

100093
急性肝不全に対する新しい治療法の開発

—遊離肝細胞の利用による—

(00548237)

昭和56年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告書

昭和57年3月

研究代表者

江 端 英 隆

（旭川医科大学医学部附属病院・講師）

は し が き

急性肝不全は致死的な疾患であり、交換輸血，異種肝灌流さらに活性炭による吸着療法，PAN膜による透析療法などの肝機能補助装置を含むいかなる療法によつても、70～90%の患者は死亡する。

近年、これまでの中毒物質を除去することを主眼とした方法より、肝不全患者の内部環境の乱れを正常へと回復させること、すなわち、それによつて肝再生を促進させる試みとしてインスリン、グルカゴン療法、各種のアミノ酸輸液などが広く行われている。しかし、これらの方法も救命率を大きく上昇させるものではないことが知られてきた。

一方、肝臓のもつ旺盛な再生力は、現在なおかつ多くの分野の研究者にとつて最も魅力ある研究対象の一つであり、*in vitro*の細胞培養および*in vivo*における肝切除，肝移植などに加えて、門脈系の種々の臓器切除を行う実験系から得られた研究成果は枚挙にいとまがない。

我々は1976年以来、同系ラットの脾臓内に遊離肝細胞を移植した結果、脾内において移植肝細胞が増殖して組織再構築する、細胞単位での*in vivo*における肝再生実験モデルを開発し、その有用性を報告してきた^{1, 2)}。この実験系において、肝細胞の増殖には脾の細網線維のmesh workが非常に重要であることより、肝切除後の再生における肝の網内系の意義を強張してきた。

本研究においては、急性肝不全実験動物としては現在最も現想的なモデルと考えられているガラクトサミン投与急性肝不全ラットを作製し、肝の網内系賦活，遊離肝細胞の脾内移植による救命効果を検討した。

研究組織

研究代表者； 江 端 英 隆 （旭川医科大学医学部附属病院。講師）

研究分担者； 草 野 満 夫 （旭川医科大学医学部。助手）

大 西 俊 郎 （医療法人回生会大西病院。医師）

研究経費

昭和 5 5 年度 5 , 8 0 0 千円

昭和 5 6 年度 1 , 5 0 0 千円

計 7 , 3 0 0 千円

研究発表

(1) 口頭発表（発表者、テーマ名、学会等名、年月日）

及川 巖，江端英隆，他； ガラクトスアミンおよびD M N Aによる

肝不全モデルの研究、

第6回急性肝不全治療研究会、昭和55年7月。

及川 巖，江端英隆，他； 網内系の賦活化による急性肝不全に関する

実験的研究、

第81回日本外科学会総会、昭和56年4月。

及川 巖，江端英隆，他； 網内系の賦活化による急性肝不全治療に

関する実験的研究、

第17回日本肝臓病学会総会、昭和56年6月。

(2) 出版物（著者、書名、出版者名、年月日）

江端英隆 ； 肝細胞の増殖と組織構築、

消化器病学—最近のトピックス、東洋書店、

昭和56年3月。

江端英隆，他； 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。

実験成果

I. 実験材料および方法

実験動物：体重 220～270 g の近交系ラット，Fisher 雄を用い、同じ時期の実験群についてはできるだけ同じ体重のものを使用した。

肝不全動物の作製：2種類の急性肝不全モデルを作製した。

1) ガラクトサミン (D-galactosamin-Hcl; Gal N, Sigma社) を生食で溶解し、ラット1匹につき 1.2 g/kg を penial vein より静注した。

2) ガラクトサミン，エンドトキシン併用急性肝不全モデルは Gal N 0.5 g/kg i. v.、24 時間後にエンドトキシン (Lipopolysaccharide Sigma社) 0.5 g/kg i. v. 投与した。

肝網内系賦活法；溶連菌に体成分で免疫賦活剤として広く臨床で使用されているピシバニール (OK-432, 中外製薬) を用いた。OK-432 は肝 RES を賦活することが知られ、最近ではとくにインターフェロン誘導体として使用されている³⁾。

肝細胞の分離：ラット門脈内のカニュレを過して、コラゲナーゼ消化液による循環灌流方式によつた。その詳細はすでに報告してある¹⁾。

II. 実 験 群

1) コントロール群

- a) Gal N 1.2g/kg i. v. 単独投与
- b) Gal N 0.5g/kg i. v. 24時間後に Endotoxin 0.5g/kg
i. v.

2) OK-432 処置群

- c) a)群の Gal N投与 24時間前に OK-432, 10 K. E. i. p.
- d) b)群の Gal N投与 24時間前に OK-432, 10 K. E. i. p.

3) 肝細胞投与群

- e) a)群の Gal N投与 24時間後に遊離肝細胞約 4×10^7 コ
(viability 70%) 脾内投与
- f) b)群の Gal N投与 12時間後に遊離肝細胞約 4×10^7 コ
(viability 70%) 脾内投与

III. 処置後の検査

肝機能 (GOT, GPT)、凝固能 (ヘパラスチンテスト、プロトロンビン時間) および組織学的検査 (H. E., PAS) を経時的に行つた。

IV. 結 果

1) 生存日数

実験群 a); Gal N投与 48 時間前後にほとんどの例は死亡し、72 時間までにすべて死亡した (N=15) (図 1)。

b); Endotoxin 投与 6 時間以内、すなわち Gal N 投与後 30 時間ですべての例は死亡した (N=10) (図 2)。

c); 15 例すべて観察期間の 4 週間生存した (図 1)。

d); 10 例すべて観察期間の 4 週間生存した (図 2)。

e); Gal N 投与後 72 時間以内にすべて死亡した (N=10)。

f); Endotoxin 投与後 2～3 時間以内にすべて死亡した (N=10)。

図 1 急性肝不全ラットの生存率

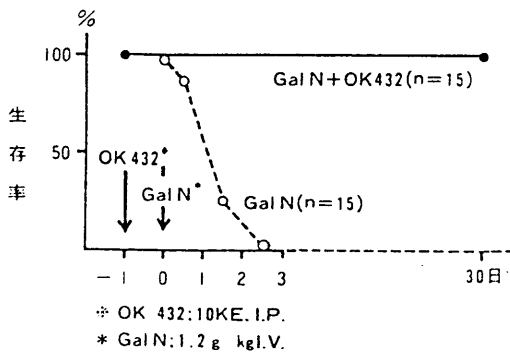
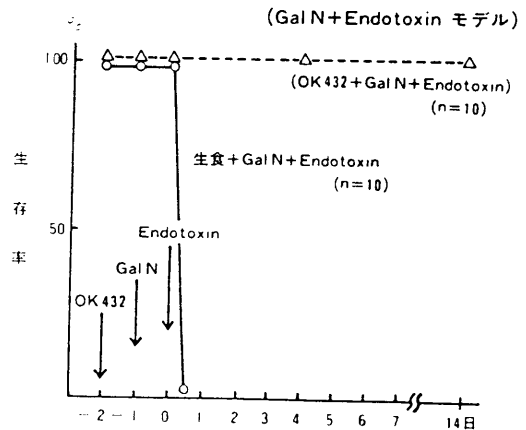


図 2 急性肝不全ラットの生存率



2) GOT, GPT の変化

a) 群において、GOT は 12 時間後平均 4000 U と非常に高値となり、48 時間後には 10,000 U 以上とさらに上昇した。それに比し、OK 432 前処置を行つた c) 群では、12 時間後に平均 3,000 U に上昇し

たが、その後除々に下降し、5日目には正常となつた(図3)。GPTについても、GOTとほぼ同様の傾向を示した。

また、b)群ではGalN投与24時間後には平均700Uと上昇し、Endotoxin投与数時間以内にすべて死亡した(図4)。

一方、OK-432投与のd)群ではGalN投与24時間後すでに対照としてのb)群より低く、Endotoxin投与24時間後には平均135Uとさらに下降し、48時間後には平均70Uと正常に復した(図4)。

肝細胞投与のe)とf)群は、それぞれコントロール群のa)およびb)とほぼ同様であつた。

図3 GOTの変化

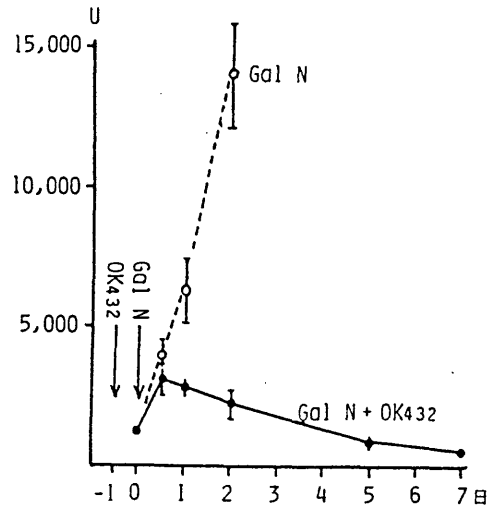
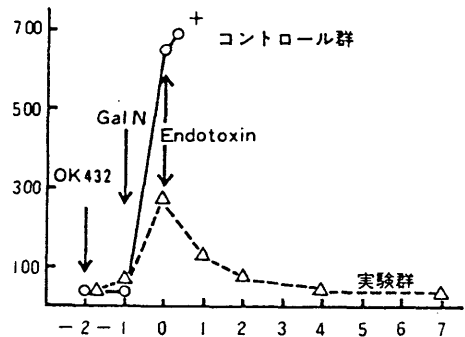


図4 GOTの変化



3) ヘパラスチンテストおよびプロトロンビン値の変化

ヘパラスチンおよびプロトロンビン値もほぼ同様であり、GalN投与後全く clottingせず、3日以上生存した例でも約10日後になつてはじめて正常化した。

4) 組織学的検査

コントロール群 (a および b にかかわらず) は、GalN 投与 24 時間後の組織像は散在する *piecemeal* および *focal necrosis* と小出血のみであつたが、48 時間後には肝の小葉構造は乱れ、広汎な壊死と出血に進展し、すべてのラットは死亡した。一方、OK-432 処置群 (c, d 群) では、24 時間後の障害はコントロールとほとんど変わらず軽微であつた。そして、48 時間後も壊死の範囲は広がることなく大略 24 時間後と同様であつた。5 日後には処置群の組織像はほとんど正常であり、部分的に小さな細胞浸潤巣を見るのみであつた。

肝細胞投与群 (e, f 群) については、コントロール群とほとんど同様であつたが、脾内に生着した数個の肝細胞集族が見られた。

V. 考 察

ペニシリンで殺した *Streptococcus pyogenes* の菌体成分である OK-432 は、インターフェロン (IFN) を強く誘起することが認められ、それには Mφ の関与が重要であることが示唆されている³⁾。我々は、独自に開発した遊離肝細胞脾内移植実験の結果から、肝細胞の増殖における RES の働きの重要性に着眼し、また急性肝不全時の肝 RES の機能低下が肝細胞膜障害を肝エ死に進行させるという Liehr & Grün⁴⁾ の主張より、網内系の賦活剤としての OK-432 を肝不全動物に投与することにより救命しようとした。

OK-432 の前投与の効果は著明で、GalN のみ投与急性肝不全ラット (

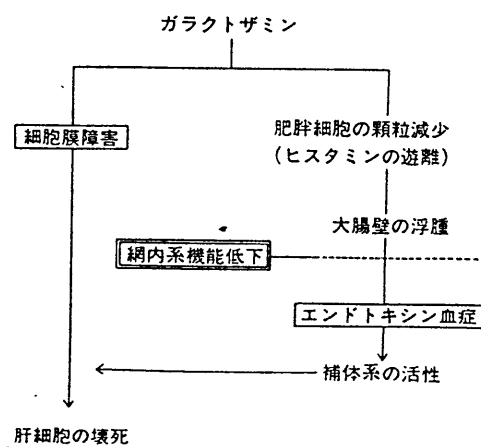
実験群 c) 15例すべてを救命した。

そこで、Liehr & Grün の仮説、肝 RES の機能低下のために、大腸壁を通して門脈系から流入するエンドトキシンを除去することができず、そのために補体 (C₃) を活性化させ、障害した肝細胞膜に作用し、広汎な壊死巣に発展するという図 5 を Gal N + Endotoxin モデルの実験群 b, d により、間接的に証明しようとした。少量の Gal N (0.5 g/kg) 投与では肝に軽微な変化しかもたらさないが、Endotoxin の中程度量 (0.5 g/kg) を 24 時間後に追加投与すると明らかに小壊死巣は急激に拡大し、まもなくすべてのラットは死亡した。この実験モデルに OK-432 を前処置すると (d 群)、Endotoxin の追加投与にても massive necrosis とはならず、その結果、すべてのラットは救命された。この実験結果は、Liehr & Grün の説を強く指示するものであつた。

ところで、この併用モデルにおいて、Gal N 後の OK-432 の投与効果はなく、それどころか Endotoxin の追加投与後、より激しいエ死が誘発された (未発表)。このことについて現在検討中であるが、肝細胞膜障害がすでに存在している時に OK-432 を投与することは、細胞障害を増悪させる危険性があることを示している。

肝の組織学的所見は、Gal N 投与後 48 時間までの (OK-432 の前投与にかかわらず) 散在する focal necrosis と軽度の出血および細胞浸潤が、48 時間後に小葉構造の乱れを伴う広汎な壊死へと進展する像を示

図 5 ガラクトザミン急性肝不全



(Liehr, Grün の図を一部変更)

した。このことも、GalN急性肝障害には48時間以降エンドトキセミアが関与することを暗示している。

GOT, GPTは、肝の組織像とほぼ一致した変化を示したが、凝固系はGalN投与直後より極度に障害され、その正常化には約10日間も要した。臨床における劇症肝炎にても凝固系の正常化が遅れることは時に見られる現象である。次に、遊離肝細胞の急性肝不全に対する効果であるが、1976年よりSutherland⁵⁾およびMakowka⁶⁾らにより、CCl₄, DMNA およびGalN投与肝不全ラットの約12～24時間後に種々の遊離肝細胞（同種、異種および凍結細胞）を投与することによつて、かなりの救命が得られることを報告している。しかし、我々の今回の追試では成功しなかつた。

彼らの実験にての最大の問題は、薬物性急性肝不全モデルの再現性であり、特にGalN単独投与量については研究者間に大きな差異がみられる。いずれにせよ、これらの実験は最近開始されたものであり、なお数多くの追試が必要である。ただ、我々のOK-432の結果から考えると、遊離肝細胞の脾内あるいは腹腔内投与による急性肝不全ラットの救命効果は、移植した肝細胞の直接効果というよりは、肝RESを介しての前述したエンドトキシン除去に関係している可能性が強いものと思われる。我国でも昨年、CCl₄ 急性肝不全ラットに前投与した遊離肝細胞（脾内投与）が救命率を向上させるという報告が見られた⁷⁾。特に前投与の場合には肝RESの賦活効果は大きいものとする。

肝細胞を生体内に投与して急性肝不全を治療しようとする試みは全く新しく、今後は再現性のある急性肝不全のモデルに対し、投与期間、量、さらに肝細胞の質（生あるいは死細胞、同種および異種細胞）また肝細胞のSub-cellular fraction などを検討することにより、期待のもてる方法とな

りうる可能性がある。

VI. 結 果

- 1) Gal N 1.2 g/kg i. v. および Gal N 0.5 g/kg 24 時間後に Endotoxin 0.5 g/kg i. v. 併用の 2 種類の再現性のある急性肝不全モデルを確立した。
- 2) OK-432 の Gal N 24 時間前投与により 100% 救命された。対照群はすべて Gal N 投与 3 日以内に死亡した。
- 3) 肝の組織像は、Gal N 48 時間後に focal より massive に移行（エンドトキシン追加モデルではエンドトキシン投与直後より）し、この像と トランスアミナーゼ値の高値は一致した。
- 4) 同系ラット遊離肝細胞の Gal N 24 時間後投与（脾内）の救命効果はみられなかった。

引用文献；

- 1) 水戸昶郎，江端英隆，他；医学のあゆみ、111；361-370、1979。
- 2) Mito, M., Ebata, H., et al.; Transplantation, 28; 499-505、1979。
- 3) 海老名卓三郎，他；医学のあゆみ、117；229-234、1981。
- 4) Liehr, H. & Grün, M.; Progress in Liver Diserses (Ed. by H. Popper & F. Schaffner)、Vol. 6、p. 313-326、1979。
- 5) Sutherland, DER., et al.; Surgery、82；124-132、1977。
- 6) Makowka, L., et al.; Surgery、88；244-253、1980。
- 7) 石崎治昭，他；移植、16；61、1981。