

氏 名(本 籍)	三 ^み 好 ^{よし} 浩 ^{ひろ} 稔 ^{とし} (兵庫 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,416 号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	“Long-term continuous culture of hepatocytes in a packed-bed reactor utilizing porous resin.” (多孔質樹脂を担体とする充填層型リアクターによる肝細胞の長期培養)
主 査	筑波大学教授 理学博士 坂 内 四 郎
副 査	筑波大学教授 医学博士 深 尾 立
副 査	筑波大学教授 医学博士 山 本 雅 之
副 査	筑波大学併任教授 工学博士 立 石 哲 也 (機械技術研究所)
副 査	筑波大学助教授 理学博士 石 井 哲 郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

劇症肝炎などの重篤な肝機能障害をもつ患者に対しては、血液浄化法のような純人工的な手法ではその治療は困難であり、未だに救命率は30%以下の低いレベルにとどまっている。その打開策として、培養肝細胞を装置内に組み込んだハイブリッド型人工肝臓（バイオ人工肝臓）の開発が求められている。バイオ人工肝臓を開発するためには、大量の肝細胞を高密度で培養できる技術確立することが不可欠であり、またその肝細胞の機能を1～2週間程度維持する必要がある。ところが、肝細胞は生体外ではほとんど増殖しないことから、これらの条件を充たすことは非常に困難であると考えられている。本研究では、バイオ人工肝臓の開発を目的として、多孔質ポリマーである polyvinyl formal (PVF) 樹脂を肝細胞の高密度培養用の担体として使用した充填層型リアクターを作製し、肝細胞の高密度培養とその機能維持を検討した。

(実験方法)

単離肝細胞（肝実質細胞）はラット肝から調製し、培地には Williams'E 培地に insulin, dexamethasone, aprotinin, 及び抗生物質を加えた無血清培地と、これに10%の牛胎児血清を加えた血清添加培地を用いた。

培養実験は、充填層型リアクターによる灌流培養と、対照として通常の肝細胞培養法である単層培養を並行して1週間以上（7～9日）行った。灌流培養では、立方体状に細切した PVF 樹脂を充填したリアクターと、リザーバー、培地交換ラインや酸素供給ラインからなる灌流回路を作製して肝細胞を培養した。ここで、培養用担体として用いた PVF 樹脂（平均孔径250 μ m）は約90%の高い空隙率を持ち、この細孔は3次的に連なった構造をもつ。一方、単層培養には、コラーゲンコートディッシュを用いた。いずれの培養実験においても培地交換は毎日行い、培地に適宜アンモニアを添加することで、肝細胞のアンモニア代謝能、および尿素合成能を測定した。このとき、培地交換後の培地中のアンモニアと尿素窒素の濃度の経時変化を測定し、速度論的解析を行った。また、培地中の GPT（グルタミン酸・ピルビン酸トランスアミナーゼ）活性および LDH（乳酸脱水素酵素）活性を測定することによって肝細胞の生存率の指標とした。培養終了後、リアクター内に固定化されていた細胞数を

計測するとともに、これらの細胞を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

(結果および考察)

充填層型リアクターを用いた灌流培養実験と、対照として単層培養実験を、無血清培地、および血清添加培地を用いて行った結果は以下の通りである。

1. 培養終了時に、リアクター内に固定化されていた肝細胞の密度は、 5.0×10^6 cells/cm³-PVF 以上であった。
2. 灌流培養、単層培養のいずれにおいても、無血清培地を使用した場合には培養時間の経過に伴って肝細胞の代謝活性は急激に低下し、アンモニア代謝活性および尿素合成活性を反応速度論的解析を用いて評価したところ、1週間後には初日の10%程度の活性しか保持していないことがわかった。
3. 一方、血清添加培地を使用した場合には、灌流培養においても単層培養においても1週間後でも初日の約半分の活性を維持していた。
4. 培地中のGPTおよびLDH活性を測定したところ、灌流培養では培養後期にGPTやLDHはほとんど放出されなかったことから、肝細胞はあまり傷害されていないことがわかった。
5. 培養後の肝細胞を観察した結果、個々の細胞が球状を保ったまま担体に固定化されていたが、一部にはスフェロイド状の肝細胞凝集塊が観察された。

以上の結果から、本実験において肝細胞は1週間の培養期間を通じて 5.0×10^6 cells/cm³-PVF 以上の高密度で固定化されていたことが明らかになった。また血清添加培地を使用した場合には、充填層型リアクター内に高密度に固定化された肝細胞は単層培養と同程度の活性を1週間にわたり維持できることが明らかになった。本リアクターは、スケールアップや無菌的操作も容易なことから、バイオ人工肝臓の開発に有意義であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、短期間の肝機能代替を行うハイブリッド型人工肝臓の開発を目標とした基礎的研究を述べたものである。本研究のもっともユニークな点は、多孔質ポリマーの細片に肝細胞を付着させ灌流培養するという方法で、これまでにない高密度の培養を実現したことにある。また、肝細胞はこの状態で1週間にわたり十分な機能を保持し続けることも明らかにした。これらにより個体の肝機能代替ができる装置が、そのサイズも含めて十分に実現可能であることが示された。本研究においては培養に関して他には特に工夫はみられないが、すでに報告のある非実質細胞との混合培養や培養液の工夫と組み合わせると、さらなる高密度化と肝細胞の長期機能維持が可能となることを示唆しているともいえる。ハイブリッド型人工肝臓の臨床応用にはまだ多くの解決しなければならない問題があるが、本研究の成果はその実現に大きく寄与するものである。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。