

ハイブリッド型人工肝臓の開発

成瀬 勝 俊

ハイブリッド型人工肝臓の開発

東京大学医学系研究科 学位論文

成瀬 勝俊

本研究は、妻の献身的な助力なしには成し遂げられなかったものであり、心から感謝する。子供たちが父親の業績である本研究を誇りに思うことを望む。

はじめに：ハイブリッド型人工肝臓の歴史と現況

近年、肝移植が肝不全の治療法として確立されたが、世界的なドナー不足の折、人工肝臓には、なお多くの役割が期待されている。すなわち、劇症肝炎もしくは術後肝不全の治療、及び、肝移植の適応患者のドナーが得られるまでの、「つなぎの治療」とであると考えられる。

人工肝臓の開発のため今までに多くの試みがなされてきたが、人工心臓や人工腎臓に匹敵する人工肝臓は現時点では存在しないと言える。それは肝臓が極めて多くの機能を有しており、心臓におけるポンプ作用、腎臓における透析機能のような単一の機能に限定して代替できるものではないからである。さらに肝臓は、成人にして重量約1400g、およそ 3×10^{11} 個の肝細胞からなる身体の中で最大の臓器であり、これを代替するには質的のみならず量的も満足されるものでなければならない。

これまでの人工肝臓開発の歴史は、工学的人工肝臓、生物学的人工肝臓、ハイブリッド型人工肝臓の三つの流れに大きく分類することができる。

工学的人工肝臓としては、血液透析、血液灌流、及び血漿交換が挙げられる。

血液透析は、1956年に Kiley らが開発し、1977年には Opolon らがPAN(polyacrylonitrile)膜を用いて透析治療を行った¹⁾。血液灌流については、1958年に Shechter らが陽イオン交換樹脂でアンモニアの吸着を行ったのに始まり、1964年には Yatizdis がヤシガラ活性炭を用いたアンモニア吸着除去装置を開発して肝性昏睡の治療に用いた²⁾。血漿交換は、1958年に Lee 及び Tink らによって研究が始められ、1976年には血漿分離(Plasmapheresis)を用いた血漿交換法³⁾が開発され、広く用いられている。これらの方法は代謝能力に限界があり、また、多様な肝臓の機能のごく一部を代用するに過ぎず、20~30%の救命率にとどまった。

そこで、生体肝を用いてこの問題を解決しようとして生物学的人工肝臓の開発が行われた。これには、交叉灌流及び抽出肝灌流が挙げられる。

交叉灌流については、1957年に杉江らがイヌの肝循環血液と肝不全患者の体循環血液を交叉透析する装置を開発した⁴⁾。摘出肝灌流については、1958年に Otto らがヒビ肝、ウシ肝を用いた摘出肝灌流治療を⁵⁾、1981年に小沢らがブタ肝を用い、患者側とブタ肝側の血液を分離膜を介して灌流治療する方法を開発した⁶⁾。しかし、これらも、30~50%の救命率であり、臨床の現場で広く用いられるには至っていない。

一方、1969年に、Beny らが、コラゲナーゼ灌流による肝細胞分離法を開発して以来⁷⁾、肝細胞を工学装置内で適切に培養すると良好な肝機能を発揮することが明らかになり、ここにハイブリッド型人工肝臓の開発が始まった。1990年代に入り、殊に米国において臨床応用も活発に行われるようになり、現在人工肝臓の開発は、ハイブリッド型が主流になっている。

ハイブリッド型人工肝臓システムの中心は、肝細胞を収容するバイオリアクターである。これには従来よりいろいろな種類のもが開発されているが⁸⁻¹³⁾、代表的なものとしてはホローファイバー型バイオリアクターがあり、ことに米国の三施設のものが高く知られており、そのうち二施設は臨床応用に進んでいる。

一つは、Rozga らのホローファイバー型バイオリアクターであり、ブタ初代培養肝細胞をデキストランのマイクロキャリア上に固定化したものをホローファイバー型モジュールのファイバー外腔に注入し、ファイバーを構成するセルロース膜を介した物質交換により肝機能を発揮させるものである⁸⁻⁹⁾。図1に、このバイオリアクターと、臨床応用におけるハイブリッド型人工肝臓システムを示すが、このシステムを用いて現在まで十数例に及ぶ臨床応用が行われ、そのうち6例で肝移植へのつなぎとしての使用に成功し、また2例では自己肝再生後の離脱に成功したと報告されている。

一方、Sussmann らは、ヒト胎児肝芽細胞腫の細胞株 C3A をホローファイバー型モジュールのファイバー外腔に固定化したバイオリアクター ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device) を開発した¹⁰⁻¹¹⁾。この細胞系はヒトの正常肝細胞が持つ代謝能と増殖活性とを有しており、長期培養が可能である。彼等は、ELAD を11例の劇症肝炎患者に用い、その

結果、10例で代謝補助作用が認められたと報告した。そのうち4例は肝移植までのつなぎとしての使用に成功し、2例（12歳の少女と67歳の女性）では、自己肝再生後の離脱に成功した。他の5例は、ELAD治療の妨げとなる脳症合併症のため死亡した。

これらのグループの臨床応用例は、多くは血漿交換と併用という形で肝移植へのつなぎ役として使用されており、その効果がこれらの人工肝臓システムによるのか、血漿交換によるのか不明であり、現在のところ、これらのシステムはなお実験的治療の段階にあると言える。

こうした世界的状況を踏まえ、従来の装置の欠点を解消した独自のバイオリアクターを開発することが本研究の目的である。

1. 背景と目的

1) バイオリアクターの条件

ハイブリッド型人工肝臓のシステムの中核であるバイオリアクターがよい性能を持つための条件としては、次の3点が挙げられる。すなわち、

- ①培養肝細胞の機能がよいこと
- ②十分量の肝細胞を収容できること
- ③肝細胞と灌流血液の間の物質交換がよいこと

である。バイオリアクターの設計は何よりこの観点から行われるべきであり、人工肝臓の開発において避けることのできない免疫学的問題についても、まず肝機能の良好な発現という目標を優先的に追及した後、設計の修正もしくは薬剤の投与等の方法により漸次解決されるべきである。

2) 装置の選択

バイオリアクターのデザインを考える場合、まず、バイオリアクター内において肝細胞を固定化して培養するのか、もしくは浮遊培養するのかという二つの問題がある。

現在、世界的には固定化する場合が主流であり、多くの研究がいかに効率よく細胞の寿命を長く保ち、かつより多くの細胞に灌流液との接触を実現させるかに工夫がなされてきた。その代表的なものは、前述した米国の2グループを初めとして現在ハイブリッド型人工肝臓の開発に従事する多くの研究グループが用いているホローファイバー型バイオリアクターである。これは、図1(a)に示すように、数百本のセルロース製の中空のファイバーをカラム内に装着し、ファイバー外腔及び内腔の灌流液の物質交換をはかるもので、従来透析に用いられてきた装置である。しかるに、これに肝細胞を収容して現在用いられて

いるホローファイバー型バイオリアクターには、前述のバイオリアクターに要求される条件から考えて、次に述べるような欠点がある。

①細胞を注入するホローファイバー・モジュール内が、培養細胞が良好な機能を維持するためになお十分な環境とは言い難いこと。ホローファイバー・モジュール内において肝細胞に安定した培養環境を与えるために、テキストラン製マイクロキャリアへの固定化⁸⁻⁹⁾、コラーゲン・ゲル中の包活^{12, 13, 14)}といった工夫がなされてきたが、いずれも固定化の基質が占有する容積が大きいこと、ゲルにより物質交換が妨げられること等の欠点があり、なお改善の余地が大きいと思われる。

②モジュール当たりの肝細胞の収容量が不十分であること。例えば、Rozgaらのバイオリアクターは一本あたり容積 500 mL で 6×10^5 個のブタ肝細胞を収容しているが、これはヒト全肝細胞数の 2% にすぎず、肝機能を代替するために十分とは言えない⁸⁻⁹⁾。もし十分な肝細胞量を人工肝システム内に収容したい場合、バイオリアクターの本数を増やさなければならないが、人工肝治療を要するような重症肝不全の患者に対して循環負荷が増えることは望ましくない。したがって、肝細胞が酸素不足にならない範囲でできるだけ高密度に培養できるバイオリアクターが望ましい。

③細胞と灌流液との接触という点において、セルロース・ファイバー膜を介した浸透によってのみ物質交換が行われるため、十分な肝機能を発揮できない可能性があること。したがって、肝細胞と灌流血液がよりよく接触できるバイオリアクターを考える必要がある。

そこで我々は、これらの欠点を凌駕するものとして、まず肝細胞と灌流血液とが直接接触できる構造を持ち、しかもより良好な細胞の機能維持が期待できる新しいバイオリアクターを模索検討し、次に述べる固定化型と浮遊培養型の二つのタイプを考案した。

a) 固定化型：不織布充填型バイオリアクター

我々は、従来、環境工学の分野で水質改善用のろ過基質として用いられてきたもので、近年、培養細胞の固定化の基質としても従来の繊維と比較して優れた素材であることが注

目されているポリエステル不織布¹⁹⁻²⁰⁾に着目し、これを用いたバイオリアクターを考案作成した。しかも、これにおいては、上述のごとく、肝細胞と灌流血液を直接接触させることで、より良好な物質交換が可能になるよう設計した。

b) 浮遊培養型バイオリアクターと肝細胞スフェロイド

肝細胞を浮遊培養槽によって浮遊旋回培養すると、経過とともに単離肝細胞が互いに凝集し合い、スフェロイドとよばれる20~30個の単離肝細胞の凝集体を形成することが知られているが、このスフェロイドは単離肝細胞と比べ単位細胞当たりの機能が良好であることが確認されている²¹⁻²²⁾。しかも、肝細胞を浮遊旋回状態で培養する場合、培養液との間の物質交換が短期的には非常によいという長所があり、また、培養液の量を増やせばより多量の肝細胞を培養することも可能である。従って、この浮遊培養槽においては、短期的であるが固定化型より良好な細胞機能と物質交換能を発揮する可能性がある。人工肝臓の使用目的は、劇症肝炎、術後肝不全といった急性肝不全の治療が主であるから、短期的にしる高い性能を発揮する浮遊培養型のバイオリアクターは、十分に検討する価値があるものと考えられる。

3) 実験目的

不織布充填型バイオリアクターと浮遊培養型バイオリアクターのどちらが今後の *ex vivo* 灌流実験、さらには臨床応用に向け、スケールアップしていくにふさわしいかを決定するため、まず小スケールのバイオリアクターにおいてその性能を比較した。すなわち、容積 1 L の浮遊培養槽によって形成された肝細胞スフェロイドを不織布充填型バイオリアクターと浮遊培養型バイオリアクターにてそれぞれ培養し、その性能を比較検討した。

2. 方法

1) プタ肝細胞の分離

我々は、Segren が確立したラット肝細胞の分離法²³⁾に基づき、ブタ肝細胞の分離を行った。体重10~15kgのサンゲン雑種ブタを、ketamine 12.5 mg/kg、pentobarbital 15 mg/kgの筋肉内注射により導入し、気管内挿管後、 O_2 3 L/min、Halothane 1%による全身麻酔下に腹部正中切開にて開腹した。固有肝動脈と総胆管を結紮切離し、門脈内に留置したカテーテルより、2000 mLのヘパリン添加生理食塩水(1 u/mL)を200 cm H₂Oの圧で注入した。下大静脈を肝の上下で切離して肝臓の脱血を行い、周囲組織を剥離して全肝を摘出した。続いて、肝下部下大静脈を結紮し、肝上部下大静脈にカテーテルを挿入して門脈-下大静脈の灌流回路を作成し、以下のごとく肝細胞分離を行った。まず、2.0 mM EDTA 及び 1.0 mM EGTA を加えた Hanks-HEPES buffer (37°C) を流速 100 mL/min で 15 分間、次いで 0.05% コラゲナーゼ液(37°C ; 和光純薬)を流速 100 mL/min で 30 分間灌流した。この後、肝被膜を破って、コラゲナーゼ溶液中に肝細胞を分散させ、粗製単離肝細胞液を得た。ピペッティング、660 rpm (約50 G)の遠心操作、Eagle's medium (MEM; 日水製薬)による洗浄を数回繰り返すことにより、精製単離肝細胞液を得た。トリパンブルー試薬を用いた血球計算板法により、肝細胞の採取数と生存率を算出した。

2) 肝細胞スフェロイドの形成

分離した肝細胞全量を、20%ウシ胎児血清、インスリン 10^{-6} M、デキサメサゾン 10^{-3} M、抗生剤を加えた William's Eagle 培地 (スフェロイド形成用培地) に懸濁し、容積 1 L のスピナーフラスコで 150 rpm で 24 時間浮遊旋回培養を行って肝細胞スフェロイドを形成した^{16, 17, 24-27)}。血球計算板法に基づき、ブタ肝細胞 1 個の重量が 6.0×10^{-9} g/cell であることを求め、これより、スフェロイド懸濁液中の細胞数を算出した。

3) バイオリアクターの作成

a) 容積 50 mL の不織布充填型 バイオリアクターの作成

繊維の径 0.06 mm、ポアサイズ 0.1 mm のポリエステル不織布 (千代田加工建設) を直径 35 mm、厚さ 4 mm の円板状に切ったもの 12 枚を、四塩化炭素中で一晩振とう洗浄し、

100% エタノール及び水で数回洗浄、乾燥させた後、0.03% コラーゲン中に一晩浸してコラーゲン・コートしてからオートクレーブした。24時間浮遊培養して形成したスフェロイド懸濁液から 1×10^8 個の肝細胞を含む液量を取り、これを濃縮して、上述の不織布12枚に播布し、千代田加工建設製の容積50 mLのカラムに積層充填して小型の不織布充填型バイオリアクターを作成した。これにより、固定化された肝細胞スフェロイドは 1×10^9 cells/50 mL bioreactor となった。これを250 mLのリザーバー及びローラー・ポンプ (Masterflex; PA25-B) と接続し、灌流回路を作成した。灌流液には、10% ウシ胎児血清、インスリン 10^{-8} M、デキサメサゾン 10^{-7} M 及び抗生剤を加えた William's Eagle 培地 (維持培養液) を用いた (図2(a))。

b) 浮遊培養型バイオリアクターの作成

浮遊培養槽は、Corning社の既成の容積100 mLスピナーフラスコを使用し、懸濁する肝細胞液の濃度は、200 rpm (4.6 G) で沈殿しない最大の濃度である 5.0×10^8 cells/mL とした。液量は、不織布充填型バイオリアクターと同じく50 mLとすべきところであったが、その場合、中心軸が液面に十分に届かないため、100 mLにて実験を行った。すなわち、 5.0×10^8 cells のスフェロイド懸濁液を形成槽から取り、上記維持培養液を追加して100 mLとした。従って、肝細胞スフェロイドの量としては、 0.5×10^9 cells/100 mL bioreactor となった (図2(b))。

4) 培地交換及び機能測定

不織布充填型、浮遊培養型とも、肝細胞固定もしくは浮遊培養開始後2, 4, 6日目に上記維持培養液を用いて培地交換を行い、同時に機能測定用のサンプリングならびにアンモニア負荷テストを行った。不織布充填型バイオリアクターはリザーバー内の培養液からサンプリングを行った。浮遊培養槽は、懸濁液を遠心して上清よりサンプリングを行い、その都度、95% O_2 /5% CO_2 を吹入して密閉した。

培地交換の都度、リザーバー内または浮遊培養槽内の培養液に、塩化アンモニウムを

1 mM となるよう負荷し、2時間後のアンモニア値、尿素値をそれぞれインドフェノール法²⁸⁾、ジアセチルモノオキシム法²⁹⁾により測定した。また、肝細胞固定もしくは浮遊培養開始後 2, 4, 6 日目の培養液中のアルブミン値を 2 抗体サンドイッチ ELISA 法³⁰⁾ によって測定し、一日当たりの値に換算した。数値の比較検定は、平均値の差の検定を行い、対応のない Student-t 法を用い、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差ありと評価した。

5) 肝細胞数の経時的变化

浮遊培養型 バイオリクター内の経過に伴う肝細胞数を以下のように算出した。すなわち、浮遊培養開始後 2, 4, 6, 8 日目の培養液を 1 mL 採取し、遠沈して上清を除き PBS バッファーで洗浄した後、沈殿物を超音波ホモジナイターを用いて破砕し、DAPI 蛍光法³¹⁾ により DNA 量を測定した。さらに、我々が、血球計算板法によって求めた以下の換算式により肝細胞数を算出した。すなわち、(ブタ肝細胞 1 個の重量) = 7.0×10^{-9} g

また、不織布充填型における肝細胞の固定化状況を調べるため、固定後 2, 4, 6, 8 日目のリザーバー内の培養液を 1 mL 採取し、不織布から脱落してリザーバーに流出した肝細胞の DNA 量を測定した。

3. 結果

1) 分離肝細胞数とスフェロイド形成

ブタ全肝から分離される総肝細胞数は、一頭当たり $2.2 \sim 3.2 \times 10^{10}$ 個であり、その生存率は常に 85% 以上であった。一方、容積 1 L の浮遊培養槽にて 24 時間巡回培養を行ってスフェロイドを形成した後の総肝細胞数は、 $1.3 \sim 1.6 \times 10^{10}$ 個であり、形成前に比べ、50~60% に減少した。

2) 機能測定

a) アンモニア除去能

不織布充填型では、肝細胞分離2日後に0.706、4日後に0.563、6日後に0.594 mM/2hrと50%以上を除去する良好な値を保ち続けたのに対し、浮遊培養槽型では、2日後に0.491、4日後に0.219、6日後に0.182 mM/2hrと急速に減少する結果となり、経過を通じて不織布充填型が有意に高いアンモニア除去能を示した(図3(a))。

b) 尿素合成能

不織布充填型では、肝細胞分離2日後に0.591、4日後に0.493、6日後に0.356 mM/2hrであったのに対し、浮遊培養型では、2日後に0.451、4日後に0.289、6日後に0.138 mM/2hrとなり、不織布充填型が有意に高い尿素合成能を示した(図3(b))。

c) アルブミン分泌能

不織布充填型では、肝細胞分離2日後に192.0、4日後に205.0、6日後に151.3 mg/dayであったのに対し、浮遊培養槽では、2日後に45.0、4日後に51.3、6日後に48.0 mg/dayとなり、不織布充填型が有意に高いアルブミン分泌能を示した(図3(c))。

3) 肝細胞数の経時的变化

浮遊培養型の肝細胞数は、浮遊培養開始後2日目に 3.6×10^8 、4日目に 2.2×10^8 、6日目に 1.5×10^8 、8日目に 1.2×10^8 個と、経過に伴って急速に減少した。一方、不織布充填型では、リザーバー内のDNA量は経過を通じて0であり、肝細胞の固定化率はほぼ100%であると考えられた。

4. 考 察

本実験では、機能測定をするに当たり、代謝能をアンモニア負荷に対するアンモニア除去能及び尿素合成能により、合成能をアルブミン分泌能によりそれぞれ評価した。これは、アンモニアの代謝とアルブミンの合成がともに肝臓の機能の指標として代表的なものであり、また、*in vitro*の実験における他施設の報告がこの3種のデータを扱っているものが多く^{8, 9, 12, 13)}、比較において好都合だからである。

今回の実験では、不織布充填型バイオリアクターについては、容積 500 mL のものにスケールアップした際、最低でもヒト全肝細胞数の約 5% にあたる 1×10^8 個の肝細胞を固定化することを現時点での目標とした。したがって、容積 50 mL のバイオリアクターでは、 1×10^8 個の肝細胞スフェロイドを不織布に固定化して充填した。一方、浮遊培養型では、50 mL あたりの肝細胞数は最高でも 0.25×10^8 個であるため、不織布充填型は、容積あたりでは浮遊培養槽の 4 倍の高密度培養ができたことになる。本実験では、前述の通り、不織布充填型で 1×10^8 cells/50 mL bioreactor、浮遊培養型で 0.5×10^8 cells/100 mL bioreactor と、前者が 2 倍の細胞量を収容したが、その機能についてはアンモニア除去能、尿素合成能、アルブミン分泌能のいずれも前者が 2~3 倍の能力を示したことになり、この細胞収容量によく付随した結果と考えられる。

細胞数の経時的変化については、浮遊培養型では急速に減少したが、浮遊培養型における代謝能の急速な衰えは、このことを反映していると考えられる。一方、不織布充填型では、不織布から脱落した肝細胞はほとんど検出されず、コラーゲン・コートされたポリエステル不織布は肝細胞に対して強い接着性を持つと考えられる。しかし、不織布充填型においても代謝能は衰えていくことから、たとえ接着していても肝細胞の生存活性は衰えている可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

ここでどちらのバイオリアクターがより実用に即しているかについてまとめると、

- ①同一容量において 4 倍量の肝細胞を収容可能なこと。
- ②固定化されているためより長期にわたってより良好な肝機能を発揮すること。
- ③スケールアップが比較的簡単なこと。

以上により、不織布充填型が浮遊培養型と比較してより臨床応用に進むためにふさわしい構造のものであることが示された。

5. 小 括

良好な培養条件で十分量の肝細胞を取容し、かつ肝細胞と灌流血液とが直接接触することにより優れた肝機能を発揮するハイブリッド型人工肝臓のバイオリアクターの開発を目指し、ポリエステル不織布をカラムに充填したものに肝細胞を固定化する不織布充填型と、単離肝細胞を旋回培養してその凝集体である肝細胞スフェロイドを形成することにより肝機能の向上が得られる浮遊培養槽型の2つのバイオリアクターを考案作成した。この二種類についてブタ肝細胞を取容して機能比較を行ったところ、不織布充填型が、浮遊培養槽型と較べて高密度に肝細胞を培養できるため、同一容量のバイオリアクターとしてははるかに性能がよいことが示された。

第2章 不織布充填型バイオリアクターにおける肝細胞の培養形態の検討²¹⁾

1. 背景と目的

1) 不織布充填型 バイオリアクターのスケール・アップ

我々は、ex vivo 実験及び臨床応用に向け、不織布充填型 バイオリアクターのスケールアップを検討した。デザインとしては、ラジアルフロー式を採用することにした。これは、中心部に流入した血液が、一旦放射状に外側に分散し、それから肝細胞が固定化された不織布を通して再び中心に集まって流出するという構造のものである。この方式は、灌流血液がバイオリアクター内で乱流したりうっ滞を起こしたりするのを防ぐ上で適していることが工学的に証明されている²²⁾。そして、カラムとしては、白血球吸着除去装置である Cellsorba (旭メディカル) が、容積200 mLのポリカーボネイト・カラムでラジアルフロー構造をしており、容積、扱いやすさともに我々の目的に適ったものであるため、このカラムを用いることにした。すなわち、不織布を Cellsorba の中心軸に巻いてカラムに充填し、これに肝細胞を固定化してバイオリアクターとして用いた (図4(a))。

2) 不織布充填型 バイオリアクターにおける単離肝細胞と肝細胞スフェロイド

我々はこれまでの実験において、肝細胞の良好な機能の維持を目的として浮遊培養槽によって24時間巡回培養して肝細胞スフェロイドを形成し、しかる後にこれをバイオリアクターに収容して性能評価を行ってきた。ところが、スフェロイド形成後の総肝細胞数は、形成前に比べ、50~60%に減少してしまうことが明らかになった。この場合、肝細胞スフェロイドが静置培養において単離肝細胞に比べ2~3倍よりよい細胞当たりの機能を発揮することを考慮にいれてもバイオリアクターとしての性能が向上するかどうか疑問が残る。

そこで、今回の実験では、この容積200 mLの不織布充填型バイオリアクターに単離肝細胞を固定化した場合と浮遊培養槽によって形成された肝細胞スフェロイドを固定化した場合とで、それぞれの性能評価を行い、あわせて従来のホローファイバー型バイオリアク

ターとの性能の比較を行った。

2. 方法

1) 容積 200 mL の不織布充填型カラムの作成

150×270×4 mm のポリエステル不織布を四塩化炭素中で一晩振とう洗浄し、100% エタノール及び水で数回洗浄、乾燥させた後、0.03% コラーゲン中に一晩浸してコラーゲン・コートしてからオートクレーブした。これを Cellsorba の中心軸に渦巻き状に巻いてポリカーボネイト製のカラムに充填し、フタをしてエチンオキシサイドガスで滅菌した。

2) ブタ肝細胞の分離

ブタ肝細胞を、第1章 2.1) で述べた方法により分離した。この肝細胞は、顕微鏡により、よく分離された単離肝細胞であることが確認された。このうち、 1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞は、単離肝細胞のまま不織布充填型カラムに固定化された。また一方、別の 1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞は、下記の如く浮遊培養槽によってスフェロイド形成させてから 200 mL の不織布充填型カラムに固定化された。

3) 肝細胞スフェロイドの大量形成

1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞からスフェロイド形成するにあたり、我々は、新たに容積 4 L の浮遊培養槽を製作した³¹⁾。 1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞が、4 L のスフェロイド形成用培地に懸濁され、24 時間、200 rpm (4.6 G) で浮遊培養された。スフェロイド形成を終了した 24 時間後、一部がスフェロイド形成した肝細胞数の算出のためサンプリングされ、生存肝細胞数は 1.0×10^{10} 個から $0.43 \sim 0.66 \times 10^{10}$ 個に減少したことがわかった。この懸濁液は遠沈され、1 L の維持用培地に再び懸濁された後に、不織布充填型カラムに固定化された。

4) 不織布充填型カラムへの肝細胞の固定化及び形態の検索

肝細胞を不織布充填型カラムに固定化するにあたっては、操作をできるだけ単純にしてコンタミネーションを防ぐために、次のような方法を取った。

まず、 1.0×10^{10} 個の単離肝細胞もしくは $0.43 \sim 0.66 \times 10^{10}$ 個の肝細胞スフェロイドを維持用培地に懸濁した液を、DOバルブと酸素吹入装置を装着した容積 1 L のリザーバーボトルに入れ、これをシリコン・チューブで不織布充填型カラムとローラーポンプに接続して *in vitro* の閉鎖回路を作成した。そしてこの懸濁液を、30 mL/min の流速で 24 hrs 灌流することによって、肝細胞を不織布充填型カラムにトラップさせ、バイオリアクターを作成した (図 4 (b))。灌流開始後、1 時間毎にリザーバー中の液をサンプリングし、カラムに固定化されないで残っている肝細胞の量を調べた。

サンプリング終了後、バイオリアクターは解体され、巻かれた不織布を広げて肉眼的に肝細胞の分布を確認するとともに肝細胞が固定化された不織布の電子顕微鏡写真が撮影された。

5) 機能測定

単離肝細胞及び肝細胞スフェロイドとも、固定化のための灌流が開始されてから 24 時間後に、アルブミン分泌量測定のため灌流液の一部がサンプリングされた。また、このときアンモニア 1 mM を添加した維持用培地により培地交換が行われ、その 1, 2, 3 時間後に灌流液の一部がサンプリングされてアンモニア除去能及び尿素合成能が測定された。数値の比較検定は、対応のない Student-t 法による平均値の差の検定で行い、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差ありと評価した。

3. 結果

1) 固定化

24 時間の灌流により肝細胞は不織布にトラップされ、リザーバーボトル内の培地は透明になった。リザーバーボトル内の培地に残った肝細胞の数は、単離肝細胞及び肝細胞ス

フェロイドとも、灌流開始6時間後には0個となった。

灌流終了後にバイオリクターを解体して肝細胞の分布状況を観察したところ、肝細胞は渦巻き状に巻かれた不織布全体に均一に分布していることが確認された。不織布に固定化された単離肝細胞及び肝細胞スフェロイドの電子顕微鏡写真を図5に示す。

2) 不織布充填型バイオリクター単位としての機能

肝細胞スフェロイドを固定化したバイオリクターは、単離肝細胞を固定化したバイオリクターと比べて有意に低いアンモニア除去能を示したが(図6(a))。尿素合成能については、有意差を示さなかった(図6(b))。

アルブミン分泌能については、肝細胞スフェロイドを固定化したバイオリクターは、 2.55 ± 0.33 g/day であるのに対し、単離肝細胞を固定化したバイオリクターは 3.57 ± 0.52 g/day (平均値 \pm 標準偏差) であり、肝細胞スフェロイドの方が有意に低い値を示した。

3) 細胞単位としての機能

細胞当たりの機能については、アンモニア除去能及び尿素合成能は、肝細胞スフェロイドが単離肝細胞と比べて有意に高い値を示した(図7)。

アルブミン分泌能については、肝細胞スフェロイドを固定化したバイオリクターは、 4.72 ± 0.57 g/day $\cdot 10^6$ cells であるのに対し、単離肝細胞を固定化したバイオリクターは、 3.57 ± 0.52 g/day $\cdot 10^6$ cells (平均値 \pm 標準偏差) であり、肝細胞スフェロイドの方が有意に高い値を示した。

4. 考 察

容積4Lの浮遊培養槽を用いたスフェロイド形成によって、肝細胞数は形成前と比べて43~66%に減少した。これは、24時間の浮遊懸濁培養中に、肝細胞が培養槽の壁、ス

ターラー、シャフトに接触する物理的傷害により死んだり機能が落ちたりするためと考えられる。したがって、バイオリクターに充填される肝細胞数が減るため、バイオリクター単位としての機能を比較した場合は、スフェロイドを固定化した方が単離肝細胞を固定化した場合より機能が落ちるのは十分考えられることである。

しかし、細胞当たりの機能を比較すると、肝細胞スフェロイドは単離肝細胞より良好な機能を発揮することが明らかになった。24時間の浮遊懸濁培養によって一度は物理的傷害を受けた肝細胞スフェロイドは、バイオリクターに固定化されたことにより、凝集体としての本来の機能を回復したと考えられる。しかし、細胞当たりのアルブミン分泌能を見ても、肝細胞スフェロイドは 4.72×10^{-10} g/cell/day であり、単離肝細胞の 3.57×10^{-10} g/cell/day と比べ、1.3 倍の値を示しているにすぎない。これは、ティッシュ上の静置培養においてスフェロイドが単離肝細胞と比べて2~3倍のアルブミン分泌能を示すことを考えると、依然として容積4Lの浮遊培養槽を用いたスフェロイド形成によって機能低下がもたらされているとも考えられる。

灌流終了後にバイオリクターを解体して肝細胞の分布状況を観察したところ、肝細胞は渦巻き状に巻かれた不織布全体に均一に分布していることが確認された。これは、バイオリクターの設計にあたってラジアルフロー式を採用したことにより、灌流液が内部で乱流したりうっ滞を起したりせずに均一に灌流されたことによると考えられる。

電子顕微鏡所見においては、肝細胞スフェロイドは房状に一塊となって不織布の繊維に付着しており、典型的なスフェロイドの球状の形態が認めにくい。単離肝細胞の電子顕微鏡所見と比べると肝細胞が凝集していることは観察できる。

以上より、現状の大型浮遊培養槽では24時間後に約50%の肝細胞数が死滅するという細胞のコスト面の欠点があり、また、作成に24時間かかるという時間的制約もある。従って、スフェロイドとしての機能向上を考えに入れてもなお現状では単離肝細胞の方が優れているという結果となった。スフェロイドを大量かつ迅速に形成でき、しかも細胞数の減少を伴わない方法の開発が今後期待される。

次に、表1に不織布充填型バイオリアクターとホローファイバー型バイオリアクターの比較を示した。3は、本プロジェクトの共同研究者である酒井が報告したホローファイバー型バイオリアクターの機能測定データのデータであり、24時間の浮遊培養によって形成された肝細胞スフェロイドを、コラーゲン・ゲルとともにホローファイバー外腔に固定化し、培養液をファイバー内腔に灌流して *in vitro* の性能を測定したものである。肝細胞をコラーゲン・ゲル中に包括し、これをホローファイバー外腔に注入固定化するという方法は、現在ホローファイバー型バイオリアクターで機能発現を図る場合、最も望ましい固定化法と考えられており、多くの研究施設で用いられている³⁴⁾。また、4は、前出のNybergが報告したホローファイバー型バイオリアクターの機能測定データのデータであり、単離肝細胞をコラーゲン・ゲルと共にホローファイバー内腔に注入し、ゲルが凝集したファイバー内腔の隙間を利用して肝細胞に酸素と栄養を供給する培養液を灌流しつつ、ファイバー外腔に別の培養液を灌流して *in vitro* の性能を測定したものである。

まず収容肝細胞数については、酒井、Nybergのいずれの場合と比較しても、バイオリアクターの容積当たりの収容肝細胞数は、不織布充填型バイオリアクターの方が大きく上回っている。また、前述のRozgaらの容積500 mLのホローファイバー型バイオリアクターは、一本あたり 0.6×10^{10} 個のブタ肝細胞しか収容できないのに対し、容積200 mLの不織布充填型バイオリアクターでは一本あたり 1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞を収容できており、従って単位容積当たり約4倍の細胞収容量を可能にしたことになる。さらに、これらのバイオリアクターの性能を比較してみると、バイオリアクター単位容積に換算したアンモニア除去能、尿素合成能、アルブミン分泌能、のいずれにおいても不織布充填型バイオリアクターが、ホローファイバー型バイオリアクターの性能を大きく上回っていることがわかる。この原因としては、不織布充填型バイオリアクターにおいては、コラーゲン・コートされた不織布が肝細胞の固定化及び培養のために優れた環境であること、高密度に肝細胞を収容でき、少ない容積で高い肝機能を発揮できること、そして、肝細胞と灌流血液が直接接触でき、肝細胞と灌流血液とを隔てるセルロース・ファイバー膜を介した浸透

によってのみ物質交換が行われるホローファイバー型バイオリアクターに較べて物質交換が上回ることが考えられる。

以上より、不織布充填型バイオリアクターは、肝機能の発揮という点ではホローファイバー型バイオリアクターの性能を上回っているといえる。しかし一方で、ホローファイバー型バイオリアクターにおいてはセルロース・ファイバー膜が免疫グロブリンをカットすることにより肝細胞を抗体から保護するという長所があり、逆に、肝細胞と灌流血液が直接接触する不織布充填型バイオリアクターにおいては免疫機構による傷害をも直接受けることになるので、*ex vivo* 実験もしくは臨床応用に臨んでは、免疫機構による傷害に対して肝細胞を保護するかが重要な問題点となることが予想され、今後の検討が必要である。

5. 小 括

前章の実験に続いて、我々は容積 200 mL の不織布充填型バイオリアクターを製作し、これにブタ肝細胞を固定化して *in vitro* における性能を測定した。まず、単離肝細胞と肝細胞スフェロイドをそれぞれ不織布充填型バイオリアクターに固定化して機能比較を行ったところ、スフェロイド形成時に多くの細胞が物理的傷害により失われるため、バイオリアクターとしての性能についてはスフェロイド形成のメリットがないことが示された。また、同バイオリアクターはハイブリッド型人工肝臓において世界的に最も広く用いられているホローファイバー型バイオリアクターより良好な性能を発揮することが示された。

第3章 不織布充填型バイオリアクターを用いたブタ同種灌流治療¹⁴⁻¹⁶⁾

1. 目的

本実験では、これまでの基礎実験により、ブタ単離肝細胞を充填した不織布充填型バイオリアクターの性能が良好であることが確認されたので、これを、手術的に作成したブタの肝不全モデルに対する同種灌流治療に用い、その治療効果を検討した。

2. 方法

1) 不織布充填型カラムの作成

第2章.2.1) に述べた方法により、不織布充填型カラムを作成した。

2) ブタ肝細胞の分離

ブタ肝細胞を、第1章.2.1) で述べた方法により分離した。

3) 不織布充填型カラムへの肝細胞の固定化

不織布充填型カラム一本につき、 1.0×10^{10} 個のブタ肝細胞を、第2章.2.4) に述べた方法に従って固定化し、不織布充填型バイオリアクターを作成した。

4) ブタ肝不全モデルの作成

ブタ肝細胞を分離した翌日、すなわち24時間の固定化の灌流により不織布充填型バイオリアクターが完成した日にブタ肝不全モデルが手術的に作成された。

体重15~22 kgのサンゲン雑種ブタを、ketamine 12.5 mg/kg、pentobarbital 15 mg/kgの筋肉内注射により導入し、気管内挿管後、 O_2 3 L/min、Halothane 1%による全身麻酔下に、内頸静脈に点滴静注、採血及び人工肝灌流のためのダブル・ルーメンのカテーテルを挿入し、一方、総頸動脈に血圧及び心拍数をモニタリングするためのカテーテルを挿入した。

術前採血の後、腹部正中切開にて開腹した。φ10 mm リング付人工血管グラフト (Gortex, USA) を用いて門脈下大静脈シャントを置き、肝門部において門脈、固有肝動脈、及び総胆管を結紮して阻血性肝不全モデルを作成した (図8)。

5) ハイブリッド型人工肝臓システムの回路

ハイブリッド型人工肝臓システムは、不織布充填型バイオリアクター2本、酸素供給器、溶存酸素 (DO) メーター、37°C に維持されたウォーター・バス2個、そしてローラー・ポンプ・セット (Plasorto 2500; 旭メディカル) によって作られた (図9)。したがって、このシステムには 2.0×10^{10} 個のブタ肝細胞が含まれることになった。このシステムを組み立てる際、プライミング・ソリューションとしては生理食塩水が用いられ、回路全体を満たすために約 500 mL の生理食塩水を要した。ブタ肝不全モデルの内頸静脈から全血が取られ、ローラー・ポンプ、酸素供給器、ウォーター・バス、そして不織布充填型バイオリアクター2本の順で灌流され、さらにウォーター・バスを経て内頸静脈よりブタ体内に戻った。バイオリアクター流出直後の血中酸素濃度が溶存酸素メーターによって測定され、それに応じて自動的に酸素供給器による酸素吸入が行われた。

6) 同種灌流実験のデザイン

この実験を行うに当たって、ブタ肝不全モデルを4群に分けた。

グループ1は、コントロール群としてのブタ肝不全モデルの群 (LF 群) である (n=4)。

グループ2は、ブタ肝細胞を充填していない不織布充填型カラムを用いて灌流が行われたブタ肝不全モデルの群 (カラム群) である (n=4)。

グループ3は、ブタ肝細胞を充填した不織布充填型バイオリアクターを用いて灌流が行われたブタ肝不全モデルの群 (バイオリアクター群) である (n=4)。

グループ4は、ブタ肝細胞を充填した不織布充填型バイオリアクターを用いて灌流が行われたブタ肝不全モデルの群で、かつ灌流直前に免疫抑制剤 FK506 10 mg (0.45~0.66 mg/kg) を筋肉内注射した群 (バイオ+FK506群) である (n=5)。

灌流は、肝不全モデル作成手術が終わってから4時間後に開始され、5000単位のヘパリンをインフューザー・ポンプで注入しつつ、流速30 mL/minにて行われた。灌流時間の長さは、以下の式で算出された。

$$\begin{aligned}(\text{灌流時間}) &= (\text{積算流量}) / (\text{流速}) = (\text{ブタ全血量}) / (\text{流速}) \\ &= (\text{ブタ体重}) \times 0.08 \times 1000 / 30\end{aligned}$$

例えば、体重22 kgのブタでは、灌流時間は58.6分であった。

全過程を通して、ブタには、点滴静注による5%ブドウ糖液と乳酸リンゲル液、及び灌流回路のプライミング・ソリューションとしての生理食塩水のみが投与され、全血もしくは血漿の投与は一切行われなかった。

7) 血中データの測定

ブタ肝不全モデルの内頸静脈から、手術直前、手術終了直後、灌流直前(手術終了後4時間)、灌流直後、そして手術終了後10時間の血液がサンプリングされ、それぞれ vor、0時間、灌流直前、灌流直後、10時間値とされた。グループ1については、灌流直後値のかわりに5時間値を測定した。また、不織布充填型バイオリアクター(またはカラム)の流入直前及び流出直後の血液が灌流開始後20分に同時にサンプリングされ、それぞれ前値、後値とされた。これらのサンプルより、血球数(血球計算板法)、ヘモグロビン(Van Kampen-松原法³⁷⁾)、プロトロンビン時間(Quick 1段法³⁸⁾)、総タンパク(Biuret 法³⁹⁾)、アルブミン(2抗体サンドイッチ法³⁰⁾)、ビリルビン(dry reagent 法⁴⁰⁾)、総胆汁酸(Mashige 法⁴¹⁾)、血糖(ヘキソキナーゼ法⁴²⁾)、GOT、GPT(Wroblewski-Karmen法⁴³⁾)、ALP(Bessey-Lowry 法⁴⁴⁾)、LDH(Wroblewski-La Due 法⁴⁵⁾)、BUN(ジアセチルモノオキシム法²⁹⁾)、クレアチニン(Jaffe 法⁴³⁾)、電解質(イオン選択電極法⁴⁶⁾)、及びアンモニア(インドフェノール法²⁸⁾)の各データが測定された。

測定は、全てSRL(東京)にて行われた。

治療効果の判定は、体循環血中データにおける灌流直後値及び10時間値の群間比較によって行い、数値の比較検定については、ANOVA法を用いた平均値の差の検定により、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差ありと評価した。

また、灌流実験を行ったグループ2, 3, 4については、群内における灌流前後の血中データの変化についても治療効果の判定を行った。すなわち、体循環血中データにおける灌流直前値と灌流直後値の比較、及び灌流血中データにおける前値と後値の比較を行い、数値の比較検定については、Repeated measures designs法を用いた平均値の差の検定により、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差ありと評価した。

灌流終了後、ブタは飼育用のケージに移され、5%ブドウ糖液と乳酸リンゲル液の点滴静注を受けて経過を観察され、生存期間が記録された。生存期間の比較検定については、ANOVA法を用いた平均値の差の検定により、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差ありと評価した。

3. 結果

1) 全身状態及び生存期間

対照群すなわちグループ1と2では、ブタは手術終了後、閉眼して震えているか、または目を開いていても横になって動かないものがほとんどであったが、灌流治療群すなわちグループ3と4では、ブタは全例手術終了後、数時間の間は意識が明瞭で体動も活発であり、鳴いたり立とうとしたりするものが多かった。

グループ1, 2, 3, 4の平均生存期間はそれぞれ28.0, 26.7, 35.7, 34.7時間であった。グループ3及び4の生存期間は、グループ1及び2の生存期間に比べてそれぞれ有意に長かった($p < 0.05$)。グループ1と2の間、そして、グループ3と4の間では、生存期間に有意差は認められなかった。

2) 血中データ

表2及び3に、人工肝臓による灌流治療の効果判定の指標となるデータをそれぞれの群について示した。すなわち、代謝能の指標としてのアンモニア及び総胆汁酸、合成能の指標としての血糖及びアルブミン、そして、凝固能の指標としてのプロトロンビン時間の各データである。

a) 代謝能

アンモニアについては、データを、表2及び3の他、図10にグラフで示す。

体循環血中値の群間比較については、灌流直後値 ($p=0.024$)、10時間値 ($p=0.038$) とも、グループ4が1に対して有意に低い値を示したが、それ以外では有意差は認められなかった。灌流施行群内の血中データについては、体循環血中値における灌流直後値の灌流直前値に対する比較では、グループ2ではやや減少したが(有意差なし)、希釈のためと考えられ、それに対してグループ3 ($p=0.013$) と4 ($p=0.046$) では有意に減少した。灌流血中値における後値の前値に対する比較では、グループ2では有意差は認められず、不織布充填型カラムの通過によってアンモニア値は減少しないことを示したが、一方、グループ3 ($p=0.018$) と4 ($p=0.045$) では、後値は前値と較べて有意に低く、不織布充填型バイオリアクターがアンモニア値を減少させることを示した。

総胆汁酸については、データを、図11にグラフで示す。

体循環血中値の群間比較については、灌流直後値 ($p<0.02$)、10時間値 ($p<0.04$) とも、グループ3と4が、それぞれグループ1と2に対して有意に低い値を示した。灌流施行群内の血中データについては、体循環血中値における灌流直後値の灌流直前値に対する比較において、グループ2では有意差は認められず、グループ3では有意に減少し ($p=0.026$)、グループ4では減少したが有意差は認められなかった ($p=0.079$)。灌流血中値における後値の前値に対する比較においては、グループ2では有意差は認められず、一方、グループ3 ($p=0.025$) と4 ($p=0.025$) では、後値は前値と較べて有意に低かった。

b) 合成能

血糖については、データを図12にグラフで示す。

体循環血中値の群間比較においては、灌流直後値 ($p < 0.01$)、10時間値 ($p < 0.05$)とも、グループ3と4が、それぞれグループ1と2に対して有意に高い値を示した。灌流施行群内の血中データについては、体循環血中値における灌流直後値の灌流直前値に対する比較において、グループ2では減少したが、グループ3 ($p = 0.026$)と4 ($p = 0.036$)では有意に上昇した。灌流血中値における後値の前値に対する比較においては、グループ2では有意差は認められず、一方、グループ3 ($p = 0.024$)と4 ($p = 0.014$)では、後値は前値と較べて有意に高かった。

アルブミンについては、どの群においてもブタ体循環血中の値は時間的経過に伴い減少した。灌流血中のデータについては、グループ2, 3, 4とも、前値と後値との間に有意差は認めなかった。

c) 凝固能

プロトロンビン時間 (%) については、体循環血中値の群間比較においては、灌流直後値は、グループ3と4では、グループ1と比較すると低い値を示し、グループ2と比較すると高い値を示したが、有意差は出なかった (それぞれ $p = 0.177$, $p = 0.139$)。10時間値は、グループ3と4では、グループ1に対しそれぞれ $p = 0.171$, $p = 0.071$ 、グループ2に対しそれぞれ $p = 0.224$, $p = 0.095$ で高い傾向を示したが、有意差は出なかった。灌流を行った群では、ヘパリンを投与の影響により灌流血中の値はどの群においても30%以下であり、評価できなかった。

4. 考 察

本実験を行うに当たって、灌流方法について以下の検討が行われた。

最初に検討されたのは、全血と血漿のどちらを不織布充填型バイオリアクターに灌流させるかという問題であった。バイオリアクターへの酸素供給の観点からは全血の方が望ましいと考えられた。また、もし血漿を血漿分離器によって分離した場合、全血の30%ま

でしかバイオリアクターに灌流されないため、より多くの積算灌流量が必要とされるので、ブタへの循環負荷もより大きくなると考えられる。ブタ肝細胞を固定化した不織布は、赤血球が通るためには十分に粗く、ヘパリンを併用すればバイオリアクター内で血液が凝固することも無い。そこで、不織布充填型バイオリアクターには全血を灌流させることにした。さらに、十分な酸素供給を確保するために、バイオリアクターの流出直後に溶存酸素メーターを配し、酸素濃度に応じて自動的に酸素供給器から酸素が供給されるように回路を設計した。

二番目に検討されたのは、灌流をいつから始めるかという問題であった。灌流治療の効果を明確に評価するためには、肝不全がある程度進行している必要があるため、より遅い方が望ましい。しかし一方で、肝不全が進行しすぎるとモデルのブタは灌流自体に耐えられなくなってしまう。そこで、予備実験の結果、ブタの全身状態が変化する前で、かつ肝機能に異常が出現する手術終了後4時間が、灌流開始に最も適当な時間という結果を得た。

三番目に検討されたのは、灌流の流速及び持続時間をどれくらいにするかという問題であった。灌流治療を行うに当たって最も優先されるべきことは、患者へ荷される循環負荷である。流速が速すぎたり、もしくは灌流総流量が大きすぎたりすると、患者に耐えられない循環負荷を与えることになり、灌流治療の効果を発揮するどころか患者の状態を一層悪化させることになる。予備実験においては、流速が50 mL/minをこえるとブタはしばしば不可逆的な低血圧に陥った。そこで、流速は30 mL/minとすることにした。一方、ブタの総血液量をヒトの場合と同じく体重の8%として計算した場合、灌流総流量(積算流量)がブタの総血液量を上回ると、ブタは不可逆的な低血圧に陥る傾向があることがわかった。そこで、積算流量がブタの総血液量に達した時点で灌流治療を終了することにし、方法6)で述べた計算式に従って灌流継続時間を決める方針とした。

最後に検討されたのは、灌流治療開始時に人工肝臓システムを満たすプライミング・ソリューションを何にするかという問題であった。この実験における基本的な方針は、ブタ血漿の輸血は行わないということだった。なぜなら、もしブタ血漿を人工肝による灌流治

療と併用すると、治療効果が人工肝臓によるものか、ブタ血漿の輸血によるものかが識別できなくなるからである。臨床応用する場合は、人工肝による灌流治療にヒト血漿の輸血を併用することは不可欠であるが、動物実験においては、治療効果の原因を明確にするため、輸血は避けなければならない。それゆえ、プライミング・ソリユーションとしては、生理食塩水 500 mL を用いることにした。

本実験では、ブタ肝不全モデルを四つのグループに分けた。治療効果の判定は、基本的には、バイオリクター群と、対照群である LF 群との比較によって行われた。そしてもう一つの対照群として、治療効果が不織布に固定化された肝細胞によるものなのか、それとも不織布への吸着等、不織布自体の効果によるものなのかを判別し、かつ、体循環血中のデータについて、灌流回路のプライミング・ソリユーションとして用いられた約 500 mL の生理食塩水による希釈の影響を検討する目的でカラム群が作られた。一方、免疫反応の影響を検討するためバイオ+FK506 群を作った。これは、血液と肝細胞が直接接触する不織布充填型バイオリクターにおいては、物質交換能がいい一方で、バイオリクター内の肝細胞がブタ肝不全モデルから流入する血液中の免疫担当細胞により傷害されてバイオリクターの性能が落ちることが考慮されるので、免疫抑制剤 FK506 を灌流治療時に投与することがバイオリクターの効果をより向上させる可能性があると考えたからである。

カラム群においては、バイオリクター前後の灌流血中データは、どの値もほとんど変化を示さなかった。したがって、不織布充填型バイオリクターの効果は不織布に固定化された肝細胞の機能によると結論され、これにより、カラム群の循環血中データは、灌流回路のプライミング・ソリユーションとして用いられた約 500 mL の生理食塩水による希釈の影響のみを表わすと考えられることになった。

全身状態及び生存期間については、肝細胞を収容した人工肝臓システムによる灌流治療を受けたバイオリクター群とバイオ+FK506 群のブタは、治療を受けなかった LF 群とカラム群のブタに較べて、意識レベルや体動等においてより良好な所見を示し、また有意に長い生存期間を記録した。

不織布充填型バイオリクターの代謝機能を評価するにあたって、ヒトの場合であれば肝不全の進行度を反映するアンモニアとビリルビンの代謝を指標とするところであるが、ブタ血中のビリルビン値はヒトと異なり死の直前まで上昇してこないため、本実験ではビリルビンのかわりに肝不全の進行に鋭敏に反応して上昇する総胆汁酸を、アンモニアとともに代謝機能の評価の指標として用いた。

アンモニアについては、体循環血中値の群間比較においては、バイオ+FK506 群が LF 群に対して直後値、10時間値とも有意に低い値を示したが、それ以外では有意差は認められなかった。これについては、バイオリクター群とバイオ+FK506 群の4時間値が、LF 群とカラム群よりも著明に高かったため、灌流治療により体循環血中値が減少してもなお、群間比較では有意差が出なかった可能性が挙げられる。バイオリクター群とバイオ+FK506 群の4時間値が著明に高かった原因については不明であるが、アンモニアは個体差の大きい物質であること、手術後の状態に個体差があること等が考えられる。しかし、時間的変化においては、体循環血中の直後値は4時間値に対して、カラム群では減少したものの有意差は認めなかったのに対し、バイオリクター群とバイオ+FK506 群の有意に減少し、希釈の影響を考慮に入れてもなお、灌流治療が体循環血中のアンモニアの減少に効果があったことが示された。これは、灌流血中のアンモニア値において、後値が前値に対し、カラム群では有意差は認めなかったのに対し、バイオリクター群とバイオ+FK506 群では有意に減少したことを反映している。

総胆汁酸については、体循環血中値の群間比較においては、バイオリクター群及びバイオ+FK506 群が、それぞれ LF 群及びカラム群に対して、直後値、10時間値とも有意に低い値を示した。4時間値と直後値の比較では、バイオリクター群においてのみ有意な減少を示したが、灌流血中の総胆汁酸値においては、バイオリクター群と FK506 群で後値が前値より有意に減少した。

アンモニア及び総胆汁酸値におけるこれらの結果から、不織布充填型バイオリクターは肝臓の代謝機能を代替する高い能力を持っていることを示していると言える。

不織布充填型バイオリアクターの合成能は血糖とアルブミンによって評価した。ex vivoの実験では、生体の生命維持に欠かせない糖の合成も評価に加えるべきであり、Rozgaらをはじめとする他施設もex vivoの実験では血糖を合成能の指標としてもちいている場合が多く^{8, 9, 12, 13)}、我々もその方針とした。

血糖については、体循環血中値の群間比較においては、バイオリアクター群及びバイオ+FK506群が、それぞれLF群及びカラム群に対して、直後値、10時間とも有意に高い値を示した。直後値は4時間値に対し、バイオリアクター群及びバイオ+FK506群で有意に上昇した。これは、これらの群において、灌流血中の後値が前値より有意に高いことを反映している。

アルブミンについては、灌流血中及び体循環血中の値に不織布充填型バイオリアクターの効果を認めることはできなかった。ヒト成人の肝臓の一日当たりのアルブミン分泌量は約15gであるとされている⁴⁷⁾。我々のin vitroの機能測定実験では、ブタ肝細胞を固定化した不織布充填型バイオリアクターは、一日当たり3.57~4.72gのアルブミンを分泌した(実験II)^{17, 36)}が、これは、今回の実験では、灌流時間が1時間と短期であったこと、もしくは、培養液ではなく肝不全の全血を灌流した場合アルブミン合成能が落ちる可能性があること等の原因が考えられる。

人工肝臓の性能を評価するにあたっては凝固機能の検討が不可欠であるが、本実験では不織布充填型バイオリアクターの凝固機能をプロトロンビン時間(%)によって評価した。灌流血中のプロトロンビン時間はヘパリン投与の影響で評価の対象にならないが、バイオリアクター群とバイオ+FK506群では、カラム群と較べて5時間値及び10時間値のいずれにおいても有意差は出なかったものの、有意に高い傾向を示した。このことにより、不織布充填型バイオリアクターは、肝不全の進行に伴う凝固機能の低下を防ぎその機能の一部を代替した可能性が指摘できる。

バイオリアクター群とバイオ+FK506群との間には生存期間には有意差を示さず、血中データについても特筆すべき効果の差は認められなかった。FK506は、T細胞活性化遺伝

子の転写を阻害し、強力な免疫抑制作用を持つことが知られており、今回は、その固定化肝細胞への急性拒絶反応の防止の意味で用いたが、その効果を認めることはできなかった。しかし、今回は、FK506の血中濃度をモニタリングしておらず、その効果の有無を一概に結論づけることはできないと考えられる。

5. 小 括

前章までの基礎実験から、我々は、単離肝細胞を固定化した不織布充填型バイオリアクターが最も臨床応用に適すると考え、これによるブタ阻血肝不全モデルに対する同種灌流治療を施行した。その結果、治療群は対照群に較べて、生存期間及び血中テータの有意な改善を示し、不織布充填型バイオリアクターが、肝臓の代謝機能、糖新生能及び凝固機能を代替する十分な能力を持つことが示された。本実験では効果を認められなかったアルブミン合成を含め、今後臨床応用に耐える性能を持つものにするべく一層の性能改善が期待される。

おわりに：今後の展望

本研究において開発した不織布充填型バイオリクターを用いたハイブリッド型人工肝臓システムは、肝不全の治療法として有効であり、臨床応用に向けて有望なものと考えられる。

今後、臨床応用に向けて検討していくべき最大の問題は、何の動物の肝細胞をバイオリクターに固定化するかである。中でも議論が別れるのは、ヒト肝細胞を用いて同種灌流を行うのか、もしくはブタ、サル等の肝細胞を用いて異種灌流を行うのかであろう。

1. ヒト肝細胞の不死化機構の研究

第3章は、臨床例においてヒト肝細胞を用いた同種灌流を行うことを想定した実験であった。ヒト全肝を人工肝臓に使えるケースは、脳死肝移植のドナー肝で傷んでいるため移植に使えないものが手に入る場合であるが、このようなケースは稀であり、また、劇症肝炎や術後肝不全といった人工肝臓治療の最も適応となる症例に時期的に合致して手に入るには限らないので実用的ではない。したがって、ヒト肝細胞を用いる場合、自己増殖能力を持った肝細胞を不織布充填型バイオリクターに固定化し、これを培養して量的に十分な肝機能を代替できるようになったものを実用に備えるという方針が現実的と言える。

そこで、如何にして自己増殖能力を持った肝細胞株を得るかが問題となる。Sussmannらは、肝機能を有し、かつ自己増殖能力を持つものとしてヒト胎児肝芽細胞腫に注目し、この細胞株を樹立してホローファイバー型モジュール内で培養することにより、独自のバイオリクターを作り出し臨床応用に至っている⁹⁻¹⁰⁾。

我々が現在取り組んでいるのは、遺伝子工学的手法により増殖活性を持つ遺伝子をヒト正常肝細胞に導入することにより不死化肝細胞株を樹立して不織布充填型バイオリクター内で培養し、かつ細胞が十分に増殖してバイオリクター内で融合状態になった段階で増殖を抑制するという方法である。具体的には、電気穿孔法またはリポフェクション法に

より、ヒト、ニホンザル、ブタの初代肝細胞へ変異 p-53、c-Hras、c-myc といった癌遺伝子の導入を試みている。ことに変異 p-53 はコドン 248 及び 273 にそれぞれトリプトファン及びシステインを点変異として持ち、高い刑罰転換能を持つことがすでに証明されているもので⁴⁴⁾、不死化肝細胞株の樹立が期待される。また、増殖を止める方法としては、不死化肝細胞株のプロモーターの下流にサイクリン・インヒビターをリポフェクション法により導入しておいて、十分に細胞が増えた段階でデキサメサゾンを加えることによってサイクリン・インヒビターを活性化させることを検討しており、ヒト肝癌細胞株 HepG2、HUH6、HUH7 においてこれを試みている。

しかし、この際問題になるのは、現在のところ不死化細胞株の樹立という一般的な癌遺伝子を導入する方法が専ら行われており、腫瘍形成性の有無によって癌化と不死化を区別しているのであるが、いずれの場合にせよ、たとえ導入に成功したとしても肝機能は著しく失われる可能性が高いということである。事実、上記 Sussmann らのヒト胎児肝芽細胞腫株においては肝細胞機能が低いため、バイオリアクターとしての性能が十分でなく、今なお広く臨床の現場で用いられるには至っていない。この方針を取る場合、いかに肝細胞機能を失わずに増殖能を獲得させるかが今後の課題であろう。

2. トランスジェニック・ピッグの研究

一方、異種肝細胞を用いるケースとしては、ブタ初代肝細胞をデキストラン製のマイクロキャリアーに固定化したものをホローファイバー型モジュールに充填したバイオリアクターを開発し、臨床応用に至っている Rozga らの例がある⁷⁻⁸⁾。この場合問題になるのは、第一にはブタ肝細胞が灌流されるヒト血液中において機能するかどうかであり、第二には、仮にブタ肝細胞がヒト血液中において機能した場合でも、窒素化合物やビリルビン、毒物等の代謝機能に関してはブタ肝細胞でも代替しうるとしても、蛋白合成その他の合成能については異種の合成産物を作るのであるから、それらがヒト体内で有効に働くよりもむしろ異種蛋白として有害な作用をもたらすと考えられることである。Rozga らは、彼等の入

工肝臓の目的は肝臓の代謝能を担うことに限るもので、上述した問題についてはホローファイバーの膜が免疫グロブリンやアルブミン等の巨大分子の蛋白をカットするので解決されているとしている。しかし、その場合腎透析に加うる人工肝臓のメリットとしてはアンモニアの代謝くらいのもとなり、わざわざ患者に循環系への負担を課してまで実施する価値があるかどうか疑問である。実際、彼等の人工肝臓システムは血漿交換との併用で使われており、症例を重ねているとはいえ今なお実験的治療の段階にあると言える。

異種肝細胞を用いる場合、マイクロインジェクション等の発生工学的手法によりブタの胚細胞にヒト遺伝子を導入し、育ったトランスジェニック・ピッグの肝臓を用いるという方法が、異種肝移植をも同時に目指した研究として有望と考えられる。異種肝もしくは肝細胞をヒトの治療に用いる際、まず直面する問題は、いかにして超急性拒絶反応(HAR)を抑制するかである。HARの発生において主要な役割を果たすのは補体系の活性化であるが、昨今これを抑制する因子として decay accelerating factor、CD59等の膜結合型補体制御因子が注目されており、これらの遺伝子をブタの胚細胞に導入する研究が世界的に行われている⁴⁹⁻⁵²⁾。この際さらに問題となるのは、胚細胞に導入されたこれらの遺伝子が成長したブタにおいて発現するのが、心臓、腎臓、肺、皮膚、筋肉、角膜等であり、現時点で肝細胞には発現が得られていないことである。従って、現在のところ、トランスジェニック・ピッグの研究はなお肝移植と結びついておらず、通常のブタ肝をヒトに移植する場合のHARの発生において主要な役割を果たすとされている Gal α(1,3)Gal を除去する方法について基礎研究が行われている段階である。

将来的には、ヒトタンパク産生遺伝子をブタ胚細胞に導入する等の方針が考えられ、こういった研究の成功が異種肝移植もしくは異種肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓の臨床医療における普及をもたらしと考えられる。

このように、癌遺伝子導入によるヒト不死化細胞株の樹立または発生工学的手法によるトランスジェニック・ピッグの生産が、今後の人工肝臓研究の焦点となることが予想される。

謝 辞

本研究は、東京大学医学部第一外科武藤徹一郎教授の御校閲を賜わり、長島郁雄先生その他諸先生方、並びに東京大学生産技術研究所長鈴木基之教授の御鞭撻を戴き、成し遂げられたものであることをここに記し、厚く感謝申し上げます。また、東京大学生産技術研究所助手酒井康行先生には、本プロジェクトを通じ同志として絶大なる御協力を戴いたことを厚く感謝いたします。最後に、東京大学医学部第一外科技術官須永昇氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Opolon P, Rapin JR, Huguet C, Granger A, Delorme ML, Boschath MB, Sausse A. Hepatic failure coma treated by polyacrylonitrile membrane hemodialysis. *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 22, 701-710, 1976
- 2) Yatzidis H. Recherches sur l'epuration extra renale a l'aide du carbon actif. *Nephron*, 1, 310-312, 1964
- 3) 井上昇 膜分離方式による血漿交換法の開発と臨床応用. *日本臨床*, 40, 897-902, 1982
- 4) 杉江三郎, 杉浦光雄, 堀原一. 交叉透析装置の開発と臨床応用. *日本消化器病学会雑誌*, 54, 504-509, 1957
- 5) Otto JJ, Pender JC, Cleary JH, Sensening DM, Welch CS, Albany NY. The use of a donor liver in experimental animals with elevated blood ammonia. *Surgery*, 43(2), 301-312, 1958
- 6) Ozawa K, Kamiyama Y, Ukikusa M, Tobe T. Clinical experience of postoperative hepatic failure treatment with pig or baboon liver cross-hemodialysis with an interposed membrane. *Artif. Organs*, 6(4), 433-446, 1982
- 7) Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.*, 43(3), 506-520, 1969
- 8) Rozga J, Williams F, Ro MS, Demetriou AA. Development of bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology*, 17(2), 258-265, 1992
- 9) Rozga J, Michael D, Holzman D, Ro MS, Griffin DW, Neuzil DF, Demetriou AA. Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann. Surgery*, 217(5), 502-511, 1993
- 10) Sussmann NL, Chong MG, Koussayer T, He D, Shang TA, Whisenand HH, Kelly JH. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 16(1), 60-65, 1992
- 11) Sussmann NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH. The hepatic extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif. Organs*, 18(5), 390-396, 1994
- 12) Nyberg SL, Shatford RA, Peshwa MV, White JG, Cerra FB, Hu WS. Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 194-203
- 13) Nyberg SL, Shirabe K, Peshwa MV, Sielaff TD, Crotty PL, Mann HJ, Rimmel RP, Payne WD, Hu WS. Extracorporeal application of a gel-entrapment, bioartificial liver: Demonstration of drug metabolism and other biochemical functions. *Cell Transplantation*, 2(6), 441-452, 1993
- 14) Gerlach J, Jorres A, Troat O, Neuhaus P. Side effects of hybrid liver support therapy: TNF- α liberation in pigs associated with extracorporeal bioreactors. *Int. J. Artif. Organs*, 16, 604-608, 1993

- 15) Uchino J, Matse H, Takahashi M, Nakajima Y, Matsushita M, Hamada T, Hashimura E. A hybrid artificial liver system - Function of cultured monolayer pig hepatocytes in plasma from hepatic failure patients - . *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 37, M337-341, 1991
- 16) 成瀬勝俊, 酒井康行, 長島郁雄, 鈴木基之, 武藤徹一郎. プラ肝細胞スフェロイドを固定化した不織布充填型モジュールの性能評価. *人工臓器*, 24(3), 821-826, 1995
- 17) Naruse K, Sakai Y, Nagashima I, Jiang GX, Suzuki M, Muto T. Development of a new bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes immobilized on non-woven fabric. *Int. J. Artif. Organs*, 19(6), 347-352, 1996
- 18) 酒井康行, 鈴木基之. ホローファイバーモジュール内固定化コラーゲンゲル包活スフェロイドの機能発現. *人工臓器*, 23(2), 473-478, 1994
- 19) Mitsuda S, Matsuda Y, Itagaki Y, Suzuki A, Kumazawa E, Higashio K, Kawanishi G. Non-woven fabrics as a new cell matrices for IMR-90 human embryonic lung diploid fibroblast cells. *J. Ferment. Bioeng.*, 70(4), 289-281, 1990
- 20) Matsumura M, Motobu M, Matsuo S, Yamazaki Y, Kataoka H. Bioreactor with a radial-flow non-woven fabric bed for animal cell culture. *Animal Cell Technol. Basic & Applied Aspects* 5, Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, 433-442, 1993
- 21) Sakai Y, Furukawa K, Suzuki M. Immobilization and long-term albumin secretion of hepatocyte spheroids rapidly formed by rotational culture methods. *Biotech. Tech.*, 6(6), 527-532, 1992
- 22) Yagi K, Tsuda K, Serada M, Yamada C, Kondoh A, Miura Y. Rapid formation of multicellular spheroids of adult rat hepatocytes by rotation culture and their immobilization within calcium alginate. *Artif. Organs*, 17, 929-934, 1993
- 23) Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Biol.*, 13, 29-83, 1976
- 24) Sakai Y, Naruse K, Nagashima I, Muto T, Suzuki M. Large-scale preparation and function of porcine hepatocyte spheroids. *Int. J. Artif. Organs*, 19(5), 294-301, 1996
- 25) Sakai Y, Naruse K, Nagashima I, Muto T, Suzuki M. Functional stability of porcine hepatocyte spheroids in various culture systems under 100% porcine and human plasma condition. *Artif. Organs*, 20(1), 56-60, 1996
- 26) Sakai Y, Naruse K, Nagashima I, Muto T, Suzuki M. Short-term hypothermic preservation of porcine hepatocyte spheroids using UW solution. *Cell Transplantation*, 5(4), 505-511, 1996
- 27) Sakai Y, Naruse K, Nagashima I, Muto T, Suzuki M. In vitro function of porcine hepatocyte spheroids in 100% human plasma. *Cell Transplantation*, 5(5S-1), S41-S43, 1996
- 28) McCullough H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 17, 297-304, 1967
- 29) Marsh WH, Fingerhut B, Miller H. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *Clin. Chem.*, 11, 625-630, 1965

- 30) Dunn CYJ, Yarmush ML, Koebe G, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.*, 3, 174-177, 1989
- 31) Naruse K, Sakai Y, Nagashima I, Jiang GX, Suzuki M, Muto T. Comparisons of porcine hepatocyte spheroids and single hepatocytes in the non-woven fabric bioartificial liver module. *Int. J. Artif. Organs*, 19(10), 605-609, 1996
- 32) 水谷悟 ラジアルフロー型バイオリアクター。組織培養, 18, 259-271, 1992
- 33) 酒井康行, 鈴木基之 浮遊培養により迅速形成させた肝細胞スフェロイドの実用条件下での安定固定化と機能発現 人工臓器, 22(1), 164-170, 1993
- 34) Naruse K, Nagashima I, Sakai Y, Suzuki M, Muto T. Investigation of homologous perfusion experiment by the bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes. 10th World Congress of the Int. Soc. Artif. Organs, p149, 1995
- 35) 成瀬勝俊, 長島郁雄 不織布充填型人工肝臓モジュールによるブタ同種灌流実験の検討 第32回日本肝臓学会ワークショップ 肝臓, 37(suppl.1), 66, 1996
- 36) 成瀬勝俊, 長島郁雄, 酒井康行, 高曉江, 鈴木基之, 武藤徹一郎 不織布充填型人工肝臓モジュールによるブタ同種灌流実験の検討 肝臓病学の最前線1996 (肝臓増刊号) 印刷中
- 37) Matsubara T. A modification of Van Kampen-Zijlstra's reagent for the hemoglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta*, 93, 163-168, 1979
- 38) Quick AJ. A study of the coagulation defect in hemophilia and jaundice. *Am. J. Med. Sci.* 190, 501-507, 1935
- 39) 高月清, 鍵本忠 血漿蛋白およびその分画. 日本臨床 (秋季臨時増刊号) 40, 62-68, 1982
- 40) Wu TW. The Ektachem clinical chemistry slide for simultaneous determination of unconjugated and sugarconjugated bilirubin. *Clin. Chem.*, 30, 1304-1307, 1984
- 41) Mashige F. A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clin. Chim. Acta* 70, 79-86, 1976
- 42) 佐々木直一 血糖検査法. 臨床検査MOOK 18, 13-28, 金原出版, 1984
- 43) Wroblewski F, La Due JS. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity as an index of liver cell injury. A preliminary report. *Ann. Intern. Med.* 43, 245-255, 1955
- 44) 飯野四郎 酵素アルカリフォスファターゼ. 免疫と疾患. 4(6), 783-791, 1982
- 45) Chasson AL. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 35, 83-91, 1961
- 46) スクリブナーBH 体液一電解質バランス (柴垣昌功訳) p13, 中外医学社, 1975

- 47) Schiff L, Schiff ER Diseases of the Liver. 7th Edition, vol 1,1993 J.B.Lippincott Company
- 48) Yanoshita RK, Miyagi M. Malignant transformation of rat embryo fibroblasts by cotransfection with eleven human mutant p53 cDNAs and activated H-ras gene. *Oncogene*, 11, 1339-1345, 1995
- 49) Rosengard AM, Cary N, Horseley J, Belcher C, Langford G, Cozzi E, Wallwork J, White DJG Endothelial expression of human decay accelerating factor in transgenic pig tissue: A potential approach for human complement inactivation in discordant xenografts. *Transplantation Proceedings*, 27(1), 326-327, 1995
- 50) Kroshus TJ, Bolman RM, Dalmasso AP, Rollins SA, Guilmette ER, Williams BL, Squinto SP Fodor WL. Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogeneic perfusion model. *Transplantation*, 61, 1513-1521, 1996
- 51) Sandrin MS, Mckenzie FC Gal α (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunological reviews*, 141, 169-190, 1994
- 52) Velander WH, Johnson JL, Gwazdauskas FC, Drohan WN. High level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12003-12007, 1992

表1. 不織布充填型バイオリアクターとホローファイバー型バイオリアクターの比較.

	容積 (mL)	細胞数 ($\times 10^{-10}$)	アンモニア 除去能 ($\times 10^{-6}$ mol/h)	尿素 合成能 ($\times 10^{-6}$ mol/h)	アルブミン 分泌能 ($\times 10^{-2}$ g/day)
1. 不織布充填型 バイオリアクター (単離肝細胞)	200	1	82	142	357
2. 不織布充填型 バイオリアクター (スフェロイド)	200	0.55	75	138	255
3. ホローファイバー 型バイオリアクター (スフェロイド: 酒井ら, 1994)	25	0.0025	4.25	4	0.33
	200	0.02	34	32	2.64
4. ホローファイバー 型バイオリアクター (単離肝細胞: Nyberg ら, 1993)	50	0.01	—	14	0.61
	200	0.04	—	56	2.44

注: 3及び4の下段は容積を200 mLに換算した値.

表 2. 同種灌流実験におけるブタ肝不全モデルの循環血中データ

LF群 (n=4)

	vor	0h	4h	5h	10h
NH ₃	77±24	161±14	221±32	307±26	532±16
BA	7±3	73±21	209±26	235±22	451±51
Glu	142±16	285±51	213±33	166±14	45±13
Alb	3.4±0.1	3.1±0.2	2.9±0.1	2.9±0.1	2.1±0.1
PT	100±0	87±16	64±31	59±26	31±25
K	4.20±0.27	4.47±0.45	4.83±0.15	4.97±0.31	5.20±0.27
Ht	42.5±1.7	43.8±8.0	48.0±10.0	46.3±3.7	35.0±9.6

カラム群 (n=4)

	vor	0h	灌流直前値	灌流直後値	10h
NH ₃	93±16	188±38	272±23	265±33	489±50
BA	6±3	58±14	220±44	243±25	590±95
Glu	125±44	296±60	225±70	148±45	54±13
Alb	3.5±0.5	3.0±0.5	3.0±0.5	2.5±0.8	2.0±0.3
PT	100±0	91±17	61±19	<30	33±14
K	4.45±0.19	5.03±0.17	5.10±0.41	5.07±0.91	5.57±0.90
Ht	44.3±5.9	46.3±2.9	46.0±2.9	35.3±7.5	34.5±4.7

バイオリクター群 (n=4)

	vor	0h	灌流直前値	灌流直後値	10h
NH ₃	85±16	168±30	345±39	255±14*	456±131
BA	6±1	53±4	215±18	180±18*	190±75
Glu	116±26	313±24	231±33	384±76*	194±41
Alb	3.6±0.3	3.3±0.2	3.3±0.2	2.4±0.3	2.2±0.3
PT	100±0	94±1	74±17	49±16	52±10
K	4.53±0.45	4.87±1.05	5.43±0.21	4.40±0.20*	5.33±1.04
Ht	42.8±2.1	47.5±3.1	52.7±2.5	43.7±4.0	39.0±6.0

バイオ+FK506群 (n=5)

	vor	0h	灌流直前値	灌流直後値	10h
NH ₃	67±10	143±36	360±69	226±61*	349±57
BA	7±3	110±9	206±35	175±25	153±40
Glu	109±25	421±34	232±37	409±113*	232±37
Alb	3.1±0.2	2.7±0.2	2.6±0.3	2.1±0.2	2.3±0.3
PT	100±0	93±5	60±18	51±22	61±17
K	4.43±0.35	4.63±0.47	4.98±0.37	4.40±0.46	5.77±0.32
Ht	37.8±2.3	40.2±5.8	41.5±5.7	33.7±4.7	30.0±11.8

注：平均値±標準偏差。*：灌流直後値が灌流直前値に対し p<0.05 で治療効果を発揮。NH₃；アンモニア(μg/dL) BA；総胆汁酸(μM/L) Glu；血糖(mg/dL) Alb；アルブミン(g/dL) PT；プロトロンビン時間(%) K；カリウム(mEq/L) Ht；ヘマトクリット(%)

表3. 同種灌流実験におけるバイオリアクター前後の灌流血中データ
 カラム群 (n=4)

	前値	後値
NH ₃	224±12	227±44
BA	195±65	187±35
Glu	122±48	118±41
Alb	2.2±0.5	2.1±0.3
PT	<30	<30
K	5.23±1.16	5.20±1.31
Ht	34.7±4.0	34.7±2.5

バイオリアクター群 (n=4)

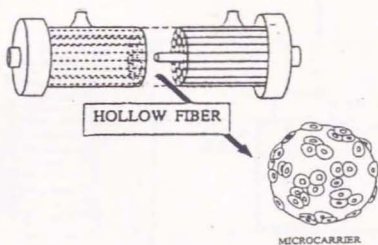
	前値	後値
NH ₃	290±29	155±30*
BA	175±13	94±17*
Glu	213±25	601±119*
Alb	2.2±0.3	1.8±0.4
PT	<30	<30
K	5.18±0.32	3.70±0.56*
Ht	46.0±5.7	45.0±2.8

バイオ+FK506群 (n=5)

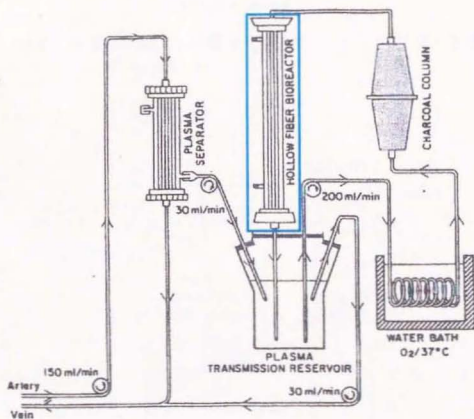
	前値	後値
NH ₃	289±39	210±45*
BA	157±31	129±23*
Glu	285±64	683±155*
Alb	1.8±0.2	1.7±0.2
PT	<30	<30
K	4.33±0.80	3.78±0.5*
Ht	32.0±7.8	30.8±4.6

平均値±標準偏差. * ; 後値が前値に対し p<0.05 で治療効果を発揮.

NH₃; アンモニア(μg/dL) BA; 総胆汁酸(μM/L) Glu; 血糖(mg/dL) Alb; アルブミン(g/dL) PT; プロトロンビン時間(%) K; カリウム(mEq/L) Ht; ヘマトクリット(%)

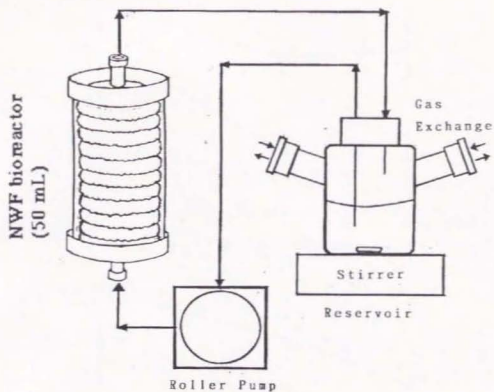


(a) ホローファイバー型バイオリアクター：Rozga et. al. Hepatology,1988

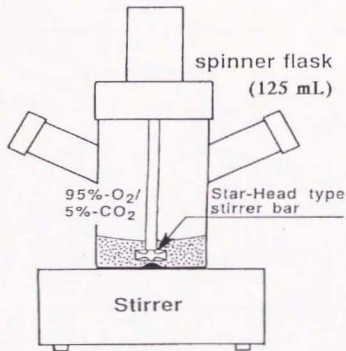


(b) 灌流回路：Rozga et. al. Hepatology, 1993

図1. 臨床応用された Rozga らのハイブリッド型人工肝臓システム

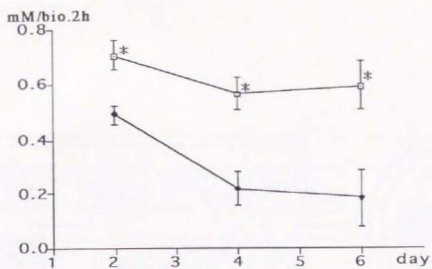


(a) 容積 50 mL の不織布充填型バイオリアクターと灌流回路
(1×10^8 cells/50 mL)

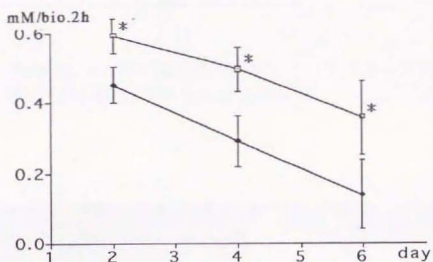


(b) 容積 100 mL の浮遊培養槽 (0.5×10^8 cells/100 mL)

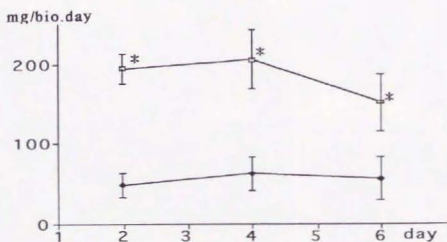
図2. 容積 50 mL の不織布充填型バイオリアクターと容積 100 mL の浮遊培養槽



(a) アンモニア除去能



(b) 尿素合成能



(c) アルブミン分泌能

図3. 不織布充填型バイオリアクターと浮遊培養槽の性能比較

□: 不織布充填型バイオリアクター ●: 浮遊培養槽

*: 不織布充填型バイオリアクターが $p < 0.05$ で有意に高値

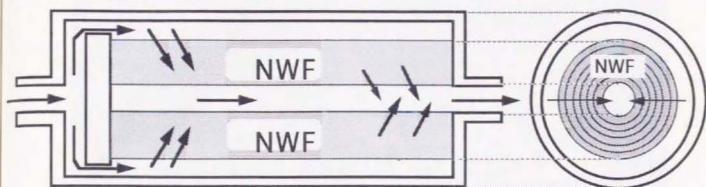


図 4 (a). 容積 200 mL の不織布充填型バイオリアクターの模式図
 NWF : 不織布 (non-woven fabric)

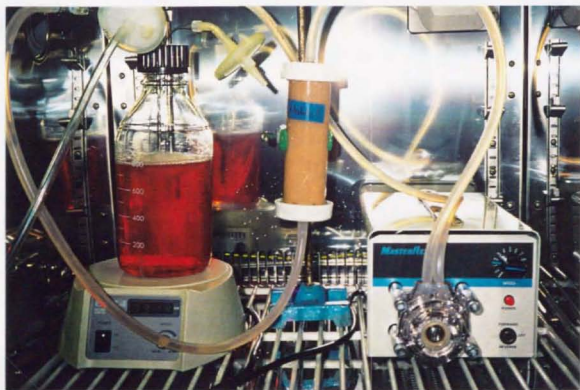
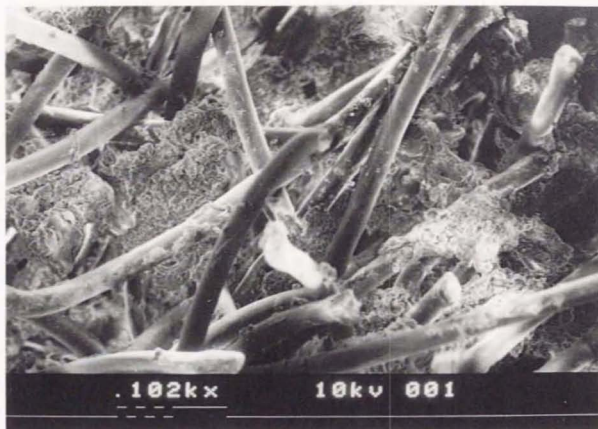


図 4 (b). 不織布充填型モジュールへのブタ肝細胞の固定化

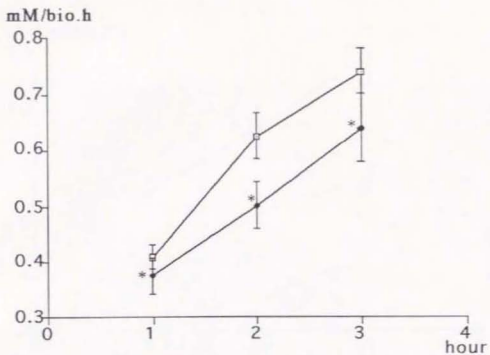


(a) 肝細胞スフェロイド

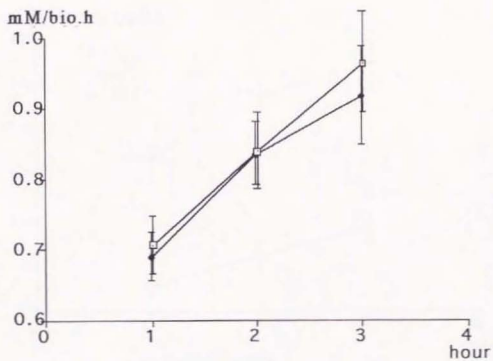


(b) 単離肝細胞

図5. 不織布充填型バイオリアクター内におけるブタ肝細胞の形態



(a) アンモニア除去能



(b) 尿素合成能

図6. 単離肝細胞 (□; n=4) 及び肝細胞スフェロイド (●; n=4) を固定化した不織布充填型バイオリアクターの代謝機能.
* ; p<0.05

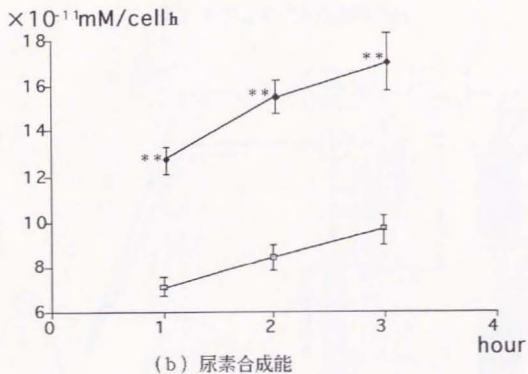
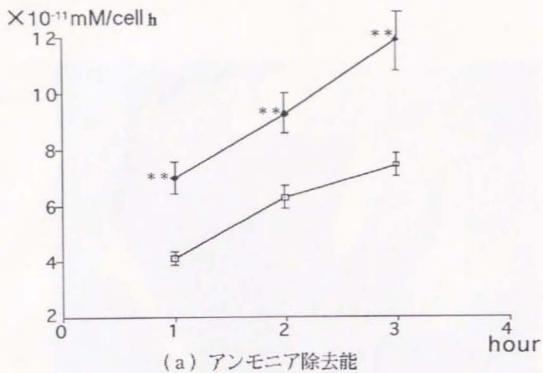


図7. 不織布充填型バイオリアクター内における単離肝細胞 (□; n=4) 及び肝細胞スフェロイド (●; n=4) の細胞当たりの代謝機能.
 **; p<0.01



図8. 肝不全モデル作成の手術

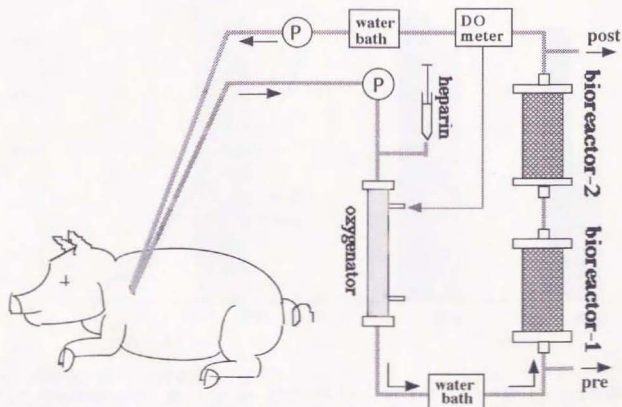


図9. 同種灌流実験の回路

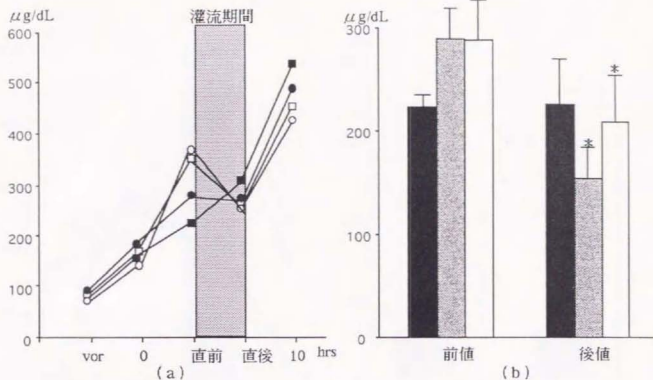


図10. 同種灌流実験におけるアンモニア代謝 (a) (b) は図11に同じ。

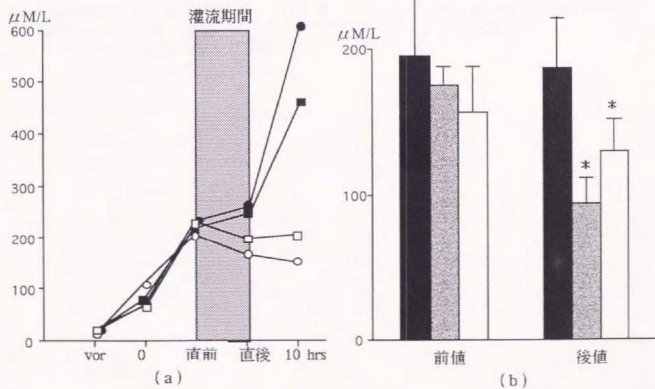


図11. 同種灌流実験における総胆汁酸代謝

(a) 体循環血中の値；■：LF群 ●：カラム群 □：バイオリアクター群 ○：FK506群

(b) 灌流血中の値；■：LF群 □：バイオリアクター群 ○：FK506群

*：後値が前値に対し $p < 0.05$ で有意 直前；灌流直前値 直後；灌流直後値

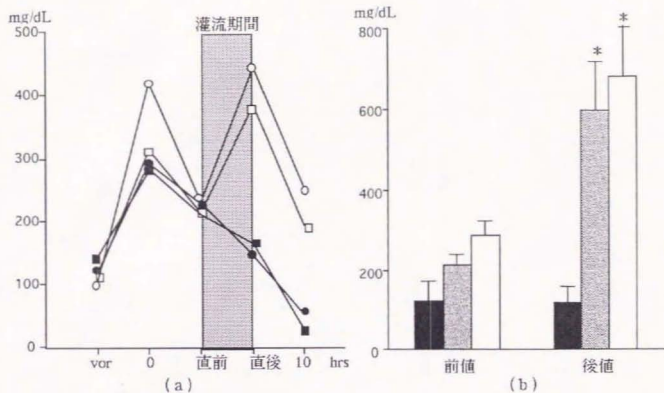
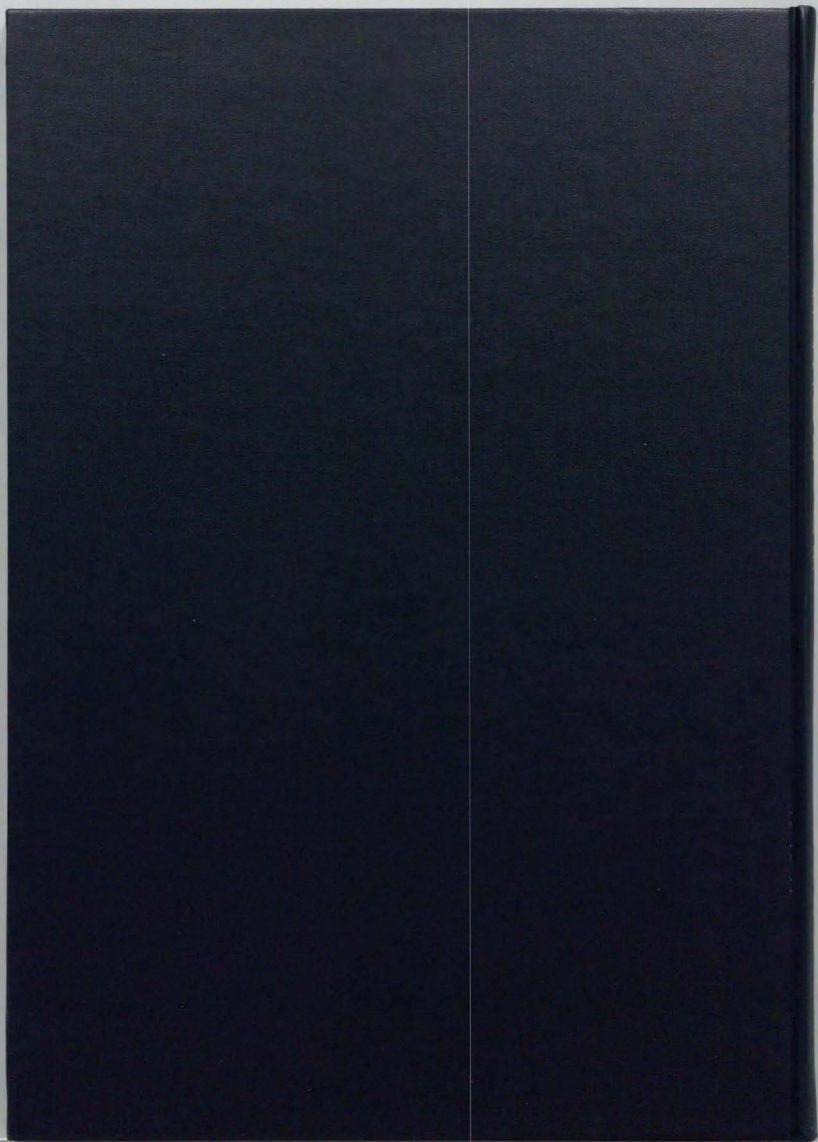


図13. 同種灌流実験における糖新生

(a) 体循環血中の値；■：LF群 ●：カラム群 □：バイオリアクター群 ○：FK506群

(b) 灌流血中の値；■：LF群 ■：バイオリアクター群 □：FK506群

*：後値が前値に対し $p < 0.05$ で有意





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak