

## 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時間冷保存に耐えう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- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid (以下 ascorbic acid-2 glucoside ; AA 2 G) 100  $\mu$  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 Primarily 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 ;

- 1) University of Wisconsin (UW) solution with ascorbic acid 2 glucoside (AA 2 G)
- 2) University of Wisconsin (UW) solution
- 3) 100% fetal bovine serum
- 4) Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum

With the UW solution, viability, plating efficiency and ammonium clearance were well preserved after eight hours of cold-preservation.

UW +AA 2 G solution yielded the best preservation effect.

The use of AA 2 G inhibited activation of caspase-3, resulting in well-preserved cellular ATP levels.

Based on the above results, the UW +AA 2 G solution appeared to be most suitable for cold-preservation of pig hepatocytes. Clinical application for the cold-preservation of human hepatocytes can be expected. (Accepted on August 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(3):199-208, 2002

**Key Words** ① Cold preservation ② Isolated porcine liver cells  
③ Ascorbic acid-2 glucoside ④ University of Wisconsin solution

## 緒 言

新しい肝再生医療の開発は、肝移植ドナー不足の現状から肝再生の資源として正常ヒト肝細胞が最も理想であるが、臓器提供者数は限られており、一定の限界がある。

こうした現況下で再生医療を効果的に発展させるには、ヒト肝細胞に代わる肝細胞の確保が重要となる。そのためには、1) 機能的な細胞の分離手技の確立、2) 効果的な細胞の冷保存・凍結保存法の開発、3) 分離・培養細胞への有効な遺伝子導入技術の樹立<sup>1)</sup>が今後の課題である。そこで、今回、外科的に切除された肝臓から長期に渡り機能的に保たれた肝細胞を分離するための手技の樹立を検討した。その基礎的研究モデルとしてブタ肝より肝細胞を分離し長期間その viability を保つための冷保存液について検討を行った。こうした細胞分離・培養が可能な施設から実際に使用する施設までの間に細胞の機能を保持した効果的な輸送を可能にする保存液の開発が必要となる。イヌ分離豚島での保存実験でその有効性が報告されている<sup>2)</sup>移植用臓器保存液である University of Wisconsin solution (以下、UW 液)<sup>3),4)</sup>と強力な抗酸化剤である vitamin C 配糖体である ascorbic acid-2 gluco-

side (以下、AA2G)<sup>5)~10)</sup>の組み合わせに本研究では注目した。本邦での現有の交通手段の利用を前提に、国内各地への輸送に十分な時間を考慮し、8時間の冷保存に十分耐えうる AA 2 G 添加 UW 液を作製し新鮮分離ブタ肝細胞の viability・代謝機能への保護効果を検討した。安定型の vitamin C を供給できる AA 2 G は冷保存中の肝細胞の caspase-3 の活性化を抑制することでアポトーシスを抑制する効果と細胞内エネルギー ATP 量を維持する効果からブタ肝細胞の機能が良好に保持された。AA 2 G は有効な細胞保存剤として今後のヒト細胞療法の発展に寄与できる可能性がある。また、本研究では効果的な切除肝からの viability の高い肝細胞の分離法の工夫についても検討したのでその結果も併せて報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1) ブタ肝細胞の分離

ラージホワイト種の雄性ブタ (体重15~20kg) を用いた。筋注用ケタラル1.5 ml を注射し鎮静後、耳介静脈を確保しイソゾール 5 mg/kg、マスキュラックス 1 mg/kg を静脈内投与することで筋弛緩を得た。気管内送管後、人工呼吸器による調節呼吸下にセボフルレンによる全身

Table 1. ブタ肝細胞分離の還流法

1. 雄性ブタ (体重15~20kg) の麻酔(ケタラール1.5ml筋注)
2. 気管内送管後、人工呼吸器による調節呼吸下にセボフルレンによる全身麻酔で開腹
3. 1次灌流液にて還流
4. 2次灌流液にて還流
5. dispase液にて還流
6. collagenase液にて還流
7. 低速遠心 (50g, 2min) 後洗浄液に再分散を3回繰り返す
8. 低速遠心 (50g, 2min) 後 $1 \times 10^6$ /mlになる様に各保存液に再分散する

麻酔で開腹手術を施行した。ブタの肝外側を外科的に切除 (約80g) し、切除断面門脈および肝静脈より灌流を行った。肝細胞分離は Table 1 に示す手順で行った<sup>11)</sup>。まず、摘出された肝臓を1次灌流液 (NaCl 9 g/L, KCl 0.42 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g/L, glucose 0.9 g/L, hepes 4.78 g/L, EGTA 0.37 g/L) にて灌流し、引き続き EGTA をのぞいた2次灌流液 (NaCl 9 g/L, KCl 0.42 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g/L, glucose 0.9 g/L, hepes 4.78 g/L) で灌流した。その後、肝臓を39℃に加温しつつ、dispase 液 (NaCl 9 g/L, KCl 0.42 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g/L, glucose 0.9 g/L, hepes 4.78 g/L, dispase 8.4 g/L (合同酒精, 東京, 日本)) で灌流し、最後に collagenase 液 (NaCl 9 g/L, KCl 0.42 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g/L, glucose 0.9 g/L, hepes 4.78 g/L, collagenase 0.5 g/L (新田ゼラチン, 大阪, 日本) CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 0.55 g/L) で灌流した。灌流後肝被膜を細切し肝細胞を collagenase 液中で分散, 細胞浮遊液を75 μm メッシュで濾過し、これを低速遠心 (50g, 2分) した。ペレットを一次洗浄液 (NaCl 7 g/L, KCl 0.46 g/L, CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 0.13 g/L, hepes 2.38 g/L, BSA (SIGMA, St. Louis, MO) 1.0 g/L, MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, DNase I (Roche Mannheim Germany) 0.1g/L) に再拡散して更に低速遠心 (50g, 75秒) した。この操作を3回繰り返した後二次洗浄液 (NaCl 7g/L, KCl 0.46 g/L, CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 0.13 g/L, hepes 2.38 g/L, BSA (SIGMA, St. Louis, MO) 1.0 g/L, MgCl<sub>2</sub>6 H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, MgSO<sub>4</sub>7 H<sub>2</sub>O 0.1g/L) に分散した。分離されたブタ肝細胞は、肝細胞培養培地 (Williams' E medium (SIGMA, St. Louis, MO), 10% fetal bovin serum, insulin (GIBCOBRL 13007-018)  $1 \times 10^{-7}$  mol/L, EGF (SIGMA, St. Louis, MO) 25 μg/L, dexametazone (SIGMA, St. Louis, MO)

$1 \times 10^{-6}$  mol/L, penicillin  $1 \times 10^5$  U/L streptomycin  $1 \times 10^5$  μg/L) に拡散し、コラーゲン I コート 6-well plate (BIOCOAT, Becton Dickinson Labware) に播種 ( $5 \times 10^5$  cell/well) した。18時間37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。viability が90%以上のものを以下の実験に提供した。

## 2) ブタ肝細胞の冷保存の実験群

ブタ肝細胞の冷保存実験のために以下の4種類の保存液を使用した。(1) UW 液に vitamin C の誘導体である AA 2 G 100 μg/ml を添加した保存液 (UW 液 + AA 2 G) (A 群) (2) University of Wisconsin solution (UW) 液 (ViaSpan, 藤沢薬品工業 (株) より提供) (B 群) (3) 100% fetal bovine serum (以下, FBS) (SIGMA, St. Louis, MO) (C 群), (4) Dulbecco's modified Eagle's medium (以下, DMEM) (SIGMA, St. Louis, MO) に10% FBS を入れた保存液 (D 群) と4群に分け、 $1 \times 10^6$  cells/ml になるように細胞を各保存液で懸濁し8時間冷保存した。

## 3) 肝細胞の viability

trypan blue exclusion test にて8時間冷保存後の細胞の viability と生細胞数を測定した。

## 4) 肝細胞の膜安定性評価

各種濃度の Triton-X (CN Biocience, Inc. (CALBIOCHEM) USA) を入れた PBS の中に肝細胞を5分間再懸濁した後に、溶液中への lactate dehydrogenase (以下 LDH) の漏出量を測定した (ELISA, Becton Dickinson Labware)。

## 5) 肝細胞の播種効率 (plating efficiency) の検討

3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (SIGMA, St. Louis, MO) にて測定した。すなわち、6-well のプレートに  $1 \times 10^6$  cells/well となるように細胞を播種し、10% FCS を含む W-E medium (SIGMA, St. Louis, MO) にて培養を行った。MTT 試薬を培養中に加え3時間、37度で培養した後、イソプロパノールで溶出し

吸光度 (450nm) (Multiskan MS, Lifescience International, Japan) を測定した。

### 6) 肝細胞の培養形態の検討

6-well のプレートに  $1 \times 10^6$  cells/well となるように細胞を播種し, 10% FCS を含む W-E medium にて培養を一週間施行した。約 8 時間ごとに, 定期的に細胞の培養状態を位相顕微鏡下にて観察した。

### 7) アンモニア代謝能の測定

8 時間冷保存後のブタ肝細胞の機能を評価するために, アンモニア代謝能を測定した。6-well のプレートに  $1 \times 10^6$  cells/well となるように細胞を播種し, 10% FCS を含む W-E medium にて培養を行った。ブタ肝細胞培地に硫酸アンモニウム (0.56 mM) を負荷し, 24 時間後の培地のアンモニアの濃度を計測 (富士ドライケムスライド (Fuji Co., Tokyo, Japan)) し, 代謝率を算出した。

### 8) Western blot 法による caspase-3 発現の検討

各種冷保存液の抗アポトーシス効果を検討するために 8 時間冷保存後のブタ肝細胞から蛋白質を抽出して活性型 caspase-3 発現量の変化を検討した。手技は, 阪口らの手法に準じた<sup>12)</sup>。すなわち, 細胞を cell lysis buffer で溶解後, protein sample を 1 レーンあたり  $30 \mu\text{g}$  に調整し 12% SDS-PAGE で電気泳動した。これをニトロセルロース膜 (Amersham, Japan) へ transfer した後, スキムミルクで blocking を行い, 続いてラビット抗 caspase-3 ポリクローナル抗体 (1:100) (Calbiochem) を使用し 1 次抗体反応, horseradish peroxidase 標識マウス抗ラビット IgG 抗体 (1:2000) (MBL) を使用し 2 次抗体反応を行った。ECL detection kit (Amersham) を使用し発色を行った。クマシー染色にて当量の蛋白が泳動されたことを確認した。泳動後検出されたバンドの濃度は NIHimage Ver. 1.62 にて定量的に評価した。

### 9) 細胞内 ATP 量の測定

生物化学発光法<sup>13)</sup>を用いて測定した。各保存液で保存後の細胞を遠心 (50 g, 2 分) し, PBS にて washing した後 ATP releasing reagent (Labo Science, Tokyo) をペレットと同量加え, ATP を放出させた。さらに Luciferinluciferase (ルシフェール LU, キッコマン) をペレットと同量加えて 560 nm の発光量を Lumiphto meter (TD-4000, Labo Science, Tokyo) で測定した。

### 10) 有意差検定

有意差検定には, Dunnett 検定を施行した。

## 結 果

#### 1) 分離直後のブタ肝細胞の viability

ブタの肝細胞の分離を計 4 回施行した。分離直後のブタ肝細胞の viability は平均  $95.5 \pm 2.5\%$  であった。還流中の切除ブタ肝 (Fig. 1-A) 及び trypan blue exclusion test を行った肝細胞 (Fig. 1-B) を示す。

#### 2) 各保存液の 8 時間保存後の viability

AA2G 添加 UW 液が  $94.9 \pm 2.1\%$  (A 群, N = 4), UW 液が  $90.1 \pm 2.8\%$  (B 群, N=4), 100% FCS が  $77.3 \pm 3.8\%$  (C 群, N = 4), 10% FCS 添加 DMEM (D 群, N = 4) が  $70.0 \pm 4.1\%$  であり, UW 液を使用した A 群と B 群で有意に良好な viability が保持された。AA 2 G 添加 UW 液では, UW 液単独と有意差認められないもの肝細胞の viability が一番良好で, 分離直後

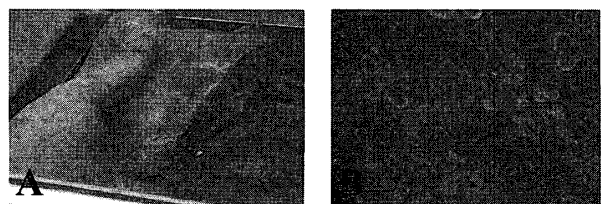
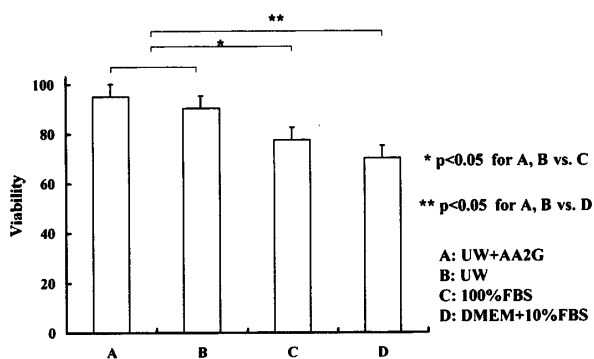
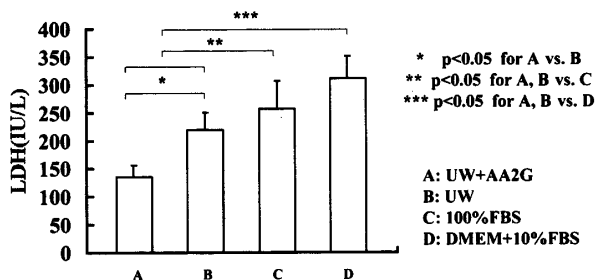


Fig. 1. ブタ肝細胞分離  
外科的に切除された肝臓の最大断面から脈管にピペットを挿入して還流を施行した (A)。分離肝細胞の viability は平均で  $95.5 \pm 2.5\%$  と極めて良好であった (B)。



**Fig. 2.** 各保存液での8時間保存後のブタ肝細胞のviabilityの比較  
AA 2 G 添加 UW 液が $94.9 \pm 2.1\%$  (A 群), UW 液が $90.1 \pm 2.8\%$  (B 群), 100% FCS が $77.3 \pm 3.8\%$  (C 群), 10% FCS 添加 DMEM (D 群) が $70.0 \pm 4.1\%$  と UW 液を使用した A・B 群で統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ) に良好な viability が保持された。



**Fig. 3.** LDH の漏出  
各保存液中への LDH の漏出量を測定したところ AA 2 G 添加 UW 液が UW 液単独に比べて LDH のリークが有意 ( $p < 0.05$ ) に少なかった。また, UW 液を使用した A・B 群では, 他の保存液に比べて LDH 漏出が有意に少ない結果であった ( $p < 0.05$ )。

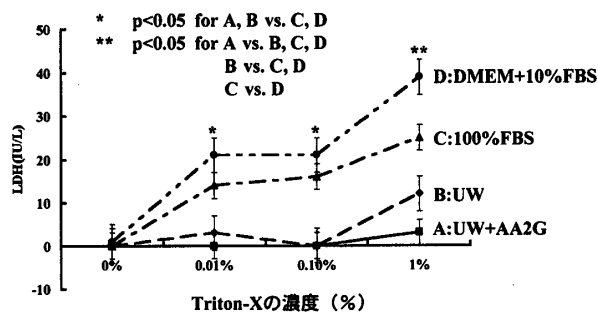
と同程度の viability が保持されていた (Fig. 2)。

### 3) LDH の漏出

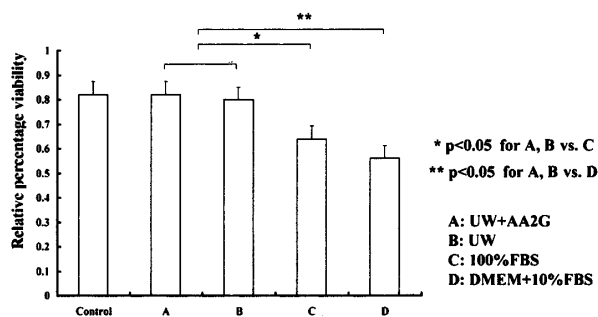
各保存液中への LDH の漏出量を測定したところ AA2G 添加 UW 液が UW 液単独に比べて LDH の漏出が有意に少なかった。また, UW 液を使用した A・B 群では, 他の保存液に比べて LDH 漏出が有意に少ない結果であった ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3)。

### 4) Triton-X 存在下の冷保存肝細胞の膜安定性

各濃度の Triton-X 存在下の PBS の中に各保存液で8時間保存した後の肝細胞を5分間再懸濁し, 溶液中への LDH の漏出量を測定した。



**Fig. 4.** 冷保存肝細胞の膜安定性  
各濃度の Triton-X を使用して, 冷保存ブタ肝細胞の膜安定性を評価した。AA2G 添加 UW 液で保存した肝細胞の LDH 漏出量が他の保存液で保存された肝細胞に比べて有意に少なかった。



**Fig. 5.** 8時間冷保存後の plating efficiency  
MTT-assay にてブタ肝細胞の plating efficiency を検討したところ, UW 液使用群 (A, B) では, relative percentage viability がそれぞれ $0.82 \pm 0.05$ ,  $0.80 \pm 0.06$ と, コントロールの $0.82 \pm 0.05$ と同程度の高い数値となり, 良好な細胞接着が確認された。

AA 2 G 添加 UW 液で保存した肝細胞の LDH 漏出量が他の保存液で保存された肝細胞に比べて有意に少なかった。これは, AA 2 G 添加 UW 液に保存された肝細胞の細胞膜の安定性が一番高いことを示しており, 高い viability が保持されていることを支持する結果である (Fig. 4)。

### 5) 8時間冷保存後の plating efficiency

UW 液使用群 A ( $0.81 \pm 0.05$ ), B ( $0.80 \pm 0.06$ ) で良好な relative percentage viability が認められ細胞接着が優れていることが確認された。当該数値は, control として使用した分離直後のブタ肝細胞の $0.82 \pm 0.05$ と遜色ないものであった。AA 2 G 添加 UW 液群では有意差はないものの, UW 液単独群に比較して良好であった (Fig. 5)。

6) 8時間冷保存肝細胞の培養状態

8時間冷保存した豚肝細胞の培養状態を播種後一週間、位相差顕微鏡下に観察した。培養72時間後の観察所見を示す (Fig. 6)。AA 2 G 添加 UW 液保存群では、肝細胞は良好にプレートに接着し、典型的な敷石状形態を呈していた (Fig. 6-A)。UW 液単独群比較的良好である (Fig. 6-B) が、100% FCS では肝細胞の接着率は不良 (Fig. 6-C) で、特に10% FCS 添加 DMEM を使用した D 群では中等度に浮遊した死細胞を認めた (Fig. 6-D)。

7) 8時間冷保存肝細胞のアンモニア代謝能

8時間冷保存したブタ肝細胞の機能を評価するためにアンモニア代謝能を測定した。アンモニア付加後12時間目の残存率が AA 2 G 添加 UW 液 (A 群) が  $17.5 \pm 6.2\%$ 、UW 液 (B 群) が  $23.9 \pm 5.9\%$ 、100% FCS (C 群) が  $40.3 \pm 6.8\%$ 、10% FCS 添加 DMEM (D 群) が  $56.2 \pm 5.8\%$ 、付加後24時間目の残存率は A 群が  $14.6 \pm 5.2\%$ 、B 群が  $18.2 \pm 4.8\%$ 、C 群が  $26.6 \pm 5.1\%$ 、D 群が  $34.0 \pm 4.9\%$ 、付加後48時間目の残存率は A 群が  $3.0 \pm 3.9\%$ 、B 群が  $6.2 \pm 4.2\%$ 、C 群が  $13.2 \pm 5.1\%$ 、D 群が  $26.9 \pm 4.6\%$ 、更に付加後72時間目の残存率が A 群が  $0.3 \pm 2.3\%$ 、B 群が  $1.2 \pm 3.3\%$ 、C 群が  $11.8 \pm 5.3\%$ 、D 群が  $21.2 \pm 5.0\%$  であった (Fig. 7)。いずれの時間帯でも UW 液使用群で保存されたブタ肝細胞のアンモニアクリアランス活性が優れていた。

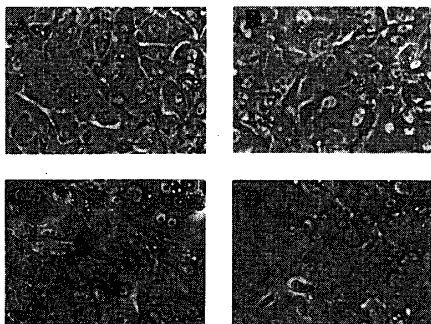


Fig. 6. 播種後48時間目のブタ肝細胞の位相差顕微鏡像  
UW 液保存群では、肝細胞は良好にプレートに接着し典型的な敷石状形態を呈していた (A, B) が、UW 液非使用群の C, D では肝細胞の接着率は不良で中等度に浮遊した死細胞を認めた (D)。

8) Western blot 法による caspase-3の発現

precaspase-3の発現量は A 群が一番高かった。B 群, C 群, D 群では precaspase-3の発現量はきわめて微量であった。活性型 caspase-3の発現量は control として使用した分離直後の肝細胞では検出されなかった。A 群, B 群, C 群, D 群の順で活性型 caspase-3の発現量が増加した (NIHimage 解析では、A 群を 1 とすると B 群が1.7, C 群が1.9, D 群が2.8であった)。当該結果は、UW 液使用群では、活性型 caspase-3の誘導が抑制されることで、抗アポトーシス効果が発揮された事を示している。(Fig. 8)

9) 細胞内 ATP 量の測定

新鮮分離肝細胞の ATP 量は、 $4.8 \pm 0.8 \times 10^{-15}$  mol/cells であった。8時間保存後の細胞内 ATP 量は、新鮮分離肝細胞のそれと比較検討すると、AA2G 添加 UW 液 (A 群) が  $81.8 \pm 8.2\%$ 、UW 液 (B 群) が  $76.2 \pm 7.5\%$ 、100% FCS

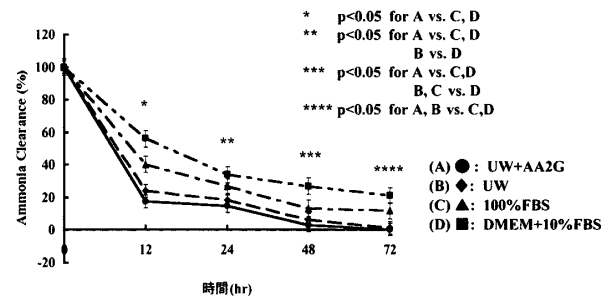


Fig. 7. 8時間冷保存肝細胞のアンモニア代謝能  
ブタ肝細胞の機能を評価するために、培養液中にアンモニアを添加して除去率を検討した。アンモニア付加後12時間、24時間、48時間、72時間後のアンモニアクリアランス活性は UW 液使用群で優れていた。

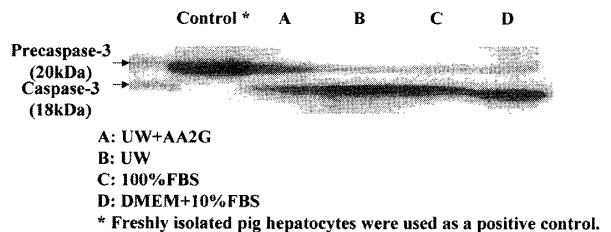


Fig. 8. Western blot 法による caspase-3の発現  
precaspase-3発現量は A 群, B 群, C 群, D 群の順で減少した。一方、活性型 caspase-3の発現量は D 群で最も高く、C 群, B 群, A 群とその発現量は減少した。positive control として分離直後の肝細胞を使用した。

(C群)が $60.8 \pm 6.9\%$ 、10% FCS 添加 DMEM (D群)が $58.2 \pm 7.6\%$ と、A群でATP量が一番多い傾向にあった(各群での有意差は認めなかった)。

## 考 察

肝再生医療を進展させるために限られた提供臓器を有効利用することが重要である。このためには1)肝細胞の効率的な分離、2)効果的な細胞の冷保存・凍結保存法の確立、3)細胞への有効な遺伝子導入技術の樹立が解決されなければならない。そこで、この目的を達成するための実験モデルとして、外科的切除を行ったブタ肝細胞を使用し当該細胞の8時間冷保存に関する基礎的研究を行った。臓器保存液である UW 液を使用することで、有意に冷保存ブタ肝細胞の viability, plating efficiency, アンモニア代謝能を維持されるとの結果を得た。

UW 液は、1987年にウイスコンシン大学の Belzer らによって開発された画期的な臓器保存液であり、現在もこれを凌ぐものは開発されていない<sup>3),4),14)</sup>。それまでの臓器保存液としては、細胞外液組成に類似した電解質液や自家血が用いられていたが、低温下では細胞の Na/K-ATPase Ca/Mg-ATPase の活動が停止し、Na/K および Ca/Mg ポンプが作動しなくなるため細胞浮腫が発生していた。Belzer らは、保存液を開発するにあたり、低温による細胞浮腫・細胞内アシドーシスの発生防止、ATP の再合成を促進することを目標とした。そこで、UW 液には、1) lactobionate (細胞の浮腫とアシドーシスの発生を防止)、2) 三糖類の raffinose (使用膠質浸透圧を上げる)、3) glutathione, adenosine, allopurinol (ATP の再合成を促進し活性酸素障害を防止する)、4) 高 K・低 Na の細胞内液型の電解質組成が採用されている<sup>4),15)</sup>。今回の検討では、臓器ばかりでなく分離した肝細胞の冷保存にも UW 液が有効であることが認められた。その機序の一つとして、活性型 caspase-3 の誘導が抑制されることで、抗アポ

トーシス効果が発揮されていた。また、細胞の ATP 量を測定したところ、UW 液使用群では、有意に高い ATP 量が保持されていた。

次に、こうした UW 液の効果を増強するために vitamin C の誘導体である AA 2 G の添加を行って UW 液単独の場合より更に細胞保護効果が高くなる事を確認した。

vitamin に関する移植臓器の保存実験では、これまで antioxidant vitamin や EPC-K 1 などが阻血再還流障害を軽減させ、移植臓器の保護に有効であることが報告されてきた<sup>16),17)</sup>。アスコルビン酸 (以下、AsA) は、従来、その強力な還元力により阻血・再還流障害を抑制するとされ、臓器移植に有用であると考えられていたが、化学的に非常に不安定で水への溶解や空気への暴露で急速に不活化されるために臓器保存液への応用が困難であった。そこで、酸化されにくく安定で、生体内に吸収されたとき  $\alpha$ -glucosidase の作用にて初めて AsA とグルコースに分解されその生理活性を発揮するという特徴をもつ AA2G が開発された<sup>6)</sup>。これまでの実験結果から AA 2 G は少量でも細胞保護効果を有し、生体毒性もなくその徐放的作用機序から持続的投与も可能であるため臨床応用が期待されている<sup>6),18)</sup>。AA 2 G は、 $\alpha$ -glucosidase や cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) により cyclomaltodextrin などの glucose を AsA に transglucosylation することにより合成される<sup>6)~9)</sup>。それ自身は還元性を示さず AsA と比較すると熱や酸化的条件下で極めて安定な AsA 配糖体である特徴を有する<sup>6),18)</sup>。AA 2 G は生体に投与された場合、速やかに組織中の  $\alpha$ -glucosidase にて代謝され活性型 AsA を遊離し作用を発揮する。従って、これまでの vitamin C 製剤と異なり、AA 2 G は酸化されにくく長期の保存も簡単で、各種ミネラルとの共存下でも安定であるため他剤との混合も可能である<sup>6),18)</sup>。こうした特徴から、我々の研究グループは、AA 2 G の臓器移植への応用の可能性について検討を重ね、特に阻血再還流障害時の移植心臓や肝臓グラフトの障害を AA 2 G が軽減

することをこれまでに報告してきた<sup>17),19)</sup>。AA 2Gは、その強力な還元力により、活性酸素によってもたらされる臓器障害を予防するばかりでなく hydroxy radical などの reactive oxygen species (以下, ROS) から臓器を保護し、また ROS を scavenge すると考えられている<sup>18),20)</sup>。そこで、今回の検討では、100  $\mu$ g/ml の AA 2G を UW 液に添加することで冷保存後の viability, plating efficiency, 細胞膜の安定性, アンモニア代謝能の面のいずれの点でも有用であることが示された。その理由として分子生物学的な検討から、活性型 caspase-3 の誘導が AA 2G 添加 UW 液で抑制されることが確認された。当該結果は、細胞内エネルギーである ATP の保持という形でもって還元されていた。今後更に電子顕微鏡などによる詳細な細胞内ミトコンドリア・Golgi 装置の構造, 細胞膜の微細構造に関する検討を行う予定である。今回の結果は、AA 2G 添加 UW 液の臨床応用を早期に実現するものであり、しいては今後の細胞療法の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

今回の研究は、生きたブタの肝臓外側区域を外科的に切除した後に、collagenase と dispase とを組み合わせることで機能的なブタ肝細胞を入手できることを証明した。これまでラットやマウスなどの小動物では門脈にカニューレションを行い、系統的に経門脈的還流を行うことで肝細胞の分離培養が行われてきたが、中大動物ではこの方法は還流液が極めて多くなるなど現実的には難しい。よって、本研究では、ブタ肝臓の外側区域を外科的に切除し、その後切除肝の還流による脱血、消化酵素の還流、細胞分離を行った。切除肝重量が 100 g までであれば適度な viability (90%以上) を保持した肝細胞を入手できた。肝重量が 120 g を超えると有意な viability (70%以下) の低下を事前検討で認めている。また、事前検討で肝臓の過消化はかえって viability の低下をもたらすことが判明している。当該手技は、ヒトにも十分応用可能な細胞分離の手技と推測され、こうした肝細胞の分離手技の確立は、代謝性肝疾患の治療に自家肝細胞

移植を応用する場合にも有用であると思われる。例えば、ビリルビン包含酵素である UGT (uridine-diphosphate glucucnyl transferase) 欠損患者, low density lipoprotein (LDL) 欠損による高コレステロール血漿の患者では患者自身の肝臓を一部切除して得た分離肝細胞に目的とする治療遺伝子を導入して患者自身に戻す autologous cell transplantation に役立つ可能性があると考えられる<sup>21)~23)</sup>。このような細胞の効果的な分離, 培養, 保存法の確立は、深刻なドナー不足の現状では極めて重要な課題であり、今後の再生医療の発展に重要な意味を持つものと思われる。

## 結 論

- 1) 外側区域切除ブタ肝の collagenase と dispase を使用した 4 step 還流法による肝細胞分離の手技は、viability の高い肝細胞を入手できる極めて有効な方法であった。当該手技は、ヒト肝細胞の分離にも応用できる手技であると推測される。
- 2) 新鮮分離ブタ肝細胞の 8 時間冷保存には AA 2G (100  $\mu$ g/ml) 添加 UW 液は、viability, plating efficiency, 細胞膜の安定性, アンモニア代謝能のいずれの面からも細胞機能を良好に維持することが可能であった。
- 3) 冷保存肝細胞で活性型 caspase-3 の誘導が AA 2G 添加 UW 液で抑制されることが確認された。さらに、細胞内 ATP 量の有意な保持が AA 2G 添加 UW 液保存肝細胞で認められた。
- 4) 移植臓器保存液である UW 液と強力な抗酸化剤である AA 2G の組み合わせは、細胞の輸送に有効な保存液であり、今後の細胞療法の発展に寄与できるものと考えられた。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御指導御校閲を頂いた川崎医科大学消化器 I 内科の山本晋一郎教授、実験について具体的に手技等の御指導を頂いた岡山大学大学



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  $\alpha$ -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed  $\alpha$ -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  $\alpha$ -glucoside. Purification and properties of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -glucoside. *Agric Biol Chem* 54 : 1697 – 1703, 1990
- 9) Aga H, Yoneyama M, Sakai S, Yamamoto I : Synthesis of 2-O- $\alpha$ -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- $\alpha$ -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 iscmia/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- $\alpha$ -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