

氏名・(本籍)	山本拓実(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士 第254号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位論文題目	コラーゲンゲル包埋肝細胞を用いたホローファイバー型人工肝臓の機能評価

審査委員	主査 教授	馬場 忠雄
	副査 教授	森 渥視
	副査 教授	小玉 正智

## 論文内容の要旨

### 【目的】

急性肝不全に対する治療方法として、我が国では血漿交換、血液濾過を中心とした血液浄化法が確立している。しかし、これらの治療方法は肝機能の全てを代行するものではないためその治療成績には限界がある。欧米諸国において実施されている肝移植も、ドナー不足や肝移植待機患者の状態維持等の問題がある。肝機能の主体である肝細胞を組み込んだハイブリッド型人工肝臓は、より生体肝に近い機能を再現する新たな肝機能補助システムとしてその実現が期待されている。我々は、コラーゲンゲル包埋肝細胞とホローファイバー型モジュールを組み合わせた体外循環型人工肝モジュールを作製した。今回、 $3.5 \times 10^8$ 個のウサギ肝細胞を有した人工肝モジュールを作製し、灌流培養によりこのモジュールの性能を評価し、更に、ウサギ全肝摘出モデルに対して体外循環実験を施行しその効果を検討した。

### 【方法】

日本白色家兎よりSeglen変法により肝細胞を分離し、I型コラーゲンを肝細胞浮遊液に添加し $2 \times 10^7$ 個/ml・0.2%コラーゲンゲル包埋肝細胞懸濁液を調整した。ホローファイバー型モジュールの中空糸外腔にコラーゲンゲル包埋肝細胞懸濁液を注入し、37°C CO<sub>2</sub>インキュベーター内で30分ゲル化させた後、Williams' E培地を基本にした培養液の灌流を開始し、24時間リカバリーさせたものを人工肝モジュールとして使用した。

実験1；24時間灌流後に培養液を交換し、培養0日目として灌流培養を8日間施行した。培養0,2,4,6日目に、アルブミン、尿素窒素を測定し、蛋白の電気泳動にて生成蛋白について検討した。培養0,2,6日目に塩化アンモニウム1mM添加し、アンモニア処理能を検討した。また、培養後の細胞形態観察のためhematoxylin-eosin(H.E.)による光学顕微鏡観察を行った。

実験2；ウサギ全肝摘出モデルは、門脈、肝下部大静脈を右頸静脈にバイパスした後、肝臓を摘出して作製した。全肝摘出1時間後より、左頸動静脈を用いて人工肝の体外循環を施行した(Hybrid Artificial Liver;HAL群)。対照として、肝細胞を含まないモジュールによる体外循環を施行した(Sham群)。2群間において体外循環中の血圧の変動、及び生存時間を検討した。肝機能評価として、血中アンモニア、プロトロンビン時間(PT)を測定し、人工肝の評価としてモジュール内のアンモニア値を測定した。体外循環後の細胞形態観察のためH.E.による光学顕微鏡観察を行った。

### 【結果】

実験1；培養0日目のアルブミン合成分泌量は $344.3 \pm 206.4 \mu\text{g/hr/module}$ 、尿素産出量は $261.6 \pm 20.1 \mu\text{g/hr/module}$ 、アンモニア処理能は $726.7 \pm 102.1 \mu\text{g/hr/module}$ であった。アルブミン合成能と尿素産出量は培養の経過とともに低下を認めたが、アンモニア処理能は培養6日目でも高機能を維持していた。電気泳動にて、培地中にウサギ血漿中と同じ分子量の蛋白の発現を認めた。形態学的には、培養0日目では肝細胞は均一に充填されているが、

培養8日目では細胞数の減少と細胞の膨化などの細胞障害を認めた。

実験2 ; Sham群では全肝摘出後血圧の低下を認めたが、HAL群では体外循環により血圧は改善した。生存時間はSham群で7.1±1.8時間に対して、HAL群では最長24時間、平均18.8±3.5時間と生存時間の有意な延長を認めた。Sham群では血中アンモニアの一過性の上昇を認めたが、HAL群では血中アンモニアの上昇が有意に抑制された。また、モジュール内のアンモニア値は血中濃度と有意さなく、有効に物質交換が行われたと考えられた。PT値は両群間で有意差は認めなかったが、HAL群でPT値の延長抑制の傾向が認められた。体外循環後の肝細胞は、細胞障害を認めずviableな状態であった。

#### 【考 察】

近年、細胞工学の進歩により高機能を維持した状態で大量の肝細胞の分離が可能になり、分離肝細胞を用いるハイブリッド型人工肝臓の研究が盛んである。分離肝細胞は接着依存型の細胞であるため何らかの基質に接着させる必要がある。我々は、高機能発現性に優れているコラーゲンをを用いて、ホローファイバー型モジュールに三次元的に接着固定することで、肝細胞の高密度化を実現した。灌流培養及びウサギ全肝摘出モデルに対する体外循環において、肝機能の一部であるアンモニア処理、蛋白合成の機能を有することが証明された。また、生体の恒常性の維持及び生存時間の延長と良好な結果が得られた。今回の実験に用いた人工肝モジュールは、宿主肝の約4%の肝細胞を有しており、全肝摘出という急激な変化をもたらすモデルに対して、肝機能補助としての効果が認められた。実際の臨床で用いられる、宿主肝機能の残っている症例に対しては、血漿交換や血液濾過などの他の肝機能補助療法と組み合わせることで更なる効果が期待できる。今後臨床応用に向けて、異種肝細胞を用いることによる免疫学的諸問題や安全性の問題について更なる検討が必要である。

#### 【結 論】

コラーゲン包埋肝細胞を用いたホローファイバー型人工肝モジュールは、灌流培養、ウサギ全肝摘出モデルに対する体外循環において、アンモニア処理、蛋白合成、恒常性の維持及び生存時間の延長と良好な機能を認めた。以上より、本モジュールが肝臓の合成、解毒機能を有する新たな肝機能補助システムとして有効であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

肝機能を維持する上で重要な役割をなす肝細胞を組み込んだハイブリッド型人工肝臓は、より生体肝に近い機能を再現する新たな肝機能補助システムとしてその実現が期待されている。本研究では、機能発現に優れているコラーゲン包埋肝細胞とホローファイバー型モジュールを組み合わせた体外循環型人工肝モジュールを作製し、その有効性を検討した。3.5×10<sup>8</sup>個のコラーゲン包埋ウサギ肝細胞を有した人工肝モジュールを用いて、灌流実験とウサギ全肝摘出モデルに対する体外循環実験を行い、以下の結果を得た。

- 1) 組織学的検討で、肝細胞はファイバー周囲にコラーゲンにより均一に接着固定された。
- 2) 灌流実験において、アルブミン合成能、尿素合成能、アンモニア処理能は灌流0日目に最も優れていた。アンモニア処理能は灌流6日間良好に維持していた。また、灌流液中にウサギ血漿中と同じ分子量の蛋白の発現を認めた。
- 3) ウサギ全肝摘出モデルに対する体外循環実験では、人工肝群では体外循環により血圧の改善を認め、有意な生存時間の延長を認めた。また、血中アンモニアの上昇は有意に抑制され、プロトロンビン時間 (PT) の延長抑制の傾向が認められた。体外循環後の肝細胞は、細胞障害を認めずviableな状態を維持していた。

体外循環に用いた細胞数は宿主肝に対して約4%に相当し、この細胞数でアンモニア処理やPT改善、更には生体の恒常性の維持及び生存時間の延長と良好な結果が得られた。以上より、コラーゲン包埋肝細胞を用いたホローファイバー型人工肝モジュールによる体外循環が、肝臓の蛋白

合成、アンモニア処理機能を有する新たな肝機能補助システムとして有効であることが示唆され、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認められる。