

ブタ肝細胞凝集体の大量迅速形成

Rapid and large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids

酒 井 康 行*・成 瀬 勝 俊**・長 島 郁 雄**
武 藤 徹 一 郎**・鈴 木 基 之*Yasuyuki SAKAI, Katsutoshi NARUSE, Ikuo NAGASHIMA, Tetsuichiro MUTO
and Motoyuki SUZUKI

要 旨

肝不全ブタ用のハイブリッド型人工肝臓モジュールに必要とされる細胞数の1/4 (2.5×10^{10} cells) に相当する初代培養ブタ肝細胞の高機能凝集体 (スフェロイド) を、浮遊培養によって形成させることができた。形成されたスフェロイドをそのまま浮遊培養しても良好に高機能を発現したことから、スフェロイド/浮遊培養槽は、実用人工肝臓モジュールとして期待される培養形態であると考えられた。

1. はじめに

ヒト正常肝細胞を大量に得ることは現状では困難であることから、ハイブリッド型人工肝臓用の細胞としては、初代培養ブタ肝細胞^{1),2)}やヒト肝芽腫由来肝細胞³⁾が用いられている。一方、最近のディッシュレベルでの初代培養ラット培養手法のひとつの到達点として凝集体 (スフェロイド) 培養が挙げられる。しかしながら、実際に使用が予想される初代培養ブタ肝細胞のスフェロイドについては、人工肝臓モジュールへの適用がまだ試みられてはいない。

そこで我々は、当面の目標を肝不全ブタ用のスフェロイド利用人工肝臓の開発におき、その実現のための培養技術の開発を行った。すなわち、初代培養ラット肝細胞を用いた従来の研究に基づき^{4),5)}、まず大規模浮遊培養による初代培養ブタ肝細胞スフェロイドの大量迅速形成を試みた。次に、形成されたスフェロイドをディッシュレベルにおいてさまざまな方法で固定化・機能発現を測定した。

2. 実験方法

体重10-15 kg の雄性サンゲン雑種ブタを全身麻酔下に

*東京大学生産技術研究所 第4部

**東京大学医学部

開腹し、腹部大静脈と門脈から肝臓にヘパリン添加生理食塩水を導入、下大静脈を切断し十分に脱血した。全肝を切除し、灌流路を形成、EGTA および EDTA を含む Hanks 液で20分間灌流し、さらに0.05%コラゲナーゼ液で30分部分灌流した。ガラスディッシュ数枚に消化された肝臓を移し、ハサミとメスで細切した。さらにコラゲナーゼ液中で15-30分程度の振とう消化を行い、一重ガーゼで濾過した。これを総計6 Lの氷冷 MEM で洗浄し、2重ガーゼで濾過した。収量は $1.0-2.0 \times 10^{10}$ cells で生存率は85%以上であった。

スフェロイド形成に用いた浮遊培養槽を図1に示す。培養体積1 Lのスプinnerフラスコ (柴田科学) のかかはん装置の周りに、酸素高透過性のシリコンチューブ (Gilbrane, (株) 富士システムズ) を、約2.0 m巻きつけた。また、

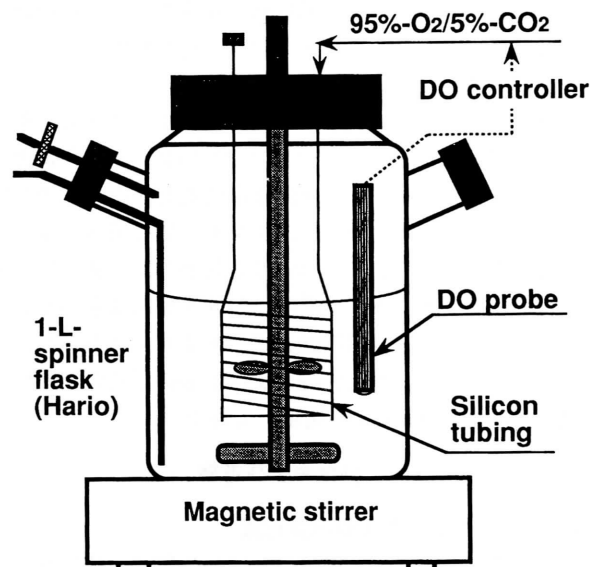


図1 スフェロイド大量形成槽

研 究 速 報

DO 電極と DO コントローラーをセットし、培養液中の DO 値が6.0 ppm 以上に保たれるように、チューブ内への 95% -O₂/5% -CO₂ 導入を ON-OFF コントロールした。ガス圧は1.0-1.5 kgf/cm²とし、チューブ出口でのガス流量は5-10 mL/min 程度となるように出口バルブを調整した。

精製された細胞は、スフェロイド形成用培地に4.0-5.0 × 10⁶ cells/mL の濃度で懸濁し、その 1 L を培養槽に入れ、70-80 rpm のかくはん速度で浮遊培養した。形成用の培地は、ウィリアムズ E 培地に抗生物質と HEPES, 20% -FBS, 10⁻⁶M インスリン, 10⁻⁵ M デキサメサゾン, 20 ng-マウス上皮成長因子 (mEGF) /mL, 100 μg-アスコルビン酸/mL を添加したものとした。

8 時間後に培地交換をし、以下24時間後のスフェロイド回収までそのまま培養した。それぞれの時刻に培地をサンプリングし、アルブミン濃度はサンドイッチ ELISA で、GOT 活性は和光の GOT-UV テストワコーを用いて測定した。また細胞量は、DAPI 蛍光法で DNA 量を測定して換算した。

24 時間後の浮遊培養液を洗浄してスフェロイドの最終懸濁液を得た。これを、60-mm ディッシュ (20 cm²) を用いる巡回培養、コラーゲンゲル包括培養 (6 穴マルチウェルプレート, 9 cm², 1.0 mL-ゲル) で10日まで培養した。コントロールとして、採取直後の遊離細胞を35-mm コラーゲンフィルムディッシュ上 (9 cm²) に単層培養した。細胞量は、ディッシュ当たりでそれぞれ、2.0 × 10⁶, 1.0 × 10⁶, 1.0 × 10⁶ cells, 培養液量は1.0 × 10⁶ cells あたり 2.0 mL とし、固定化後 1 日目に第 1 回目の培地交換を行い、以下 2 日毎に培地交換した。

培養液は、ウィリアムズ E 培地に抗生物質と HEPES, 10% -FBS, 10⁻⁸ インスリン, 10⁻⁷ M デキサメサゾン, 10 ng-mEGF/mL を添加したものをを用いた。

機能測定は、合成培地中についてはアルブミン分泌能・1 mM で添加されたアンモニアの除去能・尿素合成能について行った。アルブミン分泌能は培地交換の際にサンプリングしてその濃度変化から、アンモニアと尿素については培地交換から 3 時間までの濃度変化から除去または合成速度を求めた。アンモニア濃度は藤井・奥田改変のインドフェノール法で、尿素濃度はジアセチルモノオキシム法でそれぞれ測定した。固定化時および培養終了時の細胞数は DAPI 蛍光法で DNA 量を測定して得た。

3. 結果および考察

3.1 スフェロイドの大量迅速形成

浮遊状態においてブタ肝細胞は、8 時間後では数個の細胞からなる不規則な凝集体を形成するのみであったが、そ

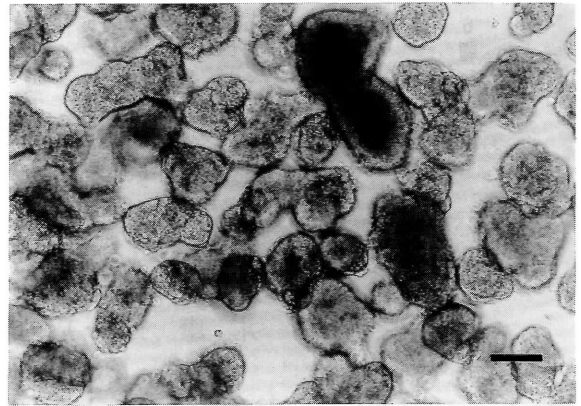


図 2 形成された肝細胞スフェロイド (Bar=100μm)。

表 1 採取後 0-24 時間の 1-L スケール浮遊培養における細胞数の減少・アルブミン分泌・GOT 漏出。

	浮遊培養	単層培養
播種細胞数に対する 24 時間後の細胞数 (%)	55.8 ± 4.0	82.6 ± 1.7
0-24 時間のアルブミン分泌 (μg/day · 10 ⁶ -播種細胞)	3.78 ± 0.87	2.75 ± 0.71
0-24 時間の GOT 漏出 (mIU/day · 10 ⁶ -播種細胞)	28.1 ± 1.2	37.0 ± 10.8

の後急速に凝集が進み24時間後には、図 2 に示すような直径 120 μm 程度のスフェロイドを形成した。

表 1 に浮遊培養における 0-24 時間での細胞の減少・アルブミン分泌能でみた機能・GOT 漏出でみた細胞障害を、飽和密度で播種した単層培養細胞と比較した結果を示す。単層培養においては、24 時間後に採取時の生存細胞はほぼ全て固定化されるが、1-L 規模の浮遊培養においては、24 時間後にスフェロイド形態へと再組織化される割合は播種細胞の 50-60% であった。播種細胞あたりでみたアルブミン分泌能は単層培養以上であり、GOT 漏出は単層培養より低い傾向を示した。

ラット肝細胞でのスフェロイド形成においては、播種密度を 1.0 × 10⁶ cells/mL 程度に抑える必要があったが、ブタ肝細胞の場合には、少なくともこの 5 倍の 5.0 × 10⁶ cells/mL 程度に高めることが可能であった。この形成槽での初期播種細胞数が 5.0 × 10⁹ cells となり、スフェロイドへの組織化率を 50% とすると、約 2.5 × 10⁹ cells 相当のスフェロイドが得られることになる。当面われわれが予定しているブタ用人工肝には最低で 1.0 × 10¹⁰ cells 程度 (ブタ全肝実質の約 10%, 約 50 g) が必要であると考えられるので、現在 4-L 規模の同様な培養槽による形成を試みている。ヒト用の人工肝製作のためには、この 2 倍程度の規模

での形成が必要となるが、単純な装置のスケールアップではなく、スフェロイドへの再組織化率の向上と播種密度の増大をも検討する必要がある。

3.2 さまざまな培養形態におけるブタ肝細胞

スフェロイドの機能発現

こうして形成されたブタ肝細胞スフェロイドを、そのまま巡回培養やコラーゲンゲル包括培養した際の機能発現を、単層培養細胞と比較した。

牛胎児血清と生理的濃度の10倍濃度のホルモンを添加した WE 培地中でのアルブミン分泌能とアンモニア除去能を、図3に示す。機能発現は、それぞれの培養形態に24時

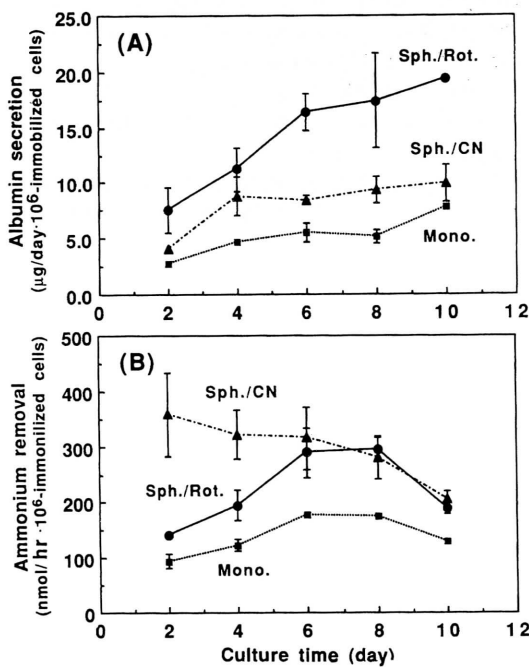


図3 各種固定化によるブタ肝細胞スフェロイドの機能発現。(A): アルブミン分泌能, (B): アンモニア除去能。Sph./Rot.: スフェロイド/巡回培養, Sph./CN: スフェロイド/コラーゲンゲル包括培養, Mono.: 単層培養。

間に固定化した細胞数あたりで示した。

アルブミン分泌能について、スフェロイドをそのまま巡回培養したものが最も高い値を示し、ついでコラーゲンゲル包括スフェロイド、単層培養の順に発現レベルが低下した。巡回培養されたスフェロイドは単層培養の約3倍程度の機能を示した(図3(A))。

アンモニア除去能は、スフェロイドを利用した2つの培養形態がいずれも、単層培養の約2倍の機能を示した。

培養10日目における残存細胞数とその細胞あたりの機能発現を比較したものが、表2である。単層培養では、若干の細胞増殖が見られたのに対し、スフェロイド培養においては、コラーゲンゲル包括した場合でも、初期固定化細胞数の約70%程度が維持されるのにとどまった。巡回培養した場合には50-60%へと細胞維持量は低下した。このように、スフェロイドへの再組織化が終了した以降は、増殖させることは困難であると考えられるため、スフェロイドへの再組織化率の向上と共に、採取してから一旦増殖させた後にスフェロイドを形成させるなどの研究が必要となるであろう。

現在、人工肝臓に求められているのは数日程度の肝機能代替であり、モジュール性能が悪化した場合にはモジュールを取り替えることにより対応すればよい。すなわち、当面のシステムにおける最重点課題は、短期において最大の性能を発揮することであろう。コラーゲンゲル包括に伴う物質交換の悪化⁶⁾を考慮すると、ブタ肝細胞を利用する実用モジュールでは、コラーゲンゲル包括は必要ないであろう。一方、スフェロイド形態は細胞活性が高いことから、適切なモジュール形態を選択しないと期待された高機能を発現しないことが十分に考えられる⁷⁾。すなわち、通常の培養形態と比較して、栄養素・除去対象物質・補てん物質・酸素などのスフェロイド周囲と血しょうとの物質交換を最優先したモジュール設計をする必要がある。増殖性の低いスフェロイド化細胞を高密度に保持しつつ1L程度までスケールアップする必要があることを考慮すると、浮遊

表2 各種培養形態における10日間培養後の残存細胞数・細胞数あたりの機能発現。

	スフェロイド/ 巡回培養	スフェロイド/ コラーゲンゲル包括	単層培養
播種細胞数に対する 残存細胞数(%)	58.5±4.5	72.5±7.4	114.0±0.0
10 ⁶ -残存細胞あたりの機能発現			
アルブミン分泌能(µg/day)	32.4±0.3	13.7±2.3	6.8±0.0
尿素合成能(nmol/hr)	76.0±25.3	92.3±14.3	23.8±3.8
アンモニア除去能(nmol/hr)	323±17	282±20	114.0±0.0

研究速報
懸濁培養またはそれに近い物質交換速度の得られるモジュールが望ましいと考えている。

4. 結 論

ブタ肝機能代替用のハイブリッド型人工肝臓に必要なとされる約1/4の細胞数相当のスフェロイドを、1-L規模の浮遊培養によって迅速形成させた。スフェロイドをそのまま緩やかに浮遊培養すると細胞数の減少が起こるが、細胞当たりの機能発現は単層培養細胞3-5倍であった。

謝 辞

高酸素透過性シリコンチューブ Gilbrane® をご供与くださいました(株)富士システムズに感謝いたします。

(1994年12月8日受理)

参 考 文 献

- 1) J. Rozga et al.: Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg*, **217**, 502 (1993).
- 2) J. Uchino et al.: A hybrid artificial liver system - function of cultured monolayer pig hepatocytes in plasma from hepatic failure patients. *Trans Am Artif Intern Organs*, **37**, 337 (1991).
- 3) N. L. Sussman et al.: Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, **16**, 60 (1992).
- 4) 酒井康行, 鈴木基之: 浮遊培養により迅速形成させた肝細胞スフェロイドの実用条件下での機能発現. *人工臓器*, **22**, 164 (1993).
- 5) Y. Sakai and M. Suzuki: Stable immobilization of hepatocyte spheroids rapidly formed by large-scale suspension culture. *Artif Organs Today*, in press.
- 6) 酒井康行, 鈴木基之: ホローファイバーモジュール内固定化コラーゲンゲル包括スフェロイドの機能発現. *人工臓器*, **23**, 473 (1994).
- 7) 井嶋博之ら: 多細管型 PUF/スフェロイド充填層を用いたハイブリッド型人工肝臓の開発. *人工臓器*, **23**, 463 (1994).