

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656129

研究課題名(和文) 肝臓組織再生に向けた肝細胞灌流抽出の流動学的研究

研究課題名(英文) Investigation of rheological effect on Hepatocyte isolation procedure for liver regeneration

研究代表者

水沼 博 (Mizunuma, Hiroshi)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：20117724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：次世代型医療として期待される肝細胞移植、パイオ人工肝臓、組織再生肝臓の確立のために肝細胞灌流抽出に関する詳細検証は必要不可欠である。本研究ではカテーテルや留置針を想定した細管せん断負荷実験ならびに一定の強度・時間で剪断を負荷可能な回転円板によるせん断付加実験、また、細胞機能評価として単離された細胞と複数個の細胞で細胞群を形成する細胞間でのアンモニア代謝能の差異に着目した細胞機能評価実験をおこない、流体力学的側面から流動下における肝細胞の力学特性を解明した。これらの成果をふまえ、肝細胞の機能を維持し、より多くの肝細胞を取得するための効率的な、細胞抽出手法を提案した。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte isolation procedure using a perfusion is one of the most important process for improvements of cell transplantation, developments of an artificial biological liver and establishments of a liver regeneration. In this study, three types of experiments were employed to investigate the rheological effect of the flow on the hepatocyte viabilities and functions during the isolation procedures. The micro-channel experiment imitated the clinical procedures using a needle and catheters was employed to clarify the effect of the shear stress induced near wall region in micro-channel. The rotating disks experiment was employed to investigate the effect of the shear stress intensity and exposure time on the cell viability. Furthermore, the evaluation experiment for the cell function was conducted to find the difference of the metabolisms of ammonia between isolated single cells and clustered cells.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：バリエーション流体力学 細胞治療 移植 せん断 マイクロチャネル

1. 研究開始当初の背景

肝臓の機能は、糖、タンパク、脂質の代謝、有害物質の処理、胆汁生成、血液浄化・管理など広範囲にわたる。この複雑な多くの機能は、肝臓を構成する肝細胞により担われている。この肝細胞の機能を人工的に代替することは難しく、移植不適合なドナー肝臓やES細胞、iPS細胞などの幹細胞分化により直接的に取得可能な肝細胞を積極的に活用する研究が進められている。中でも臨床への期待の高い肝細胞移植、肝細胞数維持等の課題のあるバイオ人工肝臓、そして、再生医療との融合への期待の高まる組織再生肝臓などの次世代型医療技術確立のためには、その詳細な解明が期待されている。肝細胞移植とは、一時的な肝機能代替を期待して肝細胞を門脈等から供給し、急性肝炎など肝不全の治療、肝臓移植までのつなぎ治療として大きな期待があり、臨床研究の段階に入りつつある。しかしながら、治療効果を得るには、 10^9 程度の十分な量の機能の高い肝細胞をいかに確保するかが大きな課題となっている。さらに、生分解性物質による多孔質構造や脱組織化された血管構造内に肝細胞を播種し、肝再生を期待する組織再生肝臓技術が精力的に研究されているものの、機能維持しさらに再生能力の高い多数の肝細胞を確保し、いかに損傷を与えず播種し再生させることができるかが、大きな課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓組織再生などの革新的な医療技術確立に重要な肝細胞分離プロセスにおいて未解明のまま利用されている灌流抽出時、細胞移植時の流動下における肝細胞に対して流体力学的な視点から明らかにする。肝細胞の灌流抽出による組織からの分離時、微細径カテーテルなどによる細胞輸注移植時などの本来は臓器組織内に存在する肝細胞が流動の影響により破壊・損傷などが考えられる。しかしながら、流体力学的な視点からの検討は十分になされておらず、機能を十分に維持し、より多くの細胞を確保するためには、その影響の詳細評価が重要である。肝細胞の機能を維持し、より多くの肝細胞を取得するための効率的な、肝細胞抽出手法を検討するために、せん断流下における肝細胞に対する力学的特性を細管せん断付加実験ならびに回転円板せん断付加実験により明らかにする。

これらをふまえ、肝細胞分離・輸注移植操作中に肝細胞に働く流体力学的作用を適切に制御し、肝細胞の機能を維持し、より多くの肝細胞を取得するための効率的な、細胞分離手法を提案する。さらに、肝細胞抽出技術の確立のみならず、組織への灌流による播種や肝細胞や血管内皮細胞などへ流動が重要な役割を果たしていると考えられる肝臓組織再生のための技術基盤を確立する。

3. 研究の方法

肝臓組織再生などの革新的な医療技術確立に重要な肝細胞分離プロセスにおける灌流抽出時、細胞移植時における肝細胞への流動による影響を明らかにするために、せん断流下における肝細胞に対する力学的特性をカテーテルや留置針を想定した細管実験(A)ならびに一定の強度・時間で剪断を付加可能な回転円板によるせん断付加実験(B)を行った。また、細胞の機能評価としてアンモニア代謝能に着目した細胞機能評価実験(C)をおこなった。

実験対象試料は、ラットあるいはブタ肝臓からコラゲナーゼ灌流法により分離された肝細胞を用いて行った。なお、ブタ肝細胞に関しては分離後凍結保存された試料を用い、ラット肝細胞に関しては臓器摘出分離直後の試料を用い実験を行った。実験装置は(A)細管せん断付加実験においては、試料をいれたシリンジならびにシリンジポンプ、マイクロ流路を用い定常流を形成し流量を調整することで肝細胞にせん断を付加した。また、細胞の沈降による細胞の分布の影響ならびに細管内での細胞の通過域の影響を検討するために細胞供給のためのシリンジの配置を水平配置、垂直配置として検討した。(B)回転円板を用いるせん断付加実験では、平行円板あるいはコーンプレートを用いて実験を行った。上下の円板を逆方向に同時に回転することが可能であり、せん断付加下の細胞観察も可能となっている。実験は、回転数を変化あるいは付加時間を変化させることで実験を行った。いずれの実験においても、せん断付加中の細胞の挙動ならびに様相を高速度カメラにより観察を行った。(C)細胞機能評価実験では、細胞の分離条件の差異による細胞群の規模による機能の差異に着目し実験を行った。細胞群の規模は、マイクロメッシュフィルタを用いて行った。

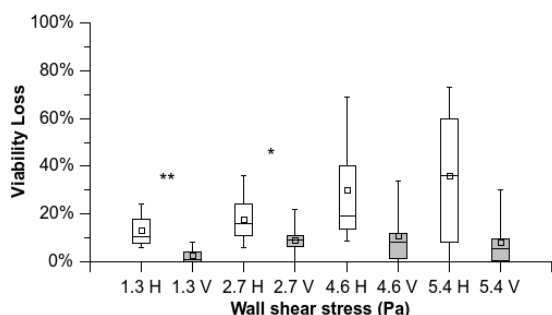
肝細胞の評価は、肝細胞取得数評価のための光学顕微鏡観察による細胞分離数・密度評価ならびにトリパンブルー染色法による生細胞、死細胞の評価を行った。生細胞死細胞マーカーによる評価も合わせて行った。肝細胞機能評価のためのアンモニア代謝により、肝細胞機能評価実験をおこなった。肝細胞のアンモニア代謝能は、恒温装置(37℃)内での3時間までの細胞代謝能を評価し、細胞あたりの代謝能力を評価した。評価は、プロムクレゾールグリーン法による濃度変化計測により行った。

4. 研究成果

4.1 細管せん断付加実験

図1は細管せん断付加実験による肝細胞の生細胞数、死細胞数の変化を細胞喪失率として整理した結果である。ここでは、せん断の強度と細胞の沈降による細胞分布の影響を検討するために、供給流量を変化させ剪断の強度を変化させ、供給時のシリンジ配置、

垂直配置(V), 水平配置(H)を変化させ沈降による細胞分布条件を制御し実験を行った結果である。なお, 各条件での壁面の剪断応力を代表値として図示している。肝細胞は比較的低いせん断付加条件下においてもその強度によらず生細胞率は低下し, 生細胞喪失率は増加する。1.3Pa, 2.7Pa の低いせん断条件においては, 水平配置は垂直配置に比して有意に細胞喪失率が高い。水平配置においては, 多くの細胞が沈降し, 剪断の大きい壁面近傍を通過する。また, 低せん断条件域においては, 供給流量が低いことから通過時間も長く, 細管内でのこれらの影響が細胞の生存率低下に影響を与えていると考えられる。一方, 垂直配置では, 細管内の細胞分布は垂直配置に比して一様に供給可能であり, 細管内中央部の低せん断領域を短時間で通過可能となると考えられる。細管内での細胞生存率のせん断家でのせん断の強度との関係は今後の詳細な検討が必要であるが, これらをふまえて細胞を取り扱うことが可能になると考え



られる。

図1 細管によるせん断負付加による生細胞喪失率 (Cell Medicine 2014)

4.2 回転円板せん断付加実験

回転円板を用いるせん断付加実験では, 円板の回転数の制御により細胞に付加する剪断強度, 剪断時間を独立に評価可能である。ここでは図示を割愛しているが, 細胞はせん断付加直後に急激に生細胞数が減少を示す。しかしながら, 本研究で採用した比較的低い剪断条件下では, せん断付加時間, せん断強度の生細胞喪失率に与える影響との明確な関係は示されなかった。一方, 詳細なデータ解析により, 肝細胞においてはせん断応力の大きさの影響を受けたのは, せん断応力の増加に伴う死細胞率の増加であり, そのため肝細胞の力学的特性を調べるには, 生細胞率が有効であることを示した。

4.3 細胞機能評価実験

細胞機能評価実験においては, 特に細胞群の規模による細胞機能変化に着目して実験を行った。細胞懸濁液には完全に単離された細胞のみならず複数の細胞で構成される細

胞群が存在する。これらはせん断などの影響で分離され, せん断実験における生細胞率の変化などとも密接に関連していると考えられる。単離された細胞が支配的となる 40 μ m メッシュにより取得した A 群, 臨床研究に向けて利用されている細胞群を維持した細胞が多く存在する 100 μ m メッシュにより取得した B 群を比較した。肝細胞 1 個の時間当りアンモニア代謝量は単離された細胞の多い A 群に比較して, 細胞群が多く存在する B 群は約 1.4 倍程度優位に代謝能が高く高い。肝細胞は, 生体内においては細胞外マトリックスに守られ, また細胞間接着機構により機能を維持していると考えられる。細胞分離時には, これらの環境を最低限保持し, 適切な細胞群の規模を維持し, 細胞を管理することが重要であると考えられる。

これらをふまえて肝細胞分離・輸注移植操作中に肝細胞に働く流体力学的作用を適切に制御し, 肝細胞の機能を維持し, より多くの肝細胞を取得するための効率的な, 細胞分離手法を提案した。これらの成果は検証を進め今後公表予定であり, ここでは詳述は割愛する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Sandi Sufiandi, Hiromichi Obara, Shin Enosawa, Huai-Che Hsu, Naoto Matsuno, Hiroshi Mizunuma, Improvement of infusion process in cell transplantation: Effect of shear stress on hepatocyte viability under horizontal and vertical syringe orientation, Cell medicine, 2014 (Accepted)

[学会発表](計 8 件)

1. 小原弘道, 隅田竜秀, 許 懐哲, 松野直徒, 水沼博, 絵野沢伸, 肝実質細胞への流体力学的負荷に関する検討, 日本臓器保存生物医学学会講演会, 2012 年 11 月 16 日, コラッセふくしま(福島市)

2. 隅田竜秀, 小原弘道, 許懐哲, 安田利貴, 松野直徒, 絵野沢伸, 水沼博, 細胞移植用肝実質細胞が受けるせん断流による損傷, 日本機械学会流体工学部門講演会, 2012 年 11 月 18 日, 同志社大学 今出川キャンパス(京都市)

3. 隅田竜秀, 小原弘道, 許懐哲, 松野直徒, 絵野沢伸, 水沼博, 細胞移植のための肝実質細胞の力学特性の検討, 日本機械学会バイオエンジニアリング講演会, 2013 年 01 月 10 日, 産業総合研究所(つくば市)

4. Hiromichi Obara, Sandi Sufiandi, Shin

Enosawa Tatsuhide Sumida, Huai-Che Hsu, Naoto Matsuno, Hiroshi Mizunuma, Effects of stretching flow on hepatocyte viability for cell transplantation, 12th Congress of the Cell Transplant Society(CTS2013), 2013年7月9日, Univ. Millan. (Italy)

5. Sandi Sufiandi, Hiromichi Obara, Tatsuhide Sumida, Huai-Che Hsu, Naoto Matsuno, Shin Enosawa, Hiroshi Mizunuma, Effect of shear stress on survival of isolated hepatocytes for cell transplantation, 12th Congress of the Cell Transplant Society(CTS2013), 2013年7月9日, Univ. Millan. (Italy)

6. Sandi Sufiandi, 小原弘道, 許懷哲, 松野直徒, 水沼博, 絵野沢伸, 細管内を通過する肝実質細胞への流体力学的負荷の影響臓器保存生物医学会総会講演会, 2013年11月09日, 東京医大(東京都 新宿区)

7. Sandi Sufiandi, Hiromichi Obara, Shin Enosawa, Huai-Che Hsu, Naoto Matsuno, Hiroshi Mizunuma, Effect of shear stress on hepatocyte viability under horizontal and vertical syringe orientation, 日本組織培養学会, 2014年05月29日, 星陵会館(東京都千代田区)

8. 宮永恭, 小原弘道, 絵野沢伸, 松野直徒, 水沼博, 肝細胞移植のための細胞群規模の代謝に与える影響, 日本組織培養学会, 2014年05月29日, 星陵会館(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

水沼 博 (Mizunuma Hiroshi)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：20117724

(2)研究分担者

小原 弘道 (Obara Hiromichi)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：80305424

(3)連携研究者

絵野沢 伸 (Enosawa Shin)

独立行政法人国立成育医療研究センター

一・研究所 先端医療開発室・室長

研究者番号：40232962

4)連携研究者

松野 直徒 (Matsuno Naoto)

独立行政法人国立成育医療研究センター

一・研究所 先端医療開発室・特別研究員

研究者番号：00231598