

博 士 論 文

ヒト肝細胞三次元培養の医用工学的応用 に関する研究

平成 27 年度

崇城大学大学院 工学研究科

応用生命科学専攻 博士課程

医用生体工学講座

1319D01

石井 貴晃

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 表面形状の異なる HAp 担体(HAp 10%、20%、30%)が細胞の増殖と機能に与える影響	
2-1 序	7
2-2 実験方法	
2-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器	8
2-2-2 試薬の調製法	11
2-2-3 滅菌法	13
2-2-4 細胞の継代及び計数法	14
2-2-5 細胞の凍結法及び融解法	15
2-2-6 使用した培養担体の作製法	16
2-2-7 グルコース消費速度からの細胞数計測法	18
2-2-8 胎児肝細胞の高密度培養法	20
2-2-9 胎児肝細胞に由来する肝芽細胞の高密度培養法	20
2-2-10 分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法	21
2-2-11 ELISA 法による PIVKA- II 産出速度測定	24
2-2-12 走査型電子顕微鏡(SEM)による培養担体の観察	29
2-2-13 電子線三次元粗さ解析装置による曲率半径計測	32
2-2-14 アクチン及び核の二重染色法	34
2-3 結果と考察	
2-3-1 HAp 10%、20%、30%担体における胎児肝細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度	37
2-3-2 HAp 10%、20%、30%担体における薬物代謝活性の比較	38
2-3-3 HAp 10%、20%、30%担体における高密度培養後の形質転換マーカー(PIVKA- II)産出速度の比較	39
2-3-4 SEM による HAp 10%、20%、30%担体表面形状の観察	40
2-3-5 HAp 10%、20%、30%担体の曲率半径分布	41
2-3-6 共焦点レーザー顕微鏡による胎児肝細胞及び肝芽細胞の形態観察	43
2-3-7 高密度培養後の胎児細胞及び肝芽細胞の SEM による形態観察	44
2-4 総括	45

第 3 章	足場材料としてのナノファイバーが細胞に与える影響	
3-1	序	46
3-2	実験方法	
3-2-1	使用細胞、使用試薬、器具及び機器	47
3-2-2	試薬の調製法	49
3-2-3	滅菌法	51
3-2-4	細胞の継代及び計数法	51
3-2-5	細胞凍結法及び融解法	51
3-2-6	グルコース消費速度からの細胞数計測法	51
3-2-7	三次元細胞培養モジュールの詳細	52
3-2-8	使用したナノファイバー不織布の作製方法及び材質	53
3-2-9	ナノファイバー不織布を用いた各種肝細胞の培養法	54
3-2-10	分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法	56
3-2-11	走査型電子顕微鏡(SEM)によるナノファイバーの観察	57
3-3	結果と考察	
3-3-1	アルミホイル有、無ナノファイバー不織布における胎児肝細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度	58
3-3-2	アルミホイル有、無ナノファイバー不織布における胎児肝細胞および肝芽細胞の薬物代謝活性	59
3-3-3	径の異なるナノファイバーにおける胎児肝細胞および肝芽細胞の最高到達細胞密度	60
3-3-4	径の異なるナノファイバーにおける胎児肝細胞および肝芽細胞の薬物代謝活性	61
3-3-5	培養終了後の肝芽細胞の SEM による形態観察	62
3-3-6	径の異なるナノファイバーにおける成人肝細胞の薬物代謝活性	64
3-4	総括	65
第 4 章	新規三次元細胞培養モジュールの開発	
4-1	序	66
4-2	実験方法	
4-2-1	使用細胞、使用試薬、器具及び機器	67
4-2-2	試薬の調製法	67
4-2-3	滅菌法	67
4-2-4	細胞の継代及び計数法	67
4-2-5	細胞凍結法及び融解法	67

4-2-6	グルコース消費速度からの細胞数計測法	67
4-2-7	種々の代謝物の濃度測定法	68
4-2-8	三次元細胞培養モジュールの詳細	71
4-2-9	使用したナノファイバー不織布の作製方法	72
4-2-10	三次元細胞培養モジュールを使用した灌流培養システムの詳細	72
4-2-11	本灌流培養システムを用いた胎児細胞及び肝芽細胞の 高密度培養法	73
4-2-12	本灌流培養システムを用いた成人肝細胞の高密度培養法	74
4-2-13	分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法	75
4-2-14	ELISA 法による PIVKA- II 産出速度測定	76
4-2-15	走査型電子顕微鏡(SEM)による培養担体の観察	76
4-3	結果と考察	
4-3-1	本灌流培養システムを用いて培養した胎児肝細胞の高密度培養 と代謝物濃度	78
4-3-2	本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の高密度培養と薬物代 謝活性（1回目）	81
4-3-3	本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の高密度培養と薬物代 謝活性（2回目）	83
4-3-4	本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の PIVKA- II 産出速度 の推移	85
4-3-5	培養終了後の肝細胞の SEM による形態観察	86
4-3-6	本灌流培養システムを用いて培養した成人肝細胞数の推移と薬 物代謝活性	88
4-3-7	培養終了後の成人肝細胞の SEM による形態観察	90
4-4	総括	91
第 5 章 培養担体 Cellbed®を用いた成人肝細胞の培養		
5-1	序	92
5-2	実験方法	
5-2-1	使用細胞、使用試薬、器具及び機器	94
5-2-2	試薬の調製法	94
5-2-3	滅菌法	94
5-2-4	細胞の計数法	94
5-2-5	細胞の融解法	94
5-2-6	Alamar Blue を用いた細胞数計測法	95

5-2-7	Cellbed®の作製方法および特徴	97
5-2-8	使用した細胞外マトリックス(ECM)の特徴	98
5-2-9	Cellbed®を用いた成人肝細胞の培養方法	100
5-2-10	POP・TOOS法を用いた GOT・GPT 漏出量測定法	101
5-2-11	分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法	103
5-2-12	走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞および Cellbed®の観察	104
5-3	結果と考察	
5-3-1	各種培養条件での成人肝細胞の細胞密度の推移	105
5-3-2	各種培養条件での GOT、GPT 漏出量測定	106
5-3-3	各種培養条件での成人肝細胞の薬物代謝活性	108
5-3-4	培養終了後の SEM による形態観察	109
5-4	総括	110
第 6 章	総論	111
参考文献		116
謝辞		122

第1章 緒論

現在、一般的に行われている細胞培養は、dishを用いた単層培養(二次元)が主流である。単層培養は *in vitro* での因子、薬剤などとの相互作用の観察や研究に便利な方法であるが、近年、付着依存性の細胞を生体外で培養すると、細胞が培養面に対して平面(二次元)状に付着増殖し、生体内の三次元構造とは異なった形態をとる為、生体内の環境を反映できていないと考えられる研究が数々報告されている(Fig.1-1)。

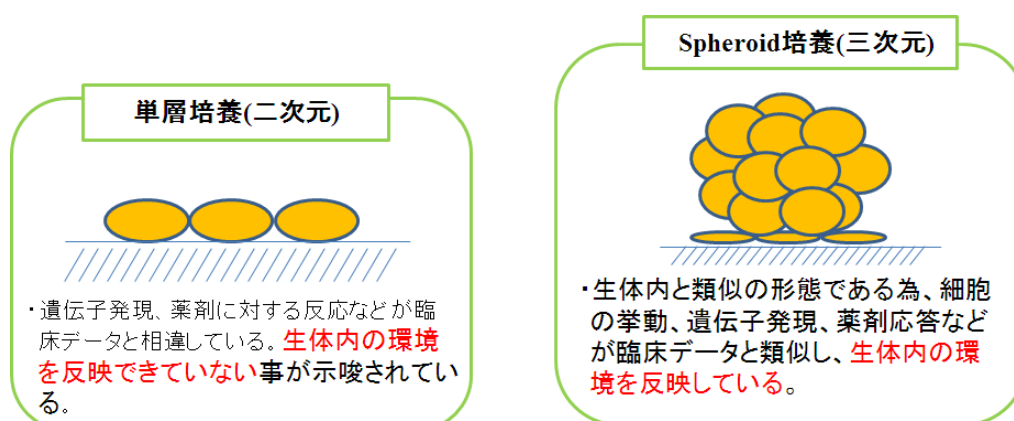


Fig.1-1 二次元培養、三次元培養の比較

例えば、神経芽腫の培養系においては、二次元培養より三次元培養でより神経突起を多く伸ばし、マイクロアレイ分析の結果 1766 個の遺伝子の発現が異なっていたという報告¹⁾や、親水化加工したポリエチレンテレフタレート(PET)の不織布上で臍帯血細胞の造血能を測定したところ、三次元(3D)培養ではサイトカインなどを添加せずに 1.3-2 倍も多くの細胞を産生したという報告²⁾など、他にも様々な報告が上がっている³⁾⁻²²⁾。

三次元培養の方法としては、多孔質性担体内での培養、プレート上でのスフェロイド形成²³⁾、液滴中でのスフェロイド形成²⁴⁾、細胞積層²⁵⁾、磁力を用いた浮遊培養²⁶⁾などの方法がある。また、生物素材、人工素材、ハイブリット素材を、種々の形状に加工したバイオマテリアルが開発され、細胞の生死、付着形態、細胞伸展、増殖、分化、極性、浸潤移行、自己組織化などの挙動を制御するために、培養担体として使用されている²⁷⁾⁻⁴⁰⁾。

一方、一般的な医薬品の開発は以下の手順で行われている (Fig.1-2)。

	2000～ 2004	2001～ 2005	2002～ 2006	2003～ 2007	2004～ 2008	2005～ 2009	2006～ 2010	2007～ 2011
合成(抽出)								
前臨床試験開始	1:2,158	1:2,538	1:2,636	1:2,790	1:3,073	1:3,213	1:3,116	1:3,216
臨床試験開始	1:3,653	1:5,154	1:7,329	1:6,790	1:7,550	1:8,698	1:8,108	1:8,286
承認申請 (自社)	1:6,724	1:8,063	1:12,443	1:16,103	1:21,088	1:25,090	1:26,920	1:28,173

Fig.1-2 新薬開発の成功率⁴¹⁾

まず基礎研究などから得た知見を出発点として化合物の合成と最適化を行う。その後、非臨床試験として動物実験(*in vivo*)を繰り返すことにより、候補化合物を数個程度まで絞り込む。そして、これらの化合物がさらに臨床試験において安全性と有効性が確認できた場合のみ市販化される。実際に市販化にこぎ着けるものは、わずかしかなく、開発期間は 8-15 年、研究開発費用は数百億円を上回り、しかも年々膨大化してきている為、新薬開発はリスクが非常に高いものとなっている^{41),42)}。開発途中でドロップアウトする大きな要因の一つとして、非臨床試験から臨床試験へ移行する際の動物種差の問題が挙げられる⁴³⁾。

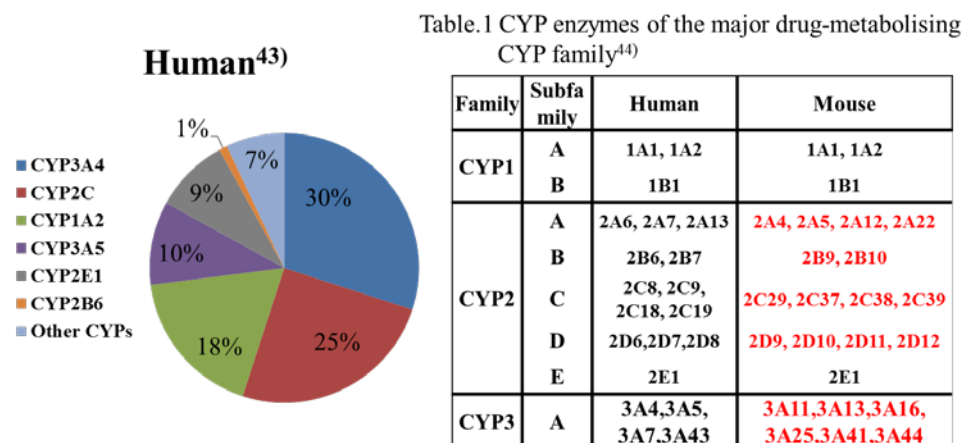


Fig.1-3 ヒト CYP 分子種の割合

ヒトとその他の動物では存在する酵素の分子種、およびその存在比に違いがあり、特に動物実験で一番用いられているマウスにおいては、Fig.1-3 の赤字で示すように多くの分子種に違いがあり、これが動物種差の一因となっている⁴⁴⁾。また、ヒトにおいては薬物の主要な代謝酵素である CytochromeP450 の中でも CYP3A4 が最も多く、肝臓に約 30%存在している。

近年、この動物種差の問題を解決するために、ヒト由来試料 (組織、細胞、細胞成分等) を用いた検討 (*in vitro*) が活発化し⁴⁵⁾⁻⁵¹⁾、さらに、コンピューターモデリングによる予測技術(*in silico*)も発展してきている⁵²⁾⁻⁵⁶⁾。そこで、様々な化学物質、毒物、医薬品などの代謝に関係する肝細胞が、医薬品の開発の分野において非常に注目されている。一般に、正常なヒト肝細胞は、*in vitro* において医薬品の効能や、毒性の評価を行うために使用されている。現在、動物実験毒性試験法として 4 つの試験法が行われている⁵⁷⁾。しかし、正常なヒト肝細胞はその培養期間が一週間以内と短いため、動物実験の代替法として研究段階にあるのは急性毒性試験(試験期間：0-7 日間)のみで、それ以上の培養期間が必要な亜急性毒性試験(14 日-28 日間)、亜慢性毒性試験(90 日間)、慢性毒性試験(6-12 ヶ月間)などは動物実験代替法の検討され始めたのが現状である (Fig.1-4)。そこで、正常なヒト肝細胞を長期間機能維持する培養法が求められている。

	急性毒性試験	亜急性毒性試験	亜慢性毒性試験	慢性毒性試験
投与期間	単回、継続投与 0-24時間 (観察期間： 0-14日間)	反復、又は継続投与 反復投与では、 国際的ガイドラインで 14-28日間とされている。	反復、又は継続投与 げっ歯類では90日間、 他の動物種では寿命の10%を超えない期間で行われる。	反復、又は継続投与 寿命の10%を超える期間で行う。 通常6-12カ月の期間で実施される。
代替法	各種細胞培養 (観察期間： 0-7日間)	無し	無し	無し

Fig.1-4 動物実験毒性試験法⁵⁷⁾

このように、ヒト正常肝細胞及び肝がん細胞の三次元培養は、医薬品開発や種々の化学物質の安全性・毒性試験、あるいは、肝不全患者の肝機能を代行するための人工肝臓開発など、様々な分野で注目されている⁵⁸⁾。

一般に肝臓の機能には、Table 1-1 に示すように、栄養素の代謝(新しい栄養素を体に取り入れ、老廃物を排泄)、摂取した栄養素の貯蔵(必要に応じて血液中に放出、体内に供給)、脂溶性物質の消化を助ける胆汁の産生、解毒作用(アルコールや薬剤を分解、タンパク質が分解時に発生するアンモニアなどの有害物質の代謝)など 500 種類以上ある⁵⁹⁾。

Table. 2 肝臓の代表的機能

代謝機能	糖質代謝 脂質代謝 アミノ酸・タンパク質の代謝 ビタミン・ホルモンの代謝
解毒機能	薬物代謝 アルコール代謝 アンモニア代謝
排泄機能	胆汁酸生成 ビリルビン分泌

肝臓の中で、この機能の主な担い手になっているのが肝実質細胞であるが、この肝実質細胞(以下、成人肝細胞)は、生体外では増殖せず、通常の単層培養では培養 1 週間程度で機能の低下や消失が起こってしまう。そのため、人工肝臓などには初代ブタ肝細胞が用いられてきた^{60),61)}。しかし、無菌状態で飼育したブタであっても、その品種によらず、染色体中に内在性のブタレトロウイルスが存在することが明らかになり⁶²⁾⁻⁶⁴⁾、さらにこのウイルスのヒトへの感染などのリスクが指摘されたため⁶⁵⁾⁻⁶⁹⁾、人工肝臓開発においても、将来はヒト肝細胞の利用が望まれている⁷⁰⁾。そこで現在、成人肝細胞を長期機能維持する為の培養法や⁷¹⁾⁻⁷⁵⁾、増殖能のある未分化の肝幹細胞を用いて、細胞供給源とする方法が注目されている⁷⁶⁾⁻⁷⁹⁾。

これまで本研究室では、基礎研究として肝幹細胞の一種である肝芽細胞⁸⁰⁾に着目し、その高密度培養及び形質転換抑制に適した培養担体素材の検討を行ってきた⁸¹⁾。また、肝細胞の機能発現、機能維持の為の培養方法としても、上述したように三次元培養が注目されてきた⁸²⁾。肝細胞の三次元培養の方法としては、プロテオグリカン等の細胞外マトリックス(ECM)を用いた培養方法⁸³⁾や、各種多孔質担体やポリウレタンフォームを用いた培養法⁸⁴⁾⁻⁸⁷⁾、dish 表面を加工し培養を行う方法^{88),89)}など様々な方法が知られている。

そこで本研究では、これまで本研究室で三次元培養担体をして使用されてきたハイドロキシアパタイト⁸¹⁾に着目し、多孔質材料内部の微小環境及び細胞と材料の相互作用を含む最適な三次元培養条件の検討を行った。

一方、近年、ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーを、細胞培養や組織形成の足場材料として用いることが注目されており、例えば、熔融紡糸に

よって作製されたナノファイバーを足場材料に用いる方法⁹⁰⁾や、有機系ナノファイバーを溶媒に分散した混合液を利用してナノファイバーのパターンを形成し、さらには細胞培養に有効な機能性薬剤をこのパターンに吸着させることにより、細胞の接着、増殖、分化を制御する方法⁹⁰⁾などが提案されている。しかしながら、これらの方法では、細胞の成育に必要な栄養分や酸素を補給することまでは考慮されていなかった。そこで、培養液を供給する中空糸と、細胞を培養するための不織布などの多孔性担体を組み合わせた細胞培養用モジュールが提案されている。しかしながらこの方法は、中空糸モジュール内に多孔性担体が配置されるだけであり、必ずしも培養液を供給する中空糸と多孔性担体が近接していないため、細胞分泌物は保持しやすいが、栄養の補給効率が悪く、代謝老廃物の除去は全く不十分であった。さらに、多孔質中空糸膜の内腔に細胞を充填し、栄養分とともに中空糸外部に化学物質や薬剤などの被験物質を流し、被験物質の細胞による代謝や代謝速度をモニタリングする試験方法及び装置が知られている⁹⁰⁾が、この方法では、充填した細胞と中空糸が直接接するため、中空糸表面が細胞吸着によって閉塞し、酸素や栄養の供給、代謝老廃物の除去が不十分になるという問題がある。

そこで本研究では、人工肝臓開発等の際に課題とされる上記の点を克服し、さらに、前臨床段階でヒトに対する毒性・効能を予見し、開発費及び開発期間を削減するヒト細胞実験による毒性・効能試験技術を開発するために、酸素透過性中空糸の製造メーカーである三菱レイヨン社との共同研究で、ナノファイバーを足場として組み込んだ三次元細胞培養モジュール⁹¹⁾を作製し、作製したモジュールを使用した灌流培養システムの開発を行った。

上述したように、これまで肝細胞の機能発現、機能維持の為の培養方法として、プロテオグリカン等の細胞外マトリックス(ECM)を用いた培養方法²⁴⁾が試みられてきた。ECMとは、細胞の外周に形成される線維状あるいは網目状の構造体の総称であり、細胞外の空間を充填すると同時に骨格的役割、細胞接着における足場の役割を担っている⁹²⁾。さらに近年では、様々な増殖因子や分化誘導因子と同様、細胞の増殖・分化の制御に直接かかわっていることが明らかになってきている⁹³⁾⁻⁹⁵⁾。ECMには、コラーゲンやプロテオグリカン、あるいはフィブロネクチンのような結合組織、基底膜の主役的構成タンパク質であるラミニニンなどが存在している。一般に、成人肝細胞を培養する際にはdishにI型コラーゲンが塗布されており、これがないと細胞が接着せずに死滅してしまう。また、ES細胞やiPS細胞に関してもECMについて報告されており、細胞培養を行う上で重要ものとなってきている^{96),97)}。そこで本研究では、日本バイリン(株)の高純度シリカ三次元培養担体Cellbed®にECMを塗布し、評価を行った。

以上のように、本研究では、生体内に近い状況で肝細胞を培養できる三次元培養を軸として、亜急性毒性試験、慢性毒性試験(動物実験代替法)を確立するために、機能を長期間(2週間～数ヶ月)維持する為の基礎的研究として 1) ハイドロキシアパタイト(HAp)多孔質担体が胎児肝細胞及びヒト肝芽細胞の増殖及び機能へ与える影響 2)三次元培養モジュールを使用した灌流培養システムによる肝細胞の長期維持培養、3)三次元培養担体 Cellbed[®]が凍結肝細胞の生存及び機能に与える影響について検討を行った。

本論文は、6章から構成されている。第2章では、本学ナノサイエンス学科友重研究室と共同で表面形状の異なる培養担体(HAp10%、HAp20%、HAp30%)を開発した。また、増殖性がありヒト肝細胞へ分化する肝幹細胞の一種である肝芽細胞⁷⁶⁾を用いて、HAp 担体表面形状の変化が細胞に与える影響について検討を行った。第3章では、中空糸の製造メーカーである三菱レイヨン社との共同研究で開発した三次元細胞培養モジュールの内部で、細胞の足場として充填されているナノファイバーのみの培養を行い、ナノファイバーが細胞の増殖及び薬物代謝活性に与える影響について検討を行った。第4章で、上述の三次元細胞培養モジュールを使用した灌流培養システムの開発を行い、胎児肝細胞、肝芽細胞及び成人肝細胞の長期時培養について検討を行った。第5章では、日本バイリーン(株)の開発した高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed[®]を用いて、成人肝細胞の長期機能維持を目的として ECM を使用した実験を行った。第6章は以上の研究の総論である。

第2章 表面形状の異なる HAp 担体(HAp 10%、20%、30%)が細胞の増殖と機能に与える影響

2-1 序

これまで物質生産を主な目的とした動物細胞の高密度培養に、マクロ多孔質性マイクロキャリア、ポリウレタンフォーム、及びハイドロキシアパタイトなどの三次元培養担体が用いられてきた⁹⁸⁾。近年、動物細胞、特にヒト組織由来細胞の三次元(3D)培養が、癌細胞の解析や、化学的試験および薬剤開発のための動物実験代替法として再び注目されている⁹⁹⁾⁻¹⁰¹⁾。しかし、多孔質材料内部の微小環境および細胞と材料の相互作用を含む最適な 3D 培養条件は、十分に検討されていない。

これまで我々の研究室では、増殖性があり、ヒト肝細胞へ分化する肝幹細胞の一種である肝芽細胞⁷⁶⁾に着目し、ヒト胎児肝細胞に酪酸ナトリウム(SB)処理を行うことで肝芽細胞を誘導する培養条件を確立してきた。また、市販のハイドロキシアパタイト(HAp)担体上で培養することにより、高密度培養にも成功している⁸⁰⁾。さらに、その実験過程で、培養担体(HAp)の表面形状の違いが、細胞の機能向上、形質転換(PIVKA-II 産出速度)の抑制に影響を与えることが示唆された¹⁰²⁾。この細胞の形質転換の抑制は、幹細胞の培養においては特に重要であり、増殖とともに、細胞の機能が変化しないようにするための、培養条件の検討が求められている。一般に、肝細胞を培養するための足場材料については数多く研究が行われているが、同じ材料を使用し、培養担体の表面形状を詳細に検討しているものは多くはない。

そこで本章では、ナノサイエンス学科友重研究室と共同で、同じ素材・組成の HAp 懸濁液濃度 10%、20%、30%を用いて、表面形状の異なる培養担体(HAp10%、HAp20%、HAp30%)を作製し、これらの担体上で胎児肝細胞及び肝芽細胞の高密度培養を行い、細胞密度、CYP3A4 活性(薬物代謝活性)及び PIVKA-II 産出速度(形質転換の指標)を測定し、評価を行った。さらに電子線三次元粗さ解析装置を用いて、作製した担体の表面に存在する凹部の細孔サイズ分布を詳細に解析し、細胞密度及び CYP3A4 活性に有効な細孔径についても検討を行った。

2-2 実験方法

2-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

米国セルシステムズ社が、インフォームドコンセントに基づいて研究用に取得したヒト胎児由来正常肝細胞（Human normal hepatocyte：Hc cells, Fig.2-1）を、DS ファーマバイオメディカル（株）より購入し、実験に用いた。

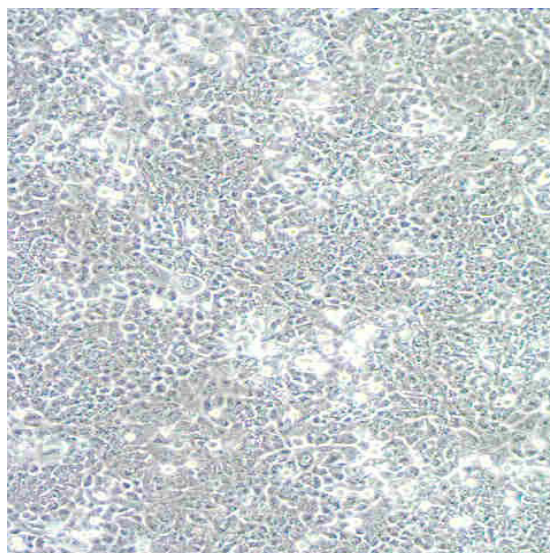


Fig.2-1 実験で用いた細胞の写真（位相差型倒立顕微鏡）

2)使用試薬

①－PBS 調製用

塩化ナトリウム〈特級〉(NaCl)	ナカライテスク
塩化カリウム〈特級〉(KCl)	ナカライテスク
リン水素二ナトリウム・12 水和物〈特級〉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	ナカライテスク
リン酸二水素カリウム〈特級〉(KH_2PO_4)	和光純薬工業

②細胞分散用

Trypsin-EDTA	GIBCO BRL
--------------	-----------

③細胞染色用	
Trypan Blue	和光純薬工業
④細胞凍結保存用	
液体窒素	内村酸素
ジメチルスルホキシド〈特級〉((CH ₃) ₂ SO) [DMSO]	ナカライテスク
⑤器具洗浄用	
次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン) (NaClO)	ナカライテスク
洗浄液 (Fine Clean CL)	東京硝子機器
⑥消毒用	
エチルアルコール〈一級〉(CH ₃ CH ₂ OH)	ナカライテスク
⑦D-MEM/F-12 培地	
D-MEM/F12	GIBCO
HEPES	DOJINDO
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	ナカライテスク
Penicillin(ペニシリン G カリウム)	明治製菓
Streptomycin(硫酸ストレプトマイシン)	明治製菓
⑧ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum : FBS)	Hyclone
Human-acidic FGF	コスモバイオ
⑨分化誘導剤	
酪酸ナトリウム(CH ₃ (CH ₂) ₂ COONa)(生化学用)	SIGMA
⑩電子顕微鏡用の試料作製	
グルタルアルデヒド (OHC(CH ₂) ₃ CHO)	和光純薬工業
t-ブチルアルコール ((CH ₃) ₃ COH)	和光純薬工業
3)使用機器及び器具	
位相差型倒立顕微鏡(ECLIPSE-TE300)	Nikon
細胞計数用顕微鏡(OLYMPUS BH-2)	OLYMPUS
バイオハザード対策用クラスⅡキャビネット	DALTON

CO ₂ インキュベーター(MCO-175)	SANYO
遠心分離機(Table-top 遠心機 510)	久保田製作所
電子天秤(AD135-S/FACT)	METTLER TOLEDO
pH メーター(MP220)	METTLER TOLEDO
純水装置(RFP343RB)	ADVANTEC
超純水装置(RFO585DA)	ADVANTEC
高温蒸気滅菌器(HV-110)	HIRAYAMA
恒温器ソフトインキュベーター(SLI-170D)	EYELA
ナチュラルオーブン(NDO-600ND)	EYELA
チューブポンプ(RP-2000)	EYELA
培養ピペット(1,2,5,10,20mL)	岩城硝子
パスツールピペット	岩城硝子
蓋付き培地ビン	岩城硝子
蓋付き遠心管	岩城硝子
スクリーバイアル瓶	岩城硝子
0.22μm 濾過滅菌フィルター(sterivex-SVGP01050)	MILLIPORE
0.45μm 濾過滅菌フィルター(DISMIC-13CP Cellulose Acetate)	ADVANTEC
Magnetic stirrer(SR550)	ADVANTEC
SLGC 血球計算盤(Burker-Turk)	クライミング
セラムチューブ(1.2mL 用)	住友ベークライト
動物細胞凍結処理容器(BICELL)	日本フリーザー
マイクロピペット(50,100,200,1000μL)	Thermo
培養ディッシュ(セルカルチャーディッシュ:φ35,60mm)	FALCON

2-2-2 試薬の調製法

1)使用培地の組成

正常ヒト胎児肝細胞(Hc 細胞)の増殖用培地は DMEM/F12 と Human acidic FGF 含有 FBS を混合し用いた。培地の組成については Table 2-1 に示した。

Table 2-1 増殖用培地(D-MEM/F12)

Reagents	Concentration
D-MEM/F12	12.0[g/L]
HEPES	3.57[g/L]
NaHCO ₃	1.2 [g/L]
Penicillin	58.8[mg/L]
Streptomycin	100 [mg/L]
FBS(Human acidic FGF 含有)	100[mL/L]

2)調製法

①細胞増殖用培地の調製法

細胞増殖用培地は、使用直前に D-MEM/F12 と Human acidic FGF 含有 FBS が、9:1 の割合になるように調製し用いた。

②D-MEM/F12 の調製法

超純水 850mL に DMEM/F12 を 1 袋(12g)加え、Penicillin 58.8mg、Streptomycin 100mg、HEPES 3.57g、NaHCO₃ 1.2g 加え 3 時間攪拌した。攪拌終了後、pH7.2 に調整し、メスアップを行い全量 900mL に調製した。その後、さらに 1 時間攪拌し、孔径 0.22 μ m の滅菌フィルターで濾過滅菌した後、培地瓶に分注した。調製後は 4℃で保存した。

③Human-acidic-FGF 含有(0.1 μ g/mL)FBS の調製

50 μ g Human-acidic-FGF を冷却遠心(5000rpm 1min 4℃)し、粉を試薬瓶底に落としてから滅菌済み超純水 1mL を加えた。ボルテックスを用い、完全に溶解してから再度冷却遠心(5000rpm 1min 4℃)した。その後、FBS 500mL に全量添加して混合した。調製後は 4℃で保存した。

④Ca・Mg free Phosphate buffer saline(－PBS)調製法

塩化カリウム(KCl)を 0.02g、塩化ナトリウム(NaCl)を 8.00g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)を 2.88g、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)を 0.20g 精秤し、1L の超純水に溶かして約 3 時間攪拌した。溶解後、0.22 μm フィルターにより濾過滅菌を行った。滅菌後、 -20°C で冷凍保存し、使用直前に解凍して使用した。解凍後は 4°C で保存した。

⑤Trypsin-EDTA 溶液の調製法

市販の Trypsin (0.5%)-EDTA(5.3mM)溶液 100mL に、－PBS を 900mL 加え、約 1 時間静かに攪拌した(最終 Trypsin-濃度 0.05%)。溶解後、0.22 μm フィルターにより濾過滅菌を行った。滅菌後、 -20°C で冷凍保存し、使用直前に解凍して使用した。解凍後は 4°C で保存した。

⑥トリパンブルー溶液の調製法

トリパンブルー(粉末)を、－PBS を用いて 0.3%(w/v)になるように溶解し、調製後、一昼夜攪拌を行い、0.45 μm フィルターにより濾過滅菌を行った。

2-2-3 滅菌法

1) 乾熱滅菌

ピペットはステンレス製の滅菌缶に収納し、電気乾熱滅菌器中で 180℃、180 分間（昇熱時間 60 分、維持時間 120 分）滅菌した。

2) 高温・高圧滅菌（オートクレーブ）

フタ付き培地瓶、フタ付き遠心管、フタ付きサンプル瓶、マイクロピペット用チップ及び乾熱滅菌が不可能な物は、滅菌テープを貼り、アルミホイルで口を覆い、120℃で 45 分間（昇熱時間 30 分、維持時間 15 分）オートクレーブ滅菌した。滅菌時には超純水を 5L 使用した。

3) 濾過滅菌

DMEM/F12 培地、－PBS、0.05%Trypsin-EDTA 及び滅菌水は、チューブポンプを用いて、孔径 0.22 μ m の濾過滅菌フィルター（sterivex-SVGP01050）で濾過滅菌を行った。

2-2-4 細胞の継代及び計数法

1)細胞増殖を目的とした継代

Hc 細胞は増殖するため、35mm dish へ播種後、約 4 日間で継代を行った。DMEM/F12 培地に FBS(Human-acidic FGF 含有)を 10%(v/v)添加したものを必要量用意し、-PBS、Trypsin-EDTA とともに 37℃で保温した。培養ディッシュからパスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、培養培地と同量の -PBS で細胞を洗浄した後、-PBS のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するため 0.05%Trypsin-EDTA を 1mL 加えて位相差型顕微鏡で細胞を観察しながら細胞の形が変わるまで静置した(約 1.5 分間)。細胞の形が変わり始めたら、血清入り培地を 1mL 加えて Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から培地ごと細胞を剥がした。これを遠心管に移し、800rpm で 1 分間遠心分離し、遠心後、上澄みを除去した。沈降細胞の入った遠心管に血清培地 5mL を加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いてトリパンプルー溶液による色素排除法で懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、生細胞数が 5×10^4 cells/mL になるように、別途加温していた新鮮培地に分注し、よくピペッティングした細胞懸濁液を直径 35mm 培養ディッシュ 1 枚当たり、2mL ずつ播種した。培養ディッシュは、37℃、CO₂ 濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

2)細胞の計数法

・色素排除法

細胞懸濁液をピペットマンで 100μL とり、マイクロチューブに入れて、トリパンプルー溶液を 100μL 添加して、よくピペッティングした。その後、血球計算盤に流し込み、顕微鏡の対物レンズ 10 倍で、1mm×1mm の区画内の染色されなかった細胞数(生細胞数)と染色された細胞数(死細胞数)を分けて計数を行った。

2-2-5 細胞凍結法及び融解法

1)細胞凍結法

適当な量の培地を用意し、 $-$ PBS、0.05%Trypsin-EDTA とともに 37°C で保温した。培養ディッシュ($\phi 60\text{mm}$)から、パストールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、次に、培養培地と同量の $-$ PBS で細胞を洗浄した後、 $-$ PBS のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するために、0.05%Trypsin-EDTA 溶液を 2mL 加え、1.5 分間インキュベーションした後、血清培地を 2mL 加え、Trypsin の作用を止めた。その後、Trypsin の作用で死にかけている細胞を完全に死滅させるために、泡立たないように注意しながら十分にピペッティングした。これを遠心管に移し、800rpm で 1 分間遠心分離し、上澄みを吸引除去した。培地 1mL を沈降細胞の入った遠心管に加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出して、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、生細胞数が $2.0 \times 10^6 \text{cells/mL}$ になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、予め氷中に保持しておいた 20%DMSO の入った増殖用培地を、細胞懸濁液と 1:1 で混合した。細胞懸濁液をセラムチューブ（アンプル）に 1mL ずつ入れ、液体窒素が混入しないようしっかりと栓をした。その後、 4°C で予冷していた BICELL にセラムチューブを入れ、 -80°C で一昼夜置き、BICELL からセラムチューブを取り出し、液体窒素(-210°C) で保存した。DMSO は室温では細胞に毒性を示すため、温度が上がらないように注意した。

2)細胞融解法

液体窒素中に保存してあるセラムチューブを取り出し、超純水で作った 40°C の超純水に入れて、溶け始めたらすぐにセラムチューブを安全キャビネットに移し、細胞毒性のある DMSO の濃度を下げるために、無菌的に約 10 倍量の培地に、融解した細胞懸濁液を添加混合した。その後、800rpm で 1 分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後、血清培地 10mL を加えてピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、生細胞数が $1 \times 10^5 \text{cells/mL}$ になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、35mm 培養ディッシュにディッシュ 1 枚当たり、2mL ずつ播種した。

2-2-6 使用した培養担体の作製法

1)使用した培養担体

Table2-2 に下記の担体の特徴を示した。

①オリジナルハイドロキシアパタイト(HAp:10%)

ナノサイエンス学科友重研究室製

②オリジナルハイドロキシアパタイト(HAp:20%)

ナノサイエンス学科友重研究室製

③オリジナルハイドロキシアパタイト(HAp:30%)

ナノサイエンス学科友重研究室製

Table2-2 各培養担体の特徴

名称	素材	かさ密度 (cm ³ /g)	粒径 (μm)
①	ハイドロキシアパタイト /β-リン酸三カルシウム	2.62	340～840
②		2.17	340～840
③		2.07	340～840

2)オリジナルハイドロキシアパタイトの作製方法

①オリジナルハイドロキシアパタイト作製の使用試薬

- ・ハイドロキシアパタイト (HAp) キシダ化学
- ・ β -リン酸三カルシウム (β -TCP) 関東化学
- ・酸化アルミニウム (Al_2O_3) [純度 98.8%] 関東化学
- ・メラミンスポンジキューブ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$) キャン☆ドウ

②オリジナルハイドロキシアパタイト作製プロトコル

HAp(HAp: β -TCP(リン酸三カルシウム)=1:1.5 の混合物)の懸濁液濃度 10%、20%、30%を、一辺が 1cm のメラミンスポンジに浸漬し、その後、スポンジを 1200°Cで焼結することで、HAp 担体ブロックを作製した。このブロックをエタノールで洗浄し、破碎することで担体を作製した。その後、篩にかけ、粒径を揃えた担体を培養に使用した(Fig.2-1)。

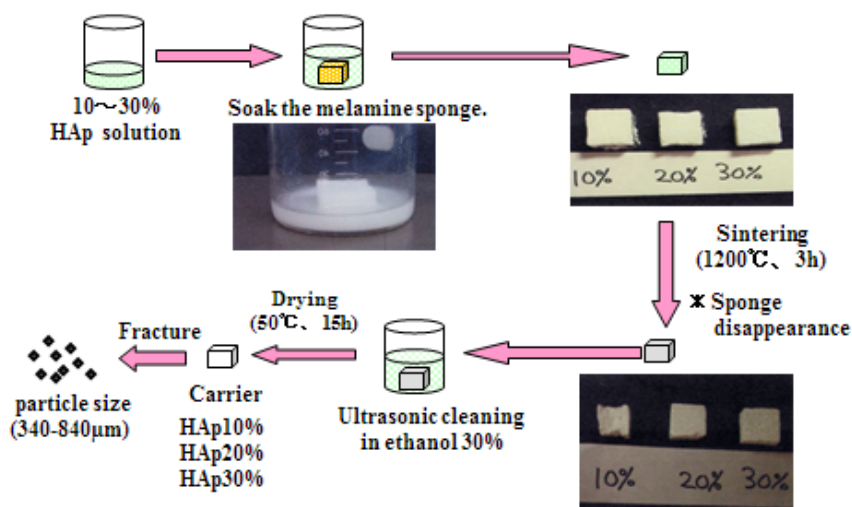


Fig.2-1 ハイドロキシアパタイト担体作製プロトコル

2-2-7 グルコース消費速度からの細胞数計測法

1)使用試薬及び機器

使用試薬

- ・ラボアッセイTMグルコース

高密度培養した Hc 細胞の細胞計数には、和光純薬工業のラボアッセイTMグルコース(ムタロターゼ・GOD 法¹⁰³⁾)を使用した。以下には測定キットの構成を示す。

- ・緩衝液

60mM リン酸緩衝液：pH 7.1、フェノール 5.3 mmol/L

- ・発色剤

ムタロターゼ (ブタ腎臓由来) 0.13units/mL

グルコースオキシダーゼ (GOD) 9.0units/mL

ペルオキシダーゼ (POD) 0.65units/mL

4-アミノアンチピリン 0.50mmol/L

アスコルビン酸オキシダーゼ 2.7units/mL

- ・ブドウ糖標準液 I

ブドウ糖 200mg/dL

- ・ブドウ糖標準液 II

ブドウ糖 500mg/dL

- ・発色液

60mM リン酸緩衝液(pH 7.1、フェノール 5.3 mmol/L)と発色剤を混合したものを発色液とした

使用機器

マイクロプレートリーダー(VERSA max)

日立モレキュラーデバイス

2)培地中のグルコース濃度測定法

①原理

α -D-グルコースをムタローゼにより β -D-グルコースに変化させる。

β -D-グルコースと H_2O と O_2 をグルコースオキシターゼにより H_2O_2 とグルコン酸に変化させる。この H_2O_2 を非色定量することでグルコース濃度を定量する。

②グルコース濃度検量線

96 well plate に発色液 300 μ L を入れ、それぞれのグルコース濃度に調整した標準溶液を 2 μ L ずつ入れ、室温で 5 分間ミキシングを行い反応させた。その後主波長 505nm、副波長 600nm で測定し、測定した吸光度をグラフにプロットした。

③グルコース消費速度を求めるための実験方法（細胞数算出）

培地交換をした直後に適量の培地を採取し、これの培地中グルコース濃度をラボアッセイTMグルコースの測定手順に従い、試料及び使用試薬量で測定した。60mM リン酸緩衝液(pH 7.1、フェノール 5.3 mmol/L)と発色剤【ムタロターゼ 0.13 単位/mL、グルコースオキシダーゼ (GOD) 9.0 単位/mL、ペルオキシダーゼ 0.65 単位/mL、4-アミノアンチピリン 0.50mmol/L、アスコルビン酸オキシダーゼ 2.7 単位/mL】を混合した発色液を 300 μ L 加え、そこに培地から採取したサンプルを 2 μ L 加え、5 分間ミキシングを行った。その後、発色した溶液を分光光度計(主波長：505nm、副波長：600nm)で測定した。数時間後の培地中グルコース濃度を同上の方法で測定し、その差であるグルコース消費量と細胞のグルコース消費速度から細胞数を算出した

3) 細胞のグルコース消費速度の算出法

トリパンブルー色素排除法によって計測した monolayer の細胞数とグルコース消費量より、担体上における細胞数の基準となる細胞のグルコース消費速度を算出した。

4) 細胞密度の算出法

サンプリングしたサンプルの吸光度と培地の吸光度の差を求め、検量線より、細胞が消費したグルコース量(mg/dL)を求めた。求めたグルコース消費量に、培養していた培地量をかけ、ディッシュあたりのグルコース消費量を求め、さらに 1 日換算をして 1 日あたりのグルコース消費量を求めた。求めた値を、各条件における Hc 細胞の monolayer 培養でのグルコース消費速度で割り、ディッシュあたりの細胞数(10^6 cells/dish)を求めた。求めた値を各担体のかさ密度で割り、細胞密度(10^7 cells/cm³)を求めた。

2-2-8 胎児肝細胞の高密度培養法

- ①それぞれの担体を電子天秤で 0.1g 測り、ガラスディッシュに入れ、オートクレーブ 120℃で 20 分間滅菌した。
- ②35mm 浮遊細胞培養ディッシュに、上記の担体 0.1g を移した。その後、細胞数 1.0×10^5 cells/dish で播種し、培地を 2mL 入れ、CO₂インキュベーターで培養を行った。
- ③細胞が増殖してきたら、dish 上に付着している細胞によるグルコース消費を防ぐために dish 交換し、担体のみを移した。
- ④培地交換は、4 日目までは 2 日に 1 度とし、それ以降は、培地中のグルコース濃度が 2.2g/L を下回らないように、1 日 1 回～2 回培地交換を行った。
- ⑤担体体積あたり、 1.0×10^7 cells/cm³以上の細胞密度になった状態を高密度培養とした。

2-2-9 胎児肝細胞に由来する肝芽細胞の高密度培養法

- ①それぞれの担体を電子天秤で 0.1 g 測り、ガラスディッシュにいれ、オートクレーブ 120℃で 20 分間かけた。
- ②35mm 浮遊細胞用培養ディッシュに 0.1 g 担体を移し、細胞数 1.0×10^5 cells/dish で播種、培地を 2mL 入れ、CO₂インキュベーターで培養を行った。
- ③細胞が増殖してきたら、dish を交換し、担体のみを移した (dish 上に付着している細胞によるグルコース消費を防ぐため。)
- ④培地交換は、4 日目までは 2 日に 1 度とし、細胞増殖後は、培地中のグルコース濃度 2.2g/L を下回らないように、1 日 1 回～2 回培地交換を行った。
- ⑤培養 6 日目に培地へ酪酸ナトリウムを(最終濃度 1mM)添加し、さらに 8 日間培養を行うことで肝芽細胞を誘導した。
- ⑥担体体積あたり、 1.0×10^7 cells/cm³以上の細胞密度になった状態を高密度培養とした。

2-2-10 分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法

1) 使用試薬及び機器

使用試薬

Rifampicin($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$)	和光純薬工業
Benzyloxyresorufin	Molecular Probes
Resorufin	Molecular Probes
Probenecid($C_{13}H_{19}NO_4S$)	Sigma
Dicumarol	和光純薬工業
β -glucuronidase+Arylsulfatase	Roche
Ethyl alcohol<一級>(C_2H_5OH)	ナカライテスク
酢酸(CH_3COOH)	和光純薬工業
酢酸ナトリウム(CH_3COONa)	Sigma

使用機器

分光蛍光光度計(F-2000)	HITACHI
VORTEX(G-560)	Scientific Industries
pH Meter	METTLER TOLEDO

2) 試薬調製法

① 酢酸緩衝溶液の調製(0.1M Sodium acetate buffer)

酢酸と酢酸ナトリウムを超純水で溶解し、それぞれの溶液が 0.1M となるように調製した。それぞれ調製した溶液を混合することで、pH が 4.5 になるように調製し、0.22 μ m フィルターにより濾過滅菌を行った。

② β -glucuronidase 溶液の調製

0.1M sodium acetate buffer(pH4.5)を用いて、 β -glucuronidase が 300Fishman units に、Arylsulfatase が 2,400Roy unit になるように希釈した。

③ P-450 活性測定用培地の調製

Benzyloxyresorufin(BROD)を DMSO に溶かし 1mM stock solution を調製し、さらに第二相反応阻害剤 Dicumarol を水酸化ナトリウム(NaOH)に溶かし、10mM stock solution を調製した。それらを細胞培養用培地 20mL に対し、Benzyloxyresorufin は 400 μ L 加え、最終濃度を 20 μ M に、Dicumarol は 50 μ L 加え、最終濃度を 25 μ M とし、HCl で pH7.2~7.4 に調整した。なお、この CYP3A4 活性測定用培地は、保存中に蛍光が落ち、pH がアルカリ側に傾く

ため、毎回調製した。

3)分光蛍光光度計による薬物代謝活性測定法の原理¹⁰⁴⁾

細胞に取り込まれた Benzyloxyresorufin(無蛍光物質)は CytochromeP-450 の isozyme(CYP3A4)により脱アルキル化され、Resorufin(蛍光物質)へと変化する。細胞内に留まったままでは、第二相反応(抱合)をうけ、無蛍光物質となるが、第二相反応阻害剤 Dicumarol を加えることで Resorufin(蛍光物質)の状態を維持する。また、Resorufin(蛍光物質)は細胞外排泄系により、細胞外に排泄されるが、中には第二相反応(抱合)を受け、無蛍光物質となったものも混在する。これらになるべく蛍光物質へ戻すようにするため、酵素 β -glucuronidase 及び Arylsulfatase で処理することで Resorufin(蛍光物質)へと変化させた。この処理後、最終的に分泌された Resorufin(蛍光物質)量を分光蛍光光度計で定量的に測定し、細胞当たりの活性に換算して薬物代謝活性を評価した。

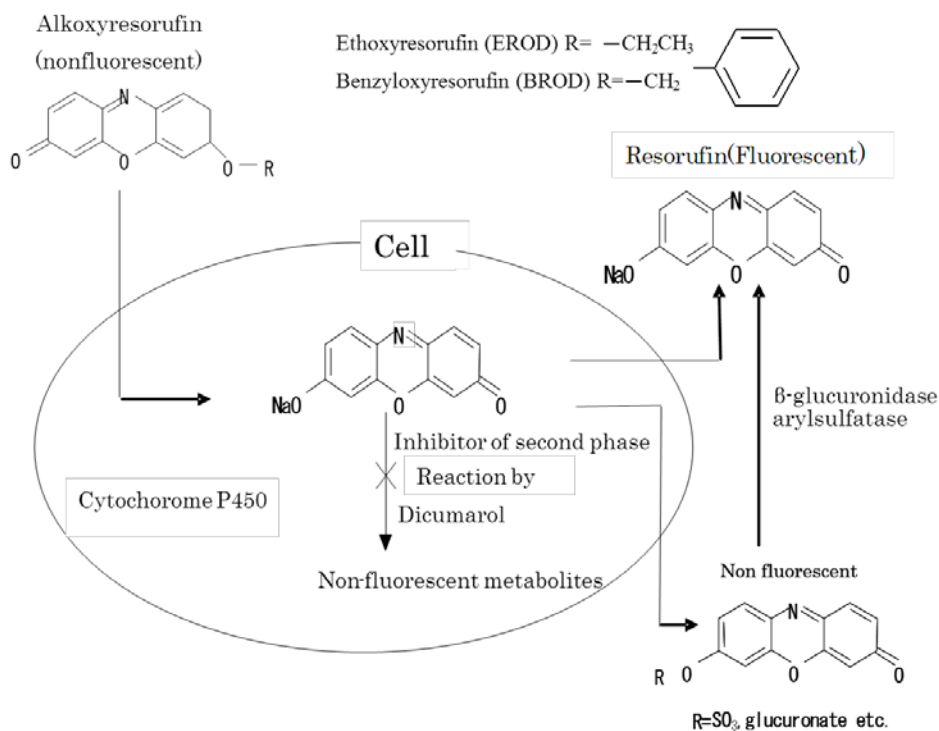


Fig.2-2 分光蛍光光度計による薬物代謝活性測定法の原理

4) 分光蛍光光度計を用いた薬物代謝活性の測定プロトコル

細胞培養用担体上で 14 日間培養した Hc 細胞を担体、培地と一緒に別のディッシュへ移し、パスツールピペットで古い培地を吸引除去した。新しい細胞培養用培地に交換し、細胞計数のための培地を少量(約 100 μ L)取り、CO₂ インキュベーターへ戻した。24 時間後、細胞計数のための培地を少量(約 100 μ L)取った。このときの培地は可能な限り小分けにし、保存しておいた(別の測定に用いるため)。35mm 浮遊細胞用培養ディッシュに、細胞を担体・培地と一緒に移し、パスツールピペットで培地を吸引除去した。そこへ P-450 活性測定用培地を 2mL 添加し、30 分間 CO₂ インキュベーター内で薬物代謝反応を促した。反応後、ピペットマンで測定用培地を 1.5mL 取り、遠心管に移した。遠心管内培地中の第二相反応(抱合)を受け、無蛍光物質となった反応物の一部を、酵素 β -glucuronidase 及び Arylsulfatase で処理し、蛍光物質へ変化させるために、 β -glucuronidase + Arylsulfatase 酢酸緩衝溶液 0.5mL 加え、恒温槽で 37°C・2 時間反応させた。2 時間後、Resorufin を分離するため、Ethyl alcohol を 4mL 加え混合し、遠心機で 3000rpm・10min 遠心分離を行った。上澄みを 2mL 取り、分光蛍光光度計(励起波長：550nm 蛍光波長：600nm)を用いて、上澄み中の Resorufin を定量測定した。

2-2-11 ELISA 法による PIVKA- II 産出速度測定

1)使用試薬及び機器

使用試薬

PIVKA-II の測定には三光純薬(株)のエイテスト PIVKA- II を用いた。

- ・ 標準抗原
脱炭酸プロトロンビン(凍結乾燥品) 三光純薬
- ・ ブランク用溶液
ウシ血清アルブミン液 三光純薬
- ・ 一次抗体(マイクロカップにコーティング済み)
抗 PIVKA- II マウスモノクローナル抗体 三光純薬
- ・ 反応溶液
10%正常ウサギ血清を含む 0.05 トリス- (ヒドロキシメチル) -アミノメタン
緩衝液 三光純薬
- ・ 二次抗体
HRP 標識抗ヒトプロトロンビンウサギ抗体 10~40E.U./mL 含む液 三光純薬
- ・ 酵素基質
日局オキシドール 三光純薬
- ・ 発色剤
2,2'アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアリゾン-6 スルホン酸) (凍結乾燥品) 三光純薬
- ・ 反応停止液
2mmol/L アジ化ナトリウム液 三光純薬
- ・ 洗浄用原液
1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含む 0.9%食塩水 三光純薬
- ・ 日本薬局方 生理食塩液 大塚生食注 大塚製薬

使用機器

Finnpipet (8 連)	DS ファーマバイオメディカル(株)
TUBE MIXER	アズワン
ELISA プレート(3801-096)	IWAKI

2)試薬の調製法

①標準抗原

10mAU/mL～500mAU/mL各濃度の凍結乾燥状態の標準抗原1バイアルに、ミリQを1mL注入した。注入後、TUBE MIXERを用いて抗原液を撹拌した。調製後は4℃で保存した。(調製した抗原液は4℃保存で1ヶ月間安定である。)

②基質液

凍結乾燥状態の発色剤1バイアルに、ミリQを4mL加えて溶解させ、酵素基質を10μL加えて、TUBE MIXERを用いて撹拌した。調製後は速やかに使用し、残液は保存して使用しないように廃棄した。

③洗浄液

32 カップ当たり、0.9%生理食塩水 80mL に洗浄用原液(調製前に TUBE MIXER で撹拌する)800μL 加えて溶解したものを使用した。残液は保存して使用しないように廃棄した。

3)PIVKA-II 測定法の原理

今回の研究で用いた測定キットは、サンドイッチ方式による固相(カップ)型の EIA 法を原理としている。固相化した抗 PIVKA-II モノクローナル抗体を用いて、検体中の PIVKA-II と抗ヒトプロトロンビン抗体の酵素標識物を反応させる。さらに、基質液を加えて反応させることで、基質液中の酵素基質が分解され、発色剤が発色し、この発色した液の吸光度を測定することでサンプル中の PIVKA-II の量を定量することができる。

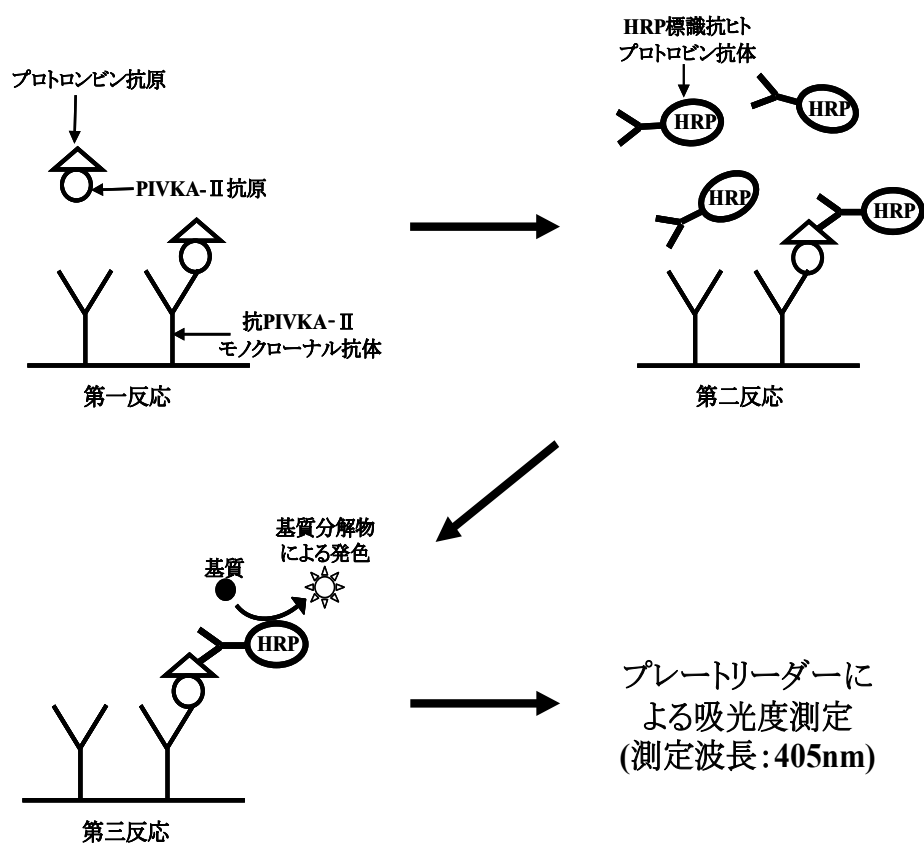


Fig.2-3 ELISA 測定原理

4) PIVKA-II ELISA 法プロトコル

・ 第一反応

- ①抗 PIVKA-II モノクローナル抗体がコーティングされたマイクロカップ内に反応用溶液 25 μ L、各濃度の標準抗原液、ブランク用の検体希釈液及びサンプルを 100 μ L ずつ各 2 カップに注入した。
- ②マイクロカップを湿潤箱に入れ、37 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーターに入れて、37 $^{\circ}$ Cで 24 時間反応させた。

・ 第二反応

- ①第一反応終了後、カップ内容液を除去し、1 カップ当たり洗浄液 200 μ L \times 5 回、洗浄を行った。
- ②洗浄後、全てのカップ内に HRP 標識抗ヒトプロトロンビンウサギ抗体を 100 μ L ずつ注入した。
- ③マイクロカップを湿潤箱に入れ、25 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーターに入れて、25 $^{\circ}$ Cで 1 時間反応させた。

・ 第三反応

- ①第二反応終了後、カップ内容液を除去し、1 カップ当たり洗浄液 200 μ L \times 5 回、洗浄を行った。
- ②洗浄後、全てのカップ内に酵素基質液を含んだ発色溶液を 100 μ L ずつ注入した。
- ③マイクロカップを湿潤箱に入れ、25 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーターに入れて、25 $^{\circ}$ Cで 1 時間反応させた。

・ 測定

- ①第三反応終了後、全てのカップに反応停止液を 100 μ L ずつ注入した。
- ②反応溶液を 96well ELISA プレートに各 190 μ L 移した。
- ③プレートリーダー(測定波長：405nm)で吸光度を測定した。

(プレートリーダーの使用法)

- ①測定を行う 30 分前に電源を入れる。
- ②波長は λ_1 のみ使用し、測定波長 405nm に設定する。
- ③測定を行う前にプレートを入れない状態で測定し、全ての値が“0”となっているかを確認する。
- ④プレートをセットし、“READ”ボタンを押して測定(測定は2～3 回行う)。

2-2-12 走査型電子顕微鏡(SEM)による培養担体の観察

1)使用試薬及び使用機器

使用試薬

Sodium Cacodylate ($C_2H_6AsO_2Na$)	和光純薬工業
Glutal aldehyde Solution ($OHC(CH_2)_3CHO$)	和光純薬工業
t-Butyl Alcohol ($(CH_3)_3COH$)	和光純薬工業
エチルアルコール〈一級〉(C_2H_5OH)	ナカライテスク

使用機器

t-ブタノール凍結乾燥装置(VDF-21S t-BuOH FREEZE DRYER)	VACUUM DEVICE
デシケーター	AS ONE
真空ポンプ (GCD-050XA)	ULVAC
蒸着装置 (ION SPUTTERING DEVICE) [JFS-1500]	JEOL
走査型電子顕微鏡 (SCANNING MICROSCOPE)[JSM-6301]	JEOL

2)試薬の調製法

・ 0.2M カコジル酸緩衝液

カコジル酸ナトリウム 1.60g を Milli-Q 水 25mL に溶解させ、1N の HCl で pH7.4 に調製した後、Milli-Q 水 25mL を加えて攪拌する。

・ 17.5 %グルタールアルデヒド水溶液

70%グルタールアルデヒド 2mL に Milli-Q 水 6mL を加え、17.5 %グルタールアルデヒド水溶液 8mL を調製した。

・ 前固定液 (0.1M カコジル酸緩衝 1%グルタールアルデヒド溶液 (pH7.4))

25%グルタールアルデヒド水溶液 400 μ L、Milli-Q 水 4.6mL、カコジル酸緩衝液 5.0mL を混合し、前固定液とした。

・ 本固定液 (0.1M カコジル酸緩衝 2%グルタールアルデヒド溶液 (pH7.4))

17.5 %グルタールアルデヒド水溶液 800 μ L、Milli-Q 水 4.2mL、カコジル酸緩衝液 5.0mL を混合し、本固定液とした。

・ 試料脱水用エタノール

99.5%エタノールを Milli-Q 水と混合し、70、80、90、95%各濃度のエタ

ノール溶液を調製した。

3) 走査型電子顕微鏡(SEM)の原理¹⁰⁵⁾

光学顕微鏡(光顕)では、凸レンズで光を一点に収束するが、電子顕微鏡(電顕)では電子レンズを使い、電子ビームを一点に収束する。この電子ビームの収束した点(スポットビーム)が、光顕よりはるかに小さいため、電顕では光顕よりも微細な構造を観察することができる。

SEMではこのスポットビームをプローブ(探針)として、試料に照射しながら走査し、試料から得られる信号を使って像を形成する顕微鏡である。

SEMの動作原理を、Fig.2-4に示した。SEMでは電子源から放出された電子(一次電子)ビームを、陽極で加速した後、電子レンズで試料上へ微小径に収束させる。これをプローブとして二次元走査し、試料から放出される二次電子、反射電子(後方散乱された一次電子)などの信号量の違いを基に像を得ることができる。

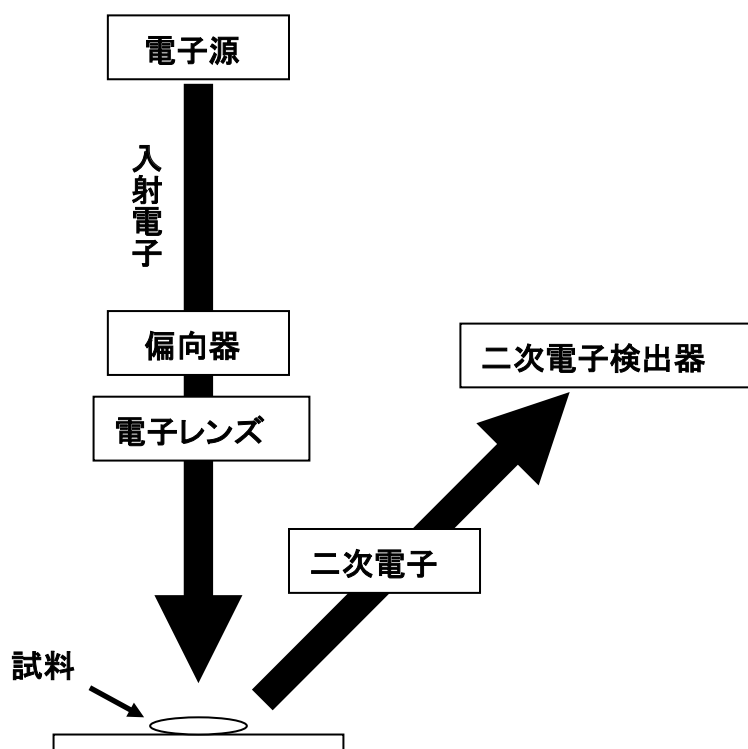


Fig.2-4 走査型電子顕微鏡の原理

4) SEM 試料作製プロトコル

①前固定

高密度培養をした細胞を、担体及び培地ごと 35mm ディッシュに移し、培地約 1mL を残して古い培地を吸引除去した。前固定液を 1mL 加え、室温で 1 時間置いた。

②本固定

培地と前固定液の混合液を吸引除去し、本固定液を 2mL 加え、室温で 2 時間置いた。

③脱水

本固定液を吸引除去し、濃度の低い順にエタノール溶液を 2mL 加え、脱水を行った。このとき、各濃度で 10 分間ずつ置いた。続いて、100%エタノールに 60 分間(20 分×3 回)置いた。100%エタノールで脱水している間に t-ブタノール凍結乾燥装置のスイッチを入れ、WARM にし、ステージを温めて置いた。

④凍結

脱水を完全に行った試料を、100%エタノールと t-Butyl Alcohol の混合液 1:1、3:7、t-Butyl Alcohol 100%の順で各 15 分間、30℃で浸漬した。続いて、新鮮な t-Butyl Alcohol 100%に入れ替え、20～30 分間、30℃で置いた。その後、凍結乾燥装置の温度コントローラーが 0℃にセットしてあることを確認し、スイッチを COOL に入れ替え、凍結させた。

⑤乾燥

5℃以下まで温度を下げ、EVAC を ON にし、真空排気を行った。排気後、凍結した凍結した t-Butyl Alcohol が完全に無くなるまで排気し、スイッチを WARM に入れ替え、凍結乾燥装置のステージの温度が 30℃を超えたところで、WARM-COOL スイッチを中点に戻し、EVAC を OFF にした。取り出した試料は大気中に放置せず、速やかに乾燥機内に移した。

⑥蒸着

乾燥終了後、試料をマニキュアで SEM 用の台に固定した。蒸着装置を用いて、金を 70 Å の厚みで 2 回蒸着させた。

2-2-13 電子線三次元粗さ解析装置による曲率半径計測

1) 使用機器

電子線三次元粗さ解析装置(ERA-8900)

ELIONIX

高分解能 SEM 用試料コーティング装置(ESC-101)

ELIONIX

2) 電子線三次元粗さ解析(3D-SRA)の原理¹⁰⁶⁾

各 HAp 担体の曲率半径を解析するために、担体の表面形状を電子線三次元粗さ解析装置(ERA-8900)を用いて測定した。ERA-8900 は、4 つの二次電子(SE) 検出器を有し、この 4 つの SE 検出機から算出された差分信号を表示することによって地形解像度を高め、定量的な表面粗さの測定を可能にしている。通常、SEM 画像の明暗コントラストは、試料表面の凹凸形状に起因し、二次電子検出器に捕捉された二次電子の量に対応している。これは、傾斜角効果と呼ばれ、電子ビームが入射する方向と試料表面とのなす角度によって二次電子の発生量が増加し、これが平行に近くなるほど二次電子の発生量が増加する。本センシング手法は、二次電子の発生量が試料表面の傾斜角度に依存し、 $0^{\circ} \sim 75^{\circ}$ 付近の間で単調に増加することを応用したものである。定量的な角度情報は、検出器の信号強度を減算することにより得られた。照射されたビームの走査方向の傾斜角及び、それに直行する側の傾斜角を積分することで断面プロファイルを作成した。さらに、この断面形状に円弧を描画することで、担体上に形成された凹部の曲率半径を求めた。Fig.2-5 にプロセスの概略図を示した。

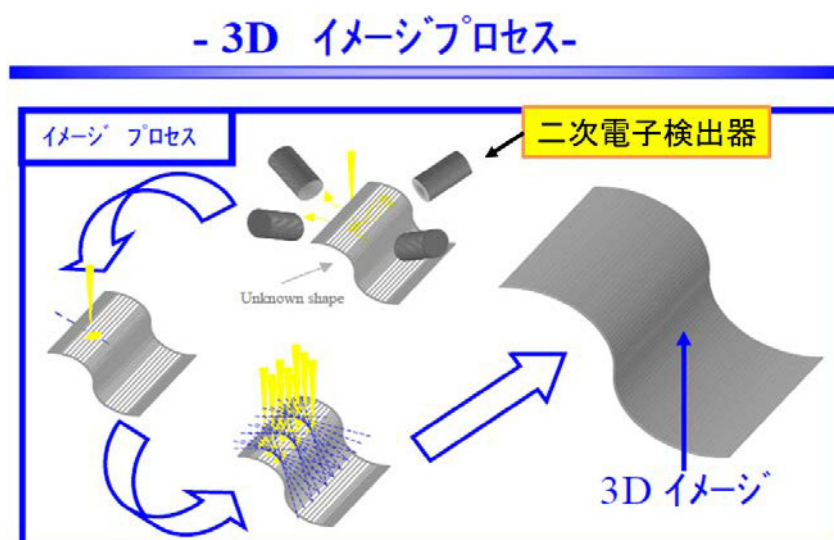


Fig.2-5 3D-SRA による 3D イメージ作製のプロセス

3) 曲率半径測定プロトコル

①蒸着

試料をマニキュアで SEM 用の台に固定し、高分解能 SEM 用試料コーティング装置(ESC-101)により、試料のコーティングを行った。

②観察

コーティングした試料を電子線三次元粗さ解析装置(ERA-8900)により観察し、断面プロファイルの数値を記録した。

③解析

得られた数値から断面プロファイルを再構築し、そこへ円弧を描画することで各担体の曲率半径を算出した(Fig.2-6)。

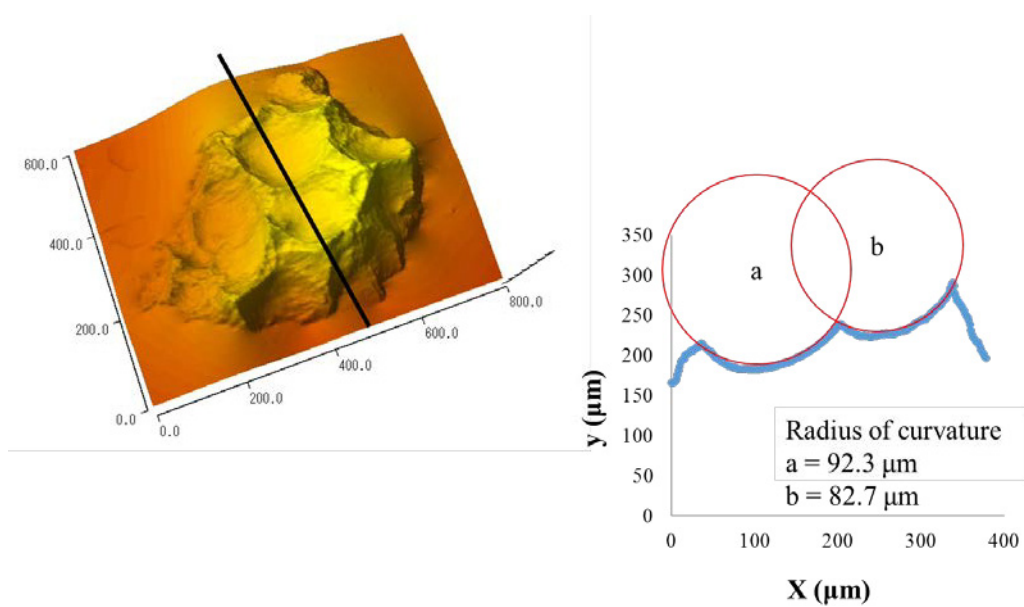


Fig.2-6 曲率半径の算出方法

2-2-14 アクチン及び核の二重染色法

1)使用試薬及び使用機器

使用試薬

- ・ 蛍光色素

Rodamine Phalloidin

Invitrogen

TO-PRO3 1mM solution in DMSO

Invitrogen

- ・ 退色防止剤

DABCO, −PBS/Glycerol 1:1

SIGMA

使用機器

35mmGlass Bottom Dish(uncoated)

MatTek

共焦点レーザー顕微鏡(STC ST)

Leica

2)試薬の調製法

①Rodamine Phalloidin/methanol

最終濃度が 6.6 μ M になるように methanol 1.5mL に溶解した。

②退色防止剤

DABCO(1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octane)5g を −PBS100mL に溶解した。

3)共焦点レーザー顕微鏡の原理

Fig.2-7 に示すように、光源から発射されたレーザー光は、イルミネーションピンホールを通った後、ビームスプリッターによって光が屈折し、対物レンズ(objective lens)を通して、観察試料を照射する。試料から戻ってきた光は、再び対物レンズによって集光される。ここで、共焦点が結ばれる位置にはピンホールフィルターが置かれているため、焦点面以外からの光はピンホールフィルターによって遮断される。そのため、焦点面での薄い断面の画像を得ることができる。また、光源としてレーザーを用いているため、ピンホールによって光が遮断されても十分な明るさを得ることができる。また、レーザー光は、波長がそろっているため、蛍光色素の励起に適しており、そのため共焦点レーザー顕微鏡は蛍光画像の取得に適している。

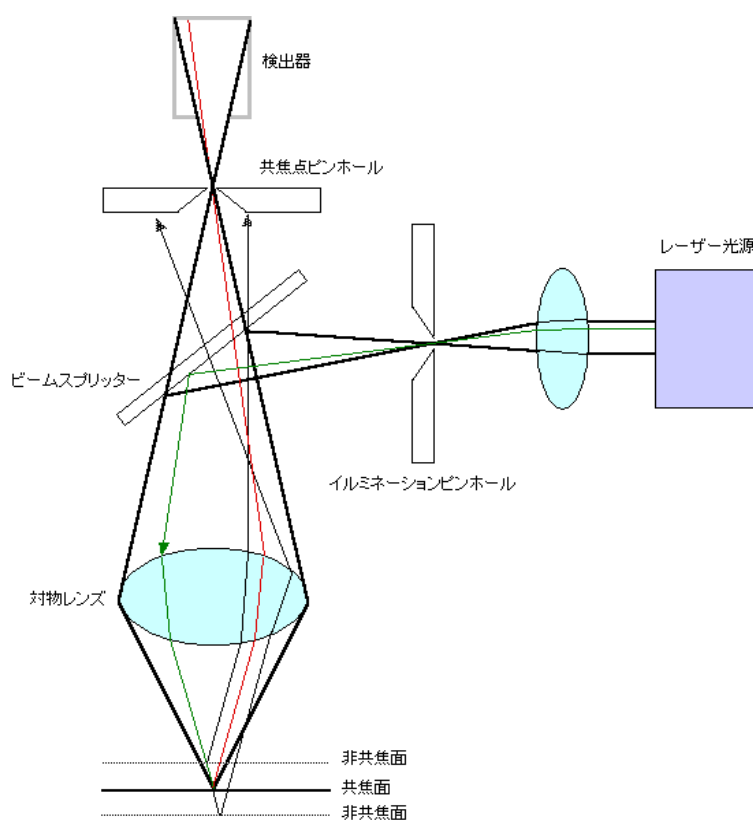


Fig.2-7 共焦点レーザー顕微鏡の光路図

4)試料作製プロトコル

①固定

2-2-12 の 4)の①～②を参照。

①洗浄

固定液を吸引除去し、-PBS による洗浄を 2 分間・2 回行った。

②染色

－PBS を除去し、1mM TO-PRO3 Stock Solution 2 μ M と 6.6mM Rodamine Phalloidin Sock Solution 0.165 μ M を溶解させた-PBS を添加し、湿潤箱に入れ、遮光して室温で 30 分間処理した。

③洗浄

染色液を吸引除去し、－PBS による洗浄を 2 分間・2 回行った。

④観察

35mmGlass Bottom Dish に退色防止剤を 100 μ L 滴下し、その上に試料を静置した。

その後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

5)共焦点レーザー顕微鏡における Rodamine Phalloidin/ TO-PRO3 染色の観察条件

①Channel 1 Rodamine Phalloidin の設定

励起波長：543nm(He-Ne Laser) 蛍光波長：554nm～573nm

②Channel 2 TO-PRO3 の設定

励起波長：633nm(He-Ne Laser) 蛍光波長：642nm～661nm

2-3 結果と考察

2-3-1 HAp 10%、20%、30%担体における胎児肝細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度

HAp10%、20%、30%担体における胎児肝細胞(Hc 細胞)及び肝芽細胞(SB treated cell)を、14 日間高密度培養した後の最高到達細胞密度を Fig.2-8 に示した。

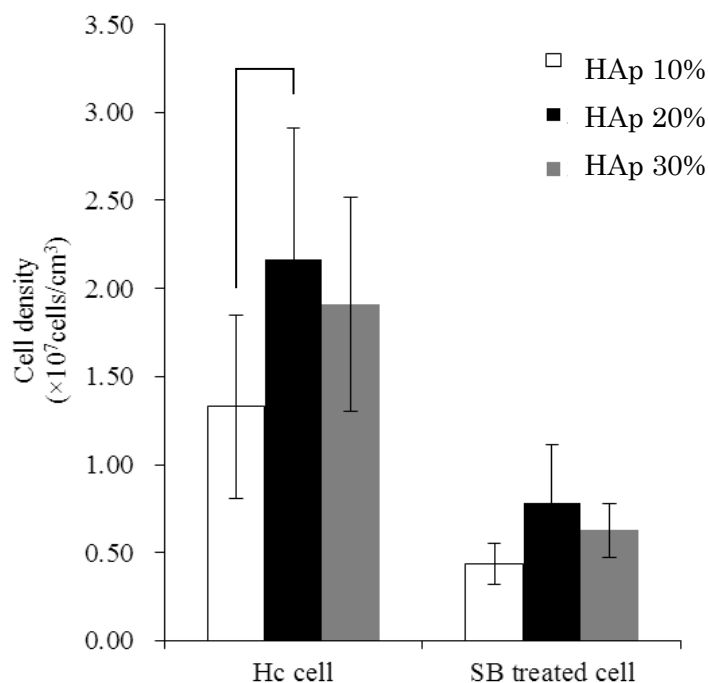


Fig.2-8 各担体における Hc 細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度

Hc 細胞は、 2.17×10^7 cells/cm³、肝芽細胞は 0.78×10^7 cells/cm³の密度を、HAp20%の担体を用いることで達成した。Hc 細胞については静置培養における高密度培養の基準となる 1.0×10^7 cells/cm³を超える細胞密度を示した。

2-3-2 HAp 10%、20%、30%担体における薬物代謝活性の比較

肝臓の薬物代謝機能の発現をみるため、ヒト CYP ファミリーの主要なアイソザイムであり肝臓の機能の一つ¹⁰⁷⁾である CYP3A4 活性の測定を行った。

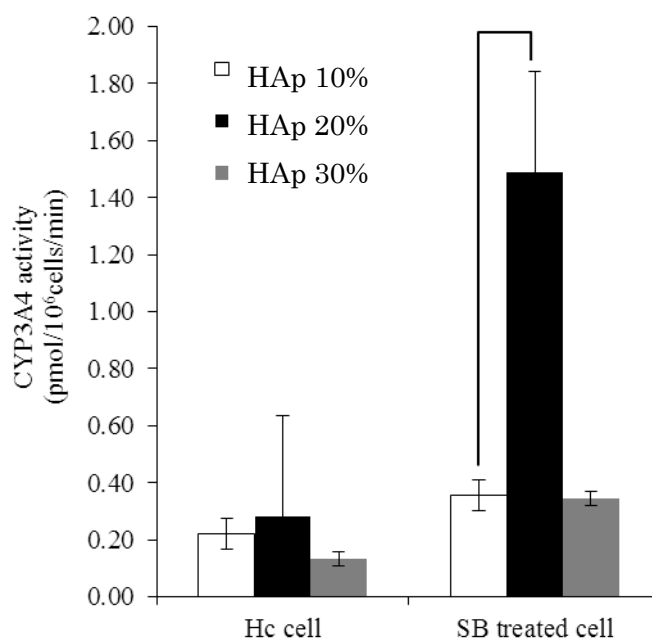


Fig.2-9 各担体における Hc 細胞及び肝芽細胞の CYP3A4 活性

各担体における Hc 細胞及び肝芽細胞の CYP3A4 活性測定の結果を Fig.2-9 に示した。HAp20%上で培養した肝芽細胞の CYP3A4 活性が他の HAp 担体に比べて大幅に上昇した。HAp20%の CYP3A4 活性値 1.49 ± 0.28 pmol/10⁶cells/min は、成人ドナーの肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95 ± 1.24 pmol/10⁶cells/min)¹⁰⁴⁾に匹敵する値であった。

2-3-3 HAp 10%、20%、30%担体における高密度培養後の形質転換マーカー (PIVKA-II)産出速度の比較

肝細胞の形質転換の指標となる異常プロトロンビン(PIVKA-II)の産出速度測定の結果を Fig.2-10 に示した。

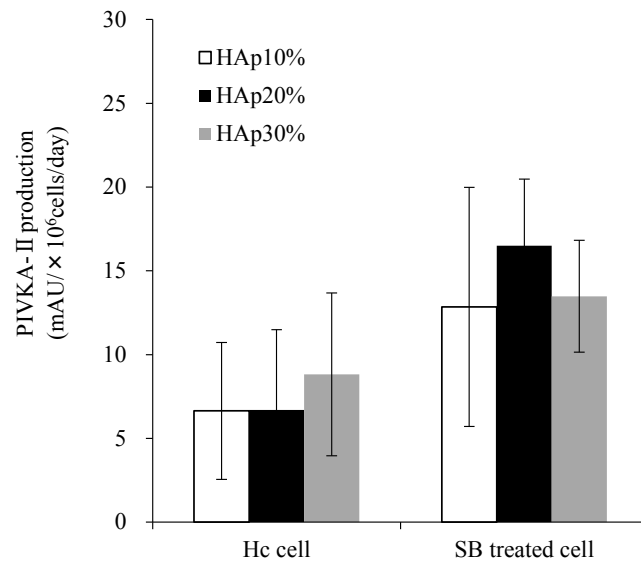


Fig.2-10 高密度培養後の Hc 細胞及び肝芽細胞の PIVKA-II 産出速度

HAp20%の肝芽細胞で最も高い PIVKA-II 産出速度(16.5 mAU/10⁶ cells/day)を示した(Fig.2-10)。しかし、肝がん細胞の産出速度 2100 mAU/10⁶ cells/day¹⁰⁸⁾と比べて非常に少ない値であり、10-30%HAp 担体が形質転換にほとんど影響を与えない事が確認された。

2-3-4 SEM による HAp 10%、20%、30%担体表面形状の観察

HAp10%、20%、30%担体を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した写真を、Fig. 2-11 に示した。

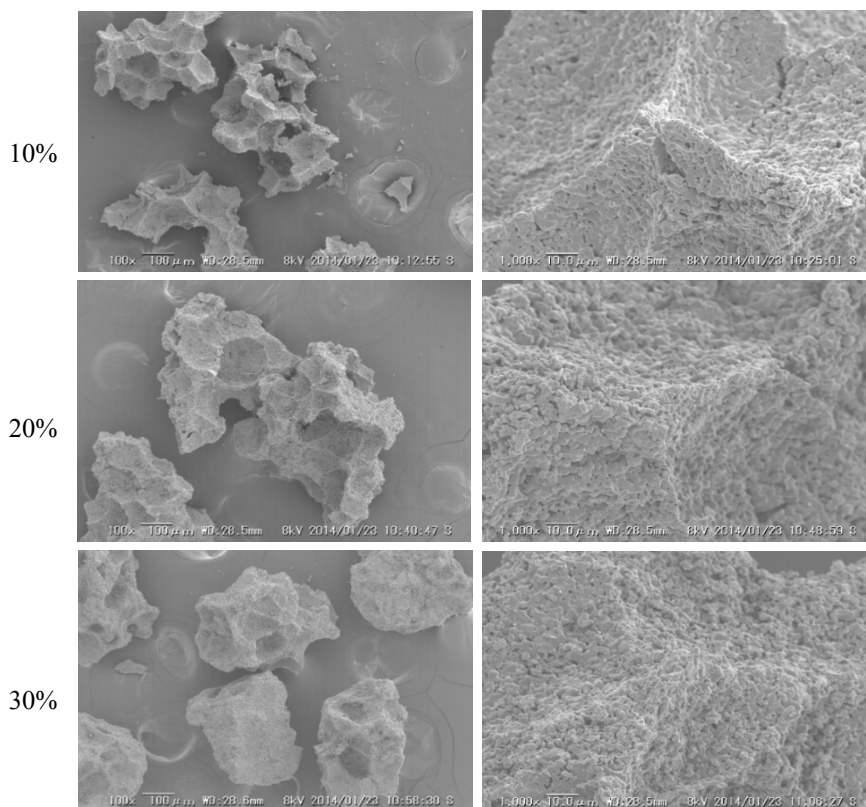


Fig. 2-11 各 HAp 担体を観察した SEM 写真

Fig.2-11 より、HAp10%の担体表面が最も凹凸が多く、HAp10%、20%、30%の順に表面の平面部分が多くなる傾向が見られた。

高倍率で観察したものでは、各担体にほとんど差は見られなかった。

2-3-5 HAp 10%、20%、30%担体の曲率半径分布

HAp10%、20%、30%担体上に形成された細孔の全体の平均細孔径を Fig.2-12 に、各担体における曲率半径の分布を Fig.2-13 に示した。

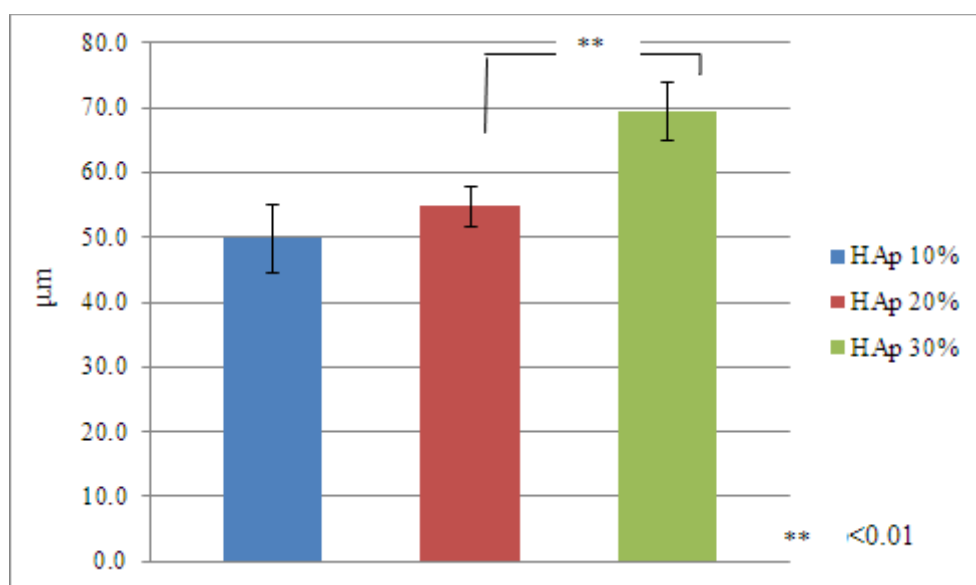


Fig.2-12 各担体における全体の平均細孔径(n=120)

全体の平均孔径は、HAp10% : 49.9μm、HAp20% : 54.8μm、HAp30% : 69.3μm で、HAp 濃度が低い担体の細孔径が小さくなる傾向が見られた(Fig.2-12)。

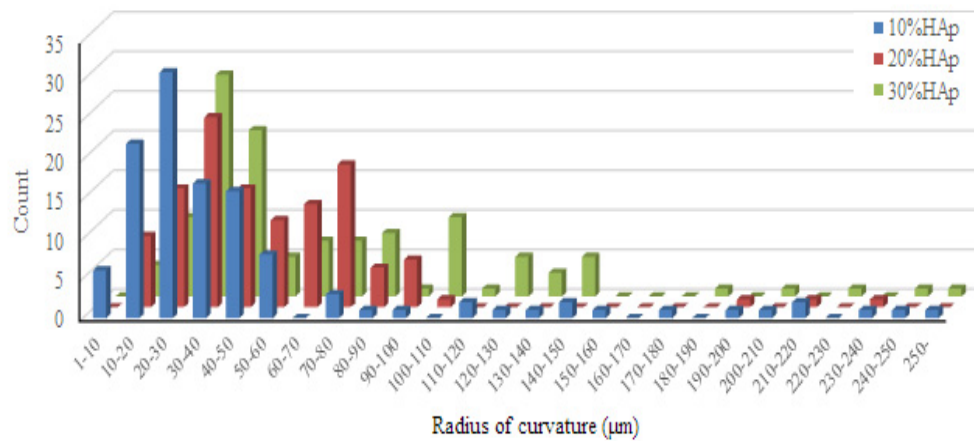


Fig.2-13 各担体における細孔径分布(n=120)

HAp10%の担体には 20～30μm にピークが見られた。一方 HAp20%には、30～40μm、70～80μm、HAp30%には、30-40μm、100-110μm の二つのピークが見られた。特に HAp20%には、他の担体では見られなかった 70～80μm の細孔径にピークが見られ、細孔径分布のうち 35%を占める特徴が見出された。

2-3-6 共焦点レーザー顕微鏡による胎児肝細胞及び肝芽細胞の形態観察

Fig.2-13 に、共焦点レーザー顕微鏡で細胞形態を観察した写真を示した。赤色の部分は核を示しており、653~702nm の波長で検出された。一方、緑色の部分はアクチンを示しており、558~617nm の波長で検出された。

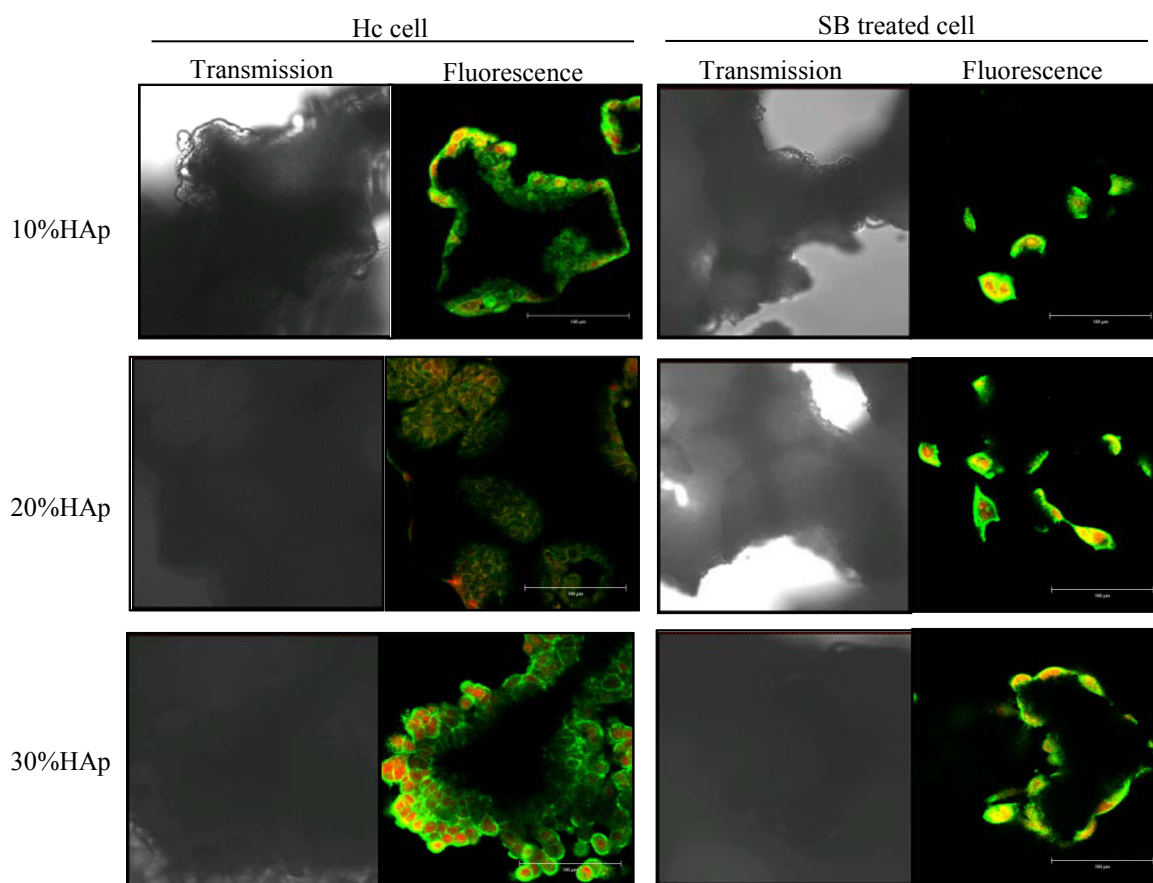


Fig.2-14 共焦点レーザー顕微鏡による細胞形態観察

Fig.2-14 より、Hc細胞においてはHAp20%とHAp30%がHAp10%に比べて、細胞が多層化して付着している様子が観察された。一方、肝芽細胞においては、すべての担体において、単層の細胞が付着している様子が観察された。

2-3-7 高密度培養後の Hc 細胞及び肝芽細胞の SEM による形態観察

HAp 担体上で高密度培養した肝芽細胞の形態を SEM で観察した写真を、Fig.2-15 に示した。

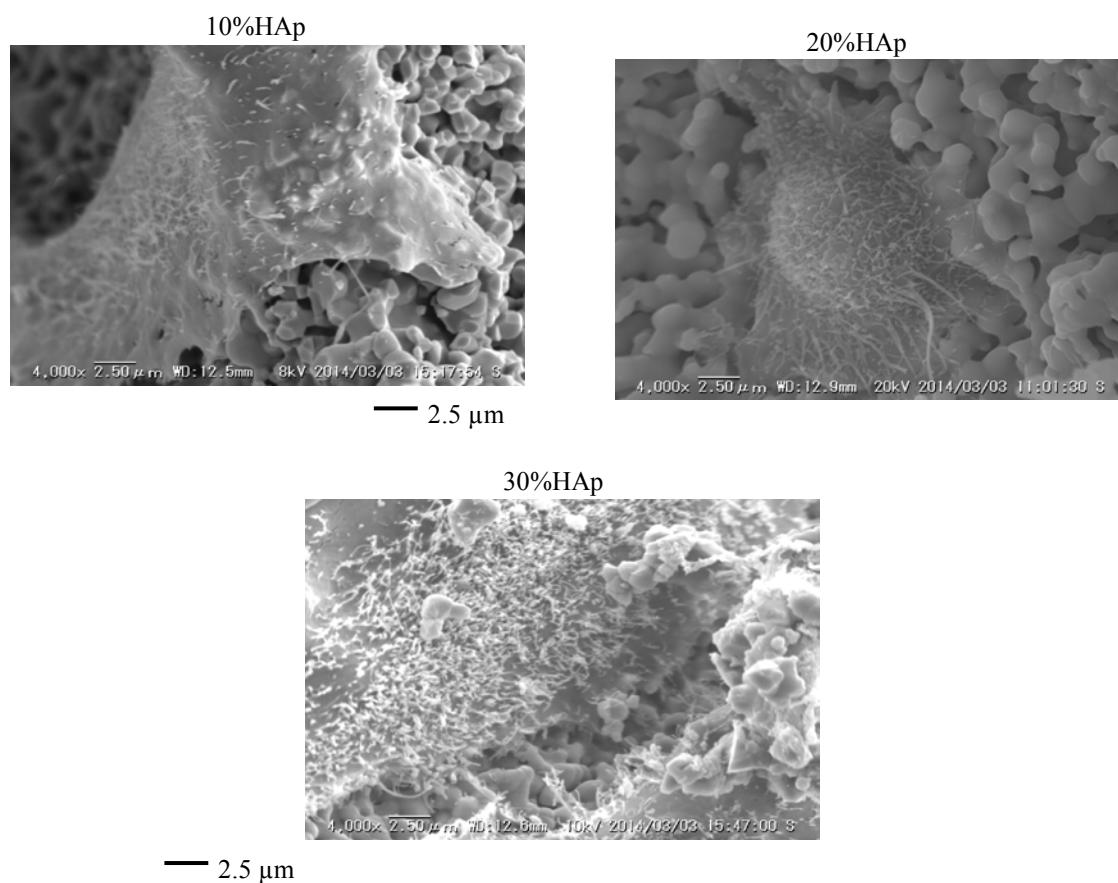


Fig.2-15 各 HAp 担体上の肝芽細胞を×4000 で観察した SEM 写真

全ての担体で細胞が付着している様子が観察された。また、HAp20%の担体上の細胞が肝細胞の機能発現に重要であるとされる球状の形態¹⁰⁹⁾をとっている様子も観察された。

2-4 総括

本章では、三次元培養担体の表面形状が細胞へ与える影響を検討するために、表面形状の異なる同じ素材、組成の培養担体(HAp10%、HAp20%、HAp30%)を作製し、これらの担体上で Hc 細胞及び肝芽細胞の高密度培養を行い、細胞密度、CYP3A4 活性(薬物代謝活性)及び PIVKA-II 産出速度(形質転換の指標)を測定し、評価を行った。

細胞密度、CYP3A4 活性については、HAp20%の多孔質担体が、他の担体に比べそれぞれ優位である事が示され、特に CYP3A4 活性値(1.49 ± 0.28 pmol/ 10^6 cells/min)は、成人ドナーの肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95 ± 1.24 pmol/ 10^6 cells/min)に匹敵する値であった。また、PIVKA-II 産出速度を測定した結果、今回使用したすべての多孔質担体で肝がん細胞の産出速度 2100 mAU/ 10^6 cells/day を大きく下回る値を示し、細胞増殖とともに、細胞の機能が変化してしまう危険性が非常に低い事が示唆された。

以上の結果より、今回作製した多孔質担体の中で HAp20%が最も肝細胞の培養に適している事が示唆された。

次に、多孔質担体のどのような表面形状が影響を与えているか詳細な検討を行うために電子線三次元粗さ解析装置による曲率半径計測を行ったところ、HAp20%には、 $30 \sim 40 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 80 \mu\text{m}$ の二つのピークが確認され、特に、他の担体には見られなかった $70 \sim 80 \mu\text{m}$ のピークを含む $50 \sim 80 \mu\text{m}$ の細孔径が、細孔径分布のうち 35%を占める特徴が見られた。いくつかの論文で細孔径と細胞の関係について述べている論文があり、その中で細孔径、スフェロイドのサイズが $80 \sim 150 \mu\text{m}^{110)-112)}$ (曲率半径： $40 \sim 75 \mu\text{m}$)のもので、細胞の増殖及び機能の向上が報告されている。

細胞密度、CYP3A4 活性、曲率半径の結果から、HAp20%に存在する $50 \sim 80 \mu\text{m}$ の細孔径が、細胞増殖と機能発現に重要な役割を持っている可能性が示唆され、SEM 観察の結果から細胞の形態に関しても影響を与えていることも推察された。

しかし今後、肝芽細胞の接着及び、それに伴うアクチン再配列などに対する HAp の細孔径の効果を確認するために、多孔質担体の細孔径分布を他の技術を使用してさらに制御し、実験を行っていく必要があるものと思われる。

第3章 足場材料としてのナノファイバーが細胞に与える影響

3-1 序

現在、初代ヒト肝細胞の機能を、生体外で再現する技術の開発は、医薬品開発のための動物実験代替法として期待されている。しかし、初代肝細胞は生体外では1週間程で代謝機能を失ってしまう為、*in vitro*において長期間の薬物曝露による効能、毒性試験ができていないのが現状である。これらの問題を解決するために、培養担体を使用したスフェロイド培養¹¹¹⁾や、ハイドロゲルを使用した三次元培養¹¹²⁾、非実質細胞との共培養¹¹³⁾などが試みられており、細胞の一部高機能化に成功している。また、近年ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーを、細胞培養や組織形成の足場材料として用いることが注目されている。例えば、熔融紡糸によって作製されたナノファイバーを足場材料に用いる方法⁹⁰⁾や、有機系ナノファイバーを溶媒に分散させた混合液を利用して、ナノファイバーのパターンを形成し、細胞培養に有効な機能性薬剤をこのパターンに吸着させることにより、細胞の接着、増殖、分化を制御する方法⁹⁰⁾などが提案されている。

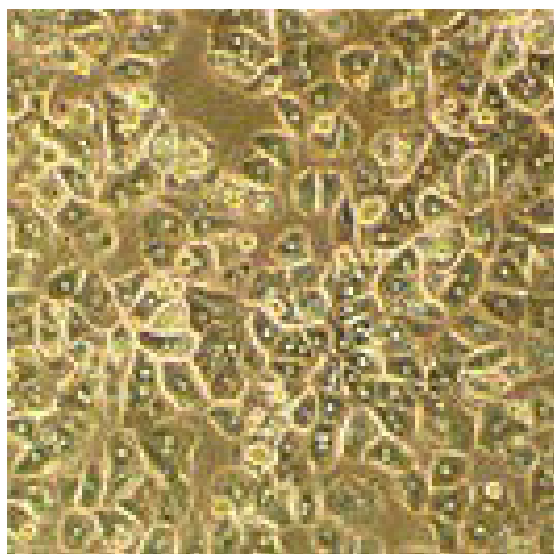
そこで本章では、第4章で使用した三次元細胞培養モジュールの中に細胞の足場として充填されているナノファイバーのみの培養を行い、ナノファイバーが細胞の増殖及び薬物代謝活性に与える影響について検討を行った。特に、ナノファイバーの径を170 nm~1300 nmの間で作製し、径の違いが細胞増殖及び機能、細胞形態に与える影響について検討を行った。細胞は、これまで本研究室で培養してきた、ヒト胎児肝細胞(Hc細胞)及び肝芽細胞及び成人肝細胞(ヒト凍結肝細胞)を使用し、培養を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

フランス BIOPREDIC International 社にて調製された成人肝細胞(Human Cryopreserved Hepatocytes)(Lot:HEP187082)を、ケー・エー・シー（株）より購入し、実験に用いた。



成人肝細胞
(Human Cryopreserved Hepatocytes)

Fig.3-1 実験で用いた細胞の写真(位相差型倒立顕微鏡)

その他は 2-2-1 を参照。

2)使用試薬

Additives for hepatocyte culture medium (1.6mL)	ADD222	BIOPREDIC
Additives for hepatocyte seeding medium (12.7mL)	ADD221	BIOPREDIC
Basal hepatic cell medium (100mL)	MIL600	BIOPREDIC
Basal hepatic cell medium (500mL)	MIL700	BIOPREDIC
Thawing medium without additives for hepatocytes (100mL)	MIL261	BIOPREDIC
Long term culture medium for human hepatocytes,10X (55mL)		BIOPREDIC

その他は 2-2-1 参照

3)使用機器及び器具

コラーゲン I コート	24 well multi plate	BD BioCoat
-------------	---------------------	------------

その他は 2-2-1 参照

3-2-2 試薬の調製法

1)使用培地の組成

培地の組成については Table3-1~4 に示した。

Table 3-1 融解用培地(Thawing medium)

Reagents	Concentration
Leibovitz 15 medium with Glutamax	-

Table 3-2 播種用培地(Seeding medium)

Williams E medium with Glutamax	-
Penicillin	100 IU/mL
Streptomycin	100µg/mL
Bovine insulin	4µg/mL
Fetal calf serum	10% v/v

Table 3-3 培養用培地(Incubation medium)

Williams E medium with Glutamax	
Penicillin	100 IU/mL
Streptomycin	100µg/mL
Bovine insulin	4µg/mL
Hydrocortisone hemisuccinate	50µM

Table 3-4 維持用培地(Long-Term culture medium)

Williams E medium with Glutamax	
HEPES:2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]	10 mM
ethanesulfonic acid	
Gentamicin	50µg/mL
Epidermal growth factor	100 ng/mL
Insulin	10µg/mL
Glucagon	4µg/mL
Bovine serum albumin	0.5 mg/mL
Linoleic acid	5µg/mL
Hydrocortisone	10µM
Selenium	100 nM
Cholera toxin	2 ng/mL
Liver growth factor	20 ng/mL
Transferrin	5µg/mL
Ethanolamine	10µM
Prolactin	100 ng/mL
Somatotropin	1µg/mL
Thyrotropin-releasing factor	10µM

その他は 2-2-2 参照

2)調製法

①播種用培地(Seeding medium)

Basal hepatic cell medium (100mL) MIL600 に Additives for hepatocyte seeding medium (12.7mL) ADD221 を添加した。

②維持用培地

維持用培地は、Basal hepatic cell medium に付属している Long term culture medium for human hepatocytes,10X(55mL)を Basal hepatic cell medium (500mL) MIL700 に全量溶解させた。

その他は 2-2-2 参照

3-2-3 滅菌法

2-2-3 参照

3-2-4 細胞の継代及び計数法

2-2-4 参照

3-2-5 細胞凍結法及び融解法

1) 細胞融解法(成人肝細胞)

液体窒素中に保存してあるセラムチューブを取り出し、超純水で作った 40℃ の超純水に入れて、表面のみ溶けた状態になったらすぐにセラムチューブを安全キャビネットに移し、遠沈管に分注し 37℃ の Thawing medium(30mL) に直接中身を注いだ。セラムチューブ内を Thawing medium(1mL) で洗い、残った細胞も遠沈管に回収し、氷が融けるまでゆっくり手で振とうし、ホモジナイズした。その後、1000rpm で 1 分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後 2mL の Seeding medium を加えピペッティングし、950 μ l のトリパンブルー溶液を入れた 1.5mL のサンプリングチューブに、細胞懸濁液を 50 μ l 入れ、ゆっくりとホモジナイズした後、血球計算盤を用いて、懸濁液中の生細胞数を計数した。生細胞数が 0.4×10^6 cells/mL になるように細胞懸濁液に Seeding medium を加え、24 well plate に 1well 当たり、0.5mL ずつ播種した。

その他は 2-2-5 参照

3-2-6 グルコース消費速度からの細胞数計測法

2-2-7 参照

3-2-7 三次元細胞培養モジュールの詳細

三次元培養モジュール(Fig.3-2)には、培地灌流用（内径 $300\mu\text{m}$ ）とガス供給用（内径 $200\mu\text{m}$ ）の 2 種類の中空糸が 1mm の間隔で編みこまれており、中空糸の間に細胞の足場としてナノファイバーが充填されている。これらの設計によりナノファイバーを足場とする三次元的な細胞集塊中に、酸素及び栄養素を供給出来るようになっている。本章では、細胞の足場として充填されているナノファイバーの選定を目的としている。

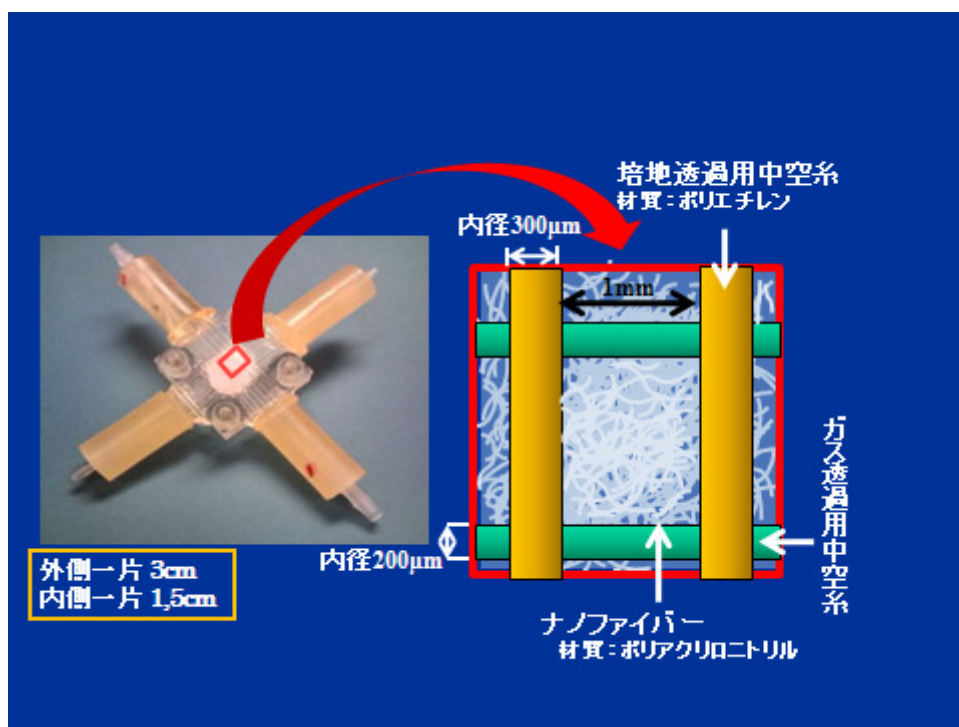


Fig.3-2 三次元培養モジュールの詳細図

3-2-8 使用したナノファイバー不織布の作製方法及び材質

今回ナノファイバーをエレクトロスピンニング法^{114),115)}で作製した(Fig.3-3)。エレクトロスピンニング法は、高分子溶液を充填したシリンジにプラス電圧(2～30kV)をかけて、ノズル先からナノファイバーを吐出させ、マイナス電極（アルミホイル）上に不織布として回収する方法である。制御因子により、糸径や密度、形状の制御が可能である。制御因子として、原液濃度（粘度）、分子量（粘度）、湿度、溶媒の揮発性、溶液の材質、吐出速度、マイナス電極の形体などがある。

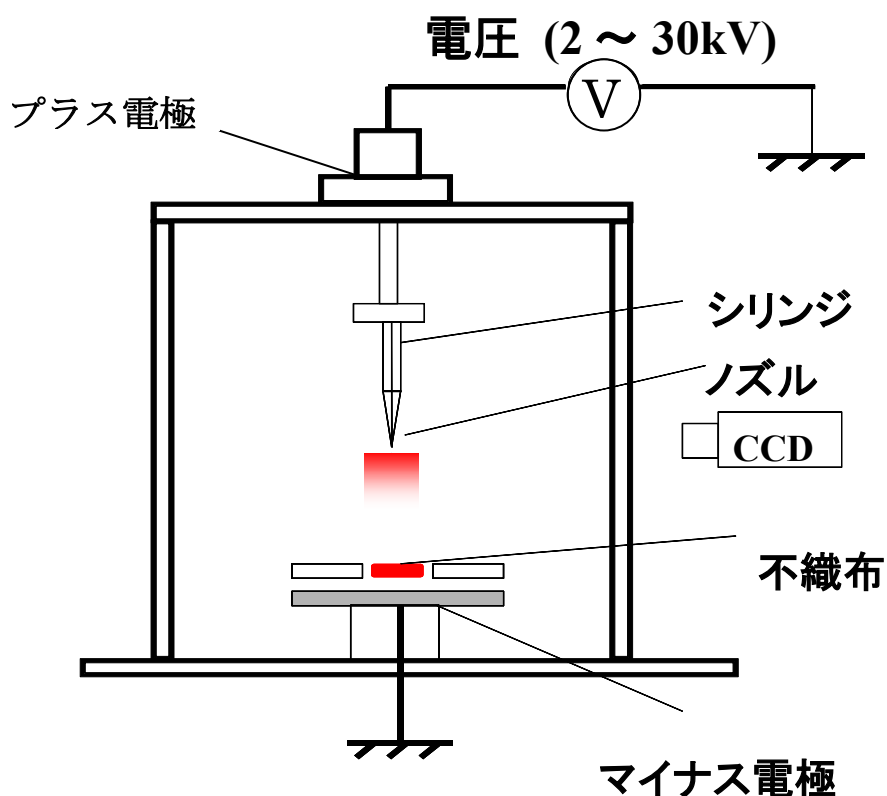


Fig3-3 ナノファイバーの作製方法の概略図

今回は、高分子溶液としてポリアクリロニトリルを用い、170nm～1300nm の糸径のナノファイバー不織布を作製し、実験に使用した。

3-2-9 ナノファイバー不織布を用いた各種肝細胞の培養法

- 1) アルミホイル有、アルミホイル無ナノファイバーを用いた胎児肝細胞の高密度培養法
 - ① ナノファイバー不織布が付着したアルミホイルを 15mm、14mm、13mm のポンチで二枚ずつ打ち抜いた。二枚打ち抜いたものの一方は、アルミホイル付きナノファイバー不織布、もう一方は、アルミホイルを剥がしナノファイバー不織布のみの状態にした。
 - ② 打ち抜いたナノファイバー不織布及びアルミホイル付きナノファイバー不織布をそれぞれ 70% エタノールで満たした 24 well multi plate に移し滅菌した。
 - ③ その後、半日 UV 殺菌し、70% エタノールを培地 500 μ L に置換した後、細胞数 1.6×10^4 cells/well で播種し、CO₂インキュベーターで培養を行った。
 - ④ 培地交換は、4日目までは2日に1度とし、それ以降は、培地中のグルコース濃度が 2.2g/L を下回らないように、1日1回～2回培地交換を行った。
- 2) アルミホイル有、アルミホイル無ナノファイバー不織布を用いた肝芽細胞の高密度培養法
 - ① ナノファイバー不織布が付着したアルミホイルを 15mm、14mm、13mm のポンチで打ち抜き、半数をアルミホイルを剥がしナノファイバー不織布のみの状態にした。
 - ② 打ち抜いたものをそれぞれ 70%エタノールで満たした 24well multi plate に移し滅菌した。
 - ③ その後、半日 UV 殺菌し、70%エタノールを培地 500 μ L に置換した後、細胞数 1.6×10^4 cells/well で播種し、CO₂インキュベーターで培養を行った。
 - ④ 培地交換は、4日目までは2日に1度とし、それ以降は、培地中のグルコース濃度が 2.2g/L を下回らないように、1日1回～2回培地交換を行った。
 - ⑤ 培養6日後に培地へ酪酸ナトリウムを最終濃度 1mM になるように添加し、さらに8日間培養を行うことで肝芽細胞を誘導した。

3) 各径のナノファイバー不織布を用いた胎児肝細胞の静置培養法

- ① それぞれの径のナノファイバー不織布をφ14mm のポンチで打ち抜き、打ち抜いたナノファイバー不織布をそれぞれ 70% エタノールで満たした 24 well multi plate に移しクリーンベンチ内で半日 UV 照射し滅菌を行った。
- ② その後、70% エタノールを・PBS で 3 回洗浄し培地に置換した後、細胞数 $1.6 \times 10^4 \text{cells/well}$ で播種し、CO₂インキュベーターで培養を行った。
- ③ 培地交換は、4 日目までは 2 日に 1 度とし、それ以降は、培地中のグルコース濃度が 2.2g/L を下回らないように、1 日 1~2 回培地交換を行った。

4) 各径のナノファイバー不織布を用いた肝芽細胞の静置培養法

- ① それぞれの径のナノファイバー不織布をφ14mm のポンチで打ち抜き、打ち抜いたナノファイバー不織布をそれぞれ 70% エタノールで満たした 24 well multi plate に移しクリーンベンチ内で半日 UV 照射し滅菌を行った。
- ② その後、70% エタノールを・PBS で 3 回洗浄し培地に置換した後、細胞数 $1.6 \times 10^4 \text{cells/well}$ で播種し、CO₂インキュベーターで培養を行った。
- ③ 培地交換は、4 日目までは 2 日に 1 度とし、それ以降は、培地中のグルコース濃度が 2.2g/L を下回らないように、1 日 1~2 回培地交換を行った。
- ④ 培養約 6 日後に培地へ酪酸ナトリウムを最終濃度 1mM になるように添加し、さらに 8 日間培養を行うことで肝芽細胞を誘導した。

5) ナノファイバー不織布を用いた成人肝細胞の静置培養法

- ① それぞれの径のナノファイバー不織布をφ14mm のポンチで打ち抜き、打ち抜いたナノファイバーをそれぞれ 70% エタノールで満たした 24 well multi plate に移しクリーンベンチ内で半日 UV 照射し滅菌を行った。
- ② その後、70% エタノールを・PBS で 3 回洗浄し培地に置換した後、細胞数 $1.6 \times 10^4 \text{cells/well}$ で播種し、CO₂インキュベーターで培養を行った。
- ③ 播種翌日から Rifampicin を 10μM で添加し、培地交換は毎日行った。

3-2-10 分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法

1)使用試薬及び機器

2-2-10 参照

2)試薬調製法

2-2-10 参照

3)分光蛍光光度計による薬物代謝活性測定法の原理

2-2-10 参照

4)分光蛍光光度計を用いた薬物代謝活性の測定プロトコル

24 well multi plate の培地を P-450 活性測定用培地に置換し、CO₂インキュベーター内で薬物代謝反応を促した。30 分の反応後、培地を 450 μ L サンプルングした。サンプルングした培地中の、第二相反応(抱合)を受け無蛍光物質となった反応物を、酵素 β -glucuronidase 及び Arylsulfatase で処理し、蛍光物質へ変化させるために、 β -glucuronidase + Arylsulfatase 酢酸緩衝溶液 150 μ L 加え、恒温槽で 37 $^{\circ}$ C \cdot 2 時間反応させた。2 時間後、Resorufin を分離するため、Ethyl alcohol を 1.2mL 加え混合し、3000rpm \cdot 10min で遠心分離を行った。上澄みを 1.8mL 取り、分光蛍光光度計(励起波長 : 530nm 蛍光波長 : 590nm)用いて、上澄み中の Resorufin を定量測定した。

3-2-11 走査型電子顕微鏡(SEM)によるナノファイバーの観察

1)使用試薬及び使用機器

2-2-12 参照

2)試薬の調製法

2-2-12 参照

3)走査型電子顕微鏡(SEM)の原理

2-2-12 参照

4) SEM 試料作製プロトコル

①前固定

古い培地を吸引除去し、前固定液を 0.5mL 加え、室温で 1 時間置いた。

②本固定

前固定液を吸引除去し、本固定液を 0.5mL 加え、室温で 2 時間置いた。

③脱水

本固定液を吸引除去し、濃度の低い順(70%→80%→90%→100%)にエタノール溶液を 0.5mL 加え、脱水を行った。このとき、各濃度で 10 分間ずつ置いた。続いて、100%エタノールに 60 分間(20 分×3 回)置いた。100%エタノールで脱水している間に t-ブタノール凍結乾燥装置のスイッチを入れ、WARM にし、ステージを温めて置いた。

④凍結

脱水を完全に行った試料を、100%エタノールと t-Butyl Alcohol の混合液 1:1、3:7、t-Butyl Alcohol 100%の順で各 15 分間、30℃で浸漬した。続いて、新鮮な t-Butyl Alcohol 100%に入れ替え、20～30 分間、30℃で置いた。その後、凍結乾燥装置の温度コントローラーが 0℃にセットしてあることを確認し、スイッチを COOL に入れ替え、凍結させた。

⑤乾燥

5℃以下まで温度を下げ、EVAC を ON にし、真空排気を行った。排気後、凍結した t-Butyl Alcohol が完全に無くなるまで排気し、スイッチを WARM に入れ替え、凍結乾燥装置のステージの温度が 30℃を超えたところで、WARM-COOL スイッチを中点に戻し、EVAC を OFF にした。取り出した試料は大気中に放置せず、速やかに乾燥機内に移した。

⑥蒸着

乾燥終了後、試料をマニキュアで SEM 用の台に固定した。蒸着装置を用いて、金を 70 Å の厚みで 2 回蒸着させた。

3-3 結果と考察

3-3-1 アルミホイル有、無ナノファイバー不織布における胎児肝細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度

アルミホイル有無ナノファイバー不織布における胎児肝細胞(Hc 細胞)及び肝芽細胞を、14 日間静置培養した後の最高到達最高密度を Fig3-4 に示した。また、ナノファイバー不織布を打ち抜いたポンチの径の影響についても検討した。

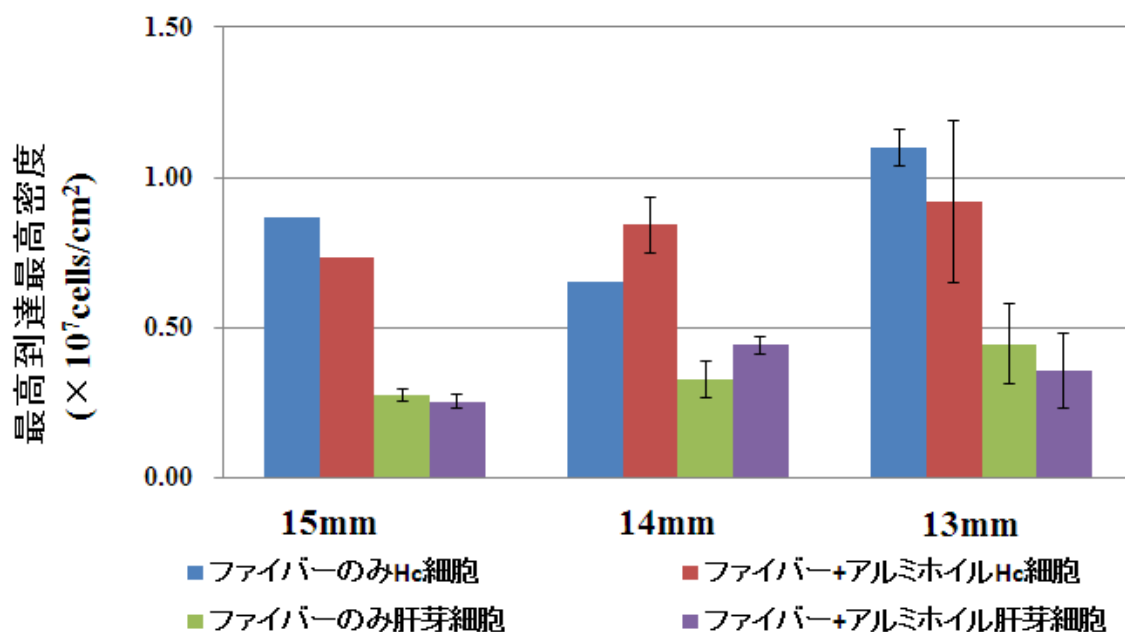


Fig3-4 ナノファイバー不織布を用いた Hc 細胞及び肝芽細胞の最高到達細胞密度

15mm, 14mm のナノファイバーのみの Hc 細胞、15mm ファイバー+アルミホイルの Hc 細胞は n=1。14mm のナノファイバー+アルミホイルの肝芽細胞、13mm のナノファイバー+アルミホイルの Hc、肝芽細胞は n=3。その他は、n=2 となっている。

Hc 細胞で $1.10 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ 、肝芽細胞で $0.44 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ の最高到達細胞密度を得られた。アルミホイルの有無による細胞密度の違いは見られなかった。また、ポンチの径の違いの有意差も見られなかった。

3-3-2 アルミホイル有、無ナノファイバー不織布における胎児肝細胞および肝芽細胞の薬物代謝活性

アルミホイル有無のナノファイバー不織布において、Hc 細胞及び肝芽細胞を 14 日間静置培養した後の CYP3A4 活性を Fig3-5 に示した。また、ナノファイバー不織布を打ち抜いたポンチの径の影響についても検討した。

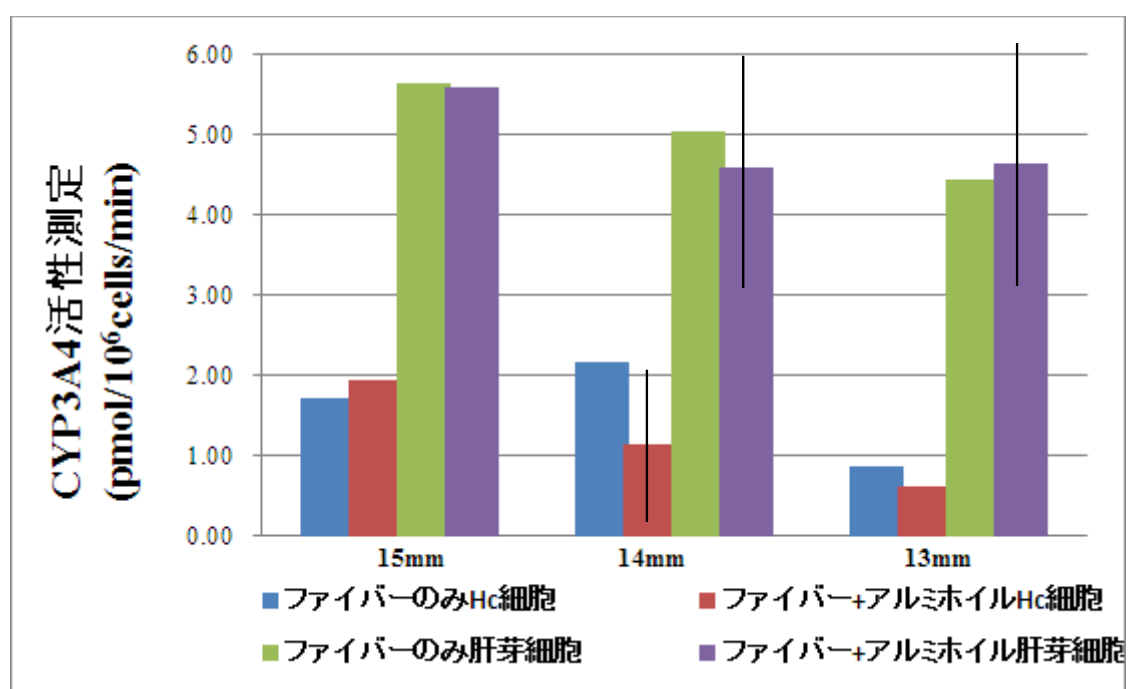


Fig.3-5 ナノファイバー不織布を用いた Hc 細胞及び肝芽細胞の CYP3A4 活性
エラーバーが付いているところは n=2

肝芽細胞の CYP3A4 活性が Hc 細胞と比べて、最高で 12 倍向上した。また、アルミホイルの有無や、打ち抜いたポンチの径による影響についても、有意差は見られなかった。そのため、以降の実験では、操作が扱いやすいアルミホイル有で、ポンチ径 14mm のナノファイバー不織布を使用した。

3-3-3 径の異なるナノファイバーにおける胎児肝細胞および肝芽細胞の最高到達細胞密度

170nm~1300nm の径のナノファイバー不織布を用いて静置培養した Hc 細胞および肝芽細胞の最高到達細胞密度を Fig.3-6 に示した。

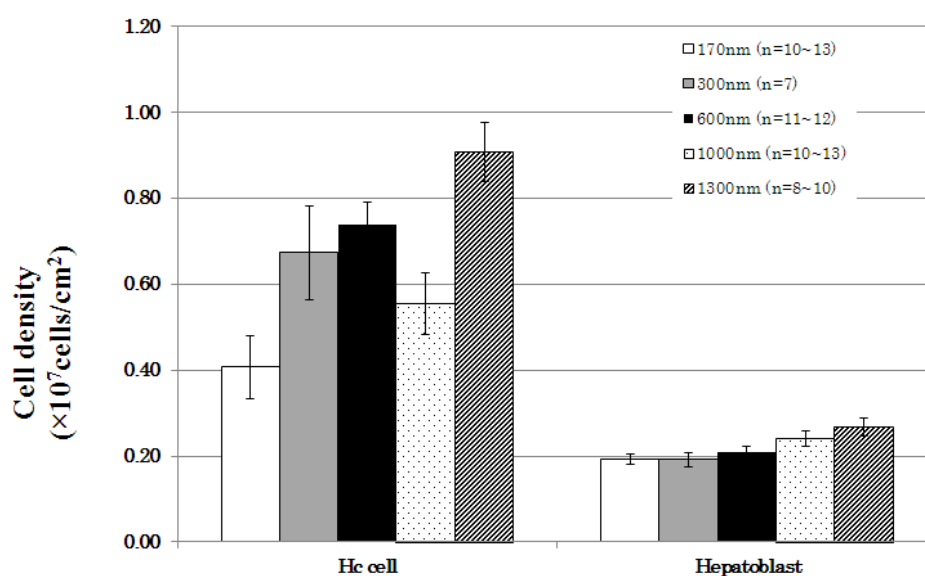


Fig.3-6 各径のナノファイバーにおける Hc 細胞および肝芽細胞の最高到達細胞密度

Hc 細胞、肝芽細胞ともに 1300nm の径のナノファイバーが最も高い細胞密度 ($0.91 \times 10^7 \text{cells/cm}^2$ 、 $0.27 \times 10^7 \text{cells/cm}^2$) となった。Hc 細胞では、径の違いにより細胞密度に変化が見られたが、肝芽細胞では、170nm~1300nm の間のナノファイバーでは、径の違いによる有意な差は見られなかった。

3-3-4 径の異なるナノファイバーにおける胎児肝細胞および肝芽細胞の薬物代謝活性

170nm~1300nm の径のナノファイバー不織布を用いて静置培養した Hc 細胞および肝芽細胞の CYP3A4 活性を Fig.3-7 に示した。

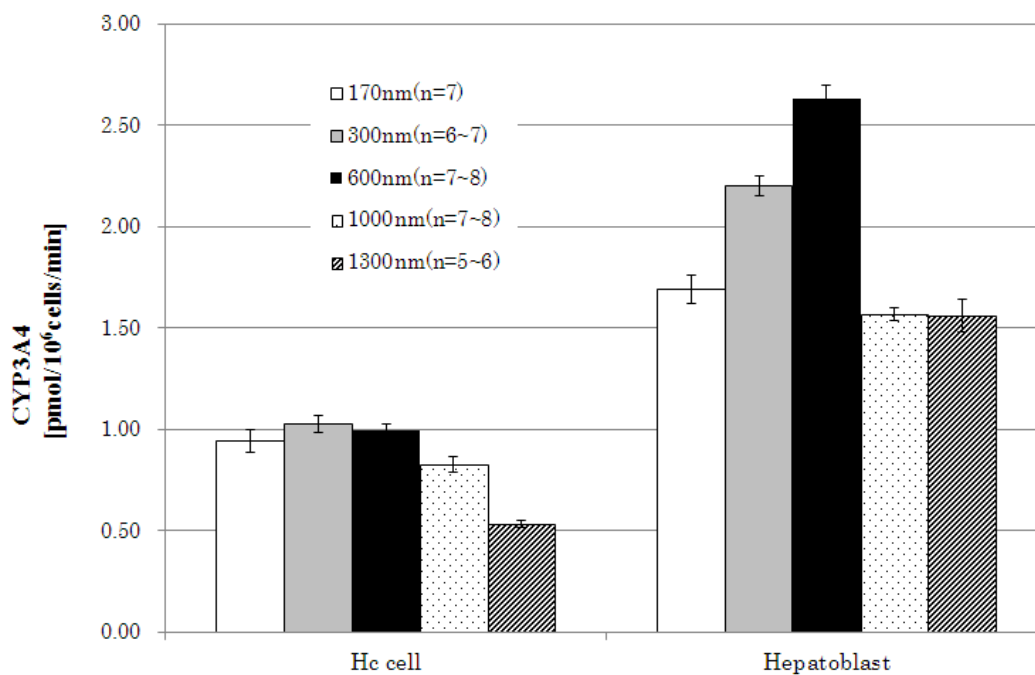


Fig.3-7 各径のナノファイバーにおける Hc 細胞、肝芽細胞の CYP3A4 活性

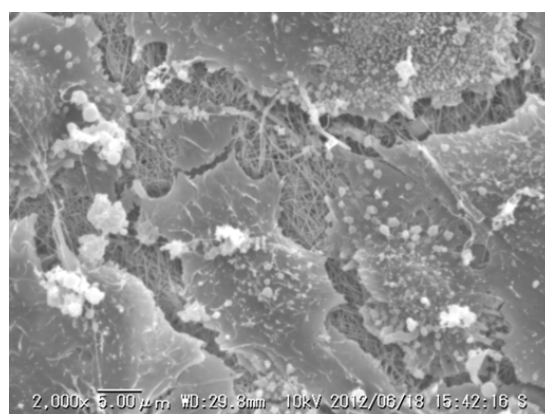
Hc 細胞、肝芽細胞ともに細胞密度は 1300nm のナノファイバーが最も高かったが、CYP3A4 活性では 1300nm は活性が低い値となり、600nm のナノファイバーの肝芽細胞が最も高い(2.63pmol/10⁶cells/min)結果となった。

またこの値は、成人ドナーの肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95±1.24 pmol/10⁶cells/min)¹⁰²⁾に匹敵する値となり、ナノファイバー自体の有用性が示された。

3-3-5 培養終了後の肝芽細胞の SEM による形態観察

培養終了後に、170nm～1300nm のナノファイバー(肝芽細胞)を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

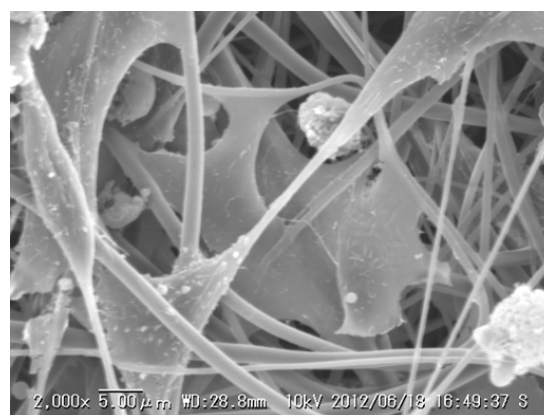
CYP3A4活性の低かった 170nm、1000nm、1300nm のナノファイバーの SEM 写真を Fig.3-8 に示した。



170nm ×2000



1000nm ×2000

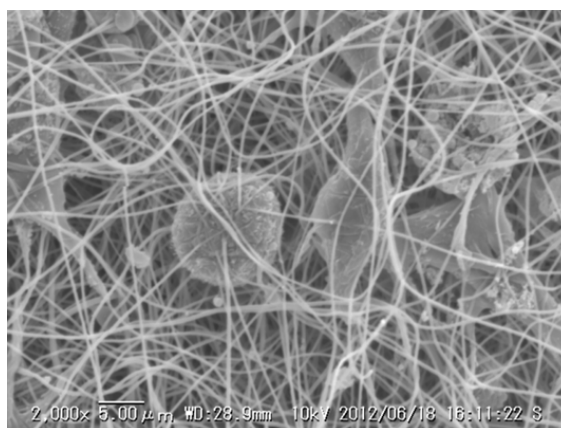


1300nm ×2000

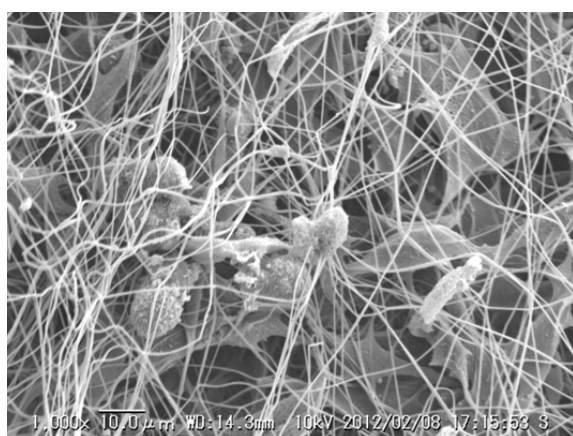
Fig.3-8 CYP3A4 活性の低かったナノファイバーの SEM 写真

一般的に、肝機能発現には球状の形態をとることが重要であるとされている¹⁰⁷⁾。本実験においても、CYP3A4 活性の値が低かったナノファイバーの径では、細胞が球状の形態をとっておらず細胞が伸展していることが明らかとなった。

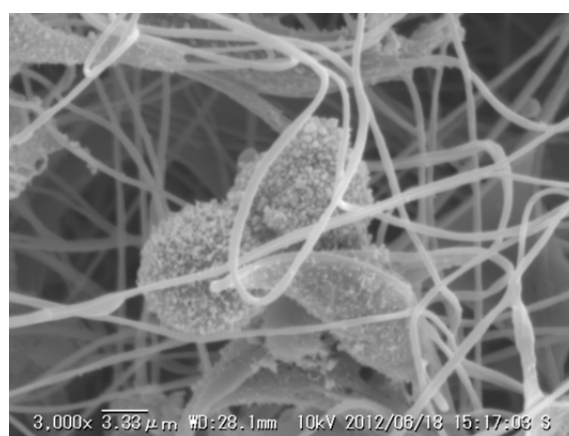
CYP3A4 活性の高かった 300nm、600nm のナノファイバーの SEM 写真を Fig.3-9 に示した。



300nm ×2000



600nm ×1000



600nm ×3000

Fig.3-9 CYP3A4 活性の高かったナノファイバーの SEM 写真

CYP3A4 活性の値の高かったナノファイバーの径では、細胞が肝機能発現に重要とされる球状の形態をとっていることが明らかとなった。

3-3-6 径の異なるナノファイバーにおける成人肝細胞の薬物代謝活性

径の異なるナノファイバー上で培養した成人肝細胞の CYP3A4 活性を Fig.3-10 に示した。

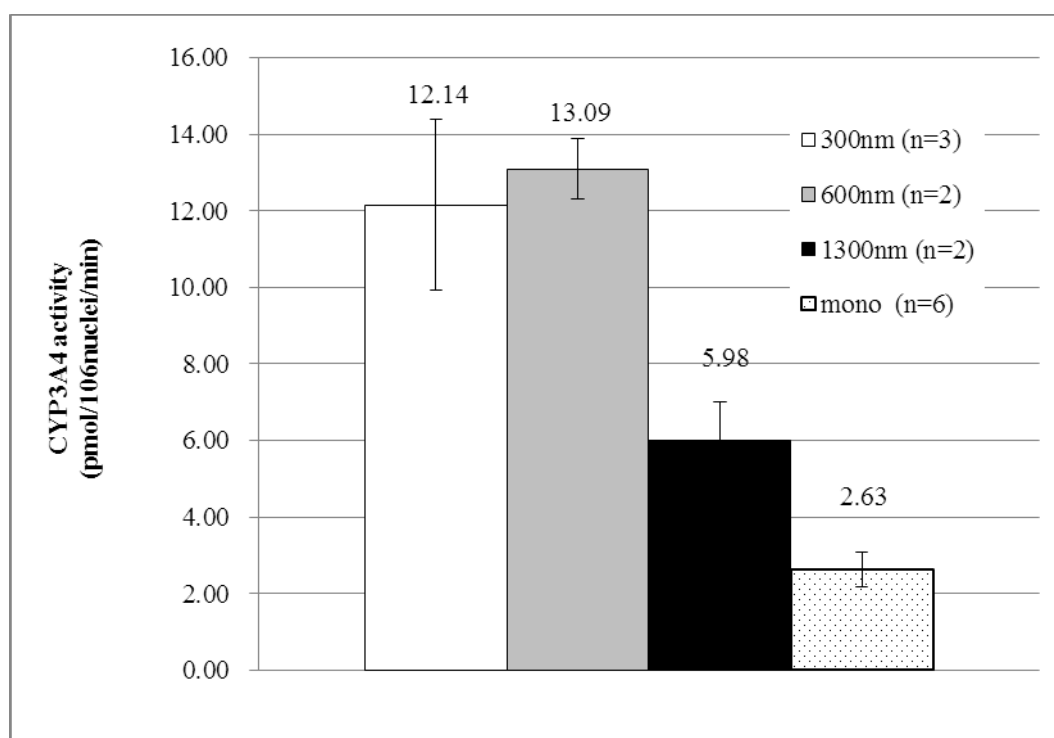


Fig.3-10 径の異なるナノファイバー上で培養した成人肝細胞の CYP3A4 活性

ナノファイバーは、肝芽細胞で CYP3A4 活性の高かった 300nm、600nm、活性の低かった 1300nm の 3 種類を使用した。また、対照として成人肝細胞に対して通常用いられるコラーゲンコートしたディッシュ上での monolayer 培養の結果も示した。

肝芽細胞の時と同様に、ナノファイバー上で培養したもので CYP3A4 活性の増加が見られ、特に、600nm のものが、1300nm および monolayer よりも高い値となった。

以上の結果から、Hc 細胞、肝芽細胞のみではなく、一般に培養が難しいとされる成人肝細胞に対してもポリアクリロニトリル製のナノファイバーの有用性が示された。

3-4 総括

本章では、第四章で使用した三次元細胞培養モジュールの中に細胞の足場として充填されているナノファイバーのみの培養を行った。具体的には、ポリアクリロニトリル製のナノファイバーの径を 170 nm~1300 nm の間で変更し、径の違いが細胞増殖及び機能、細胞形態に与える影響について評価を行った。

径を変更する前実験として、ナノファイバー不織布を作製する際に基材として使用されるアルミホイル（マイナス電極）の有無、及び不織布を打ち抜くポンチ径の細胞への影響の検討を行った。結果として、Hc 細胞、肝芽細胞ともに、細胞増殖に関して有意差は見られず、また、CYP3A4 活性についても同じように有意差は見られなかった。この結果を受け、これ以降は操作が簡便なアルミ有の状態の直径 14 mm のナノファイバー不織布を使用していく事に決定した。

Hc 細胞、肝芽細胞においては、細胞密度は Hc 細胞、肝芽細胞ともにナノファイバー径 1300 nm のものが最も高かったが、細胞機能は、肝芽細胞のナノファイバー径 600 nm が $2.63 \text{ pmol}/10^6\text{cells}/\text{min}$ で最も高い値であった。この値は、成人ドナーの肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値($1.95 \pm 1.24 \text{ pmol}/10^6\text{cells}/\text{min}$)に匹敵する値となった。培養終了後に、SEM により細胞の形態観察を行ったところ、CYP3A4 活性が低かった 170 nm、1000 nm、1300 nm のナノファイバーでは、機能発現に重要であるとされる球状の形態をとっておらず、活性の高かった 300 nm、600 nm のナノファイバーでは、機能発現に重要であるとされる球状の形態をとっている事が明らかとなった。さらに詳しく観察すると、球状の形態をとっている細胞のほとんどが奥行のある空間（空隙）に存在しており、1000 nm 以上の径では、空間が存在するところでも細胞が球状の形態を取らずに伸展していた。

成人肝細胞の培養では、300nm、600nm、1300nm の径のナノファイバーを使用した。こちらでも Hc 細胞、肝芽細胞の時と同様に 600nm のナノファイバーで活性が高く、1300nm のものでは活性が低いという結果となった。通常、成人肝細胞は、培養表面をコラーゲン処理しているものでないと細胞が接着できず死滅してしまうが、ナノファイバーを使用することで細胞機能を高めつつ、コラーゲン処理の手間を省くことができる可能性も示唆された。

以上のことから、三次元培養モジュールで用いるナノファイバー径としては 600nm とすることに決定した。また、細胞機能、細胞形態に与える影響が、ナノファイバーの径の違いによるものだけではなく、ナノファイバーの空隙も重要であることが示唆された。今後、ナノファイバーの空隙を制御したナノファイバーを用いて、さらに詳細な検討を行う必要があるものと思われる。

第4章 三次元培養モジュールを使用した灌流培養システム

4-1 序

現在、重篤な肝臓病患者の最も有効な治療法は肝移植であるとされているが、日本ではドナーの不足により移植を受けられる人は限られており、肝移植への橋渡しとして人工肝臓が必要とされている。人工肝臓の開発には、肝細胞を人工装置の中に組み込んだものが主流であるが、一般に次の点が課題となっている⁵⁸⁾。①正常なヒト肝細胞の大量取得（目標：約 10^{10} cells/モジュール）、②装置体積を小さくするための高密度培養用担体の開発（細胞密度： 1×10^8 cells/cm³、容積：約 0.1 L）、③高密度状態(10^8 cells/cm³～)の肝細胞の生存と機能を維持するための酸素と栄養素の有効な供給方法の開発、などである。また、第三章で述べたようにヒト肝細胞の機能を生体外で再現する技術の開発は、医薬品開発のための動物実験代替法としても期待されている。しかし、ヒト肝実質細胞は生体外では増殖せず、また、通常の単層培養では培養1週間程度で肝機能の低下や消失が起こるため、動物実験代替として利用できていないのが現状である。

そこで本章では、人工肝臓開発の際に課題とされる上記の点を克服し、さらに、候補薬物の前臨床段階でのヒトに対する毒性・効能を予見し、開発費の削減及び開発期間の短縮を実現するヒト肝細胞培養技術を開発することを目的とした。そのために、中空糸の製造メーカーである三菱レイヨン社との共同研究で、三次元細胞培養モジュール⁹¹⁾を作製し、作製したモジュールを使用した灌流培養システムの開発を行った。

三次元細胞培養モジュールは、人工肝臓開発の課題である②、③を克服するために、培地供給用と酸素供給用の2種類の中空糸を編み込んであること、中空糸の間に細胞の足場として、ナノファイバーが充填されていること、一枚の担体を重層することで、スケールアップが可能であることなどの特徴を持っている。これまで本研究室で培養してきたヒト胎児肝細胞(Hc細胞)、及び肝幹細胞（肝芽細胞）、成人肝細胞を本灌流培養システムで培養し、細胞密度、細胞機能及び細胞形態にどのような影響を与えるかを検討するとともに、灌流培養システムの評価を行った。

4-2 実験方法

4-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用器具及び機器

デジタル定量チュービングポンプ (DSP-100SA)	アズワン
エアポンプ(SSPP-2)	水作
ラボランシリコンチューブ(2×4mm)(3×5mm)	アズワン
ファーマド BPT チューブ(AY242012:4.8mm,8mm)	ヤマト科学
ルアーフィッティング (オス、メス) (2×4mm)(3×5mm)	アズワン
シリンジ(5mL、10mL)	テルモ
注射針 (26G:0.45×13mm、18G:0.90×3.8mm)	テルモ

その他は第 3 章 3-2-1 を参照

4-2-2 試薬の調製法

3-2-2 を参照

4-2-3 滅菌法

3-2-3 参照

4-2-4 細胞の継代及び計数法

3-2-4 参照

4-2-5 細胞凍結法及び融解法

3-2-5 参照

4-2-6 グルコース消費速度からの細胞数計測法

3-2-6 参照

4-2-7 種々の代謝物の濃度測定法

・アンモニア濃度測定

1)使用試薬及び機器

①使用試薬

- ・アンモニア－テストワコー

高密度培養した Hc 細胞のアンモニア濃度測定には、和光純薬工業のアンモニア－テストワコー(藤井・奥田法変法¹¹⁶⁾)を使用した。以下には測定キットの構成を示す。

- ・除蛋白試液

(タングステン酸ナトリウム、リン酸を含有)

- ・発色試薬 A

フェノール 0.43mol/L

ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウム二水塩 0.50mmol/L

- ・発色試液 B

水酸化カリウム 0.89mol/L

- ・発色試液 C

(炭酸カリウム、次亜塩素酸ナトリウム含有)

- ・アンモニア標準液

(NH₃-N 400μg/dL)

- ・標準液用希釈液

②使用機器

分光光度計(Spectrophotometer U-2000)

HITACHI

恒温槽(EYELA BATH SB-24)

EYELA

遠心分離機(Table-top 遠心機 8100)

久保田製作所

2)培地中のアンモニア濃度測定法

①原理

試料に除蛋白試液を加えて除蛋白することにより、呈色阻害成分を除去すると同時に試料中の諸酵素を失活させる。この上清に、フェノール、ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウム(ニトロプルシッドナトリウム)を加え、さらにアルカリ性としたのち、次亜塩素酸ナトリウムで酸化することで青色を呈色する。この青色の吸光度を測定することにより試料中のアンモニア窒素濃度を求める。

②アンモニア濃度検量線

試験管に除蛋白液を 1.0mL とり、そこに試料 0.25mL を振り混ぜながら加え、3000rpm, 5min で遠心分離を行う。遠心終了後、上清 0.5mL を別の試験管にとり、発色試薬 A, B, C を順にそれぞれ 0.5mL, 0.25mL, 0.5mL 入れ、37℃ で 20 分間反応させた。その後水冷し、吸光度 630nm で測定し、測定した吸光度をグラフにプロットした。

・尿素窒素濃度測定

1) 使用試薬及び機器

① 使用試薬

- ・尿素窒素 B-テストワコー

高密度培養した Hc 細胞の尿素窒素測定には、和光純薬工業の尿素窒素 B-テストワコー(ウレアーゼ・インドフェノール法¹¹⁷⁾)を使用した。以下には測定キットの構成を示す。

- ・ウレアーゼ(ウレアーゼ(ナタマメ由来))
- ・ウレアーゼ溶解用試液(グリセリン)
- ・緩衝液
 - リン酸緩衝液 pH7.0
 - サリチル酸ナトリウム
 - ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム二水塩
- ・発色試液 B
 - 次亜塩素酸ナトリウム
 - 水酸化ナトリウム含有
- ・標準液
 - 窒素尿素 50mg/dL

② 使用機器

分光光度計(Spectrophotometer U-2000)

HITACHI

恒温槽(EYELA BATH SB-24)

EYELA

2) 培地中の尿素窒素濃度測定法

① 原理

試料にウレアーゼを作用させ、試料中の尿素をアンモニアに分解する。このアンモニアをペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム二水塩(ニトロシッドナトリウム)の存在下でサリチル酸と次亜塩素酸と反応させインドフェノールを生成する。このインドフェノールがアルカリ性で呈色する青色の吸

光度を測定することにより試料中の尿素窒素濃度を求める。

②尿素窒素濃度検量線

試験管に発色試液 A を 1mL 入れ、そこへそれぞれの濃度に調製した標準溶液を 10 μ L ずつ入れ、37℃で、15 分間反応させた。その後発色試液 B を 1mL 加え 37℃で 10 分間反応させ、吸光度 570nm で測定し、測定した吸光度をグラフにプロットした。

4-2-8 三次元細胞培養モジュールの詳細

三次元細胞培養モジュール(Fig.4-1)には、培地供給用回路とガス供給用回路の2種類の中空糸が1mmの間隔で編みこまれており、その両中空糸の間に細胞の足場としてナノファイバーが充填されている。これらの設計によりナノファイバーを足場とする三次元的な細胞集塊中に、酸素及び栄養素を供給出来るようになっている。さらに、細胞播種用のポートが表と裏に対角上に設置してあり、効率的に細胞を播種できるようになっている。培地供給用中空糸は、内径：約300 μm 、膜厚：約50-60 μm 、材質：ポリエチレンの中空糸となっている。ガス供給用中空糸は、三菱レイヨン株が開発した特殊機能超薄膜を高密度ポリエチレン、高結晶性ポリエチレンで挟み込んだ三層構造で、内径：200 μm 、膜厚40 μm の中空糸である¹¹⁸⁾。

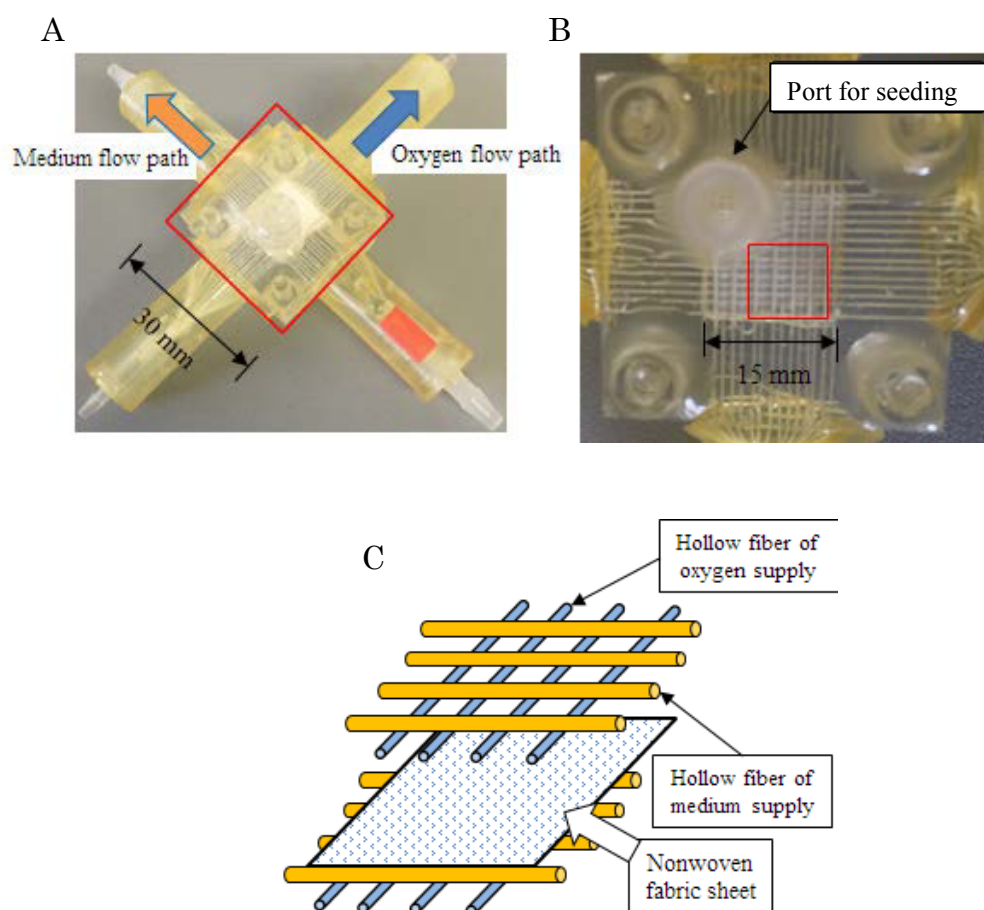


Fig.4-1 三次元培養モジュールの詳細図

A はモジュールの全体写真、B はナノファイバー充填部の写真、C は二種類の中空糸に挟み込んだナノファイバーの概略図を示している。

4-2-9 使用したナノファイバー不織布の作製方法

3-2-8 を参照

4-2-10 三次元細胞培養モジュールを使用した灌流培養システムの詳細

灌流培養システムは、三次元細胞培養モジュール、培地ビン、チューブポンプ、エアポンプ、酸素電極で構成されている(Fig.4-2)。システム全体は 5% CO₂、95% Air のインキュベーター内に設置し、チューブポンプ、エアポンプを作動させることで中空糸間にあるナノファイバーを足場とする三次元的な細胞集塊に培地及び酸素を供給することが可能となっている。2 回目以降の実験では、酸素電極により培養期間中に溶存酸素濃度をモニタリングすることで細胞への酸素供給が十分であるか確認を行った。

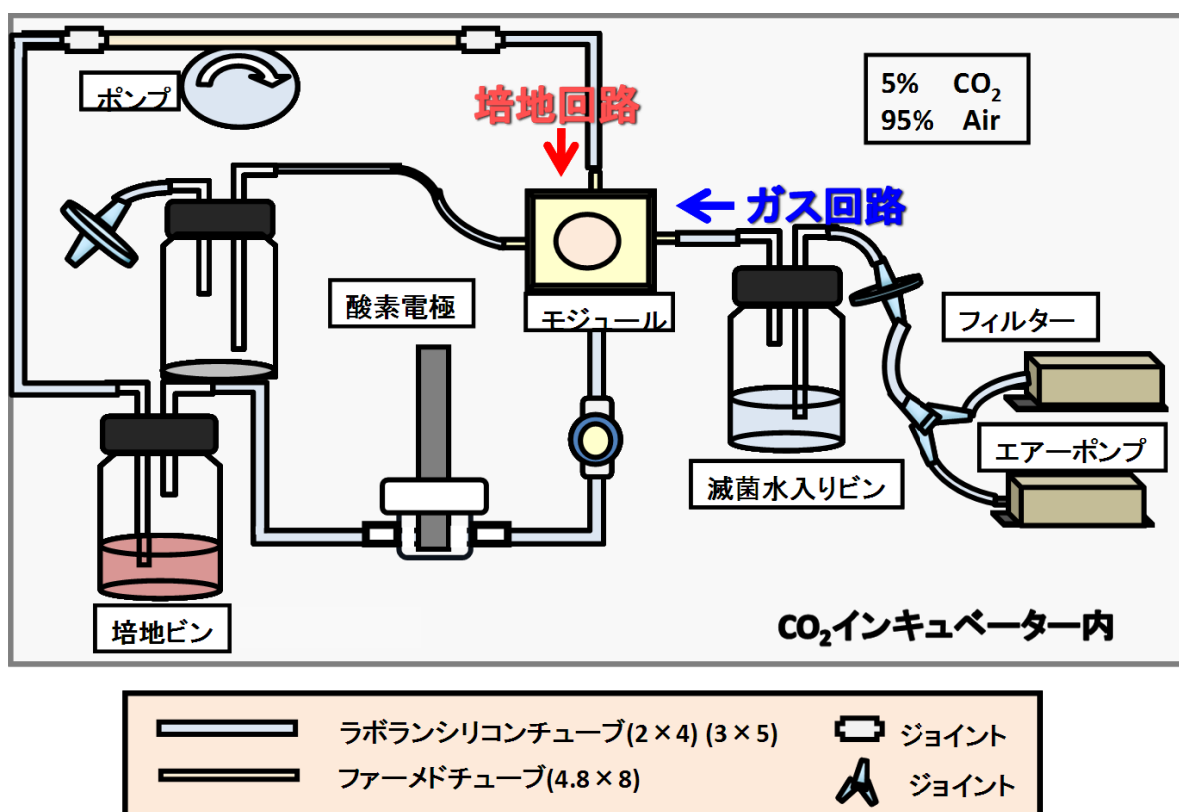


Fig.4-2 三次元培養モジュールを用いた灌流培養システム

4-2-11 本灌流培養システムを用いた胎児細胞及び肝芽細胞の高密度培養法

- 1) 灌流培養システムを一旦組立て、**Priming volume** の測定、流速の調節を行う。
その後システムを分解し、エアポンプ、三次元細胞培養モジュール以外はオートクレーブ 120℃、20 分間で滅菌した。モジュールの滅菌は、エアポンプをつないだ状態で、培地供給用回路、播種ポートからエタノールを充填し、クリーンベンチ内で半日 UV 照射することで行った。
- 2) 滅菌後、クリーンベンチ内で再度灌流培養システムを組立て、培地供給用回路に滅菌水を灌流させ、1 日 UV 照射し再度殺菌を行った。この時に、培地回路から滅菌水の漏れがないことを確認した。
- 3) 再度滅菌を行った後、培地ビン中の滅菌水を培地に替え灌流させることで、モジュール、回路内の滅菌水を培地に置換した。
- 4) 置換後、播種ポートから 6.8×10^5 cels/module で播種し、CO₂ インキュベーター内で培養を行った。
- 5) 細胞密度が 1.0×10^8 cells/cm³ を超えてから、培地へ酪酸ナトリウムを最終濃度 1mM になるように添加することで肝芽細胞を誘導した。培養終了まで SB の添加は続けた。

※ 培地量、培地交換の頻度は、培地中のグルコース濃度の減少と、培地中の pH 指示薬の色から判断した。

4-2-12 本灌流培養システムを用いた成人肝細胞の高密度培養法

- 1) 灌流培養システムを一旦組立て、**Priming volume** の測定、流速の調節を行う。
その後システムを分解し、エアポンプ、三次元細胞培養モジュール以外はオートクレーブ 120℃、20 分間で滅菌した。モジュールの滅菌は、エアポンプをつないだ状態で、培地供給用回路、播種ポートからエタノールを充填し、クリーンベンチ内で半日 UV 照射することで行った。
- 2) 滅菌後、クリーンベンチ内で再度灌流培養システムを組立て、培地供給用回路に滅菌水を灌流させ、1 日 UV 照射し再度殺菌を行った。この時に、培地回路から滅菌水の漏れがないことを確認した。
- 3) 再度滅菌を行った後、培地ビン中の滅菌水を培地に替え灌流させることで、モジュール、回路内の滅菌水を成人肝細胞播種用培地 **Seeding medium** に置換した。
- 4) 置換後、播種ポートから 4.8×10^6 cels/module で播種し、CO₂ インキュベーター内で培養を行った。
- 5) 24h 後、**Seeding medium** を長期培養用培地 **Long-Term medium** に交換した。
- 6) 培地交換は 24h 以内に毎日行い、培養中は常に培地中の溶存酸素濃度を確認した。

4-2-13 分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法

1)使用試薬及び機器

3-2-10 参照

2)試薬調製法

3-2-10 参照

3)分光蛍光光度計による薬物代謝活性測定法の原理

3-2-10 参照

4)分光蛍光光度計を用いた薬物代謝活性の測定プロトコル

培地ビンの培地を P-450 活性測定用培地に置換し、CO₂インキュベーター内で薬物代謝反応を促した。測定用培地に置換後、1 時間おきに 450μL ずつサンプリングを行った。サンプリングした培地中の、第二相反応(抱合)を受け無蛍光物質となった反応物を蛍光物質へ変化させるために、β-glucuronidase + Arylsulfatase 酢酸緩衝溶液 150μL 加え、恒温槽で 37℃・2 時間反応させた。2 時間後、Resorufin を分離するため、Ethyl alcohol を 1.2mL 加え混合し、3000rpm・10min で遠心分離を行った。上澄みを 1.8mL 取り、分光蛍光光度計(励起波長：530nm 蛍光波長：590nm)用いて、上澄み中の Resorufin を定量測定した。

4-2-14 ELISA 法による PIVKA-II 産出速度測定

2-2-11 参照

4-2-15 走査型電子顕微鏡(SEM)による培養担体の観察

1)使用試薬及び使用機器

3-2-11 参照

2)試薬の調製法

3-2-11 参照

3)走査型電子顕微鏡(SEM)の原理

3-2-11 参照

4) SEM 試料作製プロトコル

①前固定

高密度培養をしたモジュールに前固定液を注入、さらに、培地ビンに前固定液を入れ培地供給用回路に前固定液を室温で 2 時間灌流させた。

②本固定

モジュール、培地ビン内の前固定液を本固定液に置換し、室温で 2 時間灌流させた。

③脱水

モジュールを解体し、内部のナノファイバー不織布を脱水用のガラスデイスシュに移し、濃度の低い順にエタノール溶液を 2mL 加え、脱水を行った。このとき、各濃度で 10 分間ずつ置いた。続いて、100%エタノールに 60 分間(20 分×3 回)置いた。100%エタノールで脱水している間に t-ブタノール凍結乾燥装置のスイッチを入れ、WARM にし、ステージを温めて置いた。

④凍結

脱水を完全に行った試料を、100%エタノールと t-Butyl Alcohol の混合液 1:1、3:7、t-Butyl Alcohol 100%の順で各 15 分間、30℃で浸漬した。続いて、新鮮な t-Butyl Alcohol 100%に入れ替え、20～30 分間、30℃で置いた。その後、凍結乾燥装置の温度コントローラーが 0℃にセットしてあることを確認し、スイッチを COOL に入れ替え、凍結させた。

⑤乾燥

5℃以下まで温度を下げ、EVAC を ON にし、真空排気を行った。排気後、

凍結した凍結した t-Butyl Alcohol が完全に無くなるまで排気し、スイッチを WARM に入れ替え、凍結乾燥装置のステージの温度が 30°C を超えたところで、WARM-COOL スイッチを中点に戻し、EVAC を OFF にした。取り出した試料は大気中に放置せず、速やかに乾燥機内に移した。

⑥蒸着

乾燥終了後、試料をマニキュアで SEM 用の台に固定した。蒸着装置を用いて、金を 70 Å の厚みで 2 回蒸着させた。

4-3 結果と考察

4-3-1 本灌流培養システムを用いて培養した胎児肝細胞の高密度培養と代謝物濃度

胎児肝細胞(Hc 細胞)を本灌流培養システムで培養した際の細胞密度の変化を Fig.4-3 に示した。

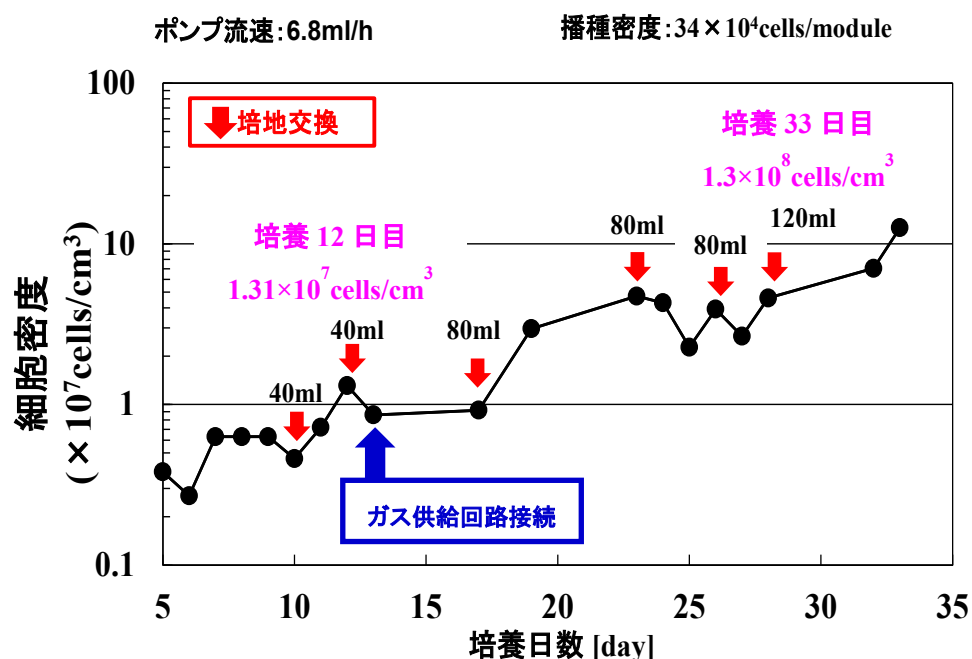


Fig.4-3 本灌流培養システムを用いて培養した Hc 細胞の増殖

Hc 細胞を 3.4×10^5 cells/module で播種し、培地流速は 6.8ml/h で、培養 13 日目にエアポンプによりガス供給を開始し、培養を行った。その結果、12 日目には 1.0×10^7 cells/cm³ に到達し、 1.0×10^8 cells/cm³ の高密度状態には、培養 33 日目に到達した。

本灌流培養システムで Hc 細胞を培養した際の種々の代謝物濃度のグラフを以下に示した。

Fig.4-4 にアンモニア濃度の変化を示した。一般に細胞培養での培地中のアンモニア濃度の上限は、2.0mM といわれているが¹¹⁹⁾、今回の培養ではアンモニア濃度は十分に低い値に抑えられていた。

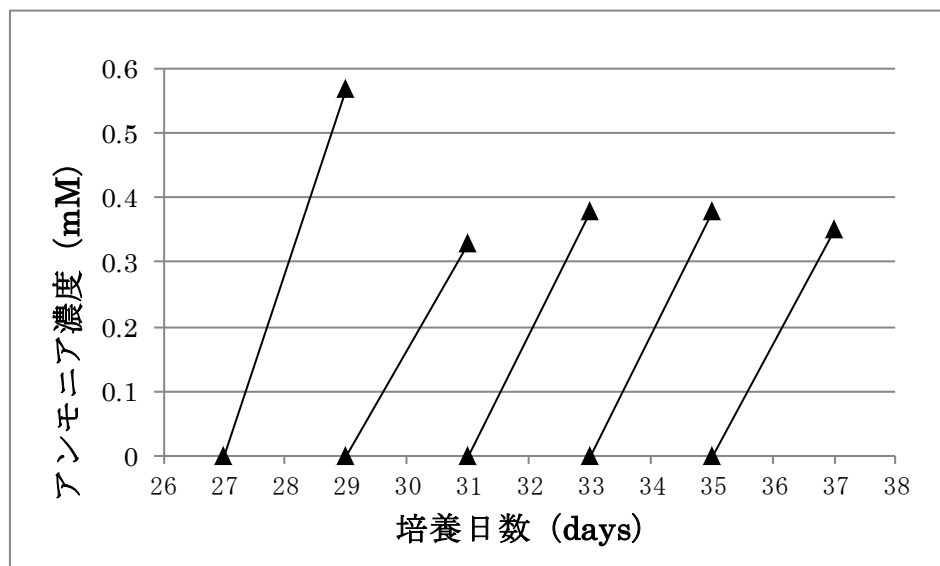


Fig.4-4 本灌流培養システムを用いて Hc 細胞を培養した際のアンモニア濃度の変化

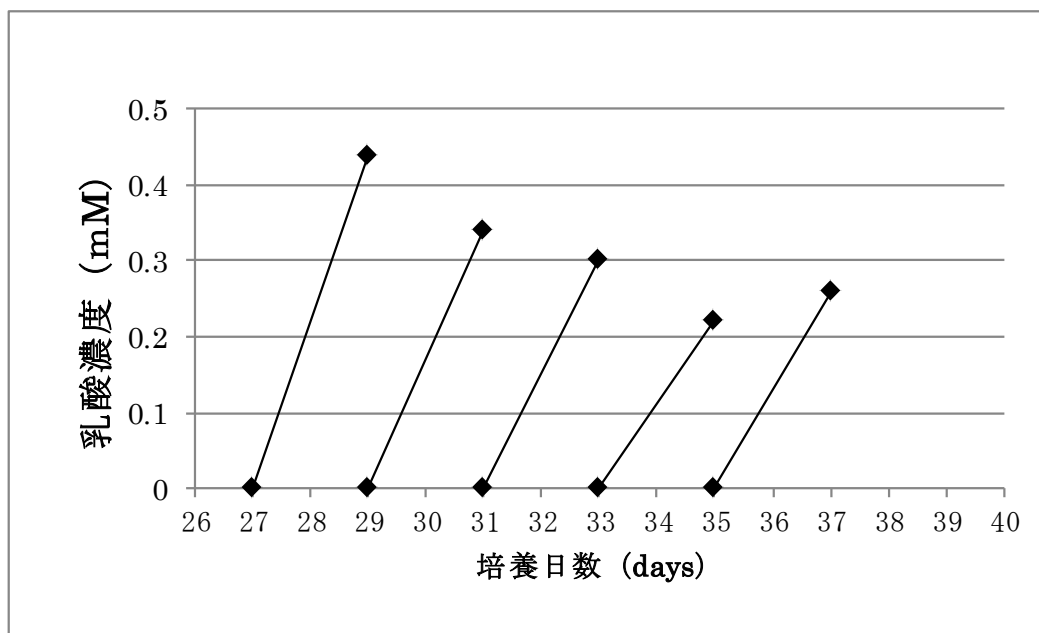


Fig.4-5 本灌流培養システムを用いて Hc 細胞を培養した際の乳酸濃度の変化

Fig.4-5 に乳酸濃度を示した。乳酸濃度は、培養中に上昇した。乳酸は、培地中の酸素が不足すると、グルコース代謝が嫌気状態になり生成される。このことから、酸素供給がまだ十分ではなかった可能性が示唆された。

Fig.4-6 に尿素濃度を示した

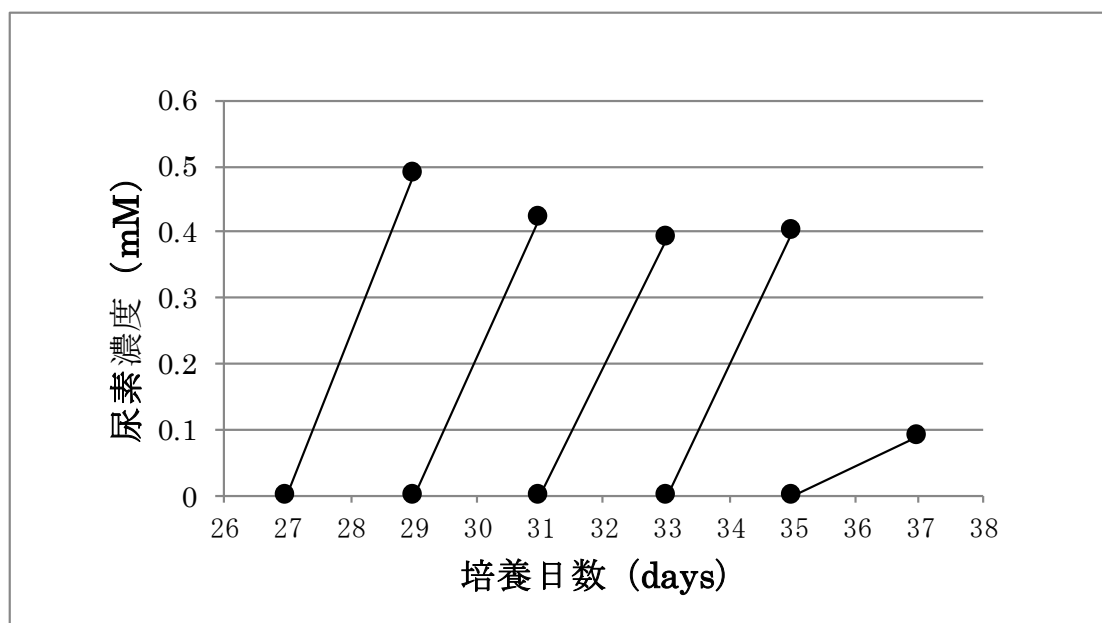


Fig.4-6 本灌流培養システムを用いて Hc 細胞を培養した際の尿素濃度の変化

尿素合成は、肝機能の一種で、この値が高いほど、肝細胞の機能が低いことを意味する。今回の培養で、本灌流培養システムで培養を行った細胞が、尿素合成を行っていることが明らかとなった。ただし、今回は、Hc 細胞のままなので、それほど高い尿素合成活性の値は出なかったものと推測される。

4-3-2 本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の高密度培養と薬物代謝活性 (1 回目)

肝芽細胞を本灌流培養システムで培養した際の細胞密度の推移(1 回目)
を Fig.4-7 に示した。

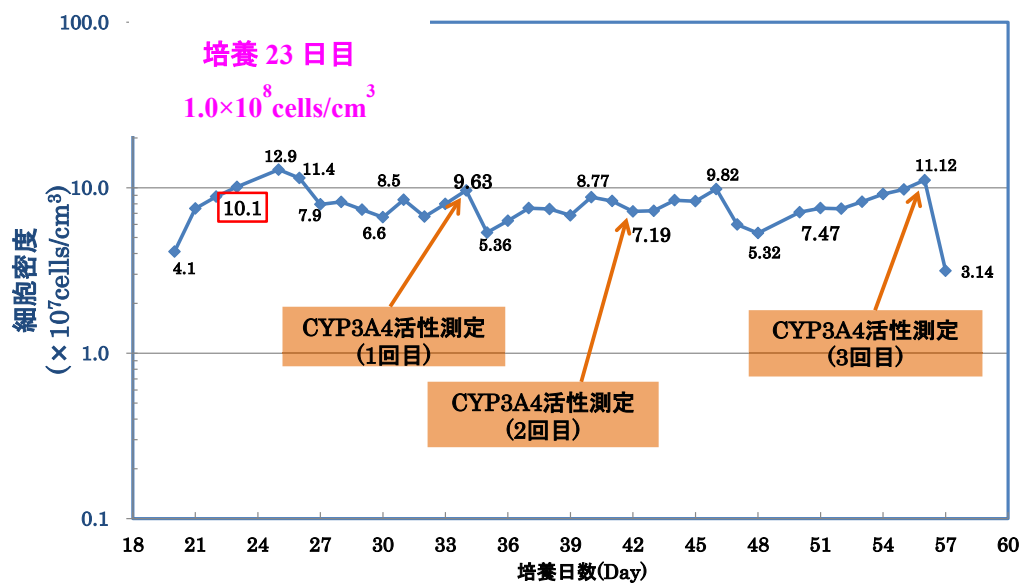


Fig.4-7 本灌流培養システムを用いて培養した肝芽細胞の細胞密度の推移
(1 回目)

Hc 細胞を 6.4×10^5 cells/module で播種し、培養初日からエアポンプによりガス供給を行い、培地流速は 60ml/h で行った。Hc 細胞から肝芽細胞への誘導は、培養 26 日目から 1mMSB により行った。

細胞密度は、培養 23 日目に 1.0×10^8 cells/cm³ の高密度状態に到達し、さらに 56 日間の長期にわたり細胞を維持することができた。

また、肝芽細胞に誘導した際に測定した 3 回の CYP3A4 活性のグラフを Fig.4-8 に示した。

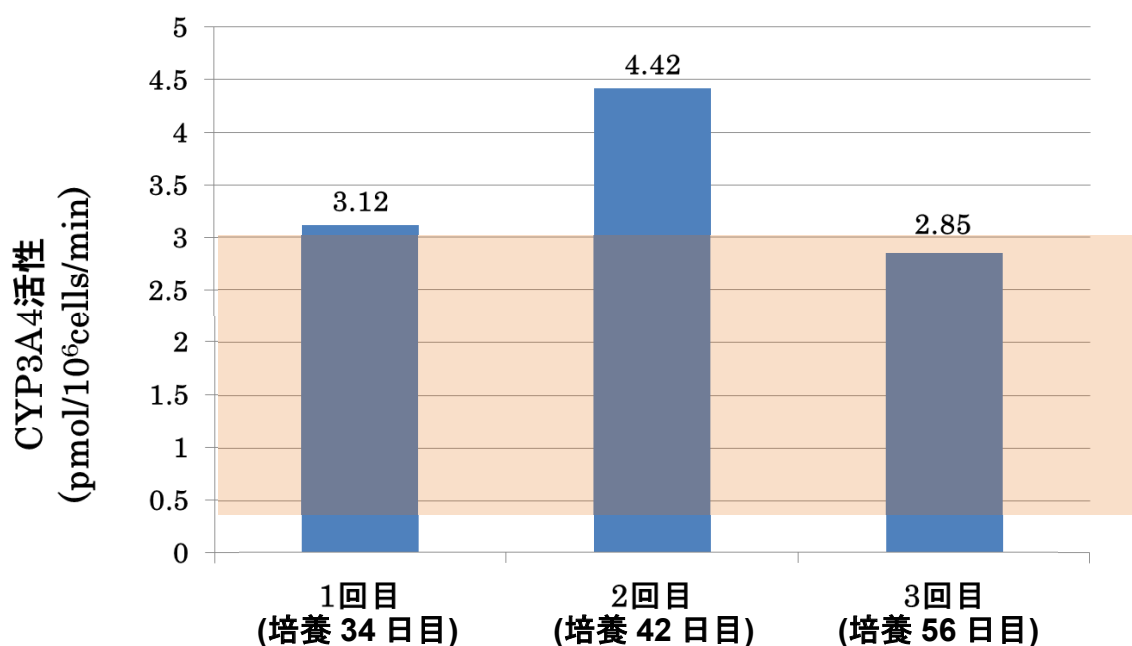


Fig.4-8 本灌流培養システムを用いて肝芽細胞を培養した際の CYP3A4 活性 (1 回目)

色のついているところは生体内肝実質細胞の CYP3A4 活性の文献値¹⁰²⁾で 1.95(±1.24)pmol/10⁶cells/min の範囲となっている。

肝芽細胞の培養中に合計で 3 回 CYP3A4 活性を測定することができた。色のついている範囲は、生体内肝実質細胞の CYP3A4 活性の文献値であるが、1～3 回目までのすべての結果において、生体内肝実質細胞と同等の活性を示し、細胞機能を、培養開始から 56 日間、SB1mM による肝芽細胞の誘導開始からは 30 日間の長期間維持させることができた。

4-3-3 本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の高密度培養と薬物代謝活性 (2 回目)

肝芽細胞を本灌流培養システムで培養した際の細胞密度の推移(1 回目)を Fig.4-9 に示した。

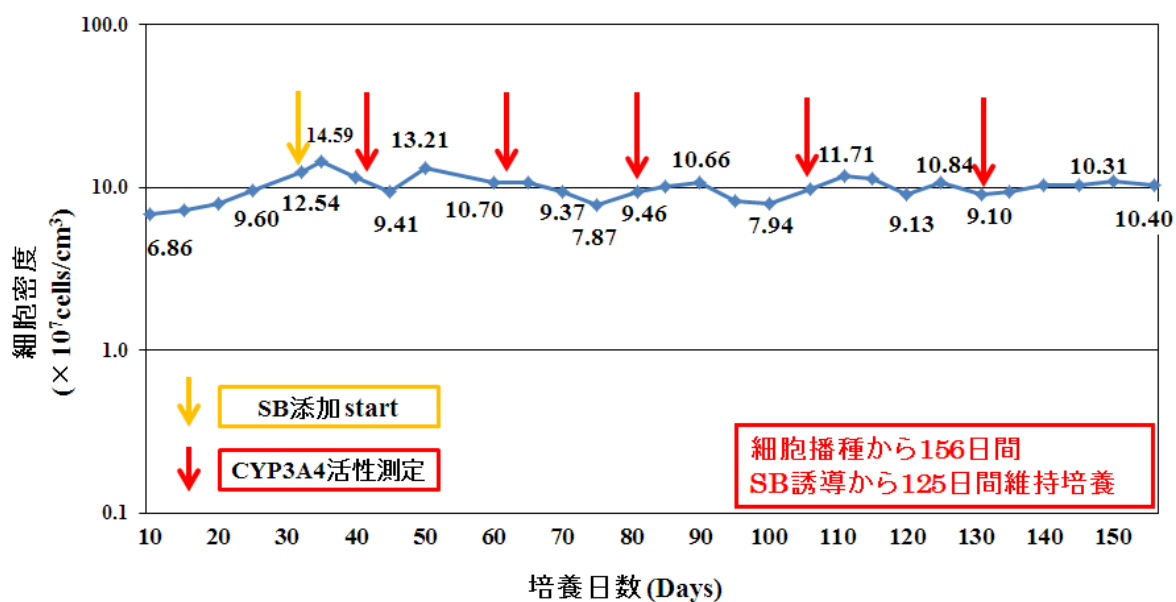


Fig.4-9 本灌流培養システムを用いて培養した肝芽細胞の細胞密度の推移
(2 回目)

Hc 細胞を 6.4×10^5 cells/module で播種し、培養初日からエアポンプによりガス供給を行い、培地流速は 60ml/h で行った。Hc 細胞から肝芽細胞への誘導は、培養 32 日目から 1mM SB により行った。

細胞密度は、培養 25 日目に 1.0×10^8 cells/cm³ の高密度状態に到達し、さらに 156 日間(約 5 ヶ月)もの長期にわたり細胞を維持することができた。

また、肝芽細胞に誘導した際に測定した 5 回の CYP3A4 活性のグラフを Fig.4-10 に示した。

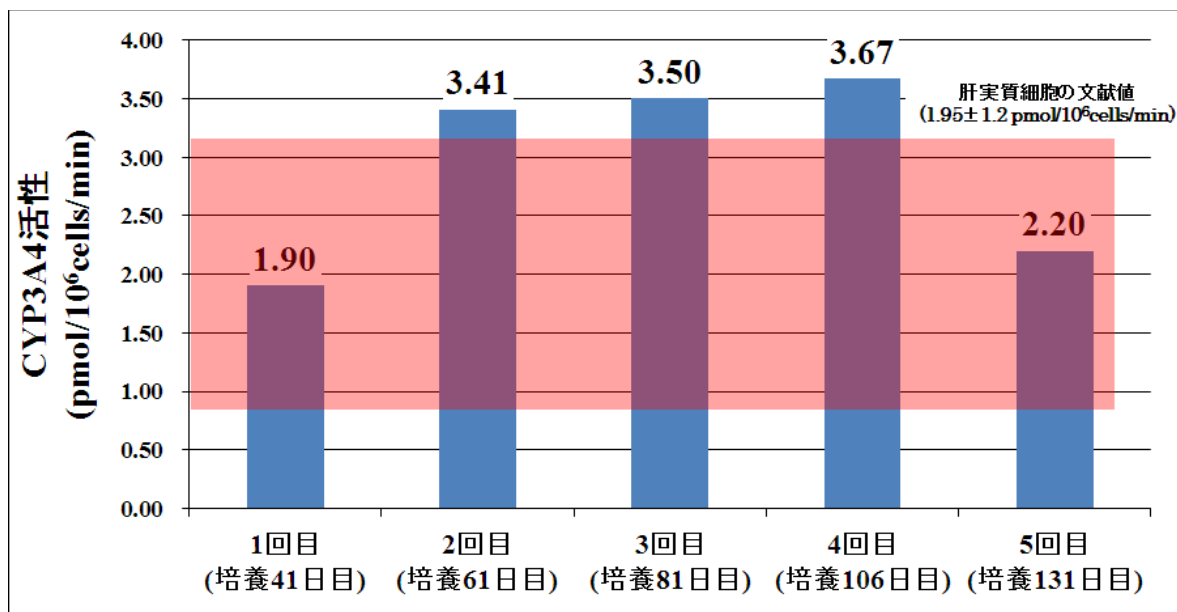


Fig.4-10 本灌流培養システムを用いて肝芽細胞を培養した際の CYP3A4 活性 (2 回目)

色のついているところは生体内肝実質細胞の CYP3A4 活性の文献値¹⁰²⁾で 1.95(±1.24)pmol/10⁶cells/min の範囲となっている。

1～5 回目まですべての結果において、CYP3A4 活性の文献値内の活性を示し、細胞機能を、培養開始から 131 日間、SB 誘導開始から 125 日間の長期間維持させることができた。

また、少なくとも 90 日間(測定している範囲)の長期に渡り CYP3A4 活性を生体内肝実質細胞と同等の値で維持し続けることができた。

4-3-4 本灌流培養システムで培養した肝芽細胞の PIVKA-II 産出速度の推移

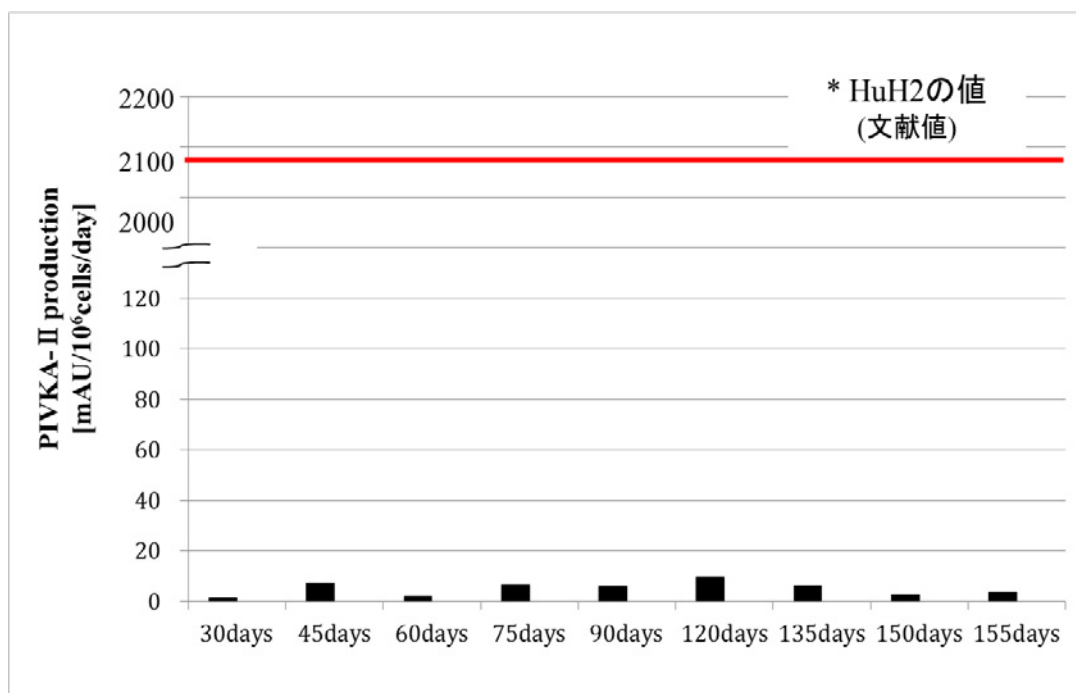


Fig.4-11 灌流培養システムで培養した肝芽細胞の PIVKA-II 産出速度

長期培養した際の形質転換が懸念されたため、約 5 ヶ月に渡り培養した際(2 回目)の PIVKA-II 産出速度を測定した(Fig.4-11)。

培養期間中最も高い数値は 9.5mAU/10⁶ cells/day であった。これは、肝がん細胞の産出速度 2100 mAU/10⁶ cells/day)¹⁰⁶⁾と比べて非常に少ない値であった。

4-3-5 培養終了後の肝細胞の SEM による形態観察

培養終了後に、三次元細胞培養モジュール内の Hc 細胞(Fig.3-4 の培養に相当)を SEM により観察した写真を Fig.4-12 に示した。

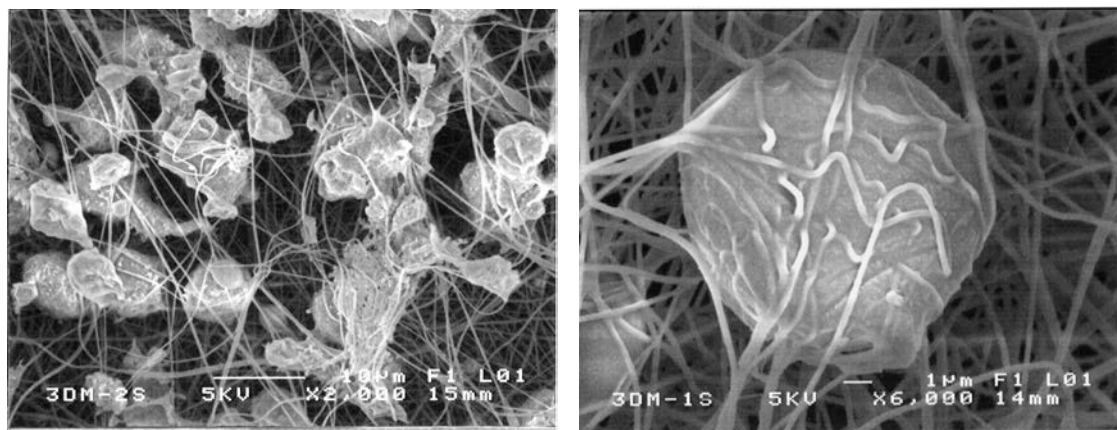


Fig.4-12 三次元培養モジュール内の細胞の様子(左：×2000、右：×6000)

細胞がナノファイバーに絡んでおり、細胞機能に重要とされている球状の形態をとっている様子が観察され、ナノファイバーの有用性が示された。

また、肝芽細胞の高密度培養(1回目)の培養終了後に、三次元細胞培養モジュール内の肝芽細胞を SEM により観察した写真を Fig.4-13 に示した。

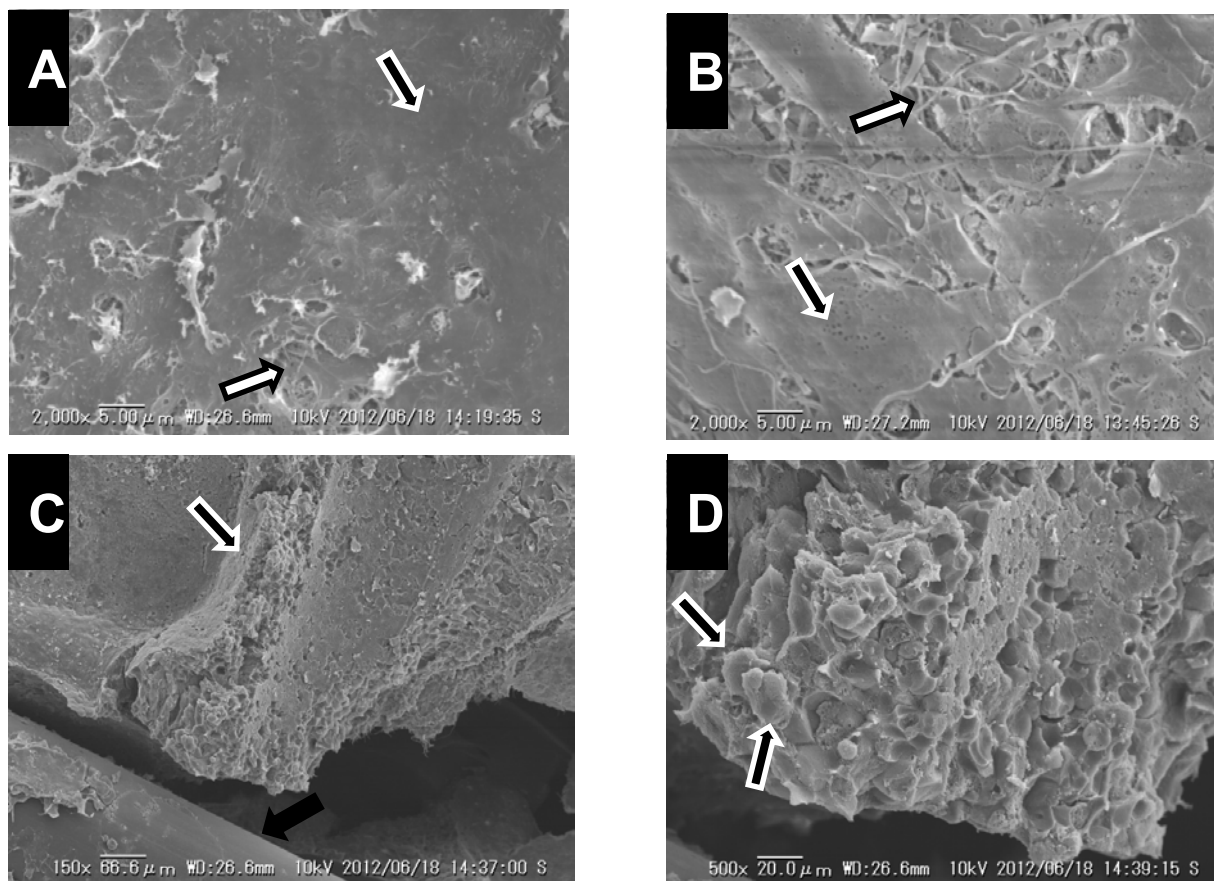


Fig.4-13 三次元細胞培養モジュール内の肝芽細胞の様子

Fig.4-12 の A、B は、ナノファイバーの表面を観察したもの、C はナノファイバーを折り内部を観察したもの、D は、C を拡大したものである。

⇒ はナノファイバーを、⇔ は細胞を、➡ は中空糸を示している。

表面を観察した A、B では、ナノファイバーが見えないほどびっしりと細胞が増殖している様子が観察され、内部を観察した C、D では、細胞の境目がわからないほど密に凝集し、ひとつの組織のような状態で存在していることが確認された。

SEM 観察により、ナノファイバーの表面から内部にかけてすべてが細胞に覆い尽くされていることが明らかとなった。

4-3-6 本灌流培養システムを用いて培養した成人肝細胞数の推移と薬物代謝活性

Fig.4-14 に、成人肝細胞の増殖曲線と溶存酸素濃度のグラフを示した。

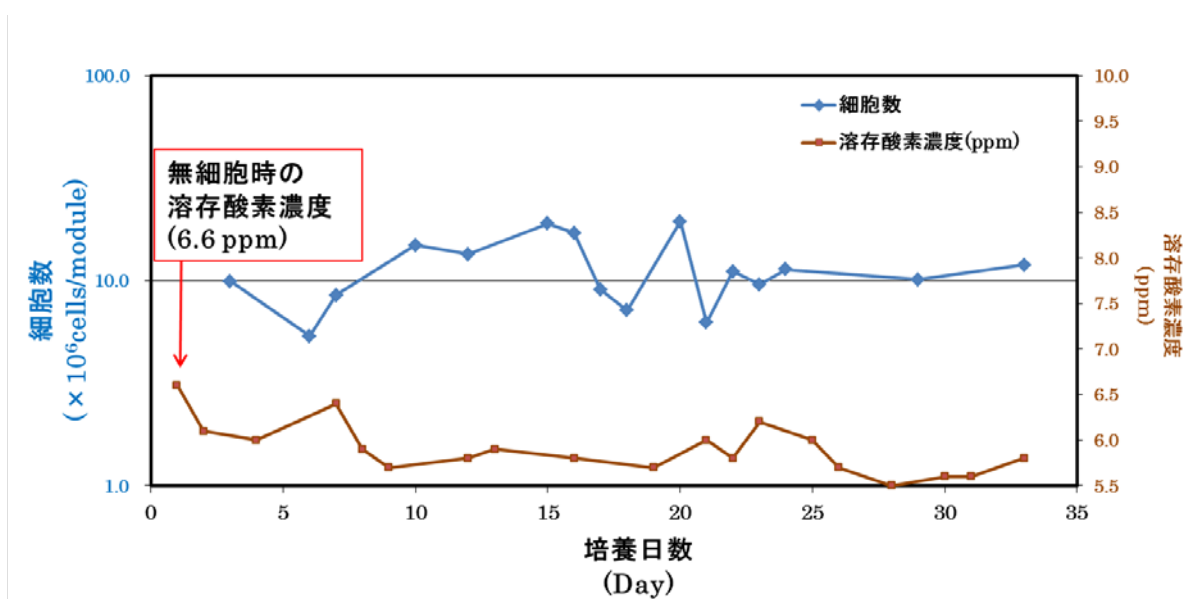


Fig.4-14 培養中の成人肝細胞数及び溶存酸素濃度の推移

培養期間中、無細胞時の溶存酸素濃度を下回る値を示し続け、グルコース消費からだけでなく、溶存酸素濃度からも細胞が長期にわたり生存していることが確認できた。

Fig.4-15 に灌流培養システムで培養した成人肝細胞の CYP3A4 活性を示した。

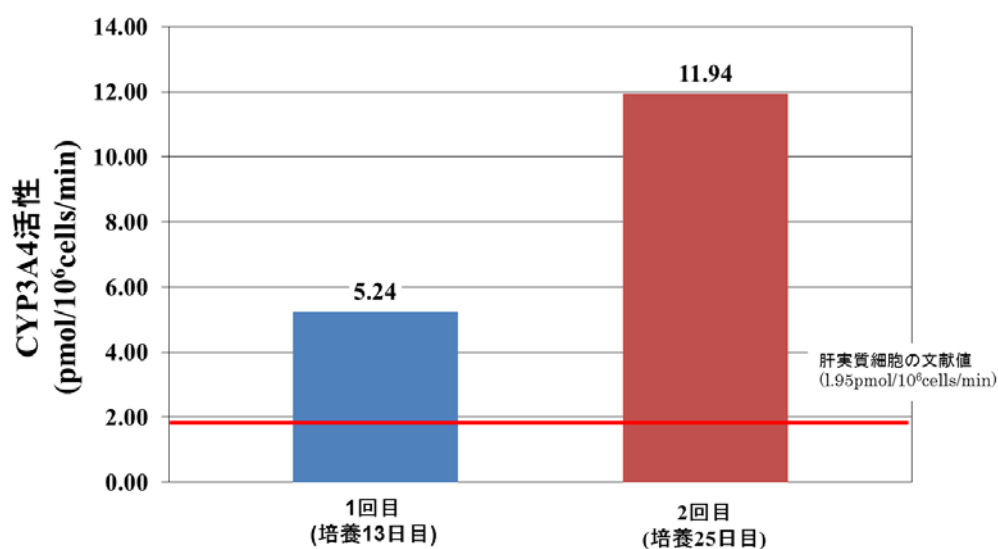


Fig.4-15 本灌流培養システムを用いて肝芽細胞を培養した際の CYP3A4 活性

CYP3A4 活性を少なくとも培養 25 日目まで高い水準で維持することができた。2 回目の値が高くなった要因として、細胞が培養期間を経るごとにナノファイバーに馴染み形態が変化しているのではないかと推察される。

4-3-7 培養終了後の成人肝細胞の SEM による形態観察

Fig.4-16 に培養終了後の成人肝細胞の SEM 写真を示した。

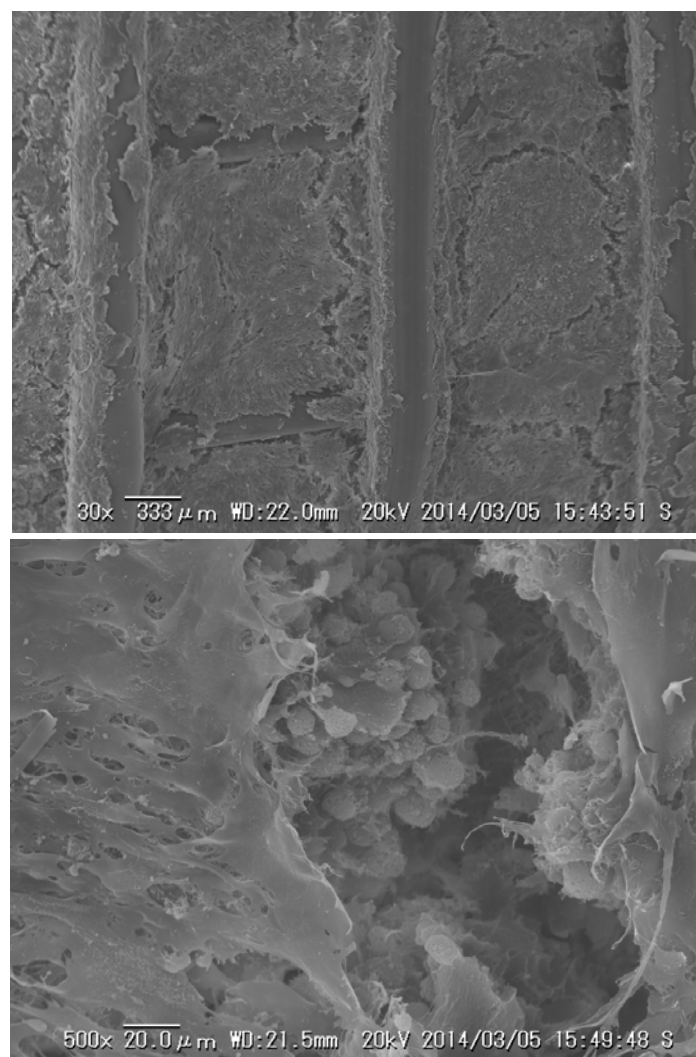


Fig.4-16 三次元細胞培養モジュール内の成人肝細胞の様子
(上 : ×30、下 : ×500)

低倍率では細胞が表面を覆うように存在していることが観察された。また、高倍率で細胞の切れ目(内部)を観察したところ、内部の細胞は肝機能発現に重要とされる球状の形態をとっており、微絨毛が発達している様子が観察された。

4-4 総括

本章では、人工肝臓開発の際に課題とされる点を克服し、さらに、候補薬物の前臨床段階でのヒトに対する毒性・効能を予見し、開発費の削減及び開発期間の短縮を実現するヒト肝細胞培養技術を開発するために、中空糸の製造メーカーである三菱レイヨン社との共同研究で、三次元細胞培養モジュールを作製し、これを用いた灌流培養システムの開発を行った。そして、本三次元培養システムにより、Hc 細胞及び肝芽細胞、成人肝細胞の培養を行い、システムの評価、及び最適化を行った。

まず、Hc 細胞を $3.4 \times 10^5 \text{cells/module}$ で播種し、培地流速 6.8ml/h 、培養途中でガス供給を開始し培養を行った。結果として細胞を $1.0 \times 10^8 \text{cells/cm}^3$ の高密度状態にする事が出来、細胞を 33 日間にわたり維持培養できることが示された。また、種々の代謝物の濃度においては、細胞に悪影響を及ぼすアンモニア濃度が低い値で抑えられており、尿素合成が確認され、肝機能を発現していることなどが明らかとなった一方で、乳酸が生成され、ガス供給が十分ではない可能性が明らかとなった。

そこで次の培養では、 $6.4 \times 10^5 \text{cells/module}$ 、培地流速 60ml/h 、培養初日からガス供給を行うなど、ガス供給が十分に行われる条件で培養を行った。その結果、Hc 細胞を $1.0 \times 10^8 \text{cells/cm}^3$ の高密度状態になった時点で肝芽細胞に誘導し、CYP3A4 活性を生体内肝実質細胞の文献値($1.95(\pm 1.24) \text{pmol}/10^6 \text{cells/min}$)に匹敵する範囲で、30 日間の長期にわたり維持することができた。また、肝芽細胞の二回目の培養では、細かい条件を変更し培養を行ったが、細胞播種から約 5 カ月(156 日間)もの長期間培養する事が出来、CYP3A4 活性についても、約三カ月(90 日間)にわたり成人肝細胞の値と同等の値を維持し続ける事が出来た。さらに、通常長期培養を行うと細胞の変性(形質転換)の危険性が出てくるが、培養期間中最も高い数値が $9.5 \text{mAU}/10^6 \text{ cells/day}$ であり、肝がん細胞の産出速度 $2100 \text{ mAU}/10^6 \text{ cells/day}$ と比べて非常に少ない値であった。

また、SEM 観察により、Hc 細胞の状態(培養 33 日目)では、細胞が球状の形態をとるにとどまっていたが、肝芽細胞の状態(156 日目)では、ナノファイバーの表面から内部にかけてすべてが細胞に覆い尽くされており、一つの細胞塊のような状態で存在していることが明らかとなった。

さらに、本灌流システムを用いて成人肝細胞の長期培養を試みたところ、通常 2-3 日で失われてしまう細胞機能を少なくとも 25 日間維持でき、さらに細胞の生存は 33 日目まで確認する事が出来た。また、SEM により形態観察を行ったところ、内部の細胞は肝機能発現に重要とされる球状の形態をとっており、

微絨毛が発達している様子も観察された。

以上の結果より、今回開発した三次元細胞モジュールを用いた灌流培養システムにおいて Hc 細胞、肝芽細胞、成人肝細胞の長期培養が可能となり、さらに細胞の足場として利用しているナノファイバー自体においても非常に有用であることが示唆されたため、人工肝臓としてだけではなく亜急性毒性試験(4 週間)への応用の可能性が示された。

第5章 培養担体 Cellbed®を用いた成人肝細胞の培養

5-1 序

第3章で述べたように、近年ナノオーダーの繊維径を有するナノファイバーを、細胞培養や組織形成の足場材料として用いることが注目されている⁹⁰⁾。一方、初代ヒト肝細胞は生体外では一週間程の短期間で機能を失ってしまう為、この機能を生体外で再現する技術の開発は、動物実験代替を始め様々な分野で期待されている¹²⁰⁻¹²²⁾。

今回我々は、日本バイリーン(株)の開発した高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed®を用いて、成人肝細胞(ヒト凍結肝細胞)の長期機能維持を目的として実験を行った。使用する Cellbed®は、高純度のシリカファイバーからなる三次元培養担体を用いることで細胞間相互作用を妨げない極細繊維と繊維間距離を持ち、均一性の高い積層シート状の培養形態から一定の細胞層を形成することが可能である。さらに、安定性が高く非常に取り扱いが簡便であるため、容易に三次元培養が可能で、既に初代マウス肝細胞においては Cellbed®に細胞外マトリックス(ECM)を塗布する事によりアルブミン分泌能の長期機能維持が認められている。細胞外マトリックスとは細胞の外周に形成される線維状あるいは網目状の構造体の総称であり、細胞外の空間を充填する物質であると同時に骨格的役割、細胞接着における足場の役割を担っている⁹³⁾⁻⁹⁵⁾。さらに近年では、様々な増殖因子や分化誘導因子と同様、細胞の増殖・分化の制御に直接関わっていることが明らかとなってきた⁹³⁾⁻⁹⁵⁾。

本章では、Cellbed®を用い初代ヒト肝細胞の機能を長期維持することを目的として実験を行った。以前から本研究室では、グルコース消費速度法から細胞数を算出していたが、成人肝細胞はグルコースを産生するためこの方法は適当ではないと考えられた。そこで今回新たな方法として Alamar Blue 法による生細胞数測定を試みた。また、肝細胞障害の指標として用いられている GOT、GPT 漏出量測定、薬物代謝活性(CYP3A4 活性)測定により Cellbed®が成人肝細胞へ与える影響について評価を行った

5-2 実験方法

5-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

3-2-1 参照

2)使用試薬

ラミニン(EHS 肉腫由来)

WAKO

Type- I コラーゲン(Cellmatrix® Type I -C)

新田ゼラチン株式会社

その他 3-2-1 参照

3)使用機器及び器具

24 well plate 用 Cellbed (φ 15.4 mm, 滅菌済み)

日本バイリーン株式会社

その他 3-2-1 参照

5-2-2 試薬の調製法

3-2-2 参照

5-2-3 滅菌法

3-2-3 参照

5-2-4 細胞の計数法

3-2-4 参照

5-2-5 細胞の融解法

3-2-5 参照

5-2-6 Alamar Blue を用いた細胞数計測法

1)使用試薬および機器

①使用試薬

Alamar Blue

invitrogen

コラゲナーゼタイプ X

和光純薬工業

②使用機器

分光蛍光光度計(F-2000)

HITACHI

2)原理

Alamar Blue とは細胞毒性がほとんどなく、細胞増殖を迅速・高感度に定量する試薬である。Alamar Blue に含まれている Resazurin(無蛍光物質)が細胞に取り込まれ、ミトコンドリア内の NADH デヒドロゲナーゼの還元力によって代謝され、Resorufin(蛍光物質)に変換されることで呈色する(Fig.5-1)。この蛍光物質である Resorufin の蛍光強度を分光蛍光光度計を用いて測定し、細胞あたりの蛍光強度から生細胞数を測定した。

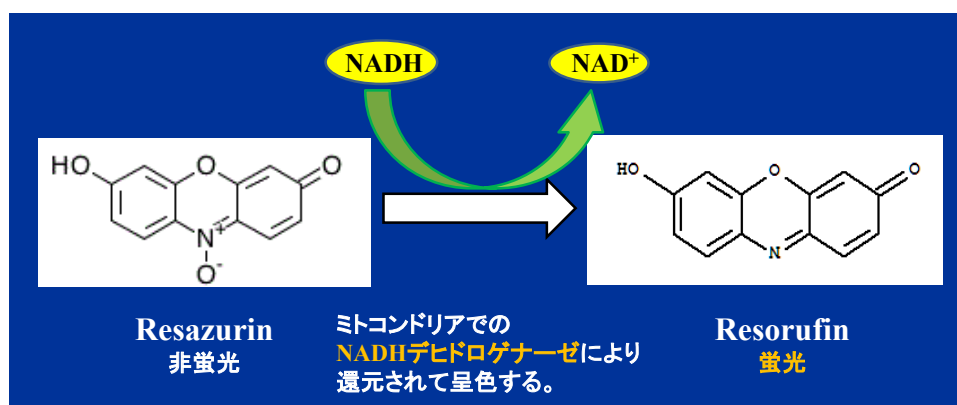


Fig.5-1 Resazurin の反応

3) Alamar Blue を用いた細胞数測定法プロトコル

- ① 成人肝細胞をコラーゲン I コート 24well multi plate に 2.5、5、10、
20($\times 10^4$ cells/well)でそれぞれ 2well ずつ播種を行った。
- ② 96h 後、クリーンベンチ内で培地の濃度 10%の Alamar Blue を添加し、CO₂
インキュベーター内で 60min 反応させた。
- ③ 60min 後、well 内の培地を全量サンプリングし、サンプルを 700 μ l 石英セル
に入れ、分光蛍光光度計で励起光：530nm、蛍光：590nm で蛍光強度を測
定した。
- ④ 測定後、-PBS で二回洗浄後、well に残っている細胞をコラゲナーゼ(250 μ l、
5min)により剥離し、血球計算板でそれぞれ計数を行った。
- ⑤ 得られた蛍光強度及び実測の細胞数から検量線を作成し、2 日毎に②～④
の方法で各サンプルの蛍光強度を測定、生細胞数を産出した。

5-2-7 Cellbed[®]の作製方法および特徴

1) 作製方法、材質

Cellbed[®]は、第三章で述べたエレクトロスピンニング法(ES 法：3-2-8 参照)により作製されており、材質は高純度シリカである。

2) Cellbed[®]の特徴

生体適合性の高いシリカファイバーから成る不織布で、高い空隙率と均一な繊維径、大きな表面積を有しており(Fig.5-2)、さらに、細胞親和性を持つことから、細胞の三次元高密度培養が可能な培養担体である。化学的に安定性の高いシリカで100%構成されているため、培養担体の取り扱いが非常に容易で、なお且つ細胞の培養に悪影響を与えないという特徴を持つ¹²³⁾。

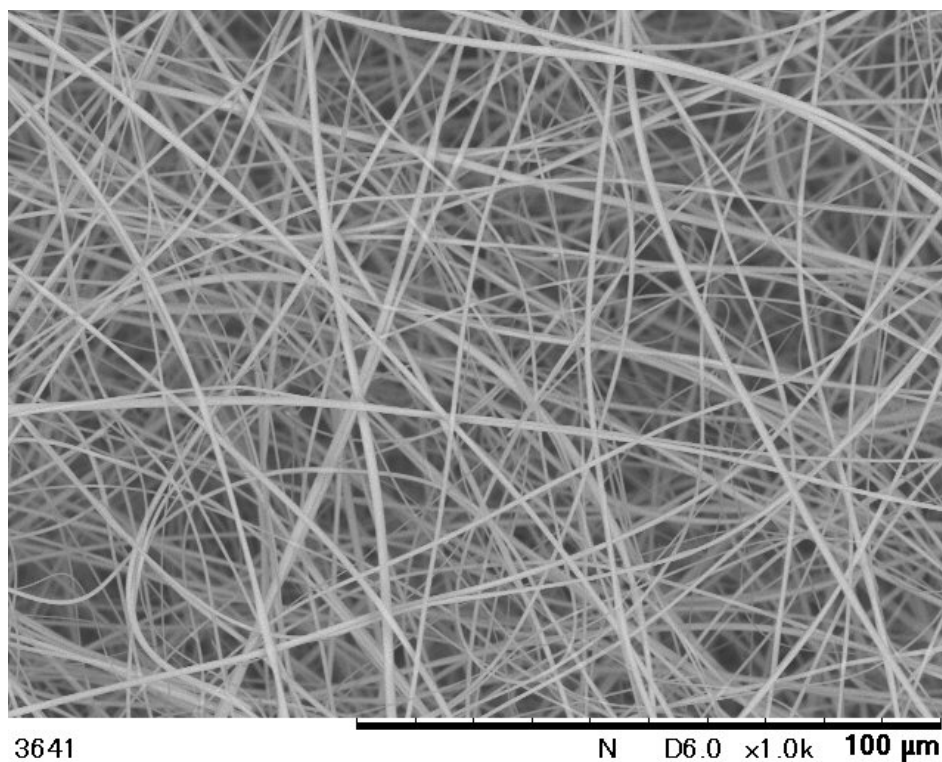


Fig.5-2 Cellbed[®]の SEM 観察画像

5-2-8 使用した細胞外マトリックス(ECM)の特徴

1) ラミニン

細胞外マトリックスの一種であり、上皮組織の土台となる基底膜のシート状構造の形成に中心的な役割を果たすタンパク質で、分子量は約 9×10^5 の柔軟な十字架状の分子である。また、細胞極性の決定、代謝、分化誘導、生存や増殖の促進などの機能を果たしている¹²⁴⁾。Cellbed®にラミニンコート処理をしたものでマウス初代肝細胞の細胞機能が向上した実験結果が得られている。本実験ではマウス EHS 肉腫由来のラミニン溶液(Laminin-111)を使用した。

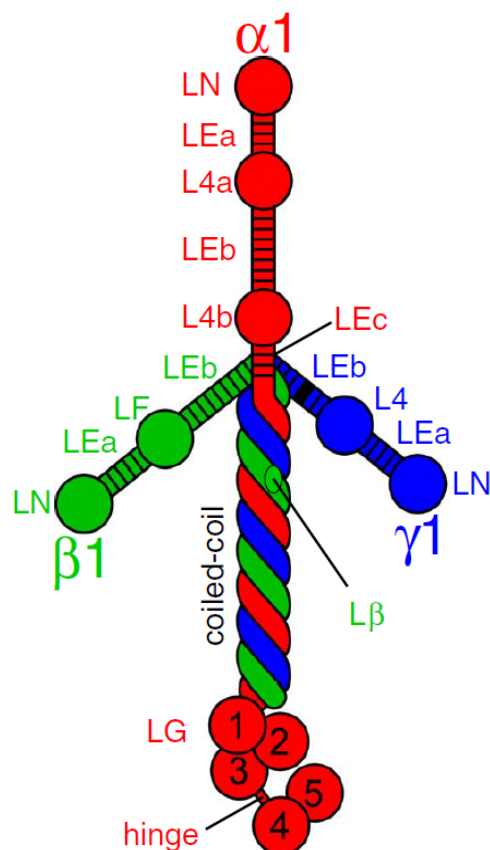


Fig.5-3 Laminin-111 の構造の概略図¹²⁴⁾

2) コラーゲン

我々の体を構成しているタンパク質の約 30 %を占めており、ECM を構築するタンパク質の中で最も多量に存在する。ヒトではこれまでに I 型～XXIX 型が同定されており、その中でも本実験で使用した I 型コラーゲンは全コラーゲン量の約 9 割を占めている¹²⁵⁾。コラーゲン分子は、Gly-X-Y の繰り返しからなるアミノ酸約 1000 残基(分子量約 10 万)のポリペプチド鎖(α 鎖)が 3 本より合わさってできている(Fig.5-4)。

コラーゲン基質の利用は、ガラス、プラスチック基質よりも細胞の接着、増殖、分化などを促進するという実験が数多く報告されている^{126),127)}。

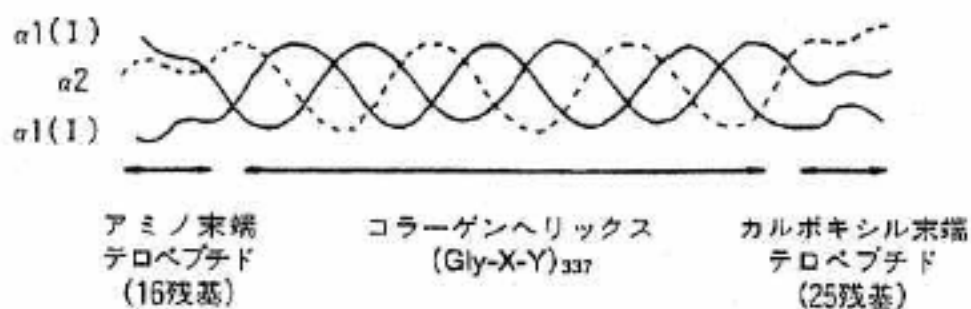


Fig.5-4 I 型コラーゲンの構造の概略図¹²⁵⁾

5-2-9 Cellbed®を用いた成人肝細胞の培養方法

1) ラミニンコート¹²⁸⁾

- ①ラミニン溶液を-PBS を用いて 0.432mg/ml になるように希釈する。この希釈液はコート予定のセルベッドの枚数×300μl 用意する。
- ②クリーンベンチ内で袋から 24well multi plate を取り出し滅菌済みの平先ピンセットを用いて、well に Cellbed®を挿入し、その後、well に-PBS を 500μl/well 入れ、Cellbed®に-PBS を馴染ませる。
※Cellbed®の裏面に気泡が入らないように注意する。
- ③-PBS を除去し、0.432mg/ml ラミニン希釈液を 300μl/well 加える。
- ④室温で一晩静置する。
- ⑤翌日、ラミニン希釈液を除去し、-PBS を 1ml 加えて洗浄する。洗浄は計 2 回行う。
- ⑥培地に置換した後、細胞数 0.2×10^6 cell/well で播種し、CO₂インキュベーターで培養した。その後、24h ごとに培地交換を行った。

2) コラーゲンコート¹²⁷⁾

- ①コラーゲン溶液を-PBS を用いて 0.432mg/ml になるように希釈する。この希釈液はコート予定のセルベッドの枚数×300μl 用意する。
- ②クリーンベンチ内で袋から 24well multi plate を取り出し滅菌済みの平先ピンセットを用いて、well に Cellbed®を挿入し、その後、well に-PBS を 500μl/well 入れ、Cellbed®に-PBS を馴染ませる。
- ③-PBS を除去し、0.432mg/ml ラミニン希釈液を 300μl/well 加える。
- ④室温で一晩静置する。
- ⑤翌日、ラミニン希釈液を除去し、-PBS を 1ml 加えて洗浄する。洗浄は計 2 回行う。
- ⑥培地に置換した後、細胞数 0.2×10^6 cell/well で播種し、CO₂インキュベーターで培養した。その後、24h ごとに培地交換を行った。

3) ECM を使用しない場合

- ①クリーンベンチ内で袋から 24well multi plate を取り出し滅菌済みの平先ピンセットを用いて、-PBS を入れた well に Cellbed®を挿入する。
- ②培地に置換した後、細胞数 0.2×10^6 cell/well で播種し、CO₂インキュベーターで培養した。その後、24h ごとに培地交換を行った。

5-2-10 POP・TOOS 法を用いた GOT・GPT 濃度測定法^{129),130)}

1) 使用試薬および機器

① 使用試薬

◎ トランスアミラーゼ CII-テストワコー

高密度培養した成人肝細胞の GOT・GPT 濃度測定には、和光純薬工業の
トランスアミナーゼ CII-テストワコー(POP・TOOS 法)を使用した。

以下には測定キットの構成を示す。

・ GOT 用酵素剤

ピルビン酸オキシダーゼ(POP)(微生物由来)

オキザロ酢酸脱炭酸酵素(OAC)(微生物由来)

4-アミノアンチピリン

アスコルビン酸オキシダーゼ(カボチャ由来)

カタラーゼ(ウシ肝臓由来)

・ GOT 用基質緩衝液

グッド緩衝液 pH7.0

L-アスパラギン酸

・ GPT 用酵素剤

ピルビン酸オキシダーゼ(POP)(微生物由来)

4-アミノアンチピリン

アスコルビン酸オキシダーゼ(カボチャ由来)

カタラーゼ(ウシ肝臓由来)

・ GPT 用基質緩衝液

グッド緩衝液 pH7.0

L-アラニン

・ 発色液

ペルオキシダーゼ(西洋ワサビ由来)

・ 発色剤溶解液

グッド(HEPES)緩衝液 pH7.0

α -ケトグルタル酸

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-m-トルイジンナトリウム(TOOS)

・ 反応停止液

クエン酸 (界面活性剤を含有)

- ・ GOT 基準液

GOT 100karmen 単位相当 (ピルビン酸カリウム含有)

- ・ GPT 基準液

GPT 100karmen 単位相当 (ピルビン酸カリウム含有)

②使用機器

分光光度計(Spectrophotometer U-2000)

HITACHI

恒温槽(EYELA BATH SB-24)

EYELA

2)培地中の GOT・GPT 濃度測定法

①原理

GOT 基質酵素液と発色試液を作用させると、試料中に含まれる GOT により、L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸からグルタミン酸とオキザロ酢酸が生成する。生成したオキザロ酢酸はオキザロ酢酸脱炭酸酵素(OAC)の作用により、ピルビン酸に変化する。

また、GPT 基質酵素液と発色試液を作用させると、試料中の GPT により L-アラニンと α -ケトグルタル酸からグルタミン酸とピルビン酸が生成する。生成したピルビン酸は、チアミンピロリン酸(TPP)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の存在下、ピルビン酸オキシダーゼ(POP)の作用により酸化され、過酸化水素を生成する。

生成した過酸化水素はペルオキシダーゼ(POD)の作用により、TOOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青紫色の色素を生成する。この青紫色の吸光度を測定することにより、試料中の GOT または GPT 活性値を求める。

②GOT・GPT 濃度検量線

GOT、GPT 基準液を用いて 0(ミリ Q)、10、20、60、100(Karmen 単位)の濃度に調製した標準溶液を 96well plate に 2 μ l ずつ入れ、37℃で 5min インキュベートした。その後、発色試液と基質酵素液を 50 μ l ずつ加え、37℃で 20min 反応させ、反応停止液を 200 μ l 加え、吸光度 555nm で測定し測定した吸光度をグラフにプロットした。

5-2-11 分光蛍光光度計によるシトクローム P-450 活性測定法

1)使用試薬および機器

2-2-10 参照

2)試薬調製法

2-2-10 参照

3)分光蛍光光度計による薬物代謝活性測定法の原理

2-2-10 参照

4)分光蛍光光度計を用いた薬物代謝活性の測定プロトコル

3-2-10 参照

5-2-12 走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞および Cellbed®の観察

1)使用試薬および機器、プロトコル

①使用試薬および使用機器

使用試薬

Sodium Cacodylate ($C_2H_6AsO_2Na$)

和光純薬工業

Glutal aldehyde Solution ($OHC(CH_2)_3CHO$)

和光純薬工業

使用機器

Miniscope TM3030

日本ハイテクノロジー

オスミウムプラズマコーター OPC60A

Filgen

②試薬の調製法

2-2-12 参照

2)走査型電子顕微鏡(SEM)の原理

2-2-12 参照

3)SEM 試料作製プロトコル

①前固定

培養後の Cellbed®の入った well に前固定液を 500 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。

②本固定

前固定液をすべて除去し、Cellbed®の入った well に本固定液を 500 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。

この後、-PBS に置換したサンプルは日本バイリーン社(株)へ送り、サンプル処理、および撮影は日本バイリーン社(株)で行った。

以下、日本バイリーン社(株)のプロトコル

・サンプル処理

①脱水処理

(10,50,60,70,80,90,100,100%エタノール,各 20 分)

②t-ブタノール置換

エタノール:t-ブタノール=1:1,100%t-ブタノール各 20 分)

③真空乾燥

BenchTop K(VirTis)にて真空凍結乾燥(-40℃,100mTeorr,8 時間)

④Cellbed®をカミソリにより圧断

⑤破断面がそれぞれ観察できるようにカーボンテープで SEM 台に固定

⑥オスミウムプラズマコーター OPC60A(Filgen)にて蒸着(膜厚 3nm)

⑦Miniscope TM3030(日立ハイテクノロジー)にて SEM 観察

5-3 結果と考察

5-3-1 各種培養条件での成人肝細胞の細胞密度の推移

Alamar Blue を用いて測定した成人肝細胞の細胞密度の推移を Fig.5-5 に示した。

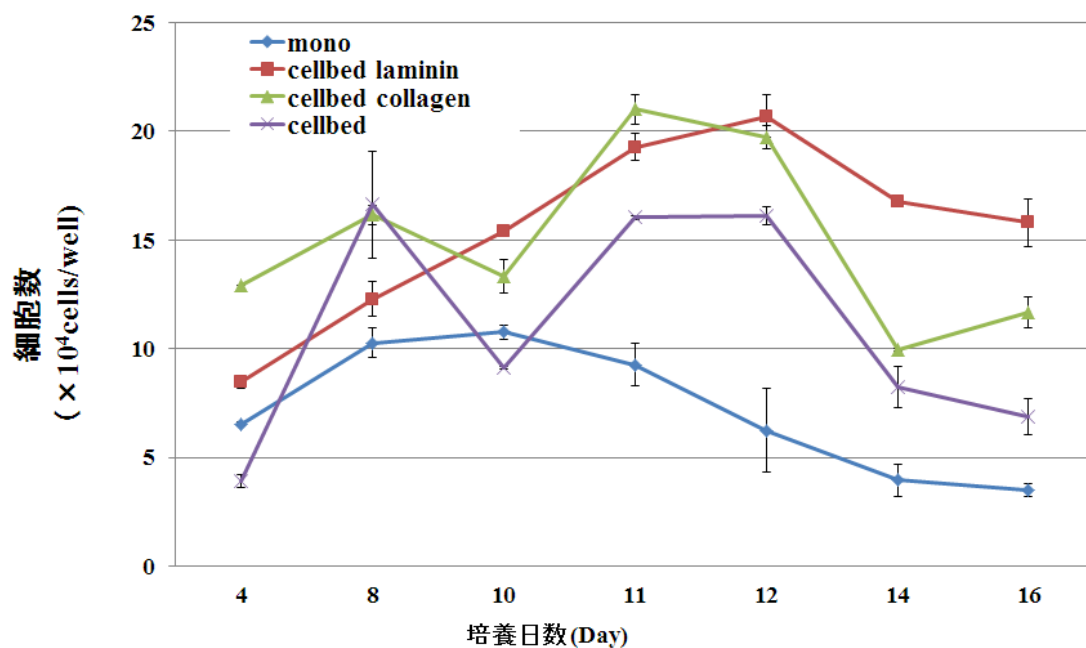


Fig. 5-5 各培養条件での成人肝細胞の細胞密度の推移
(monolayer はコラーゲンコートプレートに播種)

細胞は 0.2×10^6 cells/well で播種している。

monolayer では 10 日目以降細胞数の減少が見られたが、Cellbed 上で培養したものでは生存率が高くなる傾向が見られた。特に、ECM の一種である Laminin、Collagen によりさらに細胞数が高くなる結果となった。

5-3-2 各種培養条件での GOT、GPT 漏出量測定

各種培養条件における成人肝細胞の GOT・GPT 濃度測定の結果を Fig.5-6、Fig.5-7 に示す。

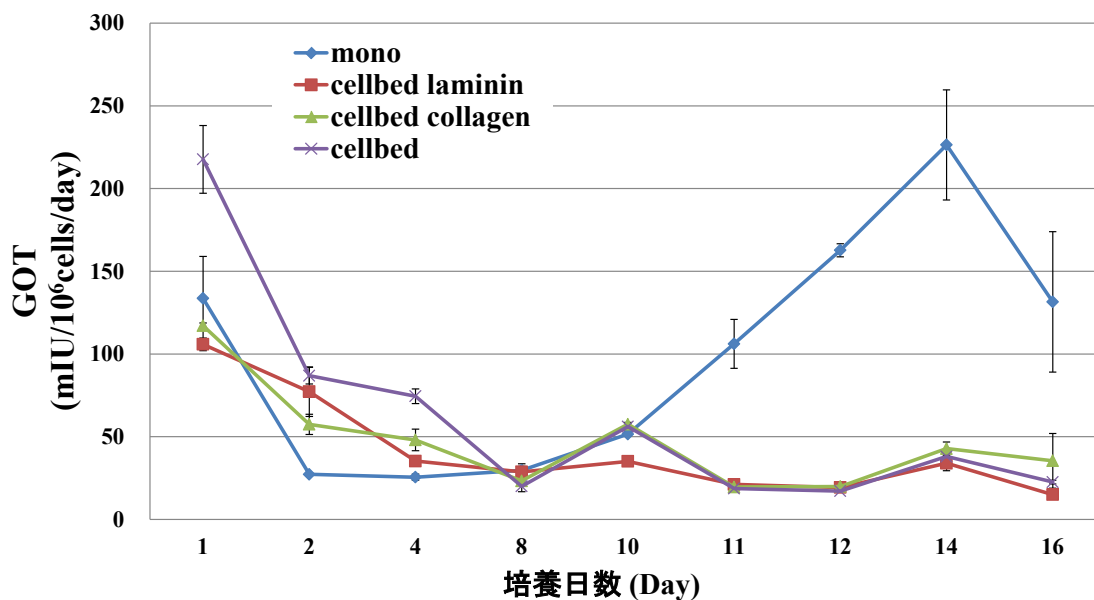


Fig.5-6 各種培養条件での GOT 漏出量

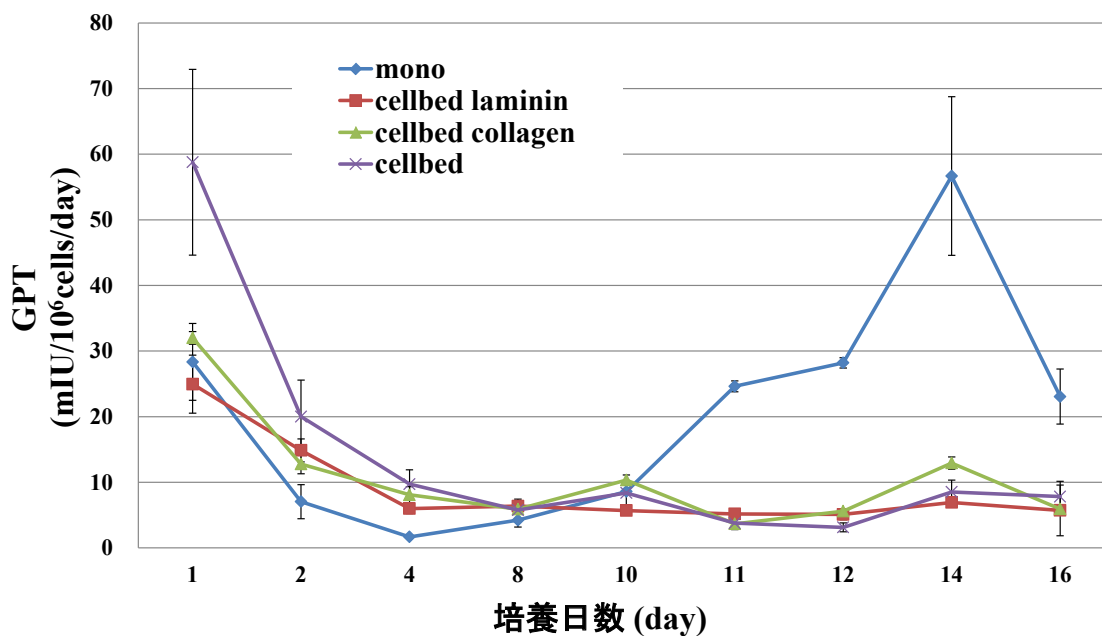


Fig.5-7 各種培養条件での GPT 漏出量

GOT 漏出量は、monolayer 条件において 10 日目以降に GOT 濃度が増加していることが確認されたが、Cellbed[®]条件では大きな変化は確認されなかった。また、GPT 漏出量に関しても 10 日目以降に GPT 濃度が増加していることが確認され、Cellbed[®]では大きな変化は見られなかった。また、monolayer の 10 日目以降の GOT、GPT 濃度の上昇が細胞密度の減少(Fig.5-5)と相関している事が確認された。

一般に、GOT、GPT は肝細胞障害の指標として知られている。今回の結果より、monolayer では 10 日目以降に細胞が障害を受けているのに対し、Cellbed[®]で培養することで成人肝細胞の障害が少なかったことが示唆された。

5-3-3 各種培養条件での成人肝細胞の薬物代謝活性

CYP3A4 活性測定の結果を Fig.5-8 に示した。

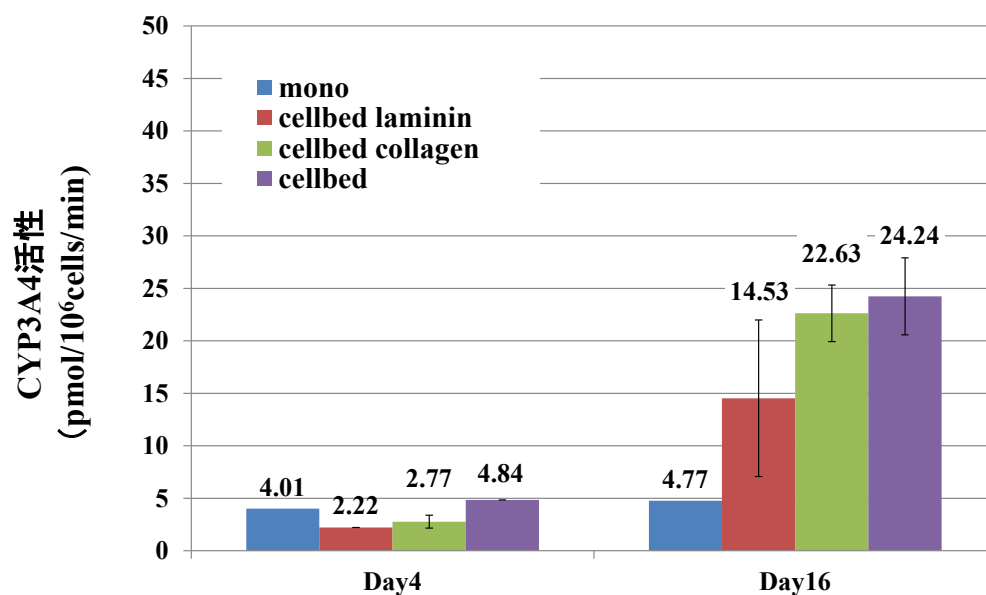


Fig.5-8 各種培養条件での CYP3A4 活性値

培養 4 日目では、どの培養条件でも大きな差は見られなかったが、培養 16 日目では、monolayer に比べ Cellbed[®]上で培養したもので有意に活性値の上昇が見られた。また活性値については、エラーバーが非常に大きいため Cellbed[®]の各条件間の比較については、今後再現性の確認が必要である。

5-3-4 培養終了後の SEM による形態観察

Fig.5-9 に培養終了後の Cellbed[®]の SEM 写真を示した。

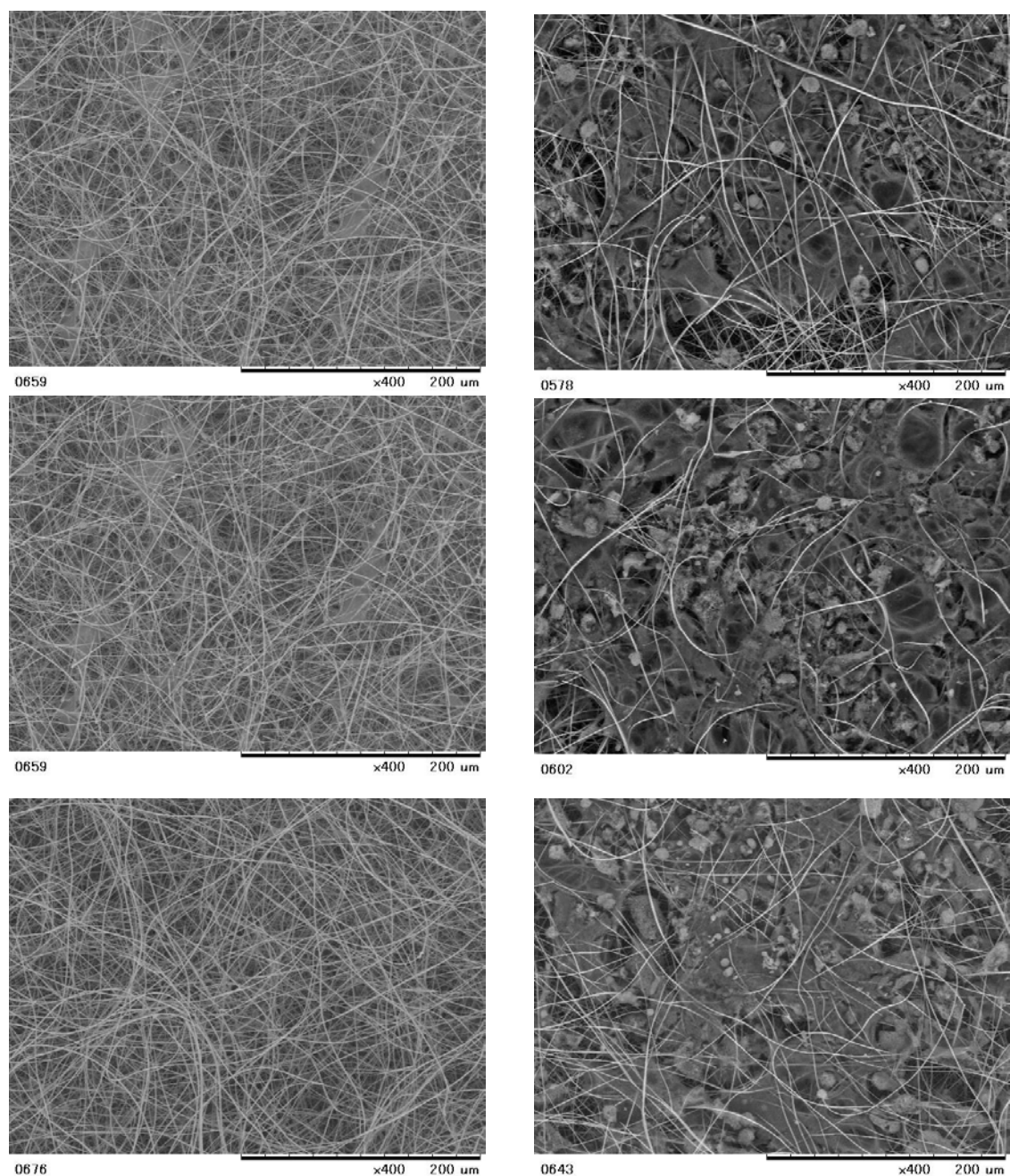


Fig.5-9 培養終了後の各 Cellbed[®]の SEM 画像
(左：細胞なし、右：培養 16 日目)

全ての Cellbed[®]で細胞がファイバーに接着し、存在している様子が観察された。

5-4 総括

本章では、日本バイリーン㈱の開発した高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed®を用いて、成人肝細胞(ヒト凍結肝細胞)の長期機能維持を目的として Alamar Blue による生細胞数の測定、CYP3A4 活性測定、GOT、GPT 漏出量測定、SEM による形態観察を行った。

今回の実験結果より、成人肝細胞を Cellbed®上で培養することで生存率が高くなる傾向が見られ、ECM の一種である Laminin、Collagen をコートする事によりさらに高い細胞数を維持できる結果となった。また肝障害の指標である GOT、GPT の漏出量については、monolayer では 10 日目以降に増加するのに対し Cellbed®ではそれが見られず、成人肝細胞への障害が少ない状態で培養できる可能性が示された。CYP3A4 活性では、培養 4 日目にはどの培養条件でも大きな差は見られなかったが、培養 16 日目では、monolayer に比べ Cellbed®上で培養したもので有意に活性値の上昇が見られた。

通常増殖しないはずの成人肝細胞がグラフ上で増殖しているように見えるのは、培養初期は Cellbed®にうまく細胞がなじめておらず、ミトコンドリア活性が低くなっており、培養が進むにつれて活性が高くなっているのではないかと推察される。これは CYP3A4 活性でも同じように、培養初期は Cellbed®に馴染んでいないため活性が低く、培養後期では細胞が Cellbed®にしっかり付着し活性値が高くなったのではないかと推察される。

培養終了後に SEM により観察を行ったところ、全ての Cellbed®で細胞がファイバーに接着し、存在している様子が観察された。

以上の結果より、生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点から成人肝細胞の長期培養において Cellbed®は非常に有用であると思われる。成人肝細胞の機能を長期維持する培養法の開発には、まだ多くの課題が残されているが、本研究を通して、Cellbed®が成人肝細胞を用いる実験において非常に有用なツールとして使用されるだけでなく、動物実験代替法としての応用への展開が期待される。

今後培養初期の活性の低さを補うために、付着効率を向上させる播種方法を考案する必要があるとともに、実際に細胞がどのような状態で Cellbed®に付着しているのか、また、細胞の構造にどのような変化が起きているのか免疫染色を含めて観察し、より詳細な検討が必要であると思われる。

第6章 総論

現在、一般的に行われている細胞培養は、dishを用いた単層培養(二次元)が主流である。しかし、単層培養は、*in vitro*での因子・薬剤などと細胞の相互作用の観察や研究に便利な方法であるが、付着依存性の細胞を生体外で培養すると、細胞が付着面に対して平面(二次元)状に増殖し、生体内の三次元構造とは異なった形態をとる為、生体内の環境を反映できていないと考えられる。そこで、生物素材、人工素材、ハイブリット素材を、種々の形状に加工したバイオマテリアルが開発され、細胞の生死、付着形態、細胞伸展、増殖、分化、極性、浸潤移行、自己組織化などの挙動を制御するために、三次元培養担体として使用されている²⁷⁾⁻⁴⁰⁾。しかし、一般に細胞を培養するための足場材料については数多く研究が行われているが、同じ材料を使用し、培養担体の表面形状を詳細に検討しているものは多くはない。

また、一般的な医薬品の開発は市販化にこぎ着けるものは、わずかしかなく、開発期間は8-15年、研究開発費用は数百億円を上回り、しかも年々膨大化してきている為、新薬開発はリスクが非常に高いものとなっている。開発途中でドロップアウトする大きな要因の一つとして、非臨床試験から臨床試験へ移行する際の、ヒトと動物の種差による代謝の違いの問題が挙げられる⁴³⁾。そのため、近年、様々な化学物質、毒物、医薬品などの代謝に関係するヒト肝細胞が、医薬品の開発の分野において非常に注目されている。一般に、正常なヒト肝細胞は、*in vitro*において医薬品の効能や、毒性の評価を行うために使用されてきている。

本論文では、より生体内に近い状況でヒト肝細胞を培養できる三次元培養を軸として、ハイドロキシアパタイト(HAp)多孔質担体、三菱レイヨン(株)と共同で開発した三次元細胞培養モジュール、日本バイリーン(株)製の高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed®を用いて、本研究室で培養してきた胎児肝細胞(Hc細胞)、および肝芽細胞、ヒト凍結肝細胞(成人肝細胞)の生存及び機能に与える影響について検討を行った。

以下に、各章において得られた知見を総括する。

第2章では、HAp多孔質担体に関して、同じ材料を使用し、表面形状の異なる担体(HAp10%、HAp20%、HAp30%)をナノサイエンス学科友重研究室と共同で作製し、これらの担体上でHc細胞及び肝芽細胞の高密度培養を行い、細胞密度、CYP3A4活性(薬物代謝活性)及びPIVKA-II産出速度(形質転換の指標)を測定し、評価を行った。その結果、細胞密度、CYP3A4活性については、HAp20%の多孔質担体が、他の担体に比べそれぞれ有意に高い事が示され、特

に CYP3A4 活性値(1.49 ± 0.28 pmol/ 10^6 cells/min)は、成人ドナー肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95 ± 1.24 pmol/ 10^6 cells/min)に匹敵する値であった。さらに、多孔質担体のどのような表面形状が、細胞に影響を与えているか、詳細な検討を行うために、電子線三次元粗さ解析装置による担体表面の曲率半径計測を行ったところ、HAp20%には、50-80 μ m の細孔径が他の担体に比べて多く、全体の細孔径分布のうち 35%を占める特徴が見られた。これらの結果から、HAp20%に 35%存在する 50-80 μ m の細孔径が、細胞密度、CYP3A4 活性に対し、いくつかの重要な役割を持っていることが示唆された。さらに、SEM 観察により HAp20%の細胞が、肝機能発現に重要であるとされる球状の形態をとっていたことから、細胞の形態に関しても影響を与えていることも推察された。また、今回使用したすべての多孔質担体で、がん細胞を大きく下回る PIVKA-II 産出値を示し、細胞増殖とともに、細胞の機能が変化してしまう危険性が低い事が示唆された。

以上の結果より、今回作製した多孔質担体の中で HAp20%が最も肝細胞の培養に適している事が示唆され、表面形状の解析により 50-80 μ m の細孔径が重要である事が示唆された。

第 3 章では、第 4 章で使用した三次元細胞培養モジュール内に、細胞の足場として充填されているナノファイバーのみの培養を行い、ナノファイバーが細胞の増殖および薬物代謝活性に与える影響について検討を行った。特に、ナノファイバー径の違いが細胞増殖および機能、細胞形態に与える影響を、ファイバー径を 170nm~1300nm の間で変更し、Hc 細胞、肝芽細胞、成人肝細胞を培養する事で評価を行った。径を変更する前実験として、ナノファイバー不織布を作製する際に基材として使用されるアルミホイルの有無による細胞への影響の検討を行った。結果として、Hc 細胞、肝芽細胞ともに、細胞増殖、機能について有意差が見られなかった為、操作が簡便なアルミ有の状態のナノファイバーを使用し、その後の実験を行うこととした。径を 170nm~1300nm で変更したナノファイバーでは、Hc 細胞、肝芽細胞においては、細胞密度は Hc 細胞、肝芽細胞ともに 1300nm のものが最も高く、細胞機能は、600nm が 2.63 pmol/ 10^6 cells/min で最も高い値となった。この値は、成人ドナー肝臓由来の肝細胞の CYP3A4 活性値(1.95 ± 1.24 pmol/ 10^6 cells/min)を超える結果となり、ナノファイバーの有用性が示された。培養終了後に、SEM により細胞の形態観察を行ったところ、CYP3A4 活性が低かったナノファイバーでは、ファイバー上に細胞が単層培養のように進展していた。一方、活性の高かったナノファイバーでは、機能発現に重要であるとされる球状の形態をとっている事が明らかとなった。また、球状の形態をとっている細胞はナノファイバーの空隙に数多く存在

していたため、径のみではなく Z 軸方向の空隙が影響している可能性が示唆された。成人肝細胞の培養では、300nm、600nm、1300nm の径のナノファイバーを使用した。肝芽細胞と同様に、600nm のナノファイバーで活性が最も高く、全てのナノファイバーで培養した成人肝細胞が monolayer より高い活性を示した。通常、成人肝細胞は、培養表面をコラーゲン処理しているものでないと細胞が接着できず死滅してしまうが、ナノファイバーを使用することで細胞機能を高めつつ、コラーゲン処理の手間を省くことができる可能性も示唆された。

以上の結果より、ナノファイバー上で細胞を三次元的に培養する事で、細胞の増殖、機能について向上させる事ができ、特に 600nm の径が最も有効であるという結果が得られた。しかし細胞形態に与える影響が、ナノファイバーの径の違いによるものだけではなく、ナノファイバーの空隙も重要であることが示唆された。

第 4 章では、三菱レイヨン(株)との共同研究で開発した、第 3 章で検討したナノファイバーを用いた三次元細胞培養モジュールについて記載した。本モジュールは、医薬品開発の前臨床段階でヒトに対する毒性・効能を予見し、開発費及び開発期間の削減に寄与しうるヒト肝細胞を利用した試験培養技術の開発を目的としたものである。特に、本章では、本モジュールを使用した灌流培養システムの開発を行った。そして、Hc 細胞、および肝芽細胞、成人肝細胞を本灌流培養システムで培養し、細胞密度、細胞機能および細胞形態にどのような影響を与えるかを検討するとともに、灌流培養システムの評価を行った。1 回目の灌流培養では、最適な培養条件(培地流速、ガス供給速度、播種密度など)が決定していなかったため、培養日数は 33 日間という結果になった。しかし、肝機能の指標となる尿素が合成されており、さらに、培養細胞障害の原因となるアンモニアについても低い値のままであったため、アンモニア代謝能が働いているものと考えられた。一方、培地中の酸素が十分でない場合に産出される乳酸が作り出されていたため、酸素不足が示唆された。そこで、2 回目の培養では、培地流速、ガス供給速度を増加させ、酸素供給を十分に行った。その結果、Hc 細胞が $1.0 \times 10^8 \text{cells/cm}^3$ の高密度状態になった時点で肝芽細胞に誘導し、CYP3A4 活性を生体内肝実質細胞の文献値($1.95 \pm 1.24 \text{pmol/10}^6 \text{cells/min}$)の範囲内で 30 日間の長期にわたり維持することができ、培養中の酸素供給の重要性が再確認された。さらに、3 回目の培養で、細かい培養条件を最適化し実験を行ったところ、細胞播種から約 5 カ月(156 日間)もの長期間細胞を培養する事ができ、CYP3A4 活性についても、約 3 カ月(90 日間)にわたり成人肝細胞の値と同等の値を維持し続ける事が出来た。また、通常長期培養を行うと細胞の変性(形質転換)の危険性が出てくるが、培養期間中形質転換の指標となる

PIVKA-IIは非常に少ない値を維持し続けた。また、成人肝細胞の長期培養を試みたところ、細胞機能を少なくとも 25 日間維持でき、さらに細胞の生存は 33 日目まで確認する事が出来た。また、SEM により形態観察を行ったところ、内部の細胞は肝機能発現に重要とされる球状の形態をとっており、微絨毛が発達している様子も観察された。

今回の結果より、本灌流培養システムを用いることにより、He 細胞、肝芽細胞のみならず成人肝細胞についても長期培養が可能となり、その有用性を示す事ができた。将来は、亜急性毒性（薬物の長期服用によって発現する毒性）試験(4 週間)への応用が期待される。

第 5 章では、日本バイリーン(株)との共同研究で、同社が開発した高純度シリカ三次元培養担体 Cellbed®を用いて、成人肝細胞の長期機能維持を目的として実験を行った。また、肝細胞の Extra Cellular Matrix (ECM)として知られている Laminin、Type I コラーゲンを塗布した Cellbed®の成人肝細胞に与える影響についても検討を行った。成人肝細胞を Cellbed®上で三次元培養することにより二次元状態の monolayer と比較して生存率が高くなる傾向が見られ、ECM の一種である Laminin、Collagen をコートする事によりさらに細胞数が高くなる傾向が見られた。CYP3A4 活性では、培養 4 日目には培養条件でも大きな差は見られなかったものの、培養 16 日目では、monolayer に比べ Cellbed®上で培養したもので有意に活性値の上昇が見られた。さらに、肝障害の指標である GOT、GPT の漏出量についても、monolayer では 10 日目以降に増加するのに対し Cellbed®ではそれが見られず、成人肝細胞への障害が少ない状態で培養できる可能性が示唆された。

以上の結果より、生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点から成人肝細胞の長期培養において、Cellbed®は有用であると思われ、今後動物実験代替法への応用が期待される。

本研究では、培養担体表面の詳細な解析による三次元培養に重要な足場形状、長期高密度三次元培養を行う上での酸素及び栄養素供給の重要性、三次元培養による細胞障害の軽減及び ECM の効果についての知見を得ることが出来た。今回得られた結果は基礎的な段階でさらに詳細な検討が必要であると思われるが、将来、正常なヒト肝細胞を用いた人工肝臓及び、亜急性毒性試験法(4 週間)開発への可能性を示す事ができたと思われる。例として Fig.6-1 には、三次元培養及び灌流培養システムを用いた新しい毒性効能試験のプロセスを示した。

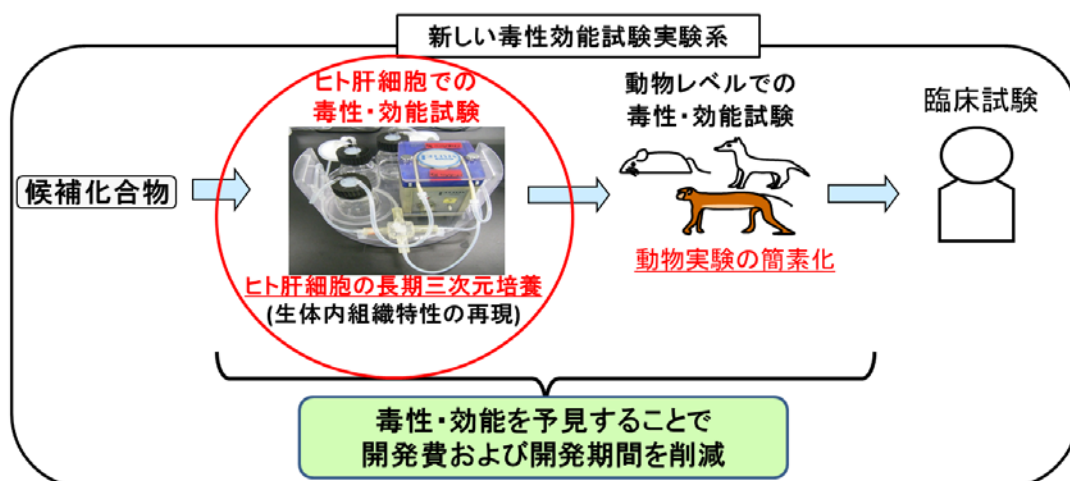


Fig.6-1 新しい毒性効能試験プロセス

新しい実験系では、本研究で得られた知見を生かしヒト肝細胞をより生体内に近い状態で長期間培養する事で動物実験の前にヒトの肝細胞を用いて毒性効能試験を行う事ができる。また、亜急性毒性試験、亜慢性毒性試験の一部代替法としても、今回の研究成果を活かすことができると思われる(Fig.6-2)。これにより、今まで多大な時間と費用のかかる動物実験を削減し、新薬開発のリスクを軽減することが可能になるものと期待される。

	急性毒性試験	亜急性毒性試験	亜慢性毒性試験	慢性毒性試験
投与期間	単回、継続投与 0-24時間 (観察期間: 0-14日間)	反復、又は継続投与 反復投与では、 国際的ガイドラインで 14-28日間 とされている。	反復、又は継続投与 げっ歯類では 90日間 、 他の動物種では寿命の10% を超えない期間で行われる。	反復、又は継続投与 寿命の10%を超える期間 で行う。通常 6-12カ月 の期 間で実施される。
代替法	各種細胞培養 (観察期間: 0-7日間)	HAp多孔質担体 ナノファイバー Cellbed® 灌流培養システム	灌流培養システム	灌流培養システム

Fig.6-2 毒性効能試験のプロセス比較

これまで示してきたように、人工肝臓への応用や、正常ヒト肝細胞を用いた亜急性毒性試験に用いるには、まだ多くの課題が存在しているが、将来的に、肝機能シミュレーターとしての応用、動物実験代替法としての応用、薬剤のスクリーニングや肝臓でのクリアランス予測、代謝予測、また、再生医療分野への応用など、幅広い分野での展開が期待される。

参考文献

- 1) Abbott, A. *Nature*. **424**, 870-872(2003).
- 2) Li, GN., Livi, LL., Gour, CM., Deweerdt, ES., et al. *Tissue Eng.* **13**, 1035– 1047 (2007).
- 3) Ohkura, T., Ohta, K., Nagao, T., Kusumoto, K., et al. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**,373-378 (2014)
- 4) Bissell, DM., Arenson, DM., Maher, JJ., Roll, FJ. *J. Clin. Invest.* **79**, 801-812 (1987).
- 5) Ringel, M., Mach, MA., Santos, R., Feilen, PJ., et al. *Toxicology*. **206**, 153–167 (2005).
- 6) Chandraiah, G., Apurva, RP., Utkarsh, D., Terrick, A., et al. *PLOS ONE*. **8**, e53708 (2013).
- 7) Meritxell, H., Helmuth, G., Ruben, VB., Karien, H., et al. *Cell*. **160**, 299–312 (2015).
- 8) Sudo, R. *Organogenesis*. **10**, 216–224 (2014).
- 9) Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., et al. *Cell*. **160**,299-312 (2015).
- 10) Kasuya, J., Tanishita, K. *Biomatter*. **2**, 290–295 (2012).
- 11) Gieseck RL III, Hannan, NRF., Bort, R., Hanley, NA., et al. *PLOS ONE*. **9**, e86372 (2014).
- 12) Maher, SP., Crouse, RB., Conway, AJ., Bannister, EC. *Biomed. Microdevices*. **16**, 727–736 (2014).
- 13) Lee, SY., Kim, HJ., Choi, D., *Int. J. Stem Cells*. **8**, 36–47 (2015).
- 14) Huh, D., Hamilton, GA., Ingber, DE. *Trends Cell Biol.* **21**, 745–754 (2011).
- 15) Domansky, K, Inman, W., Serdy, J., Dash, A., et al. *Lab. Chip*. **10**, 51–58 (2010).
- 16) Do, AV., Khorsand, B., Geary, SM., Salem, AK. *Adv. Healthc. Mater.* **4**,1742–1762 (2015).
- 17) Griffith, LG., Wells, A., Stolz, DB. *Hepatology*. **60**, 1426–1434 (2014).
- 18) Fey, SJ., Wrzesinski, K. *Toxicol. Sci.* **127**, 403–411 (2012).
- 19) Ma, L., Zhou, C., Lin, B., Li, W. *Biomed. Microdevices*. **12**, 753–760 (2010).
- 20) Goral,VN., Au, SH., A, Ronald. Faris, Po Ki Yuen. *Biomicrofluidics*. **8**, 046502 (2014).
- 21) Yu, Miao., Huang, S., Yu, KJ., Clyne, AM. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 5554-5570 (2012).
- 22) Lu,Y. Zhang,G S, Chong., Uygun, K. et al. *Biotechnol. Bioeng.* **109**,595–604 (2012).
- 23) Matsushita, T., Kiyota, A., Nishikura, Y., Anno, M., Ueoka, R. *J.Oral Tissue. Eng.* **4**, 25-31 (2006).
- 24) Kimlin, LC., Casagrande, G., Virador, VM. *Mol. Carcinog.* **52**,167-82(2013).

- 25) Ohno, M., Motojima, K., Okano, T., Taniguchi, A. *J. Biochem*, **145**, 591-597(2009).
- 26) Tseng, H., Gage, JA., Raphael, RM., Moore, RH., et al. *Tissue Eng. Part C Methods*. **19**, 665-75(2013).
- 27) Jianxing, Z., Aleksander, S., Glenn, DP. *Biomaterials*. **29**,4521–4531(2008).
- 28) Hammond, JS., Beckingham, IJ., Shakesheff, KM. *Expert Rev. Med. Devices*. **3**,21–27 (2006).
- 29) Ohashi, K., Yokoyama, T., Yamato, M., Kuge, H., et al. *Nat. Med.* **13**,880–885 (2007).
- 30) Daley, WP., Peters, SB., Larsen, MJ. *Cell Sci.* **121**,255–264 (2008).
- 31) Gillette, BM., Rossen, NS., Das, N., Leong, D, et al. *Biomaterials*. **32**,8067–8076 (2011).
- 32) Cho, CS., Seo, SJ., Park, IK., Kim, SH., et al. *Biomaterials*. **27**,576–585 (2006).
- 33) Mikos, AG., Sarakinos, G., Leite, SM., Vacanti, JP., et al. *Biomaterials*. **14**,323–330 (1993).
- 34) Hasirci, V., Berthiaume, F., Bondre, SP., Gresser, JD., et al, *Tissue Eng.* **7**,385–394 (2001).
- 35) Dalton, PD., Woodfield, T., Hutmacher, DW. *Biomaterials*.**30**,701–702 (2009).
- 36) Mooney, DJ., Park, S., Kaufmann, PM., Sano, K, et al. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**,959–965 (1995).
- 37) Carnachan, RJ., Bokhari, M., Przyborski, SA., Cameron, NR. *Soft Matter*. **2**, 608–616 (2006).
- 38) Geeta, M., Williams, CM. Alvarez, L., Lesniewski, M., et al. *Biomaterials*. **31**, 4657-4671 (2010).
- 39) Tabata,Y. *J. R. Soc. Interface*. **6**, S311–S324 (2009).
- 40) Joachim K, William JW. Doyle K. *Biomaterials*, **28**, 4171-4177 (2003).
- 41) 医薬品産業ビジョン 2013 資料編 - 厚生労働省 www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou.../vision_2013b.pdf
- 42) Paul, SM., Mytelka, DS., Dunwiddie, CT., Persinger, CC., et al. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **9**, 203-214 (2010).
- 43) Paine, MF., Hart, LH., Ludington, SS., et.al. *Drug Metab.. Dispos.* **34**,880–886 (2006).
- 44) Martignoni, M., Groothuis, GM., de Kanter R. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**,875-894 (2006).
- 45) Imai, T. *Drug Delivery System*.**22**, 48-53 (2007).
- 46) Edmondson, R., Broglie, JJ., Adcock, AF. Yang, L. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**,207–218 (2014).

- 47) Ebrahimkhani, MR., Neiman, JAS., Raredon, MSB., Hughes, DJ et al. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **0**, 132–157 (2014).
- 48) Papavlassopoulos, H., Mishra, YK., Kaps, S., Paulowicz, I., et al. *PLOS ONE*. **9**, e84983 (2014).
- 49) Meli, L., Jordan, ET., Clark, DS., Linhardt, RJ. et al. *Biomaterials*. **33**,9087–9096 (2012).
- 50) Swift, B., Pfeifer, ND., Brouwer, KLR. *Drug Metab. Rev.***42**, 446–471 (2010).
- 51) Alvarez, SD., Derfus, AM., Schwartz, MP., Bhatia, SN., et al.*Biomaterials*. **30**, 26–34 (2009).
- 52) Andreoni, C., Orsi, G., Maria, CD., Montemurro, F., al. *PLOS ONE*. **9**, e111946 (2014).
- 53) Beck, TN., Chikwem, AJ., Solanki, NR., Golemis, EA. *Physiol. Genomics*. **46**, 699–724(2014).
- 54) Hunt, CA., Ropella, GEP. Lam, TN., Tang, J. et al. *Pharm. Res.* **26**, 2369–2400 (2009).
- 55) Sheikh-Bahaei, S., Maher, JJ., Hunta, CA. *J. Theor. Biol.* **265**,718–733 (2010).
- 56) Ierapetritou, MG., Georgopoulos, PG., Roth, CM., Androulakis, IP. *Clin. Transl. Sci.* **2**, 228–237(2009).
- 57)「奈良県 HP 第六部 全身毒性試験」<http://www.pref.nara.jp/secure/64043/23237-2.pdf>
- 58) 松下 琢、清田章文、上岡龍一 人工臓器、**35**, 338-340 (2006).
- 59) 織田敏次、UP Biology「肝臓の生物学」、東京大学出版会 49-77 (1990).
- 60) Gerlach, JC. *Int. J. Artif. Organs.*, **19**, 645-654 (1996).
- 61) Watanabe, FD., Mullon, CJ., Hewitt, W.R., Arkadopoulos, N., et al., *Ann.Surg.*, **225**, 484-494 (1997).
- 62) Patience, C., Takeuchi, Y., Weiss, R. *Nat. Med.* **3**, 282-286 (1997).
- 63) Tissier, LP., Stoye, JP., Takeuchi Y., Patience, C., Weiss, RA. *Nature* **389**,681–682 (1997).
- 64) Patience, C., Switzer, WM., Takeuchi, Y., Griffiths, DJ. et al. *J. Virol.* **75**, 2771–2775 (2001).
- 65) Van der Laan, LJ., Locky, C., Griffeth, BC., Frasier, FS., et al., *Nature* **407**, 90-94 (2000).
- 66) Denner, J., Tönjesb, RR. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 318–343 (2012).
- 67) Denner, J. *Virology*. **369**,229–233 (2007).
- 68) Fiebig, U., Hartmann, MG, Bannert, N., Kurth, R. *J. Virol.* **80**, 5651–5654 (2006).
- 69) Tarlinton, RE., Meers, J., Young, PR. *Nature*. **442**,79–81 (2006).
- 70) U.S. Public Health Service Guideline on infectious disease issues in xenotrans-

- plantation. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm. Rep.* **50**, 1-46 (2001).
- 71) Gebhardt, R., Hengstler, JG, Müller, D., Glöckner, R., *Drug Metab. Rev.* **35**, 145-213 (2003).
 - 72) Levy, G., Bomze, D., Heinz, S., Ramachandran, SD., et al. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1264-1271 (2015).
 - 73) Rebelo, SP., Costa, RM., Silva, M., Marcelino, P., et al. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi: 10.1002/term.2099. (2015).
 - 74) Lin, C., Ballinger, KR., Khetani, SR. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**,519-540 (2015).
 - 75) Zeilinger, K., Schreite, T., Darnell, M., Söderdahl, T., et al. *Tissue Eng. Part C Methods.* **17**,549-56 (2011).
 - 76) Park, J-K., Lee, D-H. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 331—319 (2005).
 - 77) Fausto, N., Campbell, JS. *Mech. Dev.* **120**,117-130 (2003).
 - 78) Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., et al. *J. Exp. Med.* **204**, 1973–1987 (2007).
 - 79) Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Yagi, H., Yarmush, ML. *Curr. Opin. Organ. Transplant.* **14**, 667–673 (2009).
 - 80) Rogler, L.E. *Am. J. Pathol.*, **150**, 591–602 (1997).
 - 81) Kiyota, A., Matsushita, T., Ueoka, R. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2308–2311 (2007).
 - 82) Godoy, P., Hewitt, NJ., Albrecht, U., Andersen, ME., et al., *Arch Toxicol.* **87**, 1315-530 (2013).
 - 83) Tiffany, LS., Aarati, R., Denver, MF., George, PM., et al., *Tissue Eng Part A.* **16**, 1075–1082 (2010).
 - 84) Mignot, G., Faure, T., Ganne, V., Arbeille, B., et al., *Cytotechnology*, **4**, 163-171 (1990).
 - 85) Bancel, S., Hu, W.S. *Biotechnol. Prog.*, **12**, 398–402 (1996).
 - 86) Matsushita, T., Ketayama, M., Kamihata, K., and Funatsu, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 287–290 (1990).
 - 87) Suzuki, T. *Nihon Rinsho.*, **55**, 2140–2147 (1997) .
 - 88) Matsushita, T., Nakano, K., Nishikura, Y., Higuchi, K., Kiyota A., Ueoka, R. *Cytotechnology*, **42**, 57–66 (2003).
 - 89) Yamazaki, H., Gotou, S., Ito, K., Kohashi, S., et al., *J Biosci Bioeng.* **118**, 455-60 (2014).
 - 90) 松本 泉、「ホローファイバー培養の利点とその仕組みについて」動物細胞工学ハンドブック、朝倉書店、pp.167-169 (2000).

- 91) 細胞培養用足場材料、その製造法、細胞培養用モジュール <http://tokkyoj.com/data/tk2009-100.shtml>
- 92) Jill, S., H., Kenneth, MY. *Matrix Biol.* **30**, 363–368 (2011).
- 93) 細胞の生存・増殖・分化の制御と細胞接着由来シグナル 基礎老化研究 **36**,5-12 (2012).
www.jsbmg.jp/products/pdf/BG36-1/36-1-2.pdf
- 94) 小川 温子、「細胞外マトリックスの糖鎖による肝再生と線維化の制御」上原記念生命科学財団研究報告集, **25**,1-5 (2011)。
- 95) Sporn, MB., Roberts, AB. *JAMA*.**262**, 938-941 (1989).
- 96) Nasu, M., Takata, N., Danjo, T., Sakaguchi, H., et al., *PLoS One*. **7**, e53024 (2012).
- 97) Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., et al., *Nat Commun.* **3**, 1236 (2013).
- 98) Keemink, J., Oorts, M., Annaert, P. *Methods Mol. Biol.* **1250**, 175–188 (2015).
- 99) Oshikata, A., Matsushita, T., Ueoka, R. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 590–593 (2011).
- 100) Huch, M., Koo B.K. *Development.* **142**, 3113–3125 (2015).
- 101) Prodanov, L., Jindal, R., Bale, S.S., Bale, S.S., et al., *Biotechnol. Bioeng.* **2**, 67–74(2015).
- 102) 清田章文、崇城大学博士論文、(2008).
- 103) Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K., Okuda, G., et al., *Clin.chim.acta.*, **37**, 538- 540 (1972).
- 104) Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J., Jover, R., Nakamura, T., Castell, J.V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 760–767 (1998).
- 105) Scanning Electron Microscopy of Embryos. Morrill, JB. 著 *Academic Press, Inc.*, **27**, 264-292(1986).
- 106) Taguchi, Y., Omata, Y., *J. Surf. Finish. Soc. Jpn.*, **57**, 564–568 (2006).
- 107) Guengerich, FP. *Chem. Res. Tonicol.* **3**, 363-371 (1990).
- 108) Okuda, H., Obata, H., Nakanishi, T., Furukawa, R., Hashimoto, *J Hepatol.*, **4**, 357–363 (1987).
- 109) Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., et al., *Exp.Cell.Res.*,**186**, 227-235 (1990).
- 110) Ijima, H., Matsushita, T., Nakazawa, K., Fujii, Y., Funatsu, K. *Tissue Eng.*, **4**, 213–226 (1998).
- 111) Glicklis, R., Shapiro, L., Agbaria, R., Merchuk, JC., Cohen, S. *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 344–353 (2000).
- 112) Ranucci, CS., Kumar, A., Batra, SP., Moghe PV. *Biomaterials*, **21**, 783–793 (2000).
- 113) Ringel, M., von Mach, MA., Santos, R., Feilen, PJ., et al. *Toxicology.*, **206**, 153–67

- (2005).
- 114) Sosnik, A., Sefton, MV. *Biomaterials.*, **26**, 7425–7435 (2005).
 - 115) Bhandari, RN., Riccalton, LA., Lewis, AL., Fry, JR., et al., *Tissue Eng.* **7**, 345–57 (2001).
 - 116) Bhardwaj, N., Kundu, SC. *Biotechnol. Adv.*, **28**, 325–347 (2010).
 - 117) Huang, ZM., Zhang, YZ., Kotaki, M., Ramakrishna, S. *Comp. Sci. Technol.*, **63**, 2223-2253 (2003).
 - 118) 奥田拓道, 藤井節郎 : 最新医学, **21**, 622–627 (1966).
 - 119) Searcy, RL., Foreman, JA., Ketzi, A., Reardon, J. *Am. J. Clin. Path.*, **47**, 677-681 (1967)
 - 120) Uenishi, M. *MEMBRANE*, **25**, 135-138 (2000)
 - 121) 大政 健史, 浦山 重雄, 山中 貢, 谷村 奈緒子, 等, *化学工学論文集*, **24**, No. P184-189 (1998).
 - 122) Prodanov, L., Jindal, R., Bale, S.S., Hegde, M., et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 241–246 (2016).
 - 123) Cellbed (高純度シリカ三次元培養担体) <http://www.cellbed-jp.com/>
 - 124) Madeleine, D. *Cell Tissue Res* **339**, 259–268 (2010).
 - 125) コラーゲンを用いる細胞培養法 - 新田ゼラチン
www.nitta-gelatin.co.jp/labo/cellmatrixman.pdf
 - 126) Yang, J. Nandi, S. *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249-286 (1983)
 - 127) Marcius, M., Vrkić, N., Getaldić-Švarc, B. *Biochemia Medica*, **16**, 178-90 (2006).
 - 128) ラミニン溶液, EHS 肉腫由来
<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/Laminin/#04>
 - 129) 大川二郎, 三好由子, 松浦寛, 美崎英夫 : 臨床病理(補冊), **26**, 70 (1978).
 - 130) 鈴木一幸 : 日本臨牀(秋季臨時増刊号), **43**, 156-158 (1985).

謝辞

本論文は、崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻医用生体工学講座において、松下琢教授、古水雄志助教授のご指導の下、博士課程 3 年間で行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇切な指導ならびにご鞭撻を受け賜り、本論文を作成する上でも終始指導を受け賜りました松下琢教授に謹んで感謝いたします。また、同研究室で適切なご指導ならびに多大なご助力を承りました古水雄志助教授に謹んで感謝いたします。

研究を遂行するにあたり、終始ご懇切な指導ならびにご鞭撻を承りました上岡龍一名誉教授に深く感謝いたします。

研究を遂行するにあたり、適切なご助言を承りました松本陽子教授に厚くお礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり、適切なご助言を承りました後藤浩一教授に厚くお礼申し上げます。

本研究は、本学ナノサイエンス学科友重竜一教授との共同研究です。HAp 多孔質担体の作製及び SEM による観察、三次元培養モジュール及びナノファイバーの SEM による観察で大変お世話になり、友重竜一教授に厚く御礼申し上げます。また、HAp 多孔質担体の表面形状解析を電子線三次元粗さ解析装置によりエリオニクス(株)にて行わせていただきました、エリオニクス(株)に厚く御礼申し上げます。

本研究は、三菱レイヨン(株)との共同研究です。三次元細胞培養モジュール、ナノファイバーの作製およびご提供いただきました、三菱レイヨン(株)に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究は、日本バイリーン(株)との共同研究です。Cellbed®の作製およびご提供、SEM による観察を行っていただきました、日本バイリーン(株)に厚く御礼申し上げます。

実験を進めるにあたり、適切なご助言を承りました、市原英明准教授に厚く御礼申し上げます。

講義、セミナーを通じて応用生命科学科の諸先生方には、多大なご教授と御助言を頂きました。ここに、感謝の意を表します。

優れた研究結果を残して行かれた先輩方をはじめ、実験面で協力いただいた西倉康史氏、清田章文氏、竹下晴久氏、斎藤宏氏、押方歩さん、酒井美帆さん、宮原裕子さん、大塚友幸君、竹山健勇君、谷口弘剛君、中村遥希君、水民敬浩君、坂田優佳、松永英莉さん、伊崎淳志君、石橋孝司君、市川雄大君、稲村恒亮君、大田裕也君、田中美里さん、藤吉蓮君、和田淳君、諏訪蘭祥史君、高見昇吾君、満田健太郎君、穴田春奈さん、山口茉未さん、安部寛規君、樋口湧太君、白木明日香さんをはじめとする松下研究室、松本研究室の学生諸君には深く感謝いたします。

最後になりますが、勉学の機会と多大なる経済的支援を与えてくれた両親、弟、祖母に心より感謝いたします。また、どのような状況においても応援し、支えてくれた素晴らしい妻に心から感謝いたします。