

臓器の再生医工学

Tissue Engineering for Organs

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00204)

プロジェクトリーダー

山岡 義生

京都大学大学院医学研究科・教授

コアメンバー

井上 一知

京都大学再生医科学研究所・教授

岩田 博夫

京都大学再生医科学研究所・教授

猪飼伊和夫

京都大学大学院医学研究科・講師



1. 研究の概要

生体内の重要臓器が機能不全に陥ると生命を維持することは困難であり、感覚臓器の機能不全は日常生活に大きな支障をきたす。

本研究の目的は、現行の治療法では回復が困難である臓器不全の治療法として、自己・組織提供者または異種動物の生体組織や細胞と人工材料とを複合化した人工臓器を作成し、その人工臓器を用いて機能を代行することにより自己臓器の再生を誘導することにある。糖尿病の治療として長期の代行機能を必要とする人工膵臓、機能の複雑さゆえに人工物のみでは作成の極めて困難な人工肝臓（肝機能補助装置）を中心に、難治性心不全・虚血性心疾患における心筋の再生、網膜の再生による視力回復、乳腺の再生、人工膀胱の開発など、従来の治療法では困難であった種々の臓器の再生を試みる。

2. 研究成果概要

2.1 バイオ人工膵臓

バイオ人工膵臓とは、膵ランゲルハンス島（膵島）を半透膜に封入した後、糖尿病患者に移植する医療デバイスである。膵島は半透膜により患者の免疫系から隔離され、拒絶反応を受けことなく長期間生着し、インスリンを分泌して血糖値のコントロールを行うことができると期待されている。過去の研究により、マウスやラットなどの齧歯類を用いた系では、同種また異種膵島を用いたバイオ人工膵臓は100日以上 of 長期間生着し血糖値のコントロールを行うことができる。

2.1.1 皮下へのバイオ人工膵臓の埋め込み

従来、多くの研究ではバイオ人工膵臓は腹腔内に移植されてきた。腹腔内移植では、侵襲の大きな手術が必要であり、繰り返し埋め込みが困難である。これらの困難が克服できる皮下へのバイオ人工膵臓の埋め込みを試みた。皮下は血管が少なく、移植された細胞はすぐに酸素不足で死滅してしまう。そこで、細胞を移植できる空隙を持つ毛細血管床の形成を試みた。毛細血管を誘導する機能がある塩基性繊維芽細胞増殖因子を含む小さなバッグを糖尿ラットの皮下に埋め込み、血管床が形成された一週間後に、バッグを皮下から除去すると血管床の中心に細胞を植えることのできる空隙ができる。この場所に膵島の移植を行った。血糖値は、移植後一週間程度で正常化し、60日目に移植膵島

を取り出すまで正常値であった。移植後60日目に皮下から取り出し組織像を検討したところ、60日後においても移植膵島は生きており、そのまわりに多くの毛細血管が存在していた。

2.1.2 繰り返し埋め込み可能なシステムの開発

若年者が多いインスリン依存型糖尿病患者にバイオ人工膵臓を適用した場合、数回から10回程度のデバイスまたは膵島の入れ替えが必要となる。そこで中空糸を用いた膵島入れ替え可能なバイオ人工膵臓の検討をしている。この場合も、デバイス内の膵島への酸素と栄養の供給を十分にするため、中空糸周囲への新生血管の促進を行っている。

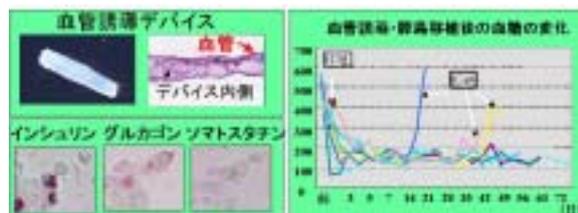


図1. 血管誘導デバイスをもちいたバイオ人工膵臓

2.2 . 人工肝臓

現在、急性肝不全に対しては確立された治療法は肝移植のみである。しかし、肝移植のための提供臓器不足は極めて深刻な問題となっており、高度の肝補助機能を持つ人工肝臓の開発が望まれている。そこで、肝細胞を用いるバイオ人工肝臓と異種臓器を用いる全肝型人工肝臓の開発を行った。

2.2.1 バイオ人工肝臓の開発

本プロジェクトでは中空糸モジュールの中空糸内にブタ肝細胞を 10^8 cells/ml の高密度に封入するバイオ人工肝臓を試作した。患者全血を中空糸とモジュールハウジングの間に流し、血液内の毒物などの代謝し、また、肝細胞により合成されたタンパクなどを患者血液に供給した後、患者に返す構成になっている。

中空糸内の肝細胞は、培養1日目には細胞同士が中空糸内で凝集し饅頭状の集合体を形成し、肝細胞凝集体内の細胞状態は生体内肝臓の細胞の存在状態と近い形態を取った。しかし、培養7日目になると細胞凝集体が断片化し、凝集体の辺縁部に死細胞が多数存在していた。バイオ人工肝臓の代謝機能は、7日までの間に少し上昇しその後徐々に単調に低下した。

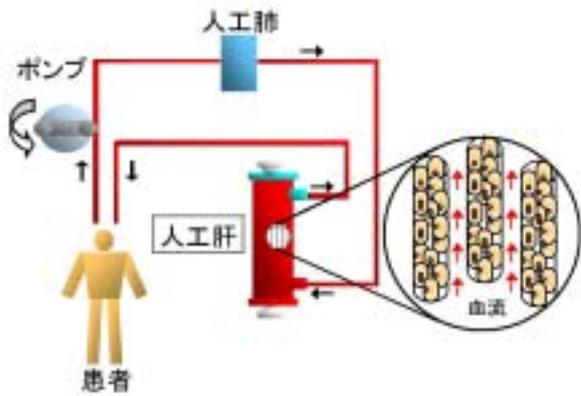


図2. バイオ人工肝臓回路図

本研究で試作したバイオ人工肝臓は、3時間程度の短時間で作製でき、中空系内の肝細胞はその機能維持に適した凝集体を形成し、さらにp450 複合酵素系解毒能と尿素サイクルの活性を10日長期間に渡って維持できた。本研究は、肝不全患者の治療に用いることの出来るバイオ人工肝臓の開発の重要な基礎を与えるものと考えられる。

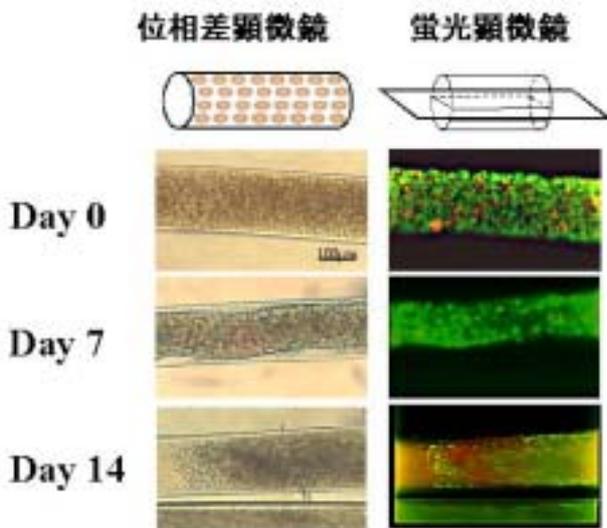


図3. バイオ人工肝臓内の肝細胞

2.2.2 異種全肝体外灌流型肝補助システム(全肝型人工肝臓)の開発

全肝体外灌流型人工肝補助装置への肝臓提供動物としてブタを選択した。全肝体外灌流において長時間の肝機能を維持するための至適条件を確立し、24時間以上の安定した体外肝灌流を行うことができる人工肝臓システムを作成した。

体外常温灌流したブタ肝臓の肝補助機能を判定するために肝不全動物に対して本システムによる直接交差灌流を行ない、生存時間の延長、肝代謝機能の改善を確認した。次に臨床応用に向けた安全性試験として本システムと霊長類(健常ヒヒ)との交差灌流を施行した。この実験では補体活性化に起因すると考えられる灌流圧の上昇、肝表面から浸出液の増加、遷

延性溶血が観察され、溶血による腎不全によりヒヒが死亡した。しかし、溶血を回避すると4.4時間の交差灌流が可能となり、この時間内では人工肝臓の機能は維持された。

人工肝臓として臨床応用するためにはさらに長時間の交差灌流が必要である。そこで、異種免疫反応を起こさないヒト補体活性抑制因子(hDAF)遺伝子導入ブタを人工肝臓システムに導入した。hDAFブタから摘出した肝臓を用いた人工肝システムは、健常ヒヒと24時間以上の安定した交差灌流が可能であり、灌流圧の上昇、肝表面からの浸出液の増加、遷延性溶血は著明に抑制された。灌流後のヒヒは軽度の貧血と血小板減少以外に特記すべき合併症はなく、長期に生存した。

この全肝型人工肝臓は臨床応用可能な段階まで開発を進めることができたが、ブタ内因性レトロウイルスの感染の危険が報告されたため、現在感染の可能性について検討中である。

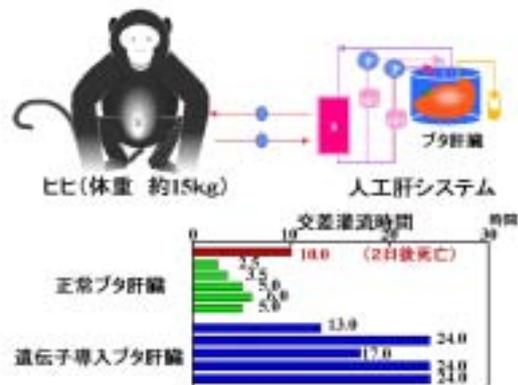


図4. 全肝型人工肝臓の前臨床試験(ヒヒとの交差灌流)

主な参考文献

- (1) Kawakami Y. et al. Modified subcutaneous tissue with neovascularization as the site for pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant.* 2000; 9:729-32.
- (2) Hori H. et al. Isolation, culture, and characterization of endocrine cells from 6-month-old porcine pancreas. *Cell Transplant.* 2001; 10:459-64.
- (3) Iwata H, et al. In vitro evaluation of metabolic functions of a bioartificial liver. *ASAIO J* 1999; 45:299-306
- (4) Sajiki T, et al. Morphologic studies of hepatocytes entrapped in hollow fibers of a bioartificial liver. *ASAIO J* 2000;46:49-55.
- (5) Takeyama O, et al. Effects of prostaglandin E1 on the efficacy of xenogeneic extracorporeal pig liver perfusion in a canine model of acute liver failure. *Liver Transpl.* 2001; 7:526-32.
- (6) Nishitai R, et al. Influence of Extracorporeal Porcine Liver Perfusion on Non-Human Primates: Minimizing Hemolysis Improves Subsequent Survival. *Liver Transpl.* 2001; 7:615-2.