

## 脾内肝組織片移植に関する基礎的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 廣瀬, 宏一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8168">http://hdl.handle.net/2297/8168</a>

## 脾内肝組織片移植に関する基礎的研究

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 岩 喬教授)

廣 瀬 宏 一

(平成2年1月13日受付)

ラット脾内肝組織片移植における移植片作製法, 細胞動態および生着促進因子につき検討した. Feulgen-DNA 顕微蛍光測光法により, DNA ヒストグラムを作製した. また, 抗 bromodeoxyuridine モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法により, DNA 合成期 (S期) 細胞の割合 (L. I.) を求めた. 移植片作製法の検討では, 鋏による細切と, コラゲナーゼによる酵素消化法の併用により, 生存率, 収量とも良好な肝組織片濾液が得られた. 移植前, 肝組織片は大部分4倍体 DNA 量 (tetraploid chromosomal complement, 4C) を持つ肝細胞で構成されていた. 移植後早期の脾内肝組織片の DNA ヒストグラムは, 4C以下の広い範囲に分散した. 移植後6ヶ月以降の脾内肝細胞は集団となった. この肝細胞の DNA 量は4Cが主であったが, 8倍体 DNA (octaploid chromosomal complement, 8C) を持つ肝細胞が10%程度を占めた. S期細胞の割合は, 移植直後より12ヶ月後まで, 低値のまま一定に推移した. 肝切除により, 宿主肝細胞の L. I. は著明に増加した. またポリプロイド化が進行した. 一方, 移植後早期の脾内肝組織片の細胞動態は, 宿主肝切除により影響を受けなかった. しかし, 移植後12ヶ月目の脾内肝細胞集団は, 宿主肝と同様の細胞動態を示した. 四塩化炭素により急性肝不全を作成すると, 宿主肝の軽度の L. I. の増加およびポリプロイド化が認められた. しかし, 脾内に移植された肝細胞の細胞動態には変化がなかった. インスリン, グルカゴン, ヒドロコルチゾン, 小腸抽出液, 脾臓抽出液を肝組織片濾液内に添加して移植を試みたが, 脾内移植肝組織片の細胞動態に影響を及ぼさなかった. しかし生着面積を比較すると, インスリン添加および70%宿主肝切除により, 脾内移植肝細胞の生着は促進された. 以上の成績より, 脾内に再構築された肝細胞集団は, 宿主肝と同様徐々にポリプロイド化が進行していることが判明した. 移植時に肝細胞濾液にインスリンを加えるか, 肝大量切除を行うと, 脾内に移植された肝細胞集団の再構築が促進された. また移植直後の急性期では, 脾内肝組織片は各種肝再生促進因子の影響を受けるに至っていないが, 慢性期では, 脾内に再構築された肝細胞集団は, 肝再生促進因子に対する応答能を獲得しているものと考えられた.

---

**Key words** 脾内肝組織片移植, 肝再生因子, bromodeoxyuridine, Feulgen-DNA 顕微蛍光測光法

---

現在, 肝不全に対する治療として, 各種人工肝機能補助装置の使用, 血漿交換などが行われている<sup>1)</sup>. これらは主に有害物質の除去を目的としており, 肝臓のもつ代謝機能の補助には, 生体肝の持つ酵素系による代謝経路を利用する以外方法はない. しかし本邦では, 脳死体肝移植に対してはまだ社会的同意が得られ

ていない. 一方生体部分肝移植も試みられつつあるが, 現在論議の最中である.

ところで, 肝臓は本来非常に再生力の旺盛な臓器であることが知られている. そこで, 肝臓から肝細胞を分離後再び生体内に移植し, それが生着, 増殖して機能すれば, いわば第二の肝臓として肝臓機能の補助が

---

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxydase complex; AFP, alphafetoprotein; A. U., arbitrary unit; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; 2C, diploid chromosomal complement; 4C, tetraploid chromosomal complement; 8C, octaploid chromosomal complement; CCl<sub>4</sub>,

可能になると考えられる。

肝臓を細切し、種々の部位に移植する試みは Ribbert を嚆矢とする<sup>2)</sup>。その後、水戸<sup>2a-9)</sup>、川浦ら<sup>9)</sup>が実験的にラット脾内に肝細胞を生着させことに成功して以来、脾内肝細胞移植が主流となった。この脾内肝細胞移植に関してさまざまな報告がなされたが、それらは形態学的変化、代謝の変化に着目したものが主であり、移植肝細胞の細胞動態を検討した研究はきわめて少ない。本研究では、移植肝細胞の細胞動態を検討するとともに、それを指標として移植肝細胞再生増殖促進因子を検討した。また移植肝細胞が宿主肝細胞におよぼす影響についても検討した。

#### 材料および方法

##### I. 実験動物

近交系の雄性 Wistar 系ラット (10~12週齢, 静岡実験動物農業共同組合より入手) を使用した。

##### II. 実験方法

###### 1. 肝組織片濾液の調整

6時間絶食後 Sodium pentobarbital 40mg/kg を腹

腔内投与した。上腹部正中切開にて開腹、Higgins-Anderson の方法<sup>7)</sup>に従い肝左外側葉、中葉切除 (約 70%) を行った。ただちに24ゲージ翼状針を切除肝に乱刺して0.1%コラゲナーゼIV型 (Sigma, St. Louis, 米国) を添加した Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 無添加 Hanks 液 (Whittaker, Walkersville, 米国) で灌流することにより血液成分を除去した。眼科用鉗にて細切し径約 1 mm 前後とし、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> を投与しながら同灌流液中で低速攪拌して、37°C, 20分間インクペートした。ついでこれを一重メッシュガーゼにて濾過し、得られた濾液を 4°C の Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 無添加 Hanks 液にて2回遠心洗浄 (800rpm, 1分) したものを移植用肝組織片濾液とした。Tripian blue を用いて染色し肝細胞の生存率を検討したところ平均85.3%であった。得られた肝細胞濾液は、肝細胞数個~十数個の集団となっていた (図1)。一匹のラットから約10<sup>6</sup>個の肝細胞が得られた。開腹から肝組織片濾液作成までの時間は約30分であった。

###### 2. 移植方法

Sodium pentobarbital 40mg/kg を腹腔内投与し、

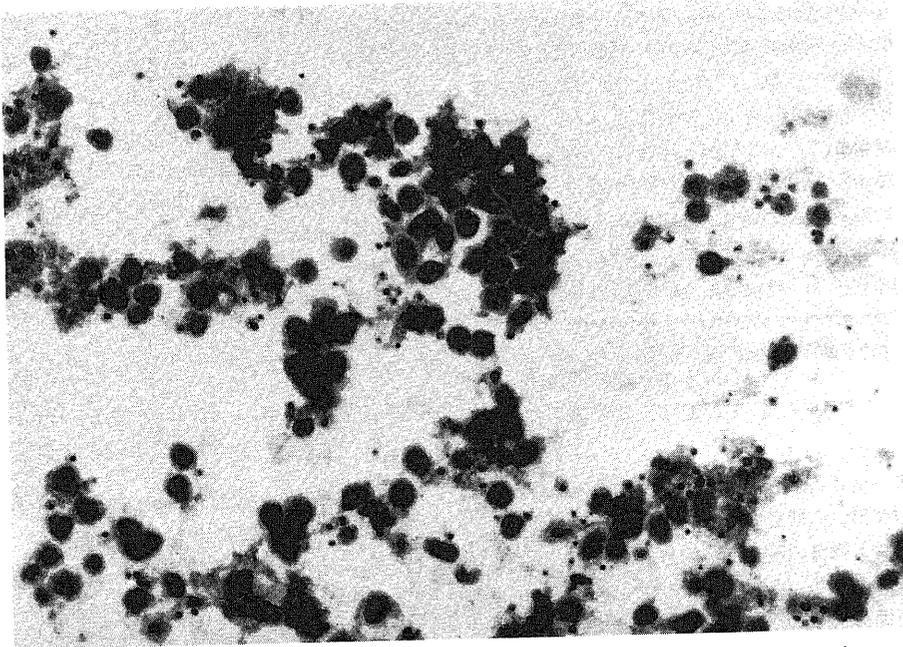


Fig. 1. I, Histological findings of liver tissue fragments before transplantation. Liver tissue fragments are composed of several hepatocytes (H-E stain).

tetrachlorocarbon; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; HE, hematoxylin and eosine; L. I., labeling index; S期, DNA 合成期; 光顕, 光学顕微鏡

上腹部正中切開にて開腹，脾臓下極より23ゲージ針を上極方向に向け刺入，ゆっくりと抜去しながら肝組織片濾液 0.2ml (約 $1.0 \times 10^7$ 個) を注入した。

### 3. Feulgen 顕微蛍光測光法

標本は36時間 Pease の中性緩衝ホルマリン液<sup>9)</sup>にて固定後，パラフィン包埋した。Feulgen 染色は Koike らの方法<sup>9)</sup>に従って行った。すなわち $12\mu$ のパラフィン切片をキシレン-アルコール系列にて脱パラフィンし，水道水中で水洗した。37°C 1 N塩酸中で1分間，60°C 1 N塩酸中で7分間，37°C 1 N塩酸中で1分間反応させ，DNA の加水分解を行った。蒸留水で洗浄後，Cold Schiff 試薬 (和光，大阪) 30ml + Sorensen のグリシン緩衝液 (pH 2.28) 870ml + 15%メタ重亜硫酸ナトリウム溶液 100ml を混合した染色液中に室温で4時間反応させた。その後，Sorensen のグリシン緩衝液 (pH 2.28) と15%メタ重亜硫酸ナトリウム溶液を9:1の割合で混合させた洗浄液で10分づつ4回洗浄し，水洗，脱水，封入した。なお，スライドガラスおよび封入材には無蛍光のものを使用した。その後，藤田の方法<sup>10)</sup>に従い，非特異蛍光を減弱あるいは消失させるため，晴天下の自然太陽光線下に約3日間曝光した。蛍光顕微測光は，落射式蛍光顕微鏡 Standard 18 型 (Zeiss, Oberkochen, 西独) に，顕微測光装置 Nikon P1 (日本光学, 東京) をとりつけておこなった。水銀ランプ光源から，励起フィルター G (IF500~550) (日本光学) および吸光フィルターを通して緑色励起光を選択し，ダイクロイックミラー (DM575) (日本光学) を経て Feulgen 染色標本に照射した。蛍光顕微鏡下で見ると，核は明らかな赤色蛍光を発した (図2)。放出される赤色蛍光を，吸収フィルター (ピーク値 620nm) (日本光学) を通じて測光した。なお，顕微測光装置 Nikon P1 では，1個の核の測光に際し自動的に10回の測定をくり返し，その平均測光値が表示される機構になっている。測光にあたっては，プレパラートを手動で操作し，肝細胞を各例100~200個測光し，細 正博博士 (金沢大学第二病理) 作製のプログラム<sup>11)</sup>で，パーソナルコンピューター PC-9801VM2 (日本電気) を用いて解析した。なお，変性，壊死に陥った細胞や，切片上に核の一部しか入っていないと考えられる細胞は，測光の対象から可能な限り除外した。なお，蛍光顕微鏡下で単核，多核細胞を区別するのは困難なため，両者を区別せず核一個当たりの蛍光量を測定した。肝細胞と，それ以外のリンパ球系細胞，間葉系細胞等の区別は蛍光顕微鏡下では容易であった。

蛍光測光のコントロールとして，各例ごとに組織中

のリンパ球の核を30~50個測光し，その最頻値を2倍体 DNA 量 (diploid chromosomal complement, 2C) として用いた。Feulgen 染色の染色性や減光処置の程度によって，標本ごとに核が発する蛍光に強弱があるため，核 DNA 量の測定データの数値は相対的なものとなる。そのため核 DNA 量の測定値を，各標本のリンパ球より求めた2Cの値で除し，おのおのを仮の共通単位系 (A. U. 単位=arbitrary unit) で表し，これを横軸に，核の個数を縦軸にとって DNA ヒストグラムを作成した。

### 4. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による DNA 合成期 (S 期) 細胞標識法 (酵素抗体法)

BrdU は，生理的食塩水に溶解し，犠死1時間前に50mg/kg をラットの腹腔内に投与した。摘出した臓器は中性緩衝ホルマリン液中で36時間固定後パラフィン包埋し，染色に供した。

染色は脱パラフィン後，37°C 4 N塩酸中で30分処理し，DNA を変性させ二重鎖 DNA を単鎖 DNA とした。硼酸緩衝液にて中和後，0.3%過酸化水素加メタノールに30分反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。次にウマ正常血清に30分反応させ，非特異反応の減弱を計った。その後，1次抗体 (抗 5-bromo-2'-deoxyuridine モノクローナル抗体，20倍希釈) (DAKO, Glostrup, デンマーク) に4°Cで一晩，2次抗体 (Vector, Burlingame, 米国) に室温で30分，avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 試薬 (VECTASTAIN<sup>®</sup> ABC Kit) (Vector) に室温で30分反応させた。次に過酸化水素加ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 溶液に入れ，光学顕微鏡 (光顕) 下に観察しながら反応をおこなった。水道水

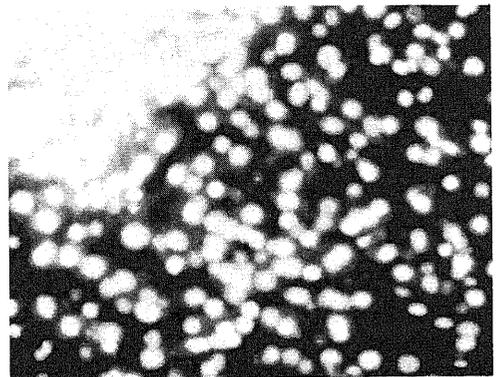


Fig. 2. Feulgen stain of intrasplenic hepatocytes six months after transplantation. Nuclei shed fluorescence.

にて水洗後ヘマトキシリンにて核染色し、脱水、封入した。顕微鏡下に観察すると、標識されたS期細胞の核は暗褐色に、他の核は淡青色に染色された。脾内移植肝細胞については、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, HE) 染色、Feulgen 染色標本と対比させ、壊死、変性に陥っていない部位の標識細胞の割合 (Labeling index, L. I.) を求めた。宿主肝については、400倍に拡大した任意の5視野で標識細胞をカウントし、L. I. を求めた (図3)。

### 5. 実験計画

#### 1) 実験 1

移植用肝組織片濾液作製法について検討した。前述したように鉄による肝細切に酵素消化法を併用した群 (A群, 5匹)、鉄による肝細切のみの群 (B群, 5匹)、ポーアサイズ 1.0mm のメッシュワイヤスクリーンを用いて2~3回用手圧砕した群 (C群, 5匹)、ポーアサイズ 0.1mm のメッシュワイヤスクリーンを使用し用手圧砕したのち、4°Cのハンクス液にて洗浄、遠沈した群 (D群, 5匹)、鉄による細切後、Hanks 液を加え超音波ホモジナイザー TP18/10S4 型 (Junke & Kunkel, Staufen, 西独) にて数秒破砕し、濾過、洗浄、遠沈した群 (E群, 5匹)、門脈内にカニューレションし下大静脈を切断、37°C 0.05% コラゲナーゼ加  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  無添加 Hanks 液 150ml に灌流後、鉄にて細切、4°C  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  無添加 Hanks 液にて数回の洗浄、遠沈、ピペッティングし、単離肝細胞濾液とした群 (F群, 5匹) を作製し、Trypan blue を用いて作製直後の肝細胞生存率を求めるとともに、移植後1日目の脾内における生着状態を

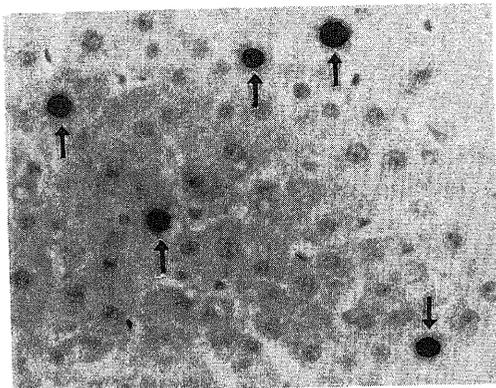


Fig. 3. Histological findings of liver one day after 30% hepatectomy (group H-1). Nuclei of S-phase hepatocytes (BrdU positive) are stained dark brown with enzyme labeled antibody method (arrows).

HE 染色を用い検討した。

#### 2) 実験 2

肝切除時における細胞動態を解析することを目的とした。肝切除前の群 (G-0群), 70% (中葉, 左外側葉) 肝切除を施行し0.5日後に犠死せしめた群 (G-0.5群), 1日の群 (G-1群), 2日の群 (G-2群), 3日の群 (G-3群), 7日の群 (G-7群), 30% (左外側葉) 肝切除を施行し0.5日後に犠死せしめた群 (H-0.5), 1日の群 (H-1群), 2日の群 (H-2群), 3日の群 (H-3群), 7日の群 (H-7群) に分けた。なお各群6匹とした。これらの肝に Feulgen, BrdU 染色を行い細胞動態を解析した。なお肝切除は午前10時~11時の間に施行した。

#### 3) 実験 3

薬剤性肝障害時における細胞動態の解析を目的とした。四塩化炭素 (tetrachlorocarbon,  $CCl_4$ ) (和光) 1ml/kg をオリーブ油にて2倍に希釈して腹腔内投与し、1日後に犠死せしめた群 (I-1群), 2日の群 (I-2群), 3日の群 (I-3群), 7日の群 (I-7群) に分けた。各群6匹とした。これらの肝に Feulgen, BrdU 染色を行い細胞動態を解析した。四塩化炭素投与は午前10~11時の間に行った。

4) 実験 4: 脾内移植肝細胞の経時的細胞動態の変化を検討した。

脾内肝組織片移植を施行し1日後に犠死せしめた群 (J-1D群), 2日の群 (J-2D群), 3日の群 (J-3D群), 6ヶ月の群 (J-6M群), 12ヶ月の群 (J-12M群) の群に分けた。各群6匹とした。脾内移植肝細胞および宿主肝細胞に Feulgen, BrdU 染色を行い細胞動態を解析した。

#### 5) 実験 5

各種ホルモンが移植後早期の脾内肝組織片に与える影響を細胞動態の変化から検討した。

肝組織片濾液 0.2ml にレギュラーインスリン0.5単位を添加し脾内に移植した。移植1日後 (K-1群), 2日後 (K-2群) に犠死せしめた。またグルカゴン0.2国際単位を添加後移植し、1日後 (L-1群), 2日後 (L-2群) に犠死せしめた。同時にヒドロコルチゾン 5mg を添加後移植し、1日後 (M-1群), 2日後 (M-2群) に犠死せしめた。各群6匹とした。脾内移植肝組織片および宿主肝に Feulgen, BrdU 染色を行い細胞動態を解析した。

#### 6) 実験 6

各種組織抽出液が移植後早期の脾内肝組織片に与える影響を、細胞動態の変化から検討した。

まず伊藤ら<sup>13)</sup>の方法に従い小腸粘膜抽出液を作製し

た。すなわち非肝切除ラットの全小腸を切除し、内腔を4°C生理食塩水にて洗浄後、肛門側1/3の小腸粘膜をスライドグラスにて擦過採取した。これに2倍の生理食塩水を加えホモジナイズ後遠沈(4°C, 4000rpm, 20分)し、その上清を濾過し得られた粗抽出液0.1mlを肝組織片濾液0.2mlに加え移植した。移植1日後(N-1群)、2日後(N-2群)におおの6匹づつ犠死せしめた。各群の脾内肝組織片および宿主肝にFeulgen, BrdU染色を施行した。同様に70%肝切除を施行し(N-2群)1日後に犠死せしめたラットの腸抽出液を作製した。その抽出液を肝組織片濾液に添加し移植した。移植1日後(O-1群)、2日後(O-2群)におおの6匹犠死せしめ、Feulgen, BrdU染色に供した。また、脾臓抽出液を作製した。非肝切除ラットの全脾臓を切除し、生理的食塩水にて灌流、血液成分除去後、眼科用鉗を用いて細切した。これに2倍の生理的食塩水を加えホモジナイズ後上清を遠沈、濾過し、得られた脾臓抽出液0.1mlを肝組織片濾液0.2mlに加え移植した。移植1日後(P-1群)、2日後(P-2群)におおの6匹づつ犠死せしめ、同様に細胞動態を解析した。

#### 7) 実験7

宿主肝切除が、移植後早期の急性期に脾内肝組織片に与える影響を細胞動態の変化から検討した。

70%宿主肝切除と同時に脾内に肝組織片を移植し、移植1日後(Q-1群)、2日後(Q-2群)に6匹づつ犠死せしめた。各群の脾内移植肝組織片および宿主肝にFeulgen, BrdU染色を行い細胞動態を解析した。

#### 8) 実験8

宿主肝切除が、移植後長期の慢性期に脾内に再構築された肝細胞集団に与える影響を、細胞動態の変化から検討した。

肝組織片移植後12ヶ月目に70%宿主肝切除を施行した。肝切除1日後(S-1群)、2日後(S-2群)におおの3匹づつ犠死せしめた。同様に30%肝切除を施行し、1日後(T-1群)、2日後(T-2群)におおの3匹づつ犠死せしめた。各群の脾内移植肝組織片および宿主肝に、Feulgen, BrdU染色を行い細胞動態を解析した。

#### 9) 実験9

薬剤性肝障害が、移植後早期の急性期に移植肝組織片に与える影響を、細胞動態の変化から検討した。

肝組織片移植と同時にオリーブ油にて2倍希釈した四塩化炭素1ml/kgを腹腔内投与した。投与1日後(U-1群)、2日後(U-2群)におおの6匹づつ犠死せしめた。各群の脾内肝組織片および宿主肝に、

Feulgen, BrdU染色を行い細胞動態を解析した。

#### 10) 実験10

薬剤性肝障害が、移植後長期の慢性期に脾内に再構築された肝細胞集団の細胞動態に与える影響につき検討した。

肝組織片移植後12ヶ月目に、オリーブ油にて2倍希釈した四塩化炭素1ml/kgを腹腔内投与した。投与1日後(V-1群)、2日後(V-2群)におおの3匹づつ犠死せしめた。各群の脾内肝細胞および宿主肝に、Feulgen, BrdU染色を行い細胞動態を解析した。

#### 11) 実験11

脾内移植肝細胞の長期生着促進因子を検討した。肝組織片濾液0.2mlにレギュラーインスリン0.5単位を添加し脾内に移植した群(W-i群, 3匹)、グルカゴン0.2国際単位添加群(W-g群, 4匹)、ヒドロコルチゾン5mg添加群(W-h群, 5匹)、70%肝切除し1日後に犠死せしめたラットの腸抽出液0.1mlを添加した群(W-e群, 3匹)、脾臓抽出液0.1ml添加群(W-s群, 3匹)、肝組織片移植と同時に70%宿主肝切除を施行した群(W-70群, 5匹)、同様に30%宿主肝切除を移植と同時に施行した群(W-30群, 3匹)につき、移植6ヶ月後、脾臓正中断面における生着肝細胞集団の面積を計測した。すなわち、脾臓断面にて肉眼上白色を呈する部分が生着肝細胞集団に一致したため、その面積をトレース紙を用いて測定し、断面における割合を概算した。肉眼上、明らかな細胞集塊を認めなかったものは測定の対象から除外した。

#### 6. 統計処理の方法

得られた百分率データはすべてprobit変換した。多群間比較の場合、一元配置分散分析法の後、Duncanの多重比較法を用いて検定した。2群間比較はStudentのt検定またはWelchの方法を用いた。いずれも危険率5%以下を有意差ありと判定した。

### 成 績

#### I. 実験1

Trypan blueを用いた作製直後の肝細胞生存率はA群85.3±7.6%, B群94.2±9.8%, C群90.6±6.9%, D群58.3±7.9%, E群52.8±9.8%, F群75.5±7.6%であり、D, E群では多数の破壊された肝細胞が観察された。脾内移植1日目のH-E染色標本では、A, F群の肝細胞は比較的変性の少ない良好な細胞形態を示したが(図4)、B, C群では多くの肝細胞はヒアリン変性に陥り、移植肝組織片辺縁の脾臓組織に接している部分に、一部変性の少ない良好な細胞形態を示す部分があった(図5)。D, E群では生存して

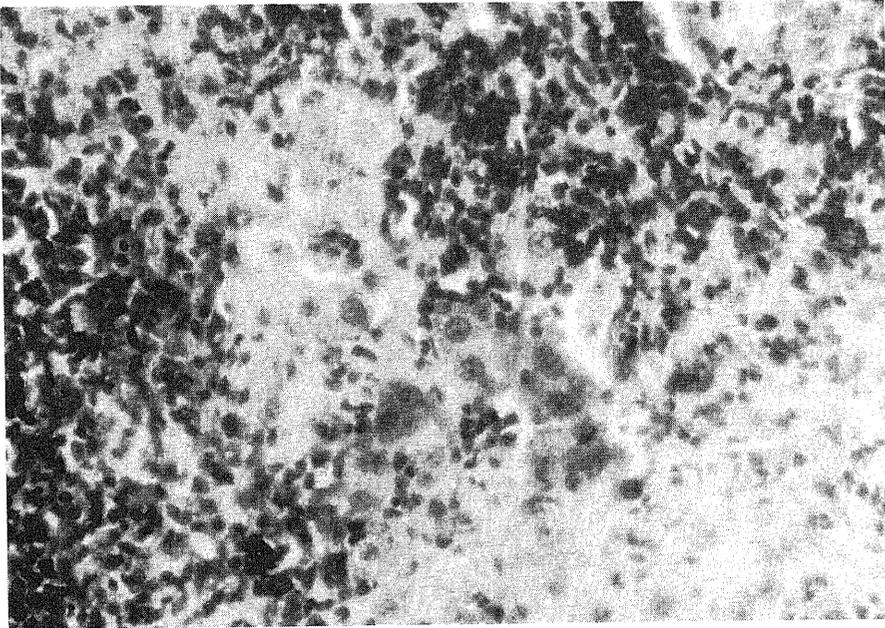


Fig. 4. Histological findings of intrasplenic hepatocytes one day after liver tissue transplantation (group A). Liver tissue fragments were prepared by combination of mincing and collagenase digestion. The hepatocytes show almost normal shape (H-E stain).

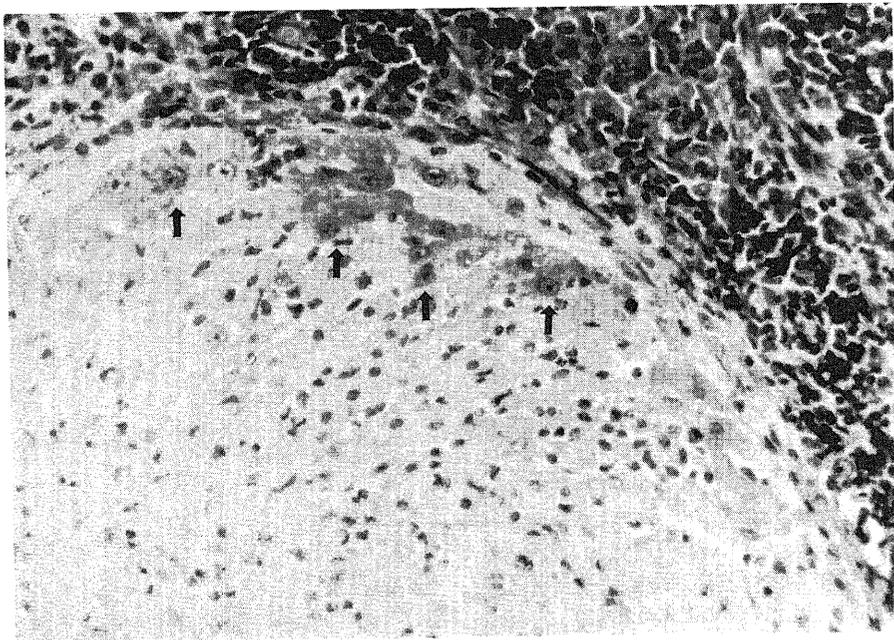


Fig. 5. Histological findings of intrasplenic hepatocytes one day after liver tissue transplantation (group B). Liver tissue fragments were prepared by mincing only. Hyaline degeneration are observed in most of hepatocytes. However, some hepatocytes located border area of liver tissue fragments (arrows) show almost normal shape (H-E stain).

Table 1. Viability and yield of liver tissue fragments

Group	Number of rats	Viability(%)	Yield(%)
A	5	85.3±7.6	61.7±5.9
B	5	94.2±9.8	88.9±4.3
C	5	90.6±6.9	86.7±8.9
D	5	58.3±7.9	23.1±7.8
E	5	52.8±9.8	9.3±3.6
F	5	75.5±7.6	72.5±6.9

Values are means±SD. Group of rats: A, combination of mincing and collagenase digestion; B, mincing only; C, press and pass through wire screen filter (pore size 1.0mm); D, press and pass through wire screen filter (pore size 0.1mm); E, crush with homogenizer; F, perfusion with 0.05% collagenase.

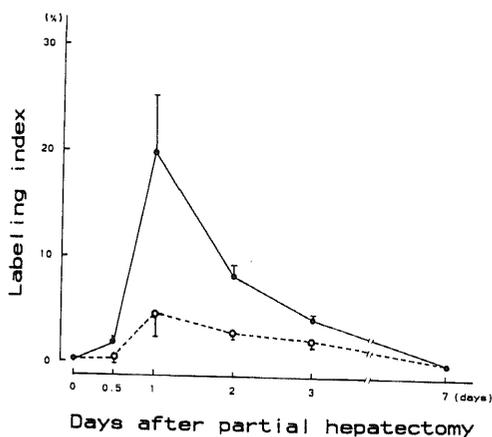


Fig. 6. Changes of labeling index (mean and standard deviation) of liver after partial hepatectomy.

●—●, group G with 30% hepatectomy.  
○---○, group H with 70% hepatectomy.

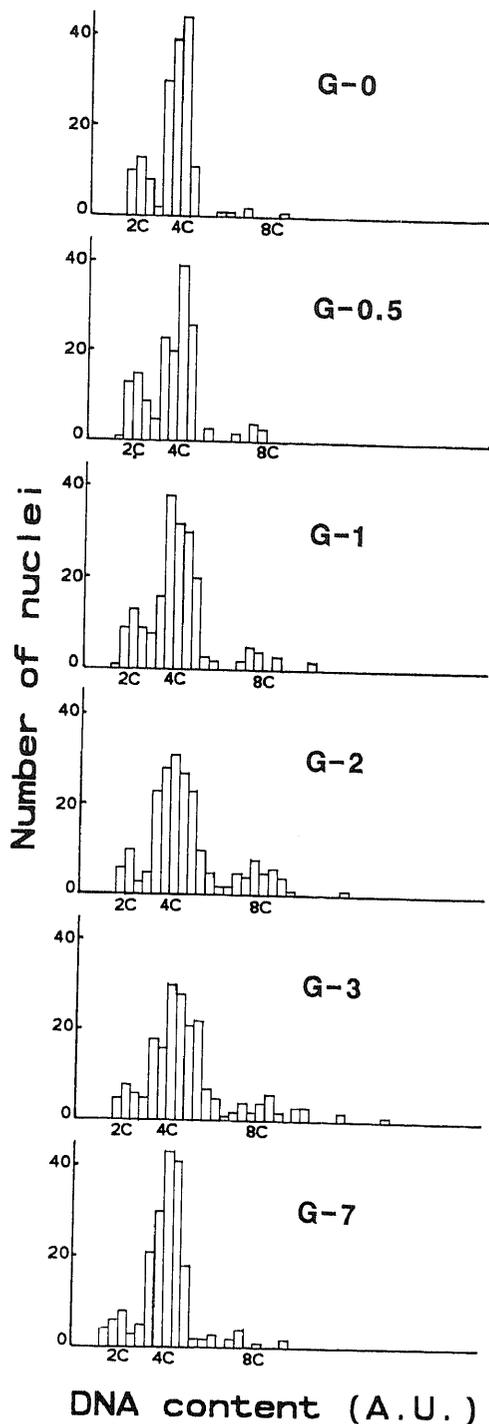


Fig. 7. Nuclear DNA content histograms of liver after 70% hepatectomy. The abscissa is DNA content expressed in arbitrary units. The ordinate is the number of nuclei measured. Group G-0, before hepatectomy; G-0.5, 12hr after hepatectomy; G-1, one day after hepatectomy; G-2, two days after hepatectomy; G-3, three days after hepatectomy; G-7, seven days after hepatectomy.

いる肝細胞はごくわずかであった。収量は、A群61.7±5.9%, B群88.9±4.3%, C群86.7±8.9%, D群23.1±7.8%, E群9.3±3.6%, F群72.5±6.9%であった(表1)。従って鉄による細切と酵素消化法の併用にて肝組織片濾液を作製しても十分であるとの結果であった。

## II. 実験2

肝切除後1日目では、残存肝は肉眼的に白色調を呈した。7日目には大きく腫大し、肝切除前の肝重量とほぼ同等となった。L. I. は G-0群0.05±0.02%, G-0.5群1.97±0.21%, G-1群19.89±5.36%, G-2群8.39±0.94%, G-3群5.68±0.45%, G-7群0.36±0.20%, H-0.5群0.13±0.11%, H-1群4.97±2.32%, H-2群2.79±0.83%, H-3群2.35±0.20%, H-7群0.27±0.08%であり、G群、H群いずれも肝切除1日後をピークにS期細胞の割合が増加し、7日目にはほぼ肝切除前の値に復した。G群に比べ肝切除量の少ないH群は、S期細胞の増加率も低かった(図6)。これに対しDNAヒストグラムを検討すると、肝切除前のG-0群では4倍体DNA量(tetraploid chromosomal complement, 4C)を持つ肝細胞が主体であり、2倍体DNA量(diploid chromosomal complement, 2C)を持つ細胞は15%前後、8倍体DNA量(octaploid chromosomal complement, 8C)以上を持つ肝細胞は2~3%であった。肝切除1日後より、4C以上のDNA量を持つ肝細胞の割合が増加し、これは7日後まで持続した。このポリプロイド化の程度は、G群でより著明であり、H群では7日後にわずかに認められたのみであった(図7, 8)。

## III. 実験3

四塩化炭素投与1日後より、肝小葉中心性に肝細胞壊死およびその周囲の肝細胞の風船状膨化像が認められた(図9)。L. I. は I-1群2.09±0.38%, I-2群2.58±0.35%, I-3群2.56±0.29%, I-7群2.09±0.47%であり、四塩化炭素投与後2~3日目をピークにわずかではあったがS期細胞の増加が認められた(図10)。DNAヒストグラムにおいては、四塩化炭素投与7日後に軽度のポリプロイド化が認められた(図11)。

## IV. 実験4

移植肝組織片は移植後脾赤色髄に密集していたが、その後徐々に変性、消失し、1週間後には赤色髄辺縁部に数個づつ集塊をなして散在しているにすぎなかった。1ヶ月後では、肝細胞はほとんど脾内に確認できなくなった。その後徐々に増殖し、6ヶ月後には肝細胞集団を形成し、一部索状構造を呈した。しかし、明

らかな小葉構造は認められなかった。この肝細胞集団は赤色髄を占拠したが、全期間を通じ白色髄内には肝細胞は認められなかった(図12)。脾内肝細胞のL. I.

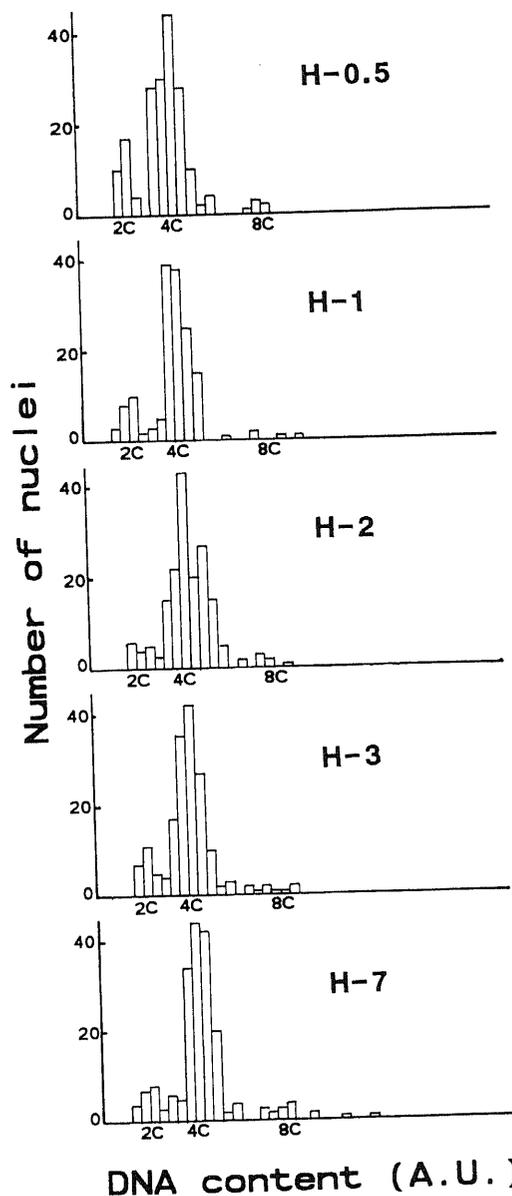


Fig. 8. Nuclear DNA content histograms of liver after 30% hepatectomy. Group H-0.5, 12hr after hepatectomy; H-1, one day after hepatectomy; H-2, two days after hepatectomy; H-3, three days after hepatectomy; H-7, seven days after hepatectomy.

は、J-1D 群 $0.27 \pm 0.38\%$ 、J-2D群 $0.16 \pm 0.27\%$ 、J-3D群 $0.34 \pm 0.46\%$ 、J-6M群 $0.72 \pm 0.29\%$ 、J-12M群 $0.80 \pm 0.19\%$ と低値のまま推移し、各群間に有意差は認められなかった。宿主肝の L. I. はすべて $0.1\%$ 以下であった(表2)。脾内肝細胞の DNA ヒ

ストグラムは、移植後1週間までは4C以下比較的広い範囲に分布した。その後、徐々にポリプロイド化が進行し、12ヶ月目のJ-12群では、8C前後の細胞が全体の10%前後を占めた。宿主肝のDNAヒストグラムは、移植後1週間までは非移植群(G-0群)と同様

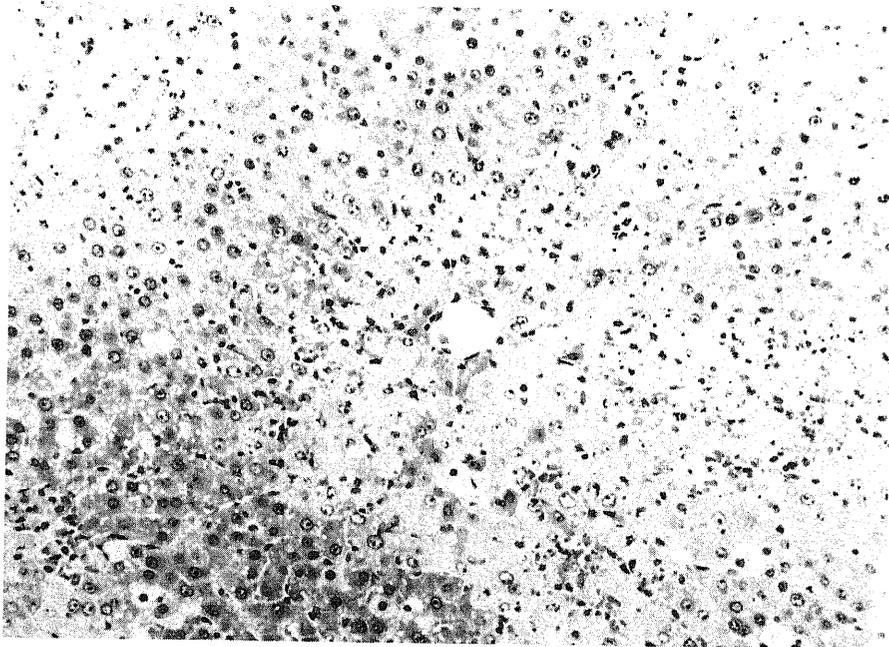


Fig. 9. Histological findings of liver one day after  $\text{CCl}_4$  administration (group I-1). Centrolobular necrosis and ballooning degeneration of hepatocytes are observed.

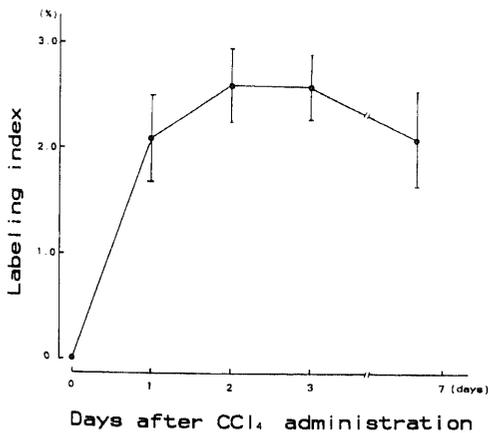


Fig. 10. Changes of labeling index (mean and standard deviation) of liver after  $\text{CCl}_4$  administration (group I).

Table 2. Labeling index of intrasplenic hepatocytes and host liver after liver tissue transplantation

Group	Number of rats	Labeling index (%)	
		Intrasplenic hepatocytes	Host liver
J-1D	6	$0.27 \pm 0.38$	$0.05 \pm 0.01$
J-2D	6	$0.16 \pm 0.27$	$0.05 \pm 0.02$
J-3D	6	$0.34 \pm 0.46$	$0.04 \pm 0.02$
J-6M	6	$0.72 \pm 0.29$	$0.06 \pm 0.03$
J-12M	6	$0.80 \pm 0.19$	$0.04 \pm 0.03$

Values are means  $\pm$  SD. Group of rats: J-1D, one day after transplantation; J-2D, two days after transplantation; J-3D, three days after transplantation; J-6M, six months after transplantation; J-12M, twelve months after transplantation

であったが、その後加齢とともにポリプロイド化が進行した(図13)。

#### V. 実験5

光顕上、各群に特徴的な所見は認められなかった。L. I. は K-1群 $0.33 \pm 0.40\%$ 、K-2群 $0.44 \pm 0.51\%$ 、L-1群 $0.32 \pm 0.36\%$ 、L-2群 $0.24 \pm 0.38\%$ 、M-1群 $0.35 \pm 0.31\%$ 、M-2群 $0.52 \pm 0.83\%$ 、いずれも低値で、コントロール群(J-1D, J-2D群)に比較して有意差はなかった。DNA ヒストグラムもコントロール群とほぼ同様であった。

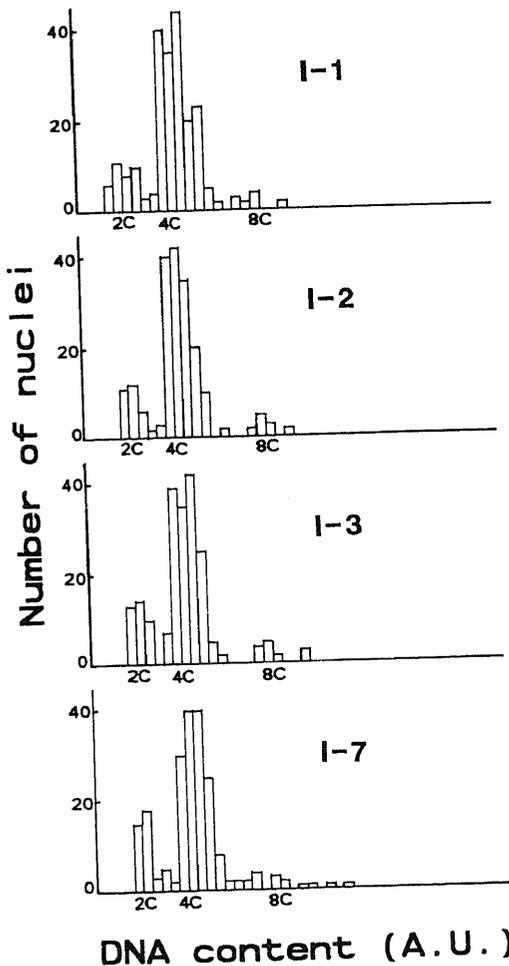


Fig. 11. Nuclear DNA content histograms after  $\text{CCl}_4$  administration. Group I-1, one day after  $\text{CCl}_4$  administration; I-2, two days after  $\text{CCl}_4$  administration; I-3, three days after  $\text{CCl}_4$  administration; I-7, seven days after  $\text{CCl}_4$  administration.

#### VI. 実験6

光顕上、脾内移植肝組織片、宿主肝とも各群すべてコントロール群(J-1, J-2群)と大差なかった。L. I. は脾内移植肝組織片で N-1群 $0.33 \pm 0.27\%$ 、N-2群 $0.38 \pm 0.32\%$ 、O-1群 $0.27 \pm 0.38\%$ 、O-2群 $0.24 \pm 0.27\%$ 、P-1群 $0.30 \pm 0.38\%$ 、P-2群 $0.30 \pm 0.36\%$ といずれも低値であり、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。宿主肝の L. I. はいずれも $0.1\%$ 以下であった。DNA ヒストグラムは脾内移植肝組織片、宿主肝ともコントロール群とほぼ同等であった(表3)。

#### VII. 実験7

脾内肝組織片の L. I. は、Q-1群 $0.29 \pm 0.34\%$ 、Q-2群 $0.33 \pm 0.37\%$ 、R-1群 $0.34 \pm 0.27\%$ 、R-2群 $0.30 \pm 0.89\%$ といずれも低値で、コントロール群

Table 3. Labeling index of intrasplenic hepatocytes and host liver after liver tissue transplantation with mixture of hormone or extract of viscera into liver tissue fragments

Group	Number of rats	Labeling index(%)	
		Intrasplenic hepatocytes	Host liver
K-1	6	$0.33 \pm 0.40$	$0.04 \pm 0.01$
L-1	6	$0.32 \pm 0.36$	$0.04 \pm 0.01$
M-1	6	$0.35 \pm 0.31$	$0.05 \pm 0.02$
N-1	6	$0.33 \pm 0.27$	$0.05 \pm 0.01$
O-1	6	$0.27 \pm 0.38$	$0.04 \pm 0.01$
P-1	6	$0.30 \pm 0.38$	$0.06 \pm 0.02$
K-2	6	$0.44 \pm 0.51$	$0.05 \pm 0.02$
L-2	6	$0.24 \pm 0.38$	$0.05 \pm 0.01$
M-2	6	$0.52 \pm 0.83$	$0.06 \pm 0.02$
N-2	6	$0.38 \pm 0.32$	$0.04 \pm 0.02$
O-2	6	$0.24 \pm 0.27$	$0.03 \pm 0.02$
P-2	6	$0.30 \pm 0.36$	$0.05 \pm 0.03$

Values are means  $\pm$  SD. Group of rats: K-1, one day after transplantation with mixture of glucagon; M-1, one day after transplantation with mixture of hydrocortisone; N-1, one day after transplantation with mixture of extract from the ileum (without hepatectomy); O-1, one day after transplantation with mixture of extract from the ileum (with 70% hepatectomy); P-1, one day after transplantation with mixture of extract from the spleen (without hepatectomy); K-2, two days after transplantation with mixture of insulin; L-2, two days after transplantation with mixture of glucagon; M-2, two days after transplantation with mixture of hydrocortisone; N-2, two days after transplantation with mixture of extract from the ileum (without hepatectomy); O-2, two days after transplantation with mixture of extract from the ileum (with 70% hepatectomy); P-2, two days after transplantation with mixture of extract from the spleen (without hepatectomy).

(J-1D, J-2D群)と比較して有意差はなかった. 宿主肝の L. I. は, Q-1群 $20.95 \pm 3.05\%$ , Q-2群 $7.70 \pm 1.14\%$ , R-1群 $6.00 \pm 0.89\%$ , R-2群 $2.71 \pm 0.79\%$ と, 非移植肝切除群 (G-1, G-2, H-1, H-2群)とは

ほぼ同等であった (図14). DNA ヒストグラムの検討でも, 脾内肝組織片はコントロール群と, 宿主肝は非移植肝切除群と, ほぼ同様のプロイディパターンを示した (図15).

VIII. 実験 8

脾内に再構築された肝細胞集団の L. I. は, S-1群 $19.1 \pm 4.74\%$ , S-2群 $7.12 \pm 1.09\%$ , T-1群 $6.42 \pm 0.96\%$ , T-2群 $2.08 \pm 0.58\%$ であり, 一方宿主肝の L. I. は, S-1群 $20.61 \pm 3.77\%$ , S-2群 $7.79 \pm 1.37\%$ , T-1群 $6.20 \pm 0.55\%$ , T-2群 $2.56 \pm 0.87\%$ であった (図16, 17). 脾内肝細胞集団と宿主肝はほぼ同等であった. DNA ヒストグラムを検討すると, S群の脾内肝細胞集団, 宿主肝ともポリプロイド化が認められた (図18).

IX. 実験 9

光顕上, 宿主肝には U-1群, U-2群とも, 小葉中心部の肝細胞壊死およびその周囲の肝細胞の風船状膨化像が認められた. これに対し, 脾内移植肝組織片には特に変化が認められなかった. 脾内肝組織片の L. I. は, U-1群 $0.17 \pm 0.26\%$ , U-2群 $0.28 \pm 0.31\%$ と低値のままであったが, 宿主肝の L. I. は, U-1群 $1.98 \pm 0.36\%$ , U-2群 $1.73 \pm 0.27\%$ と軽度の上昇を示した. これは非移植四塩化炭素投与群 (I-1, I-2群) とほぼ同等であった. DNA ヒストグラムは, 脾内

Table 4. Proliferation of hepatocytes in the spleen six months after liver tissue transplantation

Group	Number of rats	The rate of replacement in the spleen (%)
W-i	3	$38.0 \pm 5.29^*$
W-g	4	$31.0 \pm 5.29$
W-h	5	$20.6 \pm 7.44$
W-e	3	$19.5 \pm 6.21$
W-s	3	$18.3 \pm 2.52$
W-70	5	$49.4 \pm 10.4^{**}$
W-30	3	$24.0 \pm 5.26$
W-c	3	$19.3 \pm 8.33$

Values are means  $\pm$  SD. Group of rats: W-i, mixture of 0.5 unit regular insulin into the liver tissue fragments; W-g, mixture of 0.2 international unit glucagon; W-h, mixture of 5 mg hydrocortisone; W-e, mixture of extract from the ileum; W-s, mixture of extract from the spleen; W-70, 70% hepatectomy; W-30, 30% hepatectomy; W-c, liver tissue transplantation (control).

\* $p < 0.05$  vs W-c group; \*\* $p < 0.05$  vs W-c & W-30 group

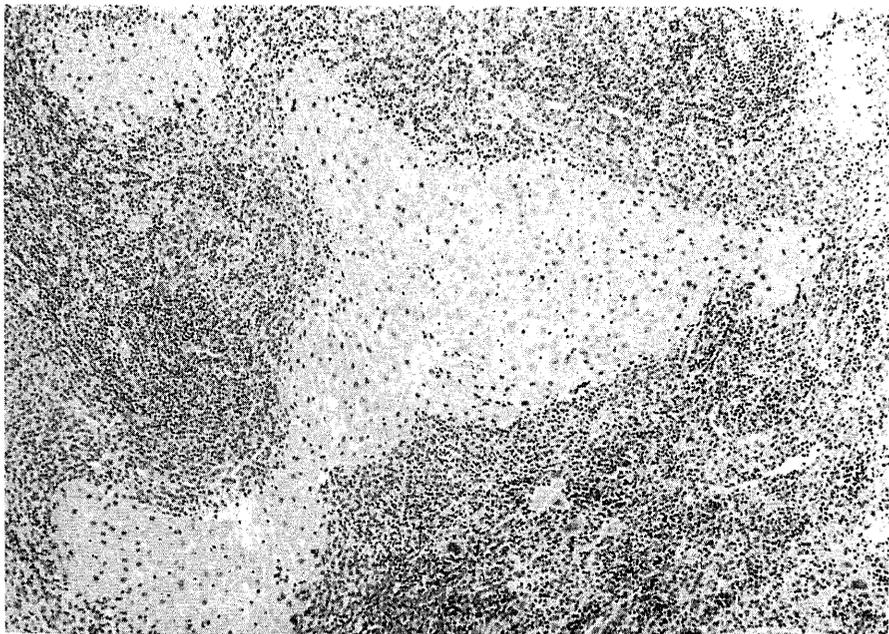


Fig. 12. Histological findings of intrasplenic hepatocytes twelve months after transplantation (H-E stain). Red pulp of spleen is occupied by hepatocytes.

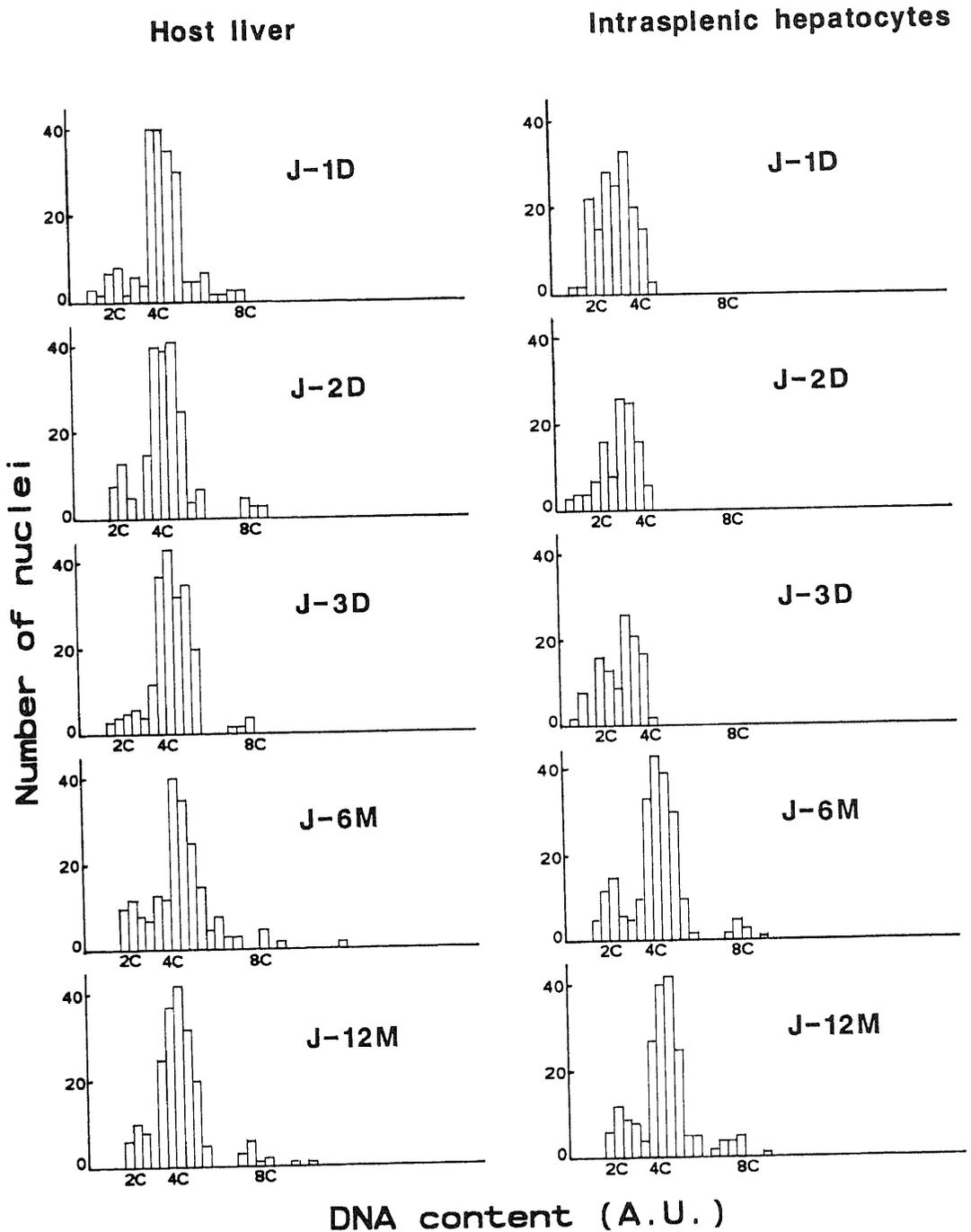


Fig. 13. Nuclear DNA content histograms of intrasplenic hepatocytes and host liver after intrasplenic liver tissue transplantation. Group J-1D, one day after transplantation; J-2D, two days after transplantaion; J-3D, three days after transplantaion; 6M, six months after transplantation; J-12M, twelve months after transplantation.

移植肝組織片ではコントロール群 (J-1D, J-2D群) と、宿主肝では非移植四塩化炭素投与群 (I-1, I-2群) と大差はなかった。

X. 実験10

光顕上、宿主肝は実験9と同様の变化を示したが、脾内に再構築された肝細胞集団には特に変化が認められなかった (図19)。脾内肝細胞集団の L. I. は、

V-1群 $0.75 \pm 0.34\%$ 、V-2群 $0.84 \pm 0.21\%$ であり、コントロール群 (J-12M群) に対し有意差は認められなかった。宿主肝の L. I. は、V-1群 $1.72 \pm 0.27\%$ 、V-2群 $1.88 \pm 0.24\%$ であり、非移植四塩化炭素投与群 (I-1, I-2群) とほぼ同等であった (図20)。DNA ヒストグラムは、宿主肝、脾内肝細胞集団いずれもコントロール群とほぼ同様であった (図21)。

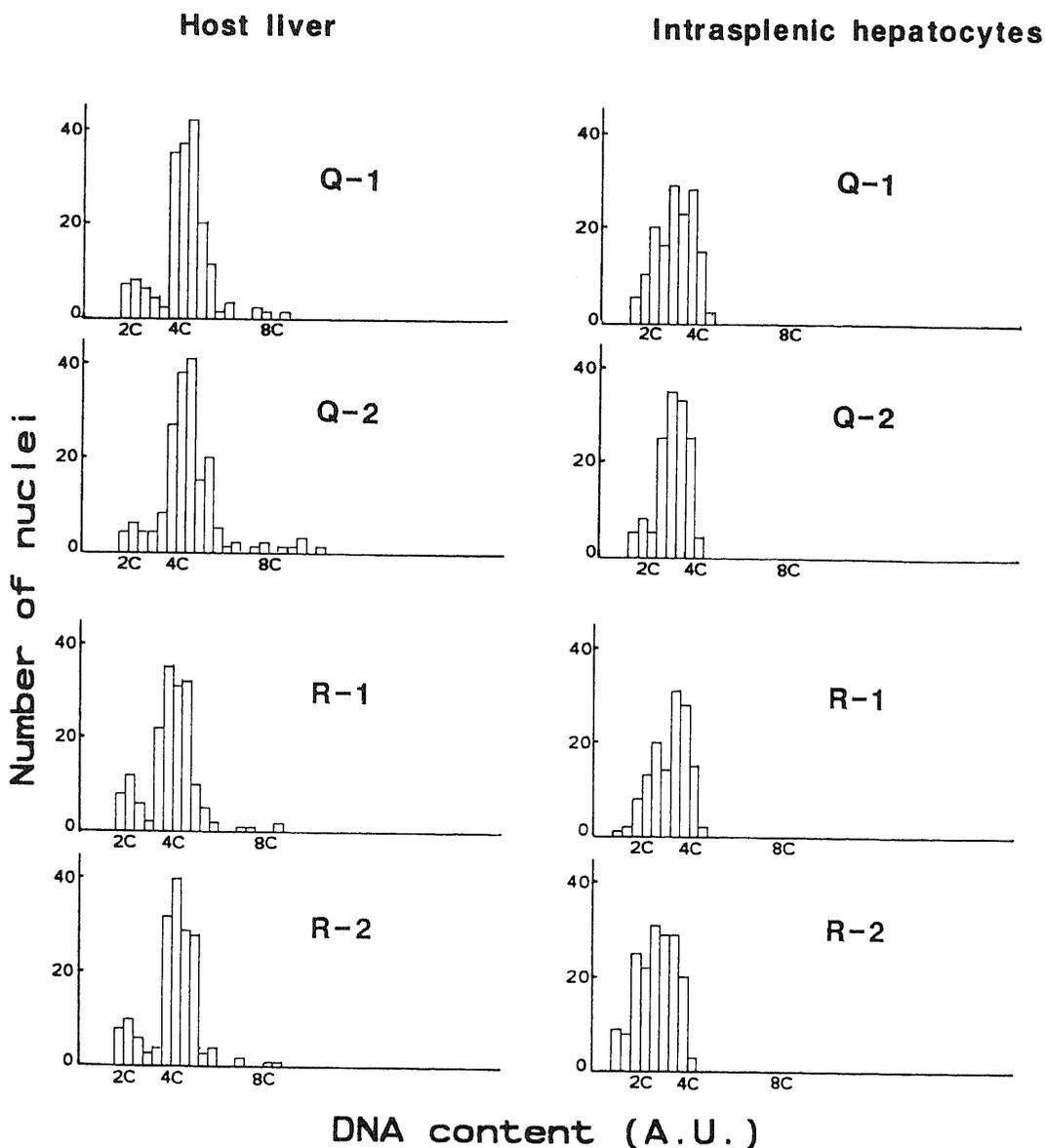


Fig. 15. Nuclear DNA content histograms of intrasplenic hepatocytes and host liver after partial hepatectomy in acute phase of transplantation. The names of group are the same with fig. 14.

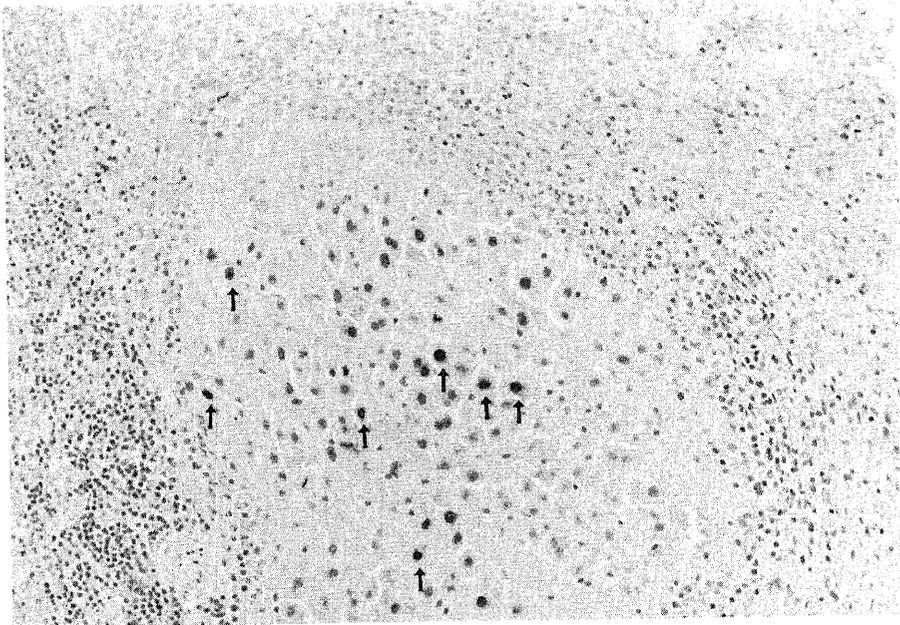


Fig. 16. Histological findings of intrasplenic hepatocytes two days after 70% hepatectomy. BrdU positive nuclei are stained by enzyme-labeled antibody method (arrows).

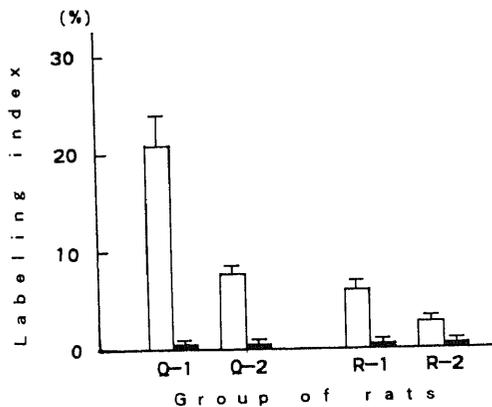


Fig. 14. Labeling index of intrasplenic hepatocytes and host liver after partial hepatectomy in acute phase of transplantation. Group Q-1, one day after 70% hepatectomy; Q-2, two days after 70% hepatectomy; R-1, one day after 30% hepatectomy; R-2, two days after 30% hepatectomy. Each bar represents the mean and standard deviation in six rats. Open bars, host liver; solid bars, intrasplenic hepatocytes.

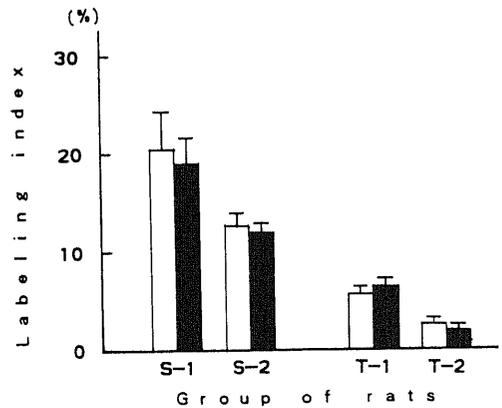


Fig. 17. Labeling index of intrasplenic hepatocytes and host liver after partial hepatectomy in chronic phase of transplantation. Group S-1, one day after 70% hepatectomy; S-2, two days after 70% hepatectomy; T-1, one day after 30% hepatectomy; T-2, two days after 30% hepatectomy. Each bar represents the mean and standard deviation in three rats. Open bars, host liver; solid bars, intrasplenic hepatocytes.

XI. 実験11

脾内移植肝細胞集団の占拠率は、W-i群 38.0±5.29%, W-g群31.0±5.29%, W-h群20.6±7.44%, W-e群19.5±6.21%, W-s群18.3±2.52%, W-70群49.4±10.4%, W-30群24.0±5.26%, W-c群19.3±8.33%であった(表4)。インスリン添加群(W-i群), 70%肝切除群(W-70群)ではコントロール

群(W-c群)に比べ占拠率は有意に上回っていた。また70%肝切除群と30%肝切除群(W-30群)間でも占拠率に有意差がみられた(p<0.05)。

考 察

生体内で最も大きな実質臓器である肝臓は、生命維持に不可欠な臓器であり多種多様な機能を有する。肝

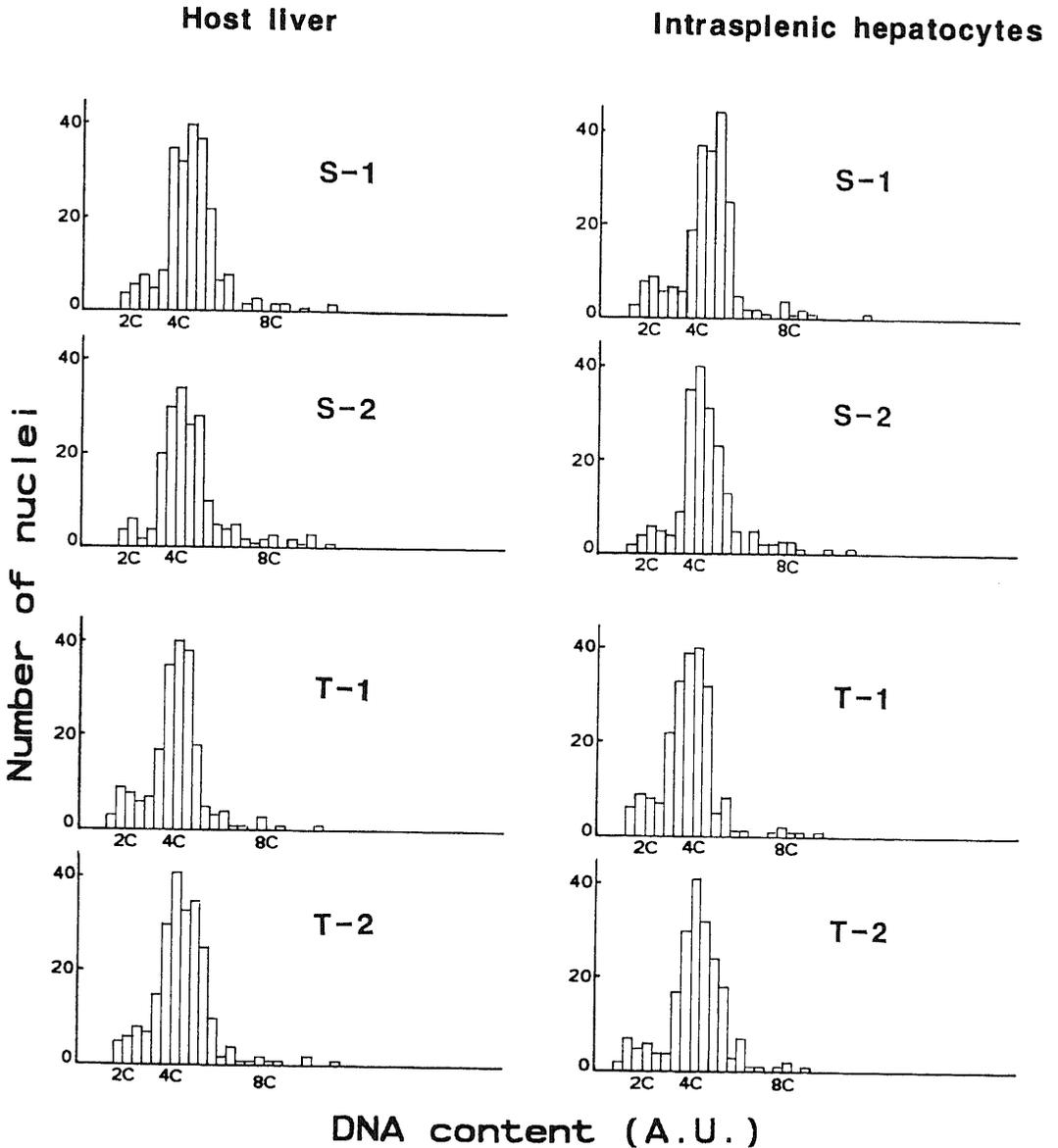


Fig. 18. Nuclear DNA content histograms of intrasplenic hepatocytes and host liver after partial hepatectomy in chronic phase of transplantation. The names of group are the same with fig. 17.

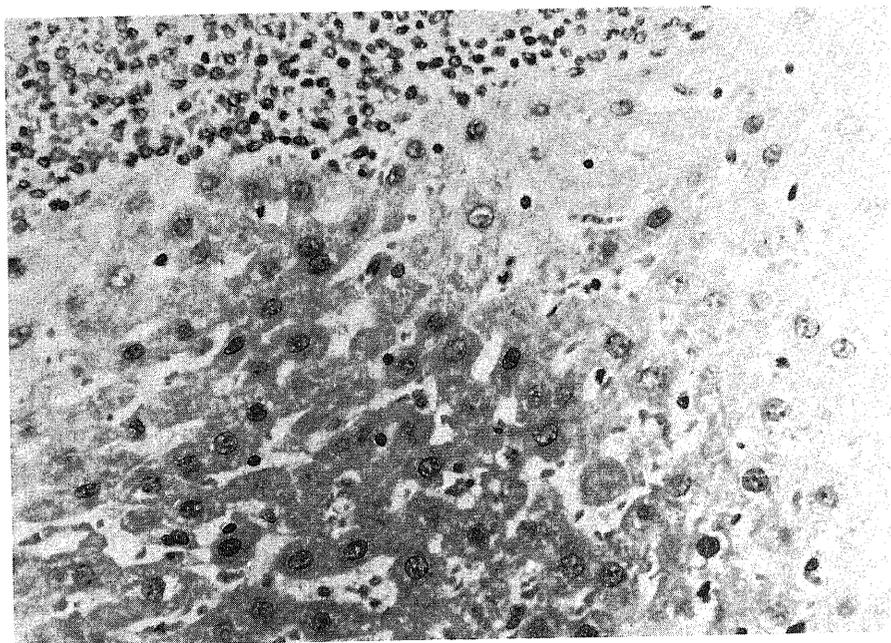


Fig. 19. Histological findings of intrasplenic hepatocytes one day after  $\text{CCl}_4$  administration in chronic phase of transplantation. The hepatocytes keep almost normal shape (group V-1, H-E stain).

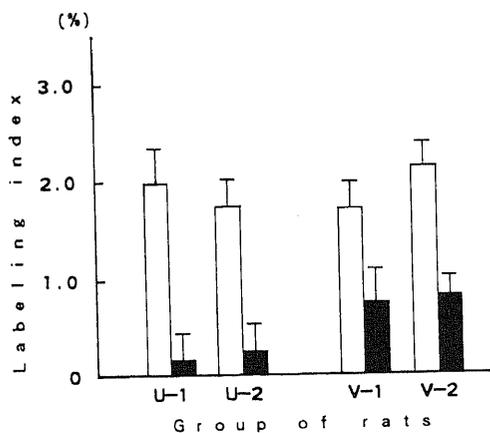


Fig. 20. Labeling index of intrasplenic hepatocytes and host liver after  $\text{CCl}_4$  administration. Group U-1, one day after  $\text{CCl}_4$  administration in acute phase of transplantation; U-2, two days after  $\text{CCl}_4$  administration in acute phase of transplantation; V-1, one day after  $\text{CCl}_4$  administration in chronic phase of transplantation; V-2, two days after  $\text{CCl}_4$  administration in chronic phase of transplantation. Each bar represents the mean and standard deviation in three or six rats. Open bars, host liver; solid bars, intrasplenic hepatocytes.

不全に対し、現在臨床的には血漿交換法が普及しているが、あくまで肝の解毒機能の一部を代行しているにすぎない。現時点では肝臓機能を十分に代行する唯一の方法が肝移植であるが、生体肝、脳死体肝移植いずれも倫理的問題が解決しておらず、たとえ肝移植が社会的に容認されたとしても、絶対的にドナー肝の数が不足する。そこで体内に肝細胞を移植し増殖させ、宿主肝の補助をさせる試みが生まれた。

Ribbert<sup>2)</sup>により肝組織片移植が、また Rugstadら<sup>12)</sup>により単離肝細胞移植がなされて以来、皮下<sup>13)</sup>、門脈内<sup>13)-15)</sup>、腸間膜<sup>16)</sup>、脾<sup>17)</sup>など、様々な臓器に肝組織片移植、肝細胞移植が試みられてきた。しかし、移植後肝細胞は急激に壊死、消失し、長期にわたり生着させることは非常に困難であった。その後、水戸<sup>30-5)</sup>、川浦ら<sup>9)</sup>は、肝細胞移植に最適な臓器は脾臓であり、脾内で肝細胞は1年以上生存、増殖していくことを報告した。脾臓は血流が豊富であり、正常肝類洞に類似した脾洞を有することなどがその理由とされる<sup>18)</sup>。そこで本実験でも移植部位として、脾臓を選択した。

実験1では移植肝細胞、肝組織片作製法につき検討した。現在、肝細胞濾液作製法としては Berry & Friend<sup>19)</sup>によって確立された酵素消化法が主流となっている。すなわち、門脈から酵素液を灌流せしめ単離

肝細胞を得る方法である。この方法で得られた肝細胞濾液を脾内に移植したところ、移植1日目では変性も少なく肝細胞濾液作製法として適当であると思われた。しかし部分切除肝には門脈内カニューレションが困難であり、本法の臨床応用は困難であると考えられた。

これに対し、肝細胞を単離せず、組織片のまま移植する試みも古くより行われてきた。この作製法も、鉄

による細切のみ<sup>20</sup>、鉄による細切に酵素消化法を併用したもの<sup>17</sup>、ステンレスメッシュを用いて圧搾する方法<sup>18</sup>、電動回転式のステンレス製2枚刃により機械的に細切する方法<sup>21</sup>など各種ある。これらにつき検討を加えた。著者の実験では、鉄による細切のみでは、移植後数時間で大部分の移植肝組織片はヒアリン変性に陥った。しかし、組織片辺縁の血流豊富と考えられる部分は良好な細胞形態を示した。このことから、個々

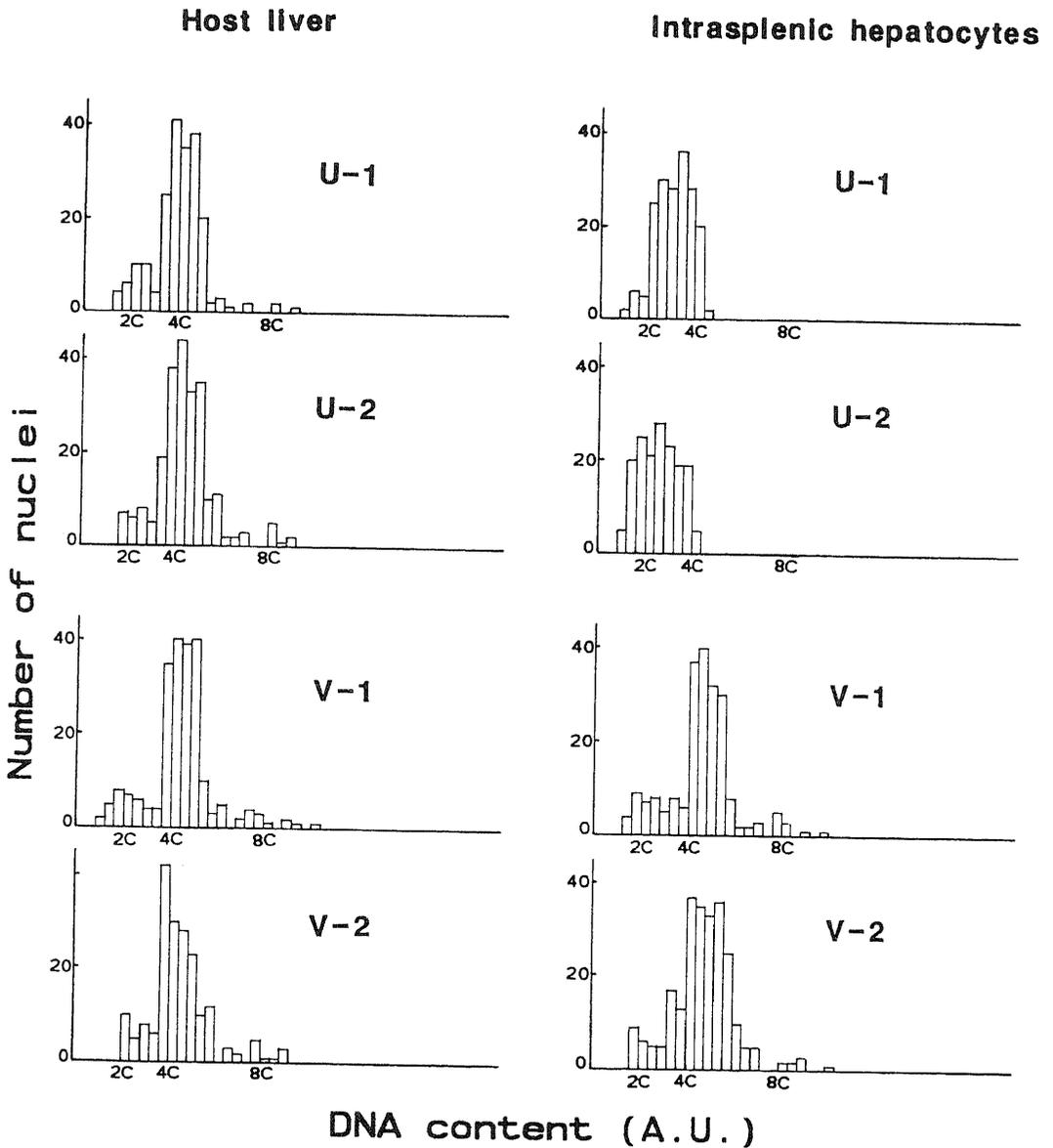


Fig. 21. Nuclear DNA content histograms of intrasplenic hepatocytes and host liver after  $\text{CCl}_4$  administration. The names of group are the same with fig. 20.

の組織片の大きさを小さくし血流との接触面積を増大させることが重要と考えられた。しかし機械的に超音波ホモジナイザーなどを使用して肝臓を破碎すると、多くの肝細胞は破壊され、移植1日後の生存肝細胞はきわめて少数であった。そこで鉄による細切と酵素消化法を併用し、肝細胞数個～十数個程度の組織片として移植すると、単離肝細胞に遜色ない良好な細胞形態を示した。しかし、本法にて得られた肝組織片濾液からさらに単離肝細胞のみを分離すると、収量が10%程度に低下し実用的とはいえなかった。よって細切と酵素消化法併用による脾内肝組織片移植が最も合理的であると判断した。

従来の脾内肝組織片移植、あるいは肝細胞移植に関する研究は、形態面、あるいは代謝、解毒面に着目したものがほとんどで<sup>20)~24)</sup>、細胞動態を詳細に検討したものは見当たらない。わずかに肝細胞の有糸分裂像、あるいは2核細胞の割合を計測したものが散見されるのみである<sup>9)</sup>。本研究では、抗 BrdU モノクローナル抗体によるS期細胞標識法と Feulgen-DNA 顕微蛍光測光法を併用し、詳細な細胞動態の評価を行うとともに、それを指標として、脾内肝細胞増殖促進因子の検討を行った。

BrdU は pyrimidine nucleoside のひとつである thymidine の化学類似体であるため、DNA 合成期(S期)細胞に与えられるとその構成材料としてDNAに取りこまれる。したがって、Gratzner<sup>25)</sup>によって開発された抗 BrdU モノクローナル抗体を用い染色することにより、容易にS期細胞を同定することができる。しかし、S期はG1, S, G2, M期とめぐる細胞周期の一部分に過ぎず、DNA ヒストグラムと合わせて評価することにより、はじめて細胞動態の全体像を把握することが可能となる。

近年、DNA ヒストグラム作成にはフローサイトメトリー(flow cytometry)が盛んに用いられている。本法は1秒間に約5000個の細胞を測定できるので、きわめて定量性が高い<sup>26)</sup>。しかし脾内肝組織片、あるいは肝細胞集団を対象とする場合、多量の脾内リンパ系細胞混入が避けられず利用不可能であった。そこでパラフィン包埋切片を用い、これに対して Schiff 反応に基づく Feulgen-DNA 染色をおこない、落射型蛍光顕微鏡にて測光、解析した。測光用試料としては12 $\mu$ の厚切切片を用い<sup>9)</sup>、連続する H-E 染色標本と対応させながら測光した。本法では多核細胞の区別が困難であること、核の重なりや切断が避けられないこと、非特異蛍光の影響が大きいことなどの欠点がある<sup>27)</sup>が、BrdU 染色と併用することにより細胞動態の傾向を

ることができた。生着した脾内肝細胞を単離、分散することは困難なため、脾内肝細胞の伸展塗抹標本による測光は施行できなかった。

実験2では基礎実験として、肝切除後の残存肝の細胞動態について検討した。これについては現在まで、多数の報告がある<sup>28)~31)</sup>。著者の実験結果はおおむね諸家の報告と一致した。すなわち、肝切除後、残存肝は急速に増大し、ほぼ1週間でもとの重量に回復すること、S期細胞の割合は切除後1日目をピークに急速に増加し、7日目には旧に復すること、肝切除量が大きいほど残存肝の増殖が活発なこと、肝切除施行後ポリプロイド化が進行し、それは長期間持続することなどである。

実験3では同じく基礎実験として、急性薬剤性肝障害時における肝細胞動態につき検討した。薬剤は、実験的肝障害モデル作製に頻用される四塩化炭素を使用した。四塩化炭素による肝障害の発生機序として、肝ミクロゾームで、フリーラジカルであるトリクロールエチレンが産生され、これが引き金となってミクロゾームに存在する抗酸化物質が減少し、膜リン脂質の不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸が過酸化され、膜の生理機能が損なわれ肝障害をきたすという説<sup>32)</sup>、またその膜障害の結果細胞内へ  $Ca^{++}$  蓄積が助長され<sup>33)</sup>、ひいてはミトコンドリア内の  $Ca^{++}$  が増加し、ミトコンドリアにおける酸化的燐酸化が抑制されるという説<sup>34)</sup>がある。著者は、四塩化炭素障害肝の細胞動態を解析した結果、四塩化炭素投与後2~3日目をピークにS期細胞の割合が増加すること、軽度ながらポリプロイド化が進行することをあきらかにした。以上より、BrdU 染色および Feulgen 染色による蛍光測光法は、肝細胞の細胞動態解析にきわめて有用であることが確認された。

以上の結果を基礎として、まず脾内移植された肝細胞の細胞動態を経時的に解析した。その結果、移植直後より12ヶ月目まではS期細胞の割合は低値のまま一定に推移した。一方、DNA 量を検討すると、移植後1週間までは脾内肝組織片は変性過程を反映し、4C以下広い範囲に分散するが、脾内に肝細胞集団が再構築されてからは宿主肝細胞と同様4C細胞が主体をなし、さらに8C細胞も増加してくることが判明した。Alfert<sup>35)</sup>、Nadal<sup>36)</sup>、その他<sup>37)38)</sup>によって報告されたように、ラット宿主肝では、出生直後は1核2C細胞が主体であるが、その後間もなく2核2C細胞が増加し、離乳期には1核4C細胞が急速に増加し8週齢にいたって肝細胞の主体となる。その後もポリプロイド化は進行し、1核8C細胞も徐々に増加してくる。こ

の現象の意義は明らかではないが、生理的な肝細胞の新生交替が生じる過程で細胞増殖活性が発揮され、それが加算蓄積された一種の老化現象と解釈されている<sup>37)</sup>。脾内に再構築された肝細胞集団においてもこのようなポリプロイド化が認められたことは興味深い。

ところで脾内肝細胞移植、肝組織片移植においては、移植肝細胞は移植後急速に減少し、1ヶ月後には肝細胞はほとんど認められなくなる。その後徐々に増殖を開始し、6ヶ月を過ぎると結節状の肝細胞集団を構築する。臨床応用を考えた場合、移植直後、および細胞集団再構築後の移植肝細胞それぞれに対し、対策が必要である。すなわち、前者では肝細胞変性、消失の阻止および活性の維持、後者では肝細胞生着、増殖の促進が重要な課題となる。その目的で各種ホルモンおよび組織抽出液を肝組織片濾液に添加し、その効果を検討した。

初代培養肝細胞において<sup>3</sup>H-thymidineの取りこみによりDNA合成活性を評価したところ、インスリン<sup>38)</sup>、グルカゴン<sup>40,41)</sup>、小腸抽出液<sup>11,30)</sup>などは合成促進因子、グルココルチコイド<sup>42)</sup>、脾臓抽出液<sup>43)</sup>などは抑制因子として作用するとされている。著者の実験では、移植後早期、これら因子は脾内移植肝細胞の細胞動態に影響を与えなかった。その理由として、移植後急激に肝細胞が消失していくことから明らかなように、脾臓内は肝細胞生存にとり非常に厳しい環境であり、これら因子に対する応答能を獲得できない可能性が考えられる。またこの応答能を獲得するには肝細胞同志の細胞間接合が密でないことが重要であり<sup>44)~46)</sup>、本実験のように肝細胞を単離せず組織片をそのまま移植すると、細胞間接合が密でありすぎるためこれら各種因子に対する応答能を獲得できない可能性も考えられる。

これに対し、著者の実験では移植慢性期の脾内肝組織再構築にインスリンは促進的に作用した。川浦ら<sup>47)</sup>は、インスリンは移植後1週間連日皮下注射しても再構築促進効果を示さず、肝細胞とともに注入されてはじめて脾内肝組織再構築促進効果を呈したと報告している。著者の実験でも当初インスリンを肝組織片濾液に混合したのみで、その後の追加投与はおこなわなかった。よって、高濃度のインスリンは肝組織片濾液内の肝細胞に直接保護的作用をおよぼすことによって移植直後の脾内肝細胞の急速な変性消失を抑制し、その結果脾内に生き残る肝細胞数が増加して6ヶ月後の脾内肝細胞占拠面積が増大したものと考えられる。

宿主肝の肝切除が移植肝組織片におよぼす影響を検討すると、移植直後と再構築後の肝細胞では、その細

胞動態に大きな違いが認められた。すなわち移植直後の肝細胞は宿主肝切除によりほとんど影響を受けなかったが、再構築後の肝細胞は宿主肝と同様急激な増殖をきたした。Mooltenら<sup>48)</sup>は、2匹のラットに体外交差循環を行い、1匹に肝部分切除を施行すると一方の非切除ラットの肝細胞にDNA量の高まりと有糸分裂の増加とが経時的に進むことを報告した。これは、肝再生が体液性因子の制御を受けることを意味する。その後、多くの研究者によって肝切除後のラット血清より肝再生促進因子が抽出され<sup>49,50)</sup>、初代培養肝細胞に対しDNA合成促進作用が認められた。慢性期、脾内に再構築された肝細胞集団は、宿主肝細胞と同じようにこの肝再生促進因子に反応したものと思われた。これに対して移植直後の脾内肝細胞は、各種ホルモン、組織抽出液などと同様にこの肝再生促進因子に対する応答能を獲得していないものと考えられた。

草野ら<sup>18)</sup>は脾内移植肝細胞を電子顕微鏡学的に検討したところ、移植後8ヶ月頃より、肝細胞表面をおおう微絨毛およびそれに接した内皮細胞によってDisse腔の形成とともに、個々の移植肝細胞は正常肝細胞に酷似してくると報告した。PAS染色の染色性、アルブミン合成の点でも脾内移植肝細胞は正常宿主肝細胞とほぼ同等であるという。著者の実験で、移植12ヶ月目の肝細胞は形態学的、機能的のみならず細胞動態的にも正常肝細胞とほぼ同等であることが強く示唆された。

また、移植と同時に70%宿主肝切除した群は、6ヶ月後の脾内肝細胞集団占拠率が增大した。インスリンと同様に、肝切除時産生される肝再生促進因子は移植直後の脾内肝組織片に対して細胞動態の変化はひきおこさないけれども、なんらかの保護的作用をおよぼすものと考えられた。

肝組織あるいは肝細胞移植により、急性肝不全モデル動物の生存率が向上したとの報告は多い<sup>14)20)24)</sup>。しかし移植された肝細胞は宿主肝のたかだか数パーセントに過ぎず、移植肝細胞が解毒能を発揮した結果とは考えにくい。Makowkaら<sup>51)</sup>は肝細胞移植によって劇症肝炎ラットの生存率が向上するには、組織適合性の影響はあまりなく、異種間の移植でも生存率の向上が認められたと報告し、この理由として、移植された肝細胞自体、あるいは肝細胞の細胞質分画が宿主肝の内因性再生能を刺激するためであると説明した。一方、O'Neill<sup>52)</sup>らは肝細胞培養に際して得られた上清液を急性肝障害を惹起させたラットの脾内、腹腔内、静脈内に注入し、これらすべての群で生存率の改善が得られ、さらにその成績は肝細胞注入群より良好であった

と報告している。これらは、移植された肝細胞が解毒機能を発揮したためではなく、移植肝細胞より再生された物質が生存率の改善をもたらした可能性を示している。著者の実験では、急性肝不全ラットに脾内肝組織片移植をすることによって、宿主肝の細胞動態は影響を受けず、宿主肝細胞の再生、増殖促進作用を認めなかった。今後肝障害惹起物質の種類、投与量などの検討が必要であろうが、移植肝組織片は宿主肝細胞に対し再生促進作用は持たず、むしろ保護作用、あるいは解毒機能活性化作用をおよぼしているものと推察された。石橋<sup>20</sup>は脾内肝細胞移植後四塩化炭素を投与したところ、非移植群に比し、*alpha*fetoprotein (AFP)の上昇がほとんど認められないことを報告した。AFPは、四塩化炭素による肝細胞障害の修復過程における蛋白合成異常により産生される<sup>20</sup>。よって脾内肝細胞移植により、宿主肝の細胞障害の程度はより軽度となると考えた。これは、脾内移植肝細胞が宿主肝に対する保護作用を持つことを意味し、著者の推定を裏付けた。

著者の実験で、四塩化炭素投与ラットの宿主肝と脾内に移植された肝組織片、あるいは脾内に再構築された肝細胞集団とのあいだでは組織像に大きな違いが認められた。すなわち前者は小葉中心帯の高度の壊死、変性およびその周囲の肝細胞の風船状膨化像を示したのに対し、後者はほとんど変化がなかった。宿主肝に認められた選択的小葉中心帯壊死および変性は、四塩化炭素による1次的細胞障害の結果肝細胞腫脹がおこり、これが1次的に類洞狭窄をひきおこすためと推定されている<sup>20</sup>。脾内移植肝組織片あるいは脾内肝細胞集団に形態学的変化が認められないのは、これらが小葉構造を持たず、宿主肝と解剖学的構造が相違しているためと思われた。また、腹腔内投与された四塩化炭素は宿主肝で多く代謝されるため脾臓に達する量が少なく、そのため脾内移植肝組織片あるいは脾内肝細胞集団は宿主肝に比べ細胞障害が軽度であったものと推察された。このことより、移植12ヶ月目における四塩化炭素投与時の脾内肝細胞と宿主肝の細胞動態の相違は、両者の増殖機能の差というより肝細胞障害の程度の差によるものと考えられた。

## 結 論

肝組織片移植について、その最適の移植組織片作製法を検討するとともに、BrdU染色、Feulgen顕微蛍光測光を行いその細胞動態の経時的変化、および移植肝細胞再生増殖促進因子を検討した。また肝切除時、急性肝不全時の移植肝組織片、宿主肝細胞の細胞動態

を解析し以下の結論を得た。

1. 機械的分散法と酵素消化法を併用することにより、収量、生存率とも満足すべき肝組織片濾液が得られた。
2. 脾内移植肝組織片の細胞動態を経時的に検討したところ、S期細胞標識率は低値のまま一定に推移したが、DNAヒストグラムにおいてポリプロイド化が徐々に進行していることが判明した。
3. インスリンを肝組織片濾液に添加することにより、脾内肝細胞集団の再構築は促進された。
4. 宿主肝の大量切除により、脾内肝細胞集団の再構築が促進された。
5. 脾内に肝細胞集団が再構築された後、宿主肝切除を行い細胞動態を解析すると、脾内肝細胞集団は宿主肝と同様、活発に増殖することが判明した。
6. 脾内肝細胞集団再構築後、四塩化炭素投与により急性肝不全状態としたところ、宿主肝のS期細胞は軽度増加したが、脾内肝細胞集団の細胞動態に変化は認められなかった。
7. 各種ホルモン、組織抽出液の肝組織片濾液内添加、宿主肝切除、四塩化炭素腹腔内投与は、移植直後の脾内肝組織片の細胞動態に影響をおよぼさなかった。

以上の結果から、脾内肝組織片移植における脾内肝細胞集団再構築促進因子があきらかとなった。また、脾内移植後再構築された肝細胞集団は宿主肝と類似したDNAプロイディパターンを持ち、共通の増殖因子の制御下にあることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師岩橋教授、ならびに御教示をいただきました本学第二病理学教室中沼安二教授、衛生学教室橋本和夫教授に深甚なる謝意を表します。

また御協力と有益な御助言をいただきました本学第一外科学教室川浦幸光博士、魚津幸蔵博士、本学第二病理学教室細正博博士、ならびに田井麻子技師はじめ本学第一外科学教室各位に心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) 水戸迪郎, 小沢和恵: 代用肝による肝の機能補助とその将来. 医のあゆみ, 125, 573-587 (1983).
- 2) Senevirance, R. D.: Transplantation of a lobe of the liver in the rat. J. Pathol. Bacteriol., 70, 271-283 (1955).
- 3) 水戸迪郎, 江端英隆, 大西俊郎, 草野満夫: 肝再生機構の新しいアプローチ. 医のあゆみ, 105,

- 815-816 (1978).
- 4) 水戸迪郎, 江端英隆, 草野満夫, 大西俊郎: 脾臓内肝細胞移植. 医のあゆみ, **111**, 362-370 (1979).
  - 5) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M., Onishi, T., Hiratsuka, M. & Saito, T.: Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplant. Proc.*, **11**, 585-591 (1979).
  - 6) 川浦幸光, 疋島 寛, 酒徳光明, 岩 喬: 肝細胞移植に関する研究. 日外会誌, **83**, 468-472 (1982).
  - 7) Higgins, G. & Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver; I. Restriction of the liver of the white rat following partial surgical removal, *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202 (1931).
  - 8) Pease, D. C.: *Histological Techniques for Electromicroscopy*, 2nd ed., p.51-56, Academic Press, New York, 1964.
  - 9) Koike, Y., Suzuki, Y., Nagata, A., Furuta, S. & Nagata, T.: Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. *Histochemistry*, **73**, 549-562 (1982).
  - 10) 藤田哲也: 定量的蛍光組織化学の現在と未来. 最新医学, **35**, 782-789 (1980).
  - 11) 細 正博: 肝細胞癌に出現するマロリ体の病理学的意義: フォイルゲン-DNA 顕微蛍光測光法および組織計測法による検討. 十全医会誌, **97**, 825-838 (1988).
  - 12) 伊藤 毅, 内野純一, 佐々木文章, 葛西洋一: 肝再生における小腸由来因子について. 医のあゆみ, **109**, 606-608 (1979).
  - 13) Starzl, T. E., Marchiro, T. L., Kaulla, K. N., Hermann, G., Britain, R. S. & Waddel, W. R.: Homotransplantation of the liver in human. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **117**, 659-676 (1963).
  - 14) 沼田 稔, 小池 冽, 林 四郎: 亜急性肝炎に対する肝組織片門脈内移植の実験的研究—血清学的検討—. 移植, **19**, 338-342 (1984).
  - 15) Groth, C. G., Arborgh, B., Björken, C., Sundberg, B. & Lundgren, G.: Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl transferase deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant. Proc.*, **9**, 313 (1977).
  - 16) 佐々木克典, 宮野 武, 駿河敬次郎, 野沢龍嗣, 横田 健: 同系ラット肝細胞の腸間膜内移植. 小児外科, **15**, 1450-1451 (1983).
  - 17) 元島幸一, 山本賢輔, 山口 孝, 井沢邦英, 野田剛稔, 角田 司, 原田 昇, 伊藤俊哉, 土原涼一: 肝組織片移植に関する実験的研究. 日外会誌, **83**, 658-664 (1982).
  - 18) 草野満夫, 水戸迪郎: 肝細胞移植による脾臓内再構築肝組織の形態と機能. *Med Way*, **2**, 81-85 (1985).
  - 19) Berry, M. N. & Friend, D. S.: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell.*, **43**, 506-620 (1969).
  - 20) 魚津幸蔵, 川浦幸光, 竹村博文, 廣瀬宏一, 山田哲司, 岩 喬: 肝組織片移植に関する研究—特に移植片機能について—. 日外会誌, **88**, 460-468 (1987).
  - 21) 榎本和夫: 肝組織片移植の基礎研究. 移植, **20**, 615-622 (1985).
  - 22) Sommer, B. G., Sutherland, D. E. R., Simmons, R. L. & Najarian, J. S.: Hepatocellular transplantation for experimental ischemic acute liver failure in dogs. *J. Surg. Res.*, **29**, 319-325 (1980).
  - 23) 石橋治昭: 単離肝細胞脾内移植による肝補助機能の実験的研究 I編, 肝細胞の分離, 門脈, 脾内への移植. 急性肝障害の作成. 京都府医大誌, **92**, 903-908 (1983).
  - 24) 石橋治昭: 単離肝細胞脾内移植による肝補助機能の実験的研究 II編, 急性肝障害に対する脾内肝細胞移植の効果について. 京都府医大誌, **92**, 909-917 (1983).
  - 25) Gratzner, H. G., Leif, R. C., Ingram, D. J. & Castro, A.: The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. Cell Res.*, **95**, 88-94 (1975).
  - 26) 高本 滋: III. 定義および原理, フローサイトメトリー 手技と実際(野村和弘, 高本 滋編), 第2版, 11-24頁, 蟹書房, 東京, 1988.
  - 27) 太田和雄, 高本 滋, 御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置. 癌と化療, **7**, 179-185 (1977).
  - 28) Grundmann, E. & Bach, G.: Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach Partieller Hepatektomie. *Beitr. Pathol. Anat.*, **123**, 144-172 (1960).
  - 29) 三浦義彰, 福井紀子: 肝再生の研究. 肝胆膵, **2**, 255-262 (1981).
  - 30) 佐藤直樹: 肝細胞動態よりみた肝再生と, hepatotrophic factors の効果に関する実験的研究. 日外会誌, **85**, 799-810 (1984).
  - 31) 松田健志, 小田島肅夫: 肝細胞の細胞動態について. 肝臓, **27**, 1303-1312 (1986).

- 32) 八木国夫, 五島雄一郎: 過酸化脂質と疾患, 第1版, 70-71頁, 医学書院, 東京, 1981.
- 33) Farber, J. L.: Progress in Liver Diseases, Calcium and the Mechanisms of Liver Necrosis, 1st ed., p347-360, Grune & Stratton Inc., New York, 1982.
- 34) Moore, L.: Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to in vivo administration of carbon tetrachloride, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1197-1201 (1976).
- 35) Alfert, M. & Geschwind I. I.: The development of polysomaty in rat liver. *Exp. Cell Res.*, **15**, 230-232 (1958).
- 36) Nadal, C. & Zajdela F.: Polyploidie somatique dans le foie de rat. *Exp. Cell Res.*, **42**, 99-116 (1966).
- 37) 北村 収: 加齢及び慢性肝疾患における肝細胞 Ploidy の変化に関する研究. 京都府医大誌, **87**, 1037-1048 (1978).
- 38) 山口秀則, 草野満夫, 水戸通郎: 肝再生時における肝細胞および Kupffer 細胞の細胞回転 - フローサイトメトリーによる解析 -. 肝臓, **29**: 1068-1077 (1988).
- 39) Leffert, H. L.: Growth control of differentiated fetal rat hepatocyte. Humoral control of DNA synthesis and its possible significance to problem of liver regeneration. *J. Cell Biol.*, **62**, 792-801 (1974).
- 40) Price, J. B. Jr., Takeshige, K. & Max, M. H.: Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration. *Surgery*, **72**, 74-82 (1982).
- 41) Whittemore, A. D., Kasuya, M. & Voorhees, A. B. Jr.: Hepatic regeneration in absence of portal viscera. *Surgery*, **77**, 419-426 (1975).
- 42) Vintermyr, O. K. & Døskeland, S. O.: Characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on the DNA replication of adult rat hepatocytes growing at various cell densities. *J. Cell. Physiol.*, **138**, 29-37 (1989).
- 43) Sakai, A., Taha, M., Kashiwabara, H., Pfeffermann, R. & Kountz, S. L.: On the origin of the regeneration factor. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **145**, 889 (1977).
- 44) Sawada, N., Tonomura, A., Sattler, C. A., Sattler, G. L., Kleinman, H. K. & Pitot, H. C.: Effects of extracellular matrix components on the growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. *In Vitro*, **23**, 267-273 (1987).
- 45) Sawada, N., Tonomura, A., Sattler, C. A. & Pitot, H. C.: Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.*, **167**, 458-470 (1986).
- 46) Tonomura, A., Sawada, N., Sattler, G. L., Sattler, G. L., Kleinman, H. K. & Pitot, H. C.: The control of DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from adult and young rats: interactions of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, **130**, 221-227 (1987).
- 47) 川浦幸光, 羽柴 厚, 魚津幸蔵, 岩 喬: 腫ホルモン脾内移植肝細胞に与える影響. 医のあゆみ, **123**, 728-730 (1982).
- 48) Moolten, F. L. & Bucher, N. L.R.: Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science*, **158**, 272-274 (1967).
- 49) Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A.: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1450-1459 (1984).
- 50) 江藤高陽: 肝再生機構に関する研究 第二報 ラット初代培養肝細胞 DNA 合成に及ぼすラット肝再生促進因子とラット肝再生抑制因子の共同作用およびラット肝再生抑制因子の性質について. 広島大医誌, **36**, 378-398 (1988).
- 51) Makowka, L., Rotstein, L. E., Falk, J. A., Zuk, R., Langer, B., Blendis, L. M. & Phillips, M. J.: Allogenic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Transplant. Proc.*, **13**, 855-859 (1981).
- 52) O'Neill, P. L., Baumgartner, D., Lewis, W. I., Zweber, B. A. & Sutherland, D. E. R.: Cell-free supernatant from hepatocyte cultures improves acute liver failure. *J. Surg. Res.*, **32**, 347-359 (1982).
- 53) 長島秀夫, 渡辺明治: 肝再生の生化学 - DNA 合成からみた肝再生 -. 肝胆臓, **2**, 303-314 (1981).
- 54) Hosokawa, S.: Morphological changes of intrahepatic vascular system in the damaged liver. *Acta Pathol. Jpn*, **10** (suppl). 531-547 (1960).

**Fundamental Studies of Liver Tissue Transplantation to the Spleen** Kouichi Hirose, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 59—81, (1990)

**Key words** intrasplenic liver tissue transplantation, hepatotrophic factor, bromodeoxyuridine, Feulgen-DNA cytofluorometry

#### Abstract

The author studied the transplantation of liver tissue into rat spleen with special reference to the transplant preparation method, cytokinetics and hepatotrophic factors. The DNA contents were displayed as a histogram by Feulgen-DNA cytofluorometry. The labeling rate of the DNA synthesis phase (S-phase) nuclei of hepatocytes was investigated immunohistochemically, with anti-5-bromo-2'-deoxyuridine monoclonal antibody. As a result of combining mincing with scissors and enzyme digestion with collagenase, liver tissue fragments with good viability and yield were obtained. Prior to the transplantation, most of the liver tissue was composed of hepatocytes of the tetraploid chromosomal complement (4C). The DNA content of the hepatocytes contained in the intrasplenic liver tissue was less than 4C in the acute phase of transplantation. Six months after transplantation and subsequently, intrasplenic hepatocytes formed a cell nest. The DNA content of the hepatocytes was mainly 4C, but hepatocytes of the octaploid chromosomal complement (8C) accounted for approximately 10%. The labeling rate of S-phase hepatocytes (labeling index, L. I.) in the spleen constantly remained low for 12 months after transplantation. Partial hepatectomy produced a marked increase in L. I. of the host hepatocytes and promoted poliploidization. The cytokinetics of the intrasplenic liver tissue in the early stage of transplantation was not affected by hepatectomy. However, the intrasplenic hepatocytes in the chronic phase of transplantation showed the same cytokinetics as that of the host liver. When acute liver failure was induced by tetrachlorocarbon, an increase of L. I. and poliploidization of the host liver were observed. However, the cytokinetics of the intrasplenic hepatocytes showed no changes. A mixture of insulin, glucagon, hydrocortisone, extract from the ileum or extract from the spleen instilled into the liver tissue fragments did not affect the hepatocytes cytokinetically. However, comparison of the areas occupied by the hepatocytes in the spleen, revealed that the insulin mixture into the liver tissue fragments, or 70% hepatectomy of the host liver, promoted the long-time survival and growth of transplanted hepatocytes. In summary, the cell nest of the transplanted hepatocytes rebuilt in the spleen, poliploidated gradually just like the host liver. The insulin mixture instilled into the liver tissue fragments or massive hepatectomy of the host liver promoted the rebuilding of the hepatocytes in the spleen. In the acute phase, transplanted liver tissue had no ability to react cytokinetically to hepatotrophic factors. However, in the chronic phase, hepatocytes in the spleen acquired the ability to react to hepatotrophic factors.