

Experimental Studies of Hepatocellular Transplantation and Liver Tissue Transplantation to the Spleen

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7967

肝細胞移植, 肝組織片移植に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 岩 喬教授)

魚 津 幸 蔵

(昭和62年7月18日受付)

肝細胞同種移植に際し, 遊離肝細胞の生着に適した臓器の決定, 肝細胞移植を助長する薬剤の検討, 肝切除範囲からみた移植肝細胞の増殖を検討した。一方, 脾臓内に肝組織片を移植した際の生着状況, 急性期におけるその機能, および急性肝不全に際し肝機能の補助が可能であるかを検討した。雄性 Wistar 系ラット (250~300 g) を使用した。肝細胞遊離の方法は Berry & Friend の変法に従った。肝組織片作成の方法は切除肝を速やかに細切し 1 mm³ 角程度とした。移植方法は肝細胞, 肝組織片共に 27G のカテーテル針の外套を用いて脾臓を直接穿刺することにより, 約 300 mm³ を注入した。肝細胞同種移植について脾内, 脾内, 腹膜内, 胃壁内に遊離肝細胞を移植したが, 脾内でのみ肝細胞の生着が可能で, 3 週間後には数個の細胞集団, 6 カ月には肝細胞索を有する細胞集団を認めた。肝細胞移植の増殖を促進する薬剤としてインスリン, グルカゴンを使用し肝細胞と混合して注入した場合増殖が著明であった。また, 宿主の肝をあらかじめ大量に切除しておいた方が, 脾内移植肝細胞の増殖は著明であった。肝組織片同種移植について, 脾内に移植された肝組織片は, 小集団を形成するが徐々に変性し約 1 カ月で消失した。しかし残存肝細胞群が脾内赤色髄に散在し約 12 カ月以降細胞集団を再構築した。生存及び解毒機能を見るため, 肝胆道排泄スキャンで使用される, ^{99m}Tc-diethyl-IDA を用いて, マクロオートラジオグラフィを施行した。脾内移植片の黒化度測定による相対的放射能からみると, 移植後早期には移植細胞群は, 20%~50% が生存し, 解毒機能を営む事を確認した。また, 移植後 1 日目, 7 日目の比較においては肝組織片の解毒機能活性化率に有意差はなかった。肝組織片移植に行い四塩化炭素を投与による肝不全を作成しマクロオートラジオグラフィを施行した。その結果, 宿主肝および移植片の相対的放射能は, 非肝不全の群に比べ有意に高値を示した。即ち, 四塩化炭素投与下では肝細胞群の非特異的な解毒機能の活性化が示唆された。肝組織片移植後に四塩化炭素を投与し急性肝不全を作成したが, 移植群の生存率が有意に上昇した。以上の成績から肝細胞移植では移植細胞が脾臓内でのみ生着し, 移植時のインスリン, グルカゴンの混合と大量肝切除により移植肝細胞の増殖促進を認めた。肝組織片移植では移植組織片が解毒機能を営なみ, 薬剤性の急性肝不全の救命に有効であるとの知見を得た。

Key words 肝細胞移植, 肝組織片移植, 肝再生因子, Macroautoradiography, 急性肝不全

肝不全に至る疾患に対し欧米では積極的に肝臓器移植が行われている。1955年, 実験的異所性肝移植が初めて Welch により報告された¹⁾。臨床例では 1963年 Starzl らにより初めて同所性移植が行われた²⁾。以後 20 年余りが経過したが 2000 例以上の肝臓器移植手術が行われている³⁾。最近では Cyclosporin A の使用

により生存率の改善が認められるものの, 原疾患の再燃や免疫の問題のため当初期待されたほどの成績を得るにいたっていない状態である。肝を異所性に再構築し, 慢性期の肝機能補助を目標とした肝細胞移植の実用性について検討するために本研究が行われた。病理組織学的変化, インスリン, グルカゴンといった薬

Abbreviations: ^{99m}Tc-diethyl-IDA, ^{99m}Tc-N-(2,6-diethylphenylcarbonylmethyl)-iminodiacetic acid; TLS, Transplanted liver tissue in the spleen; BG, Back ground.

剤を混入した場合の影響、あるいは宿主の肝切除が移植肝細胞に及ぼす影響を与えるかを検討した。

肝は再生力旺盛な臓器であり、広範な損傷を被っても一定期間肝機能の補助が可能であれば再生が期待できる。この期間、解毒機能を補助する目的で血漿交換や人工臓器が臨床的に用いられているがその使用には限界がある。本研究では肝悪性腫瘍等による肝大量切除や劇症肝炎、亜急性肝炎などを念頭に置き、急性肝不全に対し肝細胞が再生する迄の救命的補助手段として脾内肝組織片移植を行い、病理組織学的な変化、移植肝組織片の機能および生存率改善の可能性を検討した。

材料および方法

I. 実験動物

Closed colony の雄性 Wistar 系ラット（静岡実験動物農業協同組合より入手）（体重 250 g～300 g）を使用した。

II. 実験方法

1. 肝細胞濾液の調整

6 時間の絶食後 Sodium pentobarbital (ABBOTT LABORATORY 社製) 40 mg/kg を腹腔内投与した。上腹部正中切開にて開腹し、門脈、肝動脈の結紮を行わずに素早く肝全摘し、鉋で細切した。細切後ただちに 0.05% collagenase (Sigma 型) 添加 Ca^{++} , Mg^{++} 無添加ハンクス液中にて incubate し、20 分後に三重カーゼで濾過、肝細胞濾液とした。Trypan blue を用い肝細胞生存率の検索を行った。生存率は 85%前後であった。1 匹のラットより約 $10^8 \sim 10^9$ 個の肝細胞が得られ、その内、約 1×10^6 個～ 10^7 個（細胞濾液 0.3 ml）を注入用液とした。

2. 肝組織片の調整

6 時間の絶食後 Sodium pentobarbital 40 mg/kg を腹腔内投与した。上腹部正中切開にて開腹、Higgins-Anderson の方法に従い⁴⁾肝左外側葉、中葉切除（約 68%）を行った。摘山された肝を鉋にて細切し径約 1 mm 前後とした。細切肝の内、液状の部分を取り直ちに Trypan blue を用いて染色し肝細胞の生存率の検索を行った。生存率は平均 98%であった。また細胞密度は計算上 4.0×10^4 個/mm³ となった⁴⁵⁾。開腹より肝組織片作成までの時間は平均 10 分であった。肝組織片 300 mm³ (1.2×10^7 個) を注入用組織片とした。

3. 移植方法

肝細胞移植では 27 G カテーテル針の外套を用いて肝細胞濾液 0.3 ml 脾実質内に直接注入し同種移植した。

肝組織片移植では脾門部で一時血流を遮断した。脾

臓下極被膜の一部に割を加え上極方向に向けて 27 G ベニウラ針を挿入、内筒を抜去後に肝組織移植片を 300 mm³ (約 1.2×10^7 個) 注入し同種移植した。

4. 肝細胞移植に関する実験

1) 実験 1: 肝細胞移植にはどの臓器がふさわしいか検討した。

脾内移植群 (A 群, 9 匹), 脾内移植群 (B 群, 9 匹), 腹腔内移植群 (C 群, 9 匹), 胃壁内移植群 (D 群, 9 匹) を作成した。移植後 1 週間, 3 週間, 6 カ月に各群おのおの 3 匹ずつエーテルを使用して犠死せしめ、組織学的検索を行った。染色は HE 染免, PAS 染免, 塗銀染色とした。

2) 実験 2: 移植肝細胞の脾ホルモンによる影響を検討した。

肝細胞濾液 0.3 ml に regular insulin 0.5 単位を添加し脾内に移植した群 (E 群, 8 匹), 同様に肝細胞濾液 0.3 ml に glucagon 0.2 国際単位を添加し脾内に移植した群 (F 群, 8 匹), 対照として、肝細胞移植のみ行った群 (実験 1 の A 群) を作成した。E, F, A 群とも移植後 6 カ月に組織学的検索を行った。染免は HE 染色, PAS 染色とした。また、脾臓断面の肉眼所見から白色に変化した部分が生着した肝細胞群に一致したため、その面積をトレース紙を用いて測定し割合における割合を概算した。

3) 実験 3: 肝切除範囲による脾内移植肝細胞の生着状態を検討した。

Higgins-Anderson の方法⁴⁾により、尾状葉のみ（切除率約 10%）を切除した後、直ちに肝細胞濾液 0.3 ml を脾内に注入移植した群 (G 群, 8 匹), 尾状葉+右外側葉（切除率 30%）を切除し、同様に注入した群 (H 群, 8 匹), 尾状葉+右外側葉+左外側諸（切除率 60%）を切除し、同様に注入した群 (I 群, 8 匹), そして、尾状葉+右外側葉+中葉（切除率 70%）を切除し同様に注入した群 (J 群, 8 匹) を作成した。移植後 6 カ月で犠死せしめ、脾臓の組織学的検索を行った。染色は HE 染色とした。また、脾臓断面の白色に変化した最大面積を概算した。

5. 肝組織片移植に関する実験

1) 実験 4: 移植肝組織片の病理組織学的変化を検討した。

中葉+左外側葉（切除率 68%）肝切除を行った移植ラット 40 匹を作成した。移植後 1 日, 1 週間, 2 週間, 3 週間, 1 カ月, 4 カ月, 8 カ月, 12 カ月目に各 5 匹ずつエーテルを使用して屠殺、脾臓を摘出し HE 染色, PAS 染色を行い組織学的検討を行った。

2) 実験 5: 移植肝組織片の急性期における解毒機能を検討した。

中葉+左外側葉(切除率68%)肝切除を行い脾内へ肝組織片を移植した群(K群, 20匹), 対照として非特異的なアイソトープ集積を見るため肝切除を行わず大腿筋, 皮下脂肪を混合し脾内へ移植した群(L群, 10匹), また, 肝切除のみ行い移植しない群(M群, 5匹)を作成した。また, 無処置の群(N群, 5匹)を設定した。N群, 移植1日後のK群10匹, 移植1日後のL群5匹, 肝切除1日後のM群5匹を用いて, また, 移植7日後のK群10匹, 移植7日後のL群5匹を用いて肝細胞に選択性が高く臨床的にも肝胆道排泄スキャンで使用されている ^{99m}Tc -N-(2,6-diethylphenyl-carbamoylmethyl)-iminodiacetic acid (^{99m}Tc -diethyl-IDA)⁶⁷⁾(Amersham社製, U.S.A.)各2 mCiを大腿静脈より静注した。注射5分後に屠殺, 開腹し脾臓, 肝臓を摘出した。両刃カミソリ(Feather社製)2枚間に厚さ1 mmのプレパラートを挟んだカッターを作成し脾臓を長軸に切断した。また肝臓の一部を切り1 mm厚の切片を作成した。作成した切片をプレパラート上に置きその上をルミラー膜(6 μm , 東洋レーヨン社製)で覆った。X線フィルム(サクラメディカルX線フィルム, Aタイプ)にて24時間露光しマクロオートラジオグラフィを施行した。また, Sakura Densitometer PDS15(アパーチャーは50 \times 50 μm)により黒化度を測定しSakura Multi-Penrecorderを用いて記録した。

なお黒化度と ^{99m}Tc -diethyl-IDAの臓器集積率とは必ずしも直線関係に限るとは限らないので, 定量化のためには相対的黒化度標準曲線を作成する必要がある。そこで4 cm^2 の濾紙(東洋濾紙社製, TOYO FILTER PAPER)に各0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{99m}Tc -diethyl-IDA希釈液, 各0.1 mlを滴下, 風乾後に試料と同じX線フィルムに24時間密着させて, オートラジオグラムを作成した。それぞれの黒化度を測定し相対的黒化度標準曲線を作成した。

3) 実験6: 薬剤による急性肝障害状態で脾内移植肝組織片機能を検討した。

肝切除を行わず, 肝組織片移植したラット20匹を作成した。移植1日後, 四塩化炭素(和光純薬工業社製)1 ml/kg (O群, 10匹), 1.5 ml/kg (P群, 10匹)(各オリーブ油にて2倍に希釈)を腹腔内投与し急性の肝障害状態を作成した⁵⁾。また, 対象群として肝組織片移植を行わずに四塩化炭素1 ml/kgを腹腔内投与した群(Q群, 10匹)を作成した。四塩化炭素投与24時間後, 7日後, 各群5匹に対し ^{99m}Tc -diethyl-IDA各2 mCiを大腿静脈より静注し, 実験5と同様な方法でマクロオートラジオグラフィを施行し黒化度の測定から相対的放射能を求めた。

4) 実験7: 肝組織片移植後に大量肝切除を行い移植により生存率の改善が得られるか否かを検討した。

肝切除を行わず肝組織片移植のみを行ったラット40匹を作成した。24時間後, 再度開腹しHiggims-Andersonの方法⁹⁾に従い, 肝左外側葉切除+中葉切除+右外側葉1/2切除(切除率80%)した群(R群, 20匹), 肝左外側葉切除+中葉切除+右外側葉切除(切除率90%)した群(S群, 20匹)を作成した。また, 対照群として移植を行わず肝切除80%(T群, 20匹), 90%(U群, 20匹)を行った群を作成した。各群共に肝切除後1週間経過を観察し生存数を確認した。

5) 実験8: 肝組織片移植後に四塩化炭素投与による急性肝不全を作成し移植による生存率の改善が得られるかを検討した。

肝切除を行わず肝組織片移植を行ったラット45匹を作成した。24時間後に四塩化炭素1.5 ml/kg(オリーブ油にて2倍希釈)を腹腔内投与し急性肝不全とした(V群, 45匹)⁸⁾。対照として四塩化炭素1.5 ml/kgのみを投与した群(W群, 20匹)を作成した。四塩化炭素投与後1週間経過を観察し生存数を確認した。

6. 統計処理の方法

実験5, 6において脾内移植肝細胞と宿主肝臓の相対的放射能は相互にCochran-Cox法を用いて有意差を検討した。実験7, 8において各群の生存数はGeneralized Wilcoxon法を用いて有意差を検討した。

成 績

I. 肝細胞移植について

1. 実験1: 脾内に移植された肝細胞(A群)は1週間後には赤色髄内に散在していたが, 3週間後には数個の肝細胞集団を形成した。6カ月後には肝細胞集団は更に大きくなり, 肝細胞索や中心静脈を形成する例も認められた(図1, 2)。更にこれらのPAS染色ではグリコーゲン顆粒がPAS陽性として認められた(図3)。しかし, このように増殖が進行する一方, 他の部位では肝細胞質の空胞化, 移植肝細胞周囲にリンパ球浸潤などの像も認められた。

脾, 腹膜, 胃壁内に移植された肝細胞(B, C, D群)は1週間後の検索において生着が確認されなかった。

2. 実験2: インスリンの影響をみるためA, E群を比較すると, 移植肝細胞の細胞質および核の変化に特徴的な差は認められなかった。しかし, 脾内における肝細胞占拠率の最大値はA群で約10%に対しE群で約40%であった。

グリカゴンの影響をみるためA, F群を比較したがインスリンと同様, 細胞質および核の変化に特徴的な



Fig. 1. Histological finding of hepatic cell nest stained with hematoxylin-eosin in the spleen 6 months after the hepatocellular transplantation.



Fig. 2. Histological finding of hepatic cell nest stained with silver impregnation, in the spleen 6 months after the hepatocellular transplantation. Central vein (arrow) is stained in the center of the cell nest.

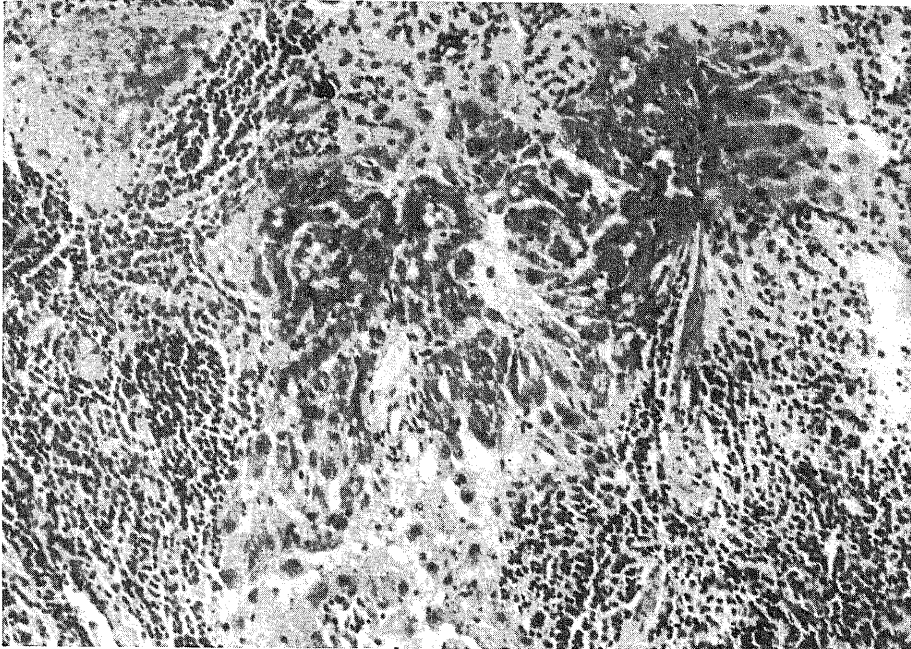


Fig. 3. Histological finding of hepatic cell nest stained with PAS reaction, in the spleen 6 months after the hepatocellular transplantation. Most of the hepatic cells are PAS positive.

Table 1. Proliferation of hepatic cells in the spleen 6 months after hepatocellular transplantation

Group	Number of rats	Maximum rate of replacement in the spleen (%)
A	3	10
E	8	40
F	8	38

A, hepatocellular transplantation; E, hepatocellular transplantation mixed with 0.5 unit regular insulin; F, hepatocellular transplantation mixed with 0.2 international unit glucagon.

Table 2. Proliferation of hepatic cells in the spleen 6 months after hepatocellular transplantation

Groups	Number of rats	Maximum rate of replacement in the spleen (%)
G	8	20
H	8	22
I	8	48
J	8	65

G, 10% hepatic resection;
H, 30% hepatic resection;
I, 60% hepatic resection;
J, 70% hepatic resection.

差は認められなかった。脾内における肝細胞占拠率の最大値はF群で約38%であった(表1)。

3. 実験3: 移植肝細胞の細胞質および核の変化に特徴的な差は認められなかった。脾内移植肝細胞の増殖は切除肝の範囲が大きいほど活発であった。即ち、脾臓割面における肝細胞占拠率の最大値はG群で20%、H群で22%、I群で48%、J群で65%(図4)であった(表2)。

II. 肝組織片移植について

1. 実験4: 移植1日目では肉眼的に暗赤褐色の腫瘍を認めた。組織学的にはPAS陰性の肝細胞集団で、好酸性変性、空胞変性を示した(図5, 6)。移植1週間目では肉眼的に黄白色の腫瘍を認めた。組織学的には肉眼的腫瘍に一致して周囲に炎症性細胞浸潤を伴ったPAS陰性の肝細胞集団であった。硝子様変性、空胞変性、核の消失を所々に認め細胞変性過程を疑わしめた(図7)。また肝細胞集団の周辺には胆管に類似した



Fig. 4. Macroscopic finding of spleen 6 months after the hepatocellular transplantation with 70% hepatic resection (Group J). White portion corresponding to hepatic cells occupied 65% of spleen.

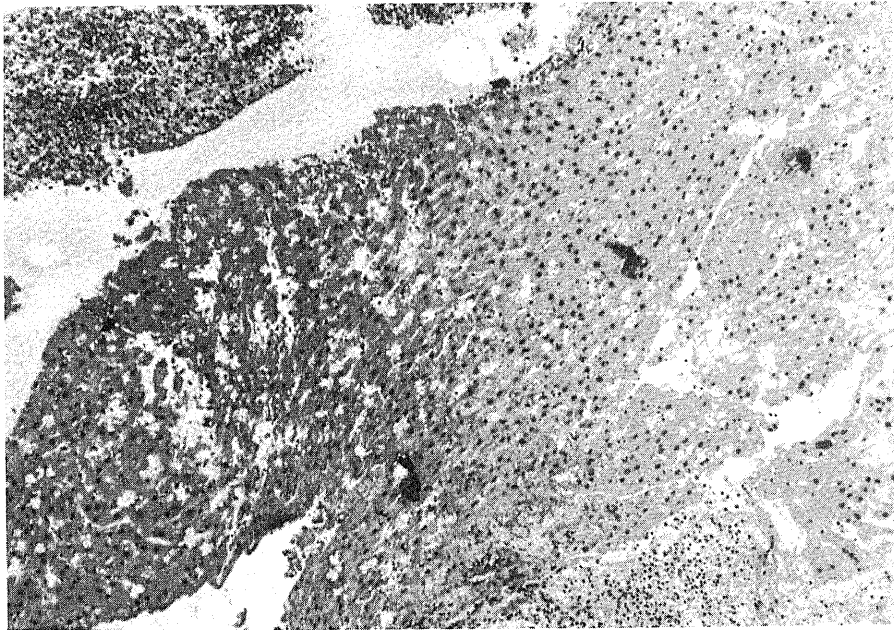


Fig. 5. Histological finding of hepatic cells stained with hematoxylin-eosin in the spleen one day after the liver tissue transplantation. Hyaline degeneration is observed in most of transplanted liver tissue.

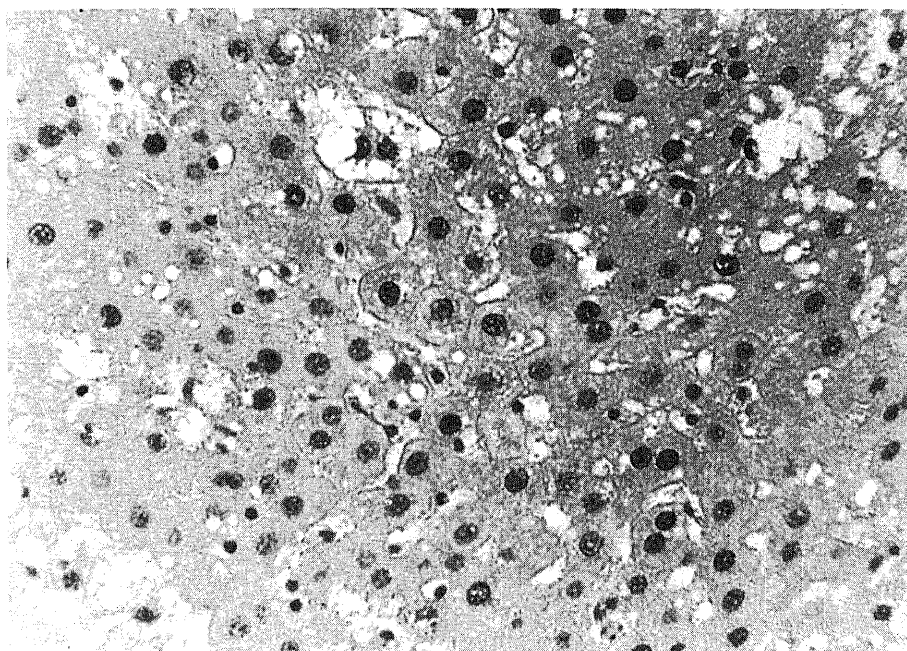


Fig. 6. Histological finding of hepatic cells stained with hematoxylin-eosin in the spleen one day after the liver tissue transplantation. Vacuolar degenerations are observed in some hepatic cells.

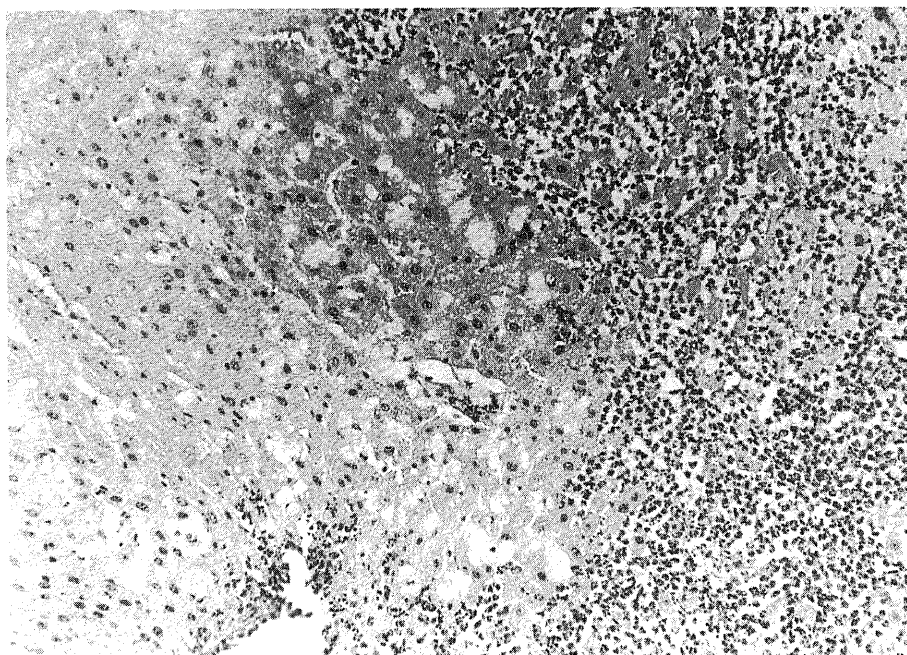


Fig. 7. Histological finding of hepatic cells stained with hematoxin-eosin in the spleen one week after the liver tissue transplantation. Hyalin degeneration and vacuolar degeneration are observed in most of transplanted liver tissue.

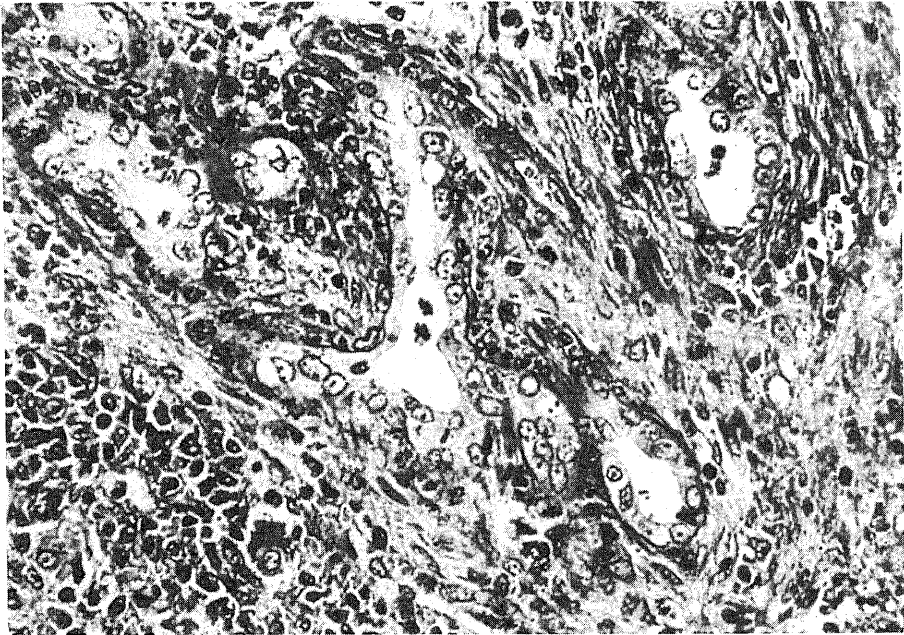


Fig. 8. Histological finding of epithelial ducts stained with hematoxylin-eosin are similar to those of bile ducts one week after the liver tissue transplantation.

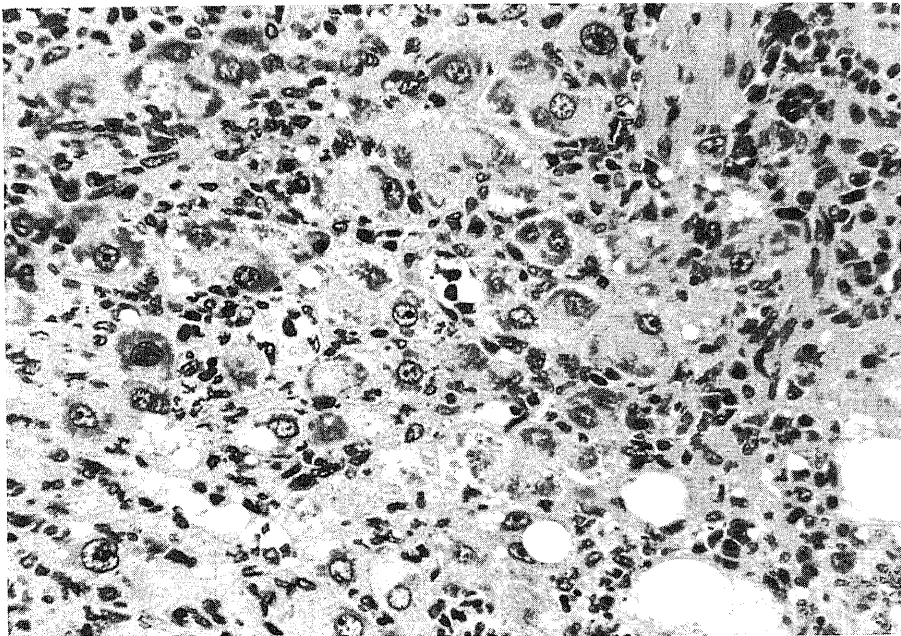


Fig. 9. Histological finding of hepatic cell nest stained with hematoxylin-eosin in the spleen 12 months after the liver tissue transplantation.

上皮細胞による腺管形成と所々に大型肝細胞の散在を認めた(図8)。移植2週間目では肝細胞集団が徐々に縮小、3週間目では更に縮小、1カ月目ではほぼ消失し胆管類似の腺管形成と大型肝細胞を見るのみとなった。移植4カ月目、8カ月目では数個ずつ集まった大型肝細胞の集団は所々に見られるが、胆管類似の腺管形成は認められなかった。移植12カ月目ではほぼ同様の組織所見であったが、肝細胞索の形成はないもののPAS陽性の肝細胞大集団を形成した例が認められた(図9)。

2. 実験5: 脾内肝組織片移植を行ったK群では移植後1日目、7日目共にマクロオートラジオグラフィにて脾内に ^{99m}Tc -diethyl-IDAの取り込みを認めた。また同部は移植後1日目の肉眼的な暗赤褐色部、または7日目の肉眼的な黄白色部に一致していた(図10, 11)。また脾内移植肝組織片像の観察では、移植片の断面の面積が大きい場合、周辺部分が中央部に比べ ^{99m}Tc -diethyl-IDAの取り込みが多い傾向にあった(図12)。

試料の黒化度の測定に先立ち相対的黒化度標準曲線

(図13)を作成しこれにより相対的放射能(N群の肝臓放射能の平均値を1.0とした場合の相対値)を決定した。黒化度測定の結果は以下の通りで、K群の脾内移植片、肝臓の黒化度は1日目で 0.32 ± 0.06 (平均値 \pm 標準偏差)、 0.94 ± 0.24 、7日目で 0.42 ± 0.15 、 0.97 ± 0.44 、L群の1日目で 0.04 ± 0.02 、 0.65 ± 0.08 、7日目で 0.05 ± 0.01 、 0.83 ± 0.03 、M群の肝臓黒化度は 0.93 ± 0.12 、N群の肝臓黒化度は 0.75 ± 0.46 であった(表3)。これによる相対的放射能は以下の通りで、K群の脾内移植片、肝臓は1日目で 0.33 ± 0.07 (平均値 \pm 標準偏差)、 1.34 ± 0.45 、7日目で 0.42 ± 0.16 、 1.34 ± 0.62 、L群の1日目で 0.05 ± 0.02 、 0.83 ± 0.10 、7日目で 0.05 ± 0.01 、 1.14 ± 0.04 、M群の肝臓は 1.33 ± 0.12 であった(表4)。以上よりK群で脾内肝組織片の相対的放射能は移植後1日目と7日目で有意差を認めなかった。L群では脾内移植片の相対的放射能がK群に比べ移植後1日目、7日目共、有意に低値であった($p < 0.01$)。また、肝臓の相対的放射能ではK、L、M群共にN群に対し有意差を認めなかった(表4)。

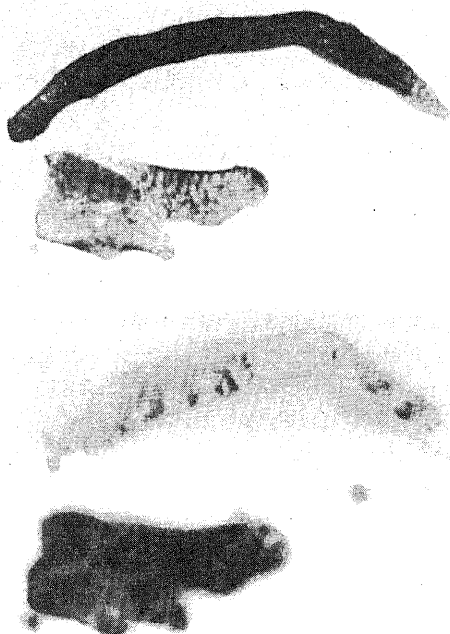


Fig. 10. Fresh specimens and macroautoradiograms using ^{99m}Tc -diethyl-IDA in spleen and host liver one day after the live tissue transplantation.

Black spots of the spleen in autoradiogram corresponded to the transplanted liver tissue in microscopic study.



Fig. 11. Fresh specimens and macroautoradiograms using ^{99m}Tc -diethyl-IDA in spleen and host liver one week after the liver tissue transplantation.

Black spots of the spleen in autoradiogram corresponded to the transplanted liver tissue in microscopic study.

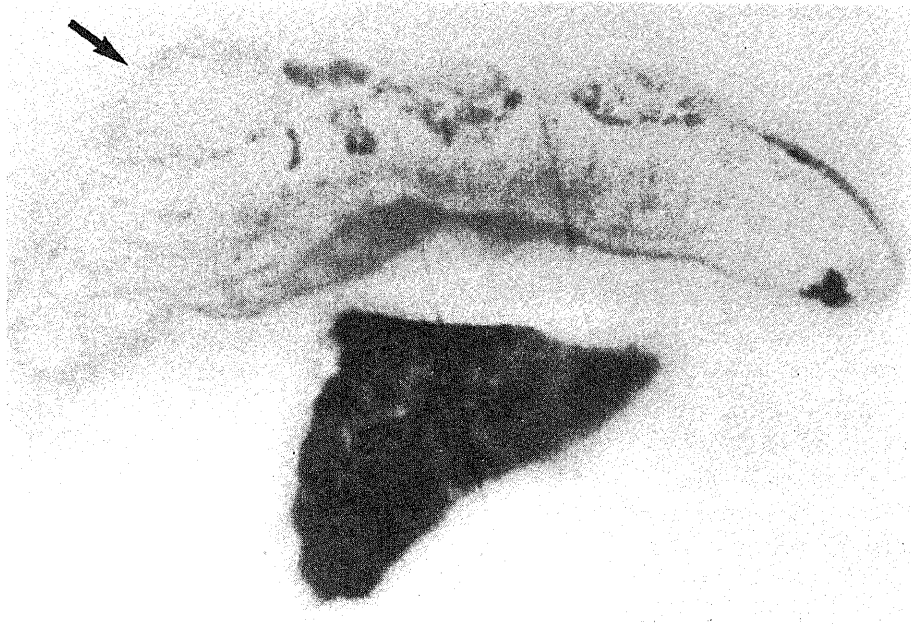


Fig. 12. Macroautoradiogram using ^{99m}Tc -diethyl-IDA in spleen one day after liver tissue transplantation. The density of circumference in the graft is higher than that of center (arrow).

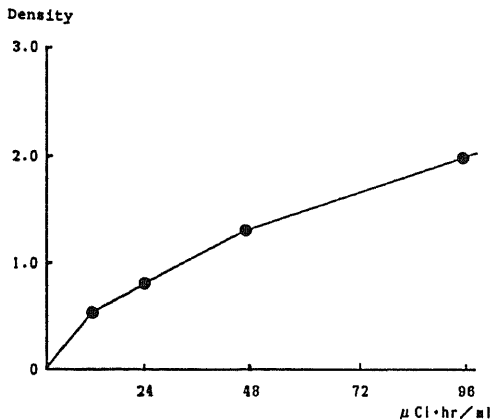


Fig. 13. Standard density curve for ^{99m}Tc -diethyl-IDA.

^{99m}Tc -diethyl-IDA の解毒機能活性率 (活性率) は, ^{99m}Tc の集積した脾内肝組織片移植部位と同一個体肝臓の比を求めることにより定量的に算定できると考えられ, 以下の式より算定した. 活性率: $A (\%) = (S - B) \times 100 / L - B$, ただし, S は脾内肝組織片移植部位の相対的放射能の最大値, L は肝臓の相対的放射能中間値, B は脾臓非移植部位の相対的放射能である. その結果活性率は, K 群の移植 1 日目で $26 \pm 7\%$, 移植 1 週間目で $34 \pm 19\%$, であり相互に有意差を認めな

かった (図 14). 一方, 脾内に筋内と脂肪を移植した L 群では血流を欠くためか, 活性率は移植 1 日目で $-11 \pm 3\%$, 移植 1 週間目で $-13 \pm 8\%$ であった.

3. 実験 6: 四塩化炭素を投与した O, P 群のマクロオートラジオグラフィでも K 群と同様に脾臓断面の肉眼的な暗赤褐色部位に一致して ^{99m}Tc -diethyl-IDA の取り込みを認めた. 試料黒化度測定の結果は以下の通りで, 脾内移植片, 肝臓の黒化度は O 群 1 日目 $0.47 \pm 0.08, 1.28 \pm 0.08, 7$ 日目 $0.43 \pm 0.10, 1.20 \pm 0.18$, P 群 1 日目 $0.55 \pm 0.12, 1.42 \pm 0.20, 7$ 日目 $0.51 \pm 0.08, 1.40 \pm 0.12$ であった (表 3). これらによる相対的放射能は以下の通りで, 脾内移植片, 肝臓の相対的放射能は O 群 1 日目 $0.50 \pm 0.08, 2.02 \pm 0.13, 7$ 日目 $0.44 \pm 0.01, 1.78 \pm 0.27$, P 群 1 日目 $0.63 \pm 0.14, 2.47 \pm 0.35, 7$ 日目 $0.56 \pm 0.09, 2.37 \pm 0.20$ であった (表 4). 以上より O, P 群 1 日目の脾内移植片と肝臓の相対的放射能は K 群 1 日目に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$). 同様に Q 群の肝臓の相対的放射能は 1 日目 $2.42 \pm 0.35, 7$ 日目 2.23 ± 0.20 であり, M 群に比べ肝臓の相対的放射能が有意に高値を示した ($p < 0.05$) (表 3). しかし, 活性率では O 群 1 日目 $29 \pm 6\%$, 7 日目 $31 \pm 14\%$, P 群 1 日目 $29 \pm 10\%$, 7 日目 $32 \pm 5\%$ であり, K 群と比較し有意差がなかった (図 13). また, 移植を行わず四塩化炭素を投与した Q

群の肝臓の相対的放射能は移植群 (O, P 群) の肝臓の相対的放射能と有意差を認めなかった (表 4)。

4. 実験 7: 肝組織片移植に肝切除を加えた群の生存率は, 1 週間後, R 群 (肝切除率 80%) で 75%, S 群 (肝切除率 90%) で 25% であった。一方, 対象群である肝切除のみを行った T 群 (80%), U 群 (90%) の

生存率は, 1 週間後, T 群で 85%, U 群で 25% であり, 共に肝組織片移植により生存率の改善は認められなかった (図 15, 16)。

5. 実験 8: 肝組織片移植に四塩化炭素投与を行った V 群の 1 週間後の生存率は 82% であり, 対照である四塩化炭素のみを投与した W 群での 1 週間後生存

Table 3. Density of autoradiogram

Group	Number	Days	TLS	Liver	BG
K	10	1	0.32±0.06	0.94±0.24	0.12±0.03
K	10	7	0.42±0.15	0.94±0.44	0.15±0.05
L	5	1	0.04±0.02	0.65±0.08	0.09±0.01
L	5	7	0.05±0.01	0.83±0.03	0.14±0.02
M	5	—	—	0.93±0.12	0.10±0.02
N	5	—	—	0.75±0.46	0.09±0.03
O	5	1	0.47±0.08	1.28±0.08	0.15±0.05
O	5	7	0.43±0.01	1.20±0.18	0.12±0.04
P	5	1	0.55±0.12	1.42±0.20	0.16±0.05
P	5	1	0.51±0.08	1.40±0.12	0.10±0.05
Q	5	1	—	1.41±0.20	0.14±0.02
Q	5	7	—	1.36±0.12	0.10±0.04

All measurements are expressed as mean values ± standard deviation.

Group of rats: K, liver tissue transplantation with hepatic resection; L, fat and muscle transplantation without hepatic resection; M, no transplantation with hepatic resection; N, no transplantation without hepatic resection; O, CCl₄ (1.0ml/kg weight) administration after liver tissue transplantation without hepatic resection; P, CCl₄ (1.5ml/kg weight) administration after liver tissue transplantation without hepatic resection; Q, CCl₄ (1.0ml/kg weight) administration without liver tissue transplantation and hepatic resection.

Table 4. Relative radioactivity[#] of autoradiogram

Group	Number	Days	TLS	Liver	BG
K	10	1	0.33±0.07	1.34±0.45	0.12±0.04
K	10	7	0.42±0.16	1.34±0.62	0.14±0.05
L	5	1	0.05±0.02*	0.83±0.10	0.09±0.01
L	5	7	0.05±0.01**	1.14±0.04	0.14±0.02
M	5	—	—	1.33±0.12	0.09±0.02
N	5	—	—	1.00±0.47	0.09±0.03
O	5	1	0.50±0.08 ^{3*}	2.02±0.13 ^{5*}	0.16±0.05
O	5	7	0.44±0.01	1.78±0.27	0.12±0.04
P	5	1	0.63±0.14 ^{4*}	2.47±0.35 ^{6*}	0.16±0.05
P	5	7	0.56±0.09	2.37±0.20	0.09±0.05
Q	5	1	—	2.42±0.35 ^{7*}	0.14±0.02
Q	5	7	—	2.23±0.20 ^{7*}	0.09±0.04

All measurements are expressed as mean values ± standard deviation. Short names of group rats are the same with table 3.

[#], relative radioactivity is expressed as ratio to radioactivity in liver of N group.

*, p<0.01 vs K group on 1 day; **, p<0.01 vs K group on 7 day; ^{3*}, ^{4*}, p<0.05 vs K group on day; ^{5*}, ^{6*}, p<0.05 vs K group on 1 day; ^{7*}, p<0.05 vs M group.

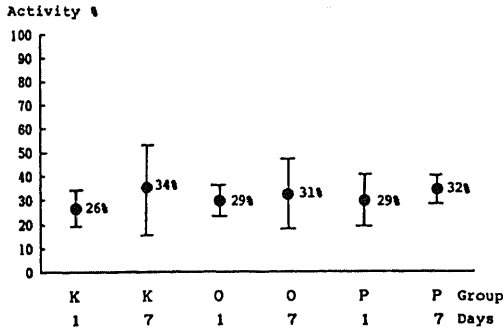


Fig. 14. Detoxication activity of liver tissue transplanted in the spleen.

K, group of the liver tissue transplantation to the spleen with hepatic resection; L, group of muscle and fat transplantation to the spleen; O, CCl₄ (1 ml/kg) administration group of the liver tissue transplantation without hepatic resection; P, CCl₄ (1.5 ml/kg) administration group of the liver tissue transplantation without hepatic resection.

$$D(\%) = \frac{S-B}{H-B} \times 100$$

D, detoxication activity; S, relative radioactivity of the transplanted liver tissue in the spleen; H, Relative radioactivity of the host liver; B, relative radioactivity of the spleen without transplantation.

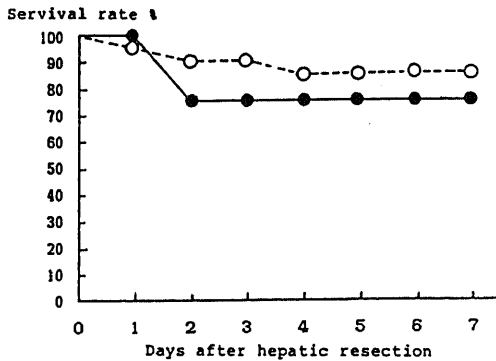


Fig. 15. Survival of the groups with 80% hepatic resection.

●-●, group R with liver tissue transplantation (n=20); ○-○, group T without liver tissue transplantation (n=20).

率 40% に比べ有意に生存率の改善が認められた (p < 0.01) (図 17)。

考 察

肝癌あるいは転移性肝癌の根治性を考慮すれば肝全摘が望ましいが、長期に渡り解毒、合成機能を代償しなければならない。欧米では肝臓器移植が行われてお

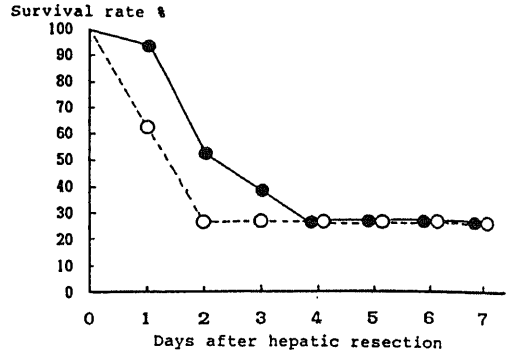


Fig. 16. Survival of the groups with 90% hepatic resection.

●-●, group S with liver tissue transplantation (n=20); ○-○, group U without liver tissue transplantation (n=20).

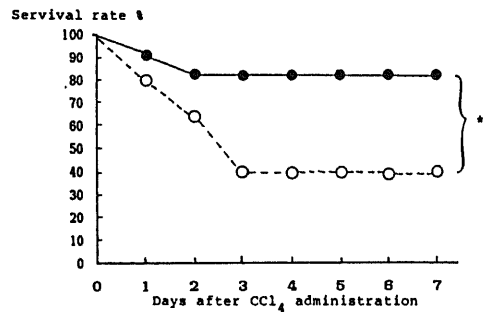


Fig. 17. Survival of the groups with CCl₄ (1.5 ml/kg) administration.

●-●, group V with liver tissue transplantation (n=45); ○-○, group W without liver tissue transplantation (n=20). *, p < 0.01.

り優れた結果が報告されている。しかし、本邦では倫理的問題から臨床応用は今後の課題と考えられる。

ここに登場したのが肝細胞移植である。Sutherland⁹⁾は実験的に肝細胞を腹腔内、門脈に移植し、生着する事、薬物性肝壊死に陥った肝が再生するための補助手段となると結論した。本邦でも水戸¹⁰⁾⁻¹⁴⁾は肝細胞移植に最も適した臓器は脾臓であると報告し、細胞の再生増殖、分化を解明するための実験的モデルを作成した。本実験も同様で、細網内皮系の発達している脾臓内でのみ生着が確認されたが¹⁵⁾¹⁶⁾、その理由は脾臓は肝臓と同様 Sinusoid を有しており血流が豊富であることが考えられた。また、PAS 染色により、移植肝細胞が正常肝細胞と同様なグリコーゲン顆粒を有しており糖代謝を行うものと考えられた。文献的には肝臓を細切し種々の部位に移植する試みは 1898 年 Ribbert により最初になされ、以来多くの報告が行わ

れてきた¹⁷⁾。Makowka ら¹⁸⁾の肝細胞腹腔内移植実験では、急性肝不全で有意な生存率の改善を報告している。また、Goth ら¹⁹⁾の門脈内移植実験では5日以内に18匹中5匹が移植された肝細胞の塞栓により死亡したとしている。また、Sommer ら²⁰⁾、沼田ら²¹⁾は門脈内に肝細胞を注入し、劇症肝炎における生存率、血清肝酵素値の改善が得られたと報告している。佐々木ら²²⁾は肝細胞を腸間膜内に同系移植し2週間後に肝細胞集団の形成、細胞分裂、腺管形成を認めたとしている。

多くの肝細胞移植の実験では門脈よりコラゲナーゼを還流する方法で肝細胞の分離が行われているが²³⁾、本実験では門脈、下大静脈の還流を行わず細切肝を用いてコラゲナーゼ処理を行った。本方法はより臨床的と考えられる。また肝細胞生存率は85%で特に問題はなかった。石橋は下大静脈よりコラゲナーゼを注入し還流することにより生存率は85±8%とした⁸⁾。

肝細胞増殖因子について考えると、実験2からインスリン、グルカゴン共に移植肝細胞の増殖を活発にしていると想像された²⁴⁾。初代培養肝細胞による門脈血を用いた研究では、インスリン投与によりチミジンの取り込みが増加し、グルカゴンの投与により抑制されたとしている²⁵⁾。逆に Price²⁶⁾、Whittemore²⁷⁾は肝再生の初期にグルカゴンが重要であるとしている。Leffert²⁸⁾はインスリンとグルカゴンの共役効果はなかったとしている。この様な違いが生ずるのは、脾臓を用いた生体内培養と組織培養による環境の相違、また肝細胞を分離する際にレセプターが変化、破壊されることを考慮すべきと考える。

肝切除範囲からみると、実験3から肝切除範囲が大きくなるほど移植肝細胞の増殖が活発になるとの知見を得たが、移植肝細胞の増殖が残存肝とコントロール下にあると考えられた¹⁰⁾²⁹⁾。

ところで、大量肝切除や劇症肝炎による急性肝不全を救命するには一定期間の肝機能補助、特に解毒機能を補助することが必要となる。臨床的には血漿交換法が行われているが、成績も充分とは言えず、また、大量の血漿が必要であり、合併症の点でも無視できない。また、肝細胞移植では移植時の細胞数は少なく、また細胞集団を形成するには6カ月以上の日数を必要とするため急性期肝不全の治療には不向きである¹⁵⁾¹⁶⁾。そこで著者は細切肝を用いた肝組織片移植を考えたのである。本質的には肝細胞移植と同様と考えられるが、移植細胞数が多いこと、移植片の作成が容易であることから、より臨床的に急性肝不全の治療に可能性を開くものと考え基礎的実験を行った。移植肝組織片作成の方法について榎本³⁰⁾は電動回転式のステンレス製2枚刃による mechanical chopper を用いて移植組織片を

作成したが、所用時間は20分であった。元島ら³¹⁾は細切肝に対して collagenase 処理を約15分に加え、Hanks液にて数回洗浄し移植組織片とした。

移植部位について、今回著者は脾臓を選んだが、実験1で肝細胞移植の結果から移植部位として最もふさわしいと判断したためである。

肝組織移植片の組織学的変化を検討すると、移植後12カ月目では肝細胞索の形成は認められず、肝細胞移植では移植6カ月後より細胞集団で肝細胞索の形成を認めたのと対照的であった¹⁵⁾¹⁶⁾。また、移植1週間で胆管類似の上皮細胞の増生を認めたが、文献的にも *in vitro* の組織培養で同様の所見が認められる³²⁾のと同じした。

肝組織移植片の機能を検討すると、Terblanche ら³³⁾が犬を用いた実験で再生肝より得た cytosol で肝細胞の DNA 合成が促進するが、正常肝の cytosol では DNA の合成は促進しないとしている。また、Makowka ら³⁴⁾は D-galactosamine の障害肝ラットに正常肝より得られた cytosol を使用し有意に生存率が改善したと報告している。これら2つの文献を考えると細胞の変性の有無に拘わらず細胞の再生を促すには細胞内成分のみで充分であるといえる。また、江端ら³⁵⁾は D-galactosamine 障害肝ラットに対する OK-432 の脾内投与実験から、RES 機構を賦活させるだけでも生存率が改善し、肝細胞移植の効果もこれによる結果であると報告した。即ち移植された肝組織片は変性しているにもかかわらず、その濾出した細胞内成分が肝臓の肝細胞再生を促したか、あるいは移植組織片が RES 機構を賦活させたため急性肝不全の生存率を改善したと考えられる。そこで移植された肝細胞は生存しているのか確認する事が必要となった。著者は広義の解毒機能を反映し、肝胆道系スキャン用薬剤として臨床で頻用されている ^{99m}Tc-diethyl-IDA を用いて、マクロオートラジオグラフィにより移植片での取り込みを確認した。^{99m}Tc-diethyl-IDA は bromsulphalein (BSP) 等と同様で肝細胞内で dye anion pathway により能動輸送され胆汁中に排泄されるとされ⁷⁾解毒機能の指標と考えられた。すなわち急性期における移植肝細胞の生存および解毒機能を直接証明する事ができたと考える。現在まで移植片機能の証明方法として、移植慢性期で PAS 染色を用いグリコーゲン顆粒の存在を証明する方法以外に、元島ら³¹⁾が脾内に肝細胞を移植し2カ月以降で indocyanine green (ICG) 負荷試験をおこない、脾液中に ICG の排泄を証明した報告がある。また、水戸ら³⁶⁾が脾内肝細胞移植したラットで、コントロールの Eck 瘻造設ラットに比し、ICG 排泄試験の半減期が短縮する成績を報告して

いる。その他、古典的な方法としては HE 染色にて細胞の形態学的変化を見ることや、肝細胞、肝組織片移植により急性肝不全下での個体生存率が改善することで代用されてきた⁵⁾⁹⁾¹⁸⁾²⁰⁾³⁰⁾³⁴⁾³⁷⁾³⁸⁾。

一般的にオートラジオグラフィで使用される水溶性あるいは脂溶性の検体は凍結ミクロトームで薄切され露光標本となる³⁹⁾。今回の実験では厚さ 1 mm の露光標本を作成した。これは半減期約 6 時間の ^{99m}Tc を使用したため露光時間の延長に意味がなく、また一個体に投与できるアイソトープ量の制限により露光標本が厚くならざるを得ないためであった。また手技上の問題から今回はミクロトームを使用せず自作のカッターを用い新鮮標本を切ったが切片の均一性には大きな問題はないと考えられた。

オートラジオグラムの相対的放射能による移植肝細胞の活性率については黒化度標準曲線の作成により標本の黒化度から相対的放射能をもとめることができた。また、^{99m}Tc-diethyl-IDA は静注後 5 分では多くが肝細胞内にあり胆汁中への排泄は少量と考えられた^{?)}。そこで脾内血中のバックグラウンドを差し引いた後、脾内移植肝組織片の相対的放射能の最高値と同一個体肝臓の相対的放射能の比を取れば移植片の名目上の活性率が半定量的に測定され得ると考えた。以上の様な考えで活性率を測定したが、注目すべき事実が明らかとなった。まず移植後 1 日目も、7 日目も活性率に有意差がないことである。但し、組織学的検討で経時的に肝細胞集団が縮小することを合わせ考えれば徐々に肝細胞は死亡減少している事になるが、生存するかぎり個々の肝細胞は少なくとも解毒機能について一定の能力を持つと推測された。次いで移植後に作成した四塩化炭素による急性肝障害では肝切除に伴う移植に比べ移植肝組織片の活性率に有意差は認められず 20~50%代であったが、相対的放射能が移植片、同一個体の肝臓ともに有意に高値を示している事である。四塩化炭素による肝障害の発生は肝ミクロゾームで、フリーラジカルであるトリクロールエチルを産生し、これが引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を受け、膜の生理機能が損なわれ肝障害をきたすとする説⁴⁰⁾、また、その膜障害の結果細胞内へ Ca^{2+} 蓄積が助長され⁴¹⁾ひいてはミトコンドリア内の Ca^{2+} が増加し、ミトコンドリアにおける酸化的磷酸化が抑制されるとする説⁴²⁾があげられている。^{99m}Tc-diethyl-IDA の肝細胞への取り込みがこれに直接関係する証拠はないが四塩化炭素の投与により肝臓、移植肝組織片の解毒機能が平等に活性化された状態にあるためと考えられる。一般的にある薬剤を投与すること

により他の化合物の代謝を促進する現象があるとされ、本現象も同様と推測された⁴³⁾。

肝組織片移植による生存率改善については文献的に急性肝不全が外科的な作成でも¹⁸⁾³⁰⁾³⁷⁾、薬剤による作成でも⁵⁾²⁰⁾³⁴⁾³⁸⁾肝細胞移植や肝組織片移植により生存率が改善したとの報告が多い。その理由として移植組織片からの肝再生因子や障害肝の保護作用も考え得るが、障害を受けている宿主肝自身も再生因子を出す事が想像され新たな疑問となる。本実験 5, 6 では大量肝切除による急性肝不全では肝組織片移植により有意な生存率の改善を認めず、四塩化炭素による急性肝不全のみ肝組織片移植により有意な生存率の改善を認めた。これは本質的に両者の間に何等かの相違点があるためである。即ち、大量肝切除に伴う移植では移植後組織片に新たな障害は加わっていないが、四塩化炭素投与群では実験 6 のマクロオートラジオグラフィで肝臓、移植肝組織片共に相対的放射能が上昇しており、また移植後も組織片に 1 週間の間肝細胞障害が持続していることから致死量に至らない持続的肝細胞障害下では肝臓と共に移植肝組織片の解毒機能が活性化されるものと想像される。従って、大量肝切除では移植片への持続的刺激が少ないため解毒機能の発現が認められても僅かで生存率に有意差が出ないのに対し、四塩化炭素投与による肝不全では臨界点に近い肝障害を受けた場合、僅かな容積であっても機能的には大きく作用し生存率改善の補助となりうる可能性があると考えられた。

結 論

肝細胞移植について、遊離肝細胞の生着に適した臓器、グルカゴンやインスリン投与の影響、および肝切除を加えた場合移植肝細胞がどのような増殖を営むか検討した。一方、肝組織片移植について、脾臓内に肝組織片を移植し、その生着状況、急性期における機能の有無、および急性肝不全に際し肝機能の補助が可能か否か検討した結果、以下の結論を得た。

1. 移植肝細胞は脾臓内でのみ生着し、腹腔内、脾内、胃壁内には生着しなかった。
2. 脾内移植肝細胞は 3 週間後には数個の肝細胞集団を作り、6 カ月後には肝細胞索の形成を伴う大型細胞集団となった。しかし、その程度は個体により様々であった。
3. 肝細胞濾液に添加するホルモンとしてインスリン、グルカゴンが脾内移植肝細胞の増殖を促進した。
4. 肝切除範囲が大きくなるにつれて脾内移植肝細胞の増殖が促進された。
5. 脾内肝組織片移植を行ったが、移植片の大部分

は病理組織学的に凝固壊死となり約1カ月で消失した。しかし、以後残存した大型の肝細胞が数個ずつ集まり脾内赤色髄中に存在し続け、移植後12カ月で大型肝細胞集団を形成する例も認められた。

6. 移植肝組織片は、マクロオートグラフィにて^{99m}Tc-diethyl-IDAの取り込みを認めたことから、生存し解毒機能を営んでいることを確認した。

7. マクロオートラジオグラフィ実験の黒化度測定より得られた相対的放射能から、移植肝組織片は宿主肝臓に比べ20~50%の解毒機能活性率であった。また、移植肝組織片の解毒機能活性率は、移植後1日目、7日目で有意差を認めなかった。

8. 四塩化炭素投与下での、マクロオートラジオグラフィで脾内肝移植片と宿主肝臓の相対的放射能の有意な上昇を認めた。しかし、解毒機能活性率は20~50%で四塩化炭素非投与群に比べ上昇は認めなかった。

9. 四塩化炭素投与による急性肝不全では肝組織片移植により生存率の有意の改善を認めた。

以上の結果から移植肝細胞の増殖を助長する因子が明らかとなり、かつ、組織片移植では解毒機能を営み薬剤性の急性肝不全の救命に有効な手段となりうることを示唆した。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師 岩喬教授、ならびに御教示を頂きました金沢大学第二病理学教室 太田五六教授、核医学教室 久田欣一教授に深甚なる謝意を表します。

また、御協力、有益なる御助言を戴きました第一外科学教室 川浦幸光博士、金沢大学アイソトープセンター 森 厚文博士、第二病理学教室 中沼安二博士はじめ第一外科学教室各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Welch, C. S.: A note on the transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant. Bull.*, 2, 54-55 (1955).
- 2) Starzl, T. E., Marchiro, T. L., Kaulla, K. N., Hermann, G., Brittain, R. S. & Waddel, W. R.: Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 117, 659-676 (1963).
- 3) 岡村 純, 門田守人, 後藤満一, 堺 秀行, 藤森次勝, Luis Valdivia, 金井俊雄, 鈴木信彦, 蓮池康徳, 市川 長, 梅下浩司, 久保田直行, 遠藤和喜雄, 山本仁, 森 武貞: 肝移植. *臨床科学*, 21, 1453-1460 (1985).
- 4) Higgins, G. M. & 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).
- 5) 石橋治昭: 単離肝細胞移植による肝補助機能の実験的研究II偏, 急性肝障害に対する脾内肝細胞移植の効果について. *京府医大誌*, 92, 909-917 (1983).
- 6) Michael, D. Loberg, Adrain, D. Nunn. & David, W. Porter.: Development of Hepato-biliary Imaging Agents. *Nuclear Medicine Annual* 1981. p.1-13, Leonard M. Freeman and Heidi S. Weissmann (ed), Raven Press, New York, 1981.
- 7) Alan, R. Fritzbeg, Wayne, P. Whitney, & William, C. Kliingensmith, III.: Hepato-biliary transport mechanism of Tc-99m-N, α -2, 6-diethylacetetanilide)-iminodi-carboxylic acid (Tc-99m-diethyl-IDA). *Proceedings of second International Symposium on Radiopharmaceuticals*. 577-586 (1976).
- 8) 石橋治昭: 単離細胞移植による肝補助機能の実験的研究I偏, 肝細胞の分離, 門脈, 脾内への移植, 急性肝障害の作成. *京府医大誌*, 92, 903-908 (1983).
- 9) Sutherland, D. E. R., Nakamura, M. & Najarian, J. S.: Hepatocellular Transplantation in acute liver failure. *Surgery*, 82, 124-132 (1977).
- 10) 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. *医学のあゆみ*, 10, 5, 815-816 (1978).
- 11) 水戸迪郎, 江端英隆, 草野満夫, 大西俊郎: 脾臓内肝細胞移植. *医学のあゆみ*, 111, 362-370 (1979).
- 12) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M., Onishi, T., Hiratsuka, M. & Saito, T.: Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte translocation into the spleen. *Transplant. Proc.* 13, 585-591 (1979).
- 13) Mito, M., Kusano, M., Onishi, T., Saito, T. & Ebata, H.: Hepatocellular transplantation-morphological study on hepatocytes transplanted in rat spleen. *Gastroenterologia Japonica*. 13, 480-490 (1977).
- 14) Ebata, H., Kusano, M., Onishi, T., Saito, T. & Mito, M.: Liver regeneration utilizing isolated hepatocytes transplanted into the spleen. *Surg. Form.* 29, 338-340 (1978).
- 15) 川浦幸光, 疋島 寛, 酒徳光明, 岩 喬: 肝細胞移植に関する研究. *日本外科学会雑誌*, 83, 468-472 (1982).
- 16) 川浦幸光, 魚津幸蔵, 平野 誠, 岩 喬: 肝細胞移植について. *北陸外科学会雑誌*, 1, 3-6 (1982).
- 17) Senevirance, R. D.: Transplantation of a

- lobe of the liver in the rat. *J. Path. Bact.*, **70**, 271-283 (1955).
- 18) Makowka, L., Rotstein, L. E., Falk, R. E., Falk, J. A., Langer, B., Nossal, N. A., Blendis, L. M., Phillips, M. J.: Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngenic, allogenic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surgery*, **88**, 244-251 (1980).
- 19) Goth, C. G., Arborgh, B., Bjorken, C., Sundberg, B., Lundgren, G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl-transferase deficient rat by intraportal hepatocytes transplantation. *Transplant. Proc.*, **9**, 313-316 (1977).
- 20) Sommer, B. G., Sutherland, D. E. R., Matas, A. J., Najarian, J. S.: Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Transplantation Proceedings*, **11**, 578-584 (1979).
- 21) 沼田 稔, 小池 例, 林 四郎: 亜急性肝炎に対する肝組織片移植の実験的研究—血清学的検討—. *移植*, **19**, 338-342 (1984).
- 22) 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).
- 23) Berry, M. N. & Friend, D. S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell (A biological and fine structural study). *J. Cell Biol.*, **43**, 506-520 (1969).
- 24) 川浦幸光, 羽柴 厚, 魚津幸蔵, 岩 喬: 睪ホルモンが脾内移植肝細胞に与える影響. *医学のあゆみ*, **123**, 728-730 (1982).
- 25) 有井滋樹: 成熟ラット初代培養肝細胞によるhepatotrophic factorに関する研究. *消化器病学最近のトピックス*, 第1版, 178-182, 東洋書店, 東京, 1981.
- 26) Price, J. B. Jr., Takeshige, K., Max, M. H.: Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration. *Surgery*, **72**, 74-82 (1982).
- 27) Whittemore, A. D., Kasuya, M., Voorhees, A. B. Jr.: Hepatic regeneration in absence of portal viscera. *Surgery*, **77**, 419-426 (1975).
- 28) Leffert, H. L., Alexander, N. M., Faloona, G.: Specific endocrine and hormonal receptor changes associated with liver regeneration in adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 4033-4036 (1975).
- 29) 川浦幸光, 魚津幸蔵, 疋島 寛, 岩 喬: 肝切除範囲からみた脾内移植肝細胞の増殖. *医学のあゆみ*, **121**, 415-416 (1982).
- 30) 榎本和夫: 肝組織片移植の基礎的研究. *移植*, **20**, 615-622 (1985).
- 31) 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, 土屋涼一: 肝組織片移植に関する実験的研究. *日外会誌*, **83**, 658-664 (1982).
- 32) 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構. *臨床科学*, **19**, 1378-1396 (1983).
- 33) Terblanche, J., Porter, K. J., Starzl, T. E., Moore, J., Patzelt, L. & Hayashida, N.: Stimulation of hepatic regeneration after partial hepatectomy by infusion of a cytosol extract from regenerating dog liver. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **151**, 538-544 (1980).
- 34) Makowka, L., Rotstein, L. E., Falk, R. 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).
- 35) 江端英隆, 水戸迪郎: 肝細胞移植の現況とこのモデルの応用. *外科*, **45**, 723-725 (1983).
- 36) 水戸迪郎, 野沢真澄: 脾内移植肝細胞の機能. *外科*, **42**, 63-65 (1980).
- 37) 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).
- 38) Contini, S., Pezzarossa, A., Sansoni, P., Mazzoni, M. P. & Botta, G. C.: Hepatocellular transplantation in rats with toxic induced liver failure: results of iso-, allo- and xenografts. *Ital. J. Surg. Sci.*, **13**, 25-30 (1983).
- 39) 水戸敏知: オートラジオグラフィ. *病態生理*, **3**, 44-59 (1984).
- 40) 八木国夫, 五島雄一郎: 過酸化脂質と疾患, 第1版, 70-71, 医学書院, 東京, 1981.
- 41) John, L. Farber: *Progress in Liver Diseases, Calcium and the Mechanisms of Liver Necrosis*, p. 347-360, Grune & Stratton, Inc., New York, 1982.
- 42) 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).
- 43) 北川晴雄, 栗山欣弥: 薬物毒性の生化学的観点. *生化学観点からみた薬理学*, 第1版, 72-74, 理工学社, 東京, 1981.

Experimental Studies of Hepatocellular Transplantation and Liver Tissue Transplantation to the Spleen Kouzou Uozu, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 739—755 (1987)

Key words: Hepatocellular transplantation, Liver tissue transplantation, Hepatotrophic factor, Macroautoradiography, Acute hepatic failure

Abstract

Hepatocellular transplantation was performed and the author studied where is the most suitable organ for the hepatocellular transplantation, influences of insulin and glucagon as the hepatotrophic factor, and the relationship between the hepatic cell growth and the resected hepatic volume. Liver tissue transplantation was performed and the author evaluated the pathological and functional changes in the acute phase of transplantation under acute hepatic failure. Male strained slc/Wistar rats, 250 g to 300 g, were used in these experiments. Hepatocytes were dispersed by modified Berry & Friend's method. Liver tissue fragments were sliced about 1 mm in diameter with scissors. One million cells of the dispersed hepatocytes and 1.2×10^7 cells of the sliced liver tissue were transplanted with direct injection. The dispersed transplanted hepatocytes could live only in the spleen, formed the cell nest 3 weeks after the transplant and formed the sinusoid 6 months after the transplant. Insulin and glucagon, when they were mixed with hepatocytes in transplant, were effective for the growth of the hepatocytes. Massive hepatic resection was also effective for the growth of the hepatocytes. Sliced liver tissue fragments of rat were transplanted into the spleen. Most of transplanted liver tissues showed coagulation necrosis, and they could not be identified one month after transplantation. Macroautoradiographic studies with ^{99m}Tc -diethyl-IDA, hepatobiliary agent, were performed. The yellowish white portions of the specimens on the seventh day indicated an uptake of the ^{99m}Tc -diethyl-IDA corresponding to the transplanted liver tissue. This means the transplanted fragments were alive and had a role of detoxication. The relative radioactivity of the fragments, measured in the standard density curve, were 20% to 50% of that of the host liver. The survival ratio in acute hepatic failure induced with tetrachlorocarbon (CCl_4) improved with the method of liver tissue transplantation. From the results of macroautoradiographic studies, under acute hepatic failure, the activation of detoxication in the transplanted liver tissue was confirmed. In summary, the author confirmed that the transplanted hepatic cell lived only in the spleen, that a mixed solution of insulin and glucagon helped the growth of transplanted hepatic cells, and that the transplanted liver tissue under acute hepatic failure was alive and had a role of detoxication from an early stage of transplantation.