

**1137 カテキンによる肝細胞保護作用と亜鉛による保護効果の増強**

○加賀谷紀貴<sup>1</sup>, 赤松総一郎<sup>1</sup>, 大八木優<sup>1</sup>, 川瀬雅也<sup>1</sup>, 八木清仁<sup>1</sup>, 田川陽一<sup>2</sup>, 西條了康<sup>3</sup> (<sup>1</sup>阪大・院・薬, <sup>2</sup>信州大・医, <sup>3</sup>香川大・教)

【目的】肝疾患治療において肝臓移植に代わる治療法として、肝細胞移植やパイオ人工肝臓に期待が集まっている。肝細胞移植では、移植細胞が障害が起きた細胞と置き換わって肝再生が進行するため、これらの細胞を更なる障害から保護する必要がある。また、パイオ人工肝臓においても、培養肝細胞の長期機能維持の面から肝細胞の保護が望まれている。これらの観点から、肝保護物質の開発が重要なテーマとなっている。本研究では、新規で安全な肝保護物質の探索を目指し、緑茶カテキンの肝保護効果を明らかにすることを目的とした。さらに、カテキンを金属と錯体形成させることにより、その作用増強を試みた。

【方法】ラット初代培養肝細胞を用い、培養液中に細胞毒（プロモベンゼンもしくはルプラトキシン B）を添加することにより、細胞障害を誘導した。細胞の各細胞毒による処理は 24 時間とした。4 種類の緑茶カテキンを細胞毒と同時に培地に加え、トリパンブルー排除法による生着細胞数評価によりその肝保護効果を検討した。

【結果】細胞計数より、カテキン主成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) および希少カテキンであるエピガロカテキン-3- (3'-O-メチル) ガレートが濃度依存的に両細胞毒から肝細胞を保護した。また、これらの物質はルプラトキシン B により誘導されるアポトーシスを阻害し、カスパーゼ 3 活性も有意に抑制していた。さらに EGCG は、亜鉛との錯体形成によりプロモベンゼンに対する防御作用を増強した。この機構についても、検討を加えたので報告する。

**Enhancing effect of zinc on hepatoprotectivity of epigallocatechin gallate in isolated rat hepatocytes**

○ Noritaka Kagaya<sup>1</sup>, Soh-ichiro Akamatsu<sup>1</sup>, Suguru Oyagi<sup>1</sup>, Masaya Kawase<sup>1</sup>, Kiyohito Yagi<sup>1</sup>, Yoh-ichi Tagawa<sup>2</sup>, Ryoyasu Saijo<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Inst. Experimental Animals, Shinshu Univ. Sch. Med., <sup>3</sup>Fac. Education, Kagawa Univ.)

**Key words** EGCG, 肝保護, カスパーゼ, 亜鉛, スカベンジャー

**1139 肝星細胞による肝実質細胞の機能制御**

○野田恵美<sup>1</sup>, 東山真二<sup>1</sup>, 村岡聡子<sup>1</sup>, 宇山直樹<sup>2</sup>, 河田則文<sup>3</sup>, 川瀬雅也<sup>1</sup>, 八木清仁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院・薬, <sup>2</sup>京大・医・消化器外科, <sup>3</sup>大阪市大院・肝胆脾病態内科学)

【目的】パイオ人工肝臓開発のためには、肝細胞の増殖能や機能を高め、それらを維持することが重要な課題となる。我々は、肝細胞の機能維持において肝星細胞との相互作用が重要であると考え、分離した肝細胞と肝星細胞を共培養し、肝細胞の機能維持について検討した。

【方法及び結果】肝細胞単独培養 (1×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) (コントロール)、肝星細胞 (2×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) を播種し数日培養後、その上から肝細胞を播種した混合培養、および culture insert を用いて細胞間接触を伴わない共培養を行った。肝星細胞の培養は播種 24 時間までは 10% 血清添加 William's Medium E を用い、それ以降は全て血清無添加で行った。その結果、接着細胞数はコントロールで経時的に減少するのに対して、混合培養では維持された。しかし肝特異的機能であるウレア合成能及びアルブミン分泌能は、コントロールに比べ混合培養では低下した。BrdU 標識により細胞増殖の測定を行った結果、混合培養において肝細胞は S 期に入り増殖へ向かっているため、肝特異的機能が低下することが示唆された。一方共培養では、接着細胞数についてコントロールと有意差がなかったが、ウレア合成能及びアルブミン分泌能はコントロールより著しく高い値を示した。細胞間接触を伴わない共培養において肝細胞の機能が維持されたため、この結果は肝星細胞が分泌する液性因子による効果であることが示唆された。そこで共培養の培養上清のプロテオーム解析を行ったところ、肝細胞、肝星細胞それぞれの単独培養に比べ、大きく発現量が増加したタンパク質が確認され、これらのタンパク質について現在検討中である。

【結論】パイオ人工肝臓構築には、高い機能を維持した肝細胞が必要である。従って、肝星細胞を肝細胞とは空間的に独立した担体を用いて共培養することにより、高機能を発現するパイオ人工肝臓の開発が期待される。

**Regulation of hepatocyte functions by hepatic stellate cells**

○ Megumi Noda<sup>1</sup>, Shinji Higashiyama<sup>1</sup>, Satoko Muraoka<sup>1</sup>, Naoki Uyama<sup>2</sup>, Norifumi Kawada<sup>3</sup>, Masaya Kawase<sup>1</sup>, Kiyohito Yagi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Gastroenterological Surgery, Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Dept. Hepatol., Grad. Sch. Med., Osaka City Univ.)

**Key words** パイオ人工肝臓, 肝細胞, 肝星細胞, 共培養, 肝機能, プロテオーム解析

**1138 酸性グリコプロテインによる肝細胞保護作用**

○赤松総一郎<sup>1</sup>, 加賀谷紀貴<sup>1</sup>, 大八木優<sup>1</sup>, 田川陽一<sup>2</sup>, 川瀬雅也<sup>1</sup>, 八木清仁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院・薬, <sup>2</sup>信州大院・医)

【目的】これまで重篤な肝疾患患者に対して、部分肝移植やパイオ人工肝等の治療法が考案されている。これらの治療法において、肝細胞の長期機能維持のためには様々な外的障害からの細胞保護が必要である。また、肝疾患時における薬物投与の際にも併用薬としての肝保護物質の開発は重要である。このような観点から、肝保護物質の開発が大きなテーマとなっている。

今回、我々は急性時の炎症に反応して肝臓で合成される血清タンパクである、 $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) の肝保護効果を検討した。

【方法及び結果】10% 血清入り WE 培地で初代培養したラット肝細胞に対して、単離して 24 時間後の培地交換の際に、プロモベンゼン (BB) 1mM 及び肝保護物質として AGP (0.1mg/ml) を加えた。その後、添加溶液を加えてから 24 時間後に、生細胞数を計測した。その結果、AGP は肝細胞に対して保護効果を示した。

次に、AGP の濃度を 0.5, 0.1, 0.01mg/ml と変化させて保護効果を測定した。その結果、AGP は 0.01mg/ml では保護効果を示さなかった。0.5mg/ml では細胞毒性を示したため、AGP は肝細胞保護効果において最適濃度をもつと考えられる。

次に、ラット初代培養肝細胞を用いて、AGP (0.1mg/ml) による肝細胞長期培養に対する効果を播種後 1, 3, 6 日後の生細胞数を計測することで検討した。その結果、AGP 投与によって、肝細胞の寿命が延長された。AGP の糖鎖末端のシアル酸を取り除いた場合、保護効果を示さなかった。

これらの結果より、AGP は外的な障害による細胞死と長期培養時における細胞死の両方に対して保護効果を示すことが *in vitro* において示された。

**Protection of hepatocytes from cytotoxin by  $\alpha$ 1-acid glycoprotein**

○ Souichirou Akamatsu<sup>1</sup>, Noritaka Kagaya<sup>1</sup>, Suguru Oyagi<sup>1</sup>, Yoh-ichi Tagawa<sup>2</sup>, Masaya Kawase<sup>1</sup>, Kiyohito Yagi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Osaka Univ., <sup>2</sup>Shinsyu. Univ. Sch. Med.)

**Key words**  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, protection, hepatocyte, cytotoxin, sialic acid, bromo benzene

**1140 肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養による肝機能維持**

○磯田勝広, 竹田昌史, 川瀬雅也, 八木清仁 (阪大院・薬)

【目的】近年、致命的な肝機能障害の治療のためにパイオ人工肝臓の開発が進められているが、肝細胞は *in vitro* において数日間のうちに増殖能と肝機能を失うことが問題となっている。骨髄間質細胞は、生体内では様々なサイトカインを分泌し造血系細胞の増殖・分化に影響を与えている。そこで我々は、骨髄間質細胞の分泌するサイトカインが肝細胞の機能発現に影響を与えることを期待し、肝細胞と骨髄間質細胞の共培養を試みた。

【方法及び結果】肝細胞と骨髄細胞は、SD 系雄性ラット (6~8 週齢) より採取した。骨髄細胞は 10% FBS を含む  $\alpha$ -MEM 培地を用い Culture Insert (FALCON) に播種し、24h 培養した後培地を交換し、その後は 2 日毎に培地を交換し骨髄間質細胞層を作成した。また、骨髄間質細胞層から Williams' E 培地を用い馴化培地を作成した。肝細胞は、Williams' E 培地を用い 6 穴プレートに播種し Culture Insert 上の骨髄間質細胞層と共培養をおこなった。また、骨髄間質細胞の馴化培地を用い肝細胞単独培養をおこなった。各々の培養は 6 日間おこなった。Williams' E 培地を用いた肝細胞単独培養の尿素合成能は、培養期間中に顕著に減少した。共培養及び骨髄間質細胞の馴化培地を用い培養した肝細胞の尿素合成能は、培養期間中一定であった。この結果より、骨髄間質細胞は肝細胞の機能を維持する因子を分泌していることが明らかとなった。肝細胞と骨髄間質細胞の共培養は、高機能パイオ人工肝臓の開発に有用であると考えられる。

**Maintenance of hepatic function by co-culture of hepatocytes and bone marrow stromal cells**

○ Katsuhiko Isoda, Masashi Takeda, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** Hepatocytes, Bone marrow stromal cell, co-culture, hepatic function, Bioartificial liver, Urea synthesis