

44009462

---

前癌肝細胞と親脂化膜による  
ハイブリッド型人工肝補助装置開発の研究

---

(05670983)

平成6年度科学研究費補助金〔一般研究(C)〕研究報告書

平成7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

近年欧米における臓器移植の発展にも関わらず、わが国では脳死問題が膠着状態にあるため、この臓器移植という新技術の導入が困難な状況にある。現在肝硬変症に代表される末期肝不全で命を奪われるヒトは、年間17,000人に達しており、これらの人々に対する新しい治療法を開発することが急務となっている。肝臓の機能不全においてもっとも致命的なのは、脂溶性毒素による中枢神経障害であることがわかっており、これらの選択的除去が、腎不全における透析療法に匹敵する治療法になりうると考えられ、脂溶性肝不全物質の選択的透析法が開発されてきた。

ドイツのG.Brunnerらは疎水性の中空高分子膜を流動パラフィンで充填し、脂溶性物質のみを透過する膜モジュールを開発し、肝臓の精製代謝酵素を使って脂溶性肝不全物質の除去に成功した。この方法では親脂化膜を隔てて水溶性物質の移動がなく、補酵素濃度の維持など特定の酵素反応に適した環境が得られる反面、複雑な肝機能すべてを網羅することができない欠点があった。

一方、我々は遊離肝細胞を利用した生物学的人工肝補助装置を開発しており、代謝のリアクターとして遊離肝細胞を用いることで複雑な肝機能に対応

できる可能性を示してきた。しかし遊離肝細胞を利用する場合の最大の問題点として、肝細胞の機能をいかにして長時間維持し得るか、また必要なときにすぐ利用できるよう、容易に保存ができるかどうかが挙げられている。細胞機能の安定化については、各種の培養技術の開発により1-2週間の維持が可能であるが、通常の人血清の条件では困難であり、細胞に適した環境で機能を利用する必要があった。また細胞の高機能化、長期保存を考えると、通常の人肝細胞より、腫瘍系の細胞の方が有利であり、安全性の高いシステムで高機能化された腫瘍系細胞を代謝のリアクターとして利用することが考えられた。親脂化膜を利用した肝機能補助装置では、脂溶性物質しか透過しない膜を隔てて灌流を行うため、リアクター側は一定の培養条件を維持する事ができ、また血液側との隔離性についても通常の人血漿交換膜よりすぐれており、遊離肝細胞を利用した肝機能補助装置の問題点とされていた細胞環境の維持を確保できると考えられた。

今回の研究では、肝細胞機能の高機能化の試みとして、腫瘍系の細胞として化学発癌モデルとして知られるHyperplastic Nodule(HN)の細胞を用いた。腫瘍系の細胞を肝機能補助装置に用いる試みとしてNL SussmanらはC3A細胞利用しているが、この培養細胞は増殖性にすぐれ、保存ないし細胞利用の即応性を満たすものの機能的には通常肝細胞より低く、機能補助としての評価は不十分であった。HN細胞については、薬物負荷によってできた細胞であ

り、薬物耐性、肝不全物質に対する耐性があると考えられ、細胞毒負荷の条件で通常の遊離肝細胞より長期間生存し機能を発現できると推定された。しかしこのHN細胞を実際に代謝のリアクターとして用いる場合には、この細胞の効率的採取、分離、モジュール化が必要であり、さらにその機能レベルを評価する必要があった。今回の研究では、HN形成の至適条件の検討、HN細胞の解毒能を含む酵素学的検討、HN細胞のアルギン酸膜包埋、アルギン酸被包HN細胞による解毒代謝、親脂化膜を介したアルギン酸被包HN細胞による脂溶性毒素の解毒能を検討した。

## 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:小野寺一彦 (旭川医科大学医学部助手)

## 3) 研究経費

平成5年度	1,100千円
平成6年度	1,100千円
計	2,200千円

## 4) 研究発表

### ア.学会誌等

#### (1) 葛西眞一,他

肝細胞組み込み型人工肝臓

組織培養,19, 484-488, 1993

#### (2) 水戸廸郎,山本 哲,稲垣光裕:

21世紀の外科－21世紀の外科領域における研究－

外科,56巻(10), 1011-1016, 1994

## イ.口頭発表

- (1) 山本 哲,葛西眞一,澤 雅之,富田一郎,紀野泰久,水戸廸郎  
脂溶性肝不全物質の生体内代謝機構とその肝機能補助への応用  
第32回日本人工臓器学会 1994年10月
- (2) T.Yamamoto,S.Kasai,M.Sawa,I.Tomita,Y.Kino,M.Mito  
Encapsulated hyperplastic liver cells for artificial liver support.  
第10回国際人工臓器学会 1995年11月 (発表予定)

## II .研究成果

### 【1】 Hyperplastic Nodule(HN)の作成

#### 1) 2-acetylaminofluorene(AAF)によるHNの形成

HN形成の方法には幾種類か報告されているが、そのHNの出来上がりまでの期間、収率、利便性などから状況に応じて選択する方法が異なる。このシリーズでは少し時間と手間はかかるが、収率の安定したAAF混入食餌を継続して与えることによる方法を採用した。

#### A.実験方法

実験動物としては雄性 Wistar系ラット (200-250g)を用い、0.025%AAF含有食餌 (MF;オリエンタル酵母) を3週間与えた後1週間の休薬期間を設け、この繰り返しを最長6カ月間続ける事により、HN形成を行った。実験動物の肝表面の観察はAAF投与開始後2カ月目から開始し、4カ月目、6カ月目に開腹して肉眼的に観察、6カ月目には動物を屠殺し、全肝を摘出、結節部と非結節部とに分け、それぞれ4倍容の溶液 (150mM KCl, 2.6mMEDTA), 4

℃でホモジナイズした後、肝組織中のGPT値、 $\gamma$  GTP値、NADPH-Cyt.C Reductase値を測定、Lowry法によって蛋白量を定量して、組織蛋白あたりの非活性として表した。

## B.実験結果

肉眼的観察では、与薬開始後2カ月目にはHNの形成は確認されず、4カ月目に初めて複数個のHN形成を認めた。6カ月目の屠殺の段階では、写真1に示すように、肝全体に大小多数の結節を認め、剖面（写真2）でも直径5mmを越える白色の結節としてHNの形成を認めた。



写真-1



写真-2

この白色の結節は、ハサミの鈍的操作により核出する事ができ、HN細胞の採取は、冷生食中に浸漬したHN形成肝より用手的に取り出したHN組織をもとにして行った。(写真3)

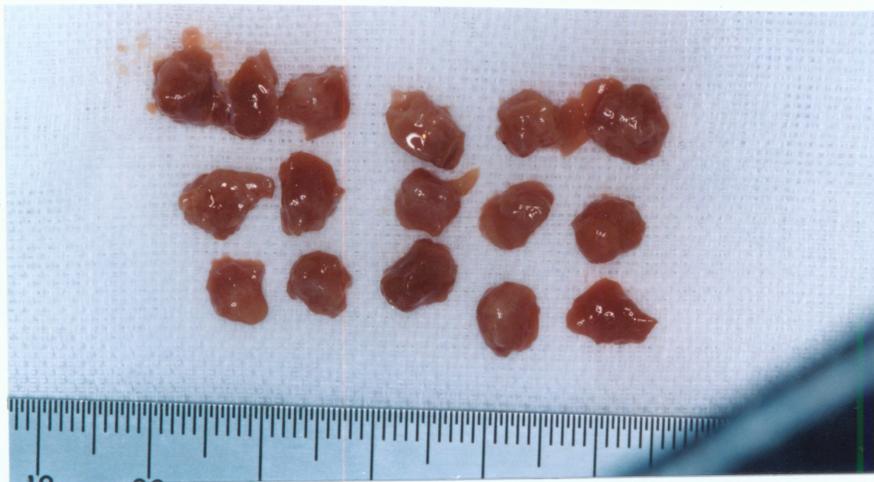
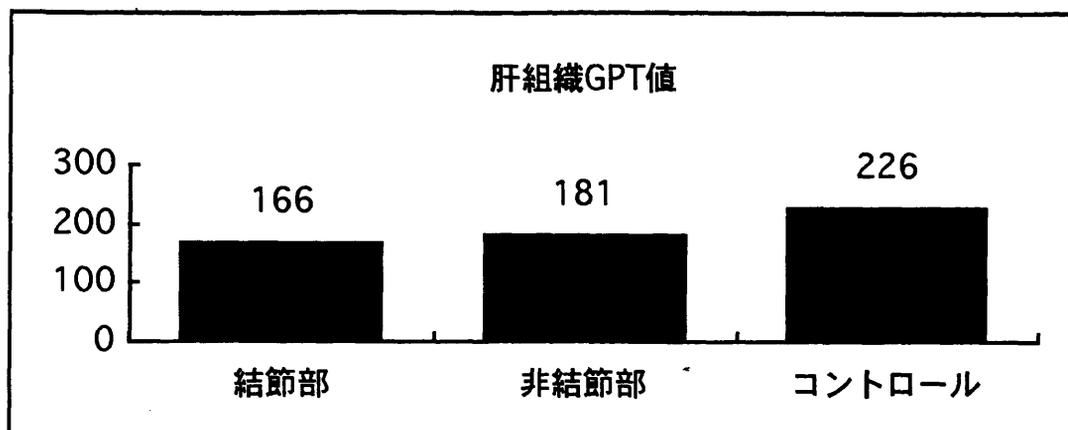


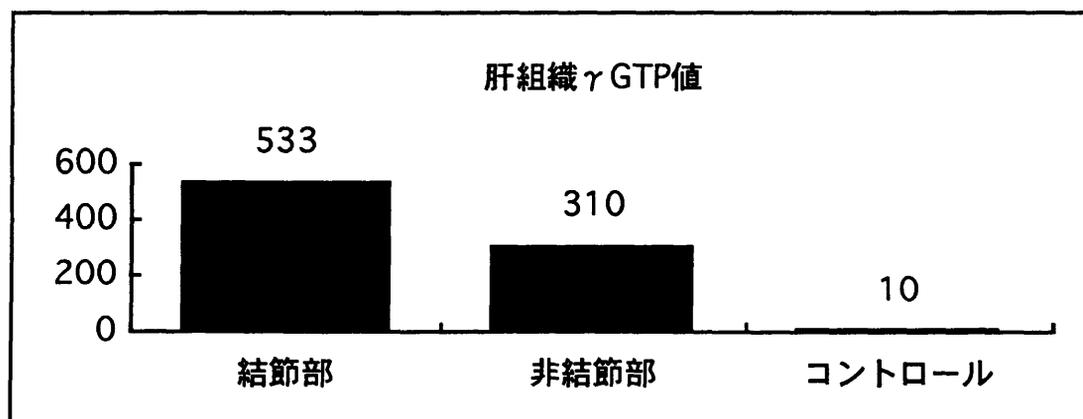
写真-3

肝組織中の酵素活性は、GPT値がコントロール $226 \pm 27$ U/g proteinに対し、結節部が $166 \pm 55$ 、非結節部が $181 \pm 30$ U/g proteinといずれもコントロールを下回った。(図1)



図一 1

HNは $\gamma$  GTP組織化学染色で同定されるように、結節中に高い $\gamma$  GTP活性が予測され、結節部、非結節部ホモジネートとコントロールとを比較した。結節部は $533 \pm 238$  U/g protein、非結節部は $310 \pm 57$ U/g protein、コントロールは $10 \pm 15$ U/g proteinと結節部、非結節部ともに、コントロールよりはるかに高い活性を示し、非結節部においても微小結節の存在を考えさせた。(図2)



図一 2

薬物代謝活性の一つであるNADPH-Cyt.C Reductase活性は、コントロールが $31.3 \pm 7.4$ U/g proteinに対し、結節部 $53.4 \pm 9.0$ U/g protein、非結節部 $21.0 \pm 2.8$ U/g proteinと、結節部で高い活性を認めた。(図3)

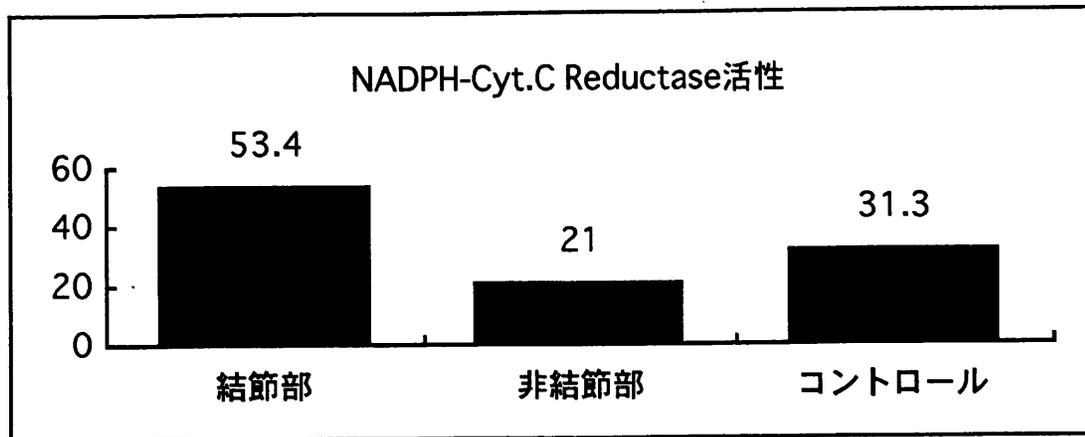


図-3

## 2) HN形成におけるPortacaval shunt(ECK瘻) の影響

AAFによるHN形成では、長期にわたる食餌の管理が必要であり、また薬物代謝に焦点を絞った場合には、必ずしも高い薬物代謝能が期待できるとは限らないため、肝機能補助装置のための細胞群を得る方法としてさらに効率的な方法を検討する必要がある。そこで、薬物負荷は短期間のみとし、手術的に肝臓内の血流状況に変化を与え、慢性的な肝不全状態に類似した環境を肝細胞に与えるために、門脈下大静脈吻合術(Portacaval shunt)を行い、HN形成の速度およびその代謝変化について検討した。

### A.実験方法

実験動物としては雄性 Wistar系ラット(200-250g)を用いた。エーテル麻酔下にPortacaval shunt(PCS)を作成し、術後1日を経て薬物負荷を加えた。このシリーズではイニシエーターとしてDiethylnitrosamine(DEN)を、プロモーターとしてphenobarbitalを用い以下の4群(各群:n=4)について比較検討した。

実験群 1: Eck + DEN (150mg/kg BW)

実験群 2: Eckのみ

実験群 3: DEN + Phenobarbital (0.5g/L 飲水)

実験群 4: DENのみ

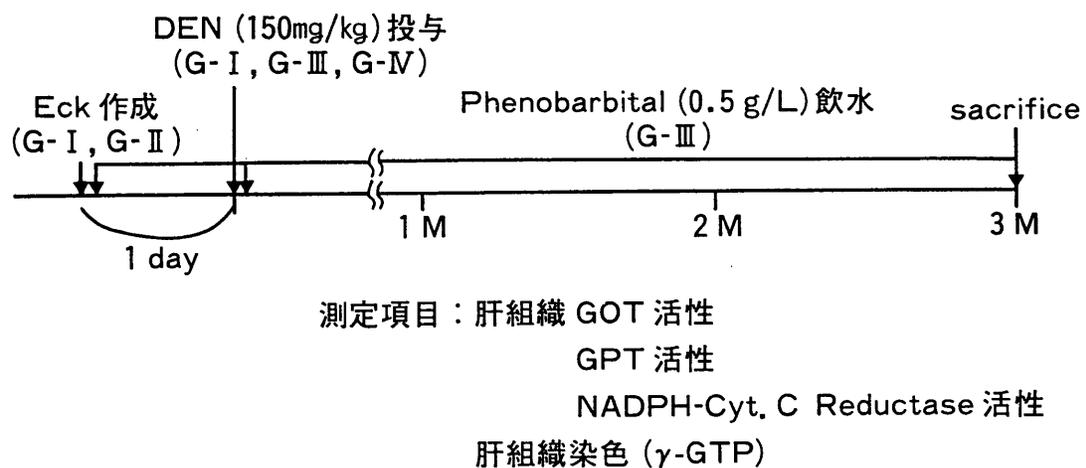


図-4

これらの各群について、図4の実験計画に示すように、薬物負荷後1カ月おきに開腹して、肝表面の白色結節(HN)の形成状態を肉眼的に観察し、3カ月目に屠殺、全肝を摘出した。

摘出した肝臓について、形態学的なHN形成の確認としてHE染色とともにRutenburgらの方法によりγGTP染色を行った。また肝組織は4倍容の溶液(150mMKCl, 2.6mMEDTA),4°Cでホモジナイズし、組織中のGOT,GPT活性および薬物代謝酵素のメンバーであるNADPH-Cyt.C Reductase活性を測定した。

## $\gamma$ GTP組織化学染色法 (J.Histochem.Cytochem.,17,517-526,1969)

- (1)肝組織を10秒間液体窒素中につけ、cryostatにて凍結切片を作成する。
- (2)染色液 ( $\gamma$ -Glutamyl-4-methoxy-2naphthylamide, Tris-HCl(pH7.4), 0.85%saline,Glycylglycine,Fast blue BBN)で15分間染色
- (3)水洗
- (4)2%硫酸銅溶液に5分間つける
- (5)軽く水洗
- (6)30秒間ヘマトキシリン染色
- (7)水洗
- (8)10%ホルマリン溶液に30分間浸漬
- (9)軽く水洗
- (10)グリセリンゼラチン封入
- (11)15分以内に顕鏡写真撮影をする

### B.実験結果

肝表面のHN形成に対する肉眼的観察では、表1に示すように薬物負荷2カ月後では、実験群1においてのみ明らかなHNの形成を認めたが、その他の群では認められなかった。薬物負荷3カ月目では、実験群1と、実験群3に複数個のHN形成を認めたが、実験群2と実験群4では全く認められなかった。

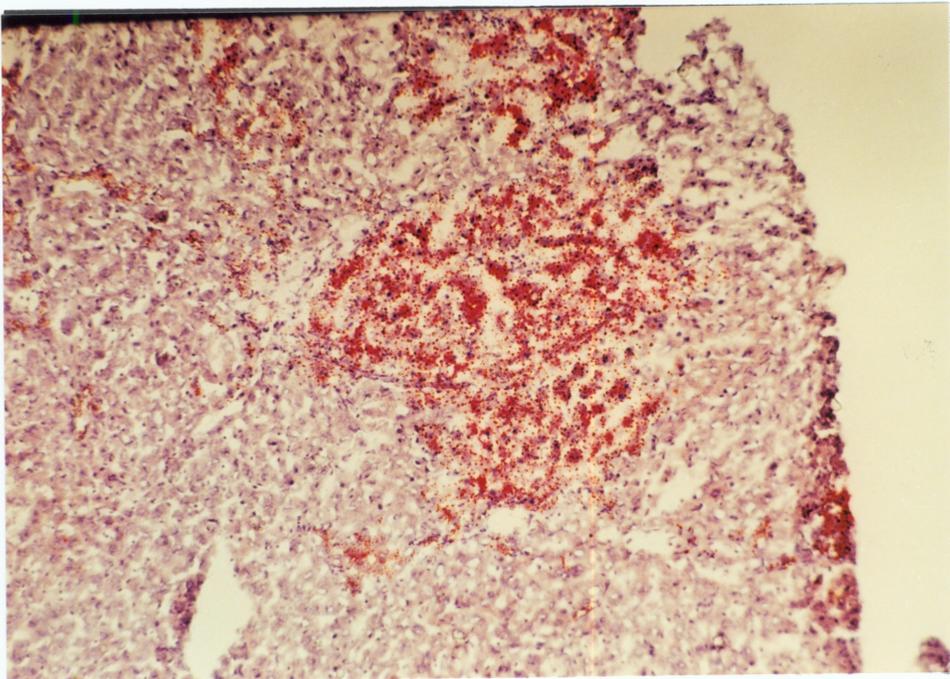
## HN (Hyperplastic Nodule) 形成の肉眼的観察

観察期間 実験群	1 mo.	2 mos.	3 mos.
G-I	—	+	++
G-II	—	—	—
G-III	—	±	++
G-IV	—	—	—

＋；明らかなHNを認める  
++；複数個のHNを認める

表－1

実験群1の3カ月目の $\gamma$ GTP染色では、肝表面に近い部位に、褐色調の顆粒で染色されるHNを認める（写真4）。



写真－4

これに対し、実験群3（写真-5、左）でもやはり、結節は小さいながらも $\gamma$ GTP陽性結節を散見するが、実験群4（写真-5、右）では認められない。組織化学染色上も、肉眼的HN形成の結果が裏づけられた。

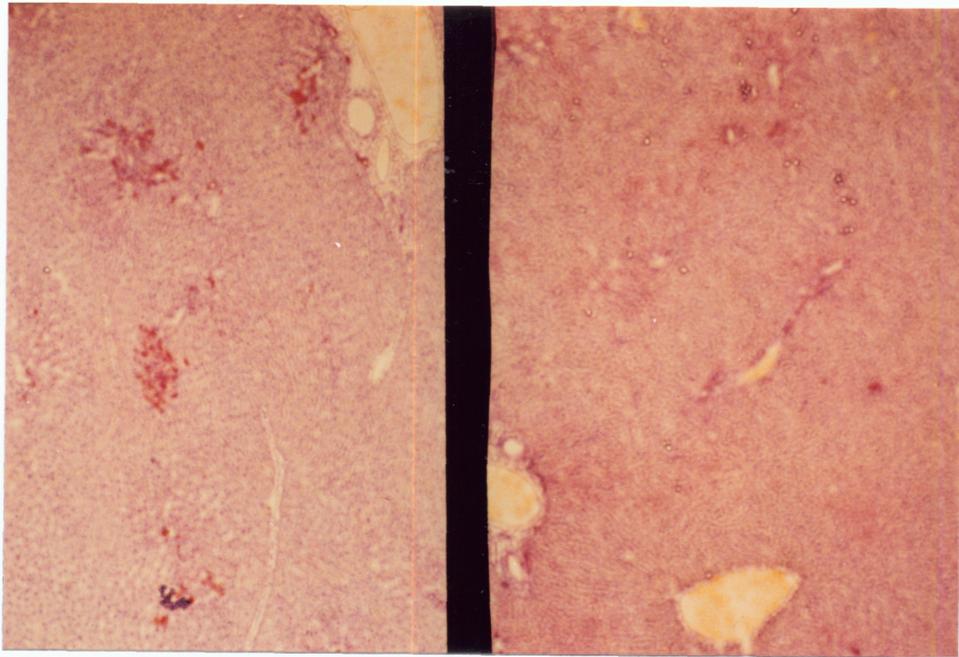


写真-5

これら4群の肝組織の酵素学的検討では、GOT値はコントロールが $255 \pm 47$ U/g proteinに対し、実験群1で $1126 \pm 236$ U/g protein、実験群2で $1191 \pm 247$ U/g proteinと高値を示し、実験群3、実験群4はそれぞれ $281 \pm 82$ ,  $307 \pm 100$ U/g proteinとコントロールと変わらない数値を示した。（図5）GPT値についてもコントロールが $398 \pm 35$ U/g proteinに対し、実験群1が $753 \pm 79$ U/g protein、実験群2が $813 \pm 161$ U/g protein、実験群3が $437 \pm 39$ U/g protein、実験群4が $418 \pm 12$ U/g protein（図6）と肝組織中GOT値と同様の傾向を示した。

### 肝組織 GOT 活性

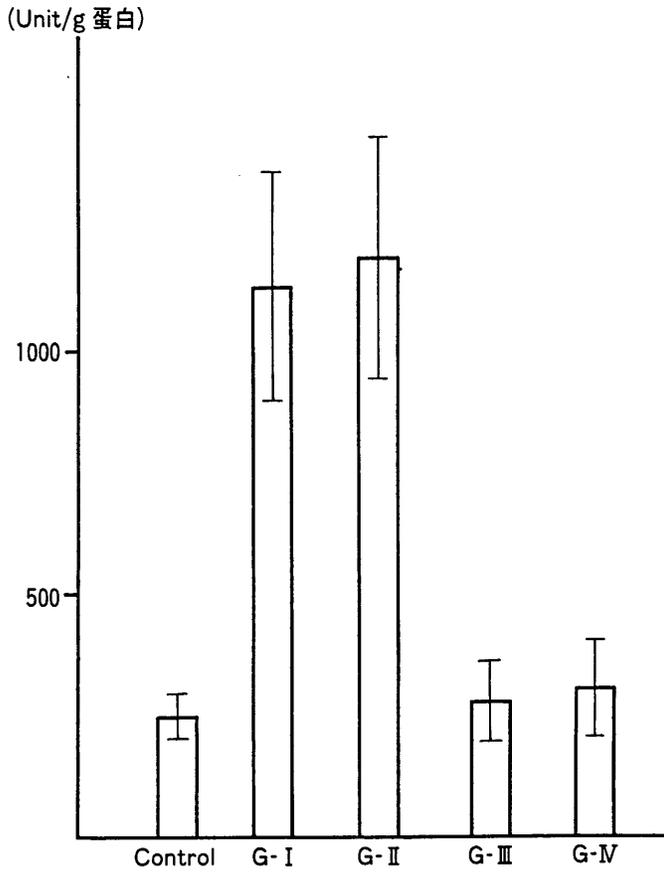


図-5

### 肝組織 GPT 活性

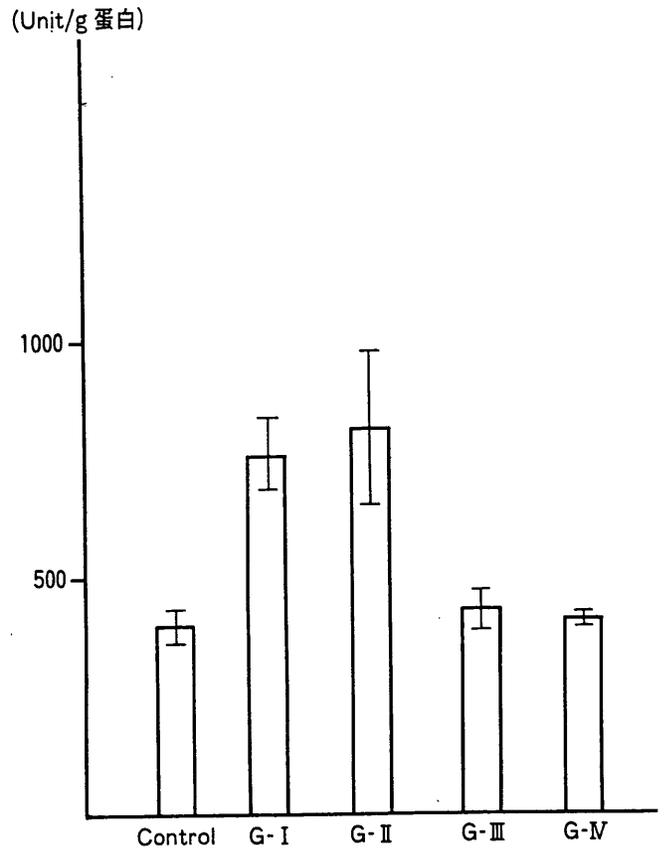
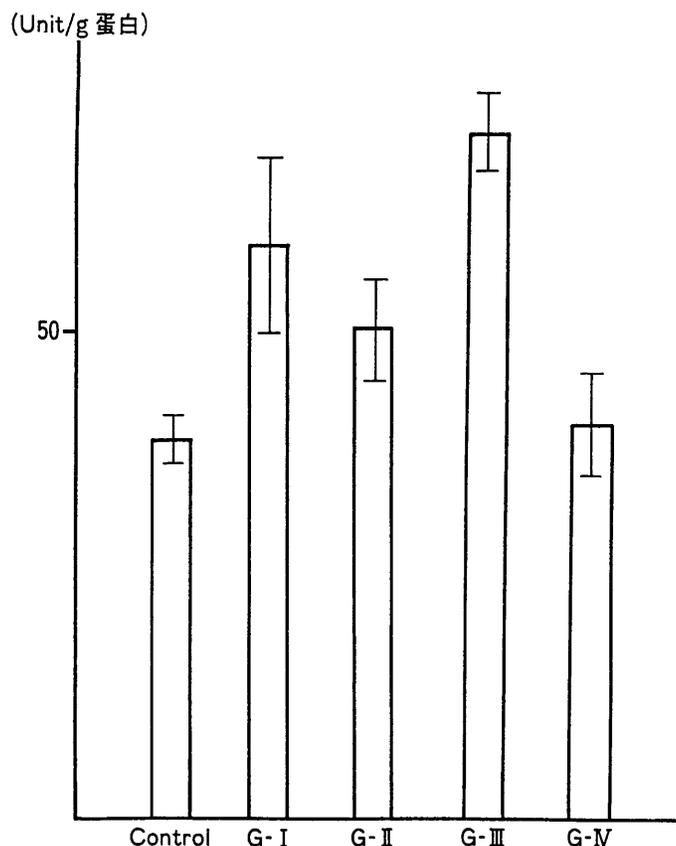


図-6

NADPH-Cyt.C Reductase活性については、コントロールが $39.3 \pm 2.4$ U/g proteinに対して、実験群1が $59.2 \pm 9.0$ U/g protein、実験群2が $50.6 \pm 5.2$ U/g protein、実験群3が $70.5 \pm 4.1$ U/g protein、実験群4が $40.8 \pm 5.3$ U/g proteinであった。(図7)

肝組織 NADPH-Cyt. C  
Reductase 活性

図一 7



3) 小括

HNの形成方法として、AAF含有食餌を長期にわたり投与する方法と、Eck瘻を作った実験動物にDENを1回負荷する方法の2つの方法を検討した。AAF含有食餌を使う方法では、長期にわたる食餌管理の手間はかかるが、与薬開始後4カ月で直径数ミリ大のHNが得られ、実験動物間でのHN形成にバラツキはさほどみられなかった。一方Eck瘻+DENによる方法では、HNの初期結節は早い時期に観察されるが、最長3カ月までの観察で、HNの大きさおよび収率で、AAF含有食餌による方法におよばなかった。また実験動物間のバラツキもみられ、肝機能補助装置の代謝のリアクターとしてHN細胞を利用するには、AAF含有食餌による方法が有利と考えられた。

酵素学的な検討では、AAF含有食餌を用いた実験で、結節部の薬物代謝活

性を代表するNADPH-Cyt.C Reductase活性が高く、代謝のリアクターとして結節部だけを利用する、意義が確認された。また非結節部においても高い $\gamma$  GTP活性が確認され、AAF与薬を6カ月継続した肝臓では、肉眼的には結節を形成していなくても、微小結節が多数存在することが示唆された。またEck瘻+DENによる方法では、Eck瘻のために、薬物代謝を含め肝臓に酵素活性に大きな変化が現れ、DENによるHN形成が促進される事が示唆された。薬物代謝酵素の誘導では、実験群3のNADPH-Cyt.C Reductase活性が最も高かったことから、phenobarbitalによる誘導の方が効果的であった。

収率の高い効率的なHN形成法として、Eck瘻を形成した実験動物にAAF含有食餌を与える方法が示唆され、今後の検討課題と考えられた。また薬物代謝活性の誘導については、利用する細胞群が一過性に獲得するものであれば、その細胞の培養過程で失われていく可能性もあり、薬物代謝酵素のmRNA発現についても検討する必要がある。

## 【2】 Hyperplastic noduleの細胞の包埋体の作成とその解毒能

### 1) HNアルギン酸包埋体の作成

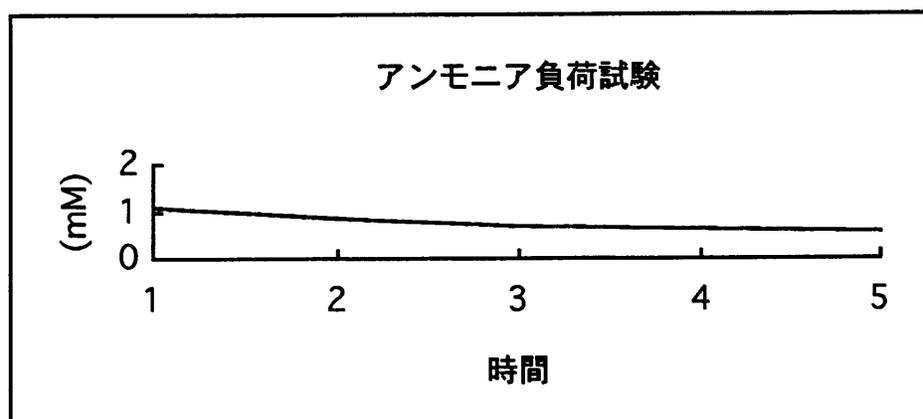
AAF含有食餌を前出の方法で6カ月間与えた実験動物から、全肝を摘出し、さらにハサミを用いてHN部分だけを取り出し、これをHanks.液中でミンス、18Gの注射針を通過するほどのサイズまで小さな組織片とした。その後上清を捨て100mlのビーカーに移した後、50mlの0.05%コラゲナーゼ溶液とともに37℃の恒温槽内で10分間振盪し、ガーゼメッシュでフラグメントを除いてHN細胞の回収を行った。4℃、800rpm、2分間遠心操作を行い沈降する細

胞の採取につとめたが、ほとんど痕跡的な量しか回収できず、その先のステップに進めないため、コラゲナーゼ消化によるHN細胞の単離をあきらめ、ミンスしたHN組織から直接包埋体を作る方法に変更した。

18Gの注射針を通過するサイズのHN組織10mlと、等量の2%アルギン酸ナトリウムとを20mlのデイスポーザブルシリンジ内で混和し、18Gの注射針を使って0.1MのCaCl<sub>2</sub>溶液（1L）,4℃ 中に滴下し、直径3mm大のHNアルギン酸カルシウム包埋体を作成した。

## 2) HNアルギン酸包埋体のアンモニア負荷試験

20mlのゲルビーズとなったHN包埋体を10mlのWE培地に浮遊させたものを、直径3cmのプラスチック・デイッシュ（WE培地2ml入り）につき2g分を分配し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。この時デイッシュ中に1mMのアンモニアを添加し、1時間おきに4時間までの、培養液中のアンモニア濃度を測定した。（図8）ゲルビーズ化されたHN細胞は2時間で36%のアンモニアを除去したのが確認された。

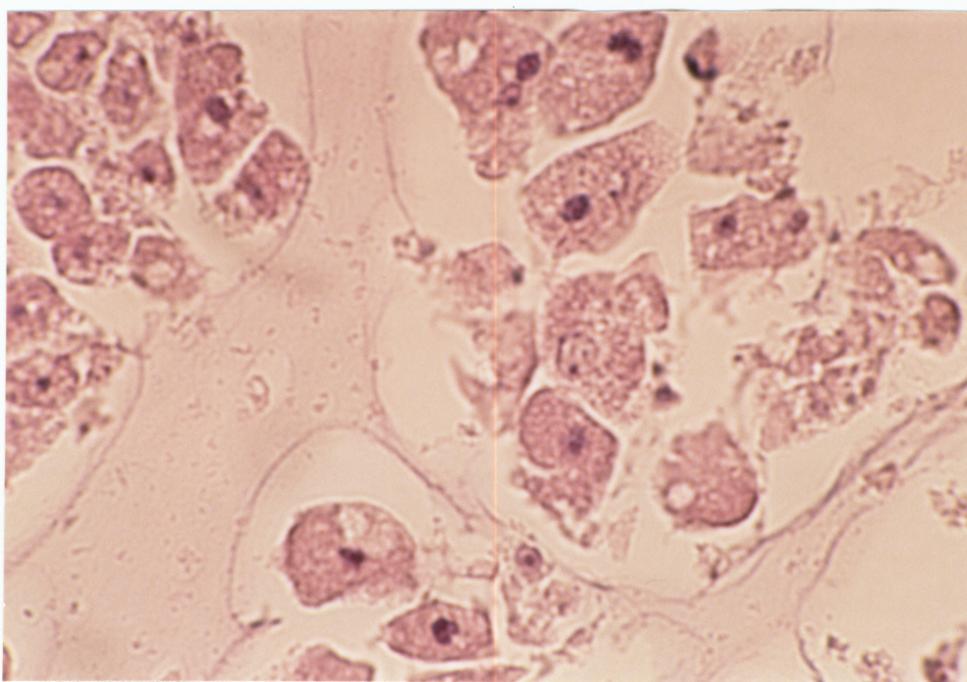


図一 8

### 3) 培養HNゲルビーズの形態学的観察

CO<sub>2</sub>インキュベータ内でWE培地を用いて48時間培養したHNゲルビーズを10%ホルマリン固定した後、HE染色を施し、ビーズ内でのHN細胞を顕微鏡的に観察した。HN細胞の多くは脱核、あるいは萎縮核のものが多く、バイアビリテイとしては10-20%と低い値であった。その理由として、HN組織を、アルギン酸膜で覆ったために、組織内部への酸素供給が十分でなく、多くの細胞が低酸素状態となって死滅したことが推定された。(写真6)

写真-6



### 【3】親脂化膜を介したHNゲルビーズによる解毒試験

#### 1) 親脂化膜とHNゲルビーズによる灌流装置の作成

親脂化膜としては、旭メデイカル社でプラズマセパレーター用が開発されたポリエチレン製の中空糸膜の親水加工のなされていないものを用いた。膜厚50 $\mu$ m、膜面積144 $\text{cm}^2$ のモジュール(全長約10cm)に5mlの注射用シリン

ジをつなぎ、流動パラフィン5mlを自然落下によってモジュール内（中空糸膜の内側）に注入、モジュール外側には持続吸引器により陰圧をかけることで、中空部分にパラフィンが充填されるようにした。中空糸が光沢を持ち、膜の内外で空気、水の交通がないことを確認した後、約2時間空気を膜の内側、外側に送り、膜を乾燥させた。この膜モジュールの内側にマイクロポンプで凍結人血漿（FFP）70mlに100mMフェノール0.7mlを混入し最終濃度1 mMのフェノール含有血漿を毎分5 mlの流速で漙流、FFPは恒温槽内で37℃に加温した。一方膜外側の漙流にはWE培地を同じ流速で循環させ、ガラス製一体型の恒温培養器(内容積100ml)内に、40mlのHNゲルビーズと25 mlの漙流液を満たし、37℃の条件下でスターラーで攪拌しながら、この漙流液内に最終濃度5 mMになるよう、グルクロン酸抱合の基質であるUDPGAとMgCl<sub>2</sub>を加えた。（図9）

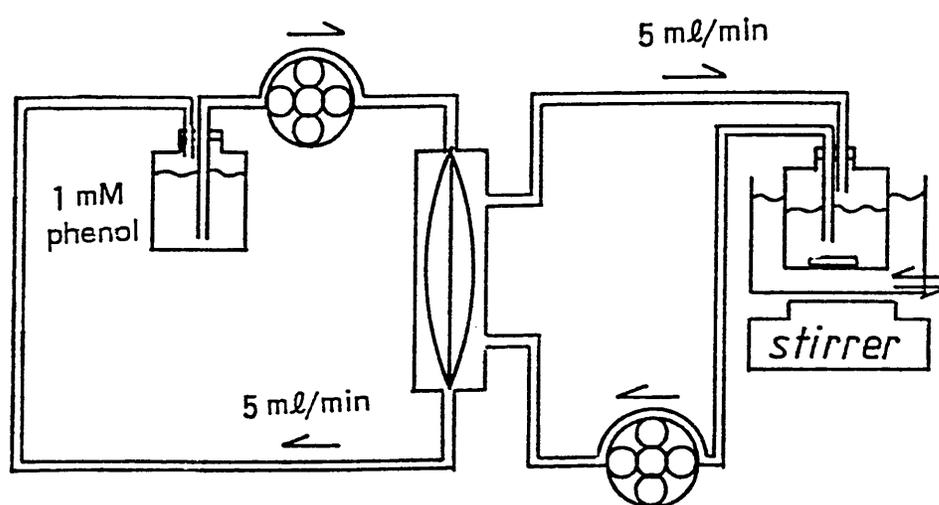


図-9

## 2) HNゲルビーズによる人血漿中フェノールの抱合除去

恒温培養器内の培養液を、灌流開始後0、15、30、45、60、90分に各1mlずつサンプリングし、親脂化膜を通過したフェノールと、ゲルビーズ化されたHN細胞によるグルクロン酸抱合体をHPLCを用いて測定した。HPLCの測定条件は、30%メタノール溶液に、10mM Tetrabutylammonium hydrogen sulfate(TBAHS)を加えたもので平衡状態としたODSカラム(ODS 80Tm)を使い、流速1ml/minとして20 $\mu$ lのサンプルを注入、OD<sub>270</sub>の吸収により測定した。

フェノールの親脂化膜の透過性は良く、恒温培養槽内の濃度として15分後で0.28mM、30分後で0.46mMに達した。またその抱合体のフェニルグルクロナイドも90分後には0.29mMにまで達している。(図10)

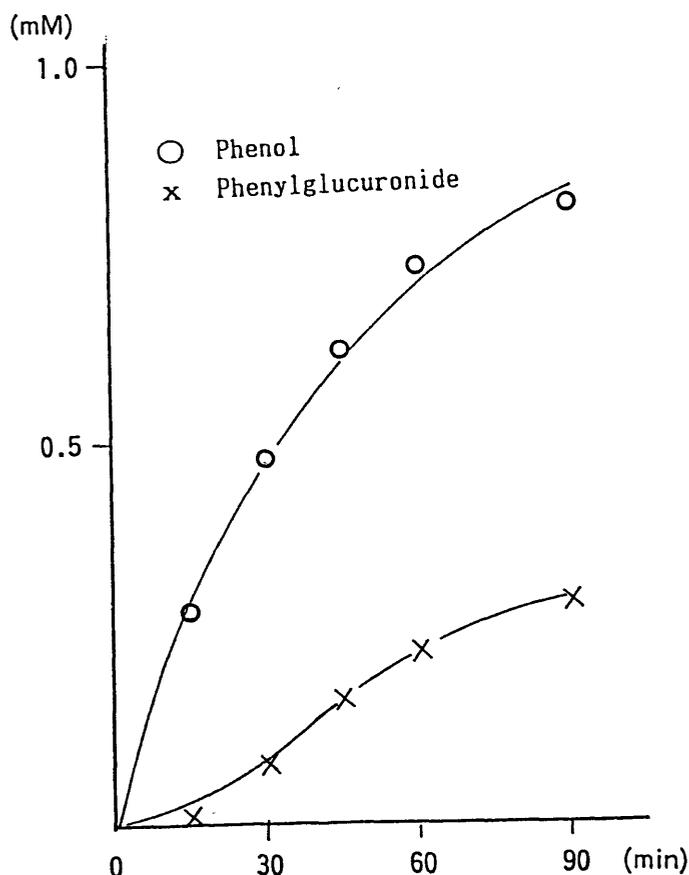


図-10

### 3) 小括

HN細胞を代謝のリアクターとして利用するために、用手的にHNだけを取り出し、ミンスーコラゲナーゼ消化法によって細胞の単離を試みたが、回収率が悪く成功しなかった。CCl<sub>4</sub>によって作った実験肝硬変からのコラゲナーゼ灌流による肝細胞分離でも、肝細胞の回収率は悪く、線維化の進んだ肝臓からの細胞分離では、さらに工夫が必要であることが示唆された。HN組織のアルギン酸膜包埋体では、組織中への酸素供給が不十分であり、長時間培養によりバイアピリテイの急速な低下がおこるため、HN細胞の分離を成功させるか、あるいはHN組織を高圧酸素の条件下で利用するか、HN細胞の培養条件の工夫が必要と考えられた。ただし包埋直後のHNゲルビーズでは、アンモニアの除去能が認められ、また親脂化膜を通過したフェノールのグルクロン酸抱合能も確認されたことにより、HN細胞の代謝のリアクターへの応用が可能であることが示された。

## III. 考察と今後の展望

肝硬変末期の肝不全準備状態では、肝臓の血流状態、あるいはホストの感染の状況などから、一時的な落ち込みとしての脳症の発現をみる。これが長時間におよぶとき、各種の代謝されない毒素による中枢神経の損傷が不可逆的となり、いわゆる肝不全死を遂げる。従って、適切な全身管理を行いながら、十分な肝血流の維持と中枢神経障害の予防に努めることで、これらの患者は一時的な落ち込みから、再びもとの状況へ復帰させることが可能であり、この中枢神経障害の予防に、特に脂溶性毒素の除去が有効と考えられる。

脂溶性毒素の選択的除去法として、我々は疎水性の中空糸膜を利用することを検討してきた。膜が疎水性であることの利点は、膜を隔てて膜内外それぞれの環境を独立させることができ、膜は脂溶性物質のみが移動し、代謝槽では代謝のリアクターとして利用する媒体に適した環境を提供することができる点にあり、媒体の特性を十分に引き出せることが挙げられる。

今回の研究では、その媒体として腫瘍系肝細胞を利用することを検討した。酵素学的に、肝不全の代謝補助ではどのような酵素群の機能補助が必要であるかについては未だに正確な回答が得られていない。従って、特定の酵素活性のみをターゲットにした細胞群の応用にはまだ論理的裏付けが乏しいが、薬物代謝の高い細胞群、あるいは慢性化不全モデル動物の肝細胞の持つ、複数の解毒酵素活性が最も可能性の高いターゲットとして、これをベースにした腫瘍系細胞群としてHN細胞を利用することにした。

腫瘍系細胞群を利用する事の利点は、凍結保存などの保存性にすぐれ、また旺盛な増殖力によって、必要量の細胞数を短期間に得られることにある。米国のベイラー医科大学のNL Sussmanらは、hepatoblastomaのcell lineからC3Aを選び、その肝機能補助への応用を行っている。彼らは2 |の膜面積を持つセルロースアセテート中空糸膜モジュールのextracapillary spaceに10gのC3A細胞を入れ、十分に酸素化を行いながら新鮮な培地を膜の内側に灌流させると、3-4週後には約200gのC3A細胞入りの代謝モジュールとして利用できることを示し、このモジュールを動物実験、臨床使用し、モジュール内のC3A細胞が作るアルブミン、凝固因子によって、肝不全状態の改善がなされたとしている。C3A細胞の選択については文献上詳しくふれられていないが、増殖性、機能測定などの試行錯誤による選択であると推定される。

いずれにせよ、彼らの腫瘍系細胞群の応用でも、特定の酵素活性をターゲットにしているわけではなく、はたしてその細胞群が、対象とする患者に最も適した肝補助機能を持ったものかどうかについては疑問が多い。事実、C3Aの持つ肝機能については、正常肝細胞の機能より低いことが示されており、なお機能的に効率の良い腫瘍系細胞が登場する可能性が示されている。

HN細胞は、もともと化学発癌によって誘導された細胞であり、薬物負荷によって人工的に作られ、その肝細胞の薬物代謝活性が高いことが示されている。またさらに、今回の実験でも示したように、実験動物にEck瘻を作ることで、肝臓の血流状態が慢性肝不全に近い状況となり、肝細胞の代謝酵素群の増加が認められている。従って、これらの組み合わせによって、解毒代謝活性の高い肝細胞を得ることはできるが、しかしこれらの能力が酵素誘導によるもので、腫瘍細胞固有の能力であるかについてはさらに検討を要する。今後肝不全の機能補助に必要な酵素群が明らかにされるにつれ、遺伝子操作により、それらの酵素群をターゲットとして高機能化された肝細胞が登場するかもしれない。

今回、腫瘍系肝細胞であるHN細胞の肝機能補助装置への応用の可能性について検討してきた。理論的には薬物代謝活性の高い腫瘍系細胞として利用価値があると考えられたが、細胞利用の形態として、ゲルビーズ化の問題、体外循環装置の酸素化など構造上の問題、など解決すべき点も多く、まだ臨床使用に耐える肝機能補助装置とは言えず、検討を要すると思われた。