

平成17年02月22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年度後期リサーチ・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 3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(CA)中空糸膜の作製と新規医療デバイスへの応用- 高性能人工肝臓用バイオリアクターの設計と評価

1. 緒言

劇症肝不全(fulminant liver failure)など肝機能の急速な悪化により肝臓の自然回復が見込めない急性肝不全患者に対して、現在のところ肝移植でしか有効な方法がない。しかし、臓器移植には常に拒絶反応、免疫抑制剤や移植ドナーの圧倒的不足の問題もあって、急性肝不全患者の死亡率はいまだに高い。これらの問題を解決するため、近年バイオテクノロジー、細胞工学、遺伝子工学、バイオマテリアルの基礎のうえに、人工材料を免疫バリアーとして用い、分化した細胞の機能をそのまま利用する、すなわち、細胞をそのまま高分子材料に人為的に組み込んだハイブリッド型人工臓器の開発が世界的に活発になっている。

しかし、このようなハイブリッド型人工臓器用バイオリアクターの作製において、培養細胞がいかに肝細胞の特異機能を維持したままで長期生存させるかが最も中心的な問題となっている。また、血液の体外循環システムによるin vitro治療においては、バイオリアクター用人工材料は血液適合性をもちながら、細胞が生体内に近い状態で生存し、長期的にその機能を発現できる組織適合性を有する高機能性材料の開発が強く望まれている。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)を修飾したCA中空糸膜を作製し、これらの中空糸膜を用いた高性能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の創製を目的とする。

2. 中空糸膜の設計

今回は、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高機能性中空糸膜(HFM)を作製するため、CAに対しMPCポリマー(PMB30)を1wt%ブレンドしたCA/PMB30ブレンド中空糸膜を作製し、その中空糸膜の外部表面にMPCポリマー(PMA30)(Fig 1)を物理・化学的に修飾させたCA/PMB-PMA30 HFMを作製した。CA/PMB-PMA30 HFMは、まず、作製されたCA/PMB30ブレンドHFMを単一中空糸膜透過性評価モジュールにセットし、中空糸膜の外部表面にと縮合反応剤(EDC(1-ethyl 3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide))いれたPMA30水溶液を36時間循環させることで、CA/PMB30の表面にある水酸基(-OH)とPMA30のカルボキシル基(-COOH)との縮合反応

によりHFMの外部表面にPMA30が修飾されるように作製した。作製された中空糸膜は24時間流れる純粋水で洗浄した後、XPS表面分析を行なった。XPS表面分析結果から、作製されたCA/PMB-PMA30HFMは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HFMであることが明らかになった(Fig 2)。また、CA/PMB-PMA30I HFM ([EDC]/[CA]=10), P/C value = 4.4×10^{-3} より、CA/PMB-PMA30II HFM ([EDC]/[CA]=50) (P/C value) = 6.3×10^{-3} の外部表面のリンのピークがより強いことをみせ、縮合反応剤の量によって外部表面に修飾されたPMA30の量が異なり、PMA30がCA/PMB30ブレンドHFMの表面に物理・化学的に修飾されていることを確認した。

3. CA/PMB-PMA30 HFM内部表面での肝細胞培養および機能評価

作製されたCAおよびCA/PMB-PMA30HFMは、内部表面上にRLC-18 (マウスの正常肝細胞) およびHuh-7 (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。また、培養された肝細胞の細胞代謝測定および尿素生産量を評価した。CA/PMB-PMA30HFM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 3)。また、CA/PMB-PMA30HFM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。Alamar Blueによる細胞代謝測定結果、細胞代謝の面ではCA/PMB-PMA30HFMの表面で培養された肝細胞とCAHFMの表面に培養された肝細胞との差がみえなかった(Fig. 4)。しかし、それぞれの中空糸内部表面に肝細胞を1週間培養した後、glutamate dehydrogenase (GLDH)法により培養された肝細胞の尿素生産量を測定した結果、CA/PMB-PMA30HFMの表面培養された肝細胞はより高い尿素生産量をみせた(Fig. 5)。

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。今後は肝細胞のアルブミン生産量などの機能を分析し、作製されたバイオリアクターの性能評価をより詳しく行なう予定である。

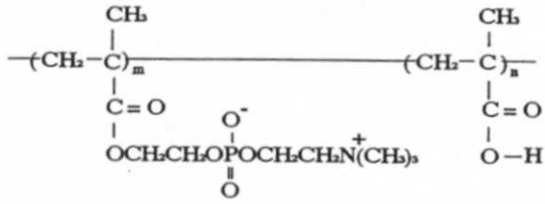


Figure 1. Chemical structure of PMA30 (m=0.3, n=0.7).

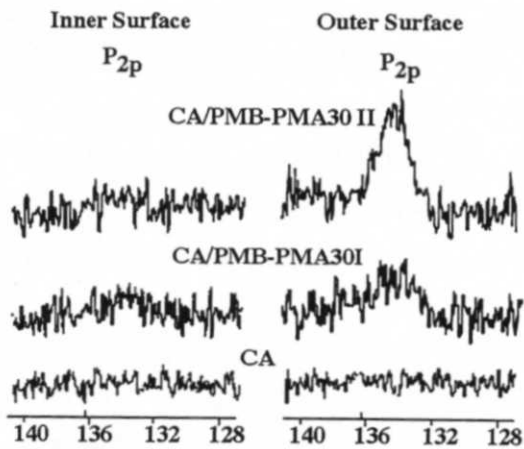


Figure 2. XPS spectra of CA, CA/PMB-PMA30I ([EDC]/[CA]=10) and CA/PMB-PMA30II ([EDC]/[CA]=50) HFMs on their surfaces.

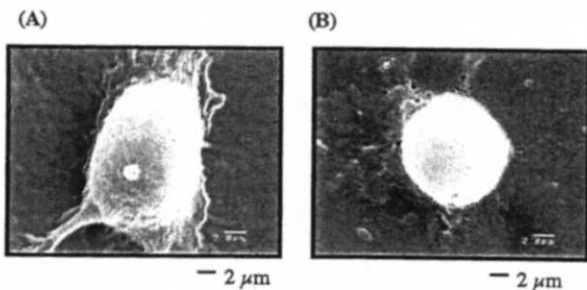


Figure 3. SEM pictures of the adherent and Hep G2 cell on the inner surface of (A) CA HFM, and (B) CA/PMB-PMA30 HFM observed 4 hours after cell seeding.

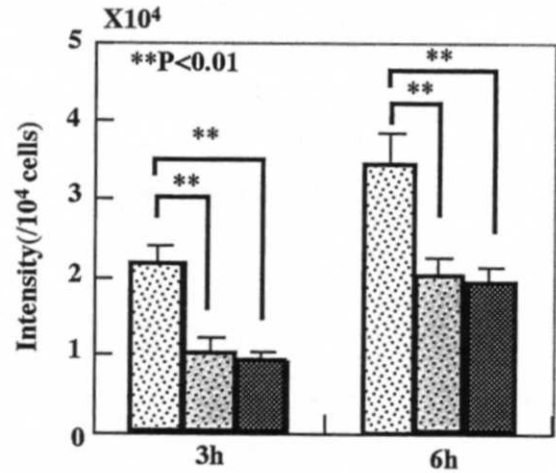


Figure 4. Metabolic activity of the cultured Huh-7 cells on the surface of the polystyrene plate (white bar), CA (grey bar) and CA/PMB-PMA30 (black bar) HFMs for 3 and 6 hours measured by alamar blue assay.

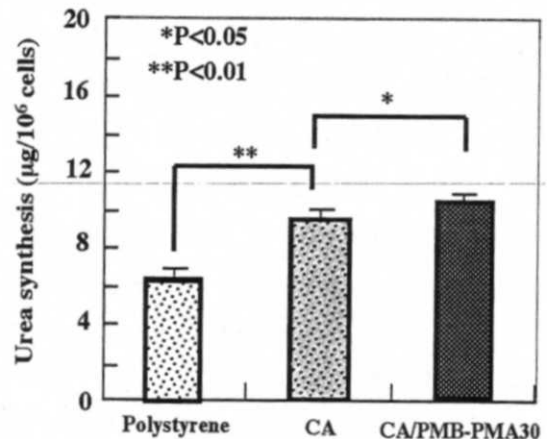


Figure 5. Urea synthesis by Huh-7 cells cultured on the surface of the polystyrene plate (white bar), CA (grey bar) and CA/PMB-PMA30 (black bar) HFMs for 24 hours.

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)

1. S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, K. Ishihara, In situ modification on cellulose acetate hollow fiber membrane modified phospholipid polymer for biomedical application. J Membr Sci 2005;249:133-41.

2. S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, M. Takai, K. Ishihara, Design of Functional Hollow Fiber Membranes Modified with Phospholipid Polymers for Application in Total Hemopurification System. Biomaterials 2005 in press.

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. 11.9 2nd COE International Symposium on Human-Friendly Materials Based on Chemistry; Better Living Through Innovative Biomaterials, Tokyo, Japan.**

High functional cellulose acetate hollow fiber membrane for a bioartificial liver

(S. H. Ye, J. Watanabe, M. Takai, Y. Iwasaki, K. Ishihara)

***2004. 11. Fourth Asia International Symposium on Biomaterials, Tsukuba, Japan.**

High performance bioreactor with hepatocytes on phospholipid polymer hollow fiber membrane

(S. H. Ye, J. Watanabe, M. Takai, Y. Iwasaki, K. Ishihara)