

培養動物細胞の形態及び機能発現の制御とその利用に関する研究

酒井 康行

①

培養動物細胞の
形態及び機能発現の制御と
その利用に関する研究

東京大学生産技術研究所
鈴木研究室
酒井康行

目次

序章	本研究の目的及び本論文の構成	- 1 -
第1章	本研究の背景	
1. 1	接着依存性動物細胞の固体表面への付着伸展現象	
1. 1. 1	固体表面への細胞付着に関わる因子	- 5 -
1. 1. 2	マイクロキャリアーへの細胞付着現象	- 13 -
1. 2	初代培養肝細胞における細胞周囲環境と細胞形態及び機能発現	
1. 2. 1	機能発現とマトリックス物質	- 16 -
1. 2. 2	ハイブリッド型人工肝臓における肝細胞凝集体の利用	- 24 -
1. 3	懸濁培養による細胞凝集と凝集体の安定固定化	- 27 -
1. 4	本章のまとめ	- 29 -
	本章の参考文献	- 30 -
第2章	固体表面特性による接着依存性株細胞の付着伸展の制御	
2. 1	本章の研究目的	- 35 -
2. 2	接触直後の細胞付着現象の速度論的評価	
2. 2. 1	本節の研究目的	- 37 -
2. 2. 2	実験方法	- 37 -
2. 2. 3	結果及び考察	- 40 -
2. 3	大量培養における培養表面特性の最適化	
2. 3. 1	本節の研究目的	- 53 -
2. 3. 2	実験方法	- 53 -
2. 3. 3	結果及び考察	- 54 -
2. 4	本章のまとめ	- 58 -
	本章の参考文献	- 59 -
第3章	固体表面特性と液性因子による初代培養肝細胞の形態及び機能発現の制御	
3. 1	本章の研究目的	- 61 -
3. 2	ポリリジン被覆表面上での肝細胞凝集体の形成と維持	
3. 2. 1	本節の研究目的	- 63 -

3. 2. 2 実験方法	- 63 -
3. 2. 3 結果及び考察	- 64 -
3. 3 肝細胞凝集体による各種肝特異機能の発現	
3. 3. 1 本節の研究目的	- 70 -
3. 3. 2 実験方法	- 70 -
3. 3. 3 結果及び考察	- 71 -
3. 4 固体表面特性と液性因子による肝細胞凝集体の形態 及び機能発現の制御	
3. 4. 1 本節の研究目的	- 77 -
3. 4. 2 実験方法	- 77 -
3. 4. 3 結果及び考察	- 79 -
3. 5 本章のまとめ	- 89 -
本章の参考文献	- 90 -
第4章 初代培養肝細胞凝集体の大量迅速形成と安定固定化	
4. 1 本章の目的	- 92 -
4. 2 懸濁培養による肝細胞凝集体の大量迅速形成	
4. 2. 1 本節の目的	- 93 -
4. 2. 2 実験方法	- 94 -
4. 2. 3 結果及び考察	- 97 -
4. 3 実用条件下での肝細胞凝集体の安定固定化	
4. 3. 1 本節の目的	- 102 -
4. 3. 2 実験方法	- 103 -
4. 3. 3 結果及び考察	- 103 -
4. 4 本章のまとめ	- 110 -
本章の参考文献	- 111 -
終章 本論文のまとめと今後の展望	- 112 -
本章の参考文献	- 115 -
本論文の出版・投稿状況	- 116 -
謝辞	- 117 -

序章 本研究の目的及び本論文の構成

動物細胞を大量高密度に培養し、生理活性物質などの生産能や細胞の由来する臓器の特異機能などを、利用しようとする試みがなされている。前者の例としては、ヒトリンパ腫由来のナマルバ細胞によるヒトインターフェロン α の大量生産や、正常2倍体線維芽細胞によるヒトインターフェロン β の大量生産、骨髄腫細胞と抗体産生細胞の雑種細胞（ハイブリドーマ）による各種モノクローナル抗体の大量生産が有名である。最近では、目的とする生理活性物質の遺伝子をハムスター卵巣細胞株などに導入し、大量培養・生産することも行われている。後者の例としては、脾臓の初代培養ランゲルハンス島細胞を利用したハイブリッド型人工脾臓や、初代培養肝細胞を利用したハイブリッド型人工肝臓などが挙げられる。

物質生産の場としては、遺伝子導入発現と大量培養が動物細胞と比較して簡単なことから、従来は大腸菌などが用いられてきた。しかし、生産物に糖鎖が結合されないことや、その高次構造が異なることなどの問題点がある。生体中で働く生理活性物質のほとんどが糖質などを含んだ複合タンパクであり、これらの付加が活性発現または生体内での安定性に必要不可欠であるとの例も多く見つかっている。そこで、天然型またはそれに近い物質を生産することのできる動物細胞の大量培養の必要性は、これからも増し続けるであろう。

動物細胞は、その培養系での性質から、浮遊性と接着依存性に大別できる。前者は、体内でもともと浮遊状態で生存していたものを由来としたもの、および培養にともなっている程度ガン化し、浮遊状態でも生育可能となったものなどがある。ほとんどの臓器の細胞は、生体外で培養した場合は、培養器内表面に付着・伸展した後に増殖するという、いわゆる接着依存性を示す。

物質生産の面からは、比較的容易に培養可能である浮遊性細胞がまず利用された。リンフォカインなど有用な免疫関連物質やモノクローナル抗体は、浮遊性細胞によって生産される。しかし、その他の多くの生理活性物質は、接着依存性動物細胞で生産される。

浮遊性動物細胞の大量培養は、菌体の培養技術の延長である程度確立されてきたが、接着依存性動物細胞の場合は、固体表面への付着伸展が増殖の前提となること、また、表面に密に増殖した細胞は一般に増殖を停止することなどの性質があるため、大量培養技術については、マイクロキャリア法が最も有望であるとされているものの、決定的なものが提出されるには至っていない。しかし、いずれにせよ、固体表面への細胞付着とその後の劇的な形態変化である細胞伸展、そして増殖をといった現象を、それに関与するさまざまな因子及びその相互関係を

解明した上で、制御することは、接着依存性動物細胞の大量培養にとって重要な課題である。しかしながら、古くからさまざまな研究が行われてきたのものにもかかわらず、細胞と固体表面の相互作用については、未だに未解明な点が多い。

細胞と固体表面の接触付着そしてその後の伸展増殖といった従来からの研究課題に加え、近年では、固体表面の特性が、細胞外マトリックス物質の固体表面への吸着現象を介して、さらに高度な細胞の組織化といった現象に与える影響についての研究が開始され始めている。この例は、応用面としては、単なる物質生産ではなく、臓器細胞の持つ機能の利用といった面で見られる。その中でも、人体の化学工場とも言うべき肝臓を構成している細胞は、多種多様な特異機能を保持したまま一定期間培養可能であるため、劇症肝炎時の一時的肝機能代替装置としてのハイブリッド形人工肝臓への応用が期待されている。近年、この初代培養肝細胞が、様々な物質で被覆した固体表面上で次第に凝集、生体と類似な構造を部分的に再現しているスフェロイドと呼ばれる細胞凝集体を形成し、高機能を長期にわたり発現することが報告されてきた。この凝集体形成においては、肝細胞から分泌されたマトリックス物質の固体表面への吸着が、重要な役割を果たしている考えられている。

物質生産に利用される接着依存性株細胞の付着伸展過程、細胞の由来する臓器特異機能の利用の代表例である初代培養肝細胞の工学的利用における細胞凝集体の形成と機能発現、のいずれの場合においても、細胞の付着・伸展・増殖あるいはより高度な組織化といった現象に対して、固体表面特性や、培地中の液性因子などの細胞周囲環境が、重要な役割を果たしていることは、既往の研究から明らかである。

そこで本研究では、培養細胞を工学的に利用する立場から、細胞形態や機能発現に対する細胞周囲環境の影響を明らかにし、それらの基礎的な知見に基づいて、より積極的な制御と利用を試みることを目的としている。具体的には、まず、標準的な接着依存性株細胞の付着伸展現象に関して、大量培養の際の細胞付着現象に絞り、速度論的な解析を行い、それに基づき大量培養における培養表面の最適化を行うことを目的とする。また、ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体に関して、主としてハイブリッド型人工肝臓モジュールへの利用面から、凝集体の形成と機能発現の制御及び凝集体の安定固定化法の選択を目的として、検討を行う。

本論文の構成を図1に示す。本論文は、序章と終章を入れて、合計6つの章からなっている。

第1章では、本研究の背景となる既往の研究について述べる。また、その中で本研究の位置を明らかにする。

第2章では、物質生産面における接着依存性動物細胞の大量培養の際の付着伸展現象について、それがごく短い細胞-固体表面接触時間内での現象であることに注目し、代表的な血清タンパクの吸着した固体表面の影響を、細胞とタンパク吸着固体表面との生物特異的相互作用の有無に着目して速度論的に解明し

(2.2)、さらにその結果に基づいて大量培養における培養表面の最適化を行う(2.3)。

第3章では、臓器細胞の特異機能の利用といった面から、初代培養肝細胞の凝集体(スフェロイド)の形成と維持(3.2)、各種肝特異機能の発現(3.3)について基礎的な検討を行った後、固体表面特性と液性因子とによって、凝集体の形態及び機能発現の制御を試み、凝集体を利用する人工肝臓モジュール製作における基本的な問題点を明らかにする。この凝集体の形態制御においては、第2章で用いた手法を利用した

(3.4)。

第4章では、第3章で提起された問題点についての改善を試みる。すなわち、実用規模の人工肝臓モジュール製作の際に問題となると考えられる大量の凝集体を迅速に調製する方法(4.2)と、得られた凝集体を人工肝臓モジュールの実用条件下その高機能を安定に維持しつつ培養するための固定化法の選択(4.3)とについて検討を行う。

終章では、第1章から第4章までを総括し、今後の展望について述べる。

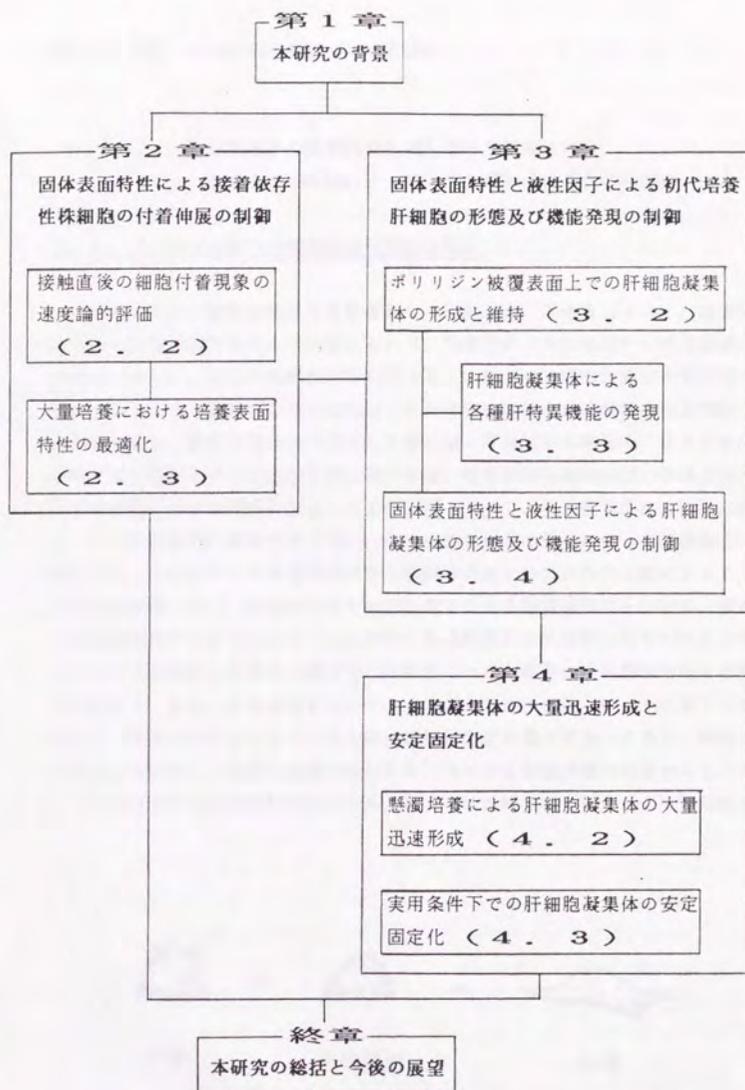


図1 本論文の構成

第 1 章 本研究の背景

1. 1 接着依存性動物細胞の 固体表面への付着伸展現象

1. 1. 1 固体表面への細胞付着に関わる因子

前述のように、動物細胞はその培養系での形態から、浮遊性のものと、接着依存性のものに大別できる。浮遊性のものは、培養槽に入れた培地中に浮遊懸濁させ攪拌するなど、従来の発酵技術を利用することにより比較的容易に大量培養可能である。一方、接着依存性の細胞は、その物質生産能や由来臓器の特異機能を利用する場合、酵素で消化するなどして得た単一浮遊状態の細胞を、さまざまな固体表面に付着させることがまず必要である。接着依存性動物細胞の固体表面への付着伸展の様子を簡略に図示したものが図 1. 1 である。接着依存性動物細胞は、表面に継続的に接触するうちに、その細胞骨格系の働きによって固体表面に伸展する。すなわちその形態を球状から周囲が表面に伸びた形へと変化させる。この伸展段階の後に、細胞は初めて細胞分裂すなわち増殖過程に入ったり、安定な機能を発現するようになる。この点が、浮遊状態のまま細胞分裂を行うことのできる浮遊性細胞とは大きく異なる。実験室レベルで接着依存性動物細胞を培養する際には、まず、ガラスやポリスチレンなどでできたディッシュや培養ビンの底面に、酵素消化などによって得た単一細胞浮遊液を導入する。すると、細胞は培養液中を沈降し、底面と接触を開始する。そのまま静置状態で放置すると、そのうち細胞は多少の液流れを加えても、容易には剝離しなくなる。その後細胞は



図 1. 1 細胞の付着伸展過程における形態変化

伸展してその形態を大きく変える。この状態になると、細胞と固体表面の結合が増し、一般には、酵素などによって結合を消化せずには、生存させたまま剥離させることは、困難となる。例えば、機械的な剥離を行うと、多くの場合に細胞を破壊してしまう結果となる。細胞付着現象における初期の研究では、細胞付着現象を可逆過程であるとして、解析を行った例があるが、細胞が、図1.1に示したように形態を変化させ、強固な付着を達成することから、細胞が球状の形態を呈するごく初期を除いては、細胞付着現象とは、一般には不可逆な過程であるといえる。

細胞-固体表面間の相互作用について、それが直接的であるか間接的であるか、また生物学的に特異的であるか特異的でないか、という分類に従って、細胞の固体表面への付着伸展現象に関与していると思われる因子を、まとめたものが、図1.2である。このような、固体表面上での細胞の劇的な形態変化には、固体表面そのものの性質による直接の相互作用と、そもそも始めから培地中に添加されていたり、培養に伴い細胞によって合成分泌されたりしたさまざまなタンパク質が、固体表面に吸着され、それらのタンパクを介して行われる間接的な相互作用の2つの異なる作用機構が関与している。さらに、タンパク質の中には、細胞膜表面に存在するリセプターに特異的に認識されるものがある。このような、生物学的に特異性を持ったタンパクと細胞側リセプターが関与する付着機構を、特異的付着機構という。このような特異的付着タンパクが関与しない付着機構は、特異的付着機構に対して、非特異的付着機構とよばれている。

動物細胞は通常、動物血清を5-10%添加した培養液中で培養されるため、さまざまな血清中タンパクが、培養固体表面には吸着されている。また、動物細胞自身が分泌したタンパクも同様に吸着される。これらのタンパク質の中には、細胞側リセプターと特異的相互作用を持つものがいくつか含まれている。代表的なものとしては、フィブロネクチン、グィトロネクチン、ラミニンなどである。固体表面上にこれらの特異的付着伸展タンパクが吸着し、それを細胞側のリセプターが認識、細胞付着が起こる。フィブロネクチンのArg-Gly-Asp(RGD)配列が、インテグリンと呼ばれる細胞リセプターに認識され、細胞の付着伸展が起きること(Pierschbacher and Ruoslahti, 1984)はその代表例である。その他の特異的付着伸展促進タンパクに関しても、分子レベルでの作用解析が進んでおり、それぞれ細胞側リセプターに認識される部位が存在する(Ruoslahti and Pierschbacher, 1987; Iwamoto et al., 1987)。

細胞が付着した後、能動的に伸展し増殖するためには、このような特異的付着伸展因子が必要不可欠である。ヒト正常線維芽細胞や初代培養肝細胞は、これらのタンパク質を活発に合成する能力を保持しているが、多くの樹立細胞株は、合成能が低いために、最速の伸展のためには外からの供給が必要である(Pena and

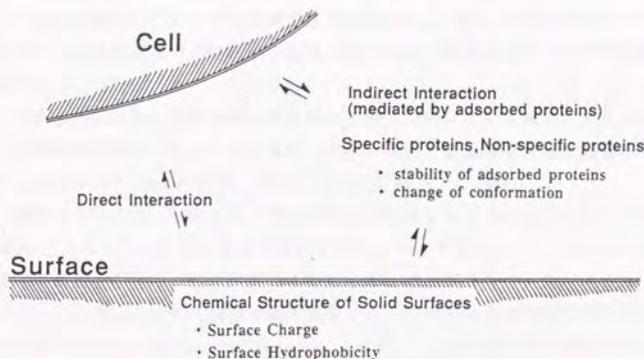


図1. 2 細胞と固体表面の相互作用に関与すると思われる各種因子

Hughes, 1978a). 例えば, 代表的な線維芽細胞株であるハムスター腎由来のBHK c21は, 最速の伸展を行うために, 最低15 ng/cm²の表面吸着フィブロネクチンを必要とする(Hughes et al., 1979b). また, 正常線維芽細胞(Pena and Hughes, 1978)や初代培養肝細胞(Gjessing and Seglen, 1980)など十分な合成能を保持している細胞でも, その合成には付着伸展過程に必要な時間と比較して, 十分に長い時間がかかるため, 特に無血清培養では, 何等かの手段でこれらの付着伸展因子を添加する.

一方, 血清由来のタンパクの中には, 細胞と特異的相互作用を全く持たないものが, 多量に含まれている. このような非特異的タンパクは通常, 固体表面に吸着することによって, 細胞の付着を妨げる働きをする. 特にアルブミンに関しては, その効果が大きい. 血清中の補体系タンパク質を不活性化するためにしばしば行われる56°C 30分の熱処理(非働化処理)は, 付着伸展因子を失活させると同時に, アルブミンを不可逆的に変成させ, 細胞付着阻害効果を相対的に大きくすると考えられる(Grinnell, 1976).

本来の固体表面の性質は, 血清由来や分泌されたタンパクの吸着ならびにその後の吸着タンパクの安定化に影響する一方で, 直接かつ非特異的な細胞表層-細胞間の結合に影響を与える. さまざまな固体表面上への細胞付着を検討した例においては, 実験中の培養液に血清を添加しているものもしくは見受けられる.

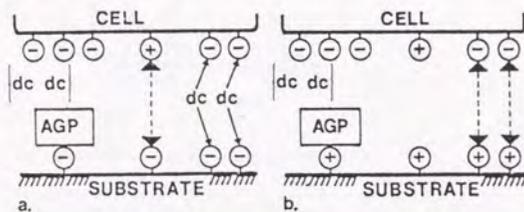
これでは吸着タンパクの影響と固体表面の影響を区別できないことになり、その結果の解釈に当たっては注意を払う必要がある(長岡, 1987)。タンパクを含まない合成培地を用いた短時間の実験においては、細胞分泌タンパクの影響も無視できる。

このような細胞と固体表面の非特異的な相互作用において重要であるとされている固体表面特性パラメーターには、表面の剛性や表面電荷、疎水性親水性のバランス等がある(Barngrover, 1986; Horbett et al., 1984)。

剛性については、細胞はリン脂質液滴には付着しない(Margolis et al., 1978)ことなどからその必要性が指摘されている。また、ヒドロゲルのような高親水性の表面上には、一般に付着しにくい。例えば、ポリヒドロキシメチルメタクリレート(HEMA)上では、細胞伸張が阻害され、球形のまま増殖活性も低いことが示されている(Folkman and Moscona, 1978)。この理由についてMaroudas (1979)は、細胞膜接着部(focal contact)の安定性のために、硬く小さな付着サイトが必要なのではないかと考えている。

細胞表層は、リン脂質2重層の膜に突き出た糖タンパクのシアル酸残基や各種プロテオグリカンなどのため、その等電点 pI は5.6-6.8程度であり、生理 pH では全体的にはマイナスに荷電している(Sherbet et al., 1972)。アルブミンのように等電点が中性よりも酸性側にあるタンパク被覆表面では、細胞が付着しにくいこと、プロタミンやポリリジンのような等電点がアルカリ側にあるタンパクでの被覆表面では速やかに細胞付着が起こることなどが明らかである。さらに、培地の pH を変えて用いたタンパクの等電点より低い pH であれば、どのタンパクに対しても細胞は良好な付着を示すこと(Takeichi and Okada, 1972)などからも、これらの表面では、静電的相互作用が支配的であるといえる。静電的な結合だけを考慮すると、マイナス荷電表面に細胞は付着できないことになるが、実際は、強くマイナスに帯電しているガラス表面などにも細胞は強固に付着する。これについては、確かに全体的には細胞表層はマイナスに荷電しているものの、その分布は一律ではなく(Borysenko, 1979)、少量ながら正電荷も存在し、どちらの極性の電荷でもある一定程度以上の表面密度があれば付着が可能であると説明されている。すなわち、表面の極性よりも電荷密度の方が、細胞付着における固体表面の静電的パラメーターとしては重要であると考えられている(Hirtenstein, 1980)。マイナスに帯電した細胞表層とマイナスに帯電した固体表面間の結合については、培地中の2価イオンが架橋すると考えられている(Gardner and Manna, 1982)が、詳細は定かでない。また、細胞表面の微べん毛(microvilli)や仮足(filopodia)は、両表面間の静電的バリアーを破る働きをしていると考えられている(Grinnell, 1978)。以上のように、表面電荷については、必ずしもプラス電荷は必要とされず、ある一定以上の電荷密度が必要であると一般には考えられている(Gardner and

Manna, 1982). しかし、一定程度以上の表面電荷は、細胞と固体表面の直接の相互作用におけるよりも、むしろ特異的付着伸展タンパクの固体表面への吸着において必要であるようである(Hirtenstein, 1980). 図1.3は、特異的付着伸展因子の影響をも含んだ細胞付着現象を模式化したもので、Hirtenstein(1980)によって提出されたものである。

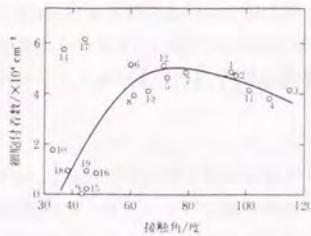


A schematic representation of the essential elements involved when a cell attaches and spreads on a) negatively or b) positively charged cell culture substrates. The process involves electrostatic interactions, divalent cations (dc) and an attachment glycoprotein (AGP).

図1.3 細胞付着機構のモデル(Hirtenstein, 1980)

このようにはっきりとした結論が得られていない最大の理由は、既往の細胞付着実験の多くが、血清タンパクを含んだ培養液中で細胞付着を行っているため、細胞と固体表面の直接の相互作用と固体表面に吸着したタンパクを介した間接的な相互作用を区別した結論を出せないことにあると考えられる。また、付着段階と伸展増殖段階を明確に区別して検討していないために、研究者によって重要と見なすパラメータが異なっていることにもその原因がある。

表面のヌレの程度が細胞付着に大きく影響することは、古くから認められてきた。さまざまな人工ポリマー上への細胞付着における初期の研究の結論は、親水性表面の方が、細胞が付着しやすいということであった。本来疎水性であるポリスチレンをグロー放電によって親水化したものは、細胞培養用のディスポーザブルディッシュの材質として広く用いられている。しかし、前述したように、その後、ヒドロゲルなどの高親水性ポリマーに細胞が付着しにくいことが明らかになるにつれ、ある領域の親水性-疎水性バランスにある固体表面が細胞付着にとって望ましいことが広く認められている。疎水性から親水性を示すさまざまな固体表面上で、表面の接触角に対する付着率を測定すると、70°付近に極大値を持つ上に凸の曲線となることが示されている。玉田ら(1986)結果をその例として、図1.4に示す。Horbettらも親水性疎水性の2種類のポリマーの比率を代えてさまざまな疎水性/親水性バランスを持つ一連の表面を調製、細胞付着への影響を測定し、同様な結果を得ている(Horbett et al, 1985)。玉田(1986)は、固体表面



$1.14 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の L 細胞で無血清培地、37℃にて 60 分間培養
材料:

1, ポリエチレン, 2, ポリプロピレン, 3, ポリテトラフルオロエチレン, 4, テトラフルオロエチレン-ヘキサフルオロプロピレン共重合体, 5, ポリエチレンテレフタレート, 6, ポリメチルメタクリレート, 7, サイロン-6, 8, ビニルアルコール-エチレン共重合体, 9, ポリビニルアルコール, 10, セルロース, 11, シリコン, 12, ポリステレン, 13, 虫歯培養用プラスチックシート, 14, ガラス, 15, ポリアクリルアミドグラフトポリエチレン, 16, ポリアクリル酸グラフトポリエチレン, 17, フェノキシエタングラフトポリエチレン, 18, コラーゲングラフトポリエチレン, 19, ワン血清アムフィングラフトポリエチレン

図 1. 4 様々な固体表面における水の接触角と細胞付着(玉田, 1986)

の疎水性 親水性バランスと細胞付着との間のこの関係は、水媒体中における接着仕事の計算結果と概ね一致していることを示し、固体表面上への細胞付着現象においては、主としてファンデルワールスの相互作用が、支配していると考えている。固体表面特性を表す単なるパラメーターから、さらに一歩進み、その機構までを熱力学的解析によって説明しようとする研究については後述する。

以上述べた剛性を除く 2 つのパラメーターに密接に関連している細胞-固体表面相互作用としては、それぞれ、表面電荷については静電的相互作用、疎水性 親水性バランスについては、主としてワンデルワールス力であるとされている(玉田, 1986)。しかし、細胞-固体表面相互作用については、そのほかに疎水的相互作用や水素結合が関与していると考えられる(Spier, 1991)。特に疎水的相互作用は、液相からのタンパク質の固体表面への吸着現象において強い作用を持つことが指摘されており(Andrade, 1985)、細胞付着においても、細胞表層のタンパクや糖鎖と固体表面との結合に関与していると考えられる。

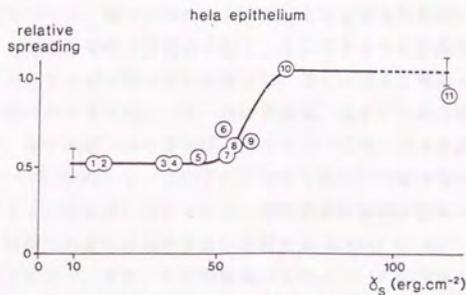
以上の、細胞-固体表面間の非特異的相互作用に関与する因子を、熱力学的な安定性の観点から統一的に説明しようとする試みがなされてきた。古くは、荷電コロイド粒子の凝集理論(DLVO理論: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbook理論)を、

固体表面と細胞との相互作用について適用を試みたGood(1972)の例がある。この理論は、非特異的な細胞-固体表面相互作用を定性的には説明する。さらに最近では、接着に伴う界面自由エネルギーの変化を示す次の基本式に、さまざまな相互作用の影響を考慮することによって、細胞-固体表面を説明しようとする試みがなされている。

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{cs} - \gamma_{sl} - \gamma_{cl}$$

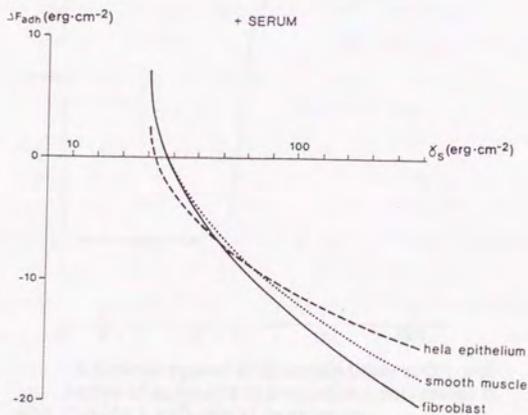
上式において、 ΔF_{adh} は細胞付着に伴う界面自由エネルギーの変化、 γ_{cs} は細胞-固体表面間の界面自由エネルギー、 γ_{sl} は固体表面-液間の界面自由エネルギー、 γ_{cl} は細胞-液間の界面自由エネルギーをそれぞれ示す。ここで、 ΔF_{adh} がマイナスならば、細胞付着はエネルギー的にみて安定であり、 ΔF_{adh} がプラスならば、細胞付着はエネルギー的には不利であることになる(Schakenraad et al., 1988)。 ΔF_{adh} の符号は、細胞と固体表面間の結合の強さとも密接な関連を持つ。例えば、バクテリアの固体表面への付着においては、 ΔF_{adh} がマイナスならば、その付着安定であり容易には剥離させることができないが、それがプラスならば、剥離は比較的容易であることが報告されている(van Pelt et al., 1985)。各々の項は、接触角によって推算される。Schakenraadら(1988)の結果を図1.5、1.6に示す。彼らはまず、上式を用いて、静電的相互作用を考慮せずに、実際の細胞伸展実験の結果との比較を行い、培養固体表面の表面自由エネルギーが50 erg/cm²以下では、細胞伸展が著しく悪いこと(図1.5)、これは、固体表面自由エネルギーの大きさと ΔF_{adh} の正負の関連と一致していること(図1.6)を報告した。さらにvan Ossらは(1989)、ファンデルワールス力の他に、ルイスの酸塩基的相互作用と静電的相互作用を考慮したより一般的な議論を行った。この酸塩基的相互作用の中には、疎水の相互作用も考慮されている。しかし、固体表面への細胞付着への適用は試みていない。

この理論の発展による非特異的な細胞-固体表面相互作用の解明と、付着伸展タンパクの特異的作用による付着機構の分子レベルでの解析、それらの上に両者の寄与を総合、しかも、1.1.2で指摘するように、細胞付着現象を動的なプロセスとして捉え、接触・付着・伸展といった各段階を連続的に捉えながらも明確に区別して、定量的に解析することによって、細胞の付着現象はより正確に説明されるようになると思われる。



The relation between relative cell spreading and substratum surface free energy in the absence of serum proteins.

図 1. 5 表面自由エネルギーと細胞伸展
(Schakenraad et al., 1988)



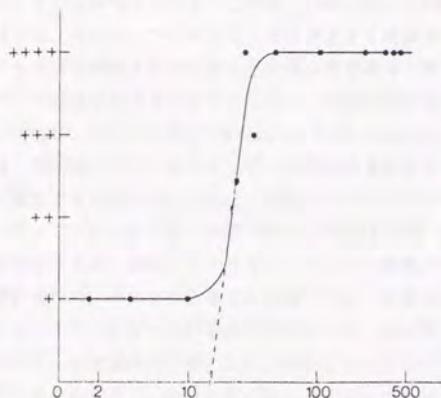
The relation between interfacial free energy of adhesion (ΔF_{adh}) and substratum surface free energy in the presence of serum; (γ_1^* and γ_2^* after cell contact were used for calculation of ΔF_{adh}).

図 1. 6 固体表面の表面自由エネルギーと付着における
界面自由エネルギーの変化

1. 1. 2 マイクロキャリアーへの細胞付着現象

1. 1. 1においては、関与が確かめられているさまざまな機構についてそれぞれ解説した。しかし、細胞付着現象は図1. 1に示すように動的なプロセスであり、それぞれのステップで関与する機構には、違いがあると考えられる。

細胞の固体表面への付着伸展という一連の現象は、大きく付着段階と伸展段階とに分けられる。まず後者における伸展の速さについては、固体表面上に吸着された特定のタンパク、すなわち、生物学的特異性を持った付着伸展タンパクの存在量が決定的である。吸着量に対するある一定時間後の細胞伸展率は、容量作用曲線で示され、伸展に必要な最低吸着量が存在する(Hughes et al., 1979)。この様子を、図1. 7に示す。また、その吸着量以上のタンパクが存在していれば、固体表面の特性は、伸展現象に全く影響を与えないと考えられている。もちろん、付着伸展タンパクを含む各種のタンパク質の固体表面への吸着については、表面特性によってタンパク質のコンフォメーションが変化することは確かめられている(Andrade, 1985)、それは細胞伸展とその後の増殖にはあまり影響しないようである(Horbett and Schway, 1988; Chinn et al., 1989)。もっとも、これ



Abscissa: ng/cm² of adsorbed fibronectin; *ordinate:* degree of spreading expressed as a percentage of cells showing a well-spread morphology.

Degree of spreading of BHK cells on plastic dishes coated with fibronectin. See Methods for details.

図1. 7 ファイブロネクチンの固体表面への吸着量と細胞伸展
(Hughes et al., 1979)

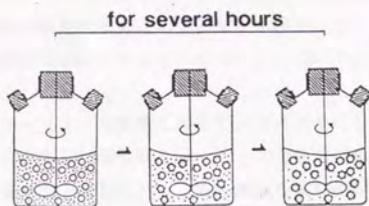
は、天然の付着伸展因子の場合であって、例えば、細胞側リセプターによって特異的に認識されるフィブロネクチン中のRGDペプチドのみをアルブミンに導入し、このアルブミンを吸着させた表面を用いた場合の細胞の付着伸展挙動については、アルブミン表層からRGD配列導入部位への鎖の長さが影響するとの報告もあり (Danilov and Juliano, 1989)、未だ詳細は不明である。以上、伸展及びその後の増殖という生物的過程においては、固体表面-細胞間の直接の相互作用の影響は、無視でき、特異的付着伸展タンパクの吸着のみに着目すればよいであろう。

一方、細胞の初期付着過程については、フィブロネクチンなどの特異的付着伸展因子の影響は、その後の伸展・増殖における場合と比較して、それほど大きくないと考えられる (Horbett and Schway, 1988; Chinn et al., 1989)。よって、相対的には固体表面自体の特性が、大きな影響を持つ過程であるといえる。

細胞の初期付着過程については、1. 1. 1で述べたように、いくつかの因子の寄与の有無については判明しているが、その寄与の大小に関しては定量的評価が難しいため、統一的な見解が共有されるには至っていない (Spier, 1991)。そこで、実用的な側面から、付着に関わる因子の評価をする試みがなされている。

工業レベルでの接着依存性動物細胞の大量培養で最も有望な方法のひとつに、マイクロキャリア法があげられる。これは、150~200 μ m程度のビーズに細胞を付着伸展増殖させ、スピナーフラスコなどで浮遊させて培養するものである。これは、細胞のみの浮遊培養と区別するために疑似浮遊培養と呼ばれている。マイクロキャリアへ細胞を付着させる方法は現在、①連続攪拌法、②間欠攪拌法、③ディッシュ内付着、の3つがある (Pharmacia Fine Chemicals, 1989; 美王ら, 1987)。①は、種細胞とマイクロキャリアの懸濁培養液をスピナーフラスコに入れ、すぐに攪拌する方法である。②は、細胞とマイクロキャリアの懸濁培養液をスピナーフラスコに入れるが、初期の間は、例えば1時間に1回、1min程度、攪拌してやる方法である。③は、ベトリディッシュ内に細胞とマイクロキャリアの懸濁培養液を入れ、そのまま放置する方法である。懸濁された細胞を1個1個のマイクロキャリアに均一に付着させるためには、①が望ましいが、細胞とマイクロキャリアの接触時間が短いため、細胞によっては付着速度が②に比較して若干遅くなるものもある。③は大量培養には不向きである。以上の中で、付着が著しく遅いいくつかの細胞における場合を除いては、実際には、①の連続攪拌法による細胞播種が一般には用いられている。

マイクロキャリアへの連続攪拌法における細胞付着過程を模式化したものを 図1. 8に示す。播種細胞数に対する付着細胞数の割合 (付着率; A) は、次式のように、非付着細胞率 (1 - A) を推進力とする1次不可逆反応モデルで記述できることが示唆されている (Levine et al., 1979; Himes et al., 1978; Tao et al., 1988)。



$$\frac{dA}{dT} = K_A(1-A)$$

図 1. 8 マイクロキャリアーへの細胞附着過程 (連続攪拌)

$$dA/dt = k_a (1 - A)$$

この時の細胞附着速度定数 k_a は、液流れによる剪断応力・細胞-固体表面間の接触時間・同接触確率・固体表面への細胞の付着力などの関数であると考えられる (Mege et al., 1986). 固体表面自体の特性およびそれが吸着された血清タンパクを介して及ぼす影響は、細胞のマクロキャリアーへの付着力に影響を与え、附着速度定数に反映されていると考えられているが、定量的解析がなされるには至っていない。

実験室レベルでのディッシュ培養においては、ディッシュ底面と細胞は培養している間、常に接触しているが、連続攪拌によるマイクロキャリアーへの細胞播種では、細胞とマイクロキャリアーは非常に短い接触時間しか持ち得ない。実際のマイクロキャリアーへの細胞附着速度定数の測定で明らかになったことは、血清中には各種の生物学的に特異的な附着伸展促進因子が含まれているにもかかわらず、血清の添加は、附着速度定数を一般に低下させる効果を持つということである (Himes et al., 1987; Tao et al., 1988). この現象は、接触・附着過程と、その後の伸展増殖過程では、その主要な機構が異なっているということの傍証となる。しかしながら、一般のディッシュ底面への細胞附着伸展現象さえも未だはっきりとは説明されていない状況であり、まして、ごく短時間での細胞附着現象については、それに焦点を絞った研究は皆無である。

そこで、本研究は、その第2章でまさに接触直後の細胞付着現象に焦点を当てた。すなわち、代表的な2つの細胞付着機構に着目し、接触直後の細胞付着現象を説明すること(2.2)、及びその結果に基づいて、大量培養における接触直後の細胞付着と、増殖と密接に関連しているその後の細胞伸展を同時に促進する表面を設計すること(2.3)を目的として検討を行った。

実際のマイクロキャリア培養槽を用いて、マイクロキャリアの表面状態を様々に変えて数多くの細胞付着実験を行うことは容易ではない。そこで、通常の静置培養での付着実験で、細胞とディッシュ底面の接触時間を既往の研究と比較して極めて短く設定することにより、特に特異的・非特異的付着作用を持つ血清タンパク質のディッシュ底面への吸着に注目し、その影響を定量的に解析した。この結果から、ごく短い接触時間においては、特異的・非特異的という2つの細胞付着機構のうち、非特異的な機構が支配的であることを明らかにした。また、この結果を簡単なモデルで表すと共に、その結果に基づき、接着依存性動物細胞の大量培養における付着伸展増殖に最適な表面特性を提案した。この表面上で、接触直後の細胞付着速度とその後の細胞伸展は、同時に促進された。このことは、上で提出したモデルの妥当性を強く支持するものと考えられた。

細胞付着現象における生物特異的相互作用と非特異的相互作用の寄与の割合については、依然として未解明であり、今後の研究成果が待たれる分野であるとされている(Prokop, 1991)。本研究で得られた以上の結果は、大量培養の際に、最も普通に見られる細胞付着現象における生物特異的相互作用と非特異的相互作用の寄与を定量的に明らかにした上で、簡単なモデルとして表した点で意義深いと考えている。

1.2 初代培養肝細胞における 細胞周囲環境と細胞形態及び 機能発現

1.2.1 機能発現とマトリックス物質

コラゲナーゼ灌流法(Seglen, 1976)によって、さまざまな肝特異機能を保持している良好な状態の肝実質細胞が動物から得られるようになってからは、通常の樹立細胞の培養に用いられる手法が、初代培養肝細胞の培養においても基本的には用いられてきた。すなわち血清やコラーゲン等で被覆したディッシュ上での静置培養である。この条件下で細胞はディッシュ底面に伸展し単層状の細胞層を形

成する。ラット肝細胞の場合では、この状態のまま約1-2週間の培養が可能である。

このように採取・培養した肝実質細胞を用いて、その後、主に次の2つの方向で研究が行われてきた。一つは培養系での肝細胞の増殖についての研究であり、もう一つは培養肝細胞の長期生存および機能発現の維持についての研究である。前者の研究は、肝細胞増殖因子(HGF)の発見(Nakamura et al., 1984)以後、その分子レベルでの作用機構の解析や、遺伝子組替え動物細胞を用いたHGFの大量生産といった発展を遂げつつある。一方、長期にわたる生存および機能維持に関する研究も、近年著しい発展を遂げている。ここでは、後者について主に述べる。

長期にわたる生存と機能発現・維持に関する研究は、大きく2つに分けられる。ひとつは培地成分の改善に関する研究であり、もうひとつは、細胞マトリックス物質および培養システムの改善に関する研究にである。前者に関しては、肝臓の機能発現が多種多様なホルモンによって厳密に制御されていることに注目、各種ホルモンや微量金属類を添加することによって、一定の到達をみている。この中でも、EnatらによるHormonally Defined Medium(1984)は、その後の数多くの研究において用いられている。後者に関しては、実際の肝臓内で肝実質細胞がおかれている細胞周囲環境を模倣する方向で研究されてきた。生体内での肝細胞周囲環境を図1.9に示す。肝細胞は、6あるいはそれ以上の面をもった多角形状の形態をした大型の細胞である。肝細胞はとなりあった肝細胞と結合し、その間には毛細胆管が流れており、血液とは全く交わることなく、胆嚢へと続いている。また、コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質ゲル層を介して肝臓内毛細血管(類洞と呼ばれる)と接し、酸素や栄養素・各種代謝生成物等の物質交換を行う。実際の構造は、図1.9に示されたように平面的ではなく、細胞同士がさ

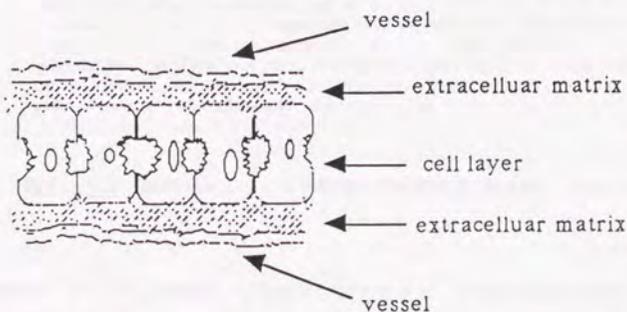
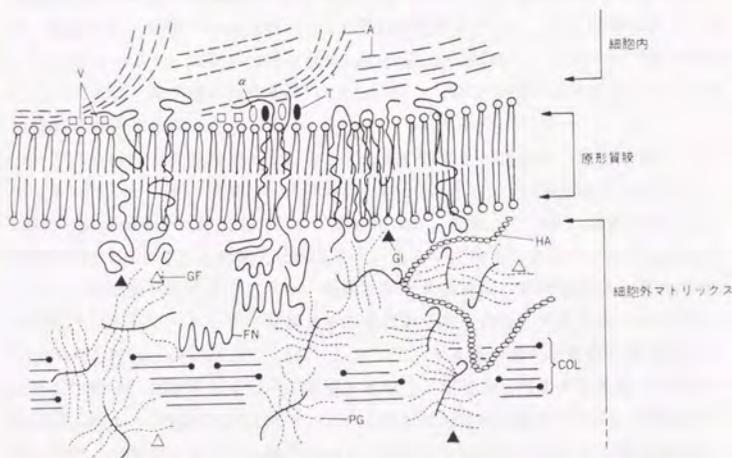


図1.9 生体内における肝細胞周囲環境

さまざまな方向で結合，その間を類洞が縦横に流れるといった立体的なものである。さらに，細胞と細胞外マトリックス物質の立体的な配置を模式化したものを，**図 1. 10** に示す(鈴木旺，1989)。肝細胞周囲の細胞外マトリックス物質は，コラーゲンゲルの3重らせん網目構造に，多糖-タンパク巨大複合体である各種プロテオグリカンと，ラミニンやフィブロネクチンといった特異的付着伸展糖タンパクが配置し，ゲル層を形成している。



細胞内骨格系分子群、細胞膜リポド、タンパク質、レセプター群、細胞外マトリックス分子群は、強弱様々な非共有結合あるいは溶媒親和力、反発力によって会合し内外を結ぶ三次元ネットワークを形成している。このネットワークは細胞活動に伴って伸縮するのみでなく構成分子の合成分泌/エンドサイトーシス、分解によって時々刻々その機能ドメインの活性や位置が変化している。各種の成長因子、成長抑制因子、ホルモン、イオンなどもこの変化に対応しつつ、その結合分布のパターンを変える。PG:プロテオグリカン、COL:コラーゲン繊維、FN:フィブロネクチン繊維、GF:成長因子、GI:成長抑制因子、HA:ヒアルロン酸、T:タリン、 α : α -アクチニン、V:ビンキュリン、A:アクチンフィラメント。

図 1. 10 細胞とマトリックス物質の立体的配置(鈴木旺，1989)

細胞マトリックスの培養系での利用は，古くはコラーゲン被覆表面の利用，生体内と同じくゲル化させたコラーゲンの利用などである。この培養系では，細胞はディッシュ底面に伸展し単層の細胞層を形成する。しかし，ラット肝細胞の場合，1~2週間の細胞維持が限界であった(Guguen-Guillouze et al., 1983)。これは一般には，細胞が生体内でとっている立方体の形態と著しく異なる過度に伸展

した形態になることが、この方法の限界を決定していると考えられている。

コラーゲンを培養基質として用い、その幾何的な配置を生体内の構造に近づけることによって、機能を維持しようとする試みがなされてきた。はじめに試みられたのは、ゲルを底面から剝離させ、培地中に浮遊させることである(浮遊コラーゲンゲル培養法)(Michalopoulos and Pitot, 1975)。これによって、背面からも栄養素や酸素などが供給されると共に、浮遊させたゲル細胞層は次第に収縮し、細胞が生体内に近い立体的な形態をとる。これによって、細胞維持が改善されたが、過度のゲル収縮のため、それでも3週間が限度であった。ゲル収縮を防ぐためにナイロンメッシュを用いた培養(Savage et al., 1978)や、コラーゲン膜の代わりにシリコーン膜を用いた培養(Silica et al., 1979)などが試みられたが、充分な改善は得られなかった。

一方、生体内で細胞層がゲルにはさまれていることを模倣し、底面付着サンドイッチコラーゲンゲル培養法が試みられた(Dunn et al., 1989; Dunn et al. 1991; Jaegwan et al., 1992)。この方法により、血漿タンパク合成能のレベルと維持期間が約1カ月へと飛躍的に向上した。さらに、膜上でこのサンドイッチコラーゲンゲル培養を行うことにより、血漿タンパク合成能の維持期間は、底面付着サンドイッチコラーゲンゲル培養法と同等であったものの、その発現レベルが著しく向上した(Suzuki et al., 1991)。よって、ゲル層の幾何的な配置の機能維持における影響は、細胞層を培地中に浮遊させて上下両面から酸素や栄養素を供給する効果よりも、細胞層をゲルでサンドイッチ状に包括する効果の方が、相対的に大きいことが判明した。この膜上サンドイッチゲル培養により、ゲル層の幾何的な配置に関しては、ほぼ完全に生体内の細胞周囲環境を模倣できたと考えられる。

生体マトリックスの成分をさらに模倣し、Biomatrixと呼ばれる肝ホモジネートから抽出した不溶性物質上で肝細胞を単層培養することによって、それが半年にわたって生存することが報告された(Rojikind et al., 1980)。このBiomatrixの成分としては、通常用いられてきたType Iコラーゲンの他、Type III, IV コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、各種プロテオグリカンなどが含まれている。

このBiomatrixは、肝小葉内間質物質と肝小葉間質物質との混合物である(田辺ら, 1985)。小出らは、このBiomatrixから、生体内において肝細胞が直接接している肝小葉内間質物質のみを精製し、これをさらに、コラーゲン分画、糖タンパク分画、プロテオグリカン分画にわけ、それぞれの細胞生存における影響を個別に検討した(Koide et al., 1989; 真治ら, 1988)。その結果、コラーゲン分画では、単層状となったが、プロテオグリカン分画では、細胞が次第に凝集し、100 μ m程度の凝集体となって培地中に浮遊、アルブミン分泌能が単層培養に比べて長期に渡り維持された。糖タンパク分画では、両者の中間的傾向を示した。このような凝集体(スフェロイド)は、poly-(2 Hydroxy methylmethacrylate)被覆

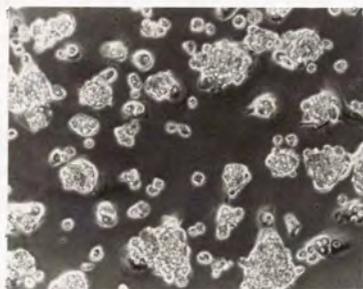
表面上の播種された胎児ラット肝細胞についても報告されている(Landry et al., 1985)。この場合も、肝特異酵素や血清タンパク合成能が約1カ月に渡り維持された。この表面は、高度に親水性であるため、細胞をまったく付着させない。よって、ディッシュ底面上での細胞運動の自由度が増し、細胞同士の接触組織化が容易となったと思われる。また幼若ラット肝細胞は、血清やホルモン等を全く添加しない条件下においても、自己の分泌する増殖因子により、活発に増殖すること(中村, 1987)から、成熟ラット肝細胞におけるスフェロイド形成と同一視することはできないと考えられる。

その後、小出らは、プロテオグリカン分画上だけでなく、さまざまな物質で被覆した表面上で、細胞凝集体が形成され、機能を長期に維持することを報告した(Koide et al., 1990)。

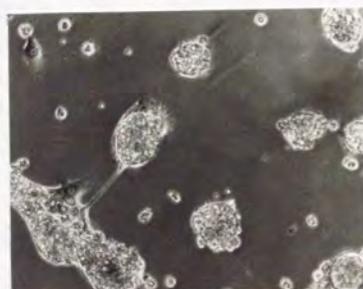
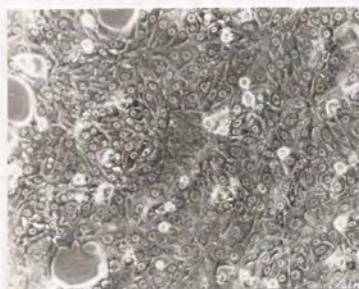
われわれも、ポリリジンで被覆したディッシュ上で、肝細胞がスフェロイドを形成することを見いだした。ポリリジン上のスフェロイドの形成過程及び形態をコラーゲン上の単層培養のそれと比較したものを図1.11に示す。コラーゲン上では、細胞は大きく伸展し、約1日の培養でディッシュ底面一杯に完全な単層の細胞層を形成するが、ポリリジン上に播種された細胞は、コラーゲン上のものほど伸展せず、培養に伴い凝集、5日目には、周囲が平滑化した凝集体(スフェロイド)を形成する。

本論文では、その第3章、3.2で、このポリリジン上の細胞凝集体について、培養系での形成と維持における固体表面特性と液性因子の影響を検討し、基礎的な形成・培養条件を明らかにすると共に、高度な機能発現を確認することによって、この凝集体が、いままで報告されているスフェロイドと同一のものであることを示すことを目的として、検討を行った。その結果、ある一定濃度以上の溶液によるポリリジンコーティングが、最速のスフェロイド形成にとって必要であることを明らかにした。ポリリジン上で形成されたスフェロイドは、Biomatrixプロテオグリカン分画上で形成されたものと同様に、アルブミン分泌能をコラーゲン上の単層培養と比較して長期にしかも高レベルで発現することを明らかにした。ポリリジンは、液相からの吸着といった簡単な方法で、さまざまな形状をした細胞担体にスフェロイド形成能を付与できる点で、便利である。

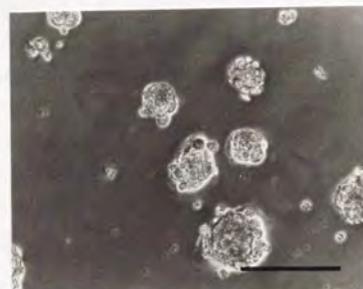
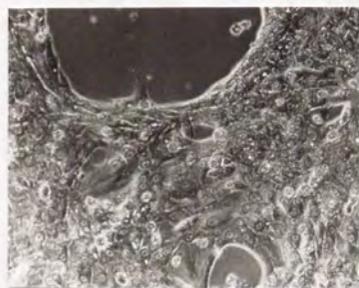
スフェロイドの発見以後、それが従来のコラーゲン被覆表面上の単層培養と比較して、アルブミン分泌能だけでなく、ビリルビン抱合能(川口ら, 1989)や胆汁酸合成能(戸部ら, 1989)などの肝特異機能の発現についても、優れていることが示されている。



1 日



2 日



5 日

コラーゲン

ポリリジン

図1. 11 コラーゲン上の単層培養とポリリジン上のスフェロイド培養における肝細胞の形態変化 (バーは200 μ m)

本研究では、その第3章、3.3で、ハイブリッド型人工肝臓に利用する上で重要であると考えられているいくつかの肝特異機能の発現を、ポリリジン被覆表面上のスフェロイドについて確かめることを目的として、検討を行った。その結果、機能によってはアルブミン合成分泌能ほど維持が良好でないものもあるものの、細胞当りの発現量で約1カ月にわたって、いままで報告されているスフェロイドと同レベルの機能が維持されることを示した。

これらの凝集体中で肝細胞は、単層培養の場合と異なり、生体内と同様な立体的な形態をとっていることが示されている。ただ、類洞や胆管など物質移動のための経路が完全には形成されず、完璧な組織化とはいえない。このため、大き過ぎる凝集体は次第に内部壊死を起こす。また小さすぎると容易に崩壊する傾向にあるため、培養条件下では、適当な大きさ(60~100 μ m)の凝集体を利用するのが適当であると考えられている(飯島ら, 1991)。

胎児ラット肝細胞で用いられた高度な親水表面(通常ほとんど細胞を付着し得ない)を例外として、これら細胞凝集を促進する表面は、陽性荷電または疎水性に富んだものに大別できる。肝小葉内細胞間基質プロテオグリカン分画被覆表面上のものと同様な細胞凝集体が、これらの人工表面上で形成される理由を示したものが、図1.12である。ポリリジン(PL)と、フィブロネクチン(FN)の細胞形態に及ぼす影響を対比させて示してある。肝細胞から分泌されたプロテオグリカンが、その強い陰性電荷と疎水性のために、まずこれらの表面に選択的に吸着されることにより、プロテオグリカン分画と同様な細胞凝集が起こると考えられている(Koide et al., 1990)。この推察は、これら人工表面上では、まず細胞が初期に伸展してから凝集するのに対し、プロテオグリカン分画被覆表面

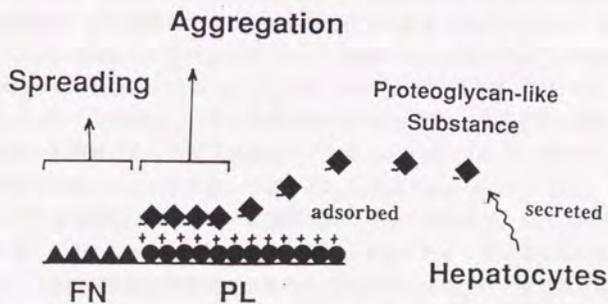


図1.12 推測される人工表面上でのスフェロイド形成機構

上では、初期の伸展度は相対的に小さく、より速く浮遊する傾向にあること (Koide et al., 1990) からも間接的に説明される。

一方、精製された各種プロテオグリカンを単独で被覆した表面上に肝細胞を播種し、凝集を見たところ、デルマトン硫酸が最も効果的であったとの報告がある (Shinji et al., 1988)。他のプロテオグリカンも若干の効果を持つ。一般に、肝に最も多く含まれているプロテオグリカンは、ヘパラン硫酸であるが、凝集を促進する効果は、デルマトン硫酸に比べて小さかった。ヘパリン、カラゲナン、デキストラン硫酸など高度に硫酸化された多糖を培地中に添加しても、同様な細胞凝集が誘起され、高レベルの機能発現が長期にわたり見られた (Fujita et al., 1985)。しかし、どの単独のプロテオグリカンでも、Biomatrixから精製したプロテオグリカン分画上で見られたような、顕著な細胞凝集体の形成および浮遊化はみられなかったことより、球状の凝集体形成は、さまざまな種類の肝特異的なプロテオグリカンの作用が総合されて起こるものであると推察される。

プロテオグリカン以外のマトリックス物質で、細胞機能の長期維持に効果を持つと思われるものとしては、ラミニンがあげられる。Bisselらは、EHS肉腫から精製されたラミニンやプロテオグリカンを多量に含むゲル (マトリゲル) を調製し、その上で肝細胞を単層培養することにより、血清タンパク合成能を約1か月に渡り維持した (Bissel et al., 1987)。また、Schetzら (1988) は、同じく EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 肉腫から抽出したマトリゲル上で、細胞が球状の形態を保持したまま、各種肝特異機能を高レベルで発現したことを報告している。

肝臓は、肝特異機能を保持している実質細胞と、それ以外のさまざまな細胞 (非実質細胞) とからなる。非実質細胞は直接に実質細胞と結合するものと、直接には決して結合を形成しないものからなる。非実質細胞のうち、上皮様の形態を示す細胞は、肝実質細胞と直接の結合を形成する細胞のひとつである。この上皮様細胞と肝実質細胞とを混合培養すると、血漿タンパク合成能が2か月以上に渡って維持される (Guguen-Guillouzo et al., 1983)。この効果は、幼若ラット肝臓から株化された上皮細胞との混合培養で最も大きい。特に、他の肝特異機能と比較して著しく困難であった解毒系酵素群であるチトクロームP-450の維持が、この混合培養系では、10日以上に渡って維持される (Guillouzo et al., 1985)。細胞機能および生存の維持における非実質細胞のこのような効果は、これらの細胞が分泌するさまざまなマトリックス物質の影響に帰着されると考えられている。

以上、生体内肝細胞の周囲環境を模倣する方向で成果をあげてきた研究を概説した。従来の単層培養は、伸展のみを促進するコラーゲンだけを用いてきたために、機能維持には限界があったと考えられる。生体内と同様に、さまざまなマトリックス物質がコラーゲンを骨格とするゲル層にある割合で適当に配置され、それが肝細胞を取り囲み細胞が生体内と同様な立方体状の形態をとり、長期に機能

を発現することになると考えられる。このような研究の中で、肝細胞スフェロイドという培養形態は、細胞の自己組織化能をきわめて簡単な方法によって誘導したものと位置づけられる。すなわち、生体内の細胞周囲環境における場合と近い成分や幾何的配置をもったゲル層で細胞を包括したりする必要がなく、しかも長期培養可能である。さらに生体肝から精製したBiomatrixプロテオグリカン分画で被覆した表面だけでなく、肝細胞から活発に合成分泌されるプロテオグリカン様マトリックス物質を選択的に吸着する人工表面上でも同様なスフェロイドが形成されることが見いだされたことは、生体内の細胞周囲環境に学びつつも、それをいかに簡単な培養条件で誘導して形成させるかといった視点の重要性を示唆している。具体的には、スフェロイドを能率よく形成させるために、肝細胞由来のプロテオグリカンの分泌能を高める、または、分泌されたプロテオグリカンの吸着性を高めた表面を用いるといった培養条件を整えてやることである。特に、より簡単な条件で肝細胞を長期にしかも大量に培養する必要があるハイブリッド型人工肝臓モジュールなどの製作を考える際には、この視点からのアプローチも今後重要になってくると考えられる。

1. 2. 2 ハイブリッド型人工肝臓における肝細胞凝集体の利用

ブタやイヌの初代培養肝細胞を利用した単層培養・積層型ハイブリッド型人工肝臓モジュールは、すでに試作されている(濱田ら、1990)。この人工肝臓モジュールシステムの全体像を図1.13に、またモジュールの構造を図1.14に示す(小平、中村、1990)。このモジュールを、ヒトの肝細胞の30%を収容するものにそのままスケールアップすると、装置容積が約40 Lとなるため、実際に臨床応用するためには10 L程度まで小型化する必要がある。10 Lの装置容積でヒト肝の1/3の細胞数を保持するためには、モジュール内細胞密度を 1×10^7 cells/cm³程度まで高める必要がある。そこで、それ自体が高密度かつ高機能である細胞凝集体を利用し、適切なモジュール化を行えば、既存モジュールの性能および装置容積を大幅に改善できると考えられる。

細胞凝集体を人工肝臓モジュールに利用する場合は、単一細胞を固定化した後に凝集を起こさせスフェロイドを形成・そのままモジュールとして用いる方法と、まずスフェロイドを大量形成した後に固定化を行う方法とが考えられる。

前者では、多孔質担体内表面を細胞凝集を促進する物質で予め被覆しておく例(佐藤ら、1991)や、そもそも多孔質担体自体が凝集を促進させるという性質を利用した例(松下ら、1991)などがある。松下ら(1992)の例におけるスフェロイドの固定化法を、図1.15に示す。また最近では、内部の流動性を高めたゲルに単一細胞を高密度包括することにより、ビーズ化したゲル内部で細胞凝集を起こさ

せる試みなども行われている(伊藤ら, 1992).

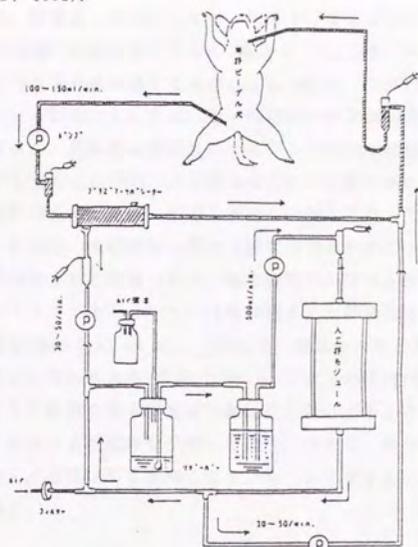


図 1. 14

人工肝臓モジュールシステム

(小平, 中村, 1990)

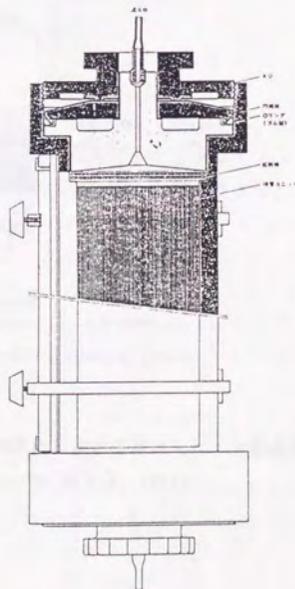
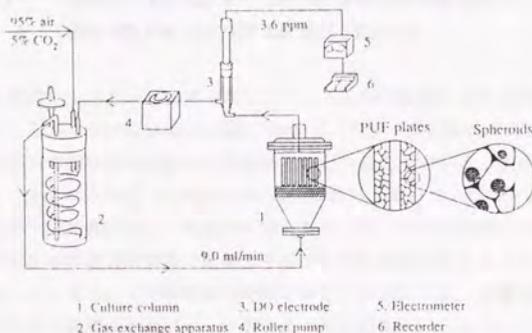


図 1. 13

単層培養/積層型モジュール

(小平, 中村, 1990)

一方、浮遊凝集体を大量形成後、固定化した例としては、アルギン酸カルシウムゲルビーズに包括し、液噴流培養層で懸濁培養するもの(高畠ら, 1991)や、ホローファイバーモジュール内にビーズを充填培養するもの(Miura et al., 1992)などがある。このタイプのモジュール製作においては、単一細胞から凝集体形成を行わせるための装置が必要となるが、最終的に製作されたモジュール内の細胞密度を、単一細胞状態で固定化する方法に比べて、より高めることが可能であると考えられる。また、実際の臨床応用を考えると、細胞を凍結し大量に保存しておく技術の確立が不可欠である。肝細胞の凍結保存に関する研究例はきわめて少ないが、融解後の生存率や機能発現がきわめて悪い点が、樹立細胞株の場合と異なる。しかし、コラーゲンコートマイクロキャリアへ付着伸展させた肝細胞は比較的凍結保存に耐えるという報告(Moscioni et al., 1989)や、凝集体の方が単一細胞より低温での保存に耐えるとの報告もある(武井, 1991)。これらの研究例は、マトリックス物質を共存させたり細胞をある程度まで組織化したりすることが、凍結保存に対する耐性を向上させる可能性を示唆しており、将来は、単一細胞を凝集体にして大量凍結保存し、必要な時に融解してモジュール化するという体制が確立される可能性が高い。



PUF/spheroid packed-bed culture system

図1. 15 ポリウレタンフォーム骨格内におけるスフェロイド形成を利用した充填層型モジュール(松下ら, 1992)

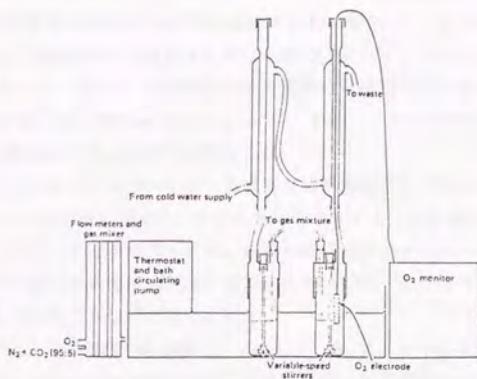
本論文では、将来予想されるハイブリッド型人工肝臓モジュールの製作までの流れ、すなわち、凝集体の大量形成→凍結保存→融解→モジュール構築→臨床応用といった、流れに沿って、第3章、3.4で固体表面と液性因子によるスフェロイド形態の基礎的な制御を試みた。まず、スフェロイドの形成における各種ホルモンの添加の有無及び添加濃度の影響を、速度論的・平衡論的に検討した。その結果を用いて、ポリリジン被覆平板上で浮遊状態の良好なスフェロイドを選択的に形成させる培地条件を設定できた。次に、この浮遊スフェロイドを回収、細胞凝集を促進するポリリジンと細胞伸展を促進するフィブロネクチンとからなる固体表面に再付着させ、スフェロイドの高機能を保持したまま、一部伸展状態で安定に固体表面に固定化する場合に望ましい表面特性を明らかにした。

これは、あくまで、ホルモンを十分に添加した合成培地中での結果であるが、ホルモンや培養表面特性によるスフェロイドの形態制御に関する生物学的知見、及びそれらを医用工学的に応用する場合の可能性と問題点を明らかにした点で意義があると考えている。

1. 3 懸濁培養による細胞凝集と凝集体の安定固定化

肝細胞が旋回シェーカー上に置かれたディッシュ内で凝集すること (Seglen, 1976)、また、さらに Jeejeebhoyら (1975; 1980) は、特注の 250 ml スピナフラスコ中で、肝細胞が 24 時間以内に凝集体を形成することを報告している。彼らの実験装置を、図 1.16 に示す (Jeejeebhoy et al., 1975)。彼らは、これを実験系として用い、肝臓での代謝に関して基礎的な研究を行った。しかしながら、これらの凝集体をそのまま浮遊懸濁状態で培養すると、すぐに機能を失ってしまう。Jeejeebhoyらによると、この限界は 48 時間であるとされている。単層培養と比較すると一時的には高機能を発現したようであるが (Jeejeebhoy et al., 1980)、実験系としては、より長期培養が可能であり、しかも簡便なコラーゲン被覆表面上での単層培養にとって代わられてしまった。

そこで懸濁培養を、肝細胞の実験系としてではなく、肝細胞スフェロイドを形成させる手段として適用できないか否かを検討した。懸濁培養によって、健全な機能発現をする肝細胞凝集体を形成することが可能であれば、人工肝臓モジュール製作に必要な多量のスフェロイドを、平板上で形成させる場合と比較して、迅速にかつコンパクトな装置容積で得ることができると考えられる。



The arrangements for return of condensate and monitoring of oxygen tension (and of pH similarly) are shown. Sampling is carried out through the gassing ports.

図 1. 16 肝細胞の浮遊培養システム (Jeejeebhoy et al., 1975)

本論文では、その第 4 章、4. 2 で、いくつかの形態の懸濁培養を試み、まず、攪拌培養時間と機能発現レベル・細胞障害の関連を詳細に定量化した。その結果を用い、最適な懸濁培養停止・回収時刻を設定し、形成された凝集体を表面上に再付着固定化して静置培養を行った場合の機能発現を評価した。その結果、懸濁培養によって形成された凝集体は、固定化・静置培養することにより、その高機能を長期にわたり発現することを明らかにした。この発現レベル・維持期間は、ポリリジン被覆表面上の静置培養で形成させたスフェロイドとはほぼ同等であったことから、懸濁培養によって、人工肝臓モジュールの製作に必要な多量のスフェロイドを、迅速かつ一度に大量に形成させうる可能性が示された。

一方、形成されたスフェロイドを、人工肝臓に利用するためには、モジュール内にスフェロイドを安定にしかも高密度に固定化しなければならない。臨床応用の際には、肝不全患者の血液または血漿がモジュール内を灌流する。ところが既往の固定化方法は、物質生産を目的とした大量培養のために開発されてきた。大量培養においては、培地に添加する血清が高価であるため、その使用量を低減あるいはゼロにすること、すなわち無血清培養が求められてきた。この研究の流れの中で選択されてきた固定化方法は、血漿の灌流が大前提となるという人工肝臓モジュールの特殊性をまったく考慮していないのは、当然である。

肝細胞のディッシュレベルでの培養においても、高濃度に血清を添加すると、実質細胞の精製時に混入する非実質細胞が活発に増殖することから、高濃度血清添加培地は、実質細胞の培養液としては不適切であることが示されてきた (Clayton et al., 1983)。実質細胞のみを選択的に維持するためには、Hormonally Defined Medium (Enat et al., 1984) のように多種多様なホルモンや微量物質を添加した無血清培地が望ましい。

肝細胞スフェロイドについては、高濃度血清添加培地中で極めて不安定であるとの報告もある (岩橋ら, 1992)。すなわち、スフェロイドが崩壊または内部壊死してしまう。以上、生理濃度のホルモン条件および血漿中でのスフェロイドの安定機能発現を可能とする固定化方法が選択されなければ、その後のモジュール化の段階に進むことができないと考えられる。

本論文では、その第4章、4.3で、まずいくつかの典型的な固定化方法について、実用条件を近似した高血清・生理濃度ホルモン培養条件下での機能発現を検討した。その結果、高濃度血清培地と直接スフェロイドを接触させると、スフェロイドの崩壊または内部壊死が容易に起きることが確認できた。ゲル包括法の中では、アルギン酸カルシウムゲルよりコラーゲンゲル包括の方が、細胞生存・機能発現維持において、著しく優れていることを明らかにした。よって生体内細胞周囲環境に近いコラーゲンを主体とする成分による包括固定化がスフェロイドを人工肝モジュールに利用する場合には、最も望ましいといえる。

本論文の第4章、4.2、4.3で得られた結果は、大量にスフェロイドを形成後、固定化を行うという人工肝モジュール製作のアプローチにおいて、モジュール設計前の段階での主要な問題点を基本的に解決する重要な成果であると考えている。

1.4 本章のまとめ

本章では、株細胞の付着伸展過程、初代培養肝細胞における細胞機能の発現維持、さらに高度な組織化といった現象において、固体表面特性や培地中液性因子、各種マトリックス物質などの細胞周囲環境が、相互に関連しあいながら、全体として重要な役割を果たしていることを述べた。

まず、接着依存性動物細胞の固体表面への付着現象・伸展現象それぞれにおいて、固体表面-細胞間の直接的な相互作用と、固体表面に吸着されたタンパク質を介した間接的な相互作用、細胞側リセプターとそれによって生物学的に特異的に認識されるリガンドを持つタンパクの関与する特異的な相互作用、何等そのような特異的相互作用を持たない非特異的な相互作用という、4種の相互作用の果

たす役割について、解説した。また、それらの相互作用を熱力学的な安定性の概念を導入することによって統一的に説明しようとする試みについても解説した

(1. 1. 1)。

次に、物質生産に接着依存性細胞を利用するための大量培養法として、最も有望であるとされているマイクロキャリア培養法における細胞附着現象に絞り、既往の研究を解説した。併せて、本研究第2章の意義および目的について述べた(1. 1. 2)。

また、初代培養肝細胞の機能発現維持を目的とした、さまざまな研究について解説した。ホルモンなどの液性因子や、各種マトリックス物質の種類及びその培養系での配置などの細胞周囲環境の改善によって、機能発現維持が改善されてきた経緯を述べ、生体内での細胞周囲環境を培養系で模倣することが、機能維持について、有効なアプローチであることを述べた。併せて、本研究で焦点をあてた細胞凝集体の形成と機能発現についての最近の知見を述べた。(1. 2. 1)。

さらに、初代培養肝細胞を用いるハイブリッド型人工肝臓モジュールの製作における細胞凝集体の利用の例について述べた。併せて、本研究第3章の意義及び目的について述べた(1. 2. 2)。

最後に、凝集体の大量迅速形成についての既往の研究と、本研究第4章の意義及び目的について述べた(1. 3)。

細胞の持つ物質生産能や臓器特異機能を工学的に利用する場合にも、固体表面特性や培地中液性因子、各種マトリックス物質などの細胞周囲環境が役割を解明し、単純化した上で、目的とする利用形態に合わせて再構成するといった作業が必要となるだろう。

本研究では、その第2章以下で、物質生産のための接着依存性株細胞の大量培養における固体表面への細胞の附着・伸展過程について、さらに、初代培養肝細胞の持つ肝特異機能を利用するハイブリッド型人工肝臓の製作における細胞凝集体の形成と機能発現について、さまざまな細胞周囲環境の影響を明らかにした上で、それらを再構成することによって、より効率的な工学的利用を図った。

本章の参考文献

- Andrade, J. D., "Principles of protein adsorption", in Protein Adsorption, ed. by Andrade, J. D., Plenum Press, New York (1985) pp. 1.
- Barngrover, D., "Substrata for anchorage-dependent cells", in Mammalian Cell Technology, ed. by Thilly, W. G., Butterworths, Boston

(1986) pp.131.

- Bissel, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J. and Roll, F. J., *J. Clin. Invest.*, **79**, 801 (1987).
- Borysenko, J. Z. and Woods, W., *Exp. Cell Res.*, **118**, 215 (1979).
- Clayton, D.F. and Darnell, J. E., *Molec. Cell Biol.*, **3**, 1552 (1983).
- Chinn, J. A., Horbett, T. A., Ratner, B. D., Schway, M. B., Haque, Y. and Hauschka, S. D., *J. Coll. Interf. Sci.*, **127**, 67 (1989).
- Danilov, Y. N. and Juliano, R. L., *Exp. Cell Res.*, **182**, 186 (1989).
- Dunn, J. C. Y., Yarmush, M. L., Koebe, H. S. and Tompkins, R. G., *FESEB J.*, **3**, 174 (1989).
- Dunn, J. C. Y., Tompkins, R. G. and Yarmush, M. L., *Biotech. Prog.*, **7**, 237 (1991).
- Enat, R., Jefferson, D. M. Ruiz-Opazo, N., Biempica, L., Arias, I. M., Dudas, G., Leinwand, L. A. and Reid, L. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1411 (1984).
- Fujita, M., *Int. Symp. on Growth and Funct. in Primary Cult. of Hepatocytes*, Kyoto, Japan (1985).
- Gardner, J. L. and Manna, M. H., *Exp. Cell Res.*, **137**, 169 (1982).
- Gjessing, R. and Seglen, P. O., *Exp. Cell Res.*, **129**, 239 (1980).
- Good, R. J., *J. Theor. Biol.*, **37**, 413 (1972).
- Grinell, F., *Exp. Cell Res.*, **97**, 265 (1976).
- Grinell, F., *Int. Rev. Cytol.*, **53**, 65 (1978).
- Guguen-Guillouzo, C. B., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D. and Guillouzo, A., *Exp. Cell Res.*, **143**, 47(1983).
- Guillouzo, A., Beaune, P., Gascoin, M. N., Begue, J. M., Campion, J. P., Guengerich, F. P. and Guguen-Guillouzo, C., *Biomed. Pharmacol.*, **34**, 2991 (1985).
- 濱田, 松江, 高橋, 長谷, 熊谷, 中島, 園谷, 内野, 橋村, 駒井, 今, *人工臓器*, **19**, 852 (1990).
- Horbett, T. A., Schway, M. B. and Ratner, B. D., *J. Coll. Interf. Sci.*, **104**, 28 (1985).
- Himes, V. B. and Hu, W-S., *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1155 (1987).
- Hirtenstein, M., Clark, J., Lindgren, G. and Vretblad, P., *Develop. Biol. Stand.*, **46**, 109 (1980).
- Horbett, T. A. and Schway, M. B., *J. Biomed. Mat. Res.*, **22**, 763 (1988)

- Hughes, R. C., Pena, S. D. J., Clark, J. and Dourmashkin, R. R., *Exp. Cell Res.*, **121**, 307 (1979).
- 飯島, 谷口, 松下, 船津, 化学工学会第24回秋季大会研究発表講演要旨集第2文冊, pp.330 (1991).
- 伊藤, 林, 小林, Chang, T. M. S., 第8回初代培養肝細胞研究会抄録, pp.22. (1992).
- Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Yamada, Y. and Martin, G. R., *Science*, **238**, 1132 (1987).
- 岩橋, 井嶋, 谷口, 松下, 船津, 化学工学会第57年会研究発表講演要旨集第3分冊, pp.183 (1992).
- Lee, J., Morgan, J. R., Tompkins, R. G. and Yarmush, M. L., *Biotech. Bioeng.*, **40**, 298 (1992).
- Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Greenberg, G. R., Phillips, M. J., Bruce-Robertson, A and Sodtke, U., *Biochem. J.*, **146**, 141 (1975).
- Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Mehra, R. and Bruce-Robertson, A., *Gastroenterol.*, **78**, 556 (1980).
- 小平, 中村, 組織培養, **16**, 390 (1990).
- Landry, J., Bernier, D., Quellet, C., Goyette, R. and Marceau, N., *J. Cell Biol.*, **101**, 914 (1985).
- Levine, D. E. W., Wang, D. I. C. and Thilly, W. G., *Biotech. Bioeng.*, **21**, 821 (1979).
- 松下, 谷口, 飯島, 船津, 化学工学会第24回秋季大会発表講演要旨集第2分冊, pp.328 (1991).
- 松下, 井嶋, 船津, 人工臓器, **21**, 1050 (1992).
- Mege, J. L., Capo, C., Bernoliel, A. M. and Bongrand, P., *Cell Biophys.*, **8**, 141 (1986).
- Michalopoulos, G. and Pitot, H. C., *Exp. Cell Res.*, **94**, 70 (1975).
- "Microcarrier Cell Culture" ed. by Pharmacia Fine Chemicals, Sweden (1989).
- 美王, 見原, 藤原, 佐藤, 藤吉, 第3回次世代産業基盤技術シンポジウム-バイオテクノロジー-予稿集, 日本産業技術振興協会・バイオテクノロジー開発技術研究組合編 (1987) pp.183.
- 川口, 小出, 坂口, 浅野, 森, 辻, 人工臓器, **18**, 1269 (1989).
- Koide, N., Shinji, T., Tanabe, T., Asano, K., Kawaguchi, M., Sakaguchi, K., Koide, Y., Mori, M., Tsuji, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 385 (1989).

- Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M.,
Matsushita, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M. and Tsuji,
T., *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990).
- Margolis, L. B., Dyatlovitskaya, E. Y. and Bergelson, L. D., *Exp. Cell
Res.*, **111**, 454 (1978).
- Maroudas, N. G., *J. Theor. Biol.*, **79**, 101 (1979).
- Moscioni, A. D., Roy-Chowdhury, J., Barbour, R., Brown, L. L.,
Roy-Chowdhury, N., Competiello, L. S., Lahiri, P. and Demetriou,
A. A., *Gastroenterol.*, **96**: 1546 (1989).
- Miura, Y., Kondoh, A., Serada, M., Tsuda, K. and Yagi, K., in
"Biochemical Engineering for 2001", ed. by Furusaki, S., Endo,
I. and Matsumoto, R., Springer-Verlag, Tokyo (1992) pp.617.
- 長岡, 織維と工業, **43**, 497 (1987).
- Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
122, 1450 (1984).
- 中村, in "初代培養肝細胞実験法", 中村編, 学会出版センター, 東京 (1987).
pp. 225.
- Pena, S. D. J. and Hughes, R. C., *Nature*, **276**, 80 (1978a).
- Pena, S. D. J. and Hughes, R. C., *Cell Biol. Int. Repts.*, **2**, 339
(1978b).
- Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E., *Nature*, **309**, 30 (1984).
- Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M-A., Ponce, P.
and Reid, L. M., *J. Cell Biol.*, **87**, 255 (1980).
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D., *Science*, **238**, 491 (1987).
- Prokop, A., "Implications of cell biology in animal cell biotechnology",
in "Animal Cell Bioreactors", ed. by Ho, C. S. and Wang, D. I.
C., Butterworth-Heinemann, Stoneham (1991) pp.22.
- 佐藤, 落合, 松原, 人工臓器, **20**, 145 (1991).
- Savage, C. R. and Bonney, R. J., *Exp. Cell Res.*, **114**, 307 (1978).
- Schakenraad, J. M., Busscher, H. J., Wildevuur, Ch. R. H. and Arends,
J., *Cell Biophys.*, **13**, 75 (1988).
- Schuetz, E. G., Li, D., Omiecinski, C. J., Muller-Eberhard, U.,
Kleinman, H. K., Elswick, B. and Guzelian, P. S., *J. Cell.
Physiol.*, **134**, 309 (1988).
- Seglen, P. O., *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).
- Sherbet, G. V., Lakshmi, M. S. and Rao, K. V., *Exp. Cell Res.*, **70**, 113

(1972)

- Silica, A. E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C. A. and Pitot, H. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 283 (1979).
- Shinji, T., Koide, N. and Tsuji, T., Cell Struc. Func., **13**, 179 (1988).
- 真治, 小出, 小川, 田辺, 浅野, 荒木, 辻, 人工臓器, **17**, 179 (1988).
- 鈴木, 市川, 酒井, 迫田, 化学工学会米沢大会予稿集, pp.32 (1991).
- 鈴木旺, 細胞工学, **8**, 59 (1989).
- 高畠, 小出, 佐々木, 松島, 武南, 小野, 坂口, 船津, 辻, 人工臓器, **20**, 139 (1991).
- 武井, 未発表データ (1991).
- Takeichi, M and Okada, T. S., Exp. Cell Res., **74**, 51 (1972).
- 玉田, "医用材料表面", in "高分子表面の基礎と応用(下)", 笹編, 化学同人, 京都 (1986) pp.181.
- 田辺, 小出, 治徳, 近藤, 小野, 長島, 森, 人工臓器, **14**, 220 (1985).
- 戸部, 武井, 久々宮, 小林明, 小林一清, 赤池, 人工臓器, **20**, 150 (1991).
- Tao, T-Y., Ji, G-Y. and Hu, W-S., Biotech. Bioeng., **32**, 1037 (1988).
- van Oss, C. J., Cell Biophys., **14**, 1 (1989).

第2章 固体表面特性による接着依存性 株細胞の付着伸展の制御

2. 1 本章の研究目的

接着依存性動物細胞の大量培養において現状で最も有望とされている培養法はマイクロキャリア法である。この方法で培養を開始する際には、まず細胞をマイクロキャリア表面に均一に付着させなければならない。接着依存性動物細胞は一般に、固体表面に付着伸展して初めて増殖を開始し、その物質生産能や特異機能が発現されるようになる一方、表面に密に増殖するとその段階で増殖を停止する性質があるため、ひとつの培養槽で最大の増殖効率を得るためには、培養開始の細胞付着段階で、細胞を各マイクロキャリア表面に均一に播種し、培養槽内のすべての固体表面がほぼ同時に密になるようにすることが重要となる。そのためには、細胞とマイクロキャリアを培地に懸濁させ、スピナーフラスコなどの培養槽の中で連続的に攪拌することにより細胞をマイクロキャリアに均一に付着させる操作が通常行われる。細胞によって付着に要する時間には差があるが、普通90%以上の細胞が付着するためには、1～数時間の連続攪拌が必要である。

この連続攪拌による細胞播種においては、細胞はマイクロキャリアとごく短時間の接触を何回も繰り返す、全体としては徐々にマイクロキャリア表面に補足され付着する。この付着現象は、ディッシュ培養におけるそれと著しく異なる。すなわち、ディッシュ培養においては、細胞は培養時間だけディッシュ底面と接触しているが、連続攪拌におけるマイクロキャリアへの細胞付着現象については、非常に短い接触時間しか持ち得ない。付着における固体表面特性の影響については、さまざまな検討が行われてきたが、いずれも比較的長い接触時間で細胞付着現象についてであり、これらの結果は、連続攪拌によるマイクロキャリアへの細胞播種に見られるような工業プロセスにおける細胞付着現象の解明に適用できない可能性が十分に考えられる。細胞と固体表面の間の相互作用については、長い接触時間を持つ場合においてさえ、未だはっきりとは解明されていない。まして、非常に短い接触時間における細胞付着現象については、それに焦点を絞った研究は皆無である。

第1章でも述べたように、細胞と固体表面の付着機構には、固体表面と細胞の直接的な相互作用によるものと、固体表面に吸着したタンパクを介した間接的な作用ものとに大別され、さらに後者には、吸着されたタンパクが細胞表面と生物学的に特異的な相互作用を持つ場合（特異的付着機構）がある。特異的な付着機構以外の付着機構は、生物学的には特異性はないため、非特異的付着機構

とよばれる。分子レベルでいえば、特異的結合も、非特異的結合の総和と考えられるが、実際に観察される現象には、両機構の間で明かな差異がみられるため、本論文では、特異的付着タンパクが関与する付着機構と特異的機構、それ以外を非特異的機構と呼ぶことにする。

そこで本章では、代表的な細胞の2つの付着機構、すなわち特異的付着機構及び非特異的付着機構に注目し、接触直後の細胞付着現象を解明すること

(2.2)、及びその結果に基づいて、大量培養における細胞付着と細胞増殖と密接に関連している細胞伸展を同時に促進する表面を設計すること

(2.3)を目的とする。細胞としては、比較的古くからワクチン生産などに用いられ、また細胞付着研究においても利用されている代表的な線維芽株細胞であるBHK21c13細胞を用いた。

実際の連続攪拌によるマイクロキャリアへの細胞付着現象におけるさまざまな特異的および非特異的相互作用の影響を検討するためには、さまざまな表面特性を持つマイクロキャリアを用いて、小型のスピナーフラスコ中で細胞付着速度の検討を行うのが最も確実である。しかしながら、数多くの特性を持つマイクロキャリアを調製し、それぞれフラスコ中での細胞付着実験を行うことは容易ではない。

そこで、まず2.2では、在来の静止系におけるディッシュ底面への付着実験において、在来の付着実験に比べて非常に短い接触時間(0, 1, 2, 3, 5 min)における付着率変化を測定することによって、マイクロキャリアへの細胞播種時に見られるような接触直後の細胞付着現象における特異的付着機構と非特異的付着機構の寄与を定量的に検討した。この方法では、各種表面の調製および細胞付着実験の遂行のいずれも、実際の培養槽を用いたマイクロキャリアへの細胞付着実験に比べてはるかに容易である。これらの検討結果を、単純なモデルで表すと共に、接触直後の細胞付着現象において重要であることが判明した非特異的な細胞付着機構について、支配的な因子について検討を加えた。

多くの樹立細胞株や形質転換された細胞株は、最速の伸展増殖のために、一定量以上の固体表面に吸着された付着伸展因子が必要である。充分な量の付着伸展因子が存在していれば、BHK細胞などは、最速の付着を行うことができる。しかしながら、細胞の正常性の程度が上がると共に、付着伸展は充分な付着伸展因子が存在していても遅くなる。例えば、正常肝細胞(Gjessing and Seglen, 1980; Johansson and Hook, 1984; Johansson et al., 1981)やヒト正常2倍体細胞株であるTIG-3(Shimo-oka et al., 1988)などは、充分な特異的付着機構を介しても、BHK細胞に比べると非常に付着が遅い。

そこで、次に2.3では、2.2で得られた結果をもとに、接触直後の細胞付着速度と、増殖と密接に関連しているその後の細胞伸展とを同時に

促進するような特性を持つ表面を提出し、同じく非常に短い接触時間における細胞附着速度と1時間後の細胞伸展を測定した。その結果、初期細胞附着と伸展を同時促進することが判明した。この結果は、2. 2で提出した接触直後の細胞附着現象を示す単純なモデルの妥当性を支持するものであった。

2. 2 接触直後の細胞附着現象の速度論的評価

2. 2. 1 本節の研究目的

本節では、代表的な2つの細胞附着機構である特異的及び非特異的な細胞-固体表面相互作用について、大量培養法として最も有望であるとされているマイクロキャリアー法における細胞播種に見られるような接触直後の細胞附着現象に絞り、両者の寄与を解明することを目的とする。

具体的には、静置ディッシュでの細胞附着実験において、接触直後(0-5 min)の細胞附着速度における特異的及び非特異的細胞附着機構の寄与を定量的に検討した。標準固体表面としては、組織培養用ポリスチレンディッシュを用い、これをさまざまなタンパク溶液で処理することにより他の表面を調製した。タンパクの吸着量は予め定量化した(2. 2. 3. 1)。まず、典型的な3種の培養表面において、接触直後(0-5 min)の細胞附着と、その後の細胞附着(5-60 min)における現象の差異を検討した(2. 2. 3. 2)。次に、血清(FBS)被覆表面上で見られたラグタイムを持つ細胞附着現象について、細胞と特異的相互作用を持つ代表的な血清タンパクであるフィブロネクチン、血清中の含有量が最大でありその固体表面への吸着が細胞附着を阻害するアルブミンの2者に着目し、さまざまな吸着量を持つ表面上への接触直後(0-5 min)の細胞附着を検討した(2. 2. 3. 3)。最後に、以上の検討結果に基づき、接触直後の細胞附着における支配的な固体表面特性について検討と考察を加えた(2. 2. 3. 4)。

2. 2. 2 実験方法

2. 2. 2. 1 細胞及びその培養

細胞は、附着伸展の研究に用いられる例の多いハムスター由来線維芽細胞株、BHK21 c13(Macpherson, 1962)を用いた。これはJCRB(Japanese Cancer Research Resources Bank)から入手した。

通常の培養は、培地として、イーグルの最小必須培地(Eagle's Minimam

Essential Medium; イーグルMEM培地「ニッスイ」①)+10%非動化FBS(Fetal bovine serum; Flow社)+20mM HEPESを用いて、70 cm²・140 cm²の培養ビン、またはCORNING社製の60 mm・100 mm組織培養用ポリスチレンディッシュで、5%CO₂-95% air下、静置培養を行った。70 cm²・140 cm²の培養ビンでの培養の際は、シリコセンを用いて開放培養を行った。継代は、PBS(-)(Ca²⁺・Mg²⁺-free Phosphate Buffered Saline)と0.25%トリプシン・0.02%EDTAを用いる常法にしたがった。

2. 2. 2. 2 固体表面の調製

細胞付着実験には、Falcon社製組織培養用ポリスチレン6穴マルチウェル(培養面積9.6 cm²)または、同じ培養面積を持つ35 mmディッシュを用いた。

タンパク吸着表面の調製は、以下のように行った。フィブロネクチン(新田ゼラチンまたはBiomed. Technol. Inc.;牛血清由来)またはアルブミン(Sigma, ウシ血清コーンの第V分画)を含むPBS(+)溶液を、各wellあたり1 mL入れ、37°Cで1時間 incubateする。フィブロネクチンの特異的相互作用のみを見るために、アルブミンブロッキング法(Grinell and Feld., 1979)を用い、bareなポリスチレン部を細胞非付着性にした。すなわち、フィブロネクチンを吸着させたwellの液を取り除き、80°Cで3 min熱処理した1%アルブミンPBS(+)溶液1.0 mLを入れ、37°Cで30 min静置した。またポリリジンによる被覆を行った。この場合、100 μg/mLのポリリジン/PBS溶液で37°C、1時間でディッシュをコーティングした。タンパク吸着を終えた後、各wellを室温のPBS(+)約3 mLで3回静かに洗浄した。そして、各wellに0.9 mLのMEMを入れ、インキュベーター内で平衡化する。これらタンパク被覆したディッシュは、0.9 mLのMEM Hanks緩衝液をいれて、37°Cの湿潤インキュベーターに入れて、平衡化した。これに0.1 mLの細胞懸濁液を播種し、付着を開始する(Soderquist et al., 1979)。

2. 2. 2. 3 タンパク吸着量の測定

ディッシュ底面へのタンパク吸着量を直接測定するのは、吸着量が微量であるため通常の方法では困難である。溶出させて測定することが考えられるが、吸着タンパクを完全に溶出させることは不可能である。現に、強力な界面活性剤であるSDS(sodiumdodecylsulfate)を用いても、約50%程度の吸着タンパクを溶出させることしかできないことが示されている(Rapoza and Horbett, 1990)。

そこで、本研究では組織培養用ポリスチレンディッシュと同じ特性を持つマイクロキャリアーを用い、液量に対する固体表面積の相対的な比率を上げ、液濃度変化から吸着量を測定した。250 mgの組織培養用ポリスチレンマイクロキャリアー(Haezelton)をサンプルチューブに入れ、タンパク質/PBS溶液500 μLと、37°C温浴上で1時間完全混合した際の、液濃度変化から測定した。液中のタンパク量

は、*o*-フタルアルデヒド(OPA)蛍光法によって測定した。この蛍光法は、0.1-50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のタンパクを簡単な方法で測定できることが示されている(Weidekamm et al., 1973; Benson and Hare, 1975)。ここでは、さらに定量性を高めるために、pH 9.5の1%-SDS(sodiundodecylsulfate)/ホウ酸緩衝液で37°C、2時間処理した後、OPAと反応させた。SDS処理によって、タンパクの高次構造が解かれ、OPAとの反応生成物の蛍光が著しく増大する。この反応液を335 nmで励起し、440 nmでの蛍光を測定した。検量線は、それぞれのタンパクで調製し、SDS液による同様な処理を行った後、蛍光を測定した。

2. 2. 2. 4 表面の疎水性/親水性バランスの測定

表面の疎水性/親水性のバランスは、水の接触角として表示した。2. 1. 2. 2のように調製したタンパク吸着ディッシュを乾燥後、測定までデシケータ内乾燥空气中で保存し、調製後3日以内測定を行った。水の接触角は、このように調製・保存されたディッシュについて、純水を用い、協和科学の接触角計(Q1型)を用いて液滴法によって測定した。

2. 2. 2. 5 接触直後の細胞付着率変化の測定

細胞採取の条件は、厳密に制御した。付着実験の前日にconfluentになった細胞を、約 5.0×10^4 cells/cm²で継代し、実験当日に活発に増殖している細胞を得た(Ruoslahiti et al., 1982)。実験当日、細胞層をPBSで2回洗浄し、0.25%-トリプシン/0.02%-EDTAで室温で90 sec処理した。トリプシン消化反応の停止は、MEM+10%-FBSで行った。4°Cで遠心して2.1 mLのMEM with Hanks BSSに再懸濁し、0.1 mLを採り、トリパンブルー染色し細胞数と生存率を測定した。通常93%以上の生存率が得られた。この細胞懸濁液は、37°Cで付着実験実施中の細胞凝集を防ぐため、氷浴上に10 min放置した(Soderquist et al., 1979)。これを再度遠心し、 2.0×10^6 cells/mLの濃度に再懸濁し、播種まで37°Cで5-10 min保持し、細胞膜と培養液を平衡化した。この懸濁液の0.1 mLを平衡化してあったディッシュに入れ、付着実験を開始した。

培養の後、往復シェーカーで90 rpm, 15 sec振盪し、まず1.0 mLを採り、さらに0.5 mLを追加して緩く付着している細胞を取り除き、始めに回収した液に加え、非付着細胞とした。この細胞液は、適当に希釈した後、ERMAの血球計算機で細胞濃度を測定した。同様に播種細胞数も測定した。細胞付着率 A_i は、次式によって計算した。

$$A_i = (N_i - N_n) / N_i \quad (1)$$

ここで、 N_i は播種細胞数、 N_n は非付着細胞数である。測定は、1表面について、2回行い、平均値を表示した。

このように得られた付着率 A_t から、初期付着速度定数 k_a を次式によって決定した。

$$dA_t/dt = k_a(1-A_t) \quad (2)$$

特に、0-1 minについての k_a を k_{a0} とした。

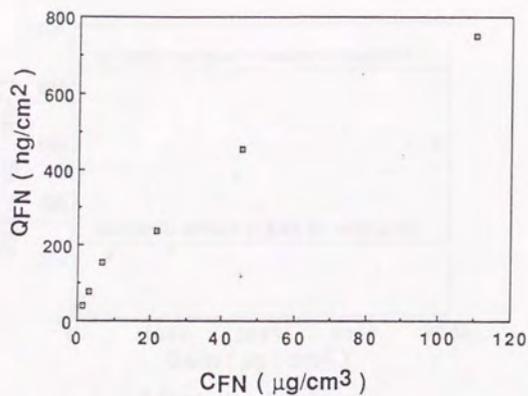
この細胞付着実験において、細胞懸濁液をディッシュ中の液と完全混合し、ディッシュを静置した時を、0 minとした。しかし細胞は、液層を沈降して固体表面と接触を開始するまで若干の時間遅れがある。これは、ディッシュ底面に焦点を合わせた顕微鏡で連続写真を撮影することにより決定した。ほぼ50%の細胞が付着するのに約20 secがかかることが判明したため、0-1 minの付着実験における正味の細胞-底面接触時間は、40 secと決定し、初期付着速度定数 k_{a0} を計算した。

2. 2. 3 結果及び考察

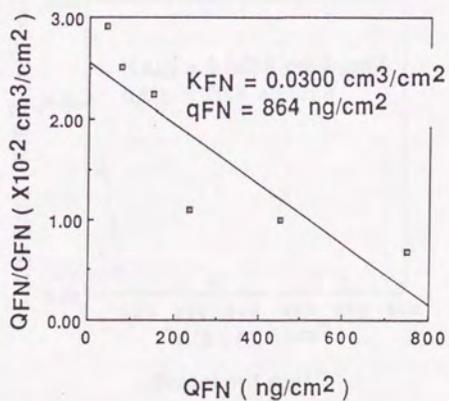
2. 2. 3. 1 組織培養用ポリスチレンへの血清タンパクの吸着

フィブロネクチンとアルブミンについての吸着平衡曲線を測定した。結果を図2. 1、図2. 2に示す。フィブロネクチンの吸着は、測定全領域について、Langmuirの式で表現することができた。よって、液濃度からのディッシュ底面への吸着量は、Langmuir式で推算した。

しかし、アルブミンの吸着については、低濃度域ではLangmuir式で表現できるものの、高濃度域になると、Langmuir式の飽和吸着量を大きく越えた量が表面に吸着した。このような非-Langmuirタイプの吸着現象は、タンパクの吸着については、しばしば報告されている。この理由は、タンパクの吸着に関しては、Langmuir式の仮定が成り立つことが考えにくいためであるとされている(Lykke, 1984)。アルブミン分子の形は、その溶液のX線小角散乱やKerr効果の緩和の測定結果によると、図2. 3のように、長軸14 nm、短軸4 nmの偏長回転楕円体であることが示されている、それが側面で最密充填の吸着(side on adsorption)を行ったとすると、飽和吸着量は250 ng/cm²、端面での吸着(end on adsorption)の場合は、820 ng/cm²となる(青木ら, 1984)。ポリスチレンディッシュ上では、Langmuir式の飽和吸着量は70.7 ng/cm²であり、side onの飽和吸着量よりかなり少ないことになる。ここでは、Langmuir式で表現できない濃度範囲については実測値を、Langmuir式で表現できる濃度範囲(0-100 μg/mL)については、近似的にLangmuir式を仮定してディッシュ底面への吸着量を推算した。



Adsorption isotherm



Scatchard plot

図2. 1 ポリスチレンマイクロキャリアへのフィブロネクチンの吸着における吸着等温線とScatchard Plot

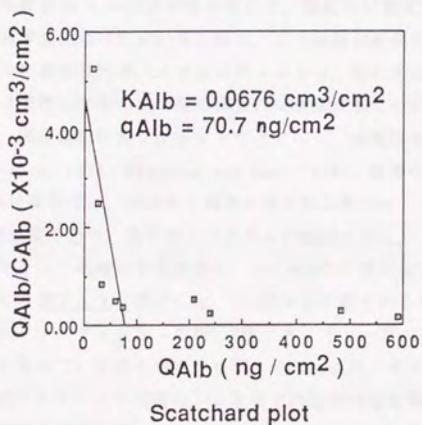
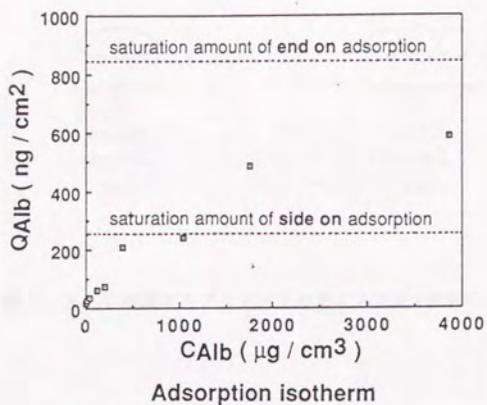


図 2. 2 ポリスチレンマイクロキャリアへのアルブミンの吸着
 における吸着等温線とScatchard Plot

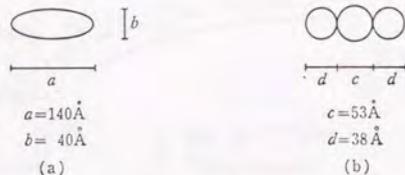


図2. 3 牛血清アルブミン分子の形と大きさ(青木ら, 1984)

2. 2. 3. 2 長時間の付着現象と接触直後の付着現象の相違

まず、接触直後(0-5 min)の付着率変化と、既往の付着実験で行われてきた接触時間での付着率変化(5-60 min)を比較し、この検討の意義を示した。ここでは、オリジナルな組織培養用ポリスチレンディッシュ、それを10%FBSで被覆したものの、ポリリジンで被覆したものの3種の典型的な培養表面について検討を行った。ポリリジンは、単に細胞付着を改善するだけでなく、増殖能を高めることが報告されている(Schell, 1974; Makeehan and Ham, 1976)。結果を図2. 4に示す。20min以降の付着率には、ほぼ全く相違が見られなかった。しかし、接触直後においては、FBS被覆表面で、若干のラグタイムが観測された。

この違いをさらに明確にするために、0-1 minの付着における細胞付着速度定数 k_{ad} を計算し、表2. 1に表示した。(2)式から計算されるポリリジン上への k_{ad} は、オリジナルディッシュの約1.7倍であった。一方、FBSは多くの特異的付着伸展因子を含んでいるにもかかわらず、その k_{ad} は、オリジナルディッシュの数分の1に低下した。この現象は、いままでの細胞付着実験は、マイクロキャリアへの細胞付着現象に見られるような接触直後の付着現象の解明には、適用できないことを示唆している。このような現象は既往の付着実験でも若干観察されているが、マイクロキャリアへの細胞付着と結び付けて解明した例はない。このような現象が見られた理由については、FBSの内、アルブミンとフィブロネクチンに注目することにより、さらに検討を行った。

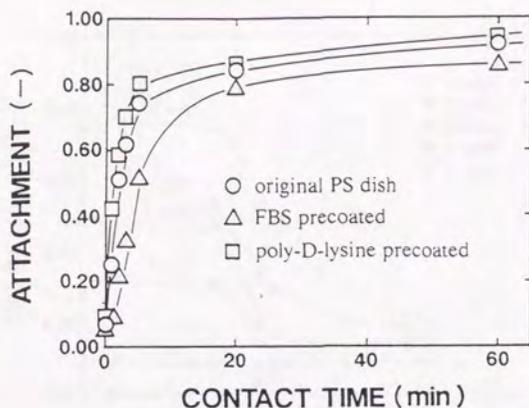


図2.4 典型的な3種の表面への細胞付着

表2.1 典型的な3種の表面への細胞付着における初期付着速度定数 k_{A01}

	original PS	FBS precoated	PDL precoated
k_{A01}^a (min^{-1})	0.38	0.07	0.66

^arate constant of a first order reaction for 0 - 1 min contact.

2.2.3.3 アルブミンとフィブロネクチンの吸着と接触直後の細胞付着

まず、さまざまな濃度のアルブミンで被覆した表面を調製し、5 min以下の付着率経時変化を測定した。結果を図2.5に示す。56 ng-Alb/cm²という小さな吸着量においても、細胞は1-2 minのラグタイムの後によく付着を開始した。この吸着量は、side on adsorptionの最密充填から計算される飽和吸着量の0.23にあたる。これは、表面被覆率であると捉えられる。この吸着量を与える液濃度は、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。10%FBS培地中のアルブミン濃度は、4,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるので、流れの存在下でのアルブミンの細胞付着阻害効果は、非常に大きいことが予想される。

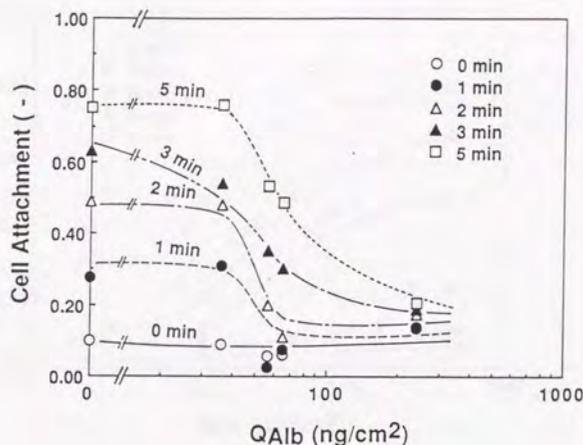


図2.5 アルブミン吸着表面への接触直後の細胞付着
(非特異的付着機構のみ)

次に、フィブロネクチンの特異的相互作用のみの影響を検討するため、フィブロネクチン被覆表面を熱変性アルブミンでブロッキングした表面を調製し、接触直後の細胞付着を速度論的に検討した。結果を図2.6に示す。46.1, 164, 452 ng-FN/cm²の各表面上での5 min後の付着率A₅は、ほぼ同じ値を示した。しかし、吸着量が小さくなるに連れて、細胞付着が小さなラグタイムを持つことが観察された。

さらに、フィブロネクチンでprecoating, アルブミンによるブロッキングを行わない表面、すなわちオリジナルポリスチレンディッシュによる非特異的付着機構とフィブロネクチンによる特異的付着機構が共存した表面を調製、初期付着率の経時変化を測定した。結果を図2.7に示す。高い初期付着速度は、フィブロネクチンの吸着量でみると、2つの領域で観察された。一方は、452 ng-FN/cm²以上であり、もう一方は3.0 ng-FN/cm²以下である。フィブロネクチンだけでオリジナルディッシュと同様な高い初期付着速度を得るためには、452 ng-FN/cm²という大きな吸着量が必要となる、この吸着量を与えるためには、単成分液で約40 μg-FN/mLの液濃度が必要となる。これは、10%FBS培地中の濃度の約2倍である。

図2.7の452 ng-FN/cm²以上の領域では、図2.6より、フィブロネクチンの特異的付着機構が支配的であることがわかる。また、図2.7の3.0 ng-FN/cm²以

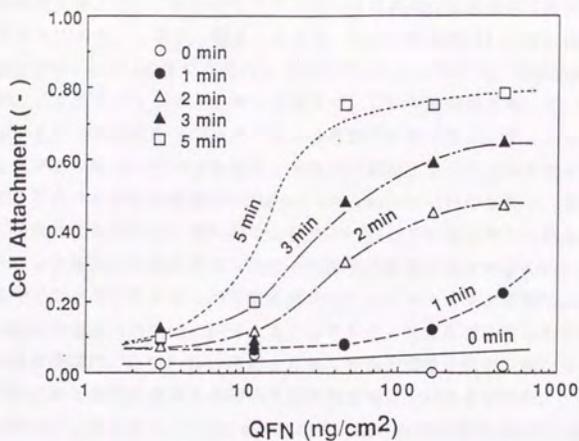


図2.6 フィブロネクチン吸着/アルブミンブロッキング表面への接触直後の細胞付着 (特異的付着機構のみ)

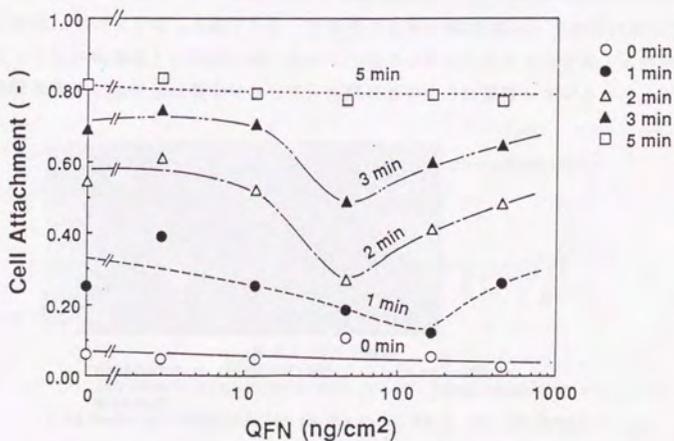


図2.7 フィブロネクチン吸着表面への接触直後の細胞付着 (非特異的及び特異的付着機構の共存表面)

下の領域では、オリジナルポリスチレンの非特異的付着機構が支配的であることは明らかである。しかし、**図2.7**では、その中間領域(46.1-164 ng-FN/cm²)で、細胞付着が1-2 minの遅れを持つことが判明した。すなわち、代表的な特異的付着伸張因子であるフィブロネクチンの吸着が、この中間領域において、細胞付着を阻害することが明らかとなった。流れの存在下においては、フィブロネクチンへのリセプターを持っている中性リンパ球の付着が、フィブロネクチン吸着ガラス上では阻害されるとの報告(Forrester and Lackie, 1984)もあり、本研究でみられた遅れ時間の存在は、流れ系での観察と一致していると考えられる。フィブロネクチンと細胞の特異的相互作用のみで細胞付着を完成させるためには、多少の接触時間が必要であることが示唆された。フィブロネクチン吸着でLangmuir平衡式の飽和吸着量は864 ng/cm²である。これから、付着阻害の見られた吸着量領域の表面被覆率は、0.053-0.19程度となる。表面の吸着状態が不明なため、細胞付着阻害効果と表面被覆率との関係を定量化することはできないが、0.19程度の表面被覆率ならともかく、0.053という非常に低い表面被覆率で細胞付着阻害が見られたことは、興味深い。

以下、あくまで推論ではあるが、吸着量によって、フィブロネクチンの吸着状態が変化していることが考えられる。フィブロネクチンの分子の形は、回転陰影法を用いた電子顕微鏡下での観察より、**図2.8**のような形であることが判明している。約70°で交わっている約70 nmの2本の腕が、それぞれ2つのサブユニットに対応していると考えられている。それぞれの腕のRGD配列は、それぞれのサブユニットの中央部近くに存在する。このようなフィブロネクチン分子が、それぞれの吸着量または表面被覆率において、実際にどのように吸着しているかは、不

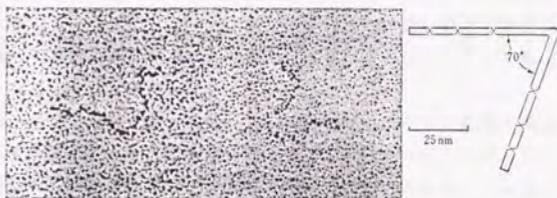


図 10.7 FN 分子の形状

- (a) 回転陰影法を用いて、電子顕微鏡下で観察したヒト pFN 分子。×280,000。
 (b) 上記の観察結果をもとにして、模式的に描いた FN 分子。×部分は、特に屈曲しやすい部分を表わす。

[J. Engel et al., *J. Mol. Biol.*, 150, 104, Fig. 4; 116, Fig. 15 (1981) より一部改変]

図 2.8 ヒト血漿フィブロネクチンの分子の形と大きさ(関口, 1982)

明である。しかし、アルブミンの吸着等温線の測定に関する考察(2, 2, 3, 1)でも述べたように、吸着量によってその吸着状態が変化することはしばしば報告されている。そこで、フィブロネクチンについても、小さな吸着量の場合には、フィブロネクチンが固体表面上に広がった形で吸着していることが考えられる。その結果、吸着量から推算される表面被覆率以上に、ポリスチレンディッシュを覆い、結果的に、この吸着量では比較的大きな細胞付着阻害効果を持つに至ったことが考えられる。

この点について、フィブロネクチン(分子量220,000)と、細胞側による特異的な認識部位(Alg-Gly-Asp; RGD)の面密度等について、さらに検討を加えてみる。初期付着の阻害効果が見られた吸着量領域の下限は 46.1 ng/cm^2 である。これは、 $2.10 \times 10^{-13} \text{ mol/cm}^2$ (1.26×10^{11} 分子/ cm^2)に相当する。RGD配列はフィブロネクチン1分子にひとつ存在するから、RGDの面密度も同じ値となる。細胞は直径 $20 \mu\text{m}$ の球と仮定すると、その平面上への投影面積は、 $3.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ となり、この面積内にフィブロネクチンまたはRGDが 3.96×10^5 個存在することとなる。一方、 46.1 ng/cm^2 から、均一にフィブロネクチンが吸着していると仮定し、同じ大きさの格子の頂点にRGDが存在するとすると、その格子の一边は、 28 nm となる。フィブロネクチンの分子形は、**図2.8**に示したように、長さ 70 nm の2本の腕を約 70° の角度で開いた形である。よって、 46.1 ng/cm^2 の吸着量は、このような形をしたフィブロネクチンが平面と平行に腕を伸ばした状態で吸着されているとすれば、分子が疎らな状態ではなく、重なりあって吸着されていることとなる。このように、 46.1 ng/cm^2 程度の吸着量(表面被覆率で 0.053 程度)でも細胞の初期付着について阻害効果が見られたことが定性的には納得できる。アルブミンのようにコンパクトな形のタンパク質と異なり、フィブロネクチンのような大きく広がった形のタンパク質では、固体表面の非特異的性質を変える効果が、吸着量から推算される表面被覆率による見積りより大きいことが、以上の考察より推察できる。

さらに、ポリスチレンディッシュ上へのフィブロネクチンの飽和吸着量からその分子密度を計算すると、 2.37×10^{12} 分子(またはRGD)/ cm^2 となり、均一に格子の頂点への吸着を仮定するとその1辺は、 6.5 nm となる。この値から、フィブロネクチンが飽和吸着した状態では、分子が非常に重なり合った状態で表面上に配列されていることが容易に推察できる。この分子密度では、2本の腕を表面と平行ではなく、表面から垂直に伸ばした状態で吸着していることも充分に考えられる。

既往の研究からは、フィブロネクチンの特異的な細胞付着伸展効果に関しては、充分な量が吸着されていれば、増殖に対しては影響を及ぼさないという結果が得られている。しかし、特異的作用ではなく、接触直後に非特異的に細胞付着を阻

害する効果については、これらの結果がそのままあてはまるわけではないだろう。今後、RGD配列を用いた人工的な細胞付着ポリマーなどを設計する際のことを考えると、特異的付着伸展タンパクの吸着状態と初期細胞付着阻害効果の関連は、詳細に検討されるべき課題であると考えられる。

2. 2. 3. 4 接触直後の細胞付着現象における支配的因子

細胞付着現象における固体表面パラメーターとしては一般に、表面電荷と疎水性／親水性のバランスの2つが重要であると考えられている。

まず、今回検討した表面の荷電状態について考察した。まずオリジナル組織培養ポリスチレンディッシュは、若干マイナスに帯電している(Hertenstein, 1980)。ポリリジンは、強い正電荷を持っている。このため、細胞を速く付着させるものと考えられる。一方、アルブミン吸着表面とフィブロネクチン吸着表面は、電荷の面からいうと、両者ともマイナスに帯電していると考えられる。アルブミンの等電点は、4.2-4.8程度であり(青木ら, 1978)生理pHでは負に帯電し、フィブロネクチンの等電点は5.5-6.2(加治, 1984)であり、同様に生理pHでは負に帯電しているためである。これらの吸着は、ポリスチレンディッシュの負電荷を、増加させていると考えられる。

次に、疎水性／親水性バランスを、水の接触角を指標として検討した。アルブミンとフィブロネクチンの吸着表面での結果を図2.9に示す。オリジナルポリ

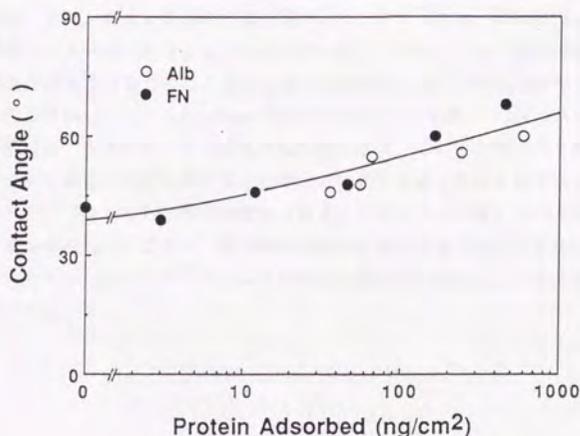


図2.9 アルブミン、フィブロネクチン吸着による接触角の変化

スチレンディッシュは、約45℃の接触角を持つ、これらのタンパクの吸着によって、表面の疎水性は増す。その程度は、アルブミンとフィブロネクチンについては全く同様であった。すなわち表面を疎水化する作用の強さは、単位吸着量当りで、両者に差異はないことがわかった。60min後の細胞付着(L細胞)については、水の接触角と細胞付着の関係は、ある接触角をピークとする上に凸の曲線で示されることが報告されている(図1.4)。いくつかのタンパクの吸着によって調製した吸着表面では、この傾向は見られず、疎水性の増加に伴って、細胞付着は悪化した。もっとも、測定条件及び表面の種類が多きの違いがあり、一概には比較ができないが、在来の長時間での付着現象と接触直後の付着現象とでは、その非特異的相互作用のみについても、支配的なパラメータが異なっている可能性もあり、今後検討を要する。

表面電荷、疎水性/親水性バランスといった細胞付着における非特異的パラメータのみを考慮した場合、アルブミンとフィブロネクチンは、同様な位置にあることがわかる。このため、図2.7で見られたように、アルブミンと同様にフィブロネクチン吸着も、特異的付着伸展因子であるにもかかわらず、接触直後の細胞付着を阻害したと考えられる。

以上の結果を、細胞付着機構における特異性の有無に着目して、模式化したものが、図2.10である。細胞の特異的相互作用で細胞付着を完成させるためには、その因子が多量に固体表面に吸着されている場合を除いて、若干の接触時間が必要であるため、接触直後の付着への寄与は、非特異的相互作用が支配的であること、また、たとえ特異的付着伸展タンパクであっても、接触直後には非特異的の表面として認識されること、を示している。このモデルは、比較的弱い特異的な相互作用を強めるために、それに比べて相対的に強い非特異的な相互作用が重要なのではないかとするProskopの推察(1991)を、より進めたものといえる。

一般には、血清タンパクの細胞付着阻害効果は、これらのタンパクが細胞がポリスチレン骨格へ直接付着するのを妨げるためであると理解されている。ポリスチレンディッシュそれ自体は静電的に見るとマイナスに帯電しているが、速い細胞付着がみられる。これは、静電的作用のみで細胞付着が説明できない例であろう。おそらく、ファンデルワールス力や疎水的相互作用が主として支配していると思われる。

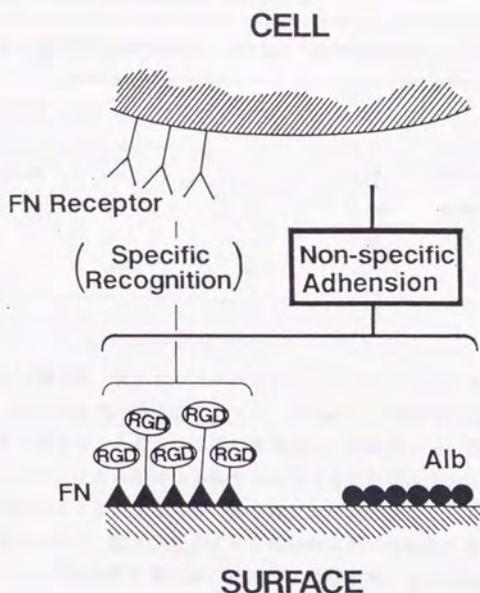


図2. 10 接触直後の細胞付着機構のモデル (本研究による)

それでは、その上に吸着したアルブミンやフィブロネクチンといったタンパクのどの様な特性が、細胞の直接の付着を妨げるのであろうか。これらのタンパクの吸着によって表面全体の非特異的特性の何が変化したのであろうか。そこで、本研究で得られた結果を一覧にして表2. 2に示す。まず、表面電荷でみると、ポリスチレンディッシュを除いて、マイナス表面では、一般に細胞付着が遅いことがわかる。一方、プラスに帯電したポリリジンは、細胞付着速度を著しく向上させる。また、タンパクの吸着で調製した表面については、疎水性/親水性バランスでみると、疎水性が若干強くなり、初期細胞付着の阻害が見られる。この阻害効果が始まる吸着量は、図2. 5と図2. 7でみると、アルブミン、フィブロネクチンのどちらにおいても、50 ng/cm²程度である。図2. 9をみると、50 ng/cm²程度の吸着量が、接触角に与える変化は、10°程度の増加である。

表 2. 2 表面特性と接触直後の細胞付着

proteins	specific interaction	charge	hydrophobicity	initial attachment
none (bare PS)	—	—	+	rapid
FBS	+	—	++	slow
FN/Alb-blocked	+	—	++	slow at low coverages
FN	+	—	++	slow at low coverages
Alb	—	—	++	slow
PL	—	+	+	very rapid

さまざまな疎水性・親水性バランスを持つ人工ポリマー上の細胞付着を検討した玉田ら(1986)の結果である 図 1. 4 や, Horbettらの結果(1985)によると, 最も良好な細胞付着を与える疎水性を持つ表面から, 接触角で10°程度増加しても, 細胞付着率には, なんら顕著な影響を与えないことが明らかとなっている。これらは, 本研究のように接触直後の付着を検討した例ではなく, そもそも接触直後の細胞付着において, 図 1. 4 のような接触角に対する細胞付着率変化曲線が成り立つのか, という疑問も残るが, この程度の接触角の変化が細胞付着に影響を与えるとは考えにくい。接触直後の細胞付着の検討ではないが, さまざまなタンパクで被覆した表面上で培地のpHとタンパクの等電点の相対的大小を変えて, 細胞付着への影響をみたところ, 用いたタンパクの等電点より低いpHであれば, 細胞は良好な付着を示すこと(Takeichi and Okada, 1972)が報告されている。

よって, ポリスチレンディッシュなど, 固体表面それ自体への細胞付着現象については, 本研究の結果からは結論を導くことはできないが, 少なくとも各種タンパクで被覆調製した培養表面への接触直後の細胞付着現象においては, 吸着タンパクの荷電状態が疎水性・親水性バランスと比較して, より支配的なパラメータであることが示唆される。また, 荷電状態としては, 従来提唱されてきた臨界電荷密度よりも, 吸着タンパクの表面電荷の極性が, 接触直後の細胞付着においては, まず第1に重要なパラメータであることが示唆された。すなわち, このように限られた, しかし工業的に最も通常にみられる細胞付着現象においては, 総括的にマイナスに荷電した細胞表面と固体表面間に働く静電的相互作用が他の相互作用に比べて重要であることが示されたといえる。

確かに, 臨界電荷密度というパラメータが提唱されてきた過程は, 細胞付着現象を動的に捕らえていない実験や, 吸着タンパクを介した間接的な相互作用と,

固体表面-細胞間の直接的な相互作用の区別が明確でない実験の積み重ねである。しかし、本研究で得られた結果は、一般的な臨界電荷密度というパラメーターの重要性を否定するものではない。実験におけるタンパク共存の有無や付着率の測定時間等を考慮せずに既往の研究を概観すれば、臨界電荷密度が、疎水性/親水性バランスと共に最も重要なパラメーターのひとつであることは、**第1章**で述べたように明らかである。本研究の結果は、工業的にみて重要である非常に短い接触時間における細胞付着現象を、最も通常に見られる血清タンパク共存系において検討すると、タンパクの電荷の極性というパラメーターの重要性を指摘したと位置づけられるであろう。

2. 3 大量培養における 培養表面特性の最適化

2. 3. 1 本節の研究目的

本節では、**2. 2**で得られた結果に基づき、大量培養における培養表面特性の最適化、すなわち、接触直後の細胞付着とその後の細胞伸展を同時に促進する表面を提出することを目的とする。

具体的には、最速の伸展に必要な最低限の特異的付着伸展因子をもち、かつ、全体がプラスに帯電しており、マイナスに帯電している細胞を接触直後から非特異的に付着させやすい表面を調製し、接触直後の細胞付着速度とその後の細胞伸展率を検討した。

2. 3. 2 実験方法

表面の調製は基本的には、**2. 2**と同様に行った。初期付着と伸展を同時促進する表面は、まず、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ のフィブロネクチンで被覆し、次に残りの吸着サイトを $100 \mu\text{g/mL}$ のポリリジンで被覆することにより調製した。コントロールとして同濃度のフィブロネクチンのみ、ポリリジンのみで被覆した表面を調製した。

一連の細胞付着実験についても、**2. 2**と同様な方法を用いた。

細胞の60min培養後伸展率(S_{60})の測定は、Grinnel and Feld(1979)の方法によった。まず、付着実験と同様な条件で60min静置培養した細胞を、PBSで2回洗浄することによって非付着細胞を取り除いた後、付着細胞を2%グルタルアルデヒド/2%ホルムアルデヒド/5%スクロース/PBS溶液中、室温で一晩固定化、さらにアジ

化ナトリウムを0.02%添加したPBSに変えて、4℃で保存した。別に測定した付着細胞に対する伸展細胞の比率を、500-1,000個以上の細胞について顕微鏡観察し、算出した。まず、倍率100倍の顕微鏡視野中のすべての細胞数を測定し、次に伸展を開始していない細胞数を数えた。ここでいう細胞伸展とは、伸展を開始していることである。すなわち、球状の形態がまったく見られないこと（顕微鏡下では球状の細胞は丸く光る輪郭を示す）、少しでも細胞周囲に細胞質が伸展していることが観察されるものとした。

2. 3. 3 結果及び考察

まず、フィブロネクチン吸着量に対して、初期付着速度定数とBHK細胞の伸展率の関連を検討した。2. 2 で得られた細胞の初期付着速度定数とここで測定された細胞の伸展率をフィブロネクチン吸着量に対してプロットしたものが、図2. 11である。これより、吸着量からみると、細胞の初期付着と伸展では、異なった領域で大きな違いが見られることがわかる。これは、細胞の接触付着現象と、細胞の伸展現象が異なった機構に基づくものであるという考えを強く支持する結果である。最速の伸展に必要な最低のフィブロネクチンの吸着量は、 46.1 ng/cm^2 である。この吸着量を分子レベルまたはRGDレベルで検討すると、2. 2. 3. 3で考察したように、 1.26×10^{11} 分子（またはRGD）/ cm^2 となる。この時、RGDの間隔は28 nmとなる。この距離が、細胞が伸展運動をスムーズに行うための限界の距離であると考えられる。

伸展に必要な最小量の特異的付着機構を持ち、かつ表面全体の特性として細胞を非特異的に付着させやすい表面を提出した。この表面特性を模式化したものが、図2. 12である。これは、約 46.1 ng/cm^2 （液濃度で $2.5 \mu\text{g/ml}$ ）のフィブロネクチンをまず吸着させた後に、ポリリジンで残りのサイトを覆ったものである。これで、全体の表面電荷は十分にプラスとなっていると考えられる。図2. 7より 46.1 ng-FN/cm^2 では、細胞は若干のラグタイムを持って付着する。そこで、この吸着量のフィブロネクチンで予め被覆した表面上では、ポリリジンの被覆による初期細胞付着促進効果を容易に観測することができる。また、このフィブロネクチン吸着量は、細胞の最速伸展に必要な最低量であるため、伸展率の低下によって、ポリリジンポストコーティングによるフィブロネクチンの細胞伸展活性部位の効果への阻害を、間接的に観測することができる。

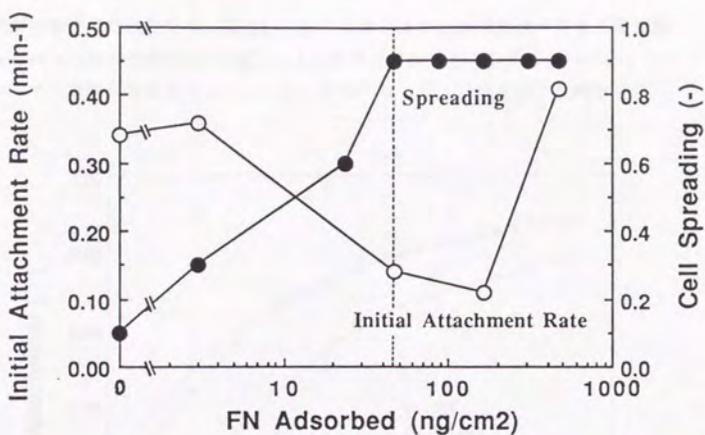


図2. 11 非特異的及び特異的付着機構共存表面における細胞初期付着速度と細胞伸展率

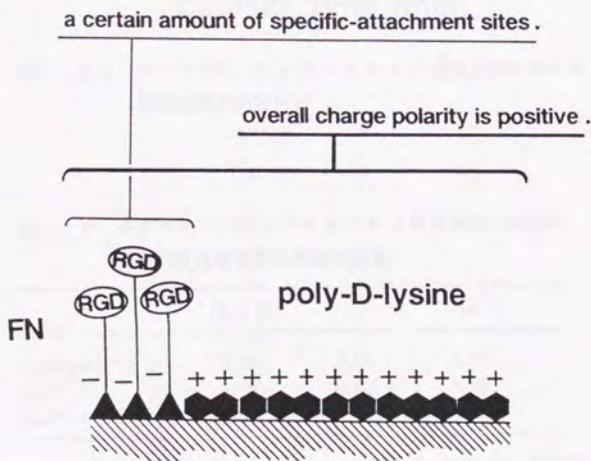


図2. 12 細胞の初期付着と伸展を同時促進する表面

初期付着率の経時変化を、図2.13に示す。また、接触直後の付着速度定数 k_{AB} と60 min後の伸展率 S_{60} を表2.3に示す。ポリリジンのポストコーティングによって、細胞付着にラグタイムは見られなくなった。速度定数で比較すると、

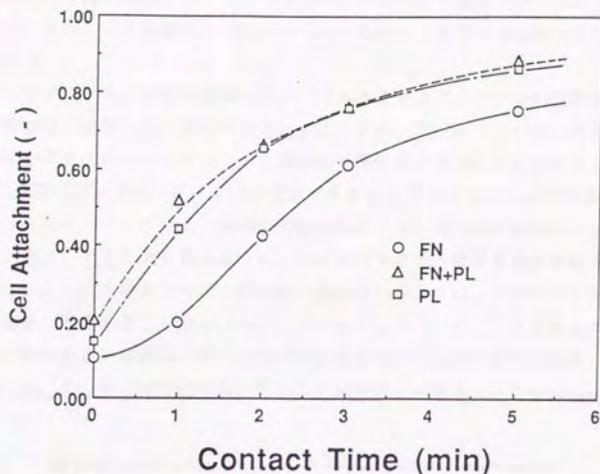


図2.13 ポリリジン/フィブロネクチン混在表面における接触直後の細胞付着

表2.3 ポリリジン/フィブロネクチン混在表面における初期付着速度定数と細胞伸展率

	FN + PL	PL	FN
k_{AB} ^a (min^{-1})	0.76	0.59	0.17
A_{60} ^b (-)	0.96	0.92	0.95
S_{60} ^c (-)	0.9	0.1	0.9

^arate constant of a first order reaction for 0-1 min contact.

^battached cell ratio after 60 min contact.

^cratio of the number of spreading cells to that of attached cells after 60 min contact.

ポリリジンによって、約4.5倍の値へと増加させることができた。また、ポリリジンのポストコーティングによっても、細胞伸長は何等影響を受けなかった。ポリリジンの被覆によっても、RGDのようなフィブロネクチン細胞伸長活性部位はその活性を阻害されないことが分かる。この表面は、特に特異的付着伸長タンパクへの応答が遅い細胞にとっての培養表面の最適化の可能性を示していると考えられる。また、この結果は、2.2で提出したモデルの傍証ともなると考えられる。

フィブロネクチンのみの表面とフィブロネクチンとポリリジンの共存表面での水の接触角を測定した。結果を図2.14に示す。ポリリジンのみを吸着させた場合は、ポリスチレンディッシュとはほぼ全く接触角が変化しなかったこと(データは示していない)より、ポリリジンはポリスチレンディッシュとはほぼ同様な親水性を持つために、フィブロネクチンに吸着されていない残りの吸着サイトに吸着しても、図2.14に見られるように、フィブロネクチン吸着表面の接触角に影響を与えなかったと考えられる。疎水性親水性バランスは、ポリリジンの共存に関わらず一定であることから、ポリリジンのポストコーティングで見られた初期細胞付着の著しい改善は、ポリリジンの正電荷によるものと考えられる。この結果は、2.2.3, 4で述べた、アルブミンやフィブロネクチンの50 ng/cm²程度

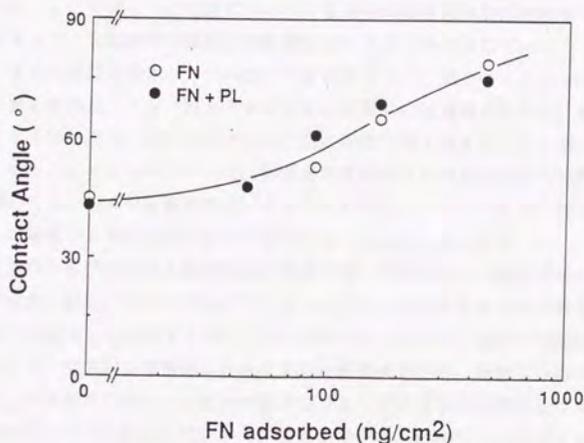


図2.14 ポリリジンポストコーティングによるフィブロネクチン吸着表面の接触角の変化

の吸着量でみられ始めた接触直後の細胞付着阻害効果の主たる原因を、吸着による表面の疎水性の増加ではなく、吸着タンパクと細胞との静電的作用によるもの推察を強く支持するものである。

2. 4 本章のまとめ

本章では、接着依存性動物細胞を用いた物質生産を工業レベルで行うために、最も有望であるマイクロキャリア法における連続攪拌による細胞播種時に見られるようなきわめて短い接触時間での細胞付着現象に及ぼす培養表面の特異的及び非特異的特性を、ディッシュを用いる静置付着実験で、細胞とディッシュ底面の接触時間を、既往の付着実験例と比較して非常に短く設定することにより検討した。

まず、培養時にしばしば見られる血清吸着表面においては、若干の接触時間の後に大部分の細胞が付着し始めるという現象が観察されたことから、既往の比較的長い接触時間での細胞付着実験の結果は、連続攪拌によるマイクロキャリアへの細胞播種における固体表面特性の影響を推察するには不適切であることが示唆された(2. 2. 3. 2)。

次に、ここで見られた現象について、血清中の特異的付着伸展因子であるフィブロネクチンと血清中で最大の含有量を示すタンパクであるアルブミンに注目して、さらに検討を加えた。アルブミン吸着表面では、短いラグタイムの後に細胞が付着し始めた。フィブロネクチンによる特異的付着機構のみでも、吸着量が小さくなるにつれて、短いラグタイムの後に細胞付着が始まることが明らかとなった。また、フィブロネクチンは、吸着量が充分大きい場合は良好な初期付着速度を与えたが、小さな吸着量では、ポリスチレンディッシュへの速い細胞付着をかえって阻害する効果を持つことが判明した(2. 2. 3. 3)。

等電点から予想される吸着表面の荷電状態、接触角として測定された吸着表面の疎水性、親水性バランスの点で、アルブミン、フィブロネクチン吸着表面の非特異的性質は、ほぼ同様であることが判明した。よって、細胞の接触付着現象については、特異的付着機構より非特異的付着機構の方が、重要な役割を演じていることが示唆された。これらの結果に基づき、接触直後の細胞付着の機構を表した簡単なモデルを提出した。また、阻害効果が見られ始めたアルブミン、フィブロネクチン吸着表面の接触角は、速い付着がみられるポリスチレンディッシュとさほど変わらなかったこと、ポリリジンのようなプラス帯電表面は初期付着を著しく改善したことより、接触直後の細胞付着においては、疎水性、親水性バランスより、表面の荷電状態、特に極性がより重要なパラメーターであることが示唆

された(2. 2. 3. 4).

さらに、フィブロネクチンの特異的細胞伸展作用と、ポリリジンの非特異的細胞接着性を組み合わせ、高い初期付着速度と最速の伸展を行わせる表面を提案した。この表面は、特異的付着因子に対する付着応答性が遅い細胞のマイクロキャリアー培養において、特に有効であると思われた。また、ポリリジンのみの表面とフィブロネクチン・ポリリジン共存表面の疎水性はほぼ同一であったことより、少なくとも固体表面に吸着したタンパクの初期付着における影響については、疎水性・親水性バランスより表面電荷の極性が重要なパラメータであることが裏付けられた(2. 3. 3)。

細胞付着現象における特異的相互作用と非特異的相互作用の役割の相対的な大小については未解明であり、今後の検討が待たれるとされている(Rpokop, 1991)。本章での結果は、大量培養の際、最も通常に見られる細胞付着現象における特異的相互作用と非特異的相互作用の寄与を定量的に明らかにした上で、簡単なモデルとして現した点で意義がある。

本章の参考文献

- Soderquist, M. E., Gershman, H., Anderson, J. M. and Walton, A. G., J. Biomed. Mater. Res., **13**, 865 (1979).
- Macpherson, I., J. Nat. Cancer Inst., **30**, 795 (1963).
- 青木, 高木, 寺田, in "血清アルブミン", 講談社 (1984) pp.28.
- 青木, in "最新電気泳動法", 広川書店 (1978) pp.187.
- Benson, J. R. and Hare, P. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 619 (1975).
- Forrester, J. V. and Lackie, J. M., J. Cell Sci., **70**, 93 (1984).
- Gjessing, R. and Seglen, P. O., Exp. Cell Res., **129**, 239 (1980).
- Grinnell, F. and Feld, M. K., Cell, **17**, 117 (1979).
- Hiertenstein, M., Clark, J., Lidgren, G. and Vretblad, P., Dev. Biol. Stand. **46**, 109 (1980).
- Horbett, T. A., Schway, M. B. and Ratner, B. D., J. Colloid Interf. Sci., **104**, 28 (1985).
- Rapoza, R. J. and Horbett, T. A., J. Biomed. Mat. Res., **24**, 1263 (1990)
- 玉田, "医用材料表面", in "高分子表面の基礎と応用(下)", 役編, 化学同人, 京都 (1986) pp.181.
- Johansson, S., Kjellen, L., Hook, M. and Timpl, R., J. Cell Biol., **90**,

260 (1981).

Johansson, S. and Hook, M., *J. Cell Biol.*, **98**, 810 (1984).

加治, in "細胞成長因子", 日本組織培養学会編, 朝倉書店 (1984) pp. 181.

Lyklema, J., *Collds. Surf.*, **10**, 33 (1984).

Mckeehan, W. L. and Ham, R. G., *J. Cell Biol.*, **71**, 727 (1976).

Prokop, A., "Implications of cell biology in animal cell biotechnology", in "Animal cell bioreactors", ed. by Ho, C. S. and Wang, D. I. C., Butterworth-Heinemann, Stoneham (1991) pp. 21.

Rouslahti, E., Hayman, E. G., Pierschbacher, M. and Engvall, E., *Methods Enzymol.*, **82**, 803 (1982).

Schell, P. L., *Biochimica Biophysica Acta*, **340**, 323 (1974).

関口, in "細胞認識と動物レクチン", 大沢編, 講談社 (1982) pp. 226.

Shimo-Oka, T., Hasegawa, Y. and Ii, I., *Cell Struc. Func.*, **13**, 515 (1988).

Takeichi, M. and Okada, T. S., *Exp. Cell Res.*, **74**, 51 (1972).

Weidekamm, E., Wallach, D. F. H. and Fluckiger, R., *Anal. Biochem.*, **54**, 102 (1973).

第3章 固体表面特性と液性因子による 初代培養肝細胞の形態及び 機能発現の制御

3. 1 本章の研究目的

初代培養肝細胞は、さまざまな肝特異機能を保持したまま一定期間培養可能であるため、ハイブリッド型人工肝臓を始めとするさまざまな有用な用途への利用が期待されている。近年、各種の物質で予め被覆した表面上で、単一状態で播種された肝細胞が次第に凝集し、スフェロイドと呼ばれる細胞凝集体を形成、従来広く利用されてきたコラーゲン被覆表面上の単層培養細胞と比較して、高レベルの肝特異機能を長期にわたり発現することが報告されている。

イヌやブタの初代培養肝細胞を単層培養したコラーゲン被覆平板を何枚も重ねたモジュール、いわゆる単層培養／積層型モジュールは、すでに試作され、動物実験が行われている。しかし、無肝犬を65時間程度しか生存させられないこと、そのモジュールをヒト肝全細胞の1/3を保持するものに単純にスケールアップすると、約40Lとなることから、ヒトでの臨床応用にはまだまだ遠い状況である。肝細胞凝集体（スフェロイド）は、それ自体が高機能・高密度であることから、適切なモジュール化を行うことにより、単層培養／積層型モジュールの装置容積と性能を大幅に向上させる可能性を持っていると考えられる。

肝細胞スフェロイドを利用した人工肝モジュールはいくつか試みられ始めているが、いずれもスフェロイドの高密度・高機能を生かききっておらず、改善の余地が多々ある。また、スフェロイド自体についても、その発見が新しいために、形成や機能発現、さらに形態制御といった応用面で必要とされる基礎的な知見が十分に得られているわけではない。

そこで本章では、培養系での細胞凝集体の形成と維持における固体表面特性と液性因子の影響を検討し、良好な形成・維持のための基礎的な培養条件を明らかにすることと共に、高度な機能発現を確認し、ポリリジン上で形成された細胞凝集体がスフェロイドであることを確認すること（3. 2）、ハイブリッド型人工肝臓への利用を前提とした際に重要と考えられている各種肝特異機能の発現を確かめること（3. 3）、モジュールへの利用のために、浮遊スフェロイドの選択的形成と再付着固定化等のスフェロイド形態変化を液性因子と固体表面特性によって制御すること（3. 4）、の3つを大きな目的とする。

われわれは、ポリリジン液で被覆した組織培養用ポリスチレンディッシュ表面

にラットより採取した単一肝細胞を播種すると、細胞が次第に凝集し、いままで報告されている細胞凝集体（スフェロイド）と類似の凝集体が形成されることを見いだした。ポリリジンは溶液状態でさまざまな表面と接触させることにより、簡単に吸着させられる。もしポリリジン被覆表面上で形成された細胞凝集体が従来報告されているものと同様に高度な機能を保持していることが判明すれば、ポリリジン溶液との接触により、さまざまな形態を持った培養表面に、簡単な操作で高機能を発現するスフェロイドを形成する能力を付与することができることになる。

そこで、まず **3. 2** では、スフェロイド形成における表面被覆ポリリジン液濃度の影響と、その後の形態的維持における各種液性因子の影響、さらに維持が改善された条件下で、従来その高レベル発現が報告されているアルブミン分泌能について、従来の単層培養と比較し、ポリリジン上で形成された細胞凝集体が、スフェロイドと呼ぶにふさわしい高度な機能を長期にわたり維持することを確認した。

肝細胞凝集体は、アルブミン分泌能(Koide et al., 1989)やビリルビン抱合能(川口ら, 1989)については、単層培養と比較して良好な発現レベルを長期に維持することが判明しているが、その他の機能発現については、調べられていない。人工肝臓モジュールへの利用を前提とする以上、可能な限りさまざまな肝特異機能を維持しなければならない。

そこで、次に **3. 3** では、人工肝臓モジュールへの利用の際に重要であると考えられ、単層培養細胞利用モジュールにおいてすでにその発現・維持が検討されているいくつかの機能について、ポリリジン被覆表面上で形成されたスフェロイドによる発現状況を検討した。また、ラット尾髄から酸抽出したコラーゲン被覆表面上においても、培地成分によっては、完全なスフェロイドと単層培養の中間的な形態、すなわち細胞多層凝集体が形成されることが判明したので、併せて機能発現状況を検討した。

スフェロイドを利用して人工肝臓モジュールを製作する場合には、採取した単一細胞を固定化した後に細胞凝集を起こさせ、スフェロイドを形成させる方法と、まずスフェロイドを大量形成させた後に固定化を行う方法とが考えられる。最終的なモジュール内の細胞密度を上げられることと、凍結保存に対してスフェロイドの方が耐性が高いことが十分に予想されることから、将来、実際に臨床応用する際には、スフェロイドを何等かの手段で大量形成した後、凍結保存しておき、必要に応じて融解、モジュールを製作することになると考えられる。

そこで、さらに **3. 4** では、ポリリジン被覆表面上で形成されるスフェロイドについて、上に述べたモジュール製作のアプローチに必要なと考えられる形態制御を、液性因子と培養表面特性によって試みた。まず、液性因子によって、

良好な浮遊状態のスフェロイドを選択的に形成させるための培地条件を設定した。さらに、得られた浮遊スフェロイドを再播種し、一部附着伸展した状態での安定固定化の際に望ましい培養表面特性について検討を行った。

3. 2 ポリリジン被覆表面上での 肝細胞凝集体の形成と維持

3. 2. 1 本節の研究目的

本節では、培養系でのスフェロイド形成と維持における固体表面特性と液性因子の影響を検討し、良好な形成・維持のための基礎的な培養条件を明らかにすると共に、高度な機能発現を確認すること、すなわちポリリジン上で形成された細胞凝集体がスフェロイドとよばれるものであることを確認することを目的とする。

具体的には、まず、凝集体形成におけるポリリジンコーティング濃度の影響について検討し、一定濃度以上のポリリジン液による被覆が細胞凝集を促進することを示した(3. 2. 3. 1)。次に、形成された細胞凝集体が、従来の報告例と比較して短期間に崩壊する現象が見られたことから、肝細胞の維持に有効であるとされているいくつかの因子について、凝集体形態の維持に対する影響を検討し、一定の改善を得た(3. 2. 3. 2)。さらに形態的維持が改善された培地条件下で、肝特異機能のひとつであり、既往の報告例で測定されているアルブミン分泌能を、ポリリジン上で形成された細胞凝集体について測定し、同時に行ったコラーゲン上の単層培養肝細胞と比較して、高レベルの分泌能を長期に維持することを確認した(3. 2. 3. 3)。

3. 2. 2 実験方法

3. 2. 2. 1 培養表面の調製

培養表面としては、Falconの組織培養用ポリスチレンディッシュ(35mm)を用いた。ポリリジンコート表面は、Sigma社のpoly-D-lysine(分子量30,000-70,000)を用い、各種濃度のPBS溶液でディッシュを37°C、1時間被覆、3mLのPBSで2回洗浄し、使用までPBSを入れてまたは、乾燥させて4°Cで保存した。ポリリジン被覆表面の保存状態の細胞凝集への影響は、全く見られなかった。コントロールとして、Micharopolous and Pitot(1975)によりラット尾腱から酢酸抽出したコラーゲンで被覆した表面を調製し、培養を行った。

3. 2. 2. 2 肝細胞の調製と培養

肝細胞は、6-8週齢、150-250 gのWistarラットオス（日本生物材料）をネンブタールで麻酔し、0.05%コラゲナーゼ灌流法（Seglen, 1976）により採取した。コラゲナーゼは和光純薬の細胞分散用を用いた。ガーゼ濾過・低速遠心・細胞濾過器（池本理化）によりほぼ実質細胞のみを得た。トリパンブルー染色による生存率は78-87%、収量は $1\sim 2 \times 10^8$ cellsであった。播種密度は生細胞で 5.0×10^4 cells/cm²、ディッシュ当り1.5または2.0 mLの培地量になるように播種した。

基本培地はウィリアムスのE培地（WE; 極東製薬）に、20 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-K⁺-2'-ethanesulfonic acid), 10^{-7} M インシュリン（タカラ）, 10^{-7} M デキサメタゾン（和光純薬）, 100 units-ペニシリン（GIBCO）/mL, 100 μ g-ストレプトマイシン（GIBCO）/mLを添加したものとした。

培養開始から6時間までは基本培地で培養し、以下各種添加物を加えた培地に交換して培養を続けた。基本培地には必要に応じて、5%非働化牛胎児血清（FBS; Filtron）, 20 ng-上皮成長因子（EGF; タカラ）/mL, 200 ng-アプロチニン（Apr; タカラ）/mL, 10^{-7} M グルカゴンを添加した。また、機能測定実験では、上記4つのホルモンに加えて、 10^{-7} MのCuSO₄·5H₂Oと 3×10^{-9} MのH₂SeO₃を添加した。この微量金属の濃度は、Enatら（1980）のHormonally Defined Mediumの濃度である。24時間後に2回目の培地交換を行い、以下2日毎に培地交換した。5日以降は、50 xg, 1 minで遠心して交換した。

3. 2. 2. 3 アルブミン濃度と細胞内DNA量の測定

細胞内DNA量は、仔牛胸腺DNAを標準物質として、Brunkら（1979）の方法によって定量した。細胞はPBSで2回洗浄して、pH7.6のリン酸カリウム緩衝液に懸濁して、超音波で破砕した。この細胞破砕液は、直接DAPIと反応させ、350 nmで励起し、450 nmの蛍光を測定した。培地中に分泌されたアルブミンは、2抗体サンドイッチELISAによって測定した。

3. 2. 3 結果及び考察

3. 2. 3. 1 ポリリジン被覆表面での肝細胞凝集体の形成

5%FBSを添加した基本培地中で、ポリリジン被覆表面における肝細胞の形態変化・維持を観察した。コラーゲン被覆表面での培養では、24時間後にはほとんど細胞が伸展した。ところがポリリジン上では、24時間後にはとなりあった細胞同士が結合するが、コラーゲン上のものほど伸展せず、島状に凝集するのみであった。その後この島状の凝集が表面上に盛り上がり、3-5日に急激に球状となり、一部は培養液中に浮遊した。以上の形成過程・形態等から見る範囲では、本条件で形成

された細胞凝集体は、最近報告されているスフェロイドと同様のものと思われた。

次に、インシュリンとデキサメタゾンのみをホルモンとして添加した合成培地中で、ポリリジンの表面被覆濃度を 10^{-5} - 10^2 mg/mLの範囲で変えて、細胞凝集への影響を検討した。結果を図3.1に示す。最速の細胞凝集には、 10^{-2} mg/mL以上のコーティング濃度が必要であった。 10^{-3} mg/mL以下のコーティング濃度では、細胞は凝集するものの完全な球形のスフェロイドとならず、固体表面に強固に付着したヘミスフェロイドまたは多層凝集体が形成されるに留まった。以上、ある一定以上の正電荷がスフェロイド形成に必要であることが示唆された。

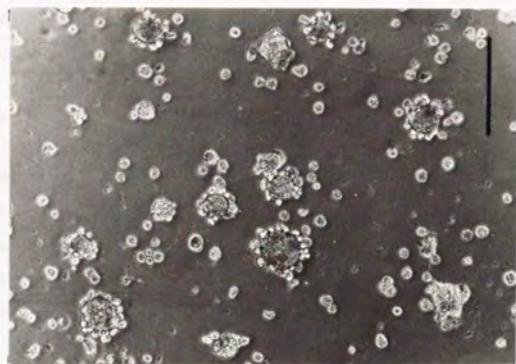
小出らは(1989)、ラット肝バイオマトリックスのプロテオグリカン分画で被覆した表面上で形成された細胞凝集体(スフェロイド)と同様なものが、さまざまな人工表面上で形成され、プロテオグリカン分画上で形成されたスフェロイドと同様に高機能を発現することを示している。彼らは、肝細胞によって合成・分泌されたプロテオグリカンが、これらの人工表面に選択的に吸着され、プロテオグリカン分画上と同様な細胞凝集・スフェロイド形成が見られると推察している。プロテオグリカンは強い陰性電荷をもった巨大タンパク-糖複合体であるため、強いプラス電荷や強い疎水性をもつ固体表面に選択的に吸着されると考えられる。ポリリジン被覆表面は、生理pHではアミノ基による強いプラス電荷を保持しているため、強いマイナス電荷を持つ肝細胞分泌プロテオグリカンを選択的に吸着したと考えられる。

以下の実験においては、最速のスフェロイド形成が見られた濃度の10倍である100 μ g/mLの濃度のポリリジンコーティングを用いることとした。

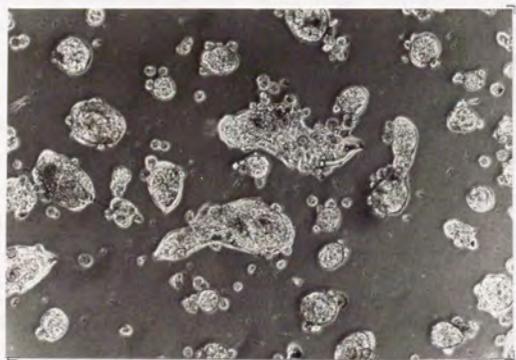
3. 2. 3. 2 肝細胞凝集体の形態と維持における液性因子の影響

5%血清を添加した培地中で、ポリリジン上に形成されたスフェロイドの維持を検討した。培養開始7日後にトリパンブルー染色を行ったところ、スフェロイドに組織化されていない細胞はすべて染色されたが、スフェロイドは表層の一部の細胞が染色されたのみであった。この条件でスフェロイドは10日まで健全な形態で維持されたが、12日では大部分のスフェロイドの表層細胞が破壊され、球状の形態は崩壊した。また、基本培地のみ(無血清)の条件下でのスフェロイド形成・維持を観察した。形成は血清添加培地と比較し、約1日速まり、2-4日に行われた。これは主に、フィブロネクチン等の血清中付着伸展因子による伸展作用がないためであると考えられる。一方維持については、6日後で早くも血清添加培地で12日にみられたのと同様な形態崩壊を起こした。本条件下では、血清による維持促進効果が確認された。

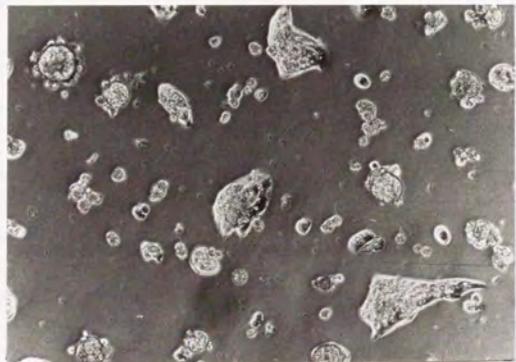
そこで、肝細胞生存促進効果が示されているEGFとアプロチニンの影響を検討した。



10⁻¹ mg/mL



10⁻³ mg/mL



10⁻⁵ mg/mL

図3.1 ポリリジン被覆濃度の細胞凝集への影響(バーは200 μ m)

EGFはスフェロイド形成を促進することが示唆されている(Akaike et al., 1989). またアプロチニンは、単層培養において、細胞膜プロテアーゼを阻害することにより、細胞層の維持を促進することが報告されている(Asami et al., 1984).

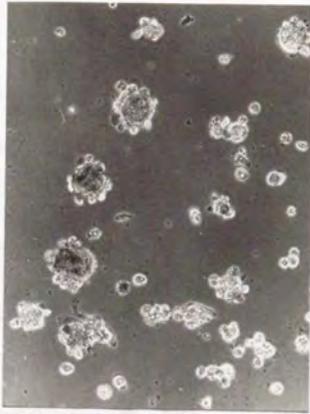
そこで、ポリリジン被覆表面でのスフェロイドの形成・維持に及ぼすEGFとアプロチニン(Apr)の影響を観察した。基本培地に両者の添加・無添加の組合せで4通りの培養液を調製、培養した場合における5日間培養後の形態を、**図3. 2**に示す。ポリリジン上のものにおいても、20 ng/mLのEGF添加により、形成は無添加のものと比較し促進された(b)。すなわち、形成が1日後から開始され、より多くの細胞が組織化された。一方、200 ng/mLのAprを添加すると、細胞は凝集するがスフェロイド形成までは至らず、多層集合体を形成するに留まった(c, d)。これらの多層集合体は、形態的に約10日目までは維持された。

さらに、基本培地(無血清)で形成させたスフェロイドを、5日から血清添加培地またはApr添加無血清培地に移し、形態の維持を観察した。基本培地で培養を継続したものは7日で崩壊したが、5日から血清添加培地に変更したものは、始めから血清添加培地で形成させたものとはほぼ同様に10日目まで維持された。また、Apr添加培地に変更したものは、血清添加培地に変更したもののほどではないが、基本培地のものに比べ、2-3日長く形態的に維持された。すなわち、形成終了後のスフェロイド維持については、血清と同様にAprも、促進効果を持つことが判明した。

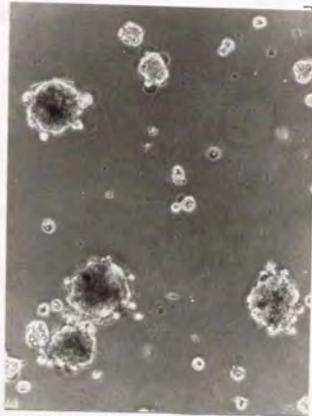
3. 2. 3. 3 ポリリジン被覆表面上の肝細胞凝集体のアルブミン分泌能

既往のスフェロイドの報告例では、特にアルブミンの分泌能が調べられている。そこで、ポリリジン上で形成された肝細胞凝集体について、同様にアルブミン分泌能を測定し、コラーゲン上の単層培養細胞と比較検討した。培地には、インシュリン、デキサメタゾン、EGF、グルカゴン、銅とセレンを添加した合成培地を用いた。

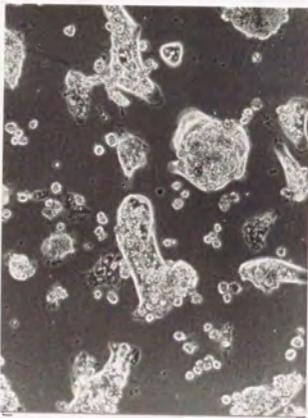
この完全培地中でポリリジン上に播種された肝細胞は、次第に凝集して、ヘミスフェロイドまたは表面付着スフェロイドを形成した。浮遊状態のスフェロイドは、ほぼ全く観察されなかった。インシュリン、デキサメタゾン、及びEGFを添加した培地中では、少なくとも半数以上は浮遊状態のスフェロイドとなったが、今回グルカゴンを添加することにより、スフェロイドの浮遊化が完全に阻害された。肝細胞の機能維持に重要なホルモンが、スフェロイド形態に影響を与える現象は興味深い。詳細な検討は**3. 3**で行う。スフェロイドの維持は、インシュリンとデキサメタゾン、EGFを添加したグルカゴンを含まない培地に比較して、非常に良好に維持された。形態的に良好な状態が、少なくとも3週間は維持された。



(a) EGF(-) / Apr(-)



(b) EGF(+) / Apr(-)



(c) EGF(-) / Apr(+)



(d) EGF(+) / Apr(+)

図3. 2 EGFとアプロチニンの細胞凝集への影響(バーは200 μm)

DNA量でみた細胞維持と細胞DNA量当りのアルブミン分泌量の測定結果を、図3.3に示す。DNA量は、コラーゲン上の単層培養の方が、ポリリジン上のスフェロイドより、若干大きい値を示した。これは、ポリリジン上に播種された細胞の内、スフェロイドに組織化されなかった細胞が、早く死亡するためであると考えられる。アルブミン分泌能は、単層培養では、急速に失われたが、肝細胞凝集体では、凝集に伴い分泌能が増加し、そのまま高いレベルで、培養終了まで維持された。このように、ポリリジン被覆表面のような人工表面上で形成された肝細胞凝集体は、プロテオグリカン分画上で形成されたスフェロイドと同様に、高レベルの機能を長期にわたり維持することが明らかとなった。

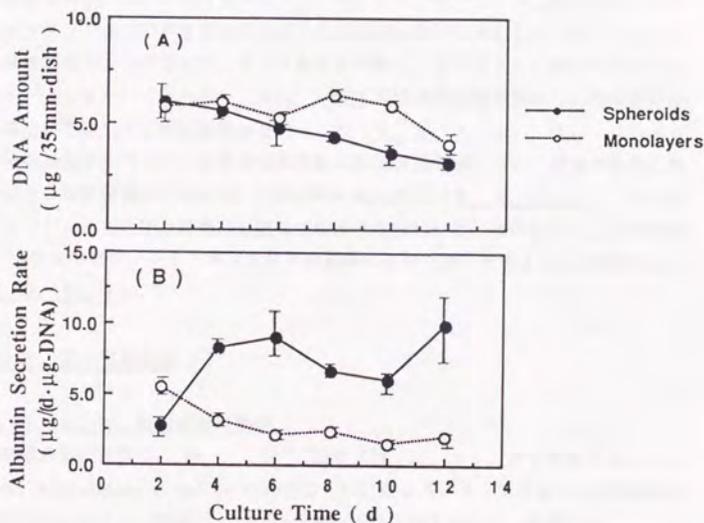


図3.3 ポリリジン上スフェロイド培養におけるDNA量でみた細胞維持(A)と機能発現(B)

3. 3 肝細胞凝集体による 各種肝特異機能の発現

3. 3. 1 本節の研究目的

本節では、人工肝臓モジュールへの利用の際に重要であると考えられ、単層培養細胞において維持が検討されているいくつかの機能について、ポリリジン被覆表面上で形成されたスフェロイドによる発現状況を検討した。また、ラット尾腱から酸抽出したコラーゲン被覆表面上においても、培地成分によっては、細胞凝集が促進されることが判明したので、両者の機能発現状況を比較検討した。

具体的には、以下のような検討を行った。まず、ポリリジン上のスフェロイドとコラーゲン上での多層細胞凝集体の形成過程の違いを検討した。ポリリジン上では細胞はあまり伸展せず、すぐに凝集を開始し、そのほとんどすべてがスフェロイドとなるが、コラーゲン上では、一度単層培養細胞層を形成し、その後徐々に細胞が凝集して、多層凝集体を形成した(3. 3. 3. 1)。次に、この2つの細胞凝集体について、各種肝特異機能の発現状況を検討した。凝集の程度と細胞当りの機能発現レベルには、正の相関が見られた(3. 3. 3. 2)。さらに、コラーゲン上での細胞凝集に必要な液性因子を検討した。その結果、上皮成長因子(EGF)の存在が、コラーゲン上の細胞凝集に必須の因子であることが判明した(3. 3. 3. 3)。

3. 3. 2 実験方法

3. 3. 2. 1 培養表面の調製

培養表面の調製は、3. 2と同様に行った。コラーゲン被覆表面については、Michalopoulos and Pitotの方法(1975)により、ラット尾腱から酢酸抽出したものと、ペプシン可溶化したブタ皮膚由来の2種を用いて、調製した。

3. 3. 2. 2 肝細胞の調製と培養

肝細胞の調製は3. 1と同様に行った。培地は、WEに20mM HEPES, 10^{-7} M インシュリン, 10^{-6} M デキサメタゾン, 10^{-7} M グルカゴン, 20 ng-EGF/mL, 10^{-7} M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10^{-8} M H_2SeO_3 , 10^{-6} M ZnSO_4 , 各種抗生物質を添加したものを標準培地とした。培地交換は、3. 1と同様な日程で行った。

3. 3. 2. 3 各種肝特異機能の測定

全ての機能は、細胞DNA量当りに規格化して表示した。DNA量の測定は、3. 1

1 と同様な方法で行った。培地中に分泌されたアルブミンは、ELISAによって測定した。DNA測定用に調製された細胞破砕液は、10,000 x gで30 min遠心した後、その上清を肝特異酵素のひとつであるチロシンアミノトランスフェラーゼ(TAT)活性測定に用いた。TAT活性は、Granner and Tompkins(1970)の方法によった。グルコース合成能は、グルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法(Tomomura et al., 1980)で測定した。細胞をPBSで2回洗浄した後、20 mMのフルクトースと10⁻⁷Mグルカゴンを添加したHanksの緩衝液に再懸濁し、2時間後の液中グルコース生成量を定量した。尿素合成能は、ジアセチルモノオキシム法(Marsh et al., 1965)によって測定した。同様に細胞を洗浄し、5 mMの塩化アンモニウムを含むHanksの緩衝液に再懸濁し、2時間後に、液中に生成した尿素を定量した。

3. 3. 3 結果及び考察

3. 3. 3. 1 ポリリジン上スフェロイドとコラーゲン上多層凝集体の形成過程の比較

ラット尾腱由来コラーゲン上と、ポリリジン上での凝集過程を比較検討した。またペプシン可溶性ブタ皮膚コラーゲン上での結果もあわせて検討した。ポリリジン上では、3. 2で観察されたとおりの凝集を示した。ラット尾腱由来コラーゲン上では、まず完全な単細胞層が形成され、そのまま約1週間維持された。しかしその後、細胞は徐々に凝集し、多層凝集体ネットワークを形成し、さらにそのネットワークが切れ、20日では多層凝集体(Multicellular Islands)となった。26日での細胞形態を図3. 4に示す。この多層凝集体は、ポリリジン上のスフェロイドと同様に、形態的には非常に安定で、培養終了(26日)までは少なくとも維持された。一方、ペプシン可溶性ブタ皮膚コラーゲン上では、細胞は単層培養を形成した後、通常みられる死亡・剥離過程を歩んだ。

3. 3. 3. 2 各種肝特異機能の発現

ラット尾腱由来コラーゲン上の多層凝集体とポリリジン上のスフェロイドにおける細胞DNA量の維持、及び各種肝特異機能の発現を検討した。

DNA量でみた細胞維持を図3. 5に示す。コラーゲン上の方が、多くの細胞を維持したが、全培養期間にわたっての細胞死滅速度には差異が見られなかったことより、播種直後における播種細胞を安定に付着させるか否かで差異が生じていると考えられる。これは、ポリリジン上では、スフェロイドに組織化されない単一状態のままの細胞は、早く死亡するためであると思われる。このことは、トリパンブルー染色することによって確認できた。すなわち、細胞凝集が進んでスフェロイドが形成された後にトリパンブルー染色を行うと、スフェロイドの多くは全

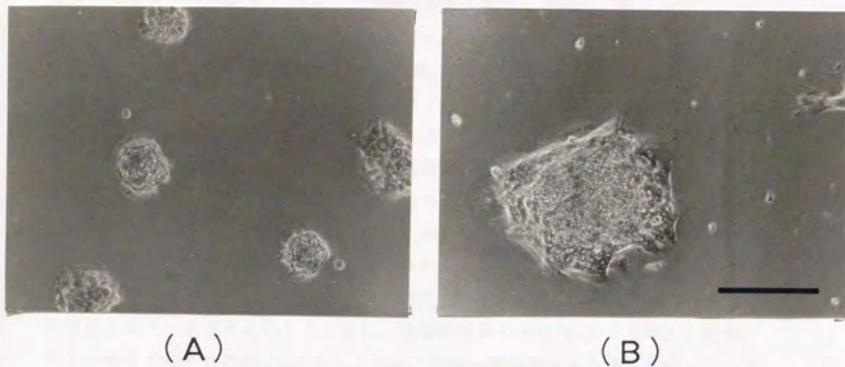


図3.4 ポリリジン上のスフェロイド (A) とコラーゲン上の多層凝集体 (B) の形態 (バーは200 μ m)

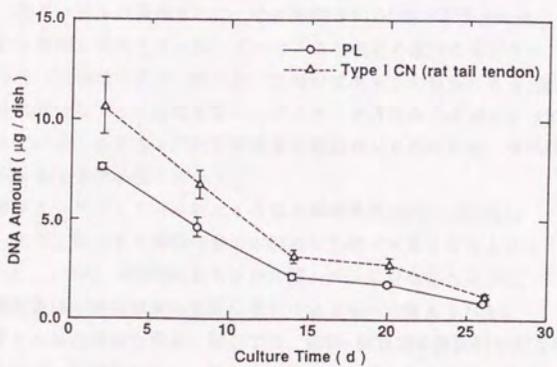


図3.5 ポリリジン上のスフェロイドとコラーゲン上の多層凝集体における細胞維持

く染色されず、染色されたものでも表層の一部の細胞のみに留まった。一方、スフェロイドに組織化されず単一状態のままの細胞は、ほとんど全てが染色された。同様な結果は、3. 2でもみられた。コラーゲン上に播種された細胞は、伸展度が大きいこととなりあった細胞と結合を形成しやすく、ポリリジン上に播種された細胞に比べ、安定性が高いと考えられる。

アルブミン合成能、TAT活性、尿素合成能、グルコース合成能の4つの肝特異機能の測定結果を図3. 6に示す。各々、ディッシュ当りと単位DNA量当りで表示してある。ポリリジン上のスフェロイドによるディッシュ当りのアルブミン分泌能は、3. 2. 3. 3に見られたように、細胞の凝集と共に増加し、その後徐々に減少した。しかしコラーゲン上では、はじめ分泌能が失われ、10日では一旦回復し、その後徐々に失われた。この傾向は、分泌能をDNAで規格化することによって、より明確になることがわかる。ここで観察された分泌能の変化と観察された細胞凝集過程の違いは、互いによく一致していることから、細胞凝集が、高い肝機能の発現に必要であると考えられる。また、多層凝集体の単位DNA量当りの分泌能が、スフェロイドのその約1/2であることは、細胞凝集の度合を忠実に反映していると考えられる。

凝集過程の進行とTAT活性の変化には、明確な関連は見られなかった。しかし、多層凝集体のDNA量当りで規格化したTAT活性は、アルブミン分泌能で見られたのと同様に、スフェロイドの約半分であった。

尿素合成能の維持については、TAT活性の維持発現とほぼ同様な傾向を示した。しかしグルコース合成能については、始めの8日でかなり発現レベルが低下し、その後、ほぼ一定のレベルが保持された。その傾向はTAT活性と尿素合成能の維持において見られた傾向と同様であった。グルコース合成能の維持については、Leibowitz 15(L-15)培地の方が、WEに比べて良好であるとの報告がある(濱田ら、1989)。彼らは十分なアミノ酸含有量が、グルコース合成能の維持にとって必要であると考えている。さまざまな肝特異機能を保持させるためには、培地成分について、さらなる改善が必要であろう。

ラット尾髄コラーゲン上でみられたような多層凝集体(Multicellular Islands)は、スフェロイドと単層培養の中間的な形態であると考えられる(Shinji et al., 1988)。単位DNA量当りの発現レベルに見られた違いは、スフェロイドと多層凝集体の細胞凝集の程度の違いによるものと考えられる。

凝集の程度と肝分化機能の発現に関しては、細胞-細胞間の直接的な相互作用が重要であることは、本研究からも、既往の研究からも明らかである。最近、肝実質細胞の生体外での凝集に、CellCAM 105(cell-cell adhesion molecule)やCDP(calcium-dependent protein)と呼ばれる細胞表面タンパクが、重要な役割を演じている可能性が指摘されている。CellCAM105はカルシウム非依存性であり、CDPは

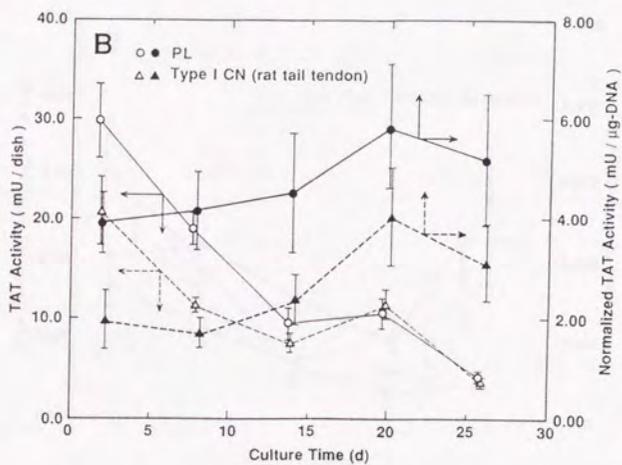
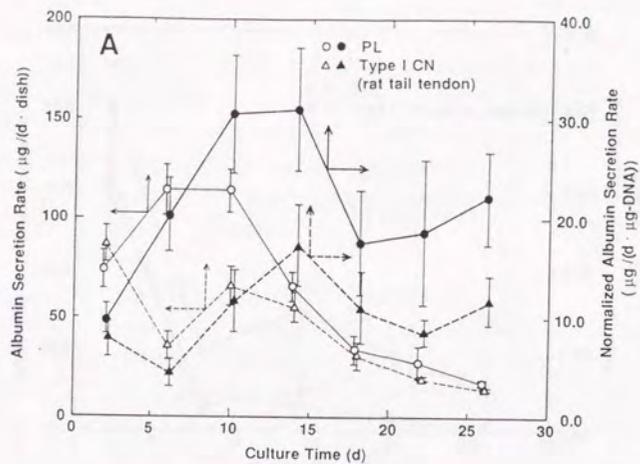


図 3. 6 ポリリジン上のスフェロイドとコラーゲン上の多層凝集体による各種肝特異機能の発現 (A: アルブミン分泌能; B: TAT活性)

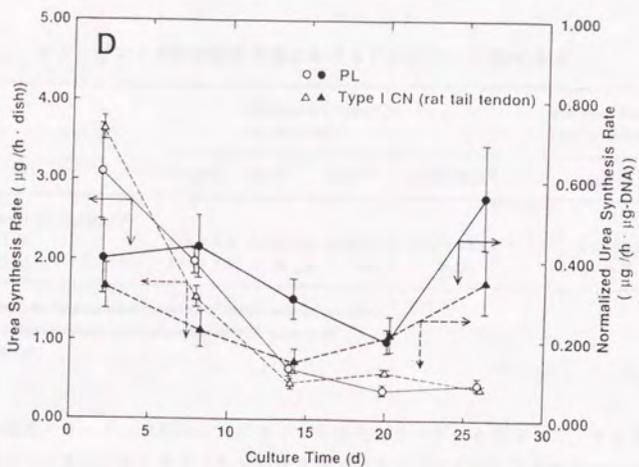
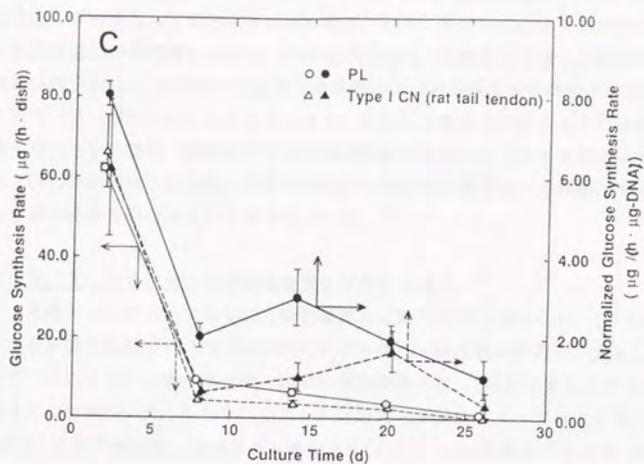


図 3. 6 ポリリジン上のスフェロイドとコラーゲン上の多層凝集体による各種肝特異機能の発現
(C: グルコース合成能; B: 尿素合成能)

カルシウム依存性である。分子レベルでの解析や、細胞の分化の過程に伴った存在部位やその量の変化などが明らかにされ始めている。特にCellCAM105についてはその細胞表層での発現量の大小が、肝細胞の分化相・増殖相と密接に対応している(Obrinck, 1986)。すなわち、正常な成熟肝のように高度な分化機能を発現している場合(分化相)ではその存在量が多く、胎児肝や再生時の肝のように増殖能が高くなっている場合(増殖相)ではその存在量が少ないことが示されている。おそらくCellCAM105は、肝細胞を正常な成熟肝における肝臓組織へと組織化することに重要な役割を果たしていると考えられる。

3. 3. 3. 3 コラーゲン上の細胞凝集を促進する因子

ラット尾腱コラーゲン上で見られた細胞凝集に必要な因子を探るため、EGFとグルカゴンの影響を検討した。14日と20日でのアルブミン分泌能の差異を、表3.1に示す。これより、このコラーゲン上での細胞凝集には、EGFが必要不可欠な因子であることが判明した。しかし、ペプシン可溶化ブタ表皮コラーゲン上では、EGFを添加した培地中でも、細胞凝集は見られなかった。この観察結果を明確に説明することは、今回の実験だけでは不可能である。以下はあくまで推測となる。

表3.1 コラーゲン上の細胞機能発現におけるグルカゴンとEGFの効果

	acid-extracted Type I CN (rat tail tendon)				pepsinated Type I CN (porcine Achilles tendon)
	Complete	Glu ^b	EGF ^b	Glu ^b , EGF ^b	complete
Albumin secretion rate (μg/d/dish) ^a					
14 d	54.3 ± 9.0	63.2 ± 1.4	4.73 ± 1.35	5.12 ± 0.89	1.72 ± 0.05
20 d	39.0 ± 1.8	27.2 ± 2.4	N.D. ^c	N.D.	N.D.

^aEach value indicates the mean value ± maximal difference between two dishes.

^bGlu^b, EGF^b: complete medium minus glucagon and EGF, respectively

^cN.D.: not detected.

酢酸抽出コラーゲン分画には、ペプシン可溶化コラーゲンと異なって、さまざまな糖タンパク・プロテオグリカンが含まれていることが示されており(Reid et al., 1986)、これらの物質が、細胞凝集を促進したという可能性が、まず第1に考えられる。しかし、酢酸抽出コラーゲン分画上でも、細胞凝集についてはEGFが必要不可欠であったことより、単に、同分画に含まれている細胞凝集を促進するマトリックス物質の影響だけに帰着させることはできない。EGFのこの作用は、今後の検討課題となろう。まず可能性として考えられるのは、EGFがプロテオグリカ

シのような細胞凝集を促進する因子の合成分泌能を上昇させ、分泌されたその物質が、nativeなコラーゲンに多くに吸着され、単層状態から細胞凝集が引き起こされたという可能性である。しかし、ここで提示された結果からは、EGFが形態制御に大きく関与している因子であること以上は、はっきりと述べられない。

今後、EGFなどの液性因子が各種マトリックス物質に与える影響、固体表面の特性がそれらマトリックス物質の吸着性におよぼす影響を明らかにし、その知見の上に両者を総合的に最適化することによって、細胞の分化と増殖を生体外で制御することが可能となるであろう。

3. 4 固体表面特性と液性因子による 肝細胞凝集体の形態及び 機能発現の制御

3. 4. 1 本節の研究目的

本節では、ポリリジン被覆平板上で形成されるスフェロイドについて、スフェロイドを大量形成後にモジュール化をするという製作アプローチに必要と考えられる形態制御を、液性因子と培養表面特性によって試みた。

3. 2 で、肝細胞の維持を改善する各種液性因子によって、スフェロイド形態が大きく影響を受けることが明らかであったため、まず、各種液性因子の添加の有無及び添加濃度のスフェロイド形成に及ぼす影響を速度論的及び平衡論的に検討して、良好な浮遊状態のスフェロイドを選択的に形成させるための最適な培地条件を設定した(3. 4. 3. 1)。次に、得られた浮遊スフェロイドを再播種し、一部付着伸展した状態での安定固定化する際に望ましい培養表面特性について検討を行った。固定化する表面を細胞凝集を促進するポリリジンと細胞伸展を促進するフィブロネクチンのさまざまな濃度の液で予め被覆し、浮遊スフェロイドを播種、初期の付着率、形態変化、付着スフェロイドの安定性、アルブミン分泌を指標とする機能発現等について検討を行った(3. 4. 3. 2)。

3. 4. 2 実験方法

3. 4. 2. 1 培養表面の調製

スフェロイド形成実験と再播種固定化実験については、 9.6 cm^2 と 21 cm^2 の組織培養用dish(Falcon)をそれぞれ用いた。浮遊スフェロイドの大量形成には、square dish(Nunc:500 cm^2)を用いた。100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のPBS溶液で、表面を 37°C 、

1時間処理することにより行った。フィブロネクチン(FN)による表面被覆は、5, 10, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のFNのPBS溶液で同様に行った。ポリリジン(PL)とFNの共存表面は、まずFNで被覆し、次にPLで残りのサイトを被覆して調製した。いずれの表面も、充分量のPBSで3回洗浄、室温で乾燥後、使用まで4°Cで保存した。

3. 4. 2. 2 肝細胞の調製と培養

ラット肝細胞は、3. 2と同様に得た。標準播種密度は、 5.0×10^4 cells/cm²で、9.6 cm², 21 cm², 500 cm²dish当りの培地容量がそれぞれ、1.5 mL, 3.0 mL, 75 mLになるように播種した。

基本培地はWilliam's E培地に、各種微量金属類や抗生物質を添加したものとした。ホルモン類は、必要に応じて、インシュリン、デキサメタゾン、EGF、グルカゴンを添加した。標準濃度はそれぞれ、 10^{-7}M , 10^{-6}M , 50 ng/mL, 10^{-7}M とした。これらの濃度は、血中最大濃度の約100倍に相当する。培地交換は、第1回を6時間後に、第2回を24時間後に、それ以後は2日に1回行った。3日以降は、スフェロイドの浮遊化が進行するため、50 xg, 1 minで遠心して培地交換を行った。

3. 4. 2. 3 肝細胞スフェロイド形成及び浮遊化の測定

スフェロイドの形成及び浮遊率は、無作意に選んだ20の顕微鏡視野(倍率100倍, 0.011 cm²)について、まず、丸くはっきりとした輪郭を持つ全スフェロイド数を測定し、次にその内、浮遊しているものの数を測定した。スフェロイド数は、面密度(スフェロイド/cm²)として表示した。また浮遊率は、全スフェロイドに対する浮遊スフェロイドの比率(%)として示した。

3. 4. 2. 4 スフェロイドの回収と再播種及び付着スフェロイド数の測定

スフェロイドの回収は、まず、 10^{-7}M のインシュリンと 10^{-6}M のデキサメタゾンを添加した基本培地中、PLで被覆したsquare dish上で7日培養して形成させたスフェロイドを、まず、培地中で緩やかなピペッティングにより、浮遊および緩く付着しているものを回収し、さらに40 mLの新鮮培地による回収を2回行った。これを、50 xg, 2 minの遠心により1回洗浄し、上記培地に 10^{-7}M のグルカゴンと50 ng/mLのEGFを添加した培地に最終懸濁した。スフェロイドの損失を防ぐため、全てのガラス器具にはシリコン処理を行った。

この一部を採り、その中の全スフェロイド数を数えることによりスフェロイド濃度を測定、9.6 cm²-dish当り1.5 mL, 約1,000 スフェロイド/cm²となるように希釈して播種した。最終懸濁液の一部を採り、DNA量を測定、細胞当りのDNA量からスフェロイド当りの細胞数を測定した。DNA量の測定は、3. 2と同様に行った。同法による採取直後の細胞当りのDNA量は、 27.8×10^{-6} $\mu\text{g-DNA}/\text{cell}$ であ

った。

再播種後第1回目の培地交換は1日後に行い、以下2日毎に培地交換した。スフェロイドの面密度は、異なる20の顕微鏡視野についてスフェロイド数を測定して求めた。

3. 4. 2. 5 再播種固定化スフェロイドの機能測定

再播種固定化後の機能測定はアルブミン分泌能について行った。培地中のアルブミン濃度は、ELISAによって測定した。

3. 4. 3 結果及び考察

3. 4. 3. 1 浮遊スフェロイドの選択的形成

初代培養肝細胞のさまざまな機能を同時に発現・維持するためには、インシュリン、デキサメタゾン、EGF、グルカゴンの4つのホルモン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(濱田ら、1989)。そこで、まず、血中最大濃度の約100倍に相当する濃度で、インシュリンとデキサメタゾンを添加した基本培地を用い、これらのホルモンがスフェロイド形成に及ぼす影響について、速度論的および平衡論的に検討を行った。各々の結果を、図3. 7と表3. 2に示す。これらの結果より、EGFの添加により、スフェロイドの個数は少なく、径は大きくなることがわかる。7日での浮遊化スフェロイド率は、無添加と比べてあまり変わらなかった。EGFを添加した培地中では、200 μm 以上の径のものがしばしば見られ、7日では内部壊死を起こしていることが観察された。さらにグルカゴンを添加すると、スフェロイドの形成過程は変わらないが、浮遊化はほぼ完全に妨げられた。以上より、中程度の径の浮遊スフェロイドを選択的に形成させるためには、EGFとグルカゴンの添加は避ける必要があることが示唆された。

そこで、次に、インシュリンとデキサメタゾンの濃度を変化させて、スフェロイドの形成と浮遊化について、同様な検討を行った。すなわち、血中最大濃度の1,000倍相当(10^{-6}M インシュリン、 10^{-6}M デキサメタゾン)、100倍相当(それぞれ 10^{-7}M 、 10^{-6}M)および10倍相当(それぞれ 10^{-8}M 、 10^{-6}M)の3種の組合せで、スフェロイド数と浮遊化率を経時的に測定した。結果を、図3. 8と表3. 3に示す。図3. 8より、インシュリンとデキサメタゾンの濃度を下げることにより、スフェロイド形成が速まることがわかる。顕微鏡下の観察でも、ホルモン濃度が増加するのに伴い、1~2日に細胞が伸展状態へ大きく傾くのが見られた。高ホルモン濃度培地中においても、その後細胞凝集が進み、5日では、ほとんどがスフェロイドとなった。表3. 4より、ホルモン濃度が増加するにつれて、径が大きくなり、浮遊化は遅れる傾向にあることがわかる。また、1,000倍相当濃度では、スフェロ

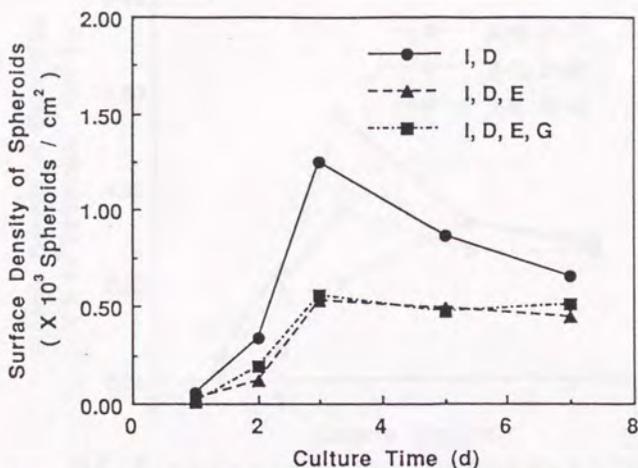


図3. 7 グルカゴンとEGFのスフェロイド形成に及ぼす影響（速度論）

表3. 2 グルカゴンとEGFのスフェロイド形成に及ぼす影響（平衡論）

Supplements	Mean Diameter ± S.D. on 5d (μm)	Floating Spheroid Ratio on 7d (%)
I, D	73.4 ± 21.4	28
I, D, E	114.4 ± 44.1	21
I, D, E, G	95.1 ± 34.6	1

* I, D, E and G represent insulin, dexamethasone, EGF and glucagon respectively.

イドの浮遊化が完全に阻止された。10倍相当濃度、100倍相当濃度とも、浮遊化については同様な結果を与えるが、10倍相当濃度では、3日以降、スフェロイド数の顕著な減少が起こることがわかる。これは、スフェロイドから単一細胞への崩壊の結果であることが観察された。スフェロイドの浮遊化を妨げず、しかも単一細胞への崩壊を防ぐためには、血中の100倍相当の濃度 (10^{-7}M インシュリン, 10^{-6}M デキサメタゾン) の添加が最適であることが判明した。この条件で7日において、付着し続けているスフェロイドを含め大部分のスフェロイドを、緩やかなピペッ

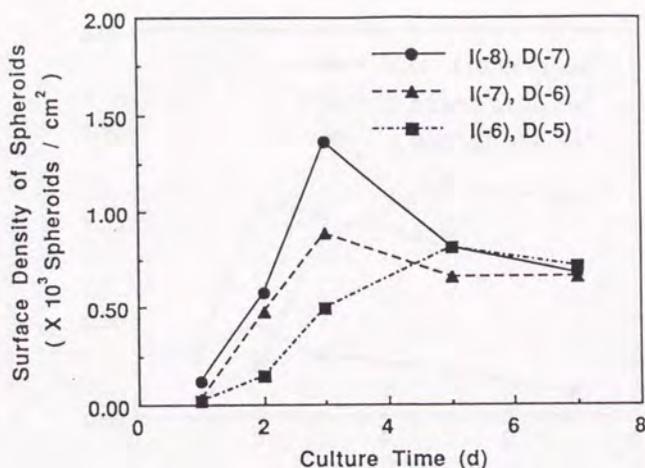


図3. 8 インスリン・デキサメタゾンの濃度のスフェロイド形成に及ぼす影響（速度論）

表3. 3 インスリン・デキサメタゾンの濃度のスフェロイド形成に及ぼす影響（平衡論）

Supplements	Mean Diameter ± S.D. on 5d (μm)	Floating Spheroid Ratio on 7d (%)
I(-8), D(-7)	68.2 ± 18.8	44
I(-7), D(-6)	74.0 ± 26.7	31
I(-6), D(-5)	78.8 ± 29.7	0

* I(-8), D(-7) represents a medium supplemented with 10^{-8} M insulin and 10^{-7} M dexamethasone.

ティングにより回収することができた。

通常スフェロイドは、単層培養における飽和面密度の約半分に対応する 0.50×10^5 cells/cm² の播種密度で形成が行われている。単位面積当りのスフェロイドの形成個数の向上を意図し、播種面密度を1.00, 0.50(標準播種密度), 0.25×10^5 cells/cm² と変えた場合におけるスフェロイド形成について、同様な検討を行った。結果を図3. 9と表3. 4に示す。 0.25×10^5 cells/cm² では、形成スフェロイド数が少なく、径も小さい。これは、多くの細胞が初期に細胞間結合を形成し得ず、

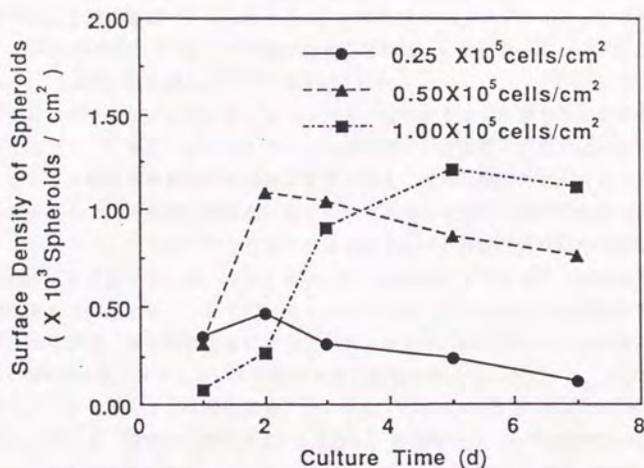


図3.9 細胞播種密度がスフェロイド形成へ及ぼす影響 (速度論)

表3.4 細胞播種密度がスフェロイド形成へ及ぼす影響 (平衡論)

Inoculation Density (X10 ⁵ cells/cm ²)	Mean Diameter ± S.D. on 5d (μm)	Floating Spheroid Ratio on 7d (%)
0.25	60.2 ± 14.4	54
0.50	75.2 ± 16.9	53
1.00	80.2 ± 21.1	33

単一細胞状態のまま、速やかに死亡するためである。1.00X10⁵ cells/cm²と0.50X10⁵ cells/cm²を比較すると、前者の方が、スフェロイドの形成が遅い。また表3.4より、播種密度の増加に伴い、スフェロイドの径は増大し、浮遊化率が低下する傾向にあることがわかる。

以上の速度論的及び平衡論的検討より、あくまで現象論的な記述であるが、浮遊を妨げるホルモンを用いず、初期の細胞間結合を適当な領域に制限する培養条件を用いることにより、中程度の径(70-80 μm)の良好な状態の浮遊スフェロイド

を平面上で最速形成することができる。このためには、インシュリンとデキサメタゾンそれぞれ 10^{-7} M, 10^{-6} M程度添加した培地、 0.50×10^5 cells/cm²の播種密度という条件が最も望ましいことが判明した。

各種ホルモンが、このようにスフェロイド形態に大きく影響を与える理由は定かではない。しかし、おそらくこれらの液性因子が肝細胞の合成分泌する細胞マトリックス物質の種類及びその量に影響を与え、これら物質のポリリジン上への吸着を介して、肝細胞の形態を決定していると考えられる。現状の知見では、フィブロネクチンやコラーゲンなどの付着伸展タンパクは細胞骨格系を活性化し、細胞伸展を促進する一方、プロテオグリカン分画は、スフェロイド形成のような細胞凝集を促進する。これらのバランスによって、スフェロイドの平衡形態（付着または浮遊、多層凝集体またはヘミスフェロイド）が決まっていると考えられる。特にEGFは、スフェロイド形態に大きく影響を与える。また、3. 3. 3. 3より、コラーゲン上での細胞凝集についても、このEGFが必須の因子であることが示されている。液性因子のうちEGFに注目し、各種マトリックス物質の合成分泌能に与える影響を詳細に明らかにすることは、単に肝細胞の機能発現の維持改善という点だけではなく、凝集体と機能発現を制御するという点からも重要であると思われる。

さて、ここで決定された条件は、確かに浮遊スフェロイドの選択的形成には望ましいが、機能発現が不可逆的に失われてしまってはならない。そこでこのインシュリンとデキサメタゾンのみを添加した培地で0-7日培養し、回収せずにそのまま、EGFとグルカゴンを添加した完全培地にかえて培養した場合の機能発現レベルを検討した。結果を表3. 5に示す。EGFとグルカゴンを培地から除くことにより、

表3. 5 グルカゴン・EGF非添加培地で形成されたスフェロイドの完全培地へ移行後の機能発現

	Complete	Glu ^b	EGF ^b	Glu ^a , EGF ^b
Albumin secretion rate (μg/d/dish) ^c				
6 d	123.0 ± 9.1	91.2 ± 10.5	52.8 ± 1.1	45.0 ± 10.7
10 d	122.1 ± 17.3	83.1 ± 11.1	85.1 ± 7.2	97.4 ± 2.8
DNA amount (μg/dish)				
on 10 d ^c	5.82 ± 0.50	5.40 ± 0.64	4.78 ± 0.40	4.87 ± 0.20
Normalized albumin secretion (μg/d/μg-DNA) on 10 d	21.0 ± 4.8	15.4 ± 3.9	17.7 ± 3.0	20.0 ± 1.4

^aHepatocytes cultured on PL in the completed medium omitting the hormones indicated above during initial 7 days, the media of all conditions exchanged to the complete medium on the 7th day, and subsequent culture was carried out.

^bGlu^a, EGF^b: complete medium minus glucagon and EGF, respectively.

^cEach value indicates the mean value ± S.D. of three dishes.

凝集体の維持および機能発現は低下する(6日)。しかし、7日にEGFとグルカゴンを添加することにより、機能は著しく改善され、10日でもた細胞DNA量当りのアルブミン分泌量は、始めから完全培地で培養したものと比較して、何ら遜色のないものとなった。よって、インシュリンとデキサメタゾンのみを添加した培地で浮遊スフェロイドを選択的に形成させても、細胞維持は若干悪化するが、回収されたスフェロイドについては、十分に機能発現をすることが確かめられた。

そこで、再播種固定化に関する検討は、ポリリジンで被覆したsquare dish上、この条件下で7日まで培養し、ピペッティングにより回収したスフェロイドを用いて行うこととした。

3. 4. 3. 2. 浮遊スフェロイドの再播種固定化と表面特性

以上の条件で調製した浮遊スフェロイドを7日に回収し、 10^{-7} Mインシュリン、 10^{-6} Mデキサメタゾン、50 ng-EGF/mL、 10^{-7} Mグルカゴンを含む基本培地に最終懸濁した。最終懸濁液中に回収されたスフェロイドは、7日に形成されたものの50-70%程度であった。図3. 10は、回収されたスフェロイドの顕微鏡写真である。平均径 \pm S. D.は(76.8 ± 18.8) μ m、DNA量から計算されたスフェロイド当りの細胞数は27.9個であった。表層の一部が破壊されているものも若干見られるが、多くははっきりとした球状の輪郭を保っていた。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。このホルモン条件下で、単一細胞からスフェロイド形成を行わせた場合、ほとんど全てのスフェロイドがヘミ

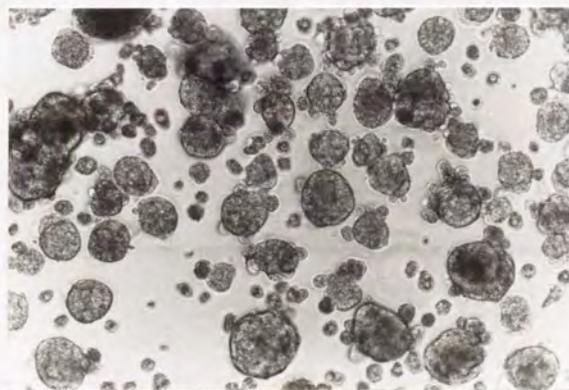


図3. 10 7日で回収された浮遊スフェロイド

スフェロイドとなる。表面側の特性は、スフェロイド形成を促進するPL(100 μ g/mL)と、伸展を促進するFN(5, 10, 40 μ g/mL)の被覆で調節した。

まず、さまざまな表面上における1日後の付着率を測定した結果を、表3. 6に示す。1日で安定してスフェロイドを付着させるためには、PLが必要であることがわかる。FNと細胞の特異的相互作用のみでスフェロイドを付着させるためには、40 μ g-FN/mL以上の濃度での処理が必要であった。どの表面においても、1日では、付着したスフェロイドの培養表面との接触部の細胞はすでに伸展を始めていたが、全体としてスフェロイド形態を保っていた。

次に、3日での各表面での再播種スフェロイドの形態をまとめたものが、表3. 7である。各表面における形態は、FNとPLの効果をよく反映している。10 μ g/mL以上のFNで被覆した表面上では、スフェロイドは、PLの存在の有無にかかわらず完全に単層状態へと移行した。5 μ g-FN/mLとPL、PLのみ、および無被覆のdish上で、一部付着伸展した安定固定化スフェロイド(multicellular islands, ヘミスフェロイド)が得られた。以上、初期付着率とその後の形態についての検

表3. 6 各種表面上における再播種スフェロイドの付着率(1日後)

PL (μ g/mL)	FN (μ g/mL)			
	40	10	5	0
100	88 \pm 14	86 \pm 1	96 \pm 11	84 \pm 15
0	83 \pm 12	60 \pm 6	65 \pm 9	46 \pm 23

* Each value represents the mean \pm maximal error of two independent experiments

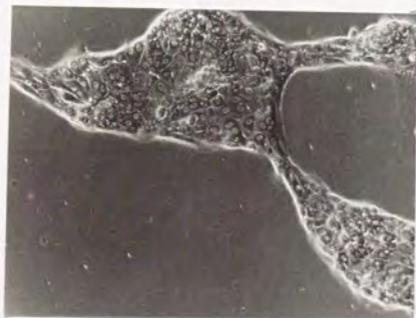
表3. 7 各種表面上における再播種スフェロイドの形態(3日後)

PL (μ g/mL)	FN (μ g/mL)			
	40	10	5	0
100	Mono ^{a)}	Mono	MCI ^{b)}	MCI, Hemisph ^{c)}
0	Mono	Mono	Mono, MCI	MCI, Hemisph

^{a)} Monolayers, ^{b)} Multicellular islands, ^{c)} Hemispheroids

討より、本培養条件下では、安定固定化のためには、PLのみ、またはPLと5 μ g/mL程度の少量のFNでの被覆が、望ましい表面特性を与えることが明らかとなった。

さらに、再播種後2週間まで培養を継続し、付着スフェロイドの維持、平衡形態を比較検討した。図3. 11は、再播種後2週目でのスフェロイド形態を示す。5 μ g-FN/mLとPLで被覆した表面上では、緩やかに伸展が進行し、ほとんど全てのスフェロイドがmulticellular islandsへと変化した。一方、3日では伸展して完全に単層状態となった40 μ g-FN/mLとPL表面においては、逆に凝集が進行し、安定な高密度の単層状態へと変化した。このような現象は、FNのみで被覆した表面上でも観察された。再播種直後にけるスフェロイド形態は表面特性への依存性が大きい。培養を続けるにつれてその依存性は減少するように見える。この現象が、ここで用いたホルモン条件が良好であるためなのかは、現状では定かでない。あくまで推察であるが、ある一定程度以上のホルモン条件では、肝細胞の各種マトリックス物質合成分泌能が大きくなり、それらが細胞周囲に吸着することによって、間接的に培養環境が改善されるのではないかと考えられる。すなわち、一定レベル以上の培養条件では、肝細胞は、固体表面特性などの初期の培養環境を培養に伴って自分自身である程度変換する能力があると考えられる。



FN⁴⁰/PL¹⁰⁰



FN⁵/PL¹⁰⁰

図3. 11 再播種後2週間培養後のスフェロイド形態(バーは200 μ m)

図3.13に、PLのみで被覆した表面と無被覆のdish上でのスフェロイドの維持を検討した結果を示す。無被覆のdish上では、PL上 비해、スフェロイドの附着安定性が著しく悪いことがわかる。しかしながらPL上においても、初期に附着したスフェロイドのうち約半数が、2週間の培養で剥離した。このように培養において、固定化されたスフェロイドが剥離してモジュールから失われるという現象は、PVLAで被覆したポリビニルフォルマールディスク内で形成されたスフェロイドについても報告されている(佐藤ら, 1991)。

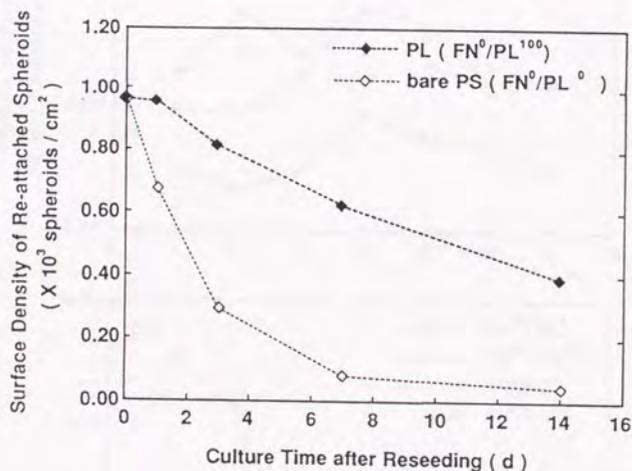


図3.12 再附着スフェロイドの安定性へのポリリジン被覆の影響

各表面上の固定化スフェロイドのアルブミン分泌能を、図3.14に示す。アルブミン分泌能は、1日に附着したスフェロイド数で規格化して表示した。(A)と(B)を比較すると、PLの存在する表面上でのアルブミン分泌能は、存在しない表面上でのものに比べ、約2倍であることがわかる。しかし、PLが存在するにもかかわらず、40 μ g-FN/mLの被覆表面では、分泌能は低いことが観察される。これらの機能発現に関する結果も、再附着スフェロイドの形態と同様に、PLとFNの相反する効果をよく反映していると考えられる。

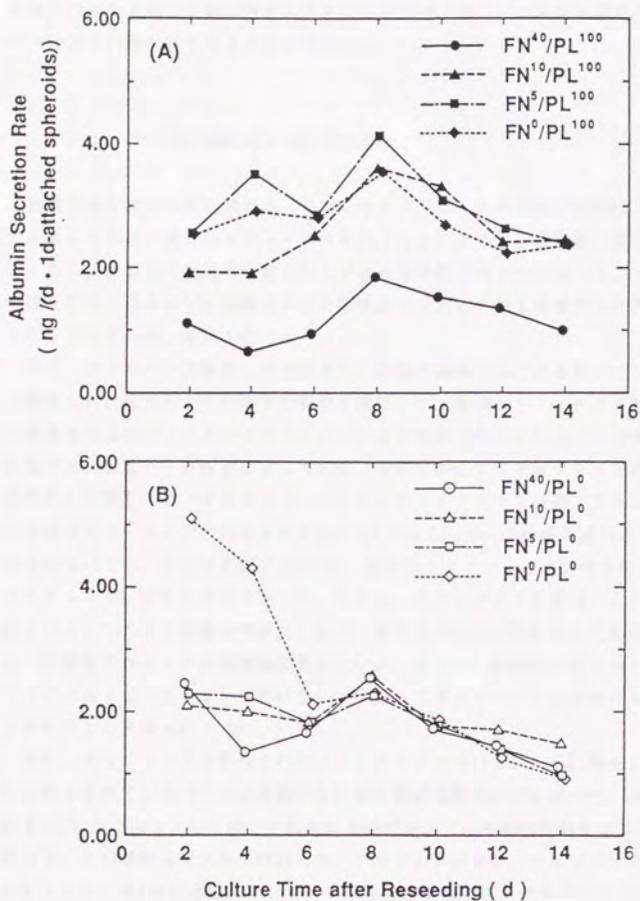


図3. 13 各種表面に再付着固定化されたスフェロイドによる機能発現

以上、さまざまな特性を持つ表面上における、再播種スフェロイドの初期付着性、形態および機能発現に関する検討より、インシュリン、デキサメタゾン、EGF、グルカゴンを血中最大濃度の約100倍相当濃度で添加した合成培地中においては、PLまたはPLと少量のFNを共存させた表面が、安定した再付着固定化に対して、望ましい特性を与えることが判明した。

3. 5 本章のまとめ

初代培養肝細胞の細胞凝集体（スフェロイド）は、それ自体が高機能・高密度であることから、適切なモジュール化を行うことにより、単層培養／積層型モジュールの装置容積と性能を大幅に向上させる可能性を持っている。そこで、形成や機能発現、さらに形態制御といった応用面で必要とされる基礎的な知見を得ることを目的として、検討を行った。

まず、ポリリジンで被覆した表面上で、細胞が凝集することを見だし、形成と維持における表面と液性因子の影響を検討した。最速のスフェロイド形成には、一定濃度以上のポリリジンコーティングが必要であったことから、一定量以上の表面プラス電荷が、肝細胞によって合成・分泌されたプロテオグリカン様物質を選択的に吸着し、肝バイオマトリックスのプロテオグリカン分画上で見られたのと同様にスフェロイドが形成されるというKoideら(1990)の推察が裏付けられた。維持については、上皮成長因子(EGF)と、細胞膜プロテアーゼの活性を阻害するアプロチニンがいずれも有効であった。しかし、スフェロイド形態は、これら液性因子によって大きく影響を受けた。また、ポリリジン上で形成された細胞凝集体は、高度なアルブミン分泌能を保持していた。よって、簡単なポリリジンコーティングによって、さまざまな形状をした表面にスフェロイド形成能を付与できることが明らかとなった(3. 2)。

次に、ポリリジン上で形成されたスフェロイドについて、人工肝臓モジュールに必要とされているいくつかの重要な肝特異機能の発現状況を調べた。上皮成長因子(EGF)の添加によって起こされたコラーゲン上での多層細胞凝集体についても併せて、その機能発現状況を検討した。アルブミン分泌能、チロシニアミノトランスフェラーゼ(TAT)活性、アンモニアからの尿素合成能、グルコース合成能を測定したところ、グルコース合成能を除いて、高い機能が約1カ月にわたり維持された。また、測定した全ての機能について、ポリリジン上のスフェロイドは、コラーゲン上の多層凝集体と比較して、高機能を発現した。細胞当りの発現レベルは、細胞凝集の程度と密接な相関があることが示唆された(3. 3)。

さらに、浮遊スフェロイドを大量形成した後、固定化することによってモジュ

ールを製作するアプローチに必要であると考えられる基礎的な形態制御を、液性因子と培養表面特性によって試みた。まず、液性因子によって、良好な浮遊状態のスフェロイドを選択的に形成させるための培地条件を設定した。結果としては、スフェロイドの平衡形態を付着方向に傾ける因子を添加せず、初期の細胞伸長を一定領域に抑えるような培地条件が、物質移動の面からもスフェロイド形態の安定性の面からも望ましいとされている中程度の径(80 μm 程度)の良好な浮遊状態のスフェロイドを選択的に形成させた。次に、得られた浮遊スフェロイドを再播種し、一部付着伸長した状態での安定固定化の際に望ましい培養表面特性について検討を行った。初期のスフェロイド再付着率、形態変化、付着スフェロイドの長期安定性、アルブミン分泌能を総合した結果では、細胞凝集を促進するポリリジンに細胞伸長を促進するフィブロネクチンを少量共存させた表面、またはポリリジンのみの表面が、最も望ましい結果を与えた。これらの表面上で、浮遊スフェロイドは全体としては球状の形態を保ち、表面に安定に固定化され、良好なアルブミン分泌能を発現した(3, 4)。

以上、あくまで合成培地中での形成、機能発現、形態制御に関する結果ではあるが、ホルモンや培養表面特性によるスフェロイドの形態の制御に関する生物学的知見、及びそれらを医用工学的に応用する場合の可能性と問題点を明らかにした点で意義があると考えている。

本章の参考文献

- Akaike, T. and Tobe, S., 細胞工学, 8, 219 (1989).
- Asami, O., Nakamura, T., Mura, T. and Ichihara, A., J. Biochem., 95, 299 (1984).
- Brunk, C. F., Jones, K. C. and James, T. W., Anal. Biochem., 92, 497 (1979).
- Granner, D. K. and Tompkins, G. M., Method Enzymol., 17, 633 (1970).
- 濱田, 松江, 長谷, 園谷, 内野, 駒井, 中村, 橋村, 今, 人工臓器, 18, 1265 (1989).
- 川口, 小出, 坂口, 浅野, 森, 辻, 人工臓器, 18, 1269 (1989).
- Koide, N., Shinji, T., Tanabe, T., Asano, K., Kawaguchi, M., Sakaguchi, K., Koide, Y., Mori, M. and Tsuji, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 385 (1989).
- Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M., Matsushita, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M. and Tsuji, T.

- T., *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990).
- Marsh, W. H., Fingerhut, B. and Miller, H. T., *Clin. Chem.*, **11**, 624 (1965).
- Michalopolous, G. and Pitot, H. C., *Exp. Cell Res.*, **94**, 70 (1975).
- Reid, L. M., Narita, M., Fujita, M., Murray, Z., Liverpool, C. and Rosenberg, L., in "Research in Isolated and Cultured Hepatocytes", ed. by Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C., Jhon Libbey Eurotext Ltd., London (1986) pp.258.
- Seglen, P. O., *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).
- Shinji, T., Koide, N. and Tsuji, T., *Cell Struct. Func.*, **13**, 179 (1988).
- 佐藤, 落谷, 松原, *人工臓器*, **20**, 145 (1991).
- Tingstrom, A. and Obrink, B., *Exp. Cell Res.*, **185**, 132 (1989).
- Tomomura, A., Nakamura, T. and Ichihara, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1276 (1980).

第4章 肝細胞凝集体の大量迅速形成と安定固定化

4. 1 本章の目的

第3章では、肝細胞スフェロイドを大量形成した後、何等かの固定化を行うことにより人工肝モジュールを製作するという方向で、固体表面特性と液性因子により、浮遊状態のスフェロイドを選択的に形成させたり、安定に再付着固定化したりするための検討を行った。しかし、臨床应用到耐える人工肝モジュールを製作するためには、解決すべき課題が数多く残っている。これらの課題のうち、モジュール製作前の段階に解決しておくべき主要なものとしては、次の2つがあげられる。それは、人工肝臓モジュール製作に必要な大量のスフェロイドを短時間で大量に調製することと、調製されたスフェロイドを実用のモジュール使用条件下で安定に機能発現させるための固定化方法の選択である。

そこで本章では、採取直後の単一細胞を懸濁培養することによって迅速かつ大量に健全なスフェロイドを形成させること(4. 2)と、形成させたスフェロイドを血漿などの中で安定に固定化する方法を選択すること(4. 3)、の2つを目的とする。

浮遊スフェロイドをポリリジンで予め被覆した平板上で最速形成させるためには、平衡形態を伸展方向に傾ける液性因子、すなわち、EGFやグルカゴンを添加しない培地を用いる必要があることが、3. 4で示された。そこでさらに、ホルモンとしてはインシュリンとデキサメタゾンのみを用いる培地で、各々の最適な添加濃度が決定された。そして、単一細胞を単層培養における飽和密度の半分程度の面密度(5.0×10^4 cells/cm²)で播種する必要があることが示された。しかしながらこのように液性因子等の培養条件の最適化を行っても、形成される半数のスフェロイドが自ら浮遊化するためには5-7日がかかる。このような方法で人工肝臓モジュールの製作に必要な大量のスフェロイドを得ることは、容易ではない。

そこで、まず、4. 1では、スフェロイドの大量迅速形成の手段として、採取直後の単一細胞懸濁液を懸濁培養し、ポリリジン被覆平板上などでの静置培養で形成させたスフェロイドと同様に高機能を保持する細胞凝集体を形成させることを試みた。まず始めに巡回培養を試みた。これは、巡回シェーカーの上においたディッシュや三角フラスコに採取した単一細胞懸濁液をいれ、緩やかに攪拌することにより、細胞同士を接触させ、凝集体を形成させる方法である。次に逆円錐回転体をセットしたスピナーフラスコを用いる連続攪拌培養を行い、肝細胞凝集体を形成させた。肝細胞浮遊液の長期連続攪拌は、困難なことは既往の研究

で明らかであったため(Jeejeebhoy et al., 1975; Jeejeebhoy et al., 1980), 凝集体形成後, 機能を失わないうちに, 回収しポリリジン上に再播種固定化した。そして, その後の機能発現維持を測定することによって, 形成された凝集体の健全性を評価した。

臨床応用の際には, 肝不全患者の血液または血漿がモジュール内を灌流する。ところが既往の固定化方法は, 物質生産を目的とした大量培養のために開発されてきた。すなわち, 血漿などの体液の中での安定な機能発現を指標として選択されたものではない。スフェロイドは実際, 高濃度血清添加培地中で極めて不安定であるとの報告もあり(岩橋ら, 1992), 我々もそれを確認している。さらに,

3. 4より, スフェロイドの形成および安定機能発現のためには, 生理濃度をはるかにこえるホルモンの添加が必要であることが示唆されている。これらの報告より, 生理濃度のホルモン条件および血漿中でのスフェロイドの安定機能発現を可能とする固定化方法が選択されなければ, その後のモジュール化の段階に進むことができないとの結論に達した。

そこで, 4. 3では, 典型的な固定化方法について, 高濃度の成牛血清を添加した培地での機能発現を比較検討した。平板上で形成させた浮遊スフェロイドを回収, それぞれの方法で固定化し, 徐々に血清濃度を上げたり, 添加ホルモン濃度を生理レベルまで下げたりした条件で長期間培養し, 細胞量及びアルブミン分泌能の維持を調べた。その結果をもとに, 人工肝臓モジュールにとって最適な肝細胞スフェロイドの固定化法を選択した。

4. 2 懸濁培養による肝細胞凝集体の大量迅速形成

4. 2. 1 本節の研究目的

本節では, スフェロイドの迅速形成の手段として, 採取直後の単一細胞懸濁液を懸濁培養して, 単一細胞同士を高頻度で接触させることにより凝集させ, 静置培養で形成させたスフェロイドと同様に高機能を保持する細胞凝集体を形成させることを目的とする。

具体的には, 以下のような検討を行った。懸濁培養の方法としては, 他の細胞で凝集体を簡単に形成させる方法として用いられてきた旋回培養法(Moscona, 1961)の適用をまず試みた。液体積は5 mLとした(4. 2. 3. 1)。次に, ディッシュ旋回培養の約10倍の液体積にあたる50 mL規模での懸濁培養を試みた。ここでは, できる限り緩やかな攪拌で槽全体にわたって混合の良好な旋回流を形成

させるために、浮遊培養用スピナー・フラスコの中に逆円錐台形の回転体を着装し、それを低速度で回転させる方法を適用した(4.2.3.2)。

長期連続攪拌は、困難なことは既往の研究で明らかであったため(Jeejeebhoy et al., 1975; Jeejeebhoy et al., 1980)、凝集体形成後、機能を失わないうちに、回収・再播種固定化する方向で検討を進めた。最適な攪拌停止・回収・再播種時刻は、機能としてアルブミン分泌能を、細胞障害の指標としてGOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)漏出を、各々の懸濁培養について、初期の48時間にわたり詳細に定量化することにより設定した。

さらに、形成・回収された凝集体を、無血清完全培地に移し、ポリリジン被覆表面上に再播種、ポリリジン上の静置培養で単一細胞から形成されたスフェロイドと、約2週間にわたって細胞当りのアルブミン分泌能を測定し、懸濁培養形成凝集体の機能発現の健全性を検討した。

4.2.2 実験方法

4.2.2.1 肝細胞の調製と培地

第3章でのべた方法で、ラット肝細胞を得た。

懸濁培養用の培地は、WEにHEPES・抗生物質・微量金属を添加したものを基本培地とし、さらに20%非働化FBS・ 10^{-6} Mインシュリン・ 10^{-6} Mデキサメタゾン・50 ng-EGF/mL・ 10^{-7} Mグルカゴン・100 μ g-L-アスコルビン酸/mLを添加した。固定化後の培地は、基本培地に 10^{-7} Mインシュリン、 10^{-6} Mデキサメタゾン、 10^{-7} Mグルカゴン、50 ng-EGF/mLを添加したものをを用いた。

いずれも第1回目の培地交換を6時間、第2回目を24時間とした。

4.2.2.2 ディッシュ内旋回培養

ディッシュを用いる旋回培養は以下のように行った。ラットから採取・精製した肝細胞を 8.0×10^5 cells/mLに最終懸濁した。予備実験より、この細胞密度周辺で、最も良好な凝集が示された。最終懸濁液の5 mLをシリコンコートした60 mmガラスディッシュに入れ、Taitecの旋回シェーカーR-II上で旋回した。これらの装置図を、 4.1に示す。旋回の直径は、3/4 inchである。旋回速度は70 rpmに設定した。旋回培養による細胞凝集の過程においては、①旋回流によるディッシュ中央部に細胞を集めようとする力(旋回流による求心力)、②旋回による細胞をディッシュ周辺部に押しやろうとする遠心力、③細胞相互の接着力、の3つの力が働く。小さな旋回速度では、旋回流による求心力が、旋回による遠心力に比べて大きいために、細胞はディッシュ中央部に集まる。逆に大きな旋回速度では、旋回流による求心力よりも、旋回による遠心力が大きくなり、細胞はディッシュ

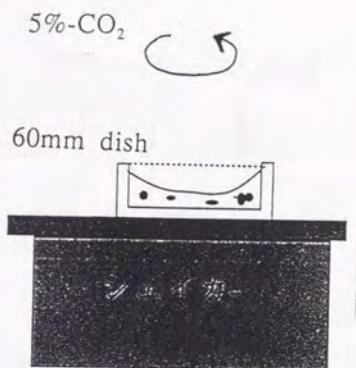


図4.1
旋回培養の装置図

直径3/4inch
旋回速度70rpm

周辺部に押しやられる。適当な旋回速度では、両者が相殺し合い、細胞はディッシュ全体に均一に分散されることになる。このとき、細胞同士は細胞自体の凝集力によってのみ凝集することになる。ここでは、スピナーフラスコなどを用いる大量形成へ発展することを予想して、細胞濃度を均一にして実験を行うために、旋回流による求心力と旋回による遠心力が釣り合う旋回速度で、全ての実験を行った。その時の旋回速度は、本実験条件下では、70rpmであった。旋回装置一式は、全てCO₂インキュベーターの中に設置した。

4.2.2.3 逆円錐台回転体攪拌による懸濁培養

逆円錐台回転体による50 mL程度の懸濁培養は、図4.2のような装置で行った。市販のマイクロキャリア培養用125 mLスピナーフラスコの攪拌子を取り外し、ポリプロピレン製の逆円錐台回転体を着装した。この回転体は生産技術研究所の試作工場に製作を依頼した。ガラス内面はシリコンコートをした。回転数は80 rpmにセットした。これは、細胞が凝集体となった場合も含めて均一に分散される最低の回転数の下限に近い。培地交換とサンプリングの都度95%O₂/5%-CO₂を無菌的に吹き込んだ。装置全体を37℃のインキュベーター内に設置した。

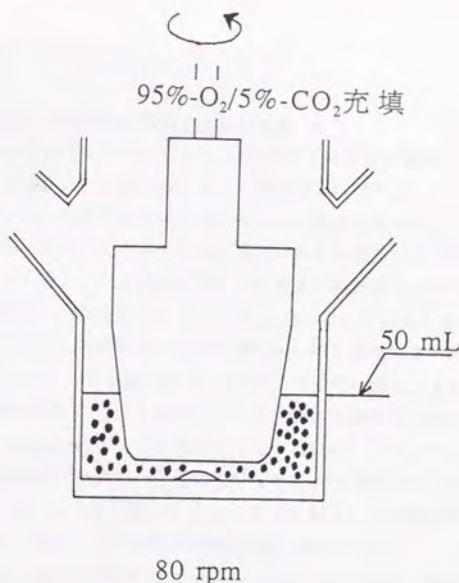


図4.2
逆円錐台回転体による
懸濁培養の装置図

4.2.2.4 細胞機能と細胞障害の定量化

培地中に分泌されたアルブミンはELISA法によって測定し、分泌速度として表示した。培地中に漏出したGOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)は、和光純薬のGOT-UV test WakoでUV rate法によりその活性を測定した。DNA量は、DAPI蛍光法によって測定した。

4.2.2.5 懸濁培養で形成された凝集体の固定化

固定化した際の機能発現実験は、次のように行った。懸濁培養を停止、細胞を回収し、培地で1回洗浄後、完全培地に懸濁し、ポリリジン被覆60 mmディッシュに播種した。際播種密度は、1,000 aggregates/cm²とした。コントロール実験は、採取直後の単一細胞を、懸濁培養と同じ培地に最終懸濁し、ポリリジン被覆ディッシュに播種した。懸濁培養の回収時に、培地を無血清のものに交換した。両培養とも、さらに1日後に培地交換し、付着しなかった凝集体を取り除いた。以後、2日毎に培地交換し、アルブミンを定量した。また、ディッシュに付着した細胞のDNA量は適宜測定し、アルブミン分泌能を細胞DNA量当りで規格化した。

4. 2. 3 結果及び考察

4. 2. 3. 1 旋回培養による凝集体の形成とその健全性

図4. 3は、細胞の凝集過程を示したものである。6時間後では数個の細胞からなる不規則な形の凝集体が形成されたのみであったが、24時間後にはスフェロイダルな凝集体へと発達した。このときの直径は、40-100 μm の範囲であった。このような凝集体は、互いに緩く結合してさらに大きな凝集体になる傾向が見られたが、これは、緩やかなピベティングで容易にもとの大きさの凝集体に分散させることができた。48時間後では、凝集体はさらに大きく(100-150 μm)丸くなり、またその表層は平滑化した。しかし、凝集体中央部の壊死がしばしば観察された。

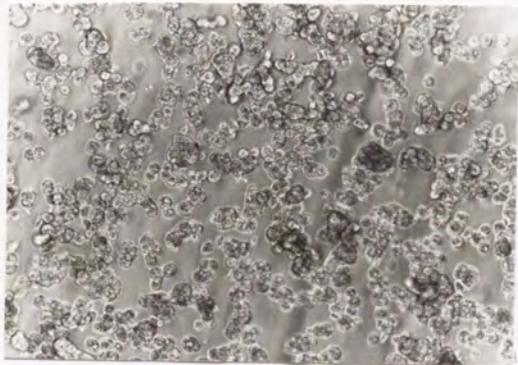
DNA量でみた細胞維持、アルブミン分泌能の維持、GOT漏出の変化を図4. 4に示す。細胞はディッシュ内壁上側に付着する傾向にあった、特に気液界面には付着し易かった。この現象は、Seglenによっても報告されている(1976)。そこで、ディッシュ内DNA総量と浮遊細胞のDNA量を、分けて測定した。24時間後には、約半分の細胞が壁に付着した。このような細胞は、巨大な凝集を起こし、内部壊死が著しかった。48時間後では、ほとんどの細胞が浮遊液中から失われた。

アルブミン分泌能の変化は、細胞の凝集過程と一致していた。すなわち、9時間後に一度低下した機能が、凝集に伴って部分的に回復された。しかし、その後の旋回継続に伴って、再び失われた。4日後では、アルブミン分泌能は、まったく観測されなくなった。一方GOT漏出は、細胞凝集の進行に伴って低下し、その後、ほぼ一定のレベルに保たれた。

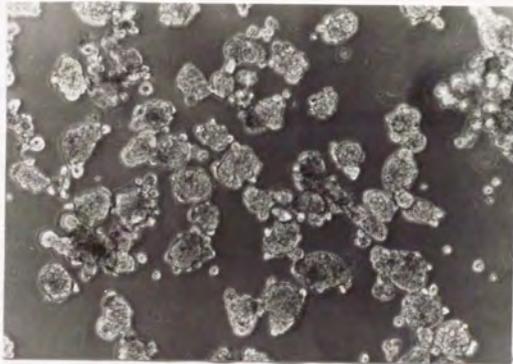
以上の結果から、機能を保持したまま長期にわたり連続懸濁培養することは、困難であることが示された。また、凝集が基本的に終了し、機能が衰えない約24時間の旋回後に回収・再播種するのが最も望ましいことが判明した。

そこで、形成された凝集体を24時間後に回収し、培地を無血清のものに替え、ポリリジン上に再播種、その後の形態変化と細胞当りの機能発現を検討した。この再播種実験に用いられた凝集体の平均径 \pm S.D.は、 $68.8 \pm 16.9 \mu\text{m}$ であった。ポリリジン上に単一細胞として播種され、静置培養で形成されたスフェロイドと機能発現を比較した。

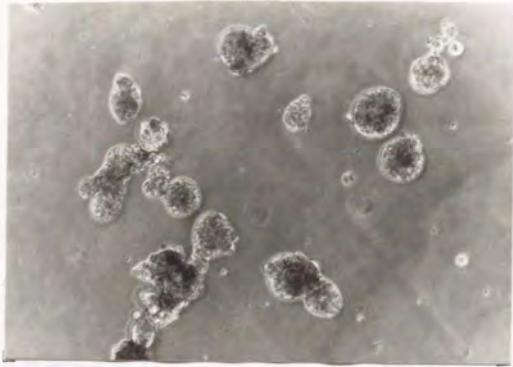
旋回培養で形成された凝集体は、その95%以上が、1日以内にポリリジン上に安定に付着した。その後表面上に伸展し、ヘミスフェロイダルまたは、多層凝集体となって平衡化した。一方、コントロール実験の方は、播種後1日でほぼ完全な単層を形成した。その後その形態は変化し、1週間後には、旋回培養で形成し再播種されたものと、ほぼ同様な形態となって平衡化した。これは、0-1日で、血清添加培地で培養したために、血清中のファイブロンectinやグイトロネクトinなどの付着伸展タンパクが、ポリリジン上に吸着したためであると考えられる。



6 h



24 h



48 h

図4.3 旋回培養における肝細胞の凝集過程

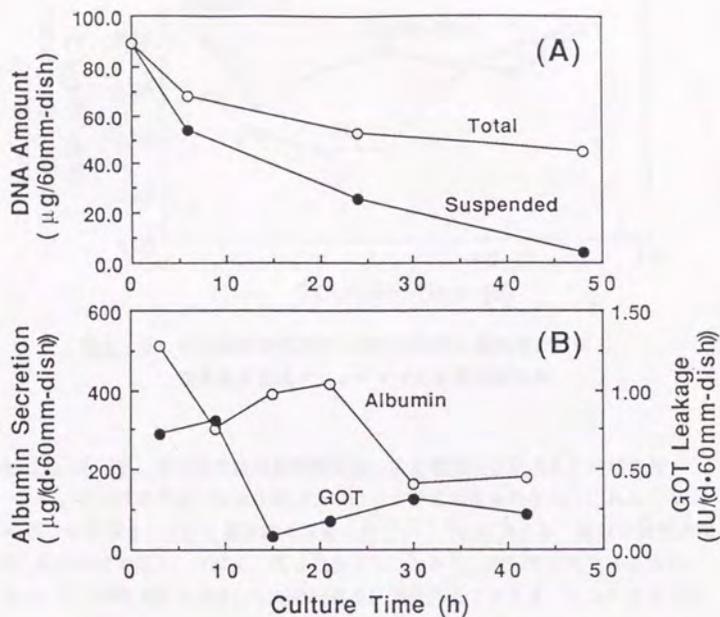


図4.4 旋回培養における細胞維持及びアルブミン分泌能と GOT漏出の変化 (0-48時間)

両者のアルブミン分泌能の発現レベルと維持を比較したのが、図4.5である。両者とも2週間にわたってほぼ同等な機能を発現した。初期において、平板上静置形成のものが劣っているが、これは、上で観察された様な形態変化の過程の違いに帰着されると考えられる。

以上、旋回培養で形成された凝集体は、適当な時刻に回収・固定化することによって、平板上で静置形成させたスフェロイドとはほぼ同等の機能を持ちまた維持することが確かめられた。よって、旋回培養によって迅速形成された肝細胞凝集体は、名実ともに、「スフェロイド」と呼ぶことができる。

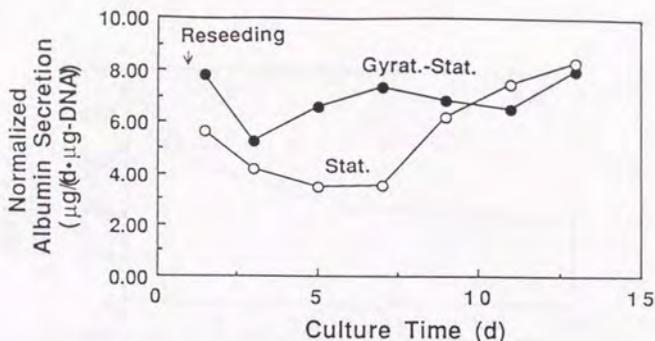


図4.5 再附着固定化された旋回培養形成凝集体と平板上静置培養形成スフェロイドの長期機能発現

4.2.3.2 逆円錐台回転懸濁培養による凝集体の形成とその健全性

次に、旋回培養の約10倍の容積(約50mL)での懸濁培養を試みた。これは、ラット1匹から採取される肝実質細胞の収量の約1/3~1/2に相当する。細胞の凝集過程は、旋回培養の際と、ほぼ全く同じであった。しかし、旋回培養時にみられた、ディッシュ内壁側面への激しい細胞附着は、気液界面でのみ見られたに過ぎなかった。よって、装置容積に対する気液界面と容器内壁の接触部分の相対的大きさを小さくすれば、附着による細胞のロス、防げることがわかった。

DNA量でみた細胞維持、アルブミン分泌能の維持、GOT漏出の変化を図4.6に示す。壁附着細胞が少なかったために、旋回培養時のようにDNA量を浮遊のものごと合計のものに区別することをしなかった。アルブミン分泌能の変化及びGOT漏出の変化も、旋回培養の時とほぼ同様な結果を示した。すなわち、アルブミン分泌能は、初期に一度低下するが、凝集と共に高まり、その後の培養で失われた。GOT漏出は、培養初期に一旦増加するものの、凝集の進行に伴って低下し、その後低レベルで一定に保たれた。

回収・再播種時刻は、旋回培養時と同じく、24時間が望ましいと考えられたため、さらに、同様に形成させた凝集体を24時間後に回収し、培地を無血清のものに替え、ポリリジン上に再播種、その後の形態変化と細胞当りの機能発現を検討した。そして、ポリリジン上に単一細胞として播種され、静置培養で形成されたスフェロイドと機能発現を比較した。

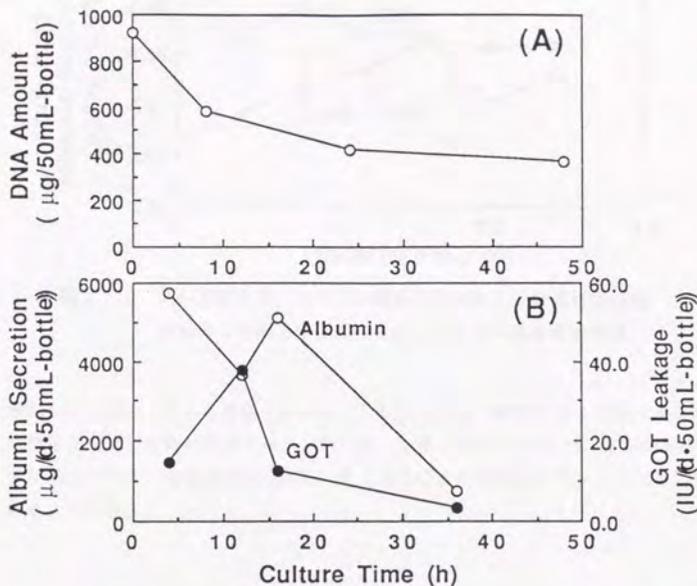


図4.6 逆円錐台回転体による懸濁培養における細胞維持及びアルブミン分泌能とGOT漏出の変化(0-48時間)

両者のアルブミン分泌能の発現レベルと維持を比較したのものが、図4.7である。1日培養後の再付着率は、逆円錐回転体による懸濁培養形成のものは、旋回培養形成に比べて、若干低下し70%程度となった。しかし、単位DNA量当りで規格化すると、平板上静置形成のものに比べて、若干機能発現が低下する傾向にあるものの、2週間にわたって高度な機能を発現した。

以上、逆円錐台回転体による大量懸濁培養で形成させた凝集体は、旋回培養で形成させた凝集体と同様に、高機能を発現することから、“スフェロイド”と呼んで差し支えないと考えられる。ここで用いた逆円錐台回転体による懸濁培養装置は、その液体積を100mL程度まで増加させることが可能で、実験室レベルでラットから採取して実験を行う場合には、ほぼ充分であると考えられる。しかし、実際の臨床応用の際に用いられる多量の凝集体を、ブタ肝などから得る場合には、

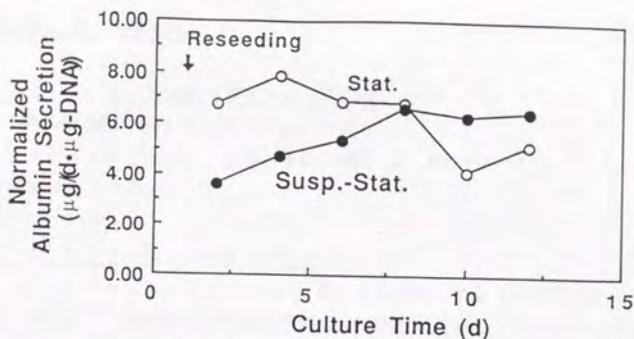


図4.7 再付着固定化された逆円錐台回転体による懸濁培養形成凝集体と平板上静置形成スフェロイドの長期機能発現

細胞が完全混合されかつ剪断力が少なく、しかも十分な酸素供給を確保できる形成槽を工夫する必要があるだろう。例えば、刈屋、戸崎が考案した、水平回転型培養装置(1987)は、細胞と液の分離をうまく行えば、大規模なスケールでは有効であると思われる。

4. 3 実用条件下での肝細胞凝集体の安定固定化

4. 3. 1 緒言

4. 2 によって、大量のスフェロイドを迅速に形成させ得ることが明らかとなった。そこで本節では、もうひとつの課題であるスフェロイドを実用条件下でモジュール内に安定に固定化する方法を選定することを目的とする。

具体的には、ポリリジン被覆平板上で5-7日で形成させたスフェロイドを、ポリリジン/ファイブロンectin表面に再付着固定化する方法、アルギン酸カルシウムゲルで包括固定化する方法、コラーゲンゲルで包括固定化する方法、の3つの方法で固定化し、合成培地中でホルモン濃度を生理レベルまで下げた培養条件下でのアルブミン分泌能の発現維持の比較(4. 3. 3. 1)、80%の成牛血清を含む培地中でホルモン濃度を生理レベルまで下げた培養条件下でのアルブミン分泌能の発現維持の比較(4. 3. 3. 2)を行った。培養終了時に細胞を回収して細胞内DNA量を測定し、単位DNA量当りのアルブミン分泌能を比較した。

4. 3. 2 実験方法

4. 3. 2. 1 肝細胞スフェロイドの調製

第3章で用いた方法で肝細胞を得た。

また浮遊スフェロイドの大量形成は、第3章で述べたように、ポリリジン被覆平板上で行った。

4. 3. 2. 2 スフェロイドの固定化

6穴マルチウェルプレートを用い、得られた浮遊スフェロイドを約10,000個/wellの密度で、典型的な3種類の方法により固定化した。ここで用いた固定化方法は、5 μ g/mLのファイブロネクチン、その後100 μ g/mLのポリリジンで処理した表面に再付着させるもの、3%のアルギン酸カルシウムゲル内に包括するもの、Type Iコラーゲンゲル（新田ゼラチン）に包括するものの3種である。ゲルは6穴マルチウェルプレート底面にディスク状に形成させた。これらの固定化方法および培養終了時の細胞回収方法は、常法に従った。

4. 3. 2. 3 高血清・低ホルモン条件下での培養

その後の固定化培養時の培地は、第3章で用いた濃度を高ホルモン濃度として、生理濃度（高ホルモンの約1/100の添加濃度）での機能発現測定も行った。また、高血清培地は、80%の成牛血清（コスモバイオ）を含むものとした。予備実験から、非働化処理はかえって、細胞維持を阻害することが判明したため、未処理の血清を用いた。固定化後3日は高ホルモンの無血清培地で培養し、その後ホルモン濃度を生理濃度まで下げたり、血清の比率を高めたりした。血清は、20%で1日、50%で1日、さらに80%で1日培養し、その後2日に1回培地交換した。この血清比率増大の過程では、高ホルモン濃度を用いた。

4. 3. 2. 4 機能測定

固定化され各培養条件下で培養されたスフェロイドの、約2週間にわたるアルブミンの分泌能を測定した。培地中のアルブミン濃度はELISAによって測定した。培養終了時に細胞を回収、DAPI蛍光法によりDNA量を定量し、細胞量当りで規格化した機能発現レベルを比較した。

4. 3. 3 結果および考察

4. 3. 3. 1 合成培地中でのホルモン濃度の影響

血中最大濃度の100倍程度の各種ホルモンを添加した100%合成培地中で培養し、

アルブミン分泌能を比較した。アルブミン分泌能の発現レベル及びその維持の結果を、図4. 8に示す。再付着の場合、合成培地中で1日培養後のスフェロイドの付着率は、約70%であった。ゲル包括法による初期細胞維持はほぼ100%であると考えられるため、再付着のみは、1日の付着率で機能を規格化して表示した。全体的に見ると、コラーゲンゲル包括が一番良好で、次にアルギン酸カルシウムゲル包括、最後が再付着固定化であった。ゲル包括法においては、10日以降はほぼ一定の発現レベルが保たれた。再付着固定化では、機能維持がゲル包括に比べて劣っていたが、これは、表面上に固定化された細胞凝集体が培養に伴って徐々に剥離してしまったためである。3. 3で、最も安定な付着を与えることされたファイブロネクチン/ポリリジン共存表面においても、ゲル包括法と比較すると、このような大きな差が見られた。

図4. 9に合成培地中で生理濃度のホルモン添加条件下でのアルブミン分泌能の発現を示す。全体的な発現レベル及び維持は、高ホルモン添加系と比較して悪化した。しかし、再付着固定化、アルギン酸カルシウムゲル包括、コラーゲンゲル包括の順で良好な結果を得たことは、高ホルモン添加系と同じであった。再付着固定化での、表面からの凝集体剥離は激しくなることが観察された。また、凝集体の単一細胞への崩壊も観察された。ゲル包括法でも、機能発現は、14日以降、ほぼ見られなくなった。ゲル包括固定化された凝集体でも、凝集体表層が破壊されたり、内部壊死を起こしているものがしばしば見られた。合成培地中では、一定濃度以上のホルモンが、凝集体の形態維持にとって、必要であることが示された。これは、3. 2の結果とも一致している。

4. 3. 3. 2 高血清培地中でのホルモン濃度の影響

高ホルモン濃度で、血清濃度を80%まで順次増大させ、スフェロイドの形態およびアルブミン分泌能の発現レベルと維持を検討した。まず、固定化後10日での凝集体の形態を図4. 10に、アルブミン分泌能の発現維持を図4. 11にそれぞれ示す。再付着スフェロイドは、血清濃度を高める段階で、そのほとんどが表面から剥離そして崩壊した。この現象は、使用血清の非働化処理の有無に無関係であったことから、補体系の活性によるものではない。表面上に残ったものも内部壊死を起こした。アルギン酸カルシウムゲル包括では、スフェロイド表層細胞の死亡および内部壊死がしばしば観察されたが、全体としてスフェロイド形態を保っていた。コラーゲンゲル包括では、そのほとんどが内部壊死も起こさず、健全な形態を保っていた。特に、コラーゲンゲル包括法では、培養10日以降、ほぼ一定の発現レベルが培養終了まで維持された。

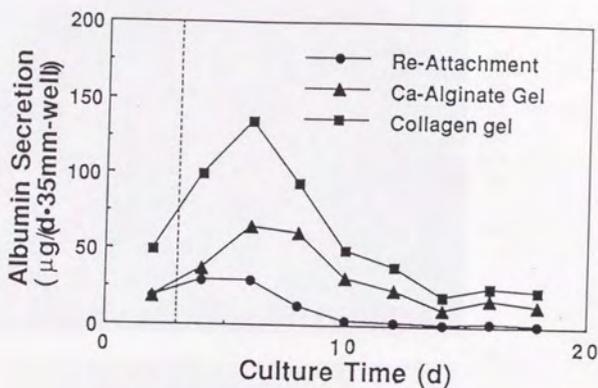


図4.8 高ホルモン添加条件下での各種固定化法における機能発現 (100%合成培地中)

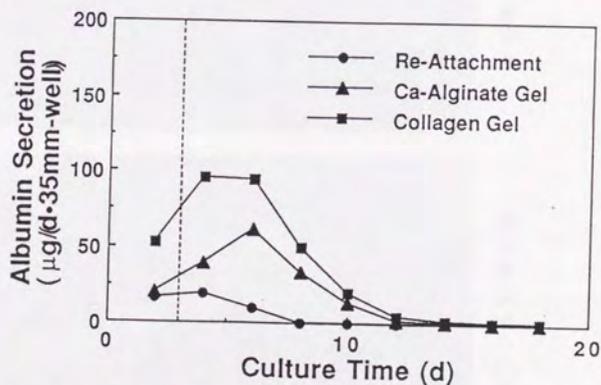
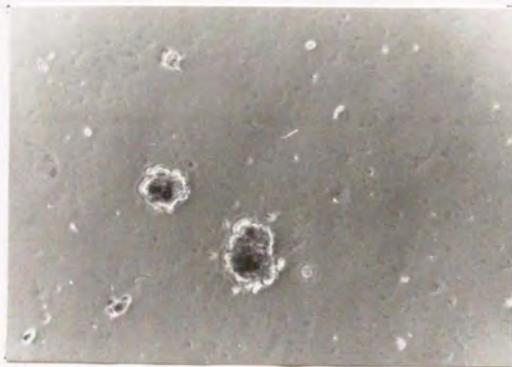


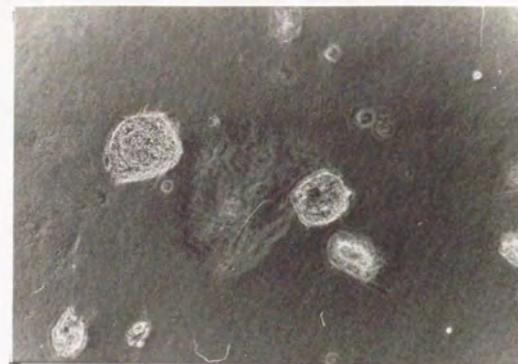
図4.9 生理濃度のホルモン添加条件下での各種固定化法における機能発現 (100%合成培地中)



ポリリジン上に再附着



アルギン酸カルシウム
ゲル包括



コラーゲンゲル包括

図4.10 各種固定化法における再播種培養10日後のスフェロイド形態
(80%成牛血清/高濃度ホルモン添加条件下)

最後に、80%血清、生理濃度ホルモン添加系での機能発現を検討した。結果を図4.12に示す。この条件は、実際の人工肝モジュールとしての使用時に最も近いものである。いままで得られた再付着、アルギン酸カルシウムゲル、コラーゲンゲルの機能維持に及ぼす影響は、全く同じであった。コラーゲンゲルでも、高ホルモン添加条件下と異なり、10日以降徐々に機能を失った。包括された凝集体でも、合成培地/生理濃度ホルモンのときに見られたような、表層の破壊、内部壊死が見られた。

高血清培地での培養終了時の細胞維持量および維持細胞当りの機能発現をまとめたものが、表4.1である。細胞維持、機能発現でも、固定化法としては、コラーゲンゲル包括法が最も優れていた。この場合、高ホルモン添加条件下では、約20日の培養後も、固定化細胞の約65%が維持された。しかし、ホルモンを生理濃度まで下げると、40%以下まで低下した。細胞当りのアルブミン分泌能は、高ホルモン添加条件下では、アルギン酸カルシウムゲル、コラーゲンゲル共に良好であるが、生理濃度までホルモン濃度を低下させると、約20日の培養でアルギン酸カルシウムゲル包括では、機能が全く観測されなくなった。しかし、コラーゲンゲル包括では、図4.12から、徐々に発現レベルが低下はするが、20日でも、体内での細胞当りのアルブミン分泌能程度(Bissel et al., 1987)は、維持することが可能であった。

以上の結果から、コラーゲンゲルを主体とする物質による包括固定化が、実際の臨床応用に近い条件下(高血清、低ホルモン)では、凝集体の維持および機能を最も、安定に保つことが判明した。

最近の研究で、コラーゲンを骨格にファイブロネクチンやラミニン、各種プロテオグリカンが適当に配置して、肝細胞の形態および機能発現が良好に維持されることが立証されつつある。今回の結果は、詳細は明らかでないが、肝細胞自身が合成したり血清中に存在したりするそれらの物質がコラーゲンゲルに吸着・配置されることによって、細胞周囲の環境が、最も細胞に適したものになっていたためである可能性が高い。また、肝細胞は、コラーゲン・プロテオグリカン・ファイブロネクチン・ラミニンなどの各種マトリックス物質を活発に合成する。それらの合成・分泌能には、添加ホルモン濃度などの培養条件が大きく影響を与えていることが十分に予想される。上記の実験で、ホルモン濃度を生理レベルの100倍とした培地中では、アルギン酸カルシウムゲル包括とコラーゲンゲル包括での機能発現維持にみられた差異はそれほど大きくないが、生理レベルのホルモン条件下では、コラーゲンゲル包括のみが、唯一良好な機能発現維持を示した。このことは、合成分泌能を良好に保持できる培地条件下では、細胞周囲環境に対する機能維持の依存性は比較的小さいが、生理レベルのホルモン添加条件など、機能発現維持の細胞周囲環境に対する依存性は大きくなるということが、推察される。

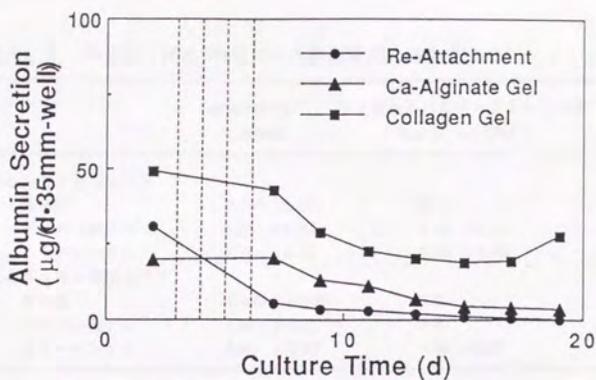


図4. 1.1 高ホルモン添加条件下での各種固定化法における機能発現 (80%成牛血清中)

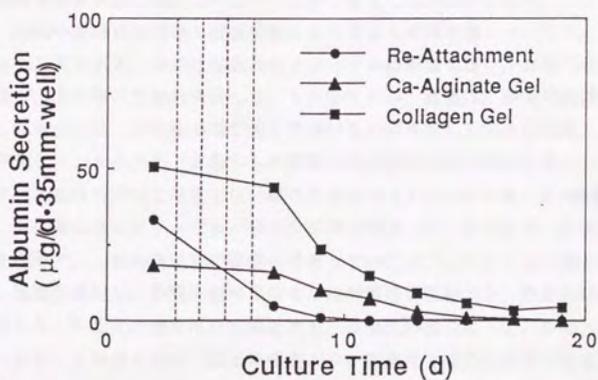


図4. 1.2 生理濃度のホルモン添加条件下での各種固定化法における機能発現 (80%成牛血清中)

表4. 1 培養終了時のDNA量でみた細胞維持と細胞当りのアルブミン分泌能

	維持DNA量* ($\mu\text{g}/\text{well}$)	DNA量当りのアルブミン分泌量** ($\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \mu\text{g}\text{-DNA})$)
高ホルモン添加条件下		
再付着	0.501 \pm 0.125	N.D.
アルギン酸ゲル	1.13 \pm 0.23	3.09 \pm 1.48
コラーゲンゲル	5.11 \pm 0.13	5.35 \pm 0.42
生理ホルモン添加条件下		
再付着	0.459 \pm 0.036	N.D.
アルギン酸ゲル	1.02 \pm 0.35	N.D.
コラーゲンゲル	2.96 \pm 0.25	1.39 \pm 0.37

**固定化時のDNA量；7.90 $\mu\text{g}/\text{well}$

*成体内でのDNA量当りのアルブミン分泌；1.2-1.6 $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \mu\text{g}\text{-DNA})$

この推察からも、人工肝臓モジュールの実用条件などのように、in vitroの通常の培養条件に比べて著しく悪い培養条件下では、コラーゲンを主体とするマトリックス物質を細胞周囲に適度に配置する必要があることが示唆される。

一方、高成牛血清添加培地に直接接触させた場合の細胞破壊については、その原因は全く不明である。当初は補体系のタンパクの悪影響を疑い、非働化処理を行った成牛血清を用いて検討を行った。しかしながら、結果は、非働化処理血清で培養した場合には、非働化処理を施していないもので培養した場合と比較して、さらに悪化した。すなわち、表層からの破壊と内部壊死がより顕著に見られた。一方、牛胎児血清を用いた培養では、調べたどのロットについても、50%濃度の添加まで、再付着スフェロイドでも、健全な状態を維持した。すなわち、血清濃度を高める段階で、一部伸展状態で安定に付着していたスフェロイドは、徐々にディッシュ底面に伸展し、多層細胞凝集体または単層培養細胞へと、健全な状態のまま移行した。牛胎児血清を用いた場合でも、非働化処理によって、かえって状態が悪化することが見られた。以上の観察より、高濃度の成牛血清添加培地中で見られたスフェロイドの内部壊死または崩壊は、牛の補体系タンパクによるものではないと結論できる。また、牛胎児血清では健全な状態が保たれたことより、少なくとも、ホルモンや栄養素などの十分な添加によって乗り越えられるような障害が、成牛血清中での培養には存在するのであろう。

初代培養ブタ肝細胞の単層培養細胞は、ヒト血漿中で安定であることが判明している。またイヌ肝細胞もヒト血漿中で安定である。しかし、イヌ血漿中では、ブタ細胞は急速に破壊されることが判明している(濱田ら、1990)。この理由については全く不明である。このイヌ血漿中で見られたブタ肝細胞の破壊と、本研究で観察されたラット肝細胞の成牛血清中での破壊についての関連も全く不明である。実際に人工肝臓モジュールをヒトの臨床応用に用いる際には、ブタ肝細胞を用いることが予想される。破壊の原因を明らかにする一方で、ブタ肝細胞を高濃度のヒト血清または血漿中で培養し、最も安定な固定化方法を再度選択する必要がある。しかし、未だ明らかにされていない肝臓の機能をほぼ完全に一定期間置き換えることが求められる人工肝臓モジュールにおいては、可能な限り良好な細胞機能を維持する固定化方法を用いることが賢明であると考えられる。よって、確かに本研究で見られたラット細胞の破壊現象が、実用モジュールで相似的に問題になるか否かは定かではないにせよ、本研究で明らかになったように、高血清培地で機能を最も良好に維持するコラーゲンゲル包括固定化法など細胞周囲環境を適度に整えるような固定化方法を、人工肝臓モジュールに用いていくのが、現状では最も確実であると考えられる。

4. 4 本章のまとめ

本章では、スフェロイドを大量形成後に何等かの高密度固定化をすることにより高機能かつコンパクトな人工肝臓モジュールを製作する際に問題となる2点、すなわち、浮遊スフェロイドの大量迅速形成と、実用条件下でのスフェロイドの安定固定化とについての改善を行った。

まず、懸濁培養によるスフェロイドの大量迅速形成については、旋回培養と逆円錐台回転体を装着したスピナーフラスコを用いた大量浮遊攪拌培養を行った。いずれの方法においても、長期連続攪拌は困難であるが、アルブミン分泌能とGOT漏出量を定量化することによって、最適な攪拌停止・回収時刻を設定した。このようにして形成された細胞凝集体をポリリジンで被覆した表面上に再播種したところ、はじめから静置培養によって形成させたスフェロイドと同様に、その後約2週間にわたって、良好なアルブミン分泌能を維持した。よって、懸濁培養によって形成された細胞凝集体を、“スフェロイド”と呼ぶことができる。酸素供給や攪拌による剪断応力、完全混合状態の実現等に注意すれば、さらに大きな容量での一括迅速形成も可能であると考えられる(4.2)。

また、生理濃度まで下げたホルモン条件下や、高濃度血清を添加した培地中での各種固定化法によって固定化されたスフェロイドの機能発現維持を検討した。

その結果、高濃度血清と直接スフェロイドを接触させる固定化法は、安定機能発現にとって著しく不利であることが判明した。また、ゲル包括法では、コラーゲンゲルがアルギン酸カルシウムゲルより著しく優っていた。人工肝臓モジュールの実用条件、すなわち、生理濃度のホルモンを含む血漿が灌流するという条件に近づけるにつれて、2つの包括固定化法に見られたこの差は、大きくなった。よって、可能な限り良好な機能発現を維持しなければならない実用の人工肝臓モジュールへの適用のためには、適度に細胞周囲環境を整えるようなコラーゲンを主体とする成分によるゲル包括固定化などが適当であることが示唆された。

(4. 3)

以上得られた結果は、大量にスフェロイドを形成後固定化を行うという人工肝臓モジュール製作のアプローチにおいて、モジュール設計に進む前に解決しておくべき問題を基本的に解決する重要な成果であると考えられる。

本章の参考文献

- Bissel, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J. and Roll, F. J., *J. Clin. Invest.*, **79**, 801 (1987)
- 濱田, 松江, 高橋, 長谷, 熊谷, 中島, 園谷, 内野, 橋村, 駒井, 今,
人工臓器, **19**, 852 (1990).
- 岩橋, 井嶋, 谷口, 松下, 船津, 化学工学会第57年会研究発表講演要旨集第3分冊, pp.183 (1992).
- Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Greenberg, G. R., Phillips, M. J.,
Bruce-Robertson, A. and Sodtke, U., *Biochem. J.*, **146**, 141
(1975).
- Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Mehra, R. and Bruce-Robertson, A.,
Gastroenterol., **78**, 556 (1980).
- 刈屋, 戸崎, 発酵と工業, **45**, 206 (1987).
- Moscona, A., *Exp. Cell Res.*, **22**, 455 (1961).
- Seglen, P. O., *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).

終章 本論文のまとめと今後の展望

本論文では、培養動物細胞を工学的に利用する立場から、固体表面特性や液性因子などの培養系での細胞周囲環境が、細胞形態と機能発現に与えている影響について解明し、それら基礎的な知見の上に、より積極的な制御と利用を試みた。

まず、以下に各章の成果を簡単にまとめる。

第1章では、本研究の背景となる既往の研究について述べた。動物細胞の物質生産能や臓器特異機能を機能を利用する場合において、固体表面と細胞が、直接またはさまざまなマトリックス物質を介して間接的に作用することによって、細胞の付着伸展やその後の増殖、さらにはより高度な生体類似組織の構築といった現象が制御されていることを述べた。また、それらの知見を利用して、ハイブリッド型人工肝臓などの有用な生化学反応装置の開発に関する研究の現状と課題について述べた。さらに、それら既往の研究の中での、本研究の目的とアプローチについて述べた。

第2章では、物質生産における接着依存性動物細胞の大量培養での付着伸展制御の第一歩として、典型的な細胞株を用い、生物特異的及び非特異的細胞付着機構の寄与を定量的に解析した。すなわち、接着依存性動物細胞の大量培養において、最も有望な方法とされているマイクロキャリア法における連続攪拌による細胞播種時に見られるような、担体と細胞の接触時間が極めて短い場合における細胞付着現象を、ディッシュを用いる静置培養での付着実験で、細胞とディッシュ底面との接触時間を、細胞付着に関する既往の研究に比較して、極めて短く設定することにより、検討した。この結果、接触直後の細胞付着においては、固体表面へ吸着した血清タンパク質をも含めた非特異的性質が支配的であることを明らかにした。たとえ特異的付着伸展タンパク質が吸着した表面であっても、非特異的には細胞が付着しにくい場合は、かえって初期の付着を阻害することも明らかとなった。このように、接触直後の細胞付着現象と、その後の伸展・増殖といった現象とでは、その機構が異なることが示唆された。また、タンパク質が吸着した表面の非特異的な性質としては、疎水性/親水性バランスよりも、吸着タンパク質の培養液中での電荷の極性が、より重要なパラメータであることが示唆された。以上の知見に基づき、接触直後の細胞付着機構を簡単なモデルで表した(2.2)。さらに、接触直後の細胞付着とその後の細胞伸展を同時に促進する表面特性を提出した。これは、マイクロキャリア法などによる接着依存性細胞の大量培養において、最適な特性を与える表面のひとつであると考えられる(2.3)。

第3章では、単なる物質生産能の利用ではなく、ハイブリッド型人工肝臓への細胞の利用に見られるような細胞が持つその由来臓器の特異機能の利用を最終目標として、肝特異機能を保持したまま一定期間培養可能な初代培養肝細胞の形態と機能発現を、固体表面特性と液性因子によって制御することを試みた。その前段階として、まず、凝集体形成における固体表面の特性やその後の維持における液性因子の効果などの基本的な培養条件を明らかにした(3. 2)。また、人工肝臓へ利用する場合において、重要な肝特異機能とされているいくつかの機能の発現状況を検討し、凝集体が様々な機能を長期間にわたって保持することを確かめた(3. 3)。さらに、凝集体を大量形成後、固定化する人工肝臓モジュールの製作アプローチに必要な凝集体の形態と機能発現の制御を試みた。すなわち、平板上での静置培養において、浮遊状態の細胞凝集体を選択的に形成させるための培養条件、及び形成させた浮遊凝集体を、平板上に一部伸展状態で安定に再付着固定化させるために最適な固体表面特性などを設定した。

第4章では、肝細胞凝集体の大量迅速形成における懸濁培養の利用と、血漿灌流モジュール内での安定固定化法の選択について検討を行った。まず、旋回培養や大容量浮遊培養で迅速に形成させた細胞凝集体が、浮遊状態での培養を中止し固定化することにより、平板上静置培養で緩やかに形成させたものと同レベルの機能を安定に発現することを確かめた。このことは、人工肝臓モジュールに必要な大量の肝細胞凝集体を、比較的簡単かつ迅速に形成させ得る可能性を示している(4. 2)。また、形成させた凝集体を血漿が灌流する人工肝臓モジュール内に安定に固定化する方法を選択するために、典型的な方法で固定化した凝集体を一般の培養条件とは著しく異なる培地、すなわち高濃度血清培地や生理レベルの各種ホルモンのみを添加した培地、を用いて培養し、機能発現とその維持を比較検討した。その結果、コラーゲン様のゲル包括固定化法が、最も安定な固定化方法であることを明らかにした(4. 3)。この2つの成果によって、肝細胞凝集体を利用する人工肝臓モジュールの製作について、モジュール設計前に明らかにしておくべき基本的な問題は解決されたと考えられる。

さらに、今後の研究課題について述べる。

固体表面の非特異的特性が、細胞の付着伸展や増殖といった現象に与える影響については、伸展増殖過程については、生物学的に特異的な機構が決定的であることは、ほぼ共通の認識となっている。ごく初期の接触・付着過程については、生物学的に特異的な作用ではない非特異的な機構が、重要な役割を果たしていることは明らかになりつつあるが、それらの中での支配的因子の解明や、付着機構全体のモデル化には程遠いのが現状である。さらに、工業レベルでの動物細胞の利用においては、流れによって生じる様々な要因をも含めた定量的な解析が必要

とされている。いくつかのモデルが提示され、非常に理想化された実験系での測定結果と理論の比較が試みられている(Mege et al., 1986; Hammer and Lauffenburger, 1987)。一方、マイクロキャリア培養槽などの攪拌状態と細胞への障害を説明・予測するための検討・モデル化が行われている(Aunins et al., 1989; Croughan et al., 1989; Croughan and Wang, 1989; Cherry and Papoutsakis, 1988)。近い将来、これら両者の研究成果が結び付き、簡単な実験によって、スケールアップした培養槽中でのさまざまな細胞の付着挙動を予測することが可能となるであろう。

付着伸展・増殖だけでなく、その後の分化機能の発現まで制御するモデル系として、また応用面の重要性からも、初代培養肝細胞の研究は重要な位置を占め続けると考えられる。初代培養肝細胞においては一般に、増殖と分化機能維持は相反すると考えられている。これは、単層培養しかも低密度であればあるほど増殖活性が高い(Nakamura et al., 1983; Ichihara et al., 1986)という報告、また凝集体の形成に伴って増殖能は低下し、分化機能発現レベルが上昇すること(Koide et al., 1989)、などから明らかである。生体外で、肝細胞を増殖相から分化相へ、または分化相から増殖相へという変換が可能となること、すなわち、増殖と分化機能発現を生体外で制御することが可能となれば、応用面としては、ごく少数の細胞から、高性能なハイブリッド型人工肝臓をはじめとする有用な装置を製作することが可能となる。このような制御を意図した研究は最近試み始められている(Takezawa, 1990)が、これらの形態制御技術を利用する場合には、固体表面の非特異的特性が、プロテオグリカンなどの巨大糖-タンパク質複合体やタンパク質の吸着性に及ぼす影響、ホルモンなどの液成因子がマトリックス物質の合成分泌へ与える影響、の両者を総合的に最適化することが、重要であると考えている。

以上、物質生産を目的とした株細胞の付着伸展の制御、由来臓器の特異機能の利用を目的とした肝細胞における細胞凝集体の形成と機能発現の制御のいずれにおいても、固体表面などの細胞周囲環境が重要な役割を果たしていることがますます明らかとなった。今後これらの役割をさらに定量的に解明することによって、細胞形態や機能発現をより簡単な方法で制御することが可能となるであろう。

本章の参考文献

- Aunins, J. G., Woodson Jr., B. A., Hale, T. K. and Wang, D. I. C.,
Biotech. Bioeng., **34**, 1127 (1989).
- Cherry, R. S. and Papoutsakis, E. T., Biotech. Bioeng., **32**, 1001 (1988).
- Croughan, M. S., Sayre, E. S. and Wang, D. I. C. Biotech. Bioeng., **33**,
862 (1989).
- Croughan, M. S. and Wang, D. I. C., Biotech. Bioeng., **33**, 731 (1989).
- Hammer, D. A. and Lauffenburger, D. A., Biophys. J., **52**, 475 (1987).
- Koide, N., Sakaguchi, K., Kiode, Y., Asano, K., Kawaguchi, M.,
Matsushita, H., Takenami, T., Shinji, T., Mori, M. and Tsuji,
T., Exp. Cell Res., **186**, 227 (1991).
- Mege, J. L., Capo, C., Bernoliel, A. M. and Bongrand, P., Cell Biophys.,
8, 141 (1986).
- Ichihara, A., Nakamura, T., Noda, C. and Tanaka, K., in "Isolated and
Cultured hepatocytes", ed. by Guillouzo, A and Guguen-Guillouzo,
C., Jhon Libbey Eurotext Limtd., London (1986) pp.187.
- Nakamura, T., Tomita, Y. and Ichihara, A., J. Biochem., **94**, 1029 (1983).
- Takezawa, T., Mori, Y. and Yoshizato, K., Bio/Technol., **8**, 854 (1990).

本論文の出版・投稿状況

本論文は、以下のように出版・投稿されている。

第2章

- ・ Sakai, Y. and Suzuki, M.: Kinetics of initial mammalian cell attachment on specific and non-specific surfaces immediately after contact; *J. Chem. Eng. Jpn.* に投稿中.

第3章

3. 2

- ・ 鈴木基之, 酒井康行; ポリリジン被覆表面上における成熟ラット初代培養肝細胞のスフェロイド形成と維持; *化学工学論文集*, **17(3)**, 667-670 (1991).
- ・ Sakai, Y. and Suzuki, M.: Formation of spheroids of adult rat hepatocytes on polylysine-coated surfaces and their albumin production; *Biotech. Techniques*, **5(4)**, 299-302 (1991).

3. 3

- ・ Sakai, Y. and Suzuki, M.: Extended expressions of various liver-specific functions by inducing aggregate formation in rat hepatocytes on polylysine- or collagen-coated surfaces; *J. Appl. Microb. Biotech.* に投稿中.

3. 4

- ・ 酒井康行, 鈴木基之; 正常肝細胞における浮遊スフェロイドの選択的形成と再播種固定化; *人工臓器*, **21(3)**, 1065-1070 (1992).

第4章

4. 2

- ・ Sakai, Y., Furukawa, K. and Suzuki, M.: Immobilization and long-term albumin secretion of hepatocyte spheroids rapidly formed by rotational tissue culture methods; *Biotech. Techniques*, **6(6)**, 527-532 (1992)

4. 3

- ・ 酒井康行, 鈴木基之; 浮遊培養により形成された肝細胞スフェロイドの実用条件下での安定固定化と機能発現; *人工臓器*, 印刷中
- ・ Sakai, Y. and Suzuki, M.: Stable immobilization and functional expressions of hepatocyte spheroids rapidly formed by suspension culture; *Art. Organs. Today*に投稿中.

謝辞

本研究は、筆者が、東京大学大学院工学系研究科化学工学専門課程に1988年の修士課程入学から1991年に博士課程を中途退学するまでの約3年間と、その後東京大学生産技術研究所に助手として勤務した1991年から1993年までの約2年間の計約6年間に行われたものであります。

研究開始時から自由な研究環境を与えて下さり、しかも何度かありました行き詰まりの時期に、適切なご指導をして下さった生産技術研究所の鈴木基之教授に、深く感謝いたします。多忙にもかかわらず、論文投稿時などに快く議論に応じて下さいました。生産技術研究所の迫田章義助教授に厚く感謝いたします。研究の遂行にあたり、実験・議論などから私生活の側面までご助言ならびにご協力下さいました迫田研究室の野村剛志技術官をはじめ、鈴木研究室の鶴達郎技術官・藤井隆夫技術官に感謝いたします。研究分野こそ違いはありましたが、当時、生産技術研究所・鈴木研究室の助手であった川島博之氏（現農林水産省農業環境技術研究所）には、研究者としての生き方を考える上で、大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。巡回培養による肝細胞凝集体の形成実験については、当時鈴木研究室で卒業研究を行った古川克子さん（現筑波大学基礎医学系医工学修士課程）に感謝いたします。また、鈴木迫田研在籍で筆者と同時期に在籍した学生・研究生の方々に感謝いたします。

動物細胞の培養開始に当たりお世話になりました（株）東レ基礎研究所の山崎・市會両氏に感謝いたします。また、ラット肝臓細胞の採取・初代培養の開始に当り大変お世話になりました。昭和大学薬学部の内海英雄助教授・村山純一郎助手に感謝いたします。

卒業研究を行わせていただいた化学工学科西村研究室の方々、特に川上泰助教授（現（財）産業創造技術研究所）や牧島房夫講師（現工学部精密機械工学科講師）には、動物細胞の培養技術をはじめ、様々な相談に応じていただきました。深く感謝いたします。また、同年代ということもあり、大変お世話になりました進藤卓也君（現（株）鐘淵化学工業生産技術研究所）に感謝いたします。

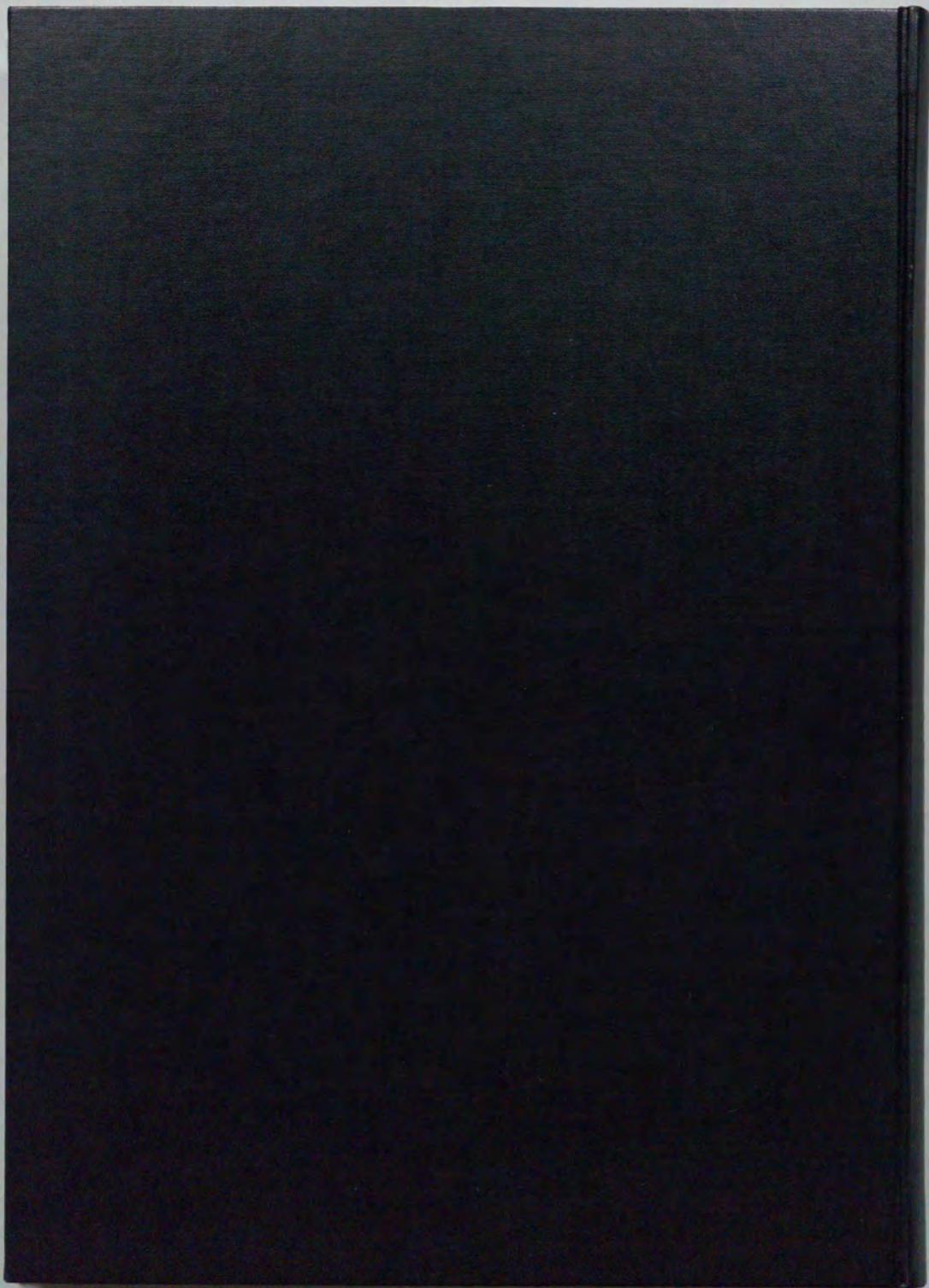
博士論文の審査過程で、お忙しい中、快く議論に応じて下さいました。生産技術研究所の渡辺正教授、化学工学科の古崎新太郎教授・鈴木栄二助教授、応用微生物研究所の戸田清教授に感謝いたします。そのほかの化学工学科の諸先生ならびに大学院学生の方々の様々な議論でも、幾たびかはっとさせられることがあり、常に、目的意識的に研究を推進する上で、大変参考になりました。厚くお礼申し上げます。

化学工学会では、数多くの研究者の方々のお世話になりました。特に九州大学

科学機械工学科の船津和守教授・松下琢助手は、同時期にハイブリッド型人工肝臓の研究を進めていらしたため、いくつかの重要なお指摘をして下さいました。また、動物細胞工学会では、名古屋大学農学部の中川泰雄助教授、東京農工大学農学部の矢ヶ崎一三助教授、(株)帝人生物工学研究所の渡嘉敷通之氏に、大変参考になるご意見をいただきました。厚くお礼申し上げます。

これまでお世話になった数多くの方々がいなければ、筆者が論文をまとめることは不可能だったにちがありません。本当にどうもありがとうございました。

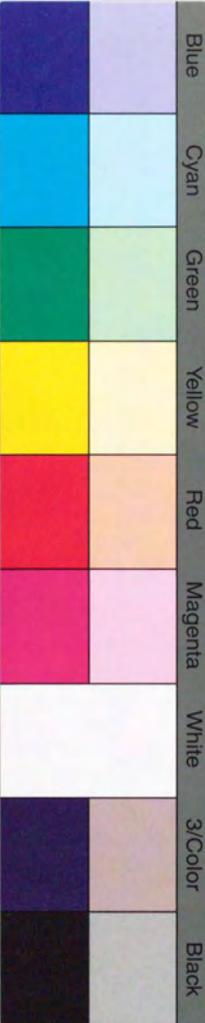
1993年 2月



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

