

## 肝細胞 spheroid に観察される vermipodia 様細胞突起

岡山大学医学部第一内科学教室 (指導: 辻 孝夫教授)

田 辺 高 由

(平成元年11月29日受稿)

Key words: ラット肝細胞, 初代培養, 細胞突起, 細胞癒合

### 緒 言

培養細胞には形態的に異なるいくつかの細胞突起が存在することが知られている。多くの接着性細胞の細胞突起は細胞の運動を担っていると考えられている<sup>1,2)</sup>。このような細胞突起の形態や機能は、従来から単層培養細胞で主に研究されてきた。しかし、*in vivo* の組織や3次元的細胞凝集塊を形成する aggregate culture での細胞突起の研究は、観察の困難さのためにあまり多くは報告がない。血液細胞のような浮遊細胞にも pseudopodia を含むいくつかの細胞突起が知られている。Vermipodia は histiocytic leukemia 細胞に特異的に観察される長い桿状虫様細胞突起<sup>2,3)</sup>であり、その機能は明らかにされていない。

一方、*in vivo* での肝細胞は baso-lateral site の細胞膜や毛胆管腔膜に多数の微絨毛が存在することが知られており<sup>4)</sup>、通常の培養法での培養肝細胞においても、このような微絨毛はしばしば観察されている。しかし、その他の肝細胞突起についてはあまり多くは知られていない。私達は、肝由来プロテオグリカン培養基質として培養することにより、成熟肝細胞を球状細胞凝集塊 (multicellular spheroid; spheroid) とする方法を開発した<sup>5,6)</sup>。球状細胞凝集塊を形成する肝細胞は形態的に細胞活性の高い細胞であり<sup>7,8)</sup>、増殖活性はむしろ低いもののアルブミンの合成分泌は形態的細胞活性の高さに一致して極めて高いことも明らかにしてきた<sup>6,9)</sup>。

本研究ではラット肝細胞の細胞突起が球状細胞

凝集塊の形成や運動、さらに球状細胞凝集塊の癒合に関する可能性について検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 肝細胞の調製

肝細胞は200-250 g の Sprague Dawley ラットからコラーゲナーゼ/肝灌流法<sup>9)</sup>により調製した。位相差顕微鏡での観察では分離細胞の99%が肝細胞であり、トリパンブルー色素排泄試験では90%以上が生細胞であった。

#### 2. 肝由来プロテオグリカンの調製と培養器材

プロテオグリカンは Sprague Dawley ラット肝より既報<sup>5,6)</sup>のように調製した。培養器材は径の35mmポリスチレン培養皿 (Falcon3001) および25cm<sup>2</sup>培養フラスコ (Falcon3013) を使用した。調製したプロテオグリカンを培養皿あたりウロン酸含量にして20 $\mu$ g/200 $\mu$ l を、培養フラスコあたりウロン酸含量にして60 $\mu$ g/500 $\mu$ l をそれぞれ塗布し、風乾して固相化した。これらのプロテオグリカン塗布培養器具を紫外線下で一夜滅菌の後、使用直前に滅菌 PBS にて洗浄して培養に供した。

#### 3. 培 養

使用培地は Enat らのホルモン添加無血清培地<sup>10)</sup>である。即ち、Williams #E培地に0.1mM Copper, 3 nM Selenium, 50pM Zinc, 50ng/ml linoleic acid, 100 U/ml Penicillin, 100U/ml streptomycin 1mg/ml amphotericin B を加えた基本培地にホルモンとして50ng/ml EGF, 10 $\mu$ g/ml insulin を添加した培地である。培養は既報<sup>5,6,7)</sup>に従い分離肝細胞、3 $\times$ 10<sup>5</sup>ml を35

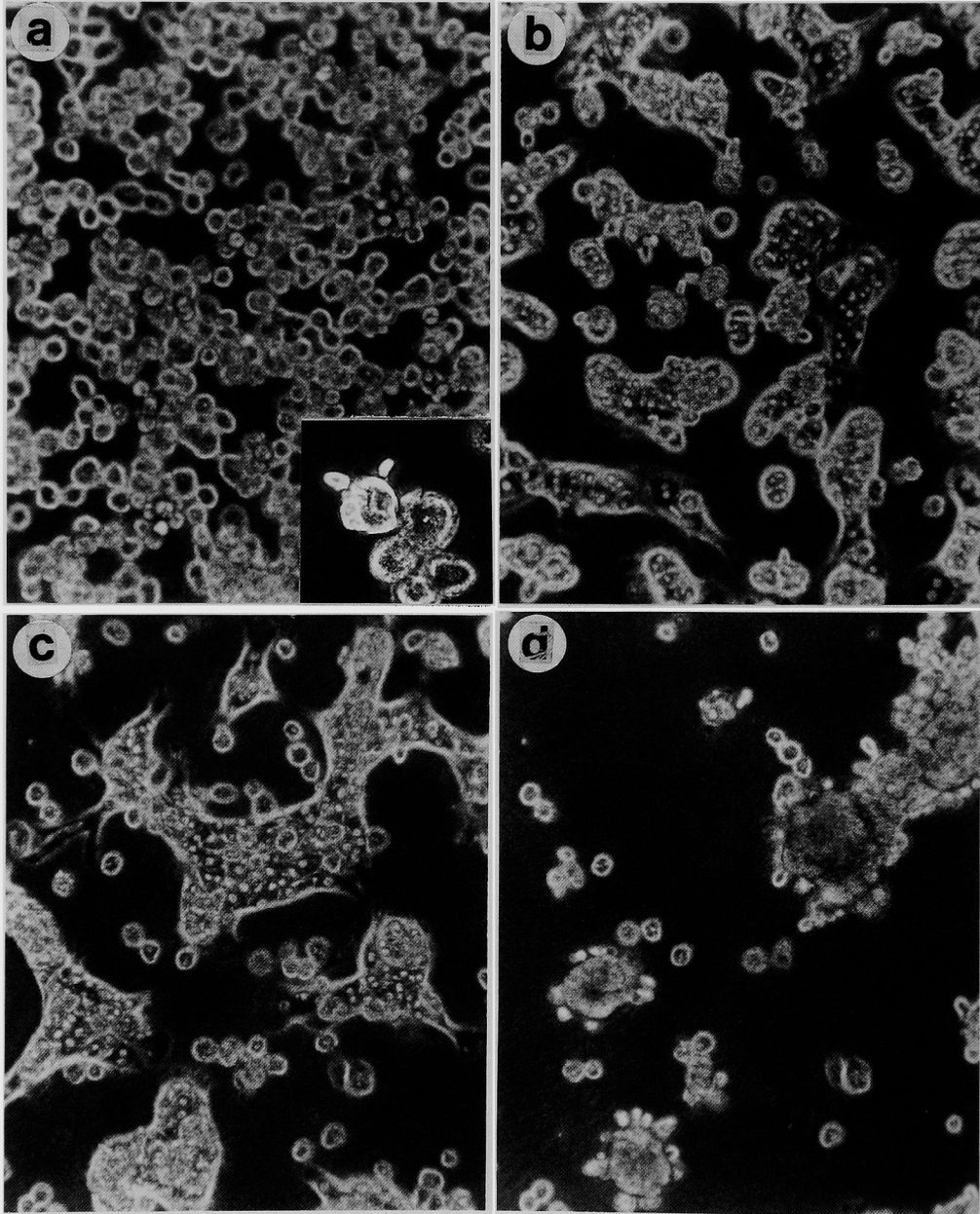


図1 肝細胞 Spheroid の形成過程顕微鏡映画像

a ; 培養開始直後, a-insert ; 単離細胞の細胞突起, b ; 4時間後, c ; 1日後, d ; 3日後

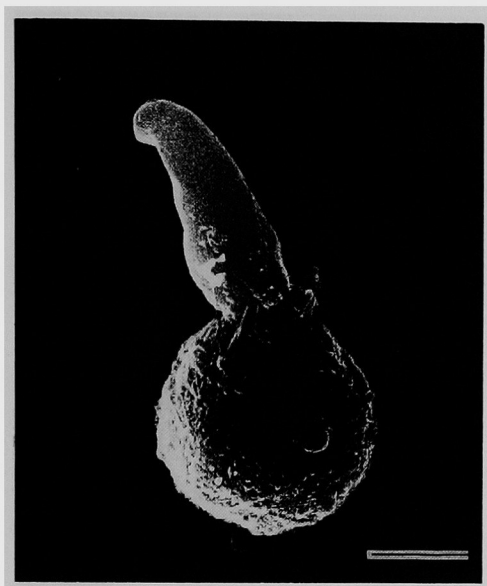


図2 単離肝細胞の細胞突起走査電顕像  
bar, 5 $\mu$ m.

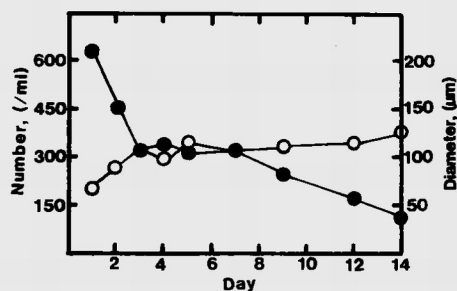


図3 肝細胞 spheroid の経時的数と直径の変化

mm培養皿あたり1.5ml あて接種することにより開始した。培地交換は培養開始6時間で1/2交換、以後1日毎に行なった。

#### 4. 顕微鏡観察

培養における細胞形態は位相差顕微鏡により行なった。細胞凝集塊の一部は1,000rpm, 5分の遠心にて回収し、メタノール固定後、アガロースに包埋してさらにパラフィンに包埋した。これから切片を作成しヘマトキシリン染色の後通常顕微鏡下での観察も行った。

#### 5. 電子顕微鏡

培養細胞は低速遠心にて回収の後、既報<sup>7,8)</sup>に

従って透過型電子顕微鏡、および走査電子顕微鏡による観察を行なった。即ち、透過型電子顕微鏡の試料は細胞凝集塊を2%グルタルアルデヒドについて1%オスミウム酸で固定後、エタノールで脱水、Epon 812に包埋、超薄切片切り出しを行なって、JEM 100 CX 電子顕微鏡により観察した。走査電子顕微鏡の試料は poly-L-lysine 塗布ガラス試料台に乗せ、透過電子顕微鏡試料の作成と同様の固定を行なった。エタノール脱水後、isoamyl acetate 洗浄、臨界点乾燥について Pt-Pd コーティングを行なって、JSM-U3 走査電子顕微鏡により観察した。

#### 6. 顕微鏡映画観察

細胞凝集塊の動きや、細胞突起の動きは位相差顕微鏡映画撮影装置により観察した。培養細胞を培養フラスコへ移し、密封した後、37°C保温装置付き位相差顕微鏡映画撮影装置（オリンパス社製）の試料台に乗せて映画撮影を行なった。撮影には Bolex カメラとフジカラー RT-500リバーサルフィルムを使用し、15秒に一コマの記録を行なった。

## 結 果

### 1. 分離肝細胞の細胞突起

Spheroid の形成過程における肝細胞を Time-lapse cinemicroscopy により経時的に観察すると、単離肝細胞は培養皿に一度接着して島状単層を形成した後、島状肝細胞集団が収縮し半球状となり、さらに培養皿から離脱することにより浮遊 spheroid が形成されることが判明した(図1)。細胞突起は細胞接種直後の肝細胞にすでに観察される。こうした細胞突起は単離肝細胞のおよそ1-5%に観察され、一部の突起はその先端部分が培養皿に接着していることが走査電顕により明らかとなったが(図2)、多くは細胞の自由表面で激しく運動することが判明した(図1)。同様の突起はプロテオグリカン基質塗布培養皿で培養される肝細胞に特異的ではなく、通常のプラスチック培養皿での培養においても同様に観察された。接種された細胞のほとんどが接着伸展し、島状単層を形成すると細胞突起は消失し観察されなくなった。その後の島状単層肝細胞が全体として収縮して多層半球状細胞凝集塊

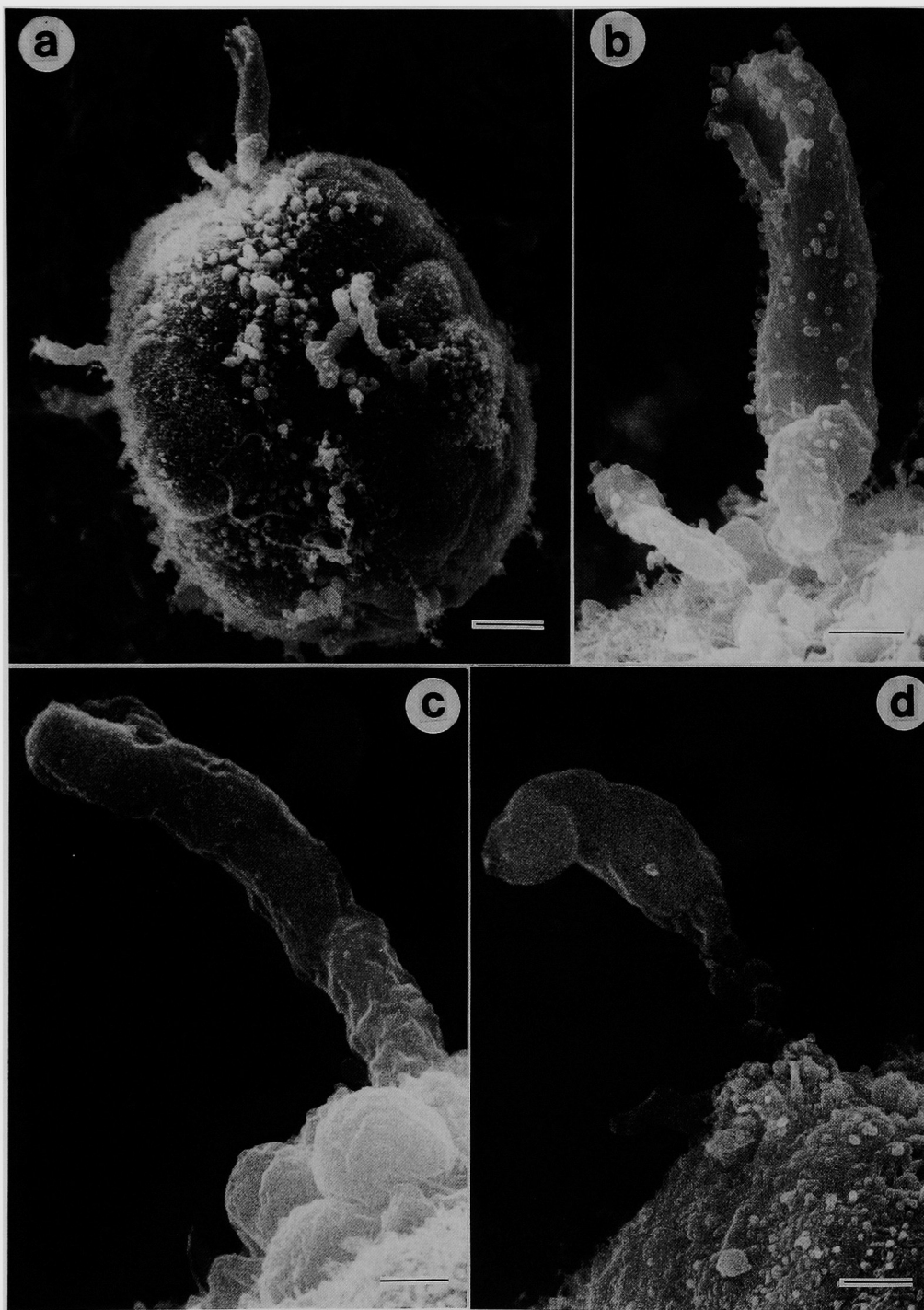


図4 肝細胞 spheroid 突起の走査電子顕微鏡像

a ; 突起を有する肝細胞 spheroid, bar,  $0.5\mu\text{m}$ , b-d ; さまざまな突起の形態, bar,  $0.15\mu\text{m}$ .

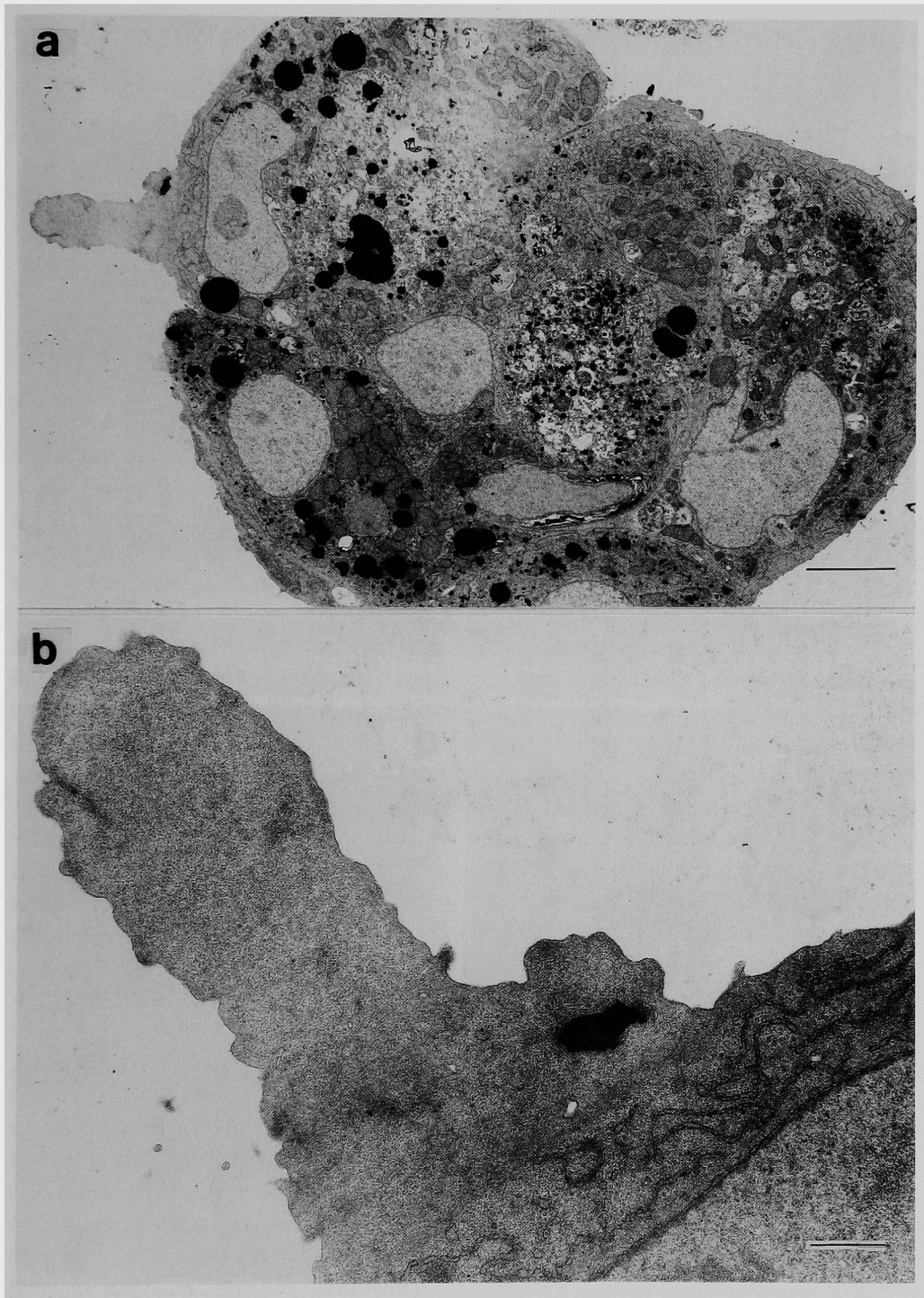


図5 肝細胞 spheroid の透過電子顕微鏡像  
a ; 培養4日の spheroid と細胞突起, bar, 0.1 $\mu$ m, b ; 細胞突起の拡大像, bar, 0.5 $\mu$ m.

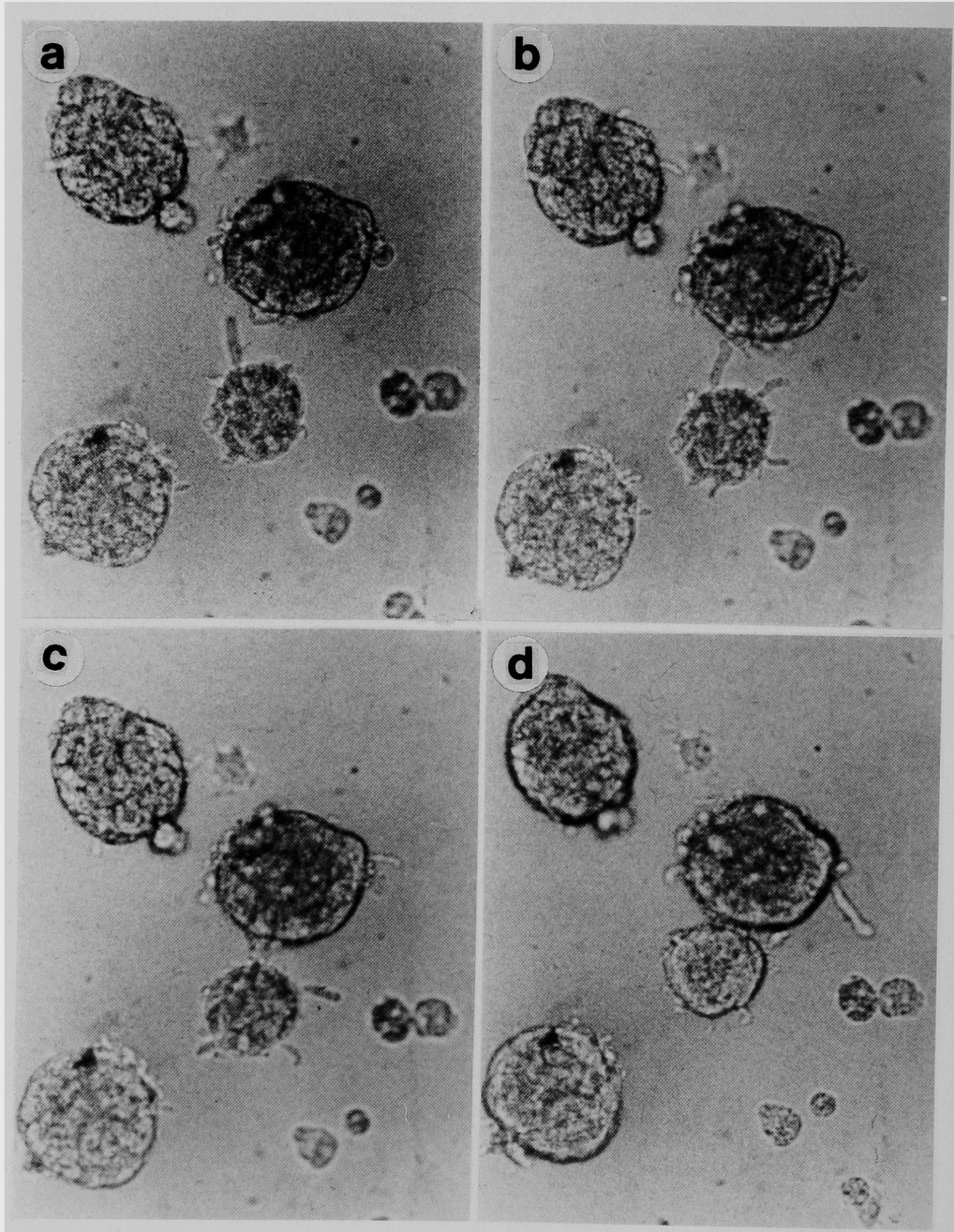


図6 肝細胞 spheroid の突起の運動と spheroid の癒合  
培養7日後の spheroid を cine microscopy により観察した。  
a : 観察開始, b : 10分後, c : 20分後, d : 30分後

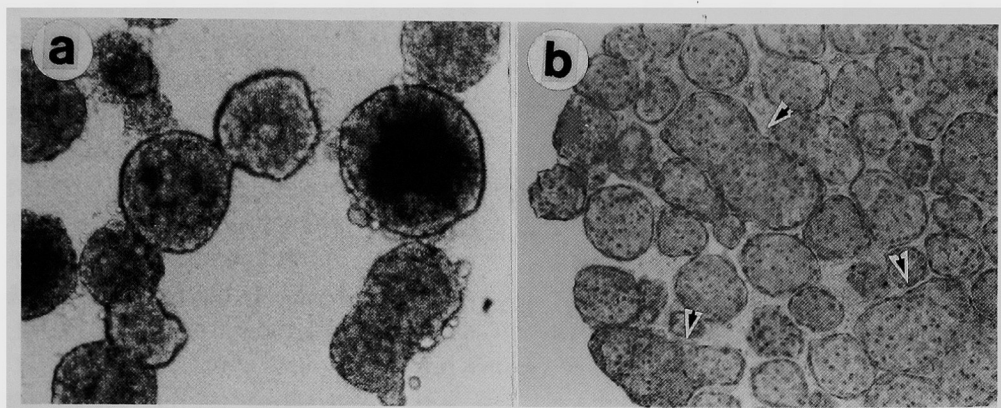


図7 癒合肝細胞 spheroid の位相差顕微鏡像

癒合肝細胞 spheroid の, a ; 位相差顕微鏡像, b ; 切片, ヘマトキシリン-エオジン染色, 矢頭; 癒合 spheroid.

を形成したが、島状単層の周辺部肝細胞は胞体の一部が多層半球状細胞凝集塊に組み込まれ、反対側の胞体先端部が培養皿に接着し続けた(図1)。この後培養皿に接着していた周辺部肝細胞の胞体の一部が培養皿から離脱すると、この胞体の一部は運動する細胞突起となりこれと同時に細胞凝集塊は浮遊する spheroid となることが判明した。

## 2. Spheroid の突起

Spheroid の突起は培養を継続する過程で再び培養皿に接着することではなく、伸展、収縮、ねじれなどの運動を繰り返した、 $5 \times 10^5$  細胞を35 mm培養皿に接種した場合には培養4日目には接種細胞のほぼすべてが平均径 $110 \mu\text{m}$ の spheroid に組み込まれ、約300個の spheroid が形成された(図3)。このような spheroid の約10%に1-6本の細胞突起が観察された。電子顕微鏡による観察ではこれらの突起は、spheroid 表層を形成する肝細胞の自由表面から突出し自由表面から同様に突出する無数の microvilli とは大きさの上で区別された(図4)。Microvilli は概ね $0.1-0.2 \mu\text{m}$ の長さを有する微小突起であるに対し、spheroid 突起はこれらの microvilli より明かに大きく円筒状形態を有していた(平均横径約 $2 \mu\text{m}$ 、長径 $15 \mu\text{m}$ )。長いものでは約 $50 \mu\text{m}$ に達する突起も観察された。突起の表面には microvilli は観察されずむしろ比較的滑らかであり、

時に先端部に陥凹を有していた(図4)。Spheroid を形成する肝細胞はオルガネラがよく発達していることから形態的には分化度の高いと考えられた(図5)。

## 3. Spheroid の運動と癒合

突起の運動に依存する spheroid の運動は特定されなかったが、突起が培養皿に接触する場合には spheroid は明らかに移動することが判明した。こうした spheroid の動きにより2つの spheroid が衝突すると、2つの spheroids が癒合するのが観察された(図6)。衝突に際して2つの spheroids の突起は互いに絡み合い、相手の spheroid 表面に接着し、さらに突起が収縮することにより2つの spheroids が密に接触することが判明した(図6)。密に接触する2つの spheroids は切片による観察では dunbel shape の1つの spheroid を形成していた(図7)ことより、密に接触する2つの spheroids は癒合することが判明した。実際には培養経過における spheroid 数の変化を調べてみると培養2週間でその数は $1/2$ に減少していた(図3)。

## 考 察

初代培養肝細胞が multicellular spheroid を形成することはすでに報告した。Spheroid の形成過程の形態観察からこれまで報告されたことのない肝細胞の細胞突起が観察された。培養細

胞には区別される多くの細胞突起が知られており、培養肝細胞の突起として最もよく知られているのが microvilli であり、通常の単層培養での肝細胞はその自由表面 microvilli を有している。肝組織では肝細胞の類洞側と毛細胆管腔にそれぞれ microvilli が存在することが知られている<sup>4)</sup>が、それ以外の突起については記載がない。本文で述べたように spheroid 突起は単層培養や肝組織にみられる microvilli とは明らかに異なる形態的特徴を有しており区別されるべきである。

Microvilli は肝障害時に膨化し肥大化することが知られている<sup>11,12)</sup>。しかし、そのような場合には自由表面に存在する microvilli の全てに同様の変化が観察される。Spheroid 突起を有する細胞の microvilli には形態的な膨化は観察されないことから本突起が microvilli の膨化とは考えられない。

Spheroid 突起の形態的特徴は、長い円筒形の虫様突起と表現することができる。本突起は uropodia, pseudopodia, blister などの既知の突起とは形態的に明らかに区別され<sup>12)</sup>、同様の形態的特徴を有する細胞突起の報告はほとんどない。多少とも類似性があるものとしては、histiocytic leukemia 細胞で観察されている vermipodia<sup>2,3)</sup> が挙げられる。Vermipodia は spheroid 突起と同様に胞体長の数倍にも伸展する円筒状虫様突起とされている。この突起は本来単一細胞として存在する血液細胞のうちでも特に histiocytic leukemia 細胞に特異的とされており、肝細胞などの接着性を有する細胞にその存在が報告されたことはない。また突起の性状に関しては細胞の変成所見<sup>12,13)</sup>ではなくむしろ積極的な探索子としての機能や細胞の運動を担う機能構造物であることが推測されている<sup>2,3,14)</sup>。Spheroid 突起についてもこれを有する細胞には、分離直後でも spheroid 形成を完了した後でも細胞の変性所見は見られないばかりか、明らかに spheroid の癒合という機能を有している。Spheroid 突起についても vermipodia と同様に少なくとも機能を有する構造物であることが推測される。このような観点から spheroid の突起は vermipodia 様突起と呼称しても差し支えないと

考えられた。

現在までのところこのような突起が肝組織では観察されないことは、重要な視点であると考えられる。確かに spheroid 突起が培養という特殊環境でのみ存在する構造物であるとの見解は否定できないが、vermipodia の場合でもその突起は培養系のみならず *in vivo* の血流中でも存在していることが明らかにされている<sup>3)</sup>ことから肝細胞の vermipodia 様突起についても今後さらに詳細な組織での検討が必要であると考えられる。

またこの検討に用いた spheroid は概ね肝細胞のみから構成されており組織中の肝細胞のように類洞内皮細胞との相互作用は有していない。予備的検討では類洞内皮細胞が添加された培養系においては肝細胞 spheroid の表面に内皮細胞が配位し、細胞突起は観察されなくなる<sup>15)</sup>ことや、胎児ラットの未分別細胞からなる同様の spheroid でも細胞突起の存在は報告されていない<sup>16)</sup>ことから、組織中で本突起が観察されないのは類洞内皮細胞のに覆われているためであると考えられなくもない。この突起の発現意義を解明するためにもサイトスケルトンを含む突起の詳細な内部構造や癒合以外の機能について今後の検討が必要であると考えられる。

## 結 論

成熟ラット肝細胞はラット肝由来プロテオグリカンを基質とする無血清培地下での初代培養系で浮遊球状細胞凝集塊 (Multicellular spheroid; spheroid) を形成した。Spheroid 肝細胞には長い細胞突起が観察され、この細胞突起が肝細胞 spheroid の運動と癒合に関与することが明らかとなった。Time-lapse cinemicroscopy による観察から分離肝細胞の 1—5% に最長 50 $\mu$ m に達する長い虫様突起が観察された。培養数時間で接種細胞が接着伸展するとこのような突起は一時消失するが、その後 2—3 日間の培養で培養皿から離脱して spheroid を形成すると再び同様の細胞突起が観察されるようになった。こうした細胞突起の伸展、収縮、ねじれなどの運動により spheroid が運動し、衝突に続いて spheroid の癒合が観察された。電子顕微鏡的観



察では、これらの細胞突起は肝細胞自由表面から突出する細胞内小器官の乏しい突起であり、並存する無数の微絨毛とは明らかに区別された。形態的特徴からは Gardially らの報告した Vermipodia に類似する突起であると考えられた。

研究を遂行するにあたりご指導いただきました岡

山大学医学部第一内科学教室辻孝夫教授に深感致します。また直接ご指導いただいた小出典男講師および第一病理学教室森晏講師に感謝致します。研究のための費用の一部は文部省科学研究補助費 (C62570327) および平成元年度厚生省科学研究費、臓器技術臨床研究開発事業を用いた。

#### 文 献

- 1) Fawcett DW : Specialization of the free surface. in *The Cell*. Fawcett DW, ed. Saunders, Philadelphia (1981) pp. 65—123.
- 2) Ghadially FN : Endocytotic structure and cell processes. in *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. Ghadially FN ed, Butterworths, London (1988).
- 3) Skinninde LF and Ghadially FN : Ultrastructure of cell surface abnormalities in neoplastic histiocytes. *Br J Cancer* (1977) **35**, 657—667.
- 4) Motta PM : The three dimensional microanatomy of the liver. *Arch Histol Jpn* (1984)**47**, 1—30.
- 5) Shinji T, Koide N and Tsuji T : Glycosaminoglycans partially substitute for proteoglycans in spheroid formation of adult rat hepatocytes in primary culture. *Cell Struct Funct* (1988) **13**, 179—188.
- 6) Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M and Tsuji T : Continued high albumin production by multicellular spheroid of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) **161**, 385—391.
- 7) Asano K, Koide N and Tsuji T : Ultrastructure of multicellular spheroid formed in the primary culture of adult hepatocytes. *J Clin Electron Microsc* (1989) **22**, 243—252.
- 8) Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M and Tsuji T : Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Exp Cell Res* (1990) **186**, (in press)
- 9) Seglen PO, Preparation of isolated rat liver cells : in *Method in Cell Biology*, Vol 13, Prescott DM ed, Academic Press. New York (1976) pp. 29—83.
- 10) Enat R, Jefferson DM, Ruiz-Opazo N, Gattmantan Z, Leinwand LA and Reid LM : Hepatocyte proliferation in vitro : its dependence of the use of serum free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81**, 1411—1415.
- 11) Reynolds ES : Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cells, following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol* (1963) **19**, 139—148.
- 12) Penasse W, Bernaert D, Mosselmans R, Wanson J-C and Drochmans P : Scanning electron microscopy of adult rat hepatocytes in situ after isolation of pure fractions by elutriation and after culture. *J Biol Cell* (1979) **34**, 175—186.
- 13) Price ZH : The micromorphology of zeiotic blebs in cultured human epithelial (HEp) cells. *Exp Cell Res* (1967) **48**, 82—91.
- 14) Bessis M : *Living blood cells and their ultrastructure*. Springer Verlag, New York (1973).
- 15) Asano K, Koide N, Kawaguchi M, Takenami T, Matsushima H, Masaharu M, Tsuji T :

- Hepatocytes-endothelial cells interaction in spheroid culture. *J Clin Electron Microsc* (1989) **21**, 5—6.
- 16) Landry JD, Bernier C, Ouellet R and Marceau N : Spherical aggregate culture of rat liver cells : histiotypic reorganization, biomatrix deposition and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* (1985) **101**, 914—923.

**The presence of vermipodia-like processes on the free  
surfaces of multicellular spheroids composed of adult rat  
hepatocytes in the primary culture**

**Takayoshi TANABE**

**First Department of Internal Medicine,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. T. Tsuji)**

The presence and function of vermipodia-like processes of hepatocytes-multicellular spheroids formed in primary culture was described. Cine microscopy and scanning electron microscopy revealed that about 1-5% hepatocytes in single cell after culture initiation already possessed the processes. The processes disappeared when the hepatocytes attached and spread, and then appeared again on the surface of multicellular spheroids. The processes were moving by extending, shrinking and twisting, and sometimes extended 50  $\mu\text{m}$ . Five to ten percent of spheroids had 1-5 processes. Occasional collision of two spheroids resulted in the fusion of spheroids after their processes intertwined, attached to the partner spheroid and shrunk. Electron microscopy revealed that the processes were larger in size than the numerous microvilli co-present on the free surface of spheroids and their cytoplasm had scarce organelle. The morphological characteristics of the processes most resembled those of vermipodia reported in histiocytic leukemia cells.