

伊藤雄一郎 論文内容の要旨

主論文

Influence of serum from rats with fulminant hepatic failure on hepatocytes in a bioartificial liver system

劇症肝不全ラット血清の人工肝臓システム内肝細胞に及ぼす影響

伊藤雄一郎、江口 晋、蒲原行雄、犬尾浩之、山之内孝彰、奥平定之、
矢永勝彦、古井純一郎、兼松隆之

The International Journal of Artificial Organs. 27 巻 4 号 303-10 2004 年.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：兼松 隆之教授)

緒 言

劇症肝不全は生来健康な患者対し、急激に肝細胞が破壊されて肝臓の機能が不全となった状態であり、合併症として脳浮腫をきたし死に至る例が多い。致命的病態をきたす原因物質は同定されていないが、肝細胞でのみ代謝されると言われている。近年、劇症肝不全の治療として肝移植は確立してきているが、供与臓器の不足や肝不全の進行により、数多くの人々がその機会を逸している。近年種々の人工肝臓システムが、劇症肝不全状態から肝移植までの橋渡しの役割や、不全肝の再生を促す目的で開発され、実際に臨床的に有効であることも証明されている。しかしながら肝細胞を用いた、人工肝臓内の細胞レベルでの検証はされていないのが現状である。劇症肝不全血清内には TNF- α 、IL-1、IL-6 等の炎症性サイトカインや Hepatocyte growth factor (HGF) や Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) などの各種サイトカインが含まれていることが知られている。しかし、*in vitro* において劇症肝不全血清下での肝細胞の機能的変化については過去の報告では明らかになっていない。また劇症肝不全患者血清の人工肝臓システム内肝細胞への影響については、ほとんど報告がなくその詳細は不明である。そこで今回我々は、劇症肝不全血清を含む回路内での肝細胞の変化が明らかになれば、さらに効果的な人工肝臓回路を作成する可能性があると考え、特に遺伝子発現に注目して以下の検討を行った。

対象と方法

劇症肝不全モデル血清

雄性 Lewis ラット(300 ~ 350g)を使用。全肝の 68%部分を切除し、残存した 24% (右葉) 部分は血行を遮断して壊死肝を作成にした (江口ら、Hepatology 24 巻:P.1452-9、1996 年)。18 時間後に動脈採血し、血清を分離した。コントロールには非手術群の血清を用いた。

肝細胞分離

同系の雄性 Lewis ラット(150 ~ 200g)から EDTA/Collagenase による 2 段階方法により

肝細胞を分離した。Percoll を用いて死細胞を除去し、トリパンブルーで Viability を計測した。

人工肝臓システム

1×10^8 個の肝細胞を 37 の培養条件で Collagen 被覆された微小ビーズに接着させ、4 時間後に hollow fiber module に充填した。システム内に劇症肝不全モデル血清、あるいはコントロール血清を満たして 6 時間システム内を循環させた（それぞれ劇症肝不全モデル群、コントロール群とする）。

相対的 mRNA 発現量

劇症肝不全モデル群とコントロール群において、システム内循環前後の肝細胞における Albumin、GST A1、CYP 1A2、OTC、c-fos 遺伝子(m-RNA)の発現量差を RT-PCR 法で計測した。内部コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。発現量はデンシトメーターを用い、減少率で評価した。

免疫染色(PCNA)

劇症肝不全モデル群とコントロール群において、システム内循環前後の肝細胞の PCNA 陽性細胞を抗 PCNA 抗体を使用して算出した。

結 果

肝補助機能

劇症肝不全モデル群において、アンモニア値、総ビリルビン値は循環後に循環前と比較して有意に減少していた。AST 値については循環後に循環前と比較して有意に増加していた。

相対的 m-RNA 発現量

Albumin、GST A1、CYP 1A2 において劇症肝不全モデル群がコントロール群と比較して循環後の減少率が有意に高かった。OTC、c-fos については有意差は認められなかった。

PCNA Labeling Index

PCNA 陽性細胞は、コントロール群において劇症肝不全モデル群と比較して循環後に増加していたが、両群間で差は認められなかった。

考 察

人工肝臓は劇症肝不全血清を浄化したが、人工肝臓内肝細胞もダメージを受けていることが分かった。また劇症肝不全モデル血清には様々な正・負のサイトカインが不均衡な状態（サイトカインストーム）で混在しており、特に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの存在が際立っている。その影響下では Albumin、GST A1、CYP 1A2 などの肝特異的機能が低下することが分かった。

増殖遺伝子である c-fos は、コントロール群と比較して差がないことから Stat3 の刺激により Stat3 伝達経路に Negative Feed Back 機構がかかり、DNA 合成の時点で増殖が抑えられていると考えられた。

このように劇症肝不全患者の血清は、患者自身の肝細胞の遺伝子発現に負の影響を与えている可能性が示唆された。また活性炭や透析膜を利用しサイトカインを除去することで人工肝臓の効率を向上させ、致命的な病態（脳浮腫）などを引き起こす毒性物質を効率よく肝細胞に代謝させることが出来ると考えられる。