

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

今日の移植 (1991.01) 4巻1号:69～73.

肝再生因子投与による脾内移植肝細胞の生着と増殖の促進

小野寺一彦、葛西真一、江端英隆、水戸迪郎

肝再生因子投与による脾内移植肝細胞の 生着と増殖の促進

original article

Transplantation Now

小野寺一彦・葛西眞一・江端英隆・水戸迪郎

Effect of administration of hepatotrophic factors on proliferating activities of intrasplenic hepatocytes in rats

肝細胞移植の有用性を高めるためには、移植直後の生着率の向上と生着した肝細胞の早期増殖が必須条件である。今回、同系ラット肝における脾内肝細胞移植後種々の時期に、部分肝切除後2日目のラット血清または h-EGF を投与し、脾内肝細胞の S 期細胞の標識率を検討した。

その結果、これらの肝再生因子の投与は異所性の肝細胞の増殖を促進することが確認され、それは投与量の多いほど、かつ投与時期が移植後早い時期であるほど有効であった。しかし、その作用は一過性で微弱なものであったことより、今後さらに投与方法などに検討を要する。

Kazuhiko Onodera・Shinichi Kasai・Hidetaka Ebata・Michio Mito*

key words: 脾内肝細胞移植, 部分肝切除後血清, epidermal growth factor, 着床, 再生増殖

先天性肝代謝異常には、肝細胞移植が肝移植にかわる侵襲の少ない治療法として期待されるが¹⁻⁴⁾、動物実験の結果からは、同種間移植において強い拒絶反応が起こることと⁵⁾、同系間でも移植肝細胞の着床率が低く生着後の増殖も遅いことが問題点である^{6,7)}。

後者について詳述すれば、 10^7 単位の単離肝細胞を含む pellet 0.2 ml を10週齢雄性ラットの脾臓内へ直接注入した場合、仮に viability が100%であっても、そのすべてが脾内に着床することはなく、多くは移植直後から数日の間に脾洞の血流に乗って脾静脈へ流出するうえ、脾内に貯留した肝細胞の集塊もその中心部から変性壊死に陥り辺縁部を残して多くは脱落する(図 1 a)。

結局、着床するのは移植した肝細胞の数%以下、個数にして 10^5 単位であり、脾臓の容積の約1%程度にすぎない(図 1 b)。さらに生き残った肝細胞は単離状態であるため、同容量であっても小葉構造を持つ肝組織に相当する機能には及ばない。そして、脾内肝細胞はこの状態からスタートして、徐々に増殖し4~6カ月後から索構造を形成し、約1~1年半後によりやく脾の50%以上が

肝細胞で置き換わるわけである。脾切片における肝細胞の占拠面積を画像解析装置 (KONTRON MOP AMO III) を用いて計測し、この経過を示すと、図 2 のようになる。これらのことから、肝細胞移植の有用性を高め、目的とする肝機能を補助あるいは代償させるためには、移植肝細胞の移植直後の急速な消失を防ぐことと、いったん着床した肝細胞を早期に増殖させることが必要と考えられる。

すでに報告されているように、同系ラット脾内へ移植された肝細胞は宿主の部分肝切除に呼応して再生増殖する。その程度は肝切除量の大きさに相関することは、生着面積からも DNA 合成の点からも確認されており^{8,9)}、異所性肝細胞も血中の肝再生因子の作用を受けて再生増殖する能力があるといえる。さらに、発癌物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を投与して、肝障害を引き起こしてから部分肝切除を行うと、肝再生が遅延するが、この肝切除と同時に肝細胞の脾内移植を行っておくと、その後著明な増殖がみられ、早期に再構築肝組織が脾内に形成される^{10,11)}。同様の現象は、宿主ラットに EcK 瘻を造設したあとに、部分肝切除を行ってもみられる。すなわち、宿主肝が再生困難な状態にあると、肝再生因子が宿主肝に消費されないために、異所肝に長期間作

* The Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College 旭川医科大学外科学第二講座

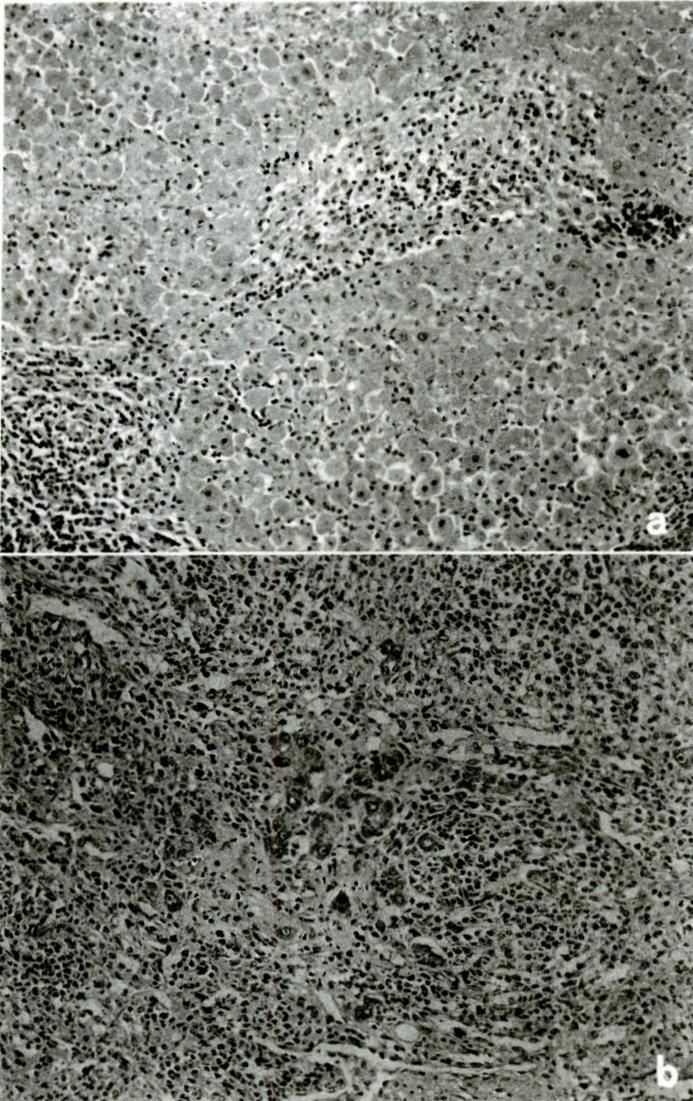


図1 脾内肝細胞組織像
(×200, HE 染色)
a: 移植直後
b: 移植後2週

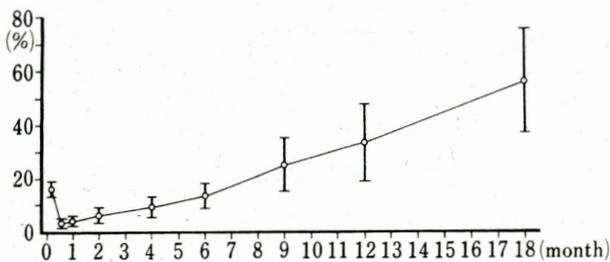


図2 移植肝細胞の経時的脾内占拠率

用すると推測される。

しかし、肝細胞移植をヒトの肝代謝病に応用する際には、特殊な事情がない限り肝切除を併施することはないので、肝切除後の血中の再生因子を利用する方法を探らねばならない。そこで肝切除後血清や human-epidermal growth factor (h-EGF)

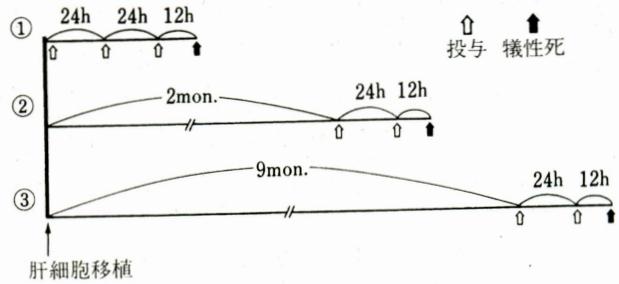


図3 実験プロトコール

の投与が、移植肝細胞の着床率向上と早期増殖促進に有効か否かを同系ラット間で検討した。なお、移植観察部位は脾臓に限定した。

対象と方法

(1) 肝細胞移植法

10週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、Seglen¹²⁾の方法に準じ経門脈的コラゲナーゼ肝灌流により肝細胞を単離し、viability 80~90%、 $5\sim 8 \times 10^7$ 個/ml の肝細胞 pellet 0.2 ml を10週齢の同系雄性ラットの脾門部を一時的にクランプしたうえで、27G針にて脾臓内へ直接注入し、刺入部は絹糸にて結紮した。

(2) 肝切除後血清と h-EGF の投与方法

体重 300 g 前後の15~20週齢雄性 Wistar 系ラットを用い、2-AAF を 0.05% 含有する基礎飼料を5日間摂食させたあと、Higgins & Anderson 法¹³⁾により、70%肝切除を施行しその48時間後に大動脈より採血し、10分間静置後 2,500 rpm で15分間遠心し、血清を得、これを [AAF+PH] 血清とした。

一方、基礎飼料だけで飼育したラットに70%肝切除を行い、その48時間後に採取した血清を PH 血清とした。コントロール血清としては、sham operation 後48時間のものを用い、いずれも -20°C にて保存した。使用時にはこれを解凍し、 37°C としてただちに陰茎静脈よりラット1匹当たり毎回 1.0 ml を注射した。

h-EGF は、 -20°C で保存された凍結乾燥品(アース製薬)の 100 μg (1 vial) を、使用時に 37°C の生食 3 ml で溶解し、ただちに kg 体重当り 100 μg または 50 μg になる用量を毎回腹腔内投与した。コントロールとしては同容量の生理食塩水を用いた。

(3) 実験プロトコール (図3)

① 移植直後：肝細胞を脾内へ移植した直後、

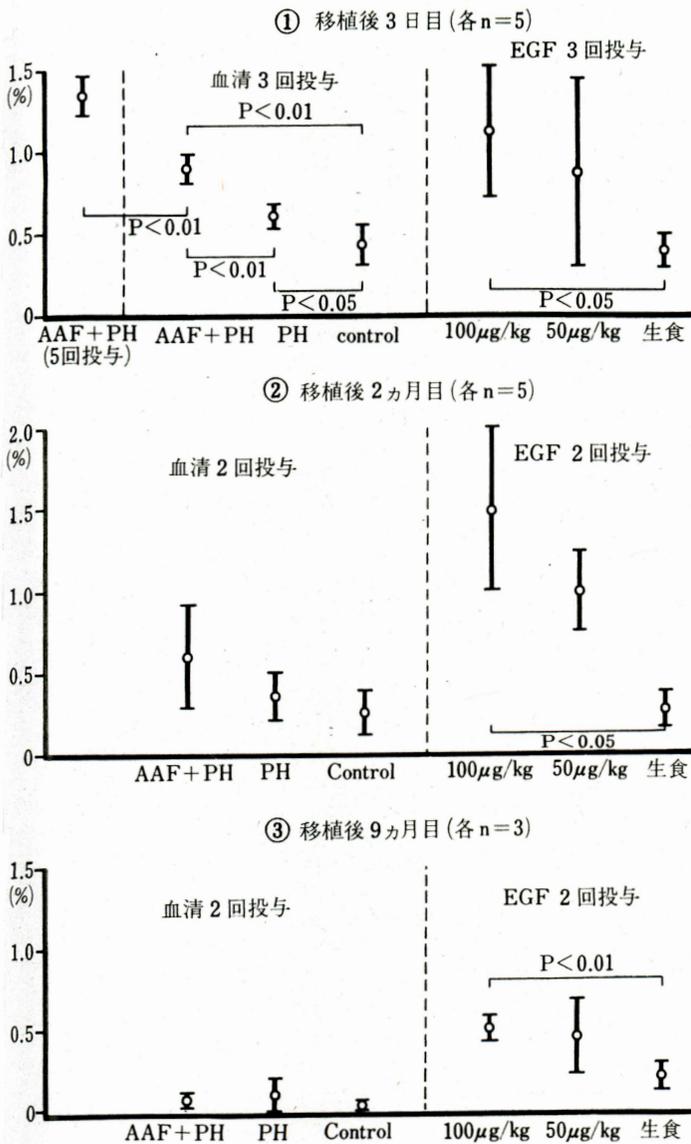


図4 脾内肝細胞の labeling index

24時間後、48時間後の計3回、前述した方法で肝切除後血清あるいは h-EGF を投与した。なお、[AAF+PH] 血清については、移植直後から12時間間隔で5回投与も行った。

② 移植後2ヵ月：脾内肝細胞移植後2ヵ月経過した時点において、24時間間隔で2回投与した。

③ 移植後9ヵ月：脾内肝細胞移植後9ヵ月経過した時点において、24時間間隔で2回投与した。

(4) 解析方法

先述のプロトコールのいずれも最終投与の12時間後に脱血死させ、肝・脾を摘出したが、前項①の h-EGF 投与についてのみ最終投与の14日後に脱血死させる実験も追加した。すべて犠牲死の1時間前には、thymidine の analogue である bromo-

deoxyuridine(BrdU)50 mg/kg を静注した¹⁴⁾。摘出した臓器は 4°C 70% アルコールに1昼夜固定後、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて abidin-biotin-peroxidase complex 法により染色し、光顕的に脾内肝細胞1,000個以上を観察し、BrdU が核内に取り込まれた S 期細胞の出現率を labeling index (LI) として求めた。この際、脾内に生着あるいは肝細胞から転換したと思われる胆管様細胞については算定しなかった。各群間の LI の平均値の比較は t 検定によった。

結果(図4)

① 移植直後

血清3回投与後(移植後3日目)の脾内肝細胞の LI は、[AAF+PH]群、PH 群、コントロール群それぞれ 0.88±0.10%、0.60±0.08%、0.42±0.13%であり、たがい有意差を認めた。また、[AAF+PH]血清の5回投与後の LI は、1.35±0.13%であり、3回投与に比し有意に高値を示した。

一方、EGF 3回投与後の LI は[100 µg/kg]群、[50 µg/kg] 群、生食群それぞれ 1.13±0.41%、0.85±0.59%、0.38±0.10%であり、[100 µg/kg]群と生食群の間に有意差を認めた。また、宿主肝の LI については EGF[100 µg/kg]群で 0.3~0.4% とわずかに高いほかは、いずれも 0.1% 以下であった。

なお、図には示していないが、EGF 最終投与の14日後に犠牲死させた追加実験(各 n = 3)ではどの群も脾内肝細胞の LI は 0.2~0.4% を示し、たがい差はなくなっていた。

② 移植後2ヵ月

血清2回投与後の脾内肝細胞の LI は、[AAF+PH]群、PH 群、コントロール群それぞれ 0.60±0.33%、0.38±0.17%、0.30±0.14%であり、順に減少するものの有意差はなかった。

一方、EGF 2回投与後の LI は、[100 µg/kg] 群、[50 µg/kg] 群、生食群それぞれ 1.50±0.51%、1.00±0.29%、0.28±0.12% であり、[100 µg/kg]群と生食群の間に有意差を認めた。また、宿主肝の LI はいずれも 0.1% 以下であった。

③ 移植後9ヵ月

血清2回投与後の脾内肝細胞の LI は、[AAF+PH]群、PH 群、コントロール群それぞれ 0.07

±0.06%, 0.10±0.10%, 0.03±0.03%であり、たがい有意差はなかった。

一方、EGF 2回投与後のLIは[100 µg/kg]群, [50 µg/kg]群, 生食群それぞれ 0.50±0.08%, 0.45±0.24%, 0.20±0.10%であり、[100 µg/kg]群と生食群の間に有意差を認めた。また、宿主肝のLIはいずれも0.1%以下であった。

以上①②③の結果より、移植直後の脾内肝細胞の増殖には肝切除後血清投与が有効であり、特に[AAF+PH]血清は効果が高いことが判明した。

さらに、その総投与量が多いほどLIは高値を示した。しかし、移植後2カ月目の脾内肝細胞に対しては、体重当たり換算した投与量が移植直後より少ないことに起因するためか、血清投与の効果は低下し、移植後9カ月目ではほとんど反応がみられなくなった。

一方、EGFの場合は、移植後どの時期においても投与量が多いほど脾内肝細胞の増殖を促進する傾向がみられた。しかし、移植後9カ月目の脾内肝細胞に対するEGF投与の効果は低いものであった。さらに、移植後24カ月目にEGF 100 µg/kgを2回投与した追加実験(n=3)ではLIが0.1%以下であったことより、移植後長期間経過すると、EGFに対する脾内肝細胞の増殖反応は消失すると考えられた。

考 察

異所性に移植された肝細胞にも、静脈内あるいは腹腔内へ投与した肝切除後血清やEGFが作用することが明らかとなったが、その増殖作用は一時的であり、また、宿主肝に部分切除を加えたときほど強くはなかった^{9,11)}。さらに、今回の実験結果は、投与直後のDNA合成の面からのみ確認したものであり、その後肝細胞の生着面積が増したかどうかは不明である。特に移植直後における作用については、着床率の増加の有無を検討すべきであったが、この時期の移植肝細胞は変性が強く生着面積の評価は困難であった。少なくとも、今回の投与量では、投与後2～3日から14日の期間に著明な容量増加はみられなかったといえる。

しかし、川浦ら⁹⁾は、肝部分切除と同時に脾内肝細胞移植を行った6カ月後の肝細胞占拠率はいちじるしく高いことを報告しているし、2-AAFを投与された宿主ラットに部分肝切除を加えると同

時に、肝細胞を移植した場合の着床率は高く、1～2週の期間でも明らかにその生着量が増していることから¹¹⁾、肝再生因子を強くかつ長く作用させれば、形態上も影響があらわれると思われる。

このことは、実験①で[AAF+PH]血清の総投与量を増したときに、LIが上昇したこと、実験①②③でEGFの投与量に相関して、LIが上昇したことから推測される。そこでさらに投与量を増したり、脾動脈内へ投与するなど今後投与方法に検討を要するであろう。

また、宿主肝に操作を加えない今回の実験において、移植後月数が経過し脾内肝細胞が再構築してくるほど肝切除後血清やEGFの効果が減弱し、ほぼ完全に脾が肝組織に置きかわった移植後24カ月目では、EGFが無効であったこと、さらに、宿主肝自体は肝切除後血清やEGFにほとんど反応しないことなどから、肝再生因子の投与は移植後早期のほうが有効であり、移植部位での肝細胞の密度が疎なほど反応が高いとも考えられる。しかし、宿主肝に部分切除を加えて脾内肝と宿主肝のLIを比較した実験では、肝切除後24～48時間においてLIは細胞密度の高い宿主肝のほうが高値であることから^{9,11)}、たんに細胞密度の差よりも、細胞間結合の強さや宿主肝と異所性肝組織の反応性の違いも考慮すべきである。

たとえば、初代培養肝細胞を用いた肝細胞増殖に関する多数の研究成果を応用して^{15,16)}、種々の肝細胞増殖因子をもっとも有効な割合に調整し、本モデルにおいて追試する場合も、初代培養肝細胞を用いた*in vitro*実験系では脾内移植実験と異なり、肝再生抑制因子を出していると考えられるintactな宿主肝が存在しないことが、結果に影響してくる可能性がある。

さらに、移植直後の肝細胞の着床率を上げるために、肝細胞が脾洞内皮に接着しやすくするか単離状態の肝細胞間の接着を強めるといった基質の利用が考えられる。

筆者らもpreliminaryな実験としてフィブログミン、フィブロネクチン¹⁷⁾、トロンビン、コラーゲンなどをそれぞれ単独に種々の濃度で肝細胞pelletに混合したうえ移植してみたが、いずれも着床率の向上をみていない。今後はたんに細胞を接着するだけでなく、肝細胞の長期生存と肝機能や増殖能の維持に有効な細胞間マトリックスの

応用が望まれる。

また、今回は脾内移植後、脾静脈から門脈へ流入し、肝内へ着床する肝細胞は検討対象にしなかったが、経門脈的に移植した肝細胞も十分機能することが確認されており^{1,2,18)}、肝内での移植肝細胞の生着と増殖についても形態的に詳細な検討をすすめるべきと思われる。しかし、それには無アルブミンラット (NAR) などを用いて特殊染色により移植肝細胞と宿主肝細胞を区別しながらの観察することが要求される¹⁹⁾。この場合、肝と脾という移植部位の差が肝細胞増殖因子の作用にどう反映するか興味深い。

結 語

肝細胞の脾内移植において、移植直後の生着率の向上と生着後の肝細胞の早期増殖を目的として、肝再生因子が豊富と考えられる肝切除後血清や h-EGF を投与したところ、脾内肝細胞の DNA 合成が促進された。また、それは投与量が多いほど、あるいは移植後早い時期に投与するほど有効であったが、宿主肝に部分肝切除を加えたときの反応よりは弱いものであり、今後投与方法などの検討を要すると思われた。

h-EGF を提供いただいたアース製薬に深謝致します。

文 献

- 1) Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., Steffes, M.W. et al.: Hepatocellular transplantation in UDP-glucuronyl transferase deficient rats. *Surg Forum* 26: 428-321, 1975.
- 2) Groth, C.G., Arbough, B., Bjoerken, C. et al.: Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl transferase deficient rat by intraportal hepatocytes transplantation. *Transplant. Proc.* 9: 313-316, 1977.
- 3) Vroemen, J.P.A.M., Buurman, W.A., Heirwegh, K.P.M. et al.: Hepatocyte transplantation for enzyme deficiency disease in congenic rats. *Transplantation* 42: 130-135, 1986.
- 4) 小野寺一彦, 江端英隆, 水戸勉郎・他: 先天性肝酵素欠損症に対する肝細胞移植. *移植* 25: 435, 1990.
- 5) Ebata, H., Oikawa, I., Mito, M.: Rejection of allogeneic hepatocytes and fetal hepatic tissue transplanted into the rat spleen. *Transplantation* 39: 221-223, 1985.
- 6) 水戸勉郎, 江端英隆, 草野満夫・他: 脾臓内肝細胞移植. *医学のあゆみ* 111: 362-370, 1979.
- 7) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M. et al.: Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* 28: 499-505, 1979.
- 8) 川浦幸光, 魚津幸蔵, 正島 寛・他: 肝切除範囲からみた脾臓内移植肝細胞の増殖. *医学のあゆみ* 121: 415-416, 1982.
- 9) 草野満夫, 紀野修一, 木下 透・他: 脾内移植肝細胞の細胞動態と肝再生因子の影響. *肝臓* 30: 345-351, 1989.
- 10) Finkelstein, S.D., Lee, G., Medline, A. et al.: An experimental method for rapid growth of liver in spleen. *Am. J. Pathol.* 110: 119-126, 1983.
- 11) 小野寺一彦, 江端英隆, 水戸勉郎: 脾内移植同種胎児肝組織片の生着延長へ及ぼす宿主肝再生抑制の効果. *今日の移植* 3(1): 58-63, 1990.
- 12) Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13: 29-83, 1976.
- 13) Higgins, G.M., Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of the liver of the white rat following parital surgical removal. *Arch. Pathol.* 16: 186-202, 1931.
- 14) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-476, 1982.
- 15) McGowan, J.A., Strain, A.J., Bucher, N.L. R.: DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effect of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic AMP. *J. Cell Physiol.* 108: 353-363, 1981.
- 16) 中村敏一, 名和克彦, 富田優美子: 初代培養肝実質細胞の増殖制御と肝再生機能. *臨床科学* 19: 1387-1396, 1983.
- 17) 中村敏一: フィブロネクチンと肝細胞培養. *最新医学* 39: 2006-2009, 1984.
- 18) 小野寺一彦, 江端英隆, 加藤一哉・他: アスコルビン酸合成酵素欠損ラットに対する肝細胞移植療法—移植部位からの検討—. *肝臓* 31(suppl.): 125, 1990.
- 19) 小川勝洋: 無アルブミンラット肝臓内へのアルブミン産生肝細胞の移植. *病態生理* 8: 601-603, 1989.

*

*

*