「医用材料の最近の動向」特集

人工臓器高機能化へのチャレンジ

—ハイブリッド型人工肝臓—

戸 辺 成四郎・小 林 一 清・赤 池 敏 宏

1. はじめに

不可逆的な臓器(組織)疾患に対しては、人工臓器による機能代行の他に臓器(組織)移植も有効な手段と考えられている。それぞれには一長一短があり、特に移植に関しては感染症の増大と限られた提供数などの大きな障害があり、とりわけ我国においては人工臓器に対し大きな期待が寄せられている。このような動きの中で、高分子を筆頭とする各種材料は人工臓器システムを担う最も重要な素子となっているが、肝臓、脾臓などの代謝系・内分泌系臓器はその機能が極めて高度でかつ複雑であるために、人工材料に細胞を組み込んだハイブリッド型人工臓器の開発が不可欠とされている。ここでは肝臓を例としてハイブリッド型人工臓器の設計論における現状および問題点などについて述べる。

肝臓は、生体の恒常性維持を司る体内最大の代謝臓器であり、種々の血中タンパク質の合成・分泌をはじめ、リポタンパク質に付随する脂質の合成、糖新生、アミノ酸代謝、ビタミンの活性化、アンモニア処理につながる尿素合成、アルコール・薬物・毒物など外來性異物の解毒、さらには脾臓との連携プレーによる血糖値の調節など多種多様な代謝機能を有している。この臓器に肝臓、肝硬変、肝炎というような障害が生じて、ひとたび組織が侵されると代謝調節機能の急激な低下により死に至る場合も多い。しかし、現在のところ死亡率の高いこれら肝臓に対する予防薬や疾患の進展を完全に停止させ得る治療薬はない。また、この臓器の有する複雑多岐にわたる機能を代行し得る生体臓器あるいは人工材料のみによる人工肝臓も存在しない。

近年、重篤な肝疾患のひとつである胆道閉鎖症の患者に対し、島根医科大学において我国初の生体部分肝移植手術が行なわれた。この手術を皮切りに京都大学、信州大学と相次ぎ肝臓の一部を切りとって患者に移植する治療法の臨床応用が行なわれてきた。しかしながら、移植に対してはシクロスポリンなどをはじめとした優れた免疫抑制剤が開発されているものの、依然として拒絶反応を完全に避けることはできず、また、薬の副作用としての感染症の増大などにも悩まされている。さらに、我国における何よりも大きな問題は、紛糾している脳死問題を避けるために、ドナー(提供者)として健康な肉親の腹を開き、肝臓の一部を取り出す生体部分肝移植が追求されているわけであるが、この行為に対する倫理的問題が残されている。以上のように脳死者からの移植にしろ生体部分肝移植にしろ、肝移植の全面的な一般化にはまだまだ多くの困難が予想される。それ故、我国においては重篤な肝疾患に対する治療法のひとつとして、人工肝臓の開発に大きな期待が寄せられているのである。

人工腎臓、人工心臓などのように既に医療に定着した人工臓器をはじめ、人工血管、人工皮膚、人工関節、人工骨に至るまで人工的に臓器機能を代替しようとする研究とその臨床応用が、近年ますます活発化している。しかし、ごく一部の人工臓器を除き、完全に臓器機能を代替するためには、それぞれ幾多の解決すべき問題点を残

The Challenge of Highly Functional Artificial Organs
—Hybrid Artificial Liver—

筆者紹介 SEISHIRO TOBE Kanagawa Academy of Science and Technology.

神奈川科学技術アカデミー, 研究員

KAZUKIYO KOBAYASHI Faculty of Agriculture, Nagoya University.

名古屋大学農学部 助教授, 工学博士

TOSHIHIRO AKAIKE Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology.

東京工業大学生命理工学部 教授, 工学博士

戸辺氏は細胞工学・生化学、小林氏は糖質高分子化学、赤池氏は医用高分子・バイオエレクトロニクス材料をそれぞれ専門とされている。赤池氏は平成元年度日本バイオマテリアル学会賞を受賞された。

本稿では、人工肝臓実現へのアプローチについて解説していただいた。

戸辺成四郎氏

小林 一清氏

赤池 敏宏氏

している。とりわけ、複雑多岐にわたる高級な機能を有する肝臓においては、人工材料のみによる機能代行は不可能といって良いほどである。このような背景から肝臓の有する代謝調節機能をまるごと代行してくれるものとして、肝機能の中心を担う肝細胞を人工材料などのマトリックスに組み込んだハイブリッド型人工肝臓の開発への期待が生まれた。しかし、肝臓の補助装置として長期間におよぶ安定性と代行機能を高度に発現維持するようなハイブリッド型人工肝臓は未だ開発されていないのが現状である。

2. ハイブリッド型人工肝臓開発における背景

現在、臨床的に用いられている人工肝臓と呼ばれるものは、肝不全などの場合に血中に増加するアンモニアや急性薬物中毒時の化学物質などを除去(除去療法)するため、活性炭などの吸着剤を利用しているものである。Kiley ら¹⁾は、肝不全時に急激に増加する血中アンモニアを人工腎臓用のセルロース膜を用いた透析により除去する試みを報告した。また、Yatzidis ら²⁾は急性薬物中毒や尿毒症の治療法として、ヤシガラ活性炭を用いた体外灌流システムにより血流灌流を行なった。これらが現在の人工肝臓の始まりといえる。その後、透析膜や吸着剤などの開発により、これらのシステムにさらに改良が加えられてきた。しかし、これらのシステムは多彩な肝機能のうち解毒という、ごく一部の機能を生理的メカニズムとは全く異なる原理(物理的吸着)で代行するだけである。体内ブールの大きな物質に対して除去効率の悪い点や代謝調節機能を有さない点などがあり、臨床的にはいまだ満足すべきものではない。

肝臓の多くの代謝調節機能を完全に代行させるためには、生体材料そのものを利用するのが最も確実な方法である。生体材料を用いた肝臓補助装置の開発としては、これまでも肝スライス³⁾、遊離肝細胞⁴⁾、摘出肝⁵⁾、肝組織片⁶⁾などを用いた方法が追求されてきたが、それらの機能性や長期保持性、さらには装置への組み込みなど解決すべき問題点を抱えたままの状態にあり、臨床応用への有望なアプローチとは見なされていない。

最近では、実用性の高い人工肝臓を確立するためには、肝機能の主役を担う肝細胞に任せる以外に方法はないという考えが強まってきた。こうして肝細胞を人工基質材料上に固定したハイブリッド型人工肝臓が、重症肝疾患の治療法のひとつとして本命視されるに至ったのである。この方法は正常な機能を有する肝細胞を単離し、生体内に極めて近い状態を与えることのできる人工基質材料(細胞接着用マトリックス)上で初代培養し大半の肝機能を長期維持、さらにその機能発現を人為的に制御し

てハイブリッド化しようとする試みである。

3. 初代肝細胞培養の進歩

肝機能の中心を担う肝細胞を応用したハイブリッド型人工肝臓を開発するためには、まず肝細胞を単離し、in vivo 同様の機能発現性と長期生存性を有する培養システムを開発することが必要である。肝細胞培養の発展は、Howard ら⁷⁾や Berry ら⁸⁾によって開発されたコラゲナーゼ消化法、さらに Seglen⁹⁾によって改良された灌流法などにより、肝組織から機能を維持した実質細胞のみを効率よく単離することが可能となったことに端を発している。この単離法の開発により初代肝細胞の単層培養を用いた肝機能の生化学的研究が活発に行なわれるようになり、また、近年その技術が著しく進歩した¹⁰⁾。しかしながら、肝組織からひとたび取り出された肝細胞の機能発現性や生存性は、生体内でのレベルに比較すると際だって低下している。それ故、生体内により近いレベルで機能発現させるための培養システムの開発を目的に、基質材料の調製をはじめ¹¹⁻¹³⁾、ホルモン^{14,15)}、薬剤^{16,17)}などの添加因子に関する研究、さらに酸素の添加方法、無血清初代培養¹⁸⁾など様々な研究が行なわれてきた。そして単離された肝細胞の多くの機能を相当程度維持することが可能になってきた。これらの詳細については、総説^{19,20)}を参照されたい。

これまで報告されてきた肝細胞培養システムは、生体内の細胞形態とは大きく異なる伸展形態の単層培養が主体である。数日間以内の検討では生体を反映した優れたモデルであるが、長期生存性や機能維持性、さらには増殖などの面においてまだまだ多くの解決すべき問題点を残している。この肝細胞培養システムをハイブリッド型人工肝臓に応用するためには、肝細胞を安定に固定できる基質材料の開発に加え、大量の肝細胞を確保するための増殖性の亢進・凍結保存・小容積の中に十分な肝細胞を生存させる高密度培養システムの確立など解決すべき重要な課題が残されている²¹⁾。

4. ハイブリッド型人工肝臓に向けての 基質材料の設計

肝細胞は接着依存性を有する細胞であるため、生体外での浮遊状態においてその生存性を長期間維持させることは困難である。肝細胞培養用基質材料としては、一般に生体由来のコラーゲンやフィブロネクチンなどの接着性タンパク質が用いられてきた。しかし、近年筆者らによって全く異なった観点から、肝細胞の有する高度なオリゴ糖鎖の識別機能に着目し、アシアロ糖タンパク質のモデル材料として肝細胞特異的な人工基質材料(PVLA

：poly-N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) が設計された²²⁾。

血液中に存在する糖タンパク質が老朽化すると糖鎖末端からシアル酸基を失い、次の末端となるガラクトース残基を露出する。これがアシアロ糖タンパク質であり、肝細胞によって特異的に処理される。肝細胞はこの末端ガラクトース残基周辺を明確に認識し、アシアロ糖タンパク質を細胞内に取り込んで分解する。このガラクトース残基の認識と細胞内取り込みに関与するのが肝細胞膜表面に存在するアシアロ糖タンパク質レセプターである。この細胞内取り込みに関与するレセプターを上手く利用することで、肝細胞を安定に固定する材料として設計されたのが PVLA である(図1参照)。

図1 アシアロ糖タンパク質モデルとして合成された PVLA の構造単位と肝細胞との相互作用

図2 各種基質上で無血清培養された肝細胞の機能保持。(A)培養日数とアルブミン合成能の関係。(B)培養日数と胆汁酸合成能の関係

人工基質材料である PVLA における肝細胞の初期接着率は、天然基質材料であるコラーゲンやフィブロネクチン上でのものと同等に非常に良好な結果を示した。また、興味深い現象としてコラーゲンやフィブロネクチン上に接着した肝細胞は、接着後2時間あたりから伸展(spreading)を開始するのに対し、PVLA 上では後述するようにコーティング濃度を希薄したり、細胞増殖因子を添加しない限り数日間経過した後も伸展形態を示すことなく、単離時の形態に近い球状形態(round shape)を保持したまま接着・生存してゆく。また、図2に示すようにアルブミン合成分泌能や胆汁酸形成能などの肝特異的な機能についてもコラーゲンやフィブロネクチン上での培養肝細胞に勝るとも劣らない良好な維持を示した。PVLA 上の肝細胞が伸展することなく球状形態を保持したまま、肝特異的な機能を良好に保持することは人工基質材料 PVLA ならではの特性であろう(表1参照)。

5. 培養肝細胞の分化・増殖の制御

生体内において肝臓は、非常に旺盛な再生能力を有し、例えば成熟ラットの肝臓の約70%を部分切除しても、ほぼ10日で元の大きさまで回復する。しかし、生体外に取り出された肝細胞の生存性は、通常の培養条件下においてほぼ1週間が限度であり、そのころから肝細胞は基質上から剥離して死滅してゆく。それ故、生体外において高い機能発現性や長期生存性を得るためには、培

表1 天然基質と人工基質上における肝細胞の細胞挙動の比較

基 質 材 料	コラーゲン	フィブロネクチン	PVLA
認識・結合サイト	インテグリンファミリー	インテグリンファミリー	アシアロ糖タンパク質 レセプター
初期接着性	++	++	++
接着に及ぼす二価カチオンの効果	$\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$	Ca^{2+}
低温度(4℃)下における接着性	—		++
熱処理した基質への接着性	+	+	++
長期生存性	++	++	+++
伸 展 活 性	++	++	—
特異的機能発現性	++	++	+++
DNA 合成能	++	++	—

養肝細胞の分化と増殖を制御することが必要になってくる。また、ハイブリッド型人工肝臓の開発には多量の培養肝細胞を必要とすることから、増殖を繰り返す長期継代培養を可能にすることも重要な課題となる。

近年、中村ら²³⁾によって肝細胞の増殖能を信頼性高く測定できる方法が開発され、生体外において分化機能発現性と増殖との調節機構が明らかにされた。培養肝細胞の増殖は低細胞密度で促進され、逆に分化機能は増殖と相反して高細胞密度においてその発現が促進される²⁴⁾。この培養肝細胞の増殖と分化機能発現との相反的な細胞密度依存性調節は、肝細胞膜表面に存在する因子(CSM: cell surface modulator)によるものと考えられている²⁵⁾。

また、筆者らは前述した人工基質材料 PVLA のコーティング濃度を変化させることで、培養肝細胞の増殖能と分化機能発現性との間に PVLA コーティング濃度依存的な相反的關係のあることを明らかにした²⁶⁾。つまり、PVLA のコーティング濃度を低くすると接着した肝細胞は伸展形態を示し、DNA 合成能の指標である [³H]-チミジンの取り込みが亢進し、逆にコーティング濃度を高めると接着形態は球状化し、その変化にともない [³H]-チミジンの取り込みが顕著に抑制された。一方、分化機能の代表である胆汁酸形成分泌能は、PVLA のコーティング濃度を高めると [³H]-チミジンの取り込みに相反して上昇する傾向を示し、逆にコーティング濃度を低くするとその発現性は低下する傾向を示した。PVLA はコーティングする際の溶液濃度によって培養シャーレ表面への吸着状態がミセル状態からアンホールディング状態まで形成し得ると考えられている²⁷⁾。すなわち肝細胞が PVLA の培養シャーレ表面への吸着状態の微妙な差を(アンホールディングからミセル状態)を明確に認

識した上での細胞応答の差異と考えられる(図3参照)。このように基質材料の設計サイドから培養肝細胞の分化・増殖を相当程度制御することが可能になった。

生体内レベルにより近い機能発現性を有する継代培養法の確立は、ハイブリッド型人工肝臓の開発にとって必須の課題である。最近、中村ら²⁸⁾によって肝再生因子の本体と考えられる肝細胞増殖因子(HGF: hepatocyte growth factor)が発見され、HGF 遺伝子のクローニング、さらには全1次構造の解析がなされた、HGF は肝細胞に特異的に作用し、わずかの濃度(ng/ml)においても初代培養肝細胞の DNA 合成を顕著に促進し、増殖を引き起こす。さらに、HGF は培養肝細胞を用いた実験において強い抗肝炎作用を有することも明らかにされた。この HGF の発見によって、肝再生機構の解析をはじめとし、肝細胞の継代培養法の確立、さらにはハイブリッド型人工肝臓の開発に至るまで肝臓に関する研究に大きな貢献をするものと思われる。

6. 肝細胞高密度培養システムの確立

肝組織内において、肝細胞は互いに接触し三次元的細胞社会を形成している。そして、細胞どうしは互いに細胞間マトリックス(extra-cellular matrix)成分を介して相互作用を行なっている。これらのことから、肝細胞の培養システムをハイブリッド型人工肝臓に応用するためには、生体肝組織に近いレベルでの高密度培養システムを確立する必要がある。現在、高密度培養システムとして動物実験で試行されているものとしては、マイクロビーズ型、重層基盤型、浮上型球状凝集塊(spheroid)、自己組織再構築による多層集合体などが挙げられる。

マイクロビーズ型としては、肝細胞をアルギン酸カルシウムを用いて包括固定型ビーズとして培養するシステ

図3 人工基質材料(PVLA)の吸着制御による肝細胞の伸展と増殖・分化の制御

ムが報告されている²⁹⁾。この肝細胞培養系では、血漿タンパク質合成活性やホルモン応答性、さらにはアンモニアをはじめとした肝性昏睡を引き起こすような物質の解毒など、それらの機能を良好に7日間維持したとされている。また、重層基盤型肝モジュールは、コラーゲンをコーティングしたガラス平板に初代培養した肝細胞を固定し、多層に重ねたもので、培養実験では2週間、肝臓を摘出した犬を用いての灌流実験では65時間生存させたとの報告がなされている³⁰⁾。Spheroid形成による培養法は、グリコサミノグリカンやプロテオグリカンを基質材料として行なわれ、単層培養と比較すると機能維持および形態維持が良好であり無血清培養下においても1ヶ月以上の生存性が確認されている^{31,32)}。また、最近肝組織から抽出したプロテオグリカン上あるいは少量のアミノ基の導入されたポリスチレンシャーレ上での無血清培養条件下において spheroid を形成した培養肝細胞は、細胞増殖能を顕著に抑制し、分化機能のひとつであるアルブミン合成分泌能を14日間にわたり良好に維持したと報告されている³³⁾。この spheroid 培養法は、ハイブリッド型人工肝臓の開発のみならずバイオリアクター

としての期待も持たれている。

一方、筆者らは先に述べた人工基質材料 PVLA 上において EGF (上皮細胞増殖因子 Epidermal growth factor) やインスリンなどの細胞増殖因子の刺激により、球状形態で接着した個々の細胞が PVLA 上を移動した後、長期生存性と高機能発現性を有する基質接着型の多層集合体を形成することを見出した³⁴⁾ (図4参照)。この多層集合体は、EGF やインスリンの添加濃度に依存し、さらに両ホルモンの共存下において相加的效果を示した。多層集合体を形成した培養肝細胞は、単層培養系に比べアルブミン合成分泌能を良好に維持し、25日目までの生存が確認されている。このことから肝細胞の多層集合体は、機能発現的にもより生体内に近い安定な環境を得たものと考えられる (図5参照)。興味あることに、図6に示すように細胞増殖因子である EGF やインスリンの存在にもかかわらず、多層集合体を形成した培養肝細胞は、コラーゲンやフィブロンネクチン上での単層培養系に比べ DNA 合成ひいては細胞増殖の指標である [³H]-チミジンの取り込みを顕著に抑制した。この多層集合体においても細胞間の接触がより密になるため細

図4 肝細胞のコラーゲン上での単層培養と PVLA 上での多層培養(多層集合体)

写真はコラーゲン(A)と PVLA(B)上で2日間培養後に位走査顕微鏡にて撮影(スケールバー:100μm)

図5 PVLA 上で多層集合体を形成した培養肝細胞とコラーゲンおよびフィブロネクチン上で伸展した培養肝細胞とにおけるアルブミン合成能(A)と胆汁酸形成能(B)(2日間培養での評価)

図6 各種基質上での培養肝細胞の^[3H]-チミジン取り込みによる DNA 合成能の評価

図7 PVLA 上での培養肝細胞の多層集合体形成過程における活性化因子と阻害因子

胞間接触を介して増殖と分化が制御されている可能性が考えられる。筆者らの系統的な研究により、この多層集合体の形成は、PVLA を明確に認識した上でアシアロ糖タンパク質レセプターと PVLA との相互作用に基づいた細胞移動を行なった後、自己産出した細胞外マトリックス成分を用いて組織再構築が行なわれることが明かにされている³⁵⁾(図7参照)。この人工基質材料 PVLA 上での新たな肝組織様多層集合体(三次元培養系)は、現在期待されつつあるハイブリッド型人工肝臓の開発や肝組織の再構築機構の解析などにとって、非常に安定で感度の高いモデル系を提供するものと考えられる。

7. 肝細胞と肝類洞壁細胞との混合培養

肝臓は、肝実質細胞(肝細胞)のみによって構成されているわけではなく、類洞内皮細胞、Kupffer 細胞、Ito 細胞、pit 細胞、胆管上皮細胞、結合組織細胞(線維芽細胞)など数種の細胞群によって構成されている。それ故、肝細胞培養システムをモジュールに組み込んだハイブリッド型人工肝臓を開発するためには、生体内での組織と同

図8 PVLA上での肝細胞多層集合体(A)と非実質細胞との混合培養(B)。培養6日目に位走査顕微鏡にて撮影(スケールバー:100 μ m)

様にこれら細胞群による共同作用に基づく肝組織様培養システムが有効であると考えられる。

近年、肝組織細胞群を個々に分離し、*in vitro*で培養する試みがなされている^{36,37)}。肝細胞と非実質細胞との混合培養において、増殖因子を全く含まない条件下でも肝細胞はDNA合成を開始することが報告され、非実質細胞の産出するなんらかの物質によるものと考えられている^{38,39)}。また、肝細胞と類洞内皮細胞との混合培養条件下において肝細胞のアルブミン合成分泌能が、肝細胞のみの培養でのものと比較し、有意に発現され長期間にわたり維持されると報告されている⁴⁰⁾。このように混合培養システムは肝細胞の機能発現性や肝組織再構築に及ぼす影響などの解析には有用である。しかし、単層培養下における肝細胞と非実質細胞との混合培養において、肝細胞と非実質細胞は個々に島状の単層を形成し直接の cell-cell contact を形成しない。そこでハイブリッド型人工肝臓の開発に向けては、三次元培養下での混合培養システムの確立に期待がもたれるのである。

肝組織由来のプロテオグリカン上での spheroid 形成過程に類洞内皮細胞を添加し混合培養を続けると、肝細胞のみの場合と同様に spheroid が形成される⁴¹⁾。この混合培養した spheroid 表面の形態観察においては、類洞内皮細胞と思われる極めて薄い一層の細胞によって覆われており、肝細胞との間には肝組織を反映した Disse 腔様細胞間隙が観察された⁴²⁾。この類洞内皮細胞によって覆われた spheroid において、機能維持性や形態的安定性が示されれば肝バイオリクターとして利用する有効な方法になり得るものと考えられる。

一方、筆者らは先に述べた人工基質材料 PVLA 上での多層集合体培養システムにおいて、肝細胞と非実質細胞との混合培養を試み、興味ある現象を見出した。肝細胞の多層集合体の形成には、先に述べたように EGF

やインスリンなどの細胞増殖因子の存在が必要であるが、これら増殖因子の全く存在しない混合培養系において、肝細胞は顕著な多層集合体を形成し、増殖因子の添加によって形成した多層集合体と比較して良好な長期生存性と機能発現性を示すことが明らかとなった(図8参照)。PVLA は、肝細胞と異なり非実質細胞には接着性を発揮しない材料であるが、培養開始後はほぼ4日目には、多層集合体の周囲に伸展した非実質細胞群が観察された。また、電顕的観察において集合体の一部の表面には内皮細胞が覆い、さらに Kupffer 細胞が接着する形態も観察された。コラーゲン上での混合培養では、ほぼ10日前後で線維芽細胞様の細胞群が基質面を埋めつくし、肝細胞を剝離してしまったが、PVLA 上での培養においては、多層集合体の周囲のみに非実質細胞群が伸展接着し、この現象は1ヶ月以上にわたり維持された。この PVLA 上での非実質細胞の接着と生存に関する詳細は、現在検討中であるが、細胞自らが産出する細胞外マトリックス成分によるものであらうと考えられる。いずれにせよ PVLA 上での混合培養系は、肝細胞と非実質細胞との相互作用の解析やハイブリッド型人工肝臓の開発にむけての肝組織様システムとして期待されるモデルであらう。

8. おわりに

肝組織がなんらかの原因により障害を受けると、肝特異的代謝調節の急激な低下により死に至る場合も多い。特に、劇症肝炎による急性肝不全の場合には肝性昏睡に陥り、ほとんどの患者が短期間の内に死亡してしまう。わが国の急性肝不全死亡者は、年間約1万人、このうち3,000から4,000人の死亡者が劇症肝炎によるものと報告されている。しかし、劇症肝炎に陥った患者ですら、なお多くの残余肝細胞数を残している場合がある。したが

って残余肝細胞が機能回復するまでの2週間程度の間、ハイブリッド型人工肝臓の補助によって治療が施されれば、死亡率の極めて高い劇症肝炎の患者を救命することも可能となる。

本稿で述べてきたように、重篤な肝疾患の治療手段として生体部分肝移植と共に、現在期待されるハイブリッド型人工肝臓の開発は、現状では動物実験による試行錯誤の状態である。しかし、肝細胞培養システムの究極の確立を目的に、基質材料の開発をはじめ培養肝細胞の分化・増殖の人為的な制御、三次元的な高密度培養システムの確立、さらには肝細胞と非実質細胞との混合培養による肝組織様培養システムの開発など様々な面から活発な研究が遂行されている。長らく困難とされてきた成熟肝細胞の生体外での増殖にも成功し、肝細胞の増殖促進因子の本体すら明らかにされてきた。生体部分肝移植手術に代わりハイブリッド型人工肝臓を用いた肝疾患の治療法の出現も近い将来必ずや可能になることが期待できよう。

謝 辞

本研究の遂行にあたり細胞増殖能の評価検討において御指導、御協力を賜った北里大学看護学部山本 昇教授に心より謝意を表します。また、本稿の執筆にあたり研究を共にした当研究室の武井由香、小林 明、後藤光昭の各研究員の多大なご協力に心より感謝致します。

参考文献

- 1) Kiley, J. E., Welch, H. F., Pender, J. C. & Welch, C. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 489-490 (1956)
- 2) Yatzidis, H.: *Proc. Eur. Dial Transplant Assoc.*, **1**, 83 (1964)
- 3) Soyer, T., Lempien, M. & Eiseman, B.: *Ann. Surg.*, **177**, 393-401 (1973)
- 4) Olumide, F., Eliashiv, A., Kralios, N., Norton, L., & Eiseman, B.: *Surgery*, **82**, 599-606 (1977)
- 5) Gundermann, K. J. & Lie, T. S.: *Artificial Organs*, **4**, 27-29 (1980)
- 6) Kawamura, A., Takahashi, T., Kusumoto, K., Kyuuno, K., Kumagai, F., Kushida, T., Saji, H., Matsusita, M., Meguro, J., Tsuburaya, T., Kakita, A., Nakanisi, Y., Kuraoka, Y. & Sakao, N.: *Jpn. J. Artif. Organs*, **14**, 253-257 (1985)
- 7) Howard, R. G. & Pesch, L. A.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3105-3109 (1968)
- 8) Berry, M. N. & Friend, D. S.: *J. Cell Biol.*, **13**, 506-520 (1969)
- 9) Seglen, P. O.: *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-83 (1976)
- 10) 市原 昭: 総合臨床, **39**, 1798-1800 (1990)
- 11) Michalopoulos, G. & Pitot, H. C.: *Exp. Cell Res.*, **94**, 70-78 (1975)
- 12) Marceau, N., Noel, M. & Deschenes, J.: *In Vitro*, **18**, 1-11 (1982)
- 13) Hirata, K., Usui, T., Koshiba, H., Maruyama, Y., Oikawa, W., Freeman, A. E., Shiramatsu, K. & Hayasaka, H.: *Cann.*, **74**, 687-692 (1983)
- 14) Richman, R. A., Claus, T. H., Pilkis, S. J. & Friendman, D. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **73**, 3589-3593 (1976)
- 15) Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. & Ichihara, A.: *J. Biochem.*, **84**, 937-946 (1978)
- 16) Miyazaki, M., Handa, Y., Oda, M., Yabe, T. & Miyano, K.: *Exp. Cell Res.*, **159**, 176-190 (1985)
- 17) 戸辺成四郎, 武井由香, 小林一清, 赤池敏宏: 応用細胞生物学研究, **8**, 48-56 (1990)
- 18) Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K. & Ichihara, A.: *Exp. Cell Res.*, **155**, 81-91 (1984)
- 19) Guillouzo, A. & Guguen-Guillouzo, C. (eds.): "Isolated and Cultured Hepatocytes.", John Libbek Eurotexw, London & Paris, (1986)
- 20) 中村敏一: "初代培養肝細胞実験法", 学会出版センター (1987)
- 21) 赤池敏宏, 戸辺成四郎: 細胞工学, **8**, 219-226 (1989)
- 22) 赤池敏宏, 小林 明, 戸辺成四郎, 真栄田篤: 人工臓器, **17**, 227-230 (1988)
- 23) Nakamura, T., Tomita, Y., and Ichihara, A.: *J. Biochem.*, **94**, 1029-1035 (1983)
- 24) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y. and Ichihara, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 7229-7233 (1983)
- 25) Nakamura, T., Nakayama, Y. and Ichihara, A.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 8056-8058 (1984)
- 26) 小林 明, 武井由香, 戸辺成四郎, 後藤光昭, 関根卓志, 増本安紀, 山本 昇, 小林一清, 赤池敏宏: 高分子学会予稿集, **39**, 2580-2583 (1990)
- 27) 高山 崇, 小林一清, 松田武久, 赤池敏宏: 生体材料, **8**, 122-128 (1990)
- 28) 中村敏一: サイエンス, **20**(3), 6-17(1990)
- 29) Miura, Y., Akimoto, T., Fuke, Y., Yamazaki, S. and Yagi, K.: *Artif. Organs*, **11**, 361-365 (1987)
- 30) 熊谷文昭, 円谷敏彦, 中島保明, 長谷泰司, 船津昭彦, 橋村悦郎, 駒井 喬, 今 忠正, 中村敏一: 人

- 工臓器, **17**, 175-178 (1988)
- 31) Landry, J., Bernier, D., Ouellet, R., et al: *J. Cell Bio.*, **101**, 914-923 (1985)
- 32) Fujita, M., Spray, D. C., Choi, H., et al.: *Hepatology*, **7**, 1S-9S (1987)
- 33) 高島弘行, 小出典男, 坂口孝作, 川口光彦, 武南達郎, 小野良策, 松島 寛, 辻 孝夫: 人工臓器, **19**, 1165-1168 (1990)
- 34) 戸辺成四郎, 武井由香, 真栄田篤, 赤池敏宏, 小林一清: 人工臓器, **19**, 1156-1160 (1990)
- 35) 戸辺成四郎, 武井由香, 久々宮岳志, 小林 明, 小林一清, 赤池敏宏: 人工臓器 (印刷中)
- 36) Doolittle, R. T., & Richter, G. W.: *Labo Invest.*, **45**, 558-566 (1981)
- 37) 向坂彰太郎, 野口和典, 河原敏彦, 権藤和久, 赤司隆裕, 石井良知, 上野隆登, 吉武正男, 阿部弘彦, 谷川久一: 肝臓, **27**, 487-495 (1986)
- 38) Shimaoka, S., Nakamura, T. & Ichihara, A.: *Exp. Cell Res.*, **172**, 228-242 (1987)
- 39) Yamamoto, N., Imazato, K. & Masumoto, A.: *Cell Struc. Funct.*, **14**, 217-229 (1989)
- 40) Guillouzo, A. & Guguen-Guillouzo, C., (eds.): "Isolated Cultured Hepatocytes", John Libbey Eurotext London & Paris, pp. 155-170 (1986)
- 41) 荒木康之: 岡山医学会雑誌, **100**, 371-376 (1988)
- 42) Asano, K., Koide, N., Kawaguti, M., Takenami, T., Matsushima, M., Mori, M. & Tsuji, T.: *J. Clin. Electronmicroscopy*, **21**, 5-6 (1988)
- (平成3年1月18日受理)

シンポジウム「絹蛋白質の生産」

主 催: 日本学術会議蚕糸学会研究連絡委員会

共 催: 繊維学会ほか

日 時: 平成3年4月5日(金) 13:00~16:30

会 場: 日本学術会議講堂(1階)

〒106 東京都港区六本木7-22-34 (電話 03-3403-6291)

(地下鉄千代田線「乃木坂」駅下車)

プログラム:

開会挨拶

(1) 絹糸腺細胞の構造と機能

(2) 絹蛋白質遺伝子の発現と組み換え

(3) ウイルスベクターを利用した有用蛋白質の生産

閉会挨拶

日本学術会議第6部 間 和夫

東農大客員 赤井 弘

農水省蚕糸・昆虫研 田村 俊樹

第一製薬(株) 佐伯 欣之

信州大・繊維 嶋崎 昭典