

肝の先天性代謝異常疾患に対する

新しい治療法の開発

(01480303)



平成元年度科学研究費補助金 [一般研究 (B)] 研究報告書

平成3年3月

研究代表者 江端 英隆
(旭川医科大学医学部)

はしがき

α_1 アンチトリプシン欠損、ウィルソン病、チロジネミアなどの肝の先天性代謝異常疾患に対する治療法は現在でもほとんどなく、放置されているといっても過言でない。多くのこれらの疾患は小児期に精神障害を発症し、肝機能障害が徐々に進行し肝硬変症に移行する。

1980年以来臓器移植の分野にサイクロスポリンA (CYA) が導入され、全肝移植の成績は著明に上昇するにつれて、肝の先天的代謝異常疾患も全肝移植の良い適応とされるようになった。アメリカ・ピッツバーグ大学における1981年から1988年までの1258例（小児例を含む）の肝移植中、先天的代謝異常疾患に対して144例（約9%）の多くに移植されている。しかし、これら疾患に対しては欠損している酵素を補うという治療が根本であり、それも小児期の早い時期に行うということが理想的であることは言うまでもない。

本研究では、肝細胞移植により動物の肝酵素欠損疾患の治療が可能か否かを検討し、将来、肝細胞移植法により、これら疾患に対する臨床応用を目指そうとするものである。

研究組織

研究代表者：江端 英隆（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：小野寺一彦（旭川医科大学医学部 助手）

澤 雅之（旭川医科大学医学部 助手）

研究経費

平成元年度 2, 7 0 0

平成2年度 2, 2 0 0

計 4, 9 0 0

研究発表

口答発表

- ① . H.EBATA:GVHR in the digestive organs (Simposia)
;Allogeneic transplantation of hepatocytes and
fetal hepatic tissue in the rat spleen. 6th
international congress of mucosal immunology
Tokyo 22-27 July.1990
- ② . H.EBATA:Hepatocyte Transplantation for
congenitally ascorbic Acid biosynthetic enzyme
deficient rats. 24th Congress of the European
Society for Surgical Research, Bruxelles, Poster
Session,1989
- ③ . 小野寺一彦 : 脾内細胞移植法を応用した新たな実験
研究 . 第34回日本消化器病外科学会総会 Young
researcher award 7月13日,1989
- ④ . 小野寺一彦 : アスコルビン酸生合成酵素欠損ラット
に対する肝細胞移植療法 - 移植部位からの検討 -
第26回日本肝臓学会,1990
- ⑤ . 小野寺一彦 : ワークショップ - 細胞移植 - その現況
と展望 . 第26回日本移植学会,1990

- ⑥ . 草野満夫 , 澤 雅之 : 脾内肝細胞移植 - 移植正常
および胎児肝細胞の細胞動態 - . 肝の生化学 - 箱根
シンポジウム , 1990
- ⑦ . 山本 哲 , 澤 雅之 : 自家移植手術手技による生体
部分肝移植の実験的研究 . 日本移植学会 , 1990
学会誌等
- ⑧ . 水戸 勉郎 : 肝移植の現況と展望 . 医学のあゆみ .
154 (1) : 35 - 38 , 1990
- ⑨ . 江端英隆 : 末期肝疾患に対する異所性肝移植の再評
価 . 医学のあゆみ . 154 (11) : 713 , 1990
- ⑩ . 小野寺一彦 : 脾内移植同種胎児肝組織片の生着へ及
ぼす宿主肝再生抑制の効果 . 今日の移植 .
3 (1) 58 - 63 , 1990
- ⑪ . 江端英隆 : 細胞移植と遺伝子操作による肝の先天代
謝異常疾患の治療は可能か ? . 医学のあゆみ .
150 : 188 - 190 , 1989 .
- ⑫ . 江端英隆 : 肝細胞移植の現況 . 外科診療 .
31 : 361 - 365 , 1989 .

実験方法

先天性アスコルビン酸 (AsA) 生合成酵素欠損ラット (ODS-^od/。a) とアルブミン合成能力を先天性に欠損している Nagase analbuminemic rat (NAR) の両動物モデルを使用して行われた。

I. 先天性アスコルビン酸生合成酵素欠損ラットに対する肝細胞移植

1) 方法

Recipient の ODS-^od/。a ラットは、実験に供するまで AsA 含有の飼料と水分を投与し正常に発育させた。Donor はその congenic であり、酵素を正常に持つ ODS-⁺/+ を用いた。脾内肝細胞移植は Seglen らの方法で細胞分離した Viability 80% の肝細胞約 1×10^7 個 / 0.2 ml を脾内へ直接注入する方法によった。

2) 実験群

実験群 (各群 n=10) は、I 群 ; 体重 200g の 9 週齢に移植し、その 6 週後に AsA 投与を中止、II 群 ; 体重 100g の 6 週齢に移植し、その直後より AsA 中止、III 群 ; 6 週齢

に移植し、その17週後にAsA中止（なおⅢ群には移植後6週に脾内肝の増殖を促すため宿主肝に70%肝切除を加えた）。コントロールとして同週齢の肝細胞移植のないODS-^o /_o を用いた（図-1）。

3) 検査

移植後体重測定と症状観察を行ない約2カ月後に犠牲死させ、血清、肝、副腎を採取し、ヒドラジン法でAsA濃度を測定した。脾はH.E., BrdU染色を施し肝細胞の生着と増殖の程度を光顕的に検討した。

4) 成績

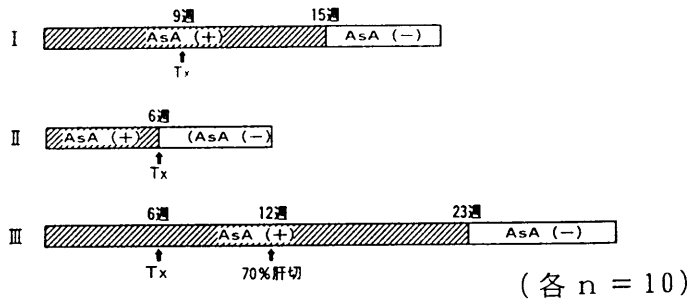
I群では全例がAsA中止後2週以降から著明に体重減少し、出血傾向・骨変形をきたし6週で死亡した（図-2, 3）。これはコントロールと全く同じ経過であった。II群ではコントロールと同じ経過をたどった8例と体重減少が鈍化した2例に分かれ、後者の血清AsA濃度は前者より高値を示した（図-4）。またII群全体でも血清、肝、副腎のAsA値はコントロールより高かった。III群では全例に体重減少の鈍化がみられ、AsA中止後9週目の生存率も100%であった（コントロールは50%）（図-5）。さらにIII群の中でも次第に体重減少と症状

発現をきたした 5 例と全く無症状で体重維持した 5 例に分かれ、前者の血清 AsA は $214 \pm 229 \mu\text{g/dl}$ で、後者は 396 ± 101 であった (図 - 6) (なお正常 ODS-⁺/₊ は 1013 ± 167 , コントロールは 35 ± 14)。組織学的には I , II 群は肝細胞が脾内に散在性に生着しているのみのに対し、III 群は索構造が発達しており、さらに III 群の後者は前者の約 2 倍の占拠面積を示した。

5) 結論

AsA を中止している時の脾内肝の相対的生着容積は Group I < II < III の順であった。血中 AsA、体重の増加、生存日数は脾内の移植肝細胞生着量と比較的良く相関するように考えられた。本法が先天性肝酵素欠損症の有効な治療法となり得るには充分量の生着肝細胞が必要であるということが明らかになった。

実 験 群



- 図-1. AsA (+) は、アスコルビン酸 (AsA) を含む飼料+AsAを含む水 3g/l
 AsA (-) は、AsAを含まない飼料+水道水
 コントロール群は実験群 I, II, IIIに移植をしないもの (n=10)

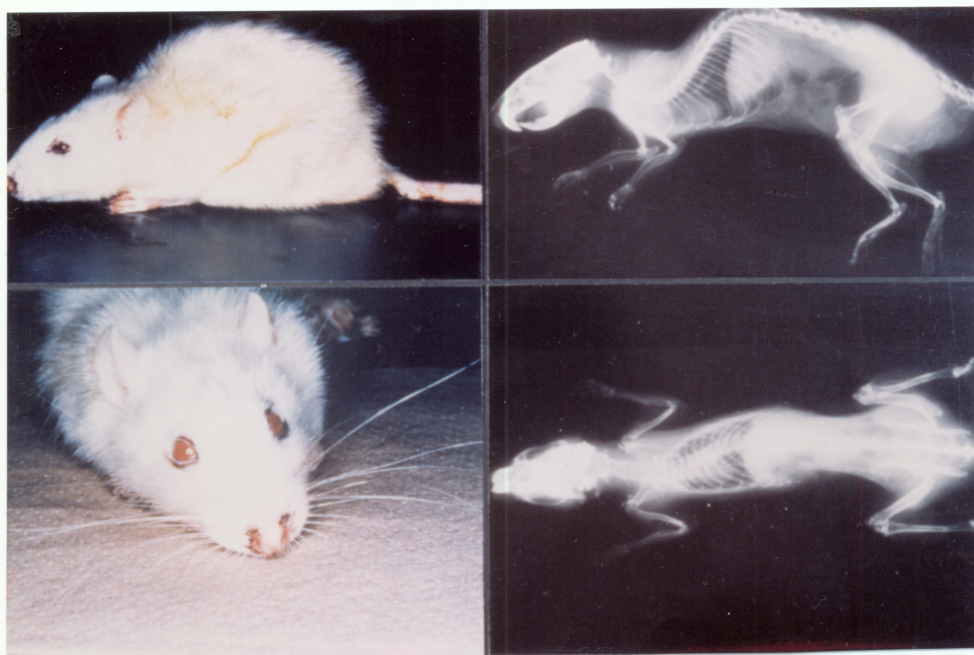


図-2. 先天性アスコルビン酸 (AsA) 生合成酵素欠損ラット (ODS-^o/_{oa}) に AsA を含まない飼料と水で飼育すると図のように4週以後壊血病様症状を示し、AsA 投与中止後約8週で死亡する。

Change of Body Weight in Group I

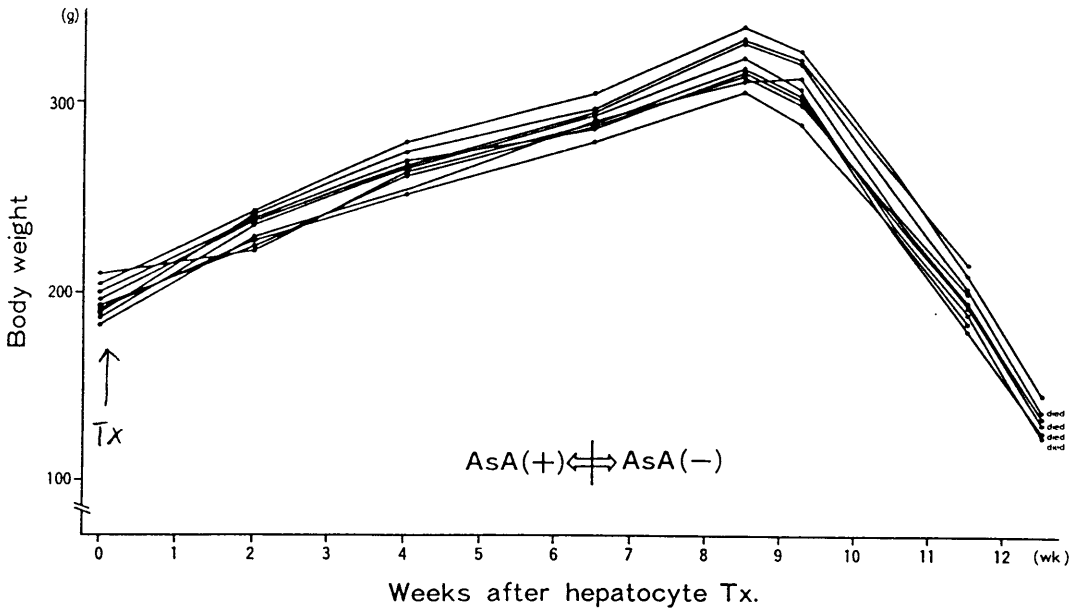


図-3. Hepatocyte Tx 後6週後にAsA投与中止したGroup I
 全例投与中止2週以降体重減少となり6週で死亡 (コントロール群と変らない)

Serum AsA Level of Group I & II

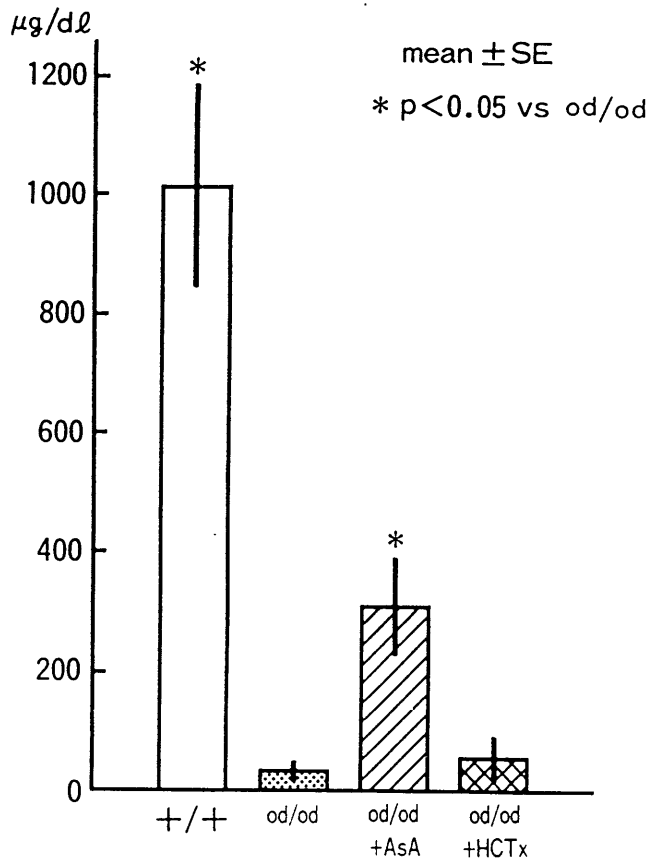


図-4. 正常ラット (+/+) に比し、 od/od ラットはAsA投与されていても結成AsA値は有意に低値であった。しかし、症状は発現しない。

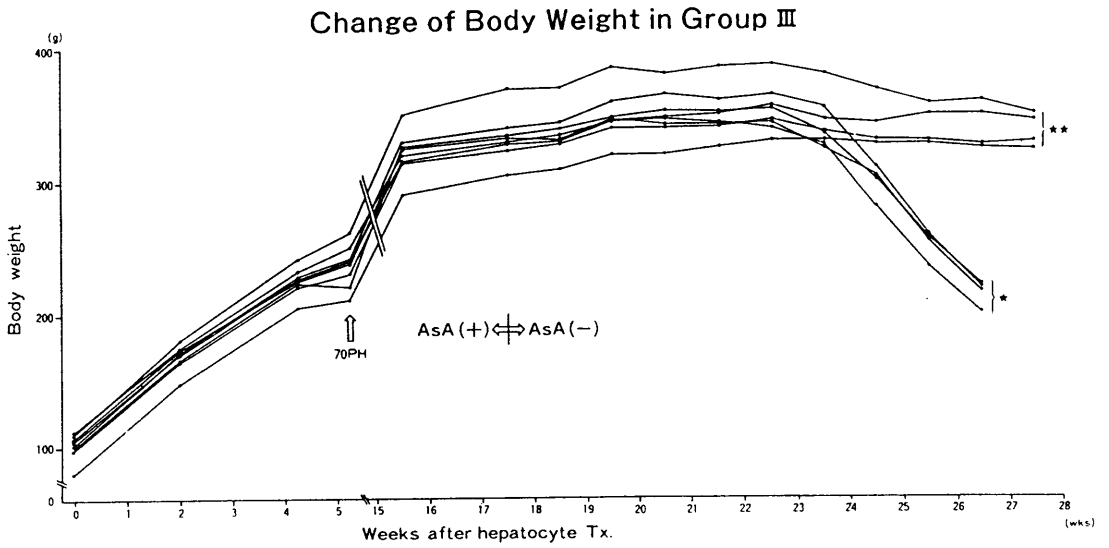


図-5. 全例に体重減少の鈍化が見られたが、9週以降体重減少を示す例が表われ2群に分れた。

Serum AsA Level of Group III

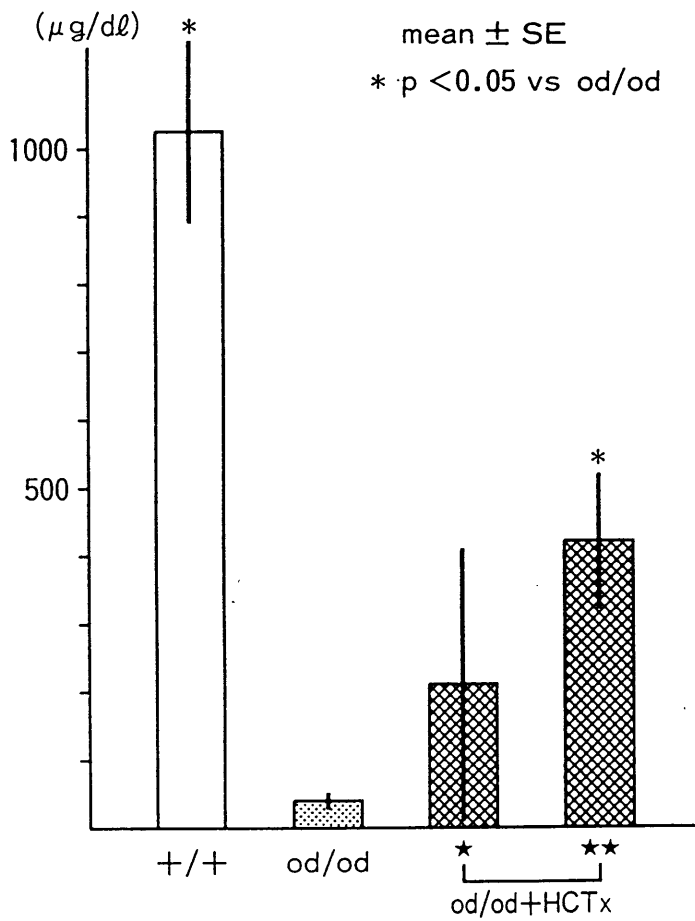


図-6. Group IIIで体重減少を示さなかった例(★★)は体重減少を示した例(★)に比し、高いAsA値を示した。(有意差はない)

II . 無アルブミンラットに対する肝細胞移植

1) 方法

Recipient として 14週 齡 Nagase analbuminemic rat (NAR) (佐々木研究所) を、donor は recipient に congenic な 8 週 齡 F344 rat (日本クレア) を用いた。

脾臓内肝細胞移植は前記の ODS ラットに対す方法と全く同様であった。すなわち donor の F344ラットから Seglenらの方法に準じた collagenase solutionによる還流法で viability 約 80% の単離肝細胞を得、 10^7 肝細胞を 25ゲージ針にて直接 recipient ラットの脾臓内に注入移植した。

2) 移植後の検査

① . 血中アルブミン値の測定

血液サンプルは、採血前日より絶食として、移植後 1 月毎にエーテル麻酔下に jugular veinより採血した。血中アルブミン値は、抗ラットアルブミン抗体を用いた radioimmunoassay (RIA) にて定量した。

② . 形態学的検索

形態学的検索のため移植した NAR のうち 3 匹を移植 16カ月後に犠牲死させた。固定方法は、門脈内にカテー

テルを挿入し経脾静脈的にPBS(-)にて paraformaldehyde (PLP) solutionにて5min(10ml/min)前還流後、0.1% glutaraldehydeを含む periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solutionにて10min(10ml/min)還流固定した。脾臓を長軸方向に3mm幅にスライスして、7.5% sacrose PBS(-)にて1hrリンス後、半分をH.E. stain, immunostain用にパラフィン封入した。残りを電顕用に1mm³に細切し、1% OsO₄ solutionにて後固定しEpon 821に封入、Reichert-Jung ultratoneにて超薄後、酢酸ウラニール、鉛二重染色、LEM electron microscopeにて観察した。

albumin immunostain は、一次抗体に rabbit anti-rat albumin serum (Cappel, U.S.A.)、BSA-kit を用いて、DAB/H₂O₂にて発色させた。

脾臓内肝細胞占有率は、CB-Tasper system (France,) をもちいて、アルブミン染色をした脾臓長軸標本より算出した。

3) 結果

①. 移植後、血中アルブミン値の増加

移植を行ったNARは、全例生存した(図-1)。

移植後1ヶ月毎に血液を採血し、RIAにて血中アルブミン値を測定した。F344コントロールラット血中アルブミン値 $2455 \pm 62 \text{ mg/dl}$ に比較し、移植を行わないNAR血中アルブミン値は $0.85 \pm 0.13 \text{ mg/sl}$ ($n=0$)で、ほとんどアルブミンが存在しないと考えられるような少量であった。実験群としての肝細胞移植したNARにおいては1カ月よりアルブミン値は観察期間の16カ月間徐々に、しかもコンスタントに上昇した(図-2)。最大値で正常ラット血中アルブミン値の約4%、平均値で約1.7%であった。コントロール群のNARは加齢に伴って血中アルブミン値が上昇することなく、変化を認めなかった。

②. 形態学的検索

移植後14カ月目の標本にては、肝組織片は脾臓の $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$ を占めていた(図-3)。光顕的には、白脾髄をとりまくようにone cell thick plate一部、two cell thick plateの分化した肝細胞索構造を持つ肝組織を形成しており、sinusoidを持つほぼ正常肝組織を再構築した(図-4)。

PAS染色では生着している肝細胞はほぼ全てが陽性(図-5)で、albumin immunostainでもほぼ全ての肝細胞

胞が陽性であった（図 - 6）。同時に施行した肝臓の albumin immunostain では、コントロール NAR と同じ頻度で少数のアルブミン陽性細胞が散見されたが、非常に少なかった（図 - 7）。

電顕像では、肝細胞はわずかに腫大したミトコンドリア、よく発達した粗面小胞体グリコーゲン顆粒をもち、他の肝細胞と接する面には bile canaliculi を形成していた。perivascular space に面する細胞膜には多くの microvilli があり、類洞を形成する内皮細胞には細胞内に fenestration を持っていた。Disse space には、fat-storing cell も認められた。

③ . 肝細胞占居率

肝組織の脾臓に占める割合より推定される脾臓内肝重量は、それぞれ約 420mg, 350mg, 120mg で（図 - 8, 9）、正常肝細胞の 0.8-2.9% を占めていた。異所性肝組織重量は、宿主 NAR 血中アルブミン値と相関がみられた。

Survival rate and body weight after hepatocyte Tx.

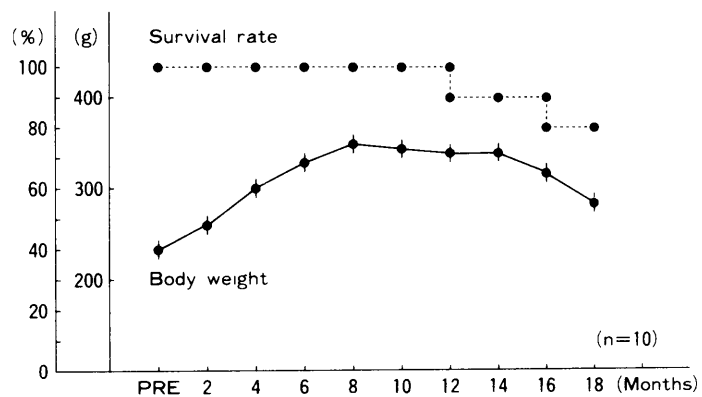


図-1. 14週後体重が減少しているのは加齢のためと考えられる。
実験ラット2匹の死亡は移植とは無関係であった。

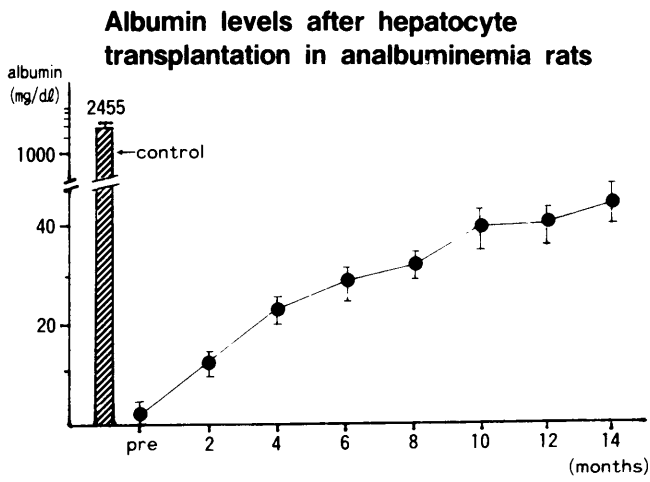


図-2. 移植後徐々にではあるが、血清アルブミン値は上昇している。



図-3. 移植後14カ月後の脾臓を示す。
左約 $\frac{2}{3}$ が、肝細胞で占居されている。

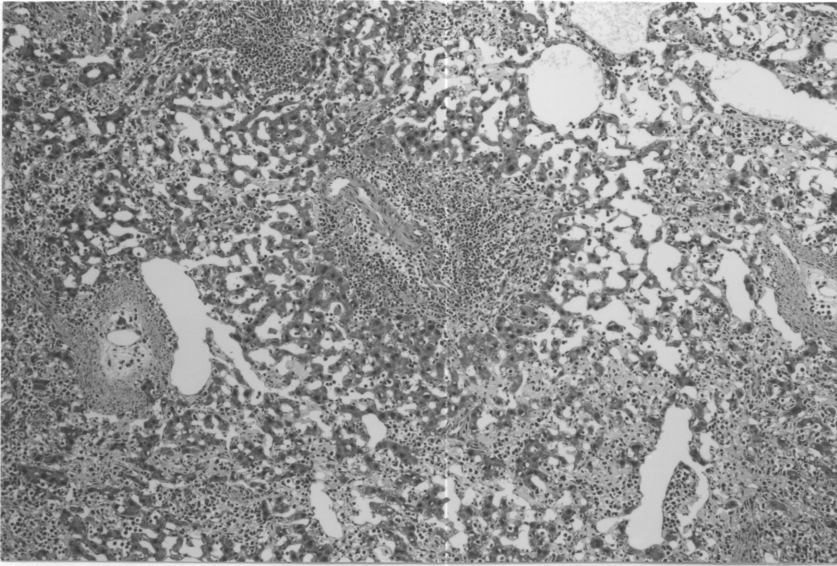


図-4. 移植後14カ月後の脾のH.E.染色を示す。

主にWhite pulp周囲に索構造をもつ肝細胞群が生着している。

(Sinusoid腔が開いて見えるのは固定の操作のためである。)

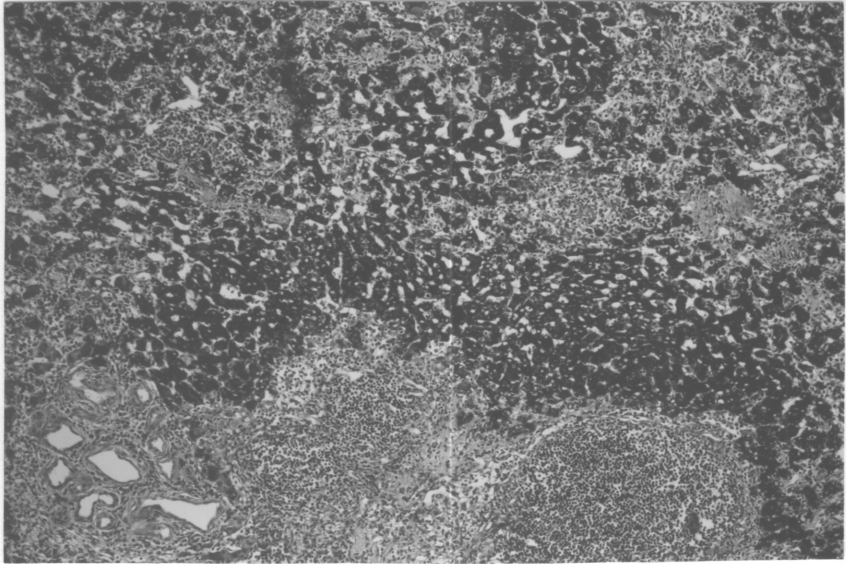


図-5. 移植14カ月後の脾のPAS染色を示す。
生着した肝細胞の胞体はグリコーゲン顆粒が豊富であることを示す。

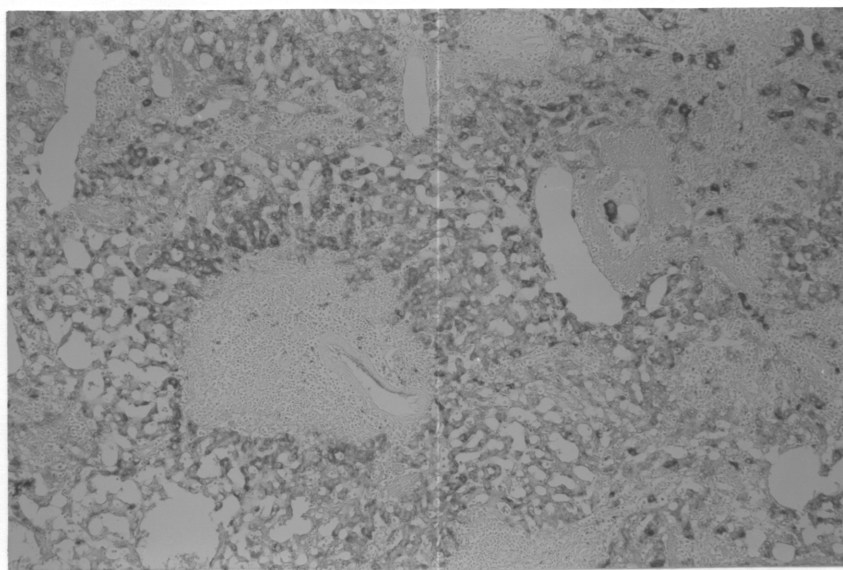


図-6. 移植14か月後のアルブミン免疫染色を示す。

White pulp周囲の生着肝細胞のアルブミンが鮮明に染色されている。

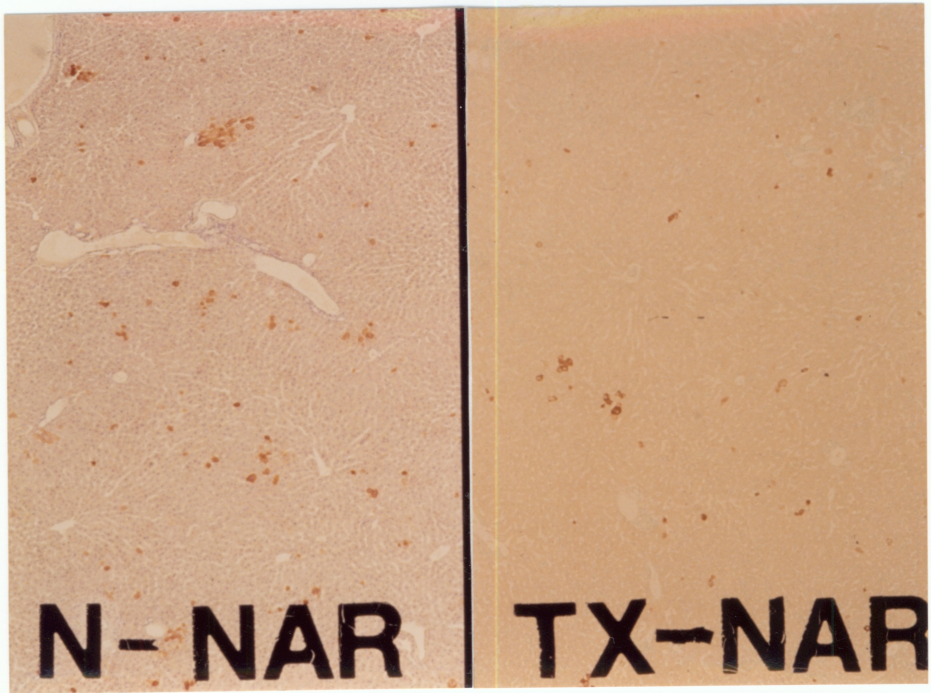


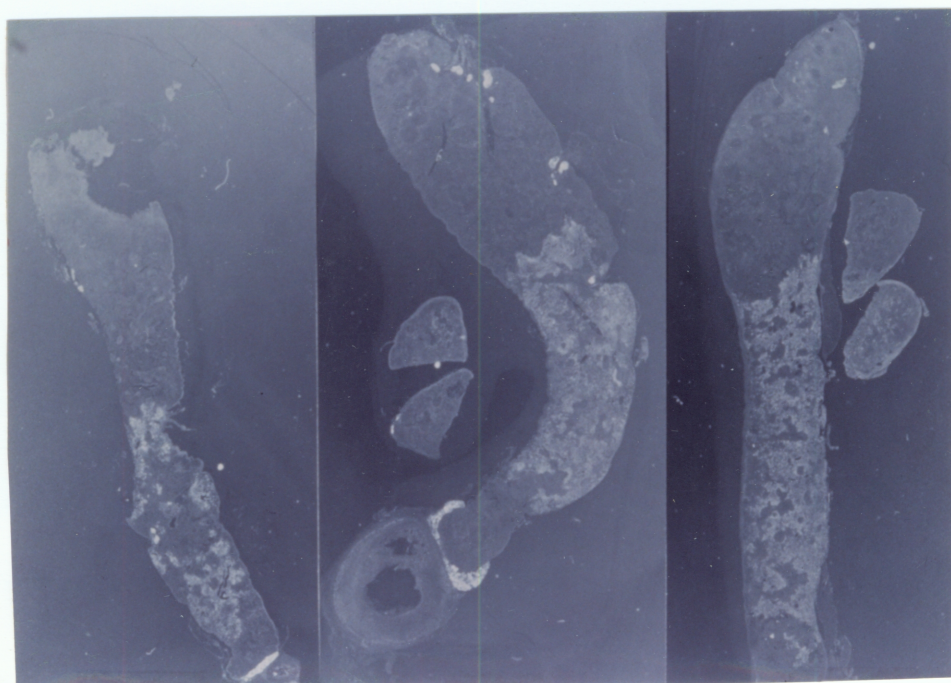
図-7. 無アルブミンラット肝 (NAR) のアルブミン染色を示す。
左無処置, 右は脾臓内肝細胞移植後の肝である。
アルブミンはほとんど染色されていない。
すなわち、肝に移植肝細胞は生着していない。

Morphometric Analysis

Rat No	Serum Albumin (mg/dl)	Total Area of the HC in the spleen (mm ²)	Total Volume of the HC in the spleen (mg)
1	22.5	16.5 (27.1%)	120
2	46.6	29.7 (36.1%)	350
3	88.3	32.7 (40.9%)	420

図-8. 脾内移植14カ月後のラット3匹の脾内肝細胞の占居率を示す。

図-9. 3匹のラットの肝細胞移植脾
-移植後14カ月-



No. 1

No. 2

No. 3

総括

先天性肝酵素欠損疾患は小児期に mental retardation となり、徐々に肝硬変が進行する不治の病気である。これら疾患に対する治療としては現在全肝移植しかなく、肝細胞移植により、小児期からの治療が期待されるものである。本研究においては先天性肝酵素欠損動物として、アスコルビン酸生合成酵素欠損ラットと無アルブミンラットを使って肝細胞移植の効果を検討した。その結果、アスコルビン酸生合成酵素欠損ラットはアスコルビン酸を与えないと約6-8週で壊血病症状を呈し、全例死亡するのに比し、肝細胞移植を行うと、生存日数を延長することが可能で、さらに、この長期生存ラットの血清には有意にアスコルビン酸が存在することが証明された。

また、無アルブミンラットに対する肝細胞移植では、移植肝細胞は徐々にではあるが、コンスタントにアルブミンを産生し続けることが証明された。これは形態学的検索でも、裏付けされた。しかし、移植肝細胞が産生するアルブミンは最大でも正常全肝の約4%に過ぎず、

先天性肝代謝異常疾患に本法を応用するためには移植肝を増大する方法の開発が急務である。

結論として、肝細胞移植法が先天性肝酵素欠損疾患を治療する方法となりうることがこの研究から得られた意義は大きいものと考えられる。

今後遺伝子は工学により gene transfer をすることにより、また、免疫学的トレランスを導入する方法などにより、脾内肝細胞移植法は臨床に応用されるようになるであろう。