

Title	肝障害時の肝機能代替に関する組織工学的研究
Author(s)	東山, 真二
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44132
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

肝障害時の肝機能代替に関する
組織工学的研究

2003年

東山真二

肝障害時の肝機能代替に関する
組織工学的研究

2003年

東山真二

目次

序論	1
本論	5
第1章 肝星細胞との共培養による肝実質細胞の機能維持	5
第1節 緒言	5
第2節 実験方法	7
第3節 結果と考察	11
第1項 アルブミン分泌能への影響	11
第2項 混合培養における肝実質細胞DNA合成能への影響	11
第3項 ウレア合成能への影響	12
第4項 肝星細胞のconditioned mediumによる検討	13
第5項 筋線維芽細胞のconditioned mediumによる検討	14
第4節 小括	16
第2章 複合リガンド修飾デンドリマー上での肝機能維持	17
第1節 緒言	17
第2節 実験方法	20
第3節 結果と考察	25
第1項 新表面修飾法の開発	25
第2項 フルクトースデンドリマー上での肝スフェロイド形成	26
第3項 F/Gデンドリマーによる肝スフェロイドの固定	26
第4項 リガンド修飾デンドリマーの肝実質細胞への影響	28
第5項 HSP60、70の発現	29
第6項 リガンド修飾デンドリマーの肝実質細胞機能への影響	31
第7項 F/Gデンドリマーを用いた肝星細胞の共培養	32
第4節 小括	34
第3章 生体内異所性肝組織の構築	35
第1節 緒言	35
第2節 実験方法	37
第3節 結果と考察	39
第1項 多孔質ヒドロキシアパタイトディスクによる肝実質細胞の培養	39
第2項 遠心法による肝実質細胞高密度培養	40
第3項 IP200における血管新生	40
第4項 IP200を用いた肝実質細胞移植による血清アルブミン濃度上昇	41
第5項 IP200の表面修飾	42
第4節 小括	43
総括	44
結論	46
謝辞	47
引用文献	48

序論

肝臓は、各種化学物質の代謝と解毒および血漿タンパク質、血液凝固因子、コレステロールなどの生命維持に不可欠な物質の生産を司るなど、複雑な臓器である。そのため、その機能が何らかの原因で正常に機能しなくなり、急性肝不全になったとき、血液や組織中に肝不全起因物質の蓄積をもたらす、精神神経症状(肝性脳症)、黄疸、腹水などの致死的な症状に陥る[1]。

日本ではC型肝炎を始め肝疾患を患う人数の増加は深刻であり、E型肝炎ウイルスや各種薬剤被害など、新たな肝疾患の原因も次々と報告され、改めて肝疾患治療、特に重篤な患者に対する治療方法が切望されている[2]。

これまで、肝不全時の療法として主に解毒機能の補助を目的に活性炭や、半透膜を用いての毒性物質の除去と血漿交換を組み合わせた治療法が一般的に行われてきた。しかしこれらの方法では肝不全起因物質の除去は完全に出来るものでなく、急性肝不全では従来の治療法でも救命率の改善が見られるが、特に亜急性型や劇症化した肝炎における救命率を十分に改善させることは不可能であった。上記の理由により現在は肝移植が最も有効な治療法であるとされる。劇症肝炎に対する肝移植は治療技術や免疫抑制剤の進歩により成功率は上昇しており、移植後生存率は一年以上にわたり良好であると言われている。しかしながら、これまでに行われてきた生体肝移植に加えて、臓器移植法が施行された現在においても、レシピエントの需要数を満たしていない。またこのようなドナー不足は移植治療数が多い欧米でも起こっており、いわゆる臓器提供待ちの患者の多くが肝移植を受けることすらできないことは世界中変わらない状況である。また、肝移植を行った後、患者は一生免疫抑制剤を用いなければならない問題が生じ、移植が最善の治療法であるとは言い難い。これらの理由から、肝移植に変わって救命率を上昇させる治療法の開発が急務となっている。

近年人工心臓を始めとした、人工臓器の開発が盛んに行われており、肝臓においても新たな治療法として現在その開発が行われている。しかし、肝臓は多岐に渡る機能を有する非常に複雑な臓器であり、人工材料のみを用いての開発には限界が生じる。そこで、肝臓の多岐の機能を代行させるため生体の肝臓を何らかの形で用い、これと人工材料を組み合わせたいわゆるバイオ人工肝臓の研究が行われている。バイオ人工肝臓は患者の血液を体外に循環させ、血漿分離を行い、リアクター中に血漿を通し、リアクター中の肝細胞に肝機能の

代替を行わせる装置である。そのため、バイオ人工肝臓はこれまでに救命率の改善が見られない亜急性型や、劇症化した場合において有効であると考えられる。このようなバイオ人工肝臓の開発には、1)どのような組織・細胞をもちいるか[3,4]、2)肝細胞の機能を治療の期間中維持させるか[5]、の大きく2つの問題点がある。

これまでに人工肝臓に用いる生体材料として異種、主にヒヒからの摘出肝臓[6]、肝スライス[7]、肝抽出酵素を包括固定化したものや細胞そのものを用いた研究が広く行われている。摘出肝や肝スライスは材料としては、非常に不安定で用いにくい、抽出酵素は活性が低いといった欠点を有しており、Seglen[8]らによってコラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を高いviabilityで回収する方法が確立されたこともあって近年では肝実質細胞を用いた研究が主流となっている。これまでに、動物から取り出した肝実質細胞、ヒト由来株化肝細胞を用いた研究が行われている。株化細胞はヒト由来の細胞であり、免疫学的問題を軽減することが可能である。また、増殖するため、調達が容易であるという利点がある。そのため、実際に人工肝へ臨床応用も行われている[9]。しかしながら株化細胞であるがゆえに、細胞が脱分化をおこしており、細胞あたりの肝機能が低くなる。比較的機能が高い細胞でも、全ての機能が維持されているわけではなく、部分的な機能欠如は避けられない。また、増殖制御が困難であり、バイオ人工肝臓リアクター中という閉鎖的な空間において細胞増殖により栄養因子が十分に行き渡らない問題が生じる。

一方、肝実質細胞は取り出したあとしばらくは*in vivo*とほぼ同様の高い機能を有していると言われており、実際には細胞が大量に回収できるブタ肝実質細胞がよく用いられている。しかし、異種由来の肝実質細胞であるため、拒絶反応等を考慮する必要がある。そのため免疫隔離の問題が生じてくるが、hollow fiberを用い、肝実質細胞の培養を行う部分と血漿を流す部分とを小孔でのみ接触させることで回避されると考えられている。つまり、免疫グロブリンの平均分子量が、15万から19万であり、実際にはhollow fiberのポアサイズを分子量が5万から10万にすることで免疫反応は回避される。また、肝実質細胞をアガロースゲルなどで包括固定することで免疫回避を行っている場合もある。

ところで、培養細胞をバイオ人工肝臓に用いるためには100億個以上の肝細胞が必要となる[10]。しかしながら、肝実質細胞は*in vitro*ではほとんど増殖せず、さらに通常の培養法では数日のうちに、その活性が低下することが知られており、機能維持のため、培養方法、培養基材の開発が進められている。

肝実質細胞は三次元培養を行うことで高密度培養が可能であるため、三次元担体を用いる方法を始めとした培養法が検討されている。また、旋回培養などの特別な培養法を用いることにより、スフェロイドと呼ばれる肝実質細胞の凝集体が形成される。スフェロイドは比較的肝機能が良好であることから、様々な方法を用いてのスフェロイド作成が行われている[11]。

これまでに、肝実質細胞と肝非実質細胞とを混合培養することで、肝非実質細胞が生産する細胞間基質様の物質や液性因子により肝実質細胞の増殖能や肝機能を高めるとの報告があり[12,13]、バイオ人工肝臓への応用が期待されている。しかし、バイオ人工肝臓へ応用する際、リアクター内の体積は限られているため、数種類の細胞を含むcrudeな肝非実質細胞群から効果のある細胞種を選択することが重要となる。

肝非実質細胞のひとつである肝星細胞はdisse腔に存在し、容積では肝臓の1.4~1.9%、細胞数では5~8%を占める。正常肝の肝星細胞はビタミンAを含む脂肪滴を有しその増殖は穏やかであるが、傷害肝中や単離した肝星細胞は活性化し、筋線維芽細胞に形質転換する。また、肝星細胞は細胞外マトリックスを産生し、transforming growth factor (TGF) $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ 、hepatocyte growth factor (HGF) 等の生理活性物質についても産生することが報告されている[14,15,16]。そこで、第1章において肝非実質細胞の中でも、特に肝星細胞に注目し肝実質細胞と肝星細胞の共培養について検討した。

培養基材の検討ではポリウレタンフォーム(PUF)上でスフェロイドを作成[17]、ポリビニルホルマール(PVF)[18]、セルロース製の多孔質担体上で、肝実質細胞の培養法が検討されており、良好な結果が得られている。日本では、まだ、ヒトに対する検討を行っていないが、動物実験では良好な成績を残している[19,20]。また、アメリカではCirce Biomedical社によって、ブタ肝実質細胞を用いたhollow fiberによる人工肝臓システムであるHepato Assist[®]が開発されている。このシステムは既に安全性試験が終了し、生存期待値が20%以下の重篤患者に適用されている。

以上のように、バイオ人工肝臓に肝実質細胞を用いるために様々な培養材料が用いられてきた。しかしながら培養材料の開発においては細胞に対する生体適合性が重要視され、材料表面に機能を付加するような検討はこれまではあまり行われてこなかった。また近年、人工肝臓以外にも生体材料と人工材料を用いるバイオ人工臓器の開発も始められており、このような人工臓器に用いる細胞の培養材料の必要性が高まる中、有効な

培養材料の開発が更に重要な課題になっている。このような培養材料の開発に従来の生体適合性のみの検討では、大きな成果を得られるとは考えられない。そこで我々は人工肝臓を含む人工臓器の培養材料に生理活性物質を固定化するという方法を用い、これまでの培養材料では得られない、高い機能が付加されると考えられる培養材料の開発を行うことにした。

我々は、生理活性物質を固定化した培養基材である、機能性培養基材の開発を行ってきた[21,22]。これまでに、樹木状多分岐高分子である dendrimer を培養基材に光反応により固定化し、末端のアミノ基にリガンドとしてフルクトースを修飾したフルクトース dendrimer を用い、肝実質細胞の初期生着数の維持およびアポトーシスの抑制に対する効果を報告してきた。そこで、第2章では dendrimer の基材表面への固定化法を改良し、dendrimer を高密度に固定化することにより、肝実質細胞の生着あるいは肝特異的機能の維持について検討した。

一方、一時的な肝機能代替を行う方法として、バイオ人工肝臓が生体外で組織構築を行うのに対して、単離した肝細胞を再び生体内で組織構築する方法についても検討されている。これまでに、単離した肝実質細胞を脾臓に移植することで、一部の肝実質細胞が脾臓内で生着したことが報告されている[23]。しかし、生着細胞数は十分ではなく肝機能代替までには至っていない。そこで、第3章において、これまでに行ってきた肝実質細胞 scaffold の研究から、肝実質細胞を播種した3次元担体をラット腹腔内に移植し、生体内異所性肝組織の構築について検討した。

本論

第1章 肝星細胞との共培養による肝実質細胞の機能維持

第1節 緒言

肝臓は、総細胞数の約70%を占める実質細胞と約30%の非実質細胞から成る。肝非実質細胞は肝実質細胞に比べ極めて小型であり、その大きさは分離直後の球形細胞と比較して、肝実質細胞のほぼ 1/3 ~1/5 である。

肝非実質細胞には胆管上皮細胞や類洞壁を形成する血管内皮細胞、肝星細胞(伊東細胞)、クッパー細胞、そして結合組織の線維芽細胞の 5 種類がある。肝臓は肝実質細胞同士の相互作用に加えて肝組織を構成する肝非実質細胞との相互作用によって同心円状の肝小葉を形成し機能的には多くの肝特異的機能や増殖能が巧みに調節されている。

*In vivo*において、肝実質細胞は肝非実質細胞との間に直接の細胞間接触を形成しない。そして、両細胞間の相互作用はお互いが合成分泌した細胞外マトリックスを介して行われる。肝小葉における肝実質細胞の列である肝実質細胞索の間の毛細血管が類洞(sinusoid)である。この sinusoid における肝実質細胞と血管内皮細胞との間のスペース(disse 腔)は肝実質細胞や内皮細胞、肝星細胞が合成分泌したコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンからなる細胞外マトリックスの網目構造で満たされている。肝組織には基底膜という構造は存在しないが、disse 腔の細胞外マトリックスが多くの組織で見られる基底膜に相当すると考えられる。そして、肝実質細胞は disse 腔で細胞外マトリックスの網目構造に接しており、この網目構造を介して肝実質細胞の多くの機能が肝非実質細胞からの影響を受けているものと考えられる。

成熟ラット肝実質細胞の DNA 合成はインスリン、EGF(epidermal growth factor)、HGF(hepatocyte growth factor)などの増殖因子が存在しないと起こらない。ところが、成熟肝実質細胞を肝非実質細胞と混合培養すると、増殖因子をまったく含まない培地中でも多くの肝実質細胞が DNA 合成を開始することが報告され

た[24]。また、当研究室でも肝実質細胞と肝非実質細胞との混合培養において肝非実質細胞の混合量の増加に従って、肝特異的機能のひとつである TAT 誘導能の促進が見られ、肝実質細胞と肝非実質細胞の混合培養が良好な肝機能発現に有効であることを示した[25]。しかし、バイオ人工肝臓に応用する際、リアクター内の体積は限られているため、数種類の細胞を含む crude な肝非実質細胞群から効果のある細胞種を選択することが重要となる。

肝非実質細胞のひとつである肝星細胞は細胞外マトリックスを産生し、transforming growth factor (TGF) $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor (TNF)- α 、HGF 等の生理活性物質についても産生することが報告されている[14,15,16]。そこで、肝非実質細胞の中でも、特に肝星細胞に注目し肝実質細胞と肝星細胞の共培養について検討した。

第2節 実験方法

第1項 ラット肝実質細胞の単離および調製

Sprague Dawley 系雄性ラット(体重、150~250g)を用い、Seglen のコラゲナーゼ灌流法を基本とし、肝実質細胞を単離した[8]。動物実験は大阪大学大学院薬学研究科動物実験指針に沿って行った。50 × g、1 分間の遠心により得られた沈殿を肝実質細胞画分とし血球計算盤を用いて細胞数を算出した。トリパンプル一色素排除法により生存率を測定し、生存率 90%以上の細胞を実験に使用した。ウイリアムス E 培地に 100IU/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシン、100ng/mL アプロチニン、50ng/mL アムホテリシン B 液を添加した基本培地 (HFSF) へ 10% 牛胎児血清 (FBS)、 10^{-9} M デキサメタゾン、 10^{-9} M インシュリンを添加した培地 (IDSA) を使用し、37°C、5%CO₂ 下で培養を開始した。

第2項 星細胞の単離および調製

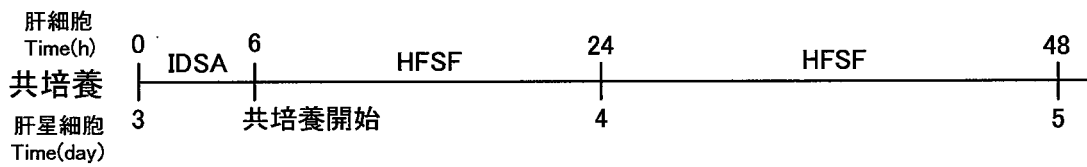
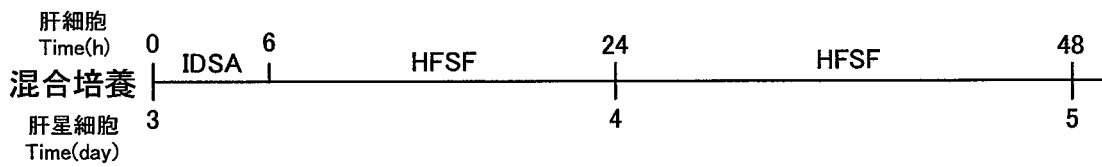
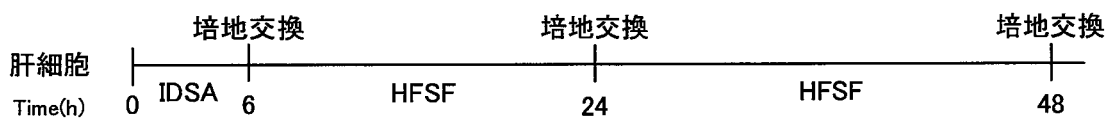
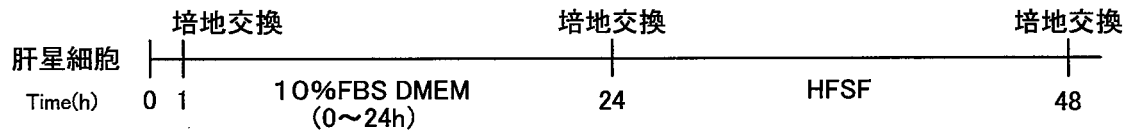
Sprague Dawley 系雄性ラット(体重、300~350g)を用い、Kawada らのコラゲナーゼ/プロナーゼ消化法に従い、肝星細胞を単離した[26]。

第3項 細胞の培養方法

単離した肝実質細胞を細胞培養用プレートに 1×10^5 cells/cm² の密度で播種した Control、肝星細胞を細胞培養用プレートに 2×10^5 cells/cm² の密度で播種し数日培養後、その上から肝実質細胞を 1×10^5 cells/cm² の密度で播種した混合培養、およびカルチャーインサート上に肝星細胞を 2×10^5 cells/cm² の密度で播種し数日培養後、細胞培養用プレートに 1×10^5 cells/cm² の密度で播種しておいた肝実質細胞とで、細胞間接触を伴わない共培養を行った。

肝星細胞は培養 24 時間目までは 10%FBS 添加 DMEM で培養を行い、その後は HFSF で培養を行った。肝実質細胞培養 6 時間目までは混合培養についても IDSA で培養を行い、その後は HFSF で培養を行った。混合培養と共培養の条件を整えるため、共培養のためカルチャー上で培養した肝星細胞についても

6時間IDSAで培養を行った後に培地交換をし、共培養を行った。肝実質細胞の培養2日目から6日目までは培地交換を行わず、培養6日目に各 assay を行った。



第4項 アルブミン分泌能の測定

肝実質細胞の培養上清と rat albumin standard (1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を ELISA 用 96 穴プレートに 50 μL ずつ添加し、4°Cで一晩放置してアルブミンをプレートの底に吸着させた。次に溶液を捨て、1%ゼラチンを含む PBS を加えて室温で 2 時間放置してブロッキングを行った。0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後、peroxidase 標識付き抗ラットアルブミン抗体を 100 μL ずつ添加し、室温で 2 時間静置後アルブミンと結合させた。その後、0.05% Tween 20 を含む PBS で 5 回洗浄した。調製した反応液を 200 μL ずつ添加して直ちに遮光し、そのまま約 10 分間静置した。10 分後、反応液がおおよそ橙色に発色しているのを確認し、そこで 6N HCl を 50 μL ずつ添加して反応を停止させた。プレートリーダーで ABS (492/655) を測定した。

第5項 DNA 合成能の測定

BrdU(終濃度 40 μM)を24時間前に培地に添加しておく。細胞を100%エタノールで浸し冷凍庫で 15 分間固定した。次に PBS で3回(5分/回)洗浄、DNA の二重鎖を解きほぐすため2規定以上の塩酸に30分室温で浸した。次に PBS で3回(5分/回)洗浄、内因性のペルオキシダーゼをブロックするため0.6%過酸化水素水を(100%メタノール:過酸化水素水原液=49 ml:1 mlの割合)室温で30分間反応させた。次に PBS で3回(5分/回)洗浄、非特異的反応のブロッキングを行った。次に1次抗体(抗 BrdU 抗体 200倍希釈)を室温で1時間反応させた後、2次抗体(ABCkit blue label)を室温30分間反応させた。最後に VECTASTAIN Elite ABC Reagent(ABCkit gray label)を室温で30分間反応させた。染色には DAB を用い約 10 分後、冷水にて反応を停止させた。BrdU 陽性細胞は茶褐色に染色されており、顕微鏡下で1視野ごとに全細胞数に対する BrdU 陽性細胞を係数し、その割合を BrdU Labeling Index(BrdU L. I.)とした。また、1サンプルにつき3視野、1条件につき3サンプルの測定を行った。

第6項 ウレア合成能の測定

肝実質細胞の培養上清を回収し、ジアセチルモノオキシム法[27]により測定した。

第7項 肝星細胞 conditioned medium の作成

肝星細胞を 2×10^5 cells/cm² の播種密度で培養し、培養3日目から7日目まで培地交換を行わず、この時得られた培養上清を回収、濾過滅菌後、肝実質細胞の培養2日目から6日目に培地として用いた。コントロールには HFSF 培地を用いた。

第8項 MFB conditioned medium の作成

MFB を 1×10^4 cells/cm² の密度で播種し5日間、10%FBS 添加 DMEM で培養した。HFSF に培地交換後、48 時間までの培地を MFB conditioned medium とした。肝実質細胞培養2日目から6日目まで MFB conditioned medium により培養し、細胞計数およびウレア合成能の測定を行った。

第3節 結果と考察

第1項 アルブミン分泌能への影響

細胞間接触を伴う混合培養、細胞間接触を伴わない共培養を行い、肝特異的機能のひとつであるアルブミン分泌能について検討した。

Fig.1 に培養6日目のアルブミン分泌能についての結果を示した。細胞間接触を伴う混合培養においては、コントロールに比べてアルブミン分泌能は低い値となった。それに対して、細胞間接触を伴わない共培養においてはコントロールに比べて2倍以上の高いアルブミン分泌能を示した。

今回、混合培養における生着細胞数を測定したが、トリプシンにより剥がした細胞は、顕微鏡下でも、肝実質細胞と肝星細胞との判別がつかないため、正しい肝実質細胞数は測定できなかった。しかし、肝星細胞は種々の細胞外マトリックスを分泌することから、混合培養において細胞外マトリックス上に多くの肝実質細胞が生着していたと考えられた。

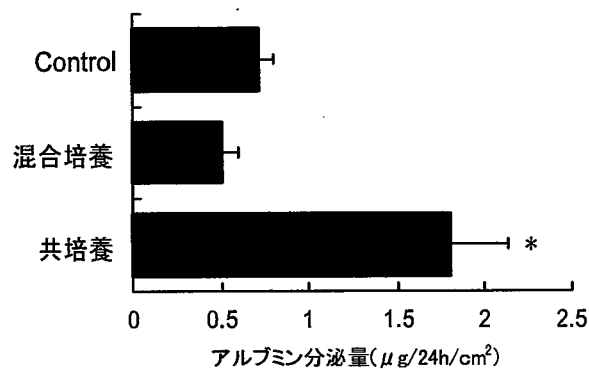


Fig. 1. 共培養におけるアルブミン分泌能維持

ラット肝細胞単独培養(Control)、ラット肝星細胞を播種し数日培養後、その上からラット肝細胞を播種した混合培養、およびカルチャーインサートを用いて細胞間接触を伴わない共培養を行った。培養6日目に培養上清中のアルブミン濃度をELISA法で測定した。エラーバーは標準偏差、Control、共培養との有意差 * $P < 0.05$

第2項 混合培養における肝実質細胞 DNA 合成能への影響

混合培養の際、肝実質細胞は DNA 合成能を亢進するとの報告があることから、次に混合培養における DNA 合成能を測定した。従来、増殖細胞の検出には、重水素標識チミジンの取り込み量から定量されてい

たが、今回はチミジンのアナログである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を用い、細胞内 DNA に取り込まれた BrdU を抗 BrdU 抗体による免疫細胞染色 (BrdU L. I.)により検出した。

Fig.2 に培養6日目の BrdU L. I.を示した。細胞間接触を伴う混合培養では、コントロールに比べ BrdU 陽性細胞が多く、増殖能に優れていることを確認した。肝星細胞はコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスを合成分泌するため、混合培養ではこれら細胞外マトリックス上の肝実質細胞が S 期に入り細胞増殖は亢進されるが、前項より細胞機能については維持されないことが示された。したがって、バイオ人工肝臓に用いるためには肝実質細胞の機能を維持することが重要であり、混合培養は適さないことが明らかとなった。

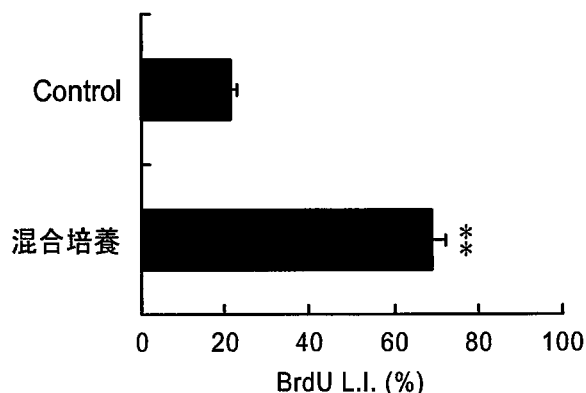


Fig.2. 混合培養によるDNA合成能亢進

ラット肝細胞単独培養 (Control)、ラット肝星細胞を播種し数日培養後、その上からラット肝細胞を播種した混合培養を行った。培養5日目から24時間、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) を培地に添加し、増殖細胞に取り込まれたBrdUを免疫細胞染色により検出した。顕微鏡下で全細胞数に対するBrdU陽性細胞の割合をBrdU L. I.とした。エラーバーは標準偏差、**P<0.01

第3項 ウレア合成能への影響

共培養において肝特異的機能のひとつであるアルブミン分泌能が維持されていたことから、異なる指標として別の肝特異的機能の測定を行った。

血中アンモニアの増加は脳への移行を招き、肝性脳症の主原因の一つであることが知られている。したがって、バイオ人工肝臓としてはこのような有害なアンモニアの除去が最も重要な機能の一つであると考

えられる。そこで、重要な機能であるウレア合成能を測定し、肝機能の評価を行った。

Fig.3に培養6日目における共培養の生着細胞数およびウレア合成能を示した。細胞数の計測はトリパンブルー排除法により行った[28]。生着細胞数に関してはコントロールと差がなく低い値となったが、ウレア合成能はアルブミン分泌能と同様に、共培養したときにコントロールに比べて2倍以上の高い値を示した。肝星細胞は *in vitro* においても、種々のサイトカイン類を分泌する。通常、培養期間を経るにしたがい肝星細胞は活性化し、分泌するサイトカインにも変化が現れる[15]。今回、共培養による結果から肝星細胞の分泌する液性因子が肝特異的機能維持に関与すると考えられたが、その液性因子が肝星細胞単独培養の時に分泌されるのか、あるいは肝実質細胞と肝星細胞が何らかのシグナルのやりとりをすることによって初めて分泌されるのかは不明である。

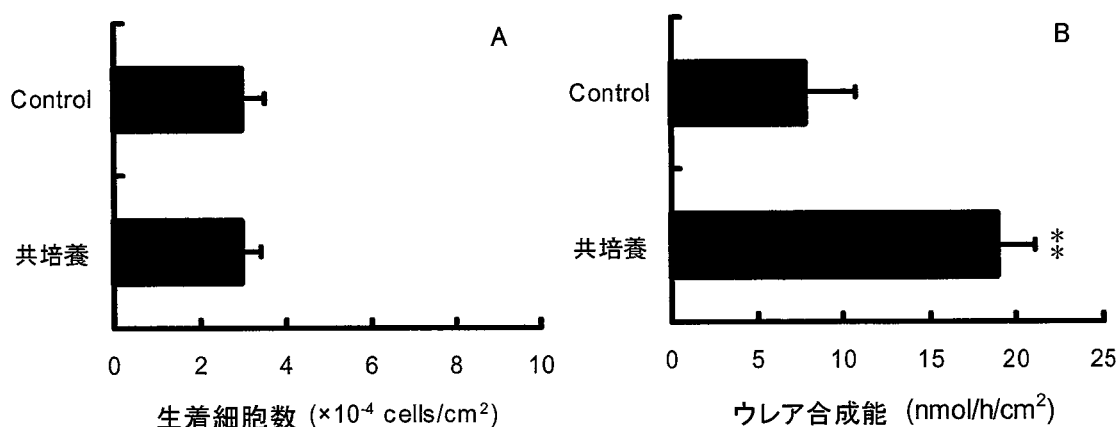


Fig. 3. 共培養によるウレア合成能維持

ラット肝細胞単独培養 (Control)、ラット肝星細胞を播種し数日培養後、カルチャーインサートを用いて細胞間接触を伴わない共培養を行った。A:培養6日目にトリパンブルー色素排除法で生着細胞を測定した。B:培養6日目にジアセチルモノオキシム法によりウレア合成能を測定した。エラーバーは標準偏差、**P<0.01

第4項 肝星細胞の conditioned medium による検討

細胞間接触を伴わない共培養において肝実質細胞の機能が維持されることから、肝星細胞の分泌する液性因子が肝機能維持に関与すると考えられた。したがって、肝星細胞の conditioned medium を用いて肝実質細胞の培養を行い、ウレア合成能の測定を行った。

Fig.4に培養6日目のウレア合成能を示した。肝星細胞 conditioned medium においても共培養と同じく、

培養6日目における生着細胞数についてはコントロールと差がなく低い値を示したが、ウレア合成能に関してはコントロールより高い値を示した。したがって、肝星細胞が肝実質細胞との相互作用によって肝特異的機能維持に関与する液性因子を分泌するのではなく、肝星細胞単独で分泌する液性因子が肝機能維持に関与することが明らかとなった。

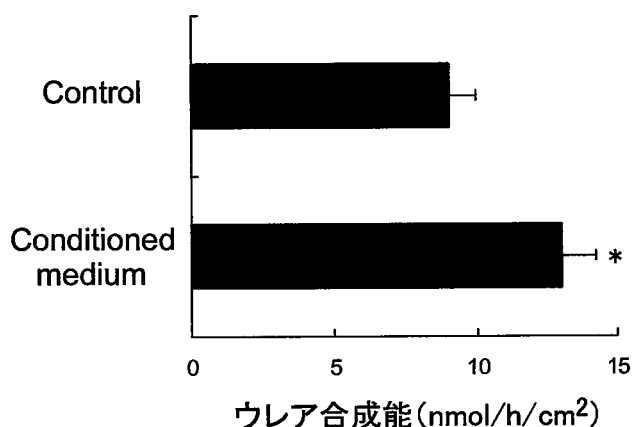


Fig.4. 肝星細胞のconditioned mediumによるウレア合成能維持

ラット肝細胞培養6日目にジアセチルモノオキシム法によりウレア合成能を測定した。HFSF培地による培養(Control)、ラット肝星細胞のconditioned mediumによる培養。エラーバーは標準偏差、*P<0.05

第5項 筋線維芽細胞の conditioned medium による検討

肝星細胞は10%血清存在下で培養を続けると活性化し、継代培養可能な筋線維芽細胞(MFB)に形質転換する。また、MFBは *in vivo* において肝線維化を引き起こす細胞であり、肝実質細胞に障害を与える[29]。しかし、実際にバイオ人工肝臓に肝星細胞を適用する際、肝星細胞を大量に確保することは困難である。したがって、この MFB を肝星細胞の代替細胞として用いる検討を行った。

これまでに、MFB を I 型コラーゲンゲル上で培養すると形質転換前の形態を示すとの報告がある[30]。そこで、I 型コラーゲンゲル上で MFB を培養した。

I 型コラーゲンゲル上で MFB を培養したところ、細胞形態は丸く、増殖も抑制されていた。Fig.5 に培養6日目の生着細胞数およびウレア合成能を示した。生着細胞数では I 型コラーゲンゲル上で培養した MFB の conditioned medium (MFB conditioned medium)を用いた時にコントロールと差がなかった。一方、ウレ

ア合成能は、単位面積あたりでは、コントロールの約 2 倍の高い値を示した。MFB は TGF- β を分泌し、オートクライン的に自らを活性化するのみではなく、肝実質細胞にも障害を与える[29]。今回、MFB を I 型コラーゲンゲル上で培養することで、活性化を抑制された形質転換前の肝星細胞に近い形態をとった。したがって、MFB を I 型コラーゲンゲル上で培養することによって肝星細胞として用いることのできる可能性が示唆された。

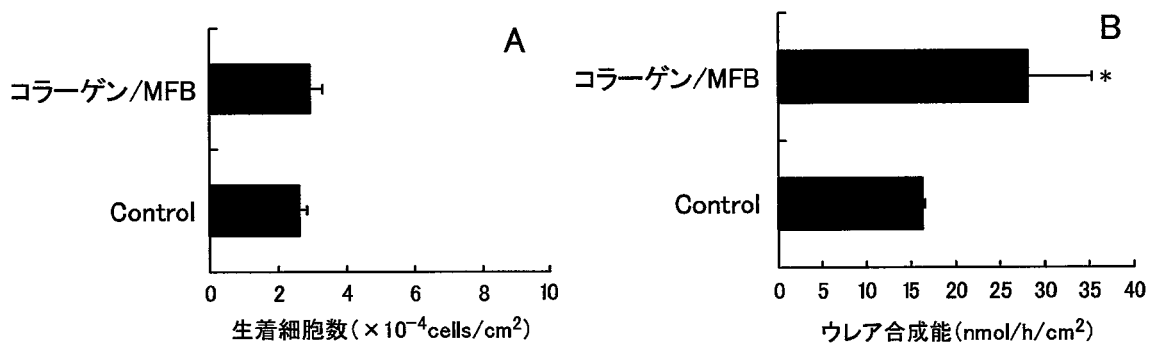


Fig.5. MFB conditioned mediumによるウレア合成能維持

ラット肝細胞単独培養 (Control)、I 型コラーゲンゲル上でMFBを培養した時のconditioned mediumを用いた肝細胞培養を行った。A:培養6日目にトリパンプルー色素排除法で生着細胞を測定した。B:培養6日目にジアセチルモノオキシム法によりウレア合成能を測定した。エラーバーは標準偏差、*P<0.05

第4節 小括

肝星細胞は細胞外マトリックス産生の中心的役割を担い、過剰な細胞外マトリックスの沈着が肝線維化あるいは肝硬変を特徴づける病態のひとつとなっている。また、正常肝において静止期にある肝星細胞が、肝障害に伴い種々のサイトカインにより活性化され筋線維芽細胞(MFB)に形質転換することが報告されている[31]。そして、活性化肝星細胞は、増殖能、細胞外マトリックス産生能が亢進し、自らも種々のサイトカインを産生する。

肝星細胞は単離直後から *in vitro* においてもプラスチックディッシュ上で活性化を始める。したがって、本章では肝非実質細胞の中でも特に肝星細胞に注目し、肝実質細胞との細胞間接触を伴わない共培養により、肝星細胞が肝機能維持に有効であることを明らかにした。この時、肝星細胞の conditioned medium においても効果が認められたことから、肝星細胞が単独で分泌する液性因子が肝機能維持に有効であることを示した。

また、継代培養可能な MFB を I 型コラーゲンゲル上で培養したときの conditioned medium によっても肝機能を維持することを確認した。したがって、MFB を肝星細胞の代替細胞として用いることの可能性を示した。

細胞間接触を伴わない共培養において、肝機能は維持されるが生着細胞数は経時的に減少した。したがって、更に高機能なバイオ人工肝臓構築のためには細胞機能を損なうことなく生着を維持する培養基材の開発が不可欠である。

第2章 複合リガンド修飾 dendriマー上での肝機能維持

第1節 諸言

1984年に Tomalia らによって報告された dendriマー [32] は樹木状多分岐高分子である。Dendriマーは Fig.6 で示すように、中心部分のコア、骨格分子、末端アミノ基から構成される。直径は約数十 nm の分子であり、正確な分子設計が可能である。Dendriマーは規則的な枝分かれ構造を有する分子で、中心のコア分子から、段階的に伸長反応を行うことで枝分かれ数を増加させることが出来る。また、伸長反応を繰り返すことにより最外部の密度が高くなり、内部の密度が低くなっている。Fig.6 に示すようなポリアミドアミン dendriマーは末端アミノ基部分の外表面が正に帯電しており、反応性が高い特徴を有している。このような特徴を生かして、様々な分野で dendriマーの研究が行われている。医療分野では内部の密度が粗であることを利用して、Dendriマー内部に薬物や遺伝子の封入、また外部の反応性の高さを利用して外部固定を行っている。Dendriマーにアンチセンス遺伝子を導入したり [33]、また dendriマー外部に薬物を固定化することによる薬物の徐放化の検討も行われている [34,35]。

このような、Dendriマーの特徴を活かし、我々はリガンド分子を結合させ、肝実質細胞培養基材とする方法を考案した (Fig.7)。我々はこれまでに dendriマーを光固定化反応により材料表面に固定化を行う方法を開発した。そして、この dendriマーを培養基材に固定化し、末端のアミノ基にリガンドとしてフルクトースを修飾したフルクトース dendriマーにより、肝実質細胞の初期生着数の維持およびアポトーシスの抑制に対する効果を報告した [36]。光固定化反応は、光の照射可能な基材には dendriマーを固定化できる。しかし一方で、光反応の効率が悪く、また、光の当たらない部分では反応が起こらないことから、特にバイオ人工肝臓構築のために必要な 3 次元担体への固定化には適さなかった。

本研究では dendriマーの基材表面への固定化法を改良し、Dendriマーを高密度に固定化することにより、肝実質細胞の生着あるいは肝特異的機能の維持について検討した。今回我々が用いたカリウム *tert*-ブトキシドを用いた新表面修飾法では、フルクトース dendriマー上でスフェロイドの形成が観察された。

スフェロイドが形成されると、肝機能は良好に維持され、その内部に一部組織化が認められる。スフェロイドを形成する方法として、プロテオグリカン[37]や陽性荷電表面[38]、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレート上で肝実質細胞を培養する方法が知られている。また物理的方法として、旋回培養や熱応答性ポリマーを用いた方法などが挙げられる。

フルクトースデンドリマー上のスフェロイドは基材への接着力が大変弱い。よって今回我々は肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖タンパクレセプターがガラクトースを認識し、細胞内に取り込むことから、培養基材表面にスフェロイドを形成させるためのフルクトースと、スフェロイド接着のためのガラクトースをリガンドとして共固定し、細胞培養を行った。

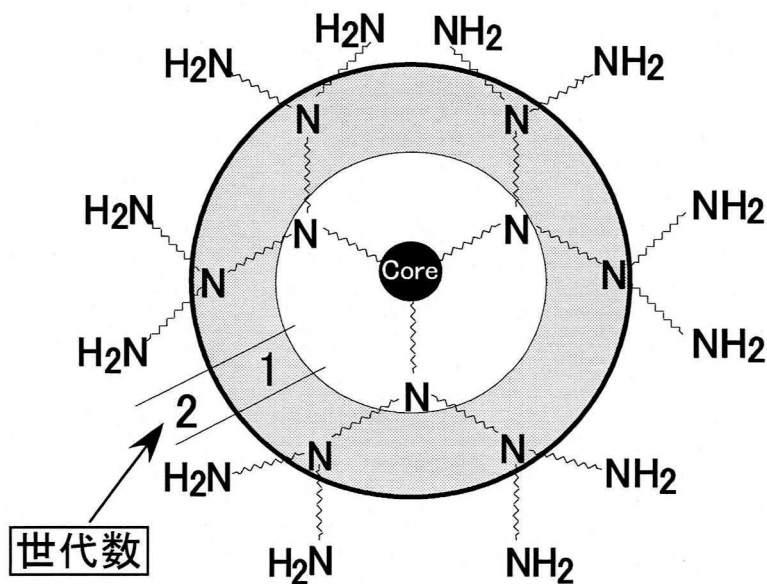


Fig.6 ポリアミドアミンデンドリマー

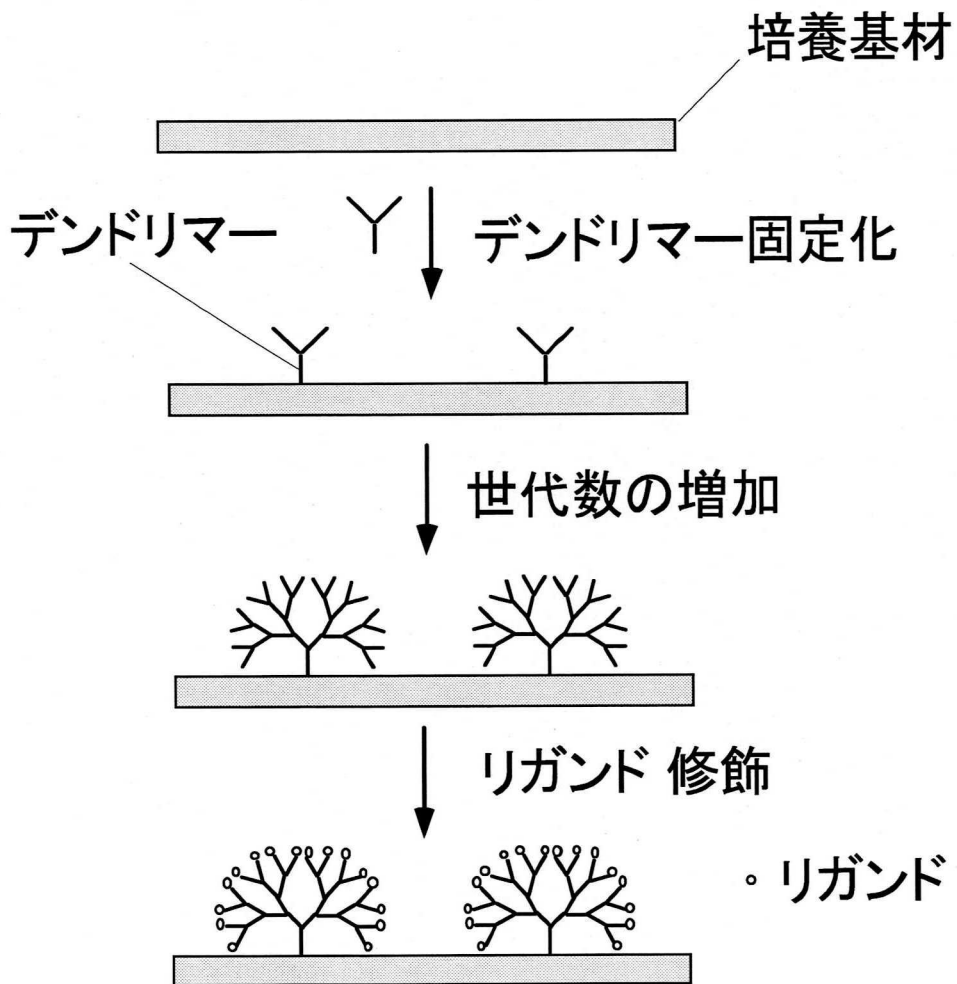


Fig.7 デンドリマーの基材表面への固定化

第2節 実験方法

第1項 基材表面への新デンドリマー修飾法

1. 原理

I) デンドリマーの固定化反応

Fig.8 に示すようにカリウム *tert*-ブトキシド(以下 *tert*-BuOK)を用い、活性酸素処理により基材表面に OH 基を導入し、デンドリマーの固定化を行った。

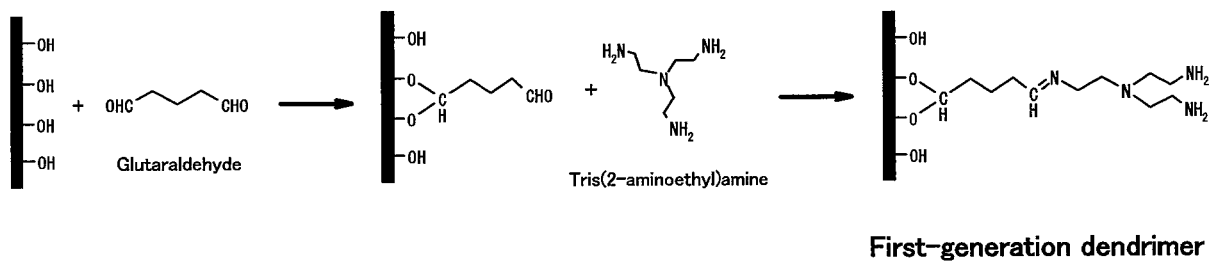


Fig.8. カリウム *t*-ブトキシドを用いた新表面修飾法によるデンドリマーの固定化

II) デンドリマーの世代増加反応

Fig.9 に示すように I) の反応に引き続き、0.36M グルタルアルデヒド水溶液を加え、その後 Tris (2-aminoethyl)amine を加えることで世代が一世代増加する。この反応を繰り返すことで、デンドリマーの世代数が上昇することになる。

III) デンドリマー末端へのリガンド修飾反応

Fig.10 に示す反応式のように、リガンド溶液及び還元剤である水素化ホウ素ナトリウムを加えることによって、固定化デンドリマーのアミノ基末端はリガンド分子と結合する。

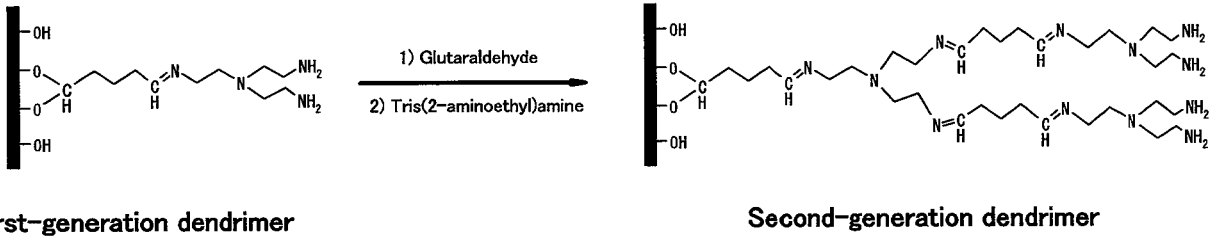


Fig.9. デンドリマーの世代増加反応

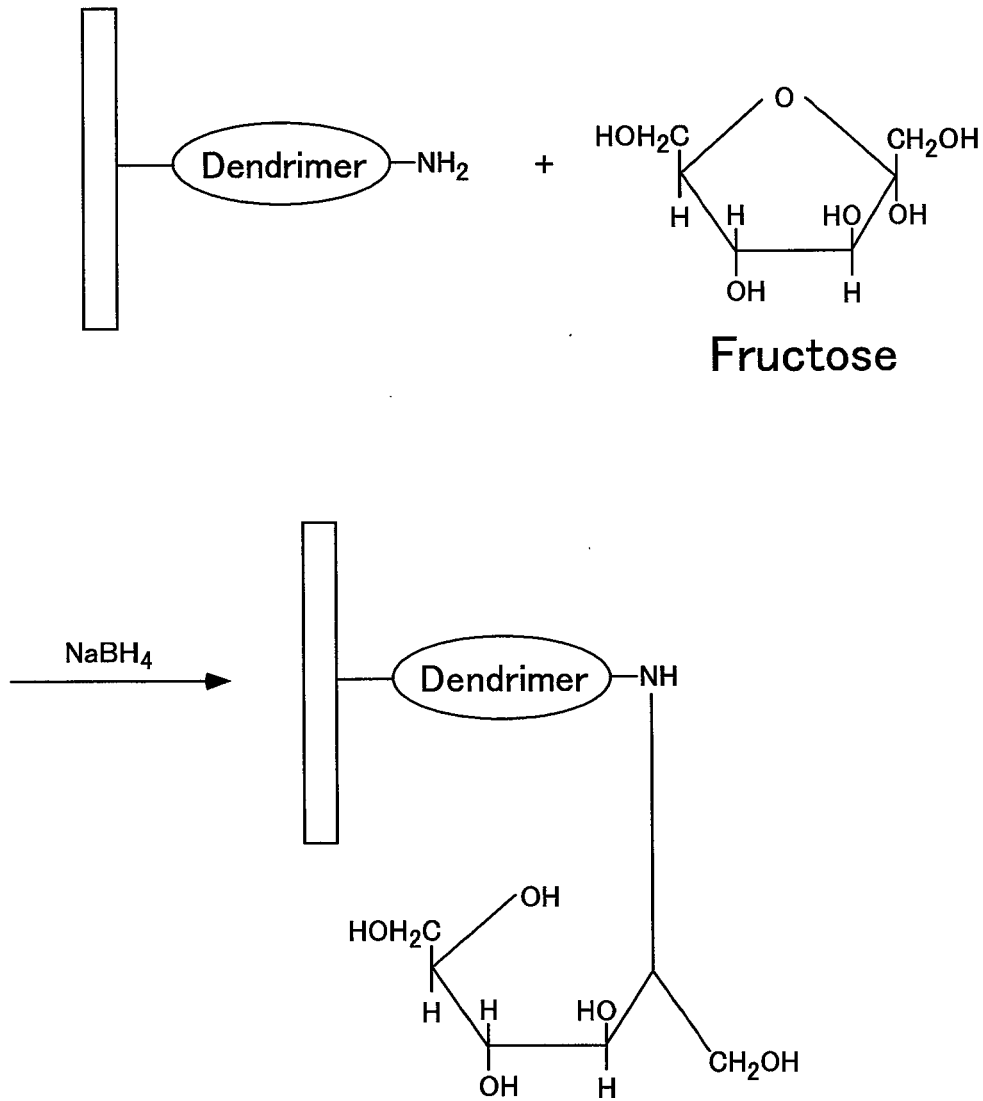


Fig.10. デンドリマー末端へのリガンド修飾反応

2. 方法

I) デンドリマーの固定化反応

50mM *tert*-BuOK を各ウェル 1.5mL ずつ注入し、室温で約 1 時間静置した。液を除去した後、0.36M グルタルアルデヒド水溶液を各ウェル 1mL ずつ注入し、室温約 1 時間放置した。液を除去した後、滅菌水で 3 回洗浄した。Tris(2-aminoethyl)amine 1mL を pH 9 に調整した滅菌水 18mL で希釈し、各ウェルあたり 1mL ずつ注入し、約一時間室温で放置した。液を除去した後、滅菌水で 2 回洗浄した。尚、全ての操作は無菌的に行った。

II) デンドリマー伸長反応

0.36M グルタルアルデヒド水溶液を各ウェル 1mL ずつ注入し、室温で約一時間放置した。滅菌水で洗浄後、Tris (2-aminoethyl)amine 1mL を pH 9 に調整した滅菌水 18mL で希釈し、各ウェルあたり 1mL ずつ注入し、約一時間室温で放置した。これを 1 サイクル行うことで、デンドリマーは 1 世代ずつ成長する。今回は第 5 世代までこの反応を繰り返した。尚、全ての操作は無菌的に行った。

III) デンドリマー末端へのリガンド修飾反応

リガンド溶液を各ウェル 1mL ずつ注入し、4°Cで一晩放置した。リガンド溶液は 100mM フルクトース、100mM ガラクトース、100mM フルクトースと 100mM ガラクトースを 1:1 の比で混合したものの 3 条件を用いた。水素化ホウ素ナトリウム水溶液を各ウェル 1mL ずつ加え、4°Cで一晩放置した。液を除去し、滅菌水で 3 回洗浄した。尚、全ての操作は無菌的に行った。

第2項 基材表面への dendrimer 導入量の定量

1. 原理

4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) は第1、第2アミンおよびアミノ酸などと温和な条件下で反応する (弱アルカリ性下、60°C、1 分間)。発蛍光体は安定で励起、蛍光波長が比較的長波長 ($\lambda_{ex}=470\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=530\text{nm}$) の強い蛍光を発するが、試薬自身は蛍光を持たない。

2. 測定

第1世代の dendrimer を固定化した 12well プレートに 20 $\mu\text{mol/L}$ の EDTA \cdot 2Na を含む 50mM のホウ酸緩衝液 (pH=8) を 0.6mL 加えた。さらに 0.2mL の NBD-F 溶液を加え、密閉して攪拌し 60°C、1分間湯浴加熱後、氷水で冷却した。冷却後 50mM の HCl を 0.8mL 加え反応を停止した。プレートのままフルオロイメジャーで ($\lambda_{ex}=470\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=530\text{nm}$) の蛍光を測定した。アミノ基定量のため Tris (2-aminoethyl)amine を用いて検量線を作成した。

第3項 アポトーシス・ネクローシス細胞の検出

1. 原理

アポトーシスを起こした細胞は細胞膜透過性が変化し、YO-PRO-1 色素が細胞膜内に透過するようになるが、Propidium iodide (PI) は透過させない。これら2つの色素により、アポトーシス細胞を染め分けることができる。また、死細胞は PI により染色されるためアポトーシス・ネクローシス細胞の検出が可能となる。

2. 測定

Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #4 (Molecular Probes) を使用した。

肝実質細胞培養4日目に培地を除去し氷冷した PBS で洗浄した。ディッシュに氷冷した PBS を 1mL 加え、YO-PRO-1 および PI をそれぞれ 1 μL 加え氷上で 30 分間インキュベートした。その後、共焦点レーザ

一顕微鏡で、530nm および 590nm の励起光により細胞を観察した。

第4項 RT-PCR 法による HSP60,HSP70 遺伝子の増幅

抽出した total RNA を鋳型として RT-PCR を行い、HSP60、HSP70 遺伝子の発現の変化を調べた。ここで、サンプル内の RNA 量を補正するために、内部標準としてハウスキーピング遺伝子である β -actin のプライマーも PCR の反応液中に同時に加えた。この実験で用いた HSP60,HSP70、 β -actin 遺伝子のプライマーの配列は Table 1 に示した。

Table 1. RT-PCR に用いたプライマー

Transcript	Sense Primer	Anti-sense Primer	Size of product
HSP60	GGAAGAACAGTGATTATTGA	TCTCCGGATTTCCACTGGAT	252bp
HSP70	AACGTGCTCATCTTCGACCT	ATGCCCTCGAACAGAGAGTC	294bp
β -actin	CATCCCCCAAAGTTCTAC	CAAAGCCTTCATACATC	347bp

第5項 ウレア合成能の測定

第1章 第1節 第6項に準じて行った。

第6項 アルブミン遺伝子発現量の測定方法

第2章、第2節、第4項に準じた。

今回用いたラットアルブミンのプライマー配列は Table 2 に示した。

Table 2. RT-PCR に用いたプライマー

Transcript	Sense Primer	Anti-sense Primer	Size of product
Rat Albumin	TGAACGTTGCCGCTAGGTTT	CTTCTGGAGTAATCATAAAG	546bp

第3節 結果と考察

第1項 新表面修飾法の開発

これまで、 dendriマーの基材表面への修飾は光固定化反応により行ってきたが[36]、今回、より効率よく高密度に固定化する方法を開発した。

dendriマーの基材表面への導入量の違いを調べるためにアミノ基の蛍光ラベル化剤により、基材表面に固定化された第1世代の dendriマーのアミノ基をラベル化し、その蛍光強度によりアミノ基を定量した。

光反応試薬(4-(3-trifluoromethylazirino)benzoyl-N-hydroxy succinimide) (以下 TDBA-OSu)を用いた光固定化反応による従来の方法に比べて、今回の *tert*-BuOK を用いた方法では、第1世代 dendriマーにおいて、その固定化密度が従来の約2倍となった(Fig.11)。光固定化反応より活性酸素処理によるほうが、効率良く dendriマーを基材表面へ固定化できることが明らかとなった。したがって、今後、 dendriマーを基材表面へ固定化する方法として、*tert*-BuOK を用い活性酸素処理により基材表面へ OH 基を導入する、今回の方法を用いることとした。

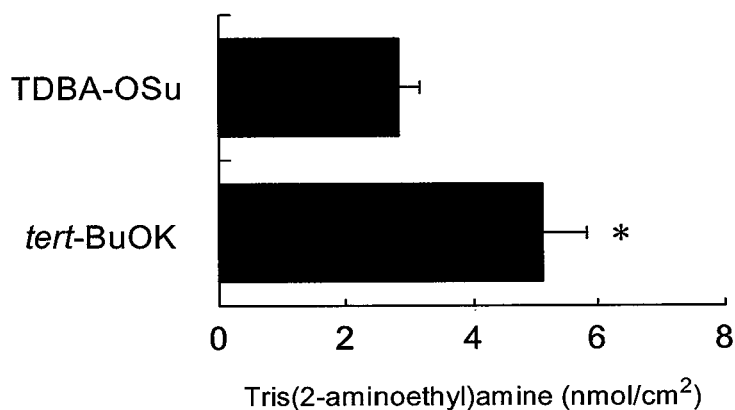


Fig. 11. 新表面修飾法による dendriマー固定量増加

基材表面に固定化された第1世代 dendriマーのアミノ基に蛍光ラベル化剤である、4-fluoro-7-nitrobenzofurazanをラベル化し、その蛍光強度によりアミノ基を定量した。エラーバーは標準偏差、*P<0.05

第2項 フルクトースデンドリマー上での肝スフェロイド形成

これまでの検討からリガンドとしてフルクトースを修飾したフルクトースデンドリマーを用いて肝実質細胞の培養を行った。光学顕微鏡による観察から、フルクトースデンドリマー上で培養した肝実質細胞は培養24時間後から細胞が凝集し始め、培養2日目にはスフェロイドを形成した(Fig.12)。これは、デンドリマーの固定化量がこれまでより増加したことで、基材表面の陽性荷電が増えたためであると考えられた。

しかし、スフェロイドは形成後、剥れ落ちていったため、次にデンドリマーのリガンドについて検討することとした。

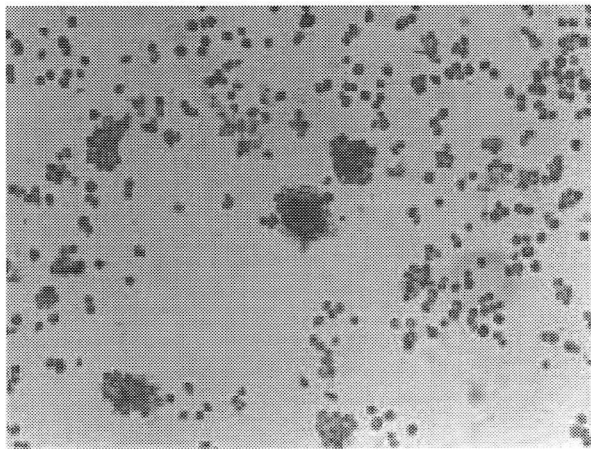


Fig.12. フルクトースデンドリマー上での肝スフェロイド形成

フルクトースデンドリマー上でラット肝細胞を成長因子などの添加なしに4日間培養した。

第3項 F/G デンドリマーによる肝スフェロイドの固定

肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖タンパクレセプターがガラクトースを認識し、細胞内に取り込むことから、培養基材表面にスフェロイドを形成させるためのフルクトースと、スフェロイド接着のためのガラクトースをリガンドとして1:1の比で共固定した F/G デンドリマー上で細胞培養を行った。同時にフルクトースデンドリマー、ガラクトースデンドリマー上でも肝実質細胞培養を行い、光学顕微鏡による観察、およびトリパンブルー色素排除法による細胞計数を行った。

それぞれの基材上における培養2、4、6日目の生着細胞数を Fig.13 に示す。培養1日目ではどの基材

上で培養した細胞においても明確なスフェロイドの形成は見られず、生着細胞数についても顕著な差はなかった。培養2日目からはデンドリマー上で培養した細胞においてはスフェロイドが形成され、培養4日目ではフルクトースデンドリマー上で培養した細胞はスフェロイドを形成後に剥がれ落ちていったのに対し、F/G デンドリマー上では多くの細胞がスフェロイドを形成したまま接着していた(Fig.14)。培養6日目にはほとんどの細胞が剥がれ落ちていったのに対し、F/G デンドリマー上では有意差をもち多くの細胞が生着していた。

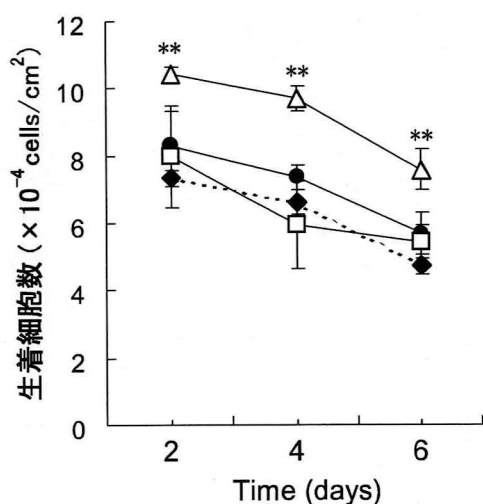


Fig. 13. F/Gデンドリマーにおける生着細胞数維持
フルクトース(□)、F/G(△)、ガラクトース(●)修飾デンドリマー上および、コントロールとして細胞培養用プレート(◆)で、ラット肝細胞を培養し、培養2、4、6日目に生着細胞数をトリパンブルー色素排除法にて測定した。エラーバーは標準偏差、コントロールとの有意差**P<0.01

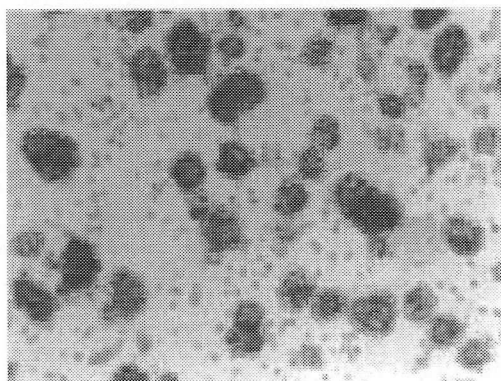


Fig. 14. F/Gデンドリマー上の肝スフェロイド接着
F/Gデンドリマー上でラット肝細胞を成長因子などの添加なしに4日間培養した。

フルクトースデンドリマーは以前から肝実質細胞の初期生着数を維持させるという結果が得られており、今回デンドリマーの基材表面への固定方法を変えたところ、スフェロイドの形成が確認された。しかし培養日数が経過するに伴い、このスフェロイドは基材表面から剥がれ落ちた。一方リガンドとしてフルクトースとガラクトースの比を 1:1 とした F/G デンドリマー上ではスフェロイドが長期間生着を保つため、高い生着細胞数を長期間維持した。これはガラクトースが肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白レセプターを認識し、細胞内に取り込んだことによると考えられる。

以上のことからリガンドとしてフルクトースとガラクトースの比を 1:1 とした F/G デンドリマーは形成されたスフェロイドが長期間基材への生着を保つため、高い生着細胞数を長期間維持することが示された。

第4項 リガンド修飾 dendriマーの肝実質細胞への影響

リガンド修飾 dendriマーのリガンドの違いが、肝実質細胞のアポトーシス・ネクローシスにどのような影響を及ぼしているのかを調べるために、アポトーシス・ネクローシス細胞を蛍光色素により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。今回は、コントロールとしてリガンドを修飾しない dendriマーを用いた。共焦点レーザー顕微鏡による観察のため、dendriマーをガラスボトムディッシュ(マツナミ)に固定化し培養に用いた。

染色結果を Fig.15 に示した。通常スフェロイド内部の細胞はネクローシスを起こしやすく、リガンドのない dendriマー上のスフェロイドもアポトーシスおよびネクローシスを起こしているのに対して、フルクトース、あるいは F/G dendriマーではどちらもアポトーシス・ネクローシスが抑制されていた。ここで、ガラクトース dendriマー上の細胞はネクローシスを起こしているが、アポトーシスは抑制されており、また、すべての細胞がネクローシスを起こしているわけではなかった。したがって、フルクトースがアポトーシス・ネクローシスを抑制し、ガラクトースがスフェロイドの生着を維持させていると考えられた。

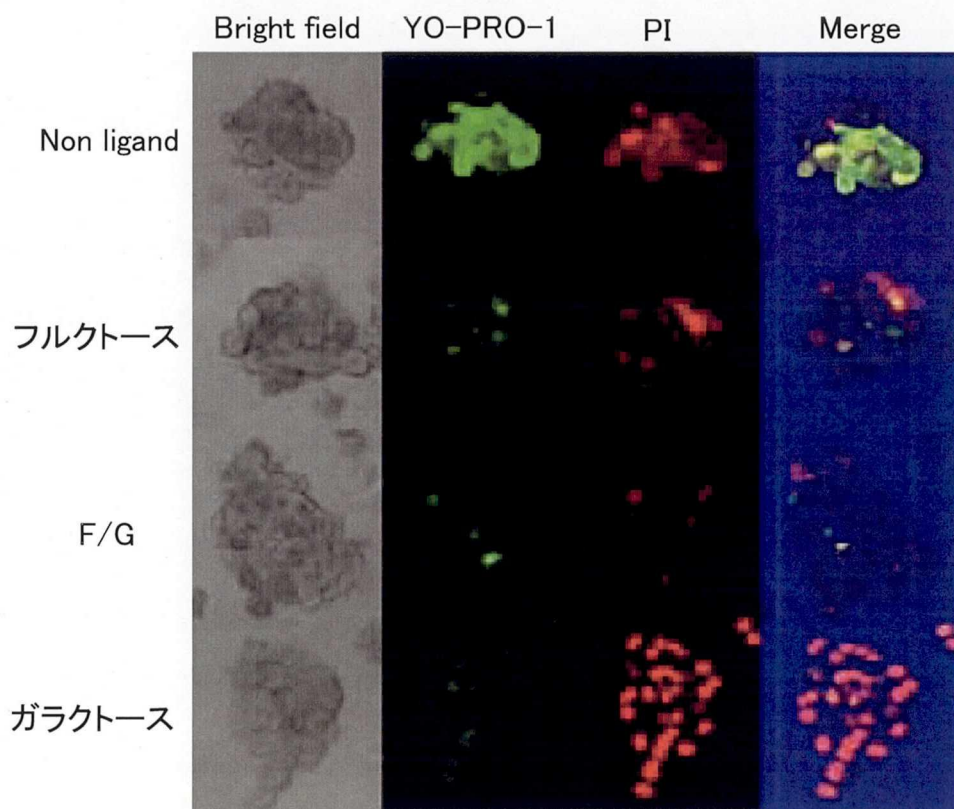


Fig.15.アポトーシス・ネクローシス細胞の検出

リガンド未修飾のデンドリマー (Non ligand)、フルクトースデンドリマー (フルクトース)、F/Gデンドリマー (F/G)、ガラクトースデンドリマー (ガラクトース) 上でラット肝細胞を2日間培養した後、アポトーシス・ネクローシス細胞を蛍光色素により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。左から明視野、アポトーシス細胞を染色するYO-PRO-1、ネクローシスあるいは後期のアポトーシスを染色するPI、そして重ね合わせた画像。

第5項 HSP60、70 の発現

細胞が基材からうけるストレスを評価するために、ストレスタンパク質 (HSP) について解析を行った。

ストレス蛋白質は細胞にかかるストレスによってその合成が誘導される。ストレスには熱ショックをはじめ、機械的外傷、低酸素、重金属、砒素など有害毒性物質などへの暴露の他に、様々な病理的ストレス、例えば発熱、虚血、活性酸素暴露、組織損傷やウイルス感染などの生体内ストレスも含まれ、これらが細胞にストレス応答を引き起こす。そこで、代表的なストレスタンパク質である HSP60[39]、70[40]について RT-PCR 法により半定量的な解析を行った。

サイクル数を変化させて HSP60、HSP70、および β -actin の発現量を調べた結果、HSP60、HSP70、 β

-actin に関しては 30 サイクルでプラトーに達しておらず、定量性が得られることを確認した。30 サイクルの泳動パターン(Fig.16(A))を画像解析ソフト(Scion Image)により数値化し、HSP60、HSP70 の発現を β -actin の発現量に対する比として定量化した結果が Fig.16(B)である。

HSP60、HSP70 ともにコントロールの細胞に比べ、デンドリマー上で培養した細胞においては発現量が少なくなっていた。特に培養6日目においてはリガンドをF/G デンドリマー上で培養した細胞においてHSP の発現量は低い値を示していた。

これらの結果から、コントロールに比べ、リガンド修飾デンドリマーは培養基材として細胞に対するストレスが少ないと考えられる。特に培養6日目においてはF/G デンドリマーにおいて、HSP の発現量は低い値を示していた。これは長期培養によってかかる培養基材からのストレスが特にこのデンドリマーにおいては少なかったためではないかと考えられる。

以上の結果から、F/G デンドリマーは肝実質細胞に与えるストレスの少ない培養基材であり、アポトーシス・ネクローシスを抑制したと考えられる。

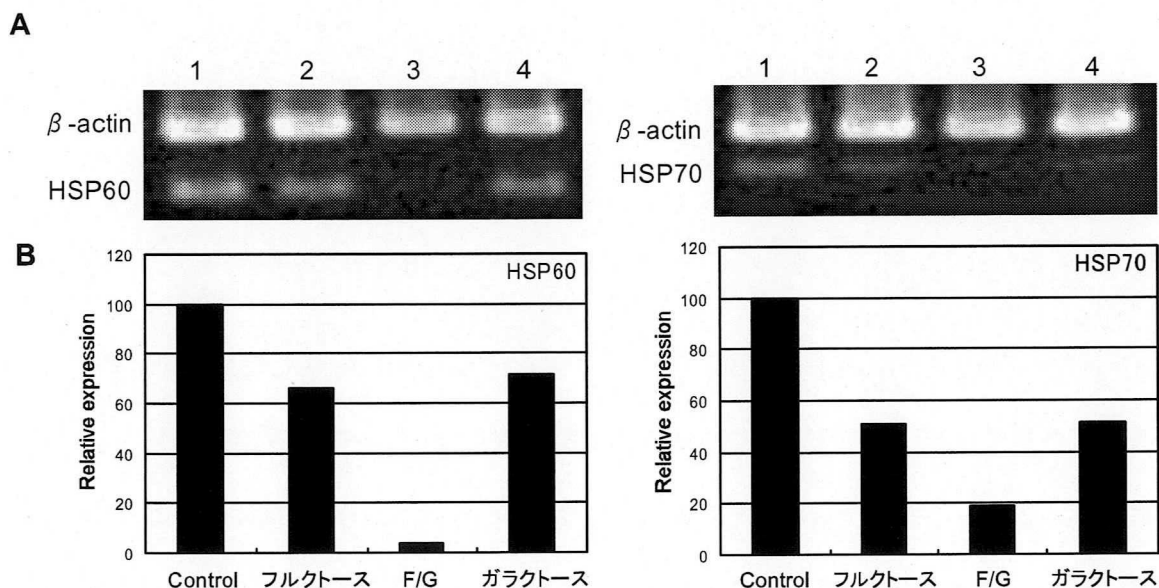


Fig. 16. HSP60・70遺伝子発現

(A)ラット肝細胞を細胞培養用プレート(lane 1)、フルクトースデンドリマー(lane 2)、F/Gデンドリマー(lane 3)、ガラクトースデンドリマー(lane 4)で培養、6日目にトータルRNAを抽出し、RT-PCRを行った。(B)画像解析により、ハウスキーピング遺伝子である β アクトチンを基準に、相対的な発現量を表した。

第6項 リガンド修飾 dendriマーの肝実質細胞機能への影響

リガンド修飾 dendriマーの肝実質細胞機能への影響を調べるために、重要な肝特異的機能であるウレア合成能およびアルブミン遺伝子の発現について検討した。

Fig.17 に培養6日目のウレア合成能を示した。F/G dendriマーにおいてコントロールに比べ単位面積あたりでは約 4 倍、細胞あたりでは約 2 倍の活性を示した。

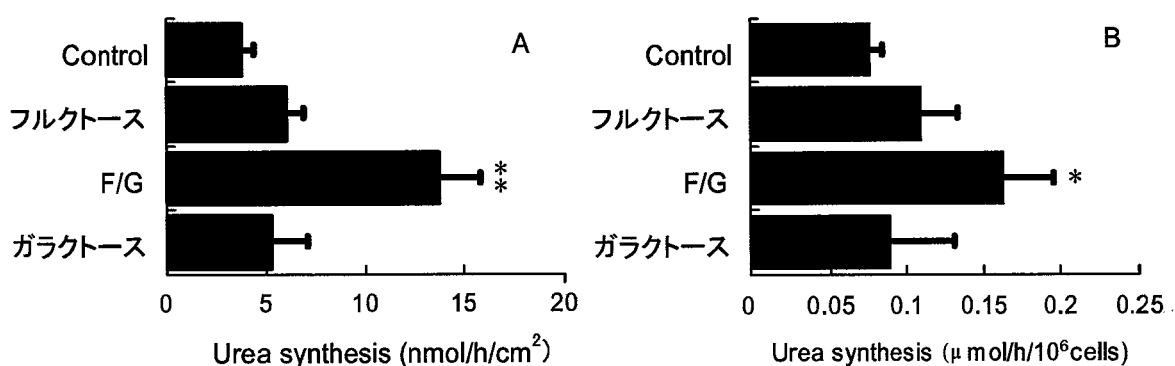


Fig. 17. F/G dendriマーによるウレア合成能維持

ラット肝細胞培養6日目における(A)単位面積あたり、(B)10⁶細胞あたりのウレア合成能。エラーバーは標準偏差、Controlとの有意差**P<0.01,*P<0.05

アルブミン遺伝子発現量の定量のため、サイクル数およびサンプル DNA 量を変化させて β -actin の発現量を調べ、サンプル間で β -actin の量をそろえることで、定量性が得られることを確認した。35 サイクルの泳動パターンを Fig.18 に示した。

培養3日目においてコントロール以外のリガンド修飾 dendriマーでは、ほぼ一定のアルブミン遺伝子が発現していたが、培養6日目になると、フルクトース、ガラクトース dendriマーではアルブミン遺伝子の発現はほぼ見られなくなった。それに対して、F/G dendriマーではアルブミン遺伝子の発現が維持されていた。以上のように、F/G dendriマー上の肝実質細胞はウレア合成能およびアルブミン遺伝子を維持することから、肝実質細胞の機能維持にも優れていることが明らかとなった。

F/G dendriマーは肝実質細胞の機能を損なうことなく生着を維持する培養基材であると言える。

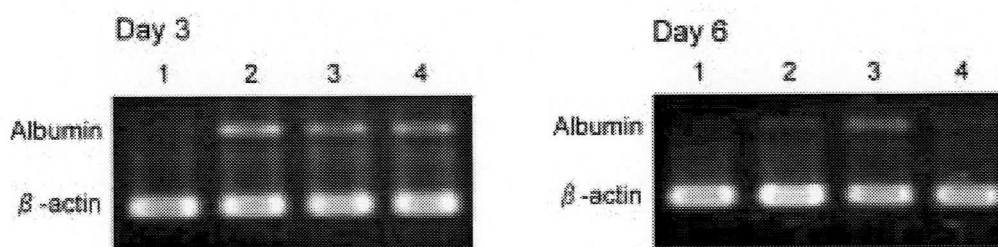


Fig. 18. F/Gデンドリマーにおけるアルブミン遺伝子発現維持

ラット肝細胞を細胞培養用プレート (lane 1)、フルクトースデンドリマー (lane 2)、F/Gデンドリマー (lane 3)、ガラクトースデンドリマー (lane 4) で培養し、3日目および6日目にトータルRNAを抽出し、RT-PCRを行った。

第7項 F/G デンドリマーを用いた肝星細胞の共培養

第1章で述べたように、細胞間接触を伴わない肝実質細胞と肝星細胞の共培養において、肝機能は維持されるが生着細胞数は経時的に減少した。したがって、更に高機能なバイオ人工肝臓構築のためには細胞機能を損なうことなく生着を維持する培養基材の開発が不可欠である。したがって、F/G デンドリマーを用い、肝実質細胞と肝星細胞の共培養を行った。また、肝実質細胞培養6日目にトリパンブルー色素排除法による細胞計数とウレア合成能の測定を行った。

肝実質細胞培養6日目において、F/G デンドリマーを用いた共培養では、コントロールあるいは通常の共培養と比べ約2倍程度の生着細胞数が維持された (Fig.19)。この時、細胞あたりのウレア合成能についても、F/G デンドリマーを用いた共培養では、通常の共培養と同等の高い値を示した。F/G デンドリマーは細胞機能を損なうことなく細胞の生着を維持したと言える。また、より長期に培養した場合、F/G デンドリマーと共培養の効果が相加的に現れると考えられる。

以上のことから、F/G デンドリマーを肝実質細胞の培養基材として肝星細胞との共培養を行うことで、更に高機能を発現するバイオ人工肝臓の開発が期待される。

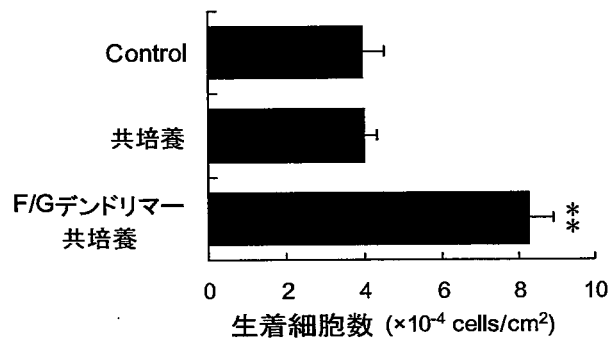


Fig. 19. F/Gデンドリマーによる生着細胞数維持

ラット肝細胞単独培養 (Control)、ラット肝星細胞を播種し数日培養後、カルチャーインサートを用いて細胞間接触を伴わない共培養およびラット肝細胞培養にF/Gデンドリマーを用いた共培養を行った。培養6日目にトリパンプルー色素排除法で生着細胞を測定した。エラーバーは標準偏差、Control、共培養との有意差** $P < 0.01$

第4節 小括

肝実質細胞はプロテオグリカンでコートしたディッシュ[37]あるいは、陽性荷電ディッシュ上[38]でスフェロイドを形成する。肝スフェロイド培養は、単層培養に比べて細胞の viability および機能を長期にわたって維持することができ、また、細胞間には微小胆管形成などいくつかの *in vivo* に近い形態を再構築することが報告されている。

我々はフルクトース修飾 dendriマー上で肝実質細胞の培養を続けると、細胞がスフェロイドを形成することを見出した。従来の dendriマー固定化法[36]に比べ、新しい方法では、基材表面へ固定された dendriマー量が多い。Dendriマーは、末端アミノ基が陽性荷電を帯びており、リガンド修飾 dendriマーの末端アミノ基全てが、修飾されているわけではなく、リガンド修飾 dendriマー上でも陽性荷電を帯びていると考えられる。したがって、従来に比べ、基材表面におけるリガンド修飾 dendriマーの陽性荷電が増加したことにより、肝実質細胞がスフェロイドを形成したと考えられる。

ガラクトースは肝実質細胞表面にあるアシアロ糖タンパクレセプターのリガンドであり、Dendriマーのリガンドに加えること(F/G dendriマー)で、スフェロイドは生着を維持した。また、通常スフェロイド内部の細胞はネクロシスを起こしやすいのに対し、F/G dendriマー上の肝実質細胞は、アポトーシス・ネクロシスが抑制されており、基材からのストレスも少なく、肝特異的機能を維持していた。フルクトースは酸化的な細胞障害や細胞毒性に対する保護効果が報告されており[41]、その結果アポトーシス・ネクロシスを抑制したと考えられる。ここでガラクトースは細胞接着維持に働くと同時に、ネクロシスを起こしているもののアポトーシスは抑制しており、結果としてフルクトースとガラクトース両方を含む F/G dendriマー上のスフェロイドは、他の表面上のスフェロイドに比べ、生着細胞数が維持されたと考えられる。

リガンド修飾 dendriマーを基材表面上に固定し、細胞培養に用いるアイデアは我々独自のものである。今回、フルクトースのみならずガラクトースを同時にリガンドとして修飾することにより、リガンドの効果を相加的に現すことが出来た。

第3章 生体内異所性肝組織の構築

第1節 諸言

Seglen らによってコラゲナーゼ灌流法による肝実質細胞を高い viability で回収する方法が確立されて以来、肝細胞移植の基礎的研究が可能となった。これまでに多くの研究者らによって肝細胞移植の有用性が実験動物で示されてきた[23]。近年、アメリカを中心に肝不全、先天性代謝性肝疾患で、臨床的肝細胞移植の有効例が報告されている[42,43,44]。現在のところ、急性肝不全の唯一の根治的治療は肝臓移植であるが、旺盛な肝臓の再生能力を考えれば、宿主の肝臓が回復するまでの期間をバイオ人工肝臓や肝細胞移植で橋渡しできれば、患者への負担の大きい肝臓移植手術を避けることができる。

肝細胞移植の利点としては1)臓器移植より患者への負担が少ない、2)1人のドナーから複数の患者に適用できる、3)将来的な使用のために細胞を凍結保存できる、4)患者自身の細胞を生体外に取り出した後、欠損機能を矯正(*ex vivo* gene therapy)し再び戻すことができる、5)臓器移植に比較して免疫原性が低いことなどがあげられる。

肝細胞移植は疾患や実験モデルに応用可能である。臨床的治療として、1)遺伝性代謝性疾患、2)急性あるいは慢性肝不全の治療、3)肝臓癌の補助療法、また、基礎的研究として5)ヒト肝細胞を免疫不全動物に移植することでヒト肝細胞のみに特異的に感染するB型、C型肝炎ウイルスなどの感染症モデルを確立し、その予防や治療を検討することができる[45,46]。

上記の疾患の中でも先天性代謝異常の原因は肝酵素の先天性欠損によるものであり、単独の肝代謝酵素異常症では宿主の肝構造は正常である。したがって、必ずしも全肝を取り替える必要はなく、欠損した肝酵素を正常肝細胞の移植により補正すればよいと考えられる。これまでに UDP-glucuronyl transferase 欠損により高ビリルビン血症を呈する Gunn ラットやアルブミン生合成が不可能な Nagase analbuminemic rats (NAR)などに肝細胞移植が試みられ、先天性代謝異常の是正が可能であると報告されている[47]が、その効果は生着細胞数に左右されるため一定ではない。

先天性代謝異常に対する肝細胞移植では多くの肝細胞が長期に生着することが必要であるが、これま

で門脈および脾臓が至適移植部位とされてきたことから、門脈塞栓や虚血肝不全の危険性のため移植可能な細胞数には限界があった。

本研究ではこれまでに行ってきた肝実質細胞 scaffold の研究から、肝実質細胞を高密度に播種した3次元担体をラット腹腔内に移植し、生体内異所性肝組織について検討した。

第2節 実験方法

第1項 孔径の異なる多孔質ヒドロキシアパタイトディスクによる肝細胞培養

今回培養に用いた多孔質ヒドロキシアパタイトディスク(Interpore®)は、珊瑚を原料にしており、均一な小孔が互いに規則正しくつながった連通管構造を持つ。

Interpore®200 (孔径 200 μm 、以下 IP200)、Interpore®500 (孔径 500 μm 、以下 IP500)はオートクレーブ滅菌し、24well 浮遊培養用プレートに1well あたり2個のディスクを入れた。肝実質細胞を単離直後、ディスクの上から IDSA に懸濁した肝実質細胞(1.5×10^6 cells/ml)を 1mL 注入し 6 時間培養した。ここでディスクを取り出し、新たな 24well 浮遊培養用プレートに移し、HFSF にて培養をはじめた。その後、18 時間で培地交換をし、引き続き 24 時間おきに培地を交換した。肝実質細胞培養6日目に生着細胞数を測定した。細胞計数時には、ディスクを新たな浮遊培養用プレートに移し、接着していない細胞の影響を排除した。

第2項 遠心法による肝実質細胞高密度培養

遠心による肝実質細胞への障害を防ぐために、肝実質細胞を単離するときと同じ条件(4°C、50 × g、1 分間 × 3)で遠心した。

24well 浮遊培養用プレートに肝実質細胞を充填した IP200 を 2 個入れ、初めの 6 時間は IDSA にて培養した。その後、ディスクを取り出し、新たな 24well 浮遊培養用プレートに移し、HFSF にて培養をはじめた。その後、18 時間で培地交換をし、引き続き 24 時間おきに培地を交換した。肝実質細胞培養6日目に生着細胞数を測定した。

第3項 無アルブミンラットへの肝実質細胞移植

1. 移植方法

動物実験は大阪大学大学院薬学研究科動物実験指針に沿って行った。

NAR ラット 6 週齢をジエチルエーテルで吸入麻酔し手術台に仰向けに固定した。麻酔が弱い時は引き

続きジエチルエーテルを吸引させるが、効きすぎると死ぬこともあるので常に注意が必要である。まず腹部の毛をバリカンで刈る。腹部下部の外皮のみに縦に約 1cm の切れ込みをいれ、続いて内皮も約 5mm 切り、腸管を確認した。肝実質細胞を遠心法で充填し、培養 6 時間後の IP200 を 4 個、腸管の間に挿入した。内皮、外皮を手術用縫合糸で縫い、患部を消毒した。ラットが覚醒するまで、保温器で体温を低下させないようにした。

2. 血清の調製

移植前、移植後 1、2、3 週間目に尾静脈より採血した。血液サンプルは常温で 2 時間静置後、常温で遠心 ($2000 \times g$, 5 分間) し、血清を得た。尚、血清は分注し -80°C で assay まで保存した。

第 4 項 F/G デンドリマーによる生着細胞数維持

IP200 を 0.1N 塩酸で洗浄し OH 基を露出させた。N,N'-カルボジイミダゾール (CDI) 溶液 (CDI80mg を 5mL の無水ジオキサンに溶解) に IP200 を浸し 2 時間反応を行った。無水ジオキサンで洗浄後、第 4 世代デンドリマー溶液 (Starburst[®] (PAMAN) Dendrimer, Generation4) を加え 1 時間後、水で洗浄した。以上で、IP200 表面に第 4 世代のデンドリマーが修飾された。リガンドのデンドリマーへの修飾は第 2 章、第 2 節、第 1 項に準じた。

第3節 結果と考察

第1項 多孔質ヒドロキシアパタイトディスクによる肝実質細胞の培養

ヒドロキシアパタイトセラミック($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)、以下 HA は緻密体や多孔体が人工歯根、人工骨、人工耳小骨としてすでに臨床で使用されている[48]。また、HA はカルシウムイオン、リン酸イオンが規則的に配列した結晶構造を有し、無機両性イオン交換体としてたんぱく質、DNA、ウイルス、細胞などを吸着することから、クロマトグラフィー担体として使用されるようになった[49]。本研究では HA が組織親和性、生物学的安全性、物理化学的安定性に優れた材料であることから3次元培養担体としても有用であると考えた。しかし、これまでに HA は肝実質細胞の培養には適さないとの報告がある[50]。今回は骨髄細胞移植の際に *in vivo* における血管新生能が高いとの報告がある多孔質ヒドロキシアパタイトディスク[51]を肝実質細胞培養の3次元担体とした。

Fig.20 にトリパンブルー色素排除法により測定した、肝実質細胞培養2日目の生着細胞数を示した。IP200 において IP500 よりも生着細胞数が維持されたため、孔径 200 μm のほうが肝実質細胞の培養に適していることが分かった。ただし、IP200 と IP500 は同じ組成を持つため、基材表面は同じ性質であると考えられる。したがって、今回の生着細胞数の違いは scaffold の表面積の違いから起こったものであると考えられた。

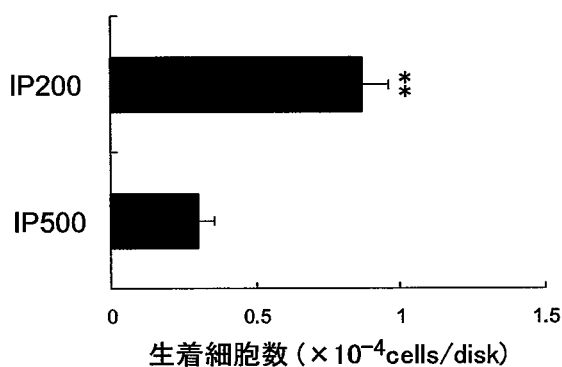


Fig. 20. 遠心法による肝細胞高密度培養

ラット肝細胞をIP200およびIP500に播種し、肝細胞培養2日目にトリパンブルー色素排除法で生着細胞を測定した。エラーバーは標準偏差、**P<0.01

第2項 遠心法による肝実質細胞高密度培養

肝実質細胞をディスク上から播種しただけでは細胞の密度は十分でない。したがって、IP200 に高密度に肝実質細胞を培養するため、遠心法により肝実質細胞を充填した。

細胞計数およびウレア合成能測定時には、ディスクを新たな浮遊培養用プレートに移し、接着していない細胞の影響を排除した。Fig.21 にトリパンブルー色素排除法により測定した、肝実質細胞培養6日目の生着細胞数を示した。遠心法により IP200 内の生着細胞数は通常の 3 倍程度維持された。したがって、遠心法により肝実質細胞を IP200 に充填しラット腹腔内へ移植することにした。

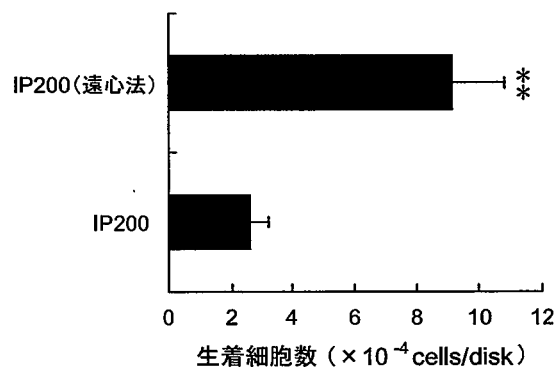


Fig. 21. 遠心法による肝細胞高密度培養

ラット肝細胞をIP200に遠心法(50×g, 1分間)で充填し、培養6日目にトリパンブルー色素排除法で生着細胞を測定した。エラーバーは標準偏差、**P<0.01

第3項 IP200 における血管新生

移植肝実質細胞の生体内での生着を確認するため、血清アルブミン濃度の極めて低い、無アルブミンラット(NAR) [52]を用い、肝実質細胞を移植した。NAR が Jcl: SD 系であることから、肝実質細胞ドナーラットとして Jcl: SD ラットを用いた。

移植 3 週間後に IP200 を取り出したところ、IP200 は脂肪組織に取り囲まれていた。移植 3 週間後に移植した IP200 を取り出しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色した。染色は(株)奈良病理研究所に依頼した。Fig.22 に移植 3 週間後の IP200 の HE 染色像を示した。紫の部分が組織であるが、組織中に薄いピンク色の部分があり、そこにリンパ球が観察された。したがって、IP200 内の血管新生を確認した。

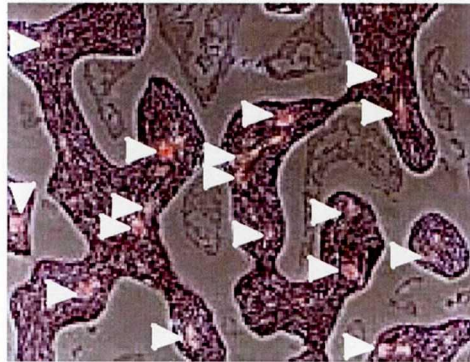


Fig. 22. IP200を用いた肝細胞移植による血管新生

ラット肝細胞を充填したIP200を無アルブミンラット腹腔内に移植、3週間後にHE染色し血管新生を確認した。

第4項 IP200を用いた肝実質細胞移植による血清アルブミン濃度上昇

Fig.23 にサンドイッチ ELISA 法[53]により測定した、移植 3 週間目までの血清アルブミン濃度を示した。肝実質細胞を移植した NAR は、何も移植しない NAR に比べて、移植 2 週間後から高い血清アルブミン濃度を示した。したがって、移植肝実質細胞は NAR ラット腹腔内で IP200 に生着し、機能していることが明らかとなった。

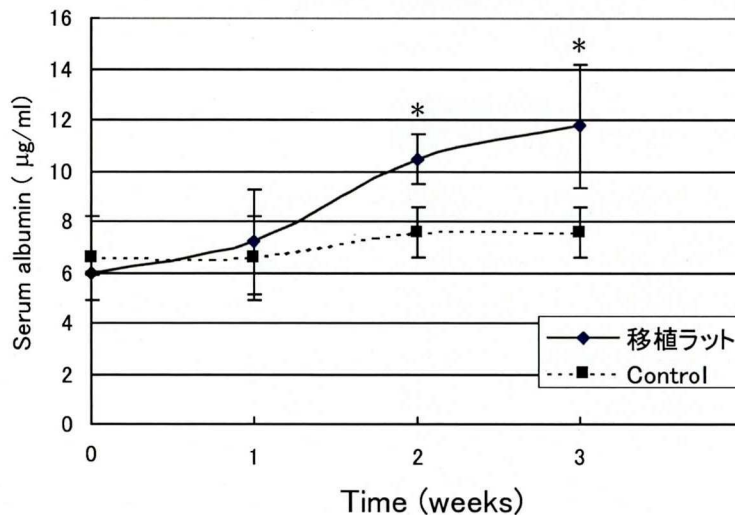


Fig. 23. IP200を用いた肝細胞移植による血清アルブミン濃度上昇

ラット肝細胞をIP200に遠心法(50×g, 1分間)で充填し、無アルブミンラット腹腔内に4個移植した。移植前、移植後1, 2, 3週目にラット尾静脈より採血し、血清アルブミン濃度をELISA法で測定した。エラーバーは標準偏差(n=3)、*P<0.05

第5項 IP200 の表面修飾

血清アルブミン濃度を更に上昇させるためには、移植肝実質細胞の生着数を増加させることが必要である。したがって、IP200 に F/G デンドリマーを修飾し *in vitro* で肝実質細胞培養を行った。

今回はデンドリマーを IP200 に修飾する際、反応を簡単にするため、市販のデンドリマー(第4世代)を用いた。

Fig.24にF/Gデンドリマーを修飾したIP200(F/G-IP200)で肝実質細胞を6日間培養した時の生着細胞数を示した。F/G-IP200で培養した時、何も修飾していないIP200に比べ多くの細胞が生着を維持した。F/Gデンドリマーは3次元担体であるIP200にも修飾可能であり、2次元培養のみならず、3次元培養においてもその効果を示した。

以上のことから、IP200を表面修飾することにより、より多くの細胞をIP200内に保持し移植を行うことで多くの肝実質細胞が生着し、無アルブミンラットの血清アルブミン濃度を更に上昇させる可能性が示された。

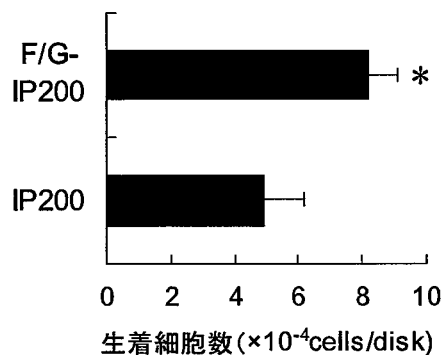


Fig. 24. F/G-IP200による生着細胞数維持

ラット肝細胞をIP200およびF/Gデンドリマー修飾したIP200(F/G-IP200)へ遠心法により充填し、培養6日目にトリパンブルー色素排除法で生着細胞を測定した。エラーバーは標準偏差、* P<0.05

第4節 小括

本章では、肝実質細胞の培養における3次元担体として多孔質ヒドロキシアパタイトディスク(IP200)の有効性を示した。これまでに肝実質細胞はヒドロキシアパタイトへ直接には生着しないとの報告があった[50]。しかし、今回用いた IP200 は均一な小孔が互いに規則正しくつながった連通管構造をしており、また、原料として珊瑚を用いているため、詳細は明らかではないが、これらの要因で肝実質細胞が直接ヒドロキシアパタイトに生着したものと考えられる。

無アルブミンラットへの IP200 による肝実質細胞の移植においては、血清アルブミン濃度の上昇が見られ、移植した肝実質細胞が生着し、機能していることが確認された。この時、IP200 内では血管新生が起こっており、組織化した肝実質細胞には血流から栄養分が供給され、また、アルブミンを分泌していると考えられた。また、IP200 に F/G デンドリマーを修飾でき、*in vitro*において、通常の IP200 よりも肝実質細胞の生着数が多かったことから、IP200 を表面修飾することによって、より多くの肝実質細胞が移植できる可能性を示した。

総括

肝機能代替を行う優れたバイオ人工肝臓開発には、用いる肝実質細胞の機能を維持することが重要となる。

肝星細胞は *in vitro* において種々のサイトカインを産生することが知られている。第 1 章では、肝実質細胞と肝星細胞の細胞間接触を伴わない共培養において、肝星細胞が肝機能維持に有効であることを明らかにした。この時、肝星細胞の conditioned medium においても効果が認められたことから、肝星細胞が単独で分泌する液性因子が肝機能維持に有効であることを示した。肝星細胞からは HGF が分泌されているとの報告[15]から、HGF により肝機能が維持されている可能性があるが、同時に TGF- β などの肝実質細胞に障害を与えるサイトカインについても分泌している可能性がある[16]ため、肝星細胞の分泌する液性因子が総合的に肝機能維持に働くと考えられる。

また、継代培養可能な筋線維芽細胞(MFB)を I 型コラーゲンゲル上で培養したときの conditioned medium によっても肝機能を維持することを確認した。通常、MFB は TGF- β を高いレベルで分泌し、また、肝星細胞は形質転換し MFB になると、HGF を分泌しないとの報告[15]がある。したがって、今回用いた MFB が培養を経るにしがたい TGF- β 分泌能を低下あるいは欠損し、同時に HGF とは異なる液性因子を分泌し、肝機能維持に有効となった可能性が考えられる。

以上のように、細胞間接触を伴わない肝実質細胞と肝星細胞の共培養において、肝機能は維持されたが生着細胞数は経時的に減少した。したがって、更に高機能なバイオ人工肝臓構築のため第 2 章において、細胞機能を損なうことなく生着を維持する培養基材の開発について検討した。

今回開発した新表面修飾法により固定化した、フルクトース修飾 dendrimer 上で肝実質細胞の培養を続けると、肝実質細胞がスフェロイドを形成することを見出した。そして、フルクトースおよびガラクトースを共固定した F/G dendrimer により肝スフェロイドを形成させ基材上に固定することを示した。この時、F/G dendrimer は肝実質細胞へ与えるストレスの少ない培養基材であり、細胞のアポトーシス・ネクローシスを抑制し、肝機能を維持させた。

これまでの検討からも、細胞ごとに異なるリガンドを用いることで、リガンド修飾 dendriマーによって最適な細胞培養表面の創出が可能であることを示してきた。今回、多種のリガンドの効果を相加的に現すことができたことから、リガンド修飾 dendriマーの有効性が大きく広がったと言え、リガンド修飾 dendriマーは、細胞ごとに最適化したカスタムメイドの培養基材表面創出のツールとなると考えられる。

近年、肝機能を代替する方法として、肝臓移植に比べて患者への負担が少ない、あるいは1人のドナーから複数の患者に適用できるなどの理由から肝細胞移植が注目されている。第3章では、これまでに行ってきた肝実質細胞 scaffold の研究から、肝実質細胞を播種した3次元担体をラット腹腔内に移植し、生体内異所性肝組織の構築について検討した。

その結果、肝実質細胞の培養における3次元担体として連通管構造をもった多孔質ヒドロキシアパタイトディスク (IP200) の有効性を示した。そして、無アルブミンラットに肝実質細胞を充填した IP200 を移植したところ、血清アルブミン濃度の上昇が見られた。また、F/G dendriマーが3次元担体である IP200 にも修飾可能であり、2次元培養のみならず、3次元培養においてもその効果を示した。

本研究では、肝実質細胞の移植に IP200 を適用するため、移植した IP200 内の肝実質細胞の生着を確認することを目的に無アルブミンラットをモデルとした。無アルブミンラットは、正常ラットに比べて繁殖性に差はなく1年以上にわたって繁殖可能である。また、血清中の総タンパク質量に差はなくアルブミンの欠損をグロブリンで代償しており、肝機能は正常である。したがって、宿主にとって移植された肝実質細胞の機能は必要がなく、そのために移植細胞の機能が十分発揮できない可能性が考えられる。

今後、先天性代謝異常に対する肝細胞移植を目的とする場合には、高ビリルビン血症を呈する Gunn ラットなどをモデルとし、また、移植した肝実質細胞の増殖を促すような検討が必要であると考えられる。

結論

1. 肝実質細胞と肝星細胞との共培養において、細胞間接触を伴わない系で肝実質細胞の機能維持が確認されたことから、肝星細胞が分泌する液性因子が肝実質細胞の機能維持に有効であることを示した。
2. デンドリマーを高密度に基材表面に固定化する方法を開発した。F/G デンドリマー上で培養した肝実質細胞がスフェロイドを形成し、生着細胞数、および肝機能を維持したことから、肝実質細胞培養基材としての F/G デンドリマーの有効性を示した。また、F/G デンドリマーを用いた肝実質細胞と肝星細胞との共培養による高機能なバイオ人工肝臓開発についての可能性を示した。
3. 多孔質ヒドロキシアパタイトディスク (IP200) を用いた肝実質細胞移植により、無アルブミンラットの血清アルブミン濃度が上昇したことから、IP200 を用いた生体内異所性肝組織構築の可能性を示した。今後、IP200 の表面修飾により高機能な生体内異所性肝組織の構築が期待される。
4. デンドリマーは 2 次元培養に限らず、3 次元担体にも適用できることを示した。また、デンドリマーは、リガンドの選択により細胞に応じた基材表面の創出が可能であり、組織工学全般の発展に大きく貢献することが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御教鞭を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科、教授、八木清仁 先生に心より厚く御礼申し上げます。

研究に際し、御指導、御助言を賜りました大阪大学薬学研究科、助教授、川瀬雅也 先生に深謝いたします。

本研究を進めるにあたり、御討論、御教唆いただきました大阪大学薬学研究科、助手、前田勇 先生、同研究科、技官、梅田房子 先生に深謝いたします。

本研究にあたり、肝星細胞の単離法について御指導いただきました、大阪市立大学医学部、河田則文 先生に感謝いたします。

本研究にあたり、多孔質ヒドロキシアパタイトディスクを御供与いただきました、ティッシュエンジニアリングリサーチセンター、大串始先生に感謝いたします。

そして、直接実験に御協力下さいました筒井俊郎さん、共同実験者の野田恵美さん、村岡聡子さん、並びに生体機能分子化学分野の皆様に感謝いたします。

引用文献

1. Suzuki K: Kantansui 1995; 31: 747-57
2. Tanaka E: Nippon Rinsho 1999; 57 Suppl: 359-61
3. Strain AJ: Gut 1994; 35: 433-6
4. Weiss RA: Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001; 356: 957-77
5. Yang J, *et al.*: Biochem Letts 2001; 23: 1385-9
6. Fox IJ, *et al.*: Am J Gastroenterol 1993; 88: 1876-81
7. Hart A, *et al.*: In Vitro 1983; 19: 841-52
8. Seglen PO: Methds Cell Biol. 1976; 13: 29-83
9. Ellis AJ, *et al.*: Hepatology 1996; 24: 1446-51
10. Strain AJ, *et al.*: Science 2002; 295: 1005-9
11. Yagi K, *et al.*: Artif Organs 1993; 17: 929-34
12. Mabuchi A, *et al.*: Nippon Ika Daigaku Zasshi 1994; 61: 120-8
13. Gregory PG, *et al.*: Cell Transplant 2001; 10: 731-8
14. Pinzani M: Pharmacol Ther 1995; 66: 387-412
15. Schirmacher P, *et al.*: Hepatology 1992; 15: 5-11
16. Bachem MG, *et al.*: J Clin Invest 1992; 89: 19-27
17. Matsushita T, *et al.*: Appl Microbiol Biotechnol 1991; 36: 324-6
18. Yanagi K, *et al.*: Appl Microbiol Biotechnol 1992; 37: 316-20
19. Takeshita K, *et al.*: Artif Organs 1995; 19: 191-3
20. Naruse K, *et al.*: Artif Organs 2001; 25: 273-80
21. Kawase M, *et al.*: Artif Organs 2000; 24: 18-22
22. Yagi K, *et al.*: Biol Pharm Bull 1997; 20: 1290-4

23. Kato K, *et al.*: *Transplant Proc* 1997; 29: 2029–31
24. Shimaoka S, *et al.*: *Exp Cell Res* 1987; 172: 228–42
25. Yagi K, *et al.*: *Cytotechnology* 1992; 10: 25–31
26. Kawada N, *et al.*: *Eur J Biochem* 1993; 213: 815–23
27. Ormsby AA: *J. Biol. Chem.* 1942; 146: 595–7
28. Patterson M, *et al.*: *Methods Enzymol* 1970; 17: 633
29. Border WA, *et al.*: *N Engl J Med* 1994; 331: 1286–92
30. Sato M, *et al.*: *Kaibogaku Zasshi* 2001; 76: 193–200
31. Friedman SL: *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129–40
32. Tomalia DA, *et al.*: *Polym. J.* 1985; 17: 117–32
33. Kukowska-Latallo JF, *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 253–61
34. Yoo H, *et al.*: *Pharm Res* 1999; 16: 1799–804
35. Zhuo RX, *et al.*: *J Control Release* 1999; 57: 249–57
36. Kawase M, *et al.*: *J Biomed Mater Res* 2001; 54: 519–24
37. Koide N, *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 385–91
38. Koide N, *et al.*: *Exp Cell Res* 1990; 186: 227–35
39. Kreisel W, *et al.*: *Acta Histochem* 1994; 96: 51–62
40. Kato S, *et al.*: *Biomaterials* 1998; 19: 821–7
41. Valeri F, *et al.*: *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 257–68
42. Strom SC, *et al.*: *Semin Liver Dis* 1999; 19: 39–48
43. Fisher RA, *et al.*: *Transplantation* 2000; 69: 303–7
44. Fox IJ, *et al.*: *N Engl J Med* 1998; 338: 1422–6
45. Ohashi K, *et al.*: *Nat Med* 2000; 6: 327–31

46. Brown JJ, *et al.*: Hepatology 2000; 31: 173–81
47. Mito M, *et al.*: Transplant Rev 1993; 7: 35–43
48. Stocum DL: Wound Repair Regen 1998; 6: 276–90
49. Kadoya T, *et al.*: J Liq Chromatogr 1988; 11: 2951–67
50. Suzuki T: Nippon Rinsho 1997; 55: 2140–7
51. Noshi T, *et al.*: J Biomed Mater Res 2000; 52: 621–30
52. Nagase S, *et al.*: Science 1979; 205: 590–1
53. Harlow E, *et al.*: Cold Spring Harbor Laboratory 1988; 579–83

