

成熟ラット初代培養肝細胞における 浮遊spheroidの選択的形成と再播種固定化

Selective Formation, Reseeding, and Implantation
of Floating Spheroids of Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture

酒井康行*・鈴木基之*
Yasuyuki SAKAI and Motoyuki SUZUKI

1. 結 言

初代培養肝細胞は、肝臓の持つ数多くの機能を *in vivo* とほぼ同レベルで保持したまま、一定期間培養可能である。このため肝細胞の大量培養には、さまざまな医学的・工学的応用が期待されている。すなわち、各種血しょうタンパクやなどの大量生産、ハイブリッド型人工肝臓などである。

これらの中でもハイブリッド型人工肝臓は、劇症肝炎患者への効果的な治療法として、最も有望なものの一つである。腎臓や心臓は比較的単純な機能を受け持っているため、人工的な装置で置き換えることが可能であるが、肝臓は代謝に関わる数多くの重要な機能を営んでおり、人工的な装置で置き換えることはほぼ不可能である。そこで、肝臓の細胞を装置の一部として組み込むハイブリッド型の人工肝臓が、さまざまなアプローチにより研究されている。

初代培養肝細胞は在来、コラーゲンやファイブロンセクチン等の付着伸展因子で被覆した表面上で、単層培養されてきた。ところが最近、非伸展性の表面において、細胞が次第に集合し、生体と類似の構造を部分的に再現した球状の高密度凝集体 (spheroid) を形成、単層培養と比較して高機能を長期に渡り発現することが見い出され、注目を集めていることは前報で報告した¹⁾。我々もポリリジン被覆表面上において、このspheroidが形成されることを見いだし^{2,3)}、各種ホルモンだけでなくセレン等の微量金属を添加することにより、アルブミン合成能だけでなくさまざまな肝特異機能が、少なくとも26日間に渡り、高レベルで維持されることを明らかにした⁴⁾。

イヌやブタの初代培養肝細胞を単層培養して利用したハイブリッド型人工肝モジュールは、すでに試作されている^{5,6)}。しかしながら、これをヒト肝の全細胞の1/3を収容するモジュールにスケールアップすると、装置容積が約40Lとなるため、高密度化が望まれている。spheroid

は、それ自体が高機能高密度であるため、うまくモジュール化すれば、在来の単層培養/積層モジュールの性能および装置体積を大幅に向上させることが可能であろう。

劇症肝炎患者の治療に実際に用いる場合は、患者の血しょうが培養モジュールを灌流することになるため、細胞を何等かの方法で固定化する必要がある。現在我々は、浮遊spheroidを大量形成後、多孔質や繊維状の高比表面積担体に高密度で固定化するタイプのモジュールの実現を最終目標として、検討を行っている。今回は、浮遊spheroidの選択的形成のための各種ホルモンの影響、および、浮遊spheroidを再播種し、一部付着伸展した状態で安定固定化可能な表面側の条件について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 肝細胞の採取と培養

ラット肝細胞は、7~9週齢、200~250gのWisterラットオス(日本生物材料)から、0.05%コラゲナーゼ(和光純薬)を用いる灌流法⁷⁾により採取した。トリパンブルー染色による生存率は76~85%、収量は $1\sim 2 \times 10^8$ cellsであった。播種密度は、 5.0×10^4 cells/cm²、60mmディッシュ当たり、5.0mLになるように播種した。最終懸濁液を一部採取、PBS(Phosphate buffered saline)で洗浄し、DAPI(4',6-diaminodino-2-phenylindol)蛍光法⁸⁾により、単位細胞数当りのDNA量を測定した。

基本培地は、ウィリアムスのE培地(WE;極東製薬)に、100 μ g/mLのBSA(Sigma)、 10^{-7} M CuSO₄·5H₂O、 10^{-8} M H₂SeO₃、 10^{-6} M ZnSO₄·7H₂O、20mM HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethane-sulfonic acid)、100units/mLペニシリン(GIBCO)、100 μ g/mLストレプトマイシン(GIBCO)、0.25 μ g/mLファンギゾン(GIBCO)を添加したものとした。ホルモン類は、必要に応じて、インスリン(Ins.;タカラ)、デキサメサゾン(Dex.;和光純薬)、上皮成長因子(EGF;タカラ)、グルカゴン(Glu.;Sigma)を添加した。培養開始から6hまでは、Ins. Dex.のみを添加した培地で培養し、6hの培地交

*東京大学生産技術研究所 第4部

研究速報

換から、実験に応じてホルモン組成を換えた培地に交換した。24h後に2回目の培地交換を行い、以下2日ごとに培地交換した。3d以降は、spheroidの浮遊化が進行するため、50g, 1minで遠心して培地交換を行った。

2.2 培養表面の調製

浮遊spheroidの選択的形成実験および再播種固定化実験については、Falconの組織培養用ポリスチレンディッシュ(60mm, 21cm²)を用いた。浮遊spheroidの大量形成は、140cm²ガラス製培養ビン(柴田ハリオ)を用いた。ポリリジン(PL)による表面被覆は、poly-D-lysine(Sigma;分子量30,000~70,000)を用い、0.10mg/mlの濃度のPBS(phosphate buffered saline)溶液で、表面を室温(約25°C), 2h, 被覆した。ファイブロネクチン(FN)による表面被覆は、各種濃度のFN(Biomed. Technol.)のPBS溶液で同様に行った。PLとFNの共存表面は、まずNFで被覆し、次にPLで残りのサイトを被覆した。いずれの表面も、充分量のPBSで3回洗浄し、室温で乾燥後、使用まで4°Cで保存した。

2.3 Spheroidの形成および浮遊化の測定

Spheroidの形成および浮遊率は、無作為に選んだ50の顕微鏡視野(倍率100倍, 0.011cm²)について、まず、明確にspheroid形態を示す全凝集体数を測定した。その内、浮遊しているものの数を測定した。Spheroid数は、面密度(spheroids/cm²)として表示した。また浮遊率は、全spheroidに対しての浮遊spheroidの比率(%)として示した。

2.4 再播種固定化と付着spheroid数および機能の測定

播種spheroid数は、浮遊spheroidをピペッティング・遠心による洗浄を2回行って得た最終懸濁液の一部を採り、その中の全spheroid数を越えることにより測定した。また、同様に採取したspheroidを0.25%トリプシン/0.02% EDTA-PBS溶液に懸濁し、崩壊するspheroidを顕微鏡下で観察し、spheroid当りの平均細胞数を測定した。Spheroid濃度を測定後、60mmディッシュ(20cm²)当り5.0mL播種、第1回目の培地交換を1d後に行い、以下2日ごとに培地交換した。付着spheroid数の測定は、2.3と同様に行った。

再播種固定化後の機能は、今回はアルブミン分泌能について行った。すなわち、培地交換の際に一部を採取し、ポリビニルプレート(Falcon)を用いる二抗体サンドイッチELISA法⁹⁾により、ラットアルブミンのみを定量した。抗体・パーオキシダーゼ標識抗体・標準ラットアルブミンは、Cappel社のものを用いた。吸光度は、東ソーのマイクロプレートリーダー(MRP-A4i)で測定した。

3. 結果

3.1 浮遊spheroidの選択的形成

初代培養肝細胞のさまざまな機能を同時に維持するためには、Ins.とGlu., EGFとDex.の4つが、必要であることが単層培養での検討により明らかにされている¹⁰⁾。我々も、この4つのホルモンの必要性を重要視し、spheroidの形成と機能発現について、基礎的な検討を行ってきた。

これらの検討での基本培地は、10⁻⁷MのDex.とIns.を添加したWE培地であった。これに、20ng/mL EGFを添加すると、spheroidの維持は非常に改善され、spheroid当りの被組織化細胞数が大きくなり、径が増大することを以前に述べた⁹⁾。また、10⁻⁷MのGlu.は、spheroidの形態的維持および、グルコース合成能等を著しく改善する一方、spheroidの浮遊化をほぼ完全に阻害することも併せて明らかにしてきた⁴⁾。よって、浮遊spheroidを選択的にしかも最も速く形成させるためには、Glu.の添加は避け

表1 Spheroid浮遊率(%)に及ぼすデキサメサゾン・インスリンの影響

培地条件	培養日数(d)				
	1	2	3	5	7
contrl.	0	0	28	69	86
Dex.(-6)*	0	0	19	73	96
Ins.(-6)*	0	0	13	40	88

*(-6)は10⁻⁶Mを示す。Contrl.は、Dex.(-7)・Ins.(-7)。

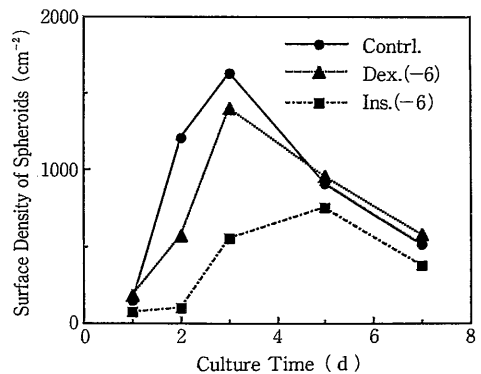


図1 Spheroid形成に及ぼすインスリン・デキサメサゾンの影響((-6)は10⁻⁶Mを示す。Contrl.は、Dex.(-7)・Ins.(-7)。

必要がある。また、EGFを添加した培地で形成させたものは、径が大きくなりすぎ、長期培養では中心部壊死を招きやすいことも観察された。

そこで、Dex.とIns.の濃度を変化させて、spheroidの形成と浮遊化について速度論的に検討を行った。すなわち、 10^{-7} MのDex.とIns.を添加した培地を基本とし、おのおのの濃度を 10^{-6} Mに高め、spheroid数と浮遊化率を経時的に測定した。結果を図1、表1に示す。

図1より、spheroidの最速形成のためには、 10^{-7} MのDex./Ins.の条件(Contrl.)が、最もよいことがわかる。 10^{-6} Mと比較すると、Dex.は2dに伸展方向に傾けるが、3dでほぼContrl.と同数のspheroidを形成させた。一方、Ins.は、2dでは単層培養とほぼ同様に伸展状態に傾けた後、spheroidを形成させた。Contrl.およびDex.(-6)では、3dで最大のspheroid数を示し、その後減少した。これは、主として小径のspheroidの崩壊のためであることを定性的に観測している。また7dでは、Contrl.では一部に中心部壊死が見られ始めたが、Dex.(-6)では全く観察されなかった。一方、Ins.(-6)では、最大spheroid数は5dに観察された。また、形成されたspheroidは、EGF添加時に見られたような径が大きく、いびつな形のものが多かった。

同時に行ったspheroid浮遊率(%)の結果を、表1に示す。どの条件でも、2dまでは全く浮遊化は観察されなかった。3dから浮遊spheroidが現れ始め、7dではいずれの条件でも、約90%の浮遊化率が得られた。しかしながら、5dではIns.(-6)の浮遊化が、他の2者に比べ低いことがわかる。

図1、表1および定性的観察より、Ins.を 10^{-6} Mに増やすと、形成および浮遊化が1~2d遅れることがわかる。これは、Ins.(-6)が、初期に伸展方向に傾ける作用が強いためであると考えられる。Dex.を 10^{-6} Mにした場合、形成初期に若干の遅れが見られるものの、その後はContrl.と

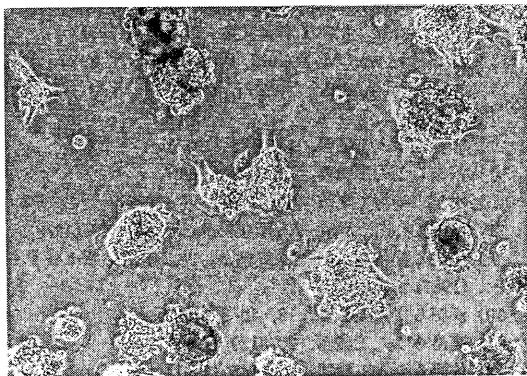


図2 再播種3d後のspheroid形態(PL/FN)

同様な形成・浮遊化を示した。

以上の検討より、中程度の径(平均約 $80\mu\text{m}$)の良好な状態の浮遊spheroidを最速形成するためには、 10^{-6} M Dex.と 10^{-7} M Ins.を添加した培地が望ましいことが判明した。よって、この条件で5dまで培養し、回収・最播種することにした。

3.2 浮遊spheroidの再播種固定化

3.1の条件で調製した浮遊spheroidを5dに回収し、 10^{-7} M Ins., 10^{-6} M Dex., 10^{-7} M Glu., 20ng/mL EGFを含むWE培地に最終懸濁した。これを用いて、一部付着伸展した状態で再播種固定化可能な表面側の条件を検索した。表面側の特性は、 $100\mu\text{g/mL}$ のPLまたは $0\sim 40\mu\text{g/mL}$ のFNの被覆で調節した。 $20\mu\text{g/mL}$ 以上のFNで被覆した表面に再播種し、その後1週間にわたり形態変化を観察すると、PLの有無にかかわらず、伸展して単層状態になり、平衡に達した。そこで、被覆FN濃度を $5\mu\text{g/mL}$ に設定し、 $100\mu\text{g/mL}$ のPL被覆との組み合わせで3種類の表面(PL, PL/FN, FN)を調製し、付着固定化spheroidの面密度とディッシュ当りのアルブミン分泌速度を、再播種後20dまで測定した。播種面密度は、 $1700\text{spheroids/cm}^2$ とした。3d後のspheroid形態を図2に、spheroid面密度とアルブミン分泌速度の結果を、図3に示す。

図2はPL/FN上の形態であるが、PLやFN表面のものと大差が見られなかった。すなわち、一部付着伸展した状態で安定に固定化されるspheroidと、付着はしているが伸展せず、中心部壊死を起こしているものとに大別で

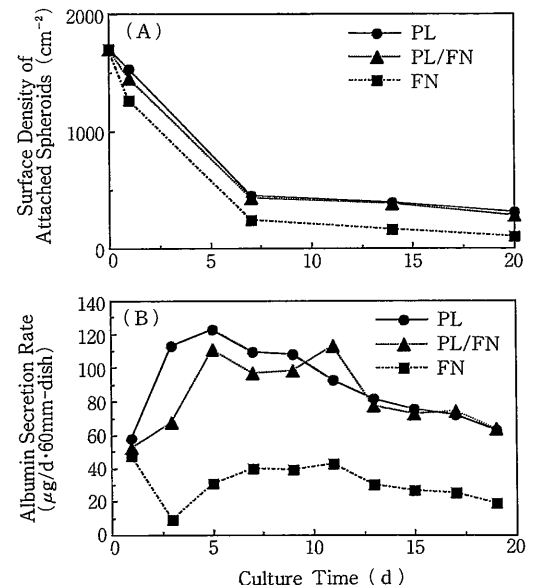


図3 再播種固定化後の付着spheroid数とアルブミン分泌能

研究速報

きた。
図3(A)で付着spheroid数の変化を見ると、どの表面でも、7d後までに急激な減少を見ている。これは、付着はしたが伸展できないものが、培地交換のたびに徐々に離れていくためである。Spheroid活性のこの低下は、5dでの回収の際に、若干強めのピペッティングを行ったことによる障害が主な原因であると考えている。

7d以降は、安定して付着伸展したもののみが選択的に維持されたために、spheroid数の変化がゆるやかとなったと考えられる。培養後期では、安定固定化spheroidのなかでも、伸展が強くhemispheroidやmulticellular islandへ変化したものは、状態が良好であったが、伸展が弱いものは、内部が暗くなり中心部壊死を起こす傾向にあることが、観察された。融合したspheroid¹⁴⁾や径の大きなspheroidは、培養後期で中心部壊死を起こすことを考えると、酸素や栄養素などの物質移動が、spheroidなどの細胞凝集体の維持を左右するひとつの大きな要因であることが示唆される。

一方、図3(B)でアルブミン分泌能の変化をみると、播種直後(～5d)では、付着spheroid数に大差がないにも

表2 再播種固定化spheroidの規格化アルブミン分泌能の比較(7d)

表面状態	Spheroid当りの アルブミン分泌能 ($\times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{d}\cdot\text{spheroid}$)	単位DNA当りの アルブミン分泌能* ($\mu\text{g}/\text{d}\cdot\mu\text{g}\text{-DNA}$)
PL	11.5	12.1
PL/FN	10.7	11.3
FN	7.84	8.27

*30cells/spheroid, $31.6 \times 10^{-6} \mu\text{g}\text{-DNA}/\text{cell}$ として計算した。

関わらず、顕著な差がみられた。伸展を促進するはずのFNをもつ表面(PL/FN, FN)の方が、アルブミン分泌能が劣っている。これは単層培養に変化したためではないことは、顕微鏡観察から明らかである。FNを持つ表面でも、7d後には機能を回復し、安定したアルブミン分泌能を発現するようになる。この段階での、spheroid数または単位DNA量で規格化したアルブミン分泌量を比較したものが、表2である。これから、安定固定化細胞数当りでは、3つの表面で、機能発現に大差が見られないことがわかる。

以上、3つの表面での、再播種spheroidの付着安定性および機能発現についての検討から、一部付着伸展した状態で安定固定化されたspheroidについては良好な機能発現がみられること、再播種直後に数多くのspheroidを安定して付着させるためには、FNよりPLの方が良好な結果を与えること、が明らかとなった。

4. 考 察

単層培養細胞と比較して高機能の長期発現が可能であるspheroidを、ハイブリッド型人工肝臓の素材として利用しようとする試みがなされ始めている。それらは、多孔質ポリマーに、採取直後の単一細胞を播種し、内部でspheroidを形成させるタイプ^{12),13)}や、アルギン酸カルシウムのゲルで浮遊spheroidを包括するタイプ¹¹⁾のものである。前者の例では、 $2.5 \times 10^6 \text{cells}/\text{mL}$ 程度の細胞密度を得るとともに、高機能の長期発現をみている。

一方我々は、浮遊spheroidを大量形成後、再播種、一部伸展した状態で高密度でインプラントするタイプのモジュール作成を目指し、今回の検討を行った。このタイプのモジュールでは、単一細胞からのspheroid形成を他の培養装置で行わなければならないことが不利な点ではあるが、モジュール内の細胞密度を約 $1.0 \times 10^7 \text{cells}/\text{mL}$ 程度にまで高めることが可能である。Spheroidの凍結保存・融解技術が確立されれば、spheroidを次々に調製して大量に保存しておき、必要時に融解してモジュールを組み上げるといった体制も可能となると考えられる。

今回の我々の結果は、まだ基礎的なものであるが、形成後に固定化するタイプのモジュール製作についての基礎的な培養条件と問題点を明らかにした点で、重要であると考えている。すなわち、在来用いられてきた高濃度EGFの代わりにDex.を用いることにより、中程度の径の浮遊spheroidを選択的に形成させうること、数多くの浮遊spheroidを安定固定化するためには、FNの特異的付着伸展機構を利用するよりも、PLの方が良好な結果を与えること、安定固定化されたspheroidは、良好な機能発現を示すこと、などである。今後、回収時の障害を防ぐと共に、血しょう中での安定固定化に関する検討が重要であろう。

(1991年5月31日受理)

参 考 文 献

- 鈴木, 酒井: 生産研究, 42, 14 (1990)
- 鈴木, 酒井: 化学工学論文集, 17, 667 (1991)
- Y. Sakai and M. Suzuki, Biotech. Tech, in press
- Y. Sakai and M. Suzuki, Proc. of JAACT'90, in press
- 熊谷ら: 人工臓器, 17, 175 (1988)
- 濱田ら; 人工臓器, 19, 852 (1990)
- 小平, 中村: 実験医学, 7, 1488 (1989)
- C.F. Brunk et al., Anal. Biochem., 92, 497 (1979)
- 中村: 初代培養肝細胞実験法, 38, 学会出版センター(1987)
- 浜田ら: 人工臓器, 18, 1265 (1989)
- 高島ら: 人工臓器, 20, 139 (1991)
- 佐藤ら: 人工臓器, 20, 145 (1991)
- 松下ら: 化学工学会第56年会講演要旨集, 582 (1991)