

肝再生に及ぼす Cyclosporin A の影響

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

山 本 浩 史

(平成 3 年 11 月 28 日 受稿)

Key words : Cyclosporin A, 肝再生

緒 言

肝再生を統御する機構についてはホルモン、増殖因子の関与が知られているが、なおその詳細については不明な点が多い。

正常マウスに肝部分切除を行うと lymphokine activated killer cell (LAK細胞) の細胞障害活性の増強がみられ¹⁾, 更にこの LAK 細胞を肝部分切除したマウスに移入すると肝再生の抑制が認められる²⁾. このことは活性化された免疫系が制御している可能性を示すものである。そこで LAK 細胞の誘導に用いられる IL-2 の産生を阻害する Cyclosporin (CsA) の肝再生に及ぼす影響を検討した。

材 料 と 方 法

実験動物: C3H/He マウス雄性 6 週齢 (静岡実験動物) を用いた。各群 n=10

肝切除操作: エーテル麻酔下で開腹後, Higgin & Anderson³⁾の方法に従い, 約70%肝部分切除 (Hep) を行った。

肝細胞分裂の指標: 多田⁴⁾の方法に準じて検討した。即ち thymidine の analogue である Bromodeoxyuridine (BrdU) 40mg/kg をマウスに陰茎静脈により静注し, 1 時間後に再生肝を摘出し, 70%エタノールに24時間固定した。ついでパラフィン包埋切片を作成し, 脱パラ後モノクローナル抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的方法にて染色し, その標識率 Labeling Index (L. I.) を比較検討した。免疫組織化学的方法としては, 抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson 社製) を一次抗体とし, Avidin-Biotin-

Peroxydase complex 法を用いた。L. I. は光学顕微鏡下に2,000個以上の細胞に対する標識細胞の割合で表わした。(表1)CsAの調整と投与方法: CsA (サンド製薬) は PBS にて稀釈し, 0.1mg/kg~40mg/kgに調整し, マウスの腹腔内へ投与した。対照群には PBS のみを腹腔内へ投与した。CsAの投与方法はHep 24時間前一回投与群とHep 24時間前・Hep直後・Hep 24時間後の3日間連続投与した群である。

表1 BrdU を用いた肝細胞分裂の標識指数測定手順

Bromodeoxy Uridine (BrdU)
40mg/kg静注 再生肝摘出1時間前
再生肝
↓
70%エタノール24時間固定
↓
パラフィン包埋切片作成
↓
免疫組織化学的方法にて染色
↓ Avidin-Biotin Complex
モノクローナル抗 BrdU 抗体
光学顕微鏡下に
↓ 2000個以上の細胞を検討
Labeling Index (L. I.)

肝再生率の算定: 肝重量からの肝再生率の算定は, Fishback⁵⁾らの方法に従い, 術前推定全肝重量で残存肝重量を除いた値を用いた。推定全肝重量は, マウス5匹を犠牲死させ, 肝部分切除時の切除肝重量が68.5%であることにより, 逆算して求めた。

推定全肝重量 = 切除肝重量 ÷ 0.685

$$\text{肝再生率} = \frac{\text{残存肝重量}}{\text{推定全肝重量}} \times 100$$

結 果

PBS のみを投与した対照群の再生肝の L. I. を検討した。L. I. は Hep 24時間後より増加しはじめ、36時間後に最大となり以後漸減した。

(図 1) 従って以下に述べる肝再生におよぼす CsA の影響は Hep 後36時間の L. I. を検討することにした。

CsA を Hep 24時間前に 1 回投与し、その投与量を 0.01mg/kg より 20mg/kg まで段階的に変えて Hep 36時間後の再生肝の L. I. に与える影響を検討した。L. I. は CsA の 5 mg/kg の投与量で最大となり、その値は 46.3 ± 8.4 で対照群に対し有意の増加 ($P < 0.05$) を示した。CsA 20mg/kg 投与した場合 L. I. は 9 ± 7.5 と著しい低値を示した。(図 2)

つぎに CsA 5 mg/kg, 10mg/kg をそれぞれ Hep 24時間前、Hep 直後、Hep 24時間後の 3 日間連続投与した場合、Hep 36時間後の再生肝の L. I.

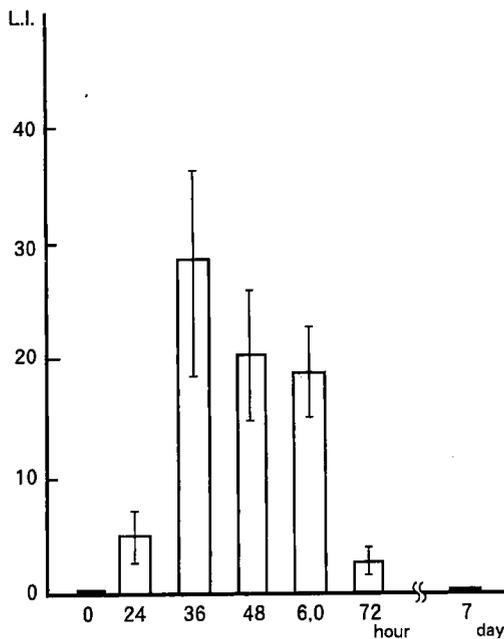


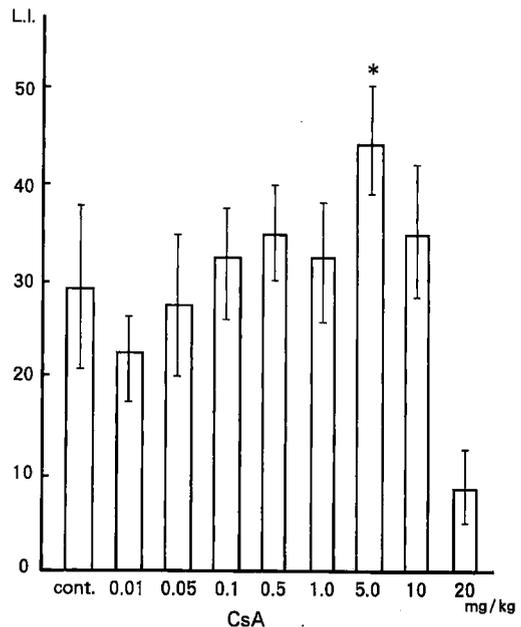
図 1 70%部分肝切除後の肝再生 L. I. の動態

を比較検討した。5 mg/kg の 3 日間連続投与群の L. I. は 48.3 ± 12.5 ($P < 0.05$)、10mg/kg 3 日間連続投与群の L. I. は 68.6 ± 6.7 ($P < 0.01$) でそれぞれ有意の増加を示した。(図 3) 図 4 A は PBS のみ投与した対照群の Hep 36時間後の顕微鏡写真である。核が濃染されているものが陽性細胞であり、その L. I. は 34.6 であった。図 4 B は CsA 10mg/kg を Hep 24時間前、Hep 直後、Hep 24時間後の 3 日間連続投与した Hep 36時間後の顕微鏡写真であり、L. I. は 64.8 で顕著な増加を認めた。

再生肝重量を推定全肝重量で除して算定した肝再生率に及ぼす CsA の影響を PBS のみ投与した対照群と CsA 10mg/kg Hep 前後 3 日間連続投与群と比較検討した。対照群では、Hep 24時間後より増加しはじめ、Hep 14日後にはほぼ 100% に達した。CsA 10mg 3 日間連続投与群では、Hep 48時間後 ($P < 0.05$)、Hep 60時間後 ($P < 0.05$) で対照群に比し有意の増加を認めた。(図 5)

考 察

細胞分裂の一指標として Labeling Index (L.



3 CsA の各種投与量 (0.01mg/kg ~ 20mg/kg) による肝再生 L. I. に及ぼす影響。各群 $n = 10$
* : $P < 0.05$

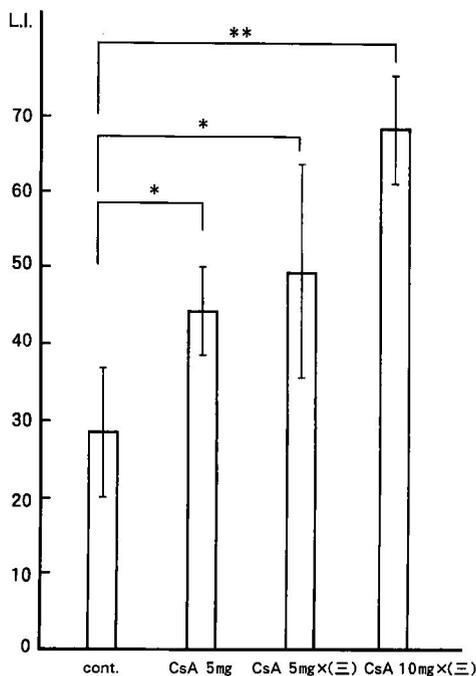


図3 CsA 連続投与による肝再生 L. I. に及ぼす効果. Hep 前24時間 CsA 5 mg/kg 1 回投与群, Hep 前後 CsA 5 mg/kg 3 日連続投与群, Hep 前後 CsA 10mg/kg 3 日連続投与群の Hep36 時間後の L. I. を検討した. 各群 n = 10 * : p < 0.05 ** : p < 0.01

I.) の有意性が認められている。従来行われている (³H) thymidine 法は, アイストープを使用するため, 限られた施設でしか実施できず, しかも auto radiography 法を用いるため, 結果を得るまでに長時間を要した。一方, Gratzner⁹⁾ により開発された thymidine の analogue である bromodeoxy uridine に対するモノクローナル抗体は, 免疫組織化学的方法を用いることにより, 短時間でしかもアイストープを用いることなく, L. I. を得ることができる。従来の方法による L. I. や mitotic index ともよく相関しており, 有用な方法といえる。

部分肝切除によって免疫系に様々な影響がみられるが^{7),8)}, それらの実験結果の中には肝切除によって生じた免疫系の変化がフィードバックされて, 肝再生を抑制するように働くことを示唆するものがみられる。即ち肝部分切除後には脾細胞などの NK 活性の上昇がみられるが, そ

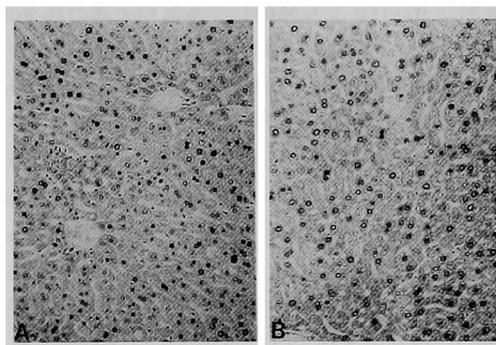


図4 抗 BrdU 抗体による再生肝の染色 (200×) A は PBS のみ投与した対照群. Hep 36時間後の L. I. は34.6 B は CsA 10mg/kg Hep 前後 3 日連続投与群. L. I. は64.8

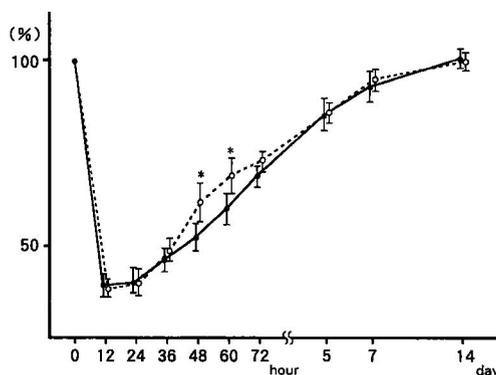


図5 肝再生率に及ぼす CsA の効果. 肝再生率を PBS のみ投与群と Hep 前後 CsA 10mg/kg 3 日連続投与群で検討した. 各群 n = 10 * p < 0.05

の脾細胞を IL-2 とともに培養して LAK 細胞を誘導すると, その活性は再生肝細胞に対し細胞障害活性を示す¹⁾. 肝部分切除後の再生肝より分離した非実質性細胞は IL-2 との培養を行わなくともそのまま再生肝細胞に対し障害活性を示すことなどである⁹⁾. 肝部分切除後には IL-2 の産生の亢進がみられるので¹⁰⁾, この肝非実質性細胞の活性化には IL-2 が関与していると考えられる. LAK 細胞を肝部分切除後のマウスに大量に移入すると再生肝の細胞分裂過程の抑制がみられる²⁾. このことからリンパ球の再生肝細胞への作用は単に in vitro での現象ではなく

実際に *in vivo* でも発揮しうるものと思われる。そこで IL-2 の産生を強力に阻害する Cyclosporin A^{11),12)} を投与することにより、脾細胞・肝非実質細胞の活性化の抑制をもたらす、これらの細胞の肝再生抑制作用を阻害することは、肝再生の促進となると考え本実験を行った。結果は一応期待どりのものであったが、果して CsA の肝再生促進作用はこのような免疫系を介したものであるのかどうか問題は残っている。まず第一に今回の実験では CsA 投与による肝非実質細胞の細胞障害活性を検討していない。ただし CsA が末梢血の NK 活性に対し抑制的に働くことは指摘されている¹³⁾。第二に CsA のリセプターであるサイクロフィリンはリンパ球以外のほとんどすべての組織に均等に分布しており、CsA は T リンパ球だけでなく、他の組織の細胞にも働く可能性がある¹⁴⁾。近年、CsA が上皮系細胞増殖に対し直接的抑制作用を有することが皮膚領域の基礎的・臨床的研究から報告されている。例えば、epidermal keratinocytes (EKC) の過剰増殖状態である乾癬は CsA を用いて改善がみられる¹⁵⁾。乾癬にリンパ球の浸潤もみられるので、リンパ球系への作用の結果とも考えられるが、*in vitro* で培養された EKC に対し、CsA は増殖抑制効果をもつことが示されており¹⁶⁾、CsA の上皮系細胞に対する直接効果を裏付けている。

本実験でみられた CsA の肝細胞増殖刺激効果は、CsA の肝細胞に対する直接的効果である可能性もあり、再生肝組織のサイクロフィリン濃度の検討が必要であろう。一般的には CsA は肝に対し障害性を有することが知られており、胆汁の流出を阻害し、血清中の胆汁酸を上昇させる¹⁷⁾。CsA は肝再生を阻害せず、オルニチンデ

カルボキシラーゼ、サイミジンキナーゼ活性などに影響しない。*in vitro* でも培養再生肝細胞の [³H] thymidine uptake に対し本実験で用いられた濃度の CsA は影響しないので²⁾、現状では再生肝に対する CsA の増殖促進作用はリンパ球系の増殖抑制作用をブロックした結果であろうと考えている。

結 論

IL-2 産生を阻害する Cyclosporin A (CsA) を部分肝切除前、部分肝切除前後のマウスに投与して、BrdU を用いた肝実質細胞の Labeling Index (L. I.) 及び肝再生率を指標に肝再生を検討した。

- 1) 部分肝切除後36時間における肝細胞の増殖は CsA 投与によって、5 mg/kg で最強の増殖促進効果を認めた。
 - 2) 肝切除前後において CsA 10mg/kg を3日間連続投与を行うと、更に強い増殖促進効果を認めた。
 - 3) 肝切除前後において CsA 10mg/kg を3日間連続投与を行うと、肝切除後48時間、60時間で肝再生率の有意の増加がみられた。
- 以上の結果より Cyclosporin A は肝切除後の肝再生に対し促進効果を有するものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました折田薫三教授に深甚なる感謝を捧げますとともに、直接御指導下さいました田中紀章先生に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第88回日本外科学会、第24回日本肝臓学会において発表した。

文 献

- 1) Ono M, Tanaka N and Orita K: The Augmentation of Lymphokine-Activated Killer Cells Induced by Partial Hepatectomy in Mice. *Jpn J Surg* (1980) **19**, 726—737.
- 2) 卜部貴光: 肝再生における LAK 細胞の影響. *日本外科学会誌* (1991) **92**, 543—550.
- 3) Higgins GH and Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restriction of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* (1931) **12**, 186.
- 4) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌, 佐藤雄一, 下里幸雄: BrdU モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. *医学のあゆみ* (1985) **135**, 510—513.

- 5) Fishback FC : A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch Pathol* (1929) **7**, 955—977.
- 6) Gratzner HG : Monoclonal Antibody to 5-Bromo-and 5-Iododeoxyuridine : A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science* (1982) **218**, 774—475.
- 7) Craddock CG, Nakai GS and Vanslager LM : Proliferative activity of the lymphatic tissues of rats as studied with tritium-labeled thymidine *J Exp Med* (1964) **120**, 389—412.
- 8) Sakai A and Tanaka S : Liver and immune responses V. Regenerating liver cells activate syngeneic lymphocytes. *Cell Differ* (1979) **8**, 285.
- 9) 小野 稔, 池村栄作, 田中紀章, 折田薫三 : 肝部分切除後の RIL-2 投与における肝および脾臓内 LAK 活性の増強. *医学のあゆみ* (1987) **140**, 57—58.
- 10) ト部貴光, 田中紀章, 小野 稔, 山本浩史, 村上 仁, 岡本康久, 日伝晶夫, 折田薫三 : シクロスポリンと肝再生. *医学のあゆみ* (1988) **144**, 815—816.
- 11) Bunjes D, Hardt C and Wagner H : Cylosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur J Immunol* (1981) **11**, 657—661.
- 12) Andrus L and Lafferty KJ : Inhibition of T-Cell Activity by Cylosporin A. *Scand J Immunol* (1982) **15**, 449—458.
- 13) Introna M, Allavena P, Spreafico F, et al : Inhibition of human natural killer activity by Cylosporin A. *Transplantation* (1981) **31**, 113—116.
- 14) 榎 昇, 高橋信弘 : 免疫系細胞以外の細胞におけるサイクロスポリン A レセプター, *メディカルイムノロジー* (1970) **20**, 69—75.
- 15) Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA et al : Cylosporin Improves Psoriasis in a Double-blind Study. *JAMA* (1986) **256**, 3110—3116.
- 16) Fisher G, Duell E, Nickoloff B, et al : of cylosporin in epidermis of treated psoriasis patients differentially inhibit growth of keratinocytes cultured inserumfree versus serum-containing media. *J Invest Dermatol* (1988) **90**, 142—146.
- 17) Pickrell MD, Sawers R and Michael J : Pregnancy after renal transplantation : severe intrauterine growth retardation during treatment with cylosporin A. *Br Med J* (1988) **296**, 925.

The effect of cyclosporin A on liver regeneration**Hiroshi YAMAMOTO**

**First Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. K. Orita)**

When lymphokine activated killer cells (LAK cell) induced by IL-2 are infused into the same strain C₃H mice following 70% partial hepatectomy, they display an action to suppress liver regeneration. Therefore, when Cyclosporin A (CsA) which inhibits IL-2 production was administered to mice following partial hepatectomy, we studied as our indicator the labeling index of hepatic parenchyma cells using Brdu. Our findings showed that proliferation of liver cells at 36 hours following partial hepatectomy was promoted by CsA, and the strongest promotion occurring at a dose of 5mg/kg. Before and after hepatectomy when CsA was administered at 10mg/kg for 3 days, a further strong proliferation increasing effect was observed, and under these conditions at 48 and 60 hours after hepatectomy a significant increase in liver weight was observed. Given the above results, CsA is thought to have a promoting effect in liver regeneration following hepatectomy.