●製品 & 技術

新規な3次元培養ラット肝細胞「TESTLIVER™ -Rat-」 について

山口達哉

(株) TMセルリサーチ 〒914-0047 福井県敦賀市東洋町10-24

A New Three-Dimensional Culture of Rat Hepatocytes , “TESTLIVER™-Rat-”

Tatsuya Yamaguchi

TM Cell Research Inc. 10-24, Toyo-cho Tsuruga, Fukui 914-0047, Japan

We have made a new rat hepatocyte culture model for a simple and long-term culturing using the method developed by Funatsu et al, of forming a cell aggregate by centrifugation in hollow fibers.

The centrifugation-derived hepatocyte aggregate in hollow fibers formed a hepatocyte organoid after culturing. Ammonia metabolizing and albumin secretion activity were maintained for more than 2 months. CYP enzyme induction was also observed after more than 1 month culture.

These result suggests that this new three-dimensional culture method will provide a simple and convenient long-term culture of rat hepatocytes and will be useful for research of liver functions and new drug developing.

Key words : hepatocyte / hollow fibers / organoid / P450 / Rat

1. はじめに

生体内の肝機能を再現する実験系として、初代肝細胞培養実験が現在広く利用されている。しかし、単層培養においては、肝細胞の持つ機能が数日単位で失われることが知られており、このため細胞外マトリックスゲルを用いた培養法¹⁾ やスフェロイド培養をはじめとする3次元培養法等が種々開発されてきた²⁻⁴⁾。

こうした中、九州大・船津らのグループは、透過性膜からなる中空糸内腔に遠心力を利用して肝細胞を充填すること（以下、「遠心充填法」と呼

ぶ）により、これまでに類のない驚異的な長期間の機能維持が可能となることを報告⁵⁾ した。遠心充填法は遠心力を利用して誘導形成した細胞組織体を中空糸を利用して培養するもので、その基本的な原理は細胞に対して強制的に遠心力を加えることにより細胞の接触頻度を短時間のうちに飛躍的に高めるという点にある（Fig. 1）。更に透過性膜中空糸を用いているため高密度の細胞凝集体の効率良い培養を可能にしている。現在、この遠心充填法を利用したハイブリッド型人工肝臓は国内外から注目を集め、将来の臨床応用に大きな期待が持たれている。

**TESTLIVER™-Rat-
and Serum-free culture medium for rat hepatocyte**

Fig. 1 Centrifugal filling into the lumen of hollow fibers

この度、我々はこの遠心充填法を利用した新しい3次元培養ラット肝細胞をTESTLIVER™-Rat-として試験研究用に商品化した。TESTLIVER™-Rat-は肝細胞の機能を長期間維持し、かつ、誰もが簡便に実験出来るという特徴を持つ。ここではTESTLIVER™-Rat-と、これとあわせて開発された専用培地「ラット肝細胞無血清培地」についても紹介する。

2. TESTLIVER™-Rat-について

2.1 概要

TESTLIVER™-Rat-は、セルローストリアセート製の多孔性膜中空糸 (Fig. 2) (内径 $285\mu\text{m}$, 外径 $387\mu\text{m}$, 平均ポアサイズ $0.2\mu\text{m}$, 長さ3cm) 6本の内腔にコラゲナーゼ灌流法により調製した

Fig. 2 Hollow fibers made of porous membrane of cellulose triacetate (internal diameter : $285\mu\text{m}$, outer diameter : $387\mu\text{m}$)

Fig. 3 Bundles of hollow fibers

初代ラット肝細胞 5.0×10^5 個が60G, 90秒の遠心によって充填されたものである (Fig. 3). このとき中空糸内腔での細胞密度は、約 $5.0 \times 10^7 \text{cells}/\text{cm}^3$ 以上に達している。

3cmという中空糸長は $\phi 35\text{mm}$ シャーレまたは6wellプレートでの培養に適したサイズであり、 5.0×10^5 個という細胞数も $\phi 35\text{mm}$ シャーレまたは6wellプレートにおいて単層培養を行なった場合、コンフルエント状態での細胞数にほぼ相当するため、これらの培養容器を用いた通常の細胞培養と同じ感覚で簡単に細胞培養が行なえる。

ユーザーには、培養後4~5日目の培養肝細胞が培地を満たした容器に入れて届けられ (Fig. 4), その後約1ヶ月間またはそれ以上の長期実験が可能である。培養は通常の細胞培養と同様 CO_2 インキュベーター内で行なうが、振盪培養を行なうた

Fig. 4 Supplied in a container filled with culture medium

Fig. 5 Change in ability to produce albumin

めに振盪器が必要となる。

2.2 肝細胞機能

TESTLIVER™-Rat-を6wellプレートを用いて培養し、代表的な肝細胞機能であるアルブミン産生能、アンモニア代謝能および薬物代謝酵素 (CYP1A1, CYP2B1) についてその経日的な推移を調べた。なお、TESTLIVER™-Rat-の培養には、専用培地「ラット肝細胞無血清培地」を使用し、単層培養系には、William's medium EにNBCS, Insulin, dexamethasoneを添加した培地を用いた。

(1) アルブミン産生能

培地中に分泌されるアルブミン量を経日的に測定した。その結果、1ヶ月目まで約80 μg/10⁶cells/24hr以上の産生能を維持し、徐々に低

Fig. 6 Change in ability to metabolize ammonia

Fig. 7 Induction of CYP1A1 by methylcholanthrene (change over days)

下傾向を示すものの2ヶ月間は安定して高い産生能を示した (Fig. 5)。ラット生体内において1個の肝細胞のアルブミン合成能は約 6.0×10^5 分子/minという報告⁶⁾があるが、これを換算すると約100 μg/10⁶cells/24hrとなることから、TESTLIVER™-Rat-は生体内に近い機能を長期間発現していることがわかる。

(2) アンモニア代謝能

培地中に1mMの濃度の塩化アンモニウムを加え、24時間中のアンモニア代謝能を測定し、この経日的な推移を調べた。初期値からの低下はあるもののアルブミン産生能と同様、安定して約2ヶ月間は高いアンモニア代謝能を維持した (Fig. 6)。

Fig. 8 Induction of CYP2B1 by phenobarbital (change over days)

Fig. 9 LDH leaking by D-galactosamin

(3) P450代謝酵素誘導

薬物代謝酵素として知られるチトクロームP450のうちCYP1A1およびCYP2B1についてそれぞれ、Methylcholanthrene, Phenobarbitalによる酵素誘導処理を行ない、経日的な変化を調べた。その結果、CYP1A1およびCYP2B1いずれにおいても培養1ヶ月後まで高い誘導比（誘導群と対照群の酵素活性比）が得られた。また、培養初期に誘導したもののについてウォッシュアウト後に再誘導を行なっても同様に高い誘導比を示した (Fig. 7, Fig. 8)。

その他、胆汁酸の分泌、D-ガラクサミン処理によるLDH漏出 (Fig. 9) などについても確認しており、TESTLIVER™-Ratは幅広く基本的な肝細胞機能を備えていると考えられる。

Fig. 10 Delivery test in Ammonia metabolism

(4) 輸送の影響

TESTLIVER™-Ratは培地に浸かった状態で輸送され、出荷から24時間以内にユーザーに届けられるような出荷体制がとられているが、その肝細胞機能への影響は極めて少ないと考えられる。24時間の輸送を想定した群と通常通り培養を続けた群のアンモニア代謝能を比較すると両者でほとんどその推移に差が無い結果となった (Fig. 10)。実際の輸送においても同様の結果を得ており、TESTLIVER™-Ratは輸送の心配をすること無く実験に使用できると考えられる。

(5) 遺伝子発現解析への応用

TESTLIVER™-Ratから遺伝子を抽出して発現解析を行なうことも可能である。ハサミで細かく切ったTESTLIVER™-Ratをホモジナイズし、AGPC法によりRNAを抽出した。Methylcholanthreneによる誘導処理を実施したTESTLIVER™-RatにおいてCYP1A1のmRNA発現が増強されていることが確認できた (Fig. 11)。

2.3 専用培地「ラット肝細胞無血清培地」について

TESTLIVER™-Ratのこれらの長期にわたる高機能発現は、専用培地によるところも大きいことがわかっている。従来培地 (William's medium E +NBCS, insulin, dexamethasone)、市販無血清培地、専用培地の3者の比較試験を実施した。

Fig. 11 Competitive RT-PCR for Rat Cytochrome P450

Fig. 12 Comparison of three different medium in Ammonia metabolism

TESTLIVER™-Rat-作製後、各培地にて培養を行ない経日的にアンモニア代謝能を調べた結果、他の培地では2~3週間でアンモニア代謝能が失われたが、専用培地では高い代謝能を長期間にわたって維持した (Fig. 12).

同様に、Methylcholanthrene およびPhenobarbital によるCYP1A1およびCYP2B1の誘導についてもこの3者の比較を行なった結果、専用培地では、いずれも培養30日後まで高い誘導比を示したのに対し他の培地では早期に誘導能が失われた (Fig. 13, Fig. 14).

このように専用無血清培地はTESTLIVER™-Rat-の肝細胞機能の発現・維持を増強するということがわかった。不明成分を含まない完全合成無血清培地は試験研究を行なうにあたって非常に有

Fig. 13 Comparison of three different medium in CYP1A1 induction

Fig. 14 Comparison of three different medium in CYP2B1 induction

用なものであり、TESTLIVER™-Rat-とこの専用培地をあわせて使用することにより、非常に良い培養システムを得ることができる。

2.4 TESTLIVER™-Rat-の形態

以上のように高い肝細胞機能を長期に発現しているTESTLIVER™-Rat-であるが、中空糸内では組織体 (organoid) を形成していることがわかっている。充填直後には中空糸内腔に細胞が充満しているが、培養を経ると中空糸内に円柱状の組織体形成が誘導されてくる (Fig. 15).

また、TESTLIVER™-Rat-を、ホルマリン固定→パラフィン包埋→薄切という一般的な手順で、組織切片を作製しHE染色を実施した結果を示す (Fig. 16)。中空糸中心部の細胞は死んでいるが、

Fig. 15 Organoid in the lumen of the hollow-fibers (this photo represents the Week 2 of culture)

Fig. 16 H.E. staining of TESTLIVER (Day 7 of culture)

組織体の周囲に沿った形で細胞が整列している様子が観察された。この構造は、培養1ヶ月後も維持されており、これが高い細胞機能を発現していると考えられる。

何故これらの細胞が高い分化機能を発現しているのか、このメカニズムは解明されていないが、細胞に対し強制的に遠心力を加えることにより、自発的な凝集では為しえない程度に細胞同士の接触頻度が高まり、その結果として細胞間情報伝達の亢進、細胞位置情報の獲得等の現象が起き易くなり、細胞がその分化機能を発現する微小環境が整うことが一因となっているのではないかと推察している。

3. おわりに

長期間の機能維持だけでなく更に、TESTLIVER™-Rat-は比較的長時間の輸送にも耐えることがわかっている。このため、出荷から24時間以内にユーザーに届けばほとんど輸送の影響を受け

ることは無い。また専用培地を輸送培地として用いているため培地置換などの操作も必要なく、到着後すぐに実験に使用することができる。

TESTLIVER™-Rat-が持つ機能にはまだまだ解明すべき点が多く、今後更に詳細な検討が必要であることは言うまでもないが、TESTLIVER™-Rat-は煩雑な操作を一切必要とせず、初代肝細胞培養実験を簡便にかつ長期間に行なうことができるため、薬物スクリーニングは無論のこと、長期毒性メカニズムの解明などこれまでは難しかった in vitroの実験に新たな展開が期待でき、肝細胞機能を利用した多くの実験に大きく貢献しうる可能性を持っている。

今後更に検討を加え、より高機能で使い易い試験研究用ツールとして本培養システムを幅広い研究分野に提供できるよう努力していきたい。

文 献

- 1) Dunn JCY, Tomkins RG, Yarmush ML : Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration, *Biotechnology progress.*, **7** 237-245 (1991)
- 2) Landry J, Bernier D, Ouellet C, *et al.* : Spheroidal aggregate culture of rat liver cells ; Histotypic reorganization, biomatrix, deposition, and maintenance of functional activities, *J. Cell Biol.*, **101** 914-923 (1985)
- 3) Nyberg SL, Shirabe K, Peshwa MV, *et al.* : Extracorporeal application of a gel-entrapment, bioartificial liver ; Demonstration of drug metabolism and other biochemical functions, *Cell Transplantation*, **2** 441-452 (1993)
- 4) Florence J Wu, Julie R, Friend C : Efficient Assembly of Rat Hepatocyte Spheroids for tissue engineering applications, *Biotech. Bioeng.*, **50** 404-415 (1996)
- 5) Funatsu K, Ijima H, Nakazawa K, *et al.* : Hybrid Artificial Liver Using Hepatocyte Organoid Culture, *Artificial Organs*, **25** (3) 194-200 (2001)
- 6) 中村敏一 : 「初代培養肝細胞実験法」 (学会出版センター) (1987)

(受付 2003年7月13日 掲載決定 7月22日)