


平成19年 2 月 28 日

氏名 黄 紅雲  印

## 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18年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	コウ コウウン 黄 紅雲	生 年 月 日
所属機関名	東京大学生産技術研究所	
所在地	目黒区駒場4-6-1	
申請時点での 学 年	D2	
研究題目	ヒト臨床応用のための埋め込み型人工肝に関する研究	
指導教員の所属・氏名	東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター医療材料・機器工学部門 [併任] 東京大学生産技術研究所臓器・生体システム工学 酒井康行	

## 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)

再生医療の成功例として皮膚や軟骨が挙げられるが、肝や腎と言ったヒト大型臓器の再構築に関する研究は依然として進んでいない。本研究は、ヒト臨床用埋め込み型肝組織の *in vitro* 再構築を目指している。具体的には、まずは数値シミュレーションを活用するなど工学的側面から担体をデザインし、それに基づき新規の SLS (粉末焼結積層造形法) 技術より造形、ブタ胎児肝前駆細胞をその担体内で培養、液性因子より分化増殖、人工酸素運搬体を用いる新規な灌流培養にて *in vitro* で育成、最後に血管化・移植する。このような新規再構築肝組織に基づく治療の方法論は、ヒト ES 細胞や体性幹細胞の増幅技術と結びつくことで、中長期的には国民医療福祉の向上への多大な寄与が期待できる。

1. ブタ胎児肝細胞の *in vitro* 成熟化 (前回報告した)
2. 三次元担体のデザイン (前回報告した)
3. 三次元担体の造形 (生研・新野研 共同研究) と灌流培養結果

SLS 造形における各種パラメータ (レーザー強度・走査速度・粉面温度など) を最適化し。この造形条件を用いて、内径 0.8 mm の流路構造を有する空隙率 89%・体積 10 cm<sup>3</sup> の多孔質担体を得ることができた。多孔質部の孔径は 100-200 μm であった。マクロ流路が正しく造形されていることを X 線 CT での観察で確かめた。培養実験では、流路の有無にかかわらず 1 日目の細胞接着率はほぼ 100% であったが、9 日間の灌流培養では流路配備したものは流路無しのものに比べて 3.9 倍の細胞増殖が観察され、最終日のグルコース消費量 3.7 倍・アルブミン分泌量は 4.5 倍となった。以上より、提案したマクロ流路ネットワークのデザインと SLS 法による担体三次元造形、および灌流培養による組織育成は、大型臓器再構築において有効な方法論であることが示された。

4. 肝細胞培養におけるヘモグロビンベースの酸素運搬体 (LEH) の有効性

三次元大きな組織例えば肝臓の *in vitro* 再構築にとって、酸素は必要不可欠なものである。しかし、従来の培地だけの溶存酸素が、細胞の消費に足りない。一つ改善案は培地中に酸素運搬体を添加すること。だから、ヘモグロビンベースの酸素運搬体は酸化した Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>4+</sup> のため、細胞への毒性は出る可能性がある。単層培養したヒト肝癌細胞 Hep G2 において、20% LEH 添加の培地に、6 日間暴露で、強い毒性が観察された。一方、ラット正常肝細胞において LEH の毒性発現は確認されなかった。毒性が発現しない理由として、肝癌細胞においてはリポソームの取り込み能が亢進しているためである、と考えられる。

今ラット正常肝細胞を用いて、酸素不足領域が作られる平板型灌流培養作製し、ヘモグロビンベースの酸素運搬体の有効性を検討している。

氏 名 黄 紅雲

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (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. Huang, H.; Hanada, S.; Kojima, N.; Sakai, Y. Enhanced functional maturation of fetal porcine hepatocytes in three-dimensional poly-L-lactic acid scaffolds: a culture condition suitable for engineered liver tissues in large-scale animal studies. *Cell Transplant* 2006;15:799-809.

氏 名 黄 紅 雲

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)

2. Hongyun Huang, Nobuhiko Kojima, Hiromichi Naruke, Shunsuke Oizumi, Toshiki Niino, Yasuyuki Sakai. A porous perfusion bioreactor that possesses microchannels: its fabrication by selective laser sintering and preliminary evaluation of culture of human hepatoma Hep G2 cells. In advances in medical engineering, drug delivery systems and therapeutic systems, N.A. Peppas, A.S. Hoffman, T. Kanamori and K. Tojo, eds., pp. 58-63, AIChE, proceeding, New York, NY, 2006.
3. Yasuyuki Sakai, Hongyun Huang, Hirosuke Naruto, Masaki Nishikawa, Nobuhiko Kojima, Atsushi Mizuno and Katsuji Ohta. Use of Liposome Encapsulated Hemoglobin (Leh) as an Oxygen Carrier to Cultured Cells. In advances in medical engineering, drug delivery systems and therapeutic systems, N.A. Peppas, A.S. Hoffman, T. Kanamori and K. Tojo, eds., pp. 45-50, AIChE, proceeding, New York, NY, 2006.