

44000015

遊離肝細胞自家移植による肝，膵の機能再建に関する
実験的ならびに臨床的研究

(56480219)

昭和57年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

昭和58年3月

研究代表者 水 戸 勉 郎

（旭川医科大学医学部・教授）

は し が き

病巣の切除が主体である外科治療は、手技上の開発および術前後管理の向上によつて、今日ではその極限に達した。80年代の外科は切除療法の限界から脱却し、病巣切除に伴う臓器機能の脱落を回復させる再建外科の発展、普及にあるといわれる。

肝臓、膵臓領域では、恒久的な機能再建の手技として臓器移植が試みられているが、これには移植臓器の入手の困難性、脳死状態での臓器剔出に対する法的是認がないこと、および移植後の拒絶現象に対する免疫抑制法など、多くの問題点がある。事実、肝臓および膵臓の末期状態の症例数が膨大な数に達するにもかかわらず、全世界で肝移植施行例は約400例、膵移植は約200例を数えるにすぎない。

本研究の目的は、切除された肝臓および膵臓から健常な肝細胞や β 細胞を分離し、これらをそれぞれ異所性に自家移植することによつて、肝臓および膵内分泌機能の再建を可能とする新しい治療法の確立をめざしたものである。したがつて、本法は自己の臓器構成細胞の移植であるために、臓器移植に伴う前述の諸問題とは無関係であるところに特色がある。動物による基礎的研究の成果は、肝および膵の末期的状態に新たな治療の道を開くばかりでなく、臓器大量切除後の機能喪失を防止しえることになり、外科手術の適応拡大にもつながるものである。

研究組織

- 研究代表者： 水戸 勉 郎 (旭川医科大学医学部、教授)
研究分担者： 江 端 英 隆 (旭川医科大学医学部附属病院、講師)
草 野 満 夫 (旭川医科大学医学部、助手)
林 宏 一 (旭川医科大学医学部、助手)

研究経費

昭和56年度	3,700千円
昭和57年度	2,500千円
計	6,200千円

研究発表

ア. 学会誌等

1. 江端英隆, 水戸廸郎: 分離肝細胞の移植。組織培養、7巻6号、ニューサイエンス社、昭和56年6月。
2. 江端英隆, 水戸廸郎: 脾内移植肝細胞成長, 増殖からみた門脈性因子の意義について——宿主門脈下大静脈, 端側および交叉吻合の影響——。肝臓、22巻10号、日本肝臓学会、昭和56年10月。
3. 水戸廸郎, 林 宏一, 江端英隆: 脾広範切除とラ氏島自家移植。臨床外科 Year Book 1982、メジカルビュー社、昭和57年3月。
4. 水戸廸郎, 江端英隆, 林 宏一: 慢性脾炎手術における脾組織片自家移植の可能性について。消化器外科、5巻8号、へるす出版、昭和57年8月。
5. 水戸廸郎, 江端英隆: 動物実験法——肝細胞移植——。肝・胆・脾., 5巻5号、国際医書出版、昭和57年11月。
6. 草野満夫, 水戸廸郎: 硬変肝細胞生体内培養実験からみた硬変肝細胞の特性。肝臓、23巻11号、日本肝臓学会、昭和57年11月。

イ. 口頭発表

1. 草野満夫, 水戸廸郎, 他: 肝細胞移植による脾内再構築肝組織の機能に関する研究。第17回日本移植学会、昭和56年9月12日。
2. 林 宏一, 水戸廸郎, 他: 慢性脾炎犬の脾ラ氏島自家移植——第2報——。第17回日本移植学会、昭和56年9月12日。
3. 江端英隆, 水戸廸郎, 他: 慢性脾炎における脾組織片自家移植——障害脾の程度と移植ラ氏島機能および賦活法——。第82回日本外科学会、昭和57年4月3日。
4. Mito, M, et al.: Hepatic support by hepatized spleen in rats with hepatic failure. 17th Congress of European Society for Surgical Reserch. 昭和57年5月
5. 草野満夫, 水戸廸郎: 線維化を伴う肝切除および硬変肝細胞生体内培養実験からみた硬変肝細胞の特性。第18回日本肝臓学会シンポジウム、昭和57年7月

7. Kusano, M., Mito, M., et al.: Morphological characteristics of recomposed liver sinusoid in the hepatized rat spleen. 2nd International Kupffer Cell Symposium (Noordwijkerhout), 昭和57年9月1日.
8. Mito, M. & Ebata, H.: Differentiation and proliferation of fetal hepatic tissue transplanted into the rat spleen. 5th Tripartite Meeting (Salzburg), 昭和57年9月10日.
9. 林 宏一, 水戸廸郎, 他: IAP (Islet Activating Protein) による移植ラ 氏島細胞の機能賦活効果。 第18回日本移植学会、昭和57年9月10日.
10. 江端英隆, 水戸廸郎: 肝細胞および組織片の移植。 第18回日本移植学会シンポジ ウム、昭和57年9月10日.

ウ. 出 版 物

1. Mito, M., et al.: Hepatocellular transplantation into the rat spleen: Transplantation of hepatocytes isolated from cirrhotic liver. Ed. Brunner, G. & Schmidt, F. W., Artificial Liver Support, Springer-Verlag, 昭和56年10月.
2. 水戸廸郎, 草野満夫: 遊離肝細胞の移植 — 脾臓内における組織再構築 — 。 識田敏次, 岡 博, 編、肝臓—機能と病態、中外医学社、昭和57年3月。
3. Kusano, M. & Mito, M.: Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. Gastroenterology, Vol. 82, No. 4, Elsevier Scientific Publishing Co. Inc., 昭和57年4月.
4. Kusano, M., Ebata, H. & Mito, M.: Morphological characteristics of recomposed sinusoids in hepatized rat spleens. The Second International Kupffer Cell Symposium, Elsevier North-Holland Biomedical Press, 昭和57年11月.

研究成果

下記の研究実施計画にしたがい、2年間にわたる研究成果を記す。

- I. ラットおよび猿における遊離肝細胞移植実験.
 - I-1. 正常ラットより遊離した肝細胞の脾内移植後の形態学的分化.
 - I-2. ラットの硬変肝より遊離した肝細胞の脾内再構築と機能.
 - I-3. 肝細胞移植後に脾内に再構築された肝組織の機能補助能力.
 - I-4. 猿における遊離肝細胞脾内自家移植.
 - I-5. 遊離肝細胞脾内移植の今後の課題と見透し.

- II. 慢性膵炎より分離した β 細胞および膵組織片自家移植実験と臨床.
 - II-1. 慢性膵炎モデル犬における β 細胞自家移植.
 - II-2. 慢性膵炎の膵垂全剝後に分離した膵組織自家移植の臨床.
 - II-3. 慢性膵炎から分離した膵組織移植の今後の課題と見透し.

I. ラットおよび猿における遊離肝細胞移植実験.

I-1. 正常ラットより遊離した肝細胞の脾内移植後の形態学的分化.

実験方法および脾臓内における組織再構築過程の光顕学的所見は、論文別冊(1)“遊離肝細胞の移植 — 脾臓内における組織再構築 — ”、357頁～361頁にわたり記した。

また、電顕学的分化過程に関しては、論文別冊(2)“Observation on the Fine Structure of Long-Survived Isolated Hepatocytes Inoculated into Rat Spleen ”に詳記した。

I - 2. ラット硬変肝より遊離した肝細胞の脾内再構築と機能.

実験方法、光顕および電顕学的再構築過程と、glycogenの染色およびアルブミンの蛍光抗体検出による機能的分化については、主として論文別冊(3) "Hepatocellular Transplantation into the Rat Spleen: Transplantation of Hepatocytes Isolated from Cirrhotic Liver" に記した。また、硬変肝細胞移植時の形態学的特徴に関しては、論文別冊(1) 361頁～362頁にその概要を記した。

I - 3. 肝細胞移植後に脾内再構築された肝組織の機能補助能力.

この項に関する知見は、すでに論文として、現在、雑誌「医学のあゆみ」で印刷中であるが、投稿中の論文より抜粋し、成果を報告する。

脾臓内肝組織の機能を検索する目的で、脾内肝細胞移植ラットの宿主肝の完全血行遮断実験を行い、その生存時間について非移植群と比較検討したので報告する。

実験方法： Wistar系ラットを用い、肝細胞の分離・移植はこれまでと同様の方法を用いた。コントロール（非移植）群；門脈・下大静脈吻合（P-C shunt）を作製し、4ヶ月後に肝動脈を肝門部で胆管も含め結紮離断、さらに結紮後の副血行路となりうる食道動脈枝をも結紮離断した。移植群；分離肝細胞移植1年後にP-C shuntを作製、さらに4ヶ月後にコントロール群と同様に宿主肝の肝動脈を結紮離断した。これら両群について、生存期間、さらに宿主肝、肝細胞移植脾について組織化学・電顕学的検索を行った。なお、死後マイクロアンギオグラフィーにて血行遮断状態を検索した。

結果： コントロール群の平均生存時間は 255.6 ± 110.2 (分)で最長450分であり、移植群では平均 613 ± 227.5 (分)で最長1000分（表1, 2）、死後のマイクロアンギオグラフィーで宿主肝への血行が完全に遮断していることを確認した。血行遮断後の宿主肝は、肝細胞の腫大と広汎なうつ血像を呈し、GOT, GPT, アンモニア値とも高値を示した。しかし、脾内肝組織はPAS染色にてグリコーゲン顆粒の減少を認めるが、形態学的変化はみられなかつた。

小括：肝細胞移植1年後の脾内肝組織は、脾の約40%を占めるようになるが、その重量は宿主肝の2~3%に過ぎず、現在のところ全肝補助とはなりえないが、今回宿主肝の完全血行遮断実験で移植群にその生存時間の延長をみたことは、脾内再構築肝の増量法を解決することにより、肝細胞移植法による肝機能補助の可能性を示唆するものとする。

表 1 Control Group (n= 9)

	Survival Time after HAL (min.)	Ammonia ($\mu\text{g dl}$)	
		pro-HAL	post-HAL
1	2 7 0	245	1.000
2	1 2 0	342	1.470
3	1 5 0	370	1.110
4	4 5 0	281	—
5	2 0 5	157	—
6	3 7 0	284	—
7	2 9 0	—	—
8	2 9 5	—	—
9	1 5 0	—	—

Mean \pm SD.....255.6 \pm 110.2

表 2 Hepatized Spleen Group (n= 5)

Rat No.	after Liver Cell	after HAL			% Surface area of hepatic tissue in the spleen
	Tx (mo.)	Survival time(min.)	GOT	GPT	
1	16	9 9 0	775	496	52.5
2	16	4 3 5	786	522	67.8
3	16	5 4 0	800	517	66.2
4	14.5	6 5 0	—	—	28.3
5	16.5	4 5 0	682	652	36.0

Mean \pm SD.....613 \pm 227.5

I - 4. 猿における遊離肝細胞脾内自家移植.

遊離肝細胞脾内移植によつて生体内補助肝臓を作ることをヒトに応用するにあたり、ラットから動物を変え犬で行つたが、長期生着を認めなかつた。ヒトに近い猿は購入量に種々の制約があつたが、55年度2匹、56年度3匹、および57年度2匹を入手しえた。これを対象として以下の実験を行つた。

実験方法

猿をネンブタールで麻酔後、気管内挿管を行い、開腹し肝左側の下葉を切除し、切除肝の門脈にカニューレーションを行い、ラットと同様コラゲナーゼによる酵素灌流を行つた。ただし、犬および豚の経験から、肝細胞分離法はBerry & Friendに変えSeglen法の変法によつた。遊離された肝細胞を脾臓内に直接注入移植した。すべての操作は無菌下に行つた。

成績

6～12カ月間移植後観察した例は4匹で、他の3匹は現在観察中である。前4匹の遊離肝細胞のViabilityは $62 \pm 18\%$ (42～85%)で、移植肝細胞数は平均 $6.3 \pm 2.8 \times 10^7$ 個 ($1.5 \sim 8.3 \times 10^7$ 個)であつた。

初期の3例は移植後6カ月(2匹)および1年後に脾を摘出し、連続切片を作製し検索したが、生着肝細胞は認められなかつた。しかし、4例目は移植後6カ月目に脾を摘出し検索した結果、PAS染色陽性の肝細胞を多数認めることができた(写真-1)。

小括と考擦

猿においても遊離肝細胞脾臓内自家移植で移植肝細胞は6カ月間にわたり生着した。この事実は、ヒトにおいても本法による異所性肝組織の形成が可能であることを示唆するものである。

ただし、現在のところ生着を認めた例は4例中1例であり、遊離肝細胞自家移植を行つた他の3例の1年以上の観察結果を待つてから結論を下すべきものとする。

生着が可能であつた要因を4例を比較検討してみると、第一の要件は遊離肝細胞のvia-

bilityが80%以上であること、第2には注入移植時に脾臓から肝細胞が静脈系に流出しやすいので、脾門部の一時的血流遮断と注入部位に流入する動脈枝の結紮が必要であることを知った。すなわち、注入移植法の手技的工夫と改良が必須要件である。現在観察中の3例は、いずれもViability 80%以上の肝細胞を得ることができ、注入法も3例とも方法を変えて移植したので、その結果をみた上でそれぞれの動物に対応する移植法を決めることになる。

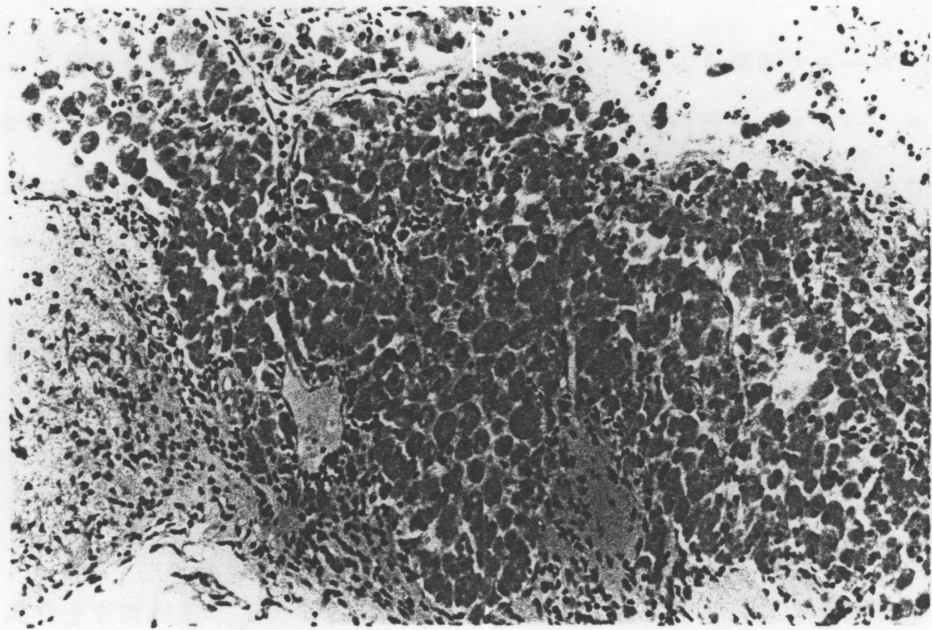


写真-1 サルの脾臓内に生着した肝細胞群(移植6カ月後)

I - 5. 遊離肝細胞脾内移植の今後の課題と見直し.

ラットを使用した基礎実験によつて、脾内に移植された遊離肝細胞は、1年以上を経ると形態学的に本来の肝構築に酷似した構造を形づくり、かつまた胆汁排泄以外の機能を具備することを実証した。と同時に、保持する機能には I-3 の項の実験成果が示すように現在のところ限界があることも知つた。その理由の第一は、脾内構築肝の重量が正常肝重量の 2.2 ~ 3.7 % 以内であること、すなわち量的に機能を十分発揮するには不十分であることである。したがつて、脾内に再構築された、いわゆる第 2 の肝臓が病肝の機能補助を行い生体を維持するには、何らかの方法で増量をはかる必要がある。また、脾内に肉眼的に再構築されるに要する期間も 1 年以上要する。短期間の間に、しかも量的に正常肝の 15 ~ 25 % 以上の異所性肝臓が形成される条件としては、宿主肝と異所性 (脾内) 肝とに競合作用があるか否かであろう。もし、全肝の異所性移植時にみられるような競合現象が、遊離肝細胞の異所性移植時にもあるとするなら、肝硬変症のように機能肝細胞の進行的減少をきたす疾患時には、移植による脾内肝細胞群は代償性に増大する可能性もある。宿主肝と脾内再構築肝組織塊との間の競合現象を確認するため、以下の実験を行つた。

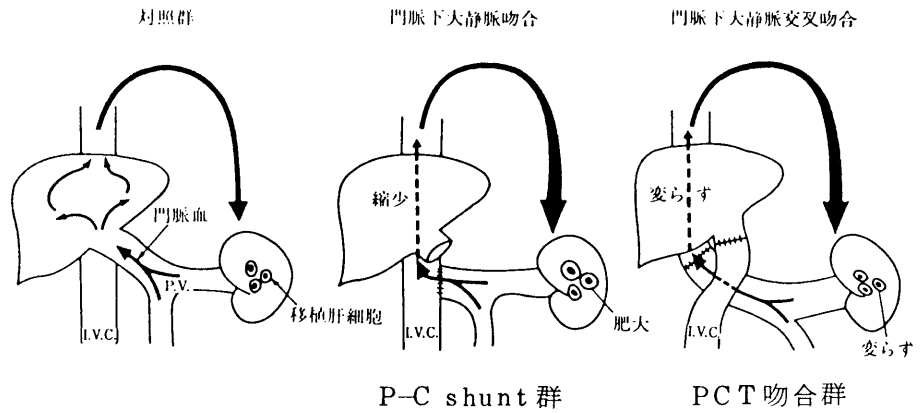
実験方法

あらかじめ 10 ~ 11 カ月前に脾内に肝細胞を移植したラットに、門脈下大静脈端側吻合 (P-C) と門脈下大静脈交叉吻合 (P-C-T) をそれぞれ作製し、肝細胞移植後 12 カ月目に屠殺した。宿主肝および脾重量を、P-C や P-C-T を施行しなかつた肝細胞脾内移植群を対照に比較検討した。また、それぞれの群の脾内肝細胞の光顕ならびに電顕学的検討もあわせて行つた。

P-C shunt 群は 9 例、P-C-T 吻合群 6 例は、吻合部の開存をマイクロアンギオグラフィで確認したものを使用した (図-1)。

さらに、第 3 群として肝細胞移植 10 カ月後に P-C shunt を作製し、その後 1 カ月後に宿主肝の 40 % 肝切除を追加した実験群 3 例についても検討を行つた。

実 験 方 法



実験成績

P-C shunt を行うと宿主肝は急速かつ著明に縮少するが、PCTではほとんど縮少しない。すなわち、対照群 (n = 9) の宿主肝/体重比は 3.03 ± 0.17 , PCT (n = 6) は 2.89 ± 0.17 であるのに比し、P-C shunt 群 (n = 9) は 1.91 ± 0.22 であつた。

また、それぞれの脾臓重量は表に示すが、P-C shunt 群では対照群の約 2.6 倍の脾重量増加をみた。また、40%肝切除群ではP-C shunt 群よりさらに重量の増加を認めた。しかし、PCT群では対照群に比し有意の増加を認めなかつた(表-3)。

表-3	Weight of spleen (g) Mean \pm SD	Relative weight (weight of the spleen/body weight) Mean \pm SD
Hepaticized spleen	0.35 ± 0.06	0.0012 ± 0.0002
Hepaticized spleen with PC shunt	0.93 ± 0.11	0.0023 ± 0.0005
Hepaticized spleen with PC shunt plus 40% hepatectomy	1.14 ± 0.31	0.0035 ± 0.0005

移植肝細胞の光顕所見は、P-C shunt を施行すると肝細胞移植後のどの時期に行われたものであつても、移植肝細胞は著明に肥大した。それに比し、PCT群に肥大は認められなかつた。この光顕学的な肥大を planimetry にて実際に計測すると (100個の移植肝細胞を計測し、その平均)、コントロールとPCTはほぼ同様であるのに比し (18.5 ± 4.7 ,

17.0 ± 3.7)、P-C shunt の細胞は平均 28.3 ± 7.2 とコントロールおよび PCT に比し有意の差をもつて肥大していた。電顕学的に P-C shunt はミトコンドリアの著明な腫大と基質の density の低下、そしてグリコーゲン顆粒の消失が認められ、PCT にはミトコンドリアの中程度の腫大、SER の拡張がみられた。

小括と考察

宿主肝の萎縮をもたらす P-C shunt あるいは P-C shunt 後の肝切除は、異所性に脾内に増殖した肝細胞の肥大ないしは増殖を促すことを知った。すなわち、宿主肝の脾内再構築肝組織塊との間には、完全ではないがある程度の競合現象があることを知った。このことは、肝細胞が次第にその数を減じる肝硬変症では脾内に移植された肝細胞が肥大、増殖を促進される状態にあることを意味し、治療法として期待がもたれる。また、宿主肝が正常状態では脾内肝重量がある一定量で制限され、宿主肝の 3.7% 以内であつたものが P-C shunt と肝切除操作で 12% 前後にいたつたことは、競合現象を利用することによつて生体の肝機能補助量の最少量と考えられる正常肝の 15~20% にもなる可能性が示唆された。

第 2 には、ラットでは肝細胞の遊離および移植が容易であつたが、ヒトの場合可能であるか否かである。一般に、臓器を構成する細胞の遊離は、ラットなどでは容易であるが、ヒト、とくに病的状態では困難であり、かつ収率が悪いといわれる。したがつて、犬あるいは猿などによる遊離肝細胞脾内移植の実験成果を待つて、はじめて本法がヒトの場合の慢性肝不全の新たな治療法となりうるものである。

本研究課題で 2 年間にわたり、犬および猿における肝細胞自家移植実験を行つた。多数の犬を使用し、移植法に種々の改良、工夫を試みたが、犬では移植直後から 3 カ月までは脾内に着床所見をみとめたが、6 カ月から 1 年後の脾には残生する肝細胞が全く認められず、本法がラットのみでみられる現象で、中動物ないしはヒトへの適用が絶望視された。しかし、I-3 に記したように猿の自家肝細胞移植で脾動脈を結紮し、移植肝細胞の流出を可及的に予防した例では移植 6 カ月後にも脾内に肝細胞の生存が認められた。現在、すでに自家移植を行つた 3 匹の猿の長期観察を継続中であり、この結果を待つて本法の臨床応用の可否を決定することにならう。

II. 慢性膵炎より分離した β 細胞および膵組織片自家移植実験と応用

II - 1. 慢性膵炎モデル犬における β 細胞自家移植の成績.

実験方法およびその成果については、すでに論文別冊(4)“膵広範切除とラ氏島自家移植”に公表したので、本別冊322頁～324頁との記述でかえる。

II - 2. 慢性膵炎の膵垂全別後に分離した膵組織自家移植の臨床.

自験例 2 例についての臨床成績は、前記論文別冊(4)の 3 2 1 頁～3 2 2 頁および論文別冊(5)“慢性膵炎手術における膵組織片自家移植の可能性について”の 1 4 3 1 頁～1 4 3 2 頁に記した。

II - 3. 慢性膵炎から分離した膵組織移植の今後の課題と見直し.

本稿に関しても、論文別冊(5) 1432頁に記した。なお、膵ラ氏島自家移植の適応拡大を目的として、ラ氏島の機能賦活法を検討したので、その結果を記す。

賦活剤として I A P (Islet Activating Protein) 投与時期の基礎的検討を行うとともに、慢性膵炎犬のラ氏島および脾尾側自家移植の効果を比較検討した。

実験方法

I A P 投与時期の検討は、正常犬ラ氏島移植を用いて行つた。慢性膵炎犬としては主膵管結紮後 3 および 6 カ月を使用した。膵全摘出は Markowitz 法または膵十二指腸切除を施行した。実験群は以下の 3 群とした。

I. 正常犬膵尾部ラ氏島自家移植群.

II. 慢性膵炎犬ラ氏島自家移植群.

1) 脾内自家移植, 2) 1) に対する I A P, インスリン投与.

III. 慢性膵炎犬膵尾側自家移植群.

1) 腸骨窩自家移植, 2) 1) に対する I A P, インスリン投与.

結 果

- I. 1) 膵尾部ラ氏島脾内移植群の平均生存日数は 17.3 日 (n=4) であつた。
- 2) 移植前 I A P (1 ug/Kg) 投与群の移植後平均生存日数は 18.3 日 (n=4) で延命効果を認めなかつた。I A P 投与により膵炎が惹起されるためによると考えられた。
- 3) 移植後投与群の生存日数は 21.3 日 (n=4) であり軽度の生存延長が認められた。
- 4) 移植ラ氏島が生着するまでの移植後 1 週間は連日インスリン (0.5 U/Kg/day) を投与し、移植後 7 日目に I A P の併用投与を行つた群では 6 週以上の長期延命を認めた。

以上の I A P 投与実験より、以下の群においては I A P, インスリン併用投与を行つ

た。

- II. 1) 慢性膵炎犬ラ氏島自家移植群の移植後平均生存日数は 14.5 (n=4) で著明な高血糖と全身衰弱で死亡した。
- 2) I-4)と同様の IAP 併用投与群の移植後平均生存日数は 33.7 (n=3) で著明な延長を認めた (図-2)。
- III. 1) 慢性膵炎犬膵尾側自家移植群は移植後 2 週を経過したが、血糖値は中程度の上昇のまま推移している。
- 2) IAP 併用投与群も移植後 2 週を経過し、現在その膵内分泌能について検索中である。

小 括

1. IAP の投与時期は移植後で、さらにインスリンとの併用が有効である。
2. 高度の慢性膵炎膵でもその内分泌機能は維持されており、ラ氏島および尾側移植が有効であり、さらに β 細胞賦活剤の有用性が確認でき、臨床への応用が示唆された。

図-2 脾内自家移植後平均生存日数

正 常 犬	膵尾部脾内移植 (Tx) (コントロール)	17.3d
	IAP 投与後、Tx	18.3d
	Tx 後、インスリン投与	29.5d
	Tx 後、IAP 投与	21.3d
	Tx 後、インスリンおよび IAP 投与	6w 卄
慢 性 膵 炎 犬 (膵管結紮 6 ヶ月犬)	全摘膵脾内移植 (Tx) (コントロール)	14.5d
	IAP 投与後、Tx	4.6d
	Tx 後、インスリンおよび IAP 投与	33.7d