



Title	Extracellular calcium protects cultured rat hepatocytes from injury caused by hypothermic preservation
Author(s)	Umeshita, Koji
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36600
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	梅 下 浩 司
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8262 号
学位授与の日付	昭和63年6月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ラット肝細胞低温保存時の細胞傷害に対する細胞外カルシウムの効果
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 鎌田 武信 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

〔目 的〕

肝移植に際しての肝臓の保存時間は、10-12時間に限定されている。肝臓の保存可能時間を延長することは、提供される臓器のより有効な利用につながる。その目的で、保存液の電解質組成・添加薬について種々の工夫がなされている。本研究では、ラット培養肝細胞を用いて、簡便に多種の保存液を比較検討できる低温保存モデルを作成し、保存液の組成、特にカルシウムの効果について検討した。

〔方法ならびに成績〕

体重180-300 g の Wistar 系雄性ラットより Seglen の方法に準じて肝細胞を分離し、培養皿に散布し、48時間培養した。その後、培養皿の培養液を種々の保存液に交換し、0-2℃の冷蔵庫中で12-72時間低温保存した。保存液は、細胞外液に近い組成をもつものとしてラット血清、Williams E 培養液、乳酸リングル液、また細胞内液に近い組成をもつものとして Euro-Collins 液を用いた。Euro-Collins 液に適当量の CaCl_2 または MgCl_2 を加え、種々のカルシウムまたはマグネシウム濃度のものを作成し用いた。また、dimethyl sulfoxide に溶解した α -tocopherol を Euro-Collins 液に加えたものも用いた。低温保存終了後、保存液を再び培養液に交換し、37℃で2時間培養した。その後、肝細胞の viability、過酸化脂質量、グルタチオン量 (GSH+GSSG) を測定した。Viability は Trypan blue exclusion test により、過酸化脂質量は TBA 反応により、またグルタチオン量は酵素的に測定した。18時間保存後の肝細胞の viability は、Euro-Collins 液で保存した場合82%であったのに対し、ラット血清で6%、Williams E 培養液で4%、乳酸リングル液で35%であった。臓器としての肝移植の場合と同じく、この系でも細胞内液型の保存液の方が優ることがわかった。

Euro-Collins 液で24時間保存すると、viability は18%に低下した。0.2, 0.4, 0.8mMのカルシウムを添加すると、viability は、各々、42%, 55%, 96%と有意に改善した。0.2, 0.4, 0.8mMのマグネシウムによっても、各々、25%, 30%, 32%と改善したが、カルシウムほど有効ではなかった。50 μ Mの α -tocopherolを添加すると、viability は96%で、0.8mMのカルシウムとほぼ等しい効果を認めた。肝細胞の過酸化脂質量は、保存前が2.09nmol/ 10^6 cellsであったのに対し、Euro-Collins 液で24時間保存した後には10.76nmol/ 10^6 cells と著明な増加が見られた。0.8mMのカルシウム、又は50 μ Mの α -tocopherolを添加すると、各々、6.11, 4.31nmol/ 10^6 cells と有意に減少した。両者を同時に添加すると、1.56nmol/ 10^6 cells とさらに有意に減少した。

Euro-Collins 液を用いて30時間保存すると、細胞の viability は1%であった。0.8mMのカルシウムを添加すると40%、50 μ Mの α -tocopherolを添加すると35%と、ともに有意に改善が見られた。0.8mMのカルシウムと50 μ Mの α -tocopherolを同時に添加すると、viability は96%とさらに有意に改善した。

保存前に、27.6nmol/ 10^6 cellsであった細胞内のグルタチオン量は、Euro-Collins 液で15時間、24時間保存すると、各々、11.7, 6.0nmol/ 10^6 cells と次第に減少した。0.8mMのカルシウムを添加した場合、各々、26.2, 24.1nmol/ 10^6 cells と、保存前に近いレベルで維持された。

〔総括〕

種々の保存液の効果を、ラット培養肝細胞を用いた低温保存モデルで検討した。

1. 細胞内液型と細胞外液型の保存液を比較すると、前者が優っていた。
2. 現在の臨床肝移植に用いられているEuro-Collins 液にカルシウムを添加することにより、細胞の生存が著明に延長された。カルシウムの効果は、 α -tocopherolを同時添加することによりさらに増強された。カルシウムは、細胞内のグルタチオンの喪失を防ぎ、脂質過酸化を抑制することにより低温傷害を抑えたと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は、初代培養細胞を用いた肝細胞低温保存モデルを作成し、この系において、保存液の電解質組成—特にカルシウム—とビタミンEの効果を検討したものである。

細胞外液に似た組成の保存液と細胞内液に似た組成の保存液を比較すると、保存後の肝細胞の viability は後者がまさっていた。また、細胞内液型の保存液であり、現在臨床で用いられている Euro-Collins 液に 0.2から0.8mMの低濃度カルシウムを添加することにより、viability の改善が認められ、保存に際して見られる過酸化脂質の生成が抑制された。さらに、抗酸化剤であるビタミンEを加えることによっても、脂質過酸化の抑制と viability の改善が見られ、カルシウムとビタミンEには著明な相乗効果が認められた。

本研究は、低温保存による肝細胞傷害と細胞外カルシウムの関係について新しい知見を示した。現在用いられている臓器保存液の改良の可能性を示し、学位に値すると考える。