

学位論文題名

初代培養ブタ肝細胞の肝不全患者血漿中における代謝機能

—ハイブリッド型人工肝臓のバイオリアクターとしての有用性—

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

多岐にわたる肝臓機能を肝細胞によって代行させ、肝不全状態から救命するために、近年、分離肝細胞を応用したハイブリッド型人工肝臓の研究開発が盛んに行われている。1989年以降当教室では、初代培養肝細胞を用いた積層型人工肝臓の開発を行ってきたが、本研究では、入手困難なヒト肝細胞に代わりの培養ブタ肝細胞が、肝不全患者血漿中で肝細胞機能を発現するかどうか、また、培養ブタ肝細胞をバイオリアクターとして用いることが可能か否かについて検討した。

II. 方 法

1. 初代ブタ肝細胞培養法：ヨークシャ種ブタ(体重約20kg)の肝葉を用い0.05%ラゲナーゼ溶液で灌流後、細切、再度コラゲナーゼ溶液で振盪する二段階法により行った。低速遠心操作(50xg, 1分間x5)を行い、生存率90%以上の肝実質細胞を用いた。コラーゲンをコーティングした35mm培養器に10%ウシ胎児血清と各種ホルモンを添加したWilliams'E培地に 2×10^5 cells/0.2ml/cm²の細胞密度で播種し培養を開始し、2時間後Livobitz L-15 medium(以下L-15培地)に各種ホルモンを加え、無血清下に培養継続して3日後に実験に使用した。

2. ヒト正常血漿, 肝不全患者血漿：ヒト正常血漿は健康成人より採血した。肝不全患者血漿は、肝胆道疾患で手術後肝不全と診断され、coma grade II~IIIの患者に行われた血漿交換療法の際の廃棄血漿を用い、-80℃凍結保存後、解凍して使用した。

3. 実験群 培養開始3日後に、肝細胞を3群に分け、さらに培養を継続し検討した。

I群：L-15培地(n=7)、II群：ヒト正常血漿(n=3)、III群：肝不全患者血漿(n=5)

4. 検討項目 1)培養ブタ肝細胞の形態学的変化：各群の培養肝細胞を位相差顕微鏡を用いて連日5日間比較観察を行った。2)肝細胞機能評価：3群に置換直前、置換後1,2,3,5日に尿素合成能、糖新生能、細胞内DNA量を測定した。尿素合成能は、5mM塩化アンモニウムを添加し上清中の尿素窒素量をジアセチルモノオキシム法により、糖新生能は、2mMアラニン、2mM乳酸を添加し上清中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法で測定し、また細胞内DNA量は、diamidinophenylindoleによる蛍光法で測定した。血漿アミノ酸組成分析はII, III群についてアミノ酸18種を、培養前と培養24時間後に測定、比較した。さらに分枝鎖アミノ酸(BCAA)ロイシン、イソロイシン、バリンの濃度の和と、芳香族アミノ酸(AAA)チロシン、フェニールアラニンの濃度の和との比(Fischer比)を検討した。得られた数値は平均値±標準偏差で示し、比較検定にはPaired t test、Wilcoxon Signed Rank testを用い、危険率5%以下($p < 0.05$)を有意差有りと判定した。

Ⅲ. 結 果

1. 培養ブタ肝細胞の形態学的変化：5日間にわたり飽和密度で維持され、3群間に形態学的差異を認めなかった。Ⅲ群では、細胞表面にフィブリン様物質の析出を観察したが、細胞への形態的影響はなかった。

2. 肝細胞機能評価 1) 尿素合成能：各群培養開始時の尿素合成能は、 $1.84 \pm 0.38 \text{ ng}/\mu \text{gDNA/min}$ で、各群とも1日後に上昇し 2.90 ± 0.69 , 2.55 ± 1.80 , $2.84 \pm 1.64 \text{ ng}/\mu \text{gDNA/min}$ となったが、5日後に低下しほぼ同値を示した。群間の比較では、3日後にⅢ群はⅡ群に比して有意に高値であり、経過を通じⅢ群は比較的高値を推移した。

2) 糖新生能：各群培養開始時の糖新生能は、 $23.57 \pm 11.01 \text{ ng}/\mu \text{gDNA/min}$ で、各群とも2日後には低下し、Ⅲ群は2日後に $3.09 \pm 1.52 \text{ ng}/\mu \text{gDNA/min}$ となり以後5日後まで低値を推移した。しかし、Ⅰ、Ⅱ群も5日後には低下し、3群ほぼ同値であった。群間では、Ⅲ群はⅠ群に比して3日後有意に低下したが、1、2、5日後には3群間に差を認めなかった。

3) 細胞内DNA量：培養開始時 $1.85 \pm 0.39 \mu \text{g}/\text{cm}^2$ が、各群培養経過と共に低下傾向を示し、5日後には 0.64 ± 0.24 , 0.97 ± 0.27 , $1.38 \pm 0.43 \mu \text{g}/\text{cm}^2$ であった。Ⅲ群では3日以後同じレベルを維持していた。群間では、5日後にⅠ、Ⅲ群間でⅢ群が有意に高値であった。4) 血漿アミノ酸組成の変化：培養前血漿の総アミノ酸量は、Ⅲ群がⅡ群に比して増加傾向を示し、フェニールアラニン、チロシン、リジンが有意に高値であった。Fischer比はⅡ群 4.17 ± 0.57 、Ⅲ群 1.79 ± 0.74 で、Ⅱ群が有意に低値であった。ブタ肝細胞と接触後のアミノ酸組成でⅡ群では、メチオニン、グルタミン、アルギニンが有意に低下したが、AAAは減少しBCAAは増加傾向を認めたため、Fischer比は培養後 3.58 ± 0.85 に低下した。またⅢ群では、培養後バリン、ロイシン、イソロイシン、グルタミン、アルギニン、シトルリンが有意に減少し、その結果AAA、BCAA共に有意に減少したため、Fischer比は培養前の 1.79 ± 0.74 から 2.01 ± 1.16 へと上昇したが、有意差を認めなかった。

Ⅳ. 考 案

積層型人工肝臓に培養ブタ肝細胞が応用可能かについて検討するために、ブタ肝細胞を肝不全患者血漿中で培養し、肝細胞機能の測定と形態学的観察を行った。形態学的にブタ肝細胞は、肝不全患者血漿中でも脱落や空胞変性をみとめず5日間維持され、糖新生能、尿素合成能は正常血漿やL-15培地と比較しても十分にその機能を発現した。またアミノ酸分析の結果では、種々のアミノ酸と同時にAAAが減少し、また、BCAAも低下したためFischer比の有意の改善には至らなかったが、培養肝細胞は患者血漿中でアミノ酸を代謝機能を発現していた。以上より培養ブタ肝細胞は肝不全患者血漿中でも代謝機能を発現し維持できることを示したが、今回検討では多岐にわたる肝細胞機能の代表的な一部であり、まだ十分に解明されていない機能もあるため、培養ブタ肝細胞の評価は今後の実験や臨床的考察を通じ、さらに評価されるものと考ええる。また、免疫学的問題の解決の一つとして抗ブタ肝細胞抗体の除去に血漿分離膜の利用も可能と考えるが、さらに検討を必要とする。以上より、培養ブタ肝細胞が、肝不全血漿中で肝細胞機能を発現することから、臨床応用に向けた人工肝臓としてのシステムを検討することにより、ブタ肝細胞をバイオリクターとする積層型人工肝の開発の可能性が示唆された。

Ⅴ. 結 語

1. 培養ブタ肝細胞は、肝不全患者血漿中でその形態を良好に維持し、尿素合成能、糖新生能、細胞内DNA量は、培養開始後低下したが、5日間にわたりその機能を維持していた。

2. 培養ブタ肝細胞は、肝不全患者血漿中で増加するリジン、ロイシン、イソロイシンを有意に低下し、フェニールアラニン、チロシンを低下させたが、Fischer比の有意の上昇を認めなかった。

以上より、培養ブタ肝細胞は肝不全患者血漿中で肝細胞機能を発現することが明らかとなり、積層型人工肝のバイオリクターとしての有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

初代培養ブタ肝細胞の肝不全患者血漿中における代謝機能

－ハイブリッド型人工肝臓のバイオリアクターとしての有用性－

多岐にわたる肝臓機能を代行させ、肝不全状態から救命するために、近年、分離肝細胞を応用したハイブリッド型人工肝臓の研究開発が行われている。1989年以降当教室では、初代培養肝細胞を用いた積層型人工肝臓の開発を行ってきたが、本研究では、入手困難なヒト肝細胞の代わりに培養ブタ肝細胞が、肝不全患者血漿中で肝細胞機能を発現し、ハイブリッド型人工肝臓のバイオリアクターとして用いることが可能か否かについて検討した。

培養ブタ肝細胞には、ヨークシャ種ブタの肝葉を用い0.05% ラゲナーゼ溶液で灌流後、分散し、低速遠心操作を加え、生存率90%以上の肝実質細胞を、コラーゲンをコーティングした35mm 培養器に、10%ウシ胎児血清と各種ホルモンを添加した Williams'E 培地にて培養を開始した。2時間後 Livobitz L-15 medium(以下 L-15培地)に各種ホルモンを加え、無血清下に培養を継続した。培養開始3日後に培養肝細胞をⅠ群: L-15 培地(n=7)、Ⅱ群: ヒト正常血漿(n=3)、Ⅲ群: 肝不全患者血漿(n=5)の3群に分け、培養を5日間継続し、培養ブタ肝細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡を用いて観察した。また肝細胞機能評価として尿素合成能は、ジアセチルモノオキシム法により、糖新生能はグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法、細胞内DNA量は diamidinophenylindole による蛍光法で測定し、3群に置換直前、置換後1・2・3・5日に測定し比較検討した。さらに血漿アミノ酸組成分析はⅡ・Ⅲ群について、それぞれ培養前と培養24時間後に測定し、また分枝鎖アミノ酸(BCAA)と、芳香族アミノ酸(AAA)のモル濃度の比(Fischer比)を求め比較検討した。培養に用いたヒト正常血漿は健康成人より採血し、肝不全患者血漿は肝胆道疾患で手術後肝不全と診断され、coma grade Ⅱ～Ⅲの患者に行われた血漿交換療法の際の廃棄血漿を用い、-80℃凍結保存後解凍して使用した。得られた数値は平均値±標準偏差で示し、比較検定には Paired t test、Wilcoxon Signed Rank testを用い、危険率5%以下($p < 0.05$)を有意差有りと判定した。

各群の培養ブタ肝細胞の形態学的変化は、5日間にわたり飽和密度で維持され、3群間に形態学的差異を認めなかった。Ⅲ群では、細胞表面にフィブリン様物質の析出を観察したが、細胞への形態的影響はなかった。培養ブタ肝細胞の機能は、尿素合成能では各群とも培養開始より1日後には上昇したが、5日後には低下しほぼ同値を示した。群間の比較では、

3日後にⅢ群はⅡ群に比して有意に高値であり、経過を通じⅢ群は比較的高値を推移した。糖新生能は、Ⅲ群では2日以後5日目まで低値を推移した。しかし、Ⅰ、Ⅱ群とも5日後には低下し、3群ほぼ同値であった。群間では、Ⅲ群はⅠ群に比して3日後有意に低下したが、1、2、5日後には3群間に差を認めなかった。肝細胞内DNA量は、各群とも培養経過と共に低下傾向を示したが、Ⅲ群では3日以後同じレベルを維持していた。群間では、5日後にⅠ、Ⅲ群間でⅢ群が有意に高値であった。血漿アミノ酸組成の変化は、培養前血漿の総アミノ酸量は、Ⅲ群がⅡ群に比して増加傾向を示し、フェニルアラニン、チロシン、リジンが有意に高値であった。Fischer比はⅡ群 4.17 ± 0.57 、Ⅲ群 1.79 ± 0.74 で、Ⅲ群が有意に低値であった。ブタ肝細胞中で培養後のアミノ酸組成でⅡ群では、メチオニン、グルタミン、アルギニンが有意に低下した。またⅢ群では、培養後フェニルアラニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、グルタミン、アルギニン、が有意に減少し、その結果AA、BCAA共に有意に減少した。しかしFischer比は、培養前の 1.79 ± 0.74 から 2.01 ± 1.16 へと上昇したが有意差を認めなかった。

積層型人工肝臓の培養ブタ肝細胞は、プラズマセパレーターによって分離された血漿と直接接触するため、肝不全患者血漿中で肝細胞機能を維持できなければならない。このため培養ブタ肝細胞を肝不全患者血漿中で5日間培養し、形態観察と肝細胞機能の測定を行い以下の結果を得た。1.培養ブタ肝細胞は、肝不全患者血漿中でその形態を良好に維持された。2.尿素合成能は高値を推移した。3.糖新生能は培養開始後低下したものが、その値は低いと維持された。4.細胞内DNA量は良好に維持された。5.培養ブタ肝細胞は、肝不全患者血漿中で増加するフェニルアラニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、グルタミンを有意に低下させ、低下していたFischer比の改善傾向を示しアミノ酸代謝能を有していた。

審査にあたって、小林教授より肝細胞機能測定上の問題点、肝細胞培養時のヘパリン添加の意義、異種肝細胞を用いた人工肝臓の臨床応用時の異種蛋白の影響について、劔物教授よりバイオリアクターとしてブタ肝細胞を選択した根拠、フィブリン様物質の肝細胞に与える影響、種々の病態の肝不全に対して適応可能か普遍性のある結果か否かについて、また加藤紘之教授より肝不全血漿と正常血漿での機能の差の原因、人工肝臓臨床応用時の肝細胞機能維持に関しての質疑があったが、申請者は概ね妥当な解答を行った。

以上より、培養ブタ肝細胞は肝不全患者血漿中で肝細胞機能を発現することが明らかとなり、ハイブリッド型人工肝臓のバイオリアクターとしての有用性が示唆された。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。