

AMCoR

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

移植 (2005.04) 40巻2号:102～110.

【移植と人工臓器】 移植と人工肝臓

葛西真一

特集 「移植と人工臓器」

移植と人工肝臓

葛西 眞一

旭川医科大学外科学第2講座

はじめに

肝臓は生命維持に必要な物質の代謝産生と、生体に必要な物質の解毒・排泄という2つの重要な機能を担う臓器である。したがって、ひとたび重篤な代謝不全に至れば致死的な状態となる。この重篤な機能不全の治療法として、肝移植と人工肝臓による方法がある。この2つの方法の基礎研究はほぼ同時期の1950年代に始まったが、臨床的な手技としては肝移植のほうが発展している。しかしながら、この肝移植の最大の課題点は、供給されるべきドナー肝不足である。人工肝臓はこのドナー肝の代用になるべく研究されてきたが、代用できる肝臓の機能としてはまだまだ不十分であり、障害された肝機能を補助しつつ、その再生を待つ方法の開発が種々検討されてきた。そして、近年のバイオテクノロジーや tissue engineering の発展に伴って、人工肝臓の研究も新たな展開をみせている。

本稿では、肝移植の現況と人工肝臓研究の現状について紹介したい。

肝移植の現況

肝移植には脳死患者からドナー肝を得る脳死肝移植と、正常人の肝臓の一部を摘出して移植する生体部分肝移植がある。最大の症例数を示す米国では、年間約5,000例の脳死肝移植が行われているが、それでもドナー不足から5～30%の待機死亡例があるという。そ

こで、いよいよ米国でも生体部分肝移植が始められ、1999年頃から年間200例以上になり、徐々に増加傾向にある。移植後の生存率は生体肝移植のほうが良好である。

本邦でも1997年に臓器移植法が成立し、脳死臓器移植症例の増加が期待されたがなかなか増えず、2004年まで32件であり、脳死肝移植は26件にすぎない。一方、生体部分肝移植例は徐々に増加し、2002年末には2,200例を超え、そのうち急性肝不全は全体の12%を占め、救命率は約70%と、米国の脳死肝移植による急性肝不全の救命率60%をしのぐ良い成績を示している。

一方、古くよりドナー肝不足に対するひとつの対策として、肝細胞移植の研究が行われてきた。基礎的な動物実験では、急性あるいは慢性の肝不全動物への肝細胞移植により、動物を延命あるいは救命できるという多数の良好な成績が報告された。そこで臨床応用が試みられた(表1)。水戸ら¹⁾は、肝硬変症の患者の部分肝を細胞単位に分離して脾内に自家移植を試みた。肝細胞の着床は確認されたが、分裂増殖して機能を補助するには至らなかった。Grossman²⁾は先天性高コレステロール患者の左葉を細胞に分離し、これに欠損遺伝子を導入して再び戻すことにより、高コレステロール血症を治療できる可能性のあることを示した。インドのHabibullah³⁾は、劇症肝炎7例にヒト胎児肝細胞 6×10^7 個を腹腔内移植して3例の生存例を得たと報告している。米国のStrom⁴⁾は、劇症肝炎や先天性醇

表1 ヒト肝細胞移植

報告者	方法	成績
水戸, 川浦 (1993)	肝硬変症 10 例に自家脾内移植 $10^7 \sim 10^8$	着床のみ
Grossman (1994)	家族性高脂血症 5 例に遺伝子導入肝細胞自家門脈内移植	GrLDLコレステロール 2 例に20%減
Habibullah (1994)	FHF 7 例にヒト胎児肝細胞 6×10^7 腹腔内移植	3 例生存
Strom (1997)	FHF, 先天性酵素欠損症など 8 例にアロ肝細胞脾・門注 $10^7 \sim 10^8$	FHF の 2 例, 他 2 例の生存
Bilir (1997)	FHF 5 例, LZ 3 例にヒト凍結保存肝細胞 $10^9 \sim 10^{10}$ 脾内移植	FHF 3/5 生存, 脳症の改善, 肝腎症候群の改善

素欠損症など 8 例に $10^7 \sim 10^9$ 個の肝細胞を移植して劇症肝炎 2 例を救命しており, 現在では症例数も数十例になっているという。米国では, 提供された脳死肝の約 1/3 がいろいろな理由で使用できずに破棄されるといわれ, それらを細胞に分離して利用する方法の検討である。全肝の機能補助の必要がない肝酵素欠損症などが良い適応であろう。

Bilir⁵⁾ は分離された肝細胞を凍結保存後でも利用できるかを検討し, その可能性を報告している。このように, 肝細胞移植によっても肝臓の機能を部分的に補助可能であり, 細胞数の確保, 免疫学的問題など解決すべき点もいろいろあるが, 今後の発展が期待される方法であろう。

人工肝臓の現況

人工肝臓に期待される主な機能は, 肝臓の代謝と解毒・排泄機能の補助であり, 対象とする病態は, 肝細胞の広汎な脱落とこれに伴う前述した機能の著しい障害であり, 急性肝不全や慢性肝不全急性増悪時などの肝機能不全の治療が目的である。障害肝が自ら再生するまでの機能の補助の他に, 近年では, 肝移植までの bridge use, 橋渡し治療として, また, 術中, 術後で移植肝が十分な機能を発現するまでの機能補助にも多用されている。

現在人工肝臓として用いられている, あるいは基礎的な研究が進められている方法として, 人工物のみで装置化されているいわゆる非生物学的人工肝臓と, 肝細胞や肝組織を用いる生物学的人工肝臓があり, さらに両者を組み合わせたハイブリッド型人工肝臓などがある。これらの方法について概説する。

1. 人工肝臓の臨床の現況

(1) 吸着剤血液灌流

肝臓や腎臓の解毒機能の補助法として, 古くから活性炭が毒性物質の吸着除去療法に利用されてきた。裸の活性炭の流出などが生ずるため, 表面の加工やいろいろな種類の活性炭が用いられている。一般的に活性炭の吸着は分子量 300 ~ 1,500 の蛋白非結合物質に有力であるとされ, 急性薬物中毒の治療に使用されている。現在臨床使用されているハイブリッド型人工肝臓の回路内に併設して使用されてもいる。

活性炭以外の吸着剤としては, イオン交換樹脂が用いられ, ビリルビンや胆汁酸の吸着, 脂溶性物質や蛋白結合物質の吸着などに使用されている。

(2) 血液透析・濾過

肝不全時の高アンモニア血症に対して, 人工腎臓用のセルロース膜を用いて透析が行われたのが始まりである。従来のセロファン膜では分子量 300 以下の水溶性低分子量物質しか透析除去できないところから, 近年では, 透析と濾過機能を合わせもつ膜が合成され, 分子量数万の物質も透析・濾過除去可能となった (Hemodiafiltration: HDF)。肝不全時の血液浄化療法として, 持続的に透析・濾過する方法が考案され (continuous hemodiafiltration: CHDF), 次項で述べる血漿交換療法と併用して急性肝不全治療に用いられている。

近年, 血中アルブミン結合毒素の選択的な除去を意図した新しい透析法として, Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) が報告されている⁶⁾。本法は, 患者血液回路とアルブミン透析液が MARS Flux 膜を介して接し, アルブミン透析液回路内には活性炭と陰イオン交換樹脂の 2 つの吸着カラムが組み込まれ, さらにこのアルブミン透析液は透析膜を介して透

析・濾過回路に接しているというきわめて複雑な方法である。本法の臨床例では、ビリルビン、胆汁酸、短鎖および中鎖脂肪酸、トリプトファンなどの低下とFischer比の上昇が報告されている。また、肝腎症候群や肝不全患者の症例で生存時間の有意な延長がみられたことも報告されているが、多数例の詳細な検討が必要であろう。

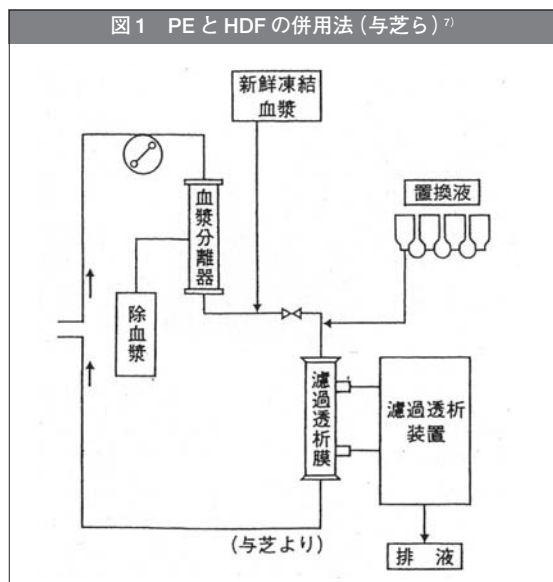
(3) 血漿交換

本法は、装置や分離膜の開発によって、容易にかつ安全に血漿を分離することが可能となり、大量の血漿交換も短時間でできるようになった。本法では血中の中毒性物質は分子量の差、蛋白結合の有無に関係なく除去され、また、凝固因子やアルブミンなどの必要な物質の補充も同時に行うことができる。しかしながら、体内代謝プールサイズの大きいアミノ酸、ビリルビン等の除去には限界があり、また、大量の輸血漿によるウイルス感染も問題である。

近年与芝ら⁷⁾は、本法と血液透析・濾過法を組み合わせたシステム(図1)を考案し、急性肝不全の治療に応用し、必要物質の補充と中毒性物質の除去を十分に行うことが可能で、きわめて高い昏睡覚醒率や救命率が得られたことを報告している。

2. バイオ人工肝臓の基礎的研究

バイオ人工肝臓は、人工材料と生体肝由来材料の複



合化によって、各々の持つ機能を補充し合うことを意図したもので、ハイブリッド型人工肝臓とも呼称される。生体材料としては、操作性、保存性、機能再現性などの点から肝臓を細胞単位にして使用する研究が中心となっており、細胞の足場としてのマトリックスが人工材料として重要であり、どのようなリアクターとして設計するかにより各種の方法がある。リアクターの概要は、モジュール内に封入された肝細胞が半透膜を介して血液と接触し、半透膜を通過してきた毒性物質を代謝解毒し、さらに生体に必要な物質を生合成することで、障害された肝機能の補助を行うというものである。

(1) 細胞浮遊型(図2)

分離肝細胞を細胞浮遊液として利用する方法で、患者血液との分離膜としては平膜あるいは中空糸膜(図2左下)が利用される。この膜を介して血液と肝細胞の間で物質交換が行われる。

Matsumura⁸⁾(図2左上)、Eiseman⁹⁾(図2右上)らは平膜のモジュールを使用し負荷したアンモニアやビリルビンの除去、アルブミン産生能を認め、後者はブタ肝細胞を用いて肝全別ブタの意識の改善をみている。その後Matsumuraは、平膜型血液透析器の透析液サイドにウサギ肝細胞を封入したモジュールの臨床使用を試み、黄疸の軽減と症状の改善をみたと述べている。筆者ら¹⁰⁾も中空糸膜を用いたモジュールを試作(図2右下)し、アンモニアの除去、尿素や糖の合成などを認め、急性薬物性肝不全犬との灌流実験で、生存時間の延長を認めた。この肝細胞浮遊型では、細胞活性の長時間維持という点では限界があった。

(2) 細胞接着型

肝細胞は本来何らかの足場に接着して機能を再現する細胞である。そこでいろいろな足場が工夫された。

1) 単層培養型(図3)

細胞培養技術の発展を背景として各種検討されている。ガラス板にコラーゲンをコーティングして肝細胞を接着培養し、何枚も重ねてモジュールを構築する方法¹¹⁾(図3左上)、コラーゲンをサンドイッチ状にして肝細胞を挟む方法(図3左下)などで、それぞれ代謝機能を数週間の間維持できたという。

図2 肝細胞浮遊系システム

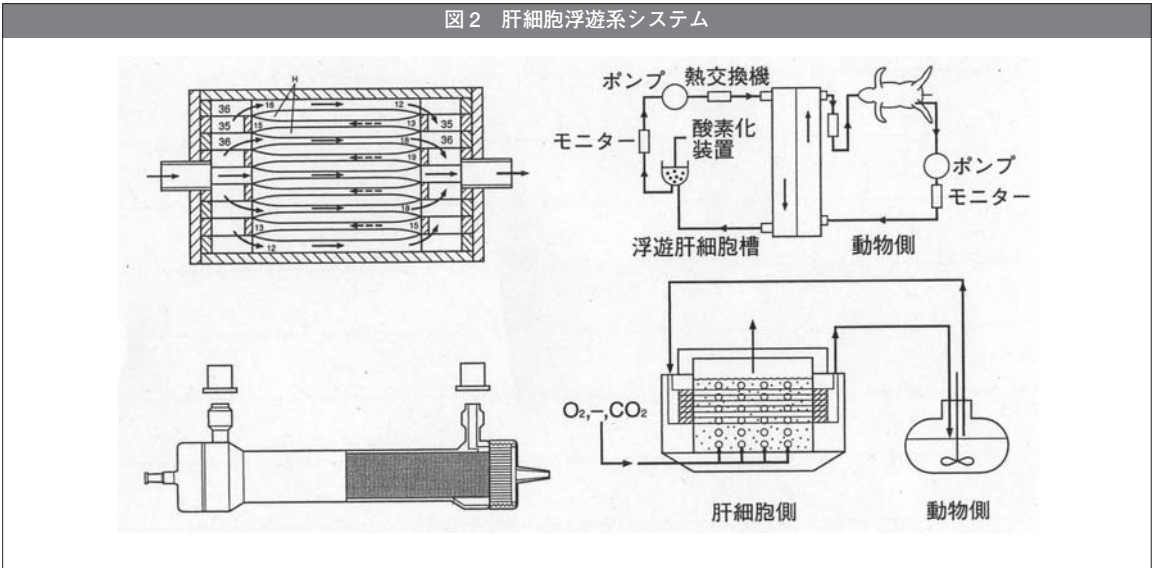
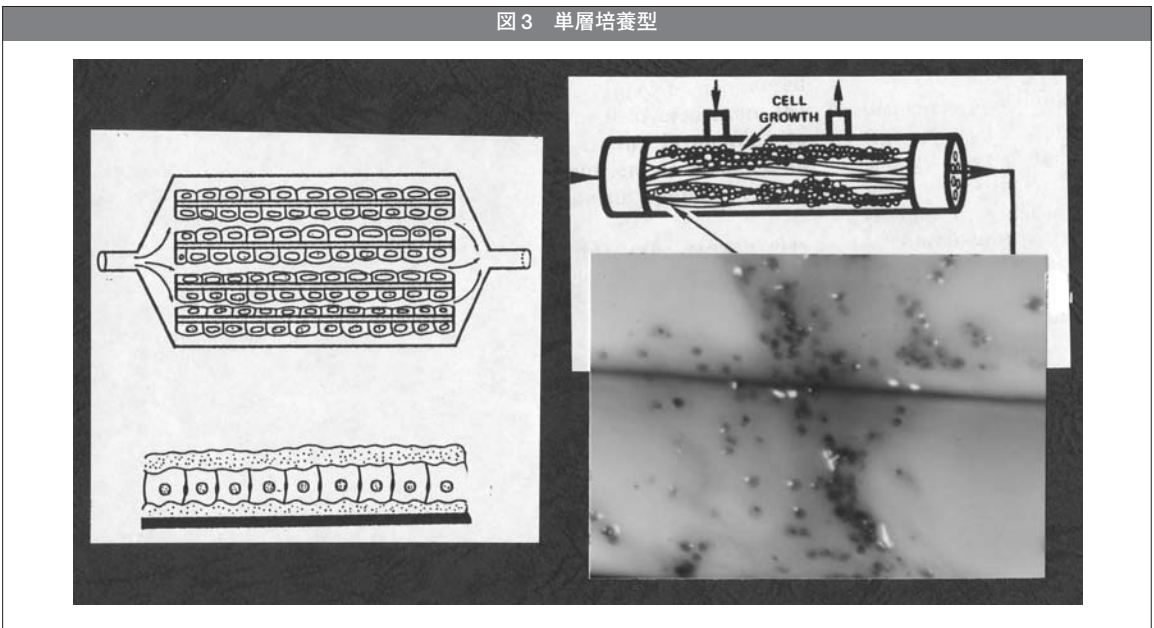


図3 単層培養型



2) 中空糸培養型 (図4)

中空糸モジュールに肝細胞を単に封入するだけでなく、中空糸外側に肝細胞を培養したり、中空糸膜表面をコラーゲンなどの基質でコーティングして使用する(図3右)。さらに中空糸内腔にコラーゲン化肝細胞を封入し、中空糸外腔を血液流路とする方法(図4右上)なども報告されている。また、中空糸外腔に、

マイクロキャリア接着肝細胞を封入するモジュール(Demetriouら¹²⁾(図4左上)、ヒト肝癌のライン化肝細胞を中空糸外腔に封入し分裂増殖させて使用する方法(Sussmanら¹³⁾(図4左下)、ひとつのハウジング内に、血液流路用、酸素供給用、培養液用などと複数の中空糸を封入し、外腔の肝細胞の活性維持を図る方法(Dixitら¹⁴⁾(図4右下)などの報告がある。

図4 中空糸模型ハイブリッド人工肝

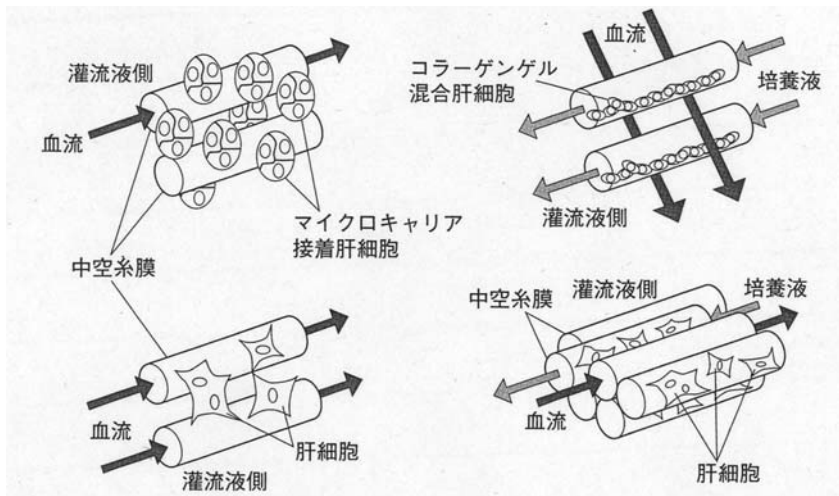
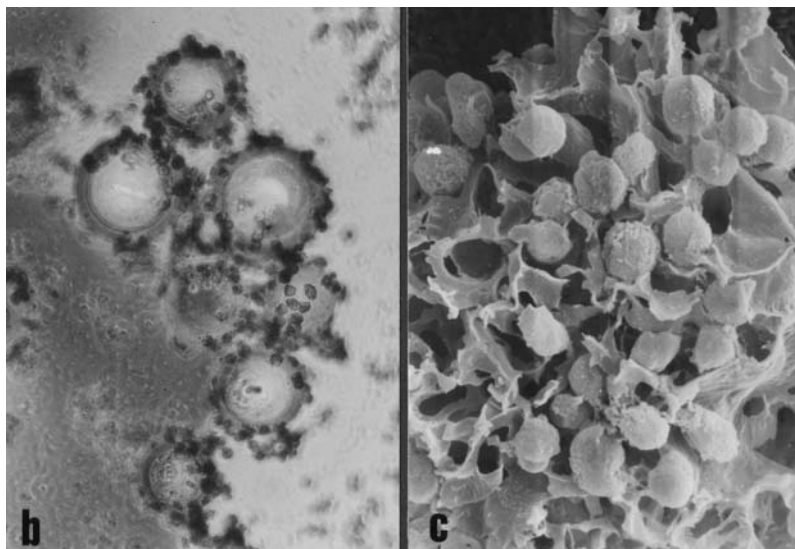


図5 マイクロキャリア接着型^{12,15)}



3) マイクロキャリア型

基質接着依存性細胞を高密度培養するために、デキストラン微粒子担体やコラーゲンコートマイクロキャリア (図5左)¹²⁾ が開発された。このマイクロキャリア接着肝細胞と中空糸モジュールの組み合わせ、フィブロネクチンコートポリスチレンマイクロキャリア、多孔質ポリビニルホルマール、多孔質セルロースマイ

クロキャリア (図5右)¹²⁾ などが検討されている。

(3) 細胞被包型

肝細胞をアルギン酸カルシウムゲルに被包化してビーズ状にしたり、ディスク状にしたりする方法で、このゲルビーズをさらにポリリジンでコーティングする方法も工夫され、Gunn ラットや薬物性肝不全ラットの腹腔内に移植して動物の延命に成功した報告もあ

る。細胞を被包化する理由は、ゲルビーズに強度を与えるためと、免疫グロブリンや抗体の進入を防ぐためであるが、ビーズの作成が煩雑であり、今後の工夫が必要である。

(4) 肝細胞スフェロイドの応用

肝細胞を組織状に三次元構造を形成させることにより、通常の静置培養よりも高機能かつ長時間の機能維持が可能であることが判明し、特殊な培養法を工夫することにより、このスフェロイドを形成することが可能である。船津ら¹⁶⁾は、このスフェロイドをポリウレタン多孔質内に形成することに成功し、このまま代謝のモジュールとして灌流システムに組み込み、肝不全豚の生存時間の延長に成功している。

3. バイオ人工肝臓の臨床的研究

前述の基礎的研究で開発されたいくつかの方法が、動物実験に引き続いて臨床応用が試みられている(表2)。

米国の Demetriou¹²⁾らは、中空糸膜外スペースにマイクロキャリアに接着させたブタ肝細胞約50gを封入した人工肝臓 Hapat Assist (図4左上)を開発し phase II/III の結果を報告している。19施設において、171名の患者(Hapat Assist適用85例、一般的治療86例)を

対象に検討した結果、30日生存率は Hapat Assist 群71%、コントロール群62%、アセトアミノフェン中毒群の生存率では治療群70%、コントロール群37%と、その有用性が報告されている。

同じく米国の Sussman¹³⁾らは、中空糸膜外スペースにヒト肝芽腫由来C3A細胞を封入した人工肝臓 ELAD システム(図4左下)を開発している。この細胞は分裂増殖能力が旺盛で、最初数10g封入すると2週間で約200gに増えるという。phase I/II studyによると、30日生存率はELAD群67%、対象群43%で、肝移植までの bridge use に成功している。

西ドイツの Gerlach¹⁷⁾らは、三種類の中空糸膜を二次元的に編み込んだ膜外腔に、ブタ肝細胞を300~600g封入したMELSシステムを開発し、phase I/II studyで、急性肝不全患者8例の bridge use に成功したと報告している。最近ではブタ肝細胞の他に、ヒト肝細胞も利用していると述べている。

イタリアの Pazzi¹⁸⁾らは、ポリエステル不織布内にブタ肝細胞約200gを充填したRFBシステムを開発し、7例の急性肝不全例に適用し6例の bridge use に成功している。

オランダの Flendrig¹⁹⁾らは、ポリエステル不織布に 1×10^{10} 個のブタ肝細胞を充填し、酸素供給用のホロ

表2 主な臨床試用バイオ人工肝臓

報告者	モジュール型式	成績
Demetriou (アメリカ)	Hepat Assistシステム 7×10 ⁹ 個凍結保存ブタ肝細胞 接着マイクロキャリアー封入中空糸型	171例のRCT多施設共同研究 30日生存率(治療群:対象群=71%:62%), アセトアミノフェン群生存率(治療群:対象群=70%:37%)
Sussman (アメリカ)	ELADシステム ヒト肝芽腫株化細胞(C3A) 約200g封入中空糸型	11例ALF4例橋渡し成功 意識改善8例 有効率約60%
Gerlach (ドイツ)	MELSシステム 3種類の中空糸束を重ね、ブタ肝細胞 またはヒト肝細胞数百g封入	7例ALFOLT成功 8例ヒト肝細胞使用、6例OLT成功 意識の改善と凝固系の正常化
Pazzi (イタリア)	RFBシステム ポリエステル不織布内にブタ肝細胞 約200g充填	7例ALF6例OLT成功 意識の改善(+) アンモニア↓ビリルビン↓
Flendrig (オランダ)	AMC-BALシステム ポリエステル不織布に1×10 ¹⁰ 個 豚肝細胞充填、酸素供給用HF封入、 直接血漿灌流	12例ALF11例OLT成功 神経学的改善(+) アンモニア↓ビリルビン↓

ーファイバーも組み込んだ AMC-BAL システムを開発し、急性肝不全 12 例に試用し、11 例の bridge use に成功したと報告している。本法は肝細胞と患者血漿が直接接触するタイプであるが、PERV test (豚内因性ウイルスの感染テスト) は陰性であったという。

最近中国から、ポリスルホン中空糸膜外腔に豚肝細胞 1×10^{10} 個を注入した HBAL システムが報告され、詳細は不明であるが 12 例中 9 例に有用性が認められたと述べている。

このように世界各地で各種のシステムが報告されているが、臨床ではまだまだ試用の段階であり、適応例の多くは肝移植までの短期的 bridge use であるが、アンモニアやビリルビン値の低下、精神神経症状の改善、脳圧の正常化などの効果も確認されている。多くのシステムは豚肝細胞が使用されているが、近年人畜共通ウイルス感染の問題が指摘され、前述の臨床試験では豚ウイルス感染は認められていないものの、解決しなければならない大きな課題のひとつである。

4. 肝細胞源の基礎的研究

バイオ人工肝臓に使用される肝細胞は、必要な時に大量用意できる細胞でなければならず、これまで豚肝

細胞が使用されてきた。しかしながらブタ内因性ウイルス等の異種感染の可能性が問題とされ、他に細胞源を求めなければならない状況になりつつある。本項では細胞源に関する最近の知見を紹介する (表 3)。

(1) ヒト肝細胞

米国では移植用に摘出された肝臓の 1/3 から半分は、様々な理由から移植に用いられない。そこで、この肝臓を細胞単位に分離して新鮮な状態で、あるいは凍結保存した状態で人工肝臓の細胞として使用する試みが行われている¹⁸⁾。しかしながら、分離された肝細胞の機能を長期間、良好な状態で維持することは難しく、凍結保存後はさらに活性度が低下するので何らかの対策が必要である。

(2) ヒト肝腫瘍細胞由来肝細胞

ヒト肝腫瘍由来肝細胞は高度な増殖活性を有し、肝細胞本来の機能を十分有していることが期待され、ELAD には C3A 細胞が使用されているが、腫瘍由来細胞は肝特異機能の発現が不安定であるという指摘がある。同様な細胞に HepG2 細胞が期待されているが同じような不安があり、この HepG2 にグルタミン合成酵素遺伝子を導入して機能を高めて利用しようとの試みもある¹⁹⁾。

表 3 本邦における肝細胞ソースの主な研究

小林ら	ヒト不死化肝細胞	肝不全マウスの救命
藤井ら	ラット骨髄細胞 (HGF 導入)	ラット CCI4 肝不全
寺井ら	マウス骨髄細胞	CCI4 肝不全マウス 肝の約 30% を占拠
鎮西ら	マウス ES 由来 EB	アルブミン産生細胞 0.2% テラトーマ 90%
吉川ら	マウス ES 細胞 (HNF3 β 導入)	肝切・レトロシンマウスに移植
谷口ら	マウス胎児肝	肝幹細胞の樹立 アルブミン・サイトケラチン
柿沼ら	ヒト臍帯血由来細胞	SCID マウス (2 \cdot AAF \cdot 30% 肝切) アルブミン (+), キメラ肝
桜川ら	羊膜上皮細胞由来	サル羊膜・肝細胞
蓮池ら	AAF \cdot 70% 肝切ラット	Oval cell, アルブミン, サイトケラチン
井嶋ら	肝実質細胞と骨髄細胞の共培養	高アルブミン産生 \cdot スフェロイド形成迅速
松下ら	ヒト胎児肝細胞スフェロイド	負電荷表面が良い
絵野沢ら	HepG2 ヒト株化細胞	アンモニア減少, 生存時間の延長
吉里ら	小型肝細胞	肝障害動物の救命

(3) 肝幹細胞

肝障害時や肝切除後の肝再生を担う細胞として、旺盛な増殖能力を持つ oval cell や small hepatocyte の存在と採取法が見出され、肝本来の機能を有していることも確認された²⁰⁾。そこで、これらの細胞を増殖させてバイオ人工肝の細胞源にする試みが研究されている。この肝幹細胞は、硬変肝や胎児肝にも存在することが確認されている。ラットやマウスなどの小動物肝不全モデルへの移植実験で、分裂増殖し動物の延命、救命に成功している。

(4) 骨髄細胞, 他

近年細胞の分化転化 (transdifferentiation) という、ある系統の細胞がそれとは異なる系統の細胞に分化する現象が多く報告され、肝細胞も骨髄細胞から誘導されることが判明した²¹⁾。このことは、骨髄や末梢血造血幹細胞からも肝の幹細胞が得られる可能性を示している。この骨髄幹細胞はいろいろな臓器の細胞に分化しうることがわかってきている。

その他、ヒト臍帯血に分化増殖因子を添加して細胞培養を行いアルブミン産生細胞や肝関連マーカーの発現を認めた報告や、ヒト羊膜細胞を培養して肝関連蛋白の発現をみた報告もあり、今後の研究が期待される。

(5) ES 細胞

動物の着床前の初期胚である胚盤胞から樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) は、培養条件によって生体の様々な細胞に分化誘導することが可能であることが判明し、この ES 細胞由来の肝細胞²²⁾も、今後の発展が期待されている。

(6) 不死化肝細胞

ヒト肝細胞に SV40Tag 遺伝子を導入して不死化し、増殖力を高めて人工肝臓に使用しようとする研究である。腫瘍化の危惧を拭うために自殺遺伝子を組み込んだり、不死化遺伝子を取り除ける Cre/loxP システムを導入したりしている²³⁾。

みで構成される非生物学的人工肝臓による機能補助能力にも限界があり、肝移植周術期の肝補助力も十分ではない。近年のバイオテクノロジーの発展を背景に、生物学的人工肝臓の研究も新たな展開をみせている。人工臓器を再生医学の観点から捉えたと、バイオ人工肝臓の研究にも新しい細胞生物学的アプローチの可能性が示唆されつつあり、今後の成果を期待したい。

文 献

- 1) Kusano M, Jiang B, Murakami M, *et al.* Clinical liver cell transplantation. In: Mito M, Sawa M editors. Hepatocyte transplantation. Basel: Karger Landes Systems, 1997: 297-311.
- 2) Grossman M, Rader DJ, Muller DW, *et al.* A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-1154.
- 3) Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, *et al.* Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58: 951-952.
- 4) Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, *et al.* Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-569.
- 5) Bilir B, Durham JD, Krystal J, *et al.* Transjugular intra-portal transplantation of cryopreserved human hepatocytes in a patient with liver failure. *Hepatology*, 1996; 24: 728.
- 6) Zhou XM, Miao JY, Yang Y, *et al.* Clinical experience with molecular adsorbent recirculating system (MARS) in patients with drug-induced liver failure. *Artificial Organs* 2004; 28: 483-486.
- 7) Yoshida M, Sekiyama K, Iwamura Y, *et al.* Development of reliable artificial liver support (ALS)-Plasma exchange in combination with hemodiafiltration using high-performance membranes. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 469-476.
- 8) Matsumura K. Method and device for purifying blood. US Patent No 3, 734851. Washington: US Patent Office, 1973.

■ ■ ■ おわりに

複雑多岐にわたる機能を有している肝臓の機能を補助することは、きわめて難しいことである。人工物の

- 9) Olumide F, Ekiashiv A, Kralios N, *et al.* Hepatic support with hepatocyte suspensions in a permeable membrane dialyzer. *Surgery* 1977; 82: 599-606.
- 10) 葛西眞一, 水戸姐郎, 丹沢宏. Hybrid Artificial Liver の研究－肝細胞浮遊液循環型代謝補助装置の検討－. *人工臓器* 1986; 15: 1429-1432.
- 11) Uchino J, Tsuburaya T, Kumagai F, *et al.* A hybrid bioartificial liver composed of multilayered hepatocyte monolayers. *ASAIO Trans* 1988; 34: 972-977.
- 12) Demetriou AA, Rozga J, Podesta L, *et al.* Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 208:111-117.
- 13) Sussman NL, Grislason GT, Conlin CA, *et al.* The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* 1994; 18: 390-396.
- 14) Dixit V, Gitnick G. The bioartificial liver: State of the art. *Eur J Surg* 1998; 582(Suppl): 1-6.
- 15) 葛西眞一, 澤雅之, 富田一郎, 他: セルロース由来多孔質マイクロキャリア接着ラット肝細胞の代謝能の検討. *人工臓器* 1993; 22: 159-163.
- 16) Funatsu K, Ijima H, Nakazawa K, *et al.* Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs* 2001; 25: 194-200.
- 17) Sauer IM, *et al.* Clinical course of patients with acute liver failure treated with an extracorporeal liver support system-a matched pair analysis. *ASAIO J* 2001; 47: 170.
- 18) 中澤文朗, 葛西眞一. 臨床応用のための凍結保存ヒト肝細胞. *医学のあゆみ* 2002; 201: 827-831.
- 19) Enosawa S, Miyashita T, Tanaka H, *et al.* Prolongation of survival of pigs with ischemic liver failure by treatment with a bioartificial liver using glutamine synthetase transfected recombinant HepG2. *Transplant Proc* 2001; 33: 1945-1947.
- 20) Tateno C, Yoshizato K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *Am J Pathol* 1996; 149:1593-1605.
- 21) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
- 22) Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 2001; 497: 15-19.
- 23) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, *et al.* Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000; 287: 1258-1262.