

〈論文〉

肝臓がん培養細胞 HuH-7 の流血中モデルおよび転移モデル の作成と 4 °C における生存率

佐藤裕二* 上杉正人† 高橋昌宏‡ 西平順§

The Establishment of Culture Model on Circulating and Metastatic Hepatoma Cell Lines (HuH-7), and Their Survival Rates at 4 °C

Yuji SATO* Masahito UESUGI† Masahiro TAKAHASHI‡ Jun NISHIHIRA §

要旨

癌患者の自己血輸血を想定し、肝臓癌培養細胞を用いて原発巣、流血中、転移巣のモデルを作成した。それぞれの細胞の 4°C における経時的な生存を検討した。通常の培養条件では、転移巣モデルの増殖が、他の 2 者より高かった。4°C 保存 24 時間では、それぞれの形態を保ったまま生存する細胞が多く見られたが、96 時間保存では、原発巣が判定保留、転移巣は死滅、流血中モデルは生存した。流血中の癌細胞は生存が長いことが示唆された。

Abstract

To ascertain the influence of autologous blood transfusion on the metastatic potential of malignant cells, three models (primary site, circulating site, metastatic site) were prepared using hepatoma cell lines, HuH-7. The cell growth rate of metastatic tumor model with 37°C, at 5%CO₂ were higher than that of the primary model and the circulating model. After 24 hours, most of cells in three models were viable in a blood storage temperature set at 4 °C. However, after 96 hours of storage at 4°C, the primary cells could not be evaluated, metastatic cells were not viable, while the circulating cells remained viable. In sum, the viability rate of circulating cells was better than that of primary cells and metastatic cells at 4°C storage.

キーワード

自己血輸血(autologous blood transfusion) 流血中腫瘍細胞(circulating tumor cells)

* 北海道情報大学医療情報学部教授, Professor, Faculty of Medical Management and informatics, HIU

† 北海道情報大学医療情報学部教授, Professor, Faculty of Medical Management and informatics, HIU

‡ 北辰病院院長, Director, Sapporo Hokushin Hospital,

§ 北海道情報大学学長, President, HIU

1. はじめに

手術時,事故,疾病などによる貧血は赤血球輸血が行われる。人口の高齢化に伴い献血不足も重大な問題となっている。また,このような同種血輸血によるデメリットは,ウイルスを主体とした感染症とアレルギーなどの同種免疫が2大副作用である。

手術時に循環血液量の15%(成人では約600ml)の出血量が予想される場合,術前に患者自身の血液を保存する自己血輸血が行われている。通常,自己血採血の保存は,4-6°Cで液状保存(全血保存)されている。そのメリットは,輸血における2大副作用が避けられることである。自己血は,液状保存で全血をCPD(citrate-phosphate-dextrose)保存液などで保存する。CPD保存液では,採取後クエン酸Na,クエン酸水和液,ブドウ糖,リン酸二水素Naを含有し21日までの保存期間とされている。また,CPDA-1(citrate-phosphate-dextrose-adenine-1)を使用する場合には35日間とされている。その適応は,産婦人科手術,心臓血管手術(開心術など),外科手術(大腸切除や肝臓切除など),脳外科手術(未破裂脳動脈瘤や脳腫瘍),泌尿器科,形成外科,歯科口腔外科手術など,輸血を必要とする予定手術全般であり幅広い。悪性腫瘍についても適応とされる。

一方,悪性固形癌進行例では,血行性転移が生存率に大きな影響があり,流血中悪性腫瘍細胞の生存により,癌の転移の危険性が高まり,自己血輸血をする場合,時間経過と血液にある癌細胞生存の有無が重要となる。

今回,固形癌悪性細胞とその流血中のモデル,さらに転移巣のモデルを作成し,増殖の差および4°Cで保存した場合の癌細胞の生存率を比較検討した。

2. 対象および方法

2-1 対象

用いた細胞は,肝細胞癌患者から採取した高分化腺癌HuH-7を使用した。HuH-7は,本学元教授中林らが1982年に発表した培養癌細胞で,広く研究に使用されている(Nakabayashi, Takeda, et al.1982;中林・武田ほか2012)。

2-2 方法

2-2-1 細胞培養容器

培養容器は以下の2種類を設定した。

1) 通常の固形癌培養容器に使用するCorning 430639(Corning, 25cm² cell culture Flask, Life Science, NY,以下639と略)で培養した。これは,癌細胞が容器下面に接着して増殖する。

2) 細胞接着せずに増殖する容器 Corning 3815 (Corning, 25cm² cell culture Flask, Ultra-Low Attachment Surface Products, Life Science, NY,以下3815と略)で培養した。この容器は細胞が培養液中を浮遊して増殖する。

2-2-2 細胞培養条件

通常の細胞培養は,639容器を用いた。HuH-7は,DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, SIGMA, UNITED KINGDOM)に10% FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO, MA), Penicillin 60,000 IU/L, Streptomycin 0.05 g/Lを加えて,37°C,5% CO₂,95% airの条件で培養した。細胞は,PBS (Phosphate Buffer Solution, 塩化ナトリウム 8,000mg,塩化カリウム 200mg,リン酸水素二ナトリウム 1,150mg,リン酸二水素カリウム 200mg, ニッスイ,東京)を用いて粉末より作成し,洗浄後 Trypsin(Trypsin-EDTA (0.05%), Phenol Red, GIBCO, MA)で細胞剥離し,DMEM液で洗浄,1,000rpm 5分遠心し継代した。

2-2-3 癌細胞流血中モデルおよび転移モデルの作成

1) 通常の固形癌培養モデル：通常の 639 容器に細胞液を入れ、培養液を加えて総量 5ml として培養し、これを原発巣モデルとした(原発巣モデル,以下 639 細胞と略)。

2) 639 容器で trypsin 処理した細胞液を 3815 容器に入れ、7 日間培養した細胞を流血中モデルとした(流血中モデル,以下 3815 細胞と略)。

3) 3815 容器で 7 日培養した後、細胞を Trypsin 処理し、再び 639 容器に入れ、培養した細胞を転移モデルとした(転移巣モデル,以下 3815-639 細胞と略)。

2-2-4 原発巣, 流血中, 転移巣の各モデルの 7 日間培養による細胞増殖と形態変化

639 容器より得られた癌培養細胞を準備して、各モデル培養 7 日後の増殖を検討した。培養液は DMEM Medium+ 10% FBS で統一した。

1) 639 細胞(原発巣モデル)：継代している細胞を trypsin 処理し、培養液で 3×10^5 個/ml として、この 1ml に培養液 4ml 追加して培養した。

2) 3815 細胞(流血中モデル)：639 細胞を trypsin 処理し、3815 容器に入れ、培養液で 3×10^5 個/ml として、この 1ml に培養液 4ml 追加した。

3) 3815-639 細胞(転移巣モデル)：3815 細胞を Trypsin 処理し、 3×10^5 個/ml として 1ml を 639 容器に入れ、培養液 4ml 追加した。

各細胞の形態変化は、7 日後の細胞を 200 倍の光学顕微鏡で観察した。

以上、細胞数の測定は、0.2% Trypan Blue で染色後に Fucks-Rosenthal 計算盤を用いて生細胞数を測定した。各細胞 n=3 とし、有意差は t 検定を行った。

2-2-5 4℃保存における経時的生細胞の有無

細胞培養条件の違いによる生存率の違いを検討するため、培養 7 日後の細胞が安定し、増

殖期にあることを確認して、それぞれの細胞を 4℃ の冷蔵庫に入れた。その後 24,48,60,72,96(4 日),144(6 日)時間冷蔵庫に保存した後に生細胞を確認した。生細胞の確認方法は、639 細胞と 3815-639 細胞は、そのまま 37℃ の培養器に入れて顕微鏡で観察した。また、3815 細胞は、浮遊細胞であるため 639 容器に移し、容器に固着することで生存を確認した。細胞が固着することを確認し、さらに鏡検にて細胞周囲に光沢があり、内部均一で球形であるものを生存、細胞が球形でないが光沢のある細胞を生存の可能性として保留、固着があるが光沢がなく、萎縮した細胞を壊死とした。なお、生細胞の確認は、冷蔵から 37℃ 培養器に移行して 3 日目に死細胞を除去して判断した。

3. 結果

3-1 培養条件による 7 日後の細胞数

細胞 3×10^5 個の培養 7 日目の細胞数は、639 細胞: $(18.0 \pm 0.50) \times 10^5$, 3815 細胞: $(17.6 \pm 0.83) \times 10^5$, 3815-639 細胞: $(25.3 \pm 1.17) \times 10^5$ であった(平均±標準偏差)。多い順から 3815-639, 639, 3815 であった。t 検定では、639 細胞, 3815 細胞と比較して、3815-639 細胞は有意に増殖力が高かった。(表 1)

表 1 培養 7 日後の増殖(細胞数)

	639細胞*	3815細胞‡	3815-639細胞*‡
No1	19	19	23
No2	17	18	26
No3	18	16	27
平均	18.0	17.6	25.3
標準偏差	0.50	0.83	1.17

各数字は $\times 10^5$ を示す。*、‡ともに $P < 0.05$

3-2 培養後の経時的および形態学的変化

639 容器の細胞は、7 日目にはほぼ底面を覆うように増殖して confluent に近い状態である。培養容器底面に強く癒着している像が見られ、

高分化腺癌とされている (図 1-a)。

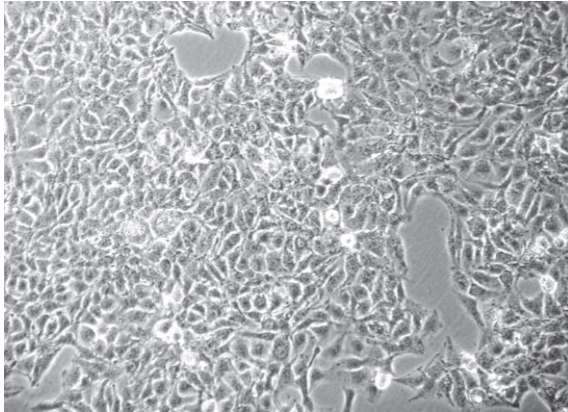


図 1-a 639 細胞培養 7 日目

一方, 3815 容器の細胞は, 浮遊しながら細胞集団を徐々に形成しつつある像を呈し, 3 日目には円形の小さな集団が互いに癒合する像も見られた(図 1-b)。

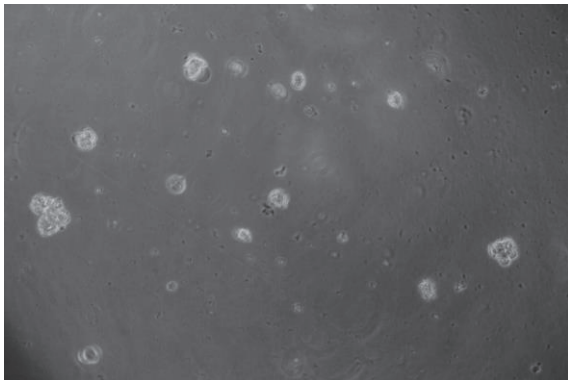


図 1-b 3815 細胞培養 3 日目

7 日後には, 同様な細胞集団が癒合して大きさを増し, 培養液中を浮遊している(図 1-c)。

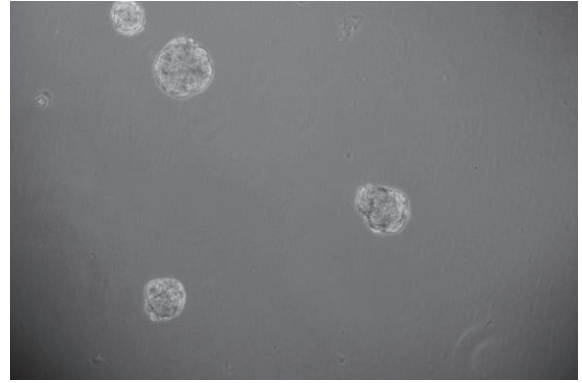


図 1-c 3815 細胞培養 7 日目

3815-639 容器の細胞は, Trypsin 処理して改めて 639 容器に培養すると元の細胞(図 1-a)と比較し, やや極性が乱れた像となった(図 2)。

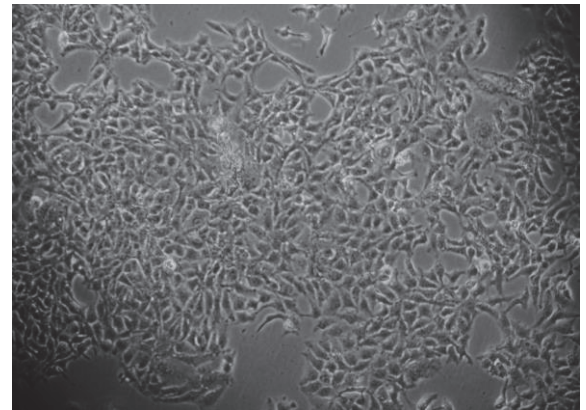


図 2 3815-639 細胞, トリプシン処理後

なお, 3815 容器から Trypsin 処理せずに直接 639 容器に移し替えた場合は, 3815 の円形の細胞集団がそのまま接着した像となり, きわめて細胞密度が高い状態であった。また, その中心部は, 壊死となりこの部位から容器に固着したものと思われた。この細胞集団は, 個々の細胞が小さく, コロニーを形成していた (図 3)。

なお, この Trypsin 処理しないで, 639 容器に移行した細胞は, 図 2 にみられるような細胞集団ではなく, 集団の大きさが異なることから,

細胞数の測定が困難と判断し、今回の実験には使用しなかった。

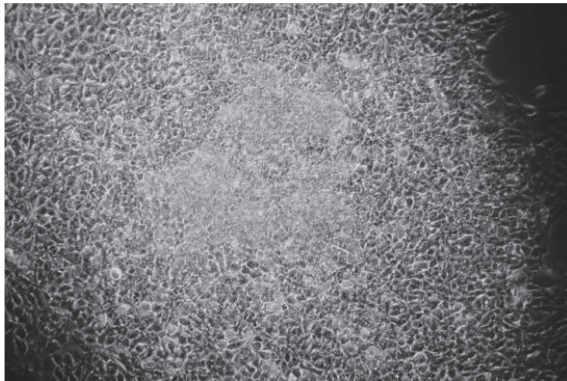


図 3 3815-639 細胞, トリプシン処理なし

3-3 冷蔵保存からの時間的経過と細胞生存

冷蔵保存 24 時間後では, 639 細胞, 3815 細胞, 3815-639 細胞とも壊死細胞が多く見られた。そのため, それらの壊死細胞を除去して, 37℃培養して生存確認した。その結果, 3 日目には, コロニーを形成していた。

冷蔵後 24 時間では, 639 細胞は形態学的に変化ないものの, 1/2 程度の細胞が壊死して浮遊していた。

また, 639 培養容器に固着した細胞は, 大小不同で極性が乱れた集団が見られた (図 4-a)。

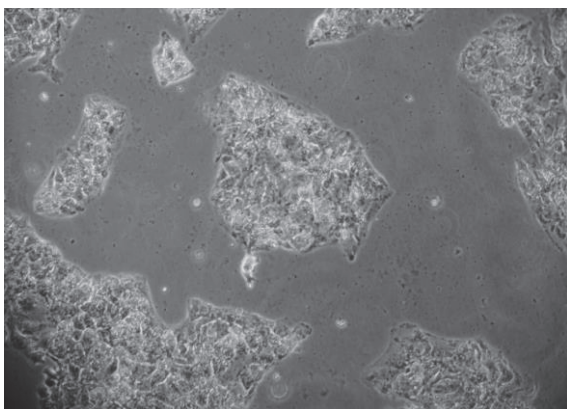


図 4-a 24 時間 4℃保存後, 培養 3 日目の 639 細胞

生存を確認するため冷蔵後に 3815 容器から 639 容器に移した細胞(3815 細胞)は, 浮遊細胞がそのまま容器に固着した状態で生存が確認されたが, 約半数の細胞が死滅し中心部は壊死していた (図 4-b)。

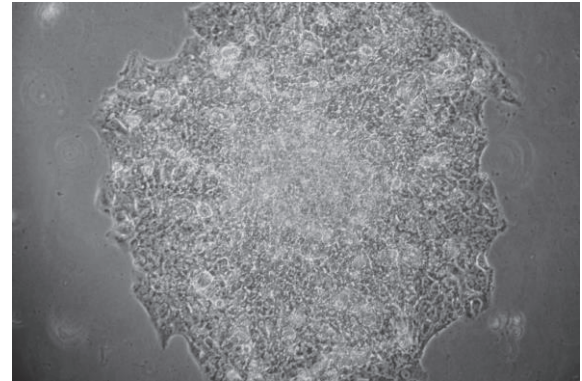


図 4-b 24 時間 4℃保存後, 培養 3 日目の 3815 細胞

3815 細胞から 639 容器に移して培養し, 冷蔵した細胞(3815-639 細胞)は, ほぼ図 4-a と同様であったがコロニー数が少ない状態であった (図 4-c)。

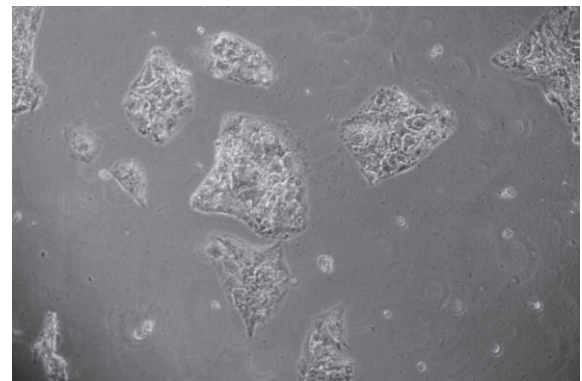


図 4-c 24 時間 4℃保存後, 培養 3 日目の 3815-639 細胞

冷蔵 48 時間後では, 639 細胞, 3815 細胞, 3815-639 細胞すべての視野においてコロニーは消失し個々の細胞となり, 大半の細胞が死滅していた。この壊死細胞除去後, 3 日間 37℃

で培養して生存確認した。

鏡検像を拡大し観察した 639 細胞は周囲に光沢をもち、細胞突起もみられ、形態が保たれていることから生存と判定した(図 5-a)。



図 5-a 48 時間 4℃保存後、37℃培養 3 日目の
639 細胞：生存

しかし、3815-639 細胞は、形態はどうか保っているが、内部不均一で保留と判定した(図 5-c)。

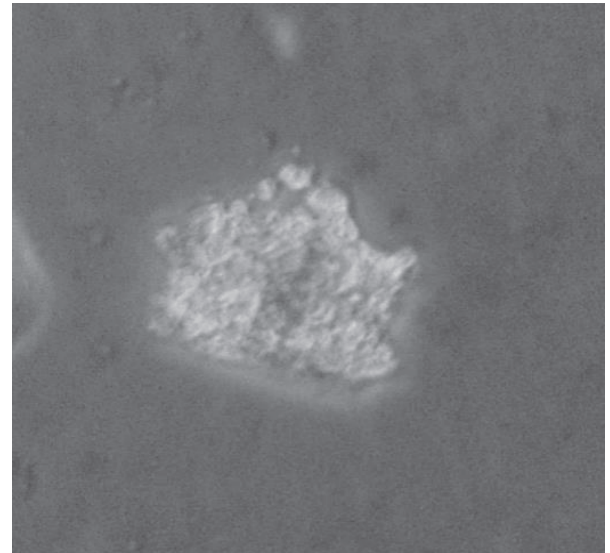


図 5-c 48 時間 4℃保存後、37℃培養 3 日目の
3815-639 細胞：保留

3815 細胞は、ほとんど細胞が重なっている像が見られたが、形態が保っていることより生存と判定した(図 5-b)。

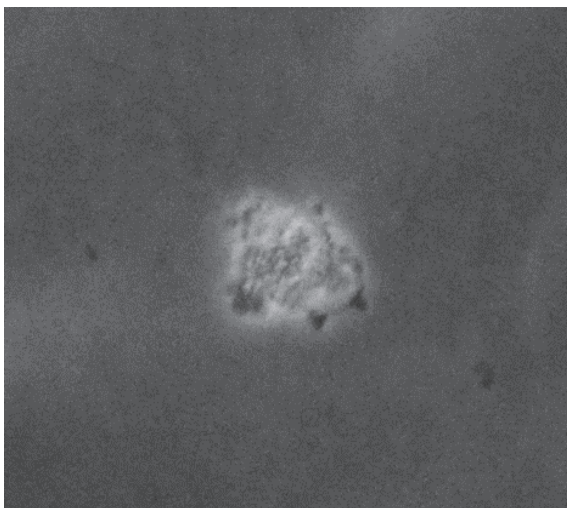


図 5-b 48 時間 4℃保存後、37℃培養 3 日目の
3815 細胞:生存

その後の冷蔵 60,72 時間後の細胞判定は、それぞれ 48 時間冷蔵細胞と同様であった。

4℃保存 96 時間では、639 細胞は、形態は保っているが、内部不均一のため判定保留とした(図 6-a)。3815 細胞は、形態が保たれて内部も均一で光沢があり生存とした(図 6-b)。

3815-639 細胞はこのような細胞は見られず、死滅したと判断した。また、4℃保存 144 時間(6 日)では、すべての細胞が死滅していた。

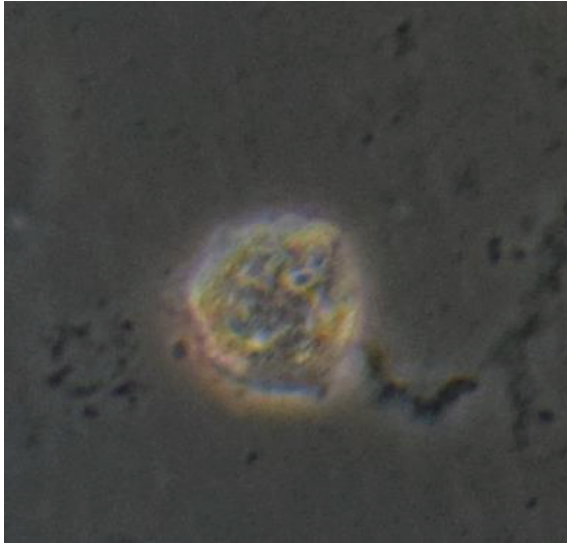


図 6-a 96 時間 4℃保存後, 37℃培養 3 日目の
639 細胞 ; 保留

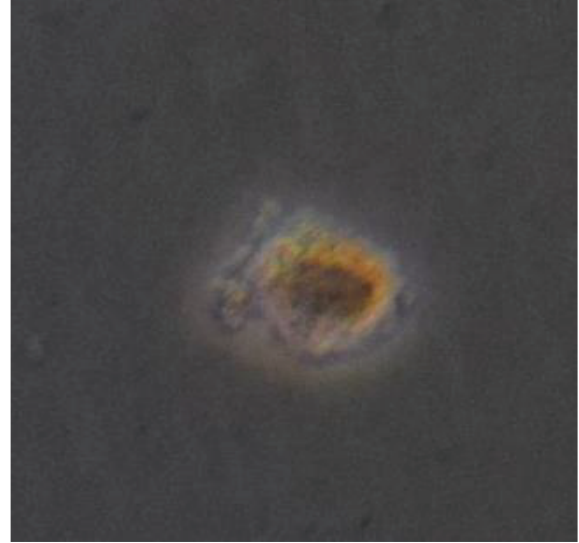


図 6-b 96 時間 4℃保存後, 37℃培養 3 日目の
3815 細胞 ; 生存

これら 3 種類の細胞の 4℃保存による判定結果をまとめた判定結果を表 2 に示す

表 2 冷蔵時間と細胞生存

	24h	48h	60h	72h	96h	144h
639細胞(原発巣)	○	○	○	○	△	×
3815細胞(流血中細胞)	○	○	○	○	○	×
3815-639細胞(転移巣)	○	△	△	△	×	×

鏡検で, ○ : 固着細胞で生存, △ : 容器に固着しているが生細胞の判断できない(判定保留), × : 固着生細胞がない(死滅) とした。

4. 考案

手術時輸血を必要とする場合に,自己血輸血が行われる。その指針は,日本自己血輸血学会に示され,心疾患,高血圧等の合併症がなく,ヘモグロビン値 11.0g/dl 以上の貧血がない患者を対象としている(日本自己血輸血学会 2020)。自己血の利点は,細菌やウイルスの感

染リスクがないこと,輸血による蕁麻疹や GVHD(Graft versus host disease:移植片宿主病)などの免疫学的副作用がないことである。また,近年の輸血用血液不足を補うものとして重要である。反対にデメリットとして,採血時や血液保存によるエルシニア菌感染症などの発生や採血時の VVR(vaso-vagal reaction:血管

迷走神経反応)が起こることである。

VVR は、採血時に起こる血圧低下・徐脈などを主症状とする反応で、軽度では顔面蒼白・冷汗・嘔吐であるが、重症となると失禁・心停止など重大な副作用があることである。この要因は、空腹、不眠などとされている(佐藤・西部ほか, 2002)。

自己血の保存は、通常そのまま全血を保存する液状保存が簡単で一般的である。凍結保存や成分採血保存は、化学療法や小児の輸血などに用いられる。成分採血はアフレーションで行われ、目的に沿って効率よく採血される(佐藤・西部ほか, 2002)。凍結保存・液状保存は、採血・保存、投与がそれぞれ保険収載されているため、医療現場に広く普及している。小田は、赤血球保存において糖代謝・酸素解離曲線を調べた結果 CPD 保存液が ACD (acid-citrate-dextrose solution) 保存液より優れていることを報告している(小田, 1981)。

しかし、肝臓や膵臓などの固形癌手術でも自己血輸血の適応とされ、自己血による癌転移の危険性はないとされる。

自己血輸血を行うことで癌患者の流血中の癌細胞による転移助長の危険性について古くから議論が行われている。吉田らは、4種類の扁平上皮癌細胞を用いて CPD, MAP(マンニトール, アデニン, リン酸二水素ナトリウム) など 4 種の保存液で癌細胞を保存し、Trypan blue 染色で生存を調べた結果、4°C 保存では 7 日以内ですべて死滅したが、保存液を使用しない培養対照液では 7 日後でも 3 癌細胞の 3.7% が生存したとしている(吉田・河野ほか, 1994)。

今回われわれの使用した肝臓癌細胞 HuH-7 では、保存液の影響をなくするため CPD, MAP などの保存液は使用せずそのまま DMEM+10%FBS 培養液で実験を行った。細胞生存については Trypan blue 染色で行わず、培養容器の接着により判定した。その理由は、細胞数が少なく Trypan blue 染色で生存と判定し

ても、固着が可能か不明であることより、容器に接着する細胞を見つける方法としたが、その判定方法で鏡検のみであるため、今後の培養で増殖を確認する必要があると思われた。

また、今回のわれわれの実験は培養癌細胞を原発巣、流血中、転移巣の 3 つのモデルを試みたことが特徴であり、このような実験報告はない。その結果、HuH-7 細胞では、4°C 保存では 6 日以内にすべてのがん細胞が死滅し、この後の自己血輸血は問題ないことが判明した。ただ、今回は HuH-7 細胞のみでの実験であるため、他の細胞でも調べる必要がある。

山崎は、子宮広汎手術(悪性)に自己血輸血を用いて術後の経過に問題はなかったとしている(山崎, 1989)。小川らも、頭頸部癌 12 例にエリスロポエチンを使用した自己血を行い、術後 18 か月自己血に伴う再発はないと報告している(小川・江川ほか, 1996)。

Lane は、担癌マウスの実験で、転移に自己血の影響はなく、癌細胞の転移能力も経時的に低下すると述べている(Lane, 1989)。

癌の接着について、Matus らは、線虫を用いてアンカー細胞が基底膜に浸潤して広がる過程を明らかにした。癌の浸潤と増殖は同時には起こらず、浸潤する細胞は分裂を停止する必要があり、すなわち、転移する細胞は増殖しないと述べている(Matus, Chang et al., 2014)。

また、最近の研究で、癌の転移には細胞外小胞の一種であるエクソソームが関与していることが判明し注目されている。癌細胞に由来するエクソソームは、発現するインテグリンにより、転移先の特定の細胞に取り込まれ、臓器特異性を持つとされている(星野・橋本ほか, 2019)。乳癌において、転移を促進するエクソソーム分泌が温度依存性に増加するとの報告もある(Kurataka Otsuka, Yusuke Yamamoto et al., 2020)。また、癌細胞や非癌細胞が分泌するエクソソームが、癌の休眠状態を誘導し長期再発に関与していることも明らかにされている(Ono, Kosaka, et al., 2014)。

今回の 4°C 保存実験でも、3815-639 細胞（転移モデル）は、増殖能が高いにもかかわらず、4°C 保存では培養器の接着能が時間を増すごとに原発巣モデル、流血中モデルと比較して低い傾向にあることは興味深い。細胞接着と増殖能との関連について、これらのモデルと温度、接着能の違いを検討する必要があると考えられた。

5. まとめ

今回、担癌患者の自己血輸血を想定して、肝臓癌培養細胞 HuH-7 を用いて原発巣、流血中、転移巣のモデルを作成して、それぞれの癌細胞の 4°C における生存を検討した。細胞の確認方法は、培養容器に細胞固定が見られ、光沢がある均一な細胞を生存とした。

- (1) 通常条件 37°C、5%CO₂ での細胞培養では、転移巣モデルの増殖が、他の 2 者に比較して優位に高かった。
- (2) 4°C 保存 24 時間では、それぞれの形態を保ったまま生存する細胞が多く見られた。
- (3) 48 時間保存では、細胞の大部分が死滅し、各細胞が単独となっていたが、転移巣モデルは、固定細胞が見られるものの内部不均一等があり判定保留となったが、他の 2 者は生存細胞が見られた。
- (4) 96 時間保存では、原発巣が判定保留、転移巣は死滅であったが、流血中モデルは生存していた。
- (5) 144 時間(6 日)後では 3 者とも死滅し、4°C 保存では、4-6 日に HuH-7 癌細胞がすべての条件で死滅することが判明した。

以上より、癌細胞の増殖能と細胞接着能は相反する可能性がある。

参考文献

- David Q Matus , Emily Chang , Sasha C Makohon-Moore, Mary A Hagedorn, Qiuyu Chi and David R Sherwood (2014) "Cell division and targeted cell cycle arrest opens and stabilizes basement membrane gaps" *nature communications* 5:4184
Doi:10.1038/ncomms5184 www.nature.com/naturecommunications(2021 年 10 月 29 日アクセス)。
- Hidekazu Nakabayashi, Kazuhisa Takeda , Keiko Miyano , Takashi Yamane and Jiro Sato (1982) "Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium" *Cancer Res*, vol. 42, pp. 3858-3863。
- 星野歩子, 橋本彩子, David Lyden (2019) 「がんの転移先はがん細胞に由来するエキソソームが規定しその臓器特異性はエキソソームに含まれるインテグリンによって決定される」『ライフサイエンス』
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/11957>, DOI:10.7875//first.author.2015.136(2021 年 11 月 05 日アクセス)。
- Kurataka Otsuka, Yusuke Yamamoto and Takahiro Ochiya (2020) "Uncovering temperature-dependent extracellular vesicle secretion in breast cancer" *J of Extracellular Vesicle*. DOI: 10.1002/jev2.12049,
Doi:10.1126/scisignal.2005231(2021 年 11 月 01 日アクセス)。
- Makiko Ono, Nobuyoshi Kosaka, Naomi Tominaga, Yusuke Yoshioka , Fumitaka Takeshita, Ryou-u Takahashi , Masayuki Yoshida , Hitoshi Tsuda , Kenji Tamura and Takahiro Ochiya (2014) "Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells" *Sci. Signal*, vol. 7, issue 332, ra63。
- 中林秀和, 武田和久(2012) 「高分化型ヒト肝臓

- 由来細胞株“HuH-7” 岡山医学会雑誌 第124巻, pp. 231-238。
- 日本自己血輸血学会(2020)「貯血式自己血輸血実施指針」w.jsat.jp>jsat_web>kijun(2021年11月01日アクセス)
- 小田貢(1981)「ACD液, CPD液による全血および赤血球濃厚液の経時的変化(代謝性変化および機能性変化)」Journal of the Japan Society of Blood Transfusion Vol. 27, No.1, pp. 11-23。
- 小川和昭, 江川雅彦, 廣田常治, 徳重栄一郎, 牛飼雅人, 福田勝則(1996)「頭頸部悪性腫瘍患者における術前自己血貯血療法」『日耳鼻』第9巻, pp.286-291, 1996。
- 佐藤裕二, 西部俊哉, 近藤正男, 神山俊哉, 安田慶秀, 中瀬俊枝, 山本定光, 池田久實(2002)「よりよい術前自己血貯血のためのアフレーシス採血と全血採血の比較」『日臨外会誌』第63巻, 4号, pp.807-812。 ,
- 佐藤裕二, 西部俊哉, 小林寿美子, 岩谷ユリ子, 篠原敏樹, 近藤正男, 神山俊哉, 安田慶秀(2002)「自己血採血におけるVVR発症例の検討と対策」, 『日輸血会誌』第48巻, 4号, pp.329-334。
- Thomas A Lane(1989)“The effect of storage on the metastatic potential of tumor cells collected in autologous blood”
TRANSFUSION Vol. 29, No. 5, pp.8-420。
- 山崎正人(1989)「自己血輸血 2. 婦人科手術に対する自己血輸血の試み(低血圧麻酔又は内腸骨動脈塞栓法の併用)」
Japanese Journal of Transfusion Medicine,
Vol..35.No.6 ,pp.707-720。
- 吉田雅司, 河野一典, 新名主宏一, 山下佐英(1994)「4. 赤血球保存液中における悪性腫瘍細胞活性」『自己血輸血』第7巻, 1号, pp.14-16。