

1. 研究課題名：動物細胞のストレス応答反応を指標とした毒性 / 薬効評価手法の開発研究
 - ・ 毒性及び薬効評価のための生体等価培養系の開発
 - ・ コラーゲンゲル上ラット肝細胞培養における培養キット化の検討

2. 研究機関：秋田住友ベーク株式会社

3. 研究分担者：
 - ・ 斧原正幸
 - ・ 澤井 博

4. 共同研究者：横山兼久（科学技術振興事業団 長崎研究室）
河村健司

5. 研究期間：
 - ・ 平成7年～8年
 - ・ 平成9年～11年

6. 要約

本研究では細胞凝集塊を形成する培養方法を用いて、種々の細胞培養実験を基本に、最終的に毒性試験、発癌性試験などの *in vitro* の評価システムを構築するための培養方法の開発を行った。

・ では培養器の表面修飾によって細胞の形態が制御可能かどうかを検討し、各ウェルに単一のスフェロイドを形成する培養器を開発した。初代培養細胞では長期間にわたって固有の細胞機能を発現することを確認した。

・ では無血清培養液によるラット肝細胞の凝集塊を形成するコラーゲンゲル上3次元培養法を用いて、各種肝特異機能の発現を評価した。モノレイヤーと比較して、アルブミン合成や細胞内の中性脂肪量、グリコーゲン量がより生体内の細胞に近い状態であることを示唆した。

凝集塊を形成する3次元培養方法を確立し、従来の培養方法よりも高度の機能発現が維持されたことによって、細胞の生死だけでなく、細胞の機能変化という観点からの新しい毒性試験などの可能性が示唆された。

7. 研究目的

医薬品の開発、薬理毒性試験では実験動物を用い薬物の動態と代謝や生体内の物質の合成について検討が行われているが、*in vivo* の実験系では生体内に存在する種々の物質が複雑に絡み合っているため、投与した物質のメカニズムについて明確な結論を引き出すことが困難な場合が多い。そこで、シンプルかつモデル化された *in vitro* での実験系の試みが行われている。

細胞を培養するためには、培養環境が重要であることはいうまでもない。ここでいう培養環境とは、大きくは、培地、培養器、インキュベータ、そして作業者のテクニックが該当する。これらの環境条件のどれが不十分でも培養は成功しない。特に、初代培養細胞はこれらの環境条件の要求度が高く、細胞の生存だけでなくその細胞の本来の機能維持のためには更に高度の環境を要求する。

本研究では種々の細胞培養実験を基本に、最終的には毒性試験、発癌性試験などの *in vitro* の評価システムを構築するための培養方法の検討を行った。

「 . 毒性及び薬効評価のための生体等価培養系の開発」ではこれらの中で培養器に着目し、特にその物理化学的性質が培養細胞に与える影響を検討することを第一の目的とした。具体的には、培養器の種々の表面修飾によって細胞の挙動を観察しその形態が制御可能かどうかを検討した。またさらにスフェロイドを、同時に、数多く、簡便に形成でき、しかもそれらのサイズが容易に制御できる培養器を開発し、この培養器を用いることによって、細胞の形態制御、機能制御が可能なシステムの基礎が構築できるかどうかを検討した。

「 . コラーゲンゲル上ラット肝細胞培養における培養キット化の検討」では無血清培養液によるラット肝細胞の凝集塊を形成するコラーゲンゲル上3次元培養法をどのような肝細胞の研究に適用できるのか応用展開を検討するための基礎的な情報を得ることを目的とした。我々はコラーゲンゲル上で3次元凝集塊を形成させる培養の検討を行ってきたが、企業的な見地から本3次元培養方法のキット化を検討しようとした場合、この培養方法をどのような肝細胞の研究に適用できるのか、十分な情報を得るに到っていない。そこで2種類の培養液を用いて3次元培養法と従来のモノレイヤーについて各種肝特異機能の発現についての評価を行い、モノレイヤーに対してコラーゲンゲル上の3次元培養法の優位性および不十分な点について検討することとした。

. 毒性及び薬効評価のための生体等価培養系の開発

- 8 . 材料と方法

【培養器】

ポリスチレン製シャーレ（住友ベークライト製 スミロン MS1135R,MS11350）及びU底のマルチウェルプレート（スミロン MS309UR）に下記の処理を施して使用した。

【表面処理剤及び処理方法】

天然の材料としてリン脂質、脂肪酸。合成物の材料としてPHEMA（ポリヒドロキシエチルメタクリレート）を使用し、これらを有機溶媒（主としてエタノール）に溶解後、塗布し乾燥して調整した。

【細胞及び培養条件】

培養は株化細胞および初代細胞で実施した。

（1）株化細胞

細胞	培地
HeLa	MEM + 10% FCS
HepG2	HamF12 + 10% FCS
V-79	MEM + 10% FCS

（2）初代培養

使用した初代細胞は以下の通り。

ラット肝実質細胞

マウス乳腺上皮細胞

【アルブミンの定量】

抗ラット・アルブミン抗体（POD標識、非標識抗体）を用いたELISA法（サンドイ

ッチ法)によりラット肝細胞より培養上清中に分泌されるアルブミン量を測定した。[1]

【分泌カゼイン量の測定】

マウス乳腺上皮細胞を無血清系に移した後、カゼイン合成分泌に必要なホルモン類(デキサメタゾン、プロラクチン)を添加、更にラジオアイソトープ標識(32P)のリン酸を加えてカゼインリン酸化時にRI標識を施した。培養上清中の分泌カゼインは酸により沈殿させフィルターで回収、洗浄の後シンチレーションカウンターで計測した。[2]

【表面化学分析】

ESCA(アルバックファイ社製ESCA5400MC)により表面化学分析を実施。

- 9 . 結果

【各種培養素材を用いた細胞培養】

35の細胞培養用シャーレ(親水処理品)及び未処理シャーレ(疎水性)、更にこれら超親水性基を有するDPPC(リン脂質)をコーティングした培養器にHeLa細胞を播種し4日間培養後の写真を図1に示す。

また、これら4種類の基材接触角及びその上で培養したHeLa細胞の接着性及び増殖性の概要を表1に示す。

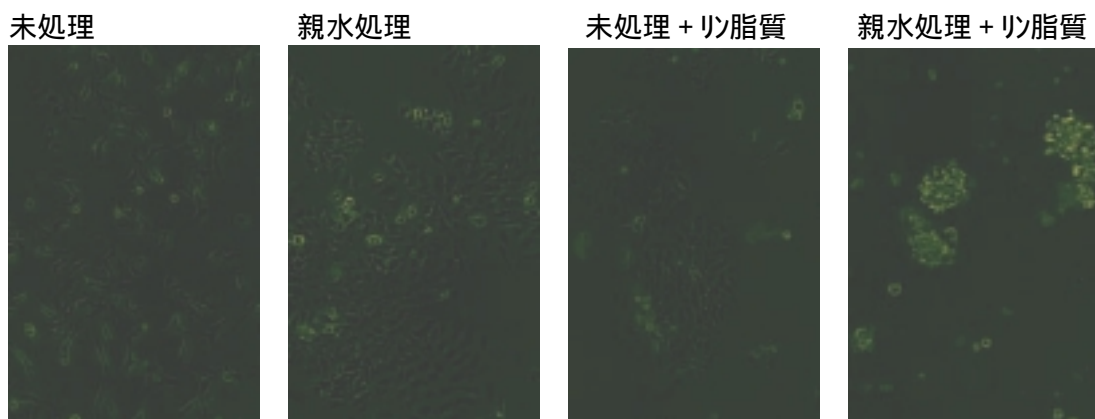


図1 各基材上でのHeLa細胞培養形態

表1 各種基材の接触角とHeLa細胞培養時の接着、伸展性

基材	接触角	細胞接着	伸展性
未処理	97.0 ± 1.3	弱い接着	高
親水化处理	55.0 ± 3.6	接着	高
未処理 + リン脂質	10.4 ± 2.4	非接着	低
親水化处理 + リン脂質	13.5 ± 1.4	接着	高

親水化処理シャーレではH e L a細胞はよく接着伸展し増殖しているが、未処理シャーレでは細胞の伸展が弱く接着も弱い。これらは、一般的に言われている現象を反映している。

しかし、リン脂質コーティングした場合は、基材が未処理の疎水性の場合にのみ、細胞は基材に接着せずにスフェロイド（細胞凝集塊）を形成し、基材が親水性の場合はリン脂質コーティングの効果が現れず、親水化処理プレートとまったく変わらないことがわかった。

【表面化学分析】

親水化シャーレ及び未処理シャーレにコーティングしたリン脂質の表面にどのような相違があるのかを明確にするために、各種表面分析を実施した。結果の概要を表2に示す。

表2 分析結果まとめ

分析方法	分析深さ	未処理 + リン脂質	親水化リン脂質
接触角	-	10.4 ± 2.4	13.5 ± 1.4
E S C A	40 ~ 50 A	アルキル基：上 コリン基：下	アルキル基：上 コリン基：下
S E M	-	表面凹凸 (クレーター状)	表面平滑
A F M	100nm	表面凹凸 (雲海状)	表面平滑
A T R - I R	2 ~ 0.5mm	リン脂質ほとんどなし (表面凹凸で乱反射か?)	リン脂質ピークが強い

いずれの表面も、接触角はかなり小さく極めて親水性に富む表面であることがわかった。未処理シャーレにリン脂質をコーティングした表面の親水性の方が平均値的には高いが統計的に有意さはなかった。

E S C Aによる分析では、測定深さ40 ~ 50 の範囲では、いずれの表面も極表面はアルキル基で親水性のコリン基は下方を向いており大差はないことがわかった。

一方、走査電子顕微鏡による観察では差が認められた。親水性の組織培養用シャーレにコーティングしたリン脂質表面は極めて平滑であるのに対し、未処理シャーレにコーティングしたリン脂質表面にはクレーター状の凹凸があることが明らかになった。

原子間力顕微鏡による観察でも、電子顕微鏡と同様に平滑、凹凸の際が明確に観察された。

また、赤外分析の結果、組織培養シャーレにコーティングしたリン脂質表面からはリン元素が明確に検出され、未処理シャーレにコーティングしたリン脂質表面からはリン元素がほとんど検出されない結果となった。

【脂肪酸の検討】

リン脂質同様に親水性基（カルボキシル基）を有する各種脂肪酸を用いた場合の現象を検討した。

各種脂肪酸をコーティングした表面の接触角を表3に示す。また、その上で培養したHeLa細胞の写真を図2に示す。

表3 脂肪酸処理シャーレの接触角

脂肪酸	接触角
パルミチン酸	92°
ステアリン酸	93°
オレイン酸	64°
リノール酸	50°
リン脂質	10°

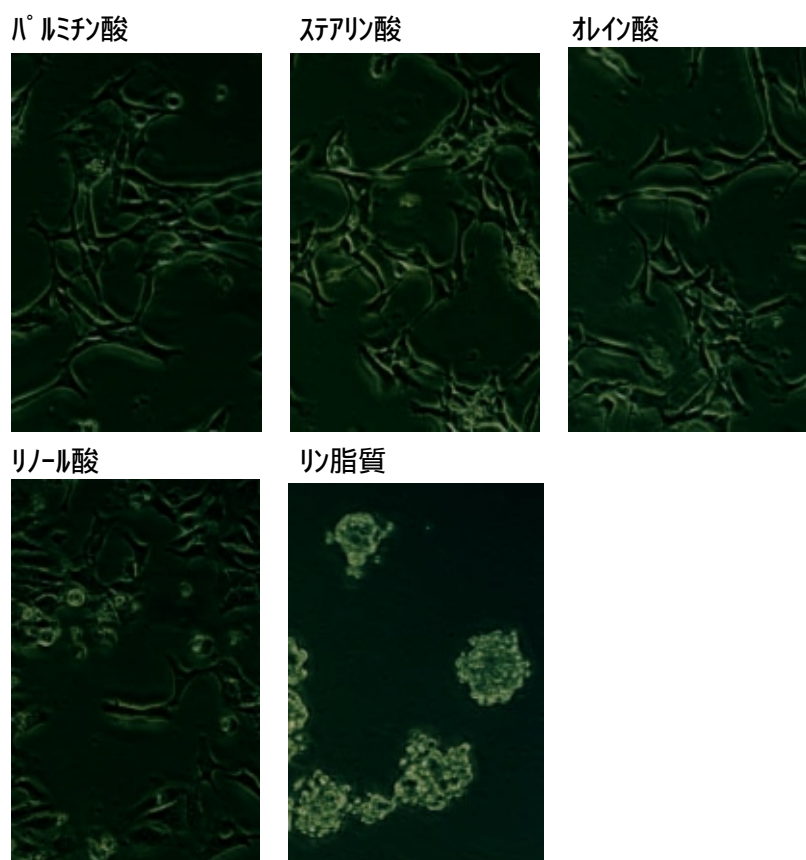


図2 脂肪酸処理シャーレ上でのHeLa細胞の培養形態

脂肪酸の種類によって接触角はかなり異なるがいずれもリン脂質よりは疎水性であり、細胞は接着する傾向にあった。

【親水性合成ポリマーによる表面処理】

代表的な親水性ポリマーであるPHEMAを組織培養用シャーレ（親水性）及び未処理シャーレにコーティングし、それらの接触角及びその基材上でのHeLa細胞の挙動を観察した。表面の接触角を表4に、HeLaの培養写真を図3にそれぞれ示す。

表4 ポリ - H E M Aコート基材の接触角

基材	接触角
未処理	97.0 °
親水化処理	55.1 °
未処理 + ポリ H E M A	49.5 °
親水化処理 + ポリ H E M A	50.2 °

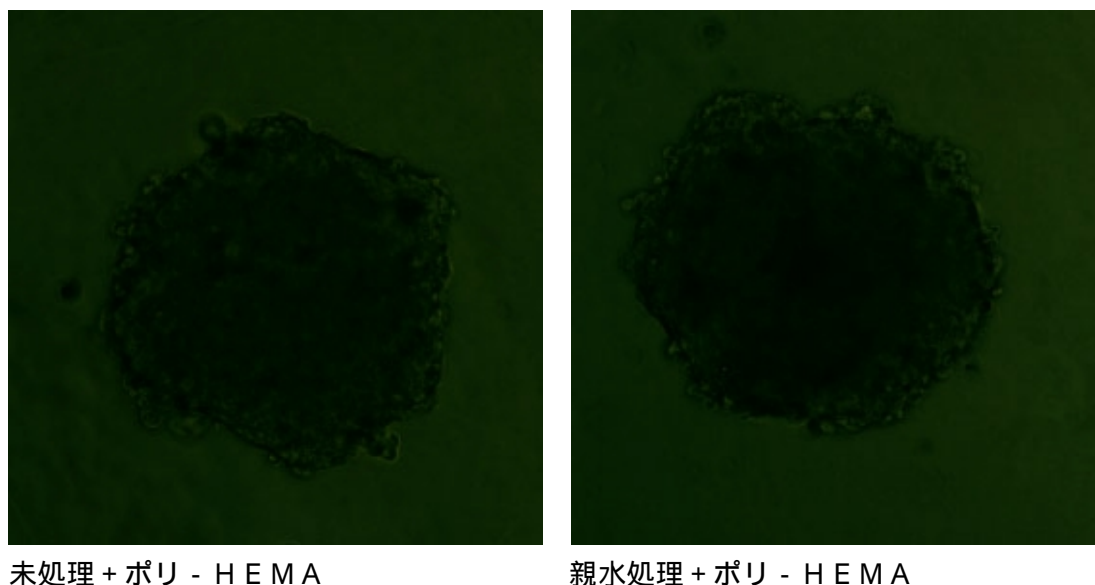


図3 ポリ - H E M Aコート基材上のスフェロイド形態

P H E M Aの場合は、基材の親水性にも関わらず接触角はほぼ同程度で、リン脂質よりも若干疎水性が高いことがわかった。しかしながら、この場合の測定方法では時間とともに接触角が次第に低下してゆき、約1時間で25度程度まで低下することがわかった。ここでは、全て水滴滴下後の接触角を示している。

リン脂質よりも接触角が高いにも関わらず、P H E M A上でもH e L a細胞はスフェロイドを形成する事がわかった。また、ここでは示さないが、この他、V 79、P C 12等多くの細胞がスフェロイドを形成する傾向が認められた。

【U底マルチウェルプレートへの応用】

(1) H e p G 2細胞の形態観察

U底のマルチプレートのウェル内表面を、同様にしてP H E M Aにて処理したプレートを試作し、H e p G 2細胞の挙動を観察した。

試作品段階のため、全てのウェルに於いて完全ではないが、各ウェルには基本的に単一のスフェロイドが形成されることがわかった。

H e p G 2細胞の播種数とスフェロイドの直径との関係を図4に示す。

また、H e p G 2細胞の培養日数とスフェロイドの直径との関係を図5に示す。

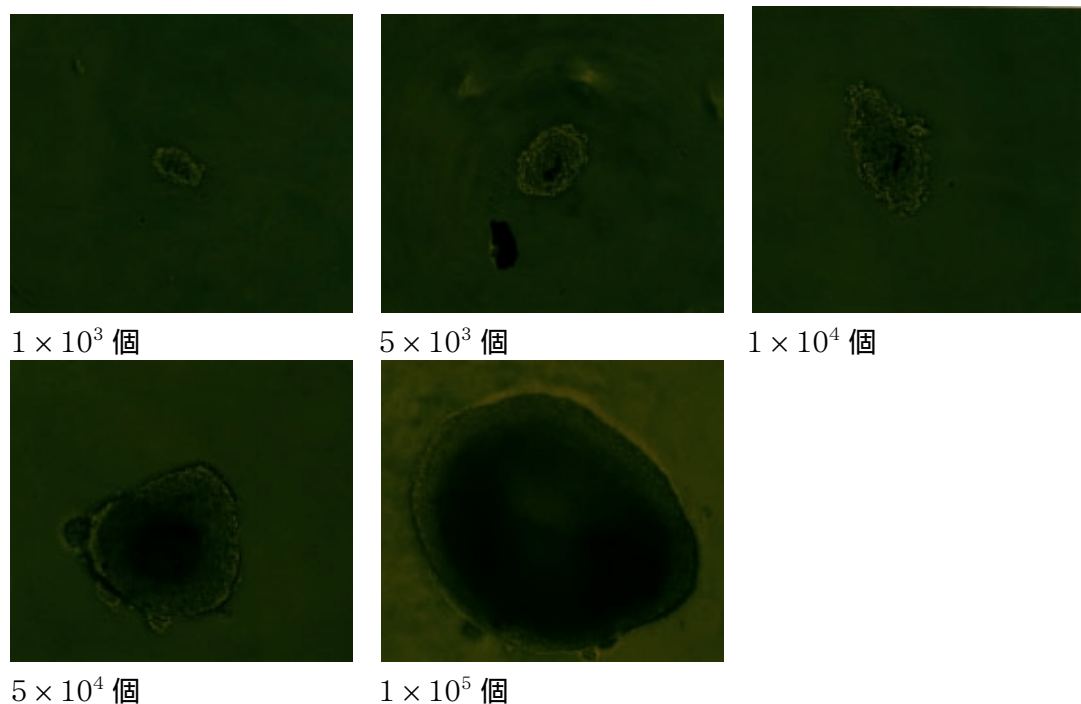


図4 細胞播種数とスフェロイド形態

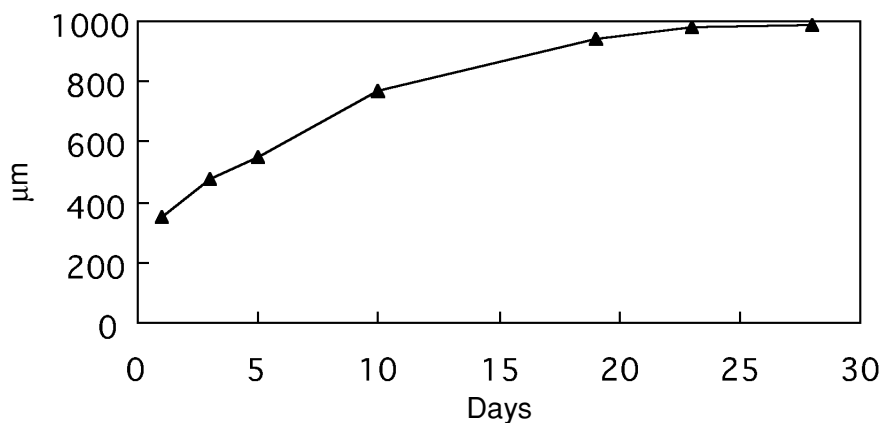
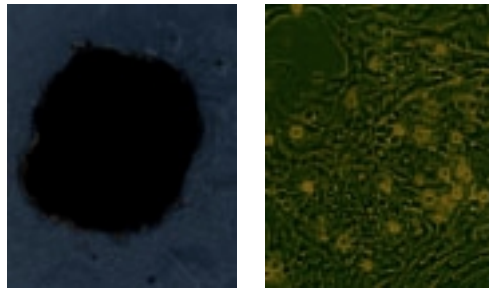


図5 スフェロイド直径経時変化

(2) 初代培養細胞の形態と機能

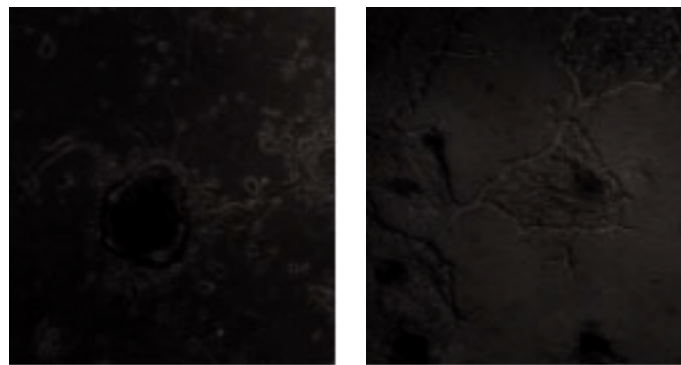
ラット肝細胞及びマウス乳腺上皮細胞の培養写真をそれぞれ図6、7に示す。いずれの場合にも細胞はスフェロイドを形成することがわかった。

また、それぞれの機能性細胞の機能の一つとして、肝細胞ではアルブミン、乳腺上皮細胞ではカゼインの分泌に関して測定した結果を、それぞれ図8、9に示す。



ポリ-HEMA コート コラーゲンコート

図6 ラット肝実質細胞培養



ポリ-HEMA コート コラーゲンコート

図7 マウス乳腺上皮細胞培養形態

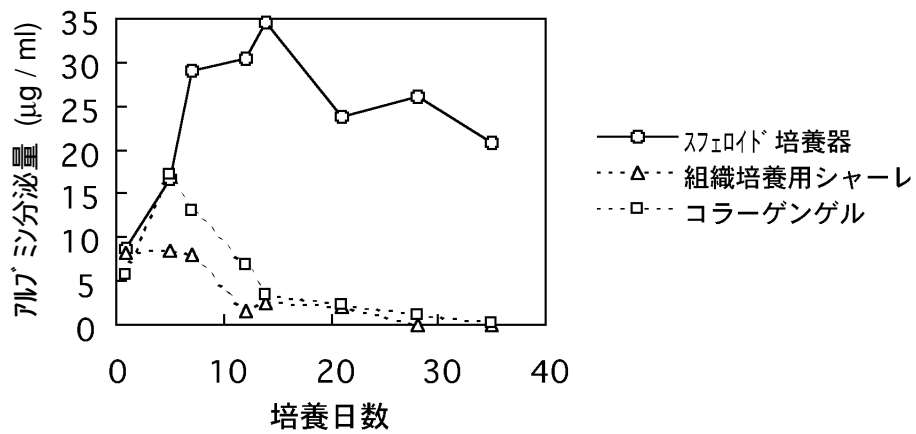


図8 培養ラット肝細胞のアルブミン分泌量

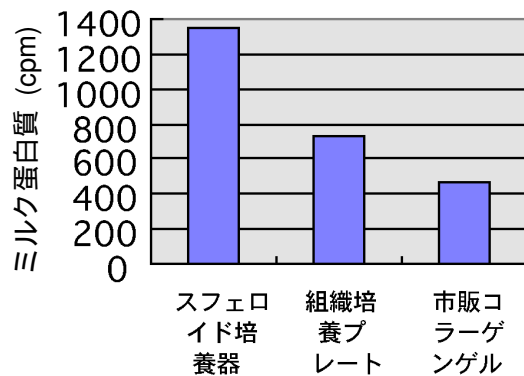


図9 マウス乳腺上皮細胞のミルク蛋白質分泌量

いずれの細胞の場合にも、生体内の正常な細胞と同様に固有の機能を明確に発現していることがわかった。

- 10 . 考察

【各種培養素材を用いた細胞培養及び素材の表面分析】

一般に、親水性や疎水性が極めて高い材料には細胞が接着しにくく、中間の適度な親水性の材料には細胞が接着し易いと言われている。

実際、未処理シャーレでは細胞の接着が不良で、市販の親水化处理シャーレは細胞の接着に好適なように適度な接触角に調製されているため細胞の接着が優れていることは良く知られている。ここでは、リン脂質処理により細胞が基材に接着しないことがわかったが、その場合に処理基材の親水性が重要な鍵を握っていることがわかった。ここで基材に対して接着せず浮遊状態の細胞は、死滅することなく、細胞が三次元的に凝集したスフェロイドを形成した。

リン脂質は親水疎水の両親媒性であり、疎水性のアルキル基と親水性のコリンリン酸基を有することは広く知られている。従って、ここで一つの仮定が立てられる。すなわち、基材が親水性の場合はコリンリン酸基が基材にイオン結合し、疎水性のアルキル基が外側に配向した形態をとり、逆に、基材が疎水性の場合は、疎水性のアルキル基と疎水性相互作用によって吸着し、親水性のコリンリン酸基が外側に向かって配向するという仮説である。もし、そうであれば、後者は親水性が高く細胞が接着しにくく、その結果、細胞間相互作用によってスフェロイドを形成したと考えるのが合理的といえる。

しかしながら、表面化学分析の結果はこの仮定を覆す結果となった。2つの基材の相違は、基材が疎水性の場合のリン脂質表面が凹凸構造であるのに対し、他方は極めて平滑であるという点のみであった。赤外分析の結果も、細胞の挙動からして逆の結果であるが、おそらく表面に凹凸の存在するリン脂質表面では乱反射が起こってリンの検出が低下したためと考えられる。

また、表面に凹凸の多い方が部分的にリン脂質の量が多いことも考えられる。リン脂質のような低分子量の両親媒性物質は、周囲の環境によってその配向を簡単に変換できる可能性

を有しているが、化学分析はいずれも絶乾状態の分析であり、培養液の存在する環境とは大きく異なる点が、解析を困難にした理由の一つかも知れない。

いずれにしても、細胞はこれらの基材を明確に識別し、全く異なった挙動を示したことは明らかといえる。それは、これらの培養実験が極めて高い再現性を有していたことから明白である。

【脂肪酸の検討】

リン脂質の一部である各種の脂肪酸を用いた実験からは、脂肪酸のカルボキシル基だけの親水性では、リン脂質のような効果はほとんど期待できず、細胞が接着せずにスフェロイドを形成させることに寄与しているのは、コリンリン酸部分であると推定される。しかし、それにはコリンリン酸の親水性が寄与しているのか、他の要因によるものであるかは明確ではない。

【親水性合成ポリマーによる表面処理と細胞培養】

PHEMAコーティング表面の接触角は、水滴滴下直後では予想よりも高く、市販の親水化処理シャーレよりもやや低い程度であった。しかし、水滴滴下後時間と共に低下し、約1時間後で25度程度の接触角に達することから、本来は親水性が高いにも関わらず、コーティングの乾燥で親水性の水酸基が基材の中に潜り込んでおり、培養液の添加によって水酸基が基材表面に次第に配向した可能性も考えられる。

このような親水性合成ポリマーを基材に用いた場合に、細胞のスフェロイド形成が起こることは、JIAN ZHONG TONG によって報告されている [3] が、親水性という物性だけが細胞の挙動を支配しているのかどうかは不明である。また、リン脂質との本質的な相違が存在するかどうか、まだ不明である。

【U底マルチプレートへの応用】

この検討では、1個のウェル内に、基本的に1個ずつのスフェロイドが形成されるという現象が認められた。これは、培養器に、細胞が集合し易い形状と、細胞が接着しにくい表面処理を付与することによって、細胞が細胞間相互作用によって単一のスフェロイドを自ら形成することを示している。また、このスフェロイドのサイズは、細胞の播種数と培養日数によって自在に制御できることも判明した。

全ての細胞がこの方法でスフェロイドを形成するかどうかは不明であるが、簡便な方法でスフェロイドを形成させることが可能なプレートの開発につながる研究成果を得た。

また、株化細胞のみならず、肝や乳腺上皮の初代培養細胞も同様にスフェロイドを形成し、通常の培養法ではそれらの機能が急速に低下するのに対し、ある程度長期間、その機能を維持することがわかった。

・コラーゲンゲル上ラット肝細胞培養における培養キット化の検討

- 8 . 材料と方法

【培養液の調製】

L15 処方培養液は、Leibovitz's L-15 (GIBCO) を基本培地として、DMSO : 2%、L-プロリン : 30 μ g/ml、デキサメサゾン : 10^{-7} M、インシュリン : 10^{-7} M、EGF :

10ng/ml、亜セレン酸ナトリウム： 10^{-7} Mを加え実験用の培養液とした。

またDME M処方培養液はDME M (GIBCO)を基本培地として、DMSO：2%、L-プロリン：30 μ g/ml、L-アスパラギン-水和物：20 μ g/ml、L-アラニン：90 μ g/ml、デキサメサゾン： 10^{-7} M、インシュリン： 10^{-7} M、EGF：10ng/ml、亜セレン酸ナトリウム： 10^{-7} M、HEPES：4.8mg/mlを加え実験用の培養液とした。

【培養器】

コラーゲンゲルプレートの作成には培養容器として6ウェルのマルチプレート（住友ベークライト）を使用。ペプシン処理I型コラーゲン酸性溶液を中和した後、1ウェルあたり1200 μ l分注し37℃インキュベータ中に静置してゲル化した。

また比較用のコラーゲンコートプレートには、住友ベークライト（株）より販売されているMS-0006Kを使用した。

【ラット肝細胞の採取】

SPFウイスターラット、雄、6週令からコラゲナーゼ灌流法により採取した。

【細胞培養】

採取したラットの肝実質細胞を培養液で 5×10^5 個/mlに分散し、これをコラーゲンコート及びコラーゲンゲル上に1ウェル当たり2mlずつ播種して、培養を開始。培養1時間後に培養液の交換を行い、接着しなかった細胞を除去した。培養液の交換は毎日で実施した。

【アルブミンの定量】

通常の培養液の交換を行うとき、培養上清を採取。抗ラットアルブミン抗体を用い、サンドイッチ法のELISAで定量した。[1]

【LDHの定量】

遊離LDHは、通常の培養液の交換を実施した24時間後に培養上清を採取。細胞内のLDHについては、上清採取後に培養細胞を回収、超音波破碎を行って、これらを市販のLDHのアッセイキット（和光純薬）を使用して定量した。[4]

【アンモニア代謝量の測定】

培養開始4、7日後の培養液の交換を実施する際に、通常の実験用培養液に塩化アンモニウムを1mM投入した培養液を分注し、これより3、6時間後の肝細胞培養上清に含まれるアンモニアを上清ごと採取。これを市販のアッセイキット（ベーリンガー・マンハイム）を使用して定量した。[5]

【細胞内のグリコーゲン量】

培養肝細胞を回収して5.4Mの水酸化カリウム溶液に加え100℃の温浴を20分行い中和した後に、アミログルコシダーゼ処理によりグルコースに分解し、HK-G6PD法により定量した。[6]

【細胞内の中性脂肪量】

培養肝細胞を回収して超音波破碎を行った後、t-ブチルアルコール、メタノール、Triton X-100で処理、遠心上清を回収し調製。これを市販の中性脂肪のアッセイキット（和光純薬）を使用して定量した。

また培養液をオレイン酸750 μ M、BSA0.005%加えた培養液に交換し、24時間培養し

た後、上記手順で中性脂肪を定量した。[7、 8]

【 P 4 5 0 酵素活性】

M C 誘導型 P 4 5 0 は培養肝細胞に 3 - メチルコラントレンを 1mg/ml 投入した培養液で 24 時間培養して誘導した。この培養肝細胞に基質としてエトキシクマリンを投入した培養液で 2 時間培養し、代謝物のヒドロキシクマリンを蛍光分光光度計で蛍光測定した。[9]

また、P B 誘導型 P 4 5 0 は培養開始 2 日後以降、フェノバルビタールを 1mM 投入した培養液を用いて、肝細胞を培養して誘導した。培養後に細胞を回収し、超音波破碎を行い、ミクロソームを採取。ペントキシレゾルフィンを経験として代謝物のヒドロキシレゾルフィンを経験分光光度計で蛍光測定した。[10、 11]

- 9 . 結果

【アルブミン合成量】

コラーゲンコートを用いモノレイヤーの細胞形態で培養を行うとアルブミン合成量は低く、培養日数に従って徐々に減少した。コラーゲングルを用い凝集塊の細胞形態で培養を行った方は培養 4 日目のモノレイアに対して 2 ~ 3 倍の高い合成量を示し、2 週間の培養で機能の低下は認められなかった。この結果は L15 と DMEM を用いて比較してもほぼ同様の傾向を示した。

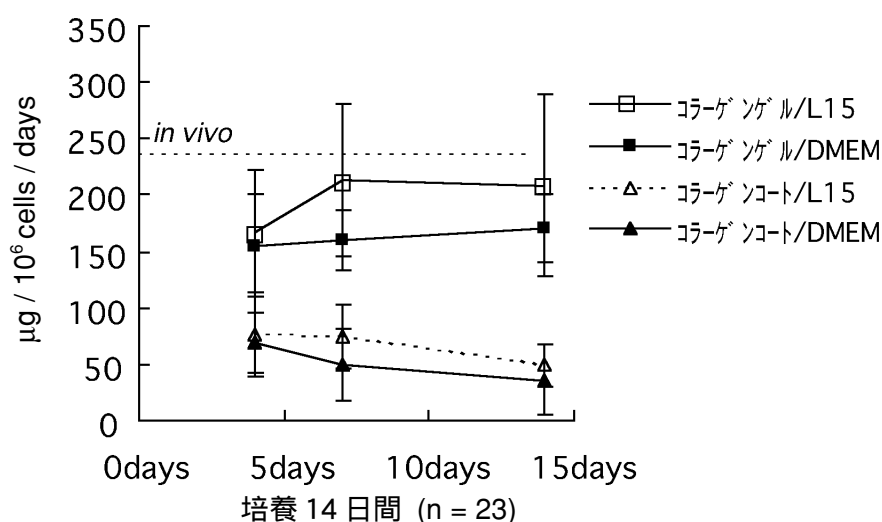


図 10 培養細胞によるアルブミン合成量

【LDH漏出率】

培養細胞内のLDHと培養上清中のLDHを定量して求めたLDH漏出率を測定した。コラーゲングルとL15処方培養液を用いた培養のみ培養3日目でも高いLDH漏出率を示したが、いずれの培養条件でも細胞を播種した直後は高いLDH漏出率で、培養5日目以降の漏出率は10%以下になって安定した値を示した。

細胞中の LDH 量は培養期間を通じてほぼ一定の値であるので、細胞を播種した直後はラットより肝細胞を単離、精製する操作によって細胞膜が損傷しているが、培養 3 ~ 5 日後には細胞膜の損傷は修復されていると考えられる。

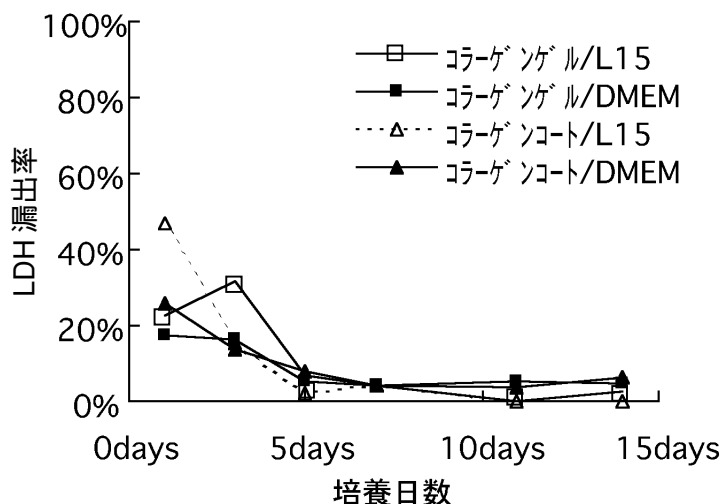


図 11 培養細胞の LDH 漏出

【アンモニア代謝】

培養液に添加したアンモニアの濃度を経時的に測定した。この評価の目標値は in vivo のアンモニア生成量より約 10 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{hr}$ と設定した。いずれの培養においても、アンモニアの代謝の機能レベルは目標値の 20% と低い値であった。

また、培養 4 日目ではコラーゲンコート上のモノレイアとコラーゲンゲル上の凝集塊での機能に大きな差は見られず、むしろ培養液による差が認められた。しかし、培養を一週間以上継続するとモノレイアではアンモニア代謝能を失うのに対して、凝集塊は機能を維持した。

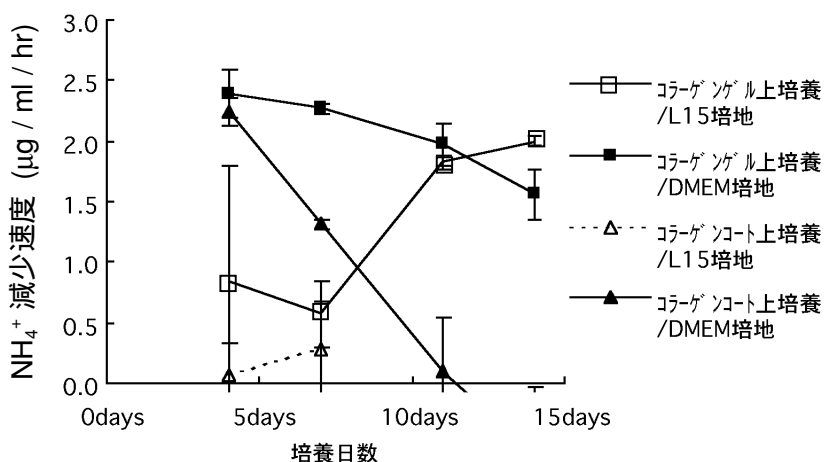


図 12 培養細胞によるアンモニア代謝

【細胞内の中性脂肪量】

次に細胞内の中性脂肪量を測定した。培養液にDMEMを用いると培養一週間までは中性脂肪量が増加しており、中性脂肪の合成が行われていると確認できる。一方、培養液にL15を用いると経時的に細胞内の中性脂肪量が減少しており、中性脂肪量はDMEMを用いるよりも低いことが示された。

また培養液に脂肪酸を添加したDMEMを用いるとコラーゲンコート上のモノレイアの中性脂肪量はコラーゲンゲル上の凝集塊とほぼ同じ値まで亢進した。

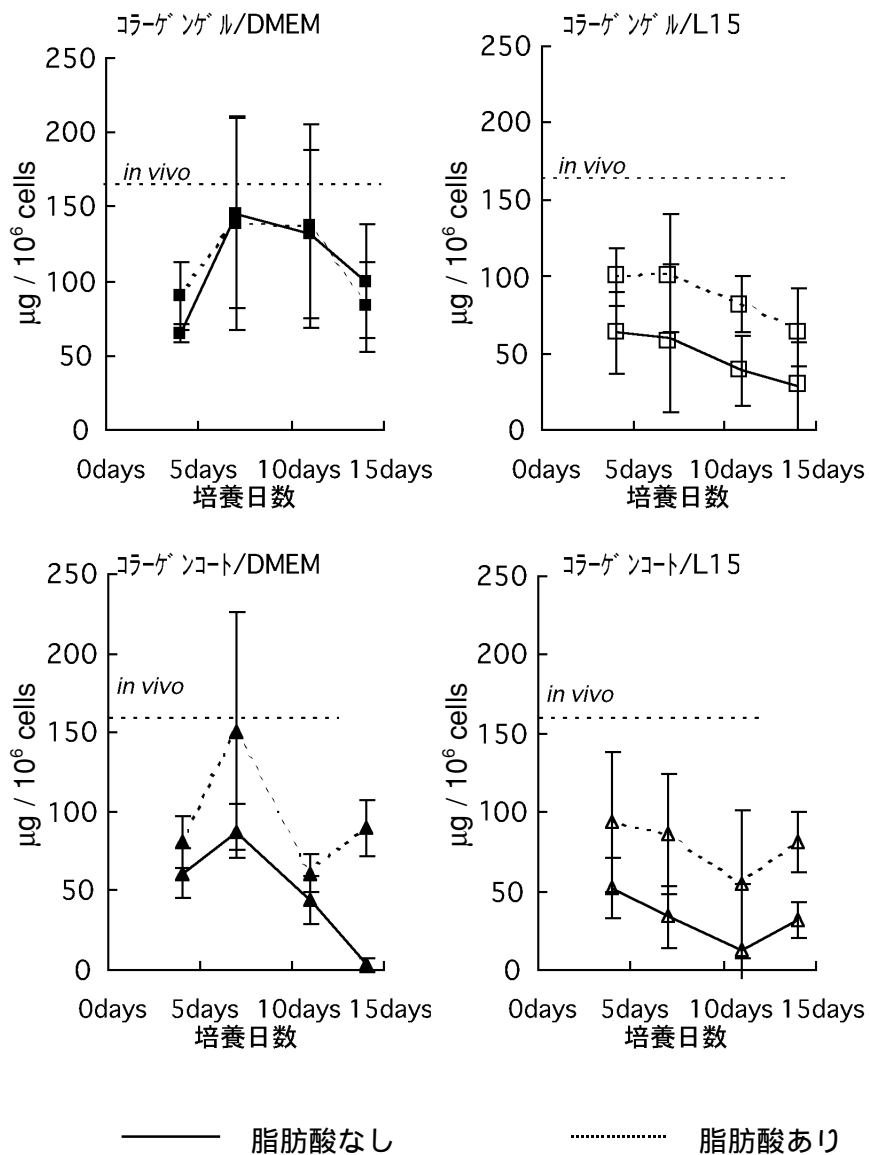


図 13 培養細胞内の中性脂肪量

【細胞内のグリコーゲン量】

細胞内のグリコーゲン量を測定した。この結果 L15 よりも DMEM で高い値を示している。またコラーゲンゲル上の凝集塊とコラーゲンコート上のモノレイアを比較した場合、どちらの培養液でもモノレイアでは検出できないか、経時的に減少しているのに対し、凝集塊では培養期間中の細胞内のグリコーゲン量がある一定の値で維持した。これはグリコーゲンの合成が維持されていることを示唆していると考えられる。

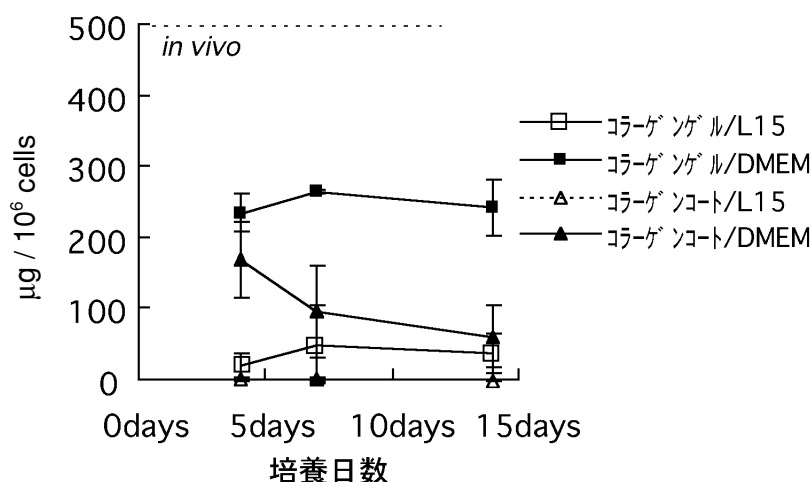


図 14 培養細胞のグリコーゲン量

【P450 酵素活性】

薬物代謝酵素 P450 について酵素活性を測定した。3 - メチルコラントレンで誘導した MC 誘導型 P450 はいずれの培養条件でも *in vivo* の機能レベルの酵素活性を維持することはできなかった。またモノレイアと凝集塊の培養法による明確な違いも見られなかった。

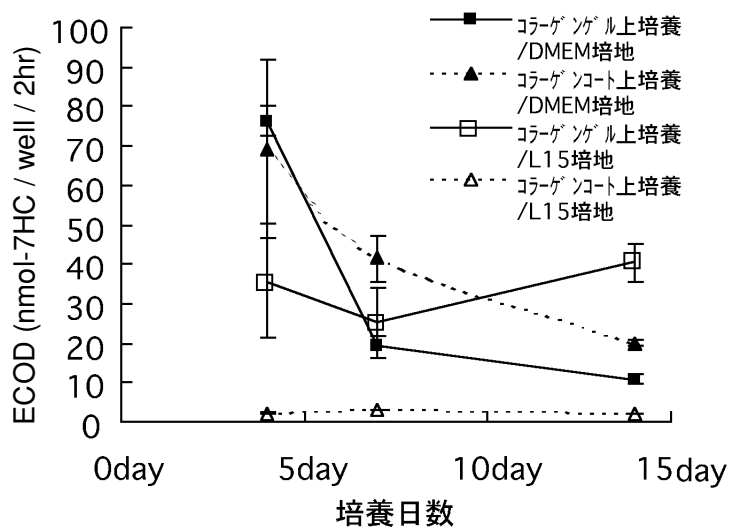


図 15 MC 誘導型 P450 酵素活性

またフェノバルビタールで誘導したP B誘導型P 4 5 0についても酵素活性を測定したが、いずれの培養条件でも *in vivo* の機能レベルより著しく低い値を示し、機能はほとんど維持されていないことを示した。

- 10 . 考察

肝臓は多種多様な特異機能を有し、生体の恒常性を維持する重要な役割を果たしている。肝臓の主な機能として、血漿タンパク質合成、脂質合成、尿素合成、胆汁合成などがあり、体内に毒物あるいは薬物が侵入した場合には肝臓で物質代謝が行われている。今回評価したコラーゲングル上ラット肝細胞培養キットは、医薬品の開発、薬理毒性試験では、肝特異機能のメカニズムを明確にする上で、より生体内に近い細胞の状態を維持できて、シンプルかつモデル化された培養法として代替法に使用する目的で開発されたものである。

今回の結果より、肝細胞をコラーゲングル上で凝集塊を培養することによりアルブミン合成や細胞内の中性脂肪量、グリコーゲン量がより生体内の細胞に近い状態であることを示唆した。これよりアルブミン合成能を指標とした毒性の判断や、高脂血症、糖尿病などの治療薬開発に中性脂肪やグリコーゲンを指標として薬効を判断するのに利用できる可能性があるのではないかと考えられる。

しかし、中性脂肪やグリコーゲンについてこれまでの評価は細胞の状態を確認したに過ぎない。細胞の活動としてこれらの合成と分泌、代謝は働いていると考えられるが、直接的な測定を行ってはいないので今後更に詳細な検討をする必要がある。アンモニア代謝や薬物代謝酵素の評価結果では機能が目標とするレベルで発現維持されていない。

また2種類の無血清の培養液を用いて評価を行った結果、コラーゲンコート上のモノレイアよりもコラーゲングル上で凝集塊を形成して培養した方が機能発現に有利な結果が多かったが、一部の機能では培養器による培養環境の違いよりも培養液の組成の違いが大きく影響している。

11 . 今後の展開

我々はこれまでに細胞凝集塊の形態による培養方法を確立し、従来の培養方法よりも高度に機能を維持することに一応の成果を得てきた。これよりスフェロイド培養器、あるいはコラーゲングル上ラット肝細胞培養用の培養キットにより、細胞の生死だけでなく、細胞の機能変化をいう観点から新しい毒性試験などが可能ではないかと考えられた。

しかし培養肝細胞を用いて医薬品の開発、薬理毒性試験を行う場合、薬物代謝に関する機能が重要であるが、今回の評価結果では *in vitro* の評価システムを構築するのに十分な機能維持を示すことはできなかった。

今後、発現が不十分であった機能がより生体内の細胞の機能レベルに近い状態にすることが求められる。この課題に取り組み、今回の研究で得たデータを元にして、さらに培養液や培養基材の改良を行い、より高度な培養環境を得られる培養方法の開発を行う予定である。

12 . 参考文献

- [1] Tomita Y. (1994) *Biochem. Biophys. Acta* 1170, p253-257
- [2] J. Enami (1987) "Growth and differentiation of mammary epithelial cells in culture.", p125-153
- [3] JIAN ZHONG TONG (1992) *EXPER. CELL RES.* 200, p326-332
- [4] 大野忠夫 (1994) *動物実験代替法マニュアル*
- [5] 井嶋博之 (1995) *人工臓器*. 22, p171-176
- [6] Brodal B. P.; Gehrken B. B. (1986) *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, 46:2, p193-195
- [7] Wiggins D. (1996) *Biochem. J.* 320(Pt 2), p673-679
- [8] Shimabukuro M., Lee Y. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9, p4637-4641
- [9] Reiners J. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, p1825-1829
- [10] Schuetz E. G. (1988) *J. Cell. Physiol.* 134, p309-323
- [11] Burke M. D. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, p3337-3345

13 . 研究業績

13 - 1 . 原著論文 なし

13 - 2 . 総説など なし

13 - 3 . 国際学会発表 なし

13 - 4 . 国内学会発表 なし

13 - 5 . 新聞など なし

13 - 6 . 特許申請 なし

14

(1) Development of toxic and pharmacological evaluation system based on animal cellular response to stress.

. Development of cell culture system in vitro for evaluating the toxicity and the effects of medicine.

. Producing a kit of rat hepatocyte culture on collagen gel.

(2) .¹ Masayuki Onohara

.¹ Hiroshi Sawai

(3)² Kanehisa Yokoyama, ¹ Kenji Kawamura

(4)¹ Akita Sumitomo Bakelite Co., LTD. 27-4 Aza, Nakashimashita, Souzenmachi, thuchizakiminato, Akita 011-0951, Japan.

² Laboratory of Cell and Stress Biology Japan Science and Technology Corporation. 2-1303-8 Ikeda, Omura, Nagasaki 856-0026, Japan.

(5) . 1995 – 1996

. 1997 - 1999

(6) Abstract:

We have developed cell culture systems to construct in vitro evaluation of toxic and carcinogenic test based on some culture tests by the use of spheroid formed cell culture system.

. Control of cell formation by some coated plate were evaluated. We developed single spheroid formation plate. Primary cultured cell have specific function by using this plate.

. Some specific function of rat hepatocyte were evaluated by spheroid culture on collagen and no serum medium. This culture system were suggested that albumin synthesis, storing triacylglyceride and glycogen were near quantity of in vivo in contrast to monolayer.

Spheroid formed cell culture systems were established and have high specific functions of cell than heretofore. It have the possibility by which we can establish the new toxicity test system.