

氏名 (本籍) 宇 野 郷 三 (岐阜県)  
 学位の種類 博 士 (医学)  
 学位授与番号 乙第 1063 号  
 学位授与日付 平成 8 年 3 月 25 日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
 学位論文題目 凍結融解処理肝組織感作血清の肝細胞増殖促進作用に関する研究  
                   第1編 ラット脾内移植肝細胞の増殖程度からの評価  
                   第2編 ラット初代培養肝細胞を用いた複製DNA合成活性と増殖因子の  
                                   性格について  
 審査委員 (主査) 教授 佐 治 重 豊  
               (副査) 教授 武 藤 泰 敏      教授 野 澤 義 則

### 論 文 内 容 の 要 旨

悪性腫瘍凍結融解処理により誘導される負の免疫活性増強作用と腫瘍増殖促進作用にヒントを得て、肝組織を凍結融解処理することにより肝細胞に対し増殖促進作用を示す因子の誘導を試みた。すなわち、教室の加藤は、凍結融解処理肝組織で感作したラット血清（凍結感作血清）が脾内移植肝細胞の増殖を促進する可能性を明らかにした。そこで申請者は、この凍結感作血清中に誘導される肝細胞増殖（HGF）促進様因子の存在を再度確認しその性格の解明を試みた。すなわち、凍結感作血清を遊離肝細胞脾内移植時に投与した場合の生着肝細胞面積と増殖促進程度を、70%肝切除ラット血清（肝切血清）或いは健常ラット血清（健常血清）投与時と比較検討した（研究Ⅰ）。次いで、凍結感作血清中に誘導されるHGF様因子の増殖促進程度を複製DNA合成活性から確認し、その性格を陰イオン交換樹脂Mono-Qカラムを用い分離精製後、各分画の培養肝細胞に対する複製DNA合成活性値から評価し、健常ラット血清および既存のHGFとの差を細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とゲル濾過法により解明した（研究Ⅱ）。

#### 研究対象と研究方法

Fisher系344雄性ラット肝臓を3-5 mm角に細切後液体窒素を用い凍結融解処理後、その約2gを大腿部皮下へ注入移植し、14日目に採血・分離した血清を凍結感作血清として実験に供した。なお、対照群として肝切血清或いは健常血清を用いた。

研究Ⅰ：遊離肝細胞の脾内移植法は、酵素灌流法で遊離・採取した精製肝細胞（viability75%以上）5×10<sup>6</sup>個/0.2mlを脾臓下極部から注入移植した。各種感作血清は脾内移植後1, 8, 15, 22日目に複数回投与し、脾内移植肝細胞の増殖程度をHE染色とPAS染色標本から画像解析処理し、生着肝細胞の面積比で表示した。なお、増殖活性はproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 標識率から評価した。

研究Ⅱ：遊離肝細胞の初代培養法はviability 90%以上の肝細胞を5%FBSとインスリンおよびデキサメタゾン添加WE培地で前培養後、無血清・無ホルモン添加WE培地で後培養した。肝細胞の増殖活性は形態学的所見を位相差顕微鏡で観察後、<sup>3</sup>H-thymidineを用いた複製DNA合成活性から評価した。また、凍結感作血清の性格は陰イオン交換樹脂mono-Qカラムを用い分離精製後、各分画のタンパク量と複製DNA合成活性から推察した。分子量はゲル濾過法により推定し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度のoscillationから凍結感作血清の機能を推察した。

#### 研究結果

研究Ⅰ：1. 脾内移植肝細胞は、HE染色で脾赤髄内で塊状に偽小葉を形成して生着するのが観察されたが、白髄内には認められなかった。

2. 脾内移植肝細胞の生着面積をPAS染色標本から画像解析すると、28日目の凍結感作血清群の増殖程度は、健常血清群に比べ有意に促進されたが肝切血清群との間に著差はみられなかった。

3. PCNA免疫組織染色で生着肝細胞は、移植後28日目には白髄周囲の赤髄内に索状に配列して存在し、HE染

色で青紫色に染色された核内に褐色に染色されるPCNA陽性細胞として観察された。

4. PCNA labeling indexは各血清投与により経時的に漸増した。とくに肝切血清および凍結感作血清群は、7日目に比べ14と28日目は有意の増加を示したが、14と28日目との間に差はみられなかった。

以上の結果、凍結感作血清中には正常血清中に存在しない、ある種の肝細胞増殖促進様因子が誘導され、その増殖促進作用は70%肝切除時に誘導されるHGF量に相当する量と推察された。

研究Ⅱ：1. 初代培養肝細胞は、培養開始後2時間後に単層に付着し、4から24時間目に細胞周期がM期からG<sub>1</sub>期へ移行するのが観察された。

2. 複製DNA合成活性は、凍結感作血清が健常血清に比べ有意に高く、肝切血清と同程度の活性を示したが、HGFに比べ低値であった。

3. Mono-Qカラムを用いNa<sup>+</sup>濃度勾配法により凍結感作血清、肝切血清および健常血清を分画すると、凍結感作血清でNa<sup>+</sup>約23%の分画で他群に比べ高いタンパク溶出を認めた。

4. Na<sup>+</sup>10%~80%の濃度勾配で46分画に分離精製すると、Fr.21とFr.36が無添加群に比べ高い合成活性を示した（それぞれ1.53倍と1.44倍）。このFr.21とFr.36の予測分子量はSuperdex 200カラムを用いたゲル濾過法でFr.21が約110kDa、Fr.36が約90kDaであった。

5. 感作血清中に含まれるHGF量を感作期間別にみると、HGF量は1日目に最高値を示し、その後漸減した。また、肝細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変動は凍結感作血清で刺激すると約30秒間持続する約630nMの高い一過性のピークを示したが、HGF刺激時に観察されるCa<sup>2+</sup> oscillationは判然としなかった。

以上の結果、凍結融解処理肝組織感作により、既存のHGFとは異なる肝細胞増殖促進様因子が誘導される可能性が示唆された。

#### 考察と結語

近年recombinant human HGFは肝細胞の増殖促進作用以外に肝細胞の悪性化に繋がる可能性が指摘され、その臨床応用には解決すべき多くの問題を残している。一方、ナチュラル型のHGFには悪性化の報告はなく、またHGF以外に多くの増殖因子やサイトカインが混在しているため、これらが宿主生体防御機構を調整・保持しながら、肝細胞の再生を促すものと推察される。ところで、凍結感作血清中には70%肝切除時に誘導される力価に相当する肝細胞増殖活性が観察された。この量はHGFに換算して約10ng/ml前後と推察される。Mono-QカラムではHGFとは異なる分画で、その推定分子量は110kDa或いは90kDaの新しい増殖因子と考えている。凍結融解処理は手技的に簡便で、細径型の凍結プローブが開発されているので、針生検的に肝臓を適時凍結処理し肝細胞増殖因子を誘導する治療法が将来的に登場するかも知れないと期待される。

### 論文審査の結果の要旨

申請者宇野郷三は、悪性腫瘍凍結手術後の腫瘍増殖促進様現象にヒントを得て、凍結融解処理肝組織を皮下移植感作することによりナチュラル型の肝細胞増殖促進様因子が誘導される可能性を明らかにし、その性格と分子量を予想した。同様方法による肝細胞増殖因子の誘導報告例はなく、極めて創造性に富んだ研究であり、この結果は、肝細胞移植あるいは肝臓移植の分野で新しい方向を示すもので、この方面の発展に少なからず寄与するものと認める。

#### [主論文公表誌]

各種免疫組織染色所見から評価した胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究

第1編 凍結融解処理肝組織感作血清の肝細胞増殖促進作用に関する研究

(Ⅰ) ラット脾内移植肝細胞の増殖程度からの評価

岐阜大医紀 44 ; 246~254, 1996

第2編 凍結融解処理肝組織感作血清の肝細胞増殖促進作用に関する研究

(Ⅱ) ラット初代培養肝細胞を用いた複製DNA合成活性と増殖因子の性格について

岐阜大医紀 44 ; 255~263, 1996