

ブタ分離肝細胞の冷保存に関する基礎的検討

武居 道彦

肝再生医療の資源として正常ヒト肝細胞の確保が理想であるが、深刻なドナー不足の現状がある。この問題を解決するためには、限られた提供臓器をいかに有効利用するかがきわめて重要である。それには、肝細胞の効率的な分離と効果的な細胞の冷保存法の確立が必要である。外科的に切除したブタ肝からの肝細胞の分離は、collagenase と dispase を組み合わせることにより90%以上の viability を有する肝細胞を得る事が可能であった。さらに当該細胞を用いて8時間冷保存に耐えるか否かについて各種保存液の比較検討を行った。冷保存液として、① University of Wisconsin solution (以下 UW) 液、② UW 液に vitamin C の誘導体である 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid (以下 ascorbic acid-2-glucoside ; AA 2 G) 100 μ g/ml を添加した保存液、③ 100% fetal bovine serum (以下, FBS)、④ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以下, DMEM) に10% FBS を入れた保存液の4種類を検討した。UW 液を使用することで、有意に8時間冷保存ブタ肝細胞の viability, plating efficiency, アンモニア代謝能が維持された。さらに、UW 液に強力な抗酸化剤である vitamin C 配糖体である AA2G を組み合わせることで更に効果的に冷保存肝細胞の機能を維持することができた。その理由として、AA 2 G 添加 UW 液では活性型 caspase-3 の誘導が抑制され、細胞内 ATP 量が有意に保持されたためであると考えられる。当該結果から、UW 液+ AA 2 G は冷保存に最も適した保存液であり、臨床応用への有効性が示唆された。

(平成14年8月28日受理)

Cold-Preservation of Primary Isolated Pig Hepatocytes—Fundamental Study Concerning Optimal Medium—

Michihiko TAKESUE

As a source for liver-targeted regeneration medicine, a supply of normal human hepatocytes is essential. However there are limitations to the supply of human liver from surgical resection. Therefore, the efficient use of a limited liver supply is required.

For this purpose it is extremely important to establish efficient techniques for the cell isolation and cold-preservation of isolated liver cells. As for the isolation of hepatocytes from surgically removed pig livers, dispase perfusion followed by collagenase digestion should yield hepatocytes with more than 90% viability.

Cold-preservation for eight hours using isolated pig hepatocytes in the following preservation media was compared ;

院医歯学総合研究科・消化器・腫瘍外科学の田中紀章教授、小林直哉先生、AA2Gを提供して頂いた岡山大学薬学部生物薬品製造学教室・山本 格教授、統計学

的解析に関して御指導を頂いた岡山大学大学院医歯学総合研究科・医療情報部長の太田吉夫先生に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M : Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 287 : 1258 - 1262, 2000
- 2) Lakey JR, Rajotte RV, Fedorow CA, Taylor MJ : Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions. *Cell Transplantation* 10 : 583 - 589, 2001
- 3) Belzer FO, Southard JH : Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45 : 673 - 676, 1988
- 4) Southard JH, VanGulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Belzer FO : Important components of the UW solution. *Transplantation* 49 : 251 - 257, 1990
- 5) Yamamoto I, Muto N, Murakami K, Suga S, Yamaguchi H : L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidases. *Chem Pharm Bull* 38 : 3020 - 3023, 1990
- 6) Yamamoto I, Suga S, Mitoh Y : Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *J Pharmacobiodyn* 13 : 688 - 695, 1990
- 7) Muto N, Nakamura T, Yamoto I : Enzymic formation of a nonreducing L-ascorbic acid α -glucoside. Purification and properties of α -glucosidases catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. *J Biochem* 107 : 222 - 227, 1990
- 8) Muto N, Suga S, Fujii K, Goto K, Yamamoto I : Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucoside. *Agric Biol Chem* 54 : 1697 - 1703, 1990
- 9) Aga H, Yoneyama M, Sakai S, Yamamoto I : Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric Biol Chem* 55 : 1751 - 1756, 1991
- 10) Muto N, Ban Y, Akiba M, Yamamoto I : Evidence for the in vitro formation of ascorbic acid 2-O- α -glucoside in guinea pigs and rats. *Biochem Pharmacol* 42 : 625 - 631, 1991
- 11) Zhou X-D, Tokiwa T, Kano J, Kodama M : Isolation and primary culture of adult pig hepatocytes. *Meth Cell Sci* 19 : 277 - 284, 1998
- 12) Sakaguchi M, Miyazaki M, Inoue Y, Tsuji T, Kouchi H, Tanaka T, Yamada H, Namba M : Relationship between contact inhibition and intranuclear S 100 C of normal human fibroblasts. *J Cell Biol* 149 : 1193 - 1206, 2000
- 13) Ishikawa M, Yogita S, Takai S : A new method for determining cellular ATP content in hepatocytes. *Tokushima J exp Med* 40 : 119 - 124, 1993
- 14) Waklberg JA, Southard JH, Belzer FO : Development of a cold storage solution for pancreas transplantation. *Cryobiology* 23 : 477, 1986
- 15) Taylor MJ, Elrifai AM, Bailes JE : Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischemia for bloodless surgery. *Advances in low temperature biology*, 3, ed by steponkus EP. London, JAI press. 1996, pp : 1 - 64
- 16) Nagel E, Meyer ZU, Vilsendorf A, Bartels M, Pichlmayr R et al : Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. *Int J Vitam Res* 67 : 298 - 306, 1997
- 17) Tanemoto K, Sakagami K, Orita K : Beneficial effect of EPC-K1 on the survival of warm ischemic damaged graft in rat cardiac transplantation. *Acta Med Okayama* 47 : 121 - 127, 1993
- 18) 山本 格 : 新規安定型アスコルビン酸誘導体2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acidの生理活性とその有用性-免疫賦活におけるビタミンCと神経成長因子の相乗効果. *Vitamins (Japan)* 68 : 593 - 600, 1994
- 19) Matsukawa T, Yagi T, Matsuda H : Ascorbic acid 2-glucoside prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in

- supercooled preserved grafts in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 32 : 313 - 317, 2000
- 20) Yamamoto I, Muto N : Bioavailability and Biological activity of L-ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside. *J Nutr Sci Vitaminol* : 161 - 164, 1992
 - 21) Fox IJ, Roy Chowdhury J, Kaufman SS : Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Eng J Med* 338 : 1422 - 1426, 1998
 - 22) Grossmann M, Rader DJ, Muller DWM : A pilot study of ex vivo gene therapy for homologous familial hypercholesterolemia. *Nature Medicine* 1 : 1148 - 1154, 1995
 - 23) Grompe M : Therapeutic liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *Human Cell* 12 : 171 - 180, 1999