

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

G.I.Research (2004.02) 12巻1号:61～66.

再生医学のUP TO DATE
再生医学と人工肝臓

葛西眞一



再生医学と人工肝臓

葛西眞一*

はじめに

肝臓は、生体に必要な物質の代謝産生と、不要物質の解毒といった、生命維持に重要な機能を担っている臓器である。したがって、ひとたび重篤な機能不全に至ればきわめて致死的で、通常の内科的治療ではもはや限界があり、人工肝臓や肝臓移植といった手段で対応することになる。現在、臨床に使われているおもな人工肝臓には、活性炭を用いた血液吸着、血漿交換と血液透析・濾過を併用した方法などがある。主として急性肝不全の治療におこなわれているが、劇症肝不全の救命率は約30%となっており、なお十分ではない。一方、肝臓移植は急性・慢性肝不全におこなわれ、その救命率は約70%ときわめて良好である。しかしながら、ドナー不足は深刻であり、欧米では移植を受けるまでにその20~40%は間に合わないといわれる。わが国でも1997年に脳死臓器移植が再開されたが、いまだに20例程度しか提供者がいない。そこで、緊急避難的処置として、生体部分肝移植がすでに2,000例以上おこなわれている状況

である。

一方、細胞や臓器の再生現象は古くより知られているが、近年の発生生物学、細胞生物学などの発展を背景に、科学的にこの再生現象をとらえ、医学に応用する可能性が研究されており、再生医学と称されるようになった。この肝不全に対する再生医学的なアプローチが、人工肝臓や肝臓移植の限界を埋める治療法として脚光を浴びてきた(図1)。

本稿では、再生医学という観点から、人工肝臓を見直し、その現況を紹介したい。

1. 再生医療と肝機能補助

何らかの理由で欠落した生体の機能や構築を再生医療として確立させるには、三つの重要な要素があることを1980年代の後半にVacantiら¹⁾は述べている。まず、欠損した組織や臓器の修復には旺盛な増殖を示す細胞の存在が不可欠であり、また、この細胞を取りまく周囲の環境や場が整備されなければならない。再生に関する情報を細胞間に伝達する情報伝達因子として多くの液性増殖

*Shinichi KASAI/旭川医科大学第2外科

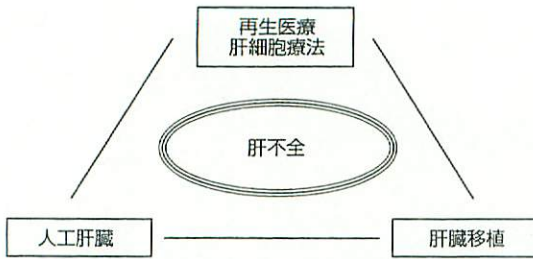


図 1. 肝不全に対する特殊治療

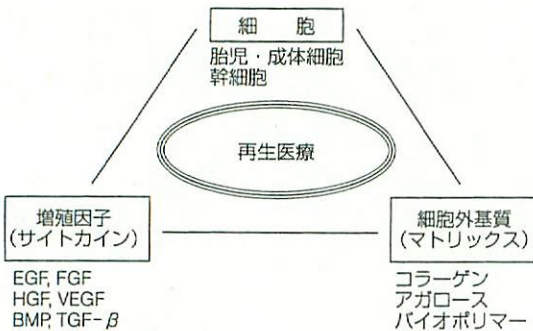


図 2. 再生医療の三要素

因子が解析され、また、細胞が増殖・分化する足場として、自然のあるいは合成の細胞外基質（間質組織マトリックス）が重要であることがわかってきた。すなわち、再生医療にとって①細胞、②増殖因子、③細胞外基質の三要素が重要な因子である（図2）。

肝機能補助という観点から、この三要素を考えると、代謝のもととなる酵素系を有する動物やヒトの肝細胞がまず必要であり、この細胞が組織、臓器として再生増殖するためには何らかの足場である細胞外基質が重要で、さらに、細胞間情報伝達因子あるいは増殖因子などのサイトカインが必要となる。

この細胞、基質、増殖因子を、最適な状態で作用させ、どのようなかたちで組織、臓器として再現させるかが再生医学的に作られた人工肝臓にとって重要な要素となる。

2. バイオ人工肝臓の発展

Vacanti らが再生医療という概念を提唱するはるか昔から、生物の再生現象は知られ、また研究されてきた。肝臓についていえば、肝臓の機能がいかなるものかを研究する手段として、肝臓を摘出し、細胞単位に分離して、細胞培養という最も単純な生体のシミュレーションモデルが用いられた。正しい機能を研究するには、活性度の高い細胞、良好な機能を再現しかつ分裂増殖するための足場（マトリックス）そして、活性度を維持するための各種のサイトカインの知識が必要となった。肝細胞が十分な機能を再現できるこのシミュレーションモデルは、取りも直さず、生体肝を代謝のリアクターとして用いる生物学的あるいはバイオ人工肝臓ということになる。その歩みと現況について以下に述べる。

1) バイオ人工肝臓の基礎研究

リアクターとして用いる肝臓は、当初は肝スライスや肝組織塊として用いられたが、良好な機能を維持、再現することはできなかった。1970年代になって、コラゲナーゼ消化法が開発され、活性度の高い分離肝細胞が得られるようになった。そこで筆者らは、ビーグル犬の肝臓より分離した約40gの肝細胞浮遊液を膜外スペースに封入する液槽型PMMA中空糸膜（分画分子量100kDa）モジュールを試作した。中空糸膜をマトリックスにみため、増殖因子としてはインスリン、上皮細胞増殖因子（epidermal growth factor：EGF）などを用いた。D-ガラクトサミン誘導急性肝不全イヌと約6時間の血液灌流をおこない生存時間の有意な延長を認めた。しかし、酸素ガスのバブリングで肝細胞に対する酸素供給をおこなったため、灌流中にリアクター内肝細胞の生存率が約60%程度まで低下した。米国のMatsumuraらは、ウサギ肝細胞を透析用中空糸膜モジュールの膜外スペースに封入して悪性黄疸患者に血液灌流をおこな

表 1. わが国におけるおもなバイオ人工肝臓の研究

発表者	モジュールのタイプ	使用細胞	成績
永森ら	ラジアルフロー型	ブタ胎児肝 ヒト肝腫瘍由来株 FLC	基礎的培養, ブタ体外灌流 実験・アンモニア↓
絵野沢ら	キグナス型	GS-HepG2	虚血性肝不全ブタ生存時間の 延長・アンモニア↓
船津ら	PUF 多細管型	ブタ肝細胞	虚血性肝不全ブタ生存時間の 延長・アンモニア↓
成瀬ら	不織布固定化 (全肝型, 浮遊培養型)	ブタ肝細胞	肝全別ブタ 生存時間の延長
柳ら	PVF 固定・充填層型	ブタ肝細胞 100 g	α -アマンチン・エンドトキシン 肝不全ブタ・生存時間の延長・ アンモニア↓
梅原ら	ブタ全肝灌流 (HF 交叉法)	ブタ肝細胞 (M. W. 100 万)	基礎的な灌流実験
小林ら	不織布固定中空糸膜型	ブタ肝細胞	肝不全サルの救命

い, 一時的な減黄効果と症状の改善を報告している。

肝細胞は何らかの細胞外基質に接着することにより, 高い細胞機能の発現と機能長期維持が可能となる。そこで, 被包化, マイクロキャリア, 多孔質担体, コラーゲンコート中空糸膜などのさまざまな細胞外接着基質の応用が検討された。

米国の Dixit らは, 肝細胞の被包化を試み, 先天性代謝異常ラットへの腹腔内移植による減黄効果を認めた。バイオ人工肝での使用を考慮した場合, 中空糸膜を必要とせず簡便かつ安価な方法であるが, 臨床応用には 300 g 程度の大量の肝細胞が必要と考えられ, 被包化に伴う容積の増大, すなわち装置の大型化が問題である。また, 機械的な力によりカプセルが破損した場合, 流出した肝細胞が直接血中もしくは血漿中に混入してしまう危険性がある。

セルロース由来多孔質マイクロキャリアは, 比重が 1.03 と軽く浮遊培養に適し, 内部に細胞を保持することにより, 外力から細胞を保護する。筆

者らの検討では, 肝細胞は球形を維持したままマイクロキャリアの中心部まで接着しているのが観察された。また, マイクロキャリア接着肝細胞は, 浮遊培養において単層培養肝細胞と同等のアンモニア代謝およびグルコース合成能を示し, また 9 時間にわたる灌流においても肝細胞機能が維持されていた。

船津らは, 肝細胞スフェロイド (肝細胞が集合し, 再度組織塊を構成した肝細胞集団) が充填されているポリウレタンフォーム (PUF) モジュールを用いて虚血性肝不全ブタの血漿灌流をおこなう, 血中アンモニア濃度の低下および生存時間の延長を認めた。

表 1 に, わが国におけるおもなバイオ人工肝臓の基礎研究をまとめた。代謝をおこなわせる細胞としては, 大量の肝細胞が必要であるところから, ほとんどがブタの肝細胞が用いられており, 一部, ヒト由来の肝細胞も検討されている。細胞接着の基質としては, 各種の微粒子担体や合成ポリマー, 繊維などが用いられ, 肝不全動物との灌流実験で,

表 2. 臨床試用ハイブリッド型人工肝臓

報告者	モジュール型	成績
Demetriou ら ²⁾ (米国)	マイクロキャリア接着ブタ肝細胞 約 50 g・中空糸型	劇症肝炎, bridge use 有効率約 80%
Sussman らの グループ ³⁾ (米国)	ヒト肝芽細胞由来株化細胞 (C3A) 約 200 g・中空糸型	劇症肝炎, bridge use 有効率約 60%
Gerlach ら ⁴⁾ (ドイツ)	ブタ肝細胞・数 100 g 数種類の中空糸膜積層型	bridge use, 少数例 有効率 100%
Patzer ら (米国)	コラーゲンゲル包埋ブタ肝細胞 100 g・中空糸型	急性肝不全 4 例 1 例肝移植, 3 例死亡 (5~10 日)

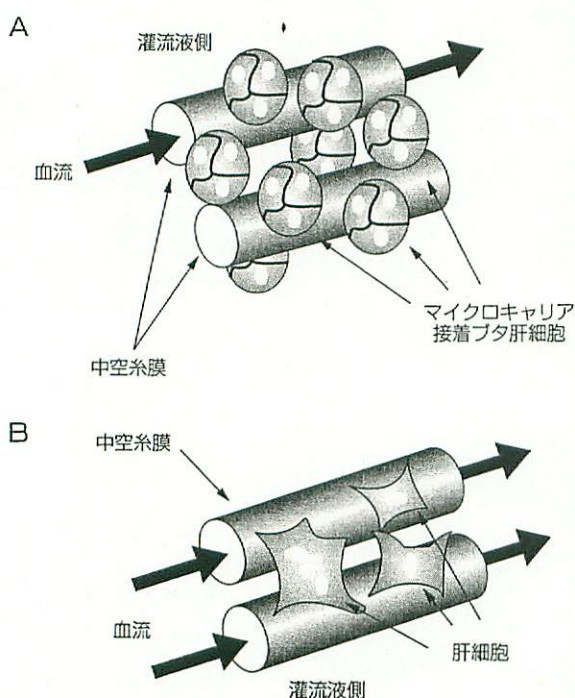


図 3. 臨床に应用されているバイオ人工肝臓

A: ブタ肝細胞をマイクロキャリアに接着させ, 中空糸モジュールの中空糸膜外スペースに封入したもの.

B: ヒト肝芽細胞腫由来の肝細胞を封入したもの.

アンモニア代謝能, 生存時間の延長などが確認されている.

2) 臨床治験の進められているバイオ人工肝臓
現在欧米では数種類 of バイオ人工肝臓が臨床に

試用されているので, その成績を紹介する(表 2).

米国の Demetriou ら²⁾は, 膜外スペースに約 50 g のデキストランマイクロキャリア接着ブタ肝細胞(図 3: A)を封入した中空糸膜モジュールと活性炭吸着カラムの組み合わせによる人工肝機能補助システムを作製し, 急性肝不全患者に対する血漿灌流をおこなっている. 急性型劇症肝炎患者に対する 6~9 時間にわたる血漿灌流では, 血中のアンモニア濃度や頭蓋内圧の低下, 循環動態の安定化などが認められ, 肝移植用ドナー肝入手までの bridge use に成功している.

米国の Sussman ら³⁾は, 臨床での緊急需要に対応すべく肝細胞の安定供給を目的として, 旺盛な増殖力を有する肝芽細胞腫由来の株化細胞 (C3A) を用いた(図 3: B). 約 40 g の C3A を中空糸膜モジュールの膜外スペースに播種し, 約 200 g まで分裂増殖させて急性肝不全患者への臨床応用を試みた. しかし, 正常肝細胞にくらべて細胞機能が安定しないことからシステム全体の機能が低く, 期待したほどの効果は得られていない.

ドイツの Gerlach ら⁴⁾は, 酸素供給用の中空糸をも有する特殊な中空糸膜モジュール内に, 全肝の約 30% に相当する 500~600 g のブタ肝細胞を封入し, 急性肝不全患者に対する最長約 40 時間の血液灌流をおこない, 肝移植までの数日間の bridge use に成功し治験を進めている.

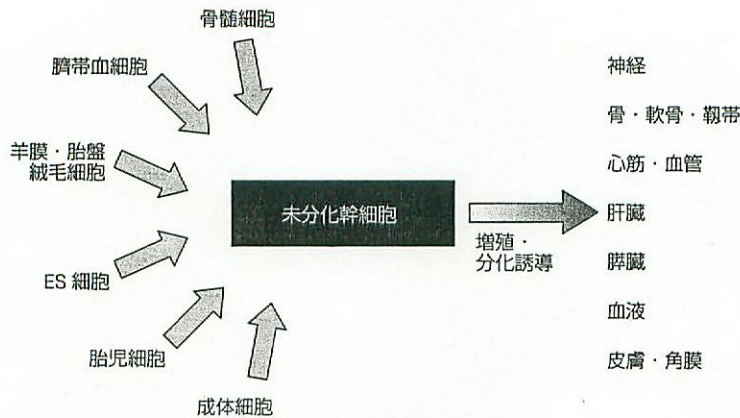


図 4. 細胞のソース

3) 肝細胞ソース (源) の研究

再生医学を支える三つの要素のうちで最も重要な因子は細胞である。バイオ人工肝臓の場合は、免疫学的にみればヒトの細胞が有利である。しかしながら、ヒトの肝臓提供すら十分ではないので肝細胞の入手は一層困難である。米国では提供された肝臓の約40%は何らかの理由で使用されないらしく、この肝臓を細胞に単離して利用する試みもなされている。成体の肝細胞は分裂増殖する能力はないので、遺伝子操作を加え、増殖能力を獲得した細胞もつくられているが、臨床に使用するには安全性が確かめられる必要がある。

そこで、入手しやすいという点からブタの肝細胞が多く用いられてきた。ところが、ブタの肝細胞では、ヒトに感染する可能性があるウイルスの存在が問題になってきた。現在、ブタの肝細胞を用いて臨床試験を続けている欧米のグループでは、患者のウイルス感染の嚴重なフォローアップをおこなうという約束のもとに続けられているのが現状である。

さて、近年の細胞生物学の発展を背景に、臓器を構成する細胞が、いろいろな組織、臓器になりうるということがわかってきた(図4)。このような細胞を幹細胞といい、その細胞数は通常臓器の1%以下ときわめて少数であるが、あらゆる臓器に存在する。肝細胞に着目すると、成人の肝臓や胎児の

肝臓にも存在し、驚くべき再生能力を有している。また、これらの細胞は、他の臓器構成細胞になりうる能力(多分化能という)をも有していることがわかった。羊膜、胎盤、絨毛細胞や臍帯血、骨髓細胞の中にも、肝細胞に分化誘導される幹細胞が認められている。

さらに、近年ヒト胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)の存在が明らかにされた⁵⁾。これは、着床前の初期胚である胚盤胞の内部細胞塊より取り出され、培養をくり返して樹立された細胞株である。培養の条件によって肝細胞やほかの組織にも分化可能である。

機能の安定性や安全性などの点から、これらの細胞が今すぐ利用できるというわけではないが、今後の進展が大いに期待される場所である。

おわりに

Vacantiらによりその概念が確立された再生医学にもとづく再生医療が、大いなる期待をもって語られている。異種動物の遺伝子操作により、ヒトとの免疫源性のバリアが低くなったとはいえ、まだまだそのハードルは高い。しかしながら、人工臓器や臓器移植のそれぞれの特性とうまく利用、融合させることにより、これまでなし得なかった新たな治療法が確立される可能性がある。ここでは、とくにバイオ人工肝臓について言及した。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* **260** : 920-926, 1993
- 2) Hui T, Rozga J, Demetriou AA : Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **8** : 1-15, 2001
- 3) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA *et al* : Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* **24** : 1446-1451, 1996
- 4) Gerlach JC, Schnoy N, Encke J *et al* : Improved hepatocyte *in vitro* maintenance in a culture model with woven multicompart ment capillary systems-electron microscopy studies. *Hepatology* **22** : 546-552, 1995
- 5) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS *et al* : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998