

# 急性肝炎の回復に向けての ハイブリッド型人工肝臓の開発



夢はバラ色

船津 和 守\*

## Development of Hybrid Artificial Liver Support System for Acute Hepatitis.

**Key words** : Artificial Liver, Spheroid, Three-dimensional Culture, Tissue Engineering

### なぜ人工肝臓が必要か

現在国内で肝炎・肝癌などの肝臓病で苦しんでおられる方々は約160万人に達すると言われており、その効果的な治療法の開発および確立が切望されている。数多くの研究者によるこれまでの多大な努力によって、広範な肝機能を有する肝細胞そのものを何らかの方法で人工材料に固定化し、これに肝機能補助を行わせるといったハイブリッド型人工肝臓が注目を集めている。この開発により期待される効果としては、一時的な肝機能回復や生体肝移植までの延命、さらには残存肝細胞による肝再生の誘導が考えられる。

### 人工肝臓にはどのような機能が期待されるか

劇症肝炎では経過中に意識障害をはじめとする重篤な肝不全症状が出現し、短期間のうちに死亡する予後不良な病態を示し、死亡率は80～90%にもものぼる。しかしこの場合2週間という短期間でも悪化した肝臓を使わずに休ませることができれば、発病初期において肝臓内に生存する十分な数の正常な肝細胞が増殖して悪化した細胞を更新し、肝機能の再生が可能であ

るといわれている。これが可能になるためには、ヒト肝機能の数分の一に相当する機能を有し、かつそれが2週間以上持続する装置(ハイブリッド型人工肝臓)を開発できることが必要である。また慢性肝炎のための装置開発は次のステップの開発目標となる。

### 肝細胞スフェロイド形成の発見と 人工肝臓開発の発想

ご存知のように初代細胞(生体から取り出した直後の細胞)といえどもそれらが生体外で培養されると数日にして分化した機能つまり生体中で行っていた働きがほとんど消失してしまう。人工肝臓開発の成否は生体外で培養された肝細胞の機能をいかに長期間維持することが可能かどうかにかかっている。生体内の分化機能を生体外で長期間維持させる方法の研究がこれまでも試みられてきたが、細胞をただ生かすことや増殖させることはできても、分化機能を維持させることは少数の特定の細胞以外は成功していない。

私共が人工肝臓開発を思い立ったのは、t-PAなどの有用生理活性物質の生産のための細胞培養用バイオリアクターの開発過程で分化機能を維持した多細胞集塊すなわちスフェロイドの形成の発見による。通常、細胞を生体外で培養する際には、細胞が付着する担体が必要である。従来、細胞付着用には表面処理された直径約200 $\mu\text{m}$ の微小粒子いわゆるマイクロキャリアーの上に細胞を付着、伸展、増殖させていた。細胞表面は石けん膜の疎水部を内側に親水部を外

\*Kazumori FUNATSU  
1941年10月3日生  
1965年九州大学工学部化学機械工  
学科卒業  
現在、九州大学工学部、化学機械  
工学科、教授、工博、生物化学工  
学、高分子レオロジー・成形加工  
TEL 092-641-1101、内線5571  
FAX 092-651-8616



側にしたような構造のリン脂質二重層によって覆われているが、これは外部からの応力に非常に弱い。しかし細胞に栄養や酸素などの必要なものを与え、老廃物を除去するためには培養液の流れが不可欠である。これら問題点の克服がバイオリクター開発において重要である<sup>1)</sup>。

肝細胞は他の多くの正常な初代細胞と同様に壁付着性であるので、担体が必要である。担体として私共は多孔質材であるポリウレタン発泡体 (polyurethane foam: 以下 PUF と略称, INOAC社製) を用いた。

PUF (図1) は加水分解の起こりにくいポリエーテル系のもので、平均孔径  $210\ \mu\text{m}$  程度、骨格厚み  $0.03\text{mm}$ 、かさ密度  $0.012\text{g}/\text{cm}^3$  の幾何特性と多少の親水性をもつ。また初代肝細胞は成熟ラット (Wistar系ラット) から通常の方法で分取された<sup>2)</sup>。

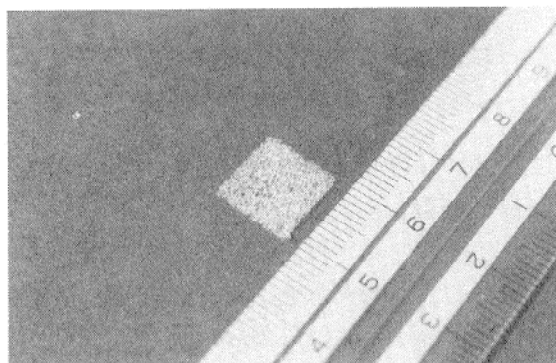


図1 PUF平板の外観 (定規の単位は cm)

PUF にラット初代肝細胞を播種すると細胞は1日経過後には PUF 表面に付着伸展し、その後細胞群は PUF 表面から紙がめくれながらはがれるように自然に剝離し、その後細胞群はある地点を中心にして集合を始め、約3日間で直径  $60\sim 170\ \mu\text{m}$  の多細胞集合体 (スフェロイド, 細胞数約200個) が形成される (図2, 図3)<sup>3)</sup>。

スフェロイドは PUF 孔内にはほぼ1個ずつ形成され、かつその底部は PUF 表面に付着固定化されている。またこのスフェロイドは単層に細胞が付着した培養方式 (単層培養系) に比べて非常に高い分化機能を長期間安定に発現することがわかった (図4)<sup>3)</sup>。スフェロイド形成や機能維持のメカニズムについて未だにほとんど解明されていない。しかし、この課題は将来大き

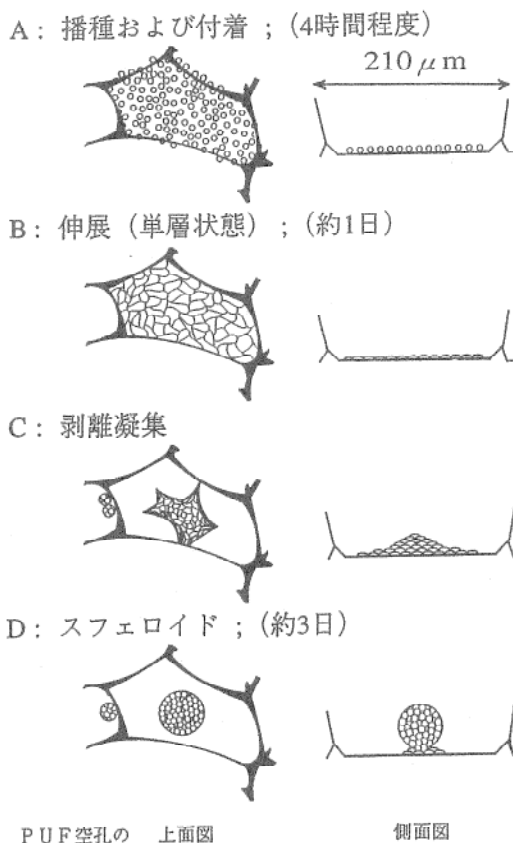


図2 PUF孔内におけるスフェロイド形成過程

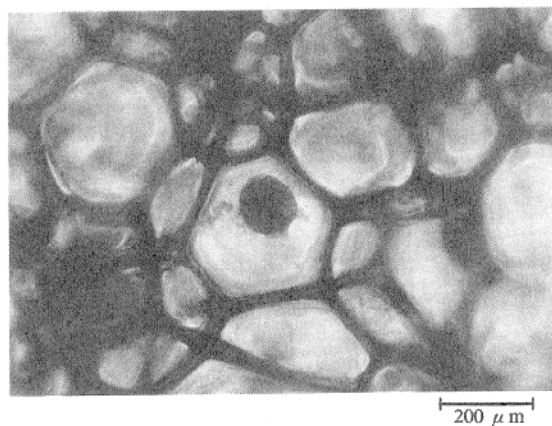


図3 PUF孔内の肝細胞スフェロイドの様子

な可能性を持つ興味あるテーマである。

機能発現と並ぶスフェロイドの大きな特長は組織の構築である。顕微鏡 TV カメラとタイムラプスビデオを用いたスフェロイド形成過程の観察によると、スフェロイド表面のある特定の部位 (胆管と予想される) から、培地とは明らかに密度の異なる液体 (胆汁と予想される) が噴出していることが確認されているし、小出らのスフェロイド切断面の電顕による観察による

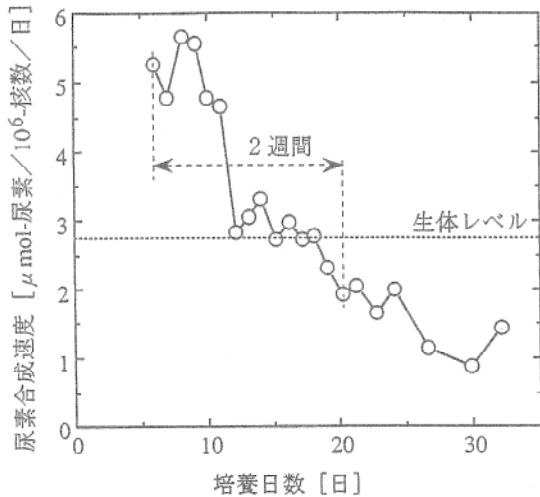


図4 PUF充填層型人工肝臓装置による尿素合成速度の経時変化  
生体レベル以上の高い細胞活性を約2週間維持しており、その後の機能低下も緩やかであった。

と、スフェロイドの内部と表面とは明らかに構造が異なっていることが明らかにされている<sup>4)</sup>。浮遊培養系や単層培養系と異なり、スフェロイドは細胞同士が三次元的に接触し合っており、生体内に似た環境が存在しているため、スフェロイドでは尿素合成やアルブミン合成などの機能が維持されている。これらのことからスフェロイドは細胞が生体外において組織の構築を部分的に行っているものと考えられる。

### スフェロイド形成から Tissue Engineering へ

このようなスフェロイドや多層集合体形成は

肝細胞だけではなく、条件によってはどのような細胞にも起りうる一般的なものと示唆される<sup>5)</sup>。スフェロイドや多層集合体の形成、すなわち三次元培養は従来まで不可能であった組織構築や分化機構発現など生物学、生化学など基礎的学問分野のみならず、有用物質生産や人工臓器の構築などの応用的分野においても新展開の萌芽となる可能性を持っている。三次元培養の基礎と応用を包含した新しい学問分野として Tissue Engineering に大きな注目が集まりつつある。

### 実用的なハイブリッド型人工肝臓装置の開発

ハイブリッド型人工肝臓のモデルシステムを図5に示す。重要な装置は図の左側の肝細胞培養装置(MC-PUFモジュール)と図の中央の血漿分離装置である。臨床応用可能な人工肝臓開発には、培養装置内肝細胞密度の飛躍的な向上とそれらが十分に機能発現できる培養環境の設定が必要不可欠であるが、これまでこれらの条件を満足できるものはなかった。本培養装置<sup>6)</sup>のポイントは円柱形 PUF ブロックに培地流動用細管を三角配置で穿孔した担体を用いたことであり、スケールアップを行った培養装置においても酸素や栄養素の供給、また代謝老廃物の除去も容易である。さらに私共は遠心法による肝細胞の播種方法を開発し、培養装置内での細胞の高密度化に成功した。各種の工夫の結果

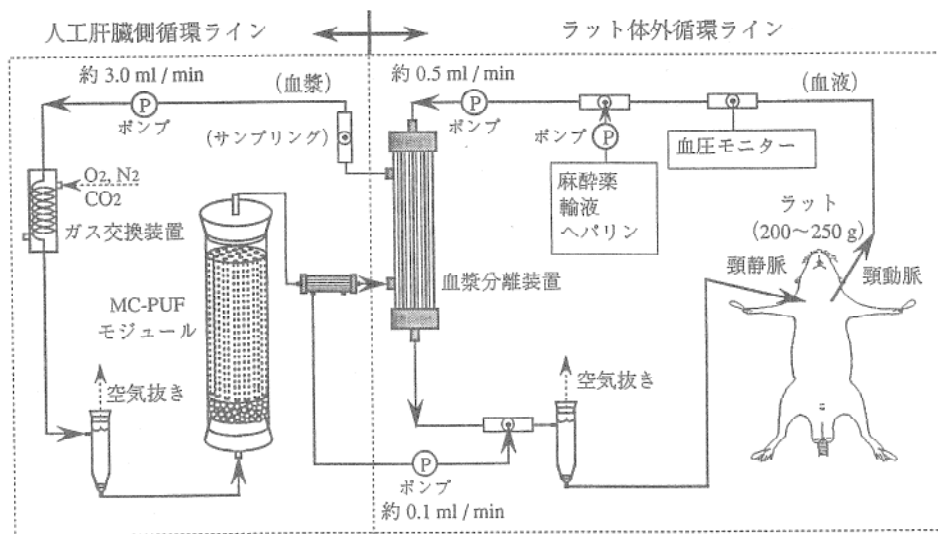


図5 ハイブリッド型人工肝臓  
肝不全ラットを用いた体外循環による人工肝臓の性能評価。

PUF孔内において多数の肝細胞スフェロイドが形成され、本装置は高い肝機能を発現することができた<sup>6),7)</sup>。

表1 生体肝と各種PUF充填層型培養装置との比較

	生体肝	平板PUF		MC-PUF 充填型
		ランダム充填型	平行積層充填型	
臓器容積 [cm <sup>3</sup> ]	1400	180	22	3.39
PUF充填率 [%]		11	69	79
総細胞数 [cells]	3×10 <sup>11</sup>	1.1×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	4.9×10 <sup>7</sup>
細胞密度 [cells/cm <sup>3</sup> -PUF] [cells/cm <sup>3</sup> -organ]	2.14×10 <sup>8</sup>	5.6×10 <sup>5</sup> 6.1×10 <sup>4</sup>	9.2×10 <sup>5</sup> 6.3×10 <sup>5</sup>	1.8×10 <sup>7</sup> 1.5×10 <sup>7</sup>
臓器代替容積 [L]	(1.4)	4909	471	20.8

<臨床側からの意見>

1/4の肝臓量でもヒトの生体肝は再生できる	→ 5.2 L
100gの肝細胞でヒトの肝機能代替可能	→ 1.5 L

表1にヒト生肝とPUF/スフェロイド培養装置の機能の比較を示す。本培養装置は容量あたりの細胞密度が従来の装置の最高値に比べ、1, 2桁向上した。以上の実験結果、理論的考察からヒト肝臓は高々数Lにコンパクト化された装置で代替できると予測され、いよいよヒト用の人工肝臓の実用化が手の届く範囲に入ってきたと思われる。

#### 肝不全動物への適用による治療効果の実証

現在人工肝臓に要求される機能についてはいまだ不明な部分が多く、その実用可能性を実証するためには動物実験が必要不可欠である。そこで図5に示す人工肝臓性能評価系を確立し、検討を行った。実験に際しては様々な操作条件下で検討を行うため、高価な設備を必要としない小型の動物としてラットを用いた。また肝疾患モデルとして、将来人工肝臓による肝再生誘導能の有無なども検討を行うため、全肝切除動物を用いず、薬物による肝不全モデル動物を用いた。動物実験の結果、同一のシステムを用いるが人工肝モジュール内に肝細胞/スフェロイドを入れていない実験すなわちコントロール実

験の場合は全例が肝不全症状の悪化で死亡した。これに対して肝細胞/スフェロイドを固定化した本人工肝臓システムを適用した場合には、血中の肝障害指標マーカー (GOT, GPT, LDH, TBA, Total Bilirubin, etc.) の経時変化は1~3日程度で正常値になり、全例速やかに回復した。これらの結果から、今回開発したハイブリッド型人工肝臓装置の臨床応用実現の可能性が大きく示された<sup>8)</sup>。

#### おわりに

2020年ごろには人工肝臓が開発されるとの予測が専門家から出されている<sup>9)</sup>。免疫拒絶反応の課題は急性肝炎患者に対する人工肝臓装着期間が2週間程度の短い期間であるので抑制剤で乗り切れるといわれている。また本報告で示したように肝細胞数あたりの機能はヒト生肝にほぼ等しく、培養装置工学的観点に基づいた高細胞密度化の達成によりヒト用でも高々数Lスケールの装置ですむ目処がついてきている。幾つかの越えるべき課題があるとはいえ、ハイブリッド型人工肝臓がヒトへの適用へ大きく前進しつつあるものといえる。この目標の実現に向かって、私共も研究を進めたいと思っている。

#### 参考文献

- 1) 船津和守ら：Artif. Organs Today, 3, 253 (1994)
- 2) 船津和守ら：Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 324 (1991)
- 3) 船津和守ら：人工臓器, 21, 1050 (1992)
- 4) 小出典男ら：Exp. Cell Res., 186, 227 (1990)
- 5) 船津和守ら：組織培養, 19, 332 (1993)
- 6) 船津和守ら：人工臓器, 23, 463 (1994)
- 7) 船津和守ら：人工臓器, 23, 469 (1994)
- 8) 船津和守ら：人工臓器, 投稿中
- 9) 駒井喬：高分子, 41, 264 (1992)