

1. 研究課題名：肝細胞凍結保存法の開発
2. 研究機関：倉敷紡績株式会社 技術研究所 (yamamoto@lab.kurabo.co.jp)
3. 研究者：山本良平
4. 研究協力者：平尾滋章、柳瀬 浩、元野 満 (倉敷紡績株式会社・技術研究所)
松田尚樹、横山兼久、竹下哲史、森田直子 (科学技術振興事業団・長崎研究室)
加藤兼房 (愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所)
Kurt Droms, Gary D. Shipley (Cascade Biologics, Inc., OR)
渡邊正己 (長崎大学・薬学部)
5. 研究期間：平成7年度～平成11年度

6. 要約

細胞を用いる *in vitro* の試験法を考える場合、特に薬理・毒性試験では肝細胞は重要な細胞の一つである。しかしながら、これを安定して供給する技術、体制は整っていない。細胞の安定供給に有用な保存法としては凍結保存法があるが、肝細胞の凍結法に関しては十分な技術は開発されていない。そこで、我々はラット肝細胞の凍結保存法の開発を目指した。その結果、解凍後の生存率および単層培養での細胞接着率がいずれも 70%以上の細胞を得ることができた。得られた凍結肝細胞を用いて、凍結によるストレスが具体的にどのような形で現れるのかを検討するとともに、ラット肝細胞と可溶性ホルマザン系色素を用いた細胞毒性試験の予備検討を行った。

7. 研究目的

薬理・毒性試験法の一つとして細胞を用いた *in vitro* の試験法は利用価値の高いものである。細胞を用いた試験は、単一の試験で毒性等を完璧に予測することはできないが、得られたデータの解析が容易であり、試験条件を整えることにより再現性のあるデータが得られる。また、何よりも有利なのはヒトの細胞も利用できることである。このような観点から、我々は *in vitro* 試験法の材料としてヒトおよび動物の正常細胞の培養系を開発し多くの研究者に供給してきた。

このような *in vitro* の試験法において肝細胞は非常に重要な細胞の一つである。即ち、肝は生体の物質代謝において、蛋白質、脂質、糖質などの合成、分解、変換というような生命を維持する上で必須となる反応を司っており、更に薬物代謝・解毒にも深く関与している。

この肝の代謝の主役である肝実質細胞を長期に保存し安定供給する技術が広く望まれているが、まだ満足しうる段階ではない。例えば、現在、最も普及している技術として、ラット肝細胞の単層培養系がある。この系は非常に有用であるが、使用に耐える細胞を安定して分離するには研究者の長期のトレーニングが必要であり、また、肝細胞が本来の機能を維持するのは分離後約 1 週間、実質的には 2~3 日と極めて短く、これを用いる研究内容が制約される。更に、肝機能のあるものは十分に再現できないという問題もある。一方、長期間の機能維持、および単層培養では再現できない機能の発現のためスフェロイド培養法が開発されて

いるが、まだ確立された手法とは言えない。

以上のことを考慮し、我々はまず研究者が必要な時に何時でも肝細胞を使用できる体制を整えるために肝細胞の凍結保存法の確立を目標とし、更に肝細胞が凍結によってどのような影響を受けるのかを検討するとともに、最終的には肝細胞を用いる動物実験代替法の開発および実用化を目指して本研究を開始した。なお、肝細胞は、我々が従来扱っている表皮系細胞や血管系細胞に比べて凍結障害を受け易く、現状満足できる凍結保存法は開発されていない。

8. 材料と方法

8-1. 肝細胞の分離

5-6 週齢ウイスタ - 系ラット (雄) を材料とし、コラゲナ - ゼ灌流法(1)によって細胞を分離した。肝灌流に用いた前灌流液および灌流液の組成を表 1 に示す。

表 1 前灌流液および灌流液の組成 (g / l)

	前灌流液	灌流液
塩化ナトリウム	8.0	8.0
塩化カリウム	0.4	0.4
リン酸二水素ナトリウム	0.078	0.078
リン酸一水素ナトリウム	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
フェノ - ルレッド	0.006	0.006
炭酸水素ナトリウム	0.35	0.35
グルコ - ス	0.19	-
塩化カルシウム	-	0.56
コラゲナ - ゼ	-	0.50
アプロチニン	-	0.05

コラゲナ - ゼとしては *Clostridium histolyticum* 由来のものを用いたが、コラゲナ - ゼの影響を検討では *Streptomyces* 由来の酵素も用いた。肝灌流法を図 1 に示す。

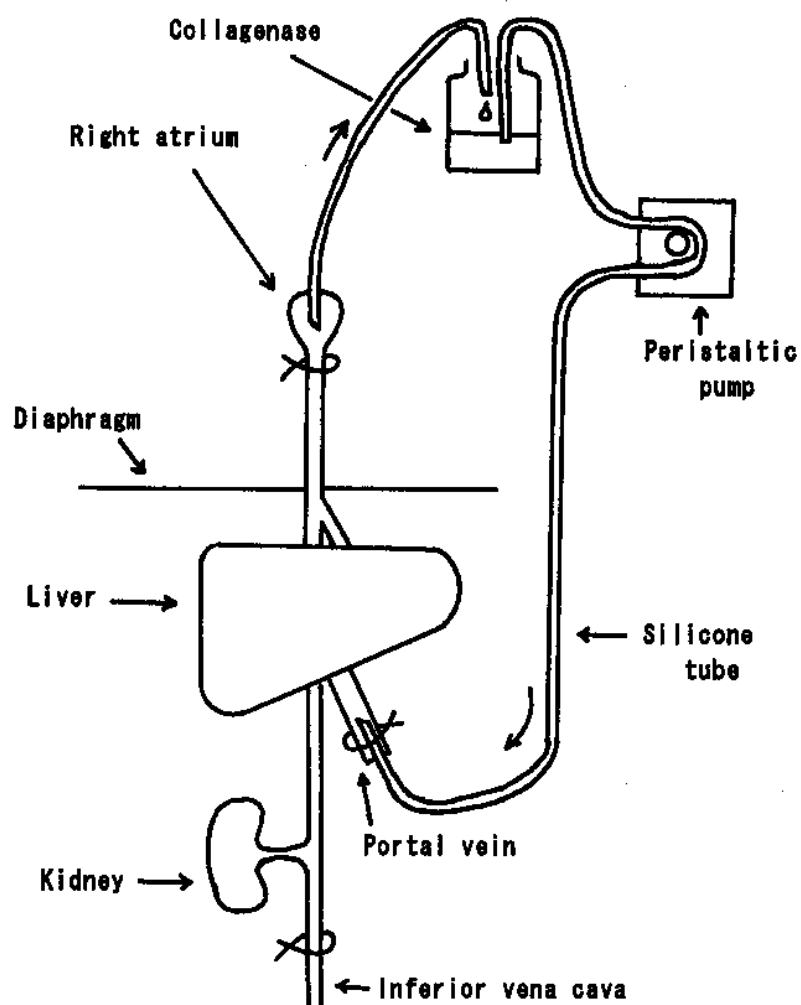


図1 肝灌流法

8-2. 細胞の凍結

2×10^6 個の肝細胞を 1ml の凍結保存液に懸濁し、ディ - プフリ - ザ - (-80°C) で一晩かけて徐々に凍結し、翌日液体窒素中に入れ使用するまで保存した。

8-3. 肝細胞の培養

肝細胞はイスコフ改変 DME 培地 (FBS、インスリン、デキサメサゾンおよびアプロチニン含有) を用いコラ - ゲンでコ - ティングした 24 ウェルマルチプレ - トで培養した。

8-4. 細胞数の測定

細胞数は血球計算板によって計測し、生細胞数についてはトリパンブル - 染色法によって算出した。

24 ウェルマルチプレ - トに接着した細胞数は、1N NaOH によって細胞蛋白を抽出し、

Lowry 法(2)によるタンパク定量によって算出した。この場合、コンフレント状態での細胞数は $1.25 \times 10^5/\text{cm}^2$ として計算した。

8-5. アルブミンの定量

肝細胞培養上清に含まれるアルブミンは、抗ラットアルブミン抗体および α -D-galactosidase 標識ラットアルブミンを用いる酵素免疫測定法(3,4)によって定量した。

8-6. インテグリンの測定

各種 mRNA の発現は RT-PCR 法により検出した。AGPC 法(5)により細胞から抽出した総 RNA $1 \mu\text{g}$ を鋳型として、ランダム 9 mers $2.5 \mu\text{M}$ をプライマーに用いて AMV reverse transcriptase $0.25 \text{U}/\mu\text{l}$ により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、各遺伝子に対応したプライマーセットを用いて Takara Taq DNA polymerase により PCR 反応を行った。

得られた PCR 産物は、エチジウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルで電気泳動し、紫外線下で写真撮影した。

8-7. LDH の測定

培養上清中の LDH は、市販されている LDH 測定キット (和光純薬) によって測定した。

8-8. 熱ストレス

細胞を一日培養した後、35 mm シャーレをパラフィルムでくるみ、プラスチック容器に移して、ウォーターバス上で 43°C 、30 分の熱ショックかけた。

8-9. ウェスタンブロット

細胞を PBS で洗浄後、RIPA 緩衝液で細胞を溶解した。この溶解懸濁液を 15000rpm で 30 分間遠心分離し、上清の蛋白質 $10 \sim 20 \mu\text{g}$ を SDS 電気泳動にかけた。泳動後、PVDF 膜 (ミリポア) にブロッティングし、10% スキムミルク / TBS - 0.1% Tween で一晩ブロッキングした。一次抗体と反応させた後、ビオチン化二次抗体およびストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼで検出した。

8-10. HSP 27 の定量

シャーレに培養した細胞を PBS で洗浄後、コラゲナーゼ処理をして細胞を回収した。これをサンドイッチ酵素免疫測定法によって測定した(6)。

8-11. 細胞毒性試験

細胞毒性試験には WST-1 ($\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$: 同仁化学) を用いた。WST-1 は細胞内の脱水素酵素による NAD^+ の還元に関与して $400\text{nm} \sim 450\text{nm}$ に吸収極大を持つ可溶性色素を生成する (図 2)。

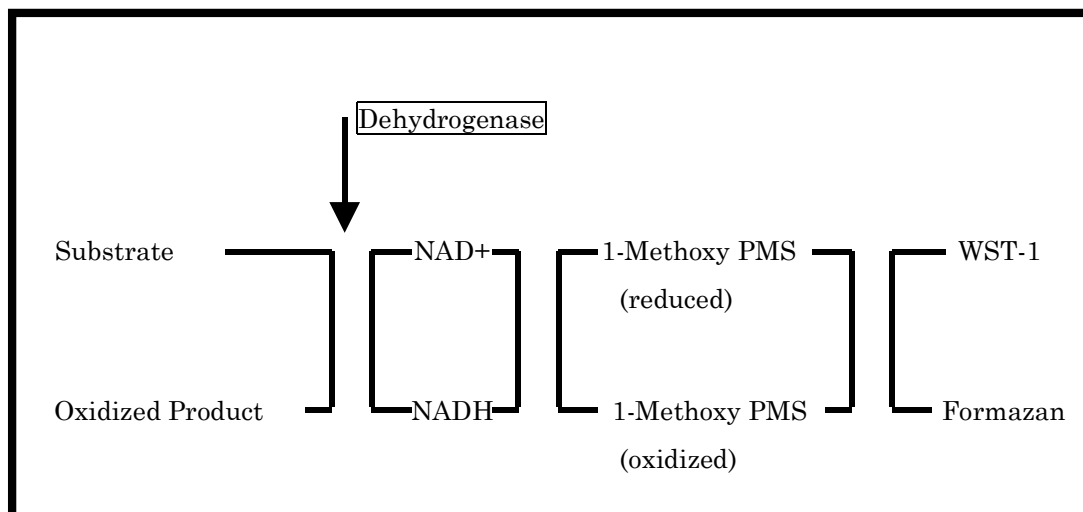


図2 WST-1 による細胞毒性試験の原理

その他の試薬

試薬としてはすべて細胞培養用または特級の試薬を用いた。

9. 結果

9-1. 肝細胞の凍結保存法に関する検討

まず、表1に示す灌流液（コラゲナ - ゼとして *Clostridium histolyticum* 由来のものを使用）を用いて分離した肝細胞で、凍結保存液の組成について検討した。

細胞保護剤のタンパク質としては、比較的安定した結果が得られた加水分解ゼラチン（2.5%）(7)を選んだ。これに10%DMSO、0.5%ポリエチレングリコールを加えたものをベースとし、更に食塩およびアミノ酸混合物を添加したものが最も良い成績であった。以後の実験ではこの組成の凍結保存液を用いた（表2）。この条件での解凍後の細胞生存率は平均72%、単層培養での細胞接着率は平均51%であった。

表2 肝細胞凍結液

加水分解ゼラチン	2.5 %
DMSO	10 %
PEG	0.5 %
NaCl	0.2 %
アミノ酸混合物	2.5 mM

上記の凍結条件で得られる解凍後の細胞生存率および細胞接着率は必ずしも満足のいくものではなかった。特に細胞接着率は向上させる必要があると考えられた。そこで、凍結前の細胞の状態をできるだけ良くすることにより凍結障害を低減することを試みた。

コラゲナ - ゼ灌流中の肝細胞を保護する目的で灌流液に種々の糖、タンパク質、ホルモンなどを添加した。その結果、ラフィノ - ス (D-galactopyranosyl-D-glucopyranosyl-D-fructofuranoside) を添加した場合に解凍後の細胞接着率が向上した。また、同時にコラゲナ - ゼの種類についても検討したが、用いた Clostridium および Streptomyces のコラゲナ - ゼでは得られる細胞に差は認められなかった。

灌流液は従来完全な組成のものを調製し、これを低温保存して用いていた。この保存法について検討したところ、塩化カルシウムを含まない状態で保存し使用時に添加することにより解凍後の細胞接着率が向上した。

以上、灌流液にラフィノ - スを添加し、塩化カルシウムを用時添加することにより解凍後の細胞生存率は平均 72%、単層培養での細胞接着率は平均 70%となった。

更に前灌流液、細胞洗浄液についても検討したところ、これらについてもラフィノ - スとアプロチニンを添加することにより、解凍後の細胞生存率および細胞接着率が向上し、最終的には細胞生存率は平均 79%、細胞接着率は平均 73%となった。

9 - 2 . インテグリンの発現

ファイブロネクチンリセプターであるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のサブユニットにつて mRNA の発現量を凍結細胞と非凍結細胞で比較した。

$\alpha 5 \beta 1$ サブユニットは、非凍結細胞では培養開始 30 分後に強く発現し、凍結細胞ではそれより遅れて 120 分後に強い発現が見られた。しかし、24 時間後にはいずれの細胞でも低いレベルとなった。

一方、 $\alpha 5 \beta 1$ サブユニットは非凍結細胞では $\alpha 5 \beta 1$ サブユニットと同じく 30 分後に強い発現が見られたのに対し、凍結細胞では低いレベルの発現しか認められなかった。

9 - 3 . アルブミンと LDH の分泌

凍結細胞と非凍結細胞を培養し、培養上清中のアルブミンを定量した (図 3) 。培養液中のアルブミンは凍結細胞で高い傾向が見られた。

同様に LDH 活性を調べたところ凍結細胞では非凍結細胞の 2 ~ 4 倍の活性が認められた (図 4) 。

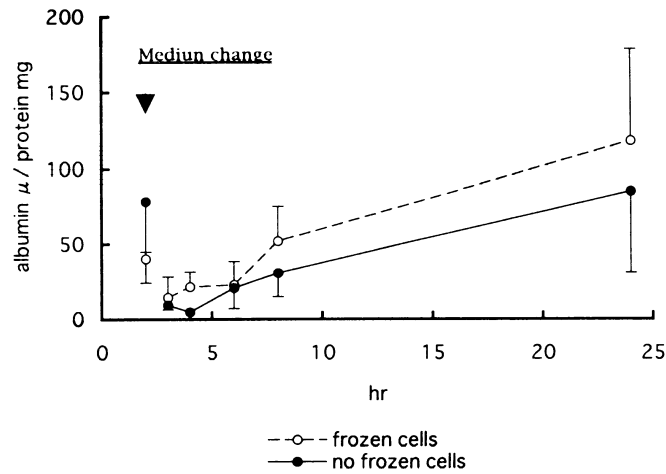


図3 培養上清中のアルブミン量

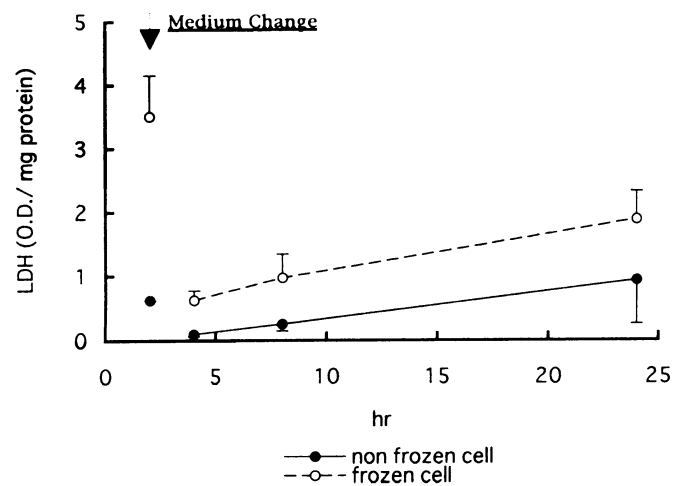


図4 培養上清中のLDH活性

9-4. HSPの発現

9-4-1. HSP27

培養前のHSP27は凍結細胞と非凍結細胞で有意差が認められなかった(図5a)。一方、培養した場合、凍結細胞では培養時間とともにHSP27が増加し、16時間では非凍結細胞の約2倍のレベルであった(図5b)。更に、凍結細胞の長期の培養を行ったところ、ばらつきは大きいものの培養5日でもHSP27の増加が認められた(表3)。

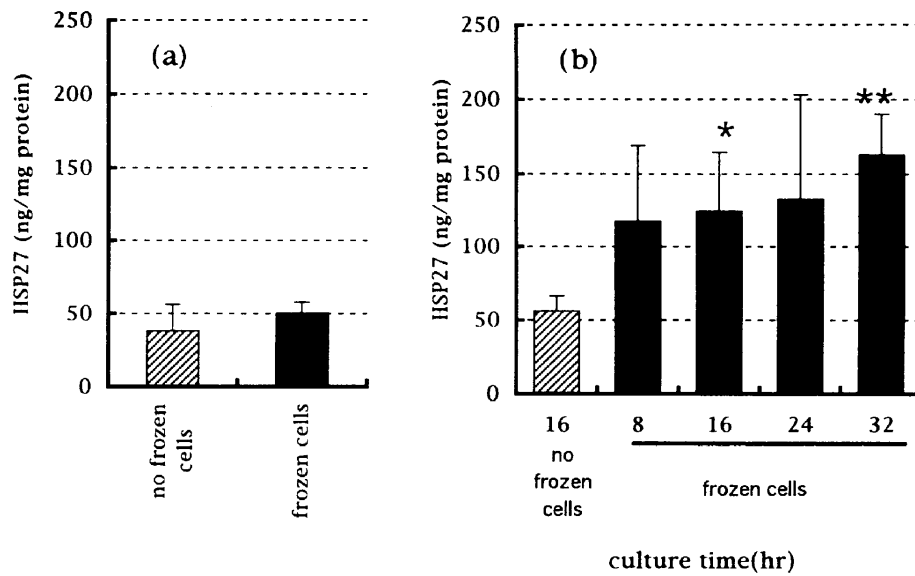


図5 肝細胞におけるHSP27の発現

表3 凍結細胞培養時のHSP27の変化

day	mean	SD	n
3	269.8	94.5	4
4	439.4	269.7	4
5	477.0	239.5	4

(ng/ mg protein)

9-4-2. HSP70

HSC73と、熱ストレスによって誘導されるHSP72についてウエスタンブロットによって調べた。同一個体から得られた凍結細胞および非凍結細胞を培養したところHSC73のみが検出された。培養初期の凍結細胞におけるHSC73の発現は、非凍結細胞より低く、培養24時間後に非凍結細胞と同じレベルに達した(図6)。

培養1日後に熱ショックをかけた細胞では1時間後および4時間後にHSP72のピークが認められたが、凍結細胞では初期の発現が非凍結細胞より高かった(図7)。

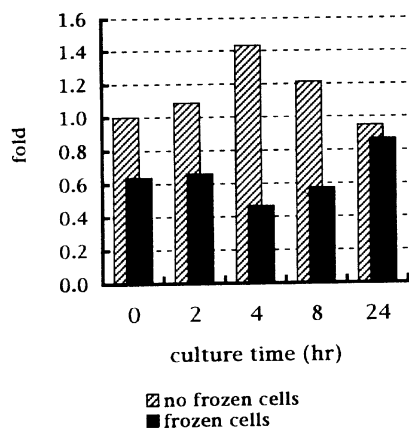


図6．肝細胞におけるHSC73の発現

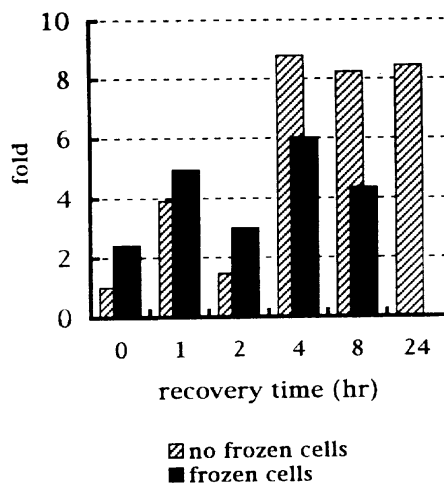


図7．肝細胞におけるHSP72の発現

9-5．肝細胞を用いた細胞毒性試験

肝細胞を用いた細胞毒性試験法として WST-1 を用いた試験について予備的な検討を行った。この検討においては、凍結肝細胞ではなく分離直後の細胞を用いた。

試験は 96 ウェルマルチプレートを用い、図 8 に示す方法で行った。この方法で、EC/HO International Study on Alternatives to Draize Eye Irritation Test(8)にて評価された被検物質 19 種について EC50 を求め、ドレイズ試験 (in vitro 試験) および正常ウサギ角膜上皮細胞を用いたニュー - トラルレッド法 (NR法) (9)の値と比較した。



図 8 肝細胞を用いた WST-1 試験

結果を表 4 に示す。表 4 から分かるように、今回の被検物質は肝細胞に対して強い障害性を示すものが少なかった。また、この試験条件では肝細胞は正常ウサギ角膜上皮細胞に比べて被検物質に対する感受性は低かった。

表4 肝細胞を用いた細胞毒性試験とドレイズ法およびNR法の比較

被検物質	ドレイズ試験 (最大評点)	肝WST法 (EC50, $\mu\text{g/ml}$)	NR法 (NR50, $\mu\text{g/ml}$)
sodium hydroxide(10%)	108	>5500	6710
benzalkonium chloride(10%)	108	212	11.1
trichloroacetic acid(30%)	108	>5150	1560
benzalkonium chloride(5%)	83.8	497	30.9
quinacrine	82.0	-	0.322
Triton X-100(10%)	68.7	917	178
sodium oxalate	61.3	>5600	240
imidazole	59.3	>5600	2920
2-ethyl-1-hexanol	51.3	>5400	333
methylethyl ketone	50.0	>5500	74300
pyridine	48.0	>5650	-
butyrolactone	43.0	1550	8190
potassium cyanate	31.3	>5150	107
isopropanol	30.5	>5010	11300
methyl cyanoacetate	27.7	1760	-
ammonium nitrate	18.3	>6600	3480
ethyl-2-methylacetoacetate	18.0	3680	1210
ethyl acetate	15.0	>5030	12600
polyethylene glycol 400	0.0	>5070	42100

10. 考察

肝細胞の凍結保存については、解凍後の細胞生存率および単層培養での接着率は改善された。今までのデータを総合して考えると、凍結障害を低減するためには単に凍結保護剤や安定化剤を使用するだけでは限界がある。使用するラットの管理など総合的なコントロールが必要と考えられる。これらの要因を一つずつ検討するという地道な開発体制で臨む必要がある。薬理試験を含む多様な研究目的に対応するためには更に性能を向上させる必要があり、今後は解凍後の培養法も含めた総合的な研究が必要である。

また、凍結の影響を生化学的に調べたところ、アルブミン、LDHの測定(図3、図4)から細胞膜の障害が予想された。各HSPの挙動も凍結細胞は非凍結細胞と異なっており、代謝面でも凍結の影響が現れていると考えられた。即ち、凍結の影響を単に細胞の生存率や接着率のみで判断するのは危険であり、凍結細胞の代謝面からの研究も重要であることが分かる。

WST-1を用いた細胞障害性試験については、WST-1の還元に関与している酵素系がまだ

明かになっていないという問題がある。今回実施した試験法では、被検物質は強い細胞毒性を示さなかったが、これは試験条件、被検物質の種類にも影響されるので、本試験法の最終的な評価には更にデータを蓄積する必要がある。今後、他の細胞障害性試験との比較も行いながら本試験法の特性を明確にしながら凍結肝細胞の応用を考えていきたい。

11. 今後の展開

今後も、肝細胞の凍結保存法の検討は継続する予定である。今回得られた凍結細胞の性能は、取りあえずは研究に使用できるレベルのものであるが、分離直後の細胞に比べて生存率、接着率ともに低い。同時に今回報告した値はあくまで平均値であり、いつも同じ品質の凍結細胞が得られるとは限らない。従って、安定した品質の凍結細胞が得られる技術の確立も必要である。基礎的な検討はラットで行ってきたが、平成11年度よりヒト肝からの細胞の分離を開始した。組織の大きさ、組織の鮮度などラットとは異なる問題もあり、まだ報告できる状況ではないが最終的にはヒト肝細胞の凍結技術を目指したい。

一方、肝細胞の凍結による障害、即ち一種の凍結ストレスともいえるが、これについての基礎研究は本共同研究のテーマとして興味深いだけでなく、得られるデータは上記凍結保存法に活用できる可能性も高い。これについても、ヒト肝細胞を中心に検討を進めたい。

また、肝細胞を用いた細胞毒性試験については、肝細胞の特徴、特性が生かせる試験法を確立するための予備検討を継続し、最終的にはいくつかの方法を提案したい。

12. 参考文献

- (1) Seglen, P.O.(1976) *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
- (2) Schmidt, G. and Thamnhauer (1945) *J. Biol. Chem.* 161, 83.
- (3) Kimura, S., Uchikawa, H., Yamamoto, R. and Kato, K. (1984) *J. Appl. Biochem.* 6, 319-324.
- (4) Yamamoto, R., Hattori, S., Inukai, T., Matsuura, A., Yamashita, K., Kosaka, A. and Kato, K. (1981) *Clin. Chem.* 27, 1721-1723.
- (5) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 157-159.
- (6) Kato, K., Goto, S., Hasegawa, K. and Inaguma, Y. (1993) *J. Biochem.* 114, 640-647.
- (7) Kato, K., Umeda, Y., Suzuki, F. and Kosaka, A. (1980) *Clin. Chim. Acta* 120, 261-265.
- (8) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann, H. (1995) *Toxic. in Vitro* 9, 871-929.
- (9) Torishima, H., Yamamoto, R. and Watanabe, M. (1995) *AATEX* 3, 29-36.

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

柳瀬 浩、平尾滋章、元野 満、山本良平、竹下哲史、加藤兼房、渡邊正己：ラット肝細胞を用いた凍結ストレスの検討、日本組織培養学会平成 9 年大会、平成 9 年 5 月 22 日 - 5 月 23 日、横浜 .

13 - 5 . 新聞など なし

13 - 6 . 特許 なし

14 .

(1) Development of cryopreserved hepatocytes.

(2) Laboratory: Technical Research Laboratory, Kurabo Industries, Ltd.

(3) Researcher: Ryohei Yamamoto

(4) Colaborator: Shigeaki Hirao, Hiroshi Yanase and Michiru Genno (Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.)

Naoki Matsuda, Kanehisa Yokoyama, Satoshi Takeshita, Naoko Morita (Laboratory of Cell and Stress Biology, Japan Science Technology Corporation)

Kanefusa Kato (Institute of Developmental Research, Aichi Prefectural Colony)

Kurt Droms, Gary D. Shipley (Cascade Biologics, Inc.)

Masami Watanabe (School of Pharmaceutical Science, Nagasaki University)

(5) 1995 – 1999

(6) Abstract:

Hepatocytes are one of indispensable cells to pharmacology and toxicology. However, we can not supply hepatocytes to researchers, because the technique to store hepatocytes is not established. In this project, we have tried to develop “the freezing method of hepatocytes for storage.”

The cryopreserved rat hepatocytes were obtained, which viability and plating efficiency were over 70% after thawing.

We studied the stress by cryopreservation, using those cells. At the same time, we obtained some preliminary data about cytotoxicity test using hepatocytes and formazan dye.