

氏名(本籍)	わた なべ み ほ 渡 邊 美 穂 (鳥 取 県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5829 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 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	人間総合科学研究科			
学位論文題目	A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele: the Application of Gelatin Scaffolds for Prenatal Closure of Myelomeningocele (脊髄膜瘤胎児に対する胎児再生誘導治療を目的とした足場材料の創製)			
主査	査	筑波大学教授	博士(医学)	榎 正 幸
副査	査	筑波大学准教授	博士(医学)	小 室 広 昭
副査	査	筑波大学准教授	博士(医学)	濱 田 洋 実
副査	査	筑波大学講師	博士(医学)	山 本 哲 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

脊髄膜瘤 (Myelomeningocele; MMC) は頻度の高い先天性奇形である。一般的には、出生後に髄膜瘤閉鎖手術が行われているが、妊娠中に受けた二次的な神経障害により下肢麻痺、膀胱直腸障害、水頭症などを生じる。胎生中期胎児手術により髄膜瘤を閉鎖する試みも実施されているが、より早期に実施可能で低侵襲な治療法として、露出した神経管を組織膜により被覆する組織工学的方法が有効である可能性が高い。本研究では、レチノイン酸で誘導したラット MMC モデルを用いて、ゼラチンスポンジとゼラチンシートから成るゼラチンハイドロゲル複合体が組織欠損の被覆材料として有効であるかどうかを明らかにすることを目的とした。更に、ゼラチンの形状が羊水環境中で表皮伸展と表面細胞接着に与える影響、及び生体活性ペプチドが羊水細胞の接着に与える影響を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

ゼラチンはウシの骨からアルカリ処理により作成された等電点 5.0 (分子量 99,000) のものを使い、ゼラチンスポンジ (孔 250 ~ 400 μm) とゼラチンシートは熱架橋法を用いて定法により作成した。ラット MMC モデルは、胎生 10 日に妊娠 SD ラットにレチノイン酸 (50mg/kg) 経口投与することにより作成した。胎生 18 日に開腹して脊髄膜瘤部を子宮外に部分露出し、ゼラチンハイドロゲル複合体を適用した。胎生 21 ~ 22 日に胎児を取り出してパラフィン切片を作成し、ヘマトキリン・エオシン (HE) 染色、トリクロム染色、免疫組織化学染色を行った。組織の被覆、細胞の接着と進入、表皮伸長、血管新生を観察し、定量的に比較した上で、有意差を検討した。更に、接着細胞の生存率は MTT 法を用いて調べた。

(結果)

(1) ゼラチン接着能の検討

乾燥したゼラチンシートは胎児によく接着したが、濡れると接着性を失った。ゼラチンの等電点は接着性に影響しなかった。ゼラチンシートの厚みは、柔軟性と強固さの観点から胎児への接着に重要な因子であり、

21 ~ 40 μm が最適であった。ゼラチンシートの胎児への接着力は 0.57 ~ 0.73 N であり、デヒドロサーマル架橋の時間を増やすほど強くなった。しかしながら、ゼラチンシートの胎児への接着力は十分に強くなかったため、本研究ではシアノアクリレート接着剤を用いた。

(2) ゼラチンスポンジによる欠損部位の被覆効果の検討

ゼラチンシートとゼラチンスポンジから成るゼラチンハイドロゲル複合体は、ラット MMC 欠損部位に強く結合し、ゼラチンシートの外側に細胞層と細胞外基質が観察された。また、胎児組織がゼラチンスポンジに進入し、表皮細胞が MMC 欠損部位を超えて伸展した。この表皮伸展効果は、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を加えたゼラチンスポンジにより誘導された。bFGF を含むゼラチンスポンジを用いた場合は、ゼラチンスポンジ内に多くの赤血球が観察され、血管新生が起こることが示唆された。

(3) ゼラチンハイドロゲル複合体の形状に関する検討

注入可能な材料は、より低侵襲で、より早期の胎児に適用できる可能性がある。そこで、ゼラチンマイクロスフェアの有効性と組織修復を促進する生体活性物質の効果を調べた。ゼラチンスポンジとゼラチンマイクロスフェアは、表皮伸展および細胞接着に関して同等の効果を持った。コラーゲン I とフィブロネクチンの添加は細胞接着効果を促進した。

(考察)

ゼラチンは生体・細胞親和性、生体分解性がともに高く、種々の形状に形成可能であることから、組織工学的材料として優れている。更に、増殖因子などの徐放担体としての利用も可能である。本研究により、ゼラチンハイドロゲルを用いた組織修復は、MMC 胎児治療において早期に適用可能で低侵襲な新規治療法となる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

ラット MMC モデルを用いてゼラチンハイドロゲルを用いた組織修復の有効性を調べた研究である。ゼラチン接着能の検討から始まり、ゼラチンハイドロゲルの種類、形状が MMC 欠損部位の修復に与える影響を *in vivo* で調べ、その有用性を立証している。将来の応用へ向けた基礎的研究として意義が高い研究であると言える。

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。