

学 位 論 文 題 名

Influence of warm ischemia on isolation
and primary culture of hepatocytes
from rat liver for a hybrid artificial liver

(ハイブリッド型人工肝に用いる肝細胞の分散・
初代培養に与える肝温阻血の影響)

学位論文内容の要旨

培養肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝は肝不全の治療として期待されている。教室では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、無肝犬や無肝家兎の生存延長に成功し、有用なシステムであることを報告してきた。一方、欧米ではバイオリアクターとして大量に得られるブタ肝細胞や増殖可能なヒト肝芽腫由来の細胞株を用いた人工肝の臨床使用が報告されている。しかし、異種肝細胞や腫瘍細胞の使用には免疫学的問題、未知の感染症、倫理上の問題などがある。また、これまでのわれわれの免疫学的検討では、約7%のヒト血清中に培養ブタ肝細胞を死滅させる自然抗体が存在することが明らかである。これらの諸問題を解決するにはヒト肝細胞を使用するのが最善の策であるが、現在のところヒト肝細胞を得るためには、手術時切除標本や屍体肝など温阻血状態に曝されたものしかない。そこで阻血肝より機能的肝細胞を取得することを目的として肝温阻血が肝細胞の分散、初代培養に与える影響について検討した。

材料と方法

動物：6～7週齢の雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。

肝温阻血：エーテル麻酔下にヘパリン500U/kgを静注し、肋弓下切開で開腹後、門脈、肝動脈、胆管を一括クランプし、肝温阻血とした。温阻血時間により次の3群に分けた。A群：温阻血時間0分(n=5)、B群：温阻血10分(n=5)、C群：温阻血20分(n=5)

肝細胞分散：コラゲナーゼ灌流法により肝細胞分散を行った。はじめに、EGTAを含む37℃のCa²⁺-free Hanks液（前灌流緩衝液）を門脈に挿入したカテーテルより灌流して脱血をした。次に0.05%コラゲナーゼ溶液で灌流して肝組織を消化した。軟化した肝を細切後に濾過し、分散した肝細胞を50Xgの遠心操作で分離し、肝1g当たりの収量およびトリパンプルーを用いてviabilityを測定した。

肝細胞培養：分散された肝細胞は、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/0.2ml/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。4時間の培養で肝細胞が接着した後、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 (7ng/ml) を含む WE に交換し、5日間培養した。

検討項目：

1. 単離肝細胞の評価

1) 肝細胞収量およびviability：1gあたりの肝より分散された肝細胞の収量と分散直後の肝細胞のviabilityを3群間で比較検討した。

2) Malondialdehyde (MDA) 量：単離肝細胞の膜脂質の過酸化を評価するためにTBA法によるMDA量の測定を行った。

3) 肝細胞接着率：肝細胞の培養基質への接着率を“接着した肝細胞のDNA量/細胞浮遊液のDNA量”より算出した。また、接着率と収量の積から肝1gより得られる利用可能な肝細胞数を算出し3群間で比較検討した。

2. 培養肝細胞機能：播種1、2、3、5日後に測定した。

1) DNA量：肝細胞の量的な維持の指標としてDNA量を測定した。

2) 糖新生能：Hanks液中に2mMアラニンと2mM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。

3) 尿素合成能：5mM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、肝細胞で合成された尿素濃度を測定した。

1-2)、2-2)、2-3)の測定値は単位DNAあたりの量で示した。有意差検定は一元配置分散分析とScheffe's Fを用い $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

1. 単離肝細胞の評価

1) 肝細胞収量およびviability：肝細胞収量は A群 41.96 ± 10.63 、B群 39.35 ± 12.15 、C群 $21.37 \pm 9.47 \times 10^6$ cells/g肝であり、C群はA群の約1/2で他の2群に比して有意に低値であった ($p < 0.05$)。viabilityもC群が他の2群に比して有意に低かった (vs A; $p < 0.01$, vs B; $p < 0.05$)。

2) MDA量：MDA量はA、B、C群でそれぞれ 70.23 ± 23.17 、 83.28 ± 17.81 、 132.31 ± 29.75 pmol/ μ g DNAであり、C群がA群に比して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

3) 接着率：接着率は A群 79.24 ± 2.28 、B群 61.04 ± 8.45 、C群 $43.88 \pm 11.31\%$ であり、温阻血時間の延長に従って有意に低下した。利用可能な肝細胞数はC群がA、B群に比して有意に低値であった ($p < 0.01$)。

2. 培養肝細胞

1) DNA量：DNA量は培養1日後でA群 0.95 ± 0.31 、B群 0.72 ± 0.32 、C群 $0.49 \pm 0.15 \mu$ g/cm² であり、DNA量は5日間維持された。

- 2) 糖新生能：1日後、A群 19.59 ± 9.30 、B群 18.92 ± 8.12 、C群 12.47 ± 5.16 ng/ μ g DNA/minであったが、経時的に低下した。しかし、5日間3群間に有意差を認めなかった。
- 3) 尿素合成能：各群とも2日後に最高値を示し、それぞれ、 8.56 ± 1.90 、 7.93 ± 0.76 、 7.39 ± 3.79 ng/ μ g DNA/minであり、5日間を通じて3群間に有意差を認めなかった。

考 察

肝温阻血に関する研究はこれまで種々の動物で行われており、温阻血に対する許容時間は種によって異なることが明らかになった。ラット30分、ブタ90分の温阻血では100%の生存率であるが、イヌでは90分で30%の生存率が報告されている。しかし、機能的な肝細胞の分散、培養に対する肝温阻血の影響についての研究はほとんどない。そこでわれわれはラット肝細胞の分散・培養に与える温阻血の影響について検討した。

ラット肝では15分の阻血状態で肝細胞表面にプレブが生じるという報告がある。われわれの実験では、阻血20分より、収量、viabilityが有意に低下し、またMDA量が有意に上昇した。このことは阻血に伴う肝細胞表面の変化が酵素灌流や分散操作により促進され、また、膜脂質の過酸化によりさらに厳しい障害を受けたためと考えられた。

一方、培養基質に対する接着率は温阻血時間の経過とともに低下し、最も鋭敏に阻血の影響を受けた。しかし、温阻血10分までは接着し、利用可能な肝細胞数は影響を与えないと考えられた。培養肝細胞の機能の指標として糖新生能、尿素合成能を検討したが、培養5日間を通じて3群間に有意差はなく、DNA量もこの期間維持された。

これらことから、一旦培養基質に接着し得た肝細胞の機能は20分までの肝温阻血では影響を受けず、バイオリアクターとして利用可能と考えられた。

結 語

1. 肝温阻血20分で単離肝細胞の収量、viabilityは低下し、MDA量は高値を示した。
2. 肝細胞接着率は温阻血時間の延長とともに有意に低下したが、接着可能な肝細胞数は10分までの肝温阻血では影響を受けなかった。
3. 一旦接着し培養可能であった肝細胞は肝温阻血時間に拘わらず機能の発現を認め、バイオリアクターとして利用可能と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Influence of warm ischemia on isolation
and primary culture of hepatocytes
from rat liver for a hybrid artificial liver

(ハイブリッド型人工肝に用いる肝細胞の分散・
初代培養に与える肝温阻血の影響)

培養肝細胞をバイオリアクターとして用いたハイブリッド型人工肝は肝不全の治療法として期待されている。教室では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、同種や異種の無肝動物の生存延長に成功し、有用なシステムであることを報告してきた。一方、欧米ではブタ肝細胞やヒト肝芽腫由来の細胞株を用いた人工肝の臨床使用が報告されている。しかし、異種肝細胞や腫瘍細胞の使用には免疫学的問題、未知の感染症、倫理的問題などがある。また、これまでの検討で約7%のヒト血清中に培養ブタ肝細胞を死滅させる自然抗体が存在することを明らかにした。これら諸問題の解決にはヒト肝細胞を使用するのが最善の対策であるが、現在のところ温阻血状態に曝された肝組織からヒト肝細胞を採取するより他にない。そこで申請者は阻血肝より機能的肝細胞を取得することを目的として肝温阻血が肝細胞の分散、初代培養に与える影響について検討した。

材料と方法：6～7週齢の雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。ヘパリン500U/kgを静注し、開腹後、門脈、肝動脈、胆管を一括クランプし、肝温阻血とした。温阻血時間により、A群：温阻血時間0分、

B群：温阻血10分、C群：温阻血20分の3群に分けた。温阻血後、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞分散を行った。はじめにEGTAを含む37℃のCa²⁺-free Hanks液(前灌流緩衝液)を門脈に挿入したカテーテルより灌流し、次に0.05%コラゲナーゼ溶液で灌流して肝組織を消化した。軟化した肝を細切後に濾過し、分散した肝細胞を低速遠心操作で分離した。ついで、単離された肝細胞をコラーゲンコートしたプラスチックディッシュ上に播種した。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。4時間の培養で肝細胞が接着した後、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、5日間培養した。

肝温阻血時間が肝細胞に与える障害の指標としてlgあたりの肝より分散された肝細胞の収量、分散直後の肝細胞のviability、Malondialdehyde(MDA)量、肝細胞の培養基質への接着率、肝lgより得られる利用可能な肝細胞数を測定し、3群間で比較検討した。培養肝細胞機能の評価としてはDNA量、糖新生能、尿素合成能を培養1、2、3、5日後に測定した。

結果：肝細胞収量はA群 41.96 ± 10.63 、B群 39.35 ± 12.15 、C群 $21.37 \pm 9.47 \times 10^6$ cells/g 肝であり、C群はA群の約1/2で他の2群に比して有意に低値であった($p < 0.05$)。viabilityはC群が他の2群に比して有意に低かった(vs A; $p < 0.01$ 、vs B; $p < 0.05$)。MDA量は各群で、それぞれ 70.23 ± 23.17 、 83.28 ± 17.81 、 132.31 ± 29.75 pmol/ μ g DNAであり、C群がA群に比して有意に高値を示した($p < 0.05$)。接着率はA群 79.24 ± 2.28 、B群 61.04 ± 8.45 、C群 $43.88 \pm 11.31\%$ であり、温阻血時間の延長に従って有意に低下した。利用可能な肝細胞数はC群がA、B群に比して有意に低値であった($p < 0.01$)。DNA量は、培養1日後でA群 0.95 ± 0.31 、B群 0.72 ± 0.32 、C群 0.49 ± 0.15 μ g/cm²であり5日間維持された。糖新生能は1日後、A群 19.59 ± 9.30 、B群 18.92 ± 8.12 、C群 12.47 ± 5.16 ng/ μ g DNA/minであったが、経時的に低下した。しかし、5日間3群間に有意差を認めなかった。尿素合成能は各群とも2日後に最高値を示し、それぞれ、 8.56 ± 1.90 、 7.93 ± 0.76 、 7.39 ± 3.79 ng/ μ g DNA/minであり、5日間を通じて3群間に有意差を認めなかった。

以上よりラット肝では阻血20分より、収量、viabilityが有意に低

下し、またMDA量が有意に上昇することが判明した。また、培養基質に対する接着率は温阻血時間の経過とともに低下し、最も鋭敏に阻血の影響を受けるが、温阻血10分までは接着し、利用可能な肝細胞数は影響を受けないことが明らかとなった。さらに、培養後の糖新生能、尿素合成能は温阻血の影響を受けないことがわかった。

これらのことから、一旦培養基質に接着し得た肝細胞の機能は20分までの肝温阻血では影響を受けず、バイオリアクターとして利用可能と考えられた。

審査に当たって、加藤教授より接着率の改善法についてなど、また、安田教授より、冷阻血との比較につい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った。

温阻血が肝細胞分散、培養に与える影響に関する報告はなく、温阻血肝より得られた肝細胞のバイオリアクターへの応用の可能性を示した点で意義があり、学位授与に値するものとする。