モデル化した肝組織の構築は、第4章で検証した理論モデルに基づき、肝細胞スフェロイド周囲を酸素放出マトリックスで包囲することを目的として行った。本実験では、まず前節で作製した肝細胞スフェロイド懸濁液 (5×10^6 cells/mL に調製済み) 0.1 mL と、酸素放出成分 (CPO 粉末と GMS) を含むコラーゲングル溶液 0.3 mL を 1.5 mL チューブ内で緩やかに混合した。次に、この混合懸濁液を遠心させ、スフェロイドおよび酸素放出成分をチューブ底部に沈降させることで、高細胞密度かつ酸素放出マトリックスがスフェロイド周囲を取り囲むような「モデル化した肝組織」を形成した。遠心後、上清 0.30 mL を除去し、チューブを 37 °C インキュベーター内で約 25 分間静置してコラーゲンをゲル化させ、底部に一定形状 (皿状・碗状) の細胞凝集体を得た (Fig. 5.9)。この構成により、酸素放出マトリックスは細胞への酸素供給源であると同時に、スフェロイド間を架橋する接着足場としても機能すると想定した。

ゲル化後、事前に脱酸素 (1% O_2) 処理を施した D-HDM 培地 1.4 mL をチューブ内に慎重に添加し、キャップを密閉して静置培養を開始した。培養は 37 °C、5% CO_2 条件下で 5 日間連続して行い、その間は培地交換を行わなかった。これは、移植用組織体が生体内に移植された後、組織内微小血管網と宿主血管が連結するまでの間に経験すると考えられる、酸素・栄養供給の乏しい過渡期を模倣することを意図した条件設定である。酸素放出条件としては、CPO を含まない普通のコラーゲングル (CG) を用いた群を対照とし、CPO 粉末分散型コラーゲングル (oxy CG-CPO) および GMS 封入型コラーゲングル (oxy CG-GMS) を比較検討した。さらに、環境酸素分圧の影響を評価するため、ポジティブコントロールとして CG のみを 20% O_2 条件下で培養し、ネガティブコントロールとして CG を 1% O_2 条件下で培養した。これらの条件設定により、oxy CG-GMS が三次元モデル肝組織内部の低酸素環境をどの程度緩和しうるかを、他条件と系統的に比較できるように設計した。

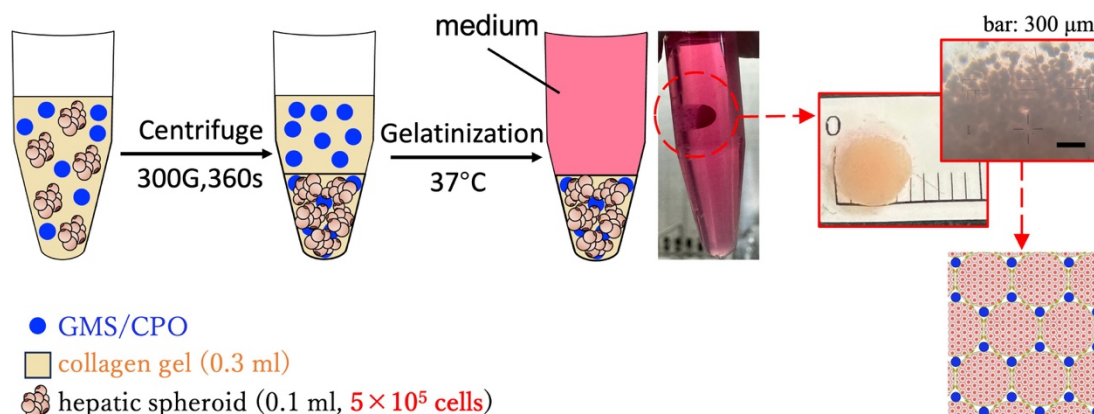


Fig. 5.9 Sequential construction of model hepatic tissue in a 3D culture system using GMS/CPO-containing collagen gel and centrifugation-assisted spheroid aggregation

5.3.2.4 細胞生存率の評価

4.2.2.3 と同様の方法で、LDH 活性から細胞生存率を測定した。

5.3.2.5 肝特異機能評価

4.2.2.4 と同様の方法で、尿素合成活性とアルブミン分泌活性を測定した。

5.3.3 実験結果

5.3.3.1 作製された肝細胞スフェロイドの形態と粒径分布

培養2日後、二つの培養法で作製された肝細胞スフェロイドの形態および粒径分布を Fig. 5.10 に示す。EZ SPHERE を用いた場合、スフェロイドは各マイクロウェル内に規則正しく配置されており、平均粒径は約 $112 \mu\text{m}$ と比較的均一であった。一方で、1枚のプレートから回収できる細胞数は約 $9 \sim 12 \times 10^5$ cells にとどまった (Fig. 5.11A)。

これに対し、非接着6ウェルプレートによる巡回培養法では、スフェロイドはウェル内に多数分散して形成され、平均粒径は約 $76 \mu\text{m}$ とやや小さいものの、1枚あたり約 $20 \sim 28 \times 10^5$ cells と回収可能な細胞数は大幅に増加した (Fig. 5.11B)。また、EZ SPHERE 6ウェルプレートは通常の6ウェルプレートに比べてコストが高いことから、粒径の許容範囲と回収効率および経済性を総合的に勘案し、以降の実験では巡回培養により作製した肝細胞スフェロイドを用いることとした。

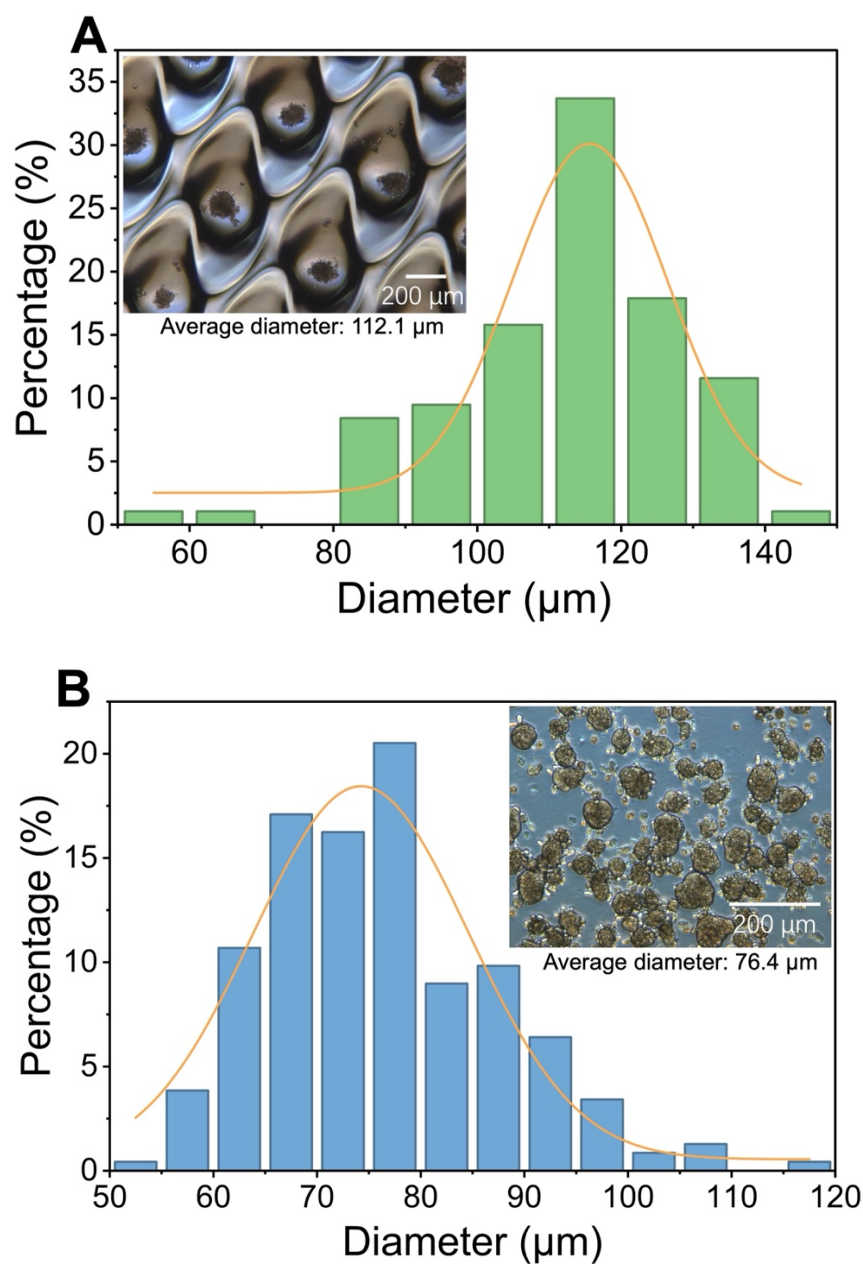


Fig. 5.10 Morphology and size distributions of hepatic spheroids generated by (A) EZSPHERE® microwell culture and (B) spinner-based suspension culture

5.3.3.2 作製肝組織の細胞生存率変化

4.2.2.3 節で述べた LDH 放出量に基づく生存率算出法を用いて、構築したモデル肝組織の経時的な細胞生存率を評価した (Fig. 5.11)。全ての条件で 5 日間の培養に伴い生存率は低下したが、CG (20% O_2) では培地交換を行わなかったにもかかわらず、高い生存率が維持され、5 日目でも約 80%の細胞が生存していた。これに対して、CG (1% O_2) では 1 日目から生存率が約 40%まで急激に低下した。

酸素放出コラーゲンをを用いた oxy CG-CPO および oxy CG-GMS の2群では、1日目および3日目の生存率に大きな差は認められなかったが、5日目には oxy CG-GMS でより高い生存率が得られ、有意な差が確認された。また、両酸素放出群はいずれの時点においても、陰性対照 CG (1% O₂) より有意に高い生存率を示した。

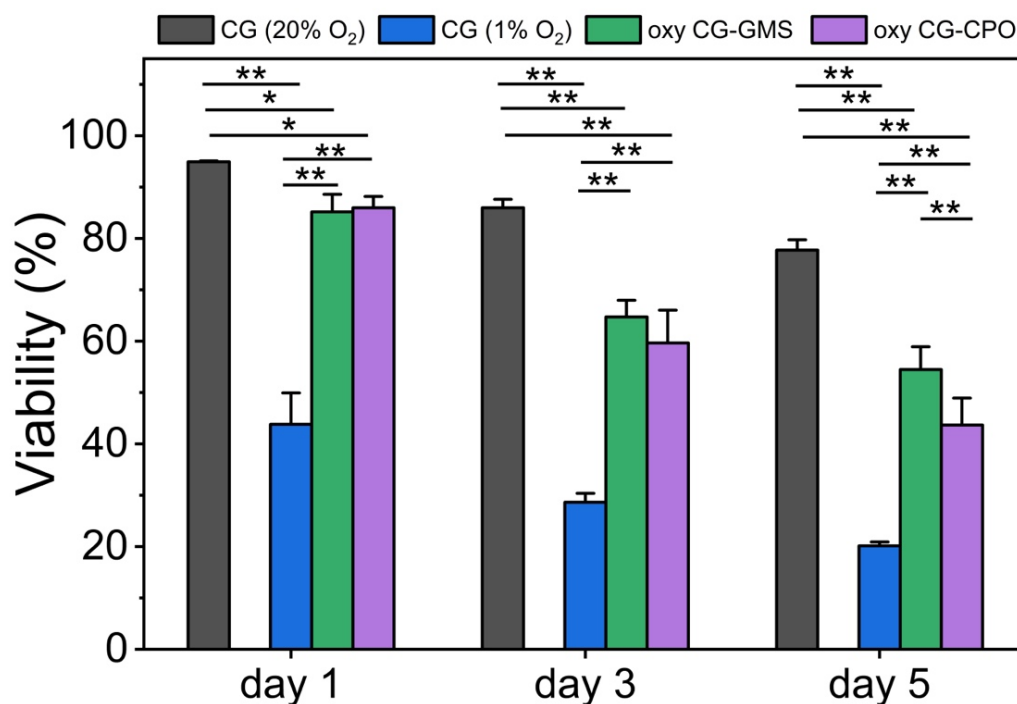


Fig. 5.11 Time-dependent viability of hepatic spheroids embedded in collagen gels (CG) with or without oxygen-releasing materials under different oxygen tensions

5.3.3.3 作製肝組織の肝特異機能評価

(一) 尿素合成活性評価

尿素合成活性の評価として、培養5日間にわたりモデル肝組織から培地中へ分泌された尿素濃度を測定した結果を Fig. 5.12A に示す。いずれの培養時間 (day 1, 3, 5) においても、コントロール CG (20% O₂) および CG (1% O₂) と、酸素放出コラーゲンをを用いた実験系 (oxy CG-GMS, oxy CG-CPO) の間には有意な差がみられた。特にポジティブコントロールである CG (20% O₂) は全期間を通じて最も高い尿素濃度を示し、ネガティブコントロール CG (1% O₂) は常に最低レベルにとどまった。

一方、2つの酸素放出ゲル系を比較すると、培養1日目では oxy CG-GMS と oxy CG-CPO の尿素合成活性に大きな差はみられなかったが、day 3 および day 5 では oxy CG-GMS が oxy CG-CPO を有意に上回る尿素濃度を示した。

(二) アルブミン分泌活性評価

アルブミン分泌活性の評価として、培養 5 日間にわたりモデル肝組織から培地中へ分泌されたアルブミン濃度を測定した結果を Fig. 5.12B に示す。いずれの培養時間 (day 1, 3, 5) においても、ポジティブコントロールである CG (20% O₂) は他の全ての条件と比較して有意に高いアルブミン濃度を示した。一方、ネガティブコントロール CG (1% O₂) は、day 1 を除く全ての時点で oxy CG-GMS および oxy CG-CPO の両酸素放出ゲル群より有意に低いアルブミン濃度を示した。

一方、2つの酸素放出ゲル系を比較すると、全ての培養時間において oxy CG-GMS は oxy CG-CPO よりも有意に高いアルブミン分泌活性を示した。

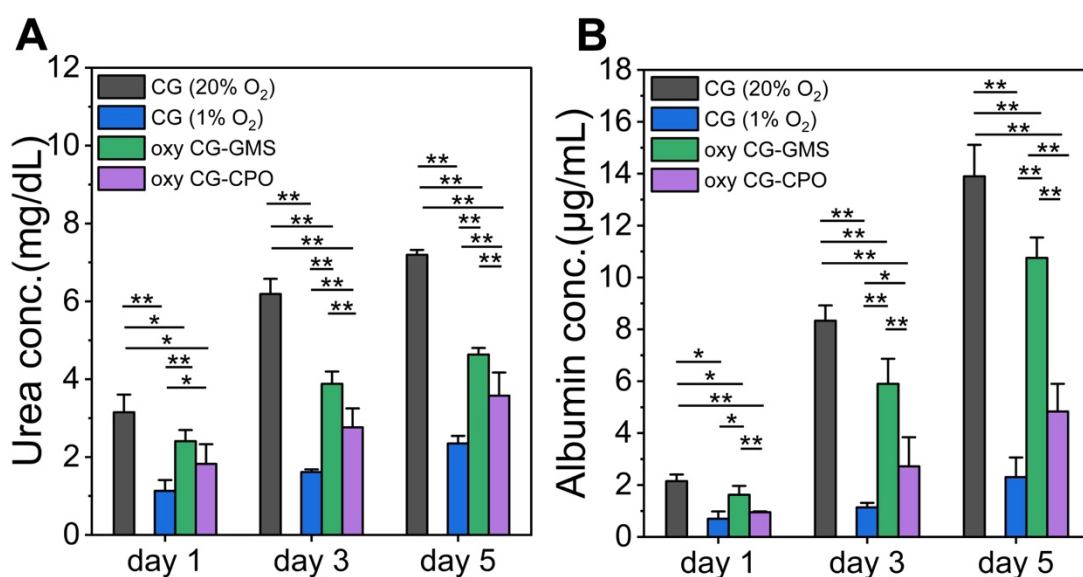


Fig. 5.12 Time-course analysis of hepatic-specific functions in 3D spheroid-collagen constructs: urea synthesis (A) and albumin secretion (B) under different oxygen-release conditions

5.3.4 考察

本節では、細胞生存率・肝特異機能の2観点から、oxy CG-GMS を用いた三次元肝組織構築戦略の妥当性を検討した。

5.3.4.1 スフェロイド作製法の選択

スフェロイド作製法の比較では、EZ SPHERE によるスフェロイドは平均直径約 112 μm で均一性に優れたが、回収可能な総細胞数が限られ、プレートコストも高いという課題があった。これに対し、旋回培養では平均直径約 76 μm のスフェロイドが大量に得られ、GMS の平均粒径 (約 34 μm) により近いサイズであったため、GMS がスフェロイド間隙に均一分散しやすく、酸素供給源として空間的に均質に配置できる利点があると考えられる。さらに、肝細胞スフェロイドにおいては直径 100 μm 以下では酸素拡散制限がほとんど生じないとする報告もあり¹⁹、直径 76 μm のスフェロイドは 112 μm に比べて内部細胞が酸素欠乏

に陥りにくいと推察される。実際、肝スフェロイドの生存に対する酸素拡散限界が約 100 μm であることも指摘されており⁸⁷、その観点からも旋回培養で得られる小径スフェロイドを採用することは妥当である。

5.3.4.2 作製したモデル肝組織の生存率

ポジティブコントロール CG (20% O_2) が5日間にわたり最も高い生存率を維持した。一方、ネガティブコントロール CG (1% O_2) は早期から著しい低下を示し、低酸素環境単独では組織生存維持が困難であることが明らかとなった。これに対し、oxy CG-GMS および oxy CG-CPO では、いずれの時点でも CG (1% O_2) より高い生存率を示し、酸素放出マトリックスが機能していることを確認した。さらに、5日目には oxy CG-GMS が oxy CG-CPO を有意に上回る結果を示した。これは、5.2節で示したように、CPO マイクロカプセル化によって初期バーストが抑制され、長時間にわたる穏やかな酸素供給が可能になったことが、三次元組織スケールでも有利に働いていることを示唆する (Fig. 5.13)。

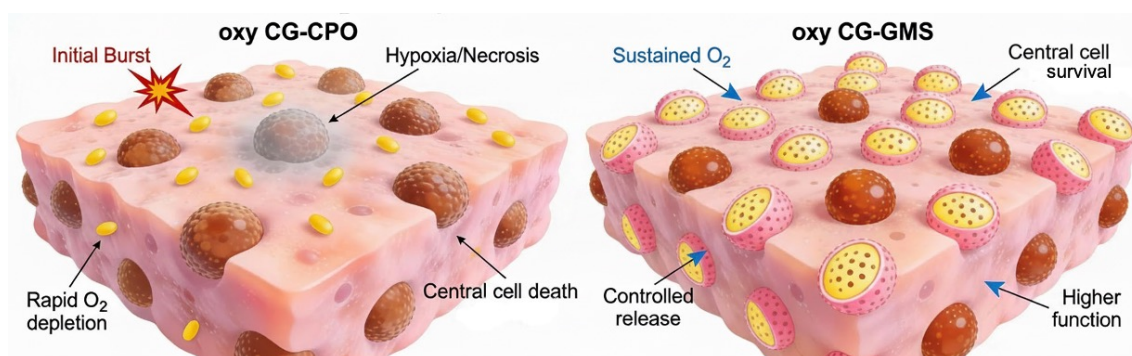


Fig. 5.13 Comparative oxygen delivery profiles of oxy CG-CPO versus oxy CG-GMS in engineered 3D liver tissue constructs.

5.3.4.3 作製したモデル肝組織の肝特異機能

肝特異機能の指標である尿素合成活性およびアルブミン分泌活性についても、生存率評価と整合した傾向が認められた。CG (20% O_2) は全培養期間を通じて最も高い機能を示し、CG (1% O_2) は常に低値で推移したのに対し、酸素放出ゲルを用いた oxy CG-GMS および oxy CG-CPO はいずれも低酸素下における機能低下を一定程度抑制していた。とくに day 3 および day 5 では、尿素合成量・アルブミン分泌量のいずれにおいても oxy CG-GMS が oxy CG-CPO を有意に上回り、GMS 封入条件が肝特異機能の維持・向上により有利であることが示された。

一方、生存率の結果を踏まえると、oxy CG-GMS と oxy CG-CPO では培養5日目を除き細胞生存率に大きな差はなく、少なくとも day 1~3 の段階では両条件下で生存している細胞数は概ね同程度であると考えられる。それにもかかわらず、肝機能指標では終始 oxy CG-GMS が優位であったことから、GMS による酸素供給は単に細胞数を維持するだけでな

く、各細胞の機能的「質」を高めていることが示唆される。すなわち、CPO 粉末分散型では初期の急峻な酸素放出に伴い一過性の酸化ストレスが生じ、ROS 蓄積により肝細胞内のタンパク質合成系や代謝酵素発現が抑制される可能性が高いのに対し、GMS ではコアシェル構造と微細孔を有する外殻により CPO への水アクセスと酸素生成速度が緩やかに制御され、過度な ROS 生成を回避しつつ細胞の酸素需要に見合った供給が持続していると解釈できる。

この結果は、「生存率」は主として生き残っている細胞数を反映する量的指標であるのに対し、尿素合成やアルブミン分泌といった機能指標は、残存細胞がどの程度分化・成熟した肝細胞として機能しているかという質的側面を敏感に反映することを示している。肝組織工学における *in vitro* 培養系では、単なる細胞生存の確保だけでなく、高度な肝特異機能の長期維持が不可欠であることから、GMS のように OGR を精密に制御できるキャリアを用いて安定かつ持続的な酸素供給を実現することが、機能性肝組織構築において極めて重要な設計要件であると考えられる (Fig. 5.13)。

5.3.5 今節のまとめ

本節では、酸素生成 GMS を内在化した三次元肝組織モデルを構築し、その有用性を総括した。まず、肝細胞スフェロイドの作製では、EZ SPHERE と比較して、旋回培養で得られるスフェロイドが小径かつ大量回収可能であり、GMS とのサイズスケールも近いことから、酸素源の均一分散に適すると判断した。このスフェロイドを oxy CG-GMS などの酸素放出コラーゲンゲルと混合し、遠心沈降法によって高密度の皿形組織体を形成することで、移植直後の虚血様環境を模した三次元培養系を確立した。その結果、低酸素下の非酸素放出ゲルと比較して、酸素放出ゲル群では細胞生存率の低下が抑えられ、さらに尿素合成活性およびアルブミン分泌活性といった肝特異機能も良好に維持されることが示された。特に GMS を用いた oxy CG-GMS は、同じ CaO_2 量を含む粉末分散型ゲルよりも長期培養下で高い肝機能を示し、時間制御型酸素源として肝組織内部の酸素環境を改善できることが確認された。以上より、本節で示した「スフェロイド+oxy CG-GMS」によるモデル化肝組織構築法は、第4章の理論枠組みに整合しつつ、厚みを有する三次元肝組織の酸素供給戦略として有望なアプローチであることが示された。

5.4 本章のまとめ

本章では以下の事項を示した。

1. CPO をゼラチンに封入した酸素生成 GMS の作製プロトコルを確立し、そのコアシェル構造と微細孔を有する外殻により酸素初期バーストが抑制されることを明らかにした。
2. 開放系・閉鎖系での評価から、GMS 封入型コラーゲンゲル (oxy CG-GMS) は酸素放出持続時間を延長するとともに k_{La} を低下させ、第4章で構築した「 $OGR \geq OUR$ 」理論を三次元培養系へ拡張できる指標となることを示した。
3. 肝細胞スフェロイドと oxy CG-GMS を遠心沈降させて酸素源を内在化した高密度三次元肝組織モデルを構築し、低酸素・無培地交換条件下でも CG (1% O_2) および oxy CG-CPO に比べて細胞生存率低下を有意に抑制できることを示した。
4. 尿素合成活性およびアルブミン分泌活性の評価から、oxy CG-GMS は oxy CG-CPO より高い肝特異機能を長期にわたり維持し、時間制御型酸素源として三次元肝組織内部の酸素環境を改善しうる有望な OGBs であることを示唆した。

第6章 総括

6.1 本論文のまとめ

本論文では、酸素生成バイオマテリアル (OGBs) の酸素供給能を「量」だけでなく「速度」の観点から再定義し、その定量解析に基づいて新規酸素生成ゼラチンベースマイクロスフェア (GMS) を作製し、肝組織工学への応用可能性を検証した。まず、過酸化カルシウム (CPO) を封入した酸素生成コラーゲングエル (oxy CG) をモデルとして、酸素放出速度 (OGR) と細胞の酸素消費速度 (OUR) のバランスに基づいて「培養可能細胞密度の閾値」を理論的に導出した。次に、この理論を肝細胞単層培養モデルによって実験的に検証し、「 $OGR \geq OUR$ 」を満たす条件では細胞生存率と肝特異機能が維持される。一方、閾値を超える高密度条件では低酸素に起因する機能低下が生じることを示した。さらに、CPO 大量封入による初期バーストと活性酸素種誘発という課題を解決するため、CPO をゼラチンにマイクロカプセル化した GMS を作製し、そのコアシェル構造と微細孔を有する外殻による制御放出特性を明らかにした。この GMS を肝細胞スフェロイドベースの三次元肝組織モデルに導入することで、組織内部に酸素源を内在化し、低酸素・無培地交換という厳しい条件下でも細胞生存と肝特異機能 (尿素合成・アルブミン分泌) を有意に改善できることを示した。以上の成果により、「OGR の定量解析に基づく設計指針」と「時間制御型酸素生成 GMS」という二つの側面から、厚みを有する肝組織構築における酸素供給戦略の新たな枠組みを提示した。

第1章では、本研究の目的・背景を述べるとともに、本研究の目的及び目的達成のための研究方針を示した。また、本研究のオリジナリティを示し、本研究の位置付けを明確にした。

第2章では、組織工学の基礎概念と足場材料、血管化戦略、三次元細胞培養技術について概説し、肝臓組織工学の現状と未解決課題を整理した。また、既報の酸素生成マテリアルの長所と課題を整理し、本研究で扱う CPO 封入コラーゲングエルおよびゼラチンマイクロスフェアの位置付けを明らかにした。

第3章では、CPO を酸素源とする oxy CG を調製し、その酸素放出期間、pH 変動、過酸化水素濃度の経時変化を開放系で評価した。CPO 濃度の増加により酸素放出時間が延長される一方、初期バーストと H_2O_2 蓄積が細胞毒性リスクとなることを示した。また、カタラーゼの併用により H_2O_2 が低レベルに抑制されることから、oxy CG が適切な条件設定のもとで細胞培養に利用可能な酸素生成足場となり得ることを示した。

第4章では、第3章で作製した oxy CG を用いて閉鎖系で OGR を測定し、OGR から酸素移動容量係数 k_La を算出した。この k_La を用いて、与えられた OGR のもとで理論上培養可能な細胞密度の閾値 X_{thr} を導出し、「 $OGR \geq OUR$ 」を満たす条件を定式化した。続いて、初代ラット肝細胞を oxy CG 上で単層培養し、播種細胞数を系統的に変化させながら生存率と肝特異機能を評価することで、理論的に導いた X_{thr} と実験結果が良好に一致することを示し、この定量解析法の妥当性を検証した。さらに、この枠組みを三次元培養および in vivo 移植モデルへ拡張する概念図を提示し、 k_La を用いた「培養可能細胞密度の事前評価」が多様な OGBs に適用可能な汎用的自己チェック手法となり得ることを示唆した。

第5章では、CPO の初期バーストを抑制しつつ持続的酸素供給を実現するため、W/O エマルジョン法により CPO 封入酸素生成ゼラチンマイクロスフェアを作製し、その酸素放出特性と物理的特性を評価した。GMS はコアシェル構造と微細孔を有する外殻により、CPO 粉末分散型ゲルと比較して酸素初期バーストを顕著に低減しつつ、開放系での酸素放出持続時間を約 120 時間まで延長できることを示した。閉鎖系で得られた OGR から算出した k_La は粉末分散条件の約 1/4 であり、OGR を緩和しつつ総供給量を維持する「時間制御型酸素源」として機能することが明らかとなった。さらに、この k_La を第4章で構築した「 $OGR \geq OUR$ 」の理論枠組みに組み込むことで、GMS を用いた三次元培養条件における培養可能細胞密度閾値を算出し、肝細胞スフェロイド径との比較から理論的に十分な酸素供給が確保されることを示した。加えて、旋回培養で得た肝細胞スフェロイドと GMS 含有コラーゲンゲルを遠心沈降させて酸素源を内在化した三次元肝組織モデルを構築し、低酸素・無培地交換条件下での培養試験から、oxy CG-GMS が CG (1% O₂) および oxy CG-CPO に比べ細胞生存率と肝特異機能（尿素合成・アルブミン分泌）の両面で優れることを実証した。

6.2 今後の課題と展望

本研究で構築した酸素生成 GMS を用いた三次元肝組織モデルは、低酸素・無培地交換条件下においても肝細胞生存および肝特異機能を維持できることを示したが、移植可能な血管化肝組織として完成させるためには、いくつかの課題が残されている。

第一の課題は、内皮系細胞を導入した血管化組織体への発展である。既報では、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) 被覆肝スフェロイドを統合することで *in vitro* で規則的な血管網を構築し得ることが報告されており^{114,124}、本研究の肝細胞スフェロイド-GMS 系に HUVEC を共培養・被覆することで、酸素供給と血管化を同時に達成できる可能性が高い。Fig. 6.1 に示す第5章で構築した三次元組織体はピンセットで把持できる程度の機械的強度を有するが、そのまま移植組織として取り扱えるかどうかについては、圧縮試験やせん断抵抗試験など機械的特性の定量評価が必要であり、輸送・縫合操作に耐えうる強度・弾性の最適化が今後の重要な検討課題である。

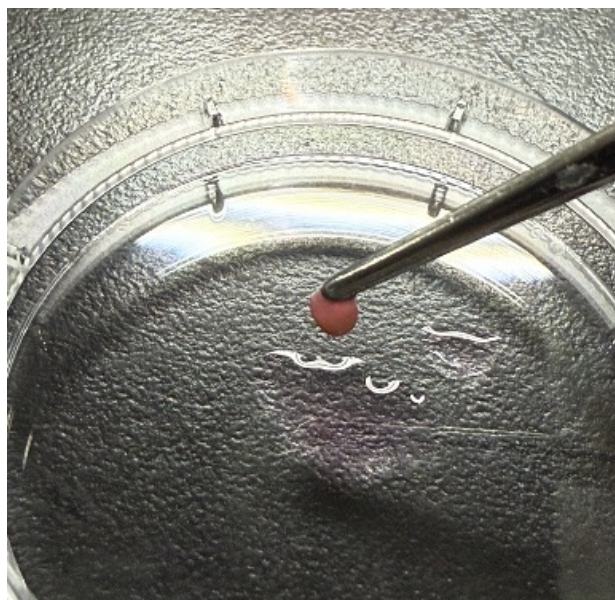


Fig. 6.1 Macroscopic appearance of the GMS-containing 3D hepatic construct grasped with forceps

第二の課題は、GMS を酸素源とした血管化肝組織の *in vivo* 移植実験である。本研究で構築した組織体は、まず異所性移植 (Heterotopic transplantation) モデルへの応用が現実的であると考えられる。異所性移植は、脾窩や皮下、腎被膜下など肝臓以外の部位に肝組織を移植する手法であり、原発肝への侵襲を回避しつつ、移植片の観察や回収が容易である点が利点として知られている^{125,126}。さらに、異所性補助肝移植は残存肝の再生を支援する有効な手段となり得ることも示されている。本研究で得られた GMS 内在化肝組織を脾窩や皮下ポケットに移植し、GMS からの長期酸素供給が移植直後から宿主血管新生・吻合が完了するま

での「低酸素ギャップ」をどの程度埋められるかを、移植片の生存率・血管侵入・肝機能指標を用いて検証する必要がある¹²⁷。

第三に、本研究で第4章において提唱した「 $OGR \geq OUR$ 」を基盤とする定量解析フレームワークを、GMS 以外の多様な OGBs および異なる細胞種へ展開することが挙げられる。最近の総説では、過酸化物系、固体過酸化物、酵素反応系など多様な酸素生成システムが報告されているが、その多くは OGR の定量評価が不十分であることが指摘されている。本研究で確立した k_{La} 測定と X_{thr} 算出の枠組みを、心筋・骨・皮膚など他組織向けの酸素生成足場や iPS 由来細胞、幹細胞スフェロイドに適用することで、組織種ごとの酸素要求性に応じた「設計図」を提示できると期待される。

さらに、GMS 自体についても、酸素放出期間・放出プロファイルを用途に合わせて精密調整する必要がある。例えば、GMS のサイズ・ゼラチン濃度・架橋度を変化させることで、OGR と分解速度を制御し、急性期補助（数日）から中期サポート（1-2 週間）まで異なるタイムスケールに対応したラインナップを構築できる可能性がある。また、GMS 表面への細胞接着性ペプチドや血管新生因子の固定化により^{128,129}、単なる酸素源から「血管誘導性・機能維持型マイクロキャリア」へと高機能化することも今後の興味深い課題である。

総じて、本研究は OGBs の評価指標として「酸素放出速度」と「培養可能細胞密度閾値」を導入し、これに基づいて GMS 設計及び三次元肝組織構築の有効性を検証した。今後は以下の取り組みを推進することで、臨床応用への道筋がさらに近づく と期待される：HUVEC を統合した血管化組織体の構築、異所性移植モデルを用いた生体内評価の実施、そして理論的枠組みを他の組織や材料へ横展開することである。

参考文献

1. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-343. doi:10.1016/S0092-8674(75)80001-8
2. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*. 1991;88(5):753-759. doi:10.1097/00006534-199111000-00001
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science (1979)*. 1993;260(5110):920-926. <https://www.science.org>
4. Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007;13(12):2827-2837. doi:10.1089/ten.2007.0335
5. Gholipourmalekabadi M, Zhao S, Harrison BS, Mozafari M, Seifalian AM. Oxygen-Generating Biomaterials: A New, Viable Paradigm for Tissue Engineering? *Trends Biotechnol*. 2016;34(12):1010-1021. doi:10.1016/j.tibtech.2016.05.012
6. Rouwkema J, Koopman BFJM, Blitterswijk CAV, Dhert WJA, Malda J. Supply of nutrients to cells in engineered tissues. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2010;26(1):163-178. doi:10.5661/bger-26-163
7. Zhu L, Liu S, Yang Z, Yang L, Yang Y, Han P, Miao Y, Lin L, Xu L, Li Y, Li X, Wang L, Zhao T, Wang W, Cui Z, Wang Z, Kong D, Shen Z, Zhang Y. Construction of vascularized liver microtissues recapitulates angiocrine-mediated hepatocytes maturation and enhances therapeutic efficacy for acute liver failure. *Bioact Mater*. 2025;50:525-539. doi:10.1016/j.bioactmat.2025.04.030
8. Shi DD, Makris E, Gerrand YW, Lo PH, Yeoh GC, Morrison WA, Mitchell GM, Yap KK. The vascularised chamber device significantly enhances the survival of transplanted liver organoids. *Elife*. 2024;13:1. doi:10.7554/eLife.90367.1
9. Chen X, Aledia AS, Popson SA, Him L, Hughes CCW, George SC. Rapid Anastomosis of Endothelial Progenitor Cell-Derived Vessels with Host Vasculature Is Promoted by a High Density of Cotransplanted Fibroblasts. *Tissue Eng Part A*. 2009;16(2):585. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0491
10. White SM, Pittman CR, Hingorani R, Arora R, Esipova T V., Vinogradov SA, Hughes CCW, Choi B, George SC. Implanted cell-dense prevascularized tissues develop functional vasculature that supports reoxygenation after thrombosis. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(17-18):2316-2328. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0311
11. Alva R, Mirza M, Baiton A, Lazuran L, Samokysh L, Bobinski A, Cowan C, Jaimon A, Obioru D, Al Makhoul T, Stuart JA. Oxygen toxicity: cellular mechanisms in normobaric hyperoxia. *Cell Biol Toxicol*. 2022;39(1):111-143. doi:10.1007/S10565-022-09773-7
12. Zhang Z, Rong Z, Wu G, Wang Y, Tan Z, Zheng J, Jin Y, Liang Z, Liu C, Guo J, Zhu L. Gelatin-CaO₂/SAP/PLGA composite scaffold enhances the reparation of critical-sized cranial defects by promoting seed cell survival. *Appl Mater Today*. 2021;22(10):100960. doi:10.1016/j.apmt.2021.100960

13. Augustine R, Gezek M, Bostanci NS, Nguyen A, Camci-Unal G. Oxygen-generating scaffolds: One step closer to the clinical translation of tissue engineered products. *Chemical Engineering Journal*. 2023;455(Pt 2):140783. doi:10.1016/j.cej.2022.140783
14. Wang C, Xu H, Liu C, Peng Z, Min R, Zhang Z, Li J, Jin Y, Wang Y, Li Z, Guo J, Zhu L. CaO₂/gelatin oxygen slow-releasing microspheres facilitate tissue engineering efficiency for the osteonecrosis of femoral head by enhancing the angiogenesis and survival of grafted bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomater Sci*. 2021;9(8):3005-3018. doi:10.1039/D0BM02071K
15. Sen Gupta A. Hemoglobin-based oxygen carriers: Current state-of-the-art and novel molecules. *Shock.Lippincott Williams and Wilkins*. 2019;52(1S):70-83. doi:10.1097/SHK.0000000000001009
16. Lu S, Zhang X, Xue Y. Application of calcium peroxide in water and soil treatment: A review. *J Hazard Mater*. 2017;337:163-177. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2017.04.064
17. Tomioka D, Fujita S, Matsusaki M. Controlled Release of Oxygen from Calcium Peroxide in a Weak Acidic Condition by Stabilized Amorphous Calcium Carbonate Nanocoating for Biomedical Applications. *ACS Omega*. 2024;9(5):5903-5910. doi:10.1021/acsomega.3c09406
18. Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, Horowitz S. Cellular Oxygen Toxicity: OXIDANT INJURY WITHOUT APOPTOSIS. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(25):15182-15186. doi:10.1074/JBC.271.25.15182
19. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. 2007;28(36):5487-5497. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.033
20. Labour MN, Le Guilcher C, Aid-Launais R, Samad N El, Lanouar S, Simon-Yarza T, Letourneur D. Development of 3D hepatic constructs within polysaccharide-based scaffolds with tunable properties. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10). doi:10.3390/IJMS21103644
21. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008;17(Suppl 4):467. doi:10.1007/S00586-008-0745-3
22. Correia SI, Pereira H, Silva-Correia J, Van Dijk CN, Espregueira-Mendes J, Oliveira JM, Reis RL. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *J R Soc Interface*. 2014;11(92):20130784. doi:10.1098/RSIF.2013.0784
23. Sillmann YM, Baggio AMP, Eber P, Freedman BR, Liu C, Jounaidi Y, Schramm A, Wilde F, Guastaldi FPS. Advancing Scaffold Architecture for Bone Tissue Engineering: A Comparative Study of 3D-Printed β -TCP Constructs in Dynamic Culture with pBMSC. *J Funct Biomater*. 2025;16(9):327. doi:10.3390/JFB16090327
24. Mukasheva F, Adilova L, Dyussenbinov A, Yernaimanova B, Abilev M, Akilbekova D. Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12:1444986. doi:10.3389/FBIOE.2024.1444986/XML

25. Kang J, Shirzad M, Min Seok J, Jung WK, Nam SY. Mechanical enhancement of porous scaffolds through integration of auxetic and conventional structures. *Mater Lett.* 2025;379(4):137675. doi:10.1016/J.MATLET.2024.137675
26. Xu P, Kankala RK, Wang S, Chen A. Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Regen Biomater.* 2024;11. doi:10.1093/RB/RBAD107
27. Palomeque Chávez JC, McGrath M, O'Connor C, Dervan A, Dixon JE, Kearney CJ, Browne S, O'Brien FJ. Development of a VEGF-activated scaffold with enhanced angiogenic and neurogenic properties for chronic wound healing applications. *Biomater Sci.* 2025;13(8):1993-2011. doi:10.1039/D4BM01051E
28. Mangani S, Vetoulas M, Mineschou K, Spanopoulos K, Vivanco M d. M, Piperigkou Z, Karamanos NK. Design and Applications of Extracellular Matrix Scaffolds in Tissue Engineering and Regeneration. *Cells.* 2025;14(14):1076. doi:10.3390/CELLS14141076
29. Guo X, Liu B, Zhang Y, Cheong S, Xu T, Lu F, He Y. Decellularized extracellular matrix for organoid and engineered organ culture. *J Tissue Eng.* 2024;15:1. doi:10.1177/20417314241300386
30. Liu J, Song Q, Yin W, Li C, An N, Le Y, Wang Q, Feng Y, Hu Y, Wang Y. Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations. *Exploration.* 2025;5(1):20230078. doi:10.1002/EXP.20230078
31. Kolouchova K, Humajova J, Matous P, Ritter N, Van Damme L, Hovorakova M, Pavlikova Z, Dalecka L, Steklikova K, Zeman J, Kucka J, Hruby M, Groborz O, Sefc L, Van Vlierberghe S. Non-destructive in vivo tracking of gelatin hydrogels for advancing tissue engineering. *Commun Mater.Nature.* 2025;6(1):1. doi:10.1038/s43246-025-00830-2
32. Besseling PJ, Szymczyk W, Teraa M, Toorop RJ, Bartels PAA, Arts B, Driessen RCH, Lichauco AM, Bakker HC, Fledderus JO, de Borst GJ, Dankers PYW, Bouten CVC, Verhaar MC. Evaluation of in situ tissue-engineered arteriovenous grafts suitable for cannulation in a large animal model. *Commun Mater.Nature.* 2025;6(1). doi:10.1038/s43246-025-00879-z
33. Zhang H, Yang D, Song X, Wu Z, Guo C, Qin K, Wang D, Wang P, Nagaumi H. Designing wear-resistant high-zinc aluminium alloys with high strength and ductility. *Commun Mater.Nature.* 2025;6(1). doi:10.1038/s43246-025-00783-6
34. Farjaminejad S, Farjaminejad R, Hasani M, Garcia-Godoy F, Abdouss M, Marya A, Harsoputranto A, Jamilian A. Advances and Challenges in Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Path Towards Personalized Regenerative Medicine. *Polymers (Basel).* 2024;16(23):3303. doi:10.3390/polym16233303
35. Mndlovu H, Kumar P, du Toit LC, Choonara YE. A review of biomaterial degradation assessment approaches employed in the biomedical field. *Npj Mater Degrad.* 2024;8(1):66. doi:10.1038/s41529-024-00487-1
36. Liu YY, Echeverry-Rendón M. 3D-printed biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering: An overview, current stage and future perspectives. *Next Materials.* 2025;8:100647. doi:10.1016/j.nxmte.2025.100647

37. Wong SK, Yee MMF, Chin KY, Ima-Nirwana S. A Review of the Application of Natural and Synthetic Scaffolds in Bone Regeneration. *J Funct Biomater*. 2023;14(5):286. doi:10.3390/JFB14050286
38. Suamte L, Tirkey A, Babu PJ. Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications. *Smart Mater Med*. 2023;4:243-256. doi:10.1016/J.SMAIM.2022.09.005
39. He Q, Feng T, Xie Y, Swamiappan S, Zhou Y, Zhou Y, Zhou H, Peng X. Recent Advances in the Development and Application of Cell-Loaded Collagen Scaffolds. *Int J Mol Sci*. 2025;26(9):4009. doi:10.3390/IJMS26094009
40. Amirrah IN, Lokanathan Y, Zulkiflee I, Wee MFMR, Motta A, Fauzi MB. A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines*. 2022;10(9):2307. doi:10.3390/BIMEDICINES10092307
41. Mizukami Y, Moriya A, Takahashi Y, Shimizu K, Konishi S, Takakura Y, Nishikawa M. Incorporation of Gelatin Microspheres into HepG2 Human Hepatocyte Spheroids for Functional Improvement through Improved Oxygen Supply to Spheroid Core. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(8):1220-1225. doi:10.1248/BPB.B20-00141
42. Souto-Lopes M, Grenho L, Manrique Y, Dias MM, Lopes JCB, Fernandes MH, Monteiro FJ, Salgado CL. Bone regeneration driven by a nano-hydroxyapatite/chitosan composite bioaerogel for periodontal regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12:1355950. doi:10.3389/FBIOE.2024.1355950/BIBTEX
43. Guo B, Ma PX. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci China Chem*. 2014;57(4):490. doi:10.1007/S11426-014-5086-Y
44. Janoušková O. Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering. *Physiol Res*. 2018;67(Suppl 2):s335-s348. doi:10.33549/PHYSIOLRES.933983
45. Chen Z, Zhang X, Fu Y, Jin Y, Weng Y, Bian X, Chen X. Degradation Behaviors of Polylactic Acid, Polyglycolic Acid, and Their Copolymer Films in Simulated Marine Environments. *Polymers (Basel)*. 2024;16(13):1765. doi:10.3390/POLYM16131765/S1
46. Pourtezari M, Dortaj H, Hashemibeni B, Yadegari M, Shahedi A. An Overview of the Application of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Scaffold for Drug Delivery in Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Medical Laboratory*. 2021;15(3):3640-3659. doi:10.18502/IJML.V8I2.6270
47. Meng Z, He J, Cai Z, Wang F, Zhang J, Wang L, Ling R, Li D. Design and additive manufacturing of flexible polycaprolactone scaffolds with highly-tunable mechanical properties for soft tissue engineering. *Mater Des*. 2020;189:108508. doi:10.1016/J.MATDES.2020.108508
48. Chen M, Jiang R, Deng N, Zhao X, Li X, Guo C. Natural polymer-based scaffolds for soft tissue repair. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:954699. doi:10.3389/FBIOE.2022.954699/BIBTEX
49. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2021;15(9):747-762. doi:10.1002/TERM.3225

50. Lopes S V., Collins MN, Reis RL, Oliveira JM, Silva-Correia J. Vascularization Approaches in Tissue Engineering: Recent Developments on Evaluation Tests and Modulation. *ACS Appl Bio Mater.* 2021;4(4):2941-2956. doi:10.1021/acsabm.1c00051
51. Singh S, Wu BM, Dunn JCY. Enhancing Angiogenesis Alleviates Hypoxia and Improves Engraftment of Enteric Cells in Polycaprolactone Scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;7(12):925. doi:10.1002/TERM.1484
52. Simón-Yarza T, Formiga FR, Tamayo E, Pelacho B, Prosper F, Blanco-Prieto MJ. Vascular Endothelial Growth Factor-Delivery Systems for Cardiac Repair: An Overview. *Theranostics.* 2012;2(6):541. doi:10.7150/THNO.3682
53. Li Y, Liu Y, Bai H, Li R, Shang J, Zhu Z, Zhu L, Zhu C, Che Z, Wang J, Liu H, Huang L. Sustained Release of VEGF to Promote Angiogenesis and Osteointegration of Three-Dimensional Printed Biomimetic Titanium Alloy Implants. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:757767. doi:10.3389/fbioe.2021.757767
54. Sleem B, Nassereldine R, Ghazi V, Eid K, Hemdanieh M, Nassereldine M. From Bone To Blood Flow: Tissue Engineering In Orthopedics - A Narrative Review. *Orthop Rev (Pavia).* 2025;17:132223. doi:10.52965/001c.132223
55. Weng T, Yang M, Zhang W, Jin R, Xia S, Zhang M, Wu P, He X, Han C, Zhao X, Wang X. Dual gene-activated dermal scaffolds regulate angiogenesis and wound healing by mediating the coexpression of VEGF and angiopoietin-1. *Bioeng Transl Med.* 2023;8(5):e10562. doi:10.1002/BTM2.10562
56. Prodanov L, Jindal R, Bale SS, Hegde M, Mccarty WJ, Golberg I, Bhushan A, Yarmush ML, Usta OB. Long Term Maintenance of a Microfluidic 3-D Human Liver Sinusoid. *Biotechnol Bioeng.* 2015;113(1):241. doi:10.1002/BIT.25700
57. Zhang H, Zhang Q, Du J, Zhu T, Chen D, Liu F, Dong Y. Nanofibers with homogeneous heparin distribution and protracted release profile for vascular tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1187914. doi:10.3389/fbioe.2023.1187914
58. Lv N, Zhou Z, Hou M, Hong L, Li H, Qian Z, Gao X, Liu M. Research progress of vascularization strategies of tissue-engineered bone. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1291969. doi:10.3389/fbioe.2023.1291969
59. Wang Y, Liu M, Zhang W, Liu H, Jin F, Mao S, Han C, Wang X. Mechanical strategies to promote vascularization for tissue engineering and regenerative medicine. *Burns Trauma.* 2024;12:39. doi:10.1093/BURNST/TKAE039
60. Xue C, Zhang T, Xie X, Zhang Q, Zhang S, Zhu B, Lin Y, Cai X. Substrate stiffness regulates arterial-venous differentiation of endothelial progenitor cells via the Ras/Mek pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(10):1799-1808. doi:10.1016/J.BBAMCR.2017.07.006
61. Zhou S wen, Wang J, Chen S yu, Ren K feng, Wang Y xiang, Ji J. The substrate stiffness at physiological range significantly modulates vascular cell behavior. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2022;214:112483. doi:10.1016/J.COLSURFB.2022.112483
62. Chen G, Creason S, Chen N, Kirkham A, Zhen L, Zhang S, Wu K, Ratner B. 3D-Printed Precision Porous Scaffolds Promote Healing In Vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2025;113(9):e37981. doi:10.1002/JBM.A.37981

63. Lieberthal TJ, Sahakyants T, Szabo-Wexler NR, Hancock MJ, Spann AP, Oliver MS, Grindy SC, Neville CM, Vacanti JP. Implantable 3D printed hydrogels with intrinsic channels for liver tissue engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121(47):e2403322121. doi:10.1073/pnas.2403322121
64. Kress S, Baur J, Otto C, Burkard N, Braspenning J, Walles H, Nickel J, Metzger M. Evaluation of a Miniaturized Biologically Vascularized Scaffold in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2018;8(1):4719. doi:10.1038/s41598-018-22688-w
65. Liu J, Chen G, Xu H, Hu K, Sun J, Liu M, Zhang F, Gu N. Pre-vascularization in fibrin Gel/PLGA microsphere scaffolds designed for bone regeneration. *NPG Asia Mater*. 2018;10(8):827-839. doi:10.1038/s41427-018-0076-8
66. Summer S, Rossmanith E, Pasztorek M, Fiedler C, Gröger M, Rauscher S, Weber V, Fischer MB. Mesenchymal stem cells support human vascular endothelial cells to form vascular sprouts in human platelet lysate-based matrices. *PLoS One*. 2022;17(12):e0278895. doi:10.1371/journal.pone.0278895
67. Acimovic I, Chochola V, Herrera JL, Hampl A, Jaros J. 3D endothelial network formation in hydrogels improved by stromal cells and specific growth factors. *Sci Rep*. 2025;15(1):41524. doi:10.1038/s41598-025-25381-x
68. Später T, Ampofo E, Menger MD, Laschke MW. Combining Vascularization Strategies in Tissue Engineering: The Faster Road to Success? *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:592095. doi:10.3389/fbioe.2020.592095
69. Langan LM, Dodd NJF, Owen SF, Purcell WM, Jackson SK, Jha AN. Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149492. doi:10.1371/journal.pone.0149492.
70. Nayak P, Bentivoglio V, Varani M, Signore A. Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. *Cancers (Basel)*. 2023;15(19):4846. doi:10.3390/CANCERS15194846
71. Yoon JK. Advanced 3D Cell Culture Platform for Tissue Engineering. *Tissue Eng Regen Med*. 2023;20(4):519. doi:10.1007/S13770-023-00562-9
72. Wu X, Su J, Wei J, Jiang N, Ge X. Recent Advances in Three-Dimensional Stem Cell Culture Systems and Applications. *Stem Cells Int*. 2021;2021(1):9477332. doi:10.1155/2021/9477332
73. Xie R, Pal V, Yu Y, Lu X, Gao M, Liang S, Huang M, Peng W, Ozbolat IT. A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications. *Biomaterials*. 2024;304:122408. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2023.122408
74. de Barros NR, Harb SV, da Silva Horinouchi CD, Tofani LB, dos Santos DM, Elias GB, Velho JCM, de Aguiar AC, Sant'Ana M, Figueira ACM. Advances in 3D Bioprinting and Microfluidics for Organ-on-a-Chip Platforms. *Polymers (Basel)*. 2025;17(22):3078. doi:10.3390/POLYM17223078
75. van den Nieuwenhof DWA, Moroni L, Chou J, Hinkelbein J. Cellular response in three-dimensional spheroids and tissues exposed to real and simulated microgravity: a narrative review. *NPJ Microgravity*. 2024;10(1):102-. doi:10.1038/s41526-024-00442-z

76. Nair DG, Weiskirchen R. Recent Advances in Liver Tissue Engineering as an Alternative and Complementary Approach for Liver Transplantation. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;46(1):262-278. doi:10.3390/CIMB46010018
77. Paris J, Henderson NC. Liver zonation, revisited. *Hepatology.* 2022;76(4):1219-1230. doi:10.1002/HEP.32408
78. Chan SC, Liu CL, Lo CM, Lam BK, Lee EW, Wong Y, Fan ST. Estimating liver weight of adults by body weight and gender. *World J Gastroenterol.* 2006;12(14):2217. doi:10.3748/WJG.V12.I4.2217
79. Rocheleau B, Éthier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: Its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999;277(5):G1000-7. doi:10.1152/ajpgi.1999.277.5.G1000
80. Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, Marongiu F, Blake W, Davila J, Strom SC. The History and Use of Human Hepatocytes for the Study and Treatment of Liver Metabolic Diseases. *Curr Protoc Toxicol.* 2014;62:14.12.1-23. doi:10.1002/0471140856.TX1412S62
81. Kamm DR, Mccommis KS, Forsythe I, Chondronikola M, Kamm DR, Mccommis KS. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *J Physiol.* 2022;600(8):1825-1837. doi:10.1113/JP281061
82. Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B, Thummel KE, Schuetz EG, Zhong XB, Tien YC, Jeong H, Pan X, Shireman LM, Tay-Sontheimer J, Lin YS. Interindividual Variability in Cytochrome P450–Mediated Drug Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition.* 2016;44(3):343-351. doi:10.1124/DMD.115.067900
83. Ma X, Huang T, Chen X, Li Q, Liao M, Fu L, Huang J, Yuan K, Wang Z, Zeng Y. Molecular mechanisms in liver repair and regeneration: from physiology to therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):63. doi:10.1038/s41392-024-02104-8
84. Li Y, Wu Q, Wang Y, Weng C, He Y, Gao M, Yang G, Li L, Chen F, Shi Y, Amiot BP, Nyberg SL, Bao J, Bu H. Novel spheroid reservoir bioartificial liver improves survival of nonhuman primates in a toxin-induced model of acute liver failure. *Theranostics.* 2018;8(20):5562-5574. doi:10.7150/THNO.26540
85. Erro E, Brookshaw T, Fuller B, Chandel S, Mendonca da Silva J, Zotova E, Chalmers SA, Watt A, Selden C. Evaluation of a single-use bioartificial liver (BAL) biocartridge consisting of cryopreservable alginate encapsulated liver cell spheroids as a component of HepatiCanTM, a novel bioartificial liver device. *Front Bioeng Biotechnol.* 2025;13:1572254. doi:10.3389/FBIOE.2025.1572254/BIBTEX
86. Jiang HL, Kim YK, Cho KH, Jang YC, Choi YJ, Chung JH, Cho CS. Roles of Spheroid Formation of Hepatocytes in Liver Tissue Engineering. *Int J Stem Cells.* 2010;3(2):69-73. doi:10.15283/IJSC.2010.3.2.69
87. Inamori M, Mizumoto H, Kajiwara T. An Approach for Formation of Vascularized Liver Tissue by Endothelial Cell–Covered Hepatocyte Spheroid Integration. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(8):2029-2037. doi:10.1089/TEN.TEA.2008.0403
88. Frye M, Stritt S, Ortsäter H, Vasquez MH, Kaakinen M, Vicente A, Wiseman J, Eklund L, Martínez-Torrecuadrada JL, Vestweber D, Mäkinen T. Ephrinb2-ephb4 signalling provides

- rho-mediated homeostatic control of lymphatic endothelial cell junction integrity. *Elife*. 2020;9:1-26. doi:10.7554/ELIFE.57732
89. Kizawa H, Nagao E, Shimamura M, Zhang G, Torii H. Scaffold-free 3D bio-printed human liver tissue stably maintains metabolic functions useful for drug discovery. *Biochem Biophys Rep*. 2017;10:186-191. doi:10.1016/J.BBREP.2017.04.004
 90. Arai K, Murata D, Takao S, Verissimo AR, Nakayama K. Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. *PLoS One*. 2020;15(4):e0230428. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0230428
 91. Wu Y, Wenger A, Golzar H, Tang X (Shirley). 3D bioprinting of bicellular liver lobule-mimetic structures via microextrusion of cellulose nanocrystal-incorporated shear-thinning bioink. *Sci Rep*. 2020;10(1):20648-. doi:10.1038/s41598-020-77146-3
 92. Ijima H, Fukuda Y, Uehara MK, Shafiq M, Wu F, Cho J, Sakai Y, Miyata T, Yamao T, Nakao Y, Kuroda Y, Motomura T, Yamashita YI, Baba H. Decellularized Mouse Liver as a Small-Scale Scaffold for the Creation of a Miniaturized Human Liver. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 2023;56(1):2204899. doi:10.1080/00219592.2023.2204899
 93. Ebrahim N, Badr OAM, Yousef MM, Hassouna A, Sabry D, Farid AS, Mostafa O, Al Saihati HA, Seleem Y, Aziz EA El, Khalil AH, Nawar A, Shoulah AA, Aljasir M, Mohamed AZ, El-Sherbiny M, Elsherbiny NM, Eladl MA, Forsyth NR, Salim RF. Functional Recellularization of Acellular Rat Liver Scaffold by Induced Pluripotent Stem Cells: Molecular Evidence for Wnt/B-Catenin Upregulation. *Cells*. 2021;10(11):2819. doi:10.3390/CELLS10112819
 94. Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A, Urbani L, Vinh Luong T, Al-Akkad W, Longato L, Brown D, Maghsoudlou P, Dhillon AP, Fuller B, Davidson B, Moore K, Dhar D, De Coppi P, Malago M, Pinzani M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep*. 2015;5(1):13079-. doi:10.1038/srep13079
 95. Carolina E, Kuse Y, Okumura A, Aoshima K, Tadokoro T, Matsumoto S, Kanai E, Okumura T, Kasai T, Yamabe S, Nishikawa Y, Yamaguchi K, Furukawa Y, Tanimizu N, Taniguchi H. Generation of human iPSC-derived 3D bile duct within liver organoid by incorporating human iPSC-derived blood vessel. *Nat Commun*. 2024;15(1):7424-. doi:10.1038/s41467-024-51487-3
 96. Saiki N, Nio Y, Yoneyama Y, Kawamura S, Iwasawa K, Kawakami E, Araki K, Fukumura J, Sakairi T, Kono T, Ohmura R, Koido M, Funata M, Thompson WL, Cruz-Encarnacion P, Chen YW, Takebe T. Self-organization of sinusoidal vessels in pluripotent stem cell-derived human liver bud organoids. *Nat Biomed Eng*. 2025;9(11):1869-1885. doi:10.1038/s41551-025-01416-6
 97. Mohammed A, Saeed A, Elshaer A, Melaibari AA, Memić A, Hassanin H, Essa K. Fabrication and Characterization of Oxygen-Generating Polylactic Acid/Calcium Peroxide Composite Filaments for Bone Scaffolds. *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):627. doi:10.3390/PH16040627
 98. Kim K, Han SH, Oh J, Bayarsaikhan D, Kim MS, Kim D, Okano T, Lee B. Engineering Multilayered Hepatic Cell Sheet Model Using Oxygen-Supplying MeHA/CPO Hydrogel. *Bioengineering*. 2025;12(10):1132. doi:10.3390/BIOENGINEERING12101132

99. Shang Y, Shen H, Wang L, Gao H, Liu Y, Jia M, Shi H, Li G. Calcium peroxide-loaded ovalbumin scaffolds with sustained oxygen release capacity for regulating the growth behavior of nerve cells and endothelial cell. *Biomaterials Advances*. 2026;180:214563. doi:10.1016/J.BIOADV.2025.214563
100. Haixia X, Peng Z, Jiezhao L, Huiling G, Xie C, Yihan W, Yanglei J, Li J, Wang C, Wenning X, Lixin Z, Liu C. 3D-Printed Magnesium Peroxide-Incorporated Scaffolds with Sustained Oxygen Release and Enhanced Photothermal Performance for Osteosarcoma Multimodal Treatments. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024;16(8):9626-9639. doi:10.1021/acsami.3c10807
101. Peng Z, Wang C, Liu C, Xu H, Wang Y, Liu Y, Hu Y, Li J, Jin Y, Jiang C, Liu L, Guo J, Zhu L. 3D printed polycaprolactone/beta-tricalcium phosphate/magnesium peroxide oxygen releasing scaffold enhances osteogenesis and implanted BMSCs survival in repairing the large bone defect. *J Mater Chem B*. 2021;9(28):5698-5710. doi:10.1039/D1TB00178G
102. Kengla C; , Lee SJ; , Yoo JJ; , Zhu X; , Murphy S V, Porta G Della, Ke D, Kengla C, Lee SJ, Yoo JJ, Zhu X, Murphy SV. Release Kinetics and In Vitro Characterization of Sodium Percarbonate and Calcium Peroxide to Oxygenate Bioprinted Tissue Models. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6842. doi:10.3390/IJMS23126842
103. Zehra M, Zubairi W, Hasan A, Butt H, Ramzan A, Azam M, Mehmood A, Falahati M, Anwar Chaudhry A, Ur Rehman I, Yar M. Oxygen Generating Polymeric Nano Fibers That Stimulate Angiogenesis and Show Efficient Wound Healing in a Diabetic Wound Model. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:3511-3522. doi:10.2147/IJN.S248911
104. Hoogendijk E, Swider E, Staal AHJ, White PB, Van Riessen NK, Glaßer G, Lieberwirth I, Musyanovych A, Serra CA, Srinivas M, Koshkina O. Continuous-Flow Production of Perfluorocarbon-Loaded Polymeric Nanoparticles: From the Bench to Clinic. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(44):49335-49345. doi:10.1021/acsami.0c12020
105. Chin K, Khattak SF, Bhatia SR, Roberts SC. Hydrogel-Perfluorocarbon Composite Scaffold Promotes Oxygen Transport to Immobilized Cells. *Biotechnol Prog*. 2008;24(2):358-366. doi:10.1021/BP070160F
106. Kimelman-Bleich N, Pelled G, Sheyn D, Kallai I, Zilberman Y, Mizrahi O, Tal Y, Tawackoli W, Gazit Z, Gazit D. The use of a synthetic oxygen carrier-enriched hydrogel to enhance mesenchymal stem cell-based bone formation in vivo. *Biomaterials*. 2009;30(27):4639-4648. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.05.027
107. Halpin-Veszeleiova K, Mallouh MP, Williamson LM, Apro AC, Botticello-Romero NR, Bahr C, Shin M, Ward KM, Rosenberg L, Ritov VB, Sitkovsky M V., Jackson EK, Spiess BD, Hatfield SM. Oxygen-carrying nanoemulsions and respiratory hyperoxia eliminate tumor hypoxia-induced immunosuppression. *JCI Insight*. 2025;10(6). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.174675
108. Huang Y, Fu Z, Wang H, Liu Z, Gao M, Luo Y, Zhang M, Wang J, Ni D. Calcium Peroxide-Based Hydrogels Enable Biphasic Release of Hydrogen Peroxide for Infected Wound Healing. *Advanced Science*. 2024;11(40):2404813. doi:10.1002/ADVS.202404813
109. Suvarnapathaki S, Wu X, Zhang T, Nguyen MA, Gouloupoulos AA, Wu B, Camci-Unal G. Oxygen generating scaffolds regenerate critical size bone defects. *Bioact Mater*. 2022;13:64-81. doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2021.11.002

110. Suvarnapathaki S, Nguyen A, Gouloupoulos A, Camci-Unal G. Oxygen-Generating Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023;9(1):409-426. doi:10.1021/acsbiomaterials.2c00853
111. Moris H, Ghaee A, Sharifloo MM, Hosseini I, Nouri-Felekori M. Gelatin- zirconium based metal-organic framework (MOF 801) nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram Int*. 2024;50(13):23986-23998. doi:10.1016/J.CERAMINT.2024.04.129
112. Li C, He X, Li Q, Lv M, Shen J, Jin L, He D. A photothermal-response oxygen release platform based on a hydrogel for accelerating wound healing. *NPG Asia Mater*. 2023;15(1):3. doi:10.1038/s41427-022-00456-7
113. Molley TG, Jiang S, Ong L, Kopecky C, Ranaweera CD, Jalandhra GK, Milton L, Kardia E, Zhou Z, Rnjak-Kovacina J, Waters SA, Toh YC, Kilian KA. Gas-modulating microcapsules for spatiotemporal control of hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(16):e2217557120. doi:10.1073/pnas.2217557120
114. Okudaira T, Yabuta R, Mizumoto H, Kajiwarra T. Fabrication of a fiber-type hepatic tissue by bottom-up method using multilayer spheroids. *J Biosci Bioeng*. 2017;123(6):739-747. doi:10.1016/J.JBIOSC.2017.01.002
115. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *The Scientific World Journal*. 2013;2013(1):632972. doi:10.1155/2013/632972
116. Fox LE, Marsh DC, Southard JH, Belzer FO. The effect of pH on the viability of hypothermically stored rat hepatocytes. *Cryobiology*. 1989;26(2):186-190. doi:10.1016/0011-2240(89)90050-3
117. Kruse LD, Holte C, Zapotoczny B, Struck EC, Schürstedt J, Hübner W, Huser T, Szafranska K. Hydrogen peroxide damage to rat liver sinusoidal endothelial cells is prevented by n-acetyl-cysteine but not GSH. *Hepatol Commun*. 2025;9(2):e0617. doi:10.1097/HC9.0000000000000617
118. Ma X, Han S, Zhang W, Fan YJ, Liu MN, Liu AY, Liu BR. Protection of cultured human hepatocytes from hydrogen peroxideinduced apoptosis by relaxin3. *Mol Med Rep*. 2015;11(2):1228-1234. doi:10.3892/MMR.2014.2842/HTML
119. Seglen PO. Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells. *Methods Cell Biol*. 1976;13(C):29-83. doi:10.1016/S0091-679X(08)61797-5
120. Place TL, Domann FE, Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med*. 2017;113:311-322. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.10.003
121. Kidambi S, Yarmush RS, Novik E, Chao P, Yarmush ML, Nahmias Y. Oxygen-mediated enhancement of primary hepatocyte metabolism, functional polarization, gene expression, and drug clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15714-15719. doi:10.1073/pnas.0906820106
122. Phromsopha T, Baimark Y. Preparation of Starch/Gelatin Blend Microparticles by a Water-in-Oil Emulsion Method for Controlled Release Drug Delivery. *Int J Biomater*. 2014;2014(1):829490. doi:10.1155/2014/829490

123. Zhang M, Kiratiwongwan T, Shen W. Oxygen-releasing polycaprolactone/calcium peroxide composite microspheres. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(3):1097-1106. doi:10.1002/JBM.B.34461
124. Wang J, Huang D, Ren H, Zhao Y. Biomimetic Vascularized iPSC-Hepatocyte Spheroids for Liver Regeneration. *Adv Sci (Weinh)*. 2025;12(6). doi:10.1002/ADVS.202405662
125. Carpenter R, Oh HJ, Ham IH, Kim D, Hur H, Lee J. Scaffold-Assisted Ectopic Transplantation of Internal Organs and Patient-Derived Tumors. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019;5(12):6667-6678. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00978
126. Deward AD, Komori J, Lagasse E. Ectopic transplantation sites for cell-based therapy. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(2):169-174. doi:10.1097/MOT.0000000000000050
127. Chen AA, Thomas DK, Ong LL, Schwartz RE, Golub TR, Bhatia SN. Humanized mice with ectopic artificial liver tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(29):11842-11847. doi:10.1073/pnas.1101791108
128. Belair DG, Khalil AS, Miller MJ, Murphy WL. Serum-dependence of affinity-mediated VEGF release from biomimetic microspheres. *Biomacromolecules*. 2014;15(6):2038-2048. doi:10.1021/bm500177c
129. Shi M, Gao Y, Lee L, Song T, Zhou J, Yan L, Li Y. Adaptive Gelatin Microspheres Enhanced Stem Cell Delivery and Integration With Diabetic Wounds to Activate Skin Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:813805. doi:10.3389/FBIOE.2022.813805/BIBTEX

謝辞

博士論文の執筆を終え、ここに至りました。ここで、これまで支えてくださった多くの方々に、心より感謝の意を表したいと思います。本謝辞は、私の研究生生活を支えてくださった皆様への深い感謝の気持ちを綴るものです。

まず、私の指導教員である九州大学大学院工学研究院化学工学部門 水本博 准教授に、心からの感謝を申し上げます。水本先生には、博士課程の初めから一貫して温かく、厳しくご指導いただきました。研究の方向性を見失いかけた時も、常に大局的な視野をお持ちになり、私に新たな視点を提供してくださいました。実験の壁にぶつかっても、先生の的確なアドバイスと励ましの言葉が、私を前進させてくれました。忙しい中でも、私の進捗を細やかに把握し、論文執筆の際には夜遅くまで詳細なフィードバックをくださった先生の姿勢は、私の研究者としての在り方を形成するものでした。この論文が、先生のご指導の賜物であることを、強く実感しております。本当にありがとうございました。

次に、本論文の審査において多大なご協力を賜りました九州大学大学院工学研究院機械工学部門 工藤奨 教授、化学工学部門 井嶋博之 教授に心より感謝申し上げます。厳正かつ建設的なご指摘と、研究の本質を見極める鋭いご意見は、本論文の完成度を飛躍的に向上させるものでした。限られた時間の中で詳細なレビューをいただき、多くの改善点を明確に示してくださったおかげで、より高い水準の論文を仕上げることができました。先生方のご指導に深く感謝いたします。

さらに、九州大学大学院工学研究院化学工学部門 上平正道 教授、河邊佳典 准教授、白木川奈菜 助教、園井理恵 助教にも厚く御礼申し上げます。化学工学分野における専門的知見と、研究に対する温かいご支援をいただきました。合同セミナーや研究交流の場でいただいた貴重なアドバイスは、私の研究視野を大きく広げ、技術的課題解決に多大な貢献をしました。先生方のご厚情に、心より感謝申し上げます。

また、九州大学 梶原稔尚 名誉教授には特別な感謝を申し上げます。長年にわたり化学工学分野を牽引されてきた先生から、研究の意義や将来展望について深い洞察を賜りました。忙しい中、論文原稿を拝読いただき、経験に裏打ちされたご助言をいただきましたことは、私にとって生涯の財産です。先生のご指導に、心から御礼申し上げます。

加えて、九州大学大学院工学研究院化学工学部門 名嘉山祥也 准教授には心より感謝申し上げます。異分野の専門知識に基づく貴重なご助言をいただき、本研究の異学科間アプローチを深化させることができました。先生の広範な学際的視点を活かしたご指摘は、私の研究設計とデータ解釈を飛躍的に向上させるものでした。本研究の学際的成功は、先生のご支援なしにはあり得ませんでした。

次に、研究室の後輩たちに感謝いたします。小林悠真氏、大坪孝太朗氏、井上淳太氏、鎌田稜太郎氏、自見壮二郎（本大学大学院修士課程 2 年）、高橋諒介氏、高星宇氏、趙英喆氏（本大学大学院修士課程 1 年）、山口琉斗氏、高德勇太朗氏（本大学 4 年）とは、日々の議

論を通じて互いに刺激を与え合い、研究の喜びを分かち合いました。深夜の研究室でコーヒーを片手に語り明かした時間は、かけがえのない思い出です。後輩たちが家族のような温かい雰囲気を作り出してくれたおかげで、厳しい研究生活が乗り越えられました。ありがとうございます。

また、共同研究や技術的な支援をいただいた化学工学部門の諸先生方、大学院の同級生の皆様にも深く感謝いたします。学会での活発な議論や、合同ミーティングでの貴重な意見交換は、私の視野を広げ、研究の質を高めるものでした。特に、分析機器の使用を許可してくださった先生方や、データ解析のアドバイスをくださった友人たちのおかげで、研究を円滑に進めることができました。大学内のネットワークが、私の研究を支える基盤となりました。

さらに、研究に直接携わっていない家族や友人たちにも、心より感謝を捧げます。両親をはじめとする家族は、私の研究生活を遠くから見守り、常に励ましの言葉を送ってくれました。友人たちも、研究以外の時間を提供し、心のバランスを保つのに欠かせませんでした。休日のささやかな集まりや、電話での愚痴聞き役となってくれた皆さんのおかげで、精神的に安定を保てました。この論文は、家族と友人の支えなしには完成しませんでした。

最後に、私自身の成長を振り返ります。博士課程に入学した当初は、不安とプレッシャーに押しつぶされそうになりました。しかし、水本先生や周囲の方々の支えにより、少しずつ自信を築き、研究者としての自覚を持つことができました。この過程で学んだ忍耐力、創造性、協調性は、将来のキャリアに活きる財産です。

これまでお世話になった全ての方々に、衷心より御礼申し上げます。本論文が、少しでも皆様のご期待に応えられるものであることを祈ります。将来的に、恩返しができる研究者となれるよう、精進してまいります。ありがとうございました。