

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 ;

- 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