— 原 著 —

肝部分切除後おこる肝再生の過程で活性化する 肝内リンパ球の性状と機能について

池田 正和・馬淵 綾子・横室 公三

日本医科大学微生物学免疫学教室

Modification of surface phenotype and function in intrahepatic lymphocytes during liver regeneration after partial hepatectomy

Masakazu Ikeda, Ayako Mabuchi and Kozo Yokomuro

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

In the intrahepatic lymphocyte fraction (IHL) of mice whose livers have been perfused by Ca^{2+} and Mg^{2+} free Hank's balance salt solution, flow cytometric analysis reveals various cells similar to those found in the spleen (CD3^{+} cell, CD4^{+} cell, CD8^{+} cell, $\alpha\beta\text{TCR}^{+}$ cell, $\gamma\delta\text{TCR}^{+}$ cell, Thy1.2^{+} cell, B220^{+} cell and asialo- Gm1^{+} cell). The cytotoxic activity against YAC-1 cells in IHL is significantly higher than that in spleen cells. Furthermore, IHL has cytolytic activity against syngeneic thymoma BW5147 cells which is not found in spleen cells. Both cytotoxic activities of IHL are greatly weakened by the pretreatment of IHL with anti asialo- Gm1 Ab and rabbit complement.

During liver regeneration after a partial hepatectomy, the percentages of lymphocyte subsets of IHL such as $\alpha\beta\text{TCR}^{+}$ cells, $\gamma\delta\text{TCR}^{+}$ cells and asialo- Gm1^{+} cells transiently increase 2 days after the partial hepatectomy and their cytotoxic activities against YAC-1 and BW5147 cells also reach a peak at that time. It is well known that the peak of mitotic index in regenerating parenchymal liver cells peaks 2 days after a partial hepatectomy and that the number of Pit cells peaks 10 to 14 days after. Compared with the time for reaching the highest mitotic index in regenerating parenchymal liver cells, the proliferation of Pit cells comes very late.

It has not been clear which proliferation process in parenchymal liver cells is suppressed by activated Pit cells. Our findings in this paper reveal that the percentages and the cytotoxic activities of asialo- Gm1^{+} cells in IHL reach their peak 2 days after an operation. This strongly suggest that Pit cells suppress the proliferation of parenchymal liver cells at the primary stage of liver regeneration.

Key words: partial hepatectomy, liver regeneration, intrahepatic lymphocytes, natural killer cell

緒 言

従来から肝臓内には、Kupffer細胞やPit細胞等の免疫系細胞が存在することが良く知られていた。最近、これらの細胞以外に、さまざまな免疫系細胞や造血系幹細胞が肝臓内に常在することが明らかになり、肝臓をhematolymphoid systemの一臓器ととらえる考えが生まれた^{1,2)}。

肝臓は、極めて再生力の大きい臓器で、マウスの肝臓を70%部分切除すると、10日から2週間でその重量、機能ともに元に復するとされている³⁾。この肝再生の過程で、Kupffer細胞、Pit細胞^{4,5)}、 $\alpha\beta\text{TCR}^{+}$ 細胞、 $\gamma\delta\text{TCR}^{+}$ 細胞^{6,7)}、造血幹細胞²⁾などの数や割合に変動の起こることが報告されている。殊にPit細胞は、肝類洞を構成する細胞で、著明なNK活性を持つところから⁸⁾、肝再生現象に深くかかわることが想像される⁹⁾。しかし、Pit細胞の数が肝部分切除後最も多くなるのは、術後10日から2週間であり⁴⁾、Pit細胞が肝再生現象に影響を及ぼす時期については、一定の見解が得ら

Correspondence to Masakazu Ikeda, Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

れぬままであった。

本論文は、肝臓内に常在する免疫系細胞群の割合が最も著明に変動するのは、肝部分切除後2日目の頃であり、その時期に一致して、肝臓内の asialo-Gm 1⁺細胞の割合や、その細胞障害活性が一過性に増強することを観察し、Pit 細胞が肝再生の極めて早期に、肝実質細胞の増殖を抑制する可能性を示したものである。

研究材料および方法

1) 実験動物

6～8週齢の雌性 C 3 H/Hecrj マウス (Charles River Japan) を使用した。

2) 抗体

fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識した anti-Thy 1.2 mAb (TS, Sigma), anti-CD 3 mAb (145-2 C 11, Pharmingen), anti-CD 4 mAb (GK 1.5, Becton Dickinson), anti-CD 8 mAb (53-6-7, Becton Dickinson), anti- $\alpha\beta$ -TCR mAb (H 57-597, Pharmingen), anti- $\gamma\delta$ -TCR mAb (3 A 10, 順天堂大学奥村 康教授 恵与), anti-CD 45 R mAb (Ly 5/B 220, Pharmingen) を用いて、細胞を直接法で染色し、flow cytometry analysis に供した。

asialo-Gm 1 抗原は、間接法により染色した。一次抗体に rabbit anti asialo-Gm 1 mAb (AG-1, 生化学工業) 二次抗体には FITC を標識した goat anti rabbit IgG Ab (Cappel) を用いた。

3) 肝部分切除

Higgins and Anderson の方法¹⁰⁾に従って、エーテル麻酔下に 70%肝部分切除を施行した。

4) 肝内リンパ画分 (intrahepatic Lymphocytes: IHL) と脾臓細胞 (spleen cell: SPC) の調整

IHL 浮遊液の調整は、以下に略述するような坂本らの変法²⁾によった。無処置あるいは 70%肝部分切除したマウスの肝臓を、EGTA を含む Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free の Hanks balanced salt solution (HBSS) で灌流後摘出した。この肝臓を 0.05% collagenase (和光純薬), 0.005% trypsin inhibitor (type 11-s, Sigma) および 10 mM HEPES を含

む HBSS (pH 7.5) 中で細切し、37℃ 15 分間振盪、金属メッシュ上で圧搾し、細胞浮遊液を調整した。この細胞浮遊液を低速遠心で肝非実質細胞の粗分画を分離、次いで percoll 比重遠心法によって肝非実質細胞画分 (IHL) を得た。SPC も赤血球を溶血除去後 percoll 比重遠心法によって同様に調製した。

5) ⁵¹Cr-release による細胞傷害活性の測定

natural killer (NK) 活性は、マウス NK 感受性腫瘍細胞株である YAC-1 細胞を用い、同系腫瘍細胞に対する傷害活性は、同系の胸腺細胞腫 BW 5147 細胞を標的細胞として測定した。効果細胞である SPC と IHL を ⁵¹Cr をラベルした標的細胞 (1×10⁴ cells/100 μ l) に種々の割合 (E/T 比 80:1～2.5:1) で加え、4 時間混合培養 (37℃, 5% CO₂) 後、培養上清中に遊離する ⁵¹Cr の放射活性を示し、% cytotoxicity を以下の式に従って算出した。

いずれの実験も、triplicate に行った。

% cytotoxicity =

$$\frac{\text{遊離 cpm} - \text{自然遊離 cpm}}{\text{最大遊離 cpm} - \text{自然遊離 cpm}} \times 100$$

6) 抗 asialo-Gm 1 抗体と補体による IHL および SPC の処理

asialo-Gm 1⁺細胞を除去するためには、まず rabbit anti asialo-Gm 1 mAb を加え 4℃ 30 分間放置し、洗浄後ウサギ補体で 37℃ 45 分間反応させるという方法で浮遊細胞を前処置した。死細胞の除去は、percoll 比重遠心法によった。

7) flow cytometry

Lysys II (FAC Scan, Becton Dickinson) を用いて測定した。

結 果

1. 肝臓および脾臓内に常在する免疫系細胞の subsets

肝類洞壁を構成する Kupffer 細胞や Pit 細胞の他に、肝臓に常在する IHL の細胞群を flow cytometry により測定し、SPC のそれと比較した (Table 1)。IHL には SPC に匹敵する多彩な免疫系細胞群 (Thy 1.2⁺細胞, CD 3⁺細胞, $\alpha\beta$ TCR⁺

Table 1 The surfaces phenotype of IHL and SPC in C 3 H mice

surface antigens	positive cell percent of	
	IHL	SPC
CD 3	32.8±7.2	30.5±7.5
CD 4	20.0±4.4	19.5±6.7
CD 8	11.3±3.2	7.7±3.4
$\alpha\beta$ TCR	26.3±4.6	29.5±2.5
$\gamma\delta$ TCR	6.9±3.6	1.5±0.3
B 220	23.7±2.1	53.3±9.0
AGM 1	17.8±2.2	9.6±4.1
Mac-1	20.5±1.4	7.2±2.6

The livers and the spleens were collected from 3 C 3 H mice to prepare IHL and SPC suspensions. The cells stained with FITC labeled mAb were analyzed their phenotypes by FACScan. Similar experiments were repeated 3 times. An asterisk shows significant difference between IHL and spc ($p < 0.01$).

細胞, $\gamma\delta$ TCR⁺細胞, CD 4⁺細胞, CD 8⁺細胞, B 220⁺細胞, asialo-Gm 1⁺細胞, Mac 1⁺細胞, 等)が存在するが, 殊に SPC に比べ, $\gamma\delta$ TCR⁺細胞, Mac-1⁺細胞, asialo-Gm 1⁺細胞の割合が有意に高値で, B 220⁺細胞の割合が有意に低く, 肝臓に常在する LHL の subsets の構成は, 脾臓のそれと異なることが明らかになった。

2. 肝内リンパ球画分および脾臓細胞の非特異的細胞障害活性

著明な NK 活性を持つことが知られている Pit 細胞を含む IHL と, SPC の NK 活性を比較したのが Fig. 1 である. YAC-1 細胞障害活性は, 効果細胞/標的細胞の比が 20/1 および 10/1 の時, IHL で 35.6 ± 0.9 と 23.4 ± 0.7 であり, SPC では 7.2 ± 0.6 と 2.1 ± 0.7 であった. さらに, 細胞比が 5/1 になると, SPC の NK 活性は測定限界以下となるが, IHL では 13.2 ± 1.4 の活性が認められる. 同系胸腺腫 BW 5147 細胞に対する細胞障害活性は, 効果細胞/標的細胞の比を変えても, SPC では測定した範囲内では 2.5% 以下であり, 有意の障害活性は認められなかったが, IHL では, 細胞比 20/1, 10/1 でそれぞれ 12.5 ± 0.7 , 7.0 ± 1.0 と有意の障害活性を示した. この様な細胞障害活性は, IHL, SPC とともに効果細胞を抗 asialo-Gm 1 抗体と補体で前処理することにより完全に消失した (Table 2).

3. 肝部分切除後おこる肝内リンパ球画分の変動

肝臓内には, 免疫系細胞群の subsets が脾臓と異なる割合で常在していることが明らかになった (Table 1). この IHL の T 細胞 subsets と

Fig. 1 Comparison between IHL and SPC in cytotoxic activity against YAC-1 and BW 5147 cells

The livers and the spleens were collected from 3 C 3 H mice to prepare IHL and SPC suspensions. The cytotoxic activities against YAC-1 and BW 5147 cells were measured by 4 hour-culture method. Typical results of similar experiments repeated 3 times are shown.

Table 2 Effect of pretreatment of effector cells by anti asialo-Gm1 antibody and complement on cytotoxic activity of IHL and SPC

target	effector	treatment	% specific Cr ⁵¹ release		
			20 : 1	10 : 1	5 : 1 (E:T)
YAC-1	IHL	C	69.0	55.9	41.6
		α -AGM 1+C	2.2	2.2	0.6
	SPC	C	18.8	—	—
		α -AGM 1+C	1.7	—	—
BW 5147	IHL	C	37.0	33.0	—
		α -AGM 1+C	0.6	1.2	—

IHL and SPC were cultured with anti asialo-Gm1 Ab at 4°C for 30 min and then incubated with or without rabbit complement at 37°C for 45 min. The cytotoxic activities of effector cells against YAC-1 and BW 5147 cells were measured by ⁵¹Cr release assay of 4 hour-culture. Figure shows typical results in similar experiments repeated 3 times.

asialo-Gm 1⁺細胞が、肝部分切除と再生の過程でどの程度に変動するかを、flow cytometryを用いて観察した (Table 3). なかでも asialo-Gm 1⁺細胞と $\gamma\delta$ TCR⁺細胞の割合は術後 2 日で急激に増

Table 3 Modification of IHL subsets by a partial hepatectomy

surface antigens	positive cell percent of IHL hepatectomized before		
	0 d	2 d	3 d
CD 3	32.8±7.2	38.0±6.5	25.5±4.0
CD 4	20.0±4.4	21.1±3.8	18.0±2.9
CD 8	11.3±3.2	13.4±4.7	9.5±0.5
$\alpha\beta$ TCR	26.3±4.6	24.5±1.1	19.3±5.9
$\gamma\delta$ TCR	6.9±3.6 —*—	12.7±2.0 —*—	6.3±1.2
AGM 1	17.8±2.2 —*—	35.4±2.4	29.2±7.2

Each IHL sample was prepared from the livers which were collected from each group of 3 mice nontreated or hepatectomized 2 or 3 days before. The cell surface antigens were stained by FITC labeled mAb and analyzed by FACScan. Similar experiments were repeated 3 times. An asterisk shows significant difference ($p < 0.01$).

大し、3 日後にはほとんど元に復すると言ふ激しい一過性の変動を示した。

4. 肝部分切除後おこる肝内リンパ球画分の非特異的細胞障害活性の変動

肝部分切除 2 日後をピークとして、一過性に

Fig. 2 Change of cytotoxic activity in IHL after a partial hepatectomy
For the preparation of IHL, the livers were collected from each group of 3 mice which were non-treated or hepatectomized 2, 3 or 6 days before. The cytotoxic activities of IHL against YAC-1 and BW 5147 cells were measured triply by 4 hour ⁵¹Cr-release assay. Similar experiments were repeated 3 times.

IHL の subsets が変動する (Table 3) のに伴って、IHL の細胞障害活性も変動する。YAC-1 および BW 5147 の各細胞に対する細胞障害活性が、術後 2 日目をピークとして亢進するのが観察された (Fig. 2)。

考 察

肝臓は大量の末梢血を含有するため、肝臓内に見出されるリンパ系細胞が、肝臓に常在する細胞であるのか、あるいは、残存する末梢血に由来するものであるのかを識別することは、それ程容易なことではない。我々は先の論文⁶⁾で、末梢血を充分灌流除去した肝臓から、collagenase 溶液の低圧灌流で容易に流出される T 細胞画分と、流出しにくい T 細胞画分とを分け、流出しにくい画分程、常在する T 細胞 subsets の割合や肝部分切除後おこるそれらの変動が、末梢血のそれと異なることを示し、IHL が末梢血とは異なる特有の T 細胞 subsets からなることを明らかにした⁶⁾。

肝臓内には、T 細胞以外にも、さまざまな免疫系細胞や造血系幹細胞¹²⁾が存在する。その細胞群の多様なことは、脾臓におとらない (Table 1)。中でも、ある種の T 細胞、Kupffer 細胞、Pit 細胞は、いずれも自己の体成分と反応する可能性のある細胞群である¹¹⁻¹⁷⁾。この様な細胞群の割合や細胞障害活性が、早期に一過性に変動することは (Table 3, Fig. 2)、これらの細胞が、肝再生に何らかの影響を及ぼすことを示唆するものと思われる。

肝臓の Pit 細胞は、形態学的には large granular lymphocyte (LGL) であり、asialo-Gml 陽性の肝臓に固着する NK 細胞である⁸⁾。常在する Pit 細胞の NK 活性は、脾臓に比べて極めて大きく、NK 細胞抵抗性の胸腺腫 BW 5147 細胞も障害する (Fig. 1)。従って、Pit 細胞は、正常状態でも活性化した状態にあり、肝部分切除 2 日後には、その割合が増加するとともに細胞障害活性がさらに増強する (Table 3, Fig. 2)。このことは、Pit 細胞が肝実質細胞の核分裂がピークとなる術後 2 日頃に、再生肝の実質細胞に働き、その増殖を制御する可能性を示唆している。事実、biological

response modifier (BRM) である polyinosinic-polycytidilic acid (poly I:C) を肝部分切除 24 時間後 ip に投与すると、マウスの肝再生が抑制される¹⁸⁾。この抑制の機序に、poly I:C により活性化した NK 細胞の分泌する interferon- γ が関与する可能性も考えられる。さらに、肝部分切除 12 時間後に、lymphocyte activated killer (LAK) 細胞を移入したラットでは肝再生が抑制されるが、この抑制は活性化したリンパ球が分泌する TGF- β によるのではないかと考えられている⁹⁾。さらに Pit 細胞が、正常肝の実質細胞より再生肝の実質細胞をより容易に障害するという in vitro の報告もある⁵⁾。

肝部分切除後、Pit 細胞が肝臓内で増量する過程に 2 つの機序が考えられる。その 1 つは肝臓局所での増殖であり、他の 1 つは末梢血からの流入である^{19,20)}。肝再生開始後 5 日までの早い時期の増加には主として局所での増殖が関与し、一方術後 7 日から 14 日目の Pit 細胞は、分裂状態にある核が激減することから、後期の増加は、肝臓外からの流入によると考えられる⁴⁾。Pit 細胞の増量の機序が、肝再生の前期と後期で異なることが、肝再生の制御に如何なる影響を及ぼすかは、肝再生の場における Pit 細胞の役割を知る上で興味もたられる。

結 論

マウスの肝内リンパ球画分の細胞群は、肝部分切除 2 日後、その subsets の割合や NK 活性が著明に変動する。従って、これらの細胞のあるものは、肝再生の早期に働きこれを制御する可能性が考えられる。

稿を終えるにあたり、細胞表層の抗原解析に御懇篤な御指導と御協力を賜った順天堂大学免疫学教室奥村 康教授並びに太田康男博士を初め教室の諸先生方に深く感謝します。

文 献

- 1) Hata, K., Zhang, X.R., Iwatsuki, S., Van Thiel, D. H., Herberman, R.B., and Whiteside, T.L.: Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. Clin. Immunol.

- Path., 56, 401~419, 1990.
- 2) Sakamoto, T., Saizawa, T., Mabuchi, A., Norose, Y., Shoji, T., and Yokomuro, K.: The liver as a potential hematology organ examined from modifications occurring in the systemic and intrahepatic hematology system during liver regeneration after partial hepatectomy. *Regional Immunol.*, 4, 1~11, 1992.
  - 3) Meister, V.V.: *Rekreations des Lebergewebes nach Abtragung ganzer Leberlappen. "Beiträge zur patologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie"* (Ziegler, E. ed.), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1894.
  - 4) Shinya, M., Kaneda, K., Wake, K., and Yokomuro, K.: Large granular lymphocytes and kupffer cells in regenerating rat liver. *Biomedical Res.*, 11, 199~206, 1990.
  - 5) Itoh, H., Abo, T., Sugawara, S., Kanno, A., and Kumagai, K.: Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regenerating hepatocytes. *J. Immunol.*, 141, 315~323, 1988.
  - 6) Hirano, F., Sakamoto, T., Mabuchi, A., Norose, Y., and Yokomuro, K.: Modification of lymphocyte subsets in peripheral blood, the liver, the spleen and the thymus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Regional Immunol.*, 5, 293~298, 1993.
  - 7) Sato, Y., Tsukada, K., Iiai, T., Ohmori, K., Yoshida, K., Muto, T., Watanabe, H., Matsumoto, Y., and Abo, T.: Activation of extrathymic T cells in the liver during liver regeneration following partial hepatectomy. *Immunology*, 78, 86~91, 1993.
  - 8) Kaneda, K., Dan, C., and Wake, K.: Pit cells as natural killer cells. *Biomedical Res.*, 4, 567~576, 1983.
  - 9) Tanaka, N., Tatemoto, A., Urabe, T., Ono, M., Hizuta, A., Naomoto, Y., Gotoh, K., Moreira, L.F., and Orita, K.: Inhibition of liver regeneration in mice following extended hepatectomy by transfusion of lymphokine activated killer cells. *Acta Med. Okayama*, 47, 21~28, 1993.
  - 10) Higgins, G.M., and Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.*, 12, 186~202, 1931.
  - 11) Porcelli, S., Brenner, M.B., Greenstein, J.L., Balk, S. P., Terhost, C., and Bleicher, P.A.: Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4⁺ CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Nature*, 341, 447~450, 1989.
  - 12) Bonneville, M., Ito, K., Krecko, E.G., Itohara, S., Kappes, D., Ishida, I., Kanagawa, O., Janeway, C.A., Jr., Murphy, D.B., and Tonegawa, S.: Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by $\gamma\delta$ T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 5928~5932, 1989.
  - 13) Vidovic, D., Roglic, M., Mckune, K., Guerder, S., Mackay, C., and Demblich, Z.: Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a $\gamma\delta$ T-cell hybridoma. *Nature*, 340, 646~650, 1989.
  - 14) Nunn, M.E., Herberman, R.B., and Holden, H.T.: Natural cell-mediated cytotoxicity in mice against non-lymphoid tumor cells and some normal cells. *Int. J. Cancer*, 20, 381~387, 1977.
  - 15) Nabel, G., Allard, W.J., and Cantor, H.: A cloned cell line mediating natural killer cell function inhibits immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.*, 156, 658~663, 1982.
  - 16) Shah, P.D., Gilbertson, S.M., and Rowley, D.A.: Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 162, 625~636, 1985.
  - 17) Liu, Y.-N., Uchida, T., Ju, S.-T., and Dorf, M.E.: Functional analysis of macrophage hybridoma III. Inhibition of lymphocyte blastogenesis and tumor proliferation. *Cell. Immunol.*, 94, 49~59, 1985.
  - 18) Jahiel, R.I., Taylor, D., Rainford, N., Hirschberg, S. E., and Kroman, R.: Inducers of interferon inhibit the mitotic response of liver cells to partial hepatectomy. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, 740~742, 1971.
  - 19) Bouwens, L., and Wisse, E.: Tissue localization and kinetics of pit cells or large granular lymphocytes in the liver of rats treated with biological response modifiers. *Hepatology*, 8, 46~52, 1988.
  - 20) Wiltrot, R.H., Gruys, M.E., and Uraias, P.E.: Inhibition of organ-associated NK activity by ⁸⁹Sr. Natural killer cells and host defense (Ades, E.W. and Lopez, C. ed.), Karger, Basel, 1989.

(受付: 1993年11月15日)