

# 無血清培地を用いた初代培養成人肝細胞に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西野, 逸男 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9001">http://hdl.handle.net/2297/9001</a>

## 無血清培地を用いた初代培養成人肝細胞に関する研究

金沢大学がん研究所内科部 (主任: 故倉金丘一教授)  
金沢大学医学部第二内科学講座 (主任: 竹田亮祐教授)

西 野 逸 男

(昭和57年8月31日受付)

ヒト肝細胞のリポ蛋白質合成について研究する手段として、無血清培地を用いた成人肝細胞初代培養を行った。生検された成人肝切片は、細切後、コラーゲナーゼとディスパーゼにより消化した。単離細胞は、DM-170を基礎培地とした、インスリン・デキサメサゾン・ウシアルブミン・ヒトファイブロンゲン添加無血清培地により、コラーゲンをコーティングした培養皿中で、5%CO<sub>2</sub>/95% air, 37°Cに培養した。形態学的に培養細胞は少なくとも5日間良好な形態を維持しており、電顕像ではin vivoにおける肝実質細胞と同様の微細構造を備えていた。<sup>14</sup>C-ロイシンによるTCA沈殿物中の放射能活性で表わした培養細胞の総蛋白質合成量は、培養96時間まで直線的に増加していた。抗ヒト全血清と96時間後の肝細胞培養液の間での免疫学的検討では、数本の沈降線が認められた。さらに、ヒト肝細胞におけるApo BとApo A-Iの合成は、<sup>14</sup>C-ロイシンを用いて放射能活性を測定することにより証明した。この培養システムは、生化学的により安定した状態で、ヒト肝細胞の形態や代謝上の特徴を研究しうる実験モデルと考えられる。

---

**Key words** 成人肝細胞, 初代培養法, 無血清培地, アポ蛋白質合成

---

担癌生体には多くの複雑な代謝上の変化が認められるが、このような生化学的変化を引き起こす多くのメカニズムについては不明である<sup>1)</sup>。近年、Keysは<sup>2)</sup>冠動脈硬化症と血漿リポ蛋白質について検討中、悪性新生物で死亡した32例においてHDLコレステロールが有意に高値であったことを見出し、臨床的に興味深い報告として注目された。従来、悪性腫瘍とリポ蛋白質の関係<sup>3)-9)</sup>については十分解明されていないので、著者は担癌生体におけるリポ蛋白質代謝を検討する手段として、まず成人肝細胞の無血清下初代培養法を試みた。

肝細胞の培養実験については、動物ではBerry & Friend<sup>10)</sup>がラット単離肝細胞の初代培養に成功し、本実験系が盛んに行われるようになり、無血清下での培養も可能になってきた<sup>10)-13)</sup>。しかし、ヒトの場合は、肝細胞間の組織結合がラットなどの実験動物よりもはるかに強固であり、また、肝灌流法などの操作が不可能であることなどから、成人肝細胞単離培養法は技術的

に非常に困難であるとされている<sup>14)</sup>。従って、従来より報告されてきた成人肝細胞培養法<sup>14)-24)</sup>のほとんどはExplant法を用いており、培養細胞が形態学的・機能的に肝実質細胞であると同等されたものは稀有である<sup>14)20)</sup>。また、従来の成人肝細胞を用いた培養系では、すべて培地中に血清が添加されており、無血清培養に成功した報告はない。もし、成人肝細胞の形態と機能を維持したまま無血清下で培養することが可能になれば、肝細胞固有の機能や発癌機構を解明するには極めて有用な実験手段になると考えられる。

本研究で、著者は、血清中の多くの不明因子を除外し、かつ、血清の細胞代謝への影響を無視しうる単純な実験モデルとして、無血清培地を用いた成人肝細胞単離初代培養法を確立し、この培養細胞についての形態学的・生化学的検討を行い、特にアポ蛋白質合成についての検討を加えた。

---

Studies of Adult Human Hepatocytes in Primary Monolayer Culture under Serum-free Condition. **Itsuo Nishino**, Department of Internal Medicine, (Director: Deceased Prof. K. Kurakane), Cancer Research Institute, Kanazawa University, and Department of Internal Medicine, (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

## 材料及び方法

金沢大学がん研究所付属病院に入院した消化器疾患患者のうち30歳から69歳までを対象とし、手術中に切除された肝および組織検索用に生検された肝組織のうち、形態学的に正常と思われる部分を用いた。

1. 肝実質細胞単離法<sup>14)</sup> (図1)

術中に無菌的に採取された肝切片をHanks液 (Grand Island Biological Co.) に入れ、可及的すみやかに剪刀を用いて細切した。細切した肝切片は、まずHanks (Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup> free) 液にて洗浄し、遠心機 (Tomy Seiko Co. CD-50SR) にて約50×g、3分間低速遠心した後、0.5 mM ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl eter) NN'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma Chem. Co.) を加えてpH 7.4に調整したHanks (Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup> free) 液にて4°C、30分間洗浄した。低速遠心にて上清を除去した後、さらに0.05% コラーゲナーゼ (Type IV, Sigma Chem. Co.) を加えたHanks液で37°C、20分間およびディスパーゼ (1,000 PU/ml: 合同酒精社) を加えたHanks液で37°C、30分間振盪し連続消化を行った。ついで充分に

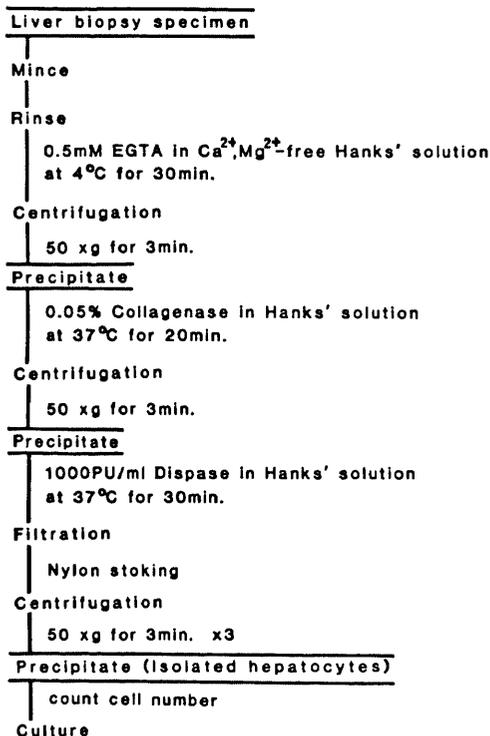


Fig.1. Isolation and culture of adult human hepatocytes.

ピペッティングを行った後、ナイロンストッキングで濾過し、濾液を約50×gの低速遠心で3分間3回繰り返し、肝実質細胞を単離した。細胞はトリパンブルーで染色し、非染細胞を血算盤で計測した。

## 2. 無血清下肝実質細胞初代培養法 (図2)

無血清培地は、極東DM-170 (極東製薬工業社) を基礎培地として用い (表1)、1.5% ウシアルブミン (Fraction V, Fatty acid free) (Sigma Chem. Co.), 10<sup>-8</sup>M デキサメサゾン (Schering Co.), 10<sup>-8</sup>M 正規インスリン (Shimizu Co.), 2×10<sup>-10</sup>M ヒトファイブロンネクチン (Collaborative Res. Inc.), ゲンタマイシン

Hepatocytes	1.2×10 <sup>6</sup> cells/dish
Culture dish (Collagen coated)	(d=35mm)
Culture media	DM-170
	1.5% Bovine albumin (Fatty acid free)
	10 <sup>-8</sup> M Dexamethasone
	10 <sup>-8</sup> M Insulin
	2×10 <sup>-10</sup> M Fibronectin

Fig.2. Culture condition.

Table 1. Composition of medium DM-170.

Amino acids and Vitamins (mg/L)				Inorganic acids and Other components (mg/L)	
Ala	400	Met	80	NaCl	6800
Arg	100	Phe	80	KCl	400
Asp	25	Pro	12	CaCl <sub>2</sub>	200
Asn	25	Ser	80	MgSO <sub>4</sub>	200
CysHCl	80	Thr	100	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125
Glu	150	Trp	40	Galactose	900
Gln	300	Tyr	50	Sodium pyruvate	550
Gly	15	Val	85	Phenol red	6
His	30	B <sub>1</sub>	1.0		
Ile	150	B <sub>2</sub>	1.0		
Leu	400	B <sub>6</sub>	1.0		
Lys	100	B <sub>12</sub>	0.005		
Pantothenic acid			1.0		
Nicotinamide			1.0		
Biotin			0.1		
Choline HCl			5.0		
Ascorbic acid			1.0		
Folic acid			1.0		
Inositol			5.0		

(50  $\mu\text{g/ml}$ : Schering Co.) を加えて作成した。培養皿 (直径 35 mm, Falcon Co.) には前もってウシコラーゲン (calf skin, Vitrogen®, Collagen Corp.) をコーティングしておき、無血清培地 1.2 ml に約  $1.2 \times 10^6$  個の単離肝細胞を浮遊させて、37°C で湿潤した 5%  $\text{CO}_2/95\%$  Air の気相下に培養を開始した。培養 12 時間目には、新たに培養液を交換し培養皿に付着しない細胞を除去した後、再び培養を続けた。これらの操作はすべて無菌的条件下で行った。

また、コラーゲンおよびファイブロンネクチンの有効性を検討するために、コラーゲンをコーティングしない場合とファイブロンネクチンを加えない場合などの組み合わせ条件でそれぞれ培養し、細胞接着率について比較した。さらに、15% ウシ胎児血清 (Flow Lab.) を加えて培養し、同様に細胞の接着状態を観察し比較検討した。

### 3. 培養肝細胞の形態学的観察

培養 5 日目までは 12 時間毎に光学顕微鏡にて培養細胞の形態学的追跡を行い検討した。さらに 48 時間後の培養細胞を、2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒド、1% 四酸化オスミウム (Sigma Chem. Co.) にて固定し、2% 酢酸ウラニールにて染色後、30% ~90% エタノールにて脱水し、Epon および HPMA (methacrylic acid 2 hydroxypropyl ester) (東京化成工業社) にて漸時包埋して試料を作成し微細構造を透過型電子顕微鏡下で観察した。

### 4. 培養肝細胞の生化学的特徴

#### 1) 培養肝細胞により合成された総蛋白量の測定

培養液中に [ $^{14}\text{C}$ ]-ロイシン (0.05  $\mu\text{Ci}$ , New England Nuclear Corp.) を添加し、培養開始後 4 日間 (96 時間) まで各 12 時間毎に培養液を集め、それぞれ 2,000  $\times$  g で 15 分間遠心し、死細胞を除去して上清を得た。新しく合成された蛋白量は、得られた上清に 10% トリクロロール酢酸 (TCA) を加えて生じた沈殿物中の放射能活性を指標として測定した。

#### 2) 培養液中の蛋白成分について

培養開始後 4 日間の培養液を集めて 2,000  $\times$  g で 15 分間遠心し、上清をダイアフロー法 (ミニコン, 分画分子量 15,000, Amicon Co.) にて約 50 倍に濃縮した。この濃縮液と抗ヒト全血清家兔抗体 (Behring Institute) を、1% アガロースを用いた Ouchterlony の免疫拡散法および免疫電気泳動法にて検討した。

#### 3) 培養液中のヒトアルブミンの存在について

抗ヒトアルブミン抗体の作成は、ヒトアルブミン (Sigma Chem. Co.) 10 mg を生食水 2 ml に溶解し等量の Freund's complete adjuvant (Difco Lab. Inc.) とともにラット腹腔内へ毎週 1 回 4 週間免疫すること

により得られた。得られた抗ヒトアルブミン血清を用いて、培養 48 時間後の濃縮培養液を免疫拡散法及び免疫電気泳動法により検討した。

#### 4) 培養肝細胞における Apolipoprotein B (以下,

Apo B) および Apolipoprotein A-I (以下, Apo A-I) の合成について

#### i) ヒト LDL<sub>2</sub> 分離法および抗ヒト Apo B 抗体の作成

Havel らの方法に準じて<sup>25)~27)</sup>、正常ヒト血漿に KBr を加え、密度 1.030 g/ml に合わせて、Beckman L5-50 超遠心機および 40.3 型ローターを使用して 105,000  $\times$  g, 44 時間遠心した。遠心後 tube slicer を用いて下層を分取し、さらに KBr を加え、密度 1.050 g/ml に合わせて 105,000  $\times$  g, 44 時間遠心し上清を得た。この上清を密度 1.050 g/ml で 2 回超遠心洗浄後、密度  $1.030 < d < 1.050$  g/ml の LDL<sub>2</sub> 分画を分離した。ついで 4°C 下に 3 mM EDTA を含む 0.15 M NaCl (pH 7.4) に対して十分透析後、LDL<sub>2</sub> 2 ml (蛋白量 3.2 mg) と等量の Freund's complete adjuvant を混和し、ウサギ腹腔内へ毎週 1 回注射免疫し抗ヒト LDL<sub>2</sub> 家兔血清を得た。この抗 LDL<sub>2</sub> 血清は、Ouchterlony 法でヒトアルブミンと沈降線を示さず、LDL<sub>2</sub> との間のみ単一の免疫沈降線を認めた。また、免疫電気泳動法で VLDL ( $d < 1.006$  g/ml) および HDL<sub>3</sub> ( $1.110 < d < 1.210$  g/ml) との間に Apo C, Apo A-I, Apo A-II に対する免疫沈降線は認められなかった。従って、この抗 LDL<sub>2</sub> 血清は Apo B に対する monospecific antibody であると考えられた。

#### ii) ヒト HDL<sub>3</sub> 分離法および抗ヒト Apo A-I 抗体の作成

ヒト LDL<sub>2</sub> 分離法と同様な方法<sup>28)</sup>にて、正常ヒト血漿より密度  $1.110 < d < 1.210$  g/ml の HDL<sub>3</sub> 分画を分離し、抗 LDL<sub>2</sub> 家兔血清を得たと同様な方法にて、抗 HDL<sub>3</sub> 家兔血清を得た。この抗 HDL<sub>3</sub> 血清は、免疫学的方法により Apo A-I にのみ一致した免疫沈降線が認められ、Apo B, Apo C, Apo A-II とは免疫反応を示さず、Apo A-I に対する monospecific antibody であると考えられた。

#### iii) 肝細胞培養液中の Apo B および Apo A-I の存在について

培養 48 時間後の濃縮培養液を用いて、抗ヒト Apo B 抗体および抗ヒト Apo A-I 抗体との間での免疫反応を、1% アガロースを用いた免疫拡散法および免疫電気泳動法にて検討した。

#### iv) 培養肝細胞により合成された Apo B および Apo A-I 量の測定

培養液中に [ $^{14}\text{C}$ ]-ロイシン 0.05  $\mu\text{Ci}$  を添加し、培

養4日間の培養液を集めて、 $2,000 \times g$ で15分間遠心し上清を得た。上清各3 mlに抗ヒト Apo B抗体および抗ヒト Apo A-I抗体をそれぞれ300  $\mu$ l加え、 $4^\circ C$ に12時間静置後さらに抗ヒト IgG家兎血清を各々300  $\mu$ l加えて、再び $4^\circ C$ に12時間静置した。その後、 $3,000 \times g$ 、30分間遠心して得られたそれぞれの免疫沈殿物中の放射能活性を測定した。

また、対照として同一条件下で $[^{14}C]$ -ロイシンを加えインキュベーションし、培地に抗ヒトアポ蛋白血清の代りに正常家兎血清を加え、以下同様の方法で免疫沈殿物の放射能活性を測定した。

## 成 績

### 1. 培養肝細胞の形態学的特徴

#### 1) 単離肝細胞の形態学的観察

単離後に得られた肝細胞収量は $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/g肝湿重量で、ほぼ均一な大きさを示し、赤血球の混入もわずかであった(図3)。また、0.2%トリパンブルーによる非染色率でみた単離直後の肝細胞生存率は85%以上であった。

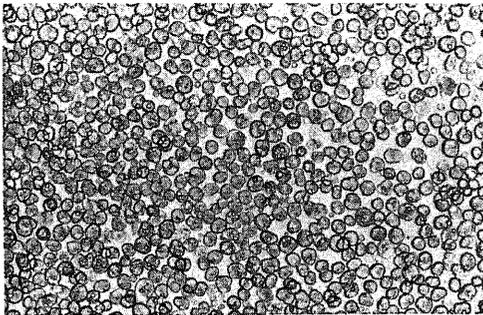


Fig. 3. Light microscopic photograph of isolated adult human hepatocytes.

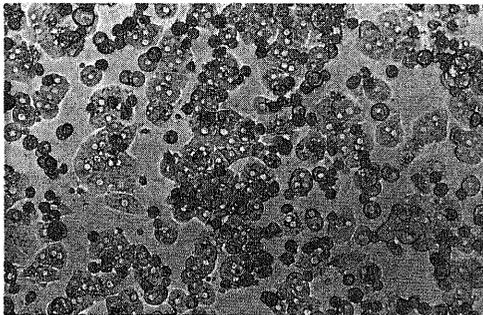


Fig. 4. Light microscopic photograph of adult human hepatocytes incubated for 48 hours.

### 2) 培養肝細胞の形態学的観察

培養12時間後の肝細胞は培養皿底に接着し始め、24時間後には隣り合った細胞と互いに接するようにして単層を形成し、培養5日後にも同様な形態が観察された(図4)。電子顕微鏡下の培養肝細胞は、明瞭な核小体を有する大型・円形の核を中心にした直径20~40  $\mu$ の大きさを示す多角形の細胞で、細胞質にはミトコンドリア・粗面小胞体・滑面小胞体・ゴルジ装置などが観察され、さらに細胞膜の培養液と接する自由縁にはマイクロビリヤが存在し、また300  $\text{\AA}$ 以下の間隙で密接する隣接細胞間の一部にデスモゾームやgap junctionにはさまれた毛細胆管の形成を確認し、内腔にむかって多数のマイクロビリヤが突出している像が観察された(図5)。

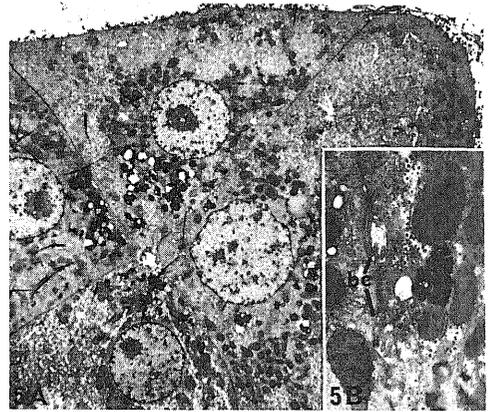


Fig. 5. Electron micrograph of hepatocytes cultured for 48 hours. Notice the newly formed bile canaliculi (Fig. 5B, bc) (5A:  $\times 2,000$ , 5B:  $\times 10,000$ ).

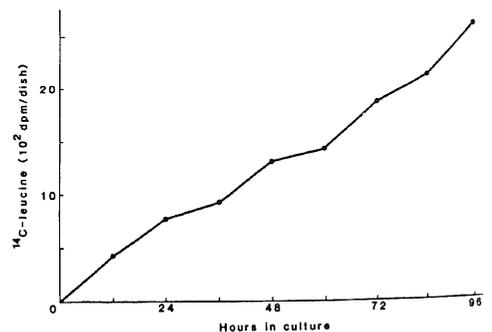


Fig. 6. Incorporation of [ $^{14}C$ ]-leucine into TCA insoluble materials. A constant rate of total protein synthesis was observed up to 96 hours of the cultured period.

無血清状態である本条件下の24時間後の細胞接着率は約35%であった。これに比較して、コラーゲンをコーティングしない培養皿を使用したり、ファイブロネクチンを加えない条件下で培養した場合は、細胞接着が極めて悪く、それらの間に明らかな差が認められた。15%ウシ胎児血清を加えて培養した場合は、35~45%の細胞接着率を示したが、血清のロットによって接着率の良・不良があり、極端なバラツキがみられた。

2. 培養肝細胞の生化学的特徴

1) 培養肝細胞の総蛋白合成能

各培養時間毎の培養液におけるTCA沈殿物中の放射能活性で表わした経時的な総蛋白合成量は、96時間

目までほぼ直線的に増加しており、培養肝細胞が少なくとも4日目まで十分な蛋白合成機能を維持していることを確認した(図6)。

2) 培養液中の蛋白成分

培養開始後4日間の培養液を集めて作成した濃縮液と抗ヒト全血清を用いて免疫学的検討を行った。免疫電気泳動法では、対照の健康ヒト血清との間に共通する5~6本の免疫沈降線が認められた(図7)。コントロールとして用いた培養前の細胞を含まない培地およびコーティングに使用されたコラーゲンと抗ヒト全血清の間には、同様な免疫沈降線を認めなかった。従って、培養肝細胞は少なくとも数種類のヒト血清蛋白を合成あるいは分泌しているものと推測された。

3) 培養液中のヒトアルブミンの存在について

肝細胞の生成機能を示す指標の一つとして重要なアルブミンが培養液中に存在していることを確認するために、抗ヒトアルブミン血清を作成し、濃縮培養液およびヒトアルブミンとこの抗血清との間で免疫学的検討を行った。培養48時間後の培養液と抗ヒトアルブミ

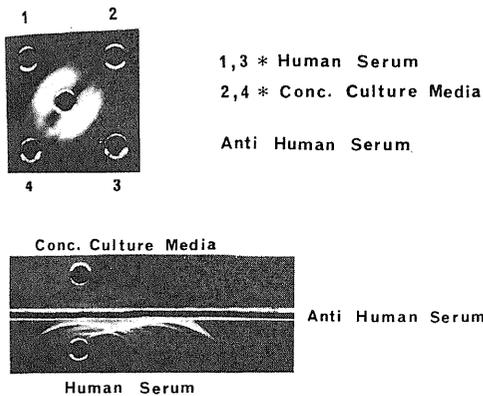


Fig. 7. Double immunodiffusion and immunoelectrophoresis of the concentrated culture media and human serum with anti-human serum. The several immunoprecipitin lines were observed between anti-human sera and the concentrated culture media.

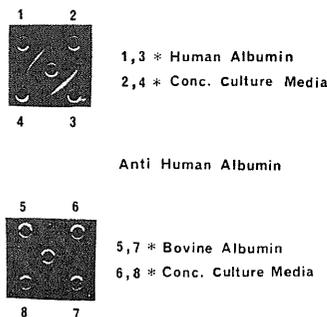


Fig. 8. Anti-human albumin reacted with the concentrated culture media and human albumin and did not react with bovine albumin by double immunodiffusion.

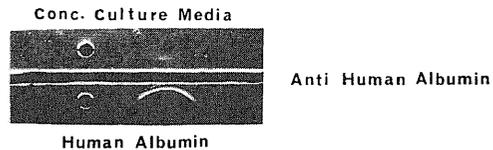


Fig. 9. Immunoelectrophoresis of the concentrated culture media with anti-human albumin.

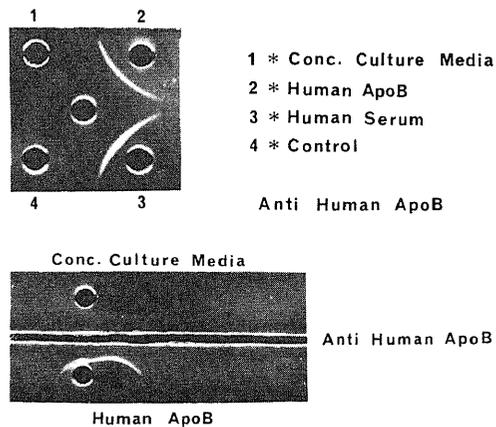


Fig. 10. Analysis of Apo B by double immunodiffusion and immunoelectrophoresis. A single precipitin line was observed between anti-Apo B sera and the concentrated culture media.

ン血清との間には、ヒトアルブミンと同一の明瞭な免疫沈降線が認められた。一方、培地中に加えられているウシアルブミンを対照として抗ヒトアルブミンとの間で行った免疫反応では、沈降線を認めなかった(図8)。また、免疫電気泳動法においても培養液と抗ヒトアルブミン血清との間にできた免疫沈降線はヒトアルブミンと同一の移動度を示しており、このことから培養液中にヒトアルブミンが存在していることを確認した(図9)。

#### 4) 培養液中の Apo B および Apo A-I の存在について

48 時間後の濃縮培養液と抗ヒト-Apo B 抗体との間に明瞭な免疫沈降線が認められ、また、対照として用いたヒト Apo B およびヒト全血清と抗ヒト Apo B 抗体との間にも単一の免疫沈降線が確認されたが、コントロールとして用いた培養前の細胞を含まない培地と抗ヒト Apo B 抗体との間にこのような沈降線は免疫反応として認められなかった。さらに、培養液と抗ヒト

Apo B 抗体との間にできた免疫沈降線は、免疫電気泳動法でも明らかにヒト Apo B と同一の移動度であることを確認した(図10)。

以上の結果より、この沈降線は培養肝細胞により合成あるいは分泌された Apo B との間の免疫反応によってできた免疫沈降線であると考えられた。

また、同様に 48 時間後の濃縮培養液と抗ヒト Apo A-I との間で行った免疫学的検討では免疫沈降線を確認できず(図11)、本法で培養液中の Apo A-I の存在を明らかにすることはできなかった。

#### 5) 培養肝細胞により合成された Apo B および Apo A-I について

培養液中に<sup>14</sup>C-ロイシンを添加し、培養後細胞内に取り込まれた放射能活性により表わした合成 Apo B および Apo A-I は、コントロールに比べ明らかに高値を示した(表2)。以上より、培養肝細胞は Apo B および Apo A-I を合成しているものと考えられたが、Apo B に比べて Apo A-I の放射能活性は低値であった。

## 考 察

ヒト肝細胞培養の歴史は Chang の報告<sup>15)</sup>に始まり、以来主に Explant による培養法が試みられてきたが<sup>15)-22)</sup>、この Explant 法により得られた培養細胞は常に均一な細胞集団から構成されているとは限らず、形態的・機能的に肝実質細胞であるとするには問題があった。そこで、Kaighn らは<sup>23)</sup>、コラーゲナーゼとヒアルロニダーゼを用いて肝細胞を分散させて培養することを試み、また、その他にもコラーゲナーゼやトリプシンなどの酵素を用いた細胞分散法が報告されている<sup>24)</sup>。しかし、いずれもこれらの培養細胞は均一な肝細胞集団とはいえず、形態的・機能的にも肝実質細胞とは断定しがたい。Miyazaki らは<sup>14)</sup>、ヒト肝組織が動物に比べてはるかに強力な細胞組織間・細胞細胞間の結合をもっており、また動物に対するような灌流法が行えないなどの困難な点に留意し、振盪法とコラーゲナーゼおよびディスパーゼによる化学的細胞分散法を組み合わせて肝細胞の単離培養を行った。この方法では、Wanson ら<sup>29)</sup>の報告した組織構築を応用して、カルシウムイオン除去による細胞間接着とくにデスモゾームの開裂、コラーゲナーゼ消化による組織骨格の解離、物理的な方法による細胞間の解離、さらにファイブロネクチンなどの糖蛋白の存在も考慮して各段階の消化を行っている。著者は、これらの基本的条件を検討し、Miyazaki らの方法に準じて肝細胞の単離を行い約 1 g の肝湿重量あたり平均  $1 \sim 2 \times 10^6$  個の肝実質細胞を得ることが可能であった。また、単離直後の肝細胞の生

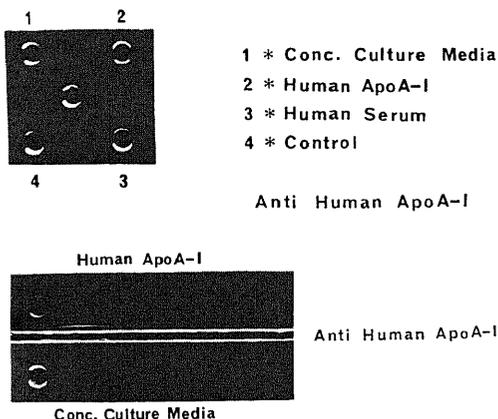


Fig. 11. Analysis of Apo A-I by double immunodiffusion and immunoelectrophoresis. No precipitin line was observed between anti-Apo A-I sera and the concentrated culture media.

Table 2. The incorporated radio-activities of [<sup>14</sup>C]-leucine into apoproteins.

	(dpm/dish/4 days)	
	Exp. 1	Exp. 2
Apoprotein A-I	279	355
Apoprotein B	2703	3286

存率は、0.2%トリパンブルーによる非染色率が85%以上と良好な結果が得られ、この単離肝細胞を用いて無血清下での初代培養を試みた。一方、近年、血清中にはアルブミン、ファイブロンネクチン、リポ蛋白およびその他の細胞増殖促進因子が存在し、これらにより細胞の発育が促進されるものと考えられている。従来より、一般に細胞培養には血清が用いられることが多く、既報のヒト肝細胞培養法でもすべて血清が添加されている<sup>14)~24)</sup>。しかし、血清とくにウシ胎児血清は、年々供給量の不足や高価であるなどの理由のため良質なロットの定常的な入手が困難で、また、血清によってはロットにより細胞増殖促進性が異なり、時には毒性があるとの指摘もある。山根ら<sup>30)</sup>も無血清下の方が血清を加えた培地よりも細胞の表現形質が安定していたと報告しており、著者の実験においても血清を加えた場合の培養の良否にかなりばらつきがあるように思われた。さらに、血清を加えた培養実験系では、血清の細胞代謝への影響が不明であり、また、血清中の多くの不明因子も無視できないなどの欠点がある。そこで、著者はより単純な実験モデルの作成を目指し、無血清下で肝細胞を培養することを試みてきた。

無血清下での細胞培養の歴史は、細胞の栄養要求をできる限り満たしうる組成をもった合成培地を作成する努力に始まり、現在までに数種の無血清培養用培地が考案されている<sup>31)~33)</sup>。著者が用いたDM-170は、Katsutaら<sup>34)~36)</sup>により考案された培地で、多くの種類の細胞が血清下でも無血清下でも培養できることを目的として作成されたもので、ラットRLC-10、マウス3T3、L-P3、ハムスターCHO-K1、などの細胞系で培養可能なことが確認されている<sup>34)</sup>。さらに、DM-170はヒト胎児肝の培養にも用いられ、Katsutaらは、ヒトの細胞培養に好適な培地であると述べている<sup>35)</sup>。また、無血清状態ではpHの変動をきたしやすいが、DM-170の培地組成の特徴としてガラクトースとピルビン酸がグルコースの代わりに加えられており、このためグルコースによる培養細胞の急速な有機酸発酵にともなう培地のpH低下を防ぐことができるものと考えられている<sup>35)</sup>。しかし、DM-170はホルモンや成長因子を含んでいないため、この培地単独では十分な培養効果を得ることができなかった。以上より著者は、本研究がヒト肝細胞を用いた培養実験であることや無血清下で細胞を維持する必要があることなどを考慮し、DM-170を基礎培地として使用し、さらに培養効果を高めるために必要と思われるものを添加して無血清培地を作成した。なお、DM-170、Dulbecco's modified Eagle (DME)、HI/WO<sub>5</sub>/BA 2000<sup>13)32)</sup>およびHam F-12との比較検討を行った結果、いずれもDM-170に比べて

光顕的な形態変化や細胞接着率が劣っており、DM-170が既存の培地中最適であろうと考えられた。

一方、培地中に細胞発育促進因子を添加して無血清下での細胞培養を試みた報告も多い。Waymouthらは<sup>10)</sup>、コーチゾンを加えてマウス肝細胞を培養し、Gerschensonらは<sup>11)</sup>、インスリンとアルブミンを加えてラット肝細胞を培養した。著者は、無血清下で培養されたこれらの報告を重視し、DM-170培地にデキサメサゾン、インスリン、アルブミンを加えた。なお、デキサメサゾンおよびインスリンについては、本邦でも市原ら<sup>37)</sup>により詳細な報告がなされ、主に細胞接着やspreadingを促進する一方、細胞維持にも必要なホルモンであるといわれている。また、アルブミンについても、Fisherら<sup>38)</sup>をはじめ多くの研究により細胞増殖促進作用があることが認められている。最近、山根は<sup>39)</sup>、ウシアルブミンV分画を培地中に添加すると細胞の増殖能が高まるが、この作用はアルブミンに含まれる不純物の脂肪酸であることを報告した。しかし、アルブミンは脂質の可溶性を増して毒性を除き、さらにインスリン活性の喪失を防ぐ作用もあるといわれており<sup>11)39)</sup>、また、Nakaiらは<sup>40)</sup>、アルブミン添加が細胞膜の安定性を増すと報告していることから、著者もとくに無血清下での培養にはアルブミンが必要であると考えている。

他方、培養細胞の培養皿底への接着率をより確実に増加させるための工夫もなされている。Michalopoulosらは<sup>41)</sup>、ラット尾より抽出したコラーゲンをを用いて浮遊コラーゲン膜の状態でラット肝細胞を培養し、同じくLinらは<sup>12)</sup>、ウシ皮膚より抽出したコラーゲンを培養皿底へコーティングし良好な培養成績を得ている。また、ファイブロンネクチンは、最近特に細胞の悪性転換および正常化との関係<sup>42)~47)</sup>において注目をあびてきた物質であるが、Pearlsteinは<sup>48)</sup>、コラーゲンをコーティングしたプラスチック表面への細胞接着率がファイブロンネクチンにより著しく促進することを報告した。この物質は、分子量約22万の糖蛋白質で<sup>49)~53)</sup>細胞表面に存在して細胞と基質あるいは細胞と細胞の接着を高め、spreadingを促進させ、さらにコラーゲンともよく結合するといわれている<sup>48)54)~56)</sup>。また、この物質はプロテアーゼで容易に分解されるため<sup>57)</sup>、本法のように細胞単離に際して長時間プロテアーゼ(ディスパーゼ)を作用させた後の細胞回復には不可欠の添加物質であると考えられる。著者が行った実験においても、無血清下での細胞接着率の比較では、培養皿にコラーゲンをコーティングしファイブロンネクチンを加えた培養条件下での成績が最も良く、いずれかの欠損した条件下では細胞接着が不良であった。

ところで、肝臓は肝実質細胞以外に胆管上皮細胞、網内系細胞、血管内皮細胞、結合組織細胞などが混在しているために、培養細胞が肝実質細胞であることを形態学的及び生化学的方法により決定することが重要である。形態学的同定として、光顕的に上皮性を示す細胞を肝実質細胞であるとして報告している研究者もあるが、上皮性細胞が必ずしも肝実質細胞由来とは限らず、胆管上皮細胞や血管内皮細胞なども上皮性の形態を示してくる。著者は、電顕レベルでの培養細胞の形態観察により、①核は大型円形で明瞭な核小体を有し、細胞は多角形を示している、②ミトコンドリア・粗面小胞体・滑面小胞体などの細胞内小器官が細胞質に散在して見られる、③隣接する2個の細胞の間にデスモゾームや gap junction に囲まれて毛細胆管が形成されている、④毛細胆管の近くにゴルジ装置が見られる、⑤細胞遊離縁に多数のマイクロビリヤがあるなどの所見を認め、培養細胞が肝実質細胞の微細構造における特徴を十分に備えていること<sup>58)59)</sup>を確認した。さらにアルブミン合成ならびにその分泌能は、肝実質細胞の示す重要な機能であり、培養細胞が肝実質細胞由来であるかどうかの生化学的同定をする場合に最もよく利用される肝特異機能の1つである。Fouad らは<sup>60)</sup>、ラット初代培養肝細胞から分泌された蛋白成分を分析し、*in vivo*における成分の構成と全く同じであることを証明している。著者も、培養液の免疫学的検討により数種類の蛋白成分が存在していることを見たが、特に、培養液中のヒトアルブミンの同定を行った。その結果、免疫拡散法および免疫電気泳動法により得られた沈降線は、あらかじめ培地に加えられたウシアルブミンとは明らかに異なり、ヒトアルブミンと同一のものであることを証明した。また、TCA 沈殿物中の放射能活性で表わした経時的な蛋白合成量測定の結果により、本研究における培養肝実質細胞は、無血清状態で少なくとも4日間は十分な蛋白合成機能を維持していることを証明した。

次に、肝細胞における Apo B および Apo A-I の合成について考察を加える。現在、10種類以上のアポ蛋白が同定されているが、肝臓におけるリポ蛋白合成に関する *in vitro* の実験研究は主に実験動物を用いて行われてきた。すなわち、ラット肝灌流法によって得られた灌流液中のリポ蛋白<sup>61)~65)</sup>やアポ蛋白<sup>40)66)</sup>に関する報告およびラット遊離肝細胞を用いた実験報告<sup>40)67)</sup>があり、リポ蛋白代謝の研究に大きな役割を果たしてきた。しかし、肝灌流法は実験動物にのみ使用可能な方法でありヒトの実験系としては応用できない。ただ、近年、細胞培養法の発展・普及により、培養細胞を用いた実験成績が多数報告されるようになってきた。

Breslow らは<sup>68)</sup>、継代培養マウス肝細胞を用いて培養液中に HDL の存在を確認し、Jeejeebhoy らは<sup>69)</sup>、初代培養ラット肝細胞の培養液中に VLDL を証明した。また、Kempen は<sup>70)</sup>、<sup>14</sup>C を用いて初代培養ラット肝細胞の VLDL 合成を証明し、Tarlow らも<sup>71)</sup>、<sup>3</sup>H を用いて初代培養ニワトリ肝細胞の VLDL 合成を明らかにした。さらに Dashti らは<sup>72)</sup>、初代培養ラット肝細胞より Apo A-I、Apo E の合成を明らかにした。また、山田らは<sup>28)</sup>、無血清培養液 HI/WO<sub>5</sub>/BA<sub>2000</sub> を用いたラット肝細胞初代培養法を確立し培養液中に Apo A-I の存在を確認、同じく Davis らも<sup>73)</sup>、DME 培地を用いて無血清下での初代培養ラット肝細胞より Apo B の合成を証明し報告した。しかし、これらの報告はラットやマウス、ニワトリなどの実験動物肝を材料としたものであり、動物種差による影響が重要な問題としてあげられ<sup>4)</sup>、これらの実験成績を直ちにヒトのリポ蛋白代謝に結びつけるのは危険である。

一方、ヒトでも肝由来の培養細胞を用いてリポ蛋白代謝の検討を試みたとの以下の報告もある。すなわち、Kaighn らは<sup>29)</sup>、正常ヒト肝組織を培養し、各種蛋白合成の検討の中で  $\beta_1$ -リポ蛋白の合成を認めているが、培養細胞の形態は線維芽細胞様を示し、肝実質細胞とは言い難い。最近、Zannis らは<sup>75)</sup>、ヒト胎児肝の器官培養により得られた培養液中に、Apo A-I、Apo A-II、Apo B、Apo C-II、Apo C-III<sub>s</sub>、Apo E が存在していることを明らかにしている。また、Knowles らは<sup>76)</sup>、幼児の肝芽細胞腫および肝細胞癌より継代培養した培養細胞株 (Hep G 2、Hep 3 B) を用いて、培養液中に  $\beta$ -リポ蛋白の存在を見た。その後、Rash らは<sup>77)</sup>、同じ Hep G 2 より Apo A-I、Apo B (Apo B<sub>n</sub>、Apo B<sub>s</sub>)、Apo C、Apo E の存在を、Zannis らも<sup>78)</sup>、Hep G2 および Hep 3B より Apo A-II、Apo C-II、Apo C-III-1、Apo C-III-2 を証明した。これらの諸報告は、いずれも今後のリポ蛋白代謝における研究には極めて重要なものであるが、培地中に種々の濃度のウシ胎児血清が添加されており、また、正常な成人肝実質細胞の単一な集団ではないために、生理的な正常ヒト肝細胞におけるリポ蛋白代謝の実験とするには問題が残る。

以上の観点から著者は、無血清下の初代培養成人肝細胞を用いてアポ蛋白合成についての検討を加えた。まず、家兎の免疫で得られた特異的抗体 (抗 Apo B および抗 Apo A-I) を用いて、培養 48 時間後の濃縮培養液との間で免疫反応を行ったところ、抗 Apo B に対して明瞭な免疫沈降線が出現し、培養肝細胞により合成あるいは分泌された Apo B が培養液中に存在していることを確認した。しかし、抗 Apo A-I に対しての

免疫沈降線は認められなかった。一方、 $[^{14}\text{C}]$ -ロイシンを培養液中に添加して細胞内に新しく合成された Apo B, Apo A-I に取り込まれた放射能活性により表わしたアポ蛋白の合成は、コントロールに比べ明らかに高値を示し、培養肝細胞が Apo B および Apo A-I を合成しているものと考えられた。しかし、Apo A-I の放射能活性が Apo B に比べて低値を示したことは、肝細胞における Apo A-I の合成量が Apo B に比べて低いとの報告<sup>66)75)77)</sup>にほぼ合致している。また、免疫沈降線が Apo A-I で確認できなかったのもそのためであろうと推測される。また、著者は、ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ抗体を用いて酵素組織化学的方法により生検肝組織のアポ蛋白局在を検討した。その結果、Apo B は細胞質内に一様に染色され Apo A-I は散在性に観察され (未発表)、やはり Apo A-I の合成量が低いものと考えられた。本研究において、著者は、無血清下のヒト肝実質細胞初代培養法を確立し、ヒト肝細胞における Apo B および Apo A-I の合成を直接証明したが、現在まで、初代培養ヒト肝細胞を利用してアポ蛋白の合成について検討した報告は著者の成績が最初である。今後、肝臓において重要なアポ蛋白の1つである Apo E などを含め、他のアポ蛋白についても本実験系での検討が必要と考えている。

## 結 論

1. 無血清培地を用いて、成人肝実質細胞の初代単離培養法を確立し、形態学および生化学的に検討を加えた。培養細胞は、光顕像・電顕像で肝実質細胞としての形態学的特徴を備えていることが確認された。また、肝実質細胞のマーカーとしてヒトアルブミンが培養液中に存在していることを証明した。さらに、培養肝細胞は、少なくとも培養4日目までは十分な蛋白合成機能を維持していることを確認した。

2. 成人肝細胞による Apo B および Apo A-I の合成が確認された。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授、故倉金丘一教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり終始御指導、御教示を頂いた山田志郎講師に心から感謝いたします。併せて、本研究遂行に多大の御協力を頂いたがん研究所ウィルス部波田野基一教授、外科部磨伊正義教授、医学部第2内科中井継彦助手、久津見恭典学兄、医学部神経内科坂戸俊一助手、富山日赤病院内科本多幸博博士ならびにがん研究所外科部および医学部第2内科第5研究室の諸先生方に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第23回日本消化器病学会秋季大会(1981)、第16回日本肝臓学会西部会(1981)、日本動脈硬化学会昭和56年度冬期大会(1982)、および6th International Symposium on Atherosclerosis, ワークショップ(1982, Berlin, West Germany)で発表した。

## 文 献

- 1) **Theologides, A.**: Cancer cachexia. *Cancer*, 43, 2004 - 2012 (1979).
- 2) **Key, A.**: Alpha lipoprotein (HDL) cholesterol in the serum and the risk of coronary heart disease and death. *Lancet*, 2, 603 - 606 (1980).
- 3) **Rejneck, J., Bednarik, R., Rerabkova, E. & Peskova, D.**: The effect of human serum fractions on cell growth and its relation to the state of serum  $\alpha$ -lipoprotein. *Exp. Cell Res.*, 37, 65 - 78 (1965).
- 4) **Narayan, K. A.**: Rat serum lipoproteins during carcinogenesis of the liver in the pre-neoplastic and the neoplastic state. *Int. J. Cancer*, 8, 61 - 70 (1971).
- 5) **Rose, G., Blackburn, H., Keys, A., Taylor, H. L., Kannel, W. B., Paul, O., Reid, D. D. & Stamler, J.**: Colon Cancer and blood-cholesterol. *Lancet*, 1, 181 - 183 (1974).
- 6) **Brenneman, D. E., Mathur, S. N. & Spector, A. A.**: Characterization of the hyperlipidemia in mice bearing the Ehrlich ascites tumor. *Europ. J. Cancer*, 11, 225 - 230 (1975).
- 7) **Kralovic, R. C., Zepp, E. A. & Cenedella, R. J.**: Studies of the mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. *Europ. J. Cancer*, 13, 1071 - 1079 (1977).
- 8) 山田志郎, 西野逸男, 坂戸俊一, 倉金丘一, 中井継彦, 玉井利孝, 久津見恭典, 茂田耕治, 竹田亮祐: HeLa細胞の分裂・増殖におよぼすリポ蛋白の影響: 高比重リポ蛋白(HDL)および低比重リポ蛋白(LDL)について. *脂質生化学研究*, 23, 234 - 237 (1981).
- 9) **Berry, M. N. & Friend, D. S.**: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A. Biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, 43, 506 - 520 (1969).
- 10) **Waymouth, C., Chen, H. W. & Wood, B. G.**: Characteristics of mouse liver parenchymal cells in chemically defined media. *In Vitro*, 6, 371 (1971).
- 11) **Gerchenson, L. E., Okigaki, T., Andersson, M., Molson, J. & Davidson, M. B.**: Fine structural and growth characteristics of cultured rat liver cells. Insulin effects. *Exp. Cell Res.*, 71, 49 - 58 (1972).
- 12) **Lin, R. C. & Snodgrass, P. J.**: Primary culture of normal adult rat liver cells which maintain stable urea cycle enzymes. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., **64**, 725 - 734 (1975).
- 13) **Yamada, S., Nakai, T., Kutsumi, Y., Takeda, R., Kurakane, K., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whayne T. F. Jr.**: Primary monolayer culture of adult rat hepatocytes in a serum-free system: Metabolic and morphological studies. *Biomed. Res.*, **2**, 491 - 500 (1981).
- 14) **Miyazaki, K., Takaki, R., Nakayama, F., Yamauchi, S., Koga, A. & Toda, S.**: Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. *Cell Tissue Res.*, **218**, 13 - 21 (1981).
- 15) **Chang, R. S.**: Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 440 - 443 (1954).
- 16) **Taylor, P. E., Zuckerman, A. J. & Farrow, L. J.**: Culture of needle biopsies of the liver from patients with suspected hepatitis. *J. Clin. Path.*, **22**, 701 - 703 (1969).
- 17) **Le Guilly, Y., Lenoir, P., Bourel, M., Poupon, R. & Guillouzo, A.**: La culture prolongée du tissu hépatique humain adulte. *Pathol. Biol.*, **18**, 733 - 741 (1970).
- 18) **Demoise, C. F., Galambos, J. T. & Falek, A.**: Tissue culture of adult human liver. *Gastroenterol.*, **60**, 390 - 399 (1971).
- 19) **Guillouzo, A., Oudea, P., Le Guilly, Oudea, M. C., Lenoir, P. & Bourel, M.**: An ultrastructural study of primary cultures of adult human liver tissue. *Exp. Mol. Pathol.*, **16**, 1 - 15 (1972).
- 20) **Sandström, B.**: Maintenance in vitro of functionally active adult human liver. *Acta Hepatogastroenterol.*, **20**, 19 - 23 (1973).
- 21) **Blüger, A., Wechsler, G., Timoschenko, I. & Treija, I.**: Growth phenomena in tissue culture of adult human livers in different disease states. *Acta Hepatogastroenterol.*, **20**, 387 - 393 (1973).
- 22) **Lemonnier, F., Gautier, M., Moatti, N. & Lemonnier, A.**: Comparative study of extracellular amino acids in culture of human liver and fibroblastic cells. *In Vitro*, **12**, 460 - 466 (1976).
- 23) **Kaighn, M. E. & Prince, A. M.**: Production of albumin and other serum proteins by clonal cultures of normal human liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2396 - 2400 (1971).
- 24) **Wands, J. R. & Isselbacher, K. J.**: Lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1301 - 1303 (1975).
- 25) **Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H.**: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345 - 1353 (1955).
- 26) **Tamai, T., Nakai, T., Yamada, S., Kobayashi, T., Hayashi, T., Kutsumi, Y. & Takada, R.**: Effects of oxandrolone on plasma lipoproteins in patients with type II a, II b and IV hyperlipoproteinemia: Occurrence of hypo-high density lipoproteinemia. *Artery*, **5**, 125 - 143 (1979).
- 27) **玉井利彦**: 糖尿病におけるリポ蛋白代謝異常に関する研究. *日内泌会誌*, **56**, 57 - 77 (1980).
- 28) **山田志郎, 中井継彦, 玉井利彦, 小林武嗣, 林多喜王, 竹田亮祐**: ラット培養肝細胞における高比重リポ蛋白 (HDL<sub>2</sub>) の合成. *動脈硬化*, **6**, 481 - 488 (1979).
- 29) **Wanson, J. C., Bernaert, D. & May C.**: Morphology and functional properties of isolated and cultured hepatocytes, P1. In H. Popper & F. Schaffner (ed.). *Progress in liver diseases*, 6th ed. Grune & Stratton, New York, 1979.
- 30) **山根績, 村上修, 加藤美和**: 実用的無血清細胞培養培地. *医学のあゆみ*, **94**, 619 - 624 (1975).
- 31) **Ham, R. G.**: Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 288 - 293 (1965).
- 32) **Morrison, S. J. & Jenkin, H. M.**: Growth of chlamydia psittaci strain meningopneumonitis in mouse L cells cultivated in a defined medium in spinner cultures. *In Vitro*, **8**, 94 - 100 (1972).
- 33) **Katsuta, H. & Takaoka, T.**: Cultivation of cells in protein- and lipid-free synthetic media, p1 - 42. In D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*, 6th ed. Academic Press, New York and London, 1973.
- 34) **Katsuta, H. & Takaoka, T.**: Improved synthetic media suitable for tissue culture of various mammalian cells, p145 - 158. In D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*, 14th ed. Academic Press, New York and London, 1976.
- 35) **Katsuta, H., Takaoka, T. & Huh, N.**: Establishment of tissue culture cell strains from normal fetal human liver and kidney. *Japan J. Exp. Med.*, **50**, 329 - 337 (1980).
- 36) **松橋佑子**: 極東 DM - 160 培地, 極東 DM - 170 培地の使用方法および応用面. *組織培養*, **7**, 287 - 290 (1981).

- 37) **Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. & Ichihara, A.** : Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. I. Hormonal effects on cell viability and protein synthesis. *J. Biochem.*, **84**, 937 - 946 (1978).
- 38) **Fisher, H. W., Puck, T. T. & Sato, G.** : Molecular growth requirements of single mammalian cells. III. quantitative colonial growth of single S<sub>3</sub> cells in a medium containing synthetic small molecular constituents and two purified protein fractions. *J. Exp. Med.*, **109**, 649 - 659 (1959).
- 39) **Yamane, I.** : Role of bovine albumin in a serum-free culture medium and its application. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **48**, 131 - 133 (1978).
- 40) **Nakai, T., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whyne T. F. Jr.** : Rat high density lipoprotein subfraction (HDL<sub>3</sub>) uptake and catabolism by isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4914 - 4921 (1976).
- 41) **Michalopoulos, G. & Pitot, H. C.** : Primary culture of parenchymal hepatocytes on Collagen membranes. *Exp. Cell Res.*, **94**, 70 - 78 (1975).
- 42) **Hynes, R. O.** : Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and proteolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**, 3170 - 3174 (1973).
- 43) **Vaheri, A. & Ruoslahti, E.** : Disappearance of a major cell-type-specific surface glycoprotein antigen (SF) after transformation of fibroblasts by Rous sarcoma virus. *Int. J. Cancer*, **13**, 579 - 586 (1974).
- 44) **Yamada, K. M., Yamada, S. S. & Pastan, I.** : Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and constant inhibition of movement to transformed fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 1217 - 1221 (1976).
- 45) **Jaffe, E. A. & Mosher, D. F.** : Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 122 - 131 (1978).
- 46) **Lipkin, G., Knecht, M. E. & Rosenberg, M.** : Glycoprotein-containing factor that mediates contact inhibition of growth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 382 - 391 (1978).
- 47) 箱守仙一郎 : 癌細胞膜。代謝, **17**, 1403 - 1416 (1980).
- 48) **Pearlstein, E.** : Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. *Nature*, **262**, 497 - 500 (1976).
- 49) **Ruoslahti, E. & Vaheri, A.** : Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane. *Nature*, **248**, 789 - 791 (1974).
- 50) **Mosesson, M. W., Chen, A. B. & Huseby, R. M.** : The cold-insoluble globulin of human plasma. Studies of its essential structural features. *Biochem. Biophys. Acta*, **386**, 509 - 524 (1975).
- 51) **Mosher, D. F.** : Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6614 - 6621 (1975).
- 52) **Mosesson, M. W.** : Structure of human plasma cold-insoluble globulin and the mechanism of its precipitation in the cold with heparin or fibrin-fibrinogen complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 11 - 30 (1978).
- 53) **Matsuda, M., Yoshida, N., Aoki, N. & Wakabayashi, K.** : Distribution of cold-insoluble globulin in plasma and in tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**, 74 - 92 (1978).
- 54) **Engvall, E. & Ruoslahti, E.** : Binding of soluble form of fibroblast surface protein, Fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer*, **20**, 1 - 5 (1977).
- 55) **Grinnell, F. & Minter, D.** : Attachment and spreading of baby hamster kidney cells to collagen substrata. Effects of cold-insoluble globulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 4408 - 4412 (1978).
- 56) 中井継彦, 久津見恭典, 山田志郎 : リポ蛋白代謝 : 肝細胞。動脈硬化, **8**, 649 - 660 (1981).
- 57) **Carter, W. G. & Hakomori, S.** : Isolation and partial characterization of "Garactoprotein a" (LETS) and "Garactoprotein b" from hamster embryo fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 299 - 308 (1977).
- 58) 海保正義, 久米川正好 : 培養肝細胞の微細構造。組織培養, **1**, 225 - 235 (1975).
- 59) **Wanson, J. C., Drochmans, P., Mosselmans, R. & Ronveaux, M. F.** : Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. Ultrastructural characteristics of intercellular contacts and cell membrane differentiations. *J. Cell Biol.*, **74**, 858 - 877 (1977).
- 60) **Fouad, F. M., Scherer, R., Abd - El - Fattah, M. & Ruhstroth - Bauer, G.** : Biosynthesis of plasma proteins in serum-free medium by primary monolayer culture of rat hepatocytes. *Europ. J. Cell Biol.*, **21**, 175 - 179 (1980).
- 61) **Mahley, R. W., Bersot, T. P. & LeQuire, V.**

- S. : Identity of very density lipoprotein apoproteins of plasma and liver Golgi apparatus. *Science*, **168**, 380 - 382 (1970).
- 62) Windmueller, H. G., Herbert, R. N. & Levy, R. I. : Biosynthesis of lymph and plasma lipoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J. Lipid Res.*, **14**, 215 - 223 (1973).
- 63) Noel, S. P. & Rubinstein, D. : Secretion of apolipoprotein in very low density and high density lipoproteins by perfused rat liver. *J. Lipid Res.*, **15**, 301 - 308 (1974).
- 64) Marsh, J. B. : Apolipoproteins of the lipoproteins in a noncirculating perfusate of rat liver. *J. Lipid Res.*, **17**, 85 - 90 (1976).
- 65) Hamilton, R. L., Williams, M. C., Fielding, C. J. & Havel, R. J. : Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, **58**, 667 - 680 (1976).
- 66) Wu, A. L. & Windmueller, H. G. : Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J. Biol. Chem.*, **254**, 7316 - 7322 (1979).
- 67) Felker, T. E., Fainaru, M., Hamilton, R. L. & Havel, R. J. : Secretion of the arginine - rich and A - I apolipoproteins by the isolated perfused rat liver. *J. Lipid Res.*, **18**, 465 - 474 (1977).
- 68) Breslow, J. L., Sloan, H. R., Ferrans, V. J., Anderson, J. L. & Levy, R. I. : Characterization of the mouse liver cell line FL83B. *Exp. Cell Res.*, **78**, 441 - 453 (1973).
- 69) Jeejeebhoy, K. N., Ho, J., Breckenridge, C., Robertson, A. B., Steiner, G. & Jeejeebhoy, J. : Synthesis of VLDL by isolated rat hepatocytes in suspension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1147 - 1153 (1975).
- 70) Kempen, H. J. M. : Lipoprotein secretion by isolated rat hepatocytes, characterization of the lipid - carrying particles and modulation of their release. *J. Lipid Res.*, **21**, 671 - 680 (1980).
- 71) Tarlow, D. M., Watkins, D. A., Reed, R. E., Miller, R. S., Zwergel, E. E. & Lane, M. D. : Lipogenesis and the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by avian liver cells in nonproliferating monolayer culture. Hormonal effects. *J. Cell Biol.*, **73**, 332 - 353 (1977).
- 72) Dashti, N., Mc Conathy, W. J. & Ontko, J. A. : Production of apolipoproteins E and A - I by rat hepatocytes in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 347 - 358 (1980).
- 73) Davis, R. A., Engelhorn, S. C., Weinstein, D. B. & Steinberg, D. : Very low density lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2039 - 2045 (1980).
- 74) Chapman, M. J. : Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J. Lipid Res.*, **21**, 789 - 853 (1980).
- 75) Zannis, V. I., Kurnit, D. M. & Breslow, J. L. : Hepatic Apo A - I and Apo E and intestinal Apo A - I are synthesized in precursor isoprotein forms by organ cultures of human fetal tissues. *J. Biol. Chem.*, **257**, 536 - 544 (1982).
- 76) Knowles, B. B., Howe, C. C. & Aden, D. P. : Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **209**, 497 - 499 (1980).
- 77) Rash, J. M., Rothblat, G. H. & Sparks, C. E. : Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **666**, 294 - 298 (1981).
- 78) Zannis, V. I., Breslow, J. L., San Giacomo, T. R., Aden, D. P. & Knowles, B. B. : Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochem.*, **20**, 7089 - 7096 (1981).

**Studies of Adult Human Hepatocytes in Primary Monolayer Culture under Serum-free Condition** Itsuo Nishino, M. D., Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Jusen Med. Soc.*, **91**, 629 - 641 (1982)

**Key words:** Adult human hepatocytes, Serum-free medium, Primary monolayer culture, Apolipoprotein synthesis.

#### Abstract

In order to study lipoprotein synthesis in human liver, a primary monolayer culture of adult

human hepatocytes in serum-free medium was investigated. Biopsy specimens of adult human liver were cut into fine pieces and the hepatocytes were dissociated with collagenase followed by Dispase (Godo Shusei Co.). Isolated cells were incubated in serum-free medium, DM-170, supplemented with  $10^{-6}$ M insulin,  $10^{-6}$ M dexamethasone, 1.5% bovine albumin and  $2 \times 10^{-10}$ M human fibronectin, on collagen precoated culture dishes. These dishes were placed in a humidified incubator at  $37^{\circ}\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ /95% air. Morphological examination with light- and electron- microscopes showed that the appearance of cultured hepatocytes was well maintained in serum-free culture medium at least for 5 days after cell cultivation. Electron microscopy revealed that the cells in primary culture had a fine structure identical with the liver parenchymal cells *in vivo*. Cellular protein synthesis, determined by [ $^{14}\text{C}$ ] - leucine incorporation into trichloroacetic acid (TCA) insoluble fractions of extracellularly released proteins, increased linearly up to 96 hours of the culture period. And several immuno-precipitin lines were recognized between anti-human sera and the conditioning culture media in which the hepatocytes were cultured for 96 hours. Moreover, synthesis of both apolipoproteins (Apo B and Apo A-I) by human hepatocytes was also confirmed by measuring the incorporated radio-activities into Apo B and Apo A-I after the cell incubation with [ $^{14}\text{C}$ ] - leucine.

Based on these findings it is claimed that the present culture system is a good model to study the morphological and metabolic characteristics of human hepatocytes under the more controlled and reliable *in vitro* condition.