ラット肝細胞の浮遊培養 (第 1 報¹⁾) 培養法の基礎的検討

毛利哲郎, 成毛 驍, 北川晴雄

千葉大学薬学部²⁾Suspension Culture of Rat Liver Cells. I.¹⁾ Standardization of the Method

TETSURO MOHRI, TAKESHI NARUGE and HARUO KITAGAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University²⁾

(Received July 20, 1968)

Suspensions of rat hepatic cord cells were prepared by homogenizing rat liver previously perfused with Locke's solution (Ca^{2+} -free) containing citrate in 0.25M sucrose with a loose homogenizer, and then by filtering the homogenate through a 200 mesh gauze. Then the cells were cultured in Eagle (Ca^{2+} -free) or PEB medium (Table I) supplemented with bovine serum in 150 ml bottles, under stirring at 37°, the air phase has been replaced by a mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%). Hepatic cells of about 30 μ in diameter maintained their morphological appearance and population throughout 48 hr of culture when PEB medium supplemented with 20% (v/v) or more of serum was used. Oxygen-consuming activity of isolated mitochondria was evident in cells cultured up to 6 hr. The activities of succinic dehydrogenase and glucose-6-phosphatase of the cells decreased markedly in the first day of culture.

哺乳動物の特定の種類の細胞について、隣接する他種の細胞からの直接的影響あるいは離れた組織や器官からの間接的影響をできるだけ除いて、しかも生活させながらその機能を研究するには、組織培養法が非常に有効な方法の 1 つであると考えられる。

われわれは、遊離肝臓細胞に対する薬物の直接作用を検討するのに有効な実験系を確立するため、まずおもにラットの肝臓を単一細胞に分散させ、肝索細胞を集めて細胞浮遊液として培養することを試みた。

肝細胞を単一細胞に分散させる方法についてはすでにいくつかの報告があり³⁾、また得られた遊離細胞について酵素の分布^{3b,4)}、クエン酸サイクル^{4a,5)}、解糖系^{4a,6)}、RNA⁷⁾、蛋白^{7b)}、尿素⁸⁾、脂質⁹⁾などの合成、膜の透過性¹⁰⁾がしらべられている。われわれはこの肝遊離細胞の浮遊液を組織培養用培地で長時間培養し、その形態的变化、細胞数変動、グルコース-6-フォスファターゼ、コハク酸脱水素酵素活性、およびミトコンドリア分画の酸素消費能について時間的に追って検討した。

1) 本報の一部は日本薬学会第 87 年年会で発表、京都、1967 年 4 月。

2) Location: 1-3, Yayoi-cho, Chiba.

3) a) S. T. Jacob, P. M. Bhargava, *Exptl. Cell Research*, **27**, 453 (1962); b) Y. Takeda, A. Ichihara, H. Tanioka, H. Inoue, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3590 (1964); c) V. A. Allfery, "The Cell: Biocpchemistry, Physiology and Morphology," Vol. 1, ed. by J. Brachet and A. E. Mirsky, Academic Press, New York, N.Y., 1959, p. 261.

4) a) J. H. Exton, *Biochem. J.*, **92**, 457 (1964); b) K. S. Henley, O. Sorensen, H. M. Pollard, *Nature*, **184**, 1400 (1959).

5) a) P. T. Iype, P. M. Bhargava, *Biochem. J.*, **94**, 284 (1965); b) D. H. Hayek, S. R. Tipton, *J. Cell Biol.*, **29**, 405 (1966); c) J. O. Laws, L. H. Stickland, *Nature*, **178**, 309 (1956).

6) M. Zimmerman, T. M. Devlin, M. P. Pruss, *Nature*, **185**, 315 (1960).

7) a) S. T. Jacob, P. M. Bhargava, *Biochem. J.*, **95**, 568 (1965); b) H. Inoue, K. Hosokawa, Y. Takeda, *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 127 (1965).

8) M. N. Berry, *J. Cell Biol.*, **15**, 1 (1962).

9) A. Ichihara, K. Adachi, Y. Daikuhara, Y. Takeda, *J. Biochem. (Tokyo)*, **57**, 696 (1965).

10) M. N. Berry, F. O. Simpson, *J. Cell Biol.*, **15**, 9 (1962).

実 験 の 部

実験方法

動物 Wistar 系ラットを日本クレア CE-2 餌料および水を自由に与えて飼育し、体重 100 g—345 g のものを使った。モルモットは同じく CR-1 餌料で飼育し、体重 230 g の雄を用いた。

肝細胞浮遊液の調製法 ラットを軽くエーテル麻酔し、消毒用アルコールで腹部をふき、開腹する。門脈に灌流液をつめたカニューレを挿入し、下大静脈を切ると同時に灌流液を流し始める。灌流液は 27 mM' のクエン酸ナトリウムを含む滅菌冷ロック液 (Ca^{2+} を除き pH 7.2—7.4 とする) を用いた。約 50 ml 流して変色した肝臓を切りとり、秤量して鋏で細切する。この一部に 4 倍量の 0.25M 蔗糖液を加え、50 ml ガラスホモジナイザーを用いて氷冷しながら組織を分散する。適当な大きさのゴム栓を整形して作ったややゆるい内筒を手で十数回上下すると組織片がなくなる。このホモジネートを、駒込ビベットから 200 メッシュのステンレス網に強く押出して濾過し、濾液を集めて 1000—1500 rpm で 2 分間遠沈し、沈澱した細胞を培地に浮遊させた。用いるすべての容器、器具はあらかじめ滅菌した。

培地および培養方法 培地として Eagle 基礎培地¹¹⁾ および PEB 培地 (858 培地¹²⁾ を基本に変形した) を用いた (Table I)。各成分を安定性、溶解度により 10 種の unit にまとめて凍結保存するか用時調製し、高圧滅菌または“ミリポアフィルター” (pore size 0.45 μ) による濾過滅菌を行なった。重炭酸ソーダの含量は一部の実験では 2000 mg/liter としたが、pH が変動しやすいので通常この倍量とした。これらの基礎培地に 20—50 % (v/v) の非働化牛血清を添加して培養に用いた。培養時の細胞濃度は 2—10 $\times 10^6$ /ml 培地として、150 ml 広

TABLE I. Compositions of Eagle and PEB Media (mg/liter)

	Eagle	PEB		Eagle	PEB
Alanine		25	Pyridoxal HCl	1	1
Arginine	105	105	Pyridoxine HCl		1
Aspartic acid		30	Riboflavin	0.1	0.4
Cysteine HCl·H ₂ O		260	Thiamine HCl	1	5
Cystine	24	24	Vitamin A		0.1
Glutamic acid		75	Ascorbic acid		50
Glutamine	292	292	α -Tocopherol succinate		0.01
Glycine		50	Calciferol		0.1
Histidine	31	31	Menadione		0.01
Isoleucine	52	52	Thymidine		10
Leucine	52	52	Coenzyme A		2.5
Lysine	58	58	NAD		7
Methionine	15	15	FAD		1
Phenylalanine	32	32	NADP		1
Proline		40	Tween 80		5
Serine		25	Cholesterol		0.2
Threonine	48	48	Glucose	1000	1000
Tryptophan	10	10	Glutathione		10
Tyrosine	36	36	Na-Acetate		50
Valine	46	46	ATP		10
p-Aminobenzoic acid		0.2	Ethanol		<0.2 ml
Biotin	1	1	NaCl	6800	6800
Ca-Pantothenate	1	1	KCl	400	400
Folic acid	1	1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	200	200
Choline chloride	1	1	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1500	1500
Inositol	2	2	NaHCO ₃	2000	4000 ^{a)}
Nicotinamide	1	1	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O		0.1

Only L-form was used in amino acids.

a) In the experiments investigating change of cell population with culture days (Fig. 2, 3 and 4), 2000 mg/liter was applied.

11) H. Eagle, *Science*, **130**, 432 (1959).

12) G.M. Healy, D.C. Fischer, R.C. Parker, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **89**, 71 (1955).

口瓶を水槽 (37°) に沈め、低速マグネチックスターラーによる攪拌培養を行なった。気相は空気 (時々交換し、pH を炭酸ガスで調節) または 5% CO₂, 95% O₂ の混合ガスとした。pH を、特にメーターにより連続測定した実験の他は、試験紙によりチェックした。培養液には“マイシリン明治” 0.2 mg/ml を加えた。

生細胞計数法 細胞浮遊液の一定量を等張磷酸緩衝液で正確に希釈し、その 1.0 ml をとり 0.1% クリスタル紫 (数滴 / liter の濃塩酸を添加) 0.5 ml を加えてよく攪拌し、一部を血球計算盤にとり、顕微鏡下で核が濃紫色、細胞質が薄青色に染まり細胞の形のよいものだけを生細胞として数えた。

形態観察 位相差顕微鏡 (千代田 NDL 20 使用) により細胞浮遊液として得た肝細胞を観察、撮影した。

ミトコンドリアの酸素消費 培養の一定時間ごとに細胞浮遊液の 20 ml をとり、これからほぼ常法にしたがって遠沈分画法によりミトコンドリア分画を調製し、pH 7.4 の 10 mM Tris 緩衝液に浮遊させて細胞呼吸測定用セル¹³⁾ および生理学用ガス分析計¹⁴⁾ を用いて溶存酸素減少を測定記録した。この呼吸測定用セルは、白金電極を装着して密閉できる内室 (容量 1.2 ml) と恒温槽から成り、この下にマグネチックスターラーを置いて内室のミトコンドリア浮遊液を攪拌する。0.1M コハク酸ナトリウムを加えて呼吸の変化を見た。

コハク酸脱水素酵素活性検出法 細胞浮遊液の一部に直接 nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) による formazan 染色法を応用した。細胞を遠沈して集め、さらに生理食塩水で 3 回洗い、細胞の 5—10 倍量の基質溶液 (0.1M Sørensen 磷酸緩衝液, pH 7.6, 3.6 ml, 0.1M コハク酸ナトリウム 4.5 ml, 25 mg% NBT 0.9 ml, 100 mg% phenazine methosulfate 0.3 ml から成る)、または対照溶液 (基質溶液からコハク酸塩を除いたもの、および基質溶液 5 ml に 23 mg のマロン酸ナトリウムを加えたもの) を加えて室温で着色を比較した。

グルコース-6-フォスファターゼ活性 細胞浮遊液を 1500 rpm, 10 分遠沈し、沈澱を生理食塩水で 1 回洗う。細胞に 0.1M, pH 6.5, クエン酸緩衝液を加え、全量 4 ml としホモジナイズする。このうち 1.0 ml に 0.08M, pH 6.5, グルコース-6-リン酸ナトリウム 0.2 ml を加え 37° で 15 分インキュベートする。10% トリクロル酢酸 2 ml を加え反応を停止し、3000 rpm で 15 分遠沈を行なう。この上清 1.0 ml について Fiske-SubbaRow 法により無機磷酸の定量を行なった。

結 果

浮遊肝細胞の形態

Fig. 1 は培養 0 時間の肝遊離細胞を 0.25M 蔗糖液に浮遊させて得た位相差顕微鏡像である。細胞濃度は 3×10^5 個 / ml で、ほとんどの細胞が単一細胞となるが、2—3 個が凝集している。単一細胞の直径は約 30 μ で細胞質が多く、空胞は見られない。細胞はクリスタル紫によって核のみが濃紫色に染まる。トリパン青 (0.5% 溶液を細胞浮遊液の半量加えすぐに鏡検) によっては核が非常に薄く青色に染まる。直径約 9 μ の球形細胞が肝細胞の約 10% 見られ、クリスタル紫によって全体が非常に濃く染まる。

肝遊離細胞の収率

すべての実験を含めて 70 余回の肝細胞浮遊液の調製を行なったが、そのときの採取肝臓単位重量当りの得られた遊離肝細胞数の例を性別、体重別に示した (Table II)。体重 100—170 g のラットでは収率の非常に悪い場合があったが、200 g 以上では比較的一定していた。しかし 300 g 以上の体重のラットでは細胞浮遊液を培養した場合に細胞の維持が悪いことが多かった。モルモットの場合はラットと同じ操作では破壊される細胞が多く、収率は非常に低かった。

培養

1. 細胞数の経日変動 すべての実験において数時間ごとに培養液の一部をとり細胞数を求めたが Fig. 2—4 に培地または血清濃度の変化による細胞数変動の相異の例を示した。Eagle 培地の場合、血清が 20% (v/v) では培養 1 日後の培養液中の細胞数は著しく減少し、その後の減少も激しかった (Fig. 2)。しかし血清が 40% では 1 日後の細胞数には大きな変動がなく、180 g のラットの例ではその後の細胞数減少もそれほど激しくはなかった (Fig. 3)。これに対し PEB 培地では血清 20% でも細胞数の変化は非常に少ないことがわかった (Fig. 4)。細胞数は、クリスタル紫により細胞質は薄く、核は濃く染まったもののみを生細胞として算出したが、上記いず

Fig. 1. Suspension of Rat Liver Cells
 3×10^5 cells/ml, $\times 200$ photographed by phase contrast with Chiyoda (Japan) NDL $\times 20$

13) 東芝製。

14) Beckman 160 型。

TABLE II. Yield of Hepatic Cord Cells in Suspensions

	Body weight of animals (g)	Wet weight of liver used (g)	Total No. of isolated cells, $\times 10^{-7}$	No. of cells per g wet wt. of liver, $\times 10^{-7}$
Rats ♂	110, 130	8.3	39.0	4.7
	143	3.8	4.0	1.1
	175	5.1	9.6	1.9
	185	5.4	13.0	2.4
	190, 180, 184, 177	25.6	56.0	2.2
	200, 175	12.0	39.0	3.3
	190, 185	12.5	53.4	4.3
	211, 217, 210, 213, 222, 195	45.8	216	4.7
	268	8.2	66.0	8.1
	261, 268, 276, 296, 266, 244	49.6	180	3.6
	345	7.9	37.0	4.7
Rats ♀	132, 145	10.3	31.0	3.0
	160, 165, 165, 173	20.8	35.0	1.7
	150, 150, 155, 160, 165, 175	36.6	86.0	2.4
	225	6.4	28.0	4.4
	230	7.3	50.0	6.9
	238	7.3	51.0	7.0
Guinea pig ♂	230	6.5	4.3	0.66

Fig. 2. Change of Cell Population with Culture Days in Eagle Medium Plus 20% (v/v) of Bovine Serum

from rats: — : 180 g
 - - - : 180 g

Fig. 3. Change of Cell Population with Culture Days in Eagle Medium Plus 40% (v/v) of Bovine Serum

from rats: — : 180 g
 - - - : 250 g

Fig. 4. Change of Cell Population with Culture Days in PEB Medium Plus 20% (v/v) of Bovine Serum

from rats: — : 145 g
 - - - : 245 g

れの培地においても、2日目まではその染色は最初とほとんど変らなかった。しかし3日後は細胞質も染色性を増し、細胞が全体的に変化していることが示唆された。

2. 培養液の pH 培養液中の重炭酸ソーダが基礎培地 (血清を加えない Eagle および PEB 培地) 中で通常

の 2000 mg/liter の濃度では、ふたの開閉の度合、細胞濃度によっては経時的に pH が変動しやすい。そこで重炭酸ソーダの濃度を 2 倍にして培養液の pH 変化をメーターにより連続測定したところ、48 時間以上にわたって pH の変化を ± 0.1 以内にとどめることができた。

3. ミトコンドリアの酸素消費 雄ラット 6 匹 (体重 122—172 g) から肝細胞を集め、PEB 培地 (血清 50% v/v) に 3.5×10^6 個細胞/ml の浮遊液として培養した。1 時間ごとにこの 10 ml をとりミトコンドリア分画を調製して酸素消費能を測定した (Fig. 5)。培養 6 時間までに採取した細胞のミトコンドリアでは明らかにコハク酸添加による呼吸促進が見られたが、培養 9 時間以後のミトコンドリアではこのような反応性はなかった。培養液 5 ml から調製したミトコンドリア量では、培養 0 時間のものでも酸素消費を検出することができなかった。上の実験で呼吸能がなかった場合でもまったくその活性がなくなったとは必ずしもいえない。

4. コハク酸脱水素酵素活性 PEB 培地 (血清 20% v/v) を用いて培養 (細胞濃度 $1.7-18 \times 10^5$ /ml) しつつ、その間浮遊細胞試料をとって NBT 還元能によりコハク酸脱水素酵素活性を定性的に試験した。培養 0 時間の細胞 (試料として 1.4×10^5 以上の細胞を使った) では基質を加えるとただちに細胞層が灰色または黒色に変じ、基質を含まない、または基質とマロン酸を含む溶液を加えた細胞では変色はみられなかった。培養 24 時間の細胞ではきわめて淡い呈色を示し、また、7 日間培養した細胞でも呈色が見られた。このことは前に述べたミトコンドリアの酸素消費における活性低下と平行関係にあり、ミトコンドリアの活性は培養 10 時間前後から急激に低くなるものと考えられる。

5. グルコース-6-フォスファターゼ活性 PEB 培地 (血清 20% v/v) を用いて培養した細胞の一部 (酵素活性の程度により $8 \times 10^5-1.3 \times 10^7$ 個をとった) で、培養 0, 1, 2, 3, 6 日後のグルコース-6-フォスファターゼ活性を測定した (Table III)。その結果この酵素活性は培養 24 時間以内に著しく活性が低下し、その後は大きな変化がないことが認められた。

考 察

ラット肝細胞の浮遊培養においては、細胞浮遊液作成時における細胞構成成分の変化の問題と、培養に伴う細胞活性の変化の問題とがある。前者については、解糖系の酵素、アルドラーゼ、乳酸脱水素酵素、^{4a)} トレオニン脱

Fig. 5. Oxygen Consumption by Mitochondria Fractions of Rat Liver Cells Cultured up to 12 hr

MT: mitochondria, SUC: 0.1 M succinate, each added at arrow. Oxygen consumption is shown by decrease of PO_2 expressed in mm Hg. Mitochondria fractions were prepared from cells cultured for hours indicated below the curves, and suspended in 0.01 M Tris buffer, pH 7.4, 37°, as reaction medium.

TABLE III. Change of Glucose-6-phosphatase Activity of Cultured Hepatic Cells of Rats in Suspension with Culture Days

Body weight of rats used g	Cell populations per ml of medium $\times 10^{-6}$	Enzyme activity, μg $P_i/10^6$ cells/15 min Days of culture				
		0	1	2	3	6
185	1.9	70	9	6.3		
145	0.7	46	26			
143	0.4	62			4.4	
245	1.9	63	9.6			5.5

水酵素, セリン脱水酵素, トリプトファン・ピロラーゼ, 可溶性 GPT,^{3b)} フォスホリラーゼ¹⁵⁾ などの可溶性分画にある酵素がほとんど失われ, 一方クエン酸サイクル,^{4a,5)} ミトコンドリアの GPT,^{3b)} グルコース-6-フォスファターゼ, GOT,^{3b,4b)} リンゴ酸脱水酵素,^{4a)} グルタミン酸脱水酵素^{4b)} の活性や, ³²P-リン酸, ¹⁴C-アデニンの RNA へのとりこみ,⁷⁾ ³H-ロイシンの蛋白へのとりこみ,^{7b)} ¹⁴C-酢酸の脂質へのとりこみ⁹⁾ などの能力は残ることが報告されている. 肝臓を単一細胞に分散させる際に細胞膜がかなり損傷をうけるともいわれる¹⁰⁾ ので, 酵素流出の原因は細胞膜の透過性の変化にあるものと考えられる (参考 3b). われわれの得た浮遊細胞においても調製直後にトリパン青によってきわめて薄くではあるが細胞核が染まったが, このことも細胞膜の変化を示唆しているものであろう. また, 培養による肝浮遊細胞の活性変化については, Hayek, Tipton^{5b)} が Waymouth 培地¹⁶⁾ を用いて攪拌培養し, 培養 8 時間まで呼吸, コハク酸の酸化が認められ, 形態も正常であったと報告している. いずれの問題についても方法や手技のいかんによってその変化の程度に相当の開きがあることも以上の報告に見られる.

われわれの実験結果では培養 0 時間において, コハク酸脱水酵素, グルコース-6-フォスファターゼ活性はかなり高く, ミトコンドリアの呼吸能も高いことが認められた. しかしこれを培養した場合には, 培養 24 時間で上記酵素活性は著しく低下し, ミトコンドリアの呼吸も, 培養 9 時間以後に採取したものでは, コハク酸による増加反応がみられなかった. 一方, 細胞の鏡検によっては, 空胞の出現, クリスタル紫による細胞染色の異常は 48 時間まで見られず, したがって生存細胞数にも大きな変動がなかったので, 肝浮遊細胞は酵素活性レベルが低下したままで, 全体としては培養 2 日ぐらいは活性を維持しているものと思われる.

これらの事実を基礎にして, 肝臓に特徴的な酵素の誘導の可能性を, この肝浮遊細胞で検討する考えである.

15) G. Gaja, A. Berenlli-Zazzera, *Ital. J. Biochem.*, **10**, 283 (1961).

16) C. Waymouth, *J. Natl. Cancer Inst.*, **22**, 1003 (1959).