【169】

氏　名(本　籍)	古川克子(東京都)
学位の種類	博　士(医　学)
学位記番号	博甲第 1,920 号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	**小口径の人工血管の開発のための基礎的な検討** －評価系の開発と血管様階層構造の再構築－
主　査	筑波大学教授　医学博士　林　浩一郎
副　査	筑波大学併任教授　医学博士　大箸信一 (生命工学工業技術研究所)
副　査	筑波大学教授　医学博士　松田光生
副　査	筑波大学助教授　医学博士　筒井達夫
副　査	筑波大学助教授　医学博士　長澤俊郎

論文の内容の要旨

(目的)

1) 小口径の人工血管の創製のための必須の要素技術である血小板のリアルタイム観察に基づく抗血栓性材料の in vitro 評価法を確立する。

2) 次世代の小口径の人工血管の創製を目指して血管壁細胞による血管様構造の in vitro における再構築のための基盤技術を開発する。

(装置の開発)

実験1では市販の円錐－平板型回転粘度計をもとに新たな装置を開発した。透明な資料では倒立型顕微鏡を用い血小板凝集を観察できるよう円錐をアクリル樹脂で作成し，透過光をプリズムにより導いた。被検材料の厚みを考慮し対物レンズに超長焦点レンズを使用した。被検材料を設置するリングをステンレスとアセタール樹脂で作り材料をこれにはさんで円錐と対峙させ，間に血小板懸濁液を満たした。

不透明な資料では正立型落射顕微鏡を使い，円錐の駆動をダイレクトドライブからシャフトドライブに変更してモーター軸のところに顕微鏡の対物レンズを配置できるようにした。

(対象と方法)

実験1：試験材料としてすでに大口径人工血管として用いられている polytetrafluoroethylene や Dacron，一般的な材料であるガラス，セルロース，ナイロン，アクリルレジン，ポリウレタンなど，および小口径人工血管材料として注目されているガラスに血管内皮細胞を播種したハイブリッド型材料など18種類を用いた。

実験2－1：血管を構成する血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，線維芽細胞の3種の細胞をコラーゲンゲル中で3次元培養しコラーゲンを足場に血管様の階層構造を生体外で作らせる。血管内皮細胞はウシ胸部大動脈から分離されたもの，血管平滑筋細胞はウサギ胸部大動脈中膜平滑筋細胞株，線維芽細胞はヒト臍帯線維芽細胞を用いた。タイプ1のウシ真皮由来コラーゲンとタイプ3のウシ胎盤由来コラーゲンを1対1で混合し，血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，線維芽細胞を均一に分散させ1㎜の厚さで24ウェルのプレートに播種した。コラーゲンを完全にゲル化させるため37℃で30分間 incubate した後ウシ胎児血清10％を含んだ α MEM 培地で培養した。

実験２－２：共存培養系から血管内皮細胞のみを材料の表面に誘導させるためポリカーボネート製フィルターにコラーゲンコートし上側に血管内皮細胞，血管平滑筋細胞を播種し下側に誘導された細胞数をカウントした。また下側に vascular endothelial growth factor（VEGF），transforming growth factor（TGF-β）を加え，血管内皮細胞のみを誘導できるか調べた。

（結果）

実験１：倒立型顕微鏡を用いた検査ではアクリルレジン（AC）への血小板付着が最も少なく，次いでポリカーボネート（PC），ポリビニールクロライド（PVC）の順であった。正立型落射顕微鏡による検査では静脈レベルの5.0dyn／cm^2の剪断応力の存在下でACに最も付着が多く，以下 PVC，ナイロン６，などの順となり，ガラスに内皮細胞を単層で覆ったものが最も付着が少なかった。動脈レベルである15 dyn／cm^2でもガラスに内皮細胞を単層で覆ったものが最も付着が少なかった。これを材料の接触角との関係で調べると準静的条件下では材料の接触角が小さい，すなわち親水性の強い材料ほど多くの血小板がその表面に付着することがわかった。

実験２－１：培養開始後約６日でゲルと培地の界面で多くの血管内皮細胞が観察された。しかし３週目に入るとこの細胞数は激減した。

実験２－２：血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，線維芽細胞の共存系では血管内皮細胞の移動速度が最も遅いため内皮細胞による単層膜を形成するのは困難であった。VEGF 存在下では血管内皮細胞単独培養系ではその遊走の促進効果があったが，血管平滑筋細胞との共存培養系ではかえって抑制に働いた。

TGF-βの存在下では血管内皮細胞単独培養系で濃度に依存して内皮細胞の VEGF による走化性が抑制された。TGF-βに対する中和抗体を加えこの抑制効果が回復するかをみたが回復しなかった。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の共存培地を血管内皮細胞のみの培養系に添加したところ血管内皮細胞の VEGF による走化性を阻害する効果があることがわかり，この培地に抗 TGF-β抗体を加えても抑制効果の回復は見られなかった。

（考察と結論）

実験１：今回新たに考察した装置はリアルタイムで血小板の凝集を定量的に観察でき，目的である抗血栓性材料の評価に極めて有用であると考えられた。これによりガラスと血管内皮細胞を組み合わせたハイブリッド型材料の血小板粘着が最も低いことが明らかになった。一方人工材料の場合は剪断応力の強さにより粘着数が変化することがわかり，単に静的状態での粘着度を測るだけでは不十分なことが示された。

実験２：血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，線維芽細胞の共存系から血管内皮細胞のみによる単層をコラーゲンゲル表面には形成できないことがわかった。これは血管内皮細胞の移動速度が他の２者より遅いからであったが，血管内皮細胞の走化性を促進する VEGF を使用した実験から，血管平滑筋細胞との共存培養系では血管内皮細胞の走化性が極端に阻害されることがわかった。共存培養系の condition medium 中に何らかの抑制物質が含まれていることが示唆された。

審査の結果の要旨

小口径人工血管の開発は血栓の形成が問題であり，いまだ満足できるものはない。従って新しい抗血栓材料の開発が切望されているが，そのためには試験材料の血小板粘着性を定量的に観測できる器械の開発が必要である。著者が開発した装置はこの血小板粘着性をリアルタイムで液流の存在下で測定できるものであり，今後の人工血管に適した材料の開発に大きな武器となり得るものである。

また実験２においては in vitro で血管様構造の再構築を図るという意欲的な試みが成されているが，血管内皮細胞の移動速度の遅れによりそれが困難であることがわかった。著者はそれに対し移動速度を高めるための VEGF を用いて再度内皮細胞の単層を形成しようと試みたところ，血管平滑筋細胞との共存培養系では medium 中に何らかの内皮細胞の運動能を強力に抑制する物質の存在を発見した。この物質は現在はまだ未知のものであ

るが，その本体が将来明らかにされれば血管様構造を in vitro で構築する道を開く重要な発見と考えられる。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。