

氏名（本籍）	田 畑 潔
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医博第 1169 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 （博士課程）外科学系専攻
学位論文題目	PVF（ポリビニールフォルマール）上に培養した肝細胞を用いた肝機能補助装置の基礎的研究

（主 査）

論文審査委員	教授 森 昌 造 教授 田 中 元 直
	教授 豊 田 隆 謙

# 論文内容要旨

## 【目 的】

各種急性、慢性肝機能不全に対しては、近年臨床的に血液透析、血漿交換、吸着療法といった中毒物質除去を目的とした肝機能補助療法が行われてきた。しかし、これらの療法は、最終的な救命率の点から、限界を指摘されてきている。

また、肝不全に対する治療法として、肝移植が臨床応用されるようになってきた。しかし、同種移植における donor の供給には限界があり、臓器の不足が言われてきている。

そこで、肝移植 donor が見つかるまでの比較的長期にわたり肝機能を代行させるために、また将来的には、移植医療に代り得るものとして、物質合成面での肝機能をもサポートすることを目的とした肝機能補助システムが求められてきた。

こうした代謝型の肝機能補助システムとしては、生体肝組織を様々な形で使用したハイブリッド型人工肝臓が考案され検討されてきた。しかし肝機能の長期に渡る維持が困難であり、一般に臨床応用されるには至らなかった。最近では、初代培養肝細胞の比較的長期の維持が可能となり、これを使用したハイブリッド型人工肝臓が注目されてきている。肝細胞の初代培養法としては、一般的にディッシュ上での単層培養が各種実験に使われているが、近年、様々な重層培養、高密度培養が可能になり、より長期の良好な肝機能発現と装置の小型化が期待されている。

以上より本研究では、肝細胞の高密度培養系を使用し、より効率の良い人工肝機能補助システムの作製を試みた。肝細胞はスポンジ様担体上に培養することとし、その基質の形状、各種細胞外 coating Matrix について、最適の培養条件の検討を行った。

更に、この条件で培養した肝細胞を使用した灌流培養モデルを作製し、検討した。

## 【材料および方法】

まず肝細胞培養を支える担体の pore 径ならびに coating 素材の最適条件の検討を行った。

肝細胞は、コラゲナーゼ灌流法にて分離し、FBS 入り Williamus-E 培地に分散した後、35mm ディッシュ及び各種条件下の PVF (poly-vinyl-formale) 内に蒔込み、培養した。

PVF の平均 pore 径としては、100um, 300um, 500um, 700um のものを用意し、各々における肝機能発現を比較した。

細胞外 coating Matrix としては Type I collagen (以後 collagen), Poly-N-para-vinylbenzyl-D-lactonamid (以後 PVLA), poly-D-lysin の3種類を比較した。

肝細胞の特異的機能発現の指標としてアルブミンの生合成能を測定した。また、結果は肝細胞

の単位 DNA 量当たりで比較した。

実際に人工肝機能補助に用いるには、血漿、血液などを灌流させるモデルが必要である。そこで次に培地を灌流させながら培養する系を試作した。

PVF としてははじめの実験の結果から、平均 pore 径として 100 $\mu$ m と 300 $\mu$ m の collagen coating PVF を使用することとした。

培養用カラムとして内径約 25mm のプラスチック製円筒を使用し、厚さ 2 mm、平均 pore 径 100 $\mu$ m と 300 $\mu$ m の PVF を円筒内に交互に計 28 枚重ね合わせた。これを縦に置き上下方向に培地を灌流させることとした。

培地は 5%CO<sub>2</sub>95%O<sub>2</sub> ガスにて bubbling しながら回路を作り、ペリスタポンプにて 1 ml/分 の速度で灌流し、灌流培養モデルを作製した。

肝機能として、アルブミン合成能に加え NH<sub>4</sub>Cl 負荷による尿素合成能を測定した。

また培養肝細胞の形態観察用に、培養 4 日目のカラムより肝細胞培養中の PVF を採取し、走査電顕用試料とした。

## 【結 果】

collagen coat ディッシュに比べ PVF 上培養肝細胞は、良好なアルブミン合成能を示した。

PVF 平均 pore 径の違いによるアルブミン合成量の差異は本研究では認められなかった。

coating Matrix の違いによるアルブミン合成量の差異では、collagen と PVLA coating で良好であり、poly-D-lysine は coating 素材として不適当と考えられた。

灌流培養における肝機能は、蒔込み後 4 日間程度の比較的短期間では十分な機能発現が見られた。

灌流培養時の蒔込み肝細胞の走査電顕による観察では、PVF 上に接着伸展しているものがある一方、PVF の pore 内に球形のままトラップされている細胞も見られた。

## 【結 論】

(1) PVF のコーティング素材としては、PVLA と collagen が適当と考えられた。

(2) collagen coat PVF を用いた灌流実験系では、蒔込み後 4 日間程度までは、十分な肝機能発現が見られた。

以上により単一装置の比較的短期間の連続使用を考えた人工肝モデルとしては、collagen coat PVF を使用した灌流培養系は有用であると考えられた。

## 審査結果の要旨

各種肝不全に対する、肝機能補助療法として、従来、血液透析、血漿交換といった中毒物質除去を主眼に置いた非生物学的人工肝臓が使用されてきたが、救命率の点で、十分な成績を上げていない。また、肝臓移植も臨床的に行われているが、donorの供給に問題を残している。そこで、物質合成面をもサポートし、これらの治療法の限界を越えるものとして生物学的人工肝臓が考案され検討されてきた。最近では、培養肝細胞を使用したモデルが目ざされ期待されている。

本研究は、培養肝細胞を使用した、生物学的人工肝臓の開発を目的とし、肝細胞の効率の良い高密度培養を実現するために、各種培養条件の基礎的検討を行っている。培養を支える三次元的基質として、PVF (poly-vinyl-formal) を使用し、特にその形態として平均 pore 径、及びその coating 用素材として培養用細胞外 Matrix の検討を行い、新知見を得ている。まず、PVF の培養素材としての適否を判断するため培養用 dish 上と PVF 上の培養肝細胞における肝特異機能の発現を比較し、PVF 上の培養肝細胞が dish 上単層培養肝細胞と同等以上の肝機能を発現することを確認している。その上で ① PVF の平均 pore 径として、100um, 300um, 500um, 700um の PVF 上での培養を比較し、ここで使用した範囲では、pore 径は直接培養肝細胞の機能発現に影響しない事を証明した。② coating 用細胞外 Matrix として、Type-I-collagen, PVL A (Poly-N-para-vinylbinzyl-D-lactonamid), poly-D-lysin を比較し、PVF の coating 用としては、poly-D-lysin は不適當であるのに対し、collagen と PVL A は、ほぼ同等の肝機能発現がみられる事を発現した。また、これらの結果より得られた、至適の培養条件による PVF 上の培養肝細胞を使用し、体外循環を想定した、灌流培養系による各種肝機能発現について検討している。ここでは collagen コートした平均 pore 径 100um と 300um の PVF を使ったカラム内に肝細胞を培養し、培地を灌流しながら培養しているが、培養開始より、4, 5 日程度といった、比較的短期間ではあるが、良好な肝機能発現を観察している。

以上の結果は、肝細胞を高密度で効率よく培養する目的で PVF を使用する事が可能である事を示し、又これを用いた、人工肝臓システムの構築の可能性を示唆するものである。特に、この素材と、細胞外 Matrix の組み合わせによる培養条件の検討の報告は初めてのものであり、今後体外循環型の生物学的人工肝臓を開発するにあたり、必ず必要とされる事項と考えられる。よって、本論文は、学位論文として十分なものとする。