

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3072368号
(P3072368)

(45)発行日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(24)登録日 平成12年6月2日(2000.6.2)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 N 5/06
C 1 2 M 3/00
C 1 2 N 11/08

C 1 2 N 5/00 E
C 1 2 M 3/00 A
C 1 2 N 11/08

請求項の数7(全14頁)

(21)出願番号 特願平10-35616
(22)出願日 平成10年2月18日(1998.2.18)
(65)公開番号 特開平11-225751
(43)公開日 平成11年8月24日(1999.8.24)
審査請求日 平成10年2月18日(1998.2.18)

特許法第30条第1項適用申請有り 「No. 97-25 熱工学講演会講演論文集 1997-11, 5-7 つくば」(平成9年11月4日) 社団法人日本機械学会発行第233-235ページに発表

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年11月6日茨城県つくば市東1-1-4工業技術院筑波研究センター共同講堂において開催された社団法人日本機械学会1997年度熱工学講演会において発表

(73)特許権者 391012361
筑波大学長
茨城県つくば市天王台1丁目1番地の1
(72)発明者 大島 宣雄
茨城県つくば市小野川8の20
(72)発明者 柳 健一
茨城県つくば市東光台2-22-10
(74)代理人 100059258
弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

審査官 内田 俊生

(56)参考文献 特開 平5-76364 (J P, A)
特開 平2-71755 (J P, A)
特表 平6-509476 (J P, A)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝細胞の高密度培養法及びその装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝細胞を樹脂多孔質担体の表面及び気孔内に固定化し、前記樹脂多孔質担体を反応器内に配置し、前記反応器が液体培地の入口と出口とを有しており、前記反応器の前記入口から前記液体培地を導入し、前記樹脂多孔質担体を前記液体培地中に浸漬し、前記液体培地を前記肝細胞に直接接触させ、前記液体培地を前記反応器の前記出口から取り出し、前記液体培地を前記反応器の前記入口に戻し、前記液体培地を灌流させることによって、前記肝細胞を培養するにあたり、前記反応器の前記出口の前記液体培地の酸素濃度を、 $204 \sim 969 \mu\text{M}$ に維持することを特徴とする、肝細胞の高密度培養法。

【請求項2】 前記出口から取り出した前記液体培地を、 $152 \sim 722 \text{ mmHg}$ の酸素分圧の気体に曝すこ

とを特徴とする、請求項1記載の肝細胞の高密度培養法。

【請求項3】 前記反応器内の前記液体培地を、 $5.4 \sim 10.8 \text{ cm/分}$ の線速度で流動させることを特徴とする、請求項1又は2記載の肝細胞の高密度培養法。

【請求項4】 前記反応器内の前記液体培地の流れが偏らないように前記液体培地を分流させることを特徴とする、請求項3記載の肝細胞の高密度培養法。

【請求項5】 前記反応器内の前記液体培地の流れを邪魔板により制御することを特徴とする、請求項3又は4記載の肝細胞の高密度培養法。

【請求項6】 肝細胞を樹脂多孔質担体に固定化し、前記樹脂多孔質担体を液体培地中に浸漬して、前記肝細胞を培養するにあたり、前記液体培地の酸素濃度を、 $300 \sim 400 \mu\text{M}$ に維持

することを特徴とする、肝細胞の高密度培養法。

【請求項7】肝細胞と、前記肝細胞が固定化される樹脂多孔質担体と、前記樹脂多孔質担体が収容される反応器と、前記樹脂多孔質担体が浸漬される液体培地に酸素を導入する酸素加器とを具備しており、前記反応器が液体培地の入口と出口とを有しており、前記反応器の前記入口から前記液体培地を導入し、前記樹脂多孔質担体を前記液体培地中に浸漬し、前記液体培地を前記肝細胞に直接接触させ、前記液体培地を前記反応器の前記出口から取り出し、前記液体培地を前記反応器の前記入口に戻し、前記液体培地を灌流させることによって、前記肝細胞を培養する肝細胞の高密度培養装置であって、前記反応器の前記出口の前記液体培地の酸素濃度が、 $204 \sim 969 \mu\text{M}$ に維持されることを特徴とする、肝細胞の高密度培養装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝細胞の培養技術に関する。

【0002】

【従来の技術】肝臓は、物質代謝の中樞臓器として、種々の物質の代謝機能を有する。肝臓には、例えば、胆汁の産生と分泌、栄養物（糖質、タンパク質、脂質）やビタミンの代謝、生理活性物質（毒物、ステロイド、ホルモン等）の不活化、血漿タンパク（アルブミン、血液凝固因子等）の合成や免疫（クッパー細胞）等のはたらきがある。

【0003】劇症肝炎では、これらの肝臓の機能が急激に失われる。この劇症肝炎を内科的に治療する試みでは、死亡率が70%以上にも及び、現在のところ、肝臓移植以外の有効な治療法はない。例えば、透析、濾過、吸着といった純人工的な手法では、重症の肝不全患者の救命は困難である。

【0004】これは、肝臓の機能が、機械的な方法では代行することが困難な物質代謝機能を中心としているためである。この解決策として、肝細胞培養系を装置内に組み込み、その代謝機能を利用するといったハイブリッド型人工肝臓の開発が期待されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体に、肝細胞等の動物細胞を高密度に固定化し、この固定化物を充填した充填層型培養装置は、有用物質を生産させるバイオリアクターや、人工肝臓等の人工肝機能補助装置として、有益な応用が期待できる。

【0006】本発明者は、一例の細胞固定化物を、特開平6-277050号及び特開平5-76364号公報に記載した。かかる細胞固定化物では、動物細胞を高密度に固定化して培養することができる。

【0007】臨床応用が可能なハイブリッド型人工肝臓

を開発するためには、肝細胞を更に高密度、大量に培養する技術が不可欠である。本発明者は、これまでに、多孔質の樹脂である、ポリビニルホルマール（PVF）樹脂多孔質体を細胞固定化用の担体として用い、充填層型リアクターを開発した。

【0008】本発明者の研究によれば、かかるリアクター内で、肝細胞を 1×10^7 細胞/cm³の高密度で培養でき、また、1週間以上にわたり肝細胞の代謝能を維持することができた〔(1) K. Yanagi, H. Miyoshi, H. Fukuda and N. Ohshima (1992), A packed-bed reactor utilizing porous resin enables high density culture of hepatocytes., Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 316-320, (2) H. Miyoshi, K. Yanagi, H. Fukuda, N. Ohshima (1994), Long-term continuous culture of hepatocytes in a packed-bed reactor utilizing porous resin., Biotechnol. Bioeng., 43: 635-644, (3) H. Miyoshi, K. Yanagi, H. Fukuda and N. Ohshima (1996), Long-term performance of albumin secretion of hepatocytes cultured in a packed-bed reactor utilizing porous resin., Artif. Organs, 20: 803-807〕。

【0009】本発明は、高密度に培養された肝細胞をより一層最適な状態に維持することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝細胞を樹脂多孔質担体の表面及び気孔内に固定化し、前記樹脂多孔質担体を反応器内に配置し、前記反応器が液体培地の入口と出口とを有しており、前記反応器の前記入口から前記液体培地を導入し、前記樹脂多孔質担体を前記液体培地中に浸漬し、前記液体培地を前記肝細胞に直接接触させ、前記液体培地を前記反応器の前記出口から取り出し、前記液体培地を前記反応器の前記入口に戻し、前記液体培地を灌流させることによって、前記肝細胞を培養するにあたり、前記反応器の前記出口の前記液体培地の酸素濃度を、 $204 \sim 969 \mu\text{M}$ に維持する、肝細胞の高密度培養法に係るものである。

【0011】また、本発明は、肝細胞を樹脂多孔質担体に固定化し、前記樹脂多孔質担体を液体培地中に浸漬して、前記肝細胞を培養するにあたり、前記液体培地の酸素濃度を、 $300 \sim 400 \mu\text{M}$ に維持する、肝細胞の高密度培養法に係るものである。

【0012】肝臓は、生体内では活発な再生能を示すことが知られているが、人工的な培養条件下では、肝細胞はほとんど増殖能を示さず、急速にその活性を失う。本発明者は、ハイブリッド型人工肝臓を開発するためには、これらの問題点を如何にして克服するかが重要であると考えている。

【0013】実用可能な人工肝臓を開発するためには、1cm当たり 10^7 個以上の高密度で、生体の肝臓の約1/3の量に匹敵する 10^{10} のオーダーの大量の肝細胞

を、生体内に匹敵する代謝能を維持したままに、人工的に培養する技術が不可欠である。また、臨床応用のためには、スケールアップと無菌的操作が容易なリアクターを開発することが不可欠である。

【0014】前述したように、本発明者は、これまでに、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を担体として、充填層型リアクターを開発し、 10^7 細胞/cm³ - P V F の肝細胞密度でディッシュによる単層培養と同等の代謝能を1週間以上維持しながら肝細胞を培養できることを報告した(上記文献参照)。

【0015】本発明者は、かかる培養方法を更に改善し、肝細胞を最適な条件で高密度に培養するため、種々の培養条件を検討した。

【0016】その結果、驚くべきことに、本発明者は、従来、細胞に傷害を与えることから好ましくないと考えられていた高酸素濃度の条件が、肝細胞の高密度培養にとってむしろ好ましいことを見出した。

【0017】本発明者は、液体培地中の酸素濃度を所定の範囲内に制御することにより、肝細胞のアミノ酸代謝能を従来の2倍以上に改善することができることを突き止め、本発明を完成させた。

【0018】本発明は、所定量以上の高密度の肝細胞を培養する条件において、肝細胞が多量の酸素を消費し、液体培地による酸素の供給がその消費に追いつかないこと、また、液体培地の流れに偏りができることが、これらの細胞の単位細胞当たりの活性を悪化させる傾向があることを見出したことに起因する。

【0019】本発明によれば、液体培地中の酸素濃度を所定の範囲内に制御することにより、培養肝細胞の機能をより一層良好な状態に保つことができる。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明では、肝細胞を固定化する樹脂多孔質担体として、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体を用いるのが好ましい。かかる担体には、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体等の種々の材質のものが含まれる。

【0021】肝細胞としては、人工肝機能補助装置への応用が期待される肝細胞を挙げることができる。

【0022】本発明では、液体培地中の酸素濃度を、 $204 \sim 969 \mu\text{M}$ の範囲に設定する。この範囲内の酸素が液体培地に付与されれば、培養肝細胞は良好な機能を維持することができる。 $204 \mu\text{M}$ の酸素濃度は、通常 $5\% \text{CO}_2 - 20\% \text{O}_2$ の条件下で、液体培地に酸素を溶け込ませた時の溶存酸素濃度に相当する。また、 $969 \mu\text{M}$ の酸素濃度は、 $5\% \text{CO}_2 - 95\% \text{O}_2$ の条件下で、液体培地に酸素を溶け込ませた時の溶存酸素濃度に相当する。

【0023】液体培地中への酸素の導入には、表面通気を用いることができる。液体培地を高酸素濃度の気相等に曝す処理は、特別な装置を必要とせず、汚染の心配も

少ない。

【0024】液体培地中の酸素濃度を、 $204 \sim 969 \mu\text{M}$ に制御するには、通常の大気圧の下で、液体培地を $152 \sim 722 \text{mmHg}$ の酸素分圧 ($20 \sim 95\%$ の含有酸素濃度に相当) の気体に曝すことにより行うことができる。

【0025】効率よく酸素を導入するには、酸素加器を用いるのが好ましい。この酸素加器としては、液体培地中に酸素を溶け込ませる種々の手段が含まれる。例えば、液体培地をテフロンチューブ内に通し、このチューブを高濃度の酸素に曝すことにより、液体培地内に酸素を溶け込ませることができる。この際、このチューブの表面積を大きくすれば、酸素をより一層液体培地に溶け込み易くすることができる。

【0026】また、本発明では、培養肝細胞に接する液体培地の流動速度を、 $5.4 \sim 10.8 \text{cm/分}$ の線速度の範囲に設定する。これらの線速度は、例えば、内径 20mm のリアクターであれば、 $17 \sim 34 \text{mL/分}$ の流速に相当する。この範囲内では、培養肝細胞に良好な代謝能が維持される。 5.4cm/分 未満の線速度では、肝細胞に十分な酸素を供給することができない。また、線速度が 10.8cm/分 を超えると、肝細胞を擦るような剪断応力が肝細胞に傷害を発生させる。これらの線速度では、肝細胞の生存率が低下し、その結果、液体培地中のアラニントランスアミナーゼ (ALT) 濃度が上昇する。ALTは、グルタミン酸 - ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) とも称され、肝細胞が破壊された場合に、肝細胞外に放出される酵素である。

【0027】以下、図面を参照して、本発明を詳細に説明する。図1は、一例の培養装置の模式図である。図1に示すような装置は、本発明の肝細胞の高密度培養方法に適切であり、肝細胞の代謝能を極めて良好に制御することができる。図1の装置1では、充填層型リアクター2を用いる。本発明の装置には、平板型、積層型、充填層型、流動床型等の種々の型の反応器を用いることができる。

【0028】図1に示す充填層型リアクター2では、筒状の反応器3内に、樹脂多孔質担体4が充填されている。反応器3は、液体培地5が流入する下部ポート3aと液体培地5が流出する上部ポート3bとを有している。この下部ポート3aには、液体培地の流れを整える分流器を設けることができる。

【0029】分流器には、例えば、図1に示すように、下部ポート3aの内側にテフロン球6を充填したものが用いられる。また、反応器3内に、複数の仕切板7を設け、担体4の充填空間を適切な間隔で仕切り、液体培地5の流れが均質になるようにすることができる。かかる仕切板としては、邪魔板等を用いることができる。更に、反応器3は、培養すべき肝細胞8が注入されるコック9を有し、ウォータジャケット10に包み込まれ、そ

の中を温水11が循環するような設計にすることができる。

【0030】樹脂多孔質担体4には、例えば、肝細胞を固定化する。この肝細胞8は液体培地5に浸漬されて培養される。この液体培地5は、ポンプ12により、下部ポート3aから充填層型リアクター2内に送られ、肝細胞8で処理され、その後、上部ポート3bから出て、リザーバ13に蓄えられる。リザーバ13には、液体培地5を供給する上部ポート13aが設けられている。リザーバ13も、反応器3と同様に、ウォータジャケット等で保温することができる。リザーバ13内の液体培地5は、再び、ポンプ12により、下部ポート3aから充填層型リアクター2内に灌流する。

【0031】本発明では、図1に示すように、液体培地5には、充填層型リアクター2内に入る前に、酸素加器14を介して高濃度の酸素15が導入される。酸素15は、酸素加器14の上部ポート14aから供給する。酸素加器14内を通る液体培地のライン16には、例えば、テフロンのような酸素透過性の高いチューブを用い、このライン16を液体培地5が流れる間に、酸素15が液体培地5に溶け込むようにする。高濃度の酸素は、リザーバ13の上部ポート13aから、液体培地5に直接導入することもできる。

【0032】本発明では、液体培地5が、所定の流速で肝細胞8の表面を流れるようにする。この液体培地5の流れは、分流器で整流し、各仕切板7間の担体4を攪拌し、液体培地5の流れの偏りを減少させて、液体培地5を充填層型リアクター2内に灌流させることができる。

【0033】本発明の培養装置は、肝細胞を培養する人工肝臓として応用することが期待できる。図2は、一例の人工肝臓の模式図である。図2に示すように、本発明の培養装置は、血漿分離器を介して、肝機能に障害のある患者の人工肝臓として機能させることができる。この際、図2に示すように、人工肝臓25は、血漿分離器26とポンプ27と本発明の培養装置1とを具える。患者の動脈から取り出された血液は、ライン28を通して血漿分離器26に送られ、この血液から血漿を分離する。血漿は、ライン29を通り、ポンプ27で培養装置1のリザーバ14に送られて処理される。処理された血漿は、ライン30を通り、血漿以外の成分を患者に戻すライン31と合わさって、ポンプ27によって患者の静脈に送り返される。

【0034】本発明の方法によれば、液体培地中へ所定濃度の酸素を導入し、液体培地の流動速度を所定の速度で均質に保たせることにより、人工肝臓としての機能を著しく改善することができる。かかるリアクターを用いれば、肝細胞の単位細胞当たりの活性を著しく向上させることができる。

【0035】

【実施例】以下、図面を参照して、実施例に基づき、本

発明をより詳細に説明する。

実験例1

1. 実験方法

本実験例では、ポリビニルホルマール樹脂多孔質体を用いる充填層型リアクターで、肝細胞の代謝能を操作条件の改良により改善することを目的とし、液体培地中の酸素濃度の影響と液体培地の灌流速度の影響を検討した。はじめに、培養肝細胞に対する酸素濃度の影響をコラーゲンコートしたディッシュを用いる単層培養系において調べた後、充填層型リアクターによる灌流培養系で検討した。

【0036】1-1. 実験材料

肝細胞固定化用の担体として、平均孔径が250 μ mのポリビニルホルマール〔PVF樹脂、カネボウ化成(株)製〕を2 \times 2 \times 2mm³に細切して用いた。反応器には、筒状のものと同様に平板状のものを用いた。この担体250個を内径20mmの筒状の反応器に充填し、オートクレーブにて滅菌した後、ハンクス液(Hanks' balanced salt solution)で洗浄し、充填層型リアクターとした。また、平板状の反応器には、35mmのペトリディッシュ(Petri dish, Falcon 1008)を0.06% I型コラーゲン溶液にてコートして用い、単層培養とした。

【0037】肝細胞は体重190~250gのWistar系雄性ラットからコラゲナーゼ灌流法により遊離して用いた。遊離時の肝細胞の生存率は、トリパンブルー排除法(trypsin blue exclusion test)により80%以上であった。1匹あたり、1.2~1.6 \times 10⁸個の細胞が得られた。

【0038】基本培地としては、Williams' E培地に、デキサメタゾン(0.1 μ M)、インシュリン(0.1 μ M)、アプロチニン(5,000KIU/L)、ペニシリンG(20,000IU/L)、ストレプトマイシン(20mg/L)、アンホテリシンB(50 μ g/L)を添加したものに、10%ウシ胎児血清を加えて用いた。

【0039】1-2. 培養方法

単層培養では、1 \times 10⁶個の生細胞を2mlの培地に懸濁して、ディッシュに播種した。培地の酸素化は表面通気により行った。インキュベータの気相中の酸素分圧を75~375mmHgに変化させて、培地に酸素を溶け込ませた。この培地中の溶存酸素濃度は、計算上、102~510 μ Mに対応する。例えば、表面通気には、5%CO₂-50%空気-45%N₂(10%O₂、75mmHgのO₂分圧、102 μ MのO₂)、5%CO₂-95%空気(20%O₂、152mmHgのO₂分圧、204 μ MのO₂)、5%CO₂-55%空気-40%O₂(50%O₂、375mmHgのO₂分圧、510 μ MのO₂)等の条件を用いた。

【0040】灌流培養では、充填層型リアクターを用いた。図3は、本実験例にかかる培養装置の模式図であ

る。この装置17は、充填層型リアクター18とリザーバ19とローラポンプ20からなり、充填層型リアクター18とリザーバ19とがライン21, 22により繋がれている。ライン21の途中で、酸素加器23を設け、培地に酸素を導入した。また、ライン22の途中で、酸素電極24を配置することにより、培地の溶存酸素濃度を測定した。この装置17は、ウォータジャケットを用いて、37 に保った。

【0041】肝細胞を充填層型リアクター18内へ播種するために、肝細胞を3mLの培地に懸濁させ、肝細胞浮遊液を調製し、これをモジュール当たり8~10×10⁷となるように、リアクター18の上部から注入した。この培養装置17をクリーンベンチ内に置き、総量50mLの培地を、リザーバ19内での表面通気が、酸素加器23により酸素化して、灌流させた。酸素加器23では、図1に示すようなシリコンチューブ16を用いた。培地中の酸素濃度を変える(60~470μM)か、培地の灌流速度を変えて(17~50mL/分)、肝細胞を5日間培養した。培地中の酸素濃度は、単層培養と同様の気相を用いて調節し、灌流速度はポンプにより調節した。尚、灌流培養では、通常の培養条件である5%CO₂-95%空気(20%O₂)により、酸素加器を介して培地に酸素を導入しても、培養細胞による酸素消費の結果、リアクターを出るときの培地の酸素濃度は、単層培養における計算上の200μMから150μM前後に低下する。したがって、この実験で用いた酸素濃度60~470μMの条件は、リアクター出口の培地の酸素濃度であり、リアクター入口では102~510μMの酸素濃度に対応する。

【0042】実験のプロトコールを、図4を参照して説明する。図4は、培養時間と培地交換時期を示す説明図である。左右に伸びる直線は時間の経過を示す。この直線上に目盛られた数字は培養時間を表す。これらの時間のそれぞれにおいて、培地を交換した。また、この直線の下に記した黒又は白の矢印は、培地の種類を示す。黒い矢印は、Williams' E培地にウシ胎児血清、ホルモン、抗生物質を加えた基本培地であり、白い矢印は、基本培地に1mMの塩化アンモニウムを加えた培地である。

【0043】図4に示すように、0時間において、肝細胞を平板型ディッシュ又は充填層型リアクターに播種して、培養を開始した。浮遊細胞を除去するために、培養開始後3時間において、培地を交換し、その後は培地を毎日交換した。肝細胞のアンモニア代謝能を評価するため、培養開始後20時間(2日目)と68時間(4日目)には、基本培地に1mMの塩化アンモニウムを添加し、経時的にアンモニア濃度を測定した。

【0044】培養開始後92時間(5日目)に培養実験を終了し、リアクター内又はディッシュ内に固定化された肝細胞数を測定した。肝細胞数は、細胞を超音波破碎

機にて破碎後、蛍光色素法によりDNA量を測定し、DNA量を細胞数に換算することにより求めた。

【0045】1-3. アンモニア代謝能の評価
アンモニアはアミノ酸の代謝の結果できる老廃物で、これを尿素に変換するのは肝臓の重要な機能の一つである。1mMのアンモニア濃度は、肝不全の患者において一般的に見られる最大レベルの濃度である。

【0046】各培養条件下での肝細胞のアンモニア代謝能を定量的に評価するために、反応速度論的な解析を試みた。即ち、アンモニアを負荷した後、経時的に培地中のアンモニア濃度を測定すると、濃度変化を次の式(1)で近似することができる[N. Ohshima, M. Shiot a, H. Kusano, G. Wada, T. Tsunetsugu, K. Ookawa and K. Yanagi, (1994), Kinetic analysis of the performance of a hybrid-type artificial liver support system utilizing isolated hepatocytes. Mater. Sci. Eng., C1: 79-85]。

$$dC/dt = -KmNC \quad (1)$$

式中、C: アンモニア濃度(mM)、Km: アンモニア代謝速度定数(L/細胞/hr)、N: 肝細胞濃度(細胞/L)である。

【0047】図5は、アンモニア濃度と培養時間との関係を示すグラフである。このグラフには、培養2日目()と4日目()の培養液中のアンモニア濃度の経時変化を示す。このグラフの傾きはKmNに相当し、本実験例では、主としてこのKmNの値を代謝能の指標とした。

【0048】1-4. 放出ALTの量

本実験では、培地の交換毎に、アラントランスアミナーゼ(ALT)の濃度を測定した。ALTは、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)とも称され、肝細胞が破壊されると放出される酵素である。肝細胞1g、1×10⁸個の細胞が破壊されると、約40IUのALTが放出される。この値が低いほど、培地中で傷害を受けた肝細胞が少ないことになる。

【0049】2. 単層培養における結果と考察

2-1. 細胞の固定化率と溶存酸素濃度

図6は、細胞の固定化率を示すグラフである。このグラフでは、溶存酸素濃度が細胞の固定化率に及ぼす影響を知ることができる。このグラフの縦軸は、固定化率(%)であり、播種した生細胞(retained cell density)の何パーセントが4日間の培養後に固定化されたかを示す。図6に示すように、細胞の固定化率は、低酸素濃度で低い傾向を示し、200~510μMの酸素濃度で、50~70%のほぼ一定の固定化率を示した。

【0050】2-2. アンモニア代謝能と溶存酸素濃度

図7は、アンモニア代謝能を示すグラフである。図7中、 は培養2日目の代謝能を示し、 は培養4日目の代謝能を示す。培養2日目の代謝能は、溶存酸素濃度に依存して著しく改善される。特に、300~400μM

の酸素濃度で優れた代謝能が得られた。細胞の固定化率がどの酸素濃度でもほぼ同じであることから、細胞当たりの代謝能が高酸素濃度下で良好になると考えられた。一方、培養4日目の代謝能は、200 μ Mの酸素濃度でわずかに良くなり、高酸素、低酸素濃度とも代謝能がわずかに低下する。

【0051】2-3. 放出AL T量と溶存酸素濃度

図8は、放出されたAL Tの量を示すグラフである。このグラフでは、4日間の培養で培地中に放出されたAL Tの総量を示す。図8に示すように、AL Tの放出は、低酸素濃度でやや高い傾向があるが、溶存酸素濃度によってほとんど影響を受けないことがわかる。

【0052】3. 充填層型リアクターにおける結果と考察

3-1. 細胞の固定化率と溶存酸素濃度

図9は、細胞の固定化率を示すグラフである。この固定化率も、溶存酸素濃度の影響を調べたものであり、単層培養の場合(図5)と同様、播種した生細胞の何パーセントが4日間の培養後に固定化されたかを示す。但し、この実験では、図3に示すような充填層型リアクターを用い、培地を灌流(17mL/分)させた。この図に示すように、細胞の固定化率は、溶存酸素濃度を上昇させることで改善した。培養1日の時点での細胞の固定化率が30%前後であることから、培養4日後の細胞が30~40%の固定化率であることは、著しい改善といえる。

【0053】3-2. アンモニア代謝能と溶存酸素濃度
図10は、アンモニア代謝能を示すグラフである。この図の中の記号も、図7の単層培養のものと同じである。灌流培養では、培養2日目()と培養4日目()とともに、酸素濃度の増加により代謝能が上昇する。但し、300 μ Mを超えてもほとんど差がなくなる。

【0054】3-3. 放出AL T量と溶存酸素濃度

図11は、放出されたAL Tの量を示すグラフである。図11に示すように、300 μ Mの酸素濃度までは、AL Tの放出量は酸素濃度の上昇に伴い低下するが、500 μ Mを超えるところでやや上昇する。

【0055】3-4. 細胞の固定化率と灌流速度

図12は、灌流速度が細胞の固定化率に及ぼす影響を示すグラフである。この固定化率は、酸素加器で酸素濃度が5%CO₂-95%空気(20%O₂)の気相を用い、灌流速度の影響を調べたものである。この図では、酸素濃度の影響を調べる場合(図9)と同様、播種した細胞の何パーセントが4日間の培養後に固定化されたかを示す。この図12に示すように、細胞の固定化率はいずれの灌流速度においても20%前後で、若干右上がりに改善するが、ほとんど差がなかった。

【0056】3-5. アンモニア代謝能と灌流速度

図13は、アンモニア代謝能を示すグラフである。図中の記号は、図10の酸素濃度の影響を見るものと同じで

ある。この図13で示すように、低灌流量でやや低いほか、灌流速度の影響はほとんどなかった。

【0057】3-6. 放出AL T量と灌流速度

図14は、放出されたAL Tの量を示すグラフである。この図で示すように、灌流速度が30mL/分までは、灌流速度とともに、AL Tの放出量はやや低下する傾向がある。この充填層型リアクターでは、17~34mL/分、好ましくは20~30mL/分の灌流速度が適切と考えられた。

【0058】3-7. 細胞1個当たりのアンモニア代謝能と溶存酸素濃度

装置全体の代謝能を表すKm値を用いる代わりに、固定化された細胞1個当たりの代謝能を表すKm値を用いて、溶存酸素濃度がアンモニア代謝能に及ぼす影響を評価した。図15は、このアンモニア代謝能を示すグラフである。細胞数は、4日間の培養終了後の細胞数を用い、培養2日目の代謝能の結果を得た。ディッシュによる単層培養()では、酸素濃度の上昇とともに、細胞当たりの代謝能が上昇した。一方、充填層型リアクターによる灌流培養(灌流速度:17mL/分)では、低酸素濃度で代謝能が悪いのに対し、200 μ M以上の酸素濃度でほぼ一定の代謝能に達した。また、この充填層型リアクターでの代謝能は、生体内の肝細胞の代謝能にほぼ匹敵するとされている20%酸素下のディッシュ培養での代謝能よりも良好で、充填層型リアクターの優位性が示された。

【0059】実験例2

1. 実験方法

本実験例では、実験例1と同様の条件で、培地中の酸素濃度の影響及び培地の灌流速度の影響を検討した。但し、培地の酸素化を、5%CO₂-50%空気-45%N₂(10%O₂)、5%CO₂-95%空気(20%O₂)及び5%CO₂-55%空気-40%O₂(50%O₂)の3条件の気相による表面通気とし、灌流培養での培地の酸素化を、リザーバー内への表面通気により行い、培地の灌流速度を8、17、34mL/分の3条件とした。

【0060】また、本実験例では、アンモニア代謝能を評価するため、培養1日目と3日目に培地内に1mMの塩化アンモニウムを添加し、培養4日目に培養実験を終了させた。本実験例では、最小二乗法により近似式(1)のKmの値を計算し、細胞1個当たりのアンモニア代謝能の指標とした。

【0061】2. 単層培養における結果と考察

2-1. アンモニア代謝能と溶存酸素濃度

図16は、アンモニア代謝能を示すグラフである。斜線が施されているカラムは、培養1日目のアンモニア代謝能を示し、斜線が施されていないカラムは、培養3日目のアンモニア代謝能を示す。この図に示すように、20%酸素濃度の条件で肝細胞の代謝能は最も良好であり、

高濃度と低濃度の酸素条件では代謝能が低下した。特に、高濃度の酸素条件では、培養初期においては代謝能に与える影響は少ないものの、細胞の活性の維持に悪影響を与えると考えられた。

【0062】3. 充填層型リアクターにおける結果と考察

3-1. 細胞の固定化率に及ぼす灌流速度と溶存酸素濃度の影響

培地の灌流量と培養時の酸素濃度について、表1に示す条件下に、5回の灌流培養実験を行った。表1に示すように、4日間の培養後、リアクター内に播種された生細胞の15~20%が基材内に固定化された。細胞の固定

化率は、高酸素濃度、低酸素濃度の両極端の条件(実験番号4、5)でやや低く、これらの条件において細胞の維持に問題があることが示唆された。一方、20%の酸素濃度下では、培地の灌流速度は細胞の固定化率に影響を及ぼさなかった。同様の充填層型リアクターを用いた本発明者の研究において、基材内への細胞の固定化率は、灌流培養1日目で約30%、7日目で15%程度であったことから、PVF樹脂内に固定化された肝細胞数は、灌流培養の期間中、徐々に減少するものと考えられた。

【0063】

【表1】

実験番号	灌流速度 (ml/分)	酸素濃度 (%)	生細胞密度 (10^6 細胞/cm ³ -PVF)	固定化細胞密度 (10^6 細胞/cm ³ -PVF)	固定化率 (%)
1	8	20	22.0	4.2	19
2	17	20	30.9	5.2	17
3	34	20	20.0	3.8	19
4	17	10	26.9	3.8	14
5	17	50	23.5	3.4	14

【0064】3-2. アンモニア代謝能と培養時間

図17は、アンモニア濃度と培養時間との関係を示すグラフである。このグラフには、培養1日目()と3日目()の培養液中のアンモニア濃度の経時変化を示す。この図では、灌流培養における培地中のアンモニア濃度の経時変化が示されている。実線および破線は、式(1)によるシミュレーションの結果である。代謝能の評価は、フィッティングカーブから $K_m \cdot N$ の値を算出し、培養終了時における細胞密度(N)で除し、細胞1個当たりのアンモニア代謝能の指標、 K_m を得た。灌流培養では、培養1日目の固定化細胞密度は培養終了時の値よりも高いものと推測されるため、以下に示す灌流培養群の培養1日目の K_m の値は過大評価されていると考えられる。

【0065】3-3. アンモニア代謝能と溶存酸素濃度
図18は、アンモニア代謝能を示すグラフである。斜線が施されているカラムは、培養1日目のアンモニア代謝能を示し、斜線が施されていないカラムは、培養3日目のアンモニア代謝能を示す。この図に示すように、充填層型リアクターによる灌流培養においては、肝細胞の代謝能は通気中の酸素濃度に依存して、良好な値を示した。尚、本実験例では、灌流培養の培地の酸素化はリザーバ内の表面通気のみによって行った。このため、50%酸素の通気によっても培地中の溶存酸素濃度はディッシュによる同条件の培養ほど高くない可能性がある。

【0066】3-4. アンモニア代謝能と灌流速度
図19は、アンモニア代謝能を示すグラフである。この図でも、培養1日目と培養3日目を比較した。この図では、培地の灌流量がアンモニアの代謝能に与える影響が示される。表1に示す高灌流量(34 mL/分; 実験番号3)の実験において、アンモニア代謝能はやや良好な

傾向を示した。充填層型リアクターにおいて培地の灌流量を論じる場合、灌流量は容積流量よりもリアクター内の線速度が問題となるが、本実験例において使用したリアクターでは、34 mL/分の灌流量において10.8 cm/分となる。この速度においても培養開始直後を除き、肝細胞のリアクター外への流出は観察されなかった。

【0067】以上、実験例1及び実験例2で述べたように、単層培養及び充填層型リアクターによる肝細胞の高密度培養系において、液体培地中の酸素濃度を204~969 μ Mに制御すること、更にこの液体培地を5.4~10.8 cm/分の線速度で灌流させることにより、培養肝細胞の代謝能をより一層改善できることがわかった。特に、培養肝細胞の機能は、液体培地の溶存酸素を所定の濃度に制御することによって良好に維持され、更に液体培地の灌流量を増やすことにより、やや良好に維持される傾向を示した。

【0068】

【発明の効果】本発明の肝細胞の高密度培養方法によれば、培養肝細胞の代謝能をより一層適切な状態に維持することができる。また、本発明の肝細胞の高密度培養装置によれば、培養肝細胞の代謝能をより一層適切な状態に維持することができる、ハイブリッド型人工肝臓を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】一例の培養装置の模式図である。

【図2】一例の人工肝臓の模式図である。

【図3】実験例にかかる培養装置の模式図である。

【図4】培養時間と培地交換時期を示す説明図である。

【図5】アンモニア濃度と培養時間との関係を示すグラフである。

- 【図6】 肝細胞の固定化率を示すグラフである。
- 【図7】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図8】 放出されたALTの量を示すグラフである。
- 【図9】 肝細胞の固定化率を示すグラフである。
- 【図10】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図11】 放出されたALTの量を示すグラフである。
- 【図12】 肝細胞の固定化率を示すグラフである。
- 【図13】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図14】 放出されたALTの量を示すグラフである。
- 【図15】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図16】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図17】 アンモニア濃度と培養時間との関係を示すグラフである。

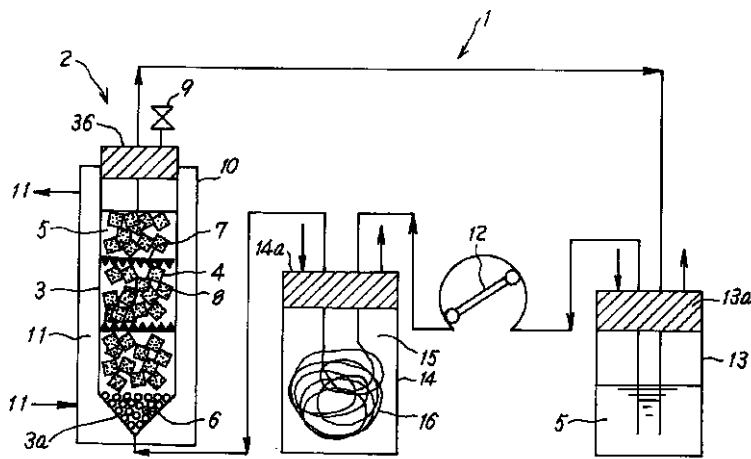
- 【図18】 アンモニア代謝能を示すグラフである。
- 【図19】 アンモニア代謝能を示すグラフである。

【符号の説明】

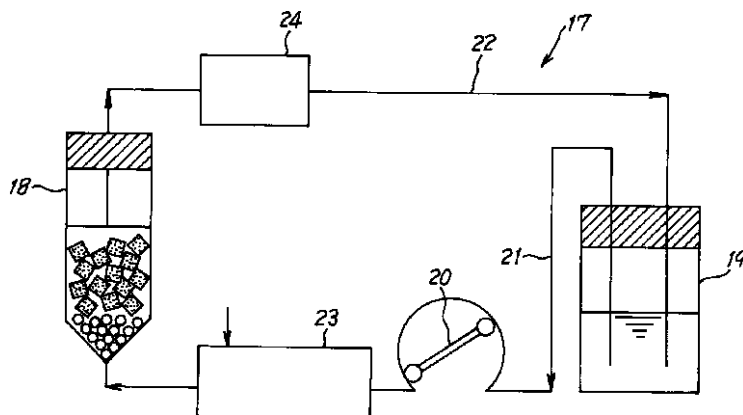
- 1、17 培養装置
- 2、18 充填層型リアクター
- 3 反応器
- 3 a 下部ポート

- 3 b 上部ポート
- 4 樹脂多孔質担体
- 5 液体培地
- 6 テフロン球
- 7 仕切板
- 8 肝細胞
- 9 コック
- 10 ウォータージャケット
- 11 温水
- 12、20、27 ポンプ
- 13、19 リザーバ
- 13 a 上部ポート
- 14、23 酸素加器
- 14 a 上部ポート
- 15 酸素
- 16、21、22、28、29、30、31 ライン
- 24 酸素電極
- 25 人工肝臓
- 26 血漿分離器
- 27 ポンプ

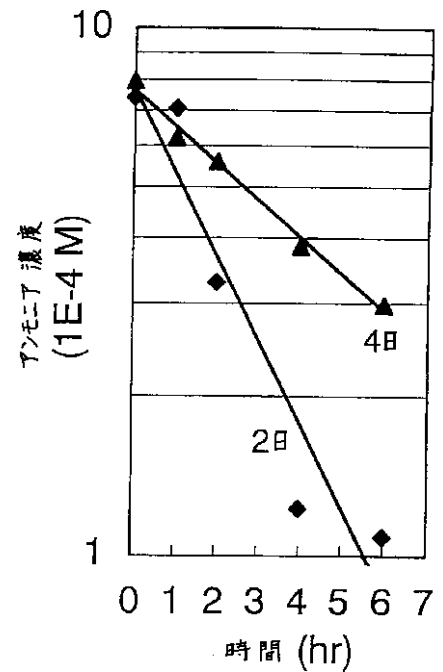
【図1】



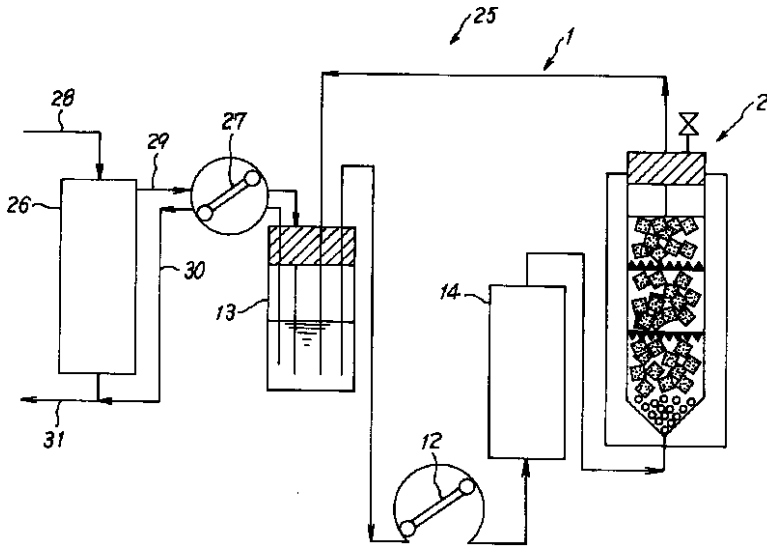
【図3】



【図5】

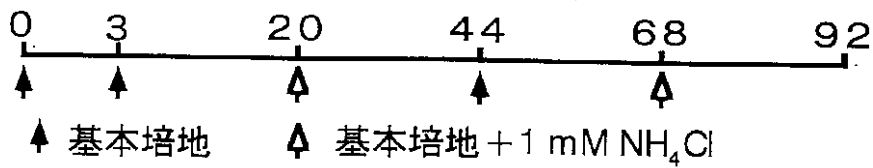


【図2】

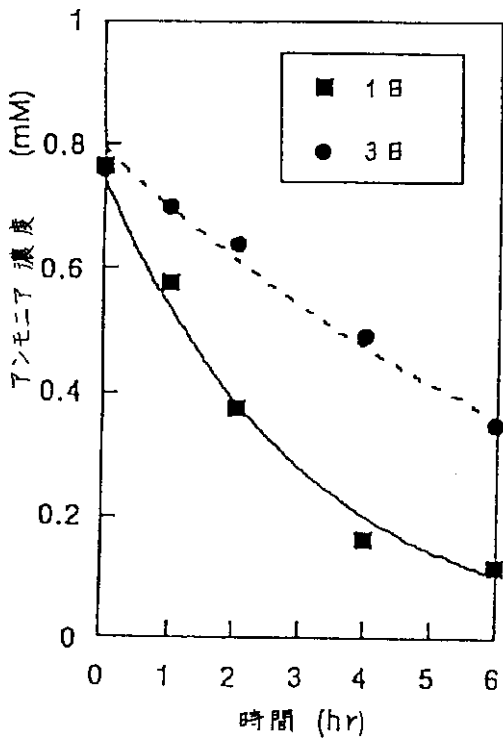


【図4】

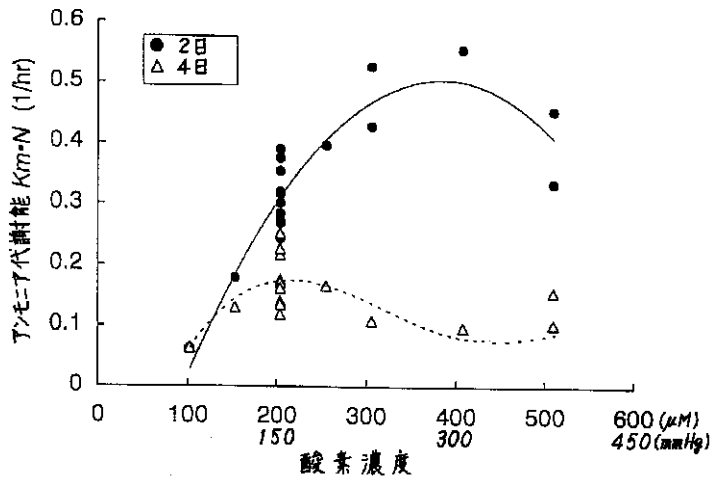
培養時間 (hr)



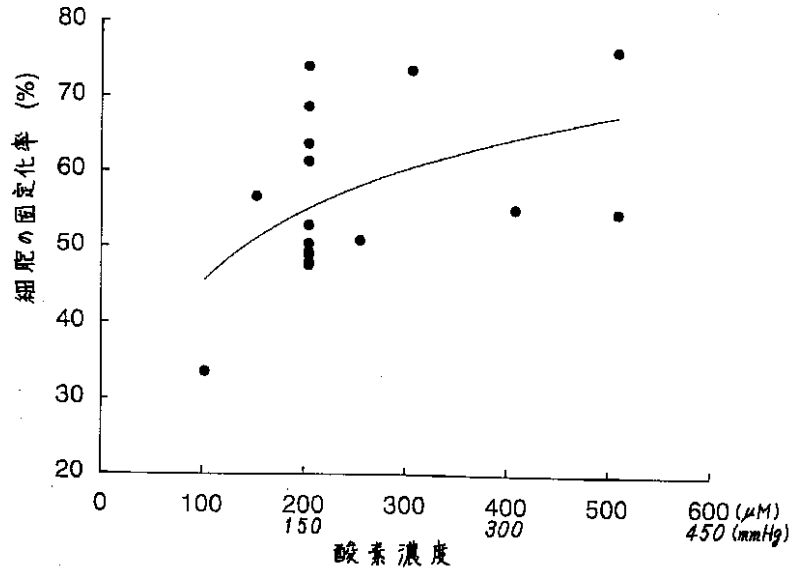
【図17】



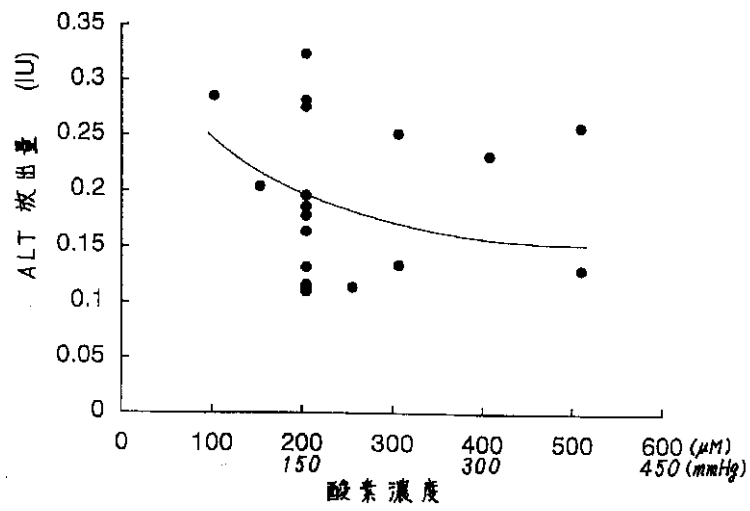
【図7】



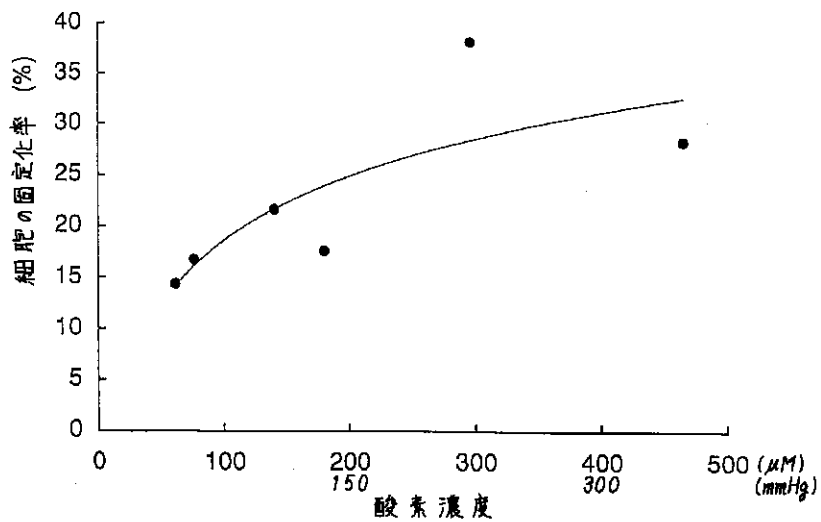
【図6】



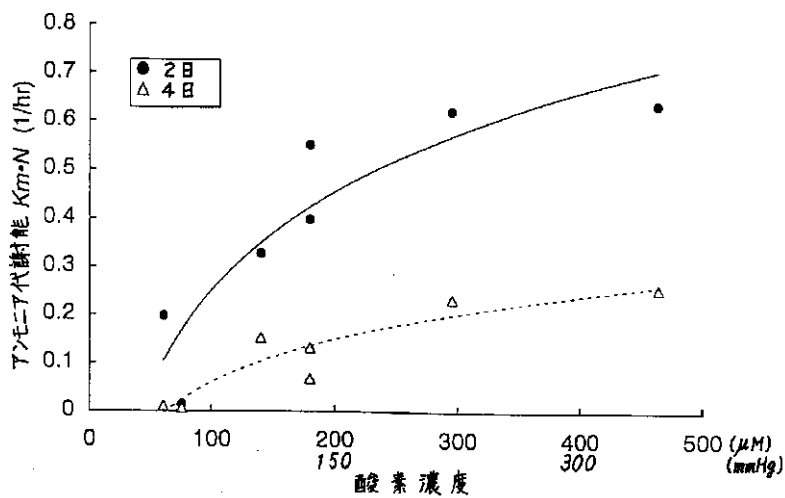
【図8】



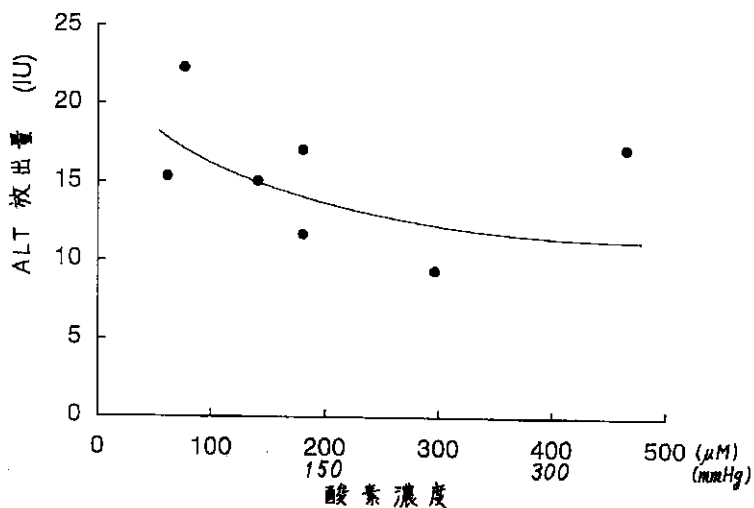
【図9】



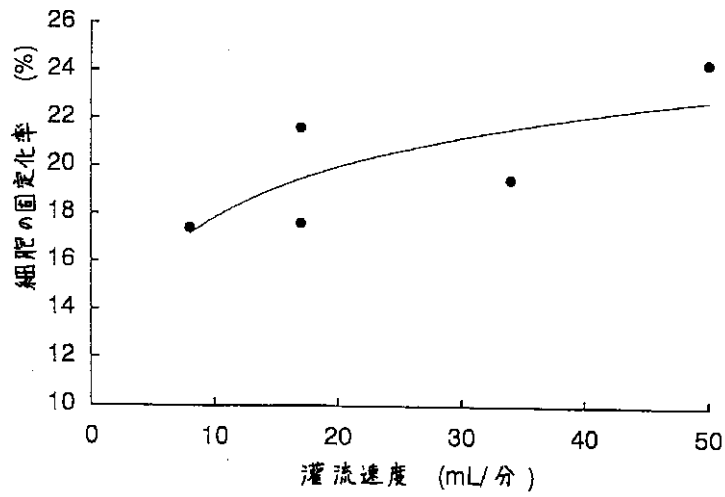
【図10】



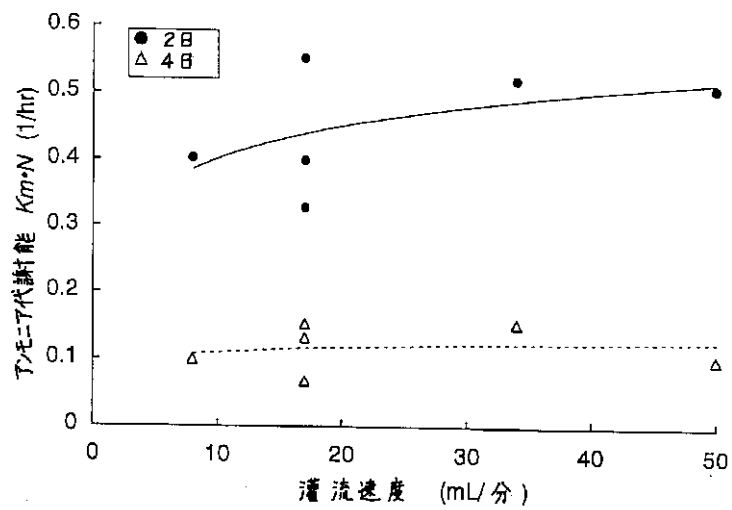
【図11】



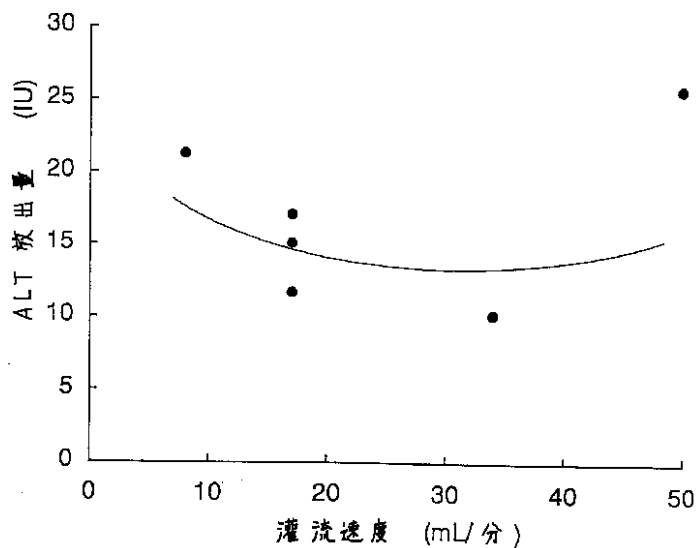
【図12】



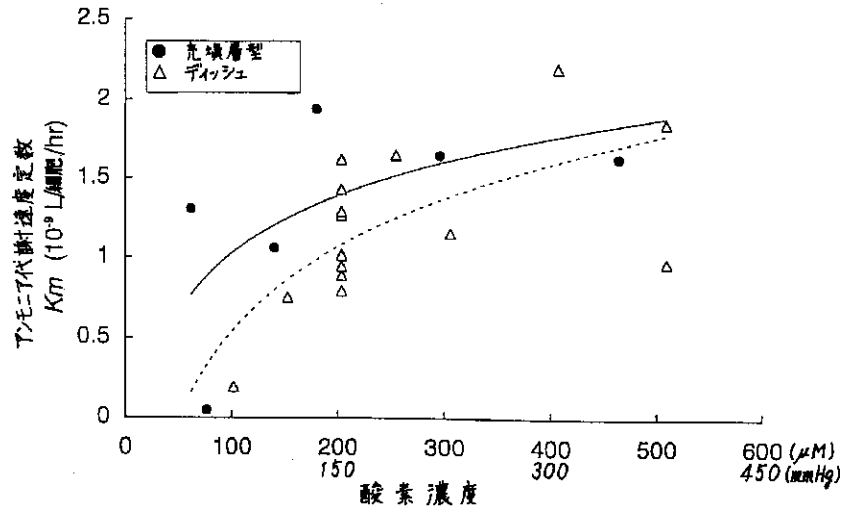
【図13】



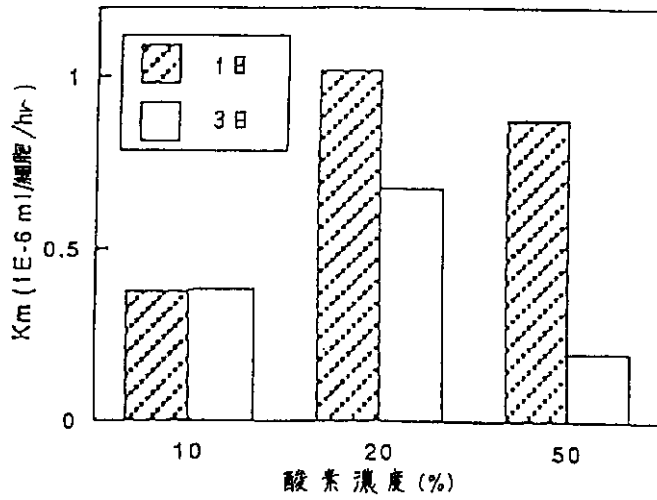
【図14】



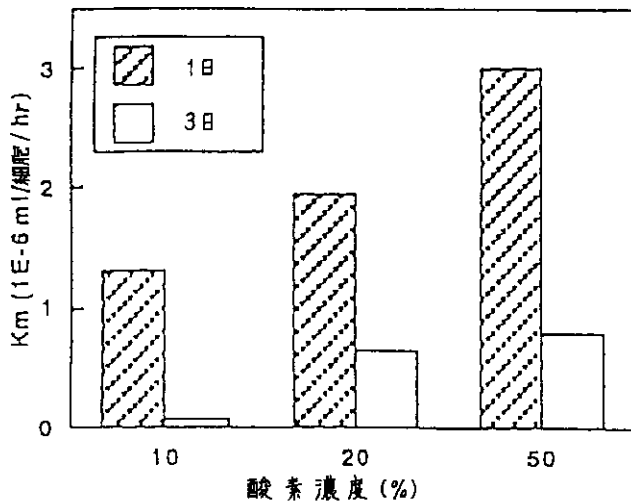
【図15】



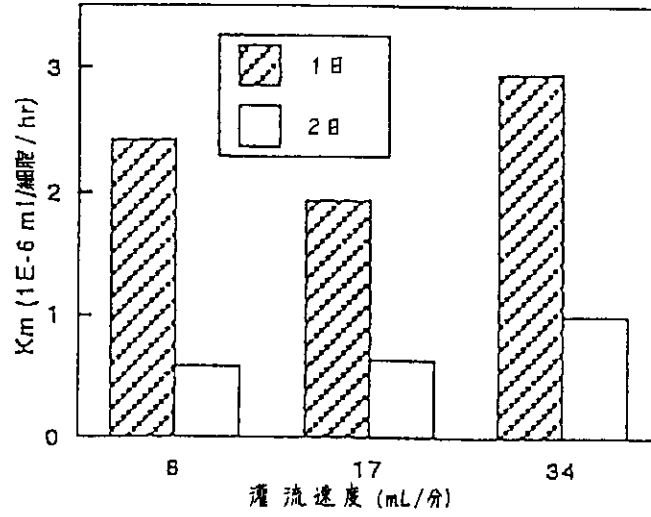
【図16】



【図19】



【図18】



フロントページの続き

前置審査

(58)調査した分野(Int.Cl.7, D B名)

C12N 1/00 - 5/28

C12M 1/00 - 3/10