

学 位 論 文 題 名

Optimal Oxygen Tension Conditions for Functioning  
Cultured Hepatocytes in Vitro

(初代培養肝細胞の機能発現に対する酸素環境の影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

Ⅰ. 目 的

急性肝不全に対する血漿交換・吸着療法等は、治療成績向上に寄与している。しかし、これらの方法は多岐にわたる肝臓機能をすべて代償するものではなく、満足できるものではない。唯一肝移植に確実な効果を期待できるが、社会的背景の整わない本邦では脳死肝移植は不可能な現状であり、また欧米でもドナー不足が深刻な問題となっている。そこで近年培養肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝の開発が進んでいる。人工肝が臨床応用されるためにはシステムの機能向上が最重要課題である。従来より肝細胞は酸素依存性と言われているが、初代培養肝細胞を用いる際の至適酸素環境についての詳細な検討はない。より機能的なハイブリッド型人工肝の完成を目指し、酸素環境が培養肝細胞機能に与える影響について検討した。

Ⅱ. 方 法

1. ラット肝細胞の分離・精製

6～8週齢のWistar系雄性ラットよりコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離、10%ウシ胎児血清を含むWilliams'E培地に分散し、コラーゲンコートした35mmプラスチックディッシュに $2 \times 10^5$  cells/0.2ml/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種した。37℃、20%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>の条件下に2時間培養し、肝細胞がディッシュに接着後、7 ng/mlヒト上皮性増殖因子を含む無血清培地に交換し、以下の実験群を設定した。

2. 実験群

I群：5%O<sub>2</sub>群(n=8)、II群：10%O<sub>2</sub>群(n=8)、III群：20%O<sub>2</sub>群(対照群、n=12)、IV群：50%O<sub>2</sub>群(n=8)、V群：90%O<sub>2</sub>群(n=8)。

各酸素相はO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>マルチインキュベーターにて制御し、他の条件は37℃、5%CO<sub>2</sub>で同一とした。1日目、3日目に上記の無血清Williams'E培地を交換し、5日間培養を継続した。

3. 検討項目

1) 位相差顕微鏡下に経時的に形態学的検討を行った。2) 接着細胞数の指標として肝細胞内DNA量をジアミノインドールを用いた蛍光法により測定した。3) 肝細胞代謝能として糖新生能および尿素合成能はグルコースオキシダーゼ・パーオキシダーゼ法、ジアセチ

ルモノオキシム法で測定した。4) エネルギーレベルの指標としての肝細胞内ATP量はバイオルミネッセンスアッセイで測定した。5) 酸素障害の指標としての肝細胞過酸化脂質はTBA(thiobarbituric acid)法で測定した。6) 細胞障害の指標としてLDH逸脱量をジホルマザン比色定量法により測定した。

### III. 結 果

1) 位相差顕微鏡像 II~IV群では、肝細胞は培養開始後24時間以内に飽和密度の単層を形成し5日間維持したが、I群では多くの細胞が死滅・脱落し、遺残した肝細胞は伸展せず細胞形態は不明瞭であった。V群では細胞の空胞状変性が著明であった。2) 肝細胞内DNA量 DNA量はすべての群で経過とともに減少したが、特にI群は培養1日目から有意に低値であった。3) 糖新生能・尿素合成能 糖新生能はII~IV群では差異はみられなかったが、V群では低下しており、I群では培養期間を通じほとんど認められなかった。尿素合成能はII~IV群では2日目にピークを持ち、同様の傾向を示したが、V群、I群はともに有意に低下しており、特にV群では2日目より急激に低下した。4) 肝細胞内ATP量 ATP量は低酸素群(I、II)においては低値であったが、高酸素群(IV、V)では終始高値にはならず、むしろV群においては2日目以降急激に低下した。5) 肝細胞過酸化脂質 脂質過酸化は酸素濃度按比例し高度となり、特にV、I群ではそれぞれ有意に高値、低値を示した。6) LDH逸脱量 培養開始後2時間ではII群で有意に抑制されたが、24時間後ではIII群が最も低く、低酸素、高酸素になるに従い上昇し、I群、V群では有意に高値であった。

### IV. 考 察

哺乳動物にとって酸素は細胞の活動性を維持するためには必須のエネルギー源である。一方、近年活性酸素種による細胞障害が明らかにされ、酸素毒性が注目されている。今回の研究では5~90%の酸素濃度下での培養肝細胞機能を評価した。

5%の低酸素相下では、培養初期より細胞形態が維持できず、肝細胞独自の代謝能が発現されなかった。これは、低いATPレベルに起因すると考えられた。特に肝細胞の分離段階で加わった物理的・化学的障害から回復するに足るエネルギー供給の不足が肝細胞の機能の発現・維持を不可ならしめた主因と思われた。また90%酸素相下では、過剰な酸素がエネルギーレベルの向上には寄与せず、過酸化脂質量に示される酸素障害が細胞に蓄積され、培養半ばより急激な機能低下を来すと考えられた。

以上の結果から、10~50%の酸素濃度が培養肝細胞機能を発現するうえで適切な酸素環境といえる。なかでも20%の通常の空気相に近い酸素濃度が酸素のmeritを生かし、demeritを抑制し、最も機能を良好に発現できる至適環境と判断された。

in vivoで肝臓は肝動脈と門脈からの血液供給を受ける。肝動脈の酸素分圧が約95 mmHg、門脈のそれが約50 mmHgであり、その血流比から肝内の酸素分圧は約60 mmHgである。一方、in vitroでの至適酸素環境を理論上計算すると、培地中の分圧値は約150 mmHgとなる。この差異の理由は、血液中には溶存酸素以外にヘモグロビンと結合した形態で酸素が含まれており、実際には分圧値以上の供給能が潜在していること、静置培養では培地表面での接触により酸素がとりこまれ、培地中に酸素の濃度勾配が生じ、実際に肝細胞と接する培地中の分圧は理論値よりも低い可能性があることで説明される。このことより、酸素供給法、培養方法により至適酸素環境は異なることが予想される。

### V. 結 語

酸素環境が初代培養肝細胞の機能発現に与える影響について検討し、以下の結論を得た。

1. 通常の大気相に近い20%の酸素濃度が、培養肝細胞機能を最も効率的に発現する至適酸素環境であると考えられた。

2. 人工肝装置としての灌流培養システムを開発する場合の酸素供給法は、細胞密度・灌流量・灌流速度などを考慮に入れて決定することが肝要と考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 内 野 純 一

## 学 位 論 文 題 名

### Optimal Oxygen Tension Conditions for Functioning Cultured Hepatocytes in Vitro

(初代培養肝細胞の機能発現に対する酸素環境の影響に関する研究)

従来より肝細胞は酸素依存性といわれているが、ハイブリッド型人工肝のバイオリアクターとして培養肝細胞を用いる際の酸素環境についての詳細な検討はない。より機能的なハイブリッド型人工肝の完成を目指し、酸素環境が培養肝細胞機能に与える影響について検討した論文であった。

研究方法はまずコラゲナーゼ灌流法により分離したラット肝細胞を用い、5%、10%、20%、50%、90%の各酸素相下に5日間培養し、以下の項目につき検討した。①位相差顕微鏡像、②肝細胞内DNA量、③糖新生能、④尿素合成能、⑤ATPレベル、⑥脂質過酸化、⑦LDH逸脱量。

10～50%酸素下に培養することで肝細胞は良好に機能し、なかでも20%の通常の空気相に近い酸素濃度は細胞障害を最も抑制した至適酸素環境であることが判明した。5%の低酸素濃度ではエネルギーレベルの低下により、また90%の高酸素濃度では酸素障害が高度で、培養肝細胞機能は不良であった。

Miyazakiらは10%酸素濃度下で培養肝細胞の生存率が最も良好であると報告した。またMillerらはハイブリッドマ細胞は低酸素下で最も増殖能を示したが、抗体産生に関してはより高い酸素濃度下で良好であったと報告した。Hochachkaは低酸素は細胞の活動性を低下させることで生存を維持するとした。これらの報告から肝細胞の維持には低酸素が適しているが、効率的に機能するには通常の空気相が至適であると推察された。

in vivoでは肝内の酸素分圧は約60 mmHgに対し、今回のin vitroでの至適酸素環境下の培地中の酸素分圧は約150 mmHgであった。この差異の原因として、生体中では溶存した酸素以外にヘモグロビンと結合した形態で酸素がふくまれており実際には分圧値以上の酸素供給能が潜在していること、さらに酸素化された血液が循環していること、また静置培養では培地表面から酸素が取り込まれ、培地中に酸素勾配が生じ、実際に肝細胞と接する培地の酸素分圧は理論値よりも低い可能性があることなどがあげられる。

以上より、酸素環境が培養肝細胞機能に与える影響について検討し、静置培養においては通常の空気相に近い20%の酸素濃度が培養肝細胞が最も効率的に機能する至適酸素環境であることが判明した。しかしながら、人工肝装置としての灌流システムにおいては、

細胞密度・灌流量・灌流速度などを考慮に入れて酸素環境を設定することが肝要であると結ばれた。

以上の発表に対して、主査から、LDH逸脱量の結果から90%の高酸素濃度下での培養は5%の低酸素下よりも良好であるかと質問したが、申請者は酸素障害が高度となる24時間ないし48時間までは高酸素下で培養したほうが低酸素下よりも良好であったと解答した。また90%における糖新成能と尿素合成能の解離を指摘されたが、その理由については今後の検討課題とされた。副査の安田教授より細胞の種類によって至適酸素環境が異なるかとの質問があったが、申請者は心筋細胞やfibroblastomaは低酸素下で増殖能が高く、一方ある種の神経細胞は高酸素下で増殖が盛んであると解答した。また、90%の高酸素下で肝細胞機能が急激に低下した原因についての質問には、高酸素に48時間暴露されることにより過酸化脂質が蓄積され、急激な機能低下をきたしたものと推察されたと解答された。副査の小山教授より肝細胞の脂肪酸構成についての質問があった。申請者は心筋等に比べ肝は飽和脂肪酸の割合が高く、高酸素環境には比較的耐性をもつものと推察されたと解答した。またscavenger等の効果についての質問に対し、申請者は $\alpha$ -tocopherolを培地中に加えた実験結果から、 $\alpha$ -tocopherolは酸素障害を軽減し肝細胞機能を高めたが、 $\alpha$ -tocopherolを添加しても20%の酸素濃度が最良であったと解答した。申請者の解答は明瞭でおおむね妥当なものであった。

申請者の研究内容はハイブリッド型人工肝システムの酸素環境を設定する際の基礎的なデータであり、システムの機能向上に結びつくものと期待された。

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定した。