

氏 名	かつら 桂 なが 長 と 門
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2528 号
学位授与の日付	平 成 14 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 消 化 器 外 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Long-Term Culture of Primary Human Hepatocytes with Preservation of Proliferative Capacity and Differentiated Functions (増殖能及び分化的機能を維持した初代ヒト肝細胞長期培養法に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 一 知 教 授 田 中 紘 一 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

「目的」本研究はヒト成熟肝細胞の長期培養及び増殖法の開発を目的とした。

「対象と方法」感染症のない肝切除症例15例より平均7.4gの肝組織片を採取した。平均年齢は51.1歳であった。EDTA-collagenase 灌流を行い、遠心分離で得た成熟肝細胞を type I collagen coated dish に播種した。10%FBS 加 Williams'E 液 (WE 液), 10%FBS 加 KSFM 液 (FBS-KSFM 液), 10%ヒト血清加 KSFM 液 (HS-KSFM 液) の3種の培養液で培養した。光学顕微鏡および走査電子顕微鏡にて形態変化を, ELISA で albumin 産生量, lidocaine 及び urea 代謝能を, Western Blotting で肝細胞 late stage marker の α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, ceruloplasmin の発現を, Bromodeoxyuridine labeling index にて増殖能を検討した。全ての培養液に 10mM nicotinamide, 10ng/ml epidermal growth factor, 0.5 μ g/ml insulin, 10^{-7} M dexamethasone を加えた。「結果」形態学的には, WE 液では1週間, FBS-KSFM 液では1ヶ月で線維芽細胞の増殖により肝細胞は認められなくなった, 一方, HS-KSFM 液では線維芽細胞は殆ど認められず肝細胞は平均2ヶ月(最長3ヶ月間) cuboidal な形態を保ち, 走査電子顕微鏡では peroxysome, mitochondria, glycogen を豊富に認め機能も良好であると推測された。また1ヶ月後からは, 一部に肝組織幹細胞とされている小型肝細胞が増殖する像も認めた。albumin 分泌量は, WE 液は1週間で, FBS-KSFM 液は1ヶ月で測定不能になるが, HS-KSFM 液は2週間 10 μ g/ml/2hrs, 1ヶ月 8 μ g/ml/2hrs, 2ヶ月 4.5 μ g/ml/2hrs と高値を示した。長期培養が可能となった HS-KSFM 液では, 尿素窒素, lidocaine 代謝能は1ヶ月まで測定できたがその後検出感度以下となり, albumin 産成能に比べ早期に機能低下した。しかし, α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, ceruloplasmin の発現は2ヶ月培養後にも認めた。Bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index は2週間後までは10から15%の値を示したが, その後は測定できなかった。また BrdU 陽性細胞については BrdU, albumin 蛍光二重免疫染色を行い, 肝細胞であることを確認した。「考察」ヒト血清を添加した KSFM 液は肝特異的機能を維持したヒト成熟肝細胞の培養期間を延長すると共に小型肝細胞を増殖させる事が可能であった。KSFM 液はカルシウムイオン濃度が低く, これが線維芽細胞の増殖を抑え, その結果肝細胞が維持され, 長期に維持されたその環境が実質分画に混入した小型肝細胞を増殖させ得たと考えられる。ヒト肝細胞を人工肝臓や細胞移植の細胞供給源として臨床応用するためには, 今後これらの細胞を純化, 増殖させることが重要である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, 正常ヒト成熟肝細胞の長期培養及び増殖法の開発を目的としたものである。

手術時に採取した肝組織から肝細胞を分離し, 10%FBS 加 Williams'E 液 (WE 液), 10%FBS 加 Keratinocyte Stimulating Factor Medium 液 (FBS-KSFM 液), 10%ヒト血清加 KSFM 液 (HS-KSFM 液) で培養した。WE 液では1週間, FBS-KSFM 液では1.5ヶ月で線維芽細胞の増殖により肝細胞は認められなくなった。一方, HS-KSFM 液では肝細胞は平均2ヶ月形態を保ち, 透過電子顕微鏡では mitochondria 等を豊富に認め, 1ヶ月後には一部に肝組織幹細胞とされる小型

肝細胞が増殖する像も認めた。albumin 分泌量は、WE 液は 1 週間で、FBS-KSFM 液は 1 ヶ月で測定不能になるが、HS-KSFM 液は 1 ヶ月 $8\mu\text{g/ml/2hrs}$ 、2 ヶ月生 $5\mu\text{g/ml/2hrs}$ と高値を示した。以上より、HS-KSFM 液は肝特異的機能を維持したヒト成熟肝細胞の培養期間を延長するとともに小型肝細胞を増殖させると結論した。

以上の研究は、ヒト肝細胞応用の前臨床研究として培養ヒト肝細胞の特性の解明に貢献し、重症肝不全の治療、薬剤開発等に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年8月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。