

---

細胞工学的アプローチによる  
Hybrid Artificial Liverの研究

---

(04454307)

平成6年度科学研究費補助金 [一般研究 (B)] 研究報告書

平成7年3月

研究代表者 葛西 眞一  
(旭川医科大学医学部助教授)

## はしがき

肝臓は生体の物質代謝の中樞を担う重要な臓器であり、ひと度代償不全に至れば致死的な状態となる。この重篤な肝不全の治療法として、人工肝臓による方法と肝移植による方法がある。前者の臨床的な方法としては、血液浄化療法といわれる血液透析・濾過、血液吸着灌流、血漿交換などが行なわれているが、劇症肝炎の救命率は約30%前後と低い。後者の肝移植は、本邦では小児例に対する生体部分肝移植が行なわれ、すでに100例を越えているが、脳死肝移植は今日なお再開されていない。欧米では、急性、慢性を問わず、代償不全に陥った肝臓の機能を再現するために脳死肝移植が積極的に行なわれており、すでに2万例を越えて、日常のルーチンワークとなっている。これには、大変よい免疫抑制剤が開発されたことと、肝臓の保存法の進歩によるところが大きい。全体の1年生存率は80%を越え、5年生存率も60%を越えている。劇症肝炎に対する肝移植成績も向上し1年生存率約60%と報告されている。しかしながら、脳死肝移植の最大の問題点はドナー不足にあり、肝移植を待っている間にその30%前後は間に合わない。したがって、予後のよくないウィルス性肝炎、AIDS、肝癌などは適応から除外されることになり、最後の手段としてヒト肝が移植に用いられたが、うまく行なえなかった。このように、本邦でも、たとえ脳死肝移植が是認されたとしてもいろいろな理由でドナーが得られない場合が推

定されよう。

このようなことから、一日も早い人工肝臓の開発が期待されるところであるが、肝臓の機能の複雑さのために、今日なお成功していない。

本研究では、肝細胞を代謝のリアクターとしたHybrid型人工肝臓を、細胞工学的アプローチにより検討する。

## 研究組織

研究代表者：葛西眞一（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：山本 哲（旭川医科大学医学部講師）

柿坂明俊（旭川医科大学医学部助手）

澤 雅之（旭川医科大学医学部助手）

## 研究経費

平成4年度 2,500千円

平成5年度 1,000千円

平成6年度 800千円

---

計 4,300千円

## 研究発表

### ア. 学会誌等

- ①. 葛西眞一, 平井修二, 澤 雅之, 柿坂明俊, 山本 哲  
水戸迪郎: Hybrid Artificial Liver の研究 - セルロ  
ース系マイクロキャリアへの肝細胞接着動態.  
人工臓器 21(3):1055, 1992.
- ②. 葛西眞一, 澤 雅之, 富田一郎, 橋本道紀, Bojian  
Jiang, 平井修二, 柿坂明俊, 山本 哲, 水戸迪郎,  
井上政昭: 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 22(1):159  
, 1993.
- ③. 葛西眞一, 澤 雅之, 水戸迪郎: 細胞組込み型人工肝  
臓. 組織培養 19(13):484, 1993.
- ④. Bojian Jiang, S.Kasai, M.Sawa, S.Hirai,  
T.Yamamoto, H.Ebata, M.Mito: Beneficial effect  
of hepatic stimulatory substances on the  
survival of intrasplenically transplanted  
hepatocytes. Cell Transplantation 2:325, 1993.
- ⑤. S.Hirai, S.Kasai, M.Mito: Encapsulated  
hepatocyte transplantation for the treatment of  
D-Galactosamine-induced acute hepatic failure in  
rats. Europ. Surgical Research. 25:193, 1993.

イ. 口頭発表

- ①. S.Kasai, M.Sawa, Y.Nishida, K.Onodera,  
T.Yamamoto, M.Mito: Cellulose microcarrier for  
high density culture of hepatocytes.  
第1回細胞移植国際会議. 平成4年5月31日
- ②. 葛西眞一, 平井修二, 澤 雅之, 柿坂明俊, 山本 哲  
水戸迪郎: バイオリアクターとしてのセルロース由来  
マイクロキャリアの検討. 第30回日本人工臓器学会.  
平成4年11月5日
- ③. Jiang Bojian, 草野満夫, 澤 雅之, 坂田博美,  
山本 哲, 小原充裕, 古根 高, 葛西眞一, 水戸迪郎  
: ブタ再生肝および新生児肝より抽出した肝再生促進  
物質の再生肝および脾内肝移植への増殖促進効果.  
第29回日本肝臓学会. 平成5年7月16日
- ④. 葛西眞一, 澤 雅之, 富田一郎, 橋本道紀, 紀野修一  
山本 哲, 水戸迪郎, 井上正昭: マイクロキャリア  
接着肝細胞封入型中空系モジュールの代謝能に関する  
研究. 第31回日本人工臓器学会. 平成5年10月14日
- ⑤. 澤 雅之, 葛西眞一, 紀野修一, 水戸迪郎: 遊離肝細  
胞を用いたHybrid型人工肝臓研究の現況と問題点.  
第32回日本人工臓器学会. 平成6年10月12日

ウ．出版物

①．葛西眞一，澤 雅之，水戸迪郎：人工臓器 1993.

肝細胞を用いた人工肝臓．中山書店．

平成6年5月31日

②．葛西眞一，水戸迪郎：FOCUS 消化器．肝不全－

ハイブリッド型人工肝臓への期待．中山書店．

平成6年5月25日

## 研究成果

### 1. 使用肝細胞採取法

ウィスター系雄性ラット等の肝臓の門脈にカテーテルを挿入し、ハンクス液で灌流しながら、肝上・下・下大静脈を切離し、血液をwash-outしながら肝を摘出する。灌流装置に摘出肝を移し、コラゲナーゼ酵素灌流消化法（Berry & Friend法）により肝細胞に分散した。実験にはトリパンブルーによるviabilityが85%以上のものを使用した。95%以上の細胞はsingle cellでほぼ球形状であり、PAS染色、G-6-Pase染色などの組織化学染色により、陽性顆粒が良く観察された。

### 2. 肝細胞機能発現と人工材料

Hybrid型人工肝臓の代謝のリアクターとして遊離肝細胞を用いる主な理由は、機能の維持、長期保存、操作性と免疫原性の修飾などである。われわれは、遊離肝細胞を浮遊培養系で用いるモジュールを試作したが、浮遊系では肝細胞の機能を長時間、有効に再現させる事ができない事を報告した。それは、肝細胞は、本来、何らかの基質に接着し、なおかつ三次元構造を示した状態で機能を発現する性質を有している為であった。この様な事を考慮しながら、今日まで、表-1の様な、多くの研究が行われている。

表 1 各種のハイブリッド型人工肝臓の研究

---

1. 遊離肝細胞単純浮遊培養システム	Matumura (1976), Eiseman (1976), 葛西 (1987)
2. 単層培養システム	Jauregui (1986), Dich (1988), 長谷 (1988), Dunn (1989), Gerlach (1988)
3. 被包化肝細胞培養システム	Miura (1985), Sun (1985), 大島 (1989), Chang (1989), 葛西 (1991), Matthew (1991), Dixit (1992)
4. マトリックス上培養システム	Demetriou (1985), Vacanti (1988), Chamuleau (1989), Nagaki (1990), Shnyra (1990), Wintermantel (1991), 柳 (1992)
5. 中空糸膜モジュール培養システム	Wolf (1975), 戸辺 (1992), Jauregui (1992), Sussman (1992)
6. スフェロイド化肝細胞	小出 (1985), 赤池 (1989), 佐藤 (1991), Ito (1992), 松下 (1992), 酒井 (1992)

---

表 - 1 . 各種のハイブリッド型人工肝臓の研究

### 1) バイオアクティブ材料の意義

肝細胞培養が成功した主な理由は、活性度の高い細胞が得られる様になった事もさる事ながら、培養液や培養器の改良に負うところも大きい。培養液にはインスリンやEGFが添加され、培養器には接着基質としてコラーゲンがコーティングされた。

われわれも、添加剤として、EGF、HSS (hepatocyte stimulating substance) 等、基質として、コラーゲンの他

にフィブロネクチンやビトロネクチン、あるいは赤池らの開発したPVLA等を検討した。その結果、静置培養のような単層培養系においては、人工材料とこれら接着基質の関係の有用性を、また、添加剤としてのEGFやHSSの有用性を観察した。しかしながら、単層培養に見られる様に、肝細胞が旺盛な接着扁平化を示している場合は、そうでない場合に比し、肝細胞自体の代謝能、合成能はむしろ低下している事が判明した。これは、細胞の分化、脱分化の環境における肝細胞機能の発現形の違いを示しており、ハイブリッド型人工肝臓を考える際、重要なポイントである。

## 2) 肝細胞接着基剤の検討

代謝モジュールのリアクターとして、沢山の肝細胞が接着し、リアクターとしての機能を良く再現させる方法として、何らかのcarrierを用いる方法がある。

図-1にみられる様に、われわれは、肝臓の細胞間物質であるbiomatrixやデキストラン微粒子担体といわれるmicrocarrierを検討した。biomatrixは大変良い接着能を示したが、この採取法が複雑かつ高価で実用性に欠けると判断された。microcarrierは表面がコラーゲンコーティングされ、近年、米国のDemetriouが豚の肝細胞を接着させてモジュール化し、臨床治験を進めているものであるが、われわれは、期待した程の細胞接着を得る事ができなかった。そこで、次に新しいキャリアーについて検討した。

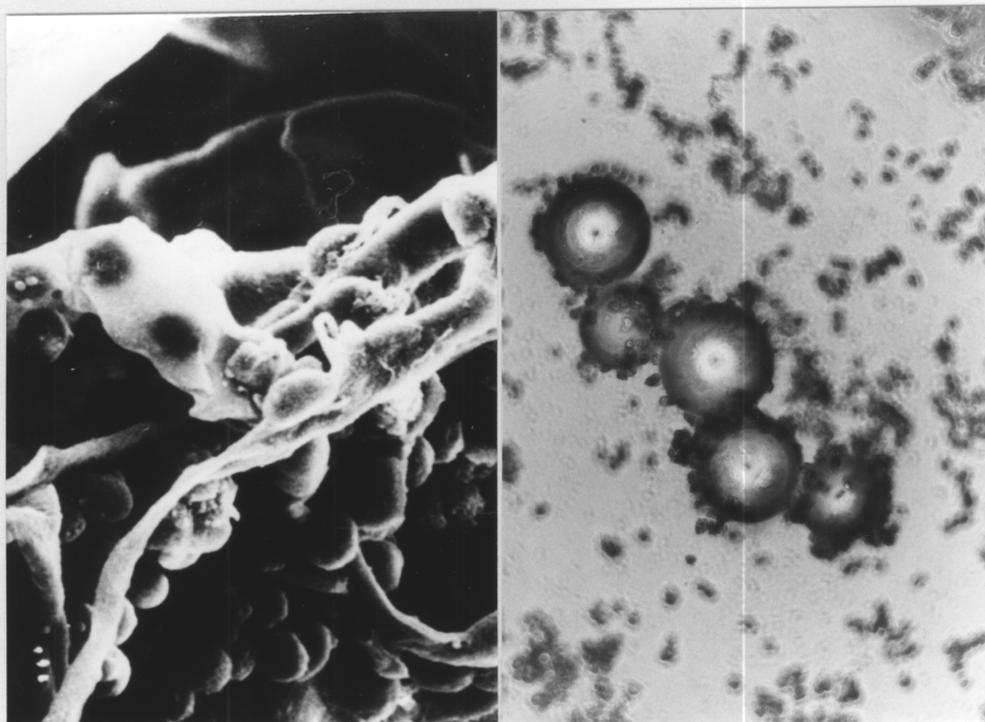


図 - 1 . 肝細胞接着担体 (左 : biomatrix ,  
右 : デキストラン微粒子担体)

### 3) セルロース系マイクロキャリア

#### ア) マイクロキャリア

セルロース由来マイクロキャリア (旭化成 CPB) は、  
図 - 2 a に示す如く粒子径  $180-210 \mu\text{m}$  の多孔質球状粒子  
で、平均開孔径は  $30 \mu\text{m}$  である。多孔質であるため、その  
表面積は  $2.8\text{m}^2/\text{g dry}$  と大きく、比重も  $1.03\text{g}/\text{ml}$  と軽く  
浮遊培養に適している。

#### イ) コーティング法

マイクロキャリア表面のコーティングは、type IC コラ  
ーゲン (新田ゼラチン、0.3%) を用い、3N HCl を用いて

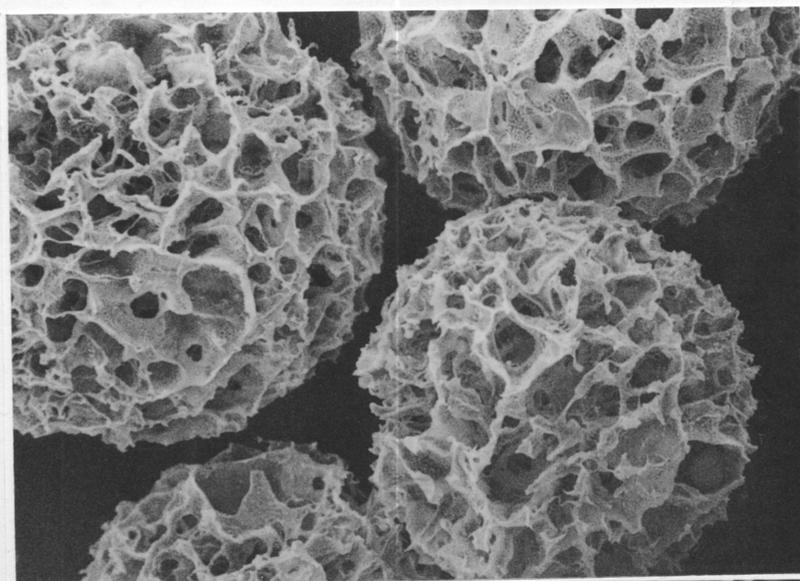


図 - 2 a .  
セルロース由来  
マイクロキャリア

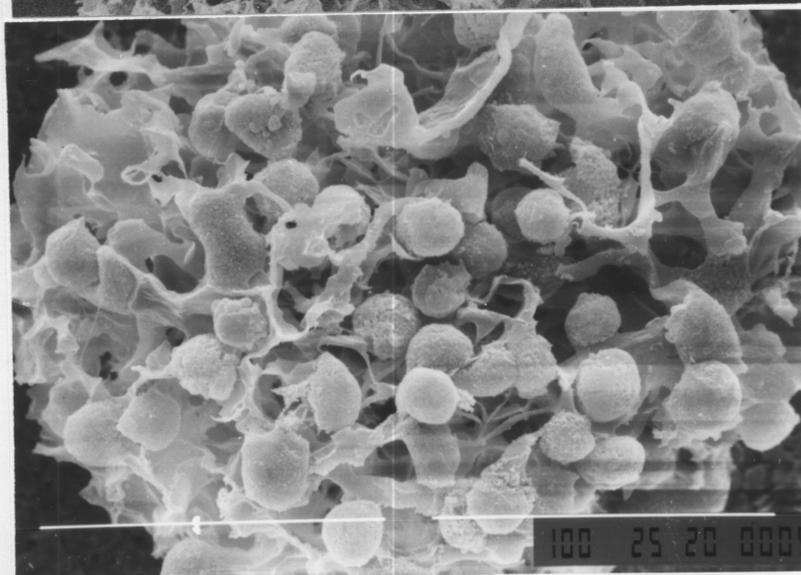


図 - 2 b .  
表面の孔に肝細胞  
が接着している

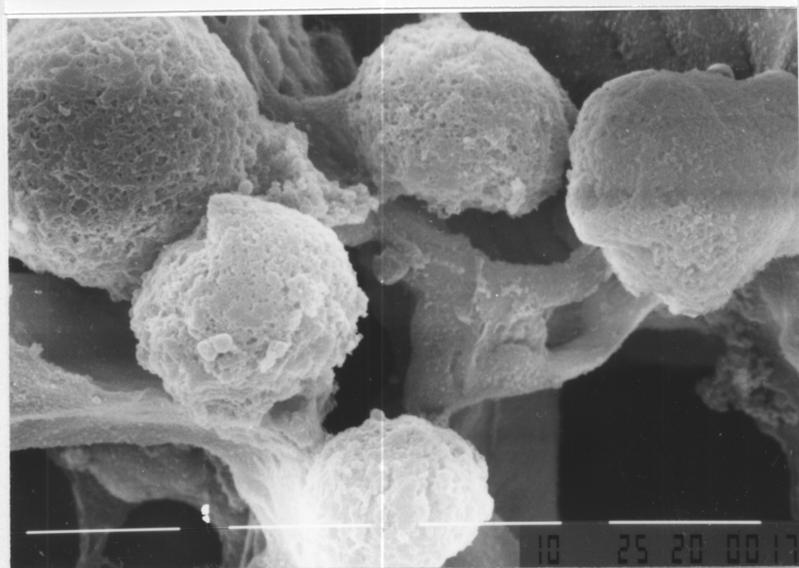


図 - 2 c .  
b の拡大像  
培養 48 時間後

10倍に希釈し、0.1M CaCl<sub>2</sub>で洗浄した後、PBS(-)を用いてさらに2度遠沈洗浄した。

#### ウ) 肝細胞接着法

20mgのマイクロキャリアに20mlの肝細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7$  個) を容量50mlのスピンナーフラスコ内で混和し、CO<sub>2</sub>・O<sub>2</sub>混合ガスdiffusion下に37℃で浮遊培養を行い、間歇攪拌法により肝細胞を接着させた。間歇攪拌は、30分毎に2分間攪拌(10回/分)し、これを3時間繰り返して行った。3時間の間歇攪拌法では、浮遊培養した肝細胞の約70%がマイクロキャリアへの接着を示した(図-3)。

#### エ) 代謝能の検討

直径6.0cmのペトリディッシュを用いて、4mlの肝細胞付着マイクロキャリア浮遊液を37℃、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。コントロールとしては、4mlの肝細胞浮遊液 ( $5 \times 10^5$  個/ml)を直径6.0cmのコラーゲンコートディッシュ内で単層培養したものをを用いた。培養24時間後に培養液を破棄し、以下の如く負荷試験を行い、肝細胞の代謝能を検討した。また隔日毎に培養液を交換し、培養6日後にも同様の負荷試験を行った。

##### i) NH<sub>3</sub> 負荷試験

NH<sub>3</sub>として1000μg/dlとなるようにNH<sub>4</sub>Clを10% FCS含有W-E培養液に負荷し、37℃ CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行い、経時的に6時間まで培養液中のNH<sub>3</sub>、Urea-N濃度を測定した。

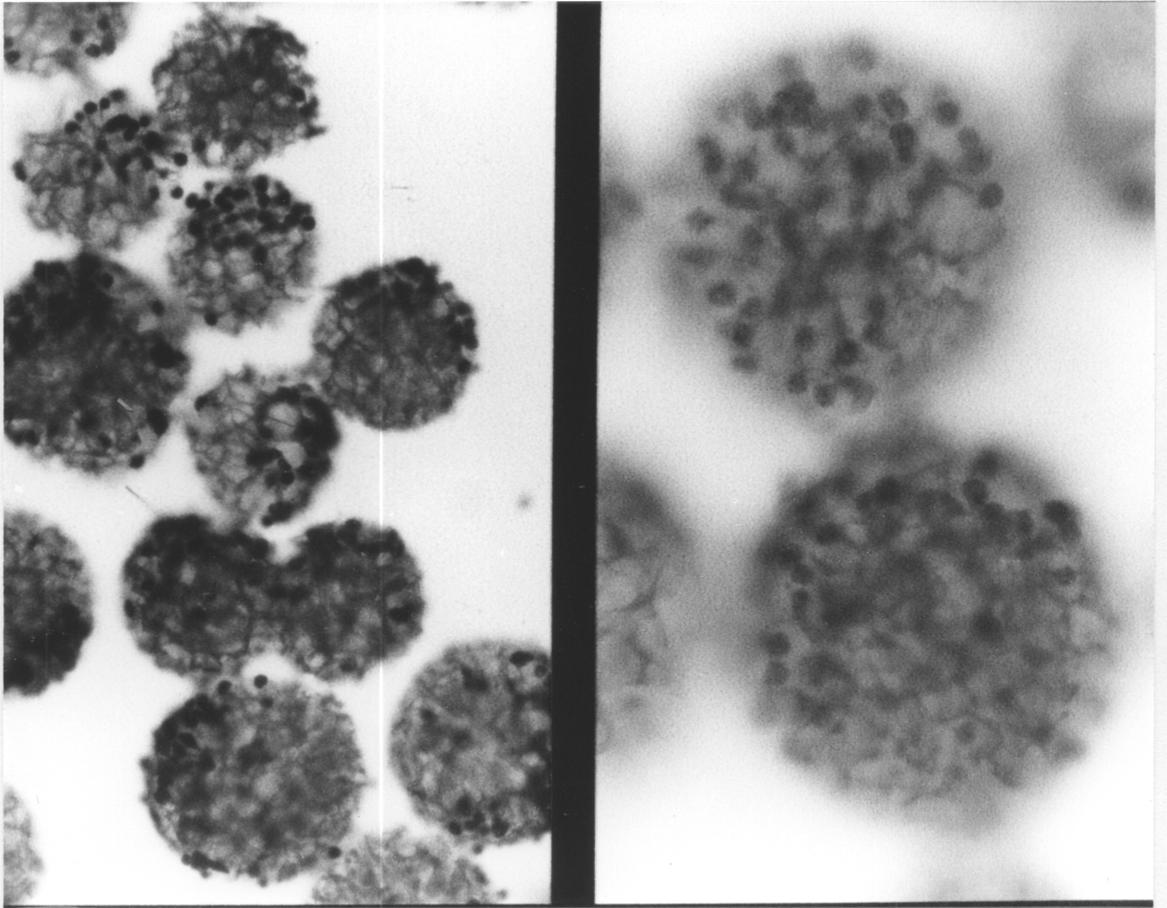


図 - 3 . 肝細胞接着のための 3 時間攪拌後の  
キャリアー

## ii) Fructose負荷試験

180mg/dlとなるようにfructoseを10% FCS含有glucose-free Hanks'III液に負荷し、同様に37°C CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行い、経時的に6時間まで培養液中のglucose濃度を測定した。また、肝細胞の生存率をみる目的で、培養液中のGOT、LDH濃度を経時的に測定した。

## iii) 成績

培養24時間および6日間後に行ったNH<sub>3</sub>、fructose負荷試験における肝細胞10<sup>6</sup>個あたりの代謝能を比較したのが表-2である。培養24時間後におけるマイクロキャリア接着肝細胞は、152.50 μg/dl/h/10<sup>6</sup>cellsの速度でNH<sub>3</sub>を代謝するが、単層培養肝細胞は、34.38 μg/dl/h/10<sup>6</sup>cellsとマイクロキャリア接着肝細胞の約1/5の代謝能を示した(図-4)。Urea-N生成(図-5)、fructose代謝(図-6)においても同様に、マイクロキャリア接着肝細胞は単層培養肝細胞に比して明きらかに良好な代謝能を示した。また培養6日後の負荷試験において、両群ともに顕著な代謝能の低下を示したが、単層培養肝細胞に比べるとマイクロキャリア接着肝細胞では、その程度が軽度であった。(図-2b, c)は培養48時間後におけるコラーゲンをコーティングしたマイクロキャリアに接着した肝細胞の走査型電子顕微鏡像である。多数の肝細胞が、多孔質マイクロキャリアの網目構造の内部に接着し、伸展せず球形を保っていた。

	Monolayer*		Microcarrier attached**	
	24 hrs <sup>a</sup>	6 days <sup>b</sup>	24 hrs	6 days
NH <sub>3</sub> <sup>c</sup>	34.38	8.00	152.50	12.33
Urea-N <sup>d</sup>	0.15	0.06	0.32	0.22
Fructose <sup>e</sup>	2.72	1.25	6.64	7.23

\*: monolayer culture, \*\*: microcarrier attached hepatocyte culture

a: after 24 hours of culture, b: after 6 days of culture

c:  $\mu\text{g}/\text{dl}/10^6$  cells, d:  $\text{mg}/\text{dl}/10^6$  cells, e:  $\text{mg}/\text{dl}/10^6$  cells

表 - 2 . 肝細胞接着セルロース・マイクロキャリアの代謝能

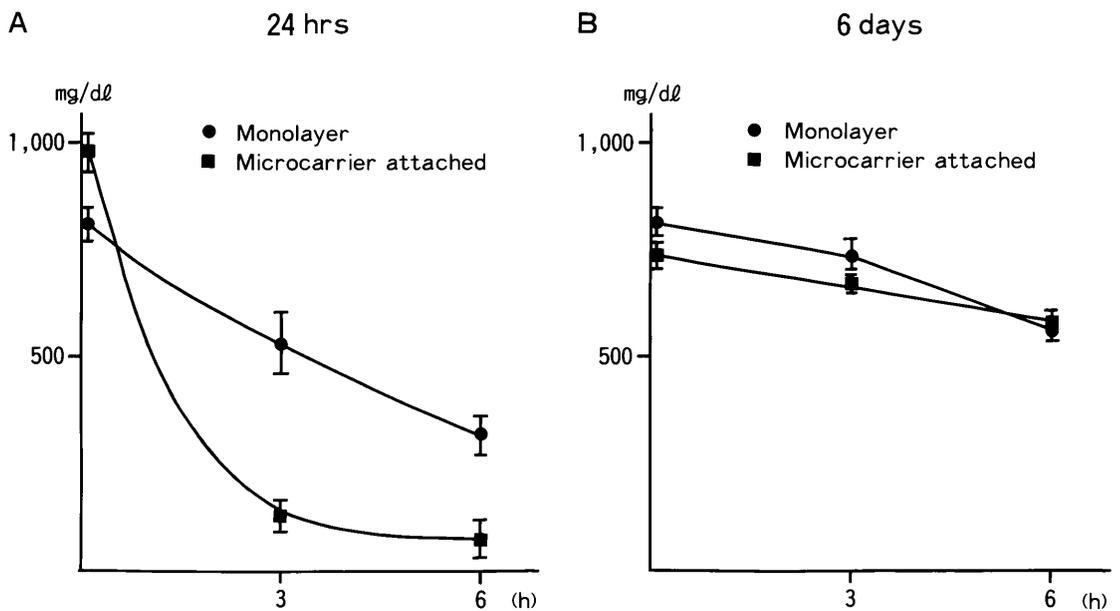


図 - 4 . アンモニア代謝除去能

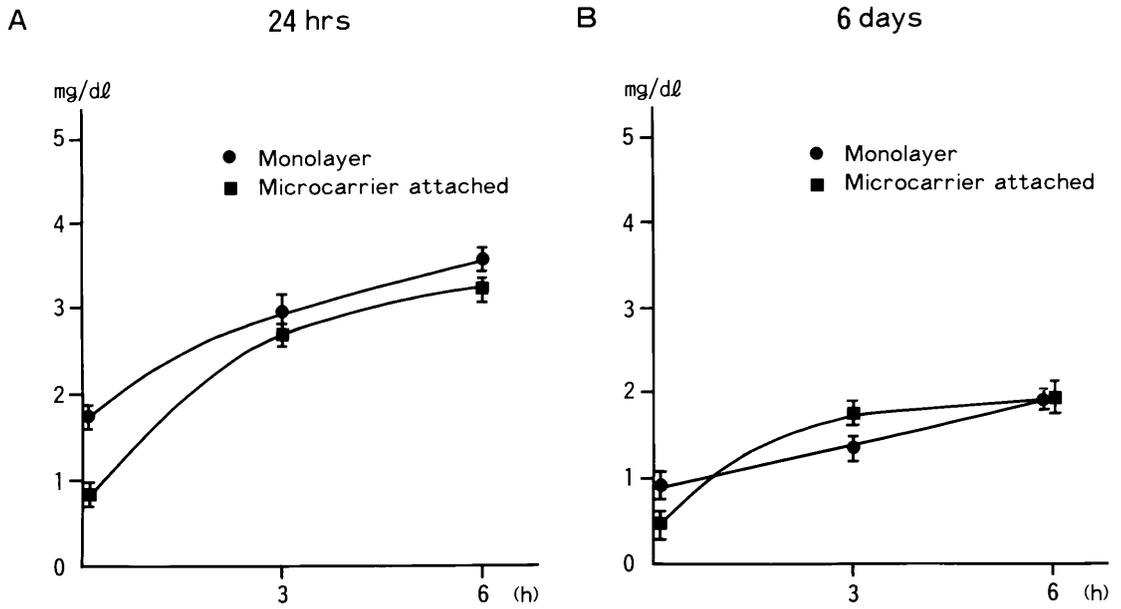


図 - 5 . 尿素窒素生成能

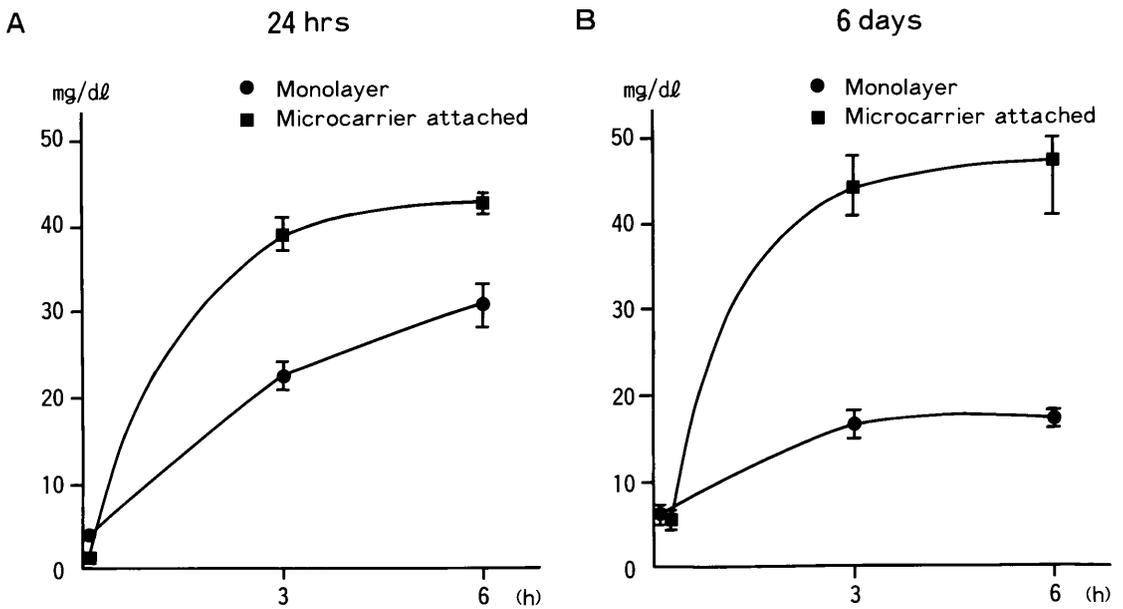


図 - 6 . グルコース生成能

### オ) 新セルロース系マイクロキャリアの検討

前述の旧タイプのキャリアは、表面孔の大きさが $30\mu\text{m}$ 程度と、肝細胞に比し小さいものと考え、その数倍の大きさのキャリアーを検討した(図-7)。また、細胞を接着させる方法にも工夫を加えた。

従来のキャリアーでは、間歇攪拌法を用いたが、新しい肝細胞浮遊液の吸引法を図-8に示し、その細胞接着量を表-3に示す。

代謝機能は前述と同様な方法で検討し、単層培養法、キャリア接着細胞の静置培養法、そして、後者を浮遊させた場合の成績を細胞蛋白当りに換算した値である(図-9, 10, 11)。いずれも、キャリア浮遊液の代謝能が良好で、このタイプのモジュール化の可能性が示唆された成績であった。

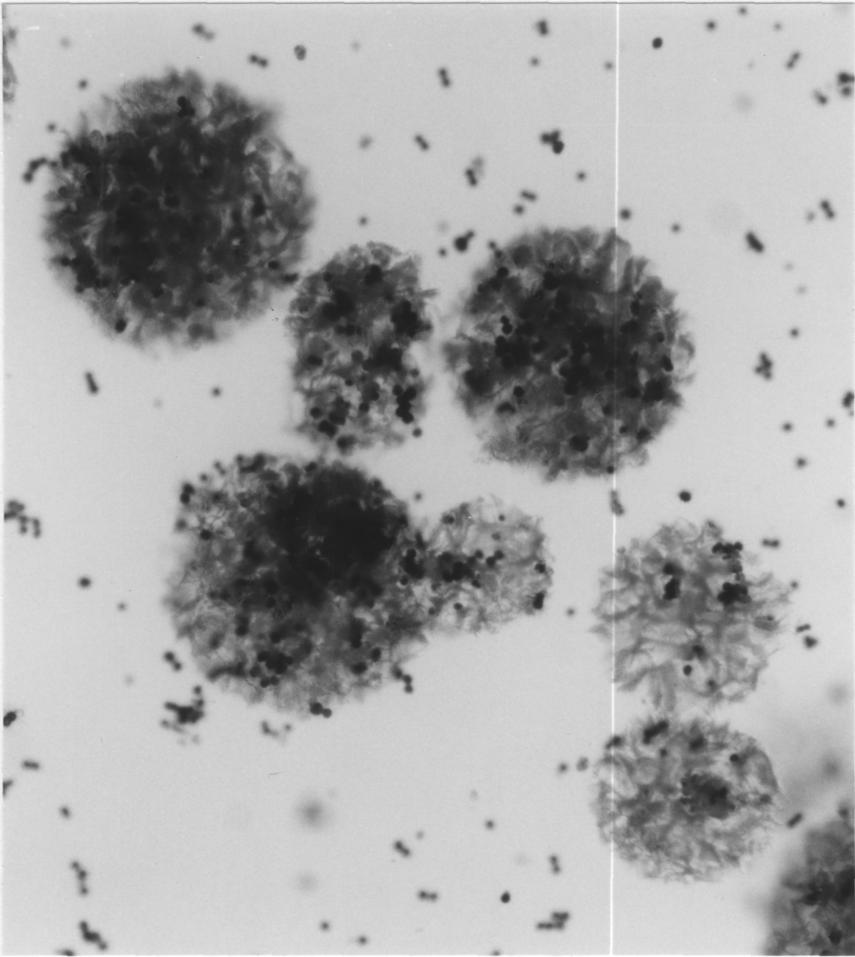


図 - 7 . 表面孔径の大きいキャリア

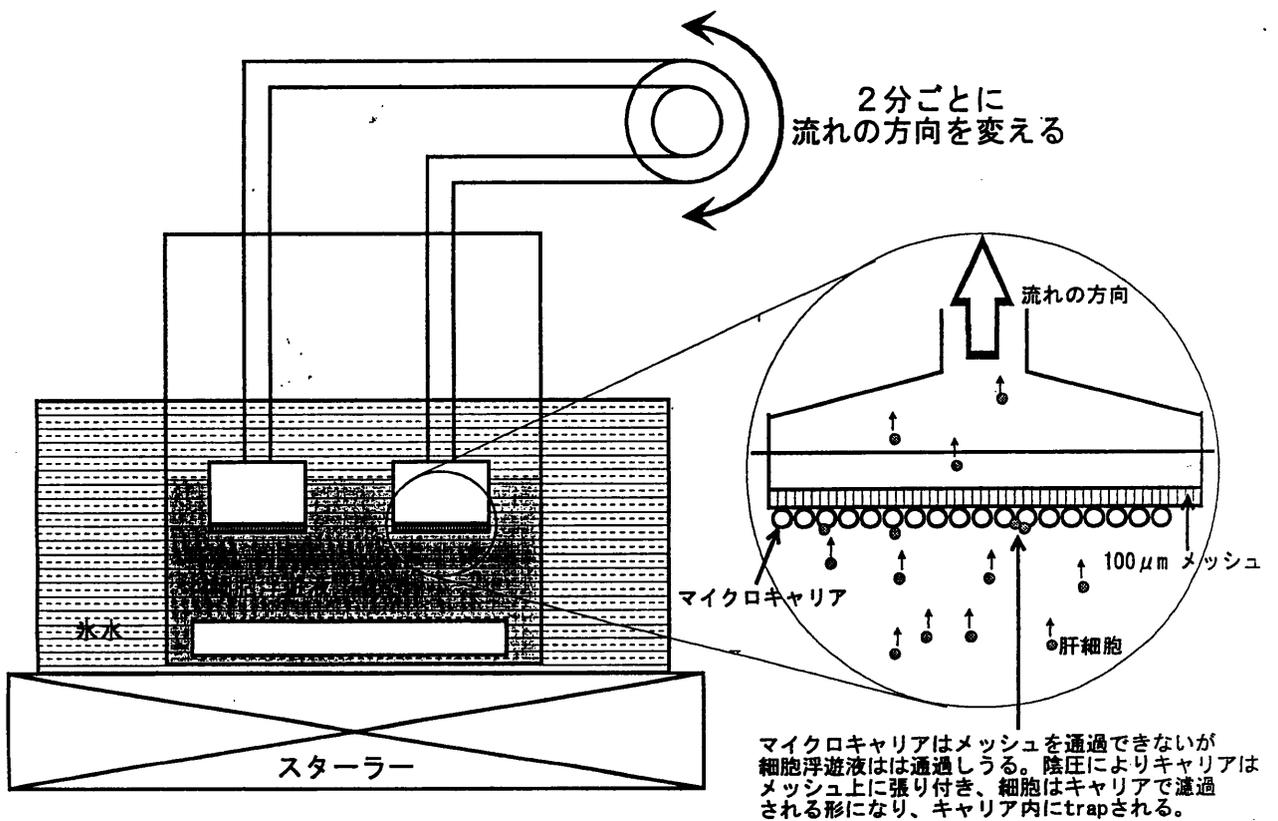
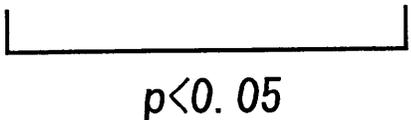


図 - 8 . 新しい肝細胞の接着法

	間欠攪拌法	吸引法
n	3	6
細胞蛋白量 (mg)*	0.48 ± 0.064	2.28 ± 0.76
	 $p < 0.05$	

\* マイクロキャリア100mgあたりの蛋白量

表 - 3 . 新・旧法による肝細胞接着量の比較  
吸引法が約5倍良好である

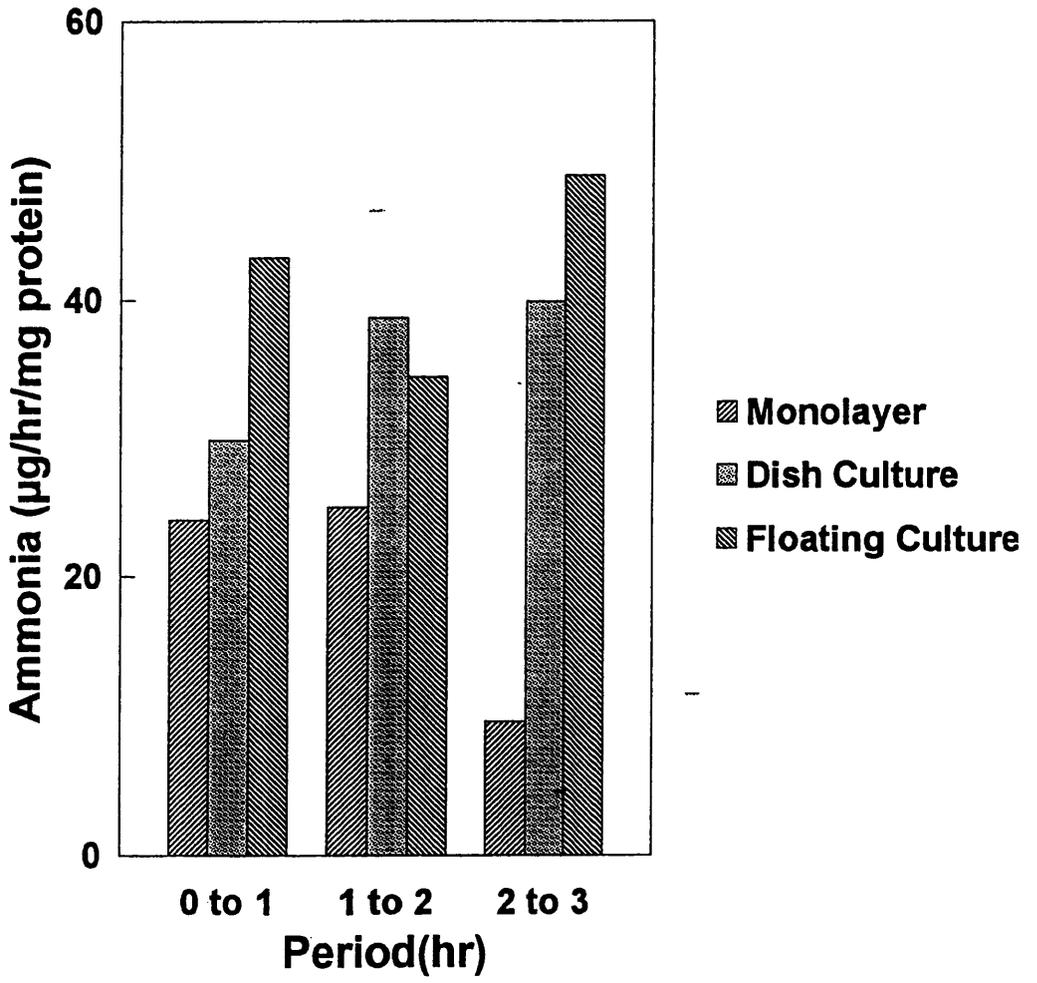


図 - 9 . アンモニア代謝除去能

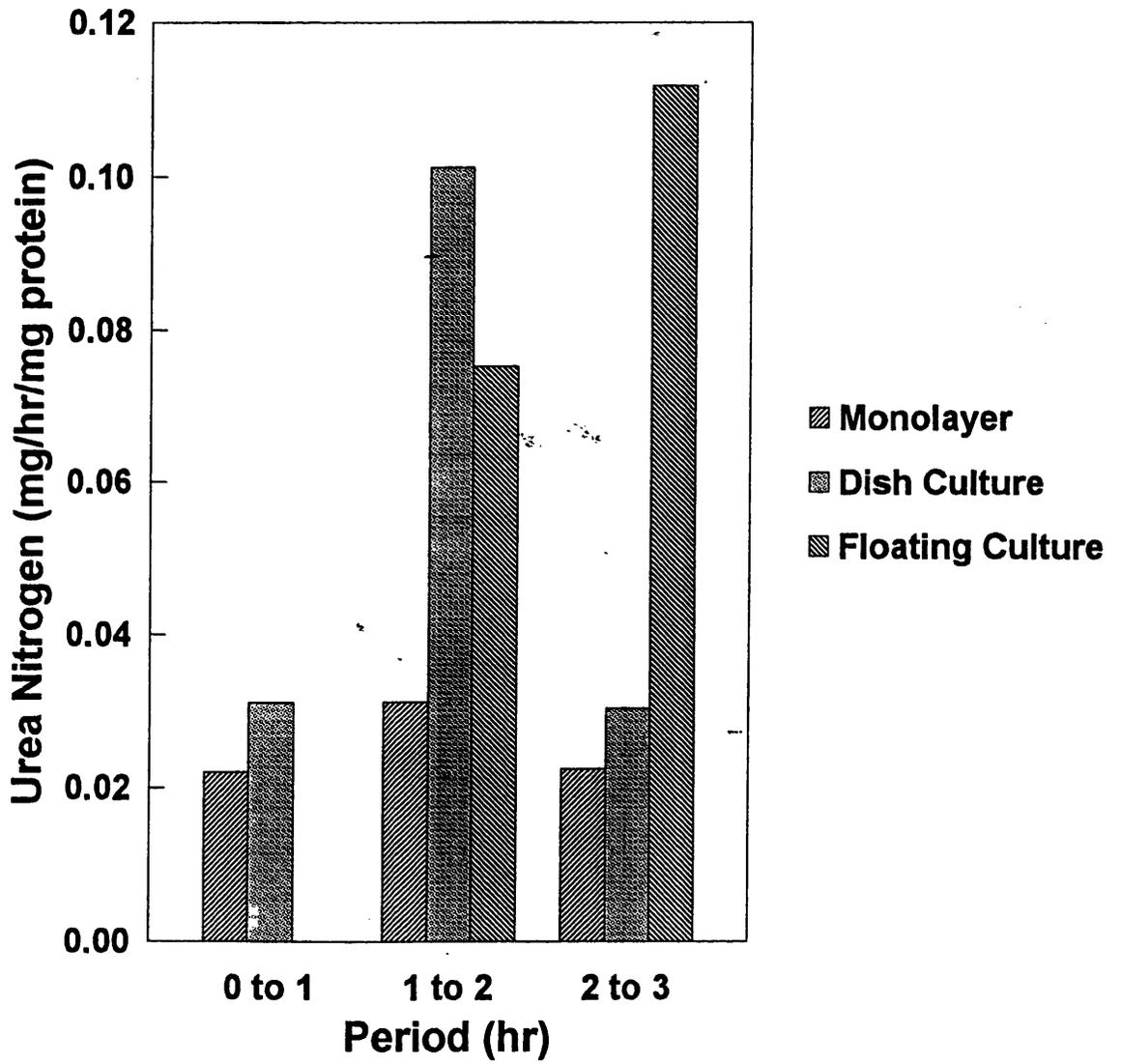


图 - 10. 尿素窒素生成能

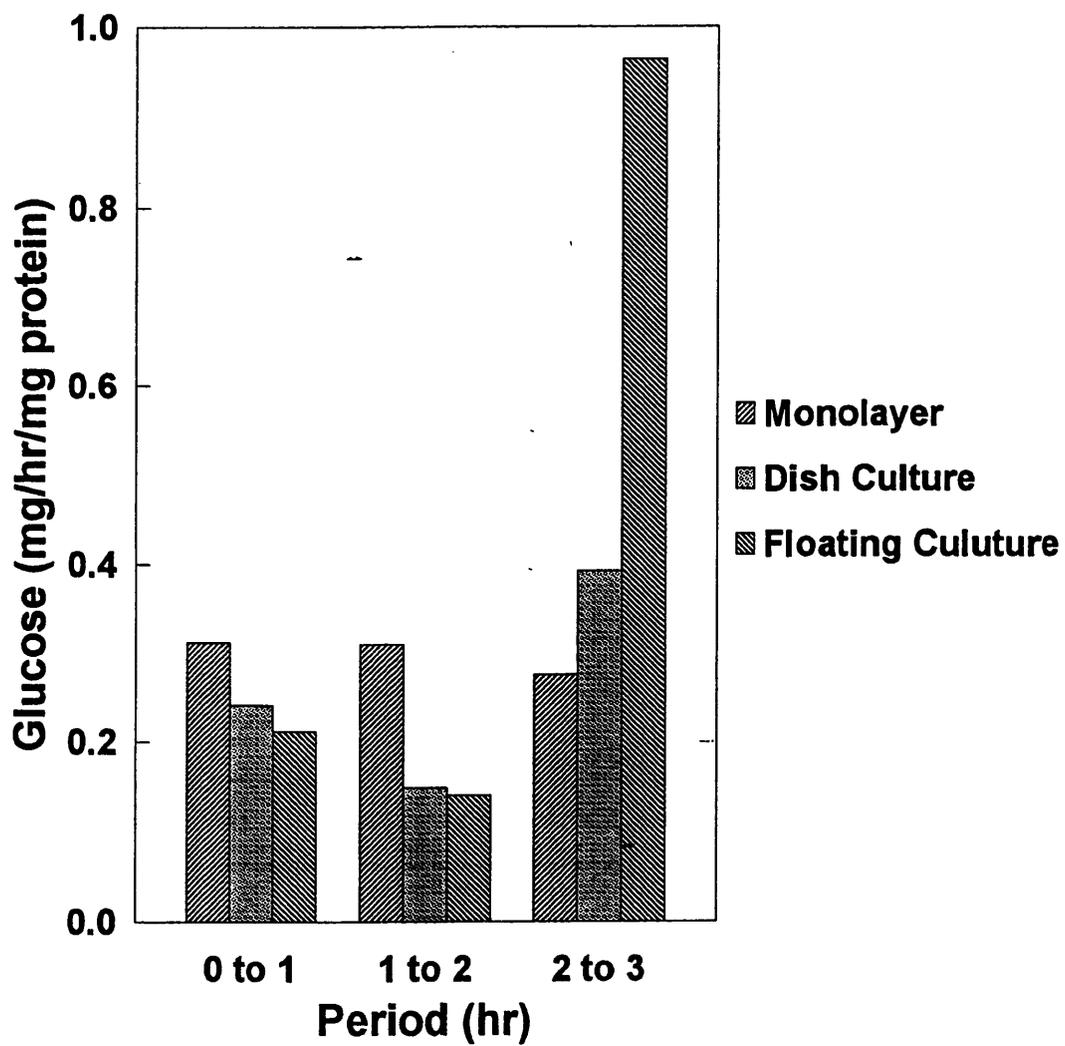


図 - 11. グルコース生成能

### 3. 肝細胞移植法からみた、細胞-材料の細胞工学的解析

肝細胞を用いた hybrid 型の代謝用リアクターは、*ex-vivo perfusion* 型の人工肝であり、これを体内に移植すれば *in-vivo* 型の人工肝と把えることができる。この事から、リアクターの機能やその安全性、あるいは相互の関連性を解析するひとつの方法になり得る。この様な観点から、本項の研究を検討した。

#### 1) ゲルビーズ型・リアクター

生体材料をゲル化して使用する方法は、ラ氏島の領域で早くから検討され、近年では、神経伝達代替にも研究されている。アガロース、アルギン酸ゲル、コラーゲンなどがその材料として使われている。われわれは肝細胞用としてアルギン酸 Ca ゲルを試みた。

ゲル・ビーズの作製法は通常の方法に順じ、肝細胞浮遊液とアルギン酸 Na 液を混合し、エアジェット法で  $\text{CaCl}_2$  液中にふき出してゲル化する方法で、 $\phi 1 \text{ mm}$  弱の大きさのゲルビーズとなる。静置培養法による代謝機能も単層培養とほぼ同程度に認められている。このビーズの *ex-vivo perfusion* 法が、人工肝のリアクターとして発展しうる可能性があるが、高密度化と物質交換能等の点で、相当の工夫が必要となろう。

このビーズを、ガラクトサミン肝不全ラット腹腔内に注入してその効果をみたところ、死亡率 100% のラットを、

約80%救命する事が可能であった(図-12)。腹腔内に注入されたビーズは、2~3日後には融解してしまうので、肝細胞のもつ代謝機能は長時間発現している事は考えにくく、ラットの解毒、免疫機能の賦活作用が考えられ、今後の検討が期待されるところである。

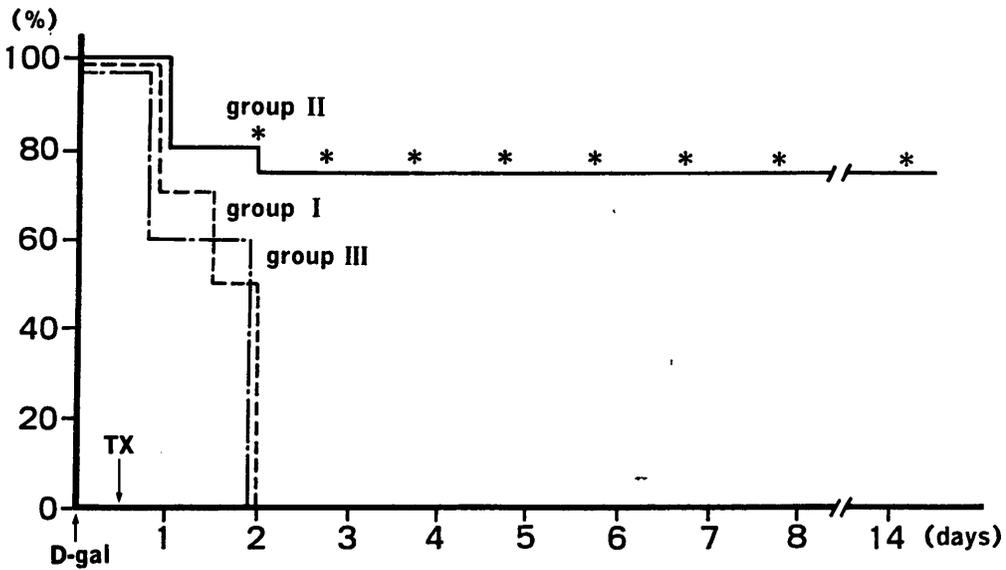


図-12. アルギン酸Caゲル・ビーズ化肝細胞を  
ガラクトサミン急性肝不全ラットの  
腹腔内に注入

- group I : 死肝細胞ケルビース ・ 生存率 0%
- group II : ケルビース 肝細胞 ・ 生存率 80%
- group III : group II をインドメタシン で処理  
・ 生存率 80%

## 2) hepatocyte stimulating substanceの併用

肝細胞の長期生存、機能の発現、再生能の賦活等の作用を期待して、肝切除動物の再生肝の抽出物(HSS)を、人工肝への添加物として検討した。

HSSは20kgの豚の40%肝切除を行い、48時間後再生肝を摘出してホモジナイズし、2,700gの円心による上清をHSSとした。ウィスターラットを用いて、通常と同系肝細胞脾内移植を行い、週に2回直接脾内にHSSを注入し、6週後に脾摘を行い、移植肝細胞の生着状態を観察した(図-13)。その結果、HSSを投与した方が肝細胞の生着率は良好であり、また、特徴的なことは、bile duct構造のstructureの増殖が強く観察された。この分析はなお今後の課題であるが、このような物質をモジュールに添加する事により、障害肝への再生因子の補充として検討したい。

## 3) ポリマー接着肝細胞移植

肝細胞の接着担体として色々なポリマーが開発、試みられている。これは、基質依存型肝細胞を基質に素早く固定化し、細胞の安定と機能の早期かつ長期発現を期待するものである。

われわれは、九大船津らの開発したポリウレタンフォーム(PUF)を用い、肝細胞を固定化した上で、同系ラット腹腔内に移植し、長期機能の再現性を検討した。まだpreliminaryのデータであるがPUFに固定化された肝細胞の生着が確認された(図-14)。しかしながら、固定

化肝細胞の有意な生着はなお今後の検討を待ちたい。

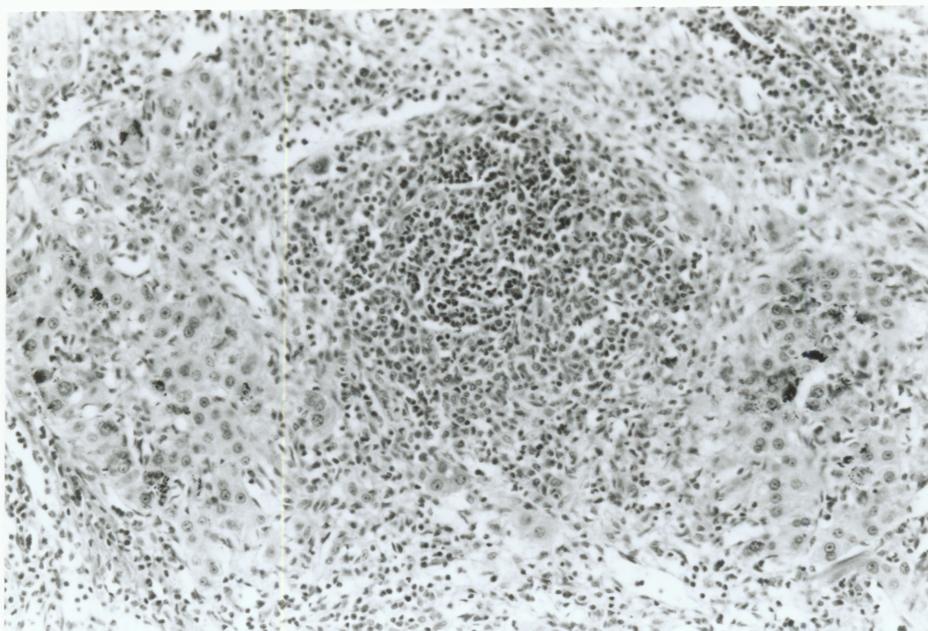


図 - 13. 肝細胞刺激因子投与，脾内移植肝細胞  
(非投与に比べ生着量が多い)

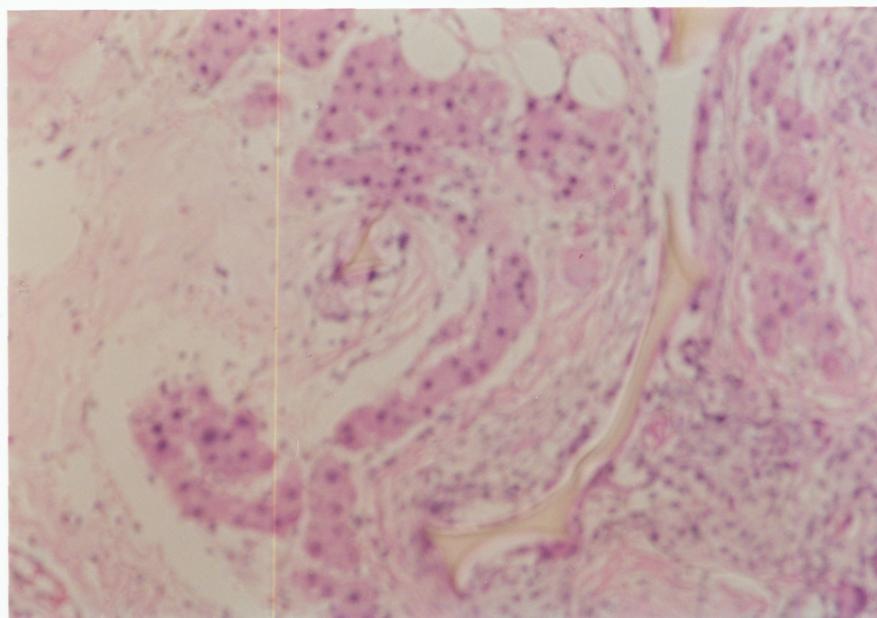


図 - 14. ポリマー接着肝細胞の腹腔内移植  
(初期の肝細胞生着量が多いようである)

#### 4. 考察と今後の展望

肝臓は体重の約3%を占める生体で最も大きな実質臓器である。肝実質細胞（通常肝細胞といえばこれを意味する）は肝重量の約60%で、体重50kgとして $2.5 \times 10^{11}$ 個あり、肝臓1g当りでは $1.7 \times 10^8$ 個となる。生体に必要な物質、糖、蛋白、脂肪、アミノ酸、ホルモンなどの物質代謝能とビリルビンや尿素などの不要な物質の解毒排泄能が主な機能である。マクロファージを中心とした肝非実質細胞も約 $0.5 \times 10^{11}$ 個あり、肝実質細胞の保護、エンドトキシンや細菌の除去、免疫反応などを担当している。後者の解毒・排泄機能は人工材料を用いた透析・濾過、あるいは吸着剤による血液灌流、さらには血漿分離膜を用いた血漿交換などで代行できる。しかしながら、物質の代謝産生は肝実質細胞のもつ酵素系によるしか方法がない。そのために、古くより、肝臓をいろいろな形態、例えば全肝、肝スライス、肝組織、肝細胞あるいは肝酵素などが代謝のリアクターとして用いられてきたが、今日なお腎臓における血液透析のような方法は開発されていない。

一方、近年のバイオテクノロジーの進歩はすばらしく、特に、肝細胞分離法、培養法の改良により、人工肝臓のバイオリアクターとしての応用が期待されるようになってきた。

人工肝臓は、人工材料のみで作られている場合を非生物学的人工肝臓、生物学的材料のみで作られている場合を生

物学的人工肝臓、この両者の混成型をハイブリッド型人工肝臓というようになった。hybrid型は非生物材料と生物材料のcombinationによって、各々の持つ機能を補強し合うことを意図したもので、生物材料としては、操作性、保存性、機能再現性などの点から、現在は肝臓を細胞単位にして使用する研究が中心となっている。このhybrid artificial liver(HAL)を完成するには以下の問題、すなわち①肝細胞の大量採取と長期保存法、②肝細胞の高密度、高機能化の確立、③異種肝細胞に対する免疫学的問題、④生体適合性、などをclearする必要がある。これらの問題の中で、②の肝細胞の高密度、高機能化の達成が最も重要と考えられ、今日多くの研究が行われている。われわれが開発したセルロース系マイクロキャリアーは、なお細胞接着数に限界があり、更に工夫を要するが、キャリアー表面のコーティング法、接着法が今後の検討課題であろう。