

テクニカルノート

肝構成細胞の分離

萱野幸三, 坂井田 功, 沖田 極

山口大学医学部内科学第一講座 宇部市小串1144 (〒755-8505)

Key words : 肝実質細胞, 肝非実質細胞, エルトリエーションローター, ナイコデンツ比重遠心法, 星(伊東)細胞

はじめに

肝臓は肝実質細胞, Kupffer細胞, 星(伊東)細胞, 類洞内皮細胞, 胆管上皮細胞, 結合織の線維芽細胞などから構成されている。これらの構成細胞と血液の中のホルモン, サイトカインなどが複雑に関連し, 生体にとって代謝の中心をなす臓器である。このため, 個々の細胞を取り出して, 複雑な要因を取り除きその特性を検討することは極めて有用である。本稿では教室で行っている, 肝実質細胞, Kupffer細胞, 星(伊東)細胞, 類洞内皮細胞の分離について述べたい。

肝実質細胞の分離

1968年にHowardとPeschによりはじめてコラゲナーゼを用いた分離法が報告され, 1969年BerryとFriendによりコラゲナーゼ灌流法が報告された。これがさらに, Seglenにより改良されほぼ確立された(1)。

方法としては, ラットをネンブタノールにて麻酔し, ヒビテンにて消毒し, さらに腹壁をエタノールにて消毒後開腹し, 門脈にカニューレーションを行い下大静脈を腎動脈の高さで結紮し, 開胸後右心房より下大静脈にカニューレーションを行う。灌流液はEGTA含有のCa²⁺-freeのHanks液(1 L中にNaCl 8g, KCl 0.4g, NaH₂PO₃2H₂O 0.078g, Na₂HPO₃ 12H₂O

0.151 g, HEPES 2.38g, EGTA 0.19g, Phenolred 6mg, NaHCO₃ 0.35g, glucose 0.9g)にて30 ml/minで10-15分行う。これは, 肝内の血液やCa²⁺依存性のAdherence junctionの接着をはずすためである。この時カニューレーションに手間取ると, 空気が混入し灌流が不十分になったり, またカニューレーションの位置が不適切な場合は, 灌流が均一にならないため, 取れた肝細胞数が少なかったりviabilityが低く実験に使用できないので注意が必要である(灌流開始後, 肝表面の色調の変化がまだらな時は, 不均一な灌流であるためよい細胞は取れない)。

この後, コラゲナーゼとCa²⁺を含むHEPES buffer(1L中に, NaCl 8g, KCl 0.4g, CaCl₂ 0.56g, NaH₂PO₃ 2H₂O 0.078g, Na₂HPO₃ 12H₂O 0.151 g, HEPES 2.38g, collagenase 0.5g, Phenolred 6mg, NaHCO₃ 0.35g, trypsin inhibitor 0.05g)を20-30 ml/minの速度で15分程度灌流する。とろけたような状態の肝を摘出し, Eagle's essential medium (MEM)の中でメスにて細切する。これをガーゼと細胞濾過用メッシュに通す。この中には肝細胞以外に, 類洞壁細胞も含まれているため, 50Gの低速円心1分間を3回繰り返し95%以上の純度で肝細胞が分離できる。

培地はわれわれは, Williams E(WE)培地を用いている(このほか, Dulbecco modified Eagle's medium(DMEM), Leibovitz-15 (L-15)などがある。)。この培地に10%仔牛血清とインシュリン, デキサメサゾンと抗生剤としてペニシリンG, ストレプトマイシンを添加し, 5 X 10⁵個/mlに希釈して通常

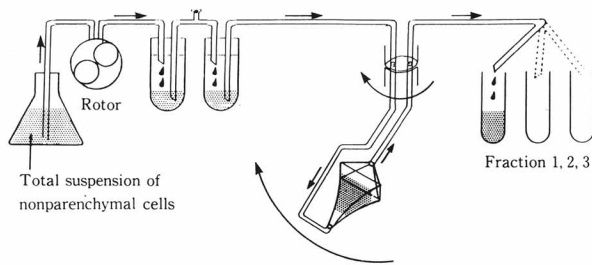


図1. エルトリエーションローターの仕組み

35mmのDishに2 mlを播いて使用している。

肝非実質細胞の分離

Kupffer細胞, 星(伊東)細胞, 類洞内皮細胞などの肝非実質細胞はエルトリエーションローターを用いた一連の操作で分離することが可能である。前述のごとく門脈にカニューレーションを行った後, 下大静脈を腎動脈の高さで切開したまま開放式にて灌流する。まず始めにCa²⁺-freeのHanks溶液(前述の組成のうちEGTAのみEDTA100mg/Lに変更)にて肝細胞分離の際よりも少しゆっくり20ml/min程度で5-7min灌流する。引き続きコラゲナーゼ(150mg/L)とCa²⁺(CaCl₂ 300mg/L)を含むHEPES buffer(組成は前述)にBSA(bovine serum albumin, 2g/L)を加えたもので約10min, 肝臓がとろけるまで灌流する。肝臓を取り出しMEMの中でメスで細切する。前述の肝細胞分離の際と同じ方法で今度は逆に肝細胞層(pellet)ではなく上清を採取する。

これをエルトリエーションローターにかける(図1)。すなわちローター内のチェンバーの流速勾配の変化と回転数(遠心力)の2つの要素にて細胞を分離するわけである(2)。最初にローターの回転数を2500rpm, ローターへの流入速度を18.5ml/minに設定し採取した肝非実質細胞が含まれる溶液をloadingする。loadingが終了したら回転数は2500rpmのまま, ローターへの流入速度を21.0ml/minに増やす。これによってローターの流出ポンプから類洞内皮細胞が採取できる(fraction1)。次に回転数を2300rpmに減少させ, ローターへの流入速度は22.5ml/minに増やす。この時の流出ポンプからはKupffer細胞と取り残した類洞内皮細胞が混じているため50mlほど捨てた後, 回転数のみ1500rpmまで減少させる。これによってKupffer細胞が採取できる(fraction2)。引

き続いて回転数を3250rpmまで一気に上昇させることで理論的には星細胞が採取可能である(fraction3)。しかしながら実際にはエルトリエーションローターでは類洞内皮細胞およびKupffer細胞の回収率は良好であるが星細胞に関しては以下のナイコデントス比重遠心方を用いた方が回収率には優れている。

ナイコデントス比重遠心方による星(伊東)細胞の分離

同様の方法にてCa²⁺-freeのHanks溶液にて灌流する。引き続きコラゲナーゼ(400mg/L)とプロナーゼ(500mg/L)を含むHEPES buffer(組成は前述)にてやはり肝臓がとろけるまで灌流する(約20min)。その後ピンセットで肝を十分にほぐした後, コラゲナーゼ(400mg/L)とプロナーゼ(800mg/L)さらにDNase(20mg/L)を含むHEPES buffer100mlにて約30minスターラーを用いて肝をさらにほぐす。この時に注意をしなければいけないのが30minの間pHを7.35前後に一定に保ち続ける点である。その後2000rpm, 8minの遠心を3回繰り返し星細胞を含んでいるであろうpelletを得る。そしてこのpelletを67.5mlのHEPES bufferでゆっくりとピペティングし, そこにナイコデントス7.75gを27mlのbufferに溶解したものを加え合計94.5mlのナイコデントス含有細胞浮遊液を作る。これを11.5mlずつチューブにいれ2000rpm, 20min遠心すると星(伊東)細胞が得られる。われわれの研究室では体重400gのラットあたり約1.5-2.0×10⁷個の細胞が得られる。

おわりに

類洞内皮細胞, Kupffer細胞, 星細胞などの肝非実質細胞は肝再生・炎症・線維化さらに癌との関連において極めて大きな役割を果たしているものと考えられる。これらの細胞の分離・培養法が確立できたことは重要な研究手段の一つを得たことになり, 今後さらに肝疾患の研究・解明に役立てたい。

参考文献

- 1) Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976 ; **13** : 29-83.
- 2) 谷川久一編, 肝類洞壁細胞研究の進歩(第1巻), 国際医書出版, 東京, 1988.