

## 審査の結果の要旨

氏名 頼 耀東

組織工学は、細胞、足場材料、液性因子を原料とし、体外で移植用組織を育成し、工学的に生産することを目標としている。ヒトの発生過程では、受胎後3週で心臓が拍動を開始し、胚子の隅々まで赤血球を含む血液が循環し、酸素を供給することで他臓器の形成が始まる。一方、組織工学の組織育成プロセスでは、3次元の足場材料に細胞を播種し、培養培地を灌流する工程が想定されている。しかし赤血球を含まない培養培地では酸素供給が不足し、十分な大きさの組織が育成できないことが懸念されている。このため培養培地に添加する新たな酸素運搬体の開発が強く期待されている。

本博士論文は「Development of new artificial oxygen carriers for tissue engineering via SPG membrane emulsification technique (SPG膜乳化法を用いた組織工学用新規人工酸素運搬体の開発)」と題し、Chapter 1-6から構成されている。

Chapter 1では、本研究の背景と目的について論じている。まず組織工学における酸素供給の重要性を論じ、酸素運搬体の必要性を指摘している。さらに既存の酸素運搬体をパーフロオロカーボン型、ヘモグロビン型、ヘム誘導体型の3種類に分類し、それらの灌流培養への適用例をまとめ、既存の酸素運搬体の課題を整理している。以上の議論を基に、本研究では新たな人工酸素運搬体の作製方法として、サイズ制御に優れ、スケールアップが容易であり、コスト的に有利な製造方法として、シラス多孔ガラス (SPG) 膜を利用した膜乳化プロセスについて述べている。運搬体材料としては、酸素溶解度が高いヘモグロビンと、長期間安定なシリコーン材料の、2種類が適用可能であることを述べている。以上、本論文の目的は、SPG膜乳化法を用いた2種類の新規人工酸素運搬体の開発であると述べている。

Chapter 2では、SPG膜乳化法により、酸素結合能を有する新規ヘモグロビン型酸素運搬体を作製した結果について述べている。既存の方法によってウシ血液からヘモグロビン (bHb) を抽出し、ウシ血清アルブミン (BSA) と混合して、SPG膜乳化を行うことにより、粒度分布の狭い安定したエマルションの作製を行っている。bHbとBSAの比率が、粒度分布制御に重要であることを指摘し、さらにエマルションをグルタルアルデヒドで架橋することで、粒度分布が揃った真球状微粒子を作製したことが述べられている。調製直後の微粒子は、90%以上が活性なヘモグロビンであり、酸素分圧の変化に応じた可逆的な酸素の吸脱着が可能であることが示されている。さらに凍結状態で長期の活性維持が可能

であることが示されている。以上から SPG 膜乳化法によって新規なヘモグロビン型酸素運搬体の作製に成功したと位置付けられている。

Chapter 3 では、Chapter 2 で確立した作製方法を用いて、直径が  $1\mu\text{m}$  から  $20\mu\text{m}$  の間で異なるヘモグロビン型酸素運搬体を作製し、酸素運搬体が培養細胞に与える影響を明らかにしている。マクロファージ細胞株は直径  $2\mu\text{m}$  前後の酸素運搬体を最も良く貪食する一方で、 $10\mu\text{m}$  程度以上の酸素運搬体では、マクロファージ細胞株を含む全ての細胞株で、酸素運搬体の取り込みは起こらないことが示されている。さらに、細胞生存率と酸素運搬体直径の関係を調べることで、サイズが増加するほど細胞生存率が増加することが示されている。酸素運搬体溶液の粘度と液中粒度分布を併せて考察することで、直径が小さな酸素運搬体の毒性に関して、粒子同士の凝集や粒子の細胞表面への付着の関与が考察されている。一方で直径が大きな酸素運搬体では比較的高い生体適合性が得られたと位置付けられている。さらに酸素の吸収・放散速度と酸素運搬体直径の関係についても議論がなされ、Thiele 数に基づく考察で、直径  $10\mu\text{m}$  前後を境に反応律速から拡散律速に変化することが示され、酸素解離曲線の酸素分圧スイープ速度を変えることで実験的な検証も行っている。

Chapter 4 では、シリコーン型酸素運搬体について述べている。SPG 膜乳化法により、Methacryloxypropyl tris(trimethylsiloxy)silane (TRIS) エマルションを作製し、光開始重合による、均一な粒子径の poly-TRIS 微粒子の合成に成功している。さらに 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) を微粒子表面にグラフト重合することにより poly-TRIS-g-MPC 微粒子を作製している。得られた微粒子は酸素放散が可能であることが示され、酸素運搬体としての利用が可能であることが示されている。

Chapter 5 では、Chapter 3 あるいは 4 で作製された酸素運搬体の酸素運搬能について述べている。酸素運搬体存在下で、肝がん細胞株 HepG2 を振とう培養し、細胞増殖速度から酸素供給の影響を検討している。酸素分圧が 1% と低く、3-bromopyruvate(3-BP)の添加により解糖系の働きを抑えた環境下で、ヘモグロビン型酸素運搬体とシリコーン型酸素運搬体の両方で、細胞増殖促進効果が示された。また酸素運搬体が培地中の酸素透過に与える影響について、反応拡散方程式モデルを構築し、酸素分圧が 1% の場合、本研究の実験条件では酸素透過流速が 27 倍程度増加すると考察されている。

Chapter 6 では本研究で得られた結果を総括している。

以上、本論文は SPG 膜乳化法を用いた新規人工酸素運搬体の開発に関する成果をまとめたものである。本研究は、工学的に高い価値を有し、化学システム工学の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。