

学位論文題名

Function of culturing monolayer hepatocytes by
collagen gel coating and co-culture with
nonparenchymal cells

(コラーゲンゲル積層と混合培養による単層培養肝細胞の機能増強の試み)

学位論文内容の要旨

1. 目 的

各種肝補助療法の進歩にもかかわらず、劇症肝炎・慢性肝炎の急性増悪・術後の肝不全の救命率は、40%以下と低く、強力な肝補助装置の出現が望まれている。肝は解毒・代謝・合成・免疫など多彩で高度な機能を有しており、この機能を代償するには現状では肝細胞を装置に組み込む以外にないという考えから、当科では1987年より肝細胞を単層培養しこれを積層する積層型人工肝を開発し、検討してきた。この人工肝は無肝犬・無肝兎の生存時間を二倍以上延長することが確認されているが、臨床応用には解決しなければならない問題点がある。その一つとして、人工肝の機能を増強し維持することがある。そこで我々は細胞培養で有効と考えられている混合培養とコラーゲンを組み合わせて、肝非実質細胞と肝細胞との混合培養した上にコラーゲンを積層するという新しい培養形態を考案してその有用性を検討した。

2. 方 法

1. 実験材料. 雄性Wistar系ラットの門脈から0.05%コラーゲナーゼを灌流し肝を細胞浮遊液とする遠沈を繰り返し肝細胞を精製した。この際、上清を集めブローチEで肝細胞を消化して非実質細胞を得た。0.3%コラーゲンにMediumと緩衝液を加えてコラーゲン溶液として、コラーゲングルの用意をした。培養液には 10^{-8} Mインスリン、 10^{-8} Mテキサメタゾン、 10^{-8} Mグルカゴン、7ng/mlヒト上皮細胞増殖因子、100 μ g/mlクロラムフェニコール、48 μ g/mlゲンタマイシンを添加したウリアムスE培地を使用した。

2. 実験群. 次の4群について検討した。I群:コラーゲンコート上に肝細胞を単層培養、II群:コラーゲンコート上に肝細胞と非実質細胞を混合培養、III群:I群の上にコラーゲン溶液を積層しゲル化させる、IV群:II群の上にコラーゲン溶液を積層しゲル化させる(n=7)。

3. 検討項目. 位相差顕微鏡で肝細胞および非実質細胞の形態を観察する。培養開始後1、2、3、5、7、14日に尿素合成能と分泌アルブミンを測定した。尿素はアンモニアを負荷し生成された尿素量をジアセチルモノキサリム法により測定した。アルブミンは細胞培養上清中に分泌されたアルブミン量をサントイッチELISA法で測定した。

4. 統計学的処理. 得られた数値は平均値±標準誤差で表し、ANOVA法にて解析し、有意差の検定にはScheffe法を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

3. 結 果

1. 位相差顕微鏡所見. I群:肝細胞は播種後2時間で接着し、24時間後には伸展が始まった。肝細胞は播種後3日までは良好な形態を保ったが、その後急速に脱落した。II群:混合培養では非実質細胞の脱落が播種後2日から始まり、以後急速に脱落した。肝細胞はI群と同様に3日までは良好な形態を保ち、以後脱落した。III群:コラーゲンゲルを積層することによって肝細胞は比較的コンパクトな形態を保ち、辺縁は明瞭であった。また、観察した14日間にわたって良好な形態を維持した。IV群:混合培養にコラーゲンゲルを積層した群では、肝細胞はやはりコンパクトで辺縁が明瞭であり、肝細胞も非実質細胞も良好な形態を14日間にわたって保った。

2. 尿素合成能. I群:尿素合成能の最高値は3日目の $1.585 \pm 0.431 \mu\text{g/ml/90min}$ であり、14日目にはほとんど合成能を認めなかった。II群:尿素合成能は3日目の $1.378 \pm 0.366 \mu\text{g/ml/90min}$ が最高で14日目にはほとんど合成能を認めなかった。III群:コラーゲンゲルを積層した群では、最高値は $17.844 \pm 1.764 \mu\text{g/ml/90min}$ であり、14日目でも $3.816 \pm 0.909 \mu\text{g/ml/90min}$ であった。IV群:混合培養の上にコラーゲンゲルを積層した群は最高値が $19.249 \pm 1.099 \mu\text{g/ml/90min}$ と著増し、14日目でも $7.569 \pm 1.716 \mu\text{g/ml/90min}$ と高値であった。統計学的にはI群とII群の間には有意差を認めなかったが、I群とIII群、I群とIV群 ($p < 0.0001$)、II群とIII群 ($p < 0.0001$)、II群とIV群 ($p < 0.0001$)、III群とIV群 ($p = 0.0014$)に有意差を認めた。

3. アルブミン分泌能. I群:アルブミン分泌は7日間保持され、 $0.94 \sim 0.556 \mu\text{g/ml/24hr}$ であった。II群:アルブミン分泌は7日間保持され、 $0.509 \sim 1.601 \mu\text{g/ml/24hr}$ であった。III群:コラーゲンゲル積層によりアルブミン分泌は減少したが、14日目まで持続した。IV群:III群と同様の結果を得た。統計学的には各群間に有意差を認めなかった。

4. 考 察

最近、Miyabeらはブタ肝細胞を利用した人工肝を短期間使用後、肝移植を行ったケースを報告しており、人工肝は現実性を帯びたものとなってきている。しかし、この報告では全例6~7時間の使用にとどまり、人工肝はそれだけで肝不全を治療できるほどの能力は現時点では持ち合わせていない。従って、さらに強力に肝機能を補助できる人工肝への期待はむしろ高まっていると思われる。

そこで従来より第一外科で開発してきた積層型人工肝の機能を増強する試みとして、混合培養とコラーゲンゲル積層による新しい培養形態を検討した。混合培養単独では非実質細胞の脱落により肝細胞単独と差がなかった。しかし、ここにコラーゲンゲルを積層することにより非実質細胞が14日間維持され、他の実験群に対していずれも顕著な有意差を認めた。

非実質細胞は肝細胞増殖因子など様々なサイトカインを分泌していることが判明してきており、培養肝細胞の増殖に影響を及ぼしていると推察され、今回の研究では、安定した培養状態では肝細胞機能の増強にも効果が期待できると思われた。また、アルブミン分泌能がコラーゲンゲル積層群でやや低い傾向にあったことは、コラーゲンゲルの網目状構造にアルブミン分子が捕らえられている可能性が強く、今後コラーゲンゲルの厚さについても検討を要すると思われた。

5. 結 語

混合培養とコラーゲンゲル積層を組み合わせた培養形態は肝細胞の機能を著しく高め、積層型人工肝への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Function of culturing monolayer hepatocytes by collagen gel coating and co-culture with nonparenchymal cells

(コラーゲンゲル積層と混合培養による単層培養肝細胞の機能)

各種肝補助療法の進歩にもかかわらず、劇症肝炎・慢性肝炎の急性増悪・術後の肝不全の救命率は低く、人工肝の開発が待たれている。人工肝には種々のものが開発されているが、未だ臨床的に有用なものはない。多くの機能を持つ肝の代行をさせるには肝細胞を用いる他に方法はなく、最近ではハイブリッド型人工肝の研究が多く行われている。人工肝の臨床応用には解決しなければならない多くの問題点があり、その一つとして、人工肝の機能を増強し維持することがある。そこで申請者は細胞培養で有効とされている混合培養とコラーゲンゲルを組み合わせた、肝非実質細胞と肝細胞との混合培養した上にコラーゲンゲルを積層するという新しい培養形態を考案してその有用性を検討した。

Wistar系雄性ラットの肝細胞を用い、肝実質細胞と非実質細胞を分離精製し実験群を次の4群に分けて検討した。I群：コラーゲンコート上に肝実質細胞を単層培養、II群：コラーゲンコート上に肝実質細胞と非実質細胞を混合培養、III群：I群の肝実質細胞上にさらにコラーゲン溶液を積層しゲル化させる、IV群：II群の混合培養上にさらにコラーゲン溶液を積層しゲル化させる（各群n=7）。また、実験で使用された非実質細胞は、第Ⅵ因子抗体を用いた免疫染色とアセチル化LDLを用いた蛍光染色から、類洞内皮細胞が95～98%を占めていた。

検討項目としては位相差顕微鏡での肝実質細胞および非実質細胞の形態観察、培養開始後1、2、3、5、7、14日に尿素合成能と分泌アルブミンの測定を行った。

その結果、位相差顕微鏡所見では、I群は培養3日以降急速に肝実質細胞が脱落していった。II群では非実質細胞は培養2日以降細胞が脱落し、培養3日以降肝実質細胞も脱落し、I群、II群共に培養5日以降ほとんど接着細胞を認めなかった。これに対して、III群、IV群は良好な形態を14日間にわたって維持した。尿素合成能ではI群、II群に比べてIII群、IV群は非常に高い機能を示し、とくにIV群は他の全ての群に対して統計学的に有意に高い機能を示した（I群、II群に対しては $p<0.0001$ 、III群に対しては $p=0.0014$ ）。また、IV群では培養14日でもかなり高い尿素合成能を示しており、肝実質細胞機能が長期間維持された。アルブミン分泌能では混合培養群は肝実質細胞培養群に比べてアルブミン分泌能が高い傾向に

あったが、有意差はなかった。コラーゲンゲルを積層することによりアルブミン分泌は低下していた。これは、アルブミンがコラーゲンゲルの内部に捕らえられている可能性が高く、コラーゲンゲルの厚さについて検討を要すると思われた。

混合培養とコラーゲンゲル積層を組み合わせた培養形態は肝細胞の機能を著明に高め、積層型人工肝への応用が期待された。

審査に当たって、安田教授よりコラーゲンゲルが肝細胞機能を改善する理由について質問があった。これに対して申請者はコラーゲンゲルが細胞分化を誘導することと、コラーゲンゲルにより肝細胞が立体的構造を保ち生体内の条件に近くなることが理由と解答した。さらに、ホローファイバー型人工肝についての質問もされたが、作成が簡便で均一なものができ、装置のスケールアップが容易であることなど積層型人工肝の利点を述べ、おおむね妥当に答えた。ついで、加藤教授より混合培養によりアルブミン分泌能が亢進する理由について質問があった。申請者は類洞内皮細胞がHGFなどのサイトカインを分泌していることを理由として上げた。さらに、小山教授よりコラーゲンゲル積層時の冷却による細胞の障害について質問があった。これに対し申請者は軽度の障害はあると思われるが、肝細胞の形態的、機能的推移からみて大きな障害とは思われないと述べた。また、コラーゲンゲルの種類による作用の違いについても質問がなされたが、申請者は以前からI型コラーゲンを使用しており、実験の経緯からI型コラーゲンを使用しているが、IV型コラーゲンを使用するとさらに機能が改善する可能性はあるが、極めて高価であり、まだ検討していることが述べられ、おおむね妥当な回答を行った。

この混合培養とコラーゲンゲル積層の組み合わせにより人工肝としての機能が著明に向上し、しかもこれが長期間にわたって維持されることから臨床応用が期待されるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。