

---

Biomimetic Hybrid Artificial  
Liver の研究

---

( 6 3 5 7 0 5 8 5 )

平成元年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成2年3月

研究代表者 葛西眞一

（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

肝臓は、生命維持に必要な物質の代謝産生と、生体に不要な、あるいは中毒性を示す物質の代謝除去といった、極めて複雑な機能を有する臓器である。前者は代謝機能、後者は解毒機能と呼ばれることもある。このような重要な機能を示す肝臓が、その機能を何らかの理由で失った場合には、意識障害を示しつつ肝不全の状態に陥る。ウイルスや薬物、あるいは外科手術や外傷による肝臓の阻血などによって、急激かつ広範な肝細胞障害による場合を急性肝不全、肝硬変のような、慢性進行性に経過する肝機能障害の末期にみられる場合を慢性肝不全という。ウイルス性肝炎や薬物性肝炎などの、急性肝炎に引き続く激烈なタイプは、とくに劇症肝炎として注目されている。

一方、近年、医学ならびに医療をサポートする周辺技術の飛躍的進歩にともない、従来であれば、ほぼ救命不能な症例でも、積極的な方法により回復させうる事が可能となってきた。その治療法のひとつとして、代用臓器による臓器機能置換療法がある。これには、重篤な機能不全に陥った臓器の機能を、他人の臓器と取りかえる臓

器移植と、人工的に開発された人工臓器による方法がある。この臓器移植と人工臓器は、お互いの欠点を補完しあう格好で進められてきた。今日最も進歩しているのは、腎臓移植と人工腎臓であろう。人工腎臓は生体の腎臓を完全に代用できるわけではないが、それだけである期間十分に生命を維持させることが可能であり、腎臓移植が行なわれるまで、あるいは移植後の機能不全を、十分にサポートすることができる。このような関係を肝臓の領域で成し得るかといえば、答えは残念ながら否である。それは、複雑な肝臓の機能を十分に代行しうる、いわゆる人工肝臓がいまだ開発されていないためである。今日、肝臓の機能を補助する目的で臨床に用いられている方法には、活性炭やイオン交換樹脂などの吸着剤を用いた血液灌流法、中分子量物質をも透析できるポリアクリロニトリル膜（PAN膜）による血液透析、患者の血漿と健康人の血漿を交換する血漿交換、動物（ヒヒ、ブタなど）の肝臓を用いる体外肝灌流などがある。これらの治療成績を、主な研究施設の発表でみると、劇症肝炎を対象としたものであるが、救命率は血液灌流で約20%、血液透析で20%前後、血漿交換で30%、体外肝灌流でも30%強といったところである。治療成績が向上しない理由として、これらの方法は、前述した肝臓の機能のうち、解毒機能の一部を補助しているに過ぎないためであろうと考えられている。従って、治療成績をあげるに

は、肝臓のもうひとつの主な機能である、代謝機能をも補助し、かつ、細胞の壊死の進行を防ぎ、再生を促進させる方法をも備えた、トータルとしての肝機能補助法の開発が必要であろうということが指摘されている。

このようなことから、人工肝臓も、代謝機能と解毒機能の両方を備えたシステムとして開発しようとの研究が進められている。前述の如く、解毒機能の補助としては、人工的に作られた吸着剤や膜を用いて可能であろうが、代謝機能を補助するには生体が持っている酵素系を利用する他に方法がない。そこで、全体のシステムとしては、人工物と生体材料との複合物となるものと考えらる。前者のみを非生物学的人工肝臓、後者のみを生物学的人工肝臓と呼んで研究が進められてきたが、この両者の複合物としてのシステムは、ハイブリッド型（混成型）人工肝臓と、今日では呼ばれている。

さて、このハイブリッド型人工肝臓の開発要素のなかで、最も重要でかつ難しいのは、生物材料の機能をいかに長期間、良好な状態で維持させるかという点であり、生物材料のための環境を人工材料でどこまで作りあげられるかということであろう。生物材料としては、肝スライスや組織、細胞、酵素などが用いられてきたが、われわれは、扱い易さ、保存性、装置への組み込み易さ、機能の長期維持などの観点から、遊離肝細胞が有利と考え研究を進めている。



この遊離肝細胞を代謝のリアクターとするモジュールを、細胞のいわば浮遊培養系類似の方法で作製し、代謝システムを試作した。このシステムで、負荷アンモニアの尿素への合成能、負荷フルクトースのグルコースへの合成能などをスピナーフラスコ試験で確認した後、ガラクトサミン肝不全犬との灌流実験を行ない、動物の生存時間の延長に成功した。しかしながら、その機能の維持時間は、せいぜい10時間程度であり、浮遊系の限界と考えられた。そこで本研究では、この生体材料の機能を組織あるいは臓器としての再構築という点からとらえ、biomimetic（生体模倣的）な方向から検討することを目的とした。

## 2) 研究組織

研究代表者：葛西眞一（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：山本 哲（旭川医科大学医学部助手）

研究分担者：柿坂明俊（旭川医科大学医学部助手）

## 3) 研究経費

昭和63年度 1,300千円

平成元年度 700千円

計 2,000千円

## 4) 研究発表

### ア. 学会誌等

①. 葛西眞一，大江成博，柿坂明俊，山本 哲，水戸廸郎：

Hybrid Artificial Liver の研究－代謝補助モジュール用接着  
基質の検討－. 人工臓器 18:1257,1989.

②. 山本 哲，葛西眞一，柿坂明俊，大江成博，水戸廸郎：

Lipophilic Membrane による脂溶性肝不全物質除去システムの  
検討. 人工肝臓 18:1278,1989.

- ③. 葛西眞一, 山本 哲, 水戸廻郎: 肝不全. 総合臨床  
38:1855,1989.
- ④. 葛西眞一: 人工肝臓と移植. 人工肝臓 18:1474,1989.
- ⑤. Yamamoto T., Trikas D. & Brunner G :Enzymatic detoxifi-  
cation using lipophilic hollow fiber membranes. III.  
Oxidation reactions of sulfides. Artificial Organs  
13:103,1989.
- ⑥. 葛西眞一, 山本 哲, 稲垣光裕, 柿坂明俊, 大江成博,  
水戸廻郎: Hybrid Artificial Liver の研究 - 遊離肝細胞の大  
量自動マイクロカプセル化装置の開発に関する研究.  
人工臓器 投稿中.
- ⑦. 山本 哲, 葛西眞一, 柿坂明俊, 大江成博, 水戸廻郎: 被包遊  
離肝細胞による脂溶性肝不全物質除去システムの検討.  
人工臓器 投稿中.

イ. 口頭発表

- ①. 葛西眞一, 大江成博, 柿坂明俊, 山本 哲, 水戸廻郎:

Hybrid Artificial Liver の研究－代謝補助モジュール用接着  
基質の検討－. 第26回日本人工臓器学会 1988年9月8日

②. 山本 哲, 葛西眞一, 柿坂明俊, 大江成博, 水戸廸郎:

Lipophilic Membrane による脂溶性肝不全物質除去システムの  
検討. 第26回日本人工臓器学会 1988年9月8日

③. 葛西眞一, 山本 哲, 稲垣光裕, 柿坂明俊, 大江成博,

水戸廸郎: Hybrid Artificial Liver の研究－遊離肝細胞の大  
量自動マイクロカプセル化装置の開発に関する研究. 第27回  
日本人工臓器学会 1989年9月29日

④. 山本 哲, 葛西眞一, 柿坂明俊, 大江成博, 水戸廸郎:

被包遊離肝細胞による脂溶性肝不全物質除去システムの検討.  
第27回日本人工臓器学会 1989年9月29日

⑤. Kasai S., Yamamoto T., Kakisaka A, Ohe N., Mito M. :

Basic research on a metabolic support device for a  
hybrid artificial liver. 第7回国際人工臓器学会  
1989年10月2日

⑥. Yamamoto T., Kasai S., Kakisaka A., Ohe N., Mito M. :

A new hepatocyte preparation for metabolic assist device  
on artificial liver support. 第7回国際人工臓器学会  
1989年10月2日

ウ．出版物

- ①．水戸廻郎，葛西眞一：代用臓器による Organ Support  
－人工肝－． 日本外科学会 1988年4月
- ②．水戸廻郎，葛西眞一：人工臓器－人工肝臓－．  
日本人工臓器学会 1988年7月
- ③．葛西眞一，水戸廻郎：医工学治療－人工肝臓の現況と問題点－  
医工学治療研究会発表記念講演会誌 1989年2月

## II. 研究成果

### 1) 遊離肝細胞の採取法について

肝細胞は、ウィ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、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。

### 2) 静置培養法による各種細胞接着基質の検討

肝細胞は本来基質に接着してその機能を発現する細胞である。そこで、代謝補助モジュール作製のために有利な接着基質を検討した。生体組織由来の天然基質としては、コラーゲン (Cell matrix: 新田ゼラチン)、フィブロネクチン、ビトロネクチン、バイオマトリックス (犬の肝臓より Rojkindらの方法により調整されたもの) などを、合成基質としては、プラスチック培養皿、ラクトースを側鎖に有するポリスチレン誘導体 (P V L A : 長瀬産業)、架橋デキ



ストランにブタ表皮の I 型変性コラーゲンをビーズ状微粒子担体にコーティングしてある Cytodex 3 (ファルマシア) などを用いた。天然基質はプラスチック培養皿に、常法に従ってコーティングし、洗浄後肝細胞を培養した。培養後経時的にアンモニア、尿素窒素、グルコース濃度を測定した。合成基質も同様の操作を行なった。

図 - 1 は、天然基質の培養 24 時間目の光顕像である。コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンとも、良好な肝細胞の接着扁平化を示した。バイオマトリックスは、接着は良好であるが前者ほど扁平化は示さなかった。図 - 2 は、合成基質の、同様に 24 時間培養の光顕像である。P V L A の場合は、細胞は接着するが扁平化を示さない。Cytodex 3 の表面には、少し扁平化した細胞が接着している。図 - 3 は、バイオマトリックスと P V L A をコーティングした場合の代謝能であるが、負荷されたアンモニアは 3 時間で約 50% に低下し、尿素およびグルコースの濃度は軽度上昇を示したが、いずれも有意の差は認められなかった。図 - 4, 5 は、バイオマトリックスの代謝能を 17 時間にわたって観察したものであるが、コントロールに比し、いずれも良好な機能を維持している様子がうかがえた。

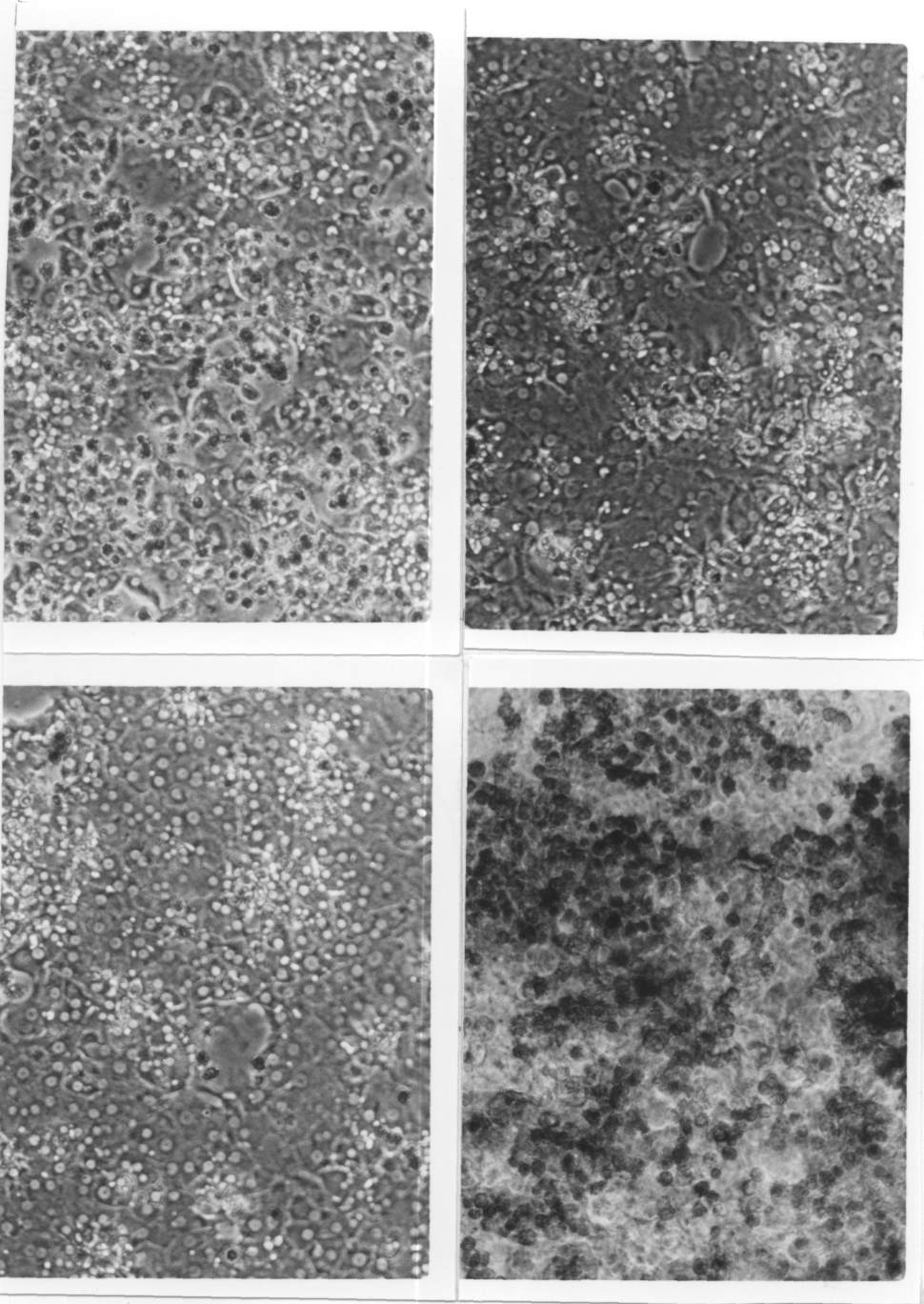


図-1. 天然基質の培養 (左上: コラーゲン. 右上: フィブロネクチン. 左下: ビトロネクチン. 右下: バイオマトリックス)

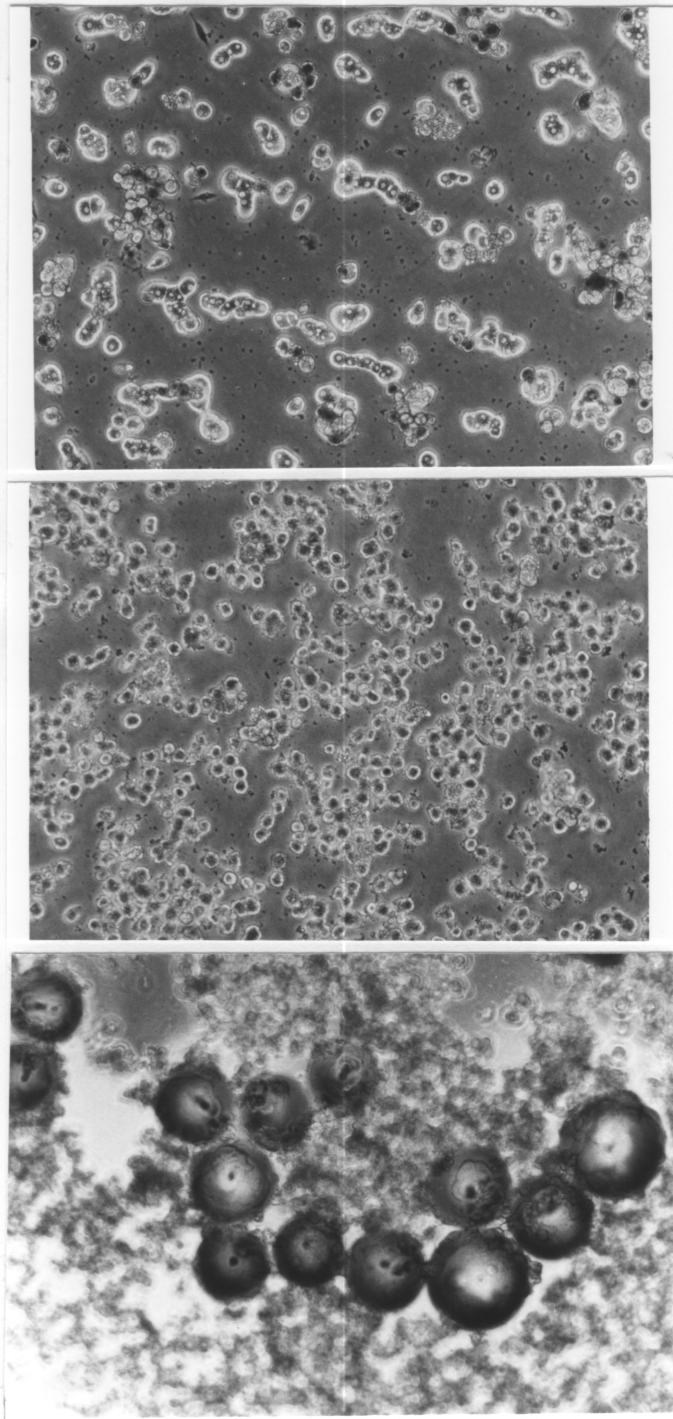


図 - 2 . 合成基質の培養 ( 上 : プラスチック培養皿 , 中 : P V L A  
 , 下 : Cytodex 3 )

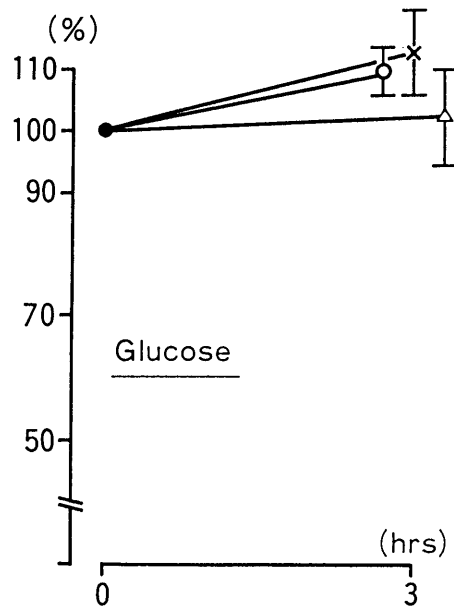
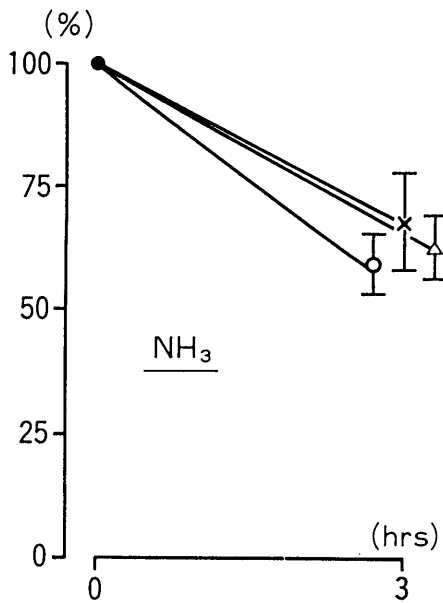
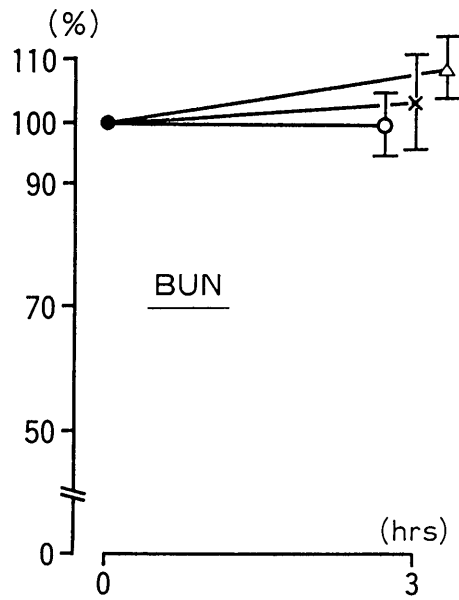
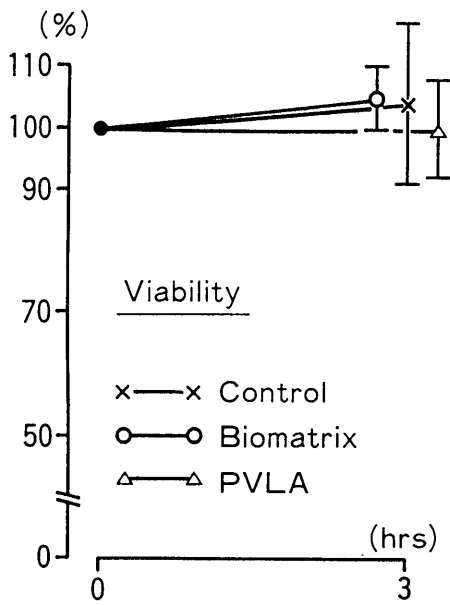


図 - 3 . 静置培養における基質の代謝能

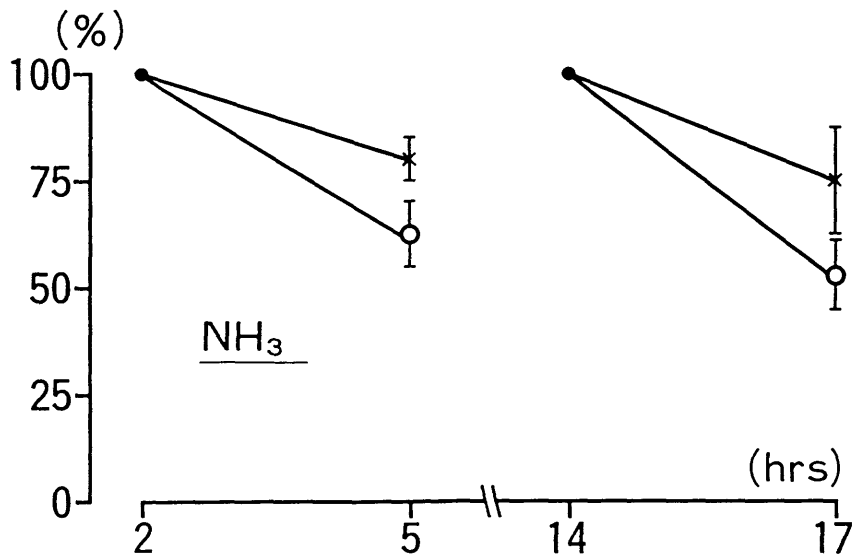
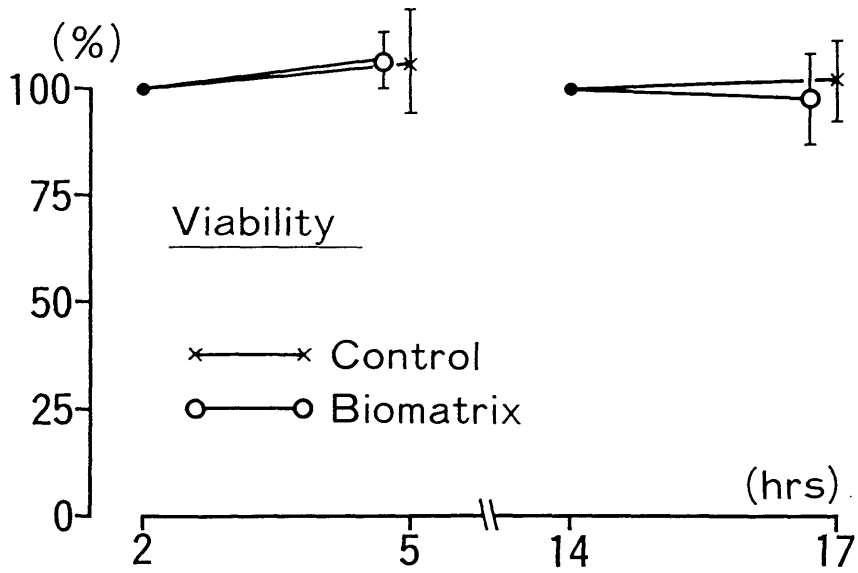


図 - 4 . バイオマトリックスの代謝能

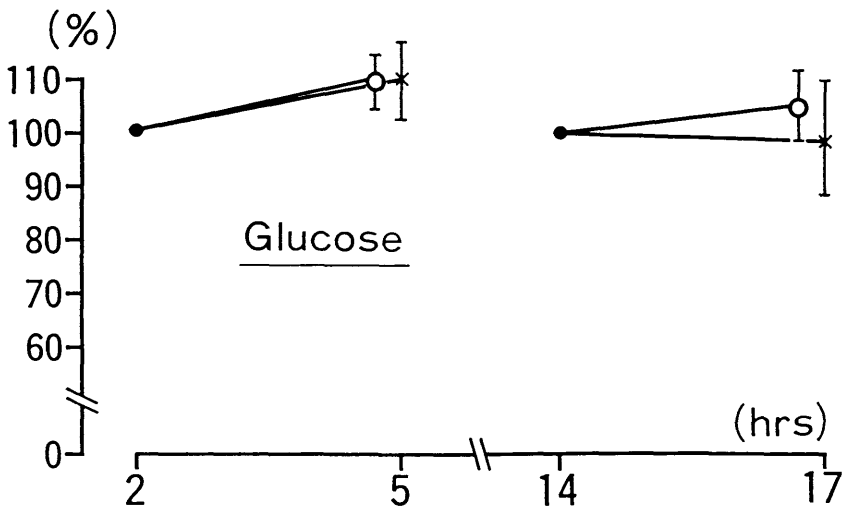
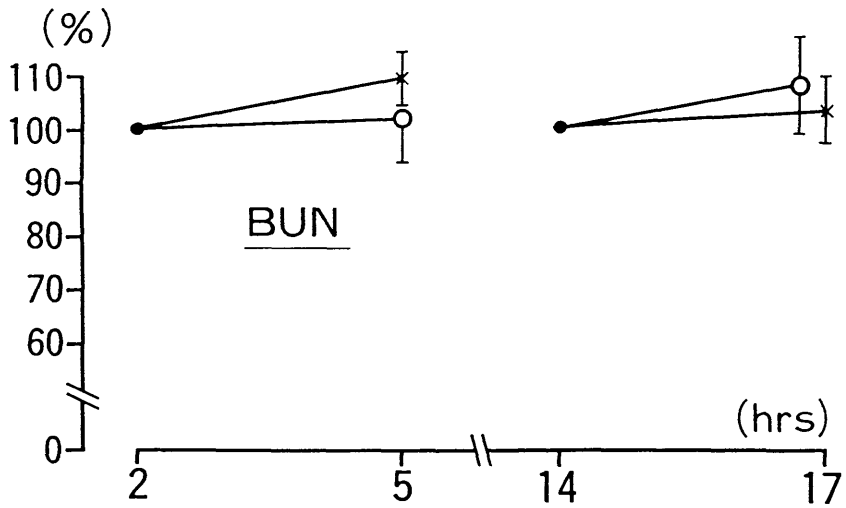


図 - 5 . バイオマトリックスの代謝能



### 3) 浮遊培養法による接着基質の検討

スピナーフラスコに肝細胞を浮遊培養し、バイオマトリックス、Cytodex 3 および P V L A コーティング Cytodex 3 を加え静かに攪拌し、2 時間静置したあと 6 時間静かに攪拌してからアンモニア、フルクトースを負荷して、経時的に代謝能を測定した。これは、浮遊培養系モジュールへの応用を意図したものである。表 - 1 は、Cytodex、Cytodex + P V L A、バイオマトリックスの 3 時間培養後における成績である。アンモニアはいずれもコントロールより良好に除去され、尿素窒素とグルコースの軽度上昇が認められた。図 - 6, 7 は、バイオマトリックスと Cytodex について 19 時間まで観察したものであるが、アンモニアの代謝除去能と肝細胞のエネルギーチャージの維持能は、これらの基質を用いた場合の方がコントロールより良好な値を示していた。尿素窒素とグルコースの変化は有意ではなかった。

	NH <sub>3</sub> (%)		BUN (%)		Glucose (%)	
	1 hrs	3 hrs	1 hrs	3 hrs	1 hrs	3 hrs
Control	51± 5	43± 7	106±16	110±10	107± 8	115±15
Cytodex	60±13	33± 5	109± 5	110± 5	106± 2	112± 3
Cytodex + PVLA	60± 7	31± 4	104± 7	110± 8	101± 5	129± 7
Biomatrix	47±10	35±11	100± 6	105±10	102± 4	110± 8

表 - 1 . 浮遊培養系による検討

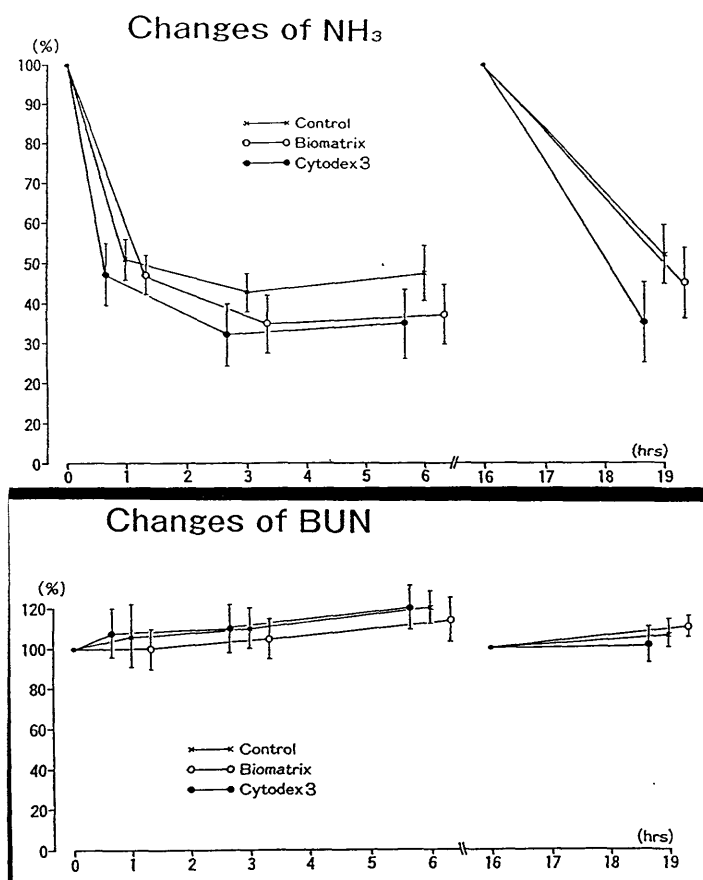


図 - 6 . 浮遊培養系の検討

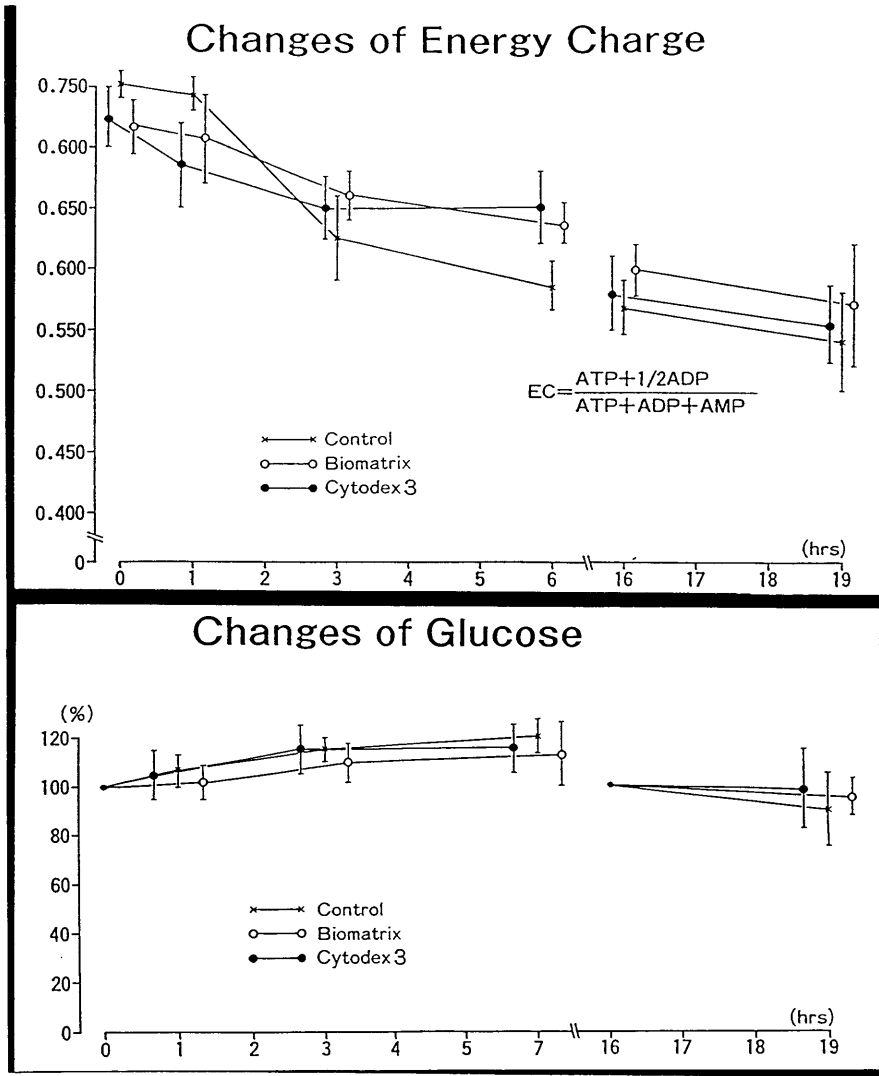


図 - 7 . 浮遊培養系の検討

#### 4) 中空糸膜への基質コーティング

中空糸膜モジュールを想定した場合、その表面へ効果的に細胞が接着するよう、基質のコーティングの有用性を検討した。静置培養ではエチレンビニールアルコール膜、ポリビニールアルコール膜、ポリスルホン膜にコラーゲンをコーティングして顕微鏡ならびに電顕で細胞接着の状態を観察した(図-8)。いずれもコラーゲンをコートしない場合よりも良好な細胞の接着状態を示したが、全体に接着する程ではなかった。次に、エチレンビニールアルコール中空糸膜モジュールの糸の外側にP V L Aあるいはコラーゲンをコーティングし、細胞を封入して、灌流実験を行ない、灌流液にアンモニアとフルクトースを負荷して、その代謝能を検討した(図-9)。灌流5時間目ではアンモニアは30~40%の低下、尿素窒素、グルコースは10~20%の増加を示していたが、いずれも有意の差は認められなかった。

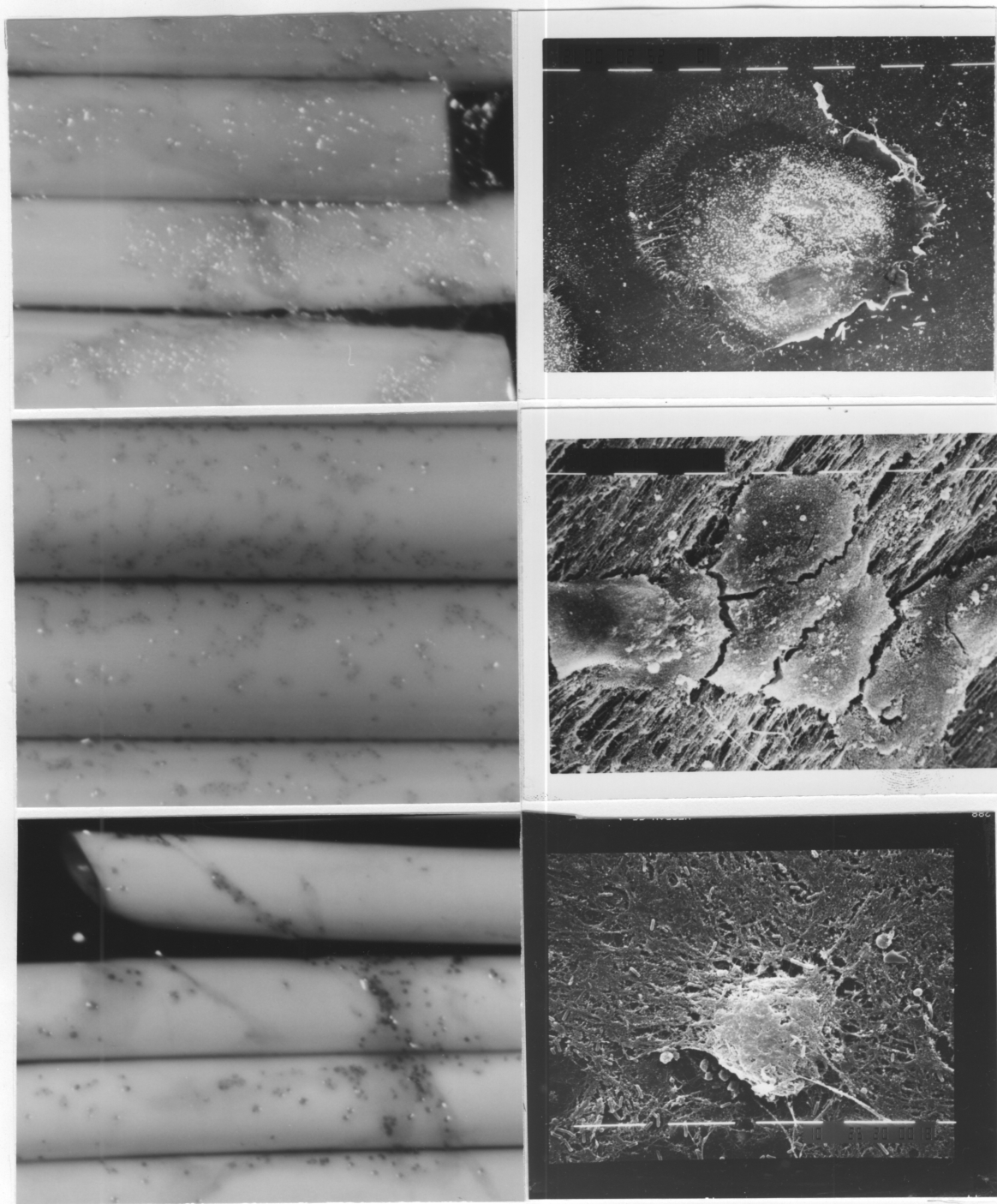


図 - 8 . コラーゲンコーティング中空糸膜への細胞接着  
 上 : エチレンビニールアルコール膜 , 中 : ポリビニール  
 アルコール膜 , 下 : ポリスルホン膜 , 左側は光顕像で右側  
 は走査電顕像

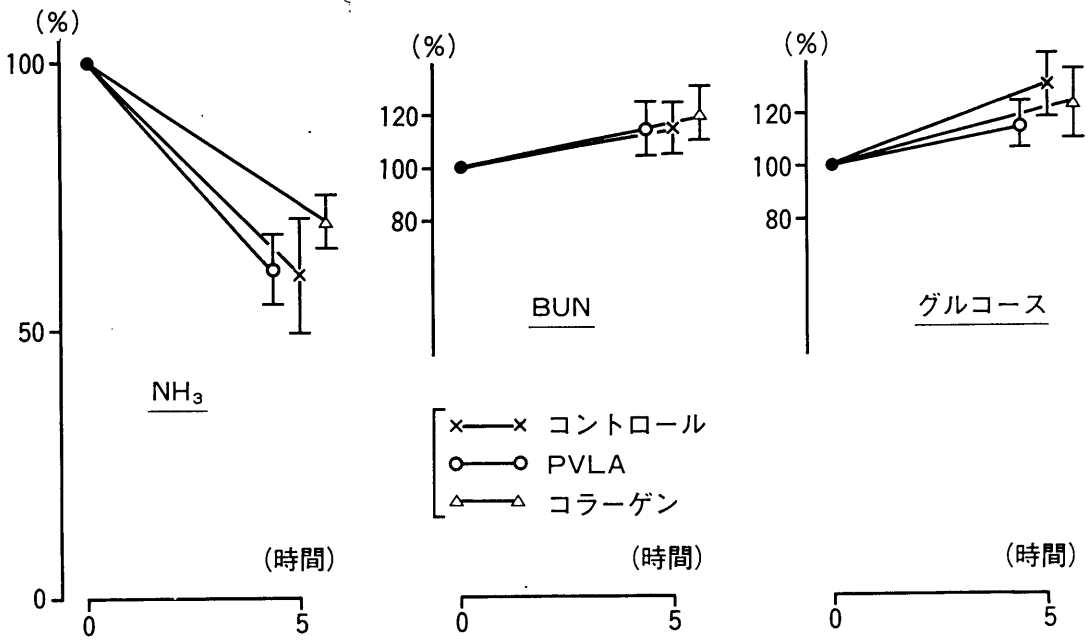


図 - 9 . 基質をコーティングしたエチレンビニールアルコール  
中空糸膜モジュールの代謝能



## 5) アルギン酸カルシウムゲルビーズの検討

肝細胞を接着基質に固定、接着させる方法と趣を異にするが、細胞が直接浮遊状態で培養されると、物理的なストレスによる膜障害が生じるところから、何らかの物質あるいは膜で保護したらどうかとの研究が進められている。この固定化肝細胞の概念は古くより検討されており、寒天アガロース、コラーゲンなどのゲル、フィブリンのり、あるいは合成高分子膜などの報告がみられる。アルギン酸カルシウムゲルは、比較的近年になって研究され、睥ラ氏島に初め用いられた。われわれもこのゲルが肝細胞の固定化に有用か否かを検討した。この場合重要なことは、ゲルの強度を必要にして最小限にし、物質移動能を低下させないことである。アルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムの濃度を 0.5～1.5%、0.05～1.0モルまで変化させて直径約 1 mmの球状のゲルビーズを作製し、物理的振盪による強度試験と、静置培養法による代謝能試験を行なった。図-10は、約100RPMの回転振盪テスト5日目のゲルビーズの状態である。この成績から、アルギン酸ナトリウム濃度が最終1%以上、塩化カルシウムのそれは 0.25モル以上あれば良いことが判明した。濃度が薄いと、ゲルは振盪に耐えられず破壊された。濃すぎると、極めて固く丈夫であるが、細胞にとって良くない条件となった。表-2

に、培養液にアンモニアとフルクトースを負荷してその濃度を測定

したところ、アンモニアの代謝除去能は、むしろ向上しているといった成績であり、このゲルビーズ状肝細胞も、代謝補助モジュール用リアクターとして有用と判定された。

図-10. アルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムの各濃度におけるゲルの強度試験-振盪5日目のもの

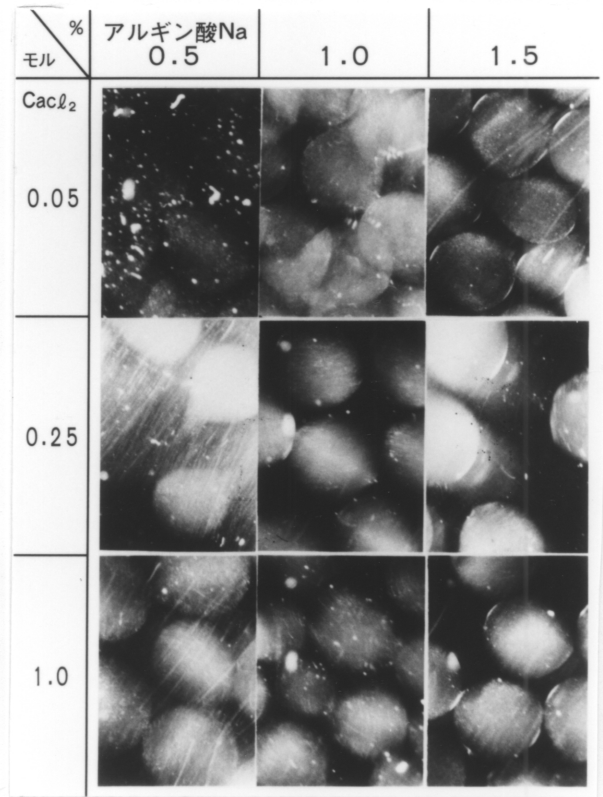


表-2. ゲルビーズ肝細胞の代謝能テスト

		0-3 時間	14-17 時間
Viab.	Cell	104 ± 13%	101 ± 5%
	ビーズ	105 ± 4%	92 ± 7%
NH <sub>3</sub>	Cell	88 ± 2%	75 ± 24%
	ビーズ	58 ± 5%	51 ± 5%
Urea	Cell	110 ± 3%	103 ± 7%
	ビーズ	100 ± 5%	109 ± 10%
Gl	Cell	110 ± 7%	94 ± 19%
	ビーズ	110 ± 4%	105 ± 6%

次にわれわれは、西独ハノーバー大学のブルンナー教授と、lipophilic hollow fiber membraneを用いた、血中脂溶性物質の効果的な除去法について研究を進めている。これは、肝障害時の中毒性物質のあるものは脂溶性であるところから、親脂性膜を用いてこの脂溶性物質を除去しようとするものである。透析側に、この脂溶性物質を代謝除去するリアクターとして、肝細胞のゲルビーズを用いようとのアイディアである。図-11にその概略図を示すが、ゲル化肝細胞側は閉鎖回路としている。このシステムで phenol を負荷し、これが肝細胞ゲルビーズによって phenylglucuronide に代謝解毒される過程を図-12に示す。明らかに、リアクター側に phenol が透過して、phenylglucuronide に変換されることがわかる。この効率については更に詳細な検討を要するが、有用な方法のひとつと考えられる。

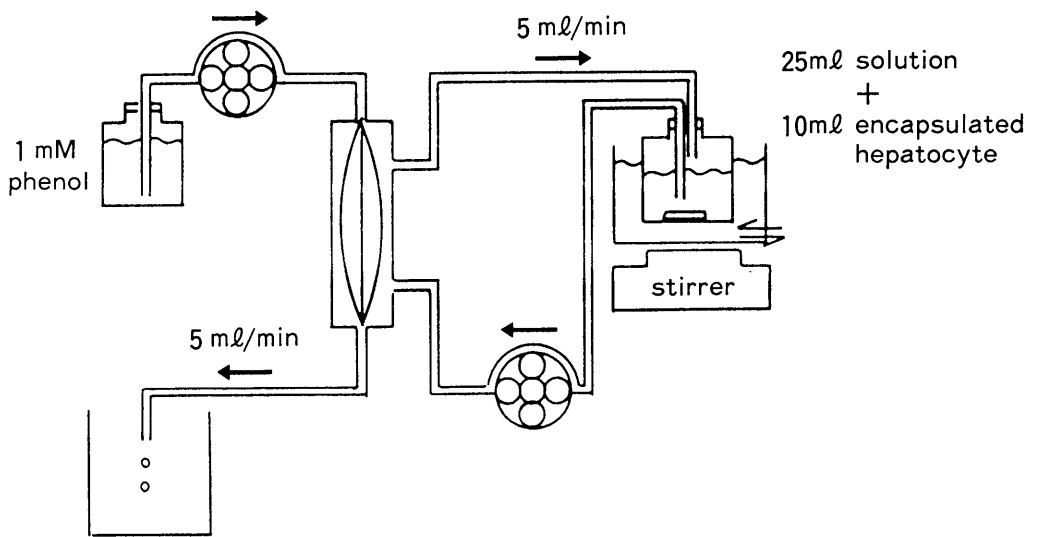


図 - 1 1 . lipophilic hollow fiber membrane と 肝細胞ゲルビーズ  
をリアクターとしたシステム

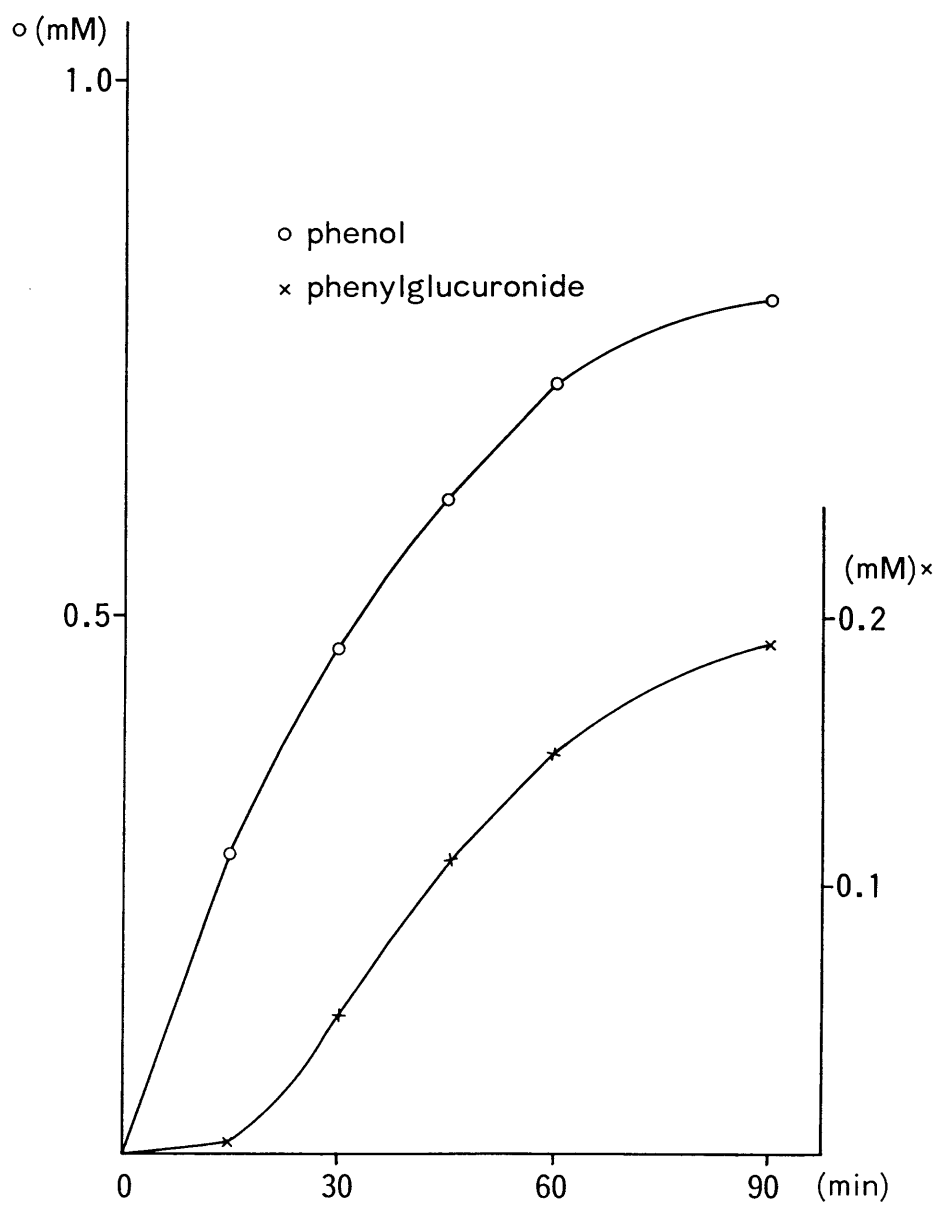


図 - 1 2 . リアクターにより phenol が phenylglucuronide に変化

### III. 考察と今後の展望

ハイブリッド型人工肝臓の重点項目として、生物材料側には材料の確保と保存の問題、機能の高度発現のための条件設定とその方法、免疫学的な相互の反応の問題などがあり、人工材料側には、細胞の高密度培養、高機能化を可能とする材料の開発、良好な物質移動を可とし、かつ免疫学的攻撃から細胞を遮断する材料の開発などの問題があり、そして、さらに材料-細胞の機能的 interrelationship を明らかにする必要がある。これらの観点から、本研究で検討した biomimetic な材料は、いずれもある程度の有効性を示したものと考えられ、モジュールとして、どのような方法として発展させていけるかについては、今回は明らかにし得ず、今後の課題である。

また、細胞の高機能化に関する将来展望として、今日明らかになりつつあるヒト遺伝子を細胞融合あるいは遺伝子操作により、ハイブリッド型人工肝臓用の機能を有する細胞を開発することにより、肝細胞の限界を乗り越えるという方法が可能となるかもしれない。さらに、細胞機能の活性を増強させる物質の補充も、今後検討を要する問題であろう。