

Hybrid Artificial Liver の開発に関する研究

(60870043)

昭和61年度科学研究費補助金〔試験研究(2)〕研究成果報告書

昭和62年3月

研究代表者 水 戸 迪 郎

(旭川医科大学第二外科)

## 研究の目的と意義

肝臓は生体の物質代謝の中核であり、生命維持に最も重要な役割を担う臓器である。したがって、ひとたび重篤な機能不全に至れば、その予後は極めて不良である。死亡統計によれば、重篤な肝機能障害、すなわち肝不全を原因とする死亡例は近年ますます増加の傾向にあり、肝硬変17,000人、肝癌15,000人、急性肝炎5,000人、薬物中毒3,500人、術後肝不全1,500人の、計4万人以上に達している。しかも重要なことは、最も働き盛りである40代から50代の年齢に多いことである。高齢化社会を迎えるにあたって、これら壮年層を失うことは大変な社会的問題である。

ところで、肝臓は本来極めて再生能力の旺盛な臓器であるので、重篤な肝障害を呈しているある一定期間を、何らかの方法でその機能を補助してやれば救命できる可能生がある。この機能代行法が、すなわち人工肝臓である。今日、人工肝機能補助装置として臨床的にも使用されているのは、吸着剤や血漿交換療法に代表される、いわゆる除去療法であり、これらの治療成績は意識の回復率には効果を認めるものの、救命率の改善には至っていないのが現状である。その最も大きな理由のひとつとして、肝臓が本来有している二大機能（代謝機能と解毒機能）のうち、これらの除去療法は解毒機能の一部を補助しているに過ぎないという点が指摘される。

そこで本研究では、代謝機能の補助に主眼を置き、代謝のリアクターとして保存ならびに機能の長期維持に有利な、遊離肝細胞を使用したhybrid artificial liverの開発を目的とし、最終的には凍結保存肝細胞を用いた代謝補助システムを意図する。

（発表論文1, 4, 11を参照）

## 研究組織

研究代表者： 水 戸 迪 郎 （旭川医科大学医学部 教授）

研究分担者： 葛 西 眞 一 （旭川医科大学医学部 講師）

研究分担者： 棟 方 隆 （旭川医科大学医学部 助手）

## 研究経費

昭和60年度 7,300千円

昭和61年度 3,500千円

計 10,800千円

## 研究発表

〔(1)-1～10を発表論文として収録した〕

### (1) 学会誌等

- 1.水戸迪郎，葛西眞一，近藤啓史：術後肝障害。外科治療、52:670-672，1985.
- 2.水戸迪郎，葛西眞一：生物学的人工肝臓。医学のあゆみ、134:815-819，1985.
- 3.葛西眞一，水戸迪郎：ハイブリッド型人工肝の現況と問題点。日本臨床、43:2622-2628，1985.
- 4.Michio Mito: Hepatic Assist—Present and Future—. Artificial Organs, 10:214-218, 1986.

5. Shinichi Kasai: What is needed for an artificial liver ?.  
Progress in Artificial Organs -1985, ISA0 Press, 711-714, 1986.
6. 葛西眞一, 水戸迪郎, 丹沢 宏: Hybrid Artificial Liverの研究 一肝細胞浮遊液循環型代謝補助装置の検討一。人工臓器、15:1429-1432, 1986.
7. 寺田良蔵, 鈴木慈郎, 丹沢 宏, 葛西眞一, 水戸迪郎: Hybrid 型人工肝臓の延命因子について。人工臓器、15:1756-1759, 1986.
8. 葛西眞一: 実質細胞の分離・保存法の進歩と外科。日外会誌、87:996-999, 1986.
9. 葛西眞一, 水戸迪郎: 肝細胞の脾内移植。病態生理、5:526-531, 1986.
10. 葛西眞一, 沢 雅之, 山本 哲, 浅川全一, 水戸迪郎, 関口定美: 肝細胞の大量凍結保存の研究。低温医学、12:86-91, 1986.
11. 葛西眞一, 水戸迪郎: 急性肝不全に対する人工肝療法の現況について。  
蘇生、印刷中。
12. 葛西眞一, 柿坂明俊, 水戸迪郎, 寺田良蔵, 鈴木慈郎, 丹沢 宏: Hybrid Artificial Liverの研究 一ガラクトサミン肝不全犬による代謝補助システムの機能と安全性の検討一。人工臓器、印刷中。

(2) 口頭発表

1. 水戸迪郎: 人工肝臓。日本人工臓器学会セミナー、1985年 8月、東京。
2. 葛西眞一: What is needed for an artificial liver ? 第5回国際人工臓器学会、1985年10月、シカゴ。
3. 水戸迪郎: Hepatic Assist -Present and Future. 第5回国際人工臓器学会、1985年10月、シカゴ。
4. 葛西眞一, 水戸迪郎, 丹沢 宏: Hybrid Artificial Liver の研究 一肝細胞浮遊液循環型代謝補助装置の検討一。第23回日本人工臓器学会、1985年

10月、東京。

5. 葛西眞一：人工臓器の開発。第5回科学技術フォーラム、1985年11月、箱根。
6. 葛西眞一：実質細胞の分離・保存法の進歩と外科。第87回日本外科学会、1986年4月、東京。
7. 葛西眞一，水戸迪郎：急性肝不全に対する人工肝療法の実況について。第5回日本蘇生学会、1986年9月、和歌山。
8. 葛西眞一，柿坂明俊，水戸迪郎，寺田良蔵，鈴木慈郎，丹沢 宏：Hybrid Artificial Liverの研究 ―ガラクトサミン肝不全犬による代謝補助システムの機能と安全性の検討―。第24回日本人工臓器学会、1986年9月、東京。

## 研究成果

本試験研究の基本的な研究項目は、中動物からの遊離肝細胞の採取法と大量肝細胞の凍結保存法の確立、遊離肝細胞を代謝のリアクターとした代謝補助装置の試作と基礎実験による評価である。

### 1) 遊離肝細胞の大量採取・保存法の検討。

肝臓を細胞に分散する方法は、Berry & Friendがコラゲナーゼを用いて、酵素灌流法を開発したことにより発展した。われわれは、原法の中動物への応用を検討したが、そのままでは十分な採取量を得ることができなかった。そこで、①十分な灌流量を得るために、人工心肺用の血液ポンプと血液回路とを改良して、循環灌流システムを作製、②酵素消化の前に、細胞間結合織のキレーターであるEDTAを用いて、肝内の血液を完全に除去すると同時に結合織のキレーティングを施行、③コラゲナーゼ酵素濃度をラットの3倍、すなわち0.15%とし、かつ、酵素活性を高めるためにCaイオンを添加、④大きな肝臓を早く細胞に分散するために、低速度の電動ミキサーを使用、などの工夫を加えた。その結果、ビーグル犬の肝臓では、全肝の約70%の細胞が分散された。子牛の肝臓の場合もほぼ良好な成績であったが、この場合はさらに大型の灌流システムが適当と考えられた。子豚の場合は、豚の肝臓の結合織の量が他動物に比し多いために、ほぼ犬と同様の採取量であったが、viabilityは約70%と低かった(表-1)。

採取された肝細胞の代謝能を検索する簡単な方法としては、静置培養が適していることが前実験で判明していたので、本法で調べた。その結果、それぞれの肝細胞は培養皿に良好な状態で接着することが確認された。

次に、凍結保存法について述べる。組織や細胞の長期保存法は、凍害防止剤を使

表1 小豚肝と犬肝の採取の比較

	小豚肝	犬肝
肝細胞浮遊液	210ml	230ml
viability	70%	89%
生細胞総数	$1.7 \times 10^{10}$ ヶ	$2 \times 10^{10}$ ヶ

用した上で、液体窒素中に保存する方法が検討されていたが、Fullerらとわれわれの $\text{Me}_2\text{SO}$  を保護剤として用いて肝細胞の超低温保存法の成功が特筆されよう。ラットの肝細胞を用いた基礎実験は、牛の精子を保存する容量約1mlのストロー様容器を用いて行なわれた。その結果、緩速冷凍・急速解凍法が良いことが判明したので、大量保存法を検討した。大量の肝細胞浮遊液を凍結するには、①適当な容器が必要、②凍害防止剤との温和かつ均等な混和、③容器全体の均等な冷却状態の確保、④理想的な凍結速度の維持、⑤最適な解凍法と凍害防止剤の除去法の確立、などの多くの問題点が生じた。そこで種々検討した結果、容器としては容量100mlの血液凍結用バッグが適当なこと、凍結には大容量のプログラミング・フリーザーが使用可能なこと、急速解凍はバッグを38℃の恒温槽に浸漬することで得られることなどが判明した。基本的な凍結保存法は、前述の方法で得られた肝細胞濃度約40%の浮遊液25mlを、氷冷中の冷凍用血液バッグに注入し、次に $\text{Me}_2\text{SO}$  よりなる凍害防止剤を同量ゆっくりと混和しながら注入する。約15～20分間のソーキングの後、プログラミング・フリーザーに移し、約4℃/分の凍結速度で-80℃まで凍結し、その後液体窒素槽に移して保存する。解凍は、取り出したバッグを恒温槽に素早く浸して一気にこなう。通常2～3分で解けるが、浮遊液の温度が上昇しないように注意する。このあと2回遠心洗浄して凍害防止剤を除去する。

表2 Pre-incubation の有用性の検討

	コントロール	pre-incubation
採取直後のviability	83 %	83 %
保存前viability	83 %	76 %
凍結保存生細胞数 (x10 <sup>9</sup> )	1.50	1.59
洗浄後の生細胞回収率	31 %	37 %
最終回収率	31 %	30 %

このようにして得られたビーグル犬肝細胞の解凍後のviability は約 70%、回収率は約 50%で、形態学的にも、また生化学的にも物質代謝能を維持しており、静置培養でも細胞は接着、扁平化する能力を保持していた。しかしながら、小豚の肝細胞は新鮮な状態ではビーグル犬肝細胞とほぼ同様な成績であったが、凍結保存後では静置培養に耐えられず死滅した。そこで、犬肝細胞を用いて、Me<sub>2</sub>S<sub>0</sub>を添加するときと解凍後除去するときの浸透圧ショックを和らげる目的で、濃度の異なる（浸透圧もちろん異なる）凍害防止剤や洗浄液を用いて、二段階にわけて肝細胞浮遊液を処理する方法を試みたが、必ずしも従来成績を上回るものではなかった。また、凍結保存する細胞を凍結前に培養して、細胞分離の際の障害を修復してから凍結へもっていくpre-incubation法をも検討したが、最終回収率はほぼ同様であった（表-2）。

（発表論文 2, 3, 8, 9, 10 参照）

## 2) 遊離肝細胞利用代謝補助装置の開発

### 1. 装置の概要

遊離肝細胞を代謝のリアクターとした装置を考えた場合、その基本構成は遊離肝細胞の機能を維持させる部分、患者血液と物質交換を行なう部分、他の血液浄化システムの部分（血漿交換、血液吸着など）などであろう。われわれは、遊離肝細胞を浮遊培養系で維持し、物質交換は中空糸膜モジュールを利用するシステムの基本設計を行ない、プロトタイプを試作した。このプロトタイプは、細胞浮遊液中に中空糸膜モジュールを浸漬し、血液はこの糸の中を通り、その間に物質交換を行なうもので、細胞浮遊液の攪拌と酸素供給は  $O_2-CO_2$  の混合ガスで行なうシステムである。このガスバブリング方式では、細胞のviability を長時間維

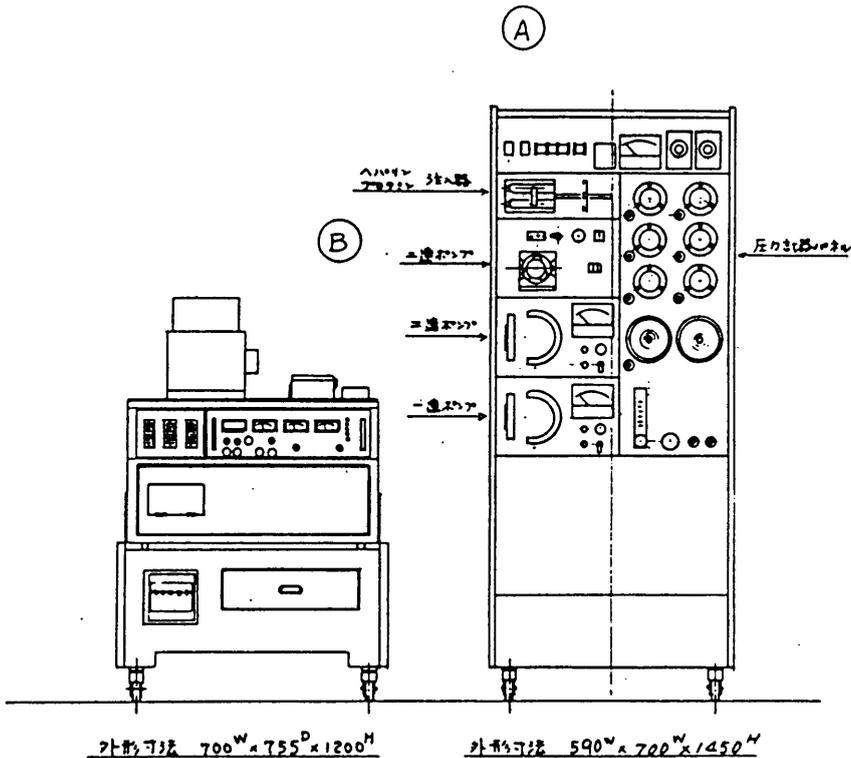


図1 遊離肝細胞利用代謝補助試作装置

持することができなかつたので、本研究ではガスバブリングを行なわない方式のシステムを試作し、ガスバブリング方式と比較検討した。

この新方式は、細胞浮遊液を第一の中空糸モジュールで培地と細胞成分とに分離し、この培地を第二の物質交換用モジュールに導き、ここで分離膜を介して血液と接触させる。第一のモジュールの手前に、酸素供給用セルを設置し、温度と pH は自動的にコントロールされる（図-1, 2）。

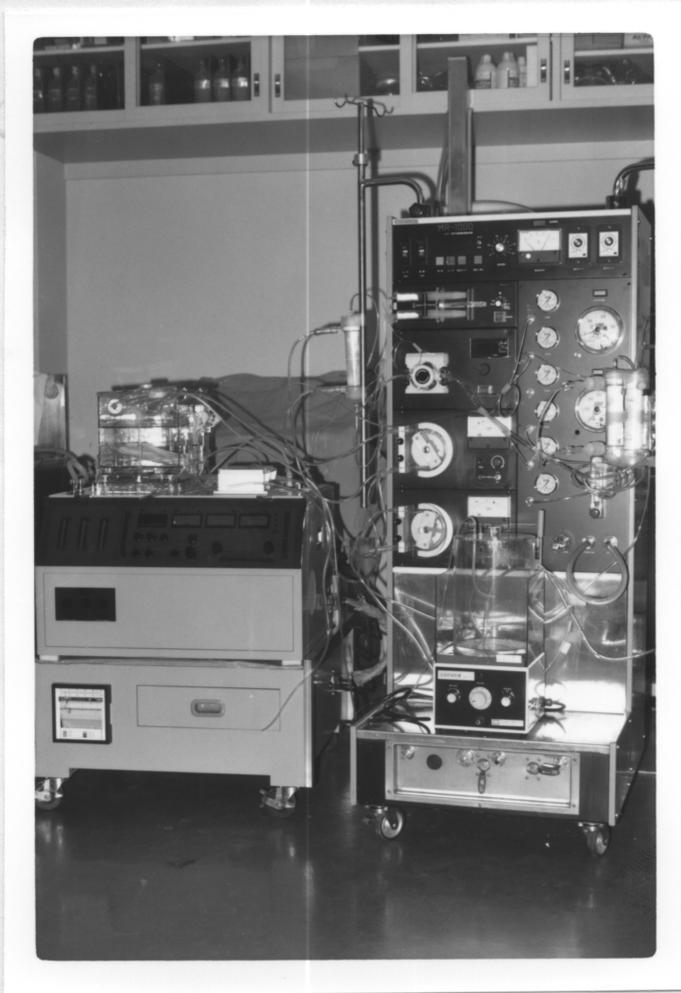


図2 試作装置の全景

## 2. 体外循環システム

本システムはハードのメインとなるもので、血漿分離、血液透析、血漿交換、血液灌流などの方法を任意の組み合わせでセッティング可能である。肝細胞を使用した代謝能補助と吸着剤を用いた解毒能補助を、分離血漿灌流システムで血液透析を併用した場合の機能を想定して必要な要素をあげる（図-3）。

- ①血液ポンプ(RP<sub>1</sub>): 0~200ml/分の可変
- ②分離血漿灌流ポンプ(RP<sub>2</sub>): 0~200ml/分の可変で二連
- ③細胞浮遊液灌流ポンプ(RP<sub>3</sub>): 0~200ml/分の可変で二連
- ④リサイクルポンプ(RP<sub>4</sub>): 0~500ml/分の可変で pH 制御系と連動
- ⑤各コンポーネントの圧力モニター
- ⑥二連式薬液注入器
- ⑦各温度、pH、圧力計と警報機能
- ⑧特製血液回路は各コンパートメント化

## 3. 試作システムの基礎実験による検討

試作システムのハードとしては、各種の機能を併用することが可能であるが、本実験では代謝補助システムの有効性についてプロトタイプの結果と比較検討された。

### 3-1. in-vitro 実験

代謝機能補助のリアクターとして、遊離肝細胞 40gを用い、MEM培養液よりなる細胞浮遊液 2ℓに浮遊させ、血液側としてはハンクス氏液にフルクトースとアンモニアを負荷した疑似血液を灌流させた。灌流血液量は約40ml/分とした。新システムでは、細胞浮遊液を500ml/分の流量で第一の血漿分離用モジュールに

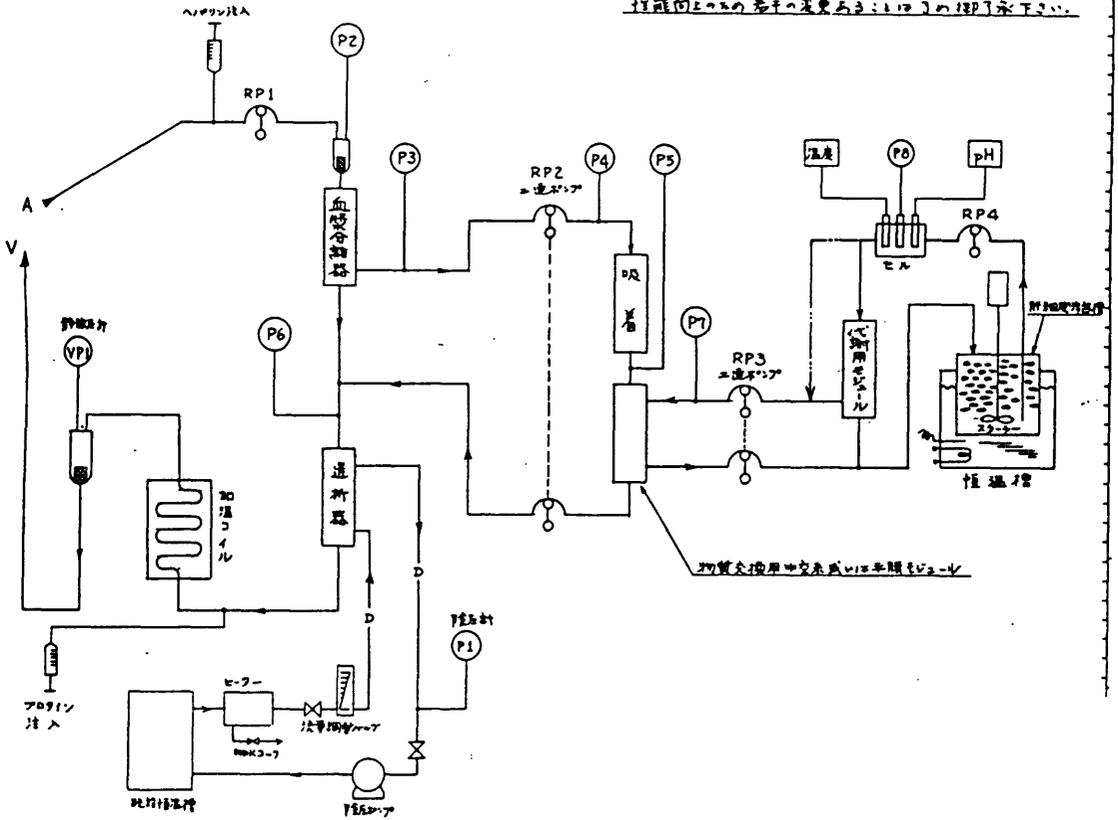
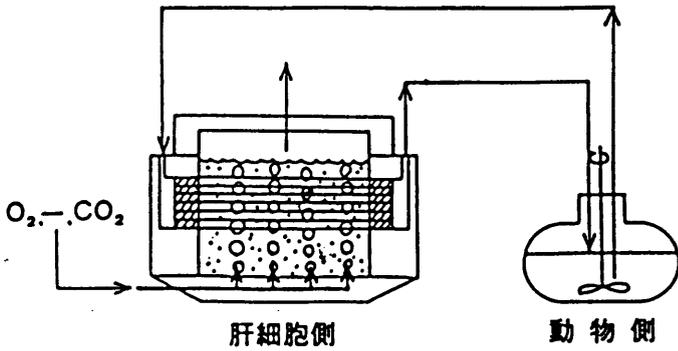


図3 試作装置のブロックダイアグラム

灌流させ、このモジュールで培養液のみ100ml/分で引き抜き、第二の分画分子量10万の中空糸膜モジュールに灌流させ、この部分で動物の血液と物質交換が行なわれて、培養液はふたたび細胞液と合流し細胞浮遊槽にもどされる。酸素供給は気相表面からの拡散のみによりなされる。図4に実験方法の模式図を示す。

In-vitroテストにより代謝能は、アンモニアの減少、BUNとグルコースの上昇でみると、バブリング方式と新方式でそれぞれ 155と 215  $\mu\text{g/g.cell/h}$ , 0.517と 0.567  $\text{mg/g.cell/h}$ , 3.5と 3.9  $\text{mg/g.cell/h}$  とほぼ同様であった (図-5)。細胞のviability と浮遊液のガス分析結果を見ると (図-6)、viability はバ

肝細胞浮遊ガス・バブリング方式



肝細胞浮遊培地灌流法

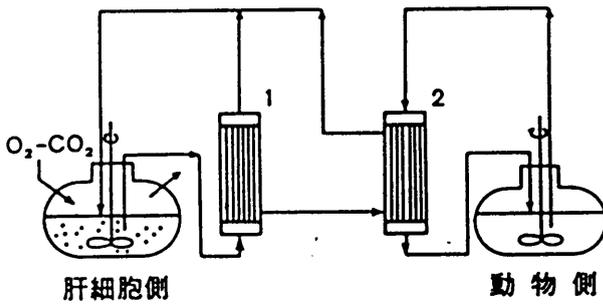


図4 両方式の模式図

バブリング方式では6時間後には70%以下となるが、新方式では10時間後でも80%を示し、また前者では供給酸素量を減少させてはいるものの上昇を示し、pHはアルカリ側へと傾いた。後者では炭酸ガスの自動吹き込みにより良好な値が維持された。

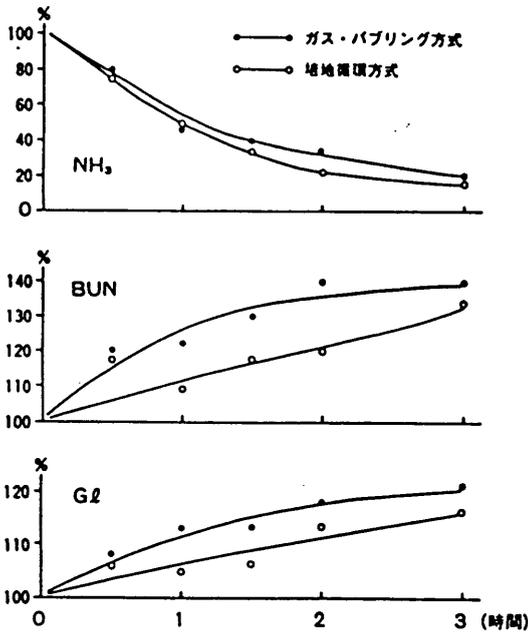


図5 In-Vitroテストの代謝能の比較

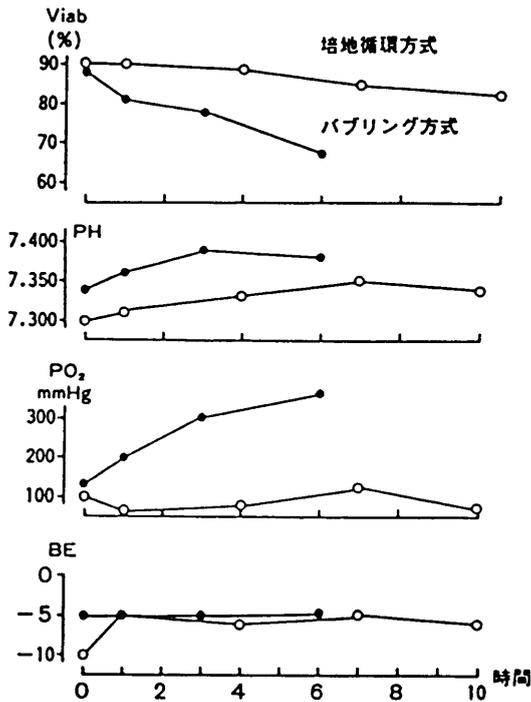


図6 両循環方式の細胞槽内の変化

### 3-2. in-vivo 実験

肝不全モデルとして、ガラクトサミン 0.7g/kg投与後約20時間目の肝障害犬を用い、約40ml/分の血流量で10時間の体外灌流を行ない、経時的に血液サンプルを採取し、平均血圧が 50mmHg 以下になった時点で犠牲死させた。諸成績をガスバブリング方式のプロトタイプの場合と対比し、それぞれ5頭の平均値を図示した。また、犬肝細胞浮遊液の異種動物に与える影響を、ラットの腹腔内への投与実験と、小豚を患者とした灌流実験における小豚の血清を培養犬肝細胞に添加して細胞障害を調べる assay系にて検討した。さらに、培養後の細胞浮遊液をガラクトサミン肝不全ラットに投与し、有効か否かも観察した。

体外灌流中の動物の血液ガス分析結果をみると（図-7）、レスピレーターで呼吸を維持しているため酸素濃度、base excess, pH は比較的安定していたが、死亡が近づくとつれ強いアシドーシスを示し、頻回のメイロンによる補正を要した。

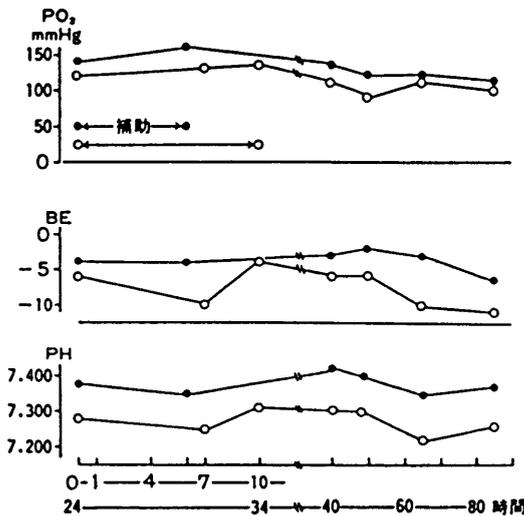


図7 兩循環方式のIn-Vivo の実験

体外循環時間が長くなるにつれ、血圧は低下傾向を示し、以後死亡まで漸減した。新方式では血液濃縮による多血症が持続した（図-8，9）。図中x印は非治療群のデータを示す。

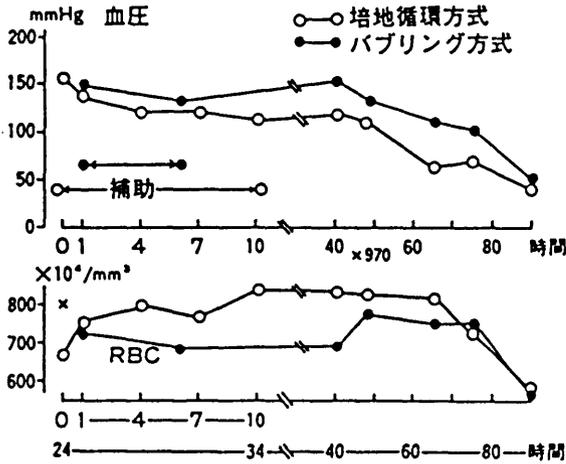


図8 兩循環方式の In-Vivoの実験

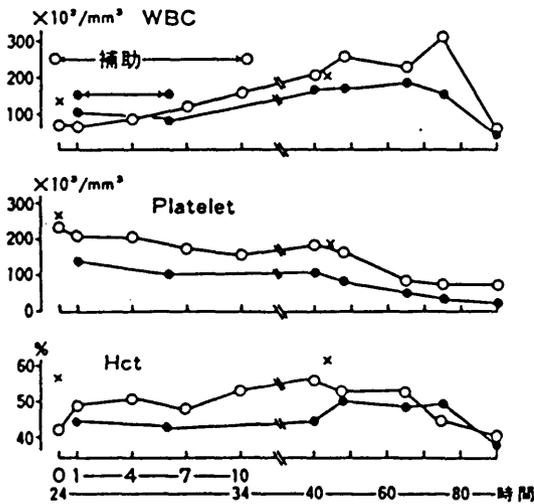


図9 兩循環方式の In-Vivoの実験

血液生化学検査では（図-10, 11）、基本的には両方式ともほぼ同様の変動を示したが、新方式における灌流中の低蛋白血症が著明であった。

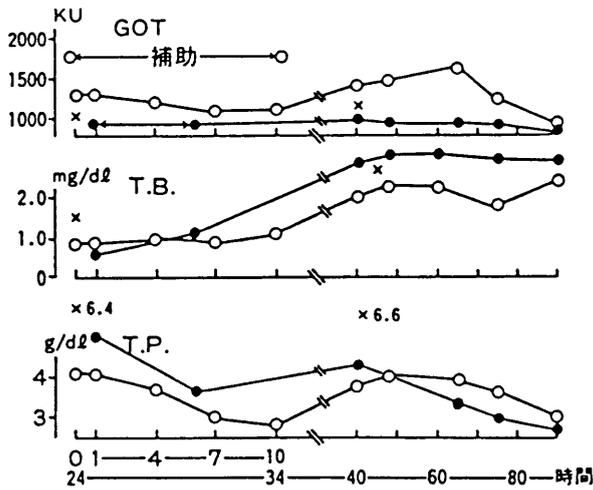


図 10 兩循環方式の In-Vivoの実験

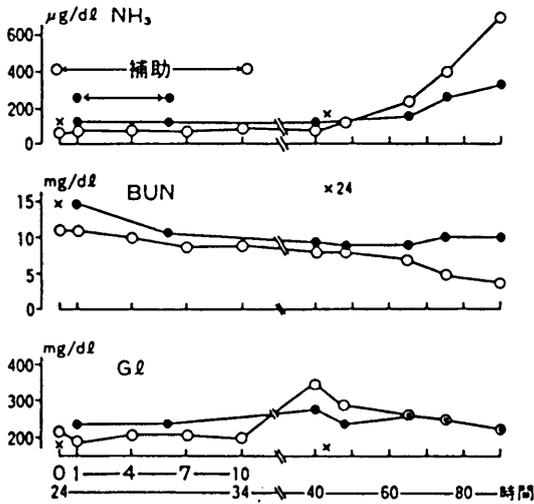


図 11 兩循環方式の In-Vivoの実験

動物の生存時間をみると（図-12）、バブリング方式は $86 \pm 11$ 時間、新方式は $76 \pm 12$ 時間とほぼ同様であり、非治療群に比し有意の延長が認められた。

豚を患者として、犬・豚肝の免疫学的反応を検討したところ、灌流後の豚血清中に犬肝細胞に対する抗体の産生が確認された。しかしながら臨床的なアナフィラキミー様反応は観察されなかった（図-13）。

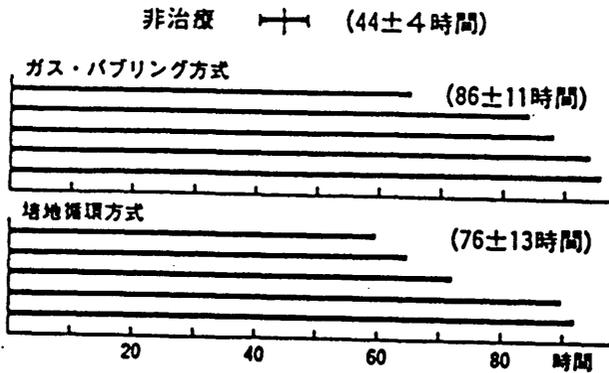


図 1 2 Gal肝不全犬の生存時間の比較

図 1 3 Cytotoxicity of Patient (Pig) Serum to Hepatocyte (Dog)

(Dog Hepatocyte Perfusion to Pig)

	Patient (Pig) Serum				control MEM
	Pre-perfusion	Post-perf.(1x)	Post-perf.(2x)	Post-perf.(4x)	
1st perfusion	75 (X)	40	62	72	82
2nd perfusion (1 week)	51 (X)	67	50	55	73

(% Hepatocyte Viability)

また、浮遊液をラットの腹腔内に10ml注入して、血中のGOTとクレアチニン  
 を1週間にわたり観察したが、全く異常はみられなかった(図-14)。この浮遊  
 液を、ガラクトサミン肝不全ラットの腹腔内に注入したところ、有意に生存率を  
 改善した(図-15)。

(発表論文 5, 6, 7 参照)

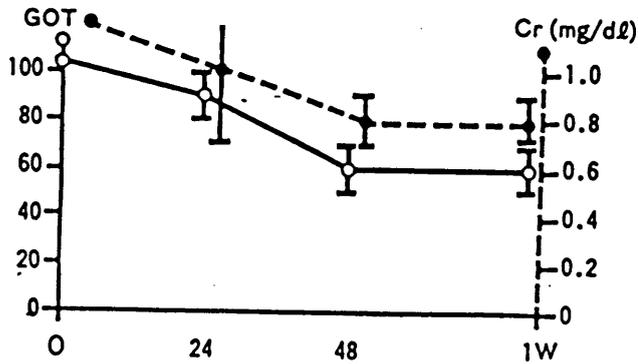


図14 Toxicity Test of Cell Suspension

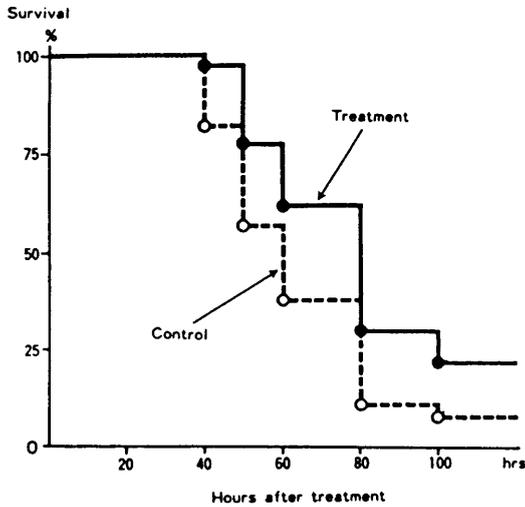


図15 細胞浮遊液の Gal肝不全ラットへの投与効果

### Ⅲ. 考察および今後の見通し

劇症肝炎に対する解毒療法の成績を集計してみると、近年血漿交換の救命率が30%を超えつつある。この大きな理由は、交換療法の技術の進歩もあろうが、早期治療開始による点も大きい。すなわち、昏睡度Ⅲ度で交換される例が多くなっている。一方、西独におけるヒト肝体外灌流の成績は、昏睡度Ⅳ度で30%を超えている。このように、人工的な除去療法のみでは限界があると考えられるところから、生体肝を何とか利用しようとする研究も根強い。われわれは、これら両者を適当に組み合わせることによって一層の効果をあげられるのではないかと考え、total systemとしての hybrid typeの装置の開発研究を続けている。本システムの生体肝素材は要に応じて大量に必要であるところから、保存法の開発も必須となる。さらに、この生体肝素材の機能を有効に引き出すsystem化の問題がある。これらの点に長い間努力がなされてきた。

さて、肝細胞の大量採取法であるが、われわれの改良法で、ラットのような小動物の成績に全く劣らない量および質の細胞の分散が可能である。10kgの成犬肝から  $2 \times 10^{10}$  個、全肝の約70%という成績は最高であり、今後は全体システムの簡略化を検討する必要がある。

長期保存法は、全臓器では全く不可能であるところから、どうしても細胞単位にせざるを得ない。われわれの方法では、解凍後のviability約70%、回収率50%、その機能は全体的にみれば40~50%で、保存細胞も移植可能であり、さらに静置培養にて接着扁平する能力を維持していることが確認されている。これらの成績は他に例をみないものであるが、一層の成績の向上が望まれ、凍害防止剤の改良を含め研究を続ける必要がある。

次に、遊離肝細胞の機能をいかに引き出すか、その方法の開発が本邦の最重要課題である。今回のシステムでは、肝細胞の機能を、いわば浮遊培養系で引き出

すことになるが、ガスバブリング方式から拡散法とすることによって、細胞の viability を2倍に延長させることができた。10時間の灌流実験は問題なく可能である。しかしながら、より長時間、一層の細胞機能を維持させるには、何らかの方法が必要となる。すなわち、肝細胞は本来基質に接着して機能を営んでいるものなので、基質に包埋したり接着させたりすると、より長時間培養できると報告されている。今後は、このような方法を利用したシステムが有効と考えられ、期待される。

以上、遊離肝細胞を代謝のリアクターとした肝機能補助システムを開発し、その有用性を評価したことを報告した。