

コラーゲンゲル包括した肝細胞スフェロイド のホローファイバーモジュールによる高密度培養

High Density Culture of Hepatocyte Spheroids Entrapped in Collagen Gel by using a Hollow Fiber Module

酒井 康行*・鈴木 基之*

Yasuyuki SAKAI and Motoyuki SUZUKI

1. 緒 言

生体肝の保持する高度に調節された多種多様な機能を代替するためには、物理化学的な単位操作の組み合わせでは不十分で、生体の肝細胞を利用する必要がある。そこで、いわゆるハイブリッド型の人工肝臓の開発が、劇症肝炎時の一時的な肝機能の代替を当面の目標として、活発に行われている。この装置の実現のためには、ヒトの肝の全細胞数の約3分の1の肝細胞を、生体とほぼ同じ機能を維持したまま1-2週間、高密度培養する方法の確立がまず必要である。最近、近年の細胞培養技術の一定の進歩を取り入れて、モジュール開発が行われている。

最近の肝細胞培養技術の一つの到達点として、細胞を凝集塊、すなわちスフェロイドと呼ばれる形態で培養する方法が挙げられる。われわれは、スフェロイドを形成した後、高密度モジュール化を行うことにより、ハイブリッド型人工肝臓の製作をめざし、基礎的な検討を行ってきた。まず最初は、スフェロイド形成を促進するポリリジン¹⁾で被覆した平板上でスフェロイドを大量に形成させ、再び他の表面上に固定化する方法を試みた。しかしながら、細胞の自発的なスフェロイド形成には、少なくとも約5日間が必要であった。また、再付着固定化したスフェロイドが徐々に表面から剝離することなどの問題点も明らかとなった²⁾。

その後、スフェロイドの形成については、ディッシュを用いる旋回培養やスピナーフラスコを用いる浮遊培養によって、大量迅速化が可能であることを示した^{3),4)}。また、こうして形成されたスフェロイドをさまざまな方法で固定化し、生理的濃度のホルモンしか添加していない高濃度血清培地中で、機能発現を比較検討したところ、コラーゲンゲル包括が最も望ましい固定化法であることを明らかにした⁴⁾。

これらの基礎的な検討に基づき、ホローファイバーモジュールのキャピラリー外容積にコラーゲンゲルとラット遊離肝細胞から迅速形成されたスフェロイドを導入・固定化するタイプのハイブリッド型人工肝臓モジュールモデルを製作した。10%成牛血清・高濃度ホルモン添加培地中で2週間の灌流培養を行い、いくつかの肝特異機能の発現を検討した。また、実用条件下での機能発現を評価するために、80%成牛血清中でも同様な検討を行った。

2. 実験方法

2.1 肝細胞スフェロイドの大量迅速形成

肝細胞は、6-8週齢、200-250gの雄性ウイスターラットから、コラゲナーゼ灌流法により調製した。この遊離肝細胞から、既報⁴⁾に従い、市販品に改造を施した図1のような125 mLのスピナーフラスコを用いて、約24時間

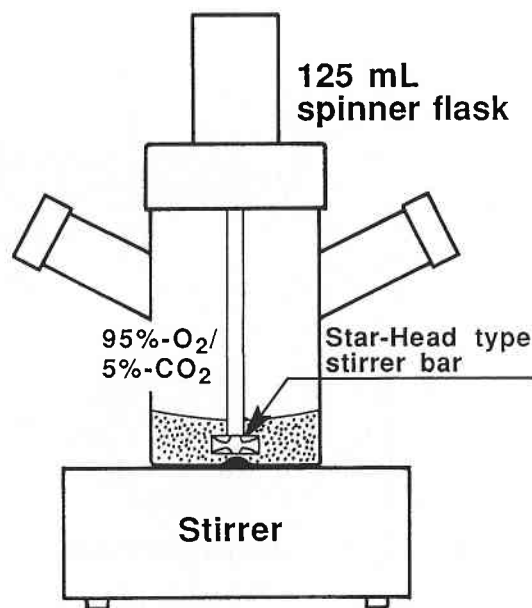


図1. 肝細胞スフェロイドの大量形成槽

*東京大学生産技術研究所 第4部

研 究 速 報

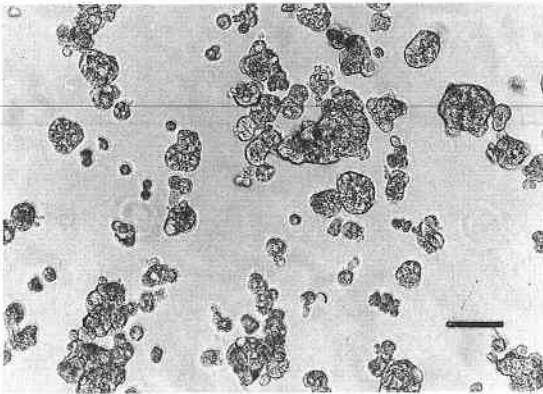


図 2. 24時間の浮遊培養により形成された肝細胞スフェロイド (バーは100 μm)

で形成させたスフェロイドの顕微鏡写真が、図 2 である。細胞の状態によって、形成されるスフェロイドの状態には、非常にばらつきがあるが、おおよそ、平均径が約70 μmで、約25個の肝細胞からなるものが形成された。

2.2 ホローファイバーモジュールによる灌流培養

本実験の灌流培養装置を、図 3 に示す。あらかじめ 4°C に冷却しておいた市販の細胞培養用ホローファイバーモジュール(旭メディカル, Cultureflo G)のキャピラリー外容積(湿潤化しない状態で約2.5 mL)に、0.18% Type I コラーゲンゲル(新田ゼラチン)に 1.0×10^7 cells/mL (4.0×10^5 spheroids/mL) の密度で懸濁させたラット肝細胞スフェロイド液 2.0-2.5 mL (総細胞数 $(2.0-2.5) \times 10^7$ cells) を、室温下で滅菌シリンジを用いて極力均一に導入

した。37°C で30 min 放置してゲル化させた後、灌流回路を組み立て、2.0 mL/min の流量で培地の灌流を開始すると同時に、培養装置全体を CO₂ インキュベーターに入れた。約 1 時間後に流量を10.0 mL/min に上げて、実験終了までこの流量で培養を行った。リザーバーボトルには、シリコセンを着装し、ガス交換を行わせた。培地総量は25 mL とし、導入後 1 日目に最初の培地交換を行い、以下 2 日毎に交換した。培地交換は、まずチューブ・モジュール内の培地(合計7.0 mL)をリザーバーボトルに回収してから、全量を交換した。モジュール出口にバックプレッシャーバルブを設置し、流量低下を招かない範囲で圧力をかけ、培養に伴って起きるコラーゲンゲルの収縮によってできるキャピラリー外容積空間に、積極的に培地を導入した。

基本培地は、HEPES や抗生物質などを添加したウィリアムズ E 培地に、10% 成牛血清 (BS; コスモバイオ)、 10^{-7} M インスリン、 10^{-6} M デキサメサゾン、 10^{-7} M グルカゴン、50ng- 上皮成長因子 (EGF; タカラ) を添加したものとした。これらのホルモン濃度は、生理的濃度の約100倍に相当する。患者血漿が灌流する実用条件下での機能の発現レベルを評価するために、80% 成牛血清に上記 3 つのホルモンを100分の 1 の濃度で添加したのもでも同様な灌流培養を行った。

2.3 各種肝機能の測定

肝特異機能の発現については、アルブミン分泌能・アンモニア除去能・尿素合成能を、2 日毎に測定した。アルブ

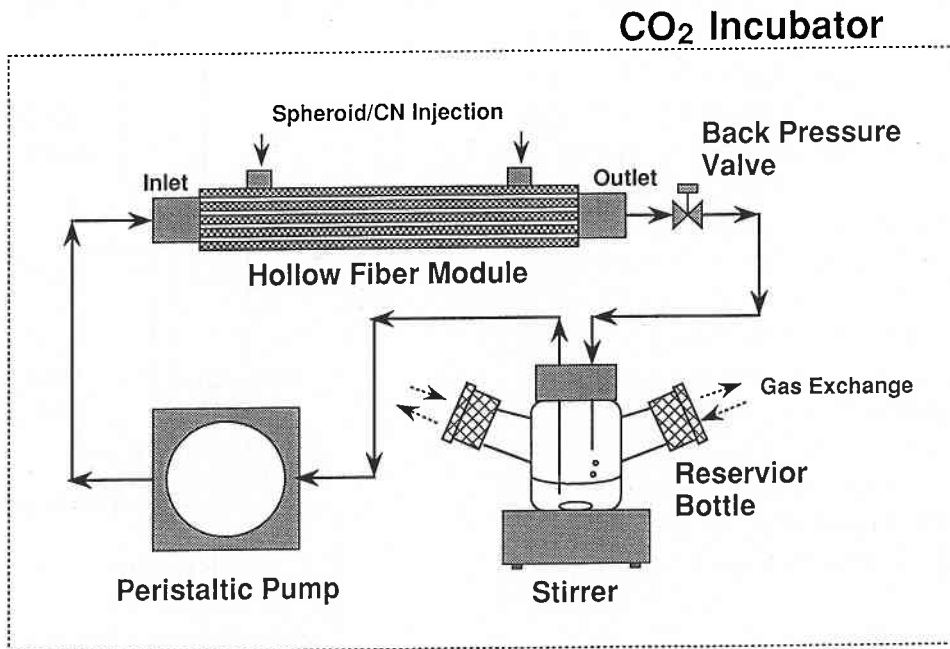


図 3. 灌流培養装置

ミン分泌能は、培地交換後24時間後の培地中濃度を2抗体サンドイッチ ELISA によって測定し、分泌速度として表示した。アンモニア除去能については、培地交換の度に、 NH_4Cl を最終濃度1.0 mM となるように添加し、初期培地中濃度と2時間後の濃度を測定、初期除去速度として示した。培地中アンモニア濃度は、藤井・奥田改変のインドフェノール法⁵⁾によって行った。尿素合成能は、培地交換時の初期培地中濃度と2時間後の濃度を測定し、初期合成速度として示した。培地中尿素濃度は、トリクロロ酢酸でタンパク質を除去した後希釈し、ジアセチルモノオキシム法⁶⁾によって定量した。

3. 結果および考察

高濃度ホルモン添加10%成牛血清(10%-BS/100X-hormones)培地と生理的濃度ホルモン添加80%成牛血清培地(80%-BS/1X-hormones)で2週間の灌流培養実験を行い、各種肝機能を測定した。結果を図4に示す。アルブミン分泌能は、合成培地中では良好に維持されたが、高濃度血清培地では、1週間以後急激に低下した(A)。アンモニア除去は、初期においては、高濃度血清培地の方が良好であったが、その後低下し、低濃度血清培地とほぼ同レベルとなった(B)。尿素合成能は、いずれの培地でも2週間にわたって非常に良好に維持された(C)。

以上の測定結果を既往のモジュールと比較したのが、表1^{7)~10)}である。培地条件・測定方法が異なるため、妥当と思われる仮定をおいて評価してある。また、モジュール運転開始から1週間における平均的な発現量を、細胞DNA量当たりで比較してある。まず、Spheroid/PUF 充

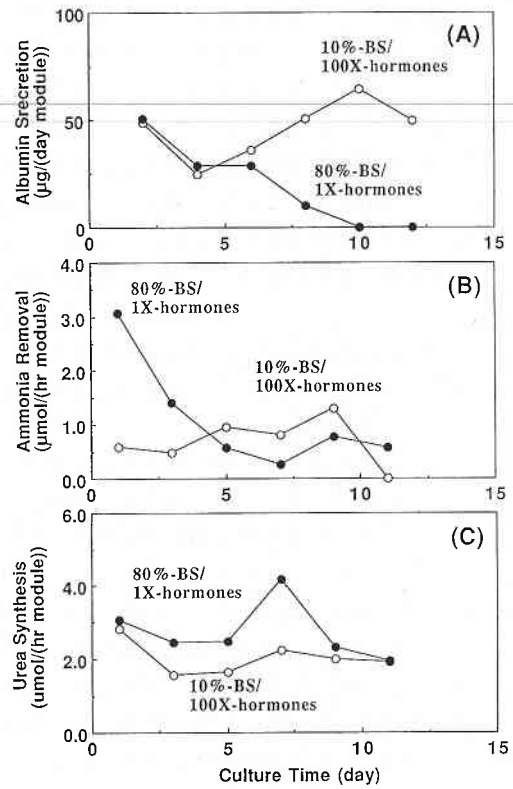


図4. 各種肝機能の発現

填型の低密度タイプを除くと、アンモニア除去能と尿素合成能については、本モジュールは既往のものと同程度の発現が見られている。しかも、生理的濃度のホルモンしか含まない高濃度血清培地中で、むしろ発現レベルが向上する傾向を示した。しかし、アルブミン分泌能については、発

表1. 既往のモジュールとの性能比較

モジュール型及び培養条件など	機能発現(µg・細胞DNA当たり)		
	アルブミン分泌 (µg/day)	アンモニア除去 (nmol/hr)	尿素合成 (nmol/hr)
酒井ら(Spheroid/CN包括-HF型)			
(1.0×10^7 cells/cm ³) 10%-BS/100X	0.068	1.4	3.4
80%-BS/1X	0.068	3.0	4.6
松下ら(Spheroid/PUF充填型)			
(0.036×10^7 cells/cm ³)	0.42	7.7	1.4
(1.8×10^7 cells/cm ³)	—	—	2.2
三好ら(単一細胞/PVF充填型)			
(1.1×10^7 cells/cm ³)	—	4.6	4.1
Nybergら(単一細胞/CN包括-HF型)			
(0.75×10^7 cells/cm ³)	0.21	—	4.5

研 究 速 報

現レベルが他のモジュールと比較して、低値に留まった。

このように、アンモニアや尿素などの低分子物質の代謝については良好であったが、アルブミンのような高分子物質については発現レベルが低かったことより、本モジュールは、細胞・培養液間の物質交換速度にまだまだ改善点があるといえよう。すなわち本モジュールでは、ゲル包括を行っているために、物質交換が基本的には拡散によって行われることが大きな理由であろう。また、本研究で使用した小規模ホローファイバーモジュールは、モジュール内のファイバー同士の間隙が非常に不均一であるため、大きな間隙に固定化されたスフェロイドの能力を十分には生かしていないことも考えられる。

一方、スフェロイドのようなコンパクトな容積中に高い代謝能を持つ培養形態の場合には、拡散でしか物質交換がなされないことが、一層大きな問題となることも考えられる。しかしながら、ゲル包括をせず、流れによって直接的に培地・細胞間の物質交換が行われる松下・井嶋らのモジュール形態においても、高密度化した場合には機能が著しく低下することが報告されている(表1)^{7),8)}。よって、単に物質交換が律速となっているだけではなく、高密度することによる細胞のおかれた生物学的環境の変化に起因することも考えられる。

ゲル包括に伴う、以上のような問題点の一方で、本モジュールは、人工肝臓モジュールの実用条件に近い生理的濃度のホルモンしか含まない高濃度血清培地中でも、通常の培養条件におけるのと同様な機能を示した。このことから、コラーゲンゲルによる包括は、実用条件では機能の安定発現に極めて有効であることが示唆される。現状では、ヒト肝細胞を大量に得ることは困難であるため、ブタなどの大型哺乳動物の肝細胞の利用が現実的手段として検討されている。つまり、異種動物の灌流血漿の中で、細胞

を良好に機能発現させる必要がある。この点からも、細胞と灌流血漿とを直接接触させないゲル包括法は、高分子物質の拡散が問題となる可能性が非常に大きいにもかかわらず、臨床での利用を想定した場合には、より信頼性が高い固定化方法であると思われる。

4. お わ り に

肝細胞スフェロイドの大量迅速形成および、実用条件下での安定固定化法の検討を行った上で、コラーゲンゲル包括ホローファイバー型人工肝臓モジュールを製作した。ゲル包括は、物質交換の悪化を招くことが示唆されたが、一方で実用条件下での安定機能発現にきわめて有効であることが示された。生体肝は、非常に薄いゲル層を介して毛細血管にすべての細胞が接するというきわめて精緻な構造となっている。今後、スフェロイドの優れた機能を十分に引き出すようなモジュール形態についてのさらなる工学的検討と、肝障害または無肝動物の延命実験での検討とを互いにフィードバックさせて、実用の苛酷な条件に耐えうるような信頼性の高いモジュールを開発していく必要がある。

(1993年10月8日受理)

参 考 文 献

- 1) Sakai, Y., and Suzuki, M.: *Biotech Tech*, 5, 299, 1991.
- 2) 酒井康行, 鈴木基之: *人工臓器*, 21, 1065, 1992.
- 3) Sakai, Y., et al.: *Biotech Tech*, 6, 527, 1992.
- 4) 酒井康行, 鈴木基之: *人工臓器*, 22, 164, 1993.
- 5) 奥田拓道, 藤井節郎: *最新医学*, 21, 622, 1966.
- 6) Marsh, W. H., et al., *Clin. Chem.*, 11, 624, 1965.
- 7) 松下 琢ら: *人工臓器*, 21, 1050, 1992.
- 8) 井嶋博之ら: *人工臓器*, 22, 171, 1993.
- 9) 三好浩稔ら: *人工臓器*, 22, 147, 1993.
- 10) Nyberg, S. L., et al., *Biotech. Bioeng.*, 41, 194, 1993.