

微小環境制御による肝小葉モデルの構築

笠原 大瑚^{*1} 住吉 秀明^{*2} 稲垣 豊^{*3} 木村 啓志^{*4}

Establishment of an *in vitro* Hepatic Lobule Model Based on Microfluidic Technology

by

Daigo KASAHARA^{*1}, Hideaki SUMIYOSHI^{*2}, Yutaka INAGAKI^{*3} and Hiroshi KIMURA^{*4}

(Received on Mar. 31, 2016 and accepted on May. 12, 2016)

Abstract

In this paper, we report the establishment of an oxygen gradient microfluidic device that mimics an *in vitro* hepatic lobular architecture. During the drug development process, reproduction of the hepatic architecture and function *in vitro* is necessary and important to evaluate the efficacy and toxicity of the drugs. In this study, we aimed to construct a microfluidic device that maintains the specific hepatocyte functions under an oxygen concentration gradient. For this purpose, we fabricated a T-shaped microchannel within a microfluidic device. After simulating the gradient of oxygen concentration, we evaluated the actual oxygen concentration gradient in the device using a sensing film coated with an oxygen-responsive dye. We also confirmed the survival and functions of hepatocytes that had been seeded inside the device by using a live and dead cell staining kit and the indocyanine green uptake and excretion test, respectively. However, hepatocyte-specific functions such as expression of glucose metabolizing enzymes declined during culture in the presence of sodium sulfite, which was used to decrease the oxygen concentration in the perfusion medium. We conclude that this microfluidic device may serve as a useful tool for drug development, but further experiments are needed to maintain the stable primary culture of hepatocytes in the device by utilizing alternative oxygen reducing methods.

Keywords: Hepatic lobule, Metabolic zonation, Microfluidic device, Laminar flow, Oxygen gradient

1. 緒言

現在、新規薬剤の開発過程においては、肝細胞機能に及ぼす影響の評価が重要となっている。肝臓は生体内で最大の臓器であり、生体の恒常性を保つための様々な機能を有している。そのため、薬剤についても肝臓を介することによって標的に対して初めて効力を示すものも多い。すなわち、肝臓の代謝、排泄などの要因を踏まえた上で、薬効や毒性を評価することが創薬では欠くことのできない条件とされる¹⁾。

肝臓において代謝された薬剤の人体に対する薬効毒性は、まず小動物などを用いた動物実験において評価される。しかし、ヒトと動物の間には薬物代謝の上で種差が存在することから、動物実験で得た知見はヒトに当てはまらないことも多い。そこで、動物実験の代替法として薬剤評価に用いられている細胞に、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞を使用することによって種差問題などをクリアできることが期待されている²⁾。しかしながら、培養皿のような静的な培養環境では、生体内において複雑に形成されている臓器構造を模することが困難である他、生体内が血流などの流れに起因する動的な環境であ

ることから、静置培養系である培養皿では細胞に必要な栄養分や酸素の供給状況が全く異なり、実際の生体内における正確な薬物動態を把握することは難しい。この問題に対して我々は、マイクロ流体デバイス技術の応用を検討した。

マイクロ流体デバイスとは、微細な構造を形成可能な樹脂製のチップであり、内部に細胞を導入することによって細胞に対するアプローチを制御することが可能である³⁾。これまでのマイクロ流体デバイスの研究分野の中では、細胞の薬物動態の評価⁴⁾や、人工多能性幹細胞の分化制御⁵⁾など、細胞培養に関連するセルエンジニアリングデバイスとしての利点が報告されてきた。なかでも、肝臓に着目したマイクロ流体デバイスの研究としては、Nakao らによって行われた肝細胞索構造の再現が挙げられる。これは、肝臓を構成している最小構成単位である肝小葉に着目した研究であり、類洞に沿って規則正しく配列されている肝細胞列（肝細胞索）をマイクロ流体デバイスによって再現したものである⁶⁾。

しかしながら、実際の肝小葉では Fig. 1 に示すように門脈周辺域（Zone 1）から中心静脈周辺域（Zone 3）に向かって類洞内を血液が流れる過程で肝細胞による物質代謝が行われるため、Zone 1 から 3 にかけて酸素や栄養分などの濃度が異なるという特殊性がある⁷⁾。この酸素や栄養分などの濃度勾配により、Zone 1 では好気性代謝で

*1 工学研究科機械工学専攻修士課程

*2 医学部医学科講師

*3 医学部医学科教授

*4 工学部機械工学科准教授

ある糖新生や尿素合成などが優位に行われ、Zone 3 では嫌気性代謝である解糖系やグルタミン生成酵素などが優位に発現することが知られており、この肝細胞が存在する部位によって発現する機能が異なる代謝機能の不均一性を” Metabolic zonation”と呼んでいる。生体外で肝臓に着目した薬物動態評価系を確立する際には、肝細胞配列の再現のみならず、この Metabolic zonation に着目することが非常に重要である。また、Metabolic zonation の形成には肝細胞の酸素消費により形成される酸素濃度勾配が重要な因子として作用することも報告されている⁸⁾。

そこで本研究では、内部に酸素濃度勾配が形成されるような肝細胞培養のためのマイクロ流体デバイスを開発し、生体外において肝小葉特異的な機能発現を再現することを目的とした。設計したデバイスのシミュレーション解析を行い、その妥当性を確認するとともに、本デバイスを用いて酸素濃度勾配下で灌流培養を行った際の肝細胞の機能解析を評価した結果について報告する。

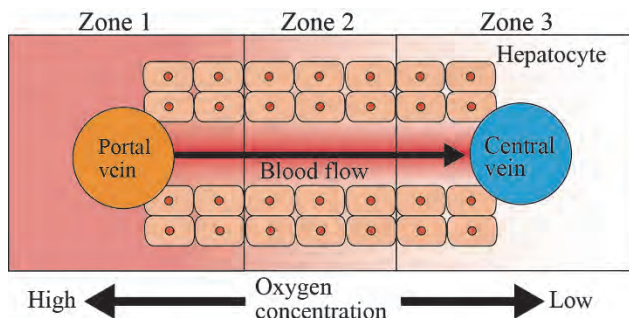


Fig. 1 The concept of metabolic zonation.

2. 実験方法

2.1 酸素濃度勾配形成デバイスの構築

本研究では、層流現象を利用してマイクロ流体デバイス内に酸素濃度勾配を形成する方法として、Fig. 2A に示すようなデバイスコンセプトを提案した。マイクロ流体デバイス内では、粘性力が慣性力よりも支配的になりレイノルズ数が極めて小さくなることで、2種類の液体を1つの流路に送液しても混合が起こらない層流現象が発生する⁹⁾。そこで、微細な構造を形成可能なシリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を、半導体技術を用いて作製した流路形状の型に流し込んで焼き固め、剥離することでT字型の微細流路が転写されたチップを作製した。この流路チップが有する二つの流入口からそれぞれ酸素濃度が異なる培養液を送液すると、培養液が一つに合流した際に二つの液性界面領域に層流現象が生じ、時空間的に拡散による混合が起きるため、流路内に酸素濃度勾配を形成することが可能である。

一般的に、マイクロ流体デバイスは接着基板であるガラスとPDMS製の流路チップを化学的に接着して用いる。しかしながら、細胞培養デバイスとしての観点からは、RNA 発現量の解析や染色などの操作を行うために細胞へのアプローチが容易でなければならない。そこで、本デバイスの設計思想として新たに細胞へのアプローチが

簡便な設計を提案した。本研究で設計したデバイスの構造寸法と導入した細胞を評価する際、染色操作や細胞の回収を容易にするため取り入れたデバイス脱着機構図をFig. 2B に示す。T字型流路を有しているデバイスは流入口と、細胞培養部および酸素濃度勾配形成部を兼ねている流路から成る。流路径は流路高 200 μm 、流路幅は直径 1~2 mm の肝小葉内の環境を模倣するため 2 mm とした。Fig. 2C に、実際に作製したデバイス写真を示す。本デバイスでは、細胞の接着基板となるスライドガラス(S1111, 松浪硝子工業)と微小流路構造を有するマイクロチップから構成されている。スライドガラスにコラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-C, 新田ゼラチン) でコートをし、流路チップをクリップ (ライオン事務器, No.111) によって圧着した。その後、コラーゲンゼラチン法により単離したマウス由来初代培養肝細胞を内部に導入した。このように本デバイスでは培養後にクリップを外すことでデバイスの着脱が可能となるため、培養後の細胞染色や回収などのアプローチが容易である。

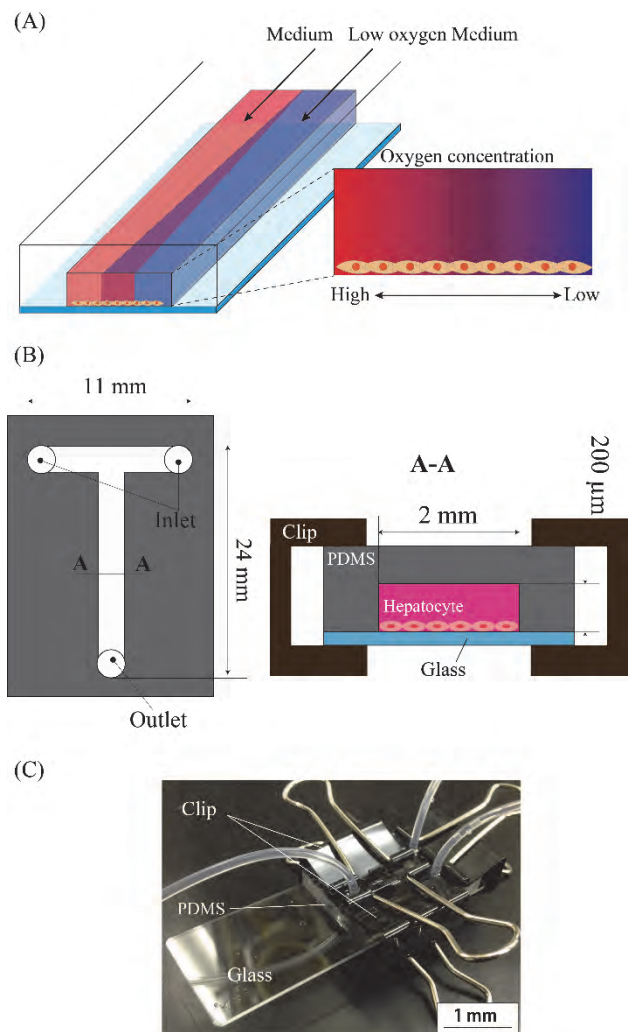


Fig. 2 The proposed microfluidic device. (A) Schematic image of oxygen concentration gradient and (B) the structure and dimensions of the micro channels are shown. (C) Overview of the device.

2.2 数値シミュレーションによる流体解析

作製したデバイス内で実際の肝小葉と同様の酸素濃度勾配を形成するため、本実験では設定した流量およびデバイス形状において流路内で適正な酸素濃度勾配の形成が可能か評価を実施した。ここでは、製図ソフト (AutoCAD 2014, Autodesk Inc.) によって疑似的にモデリングしたデバイスを有限要素解析ソフト (COMSOL Multiphysics, COMSOL Inc.) に読み込んだ。シミュレーションを行うことでデバイス内に形成される層流が流路を進んでいく際に起こる自然拡散によって生じる酸素濃度勾配を計算し、デバイス内での酸素濃度勾配が形成されることを確認した。実験条件はデバイスの寸法が流路高 200 μm , 流路幅 2 mm, 送液対象を H₂O とし、流量は 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ の 3 条件を解析した。

2.3 酸素応答性色素膜による酸素濃度勾配の可視化

2.2 節で述べた有限要素解析によるデバイス内酸素濃度勾配形成のシミュレーションの妥当性を証明するためには、酸素を酸素応答性物質によって可視化し、解析する必要がある。そこで、発光特性が酸素分圧によって変化する酸素応答性色素の白金オクタエチルポルフィリン (Sigma-Aldrich) を PDMS に混合し易くするため有機溶媒であるトルエン (和光純薬工業) に溶解した上で PDMS とリンカー内に重合し、スピニングコート (MIKASA Opticoat, 1000 rpm) によってスライドガラス上に膜厚 88 μm の酸素センシングフィルムを作製した¹⁰⁾。

このスライドガラス上に作製した酸素センシングフィルムに対し、PDMS 製の流路チップを載せて酸素プラズマ処理によるボンディングを行った後、2 つの流入口から酸素濃度を調整した超純水を送液することで酸素濃度勾配を形成し、蛍光顕微鏡 (DP72 OLYMPUS) によって励起光 (330~385 nm) 照射による蛍光観察を行った。撮影した蛍光観察像を image J ソフトウェアにて解析することで流路内の蛍光強度分布を測定し、物質濃度分布を把握した。実験条件は酸素濃度 0% および 20%, 流量は 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。

2.4 初代肝細胞の単離と培養

デバイス内で肝細胞を培養するにあたり、マウスの肝組織からコラゲナーゼ灌流法を用いて初代培養肝細胞を単離した¹¹⁾。すなわち、ソムノペンチル麻酔下に胸腔を開いて右心耳を切断、左心房にカニューレを挿入し、ペリスタポンプを用いて内部に EDTA (0.19 mg/ml) を含む前灌流液を送液することで心臓脱血を行った後、門脈内にカニューレを挿入し、前灌流液を送液した。次に、コラゲナーゼ (0.06 mg/ml) を含む本灌流液を送液して肝組織の消化を行った上で、組織を単離して灌流液に浸し、ほぐすことで組織から細胞を液中に分散させた。細胞懸濁液中には肝実質細胞の他、クッパー細胞や星細胞などの非実質細胞も含まれるため、500 rpm, 1 分間の低速遠心を 2 回繰り返すことによって肝実質細胞のみを収集した。得られた初代培養肝細胞は、10% ウシ胎仔血清, 2% L-グルタミン, 1% ペニシリン G・ストレプトマイシン, 2% 重炭酸ナトリウム, 1% 非必須アミノ酸を含むダル

ベッコ変法培地を用いて、デバイスや培養皿にそれぞれ適正播種密度で培養を行った。なお、本実験は東海大学動物実験実施規定に遵守して実施された。

2.5 肝細胞生存率の評価試験

シミュレーションの結果に基づいて作製したデバイスを用いて、従来の培養系である培養皿と同様の細胞培養が行えるか検討を行った。マウスから単離した初代培養肝細胞を、コラゲンコーティングを施したデバイスおよび培養皿に 3.5×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種し、37 °C 炭酸ガスインキュベーター内で一晩静置した。播種 24 時間後に肝細胞の定着を確認し、培養皿は培地交換、デバイス内にはシリジポンプを用いて培地を流量 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ で送液し、24 時間灌流培養を行った。播種 48 時間後に、培養皿とデバイスに対し Phosphate buffered saline (PBS) 3 ml あたり Calcein AM (同仁化学研究所) 15 μl と、Propidium iodide (PI) solution (同仁化学研究所) 12 μl を混合した染色液を調整し、PBS で培地を洗浄後、染色液を加えて 15 分間 37 °C インキュベーター内に静置することで生死細胞の二重染色を行った。また、Image J ソフトウェアを用いて、撮影した生細胞の蛍光像から細胞数を数え、生存率を算出した。

2.6 肝細胞機能の評価試験

肝細胞機能を評価する 1 指標として、ICG (インドシアニングリーン) 検査を用いた。これは肝細胞が体内の異物をとらえ中和する働きを利用して、ICG を体内に注射し一定時間後に採血して ICG の血液残留度を計測することで肝機能の正常度合いを診断する方法であり、臨床の現場でも用いられている¹²⁾。この ICG をデバイス内で灌流培養した肝細胞に曝露することで、肝細胞の物質取込と排泄機能が正常に保たれているかの評価を行った¹³⁾。単離したマウス由来初代培養肝細胞を、コラゲンコートしたデバイスおよび 35 mm 培養皿に対して 3.5×10^4 cells/cm² の密度になるよう播種し、37 °C インキュベーター内に一晩静置した後、ICG (参天製薬) 濃度が 5 mg/ml になるよう調製した培養液を肝細胞に 30 分間曝露を行い、30 分後における肝細胞の物質取込能を評価するため顕微鏡によって明視野像を撮影した。その後、通常の培養液に置換して 6 時間培養後、物質排泄能を評価するため同様に明視野像を撮影した。

2.7 脱酸素剤を用いた生体内酸素分圧の形成

デバイス内で酸素濃度勾配下における肝細胞培養を行うにあたり、脱酸素剤による生体内近似的な酸素濃度勾配が形成可能かの検討を行った。脱酸素剤には、化学的に酸素と結合して脱酸素化を行う亜硫酸ナトリウム (関東化学) を用いた。培養液に亜硫酸ナトリウムを溶解して亜硫酸塩濃度 0~0.1% までを 0.01% ごとに濃度を振り、スターラーによって攪拌 (約 300 rpm 程度) しながら溶存酸素計 (SI782, Strathkelvin Instruments) を使用して溶存酸素濃度を計測した。

2.8 生体内近似的酸素濃度下での肝細胞の生存評価

亜硫酸ナトリウムを用いた酸素濃度調整培地で肝細胞を培養するにあたり、肝細胞が亜硫酸ナトリウム存在下で培養可能かを評価するため、肝細胞に対する細胞毒性評価を行った。96 well コラーゲンプレート（旭硝子）にコラーゲンゼラチン法によってマウスから単離した初代培養肝細胞を播種し、37 °C炭酸ガスインキュベーターで一晩静置した。播種 24 時間後に亜硫酸ナトリウム濃度を 0 ~ 0.1 % まで 0.01%刻みに調整した酸素濃度調整培地を加え、播種 48 時間後に細胞数測定の為の Cell counting kit-8（同仁化学研究所）を各ウェルに添加してマイクロプレートリーダー（Spectra MAX 250, Molecular devices）を用いた肝細胞の生細胞数測定を行った。

さらに、培地の酸素濃度調整に用いた亜硫酸ナトリウムの肝細胞に対する毒性を詳細に評価するため、アルブミン遺伝子のエンハンサー・プロモーターを用いて肝臓特異的に緑色蛍光タンパク質（Enhanced green fluorescent protein, EGFP）を発現させるトランスジェニックマウスを用いた。同マウスから初代肝細胞を単離し、デバイスと培養皿に播種密度 3.5×10^4 cells/cm² で培養を行った。播種 24 時間後に細胞の定着を確認後、通常培地あるいは 0.08 % 亜硫酸ナトリウム懸濁培地をそれぞれ添加して培養を継続した。播種 48 時間後に蛍光観察を行い、EGFP の消長を確認した。

2.9 肝小葉模倣環境下での肝細胞機能解析

本デバイス内において、生体内近似的な物質濃度環境下で肝細胞培養を行った後、糖代謝酵素遺伝子発現を定量化することで、肝細胞の機能解析を試みた。コラーゲンコートを行ったデバイス内に、単離したマウス由来初代培養肝細胞を導入し、播種 24 時間後に酸素濃度およびグルコース濃度を調整した培養液を各流入口から流量 2 μl/min で送液して灌流培養を行った。物質濃度条件は、門脈周辺域に相当する亜硫酸ナトリウム濃度 0.06 %・グルコース濃度 200 mg/dl、中心静脈周辺域に相当する亜硫酸ナトリウム濃度 0.08 %・グルコース濃度 100 mg/dl の 2 条件とした。播種 72 時間後にデバイスの左右両端部分から細胞を回収し、RNeasy mini kit（QIAGEN）を用いて total RNA を抽出した。肝細胞の部位特異的な機能発現の指標として、門脈域周辺に発現する糖新生酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) と中心静脈域に発現する解糖系酵素 glucokinase (GK) をコードする各遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR システム（Step One Plus, Applied Biosystems）を用いて定量解析した。対照として、どのような条件下でも一定の発現を示す glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

2.10 コラーゲンコートゲル培養

肝臓から単離した肝細胞は、生体外で培養を行うと徐々に肝細胞としての形態や生体内で有している様々の機能を喪失する。そこで、生体外培養において肝細胞の形態や機能の維持、さらに毛細胆管形成の促進効果など

が報告されているコラーゲンサンドイッチ法¹⁴⁾を用いて検討を行った。マウスから単離した初代肝細胞を 24 well コラーゲンプレート（旭硝子）に密度 3.5×10^4 cells/cm² で播種し、24 時間後に細胞の定着を確認後、Cellmatrix Type I-A（新田ゼラチン）を用いて調製したコラーゲングル 100 μl を培養肝細胞上に重層し、3 日目まで観察を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 数値シミュレーションによる流体解析

COMSOL によって得られた、デバイス流路内の 2 次元空間において形成される酸素濃度勾配のシミュレーション画像を Fig. 3A に、酸素濃度勾配形成シミュレーション画像の流路中央部 X-X 断面を画像解析ソフトウェア（Image J, NIH）によって断面解析し、グラフ化した結果を Fig. 3B に示す。グラフの縦軸は輝度値、横軸はデバイスの流路幅をそれぞれ表している。2.2 節にて設定した 3 通りの流量条件を用いてシミュレーションを行った結果から線形近似曲線を引き、各条件を比較すると、一次の線形近似曲線において相関係数 R² 値が線形に近い値 1 に最も近く、かつデバイス流路端 0 μm から 2000 μm にかけて線形的な酸素濃度勾配を形成可能な流量条件が 2 μl/min であることを確認した。この結果から、作製したマイクロ流体デバイスの流路内において、肝小葉内に近似的な酸素濃度勾配を形成可能なことが示唆された。

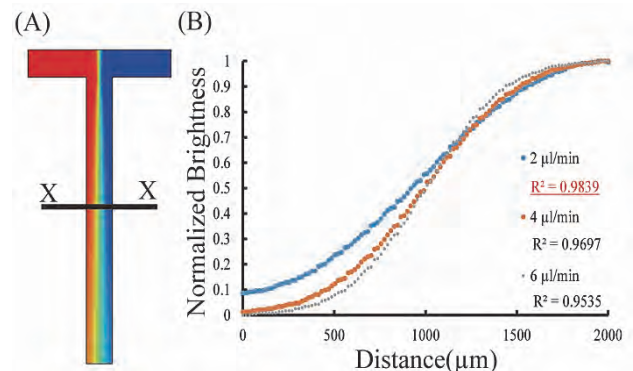


Fig. 3 Results of FEM simulation. (A) A T-shaped microchannel. (B) Plot in the X-X cross section.

3.2 酸素応答性色素膜による酸素濃度勾配可視化

Fig. 4A に酸素濃度勾配を可視化して撮影した蛍光顕微鏡像を、Fig. 4B に X-X 断面から蛍光強度を解析したグラフを示す。測定した部分の輝度の最高値で全測定値を正規化すると、層流が形成されている液相界面部分の輝度値は 0.5~0.6 であった。また、流路内において輝度値の緩やかな勾配が形成されていることを確認した。

以上より、流路内において数値シミュレーション結果に近似的な酸素濃度勾配が形成されていることから、シミュレーション結果の妥当性を証明するとともに、本デバイスを用いることで肝小葉における酸素濃度勾配形成が実現可能なことを確認した。

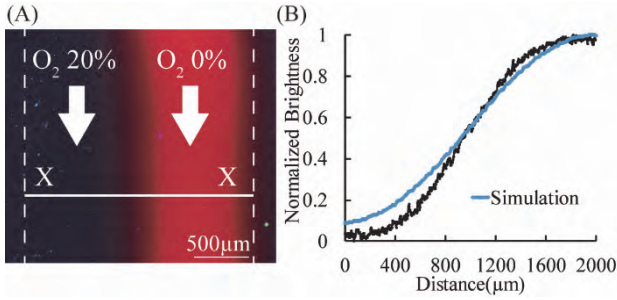


Fig. 4 Fluorescent imaging of the device with different concentrations of oxygen fluids. (A) Fluorescent image. (B) Calculated brightness of X-X line.

3.3 肝細胞生存率評価試験

Fig. 5A に、デバイスあるいは培養皿上で培養した肝細胞の明視野像を示す。明視野像においてはデバイスと培養皿ともに高密度培養が行われている様子を確認した。次いで、Fig. 5B と Fig. 5C に、Calcein AM 染色 および PI 染色後の蛍光撮影像を示す。本実験で使用した Calcein AM は生細胞の細胞膜を透過して細胞内のエステラーゼによる加水分解によって緑色に、PI は死細胞の細胞膜を透過して核酸と結合することで赤色に染色する。Fig. 5B において培養皿とデバイスの生細胞蛍光写真を比較すると、双方とも細胞質が明るい緑色蛍光に染色されている状態を確認した。また、死細胞に関しては、Fig. 5C に示す結果より、デバイスと培養皿で同程度の赤色蛍光を確認した。Fig. 6 に、デバイスと培養皿を用いた際の生存率を示す。算出した結果から、デバイスと培養皿ともに 80% 近い生存率を確認した。以上の結果より、デバイスでも培養皿と同様に初代肝細胞の培養が可能であることが示された。

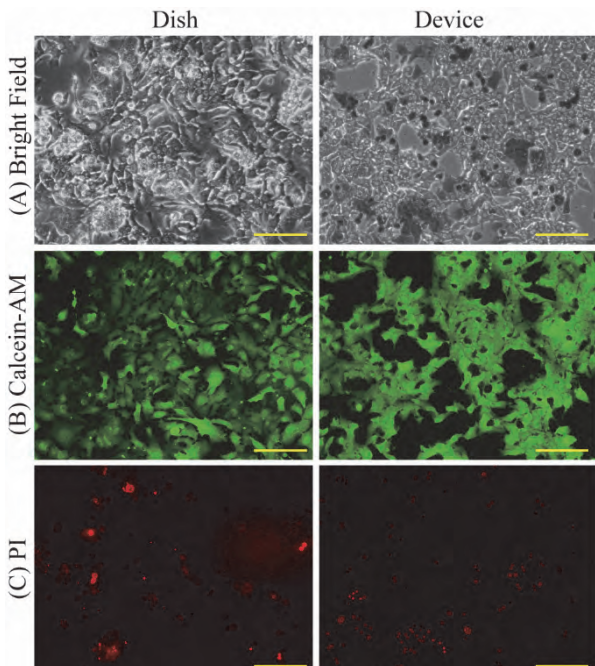


Fig. 5 Microscopic images of primary cultures of hepatocytes. (A) Bright field image. (B) Calcein AM stained. (C) PI staining. Scale bars, 200μm.

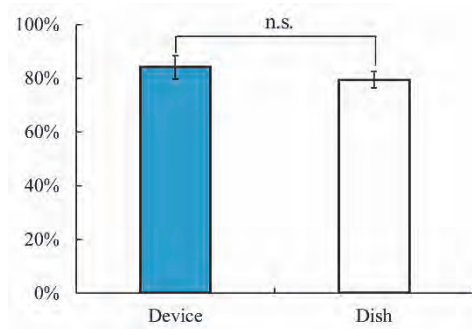


Fig. 6 Comparison of the survival rate of primary cultures of hepatocytes between the device and dish.

3.4 肝細胞生存率評価試験

Fig. 7A に ICG 導入前の培養肝細胞の明視野像, Fig. 7B に ICG 導入 30 分後における肝細胞の ICG 取込み像, さらに Fig. 7C に通常培地にして置換 6 時間後の肝細胞からの ICG 排泄像を示す。ICG を導入後 30 分後では、培養皿で培養した肝細胞のほとんどが ICG を取り込んでいないのに対し、デバイス内で培養した大半の肝細胞が ICG を取り込んでいる様子を確認した。また、通常の培養液に置換した 6 時間後には、30 分間曝露後に ICG を取り込んでいた肝細胞が ICG を排泄することによって緑色が薄くなっている像を確認した。この結果より、培養皿では確認困難であった肝細胞の機能維持 (ICG 取り込みと排泄) がデバイス内において正常に保たれていることが確認され、デバイス内で実現可能な初代培養肝細胞の高密度培養が、肝細胞の正常な物質の取込・排泄機能の維持を促進していることが明らかになった。

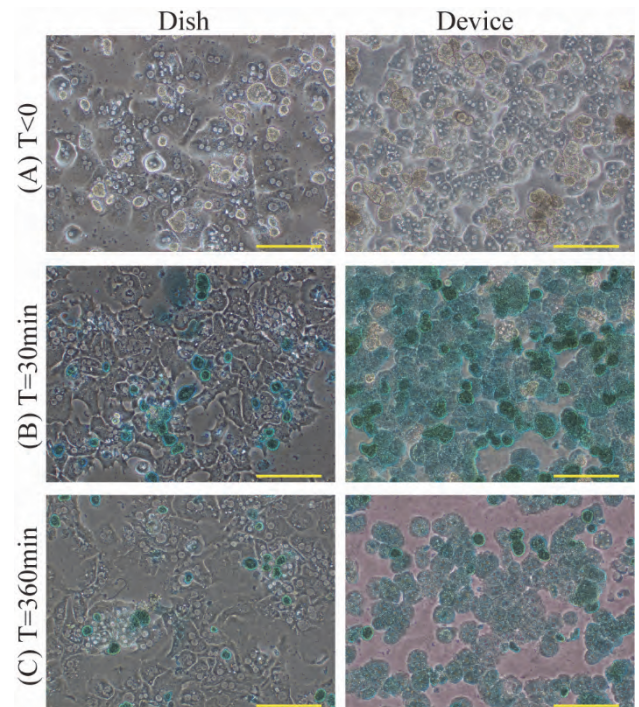


Fig. 7 ICG uptake and excretion by primary cultures of hepatocytes. (A) Pre-staining. (B) ICG uptake at 30 minutes. (C) ICG excretion after 6 hours. Scale bars, 100μm

3.5 脱酸素剤を用いた生体内酸素分圧の形成

Fig. 8 に、用いた亜硫酸ナトリウム濃度別の酸素濃度の測定結果を示す。一般に、肝小葉内における酸素濃度は門脈域が 70 mmHg, 中心静脈域が 40 mmHg と言われており、この結果より肝小葉内の酸素濃度を形成可能な亜硫酸ナトリウム濃度は 0.06 % (門脈域) および 0.08 % (中心静脈域) と算出された。

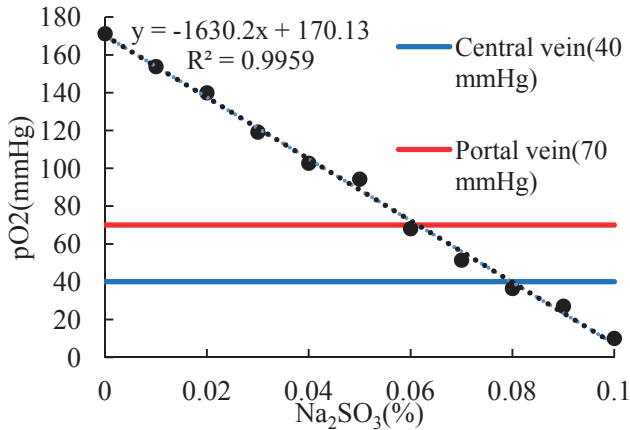


Fig. 8 Oxygen concentrations obtained by using Na_2SO_3 solution.

3.6 生体内近似的な酸素濃度下の肝細胞生存評価

異なる酸素濃度下の培養肝細胞の生存率を Fig. 9 に示す。亜硫酸ナトリウムを加えることで生細胞数が低下したが、生体内近似的な酸素濃度を形成可能な亜硫酸ナトリウム濃度域 (0.06~0.08 %) においては 60 % 程度の同程度の生細胞数を維持した。これにより、デバイス内における評価の際にある程度の細胞毒性の影響は存在するものの、細胞生存率については同条件での評価が可能であることを確認した。

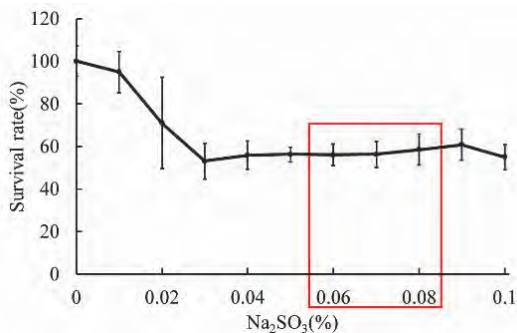


Fig. 9 Survival rates of primary cultures of hepatocytes in the presence of Na_2SO_3 .

3.7 肝小葉模倣環境下での肝細胞機能解析

亜硫酸ナトリウムを用いた培養条件下で 2 種類の糖代謝遺伝子の発現を定量解析した結果、陽性対象である GAPDH においてはシグナル増幅が確認されたが、PEPCK と GK はいずれも抽出した RNA が検出限界より薄い濃度であったため検出が困難であった。この際、亜硫酸ナトリウム培地送液後の肝細胞には、Fig. 10 に示すような形態変化が見られた。すなわち、GAPDH 遺伝子が

増幅されていることから、リアルタイム PCR の実験系は正常に動いているものの、肝細胞機能に対する亜硫酸ナトリウムの毒性が強い可能性が考えられた。

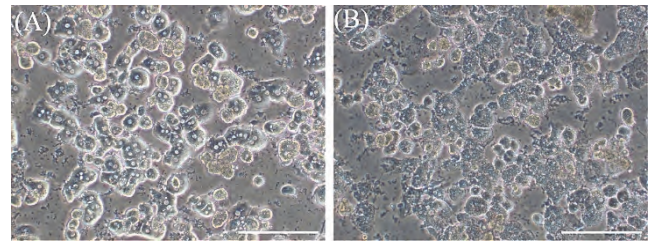


Fig. 10 Microscopic images of primary hepatocytes at (A) day 1 or (B) day 3 after perfusion culture in the presence of sodium sulfite. Scale bars, 100 μm .

この可能性を証明するため、EGFP マウスから単離した初代肝細胞をデバイスと培養皿に播種し、亜硫酸ナトリウムの有無で培養を行った。Fig. 11 に示すように、通常の培地を用いて培養を行った場合は、デバイスと培養皿のいずれも肝細胞の EGFP 蛍光に減退は確認されなかった。一方、亜硫酸ナトリウムを添加した培地で培養を行った際は、デバイス内培養では培養皿以上に EGFP 蛍光が消失している様子が確認できた。すなわち、3.6 節に示した亜硫酸ナトリウムの濃度別肝細胞生存評価では約 6 割の生存率を確認したが、EGFP の蛍光挙動を用いた細胞毒性評価では、亜硫酸ナトリウムに起因する細胞死および EGFP 消失がより顕著であることを確認した。また、上述した RNA 収量の減少によりリアルタイム PCR が解析不可能となった原因は、デバイス内の培地に亜硫酸ナトリウムを添加したことに起因することが示唆された。

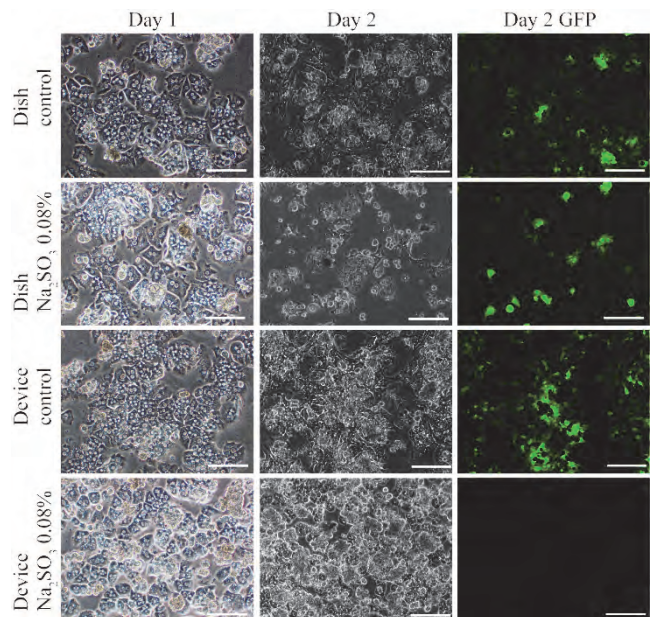


Fig. 11 Bright field images and fluorescent microscopic images of primary cultures of EGFP-expressing hepatocytes in the absence or the presence of sodium sulfite. Scale bars, 200 μm .

3.8 コラーゲングル培養による肝細胞形態への影響

Fig. 12 に、通常培養とコラーゲンサンドイッチ培養を行った際の継時的変化を示す。細胞の定着状態や播種密度に関しては同等であったが、コラーゲンサンドイッチ培養を行った場合には肝細胞群の形態に変化が生じ、肝細胞間に線状の毛細胆管が生じていることを確認した。この結果より、コラーゲンサンドイッチ法を用いることによって肝細胞の形態を良好に維持し、毛細胆管形成という生体内に近い状態を再現可能なことがわかった。本方法を酸素濃度勾配形成デバイス内に複合的に組み込むことで、肝細胞の状態を良好に保ち、生体外肝小葉環境の再現に有用である可能性が示唆された。

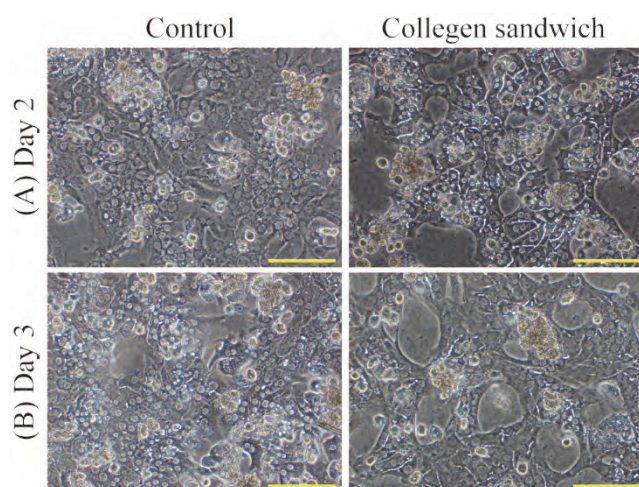


Fig.12 Microscopic images of primary hepatocytes in regular control or collagen sandwich culture at (A) day 2 or (B) day 3. Scale bars, 100 μ m.

4. 結論

従来の静置培養系と比較してより生体内に近い環境を生体外で再現するため、マイクロ流体デバイス技術を用いて肝小葉特異的な酸素濃度勾配を形成可能な肝小葉環境模擬デバイスを開発した。肝小葉内における酸素濃度に近似した微小環境の構築が可能となったが、脱酸素剤として用いた亜硫酸ナトリウムの肝細胞毒性が問題であり、他の方法の応用も含めてさらなる検討が必要と考えられた。

謝辞. 項を終えるにあたり、実験の実際について多くのご助言を賜りました医学部医学科の柳川享世奨励研究員に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨は、第 29 回肝臓洞壁細胞研究会学術集会（平成 27 年 10 月 31 日）にて発表した。

参考文献

1) Y. Kanda, [Cardiac differentiation of human iPS cells], *Nihon Yakurigaku Zasshi* 141 pp.32-36 (2013).

2) T. Kido, Y. Kouji, K. Suzuki, A. Kobayashi, Y. Miura, E.Y. Chern, M. Tanaka, A. Miyajima, CPM Is a Useful Cell Surface Marker to Isolate Expandable Bi-Potential Liver Progenitor Cells Derived from Human iPS Cells, *Stem Cell Reports* 5 pp.508-515 (2015).

3) T. Kraus, E. Verpoorte, V. Linder, W. Franks, A. Hierlemann, F. Heer, S. Hafizovic, T. Fujii, N.F. de Rooij, S. Koster, Characterization of a microfluidic dispensing system for localised stimulation of cellular networks, *Lab Chip* 6 pp.218-229 (2006).

4) S. Ostrovidov, J. Jiang, Y. Sakai, T. Fujii, Membrane-based PDMS microreactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures, *Biomed Microdevices* 6 pp.279-287 (2004).

5) J. Kawada, H. Kimura, H. Akutsu, Y. Sakai, T. Fujii, Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation, *Lab Chip* 12 pp.4508-4515 (2012).

6) Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii, Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device, *Biomicrofluidics* 5 22212 (2011).

7) G.L. Semenza, Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1, *Physiology (Bethesda)* 24 pp.97-106 (2009).

8) K. Jungermann, T. Kietzmann, Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver, *Hepatology* 31 pp.255-260 (2000).

9) E.R. Choban, L.J. Markoski, A. Wieckowski, P.J.A. Kenis, Microfluidic fuel cell based on laminar flow, *Journal of Power Sources* 128 pp.54-60 (2004).

10) K. Montagne, K. Komori, F. Yang, T. Tatsuma, T. Fujii, Y. Sakai, A micropatterned cell array with an integrated oxygen-sensitive fluorescent membrane, *Photochem Photobiol Sci* 8 pp.1529-1533 (2009).

11) T. Moro, S. Nakao, H. Sumiyoshi, T. Ishii, M. Miyazawa, N. Ishii, T. Sato, Y. Iida, Y. Okada, M. Tanaka, H. Hayashi, S. Ueha, K. Matsushima, Y. Inagaki, A Combination of Mitochondrial Oxidative Stress and Excess Fat/Calorie Intake Accelerates Steatohepatitis by Enhancing Hepatic CC Chemokine Production in Mice, *PLoS ONE* 11 e0146592 (2016).

12) Q.S. Sheng, R. Lang, Q. He, Y.J. Yang, D.F. Zhao, D.Z. Chen, Indocyanine green clearance test and model for end-stage liver disease score of patients with liver cirrhosis, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8 pp.46-49 (2009).

13) C.-M. Ho, A. Dhawan, R.D. Hughes, S.C. Lehec, J. Puppi, C. Philippeos, P.-H. Lee, R.R. Mitry, Use of indocyanine green for functional assessment of human hepatocytes for transplantation, *Asian Journal of Surgery* 35 pp.9-15 (2012).

14) J. Yin, Q. Meng, Use of primary rat hepatocytes in the gel entrapment culture to predict in vivo biliary excretion, *Xenobiotica* 42 pp.417-428 (2012).