

氏名・(本籍) 仲 成 幸 (大阪府)
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 博士第318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11年3月26日
 学位論文題目 Bioartificial liver support system using porcine hepatocytes entrapped in a three-dimensional hollow fiber module with collagen gel: An evaluation in the swine acute liver failure model
 (コラーゲンゲル包埋ブタ肝細胞を用いたホローファイバー型バイオ人工肝補助システム: ブタ急性肝不全モデルにおける評価)

審査委員 主査 教授 野坂 修一
 副査 教授 三ツ浪 健一
 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として血漿交換および血液濾過等を中心とした血液浄化療法が行われてきたが、十分な治療成績は得られていない。同所生肝移植も、ドナー肝の不足が問題となっている。そこで、生命維持に必要な肝機能を代償し得るバイオ人工肝補助システムの実現に期待が寄せられている。我々は、コラーゲンゲル包埋肝細胞をホローファイバーモジュールの中空糸外腔に充填することにより新しい肝細胞灌流培養法を開発した。本研究では、コラーゲンゲル包埋ブタ肝細胞を組み込んだ人工肝補助システムを作製し、その機能を評価するとともに臨床応用の可能性を検討することを目的とした。

【方法】

体重約10~12kgの雑種仔ブタよりコラーゲナーゼ消化法にて分離した肝細胞をI型コラーゲン溶液に混和し、コラーゲン肝細胞懸濁液を調製した。これをホローファイバー型モジュール(細孔径0.3 μ m)の中空糸外腔に注入、37 $^{\circ}$ Cにてコラーゲンをゲル化させた(組み込み細胞数: 5.4×10^9 cells)。その後、Williams'E培地を灌流させ48時間後に人工肝モジュールとして使用した。PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor-1)のmRNAの発現は、分離直後、培養48時間後の単層培養及び人工肝モジュールの肝細胞よりtotal RNAを抽出、ノーザンブロット法により検討した。急性虚血性肝不全モデルは、体重約20kgの雑種ブタの肝門部にて門脈及び肝動脈を含めた肝臓への流入血管を完全に結紮切離し、門脈を下大動脈に吻合することにより作成した。In vitro人工肝モジュール灌流実験では、肝虚血後12時間後に肝不全血漿を採取し、灌流培養装置において人工肝モジュールに12時間灌流し、血漿中の肝機能指標につき検討した。次に、以下の3群において急性虚血性肝不全モデルにおける人工肝補助システムの機能評価を行った。肝補助群(BAL群: n=4); 肝細胞を含む人工肝モジュールにより12時間の肝補助を施行。Sham群(n=4); 肝細胞を含まずコラーゲンゲルのみを充填した人工肝モジュールにより12時間の体外循環を施行。Control群(n=4); 体外循環を施行せず無治療。

【結果】

ノーザンブロット法による解析では、分離直後の肝細胞ではPAI-1のmRNAの発現を認めなかったが、培養48時間後人工肝モジュール内の肝細胞ではPAI-1のmRNAの発現を単層培養に比べ2倍程度強く認めた。In vitroの肝不全血漿灌流実験では、血漿中のアンモニア濃度の減少、プロトロンビン時間、フィッシャー比の著明な改善を認めた。ブタ急性虚血性肝不全モデルに対する人工肝補助システムによる治療実験では、肝補助群の生存時間が 31.2 ± 3.1 時間と他の2群に比べ2倍程度の有意な延長を認めた。また、肝補助群では他の2群に比べ体外循環施行中の血中アンモニア濃

度の上昇が有意に抑制された。プロトロンビン時間は3群肝に有意差を認めなかったが、手術創および肺出血を含めた出血傾向は肝補助群において他の2群に比べ出現時期の遅延を認めた。乳酸値も肝補助群において肝虚血後12時間後に有意な抑制を認めた。

【考 察】

これまでに、多くのバイオ人工肝臓の研究が行われている。しかし、臨床応用例はまだ少なく、肝補助効果も十分とは言えない。我々が開発した人工肝補助システムはIn vitroの灌流実験において、代謝・合成機能を有することが示された。さらに、ブタ急性虚血性肝不全モデルに対する肝補助実験では、肝補助群において生存時期の有意な延長、血中アンモニア値及び乳酸値の上昇の有意な抑制を認めた。プロトロンビン時間では有意な改善を認めなかったが肝補助群において出血傾向の出現時期の遅延を認めた。人工肝モジュール中の肝細胞にPAI-1のmRNAの発現の増強を認め、PAI-1により線溶の亢進が抑制され出血傾向が抑制されたものと考えられる。

我々の人工肝モジュールは体重20kgのブタの全肝の約7%程度の肝細胞を有する。これまでのウサギ無肝モデルにおいても8%程度の肝細胞で凝固系を含め十分な肝補助機能を有していたことより、臨床応用の際には3個の人工肝モジュールを使用することで十分な肝補助効果が得られるものと考えられる。また、ブタ肝細胞を用いることによる宿主に対する免疫学的な影響に関しては、他施設の臨床応用例によると、1～2回の肝補助施行では患者の抗ブタIgG、IgM抗体の上昇の他は臨床的な問題は無かったと報告されている。

以上により、今回検討した人工肝補助システムは急性肝不全に対し有効な治療手段となる可能性が示唆された。

【結 論】

コラーゲンゲル包埋ブタ肝細胞を用いたホローファイバー型人工補助システムを開発し、ブタ急性肝不全モデルにおいて十分な肝補助効果を有することを示した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、コラーゲンゲル包埋ブタ肝細胞を組み込んだバイオ人工肝補助システムを作製し、その機能評価および臨床応用の可能性を検討したものである。

肝不全血漿灌流実験では、バイオ人工肝臓がアンモニア代謝能、血液凝固因子合成能、アミノ酸代謝能を有することを示した。ブタ急性肝不全モデルに対する人工肝補助実験では、有意な血中アンモニア濃度上昇の抑制、生存時期の延長を示した。また、出血傾向出現の遅延が認められ、バイオ人工肝臓内の肝細胞においてプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1のmRNAの発現を認めたことにより、線溶系への肝補助効果をも有することが示唆された。以上より、本バイオ人工肝補助システムが優れた肝補助機能を有することを明らかにした。

これらの成果は、臨床応用に向けてバイオ人工肝補助システムの研究開発をすすめるうえで、寄与すること大であり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

尚、本学位授与申請者は、平成11年2月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。