

学位論文題名

Isolation and Culture of Human Hepatocytes from Resected Liver Tissue
as a Bioreactor for a Hybrid Artificial Liver

（ハイブリッド型人工肝のバイオリアクターとしての
ヒト肝細胞の分散および培養法に関する研究）

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

培養肝細胞を用いた人工肝は肝不全の治療方法として期待されている。教室ではコラーゲンコートしたガラス板上に単層培養した肝細胞を積層したハイブリッド型人工肝を開発し、無肝犬の生存時間を3倍延長させることに成功し、また、ブタ肝細胞を用いた人工肝による無肝家兔の生存時間の延長を認め、この積層型ハイブリッド人工肝は臨床応用に向け期待できる有用なシステムであることを報告してきた。さらに、培養ブタ肝細胞は正常ヒト血漿および肝不全ヒト血漿中でも十分に機能することを証明し、培養異種肝細胞のバイオリアクターとしての応用の可能性を報告してきたが、異種動物の肝細胞を使用するには、現在のシステムでは免疫学的問題、未知のウイルス感染、倫理的問題などの解決しなければならない諸問題がある。これらの諸問題の解決のためには、ヒト肝細胞をバイオリアクターとして使用することが最善の策と考えられる。今回われわれは、手術時切除肝より得られた正常肝組織からヒト肝細胞の単離およびその培養方法について検討した。

II. 材料と方法

1. 肝組織：ヒト肝組織は肝切除を施行した8例の切除肝の非病変部より得た。原疾患は、肝多胞虫症3例、肝血管腫2例、肝膿瘍1例、FNH1例、転移性肝癌1例であり、全例非病変部は正常の肝組織であった。患者の年齢は12歳から69歳までであった。実験のために使用した肝組織の重量は10gから65gであった。また、術中阻血から肝組織採取までの温阻血時間を測定した。
2. 肝細胞単離方法：肝細胞の単離は2群に分け検討した。

I 群 (n = 3) : 初めに, EGTA を含む 37°C の Ca^{2+} -free Hanks 液 (前灌流用緩衝液) を約 10 分の間完全に肝組織が脱血されるまで灌流した。灌流は 18 ゲージのカテーテルをつけたシリンジを用い, 肝組織切離面の挿入可能な全ての脈管にカテーテルを挿入して行なった。次に, 0.05% コラゲナーゼ溶液を約 13 分間灌流し肝組織が消化された後にメスにて細切した。その後, コラゲナーゼ溶液中にて約 18 分振盪して肝細胞を分散した。

II 群 (n = 5) : 初めに I 群と同様に前灌流用緩衝液にて肝組織を灌流した。次に, 0.05% コラゲナーゼおよび 1000 PU/ml ディスパーゼを含む緩衝液にて約 5 分間灌流した後, 0.05% コラゲナーゼ溶液にて約 7 分間灌流した。最後に I 群と同様に消化された肝組織をメスにて細切して肝細胞を分散した。

I 群および II 群とも, 分散された肝細胞は濾過後, 50×g の遠心操作で分離し, 肝組織 1 g 当りの肝細胞収量およびトリパンブルーを用いた viability を測定した。

3. 肝細胞培養方法 : 単離された肝細胞は, コラーゲンコートしたプラスチックディッシュ上に 2×10^5 cells/0.2 ml/cm² の細胞密度で播種した。培地は Williams' E (WE) を使用し, インスリン (10^{-8} M), デキサメサゾン (10^{-8} M), 胎児牛血清 (10%) を加えた。3 時間培養し肝細胞が十分に接着伸展した後, 培地をインスリン (10^{-8} M), デキサメサゾン (10^{-8} M), グルカゴン (10^{-8} M), EGF (7 ng/ml) を含む WE に交換し培養を続けた。24 時間培養した後, 培地を WE と Leibovitz L-15 (L-15) 培地の 2 種類に分けて, 培養ヒト肝細胞の機能検査を行なった。

4. 検討項目 :

- 1) 肝細胞収量および viability : 1 g あたりの切除ヒト肝組織より単離された肝細胞の収量および単離直後の肝細胞の viability を I 群と II 群間で比較検討した。
- 2) 温阻血時間と単離肝細胞 : 温阻血時間が単離されたヒト肝細胞の収量およびその viability に与える影響を検討した。
- 3) 培養ヒト肝細胞およびその機能 : 播種後 2, 5, 7, 10 日目に測定した。
 - a) DNA 量 : 肝細胞の量的な維持の指標として DNA 量を測定した。
 - b) 糖新生能 : Hanks 液中に 2 mM アラニンと 2 mM 乳酸を添加した溶液中で 90 分間肝細胞を培養し肝細胞にて合成された糖の濃度を測定した。
 - c) 尿素合成能 : 5 mM 塩化アンモニウムを添加した Hanks 液中で 90 分間肝細胞を培養し, 肝細胞にて合成された尿素的濃度を測定した。
- b), c) の結果は単位 DNA あたりの量で示した。

Ⅲ. 結 果

1. 単離ヒト肝細胞収量とその viability : 肝細胞収量は I 群で $0.94 \pm 0.74 \times 10^6$, II 群で $13.31 \pm 7.94 \times 10^6$ 細胞 / g 肝臓であり, II 群での細胞収量は I 群の約 15 倍と有意に高かった ($p < 0.05$)。viability では両者間に有意差を認めなかった。

2. 温阻血時間の影響 : 切除肝から得られた肝組織の温阻血時間は 0 分から 90 分 (平均 29.4 ± 30.6) であったが, 単離肝細胞の収量, viability には差を認めなかった。しかし, I 群の肝細胞はすべて温阻血時間が短かったにもかかわらず収量は低い傾向にあった。

3. 培養肝細胞およびその機能

a) DNA 量 : WE で培養した肝細胞の DNA 量は 2 日目で 0.616 ± 0.338 , 10 日目で $0.637 \pm 0.373 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ であり, また L-15 で培養した肝細胞の DNA 量は, 2 日目で 0.607 ± 0.376 , 10 日目で $0.752 \pm 0.289 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ であり, この 2 種の培地間で有意差を認めず DNA 量は 10 日間維持された。また形態学的にも線維芽細胞などの混入はなく期間中培養肝細胞は密な単層を形成していた。

b) 糖新生能 : WE で培養した肝細胞は 2 日目で 38.94 ± 32.93 , 10 日目で $33.36 \pm 18.10 \text{ng} / \mu\text{g DNA} / \text{min}$ であり, また L-15 で培養した肝細胞は, 2 日目で 39.21 ± 45.18 , 10 日目で $21.09 \pm 15.62 \text{ng} / \mu\text{g DNA} / \text{min}$ であり, いずれの培地でも有意差はなく, 高水準で 10 日間は維持された。

c) 尿素合成能 : WE で培養した肝細胞は, 2 日目で 2.84 ± 1.19 , 10 日目で $1.44 \pm 0.38 \text{n g} / \mu\text{g DNA} / \text{min}$ であり, また, L-15 で培養した肝細胞は, 2 日目で 2.38 ± 1.31 , 10 日目で $2.18 \pm 0.79 \text{n g} / \mu\text{g DNA} / \text{min}$ であり, 使用した 2 種の培地間で有意差を認めず, 尿素合成能も測定を行なった 10 日間は高水準で維持されていた。

Ⅳ. 考 察

ヒトの肝組織はラットに比べ硬く分散が困難であり, 肝細胞分散のために, これまでいくつかの方法が試みられてきた。今回われわれは, ラットなどの肝細胞分散に最も一般的に使用されているコラゲナーゼ灌流法と, コラゲナーゼとディスパーゼ混合液の灌流法の 2 通りの方法を試みた。後者の収量は前者の約 15 倍でありヒト肝細胞の分散にはコラゲナーゼとディスパーゼの混合液の灌流法が優れていることが判明した。本研究でヒト肝細胞の分散に対し, コラゲナーゼとディスパーゼ混合液の灌流法がコラゲナーゼ単独より優れていることが初めて証明されたことになる。

肝組織に対する温阻血時間とヒト肝細胞培養に関する報告はこれまであまりなされていない。心停止後約1時間の剖検例から得られた肝臓からの肝細胞の分散培養法に関する報告があるが、収量は 3×10^6 細胞/g肝臓であり、われわれの90分温阻血肝組織から得られた肝細胞収量(12.5×10^6 細胞/g肝臓)の約4分の1であった。これは、その肝細胞分散にコラゲナーゼ単独で灌流を行っており、その上剖検例より得られた肝臓は単純に温阻血だけの影響を受けているわけではなく、その経過中死戦期があり、肝に対して損傷が加わっているものと考えられ、その結果収量が低かったものと考えられる。ヒトの肝臓は手術中の温阻血に90分までは耐え得るとの報告があるが、今回のわれわれの結果からも肝細胞は90分の温阻血の上に酵素消化という負荷にも十分耐え得ると考えられた。

ヒト肝細胞の培養では、われわれはWEとL-15の2種類の培養液を使用し、また、ブタ、ラットなどの肝細胞培養において機能発現に適しているとされているホルモン類を添加した。肝細胞の機能の指標として糖新生能と尿素合成能を検討したが、いずれの培地を用いても肝細胞機能は10日間高水準に維持された。また、DNA量もこの期間中良好に維持され、顕微鏡における観察においても密な単層を維持し、培養肝細胞の機能評価を裏付ける結果であった。すなわち、培養ヒト肝細胞の機能発現には、他の肝細胞と同様にホルモン類の添加が必要であると考えられた。

V. 結 語

手術による切除肝より得られた肝組織からのヒト肝細胞の分散法と培養肝細胞機能を検討し、以下の成績を得た。

1. 肝細胞の分散には、コラゲナーゼ単独よりもコラゲナーゼとディスパーゼの混合液による灌流法が優れており、約15倍の収量を得た。
2. 温阻血時間が90分まででは、単離肝細胞の収量および viability に影響はなかった。
3. ヒト肝細胞の培養では、WE および L-15 培地にインスリン、デキサメサゾン、グルカゴン、EGF を添加したもので培養すると、10日間は培養肝細胞機能を維持できた。

以上より、今回報告した方法によって分散培養されたヒト肝細胞は、ハイブリッド型人工肝のバイオリアクターとして十分機能が期待できるものであると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 宮 崎 保

肝不全に対する肝機能の補助を目的に培養肝細胞をバイオリアクターとして用いるハイブリッド型人工肝は有効な治療方法として期待されている。教室ではガラス板上に単層培養した肝細胞を積層したハイブリッド型人工肝を開発し、無肝動物の生存時間を延長させることに成功し、さらに培養ブタ肝細胞は肝不全ヒト血漿中でも十分に機能することを証明し、培養異種肝細胞のバイオリアクターとしての応用の可能性を報告してきた。しかし、異種動物の肝細胞を使用するには、現在のシステムでは免疫学的問題、未知のウイルス感染、倫理的問題などの解決しなければならない諸問題がある。これらの諸問題の解決のためには、ヒト肝細胞をバイオリアクターとして使用することが最善の策と考えられる。今回申請者は、手術時切除肝より得られた正常肝組織からヒト肝細胞の単離およびその培養方法について検討した。

材料と方法：ヒト肝組織は肝切除を施行した8例の切除肝の非病変部より得た。全例非病変部は組織学的に正常の肝組織であった。実験のために使用した肝組織の重量は10 gから65 gであった。また、術中温阻血から肝組織採取までの温阻血時間を測定した。

ヒト肝細胞の単離方法は2群に分け検討した。

I 群：初めに、EGTAを含む37℃のCa²⁺-free Hanks液（前灌流用緩衝液）を肝組織切離面の挿入可能な全ての脈管にカテーテルを挿入してシリンジを用いて灌流し、次に、コラゲナーゼ溶液を灌流し消化された肝組織をメスにて細切した。その後、コラゲナーゼ溶液中にて振盪して肝細胞を分散した。

II 群：初めに、I 群と同様に前灌流用緩衝液にて肝組織を灌流した。次に、コラゲナーゼおよびディスパーゼを含む緩衝液にて灌流した後、さらにコラゲナーゼ溶液にて灌流し、最後にI 群と同様に消化された肝組織をメスにて細切して肝細胞を分散した。

I 群およびII 群とも、分散された肝細胞は濾過後、遠心操作で肝細胞を分離し、肝組織1 g当たりの肝細胞収量およびトリパンブルーを用いたviabilityを測定し、比較検討した。また、温阻血時間が細胞収量およびviabilityに与える影響について検討した。

単離された肝細胞は、プラスチックディッシュ上で培養した。培地はWilliams'E (WE)

を使用し、インスリン、デキサメサゾン、胎児牛血清を加えた。3時間培養し肝細胞が十分に接着伸展したのち、培地をインスリン、デキサメサゾン、グルカゴン、EGFを含むWEに交換し培養を続けた。24時間培養したのち、培地をWEとLeibovitz L-15 (L-15) 培地の2種類に分けて、培養ヒト肝細胞機能としてDNA量、糖新生能、尿素合成能を2, 5, 7, 10日目に測定した。

結果：肝細胞収量はI群で $0.94 \pm 0.74 \times 10^6$ 、II群で $13.31 \pm 7.94 \times 10^6$ 細胞/g肝臓であり、II群での細胞収量はI群の約15倍と有意に高かった ($p < 0.05$)。viabilityでは両者間に有意差を認めなかった。温阻血時間は0から90 (平均 29.4 ± 30.6) 分であったが、単離肝細胞の収量、viabilityには差を認めなかった。

培養肝細胞のDNA量、糖新生能、尿素合成能は測定した10日間は使用した2種の培地間で有意差なく、高水準で維持された。

以上より、肝細胞の分散には、コラゲナーゼ単独よりもコラゲナーゼとディスパーゼの混合液による灌流法が優れており、90分までの温阻血時間では、単離肝細胞の収量およびviabilityに影響を与えないことが明らかになった。またヒト肝細胞の培養ではWEおよびL-15培地にインスリン、デキサメサゾン、グルカゴン、EGFを添加したもので培養すると、培養肝細胞機能を10日間維持することが判明した。

以上より今回の方法により分散培養されたヒト肝細胞は、ハイブリッド型人工肝のバイオリアクターとして十分機能が期待できるものであると考えられた。

審査に当たって、宮崎教授よりトランスフェリンとHGFの培養肝細胞におよぼす影響について、安田教授より、培養肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝の臨床応用に向けての問題点などに関して、また、武市教授より培養肝細胞の長期機能維持に関してなどの質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行なった。

ヒト肝細胞の分散方法についてディスパーゼとコラゲナーゼ混合液の灌流が優れていること、また、90分までの肝組織の温阻血ではヒト肝細胞の収量およびviabilityに影響がなく、ヒト肝細胞の機能を10日間維持することを示した報告はなく、培養ヒト肝細胞のハイブリッド型人工肝のバイオリアクターとしての応用の可能性があることを示した点で意義があり、学位授与に値するものとする。