

## 脱細胞化肝臓を鋳型とした肝グラフトの性能評価系 および臓器培養システムの開発

坂本, 裕希

<https://hdl.handle.net/2324/2236199>

---

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (工学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

脱細胞化肝臓を鋳型とした肝グラフトの  
性能評価系および臓器培養システムの開発

平成 31 年 1 月

坂本 裕希

## 目次

<b>第1章 序論</b> .....	<b>1</b>
1.1 本研究の目的.....	1
1.2 本研究の位置づけおよび方針.....	3
1.3 本論文の構成.....	5
<b>第2章 既往の研究</b> .....	<b>7</b>
2.1 肝臓.....	7
2.1.1 肝臓の形態.....	7
2.1.2 肝臓の機能.....	8
2.1.3 肝臓を構成する細胞.....	11
2.2 肝不全.....	13
2.2.1 急性肝不全について.....	13
2.2.2 慢性肝不全について.....	13
2.2.3 研究用肝不全動物モデル.....	13
2.3 肝不全に対する治療の現状.....	16
2.3.1 肝移植.....	16
2.3.2 人工肝臓.....	17
2.3.3 肝組織工学.....	18
2.4 脱細胞化肝臓を足場とした肝グラフトの構築.....	21
2.4.1 脱細胞化について.....	21
2.4.2 界面活性剤による脱細胞化.....	23
2.4.3 脱細胞化肝臓を用いた既往の報告.....	25
<b>第3章 肝不全ラットモデルの開発</b> .....	<b>28</b>
3.1 本章の目的および概要.....	28
3.2 既往の報告に基づく肝不全ラットの作製.....	29
3.2.1 本節の目的.....	29
3.2.2 実験方法.....	29
3.2.3 結果.....	30
3.2.4 考察.....	32
3.2.5 本節のまとめ.....	32
3.3 新規肝不全ラットモデルの開発および評価.....	33
3.3.1 本節の目的.....	33

3.3.2	実験方法.....	34
3.3.3	結果と考察.....	36
3.3.4	考察.....	41
3.3.5	本節のまとめ.....	45
3.4	本章のまとめ.....	46
<b>第4章 再細胞化肝臓の有効性評価 .....</b>		<b>47</b>
4.1	本章の目的および概要.....	47
4.2	血液灌流による再細胞化肝臓の <i>in vitro</i> 評価.....	48
4.2.1	本節の目的.....	48
4.2.2	実験方法.....	48
4.2.3	結果.....	55
4.2.4	考察.....	55
4.2.5	本節のまとめ.....	56
4.3	<i>Ex vivo</i> での再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性評価.....	57
4.3.1	本節の目的.....	57
4.3.2	実験方法.....	57
4.3.3	結果と考察.....	61
4.3.4	考察.....	66
4.3.5	本節のまとめ.....	68
4.4	本章のまとめ.....	69
<b>第5章 再細胞化肝臓の高機能化に向けた基盤技術の開発 .....</b>		<b>70</b>
5.1	本章の目的および概要.....	70
5.2	酸素化灌流培養システムの構築.....	71
5.2.1	本節の目的.....	71
5.2.2	実験方法.....	71
5.2.3	結果.....	77
5.2.4	考察.....	82
5.2.5	本節のまとめ.....	83
5.3	再細胞化肝臓への酸化ストレスに関する検討.....	84
5.3.1	本節の目的.....	84
5.3.2	実験方法.....	84
5.3.3	結果.....	86
5.3.4	考察.....	90
5.3.5	本節のまとめ.....	91

5.4	本章のまとめ.....	92
<b>第6章</b>	<b>結論.....</b>	<b>93</b>
6.1	本論文のまとめ.....	93
6.2	今後の展望.....	95
<b>第7章</b>	<b>参考文献.....</b>	<b>97</b>
<b>第8章</b>	<b>謝辞.....</b>	<b>105</b>

# 第1章 序論

## 1.1 本研究の目的

肝臓は体重の約 45 分の 1 を占める脳に次ぐ最大の臓器であり、生命活動の維持に欠かせない様々な機能を有することが知られている。肝臓は、様々な栄養素を分解・生成する代謝機能、アルコール・アンモニア等を代謝し毒性を弱める解毒機能、胆汁の生成・分泌といった消化排泄機能、心臓へ流出する血液量を調整するといった循環調節機能などを有しており、体内の恒常性維持に大きく関与している。500 を超える多様な機能を有することから肝臓と同等の化学プラントを作ることは不可能だとさえ言われている。また、肝臓は非常に再生力の高い臓器としても知られ、その 4 分の 3 を切除したとしても旺盛な肝再生が起り、元の大きさにまで回復する。それ故、症状が進行するまで自覚症状が現れにくく“沈黙の臓器”とも呼ばれており、症状が現れたころには取り返しのつかない重篤な症状に陥っていることも珍しくはない。

現在、重篤な肝臓病に対する根本的な治療法は肝移植しかない。日本臓器移植ネットワークによると 2015 年 1 月 5 日時点で肝移植希望登録者は 401 人であるが、2014 年 01 月 01 日から 2014 年 12 月 31 日の間で行われた移植件数は 43 件と、臓器移植ネットワークに登録した移植希望者の 10 分の 1 ほどでしかない [1]。臓器移植が進んでいると言われているアメリカにおいてさえも、OPTN/SRTR Annual Data Report 2016 によると、2016 年において 12 月 31 日時点の移植希望登録者リストの 13726 人に対して、実際に移植が行われたのは 7841 人であった [2]。このように慢性的なドナー不足により毎年多数の人が死亡しており、移植用臓器が希求されている状況にある。

人工肝臓を作ることによってこの問題を解決しようというアプローチで様々な研究がなされてきたが、肝臓は多岐にわたる機能を持つため人工的手段を用いてすべての機能を代替する人工肝臓を作製することはほぼ不可能である。そこで、肝機能を有する細胞を直接装置に組み込んだハイブリッド型人工肝臓が開発された。このハイブリッド型人工肝臓は臨床試験の段階にまで至っており、今後更なる発展が期待される。しかし、この人工肝臓は血液体外循環を用いるシステムであるため、一時的な回復は期待できるが重篤な肝不全患者に対しての根治療法とはなり得ない。そのため根治療法として、永久的に自分の臓器として利用可能な移植用の肝組織（グラフト）の構築が急務であるが、未だ治療に有効な

規模の肝組織の構築は実現できていない。

そこで、1993年に Robert Samuel Langer および Joseph Philip Vacanti によって、組織固有の細胞、生体足場、細胞を増殖させる環境、この3点に着目し臓器の構築を目指す組織工学 [3]が提唱され、その後様々な研究がされてきた。この組織工学に基づき、その一例として細胞シートを積層させて組織の構築を目指す研究が行われ、皮膚や心筋、網膜など比較的薄い組織の構築に成功している。しかし、肝臓のような重厚な組織においては細胞への酸素供給が課題であるが故にスケールアップができず、治療可能な規模の肝組織の構築ができていないのが現状である [4]。

近年、一部の研究者によって臓器工学といった概念が提唱されつつある。これは組織工学をベースに臓器規模の組織の構築を行おうといった考え方である。肝細胞は酸素消費量の大きい細胞であるため、治療可能な規模の肝組織の構築には精緻な血管網が必要不可欠である。そこで本研究において、脱細胞化技術に注目した。これは臓器から細胞を除去し、足場のみを取得する技術のことである。肝臓に界面活性剤を灌流させ取得した脱細胞化肝臓（以下 DC 肝臓）は血管由来の構造間距離 1 mm 以下の精緻な樹状構造を有することが確認されている [5]。臓器規模の大きさを持ち、細胞の生着に有効と言われている生体由来足場であり、かつ肝細胞に十分な酸素供給ができることが期待されている点で、DC 肝臓は移植治療が可能な肝組織構築の上で非常に優れていると考えられる。本研究では、移植に用いることが不可能であるドナーの肝臓を用いて DC 肝臓を作製し、これを鋳型として自己由来の細胞を播種・培養することにより再細胞化肝臓（以下 RC 肝臓）を構築する。そして最終的に究極の治療である移植治療を行うことを目標としている。

しかし、この RC 肝臓を最終目標である移植治療に用いるためには、十分な機能を持つ RC 肝臓を作製し、救命効果を評価する必要がある。そこで、本研究では十分な救命効果を持つ RC 肝臓の開発に向け、RC 肝臓の治療効果の評価系の開発を行った。更に、RC 肝臓の高機能化に向けた基盤技術の開発を行った。

## 1.2 本研究の位置づけおよび方針

脱細胞化肝臓を鋳型とする移植用肝グラフトの構築を目指す研究において、構築したグラフトの肝不全に対する有効性は未だに示されておらず、その有効性に関する知見はほとんどない。既往の研究においては構築した RC 肝臓の評価はそのほとんどが血液成分に着目した *in vitro* での評価が行われており、次の段階の評価として移植評価を行った報告が数件ほど存在するのみである。しかし、肝不全からの救命の指標が未だに不明であるため、*in vitro* での評価で最重要項目である救命効果を評価することは非常に困難である。移植評価においても、グラフトの血液の漏洩や抗血栓性の問題が解決できておらず、満足のいく評価が行えていないのが現状である。また、このように十分な救命効果の評価ができていないグラフトを移植しても、全身障害を含む様々な要因が評価結果に加味されるため明瞭な評価が困難であり、RC 肝臓の作製法の改善指針を明確にすることはできない。つまり、研究初期段階の評価において移植評価は不適切であると考えられる。つまり、RC 肝臓の救命効果を評価するにあたり、肝不全モデル動物に対して実際にグラフトを適用することが必要であるが、明瞭な評価が可能な移植以外の評価系が必要である。そこで、RC 肝臓の救命効果の評価系の開発においてポイントとなる点を以下に示す。

### 1. グラフトによる救命効果の評価に適した肝不全動物モデルの開発

肝不全に対するグラフトの有効性を評価するためには、再現性の高い肝不全動物モデルが必要となる。

### 2. 肝不全モデルを用いたグラフトの有効性評価系の開発

グラフトを実際に肝不全動物に適用してその有効性を評価する新たな評価系が必要である。本研究では、ハイブリッド型人工肝補助システムが血液体外循環による体外灌流システムを用いている点に着目し、グラフトを血液体外循環回路に組み込むことによって新たな *ex vivo* 評価系の開発を目指した。

### 3. グラフトの高機能化に向けた基盤技術の開発

移植に用いることが可能なパワーを有するグラフトの作製の為には播種する細胞の高密度化が必須であると考えられる。そこで、高細胞密度のグラフトを培養可能なシステムの開発を目指し、酸素供給に着目した基盤技術の開発を行った。

以上のポイントを解決することによって、構築したグラフトの救命評価が可能となり、最適設計に向けた情報が得られるようになると考えられる。更に、グラフトの培養システムの開発によってグラフトの高機能化が期待され、真に肝不全患者を救命可能なグラフトが実現できると考えられる。

### 1.3 本論文の構成

第一章では、本研究の背景として人工肝臓を取り巻く現状を示し、ならびに本研究の目的・方針を示した。

第二章では、本研究に関連する分野に関する既往の研究について示した。本研究は肝臓をターゲットとしていることから、まず肝臓の構造や機能および肝不全の病態、更に臨床が進められている人工肝臓について示した。続いて、本研究の根幹となる考え方である組織工学や臓器工学、加えてキーテクノロジーとなる脱細胞化について示した。

第三章では、治療効果の評価に必要な新規肝不全モデルの開発を行った。開発した肝不全ラットモデルの生存率ならびに血中成分を評価した。

第四章では、まず既往の報告に基づき RC 肝臓を作製し *in vitro* での RC 肝臓の評価を行い RC 肝臓の肝機能を確認した。その後、血液体外循環システムを構築し、肝不全モデルに対し RC 肝臓を組み込んだ血液体外循環を行うことによって RC 肝臓の治療効果を評価した。

第五章では、RC 肝臓の灌流培養システムの開発を行った。高密度化した再細胞化肝臓が培養可能となるよう、酸素供給に着目したシステムの開発を行った。

第六章では、本論文の総括を行った。さらに、本論文の成果をもとに今後の展望について示した。

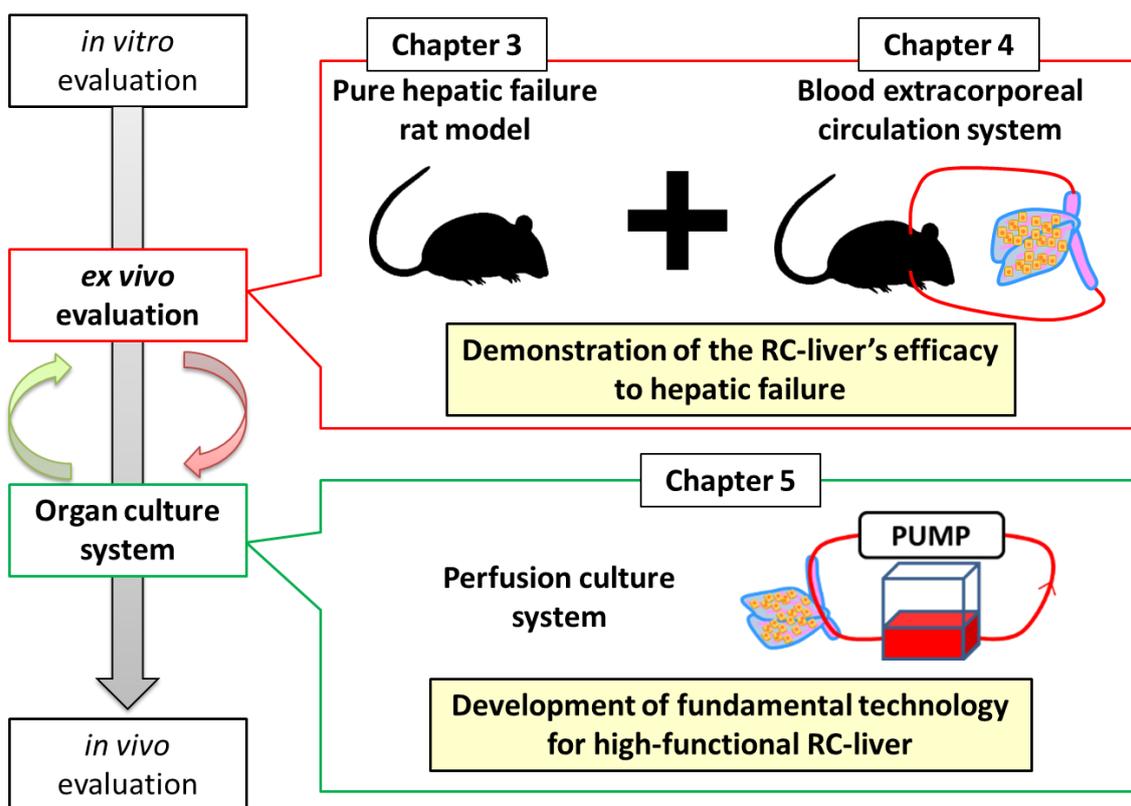


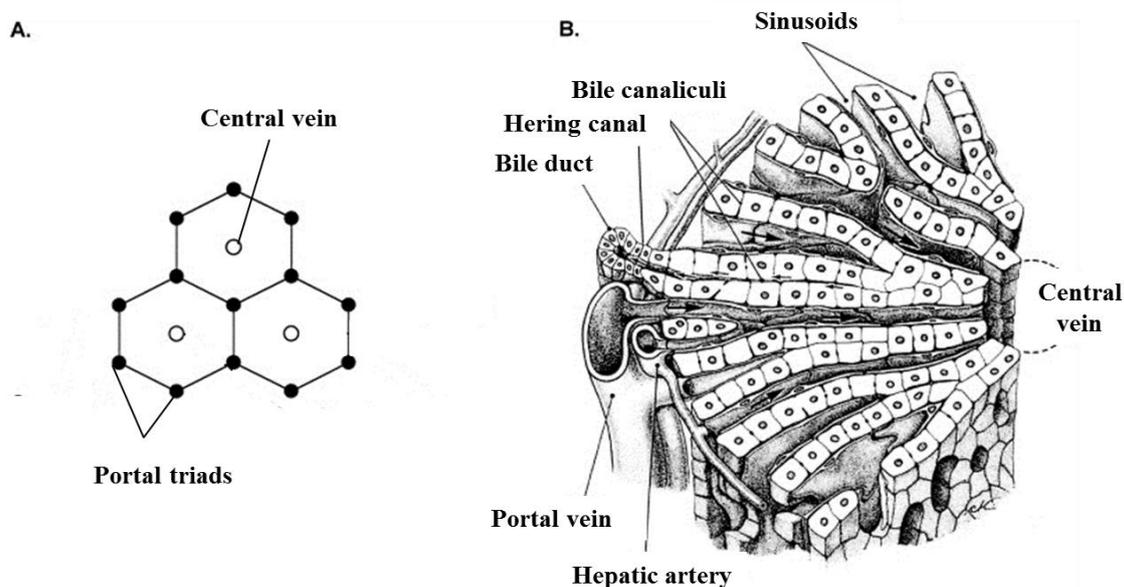
Fig. 1-1 Outline of this study.

## 第2章 既往の研究

### 2.1 肝臓

#### 2.1.1 肝臓の形態

肝臓はヒトの体重の約 45 分の 1 を占める体内最大の臓器であり、糖質やタンパク質、脂質等の代謝やアルコールやアンモニア等の解毒、胆汁の排泄、循環血液量の調節といった多種多様な役割を担う。肝臓は生体の化学工場に例えられ、判明しているだけでも 500 以上の機能があるとされる。肝臓は約 70%の肝実質細胞と約 30%の非実質細胞で構成され、肝細胞が 50 万個ほど集合した構造を基本単位としている。この構造は肝小葉と呼ばれており、これは中心静脈を軸として放射状に肝細胞が配列し周辺部にグリソン鞘が配置された、直径 1~2 mm 程の六角柱型の肝細胞の集合体である (Fig. 2-1)。肝小葉内の肝細胞索の間を走る毛細血管は類洞と呼ばれており、その直径はわずか 10  $\mu\text{m}$  ほどである。肝細胞の類洞に接する面積は全表面積の 7 割ほどであると考えられており、このような効率的な構造が血液と肝細胞との間の良好な物質移動を可能としている。その結果としておよそ  $2 \times 10^8$  cells/g-liver もの高い細胞密度を実現している。



**Fig. 2-1 Lobular structure of the liver. Three lobules are shown as hexagonal structures demarcated by portal tracts or triads in the periphery and containing a central vein at the center (A). The histologic structure of the lobule is shown in (B). Portal triads contain branches of the portal vein and hepatic artery, as well as bile ducts. Hering canals and bile canaliculi are also indicated. [6]**

### 2.1.2 肝臓の機能

肝臓は、外来の栄養物を取り込んで、いろいろな形で貯蔵、変形さらには必要に応じて自由に放出している。また、解毒・排泄にも重要な臓器であり、内因性のアンモニア、ビリルビン、ステロイドホルモンの代謝から、血中や胆汁中にそれらの代謝産物を排泄する他、薬物の代謝も多くは肝臓で行われる。さらに外分泌器官として胆汁酸、その他を腸管に排泄して脂肪の消化やビタミンの吸収にも大きく関与している。Table 2-1 に示すように、それら多様な機能は代謝機能、解毒機能、排泄機能および循環調節作用に大別される。代謝機能には、糖質、脂質、アミノ酸、たんぱく質および核酸などの代謝が含まれる。門脈により運ばれてくるこれらの物質を取り込み、それを再び血中に、血糖、リボタンパクあるいは血漿タンパクといった形で送り出し、一種の内分泌的な機能を演ずることにもなる。また、他の臓器の代謝にも重要なビタミンやホルモンも肝臓で代謝され、活性化ないしは不活性化されている。解毒機能は、内因性あるいは外因性の物質を解毒し、排泄するもの

である。解毒は滑面小胞体による酸化反応が最も重要だが、それ以外にもグルクロン酸抱合、グリシン抱合その他の解毒機構が、薬物などの極性を高めて水に溶解しやすい状態に変え、血中へそして尿へ、あるいは一部は胆汁中に排泄していく。排泄機能は、胆汁を生産し、これを腸管へ送ることである。胆汁酸は、腸管から吸収され門脈血に入って肝臓に達し、再び胆汁中に排泄され、腸肝の間を循環する。胆汁酸は、脂質ないしコレステロールの代謝に不可欠な働きをもっているが、その一部のもの毒性が強いため大循環系には漏れないようにし、腸肝循環回路という一定の狭い領域に閉じ込めて循環しながら利用する。循環作用について、肝臓は造血に関与したり、血液凝固に必要な因子を生成し、放出もしている。また肝臓は非常に大きな臓器であることから、血液の循環調節の機能も果たしている。

**Table 2-1 Functions of liver. These functions can be classified roughly into four types (metabolism, detoxication, excretion and circulatory regulation). [7]**

	<b>Carbohydrate metabolism</b>
	Uptake of glucose, Glycogenesis and storage
	Oxidative glycolysis of glucose
	Secretion to blood
	Galactose, fructose metabolism
	<b>Lipid metabolism</b>
	Biosynthesis of fatty acid, triglyceride and lipoprotein
	Biosynthesis of cholesterol and phospholipid
	Uptake and degradation of fatty acid
	Ketogenesis
<i>Metabolism</i>	LCAT biosynthesis and secretion
	<b>Nucleic acid metabolism</b>
	<b>Regeneration and necrosis</b>
	<b>Amino acid, protein metabolism</b>
	Amino acid metabolism
	Ammonia metabolism in urea cycle
	Protein synthesis and proteolysis
	<b>Vitamins, hormone metabolism</b>
	Vitamin inactivation and storage
	Hormone inactivation and decomposition
	<b>Oxidation and hydroxylation by drug-metabolizing enzyme</b>
	<b>Glucuronide, glutathione and other conjugation</b>
<i>Detoxication</i>	<b>Alcohol metabolism</b>
	<b>Ammonia disposition</b>
	<b>Phagocytosis of Kupffer cell</b>
	<b>Bile secretion</b>
<i>Excretion</i>	<b>Bile acid biosynthesis and secretion</b>
	<b>Secretion of cholesterol, phospholipid, bilirubin and so on</b>
	<b>Secretion of detoxicated drugs and so on to bile</b>
<i>Circulatory regulation</i>	<b>Regulation of blood flow to heart</b>

### 2.1.3 肝臓を構成する細胞

上述のように肝臓は肝特異的機能を発現する肝実質細胞が約70%を占め、残りの30%は類洞内皮細胞、胆管上皮細胞、星細胞、クッパー細胞、ピット細胞などの非実質細胞が占めている [7] [8]。これらの細胞は3次的に非常に複雑な構造を形成し、シグナルのやり取り等を行うことによって相互に影響を与えながら機能している。以下に、各構成細胞について簡潔に述べる。

#### 1) 肝実質細胞（肝細胞）

肝実質細胞は肝臓内の細胞数の70%を、容積の85%を占める細胞であり、その直径はおおよそ30  $\mu\text{m}$  である。これらは2軸性の肝実質細胞索を形成し、中心静脈より肝小葉辺縁部に向かって断続的に放射状に配列し、前述の肝小葉を形成している。肝実質細胞索は類洞により挟まれているが、この類洞の内皮細胞と肝実質細胞間のDisse腔に向かって肝実質細胞は微絨毛を出すことによりその表面積を大きくし、接している類洞との間で盛んに物質移動を行いながら、生命維持に不可欠な成分を血中に供給している。また、肝実質細胞間には毛細胆管が形成され、ここへ肝細胞で作られた胆汁が分泌され、胆管上皮細胞により囲まれた小葉間胆管へと送られる。

#### 2) 類洞内皮細胞

肝細胞索間の類洞を縁取る細胞で、一般の内皮細胞と異なり基底構造を有さず、直径約100 nmの小孔を有している。類洞内血液と肝実質細胞間の物質移動を行っているのに加え、血管収縮作用を有するエンドセリンやプロスタグランジン、サイトカイン等を分泌している。

#### 3) 胆管上皮細胞

胆管を形成する上皮細胞であり、肝実質細胞と比較すると細胞内小器官が乏しい。

#### 4) 星細胞（伊東細胞）

類洞内皮細胞と肝実質細胞との間のDisse腔に存在し、数本の長い突起をもつ星状の形態を有する。血中よりビタミンAを摂取し、脂肪滴と共にそれを細胞質内に貯蔵することから、脂肪摂取細胞とも呼ばれる。また、星細胞の周辺には各種コラーゲンやプロテオグ

リカン、フィブロネクチンやラミニンなどの糖タンパク質が分布しており、これらの細胞外マトリックスと共に3次元的に存在している。

5) クッパー細胞

強い貪食作用を有する肝臓固有のマクロファージであるが、星型、三角形、棒状といった不規則な形状をし、表面はマクロファージ特有の微突起に覆われている。類洞内腔に存在し、門脈を通り肝臓内へ流入した毒素や病原体等の異物をとらえて攻撃することで、全身に循環するのを防いでいる。

6) ピット細胞

類洞内腔に存在する免疫担当のナチュラルキラー細胞である。細胞質内には内皮細胞やクッパー細胞に接着するための顆粒を有している。

## 2.2 肝不全

肝不全とは、肝細胞の機能異常が進行、悪化し、肝臓の機能がもはや維持できなくなった重篤な臨床像のことを指す。意識障害、黄疸、腹水、消化管出血、腎不全や出血傾向、更には多臓器にも多大な影響を与え、しばしば多臓器不全へと発展するなど、様々な病態を併発する極めて重篤な疾患である。

### 2.2.1 急性肝不全について

急性肝不全は、「肝細胞の広範囲な壊死または急激に起こる重篤な肝機能障害の結果出現する症候群」と定義され、内因性（壊死型）として大別される [9]。症状発現後 8 週間以内に高度の肝機能障害に基づいて肝性昏睡Ⅱ度以上の脳症をきたし、プロトロンビン時間が 40%以下、発病後 10 日以内に脳症が出現する急性型と、それ以後に発現する亜急性型に分けられる。急性型の方が亜急性型に比べると予後が良好である。肝機能不全による代謝能力の欠落や壊死物質の遊離・放出が生じることにより、アンモニア、低級脂肪酸、芳香族アミノ酸やメチオニン、メルカプタン、胆汁酸、エンドトキシン、間接ビリルビンなどの多くの有害物質が循環血液中に蓄積する。

### 2.2.2 慢性肝不全について

慢性肝不全は、外因性（シャント型）として大別される [10]。門脈-大循環系短絡路の存在のために門脈血流が肝臓を通過せず大循環に流入し、腸管内細菌に由来する門脈血中の有毒物質による中毒症状が出現する。アンモニア、低級脂肪酸、メルカプタンなどの血中濃度が上昇し、肝細胞機能の低下のために代謝することができず、系統的代謝異常を誘起して多臓器障害を誘発する。

### 2.2.3 研究用肝不全動物モデル

研究の目的に合わせて、様々な肝不全動物モデルが開発されている。急性肝不全の動物モデルについては、可逆性 (Reversibility)、再現性 (Reproducibility)、肝不全による死亡 (Death from liver failure)、治療効果を観察できること (Therapeutic window)、大型

動物 (Large animal)、ヒトへの危険が最小限であること (Minimum hazard to person) の6項目が具備すべき条件として挙げられている [11]。以下に、肝不全モデルの作製法を示す。

1) 門脈-下大動脈短絡経路モデル [12], [13]

臨床を想定した門脈-下大静脈短絡経路 (Porto-caval shunt) モデルである。本手法による肝細胞への障害はほとんどないと考えられるが、ラットモデルの場合は手技が難しい。尚、本モデルに薬物などによる肝壊死を組み合わせることも可能である。

2) 部分肝切除モデル [14], [15]

1931年に Higgins らによって 2/3 部分肝切除モデルが報告された [14]。容易に作製できるとともに個体差が少ない。また、虚血や薬物との組み合わせができるほか、切除する量も調節可能である。切除のみのモデルは生体肝移植後の肝不全状態に類似している。切除を行っているので必然的にこのモデルでは残存肝により再生を行う挙動が見られる。

3) 温虚血肝不全モデル [16]

虚血による広範囲性肝壊死を誘発したもので、劇症肝炎を想定した動物モデルである。このモデルでは高アンモニア血症、黄疸および顕著なトランスアミラーゼの増加が認められ、ヘパラスチンテストも明らかに延長する。更に、血漿遊離アミノ酸も芳香族アミノ酸およびメチオニンの増加が著しく、劇症肝炎に代表される急性肝不全患者に類似したパターンを示す。肝切除を組み合わせることで個体によるばらつきも低減可能である。

4) 薬物誘導モデル

四塩化炭素 [17]、ガラクトサミン [18]、アセトアミノフェン [19]などの薬剤を注入することで肝不全動物モデルを作製する。しかし、個体差が大きく作製まで時間を有すること、肝不全状態が明確でなくさらに一定でないなどの欠点も有する。

5) 免疫学的肝不全モデル

多くの肝疾患、特に肝炎の発症・進展の病態には種々の免疫反応が関与すると考えられている。肝炎・肝不全の発症機序の解明および治療法の開発には、より実際の病態に類似

した動物モデルが必要であり、菌体やウイルスを注入し免疫学的機序を介した肝不全モデルが開発されている。しかし、作製される肝不全モデルには個体差が大きいことや、菌体やウイルスを用いるため術者への危険度が高いといった欠点もある。

中には、これらの作製法を組み合わせた肝不全モデルも存在する。Eguchiらはラットを用いて、中葉および左葉を切除し右葉を結紮するモデルを報告している。残存肝はおよそ6%であり虚血されている右葉が残存する非常にシビアなモデルである [20]。またYongらは、肝切除部位を変えることで肝不全の重篤度を制御しており、90%肝切除がラットにおける自然回復可能なギリギリのラインであると報告している。部分肝切除による残存肝の制御によって、段階的ではあるものの重篤度の操作が可能である [21]。一方、Ijimaらはラットに対し中葉と左葉の74%肝切除を行い、残存肝に対しては温虚血を行うことによって重篤度を細やかに制御可能なモデルを報告している [16]。

このように、様々な作製法の特徴を踏まえ適切に組み合わせることによって、実験の目的に合った肝不全動物モデルを作製することが可能となる。

## 2.3 肝不全に対する治療の現状

### 2.3.1 肝移植

肝移植とは、ドナーから摘出した肝臓を患者へと移植する治療法である。1963年に Starzl らによって世界で初めて肝移植が行われ [22]、免疫抑制剤や臓器保存液等の開発もあって肝移植は着実に発展してきた。現在まで世界中で 10000 以上の肝移植が行われ、移植後 1 年間の生存率は 80~90%と報告されている [23]。レシピエントは免疫抑制剤を生涯に亘って服用しなければならないが、比較的予後も良好である。

肝移植は、健常者の肝臓の一部を切除しグラフトとして用いる生体肝移植と、脳死または心停止ドナーの肝臓をグラフトとして用いる死体肝移植に大別される。生体肝移植については、健常者に対して多大な負荷が掛かることや、中にはドナー側の死亡例もあり、臓器提供者へのリスクが問題となっている。死体肝移植についても、慢性的なドナー不足が問題となっており、移植を受けられずに多数の方が死亡している。

以上のように、移植を受けることができれば比較的良好な結果が得られる一方で、Fig. 2-2 に示されるようにドナー不足が深刻であり、代替的な治療法の開発が望まれている。

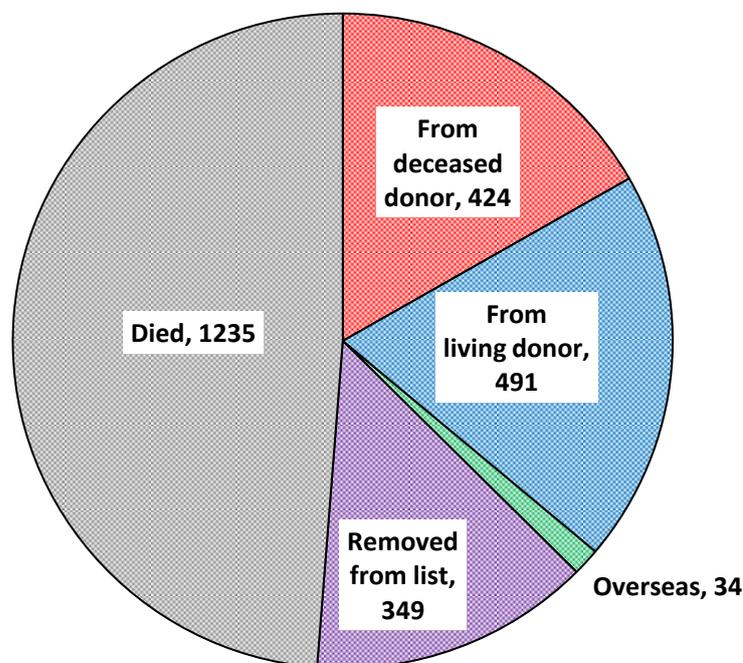


Fig. 2-2 Status of registrants for liver transplantation (1997.10 ~ 2018.11) [24].

### 2.3.2 人工肝臓 [25]

劇症肝炎に対し、血漿交換と血液濾過透析を組み合わせられて行われるのが人工肝補助療法である。人工肝補助療法は、有害物質の除去により肝性昏睡からの覚醒と凝固因子などの補充を目指して行われている。装置としては大きく分けて膜型人工肝臓と、吸着型人工肝臓の2つに分けられる。

#### 1) 膜型人工肝臓

血液透析あるいは濾過方法では、脂溶性物質やタンパク質結合性物質の除去には無力であるため、吸着材や血漿交換との併用、あるいは脂溶性物質のみ濾過させる膜の開発などが行われている。

#### 2) 吸着型人工肝臓

活性炭によるタンパク非結合物質を中心とした吸着除去や、イオン交換樹脂による吸着がなされている。アンモニアやビリルビンなどに特異的な吸着カラムまで市販されるようになってきている。

どちらのものも有害物質の除去が主目的であり、肝臓の重要な機能である代謝については補助できていない。

#### 3) ハイブリッド型人工肝臓 [26]

肝細胞そのものを固定化したモジュールと血液体外循環回路を組み合わせた効果的な治療法としてハイブリッド型人工肝臓（バイオ人工肝臓）が開発された。このハイブリッド型人工肝臓は、動物実験や試験的臨床適用によりその有効性が実証されてきた。肝補助療法では困難であった代謝的なサポートを実現でき、大きな治療効果が期待される。臨床適用例では血中生化学、脳症、全身状態の改善効果などが示されたが、従来の治療法と比べてどの程度有効な治療法であるかはいまだ不明な点も多い。ハイブリッド型人工肝臓は重篤な肝不全患者に対する肝移植までの橋渡しはもちろんのこと、肝機能補助をしながら肝再生誘導による根治が期待できる非常にパワフルで有効な治療手段である。しかし、肝再生が期待できないほど重篤な肝不全に対しては根治療法とはならず、肝移植が前提の適用に留まっており、移植可能な人工肝臓の開発が望まれている。

### 2.3.3 肝組織工学

1993年に Robert Samuel Langer および Joseph Philip Vacanti によって組織工学 (Tissue Engineering) が提唱された [3]。これは、臓器を構成する細胞、細胞に接着面を与え増殖するための空間を確保する足場、細胞に対して増殖や分化さらには機能発現のシグナルを与える因子の三要素を組み合わせることで組織を構築しようというものである。また、この組織工学の実現には、医学・工学・理学・薬学などの異分野間研究交流（学際的研究）が重要とされている。さらに、従来、主に基礎研究の目的で用いられていた細胞培養という手法を、培養した細胞そのものを患者の治療に用いる点で革新的であるとされている。この組織工学に基づき、皮膚 [27]、軟骨 [28]、角膜 [29]、および心筋 [30] の構築においては多大な成功例が示されている。

上記のような組織は大半を細胞外マトリックスが占める組織や単一細胞からなるシート状組織である。これらに対して、肝臓、膵臓、および腎臓などは機能性細胞が高密度に充填されており、その酸素や栄養の物質交換を維持するための毛細血管が縦横無尽に張り巡らされ、複雑に構造化された大型組織（臓器）であるため、構築が非常に困難を極めている。

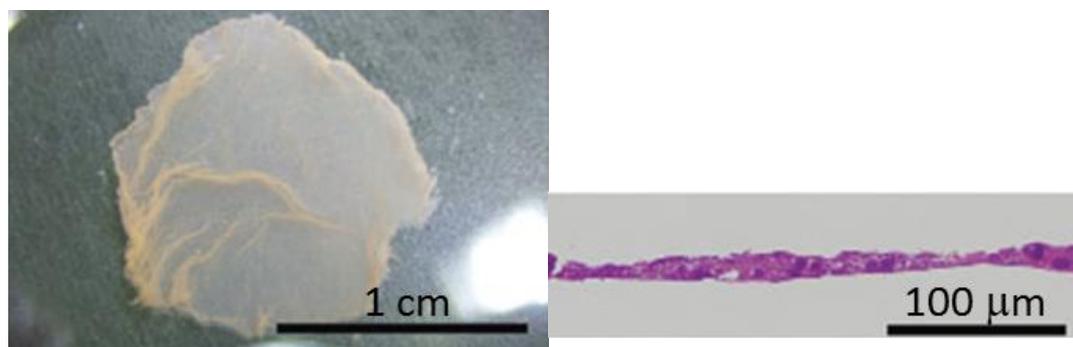
肝組織工学においては、細胞個々の生着を促し、かつ組織化を行うプロセスが必要となる。細胞生着のための足場の提供に加え、細胞相互の接着促進、そして血管網の形成等多くの検討項目がある。また、肝臓は非実質細胞も緻密に配列しており、肝機能を様々な面で支援している。組織作製においては非実質細胞の混合のタイミングも細胞配置の技術として検討が必要である。しかしながら、現状では肝実質細胞と血管網を重視した検討が多く、非実質細胞まではまだ検討できていないものがほとんどである。以下に、肝臓構築を目指す研究を紹介する。

## 1) 高分子材料を足場とした肝組織の構築 [31]

成分肝性高分子を肝細胞の生着足場として用いることで三次元的に肝細胞を配置し、体内の組織化を目指すものである。組織工学で広く用いられるポリ乳酸、ポリグリコール酸、キトサンなどが肝細胞でも汎用されている。孔サイズの最適化などによって培養下では高機能な組織体の形成が可能になってきている。増殖因子徐放システムを搭載した改良型スカフォールド [32]やRGDS（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン配列）固定化スカフォールドに線維芽細胞と類洞内皮細胞を共培養した組織体を移植することで、約1週間の機能維持に成功している [33]。しかしながら、移植後の酸素供給や物質交換を即時的に構築することが困難であるため、長期の機能維持の報告は少ない。局所での血管網誘導などの前処理により、更なる機能維持が期待される。

## 2) 細胞シート工学を用いた手法

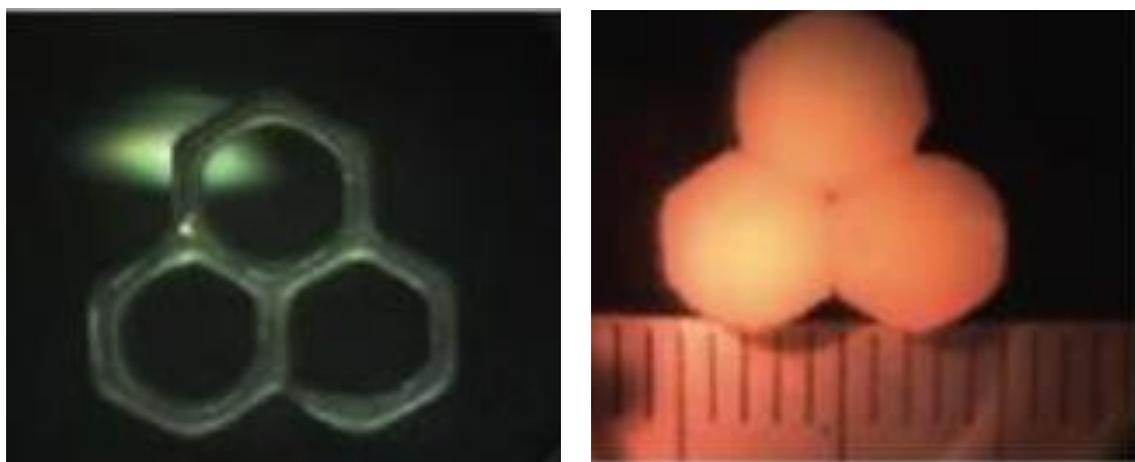
スカフォールドを用いない組織体構築法として、近年開発されたのが細胞シート工学である [34]。この手法では温度応答性ポリマーであるポリ N-イソプロピルアクリルアミドでコートした培養皿状に細胞を培養すると、20°Cに15分置くという温度変化のみで細胞を培養皿から剥がすことができ、細胞間接着を保ったまま細胞をシート状に取得できる。この手法は様々な組織への応用が進められており、特に心筋組織の構築が顕著である [35]。シートを積層させることで組織構築を目指すものであるが、積層のみでは構築できる組織の厚みに限界があり、内皮細胞のサンドイッチによる前内皮化 [36]や、細胞シート下に流路を形成する方法 [37]、また細胞シート下に摘出した血管を敷く方法などが検討されている。



**Fig. 2-3 Left: Gross appearance of the engineered hepatic tissue sheet harvested by temperature-dependent removal from a PIPAAm culture dish. Right: Histological analyses of the harvested hepatic tissue sheets by hematoxylin-eosin staining. [34]**

## 3) バイオプリンティングによる肝組織の構築

3Dプリンターの技術を応用し生体適合性材料を用いて3次元的に組織を印刷するバイオプリンティングについても様々な研究が行われている。生体に対して温和な環境を保ちつつプリンティングを行う必要があり、アルギン酸塩ゲルやフィブリンゲル [38]、ポリカプロラクトン [39]、肝臓の細胞外マトリックス [40] 等の生体適合性材料がバイオインクとして開発されつつある。現段階では、バイオインクの特性或プリンティングの解像度に大きな課題があるものの、今後の発展が大いに期待される。

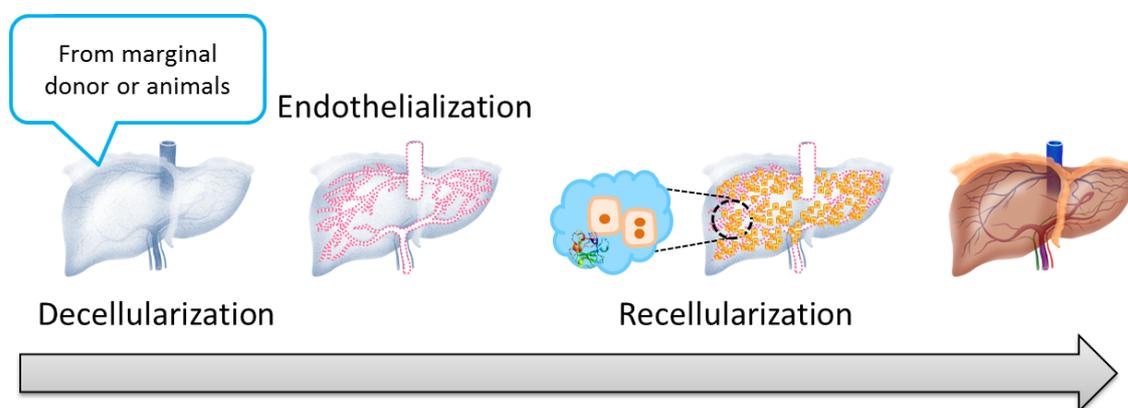


**Fig. 2-4 Photographs showing the liver organoids immediately after bioprinting. [41]**

以上のように、肝組織の構築に向けて様々なアプローチが試みられており、今後の発展が期待される。しかしながら、臓器レベルの肝組織の実現には毛細血管を含む微細構造の再現が必須にもかかわらず、微細構造の再現の目途は立っていない。つまり、移植可能な肝グラフトの実現の為には、肝臓の微細構造を有する足場材料が必要であると考えられる。

## 2.4 脱細胞化肝臓を足場とした肝グラフトの構築

階層的な管構造を持つ臓器規模の血管網構築のための人工的な足場材料はまだ開発されていない。そこで近年、肝臓そのものの構造を有する足場材料として、脱細胞化肝臓が注目されている。この脱細胞化肝臓は、移植に用いることのできないドナーや、免疫問題を解決できれば動物からも取得が可能と考えられる。脱細胞化肝臓を足場として用いることで、肝グラフトの構築に必要な精緻な血管網が実現でき、本足場に細胞を播種することによって臓器規模の移植用肝グラフトの構築が可能になると考えられる (Fig. 2-5)。



**Fig. 2-5 Concept of construction of a liver graft using a decellularized liver as a scaffold which has fine vascular structure.**

### 2.4.1 脱細胞化について

脱細胞化とは、生体内の組織を摘出し、組織内の細胞を除去して組織の細胞外マトリックスのみを回収することである [42]。

脱細胞化の技術は大別すると、圧力などを用いて直接的に細胞成分を流し出す物理的方法、酵素などの生物活性を用いる生物学的方法、酸や塩基、または界面活性剤などを用いる化学的方法がある [43] [44] [45] [46]。臓器、組織の力学的強度や最終的な使用目的に応じた脱細胞化方法を選択することが重要である。以下にそれぞれの方法の特徴について述べる。

### 1) 物理的手法

機械的攪拌、凍結融解、超音波処理などの方法がある。特に注目すべきは圧力による脱細胞化である。心臓弁などの圧力を断続的に受けている組織は耐圧性に優れている。また、このような組織では、組織を構成する細胞も他の臓器に比べ少ないために圧力による脱細胞化は有効である。そこで用いられている手法が超高静水压印加法と呼ばれる技術である。これは液体中において、対象組織に超高压（980 MPa、1 万気圧）を印加してドナー細胞を破壊し、洗浄液で細胞残渣を洗浄する方法である。これにより、レトロウイルスを不活化でき、細菌類を死滅させる効果も併せ持つ。また、本方法を用いる力学的負荷に対する抵抗が向上したと報告されている。

### 2) 生物学的方法

トリプシン、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼなどを用いる。膵臓に含まれる消化酵素であるトリプシンは、エンドペプチターゼの一種でありペプチドの加水分解を行う。ヌクレアーゼとは、核酸分解酵素の総称であり、核酸の糖とリン酸とのホスホジエステル結合を加水分解する。分解の形式により、エンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼに二分できる。前者は、核酸配列の内部で核酸を分解する酵素であり、制限酵素が代表的なものである。後者は、核酸配列の外側から、すなわち核酸の 5'端または 3'端から削るように核酸を分解する。本手法は他の脱細胞化方法と併せて用いるのが一般的である。例えば、後述する界面活性剤による脱細胞化処理を施された臓器は、元々の臓器から色が変わり細胞成分が除去されているように見えるが、H&E 染色などで評価した結果、細胞核の残存が確認されている。このような残存 DNA などの選択的な分解に対して本方法は有効であると考えられる。

### 3) 化学的方法

酸塩基溶液、低張液、高張液、EDTA、EGTA、界面活性剤などを用いる方法がある。酸塩基は細胞成分を可溶化し核酸の分裂やタンパク質の変性を引き起こす傾向にある。低張液・高張液は浸透圧により細胞を破壊し可溶化することでタンパク質と核酸の相互作用を断ち切る効果を有するが、細胞成分残渣物の洗浄には効果的ではない。非イオン性界面活性剤はタンパク質相互作用を脆弱化し可溶化を行い、グリコサミノグリカン（GAG）を少なからず除去する。イオン性界面活性剤はタンパク質を変性する可能性が高く、非イオン

性界面活性剤以上に GAG の除去能が高い。最後に両イオン性界面活性剤はアニオン・カチオン界面活性剤の性質を併せ持つものである。化学的方法は、肺や肝臓や心臓などの比較的強度の低い組織や臓器に用いられる。また、一種類の溶液や特定の濃度で行うことは稀であり、数種類の溶液を用いる方法や、一種類の溶液でも異なる濃度で段階的に脱細胞化を行う方法も少なくない。これは、それぞれの溶液の有する効果を組み合わせるなど、欠点を補うことを目的としている。

本研究では、脱細胞化した臓器に対して血管構造を足場とした血管網の構造と、肝細胞を維持するための空間の維持を期待している。そのため、細胞を抜き去りながらも細胞外マトリックスの保持が最も期待できる界面活性剤による脱細胞化手法を用いている。以下に界面活性剤による脱細胞化法について述べる。

#### 2.4.2 界面活性剤による脱細胞化

生体膜の基本構造は脂質二重層だが、肝機能の多くはタンパク質が担っている。膜タンパクには様々な種類があるが、脂質二重層を貫通して、両端が膜の両側に突出しているものが多い。このような膜貫通タンパクは二重層を構成する脂質と同じく両親媒性であって、疎水性領域と親水性領域がある。膜を通過する部分が疎水性で、二重層内の脂質分子の疎水性尾部と相互作用をしている。親水性領域は膜の片側、あるいは両側に突き出して水と接している。

一般に膜貫通型タンパク（および膜にしっかりと結合しているタンパク質の一部）は、疎水結合を壊し二重膜を破壊するような試薬でしか可溶化できない。この種の代表的な試薬として知られているのが界面活性剤である。

界面活性剤とは、界面活性すなわち少量で界面または表面の諸性質を変化させる性質を有する物質である。化学構造的には分子内に親水性原子団と疎水性原子団を持つ両親媒性の低分子物質で、水中ではミセルを作りやすい。膜に界面活性剤を作用させるとその疎水性末端が膜タンパクの疎水性部分に結合し、脂質分子と置き換わる。界面活性剤のもう一方の端は極性なので、膜タンパクは界面活性剤とタンパク質の複合体となって水中に溶出する（膜タンパクに固く結合した脂質分子はそのままのこともある）。以下、脱細胞化肝臓を用いた肝グラフトの構築においてよく用いられる界面活性剤である、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）および Triton X-100 について述べる。

## 1) SDS [47]

ドデシル硫酸ナトリウムは生化学の分野において、最も頻繁に用いられる界面活性剤である。直鎖状のドデシルアルコールの硫酸半エステルのナトリウム塩である  $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+)$  (Fig. 2-6)。やし油から得られる高級アルコールを分留して得られるドデシルアルコールを硫酸化して製造する。強力な陰イオン性界面活性剤で、タンパク質に対してきわめて高い親和性を持ち、同重量以上のドデシル硫酸ナトリウムが結合してタンパク質を変性させる。タンパク質内部にある”疎水性の芯”に結合して膜タンパクの立体構造をほどくため、膜タンパクの活性は失われる。この変性したタンパク質は分離分析の試料として好適である(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)ほか、精製しやすいため、変性したもののから界面活性剤を除去すれば機能が戻ることもある。

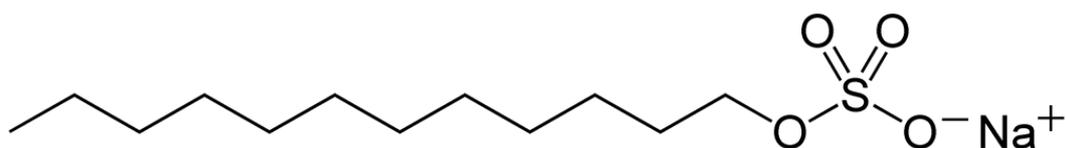


Fig. 2-6 Structural fomula of SDS.

## 2) Triton X-100 [47]

非イオン性界面活性剤の一種でポリオキシエチレン *p-t*-オクチルフェニルエーテル類の商品の一つ。比較的弱い界面活性剤で膜タンパクの膜横断部分に結合する。可溶化後、バイオビーズ SM-2 (Bio-Beads SM-2) などによって精製が可能であり、完全ではないにしても機能の正常なものを得ることもでき、再構成膜調製にも使われる。

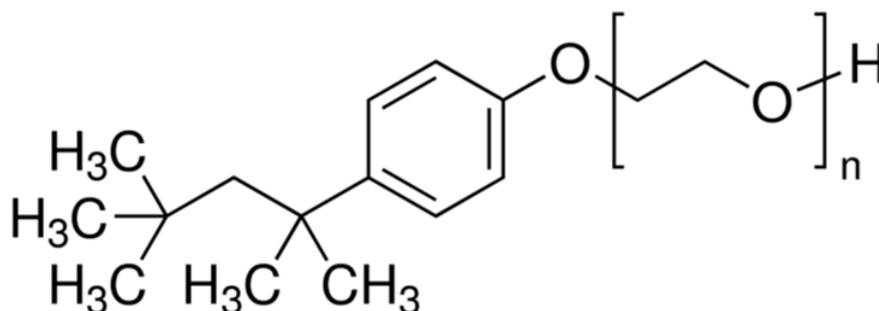


Fig. 2-7 Structural formula of Triton X-100.

## 2.4.3 脱細胞化肝臓を用いた既往の報告

脱細胞化については、血管や角膜、心臓の弁等で活発に研究が進められているが、肝臓などの代謝系の臓器についての研究を行っているグループは少ない。以下に他グループの研究を紹介する。

## 1) Uygun K らのグループ [48] [49] [50]

最近、脱細胞化肝臓が注目されるきっかけとなったのが、2010 年に Nature Medicine に発表された彼らの論文と考えられる。ラットの肝臓を凍結後、0.01、0.1、1%と徐々に SDS 濃度を上げた溶液を各 1 日ずつ流し、その後、1% Triton X-100 溶液を 30 分流して脱細胞化肝臓を取得した後、門脈から肝細胞を播種し、再細胞化を行っている。*in vitro* での灌流培養においてアルブミンや尿素の合成が確認されており、また、腎動脈と腎静脈に 8 時間接続している。その後、再細胞化の播種方法の最適化や、ブタにおける脱細胞化についても報告している。

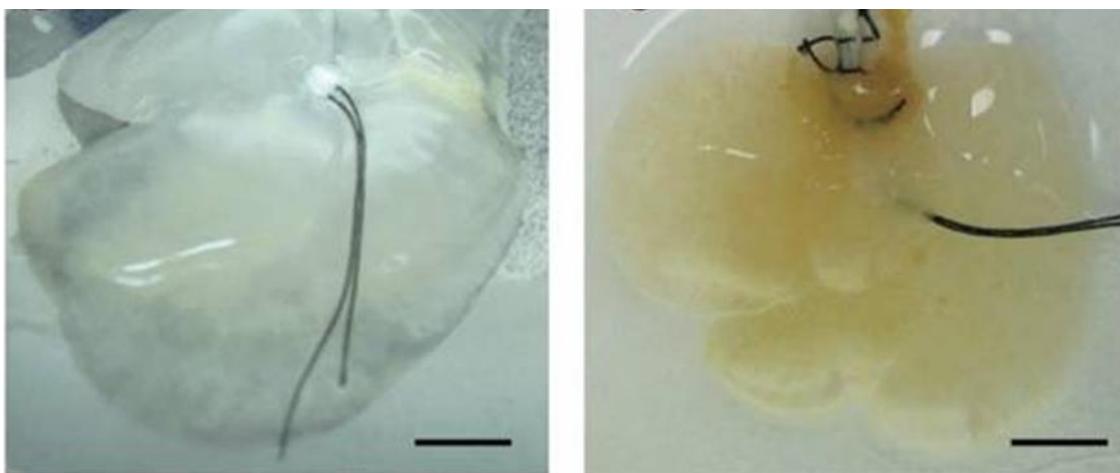


Fig. 2-8 Decellularized whole liver matrix (left) and same liver after recellularization with about 50 million hepatocytes (right). [48]

2) Baptista PM らのグループ [51] [52]

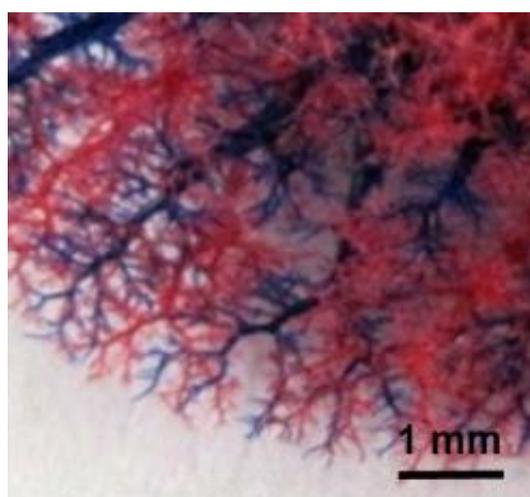
彼らは主にフェレットを用いて研究を行っている。使用している界面活性剤は 1% Triton X-100 溶液であり、内臓全般においても検討している。スキャフォールドとしての培養や、流速測定、応力試験、そしてバイオリアクターとしての応用などを報告している。

3) Bao J らのグループ [53]

Bao らは血栓形成防止のためのヘパリンを導入した脱細胞化肝臓を用いて再細胞化肝臓を作製し、90%肝切除モデルの門脈に移植し、移植 3 日後においても細胞が生存していたことを報告している。しかしながら、消化管のうっ血や腹水も確認されており、門脈圧亢進症を併発していることも示唆されている。

4) 本研究グループ [54] [5]

本研究室においては、4%Triton X-100 溶液を灌流することで脱細胞化肝臓を取得した。本研究室で開発された脱細胞化肝臓は血管間隔 1 mm 以下の非常に精緻な血管構造を保持しており肝グラフト構築のための鋳型として非常に有用であることが示唆されている。更に本鋳型に対して血管内皮細胞の播種に成功し、初代肝細胞の播種によってアルブミン合成能も確認された。



**Fig. 2-9 The cast of the tubular structure in decellularized liver. Red and blue resins were injected via the portal vein and hepatic vein, respectively. [5]**

以上のように、脱細胞化肝臓を用いた移植用肝グラフトの構築の可能性は既に示されており、今後は更なる最適化を進め、移植によって真に肝不全患者を救命できるグラフトの構築を目指さなければならない。

既往の研究では構築された再細胞化肝臓のほとんどが *in vitro* で評価されている。しかしながら、肝不全からの救命のための指標は未だ不明であり、*in vitro* では再細胞化肝臓の救命効果を評価することは不可能である。従って、実際に肝不全動物に対して再細胞化肝臓を適用し、有効性を評価しなければならない。一部の研究者は動物に対する移植評価も行っている。しかしながら、構築した再細胞化肝臓の内皮化の不完全さによって血液の漏洩や血液凝固といった問題が起こり、満足に評価ができていない。以上のように、現状の *in vitro* 評価系と最終目標である移植評価との乖離が大きいが故に再細胞化肝臓の有効性評価が実現できていない。つまり、肝不全動物を用いた新たな評価系を開発し、再細胞化肝臓の有効性を評価する必要があると考えられる。また、このような評価系が実現できれば、評価で得られた情報を基に再細胞化肝臓の最適化が可能となり、臨床において真に有用なパワーを有する移植用肝グラフトが実現可能になると思われる。

## 第3章 肝不全ラットモデルの開発

### 3.1 本章の目的および概要

肝不全の詳細な発症機序や救命の為に改善すべき項目の指標は未だに明らかになっていないため、構築したグラフトの治療効果を評価するためには、肝不全動物に適用することが必要となる。そこで本章では、再細胞化肝臓の有効性評価に適した肝不全動物モデルの開発を目指した。本研究においては、小型動物であり取り扱いが比較的容易であることからラットを用いた検討を行った。

第2章で述べたように、肝不全モデル動物の作製法は様々であり、実験の目的に沿ったモデルを用いなければならない。本研究における肝不全ラットモデルの使用用途は、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性の評価である。従って、個体差が小さく再現良く作製できること、性能評価のために重篤度を制御できること、肝臓以外の全身障害を極力併発しないことが最低限求められる。

本章では、上記のような条件を満たす肝不全ラットモデルの開発を目的とした。

## 3.2 既往の報告に基づく肝不全ラットの作製

### 3.2.1 本節の目的

第2章で述べたように、薬物によって肝不全を誘導した肝不全モデルは再現性が低い[55]。そこで本研究では、本研究室での既往の報告[16]を基に、急性肝不全のモデルとなる温虚血肝不全ラットに対して部分肝切除を行うことによって個体差を低減したモデルの開発を行った。加えて、本モデルは既往の報告において、温虚血時間によって重篤度の制御が可能であると報告されている。従って、本研究を遂行するにあたり、適した肝不全ラットモデルであると考えられる。

### 3.2.2 実験方法

基本的な作製方法は既往の報告[16]に準ずる。ラットに対して麻酔をかけた後に開腹し、左葉および中葉の切除を行い、続いて門脈および肝動脈の血流を遮断することによって肝障害を惹起させる(Fig. 3-1)。本手法によって肝臓は虚血再灌流障害を受け、本障害によって肝機能が低下するものと考えられる。以下に、詳細な実験手順を示す。

8週齢の雄のWistarラット(Kyudo, Saga, Japan)に対してイソフルラン(Pfizer Japan, Tokyo, Japan)で吸入麻酔をかけた。術前の血中成分の測定のために26G針付きシリンジ(Terumo, Tokyo, Japan)を用いて尾静脈より採血を行った。続いて、腹部をバリカンで剃毛し、70%エタノールおよびイソジンで術部の滅菌を行った。正中線に沿ってI字に開腹し、小腸および大腸を体外に出し、ガーゼで覆った。この際、乾燥を防ぐために生理食塩水で適宜濡らしておいた。中葉および左葉を5-0の縫合糸で根元から結紮し切除した。今回の手法による残存肝はおよそ全肝の26%であると思われる。門脈および肝動脈を血管用ブルドック鉗子でクランプし、30分の温虚血を行った。虚血終了後、内臓を元の位置に戻し、開腹部を縫合した。経過観察時に適宜尾静脈より採血し、術後の血中成分の測定用の血液サンプルを採取した。採取した血液サンプルはアンモニアテストワコー(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)を用いて血中アンモニア濃度を測定した。

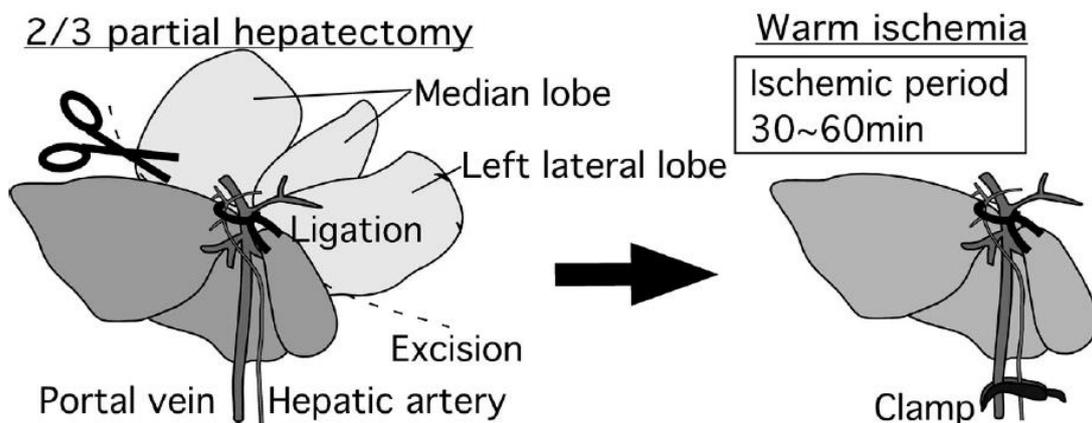


Fig. 3-1 Procedure of previous hepatic failure rat model [16].

### 3.2.3 結果

既往の研究に基づき、中葉・左葉を切除後に30分の温虚血を行い、肝不全ラットを作製した。しかし、術前のアンモニア濃度が0.15 mMであったのに対し術後の血中アンモニア濃度は術後45分において0.15 mM、術後24時間後において0.12 mMとなり、上昇は確認されず、肝不全が誘導できていないことが示唆された (Fig. 3-2)。また、術後のラットの生存も確認された。

一方で虚血中に、腸がうっ血している様子が確認された (Fig. 3-3)。これは門脈の血流を完全に遮断してしまっているため門脈圧亢進症を引き起こしたためであると考えられる。

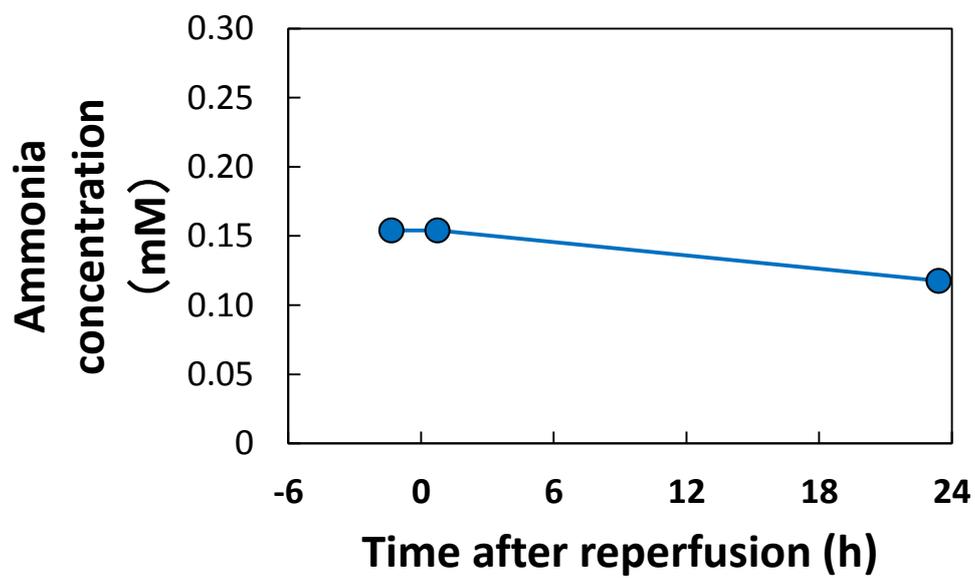


Fig. 3-2 Ammonia concentration in the blood of 30-min ischemia rat model.



Fig. 3-3 Photograph of intestine of 30-min hepatic failure rat model during warm ischemia.

### 3.2.4 考察

既往の報告 [16]に基づき、温虚血と部分肝切除による肝不全ラットモデルを開発したが、手術前後での血中アンモニア濃度がほとんど変化しなかったことから肝不全の誘導ができていないと考えられる。1例のみであるため、個体差による影響である可能性もあるが、本来このような極端な個体差が存在する肝不全ラットモデルは本研究において不適であると思われる。

一方で、温虚血中において腸の重度のうっ血が確認されている。腸に対して流れ込んだ血液は、門脈に合流し肝臓へと向かう。本手法においては、門脈及び肝動脈がクランプされ、血流が完全に遮断されるため、温虚血中は門脈圧が著しく亢進する。門脈圧が亢進すると、行き場を失った血液が迂回路を形成しようとし、異常な場所に血管流路が形成される。また、血液が肝臓を迂回し体循環へと戻っていくため、解毒されていない血液が全身を巡り、多臓器不全を引き起こす危険性があると考えられる。従って、虚血時間の延長に伴い肝臓以外の臓器にも障害が及ぶ可能性が潜在的に危惧され、本研究の目的に対し不適であると考えられる。

従って、再細胞化肝臓の評価に適した新たな肝不全モデルを開発する必要があることが示唆された。

### 3.2.5 本節のまとめ

既往の研究に基づき、中葉および左葉を切除し門脈と肝動脈を鉗子でクランプすることによって肝不全ラットを作製したが、血中アンモニア濃度の上昇は確認されなかった。また、腸が激しくうっ血している様子が確認され、門脈圧亢進症による全身状態の悪化が懸念された。

### 3.3 新規肝不全ラットモデルの開発および評価

#### 3.3.1 本節の目的

既往の研究に基づき肝不全ラットの作製を行ったが、門脈・肝動脈を完全にクランプするため、門脈圧亢進症の併発による全身障害が危惧された。つまり、既往の肝不全ラットモデルは再細胞化肝臓の評価に不適であると考えられた。そこで本節では、再細胞化肝臓の評価に適した新たな肝不全ラットモデルの開発を目的とした。

今回の本研究の目的の達成のために肝不全ラットモデルに要求される項目を以下に述べる。

#### 1) 重篤度が制御可能であること

様々な重篤度の肝不全ラットモデルに対し再細胞化肝臓を適用することによって、どの重篤度の肝不全まで救命が可能か検討することが可能となる。

#### 2) 再現性が良いこと

肝不全ラットモデルの再現性は、評価の信頼性や動物実験数の低減に直結する。

#### 3) 肝臓のみが障害を受けていること

肝臓以外の他臓器への障害を惹起するような作製法である場合、評価結果に他臓器の障害の影響が加味されるため、今回の目的に不適である。

上記の項目を満たすために、薬物誘導型の肝不全ラットモデルは、再現性が低いことや副作用による他臓器への影響が懸念され 2) および 3) の条件を満たしておらず不適であると考え、外科的手法を用いた肝不全ラットモデルの開発を目指した。また、外科的手法の中でも門脈-下大静脈短絡経路造設モデルは、アンモニア等の有害物質を含んだ血液が全身に循環することによって多臓器不全を誘発するものであり、肝細胞に障害はほとんどないと言われている。従って、再細胞化肝臓の有効性を評価するための肝不全ラットモデルとして不適であると思われる。従って、温虚血と部分肝切除を組み合わせた肝不全ラットモデルが適切であると考えられる。

80%部分肝切除後においても生存が可能と言われていることから、今回は 80%部分肝切除を行い、残存肝に対しては虚血障害を加えることによって重篤度を制御するモデルの開

発を試みた。温虚血による障害を加える場合、全肝臓に対して虚血を加えるよりも一部の肝臓に対して虚血を加えた方が虚血による障害誤差が少なくなると思われる。

また、部分肝切除前に右葉のみを虚血し、虚血終了後に右葉以外の肝葉である中葉、左葉、尾状葉を切除することによって、虚血中も右葉以外の肝臓が機能し血流も維持されるため、虚血中の門脈圧亢進症の併発を防ぐことが可能である (Fig. 3-4)。

本節では、上記のような手法で肝不全ラットモデルの開発および評価を行った。

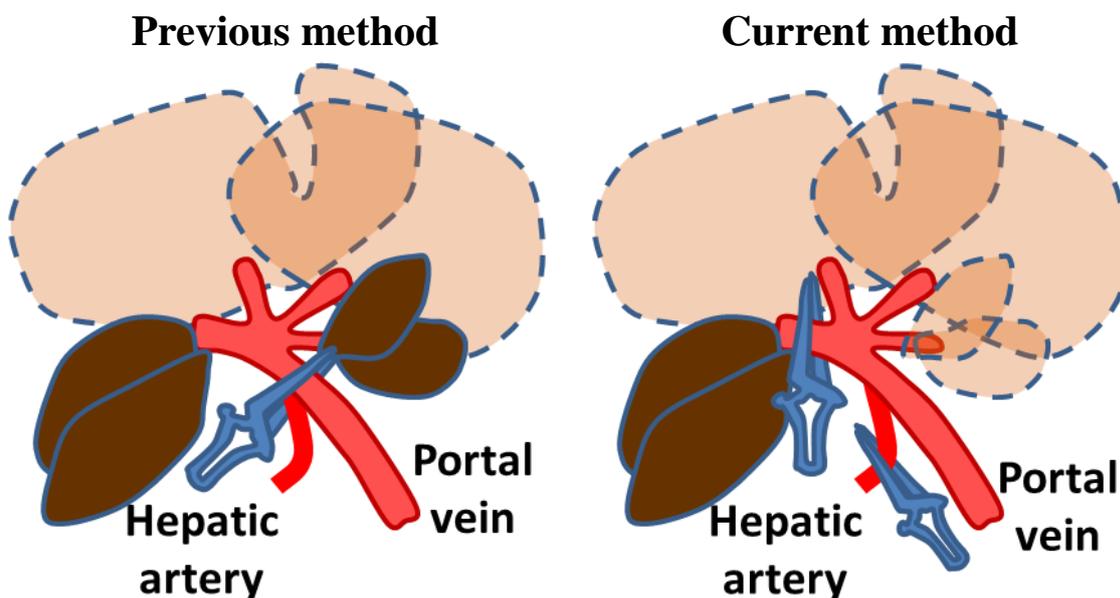


Fig. 3-4 Comparison of previous method and current method.

### 3.3.2 実験方法

本実験では、体重がおよそ 300 g の 8 週齢の雄の Sprague Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。ラットはイソフルラン (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) によって麻酔された。まず、肝臓の各葉 (中葉、右葉、左葉、尾状葉) を結紮および切除しそれぞれの肝重量を測定し、各葉の肝臓全体に対する割合を調査した。一方、肝不全モデル用のラットは麻酔後に正中切開によって開腹され、肝動脈および右葉へと通じる門脈をそれぞれブルドック鉗子を用いてクランプされ 30 分から 60 分温虚血が行われた。虚血終了後に中葉、左葉、尾状葉を結紮および切除し、腹部を縫合し閉腹した (Fig. 3-5)。採血は尾静脈および大腿静脈より適宜行った。術後 2 週間は経過観察を行い、生存率を評価した。

また、虚血 30、45、60 分モデルについては再灌流から 6 時間後に採血および肝臓のサンプリングを行い、プロトロンビン時間の測定 (Sysmex, Hyogo, Japan) に加えてヘマトキシリンおよびエオジン (H&E) 染色での肝臓の組織学的評価による壊死範囲の測定を行った。更に虚血 30 分モデルについては血中アンモニア濃度 (PocketChem BA:ARKRAY, Kyoto, Japan)、ALT、AST (DENKA SEIKEN, Tokyo, Japan)、の経時変化を測定した。詳細な実験手順を以下に示す。

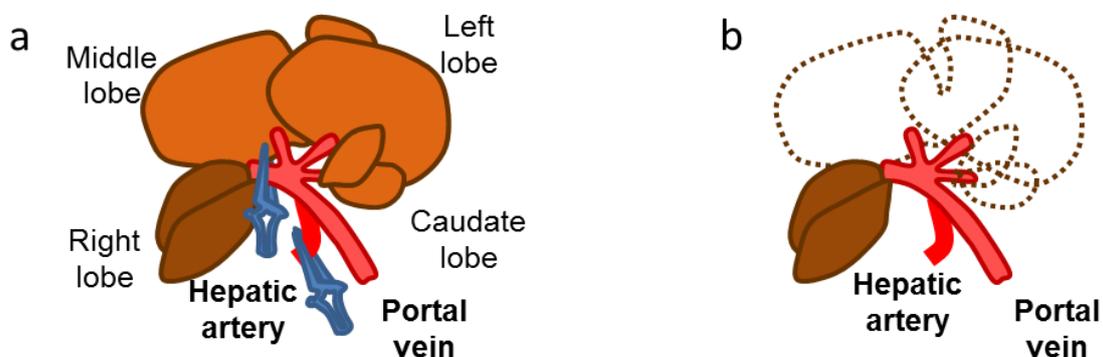
### 3.3.2.1 ラット肝重量測定

8 週齢の雄の Sprague Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) の体重測定を行った。続いて、ラットにイソフルラン (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) で吸入麻酔をかけた。腹部に 70%エタノールを噴霧し滅菌後、手術用はさみで腹部を正中切開した。中葉・左葉・右葉・尾状葉を、5-0 縫合糸を用いて結紮し、摘出した後、各葉をキムワイプで軽く拭きそれぞれ秤量した。

### 3.3.2.2 新規肝不全ラットモデルの作製

8 週齢の雄の Sprague Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) に対しイソフルラン (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) で吸入麻酔をかけた。術前の血液サンプルを採取するために 26G 針付きシリンジ (Terumo, Tokyo, Japan) を用いて尾静脈より採血を行った。腹部を剃毛し、70%エタノール、続いて 70%エタノール・イソジン混合溶液 (1:1) を噴霧し滅菌後、腹部を正中切開した。術野を確保するため小腸・大腸を体外に露出させ、生理食塩水を含ませたガーゼで包んでおいた。続いて、ピンセットを用いて肝動脈を単離し、ブルドック鉗子を用いてクランプした。更に門脈の右葉へ向かう部分をブルドック鉗子でクランプし温虚血を開始した (Fig. 3-5 a)。虚血終了後、すぐに中葉・左葉・尾状葉を結紮し切除した (Fig. 3-5 b)。小腸・大腸を元の位置に戻し、腹部を縫合した。少なくとも 2 週間の経過観察を行い、生存率を評価した。一部のラットは経時的に採血を行い、再灌流から 6 時間後に犠死させて右葉を摘出し、H&E 染色による組織学的評価を行った。採血された血液の血中成分評価を行った。タンパク合成能の指標としてプロトロンビン時間をトロンボチェック PT (Sysmex, Hyogo, Japan) を用いて測定した。また、肝障害に指標として ALT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ) および AST (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ) をそれぞれ GPT-JS および GOT-JS (Denka Seiken, Tokyo,

Japan) で測定した。さらに肝機能の指標として血中アンモニア濃度を PocketChem BA (ARKRAY, Kyoto, Japan) を用いて測定した。



**Fig. 3-5** The image of the hepatic failure procedure in rats. **a** Warm ischemia was performed by clamping the proper hepatic artery and the right portal vein via the right lobe. **b** Other liver lobes except the right lobe were resected after the end of warm ischemia.

### 3.3.3 結果と考察

#### 3.3.3.1 ラット肝重量測定

ラットの肝臓は大別すると、中葉、左葉、右葉、尾状葉に分かれており、まずラットの各葉の肝臓全体に占める割合を調査した。それぞれの葉の重量を測定し 3 匹の平均を算出したところ、中葉が  $4.4 \pm 0.32$  g、左葉が  $3.5 \pm 0.38$  g、尾状葉が  $0.72 \pm 0.16$  g、右葉が  $2.2 \pm 0.33$  g であった (Table 3-1)。また、その割合はそれぞれ中葉が 41%、左葉が 32%、尾状葉が 7%、右葉が 20% であった。従って、右葉以外を切除する場合の残存肝は約 20% であることが確認された。

**Table 3-1 The weight of each liver lobe and the ratio with respect to the whole liver. The weight of each lobe was measured and the ratio of each lobe was calculated after harvesting the liver from 3 rats.**

	Weight (g)					
	Rat	Middle lobe	Left lobe	Caudate lobe	Right lobe	Whole liver
1	320	4.058	3.322	0.553	1.955	9.888
2	325	4.455	3.263	0.745	1.985	10.448
3	320	4.697	3.944	0.860	2.536	12.037
Average	322	4.403	3.510	0.719	2.159	10.791
Standard deviation	2.9	0.323	0.377	0.155	0.327	1.110
Ratio		40.8%	32.5%	6.7%	20.0%	100%

### 3.3.3.2 新規肝不全ラットモデルの開発

生存率について着目すると、虚血 30 分モデルの生存率 100% (n=3) から虚血 60 分モデルの 0% (n=3) と変化し、虚血時間に伴った生存率の低下が確認された (Fig. 3-6)。さらに再灌流から 6 時間後の右葉をサンプリングし H&E 染色を行い、組織学的評価を行った。各モデルの典型的な部位を Fig. 3-7 に示す。虚血 30 分モデルについては、ほとんど壊死は確認されず壊死範囲は全体のおよそ  $1.11 \pm 0.39\%$  であった。対して虚血 45 分モデルでは  $8.37 \pm 5.20\%$ 、虚血 60 分モデルについては、 $20.89 \pm 2.43\%$  の範囲で壊死が観察され構造も崩壊していた (Fig. 3-8)。加えて虚血 30 分、虚血 45 分、虚血 60 分モデルを作製し、再灌流から 6 時間後の血液のプロトロンビン時間を測定したところ、肝不全前はいずれのモデルにおいても 15 秒弱であったのに対し、虚血 30 分モデルは約 18 秒、虚血 45 分モデルは約 20 秒、虚血 60 分モデルは約 28 秒に延長したことが確認された (Fig. 3-9)。検量線

を用いて、プロトロンビン時間を凝固活性に変換すると、虚血 30 分モデルはおよそ正常値の 50%、虚血 45 分モデルはおよそ 33%、虚血 60 分モデルはおよそ 20%となり、虚血時間の延長に伴って凝固活性が低下することが確認された。

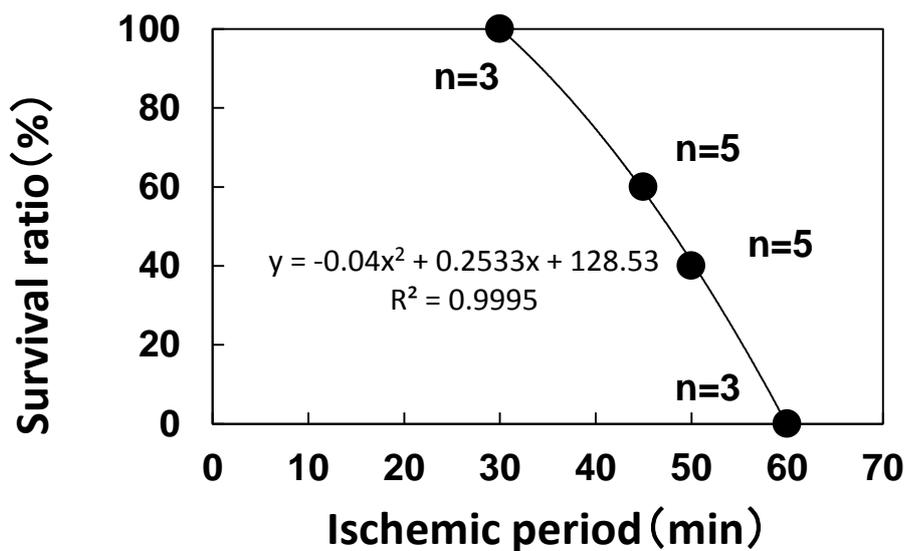


Fig. 3-6 The relation between the warm ischemic period and survival ratio in the developed HF rat model (n indicates the number of rats used in each condition).

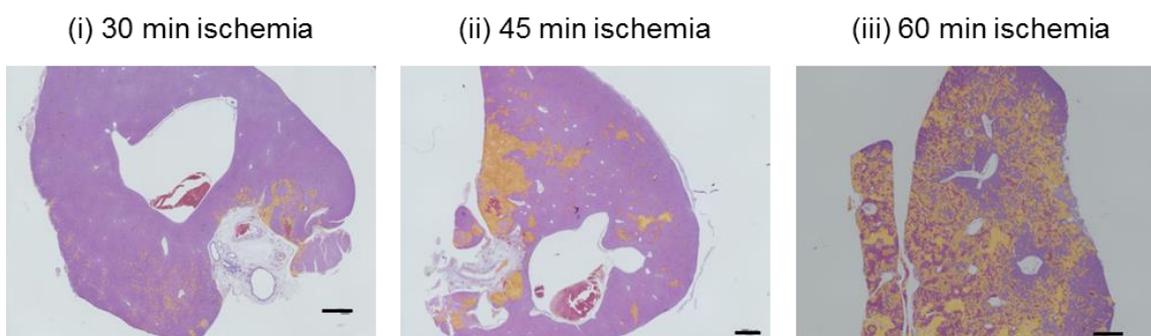


Fig. 3-7 H&E staining of the liver in the HF rat model. (i) 30-min ischemia, (ii) 45-min ischemia, and (iii) 60-min ischemia at 6 h after the end of warm ischemia. Bars: 1 mm. Necrotic area is shown in yellow.

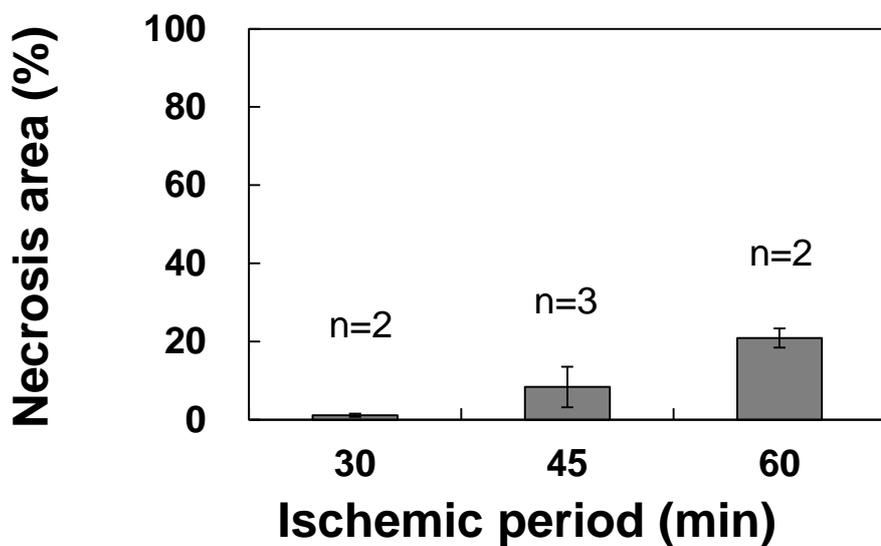


Fig. 3-8 Liver necrosis area of the 30, 45, and 60-min ischemia rat model at 6 h after the end of warm ischemia. (n indicates the number of rats used in each condition)

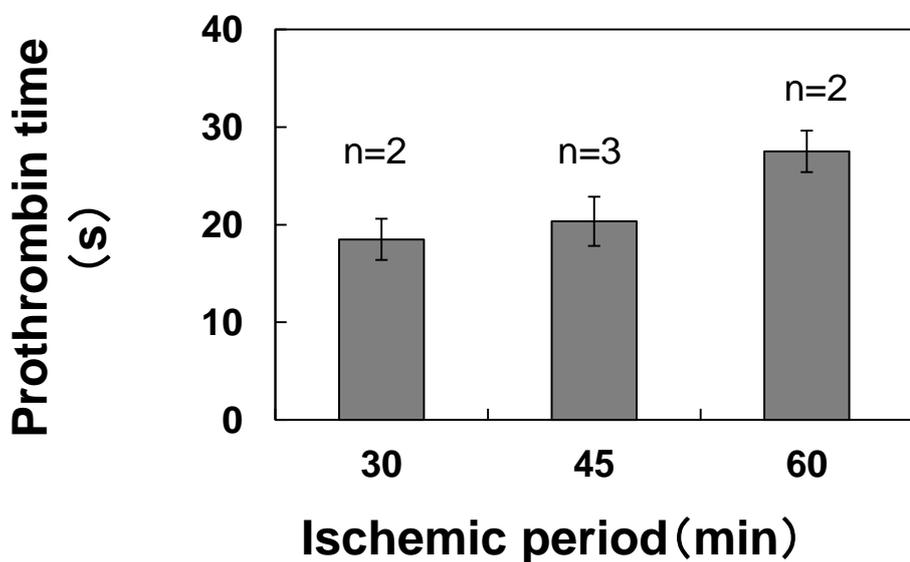


Fig. 3-9 Prothrombin time of 30, 45, and 60-min ischemia rat models at 6 h after the end of warm ischemia. (n indicates the number of rats used in each condition)

一方、術後の血中成分の経時変化を測定するために虚血 30 分モデルにおいて術後から経時的に採血を行い、血中成分を評価した。トランスアミナーゼについては、ALT、AST ともに再灌流からの経時的な上昇が確認され、正常値を大きく上回る値を示した (Fig. 3-10)。また、血中アンモニア濃度については、再灌流からの経時的な上昇が確認され、再灌流から 6 時間後には肝性昏睡発症レベル [56]とされている  $100 \mu\text{M}$  まで上昇していることが確認された (Fig. 3-11)。また特筆すべきことに、血中成分の推移における個体差が非常に小さく、術後からわずか 6 時間で再現良く肝不全が誘導できていることが示唆された。まとめると、個体差がきわめて少なく、かつ虚血時間により応じた重篤度の制御が可能な肝不全ラットモデルの作出に成功した。

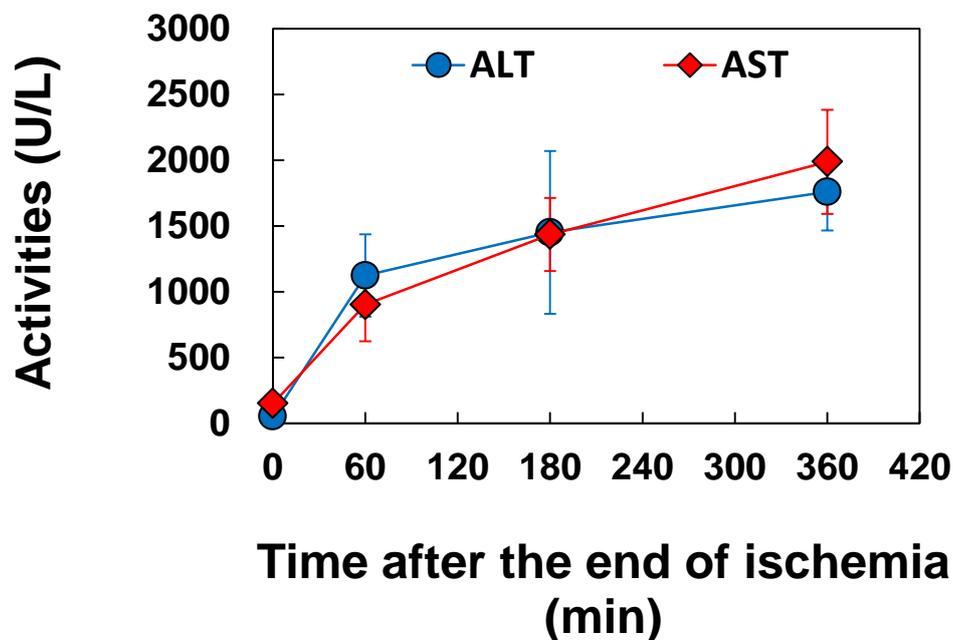


Fig. 3-10 ALT and AST activities in blood of 30-min ischemia rat model at 1, 3, and 6 h after the end of warm ischemia. The value at 0 min indicates ALT and AST activities of the rat before HF operation ( $n = 3$ ). Blue circle: ALT, red diamond: AST.

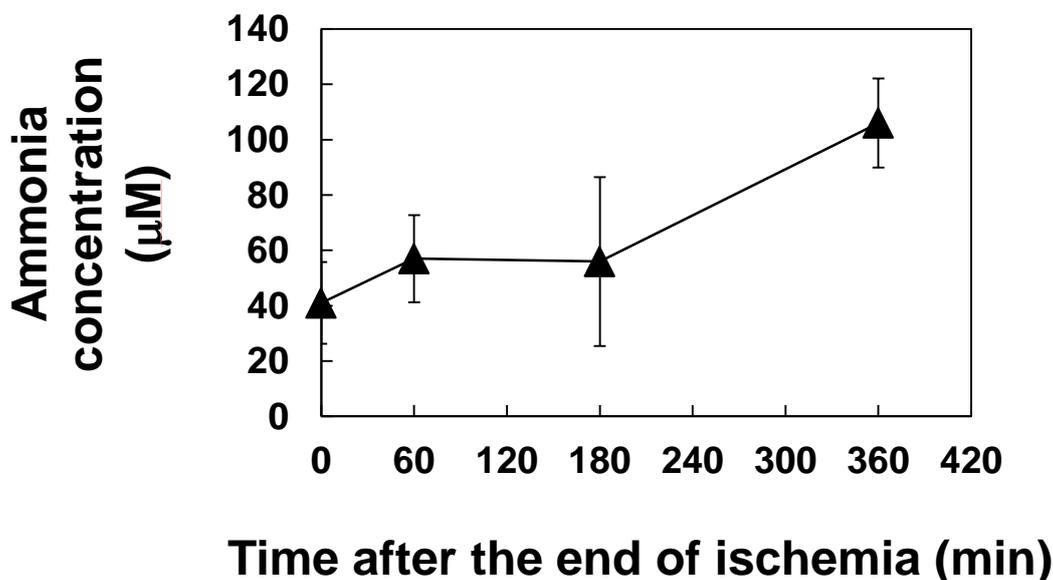


Fig. 3-11 Ammonia concentration in the blood of 30-min ischemia rat model at 1, 3, and 6 h after the end of warm ischemia (n = 3). The value at 0 min indicates the ammonia concentration before the HF operation.

#### 3.3.4 考察

本節では、再細胞化肝臓の有効性評価に適した肝不全ラットモデルの開発を行った。今回のモデルの残存肝は全肝のおよそ 20%である。つまり、この 20%の残存肝に対して温虚血中の酸素枯渇による壊死および再灌流後の虚血再灌流障害を付与し、肝不全を惹起しているのが今回のモデルである。壊死範囲の結果を用いると、生存率 100%の虚血 30 分モデルでは生存している肝細胞の全肝に対する割合は 20%であり、生存率 60%の虚血 45 分モデルでは 18%、生存率 0%の虚血 60 分モデルではおよそ 15%であると推察される。本モデルは温虚血時間の延長に伴って、肝細胞の壊死範囲が増大した。この肝細胞の壊死範囲の増大によって、肝特異的機能の一つである血液凝固活性が低下したと考えられる。以上のように壊死範囲の増大によって肝機能が低下し、それに伴い生存率が低下したと考えられる。また、虚血 30 分モデルの生存率は 100%であったが、血液凝固活性は正常血漿の 50%であった。肝障害の重篤度の目安となる Child-Pugh(チャイルド・ピュー)分類において、血液凝固活性 50%は移植の適用となるような極めて重篤な肝不全と診断される。つまり、

ヒトとラットは動物種が違うため一概には言えないものの、今回作製したモデルは虚血 30 分から 60 分のどのモデルにおいても移植の適用となるような重篤なモデルである事が示唆されている。

以下に、他の肝不全動物モデルとの差異について考察する。既往の肝不全ラットモデル [16] を作製した際には手術前後の血中アンモニア濃度の上昇が確認されなかったが、本節での手法によって作製された肝不全ラットモデルは、経時的な上昇が確認された。また、本手法は温虚血中の門脈流を確保でき、温虚血中の腸のうっ血も確認されなかった (Fig. 3-12)。従って、全身障害の併発を防止できたことが期待された。以上より、以前の肝不全ラットモデルの改善に成功したと考えられる。一方で、トランスアミナーゼに着目すると、ALT および AST がほとんど同じ挙動を示していた。ALT は肝特異的酵素であり、AST は肝臓のみならず心臓や骨格筋、腎臓および脳などに幅広く存在している。つまり、AST が ALT と比較して大幅に上昇している場合は肝障害よりも他の臓器の障害が重篤であることを意味する。予備実験において、ラット初代肝細胞中の ALT および AST 活性はほぼ同等であることが確認されており (Fig. 3-13)、今回の結果は ALT と AST の値がほぼ同等であることから、肝臓以外の臓器に対する障害はほとんどなく、肝臓のみに対して障害を与えることに成功したことが示唆された。

また、他の外科的手法によるモデルとして 95%肝切除によって肝不全を誘導したモデル [21] においては、術後の ALT 活性は  $2676 \pm 872$  U/L と誤差はおよそ 33%であるものの、本検討における術後の ALT 活性は  $1759 \pm 294$  U/L と誤差はおよそ 17%であり、本肝不全ラットモデルは他の肝不全ラットモデルと比較しても非常に再現性が良いことが示唆されている (Fig. 3-14)。

更に、本モデルは虚血 30 分モデルにおいて、術後わずか 6 時間で肝性昏睡発症ライン [56] と報告されている  $100 \mu\text{M}$  を超えており、短時間で肝不全を誘導可能であることが示唆されている。参考までに、アセトアミノフェンや D-ガラクトサミンを用いた薬物投与による肝不全モデルにおいては、作製まで少なくとも 12 時間以上 [57] を要している。短時間で肝不全が誘導可能である場合、個体差の低減や、実験労力の低減等がメリットとして挙げられる。

以上より、本肝不全ラットモデルは重篤度が制御可能であり、既往の報告と比較しても個体差が少なく、再現性の高い有用なモデルであると考えられる。

本モデルは、肝細胞障害に起因する急性肝不全のモデルであると考えられ、慢性肝不全

や肝硬変、肝がん等のすべての実験に用いることができるような万能な肝不全モデルではない。しかしながら、本肝不全ラットモデルは本検討のみならず、急性肝不全モデルを用いることが適切である実験系（人工肝臓の救命効果の評価など）においても応用が可能であると考えられる。

一方で本モデルを更に特徴づけるためには、排泄系の機能としての胆汁酸やビリルビン、肝性昏睡の程度の指標としてラットの意識状態の評価等、更なる病態の評価が必要となると考えられる。



**Fig. 3-12** Photograph of intestine of new 30-min hepatic failure rat model during warm ischemia.

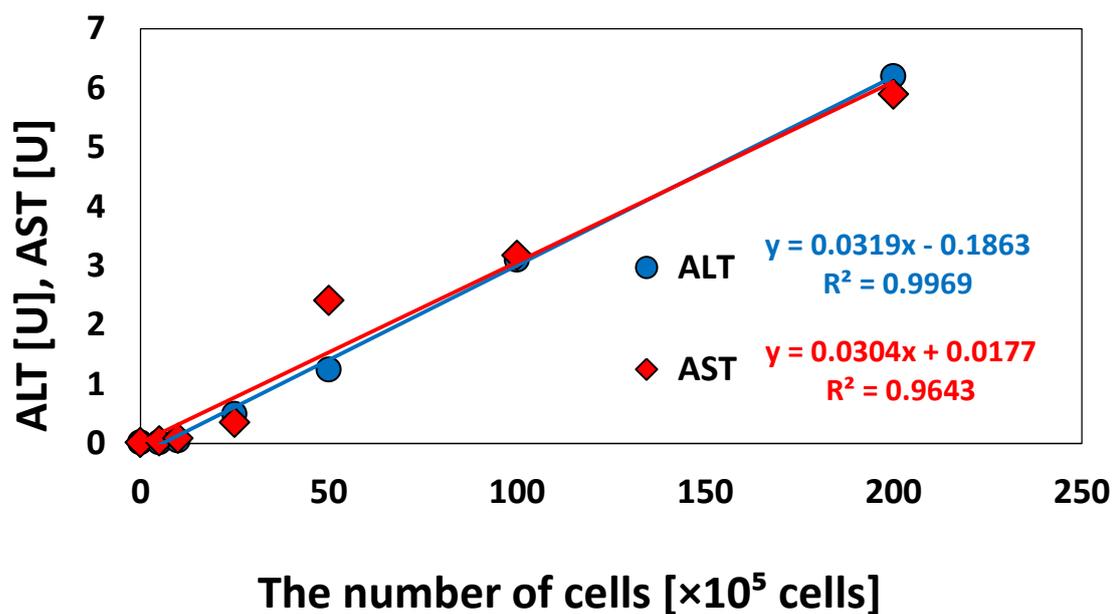


Fig. 3-13 Relationships between ALT and the number of hepatocytes (blue circle) and between AST and the number of hepatocytes (red diamond).

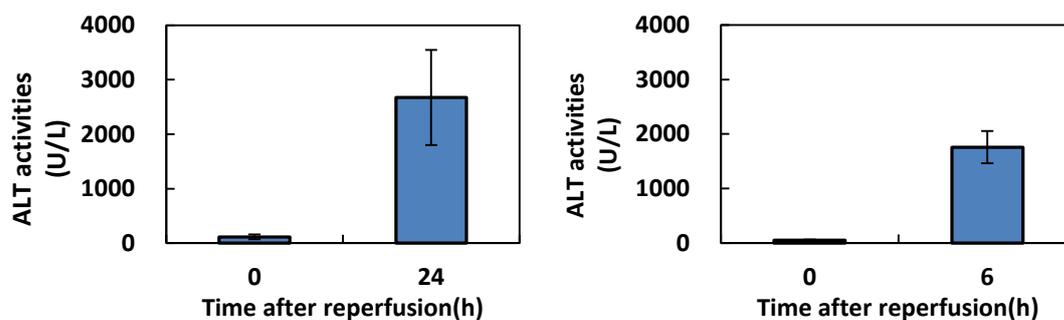


Fig. 3-14 ALT activities in the blood of the past hepatic failure rat model (left) [15] and this hepatic failure rat model (right).

### 3.3.5 本節のまとめ

本肝不全ラットモデルは温虚血時間 30 分～60 分と操作することで生存率はそれぞれ 100%～0%となった。更に虚血時間の延長に伴って、本モデルの肝壊死範囲の増大および肝臓のタンパク合成能の指標である血液凝固活性の低下が確認された。一方、血中アンモニア濃度、ALT、AST の経時変化の結果より、わずか 6 時間で肝不全を誘導可能であり、個体間のばらつきも小さいことが確認された。

以上より、温虚血と部分肝切除を組み合わせることにより、温虚血時間によって重篤度が制御可能かつ再現性の高い肝不全ラットモデルの開発に成功した。

### 3.4 本章のまとめ

- 既往の報告に基づき温虚血と部分肝切除を組み合わせた肝不全ラットモデルを作製したが、循環障害の併発が危惧され、本研究には不適であると示唆された。
- 温虚血中の血流を確保し再灌流後に部分肝切除を組み合わせることで、重篤度が制御可能かつ再現性の高い肝不全ラットモデルの開発に成功した。
- 本肝不全ラットモデルは上記の特徴を有しているため、再細胞化肝臓の有効性評価に非常に適していると期待された。

## 第4章 再細胞化肝臓の有効性評価

### 4.1 本章の目的および概要

第3章では、再細胞化肝臓の有効性を評価するための肝不全ラットモデルを開発した。本章では本肝不全ラットモデルに対して再細胞化肝臓を適用することで、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性を評価することを目的とした。

再細胞化肝臓は最終的には移植による肝不全患者の救命を目指すものであるため、理想的には同所移植による評価を行うべきである。再細胞化肝臓の移植評価が数例報告されているが [48] [50] [53]、現状として再細胞化肝臓からの血液の漏洩や血栓の形成といった問題が解決されておらず、満足に評価できていない。従って、未だに肝不全患者の救命の為に必要な細胞数等の指標が得られておらず、再細胞化肝臓の開発指針が不明瞭なままである。本研究では、以上のような現状が再細胞化肝臓の最適設計を阻害している原因であると考え、再細胞化肝臓の新たな性能評価系の開発を目指した。

## 4.2 血液灌流による再細胞化肝臓の *in vitro* 評価

### 4.2.1 本節の目的

第3章において、再細胞化肝臓の有効性評価のために肝不全動物に適用する適用することの必要性を述べた。しかしながら、*in vitro*において肝機能を確認することなく再細胞化肝臓を肝不全動物に適用することは動物愛護の観点からも好ましくない。そこで本節では、再細胞化肝臓が肝不全動物に適用するに値する肝機能を有しているか評価することを目的とした。

### 4.2.2 実験方法

#### 4.2.2.1 ラット初代肝細胞採取

実験には6-8週齢の雄性 Wistar もしくは Sprague Dawley ラットより、Seglen 法 [58] を改変した中村らの方法 [59] を参考に2段階コラゲナーゼ灌流法により採取した肝実質細胞、肝非実質細胞を用いた。この方法は前灌流液により肝臓内の脱血を行い、コラゲナーゼ溶液により肝細胞の足場であるコラーゲンを主成分とする ECM を消化し、肝細胞を単離する方法である。両溶液の組成は Table 4-1 に示す。

前灌流液には GEDTA (同仁化学,熊本) を添加している。これは、GEDTA が細胞結合に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  とキレートを形成するという性質を利用するためであり、これを除去することにより肝細胞間の結合を弱めることが目的である。また前灌流液によって肝臓内の脱血を行い赤血球、白血球、血小板をはじめとする血液成分を除去し、コラゲナーゼによる ECM 消化を効率的に行う役割もある。

コラゲナーゼは肝細胞間の結合に重要なコラーゲンを消化するために用いた。また別種のタンパク質消化酵素であるトリプシンの活性を抑えるためにトリプシンインヒビターを用いた。トリプシンインヒビターは常温で溶液状態では失活しやすく、それによって生存率は大きく低下すると言われている。

これらの溶液は調製後、 $\text{pH} = 7.4$  にしてから孔径  $0.22 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌を行い、 $4^\circ\text{C}$  で保存した。長期保存によるコラゲナーゼおよびトリプシンインヒビターの失活を防ぐため、コラゲナーゼ溶液は調製後1-2日で肝細胞採取に用いた。また、使用時には液温を酵素活性の至適温度である  $37^\circ\text{C}$  とした。

また、培養に用いた血液の希釈に D-HDM 培地を用いた。これは、基礎培地として

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Low-Glucose (1000 mg/L)) を用い、これに肝機能発現・維持に効果的であると言われている成分 (EGF、インスリン、L-プロリン、ヒドロコルチゾン) を添加したものである [60]。Table 4-2 に D-HDM の組成を示す。D-HDM の成分のうち、リノール酸は難水溶性であるため 50 mg-Linoleic acid/600  $\mu$ L-Ethanol となるようにエタノールに溶解後、培地に添加した。さらに 3500 mg/L の Glucose を添加し 4500 mg-Glucose/L-medium となるように調製した。それぞれの培地は孔径 0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターによって濾過滅菌を行い 4°C で保存した。

**Table 4-1 Composition of pre-perfusion buffer and collagenase buffer.**

Component	Concentration [g/L]	
	Pre-perfusion buffer	Collagenase buffer
NaCl	8.00	8.00
KCl	0.40	0.40
CaCl <sub>2</sub>	–	0.56
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.078	0.078
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
NaHCO <sub>3</sub>	0.35	0.35
GEDTA	0.19	–
Glucose	0.90	–
Penicillin	0.0588	0.0588
Streptomycin	0.10	0.10
Trypsin inhibitor	–	0.05
Collagenase Type I	–	0.50

Table 4-2 Composition of D-HDM.

Component	Concentration
D-HDM	10 [g/L]
Epidermal Growth Factor	50 [ $\mu$ g/L]
Insulin	10 [mg/L]
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1 [ $\mu$ M]
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	3 [ $\mu$ g/L]
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 [pM]
Linoleic acid	50 [mg/L]
Penicillin	58.8 [mg/L]
Streptomycin	100 [mg/L]
NaHCO <sub>3</sub>	1.05 [g/L]
HEPES	1.19 [g/L]
L-proline	60 [mg/L]
Hydrocortisone	7.5 [mg/L]

以下に、詳細な実験手順を示す。

実験に用いるラットの腹腔内に 0.30 - 0.40 mL のソムノペンチル(Kyoritsu-seiyaku, Tokyo, Japan)を注射して麻酔をかけた後、ラットを解剖台に固定して 70%エタノールを全身に噴霧し滅菌した。開腹し、腸を向かって右側に寄せ門脈を露出させ、門脈に縫合糸を 2 本かけて心臓側 1 本はループを作った。ループを作っていない方の糸を左手で引き寄せ、ループを通るように静脈留置カテーテル (Insyte, 18G; Becton Dickinson, U.S.A.) を門脈に挿入し、カテーテルの外装のみを肝臓の 2 mm ほど手前まで進め、縫合糸を縛ることで固定した (Fig. 4-1)。この際、門脈へカテーテルを挿入した後は先端に針を露出させないようにして血管の損傷を防ぐことに留意した。カテーテル固定後、前灌流液の流動を開始し、同時に開胸して心臓を切開、大静脈をはさみで半切し、溶液の流出を確認した。ペリスタリックポンプを用い、カテーテルを通じて前灌流液をポンプの最大流量で流し肝臓内の脱血を行った。肝臓が赤色から黄土色へと変化し脱血が完了した後、コラゲナーゼ溶液を灌

流した。灌流中はクレンメを用いて大静脈を挟み、コラゲナーゼ溶液が肝臓内に充分に行き渡るよう留意した。また肝臓内の液圧が上がりすぎるのを防ぐため2-3分おきにクレンメを解放した。20分程度コラゲナーゼ溶液を灌流し、視覚的、触覚的に肝臓内のECMが十分に消化されたことを確認し、門脈に挿入していたカテーテルを取り外し、肝臓を周辺組織から切り離した。コラゲナーゼ溶液の肝細胞への接触は最小限にし、ダメージによる生存率低下を防いだ。採取した肝臓を氷冷しておいたガラスシャーレに移し、クリーンベンチ内へ持ち込んだ。続いて、肝臓を基礎培地中に浮遊させた状態で一對のメスで細切した。得られた肝細胞懸濁液を孔径150  $\mu\text{m}$ 、45  $\mu\text{m}$  のステンレスメッシュで濾過し未消化の肝組織や周辺組織を除去した後、80 mL程の基礎培地に懸濁し(50 mL遠沈管2本)、低速遠心分離(40 $\times$ g (500 rpm), 2 min)を行った。肝実質細胞は非実質細胞よりも比重が大きいため、遠心分離後のペレットの大部分は肝実質細胞である。細胞ペレットの培地への再懸濁、遠心分離を2回行うことによりほぼ純粋な肝実質細胞ペレットを調製した。得られたペレットを30 mLの培養培地によって懸濁し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を10倍に希釈して細胞数計数および生細胞数計数を行った。生細胞数はトリパンプルー色素排除法により測定した。トリパンプルー溶液はPBSにトリパンプルーを3.0 g/Lとなるように溶解して調製した。

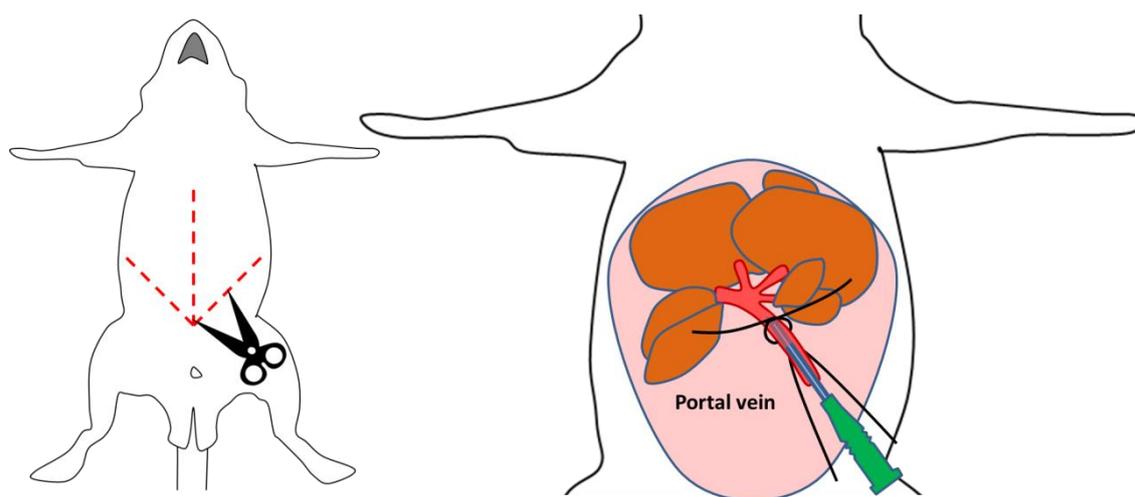


Fig. 4-1 The image of cannulation to the portal vein.

## 4.2.2.2 再細胞化肝臓の作製

本研究室での既往の報告 [54], [5]に基づき、再細胞化肝臓を作製した。ラットは 80%部分肝切除後においても生存することができると報告されている [15]。従って、本研究ではまず全肝の 20%の機能を有する再細胞化肝臓の構築を目指した。第 3 章での検討によって右葉の体積はおよそ肝臓全体の 20%であることが明らかとなっているため、本研究では右葉のみを使用し、再細胞化肝臓を作製した。

イソフルランで麻酔後に開腹し、前灌流液を門脈から灌流させ肝臓の脱血を行った後に右葉以外の肝切除を行った。肝臓の脱細胞化は既往の報告 [5]を簡略化したプロトコルで行った。具体的には、カルシウム・マグネシウムフリーの PBS (CMF-PBS) を溶媒とする 4%TritonX-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を右葉に対し 100 mL/h で 2 時間灌流することによって脱細胞化を行った。更に界面活性剤の除去のために CMF-PBS で洗浄を行い、脱細胞化肝臓を得た。再細胞化に用いる初代ラット肝細胞は 6~8 週齢の雄の Wistar ラットより 2 段階コラゲナーゼ灌流法 [59]で得た。再細胞化は既往の報告 [5]と同様に初代ラット肝細胞  $1 \times 10^7$  cells を 1 mL のコラーゲンゾルに懸濁し 26G の針 (Terumo, Tokyo, Japan) を有する注射器を用いて、周囲から脱細胞化肝臓に注入し、37°C で 30 分インキュベートすることによって行った。ネガティブコントロールとしては脱細胞肝臓に 1 mL のコラーゲンゾルのみ注入したグラフトを作製した。ポジティブコントロールとしては摘出直後の右葉をグラフトとして用いた。

以下に詳細な実験手順を示す。

肝摘出を行うラットの腹腔内に 0.30 - 0.40 mL のソムノペンチル (Kyoritsuuseiyaku, Tokyo, Japan) を注射して麻酔をかけた後、ラットを解剖台に固定して 70%エタノールを全身に噴霧し滅菌した。開腹し下大動脈より採血を行った。このときシリンジに 1000 U/mL ヘパリンナトリウム (Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 1 mL をあらかじめ入れておき、血液が凝固しないように留意した。門脈に 18G カニューレ (Becton Dickinson, U.S.A.) を挿入し 0.19 mg/mL GEDTA・抗生物質添加 CMF-PBS を流して脱血した。右葉以外の葉 (中葉・左葉・尾状葉) を結紮・切除した。門脈・肝静脈以外の血管・胆管等を結紮し、液が漏洩しないようにした。肝静脈に塩ビ製チューブ (Kawasumi Laboratories, Tokyo, Japan) を装着し、右葉を摘出した。表面からの灌流液の漏洩を防ぐために摘出した右葉をガーゼとボルヒール (Kaketsuken, Kumamoto, Japan) で表面をコーティングし

た(Fig. 4-2)。抗生物質添加 CMF-PBS に 4%Triton X-100 を溶かした溶液を流し、200 mL/h で約 1 h 脱細胞化を行った。抗生物質添加 CMF-PBS を流し、200 mL/min で約 1.5 h 洗浄を行った。 $10^7$  cells/mL ラット初代肝細胞懸濁コラーゲンゾル 1 mL を調製した。調製したゾルを 26G 針付きシリンジで脱細胞化肝臓の複数箇所より注入した。37°C で 30 分間インキュベートしゲル化させた。再びガーゼとボルヒールでコーティングした。

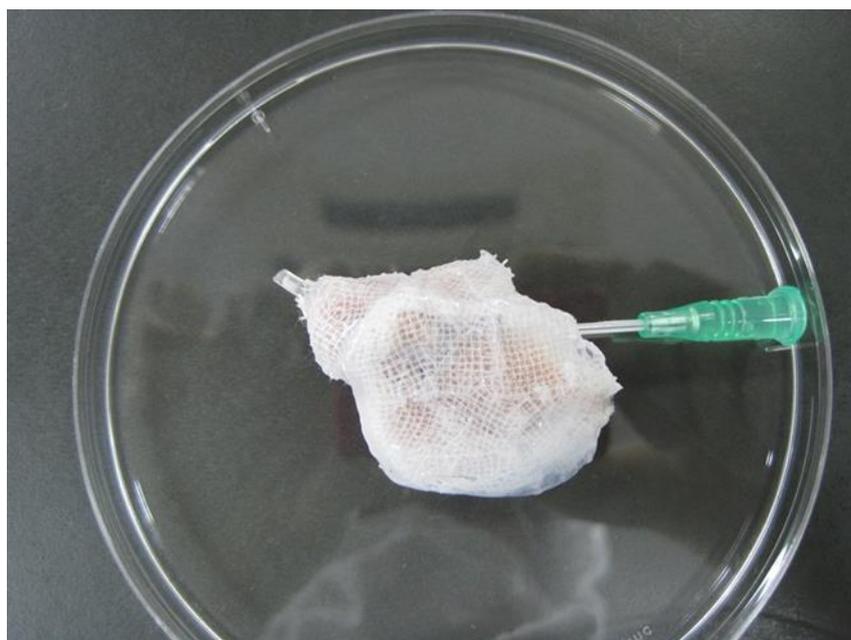


Fig. 4-2 Photograph of native liver coated with fibrin gel and gauze.

#### 4.2.2.3 血液灌流による再細胞化肝臓のアンモニア代謝能評価

再細胞化肝臓の肝機能評価の一つとして、アンモニア代謝能について評価を行った。アンモニアは劇症肝炎の主な死因となっている肝性昏睡を引き起こす原因物質の一つであると言われている。また、肝細胞のアンモニア代謝反応は応答が早く、短時間での評価が可能である。以上の理由より、Ijima らの報告 [61]を参考にして高アンモニア血症のモデルとして灌流液中に 1 mM となるように塩化アンモニウムを添加し、アンモニア負荷試験による評価を行った。一方で、肝臓に対する酸素供給に留意し、酸素キャリアとして血液を灌流液に添加した。

詳細な実験方法を以下に示す。

グラフトチャンバーと血液回路用チューブ (Kawasumi Laboratories, Tokyo, Japan)、ペリスタリックポンプ (Gilson, Middleton, WI, USA) からなる灌流培養回路を構築した。別のラットより採血した血液を用いて灌流液を調製した (血液 2 mL, 1000 U/mL ヘパリンナトリウム 1 mL, MEM 基礎培地 16.8 mL, 100 mM 塩化アンモニウム水溶液 0.2 mL)。回路用チューブとしてカワスミコネクティングセット (Kawasumi Laboratories, Tokyo, Japan) を用い、灌流回路を構築し、前述の灌流液を満たした (Fig. 4-3)。再細胞化肝臓を回路につなぎ、0.4 mL/min で 1 h の灌流を行った。アンモニア-テストワコー (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で灌流終了時の灌流液中のアンモニア濃度を測定した。

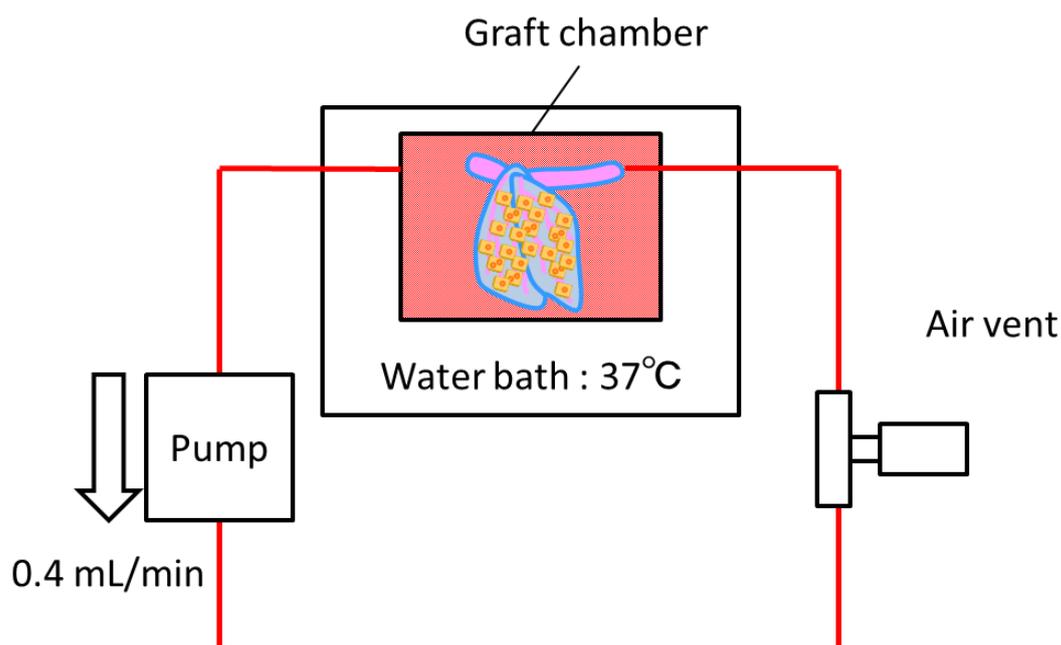


Fig. 4-3 The image of the circuit for the ammonia metabolism evaluation of the graft *in vitro*. This system consisted of the chamber, the peristaltic pump, tubes for circuit, air vents, the water bath which is set to 37°C.

## 4.2.3 結果

本研究室の既往の報告に基づき、再細胞化肝臓を作製した。1時間の血液灌流後の灌流液中のアンモニア濃度は、脱細胞化肝臓適用条件が  $0.897 \pm 0.095$  mM であり、初期濃度の 1 mM からほとんど変化しなかった。一方で、正常肝臓適用条件では  $0.284 \pm 0.099$  mM、再細胞化肝臓適用条件では  $0.445 \pm 0.071$  mM となり、灌流液中のアンモニア濃度が減少した (Fig. 4-4)。したがって、再細胞化肝臓がアンモニア代謝能を有することが確認された。

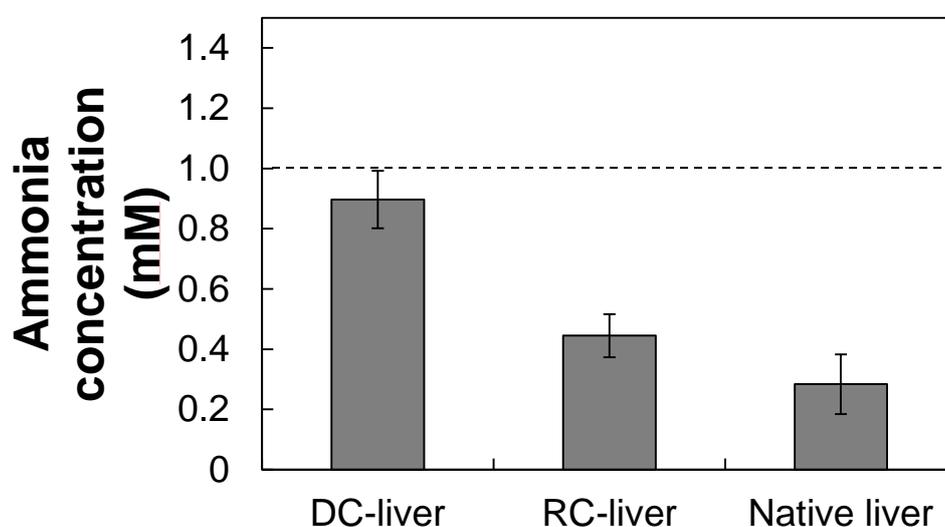


Fig. 4-4 Ammonia concentration in the perfusate after circulation culture. DC-liver (decellularized liver), RC-liver (recellularized liver), and native liver were applied in the circuit (n = 2).

## 4.2.4 考察

アンモニア濃度が減少した要因として、元々右葉内に満たされていた溶液によって希釈されたことが考えられる。しかし、右葉の体積は約 2 mL であり、容器内の血液は 20 mL と、理論上 10/11 にしか希釈が起こらないはずである。また、脱細胞化肝臓においてはほとんどアンモニア濃度が変化していない点からも、希釈のみがアンモニアの減少に寄与したわけではなく、再細胞化肝臓中の肝細胞によるアンモニア代謝能によってアンモニア濃度が減少したことが確認された。

細胞あたりの代謝速度についてもおよそ 50 pmol/cell/day であると算出された。これは初

代ラット肝細胞のコラーゲンゲル包埋培養での予備検討で得られた代謝速度である 6.4 pmol/cell/day よりも大幅に高いことが示された。この結果は、脱細胞化肝臓の精緻な血管構造による良好な物質移動、細胞外マトリックスの成分による肝機能増強などによるものであると考えられる。

更に、2D 培養時 (32 pmol/cell/day) [62] やスフェロイド培養時 (5.5 pmol/cell/day) [63] の初代ラット肝細胞のアンモニア代謝能に関する既往の報告と比較しても高水準であることが確認された。つまり、再細胞化された個々の細胞が良好に機能していることが示唆された。

以上より本再細胞化肝臓は肝不全ラットモデルの血中アンモニアを代謝できると期待された。

#### 4.2.5 本節のまとめ

以上の結果より、今回作製した再細胞化肝臓がアンモニア代謝能を有していることが確認された。また、その細胞あたりの代謝速度は既往の 2D 培養系よりも高く、再細胞化肝臓内の個々の細胞が良好に機能していることが示された。

したがって、本再細胞化肝臓は肝不全動物に対しても有効であると期待された。

### 4.3 *Ex vivo* での再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性評価

#### 4.3.1 本節の目的

第4章2節において今回作製した再細胞化肝臓がアンモニア代謝能を有していることが確認された。また、再細胞化肝臓の細胞あたりのアンモニア代謝速度は、2D培養系での初代肝細胞のアンモニア代謝速度とほぼ同等かそれ以上の値を示した。そこで本節では、再細胞化肝臓を第3章で開発した肝不全ラットモデルへ適用した。

本章の冒頭で述べたように、移植評価の実現のためには、再細胞化肝臓は血管構造の不完全性による血液の漏洩や血液凝固などの克服すべき課題が多い。更に、上記の課題を完全に克服した再細胞化肝臓の作製の目途はまだ立っていない。そこで新たな評価系として体外灌流に着目した。ハイブリッド型人工肝臓は体外灌流によって肝不全動物に適用され、その治療効果は既の実証されている [64]。そこで本研究においても再細胞化肝臓を組み込んだ体外灌流を肝不全動物に対して行うことで、再細胞化肝臓の有効性を同様に評価できると考えた。本節では、3章で開発した肝不全ラットモデルに対して再細胞化肝臓を組み込んだ血液体外循環システムの開発を行った。また、本システムを用いて再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性を評価し、再細胞化肝臓の最適設計に向けた開発指針を示すことを目的とした。

#### 4.3.2 実験方法

再細胞化肝臓を組み込んだ血液体外循環を実現させるため、まずは血液体外循環回路の開発を行った。以下に回路構築のポイントを列挙する。

##### 循環ライン総体積 (プライミングボリューム)

ラット等の小動物を実験動物として用いる場合、生体内血液量の少ない小動物は血液体外循環による影響を受けやすいことから、循環負荷の軽減のためにも極力循環ラインの総体積を減らさなければならない。更に、生体外での血液は血管内皮と異なる異物との接触により血栓形成の可能性が高まることから循環ライン総体積の低減が望まれる。肝不全患者に一般的に施行されている血漿交換療法を参考にすると、回路の血液量については、一般的には全血液量の10%以下の容量であれば生体への負荷が小さく、体外循環が円滑に行うことができるとされている。

### 循環ライン流量

血液体外循環の実験において、ラットの頸動脈および頸静脈にカニューレーションを行い、頸動脈から血液を引き出し頸静脈から血液を戻す手法を用いて体外循環を行う。これはラットにおいて頸動脈及び頸静脈は各2本ずつ存在し、各1本ずつが体外循環によって用いられたとしても生存が可能であるからである。血液流量は頸動脈及び頸静脈直下に存在する心臓に即座に大きな影響を及ぼすことから、心拍数や血圧の低下を招く恐れがある。また、麻酔下においては心拍数や血圧が低下することから、かなり余裕を持って設定する必要がある。また、回路間の高低差がある場合は、その高低差に起因する圧力損失によって安定した血液体外循環ができない可能性があるため極力高低差をなくす必要がある。

### 温度管理

ラットのような小動物は体重に対する比表面積が大きく、体温管理に関して大型動物よりもシビアに管理する必要がある。術中のラットに対する体温管理のみならず、特に血液体外循環において体内へと戻っていく血液は体温と同等まで加温されなくてはならない。

上記のポイントを踏まえ、グラフトチャンバー、ペリスタリックポンプ、血液回路用チューブ、エアトラップ、保温用の恒温槽、熱交換器からなる回路体積およそ5 mLの血液体外循環システムを構築した (Fig. 4-5, Fig. 4-6)。エアトラップは左頸動脈および右頸静脈付近にそれぞれ1つずつ設置された。これらの回路は事前に滅菌され、循環直前まで100 U/mLのヘパリン (Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 添加生理食塩水によってプライミングされた。また、先述と同様の方法で初代ラット肝細胞  $2 \times 10^7$  cells を播種したグラフトを循環直前にチャンバーに入れ回路に接続した。虚血30分の肝不全ラットモデルを作製し、左頸動脈および右頸静脈にカニューレ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を挿入した。ラットには30 Uのヘパリンを静脈内投与した。虚血のクランプを解放してから1時間後にカニューレと回路を接続し0.4 mL/minで血液体外循環を開始した。循環開始直後と循環終了直前および循環終了から4時間後 (再灌流から6時間後) に採血を行い、アンモニアおよびALT、ASTを測定した。また、循環中は30分おきに10 U/mLヘパリン添加生理食塩水を1 mLずつ補液した。血液体外循環は1時間行い、循環終了から4時間後にラットはサクリファイスされ、肝臓をサンプリングした。適用したグラフトおよび肝不全ラットモデルの循環後の肝臓は10%中性緩衝ホルマリンによって

固定化され H&E 染色によって評価された。

以下に詳細な実験手順を示す。

循環回路のチューブ (Kawasumi Laboratories, Tokyo, Japan) に 70%エタノール、生理食塩水、100 U/mL ヘパリン添加生理食塩水を順に流した。頸動脈側のカテーテル (Insyte, 24G; Becton Dickinson, U.S.A.) には 10 U/mL、頸静脈側には 100 U/mL のヘパリン添加生理食塩水を満たしておいた。イソフルラン (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) で循環を行う 8 週齢の Sprague Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) に吸入麻酔をかけた。尾より採血し、アミチェック (Arkray, Kyoto, Japan) で血中アンモニア濃度を測定した。首回りをバリカンで剃毛し、70%エタノール、エタノール・イソジン混合溶液 (1:1) を順に噴霧して滅菌後、首を V 字に切開し頸動脈・頸静脈に 3 本ずつ糸をかけておいた。また、不感蒸散を極力防ぐため、切開部を生理食塩水を含ませたガーゼで覆っておいた。腹部を正中切開し、術野を確保するため小腸・大腸を体外に露出させ、生理食塩水を含ませたガーゼで包んでおいた。肝動脈をトリミングし、ブルドック鉗子を用いてクランプした。門脈の右葉へ向かう部分を同様にブルドック鉗子でクランプし、温虚血を開始した。虚血中は、中葉・左葉・尾状葉に糸をかけておき、すぐに結紮できるように準備しておいた。30 分間の虚血終了後、すぐに中葉・左葉・尾状葉を結紮し切除した。小腸・大腸を元の位置に戻し、正中切開部を縫合した。頸静脈の頭側の糸を結び、準備しておいた静脈用カテーテル (Insyte, 24G; Becton Dickinson, U.S.A.) を挿入した。この際 100 U/mL ヘパリンナトリウム溶液を約 0.3 mL 注入し全身のヘパリン化を行った。頸動脈の頭側の糸を結び、体側を鉗子で止め準備しておいた動脈用カテーテル (Insyte, 24G; Becton Dickinson, U.S.A.) を挿入した。各カテーテルと体外循環回路をつなぎ、頸動脈側の鉗子を外して血液体外循環を開始した。循環回路より適宜血液のサンプリングを行い、アミチェック (Arkray, Kyoto, Japan) で血中アンモニア濃度を測定した。循環終了後、頸動脈を結紮しカテーテルを抜き、回路内の血液を頸静脈へと戻した。頸静脈を結紮し、切開部を縫合し、経過観察を行った。

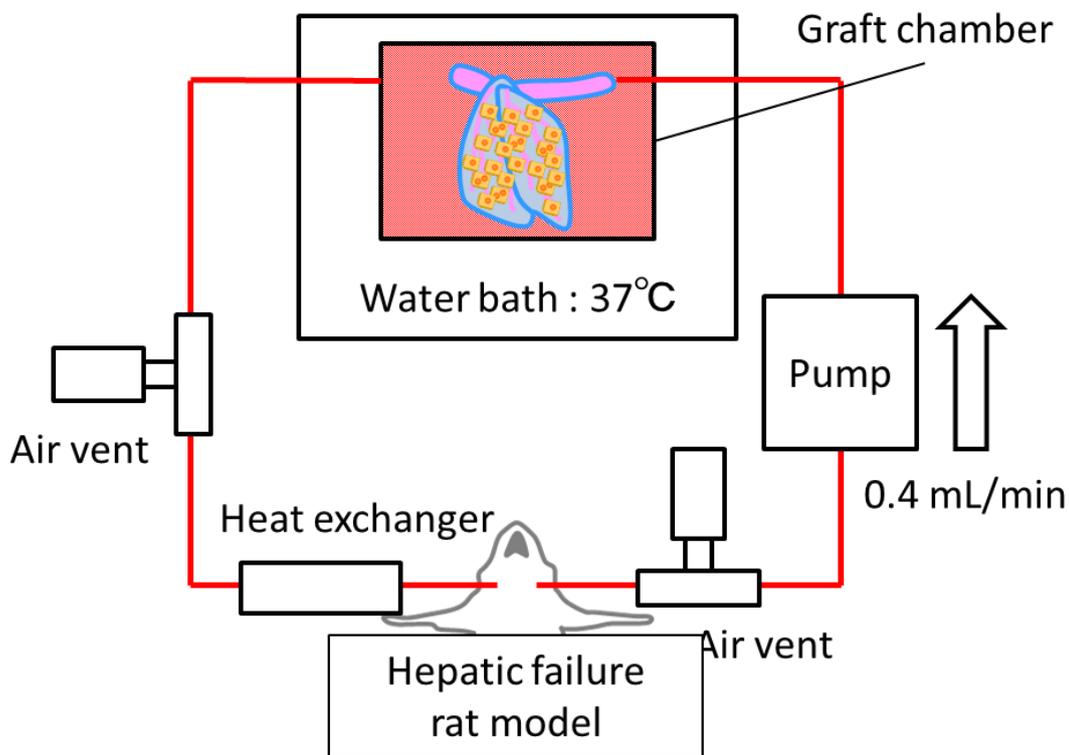


Fig. 4-5 The image of the blood extracorporeal circulation circuit. The blood extracorporeal circulation system consisted of a chamber, a peristaltic pump, tubes, air vents, a water bath and a blood heating system. HF: hepatic failure.

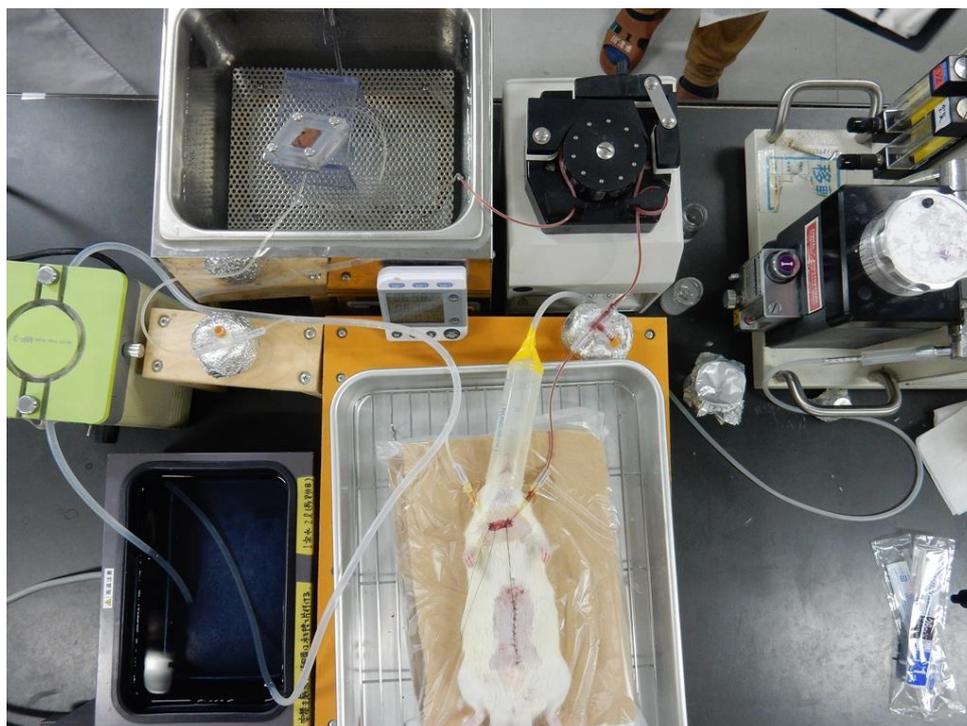


Fig. 4-6 The photograph of the blood extracorporeal circulation.

#### 4.3.3 結果と考察

Fig. 4-5 および Fig. 4-6 に示すような血液体外循環システムを構築した。本システムの詳細を以下に示す。

##### 循環ライン総体積 (プライミングボリューム)

循環ライン総体積はおよそ 5 mL であった。その内訳は、グラフトチャンバーが 3.7 mL、回路用のチューブが 1.3 mL であった。

##### 循環ライン流量

循環ライン間の高低差はラットへの心負荷を考慮し最小限にとどめた。本循環ラインの高低差は最大で 9 cm と最小化することによって 0.4 mL/min での安定した血液体外循環が可能となった。

##### 温度管理

グラフトチャンバーを 37°C の恒温槽中に設置することでグラフトを 37°C に保温することに成功した。また、肝不全ラットへの負荷を軽減するために、血液が体内へと戻る頸静脈付近の回路に熱交換器を設置した。本熱交換器によって血液を 37°C に加温後にラットの体

内へと戻すことに成功した。

以上のように、プライミングボリュームや循環流速、温度管理等に留意して血液体外循環回路を構築することで肝不全ラットモデルに対する血液体外循環が実現可能となった。

そこで、虚血30分モデルに対し、再灌流から1時間後に正常肝臓、脱細胞化肝臓、再細胞化肝臓をそれぞれ血液体外循環によって適用し、再灌流から6時間後にサクリフェイスし、肝臓の組織学的評価を行った。また、経時的に採血し血中アンモニア濃度およびトランスアミナーゼの測定も併せて行った。

まず、肝障害の指標となるトランスアミナーゼ活性については、全条件において再灌流から1時間後に正常値からの上昇が確認され、その値は各条件間でほぼ同等であった。

(Fig. 4-7, Fig. 4-8) したがって、各条件下においてグラフト適用前の肝障害はほぼ同等であることが確認された。更に、血液体外循環以降の経時変化については統計学的な有意差は確認されなかったものの、正常肝、再細胞化肝、脱細胞化肝の順で肝障害が抑えられているという傾向が確認された。しかしながら、肝不全ラットモデルの肝臓の組織学的評価においてはほとんど壊死範囲に差が見られなかった。(Fig. 4-9 a,b,c)

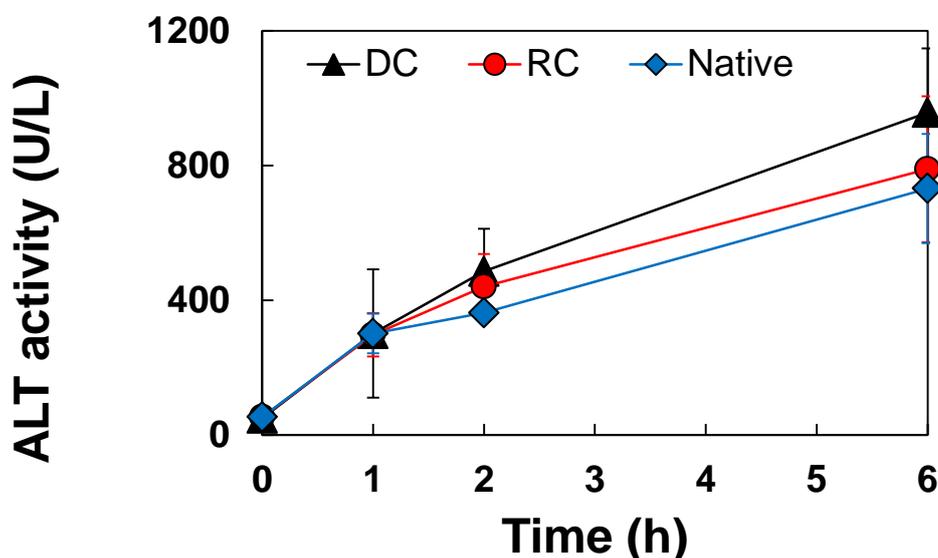


Fig. 4-7 The value of ALT activity in the blood of the 30-min ischemia rat models after the end of ischemia. Blood extracorporeal circulation was performed for 1 h from 1 h after the end of ischemia. The value at 0 min indicates ALT activity in the blood of the rat before HF operation (n = 3). Black triangle: DC-liver, red circle: RC-liver, blue diamond: Native liver.

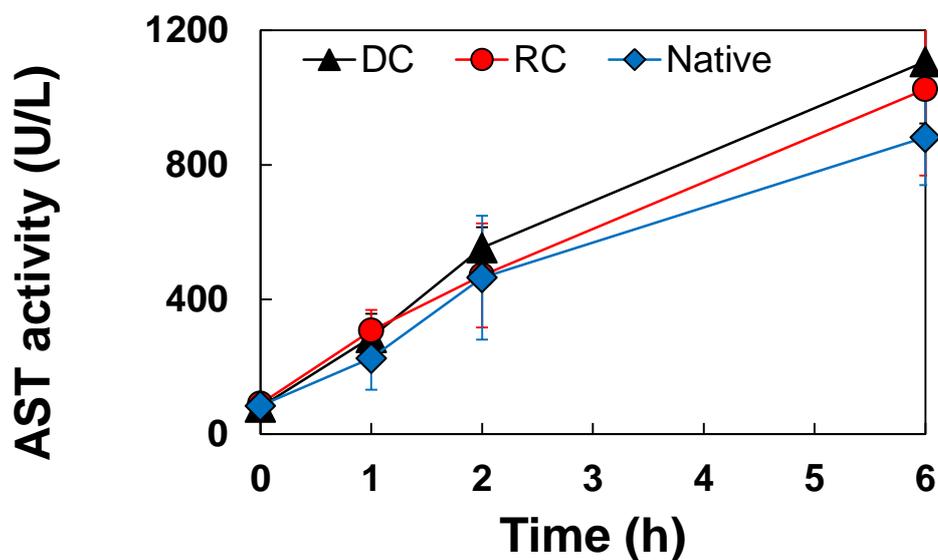


Fig. 4-8 The value of AST activity in the blood of the 30-min ischemia rat models after the end of ischemia. Blood extracorporeal circulation was performed for 1 h from 1 h after the end of ischemia. The value at 0 min indicates ALT and AST activities in the blood of the rat before HF operation (n = 3). Black triangle: DC-liver, red circle: RC-liver, blue diamond: Native liver.

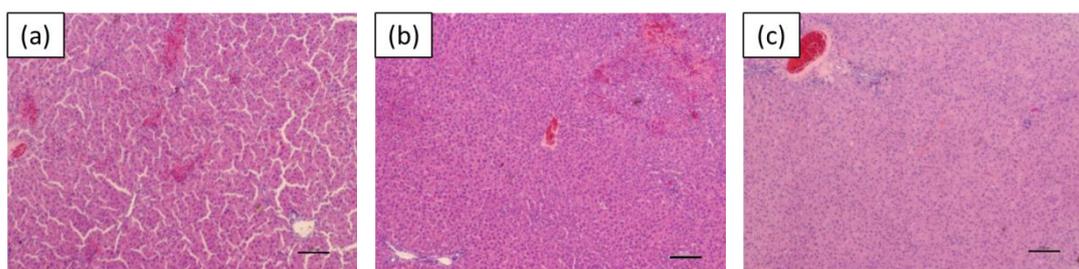
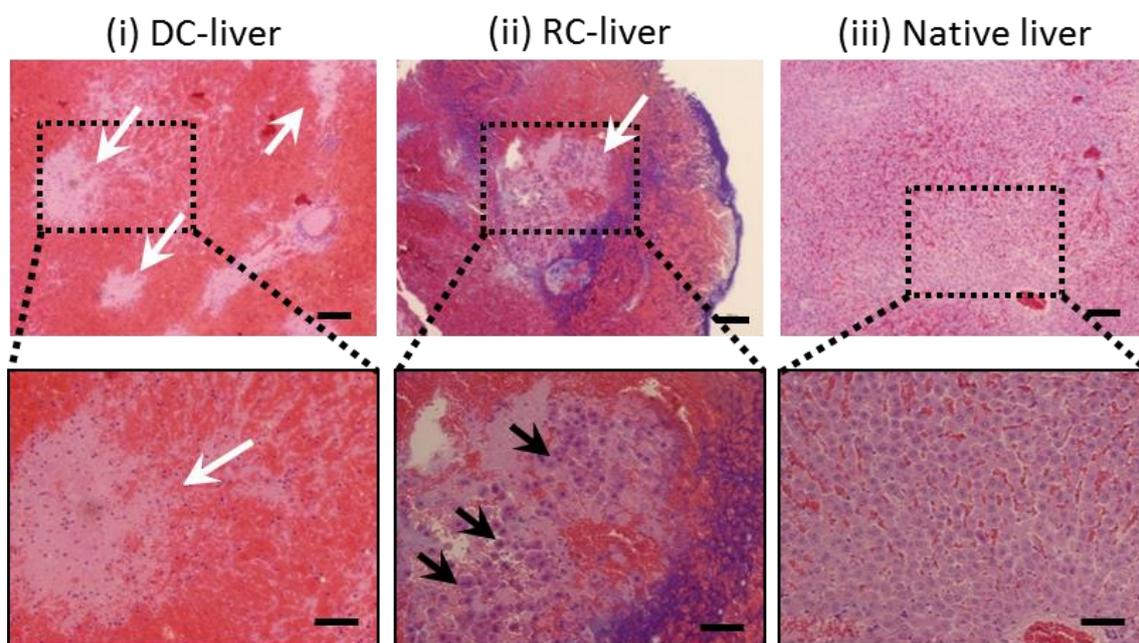


Fig. 4-9 H&E staining of the liver of 30-min ischemia rat models applied (a) DC-liver, (b) RC-liver, (c) native liver at 4 hours after the end of the blood extracorporeal circulation. Bars:200  $\mu$ m

一方で、適用肝についての組織学的評価については、脱細胞化肝臓は酵素処理を行っていないため、多少の核の残存は確認されるが、完全な細胞は確認されなかった (Fig. 4-10 i)。再細胞化肝臓については播種したゲル内にものみ、初代肝細胞が確認された (Fig. 4-10 ii)。また、すべての適用肝の全体に赤血球が確認され、グラフト全体に血液が行き渡っていることが確認され、各グラフトの効果が期待された (Fig. 4-10)。



**Fig. 4-10 H&E staining of (i) DC-liver, (ii) RC-liver, and (iii) native liver applied in the BECS. Bars indicate 200  $\mu\text{m}$  in upper figures and 100  $\mu\text{m}$  in lower figures. White arrows: areas that seemed to be injected with collagen gels, black arrows: hepatocytes.**

更に、血中アンモニア濃度の経時変化について着目すると、いずれの条件においても再灌流から1時間後には100  $\mu\text{M}$  前後に上昇していた。また、脱細胞化肝臓適用条件では体外循環終了時である再灌流から2時間後には300  $\mu\text{M}$  程度に上昇していたのに対し、正常肝臓および再細胞化肝臓適用条件では150  $\mu\text{M}$  未満であり、正常肝臓および再細胞化肝臓が肝不全ラットモデルの血液中のアンモニアを代謝したことが確認された。さらに再灌流から6時間後では脱細胞化肝臓が135  $\mu\text{M}$  であったのに対し、正常肝臓適用条件が52  $\mu\text{M}$ 、再細胞化肝臓が66  $\mu\text{M}$ 、という結果となり、正常肝臓および再細胞化肝臓適用群の良好な回復が示唆された (Fig. 4-11)。

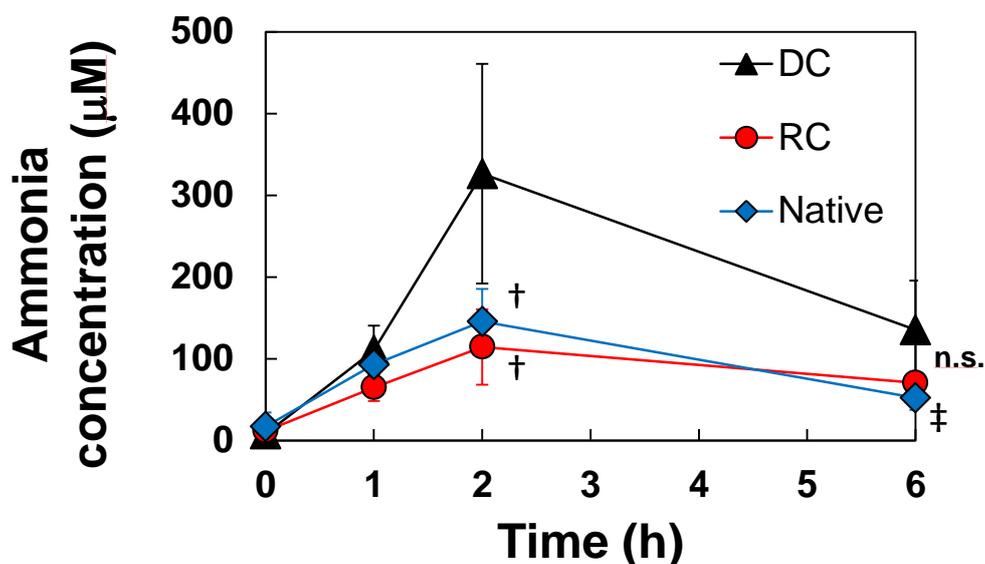


Fig. 4-11 Ammonia concentration in the blood of 30-min ischemia rat models after the end of warm ischemia. At 1 h after the end of warm ischemia, blood extracorporeal circulation was performed for 1 h. The value at 0 min indicates the ammonia concentration in the blood of rats before HF operation (n = 3). Black triangle: DC-liver, red circle: RC-liver, blue diamond: Native liver. Significant differences were analyzed by Dunnett's test with DC-liver as the control group. RC-liver and native liver were compared with DC-liver at 2 h (†:  $p < 0.05$ ) and 6 h (‡:  $p < 0.05$ ). n.s.: not significant.

一方で、別のラットに対して各グラフト（正常肝臓、脱細胞化肝臓、再細胞化肝臓）を組み込んだ 2 時間の血液体外循環を行い、経過観察を行ったところ、再細胞化肝臓が生存率を改善する傾向は見られたものの正常肝臓適用条件のように全例の生存は確認されておらず、再細胞化肝臓は救命に対しては不十分であることが示された (Fig. 4-12)。

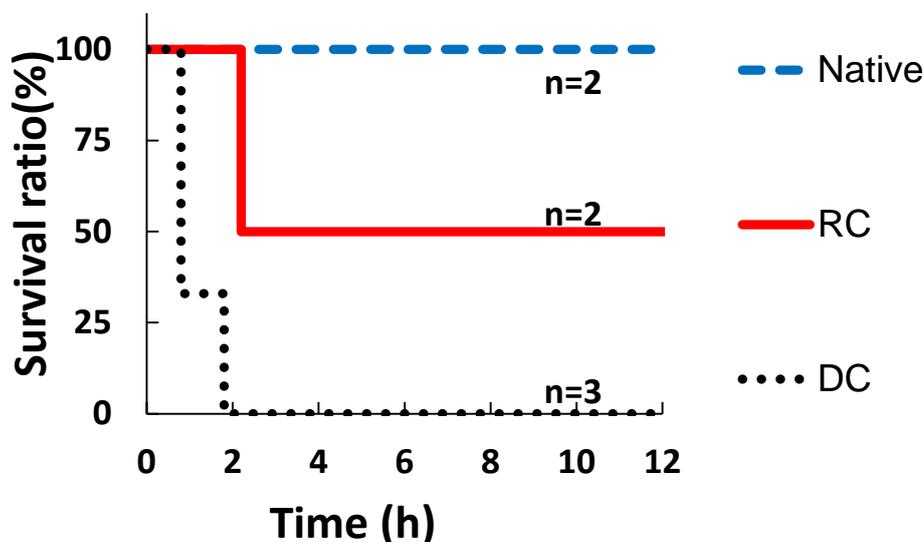


Fig. 4-12 Survival time of 30-min ischemia hepatic failure rat model which was treated each graft. RC: recellularized liver, DC: decellularized liver.

#### 4.3.4 考察

現在のハイブリッド型人工肝臓は非常に強力な肝機能のサポートが可能であるが、肝再生が期待できない重篤な肝不全に対しては根治療法とならない。一方で、再細胞化肝臓は移植が可能で半永久的に自身の臓器として使用可能であることが期待される一方で、その肝機能は未知であった。そこで、本研究では新たな *ex vivo* 評価系を開発し、再細胞化肝臓の性能評価を行った。

ハイブリッド人工肝補助システムにおける既往の報告において、肝補助システムによって肝不全動物の生存時間の延長が確認されており、その動物モデルの血中アンモニア濃度の上昇が抑えられていた [64]。つまり、血中アンモニア濃度は肝不全動物の生存と相関が強く、良い指標となると考えられる。今回の検討において、ハイブリッド型人工肝補助システムと血中アンモニア濃度が同様の傾向を示したことは非常に価値ある結果であると考えられ、再細胞化肝臓の肝不全動物に対する有効性が期待された。

また、血中アンモニア濃度について、再細胞化肝臓と正常肝臓がほぼ同等の傾向を示している。以上の結果から、再細胞化肝臓が正常肝臓と同等の機能を有することが期待はされる。しかしながら、本再細胞化肝臓は *ex vivo* での適用であるため、血液の流量が *in vivo* とは異なるため、機能の直接的な比較はまだ実現できない。これは、本結果が代謝基質で

あるアンモニアの供給速度律速となっている点を否定できないためである。今回は麻酔下で血液体外循環を行っているため、Fig. 4-13のようなシステムを応用し、覚醒下での血液体外循環が実現できれば *in vivo* とほぼ同等の血流量が確保でき、正常肝臓との機能の比較が可能になると思われる。また、他の評価指標（胆汁生成能や血液凝固活性等）についても評価を行い、総合的に再細胞化肝臓の評価を行う必要がある。特に、血液凝固因子の産生能については、臨床でも非常に重要視されており、重視すべき指標であると考えられる。

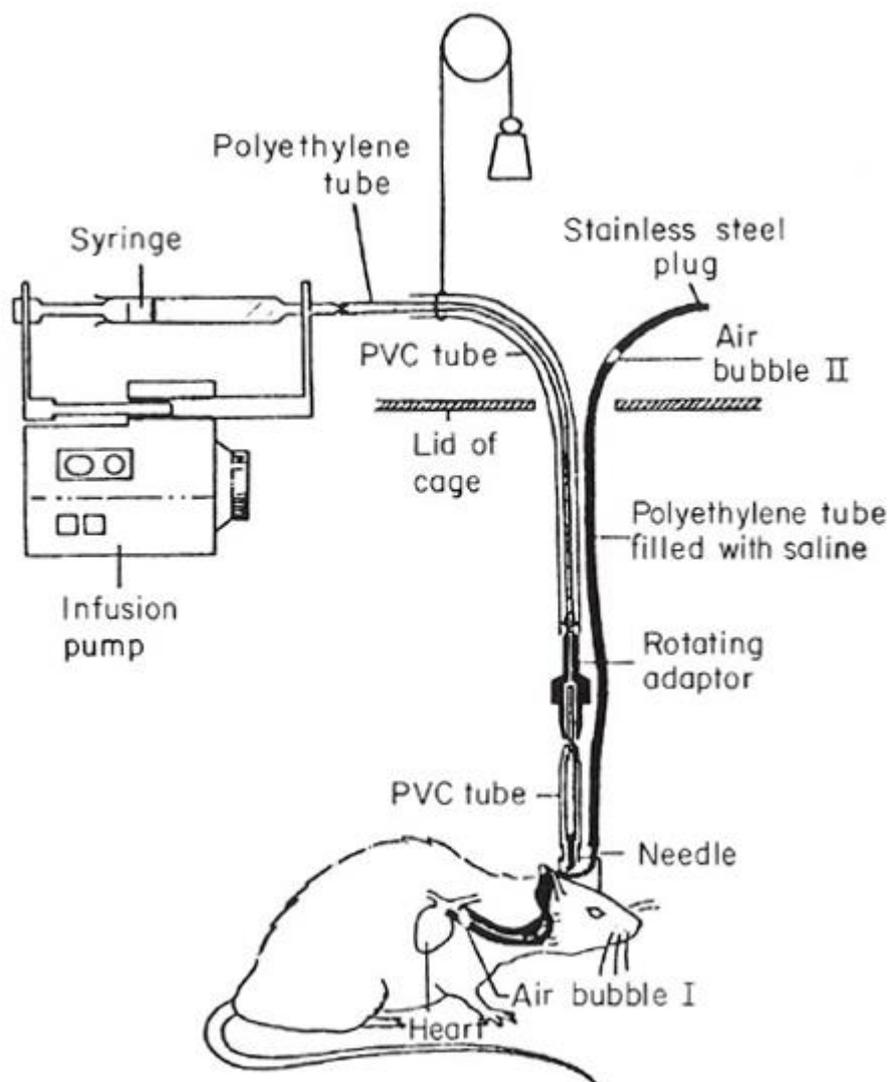


Fig. 4-13 The complete head apparatus attached to the rat and connected to two indwelling catheters and to an infusion apparatus. [65]

移植評価の実現にはまだ課題が多く、完全な内皮化や血栓形成の防止が実現できるまでは本研究のような *ex vivo* での評価を行い、再細胞化肝臓の最適化を進めていかなくてはならない。本評価系の体外循環負荷においても、更なるプライミングボリュームの低減（グラフトチャンバーの更なる小型化や回路全長の縮小など）や、循環流速等の検討を引き続き行っていく必要がある。

また、本検討で用いた再細胞化肝臓の細胞数は全肝臓のおよそ 1% である。これは脱細胞化肝臓内の血管化が不十分であるため、現状における実現可能な最大の播種細胞数である。本評価によって、再細胞化肝臓によるアンモニアの代謝が確認されたものの、現在の細胞数では救命はまだ実現できないことが示された。つまり、今後は移植によって肝不全患者を救命可能な細胞数（たとえば全肝臓の 20%）を目指して細胞数の増加の必要性が示された。

### 4.3.5 本節のまとめ

肝不全ラットモデルに対して再細胞化肝臓を組み込んだ血液体外循環システムを開発した。本システムによって、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性を評価することが可能であることが示された。本評価系に作製した再細胞化肝臓を適用したところ、血中アンモニア濃度の上昇が抑制され、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性が期待された。

今後は再細胞化肝臓の更なる細胞密度の増加に伴って、より重篤な肝不全ラットモデルに対する適用や様々な血中成分評価等によって有効性を実証できると考えられる。

#### 4.4 本章のまとめ

- 本研究において作製した再細胞化肝臓が *in vitro* 血液灌流システムによってアンモニア代謝能を有していることが確認された。また、再細胞化肝臓内の細胞あたりのアンモニア代謝速度は他の培養系と比較して高いレベルにあった。
- 再細胞化肝臓を組み込んだ血液体外循環システムの開発に成功した。
- 作製した再細胞化肝臓を 3 章で開発した肝不全ラットモデルに適用したところ、肝不全ラットモデルの血中アンモニアを代謝し病態を改善する傾向が確認された。
- 以上の結果から、肝不全ラットモデルと血液体外循環システムによる再細胞化肝臓の *ex vivo* 評価システムの開発に成功した。
- 本評価系によって、肝不全からの救命に向けて再細胞化肝臓の細胞数の増加の必要性が示された。

## 第5章 再細胞化肝臓の高機能化に向けた基盤技術の開発

### 5.1 本章の目的および概要

第 4 章では、再細胞化肝臓を肝不全ラットモデルに血液体外循環によって適用し、有効性の評価を行った。その結果、再細胞化肝臓が肝不全ラットの血中アンモニアを代謝し、肝不全の症状を改善する傾向が見られた。しかしながら、今回播種できた細胞数は全肝のおよそ 1%であり、移植に必要であると考えられる細胞数にはまだ不十分であると考えられる。従って今後は再細胞化肝臓の細胞数の増加が必須であると考えられる。そこで、本章では、細胞の高密度化の観点から再細胞化肝臓の高機能化を目指し、その基盤技術の開発を行った。

再細胞化肝臓の肝細胞の高密度化を達成するためには、初期に高密度で播種する、もしくは初期に低密度で播種し成熟化させるといった 2 つの方針が考えられる。いずれの方針においても、成熟肝細胞は酸素要求性が高い [66]ため、十分な酸素供給能を持つ臓器培養システムの開発が求められる。そこで本章では、再細胞化肝臓の臓器培養の実現のための基盤技術として、十分な酸素供給能を有する臓器培養システムの開発を目的とした。

## 5.2 酸素化灌流培養システムの構築

### 5.2.1 本節の目的

高密度化を目指し、再細胞化肝臓を培養する場合、播種した細胞に対する酸素供給が最も大きな課題となると考えられる。再細胞化肝臓に対して十分な酸素供給を行うためには、灌流培養が必須であると考えられる。そこで本節では、再細胞化肝臓の培養において、流速条件は酸素供給であると考え、十分な酸素供給を行える酸素富化装置を開発し、それを灌流培養回路に組み込んで再細胞化肝臓の培養システムを構築することを目的とした。

まず、開発した酸素富化装置の性能評価を行い、再細胞化肝臓に対して十分な酸素供給を行うことができるか検討を行った。その後、高密度再細胞化肝臓のモデルとして正常肝臓の培養を行い、細胞の生存および機能が維持できるか評価した。

### 5.2.2 実験方法

#### 5.2.2.1 酸素富化装置の作製および評価

市販の人工肺は小動物系に適用するには大きすぎるため、小型の酸素富化装置の開発を行った。市販の人工肺の構造を参考に、ポリカーボネート製の円筒型のハウジング内に中空糸を充填し、両端をポッティングすることによって装置を作製した。

中空糸は、市販の脱気・吸気膜モジュール (STERAPORE 2000、Mitsubishi Rayon, Tokyo, Japan) より回収して用いた。以下に中空糸膜の特性を示す。

**Table 5-1 Characteristics of the hollow fiber.**

Multi-layered composite hollow-fiber membrane	
Material	Polyethylene
Inner diameter (μm)	200
Outer diameter (μm)	275

上記の中空糸を約 400 本用いて酸素富化装置を作製した (Fig. 5-1)。

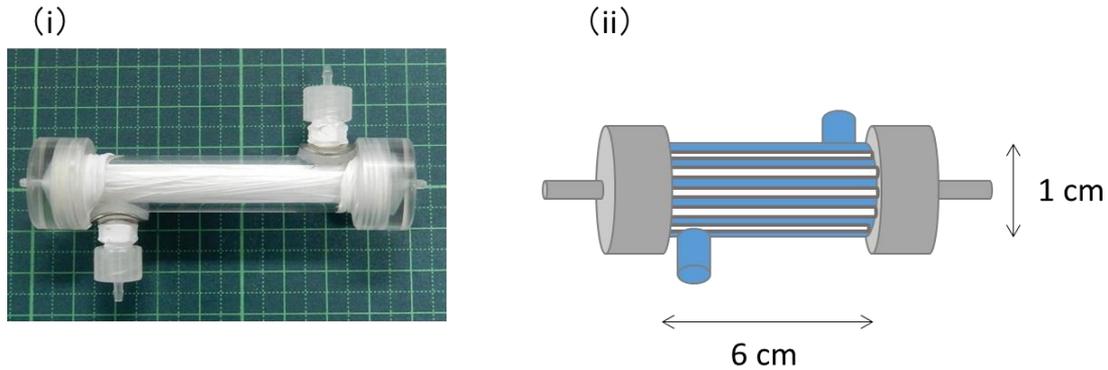
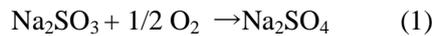


Fig. 5-1 Photograph (i) and dimension (ii) of the oxygenator.

本装置の有効膜面積はおよそ 200 cm<sup>2</sup> であり、中空糸の充填率はおよそ 30%と計算された。

上記のようにして作製した装置が、実際に培養液への酸素富化が可能か、またどの程度の酸素富化を行えるのかを評価する。そこで評価方法として、本装置を組み込んだ灌流培養システムの酸素移動容量係数  $k_{La}$  [1/min] に着目した。 $k_{La}$  は単位時間当たりの酸素移動量の程度を示す値である。これを亜硫酸ナトリウムと酸素の化学反応を用いて測定した。

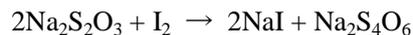
本実験における亜硫酸ソーダの酸化および滴定原理は以下のような化学反応に基づく。



ここでの未反応の  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  の量をヨードメトリーによって求め、その量から吸収された酸素量を求める。まず、サンプリング液を  $\text{I}_2$  溶液と反応させる。このときの反応式は次のようになる。



その後、過剰の  $\text{I}_2$  量をチオ硫酸ナトリウムを用いた滴定により求めることで反応式(1)における未反応の  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  の量を求めることができる。この時、以下の反応が起こる。



また、 $k_{La}$  は以下の式で表される。

$$v = k_{La}(C^* - C) \quad (2)$$

理想溶液と仮定すると、 $C^*$ は Henry の法則により推算することができる。

$$P_i = HC^*$$

また、未反応の  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  濃度を  $S$  ([mol/mL]) とすると、(1)式から

$$v = -1/2 \cdot dS/dt$$

C は 0 と仮定するとこれらから、

$$k_{La} = -1/2 \cdot (H/Pi) \cdot dS/dt \quad (3)$$

が導かれる。

ただし、

v : 培養液単位体積あたりの酸素移動速度 [mol/(mL · min)]

C\* : 気相中酸素分圧に対する平衡状態の溶存酸素濃度 [mol/mL]

C ; 液相の溶存酸素濃度 [mol/mL]

Pi : 気液界面の酸素分圧 [atm]

H : ヘンリー定数 [atm · mL/mol]

t : 時間 [min]

Pi は飽和酸素分圧 0.21 atm に等しいとし、 $H = 9.3 \times 10^5$  atm · mL/mol とする。

詳細な実験手順を以下に示す。

$k_{La}$  測定回路を準備した (Fig. 5-2)。リザーバーには蒸留水 30 mL、無水亜硫酸ナトリウム 1.2 g および 0.1 M 硫酸銅溶液 240  $\mu$ L を加えておいた。37°C 下、2 mL/min で循環を開始した。経時的にリザーバーから溶液を 200  $\mu$ L サンプルングした。サンプルチューブに 0.05 M ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液 750  $\mu$ L を入れ、サンプルングした試料を 75  $\mu$ L 採取し、チップの先端を液に入れ、空気に接触しないように注入した。よく混合した後、残存  $I_2$  を 0.1 M  $Na_2S_2O_3$  液で滴定した。 $I_2$  の褐色が薄くなったとき、1% デンプン液を 10  $\mu$ L 加え、濃青色が消えるところを終点とした。液中  $Na_2SO_3$  濃度と時間とをプロットし、 $k_{La}$  を(3)式により求めた。

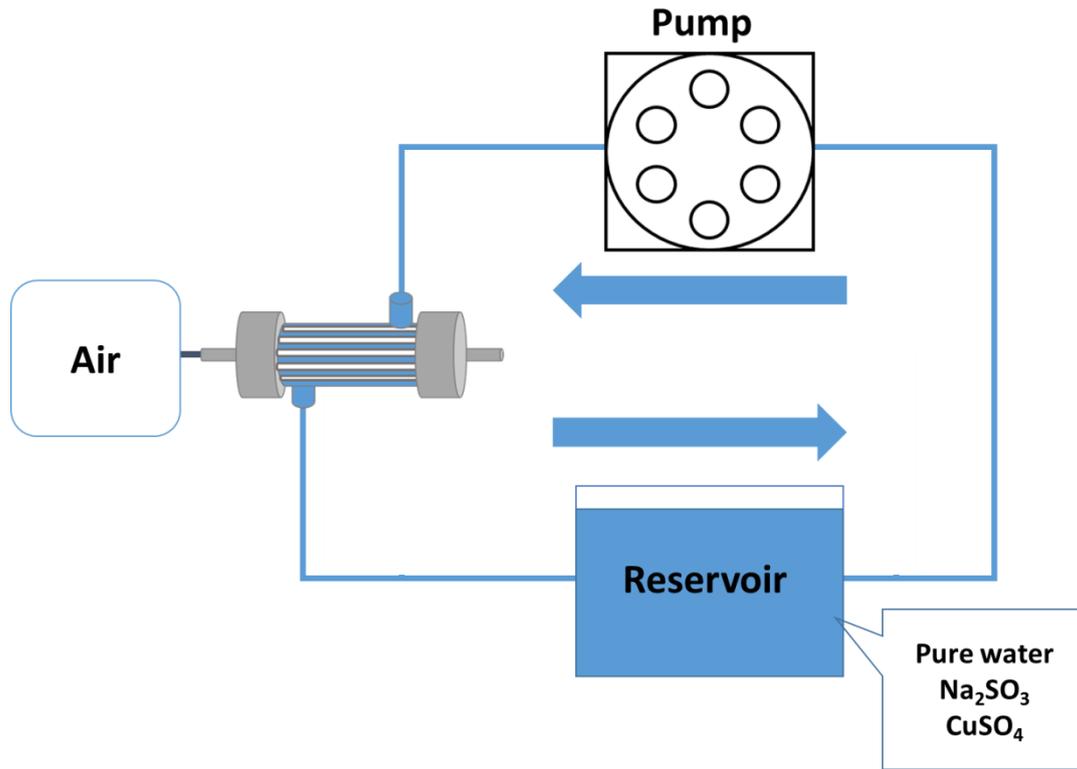


Fig. 5-2 k<sub>L</sub>a measurement circuit.

また、実際に静脈血を本酸素富化装置に流通させ、酸素富化装置の前後の血液の酸素飽和度を測定することで、実際に血液に対して酸素富化が可能であるか評価した。血液の酸素飽和度は、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの波長スペクトルの違いから測定が可能である [67]。

体重 180 g 程度の 6 週齢の雄の Sprague dawley ラットより右葉を氷冷した前灌流液で脱血後に摘出し、本右葉に対して血液を肝臓に流通させることで静脈血を得た。続いて、得られた静脈血を酸素富化装置に流通させ、酸素富化装置前後の血液をサンプリングした。得られたサンプルに溶血試薬 (10% Triton X-100) を加え、遠心分離を行い、上澄みを得た。分光光度計で波長スペクトルを測定し、検量線より酸素飽和度を求めた。酸素飽和度は以下の式によって計算できる。

$$\text{Oxygen saturation} = \frac{SHb_{506}}{SHbO_{2,475} - SHb_{475}} \times \frac{D_{475}}{D_{506}} - \frac{SHb_{475}}{SHbO_{2,475} - SHb_{475}} \quad (4)$$

ここで、SHb<sub>506</sub> および SHb<sub>475</sub> はそれぞれ、脱酸素化された酸素飽和度 0% の血液の 506 nm および 475 nm の吸光度を示す。SHbO<sub>2,506</sub> および SHbO<sub>2,475</sub> はそれぞれ、酸素化された酸素飽和度 100% の血液の 506 nm および 475 nm の吸光度を示す。同様に、D<sub>506</sub> および D<sub>475</sub> はそれぞれ、サンプルの 506 nm および 475 nm の吸光度を示す。

#### 5.2.2.2 酸素富化装置を組み込んだ灌流培養システムによるグラフトの培養

続いて、先述の酸素富化装置を組み込んで灌流培養回路を作製した (Fig. 5-3)。設計指針を以下に述べる。

生体内における右葉に対する血液の流速と合わせるため、本灌流培養システムでの灌流液の流速は 2 mL/min とした。先述の検討で、酸素富化装置の酸素移動容量係数を測定した。しかしながら、酸素移動容量係数は気体から液体への酸素の移動のみを対象とする指標であり、灌流液から肝臓への酸素供給の指標とはならない (Fig. 5-4)。灌流液から肝臓への酸素移動を大きく支配する操作変数である流速は、液流れによる肝臓に対するせん断応力によって制限されるため、液中の酸素濃度を向上させる必要がある。つまり、本流速で十分な酸素供給を行うためには灌流液中に酸素キャリアの添加が必須である。従って、灌流液は肝細胞培養培地である D-HDM と血液を 1:1 で混合したものをを用いた。一方で、灌流液に血液を用いるため、灌流培養中の血液凝固が問題となると考え、抗凝固剤であるヘパリンを連続的に供給した。

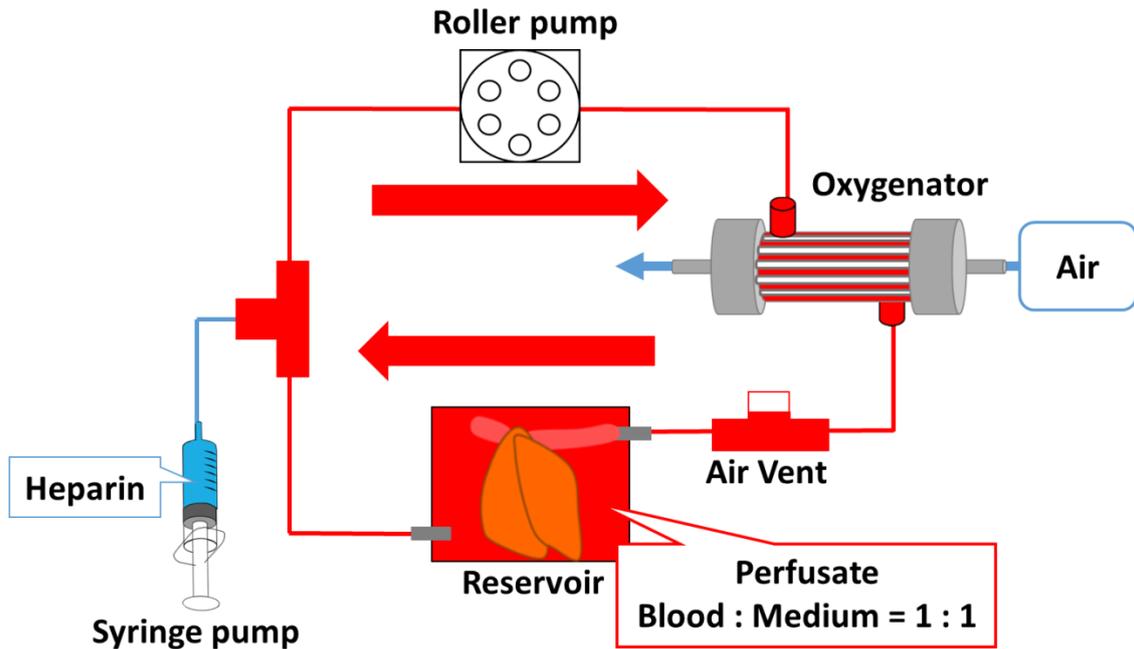


Fig. 5-3 The image of organ perfusion culture system.



Fig. 5-4 The flow of oxygen to liver graft.

本灌流培養回路に対して、高密度再細胞化肝臓のモデルとしてラット肝臓の右葉を適用し、灌流培養を 12 時間行った (Fig. 5-5)。更に、培養後に別の灌流培養回路に繋ぎ替え、高アンモニア血症のモデルとして灌流液中に 1 mM となるように塩化アンモニウムを添加し、アンモニア負荷試験による評価を行った。

評価指標としては、灌流培養中の肝障害の指標として ALT および H&E 染色、培養後の機能評価の指標としてアンモニアを用いた。

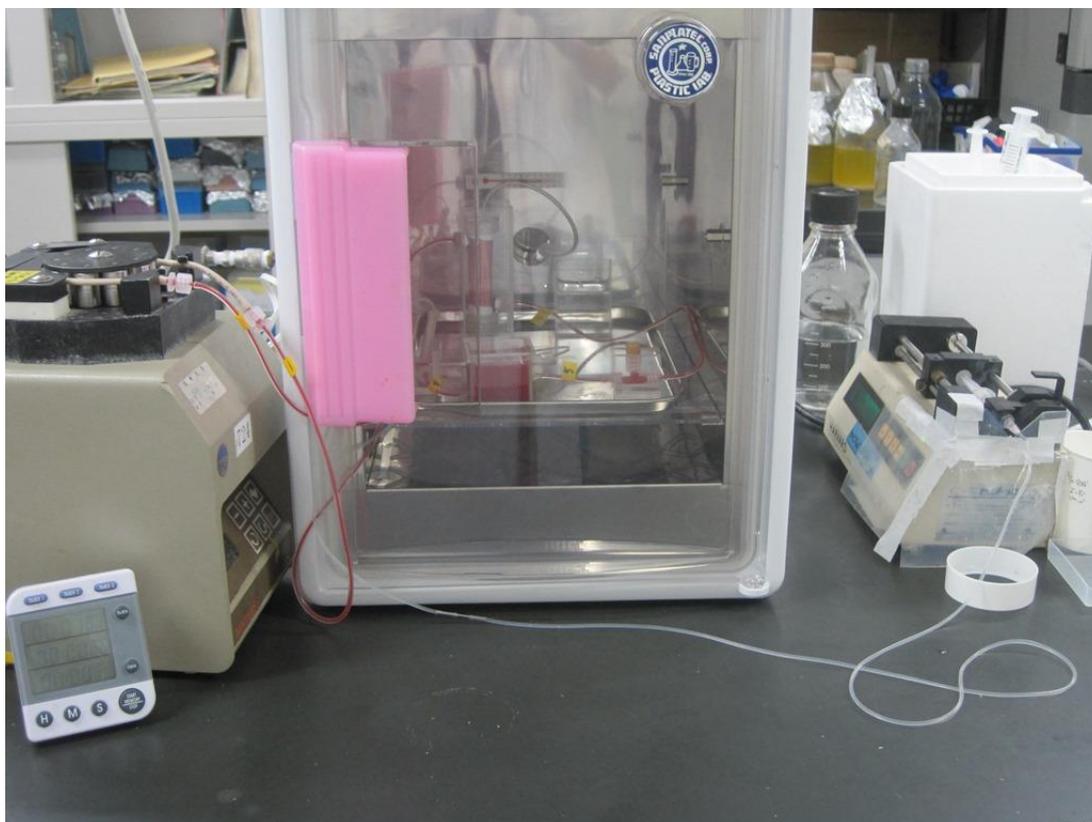


Fig. 5-5 The photograph of the organ perfusion culture system.

### 5.2.3 結果

#### 5.2.3.1 酸素富化装置を組み込んだ灌流培養システムの性能評価

今回構築した灌流培養システムの酸素移動容量係数  $k_La$  を亜硫酸ソーダ法によって測定したところ、酸素富化装置なしの条件では  $k_La = 0.42 / \text{min}$  であったのに対し、酸素富化装置ありの条件では  $k_La = 2.4 / \text{min}$  となり、酸素富化装置による酸素移動容量係数の上昇が確認された (Fig. 5-6)。

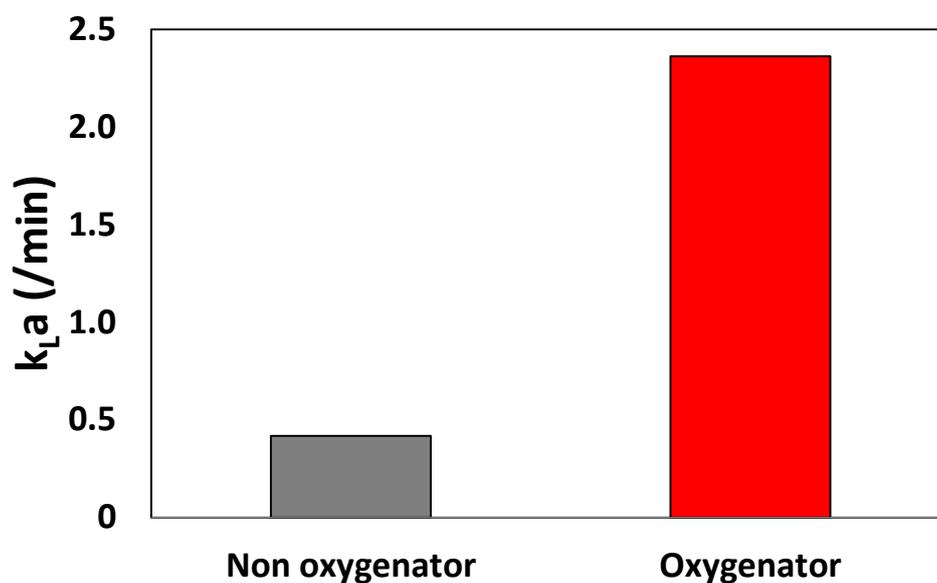


Fig. 5-6 Over-all oxygen transfer coefficient of each conditions.

以上の結果より、高密度再細胞化肝臓の酸素供給を充足させることができると期待されるが、血液に対して酸素富化が可能であるかの検討も引き続き行った。結果として、酸素富化装置前、つまり静脈血の状態での酸素飽和度が約 44%であったのに対して、酸素富化後の血液の酸素飽和度は約 99%であった (Fig. 5-7, Fig. 5-8)。以上のことから、本酸素富化装置は血液に対しても酸素富化が可能であり、酸素飽和度もほぼ 100%を達成できていることから、その性能も申し分ないことが示唆された。

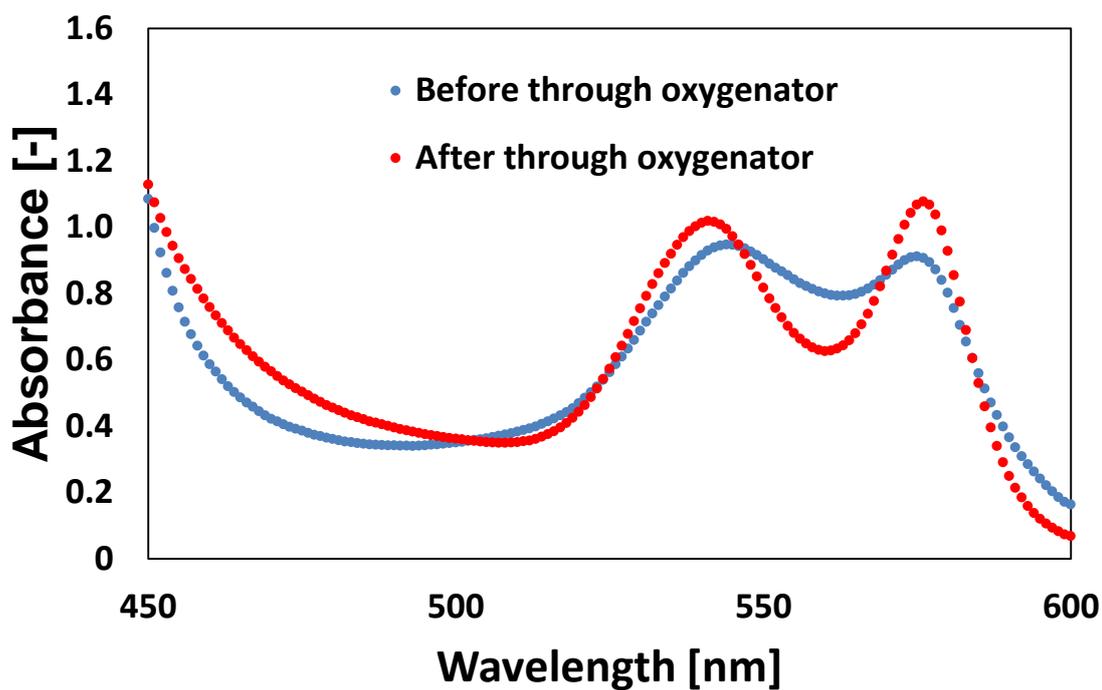


Fig. 5-7 Optical absorbance spectrum of hemoglobin before and after the oxygenator.

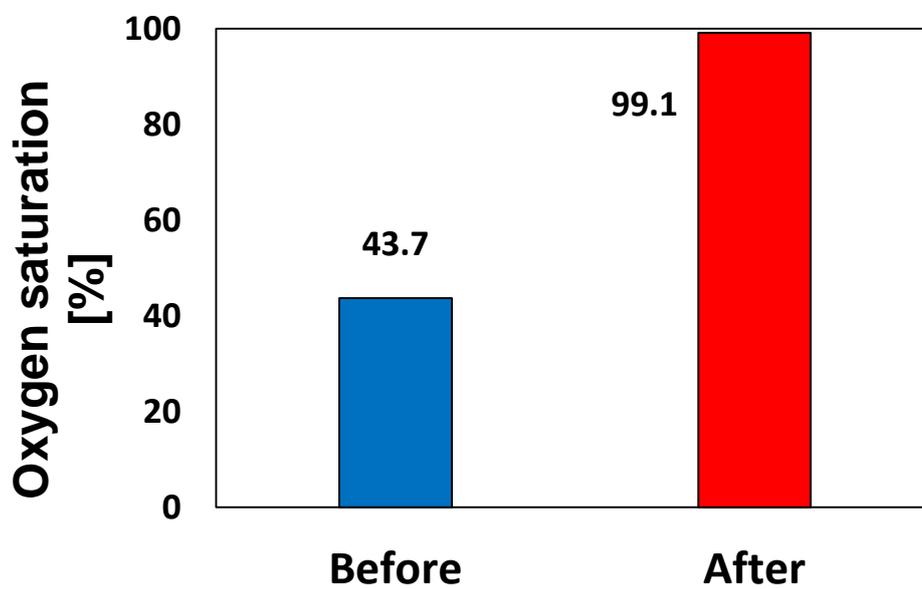


Fig. 5-8 Oxygen saturation of blood before and after the oxygenator.

## 5.2.3.2 灌流培養システムによるラット右葉の培養

現時点では、正常肝臓に匹敵する細胞密度での再細胞化肝臓の作製は実現できていない。そこで今回は高密度再細胞化肝臓のモデルとしてラットの右葉の灌流培養を行った。

まず、基礎検討として、酸素富化装置の有無を変数としてラット右葉の12時間の灌流培養を行い、肝障害の指標としてALTを経時的に測定した。また、培養終了後の右葉のH&E染色を行った。結果として、灌流培養12時間後には酸素富化装置なしの条件ではALTが2549 U/Lまで上昇し、酸素富化装置ありの条件では234 U/Lに抑えられていた(Fig. 5-9)。肝細胞懸濁液を超音波処理によって破碎してALTを測定して細胞あたりのALT量を実験的に求めたところ、およそ0.44 U/10<sup>6</sup> cellsとなった。本データを用いて灌流培養後の右葉の何割が死滅しているか推算したところ、酸素富化装置なしの条件ではおよそ40%が死滅していたのに対して、酸素富化装置を組み込むことで約4%の死滅に肝障害を抑えることができたことが示唆された。また、H&E染色の結果からも、酸素富化装置なしの条件では広範囲に壊死が見られ重度のうっ血や肝障害が確認されたが、酸素富化装置を組み込んだ条件においては壊死や類洞構造の崩壊等はほとんど観察されなかった(Fig. 5-10)。以上の結果より、酸素富化装置の導入によって長期間の培養が可能であることが期待された。

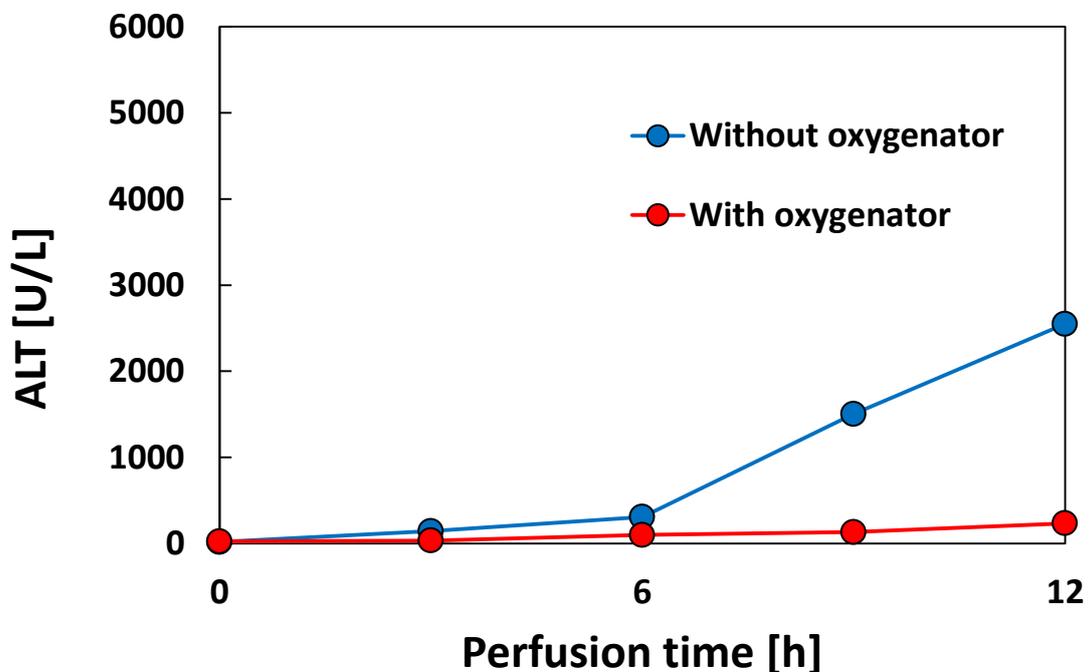
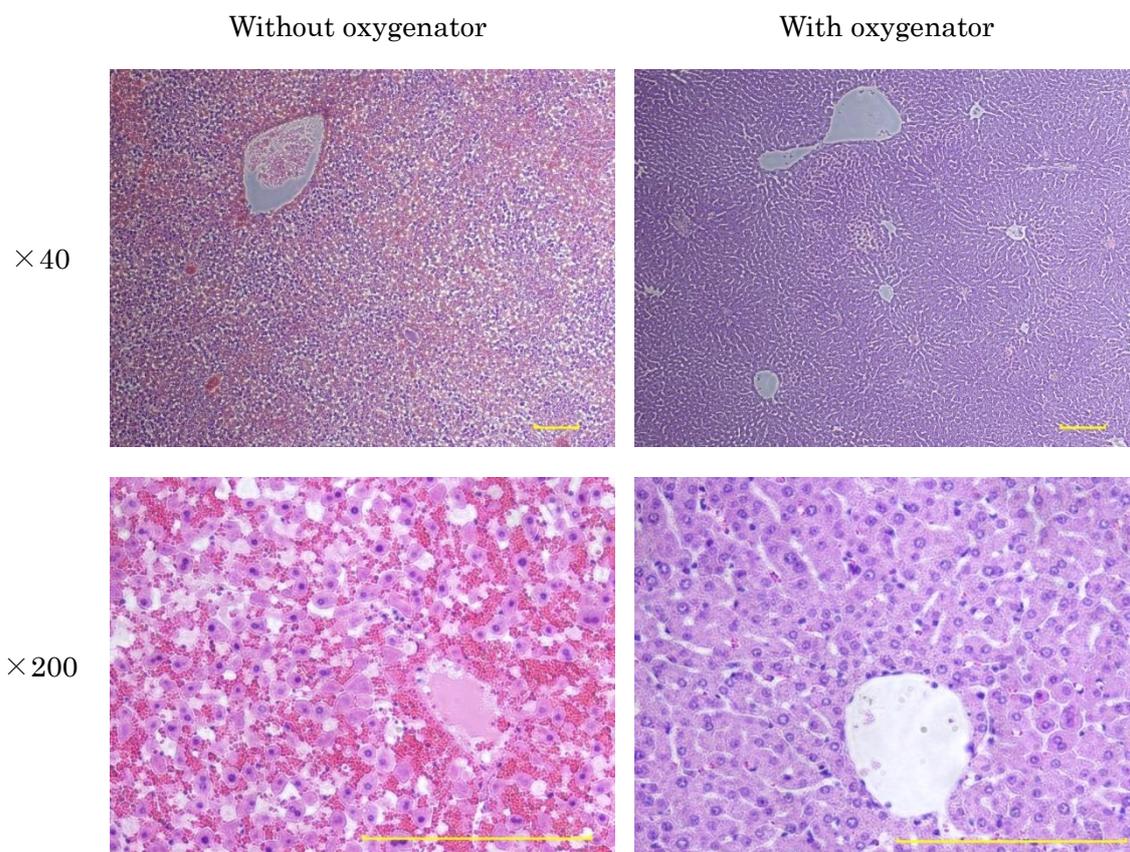


Fig. 5-9 The change of ALT activity in perfusate with time. The right lobe was cultured for 12 h (n = 1).



**Fig. 5-10 H&E staining of 12 h preserved liver in the perfusion culture system. Bars : 200  $\mu$ m**

更に、灌流培養後の肝機能評価として、灌流培養回路に 1 mM となるように塩化アンモニウム水溶液を添加し、1 時間灌流を行うことによってアンモニア負荷試験を行った。1 時間の灌流培養後の灌流液中のアンモニア濃度を Fig. 5-11 に示す。本灌流システムによって 12 時間の灌流培養を行った右葉は、摘出直後の右葉と同等のアンモニア代謝能を有していることが示された。この結果から、本灌流培養システムによって培養された右葉はアンモニア代謝能を保持していることが明らかとなった。従って、本灌流培養システムによって高密度再細胞化肝臓の培養が可能になることが期待される。

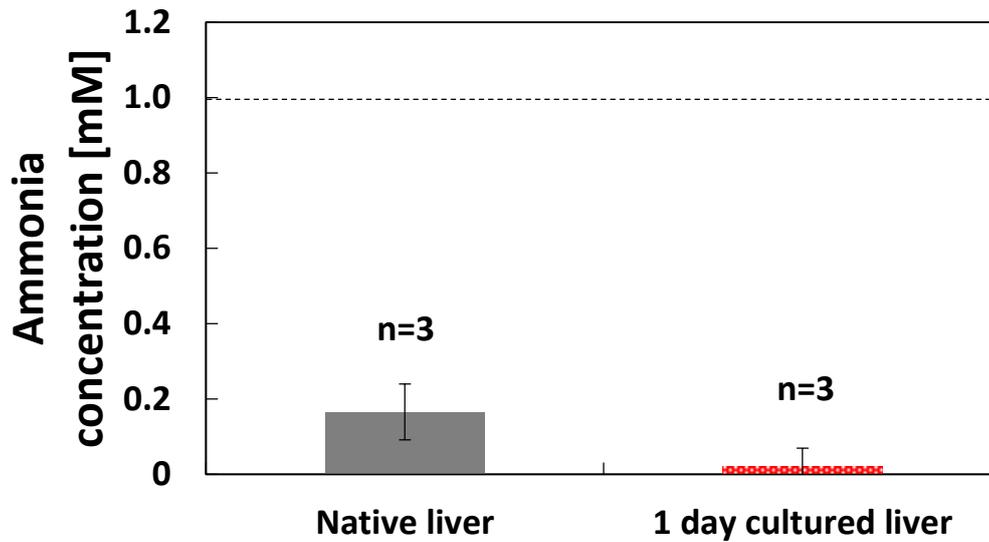


Fig. 5-11 Ammonia concentration after 1 h perfusion of the perfusate which contained 1 mM ammonia. n means the number of experiments.

#### 5.2.4 考察

最終的な目的であるラット右葉と同等の細胞密度を有する再細胞化肝臓への酸素供給のために必要な酸素移動容量係数について考察を行う。まず、肝細胞の酸素消費速度は  $12 \text{ fmol/cell/min}$  である [66]。また、肝臓  $1 \text{ g}$  につき  $2.14 \times 10^8 \text{ cells}$  の肝細胞が存在すると言われているため、ラット右葉がおおよそ  $2 \text{ g}$  であることから、 $4 \times 10^8 \text{ cells}$  程度の肝細胞が存在すると考えられる。これらのことから、ラット右葉の酸素消費速度は約  $4.8 \text{ } \mu\text{mol/min}$  となる。よって、今回の実験で用いた回路全体を一つの通気槽であると考えると、このときの(2)式における  $v = (-1/2 \cdot dS/dt) = 4.8/30 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min}) = 0.16 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$  であり、(2)式より  $k_L a = 0.71 / \text{min}$  となる。本灌流培養システムは  $k_L a = 2.4 / \text{min}$  であるため、気液界面での酸素の移動は十分行われることが示された。

一方で、灌流液から肝臓への酸素の移動つまり本灌流培養系の酸素供給速度がラット右葉の酸素消費速度を充足させることができるか計算を行い、確認した。ここで、本灌流培養システムの灌流液中の酸素濃度を求める。灌流液は D-HDM と新鮮血液を 1:1 で混合し調製しているため、酸素は液中のみならず、赤血球中のヘモグロビンとも結合し存在している。液中に溶解している酸素、つまり溶存酸素濃度は  $37^\circ\text{C}$  の大気圧下において、 $0.51 \text{ mL-O}_2/\text{L}$  である。一方で、ヘモグロビンは 1 分子につき、4 分子の酸素分子を結合させることができ、

ヘモグロビン 1 g には 1.39 mL の酸素が結合できる。本ラット血液のヘモグロビン濃度は約 15 g/dL であるため、灌流液中のヘモグロビン濃度は半分の約 7.5 g/dL である。従って、ヘモグロビン結合型酸素濃度は 10.43 mL-O<sub>2</sub>/dL と計算される。以上より、血中酸素濃度は溶解酸素濃度とヘモグロビン結合型酸素濃度の和であるため、およそ 11 mL-O<sub>2</sub>/dL と計算される。単位換算を行うと、およそ 5 mmol/L となる。本灌流培養システムの流速は 2 ml/min であるので、血中の酸素がすべて肝臓で消費されると仮定すると酸素供給速度は、約 10 μmol/min と概算される。一方で、先述のように、ラット右葉の酸素消費速度は約 4.8 μmol/min と計算される。従って、本灌流培養システムの酸素供給速度はラット右葉の酸素消費速度の約 2 倍であることが期待された。従って、今回作製した酸素富化装置を含む灌流培養システムによって右葉と同等の細胞数（細胞数が全肝の 20% 程）を有する再細胞化肝臓の灌流培養が可能になったと考えられる。

一方で、実際に高密度再細胞化肝臓のモデルとしてラット右葉の培養を行ったところ、培養 12 時間後においても細胞の生存やアンモニア代謝能の維持が確認されており、本臓器培養システムの設計指針の妥当性が示された。

以上より、本灌流培養システムは臨床での適用を見据えた高密度な再細胞化肝臓に対しても十分な酸素供給が可能であることが示された。

### 5.2.5 本節のまとめ

灌流液に対して、十分な酸素化が可能な酸素富化装置の開発に成功した。また、灌流液に酸素キャリアとして血液を添加することによって、生体内とほぼ同等の流速で灌流培養が可能であることが示された。更に、本灌流培養システムに高密度再細胞化肝臓のモデルとして右葉の灌流培養を行ったところ、培養後においてもほとんどの細胞が生存しており、更にアンモニア代謝能を有していることが確認された。以上の結果より肝臓の高い酸素消費速度を満たすことが可能な灌流培養システムの開発に成功した。

### 5.3 再細胞化肝臓への酸化ストレスに関する検討

#### 5.3.1 本節の目的

5章2節において、肝臓の酸素消費を満たすことが可能な灌流培養システムを開発した。しかしながら、再細胞化肝臓の作製において細胞播種時には、たとえ一過性ではあっても虚血は避けられず、灌流培養時に酸素供給が再開されることによる虚血再灌流障害が潜在的に危惧される。虚血再灌流障害は、主に再灌流時に大量に産生されるヒドロキシラジカルなどの活性酸素種による酸化ストレスによって引き起こされる [68]。そこで本節では、本灌流培養システムでの酸化ストレスの影響について検討を行った。

虚血再灌流障害に対して、福田らは肝虚血再灌流障害マウスモデルに対して水素ガスを吸入させることで酸化ストレスを軽減することが可能であると報告した [69]。水素ガスはその優れた還元能によって活性酸素種の中でも最も酸化力が強く有害であるヒドロキシラジカルと選択的に反応し除去する。一方で、生体内での代謝における酸化還元や細胞シグナル伝達に必要な活性酸素種はほとんど阻害しない [70]。そこで本節では、本灌流培養システムに水素ガスを導入することで再細胞化肝臓の灌流培養時における酸化ストレスの低減を目指した。

#### 5.3.2 実験方法

水素ガスは可燃性であり爆発の危険があるため、その取扱いには十分注意する必要がある。従って本検討では、爆発の危険性のない1%水素ガス混合空気を用いた。

##### 5.3.2.1 水素ガスの虚血再灌流障害に対する有効性の確認

本検討では安全性を考慮し、1%水素ガスを用いる。1%水素ガスの有効性を確認するために、再細胞化肝臓ではなく虚血再灌流ラットモデルに対して1%水素ガスを導入しその効果を確認した。

まず、第3章で開発した手法で虚血60分の肝不全ラットモデルを作製した。作製した肝不全ラットモデルを1%水素ガス混合空気環境下に6時間おき、経過観察を行った。経過観察後に採血および肝臓の採取を行い、血中成分分析および組織学的評価（H&E染色）を行った。

詳細な手順を以下に示す。

8 週齢の雄の Sprague Dawley ラットにイソフルランで吸入麻酔をかけた。腹部を正中切開し、腸をガーゼ上に出し生食をかけて乾燥しないように留意した。ブルドック鉗子を用いて門脈の右葉への分岐部分と肝動脈をクランプすることによって、右葉に対し 45 分または 60 分間温虚血を行った。虚血終了後、速やかに右葉以外の部分肝切除を行った。腸を元の位置に戻し腹部の縫合を行った。1%水素ガスおよび空気の環境下（両条件ともに 1 L/min で供給）に置き経過観察を行った。再灌流から 6 時間後にサクリフェイスし、血液および肝臓のサンプリングを行った。採取した肝臓を 10%中性緩衝ホルマリンで固定化し、H&E 染色を行った。採血した血液の血中 ALT および AST 活性を測定した。



**Fig. 5-12 Photograph of 1% hydrogen gas administration to hepatic failure rat model.**

#### 5.3.2.2 灌流培養システムへの水素ガスの適用

5 章 2 節において開発した灌流培養システム中の酸素富化装置に 1%水素ガス混合空気を送り込むことで灌流培養システム中に水素ガスを導入した。高密度再細胞化肝臓のモデルとしてラットの右葉を用いた。再細胞化時の肝細胞の虚血状態を模倣するために、本右葉に対して 60 分の温虚血を行い、水素ガスを導入した灌流培養システムを用いて 24 時間の灌流培養を行った。

詳細な実験手順を以下に示す。

5章2節と同様の灌流培養を構築した。まず、滅菌操作として70%エタノールを流し、生理食塩水で洗浄した。酸素富化装置を取り付け、ヘパリン+生理食塩水(1 mL:9 mL)を流し、回路のヘパリン化を行った。リタイアラット(Japan SLC, Shizuoka, Japan)から採血を行った。この時あらかじめシリンジにヘパリン1 mLを加えておき、血液凝固を防止した。6週齢の雄のSprague Dawleyラットの右葉に前灌流液を流し、摘出した。摘出した右葉を60分間温浴に浸漬することで温虚血状態(37°C)にした。血液15 mL+D-HDM培地15 mLを混合しこれを灌流液とし、恒温槽で37°Cに温めたのち、リザーバーに入れ回路を満たした。リザーバーに摘出した肝臓を取り付けた後、灌流液をすべて移した。中空糸膜モジュールの中空糸中に1% H<sub>2</sub>/Airを1 L/minで流し、37°C下、灌流液流速2 mL/minで灌流培養を開始した。灌流中に経時的に灌流液をサンプリングした。この際、2 h以降のサンプリング時にヘパリンを添加し、ヘパリン濃度50 U/mLを維持するように留意した。サンプリングした液は遠心分離後、上澄みを採取しALTを測定した。12 hの灌流培養後、肝臓を採取し、組織中のMDAの測定を行った。また、一部の組織は10%ホルマリンで固定化後H&E染色を行った。

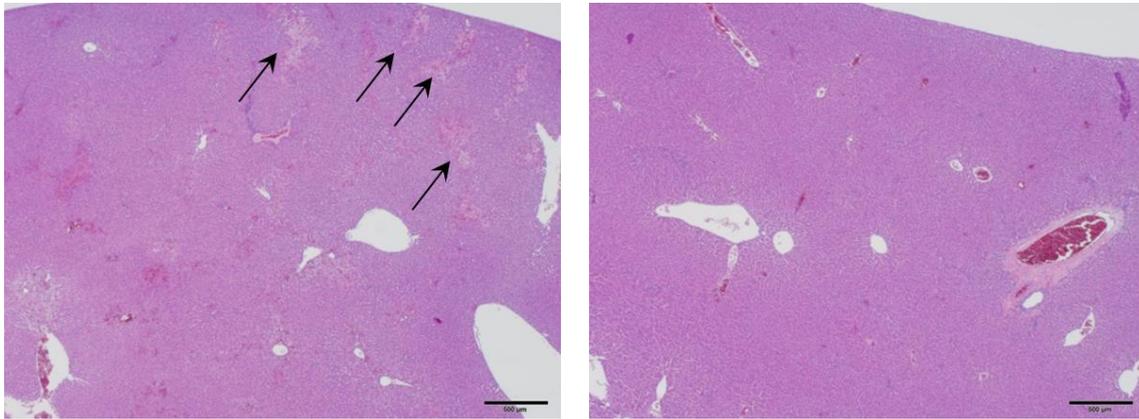
### 5.3.3 結果

#### 5.3.3.1 水素ガスの虚血再灌流障害に対する有効性の確認

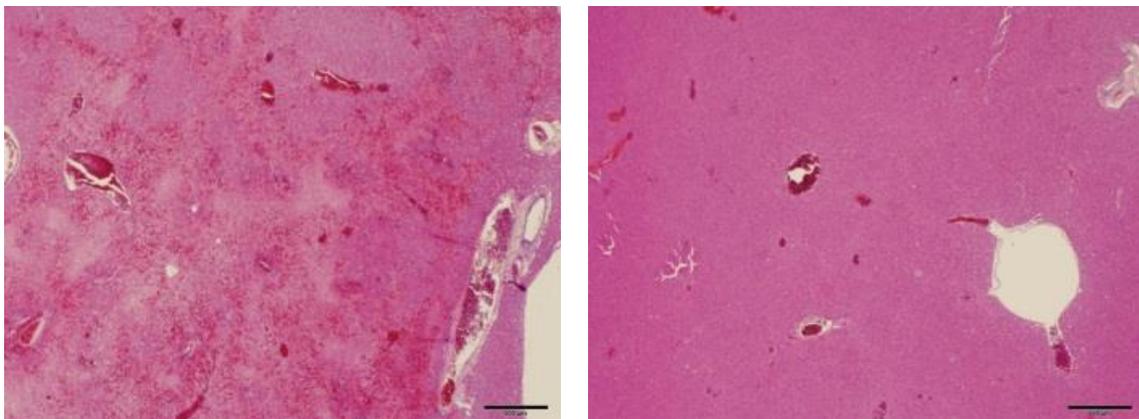
今回は肝不全ラットモデルに対し、水素ガスを吸入させ、虚血再灌流障害の原因の一つである酸化ストレスの低減による肝障害の緩和の確認を目指した。まず、虚血45分モデルに対して空気および1%水素ガスを適用したところ、壊死範囲はそれぞれ35%、10%であった。更に虚血60分モデルに対しては、壊死範囲は空気および1%水素ガスを適用した条件においてそれぞれ60%、10%であり、水素ガス適用の条件において壊死が抑えられることが確認された(Fig. 5-13, Fig. 5-14)。一方で、血中ALT、AST活性に関しても、統計学的有意差は確認されなかったが、水素ガス適用の条件において虚血45分および60分モデルの両条件において平均値として低い値を示していた(Fig. 5-15)。また、その差は虚血時間が60分になってもほぼ同じであり、水素ガスの有効性には限界があることが示唆された。

以上の結果より、水素ガスが虚血再灌流障害モデルに対して効果があることが示唆され、水素ガスを導入した機械灌流保存システムの構築によって保存中の虚血再灌流障害を低減

できることが期待された。



**Fig. 5-13** H&E staining of 45-min ischemia rat model's liver. Left: Air, right: 1% hydrogen. Arrows: necrosis



**Fig. 5-14** H&E staining of 60-min ischemia rat model's liver. Left: Air, right: 1% hydrogen.

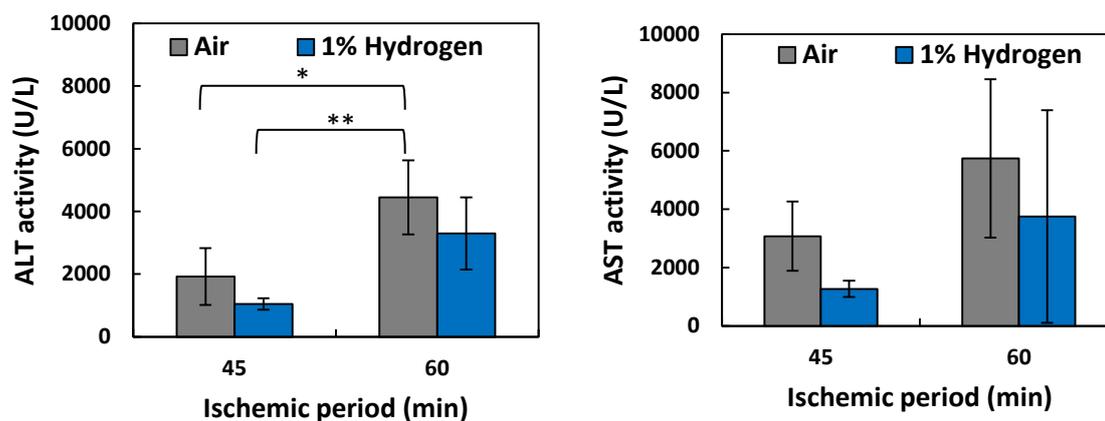


Fig. 5-15 ALT and AST activities of 45 and 60-min ischemia rat model. Significant differences were analyzed using Tukey's test. \*:p < 0.05, \*\*:p < 0.01.

### 5.3.3.2 灌流培養システムへの水素ガスの適用

肝損傷の指標となる灌流液中の ALT 活性の経時変化を Fig. 5-16 に示す。水素ガス未導入および導入の灌流培養開始時の ALT 活性はそれぞれ  $236 \pm 143$  U/L、 $194 \pm 100$  U/L であり、温虚血による肝障害はほぼ同程度であることが確認された。灌流培養開始から 12 時間には水素ガス未導入条件では、 $734 \pm 124$  U/L、水素ガス導入条件では、 $855 \pm 270$  U/L となり、両条件において差異は見られなかった (Fig. 5-16)。細胞あたりの ALT 活性から肝障害を受けている細胞の割合を概算すると、両条件ともに約 13% の細胞が障害を受け壊死していると推察される。また、酸化ストレスの指標として広く用いられている脂質過酸化分解生成物である MDA (Malondialdehyde) についても、水素ガス未導入条件で  $7.2 \pm 2.1$  pmol/mg-tissue、水素ガス導入条件で  $7.1 \pm 1.2$  pmol/mg-tissue となり、共に正常肝臓よりも高い値を示しているが、両条件において差異は見られなかった (Fig. 5-17)。さらに、灌流培養終了時の右葉の H&E 染色結果においては、どちらの条件においても微小循環障害によるうっ血が見られ、同程度の肝障害が起きていることが示唆された (Fig. 5-18)。

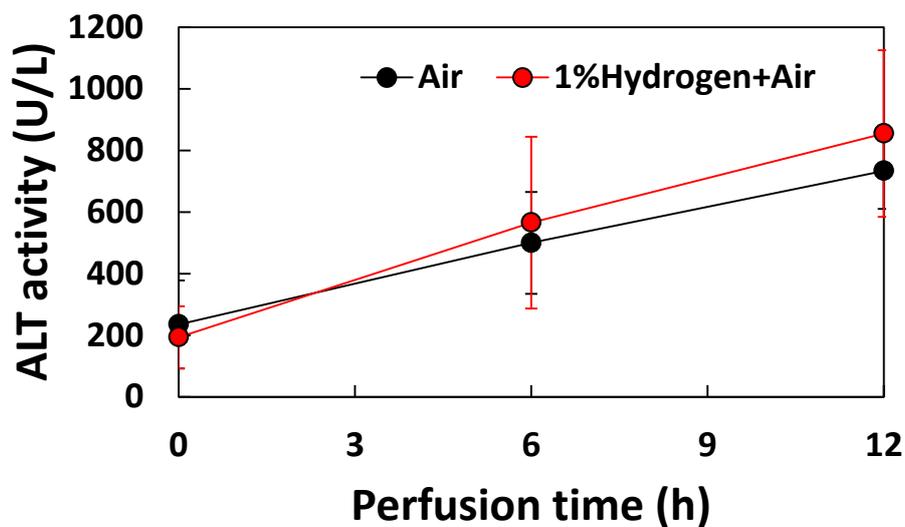


Fig. 5-16 The change of ALT activity in perfusate with time. The 60-min ischemia right lobe was cultured for 12 h (Air: n = 3, 1%Hydrogen + Air: n = 2).

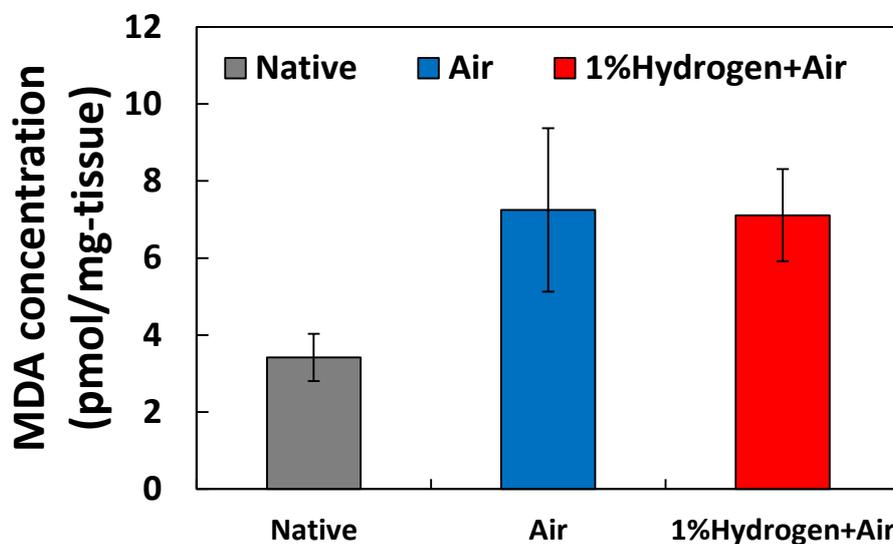
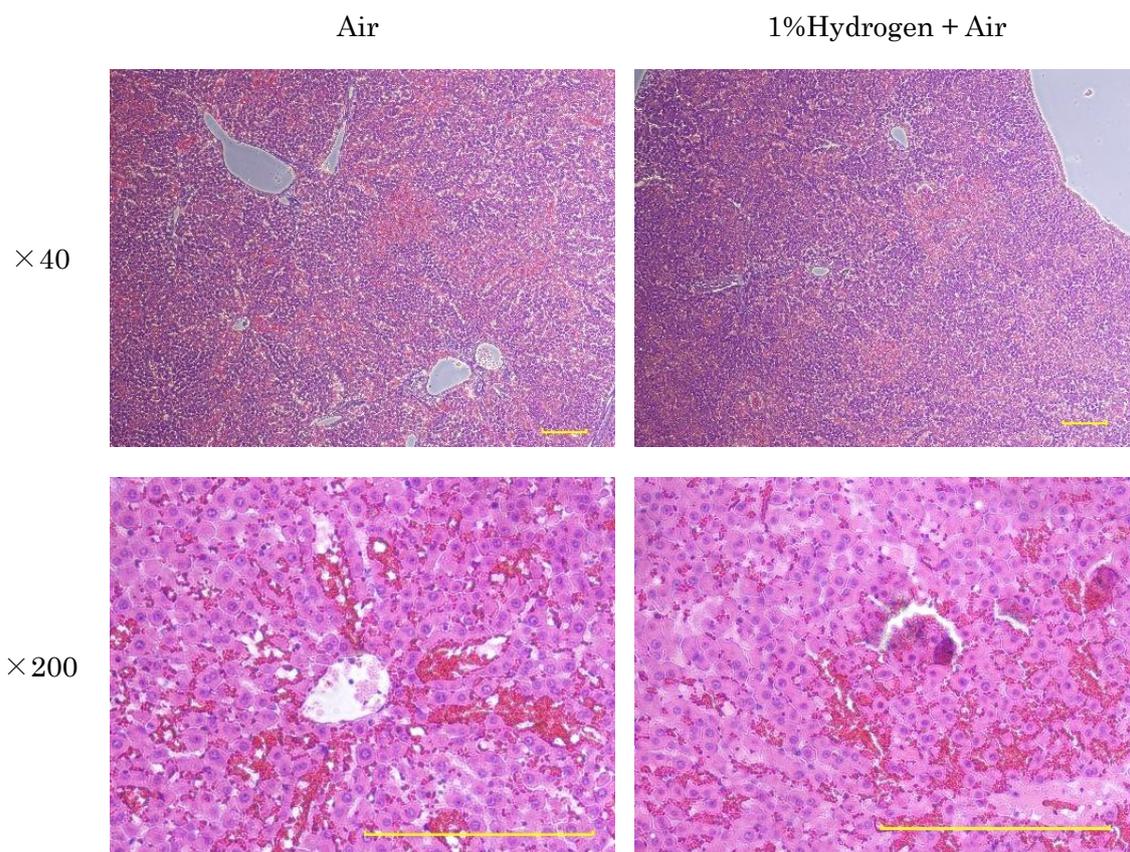


Fig. 5-17 MDA concentration in the 12 h-cultured right lobe (Native: n=2, Air: n = 3, 1%Hydrogen + Air: n = 2).



**Fig. 5-18 H&E staining of 12 h-cultured liver in the perfusion culture system. Bars : 200  $\mu$ m**

#### 5.3.4 考察

再細胞化肝臓作製の際に潜在的に危惧される虚血再灌流障害による酸化ストレスを軽減するために、活性酸素種の還元剤として1%水素ガスの導入を試みた。動物モデルに対しては既往の報告と同様に有効性が確認された。しかしながら、灌流培養時においては1%水素ガスの導入による有意性が確認されなかった。

今回の検討において用いた水素ガス濃度が1%であるため、高濃度の水素ガスを用いることで肝障害が低減される可能性も考えられる。しかしながら、水素ガスは可燃性の気体であり、酸素存在下において高濃度の水素ガスを使用するためには特別な管理用の設備が必要となり、爆発等のリスクから臨床には不適であると思われる。

動物モデルに対して1%水素ガスの有効性が確認されたことから、肺と同等のガス交換能を持つ水素富化装置の開発を行うことによって灌流培養においても虚血再灌流障害の低減

が実現可能になると考えられる。また、水素ガス以外の還元剤（アスコルビン酸、ビタミンEおよびグルタチオンペルオキシターゼなど）の検討も有効となると考えられる。

5章で得られた知見をまとめると、再細胞化肝臓の臓器培養の基盤となる、十分な酸素化が可能な臓器培養システムの構築に成功した。しかしながら、現段階ではあくまで“基盤技術”であるため、本システムの更なる最適化を行っていく必要がある。

具体的には、5章3節で検討を行った酸化ストレスへの対策や、臓器全体への均一な血液灌流を実現するための臓器形状の保持など包括的なシステムの開発が必要となると思われる。

### 5.3.5 本節のまとめ

本灌流培養システムに水素ガスの導入を行い、虚血再灌流障害の低減を目指した。高密度再細胞化肝臓のモデルとして温虚血を行った右葉の灌流培養を行ったところ、培養後においても差異が確認されず、効果がほとんどなかったと考えられる。動物モデルに対しては水素ガスの有効性が確認されたことから、今後はガス交換装置の性能向上によって虚血再灌流障害の低減が実現できると期待された。

#### 5.4 本章のまとめ

- 肝臓の灌流培養を実現するために必要な酸素供給能を持つ酸素富化装置の開発に成功した。
- 本酸素富化装置を灌流培養回路に組み込み、灌流液に酸素キャリアとして血液を添加することによって、12時間の灌流培養後においてもほとんどの細胞が生存していた。
- 12時間の灌流培養後も正常肝臓と同等のアンモニア代謝能を有していることが確認された。

以上の結果より、十分な酸素化が可能な再細胞化肝臓培養システムの開発に成功したことが示された。

- 酸化ストレス対策として1%水素ガスが虚血再灌流障害ラットモデルに対して有効であることが確認された。
- 灌流培養システムに1%水素ガスの導入を試みたが有効性は確認されず、ガス交換装置の性能向上の必要性が示唆された。

## 第6章 結論

### 6.1 本論文のまとめ

本研究では、脱細胞化肝臓を鋳型とした移植用肝グラフトの開発に必要となる基盤技術の開発を行った。現状において再細胞化肝臓の最適化が停滞している理由として、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性が評価できていないことが挙げられる。そこで本研究では再細胞化肝臓の評価のために必要な肝不全ラットモデルを開発した。更に、本肝不全ラットモデルに対して再細胞化肝臓を組み込んだ血液体外循環を行う新たな *ex vivo* 評価系を開発した。一方で、再細胞化肝臓の更なる高機能化に向けて、臓器培養システムが必須であると考え、再細胞化肝臓に対して十分な酸素供給が可能な灌流培養システムを開発した。

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。

第2章では、既往の研究について述べ、研究上必要な知見や課題を明らかにした。

第3章では、再細胞化肝臓の有効性評価のための肝不全ラットモデルの開発を行った。温虚血と80%部分肝切除を組み合わせることで、重篤度の制御が可能であり再現性の高い肝不全ラットモデルの開発に成功した。また、本モデルは手術からわずか6時間で肝性昏睡発症レベルの血中アンモニア濃度を示し、迅速に肝不全が誘導可能な非常に有用なモデルであることが示された。

第4章では、本研究室の既往の報告に基づいた再細胞化肝臓を作製し、その有効性を評価した。まず、*in vitro* において、高アンモニア血症のモデルとして塩化アンモニウムを添加した灌流液を再細胞化肝臓に灌流することによってアンモニア負荷試験を行い肝機能評価を行った。本検討により、再細胞化肝臓がアンモニア代謝能を有していることが確認され、その細胞あたりの代謝速度は既往の細胞培養系での報告よりも高い値を示し、播種された細胞の良好な肝機能発現が示された。一方で、第3章で開発した肝不全ラットモデルに対して再細胞化肝臓を血液体外循環によって適用し、再細胞化肝臓の肝不全に対する有効性を評価した。本検討により、肝不全ラットモデルの血中アンモニア濃度の上昇が抑え

られ、再細胞化肝臓の有効性が示されたとともに、本 *ex vivo* 評価システムによって肝不全に対する有効性の評価が可能となったことが示された。

第5章では、酸素富化装置の開発および本装置を組み込んだ再細胞化肝臓の灌流培養システムを構築した。本検討によって灌流液に対して、十分な酸素化が可能な酸素富化装置の開発に成功した。また、灌流液に酸素キャリアとして血液を添加することによって、生体内とほぼ同等の流速で灌流培養が可能であることが示された。更に、本灌流培養システムに高密度再細胞化肝臓のモデルとして右葉の灌流培養を行ったところ、3日間の培養後においてもほとんどの細胞が生存しており、アンモニア代謝能を有していることが確認された。以上の結果より肝臓の高い酸素消費速度を満たすことが可能な灌流培養システムの開発に成功した。

## 6.2 今後の展望

今後、脱細胞化肝臓を鋳型として作製した再細胞化肝臓の実用化に向け、高密度かつ臓器全体に均一に細胞播種が可能な再細胞化方法の開発や、移植の実現に向けた検討、患者由来の細胞源の確保等が必要となると考えられる (Fig. 6-1)。

現時点においては、正常肝臓とほぼ同オーダーの細胞密度での臓器全体への均一な播種は実現できていない。既往の報告としては門脈より細胞懸濁液を灌流する播種や、本研究のように細胞懸濁ゲルを外部より注入する播種が主に行われているが、それぞれ、播種細胞による血管網の閉塞、臓器表面の損傷等の課題がある [48] [5]。近年、移植の際に吻合を行わなくても生存が可能と考えられる肝動脈からの細胞懸濁液の灌流や胆管からの播種 [71]を行ったもの等が報告されており、これらの手法を細胞ごとに適した経路を用いて播種することによって元の肝臓とほとんど同様の構造を有する再細胞化肝臓の構築が期待される。

移植の実現に向けては、脱細胞化肝臓に対して抗血栓性を有するヘパリンを固定化し、移植初期における血栓形成を防止する研究 [72]が報告されており、短期的な移植評価についての基盤は整いつつあると思われる。しかしながら、長期的な移植評価のためには、血液灌流のための完全な血管部位の内皮化やその内皮細胞を維持するための壁細胞等も必要となると考えられる。更に、肝臓表面からの血液の漏洩に対する対策として生分解性を有する素材での表面のコーティング等が必要になると考えられる。

また、細胞源としては患者由来の細胞から誘導した増殖性を有する細胞を用いる必要があると考えられる。近年、山中らによって報告された iPS 細胞 [73]が細胞源として様々な研究分野で期待されている。この iPS 細胞由来の肝芽細胞と MSC および血管内皮細胞である HUVEC を共培養することによって発生学における肝原基が形成されるとの報告 [74]もあり、様々な細胞を脱細胞化肝臓内で共培養を行うことによって、血管新生や自己組織化による類洞構造の形成等も期待される。

以上のような検討を行い、本研究によって開発された性能評価システムや灌流培養システムに組み込んでいくことによって再細胞化肝臓の最適化が進展し、臨床への道が拓けるとと思われる。

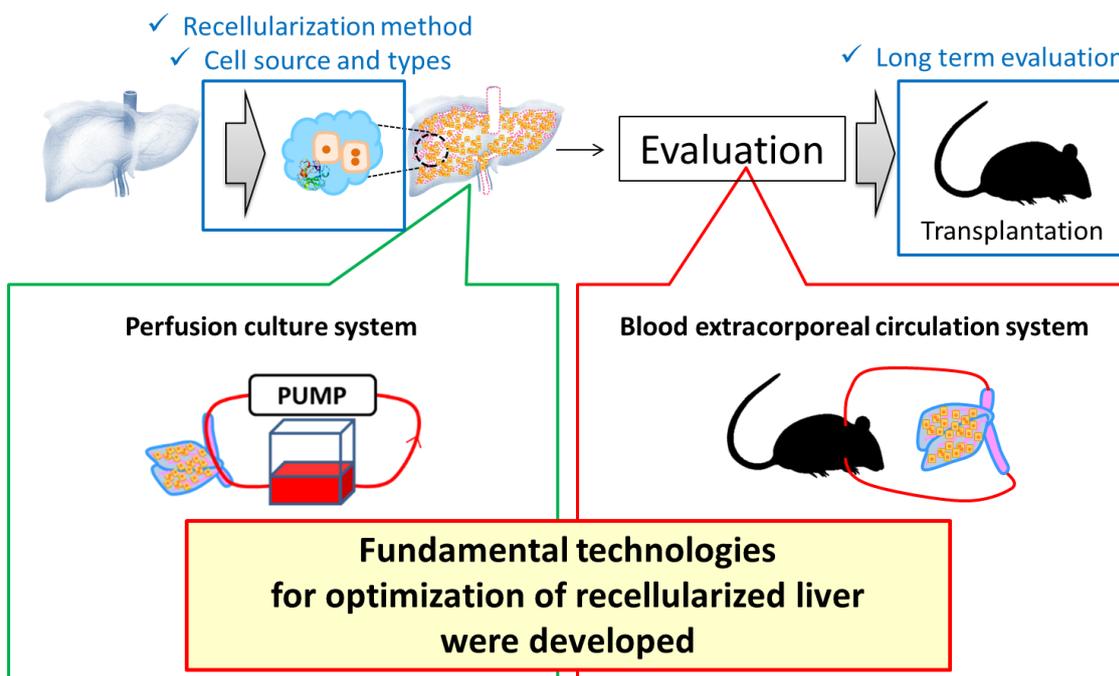


Fig. 6-1 Results of this study (red and green) and future works (blue).

## 第7章 参考文献

- [1] “移植に関するデータ,” 公益社団法人日本臓器移植ネットワーク.
- [2] Kim WR, Lake JR, Smith JM, Schladt DP, Skeans MA, Harper AM, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL, “OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Liver,” *Am J Transplant.*, Suppl 1, 172-253, 2018.
- [3] Langer R, Vacanti JP., “Tissue engineering.,” *Science.*, 260, 920-926, 1993.
- [4] K Ohashi, T Yokoyama, M Yamato, H Kuge, H Kanehiro, M Tsustumi, T Amamura, H Iwata, Yang J, T Okano, Y Nakajima, “Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets,” *Nat. Med.* , 13, 880-885, 2007.
- [5] N. Shirakigawa, T. Takei, H. Ijima, “Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering,” *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 6, 740-745, 2013.
- [6] N. Fausto, J.S. Campbell, “The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation,” *Mech. Dev.*, 120, 1, 117-130, 2003.
- [7] 織田敏次, 肝臓の生物学, 東京大学出版会, 1990.
- [8] 中嶋俊彰, 肝臓病, (株)主婦の友社, 1999.
- [9] 武籐泰敏, 著: 肝不全-臨床と基礎-, 東京, 日本医事新報社, 1994, 139-140.
- [10] 奥平雅彦, 著: 臨床のための肝臓病理, 東京, 医学書院, 1995, 23-32.
- [11] Terblanche. J, Hickman. R, “Animal models of fulminant hepatic failure.,” *Dig Dis Sci.*, 36, 6, 770-774, 1991.
- [12] Hindfelt B, Plum F, Duffy TE., “Effects of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts.,” *J Clin Invest*, 59, 386-396, 1977.
- [13] Butterworth RF, Girard G, Giguère JF., “Regional differences in the capacity for ammonia removal by brain following portacaval anastomosis.,” *J Neurochem*, 51, 486-490, 1988.

- [14] Higgins GM, A. RM, “Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.,” *Arch Pathol.*, 12, 186-202, 1931.
- [15] He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y., “A rat model for acute hepatic failure.,” *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*, 2, 423-425, 2003.
- [16] Ijima H, Noguchi A, Katsuno T, Ono T, Nakazawa K, Funatsu K, Kawakami K., “Evaluating the performance of a hybrid artificial liver support system with a recoverable hepatic failure rat model.,” *Ann NY Acad Sci.*, 944, 344-349, 2001.
- [17] Mullen KD, Birgisson S, Gacad RC, Conjeevaram H., “Animal models of hepatic encephalopathy and hyperammonemia.,” *Adv Exp Med Biol.*, 368, 1-10, 1994.
- [18] Wang JB, Wang HT, Li LP, Yan YC, Wang W, Liu JY, Zhao YT, Gao WS, Zhang MX., “Development of a rat model of D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatorenal syndrome.,” *World J Gastroenterol.*, 21, 34, 9927-9935, 2015.
- [19] James LP, Mayeux PR, Hinson JA., “Acetaminophen-induced hepatotoxicity.,” *Drug Metab Dispos.*, 31, 12, 1499-1506, 2018.
- [20] Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, Rozga J., “Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration.,” *Hepatology.*, 24, 6, 1452-1459, 1996.
- [21] He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y., “A rat model for acute hepatic failure.,” *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*, 2, 3, 423-425, 2003.
- [22] STARZL TE, MARCHIORO TL, VONKAULLA KN, HERMANN G, BRITTAIN RS, WADDELL WR., “HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS.,” *Surg Gynecol Obstet.*, 117, 659-676, 1963.
- [23] Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, Evangelista AS, Guardia BD, Matielo CE, Neves DB, Pandullo FL, Felga GE, Alves JA, Curvelo LA, Diaz LG, Rusi MB, Viveiros Mde M, Almeida MD, Pedroso PT, Rocco RA, Meira Filho SP., “Liver transplantation: history, outcomes and perspectives.,” *Einstein (Sao Paulo).*, 13, 1, 149-152, 2015.

- [24] 日本臓器移植ネットワーク, 移植に関するデータ 累計登録者数, 2018.
- [25] 後藤満一、大橋一夫, 著: *再生医療叢書 5 代謝系臓器*, 朝倉書店, 2012, 133-141.
- [26] 後藤満一、大橋一夫, 著: *再生医療叢書 5 代謝系臓器*, 朝倉書店, 2012, 141-147.
- [27] Phillips TJ, Manzoor J, Rojas A, Isaacs C, Carson P, Sabolinski M, Young J, Falanga V., “The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers.,” *Arch Dermatol.*, 138, 8, 1079-1081, 2002.
- [28] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L., “Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.,” *N Engl J Med.*, 331, 14, 889-895, 1994.
- [29] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y., “Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium.,” *N Engl J Med.*, 351, 12, 1187-1196, 2004.
- [30] Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T., “Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets.,” *Tissue Eng.*, 12, 3, 499-507, 2006.
- [31] 後藤満一、大橋一夫, 著: *再生医療叢書 5 代謝系臓器*, 朝倉書店, 2012, 123-132.
- [32] Smith MK, Riddle KW, Mooney DJ., “Delivery of hepatotrophic factors fails to enhance longer-term survival of subcutaneously transplanted hepatocytes.,” *Tissue Eng.*, 12, 2, 235-244, 2006.
- [33] Chen AA, Thomas DK, Ong LL, Schwartz RE, Golub TR, Bhatia SN., “Humanized mice with ectopic artificial liver tissues.,” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108, 29, 11842-11847, 2011.
- [34] Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, Amanuma T, Iwata H, Yang J, Okano T, Nakajima Y., “Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets.,” *Nat Med.*, 13, 7, 880-885, 2007.

- [35] Matsuura K, Haraguchi Y, Shimizu T, Okano T., “Cell sheet transplantation for heart tissue repair.,” *J Control Release.*, 169, 3, 336-340, 2013.
- [36] Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, Okano T., “Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology.,” *Biomaterials.* , 31, 7, 1646-1654, 2010.
- [37] Sakaguchi K, Shimizu T, Horaguchi S, Sekine H, Yamato M, Umezu M, Okano T., “In vitro engineering of vascularized tissue surrogates.,” *Sci Rep.*, 3, 1316, 2013.
- [38] Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, Arai K, Nishiyama Y., “Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication.,” *Biofabrication.*, 2, 1, 2010.
- [39] Lee JW, Choi YJ, Yong WJ, Pati F, Shim JH, Kang KS, Kang IH, Park J, Cho DW., “Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering.,” *Biofabrication.*, 8, 1, 2016.
- [40] Lee H, Han W, Kim H, Ha DH, Jang J, Kim BS, Cho DW., “Development of Liver Decellularized Extracellular Matrix Bioink for Three-Dimensional Cell Printing-Based Liver Tissue Engineering.,” *Biomacromolecules.*, 18, 4, 1229-1237, 2017.
- [41] Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J, Jia W, Dell'Erba V, Assawes P, Shin SR, Dokmeci MR, Oklu R, Khademhosseini A, “3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication.,” *Ann Biomed Eng.* , 45, 1, 148-163, 2017.
- [42] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF., “An overview of tissue and whole organ decellularization processes.,” *Biomaterials.*, 32, 12, 3233-3243, 2011.
- [43] Badylak SF, Taylor D, Uygun K., “ Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds.,” *Annu Rev Biomed Eng.* , 13, 27-53, 2011.
- [44] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF., “An overview of tissue and whole organ decellularization processes.,” *Biomaterials.*, 32, 12, 3233-3243, 2011.

- [45] Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF., “Quantification of DNA in biologic scaffold materials.” *J Surg Res.*, 152, 1, 135-139, 2009.
- [46] Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, Winston S, Wang J, Walls S, Nichols JE., “Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation.” *Tissue Eng Part A.*, 16, 8, 2562-2580, 2010.
- [47] 今堀和友、山川民夫, 生化学辞典 第1版, 東京化学同人, 1984.
- [48] Basak E Uygun, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A Guzzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, Francois Berthiaume, Martin Hertl, Yaakov Nahmias, Martin L Yarmush, and Korkut Uygun, “Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix,” *Nat Med.*, 16, 7, 814-820, 2010.
- [49] Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, Fukumitsu K, Faulk D, Jiang H, Reing J, Gramignoli R, Komori J, Ross M, Nagaya M, Lagasse E, Stolz D, Strom SC, Fox IJ, Badylak SF., “A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement.” *Tissue Eng Part C Methods*, 17, 6, 677-686, 2011.
- [50] Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, Kitago M, Shinoda M, Obara H, Itano O, Kawachi S, Tanabe M, Coudriet GM, Piganelli JD, Gilbert TW, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y, “Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach.” *Cell Transplant.*, 22, 2, 231-242, 2013.
- [51] Park KM, Woo HM., “Porcine bioengineered scaffolds as new frontiers in regenerative medicine.” *Transplant Proc.*, 44, 4, 1146-1150, 2012.
- [52] Park KM, Woo HM., “Systemic decellularization for multi-organ scaffolds in rats.” *Transplant Proc*, 44, 4, 1151-1154, 2012.
- [53] Bao J, Shi Y, Sun H, Yin X, Yang R, Li L, Chen X, Bu H., “Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats.” *Cell Transplant.*, 20, 5, 753-766, 2011.

- [54] N. Shirakigawa, H. Ijima, T. Takei, “Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering,” *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 5, 546-551, 2012.
- [55] Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J., “ An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure.,” *World J Gastroentero.* , 15, 25, 3086-3098, 2009.
- [56] Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J., “Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure.,” *Hepatology.* , 46, 6, 1844-1852, 2007.
- [57] Éboli LP, Netto AA, Azevedo RA, Lanzoni VP, Paula TS, Goldenberg A, Gonzalez AM., “Evaluating the best time to intervene acute liver failure in rat models induced by d-galactosamine.,” *Acta Cir Bras.* , 31, 12, 783-792, 2016.
- [58] S. PO., “Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver.,” *Exp Cell Res.*, 74, 2, 450-454, 1972.
- [59] 中村敏一, 初代培養肝細胞実験法, 学会出版センター, 1987.
- [60] Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K., “Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions.,” *Int J Artif Organs*, 27, 2, 118-126, 2004.
- [61] Ijima H, Kawakami K., “Promotion of monolayer formation and high expression of ammonia metabolism of primary rat hepatocytes on arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide-coated polystyrene dish.,” *J Biosci Bioeng.*, 100, 1, 62-66, 2005.
- [62] Takagi M, Kojima N, Yoshida T., “Analysis of the ammonia metabolism of rat primary hepatocytes and a human hepatocyte cell line Huh 7.,” *Cytotechnology.* , 32, 1, 9-15, 2000.
- [63] 井嶋博之, “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,” 九州大学大学院工学部機械工学科平成六年度博士論文, 1995.

- [64] Yamashita Y, Shimada M, Tsujita E, Shirabe K, Ijima H, Nakazawa K, Sakiyama R, Fukuda J, Funatsu K, Sugimachi K., “Efficacy of a larger version of the hybrid artificial liver support system using a polyurethane foam/spheroid packed-bed module in a warm ischemic liver failure pig model for preclinical experiments.,” *Cell Transplant.* , 12, 2, 101-107, 2003.
- [65] H. B. Waynforth, P. A. Flecknell, Experimental and surgical technique in the rat second edition, Academic press.
- [66] Guarino RD, Dike LE, Haq TA, Rowley JA, Pitner JB, Timmins MR., “Method for determining oxygen consumption rates of static cultures from microplate measurements of pericellular dissolved oxygen concentration.,” *Biotechnol Bioeng.* , 86, 7, 775-787, 2004.
- [67] 牧野幹男, 桑島俊彦, 遠藤武, 宮内伊久子, “分光々度計による血液酸素飽和度測定 [I] 等吸光点を含む二点測定法,” *臨床病理*, 16, 6, 536-650, 1968.
- [68] Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT., “Hepatic ischemia-reperfusion injury.,” *Am J Surg.*, 181, 2, 160-166, 2001.
- [69] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S., “Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress.,” *Biochem Biophys Res Commun.*, 361, 3, 670-674, 2007.
- [70] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S., “Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals.,” *Nat Med.* , 13, 6, 688-694, 2007.
- [71] Hassanein W, Uluer MC, Langford J, Woodall JD, Cimeno A, Dhru U, Werdesheim A, Harrison J, Rivera-Pratt C, Klepfer S, Khalifeh A, Buckingham B, Brazio PS, Parsell D, Klassen C, Drachenberg C, Barth RN, LaMattina JC, “Recellularization via the bile duct supports functional allogenic and xenogenic cell growth on a decellularized rat liver scaffold.,” *Organogenesis.*, 13, 1, 16-27, 2017.

- [72] Bao J, Wu Q, Sun J, Zhou Y, Wang Y, Jiang X, Li L, Shi Y, Bu H, “Hemocompatibility improvement of perfusion-decellularized clinical-scale liver scaffold through heparin immobilization.,” *Sci Rep.*, p. doi: 10.1038/srep10756, 2015.
- [73] Takahashi K, Yamanaka S., “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.,” *Cell.*, 126, 4, 663-676, 2006.
- [74] Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H., “Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.,” *Nature.*, 499, 7459, 481-484, 2013.

## 第8章 謝辞

本論文の執筆にあたり、右も左もわからない私を研究室配属当初から一から面倒を見て頂き、時に厳しく、時に優しく、研究のいろはをご教示頂きました。また、広く深い視野の下、懇切丁寧に様々なアドバイスや研究の指針を示して下さいました九州大学大学院工学研究院化学工学部門の 井嶋 博之 教授 に深く御礼を申し上げます。

本論文の審査にあたり、ご多忙の中種々の貴重なご助言を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学部門の 上平 正道 教授、九州大学大学院工学院機械工学部門の 工藤 奨 教授に深く感謝申し上げます。

実験方法やオペの手技だけではなく、研究者としての在り方など様々な面でご指導頂きました 池田（旧姓：白木川） 奈菜 氏（九州大学大学院工学研究院化学工学部門元助教）に深く感謝しております。

本研究に対し、多方面から様々なご支援を頂きました熊本大学医学部消化器外科学の馬場 秀夫 教授、山下 洋市 准教授、宮田 辰徳 医師、山尾 宣暢 医師に深く感謝しております。

肝不全モデルの病理診断において、的確な診断・説明を頂きました佐賀大学医学部病因病態科学診断病理学分野 相島 慎一 教授 に深く感謝しております。

酸素富化装置の作製に関して、実験器具の提供や実験の指導をして頂いた九州大学大学院工学研究院化学工学部門の 水本 博 准教授に深く感謝しております。

実験の遂行にあたり、必要な器具の作製で多大なるお力添えを頂きました工作室の皆様 に深く感謝しております。

化学工学部門の諸先生方ならびに事務室、そして九州大学の職員の皆様には大変お世話になりました。深く御礼申し上げます。

研究室内を明るく盛り上げ、笑いの絶えない非常に居心地の良い環境を築いて頂いた本研究室の皆様には深く感謝しております。

最後に、長い学生生活を温かく見守り、支えて頂いた家族に心から感謝申し上げます。

平成 31 年 1 月 坂本 裕希