九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

初代肝細胞の発泡体孔内三次元培養法を利用したハイブリッド型人工肝補助システムの開発

井嶋, 博之
九州大学工学化学工学

https://doi.org/10.11501/3081201

出版情報：九州大学, 1994, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

第４章　ハイブリッド型人工肝臓の開発

4.1 PUF／スフェロイド培養系を利用したハイブリッド型人工肝臓装置の開発の経緯

”第３章”において、PUFを細胞の培養担体として使用すると、その孔内において球状細胞集塊、いわゆるスフェロイドを形成し、壁付着性動物細胞の高密度培養に適していることが示された。またここで形成されたスフェロイドは、細胞活性を高レベルで長期間維持していた。このPUF／スフェロイド培養系は動物細胞の高密度培養による生理活性有用物質生産のみならず、これまで *in vitro* 培養系における細胞活性発現とその維持が困難であるという理由から開発が遅れていた人工肝臓開発に対して有効な手法となり得るものと考えられる。肝臓は他の臓器と比べて、非生物学的代替は不可能であり、本研究で開発したPUF／スフェロイド培養系の有効性が最も発揮できる分野の一つである。また、PUF孔内で自然形成されたスフェロイドは、その一部分がPUF表面に付着固定化された状態であり、担体ごと装置内に封入した充填層型の培養装置開発に適していると考えられる。本章においては、PUF／スフェロイド培養系を利用した充填層型の人工肝臓開発を試みた。

4.2 節では、静置培養を行っているPUF平板を培養槽内にランダムに充填し、培地流動下でのスフェロイドの固定化保持率や肝機能発現とその維持について検討を行い、充填層型の装置開発の可能性について調べた。4.3 節では、平板PUF間の培地流路の均一化を図り、PUFの高充填率化を達成し、ヒト生肝の必要代替容積を試算した。4.4 節では、肝臓の精巧かつ緻密な構造にヒントを得て、多細管型PUF充填層培養装置を開発し、細胞の高密度化，PUFの高充填率化の達成による、実用化可能な人工肝臓装置の開発を試みた。

4.2 平板PUFランダム充填型人工肝臓の開発

4.2.1 本節の目的

本研究で開発したPUF／スフェロイド培養系は、これまで有効とされてきた単層培養系に比べて細胞活性の発現と安定性および高密度化において、はるかに優れていることが示された。しかしながら、これは静置培養系（シャーレスケール）での結果であり、装置化した場合にも同様の結果となるのかについて検討を行う必要がある。装置化に伴い、肝細胞／スフェロイドは培地流動下に置かれ、細胞が直接剪断応力を受けることになる。このような培養環境の劇的な変化によって、肝細胞／スフェロイドのPUF孔内での固定化保持率，スフェロイド形態および高い肝機能の発現とその長期にわたる維持が可能であるのかについて検討を行う必要がある。そこで、本節においてはこれ

らの項目について調べることで、平板PUF／スフェロイド培養系を充填層型の培養装置作製に応用できるかについて、検討を行った。

4.2.2 実験方法

4.2.2.1 装置

Fig.4-1に装置の詳細図を，Fig.4-2 にラインの全体図を示した。この装置の特徴は 25×25×1.5 mm のシート状のPUF32枚を培養層内にランダムに充填したものであり、培養層内におけるPUF充填率は11％である。初代肝細胞のPUF平板への播種方法は”3.3.2.3 培養条件および方法”で示した方法と同様に静置培養系で行った。まず前培養として、3.3節と同様に静置培養を行い、PUF孔内においてスフェロイドを形成させた後（培養4～6日目）に、そのPUF平板を装置内にランダムに充填した。系内における培地流速は 2.7 ml／h，溶存酸素濃度は 3.3 ppm に制御し、培地容量はライン内総量 580 ml，充填層培養装置内 220 ml であった。このラインは培養装置本体，ガス交換器，新鮮培地供給瓶，廃液回収瓶から成り立っている。培地供給瓶から供給された新鮮培地は 5％CO_2 -95％air 存在下のガス交換器に運ばれ、そこで内径 1.5 mm，外径 2.5 mm，長さ 15 m のシリコンチューブを介してO_2，CO_2を吸収し装置へと運ばれた。ここで培地はシリコンチューブ内を通した。装置内において培地成分はPUFに固定化された肝細胞によって消費され、その後培地は廃液回収瓶に回収された。培地の供給・回収はペリスタリックポンプを用いて行った。また溶存酸素濃度は装置に設置した溶存酸素電極によって測定した。

4.2.2.2 評価方法

培養とともに経時的に廃液回収瓶からサンプリングを行い、培地中のアルブミン濃度変化を測定した。また、各サンプリング時において、前回の総アルブミン量を差し引き、各培養期間における核数あたりのアルブミン分泌速度を求めた。培養層内の核数評価には、経時的に層内からPUF平板を２枚ずつ取り出し、”3.3.2.4 各種評価方法”で述べた方法で核数計数を行った。

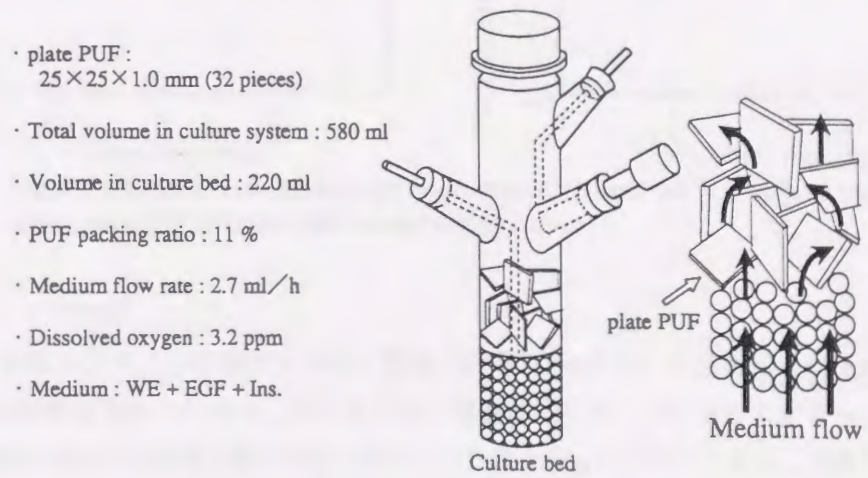
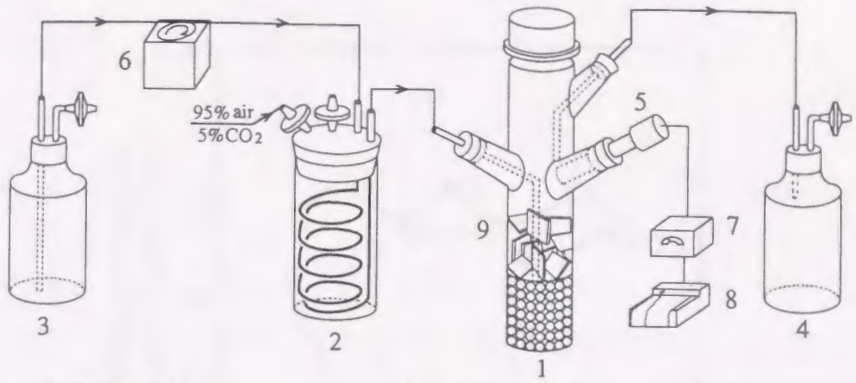


Fig.4-1 Details of PUF／spheroid packed-bed.
(Bed packed randomly with plate PUF in whose pores spheroids are formed.)



1. Culture bed
2. Gas exchange apparatus
3. Medium reservoir
4. Waste reservoir
5. DO electrometer
6. Roller pump
7. Electrometer
8. Recorder
9. plate PUF

Fig.4-2 PUF／spheroid packed-bed culture system.
(Plate PUF randomly packed in culture bed.)

4.2.3 実験結果

（1）核数変化

培養層内における肝細胞の核数変化をFig.4-3 に示す。これより、培養とともにPUF単位体積あたりの核数が激減していたことが示される。またPUF単位体積あたりの核数に比べて層容積あたりの核数の減少がより急激であった。これは、充填層内の核数評価のために毎回 2 枚ずつPUF平板を抜き去ったことに起因している。

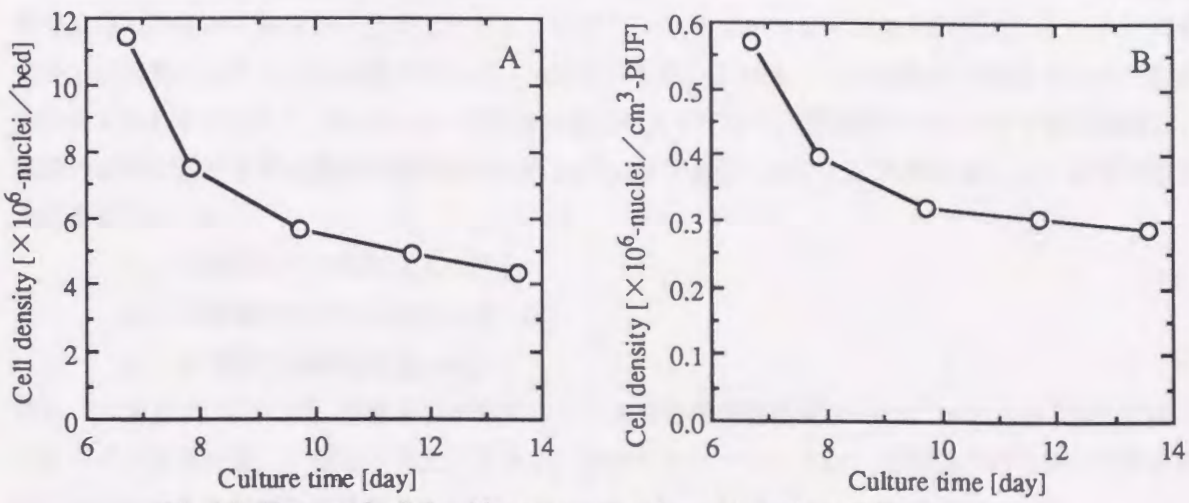


Fig.4-3 Change of cell densities per organ volume (A) and per PUF volume (B) in the plate PUF randomly packed-bed during culture.

（2）アルブミン分泌能

Fig.4-4 に結果を示す。この場合も静置培養系の結果（Fig.3-19）と同様に、PUF／スフェロイド培養系の方が単層培養系に比べて、はるかに高い細胞活性を有していることが明らかとなった。また、静置培養の場合には培地交換間での合成分泌の測定を行っているのに対し、装置培養では毎回、前回の値を差し引くといった操作を行っており、肝細胞が生産するプロテアーゼ等によるアルブミンの失活量を考慮していない。以上の点を踏まえるとPUF充填層培養系の場合、PUF静置培養系と同等以上の細胞活性を有していたことが示される。

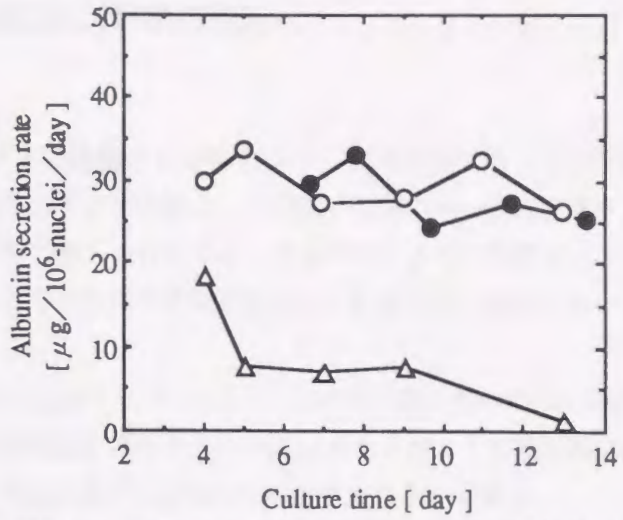


Fig. 4-4 Change of albumin secretion rates in various culture systems of PUF stationary culture（○）, monolayer culture（△）, and plate PUF randomly packed-bed culture（●）. Culture medium is WE + EGF + Ins.

4.2.4 考察

平板PUFランダム充填型装置においては、培地流路の均一化などを行わなかったにもかかわらず、少なくとも細胞あたりでシャーレスケールの静置培養の場合と同程度の活性維持が可能であった。すなわち肝細胞スフェロイドは、培地流動下においてもその形態、さらには高い細胞活性の長期維持が可能であることが示された。これらの結果からPUF／スフェロイド培養系を利用した充填層型培養装置の開発が可能であると考えられる。ただし、シリコンチューブで作製したライン中に気泡の混入が頻繁に生じ、それが層内に入り、PUF平板を舞い上げることで細胞に剪断応力などの余分な負荷を与えるとともに、PUF孔内への気泡の混入が大きくなり、肝細胞スフェロイド数が激減し、細胞の固定化保持率が充填層培養開始時の約50％にまで減少していた。培養装置として改善が必要な点を以下に示す。

1．培養層内への気泡混入の防止

2．培養層内での培地流路の均一化

3．培養層内の細胞密度の向上

特に、3項目については、静置培養の結果より、初期付着細胞密度 2.6×10^6 cells／cm^3-PUF ではスフェロイド形成が著しく阻害されたことから、次のステップとしては、培養層内のPUF充填率を如何に向上させるのかが主要課題となる。

4.2.5 本節のまとめ

平板PUFランダム充填型培養装置による検討の結果以下の事項が明らかとなり、高細胞密度化と高機能の長期安定発現が期待されるPUF／スフェロイド培養系を用いた充填層型の装置開発の可能性が示された。

充填層培養装置内（培地流動条件下）でも、

・スフェロイド形態の保持とその安定した高機能発現の維持

・培養期間を通して、少なくとも50％程度の肝細胞／スフェロイド固定化保持率の維持

4.3 平板PUF平行充填型人工肝臓の開発

4.3.1 本節の目的

”4.2 平板PUFランダム充填型人工肝臓”より、PUF／スフェロイド培養系を利用した充填層型の装置開発が可能であることが示された。その際、培地の均一流路設置や、PUF充填率の向上、さらにはライン中への気泡の混入の防止など、改善すべき多くの問題点が示された。そこで本節ではこれら問題点を改善した平板PUF平行充填型の人工肝臓装置の開発を行い、その性能について評価を行った。

本装置は、PUF平板をFig.4-5に示すように、PUF支持体を用いて平行縦型に積層したものであり、PUF平板間に均一な培地流路が確保されている。またこのように規則的にPUF平板を配置することによって層内におけるPUF充填率を飛躍的に向上することができる。

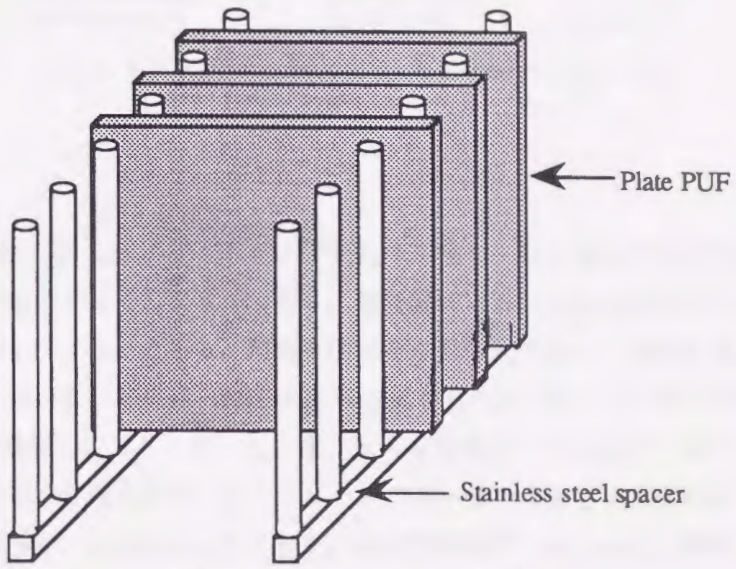


Fig.4-5 Details of plate PUF parallel packed bed.

4.3.2 実験方法

4.3.2.1 装置

装置の詳細図およびラインの全体図をそれぞれFig.4-6およびFig.4-7に示す。

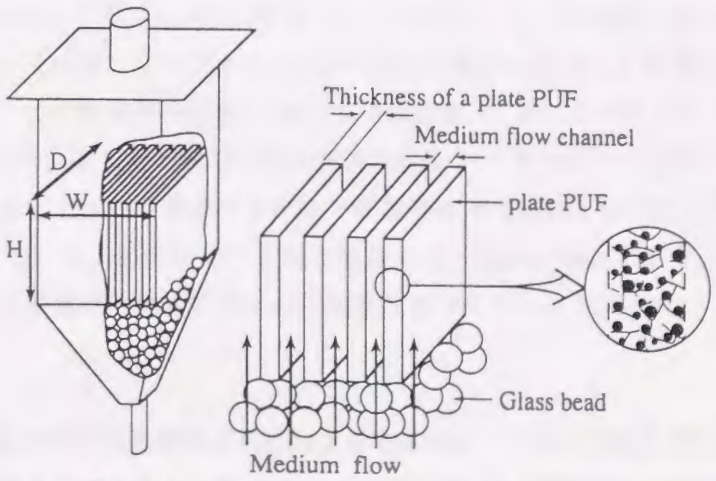
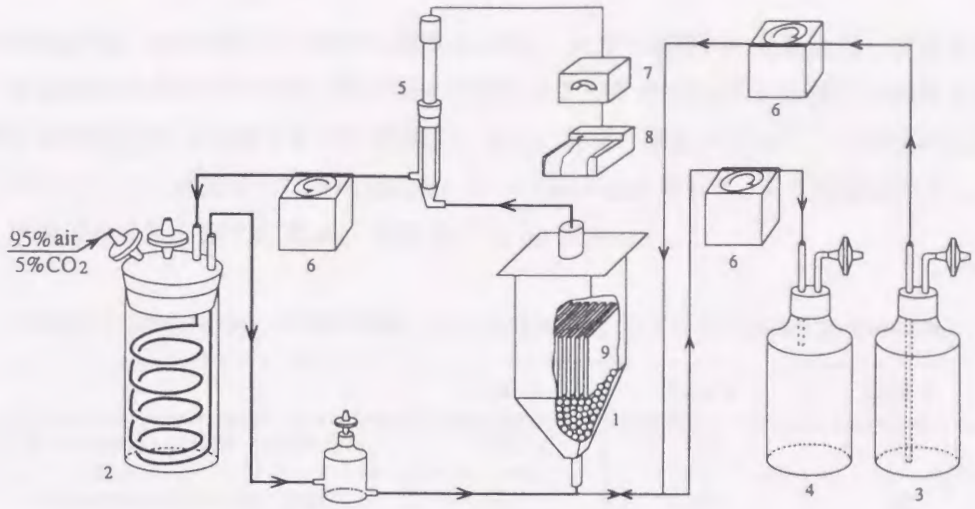


Fig. 4-6 Details of plate PUF parallel packed-bed.



1. Culture bed
2. Gas exchange apparatus
3. Medium reservoir
4. Waste reservoir
5. DO electrometer
6. Roller pump
7. Electrometer
8. Recorder
9. plate PUF

Fig. 4-7 PUF／spheroid packed-bed culture system.
(Plate PUF parallel paced-bed.)

（1）Type A bed

本装置は 40×40×1.5 mm のシート状の平板PUF 7 枚を平行に積層状態で充填し、PUF平板間における培地流動の偏流をなくしたものである。培養層内におけるPUF充填率は 19％であり、PUF平板間の培地流路幅は 4.9 mm である。培養方法は完全回分式で行い、培養培地には前述のホルモン添加無血清培地を用いた。培地は、PUF 充填層上部から流出させ、出口側での溶存酸素濃度を測定（溶存酸素 (DO) 電極：ＥＹＥＬＡ）した後、ガス交換装置でガス分圧の調節を行った。その後培地はPUF充填層底部より流入させ、ガラスビーズで均一流れとし、PUF充填部へと導いた。系内における培地流速は 8.0～10.0 ml／min であり、溶存酸素濃度は 6.2 ppm に制御し、培地容量は系全体で 200 ml, 装置内では 90 ml であった。

（2）Type B bed

本装置は 40×40×1.5 mm のシート状の平板PUF 15 枚を平行に積層状態で充填し、Type A の PUF充填率をさらに向上させ、40％としたものである。平板PUF間の培地流路幅は 1.7 mm である。培地の流れは Type A と同様であった。培養方法は半回分とし、充填層内部及びライン中の培地全量を毎日交換した。その際、サンプリングおよびPUF平板から漏洩した肝細胞数を測定した。具体的な培地交換法は、まず培養済み培地を Fig.4-6 の培養層 (1) 底部よりローラーポンプを用いて廃液回収瓶 (4) へ流入させ、次に培地瓶 (3) 内の新鮮培地をローラーポンプを用いて再び培養系内に導いた。また培養培地としては、前述のホルモン添加無血清培地に 1 mM-NH_4Cl または3 mM-NH_4Cl を添加したものを用いた。系内における培地流速は 6～10 ml／minであり、溶存酸素濃度は 6.2 ppm に制御し、培地容量は系全体で 150 ml, 装置内 90 ml であった。

（3）Type C bed

本装置は Type B のPUF充填率をさらに向上させるため、PUF支持体を用いずに平板PUFをそのまま縦型に充填したものである。したがって、PUF間の流路の確保については不明である。25×25

×1.5 mm のPUFを16枚充填した。PUF充填率は69 %，PUF平板間の培地流路幅は平均 0.65 mm であった。培養培地は前述のホルモン添加無血清培地に 1 mM の NH_4Cl を添加した培地を用いて約24時間毎に培地全量を入れ換えながら培養を行った。装置の構成内容およびその他の培養条件は Type B と同様とした。系内における培地流速は 6 ～ 8 ml／min であり、溶存酸素濃度は 6.2 ppm に制御し、培地容量は系全体で約 70 ml，装置内で 22 ml であった。

Table 4-1 Comparison of the culture conditions among plate PUF parallel packed-beds.

	Type A	Type B	Type C
Total volume in culture system [ml]	200	150	70
Volume in culture bed [ml]	90	90	22
Size of culture bed [H×D×W]	40×45×50	40×45×50	25×30×25
Size of plate PUF [mm]	40×40×1.5	40×40×1.5	25×25×1.5
Number of PUF plates	7	15	16
PUF packing ratio [%]	19	40	69
Medium flow channel [mm]	4.9	1.7	0.65
Medium flow rate [ml／min]	8.0～10.0	6.0～10.0	6.0～8.0
Dissolved oxygen conc. [ppm]	6.2	6.2	6.2

4.3.2.2 培養条件

滅　　菌　：装置全体をオートクレーブ滅菌（1.8気圧，125℃，15分）した。

培 養 温 度　：装置全体を37℃に設定したクロマトチャンバー内に設置した。

pH　：ガス交換器内に 5 % CO_2-95 % air（37 ℃，水蒸気飽和）を導入し、$NaHCO_3$ と CO_2 ガスとの緩衝作用および HEPES の緩衝作用を併用し、pH 7.2 を維持した。

溶存酸素濃度　：溶存酸素（DO）濃度は装置出口直後にDOメーターを設置し、記録計を用いてモニタリングを行いながら、系内の培地流動を変化させ、至適範囲内に入るように調整した。

サンプリング　：Type A ではクリーンベンチ内で装置上部をあけ、サンプリングを行った。また Type B，Type C については24時間ごとに培地全量を交換したので、その廃液からのサンプリングを行った。また、その際系内からの流出肝細胞数のチェックも併せて行った。

4.3.2.3 評価方法

（1）細胞数測定法

細胞数および細胞の固定化効率測定のためには、”3.2.2.5（1）細胞計数法”と同様に、肝細胞の核数で評価することにした。Type A については完全回分式で培養したため、充填層培養開始時および終了時での値を補間することにより培養期間中の装置内核数を求めた。Type B および Type C については、毎日系内の培地全量の入れ変えを行ったため、層内から漏洩する細胞数を毎日測定することにより求めた。

（2）アルブミン合成分泌活性

Type A については ” 4.2.2.2 評価方法 ” と同様の手法で測定を行った。Type B および Type C については、培地交換間（約24時間）毎にサンプリングし、その間の平均値を合成分泌速度として評価した。

（3）尿素合成（アンモニア代謝）活性

(2) のアルブミン合成分泌活性測定と同様にして行った。また注意すべき点としては、尿素合成（アンモニア代謝）には、反応の基質となるアンモニアが必要不可欠である。そこで 1 または 3 mM の NH_4Cl 添加無血清培地を用いて培養を行い、その活性について評価することとした。ここで添加アンモニア濃度は以下の様にして算出し、決定した。

- 生体内肝細胞の尿素合成速度：3.33 μmol-urea／10^6 cells／day
- 装置内肝細胞数：（6.18×10^7）／（1.45）＝4.26×10^7 cells
- 一日あたりの装置内尿素合成量：3.33×42.6＝142 μmol／day
- 一日あたりの装置内アンモニア代謝量：142×2＝284 μmol／day
- 必要アンモニア濃度：284／150＝1.89 mM
- 静置培養系の結果から、細胞あたりの最大尿素合成速度は 0.479 μmol-urea／10^6 cells／h（11.5 μmol-urea／10^6 cells／day）であることが示されており、尿素合成の基質律速となる危険性があったことから、50％程度の余裕を持たせて 3 mM-NH_4Cl 添加培地を用いることにした。

4.3.3 実験結果

4.3.3.1 Type A bed（PUF充填率19％）

（1）細胞密度と固定化保持率

結果を Fig.4-8 に示す。ここでは充填層培養開始時および終了時において核数計数を行った。約18日間の充填層培養の結果、細胞密度は 21.6 から 14.1 [$\times10^6$ nuclei／module] または 1.29 から 0.84 [$\times10^6$ nuclei／cm^3-PUF] へと減少した。また、培養開始時に対する培養終了時での肝細胞固定化保持率は 65% であった。

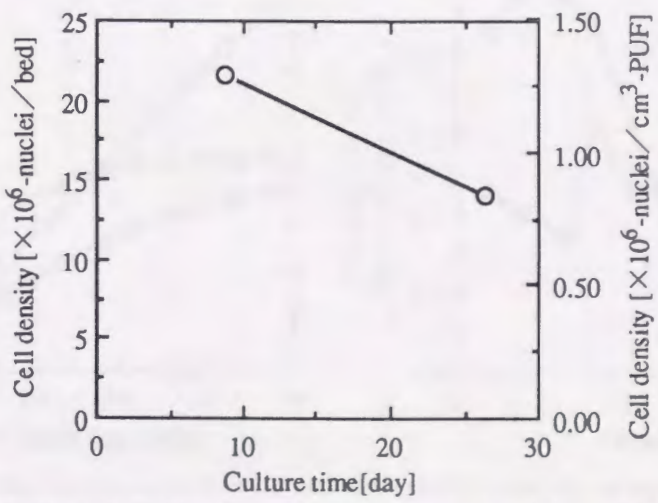


Fig.4-8 Change of cell density in the plate PUF parallel packed-bed (Type A bed) during culture.

（2）アルブミン合成分泌活性

結果を Fig.4-9 に示す。また図中には、比較として静置培養系での結果も併記した。これより培養環境の違いにもかかわらず、PUF／スフェロイド充填層培養系はPUF静置培養系と同等の活性発現を行っており、さらにこれらPUF／スフェロイド培養系はともに単層培養系に対して良好な活性を維持していた。

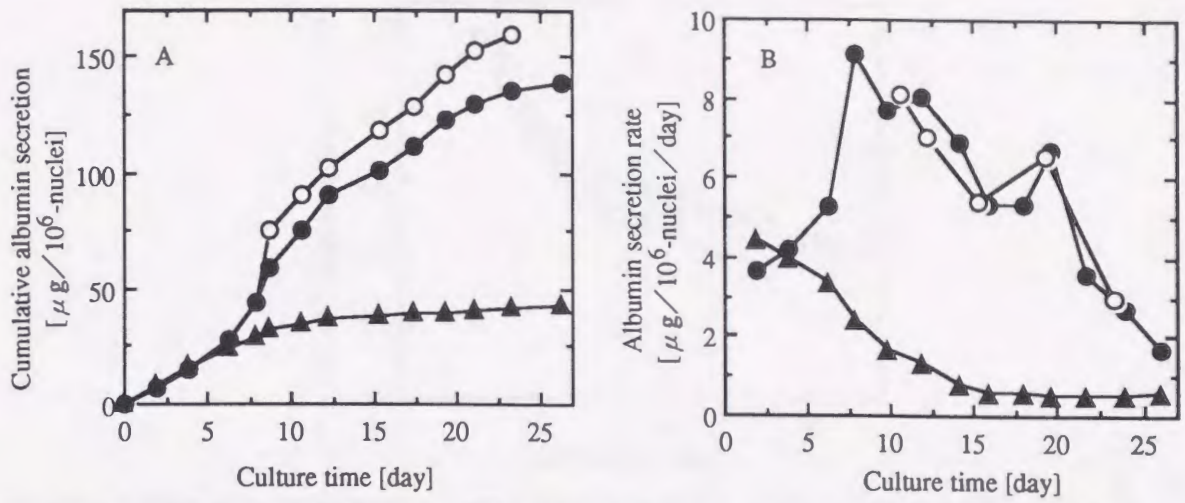


Fig. 4-9 Change of cumulative albumin secretion (A) and albumin secretion rate (B) during culture in Type A PUF／spheroid packed-bed（○）, PUF／spheroid stationary culture（●）, and monolayer culture（▲）.

（3）尿素合成能

結果を Fig.4-10 に示す。まず尿素蓄積量についてみてみると、PUF／スフェロイド培養系においては、モジュールを用いたほうが、静置培養系に比べて高い細胞活性を示すことが明らかとなった。しかし、静置培養系における単層培養系とPUF／スフェロイド培養系との比較においては単層培養系の方が優れた細胞活性を有していた。次に尿素合成速度を見てみると、静置培養系においては、培養初期に単層培養系の方がPUF／スフェロイド培養系の２倍近い細胞活性を有していることが示された。しかしながら培養 10 日目付近で単層培養系の機能低下により、細胞活性レベル逆転が生じた。以上より活性の長期安定維持といった点において、PUF／スフェロイド培養系の優位性が示された。

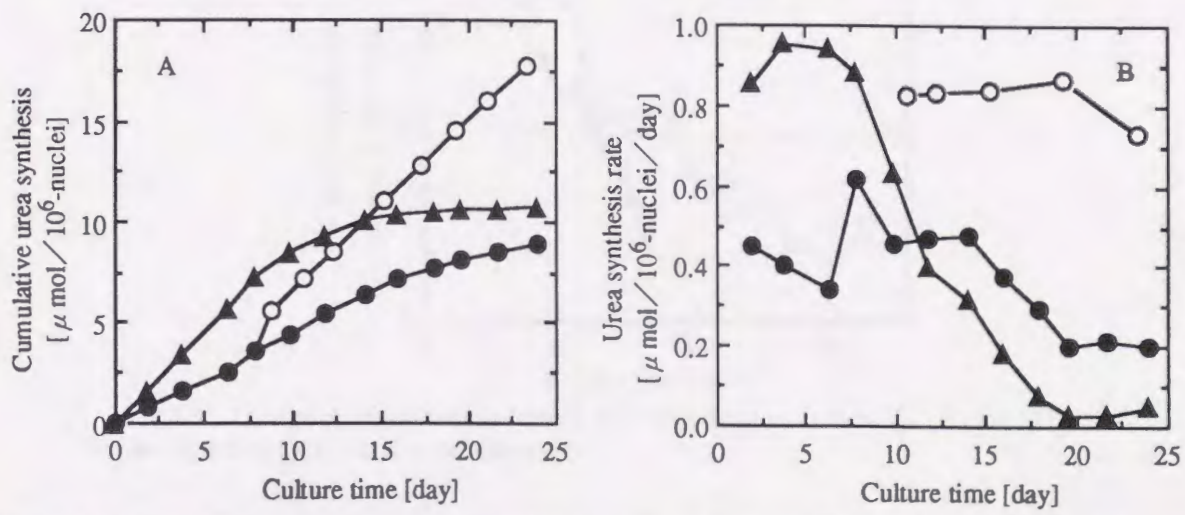


Fig. 4-10 Change of cumulative urea synthesis (A) and urea synthesis rate (B) during culture in Type A PUF／spheroid packed-bed（○）, PUF／spheroid stationary culture（●）, and monolayer culture（▲）.

4.3.3.2 Type B bed（PUF充填率40％）

（1）細胞密度と固定化保持率

結果を Fig.4-11 に示す。培養32日目における肝細胞／スフェロイドの固定化率は約42％であり、培養２週間目での値は約64％であった。

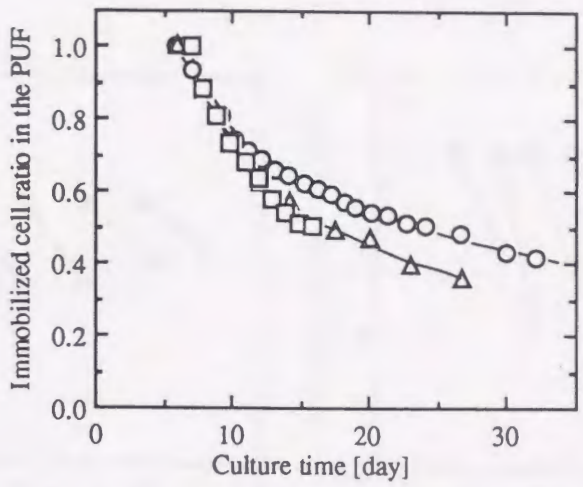


Fig.4-11 Change of nuclei numbers in Type B bed during culture. Culture medium is WE + EGF + Ins. + NH_4Cl. ○ and △ : 3 mM-NH_4Cl , □ : 1 mM-NH_4Cl .

（2）尿素合成能

結果を Fig.4-12 に示す。これより 3 mM-NH_4Cl 添加培地を使用した方が、若干ではあるが、より良好な尿素合成活性を維持していることが示される。また全体的な傾向としては、充填層培開始時に活性の最大値を示し、その後培養とともに徐々にその活性を失っているが、培養３週間程度では、*in vivo* レベルの活性を維持している。

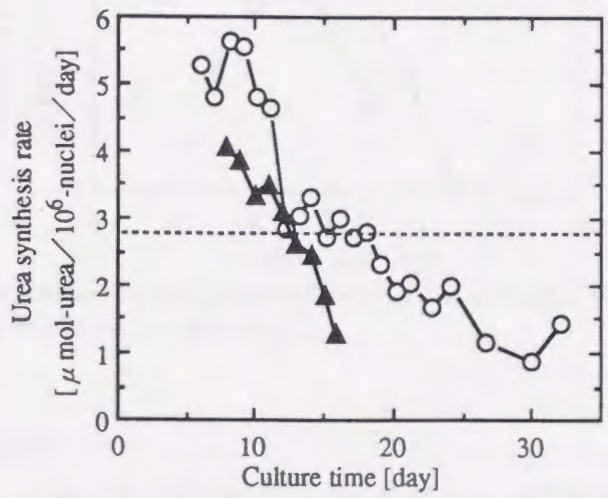


Fig.4-12 Change of urea synthesis rates in Type B bed during culture. ○ : 3 mM-NH_4Cl , ▲ : 3 mM-NH_4Cl. -------: *in vivo* level.

（3）アンモニア代謝活性

結果を Fig.4-13 および Fig.4-14 に示す。Fig.4-13 より、培養培地中に添加したアンモニア濃度が速やかに低下していたことが示され、人工肝臓装置が培養期間中を通じてアンモニア代謝解毒に有効であったことが示される。また Fig.4-14 の結果より、その活性は実験毎にレベルのばらつきはあるが、少なくとも２週間程度は維持されていた。

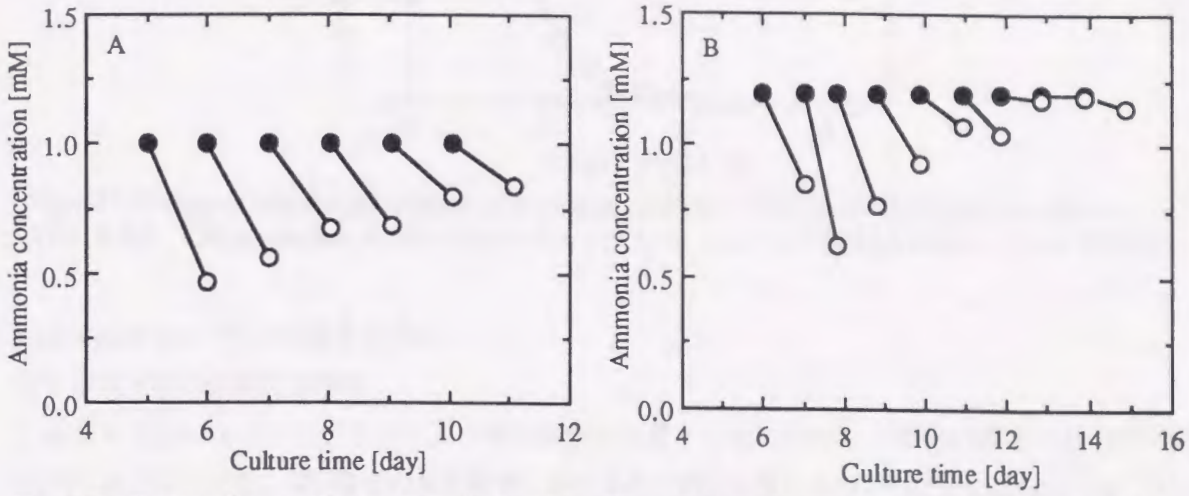


Fig.4-13 Change of ammonia concentration in the medium during culture of Run 1 (A) and Run 2 (B) in Type B bed. Culture medium is WE + EGF + Ins. + NH_4Cl. ● is the initial ammonia concentration and ○ is ammonia concentration in the medium at the medium exchange.

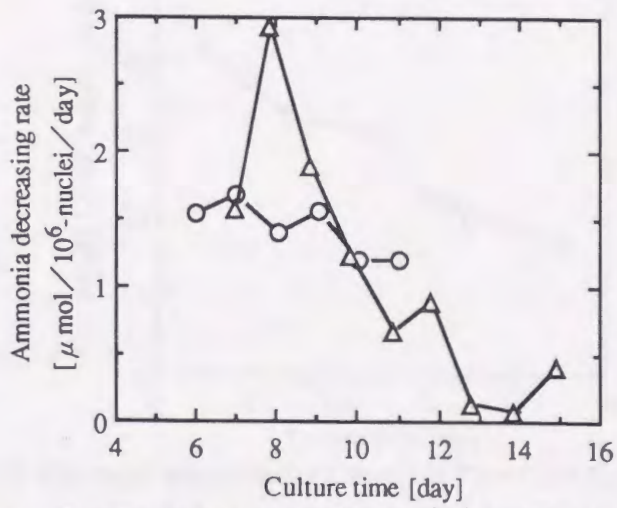


Fig.4-14 Ammonia decreasing rates during culture of Run 1（○）and Run 2（△）in Type B bed. Culture medium is WE + EGF + Ins. + 1 mM-NH_4Cl.

（4）アルブミン合成分泌活性

結果を Fig.4-15 に示す。これより 3 mM-NH_4Cl 添加の場合には、充填層培養開始時より速やかにその活性は低下し、培養３週間目にはほとんど失っていた。これに対して、1 mM-NH_4Cl 添加の場合には、NH_4Cl を添加していない通常の無血清培地を用いた場合と同様に、安定した機能発現を示している。

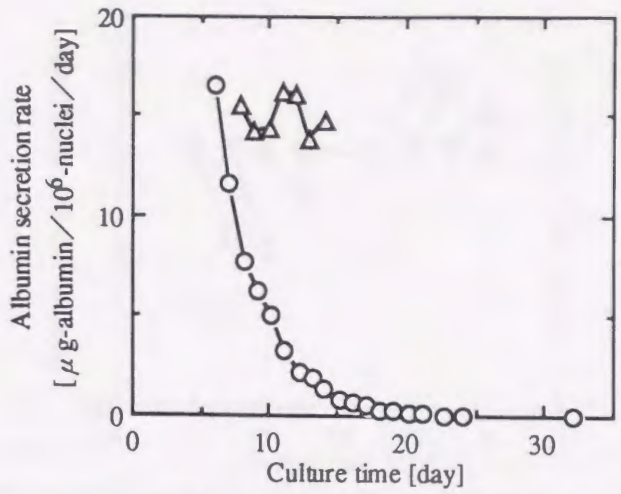


Fig.4-15 Change of albumin secretion rates depending upon concentration of NH_4Cl during culture in Type B bed. Culture medium is WE + EGF + Ins. + NH_4Cl. ○ : 3 mM-NH_4Cl and △ : 1 mM-NH_4Cl.

4.3.3.3 Type C bed（PUF充填率69％）

（1）細胞密度と固定化保持率

結果を Fig.4-16 に示す。リアクター内の核数は培養とともに減少し、培養15日目には初期の約40％に減少していた。この場合の培養層内における最大細胞密度は 0.687×10^6 nuclei／cm^3-bed であった。

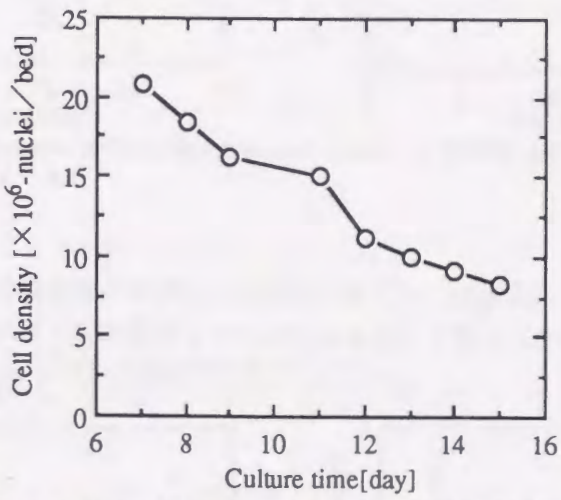


Fig.4-16 Change of immobilized cell density in Type C bed during culture.

（2）アンモニア代謝能

結果を Fig.4-17 , Fig.4-18 に示す。Fig.4-17 より、培地中のアンモニア濃度は培養10日目までは良好に減少したが、それ以降は逆に増加した。Fig.4-18 においても、培養初期においては良好なアンモニア代謝活性を有しているものの、培養11日目以降、その値は負となり、培養層内における細胞の尿素合成活性に対し、細胞の代謝老廃物としてのアンモニア生産量が上回ったことが示される。

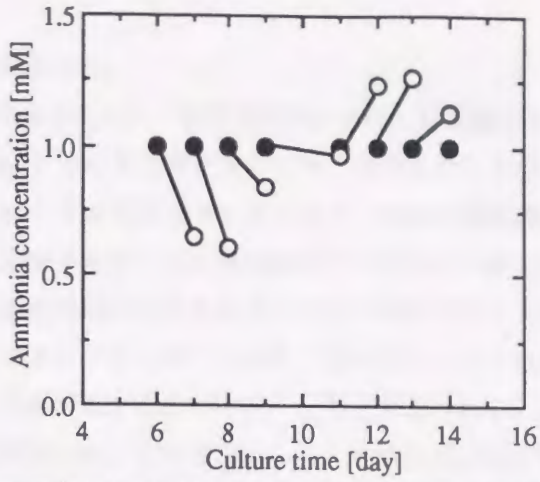


Fig.4-17 Change of ammonia concentration in the medium during culture in Type C bed.
● : the initial ammonia concentration and ○ : ammonia concentration at the medium exchange.

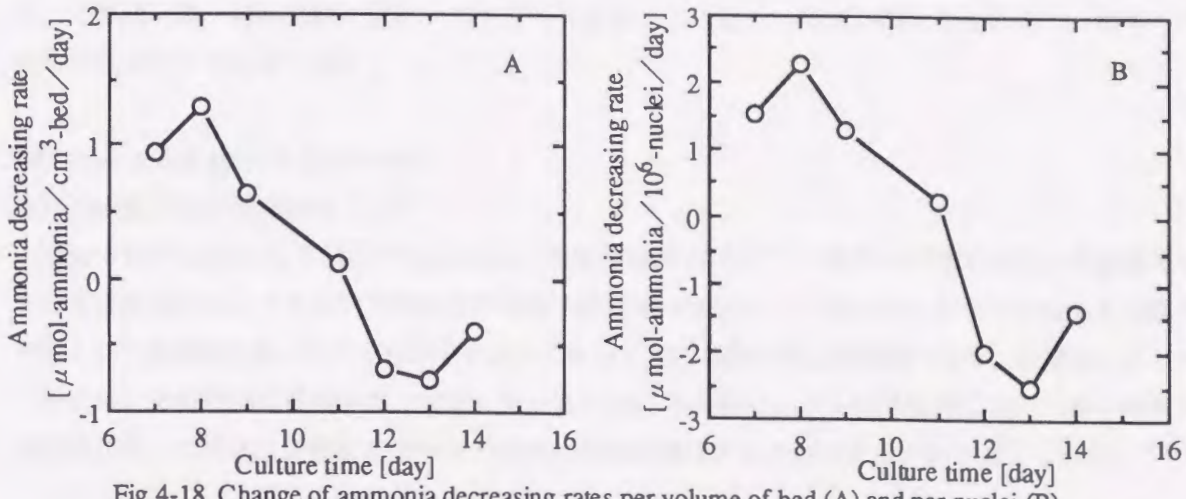


Fig.4-18 Change of ammonia decreasing rates per volume of bed (A) and per nuclei (B) during culture in Type C bed.

（3）尿素合成能

結果を Fig.4-19 に示す。培養期間中を通じて培養容積あたり，核数あたりともに良好に機能を維持していた。特に Fig.4-12 に比べて核数あたりの尿素合成速度は低かったが、その維持は良好であり、培養期間を通じて *in vivo* レベル近傍の活性を示していた。

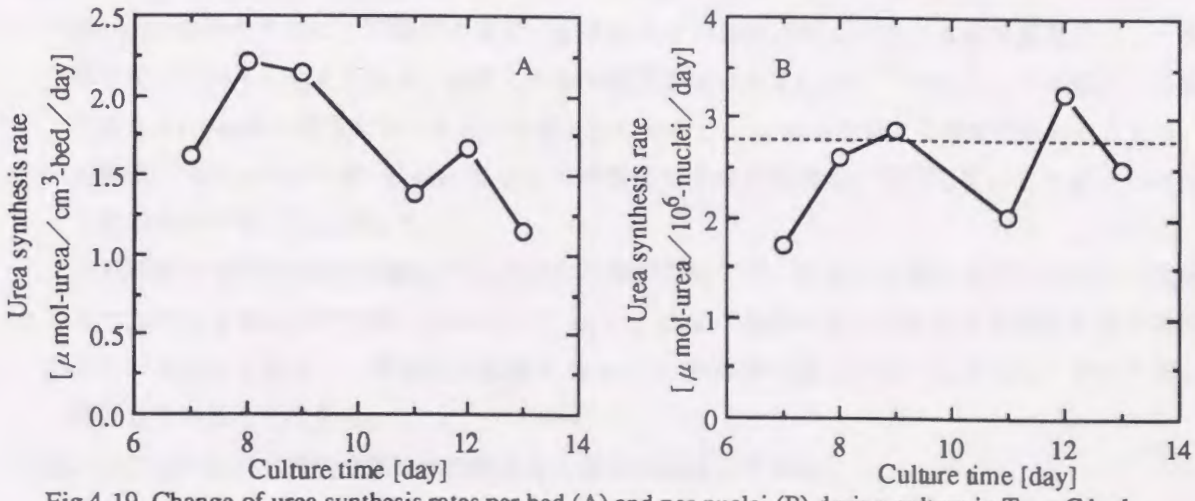


Fig.4-19 Change of urea synthesis rates per bed (A) and per nuclei (B) during culture in Type C bed.
-------- : *in vivo* level.

4.3.4 考察

4.3.4.1 Type A bed（PUF充填率19％）

完全回分式による実験であったため、培養期間中における培養層内の核数を正確に把握できなかった。したがって Type A bed における実験結果のうち、核数あたりの機能発現量については定量的信頼性には若干疑問が残るが、本培養系においてもまた、PUF静置培養および 4.2 節のPUFランダム充填型培養装置同様、良好なアルブミン合成分泌活性を得ることができた。また培養液中に分泌されたアルブミンは、肝細胞が同時に生産するプロテアーゼなどにより失活する。本培養系においては廃液回収瓶から経時的にサンプリングしており、長い場合で約 7 日間も放置された状態にあり、実際に肝細胞が生産したアルブミンはさらに多いものと考えられる。また Type A bed の尿素合成能は、PUF静置培養系以上であった。この理由として、培地流動により細胞への酸素や栄養素の供給や細胞周りからの代謝老廃物の速やかな除去、さらには合成された尿素の速やかな除去が考えられる。また肝細胞の固定化保持率は65％であり、4.2 節で示したランダム充填型の50.5％よりも高かった。これは、均一培地流路設定と、 空気抜きの設置による層内への気泡混入防止により、細胞への負荷が軽減されたためである。

4.3.4.2 Type B bed（PUF充填率40％）

（1）肝細胞の固定化保持率

Type B bed の結果は、” 4.3.3 Type A bed（PUF充填率19％）” の場合と同様である。培養層内における流路幅の減少によるPUF平板間の流路内線流速の増加は、今回の系においては細胞の固定化にほとんど影響がなかったことが示される。これは、PUF自体が多孔質構造であり、肝細胞／スフェロイドは、その孔内に保持された状態にあったため、本実験のような操作範囲においては、培地の線流速に伴って増加する剪断応力からの直接の影響を避けることができたためと考えられる。

（2）尿素合成能

添加したNH_4Cl 濃度によって肝細胞の尿素合成速度が変化することが示されたが、これは NH_4Cl 中のアンモニウムイオンが、合成される尿素の基質となっているためである。また興味深いことに、培養初期において両実験系ともに *in vivo* レベルをはるかに上回る高機能発現が観察された。この原因については不明であるが、現在のところ以下のように考えられる。

- Fig.3-11 に示すように、肝細胞の尿素合成速度はその細胞周囲に存在する尿素濃度によって影響を受けていると考えられる。健常人の血中尿素濃度は約 4.6 mM [97] であり、今回使用した系では 0 ～1.1 mM の濃度であったことを考え合わせると、 *in vivo* を超える値が得られたことも、肝細胞／スフェロイドが *in vitro* において肝機能を十分に保持し、発現していると考えれば、当然の結果であったと言える。
- 元来肝臓はその 3／4 を切除しても旺盛な肝再生が起こり、生存が可能なだけではなく、数ヶ月で元の大きさにまで回復する。よって *in vivo* における肝細胞はその有する機能を全て発揮しているわけではなく、機能発現総量を *in vivo* の細胞数全量で割ってしまうと、かなり過小評価していることになる。

以上のことから、本研究で得られた結果は、妥当であると考える。

（3）アンモニア代謝活性

アンモニア代謝活性については、先の尿素合成活性に比べてその維持が困難であり、維持期間が短い。培地中アンモニア濃度変化は、装置内肝細胞が代謝老廃物として生じるアンモニア量と尿素への変化により代謝されるアンモニア量との収支の結果であり、細胞活性そのものを示しているものではない。しかしながら、ここで目的としているのは、人工的肝機能の代替がどれだけ可能であるかであり、ハイブリッド型の装置開発を行う以上、差し引きのアンモニア除去能力が重要となる。ただし、この場合においても、培養2週間程度は培地中アンモニア濃度が良好に減少していたことから、本装置の有用性が実証されたと考えられる。

（4）アルブミン合成分泌活性

本研究で得られた結果から、明らかに3 mM-NH_4Cl 存在下で培養を行った場合には、そのアンモニアの細胞毒性のために、肝細胞／スフェロイドが大きく障害を受けることが示された。これまでの静置培養での結果は、全て通常無血清培地で培養し、尿素合成活性測定時のみ NH_4Cl 添加培地へと置換していたことから、このような結果とはならなかったと思われる。また、この培養後半において、系内から漏出してくる細胞はスフェロイド状態が崩れたものが多くなっており、培養終了時には、かなりのスフェロイドが崩壊していた。これらより、一般に尿素合成活性を測定するために5 mM 程度のアンモニア添加培地を用いる場合もあるが、細胞を長期間培養する環境としては、1 mM-NH_4Cl 以下の培地を使用すべきであることが示される。また3 mM-NH_4Cl 添加系は、健常人の肝臓の尿素合成活性から算出したものであるが、劇症肝炎患者血中アンモニア濃度においては通常0.5 mM 以下（0.05～0.5 mM）[98] であることからも、装置性能の評価のためには高くとも1 mM-NH_4Cl 添加培地にとどめるべきである。

4.3.4.3 Type C bed（PUF充填率69％）

尿素合成活性は良好に維持されていたが、細胞の固定化率やアンモニア代謝活性の維持はあまり良くなかった。これは、PUF支持体の撤去による均一な培地流路の崩壊により、培養層内において偏流が生じ、さらに細胞の高密度化により、酸素や他の栄養素の供給、さらには細胞の代謝老廃物の除去が悪化し、細胞活性が低下したためである。このことは、Fig.4-19 における尿素合成活性が低かったことからも容易に推測できる。以上より、平板PUF平行充填型培養装置においては、これ以上のPUFの高充填率化は不適当であると考えられる。

4.3.5 本節のまとめ

4.3.5.1 PUF充填率および細胞の高密度化

培養初期に急激な核数の減少が生じた。これはPUFプレートをPUF支持体内へ挿入する再播種時に主因がある。この操作はPUFの支持体を培養系外に取り出し、そこにPUF平板を1枚ずつ挿入するが、この過程に5～10分程度の時間が必要で、その間PUF平板は外気にさらされ、一部の細胞の表面が乾燥してしまうことと、操作の際ピンセットではさんだり、引っ張ったりすることで、PUFに対して過大な応力をかけることになり、その結果細胞がダメージを受けたり、スフェロイドの固定化部位がはずれるためである。

4.3.5.2 細胞機能発現

Fig.4-10 より培養初期において単層培養系が、静置状態のPUF／スフェロイド培養系の２倍程度高い尿素合成活性を示している。Fig.3-9 に示したように、尿素合成速度はその細胞周りの尿素濃度により制限されていることがわかっており、PUF／スフェロイド培養系はその細孔構造のため、単層培養系に比べて物質移動が悪いと考えられる。すなわち、PUF孔内（細胞周囲）の尿素濃度の局所的増加により、そのような結果となったことが考えられる。また Fig.4-10 に示す Type A の結果について、静置培養系での結果との比較を行うと、PUF／スフェロイド培養系同士の場合には、モジュール内の細胞活性の方がはるかに高くなっている。これは、モジュール内における培地流動の結果、物質交換が促進され、細胞周りの局所的尿素濃度の上昇が回避されたことに起因するものと考えられる。またその時の尿素合成活性は、培養初期の静置の単層培養系での値とほぼ一致していたことからも、Fig.4-10 で得られた結果（尿素合成活性：静置のPUF／スフェロイド培養系＜単層培養系）は、物質交換の問題に起因していたと結論付けられる。

4.3.5.3 人工肝臓としての必要代替容積

ヒト肝臓全量を基準とし、細胞量あたり、および尿素合成量あたりの必要代替容積について Table 4-2 および Table 4-3 にまとめた。人工肝臓装置内における細胞活性は生体内のそれと比べて高い場合で約３倍もの値を示したが、モジュール容積あたりの細胞密度が生体肝の値を２～３桁下回っていた。したがってヒトの肝機能あるいは肝細胞数の全量を代替するためには、数百リットルオーダーの装置容積になる。手軽にベッドサイドで使用するためには数リットル程度、もしくは大きくても高々数十リットルの装置にまでコンパクト化する必要がある。しかしながら、4.2.4 および 4.3.4.3 で述べたように平板PUFの使用ではこれ以上の細胞の高密度およびPUFの高充填率化は不可能である。今後なんらかの技術革新により、まだ改良の余地がある細胞の高密度化を成功させ、実用化可能な性能を持つ人工肝臓装置の開発が必要である。

Table 4-2 Comparison of volumes and cell densities among human liver and the hybrid artificial liver support systems of various PUF packed-bed culture systems.

	Human liver	Plate PUF randomly packed-bed	Plate PUF parallel packed-beds		
			Type A	Type B	Type C
Organ volume [cm^3]	1400	180	90	90	22
PUF packing ratio [%]	———	11	19	40	69
Total cell number [cells]	3×10^{11}	1.1×10^{7}	2.2×10^{7}	4.3×10^{7}	2.1×10^{7}
Cell density					
[cells／cm^3-PUF]	———	5.6×10^{5}	1.3×10^{6}	1.2×10^{6}	1.4×10^{6}
[cells／cm^3-organ]	2.1×10^{8}	6.1×10^{4}	2.4×10^{5}	4.7×10^{5}	9.4×10^{5}
Substitute organ volume calculated from the cell deisity [L]	1.4	4909	1227	628	314

Table 4-3 Comparison of urea synthesis activities as one of the performance among human liver and the hybrid artificial liver support systems of various PUF packed-beds.

	Human liver	Plate PUF randomly packed-bed	Plate PUF parallel packed-beds		
			Type A	Type B	Type C
Organ volume [cm^3]	1400	180	90	90	22
PUF packing ratio [%]	——	11	19	40	69
Cell density					
[cells／cm^3-PUF]	——	5.6×10^5	1.3×10^6	1.2×10^6	1.4×10^6
[cells／cm^3-organ]	2.1×10^8	6.1×10^4	2.4×10^5	4.7×10^5	9.4×10^5
Urea synthesis rate					
[μmol／10^6 cells／day]	2.78	——	——	8.48	2.88
[mmol／organ／day]	833	——	——	0.33	0.048
Substitute organ volume calculated from urea synthesis rate [L]	1.4	——	——	227	382

4.3.5.4 総括

平板PUF平行充填型培養装置の開発により得られた研究成果を以下にまとめる。

・均一培地流路確保によりPUFの高充填化が達成でき、肝細胞／スフェロイドの固定化保持率も向上した。

・静置培養系、さらには *in vivo* レベルを上回る高機能発現を示し、かつその維持も比較的良好であった。

・ヒトの肝臓全量を代替するには 200～300 リットルもの装置容量が必要である。

・細胞の高密度化には限界があり、またPUFの剛性の問題からスケールアップは困難である。

4.4 多細管PUF充填層型人工肝臓の開発

4.4.1 はじめに

生体肝は Fig.4-20 [97] に見られるように”究極のバイオリアクター”とも呼ばれるべき精巧かつ緻密な構造を有している。このため 2.14×10^8 cells／cm^3-organ もの高細胞密度が達成されるとともに、全ての肝細胞の生存環境が維持されている。そこで、この生体肝の構造的特徴のポイントをつかみ、それを基にした装置開発を行う。その生体肝の特徴は Fig.4-21 に示されるように、細胞層を血管が挟み込んだ基本構造の繰り返しであり、均一流路を設定した充填層型培養装置の開発により、実用可能なハイブリッド型人工肝臓装置の開発が期待される。

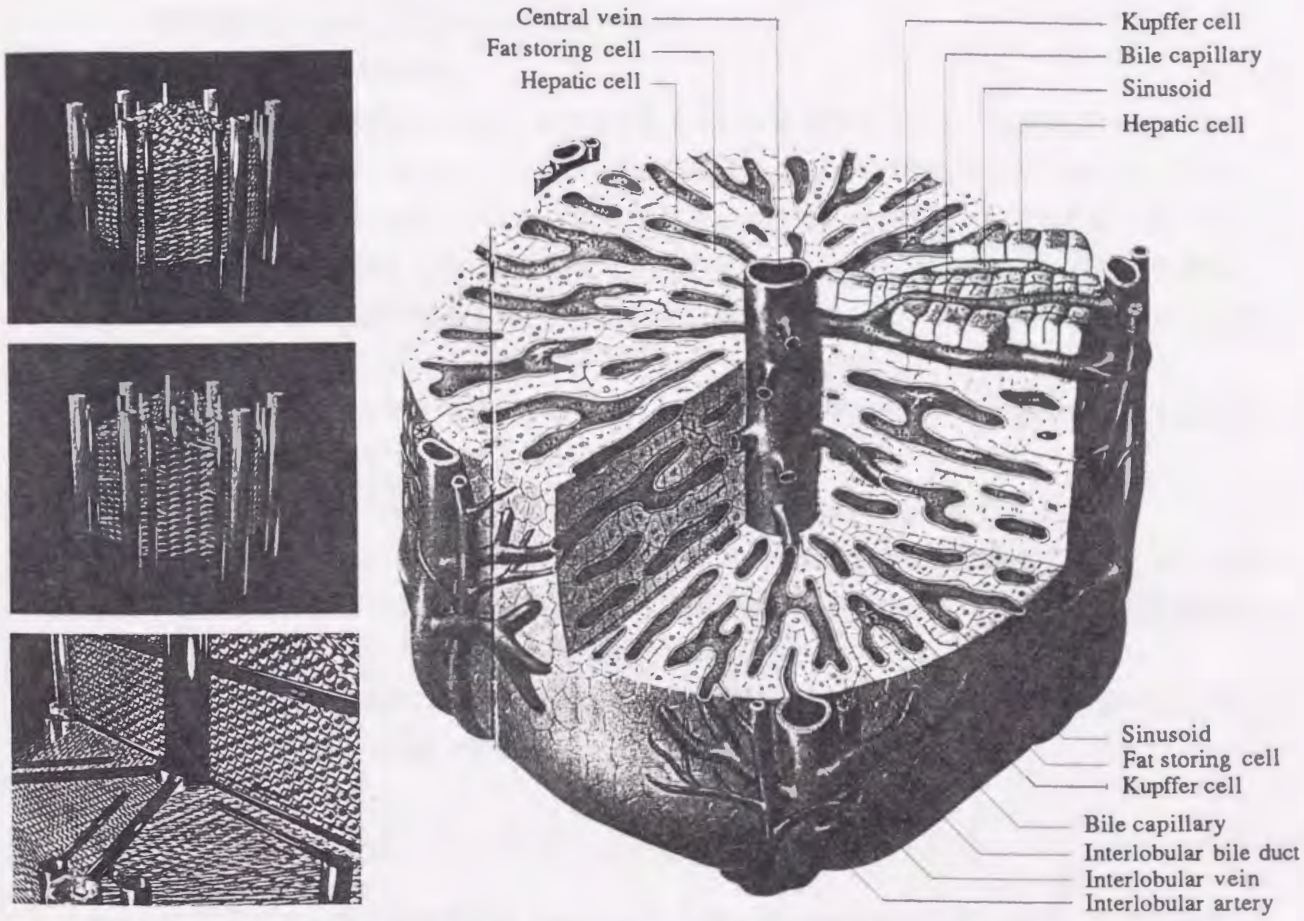


Fig.4-20 Structure of the hepatic lobule [97] .

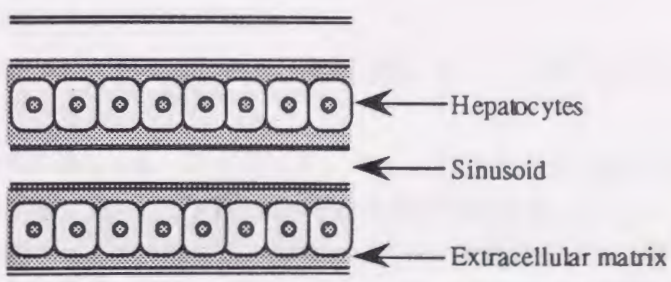


Fig. 4-21 Sandwitch structure formed by hepatocytes, sinusoid and extracellular matrix.

4.3節において平板PUF充填層型人工肝臓では細胞あたりの肝機能発現量は生体肝と同程度もしくはそれ以上であり、良好な結果が得られた。しかし、装置容積あたりの細胞密度が低かったことからヒトへの適用を考えた場合、数百リットルもの大容量となってしまうことが予測される。したがっていつでもどこでも使えるベッドサイドタイプの人工肝臓とはなりえない。そこで本節ではこれまでの培養装置開発における装置工学的経験を活かし、これら問題点を克服できる装置開発を行い、PUF／スフェロイド培養系を利用したハイブリッド型人工肝臓のベッドサイドでの使用を可能とすることを目的として検討を行った。

ここで、装置単位体積あたりの高密度化を図るうえで重要な点として、

1) 細胞への剪断応力の負荷をいかに避けるか、

2) 細胞周りの微小環境を良好にし、いかに物質移動を効率よく行わせるか、

3) 培養層内の担体の充填率をいかに上げるか、

4) スケールアップが容易か

が挙げられる。4.3節で培地流れに対してPUF平板を平行に配置することで、上記項目の 1) と 2) を解決したが、3) の充填率、4) のスケールアップの問題点をクリアーできなかった。そこで、これらの項目を解決するために、ブロック状のPUFに培地を流す細管を多数開けた形状の担体を用いた、多細管型PUF充填層培養装置（Multi capillary PUF : MC-PUF packed-bed culture system）の開発を試み、高密度培養および物質生産の面から検討した。また、同時にスケールアップの可能性についても考察した。

ここで開発したMC-PUF型充填層培養装置は、4.2 および4.3節で示した平板PUF充填型の培養装置とは本質的に異なり、以下の特徴を有するものと考えられる。

・培養装置内への直接播種により、強制的に高細胞密度状態を作り出せる。

・装置内においてスフェロイド形成を行わせるため、煩雑で手間のかかる前培養としての静置培養が不要となる。また播種直後から培地流動下におかれるため、さらに高細胞密度状態でのスフェロイド形成への期待が持てる。

・装置幾何形状が非常に単純であり、かつPUF形状も平板状からブロック状へと変わるため、スケールアップが容易である。

4.4.2 実験方法

4.4.2.1 装置

Fig.4-22 に示すような多細管型PUF（MC-PUF）を用いた充填層培養装置を開発した。これは、ドリルを用いて円柱状のPUFに培地が流れる細管を三角配置状に多数開けた構造になっている。このMC-PUFには、次のメリットが考えられる。

1. 高い充填率を達成できる（70％以上）。
2. 均一な培地流路を確保できる。
3. 幾何形状が単純であることから、雑菌汚染しにくく、取り扱いやスケールアップが容易である。

MC-PUF充填層培養装置を Fig.4-23 に示した。ラインの全体図は Fig.4-24 に示したとおりであり、その基本構造は 4.3節の Fig.4-7 の平板PUF平行充填型培養装置と同じで、MC-PUF充填層とガス交換装置間を培地循環させる方式である。装置はMC-PUF充填層、ガス交換装置、流量計、DO電極から構成されている。培地の循環ラインには、シリコンチューブを使用した。

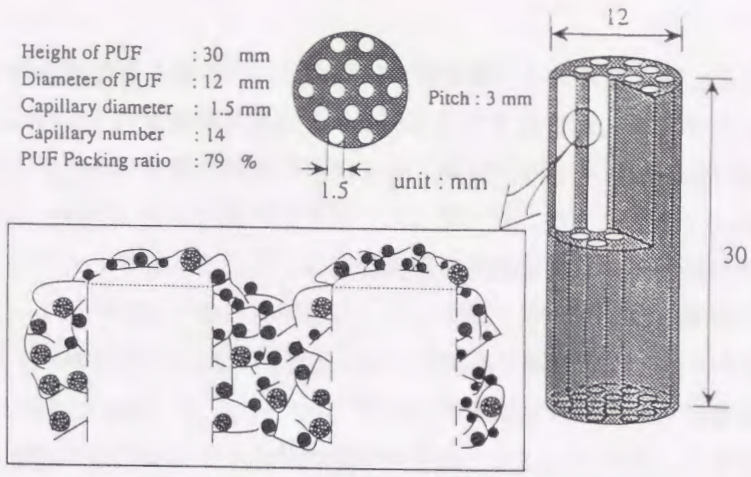


Fig.4-22 Details of Multi-Capillary PUF (MC-PUF) block and immobilization of spheroids in PUF pores.

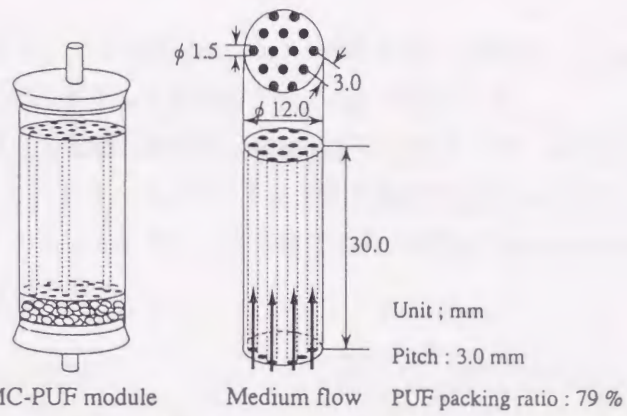


Fig. 4-23 Dimensions of Multi-Capillary PUF and its build-in to a module.

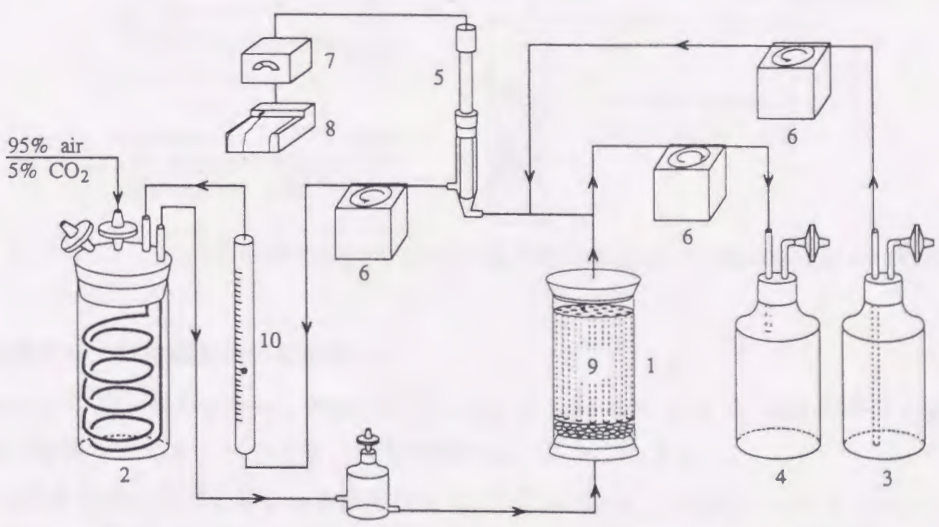


Fig. 4-24 Multi Capillary (MC) PUF packed-bed culture system.

また培養期間中の培地交換は毎日行い、装置内の培地全てを入れ替えた。具体的には，MC-PUFモジュール（Fig.4-24 (1)）内に空気を混入させないようにするため，まずモジュールの入口・出口をクリップで止め，モジュール部分以外の培地を全て廃液回収ビン（Fig.4-24 (4)）へ導いた。次に培地供給ビン（Fig.4-24 (3)）から新鮮培地をポンプを用いて供給し，ラインを満たした。モジュールの入口・出口のクリップをはずし，さらに新鮮培地の供給を続けると同時に廃液回収ビンへの回収を行うことによって、モジュール内に残存していた培地を洗い流した。最後に新鮮培地供給ビンおよび廃液回収ビンへのラインを閉じ，培養ラインの循環を開始した。培地液量は系全体で 30～40 ml，流量は 3 ～ 6 ml／min，モジュール出口側溶存酸素濃度は 6.3 ppm 前後であった。

サンプリング，核数計数法およびその他の培養条件は ” 5.2.2.1” で示した平板PUF平行充填型人工肝臓の Type B bed，Type C bed の場合と全く同様である。

4.4.2.2 播種方法の開発

（1）遠心法による播種手順

(1) 肝細胞調整

(2) 細胞懸濁液の密度を 0.3～3.0×10^7 cells／ml（総細胞数）に調整し、5 ml のシリンジを用いて液量約 4 ml をMC-PUFカラムに流速約 1 ml／min で注入した。

(3) MC-PUFカラムを遠心分離機にかけた。Fig.4-25 に示すように、MC-PUFモジュールを 120°ずつ回転させることにより、3 方向にそれぞれ 2 分間遠心をかけた。

(4) 各カラムを、流速約 6 ml／min で 3 ～ 5 分間流路内の細胞が流れ出るまで洗い流した。

(5) 装置への接続および培養開始

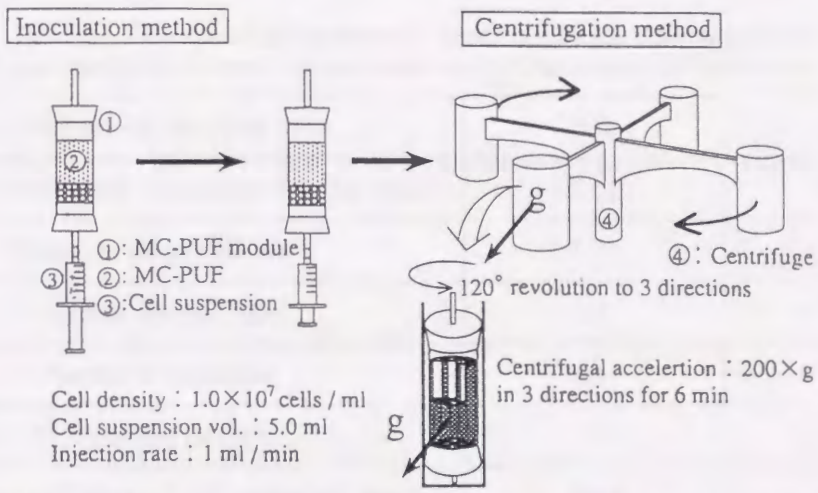


Fig. 4-25 Locally uniform inoculation of hepatocytes by centrifugal method.

（2）細胞密度および播種効率の測定法

(1) Fig.4-26 に見られるように、MC-PUFを入り口から約 0.3，1.5，2.7 cm の部分を各々約 2 mm 幅に輪切りにした。このとき、PUFが潰れないように注意する。

(2) これにクリスタルバイオレット液を加えて37℃ にて 4 ～ 6 時間インキュベートし、核数計数を行った。

(3) 上記 (1) で残ったPUFを用いて、倒立型位相差顕微鏡による写真撮影を行った。

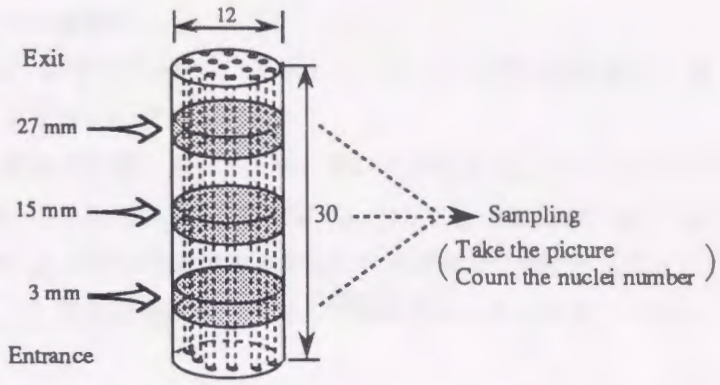


Fig. 4-26 Sampling parts cutting out of a MC-PUF block.

4.4.2.3 培養条件および評価方法

（1）培地流動用細管径および細管間ピッチの影響

Table 4-4 にピッチの影響を調べるために用いた、各種実験条件を示した。細管径は 1.5 mm，細管間ピッチは 3.0 mm または 4.5 mm とした。ピッチ 3.0 mm では細管数14本，充填率79％，培地循環流量 6.0 ml／min であり、ピッチ 4.5 mm では細管数7本，充填率89％，培地循環流量 3.0 ml／min であった。細管内の培地線速は、いずれの場合にも 4.04 mm／sec であった。

培養培地としては、培養3日目まではWE培地を基礎培地とし、インスリン，EGFを添加した無血清培地で培養した。培養4日目からは、肝特異的解毒機能であるアンモニア代謝能，尿素合成能を評価するために、無血清培地（HDM；WE＋EGF＋Ins.）に 1 mM の NH_4Cl を添加した培地を用いて培養した。培地の交換は約24時間毎に培地全量を入れ換えることで行った。

Table 4-4 Operational and geometrical conditions for the determination of pitch dimension between the capillaries for opitimal culture of hepatocytes.

Pich between the capillaries [mm]	3.0	4.5
Size of MC-PUF block（Diameter×Height）[mm]	12×30	12×30
Volume in the module [cm^3]	3.39	3.39
Capillary diameter [mm]	1.5	1.5
Number of capillaries	14	7
PUF packing ratio [%]	79	89
Immobilized cell density [$\times 10^6$ cells／cm^3-PUF]	6.60	9.51
Volume of culture medium [ml]	30～40	30～40
Medium flow rate [ml／min]	6.0	3.0
Average velocity in capillary [mm／sec]	4.04	4.04
Culture medium	HDM + NH_4Cl	HDM + NH_4Cl
Intervals of medium exchange [hour]	24	24
Dissolved oxygen concentration（DO）[ppm]	6.3	6.3

（2）装置内細胞密度の最適化

細管径は 1.5 mm，細管間ピッチは 3.0 mm とした。この時の細管数は14本で、PUF充填率は 79 %，PUFの総体積は 3.39 cm^3 であった。

Table 4-5 に細胞密度の影響を調べるために用いた多細管型PUFと培養条件を示した。培地循環流量は、4.0 ml／min とした。播種細胞密度は 30，20，10，3.0 [$\times 10^6$ cells／ml] とした。播種方法は遠心法を用い、100 ×g の遠心加速度を 4 方向にそれぞれ 2 分間かけることで行った。

培養培地は ”（1）培地流動用細管径および細管間ピッチの影響” で述べた方法と同様の方法で交換した。

Table 4-5 Culture conditions for finding an optimal cell density for maximum hepatic activity.

Inoculum cell density [$\times 10^7$ cells／ml]	3.0	2.0	1.0	0.3
Size of MC-PUF block (Diameter×Height) [mm]	12×30	12×30	12×30	12×30
Volume of module [cm^3]	3.39	3.39	3.39	3.39
Capillary diameter [mm]	1.5	1.5	1.5	1.5
Number of capillaries	14	14	14	14
PUF packing ratio [%]	79	79	79	79
Pitch between the capillaries [mm]	3.0	3.0	3.0	3.0
Volume of culture medium [ml]	30～40	30～40	30～40	30～40
Medium flow rate [ml／min]	6.0	6.0	6.0	6.0
Average velocity in capillary [mm／sec]	4.04	4.04	4.04	4.04
Culture medium	HDM + NH_4Cl	HDM + NH_4Cl	HDM + NH_4Cl	HDM + NH_4Cl
Intervals of medium exchange [hour]	24	24	24	24
Dissolved oxygen conc. (DO) [ppm]	6.3	6.3	6.3	6.3

（3）培養条件

MC-PUFへの播種終了後ただちに無菌的に装置内に組み込み、37℃のインキューベーター内に装置全体を設置した。充填層内の培地量は約 20 ml であった。静置培養と同様約 4 時間後に培地交換を行った。培地交換はペリスタリックポンプによって一日に約 21 ml の新鮮培地供給、消費培地の回収をすることによって行った。

（4）血漿培地への置き換え

血漿による培養を行う場合、無血清培地から直接血漿培地に置き換えを行うと血栓が形成される可能性が高い。そこでMC-PUF充填層においては血漿へ置き換える前にあらかじめ Table 4-6 に示す Hanks（Ca^{2+}-free）液を装置内に流しておき、その後にラット血漿へ置き換えた。

Table 4-6 Components of Hanks buffer solution（Ca^{2+}-free）.

Component	Final concentration [g／l]
NaCl	8
KCl	0.4
$CaCl_2$	0.14
$MgSO_4$	0.049
$MgCl_2$	0.0476
KH_2PO_4	0.06
$NaHPO_3 \cdot 12H_2O$	0.048
$NaHCO_3$	0.35
glucose	1
phenol red	0.006

4.4.3 実験結果

4.4.3.1 播種方法（遠心法）の開発

（1）ヒト株化肝細胞（PLC/PRF/5）を用いた遠心法によるPUF内の細胞分布および播種効率の評価

PLC/PRF/5 細胞を用いた結果、Fig.4-27 に示したように遠心加速度の増加に伴い付着細胞密度はほぼ直線的に増加した。MC-PUFに対して重力沈降作用のみによる細胞の播種を行うと、播種効率約 10～20 % であったが、最大で 90 % 近い値が達成できた。

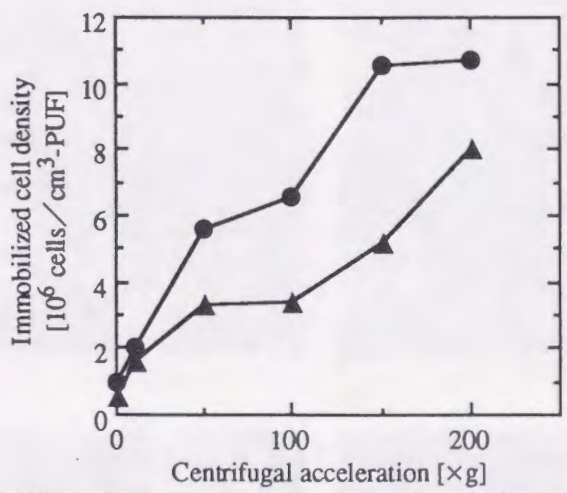


Fig. 4-27 Effect of centrifugal acceleration on immobilized cell density in the entrance（●）and exit（▲）of the MC-PUF module.

（2）ラット初代肝実質細胞を用いた遠心法による生存率の評価

Fig.4-28 は、遠心前後の生存率の変化と、遠心加速度による付着効率の変化についてラット初代肝細胞を用いた結果を示したものである。これより 500 ×g の遠心加速度においても生存率の低下は見られなかった。しかし、300 ×g の遠心加速度以上においては、細胞のカラム壁への偏りが顕著に見られたため、以後の実験においては 200 ×g の遠心加速度を用いることに決定した。また 200 ×g の遠心加速度での細胞の付着効率は約90%であった。

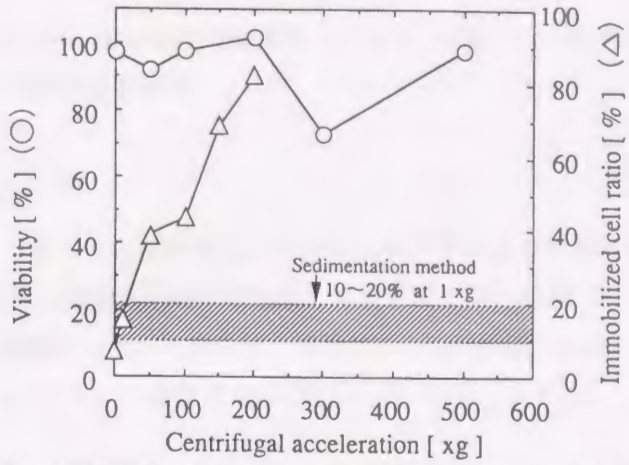


Fig. 4-28 Effect of centrifugal acceleration on viability and immobilized ratio of hepatocytes in the PUF pores.

4.4.3.2 培地流動用細管径および細管間ピッチの影響

（1）細胞形態

平板PUFを用いた静置培養においては、高細胞密度になるほどスフェロイドが形成されにくく、スフェロイドが形成される限界の細胞密度は2 ×10^6 cells／cm^3-PUF 程度であった。しかしながら Photo 4-1 および Photo 4-2（p.73）に見られるように、多細管型PUFを用いた実験においては、平板

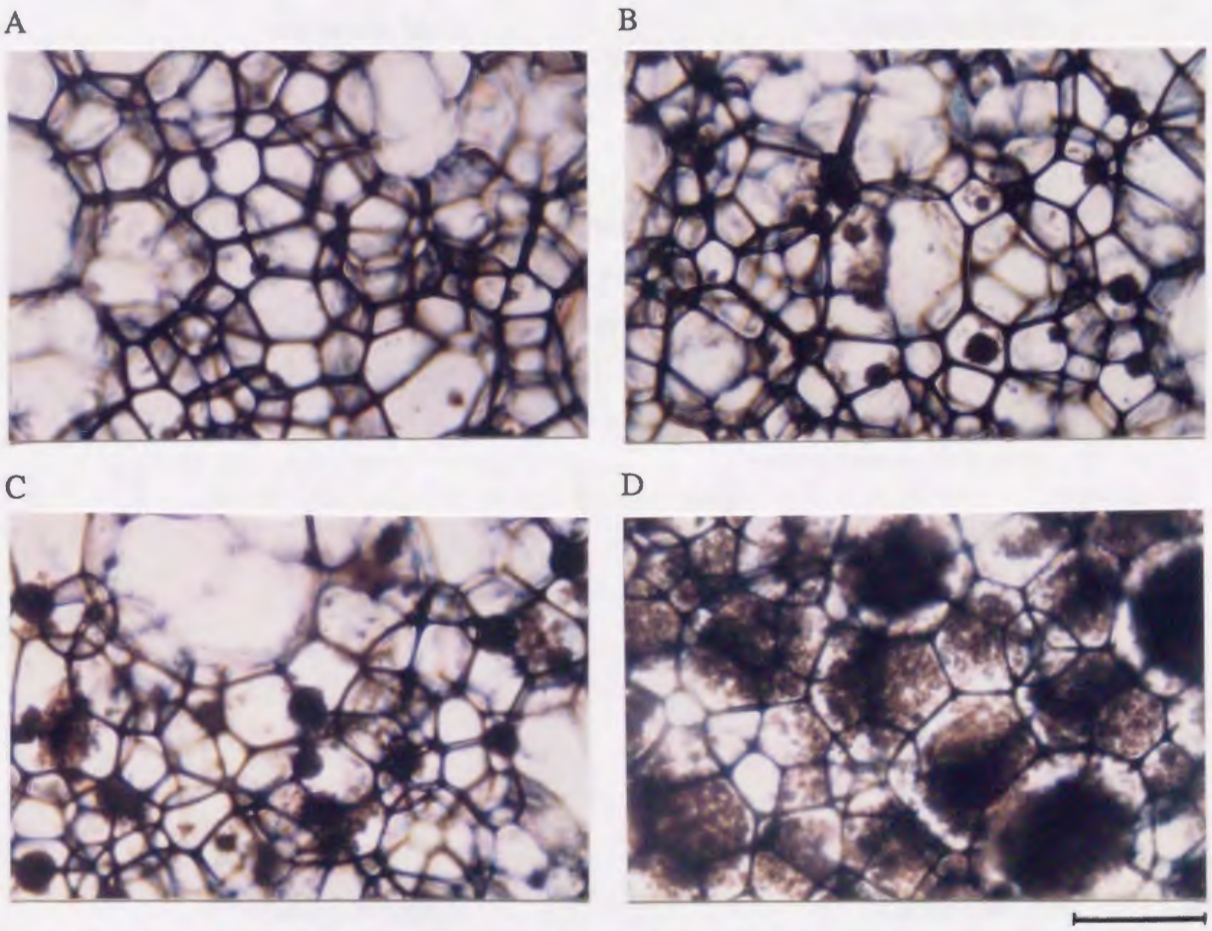


Photo 4-1 Effect of initial cell density on spheroid formation in plate PUF stationary culture.
In initial cell density, A : 0.2 , B : 0.6 , C : 1.8 , D : 2.6 [×10^6 cells／cm^3-PUF]. Bar indicates 500 μ m.

PUFの限界細胞密度の３～４倍の密度である６～８×10^6 cells／cm^3-PUFでもピッチ 3.0 mm，4.5 mm ともにスフェロイドが形成された。

（２）細胞密度と固定化率

Fig.4-29 にモジュールあたりの細胞数および単位体積PUFあたりの細胞数の経時変化を示した。これらの値は初期細胞数と培養終了時の細胞数を培養日数で線形補間したものであるが、これを培養日数ではなく培地交換時にこぼれた細胞数で補間しても線形補間とほとんど差はなかった。また、ピッチ 3.0 mm，4.5 mm において細胞固定保持率は、約50％であった。

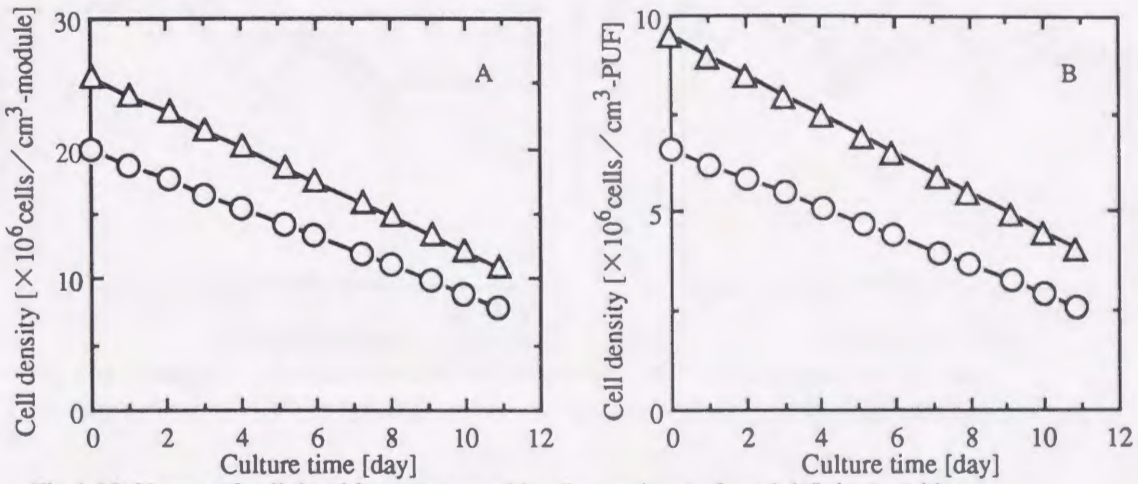


Fig.4-29 Change of cell densities represented by "per volume of module" in A and by "per volume of PUF" in B during culture for capillary pitch of 4.5 mm（○）and 3.0 mm（△）.

（３）アンモニア代謝能

Fig.4-30 より、培養初期においては高い機能を示すが、培養とともにその機能が低下している。ピッチ 3.0 mm，4.5 mm を比較してみるとピッチ 3.0 mm の方が高い値を示している。また 4.5 mm ピッチの場合には、培養９目において負の値を示し、肝細胞自身が出す代謝老廃物としてのアンモニア量が、その処理速度を上回っていることを示していた。

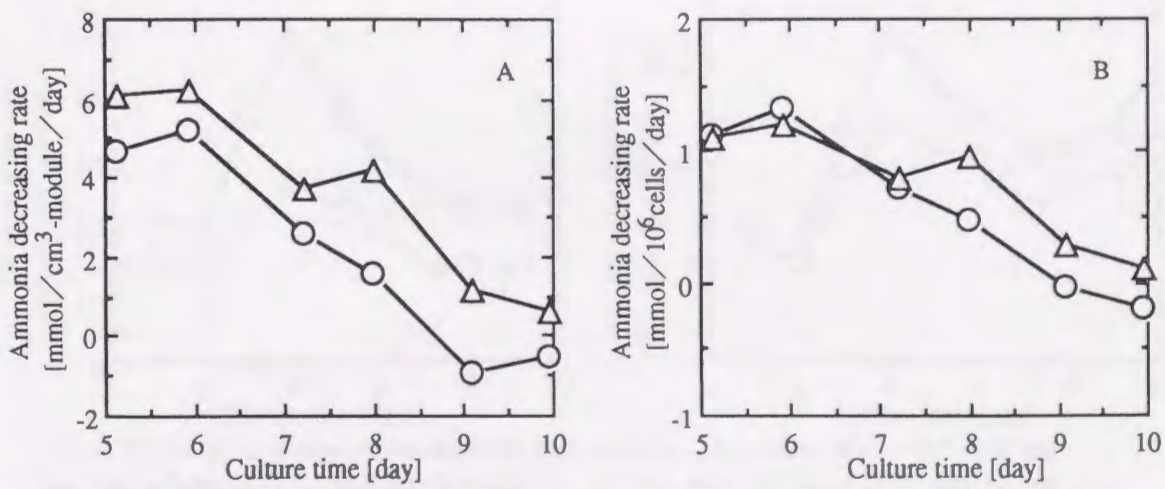


Fig.4-30 Change of ammonia decreasing rates represented by "per volume of module" in A and by "per volume of PUF" in B during culture for capillary pitch of 4.5 mm（○）and 3.0 mm（△）.

（4）尿素合成能

Fig.4-31 より、装置容積あたりの機能発現量は培養とともに徐々に低下したが、細胞あたりの活性は培養期間中を通じて良好に維持されている。またピッチの違いによる尿素合成活性の違いは有意な差はなく、全体的傾向として、装置容積あたりの活性は 3.0 mm，細胞あたりの活性は 4.5 mm ピッチの場合が若干ではあるが良好な結果を示していた。

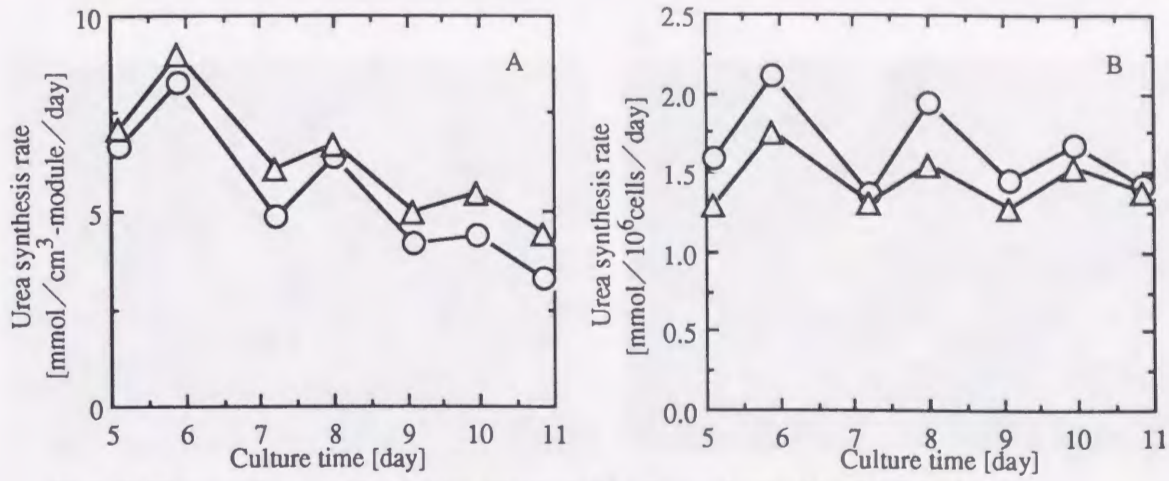


Fig.4-31 Change of urea synthesis rates represented by "per volume of module" in A and by "per volume of PUF" in B during culture for capillary pitch of 4.5 mm（○）and 3.0 mm（△）.

（5）アルブミン分泌能

Fig.4-32 より 3.0 mm の方が 4.5 mm ピッチよりも高い細胞活性を示すことがわかる。また、この傾向は装置容積あたりまたは細胞数あたりでも同様であった。培養 4 日目に細胞活性のピークを示しているが、Fig.3-17，Fig.4-9 で示された結果と一致している。これはスフェロイド形成による機能発現の向上の結果だと考えられる。

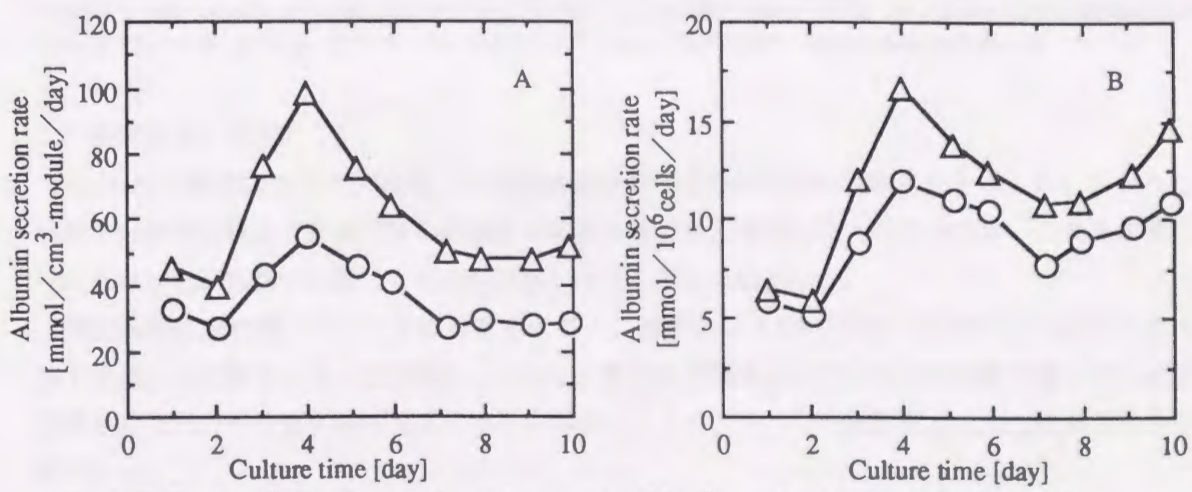


Fig.4-32 Change of albumin secretion rates represented by "per volume of module" in A and by "per volume of PUF" in B during culture for capillary pitch of 4.5 mm（○）and 3.0 mm（△）.

4.4.3.3 装置内細胞密度の最適化

（1）細胞形態

Photo 4-2 に培養10日目の細胞形態について示す。これより細胞密度の増加とともにスフェロイド形成は阻害される傾向にあることがわかる。しかし、静置培養の約10倍の値である 14.3×10^6 cells／cm^3 - PUF の高密度培養状態においてもスフェロイドの形成が確認された。一方、18.3×10^6 cells／cm^3 - PUF ではスフェロイド形成は確認できなかった。

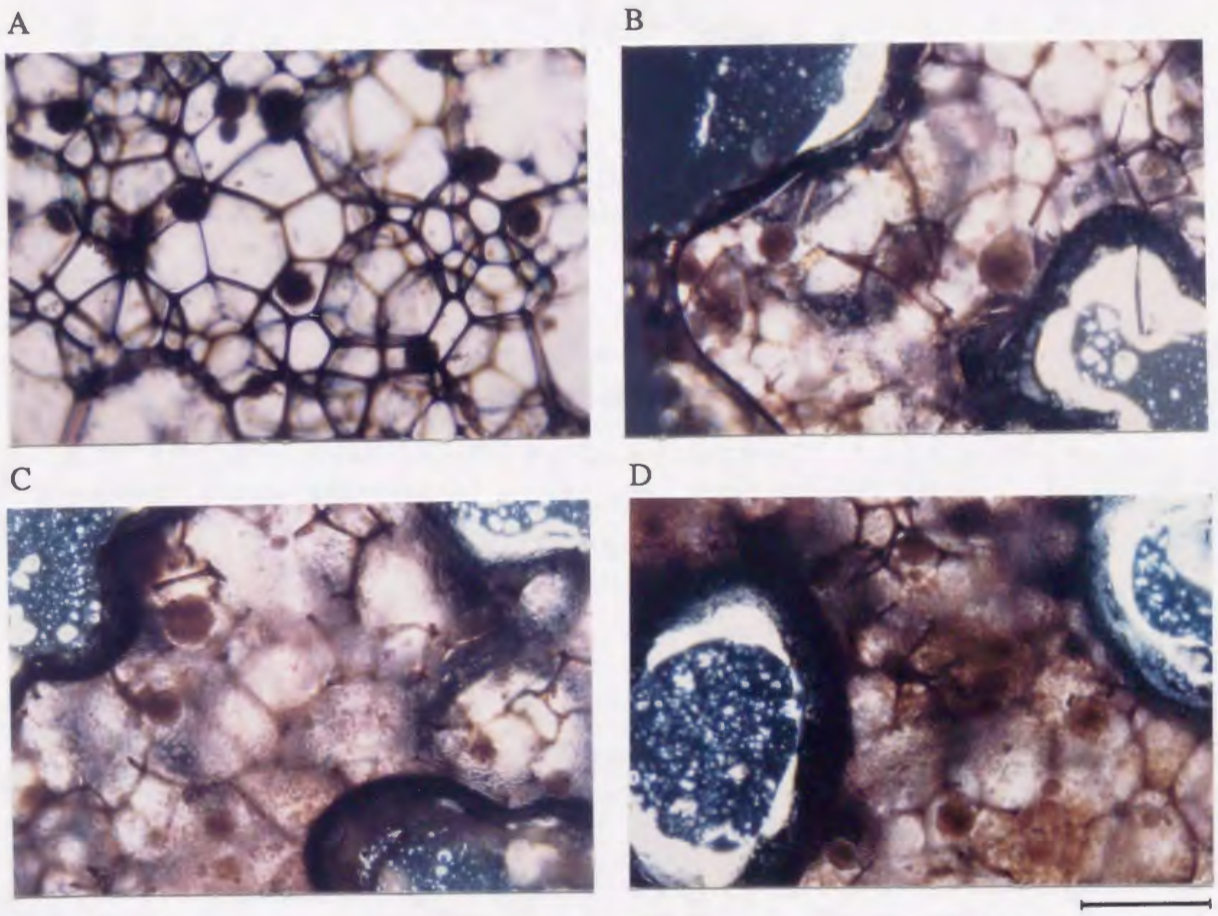


Photo 4-2 Appearance of rat hepatocytes in MC-PUF at 10th day culture under several initial cell densities of A (plate PUF) 1.8 , B : 2.0 , C : 7.9 , D : 14.3 [$\times10^6$ cells／cm^3-PUF]. Bar indicates 500 μ m.

（2）細胞密度と固定化

Fig.4-33 に臓器あたりの細胞数，PUF単位体積あたりの細胞数の経時変化を示した。これらの値は初期付着細胞数と培養終了時の細胞数を培養日数で線形補間したものであるが、これを培地交換時にこぼれた細胞数で補間しても線形補間とほとんど差はなかった。

播種細胞密度が高いほど付着細胞密度も高く、播種効率は40～50％で平板PUFの場合と比べて若干増加するに留まった。この理由としては、細胞懸濁液を注入する際に充填層容積よりも過剰な液量を注入し、その値を使って求めたからである。また、注入口の細胞密度は出口部分の約２倍の値であった。

細胞の固定化という観点から見ると、細胞固定化保持率は20～60％であり、細胞密度が向上するにしたがって保持率は高かった。これはスフェロイド形成率と逆の傾向である。

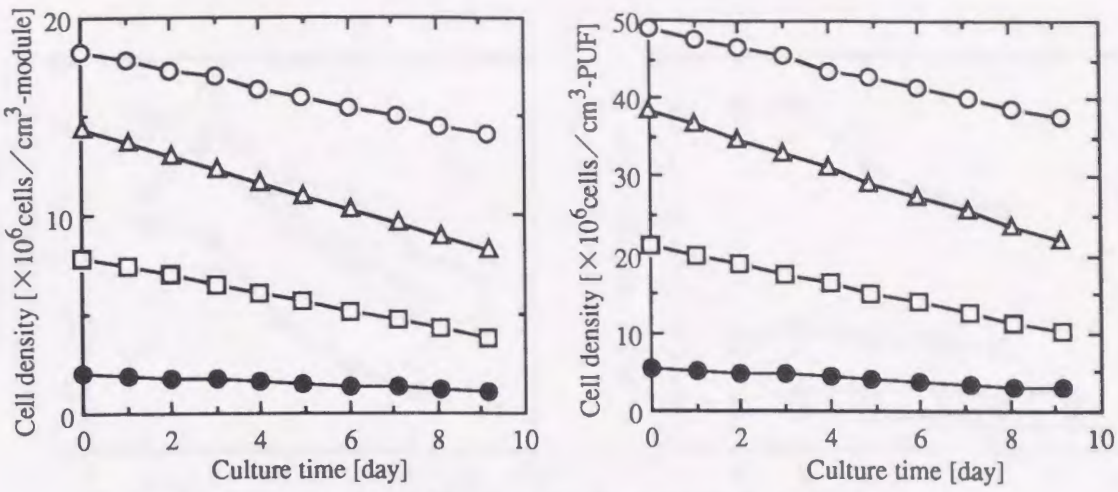


Fig.4-33 Change of cell densities during culture under several initial cell densities of ○：18.3, △：14.3, □：7.9, ●：2.0 ×10^6 cells／cm^3-PUF.

（3）アンモニア代謝能

Fig.4-34 に見られるように、装置容積あたりのアンモニア代謝活性は、培養初期に高い値を示すが、どの細胞密度の場合にも培養とともにその機能は低下している。またその値は、細胞数の違い（最大で 9 倍の違い）程の差は見られなかった。細胞あたりのアンモニア代謝活性については、細胞密度が低いほど高い細胞活性を示した。特に初期付着細胞密度 2.0×10^6 cells／cm^3-PUF（●）の場合は、培養初期に他と比べて非常に高い活性を有していた。

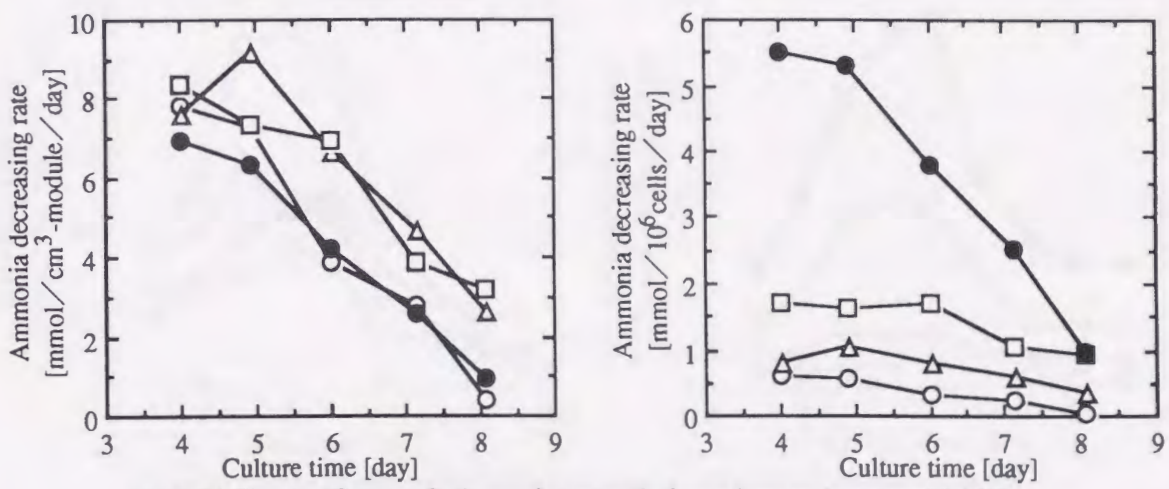


Fig.4-34 Change of ammonia decreasing rates during culture under several initial cell densities of ○：18.3, △：14.3, □：7.9, ●：2.0 ×10^6 cells／cm^3-PUF.

（4）尿素合成能

Fig.4-35 に示されているように、先のアンモニア代謝活性の場合よりも各細胞密度での機能の差が明確に現れている。特に特徴的な点は、細胞あたりの活性が低い初期付着細胞密度 2.0×10^6 cells／cm^3-PUF（●）の場合、他に比べて非常に高い細胞活性を有しているが、その細胞密度の低さから装置容積あたりの機能では最も低くなっている点である。また細胞あたりの活性は、初期付着細胞密度に反比例して大きくなっていた。

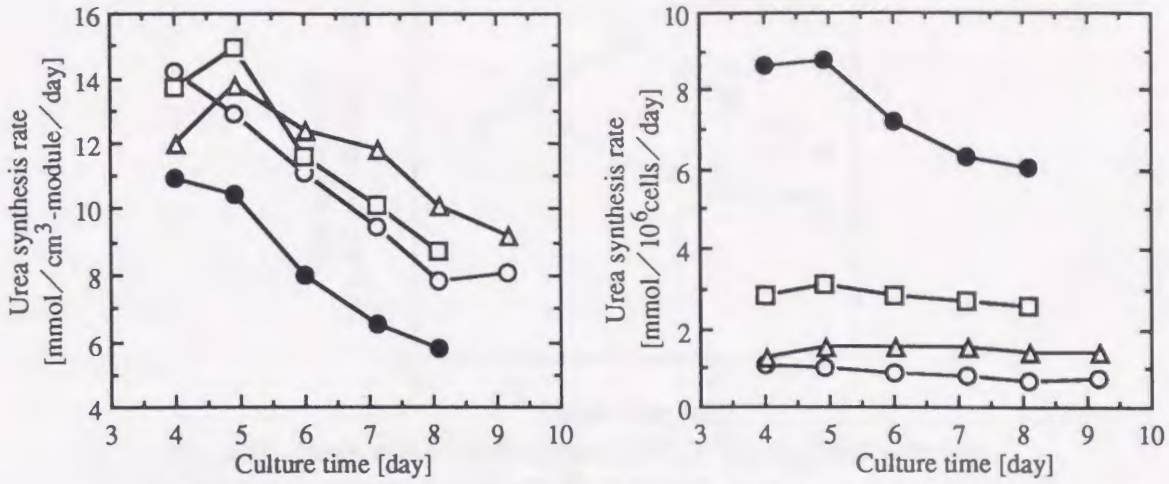


Fig.4-35 Change of urea synthesis rates during culture under several initial cell densities of ○：18.3, △：14.3, □：7.9, ●：2.0 ×10^6 cells／cm^3-PUF.

（5）アルブミン分泌能

Fig.4-36 より、この場合も先のアンモニア代謝，尿素合成活性と同様の傾向を示しているが、装置内の細胞密度とその細胞あたりの活性の積で表される装置容積あたりの活性については、初期付着密度 0.79×10^7 cells／cm^3-PUF （□）の場合が至適細胞密度であることが示される。

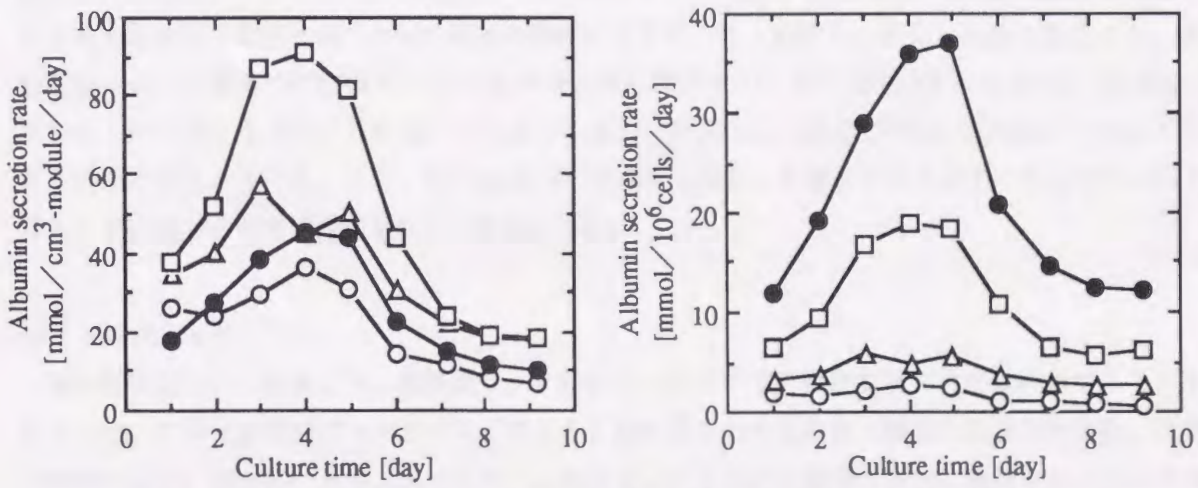


Fig.4-36 Change of albumin secretion rates during culture under several initial cell densities of ○：18.3, △：14.3, □：7.9, ●：2.0 ×10^6 cells／cm^3-PUF.

4.4.3.4 ラット血漿中での肝機能発現

アンモニア代謝解毒に伴う尿素合成活性についての結果をFig.4-37 に示す。これより、無血清培地と比べて100％ラット血漿を用いた場合には培養期間を通じて、同等ないしは、より良好な尿素合成活性を安定して発現することが明らかとなった。

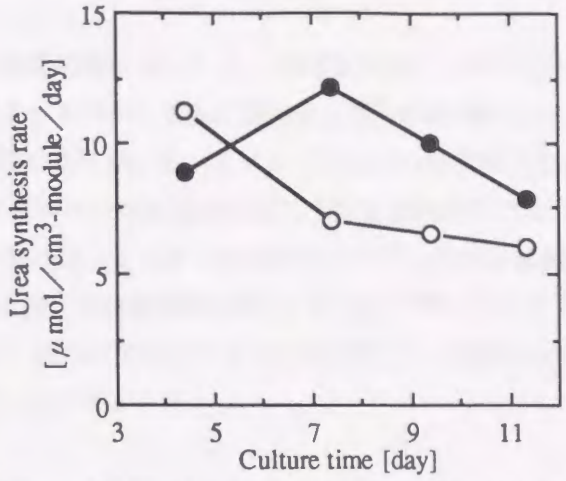


Fig. 4-37 Change of urea synthesis rates in MC-PUF packed-bed culture for ○: serum free medium (HDM) and ●: rat plasma.

4.4.4 考察

4.4.4.1 細胞の固定化方法

近年、ハイブリッド型人工肝臓の開発において装置のコンパクト化は重要な問題であるが、肝細胞の生体外での増殖培養系が確立されていない。したがって、限りある肝細胞を効率よく、しかも高密度に固定化させることが問題となる。本研究でのMC-PUF充填層を用いた場合について、遠心法による播種効率の評価および細胞の生存率の評価を行った。その結果、MC-PUFを用いることにより高充填率化の達成と均一な培地流路の確保がなされ、さらに新たに開発した遠心法により、播種段階において細胞の高密度化（200 ×g の最大遠心加速度のときの播種効率は約90％）を達成できることが可能となった。これは、これまでの重力沈降法による播種効率10～20％に比べると大きな飛躍であると言える。また、500 ×g の遠心加速度を負荷した場合でも生存率の低下はほとんど見られず、遠心法はほぼ確立されたと考えられる。

4.4.4.2 細管間ピッチ

本研究で得られた結果より、細管間ピッチは小さいほうが細胞機能発現に良好に作用することが示された。これは細管間ピッチが小さくなると、細胞周りの物質交換（酸素・栄養分の供給，代謝老廃物の除去）が良好になり、スフェロイド形成およびその生存環境が良好に維持されるためである。3.3節の結果よりアルブミン分泌に関しては、スフェロイド形成率が大きく影響し、また尿素合成活性に関しては、細胞周りの物質移動（特に生産された尿素の細胞周りからの除去）が大きく影響することが判明している。これらの結果より、細管間ピッチはできるだけ小さくすべきであることが示される。しかし予備実験においてピッチ 2.0 mm，細管径 1.0 mm のMC-PUFを検討したところ、細胞播種時に細胞が詰まった細管もあり、培地流路が確保できず、当然ながらその結果細胞活性はむしろ低くなってしまった。これらのことを考えると、ピッチ 3.0 mm，細管径 1.5 mm の MC-PUFモジュールが妥当な幾何形状であったと推定される。

4.4.4.3 細胞密度

通常平板PUFを用いた静置培養においては、高細胞密度になるほどスフェロイドが形成されにくく、スフェロイドが形成される限界の細胞密度は 2×10^6 cells／cm^3-PUF 程度であった。しかしながら今回の多細管型PUFを用いた実験においては、平板PUFの限界密度の 7 倍の密度である 1.43×10^7 cells／cm^3 - PUF でもスフェロイドが形成された。多細管型PUF内では、静置培養を行った平板PUF内と異なり、細胞播種直後のスフェロイド形成時においても培地の流動があるため、細胞周りの物質交換（酸素・栄養分の供給，代謝老廃物の除去）が良好であったと考えられる。また遠心法によって細胞を付着させるため、細胞播種直後において細胞同士の接触頻度が増加し、スフェロイドが形成され易い状態にあったことが考えられる。

4.4.4.4 細胞活性

アルブミン分泌活性から算出したスフェロイド形成率と尿素合成活性の関係さらに初期付着細胞密度とアルブミン分泌，尿素合成活性との関係をそれぞれ Fig.4-38 および Fig.4-39 に示す。これより、培養環境が固定されている場合、スフェロイド形成は初期付着細胞数に依存し、また細胞活性もそれと全く同様な挙動を取ることが示される。さらに、今回の培養条件での至適初期付着細胞密度は 7.9×10^6 cells／cm^3-PUF であることが示される。今後さらに高性能な人工肝臓装置を開発するためにはスフェロイドの固定化状態を良好に維持させたうえで、さらに良好な物質交換が可能な培養環境の実現を図ることが不可欠である。

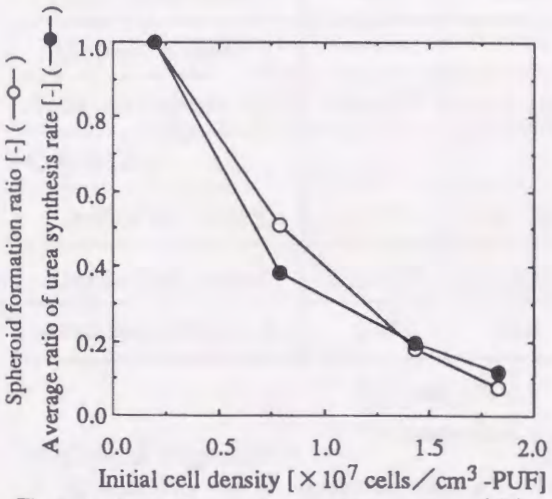


Fig.4-38 Dependence of spheroid formation (○) and average ratio of urea synthesis rate (●) upon initial cell density.

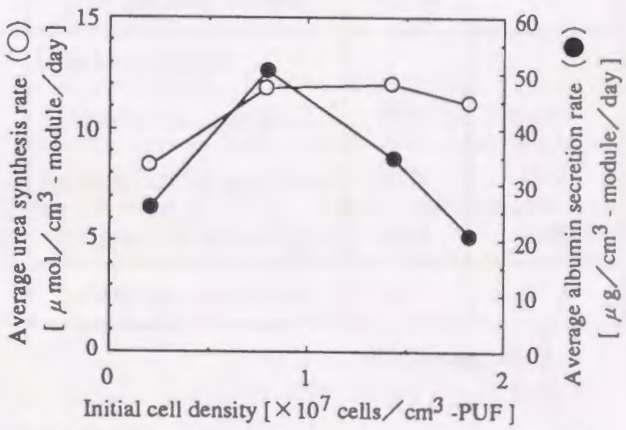


Fig.4-39 Dependence of average urea synthesis rate (○) and average albumin secretion rate (●) upon initial cell density. Medium is HDM + 1.2 mM-NH_4Cl.

4.4.4.5 血漿中での肝機能発現

これまで主に無血清培地を用いて、PUF／スフェロイド培養系の有効性とそれを用いた装置開発について述べた。しかし臨床の現場では全血もしくは100%血漿に接することから、この場合にも同様なスフェロイド形態の維持およびその機能的有効性が示されるかが問題である。そこで検討を行った結果、Fig.4-37 に示したとおり、無血清培地の場合と同等もしくはそれ以上の良好な肝機能を発現することがわかった。このことから、本研究での人工肝臓装置の実用化の可能性が、より具体性を増すと期待される。

4.4.4.6 人工肝臓としての必要代替容積

人工肝臓装置としての必要代替容積についてのまとめをTable 4-7 および Table 4-8 に示した。Table 4-7 より細胞数あたりの結果では、MC-PUFおよび遠心法の開発により、ヒトの肝臓全量を代替する場合でも 20 L 程度の装置容積で十分であることが示される。したがって、このままでも十分臨床応用可能であるが、元来肝臓はかなりゆとりのある臓器であり、この点を踏まえて計算すると、1.5 L 程度の装置容積で代替が可能であるという結果が得られる。これは非常にコンパクトなものであり、簡便にベッドサイド使用可能なものになると期待される。また Table 4-8 のように機能発現量あたりで見ると細胞あたりで得られた結果より大きめの装置になる。これは細胞あたりの機能発現量が低下したためであるが、4.3 節で得られたように、操作条件などの培養環境の改善を行えば、生体肝以上の高機能発現が達成されることから、今後装置工学的改善によって、さらにコンパクトな装置開発が可能になる。これらの結果より、本研究では臨床に応用可能な装置開発に成功した。

Table 4-7 Comparison of substitute organ volume predicted from the cell density between human liver and MC-PUF packed-bed system.

	Liver	MC-PUF packed-bed
Organ volume [cm^3]	1400	3.39
PUF packing ratio [%]	——	79
Total cell number [cells]	3×10^{11}	4.9×10^{7}
Cell density		
[cells／cm^3-PUF]	——	1.8×10^{7}
[cells／cm^3-organ]	2.1×10^{8}	1.5×10^{7}
Substitute organ vol. [L]	(1.4)	20.8

5.2 L ← a
1.5 L ← b

Table 4-8 Comparison of substitute organ volume predicted from urea synthesis activity between human liver and MC-PUF packed-bed system.

	Liver	MC-PUF packed-bed
Organ volume [cm^3]	1400	3.39
PUF packing ratio [%]	——	79
Urea synthesis rate		
[mmol／organ／day]	833	0.049
[μmol／cm^3-organ／day]	595	14.9
[μmol／10^6 cells／day]	2.78	3.16
Substitute organ vol. [L]	(1.4)	57.6

14.4 L ← a
4.1 L ← b

<Clinical suggestion>
a : Human liver can be regenerate, when a 1／4 of the liver remains as it is.
b : An urgent target amount of hepatocytes in 100 g-cells.

4.4.5 本節のまとめ

多細管型PUF充填層培養装置の開発により、培地流路の均一化，高いPUF充填率（79％）および容易なスケールアップが達成できた。また、この装置に対して遠心法による細胞の播種方法を開発したことにより、最高で約90％の播種効率が達成でき、その時の最高細胞密度は 1.8×10^{7} cells／cm^3-PUF に達した。

4.5 本章のまとめ

今回開発した充填層型培養装置の特徴を以下に列挙する。

1．平板PUFランダム充填型

長所 ： 平板PUFをランダムに充填することから、取り扱いが容易である。また、前培養として静置培養を行うので、その間にスフェロイド形成状態が確認できる。

短所 ： 培養層内が不均一であり、それに伴い培地の偏流が発生する。またPUFの高充填率化は不可能である。以上より、スケールアップも困難である。

2．平板PUF平行充填型

長所 ： 均一な培地流路の確保ができ、PUFの高充填率化が可能である。また、前培養として静置培養を行うことから、スフェロイド形成状態の確認が可能で、しかも、静置培養系との比較も容易である。

短所 ： 剛性に乏しい平板PUFを用いるためスケールアップは困難である。また、細胞密度は静置培養条件により限定され、より以上の高細胞密度化はスフェロイド形成を阻害することから不可能である。

3．多細管型

長所 ： ブロック状のPUFを用いたシンプルな幾何形状の装置となり、PUFの高充填率化，均一な培地流路および容易なスケールアップが達成できる。また、遠心法による細胞の播種により、高細胞密度化も達成できる。また、培養層内への直接播種により、培養開始時から良好な物質交換が達成され、良好なスフェロイド形成と機能発現が期待できる。

短所 ： ブロック状のPUFを使用するため、PUF孔内の細胞の状態を知るためには、装置を解体しなければならない。

これらの特徴を有するPUF充填層型培養装置を開発，検討した結果、以下のことが示された。

1．平板PUFランダム充填型人工肝臓の開発で、PUF／スフェロイド培養系を利用したPUF充填層型培養装置の開発が可能
2．平板PUF平行充填型人工肝臓の開発で良好なスフェロイドを有する培養装置開発に成功
3．遠心法の開発によりMC-PUF充填層型培養装置への高い播種効率の達成
4．培地流動下でもスフェロイドの形成が可能
5．MC-PUF型充填層培養装置の開発により、PUF／スフェロイド培養系を利用したハイブリッド型人工肝臓装置の臨床への応用が可能

以上の結果より、人工肝臓装置としてヒトへ適用するために必要な代替容積の試算結果を以下のTable 4-9 および Table 4-10 にまとめて示す。

Table 4-9 Comparison of substitute organ volumes predicted from cell densities between human liver and various PUF packed-bed culture systems.

	Human liver	Plate PUF randomly packed-bed	Plate PUF parallel packed-bed			MC-PUF packed-bed
			Type A	Type B	Type C	
Organ volume [cm^3]	1400	180	90	90	22	3.39
PUF packing ratio [%]	——	11	19	40	69	79
Total cell number [cells]	3×10^{11}	1.1×10^{7}	2.2×10^{7}	4.3×10^{7}	2.1×10^{7}	4.9×10^{7}
Cell density						
[cells／cm^3-PUF]	——	5.6×10^{5}	1.3×10^{6}	1.2×10^{6}	1.4×10^{6}	1.8×10^{7}
[cells／cm^3-organ]	2.1×10^{8}	6.1×10^{4}	2.4×10^{5}	4.7×10^{5}	9.4×10^{5}	1.5×10^{7}
Substitute organ vol. [L]	(1.4)	4909	1227	628	314	20.8

Table 4-10 Comparison of substitute organ volumes predicted from urea synthesis activities between human liver and various PUF packed-bed culture systems.

	Human liver	Plate PUF randomly packed-bed	Plate PUF parallel packed-bed			MC-PUF packed-bed
			Type A	Type B	Type C	
Organ volume [cm^3]	1400	180	90	90	22	3.39
PUF packing ratio [%]	——	11	19	40	69	79
Urea synthesis rate						
[mmol／organ／day]	833	——	——	0.030	0.0043	0.049
[μmol／cm^3-organ／day]	595	——	——	0.33	0.048	14.9
[μmol／10^6 cells／day]	2.78	——	——	8.48	2.88	3.16
Substitute organ vol. [L]	(1.4)	——	——	227	382	57.6

第５章　肝不全ラット体外循環によるハイブリッド型人工肝臓の性能評価

5.1 動物実験の必要性と具体的な検討方針

第４章で示したように、多細管型PUF充填層培養装置を利用した人工肝臓装置の開発により、本装置の臨床への応用の可能性が示されたが、これらの検討は全て *in vitro* における実験により示されたものである。しかしながら劇症肝炎などの詳細な発症機序や改善すべき項目の必要十分条件が未だ明らかになっていない現状において、本システムの人体への有効性を実証することは非常に困難である。そこで肝不全動物に対して人工肝臓による肝機能補助を行い、臨床への応用の可能性について評価を行う必要がある。

そこで本章では、肝不全動物を用いた動物実験を行うことにした。具体的には、まず実験動物の血液を動脈側から体外へ導きだし、人工肝臓装置によって代謝解毒などの肝機能補助を行わせた後、再びその血液を静脈側から体内へ戻すという体外灌流法を用いることにした。ここで使用する実験動物の選定が大きな問題点となるが、小動物を用いた評価系が確立できれば、以下のようなメリットがあることから、本研究ではラットを用いて実験を行うこととした。

1．設備，人員，経費の大幅削減と、それに伴い実験結果がより速くわかることから評価時間の低減が可能となる。また、これにより様々な条件下での検討が簡便に行える。
2．測定ごとに動物を死亡させていたこれまでの実験系と異なり、１例の実験において経時的に少量ずつサンプリングが可能であり、多くの測定点が得られ、使用実験動物数の低減および実験動物の個体差によるデータのばらつきの低減が可能となる。

まず5.2節でラット体外循環ラインを作製し、ラットを用いた実験の可能性について調べた。さらに、ここではラット体外循環の各種操作条件の設定とその自動化を試みた。5.3節では、D-ガラクトサミンを用い、肝不全動物モデルを作製した。また、この動物と5.2節で作製した体外循環ラインを用いて、４章で開発したハイブリッド型人工肝臓装置の性能について検討を行った。

5.2 ラット体外循環ラインの開発

5.2.1 本節の目的

小動物実験は上述したメリットを有するが、動物個体があまりにも小さく、通常用いられている医療用機器が使用できないなどの問題点も有している。体重約200 g のラットの場合、体内総血液

量は約 14 ml であり、体外循環を行うとなれば極めて小型の体外循環ラインを作製する必要がある。また麻酔や血液循環速度さらには輸液供給速度など、確立されていない操作条件も多く、これら問題点を解決することが必要不可欠である。そこで本節では、最も大きな血管系の中から、両足の付け根の部分にあり、心臓への負荷が少なく、手術もより容易な総腸骨動・静脈を用いたラット体外循環ラインを作製し、各種操作条件を設定することによって人工肝臓の性能評価システムの開発を行った。

5.2.2 実験方法

5.2.2.1ライン

開発したライン全体図を Fig.5-1 に示した。血液は右総腸骨動脈から導き出し、輸液や麻酔薬などの自動供給ラインを兼ねる血圧モニタリングシステム（Dyna Scope DS-503 , AU-513 , FUKUDA DENSHI , JAPAN）のラインを経て極小型の血漿分離装置へと流れる。その後、ラインの途中で混入した気泡などを取り除くために空気抜きを通って、再び右総腸骨静脈からラット体内へ戻る。このラインは小動物用に小型化を行ったものであり、その結果ライン中総液量が約 1.4 ml までに少量化できた。

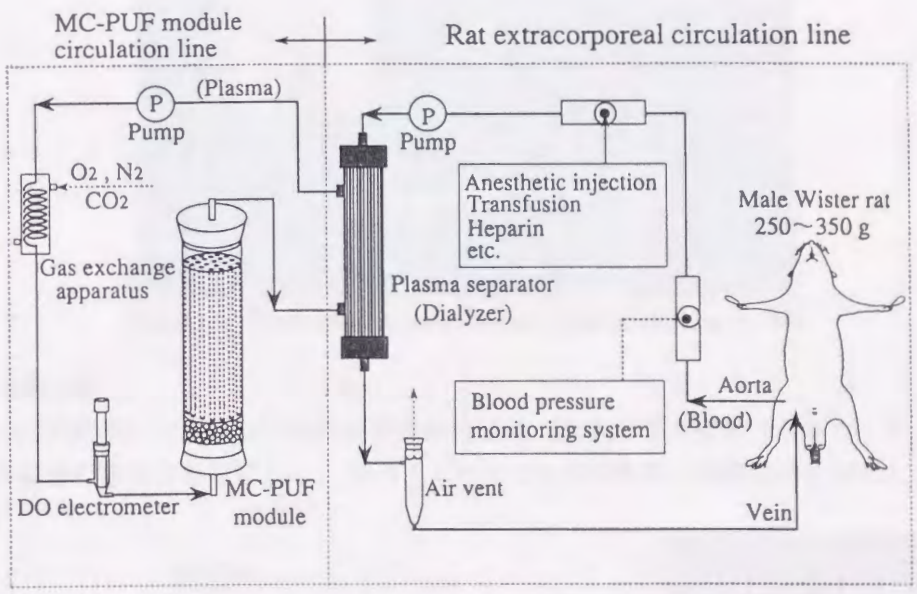


Fig. 5-1 Schematic diagram of the main loops connected with plasma separator between MC-PUF module circulation line and rat extracorporeal circulation line in a hybrid artificial liver support system.

ライン全体は、カワスミのヘパリン注入ライン（カワスミコネクティングセット；川澄化学，東京）を用いて作製した。

ハイブリッド型人工肝補助システムライン図を Fig.5-2 に示した。ここで、5.2.1 項に示した理由から、Fig.5-1 の 右半分を取り出したラット体外循環ライン（Fig.5-2 , Photo 5-1）を用いて検討した。また本ラインは前もってヘパリン入り生理食塩水（100 unit-ヘパリン／ml）を満たし、内部をヘパリン化処理することで、循環中におけるライン内部での血栓形成を防止した。

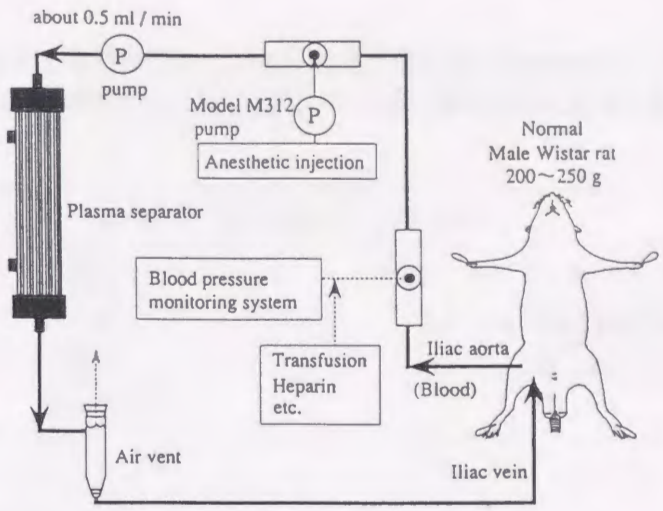


Fig. 5-2 Details of the rat extracorporeal circulation line.

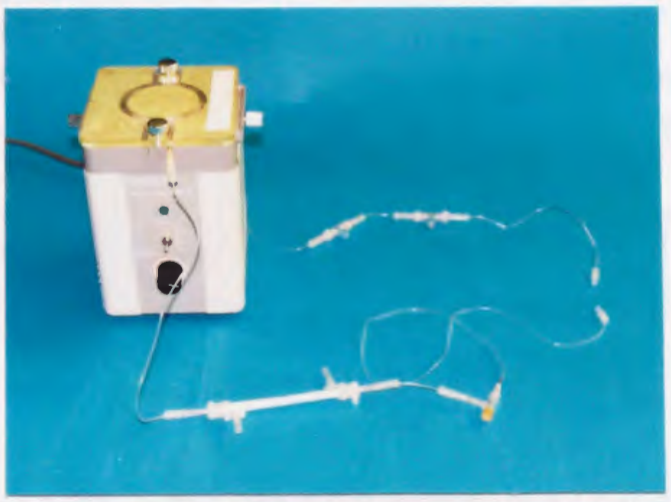


Photo 5-1 Photograph of the rat extracorporeal circulation line.

5.2.2.2 血漿分離装置

ラットの体外循環において、市販の血漿分離装置は、大きすぎて使用できなかった。そこで、ヒトに対する装置の各値を参考にして、Fig.5-3 に示す極小型の血漿分離膜装置を試作し、本実験系に使用した。

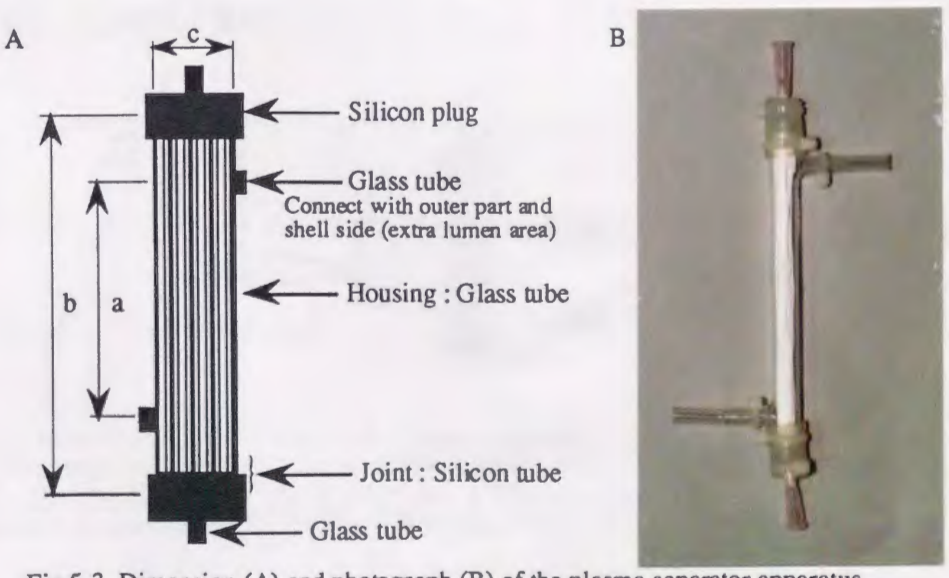


Fig.5-3 Dimension (A) and photograph (B) of the plasma separator apparatus.

すなわち、小型血漿分離装置作製を市販の血漿分離装置（Plasmacure；クラレ，岡山）に使用されている中空糸を用いて作製した。まず使用した中空糸膜の特性を以下に示す。

中空糸膜特性（PS-06）	
素材	PVA（ポリビニルアルコール）
内径	320 μm（80.4 mm^2／m）
膜厚	65 μm
最大孔径	0.2 μm

次に、計算基準を示す。

成人血液量：80 ml／kg × 60 kg ＝ 4800 ml

ヒト用血漿分離装置膜面積：0.6 m^2

ラット血液量：14 ml

以上より、ラット用血漿分離装置膜面積：（14／4800）× 0.6 ＝1.75×10^{-3} m^2

＝17.5 cm^2

以上の結果を参考にして作製したラット用血漿分離装置の詳細は、以下に示すとおりである。

ガラス管寸法（c×a）　：φ7×100 mm

有効長さ（b）　：88 cm

有効膜面積　：21 cm^2

中空糸本数　：30

Fig.5-4 に示すラインを作製し、肝不全時に肝性昏睡発症の引き金となる血中有害因子のひとつであるアンモニアの透過速度について評価したところ、Fig.5-5 に示す結果が得られた。このデータを基に、十分な性能を有する人工肝臓を用いた場合の血中アンモニア濃度変化の試算を行うと、Fig.5-6 のようになり、今回試作した極小型の血漿分離装置は、肝不全ラット体外循環において使用が可能であることが示される。またここで使用した中空糸は、元来ヒト用の血漿分離装置から取得したものであり、抗血栓性も優れていると考えられる。

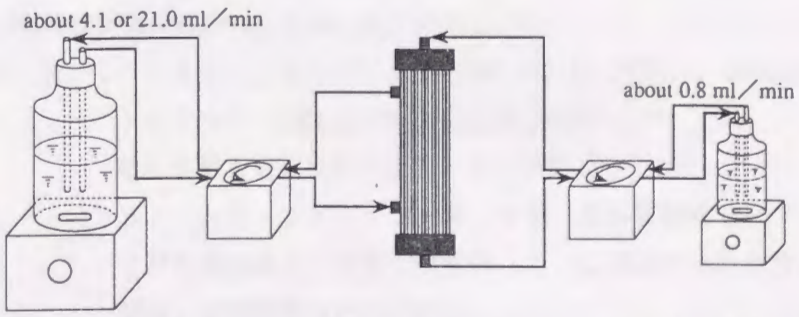


Fig. 5-4 Examination of performance of a plasma separator apparatus through measurement of the ammonia concentration in the tube side bottle to calculate the amount of ammonia which across the membrane. Components are : 1. Plasma separator , 2. Reservoir (water), 3. Reservoir (water + 0.9 mM-NH_4Cl) 4. Magnetic stirrer , 5. Roller pump.

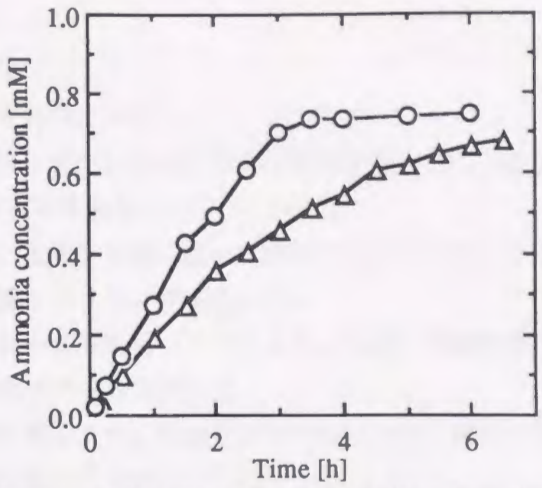


Fig.5-5 Change of ammonia concentration in the tube side solution whose flow rates are ○ : 21 ml／min and △ : 4.1 ml／min , and shell side flow rate is 0.8 ml／min. Final ammonia concentration in the shell side solution is 0.9 mM.

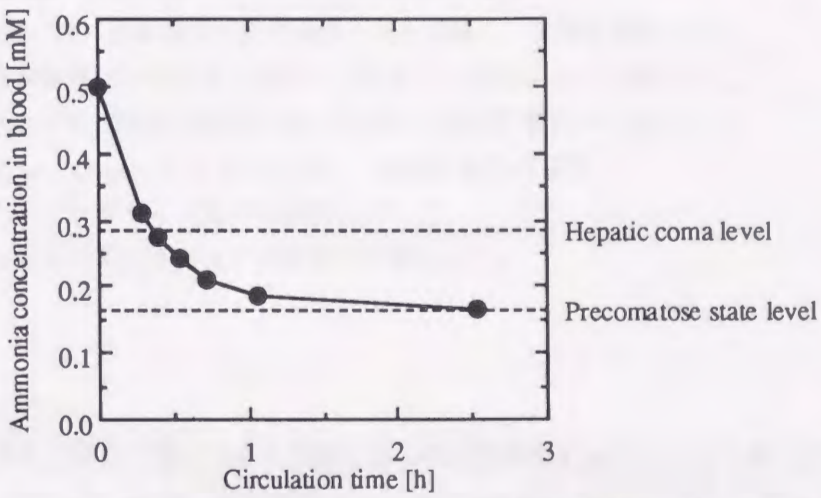


Fig. 5-6 Change of calculated ammonia concentration in the blood of hepatic failure patient based on the data shown in Fig.5-5.

5.2.2.3 試薬

本研究で使用した各種試薬の詳細は、次のとおりである。

・血液凝固阻止剤　；ヘパリン（ノボヘパリン注 1000 ：小玉，大阪），1000 unit／ml

・麻酔薬　；ケタラール（KETALAR 10：三共，東京）
静脈注射もしくは皮下注射により使用。

・輸液　；ラット血漿，フィジオゾール・4号（電解質補液；ミドリ十字，大阪）および生理食塩水を等量ずつ混合した（体外循環中の水分，糖分，タンパク質および電解質などの補給用）。

・ラット血漿　；実験動物と同じ KUD Wistar rat から採取したもの（九動，佐賀）。また血栓形成を阻害するためにヘパリンを 10 unit／ml-plasma の濃度で添加し、使用した。

5.2.2.4 手術手順

以下の手順で実験を行った。

(1) まずラットにエーテル麻酔をかけた。

(2) 麻酔の持続効果と、エーテルによる肝障害の軽減を図るため、静注麻酔薬であるケタラールを右側脇の下に 0.3 ml 皮下注射した。

(3) ラットを仰向けにし、尻尾を手前に置いた状態で手術台にピンで固定した。

(4) 切開部およびその周囲をバリカンで剃毛した。

(5) 下腹部から胸部に向かって手術用ハサミを入れ、皮膚、腹膜の順に膀胱付近から下腹部と剣状軟骨のちょうど中間点まで正中切開した。

(6) 鉗子を用いて腹腔内を露出させ、内臓を傷つけないように綿棒を用いて腸を向かって右側に寄せ、総腸骨動・静脈を露出させた。

(7) 先端の鋭利なピンセットを用いて動脈・静脈間の剥離を慎重に行い、それぞれ２本ずつ縫合糸（ELPプレート縫合糸 USP No.5-0；秋山製作所，東京）のループを作った。

(8) ２つのループ間に留置針（Insyte (I.V. Caterter／Needle unit) 22 or 24 GA , Becton Dickinson , Utah）を挿入（動脈・静脈の順）し、しっかりと固定した。

(9) まず動脈側、次に静脈側を体外循環ラインと接続し、循環を開始した。

(10) 膀胱に直接留置針を挿入後、縫合糸で固定し、採尿ラインに接続した。

(11) 感染症および不感蒸散の低減を図るために、術部を速やかに縫合した。

(12) ラットを warm plate（37℃）上へ移し、術後処置を行った。

(13) 血圧モニタリングラインなどの接続を行った。

(14) 以後、ラットが死亡するまで体外循環を継続した。

5.2.3 実験結果

5.2.3.1 血栓形成について

体外循環を行うにあたり常に大きな問題となるのは切開部における出血と体外循環ライン中における血栓形成であった。当初、体外循環ライン中に 10 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水（1.4 unit）を満たすことで循環ライン中のヘパリン化処理を行った。また同時に循環開始時における静脈側での血栓形成を防ぐ目的で、体外循環時に静脈側からヘパリン原液約 0.1 ml （ 100 unit ）を投与した（循環初期総ヘパリン投与量：約 114 unit）。しかしながらこの場合、体外循環中は２～３時間ごとにラインが血栓でつまり，そのたびに循環を止めてラインの洗浄またはラインごと交換する操作を行う必要があり，大量の血球系の成分を失い、実験動物に対して多大な負担をかけていた。

当初、血液の滞留部を極力なくし，流れをスムーズにすることでライン中の血栓形成を抑える努力を払い、その効果は確認されたが，完全に血栓形成を抑えることは不可能であった。そこで静脈側からのヘパリン投与をとりやめ、ライン内面のヘパリン化処理に使用する生理食塩水のヘパリン濃度を 100 unit／ml に増やし，強力にヘパリン化処理を行った。この時の循環初期総ヘパリン投与量は約 140 unit であった。

その結果，腹部切開口からの若干の出血傾向は認められたが、ライン中の血栓形成によってヘパリンを過剰投与した場合と比べると出血は少なく，それによるラットへの影響は大きな問題にはならない。また、約４時間の体外循環に使用したラインを洗浄してみたところ，ライン中に血栓はほとんど見られなかった。

5.2.3.2 麻酔の自動供給

(1) マニュアル操作によるケタラールの回分供給

まずはじめにマニュアル操作によるケタラール投与量をみたが、Fig. 5-7 に見られるように、そのほとんどが直線近似可能であった。これよりケタラールは低流量ポンプを用いて自動供給できることが示された。また、その供給速度は5回の実験の結果、塩酸ケタミン量で 33.5±5.4 mg／kg-rat／h （2.88±0.47 ml-ketalar／kg-rat／h ）であることが示された。

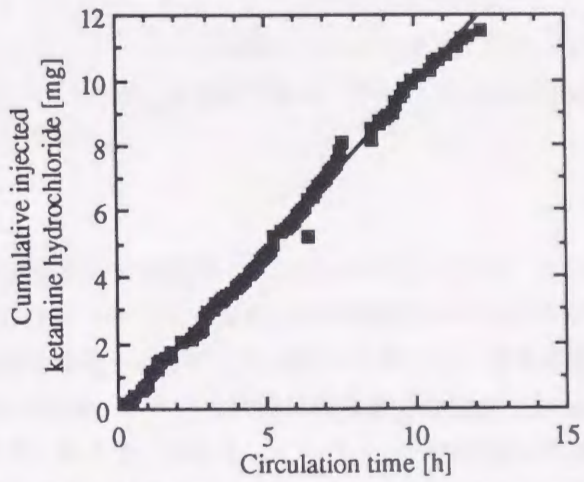


Fig.5-7 Cumulative ketamine hydrochloride injected manually into extracorporeal circulation line for a rat. Slope is 33.1±5.4 mg／kg-rat／hour.

(2) 自動化によるケタラールの連続供給

Fig.5-8 に代表的な結果を示した。図中のプロットは、供給速度を変化させた点を示している。本実験結果より、上記 (1) の結果からも予測されるように、静注麻酔薬であるケタラールの自動供給が可能であることが示される。この場合、ラット体重あたりのケタラール供給速度はマニュアル操作の場合と比べて約1.6倍も増加した。

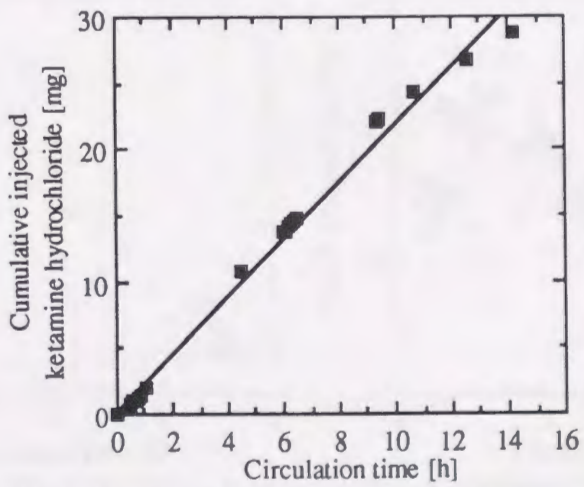


Fig.5-8 Cumulative ketamine hydrochloride automatically injected into extracorporeal circulation line for a rat.

5.2.3.3 輸液，ヘパリンの自動供給

（1）ヘパリンの供給

Fig.5-2 の体外循環ライン図にも示されているように、血圧モニターのラインが循環ラインに接続しており、モニター側ライン内部液と循環ライン内血液は直接接している。したがって、この使用に際しては、その接触部分が血栓で詰まるのを防止するためにモニター側ライン内部液としてヘパリン添加生理食塩水を使用し、かつそれが少量ずつ血液内に流入するようにした。しかしながら、2 unit／ml のヘパリン添加内部液を使用した場合、血栓形成を十分に抑制できず、体外循環ラインが詰まった。さらに 10unit／ml のヘパリンを添加し循環を行ったが、Fig.5-9 に示されるように体外循環時間が 7 時間を過ぎてくると、やはりライン中に血栓が形成された。そこで速やかに 75 unit／ml のヘパリンを添加したところ、循環 8 時間以降の血栓形成の防止に成功した。この実験においては 15.5 時間の体外循環を行ったが、循環終了時までライン中における血栓形成は見られず、また出血傾向の増加も見られなかった。

（2）輸液の供給

ラットへの輸液供給の目安としては通常 1～2 ml／h 程度である。また、上述したように、血圧をモニターする際には血圧モニターライン側から体外循環ライン中にヘパリン添加生理食塩水が常時流入している。その速度を測定すると約 1.38 ml／h であった。さらに静注麻酔薬であるケタラールが 0.66 ml／h で流入しており、ラットへの液体流入量の合計は 2.04 ml／h にもなり、それ以上の液体供給が不可能となる。そこで、血圧モニターラインの内部液を生理食塩水から輸液に変えて検討を行った。これにより、ケタラールの自動供給は維持したまま、血圧モニターライン側からヘパリンと輸液の連続自動供給が可能となった。

5.2.3.4 血圧の経時変化

Fig.5-9 A より、マニュアル操作による回分式での各種薬物投与では、体外循環中にラットの血圧は低下し、短時間で死亡する。これに対して自動化による連続供給開始後は、血圧が全体的に見て若干の減少傾向はあるものの、体外循環中を通してほぼ安定した値を示し、実験動物への負荷が軽減された、より良好な体外循環システムが達成できていることが示された。また血圧は死亡する直前に急速に低下する現象がみられた。

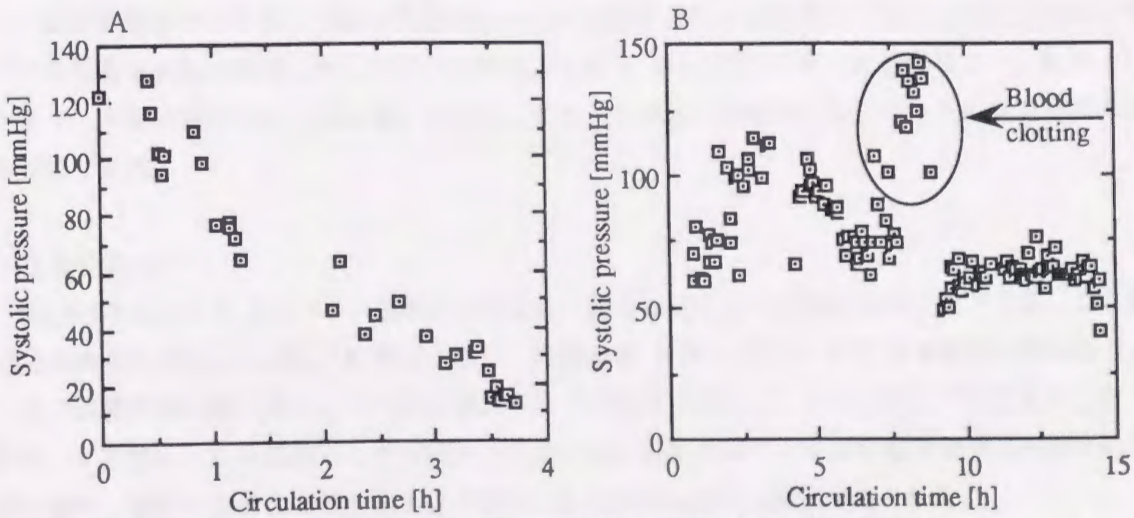


Fig. 5-9 Change of systolic pressure in extracorporeal circulation line for a rat .
A : discontinuous or manual supply of liquid, B : continuous or automatic supply of liquid.

5.2.4 考察

5.2.4.1 血栓形成について

体外循環における血栓形成の防止は、体外灌流型の人工的肝補助を行う際の非常に困難かつ重要な問題点となる。肝臓は生体内における血液凝固因子生産も担っており、肝不全時にはこの機能が低下する。しかし体外循環を行うと、5.2.3.1（p.86）で示したように循環ライン内に血栓形成が生じる。これらを回避するために抗凝固療法を過度に行うと、術野および生体内において出血傾向が亢進し、生体に大きな負担を与える。そこで、ここではこの問題の解決法を血管に求めた。元来、血管壁面からは t-PA（血栓溶解酵素）が徐放されており，血管自体が抗血栓材料となっている。したがって、血栓形成防止のためには、血液が直接接するライン内面を強力にヘパリン処理すれば、必要以上のヘパリン投与を抑制でき、これら問題点を解決できるものと考えられる。検討の結果、十分使用に耐える体外循環ラインを開発することができた。

5.2.4.2 麻酔供給について

今回の実験結果より、各種投与試薬の連続的な自動供給化に成功したが、麻酔薬であるケタラールの投与量がマニュアル操作による回分供給の場合と比べて約1.6倍に増加した。現在のところ、その理由としては、次の２点が考えられる。

1．マニュアル操作では、ラットが麻酔から覚めてきた際、まずエーテルで眠らせてからケタラールを投与していたのに対し，自動供給の場合にはケタラールが連続的に投与されるのでエーテルを吸引させる必要がない。このことにより、ケタラールの投与量が増加したと考えられる。

2．麻酔（ケタラール）をはじめとする各種注入薬の投与を自動化したことにより実験動物への負担が軽減し，その恒常性維持がより容易になり、麻酔からの覚めが早くなった。

上記 1. については、手術および体外循環中にラットが吸引したエーテル量が不明であり、その証明はできないが、効果は大きかったと考えられる。さらに 2. については血圧測定の結果から、各種投与薬の連続供給により体外循環中のラットの状態が回分供給の場合と比較して大きく改善されたことによるものと推察される。これは連続供給することにより、ラットの心臓や毛細血管が発達している肺などへの負荷が大幅に低減したことと麻酔状態の安定化により、ラットが覚醒することがなく、回分供給時のような一時的な多量のエーテルの吸引を行う必要がなくなり、薬物面からのラットへの負荷も大幅に軽減されたためであろう。上記 1. および 2. に示した理由により、結果としてケタラール供給量が増大したと考えられる。また、このような理由から、ラットの生存時間の延長も達成できた。

5.2.4.3 血圧について

Fig.5-9 B に見られるように、連続供給の場合に血圧は死亡する直前に急速に低下する。この原因は各種薬品の連続的な自動供給が確立され、実験動物（特に心臓）への負担は軽減したものの、それまで循環不全の影に隠れていた他の臓器不全（呼吸器不全など）が表に現れてきたものと考えられる。この傍証となる現象としては術中，術後における出血等による血中膠質浸透圧の低下による肺浮腫や、微小な血栓による毛細血管の閉塞による肝細胞壊死の症状が見られた。

5.2.5 本節のまとめ

本節での検討の結果、以下の事項が明らかとなった。

(1) 極小型の血漿分離装置を組み込んだラット体外循環ラインの開発に成功した。

(2) 血圧モニタリングシステム，麻酔・輸液・ヘパリンなどの連続的な自動供給ラインを有する極小型のラット体外循環システム（ライン）を作製した。また、その総液量は約 1.4 ml であった。

(3) 正常ラットを用いた体外循環実験の結果、その生存時間は 9 回の実験の平均で 8.3±4.8 時間であり、最大で15.5時間であった。

(4) 各種投与薬の回分供給時には、死因として心不全を含む循環不全の傾向が見られていたが、連続供給時には呼吸器不全（肺浮腫など）が主な死因であった。

5.3 ハイブリッド型人工肝臓の性能評価

5.3.1 本節の目的

5.2節において、人工肝臓性能評価のための肝不全ラット体外循環ラインの開発に成功した。しかし右総腸骨動・静脈を用いた体外循環ラインでは、右大腿部以下において組織の広範な壊死を生じる危険性があり、予後不良な結果をもたらす可能性もある。これに対して、脳は血液を供給する主な血管が動脈，静脈共に2本ずつある唯一の臓器であり、一方の血管を閉じても動物が死に至ることはない。よって頸動・静脈を用いたラット体外循環系を確立し、これを用いてハイブリッド型人工肝臓の性能評価を行うべきであると考えられる。また本研究での人工肝補助システムの有効性を示すために、肝障害モデルを用いた実験を行う必要がある。100％肝切除ラットまたは薬物によって肝不全ラットを作製できるが、開発を目指しているハイブリッド型人工肝臓の満たすべき性能としては、移植までの"bridge use"だけではなく、次のステップとして肝再生の誘導能も必要である。

そこで本節では、人工肝臓適用後、肝再生などによる回復が可能な実験系である薬物誘導肝不全ラットを作製し、検証を試みた。また数種の人工肝臓性能評価ラインを作製し、検討を行った。具体的には、最も単純なラインとして、ラット体外循環ライン中に直接人工肝臓装置を組み込んだOL型をはじめとして、血漿分離装置を介して物質交換を行うTL-M型などについて検討を行い、人工肝臓装置の性能評価だけではなく、システムとしての人工肝補助法の評価を試みた。

5.3.2 実験方法

5.3.2.1 ライン

ラインの写真および全体図を Photo 5-2 および Fig.5-10 に示す。

（1）1ループ型（One-loop type：OL 型）

本ラインは、人工肝臓装置を直接体外循環ライン中に組み込んだものであり、非常に単純な構造である。まず左外頸動脈から血液を引き出し、血圧モニタリングライン（輸液，ヘパリンの自動供給ライン兼用）と接し、ポンプを介して直接人工肝モジュールへと導かれる。その後、空気抜きで混入気泡の除去を行い、再び右総頸静脈からラット体内へと戻す。本ラインはその構造が特に単純であり、簡便に作製および使用できる。さらに、装置内に血液が流れ込み、血中有害成分と装置内の肝細胞が直接接することから、良好な物質交換が行えるという利点を有している。ただし、血漿分離装置は設置していない。

（2）膜分離装置付加2ループ型（Two-loop type with a membrane separator：TL-M 型）

本ラインは、ラット体外循環ラインと人工肝臓装置側の循環ラインに分かれており、先に開発した小型の血漿分離装置による膜接触によって物質交換を行う。これによって、血球系成分，装置内から遊離してくる肝細胞さらにはその分解物などが相互に混合することがない。ラット体外循環ラインおよび人工肝臓装置側の循環ライン内にはそれぞれラット全血およびラット血漿を循環させた。ライン内液の流れは、まずラット体外循環ライン側については、上述の OL 型 と同様に血液を導き出すものの、ポンプを通った直後に血漿分離装置の中空糸内側を通り、人工肝臓ライン側との血漿分離膜面を介した接触による物質交換を行う。その後は再び OL 型 と同様にラット体内へと戻した。また人工肝臓装置側の循環ライン内の流れは、まず血漿分離装置の中空糸外側の空間（shell side）

からポンプにより導きだし、細胞の生存のためにガス交換装置によるガス環境の調整後、途中混入した気泡を空気抜きで除去し、人工肝臓モジュールへと導いた。その後、再び血漿分離装置（shell side）へと戻された。このラインは先の直接型ラインと比べると、大幅に複雑になることと、物質移動速度が低下するという問題点を有している。

（3）膜分離装置，バイパスライン付加２ループ型
（Two-loop type with a membrane separator and a bypass line：TL-MB 型）

本ラインは、上記の TL-M 型を基礎とし、物質交換をさらに促進するために、人工肝臓装置側の循環ライン中のラット血漿の一部を直接ラット体外循環ライン中へ戻すバイパスラインを増設したものである。血液および血漿の流れは、基本的には前述の TL-M 型 と全く同様である。バイパスラインの設置箇所（Fig.5-10 C）は、人工肝臓装置側の循環ライン内の人工肝臓モジュール出口直後に血漿の一部を引き出すために設けたクロスフロー型血漿分離装置（Fig.5-11）から、ラット体内へ血液が戻る直前の空気抜きまでである。なお、この間に流量計も設置した。バイパスライン中の流速は約 0.1 ml／min とし、ラット体外循環ライン側へと流入させた。ここで、バイパスラインの採液口としてクロスフロー型の血漿分離装置を用いた理由は、その自浄効果による目詰まりの防止のためである。平膜を用いた場合には膜面の目詰まりのため、数分～数十分で膜の交換が必要であったが、この装置の使用により３時間にわたる体外循環中でも交換は必要なかった。

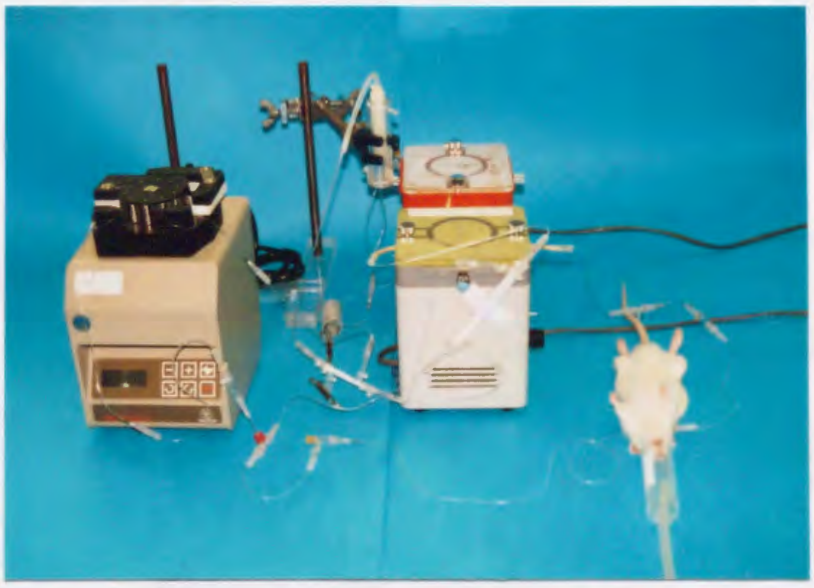
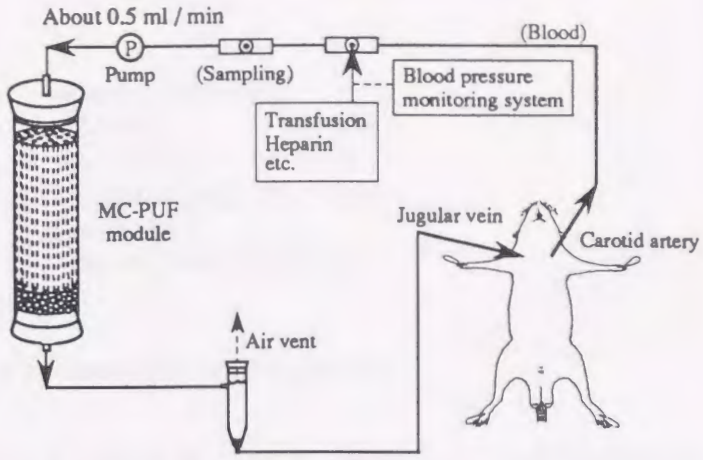


Photo 5-2 Photograph of rat, pump, plasma separator, etc. in rat extracorporeal circulation line.

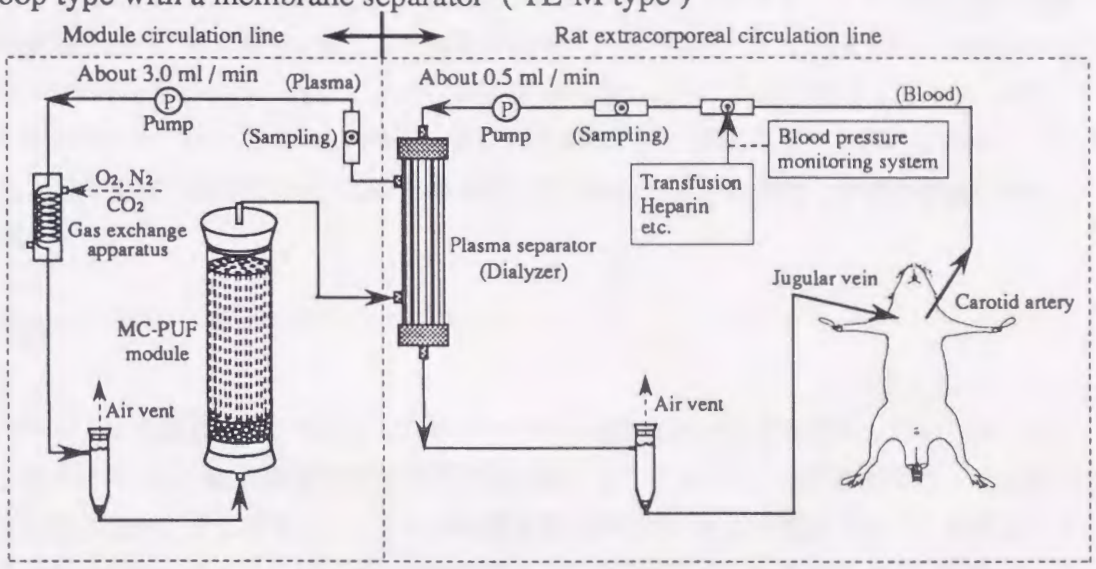
5.3.2.2 評価方法

手術前の肝不全状態の評価には、プロトロンビン時間（PT値）を用いた。これは分析時間が非常に短く、またその結果の信頼性も高く、ラット間の個体差によるばらつきも小さい。また実験中得られたサンプルは、遠心分離した後、血漿部分を凍結保存した。実験終了後、GOT，GPT，LDH，コリンエステラーゼ，クレアチニン，尿素態窒素，アルブミン，総ビリルビン，総胆汁酸，アンモニアの定量分析を行い、これらの結果をまとめて評価を行った。これらの分析には、自動分析装置（Super Stat Random ; RA-1000 ; TECHNICON）を用いた。

A : One-loop type (OL type)



B : Two-loop type with a membrane separator (TL-M type)



C : Two-loop type with a membrane separator and a bypass line (TL-MB type)

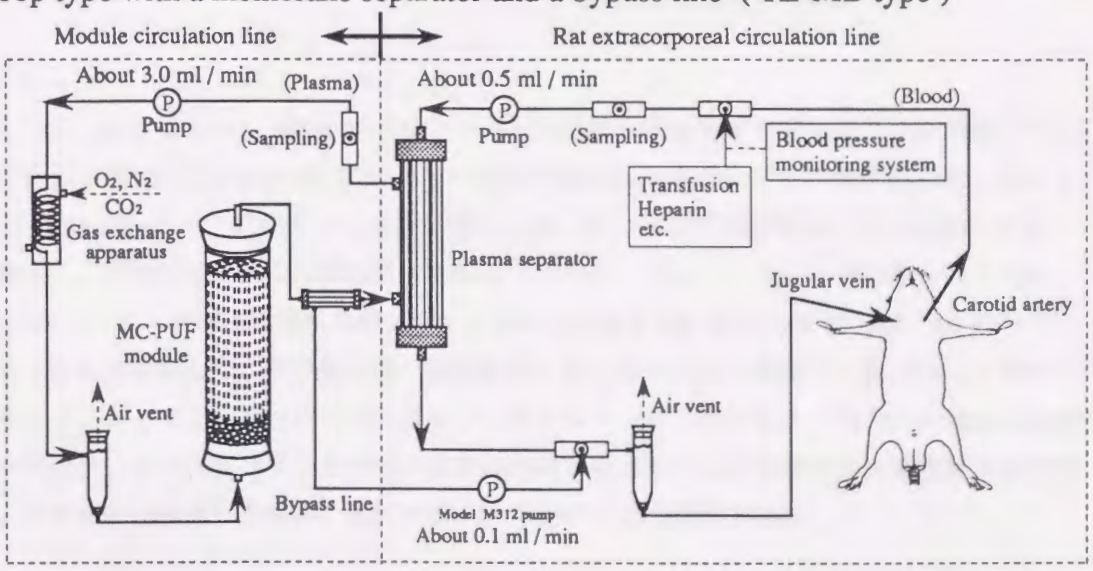
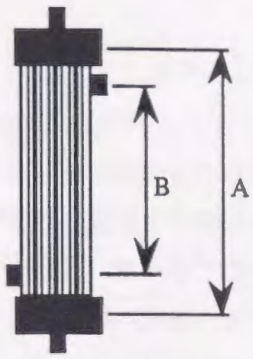


Fig. 5-10 Classification of hybrid artificial liver support system from the viewpoint of circulation.



Housing : Glass tube
Diameter : 4 mm
Length (A) : 5 mm
Effective length (B) : 3 mm
Lumen : PVA
Number of the lumen : 10

Fig.5-11 Dimensions of a plasma separator for bypass line.

小動物を用いた体外循環では、それ自体による負荷が避けられず、場合によっては循環不全を生ずる可能性もある。そこで対照実験として、肝細胞／スフェロイドを含まない人工肝臓装置を接続した場合の実験を行い、その結果に対する肝細胞／スフェロイド固定化人工肝臓を用いた場合の効果についての相対的評価を行った。ここで、PUF高さは 50 mm のものを使用し、それ以外は Fig.4-22 と同じである。また、ラットの肝不全状態の把握や、人工肝臓の効果を調べるために、生存時間や血中成分組成の変化について、体外循環中（30分毎）および循環終了後約２週間にわたって追跡調査を行った。

5.3.2.3 操作条件

（1）OL 型

これまでラット体外循環ライン中には 1.4 ml のヘパリン添加生理食塩水を満たしていたが、本ラインでは、その中に 5.65 ml の容積を持つ人工肝臓装置を含んでおり、15 ml 程度のラット血液量に比べて無視できない。そこで本ラインでは、実験直前に健常ラットから採血を行い、等量のラット血漿で２倍量に希釈したものを用いて、体外循環ライン中を満たすとともに、ライン接続まで、0.5 ml／min の流速で循環させた。

（2）TL-M 型

前準備として、まずはじめに 100 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水を用いてライン中のヘパリン化処理を行い、次いで 10 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水を用いて先の液を軽く洗い流した後、10 unit／ml のヘパリン添加ラット血漿を満たした。また人工肝臓装置は、手術開始直前にラインに接続した。接続の際、人工肝臓装置は無血清培地を用いて３～５日間の前培養を行うため、10 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水約 10 ml を用いて培地を洗い流した後 10 unit／ml のヘパリン添加ラット血漿で置換した。その条件は、装置底部より３ ml／min の流速で、約 10 ml のラット血漿を流すことによって行った。以上の処置後、装置をライン中に組み込み、速やかに循環を開始した。この循環は、ラットにラインを接続する時以外は手術中および３時間の体外循環終了時まで継続した。またその他の操作条件は、上記の OL 型 の場合と全く同様である。

（3）TL-MB 型

上記の TL-M 型 と全く同様である。

5.4.2.4 手術手順

以下の手順で、手術を行った。

(1) まず、ラットをエーテル麻酔にかけた。

(2) ラットを仰向けにし、尻尾を手前に置いた状態で手術台にピンで固定した。

(3) 切開部およびその周囲（胸から下顎の付け根までの部分）をバリカンで剃毛した。

(4) 首の付け根から下顎の付け根まで正中切開した。

(5) 先端の鋭利なピンセットを用いて、頸動脈および頸静脈を周囲の筋肉および結合組織から慎重に剥離し、それぞれ３本ずつ縫合糸のループを作った（２本は留置針固定用、１本は循環終了時の血管結紮用）。

(6) ２つのループ（動脈：血管下流側，静脈：血管上流側のループ）の間に留置針を挿入（頸静脈・頸動脈の順）し、しっかりと固定した。またこの際、頸動脈からの余分な出血を防ぐために、留置針挿入前に頸動脈を小型のヂェフェンバッハクレンメを用いて鋏んでおいた。また頸静脈入口における血栓形成を防ぐために、Insyte 挿入後速やかに、その入口に 10 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水を満たしたシリンジを接続した。

(7) まず動脈側、次に静脈側を体外循環ラインと接続し、循環を開始した。頸静脈接続に際しては、10 unit／ml のヘパリン添加生理食塩水をシリンジから 0.1～0.3 ml 程度押し出し、血管内に空気が混入しないように注意した。

(8) ラットを warm plate（37℃）上へ移し、術後処置を行った。

(9) 血圧モニタリングラインなどの接続を行った。

(10) ３時間の体外循環後、ラインを止めると同時に留置針を挿入していた頸動脈，次いで頸静脈を結紮した。

(11) 術部を縫合した。

5.3.2.5 試薬

（１）D-ガラクトミン（D-Galactosamine Hydrochloride；和光純薬，大阪）

肝不全誘導に際しては、D-ガラクトサミンを用いた。これによって誘導される肝不全症状は急性型に近く、本実験系での使用に適していると考えられる。まず塩酸 D-ガラクトサミン塩酸塩粉末を超純水を用いて溶解させ、１N-NaOH を用いて pH 7.2 に調整した。調整後のD-ガラクトサミンの濃度は 0.1 g／ml であった。

（２）輸液

5.2 節において体外循環中の尿量が安定しておらず、カリウムなどの過剰投与が懸念されたため、ここではフィジオゾール・４号の使用をひかえた。そのかわりにブドウ糖注射液（大塚糖液５％；大塚製薬，東京）を使用した。ここで実際に使用した輸液の組成は、ラット血漿，ブドウ糖注射液および生理食塩水を等量混合したものである。

その他の試薬については 5.2 節と同様である。

5.3.2.6 肝不全ラットの作製方法

肝不全ラットの作製手順を Fig.5-12 に示す。実験に使用したラットは SPF（Specific Pathogenfree）動物であったが、ラット間の個体差が無視できないために、1例の実験についてラット5体を使用した。まずラットの尾静脈から採血し、正常値を測定した。エーテル麻酔下において、D-ガラクトサミン溶液を5～6 ml／kg-rat body weight 腹腔内注射し、約24時間放置した。ここで再び尾静脈より採血し、誘導された肝不全状態の検査を行い、目標とする範囲にある肝不全症状（PT 値；30～35 sec）のラットを実験に使用した。この値は、予備実験において3時間の体外循環が可能な肝不全症状の範囲内にあることを確認済みのものであり、重篤な症例である。

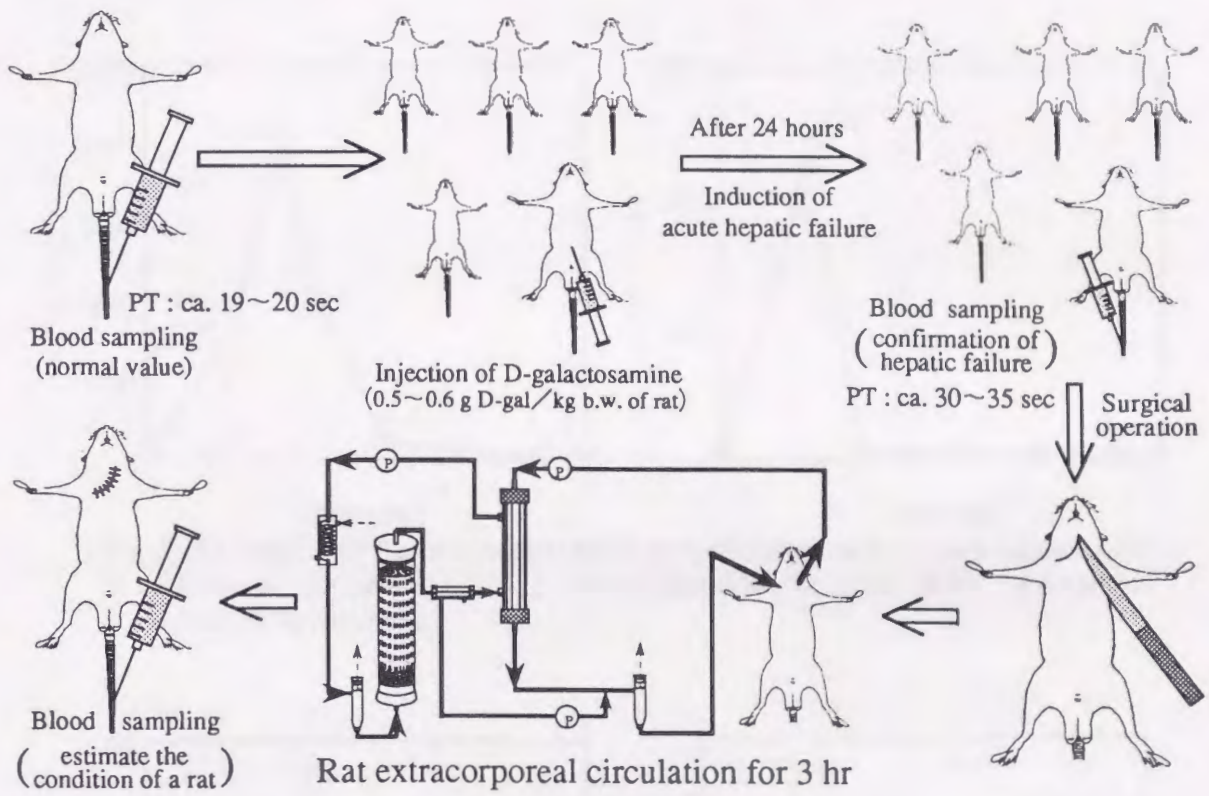


Fig. 5-12 Procedure for estimating the performance of an artificial liver support system using an *ex vivo* circulation line with a hepatic failure rat.

5.3.3 実験結果

（1）OL 型ライン

血中GPT活性の経時変化 を Fig.5-13 に示す。対照実験では循環終了後２日目までに、血中GPT活性は正常値にまで回復していた。これに対して、OL 型の人工肝臓装置を用いた場合には、正常値まで回復するのに３日間を要した。

また肝不全による黄疸症状の発現および回復について考察するため、血中ビリルビン値の経時変化を Fig.5-14 に示す。対照実験では体外循環終了時に濃度のピークを迎え、その後速やかに減少し、循環後１日目には正常値にまで回復している。しかし、OL 型の人工肝臓装置を適用した系においては、循環後さらに血中ビリルビン濃度が増加し，正常値に戻るまでに対照実験の２倍近い２日間を要した。

これらのことから、OL 型では、人工肝臓装置を適用することにより、対照実験に比べてむしろ肝不全症状が悪化することが示された。

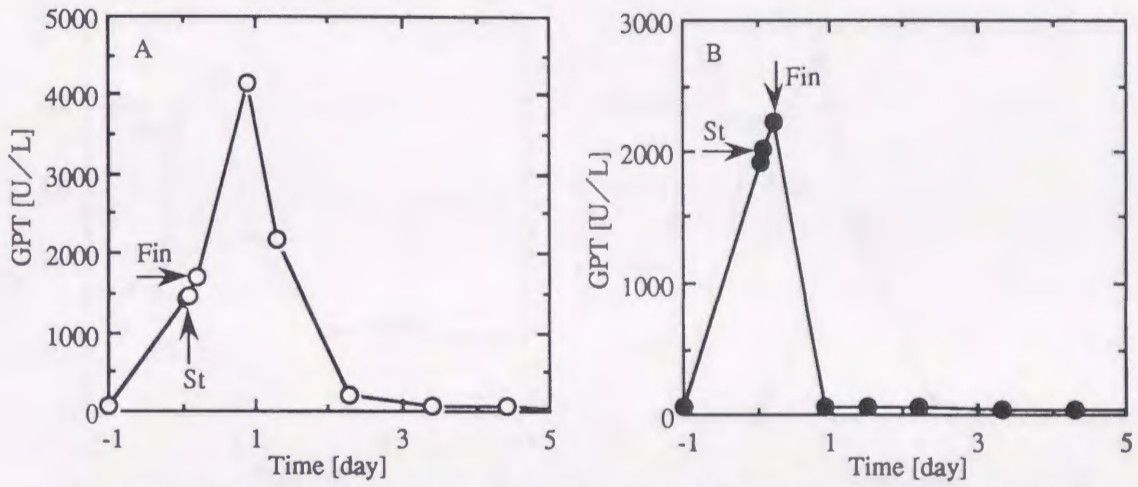


Fig. 5-13 Change of GPT concentration in blood of hepatic failure rat in one-loop circulation line. A : with hepatocyte／spheroid（○）, B : without hepatocyte／spheroid（●）. St is start and Fin is finish of the circulation.

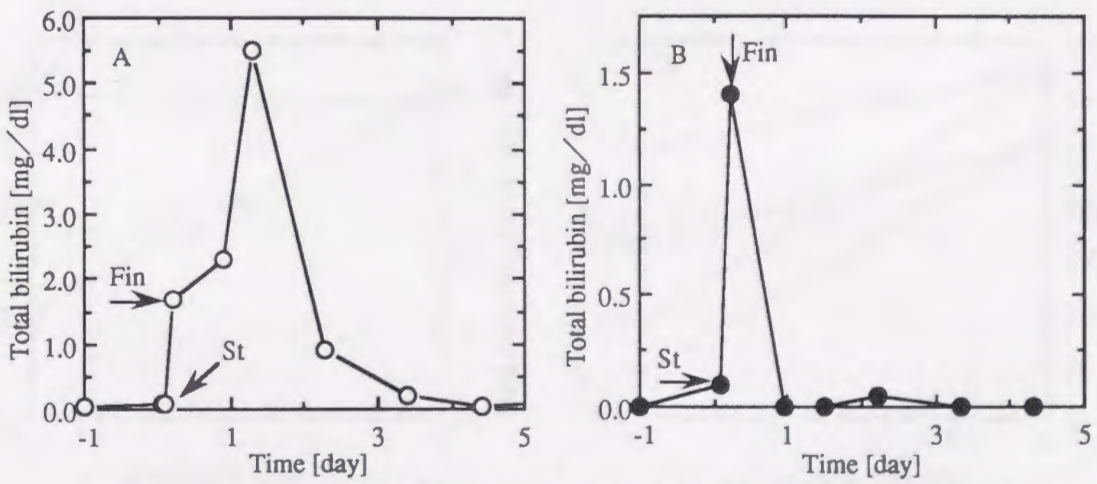


Fig. 5-14 Change of total bilirubin concentration in blood of hepatic failure rat in one-loop circulation line. A : with hepatocyte／spheroid , B : without hepatocyte／spheroid. St is start and Fin is finish of the circulation.

（2）TL-M 型ライン

血中GPT活性の経時変化を Fig.5-15 に示す。肝不全症状の個体差が大きく、対照実験と TL-M 型の人工肝臓装置を用いた場合の差は不明瞭であった。また循環開始と終了時におけるラット血液および装置側血漿中のGPT活性値を比較すると、循環中のラット血液側から人工肝臓装置側への物質移動はほとんど行われていなかったことが示される（Fig.5-15 B）。

3時間の体外循環前後の総ビリルビンと胆汁酸の血中濃度を Fig.5-16 に示す。GPTの結果と同様、総ビリルビン，胆汁酸ともに血中濃度の絶対値が大きく異なり、明言はできないが、全体的な傾向として、総ビリルビンについては、対照実験に比べ人工肝臓の適用例では体外循環中の濃度上昇が若干抑えられたようであるが、有意な差は見られない。一方、胆汁酸については、対照実験では体外循環前後で明らかに血中濃度が上昇したのに対し、人工肝臓の適用例では循環前の値を維持している。すなわち TL-M 型ラインを用いた場合、全体的傾向として、対照実験に比べて同等ないしは症状の悪化を若干抑えることができる。

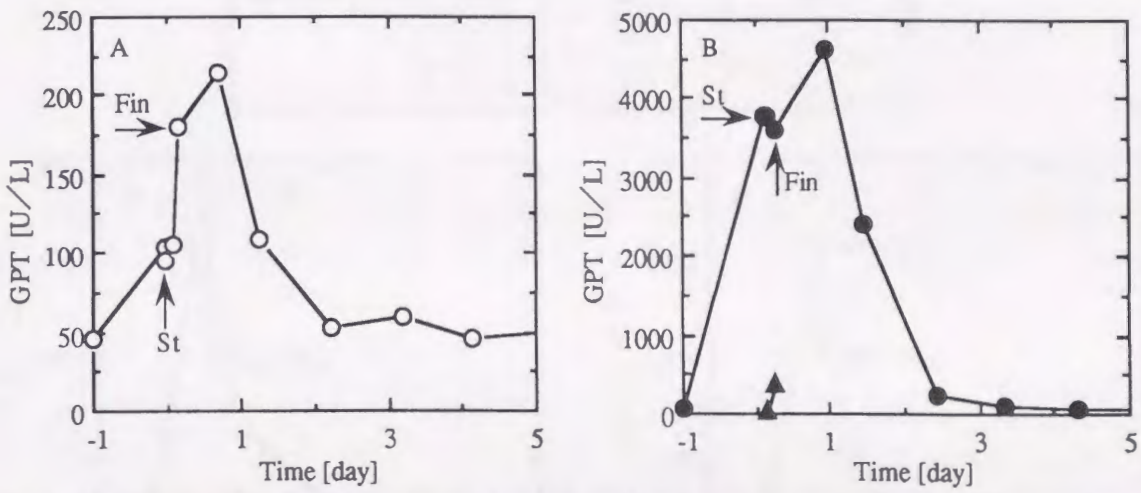


Fig. 5-15 Change of GPT concentration in blood of hepatic failure rat in two-loop type with a membrane separator. A : with hepatocyte／spheroid , B : without hepatocyte／spheroid. St is start and Fin is finish of the circulation. ○ : in the rat extracorporeal circulation line , ▲ : in the module circulation line.

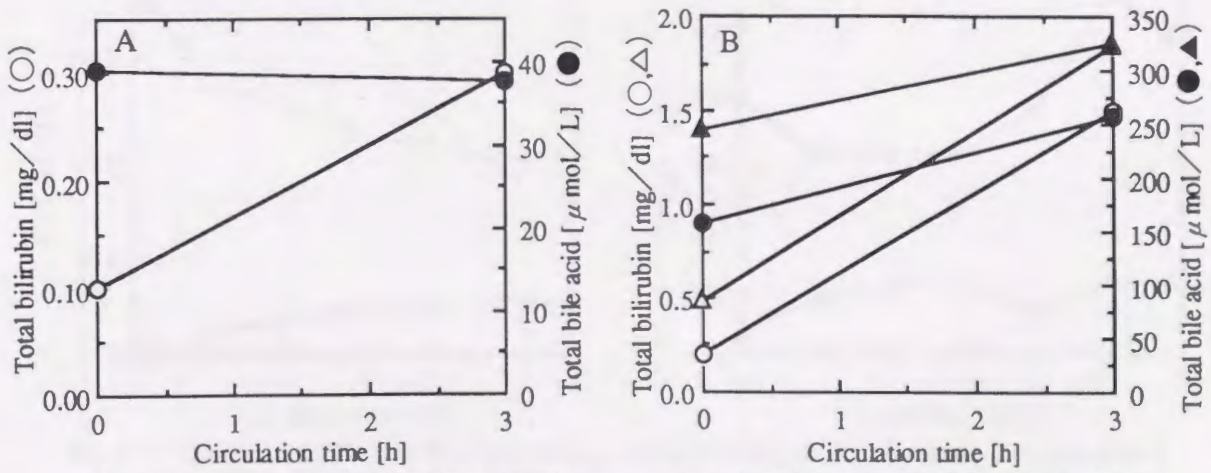


Fig.5-16 Change of total Bilirubin and TBA concentrations in blood of hepatic failure rat during extracorporeal circulation. A : with hepatocyte／spheroid , B : without hepatocyte. ○ and ● indicate run 1 and △ and ▲ indicate run 2.

（3）TL-MB 型ライン

実験に用いた全症例の肝不全状態（PT値）を Table 5-1 に示す。各実験につき 5 例ずつ肝不全ラットの作製を行ったが、ラット間の個体差が大きく、PT値で 25.2～43.4 sec ものばらつきがみられる。

Fig. 5-17 に肝酵素である GPT および GOT の血中濃度変化を示す。Fig.5-17 A, C より、体外循

Table 5-1 Prothrombin time of the D-galactosamine induced hepatic failure rats which were used for extracorporeal circulation to estimate the performance of hybrid artificial liver (MC-PUF) .

	Ex.	Prothrombin time [sec]	
		Normal	Preoperation
Control	C-1	20.5	25.2
	C-2	18.8	31.2
	C-3	19.1	36.7
Artificial liver	AL-1	22.0	32.3
	AL-2	20.1	28.9
	AL-3	20.2	26.8
	AL-4	19.4	33.9
	AL-5	19.3	43.4

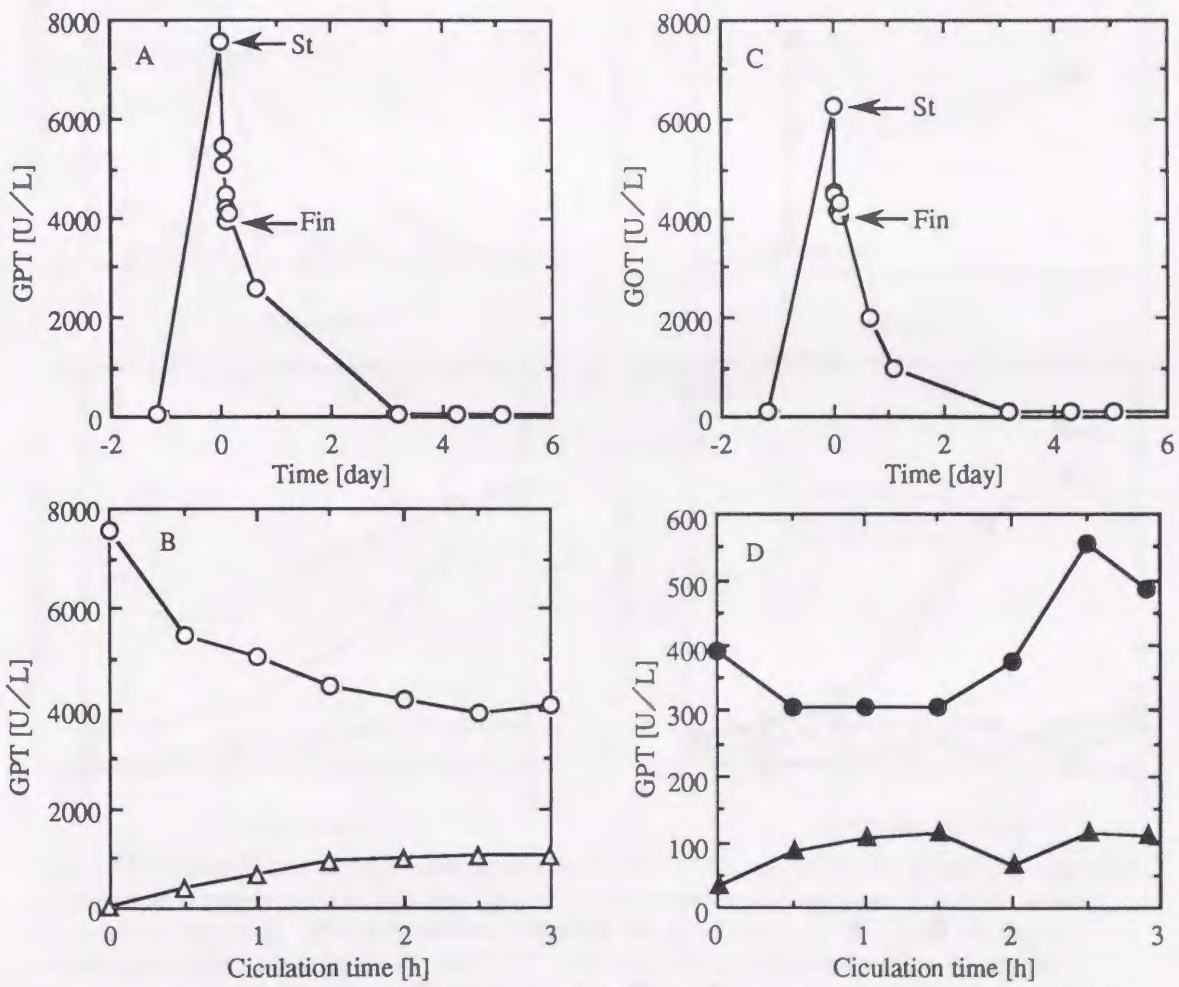


Fig. 5-17 Change of GPT and GOT concentrations in blood of hepatic failure rat two-loop type with a membrane separator and a bypass line. A, B, C : with hepatocyte／spheroid (Ex. AL-5) , D : without hepatocyte／spheroid (Ex. C-2). St is start and Fin is finish of the circulation. ○ : in the rat extracorporeal circulation line , ▲ : in the module side circulation line.

環開始時にピーク値を示していたGPT , GOT 値は、循環終了時に 4 ～ 5 割程度減少している。これは人工肝臓によって代謝されたわけではなく、Fig.5-17 B に示すように、正常値である人工肝臓装置側の循環ライン中への物質交換によりGPTおよびGOTが移動した結果である。しかしながらFig.5-17 D より、対照実験では、Fig.5-17 B と同様に物質移動は行われるが、その値はあまり低下せず、むしろ循環1.5時間以降逆に増加している。GPTは肝細胞内にのみ存在するアミノ転移酵素であることから、これは循環中にラット肝細胞の壊死が生じ、細胞内から多量のGPTが流出してきたことを示している。

血中ビリルビン濃度の経時変化を Fig.5-18 に示す。これより 3 時間の体外循環中にその血中濃度は上昇し、手術および体外循環による実験動物への負荷が大きいことが示される。また、人工肝臓を適用した場合の方が、その上昇は大きかった。さらに血中の胆汁酸濃度の経時変化についても、Fig.5-19 に見られるようにその傾向は同じであった。

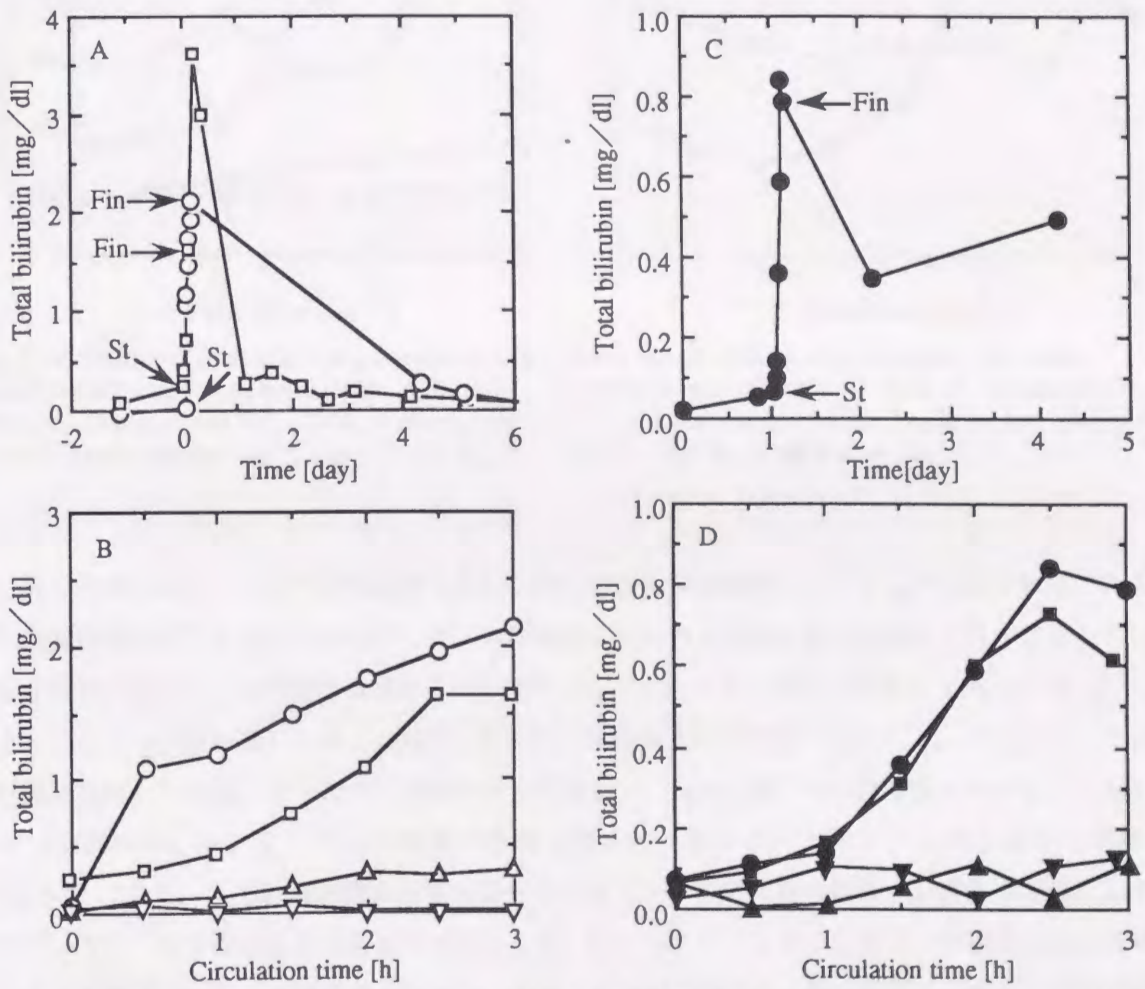


Fig. 5-18 Change of total bilirubin concentrations in blood of hepatic failure rat in two-loop type with a membrane separator and a bypass line. A and B : with hepatocyte／spheroid , C and D : without hepatocyte／spheroid. St is start and Fin is finish of the circulation. ○, ●, □, ■ : in the rat extracorporeal circulation line , △, ▲, ▽, ▼ : in the module side circulation line. ○ and △ : Ex. AL-5 , □ and ▽ : Ex. AL-4 , ● and▲ : Ex. C-3 , ■ and ▼ : Ex. C-2.

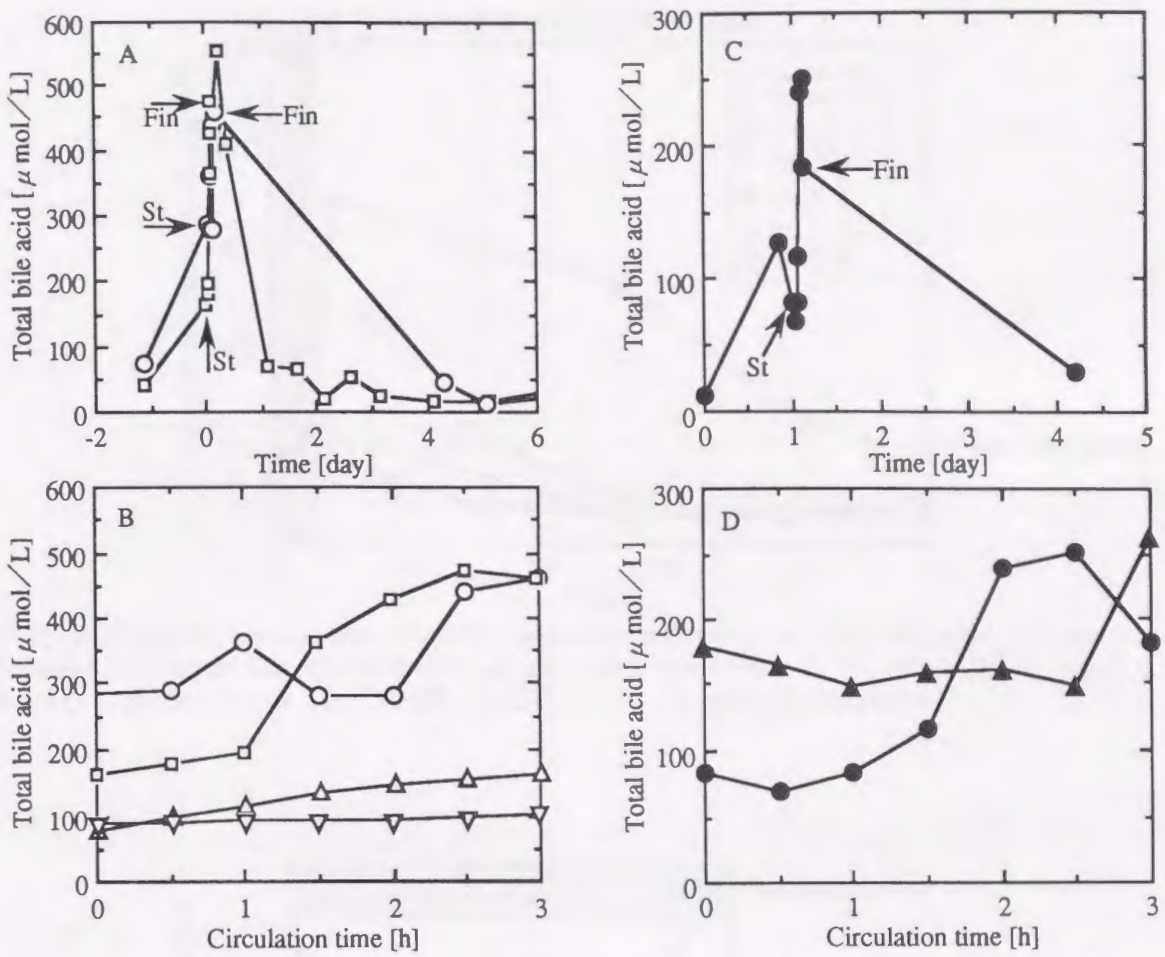


Fig. 5-19 Change of total bile acid concentrations in blood of hepatic failure rat in two-loop type with a membrane separator and a bypass line. A, B and C : with hepatocyte／spheroid , D : without hepatocyte／spheroid. St is start and Fin is finish of the circulation. ○ : in the rat extracorporeal circulation line , ▲ : in the module side circulation line. ○ and △ : Ex. AL-5 , □ and ▽ : Ex. AL-4 , ● and ▲ : Ex. C-3.

肝不全時に増加する血中有害物質であり、肝性昏睡の起因物質の一つとして注目されるアンモニア濃度の経時変化を Fig.5-20 に示した。対照実験３例中の２例は、体外循環中に血中アンモニア濃度が急激に増加し、３時間の循環終了時を待たずして死亡した。死亡を免れた１例（Ex. C-3）も、そのアンモニア値は著しく高く、回復も進まず、循環終了後92時間で死亡した。これに対して人工肝臓を適用した場合、アンモニア濃度の急上昇はなく、実験を通して肝性昏睡レベル以下に抑えられ、全例回復した。ここで体外循環中の両循環ライン液中のアンモニアの濃度変化の詳細を Fig.5-21 に示す。人工肝臓装置側の値は装置によるアンモニア代謝の結果、正常値まで低下したことで、ラット血中濃度は肝性昏睡レベルより低く抑えられた。しかしながら、代謝阻害発症領域以下にまで低下させることはできなかった。また、循環終了時には、再び血中アンモニア濃度が増加する傾向が見られた。

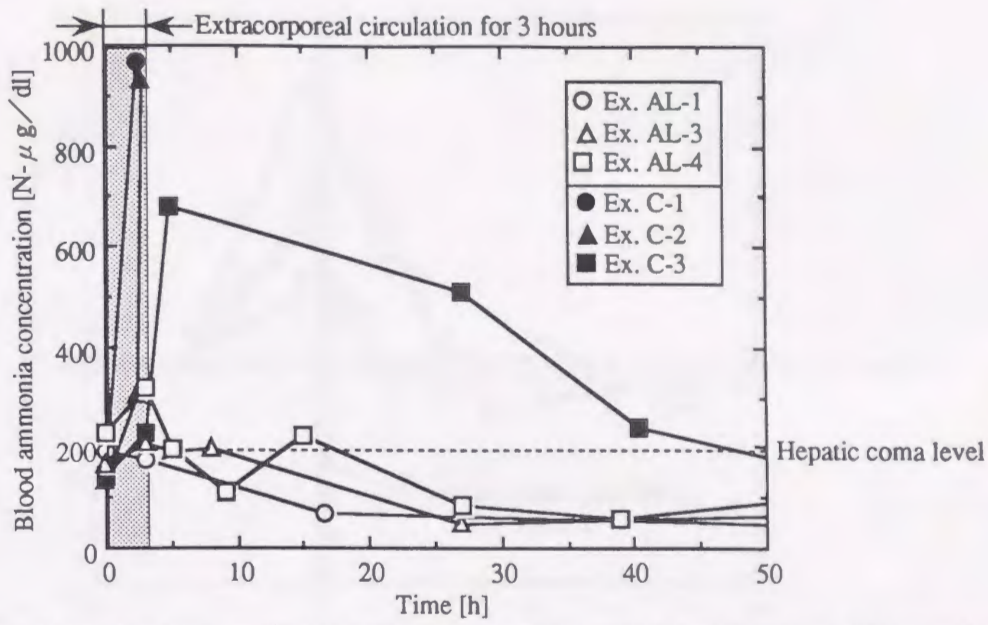


Fig.5-20 Change of ammonia concentrations in blood of hepatic failure rats in two-loop type with a membrane separator and a bypass line. Closed simbols indicate control experiments. ○ : Ex. AL-1 , △ : Ex. AL-3 , □ : Ex. AL-4 , ● : Ex. C-1 , ▲ : Ex. C-2 , ■ : Ex. C-3. ------- shows hepatic coma level.

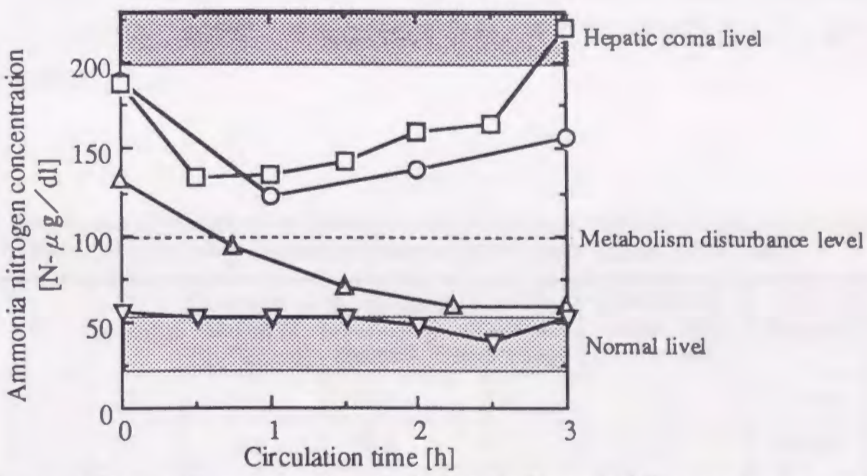


Fig.5-21 Change of ammonia concentrations in the blood of hepatic failure rats during operations of a hybrid artificial liver support system. ○ and ● : Ex. AL-1 , △ and ▲ : Ex. AL-2 , ○ and △ are in the rat extracorporeal circulation line., ● and ▲ are in the module side circulation line.

本実験を通してのプロトロンビン時間の推移を Fig.5-22 に示す。対照実験は全例死亡したことから、ここでは人工肝臓装置の適用例のみを示す。前述のとおり、各症例間の値のばらつきは大きかったが、どの症例においても循環開始時にピーク値を示し、血液凝固活性の著しい低下を示した。しかし循環後その値は速やかに回復し、速い場合で約１日、遅くとも３日以内には全例正常値にまで回復していた。また、回復にはPT値が高いほど、多くの時間を要した。

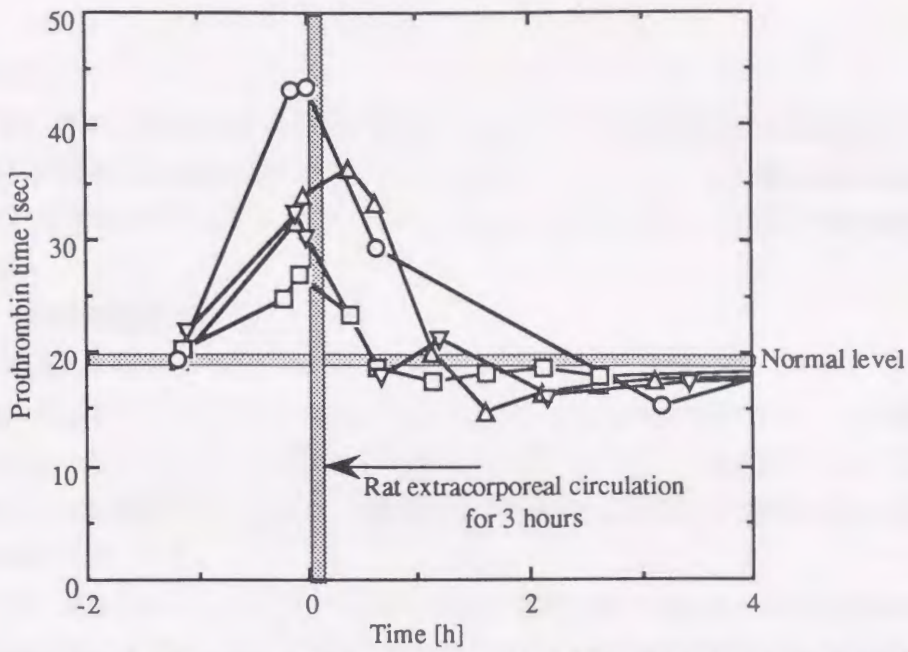


Fig.5-22 Recovery from D-galactosamine induced acute hepatic failure using extracorporeal circulation with a hybrid artificial liver support system. ▽ : Ex. AL-1 , □ : Ex. AL-3 , △ : Ex. AL-4 , ○ : Ex. AL-5.

TL-MB ラインを用いた実験結果をTable 5-2 にまとめた。人工肝臓の適用実験は 6 例行い、内 1 例はラインのトラブルが生じたため、5 例の結果を得た。その内 4 例が回復した。また、対照実験は 3 例行ったが全例死亡した。

Table 5-2 Experimental results for estimating of the performance of a hybrid artificial liver support system (TL-MB type line) using D-galactosamine induced acute hepatic failure rats.

	Ex.	b.w. [g]	Dose rate of D-Gal N [g／kg-rat]	Prothrombin time [sec]		Hematocrit value [%] (postcircuration)	Result	Note
				Normal	Preoperation			
Control	C-1	252	0.6	20.5	25.2	40	Death	151 min*1
	C-2	215	0.5	18.8	31.2	27	Death	175 min*1
	C-3	209	0.5	19.1	36.7	19	Death	92 hr*2
Artificial liver	AL-1	250	0.6	22.0	32.3	38	Recovery	——
	AL-2	204	0.6	20.1	28.9	12	Death	2 hr*2 : BL*3
	AL-3	224	0.6	20.2	26.8	30	Recovery	——
	AL-4	260	0.5	19.4	33.9	31	Recovery	——
	AL-5	219	0.6	19.3	43.4	36	Recovery	——
	AL-6	245	0.5	20.2	28.2	37	Death	line trouble*4

*1 : The time of extracorporeal circulation when the hepatic failure rat was dead.
*2 : The time when the hepatic failure rat was dead after extracorporeal circulation.
*3 : The rat was bled from the surgical area and bled to death.
*4 : The rat was dead from disconnection of a tube.

5.3.4 考察

5.3.4.1 OL 型ライン

OL 型ラインを用いた場合には、期待した結果とは異なり、人工肝臓装置を適用すると対照実験に比べてむしろ悪影響があることが示された。この原因としては”本人工肝臓装置が宿主動物側に対して何等かの有害物質を出している”ということが考えられる。そこで、その有害物質について考察してみると、

1．生体毒性物質

2．装置内肝細胞またはその分解生成物

が考えられる。ここで 1. については、肝臓は元来生体内における代謝解毒反応の中心臓器であることから考えにくい。さらに、ここで使用した肝細胞も、遺伝子レベルで宿主動物とほぼ同じと考えられる同系のラットを使用したことから、免疫拒絶反応によるものである可能性も低いと考えられ、他に主要因があると思われる。

2. については、本実験ラインの最大の問題点であり、装置内から漏洩してきた肝細胞そのもの、さらには肝不全血液が直接流れ込むために循環途中で壊死した装置内肝細胞の分解生成物や、その中から放出されたプロテアーゼなどの影響によるものである可能性が高い。以上の点から、装置内に直接肝不全血液を流し込む本実験ラインの使用にはかなりの問題があり、膜によってラット血液と人工肝臓装置側血漿を分離する必要があると考えられる。

5.3.4.2 TL-M 型ライン

肝細胞／スフェロイドの有無にかかわらず、肝不全ラットの症状改善に差がなかった。これは Fig.5-15 B に示されるように、血漿分離膜を介した物質移動がほとんどなされず、人工肝臓を接続した効果が示されなかったためである。しかしながら、OL 型の結果と比較すると、人工肝臓装置内から漏洩してくる肝細胞などのラット体内への流入を防いだことで、少なくとも肝不全症状からの回復に与えていた悪影響は除去できている。

以上のことから、血漿分離膜を介した物質交換を良好に行わせ、人工肝臓装置の性能を発揮させることが重要な問題となる。

5.3.4.3 TL-MB 型ライン

上記の TL-M 型ラインで指摘された物質交換の改善には、

1．溶質透過性の良好な膜（大きな孔径、薄い膜厚、など）の使用

2．中空糸膜の有効表面積の増大

3．中空糸内外の液体流速の増加

4．中空糸膜面を透過する強制流れ

などが考えられるが、ここでは最も効果的であると考えられる 4．を採用し、バイパスラインを作製した。その結果、本人工肝臓装置の有効性が十分に示された。

また、死亡した一部症例について説明を加える。まず 1 例の死亡（Ex. AL-2）については、Table 5-2 からもわかるように、循環終了時におけるヘマトクリット値が非常に低くなっていた。これは体外循環中の出血傾向がかなり顕著であったためであり、本来ならば輸血を行うべき症例である。しかし、他の症例においては輸血を行っておらず、血液浄化作用の影響を加えていない。これ

より本症例は、多量の出血による死亡であったと考えられる。これとは別に、体外循環中に、ラインが外れて死亡した症例（Ex. AL-6）が1例あった。ただし、この場合循環中の血中アンモニア値の低下が速やかであり、他の症例以上にラットが麻酔からの覚醒が速やかであったことから、本症例も本人工肝臓装置の有効性を示す1例である。

Fig.5-17 B, D の比較でも示されるように、対照実験では体外循環中に肝細胞の壊死が進行したが、人工肝臓を適用した場合には、GPT レベルが平衡となり、肝細胞の壊死の亢進が防止されたと予測される。このことより、本装置が肝障害の緩和ないしは低減にも効果を有するものと考えられる。

以上の点から、漏洩細胞などのラット体内への混入防止と物質交換の促進が、本人工肝臓装置の性能を発揮させる重要な因子であることが示される。

しかし Fig.5-17 B に示されるように、循環終了時においても血液と血漿の間には約4倍もの GPT 濃度差が生じていることから、今後さらに改善の必要がある。

5.3.5 本節のまとめ

ラット頸動・静脈を用いた体外循環ラインの開発により、広範な組織の壊死を回避した体外循環が可能となった。また、TL-MB 型ラインを用いた体外循環による人工肝臓装置の性能評価系を確立したことで、本研究でのMC-PUF型人工肝臓の臨床への応用が可能になったその際、漏洩肝細胞の分離を行うとともに、良好な物質交換の促進が重要課題である。将来的には、人工肝臓開発に際して必須項目となる肝再生に関与する因子などが速やかに動物側へ供給されるように血漿分離装置の物質移動特性を改善する必要がある。

5.4 本章のまとめ

本研究で小動物（ラット）の体外循環に成功したことで、動物実験による装置の性能評価が簡便かつ迅速に行えるようになった。また、その実験系を用いて人工肝臓としての性能について検討を行ったところ、 *in vitro* 実験で得られた結果と同様 *ex vivo* においても、その有効性を十分に示すことができた。これらの結果より、本人工肝臓装置の臨床への応用の可能性が確認された。

第6章　結論

6.1 本論文のまとめ

近年、重篤な臓器疾患に対する医療工学的視点から、メカニカルな人工臓器の開発が盛んに行われている。一方、医薬品などの生理活性有用物質の生産において、動物細胞の大量培養技術の開発とその応用が盛んになってきている。したがって、動物細胞そのものを生体触媒とみなし、これら二つの分野を組み合わせたハイブリッド型の人工臓器の開発は、生物化学工学の分野において今後大きく発展するものと考えられる。特に生体の化学工場に例えられる肝臓は、それが担っている機能の多様さ、複雑さから最も重要であり、また人工臓器としての開発が困難である。そこで本論文では、ハイブリッド型人工肝臓の開発を試み、その臨床への応用の可能性を検討した。以下に本研究で得られた結果を示す。

第1章では、本研究の背景について述べ、本研究の目的を明らかにした。また、第2章では既往の研究について述べ、研究上の問題点、解決すべき点を明らかにした。

第3章では、壁付着性動物細胞の大量高密度培養を達成するために、多孔質材であるPUFを細胞の培養担体として使用すると、その孔内において表面が平滑化した球状細胞集塊であるスフェロイドが形成されることを見い出した。このスフェロイドは、各種動物細胞機能を *in vitro* において、高レベルで長期間安定であった。また、このスフェロイド形成は、培地に加えるべき各種ホルモンなどに対する依存性も少なかった。以上より、このスフェロイドは *in vitro* において細胞の組織化が生じ、形成されたものと考えられる。特に初代肝細胞では、これまで *in vitro* おける機能発現とその維持が極めて困難であったにもかかわらず、本研究での肝細胞／スフェロイドは *in vitro* においても生体肝と同レベルもしくはより以上の高機能性を発現し、それが3週間以上もの長い間安定していた。

第4章では、培養装置の開発の際に問題となる培地流動の影響について検討し、培養装置の最適設計について考察した。まず平板PUF平行充填型培養装置の開発により、スフェロイドの構造やその高機能発現を維持することが可能となった。またMC-PUF型培養装置の開発により、培地流動下においても肝細胞／スフェロイドが形成できることが明らかとなった。本研究により、培養担体であるPUFの高充填率化が実現され、さらに遠心法による播種方法を開発したことにより、これまでにない高密度の細胞培養が達成できた。これら *in vitro* 実験の結果を基に試算すると、高々数リッ

トルの装置でヒトへの臨床使用が可能であという有望な知見が得られた。また、この装置はスケールアップが容易であり、今後多方面にわたって応用が可能であろう。

第5章では、小型の実験動物であるラットに適用可能な小型の体外循環ラインを開発した。正常ラットに対しこのラインを適用したところ平均生存時間8.3時間，最大で15.5時間の連続循環が可能であった。そこで第4章で開発した人工肝臓装置（MC-PUF）の性能評価を行った。装置の性能を十分に発揮させ、人工肝補助システムとして確立するためには、肝不全血液と装置側を循環する血漿との直接接触を防ぎ、良好な物質交換を促進する血液灌流型循環ラインの開発が必要であることを強調した。また、この知見を基にバイパスライン付加型の体外循環ラインを開発し、対照群と比較して十分効果があることを示した。これにより、様々な生体反応が相互作用を及ぼしあう動物体を用いた *ex vivo* 実験においても、本人工肝臓装置の有効性が十分に示され、臨床への応用の可能性が期待される。

以上をまとめると、下図に示したように、3つの大きな問題点が本研究により解決された。これにより、臨床への応用が可能となるハイブリッド型人工肝補助システムが開発された。

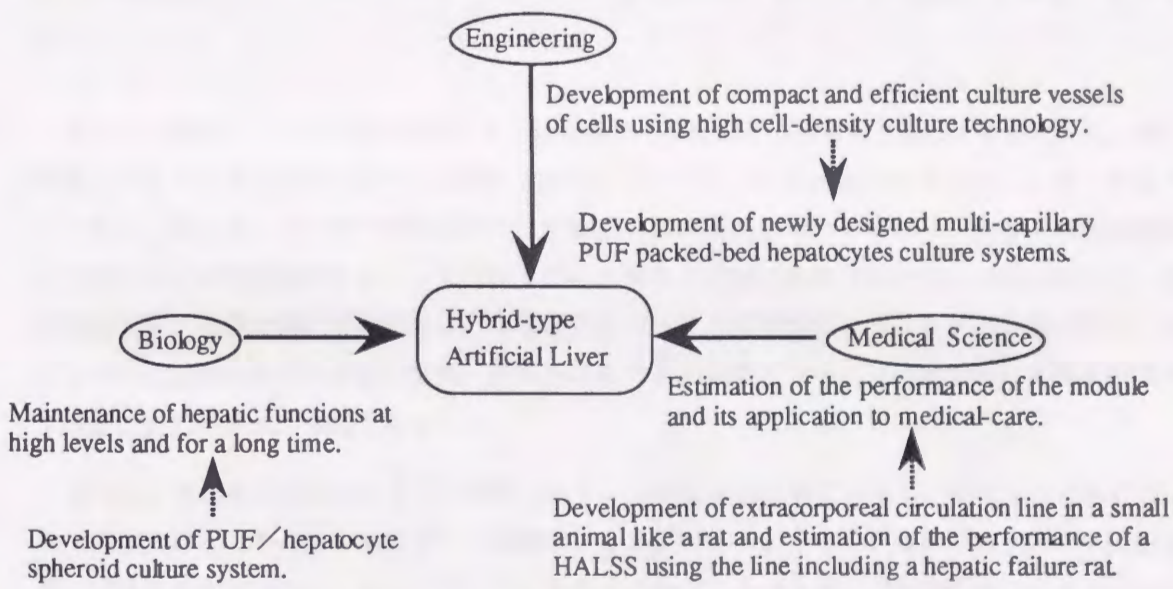


Fig. 6-1 Development of HALSS (hybrid artificial liver support system) by collaboration with researches in many fields.

本研究では小動物であるラットを使用しており、さらにイヌやブタなどの大動物を用いた検討を行う必要があるが、ヒトへの臨床使用が可能なハイブリッド型人工肝補助システムが開発されたものと考えられる。

6.2 今後の展望

本研究により、人工肝臓開発についてはもちろんのこと、その他の研究分野に影響を与え得る有益な知見が多数得られた。そこで、これらの点を踏まえ、今後の展望を以下にまとめる。

第3章で形成が確認されたスフェロイドは、生体外における細胞の組織化により形成されたものであると考えられる。そこで、この形成機構および形成誘導因子の究明により、動物細胞の三次元培養のための各種培養条件の確立ができると期待される。さらに、発生学の分野に対しても重要な知見を与え得るものとも期待できる。

第4章で開発した細胞培養装置は、生理活性有用物質生産のための様々な動物細胞の培養にも応用できる。初代細胞や株化細胞の中でも、培養担体への付着力や剪断応力に対する耐性などにおいてその応答は様々である。そこで、培養細胞の特性データの採取を行うとともに、装置開発のために計算機シミュレーションを用いた培養装置の最適設計への指針を作る必要が生ずるであろう。またこれら各種細胞特性データを得ることによって臓器ごとの細胞の特徴が明らかとなり、各臓器（特に肝臓）の生体内における配置や、その構造の必然性を解明する手掛かりとなるであろう。さらに、その応用として究極のバイオリアクター（生体臓器に匹敵する人工臓器）が開発されるであろう。

第5章で開発したラット体外循環ラインは今後様々な分野で応用可能であると考えられる。特に、医薬品開発や各種薬物の代謝などに関する研究において大いにその有効性を示すことができると考えられる。例えば、これまで各種薬物の血中濃度の経時変化を求める際には、数多くの実験動物に同じ条件でその薬物を投与し、1点を得るのに1個体を用いる必要があった。これに対して、本体外循環ラインを間欠的に使用すれば、1個体からの一連の経時的サンプリングが容易に行え、結果として必要実験動物数の大幅な削減，結果のばらつきの減少，さらには各種検討に必要な所要時間や経費，労力の軽減が期待される。

最後に、本研究で開発した人工肝補助システムを劇症肝炎患者に適用し、救命するためには、工学や医学分野などからなる研究チームを結成する必要がある。そして、臨床用の大型の人工肝臓装置の開発を行うとともに、ヒトと同スケールのイヌやブタなどを用いた動物実験により、その有効性を示す必要がある（Fig.6-2）。その有効性とは、生体肝移植までの ”橋渡し” としての使用はもちろんのこと、肝再生を誘導でき、患者の救命に貢献する（Fig.6-3）ことである。さらに将来的な目標として、半永久的に使用可能な人工肝臓への発展の可能性についても検討していく必要がある。

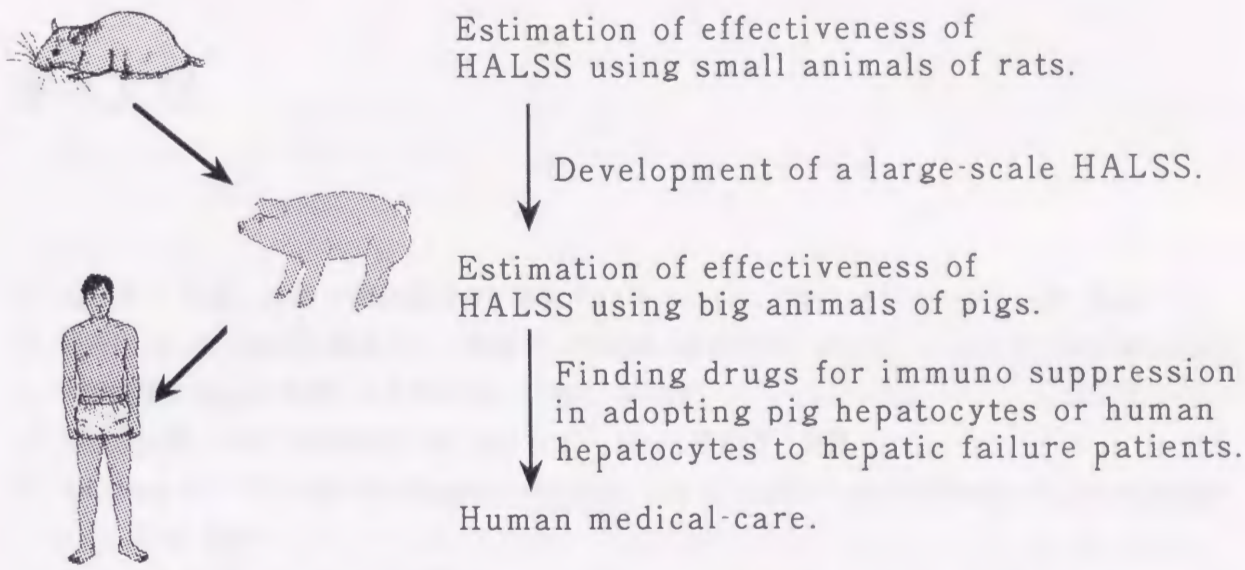


Fig. 6-2 Steps in development of HALSS (hybrid artificial liver support system) for human medical-care.

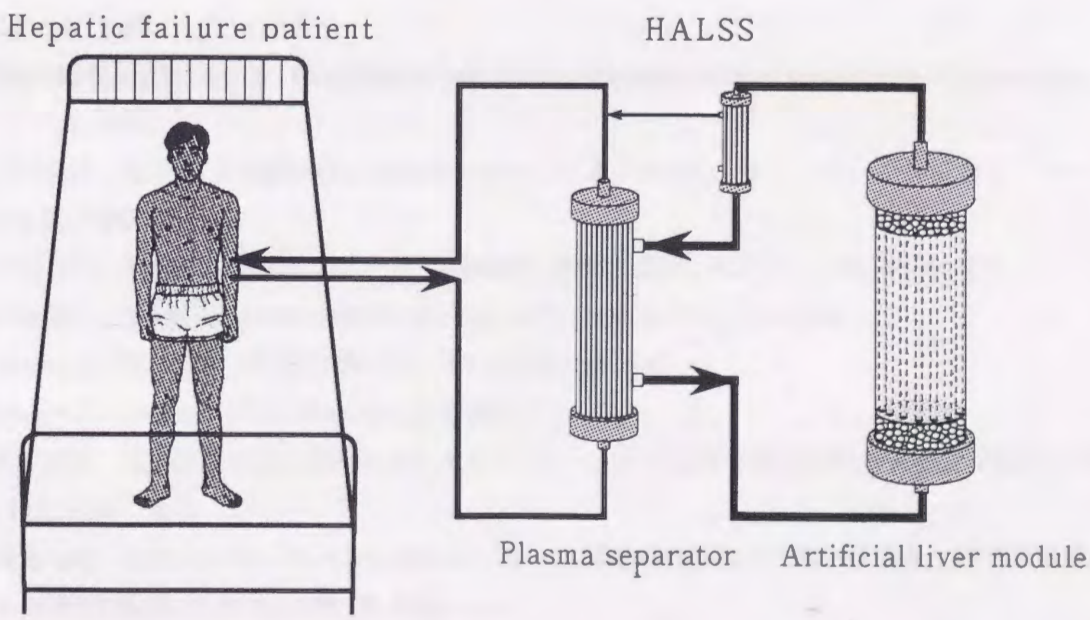


Fig. 6-3 Actual application of HALSS (hybrid artificial liver support system) to hepatic failure patients.

参考文献

1) 山村雄一 監修：肝臓 —図説臨床内科講座 第18巻 —，p.9，1986，メジカルビュー社，東京

2) 内野純一，松下道明，松江弘一，高橋学，西川眞，小池雅彦，田口宏一：ハイブリッド型人工肝補助装置の現況と課題，人工臓器 22：1145-1149, 1993

3) 金子丑之助：日本人体解剖学 第二巻，p.107，1986，南山堂，東京

4) van Wezel A.L. : Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogenous culture. Nature 216 : 64-65, 1967

5) Knazek R.A., Gullino P.M., Kohler P.O., and Dedrick R.L. : Cell culture on artificial capillaries : An approach to tissue growth in vitro. Science 178 : 65-67, 1972

6) Keat L. : Physiology of immobilized cells. Proc. International Sympo. p.249, 1989, Wageningen

7) Tharakan J.P. and Chau P.C. : A radial flow hollow fiber bioreactor for the large-scale culture of mammalian cells. Biotechnol. and Bioeng. 28 : 329-342, 1986

8) 飯島信司：動物細胞培養の新領域，化学工学，55：107-110, 1991

9) 満田伸二郎，真野隆，川原弘之：固定化細胞培養方および膜型バイオリアクター，組織培養，18：243-248, 1992

10) Griffiths B. and Looby D. : Fixed immobilized beds for the cultuvation of animal cells. Biotechnology. 17 : 165-190, 1990

11) カタログ．動物細胞培養担体，Cellsnow TM-Text & Manual，キリンビール株式会社．エンジニアリング事業部

12) カタログ．旭化成の新素材ニュース，旭化成工業株式会社．セルロース新事業開発室

13) Dean R.C. : Large scale cell culture technology. BK Lydersen, 1987, New York

14) Voumakis J.N. : VELAX TECHNICAL BULLETIN, Jan 1990

15) Tung A.S. : Diopharm Manufacturing, Feb 1988

16) 福田秀樹：固定化微生物／細胞とバイオリアクター，化学工学会第23回秋季大会要旨集第4分冊，p.126, 1990，金沢

17) 飯島信司：発泡セルロース系多孔性担体を用いた動物細胞の固定化高密度培養，化学工学第55回年会講演要旨集，p 395, 1990，名古屋

18) Looby D. : Physiology of Immobilized Cells. Proc. International Sympo. p.255, 1989, Wageningen

19) Kiley, J.E., Welch H.F., Pender J.C., and Welch C.S. : Removal of blood ammonia by hemodialysis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91 : 489-490, 1956

20) Opolon, P., Rapin J.R., Huguet C., Granger A., Delorme M.L., Boschat M., and Sausse A. : Hepatic failure coma treated by polyacrylonitrile membrane hemodialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 22 : 701-710, 1976

21) Brunner G, Tegtmeir F : Enzymatic detoxification using lipophilic hollow-fiber membranes (I) Glucuronidation reaction. Artif. Organs. 8 : 161-166, 1984

22) Yatzidis H : A convenient hemoperfusion microapparatus over charcol for the treatment endogenous and exogenous intoxication. Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc. 1 : 83, 1964

23) Kawanishi H., Tsuchiya T., and Hirabayashi A. : Temporary liver support using a new type of sorbent ; A urethane sheet embedded with powdered charcoal. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 34 : 250-254, 1988

24) Sakagami K., Miyazaki M., Matsuoka J., Shiozaki S., Saito S., Orita K. : Artificial liver support for postoperative hepatic failure with anion exchange resin (BR-601). Acta. Med. Okayama 40 : 249-255, 1986

25) Pineda A.A., and Taswell H.F. : Selective plasma component removal : Alternatives to plasma exchange. Artif. Organs 5 : 234-240, 1981

26) Yoshiba M., Yamada H., Yoshikawa Y., Fujiwara K., Toda G., Oka H., Sanjo T., Yamazaki Z., Idezuki Y., Inoue N., and Sakai Y. : Hemodiafiltration treatment of deep hepatic coma by protein passing membrane : Case report. Artif Organs. 10 : 417-421, 1986

27) 川村明夫：肝性昏睡も血液浄化で覚醒，Clinical Engineering 3 : 170-177, 1992

28) 小玉正智，岡藤太郎，谷徹，中根佳宏：人工肝臓の開発と臨床応用の現況，診断と治療 73 : 1975-1978, 1985

29) 葛西眞一：人工肝臓と移植，人工臓器 18 : 1474-1480, 1989

30) 小玉正智，岡藤太郎，谷徹，花沢一芳：血液浄化法としての人工肝装置の進歩，日本臨床 43 : 2605-2610, 1985

31) 森岡恭彦，河野信博，長尾桓，大盛芳路，吉見富洋：血液浄化を目的とする人工肝の限界，日本臨床 43 : 2611-2616, 1985

32) 浮草実，森本泰介，嶌原康行，山岡義生，小澤和恵：ベッドサイド用肝機能補助装置の試作研究，病態生理，6 : 45-51, 1987

33) 葛西眞一，沢雅之，水戸廸郎：ハイブリッド型人工肝臓，人工臓器，19 : 1545-1551, 1990

34) Sorrentino F. : Premericorche per la realizzation di un fegatto artificiale. Chir. Patol. Sper. 4 : 1401, 1956

35) 杉江三郎，杉浦光雄，坂本啓介，堀原一，三浦健：生物学的人工肝臓の試作と実験（予報），日消会誌，54 : 504, 1957

36) Hems R., Ross B.D., Berry M.N., and Krebs H.A. : Gluconeogenesis in the perfused rat liver. Biochem. J. 101 : 284-292, 1966

37) Mikami J. : Surgical treatment of acute liver failure. II. An experimental study of extracorporeal metabolism in the artificial liver using slices of canine liver. Jpn. J. Gastroenterol. 56 : 1022, 1959

38) Soyer T., Lempian M., Walker J.E., Supanwanid P., and Eiseman B. : Extracorporeal assist of anhepatic animals with liver slice perfusion. Am. J Surg. 126 : 20-24, 1973

39) Koshino I. : A biological extracorporeal metabolic device for hepatic assist. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 21 : 492-500, 1975

40) Kimura K. : Hemoperfusion over small liver pieces for liver support. in Brunner G., Schmidt F.W. (eds.), Artificial Liver Support. p.254, 1980, Springer Verlag Berlin

41) Lie T.S., Jung V., Kachel F., Hohnke Ch., and Lee K.S. : Successfull treatment of hepatic coma by a new artificial liver device in the pig. Res. Exp. Med. 185 : 483-494, 1985

42) Eiseman B., Norton L., and Kralios N.C. : Hepatocyte perfusion within a centifuge. Surg. Gynecol Obsted. 142 : 21-28, 1976

43) Matsumura K.N. : Artificial Liver. p.6, 1976 Alin Foundation Press California

44) Ozawa K., Kaniyama Y., Kimura K., Ukikusa M., Kono Y., Yamato T., Shimahara Y., Nakatani T., Asano M., Irie R., Kawashima S., Uchida K., Ohtoshi M., Aoyama H., Hirai F., Yasuda K., and Tobe T. : Clinical experience of postoperative hepatic failure treatment with pig or baboon liver cross-hemodialysis with an interposed membrane. Artif Organs. 6 : 433-446 1982

45) Berry MN, Friend DS : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. J Cell Biol. 43 : 506-520, 1969

46) Olumide F., Eliashiv A., Kralios N., Norton L., and Eiseman B. : Hepatic support with hepatocyte suspensions in a permeable membrane dialyzer. Surgery 82 : 599-606 1977

47) 高橋郁夫：分離肝細胞による肝補助システム，人工臓器，10 : 537, 1981

48) 葛西眞一，柿坂明俊，水戸廸お，寺田良蔵，鈴木慈郎，丹沢宏：Hybrid Artificial Liver の研究 ―ガラクトサミン肝不全犬による代謝補助システムの機能と安全性の検討―，人工臓器，16 : 912-915, 1987

49) Matsumura K.M., Guevara G.R., Huston H., Hamilton W.L., Rikimaru M., Yamasaki G., and Matsumura M.S. : Hybrid bioartificial liver in hepatic failure : Preliminary clinical report. Surgery 101 : 99-103 1987

50) Shumakov V.I., Koroukhov N. Ju., Pisarevskyi A.A., Onyshenko N.A. : Liver assist device in a complex intensive treatment of acute liver impairment. Artif. Organs 14 (Suppl 2) : 248, 1990

51) Uchino J., Tsuburaya T. Kumagai F., Hase T., Hamada J., Komai T., Funatsu A., Hashimura E., Nakamura K., and Kon T. : A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers. Trans Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 34 : 972-977, 1988

52) Dunn J.C.Y., Yarmush M.L., Koebe H.G. and Tompkins R.G. : Hepatocyte function and extracellular matrix geometry : Long-term culture in a sandwitch configuration. FASEB 3 : 174-177 1989

53) Lim F, San AM. : Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science 210 : 908-910, 1980

54) Miura Y., Akimoto T., Kanazawa H., Yagi K. : Synthesis and secretion of protein by hepatocytes entrapped within calcium alginate. Artif. Organs 10 : 460-465 1986

55) Miura Y., Akimoto T., Fuke Y., Yamazaki S., and Yagi K. : *In vitro* maintenance of terminal-differentiated state in hepatocytes entrapped within calcium alginate. Artif. Organs 11 : 361-365 1987

56) Yanagi K., Ookawa K,. Mizuno S., and Ooshima N. : Performance of a new hybrid artificial liver support system using hepatocytes entrapped within a hydrogel. Trans Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 35 : 570-572 1989

57) Chang TMS : Multifacet approach of artificial liver support : Hemoperfusion, prostaglandin E_2, and micro encapsulated hepatocytes. Artif. Organs 13 (Abstr) : p. 291, 1989

58) Bruni S., Chang T.M.S. : Hepatocytes immobilized by microencapsulation in artificial cells : Effects of hyperbilirubinemia in Gunn rats. Biomat Art. Cells Art. Ograns 17 : 403-411 1989

59) Cai Z., Shi Z., O'Shea G.M., and Sun A.M. : Microencapsulated hepatocytes for bioartificial liver support. Artif. Organs 12 : 388-393 1988

60) Kleinman H.K., Klebe R.J., and Martin G.R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J. Cell Biol. 88 : 473-485 1981

61) Rojkind M., Gatmaitan Z., Mackensen S., Giambrone M.A., Ponce P., and Reid L.M. : Connective tissue biomatrix : Its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. J. Cell Biol. 87 : 255-263 1980

62) Lee J., Morgan J.R., Tompkins R.G. and Yarmush M.L. : The importance of proline on long-term hepatocyte function in a collagen gel sandwich configuration : Regulation of protein secretion. Biotechnology and Bioengineering. 40 : 298-305 1992

63) Parsons-Wingerter P.A. and Saltzman W.M. : Growth *versus* function in the three-dimensional culture of single and aggregated hepatocytes within collagen gel. Biotechnol. Prog. 9 : 600-607 1993

64) Arnaout W.S., Moscioni A.D., Barbour R.L., and Demetriou AA, et al. : Development of bioartificial liver : Bilirubin Conjugation in Gunn rats. J Surg. Res. 48 : 379-382 1990

65) 永木正仁，加納隆，山田鉄也，杉原潤一，加登通正，大西弘生，森脇久隆，冨田栄一，武藤泰敏：D-galactosamine投与急性肝不全ラットの生存時間に及ぼすマイクロキャリア接着肝細胞移植の効果，肝臓，30 : 379-380, 1989

66) 赤池敏宏，小林明，戸辺成四郎，新栄田篤：ハイブリッド型人工肝臓用合成基質の開発 — 肝実質細胞の伸展抑制型接着基質の意義，人工臓器，17 : 227-230, 1988

67) 戸辺成四郎，武井由香，赤池敏宏，竹下和良，小玉正智：PVLAコートホローファイバーモジュール内での肝細胞多層集合体の形成と体外循環型ハイブリッド人工肝臓への応用，人工臓器，21 : 1045-1049, 1992

68) Koide N., Sakaguchi K.,Koide Y., Asano K., Kowaguchi M., Matsushima H., Takenami T., Shinji T., Mori M., and Tsuji T. : Formation of multicellular sphroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. Exp. Cell Res. 186 : 227-235 1990

69) 高畠弘行，小出典男，佐々木俊介，松島寛，武南達郎，小野良策，坂口孝作，船津和守，辻孝夫：肝細胞spheroidを用いる人工肝モジュール作製の試み，人工臓器，20 : 139-144, 1991

70) Scott L.N., Shatford R.A., Peshwa M.V., White J.G., Cerra F.B., and Hu W.S. : Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor : A potential bioartificial liver. Biotechnology and Bioengineering. 41 : 194-203 1993

71) Saito S., Sakagami K., and Orita K. : A new hybrid artificial liver using a combination of hepatocytes and biomatrix. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Ograns 33 : 459-462 1987

72) Denti E., Freston J.W., Marchisio M., and Kolff W.J. : Toward a bioartificial drug metabolizing system : Gel immobilized liver cell microsomes. Trans Am. Soc. Artif. Intern. Ograns. 22 : 693-700 1976

73) Brunner G : Advances in the development of immobilized enzymes for future extracorporeal liver support. in Brunner G., Schmidt F.W. (eds.) , Artificial Liver Support. p.230, 1980, Springer Verlag Berlin

74) Brunner G. : An apparatus for the removal of lipophilic and hydrophilic toxins from blood of patients in fulminant hepatic failure. 2nd International Symposium on Artificial Liver Support, Abstr, 6, 1990

75) Moscona A. : Rotation mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. Exp. Cell Res. 22 : 455-475 1961

76) Takaoka T., Katsuta H., and Akatsuka T. : carcinogesis in tissue culture 24 : Tumorigenicity and aggregate-forming capacity of mammalian cells in culture. Jpn. J Exp. Med. 45 : 299-312 1975

77) 高橋直躬：ラット肝実質細胞の分離と長期培養，組織培養，12 : 308-312, 1986

78) Hata R., and Senoo H. : Extracellular matrix system regulates all growth, tissue formation, and cellular functions. Tiss. Cult. Res. Commun. 11 : 337-343 1992

79) Koide N., Shinji T., Tanabe T., Asano K., Kawaguchi M., Sakaguchi K., Koide Y., Mori M., and Tsuji T. : Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. Biophys. Res. Comm. 161 : 385-391 1989

80) Landry J., Bernier D., Ouellet C., Goyette R., and Marceau N. : Spheroidal aggregate culture of rat liver cells : Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. J. Cell Biol. 101 : 914-923 1985

81) Tong J.Z., Bernard O., and Alvarez F. : Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. Exp. Cell Res. 189 : 87-92 1990

82) 井嶋博之，川久保康彦，松下琢，船津和守：ポリウレタンフォームを用いた壁付着性動物細胞の三次元培養，化学工学シンポジウムシリーズ，25 : 180-184, 1991，化学工学会，東京

83) Matsushita T, Ijima H, Koide N and Funatsu K : High albumin production by multicellular sphroid of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 324-326 1991

84) 竹澤俊明，森有一，吉里勝利：温度感受性ポリマーを用いたヒト真皮由来繊維芽細胞のスフェロイド形成法，応用細胞生物学研究，9 : 1-11, 1991

85) Sussman N.L., Gislason G.T., Conlin C.A., and Kelly J.H. : The hepatix extracorporeal liver assist device; Initial clinical experience. Artificial Organs, 18 : 390-396 (1994)

86) Rozga J., Podesta L., LePage E., Hoffman A., Morsiani E., Sher L., Woolf G.M., Makowka L., and Demetriou A.A. : Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fluminant hepatic failure. Lancet, 342 : 898-899, 1993

87) Yanagi K., Miyoshi H., Fukuda H., and Ooshima N. : A packed-bed reactor utilizing porous resin enables high density culture of hepatocytes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 316-320 1992

88) Kuroda Y. : Development and contributions of tissue culture studies in Japan. Tiss. Cult. Res. Commun. 11 : 287-303 1992

89) Ploug J., and Kjeldgaard N.O. : Urokinase - an activator of plasminogen from human urine -. Biochim. Biophys. Acta., 24 : p. 278-289, 1957

90) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chemistry, 193 : 265-273, 1951

91) Seglen P.O. : Preparation of isolated rat liver cells., in Prescott D.M. (ed.), Methods Cell Biol. 13 : 29-83 , 1976Academic Press, New York,

92) 中村敏一：初代培養肝細胞実験法，p.8 , 1987，学会出版センター，東京

93) Enat R., Jefferson D.M., Ruiz-Opazo N., Gatmaitan Z., Leinwand L.A., and Reid L.M. : Hepatocyte proliferation *in vitro* : Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1411-1415 , 1984

94) 酒井康之，鈴木基之：浮遊培養により迅速形成させた肝細胞スフェロイドの実用条件下での安定固定化と機能発現，人工臓器，22 : 164-170, 1993

95) Mavituna F. : Activity of immobilised cell particles. in Webb C., Black G.M. and Atkinson B. (eds.) , Process Engineering Aspects of immobilised cell systems, p.145, 1986, Pergamon Press Ltd. Heddington Hill Hall Oxford OX3 OBW, England

96) Rotem A., Toner M., Tompkins R.G., and Yarmush M.L. : Oxygen uptake rates in cultured rat hepatocytes. Biotechnol. and Bioeng. 40 : 1286-1291, 1992

97) Geigy Scientific Tables Vol.3 p.90 , ed. by Lentner C., Published by Chiba-Geigy , Basle , Switzerland

98) Geigy Scientific Tables Vol.3 p.91 , ed. by Lentner C., Published by Chiba-Geigy , Basle , Switzerland

99) NHK取材班：驚異の小宇宙・人体４；壮大な化学工場［肝臓］. : p. 16-17, 1989, 日本放送出版協会，東京

Appendix　用語解説

足場依存性

多くの細胞は培養容器の表面に接着して分裂増殖することはできるが、物理的な方法で浮遊状態に保つと増殖できない。この現象を足場依存性という。同様の現象を基質依存性，表面依存性ともいう。*(組織)*

アンモニア

アミノ酸代謝の結果、生体にとって毒性のアンモニアが産生されるが、この除去の仕方は動物種によって異なる。哺乳動物では主として尿素回路によって尿素として排泄されるか、グルタミン酸脱水素酵素によって α-ケトグルタール酸と結合して、グルタミン酸となり再利用される。*(医)*

in vitro

もともとガラス器内（試験管内）の意味である。生物個体のなかで営まれている機能や反応を個体外に取り出して行わせること。たとえば、酵素反応を行わせることはこれに相当する。*(医)*

in vivo

生物個体の中で生体物質が機能している状態をいう。生体物質を生体外に取り出したときの状態である *in vitro* と対比される。*(医)*

黄疸

血液中にビリルビンが増加した状態である。諸種の分類法があり、溶血性，肝細胞性および閉塞性に大別する分類が最も広く用いられ、臨床的にも使用しやすい。このほか、肝前性，肝性および肝後性との分類法もある。溶血性黄疸では間接ビリルビン，閉塞性黄疸では直接ビリルビン，肝細胞性黄疸では両者が増加するので、血中ビリルビンを直接型と関節型とに分けて測定することにより黄疸の種類をある程度鑑別できる。*(医)*

肝性昏睡

重篤な肝障害により起こる昏睡であるが、一般的には精神神経症状を伴った肝疾患で、進展すれば昏睡なることを想定される場合も含まれ、肝性脳症と同義語として用いられている。*(医)*

肝性脳症

肝性脳症は肝疾患に伴う精神神経症状で、昏睡になる場合には肝性昏睡といわれる。急性型と慢性型に区別される。急性型は急激かつ広範な肝細胞の脱落によるもので、劇症肝炎が典型的である慢性型は肝内外の血管型の短絡によるものである。種々の程度の意識障害，性格変化，知能低下，神経症状などが主症状である。診断は肝障害，血中アンモニア値，脳波所見などによる。治療は、急性型では血漿交換，交換輸血が必要であり、慢性型では高アンモニア血症の軽減，分枝鎖アミノ酸を主とする特種アミノ酸輸液などが有効である。*(医)*

劇症肝炎

急性肝炎の経過中に意識障害をはじめとする急性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いう（死亡率80～90％）。（医）

血液凝固

血液は血管外に出ると、ゲル状となって流動性を失う。血漿中の可溶性タンパク質フィブリノーゲンが不溶性のフィブリンに転化し、これが網状となって血球成分を取り込むからである。この現象を血液凝固という。15種の凝固因子が関与した複雑な反応である。（医）

血漿

血液中から血球を除いた淡黄色の液状部分を血漿という。血漿中には多種類のタンパク質が含まれている。血漿の生物学的作用としては、培養された組織の構築や細胞の器壁への接着促進および栄養源の補給，培養細胞の培養への接着促進，継代培養に伴う細胞分散による障害からの保護，培養液交換時の培養環境の急激な変化を軽減させること，培養液の順化（conditioning）効果などがあげられる。（組織）

血清

血液から血球といくつかの血液凝固因子（フィブリノーゲン（Ⅰ因子），プロトロンビン（Ⅱ因子），Ⅴ因子，Ⅷ因子など）を取り除いたものである。乾燥注射器で採取した血液を容器に放置すると血液は凝固し、やがて血餅の上にたまる淡黄色の液として得られる。血清に最も多く含まれるのはタンパク質で、正常成人では約７％を占める。培養に用いられる血清は、ヒト，ニワトリ，ウサギ，ウマ，ウシなどの血清があるが、一般的には、ウシ血清を指すことが多い。ウシ血清は、ウシ自身の年齢により分類されている。血清は、凍結保存し、必要に応じて、合成培養液に５～20％の割合で添加して使用する。血清の細胞に対する役割は、細胞の培養容器面への接着性と細胞膜の透過性を高め、細胞の物理的安定性を増し、細胞への栄養，ホルモンの供給，老廃物の除去など多くの作用があるといわれている。（組織）

血清アルブミン

血清タンパクの55～60％を占める（3.5～4.5 g／dl）。肝で合成される。分子量66000の単純タンパク質。カルシウムイオン，脂肪酸，ビリルミン，トリプトファン，薬物など様々なものを結合，運搬。血液膠質浸透圧を維持し、組織と血液間の水，栄養素，代謝産物の移動に重要。栄養失調，消化不良，体タンパク質喪失，肝不全などで最も減少著しいタンパク質で、それが浮腫の原因となる。等電点4.7で、血清タンパク質の弱アルカリ性での電気泳動で陽極側への移動が最大。（医）

血栓

個体の生存中に血管内で血液が凝固したもの、血栓は血小板，フィブリン，赤血球および白血球からなる。血小板のみからなるものを血小板血栓，フィブリンのみからなるものをフィブリン血栓，赤血球が主体の血栓を赤色血栓，白血球およびフィブリンが主体となるものと白色血栓，白・赤色の部が縞状に混じっているものを混合血栓という。（医）

コンフルエント（集密的）

細胞が利用することのできる培養容器表面上に付着して目詰まり状態に増殖した状態をいう。（組織）

細胞株（cell strain）

従来は生体から体外培養系に移した細胞が、無限増殖性を獲得して安定に維持，継代できるようになった細胞系（cell line）を細胞株といい、このような過程を経て細胞株を得ることを株の樹立といったが、現在では生体から分離して体外培養に移した初代培養細胞、またはその後継代を重ねた継代培養細胞のいずれから由来するかを問わず、これらの細胞系から、クローニングまたは特殊な選択培養液による選抜によって、特異な性質または遺伝的マーカーを持つようになった細胞を細胞株（単に株ともいう）という。*（組織）*

腫瘍細胞

正常細胞が遺伝子レベルの変化によって安定した形質として異常増殖能を獲得したものである。*（生化）*

樹立細胞系

一般に培養内で継代する、または動物に移植継代する細胞が、集団として見掛け上限りなく安定に増殖し続け、その特性がほぼ安定に保たれる状態に達しているとき、その細胞系統をいう。このような細胞系の特性は、多くの場合正常の組織や器官を構成している細胞が保有する特性と異なっており、多くの場合培養内で自然に、あるいは化学物質やウィルスの影響下で細胞が変化した結果、獲得した特性であって、癌細胞に見られる特性と類似点を持つ。*（生化）*

組織形成（histogenesis）

組織分化（histodifferentiation）ともいう。多細胞生物の未分化な細胞群が分化して、特定の形態的・機能的な特徴を持った組織となること、またはその過程。組織形成にはその組織を構成する個々の細胞の分化や細胞相互作用などが関与することが多い。その機構の研究は発生学上の中心的な課題であるが、独立した個体の発生の過程では多種類の組織が同時進行的に形成されるので、その解析は困難である。*（組織）*

胆汁酸

胆汁の主成分で、5β-コラン-24-酸を母核に、1～3個のOH基が結合した構造をもつ。胆汁酸の生合成は、腸肝循環により肝を通過する胆汁酸量により調節され、律速酵素はコレステロール7α-ヒドロキシラーゼで、胆汁酸によりフィードバック阻害を受ける。胆汁酸には脂肪の吸収促進作用，利胆作用などがある。*（医）*

培地

培養液，培養基ともいう。組織や細胞がその生理条件を良好に保持し、正常な機能を営むために使用される培養液をいう。培養液は細胞の生育のために必要な糖，アミノ酸やビタミンなどの栄養物や、細胞や組織が液中で浸透圧、その他物理的に安定な状態に保持されるための無機塩などの物質からなる。動物細胞培養においては、ホルモンや血清を添加して用いる。

培養基質

培養細胞を支持する構造物質。細胞が付着するためのガラス面やプラスチック面，コラーゲンやスポンジの構造物，細胞を浮遊状態に保つための寒天などが用いられる。*（組織）*

播種

細胞を継代するときなど、培養容器の培地中に細胞を植え込むこと。接種と同義語としても用いられるが、接種は動物体内に細胞を植え込む場合にも用いるので、特に培養系であることを意識した言葉である。*（組織）*

ビリルビン

胆汁色素の主成分で、主にヘムがヘムオキシゲナーゼなどにより酸化的に開環されビリベルジンとなり、さらに還元されて生成する。ヒト胆汁中では、α位のメチン基が開裂した異性体IXαが約９６％を示す。肝臓でグルクロニルトランスフェラーゼ作用により１分子あたり１，あるいは２分子のグルクロン酸が側鎖のプロピオン酸基とエステルをつくる。（医）

プロトロンビン時間

外因系凝固動態を総合的に検査する測定方法。被検血漿に組織トロンボプラスチンと塩化カルシウムを加えてフィブリンの析出するまでの時間を測定する。外因系凝固に関与する第VII，X，V，II 因子、およびフィブリノーゲン（80 mg／dl 以下）の量もしくは質的異常と、その反応系に関与する後天性循環抗凝血素に感受性を持つ（医）

ヘパリン化（heparinization）

ヘパリンは抗凝固剤であり、1 mg で 100 ml の血液の凝固を阻止しうる。体外循環を行う際、血液は接触因子の活性化により凝固しやすするなる。この凝固を防ぐ目的でハパリンの凝固阻止量を加える。これをヘパリン化とよぶ。広義には試験管内の血液凝固の阻止のためにヘパリンを加えることもヘパリン化ということがある。（医）

輸液

水分，電解質，栄養素などを頸静脈的に投与する方法。外科手術時における水分，電解質の投与は維持輸液であり、脱水，電解質異常の治療としてこれを補う場合は欠乏輸液である。一般的輸液として、ブドウ糖液，キシリトール液，電解質液，乳酸加リンゲル液，アミノ酸液が用いられる。（医）

参考文献

・（組織）

組織培養辞典：日本組織培養学会，日本植物組織培養学会 共編，学会出版センター，東京，1993

・（生化）

生化学辞典（第２版）：今堀和友，山川民夫 監修，東京化学同人，東京，1990

・（医）

最新 医学大辞典：後藤 稠（代表編者），医歯薬出版，東京，1987

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なご指導，ご鞭撻を賜わり、さらに、高い次元と広い視野に立ったものの考え方についてご教示くださいました九州大学工学部化学機械工学科 船津和守 教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、種々の有益なご助言を賜わりました九州大学工学部化学機械工学科 荒井康彦 教授，合成化学科 高木 誠 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始有益かつ的確なご指導，ご助言をいただきました九州大学工学部化学機械工学科 松下 琢 助手には心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり、ラット肝細胞の調整方法をはじめ、終始有益なご助言をいただきました岡山大学医学部第一内科 小出典男 講師に感謝いたします。また、ラットの体外循環実験を行うにあたり、その手術方法などについてご教示くださいました岡山大学医学部第一外科 浜崎啓介 講師に感謝いたします。

人工肝臓装置の開発に関して甚大な貢献をしていただいた谷口佳孝氏（現、電気化学工業（株））および松本耕一氏（現、帝人医薬（株））に感謝します。血漿を用いた検討を行っていただいた岩橋努氏（現、アサヒビール（株））に感謝します。肝細胞の播種方法の開発に協力していただいた馬場俊博氏（現、麻生セメント（株））および境剛太氏（現、コスモ石油（株））に感謝します。体外循環ライン開発に協力していただいた和田茂久氏（本学大学院修士課程）および多賀将志氏に感謝します。

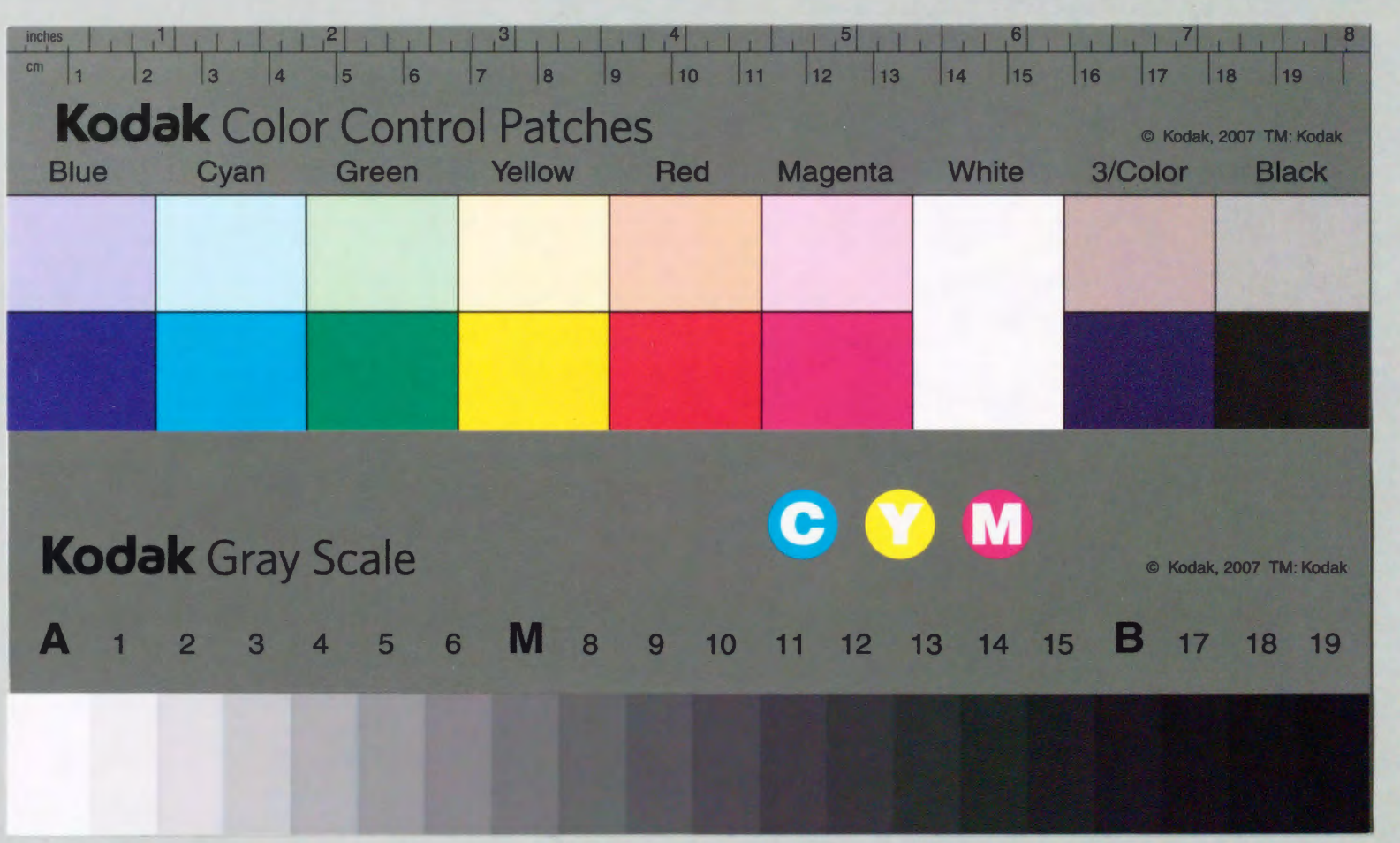
本研究グループとして協力していただいた川久保康彦氏（現、住友製薬（株））をはじめ、中澤浩二氏（本学大学院博士後期課程），川原富貴氏（本学大学院修士課程），高宮和宏氏（本学４年）および金子充氏（本学４年）に感謝します。

本論文をまとめるにあたり、多大な協力をしていただいた榊一任氏（本学大学院博士後期課程）および田上秀一氏（本学大学院博士後期課程）に深く感謝いたします。

研究者としての姿勢についてご教示くださいました九州大学工学部化学機械工学科 梶原稔尚 助教授をはじめ、第三講座の皆様には、いろいろとご協力いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

化学機械工学科の諸先生方並びに事務室をはじめ職員の方々には多くの面でお世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

大阪市二清掃本所図書
651-2644


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19