

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450443

研究課題名(和文) 犬の慢性肝障害に対する自己骨髄細胞移植治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the bone marrow stromal cell autotransplantation therapy for the chronic liver in dogs

研究代表者

谷 健二 (TANI, KENJI)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：00365420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己BMSCを凍結保存し、解凍増殖したところ、接着細胞は凍結解凍前と比べて表面抗原や細胞形態に異常は認められなかった。この解凍自己BMSCを四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)誘導性肝障害モデル犬の末梢静脈から移植したところ、各種パラメーターに統計的な有意差は認められなかった。しかしながら、興味深いことに肝障害の程度が大きい例ほどBMSC治療効果が認められた。股動脈からの経カテーテル肝動脈に自己BMSC治療を実施したところ、肝の線維化領域が縮小した。犬BMSCは肝線維症を軽減する能力を有し、肝動脈経路による動注法は治療効果をより高める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Auto-transplantation therapy was evaluated for dogs with liver injured induced with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) by using cryopreserved bone marrow stromal cells (BMSCs). The statistical significant difference was not found in various parameters in treated dogs, however, interestingly, BMSC effect was found in dogs with severe liver injury. A hepatic fibrosis region reduced when BMSC treatment was performed via transcatheter hepatic artery. Canine BMSC may be a source cell to improve liver injury and hepatic artery course may raise the effect of the treatment.

研究分野：獣医外科学

キーワード：骨髄間質細胞 再生医療 慢性肝炎 肝線維症 肝動脈 犬

### 1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である肝不全罹患犬に対する有効な治療法はなく、臓器の再生が期待できる再生医療の確立が望まれている。骨髄間質細胞 (BMSC) は、肝細胞に分化する能力を持つだけでなく、障害を受けた肝臓臓器内の肝線維化を改善する能力を持つ。自己の BMSC 移植治療は、生命倫理やドナー不足などの問題が無く、人の肝硬変の有効な治療法であると期待されている。我々は、マウス肝炎モデルに対する犬 BMSC 治療効果は肝細胞分化による肝細胞の補充効果よりも線維症を改善する効果が高いことを見出した。人医学では、マウス・ラットの実験結果から臨床応用するのではなく、より高度な大型動物からのデータ収集による Proof of Concept (POC) の確立が望まれていることから、肝障害モデル犬を用いた自己犬 BMSC 移植について検討するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝障害モデル犬を作製し犬骨髄間質細胞移植の治療的効果を検討することであり、肝障害モデル犬を作製し、定量性のある検査系を確立することである。申請者は、肝不全罹患犬に対する自己骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の新規確立を目指した。

### 3. 研究の方法

犬 BMSC の移植治療効果を評価するために、2種類の肝障害モデル犬を作製した。

(1) 部分的胆管結紮モデル (BDL); ビーグル犬 5 頭に部分胆管結紮を行い、血球計算、血液生化学検査、血液凝固系検査、ICG クリアランス検査、造影 X 線 CT 検査および肝容積の測定、腹腔鏡検査、組織学的評価を経時的に行った。

(2) 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導性肝障害モデル; ビーグル犬 8 頭に 0.1ml/kg 連日経口投与を実施し、血球計算、血液生化学検査、血液凝固系検査、ICG クリアランス検査、造影 X 線 CT 検査および肝容積の測定、腹腔鏡検査、組織学的評価を経時的に行った。

(3) 犬の肝機能検査; 肝機能検査として犬におけるインドシアニングリーン (ICG) クリアランス検査の有用性について検討した。ICG (ジアグノグリーン注射用 25 mg、第一三共株式会社、東京) 1 パイアルに注射用水 (添付溶解液) 5 mL を無菌的に注入し、5 mg/mL の ICG 溶液を作成し、採決肢とは反対側の橈側皮静脈に 0.5mg/kg で投与後、5, 10, 15, 30 分後に採血した。血漿中 ICG 濃度は ICG 測定器 (I.C.G.メータ A30、株式会社府中技研、東京) で測定した。

(4) 犬 BMSC の解析; あらかじめ各ビーグル犬の骨髄液を採取し、接着細胞の性状解析を行い使用するまで -80 °C で凍結保存した。解凍培養した細胞を 3 × 10<sup>5</sup> 個/kg で静脈投与した。

### 4. 研究成果

(1) BDL モデル犬の作製; 実験期間を通して、BDL 犬は良好な全身状態を保った。AST、ALT、ALP、GGT は術後一過性に上昇し、血球計算、血液凝固系検査においては、実験期間を通じて標準値におさまった。BDL 実施 1 または 2 カ月後の造影 X 線 CT 検査では、BDL 肝葉で動脈相における造影効果が認められた。同時期の組織学的検査では小葉間の線維の増生と肝小葉の委縮が認められ、非 BDL 肝葉では異常所見は認められなかった。測定したサイトカインはすべて、BDL 肝葉に比べて非 BDL 肝葉で増えていた。BDL 肝葉の容積は実験期間中著しく減少し、非 BDL 肝葉は増加した。腹腔鏡所見では、肝右葉容積の増大および左葉容積の縮小により胆嚢が左側に変位していた (図 1)。ICG クリアランスは低下しており、肝機能の低下が認められた。本研究において、部分胆管結紮誘導性肝障害犬は、臨床症状を示さない安定したモデルであることが確認された。BDL 肝葉では炎症細胞の浸潤、線維化が確認され、BDL は犬においても肝障害を誘導することが明らかとなった。しかし、BDL 肝葉の容積は著しく減少しており、肝線維症や肝硬変とは異なる病態を示すことから、犬における BDL は肝線維症モデルとしては不相当だと思われた。非 BDL 肝葉では、肝臓の代償機構を反映し、容積が増大していたが、肝臓全体としての機能は低下していることが明らかになった。これらのことから、部分胆管結紮や肝内結石による胆管閉塞など特定の肝葉が障害された場合の悪影響は肝臓全体に及ぶ可能性が示唆された。また、画像診断学的には、動脈相の特定肝葉における造影剤の濃染は、BDL 類似疾患における診断の一助になりえると考えられた。

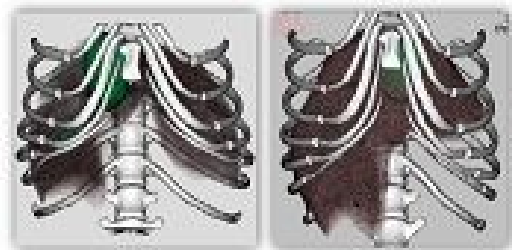


図 1. BDL 肝障害犬の肝臓 CT 立体像: 胆管結紮前 (左) と結紮後 (右)

(2) 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導性肝障害モデル; CCl<sub>4</sub> 投与後は、食欲減退、体重減少、活動性低下、黄疸などの臨床症状がみられ、MCHC、AST、ALT、ALP、GGT、総ビリルビン、PT は有意な増加を認め、フィブリノーゲン、AT、総アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、フィッシャー比、肝容積は有意な減少が認められた。肝表面像は 100 ~ 400 番台まで分類され (図 2: CCl<sub>4</sub> 誘導性肝障害犬の腹腔鏡下所見) 病理組織は線維化ステージ F1 ~ F6 が認められた。ALP、総ビリルビン、芳香族アミノ酸、肝表面像所見は線維化ステージとの正の相

関を認め、アンチトロンピン、分枝鎖アミノ酸、フィッシャー比、肝容積は負の相関が認められた。肝表面像所見は線維化ステージと最も強い相関が認められた。



図 2. CCl<sub>4</sub>誘導性肝障害犬の肝臓外観

CCl<sub>4</sub>誘導性肝障害犬では様々な程度の肝臓の炎症・線維化が確認され、CCl<sub>4</sub>は犬においても肝障害を誘導することが明らかになった。本研究で認められた変化の多くはヒトの慢性肝炎において報告されているものであり、犬への CCl<sub>4</sub> 投与によってヒトの慢性肝炎に類似した病態を作製できることが示唆された。また、本疾患モデル犬では、ALP、総ビリルビン、AT、血中アミノ酸などの血液検査、造影 CT による肝容積測定は有意に顕著な変化が認められ、腹腔鏡下の肝表面像所見は特に肝組織線維化と強い相関が認められたことから、これらの検査は慢性肝炎自然発症例に対する診断に有用である可能性が示唆された。本研究における肝炎は CCl<sub>4</sub> 誘導性であり、臨床例を反映していない可能性があるものの、本モデルを用いて新規治療法の効果、副作用に関する研究が可能になりえると思われた。

(3) インドシアニングリーン (ICG) クリアランス検査：健常ビーグル犬、BDL 群、CCl<sub>4</sub> 群および臨床例において ICG クリアランス検査を行い、すべての犬でショックなどの危険な副作用は認められず、慢性肝炎や重度の肝障害症例でも安全に試験を行うことができた。健常犬では、各群間における k 値、T<sub>1/2</sub>、ICG R<sub>15</sub> に有意差はなかった無く、血検正常群の mean ± 2SD より k 値：0.057 ~ 0.113、T<sub>1/2</sub>：6 分 1 秒 ~ 10 分 37 秒、ICG R<sub>15</sub>：12.5 ~ 45% という参考値を設定した。また、健常犬の中から 11 頭において、ICG 投与完了から 1 分後および 30 分後にも採血を行い、その濃度を測定した。C5、C10、C15 を加えたこれらの 5 点を片対数グラフにプロットすると、ほぼ直線状に並んだ (図 3)。このことから、犬において ICG 血中濃度は投与 30 分後までは指数関数的に減少していくことが確認された。つまり、30 分後までは k 値は一定の値をとるということである。本検査では、片対数グラフにプロットする 2 点が存在すれば、k 値、T<sub>1/2</sub> を算出できる。したがって、時間を正確に測り ICG 投与後 30 分以内に異なる時間に採血を 2 度行えば、理論上、C5、C10、C15 の 3 点から算出した k 値、T<sub>1/2</sub> と同義の結果が得られるはずである。このことは臨床現場において ICG クリアランス試験を行う際、好都合なのではないかと考えられた。また、C0 と C30 から ICG R<sub>30</sub> を算出したところ、13.8 ± 6.76% であり、その参考値は 7.0 ~ 20.6% で

あった。さらに、ICG クリアランス検査は、肝障害モデル犬の重症度について数値化することが可能であった (図 4)。

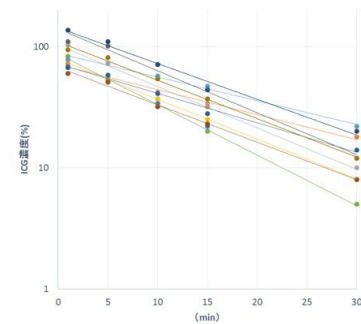


図 3 犬の ICG 排泄は少なくとも投与 30 分後まで指数関数的に減少する。

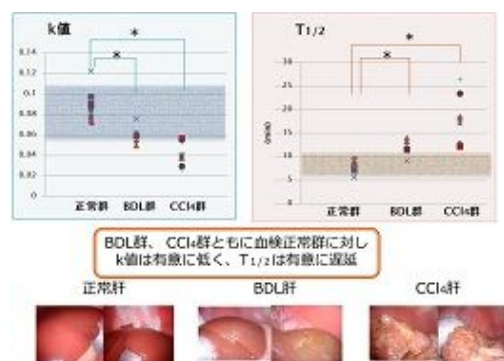


図 4 正常ビーグル犬、BDL 群および CCl<sub>4</sub> 群における ICG クリアランス検査結果：肝臓の病態の重症度に比例して ICG クリアランスが低下している。

(4) 自己犬 BMSC 移植治療効果について；凍結解凍後の犬 BMSC の性状は CD44+、CD90+、CD45- であり、凍結解凍前と比べて表面抗原や細胞形態に異常は認められなかった (図 5 および 6)。

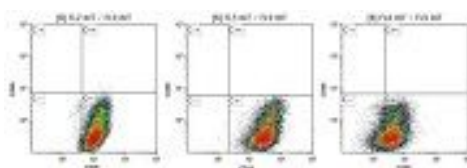


図 5 犬 BMSC の性状解析



図 6 犬 BMSC は多分可能を有する

血液検査、造影 X 線 CT 検査、肝容積の測定、病理組織学的検査 (HE 染色、シリウス・

レッド染色) 肝線維化のスコアリングにおいて比較検討を行ったが、個体差が大きく、2 群間に有意差は認められなかった。しかしながら、CC1<sub>4</sub>-5 カ月投与犬のみの結果を比較してみると、1 頭でアルブミン値の上昇が認められ、2 頭共に凝固系の改善と肝容積の増加が認められた。さらに BMSC 治療前の線維化が重症であった 1 頭に関しては、線維化スコアの改善が認められた。これらのことから、CC1<sub>4</sub> 誘導性慢性肝炎犬に対する自己骨髄間質細胞移植は CC1<sub>4</sub> によって委縮した肝容積を増加させ、延長した血液凝固能を含む肝機能を改善させる可能性のあることが示唆された。また、線維化の重症例に対して、より高い治療効果を発揮する可能性があると考えられた。これは、肝障害マウスモデルを用いた犬 BMSC 移植治療結果と一致した。移植直後の肺動脈塞栓は X 線造影 CT 検査では確認されなかったことから、犬 BMSC の自己移植治療の安全性は比較的高いことが確認された。犬 BMSC の自己移植治療は、軽微な慢性肝炎発症犬には効果が無く、重度な線維症や肝硬変罹患犬に対してこそ治療効果があるのかもしれない。肝動脈から同数の犬 BMSC 投与を試みたところ、ICG クリアランスの低下が有意に妨げられたことから、移植経路は肝動脈の方が効率が良いことが示唆された。今後、大規模な臨床例での応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Oishi Y, Tani K. (correspondence author), Nakazawa H, Itamoto K, Haraguchi T, Taura Y. (2015) Anatomical evaluation of hepatic vascular system in healthy beagles using X-ray contrast computed tomography. J. Vet. Med. Sci. **77**:925-929.

[学会発表](計 1 件)

Oishi. Y, Tani. K., Itamoto. K, Haraguchi. T, Taura. Y. Effect of arterial embolization in four dogs with hepatocellular carcinoma. The 5th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery. 2015 Nov., Kuala Lumpur, Malaysia

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷 健二 (TANI KENJI)  
山口大学共同獣医学部・准教授

研究者番号：00365420

##### (2) 研究分担者

田浦 保穂 (TAURA YASUHO)  
山口大学共同獣医学部・教授

研究者番号：80163153

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)  
山口大学大学教育機構・講師

研究者番号：90448283