

# 初代肝細胞機能探索を目的とした 培養スライドガラスの開発

東京バイオテクノロジー専門学校

バイオテクノロジー学科 DNA コース 3 班  
大貫 田中 湯浅

担当講師  
藤木亮次

## 本論文の要旨

生体内において肝臓は、栄養の代謝や貯蔵などの高次機能を担っている。これらの機能は特殊な細胞によって構築されると考えられ、密度勾配遠心法や FACS 法など様々な手法で分離されてきた。しかし、従来の方法によって分離した細胞は、別々のディッシュに培養し、評価を行う必要があった。本研究では、これら分離操作を円滑に進めるため、スライドガラス上に 30,000 個の孔がある培養器具の開発を行った。

通常、培養ディッシュには細胞接着の足場となるコーティングがされている。しかし、スライドガラスのコーティングにスプレー方式を試みたが、コーティング剤の粘性度が低く処理できなかった。そこで、グリセロールやゼラチン溶液の濃度を高め、スプレー可能となるまで粘性度を持たせた。ここで、これらコーティング剤が細胞の接着と増殖に影響することが考えられたため、コーティング剤の評価系を構築した。また、実験には扱いの容易な HeLa 細胞を用いた。接着に関しては、コーティング剤をディッシュ上に塗って、継代 24 時間後に 1 cm<sup>2</sup>あたり、接着した細胞数を計測した。一方、増殖については、直径 2.5 mm 円内の細胞数を経時的に観察し、その増加率を算出した。その結果、評価した中ではゼラチンが最も適切なコーティング剤であることがわかった。

これらの知見を基に、100 個の孔がある培養スライドガラスを作成し、実際に細胞の試験培養を行っており、現在検討中である。最後に、生体内にある肝臓の細胞についても培養できるか検討を行った。その結果、ポリ-L-リシンでコーティングを施したディッシュに最も接着した。

本研究で導入した評価系は、様々なコーティング剤を検討する場合に非常に有効であった。また、開発した培養スライドガラスは、多様な細胞集団に対する生物学的研究やスクリーニングなどに活用できるかもしれない。

## 英文要旨

Liver has a pivotal role for metabolism and storage of nutrients. The liver functions have been believed to be maintained by the several sorts of specific cells. The heterogenous cells prepared from liver have been fractioned by the methods based on density centrifugation and flow cytometry. However, these traditional methods require a large amount of labors to assess the individual cells. In this study, we develop to introduce a culture ware, in a size of a slide-glass, with 30,000 wells.

Culture wares are coated for the cells to attach their surface. However, it is impossible to spray coating materials, e.g. Poly-L-lysine, because of their low viscosity. We assessed various reagents with viscosity in a range of 0.5-10 mPa sec, such as glycerol, gelatin etc., to spray on a slide-glass-size culture ware. Two approaches are developed to assess the integrity for their using as coating materials, in terms of HeLa-cell growth and attachment. First, the number of the cells was counted, which attached to 1 cm-square surface 24 hours after cells seeding. Second, cell growth on the coated surface was measured in the course of a week. We concluded that >4 % (w/v) gelatin was the most useful in the terms of viscosity and cell toxicity.

Finally, we succeeded that primary cells from mice liver could culture in the slide-glass ware with 100 wells, which is used for pilot slide-glass ware with 30,000 wells. Hence, the assessments developed in this study are useful for testing the coating materials. And the culture ware might help screening for the specific cells of interest or pharmacological chemicals.

## 目次

第一章 序論 .....	- 1 -
第二章 培養スライドガラス作製の各種コーティング剤の評価 .....	- 2 -
第一節 粘性度試験 .....	- 2 -
第一項 緒言 .....	- 2 -
第二項 材料と方法 .....	- 2 -
第四項 小括 .....	- 4 -
第二節 接着試験 .....	- 5 -
第一項 接着試験定義 .....	- 5 -
第二項 材料と方法 .....	- 5 -
第三項 結果 .....	- 6 -
第四項 小括 .....	- 6 -
第三節 増殖試験 .....	- 8 -
第一項 増殖試験定義 .....	- 8 -
第二項 材料と方法 .....	- 8 -
第三項 結果 .....	- 9 -
第四項 小括 .....	- 9 -
第三章 初代肝細胞系の導入 .....	- 11 -
第一節 初代肝細胞の採取 .....	- 11 -
第一項 緒言 .....	- 11 -
第二項 材料と方法 .....	- 11 -
第三項 結果 .....	- 13 -
第四項 小括 .....	- 17 -
第一項 緒言 .....	- 18 -
第二項 材料と方法 .....	- 18 -
第三項 結果 .....	- 18 -
第四項 小括 .....	- 19 -
第四章 総合討論 .....	- 20 -
謝辞 .....	- 21 -

## 第一章 序論

高等多細胞生物の生体は、さまざまな機能を担う器官によって構成されている。人体最大の器官である肝臓は、500種類に及ぶ生化学反応を行うことで知られている。肝機能はタンパク質の「合成」、ブドウ糖や脂質の「代謝」、グリコーゲンなどの栄養分の「貯蔵」、アルコールや薬など有害物質の「解毒」の4つに大別される。これら肝臓の機能は様々な機能的細胞によって担われると考えられている。実際、肝臓には異物を貪食するクッパー細胞、血中のビタミンを貯蔵する伊東細胞、主に栄養代謝を司る肝細胞など多様な細胞群が存在することが知られている。従って、肝臓の機能は器官内に存在する数種類からなる細胞群を別個に分離し、評価することで説明できると考えられる。しかしながら、肝臓など多種多様な細胞群の集合体である肝臓から、適切な細胞のみを単離するには膨大な労力が必要となる。

現在細胞のスクリーニングに用いられている方法は、細胞の大きさや比重で選別する方法、細胞の表面構造により選別する方法の2種類に大別することができる。細胞の大きさや比重で選別する方法としては、アルブミン比重沈殿法、パーコールを用いる比重遠心法、エルトリエーターやセルソーターといった装置を用いる方法がある。細胞の表面構造により選別する方法では、細胞膜抗原と特異的抗体の抗体反応を用いる方法、蛍光検出細胞分別装置を用いる方法がある。しかし、パーコールには細胞毒性があるので、遠心後にはパーコールを取り除く工程が必須となり手間がかかる。また、装置を導入しようとする多大なコストがかかる。そこで、本研究では肝臓の細胞群を別個にスクリーニングするため、スライドガラス上に30,000個の培養孔を持った超高密度多孔式スライドガラスを独自に開発することを目的とした。

接着性の細胞を培養するには、培養容器表面に細胞接着の足場となるコーティング処理が不可欠となる。一般に、コーティング剤の塗抹処理には、コーティング剤を微細粒子にして散布する。しかし、スプレー方式でコーティング処理を行うにはコーティング剤の粘性度を上げる必要があった。そこで、本研究では適正なコーティング剤を探索する目的で、以下三種の評価系を構築した。第一に、スプレー方式での散布可能な粘性を持ったコーティング剤の濃度を調べる『粘性試験』。第二に、スプレー方式での散布可能領域のコーティング剤で実際に細胞が接着するかを調べる『接着試験』。第三に、接着した細胞の細胞増殖にコーティング剤が障害を与えないかを調べる『増殖試験』。以上の実験には、操作の簡便を図る目的で、ヒト子宮ガン接着性細胞であるHeLa細胞を用いた。次に、肝機能を探索するため、マウス肝臓より初代肝細胞を調整する系を構築した。最後に、超高密度多孔式スライドガラスの試作品として、カバーガラス上に100個の孔を持った培養器具を作成し、マウス初代肝細胞の接着を試みた。

## 第二章 培養スライドガラス作製の各種コーティング剤の評価

### 第一節 粘性度試験

#### 第一項 緒言

超高密度多孔スライドガラスの作成には、細胞接着の足場となるスライドガラス上へのコーティング処理が不可欠である。コーティング剤として、ゼラチンやコラーゲン、フィブロネクチンなどの間質系タンパク質、またはポリ L-リシンなどの合成ポリペプチドなどが用いられるが、各種コーティング剤の選択には用いる細胞に応じて検討する必要がある。本研究では、一般的に用いられるゼラチンおよびポリ L-リシンに着目し、超高密度多孔スライドガラス上へのコーティングを試みた。

コーティング処理はスプレー方式による塗抹処理で行うため、コーティング剤の適切な粘性度が必要となる。一般に、タンパク質の水溶液は非ニュートン流体であり、粘性度は実験的に測定する必要がある。スプレー方式に必要な粘性度範囲は、 $0.5 - 10.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ と決定されているため、まず適切な粘性度に必要なゼラチンのタンパク濃度を検討した。

#### 第二項 材料と方法

##### 材料

粘性度計：VISCOTESTER VT-03F 低粘性度用（リオン）

ゼラチン水溶液：50g のゼラチン粉末を 950ml の蒸留水に溶解し、5%ゼラチン溶液を作成した。121°C、2atm で 20 分オートクレーブ滅菌した。溶液を段階的に希釈し 4%・3%・2%・1%・0.5%ゼラチン溶液を各種 500ml 作成した。

0.05%ポリ L リシン溶液：0.05%ポリ L リシン溶液 15ml を  $0.2 \mu\text{m}$  フィルター（ミリポア）で濾過滅菌した。

##### 粘性試験の方法

各種濃度のゼラチン水溶液を調整し、その粘性度を室温（20°C）にて測定した。粘性度計を用いた測定は、測定値が安定する約 1 分後にて計測した。

### 第三項 結果

粘性試験の結果の 1 回目の測定結果は、 $T_n=(19-14.25)/3.11$  の計算により、 $T_n=1.526>T_n\alpha=1.426$  となり、 $P\leq P0.55$  となるため棄却し、2 回目から 4 回目の結果の平均及び標準偏差を求めた。各ゼラチン濃度における水溶液の粘性度は、表 1 にまとめた。また、その結果は図 1 にグラフ化した。

表 1 各種ゼラチン濃度水溶液の粘性度

	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	平均
5%	19.0	12.0	15.0	11.0	12.67±2.08
4%	15.0	7.0	9.0	7.0	7.67±1.15
3%	8.0	4.0	5.0	4.0	4.33±0.58
2%	4.0	3.0	3.0	3.0	3.00±0.00
1%	2.5	2.0	2.5	2.3	2.27±0.25
0.5%	2.0	2.0	2.0	1.8	1.93±0.12

単位：mPa・s

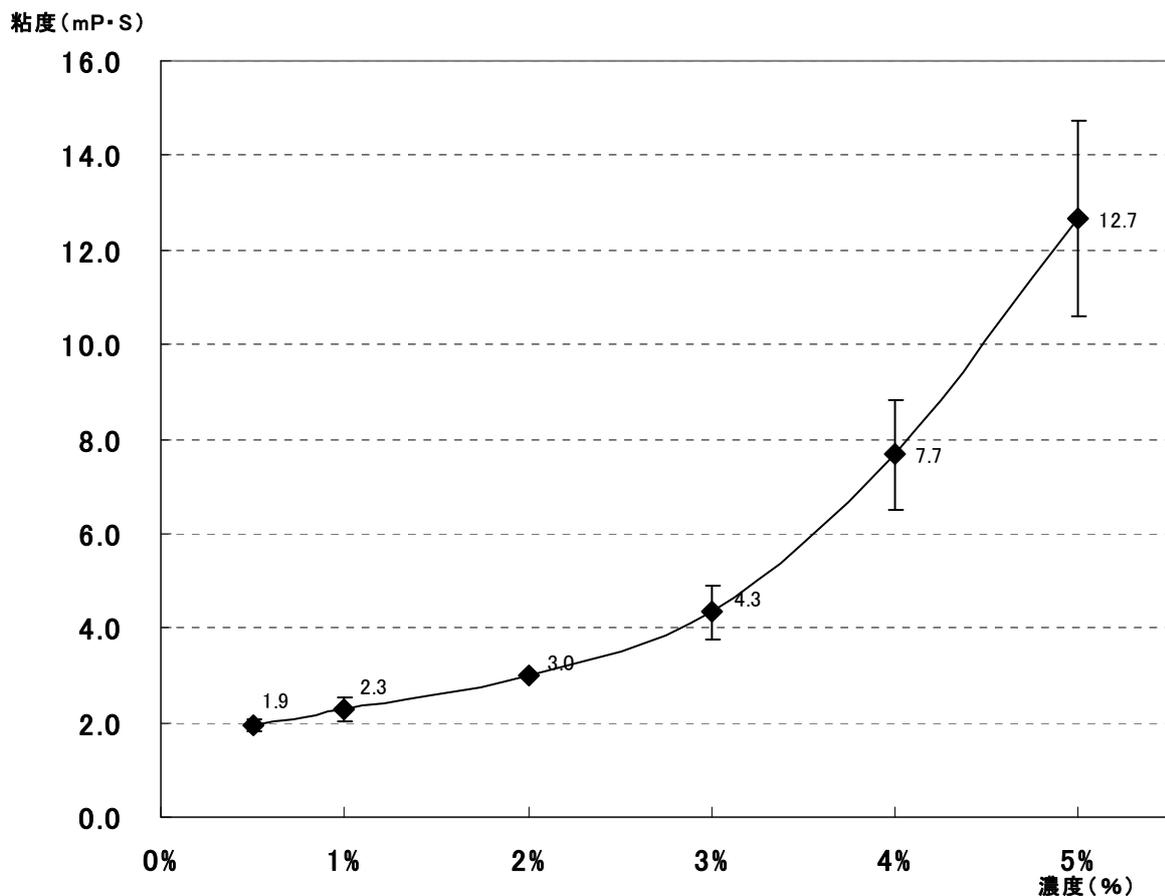


図 1 ゼラチンの粘性度

#### 第四項 小括

以上の結果から、スプレー方式に必要な粘性度範囲（0.5 – 10.0 mPa・s）を得るためには、ゼラチン濃度が 0.5 – 4 %程度で十分であることを示した。しかしながら、粘性度計の測定範囲限界が 2 – 300 mPa・s であるため、厳密な濃度範囲の決定にはさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。本研究で用いるゼラチン粘性度として、スプレー方式に可能な、1%（粘性度 2.27 mPa・s）および 4%（粘性度 7.67 mPa・s）を用いることにした。

## 第二節 接着試験

### 第一項 接着試験定義

接着試験では、各種コーティング剤で塗抹処理を行った培養ディッシュに、細胞が正常に接着するかを評価する。底面積  $1\text{cm}^2$  あたり  $7.8 \times 10^4$  個の細胞を撒き込み、正確に 24 時間培養を行う。その後、 $1\text{cm}^2$  あたり接着した生細胞数を計測する。

### 第二項 材料と方法

#### 材料

MEM 培地：MEM 培地 4.7g を量り取り、蒸留水 500ml に溶かした。121°C で 20 分オートクレーブして滅菌した。そこに滅菌済み 8% 重炭酸ナトリウム溶液を MEM 培地が柿色になるまで加え、pH 調整をした。MEM 培地に、濾過滅菌したグルタミン 0.15g とペニシリン溶液を 100U/ml、ストレプトマイシン溶液を  $100\ \mu\text{g/ml}$  になるように加えた。

HeLa cell：コンフルエントになったディッシュの MEM 培地を除去し、PBS を適量入れて底面を洗った。PBS を除去し 0.5%トリプシン/0.5%EDTA 溶液を適量入れ、37°C でインキュベートして細胞をはがし、1.5 倍量の MEM 培地を加えた。新しいディッシュに MEM 培地を適量入れ、そこに細胞数が適当な数になるように細胞液を加えて 37°C のインキュベーターで培養した。また、細胞の保存には対数増殖期にある HeLa cell を使用する。ディッシュ内の MEM 培地を捨て、PBS 適量をディッシュ低面に行き渡らせたのち、PBS をのぞいて死細胞と MEM 培地成分を除去した。その後、0.5%トリプシン/0.5%EDTA 溶液を適量入れ、37°C でインキュベートして細胞をはがし、1.5 倍量の MEM 培地を加えたのち、一部をとり出し血球計算板を用いて細胞数を計測した。計測後、細胞懸濁液全量を 15ml ファルコンチューブにうつし 1000 rpm 3 分 で遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て  $3 \times 10^6$  cells/ml になるように MEM 培地を加え、よくピペティングをしてペレットを溶解させた。細胞懸濁液を凍結保存用チューブに  $1000\ \mu\text{l}$  入れ、DMSO  $100\ \mu\text{l}$  を入れ、よくピペティングをした後、急速に温度が下がらないようにするためペーパータオルに包み、さらにアルミ箔で包み -80°C で保存した。このうち一部の細胞についてコンタミネーションの確認と、凍結した細胞が正常に増殖するか確認した。

各種コーティング方法：滅菌を行った各種コーティング剤をディッシュの底面を覆うように滴下し、37°C で 1 時間静置する。例として、底面積が  $75\ \text{cm}^2$  の培養ディッシュを用いる場合、約 3 ml のコーティング剤を用いる。この際、静置時間が長すぎると、コーティング剤が乾燥してしまい、細胞接着に支障を来たすので、注意を要する。1 時間後に、コーティングを除き、PBS で数回洗浄する。

## 接着試験の方法

各種コーティング処理をほどこしたディッシュに、 $1\text{cm}^2$ あたり  $7.8 \times 10^4$  個の HeLa 細胞を撒き、10% FBS 入り DMEM 培地内で 24 時間培養する。接着した生細胞の数は、トリパンブルー染色した後、血球計算版を用いて計測した。

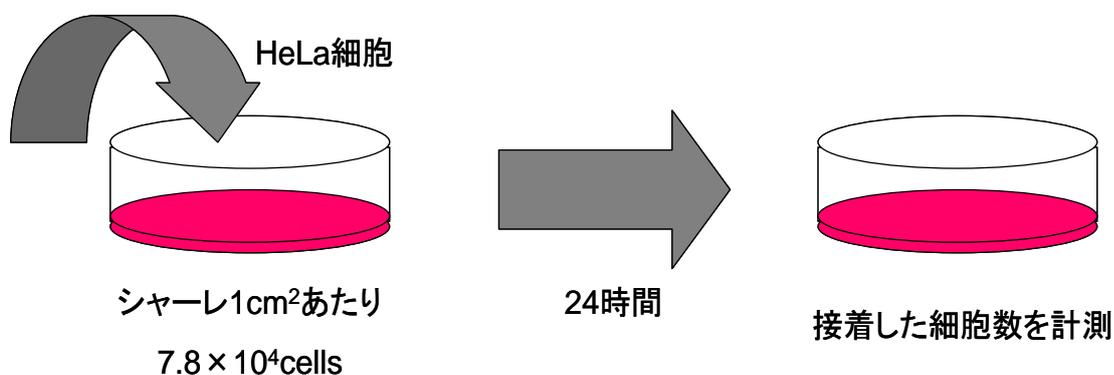


図2 接着試験の方法

## 第三項 結果

まず、接着試験を行うにあたり、適当な細胞数を検討した。検討の結果、 $1\text{cm}^2$ あたり  $7.8 \times 10^4$  個の HeLa 細胞を用いた場合、24 時間後にほぼ 80 %コンフルエントになることを確認した。

接着試験を行い、計測した生細胞数を表2に示した。その結果、コーティング未処理のディッシュを用いた試験と、各種コーティング剤処理を行った試験を比較した場合、後者の試験で良好な結果が得られた。また、各種コーティング剤を用いた試験では、それぞれ接着した生細胞数には差が見られなかった。

表2 各コーティングディッシュに接着した細胞数( $\times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)

未処理	プラズマ	ポリ L-リシン	コラーゲン	1%ゼラチン	4%ゼラチン
5.9	15.0	14.3	14.3	12.5	15.6

## 第四項 小括

接着試験においては、撒き込む細胞数が多すぎると、24 時間以内にオーバーコンフルエントとなり、正確な接着細胞数を評価できない。反対に、少なすぎると、実験誤差が大きくなり、本試験の趣旨に適さないと考えられた。検討の結果、 $1\text{cm}^2$ あたり  $7.8 \times 10^4$  個の HeLa 細胞を撒き込むと、24 時間後にほぼ 80 %コンフルエントになることを確認した。80 %コンフルエントの細胞

密度では、HeLa 細胞は対数増殖期にあり、評価に適すると考えられた。

また、本試験では操作の簡便を図るため、HeLa 細胞を用いて接着試験を行った。現在 HeLa 細胞は、生物学研究において、最も広く用いられている細胞である。しかしながら、HeLa 細胞などの一部がん細胞は細胞接着性が極めて強く、生体内の細胞接着を反映していないと考えられている。そのため、初代細胞培養などを行う場合は、コラーゲン、ゼラチンなど各種コーティング剤を、目的の細胞に応じて検討する必要がある。本章にて導入した接着試験は、これらコーティング剤の検討を行う場合、非常に有用であると考えられた。

## 第三節 増殖試験

### 第一項 増殖試験定義

増殖試験とは、各コーティング処理で使用した物質が、細胞の接着と成長に悪影響を及ぼさないかを確認する試験である。細胞を底面積  $1\text{cm}^2$  あたり  $2.5 \times 10^6$  個撒き込んだ後、直径  $0.5\text{mm}$  円内での、1日から7日間の経時的な細胞増殖数を計測した。

### 第二項 材料と方法

#### 材料

4円刻印スライドガラス：  $76\text{mm}$ （横幅） $\times 26\text{mm}$ （縦幅） $\times 1\text{mm}$ （厚さ）のポリカーボネート製スライドガラス上に、視認用の直径  $2\text{mm}$  ガイドサークルと、その中に試験用の直径  $0.5\text{mm}$  テストサークルが4カ所刻印されている（図3）。ガイドサークルは目視可能な直径と定め、テストサークルは顕微鏡（ $\times 200$ ）で観察した際に測定が容易な、直径  $0.5\text{mm}$  の大きさに定めた。また、スライドガラスの素材には、オートクレーブ可能なポリカーボネートを用いた。

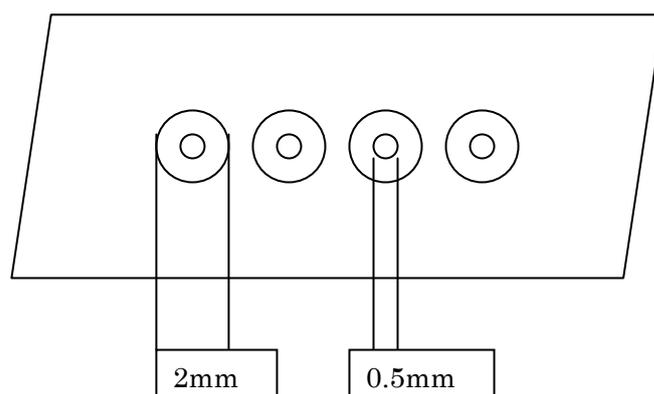


図3 4円刻印スライドガラスの模式図

ライトギムザ染色液：ライトギムザ染色は、既製品（ディフクイック液， Sysmey）を用いて行った。

#### 増殖試験の方法

滅菌済み4円刻印マークスライドガラス上に、ポリLリシン、1%ゼラチン、4%ゼラチンを  $10\mu\text{l}$  滴下し、 $37$ 度のインキュベーター内で1時間静置した。この際、溶液が乾くと細胞が正常に接着出来なくなり失敗するので注意を要する。なお、1カ所はコーティング処理をせず、ネガティブコントロールとした。その後、コートしたテストサークルを、数回 PBS にて洗浄した。

まず、コーティング処理を行った4円刻印スライドガラスを  $10\text{cm}$  ディッシュに入れ、 $2.5 \times 10^6$  個の HeLa 細胞を撒き込み、10% FBS 入り DMEM にて培養を行う。この際、24時間後に培

地交換を行い、これはスライドガラス上に接着しなかった HeLa 細胞を除去した。

24 時間後から 1 週間後のスライドガラスを経時的に取り出し、スライドガラス上で増殖した細胞をライトギムザ法により染色した。テストサークル内の HeLa 細胞は、顕微鏡に設置した CCD カメラ (OLYMPUS) を用いて撮影した。

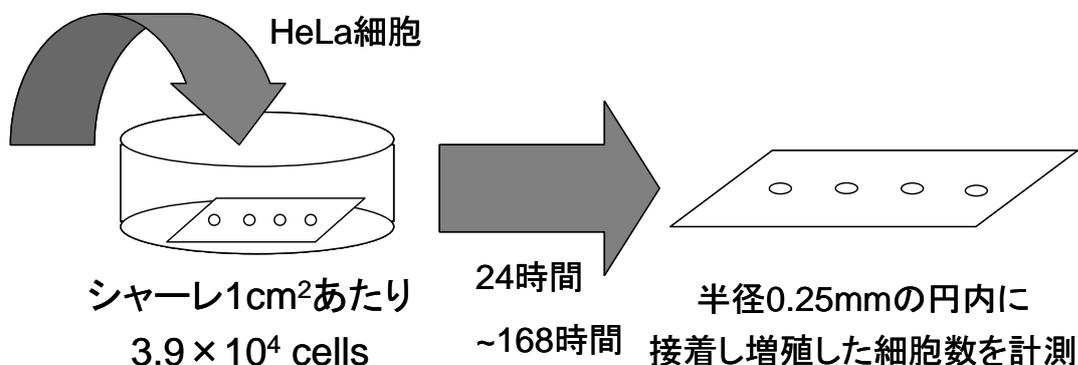


図 4 増殖試験の方法

### 第三項 結果

増殖試験を行い、4 円刻印スライドガラス上にて増殖した細胞数を表 2 に示した。その結果、24 時間培養した際、各種コーティング剤処理を行ったテストサークル内には、未処理のサークルと比較し、多くの細胞が接着した。この結果は、前の章に示した結果と同様であった。一方、1 週間培養した後、全てのテストサークル内で、接着した細胞数には差が見られなかった。

表 3 各種コーティング剤を用いた増殖試験の結果

	未処理	ポリ L-リシン	1%ゼラチン	4%ゼラチン
1 日間	11	18	18	26
3 日間	204	187	139	173
5 日間	169	194	238	152
7 日間	>350	>350	>350	>350

### 第四項 小括

本章では、各種コーティング剤が、細胞増殖に与える影響を検討する目的で、増殖試験系を構築した。試験には、操作の簡便性を図る目的で、HeLa 細胞を用いた。前章に記載したとおり、HeLa 細胞などの一部がん細胞は、生体内の細胞を反映していない可能性がある。そのため、初代細胞培養などを行う場合は、コラーゲン、ゼラチンなど各種コーティング剤を、目的の細胞に応じて検討する必要がある。本章にて導入した増殖試験は、これらコーティング剤の検討を行う際、非常に有用であると考えられた。

また、コーティング未処理のテストサークルでは、24 時間後に接着する細胞数は減少傾向にあ

った。しかしながら、1週間後の細胞数を計測した場合、未処理と各種コート処理を行ったサークルでは、細胞数に差が見られなくなった。このことから、コーティング処理は細胞接着に影響を与えるが、その後の細胞増殖には影響を与えないことを示している。以上の結果から、各種コーティング剤は HeLa 細胞に対し、その増殖に影響を与えないことを確かめることができた。

## 第三章 初代肝細胞系の導入

### 第一節 初代肝細胞の採取

#### 第一項 緒言

肝臓は、非常に機能が多くのことで知られ、栄養の代謝とその貯蔵および排出、解毒、胆汁酸の分泌などにおいて重要な役割を担っている。肝臓は多様な機能細胞により構成され、肝機能の中心的役割を担う肝細胞、異物を貪食するクッパー細胞、血中のビタミンを貯蔵する伊東細胞などの各種細胞があることが知られている。しかし、これら細胞のみで肝臓の多様な機能を説明することはできないため、その他機能的に特化した未同定の細胞群が複数存在すると考えられている。従って、肝臓の機能は、器官内に存在する異種細胞群から別個の細胞を単離し、評価することで説明できると考えられる。ここで重要な点は、評価する細胞は生体内での性質が保たれていなければならない、ということである。本章では、生体内細胞の機能を評価するために、その条件を満たす初代培養細胞を構築することを目的とした。

#### 第二項 材料と方法

##### 材料

8%重炭酸ナトリウム：  $\text{NaHCO}_3$  8 g を蒸留水 100 ml に溶かし、121 °C 20 分 2 atm でオートクレーブ滅菌した。貯蔵は4 °Cで行った。

L-グルタミン： 粉末グルタミン 0.3 g を蒸留水 10 ml に溶かしてろ過滅菌する。

ダルベッコ変法イーグル培地： ダルベッコ変法イーグル培地 4.75 g を蒸留水 500 ml に溶かし、121 °C 20 分 2 atm オートクレーブ滅菌する。培地を冷やし、L-グルタミン 10 ml 血清 50 ml 8%重炭酸ナトリウム 10 ml を加えた。貯蔵は4 °Cで行った。

コラゲナーゼストック液： CollagenaseIV 100 mg を HANKS 液 1 ml に溶かした。溶けたところでグリセロール 1 ml 加えよく懸濁し、エッペンチューブに 200  $\mu$ l ずつ分注し -20 °C で貯蔵する。

25×PBS(-)： NaCl 20 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7.24 g、KCL 0.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g を量り取り、ミリ Q 水で溶解した。100 ml にメスアップし、121 °C、2 atm で 20 分オートクレーブ滅菌した。貯蔵は4 °Cで行った。

0.5M/ml EDTA： EDTA $\cdot$ 2Na 37.25g を 200ml 蒸留水 に溶解し、pH を 8 に調整した後 121°C、2atm で 20 分オートクレーブ滅菌した。貯蔵は、4 °Cで行った。

HANKS 溶液： HANKS 4.9g を 500ml の蒸留水に溶解した。貯蔵は、4 °Cで行った。

コラゲナーゼ液： 使用直前に 0.02 %EDTA/HANKS 液 10 ml にコラゲナーゼストック液を 100  $\mu$ l 加え、混合液を濾過滅菌した。EDTA を加えないと、金属イオンがコラゲナーゼの活性を阻害し働かないので注意する。

ナイロンメッシュ 270T 及び 150T： 東京スクリーン株式会社製の材質が ナイロン 66PA で、下記の日開き、線径のものを使用した。

コード	目開き	線径
N-No.270T	59 $\mu$ m	35 $\mu$ m
N-No.125T	133 $\mu$ m	70 $\mu$ m

セルストレーナー： ナイロン製のフィルタ、ポリプロピレン製のホルダーでメッシュサイズ 70  $\mu$  m を使用した。

## 方法

### (1)マウスの開腹

ジエチルエーテルでマウスに麻酔をし、70 %エタノールに全身を浸し消毒した。クリーンベンチ内にマウスを移動させた。ピンセットと、解剖バサミを用いてマウスを開腹し、腸を体の外にずらした。肝臓の下に見える門脈を露出させた。

### (2)カニューレの挿入

門脈を突き破らないように注意を払いカニューレセットの針を刺した。針が挿入されていることを確認した。マウスの腸をどかした後に確認できる大静脈を切断し、そこから灌流液が流出するようにした。

### (3)脱血

ハンクス液 10 ml を約 5 分かけてカニューレセットで流して灌流し脱血した。灌流がうまくいくと肝臓の色が赤から黄色に変化していく。

### (4)酵素処理

灌流の終了したマウス肝臓を摘出し、ディッシュに入れた PBS (-)で 2 回洗浄した。その後、氷上のガラスシャーレに移した。肝臓の乾燥を防ぐため HANKS 液 1 ml を入れ、メスを使い肝臓を細分させた。この際、その後の酵素処理をより円滑に進めるため、出来るだけ細かく細分させた方がよい。肝臓を細分後、コラゲナーゼ溶液 200  $\mu$ l を加え、37 °Cに設定したインキュベーター内でスターラーで攪拌しながら 30 分間反応させた。その後、コラゲナーゼ溶液 160  $\mu$ l、0.25%トリプシン溶液 16 ml 及び EDTA 溶液 30  $\mu$ l を加え、さらに 1 時間反応させた。酵素反

応終了後、検鏡して細胞が分離されている事を確認する。酵素処理が不十分だと反応液がドロドロとなっている場合があるので重ねて確認する。

#### (5)細胞の篩い分け

酵素処理の終了したマウス肝臓に、ダルベッコ変法イーグル培地を適量加えてコラゲナーゼ反応を止めた。肝臓懸濁液をファルコンチューブにセットしたセルストレーナーを通し細胞をろ過した。セルストレーナー内に残った肝臓片を注射器のシリンジのゴム部分で擦り、ダルベッコ変法イーグル培地を加えさらに細胞をろ過した。

#### (6)細胞の洗浄

懸濁液を 1000 rpm 5 分間 遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿物にダルベッコ変法イーグル培地を加えよく懸濁させた。再度遠心分離を行い、細胞をリンスした。もう一度細胞をリンスした後、細胞液をよく懸濁させた。

#### (7)細胞を撒く

ポリ L-リシン、プラズマ、1 %及び 4 %ゼラチンでコートされた 3 cm ディッシュに細胞懸濁液をよくピペッティングして 1 ml ずつ撒き、37 °C 5 % CO<sub>2</sub>のインキュベーターで培養した。

一晚培養した細胞の培地を抜き、PBS (-)でディッシュ内を洗浄した。PBS (-)を捨てた後、ディフクイック染色を行い撮影を行った。

### 第三項 結果

一般的に初代培養細胞を取り出す実験におけるプロトコールでは、(1)マウスの開腹(2)カニューレセットの挿入(3)肝臓の脱血(4)酵素処理(5)細胞の篩い分け(6)細胞の洗浄(7)細胞をディッシュにまく。といった手順で行われる。

#### プロトコール I

##### (1)マウスの開腹

ジエチルエーテルでマウスに麻酔をし、70 %エタノールに全身を浸し消毒した。クリーンベンチ内にマウスを移動させた。ピンセットと、解剖バサミを用いてマウスを開腹し、腸を体の外にずらした。肝臓の下に見える門脈を露出させた。

##### (2)カニューレセットの挿入

門脈の周囲の小網部を血管が傷つけないように破り、手術糸を通した。門脈を突き破らないように注意を払いカニューレセットの針を刺した。針が挿入されていることを確認した後に、手術糸できつく縛り針を固定した。マウスの腸をどかした後に確認できる大静脈を切断し、そこから灌流液が流出するようにした。

### (3)脱血

事前にウォーターバスで 37 °C に温めておいた HANKS 液 10 ml を約 5 分かけてカニューレセットで流して灌流し脱血した。HANKS 液がなくなりかけたらカニューレセットのシリコンチューブ上のピンチコックを閉じ、注射器のピストンを引き抜いた。

### (4)酵素処理

37 °C に温めておいたコラゲナーゼ液 10 ml をカニューレセットに入れた。そして、コラゲナーゼ液を約 5 分かけて注入した。この時のコラゲナーゼ液には EDTA が入っていなかった。

### (5)細胞の篩い分け

灌流の終了した肝臓を取り出し、コラゲナーゼ液を 10 ml 入れたディッシュに移した。ピンセットを 2 本使い、肝臓の皮膜を除いた。ディッシュにダルベッコ変性イーグル培地を 10 ml 加え、駒込ピペットで懸濁した。細胞液をファルコンチューブに移し 4 °C 500 rpm 5 分間で遠心した。

### (6)細胞の洗浄

上清を捨て沈殿に新たにダルベッコ変性イーグル培地を加え穏やかに懸濁した。細胞液を 300 rpm で 5 分間遠心し上清を捨てた。この操作を 2 回行った。

### (7)細胞を撒く

沈殿に 10 ml のダルベッコ変性イーグル培地を加え、懸濁した。細胞液を顕微鏡で観察し各コーティングディッシュに細胞懸濁液をよくピペティングした後に撒いた。一晚培養した細胞の培地を抜き、PBS (-) でディッシュ内を洗浄した。PBS (-) を捨てた後、ダルベッコ変性イーグル培地を加え引き続き培養した。

#### ・プロトコール I の問題点及び改善策

(3)脱血から(4)酵素処理の間に門脈に刺した注射針が動いてしまい、その結果、針が門脈から抜けたり、血管傷つけてしまうためコラゲナーゼ液が肝臓に入っていないことがあった。注射針が動かないようにするため、門脈に刺した針の上部と下部の 2 箇所を糸で結び固定しようとした。しかし、技術的な問題で 2 箇所結ぶことが出来なかった。そこで、溶液を入れ替えることを諦め、コラゲナーゼ液だけを流すこととした。

(4)酵素処理後、灌流の終了した肝臓の皮膜を除いても細胞間物質を消化された肝細胞が流れ出てこないことから、酵素処理が十分に行なわれていないと考えられた。コラゲナーゼ液の濃度を 0.1 % に上げ、灌流の流速を落として反応時間を延ばした。しかし、皮膜を除いても肝細胞が流れ出てこなかった。そこで、灌流の終わった肝臓を取り出し、メスで細分した上で酵素処理を行うことにした。

## プロトコールⅡ

### (2)カニューレセットの挿入

門脈を突き破らないように注意を払いカニューレセットの針を刺した。刺した状態のまま手を動かさないようにし、マウスの腸をどかした後に確認できる大静脈を切断し、そこから灌流液が流出するようにした。

### (3)脱血

事前にウォーターバスで 37 °C に温めておいた EDTA 不含のコラゲナーゼ液 10 ml をカニューレセットに入れた。その後、コラゲナーゼ液を約 5 分かけて注入した。

### (4)酵素処理

灌流の終了した肝臓を取り出し、HANKS 液を 1 ml 入れて氷上に置いたガラスシャーレに移し、メスで細分した。EDTA 不含のコラゲナーゼ液を 10 ml 加え、37 °C のインキュベーター内で 1 時間反応させた。酵素処理後の細胞懸濁液を 50ml ファルコンチューブに移し、ダルベッコ変性イーグル培地を 10ml 加え、駒込ピペットで懸濁した。

### (5)細胞の篩い分け

その後、氷上に細胞液を移し 30 分間放置した。放置後の細胞液の上清を 500 rpm 5 分間 4 °C で遠心した。

(1)マウスの開腹、(6)細胞の洗浄及び(7)細胞を撒く、以上の手順はプロトコール I と同様に行った。

#### ・プロトコールⅡの問題点及び改善点

(4)酵素処理の際、細胞塊のまわりしか酵素処理された様子がなかった。酵素処理後の細胞液がドロドロとなっていたのでコラゲナーゼ処理が行われていないのではないかと推測された。HANKS 液中の金属イオンがコラゲナーゼの活性を阻害し正しく働かない可能性が考えられ、EDTA 溶液を HANKS 液に加え使用した。

検鏡の結果、死細胞や赤血球、酵素処理が十分にされていない細胞間物質が多く混入していた。細胞液をナイロンメッシュでろ過をして酵素処理不足の細胞間物質を取り除き、細胞ろ過後に遠心し細胞をリンスすることにより死細胞や赤血球を取り除く工程を取り入れた。

## プロトコールⅢ

### (3)脱血

事前にウォーターバスで 37 °C に温めておいた 0.05 % コラゲナーゼ液 10 ml をカニューレセットに入れた。そして、コラゲナーゼ液を約 5 分かけて注入した。

#### (4)酵素処理

灌流の終了した肝臓を取り出し、0.02 %EDTA/HANKS 液を 1 ml 入れて氷上に置いたガラスシャーレに移し、メスで細分した。コラゲナーゼ液を 10 ml 加え、37 °Cのインキュベーター内で1時間反応させた。酵素処理の終了したマウス肝臓に、ダルベッコ変法イーグル培地を 10 ml 加えてコラゲナーゼ反応を止めた。

#### (5)細胞の篩い分け

肝臓懸濁液をファルコンチューブにセットした 105T のナイロンメッシュを通過させ、その上から、PBS (-)を 5 ml ほど流した。別のチューブに 270T のナイロンメッシュをセットし同様に肝臓懸濁液を通過させ、その上から、PBS (-)を 5 ml ほど流した。

(1)マウスの開腹、(2)カニューレの挿入、(6)細胞の洗浄、(7)細胞を撒く、以上の手順はプロトコールⅡと同様に行った。

・プロトコールⅢの問題点及び改善点

(3)脱血の後、細分するためメスを入れた際内部から細胞間物質を消化された肝細胞が流れ出てこなかったため、灌流中に酵素処理が行われていないと思われた。プロトコールⅣでは、コラゲナーゼを流さず HANKS 液のみを流し脱血を行った。

(4)酵素処理の後検鏡すると、酵素処理が十分でない細胞間物質と思われる雑物が多く見られた。プロトコールⅣでは、雑物をより消化させるため酵素処理の際、EDTA を加えずにコラゲナーゼ溶液を加えスターラーで攪拌した後、さらにコラゲナーゼ溶液、トリプシン溶液及び EDTA 溶液を加え攪拌しながら酵素処理を行った。

(5)細胞の篩い分けは、より細胞を分けるためにセルスクレーパーを使用することとした。

#### プロトコールⅣ

#### (3)脱血

ハンクス液 10 ml を約 5 分かけてカニューレセットで流して灌流し脱血した。

#### (4)酵素処理

灌流の終了したマウス肝臓を摘出し、ディッシュに入れた PBS (-)で 2 回洗浄した。その後、氷上のガラスシャーレに移し、肝臓の乾燥を防ぐため HANKS 液 1 ml を入れ、メスを使い肝臓を細分させた。肝臓を細分後、コラゲナーゼ溶液 200  $\mu$ l を加え、37 °Cに設定したインキュベーター内でスターラーを使い攪拌しながら 30 分間反応させた。その後、コラゲナーゼ溶液 160  $\mu$ l、0.25 % トリプシン溶液 16 ml 及び EDTA 溶液 30  $\mu$ l を加え、さらに 1 時間反応させた。

#### (5)細胞の篩い分け

酵素処理の終了したマウス肝臓に、ダルベッコ変法イーグル培地を適量加えてコラゲナーゼ反応を止めた。肝臓懸濁液をファルコンチューブにセットしたセルストレーナーを通し細胞をろ過させた。セルストレーナー内に残った肝臓片を注射器のシリンジのゴム部分で擦り、ダルベッコ

変法イーグル培地を加え細胞をろ過した。

(1)マウスの開腹、(2)カニューレの挿入、(6)細胞の洗浄、(7)細胞を撒く、以上の手順はプロトコールⅢと同様に行った。

プロトコールⅣで採取した細胞ディフクイック染色を行い検鏡したところ、各種コーティングディッシュで図5のように細胞が接着した。

ポリ L-リシンコートを行ったディッシュに初代肝細胞が多く接着していた。

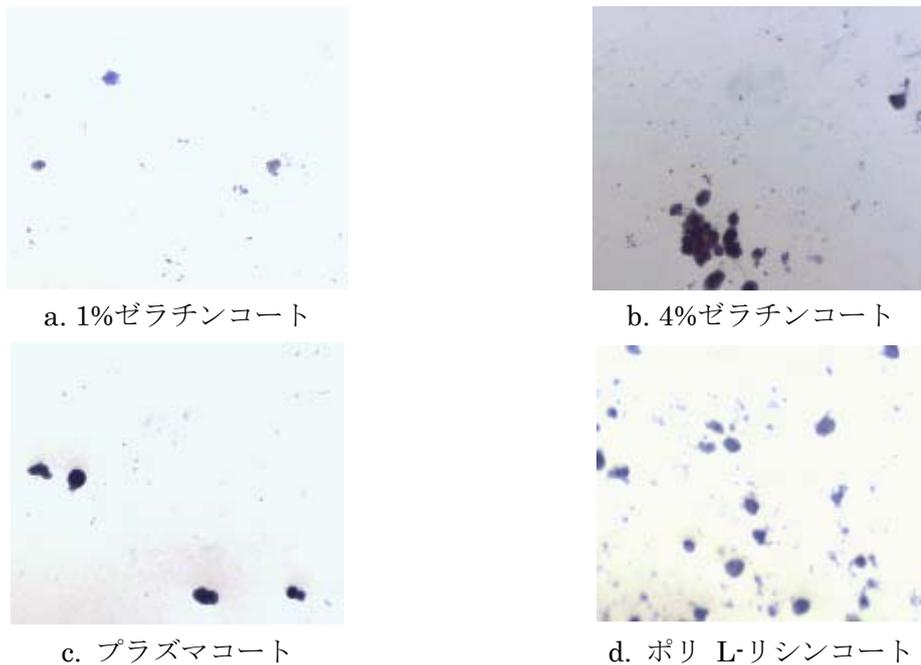


図5 各種コートディッシュに接着したマウス初代肝細胞

#### 第四項 小括

以上の結果から、今回の実験では、マウス初代肝細胞にポリ L-リシンに対して特異的に接着する傾向がみられた。

最終的なプロトコールでも細胞懸濁液に雑物が含まれていた事から、さらなるプロトコールの改良が必要であると考えられる。

本研究ではマウス初代肝細胞を使用したけど、他の臓器の細胞を使用する場合はまたコーティング剤の検討が必要となることが考えられる。コーティング剤の検討するにあたり、本研究の系を使うことが有効である。

## 第二節 スライドガラスを使った評価

### 第一項 緒言

本研究では、肝臓の初代培養細胞の機能を探索する目的で、スライドガラス上に 30,000 個の培養ウェルを持つ超高密度多孔式スライドガラスの開発を目指している。本章では、操作の簡便のため、カバーガラス上に 100 個の孔を持つ試作品を作成した。この培養器具を用い、細胞培養が可能であるか検討を行った。

### 第二項 材料と方法

#### 材料

100 ウェル培養カバーガラス： ポリカーボネート製のカバーガラス上に、100 個の培養ウェル [50  $\mu$  m (口径)  $\times$  50  $\mu$  m (深さ)] を持つ培養器具を作成した。

HeLa 細胞： 第二章の方法で培養を行った。

マウス初代肝細胞： 第三章の方法により、マウス肝臓から初代細胞を調整し、培養を行った。

#### 方法

100 ウェル培養カバーガラスに、ポリ L-リシンでコート処理を行った。その後、カバーガラス上に HeLa 細胞または初代肝細胞の 10% FBS 入り DMEM 培地懸濁液を滴下し、セルスクレーパーを用いて細胞を孔の中に導入した。細胞の写真撮影には、ライトギムザ染色を行った後、CCD カメラ (オリンパス) を用いた。

### 第三項 結果

培養の結果、それぞれ HeLa 細胞およびマウス初代肝細胞ともに、100 ウェル培養カバーガラスの孔内に接着することを確認した。実際に、接着した細胞を図 6 に示した。マウス初代肝細胞では (図 6 a)、1 個の肝細胞が 1 つの孔内に接着した。一方、HeLa 細胞では (図 6 b)、1 つの孔内に複数の細胞が接着した。



a. マウス初代肝細胞



b. HeLa 細胞

図 6 100 孔カバーガラスの孔に接着した細胞

#### 第四項 小括

本章では、 $50\mu\text{m}$ （口径） $\times 50\mu\text{m}$ （深さ）の孔内にて、マウス初代肝細胞および HeLa 細胞を培養することに成功した。この結果は、超高密度多孔式スライドガラスが、実用可能であることを示している。しかしながら、セルスクレーパーを用いて孔内に細胞を封入した場合、多くのウェルで封入される細胞数にばらつきが認められた。したがって、超高密度多孔式スライドガラスを用いる細胞の継代には、今後の検討課題である。

## 第四章 総合討論

本研究では、肝臓の初代培養細胞の機能を探索する目的で、スライドガラス上に 30,000 個の培養ウェルを持つ超高密度多孔式培養スライドガラスの開発を試みた。

第二章第一項では、HeLa 細胞を用いた接着試験において、未処理のディッシュでは、コーティング処理を行ったディッシュと比較し、細胞の接着は減少傾向にあった。この結果から、ポリ L-リシン、コラーゲン、ゼラチンなど今回用いたコーティング剤に関し、HeLa 細胞の接着性を向上させると考えられた。今後の課題として、実験を重ねることにより、正確な数値を取得する必要がある。また、第二章第二項の増殖試験の結果では、今回使用した全ての条件において、コーティング未処理を含め、各種コーティング剤でも HeLa 細胞は問題なく増殖していく傾向となった。従って、少なくとも HeLa 細胞を用いた場合、各種コーティング剤の細胞毒性はないものと推察された。

第三章では、マウスの肝臓より初代肝細胞を取得した。HeLa 細胞の結果とは異なり、接着性を評価する実験では、ポリ L-リシンコートをしたディッシュにおいて、最も良好な細胞接着を観察できた。このことから、生体組織の初代培養を取得した場合、細胞種に応じて異なるコーティング剤を評価する必要がある。

第四章では、100 ウェル培養カバーガラスを用いた試行実験により、HeLa 細胞および初代肝細胞を用いて、極小培養ウェル（口径 50  $\mu\text{m}$ ）内での細胞接着および培養に成功した。この結果は、超高密度多孔式培養スライドガラスが実際に実用可能であることを示している。問題点として、全てのウェルに細胞を封入することが困難であったため、今後の検討課題として、培養ウェル内への細胞封入手法を検討する必要がある。

以上、本研究では超高密度多孔式培養スライドガラスの導入に関し、「各種コーティング剤の評価方法の構築」と、スライドガラスを用いた生体内細胞の評価を目的とした「初代肝細胞取得系の構築」を行った。また、100 ウェル培養カバーガラスによる試行実験により、「超高密度多孔式培養スライドガラスを用いた細胞実験系」の可能性を、一部示すことができた。

将来的に、培養スライドガラスが実用化された場合、細胞単離の手順の簡易化、また実験の省スペース化が期待される。また、多種多様な生体内細胞群を培養スライドガラスの孔に入れ、組織特異的な創薬を目的とした、各種候補薬剤の細胞応答を網羅的に探索することが可能となる。さらに、本研究を浮遊系細胞に応用し、白血病の研究など多彩な場面での活用が期待される。

本研究の意義は、近年、飛躍的な技術革新として認知されている DNA マイクロアレイなど染色体レベルでの網羅的解析系を受け、細胞レベルでのバイオ研究の発展に、大きく寄与する可能性を示すものである。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、過分なご指導ご鞭撻を賜りました 藤木亮次 先生に心より感謝いたします。また、有益なご意見を頂きました 初瀬怜 先生および三澤龍太郎 先生に厚く御礼申し上げます。

日ごろより、暖かい励ましを頂きました東京バイオテクノロジー専門学校 青山慶子 先生、坂本拓也 先生および吉村まふみ 先生に深く感謝いたします。また、研究を円滑に進めるにあたり、多大なるご協力を賜りました東京バイオテクノロジー専門学校 大井康隆 先生、金乙美 先生および小室真保 先生に厚く感謝いたします。

本研究に用いた実験材料をご供与頂きました、東洋ガラス株式会社 佐々木光雄氏に心より御礼申し上げます。

最後に、学校生活を通じて暖かい励ましを下さいました、両親に心より感謝申し上げます。