

平成16年09月13日

氏名: YE SANG HO



21世紀 COE プログラム

拠点: 大学院工学系研究科

応用化学専攻、化学システム工学専攻、

化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成16年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	エ サン ホ YE SANG HO	生年 月 日
所属機関名	東京大学大学院 工学系研究科 マテリアル工学専攻	
所在地	〒305-0006 茨城県つくば市天王台2-1-1ノ矢宿舎32-502号 電話 090-9370-7313	
申請時点での 学年	博士課程 2年	
研究題目	リン脂質ポリマーを導入したセルロースアセテート中空糸膜の特性評価および 新規の高機能医療デバイスへの応用	
指導教官の所属・氏名	石原一彦	



## I 研究の成果 (1000字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

MPCポリマーを修飾したセルロースアセテート中空糸膜の作製と新規医療デバイスへの応用- 高性能ハイブリッド型人工肝臓の設計と評価

## 1. 緒言

肝臓には、約 2,500億の肝細胞 (Hepatocyte)から構成されており、500種類以上の代謝反応を行なっている生体化学工場である。このような肝臓の機能を人工的な装置で補うことは極めて困難であり、現在では生体の肝細胞を利用した代謝型へと発展し、肝細胞と足場となる人工物を組み合わせたハイブリッド型人工肝臓の開発が最も活発に研究され、その治療効果を実証しつつある。しかし、現在開発されているハイブリッド型人工肝臓を用いた海外の臨床実験においても、十分な肝機能を補助できないことや、肝移植までの短期的治療程度であり、患者の肝臓を強力的に再生へと導き救命するものには至っていない。従って、組織工学や、分子生物学的機能を付与した材料開発、化学工学的設計を組み合わせ、より長期間の肝機能補助が可能で、病因を取り除くとともに患者肝の再生を強力的に誘発できるより高性能の人工肝臓の開発が必要がある。

セルロースアセテート(CA)中空糸膜(HFM)は現在医療用分離膜として血液透析、ろ過膜などの血液浄化治療をはじめ、バイオ人工肝臓、腎臓などの免疫隔離膜としても幅広く使用されている。しかしながら、CA中空糸膜は使用されている医療用合成膜と同様に生体適合性および血液適合性を満たさないことから血液浄化治療およびバイオ人工臓器の免疫隔離膜などとして応用する際には抗血栓剤の使用が欠かせず、膜の性能低下や生体および細胞への非毒性の面でも満足できる材料とは言えない。

本研究では生体膜と類似する分子構造を有し、優れた生体適合性を発現するリン脂質ポリマー (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) コポリマー)をブレンドまたはコーティングしたCA中空糸膜を作製し、これらの中空糸膜を用いた血漿分離膜および人工肝臓バイオリアクターを作製することで、生体適合性と組織適合性を有する新規な高性能人工肝臓創製を目的とする。

## 2. 中空糸膜の設計

これまでにCAにMPCポリマー (PMB30およびPMB80)をブレンドまたはコーティングしたCA/PMB30ブレンドまたはCA/PMB80コーティング中空糸膜(HFM)を作製し、血液ろ過膜としての評価を行なった結果、CA/PMB30ブレンドまたはCA/PMB80コーティングHFMは、タンパク質吸着が少なく、膜の透過性の低下がほとんど起こらない性能持続性をもっていることが証明された。さらに、CA/PMB30ブレンドHFMはCA膜より多孔質であり、優れた血液適

合性および性能持続性を有する高性能血漿分離HFMとして応用できると期待された。

また、PMB30とPMB80をブレンドおよびコーティング法により、内部表面と外部表面に存在するMPC ポリマーの量が異なるCA/PMB30-80 HFMを作製し、そのHFM内部での肝細胞を培養実験を行なった。

### 3. CA/PMB30-80 HFM内部表面での肝細胞培養

作製されたCAおよびCA/PMB30-80HFMは、内部表面上にRLC-18（マウスの正常肝細胞）および HepG2（人の肝芽腫細胞）を培養し、細胞の接着、増殖を観察し評価した。

まず、作製されたHFMを固定したテストモジュールを作製し、蒸留水500mLを入れた滅菌用瓶のなかに入れ、オートクレーブ（120°C、30分）で滅菌した後、細胞外マトリックスとしてフィブロネクチン（20μg/mL）を中空糸膜内部に注入し、インキュベーター（5%CO<sub>2</sub>、37°C）内で一晚吸着させた。その後、前もって培養しておいたRLC-18（D-MEM(5%FBS)）および HepG2（E-MEM（10% FBS)）の濃縮液を中空糸膜の内部に注入（モジュールを90°ずつ回転しながら、2時間おき4回注入し、37°Cインキュベーター内に放置）することにより、細胞を中空糸膜の内部に均一にまいた。細胞がまかれたHFMモジュールと培地リザーバをインキュベーター（5%CO<sub>2</sub>、37°C）内に置き、培地が一方向的に流れ中空糸膜の内部に少しずつ連続的に供給（1mL/hour）されるように設置し、一定期間細胞培養を行なった。細胞接着様子や培養状態および細胞付着数は、SEM観察およびLDHアッセイで確認した。

### 4. 結論および今後の予定

いままで中空糸内部にRLC-18および HepG2細胞をまいた後、付着している細胞をSEMで観察した結果、CA/PMB30-80膜の内部表面ではCA膜上より付着している細胞の変形が少なく、ほとんどの細胞が球状を維持していることが観察された(Figure 1)。また、CA/PMB30-80膜では球状に接着した細胞がお互いに密集し、数百個の肝細胞が凝集した球状組織体（スフェロイド）を形成し、3次元的に成長することが確認された。さらに、RLC-18細胞を1週間培養したあと、SEMで観察したCA/PMB30-80HFM内部では、ほとんどのRLC-18細胞がお互いに密着帯(tight junction)を形成し、大きなスフェロイドを形成していることが確認された。このスフェロイド内の細胞は球状を維持しており、お互いにギャップジャクションを形成していることから微小胆管なども再構築されていると考えられ、肝細胞は高い機能を長期間維持できる状態で培養されていることがわかった(Figure 2)。

これらの結果により、CA/PMB30-80HFM内部表面には肝細胞がゆっくり、マイルドに接着することで、その球状を維持しながら、肝細胞が密集したスフェロイドを形成・成長する特徴をみせ、高い肝機能を発現・維持できる人工肝臓バイオリアクターが作製できると期待された。今後は作製されたバイオリアクターの性能評価を行なう予定である。

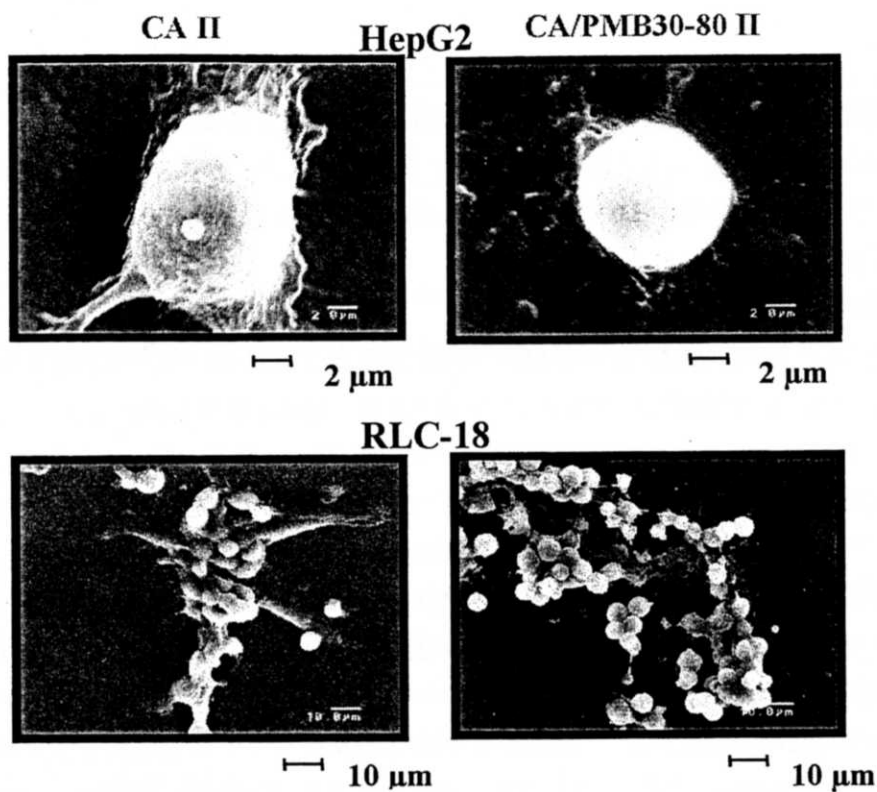


Figure 1. Hep G2 and RLC-18 Cells at 8 Hours After Cell Seeding ( $2 \times 10^6$  cells/mL) on the inner surface of CA and CA/PMB30-80 HFM.

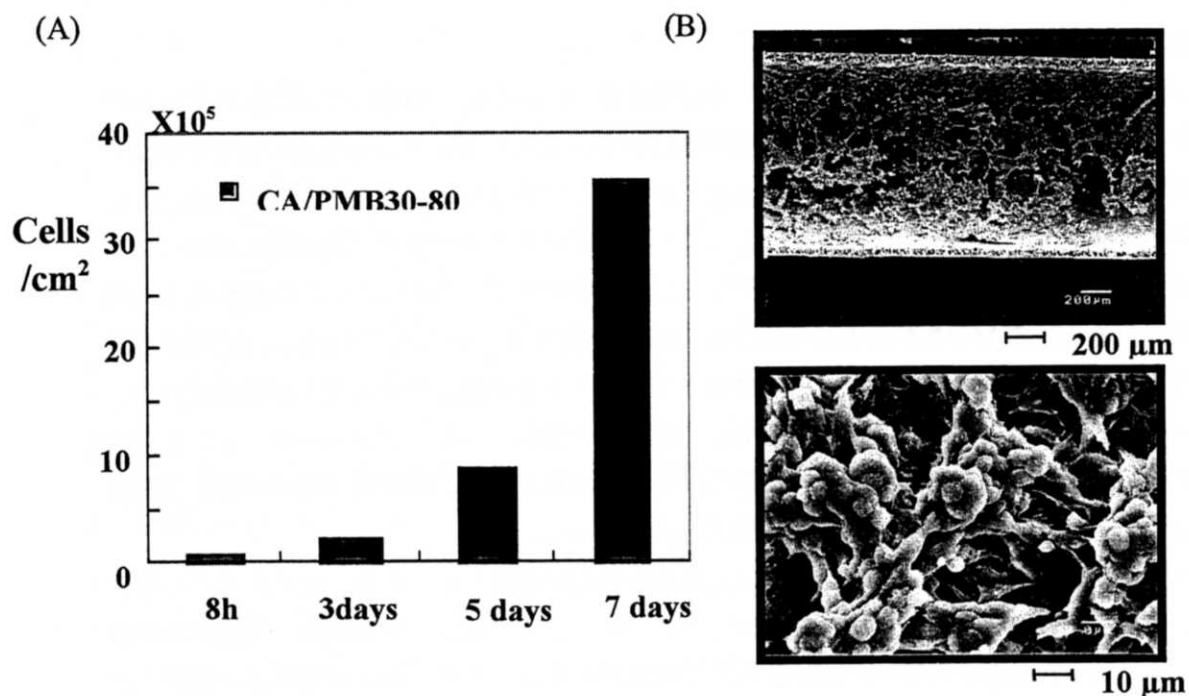


Figure 2. (A) Number of RLC-18 cells on the inner surface of CA/PMB30-80 hollow fiber membranes after cell seeding ( $5 \times 10^6$ /mL) determined by LDH-Cytotoxic test and (B) SEM picture of the RLC-18 cells after 7 days cell culture.

- II (1) 学術雑誌等に発表した論文 (掲載を決定されたものを含む.)  
共著の場合, 申請者の役割を記載すること.  
(著者, 題名, 掲載誌名, 年月, 巻号, 頁を記入)

**\*In situ modification on cellulose acetate hollow fiber  
membrane modified phospholipid polymer for biomedical application**

Sang Ho Ye, Junji Watanabe, Yasuhiko Iwasaki, Kazuhiko Ishihara

J. Membr. Sci., submitted

**\*Design of Functional Hollow Fiber Membranes Modified with Phospholipid  
Polymers for Application in Total Hemopurification System**

Sang Ho Ye, Junji Watanabe, Madoka Takai, Yasuhiko Iwasaki, Kazuhiko Ishihara

In preparation

- II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文  
(共同研究者 (全員の氏名), 題名, 発表した学会名, 場所, 年月を記載)

**\*2004.5.20, 7th World Biomaterials Congress (Sydney, Australia)**

Cellulose acetate hollow fiber membranes modified by phospholipid polymers for hemopurification

(Sang Ho Ye, Junji Watanabe, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara)

**\*2004.6.25, 東京大学 COE(化学・材料)合同シンポジウム (東京大学)**

Cellulose Acetate Hollow Fiber Membranes Modified by Phospholipid Polymers

(Sang Ho Ye, Junji Watanabe, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara)

**Design of Functional Hollow Fiber Membranes Modified with Phospholipid  
Polymers for Application in Total Hemopurification System**

**\*2004.8.2., 3<sup>rd</sup> The Univ. of Tokyo and Univ. of Toronto Graduate Students  
Workshop**

Biocompatible cellulose acetate hollow fiber membranes modified with phospholipid polymers  
and their application in total hemopurification system

(Sang Ho Ye, Junji Watanabe, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara)