<短 報>

ラット脾内移植肝細胞の生着と増殖に及ぼす hHGF の効果

加藤 一哉 葛西 眞一 小野寺一彦 沢 雅之
 川端 規弘 中澤 文朗 今井 政人 紀野 泰久
 川原 敏靖 Jiang Bojan 水戸 廸郎*

緒 言

われわれは、脾内肝細胞移植が先天性肝酵素欠損症や急性肝不全モデルに対して有効であることを報告してきた¹⁾。本療法が臨床応用へと確立されるためにはその安全性、移植肝細胞の生着効率の向上および迅速な増殖を誘導することが必要である。一方、hepatocyte growth factor (HGF) は成熟肝細胞を増殖させる因子としてラット血小板²⁾および劇症肝炎患者血清³⁾より生成され、その cDNA クローニングもなされ全一次構造が決定された^{4,5)}。そこで今回われわれは、human HGF (hHGF) を用いて脾内移植肝細胞の生着率および増殖に及ぼす影響について検討を加えたので報告をする。

対象および方法

<脾内肝細胞移植>

実験動物は10~12週齢の体重約230g の Wistar 系雄性ラットを用いた。肝細胞分離は Seglen ら⁶⁾の方法に準じて無菌的に行った。Ca⁺⁺-free Hanks' balanced salt solution (HBSS) 20ml で肝内を wash out した後、肝を摘出して collagenase type 1 (Sigma 社) を 0.05% 含有した HEPES 添加 HBSS 50ml (pH 7.4, 37°C) を用いて再灌流式に肝を消化した。4°C HBSS 中で遊離肝細胞浮遊液を作成し 5×10^7 個/ml となるように調整し以下の実験に用いた。

Viability は trypan blue 染色により判定し、平均 85% であった。脾内肝細胞移植は脾臓の下極より 25G 針を用いて肝細胞浮遊液 0.2ml (1×10^7 個) を注入した⁷⁾。脾臓内肝細胞生着率は、脾臓の短軸横断面の病理組織標本において単位面積あたりの肝細胞数を画像解析装置 Nachet NS 1500 CB-TASPER (Nachet 社, France) を用いて測定した。また増殖率は、同一切片において抗 bromodeoxy-uridine (BrdU) モノクローナル抗体を用いた免疫染色組織標本にて、肝細胞

1,000個に対し染色された核を持つ細胞数をカウントし labeling index (BrdU L.I.) として評価した。

<hHGF 投与法>

hHGF (三菱化学横浜研究所より供与) を phosphate buffer にて希釈し、 $360 \mu\text{g}/\text{kg BW}$ を one shot にて移植直後より 24 時間おきに静脈内に計 5 回投与した。

<70%部分肝切除術; 70%PH>

宿主の 70%PH は、Higgins and Anderson の方法⁸⁾に準じて行った。実験群は下記のごとく作成した。コントロール群：脾臓内に肝細胞移植 (H-Tx) のみを施行した群、PH 群：H-Tx 施行と同時にレシピエント

図1 脾臓内移植肝細胞像

A : コントロール群, B : HGF 群 (H&E stain, $\times 100$)

*旭川医科大学第2外科

<受付日1995年10月20日>

図2 A:脾臓内移植肝細胞の生着数, B:脾臓内移植肝細胞のBrdU L.I.

に70%PHを施行した群, HGF群: H-Tx施行直後よりhHGFを投与した群, HGF+PH群: H-Tx施行と同時にレシipientに70%PHを施行し, その後hHGFを投与した群の4群を作成した. 各群ともH-Tx施行後5日目に犠牲死させ検討を加えた. 測定は各群ともn=5にて行い, 有意差検定はstudent's t-testを用い, 危険率5%以下を有意とした.

結 果

図1は, 脾内移植肝細胞のhematoxylin-eosin染色像である. わずかに脾臓内に移植された肝細胞が赤脾臓内に生着しているのが散見される. コントロール群(A)に比しHGF群(B)においてより多くの肝細胞が生着している. 単位面積あたりの生着肝細胞数は, コントロール群で 14.9 ± 7.7 個, PH群では 39.8 ± 10.5 個, HGF群では 45.5 ± 12.9 個, HGF+PH群 57.2 ± 12.8 個と各群ともコントロール群に比し有意に多かった(図2A). またBrdU L.I.は, コントロール群では 1.8 ± 0.7 , PH群 2.0 ± 1.0 , HGF群 2.9 ± 1.0 , HGF+

PH群 6.3 ± 0.9 でありHGF+PH群において有意($p < 0.01$)に高値を示した(図2B). また犠牲死直後の血中hHGF濃度は全例とも 0.2 ng/ml 以下であった.

考 察

現在種々の肝疾病に対し肝移植による治療が行われているが, 一方では深刻なドナー不足状態であることも事実である. かかる状況下においては慢性肝不全, 劇症肝炎, 薬剤等による急性肝不全, 先天性肝酵素代謝異常などに対し, 肝細胞移植による加療ができる可能性がある^{9,10}. そこで今回われわれは脾臓内移植肝細胞に対しhHGFを用い, その生着率の向上と迅速な増殖を誘導できる可能性について検討した. また, 強い肝再生刺激とされる70%部分肝切除との比較検討も行った. hHGFは, 脾内肝細胞の生着率をコントロール群に比し有意に向上させることが可能であり, この効果は70%PHとほぼ同レベルであった. 一方, 増殖率については有意差を認めなかったものの, コントロール群に比し増殖が増強される傾向にあった. この結果は, 5日間という短い観察期間のためと推定された. またhHGFに70%PHを加えた群では生着率, 増殖率ともコントロール群に比し有意に高く, 相乗効果が誘導されたものと考えられた. 以上より外因性hHGFのラット脾内移植肝細胞に対する生着率, および増殖の増強効果が確認された.

索引用語: 脾内肝細胞移植, 肝細胞増殖因子, human hepatocyte growth factor; hHGF

文 献: 1) Onodera K, et al: Transplant Proc 24: 3006—3008, 1993 2) Nakamura T, et al: Kaisei N & Nishino T: FEBS Lett 224: 311—318, 1987 3) Gohda E, et al: J Clin Invest 81: 414—418, 1988 4) Nakamura T, et al: Nature 342: 440—443, 1989 5) Miyazaki K, et al: Biochem Biophys Res Commun 163: 967—973, 1989 6) Seglen PO: Methods Cell Biol 13: 29—83, 1976 7) Mito M, et al: Transplantation 28: 499—505, 1979 8) Higgins GM, et al: Arch Pathol 12: 186—202, 1931 9) 小野寺一彦, 他: 日外会誌 96: 301—308, 1995 10) Kato K, et al: Cell Transplant 3: 15—21, 1994