

博士（医学）田口宏一

学位論文題名

Development of a Bioartificial Liver with Sandwiched Cultured Hepatocytes between Two Collagen Gel Layers

（サンドイッチ型肝細胞培養法（コラーゲンゲル間培養法）  
を用いた人工肝の開発）

学位論文内容の要旨

I. 目的

急性肝不全に対する治療法として血漿交換や血液吸着などが施行されているが、未だ十分な成果が得られていない。それは肝臓が多種多様な機能を営んでおり、単に有毒物質の除去のみでは不十分なためであり、肝細胞を用いた人工肝の開発が待たれている。教室ではハイブリッド型人工肝モジュールを作製し、無肝犬や無肝家兎に応用してその有効性を報告してきた。しかし、臨床応用に当たって大量の肝細胞を必要とし、また免疫学的问题から異種動物よりヒト肝細胞を用いた方が有利だが、本邦ではその取得に限界がある。したがって、人工肝モジュール機能の飛躍的な向上が不可欠である。しかるに最近、肝細胞をコラーゲンゲルではさんだサンドイッチ型肝細胞培養法により、良好な肝細胞機能を維持したとの報告があり、今回はサンドイッチ型培養法が人工肝モジュールに応用可能かその有用性について検討した。

II. 材料と方法

1. 肝細胞の分離及び精製：6-8週齢（体重180-220g）のWistar系雄性ラットからSeglenのコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採取した。トリパンブルー排泄試験にて、生存率85-92%の肝細胞を実験に使用した。この肝細胞を10%ウシ胎児血清、 $10^{-8}$ Mデキサメサゾン、 $10^{-8}$ Mインシュリン、5,000KIU/Lアプロチニン、48mg/Lゲンタマイシン、100mg/Lクロラムフェニコールを添加したWilliams'E培地(WE)に分散して、 $10^6$ cells/mlの細胞密度に調整した。

2. 静置培養：サンドイッチ型培養法(GEL+GEL)における肝細胞機能及び形態を、従来のコラーゲンコート法(COAT)、コラーゲンゲル法(GEL)及びコラーゲンコート/コラーゲンゲル間法(COAT+GEL)と比較検討した(各群n=3)。

35mmプラスティックディッシュ上にコラーゲンコートまたはコラーゲンゲルを作成し、その上に肝細胞浮遊液を播種した。2時間培養後、培地を7ng/mlEGF、 $10^{-8}$ Mデキサメサゾン、 $10^{-8}$ Mインシュリン、5,000KIU/Lアプロチニン、48mg/Lゲンタマイシン、100mg/Lクロラムフェニコール添加のWE培地に交換して24時間培養した。その後培地を吸引して肝細胞の上にコラーゲンゲルを乗せた群と乗せない群に分けた。即ち上記の4群に分けて14日間培養を続けた。

3. 灌流培養：積層型小型人工肝モジュールを使用した。モジュールはアクリル製で内部に9枚の培養用のアクリル板を収納した。静置培養と同様にアクリル板上に作成したコラ

ーゲンゲルの上に肝細胞を播種して、2時間後に無血清のWE培地に交換した。24時間培養後に、培地を吸引して、肝細胞の上に更にコラーゲンゲルを乗せた。このアクリル板9枚を人工肝モジュールに組み込んだ。培養面積は324cm<sup>2</sup>、肝細胞数は約6.5×10<sup>7</sup>個となった。灌流培地にはLeibovitz L-15培地を使用し、灌流速度は25-30ml/minとして毎日培地を交換した(n=6)。

4. 検討項目：形態学的観察は位相差顕微鏡により、静置培養の4群について検討した。肝細胞機能については尿素合成能を静置及び灌流培養下で測定した。また、DNA量を静置培養下で、アンモニア代謝能を灌流培養下で測定した。

### III. 結 果

1. 形態学的観察：COAT及びGEL群では肝細胞は、細長く伸展し、単層形成を示した。また培養5日では細胞内に空胞が目立った。一方、GEL+GEL及びCOAT+GEL群では肝細胞は多角形を示した。培養10日ではCOAT,GEL及びCOAT+GEL群では死滅した細胞が多くなったが、GEL+GEL群では細胞内に空胞を認めたが、ほとんどの細胞が多角形を維持していた。

2. 肝細胞機能：1) 尿素合成能；静置培養ではGEL+GEL群はCOAT群と比較して14日間にわたり5~15倍の高い尿素合成能を示した。またGEL+GEL群はCOAT+GEL群やGEL群と比較しても有意に高値を示した。また灌流培養では5日間にわたり17.5~22.6 μg/2x10<sup>6</sup> cells/90minを維持したが、7日に急激な低下をみた。灌流培養とL-15培地を使用した静置培養でのGEL+GEL群とCOAT群を比較すると、培養3日で灌流培養では17.5±3.4に対し、静置培養でのGEL+GEL群は39.9±4.9、COAT群は6.3±0.4 μg/2x10<sup>6</sup> cells/90minであり、灌流培養はCOAT群に比べ有意に高値を示したが、GEL+GEL群に比べ有意に低値であった。2) アンモニア代謝能；7日間にわたり100~150 μg/dl/hr/moduleのアンモニア代謝能を示した。3) DNA量；GEL+GEL群とCOAT群の培養2日のDNA量は1.63±0.08、0.96±0.18、7日で0.50±0.01、0.17±0.02 μg/cm<sup>2</sup>と有意にGEL+GEL群で高値を示した。またGEL+GEL群はGEL群やCOAT+GEL群と比較して3日までは有意差はないが、5日以降は有意に高値を示した。

### IV. 考 察

コラーゲンゲル上で培養された肝細胞の上に、更にコラーゲンゲルを重ねるサンドイッチ型培養法はコラーゲンゲル以外の特別なマトリックスは不要で、容易に作成できた。この培養法では肝細胞は正常の肝細胞に近い多角形を呈し、従来のコラーゲンコート法でみられる様な細長い細胞の伸展は認めなかった。また静置培養での尿素合成能及びDNA量は、サンドイッチ型培養法では他の3つの培養形態と比較して有意に良好な機能を維持した。特に我々がこれまで人工肝モジュールに採用していたコラーゲンコート法に比べ極めて有意に高値を示した。本培養法を用いて人工肝モジュールに組み込んだ灌流培養実験では、尿素合成能は静置培養のコラーゲンコート法に比べ有意に高値だったが、静置培養のサンドイッチ型培養法の値には至らなかった。これは酸素不足や塩化アンモニウムの過量負荷などが考えられ、今後の検討が必要である。しかしサンドイッチ型培養法が1週間の灌流培養に十分耐え、良好な機能を発現し得ることを示したことから、サンドイッチ型培養法は人工肝モジュールに応用可能と考えられた。

### V. 結 語

1. サンドイッチ型培養法は、静置培養において、他の培養形態に比べ14日にわたり有意に良好な尿素合成能及びDNA量を示した。
2. 本培養法は、積層型人工肝モジュールを用いた灌流培養においても良好な尿素合成能を示したが、静置培養程、高値ではなかった。

3. 今後他の肝機能やスケールアップの問題など検討を要するが、サンドイッチ型培養法は積層型人工肝モジュールに応用可能であると考えられた。

## 学位論文審査の要旨

主査教授 小林邦彦  
副査教授 安田慶秀  
副査教授 加藤紘之  
副査教授 内野純一

### 学位論文題名

Development of a Bioartificial Liver with Sandwiched Cultured Hepatocytes between Two Collagen Gel Layers

(サンドイッチ型肝細胞培養法（コラーゲンゲル間培養法）  
を用いた人工肝の開発)

急性肝不全に対する治療法として、血漿交換や血液吸着等が施行されているが、未だ十分な成果が得られていない。そのため多様な肝機能を代償するには肝細胞を用いた人工肝の開発が期待されている。教室ではハイブリッド型人工肝を作製し、無肝犬や無肝家兎に応用してその有効性を報告してきた。しかし、臨床応用に当たって大量の肝細胞を必要とするため、人工肝モジュールの飛躍的な向上が不可欠である。最近、肝細胞をコラーゲンゲルではさんだサンドイッチ型肝細胞培養法により、良好な肝細胞機能を維持されたとの報告があったので、今回申請者は本培養法が積層型人工肝モジュールに応用可能かその有用性について検討した。

肝細胞の分離及び精製は6-8週齢の Wistar 系雄性ラットからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を採取し、生存率85-92%の肝細胞を各種ホルモンを添加した Williams'E 培地に分散して  $10^6$  cells/ml の細胞密度に調整した。静置培養ではサンドイッチ型培養法 (GEL+GEL) における肝細胞機能及び形態を、従来申請者らが肝細胞培養で用いていたコラーゲンコート法 やコラーゲンゲル法 (GEL) 及びコラーゲンコート / コラーゲンゲル間法 (COAT+GEL) と比較検討した (各群 n=3)。即ち35mm ディッシュ上にコラーゲンコートまたはコラーゲンゲルを作成し、その上に肝細胞浮遊液を播種した。24時間培養後、肝細胞の上にコラーゲンゲルを乗せた群と乗せない群に分け、14日間培養を続けた。灌流培養には積層型小型人工肝モジュールを使用した。培養用のアクリル板上に作成したコラーゲンゲルの上に肝細胞を播種し、24時間培養後に、更にコラーゲンゲルを乗せた。このアクリル板9枚を人工肝モジュールに組み込んだ。培養面積は  $324\text{cm}^2$ 、肝細胞数は約  $6.5 \times 10^7$  個であった。培地には Leibovitz L-15 培地を使用し、灌流速度は 25-30ml/min として毎日培地を交換した (n=6)。形態学的観察には位走査顕微鏡を用いて、静置培養の4群について検討した。肝細胞機能

として尿素合成能を静置及び灌流培養下で測定し、DNA量を静置培養下で、アンモニア代謝能を灌流培養下で測定した。

形態学的観察では COAT 及び GEL 群では肝細胞は、細長く伸展し、単層形成を示した。また培養 5 日では細胞内に空胞が目立った。一方、GEL+GEL 及び COAT+GEL 群では肝細胞は多角形を示した。肝細胞機能尿素合成能では、静置培養では GEL+GEL 群は COAT 群と比較して 14 日間にわたり 5~15 倍の高い尿素合成能を示した。また GEL+GEL 群は GEL 群や COAT+GEL 群と比較しても有意に高値を示した。また灌流培養では 5 日間にわたり 17.5-22.6  $\mu$  g/2x10<sup>6</sup> cells/90 min を維持した。アンモニア代謝能は 7 日間にわたり 100-150  $\mu$  g/dl/hr/module を維持した。DNA量は GEL+GEL 群は COAT 群と比較して 2 週間にわたり有意に高値を示した。また GEL+GEL 群は GEL 群や COAT+GEL 群と比較して 5 日目以降は有意に高値を示した。

サンドイッチ型培養法では肝細胞は正常の肝細胞に近い多角形を呈し、従来のコラーゲンコート法でみられる様な細長い細胞の伸展は認めなかった。また静置培養での尿素合成能及び DNA 量は、他の 3 培養形態と比較して有意に良好な機能を維持した。特に従来の人工肝モジュールに採用していたコラーゲンコート法に比し明らかに有意の高値を示した。また本培養法を用いた肝細胞を組み込んだ人工肝モジュール灌流培養実験においても、良好な尿素合成能及びアンモニア代謝能を認めた。以上からサンドイッチ型培養法は良好な肝機能を維持し、灌流培養にも耐えうることが明らかになり、人工肝モジュールに可能と評価した。

審査に当たって、安田教授からサンドイッチ型培養法による良好な機能の発現機序、灌流培養時の肝細胞の維持やゲルの状態、今後の人工肝の見通しについて質疑があり、申請者はサンドイッチ型肝細胞は、正常肝細胞に類似したアクチンフィラメントの分布がある点、肝細胞及びゲルは脱落なく良好に維持したことの他、人工肝の現況や可能性について回答した。加藤教授からアンモニア代謝能と DNA 量との相関及び無肝ラットへの応用について質疑があり、培養条件の相違がある点、現システムでは無肝ラットへの応用は困難である旨を回答した。小林教授からモジュール設計や形状、及び異種タンパクの影響について質疑があり、モジュールの構造やシステム及び異種タンパクに対する生体の反応について回答した。

サンドイッチ型肝細胞培養法は、静置培養において他の培養形態に比べ非常に良好な肝機能を維持したこと、灌流培養においても 5 日間にわたり良好な機能を維持したことから、本培養法は積層型人工肝モジュールに応用可能であることを示唆した点で意義があり、さらに臨床応用への可能性を高めた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であることから、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。