

46

心停止ドナーからの肝細胞移植の可能性に ついての研究

(研究課題番号: 12671134)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金[基盤研究(C)(2)]研究成果報告

平成15年3月

研究代表者 小原充裕

(旭川医科大学医学部助手)

はしがき

1) 研究の目的と意義

末期肝障害患者の治療において、肝臓移植は今や確立された医療となった。しかし、欧米でも症例が増加することによるドナー不足が問題となっており、日本のように脳死ドナーからの移植が始まったばかりの国においては、ドナー不足はさらに深刻な問題である。近年、先天性酵素欠損症の様に肝機能の一部の欠落においては、必ずしも全肝移植の必要はないと考えられている。その意味において、肝細胞移植は、移植医のみでならず小児科医からも先天性酵素欠損症に対する新しい治療法として現在注目されている。

ヒト肝細胞移植において、現在の Living Donor あるいは Brain Death Donor からの肝細胞分離だけでは、全肝移植と同様にドナー不足が深刻となることは容易に想像される。そこで、心停止ドナー肝の利用は臓器の有効利用だけでなく、ドナー確保に伴う倫理的問題からも大変有用な手段と思われる。しかし、現在まで心停止ドナー肝よりの細胞分離およびその移植成功例の報告はなく、この技術の開発は肝細胞移植の進歩発展にとって大変重要と思われる。

本研究においては、心停止ラット肝からの肝細胞分離法を確立し、その細胞の収量増加法とバイアビリティ向上法を開発する。次に、心停止ラット肝から採取した肝細胞を脾内に移植し生着の有無を確認する。移植肝細胞の生着が確認された場合には、実際に酵素欠損ラットに肝細胞移植を行い、移植肝細胞の機能発現を検討する。

2) 研究組織

研究代表者： 小原充裕（旭川医科大学医学部助手）

研究分担者： 富田一郎（旭川医科大学医学部医員）

（研究協力者：澤 雅之）

3) 研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成12年度	1,500	0	1,500
平成13年度	1,200	0	1,200
総 計	2,700	0	2,700

4) 研究発表

(1) 学会誌等

澤 雅之、間宮規章、葛西眞一：人工肝臓開発の現況. 外科治療
82:189-194,2000.

葛西眞一、澤 雅之：肝細胞移植－基礎と臨床の現況－. 北海道医報（臨時増刊号）52-56,2000.

葛西眞一、澤 雅之：肝細胞移植による肝不全の治療. 蛋白質・核酸・
酵素 45(13),2301-2306,2000.

葛西眞一、紀野泰久：人工肝臓研究－肝細胞浮遊型人工肝臓. 外科
63:522-527,2001.

(2) 口頭発表

(3) 出版物

葛西眞一、澤 雅之：Annual review 消化器 2000; 肝細胞移植 58-64,2000.
中外医学社. 東京

5) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

研究成果

- 1) 心停止ドナー肝からの肝細胞分離法の開発および生肝細胞収量の増加法とバイアビリティ向上法の研究

ウイスター系雄ラットの尾静脈からヘパリン 400 IU 静注後、サイアミラール 50 mg/kg 静注し心停止させた。室温 (23-25℃) で放置し、0, 30, 60, 90, 120分後に開腹肝摘出し肝細胞分離を施行した。

① 経門脈的灌流法

Berry らのコラゲナーゼ消化法に従い、5 Fr のアトム栄養チューブを門脈内に挿入し血液を wash out 後コラゲナーゼ液で灌流した。ヘパリン化が不十分で血液が充分 wash out されない肝においてはこの方法では酵素液が灌流されず生細胞は分離回収できなかった。血液が wash out された肝では Fig.1 の如くの結果であった。

② 多枝穿刺灌流法

当科で開発した灌流装置を使い 8 チャンネルのチューブに 22G の翼状針を付け肝実質に穿刺し血液を wash out 後コラゲナーゼ液で灌流した。この方法では、心停止 30 分以後の摘出肝においては血液が充分 wash out されず、酵素液が灌流されず生細胞は分離回収できなかった (Fig.1)。

Fig.1 分離法別肝細胞収量および viability

分離法	心停止時間(分)				
	0	30	60	90	120
経門脈的灌流法 収量(生細胞数/ 湿肝臓重量) viability	1.2×10^7 92.0%	8.1×10^5 70.2%	5.6×10^3 43.2%	1.5×10^2 12.3%	1.7×10 1.4%
多枝穿刺灌流法 収量(生細胞数/ 湿肝臓重量) viability	1.5×10 10%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%

分離肝細胞の viability は trypan blue dye exclusion test により判定した。

以上の結果より、経門脈的灌流法にて細胞分離を行うこととした。

2) DBcAMP の心停止ドナー肝からの肝細胞分離に対する影響

肝細胞温阻血障害において、保護作用が確認されている DBcAMP の心停止ドナー肝からの肝細胞分離に対する影響を検討するため、下記のようなプロトコールに基づき 1)-①と同様な実験を行い Fig.3 の結果を得た。



Fig.3 肝細胞収量および viability に対する DBcAMP 前投与の影響

心停止時間	0分	30分	60分	90分	120分
経門脈的灌流法 収量(生細胞数/ 湿肝臓重量)	1.3×10^7	7.1×10^5	4.8×10^4	4.5×10^3	3.7×10^3
viability	91.3%	76.4%	52.6%	26.8%	13.8%

以上の結果から、DBcAMP の前投与により若干のバイアビリティと生細胞収量の増加を認めた。同様な実験を、肝細胞保存液中の添加で細胞膜保護作用が確認されているクロールプロマジンを経心停止前 60 分に前投与したが、バイアビリティと生細胞収量の有意な増加は認められなかった。

3) 遊離肝細胞の精製

心停止後 30 分ドナーから採取された肝細胞(viability 70.2%)を Percoll にて精製を試みたが、精製過程でほとんどの肝細胞が失われた。見かけ上トリパンブルー色素排泄試験陰性の細胞も、細胞膜には温阻血障害が起こっており精製過程の機械的刺激で membrane leaky となることが判明した。同時にこの細胞を精製せずにそのまま MEM 培養液内で培養すると、細胞膜に budding 様変化が起こっていた (Fig. 4)。また機能面では、 NH_4Cl 負荷で尿素合成能を検討するとコントロール(心停止時間 0 分)の $40.3 \mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ に対し $11.5 \mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{cell}/\text{h}$ と著明に低下していることが判明した (Fig. 5)。

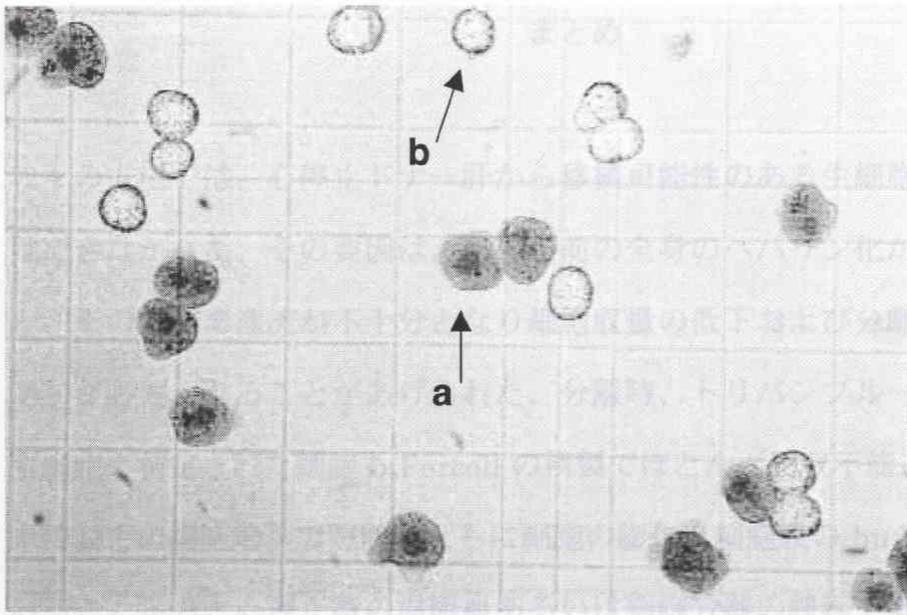


Fig.4 心停止後 30 分ドナーから採取された肝細胞の MEM で培養後の状態

- a; 細胞の膨化と色素の取り込みを認める。
- b; 生細胞にも細胞膜に budding を認める。

心停止時間	アンモニア 負 荷 試 験 ug/g cell/hour
0 分	40.3
30 分	11.5

Fig.5 アンモニア負荷試験に対する心停止時間の影響

まとめ

我々の方法では、心停止ドナー肝から移植可能性のある生細胞を分離することはできなかった。その要因は、心停止前の全身のヘパリン化が不確実であること、その為酵素灌流が不十分となり細胞収量の低下および分離時の器械刺激の増加が必要となることがあげられた。分離時、トリパンブルー色素排泄試験で生細胞と判定された細胞も Percoll の精製でほとんど回収不能となった。これは、未精製での細胞培養で時間とともに細胞の膨化と細胞膜の budding が起こっていることから、心停止時の温阻血あるいは細胞分離の課程で細胞膜に障害が起こっており分離直後に色素を排泄していた細胞もかなりの障害を受けている事から起こるものと思われた。これは形態面だけでなく、アンモニア負荷試験でもコントロールの 28.5%しか尿素形成を認めず、機能面でも著明に低下していることが確認された。今回の分離法では、この先の移植実験に供することができず、生細胞回収率向上のための工夫が必要と考えられた。