遺伝子組換えによるハイブリッド型人工肝に適したアンモニア除去細胞構築の試み[†]

大政健史^{1††}・浦山重雄¹・山中 貢¹・谷村奈緒子¹・片倉啓雄¹
岸本通雅¹・菅 健一¹・絵野澤伸²・雨宮 浩²

¹大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻, 565-0871 吹田市山田丘 2-1

²国立小児病院小児医療研究センター実験外科部, 154-0004 世田谷区太子堂 3-35-31

ハイブリッド人工肝に適した人工肝細胞の構築を目的として、遺伝子組換えにより動物細胞株にアンモニア除去能を付与することを試みた。組込み遺伝子として、1段階反応でアンモニアを除去可能で、遺伝子増幅現象を引き起こすグルタミン合成酵素遺伝子を選択した。SV40 プロモーターを接続したグルタミン合成酵素遺伝子を組込んだ pSV2-GS ベクターを構築し、Chinese Hamster Ovary 細胞に遺伝子導入した。得られた組換え細胞株をグルタミン合成酵素の阻害剤 Methionine Sulfoximine (MSX) の存在下にて選択を行ない、グルタミン合成酵素活性の上昇した細胞株 (800 μ M MSX 耐性株) を取得した。さらに、得られた細胞株のアンモニア除去特性を検討した結果、0, 1, 2 mM いずれのアンモニア添加条件下においても培養中期(増殖期)にアンモニア消費がおり、そのアンモニア比消費速度の値は人工肝に汎用されている初代肝細胞の約 1/5 の値となった。

緒 言

肝臓は体内最大の器官であり、日本の成人男子においては重量 1,000~1,300 g で体重のおよそ 1/50 を占めている。その機能は、糖質、蛋白質、薬物の代謝、内因性および外因性物質の解毒、血液凝固因子の生成および造血等、様々であり、「人体の化学工場」ともいべき重要な代謝臓器である (Miyazaki, 1991; Nagaki and Muto, 1994; Oda *et al.*, 1977)。この肝臓の重篤な機能障害である劇症肝炎は、依然原因不明な点が多く、治癒率の低い症状の一つに挙げられている。劇症肝炎の治療には、対処療法としての血漿交換、グルカゴン-インスリン療法、特殊組成アミノ酸投与などが行われているが、必ずしも満足すべき成績は得られていない (Komata 1996)。また、唯一の根治治療法である肝移植も、現時点ではドナーの供給に限界がある、さらに移植後には長期間の免疫療法が必要である、などの幾つかの問題点がある (Nagaki and Muto, 1994; Ronza and Demetriou, 1995)。一方、肝臓は旺盛な肝機能回復力を有し、ある程度の肝機能障害が生じて、適当な期間の後には、正常な肝機能を回復することが知られている (Nagaki and Muto, 1994)。そこで、この回復するまでの期間の治療法、また、肝移植までの架け橋の治療法として、人工肝補助システム (Bioartificial liver support system) が注目されている (Komata 1996; Yoshida and Sakai, 1993)。しかし、複雑な肝機能を人工物のみで代替させることは困難であり、現在では一部、細胞 (生物的材料) の機能を利用し、人工装置 (物理的材料) とを組み合わせたハイブリッド型の人工肝補助システム (Matsushita *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1994) の開発がさかんに行われている。

現在までに研究されているハイブリッド型人工肝補助システムにおける生物的材料として、ブタやラットの異種動物由来初代肝細胞 (Ronza *et al.*, 1994; Nyberg *et al.*, 1993)、またはヒト肝ガン細胞から株化した細胞 (Sussuman and Killy, 1993) 等が用いられている。しかし、初代肝細胞を用いるには、その細胞の準備、調製の問題があり、肝ガン細胞を用いる際には、同種細胞を用い

ることからの転移の可能性がある。また、株化した段階ですでに分化された肝機能の幾つかは脱落しており (Enosawa *et al.*, 1996)、さらに長期培養するにつれても脱落していくということが指摘されている。そこで、本研究では、培養が容易で、調製が簡単である動物培養細胞に、肝機能を有する遺伝子を導入することにより、ハイブリッド型人工肝臓に適した人工肝細胞の構築を試みた。具体的には、増殖能が高く、工業生産等に汎用されており (Cokett *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1990)、バイオ人工肝臓の実績 (Iwata *et al.*, 1993) もある Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を宿主として選択した。肝臓は様々な機能をもつが、ここでは、肝機能として、解毒機能の一つであるアンモニア除去活性に注目した。アンモニアは、劇症肝炎で最も危険とされる肝性脳症の原因物質の一つとして考えられており、その除去には、透析あるいは血漿交換を主流とした方法が行われている。しかし、これらの方法では、除去される物質の選択性について分子サイズ以外の調整はできておらず、血流中の有用物質も同時に除去される危険性がある (Enosawa *et al.*, 1996)。また、アンモニアの選択的除去には、酵素反応を用いた方法が試みられている (Enosawa *et al.*, 1996) が、この方法では、細胞を用いた場合と異なり、反応に基質や金属イオンの添加が必要となる。そこで、本研究では、アンモニアの選択的除去能を持つ細胞の構築を目的として、遺伝子組換えにより、CHO 細胞にアンモニア除去能を付与することを試みた。実際の肝臓におけるアンモニアの除去は、尿素サイクルが主として用いられている。しかし、尿素サイクルは、5種類の酵素系から成り立つサイクル反応であり、これらすべての酵素を遺伝子組換えで細胞に組込むことは容易ではない。そこで、グルタミン合成酵素 (Glutamine Synthetase; GS) をアンモニア代謝反応として選択した。グルタミン合成酵素は、グルタミン酸とアンモニアから細胞の構成成分やエネルギー源として重要なグルタミンを合成する酵素である。また、CHO 細胞中では、グルタミン合成酵素遺伝子は、グルタミン合成酵素の阻害剤 Methionine Sulfoximine (MSX) の存在下にて選択を行なうことにより、そのコピー数が増大する、という遺伝子増幅現象が知られている (Cokett *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1990)。そこで、この遺伝子増幅現象を利用して、アンモニア除去活性を持つ細胞の構築を試みた。

[†] 1997 年 3 月 31 日受理

^{††} omasa @ bec. bio. eng. osaka-u. ac. jp

Fig. 1 Stepwise selection in glutamine synthetase gene amplification system

1. 実験

1.1 実験材料

遺伝子組換えの宿主として、理化学研究所細胞バンクより入手した CHO-K1 株 (RCB 0285) を用いた。また、グルタミン合成酵素遺伝子として、ラット腎臓由来のグルタミン合成酵素遺伝子 (pGSRK-1, ATCC 63067) を用いた。また、培地として、グルコースおよびグルタミンを含んでいない RDF (HO) 培地 (Omasa *et al.*, 1992) に、グルコースを 2.58 g l^{-1} 、グルタミン酸を 0.366 g l^{-1} 、牛胎児透析血清を 10% (v/v) 添加したものを用いた。また、アンモニアは実験条件にあわせて適宜添加した。

1.2 細胞への遺伝子導入と細胞株構築

グルタミン合成酵素遺伝子導入は以下の様な手順で行った。まず、ラット腎臓由来の pGSRK-1 より、グルタミン合成酵素遺伝子を切り出した。次に、pSV 2-dhfr (ATCC 37146) より、dhfr 遺伝子を除去し、この部分に、グルタミン合成酵素遺伝子を挿入して、グルタミン合成酵素発現ベクター pSV 2-GS を構築した。構築した pSV 2-GS を、エレクトロポレーション法を用いて、CHO-K1 株に導入した。遺伝子導入した CHO 細胞を、適宜、MSX を添加した培地にて培養を行ない、MSX 濃度を段階的に上昇させることによって、遺伝子増幅を起させた。

1.3 培養方法および分析方法

様々なアンモニア添加濃度条件における遺伝子組換え CHO 細胞培養は、細胞培養用 T-フラスコ (底面積 225 cm^2 、培養液量 90 ml) を用いて行った。細胞濃度の経時変化は、サンプリング時間毎に顕微鏡写真を撮り、写真上の細胞数を測定し、細胞濃度を算出した。アンモニア、グルタミン酸、グルタミン濃度の測定は、酵素法 (ペーリンガー・マンハイム F キット) を用いて測定した (Omasa *et al.*, 1992)。グルコース濃度は、グルコースアナライザーを用いて測定した (Omasa *et al.*, 1992)。また、アミノ酸濃度は、Phenyl Isothiocyanate (PITC) によってアミノ酸を標識し、高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析システム (Waters PICO-TAG) を用いて測定した。グルタミン合成酵素活性は、細胞より粗酵素液を抽出し、Kingdon らの方法 (Kingdon *et*

al., 1968) に準じて、グルタミン合成酵素による ATP 消費反応を Pyruvate kinase, Lactate dehydrogenase を介して、NADH 340 nm 吸光の減少速度に置き換え、340 nm の吸光度を用いて測定した。なお、活性測定の際には基質 (L-グルタミン) を含まない場合との減少速度の差よりグルタミン合成酵素活性を算出した。また、比速度は、各濃度の経時変化より、サンプリングによる培地量の減少を補正して、積分法を用いて 95% 信頼限界と共に算出した (Omasa *et al.*, 1992)。また、各濃度測定における分散係数は 5% 以下であり、アンモニア濃度測定に関しては 1% 以下であった。

2 結果と考察

2.1 高 MSX 耐性株の取得

グルタミン合成酵素遺伝子を組込んだ細胞をグルタミン合成酵素の阻害剤 MSX の存在下にて培養したとき、グルタミン合成酵素のコピー数が CHO 細胞の染色体中で増大するという遺伝子増幅現象が知られている。この現象を利用し、グルタミン合成酵素と目的遺伝子を同時に組込んだベクターを構築し、これを CHO 細胞に組込み、MSX 存在下にて培養を行い、コピー数が数十倍に増幅した高生産性株を取得することができる (Cokett *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1990)。遺伝子増幅現象は、細胞分裂時に起こる事が知られている。すなわち、高生産性株取得のためには、細胞が増殖可能かつ遺伝子増幅されていない細胞は増殖できない MSX 濃度条件を設定し、この MSX 濃度を徐々に増加させ、遺伝子増幅させる必要がある。

しかし、遺伝子増幅された細胞を得るための適切な MSX 上昇方法については、未だ確立されてはいない。そこで、グルタミン合成酵素遺伝子を組込んだ CHO 細胞を様々な MSX 濃度の培地に接種し、段階的に培地中の MSX 濃度を上昇させて順化することにより、高 MSX 濃度耐性株の取得を試みた。

まず、Fig. 1 に示される様な、25 μM から 3200 μM まで、14 種類の上昇パターンにて MSX 濃度を増加させ、MSX 耐性細胞株を取得した。この様々な上昇パターンで MSX 耐性を獲得した細胞株について、耐性獲得日数 (confluent な状態 (細胞が接着面を全て覆い尽くす状態) になるまで増殖するのにかかった日数) と、耐

Fig. 2 Days required for selection under several MSX concentrations in the glutamine synthetase gene amplification system

Fig. 3 The comparison of days required for selection under various in MSX condition between series (a) (○) and (k) (●)

性 MSX 濃度の関係について検討した。

Fig. 2 に、耐性 MSX 濃度と耐性を獲得するまでの日数との関係を示す。この図からわかるように、耐性 MSX 濃度が上昇するに伴って、耐性を獲得するまでの日数も増加したが、同じ濃度の MSX に対する耐性を獲得するのに必要な日数は、MSX 上昇パターンによって異なることがわかった。さらに、段階数と、耐性取得までにかかった日数を Fig. 1 に示す系列(a)と(k)について比較したのが、Fig. 3 である。ここでは、MSX 濃度を 2 倍毎に上昇させた場合(系列(a))と、4 倍毎に上昇させた場合(系列(k))の 2 通りを比較している。この図に示される様に、MSX 濃度を 4 倍毎に急激に上昇させた場合には、2 倍毎に上昇させた場合に比較してより少ない日数で同じ耐性 MSX 濃度に達することができた。以上の結果より、急激に MSX 濃度を上昇させた場合が、より少ない日数で、MSX 耐性株を取得できることが示された。

2.2 耐性 MSX 濃度とグルタミン合成酵素活性

さて、得られた高濃度 MSX 耐性株においては、膜透過変異などグルタミン合成酵素遺伝子増幅以外の機構で MSX 耐性を獲得している可能性もある。そこで、得られた MSX 耐性細胞株の細胞内グルタミン合成酵素活性を測定し、実際の細胞内におけるグルタミン合成酵素活性上昇について検討した(Table 1)。測定したすべての MSX 耐性株において、グルタミン合成酵素活性が上昇し、800 μ M 以上の MSX 濃度耐性株については、25 μ M 耐性株の約 6

Table 3 Glutamine synthetase activity in MSX tolerable cell lines

Cell line	Glutamine Synthetase Activity ($\times 10^{-12}$ units cell $^{-1}$)
CHO-K1	0.03
25 μ M MSX tolerable cell line	0.35
Series i. 800 μ M MSX tolerable cell line	2.1
Series j. 1200 μ M MSX tolerable cell line	2.2
Series k. 1600 μ M MSX tolerable cell line	1.8

Fig. 4 The relationship between the tolerable MSX concentration and the change of ammonia concentration in the medium during 84 h cultivation

倍、CHO-K1 株の約 70 倍の細胞あたり活性を示した。さらに、800 μ M から 1600 μ M の細胞株については、そのグルタミン合成酵素活性にはあまり違いは見られず、阻害剤の耐性濃度に差があっても、グルタミン合成酵素活性に差があるとは限らない、すなわち、グルタミン合成酵素遺伝子増幅以外の機構で耐性を獲得している可能性があることが考えられた。

2.3 MSX 耐性株の増殖特性とアンモニア除去

得られた MSX 耐性細胞株のグルタミン合成酵素活性は、*in vitro* にて測定したものであり、実際のアンモニア消費と比例するとは限らない。そこで、得られた MSX 耐性細胞株より、アンモニア除去可能な細胞株を選択するために、初発アンモニア濃度 2 mM の培地中にて、培養 86 時間後におけるアンモニア濃度の変化を測定した。耐性 MSX 濃度と、アンモニア濃度変化(最終アンモニア濃度-初発アンモニア濃度)の関係を Fig. 4 に示す。その結果、MSX 濃度の上昇に伴い、アンモニアを減少させることのできる細胞が得られ、最もアンモニア濃度を減少させることのできた細胞株は 800 μ M MSX 耐性株(系列(i))であった。そこで、この細胞株を用いて、様々な初発アンモニア濃度条件下におけるアンモニア除去について検討した。

初発アンモニア添加濃度を、0, 1, 2 mM に変化させた 109 時間の培養(MSX 非存在下)を行ない、培養中の細胞濃度、アンモニア濃度、グルタミン酸濃度、グルタミン濃度、グルコース濃度の経時変化について測定した。またアンモニア添加濃度 2 mM の培養においては、培養開始後 48 時間目に、新鮮培地に培地を交換した培養も行った。Fig. 5 に、細胞濃度、グルタミン酸濃度、グルタミン濃度、グルコース濃度の経時変化を、Fig. 6 に、アンモニア濃度の経時変化を示す。

この図に示される様に、いずれの初発アンモニア濃度条件下においても、まず、培養初期の段階においてはアンモニア濃度の上昇がみられた。しかし、細胞の増殖する培養中期においてアンモ

Table 2 The kinetic parameters of 800 μ M MSX tolerable cell line under various added ammonia concentrations.

		Run 1	Run 2	Run 3	Run 4
Specific growth rate	[h ⁻¹]	0.017 $\pm$ 0.0018	0.020 $\pm$ 0.0044	0.016 $\pm$ 0.0018	0.018 $\pm$ 0.0011
Specific ammonia consumption rate	[$\times 10^{-13}$ mol cell ⁻¹ h ⁻¹]	0.057 $\pm$ 0.012	0.18 $\pm$ 0.037	0.22 $\pm$ 0.072	0.22 $\pm$ 0.095
Specific glutamate consumption rate	[$\times 10^{-13}$ mol cell ⁻¹ h ⁻¹]	0.29 $\pm$ 0.0091	0.33 $\pm$ 0.052	0.37 $\pm$ 0.052	0.39 $\pm$ 0.12
Specific glutamine production rate	[$\times 10^{-13}$ mol cell ⁻¹ h ⁻¹]	0.064 $\pm$ 0.028	0.14 $\pm$ 0.051	0.20 $\pm$ 0.025	0.18 $\pm$ 0.020
Glutamine synthetase activity	[$\times 10^{-12}$ units cell ⁻¹]	2.85	2.14	ND	3.11

Run 1 without ammonia addition

Run 2 1 mM ammonia addition

Run 3 2 mM ammonia addition

Run 4 After 48 h cultivation, the medium was exchanged to 2 mM ammonia added medium

ND Not determined

Fig. 5 The time courses of 800 μ M MSX tolerable cell line under various ammonia concentrationsRun 1 without ammonia addition ($\circ$)Run 2 1 mM ammonia addition (Δ)Run 3 2 mM ammonia addition ($\square$)Run 4 After 48 h cultivation, the medium was exchanged to 2 mM ammonia added medium ($\diamond$)

ニア濃度は減少し、さらに培養後半の細胞増殖が低下した時点においては、再びアンモニア濃度は上昇した。また、この培養を通じてグルコースおよびグルタミン酸消費、グルタミン生成が見られた。また、培養途中 48 時間目に新鮮培地に交換した培養においても、アンモニアの消費は持続し、その消費パターンは、培地交換を行わないものとほぼ同じであった。

培養中期(アンモニア消費期)における各比速度を実験結果から算出した。その結果を、Table 2 に示す。ここでは、各培養における比増殖速度、アンモニア比消費速度、グルタミン酸比消費速度、グルタミン比生産速度、および、グルタミン合成酵素活性を示している。いずれの添加アンモニア濃度においても、アンモニア消費は起こっており、さらにアンモニア比消費速度は添加アンモニア濃度が低くなるに伴って低下した。また、培養中の各アミノ酸の濃度を測定したが、培養中枯渇したアミノ酸はみられなかった。

次に、構築した細胞を用いて、より実際の血液に近い血清中におけるアンモニア除去活性を検討した。初代肝細胞を用いたハイブリッド人工肝の場合には、血漿中で、安定に機能発現されない場合もあり、スフェロイドを形成させその機能を安定に発現することは重要な課題となっている (Sakai *et al.*, 1996)。そこで、こ

Fig. 6 The time courses of ammonia concentration in 800 μ M MSX tolerable cell line under various ammonia concentrationsRun 1 without ammonia addition ($\circ$)Run 2 1 mM ammonia addition (Δ)Run 3 2 mM ammonia addition ($\square$)Run 4 After 48 h cultivation, the medium was exchanged to 2 mM ammonia added medium ($\diamond$)

こで構築した CHO 細胞についても、血清中で安定に機能発現が可能かどうかについて検討した。培養中期において、培地を仔牛血清に交換し、培地交換後の血清中でのアンモニア消費の変化を測定した。その結果、培養途中で血清に交換した後も、アンモニア消費は持続し、血清培地中とほぼ同じ挙動を示した。血清中での培養における比増殖速度、アンモニア比消費速度、およびグルタミン合成酵素活性についての測定結果を Table 3 に示す。血清中でのアンモニア比消費速度、グルタミン合成酵素活性は、ともに培地中でのそれぞれの値と比較して大きな値となり、構築した細胞は血清中でもアンモニア除去能を持つことが示された。

以上の結果をまとめて、構築したグルタミン合成酵素組込み CHO 細胞と、初代肝細胞のアンモニア除去能を比較したのが、Table 4 である。遺伝子導入前の CHO-K1 細胞においては、アンモニア消費はみられず、逆にアンモニアを生成した。一方、遺伝子導入した CHO 株においては、アンモニア消費が見られ、そのアンモニア比消費速度は、初代肝細胞に比較して、約 1/5 の値であっ

Table 3 Kinetic parameters of 800 μ M MSX tolerable cell line in serum with 1 mM ammonia and 2.5 mM glutamate addition

Specific growth rate	[h ⁻¹]	0.026 $\pm$ 0.0059
Specific ammonia consumption rate	[$\times 10^{-13}$ mol cell ⁻¹ h ⁻¹]	0.31 $\pm$ 0.00035
Glutamine synthetase activity	[$\times 10^{-12}$ units cell ⁻¹]	4.3

Table 4 The comparison of specific ammonia consumption rates between primary hepatocyte and recombinant CHO cell lines

	Initial ammonia concentration [mM]	Specific ammonia consumption rate [$\times 10^{-13}$ mol cell ⁻¹ h ⁻¹]
800 μ M MSX tolerable cell line	2	0.22 $\pm$ 0.072
	1	0.18 $\pm$ 0.037
	0.2	0.057 $\pm$ 0.012
	1.8 (serum)	0.31 $\pm$ 0.00035
CHO-K1	0.2	-0.85 $\pm$ 1.0
Primary hepatocyte*	1	1.0

* Primary hepatocyte in PUF/Spheroid culture system (Ijima *et al.*, 1993)

た。

最後に、得られたアンモニア比消費速度の値を用いて、アンモニアの選択的除去を行うハイブリッド型人工肝補助システム構築の可能性について検討した。まず、人工肝に必要なとされるアンモニア処理として、肝疾患の患者中のアンモニア濃度 0.1 mM (170 μ g dl⁻¹) を約 5 時間で、正常成人のアンモニア濃度 0.047 mM (80 mg dl⁻¹) まで低下させる場合を考える。今、体重 65 kg の患者についてその体重の 1/13 が血液量とし、さらにその 1/2 をしめる血漿 2.5 l 中のアンモニアを処理する場合、 2.6×10^{-5} mol h⁻¹ の処理速度が必要となる。ハイブリッド型人工肝モジュールの容積を 200 ml と仮定すると、モジュールの単位容積あたりの処理速度は、 1.3×10^{-4} mol l⁻¹ h⁻¹ である。そこで、構築した細胞のアンモニア比消費速度、 0.07×10^{-13} mol cell⁻¹ l⁻¹ (0.2 mM アンモニア添加条件下) より、モジュール内の細胞濃度を計算すると 1.9×10^{10} cells l⁻¹ の細胞濃度が必要とされる。ここで用いた T-フラスコ培養法では、細胞濃度は 5×10^8 cells l⁻¹ 程度しか達成されていないが、高密度培養でよく用いられているホロファイバー培養法においては、約 5×10^{10} cells l⁻¹ の高細胞濃度が達成されており (Omasa *et al.*, 1995)、高細胞密度モジュールを作成すれば、現在の比消費速度でも十分にアンモニア処理は可能であると考えられる。また、このアンモニア消費能は、培養中期 (増殖期) において発現されている。従って、実際にアンモニア処理細胞として構築した細胞株を用いる際には、適切なアンモニア処理期 (培養中期) の細胞を調製し、これを用いて、人工肝モジュールを作成する必要があると考えられる。さらに、増幅した遺伝子は、MSX 存在下では安定に保たれるものの、MSX を添加しない状態で長期間培養を行うと、その機能は脱落してくる。他の遺伝子増幅系 (CHO 細胞におけるジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子増幅系) では、阻害剤抜き 20 日程度の培養で約 30% 程度の機能低下が見られており (Omasa *et al.*, 1996)、より長期の利用における細胞の機能維持も今後の課題である。

結 言

ハイブリッド人工肝に適した人工肝細胞の構築を目的として、遺伝子組換えにより、グルタミン合成酵素を組込んだアンモニア処理 CHO 細胞株を構築した。得られた細胞株をグルタミン合成酵素の阻害剤 Methionine Sulfoximine の存在下にて選択を行ない、グルタミン合成酵素活性の上昇した細胞株 (800 μ M MSX 耐性株) を取得した。さらに、得られた細胞株のアンモニア除去特性を検討した結果、0, 1, 2 mM いずれのアンモニア添加条件下においても培養中期 (増殖期) において、アンモニア消費がおり、そのアンモニア比消費速度の値は人工肝細胞によく用いられている初代肝細胞の約 1/5 の値となった。この細胞を用いてアンモニア処理を行うためには、 1.9×10^{10} cell l⁻¹ の高密度培養が達成されればよいことが示された。

Literature cited

- Cokett, M. I., C. R. Bebbington and G. T. Yarranton; "High Level Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in CHO Cells Using GS Gene Amplification," *BIO/TECHNOLOGY*, 8, 662-667 (1990)
- Davis, S. J., H. A. Ward, M. J. Puklavec, A. C. Willis, A. F. Williams and A. N. Barclay; "High Level Expression in CHO Cells of Soluble Forms of CD 4 T Lymphocyte Glycoprotein Including Glycosylation Variants," *J. Biol. Chem.*, 265, 10410-10418 (1990)
- Enosawa, S., S. Suzuki, T. Kakefuda, H. Amemiya, T. Omasa, K. Suga, N. Ito and K. Kuramochi; "Estimation of Ammonia Removal Activity of Glutamine Synthetase Immobilized Gel with the Aim of Selective Detoxification of a Blood Ammonia," *Jpn. J. Artif. Organs*, 25, 399-402 (1996)
- Ijima H., T. Matsushita and K. Funatsu; "Development of a Hybrid Type Artificial Liver using PUF/Spheroid Culture System of Adult Hepatocytes-Evaluation of Ammonia Metabolizing Activity-," *Jpn. J. Artif. Organs*, 22, 171-176 (1993)
- Iwata, H., N. Ogawa, J. Mizoguchi and T. Takagi; "Preparation of Insulin Releasing CHO Cells by Transfection of Human Insulin Gene and its Implantation into Diabetic Mice," *Jpn. J. Artif. Organs*, 22, 1172-1176 (1993)
- Kingdon H. S., J. S. Hubbard and E. R. Stadman; "Regulation of Glutamine Synthetase. XI. The Nature and Implication of a Lag Phase in the *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Reaction," *Biochemistry*, 7, 2136-2142 (1968)
- Komata, M.; Kanen Kankouhen Kangan, Yodosha, Tokyo, Japan (1996)
- Matsushita, T., H. Ijima, S. Wada, and K. Funatsu; "Estimation of the Performance of a PUF/Spheroid Packed-bed Type Artificial Liver by Using an Extracorporeal Circulation with hepatic failure rats," *Jpn. J. Artif. Organs*, 24, 815-820 (1995)
- Miyazaki, M., "Kanzou" Saibou To Baiosaiensu I, pp. 177-183, Asakurashoten, Tokyo, Japan (1991)
- Nagaki, M., and Y. Muto "Development of a Hybrid Bioartificial Liver," *Nihonrinsho*, 8, 247-252 (1994)
- Nyberg, S. T., R. A. Shatford, M. V. Peshwa, J. G. White, F. B. Cerra and W. S. Hu; "Evaluation of a Hepatocyteentrapment Hollow Fiber Bioreactor: A Potential Bioartificial Liver," *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 194-203 (1993)
- Oda, T., M. Yamanaka and T. Sakai; Soshiki To Kikan II, Iwanami-shoten, Tokyo, Japan (1977)
- Omasa T., M. Ishimoto, K. Higashiyama, S. Shioya and K. Suga; "The Enhancement of Specific Antibody Production Rate in Glucose- and Glutamine-controlled Fed-batch Culture," *Cytotechnology*, 8, 75-84 (1992)
- Omasa T., M. Kobayashi, T. Nishikawa, S. Shioya, K. Suga, S. Uemura, Y. Kitani, and Y. Imamura; "Enhancement of Antibody Produc-

- tion by Growth Factor Addition in Perfusion and Hollow-fiber Culture Systems," *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 673-680 (1995)
- Omasa T., S. Itami S., D. Kameoka, Y. Katakura and K. Suga ; "Selection and Stability for Recombinant CHO Cell Line Expressing human GM-CSF in Gene Amplification," In "Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects" vol. 9 K. Nagai and M. Wachi eds. (in press) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1998)
- Rozga, J., E. Morsiani, E. Morsiani, E. LePage, A. D. Moscioni, T. Giorgio and A. A. Demetriou ; "Isolated Hepatocytes in a Bioartificial Liver: A Single Group View and Experience," *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 645-653 (1994)
- Rozga, J. and A. A. Demetriou ; "Artificial Liver Evolution and Future Perspectives," *ASAIO Journal*, **41** 831-837 (1995)
- Sakai Y. and M.Suzuki "Functional Expressions by Hepatocyte Spheroids in collagen Gel in Hollow Fiber Modules," *Jpn. J. Artif. Organs*, **24**, 473-478 (1994).
- Sakai Y., K. Naruse, I. Nagashima, T. Muto and M.Suzuki "Functional Stability of Porcine Hepatocyte Spheroids in Various Culture Systems under 100% Porcine and Human Plasma Conditions," *Artif. Organs*, **20**, 56-60 (1996)
- Sussuman N. L. and J. H. Killy ; "Improved Liver Function Following Treatment with an Extracorporeal Liver Assistant Device," *Artif. Organs*, **17**, 27-30 (1993)
- Yoshida F. and K. Sakai ; Kagakukougaku To Jinkouzouki, Kyouritsusyuppan, Tokyo, Japan (1993)

Construction of Ammonia Metabolizing Cell Line for Artificial Hybrid Liver Support System Using Recombinant DNA Techniques

TAKESHI OMASA¹, SHIGEO URAYAMA¹, MITSUGU YAMANAKA¹,
NAOKO TANIMURA¹, YOSHIO KATAKURA¹ MICHIMASA KISHIMOTO¹,
KEN-ICHI SUGA¹, SHIN ENOSAWA² and HIROSHI AMEMIYA²

¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita 565-0871

²National Children's Medical Research Center, Tokyo 154-0004

Key words: bioartificial liver, glutamine synthetase, Chinese hamster ovary, ammonia removal, recombinant DNA.

In order to establish a cell line suitable for a hybrid artificial liver support system, an ammonia metabolizing activity is given to a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line using genetic engineering techniques. CHO-K1 cells were transformed with pSV 2-GS vector which contain glutamine synthetase gene connected with SV 40 promoter. The recombinant cell line was selected under various concentrations of glutamine synthetase inhibitor, methionine sulfoximine (MSX). The 800 μ M MSX tolerable cell line has high glutamine synthetase activity and can remove ammonium from the medium. The kinetic parameters of this cell line were investigated under 0, 1, or 2 mM ammonia concentration. Ammonia consumption occurred during the middle phase of cultivation (growth phase). The specific ammonium consumption rate of the established cell line during growth phase is about one fifth of that of primary hepatocyte.