

肝臓の免疫学的特異性に関する研究

(59480268)

昭和60年度科学研究費補助金(一般研究(B))研究成果報告書

昭和61年3月

研究代表者 江 端 英 隆  
(旭川医科大学医学部)

## は し が き

同所性肝移植における donor と recipient との組み合わせ（ラット）によっては移植肝の永久生着が免疫抑制剤の投与なしに得られ、さらに一度肝が生着すると、同じ donor からの他の臓器も受け入れるようになることが明らかにされてきた。肝以外の臓器移植では、常に急性拒絶されるのに、なぜ移植肝のみが生着できるかについては現在まだ解明されていない。そこで我々は、肝の構成細胞の抗原性について検索し、肝の免疫原性の観点から、肝のもつ免疫学的特異性を明らかにしようとした。すなわち、minor および major な組織適合抗原の違うラット間において、種々の免疫抑制法を移植細胞および recipient に加え、それらの脾内生着の成績から肝の構成細胞の免疫原性を検索しようとした。

### 研 究 組 織

研究代表者： 江端英隆 （旭川医科大学医学部，助教授）

研究分担者： 及川 巖 （旭川医科大学医学部，助手）

### 研 究 経 費

昭和59年度 3,400千円

昭和60年度 1,800千円

計 5,200千円

研 究 発 表

(1)学会誌等（発表者、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日）

1. Hidetaka Ebata, Michio Mito: Intrasplenic Fetal Rat Hepatic Tissue Isotransplantation. Transplantation, Vol. 39, No. 1, p. 77, 1985.
2. Hidetaka Ebata, Iwao Oikawa, Michio Mito: Rejection of Allogeneic Hepatocytes and Fetal Hepatic Tissue Transplanted into the Rat Spleen. Transplantation, Vol. 39, No. 2, p. 221, 1985.

(2)口頭発表（発表者、テーマ名、学会等名、年月日）

1. 江端英隆，水戸勉郎： 細胞および組織片移植の現況と問題点： 肝細胞および組織片の移植。  
第18回日本移植学会総会シンポジウム、昭和57年9月10日。
2. 及川 巖，江端英隆，水戸勉郎，他： 肝の免疫学的特異性に関する研究 一肝細胞・胎児肝脾内移植による一。  
第83回日本外科学会総会、昭和58年3月16日。
3. 及川 巖，江端英隆，水戸勉郎，他： 肝の免疫学的特異性に関する研究 一肝細胞・胎児肝の脾内移植による一。  
第19回日本移植学会総会、昭和58年9月16日。
4. 澤 雅之，及川 巖，江端英隆，他： 胎児肝の凍結保存とその影響に関する研究。  
第20回日本肝臓学会総会、昭和59年7月6日。

5. 及川 巖, 江端英隆, 水戸勉郎, 他: サイクロスポリンAと術前紫外線照射血液輸血に対する同種肝細胞脾内移植への生着延命効果について.

第20回日本移植学会総会、昭和59年9月21日.

6. 澤 雅之, 江端英隆, 及川 巖, 他: 脾内胎児肝移植法を用いた肝再生の研究 —宿主ラット Eck瘻および肝切除の影響—.

第21回日本肝臓学会総会、昭和60年6月14日.

7. 及川 巖, 江端英隆, 水戸勉郎, 他: Major な組織不適合ラット間の脾内移植肝細胞および胎児肝組織の生着に対するサイクロスポリンAの効果.

第21回日本移植学会総会、昭和60年9月19日.

## 研 究 成 果

Minor および Major な組織適合抗原の異なるラット間において、種の免疫抑制を移植する肝細胞、胎児肝および recipient を行い、脾内移植細胞および組織の生着状態を観察した。そこでまず主な実験材料、方法、および実験群について記し、その後各実験群の成績について述べることにする。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

Donor としては F344 (RT1<sup>l</sup>), Lewis (RT1<sup>l</sup>), ACI (RT1<sup>a</sup>)、Recipient としては WKA (RT1<sup>k</sup>), Lewis (RT1<sup>l</sup>), ACI (RT1<sup>a</sup>) を種々の組み合わせで使用した。

#### 2. 肝細胞の採取法と脾内移植法

肝細胞の遊離は、Berry and Friend の collagenase 消化法による再循環灌流法によった。一個の正常肝より約  $5 \times 10^8$  個の遊離肝細胞が得られ、トリパンブルーによる viability は 80~90% であった。移植は、これらの肝細胞浮遊液 0.2ml (約  $2 \sim 3 \times 10^6$  個) を recipient ラットの脾実質内に直接注入し行った。

#### 3. 胎児肝脾内移植法

胎児の組織片移植は、妊娠 18 および 19 日目の胎児肝を細切し、recipient 1 匹につき胎児肝約 1.5 ケに相当する量を脾内に直接注入移

植した。

#### 4. Recipient への Total Lymphoid Irradiation (TLI) の

##### 方法

Recipient への T L I は、移植 2 週前より 1 日 250 rads. 11 回とした。この総線量は、一般的に骨髄移植時に T L I より寛容を誘導しうる量よりはるかに少ない量である。

#### 5. 肝細胞・胎児肝組織片による感作状態の検索。

肝細胞・胎児肝組織片による recipient の感作状態の検索は、脾内移植 2 週後に donor と同系ラットの皮フ移植により行った。

#### 6. 移植肝細胞への紫外線 (U V) 照射法。

肝細胞への U V 照射は、波長  $304\mu m$  で照射量  $1,000 J/m^2$  を行った。

#### 7. 前投与する donor 血への U V 照射と recipient への輸血法。

前もって採取した donor 血に、波長  $304\mu m$  で  $1,000 J/m^2$  の量の U V を照射し、これをヘマトクリット値として 50% とした血液  $1ml$  を、移植前、週 1 回 3 週にわたって recipient に静脈投与した。

#### 8. サイクロスポリン A (C s A) の短期投与法。

C s A の短期投与は、C s A  $30mg/kg$  を移植日、移植 1, 2 日目の計 3 回、筋肉内に投与した。

### 9. CsA の長期投与法.

CsA の長期投与法は、移植日、移植1, 2日の3日間は30mg/kg とし、その後移植14日までCsA10mg/kg を連続投与した。

## II. 実験群

実験群は以下の如くとした。

1. Donor と recipient の種々の組み合わせにおける肝細胞、胎児肝の脾内生着期間の観察.
2. 術前 recipient ラットに対する T L I (F344→Lewis).
3. 肝細胞への UV 直接照射 (F344→Lewis).
4. donor 血の UV 照射前輸血.
5. CsA の短期投与
6. CsA の長期投与

## III. 成績および考察

1. 3 種類の組み合わせにおける肝細胞、胎児肝の生着期間の比較.

図1に示したように、F344→WKA では肝細胞のみの結果であるが、移植された肝細胞は24時間以内に拒絶された。一方、F344→Lewis間では胎児肝は5~7日、肝細胞は3~5日で拒絶された。さらに近い関係の Wistar→F344では、移植胎児肝、肝細胞とも移植後3週以上脾内に生

	F344 → WKA (RT1 <sup>l</sup> ) (RT1 <sup>k</sup> )	F344 → Lewis (RT1 <sup>l</sup> ) (RT1 <sup>l</sup> )	Wistar → F344 (RT1 <sup>l</sup> ) (RT1 <sup>l</sup> )
胎児肝の拒絶	N D	5 ~ 7 日 (N = 12)	3 週 (N = 30)
肝細胞の拒絶	24 時間以内 (N = 10)	3 ~ 5 日 (N = 15)	2 週 (N = 12)

(ND: not done)

図 1 組織適合抗原の差異による拒絶までの期間

		皮フ生着期間
肝細胞脾内移植群	T L I (-)	6 ~ 8 日 (N = 5)
	T L I (+)	15.8 ± 3.2 日 (N = 5)
胎児肝脾内移植群	T L I (-)	5 日目には全例拒絶 (N = 5)
	T L I (+)	14.5 日 (N = 5)

F344 → 無処置 Lewis への皮フ移植生着期間 8 ~ 9 日 (N = 5)

F344 → T L I のみの Lewis への皮フ移植生着期間 13.5 ± 0.05 日 (N = 5)

図 2 T L I による皮フの生着期間



着した。この結果は、脾内移植肝細胞・胎児肝の生着は組織適合抗原の差異により左右されることを示した。

## 2. Recipient に対する術前 T L I の成績。

最も生着・拒絶期間の制定が容易な F 3 4 4 → Lewis 内での組み合わせで実験を行ったが、肝細胞の脾内生着は正常ラットでは 3 日までであるが、T L I を施行すると 7 日まで延長した。

また、胎児肝は、無処置ラットでは 5 日までの生着であるが、T L I を施行すると肝細胞と同様 7 日まで生着延長した。

以上のように、この実験で照射した T L I の量では、軽度の肝細胞、胎児肝の生着延長となった。

## 3. 移植 3 週後の皮フ移植生着期間。

皮フの生着期間の成績は、図 2 の如くである。T L I を行くと、肝細胞移植群では皮フ生着期間は  $15.8 \pm 3.2$  日であり、肝細胞を移植していない T L I のみの皮フ生着期間  $13.5 \pm 0.05$  日と比較し、有意の差をもって生着は延長した。このことは、T L I により肝細胞が免疫寛容を recipient に誘導したものと考えられた。また胎児肝脾内移植群では、T L I (-) では皮フ片は 5 日目に全例拒絶され、無処置 recipient への皮フ移植の生着期間 (7 ~ 8 日) より明らかに短かく、胎児肝組織片移植が recipient を感作していた。

一方、recipient に T L I を行くと、胎児肝移植群の皮フ片の生着期間は 14.5 日と生着延長したが、これは T L I のみの皮フ生着期間 13.5 日と比較し差はほとんどなく、胎児肝移植では T L I により胎児肝組織に

よる recipient への感作状態が抑えられたと考えられた。

結果 1, 2, 3. の小括

1) 脾内に移植された肝細胞, 胎児肝組織片の生着期間は、Donor — Recipient 間の組織適合度に左右されることが示された。

2) 肝細胞は脾内移植により recipient を感作しないが、胎児肝組織は感作した。

3) T L I は、移植肝細胞, 胎児肝組織片の生着を延長させた。

4) T L I の前処置は、脾内移植肝細胞により寛容状態を誘導し、胎児肝組織片による感作状態を抑制した。

4. U V の肝細胞直接照射による脾内生着への影響。

Donor は F 3 4 4、recipient は Lewis を用いた (minor な組み合わせ)。U V 直接照射肝細胞移植 4 日目では、数多くの生着した肝細胞が認められたが、移植 7 日目では生着した肝細胞は認められなかった。すなわち、今回の U V の照射法では明らかな肝細胞の生着延長効果は認められなかった。

5. U V 照射 donor 血前輸血による効果。

Donor は F 3 4 4、recipient を Lewis とした。U V 照射 F 3 4 4 ラット血液の前輸血群の移植肝細胞は、移植 4 日目にはすでに拒絶されており、非輸血群に比しより早く拒絶された。

#### 結果 4.5 の小括

1) UVを直接照射した肝細胞は、移植4日目まで生着したが、無処置群に比し長く生着しなかった。

2) 紫外線照射血液の前輸血では、移植肝細胞は移植4日までにすでに拒絶された。すなわち、今回の照射量の輸血は recipient を感作した可能性はある。

#### 6. CsA の短期投与による効果.

##### 1) minorな関係での結果

DonorはF344、 recipient は Lewisとした。図3は移植7日目の組織像であるが、核小体、核膜の明瞭な肝細胞が多数認められた。しかし、一部核のない細胞、また細胞質が乏しく細胞膜がほとんど認められない肝細胞もみられた。すなわち、移植7日目は移植肝細胞は拒絶反応にさらされ、健全な細胞と破壊されつつある細胞が混在した像であるといえる。図4は移植14日目の組織像であるが、個々の細胞質は比較的豊富で、細胞は一部列をなして生着している。このように、CsA の短期投与は肝細胞の生着に効果的であり、現在までの観察では移植14日目の生着が証明された。

図5はCsA 投与移植7日目の胎児肝組織の像であるが、胞体はあまり明瞭でない部分が見られるが、核はよく保たれている。図6の移植14日目の組織像では、細胞質はエオジン好性となり充実し、細胞膜も明瞭となっている。索構造も明らかに認められ、移植胎児肝組織は確実に生着し分化した。このように、CsA を投与した移植肝細胞・胎児肝組織の生着は、移植7日目より14日目の方がより良好であるように考えられた。これは、最も拒絶反応の強い1週目より2週目になりやや立ち直ってきた

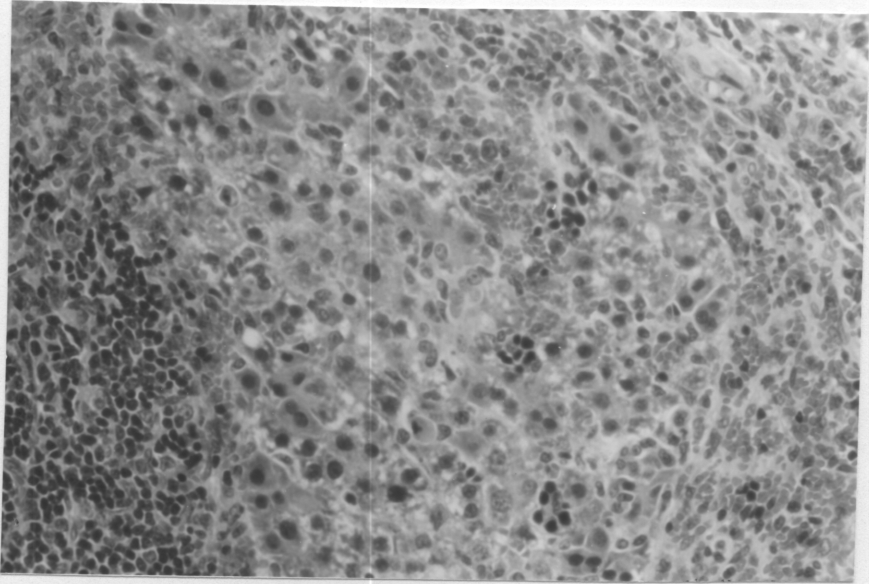


图 3 F344→Lewis 肝細胞. CsA 短期投与 移植 7 日目

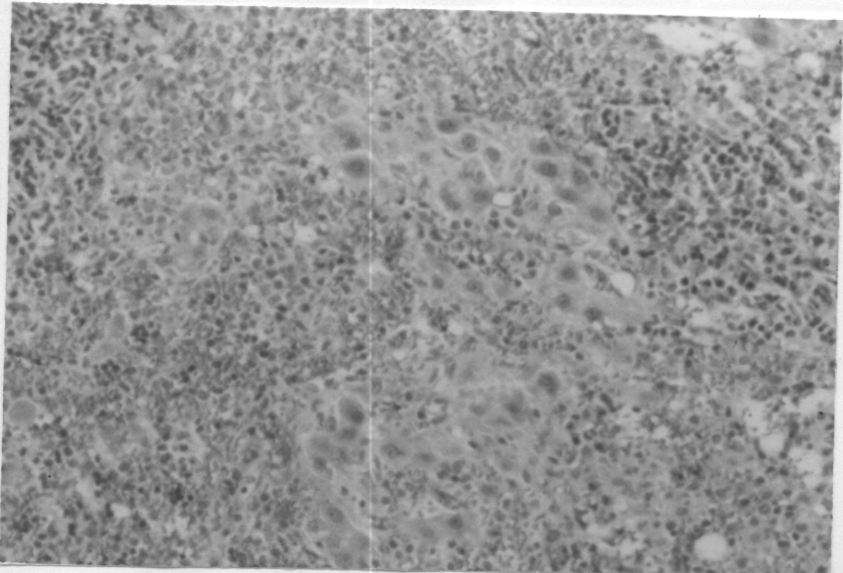


图 4 F344→Lewis 肝細胞. CsA 短期投与 移植 14 日目

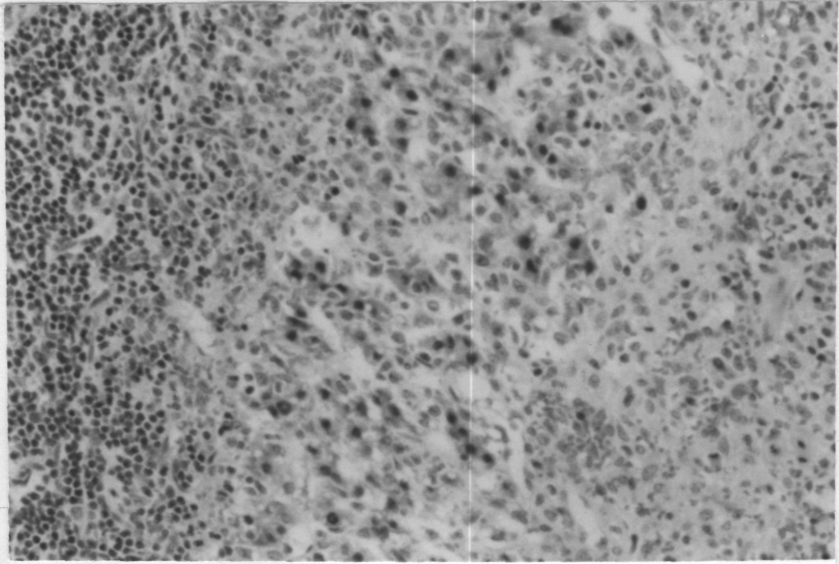


图 5 F344→Lewis 胎兒肝. CsA 短期投与 移植 7 日目

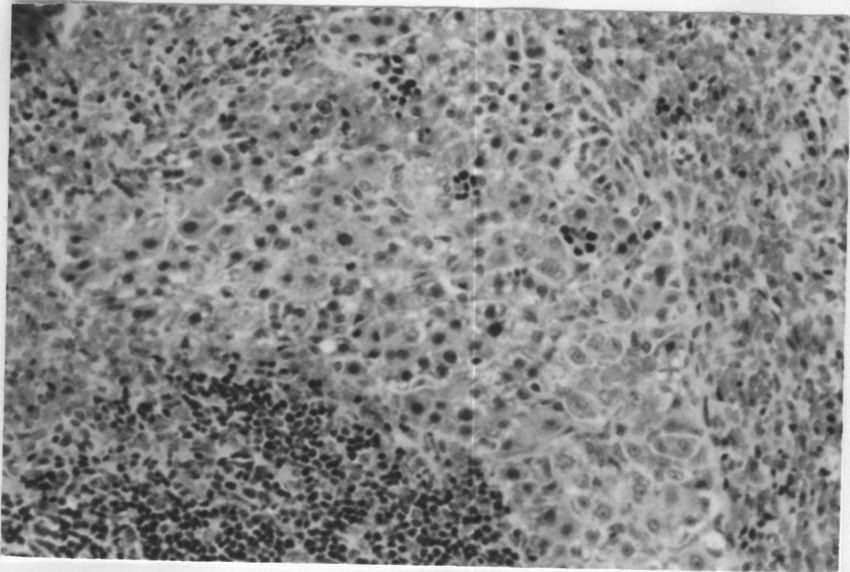


图 6 F344→Lewis 胎兒肝. CsA 短期投与 移植 14 日目

ことを物語るものであろう。

## 2) Majorな関係における生着。

Majorな組織適合抗原の違いの組み合わせとしては、donorをLewis、recipientをACIとした。Lewis→ACI間での肝細胞移植では、CsAを3日間、30mg/kg投与しても、移植後4日目にはすでに拒絶された肝細胞を取り込んだと思われる貧食細胞がみられるのみで、生着した肝細胞は見られなかった。そこで、採取肝細胞に含まれていると思われるla positive細胞を修飾することを目的として、肝細胞浮遊液に紫外線照射を行い、移植し、CsAと併用させた。図7は脾内移植7日目の組織像であるが、拒絶されずに生着した肝細胞が認められ、UV照射が効果的であったと考えられた。

一方、胎児肝はCsAの短期投与が非常に効果的であり、移植14日目にもほぼsyngenicの胎児肝移植と同じくらい鮮明に生着していた。すな

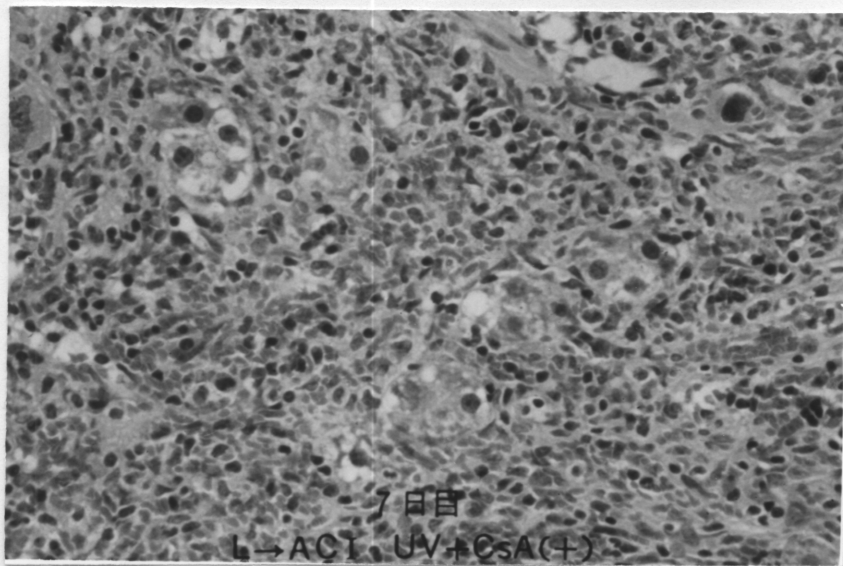


図7 Lewis→ACI 紫外線照射肝細胞・CsA短期投与 移植7日目

わち、個々の胞体は豊富で、索構造も明らかであった（Lewis→AC Iにおける無処置の胎児肝組織は4日以内に拒絶される）。

以上、majorな関係（Lewis→AC I）でのCsA短期投与での移植結果より、明らかに胎児肝組織の方が肝細胞に比して生着が容易であった。この理由としては、抗原性の違い、肝細胞と胎児肝細胞の増殖力の違いなどが考えられた。

	CsA	生着期間
胎児肝	(-)	4～5日
	(+)	4週以上
肝細胞	(-)	3～4日
	(+)	2週以上

図8 MinorなF344→Lewis間での胎児肝、肝細胞の脾内生着（CsA短期投与群）

	免疫抑制	生着期間
胎児肝	(-)	4日以内に拒絶
	CsA(+)	2週以上
肝細胞	(-)	4日以内に拒絶
	CsA(+)	4日以内に拒絶
	紫外線+CsA(+)	1週間生着

図9 MajorなLewis→AC I間での胎児肝、肝細胞の脾内生着（CsA短期投与群）

結果6の小括

1) F344→Lewis の minor な関係での移植では、肝細胞、胎児肝とも2週以上生着した (図8)。

2) Lewis→ACI の major な関係においては、CsA 30mg/kgの短期投与により、胎児肝はコントロールの4日以内に比し2週間以上生着延長したが、肝細胞は4日以内に拒絶された。

3) 肝細胞へのUV直接照射とCsA短期投与を併用すると、移植1週まで生着を認め、肝細胞移植においてもUV照射の効果が認められた (図9)。

7. CsA の長期投与におけるmajorな関係での肝細胞、胎児肝の生着。

実験動物の組み合わせは、図10に結果とともに示した。

		免疫抑制	生着期間
Lewis→ACI	胎児肝	(-)	4日以内に拒絶
		CsA(+)	5週
	肝細胞	(-)	4日以内に拒絶
		CsA(+)	4日以内に拒絶
ACI→Lewis	肝細胞	(-)	4日以内に拒絶
		CsA(+)	1週

図10 Major間での胎児肝、肝細胞の脾内生着 (CsA長期投与群)



○肝細胞

Lewis→ACI の関係においては、CsA を連続投与してもすでに移植4日目で肝細胞は認められなかった。一方、donorとrecipientを逆にしたACI→Lewisの組み合わせによるCsA長期投与では、移植7日まで生着した肝細胞が脾内に明瞭に認められた(図11)。これはmajorな関係でも拒絶に大きな差があることを示したものである。

○胎児肝

Lewis→ACI間のCsA長期投与では、胎児肝細胞は移植5週まで明瞭に生着しているのが認められた。

以上、肝細胞と胎児肝のCsAの長期投与の結果からも、胎児肝組織がより容易に長期生着した。

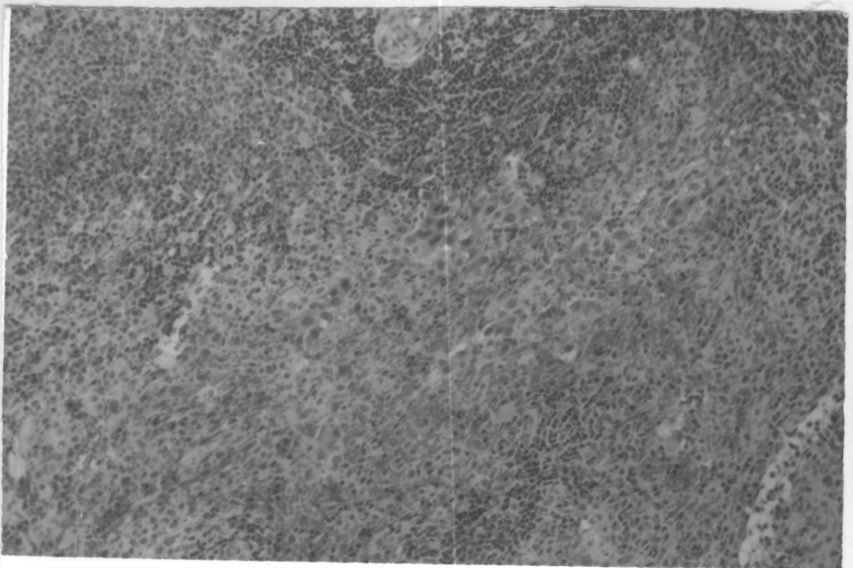


図11 ACI→Lewis肝細胞. CsA長期投与 移植7日目

#### IV. ま と め

肝の免疫原性を明らかにするために、肝細胞および胎児肝を脾内に移植し、種々の免疫抑制法を donor および recipient に加え、脾内での肝細胞、胎児肝の生着状態を検索した。

無処置での種々の donor と recipient の組み合わせの結果、肝細胞と胎児肝の脾内での生着は、他の臓器移植と同様にそれらの組織適合性の差異に大きく左右されていることが示された。

CsA を 30mg/kg 3日間投与すると、F344→Lewis の minor な関係では、肝細胞、胎児肝とも2週以上の生着が認められた。Major な Lewis→ACI の関係では、胎児肝は2週以上の生着を示したが、肝細胞は移植4日目までに拒絶された。すなわち、肝細胞より胎児肝の方が生着が容易であることが認められた。この胎児肝と肝細胞の生着の差異は、組織学的検索から胎児肝の旺盛な増殖力に帰因することが強く示唆された。

Lewis→ACI の肝細胞移植の際、肝細胞への紫外線直接照射とCsAを併用させた結果、1週目までの肝細胞の生着が認められた。この紫外線の生着延長効果は藤ラ氏島移植などと同様、採取肝細胞に混入する Ia陽性細胞の紫外線による処置によってもたらされたものと考えられた。

Majorな関係をACI→Lewisに変えてCsAの長期投与を試みたが、この関係では肝細胞においては1週間の生着延長がみられた(胎児肝では5週の生着)。すなわち、majorな違いでもdonorとrecipientの組み合わせによって拒絶反応に差があることが明らかにされた。

これまでの種々の実験結果から、肝細胞、胎児肝とも免疫原性を強く所有することが示された。しかし一方、CsAなどの免疫抑制を強く加えたにもか

かかわらず、移植細胞が早期に拒絶される傾向にあると言えるが、この理由としては免疫担当細胞が非常に多い脾という場所を移植部位に選択したことが大きな要因として考えられる。さらに、脾内移植はもともと肝の宿主肝が存在する異所性移植と同じ状況にあることも、さらに生着を困難にしている要素と思われた。一方、永久生着が得られる組み合わせでの同所性肝移植においても、移植1週においては強い拒絶反応がみられ、その後移植肝が立ち直り生着している。我々の胎児肝と肝細胞の実験結果は、このような移植肝の立ち直りの機序が、肝のもつ旺盛な再生能力にあることを示したといえるが、肝の免疫学的特異性の完全な解明には、さらに深い研究が必要と考えられた。