

## アルブミン産生ラット(F344)および無産生ラット(NAR) 肝臓におけるアルブミン抗原存在様式の比較

三村 孝俊    藤井 宏彦    江藤 晶    守 且孝

この研究は、アルブミン無産生(NAR)および通常の産生ラット(F344)について肝組織中のアルブミン検出を目的に、抗アルブミン抗体を使用した間接免疫染色を行い、それぞれのラット肝におけるアルブミンの染色態度について検討した。その結果、肝細胞内におけるアルブミン抗原の存在様式が異なることが判明した。この違いは固定条件により一段と明瞭になること、すなわちパラフォルムアルデヒドによる灌流固定することで一層明瞭になった。

キーワード：アルブミン無産生ラット、アルブミン、免疫染色、ラット

### I. 緒 言

骨髄幹細胞の分化能を調べるための移植実験を行う際に、ドナー細胞がレシピエントに定着し、どのような細胞に分化したかを評価する方法として、雄ドナー細胞を雌レシピエントに移植した場合のY染色体の検出<sup>1)</sup>、ドナー細胞特有の膜抗原の検出<sup>2)3)</sup>、ドナー細胞の特異的な酵素活性の検出<sup>4)</sup>等が報告されている。

我々は、骨髄細胞内に肝細胞に分化する幹細胞が含まれていると考えている。また、アルブミン産生F344ラットの骨髄細胞をアルブミン無産生ラット(NAR)に移植し、骨髄細胞中に含まれる幹細胞がNARラット肝臓に定着し、アルブミン産生細胞に分化するのではないかと予想している<sup>5)</sup>。よって、レシピエントの肝臓中にドナー骨髄細胞由来のアルブミン産生肝細胞が存在することを証明する手段として抗アルブミン抗体を用いたアルブミン染色を用いることを検討した。また、その過程で、アルブミン産生ラットと無産生ラットではアルブミン抗原の存在様式が異なることを見出した。

### II. 方 法

実験動物：

アルブミン産生ラット(F344)およびアルブミン無産生ラット(Nagase Analbuminemic Rat, NAR)

はいずれもF344系統のコンジュニクラットである。日本エスエルシーより購入し、現在熊本保健科学大学動物舎で、温度、照明時間管理のもとで繁殖・飼育したものを使用した。

肝臓組織標本の作成：

この研究に使用したすべての実験動物の扱いは、熊本保健科学大学の倫理審査により認められている。エーテル麻酔下でラット門脈より全血を脱血し、直ちに肝臓から5 mm角の組織を切り出した。一方、脱血後、門脈よりヘパリン加生理食塩水30 mlで灌流、更に4%パラフォルムアルデヒド30 mlで灌流固定した肝臓組織を作った。組織片はOCTコンパウンドにて包埋凍結後、5 μmの凍結切片を作製した。凍結切片はそのままスライドガラスに貼りつけ、風乾した。

免疫染色：

風乾後の切片は10分間純アセトンで固定、風乾し、切片の周囲を撥水性ペンで囲った。内因性ペルオキシダーゼ酵素を失活させるために、0.3%過酸化水素加メタノール中に20分間浸漬した。一次抗体(Rat Albumin Antiserum, Produced in Rabbit, BETHYL USA)、二次抗体(Rabbit IgG Antiserum, Produced in Goat, HRP conjugated, CHEMICON USA)を使用した。ペルオキシダーゼの発色基質としてジアミノベンチジン(DAB, 和光)を使用した。免疫染色後、ヘマトキシリンで核染色した。なお、この実験に先立ち、それぞれの抗体について、種々の希釈

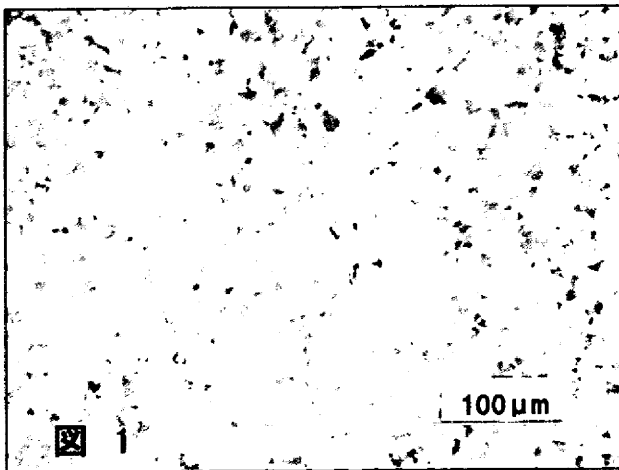


図1 無灌流のラット肝臓 (F344) の免疫染色。多くの細胞でアルブミンが陽性を示している。

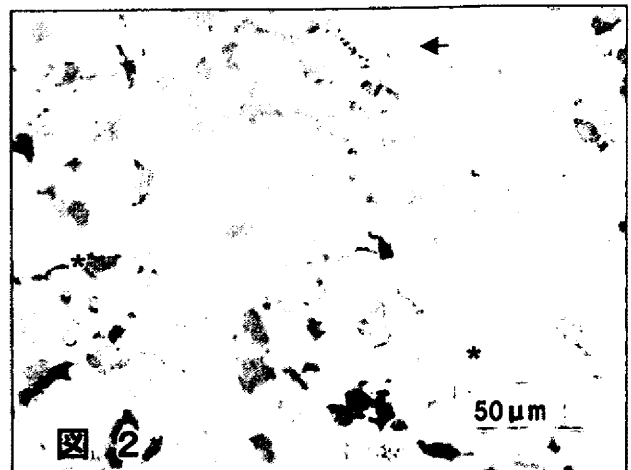


図2 無灌流のラット肝臓 (F344) の免疫染色。多くの肝細胞内で小胞状あるいは嚢状にアルブミン陽性を示している。しかしながら細胞内に陽性反応を示さない細胞(←)や、アルブミン陽性を示す類洞(図中は\*)が見られる。

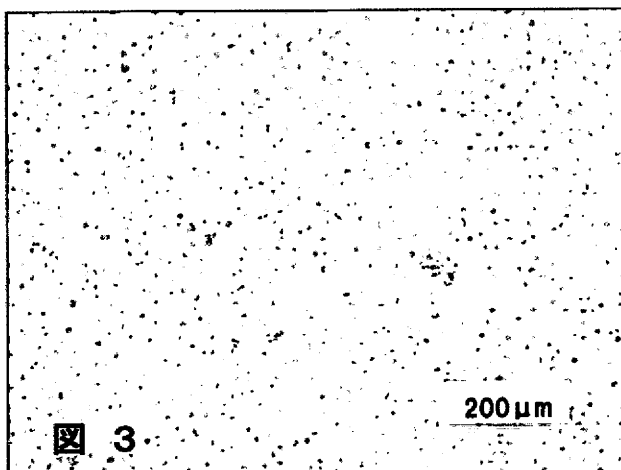


図3 無灌流のラット肝臓 (NAR) の免疫染色。1個あるいは2個組の肝細胞がアルブミン陽性に染まり、散在している。

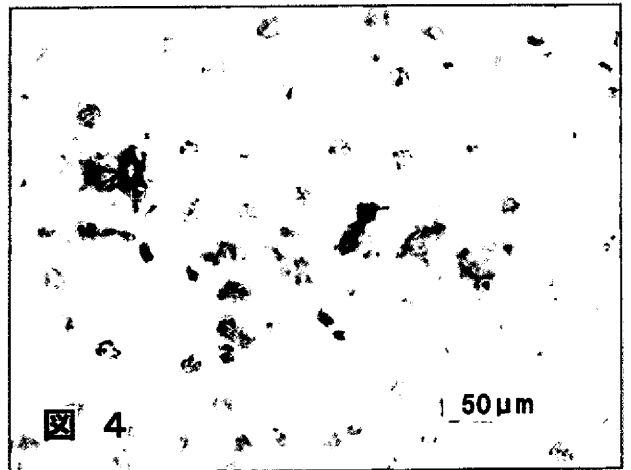


図4 無灌流のラット (NAR) の免疫染色。10個ほどのアルブミン陽性細胞が集塊をつくっている。

濃度や染色条件を検討した結果、両抗体とも300倍希釈濃度で使うと良好な染色結果が得られることが判明している。

顕微鏡および撮影装置：

オリンパスシステム顕微鏡 BX51にデジタルカメラ OLYMPUS DP70を取り付けデジタル写真撮影を行った。画像は専用ソフトウェア DP Managerで管理したものを画像として別図に示した。

### Ⅲ. 結 果

灌流固定を行わなかったものについて、免疫染色の結果を図1～5に示した。図1および図2は、

アルブミン産生 (F344) ラットのものである。ほとんどの肝細胞内に小胞状あるいは嚢状に陽性反応が見られる。また陽性反応は肝細胞間の類洞部分にも見られる。図3、図4および図5は、アルブミン無産生 (NAR) ラットのものである。全体的には1個あるいは2個組となった陽性細胞が肝臓内に散在しているが (図3)、場所によっては10個ほどの陽性細胞がクラスターをつくっていることもある (図4)。細胞内の陽性反応は、小型ではあるが、F344ラットと同様に小胞状あるいは嚢状を呈している (図5)。肝細胞間の類洞部分には全く反応は見られない。図6と図7は灌流固定を行ったラットの肝臓組織である。図6はF344ラットのものである。無灌

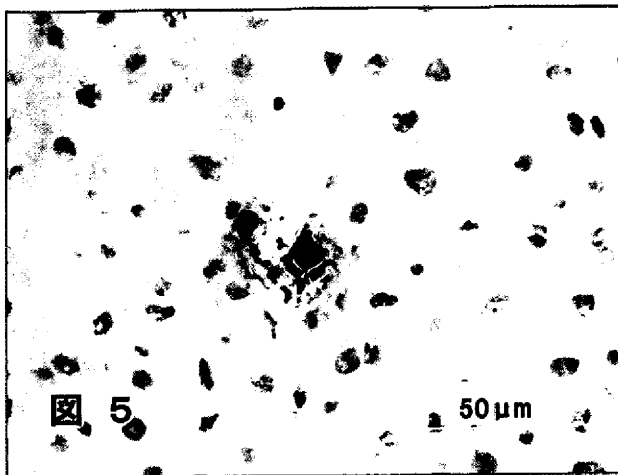


図5 無灌流のラット肝臓 (NAR) の免疫染色。アルブミンは肝細胞内で小胞状あるいは顆粒状に染まっている。

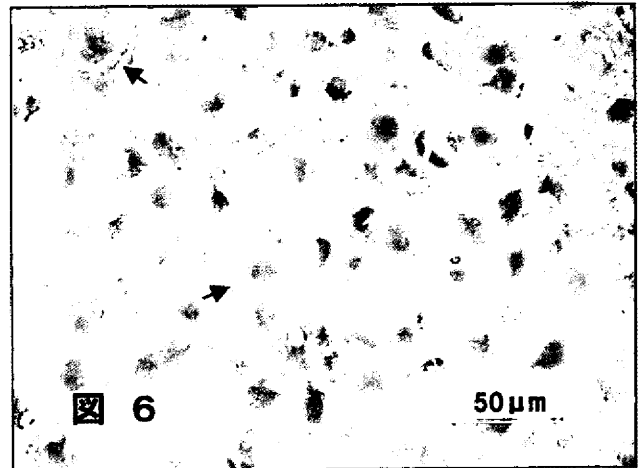


図6 灌流したラット肝臓 (F344) の免疫染色。無灌流で観察された細胞内の小胞状あるいは囊状のアルブミン陽性反応が消失している。類洞の陽性反応も消失しているが、灌流で広がった類洞と肝細胞の間に線状に陽性反応が見られる (←)。

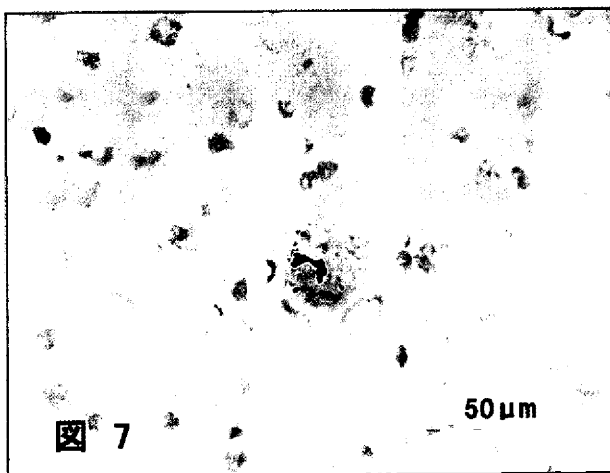


図7 灌流したラット肝臓 (NAR) の免疫染色。無灌流の場合とほとんど変わらない染色態度を示している。

流固定の肝細胞内に見られた小胞状あるいは囊状の陽性反応のほとんどは見られなくなっている。しかし、類洞に面した部分が肝細胞と類洞を境するように染まっている。図7はNARラットのものである。染色状態は無灌流の場合とほとんど変わらず、陽性反応は細胞内に限局して見られた。

#### IV. 考 察

NARラットは、アルブミンを産生しない無アルブミンラットと言われている<sup>6)</sup>。しかしながら、今回の実験でNARの肝臓に極めて少数であるが、アルブミンを産生する肝細胞が存在することが判明し

た。この結果はArikuraら<sup>5)</sup>により報告された結果と類似している。彼らによるとアルブミン抗原陽性細胞は単独かあるいは2個の細胞が塊りとなって散在していると報告されている。しかし今回の我々の結果では、10個ほどのアルブミン産生細胞が集団を作り、散在しているのが観察された(図4)。この所見の違いは用いた無アルブミンラットの系統の違いか、又は飼育条件の違いかも知れないが現在のところ正確な原因は不明である。F344ラットでは、ほとんどの肝細胞にアルブミン抗原が陽性に検出されたが、陽性の程度は個々の細胞間で異なっているようである。組織全体を見ても一部にアルブミンをほとんど認めない部分も見られた。それぞれの細胞間にアルブミン産生活性に差があることは知られているが、産生したアルブミンを細胞外に放出あるいは細胞内に一時的に貯留しておくタイミングは血漿アルブミン量に依存しているのかもしれない。

一方、灌流固定を行うと正常にアルブミンを産生しているF344ラットでは、ほとんどのアルブミンが細胞内より失われることが分かった。細胞内に長く貯留されることのないアルブミンは、ヘパリン加生理食塩水や固定液の灌流により類洞へ流れ出てしまうのではないかと考えられる。灌流後は細胞内には全くアルブミンの存在は認められず、類洞に沿った部分のみに陽性反応が現れていることから、そのようなことが推察される。このことに関しては灌流

液の種類や量、灌流時間などの条件を変えて調べる必要がある。しかし、NAR ラット肝臓に見られる少数のアルブミン産生肝細胞内のアルブミンは、灌流によって全く影響を受けないのは興味ある所見である。これは肝細胞の特性によるものなのか、アルブミンの性状によるものなのかについては現在不明である。なおF344ラットとNARラットではそれぞれのアルブミンに遺伝子レベルで若干の違いがあると報告されている<sup>5)</sup>。

以上の研究結果から、我々の目指している骨髓幹細胞の肝細胞への分化に関する研究方法において、アルブミンの産生を細胞分化の指標とするためには、灌流固定しないものと灌流固定したものを比較し、その差を詳しく検討する必要があることが判明した。もし、ドナー由来の幹細胞がNARの肝臓に定着しアルブミン産生肝細胞に分化した場合、アルブミンが細胞外に流出しにくい性質のものとなれば、灌流固定を行いアルブミン産生細胞のクラスター数の増加によりドナー細胞の定着を推定できるものと思われる。一方、細胞外に流出しやすい性質のものであれば、無灌流標本についての検索が重要となる。

## V. 結 語

今回の実験から次のことが明らかになった。(1) NARの肝細胞にもアルブミンを産生するものが散発的に見られた。(2) 従来、NARにおいては1個あるいは2個組の状態でしかアルブミン産生細胞は存在しないと報告されてきたが、今回10個ほどのアルブミン産生細胞がクラスターをつくっていることが分った。(3) F344ラットに於いて、灌流操作により細胞内のアルブミンが消失することが分かった。(4) しかし、灌流によってもNARのアルブミン産生肝細胞は全く影響されなかった。

## VI. 謝 辞

この研究は、平成16年度および17年度熊本保健科学大学学内研究費の助成を受けて行ったものである。

## 引用文献

- 1) Avital I, Feraresso C, Aoki T, et al.: Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery* 132 : 384 - 390, 2002
- 2) Mori K, Yamaguchi Y, Morinaga H, et al.: Prolongation of liver allograft survival induced by donor spleen cells in RT 1-incompatible rats. *Transplantation* 43 : 577 - 579, 1987
- 3) Yamaguchi Y, Goto M, Makino Y, Mori K, et al.: Prolonged survival of rat hepatic allografts pretreated with single donor specific blood transfusion : The distribution of donor cells expressing class I major histocompatibility complex antigens in the recipient. *J surg. res.* 61 : 23 - 29, 1996
- 4) Menthen A, Deb N, Oertel M, et al.: Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cell* 22 : 463 - 470, 2004
- 5) Arikura J, Inagaki M, Huiling X, et al.: Colonization of albumin-producing hepatocytes derived from transplanted F344 rat bone marrow cells in the liver of congenic Nagase's analbuminemic rats. *J Hepatol.* 41 : 215 - 221, 2004
- 6) Kaneko T, Shima H, Esumi H, et al.: Marked increase of two kinds of two-exon-skipped mRNAs with aging and their further increase by Nagase analbuminemic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2707 - 2711, 1991
- 7) Huiling X, Inagaki M, Arikura J, et al.: Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in analbuminemic rat livers. *J Sug. res.* 122, 75 - 82, 2004

(平成18年1月16日受理)

三村 孝俊, 藤井 宏彦, 江藤 晶, 守 且孝

〒861 - 5598 熊本市和泉町325番地

熊本保健科学大学

保健科学部 衛生技術学科

保健科学部 看護学科

## A Comparison of Immunostaining Patterns of Albumin-Antigen in the Liver of Albuminemic (F344) and Nagase Analbuminemic (NAR) Rats

Takatoshi MIMURA, Hirohiko FUJII, Akira ETO, Katsutaka MORI

### Abstract

We examined conditions of indirect-immunostaining method using antialbumin antibody to demonstrate the presence of albumin antigen in the hepatic tissue and hepatocytes. The optimal dilution of each first and second antibodies was 1/300. The condition gave fine and clear histological features. Furthermore, there were characteristic differences in staining patterns of the albumin antigen between the albuminemic and analbuminemic rats.