

Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
V	99.07	100.08	83.05	978.53	961.50
N	114.04	214.12	197.09	879.46	862.43
F	147.07	361.19	344.16	765.41	748.39
T	101.05	462.23	445.21	618.35	601.32
E	129.04	591.28	574.25	517.30	500.27
I	113.08	704.36	687.33	388.26	371.23
Q	128.06	832.42	815.39	275.17	258.14
K	128.10	960.51	943.49	147.11	130.09

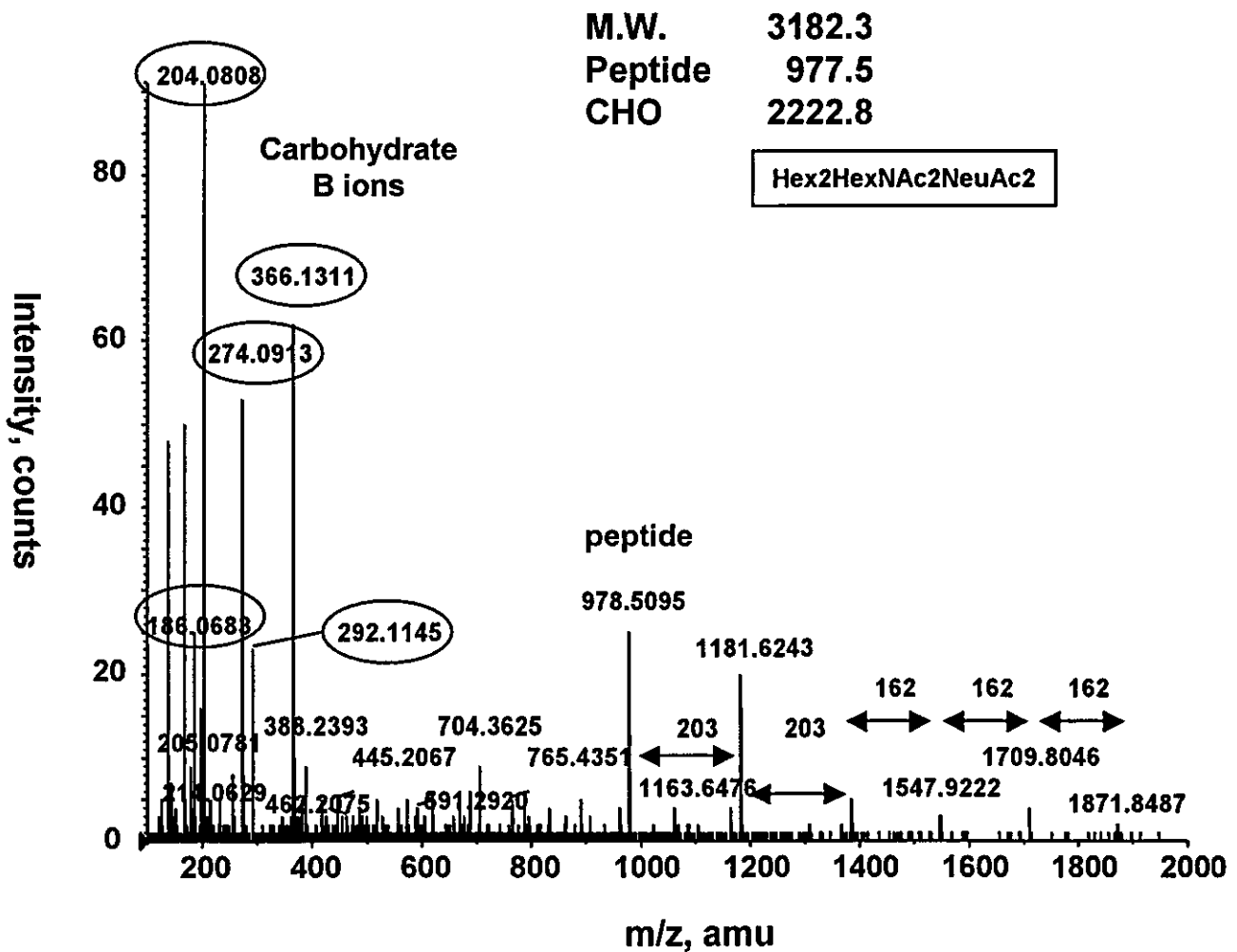


Fig. 4 Product ion spectrum of $M^+(m/z1061.8^{3+})$ at 25 min

(A) TIC for the full scan m/z 1000-2000

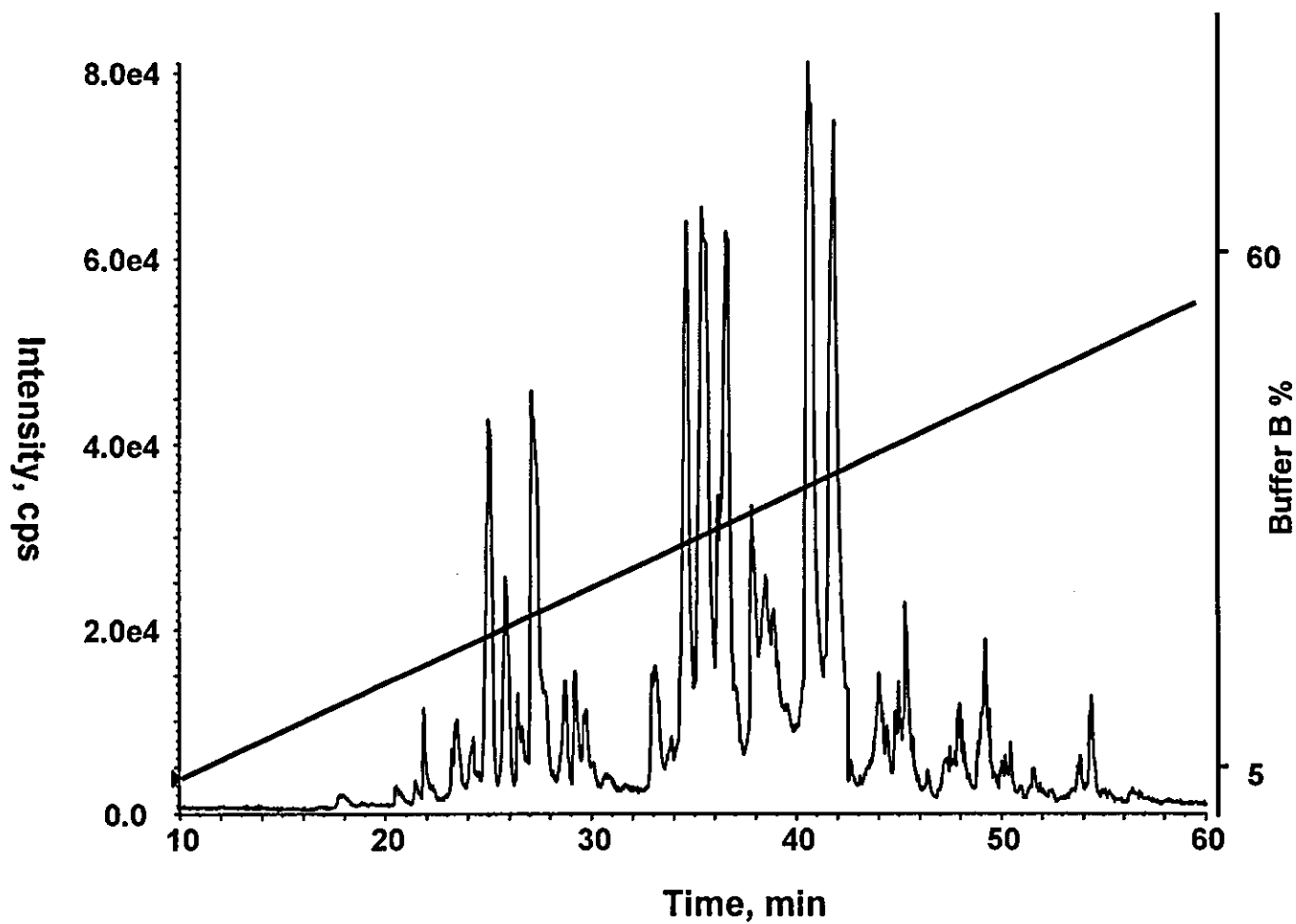


Fig. 5 LC-MS/MS of tryptic digest of ceruloplasmin

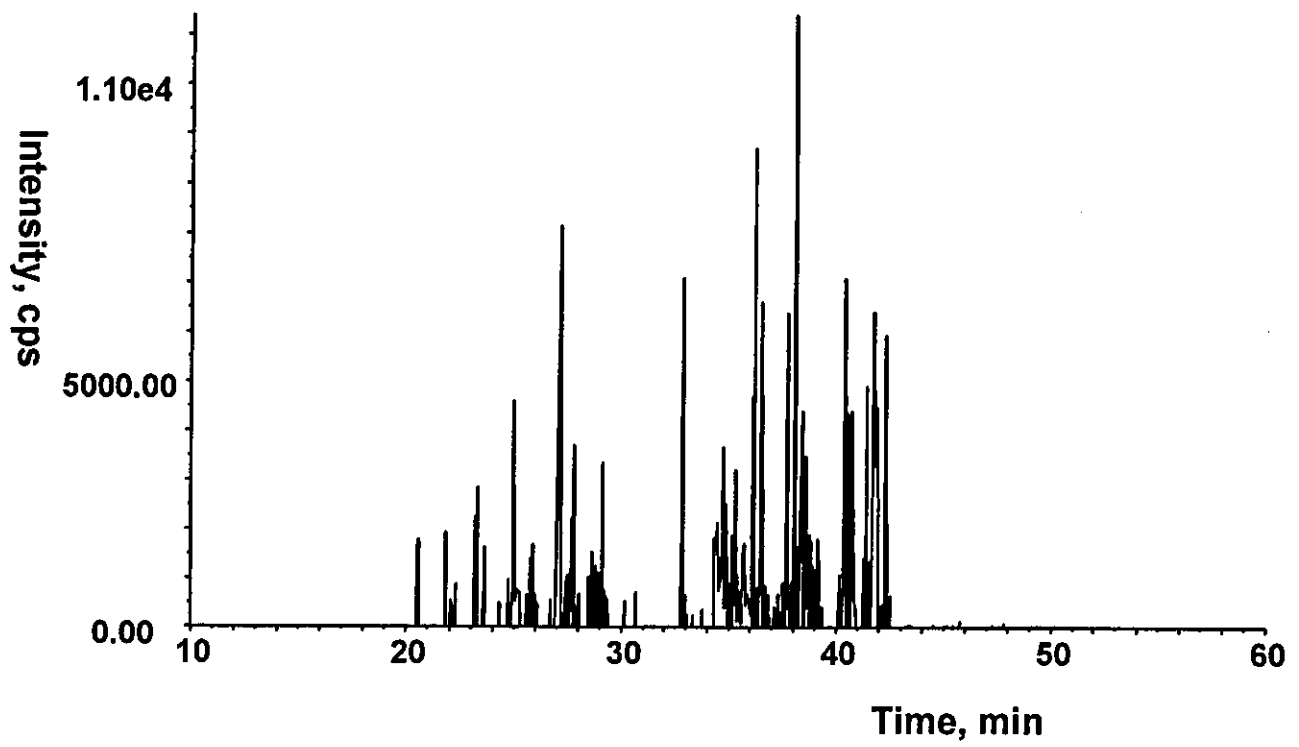
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

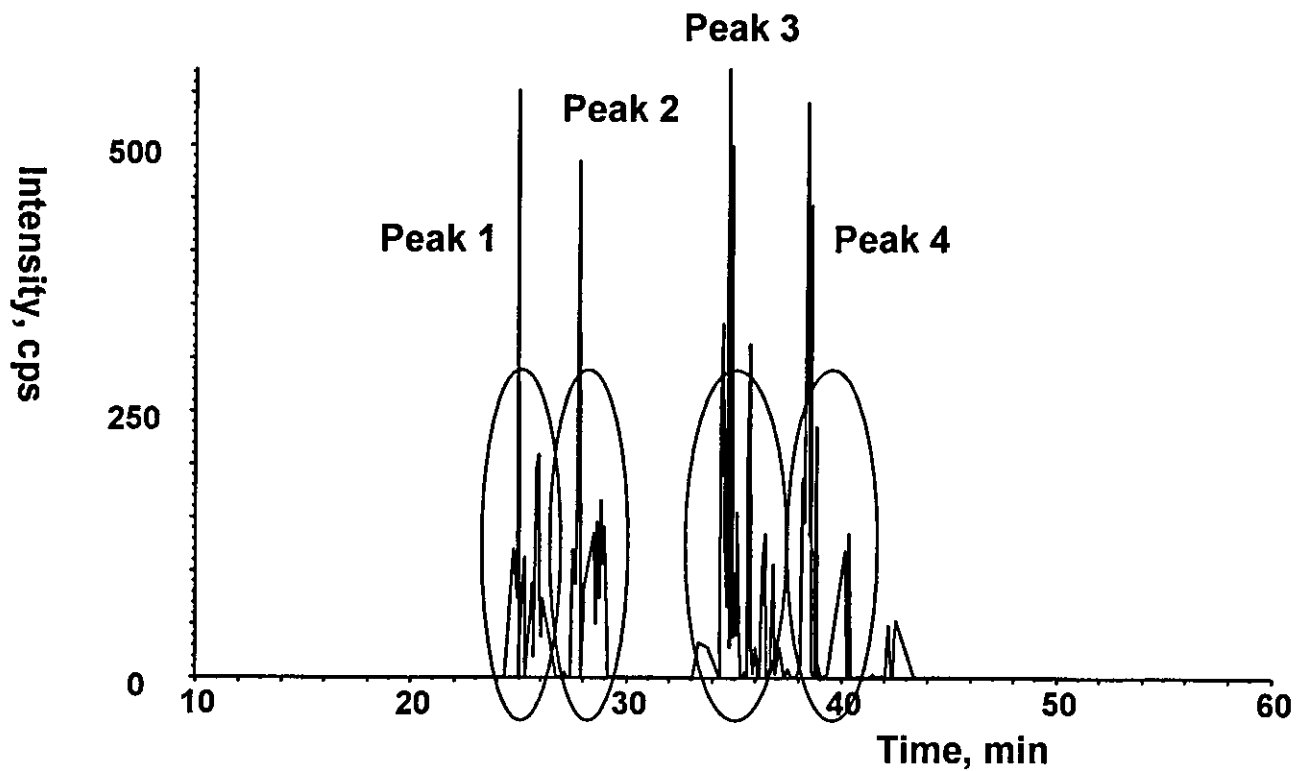
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

(B) TIC for the product ion scan at m/z 100 - 2000



(C) Product ion scan at m/z 204



M.W. 4096.6
 Peptide 1891.8
 CHO 2222.8

Hex₂HexNAc₂NeuAc₂

Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
E	129.04	130.05	113.02	1892.84	1875.81
H	137.06	267.11	250.08	1763.80	1746.77
E	129.04	396.15	379.12	1626.74	1609.71
G	57.02	453.17	436.15	1497.70	1480.67
A	71.04	524.21	507.18	1440.68	1423.65
I	113.08	637.29	620.27	1369.64	1352.61
Y	163.06	800.36	783.33	1256.55	1239.53
P	97.05	897.41	880.38	1093.49	1076.46
D	115.03	1012.44	995.41	996.44	979.41
N	114.04	1126.48	1109.45	881.41	864.38
T	101.05	1227.53	1210.50	767.37	750.34
T	101.05	1328.58	1311.55	666.32	649.29
D	115.03	1443.60	1426.58	565.27	548.25
F	147.07	1590.67	1573.64	450.25	433.22
Q	128.06	1718.73	1701.70	303.18	286.15
R	156.10	1874.83	1857.80	175.12	158.09

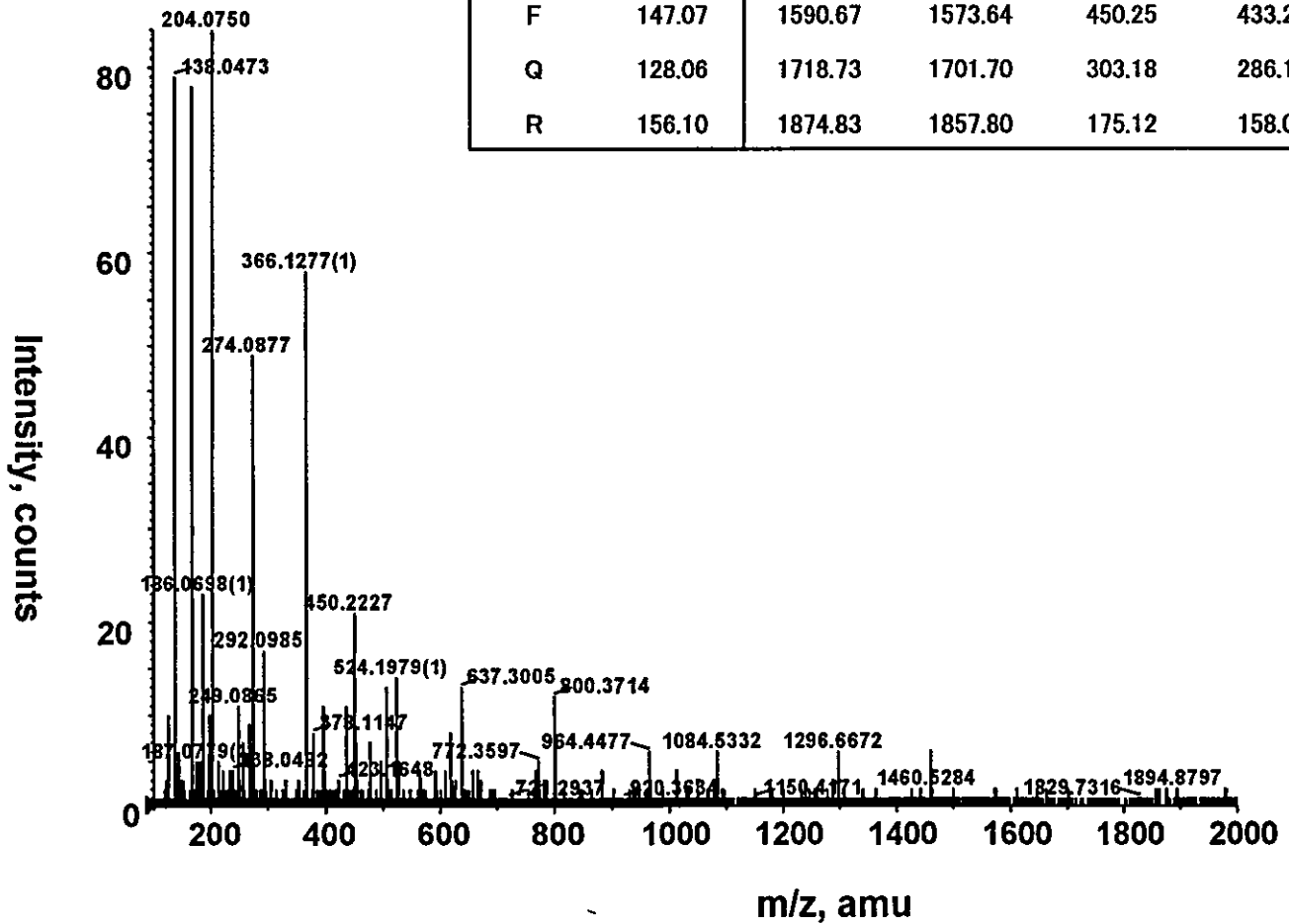


Fig. 6 Product ion spectrum of M⁺(m/z1366.6³⁺) at 25 min

(A) TIC for the full scan m/z 400-2000

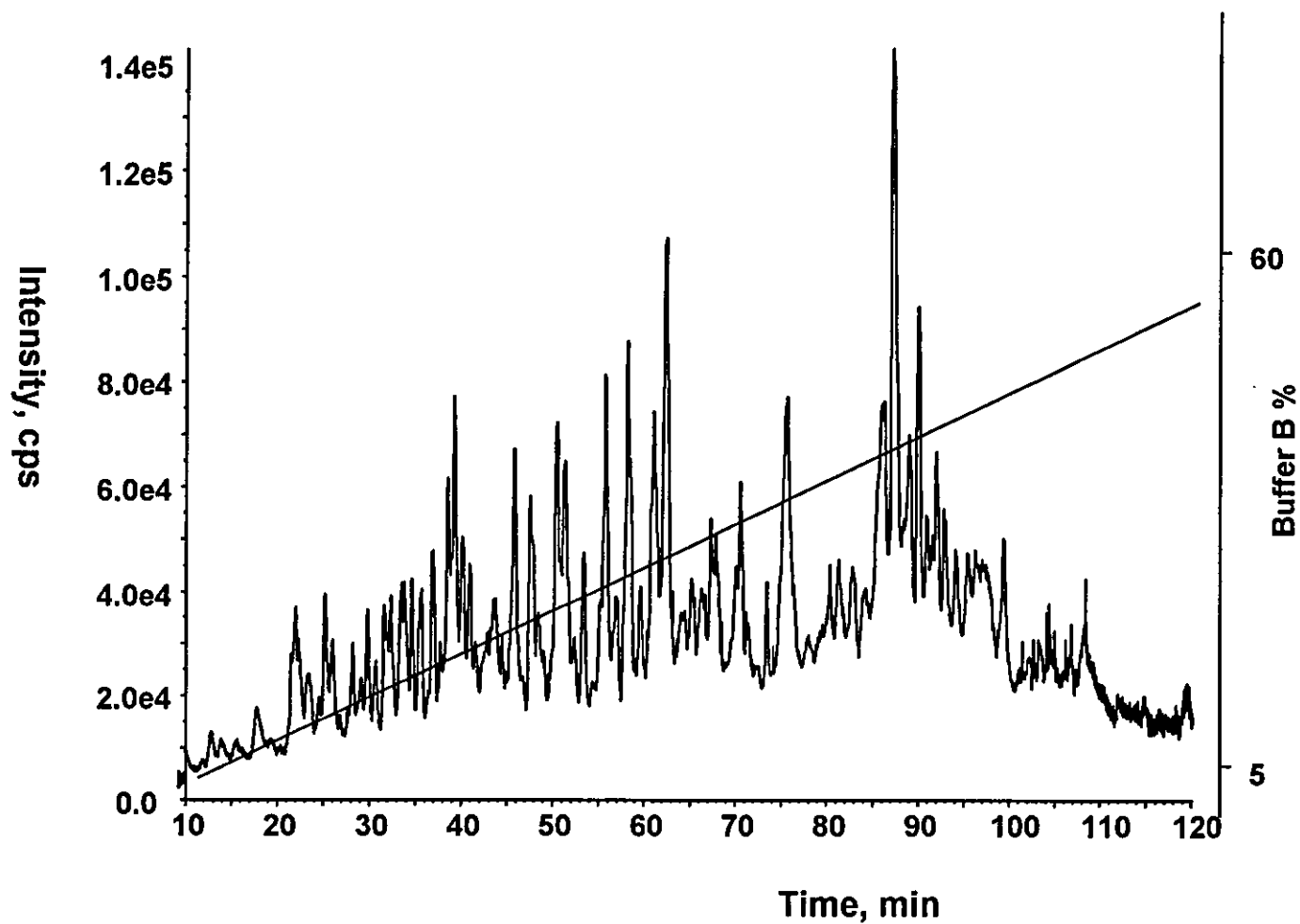


Fig. 7 LC-MS/MS of tryptic digest of human serum

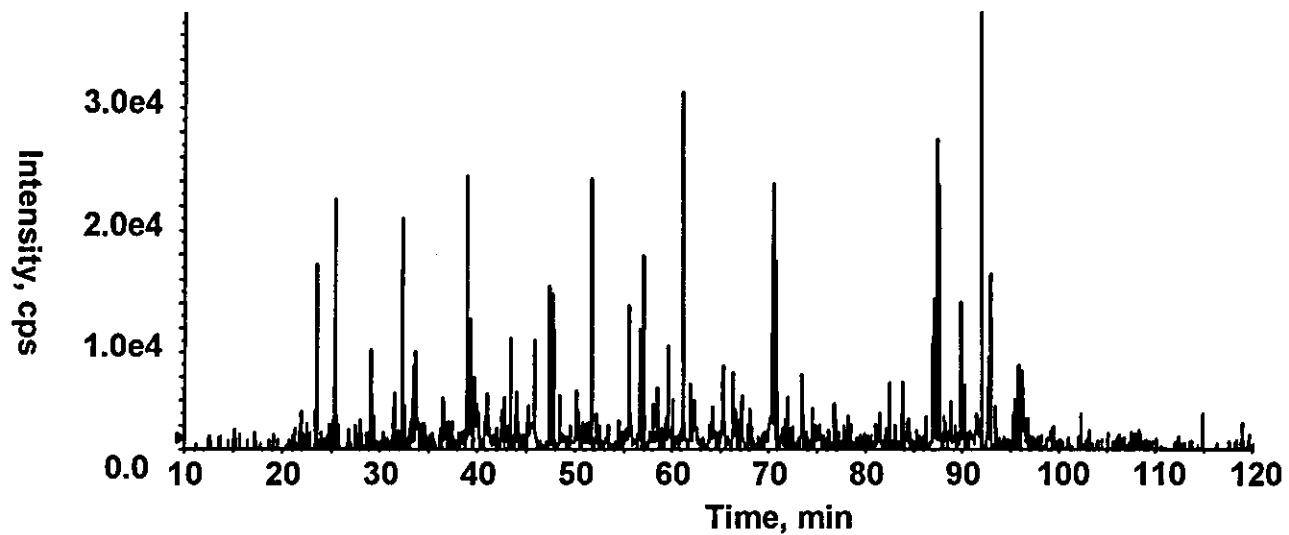
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

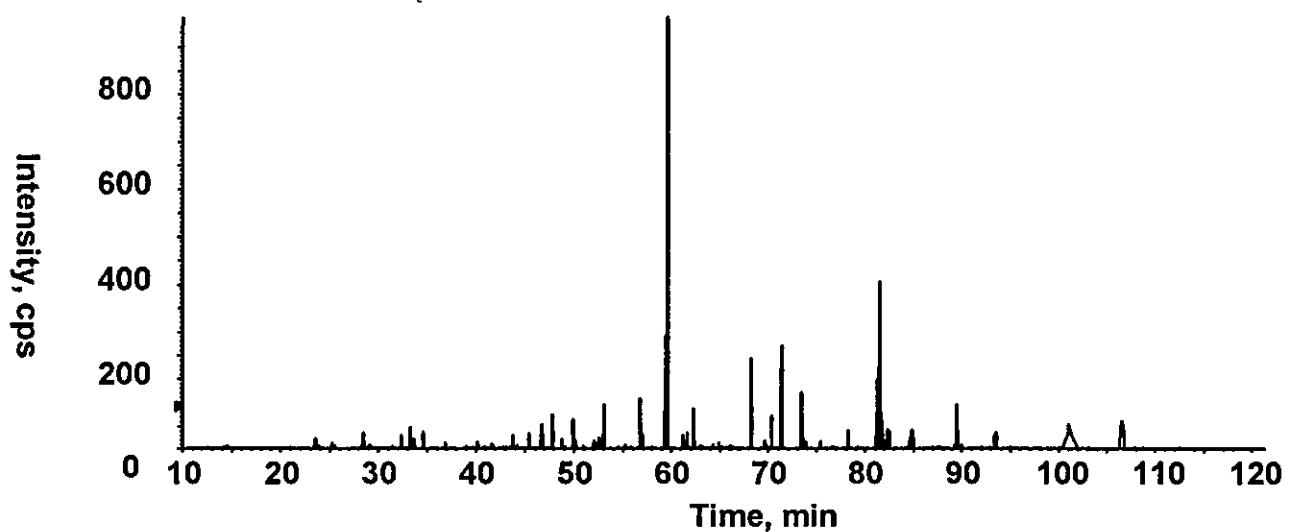
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

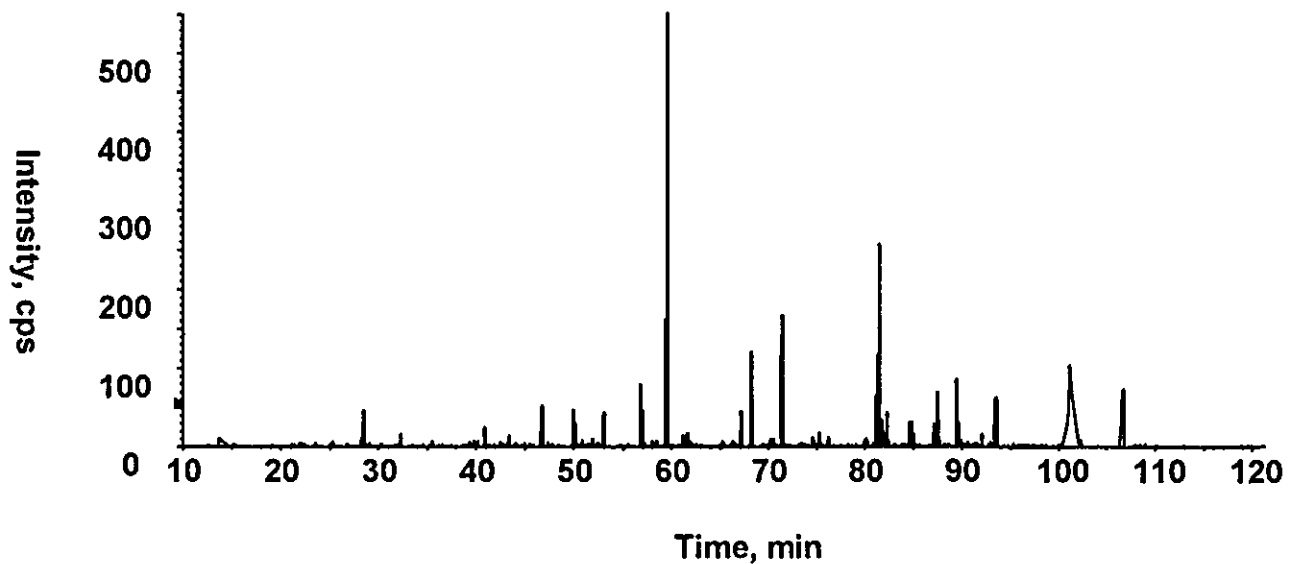
(B) Product ion scan at m/z 100-2000



(C) Product ion scan at m/z 204



(D) Product ion scan at m/z 366



Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
M	131.0	132.0	115.0	2679.4	2662.4
V	99.1	231.1	214.1	2548.4	2531.3
S	87.0	318.1	301.1	2449.3	2432.3
H	137.1	455.2	438.2	2362.3	2345.2
H	137.1	592.3	575.2	2225.2	2208.2
N	114.0	706.3	689.3	2088.1	2071.1
L	113.1	819.4	802.4	1974.1	1957.1
T	101.0	920.4	903.4	1861.0	1844.0
T	101.0	1021.5	1004.5	1760.0	1742.9
G	57.0	1078.5	1061.5	1658.9	1641.9
A	71.0	1149.5	1132.5	1601.9	1584.9
T	101.0	1250.6	1233.6	1530.9	1513.8
L	113.1	1363.7	1346.7	1429.8	1412.8
I	113.1	1476.8	1459.7	1316.7	1299.7
N	114.0	1590.8	1573.8	1203.6	1186.6
E	129.0	1719.8	1702.8	1089.6	1072.6
Q	128.1	1847.9	1830.9	960.6	943.5
W	186.1	2034.0	2017.0	832.5	815.5
L	113.1	2147.1	2130.0	646.4	629.4
L	113.1	2260.2	2243.1	533.3	516.3
T	101.0	2361.2	2344.2	420.2	403.2
T	101.0	2462.2	2445.2	319.2	302.2
A	71.0	2533.3	2516.3	218.1	201.1
K	128.1	2661.4	2644.4	147.1	130.1

M.W. 4882.8
Peptide 2678.4
CHO 2222.8

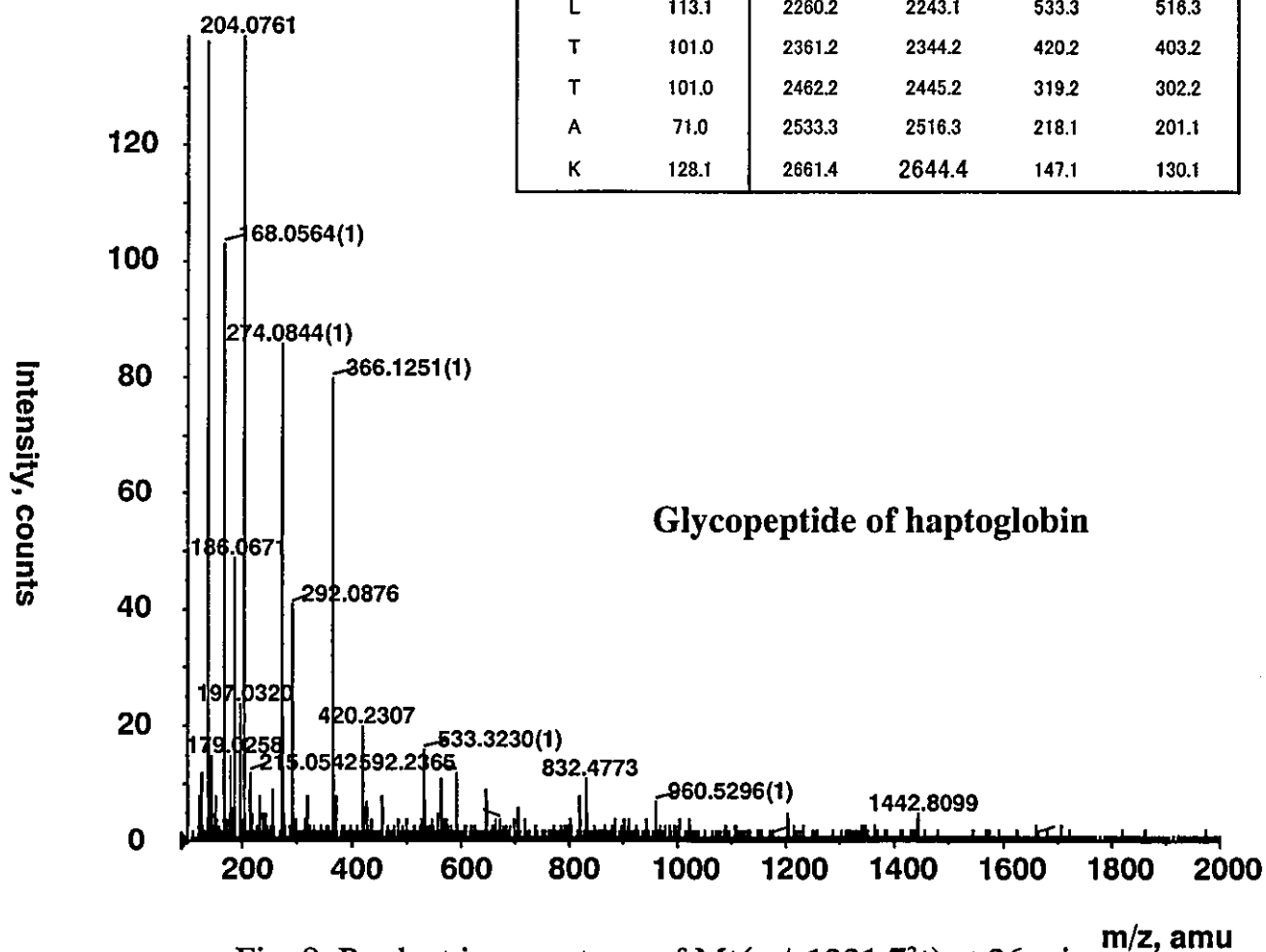


Fig. 8 Product ion spectrum of $M^+(m/z1221.73^+)$ at 26 min m/z, amu

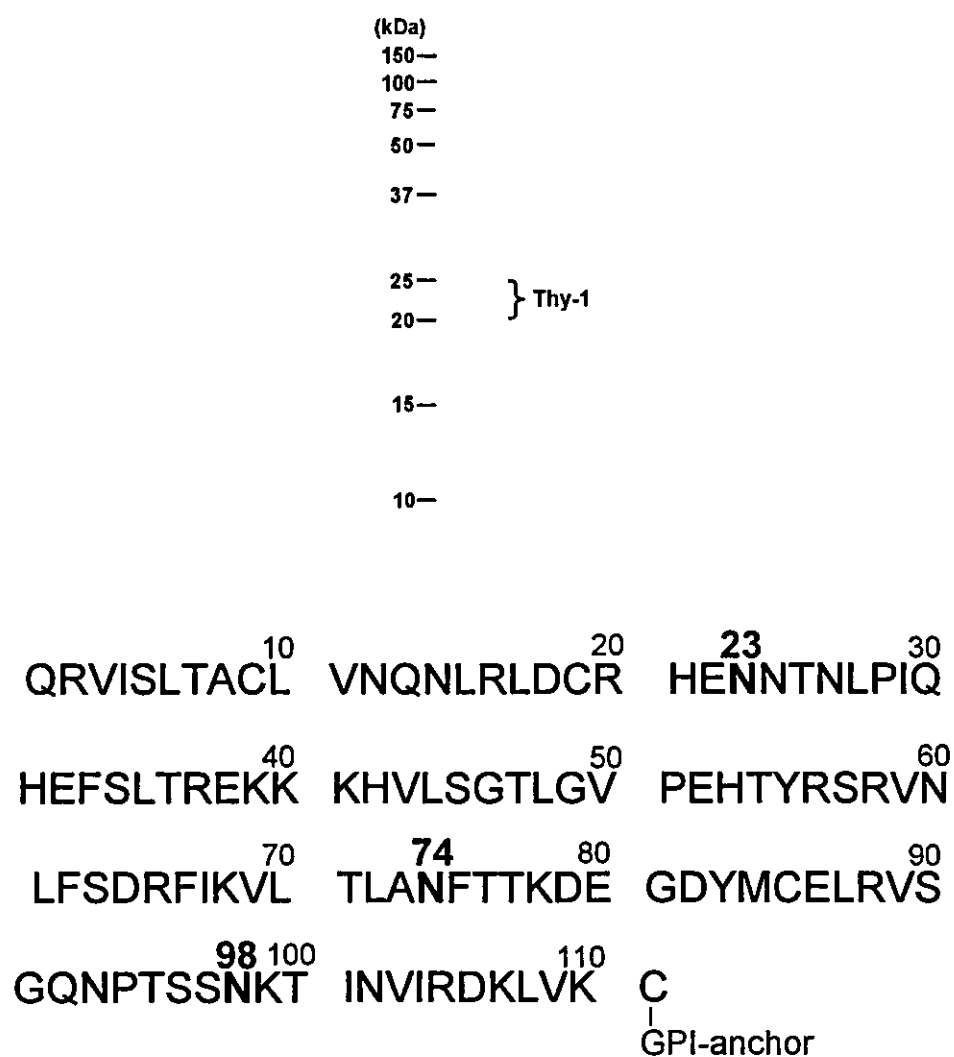


Fig. 9 Separation of soluble GPI-proteins in rat brain by SDS-PAGE, and amino acid sequence of rat Thy-1 (Bold, N-glycosylation site)

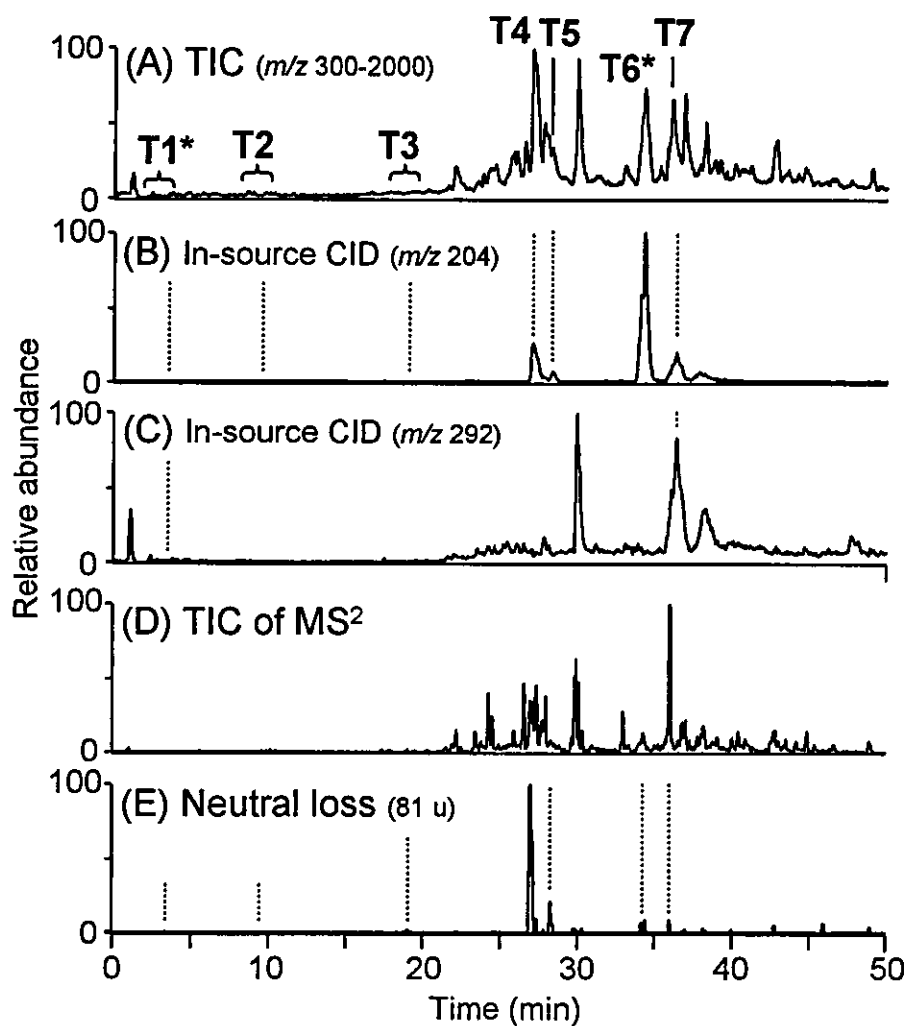


Fig. 10 Total ion (m/z 300-2,000) chromatogram of trypsin-digested Thy-1(A), mass chromatograms of m/z 204(B), and m/z 292(C) ion produced by in-source CID, total ion chromatogram of product ions by data-dependent CID MS^2 (D), and mass chromatogram of neutral loss ions (81 u) by MS^2 (E)

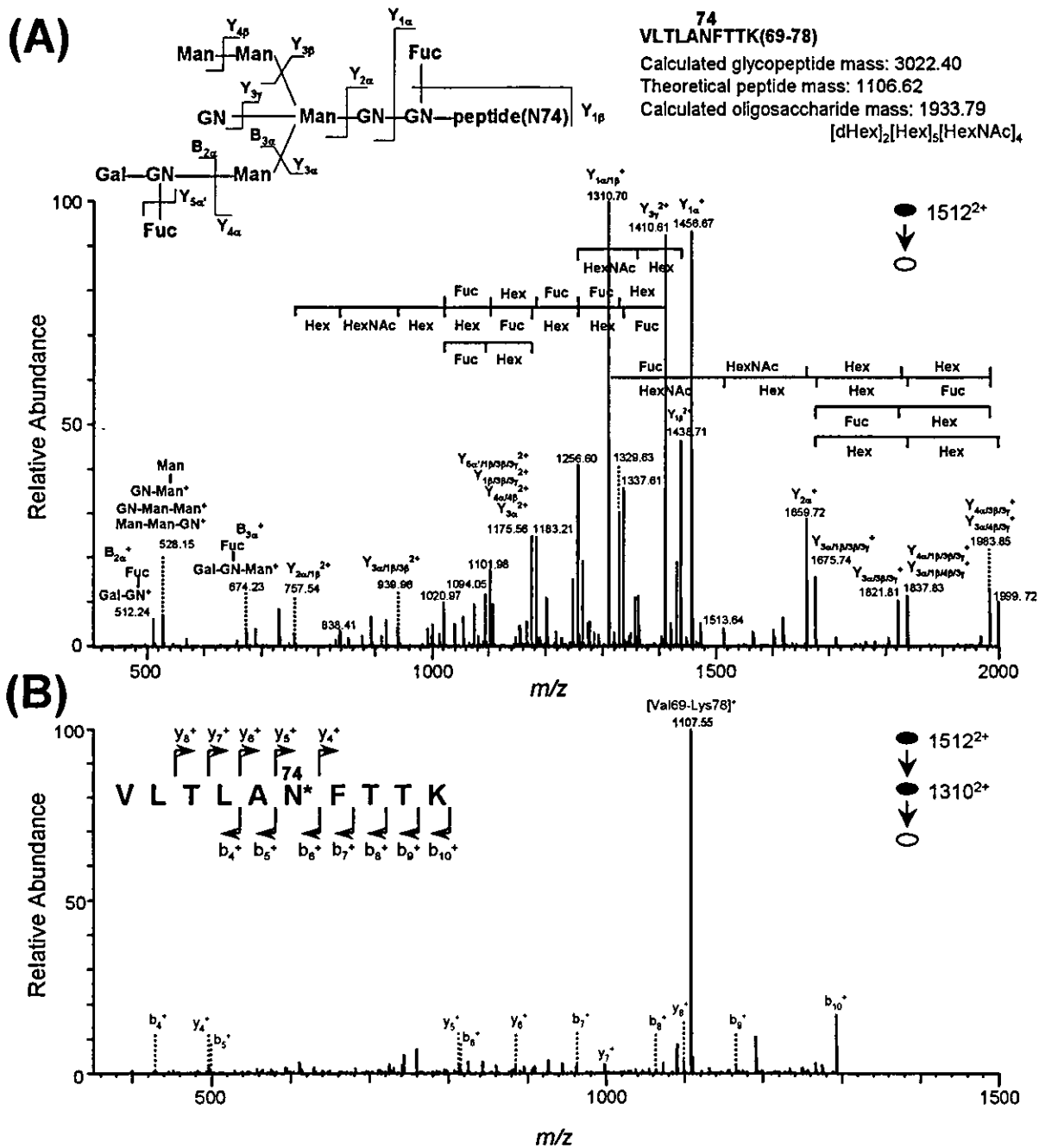


Fig. 11 MS² (A), MS³ (B), and MS⁴ (C) spectrum of glycopeptide ion (*m/z* 1512.21²⁺) in peak T3

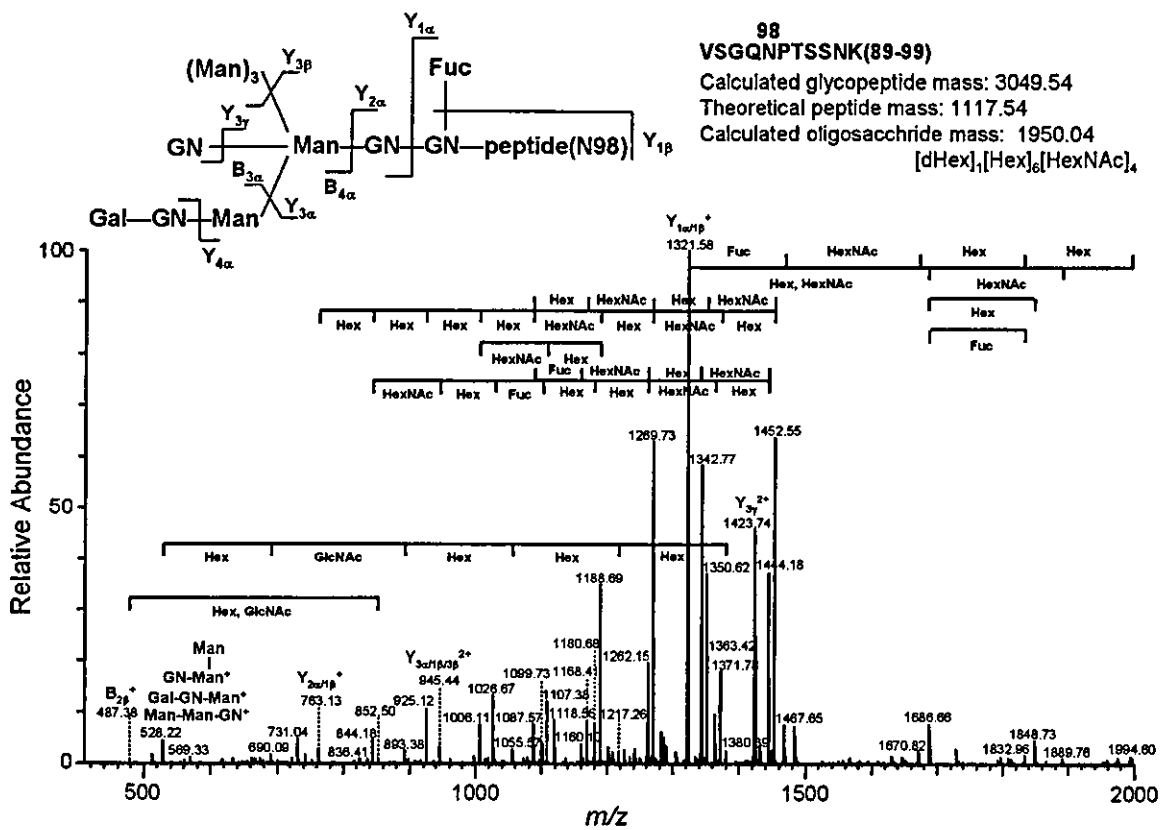


Fig. 12 product ion spectrum of glycopeptide ion (m/z 1525.78²⁺) in peak T1

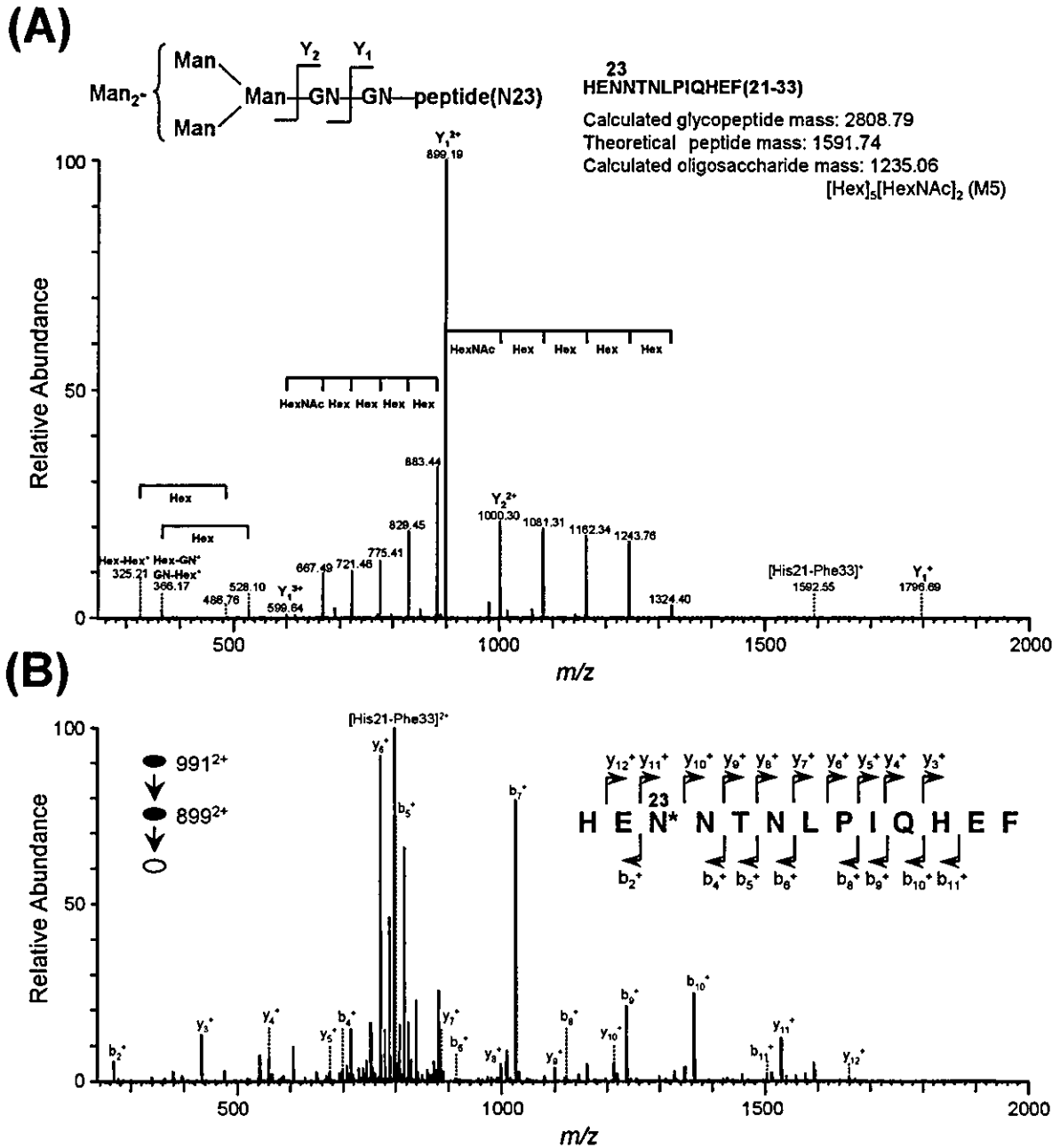


Fig. 13 MS² (A) and MS³ (B) spectra of glycopeptide ion (m/z 937.27³⁺) in peak T4

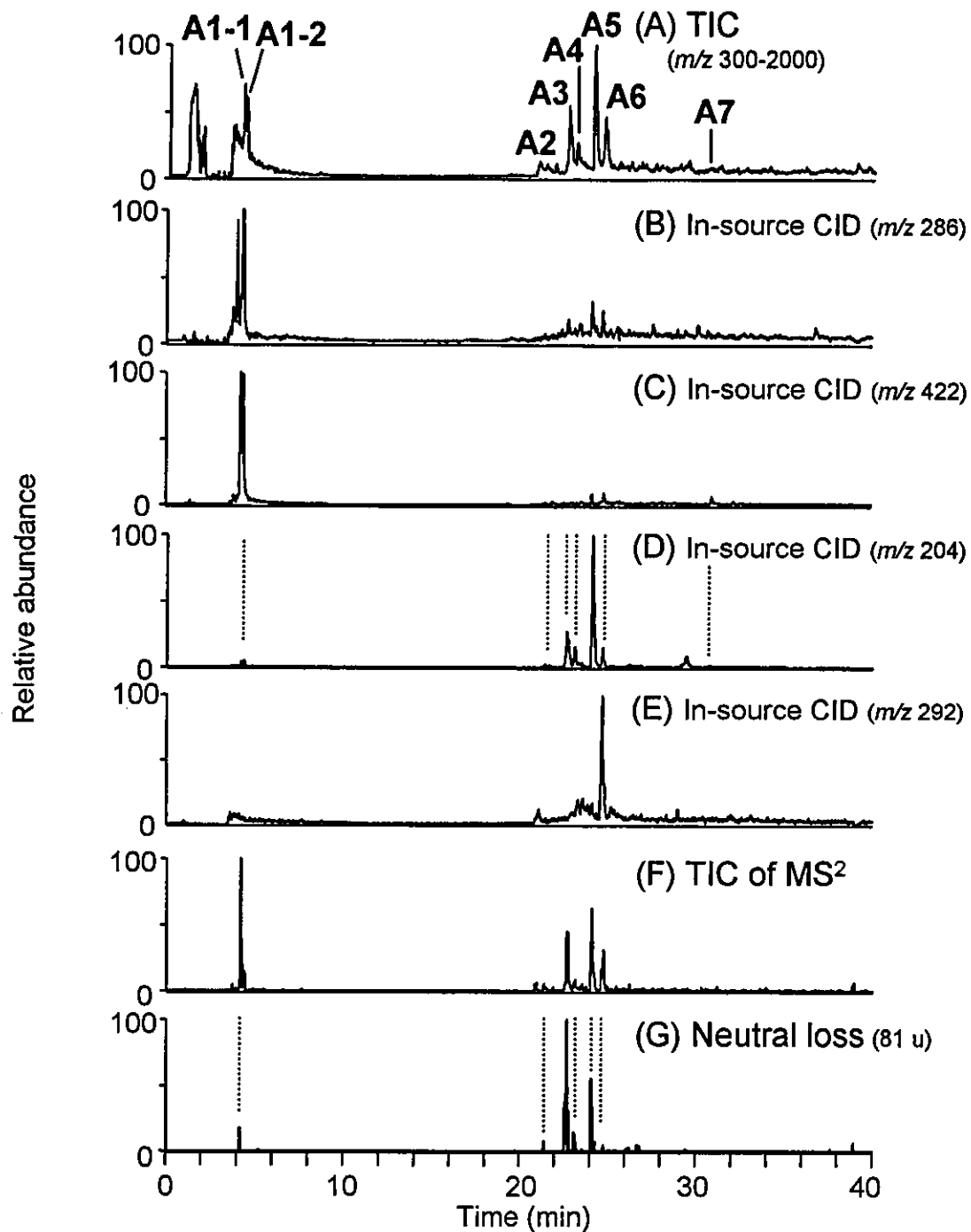


Fig. 14 Total ion (m/z 300-2,000) chromatogram of AspN-digested Thy-1(A), mass chromatograms of m/z 204(B), m/z 292(C), m/z 286 (D), and m/z 422 ion produced by in-source CID, total ion chromatogram of product ions by data-dependent CID MS² (F), and mass chromatogram of neutral loss ions (81 u) by MS² (G)

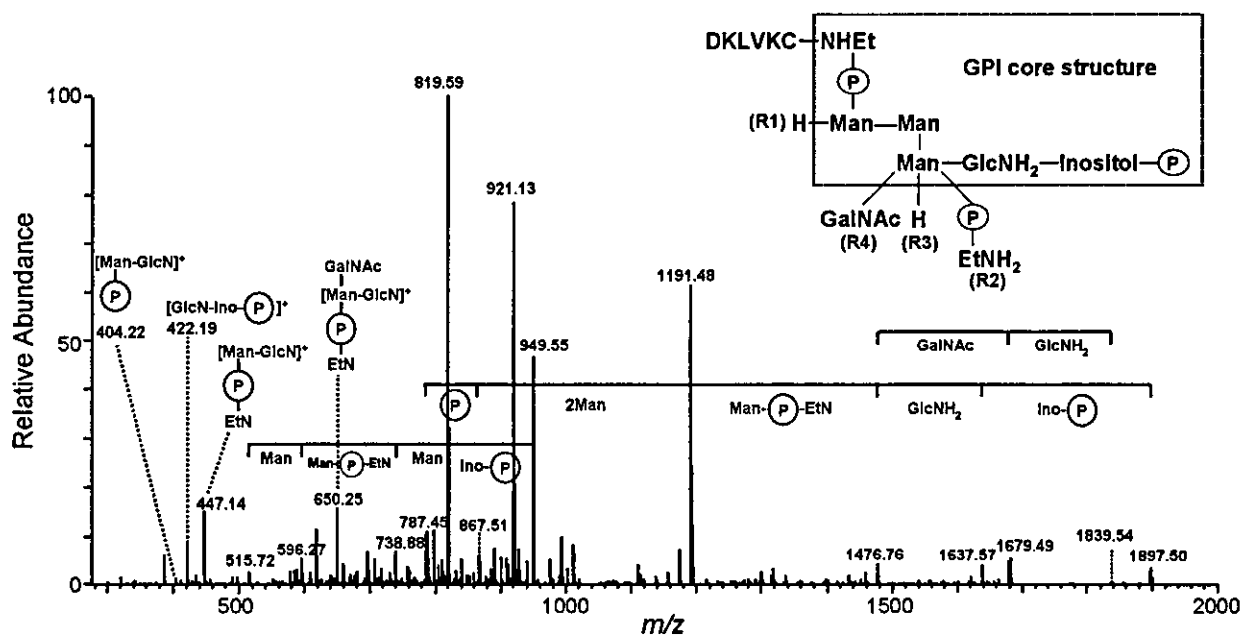


Fig. 15 Product ion spectrum of GPI-peptide (m/z 1050.89²⁺) in peak A1, and 2

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担総合研究報告書

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長）
有賀豊彦（日本大学生物資源科学部農芸化学科教授）

研究要旨

細胞・組織加工医薬品の品質評価法の開発を目的とし、肝細胞の幹細胞と考えられている小型肝細胞において特異的に発現するタンパク質の探索を小型肝細胞と成熟肝細胞のプロテオーム解析および免疫化学的手法により試みた結果、annexin A3 (AnxA3)が小型肝細胞において特異的に発現することが明らかになっている。本知見に基づき AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性について以下のような検討を行った。

まず、両細胞における AnxA3 発現の違いが mRNA レベルによるものかどうか調べることにより、AnxA3 mRNA の小型肝細胞のマーカーとしての有用性について検討した。AnxA3 mRNA レベルは分離直後の小型肝細胞と成熟肝細胞から Total RNA を調製し、RT-PCR 法を用いて測定した。その結果、小型肝細胞から調製した Total RNA において、用いたプライマーから予想されるサイズの位置に PCR 産物を検出した。一方、成熟肝細胞から調製した Total RNA において PCR 産物は検出されなかった。また、両細胞のマーカータンパク質であるアルブミンの PCR 産物は、両細胞において同様な強度で検出された。したがって両細胞における AnxA3 発現の違いは mRNA レベルで調節されていることが明らかになった。さらに、肝細胞の分化マーカーであるチロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) およびトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) についても同様な検討を行ない、ネガティブマーカーとしての有用性について検討した。その結果、各 PCR 産物は両細胞においてほぼ同様な強度で検出された。以上の結果から、AnxA3 mRNA は小型肝細胞のマーカーとして有用であること、並びに TAT、TO は小型肝細胞のネガティブマーカーとして利用できないことが示された。

次に、2-acetylaminofluorene (2-AAF)/carbon tetrachloride(CCl₄)投与ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用い、annexin A3 (AnxA3)について肝幹細胞マーカーとしての有用性について検討を行った。ラットに 2-AAF を 5 日間投与後、CCl₄ と 2-AAF を同時投与した。2-AAF /CCl₄ 同時投与の 2 日後、肝臓の中心静脈域においてアルブミンと AnxA3 共陽性で小型の血球様細胞（小型血球様細胞）が顕著に増加した。その後、その小型血球様細胞における AnxA3 の染色強度は低下し、4 日後にはアルブミンのみ陽性となった。一方、門脈域においても 2-AAF/CCl₄ 同時投与の 2 日後、アルブミンと

AnxA3 共陽性の小型血球様細胞が巣状壊死部位において局所的に発現したが、中心静脈域と比べるとその出現頻度は低く分布も異なっていた。以上の結果から、2-AAF/CCl₄ 同時投与 2 日後、主に中心静脈域においてアルブミンと AnxA3 共陽性の小型血球様細胞が顕著に出現し、その後その細胞はアルブミン陽性、AnxA3 陰性の細胞へ転換する、すなわち肝細胞へ分化するというシナリオが見出される。したがって、AnxA3 は小型血球様細胞が肝細胞に分化誘導される過程の初期のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

協力研究者

有賀豊彦 日本大学生物資源科学部
農芸化学科教授

A. 目的

肝疾患による死亡者は年 4 万人にもものぼる。根治療法として肝移植の有用性は明らかであるが、60 歳以下の移植適応患者は年間 3,500~5,000 人と見積もられている。しかも、適応拡大によって移植適応患者数が急激に増加しており、肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず深刻なドナー不足をもたらしている。したがって、肝ドナーの確保や移植法の改良のみならず、肝移植に代わる治療法の開発は急務の課題となっている。

最近、肝移植に代わる次世代の治療法として、肝幹細胞移植による細胞治療が注目されている。これまで、人工肝臓補助装置の作製が試みられているが、実現には程遠い段階である。一方、強い自己複製能を有し肝細胞へ分化誘導される肝幹細胞の存在が見出され、この細胞を積極的に補充し治療することが実現可能な段階になりつつある。すなわち、肝幹細胞を移植し肝機能を一時的に回復させることで、生体肝移植までの橋渡しや、肝不全の際の代謝補助となることを期待した治療法である。さらに、細胞移植の効率を高めることで、代謝性疾

患における全肝移植に置き換わる方法となりうると期待されている。したがって、細胞移植の成功の鍵は、安全かつ有効な治療用細胞を、十分量確保する方法を確立することである。また、肝幹細胞の調製法が確立されることで、人口肝臓補助装置の研究推進に寄与するものと期待される。

肝幹細胞として、oval cell、骨髄由来細胞、小型肝細胞などがあげられるが、これらの細胞を細胞治療薬として応用しようとする場合、細胞の品質評価法の確立は必須である。すなわち、目的の細胞を単離し増殖させる過程で生じうる目的外の細胞の混在には注意を要する。また、目的の細胞が期待される機能を有する、もしくは機能細胞へと分化しうることを担保することが求められつつあることから、治療用細胞を的確に位置付ける分子マーカーを同定し、適切な評価法を確立することが極めて重要となる。

最近、我々は分離直後の小型肝細胞および肝細胞におけるプロテオミクス、免疫化学的手法を用いた解析により、annexin A3 (AnxA3) が小型肝細胞のみに発現することを見出し、AnxA3 が小型肝細胞のマーカーとして有用である可能性を示した。また、しかしながら、このような両細胞における AnxA3 発現の違いがどのレベルで調節されているかについては不明である。また、

肝幹細胞マーカーとしての AnxA3 の有用性が示唆されたのは小型肝細胞についてのみであり、他の幹細胞についてはその存在も含め不明である。

本研究では、AnxA3 の肝幹細胞マーカーとしての有用性についてさらに以下のような検討を行った。①両細胞における AnxA3 発現の違いが mRNA レベルによるものかどうか調べることにより、AnxA3 mRNA の小型肝細胞のマーカーとしての有用性について RT-PCR 法を用いて検討した。また、成熟肝細胞の分化マーカーであるチロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) およびトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) についても同様な手法により、小型肝細胞のネガティブマーカーとしての有用性について検討を行った。②2-acetylaminofluorene /carbon tetrachloride (2-AAF/CCl₄) を用いたラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用い、AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 分離ラット小型肝細胞および成熟肝細胞における AnxA3、TAT、TO mRNA レベルの検討

1.1 成熟および小型肝細胞の調製

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50×g, 1分遠心した。沈殿として得られた肝細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を3回繰り返して成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞はその細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50×g, 10分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、

150×g, 5分遠心した。沈殿として得られた小型肝細胞と他の非実質細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を3回繰り返した。沈殿として得られた細胞を懸濁後50×g, 2分遠心し小型肝細胞を得た。小型肝細胞はその細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50×g, 24分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。

1.2 Total RNA の調製

Total RNA は QuickPrep[®] Total RNA Extraction kit (アマシャム バイオサイエンス) を用いて、添付の操作法に従い調製した。

1.3 cDNA 合成

一本鎖 cDNA は ThermoScript[™] RT-PCR System (インビトロジェン) を用い、Oligo (dT)₂₀ をプライマーとして Total RNA より調製した。

1.4 PCR 反応

ThermoScript[™] RT-PCR System (インビトロジェン) を用いて PCR 反応 (熱変性: 94°C、30秒、アニーリング: 60°C、30秒、伸長反応: 72°C、1分、サイクル数: 20) を行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列、および予想される PCR 産物の塩基数は以下の通りである。

AnxA3-primers#1:

5'-TTGAGAGCAAGGTGGACAGC-3'
(sense strand),

5'-GCAGCTGTTGGAAGCCATCT-3'
(antisense strand); 1019 bp.

AnxA3-primers#2:

5'-CAAATTCACCGAGATCCTGT-3'
(sense strand),

5'-TGCTGGAGTGCTGTACGAAA-3'
(antisense strand); 472 bp.

TAT primers:

5'-GTCTAGCTGTGTTGGCCAAT-3'

(sense strand),

5'-GTTTCGCTGAAGGATGCTCTT-3'

(antisense strand); 550 bp.

TO primers:

5'-AGAGTACCTGTCTCCAGCAT-3'

(sense strand),

5'-ACCAGGTACGATGAGAGGTT-3'

(antisense strand); 687 bp.

Albumin primers:

5'-AAGGCACCCCGATTACTCCG-3'

(sense strand),

5'-TGCGAAGTCACCCATCACCG-3'

(antisense strand); 652 bp.

GAPDH primers:

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

(sense strand),

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

(antisense strand); 452 bp.

1.5 PCR産物の検出

PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動で分離後、SYBR Green I で染色し、蛍光画像解析装置 (Fluor Imager 595, Molecular Dynamics社) で検出した。

2. ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性についての検討

2.1 実験動物

F344 系雌ラットを 9 週齢で購入し、1 週間予備飼育をした。飼料として CLEA Rodent Diet CE-2 を使い、オートクレーブしたイオン交換水を飲料水としてそれぞれ自由に摂取させた。飼育は 22±2℃、12 時

間の明暗期 (明期 8-20 時) の条件で行った。

2.2 モデル動物の作製

2-AAF を最小容量の DMSO に溶解後、終濃度が 2 mg/ml となるように corn oil に懸濁させた。CCl₄ は 5 倍量の olive oil と混合した。肝幹細胞分化誘導モデルラットとして 2-AAF+CCl₄ 群を設定し、エーテル麻酔下で 1kg 体重当り 10 mg の 2-AAF を 5 日間経口投与した。5 日目には 2-AAF 投与 1 時間後に 100g 体重当り 55 µl の CCl₄ を経口投与した。その後 2-AAF の投与は毎日同様に続け、CCl₄ 投与 2 日後、3 日後、4 日後に屠殺した。対照群として、2-AAF 群、control 群を設定した。2-AAF 群は 2-AAF+CCl₄ 群の CCl₄ 投与の代わりに vehicle として olive oil を投与し、control 群は 2-AAF+CCl₄ 群の 2-AAF 投与と CCl₄ 投与の代わりに vehicle として、それぞれ corn oil、olive oil を投与した。そして、それぞれ 2-AAF+CCl₄ 群の CCl₄ 投与後 3 日目に相当する日に屠殺した。

2.3 ラットの解剖

ラットはネンブタール麻酔下で、四肢を解剖台にビニールテープで固定した。次に頸静脈から採血をして、門脈にカニューレションをした後、冷 PBS (-) を注入し、下大静脈と大静脈を切断して肝臓を灌流した。

2.4 組織の固定、包埋と薄切

PBS (-) 灌流後に摘出した肝臓は、適度な大きさに切断後、4%パラホルムアルデヒド/PBS (-) 溶液中 4℃で固定した。固定後の臓器は包埋カセットに入れて、1 時間以上流水中で洗浄し、70%、80%、90%、100% エタノールを用いて氷上で振とうしながら各々 1 時間 30 分以上脱水処理を行った。最

後のエタノール処理の後、脱水 エタノールに入れ替えて一晚4℃で脱水処理を行った。脱水後のエタノールを3/4 捨て、残ったエタノールに対し約3倍量のトルエンを入れて、30分間室温で振とうした。その後新しいトルエンに交換して、30分間室温で振とう処理を2回行い、予め65℃のウォーターバスで溶解したトルエン：パラフィン(1:1)の中にカセットごと移し変えた。パラフィン溶液を新しいパラフィン溶液に入れ替えた後、水浴中で30分65℃静置するという操作を3回繰り返し、型を用いて包埋した。包埋した試料はマイクロトームで3µmの厚さに薄切し、MASコートスライドグラスに乗せて37℃で一晩乾燥後、4℃で保存した。

2.5 肝組織像の観察

切片を乗せたスライドグラスを染色皿に入れ、染色バットを用いて次の操作を行った。まず、トルエンで10分間処理を2回行い、脱パラフィンした。次に、100%エタノールで3分処理し、続いて100%、90%、70%エタノールで5分処理した。その後、2倍法マイヤーヘマトキシリンで7分処理して核を染色し、流水洗浄を約17分行って色出しを行った。さらに、1%エオジンで2分30秒間処理し細胞質を染色した。純水で洗浄後、70%、90%、100%エタノールで数秒間処理した後100%エタノールで2分間処理し、トルエンで5分間、10分間処理後標本封入剤で封入し光学顕微鏡 ECLIPSE E400 (Nikon) を用いて観察した。

2.6 アルブミン、AnxA3の免疫組織染色

切片を乗せたスライドグラスを染色皿に入れ、染色バットを用いて次の操作を行った。まず、キシレンで5分間処理を3回行

い、脱パラフィンした。次に、100%エタノールで5分間2回処理し、続いて90%、70%エタノール、超純水、TBSの順にそれぞれ5分間処理した。その後、10mMクエン酸ナトリウム buffer (pH 6.0) 中で95℃、5分間処理を2回行い、室温の10mMクエン酸ナトリウム buffer (pH 6.0) に移して20分間冷却した。その後、超純水で2分間処理後同様な操作を繰り返し、切片の周りを防水ペンで囲みTBSを10%正常マウス血清と混合した溶液を用いて1時間室温の湿潤箱中でブロッキング反応を行った。ブロッキング終了後、血清を回収し、1% TBS-Tween 20 (1% TBS-T) で5分間3回洗浄操作を行い、1次抗体として Goat anti-rat albumin IgG と Rabbit anti-human AnxA3 serum を1%マウス血清含有TBSに添加して希釈した溶液を用い、1時間室温の湿潤箱中で静置した。その後、1% TBS-T で5分間3回洗浄した。次に、2次抗体として Cy3-conjugated mouse anti-goat IgG と FITC-conjugated sheep anti-rabbit IgG を1%マウス血清含有TBSに加えて希釈した溶液を遮光した湿潤箱中で添加し、30分間室温で静置した。その後、1% TBS-T で5分間3回洗浄した。最後に標本封入剤で封入して、蛍光顕微鏡 Axioplan 2 and Axiophot 2 Universal Microscopes 下でデジタルカメラ Axio Cam MRm を用いて観察し、解析ソフト Axio Vision 3.1.2 を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 分離ラット小型肝細胞および成熟肝細胞における AnxA3、TAT、TO mRNA レベルの検討

図1は成熟肝細胞および小型肝細胞由来の Total RNA を用いて調製した AnxA3 を含む各種 PCR 産物を示している。なお、これら全ての PCR 産物において、用いた各プライマーから予想されるサイズの位置にバンドが検出された。小型肝細胞において AnxA3 の PCR 産物が検出され、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加した。一方、成熟肝細胞において AnxA3 の PCR 産物は検出されなかった。同様な結果が異なるプライマーを用いた場合においても得られた。TAT および TO については両細胞において PCR 産物が得られ、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加し、両細胞においてほぼ同等であった。アルブミンについては、昨年度両細胞においてタンパク質レベルで同様な発現がみられることを報告したが、PCR 産物についてもほぼ同様な強度で検出された。なお、コントロールとして用いた常在遺伝子である GAPDH の PCR 産物については両細胞において、添加した cDNA に依存して増加し、その強度は両細胞においてほぼ同様であった。

2. ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性についての検討

図2および3における hematoxylin と eosin (H&E) 染色像および免疫組織染色像はコントロールとして 2-AAF および CCl₄ の代わりに oil を投与したものおよび 2-AAF を投与した場合におけるものをそれぞれ示している。図2において肝臓全体で非常に少数の AnxA3 陽性の細胞が検出されたが、その細胞はアルブミン陰性であっ

た。図3においても図1と同等な免疫組織染色像が得られたが、AnxA3 陽性の細胞の出現頻度は低下していた。なお、両 H&E 像において障害は観察されなかった。図4は図2の中心静脈域における免疫組織染色像を拡大したものであるが、アルブミン陽性細胞に比べて、AnxA3 陽性の細胞はごく少数であることが明らかである。

図5は 2-AAF/CCl₄ 投与 2 日後における H&E 染色像および免疫組織染色像を示している。その結果、中心静脈域である第3ゾーンから第2ゾーンにわたり AnxA3 およびアルブミン共陽性で小型の血球様細胞（小型血球様細胞）の顕著な出現が検出された。門脈域においても共陽性小型血球様細胞は検出されたが、その出現頻度は中心静脈域に比べ低かった。また、胆管の一部においてアルブミンあるいは AnxA3 陽性の細胞が検出された。一方、H&E 染色像において第3ゾーンから第2ゾーンにわたり亜広範の細胞壊死が観察された。その虚脱部位には血球系細胞様の形態を呈し、エオジンで赤く染色される小型の細胞が多数観察され、その局在は AnxA3 およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞と一致した。一方、門脈域では一部巣状細胞壊死が観察されたが、大部分は正常な肝組織像を呈した。

図6は 2-AAF/CCl₄ 投与 3 日後における H&E 染色像および免疫組織染色像を示している。その結果、2-AAF/CCl₄ 投与 2 日後の中心静脈域において多数観察された AnxA3 およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞はその数が顕著に減少した。門脈域においては 2-AAF/CCl₄ 投与 2 日後に一部巣状壊死部位に局在していた共陽性の小型血球様細胞はみられなくなった。一方、