

0966

---

臓器工学的アプローチによる  
代謝機能補助を意図した肝臓の  
器官形成に関する研究

---

(02670530)

平成2年度科学研究費補助金〔一般研究(C)〕研究報告書

平成4年3月

研究代表者 葛西真一  
(旭川医科大学医学部助教授)

## は し が き

生体の物質代謝の中枢であり、生命維持に必要な物質の産生と、不要なあるいは中毒性物質の解毒・排泄を担う肝臓は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り、今日の進歩した医療をもってしてもその救命率は30%に達しない。しかしながら、肝臓の稀にみる再生能力により、機能不全の状態を何らかの手段により乗り切れば救命しうる可能性がある。この手段が人工肝臓に期待されるが、今日の方法では限界がある。また、今後施行されることが必須の肝移植においても、移植前後の患者管理に、あるいは、絶対的ドナー不足の対策に、人工腎臓における血液透析に相当する人工肝臓は必要不可欠の治療法である。しかしながら、今日臨床的に施行されている人工肝臓は、肝臓の解毒機能の一部を補助できるにすぎず、代謝能の補助法の開発が急務である。本研究では、肝臓を臓器工学的に解析し、種々の肝細胞培養法の検討から、新たな肝臓としての器官形成を試み、代謝機能補助の可能なリアクターの作製を目的とする。

## 研 究 組 織

研究代表者：葛西真一（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）

## 研 究 経 費

平成2年度 1,400千円

平成3年度 900千円

## 研 究 発 表

### ア．学会誌等

- 1．葛西眞一，水戸迪郎：肝細胞移植およびHybrid Artificial Liver., 集中治療, 2(4):443-450, 1990.
- 2．葛西眞一，澤 雅之，水戸迪郎：Hybrid Artificial Organ-IV. ハイブリッド型人工肝臓., 日本人工臓器学会, 19(6):1445-1551, 1990.
- 3．葛西眞一，水戸迪郎：ハイブリッド型人工臓器., 外科, 53(9):933-938, 1991.
- 4．葛西眞一，平井修二，澤 雅之，柿坂明俊，山本 哲，水戸迪郎：人工的肝機能補助の現況と将来., 日本外科学会雑誌, 92(9):1249-1252, 1991.
- 5．葛西眞一，澤 雅之，水戸迪郎：ハイブリッド型人工肝臓., 腹部救急診療の進歩, 11(6):827-833, 1991.

### イ．口頭発表

- 1．葛西眞一，柿坂明俊，山本 哲，林 宏一，草野満夫，江端英隆，水戸迪郎：Biotechnology による臓器機能の再建., 第90回日本外科学会総会. 1990, 5 (札幌) .

- 2 . 葛西真一，山本 哲，大江成博，柿坂明俊，水戸廻郎：  
Hybrid Artificial Liver の研究 - ゲル固定化肝細胞の高  
機能化に関する検討 ., 第28回日本人工臓器学会 . 1990, 9  
(新潟) .
- 3 . Kasai S., Yamamoto T., Kakisaka A., Ohe N., Mito M. :  
A Metabolic Support Device for a Hybrid Artificial  
Liver., 12th World Congress of the International  
Society for Artificial Organs. 1990, 10 (Sapporo).
- 4 . 葛西真一，平井修二，小原充裕，澤 雅之，柿坂明俊，  
山本 哲，水戸廻郎：人工的肝機能補助の現況と将来 .,   
第91回日本外科学会総会 . 1991, 4 (京都) .
- 5 . Hirai S., Kasai S., Sawa M., Kondo K., Kakisaka A.,  
Yamamoto T., Mito M. : The Assessment of Improvement  
on Survival Rate of Rats with D-Galactosamine  
Poisoned Acute Liver Failure by the Gel-Entrapped  
Hepatocyte Transplantation., 26th Congress of European  
Society for Experimental Surgical Research. 1991, 5  
(Salzburg, Austria).

1) 肝細胞分離法

肝細胞は、ウイスター系雄性ラットの肝臓を、Berry & Friendの方法によるコラゲナーゼ酵素灌流法により分散して得た。実験には、トリパンプルーによる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、プラスチック培養皿に静置培養するときれいな敷石状の接着を示し、PAS染色、G-6-Pase染色にても、良好な陽性顆粒が観察された。図-1は、ラット肝のコラゲナーゼ灌流消化法(Seglen法)のシステムである。

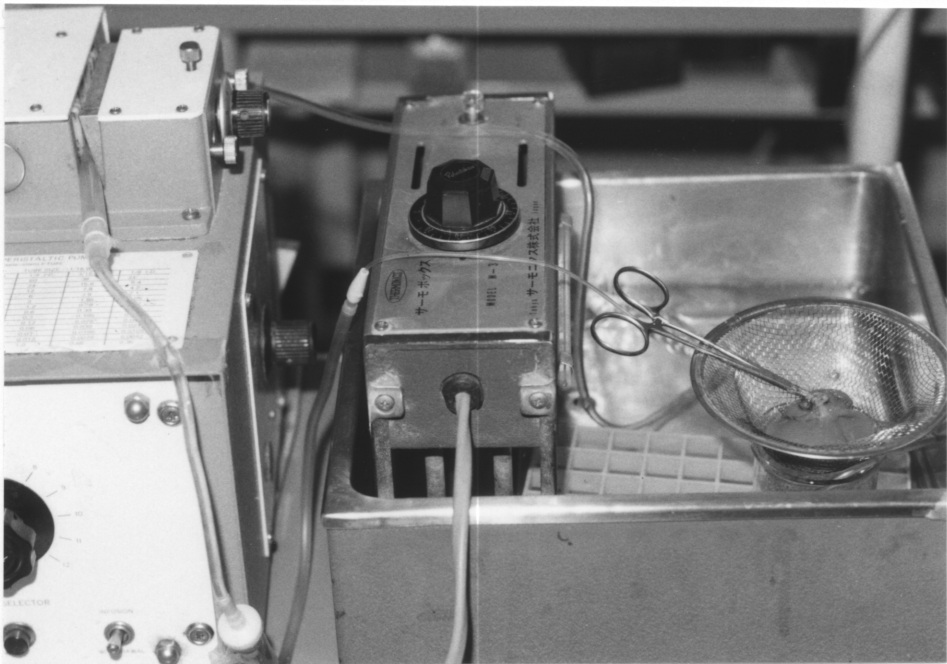


図 - 1

## 2) ラット肝細胞脾内移植による肝再構築

肝細胞を脾内に移植することにより、その再構築過程と、移植肝細胞に対する分裂増殖のメカニズムと、増殖法について検討した。

肝細胞脾内移植法は、10週令のWistar系雄性ラットを用い、先に記述した方法で採取した肝細胞を $1 \sim 1.6 \times 10^7$ ヶを、ラットの脾門部を一時的にクランプしたうえで、27G針にて直接脾内へ注入した(図-2)。

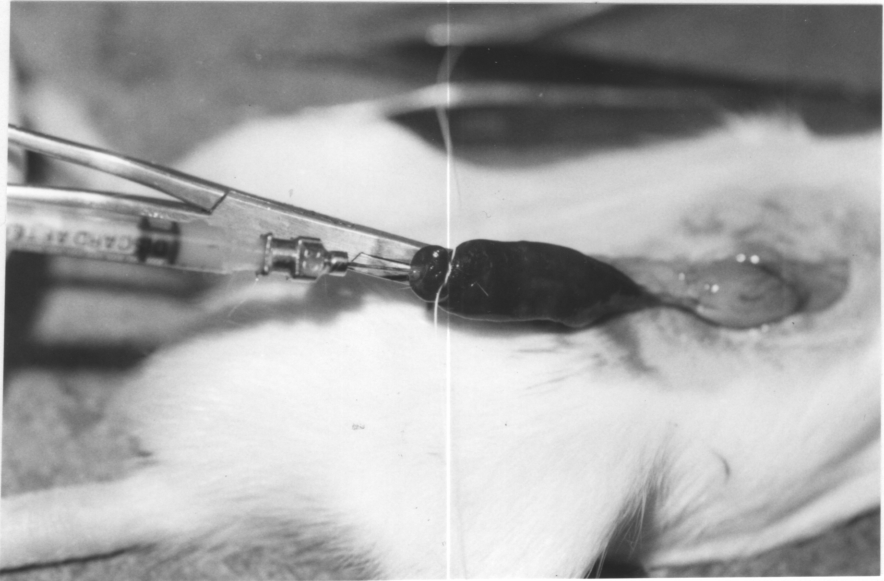


図 - 2

移植肝細胞の増殖率を、摘出脾切片における肝細胞の占拠面積を画像解析装置(KONTRON MOP AMO III)を用いて計測し、その経過をみたのが図-3である。2週目には、生着肝細胞数は最も少なくなり、その後脾内に生着した肝細胞が分裂増殖を始

め、脾内の約半分を占めるようになるには約1年数カ月必要である。

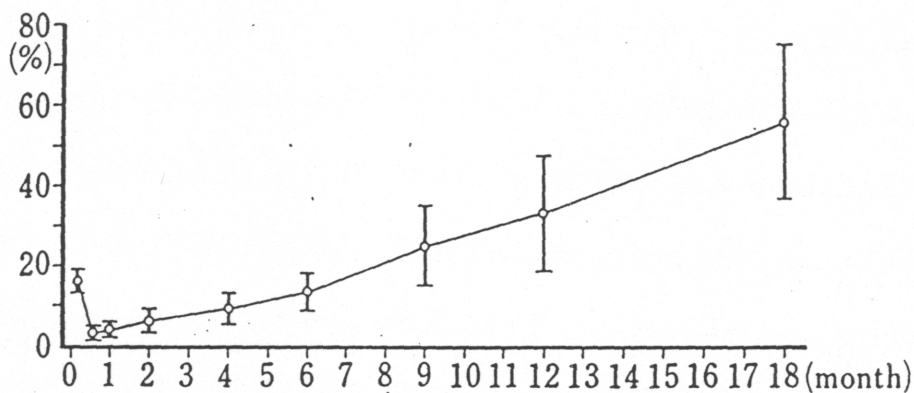


図 - 3 移植肝細胞の経時的脾内占拠率

光顕あるいは電顕による形態学的観察を行なうと、肝細胞の索構造もきちんと再構築され、毛細胆管構造も認められる。しかしながら、毛細胆管の後の胆汁排出経路は作られていない（図 - 4）。

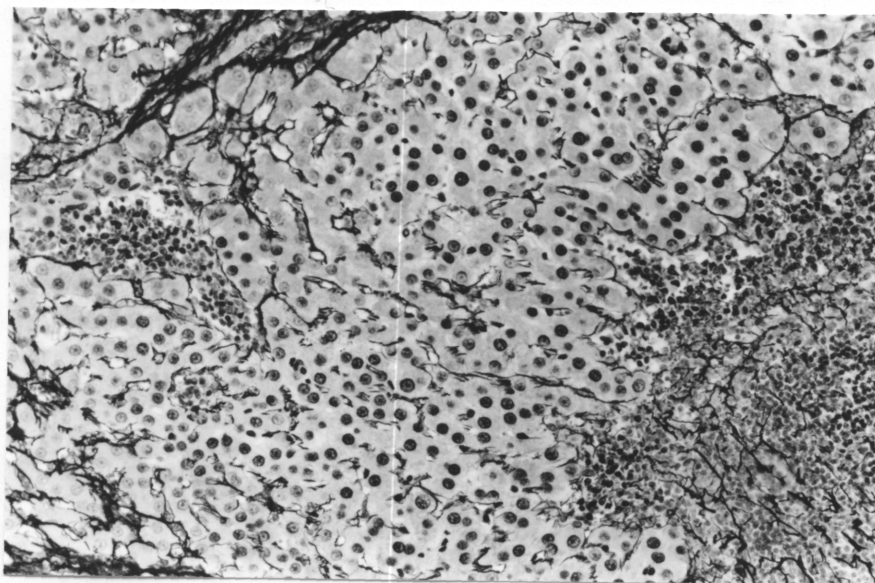


図 - 4



組織染色では、PAS陽性顆粒やG-6-Pase陽性顆粒も豊富に認められ、アルブミン合成能やビリルビン抱合能なども観察され、本来の肝臓が有する酵素系で、認められないものはないようである。

この脾内再構築肝は、阻血性肝障害時には一次的に肝機能を補助し得ることがわかっており、また、先天性ビタミンC合成酵素欠損ラットや、高ビリルビンラットを正常化させることも知られている。

### 3) 移植肝細胞の増殖法の検討

移植肝細胞が、脾の半分以上を占めるには約1年数カ月の期間を要するので、何とか早く増殖させる事ができないだろうかという点を検討した。

肝再生を促進する因子として昔から色々な物質が知られているが、今回は、肝切除動物の血清と、近年作られるようになったh-EGFを検討した。

肝切血清(PH)は、基礎飼料だけで飼育したラットにHiggins-Anderson法による70%肝切除を行ない、その48時間後に血清を採取した。ラットに毎回1匹当たり1mlを注射する。肝再生刺激をより強くするために、2-AAFを0.05%含有する基礎飼料を5日間摂食させたあと、70%肝切を行ない、48時間後の血清を採取し(2-AAF+PH)使用した。コントロールは

sham operation約48時間後の血清を採取し使用した。

h-EGFは、50~100  $\mu$ g/kg当たりを腹腔内に投与した。  
コントロールとしては生食を注入した。

これらの肝再生刺激因子を、肝細胞を脾内に移植してから直後、24時間後、48時間後の計3回、また、移植後2ヶ月と9ヶ月目に、24時間間隔で2回投与した。犠牲死前1時間にBrdU 50mg/kg 静注し、脾臓を摘出しBrdUモノクローナル抗体を用いてabidin-biotin-peroxidase complex法により染色し、光顕的に脾内肝細胞1,000個以上を観察し、BrdU取り込み細胞数をlabeling index (LI)として判定した(図-5)。

#### ①移植直後

血清3回投与後(移植後3日目)の脾内肝細胞のLIは、[AAF+PH]群、PH群、コントロール群それぞれ $0.88 \pm 0.10\%$ 、 $0.60 \pm 0.08\%$ 、 $0.42 \pm 0.13\%$ であり、たがいに有意差を認めた。また、[AAF+PH]血清の5回投与後のLIは、 $1.35 \pm 0.13\%$ であり、3回投与に比し有意に高値を示した。

一方、EGF3回投与後のLIは[100  $\mu$ g/kg]群、[50  $\mu$ g/kg]群、生食群それぞれ $1.13 \pm 0.41\%$ 、 $0.85 \pm 0.59\%$ 、 $0.38 \pm 0.10$ であり、[100  $\mu$ g/kg]群で0.3~0.4%とわずかに高いほかは、いずれも0.1%以下であった。

なお、図には示していないが、EGF最終投与の14日後に犠牲死させた追加実験(各n=3)ではどの群も脾内肝細胞のLIは0.2~0.4%を示し、たがいに差はなくなっていた。

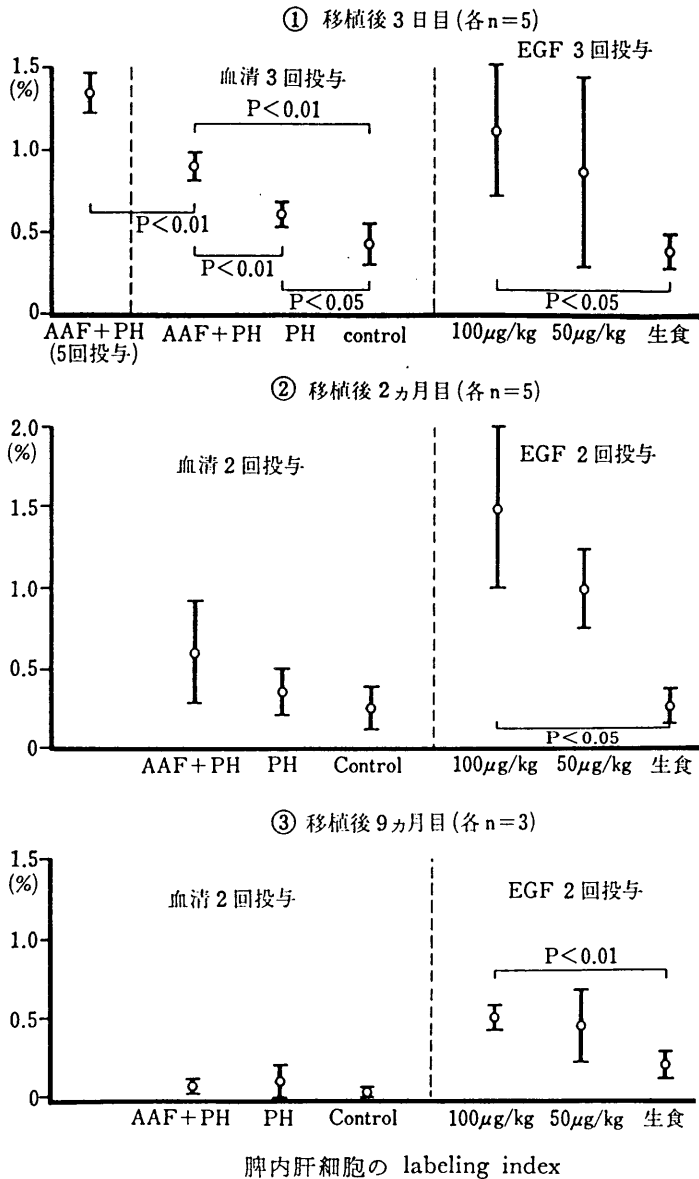


図 - 5

脾内肝細胞の labeling index

②. 移植後2ヵ月

血清2回投与後の脾内肝細胞のLIは、[AAAF+PH]群、PH群、コントロール群のそれぞれ $0.60 \pm 0.33\%$ 、 $0.38 \pm 0.17\%$ 、 $0.38 \pm 0.14\%$ であり、順に減少するものの有意差はなかった。

一方、EGF 2回投与後のLIは、[100  $\mu$ g/kg]群、[50  $\mu$ g/kg]群、生食群それぞれ $1.50 \pm 0.51\%$ 、 $1.00 \pm 0.29\%$ 、 $0.28 \pm 0.12\%$ であり、[100  $\mu$ g/kg]群と生食群の間に有意差を認めた。また、宿主肝のLIはいずれも0.1%以下であった。

### ③. 移植後9カ月

血清2回投与後の脾内肝細胞のLIは、[AAF+PH]群、PH群、コントロール群それぞれ $0.07 \pm 0.06\%$ 、 $0.10 \pm 0.10\%$ 、 $0.03 \pm 0.03\%$ であり、たがいに有意差はなかった。

一方、EGF 2回投与後のLIは[100  $\mu$ g/kg]群、[50  $\mu$ g/kg]群、生食群それぞれ $0.50 \pm 0.08\%$ 、 $0.45 \pm 0.24\%$ 、 $0.20 \pm 0.10\%$ であり、[100  $\mu$ g/kg]群と生食群の間に有意差を認めた。また、宿主肝のLIはいずれも0.1%以下であった。

以上①②③の結果より、移植直後の脾内肝細胞の増殖には肝切除後血清投与が有効であり、特に[AAF+PH]血清は効果が高いことが判明した。さらに、その総投与量が多いほどLIは高値を示した。しかし、移植後2カ月目の脾内肝細胞に対しては、体重当たりに換算した投与量が移植直後より少ないことに起因するためか、血清投与の効果は低下し、移植後9カ月目ではほとんど反応がみられなくなった。

一方、EGFの場合は、移植後どの時期においても投与量が多いほど脾内肝細胞の増殖を促進する傾向がみられた。しかし、移植後9カ月目の脾内肝細胞に対するEGF投与の効果は

低いものであった。さらに、移植後24カ月目にEGF  $100\mu\text{g}/\text{kg}$ を2回投与した追加実験 ( $n = 3$ ) ではLIが0.1%以下であったことより、移植後長期間経過すると、EGFに対する脾内肝細胞の増殖反応は消失すると考えられた。

#### 4) ゲル包埋肝細胞の検討

##### ①. 肝細胞の包括固定化法

Miura<sup>11)</sup>らの方法に準じ、2%アルギン酸ナトリウム溶液と等量の肝細胞浮遊液を20mlの注射筒内で混和し、25Gの注射針より0.1モルの塩化カルシウム溶液中に滴下し、包括固定化肝細胞のゲルビーズを得た。PBS(-)液で洗浄後使用した。肝細胞は、培養液に $2 \times 10^6$ 個/mlの濃度に分散し $1 \times 10^6$ 個/mlゲルの濃度に包括固定化した。なおゲル・ビーズの大きさは0.5~1.0mmであった(図-6)。

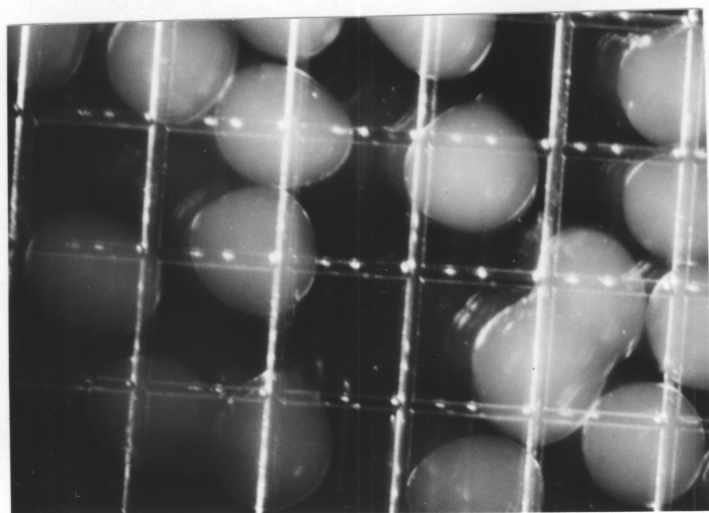


図 - 6

## ②. 包括固定化肝細胞の viability

フィコール処理後の肝細胞の viability は約 90% で、球形を示していた。ゲル・ビーズに固定化直後の viability は約 65% に低下していた。MEM と WE を基本培地とした群では、2, 4, 6 日目の viability はそれぞれ、約 60~65%、25~30%、5~10% であったが、HANKS では 30%、5%、5% 以下であった。viability は添加剤によるよりは、培地によって規制されていた (図 - 7)。

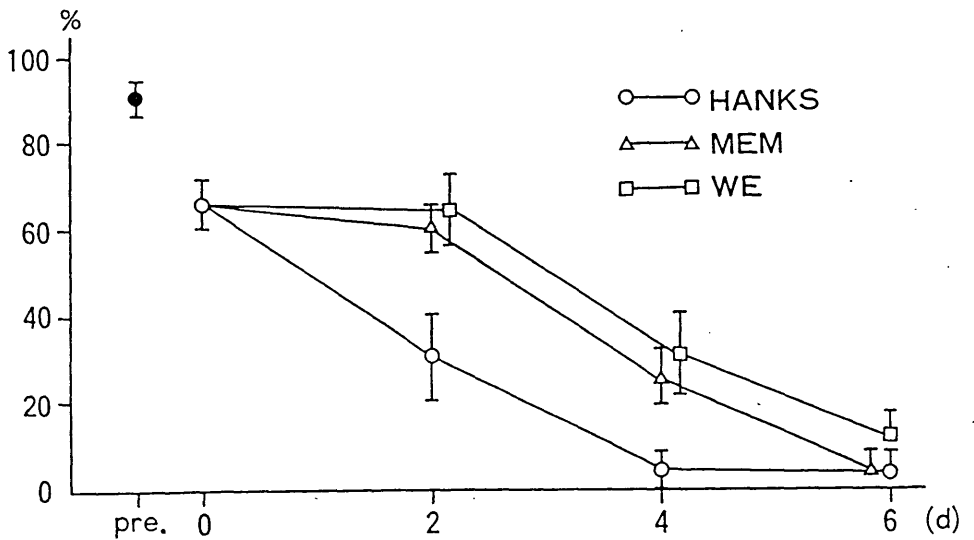


図 - 7

## ③. 包括固定化培地の検討

肝細胞を以下の培養液ならびに添加剤の条件で suspension とした。

ハンクス (HANKS)、イーグル MEM 培地 (MEM)、Williams E 培地 (WE) に、5% FCS、 $10^{-7}$  モル Insulin、

$10^{-5}$ モル Dexamethasone を添加した培養液をそれぞれ基本培地とした。これら基本培地に、 $10\text{ng/ml}$  h - E G F (アース製薬) と  $5\ \mu\text{g/ml}$  Fibronectin (岩城硝子) を、さらにこれらに  $0.5\text{mg/ml}$  DBcAMP (第一製薬) を、また、E G F と  $30\ \mu\text{g/ml}$  Proline と  $0.3\text{mg/ml}$  Glutamine を、それぞれ添加した群を作製した。

#### ④. 培養法と肝細胞機能の評価

$\phi 6\text{ cm}$  のプラスチック培養皿に、 $2 \times 10^6$  個の固定化ゲル・ビーズを入れ、前述の各条件培地を  $4\text{ ml}$  加えた。なお、それぞれに対応する肝細胞を  $\phi 6\text{ cm}$  のコラーゲンコーティング培養皿に培養し、ビーズと対比した。培養開始約 4 時間後、約 12 時間後、そして隔日に F C S を除いた各培養液に取り替えた。

各培養皿に  $0.12\text{mg}$  の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と  $7.2\text{mg}$  のフルクトースを負荷して培養 3 時間後のアンモニアとグルコース値を測定した。

アルブミン合成能は、培地中に分泌されたアルブミン量をビーズを用いた E I A サンドイッチ法<sup>20)</sup> により測定した。

T A T 活性<sup>21)</sup> は、Grannerらの方法により測定した。

肝細胞の蛋白量は、Lowry 法で測定した<sup>22)</sup>。なお、ゲル・ビーズは 5 倍量の 2% クエン酸中で溶解し遠沈して肝細胞とし、viability と蛋白量を測定した。

また光顕により、静置培養およびゲルビーズの肝細胞の形態を観察した。

## 2. 各種培地条件による代謝能

包括固定化肝細胞の viability が経日的に低下するところから、代謝能の比較検討には培養2日目の成績を用いた。

E G F と Fibronectin の添加の有無では、単層培養群においても、また、ゲル・ビーズ群においても、有意の差はみられなかった。アンモニア減少量とアルブミン分泌量は WE > MEM > HANKS の順で、グルコース増加量は HANKS が最も低く、TAT 活性はほぼ同様であった。アンモニア減少量とアルブミン分泌量は単層培養群の方がゲル・ビーズ群より良好であったが、グルコース増加量と TAT 活性はほぼ同様であった(表-1)。

		HANKS		MEM		WE	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
NH <sub>3</sub>	C	16.5	13.0	28.5	23.8	25.9	30.2
	B	3.0	3.2	6.4	5.2	12.1	11.5
Gl	C	0.10	0.10	0.32	0.22	0.22	0.3
	B	0.25	0.15	0.35	0.37	0.20	0.20
Alb	C	6.3	4.7	22.6	12.8	31.0	35.0
	B	5.0	3.4	12.5	7.2	22.2	28.7
TAT	C	15.4	15.4	11.3	11.9	13.9	13.1
	B	14.4	14.4	15.5	14.8	12.8	15.1

NH<sub>3</sub> : μg/mg. prot/3 h.

Gl : mg/mg. prot/3 h.

Alb : μg/mg. prot/d.

TAT : unit/mg. prot.

C: 単層培養群

B: ゲル・ビーズ群

表-1. h - E G F と Fibronectin 添加有無の代謝機能



E G F、Fibronectin に DBcAMP を添加した場合は、単層培養群、ゲル・ビーズ群ともにグルコース増加量が多い傾向を示した。その他は E G F・Fibronectin 群とほぼ同様であった（表 - 2）。

E G F、Proline、Glutamine の添加の効果を見ると、H A N K S、M E M 群において添加群の代謝能がやや良い傾向を示した。また、全体の代謝能は W E 群が最も良好であった（表 - 3）。

表-2. h-E G F、Fibronectin、DBcAMP 添加有無の代謝機能。

		HANKS		MEM		WE	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
NH <sub>3</sub>	C	8.5	12.0	37.0	37.0	30.0	27.4
	B	0.7	12.6	15.4	11.6	12.2	9.7
Gl	C	0.05	0.10	0.67	1.03	0.05	0.50
	B	0.07	0.30	0.80	0.20	0.08	0.26
Alb	C	2.6	1.3	34.9	23.0	44.7	34.4
	B	4.4	4.0	25.5	19.0	33.6	29.2
TAT	C	12.0	13.1	8.5	9.8	12.0	12.4
	B	10.7	7.5	7.6	11.7	12.5	9.3

NH<sub>3</sub>: μg/mg. prot/3h. Gl: mg. prot/3h. Alb: μg/mg. prot/d. TAT: unit/mg. prot. B: ゲルビーズ培養群、C: 静置培養群、(-) 無添加群、(+) 添加群

表-3. h-EGF、Proline、Glutamine 添加有無の代謝機能.

		HANKS		MEM		WE	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
NH <sub>3</sub>	C	6.7	6.6	3.2	8.6	8.4	3.7
	B	1.3	3.1	3.1	4.4	13.5	8.8
Gl	C	0.10	0.06	0.11	0.26	0.12	0.07
	B	0.01	0.03	0.03	0.05	0.10	0.04
Alb	C	2.7	4.1	17.0	18.8	72.1	70.3
	B	0.8	1.1	8.9	17.9	35.7	41.7
TAT	C	11.7	8.8	5.8	5.4	8.4	7.7
	B	7.0	9.4	6.1	6.6	4.3	4.0

NH<sub>3</sub>: μg/mg. prot/3h. Gl:mg. prot/3h. Alb: μg/mg. prot/d. TAT:unit/mg. prot. B:ゲルビーズ培養群、C:静置培養群、(-)無添加群、(+ )添加群

アンモニアの減少量に着目すると、単層培養群がゲル・ビーズ群より良好であり、また、単層培養群でも、Fibronectin 添加群がProline・Glutamin添加群より良好であった(表-4)。

アルブミンの分泌量に着目すると、やはり、単層培養群がゲル・ビーズ群より良好であり、培地ではHANKS群は著しく少なく、WE群が最も良好であった。しかしながら、明らかな添加剤の効果は認められなかった(表-5)。

TAT活性に着目すると、HANKS、MEM、WEと培地間に差は認められなかった。いずれの群も経日的にTAT活性は低くなっていくが、これは単層培養群よりゲル・ビーズ群でより明らかであった(表-6)。

表-4. アンモニア除去能の比較.

		HANKS		MEM		WE	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
EGF	C	16.5	13.0	28.5	23.8	25.9	30.2
Fibro	B	3.0	3.2	6.4	5.2	12.1	11.5
EGF	C	8.5	12.0	37.0	37.0	30.0	27.9
Fibro	B	0.7	12.6	15.4	11.6	12.2	9.7
cAMP							
EGF	C	6.7	6.6	3.2	8.6	8.4	3.7
Prol	B	1.3	3.1	3.1	4.4	13.5	8.8
Glut							

NH<sub>3</sub>:  $\mu\text{g}/\text{mg. prot}/3\text{h.}$  B:ゲルビーズ培養群、  
C:静置培養群、(-)無添加群、(+)  
添加群

表-5. アルブミン産生能の比較.

		HANKS		MEM		WE	
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
EGF	C	6.3	4.7	22.6	12.8	31.0	35.0
Fibro	B	5.0	3.4	12.5	7.2	22.2	28.7
EGF	C	2.6	1.3	34.9	23.0	44.7	34.4
Fibro	B	4.4	4.0	25.5	19.0	33.6	29.2
cAMP							
EGF	C	2.7	4.1	17.0	18.8	72.1	70.3
Prol	B	0.8	1.1	8.9	17.9	35.7	41.7
Glut							

Alb:  $\mu\text{g}/\text{mg. prot}/\text{d.}$  B:ゲルビーズ培養群、  
C:静置培養群、(-)無添加群、(+)  
添加群

表-6. TAT活性の比較.

day		HANKS	MEM	WE
2	C	10.5±4.4	7.5±3.6	10.3±2.9
	B	9.7±3.7	10.6±4.0	9.5±4.1
4	C	8.4±1.9	8.5±2.9	9.0±2.0
	B	9.8±1.6	6.6±2.6	5.7±2.0
6	C	6.9±2.8	7.8±5.2	8.4±3.2
	B	3.0±0.8	4.6±3.5	5.2±4.2

TAT:unit/mg.prot. B:ゲルビーズ培養群、  
 C:静置培養群、(-)無添加群、(+ )添加群

次に光顕による形態学的観察の成績をみると、単層培養においては、基本的な培養液による差が明らかに認められたが、ゲル・ビーズ化した群では、単層培養群ほどその差は明らかではないが、活性の高い細胞は辺縁がはっきりとしたきれいな円形をしていた(図-8)。

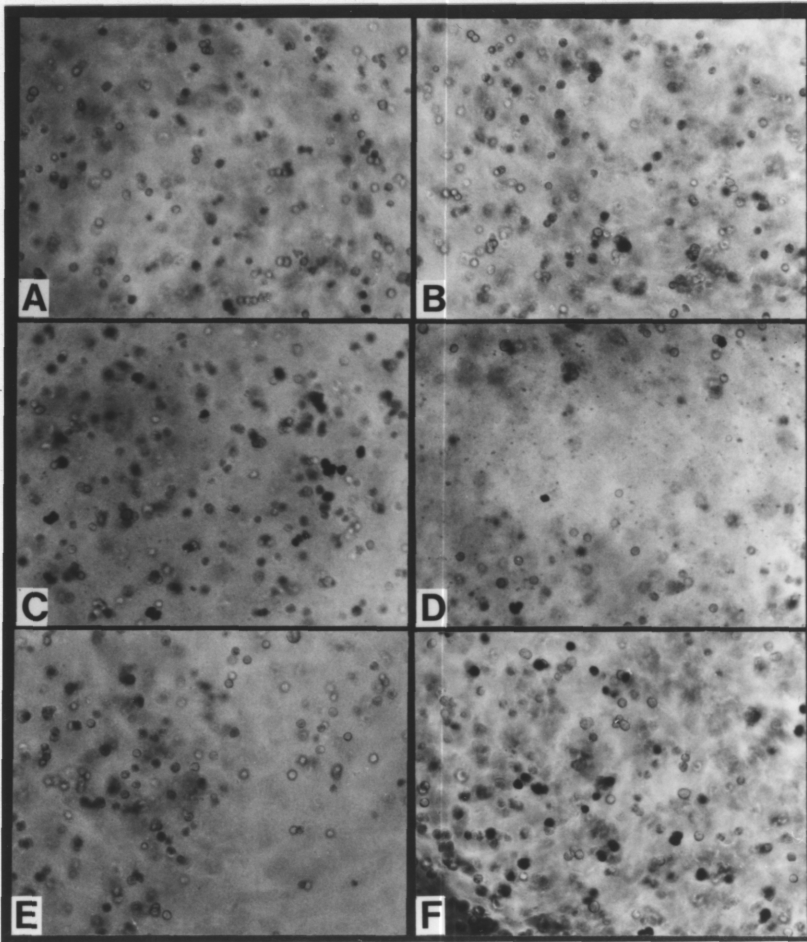


図 - 8 . ゲル・ビーズ肝細胞培養における基本培地 (A,B:ハックス  
C,D:MEM、E,F:WE)とh-EGF, Fibronectinの添加効果  
(B,D,F:添加群)

## 考察と今後の展望

回復不能となった臓器の機能不全を代行する手段として、人工臓器と臓器移植による方法がある。肝臓について云えば、ALSと肝移植であるが、残念ながら今日のALSの発展段階はまだ未熟である。現在ALSとして臨床に応用されている吸着剤血液灌流、大孔径膜血液透析・濾過、あるいは血漿交換などの劇症肝炎に対する治療成績をみると、活性炭のバイオニア Williams<sup>23)</sup>らは、コントロールスタディーでその有用性を確認するに至らず、PAN膜透析・濾過法のOpolonらも当初の成績を改善しえず、また、厚生省の劇症肝炎全国集計<sup>24)</sup>でもこれらの有用性が認められていない。ただし、昏睡からの覚醒率は、50~60%と有意に高率であるところから、肝不全起因物質の除去療法としては有用と思われる。覚醒が救命につながらない主な理由は、障害肝の再生が不十分である事、脳浮腫、腎不全などの合併症の発生などと云われている。臨床的に継続するには種々の障害があり、中止せざるを得なかった西独のヒト肝体外灌流は、23例中13例(約57%)の救命を得ており、また、近年積極的に行われている本症に対する肝移植は、救命率50~60%をあげている<sup>25)</sup>。これらの事は、ALSには、やはり生体肝のもつ metabolic pathway をも考慮した方法がよい事を示唆しよう。

さて、近年のバイオテクノロジーの進歩はめざましく、生理

活性物質を大量に獲得する為の bio-reactor も実用化されている。この bio-reactor の idea を肝の代謝機能補助装置に応用しようというのが hybrid artificial liver である。その為には、本来肝細胞が有する機能を長時間、良好な状態で、さらにはより機能的に grade up した状態を作り出す必要がある。

近年、ハイブリッド型人工肝を意図した代謝用モジュールの基礎実験が報告されてきている（表-7）。われわれも、以前、浮遊培養系に類似したモジュールを報告したが、機能的には、なお十分とは云いがたい。そこで今回は、肝細胞をアルギン酸 Ca ゲル内に包括固定化する場合の、細胞の高機能化という点から主に検討を加えた。

表 - 7 .

### ハイブリッド型人工肝の実験成績の現況

報告	方法	アルブミン(日)	ブドウ糖(日)	尿素(日)
(肝臓)	—	10g	180g	10g
葛西	浮遊系	—	140g	18g
"	ゲルビーズ	30 $\mu$ g/mg $\cdot$ prot	1mg/mg $\cdot$ prot	100 $\mu$ g/mg $\cdot$ prot
内野	単層系	1g	220g	5g
赤池	PVLA	90 $\mu$ g/mg $\cdot$ prot	—	—
柳	多孔質樹脂	13 $\mu$ g/ $\mu$ gDNA	—	—
小出	spheroid	40 $\mu$ g/mg $\cdot$ prot	—	100 $\mu$ g/mg $\cdot$ prot
佐藤	ポリウレタン	1g	—	84g
Tompkins	コラーゲン被覆	7 $\mu$ g/ $\mu$ gDNA	—	—

肝細胞の基本培地として、Eagle's MEMとこれを改良した Williams' Medium E (WE) を取りあげ、これに肝細胞の生存環境ならびに機能発現率を改善する目的で、h-EGF、Fibronectin、DBcAMP、Proline、Glutamineなどを添加し、これらの有用性を、負荷アンモニアの処理能、グルコースやアルブミンの産生能、TAT活性値などから、単層培養法と比較検討した。EGFおよびFibronectinは、肝細胞初代培養系において細胞間あるいは、細胞基質間の接着伸展を促進することにより機能維持に有用である事、DBcAMPは細胞内情報伝達物質として、蛋白合成系を促進させる事、ProlineおよびGlutamineなどのアミノ酸は、とくにコラーゲン合成や細胞膜傷害の修復に必須である事などの理由から選択された。

フィコール処理後の肝細胞のviabilityは約90%であるが、ゲル・ビーズとした後に、ゲルを2%クエン酸で溶解してviabilityを計算すると約65%に低下しており、その後培養期間とともにさらに低下を示した。WE > MEM > HANKSの順で良く、添加剤の効果よりはmediumに規制されていた。アンモニア除去能は、添加剤の有無で有意差はなく、MEM、WEが良好であり、このことは、アルブミンやグルコースの産生能、TAT活性値などでも同様であった。また、これらの代謝活性は、単層培養の方が良好な値を示しているが、これは、測定値を単層培養細胞やゲル・ビーズ内肝細胞の蛋白で除する事で基準化した事が大きな要因であり、DNA量で基準化した方が



より正しい値を示した可能性がある。それにしても、アルブミンの産生量をみれば、ゲル・ビーズの場合でも諸家の報告とほぼ同様の値を示しており、単層培養よりはゲル・ビーズ培養の方がシステム化の点で有利である事を考えれば、期待される方法のひとつといえよう。

今回、ゲル・ビーズ内の培地に、各種の添加剤を加えたにもかかわらず、それらの効果が期待された程ではなかった理由は明らかではないが、単層培養における形態観察では、いずれのmediumの場合も、添加剤を加えた方が若干良好であり、とくにHANKSの様なpoorなmediumで明らかであった点は、今後の添加剤を追求していく上で興味深い点である。

一方、脾内肝細胞移植実験より、移植肝細胞も、外因性の再生刺激によりhostの肝と同様の挙動を示すことが明らかとなり、それは生体のホメオスターシスの範囲内においての変動であることが推定された。ホストの肝臓自体には障害を加えていないので、移植肝細胞が勝手に分裂増殖しない事は、極めて興味あるところである。肝硬変の様な機能障害下では、どのような態度を示すか、今後検討を加える必要があるだろう。また、ゲル・ビーズ化肝細胞を移植することにより、生体の免疫機序に基づく、移植肝細胞への攻撃をかわす事も期待でき、体外モジュールのみならず、生体内移植への可能性も期待できるものと思われる。