

## Technical corner 43 ヒト組織からの初代細胞分離法シリーズ

### ヒト肝組織からの肝細胞分離

絵野沢 伸

国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部

### Hepatocyte isolation from human liver tissue

Shin Enosawa

Department of Innovative Surgery, National Research Institute for Child Health and Development

A method for human hepatocyte isolation is demonstrated. Either surgically removed liver tissue donated for medical research or untransplantable liver supplied from NDRI, USA through HAB Research Organization were used under permission of institutional review board conforming to Ethical Guidelines of Clinical Studies (Amended December 28, 2004) by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Portal branch exposed on the open cut surface was cannulated and perfused with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free Hanks solution. After replacing perfusate to collagenase solution, the tissue was incubated at 37 °C for 20 min with circulating by a perfusion pump. Perfusion pressure was kept at 800-900 mmH<sub>2</sub>O or lower, monitored by a pressure gauge. Digested tissue was placed on another tray and broken mildly into cells with adding isotonic solution such as Dulbecco modified MEM. The cell suspension was centrifuged at 50xg for 3 min to separate parenchymal hepatocytes (precipitate) and non-parenchymal hepatocytes (supernatant). The latter fraction contains Kupffer cells, stellate cells, bile duct epithelial cells, sinusoidal epithelial cells, hepatic stem cells, etc. The present procedure affords hepatocytes for various fields of medical research such as regenerative medicine, drug development, toxicology, and liver pathophysiology.

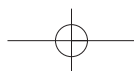
#### 1. 緒言 —肝細胞の研究面での重要性和ソース—

近年、多くの医学研究が対象を動物から人に変えるようになってきた。背景には、分析技術の進歩と研究を早期に医療に還元すべきとする社会的要請がある。人に由来する検体は医療行為の余剰として得られるものであり、実験動物に比べ、個

人差、病歴、保存状態、など種々の点で均一性に欠ける。前二点は人由来試料固有の性質でいかんともし難いが、保存をはじめとする研究検体の入手や処理方法の適切さは研究者のノウハウに依存し、この良否が成果に直結する。

また、被験者、この場合は検体の提供者、の人權に配慮することも重要である。これはニュールンベルグ綱領、ヘルシンキ宣言、ベルモントリポ

別刷請求先：絵野沢伸 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1  
国立成育医療センター研究所  
E-mail : senosawa@nch.go.jp



## Technical corner



図1 必要物品。

### <その他>

- ✓ 膿盆あるいはトレイ 2個
- ✓ 消耗品
  - 手術用手袋 1双以上
  - 5-0程度の糸付き針
  - 1-0~2-0絹糸20cm程度 数本
  - 延長チューブ、各太さ
  - 三方活栓
  - 20~30mL注射筒

### <使用する可能性があるもの>

- ✓ アロンアルファ
- ✓ 留置針

ートなど、第二次大戦直後から検討されてきた<sup>1)</sup>。特に1980年代から社会の研究倫理への関心が高まり、それぞれの研究者が宣言などの精神に則り自律的に取組むのではなく、国が定めた法や指針に従うという体制に変わった。法・指針は広い範囲を対象にするため、研究内容によっては過剰と思える対応を要求する部分もあるが、公式に決まっている以上、各項目に配慮しなくてはならない。この配慮は次項で少し触れる。

ヒト肝からの分離細胞は、肝臓の生理・病理を専門とする基礎・臨床研究、再生医療研究、そして創薬研究においてきわめてニーズが高い<sup>2-4)</sup>。このことは年々発表される科学論文を見れば明らかであるが、さらに政策的にも黒川答申として知られる報告書「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について<sup>5)</sup>」で明確にされている。創薬研究では前臨床データをヒト肝細胞で取得することがほぼ義務化されるようになり、新薬開発にヒト肝細胞は必須である<sup>4)</sup>。そこで以下に肝組織片からの肝細胞分離手順を記す。

## 2. 肝組織の入手

本稿で述べる手技は、筆者の所属する国立成育医療センターにて倫理審査を経て許可された当センター手術摘出検体と特定非営利活動法人エイチ・エー・ビー研究機構が米国より輸入した移植不適合肝<sup>6)</sup>の一部を使用して検討したものである。これらの研究は基本的に臨床研究に関する倫

理指針<sup>7)</sup>に従って行う。研究内容に生殖系列遺伝子解析が含まれる場合は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針<sup>8)</sup>にも従う必要がある。例えば筆者らは、得られた肝細胞を用い、薬物代謝酵素CYPの活性と多型との関係を調べる実験では後者（ヒトゲノム指針）に係る審査も受けた。

## 3. 準備

基本的には既報、ブタ肝細胞分離法<sup>9)</sup>と同様である。参照の手間を省くため概略を再掲する。細胞分離に使用する器具（図1）はすべて高圧蒸気（オートクレーブ）滅菌をするか滅菌済み品を入手し、自製する使用溶液類（表1）は濾過滅菌をする。培地は表1にWilliams Medium Eベースの培地を挙げたが、添加物としてニコチンアミドや活性持続型ビタミンC（L-Ascorbic acid 2-phosphate）、あるいはEGF（Epidermal Growth Factor）やHGF（Hepatocyte Growth Factor）といった生理活性因子を加える処方も報告されている<sup>10)</sup>。

基本培地のWilliams Medium Eはアミノ酸としてプロリン（コラーゲン高含有アミノ酸）が入っているからよいと成書<sup>11)</sup>にある。実際、筆者の経験でもWilliams Medium Eは肝細胞初代培養に適する感触がある。しかしながら、プロリン不含のDulbecco Modified MEM（DMEM）ベースで良好な培養を行っている研究者もいるので、果たしてプロリンだけが重要なのかはよくわからない。

## Technical corner

表1 溶液と培地。

前灌流液とコラゲナーゼ溶液の基本組成はハンクス液である。それぞれSIGMA社製調製粉末に1L弱の超純水を加え攪拌後、NaOHあるいはHClでpHを7.2（前灌流液）または7.5（コラゲナーゼ用溶液）に合わせる（NaOHかHClのいずれかはHEPESやEGTAがナトリウム塩か否かで決まる。大気中で使用するためNaHCO<sub>3</sub>（重ソー）は加えていない）。次いで全量を1lとして濾過滅菌する。コラゲナーゼ用溶液には使用時にコラゲナーゼを0.5mg～1mgの濃度で加える。コラゲナーゼは肉眼的に溶けたように見えても必ず1時間程度は室温で攪拌し続けた方がよい。コラゲナーゼ溶解後の濾過は0.45ミクロン径のフィルターによる。0.22ミクロン径のフィルターで濾過すると失活する。

### 前灌流液（1L分）

ハンクス粉末（Ca, Mg 不含、SIGMA、H-2387）1L用	1ビン
HEPES	2.38g
EGTA	0.19g

### コラゲナーゼ用溶液（1L分）

ハンクス粉末（Ca, Mg 不含、SIGMA、H-2387）1L用	1ビン
HEPES	2.38g
CaCl <sub>2</sub>	0.56g

### 細胞洗浄液

DMEM（GIBCO、SIGMA、WAKO など、液体でも粉末でも購入可能）

### 培地（下に挙げたものは一例。この他にいろいろある）

Williams Medium E GIBCO あるいは SIGMA など、液体でも粉末でも購入可能  
 添加物はウシ胎仔血清（10%程度）、インスリン（1micro-mol/L）、デキサメサゾン（接着時（初期3時間から24時間程度）は1micro-mol/L、その後の維持時には1/10程度に減らしてもよい）は必須。その他有名な組成は抗生物質はペニシリンーストレプトマイシン混液と、あればカナマイシン。アンホテリシンB（ファンギゾン）は通常は特に必要ない。

この他、薬物動態研究向けにLanford培地（日本チャールズリバー）、無血清培地としてHepatoZYME（GIBCO）が市販されている。

### 1) コラゲナーゼ溶液の調製

筆者は長年新田ゼラチンのコラゲナーゼS-Iを使っていたが、同酵素が本年発売中止になった。代替品を探すべくいくつか調べたところ、その後継酵素（コラゲナーゼL）だけでなく、和光純薬製、SIGMA社製も特に効果に目立った変化がないことがわかった。従ってとりあえずはいずれでもよいと思う。また使用時の濃度は重量ベースで0.5～1mg/mLとしており、特に活性ユニットで統一はしていない。

コラゲナーゼは使用時に溶解することが高活性

を得るための基本とされるが、ヒト由来検体の場合は臨機に溶液を増減量する可能性があるため、筆者は生理的食塩水あるいは滅菌水に100mg/mLの濃度で溶かしたストック液を調製し、2～3mL位ずつ分注の上、-20℃（またはそれ以下）にて凍結保存をしている。使用時にはコラゲナーゼ用溶液100mLに対しコラゲナーゼストック液0.5～1mLを加えることになる。50g程度の肝組織なら300mL程度を調製すればよく、3mLのストック液を解凍して加えている。溶解してあるストック液を用いるとコラゲナーゼの溶解が比較的良好である。病院からの連絡で組織が得られたとわかってから解凍・溶解してもよい。

筆者はコラゲナーゼ粉末から無菌操作でストック液を調製し、濾過滅菌をせずに使用しているが、

## Technical corner

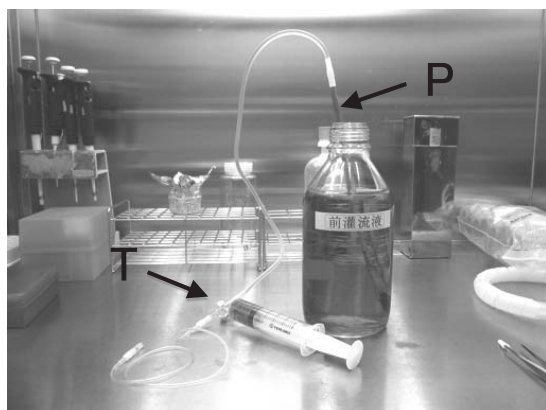


図2 灌流用回路。

P：5 mLピペット（綿栓は抜き、持ち手側が前灌流液に浸けてある）。T：3方活栓。シリンジ（ポンピング用）は20mLか30mL。

培地に通常の抗生物質（表1）を添加していれば培養中の細菌汚染（コンタミ）はまずない。ただし、培地に抗生物質を入れられない場合は、ストック液を溶解して使う直前になった段階で、ポアサイズ0.4  $\mu\text{m}$ のフィルターによって濾過滅菌をする。ポアサイズ0.2  $\mu\text{m}$ のフィルターを使用すると、コラゲナーゼが捕捉されるためか、活性がかなり低下する。

### 2) 前灌流用回路の作成（図2）

前灌流液が入ったビンに、管内の綿を抜いた5 mLピペットの吸飲側（持ち手側）を液に浸ける。先端には延長チューブのメス側を押し込み、延長チューブオス側に三方活栓を付ける。三方活栓の直角に交わる側に20mLか30mLのシリンジを付ける。三方活栓のオス側には次項で述べる血管確保に用いる延長チューブをつなぐ。

### 3) 組織の消化、および細胞の分散から粗精製に必要なもの（表2）

組織の消化はコラゲナーゼ溶液を300mLから600mL程度満たした500mLないし1Lのビーカーに肝組織を浸し、全体を38℃から40℃の温浴に入れて加温しながら灌流して行く。

洗浄用培地、培養培地の組成詳細は表1を参照していただきたい。通常の培養器具と異なるのは、先端の口径を太くした駒込ピペットや細胞濾過器である。ピペットの先端を太くする理由は、肝実質細胞は力学的刺激に非常に弱いいため、通常のピペットを用いると出入り口付近で受ける圧で傷害されるためである。細胞濾過器は食器売り場で販売されているステンレス製の茶こしと200mLのガラスビーカーを組み合わせればよい。これを2組作成し、ひとつにはガーゼ（1枚でよい）を、もうひとつにはナイロンメッシュをはさみこむ。ガーゼの濾過器で大きな残渣を取り除き、ナイロンメッシュの濾過器で大きな細胞塊を取り除く。ナイロンメッシュは東京スクリーンの150メッシュ（目開き108  $\mu\text{m}$ ）を使っている。この規格幅は115cmと長いので、事前に適当な大きさに切っておく。尚、同様の用途でセルストレーナー（FALCON）という市販品があるが、小スケール実験用であり、肝細胞塊がメッシュにすぐに詰まってしまい不向きである。

## 4. 手技

### 1) 肝組織断面の血管確保

筆者の場合、病理医が研究用検体として切除・分与してくれた部分を使用している。通常、左葉あるいは右葉の端で、断面が1面だけの盲端である。細胞を効率的に得るためにはこの形状であることが重要なので、事前に病理医とよく打ち合わせる必要がある。まず断面に露出している血管断端にシリンジを当て前灌流液または生食を注ぎ込んでざっと灌流・脱血を行う。病理科から実験室までの移動時間は10分程度なので、その間、肝組織を置いた膿盆を氷上に乗せてはいるが、冷却した保存用溶液に浸けることはしていない。この段階で徹底的に冷やしたところで、十数分後にはコラゲナーゼによる組織消化を37℃で行うからである。ただし、輸送における冷却の効果について系統的に調べたわけではない。他施設からの移動で時間がかかる場合は移植用臓器の保存に準じ、脱血後、保存液に浸漬する方法がよいと思われる。

## Technical corner

表2 組織消化, 細胞分散, 粗精製に必要なもの。

\*培地の組成に関する詳細は表1参照。

### 組織消化

- ✓500ml または 1L ビーカー (コラゲナーゼ消化を行う)
- ✓温浴
- ✓簡易圧モニタ

### 細胞分散・粗精製

- ✓細胞洗浄用 DMEM 培地適当量 (500ml ボトル1本程度、血清不要、氷冷)\*
- ✓培養用 Williams' Medium E 培地\*
- ✓懸濁用駒込ピペット (先端を切って出入り口径を太くした 20ml 駒込ピペット およびニップル、どちらもオートクレーブ滅菌をしておく) 1本
- ✓ハサミ (組織が硬い時、血管確保時に用いた解剖具を残しておけばよい)
- ✓細胞濾過器 (ステンレス製茶こしを 200ml ガラスビーカーにはめ込む。茶こしとビーカーの間にガーゼあるいはナイロンメッシュ 150 メッシュをはさんだもの各1)
- ✓アイスボックス
- ✓50ml 遠心管、メスピペットなど細胞培養に必要なもの
- ✓冷却低速遠心器
- ✓計数用顕微鏡、細胞計数板

実験室の作業はすべて無菌操作として行う。あたりまえだが、肝組織に触れる時は手術用手袋をはめる。まず太い血管を選び出し、両端に5-0程度の糸付き針で糸をかける (図3A)。このとき糸は結び目を作って固定する。それらの糸を引っ張り、組織全体をつり上げるように保持して (図3B) 血管の太さに合った管を挿入する。筆者は、血管が太い場合は先端を切り落とした延長チューブ、細い場合は血管に合った太さの留置針外筒 (先は適宜短く切る) を挿入している。挿入後、1-0か2-0絹糸を血管外周に回し結紮、挿入した管を固定する。血管の端をつまみあげている糸の結び目の下に絹糸を回すとしっかりと固定できる。ひと巻きで全周が漏れなく結紮できない場合は、徐々に下へ下へと結紮を数回繰り返す。それでも漏れがある場合はアロンアルファでふさぐ。

灌流用血管はなるべく門脈を選ぶようにしている。注意して見ると血管周囲にグリソン鞘が見えるので判別できる。通常、マウス、ラットなど、動物の肝細胞分離では門脈から灌流するので条件を同等にするためである。中心静脈から灌流すると、得られた分散細胞中に中心静脈に近い細胞の割合が増えるらしい。肝実質細胞は門脈周囲と中心静脈周囲でいくらか生理機能が異なると言われている<sup>12, 13)</sup>ので、門脈からの灌流を行うように努めている。

こうして血管を確保するとその支配領域の灌流は問題なく行われる。断面にバイパスして流れ出してしまう心配はない。もし肝組織からできるだけ多くの細胞を採取したいなら、断面で灌流液が出てこない血管、すなわち支配領域が異なる血管を同定し、それにも灌流用チューブを前述の方法

Technical corner

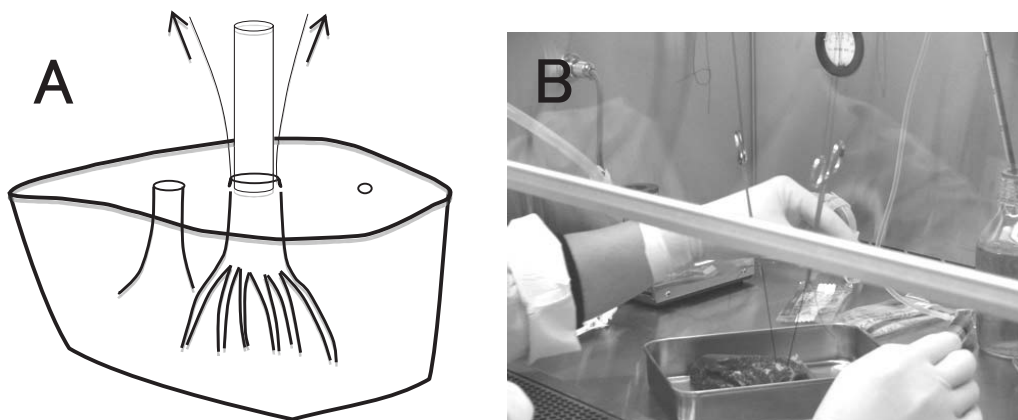


図3 肝組織断面の血管確保。

A：模式図。B：実際の様子。血管の両端にかけた糸をつり上げている。



灌流時使用機器

- 温浴
- 定流ポンプ
- 圧センサー

図4 カニューレの固定から灌流。

A：カニューレ固定終了。B：コラゲナーゼ溶液を入れたビーカーに浸ける。C：ビーカーを温浴に浸けてコラゲナーゼ灌流を行う。

## Technical corner

で挿入・固定する。回路側の分枝には三方活栓を使う。

やむを得ず断面が2面(以上)の肝組織を用いる場合もなるべく太い血管を見つけ出し灌流を行う方がよい。この場合、バイパス血管(と思われるものはアロンアルファで塞ぐ。細切してコラゲナーゼ溶液内に懸濁して細胞を消化する方法は、細胞の収量・生細胞率ともに著しく低下するので、できるだけ避ける。

### 2) 前灌流からコラゲナーゼ消化

肝組織をトレー上に置いたまま、三方活栓につけたシリンジのポンピングによってカニューレを通じて肝組織重量の5倍~10倍量の前灌流液を送り、脱血する。次いで、溶液採取のピペット部分をコラゲナーゼ溶液に移し変えて、同じくポンピングで回路内および肝組織内の前灌流液をコラゲナーゼ溶液に置換する。それが終わったら肝組織をつまみ上げてコラゲナーゼ溶液が満たされたビーカーに浸ける。

これ以降は肝組織を直接手で触れることはなくなるので、今まで使っていた手袋(手術用手袋)をはずし、普通の未滅菌の手袋に変えられる。

肝組織を浸けたビーカーを38℃から40℃に温めた温浴に浸けてコラゲナーゼ灌流を開始する。この時、筆者は定流ポンプ(東京理科機械(EYELA)のRP-2000(P)など)を用いている。流れの強さは流速で決めず、簡易圧モニターにより800~900mmH<sub>2</sub>Oか、それ以下を保つようにしている。簡易圧モニター(アズワン(AS ONE)のデジタルマンオメーターM-382など)は回路の三方活栓部分に延長チューブをはめて接続している。コラゲナーゼ灌流の時間は15分から20分としている。

定流ポンプを使わず、前灌流と同様にシリンジによるポンピングを続けてもよい。欠点は、20分間の作業は結構疲れること、間欠的な送液なので20分間でも実質15分程度になることである。利点は、定流ポンプを買わずに済むこと、圧モニターを使わずとも手の感覚で流量を調節できることで

ある。

### 3) 細胞の分散と粗精製

コラゲナーゼ灌流を終えたら肝組織を溶液からつまみ出して新しい膿盆あるいはトレー上に置く。もし灌流中に肝表面が破れ細胞が溶け出していたら、組織片を回収後、細胞が沈殿するのを待ってコラゲナーゼ溶液を吸飲し、細胞だけ回収する。新しい膿盆上で、DMEM溶液を若干量加えたのち、駒込ピペットの先を使って肝組織をほぐす。十分に消化されている部分は血管だけが脈管標本のように残る(図5)。ただし、肝硬変組織の場合は、ハサミで切らなくてはならない。その場合、切った部分から目の粗い砂のような感じで細胞が得られる。

得られた分散細胞は、DMEM溶液を加えながら、ガーゼをはさんだ細胞濾過器を通す。次いで濾液を150メッシュをはさんだ細胞濾過器を通す。得られた細胞懸濁液は、肝実質細胞の他、クッパー細胞、星細胞(伊東細胞)、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、肝幹細胞、除去しきれなかった赤血球などを含む。肝実質細胞の比重は重いので常法<sup>11)</sup>に従い50xg、2分の低速遠心で落とすことができる。50xgを得る条件は、通常の低速遠心器のスイングローター(半径15cm程度)で600rpm前後である。

肝実質細胞を精製するのは比較的簡単で、この低速遠心をあと2回繰り返すとかなりきれいになり、生細胞率も上がる。生細胞は重く、死細胞はやや軽いからである。この比重の差を利用し、パーコールを加えた溶液で遠心して生細胞率を上げる方法がある<sup>14, 15)</sup>。しかしながら、これら引用した2報はラットおよびブタの肝細胞の場合で、ヒト肝細胞では必ずしもうまくゆかない。ヒト肝細胞の場合、もともとの肝の状態が不均一で、特に脂肪肝であったりすると生細胞の比重も軽くなるので、一概にパーコール濃度を標準化できないのである。市販されている凍結ヒト肝細胞の場合は、それぞれの供給会社(Xenotech, In Vitro Technologiesなど。各代理店は積水メディカル、

## Technical corner

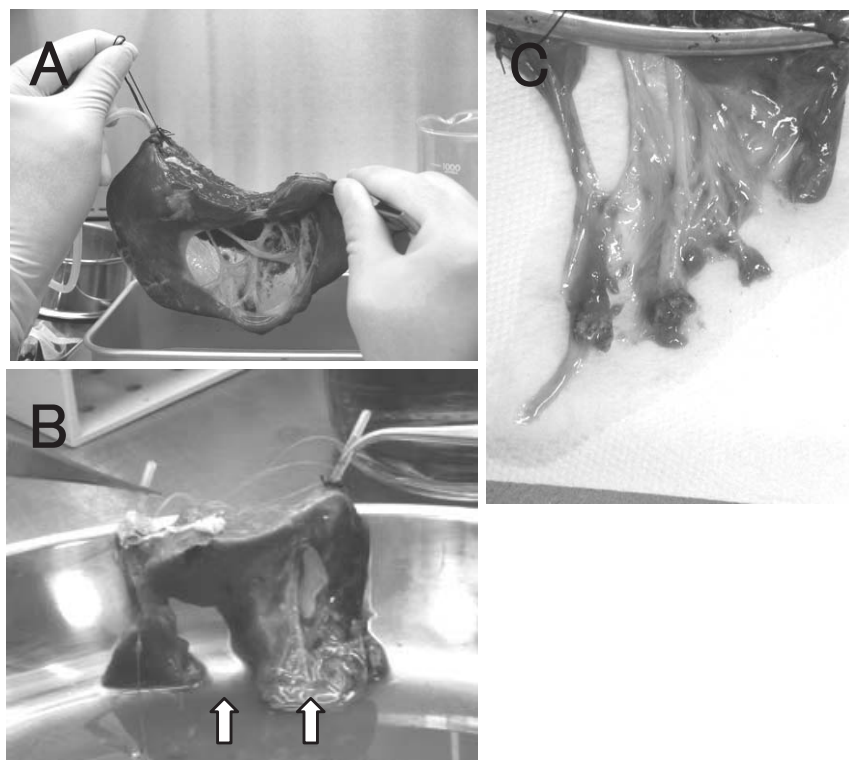


図5 細胞分離後の肝組織の様子。

A：門脈1本による灌流。この時は米国の移植不適合肝の左葉の一部を使用したので組織片が320gと大きい。B：門脈2本を灌流した場合。消化部分は2ヶ所（矢印）。C：門脈3本を灌流した場合。ほぼすべての組織が消化されている。

日本チャールズリバー)がパーコール遠心用のキットを販売しており、利用すれば一定の成果が上がるが、そのキットを自分たちで調製した肝細胞に利用してもうまくゆくとはいえない。筆者は、生細胞率を上げる必要があれば、パーコール遠心を行うより、牛胎児血清を10%なり20%入れた培地で2-3回遠心を行うことにより生細胞率を高めている。パーコールは細胞毒性を有すると言われているので、血清培地利用の方がその後の培養にもよいのではないかと考えている。ただし、遠心を行えば行うほど細胞の回収率は下がる。

肝実質細胞以外の細胞を利用したい場合は、もう少し複雑になるがそれぞれの細胞に合った精製法がある。手段としては、密度勾配遠心(星細胞, クッパー細胞)<sup>16)</sup>、特異的阻害剤使用(クッパー細胞に対するクロドロネート)<sup>17)</sup>、ソーティング

といったものである。あるいは非実質細胞を極く低密度に培養器に播種し、それぞれのコロニーの性質をトレースして調べる方法もある<sup>10)</sup>。

細胞の計数はトリパンプルーを最終濃度で0.2%となるように加え、血球計数盤を用いて数える。遠心後の肝実質細胞のペレットは概ね $10^8$ 細胞/mLである。例えばペレットに培地を加え10倍容にし( $10^7$ 細胞/mL)、その懸濁液50  $\mu$ Lを採取し、培地を50  $\mu$ L加えた後、0.4%トリパンプルー(GIBCOブランドでトリパンプルー染色液として市販)を100  $\mu$ L加えて血球計数盤に乗せれば1視野あたり200細胞程度になる。肝実質細胞は大型なので識別・計数は簡単であるが、非実質細胞画分には多様な細胞が含まれているので、どの細胞を計数の対象にするか、自分なりに基準をもって行わないとならない。



## Technical corner

表3 肝実質細胞の平面培養時の各培養器標準的播種細胞数。

プレートの場合は各種類で1穴当たりの播種細胞数。

10cm 径シャーレ、75cm <sup>2</sup>	5~10x10 <sup>6</sup>
6cm 径シャーレ、25cm <sup>2</sup>	1.5~3x10 <sup>6</sup>
35mm 径シャーレまたは12穴プレート、9.6cm <sup>2</sup>	5~10x10 <sup>5</sup>
12穴プレート、3.5cm <sup>2</sup>	3~5x10 <sup>5</sup>
24穴プレート、1.8cm <sup>2</sup>	1.5~2.5x10 <sup>5</sup>
48穴プレート、0.75cm <sup>2</sup>	0.6~1x10 <sup>5</sup>
96穴プレート、0.3cm <sup>2</sup>	2~4x10 <sup>4</sup>

培養に関してはそれぞれの実験で異なるし、また網羅するだけの紙面もないので省略する。参考までに肝実質細胞の平面培養の場合の培養器ごとの標準的播種細胞数を表3に挙げた。肝実質細胞は線維芽細胞などに比べて大きいので、播種できる細胞数は少ない。

### 5. おわりに

本稿の中に筆者のノウハウをすべては書ききれなかった。まずはこれを参考に行ってみて、徐々に自分なりの方法が確立できるものと思う。また、すでにこれら手技を行っている読者があれば、若干でも改善の参考になれば幸いである。尚、もっと培養の基礎について知りたい場合は成書をご覧いただきたい<sup>18)</sup>。

### 謝辞

研究用に肝組織の提供をいただいた皆様に心より感謝申し上げます。実験実施に必要な費用の一部は政策創薬総合研究事業KHD1027補助金によった。記して謝意を表します。

### 参考文献

- 1) 田代志門. 研究と診療を区別する二つのモデル：ヘルシンキ宣言からベルモント・レポートへ. 医学哲学医学倫理25；21-29, 2007
- 2) 雨宮 浩, 鈴木 聡. 再生医療産業の研究開発を目的とした新鮮ヒト由来試料の安定供給の方

策を採る-NPO法人HAB研究機構の経験-. 再生医療 3 (3)；21-26, 2004

- 3) 立野知世. ヒト肝細胞キメラマウス. Organ Biology 12 (1)；21-28, 2005
- 4) 山田泰弘. 創薬におけるヒト肝細胞の必要性と市販ヒト肝細胞の問題点. Organ Biology 13 (2)；119-135, 2006
- 5) 厚生科学審議会答申. 手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方. 医薬品の研究開発を中心に. (平成10年12月16日) [http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s9812/s1216-2\\_10.html](http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s9812/s1216-2_10.html)
- 6) 鈴木 聡. 米国における移植用臓器・組織から分離したヒト細胞の開発研究利用. 移植 44 (2)；167-172, 2009
- 7) 厚生労働省. 臨床研究に関する倫理指針. (平成20年厚生労働省告示第415号) (平成21年4月1日より施行) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf>
- 8) 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省. ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針. (平成17年6月29日 17文科振第346号 科発第0629006号 平成17・6・29製局第3号) (平成17年6月29日一部改正) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/genome/0504sisin.html>
- 9) 絵野沢伸, 宮下智之, 鈴木盛一. ブタ肝細胞

## Technical corner

---

- 分離法 購入・飼育から分離・培養まで. Technical Corner 19. Organ Biology 7 (3); 61-67, 2000
- 10) Tateno C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. Am J Pathol 148 (2); 383-392, 1996
- 11) 中村敏一. 肝細胞の分離法, 初代単層培養法: 「肝細胞初代培養実験法」(中村敏一著) 学会出版センター pp.5-53, 1987
- 12) Volk A, Michalopoulos G, Weidner M, Gebhardt R. Different proliferative responses of periportal and pericentral rat hepatocytes to hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun 207 (2); 578-584, 1995
- 13) Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krügel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. Prog Histochem Cytochem 41 (4); 201-266, 2007
- 14) Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Hsia MT, Pitot HC. Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In Vitro Cell Dev Biol* 22 (4); 201-211, 1986
- 15) Zhou XD, Tokiwa T, Kano J, Kodama M. Isolation and primary culture of adult pig hepatocytes. *Methods Cell Sci* 19; 177-284, 1998
- 16) 河田則文. Kupffer細胞と星細胞の分離培養—高収率・高純度を目指して. 第6回肝細胞研究会 ハイテクセミナー要旨集 pp.4-9, 1999
- 17) Yata Y, Enosawa S, Suzuki S, Li XK, Tamura A, Kimura H, Takahara T, Watanabe A. An improved method for the purification of stellate cells from rat liver with dichloromethylene diphosphate (CL 2 MDP). *Methods Cell Sci* 21 (1); 19-24, 1999
- 18) 日本組織培養学会. 組織培養標準技術. <http://jtca.umin.jp/> (日本組織培養学会教育研究システム委員会 企画・編集) 2009