
細胞工学的手法を用いた不死化遺伝子導入
肝細胞移植による先天性代謝異常の治療

(12671136)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 紀野泰久
(旭川医科大学・医学部・助手)

はしがき

われわれは、1980年代より各種肝機能障害に対する新しい治療法として、肝細胞移植やハイブリッド型人工肝臓など肝細胞を用いた肝機能補助法の開発に取り組んでおり、ラット脾臓内に移植肝細胞が着実に生着し、正常肝組織を構築することを世界に先駆けて報告してきた。肝細胞移植の臨床応用には、いまだ様々な解決すべき問題点が残されている。なかでも、如何にして移植肝細胞による肝機能補助能を増加させるかが重要な課題である。これには、1) 移植肝細胞の早期分裂を刺激する方法と、2) 何らかの細胞外接着基質を用いて移植肝細胞を確実に生着させ、同時に移植部位を増加させる方法が考えられる。

本研究では、これらの方法を開発するために、肝細胞の分裂増殖法の可能性ならびに各種の接着基質の検討を行い、あわせて人工肝臓への応用についても検討したので報告する。

研究組織

研究代表者 : 紀野泰久 (旭川医科大学・医学部・助手)
研究分担者 : 松田 年 (旭川医科大学・医学部・助手)
(研究協力者 : 澤 雅之)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,100	0	2,100
平成13年度	1,300	0	1,300
総計	3,400	0	3,400

研究発表

(1) 学会誌等

Kino Y., Sawa M., Kasai S., and Mito M.: Multiporous cellulose microcarrier for the development of a hybrid artificial liver using isolated hepatocytes. *Journal of Surgical Research* 79:71-76,1998.

Ikebukuro H., Inagaki M., Mito M., Kasai S., Ogawa K., and Nozawa M.: Prolonged function of hepatocytes transplanted into the spleens of nagase analbuminemic rats. *Eur Surg Res* 31:39-47,1999.

澤 雅之、間宮規章、葛西眞一：人工肝臓開発の現況．外科治療 82:189-194,2000.

葛西眞一、紀野泰久：人工肝臓研究－肝細胞浮遊型人工肝臓．外科 63:522-527,2001.

(2) 学会発表

Sawa M., Mamiya N., Hoshi T., Kawahara T., Nakazawa F., Inagaki M., Obara M., and Kasai S.: Proliferation of ectopically transplanted autologous hepatocytes in pigs by HSS. 4th International Congress of Cell Transplantation Society, Montroux, Switzerland, 1999年3月17日

澤 雅之、間宮規章、紀野泰久、柿坂明俊、葛西眞一：バイオ人工肝臓による急性肝不全の治療－ガラクトサミン誘導急性肝不全ラットに対する肝細胞移植による検討－ 第37回日本人工臓器学会、1999年10月14日

(3) 出版物

Kasai S., and Sawa M.: Present status of an artificial liver support system for hepatic failure. Elsevier Science, Amsterdam, Tissue Engineering for the Therapeutic Use 1, edited by Y. Ikeda and Y. Yamaoka, 1998.

葛西眞一、澤 雅之: Annual review 消化器 2000; 肝細胞移植 58-64, 2000. 中外医学社. 東京

研究成果

1) はじめに

肝臓は極めて複雑な酵素系を有し、生体に必要な物質の代謝産生や、不要な物質の解毒排泄といった、生命維持に重要な機能を担っている臓器である。

肝悪性腫瘍、肝硬変症あるいは先天性胆道閉塞症などの末期肝疾患患者を救命するには、肝臓移植によるほかに方法はなく、表-1 に示すように、本邦では年間約4万人が肝疾患で死亡している。ところが、脳死下の臓器摘出が社会的に是認されたけれども、絶対的にドナー肝の数が少ない。したがって何らかの対策を早急に開発する必要がある。

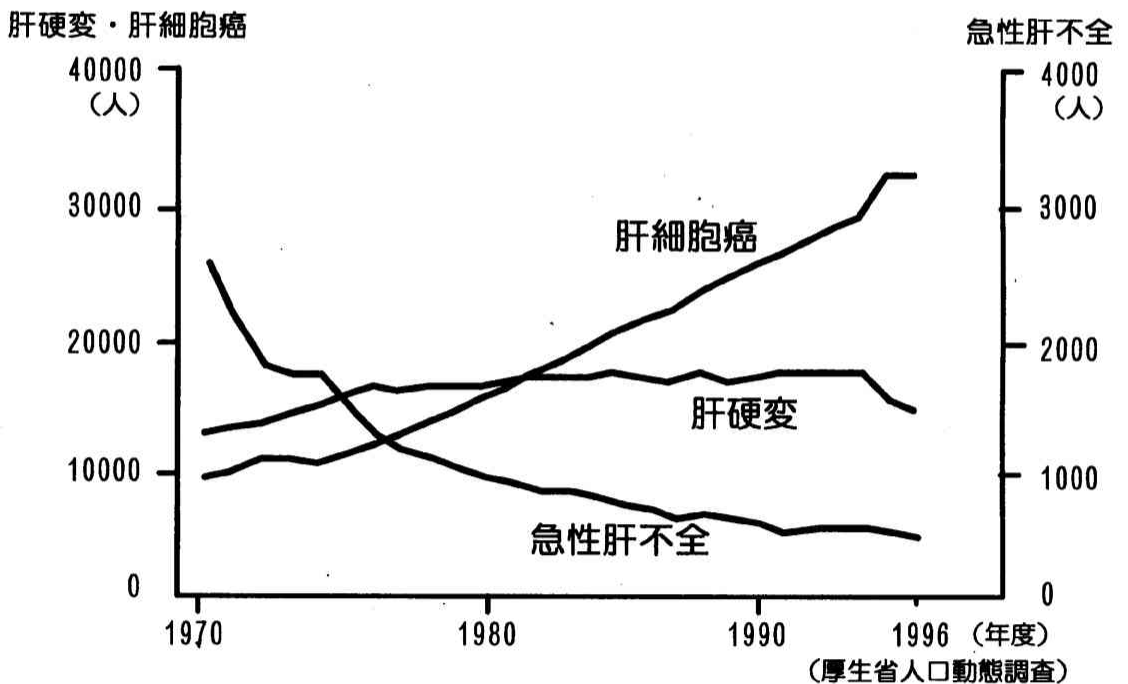


表-1. 肝疾患の年次別死亡推移

さて、肝臓は本来非常に再生力の旺盛な臓器であることが知られている。そこで、肝臓を細胞に分離して再び生体に移植し、移植された肝細胞がどんどん分裂増殖すれば弱った肝臓の機能を補助してくれるかもしれない。

コラゲナーゼ消化法の開発による肝細胞分離の成功により、肝機能不全に対

する新しい治療法として肝細胞移植および遊離肝細胞を代謝リアクターとするハイブリッド型人工肝機能補助の研究が進められるようになった。

1970年代後半のSutherlandらによる急性肝不全ラットに対する肝細胞移植の報告に端を発し、実験的急性肝不全に対する肝細胞移植の有用性が数多く報告されている。さらに米国のStromらは、急性肝不全患者に対して肝細胞脾内移植を行い、肝移植までのつなぎ役として有効であると報告した。また、先天性酵素欠損症に対する肝細胞移植も試みられ、その効果が確認されている。

遊離肝細胞を用いた人工肝機能補助法として、著者らは犬肝細胞を代謝リアクターとする人工肝機能補助装置を試作し、実験的急性肝不全動物の生存時間の延長を認めた。米国のDemetriouらによるマイクロキャリア接着豚肝細胞およびドイツのGerlachらによる3次元培養豚肝細胞を用いた人工肝機能補助装置の臨床応用が試みられ、細胞移植と同様に肝移植までのつなぎ役として有用であることが報告されている。いずれの方法も疾患の緊急性を考慮すると常に大量の肝細胞が供給可能でなければならず、ドナーソースとして、いかなる肝細胞をいかに入手するかが重大な問題点である。

本研究では、われわれが確立した肝細胞採取法により得られた肝細胞を用いて、肝細胞移植の有用性の検討を行うとともに、代謝のリアクターとした応用法について合わせて報告する。

2) 肝細胞分離法の確立

肝臓を細胞単位に分離して、活性度の高い細胞を効率よく得る事はなかなか困難であったが、1969年にBerry & Friendがコラゲナーゼ酵素消化法を開発して以来飛躍的に進歩した。本法は、ラットの門脈内にカテーテルを挿入し、0.05%の Ca^{++} を含まないコラゲナーゼ酵素液を約10分間循環灌流させて、細胞間の結合織を消化し、ハサミで肝を細切して遠心洗浄して細胞とするものである。犬、サル、豚などの大きな肝臓を分離するには、基本的なシステムは同様であるが、細胞間の接着イオンである Ca^{++} のキレート剤としてのEGTAの使用、コラゲナーゼ酵素濃度の増加(0.15%)、酵素消化時間の延長(15~30分)、低速度電動カッターの併用などの工夫が必要であった。250g前後のラットでは、viability 90~95%で約 5×10^8 コ/匹、10kg前後の犬、豚ではviability

約 90%、 2×10^{10} コ/匹の肝細胞が分離された。また、門脈内挿管の不可能な部分切除肝では、多数の針を肝に刺入して循環灌流するシステム（多肢穿刺灌流法）が有効であった。門脈内挿管法では、全肝細胞の 70% 以上を分離することができるが、部分肝の場合には多肢灌流法でも、収率は全肝の場合の 1/3 である。表-2 に、ヒトの肝臓を含めた採取成績を示す。

最近、米国の Strom らは、何らかの理由で使用しなかった肝臓を細胞単位に分離し臨床に使用している。ディスパーゼを併用しているが、活性の低下した肝臓からは収率も低下し、肝細胞のバイアピリティーも低いようである。分離された肝細胞を静置培養すると、図-1 の様にきれいに敷き石状を示し、灌流培養による代謝機能も良好に維持されており（表-3）、Strom らはチトクローム機能も良好であることを報告している。

	ラット	豚	イヌ	サル	ヒト
前 灌 流	Ca(-)Hanks' 緩衝液	EGTA 加 HEPES 緩衝液	EGTA 加 HEPES 緩衝液	EGTA 加 HEPES 緩衝液	EGTA 加 HEPES 緩衝液
灌 流 量	30ml/分 (全肝)	1l/300g肝・分 (全肝)	1l/300g肝・分 (全肝)	30ml/30g肝・分 (部分肝)	100ml/60g肝・分 (部分肝)
酵素液 { 濃度 Ca ⁺⁺	0.05% -	0.15% +	0.15% +	0.15% +	0.15% +
機 械 的 方 法	ハサミ	ミキサー	ミキサー	ハサミ	ハサミ
汙 過	ガ ー ゼ	金属メッシュ (100 μ m)	金属メッシュ (100 μ m)	ガ ー ゼ	ガ ー ゼ
採取量 (ヶ/g) バイアピリティー (%)	4~6 $\times 10^7$ 90	8 $\times 10^7$ 90	8 $\times 10^7$ 90	2~3 $\times 10^7$ 80~90	3 $\times 10^6$ 70~80

表-2. 各種動物肝細胞採取法の比較

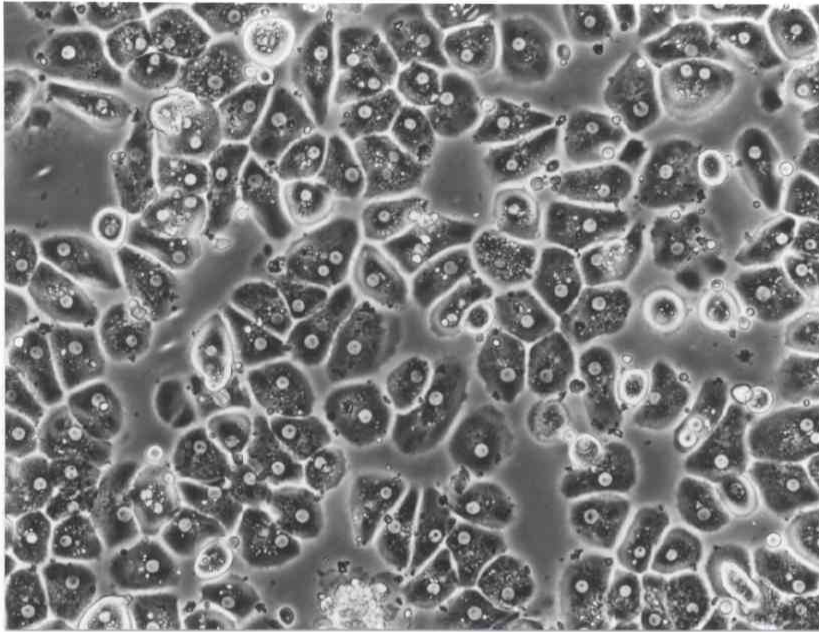


図 - 1 . 肝細胞の静置培養

Culture Time		0 hr	3 hrs	6 hrs	Metabolic Volume
Viability (%)	non-preserved (n=5)	93±0.5	79±1.4	75±3.8	—
	preserved (n=7)	75±3.0	55±4.0	50±7.0	—
Ammonia Concentration (%)	non-preserved	100	16±6.6	12±7.5	475±86.8 ^(a)
	preserved	100	46±22.0	29±15.0	99±20.0
Urea-N Concentration (%)	non-preserved	100	122±3.4	152±17.1	0.6±0.25 ^(b)
	preserved	100	119±7.1	136±11.2	0.3±0.13
Glucose Concentration (%)	non-preserved	100	136±24.3	150±33.4	2.8±0.70 ^(b)
	preserved	100	127±16.8	138±19.0	1.5±0.38

表 - 3 . 灌流培養による肝細胞の代謝機能

3) 肝細胞移植の基礎的検討と問題点

肝臓を臓器として扱うのではなく、細胞単位にして使用することによる利点として、移植手技が容易であること、手術侵襲が小さいこと、自家移植が可能であること、免疫学的・遺伝子工学的操作ができることなどがあげられる。そして、肝細胞移植の適応疾患としては、急性肝不全、慢性肝不全、先天性酵素欠損症などがあげられ、また、臓器移植時の *brige use* にも使用可能である。

肝臓移植の臨床はすでに 1963 年に始められたが、肝細胞移植の方は、1970 年になって初めて動物実験がスタートした。これは先天的な酵素欠損のために、高ビリルビン血症となっているラット (Gunn ラット) に、ラットの肝癌細胞を皮下に移植したものである。同様な実験の成功が、成熟ラットの肝細胞を門脈内に注入して得られている。われわれは、1976 年に酵素消化法で分離したラット肝細胞が、脾臓内に最も良く生着する事を見出し、脾臓が肝臓化して肝機能を再現する事を世界に先駆けて成功した。

3-1) 急性肝不全に対する検討

1970 年代より実験的急性肝不全動物に対する肝細胞移植の有用性が報告されている。肝不全モデルとしては、さまざまな薬剤性急性肝不全、虚血性肝不全や 90% 部分肝切除などの外科的急性肝不全が用いられ、移植部位としては、腹腔内、脾内、門脈内、肺内と多様であるが、肝細胞移植による生存率の改善あるいは生存時間の延長が得られている。いずれの場合も、移植肝細胞数が全肝の肝細胞数のわずか数%以下で、生存率の改善が得られている。

われわれは、D-ガラクトサミン (D-gal) 投与 12 時間後のラットに、アルギン酸 Ca 被包化肝細胞腹腔内移植と同時に、プロスタグランジン類 (PG) 生合成酵素阻害薬であるインドメタシンを投与し、網内系機能と肝不全動物の生存率改善との関連を検討した。肝細胞移植群では、血清肝逸脱酵素値の上昇および網内系機能の指標である phagocytic index (PI) の低下が抑制され、生存率は 80% に改善された。移植後 1 週間後の肝組織学的検索においてもほぼ正常な肝組織像を呈していた。一方インドメタシン投与群では、PI の経時的な低下と血清肝逸脱酵素値の著名な上昇が認められ、非移植群と同様に D-gal 投与 48 時間以内に全例死亡した (図-2)。

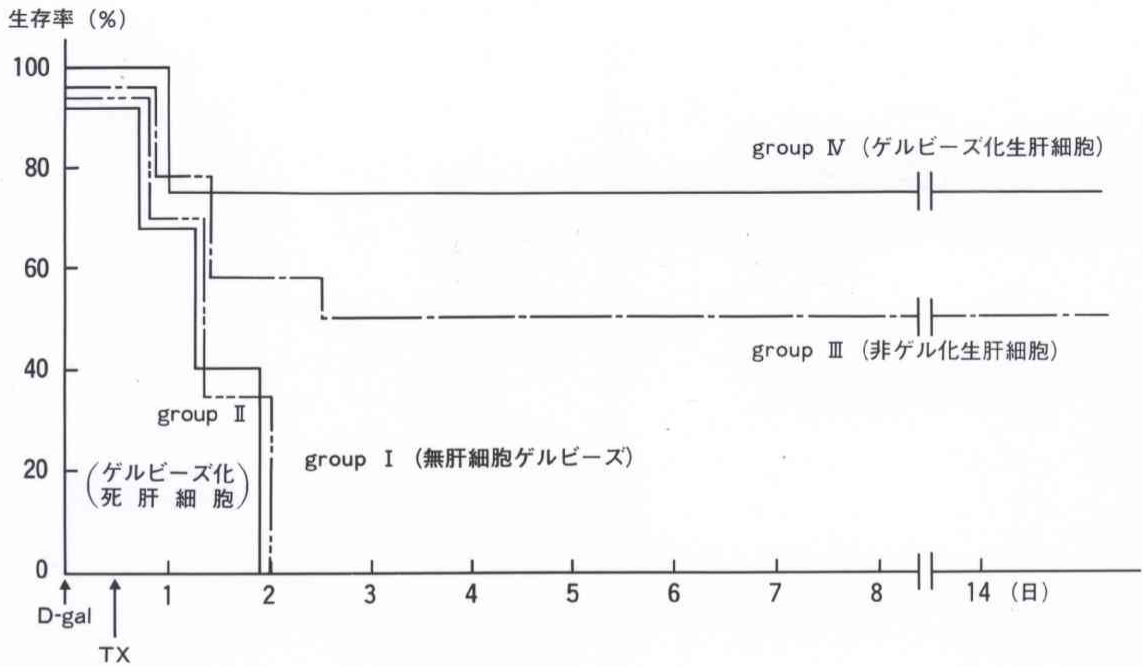


図-2. 肝不全ラットの生存率

この成績で特筆すべきことは、腹腔内に移植する肝細胞は、単離のままであるよりも、何らかの基質に包埋されている方がより有効であったという点である。また、注入された肝細胞数が全体の数%という少ない量でも生存率を向上させることが出来たという点である。肝細胞は、本来何らかの基質に接着して良好な機能を再現する細胞であるところから、後述する様に、コラーゲングルビーズ状に包埋した事が良い成績になったものと推定され、各種の方法を検討することとした。

3-2) 先天性肝酵素欠損症に対する検討

先天性代謝異常の原因は肝酵素の先天性欠損によるものであり、他の肝機能は正常である。したがって、必ずしも全肝を取り換える必要はなく、欠損した肝酵素を正常肝細胞を移植することにより補正すればよい場合があると考えられる。UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ欠損により高ビリルビン血症を呈する Gunn ラットや、アルブミン生合成が不可能な Nagase albuminemic

ラット（NAR）などに肝細胞移植が試みられ、先天性代謝異常の是正が可能であると報告されているが、その効果は生着肝細胞数に左右されるため部分的である。筆者らも、NAR への脾内移植肝細胞による経時的な血清アルブミン値の上昇を認めたが、移植後 1 年以上を経過しても正常ラットのわずか 0.4% 程度の血清アルブミン値を示すに過ぎなかった（図-3）。

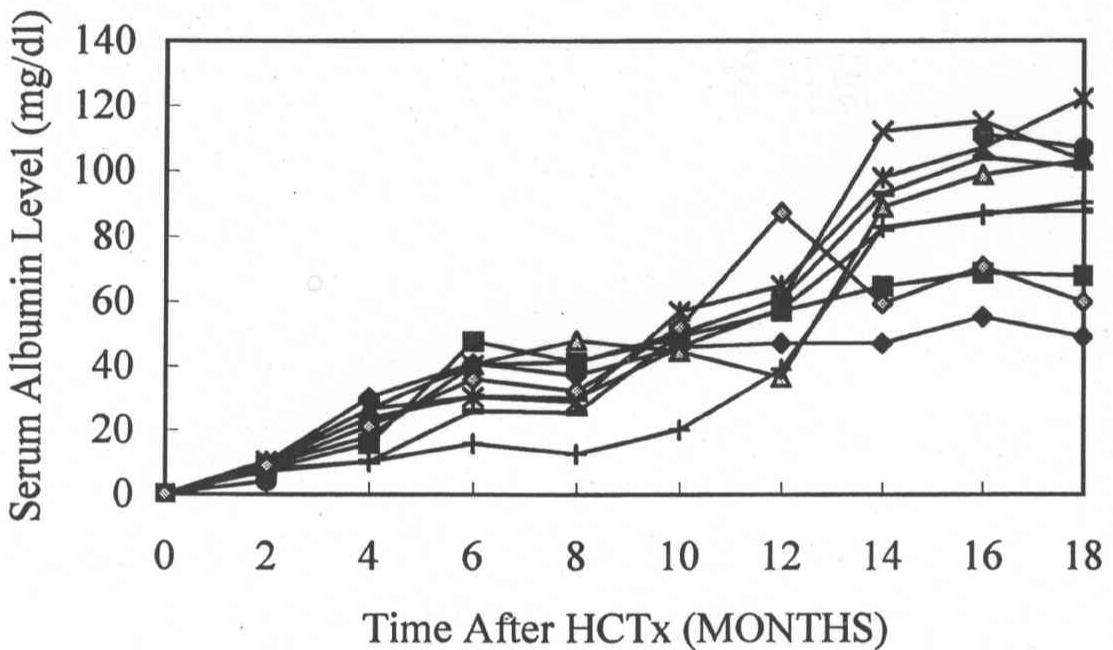


図-3. SERUM ALBUMIN LEVEL IN NARs WITH HCTx

次に、先天性肝酵素欠損症のモデルとして、ビタミンC合成酵素欠損ラットへの、正常肝細胞移植実験を行った。このモデルは、ビタミンCを補給しないと、出血傾向や骨の発育異常や体重減少を来して死亡するというモデルである。図-4に示す如く、肝細胞非移植群は、アスコルビン酸の投与中止により全例体重減少を示し死亡したが、腹腔内移植群、脾内移植群、門脈内移植群ともに、細胞が良好な生着を示した動物は延命した。

これらの成績は、先天性酵素欠損の治療の場合にも、ある程度の肝細胞量を必要とすることを示しているものと推定され、次に移植肝細胞の増量法の検討を行った。

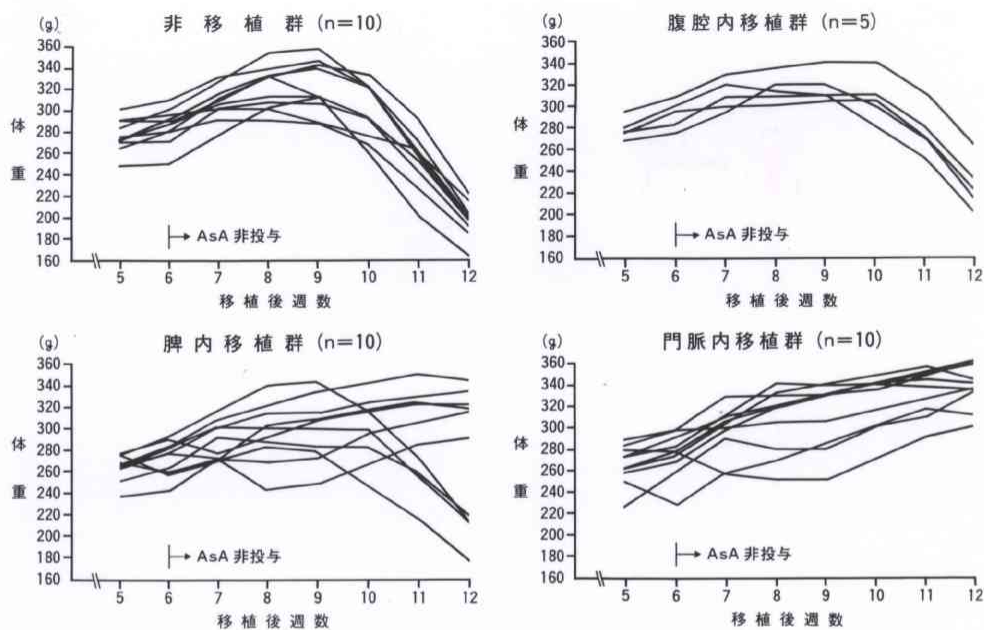


図-4. AsA 投与中止後の体重変化

3-3) 移植肝細胞の増量促進法の検討

Ilan らは、移植肝細胞の増殖促進を目的として門脈枝の結紮 24 時間後の Gunn ラットの非結紮肝葉に肝細胞を移植し、血清ビリルビンの推移を検討した結果、血清ビリルビン値は、移植前値の 20% 程度まで低下した。これは、門脈枝非結紮群に 20 倍の肝細胞を移植した場合と同様の効果であった。一方 Oren らは、retrolsine (肝再生を抑制するアルカロイド) の前投与により肝切除後の再生を抑制し、内因性再生刺激因子の門脈内移植肝細胞に対する増殖促進効果を NAR を用いて検討した。移植 2 ヶ月後の NAR 肝における albumin mRNA の発現は約 77% に達し、血清 albumin 値はほぼ正常値を示した。このように、再生肝内に移植された肝細胞は宿主肝と同様に再生刺激を受けて増殖促進させることが証明された。しかしながら、門脈枝結紮や肝切除、あるいは肝毒性物質の投与などの方法は、臨床には応用できない。そこでわれわれは、臨床応用可能な肝再生促進法として、肝再生因子の投与を検討した。

図-5 は、脾内移植肝細胞に、肝切除血清と EGF を投与した実験成績である。肝細胞移植 3 日目、2 ヶ月目、9 ヶ月目の移植肝細胞の labeling index を測定

したところ、EGF 投与群で有意に高値を示していることが判明した。

図-6 は、血小板由来肝再生促進因子 (HGF) を、脾内移植肝細胞群に静脈内投与した場合の、移植肝細胞量と BrdU のラベリングインデックスをみたものである。やはり HGF 投与群で肝細胞の再生が有意に生じていることが判明した。

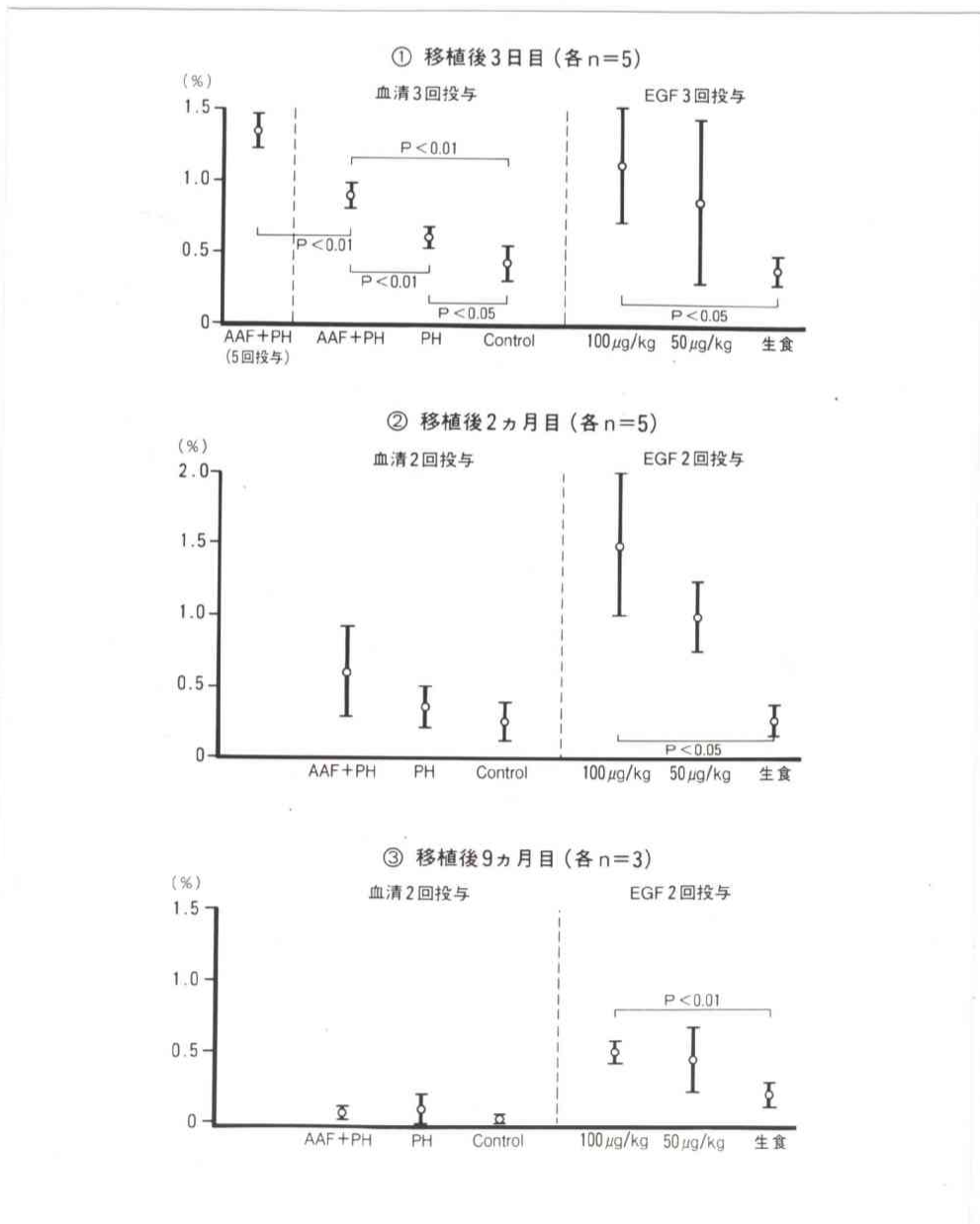


図-5. 脾内肝細胞の Labeling Index

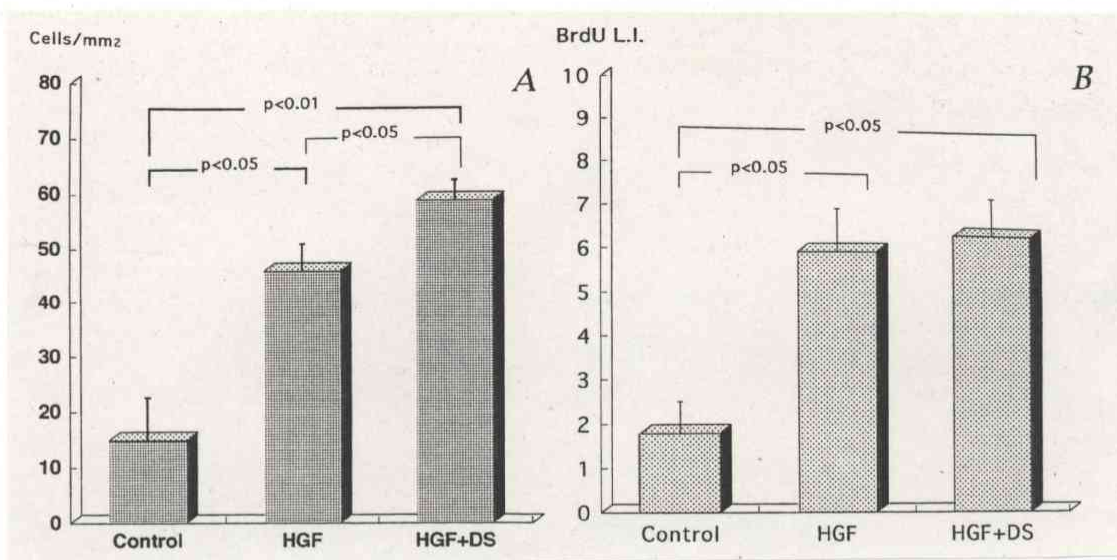


图-6. Cell number (A) and BrdU labeling index (B) of intrasplenically transplanted hepatocytes. HGF group: The rats underwent HTx and then received hHGF intravenously. HGF+DS group: After HTx, rats received hHGF mixed with dextran sulfate.

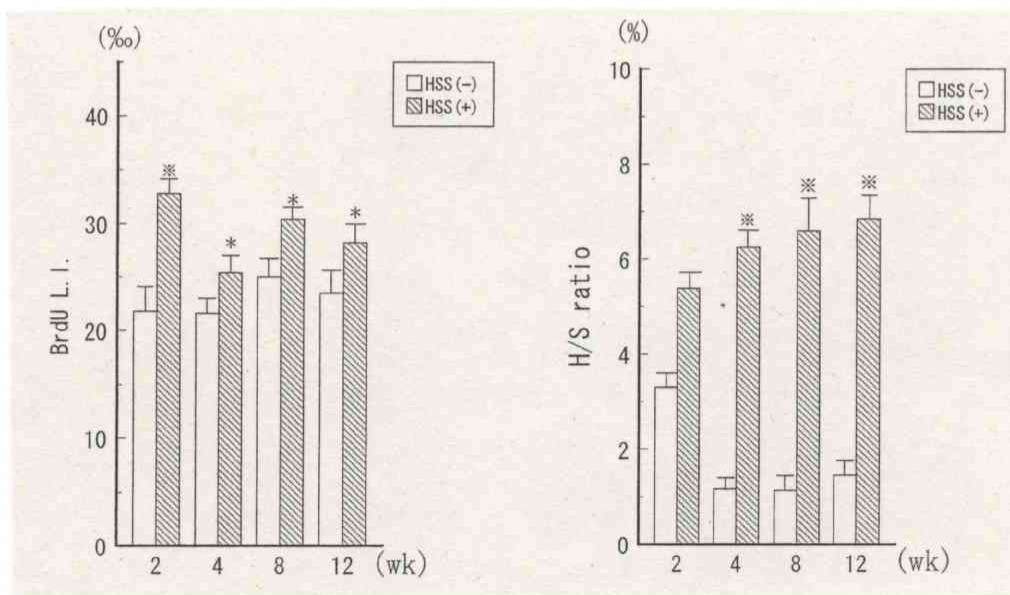


图-7. HSS 使用例

さらにわれわれは、培養肝細胞の増殖を促進するとされる、肝切除後再生肝から抽出した hepatic stimulatory substance (HSS) に注目し、四塩化炭素誘導肝硬変ラットの脾内移植肝細胞に対する HSS の増殖促進効果を検討した (図-7)。肝細胞移植後間欠的に HSS を静脈内投与した結果、非投与群に比して明かな脾内生着肝細胞に対する増殖促進効果を認め、またその効果は肝硬変の重症度に対応していた。次に、HSS で増殖を促進された移植肝細胞の機能発現を、アスコルビン酸合成酵素欠損ラットを用いて検討した。脾内もしくは脾内+門脈内の両方に、酵素欠損がみられないラットの肝臓より分離した肝細胞を移植。移植後間欠的に HSS を投与し、体重の変動、生存率、血清アスコルビン酸値を比較的検討した。肝細胞移植後 HSS 投与を受けた群の血清アスコルビン酸値は、非投与群および

非移植群に比して有意に高く、体重減少も抑制され、生存率も有意に高く保たれていた (図-8)。以上より、HSS 投与により移植肝細胞の増殖促進が可能であり、さらに増殖した肝細胞数は良好な肝細胞機能を発現することが判明した。

4) 肝細胞機能再現法の検討

前述した如く、肝細胞は何らかの基質に接着して、その機能をより長く発現する細胞である。天然の状態では、肝細胞は肝細胞外マトリックスに接着し三

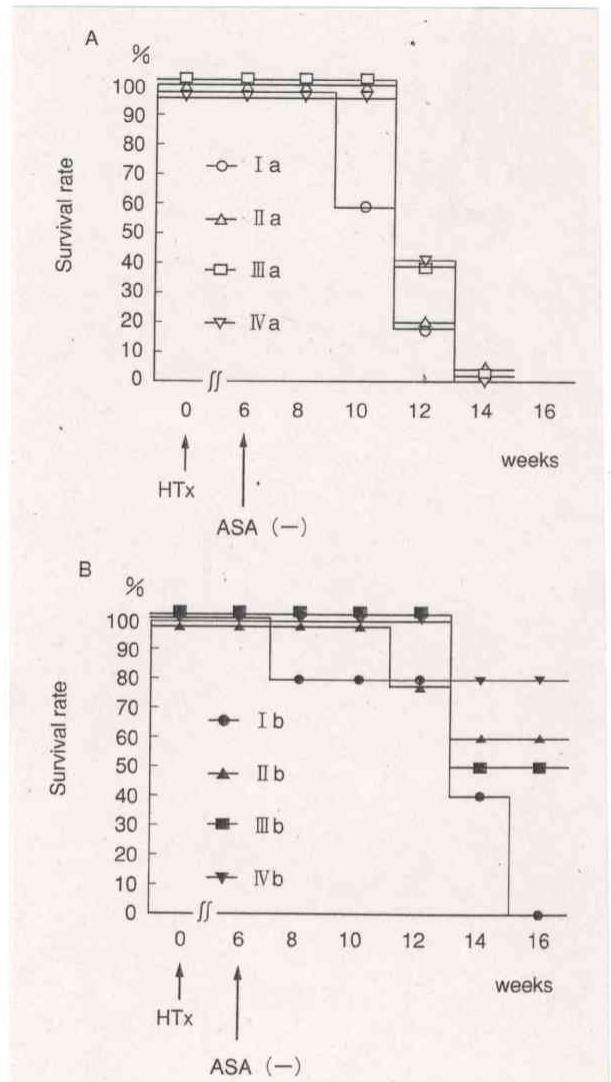


図-8. ODS-od/od ラットの肝細胞移植後生存率

次元構造を呈している。

そこでわれわれは、各種の接着担体あるいは包埋法の基礎的検討を行った。図-9 左上は、デキストランマイクロキャリアーの表面に肝細胞を接着し、かつスペースを得ようとする方法で、米国の Demetriou らは、この状態で腹腔内移植や、ハイブリッド人工肝のリアクターに使用し、臨床例の試みを行っている。われわれの経験では、このままの状態ではなお接着力が不十分であり、さらに接着因子のコーティング法を検討する必要がある。図-9 右上は、天然の肝臓の細胞外マトリックスに接着した状態を示したものである。接着状態は良好であるが、この基質を作製する費用が極めて高く実用的ではない。図-9 左下は、セルロース系多孔性マイクロキャリアーを示す。多孔質の中および表面に肝細胞が接着している。このキャリアーを人工肝臓のリアクターに利用するわれわれの方法を後述する。図-9 右下は、肝細胞をコラーゲンゲルに包埋する方法である。この状態で腹腔内に移植して、肝不全ラットの生存率を向上させた成績は前述した。この方法も人工肝のリアクターに応用することができる。

さらにわれわれは、スイスの Dr. Saad らの好意で、生体内分解性高分子ポリマーの提供を受けたので、パイロットスタディーを行った。われわれの多孔質マイクロキャリアーと同様な接着状態を示したので、アスコルビン酸合成酵素欠損ラットに移植してみたところ、体重減少や出血傾向を抑制する傾向にあったが有意差を示さなかった。生体内分解性である為に、十分長時間細胞を良好な状態で維持できなかつた可能性もあり、更に今後の改良が必要と判断された。

5) 多孔質マイクロキャリアーの検討—人工肝のリアクターの観点より

肝機能の長時間、良好な発現を期待して、セルロース多孔質マイクロキャリアーを検討し、ハイブリッド型人工肝のリアクターとしての有用性を検討した。このキャリアーは直径約 $500\mu\text{m}$ で約 $100\mu\text{m}$ の孔径を有する多孔性キャリアーである。比重は 1.024 でほぼ水と等しく、0.003% のタイプ I-C コラーゲンでコーティングして使用した。肝細胞のシーディング法は、キャリアーに肝細胞浮遊液を灌流させる方法を用いた。図-10 は、キャリアー 1 ヶに肝細胞が多数接着している状態を示し、図-11 は、キャリアー横断像の HE 染色標本である。

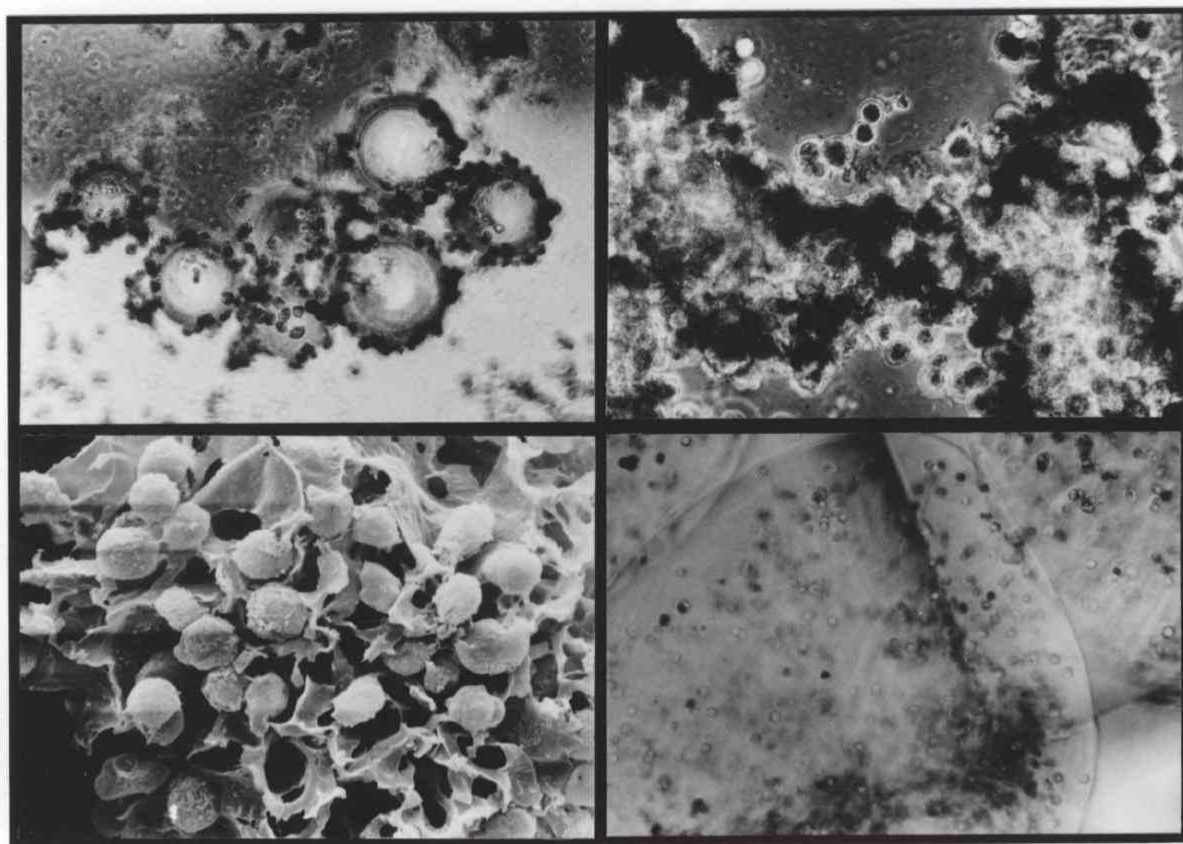


図-9. キャリア接着肝細胞

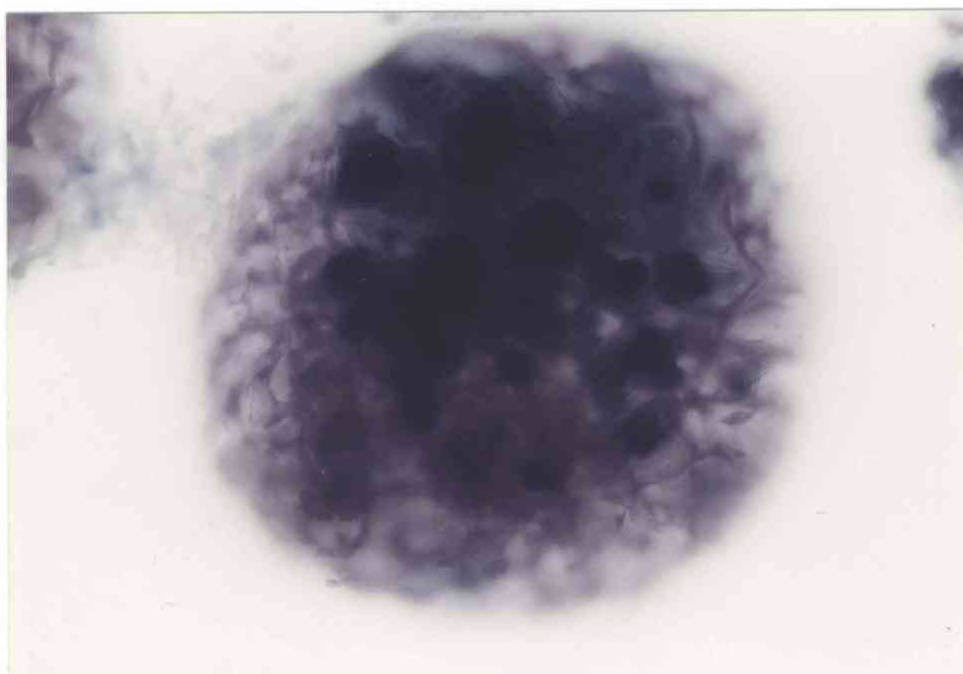


図-10. セルロースマイクロキャリア

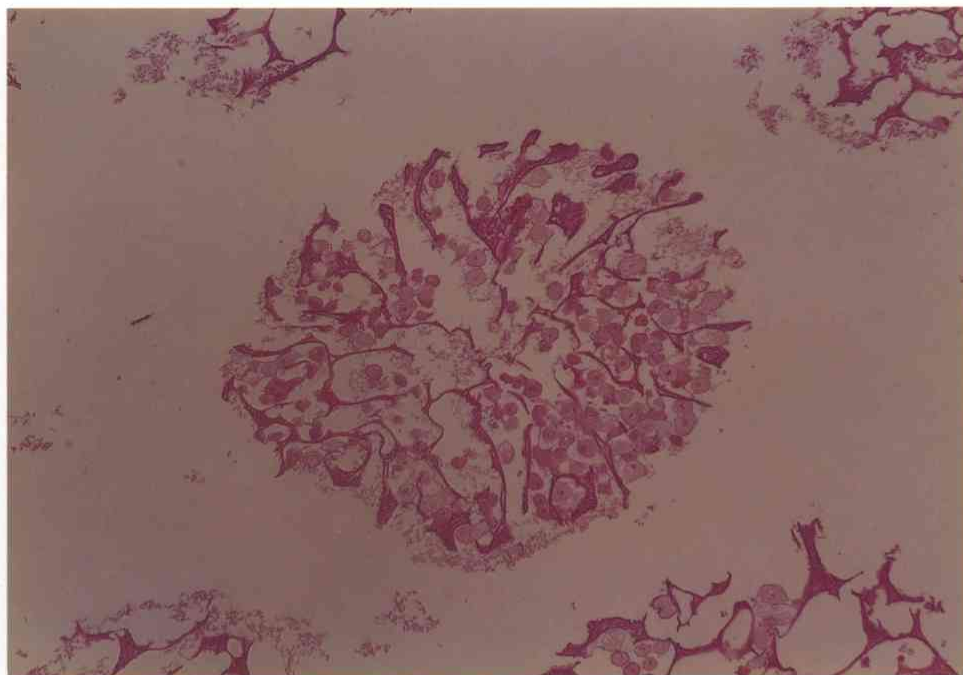


図-11. HE 染色

多孔の中にたくさんの肝細胞が封入されているのがわかる。図-12 は、位相差電顕像であり、立体構造を示す肝細胞表面の微絨毛も良好に観察される。

図-13 のような中空糸型モジュールの膜外スペースにこのマイクロキャリア接着肝細胞を封入して灌流システムを構築し、代謝機能を検討した。その結果、表-4 の如く、マイクロキャリアのみの場合は、モノレイヤーよりも若干良い代謝機能を示したが、モジュールに封入すると、50~60%に低下することが判明した。キャリアを浮遊状態にすると、モノレイヤーより良い代謝機能を示すことから、単に中空糸モジュールに封入するだけでなく、灌流法の工夫が必要であることが推定された。

このマイクロキャリアを腹腔内に移植してその機能が発現するか否かを今後検討したい。

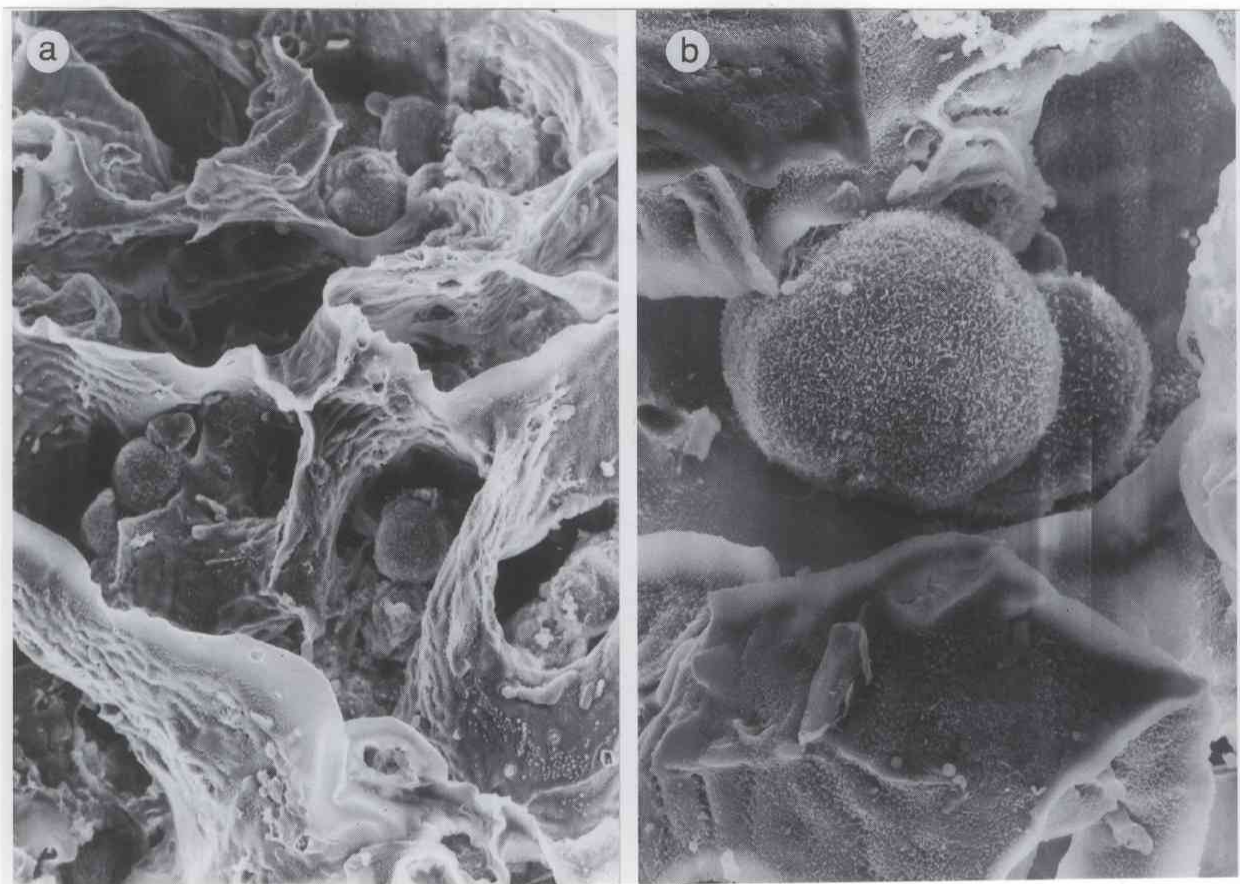


図-12. 電顕像

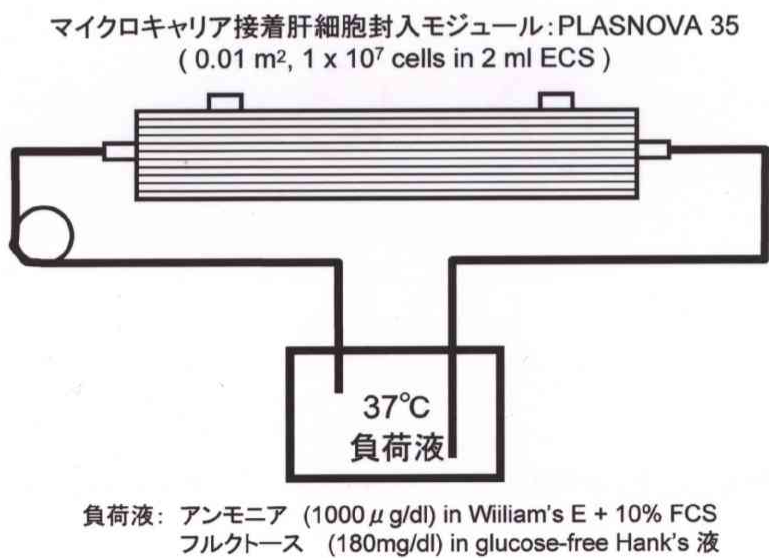


図-13. 代謝能の検討

	Monolayer	Microcarrier	Module
NH ₃	0.84	1.19	0.48
UN	3.97	3.27	2.30
Glucose	37.47	87.23	19.2
	$\mu\text{g/h/mg-protein}$		

表-4. 各種肝細胞の代謝機能

6) 遺伝子工学的修飾による肝細胞の改変

近年、遺伝子工学、分子生物学などの発展を背景に、新しいタイプの肝細胞を求める研究が進んでいる。肝細胞療法に期待される肝細胞は、本来の機能を良好にかつ長時間発現すること、分裂増殖能を有すること、免疫学的に修飾されていることなどであろう。これらの要求に応える細胞として、表-5 の様な研究が報告されている。胎児肝や成体肝の構成細胞から肝幹細胞を分離する試み、ライン化された細胞に色々な遺伝子を導入して機能の発現と増殖能を獲得する試み、あるいは不死化遺伝子を導入して増殖を得る方法などが検討されている。

1. 立野	分離肝細胞より幹細胞を同定	増殖能↑
2. 絵野沢	グルタミン合成酵素導入 HepG2 株	アミノ酸代謝能
3. 小林	不死化ヒト胎児肝細胞株	各種肝細胞マーカー
4. 近藤	胎児肝より肝幹細胞	肝細胞・胆管細胞へ分化可能 増殖能↑、各種肝細胞マーカー
5. 寺田	ヒト羊膜細胞 {MHC クラス2 発現(-)}	サイトカインによる増殖能↑ 肝特異的マーカー (+)

表-5. 多能性細胞の確立

われわれは、岡山大学第一外科の小林直哉博士らの好意で、彼らが樹立したヒト不死化肝細胞株の提供を受けた。この細胞は、ヒト胎児肝細胞に、不死化遺伝子として、ポリオウィルス由来の simian virus 40 large T 抗原 (SV40Tag) 遺伝子を導入して不死化したものである。

このままでは、いつまでも増殖を続け、腫瘍化する危険性もあるので、この不死化遺伝子を切り出す Cre/loxP システムを導入し、必要なときに不死化遺伝子を切り出せる様にした。従って、肝細胞療法として使用する為に多量のポリウムに培養し、移植なり、人工肝のリアクターなるに使用するとき、不死化遺伝子を切り出して、安全な肝細胞として使用しようとするものである。彼らは、この不死化肝細胞が急・慢性肝不全ラットへの移植による救命、機能の回復などを報告しており、ヒトへの応用が期待されるところである。

われわれは、この不死化肝細胞をコンフェルエントな状態に静置培養し、その半分をスクラッチアウトして、その残存肝細胞の動態を観察した。その結果、残存肝細胞の再生状態に極めて興味ある知見を得た。図-14 は、上から右半分をスクラッチアウト直後、1 日目、6 日目、13 日目の静置培養写真である。1 日目は大型の細胞が分裂増殖を始め、6 日、13 日と、経過とともに核の大きな小型の肝細胞が全体を占めて激しく増殖している様子が見受けられる。先端の方よりも内部にその傾向が強くみられるが、どの細胞が幹細胞様変化を示しているのか、細胞本来の機能はどうなっているかなど、正常の肝臓の再生状態と比較して検討したい。

7) 研究のまとめと今後の展開

近年、シクロスポリン、FK-506 などの新しい免疫抑制剤の開発、手術手技の確立、術前・術後管理技術の進歩などにより肝移植の成績は飛躍的に向上し、欧米では各種肝不全に対する究極的な治療法として定着している。しかし、適応拡大による移植症例数の急激な増加は、ドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。一方、摘出されたドナー肝の約 50% が何らかの理由で肝移植に用いられずに棄却されている。

Berry と Friend により確立されたコラゲナーゼ消化法は、動物さらにはヒ

トの肝臓から活性の高い肝細胞を分離することを可能とし、分離肝細胞を用いた肝細胞移植もしくはバイオ人工肝臓などの肝機能補助法が研究開発されてきた。

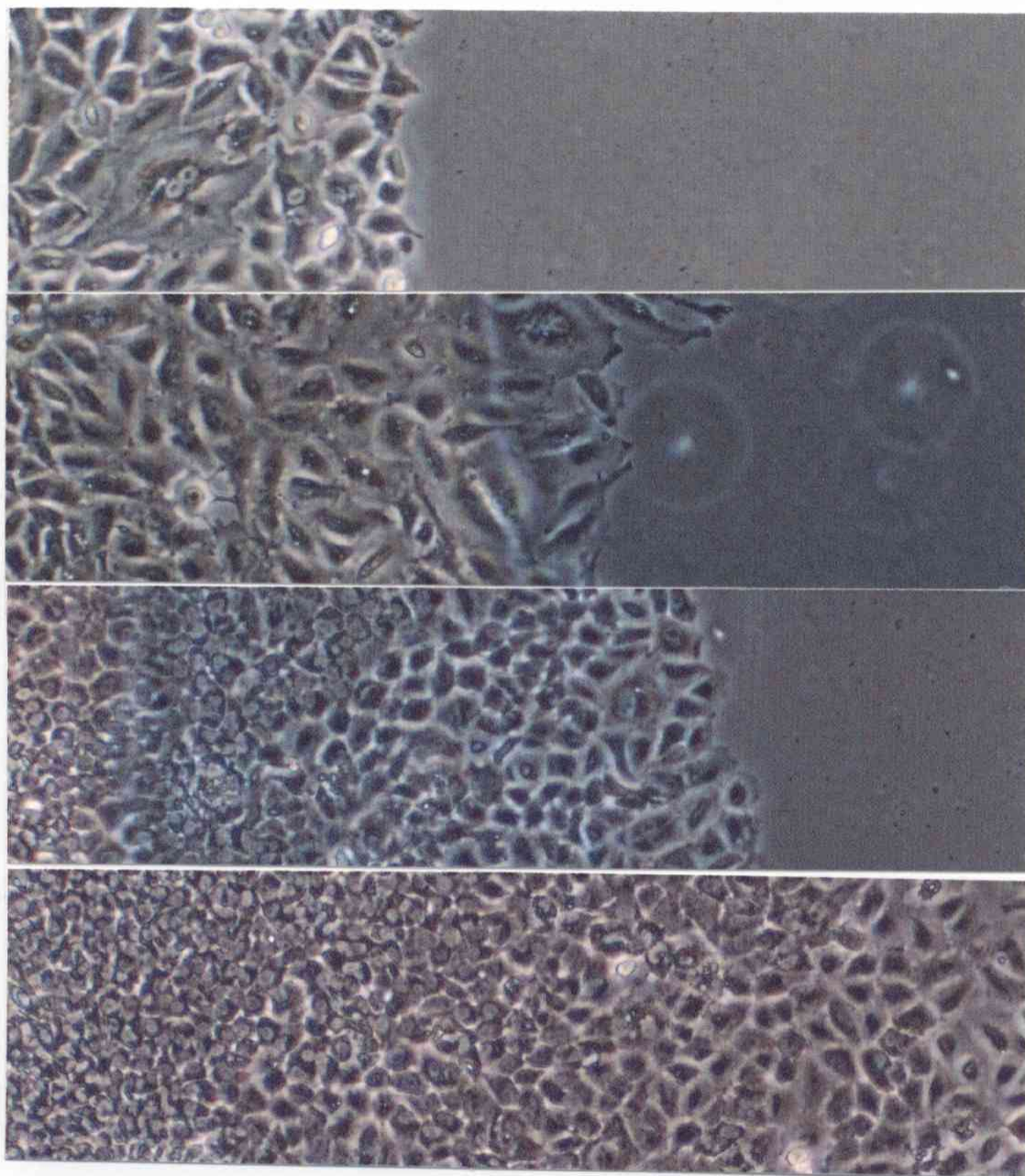


図-14. 不死化細胞培養

急性肝不全に対する肝細胞移植は、現在臨床応用が進められているバイオ人工肝臓のような複雑かつ高価なシステムが不要で手技も簡便であるため、肝移植までの bridge-use としての役割が期待される。しかし、bridge-use 以外の臨床応用には、ラットなどの小動物を用いた実験では、安全性のみならず有用性などの検討も不十分であり、大動物を用いて移植細胞数、移植部位、移植時期などを詳細に検討する必要がある。

一方、遺伝子導入自己肝細胞移植は、免疫抑制を必要とせず移植肝細胞の生着が確実であることから、もっとも現実的な方法と思われる。今後は、移植肝細胞の増殖促進法との組み合わせにより、生着肝細胞数を増加させたり、生体適合性の高い特殊な細胞外接着基質を用いることにより、移植可能肝細胞数の増加を図り、さらに良好な成績が得られることが期待される。