

主論文

Protective effects of a hibernation-inducer on hepatocyte injury induced by hypothermic preservation

冷保存による肝細胞障害に対する冬眠誘導物質の保護効果の検討

Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery. 2007; 14: 509-513.

犬尾浩之、江口 晋、矢永勝彦、濱田貴幸、山之内孝彰、奥平定之、兼松隆之

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻

(指導教授：兼松隆之)

【緒言と目的】

ほ乳類の冬眠では臓器障害なく生体の代謝活性のみが抑制されるが、この冬眠誘導には Met-enkephalin というオピオイドのアナログが関与しているといわれている。しかし Met-enkephalin を血中に投与しても速やかに分解酵素により分解されるため、5つのアミノ酸のうち2つを L 型から D 型に置換して分解を受けにくいように人工合成されたのが DADLE(D-Ala²-Leu⁵-enkephalin)である。DADLE には vivo および vitro にて神経・肺・心筋・肝臓などの組織、細胞の生存率改善効果が報告されており、我々も以前、vivo において肝の虚血再灌流障害における DADLE の臓器保護作用について報告した。そこで今回、以前より研究を進めてきた肝細胞を用いた細胞療法臨床応用に向けて肝細胞の冷蔵保存(4℃)の可能性を考え、“冬眠誘導物質”DADLE の臓器保護作用に注目した。実験は DADLE を用い肝細胞の冷保存(4℃)による細胞傷害の軽減の可能性を検討する目的で以下の如く行った。

【対象と方法】

1. 動物； 7～9 週令 雄性 Wistar rat
2. 肝細胞分離； Seglen の EDTA/コラゲナーゼ門脈灌流法。肝細胞 5×10⁶ 個/ml の細胞浮遊液を調整し、1×10⁶ 個/well にて培養。
3. 実験計画；4 時間 37℃DMEM+10%FBS で培養後、次の 24 時間を 4℃DMEM±DADLE にて冷保存。
4. 群別；① DADLE 2.5mg/ml 添加群 (n=12) ② control 群 (n=12)
5. 検討項目
 - ① 肝細胞の生存率：24 時間 4℃冷保存直後の細胞を Trypan blue 法にて測定。
 - ② 肝細胞傷害の測定：24 時間 4℃冷保存後の保存液中の alanine aminotransferase(ALT)濃度、lactate dehydrogenase(LDH)濃度を測定し肝細胞

傷害を評価。

③ 4℃冷保存後、再培養（37℃）後の肝細胞の機能評価

アルブミン産生能（ELISA法）、リドカイン除去能の測定（TMX法）。

【結果】

① 冷保存後の生存率

DADLE 添加群 74.2±8.8% control 群 63.2±7.7% (p<0.005) と冷保存肝細胞の生存率が DADLE 添加により有意に改善された。

② 保存液中の ALT 濃度

DADLE 添加群 139±52.2 IU/l control 群 183±53.2 IU/l (P<0.005)

保存液中の LDH 濃度

DADLE 添加群 984±722 IU/l control 群 5225±5217 IU/l (P<0.005)

24時間冷保存後の保存液中の ALT、LDH いずれも DADLE 添加群で有意に低値を示し、肝細胞に対する保護作用を認めた。

③ DADLE 添加、冷保存後の viable な肝細胞は通常の肝細胞と同等の

アルブミン産生能（DADLE 添加群 2.73±1.38 ug/ml control 群 2.85±1.79 ug/ml）を有していた。リドカイン除去能も同様であった。つまり個々の肝細胞の機能は正常肝細胞と同等で DADLE による毒性は認められなかった。

【考察】

今回の検討では、DADLE により肝細胞の代謝活性が抑制され生存率の改善を認め、また DADLE を添加しても復温することにより肝細胞は傷害されずに、アルブミン産生能、リドカイン除去能が保持されることが明らかとなった。現在行なわれている細胞保存法である -180℃による冷凍保存は再加温の際の強い細胞障害が知られており、ここに DADLE を用いた 4℃冷蔵保存の可能性が明らかとなった。このことは、劇症肝炎など急性疾患治療に対する肝細胞移植や人工肝などの治療において、肝細胞分離より治療までに冷凍することなく、保存が可能であることが示唆された。また、細胞を他期間に運搬などを行う際にも 4℃で冷蔵保存を行なうことにより、いわゆる“冬眠”状態で、培養系を用いずに移送することができると思われる。

今後の課題として DADLE によりどの程度冷保存が延長可能か、添加する回数による有効性、DADLE の適正な濃度の検討、他の活性酸素を抑制する SOD や抗アポトーシス作用を持つ薬剤との比較検討等が必要と考えられた。