

<原 著>

## ヒト伊東細胞の分離に関する研究

中川 正則 中林 仁美 中野 博\*

**要 旨**：ヒト伊東細胞を比較的容易に、かつ多量に集め得る分離法について報告した。すなわち、手術時得られた肝組織を細切、切片の組織培養を行なうと切片周辺の培養底にさまざまな細胞が成育してくる。この細胞を trypsin 液にて単離し、metrizamide 三層比重遠心法にて伊東細胞の分離を行なった。伊東細胞の同定には、顕微鏡ならびに電顕による細胞の形態学および細胞内脂肪滴の検索、蛍光顕微鏡による vitamin A 蛍光の存在、retinol 共存下培養による細胞内 vitamin A 含有脂肪滴の出現で行なった。この方法で得られた細胞は peroxidase antiperoxidase, avidin-biotin peroxidase complex 法による免疫組織化学的方法で細胞内 desmin, vimentin の存在が確認された。これらの方法による検討から今回分離された細胞は約 90% が伊東細胞で、500mg の肝組織からは大略  $10^6$  個の伊東細胞が採取可能である。

**索引用語**： ヒト伊東細胞 分離 組織培養 三層比重遠心法

ヒト伊東細胞を用いた in vitro の研究は殆どみられない。その理由は肝より伊東細胞を分離する方法としては Knook ら<sup>1)</sup>の報告した経門脈的コラゲナーゼ、あるいはコラゲナーゼ・プロナーゼ液の灌流法が最も確実な方法として専ら行なわれているため、この方法を用いて人体より伊東細胞を採取することが困難であることによるのであろう。伊東細胞のもつ機能として脂肪代謝、結合繊維、とりわけコラーゲン繊維の産生細胞としての役割が注目されている。肝の線維化と伊東細胞の関連についての研究では、その殆どがラットを用いて行なわれているのが現状である。しかし、ヒトの肝線維化、とくに肝硬変の形成に対する伊東細胞の意義を明らかにするためにはヒト伊東細胞を用いての研究が不可欠であることはいうまでもない。今回われわれは、手術時に得られた肝組織を用いて比較的簡単にヒト伊東細胞を分離する方法を見いだしたので報告する。

### 材料並びに方法

#### 1. 材料

肝細胞癌のため、肝の部分摘除を受けた非癌部肝組織を用いた。切除肝を鉢にて大略  $1 \times 1 \text{mm}$  の大きさに細切し、Falcon 社製プラスチック培養フラスコ (25  $\text{cm}^2$ ) 底に 8~12 個静置後、10% fetal calf serum (FCS)

を含む Dulbecco' minimum essential medium (DMEM) 2ml を加え、37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 95% 空気相下に培養を行なった。4~7 日後より、切片周囲に多様な細胞が成育するが、2~3 週後には切片より離れた部位にまで扁平多足、紡錘状、円盤状、その他さまざまな細胞群がフラスコ底に成育してくる。なお培養液の交換は 1 週間に 2 回の割合で行なった。この時期に 0.25% trypsin 液処理して培養底を成育した細胞を剥離、10% FCS 加 DMEM 液に懸濁、2,000 回転、5 分の遠心後上清を捨て細胞を回収の後 Hanks' 液にて遠心、洗浄した後、8% metrizamide (Nycomed AS, Norway) Hanks' 溶液に再懸濁した。なお回収された細胞数はフラスコ当たり約  $1 \sim 4.5 \times 10^5$  個であった。

#### 2. 伊東細胞の分離

伊東細胞の分離は metrizamide 三層比重遠心法にて行なった<sup>2)</sup>。即ち、metrizamide の 18, 13% Hanks' 溶液、および細胞を懸濁した 8% 溶液を 3,3,6ml の割合に重層し 1,400g, 17 分間遠心、上層と中層の境界に集まった伊東細胞を多く含む細胞群を集め Hanks' 液で 2 回洗浄の後 10% FCS を含む DMEM 液に懸濁、上記 Falcon 社製プラスチック培養フラスコにて 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 95% 空気相下に培養を行なった。この操作にて採取される伊東細胞の回収率は約 10~15% であった。培養液の交換は 1 週間に 2 回の割合で行なった。細胞層が充満した時期に 0.25% trypsin 液処理にて細胞を単離、継代培養を行なった。伊東細胞の形態学的観察、

\* 奈良県立医科大学病態検査

<受付日 1990 年 7 月 25 日>

細胞内脂肪滴の検討は分離後の細胞を、細胞内 desmin, vimentin の確認, retinol 添加培養系には主として2代から4代継代した細胞を Lab-Tek tissue culture chamber/slide (4 wells, マイルズ社製) にて細胞数5,000個を上記培養液中に懸濁して播種, 培養を行なったものを用いた。

### 3. 伊東細胞の同定

#### A. 形態学的観察

a) 光顕および電顕学的観察: Metrizamide 三層比重遠心法にて分離された細胞をスライドガラス上にて培養を行なった細胞についてオリンパス製位相差顕微鏡, 日本電子製透過型電顕 (1200E) にて形態学的観察を行なった。

b) 細胞内 vitamin A 含有脂肪滴の確認: 分離した細胞内脂肪滴の形態学的確認は, オリンパス製位相差顕微鏡にて, 脂肪滴内 vitamin A 含有の証明はスライドガラス上で培養した細胞をグリセリンで封入し, 蛍光顕微鏡下波長330nm 下での蛍光の存在を検討することで行なった<sup>3)</sup>。

c) Retinol 添加培養による細胞内 vitamin A 含有脂肪滴の発現: 細胞内 desmin, vimentin の存在を検討した培養細胞を用い, retinol 添加培養による細胞内脂肪滴の発現の影響を検討した。すなわち, 分離後2~4代継代培養を行なった細胞の培養液中に Chen らの報告に従って<sup>4)</sup>, 0.1% の DMSO に retinoic acid を溶解, 培養液中に最終濃度  $1 \times 10^{-5} M$  の濃度に加えた培養液を連日交換し, 7日後の細胞内脂肪滴について vitamin A の蛍光の存在を上記と同様な方法で検討した。

B. Peroxidase-antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC 法) による細胞内 desmin, vimentin の確認

細胞内 desmin の存在は<sup>5)</sup>Dako 社製抗マウス抗人 desmin ラビット抗体, Dako 社製抗ヒト desmin モノクローナル抗体を用いる PAP 法にて, vimentin の存在は Transformation research (TR) 社製抗ヒト vimentin ラビット抗体を用いる PAP 法, 同じく TR 社製抗ヒト vimentin モノクローナル抗体を用いる avidin-biotin peroxidase complex (ABC 法) にて行なった。すなわち, 培養 chamber 底に細胞が充満した時期に培養液を除き,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  を含まない phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後, 2% paraformaldehyde 液にて2時間固定, 4℃にて2~4時間風乾後, 内因性ペルオキシダーゼ阻害の目的で0.3%過酸

化水素加メタノールにて30分間処理, 二次抗体と同一動物の正常血清を0.01M PBS (pH 7.4) にて5%に希釈した液に30分間室温にて反応させ, PAP 法では Ortho 社製 Immunostaining universal Kit を用いて, 一次抗体は2時間, 二次抗体および標識抗体は20分間反応させた。3,3'DAB 染色は武藤化学製 DAB 染色キットを用い, 洗浄後ヘマトキシリン染色を行なった。なお各処理段階終了後の洗浄, 一次抗体の希釈には0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.6) を使用した。一方 ABC 法は Vector 社製 Vectastain ABC Kit (mouse, IgG) を使用し, PAP 法と同様に DAB, ヘマトキシリン染色を行なった。一次抗体は, ポリクローナルの抗 desmin 抗体, 抗 vimentin 抗体ともに100倍希釈, モノクローナル抗 desmin 抗体, 抗 vimentin 抗体はそれぞれ8倍, 10倍に希釈したものを用いた。desmin, vimentin の陽性対照として子宮筋腫, 心筋, desmin の陰性対照として線維腫の組織切片, および継代培養した線維芽細胞を使用した。

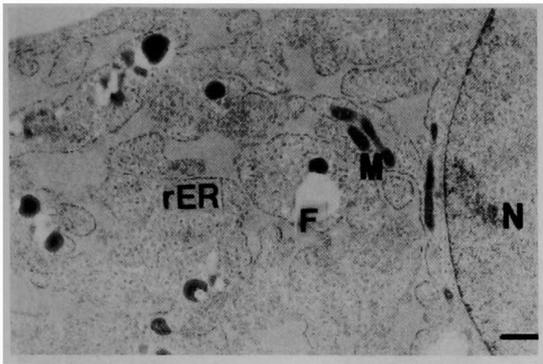
## 成 績

### 1. 形態学的観察

Metrizamide 三層比重遠心法によって分離された細胞は培養フラスコに播種後24時間には扁平, 多足状で突起で互いにつながって伸展する。この形態学的特徴は, 観察した8代までの継代した細胞で大略変化はなかった (Fig. 1)。肝切片より伸展成育して7日間経過し, 形態的に伊東細胞と考えられる細胞では, 核周辺の細胞質に脂肪滴を30~50%の細胞内に認めるが,



Fig. 1 Phase-contrast micrograph of isolated Ito cells (ICs) after 4 days of culture in primary culture. ICs are flattened and polygonal in appearance and extrude short projections which tend to contact with those of adjacent cells. ( $\times 600$ )



**Fig. 2** Ultrastructural characteristics of an isolated IC in primary culture after 4 days of incubation. The cells are characterized by a developed rough endoplasmic reticulum (rER) and small fat-droplets (F). N: nucleus M: mitochondria Scale bar = 1 $\mu$ m

経日的に脂肪滴は縮小、かつ数も減少し、14日頃には約10%の細胞に脂肪滴を認めるに過ぎない。さらに、三層比重遠心法にて分離した後の細胞では、細胞質内に極めて小さい脂肪滴を、しかも5%以下の細胞にししか認めない。分離後の細胞についての電顕的観察では、細胞質内の脂肪滴の存在、粗面小胞体の発達が特徴的である(Fig. 2)。なお、分離後の細胞につき非特異的エステラーゼ染色を行なったが、すべて陰性であった。

### 2. Vitamin A 蛍光の証明

三層比重遠心法にて分離した細胞の脂肪滴中には、波長330nmの条件下で蛍光を発する vitamin A の陽性所見がみられた。しかし、この蛍光は極めて淡く、かつ速やかに消褪した(Fig. 3)。また陽性細胞数も僅かであり、陽性細胞の頻度についても確認できなかった。対照として試みたコラゲナーゼ液灌流法によって分離したラット伊東細胞では極めて強い蛍光が観察された。

### 3. Retinol 添加培養による細胞内 vitamin A 含有脂肪滴の発現

Retinoic acid 添加培養3日目頃より、80%以上の細胞内に小脂肪滴が増加し(Fig. 4)、蛍光顕微鏡の検索により強い vitamin A の蛍光が観察された<sup>4)</sup>(Fig. 5)。

### 4. Desmin, vimentin の免疫組織学的証明

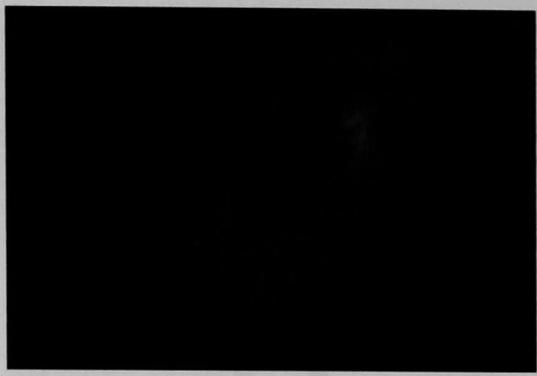
**Desmin**: ポリクロナール、およびモノクロナール抗 desmin 抗体を使用した PAP 法では、ともに核を中心に放射状に、しかも網状に走る desmin 陽性物質

が90%以上の細胞に認められた(Fig. 6, Fig. 7)。この物質は対照とした子宮筋腫、心筋では陽性であったが、線維腫、継代線維芽細胞では認めなかった。

**Vimentin**: ポリクロナール抗 vimentin 抗体を一次抗体に用いた PAP 法、およびモノクロナール抗 vimentin 抗体を使用した ABC 法による成績では desmin と同様に核を中心に放射状、網状の vimentin 陽性物質の存在が90%以上の細胞に認められ(図省略)この物質は対照とした子宮筋腫、心筋、および線維腫の組織切片で陽性であった。

### 考 案

肝類洞壁細胞の一つである伊東細胞が肝内結合組織線維、特にコラーゲン線維の産生細胞であるとの知見は谷川の電顕による形態学的観察の報告に始まる<sup>6)</sup>。その後、この形態的観察を生化学的に裏付けるための伊東細胞を採取する方法が見出されず、この方面の研究はあまり行なわれなかった。しかし、1982年 Knook らによる経門脈のコラゲナーゼ液灌流法を使った伊東細胞の分離法が報告されるや<sup>1)</sup>急速に伊東細胞と肝コラーゲン代謝、つまり肝線維化における伊東細胞の意義について数多くの研究が行なわれてきた。現在伊東細胞はコラーゲン、その中でも I, III, IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロンectin、酸性ムコ多糖の産生細胞であることが *in vitro* の研究から明らかにされている<sup>7-10)</sup>。さらには実験的障害肝より分離した伊東細胞は正常肝由来のものに比しコラーゲン合成能が高まっていること<sup>11)</sup>、また同じく類洞壁に存在するクーパー細胞からは伊東細胞のコラーゲン<sup>12)</sup>、およびムコ多糖<sup>13)</sup>合成を調節する因子が産生される可能性も示唆されている。しかしこれらはすべて実験動物、とくにラットを用いた成績でありヒトの線維肝、つまり肝硬変成立における伊東細胞の意義についてはまったく不明である。この理由は Knook らの経門脈のコラゲナーゼ液灌流法がヒトでは応用出来ないことが主なものであろう。僅かに松浦らはヒト肝切片を細切し collagenase, dispase 液の存在下に細胞を物理化学的に分離し、percoll を用いて比重遠心を行い伊東細胞を得たと報告しているのがヒト伊東細胞の分離を試みた報告である<sup>14)</sup>。われわれは、ヒト肝より線維芽細胞の分離を試みるため、ヒト肝組織の組織培養を行なっている経過中に、肝組織周辺に成育する細胞は従来の報告にみられるほど紡錘形のいわゆる線維芽細胞様の細胞は多いものではなく、扁平な伊東細胞に似た細胞が多数みられることに気付いた。そこでまず予め vitamin A



**Fig. 3** Characteristic autofluorescence of vitamin A in an IC in primary culture after 4 days incubation. ( $\times 600$ )



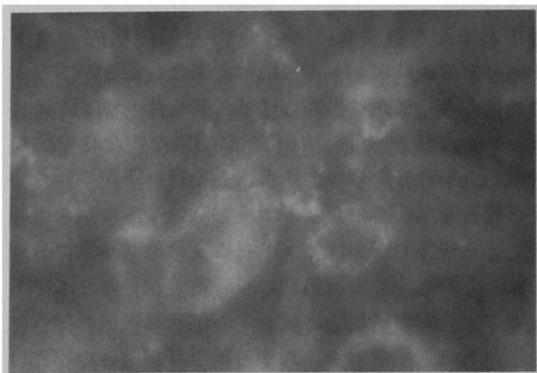
**Fig. 6** Demonstration by PAP-staining of the presence of desmin using a polyclonal antidesmin antibody (DAKO) in ICs from the 4th passage after 7 days of incubation. ( $\times 600$ )



**Fig. 4** Phase-contrast micrograph of ICs from the 4th passage after 7 days of culture in the presence of retinoic acid.



**Fig. 7** Demonstration by PAP-staining of the presence of desmin using a monoclonal antidesmin antibody (DAKO) in ICs from the 4th passage after 7 days of incubation. ( $\times 600$ )



**Fig. 5** Characteristic autofluorescence of vitamin A in retinoic acid-treated cells.

投与を行なったラット肝について組織培養を行なった結果、培養肝組織周辺には脂肪滴含む伊東細胞に類似の細胞が多数増殖し、これら肝組織周辺に増殖した細胞を用いて metrizamide 三層比重遠心法を施行し、いわゆる伊東細胞を多く含む細胞群について細胞内 vitamin A 含有脂肪滴の存在を検討すると、大部分の細胞に陽性所見が得られ、この方法で大量に伊東細胞が分離可能であることを推測させた。この結果に基づき、ヒト肝組織より同様な方法にて伊東細胞の分離を行なったところ今回報告した如く可成り高率に伊東細胞と考えられる細胞を分離し得た。この際、肝組織周辺に成育する細胞の増殖速度は肝切除から培養開始までの時間、培養肝切片の大きさ、使用する肝組織によっ

て必ずしも一定でないが、一般的には組織学上、肝障害が軽度な場合には遅く、慢性活動性肝炎では速い傾向がある。今回は肝硬変は使用しなかった。条件により一定ではないが、慢性活動性肝炎例で、切除後1時間以内に培養を行い、1×1mm位の肝切片を使用すると湿重量約500mgの肝組織からは大略 $1 \times 10^6$ 個の伊東細胞は回収可能である。また障害の軽度な肝では回収される伊東細胞数も少ない傾向にあった。今回分離採取した細胞の光顕レベルでの観察では分離24時間後、フラスコに細胞が接着すると、扁平、多足状で突起を出し松浦らが示したヒト伊東細胞と類似な形態であった<sup>14)</sup>。また電顕的にも細胞質の脂肪滴の存在、粗面小胞体の発達が特徴的で従来からの動物での伊東細胞にみられる電顕所見に合致した<sup>3,9,11,15)</sup>。今回検討した細胞の同定に用いた細胞内脂肪滴中のvitamin Aの蛍光を(Fig. 3)に示した。しかし、これらの蛍光は極めて淡く、かつまた速やかに消褪しすべての細胞に陽性所見を求めることは不可能であった。そこで2~4代継代を行い、細胞内desmin, vimentinの局在を調べたのと同一条件の細胞をretinolの存在下に培養を行なうと80%以上の細胞にvitamin Aの蛍光が観察された(Fig. 5)。しかし、この蛍光もまた程度は極めて淡く、ただちに消褪した。Chenらは、われわれと同様な方法で採取して10代継代培養したマウスの伊東細胞をretinoic acidまたはretinol palmitateの存在下に培養すると、4日後より細胞内にvitamin A含有脂肪滴が出現することを報告している<sup>4)</sup>。松浦らはin vitroでラット伊東細胞がvitamin Aを取込むことをオートラジオグラフ法にて証明している<sup>16)</sup>。さらにDavisらは、ラット伊東細胞の培養系に加えたretinolは細胞内に取り込まれ伊東細胞のコラーゲン合成を調節することを述べている<sup>17)</sup>。これらの報告は、伊東細胞がin vitroの条件下でvitamin Aを取り込むことを示したものとと言える。今回のわれわれの得たヒト伊東細胞でもChenらの報告したマウス伊東細胞の成績<sup>4)</sup>と概ね同様であった。また、この2~4代継代した細胞について細胞内desmin, vimentinの局在を調べたところ、90%以上の細胞でdesmin陽性であった。従来から哺乳類での伊東細胞はラットでは陽性所見が得られるものの、ヒトでは陽性所見は得られていないとされている<sup>18)</sup>。しかし、これらはいずれも肝組織切片を用いたin situの条件下でのものであり、分離した伊東細胞について行なわれたものではない。あるいはin vivoではdesminの発現が少なく陽性所見が得られないもの

の、in vitroの条件下ではdesminの発現が優位になるのかもしれない。いずれにしろ今回のわれわれの検討では、分離したヒト伊東細胞の同定にdesminの局在を証明することは有用であると思われた。今後はこの細胞を用いて、ヒトの伊東細胞のin vitroのコラーゲン、糖蛋白、ムコ多糖の代謝、その調節因子などの研究が可能となることが期待される。

### 結 論

今回われわれは、ヒト肝組織切片の培養により切片周辺に成育する細胞から、metrizamide三層比重遠心法を用いて、ヒト伊東細胞の分離が可能であることを報告した。この方法によって分離された伊東細胞の同定は光顕、電顕による形態学的観察、細胞内脂肪滴中のvitamin A, retinol共存下培養によるvitamin A含有脂肪滴保有細胞の出現で行なった。この細胞は細胞内desmin陽性であった。この方法による伊東細胞の分離純度は約90%であると考えられた。

終わりに今回の研究にあたって検体の提供をいただいた奈良医大第一外科中野博重教授、電顕の写真撮影、技術的援助をいただいた奈良医大寄生虫学教室高橋優三助教授、形態学的確認にご指導頂いた和歌山医大病理学教室大島章教授、高知医大病理学教室円山英昭助教授に深く感謝します。

なお、この研究は文部省科学研究費(課題番号02670316)の援助を受けた。

### 文 献

- 1) Knook DL, Seffelaar AM, De Leeuw AM: Fat-storing cells of the rat liver, their isolation and purification. *Exp Cell Res* 139: 468-471, 1982
- 2) Tsutsumi M, Takada A, Takase S, Ooshima A: Connective tissue components in cultured parenchymal and nonparenchymal cells of rat liver; immunohistochemical studies. *Lab Invest* 58: 88-92, 1988
- 3) De Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, et al: Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology* 4: 392-403, 1984
- 4) Chen W, Gendrault JL, Steffan AM, et al: Isolation, culture and main characteristics of mouse fat-storing cells: Interaction with viruses. *Hepatology* 9: 352-362, 1989
- 5) Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, et al: Im-

- munocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology* 4 : 709—714, 1984
- 6) Tanikawa K : Ultrastructure of hepatic fibrosis and fat-storing cells. *In* : Collagen Metabolism in the Liver. Edited by Popper H, Becker K, Stratton Intercontinental Medical Book Co. New York, 1975, p93—99
  - 7) Kent G, Gay S, Inoue T, et al : Vitamin A containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 3719—3722, 1976
  - 8) Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, et al : Hepatic lipocyte: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 8681—8685, 1985
  - 9) Clement B, Grimaud JA, Campion JP, et al : Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 6 : 225—234, 1986
  - 10) Arenson DM, Friedman SL, Bissell DM : Formation of extracellular matrix in normal rat liver: Lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterol* 95 : 441—447, 1988
  - 11) Shiratori Y, Ichida T, Geerts A, et al : Modulation of collagen synthesis by fat-storing cells, isolated from CCl<sub>4</sub> or vitamin A treated rats. *Digestive Diseases Sciences* 32 : 1281—1289, 1987
  - 12) Shiratori Y, Geerts A, Ichida T, et al : Kupffer cells from CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J Hepatol* 3 : 294—303, 1986
  - 13) Gressner AM, Zerbe O : Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. *J Hepatol* 5 : 299—310, 1987
  - 14) Matsuura T, Nagamori S, Fujise K, et al : Morphological characteristics of human fat-storing cells fractionated and cultured by newly techniques. *Human Cell* 2 : 181—188, 1989
  - 15) Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J : The role of fat-storing cells in disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 3 : 559—566, 1983
  - 16) 松浦知和, 永森静志, 藤瀬清隆, 他 : 培養ラット Fat-storing Cell (stellate cells)におけるビタミン A 移送に関する研究. *肝臓* 27 : 480—486, 1986
  - 17) Davis BH, Pratt BM, Madri JA : Retinol and extracellular collagen matrices modulate hepatic Ito cell collagen phenotype and cellular retinol binding protein levels. *J Biol Chem* 262 : 10280—10286, 1987
  - 18) Miyazaki A, Yokoi Y, Matsuzaki K, et al : Immunological cross-species reactivity of desmin in fat-storing cells (Ito cells) of vertebrates. *Acta Histochem Cytochem* 19 : 219—229, 1986

## A simple method for the isolation of human Ito cells (Fat-storing cells)

Masanori NAKAGAWA, Hitomi NAKABAYASHI and Hiroshi NAKANO\*

Human Ito cells (ICs) were isolated from a portion of hepatectomized liver. Various types of cells emerged from a small tissue specimen after 14~20 days of culture. ICs were separated from the cultured cells by triple-layered metrizamide solution gradient centrifugation. The ICs have the main morphological features already reported. Approximately less than 5% of the isolated ICs was positive for vitamin A autofluorescence. However, 2~4 times subcultured ICs, almost devoid of fat-droplets, were able to take up retinol, as the appearance of typical vitamin A fluorescence indicated. Fat-droplets were demonstrated in more than 80% of the subcultured cells. The presence of desmin in the subcultured ICs also demonstrated by immunohistochemical method using polyclonal and monoclonal antidesmin antibodies. The method reported here is capable to harvest approximately  $1 \times 10^6$  ICs from 500 mg of liver tissue.

\* The Department of Clinico-Laboratory Diagnostic, Nara Medical University (Nara)