

体内外における肝機能補助の基礎ならびに臨床的研究

(58440050)

昭和59年度科学研究費補助金(一般研究A)研究成果報告書

昭和60年3月

研究代表者 水戸 廸郎

(旭川医科大学医学部.教授)

は し が き

良性の肝臓疾患で肝臓機能が不全となって死亡する例は、本邦では急性型約 8,000 例、慢性型では約 15,000 例に達する。しかしながら、現時点では肝機能の一部を補助する治療法はあっても、肝の主要機能である物質代謝を補助し治療する適確な方法がなく、予後は極めて悪い。そこで申請者は、第一には肝硬変症などの慢性型に対して、病変の一部から健常肝細胞を遊離しこれを脾内に移植し、いわゆる第 2 の肝臓を形成して体内における肝機能代償補助の臨床応用を意図し、第二には劇症肝炎や術後急性肝不全に対し、異種肝細胞の物質代謝能力を利用し、高分子膜を介し代謝補助を行なう hybrid 型肝機能補助装置の完成を目的として本研究を行なった。

研究組織

研究代表者： 水 戸 勉 郎 (旭川医科大学医学部, 教授)
研究分担者： 江 端 英 隆 (旭川医科大学医学部, 助教授)
葛 西 眞 一 (旭川医科大学医学部附属病院, 講師)
草 野 満 夫 (旭川医科大学医学部附属病院, 講師)
林 宏 一 (旭川医科大学医学部, 助手)

研究経費

昭和 58 年度	3,800 千円
昭和 59 年度	3,800 千円
計	7,600 千円

研究発表

(1)学会誌等

1. 水戸勲郎, 葛西眞一: 人工肝機能補助. 人工臓器 12巻3号、1983.
2. 関口定美, 葛西眞一, 水戸勲郎: 細胞, 組織, 臓器の凍結保存; 肝. 低温医学 p. 243、1983.
3. 水戸勲郎, 浅川全一, 草野満夫: 切除不能肝癌の肝動脈結紮と側副血行路. 消化器外科 6巻1号、1983.
4. 水戸勲郎, 草野満夫, 河野 透: 硬変肝細胞生体内培養実験からみた硬変肝細胞の特性. 最新医学 38巻6号、1983.
5. 江端英隆, 水戸勲郎: 肝細胞移植の現況とこのモデルの応用. 外科 45巻7号、1983.
6. 水戸勲郎, 草野満夫: 肝の再生増殖, 遊離肝細胞の移植. 肝臓 一機能と病態一 p. 357、1982.
7. 水戸勲郎, 小沢和恵: 代用肝による肝の機能補助とその将来. 医学のあゆみ 125巻4c、1983.
8. 水戸勲郎, 葛西眞一: 人工肝の現況と将来. ICUとCCU 7巻10号、1983.
9. 沢 雅之, 葛西眞一, 水戸勲郎, 他: 胎児肝の凍結保存とその影響に関する研究. 肝臓 25巻Suppl., 1984.
10. 草野満夫, 河野 透, 江端英隆, 水戸勲郎: 脾内再構築肝組織類洞構造の形態と機能について. 肝臓 25巻Suppl., 1984.
11. 水戸勲郎, 草野満夫: 長期凍結保存肝細胞の脾内移植. 外科治療 51巻1号、1984.

12. 水戸廸郎, 草野満夫: 臓器保存法の進歩. 消化器外科 7巻13号、1984.
13. 葛西眞一, 水戸廸郎: 人工肝臓. 外科診療 26巻1号、1984.

(2)口頭発表

1. 葛西眞一, 浅川全一, 水戸廸郎, 他: Hybrid artificial liver の研究 一凍結保存遊離肝細胞を利用した代謝補助装置の開発とその問題点一. 第21回日本人工臓器学会、昭和58年9月14日.
2. Kasai S., Oikawa I., Mito M., et al.: Evaluation of artificial liver support device using isolated hepatocytes. 第4回国際人工臓器学会、昭和58年11月14日.
3. 葛西眞一, 浅川全一, 水戸廸郎, 他: Hybrid artificial liver の研究 一代謝補助モジュール用分離膜の検討一. 第22回日本人工臓器学会、昭和59年11月9日.
4. Mito M., Kusano M., Ebata H., et al.: The competitive effect of the host liver on a hepatized spleen in rats with portacaval shunt and hepatectomy. 6th Tripartite Meeting. Boston, Feb. 9, 1985.

(3)出版物

1. 水戸廸郎, 葛西眞一: 人工臓器 一機能代行の現況と将来一. 南江堂、昭和58年9月10日.
2. 水戸廸郎: 肝再生. 関東肝臓集談会、昭和59年10月1日.

研究成果

I. 体内肝機能補助の基礎的研究

1. 遊離肝細胞脾内移植によって再構築された肝組織の増量法の検討.

肝細胞脾内移植1カ年後には、脾内肝組織は肉眼的にも明らかに識別され、組織学的検索でも多いものでは脾臓の50%以上をも占拠するようになる。しかし、このような状況においても脾臓重量は0.6~0.8%、宿主肝の8~10%で、脾臓が完全に肝組織に置き換ったとしても全肝補助とは成りえず、いかにして脾内肝組織の増量を計るかが第1の課題であり、われわれは図-1に示す如く4つの方法にて、その増量法を検討した。

①宿主肝と異所性肝組織との競合、代償作用の利用；この現象は異所性肝移植時に観察されたもので、すなわち宿主肝の量的減少による異所性肝組織の代償性の増加現象を利用するものである。今回は脾内肝細胞移植ラットに門脈下大静脈吻合(PC shunt)を作製し、宿主肝の萎縮を惹起し、異所性

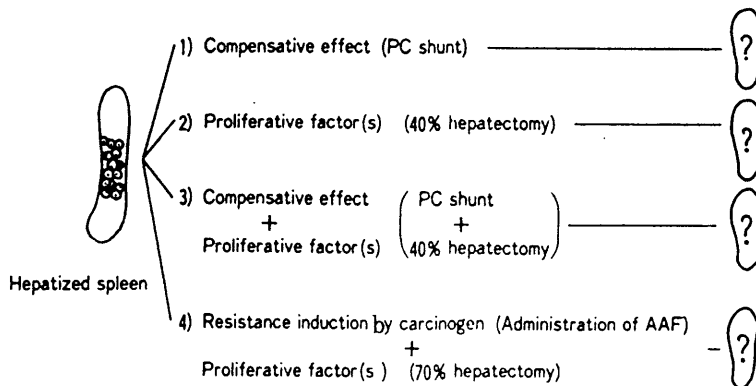


図-1 脾内肝組織の増量法

の脾内肝組織を増量させようとした。

②肝再生促進因子の応用； まだその物質がいかなるものか究明されていないが、肝切除時には肝再生を促進させる因子が放出される。われわれは、宿主肝を切除し、この肝再生促進因子が脾内肝組織に如何なる影響を与えるかを検討した。

③①と②の併用； PC shunt 作製後に宿主肝の肝切除を施行した。

④発癌物質の投与と肝切除術の併用； 肝切除により肝再生が開始されるが、それに肝癌発癌物質である A A F (Acetylaminofluorene)を投与すると、肝再生が抑制される。その際、残存肝はこれに抵抗し、再生を継続せしめる何らかの物質(肝再生の抑制に対する抵抗因子)を遊出すると考えられ、この物質による脾内肝組織の増量効果を検討した。

Methylcellulose により脾腫を作製し、脾内肝組織の増量を計る方法についても実験を行なったが、明らかに脾腫は作製されるが脾内肝組織は control 群と殆んど変化がなかった。今回、上記4法の結果について報告する。

正常肝細胞脾、PC shunt、それにPC shunt と40%肝切除の併用群の3群の脾重量と肝重量を、体重比とした相対重量として図-2に示す。

正常肝細胞脾の相対重量($n=8$)は $2.16 \pm 0.07 (\times 10^{-3})$ に対し、PC shunt 群($n=7$)では 3.29 ± 0.87 と約15倍の重量増加となっている。しかし、PC shunt に40%肝切除を付加してもその重量増加はPC shunt のみと同量の増加しかみられなかった。肝重量も、PC shunt 群では 1.92 ± 0.15 と正常の 2.81 ± 0.52 に比し有意に減少しており、明らかに宿主肝の重量減少に起因する肝細胞移植脾の競合代償性肥大による重量増加を計ることが可能であった。PC shunt は、このように脾重量を増加させるが、同時に脾内肝細胞の分裂増殖を促進させる。図-3はPC shunt 付加後の脾内肝

	weight of the liver / body weight ($\times 10^{-2}$)	weight of the spleen / body weight ($\times 10^{-3}$)
untreated (n=8)	2.81 ± 0.52	2.16 ± 0.07
PC shunt (n=7)	1.92 ± 0.15	3.29 ± 0.87
PC shunt +40% hepatectomy (n=10)	2.02 ± 0.25	3.21 ± 0.60

$p < 0.001$ (between untreated and PC shunt for liver weight)
 $p < 0.01$ (between untreated and PC shunt for spleen weight)
 $p < 0.01$ (between PC shunt and PC shunt +40% hepatectomy for spleen weight)

図-2 各実験群での宿主肝，肝細胞移植脾の相対重量

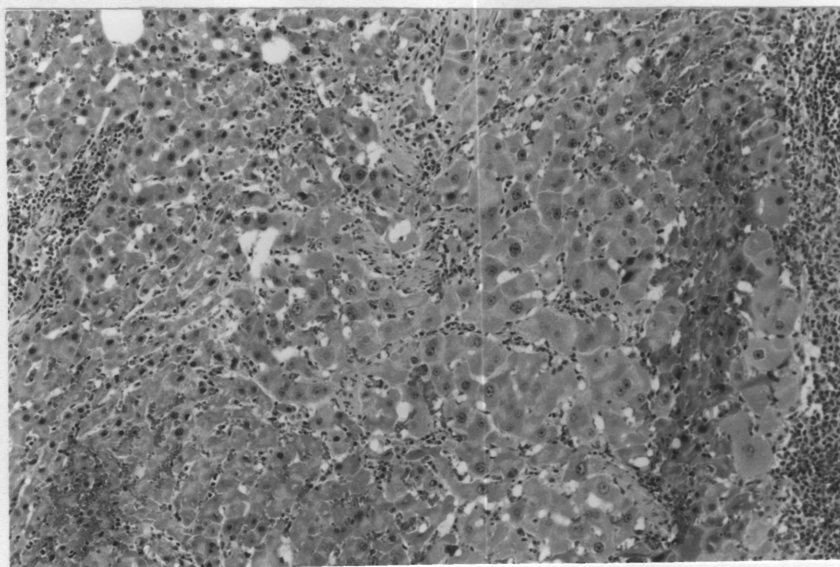


図-3 PC shunt 付加後の脾内肝組織

組織であるが、脾内肝細胞の分裂・増殖が極めて旺盛であり、プラニオメーターにて算出した割面の肝組織の脾内占拠率も大きく、最高 67.8% であった。

④の方法はカナダの Finkelstein 等によって試みられ、今回その追試を行なった(図-4)。図-5は、AAF 投与後肝細胞移植と同時に 70% 肝切除を施行 4 週目の脾内移植肝細胞である。コントロールの脾内生着肝細胞に比し明らかに肝細胞数も多く、AAF 投与と 70% 肝切により脾内移植肝細胞の分裂・増殖が促進されることが実証され、現在その長期間の follow-up を行なっている。

今回、前述した 4 つの方法によって脾内肝細胞の増量法について検討したが、PC shunt による代償作用、AAF 投与と肝切除により、明らかに脾内肝組織および肝細胞が増量された。今後、これらの方法の組み合わせにより、全肝補助となりうるに十分な脾内肝組織を得ることが可能であると考えられ、現在検索中である。

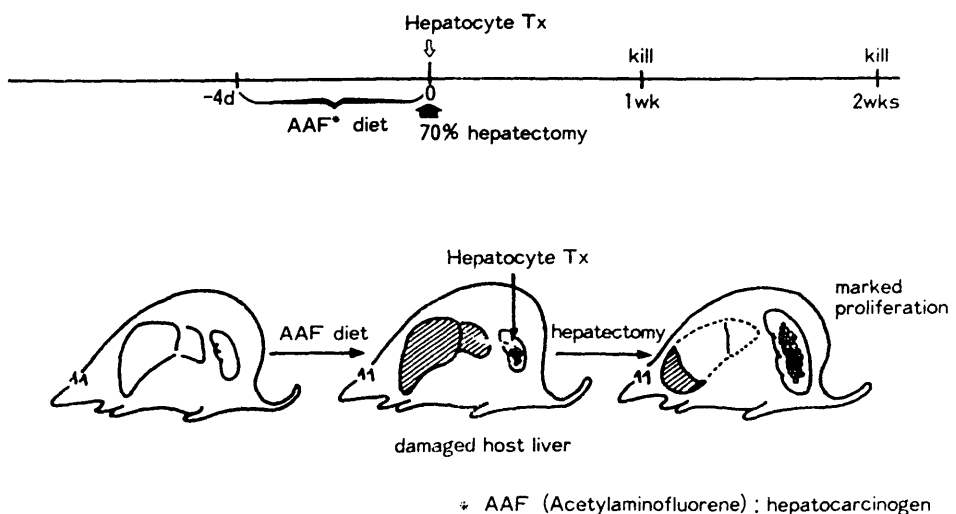


図-4 発癌物質と肝切除併用による脾内肝細胞の増量実験プロトコール

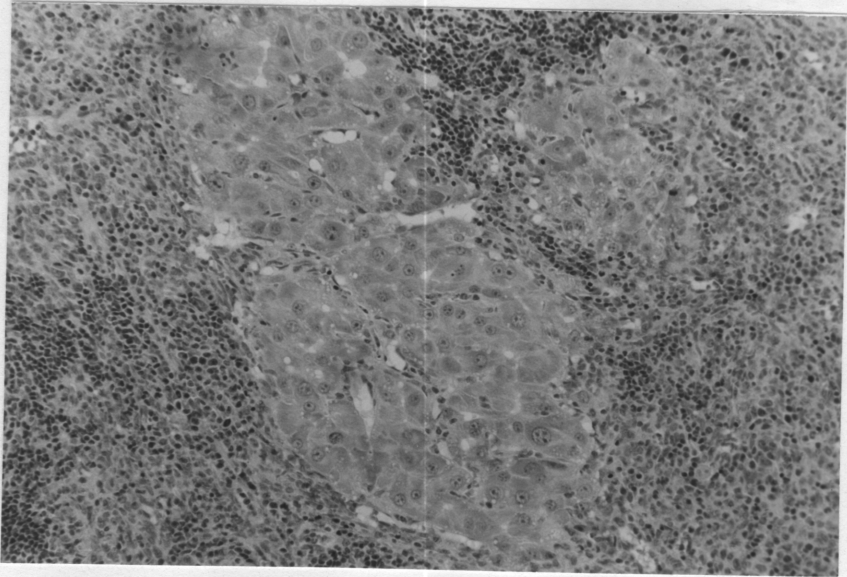


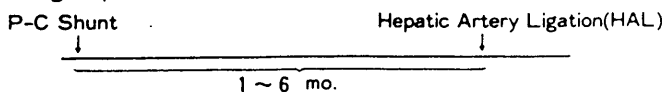
図-5 移植1週目の脾内肝細胞 (AAF投与+70%肝切除)

2. 脾内再構築肝の代謝補助能力の検討；宿主肝全剝後の延命効果などの究明。

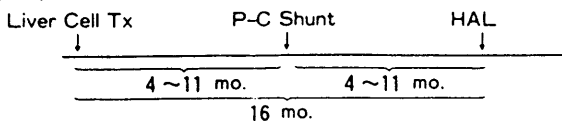
脾内肝組織は、これまでの組織学的検索から糖および蛋白代謝機能を有することが判明したが、今回この脾内肝組織が肝の補助機能を有するか否かについて検討した。その実験方法として、肝全剝モデルが最も適していると考え実験を開始したが、手技的に困難であること、手術侵襲が大きいことにより、宿主肝の完全血行遮断モデルにてその延命効果について検索した。宿主肝の阻血はPC shuntと肝動脈結紮にて行なった(図-6)コントロール群、肝細胞移植群、宿主肝の40%肝切除を付加した肝細胞移植群の、各群の完全肝血行遮断後の生存時間を図-7に示した。肝細胞移植群は、2群ともコントロール群に比し生存時間の延長を認めた。その生存時間は、平均コントロール群では平均226分、肝細胞移植群ではそれぞれ603分、962分で、最長2234分であった。

以上の実験結果より、脾内肝組織が肝機能補助能力を有することが判明した。

I. Control group:



II. Tx group (2) (P-C Shunt)



III. Tx group (2) (P-C Shunt + 40% Hepatectomy)

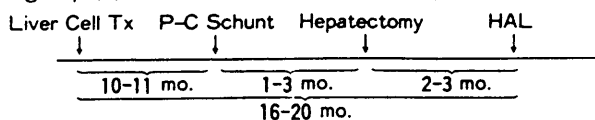


図-6 脾内肝細胞移植ラットの宿主肝阻血実験

Survival Time After Hepatic Arterial Ligation

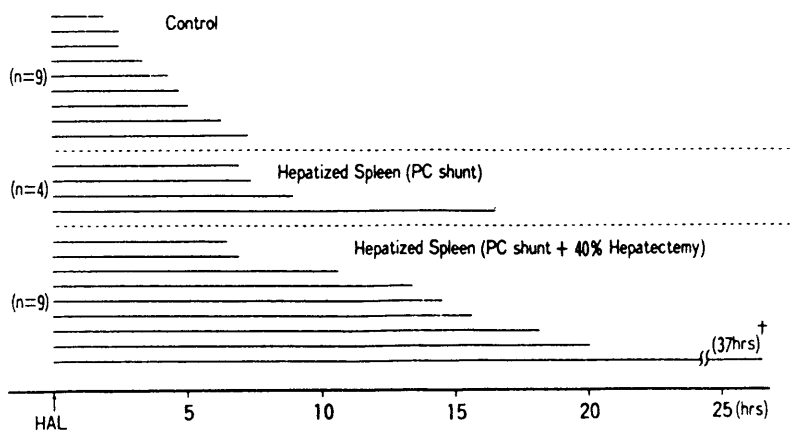


図-7 脾内再構築肝の機能補助能力
宿主肝阻血後の生存時間

3. 中動物を用いた肝細胞自家移植の研究.

3-1. 方法

動物は、体重7～9.5 kgのビーグル犬ならびに4.5～11 kgのサルを用いた。動物は実験当日は絶飲食とし、静脈麻酔下に挿管し、レスピレーターによる補助呼吸を行なった。上腹部正中切開により開腹し、肝左外側葉を切除し、直ちに肝断端面の最も至適な血管よりヘパリン加4℃生食液にて肝内血液のwash-outを行なった。

摘出肝を灌流装置にセットし、EGTA加ヘベスbuffer液にて細胞間のキレーティングを行ない、これをPBS(-)液で洗った後、0.15%コラゲナーゼ+0.01%ヒアルロニダーゼ酵素液による消化を10～15分間施行した。軟かくなった肝臓をハサミで細切し、4℃ハンクス液にて2回洗浄を行なって肝細胞浮遊液を得た。

脾臓内自家移植法は、移植直前に脾動脈本幹を結紮し、脾門部の血管系をクランプで止血しながら脾下極よりベニユーラ針で肝細胞浮遊液を脾内に注入した。2～3分してから脾門部のクランプを除去し、止血確認の上閉腹し、術後3日間は抗生物質を投与した。以後、通常の飼料で飼育された。

3-2. 成績

ビーグル犬の切除肝からは、トリパンブルーによるviabilityが平均81±7%の肝細胞が平均 5.6×10^8 採取された。注入量が多すぎると肝内門脈を広範に閉塞し、動物は死亡した。翌日死亡した例を図-8に示す。

移植1ヶ月後では、PAS陽性顆粒の豊富な肝細胞が数十ヶの小集団として赤脾髄内にびまん性にみられ、一部索構造の形成も認められた(図-9)。ところが、移植3ヶ月後では脾内移植肝細胞はわずかとなり、6ヶ月後では確認するのが困難な程となり、12ヶ月後ではもはや確認することができなかった(図-10)。

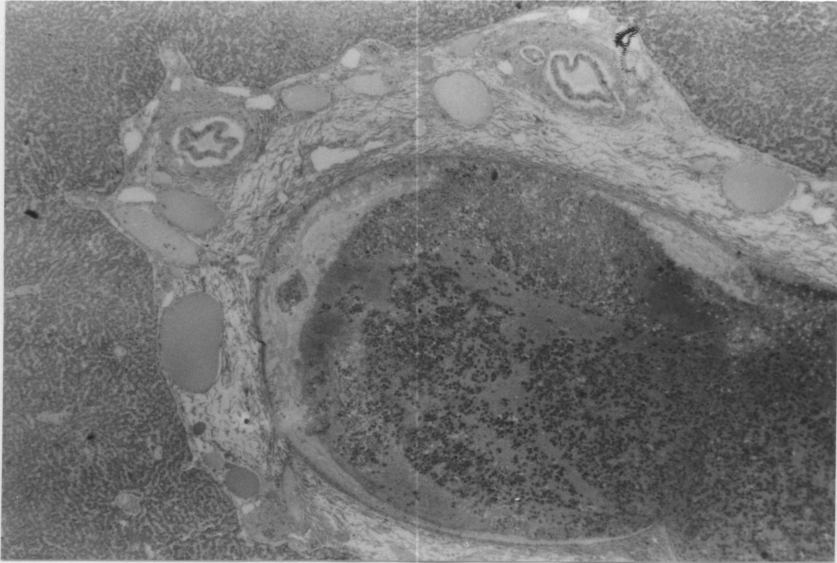


図-8 移植1日目死亡

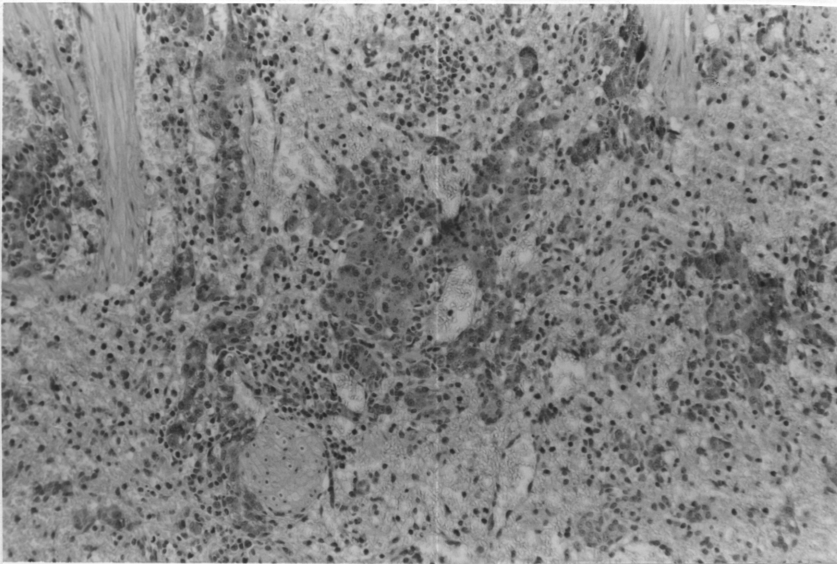


図-9 移植1ヶ月目

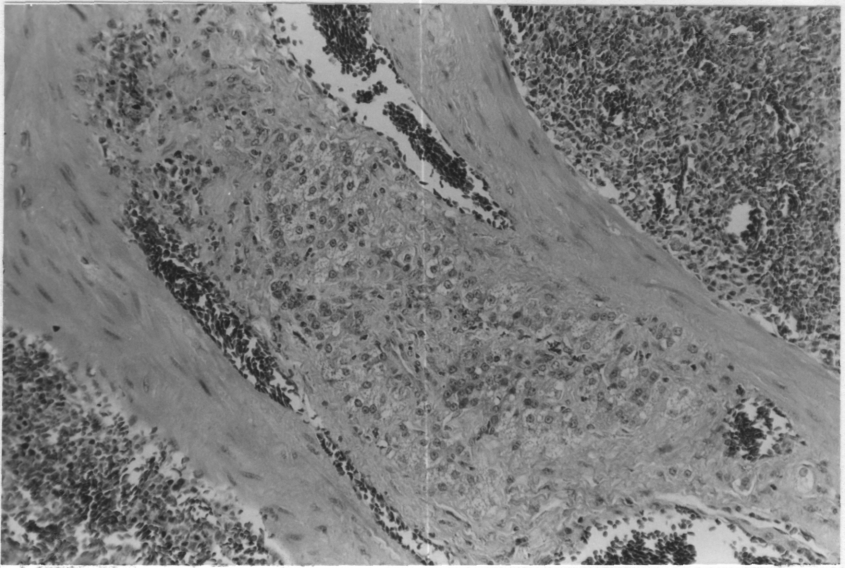
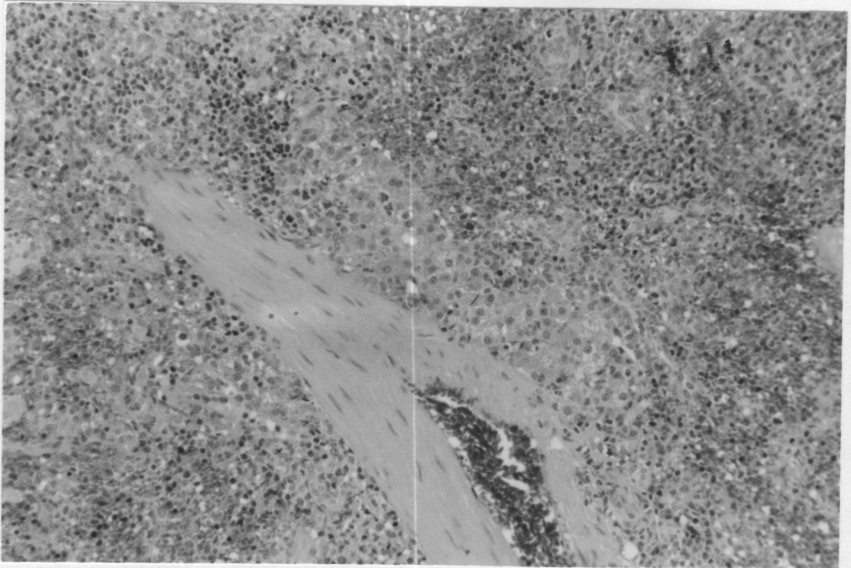


図-10 上： 移植 3 ヶ月目
下： 移植 6 ヶ月目

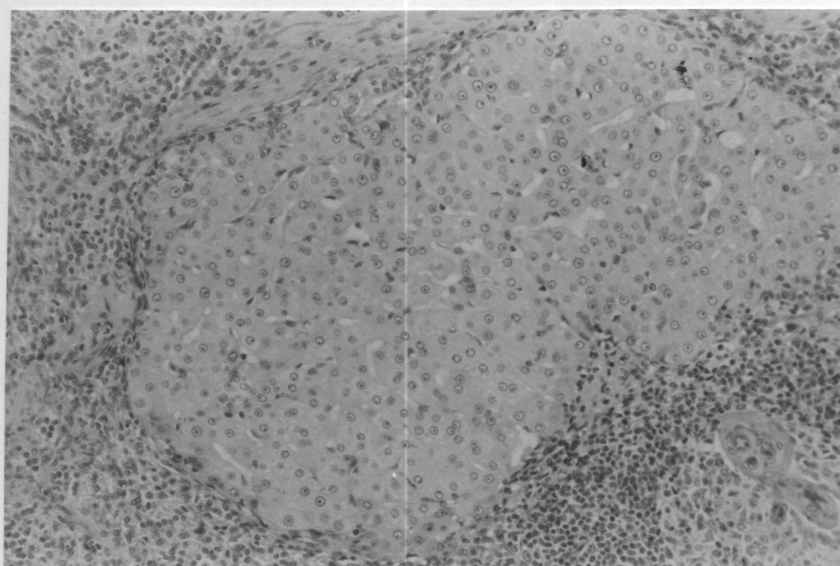


図-11 サルの12ヶ月目

サルの切除肝からは、平均 viability が $88 \pm 5\%$ の肝細胞が $5.2 \pm 1.6 \times 10^8$ ケ採取され、そのうち $2.7 \pm 1.5 \times 10^8$ ケが移植された。移植8～12ヶ月の長期例をみると、細胞質が豊富で、核小体の明瞭な肝細胞が数十ケよりなる集団をなして赤脾髄内に島状にみられ、索構造の形成も確認されたが、PAS陽性顆粒はあまり認められなかった(図-11)。

3-3. 小 括

ビーグル犬やサルのような中動物の摘出部分肝からも、灌流法によって良好な肝細胞が採取され、脾内への自家移植が可能であることが判明した。犬もサルもそうであるが、注入量が多すぎると肝細胞は脾静脈系へ流れて門脈へ至り、肝内門脈系を閉塞して急性門脈閉塞症となり、動物は死亡する。したがって、注入量には限界があり、注入量についてもより詳細に検討する必要がある。

移植された肝細胞の運命については、ラットでは脾内にて分裂・増殖し、1年後では脾の2/3を占めるに至るが、犬、サルでは全く異なった成績であった。犬の脾臓は血管構築が極めて粗であるために、注入された肝細胞が着床する前に流出してしまふ可能性も考えられるが、経日的にその量が低下することを考えると、むしろ脾内移植肝細胞は分裂・増殖せずにそのまま一生を終えるのではないだろうか。この現象は、サルにおいてもほぼ同様であった。即ち、生体は肝機能的には何ら負荷となっていないために、脾内移植肝細胞が分裂・増殖する必要がない。このことは、サルの移植1年後の例に Eckを行ない、その3ヶ月後にみた脾内肝細胞が少数ではあるが良好な形態を示していたことから推定でき、今後このような何らかの負荷を加えて検討する必要がある。また、このことは臨床における肝機能低下例への apply が合目的々であることも示唆することになる。

4. ヒト肝よりの肝細胞分離法の確立

ラット や中動物からの肝細胞分離法は、 酵素灌流法を採用することにより極めて良好な成績をうる事が可能となった。しかしながら、この場合は全肝灌流法を用いることができるが、臨床の実際を考えるとほとんどの場合が部分肝であり、また肝硬変症を合併していることが多く、細胞分離の面からみると極めて不利な条件下にある。そこで、ヒト肝よりの肝細胞分離法を確立するために、以下の検討を行なった。

4-1. 方法と成績

4-1-i. 分離法の検討

ラット肝を用いて各種分離法を試み、収量および viability より評価を行なった。方法は、ハサミによる細切、コラゲナーゼ酵素液による振盪消化法、コラゲナーゼ酵素液を 22G 注射針にて乱刺注入する法の組み合わせで、全肝

の循環灌流消化法と比較した。その結果、図-12のように灌流法が最も良好で、次は乱刺+細切+消化法の組み合わせであった。

4-1-ii. 動物の種類による比較

各種動物の全肝の酵素灌流法を行なって、収量、viabilityを比較した。犬、ブタ、サルなどの中動物では、ラットに比しコラゲナーゼ酵素濃度を3倍とし、

図12 ラット肝 一分離法別肝細胞収量, Viability—

—全肝—		
	収量 (cells/g wt)	viability (%)
細切のみ (n=5)	0	0
細切 + 消化 [※] (n=6)	$2.44 \pm 2.15 \times 10^5$	21.25 ± 10.73
乱刺 [※] + 細切 (n=5)	$4.39 \pm 2.56 \times 10^5$	33.92 ± 14.17
乱刺 [※] + 細切 + 消化 [※] (n=4)	$7.85 \pm 5.45 \times 10^5$	67.77 ± 17.95
酵素灌流 (0.05% collagenase (0.1% hyaluronidase) (n=10)	$2 \sim 5 \times 10^7$	80~90

※ 0.01% collagenase

※※ 0.05% collagenase

(M±SD)

図13 動物別, 肝細胞分離 —収量, Viability—

—全肝—

—酵素 (0.05% collagenase + 0.01% hyaluronidase) 灌流法—

	収量 (cells/g wt)	viability (%)
ラット (n=10)	$2 \sim 5 \times 10^7$	80~90
犬 (n=10)	$(8.4 \pm 1.8) \times 10^7$	89 ± 5.3
ブタ (n=5)	$(5.3 \pm 1.1) \times 10^7$	65 ± 8.5
サル [※] (n=5)	$(2.4 \pm 0.8) \times 10^7$	88 ± 5

※ サルのみ—個葉肝

(M±SD)

またEGTAによるキレーティングの併用を必要とした。その結果、ブタの viability が他より低く、これはブタ肝は細胞肝結合識が極めて発達していることに起因していることが推定された。その成績を図-13に示す。

4-1-iii. 中動物およびヒトの肝細胞分離

前述の成績から、灌流法以外では乱刺+細切+消化法の組み合わせが良好であることが判明したが、この方法ではなお収量が低いため、複数穿刺灌流法を開発し評価を試みた。方法は、灌流法に使用する門脈側のチューブにタコ足状の複数のチューブを接続し、これに22Gの針をつけ切除された部分肝に適当に穿刺し、酵素液再灌流法を行なうものである。ヒト肝の場合には、さらに高濃度のコラゲナーゼを必要とした。その成績を図-14に示すが、乱刺+細切+消化法よりも1~2桁高い収量が得られた。

図14 中・大動物肝の分離法別肝細胞収量と Viability

一部分肝一

	犬 (0.15% 0.01%)	サ ン (0.15% 0.01%)	人 (0.5% 0.1%)
乱刺+細切+消化	(n=5)	(n=9)	(n=6)
収量 (cells/g wt)	$(3.58 \pm 1.8) \times 10^6$	$(2.48 \pm 2.43) \times 10^5$	$(6.29 \pm 9.22) \times 10^4$
viability	59.4 ± 7.86	79.31 ± 9.04	34.6 ± 32.02
multi perfusion	(n=2)	(n=2)	(n=3)
収量 (cells/g wt)	2.6×10^7	3.5×10^5	1.6×10^6
viability	77	69	66

(MtSD)

4-2. 小 括

肝臓が全肝あるいは肝葉として利用できる場合、門脈カニューレーションによる酵素液灌流法が最も良いが、適当なカニューレーションの不可能な部分肝にあってはなかなか難かしい。小さなスティックであれば、ハサミで細切し酵素液中で消化すればよいが、比較的大きな部分肝ではそうはいかない。そこで、複数穿刺+灌流法を開発し評価を試みたところ、従来の方法に比し1~2桁も高い収量が得られた。硬変肝ではやはり収量は低下するものの、本法が適用されることが判明したので、さらに改良を加えて検討する予定である。

II. 体外肝機能補助装置の基礎的検討

われわれは、急性肝不全時の重篤な肝機能障害に対する人工的な機能補助法としては、肝の二大機能である解毒能と代謝能の両面を全体的に補助するものでなければならないとの観点から、解毒能は除去療法で、代謝能は生体肝素材としての遊離肝細胞を用いる方法で補助しようという total support system の開発を検討してきた。この遊離肝細胞を代謝能補助の reactor とするには、大量の肝細胞を採取する方法やいつでも使用できるための保存法、さらにはどのようなモジュールに適用して機能補助を行なわしめるかなどの方法を開発する必要がある。

本項では、これまで開発しえた方法とその成績を述べる。

1. 方法

1-1. 遊離肝細胞の採取法

動物は飼育制御された体重 7~10kg のビーグル犬を用いた。気管内挿管麻酔下に開腹し、門脈にチューブを挿入し、EGTA 加前灌流液で血液の洗い流しと細胞間 Ca イオンのキレーティングを行なう。灌流しつつ肝を摘出しこのキレーターをさらに PBS (-) 緩衝液で洗浄した後、循環灌流装置に移し Ca.Mg 加コラゲナーゼ、ヒアルロテターゼ酵素液で約 15 分間酵素灌流を行なう。肝をおおまかに鉋で細分した後低速度の電動カッターで細切し、最終 100 μ m の金属メッシュで濾過し、洗浄後肝細胞浮遊液を得る。

1-2. 大量肝細胞の凍結保存法と機能の評価

細胞濃度約 40% の肝細胞浮遊液 25 ml を凍結バックに注入し、25% DMSO 凍害防止液を等量注入して静かに混ぜ、4 $^{\circ}$ C 20 分間浸漬した後 programming freezer を用い 3~4 $^{\circ}$ C/min の冷却速度で -80 $^{\circ}$ C まで凍結して、液体窒素槽に移し保存する。解凍は、このバックを 38 $^{\circ}$ C 恒温槽中に浸して

一気に行ない、洗浄してDMSOを除去する。

保存後の肝機能の評価は、H. E., PAS, G-6-Pase染色や走査電顕による形態学的観察、静置培養による細胞の接着率、スピナーフラスコ試験によるNH₃, 尿素窒素, 糖の変化や、細胞内ATP量、¹⁴C-leucineのup-take能などにより検索した。

1-3. 代謝補助モジュールの概要.

代謝補助モジュールは、肝細胞浮遊槽（容量2ℓ）中に有効膜面積0.4m²のPMMA中空糸膜が張ってあるものである。10kg程度の動物を対象として作製されており、肝細胞浮遊液は最下段中央の散気管からの混合ガスのバブリングにより、攪拌と酸素供給およびpHのコントロールがなされる。このモジュール全体は、38℃の恒温槽中に浸漬されている。このPMMA分離膜の分画分子量が4万と10万の2種類のモジュールが実験に供された。図-15にこれらのrejection curveを示す。4万の分離膜はアルブミンを92.4% rejectionし、10万の分離膜はアルブミンを62.8%, γ-グロブリンを94.8% rejectした。

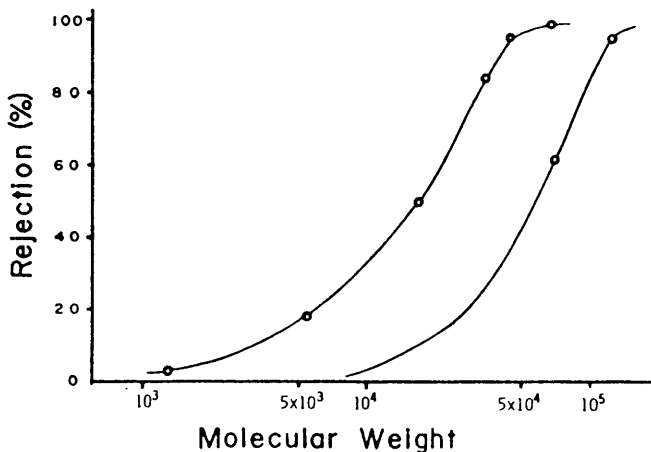


図-15 Rejection Curve of PMMA-Membrane

1-3-i. In-Vitro灌流実験

モジュールの肝細胞浮遊槽に約 2 ℓ の MEM 培養液 (10% FCS, インスリン, デキサメサゾン) と約 40 g の肝細胞を注入し、血液側は NH₄Cl とフルクトース, 10% FCS を添加したハンクス氏液を、流量 35 ml/min で灌流させた。両液のサンプリングを灌流開始 5 分目を 0 時間として、30 分, 60 分, 90 分, 120 分, 180 分に行ない、両液中のアンモニア, BUN, グルコースの量を測定し、総量の経時的变化を 0 時間目の総量を 100% として表わした。

1-3-ii. In-Vivo灌流実験

ガラクトサミン (Gal) 0.8 g/kg 投与後約 20 時間目の肝障害犬にネンブタール静脈麻酔を施行し、人工呼吸器下で維持した。一側大腿動・静脈に体外灌流用のカテーテルを、他側の大腿動脈に血圧測定用カテーテルを、前腕静脈に持続点滴用カテーテルを挿入した。体外灌流は、約 40 ml/min の流量で 6 時間の全血灌流とした。血液サンプルは灌流前、灌流直後、Gal 投与約 40, 48, 65, 73, 90 時間後と、平均血圧が 50 mmHg 以下になった時点での犠牲死まで採取した。血液は一般検血, 血中アンモニア, BUN, グルコース, GOT, GPT, TB, TP およびプロトロンビン時間とヘパプラスチンテストに供された。

動物実験群は、Gal 投与非治療群 5 頭、分画分子量 4 万群 9 頭、同 10 万群 5 頭と、同 10 万群で肝細胞非使用群 3 頭の 4 群である。これら 4 群の平均生存時間と最後の肝細胞非使用群を除いた 3 群の血液検査値を、各群、各時間の平均値として経過を表示した。

2. 成績

2-1. 肝細胞採取成績

体重 $8.3 \pm 1.2 \text{kg}$ のビーグル犬から、トリパンプルーによる viability $89 \pm 5.3\%$ の肝細胞が生細胞総数として $2.1 \pm 0.45 \times 10^{10}$ ケ/匹採取された。推定採取率は $72 \pm 13\%$ で、ほとんどの細胞は single cell であった。各種染色状態も良好で、静置培養でも敷石状の接着状態が観察された。

2-2. 凍結保存成績

解凍後の viability は $74 \pm 7.7\%$ 、生細胞回収率は約 52% であった。各種染色も良好であり、走査電顕による観察でも培養 30 分後には球形となり、細胞表面の微絨毛の形態も回復し (図-16)、6 時間後には接着扁平化するのが確認され (図-17)、接着細胞数は非保存細胞の約半分であった。6 時間のスピナーフラスコ試験では、非保存細胞と保存細胞の viability はおのおの 70% 、 40% と低下したが、アンモニアの減少率はおのおの 42 ± 1.9 、 $32 \pm 14.8 \mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ 、尿素窒素の上昇率はおのおの 0.7 ± 0.34 、 $0.4 \pm 0.11 \text{mg}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ 、グルコースの上昇率は 8.6 ± 2.2 、 $2.9 \pm 0.82 \text{mg}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ であった。細胞内 ATP 量は 3 時間の培養後おのおの 3.1 ± 0.3 、 $2.9 \pm 1.2 \text{pg}/\text{cell}$ と回復し、 ^{14}C -leucine の up-take 能はおのおの $1.4 \pm 0.9 \times 10^7$ 、 $0.8 \pm 0.4 \times 10^7 \text{cpm}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ であった (図-18)。

2-3. 試作代謝補助モジュールの成績

2-3-i. In-Vitro 灌流実験成績

灌流 3 時間後、4 万と 10 万群のアンモニア量は 37% 、 21% と低下を、BUN は各々 133% 、 146% と増加を、グルコースは各々 127% 、 121% と増加を示した。これらの各物質の変化量を肝細胞 1g で単位時間当りで表わすと、4 万と 10 万群のアンモニア除去量は $165 \mu\text{g}$ と $155 \mu\text{g}$ 、BUN 増加量は 0.215mg と 0.517mg 、そしてグルコース増加量は 3.68mg と 3.5

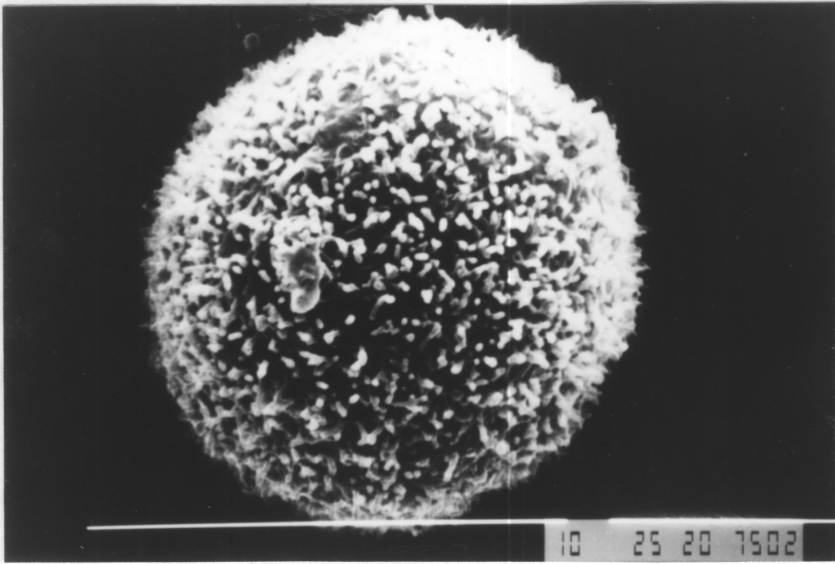


圖-16 培養30分後

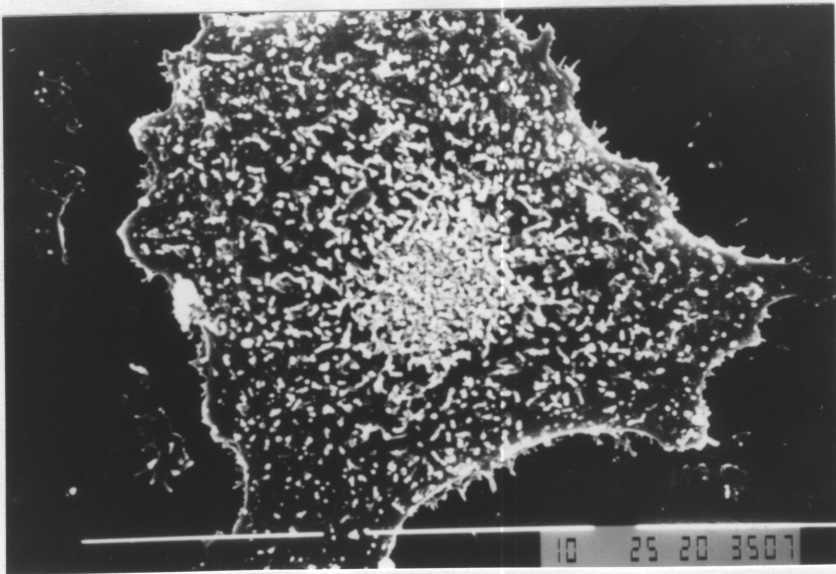


圖-17 培養6時間後

parameter	non-preserved	preserved
Viability (%)	70±13 ↓	40±15 ↓
NH ₃ (μg/g-cell/h)	42±1.9 ↓	32±14.8 ↓
BUN (mg/g-cell/h)	0.7±0.34 ↑	0.4±0.11 ↑
Gl (mg/g-cell/h)	8.6±2.20 ↑	2.9±0.82 ↑
¹⁴ C-leusin (CPM/g-cell/h)	1.4±0.9×10 ⁷ ↑	0.8±0.4×10 ⁷ ↑
ATP (pg/cell/h)	0.86±0.03 ↑	0.77±0.30 ↑

図-18 非保存、保存肝細胞の代謝能

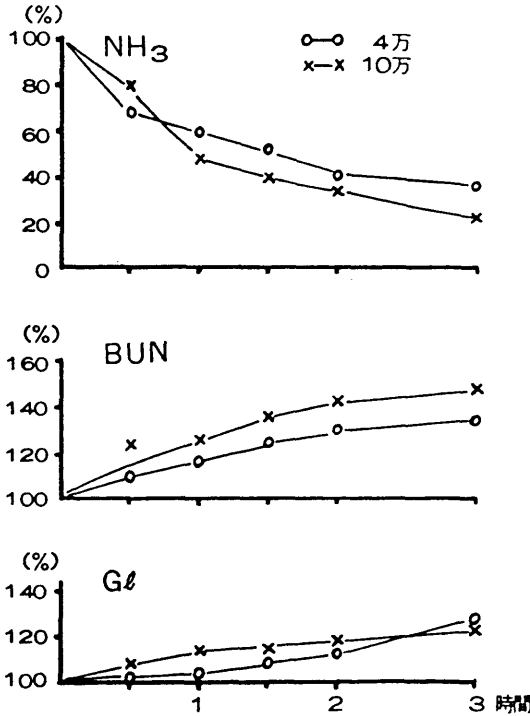


図-19 In-Vitro 灌流実験

図-21に示す。非治療群は、Gal投与後徐々にHt値が上昇し、血液濃縮状態となって60%に達する。4万群および10万群は、持続点滴をしているので40~50%の間を推移しているが、10万群の長期生存群では逆にHt値は低下の傾向を示した。WBCは、体外循環により一時的減少を示すが、非治療群とも40時間目頃より著明な白血球増多を呈した。Ht値と同様、10万群の長

mgであった。この二群においては、物質の変化量に有意の差は認められなかった(図-19)。

2-3-ii. In-Vivo 実験成績.

各実験群のGal投与後の生存時間をみると、非治療群44±4時間、4万群55±11時間、10万群86±11時間、10万細胞非使用群50±5時間であった(図-20)。有意差をみると、非治療群と4万群では $0.1 > P > 0.05$ 、4万群と10万群では $0.01 > P > 0.001$ であった。

一般血液検査として、赤血球、ヘモグロビン、血小板をも測定しているが、代表例としてHtとWBCの変化を図

期生存群ではやはり逆に低下した。

血液生化学検査をみると、血中アンモニア値は20時間を過ぎる頃より上昇傾向を示すが、10万群では上昇を示す時期が遅れていた。BUN値は、補助群でむしろ低下傾向を示したが、いずれも正常値内を推移した(図-22)。

グルコース値は、非治療群は100mg/dl前後を示したが、灌流群は200mg/dl以上の高値を示した。TP値は、非治療群では高値を維持したが、灌流群では時間の経過とともに徐々に低下を示した(図-23)。

GOT値はいずれも高値を示したが、長期生存群では徐々に低下を示した。TB値は生存時間の延長とともに増加を示したが、70時間以後は軽度低下を示した(図-24)。

血液凝固因子を反映するプロトロンビン時間およびヘパラスチンテストをみると(図-25)、プロトロンビン時間の犬正常値は約7.2秒であるが、Gal投与後20時間を過ぎる頃より急激に延長を示すようになる。しかし、

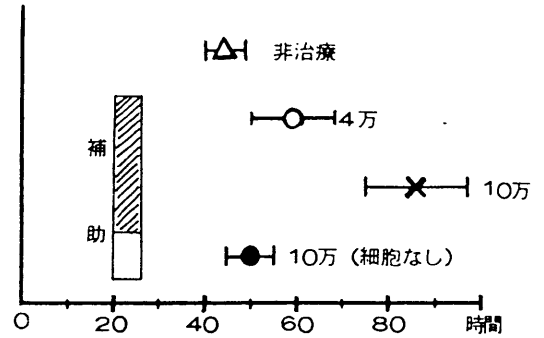


図-20 Gal肝不全犬の生存時間の比較

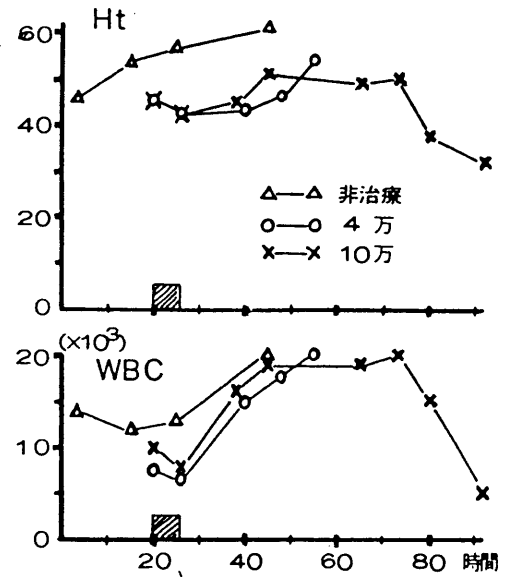


図-21 一般検血値の変化

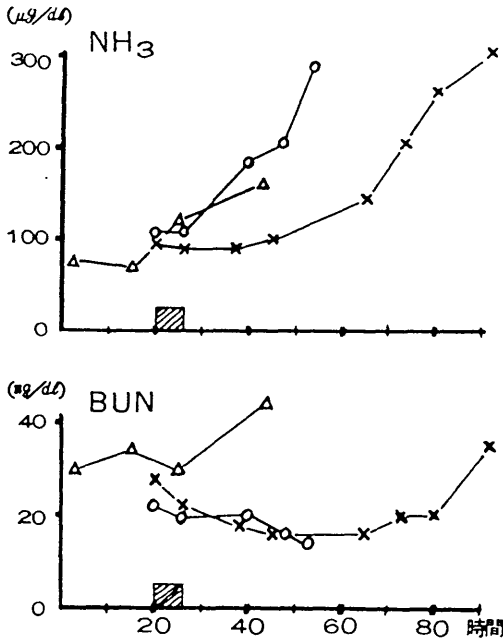


図-22 血液生化学検査値の変化

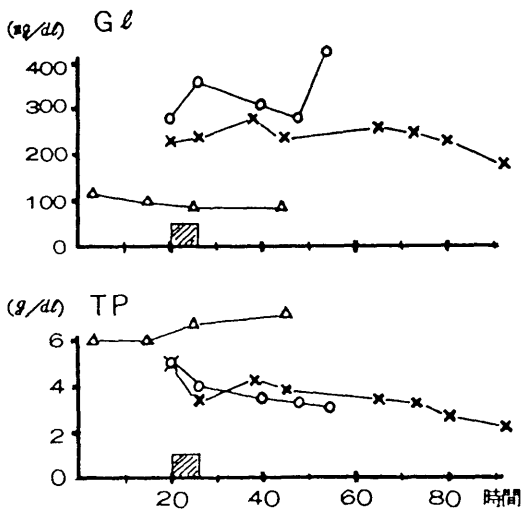


図-23 血液生化学検査値の変化

10万群ではプロトロンビン活性持続の延長傾向がみられた。ヘパラスチンテストの犬正常値は約28.8秒であるが、Gal投与後15時間目頃より著明な延長を示すようになり、これらの変化はプロトロンビン時間より急激な経過を示した。

3. 小 括

ビーグル犬のような中動物からでも、酵素灌流法の改良により、良好な遊離肝細胞を全肝の約70%量を得ることが可能となった。また、凍結保存法では液体窒素槽を利用するわれわれの成績は国内外で最も良好なものであるが、回収率50%はなお改良の必要があるものと思う。

さて、生体肝素材を reactor とした肝機能補助法は各種検討されているが、なお十分見通しのある装置は報告されて

いない。その最大の問題点は、小動物を対象としたモジュールの scale-up がなかなか難しいことによる。それと、体外循環法によって患者に適用されることになるが、この場合、その血流量に限界がありこの点が物質交換能の律速となる可能性が大である。したがって、装置の面に最良の条件が要求され、このことは必然的に本法の開発に大きな解決要素として、研究を困難なものとしている。われわれは、浮遊培養系という培養条件では最も過酷な条件でモジュール化を試みたが、Gal 肝不全犬の生存時間の延長やある程度の物質代謝能を確認することができた。このことは、遊離肝細胞を reactor としたモジュールの有用性を示すものであり、臨床応用可能な装置の開発が可能であることを示したものと判断され、今後の研究課題としたい。

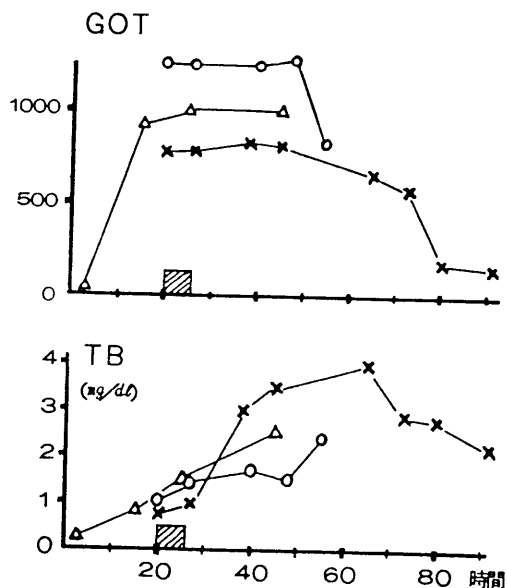


図-24 血液生化学検査値の変化

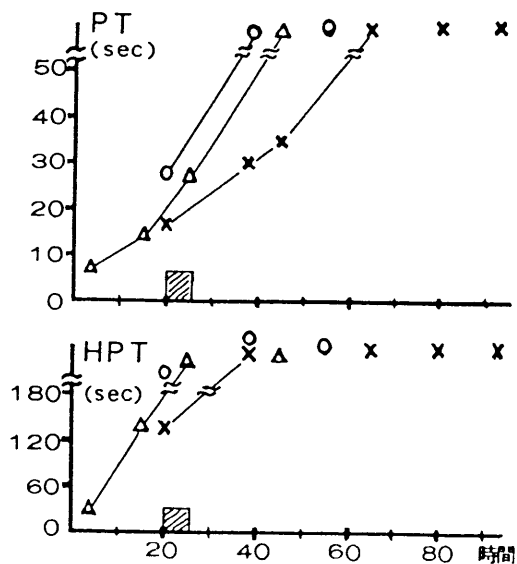


図-25 血液凝固因子の変化

III. まとめ

遊離肝細胞脾内移植による体内肝機能補助の基礎的検討では、脾内移植された肝細胞はゆっくりと分裂・増殖して確かに脾の70%近くを占めるようになり、アンモニアや色素の負荷試験、肝阻血に対する延命試験などの成績によると、肝機能を発現していることが判明した。しかしながら、より十分な肝機能を得るためには、脾内移植肝細胞のより大きなmassとしての量が必要である。そこで、各種の方法を研究したところ、門脈下大静脈吻合を併用した群に最もその効果が大であった。これは、肝の代償性肥大という点を利用したものであり、このことは臨床における患者の肝臓機能が低下している場合と想定することができ、脾内肝細胞移植が合目的々であることを示すものと考えられる。

ヒトに近い動物ということで、犬やサル脾内肝細胞自家移植を検討したが、移植後長期になると脾内肝細胞は確認されなくなった。この場合、生体肝機能には全く負荷を与えていないので、肝の異所性移植時にみられる移植肝の縮少とはほぼ同一の理由によることが推定され、ラットにおける実験と同様に、門脈下大静脈吻合や肝切除などを併用した場合について検討を加える必要がある。

また、ヒトの部分肝から遊離肝細胞を得るための基礎研究を行なったところ、新しく開発されたmultipuncture-perfusion methodが極めて有用であることが確認され、硬変肝への応用が期待される。

次に、遊離肝細胞を代謝のreactorとした体外肝機能補助装置の基礎的検討では、肝細胞浮遊培養系を応用したモジュールの有用性が確認された。In-vitro実験では、肝細胞1g、1時間あたりアンモニアを約150 μ g代謝除去し、尿素窒素、グルコースはそれぞれ0.5mg、3.5mgの増加を示し、またガラクトサミン肝不全犬とのex-vivo灌流実験では、血中アンモニアの減少、生存時間の延長などが認められた。

肝細胞を長時間維持するには、極めて不利な条件で設定されているにもかかわらず、その代謝補助能力が確かめられたので、今後、モジュールの改良を行なうことにより、臨床的に有用な装置の開発が可能になるものと考えられる。

以上、遊離肝細胞を、体内ならびに体外における機能補助として用いる方法の基礎的研究成績を報告した。

1