

---

親脂化膜を用いた増殖型  
ハイブリッド人工肝臓の  
開発に関する研究

---

(03670576)

平成3年度科学研究費補助金〔一般研究(C)〕研究報告書

平成5年3月

研究代表者 山本 哲  
(旭川医科大学医学部講師)

## I. はしがき

### 1) 研究の目的と意義

末期の臓器不全の治療では、近年臓器移植が行なわれ、免疫抑制剤の発展とあいまって治療成績も格段に向上しており、今後ますます発展すると思われる。しかし我国では脳死問題が解決されないことから、肝臓移植においては健康体から肝臓の一部を貰う、いわゆる生体部分肝移植のみが行なわれているに過ぎない。この治療法は生体腎移植と異なり、移植された臓器が機能不全に陥った場合には、透析療法に相当する治療法がないため、代わりの臓器を移植することでしか救命し得ず、再移植が困難な状況では救いようがない。このため腎不全における透析療法に匹敵する治療法としての肝機能補助装置の開発が行なわれているが、肝不全の複雑な病態に対応した装置はいまだ開発されていない。

肝臓の機能不全において最も致命的なのは、脂溶性毒素による中枢神経障害である事が分かっており、その選択的除去法としてドイツのG. ブルンナーらは、lipid membraneを用いる方法を考案し、その効果を検討してきた。これは、脂肪の疎水性を利用して、水分子・電解質を透過せず、脂溶性物質のみを選択的に透過する膜を用

いるものがある。この膜をはさんで一方に体外循環装置によって肝不全に陥った患者の血液を流し、反対側には脂溶性毒素の酵素反応による解毒槽を置くもので、水溶性の補酵素類の保持や、反応の至適条件の任意設定など、酵素反応の環境を維持するのに有利であるとして注目されていた。しかし肝不全の病態は複雑であり、解毒を必要とする脂溶性毒素も複数におよびかつそれぞれ相乗効果も指摘されているため、どの酵素反応系を組み合わせる事が最も効果があがるのかいまだ解明されていない。

我々は、以前より遊離肝細胞を用いた解毒代謝装置の開発を行なっており、細胞環境を維持するのにlipid membrane techniqueが有利と考え、この親脂化膜を用いたハイブリッド型の人工肝補助装置の開発を行なった。また遊離肝細胞の利用面では、この細胞機能を低下させる事なくいかに長く維持できるか、接着、あるいは包埋技術により、物理的・機能的に安定な条件を与え、また分裂増殖を刺激するような添加物を加え、細胞の至適利用法も同時に検討している。

## 2) 研究組織

研究代表者：山本 哲（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：葛西眞一（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：沢 雅之（旭川医科大学医学部助手）

## 3) 研究経費

平成3年度	1, 100千円
平成4年度	1, 000千円
計	2, 100千円

## 4) 研究発表

ア. 学会誌等

- ①. S.Kasai, M.Sawa, S.Hirai, K.Onodera, T.Yamamoto, M.Mito  
Beneficial Effect of Hepatocyte Transplantation on  
Hepatic Failure in Rats  
Transplantation Proceedings, 24(6), 2990-2992, 1992



②. S.Kasai, M.Sawa, Y.Nishida, K.Onodera, S.Hirai,  
T.Yamamoto, M.Mito  
Cellulose Microcarrier for High-Density Culture of  
Hepatocytes  
Transplantation Proceedings, 24(6), 2933-2934

③ 山本 哲  
人工肝臓 - この1年の進歩  
人工臓器, 21(6), 1416-1417, 1992

イ. 口頭発表

①. S.Hirai, S.Kasai, M.Sawa, K.Kondo, A.Kakisaka,  
T.Yamamoto, M.Mito  
The Assessment of Improvement of Survival Rate of Rats  
with D-GalactosaminePoisoned Acute Liver Failure by the  
Gel-Entrapped Hepatocyte Transplantation.  
第26回ヨーロッパ実験外科学会 1991年 5月

②. S.Hirai, S.Kasai, M.Sawa, T.Yamamoto, M.Mito  
Survival of Experimental Liver Failure by Gel-entrapped  
Hepatocyte Transplantation.  
第8回国際人工臓器学会 1991年 8月

③. 山本 哲、葛西眞一、沢 雅之、柿坂明俊、水戸迪郎

親脂化膜を用いた肝機能補助装置の研究

第4回北海道代用臓器研究会 1991年11月

## II. 研究成果

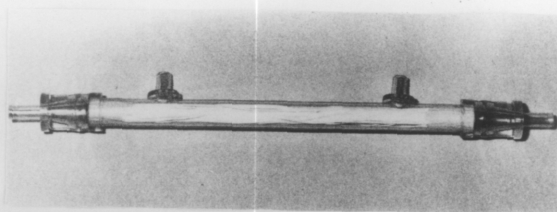
### [1] 脂溶性物質の選択的除去装置の作成

#### 1) 疎水性ポリプロピレン・ポリエチレン膜の親脂化

体外循環により脂溶性毒素を抽出する膜として、ポリプロピレンを素材とする中空糸膜と、ポリエチレンを素材とする膜の2種類を用いた。ポリプロピレン膜はドイツ、フレゼニウス社が開発したプロトタイプの膜で、膜厚は150  $\mu\text{m}$ 、総膜面積が76  $\text{cm}^2$  のモジュールとなっている。ポリエチレン膜は旭メデイカル社でプラズマセパレーター用に開発されたもので、親水加工が施される前の疎水性の膜を実験用モジュールとしたもので、膜厚は50  $\mu\text{m}$ 、総膜面積は144  $\text{cm}^2$  となっている(写真-1)。いずれもプライミングボリュームは10ml以下であり、小動物の実験に適している。これらの膜は、スポンジ様構造(写真-2)を取っており、このスポンジ部分

*polypropylene*  
(Fresenius)

surface area 76 cm<sup>2</sup>  
wall thickness 150 μm  
priming vol. 7.2 ml



*polyethylene*  
(Asahimedical)

surface area 144 cm<sup>2</sup>  
wall thickness 50 μm  
priming vol. 6.6 ml

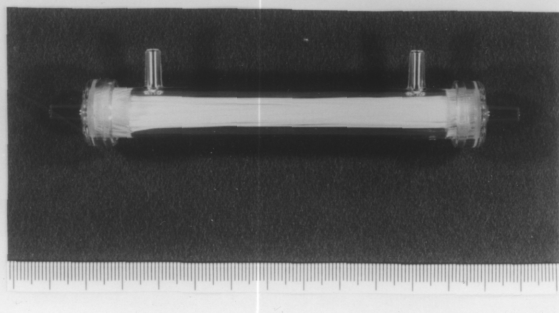


写真-1. ポリプロピレン・ポリエチレン膜モジュール

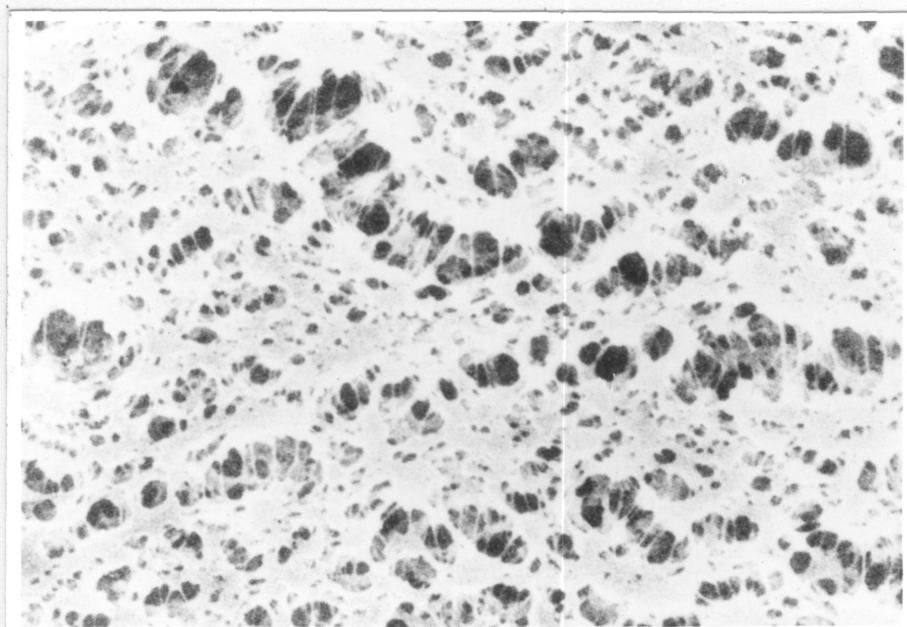


写真-2. ポリプロピレン中空糸膜走査電顕写真 (x 4,000)

をパラフィンの主成分とす脂溶性溶液 LA-2 (表-1) に2時間浸して親脂化、さらに数時間通気によって余分な溶液成分を取り除いて使用できる。

この親脂化膜を用いて、脂溶性物質の透過性を評価する実験を行った。脂溶性物質としてはフェノールを用い、1 mMの濃度で血清に溶解したものを、マイクロポンプを用いて膜の内側 (A) に毎分5 mlの速度で還流した。膜の外側

Paraffin, liquid	54	%
Parafin, thick	40	%
Lecithin	5	%
Dodecanol	1	%

表-1 LA-2の組成

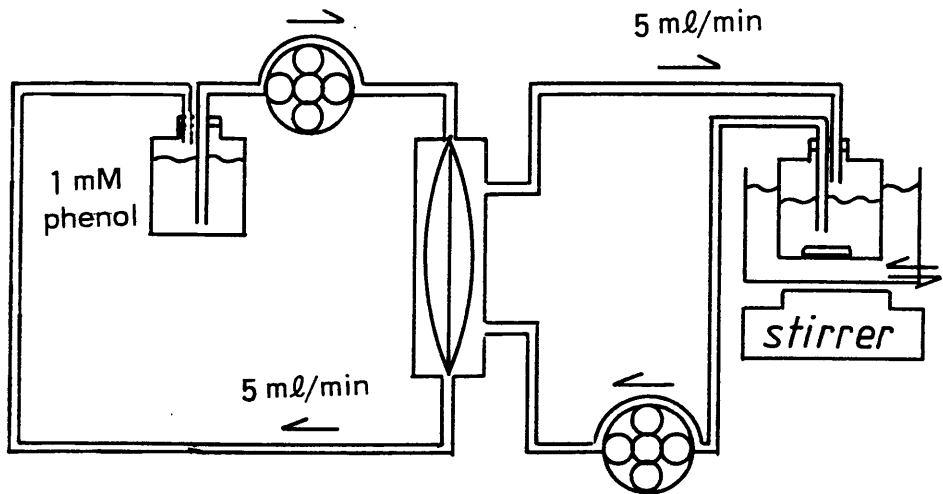


図-1 親脂化膜モジュールによる還流実験

(B)にも血清を毎分5mlの速度で還流し、100mlのreservoirから継時的にサンプリングを取り、C.J.Hollowayらの方法に従って血清中のフェノール濃度の測定を行なった。

図-2は2種類の親脂化中空糸膜モジュールを用いて、脂溶性物質であるフェノールを還流した際の透過性を示している。

膜の内側を流れるフェノールは数時間で70~80%が透過し、平衡状態に近づくことがわかる。膜の素材による両者の透過性の違いについては、ポリプロピレン膜の膜厚が150  $\mu\text{m}$  に対して、ポリエチレンのそ

れは50  $\mu\text{m}$  しかなく、膜厚による透過速度の差と考えられるが、いずれにせよ数時間の還流により、目的とする脂溶性毒素の抽出が達成されることがわかる。また脂溶性毒素の種類によっては、脂溶性の度合いによって、膜の透過性、平衡状態への到達速度が異なる。

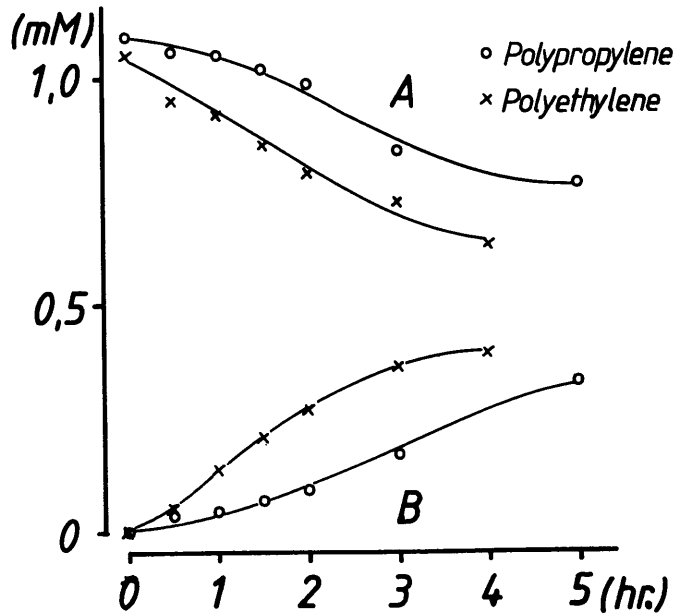


図-2 ポリプロピレン・ポリエチレン親脂化膜におけるフェノールの透過性

Dimethylsulfide (DMS) もやはり肝不全を誘発する脂溶性毒素として知られ、実際に肝不全患者の血清中で高濃度に達していた事が報告されている。この脂溶性毒素は肝臓内のミクロソームにある解毒酵素系によって代謝され、水溶性のDimethylsulfoxide (DMSO) さらにDimethylsulfone (DMSO<sub>2</sub>) となって尿中に排泄されると考えられている。この代謝経路は、肝不全の際の特有の口臭の元と考えられている、メルカプタンの生体内での解毒代謝経路の可能性があり、肝不全治療の解毒システム開発において重要なターゲットと考えられている。(図-3)

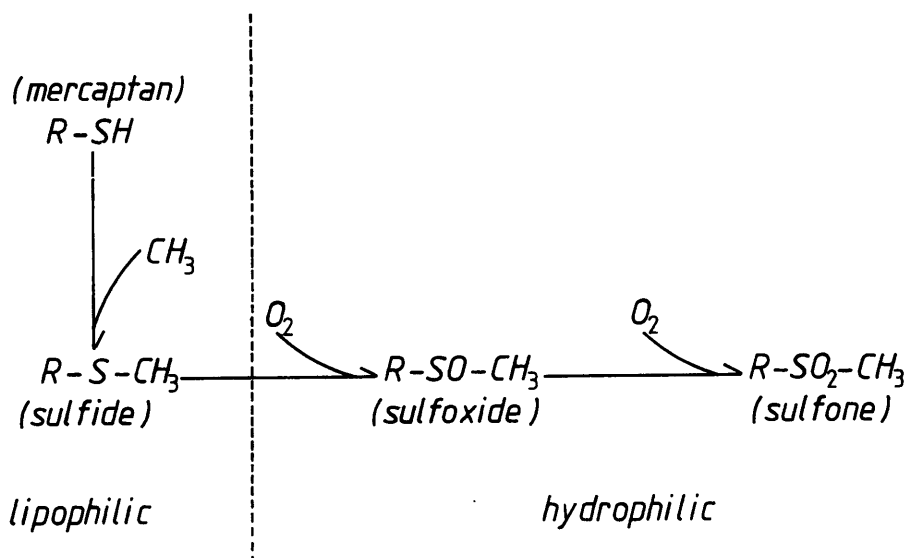


図-3 メルカプタン・サルファイドの代謝経路

このDMSとDMSOを図-1のフェノールのかわりに親脂化ポ

リプロピレンの内側 (A) に還流し、そのreservoir 容量 (150ml) の十分の 1 量のreservoir を膜の外側 (B) におき、reservoir から継時的に0.5ml ずつサンプリング、素早くグラスバイアルに封入して測定に供した。DMSは揮発性物質であるため、還流回路、測定系はすべて密封状態で行ない、この濃度の測定はS.E.Garretsonの方法に準じてガスクロマトグラフによって行なった。使用したガスクロマト装置はPackard Model 438 (FID,PID)、Porapak Type Q 80/100 mesh

(Water Associa

te, INC) を160

x 0.2 cmのガ

ラスカラムに

充填して用い

た。

DMSは脂溶

性物質である

ため、親脂化

膜を透過する

が、代謝産物

のDMSOは

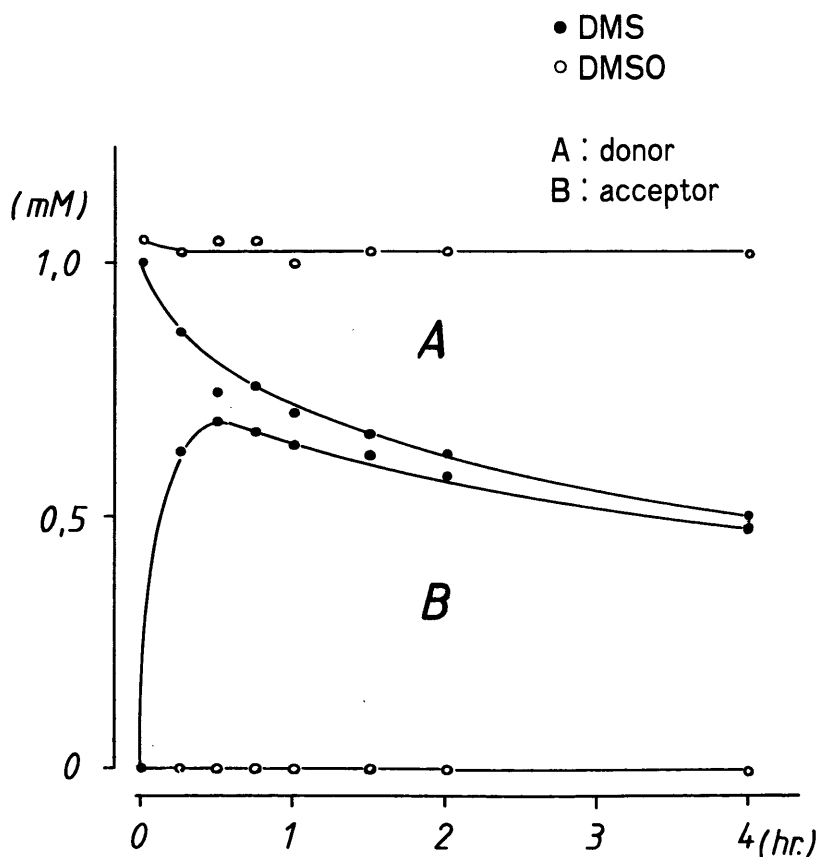


図-4 DMS・DMSOの親脂化ポリ  
 プロピレン膜における透過性

水溶性物質であるため、膜を透過できない。(図-4)

DMSは脂肪相への移行が速く、わずか30分でA側の約80%の濃度に到達し平衡状態となるが、DMSOについては膜透過性が全くなく、B側のreservoir中には検出されなかった。DMSの平衡状態が全体に右下に傾いているのは、DMSが揮発性であり、沸点が37℃と低く、回路のテフロンチューブをもつうじて拡散するためと考えられる。

## 2) 代謝システムの検討

### ①肝ミクロソームを代謝のリアクターとする方法

肝ミクロソームの調整およびDMS酸化酵素であるflavin-containing monooxygenase

(E.C. 1.14.13.8) の	1 M	K P O <sub>4</sub> (pH7.4)	100 μl
部分精製は、家兎肝を用	50mM	M g C l <sub>2</sub>	100 μl
いてD.M.Ziegler とL.L.	10mM	N A D P H	20 μl
Poulsen の方法により調	13.6mM	D M S	100 μl
整した。酵素反応は容量		H <sub>2</sub> O	0.66 ml
9 mlの密封ガラス容器内	+	サンプル	20 μl
に表-2の如く、リン酸		total	1.00 ml
バッファーと補酵素を含			

表-2 酵素反応溶液



む溶液にサンプル20 $\mu$ lを加え、30 $^{\circ}$ Cの恒温槽内で30分間振蕩して反応させた後、200 $\mu$ lの5N過塩素酸を加えて反応停止、遠心分離した後、上清を4NKOHにより中和、さらに遠心して上清を前述のガスクロマト装置にてサンプル内蛋白量あたりのDMSO産生量として測定した。

家兎の各臓器に5倍量	肝臓	1.44
(v/w)の150mM KCl,	心臓	0.00
2.6mM EDTA溶液を加え、	肺	0.00
窒素ガスブローの条件で	腎臓	0.00
ホモジナイズし、それぞ	小腸	0.00
れサンプルとして比較を	大腸	0.00
行なった。表-3は単位		(nmol/min/mg protein)
蛋白あたりのDMSO産		
生量を示しているが、D		
MSの代謝酵素は肝臓以		

表-3 臓器別酵素活性

外にはない事がわかる。また肝臓のミクロソームに含まれる解毒酵素のCytochrome P-450がフェノバルビタールで誘導される事実があり、より多くの酵素活性を得るために、家兎の飲料水に0.5 g/LのNa-Phenobarbitalを与え、1週間飲用させた後、肝臓を摘出した。

これらの肝臓を前述の方法にしたがってミクロソームにまで精製

し、それぞれの酵素活性について比較した。

分 画	DMSO 産生量 (nmol/min/mg protein)	Cyt. P-450含量 (nmol/mg protein)	比活性 (u/cytP450)
homogenate	1.40	0.364	3.85
microsome	2.32	0.609	3.81
phenobal microsome	3.84	0.686	5.60

表 - 4 肝臓分画別酵素活性

また、この酵素の基質特異性を調べるために、反応系から、酵素 NADPH、O<sub>2</sub> を順次除き、DMSO の産生能を検討した。O<sub>2</sub> は酵素反応を行なうガラスバイアル中に N<sub>2</sub> ガスを吹き込み、気相から酸素を追い出し

た。NADPH、酸  
素除去群で約十分の  
1 の酵素活性が見ら  
れるのは、サンプル  
に内在する NADP  
H あるいは水中の溶

<i>Fraction</i>	<i>Production rate of DMSO</i> (nmol/min/mg protein)
<i>Homogenate</i>	1,40
<i>Microsomes</i>	2,32
<i>Microsomes</i> ( <i>Phenobal. induced</i> )	3,84

表 - 5 酵素反応における基質特異性

存酸素を完全に除去し得ないためのもので、DMSの酸化反応には必須の要素である事がわかる。この酵素反応系を全容積50mlのガラスreservoirに、

溶液量が25mlとなるよう、さらにNADPHの再還元系として、isocitrate-dehydrogenase系を加えたものを用いて

liver microsomes(1:5 buffer)	0.5 ml (2.5 ml)
1 M KPO <sub>4</sub> (pH 7.4)	2.5 ml
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 ml
10 mM NADPH	2.5 ml
0.1 M sodium isocitrate	2.5 ml
isocitrate dehydrogenase	50 units
Bidest	
TOTAL 25.0 ml	

(表-6) in vitro

表-6 代謝槽内の酵素反応系

の親脂化ポリプロピレン中空糸膜を用いた、脂溶性毒素DMSの還流解毒実験を行なった。還流システムのセットアップは図-1と同じ、A側のreservoir容量は家兎を想定しておよそ250ml、血清中に1mMのDMSを溶解し密封状態、チューブ類はすべて硬質テフロンチューブとしている。肝ミクロソームはフェノバルビタール処理された家兎肝から抽出され、-70℃に凍結保存されていたものを5倍容のリン酸バッファー(pH7.4)で溶解したものを用いた。

A・B両サイドのサンプル0.5mlを継時的にreservoirから取り前述のガラスバイアルに100μlの5N過塩素酸とともに密封し、37℃恒温槽内で30分incubationした気相をDMSの測定に、溶

液は除蛋白、  
中和の後 D M  
S O 測定に用  
いた。

A 側の血清  
中の D M S は  
素早く親脂化  
ポリプロピレ  
ン膜を透過し  
酵素反応槽の  
ある B 側に移

行し、肝ミク  
ロソームに含  
まれる酵素活

性により、酸素分子を添加されて D M S O となる。この D M S O は水溶性であり、親脂化膜の透過性がないため再び膜をくぐって A 側に戻ることはなく B 側で増加する。これによって D M S の平衡状態は大きく右下りに傾き、donor から効率的に D M S を減少させることができた。また肝ミクロソームを含む酵素溶液の持続注入によって、この解毒能は半永久的に維持することができた。

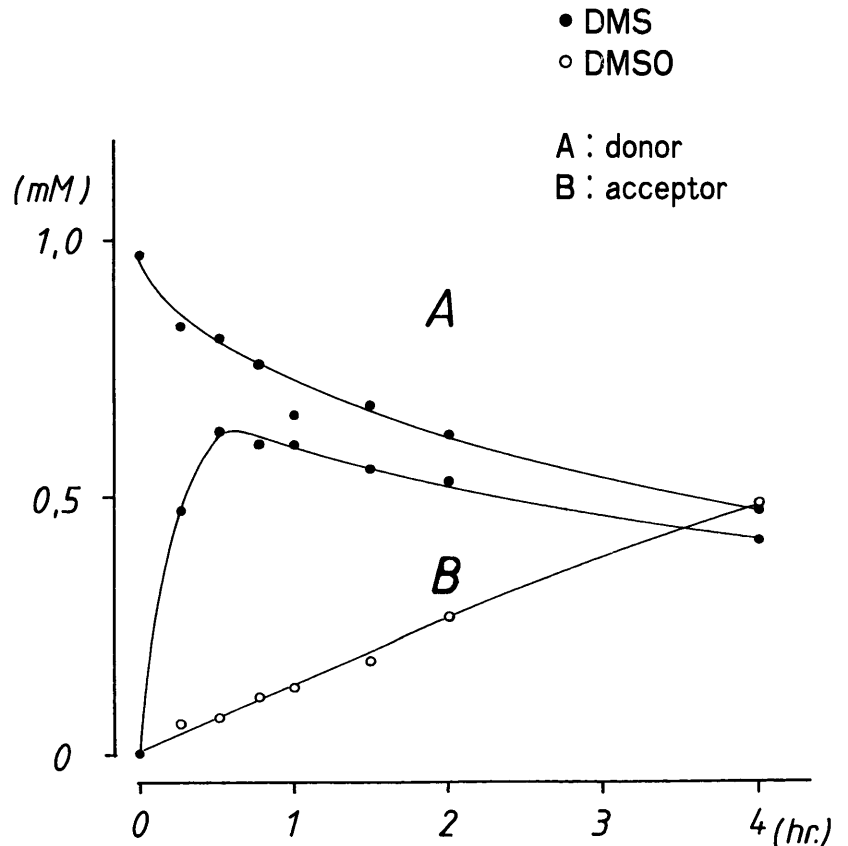


図-5 親脂化ポリプロピレン膜を介した  
D M S の酵素的酸化除去

## ②遊離肝細胞を代謝のリアクターとする方法

遊離肝細胞を用いるハイブリッド型肝機能補助装置は、これまで数多くの施設で検討されてきたが、脂溶性毒素の解毒に焦点をおいた報告はされていない。この研究では肝細胞による脂溶性毒素の解毒能を、被包遊離肝細胞を中心に検討した。

### ア. ラット遊離肝細胞における解毒酵素活性

解毒能を表わす指標として、肝組織中のNADPH Ct.C Reductase活性を測定し、肝組織中の酵素活性を高めるために、肝細胞遊離を行なう1週間前に、ラットに門脈下大静脈吻合術（PC S）を行なった。肝組織中の

酵素活性は、P C	対象群 (n=5)	39.0 ± 2.4
S群で約3割増加	P C S群 (n=5)	50.6 ± 5.2
しており、肝ミク		(unit/g protein)

ロソームの薬物代

謝に有利であると

表-7 正常・P C Sラットの肝組織

考えられ、細胞調

NADPH Cyt.C Reductase 活性

整は、P C S施行後1週目のラットから行なうことにした。

P C Sからの遊離肝細胞調整にあたっては、肝静脈側より、コラゲナーゼ酵素液を還流し、通常の遊離肝細胞と同様の時間で消化さ

れ、かつバイアビリテイについてもほぼ同様であった。この遊離肝細胞液を等量の2%アルギン酸ナトリウム溶液と混和し、0.1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液中に滴下して、被包PC<sub>2</sub>S肝細胞を作成した。

イ. 被包PC<sub>2</sub>S肝細胞による脂溶性毒素の解毒代謝

脂溶性毒素としてはフェノールを用いた。このフェノールはグルクロン酸抱合により胆汁中に排泄解毒されるため、肝細胞の代謝能を測定するにはフェノールのグルクロン酸抱合体の生成を測定する必要がある。フェノールのグルクロン酸抱合体の測定にはHPLCを用いた。

肝組織は表-	0.1 M	Tris-HCl (pH7.4)	100 μl
8に示される反	50 mM	MgCl <sub>2</sub>	100 μl
応溶液とともに	50 mM	Saccharolactone	100 μl
37℃の恒温槽	50 mM	UDGPA	100 μl
内で15分間	10 mM	Phenol	100 μl
incubateした後		liver homogenate (1:5 PKO <sub>4</sub> )	100 μl
等量の4℃アル		H <sub>2</sub> O	400 μl
コールを加えて	(37 °C, 15 min)	total	1.00 ml
反応停止、遠心			
操作による上清	表-8	グルクロン酸抱合活性測定反応溶液	

を検体とした。

H P L C の設定条件は、10 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate ( TBAHS ) を 30 % メタノール溶液に溶解したバッファーで平衡状態にした O D S カラム ( ODS-80 T<sub>M</sub> ) , 流速 1 ml/min にサンプル 20 μl を注入し、O D<sub>270</sub> の吸収により測定した。P C S 肝組織中の U D P -glucuronyl transferase 活性は 3. 27 ± 1. 0 2 nmol/mg protein であった。

次に被包 P C S 肝細胞による親脂化ポリエチレン膜を介した、フェノールのグルクロン酸抱合解毒システムを検討した。

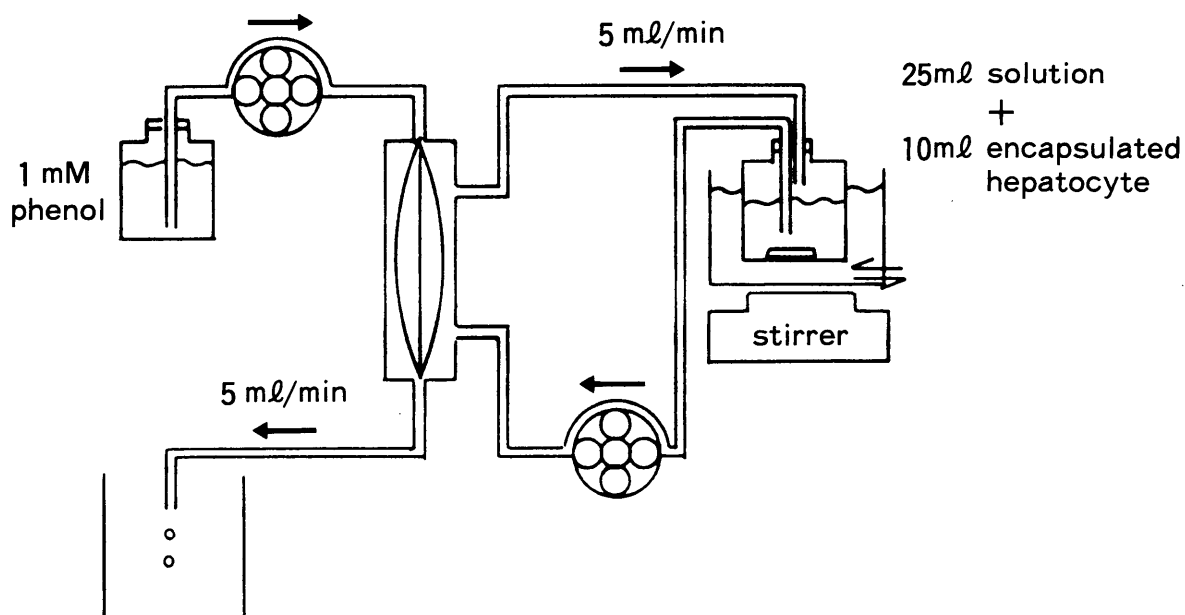


図 - 6 親脂化ポリエチレン膜を介した被包 P C S 肝細胞によるフェノールの解毒代謝システム

還流システムは図-1のものと同様のものを用いたが、A側のフェノールは再還流式とはせず、B側のreservoir中にはW-E培地溶液25mlに5mMのUDPGAと5mMのSaccharolactoneを加えたものにア)で作成した被包PCS肝細胞10mlを入れ、ゆっくり攪拌して、継時的に0.5mlずつサンプリングして、前述の条件のHPLCに直接20 $\mu$ lを注入した。(除蛋白操作はなし)

遊離肝細胞はアルギン酸膜によって包まれているため、ポンプ、攪拌などの物理的外力による破壊を防ぐことができ、還流液の蛋白濃度が低いためHPLCへの直接注入による測定が可能であった。

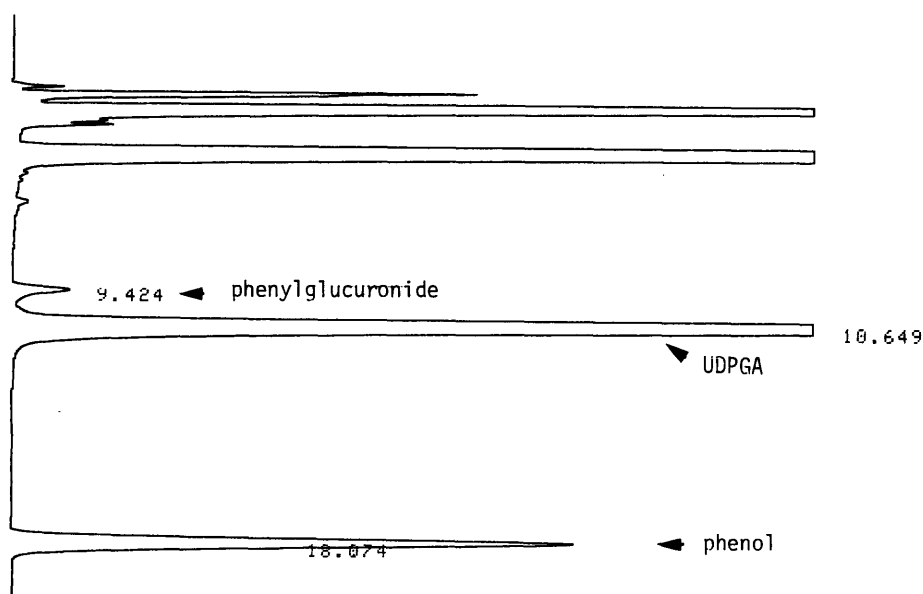
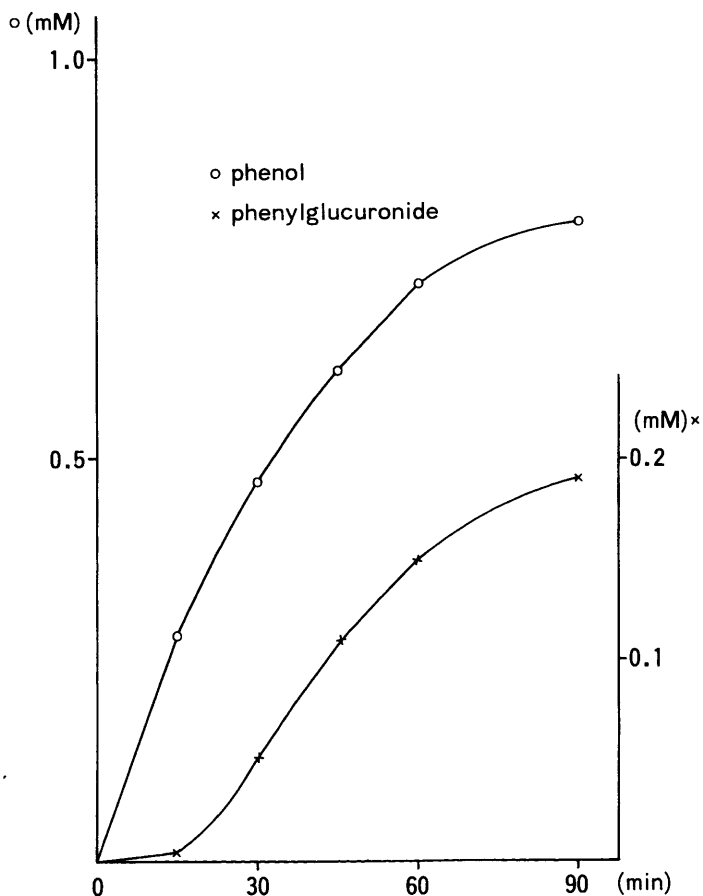


図-7 HPLC直接注入による、フェノール、UDPGA、フェニルグルクロナイドのクロマトグラム



ドナー側のフェノールは素早く親脂化ポリエチレン膜を透過し、被包PCS肝細胞を入れたreservoir内で増加し、1時間ほどでプラトーに達する。一方フェノールのグルクロン酸抱合体はやや遅れるが、短調増加を認めた。この



時相のずれは、肝細胞を包むアルギン酸カルシウム膜のフェノールあるいはグルクロナイドの拡散効率に依存すると思われる。

ウ. EGF、フィブロネクチン、c-AMP添加による被包肝細胞の機能の増強

予備実験においてこれら添加物による初代培養肝細胞の増殖を形

態学的に評価したところ、添加群の生着像はやや良好であるものの明らかな増殖に対する添加効果は評価できなかった。次にこれらの添加物が、被包肝細胞の機能に及ぼす影響について評価した。機能評価には解毒能としてアンモニア除去能を、合成能としてアルブミン合成能を測定した。

	アンモニア除去能	アルブミン合成能
EGF+フィブロネクチン	11.5	28.7
EGF+フィブロネクチン+c-AMP	9.7	29.2
無添加	12.1	27.9

( $\mu\text{g}/\text{mg protein}/3\text{h.}$ ) ( $\mu\text{g}/\text{mg protein}/\text{d.}$ )

表-9 各種添加物による被包肝細胞機能の賦活化

いずれにおいてもこれら添加物の機能増強効果は認められなかった。遊離肝細胞を被包して用いる際には物理的外力、免疫学的攻撃から細胞を保護する効果はあるが、これら添加物を内包し、細胞の増殖・機能の活性化など、継続した作用を期待することはできないと思われた。

## 〔Ⅱ〕脂溶性物質の選択的除去装置による肝機能補助療法

### 1) 親脂化膜による脂溶性毒素の抽出

親脂化ポリエチレン膜を用いた還流システム（図-1参照）を用いて動物実験を行なった。このシステムのドナー側（A）を体重2.5～3.5kgの家兎の大腿動脈と静脈に接続し、ヘパリン1000単位を静注して体外循環を行なった。体外循環を行なうための基礎麻酔としてネンプタール(50mg/ml) 1mlを静脈注射し、還流速度は毎分5ml、親脂化ポリエチレン膜モジュールは膜面積144cm<sup>2</sup>のものを用いた。このスケールは、成人が家兎の体重の約20倍として、流量・モジュール面積ともに臨床使用に近いモデルとなっている。

家兎をフェノールによって昏睡状態とするために、半拘束の状態ですみ静脈より0.3M(pH7.4) フェノール/生理食塩水溶液をマイクロシリンジを用いて持続注入し、始めは6mmol/hrで、やがて家兎の血中フェノール濃度の増加により、注入開始から30分程度で呼吸促迫と震顫が認められprecomaの状態になる。この時点で体外循環装置をスタートさせ、アクセプター側（B）のreservoirから継時的にサンプルを取り出し、そのフェノール濃度を測定した。家兎の血中フェノール濃度は安全域が狭いため、この頃から投与量を半減

している。

### 体外循環

の開始時点  
(Ex.) から  
動物の血中  
フェノール  
は減少し、  
一方アクセ  
プター側の  
フェノール  
濃度は急増  
体外循環開  
始から60  
分ほどで平  
衡状態に達

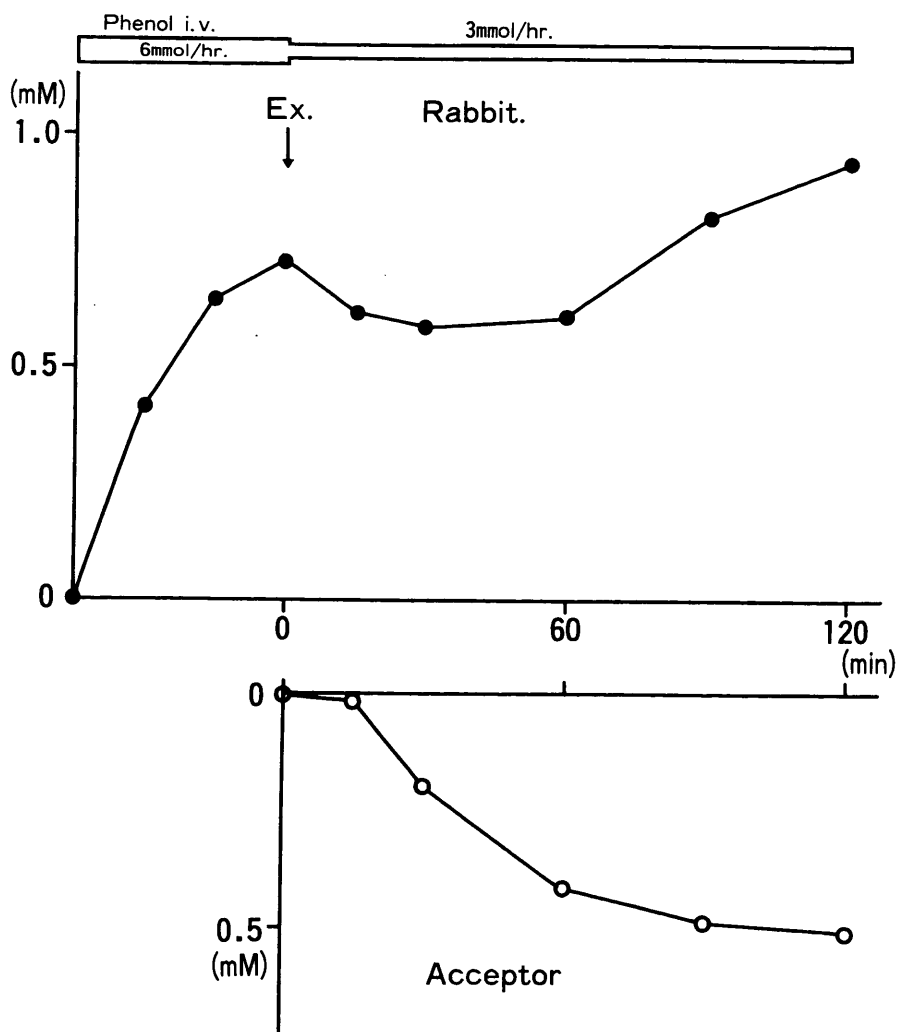


図-9 親脂化ポリエチレン膜を用いた体外循環

装置による昏睡動物のフェノール抽出

後は抽出限界によって動物の血中フェノール濃度は再上昇した。この実験により、親脂化ポリエチレン膜を用いることによって昏睡状態の動物から効率的に脂溶性毒素であるフェノールを抽出し、血中濃度を低下させ昏睡治療上有用であることがわかった。

## 2) ガラクトサミン肝障害家兎に対する肝機能補助

体重 2 ~ 3 kg の家兎に対して D-Galactosamine hydrochloride を Berkらの方法に基づいて、4.25mmol/kg 体重を 5 ml の生食に溶解し耳静脈から 2 分ほどで注入した。静注後約 16 ~ 20 時間で家兎は昏睡状態となり、2 時間ほどの昏睡の後死亡するが、この昏睡状態になった時点であらかじめ鼠径部動静脈に設けておいたブラッドアクセスを用いて体外循環を行なった。

アクセプター側 (B) には血清を還流し、その reservoir から継続的にサンプリングしてフェノール濃度を測定したが、抽出効果は認めなかった。昏睡動物血液中のフェノール濃度もバックグラウンド以上の増加がみられず、フェノール測定系では親脂化ポリエチレン膜による体外循環装置の機能評価ができないことがわかった。

## 3) 被包肝細胞の腹腔内投与による外科的肝不全治療法の検討

肝硬変合併肝癌の罹患部切除に伴うリスクは、残存する肝臓の機能が生体を支えるのに十分足り得るかどうかによっており、この機能が不十分であれば術後肝不全となる。この実験モデルとして、ラットを用いて、肝血流が乏しい状況を門脈のバイパス (PCS) によって、さらに 70% の肝切除を加えることで作成した。この際 PCS と肝切を同時に行なうと外科侵襲が大きすぎ、20% ほどの生

存率しか得られず肝不全治療の解析には不適切であるので、PCS後24時間後に70%肝切を行なうことにした。この肝切施行時に可逆性の昏睡状態を作り出すためにフェノールを0.2Mの濃度で2ml腹腔内に注入した。この場合、動物の肝臓は動脈血しか流れておらず、また肝容量が30%にまで減少しているという、肝臓の解毒処理能力の極めて低い状態であるため容易に肝不全を誘発することができた。このラットの腹腔内に被包遊離肝細胞を入れ、その機能補助について検討した。実験は前述の方法により調整した被包遊離肝細胞2mlを肝切と同時に腹腔内に入れ、投与1日後の動物の血液中のフェノール濃度を測定した。

PCS+70%肝切群	0.76 ± 0.04 mM
PCS+70%肝切+フェノール群	1.40 ± 0.19 mM
PCS+70%肝切+フェノール+被包肝細胞群	1.22 ± 0.29 mM

表-10 外科的肝不全誘発モデルにおける被包肝細胞  
腹腔内投与時の血中フェノール濃度

被包肝細胞を与えた群と、与えない群との間で、投与後1日目の血中フェノール濃度に有意差はなかったが、10~15%程度の低

下を認め、腹腔内の被包肝細胞機能に依存したものと推定された。

### Ⅲ．考察と今後の展望

肝不全治療のあり方としては、体外還流による血液中の組成を解毒ないし補充によって正常に復する治療法と、患者の体内に肝細胞機能をもつ成分を入れ、肝機能補助を行なう2つの方法が考えられる。後者は移植治療にもつながるが、一時的、あるいは長期にわたる機能補助の問題と同時に、体内での免疫学的な問題をクリアーする必要がある。さらに、肝機能補助を必要とする時期が終って、自身の肝臓が十分な機能を回復した場合に、これをどのように撤退させるかという問題もある。大きな生物組織はそれ自身感染源になり得るし、生体が消化するものであれば、機能を必要とする時はそれを待ってもらはなければならない。さらに重要な問題はどのような形態のものを、どれほど必要とするのかというもので、その答えはいまだに出ていない。

今回の実験では、肝臓の持つ脂溶性毒素の解毒機能という点に焦点をあわせ研究を行なった。肝臓のミクロソームは生体での薬物代謝の中心であり多くの解毒酵素群を持っている。特に脂溶性薬剤は大部分がミクロソームで代謝されるといっても過言ではなく。肝不

全誘発物質の多くがこのミクロソームの機能に依存している。従ってsub-cellularの組織で、肝機能補助を期待する場合には、保存、酵素の安定条件のいずれをとってもミクロソームレベルで行なうほうが、複数の酵素活性を同時に利用する場合に有利である。遊離肝細胞を利用する場合の利点も、この複数の解毒機能を同時に活用できる点にあり、最終的には肝不全を引き起こしている実態が解明されないと、いずれが機能的にすぐれているか評価することができないと思われる。

増殖性という点では、細胞にしかその機能はないが、少なくとも今回のように、遊離肝細胞を各種の増殖促進因子とともに被包しても、その増殖因子が内部の肝細胞に働いて、被包状態で増殖する可能性は少なく、我々の実験ではカナダ、トロントのT.M.S. Changらが報告しているように、機能の回復すら明らかではなかった。遊離肝細胞の利用形態には接着基材を用いる利用法もあるので、その場合の培養液中への増殖因子添加効果については今後の検討を要すると思われる。また体外循環でこれらの代謝のリアクターを利用する際には、reservoirの随時変更が可能であり、ミクロソームについてはこれを含む溶液の持続的な追加によって、解毒機能の増殖に匹敵した装置にすることが可能であると考えられる。

脂溶性毒素の抽出については、ドイツフレゼニウス社のポリプロ



ピレン中空糸膜、旭メデイカル社のポリエチレン中空糸膜ともに親脂化技術によって良好な機能を維持し、数時間の実験操作に使用できた。これらの素材はもともと疎水性であり、実際の臨床には親水加工を施して用いられているが、素材の耐久性、均一性ともにすでに確立しているものであり、親脂化膜としての転用に有利と考えられた。

肝不全の実験モデルについては、現在のところヒトの肝不全に類似したモデルとして、いまだに適当なものがなく、これが肝不全治療の研究を進めていくうえでの難点と考えられている。今回は門脈下大静脈吻合術（PCS）を行なったラットに70%という大量の肝切除を加えることで、実験動物の肝臓機能を著しく低下させる方法をとった。これは外科的肝不全のモデルとして、肝血流他の点で肝硬変合併肝癌の切除状況に似ており、その機能補助を検討するうえで有意義なモデルと考えられた。