

521 ラット初代肝細胞およびヒト肝ガン細胞株のアンモニア代謝解析
(阪大・ICBiotech) ○小島伸彦、高木 陸、吉田敏臣

【目的】 ハイブリッド型人工肝臓に関する基礎的知見を得るため、ラット初代肝細胞およびヒト肝ガン由来細胞株のアンモニア除去速度への各種代謝物濃度の影響を調べる。

【方法】 Wistar系ラット初代肝細胞およびヒト肝ガン由来細胞株Huh 7¹⁾をそれぞれ $0.1-2.2 \times 10^5$, $0.5-2.0 \times 10^6$ cells/mlの細胞密度で使用した。10%FCS添加DMEM培地を基本とし種々濃度のNH₄Cl、グルコース、グルタミンを含むアンモニア負荷培地を各ディッシュに添加し3-24時間負荷培養を行い、アンモニア(NH₃)、尿素(Ur)、グルタミン(GLN)、グルタミン酸(GA)、グルコース(G)、乳酸(L)濃度の経時変化を測定した。そして、細胞を含まないコントロールとの差を、細胞代謝による変化とした。

【結果】 初代細胞を用いた負荷培養中、GLNおよびNH₃は減少しUrが増加する一方でGAはほとんど変化しなかった。負荷培地のGLN濃度を上げると、G消費、L生成各比速度は変化しないが、GLN消費、Ur生成の各比速度がともに増大し、NH₃比消費速度は減少した。以上などからGLNはGAで滞留せず消費され、生成したNH₃の約85%がUrになること、GLN濃度の増加によるNH₃生成の増加分すべては尿素回路が補償できないことがわかった。一方、負荷培地のG濃度を上げてNH₃代謝には影響がなく、NH₃代謝とG代謝とがほぼ独立していると考えられる。NH₃比消費速度が低いHuh 7でも同様の検討を行っている。

1) M. Takagi *et al.*, Cytotechnology, 24, 39-45(1997).

Ammonia metabolism analysis of rat primary hepatocyte and a hepatocyte cancer derived cell line

○Nobuhiko KOJIMA, Mutsumi TAKAGI, Toshiomi YOSHIDA (ICBiotech, Osaka Univ.)

【Key Words】 ammonia metabolism, primary hepatocyte, hepatocyte cell line

522 骨髄ストローマ細胞株の多孔性担体を用いた三次元培養
(阪大・ICBiotech) 高木 陸、○佐々木隆英、吉田敏臣

【目的】 制御の容易な三次元造血微小環境の構築を目指して、繊維芽細胞である骨髄ストローマ細胞株の多孔性担体内への接着、増殖方法を確認する。

【方法】 マウス骨髄由来ストローマ細胞株SR-4987を10%NBS含有McCoy's 5A培地を用いて37°C、5%CO₂雰囲気下で、ディッシュ(1.8 cm²、液量1 ml)静置培養または100 ml容スピナーボトル(液量30 ml)を用いて攪拌培養した。多孔性担体としては、中孔径セルロース担体(CPB; 旭化成、孔径100 μm)、大孔径セルロース担体(MC; バイオマテリアル社、孔径500 μm)、ポリエステル不織布(FC; NBS社)の3種を用いた。細胞数は脱核染色法で測定した。

【結果】 担体(CPB)への細胞接着方法(遠心、間欠攪拌、低速(20 rpm)連続攪拌)のうち低速連続攪拌法が最も接着効率が良かった。細胞接着後の増殖培養における攪拌速度については低速(20 rpm)およびディッシュ内での静置培養と比較して十分な酸素供給能を有する70 rpmでも十分良好な増殖が認められた。また初期細胞密度をCPBで5→10×10⁵ cells/ml、MCで3→30×10⁵ cells/mlと上げたところ到達細胞密度はそれぞれ1.2倍、2倍となり、到達細胞密度を上げるには担体上での初期接着細胞密度が重要と考えられる。走査型電子顕微鏡観察によると、CPB上では球形の接着細胞のみだったが、MCやFC上では本来の繊維芽状に伸展した細胞が大部分を占め、担体表面が平面に近い方が細胞が伸展しやすいと考えられる。

Spatial development of the cultivation of a marrow stromal cell line in porous carriers

Mutsumi TAKAGI, ○Takahide SASAKI, Toshiomi YOSHIDA (ICBiotech, Osaka Univ.)

【Key Words】 bone marrow, stromal cell line, porous carrier