＜短 報＞

ラット脾内移植肝細胞の生着と増殖に及ぼす

HGF 持続静脈内投与の効果

加藤 一哉 小野寺一彦 今井 政人
川原 敏靖 葛西 眞一 水戸 勉郎*

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⁾。しかしながら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)}。われわれは、human recombinant 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報告してきたが^{6,7)}、今回さらに hHGF の投与方法について改良を加え検討したので報告する。

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⁸⁾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、85% 以上のものを用いた。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⁹⁾。脾臓内の肝細胞生着率は、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をカウントし labeling index (BrdU L.I.) として評価した。

実験群を下記の如く作成した。

コントロール群：脾内肝細胞移植 (HTx) のみを施行した群。

HGF 群：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 HTx 直後より 24 時間おきに静脈内に計 5 回投与した群。

HGF-CIV 群：HTx 直後より Alzer 社製 micro-osmotic pump を用いて内頸静脈よりカニューレションしたカテーテルより hHGF を $1,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BW/day にて 5 日間持続投与した群の 3 群を作成した。各群とも HTx 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 $n=7$ 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：脾内移植肝細胞は、わずかに脾臓内の赤脾髄内に生着しているのが散見された⁶⁾。一方コントロール群に比し HGF 群⁷⁾、HGF-CIV 群においてはより多くの肝細胞が生着していた。単位面積あたりの生着肝細胞数は、コントロール群では 14.9 ± 7.7 個、HGF 群では 45.5 ± 12.9 個、HGF-CIV 群では 61.6 ± 3.8 個と各群ともコントロール群に比し有意に多かった。また HGF-CIV 群は HGF 群に比し有意 ($p < 0.05$) に多かった (表 1)。BrdU L.I. は、コントロール群では 1.8 ± 0.7 、HGF 群では 2.9 ± 1.0 、HGF-CIV 群では 5.8 ± 0.9 であり HGF 群および HGF-CIV 群はコン

表 1 Number of Hepatocytes.

Control	group	14.9 ± 7.7	$\left. \begin{array}{l} \text{p} < 0.05 \\ \text{p} < 0.05 \end{array} \right\} \text{p} < 0.01$
HGF	group	45.5 ± 12.9	
HGF-CIV	group	61.6 ± 3.8	

cells/mm²

*旭川医科大学第 2 外科

＜受付日 1996 年 11 月 5 日＞

表2 BrdU Labeling Index

Control	group	1.8±0.7	] p<0.05] p<0.05
HGF	group	2.9±1.0	
HGF-CIV	group	5.8±0.9	

コントロール群に比し有意 ($p<0.05$) に高値を示した。また HGF-CIV 群では HGF 群に対し有意差はなかったが高値を示す傾向にあった (表2)。

考察：現在種々の肝疾患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、先天性酵素代謝異常などに対しては、肝細胞移植による加療ができる可能性があることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。われわれは脾臓内移植肝細胞に対し hHGF を用い、その生着率の向上および迅速な誘導について検討してきた^{6,7)}。今回はさらに強い移植肝細胞の増殖を誘導する目的にて hHGF の持続静脈内投与を用いて検討を加えたところ、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、この効果は持続投与群においてさらに有意に高値を示した。一方、増殖率においても HGF-CIV 群では HGF 群に比し増殖が増強される傾向にあった。hHGF の血中半減期は数十秒とされ、HGF 群における一過性の

血中濃度の上昇でもある程度有効であったが^{6,7)}、hHGF 1,000 μ g/kg/day の持続投与では8~12ng/ml (data not shown; personal communication, 三菱化学横浜研究所) の血中濃度を維持することができるため、持続投与が HGF の有効血中濃度^{3,12)}とされる、5~8ng/ml を維持し脾内移植肝細胞の増殖を誘導したものと考えられた。

索引用語：脾内肝細胞移植、肝細胞増殖因子 (human hepatocyte growth factor; hHGF)、持続静脈内投与

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) 加藤一哉, 他: 肝臓 37: 187-188, 1996 7) Kato K, et al: Biochem Biophys Res Commun 222: 101-106, 1996 8) Seglen PO: Methods Cell Biol 13: 29-83, 1976 9) Mito M, et al: Transplantation 28: 499-505, 1979 10) 小野寺一彦, 他: 日外会誌 96: 301-308, 1995 11) Kato K, et al: Cell Transplant 3: 15-21, 1994 12) Nakamura T, et al: Proc Natl Sci Acad USA 83: 6489-6493, 1986