

氏 名 おぐら りょうすけ  
小倉 亮介

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 富生命博甲第147号

学位授与年月日 令和4年9月28日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

教育部名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程  
生体情報システム科学専攻

学位論文題目  
体外臓器灌流下の腎臓再生に関する基礎研究  
(Basic research on the regeneration of damaged kidney under ex vivo  
machine perfusion)

論文審査委員

(主査) 教授 篠原 寛明

(副査) 教授 北村 寛

(副査) 教授 中村 真人

(指導教員) 教授 中村 真人

## 学位論文内容の要旨

学位論文題目 体外臓器灌流下の腎臓再生に関する基礎研究

Basic research on the regeneration of damaged kidney under ex vivo machine perfusion

生体情報システム科学専攻

氏名 小倉亮介

人工透析治療を受けている患者人口は年々増加し、2016年の時点で33万人にも上る。種々の疾患で腎臓が傷害され腎不全に陥った場合、尿を作るネフロンの細胞も構造自体も失われるため、自然治癒することはない。腎臓移植を受けなければ、一生涯人工透析を受けるしかない。透析治療はあくまで体内に溜まった水や老廃物を排出する治療でしかなく、週に何回もの透析が必要で、日常生活の Quality of Life (QOL) も満足いくものではない。同時に医療費の圧迫も問題になっている。依然、腎移植が最終治療手段となっているが、移植臓器は圧倒的に不足しており、希望者数に対し移植件数はわずか 13% 足らずで、しかもその大部分は生体腎移植で、家族親族は大きな犠牲を払っている。腎臓を再生する治療法は未だないに等しい。

この問題に対して、医工学の観点から、新規治療法の開発として、機能不全に陥った腎臓を生体外で灌流培養を行い、集中治療を施し再生させる方法の開発を目指し、取り組んだ。本研究では「体外長期腎臓灌流培養技術の開発」、「灌流培養中の腎機能評価法の開発」、「灌流腎臓治療法の開発」の3つを大きなテーマとして研究を進めてきた。

第一に体外長期腎臓灌流培養技術の開発として、まず 企業との共同研究で灌流培養装置の開発を行った。「灌流量」「灌流圧」「灌流液温度」を常時モニタリング可能にし、灌流圧を設定しフィードバック機構を持たせることで自動的に適切な灌流量に調節することが可能になった。また、人工肺を取り付け灌流液への酸素付加も可能にした。灌流液だけでの灌流では pH 低下や乳酸値上昇がみられたが、赤血球を添加することで、それらを防止する効果があることを確認した。

第二に腎機能評価法の開発として集中治療を行うにあたり、治療法の開発とともに体外臓器灌流下の腎臓の灌流状態や機能をモニタリングし評価する技術が必要であると考えた。そこで、まず、低侵襲かつリアルタイムで評価が可能な超音波エコー装置を用いて、灌流下の腎臓の循環動態の評価及び微細構造の形態評価を試みた。その結果、腎臓内の血行動態の観察及び、糸球体の観察を確認した。

次に、腎機能検査については、臨床で行われている「イヌリン負荷試験」と「PSP (Phenolsulfonphthalein) 負荷試験」に着目し、臨床プロトコールを灌流培養用に改良し、時間経過による各検査薬の濃度変化やクリアランスを求めた。また、蛋白尿が見られたため、ウシ血清由来のアルブミンに蛍光試料である Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC-1) をラベル化したアルブミンを作製し、灌流液に添加し、尿中に排泄されるアルブミン量の定量化を行った。これらの結果、尿中の負荷試験薬濃度変化やクリアランス値から近位尿細

管や糸球体ろ過量の障害、また、尿中にアルブミンの定量から、糸球体の濾過能に障害が示された。

さらに、腎血管の反応を調べるために血管拡張剤としてベラパミルやニトログリセリン、血管収縮薬であるアドレナリンを投与して血行動態の変化を測定した。血管拡張剤を用いることで、灌流量増加の傾向が見られ、安定した灌流量確保に有効であることが示された。アドレナリン投与では、灌流時間によってアドレナリンの効果発現の時間変化に違いが見られ、臓器の機能評価にアドレナリンが有効である可能性が示唆された。

第三に腎治療の開発として間葉系幹細胞（MSC）による治療法に着目し、間葉系幹細胞（MSC）による腎臓の再生を目指し、屠殺ブタから脂肪組織由来間葉系幹細胞の採取方法を確立し、間葉系幹細胞（MSC）の同定を行った。幹細胞の採取のために初代培養の条件として、コラゲナーゼの作用時間や遠心分離時間、そして遠心力の条件を変更して検討した。その結果、間葉系幹細胞採取に適した遠心速度や時間などの条件を絞り込むことができた。また、細胞の同定方法として、抗 CD105 抗体と von Willebrand Factor (vWF) による免疫染色法と、フローサイトメーターを利用した方法で同定を行った。得られた細胞は CD105 を発現していたのに対して、vWF は未発現であり、フローサイトメーターによる同定では、初代培養された細胞の均一な集団においては、CD105 が発現した細胞が 9 割を超えていることが確認された。

以上、機能不全に陥った腎臓を生体外で灌流培養を行い、集中治療を施し再生させる方法の開発を目指して研究を開始し、上記の結果を得た。腎臓再生への道のりは長いですが、体外臓器灌流下の腎臓再生に向けた研究を大きく前進させることができた。

## 【論文審査の結果の要旨】

本審査委員会は、令和4年7月27日（水）に、小倉亮介氏の博士学位論文公聴会および最終審査を行い、以下に概要を示す通り、博士学位論文審査及び最終試験ともに合格と判断した。

本博士学位論文の概要は以下のとおりである。

慢性腎不全の治療において、腎臓移植や透析医療の問題を克服する革新的治療技術の確立を目指して取り組んだ基礎的研究が本学位論文の主軸となる。

その治療戦略は、体外臓器灌流技術を活用して、体外で患者の腎臓を長期灌流培養しながら腎臓再生のための強力な集中再生治療を施し、腎臓を再生させて患者に再移植するという独創的な医工学的治療戦略で、その実現を想定して3つの主課題をあげて、その克服に取り組んでいる。このような発想での腎臓再生法は独自の取り組みで、未開領域であるため、実験装置の準備と実験手技の試行錯誤から始め、いろいろな可能性への挑戦が果敢に行われている。

本研究ではまず、「体外長期腎臓灌流培養技術の開発」を第一の課題とし、灌流量、灌流圧、温度を制御できる腎臓灌流培養装置を開発し、屠殺場から入手したブタ腎臓を用いての体外腎臓灌流実験という研究の実験基盤を確立した。

次に、体外灌流腎臓では臨床での腎機能評価ができないことから「腎機能評価法の開発」を第2の課題にあげ、まず画像評価法として、超音波エコー装置で造影剤を投与するコントラストエコー(血管造影)検査を行った。ブタ糸球体の造影と観察に成功し、画像解析による定量評価の可能性を示した(特許出願済)。次に、薬物負荷試験に着目し、イヌリン負荷試験(糸球体ろ過機能)、PSP(Phenolsulfonphthalein)負荷試験(近位尿細管機能)、FITCアルブミン負荷試験(糸球体ろ過障害の評価)を試行し結果を示した。加えて、アドレナリン負荷試験を行い、灌流腎の血管反応が検査できることも明らかにした。このように、造影剤や薬物負荷試験を行うことで、体外灌流腎ならではの詳細な腎臓評価ができる道を示したと言える。

さらに、「灌流腎臓の再生治療法の開発」の課題をあげ、まず2種類の血管拡張剤の投与実験を行い、血管抵抗の低下と灌流量の増加作用を確認した。また、細胞移植による腎臓再生を想定して、ブタ腎周囲脂肪組織から脂肪由来間葉系幹細胞の初代培養を試み、細胞採取同定の結果を示した。どちらも腎臓再生治療の準備の域を出ていないが、これからの進展を十分期待させる有用な成果を示したと言える。

腎臓再生の治療戦略実現までの道のりは長いですが、実現に向けての基礎構築で着実に道を拓いており、有意義な研究と評価できる。

最終試験を兼ねた公聴会では、多くの内容がまとめて発表された。来聴者および審査委員より質疑が行われたが、小倉氏はいずれにも的確に応答し、研究内容について十分精通していることがうかがわれた。また、博士学位論文は、予備審査時での議論を踏まえて、使用した腎臓の条件記述を追加し、負荷試験の図やグラフが見やすく改

善された。また各実験での考察を深め、結論の記述を加え、改善が認められた。薬剤負荷試験の内容は原著論文として査読付き学会誌に掲載されており[1]、生体情報システム科学専攻の学位授与基準を満たしていることも確認された。さらに、iThenticateの剽窃チェックでも問題ないことが報告された。

以上の結果を総合し、本審査委員会は、博士学位論文審査、および最終審査ともに合格と判断した。

[1] Ogura R, Kurooka T, Iwanaga S, Nakamura M, Functional assessment of extracorporeally perfused kidneys using drug loading tests, *Organ Biology* 29 (1), 29-38, 2022.