

バイオ人工肝臓への応用を目指した各種肝細胞株 3次元培養による細胞生物学的検討

阿不都許庫尔 米吉提¹⁾²⁾ 岩 堀 徹¹⁾ 松 野 直 徒¹⁾
長 尾 桓¹⁾

¹⁾東京医科大学外科学第五講座

²⁾中国新疆ウイグル自治区喀什地区人民病院外科

【要旨】 バイオ人工肝臓 (BAL) は肝不全患者の肝移植までの橋渡しとしての治療手段として有用性が期待されている。BAL に求められる機能は多種多様な肝機能の補助であるがこれらを全て BAL で代替するのは困難と言わざるを得ない。現実的な方針としては、薬物代謝、アンモニア処理、蛋白合成など目的に応じた細胞を選択する必要がある。我々はこの目的のためにラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を用いて Huh7、HAK1A1、HepG2 といった3種類の肝細胞の3次元培養に取り組んだ。その結果各細胞は植え継ぎなく2週間以上培養が可能であった。そして Huh7 や HepG2 は倍加時間が24時間以内で細胞株の増殖能が良いが、HAK1A1 は倍加時間が48時間以上で細胞株の増殖能が良くないことが判明した。また単層培養に比べ、RFB培養では Huh7、HAK1A1、HepG2 の Alb 産生量が増加し、Huh7、HepG2 の AFP 産生量が著明に減少し細胞の分化に寄与したと考えられたが HAK1A1 では AFP が産生しなかった。これらの結果より Huh7、HepG2 は長期間高密度培養が可能であり、細胞の分化を促し BAL の細胞源になり得ると考えられた。

はじめに

肝臓は、生体における代謝の中心的臓器であり、血清蛋白質の合成、胆汁酸の分泌、糖・脂質代謝、ビリルビン代謝、アンモニア・アルコール等の分解といった機能を通じて生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。このため、いったんこの恒常性が崩れると、長期間にわたる肝不全を惹起し重大な生命の危機に陥る。現在、日本では年間数万人の患者が種々の肝不全で死亡しており、特に劇症肝炎は死亡率が80～90%と高く、肝不全対策は、医療上の緊急課題の一つである。肝臓は旺盛な再生能を有しているため、劇症肝不全で肝臓が急激に傷害を受けたとしても、1週

間ほど何らかの手法で肝機能を代替することができれば肝臓は回復し、患者は復活する。

肝不全患者に対する最も効果的な治療は肝移植である。しかし、ドナー不足は深刻な問題であり、万人が肝移植を受けることはできない。そのため、現在日本では一時的肝機能を補助する手段として血漿交換療法等が確立され、ある程度の救命率は得られているが十分ではない。そこで、ドナーが現れるまでの生命維持や自己肝臓の再生促進による移植の回避又は肝移植までの橋渡しとしての治療手段として、バイオ人工肝臓 (bio artificial liver: BAL) の有用性が期待されている¹⁻⁶⁾。しかし、BAL の細胞源として初代ヒト肝細胞を使用することが理想的であるが、移植臓器さえ

2006年5月10日受付、2006年6月27日受理

キーワード: ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB)、ヒト培養肝腫瘍細胞、人工肝臓

(別冊請求先: 〒193-0998 東京都八王子市館町1163 岩堀 徹)

不足している現状では困難であり、そこで注目されるのは肝細胞株である。肝腫瘍細胞株は *in vitro* で増殖性を有し、冷凍耐性を持つという BAL の細胞源として非常に高い利点を持つが、多くの肝特異機能の低下や欠損が見られる⁷⁾。さらに培養環境を変えることで細胞の特異機能を誘導しうれば BAL の細胞源となりうる。我々が取り組んできた RFB は従来のフォローファイバー型リアクターに比べ、細胞を三次元的に配列し細胞本来の機能を良好に発現することが示されている¹⁰⁾¹¹⁾。我々は今回 RFB の BAL への応用を目指して樹立ヒト肝癌細胞株 (human liver cancer cell lines) であるヒト肝腫瘍細胞株 HepG2、ヒト高分化肝細胞癌株 Huh7、IL-8 産生型高機能肝細胞株 HAK1A1 を RFB で三次元培養 (three dimensional culture) を行った。RFB 培養後 HE 染色にて細胞の形態観察を行い、肝特異蛋白として代表的蛋白であるアルブミン (Alb: albumin)、分化度を示す蛋白であるアルファフェトプロテイン (AFP: alpha-fetoprotein) 産生量を測定した。各結果を単層培養 (monolayer culture) と比較し、培養法の違いによる影響を検討した。

研究材料および方法

1. 細胞

本研究に用いた細胞株、ヒト肝腫瘍細胞株 HepG2 は国立成育医療センターから入手した。ヒト高分化肝細胞癌株 Huh7 と IL-8 産生型高機能肝細胞株

HAK1A1 は国立感染症研究所ウイルス 2 部から入手した。

2. 増殖曲線と倍加時間

目的の細胞を 1×10^5 個ずつ 24 枚の 2 ml dish に播種して、培養 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 日目に細胞数をカウントし平均値を取り細胞の増殖曲線を作成、細胞の増殖能を検討した。倍加時間 (doubling time, *DT*) は次式によって求めた: $DT = (t - t_0) \log 2 / \log N - \log N_0$ (t, t_0 : 細胞数を数えた時間、 N_0 : t_0 時での細胞数、 N : t 時での細胞数)。

3. 簡易型ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB)

本研究に用いた RFB は (RA-14、ABLE Co., Ltd., Tokyo, Japan)、培養担体は多孔性セルロースビーズ (直径 200 μm 孔径 50 μm) である。RFB の特徴 (Fig. 1, Fig. 2) は ① 三次元構造を有する担体を用いることにより高密度培養が可能であること。② ラジアルフロー型の培養液が外周から中心に流れることにより酸素、栄養素の細胞への供給が均一となり、スケールアップも可能であること。③ 培養装置は 37°C の恒温槽内に設置され温度調整できること。

4. 簡易型 RFB の培養条件

今回の培養時の培地供給量は 30 ml/day、培地循環流速 7 ml/min である。播種細胞数 1×10^7 個、培養時間は 14 日間であり、恒温槽内の温度は 37°C に設定した。

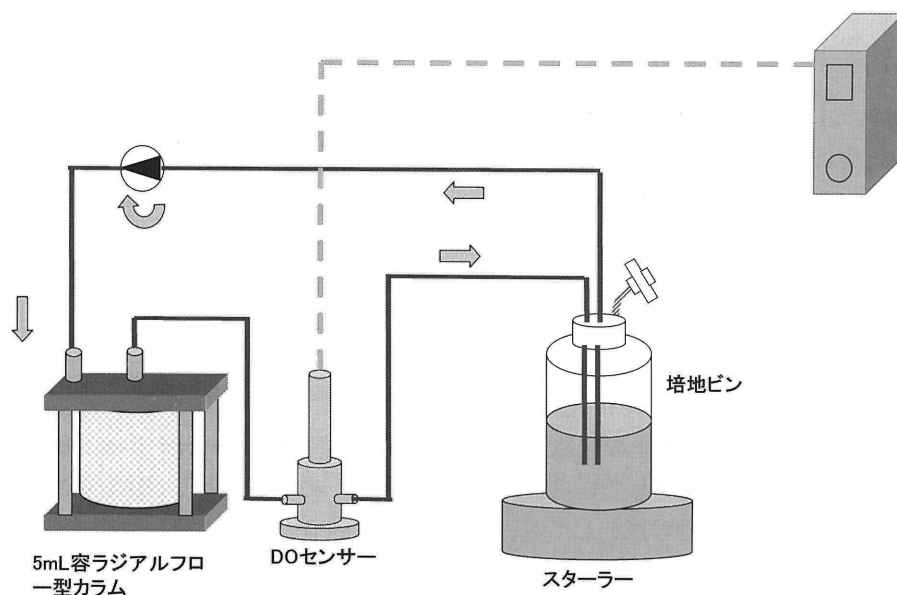


Fig. 1 Schematic diagram of the simple RFB System

5. 単層培養の条件

目的の細胞を直径225 mm細胞培養ディッシュ (IWAKI社) に播種した。培養細胞の形態を経時的に位相差顕微鏡で観察した。RFB培養と同じく培地供給量は30 ml/day、播種細胞数 1×10^7 、培養時間は14日間であり、恒温槽内の温度は 37°C に設定した。

6. 使用培養液

10%ウシ胎児血清 (FBS) (JRH BIOSCIENCE社) と5 mlのPenicillin-Streptomycin (GIBCO社) を添加したDMEM (Sigma, St. Louis, Mo, USA) を培養液として細胞を増殖させて実験した。

7. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法

培養期間中経時的採取した培養上清中Alb、AFPの産生量を検討するため、Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法にて測定した。Alb測定にはBETHYL社製のHuman Albumin ELISA Quantitation Kitを使用した、AFP測定にはARCHITECT (JAPAN) 社製のAFP測定キットを使用した。

8. 統計処理

各細胞のAlb、AFP産生量に関してはStudent-*t* 検定で検討した、検定は p 値が0.05以下を有意差があると見た。

結 果

1. 各細胞の増殖曲線と倍加時間

まず、RFB培養を行う前に各細胞の増殖能の検討を単層培養で行った。Fig. 3に示すようにHAK1A1細胞と比べてHepG2、Huh7細胞の増殖能が良好であった。Table. 1に示すように倍加時間で見ると、培養初期においてHepG2、Huh7細胞では24時間以内であるが、HAK1A1細胞では48時間以上と長かった。

2. 各細胞のHE染色

Fig. 4に示すようにRFB14日連続培養後培養担体ごと細胞を20%中性緩衝液で固定してHE染色おこなった。HepG2、Huh7細胞は非常に高密度増殖してあり、HAK1A1細胞の場合は一部細胞が付着したが、高密度増殖しなかった。

3. 各細胞のAFP産生量

Fig. 5に示すように単層培養、RFB培養後2、12日目培養上清回収してAFP産生量測定した、Huh7単層培養でのAFP産生量は2日目 $6,890 \text{ ng}/24 \text{ h}/10^6 \text{ cells}$ 、12日目 $10,080 \text{ ng}/24 \text{ h}/10^6 \text{ cells}$ に対して、RFB培養でのAFP産生量は2日目 $3,970 \text{ ng}/24 \text{ h}/10^6 \text{ cells}$ 、12日目 $5,640 \text{ ng}/24 \text{ h}/10^6 \text{ cells}$ であった。RFB培養後AFP産生量は単層培養に比べて有意に抑制された ($p < 0.05$)。



Fig. 2 Overview of the small RFB System

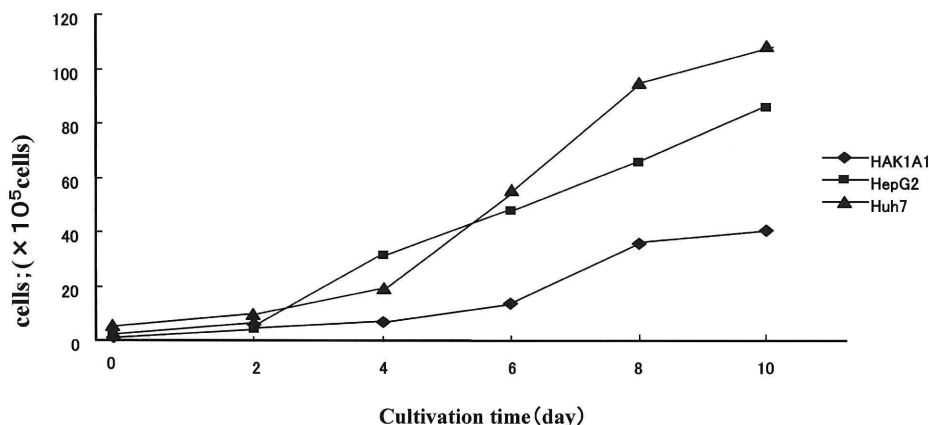


Fig. 3 Growth curve of various liver cell lines

Table 1 Doubling time from Huh7, HAK1A1 and HepG2 cells in monolayer culture (hour)

Cultivation time (day)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
Huh7	9.8	17.7	31.9	62.3	260
HAK1A1	55	48.6	26	34.8	265.8
HepG2	16.9	22.7	78.8	110.7	124.5

HAK1A1では単層培養、RFB培養共にAFP産生しなかった。

HepG2単層培養でのAFP産生量は2日目1,720 ng/24 h/10⁶ cells、12日目3,947 ng/24 h/10⁶ cellsに対して、RFB培養でのAFP産生量は2日目423 ng/

24 h/10⁶ cells、12日目494 ng/24 h/10⁶ cellsであった。RFB培養後AFP産生量は単層培養に比べて有意に抑制された ($p < 0.05$)。

4. 各細胞のAlb産生量

Fig. 6に示すように単層培養、RFB培養後2, 12日目培養上清回収してAlb産生量測定した、Huh7単層培養でのAlb産生量は2日目228 ng/24 h/10⁶ cells、12日目243 ng/24 h/10⁶ cellsに対して、RFB培養でのAlb産生量は2日目331 ng/24 h/10⁶ cells、12日目289 ng/24 h/10⁶ cellsであった。RFB培養初期のAlb産生量は単層培養に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

HAK1A1単層培養でのAlb産生量は2日目33 ng/

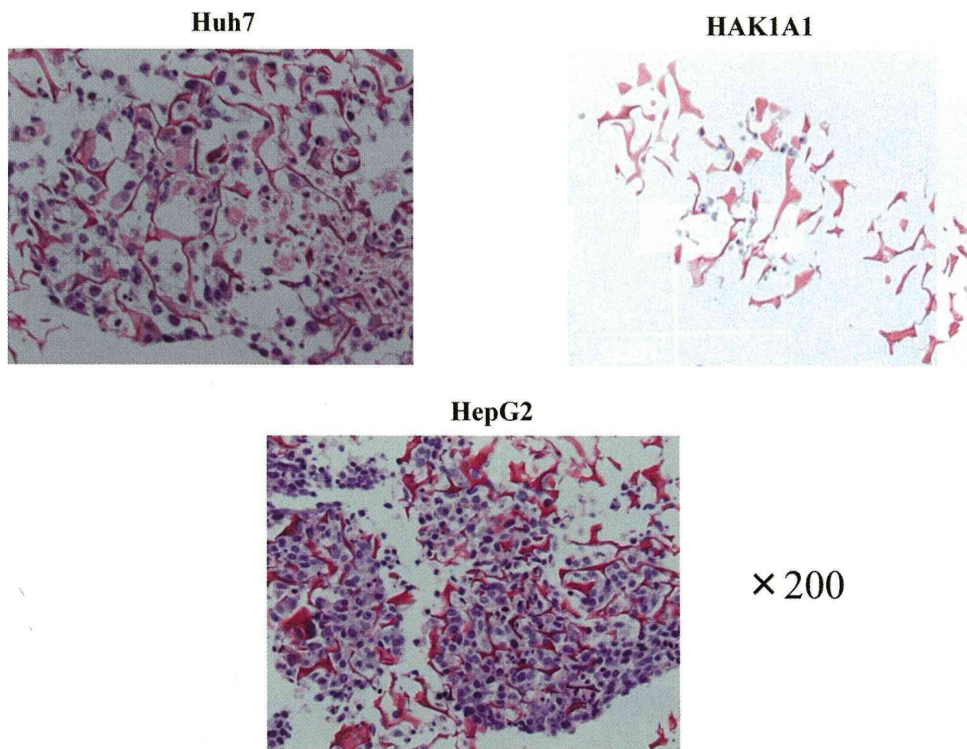


Fig. 4 H/E-stained sections from Huh7, HAK1A1 and HepG2 cells in RFB culture for 14 days

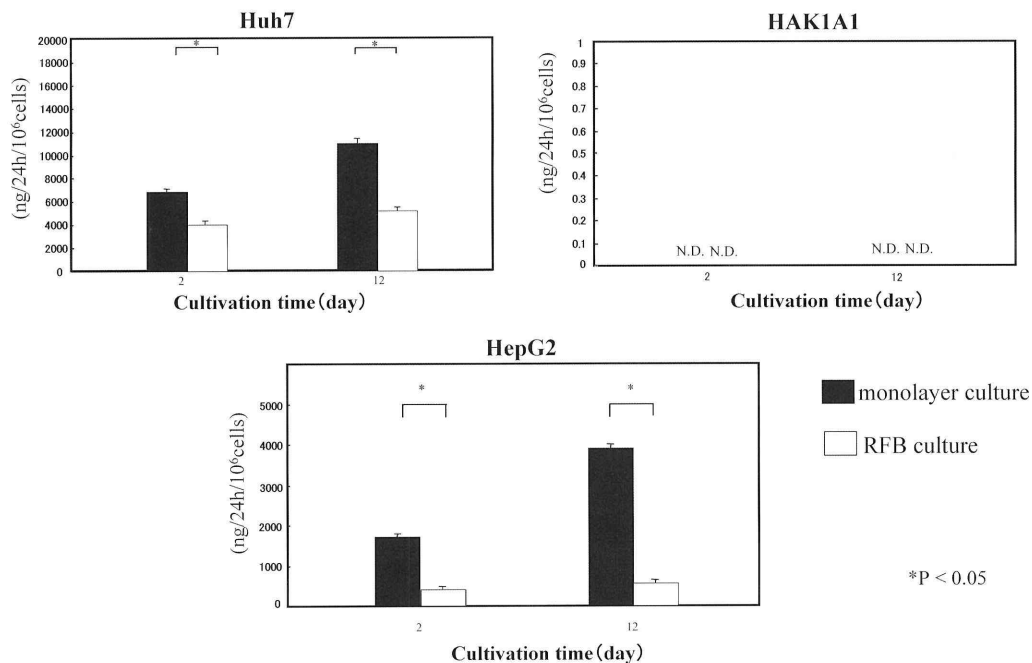


Fig. 5 Concentration of AFP levels in supernatant from Huh7, HAK1A1 and HepG2 cells

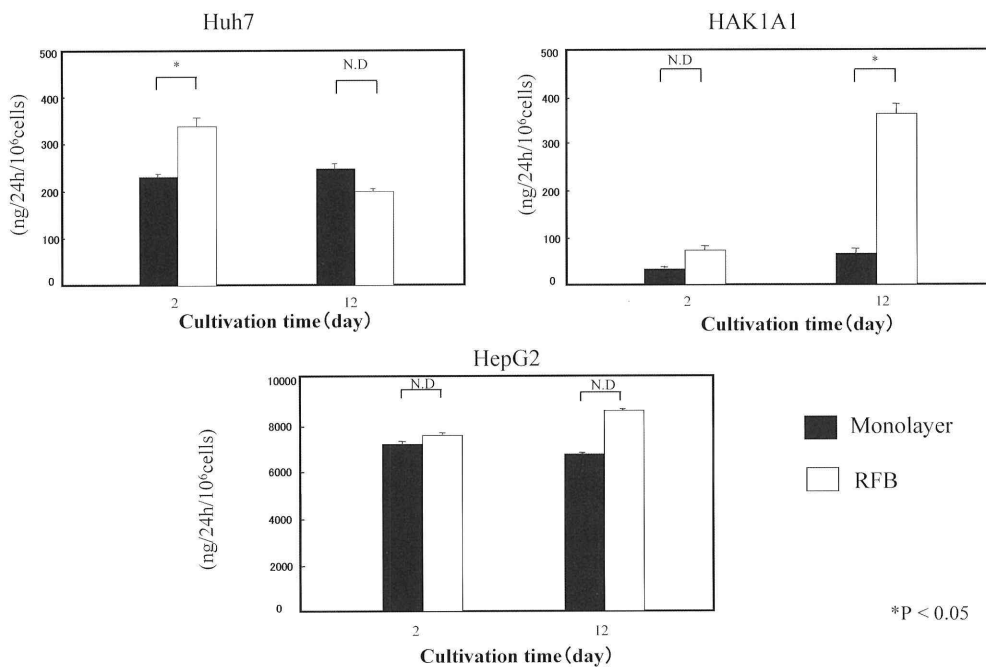


Fig. 6 Concentration of albumin levels in supernatant from Huh7, HAK1A1 and HepG2 cells

24 h/10⁶ cells、12 日目 79 ng/24 h/10⁶ cells に対して、RFB 培養での Alb 産生量は 2 日目 86 ng/24 h/10⁶ cells、12 日目 396 ng/24 h/10⁶ cells であった。RFB 培養全期に渡って Alb 産生量は単層培養に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

HepG2 単層培養での Alb 産生量は 2 日目 7,363 ng/24 h/10⁶ cells、12 日目 7,235 ng/24 h/10⁶ cells に対して、RFB 培養での Alb 産生量は 2 日目 7,502 ng/24 h/

10⁶ cells、12 日目 8,681 ng/24 h/10⁶ cells であって RFB 培養全期に渡って Alb 産生量は単層培養に比べて高い傾向を示したが有意差は見られなかった。

考 察

これまでにブタ肝細胞を使用した BAL の臨床試験が多く報告されているが¹⁰⁻¹⁴、ブタ細胞よりヒトへのブタ内在性レトロウイルス (PERV) の感染が *in vitro*

にて証明されて以来、ブタ細胞を用いた BAL の治療が懸念されている¹⁵⁾¹⁶⁾。近年ヒト肝細胞¹⁷⁾ (細胞源として移植不適合のドナー肝臓より調整されたヒト肝細胞)、ヒト肝芽腫由来細胞¹⁸⁾¹⁹⁾ を使用した BAL の臨床試験報告があるが、コストが高く、ドナー肝に頼らざるを得ないといった欠点がある。また肝細胞、肝腫瘍細胞は継代培養を重ねるにつれその機能を失ってしまう。よって、BAL の細胞源として安全性が高く健全細胞に近い機能を有し、かつ低コストで大量培養が可能な細胞が開発されればよいことになる²⁰⁾。また新規薬剤が開発された際、ヒトにおける薬物代謝の検定に用いる方法がなく、我々はこれまでに BAL を用いて *in vitro* 薬物代謝解析モデルの開発と各種細胞のラジアルフロー型バイオリクター (RFB) での三次元培養の研究にも取り組んできた²¹⁾²²⁾。これらの結果から、BAL に求められる機能は多種多様な肝機能の補助であるがこの多機能の肝機能を全て代替するのは困難と言わざるを得ない。むしろ現実的な方針としては、薬物代謝、アンモニア処理、蛋白発現等目的に応じた細胞の選択をすることが重要と考える。我々はこの問題を解決するために RFB を用いて Huh7、HAK1A1、HepG2 といった 3 種類の細胞を長期培養し、機能亢進或は機能維持の可能性について検討した。

先に述べたように水谷らにより開発された RFB は従来のフォローファイバー型リアクターに比べ、細胞は 3 次元的に配列し細胞本来の機能を良好に発現することが示されている⁸⁾⁹⁾。RFB の特徴は ① 3 次元構造を有する担体を用いることにより高密度培養が可能であること。② ラジアルフロー型の培養液が外周から中心に流れることにより酸素、栄養素の細胞への供給が均一となり、スケールアップも可能であること。③ 培養装置は 37°C の恒温槽内に設置され温度調整できること。これらの特徴によって細胞によい環境を作り出した。今回の簡易型 RFB (5 ml) を用いた 3 次元培養では細胞は植え継ぎなく 2 週間以上培養が可能であった。

RFB 培養後、単層培養より培養 2 日目の Huh7 と、培養 12 日目の HAK1A1 では Alb 産生量が増加する一方、Huh7、HepG2 の AFP 産生量は培養初期、後期ともに著明に減少し、HAK1A1 では AFP 産生しなかった。これはもともと HAK1A1 を樹立した時点から判明していた事実であり²³⁾、RFB 培養による変化は見られなかった。蓮村ら²⁴⁾ Kataoka ら²⁵⁾ のヒト肝癌細

胞株を用いた完全制御型 RFB によるアルブミン産生増加の報告と一致する。しかし、今回培養期による Alb 産生量の相違が見られるが、これは完全制御型と簡易型の相違によるものと考えられた。HAK1A1 のアルブミン産生能はご指摘のとおり 12 日目で良好ですが、14 日以降の長期培養は HE 染色でできなかったため、最終的には望ましくないと考えた。各ヒト肝癌由来細胞株を用いて、細胞生物学的差異での蛋白産生量を比較検討することは Alb、AFP の発現調節を明らかにするため有意義である²⁶⁾²⁷⁾。本研究では肝特異蛋白の産生が異なる細胞株で異なる培養環境によって蛋白産生量も異なることがわかった。これによって、人工肝の細胞源となりうる細胞を選択する時は各細胞の機能に併せて選択する必要があると考えられた。また各細胞の倍加時間を明らかにした結果、Huh7、HepG2 のように倍加時間が 24 時間以内の細胞株の RFB での増殖が良いこと、HAK1A1 のように倍加時間が 48 時間以上の細胞株の増殖が良くないことが判明した。これは RFB の特殊な構造により初期の細胞増殖能が重要であると考えられた。増殖能自体は単層培養も RFB 培養もともに細胞数の増加そのもので判定するが、今回の RFB の評価は細胞の増殖能ではなく、RFB 培養が可能かどうかという点が最も重要と考える。今回、いろいろな細胞の動態から、14 日培養しなくても培養初期にその細胞が RFB にふさわしいか判定するため倍加時間を取り上げた。今後の課題として、本来の各細胞増殖能を高めることにより、RFB 培養を可能として薬物代謝能、アンモニア代謝能を高めるための対策が重要であり、各細胞の機能をもちよる混合培養も検討が必要だと思われた。

結 語

これらの結果により従来のフラスコでの単層培養と比較し、RFB では生体内により近似した三次元培養が可能となり、肝細胞が本来持つ機能を発揮できる点で有用であり、今後の BAL の発展に寄与するものと考えられた。また Huh7、HepG2 は長期間高密度培養が可能であり、細胞の機能を維持しており BAL の細胞ソースになり得ると考えられた。

文 献

- 1) 小林直哉、陳 勇、田中斎仁、中路修平、田中紀章：バイオ人工肝臓。今日の移植 **17**: 725-736, 2004

- 2) 松浦知和、斎藤勝也、筋野 浦、蓮村 哲、正木隆博、永森静志: 人工肝臓研究—最近の進歩 肝臓細胞由来ヒト高機能肝細胞株の樹立。外科 **63**: 539-543, 2001
- 3) 石井雄二、矢永勝彦: 肝不全に対する肝移植と人工肝臓。Frontiers in Gastroenterology **9**: 190-210, 2004
- 4) Demetriou AA, Brown RS Jr, Busuttill RW, Fair J, McGuire BM: Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. Ann Surg **239**: 660-667, 2004
- 5) van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Scala D, Scala S: Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. Cell Transplant **12**: 563-568, 2003
- 6) Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrade P, Efimova E, Mieder T, Naumann G: Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cell in bioreactors: a morphologic study. Transplantation **76**: 781-786, 2003
- 7) Enosawa S, Suzuki S, Kakefuda T and Amemiya H: Examination of 7-ethoxycoumarin deethylation and ammonia removal activities in 31hepatocyte cell lines. Cell Transplant **5**: 39-40, 1996
- 8) 水谷 悟: ラジアルフロー型バイオリアクターの開発。組織培養研究 **18**: 229-233, 1999
- 9) Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Mizutani S, Ikenaga H: Massive culture of human liver cancer cells in newly developed radial flow bio_reactor system: ultrafine structure of functionally_enhanced hepatocellular carcinoma cell lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology **34**: 109-115, 1998
- 10) van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, Di Nicuolo G, Amoroso P: Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. Int J Artif Organs **25**: 950-959, 2002
- 11) Donini A, Baccarani U, Risaliti A: Temporary neurological improvement in a patient with acute or chronic liver failure treated with a bioartificial liver device. Am J Gastroentrol **95**: 1102-1104, 2000
- 12) Mazariegos GV, Kramer DJ, Lopez RC: Safety observations in phase I clinical evaluation of the excorp medical bioartificial liver support system after the first four patients. ASAIO J **47**: 471-475, 2001
- 13) Ding YT, Qui YD, Chen Z: The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. World J Gastroenterol **9**: 829-832, 2003
- 14) Pazzi p, Valier L, Gorini P, Scoletta p, Marangoni E, Ragazzi R, azzena G, Frazzoli E, Luca D, Cassai E: Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. Int J Artif Organs **25**: 192-202, 2002
- 15) Pateince C, Takeuchi Y, Weiss RA: Infection of human cells by an endogenous retrovirus in pigs. Nat Med **3**: 282-286, 1997
- 16) Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. Science **285**: 1236-1241, 1999
- 17) Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grunwald A, Pascher A, Kardassis D, Mas A, Neuhaus P, Gerlach JC: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support-a preliminary report. Int J Artif Organs **25**: 1001-1005, 2002
- 18) Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA: The hepatic extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. Artif Organs **18**: 390-396, 1994
- 19) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. Hepatology **24**: 1446-1451, 1996
- 20) 小林直哉、陳 勇、江尻洋子、赤須弘幸、田中紀章: ハイブリット人工肝。移植 **40**: 420-431, 2005
- 21) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T: CYP3A4 Inducible Model for In Vitro Analysis of Human Drug Metabolism Using a Bioartificial Liver. Hepatology **37**: 665-673, 2003
- 22) Iwahori T, Matsuno N, Johjima Y, Konno O, Akashi I, Nakamura Y, Hama K, Iwamoto H, Uchiyama M, Ashizawa T, Nagao T: Radial flow bioreactor for the creation of bioartificial liver and kidney. Transplantation Proc **37**: 212-214, 2005
- 23) Yano H, Iemura A, Fukuda K, Mizoguchi A, Haramaki M, Kojiro M: Establishment of two distinct human hepatocellular carcinoma cell lines from a single nodule showing clonal dedifferentiation of cancer cells. Hepatology **18**: 320-327, 1993
- 24) 蓮村 哲、松浦知和、相崎英樹、川田雅昭、清水英佑、水谷 悟、永森静志: ヒト由来肝臓細胞を用いたラジアルフロー型バイオリアクターによるアルビミン大量産生。人工血液 **5**: 33-3, 1997
- 25) Kataoka K, Nagao Y, Nukui T, Akiyama I, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, Huh N. An organic-inorganic hybrid scaffold for the culture of HepG2 cells in a bioreactor. Biomaterials **26**: 2509-2516, 2005
- 26) 永森静志: バイオテクノロジー素材としてのヒト癌細胞(1)。胆嚢癌 NOZ。蛋白質。核酸。酵素。 **33**:

- 2605-2606, 1988
27) Nagamori S, Hasumura S, Shimizu K, Niiya M:
Relation Between Albumin-Positive Hepatocytes and
Glutathione-S-Transferase-Positive Foci in Nagase

Analbuminemic Rats Treated With 3'-Methyl-
4-Diaminoazobenzene. Journal of Toxicologic
Pathology 5: 39-46, 1992

Cytological analysis of the most appropriate liver cell lines for culture for bioartificial liver

Abudushukur MEJIT¹⁾²⁾, Tohru IWAHORI¹⁾, Naoto MATSUNO¹⁾
Takeshi NAGAO¹⁾

¹⁾Division of Artificial Organs and Blood Purification, Fifth Department of Surgery,
Hachioji Medical Center of Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

²⁾Department of Surgery, Kashgar First People,s Hospital ,
Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

Abstract

Bioartificial livers (BAL) are hoped to become bridges until liver transplantation for patients with liver failure. Although we try to creak BAL as an alternative to the liver, it is difficult to make a complete substitute because of the wide range of the functions of the human liver. We therefore considered it important to select the most suitable cells for various liver functions, such as drug metabolism, ammonium metabolism and protein production. We therefore applied a radial flow bioreactor (RFB) for 3-dimensional culture of 3types of cell lines, Huh7, HAK1A1, and HepG2. We were able to culture all cell lines in RFB for up to 2 weeks without subculture. The cell lines Huh7 or HepG2, which had doubling times (DT) within 24 hours grew well, but HAK1A1, the DT of which is 48 hours, grew poorly. The production of albumin from those 3 cell lines cultured in the RFB was greater than with monolayer culture, and the production of AFP decreased. These results suggested that culture in the RFB contributed to cell differentiation.

<Key words> RFB, Human liver cancer cell lines, Bioartificial liver
