

劇症肝炎患者血中のラット肝細胞DNA合成抑制活性

山 田 春 木

## (目次)

はじめに-----	2
対象および方法-----	3
成績-----	8
考案-----	14
文献-----	17
謝辞-----	22



(はじめに)

今回の研究においては、劇症肝炎患者血液中に肝再生を抑制する因子が出現するかどうかを、初代培養肝細胞を用いて検討した。まず、研究の背景となる劇症肝炎患者血液中の肝再生促進因子および抑制因子に関する現時点での知見と、これまで著者らがすすめてきた抑制因子の分析結果について述べてみたい。

劇症肝炎(fulminant hepatic failure; FHF)は、急激におこる肝広範性壊死に基づいて急速に肝不全症状が現れる肝炎である<sup>1)</sup>。わが国では第12回犬山シンポジウム(1981年)においてその定義がなされており<sup>2)</sup>、年間の発症は推計2,000-4,000例、生存率は20%前後の大変予後の悪い疾患である。

肝臓は旺盛な再生力を有する臓器である<sup>3) 4)</sup>。臨床の場合において肝臓は、ウイルス性肝炎や薬剤性肝障害等による肝細胞壊死、あるいは肝切除術に際し、速やかな機能の改善と画像検査上の容積の回復を示す。ラットにおいては実に90%の部分肝切除の後でも良好な肝再生を認めたという報告もある<sup>5)</sup>。一方、80%以上の機能的肝細胞容積(hepatic functional cell mass)脱落が起こっている<sup>1)</sup> FHF患者においては、肝再生はきわめて不良である。その背景には、FHF患者では常に肝再生を上回る量の肝細胞壊死が進展しているか、あるいは肝再生そのものを阻害する病態が生じているのか、いずれかが介在すると考えられる。

肝再生現象は何らかの液性因子によって駆動されるらしいことが、30年以上前から肝移植や体液交流実験から示唆されていた。近年 Gohda et alにより、FHF患者血中から肝細胞増殖因子(human hepatocyte growth factor; hHGF)が精製された<sup>6)</sup>。hHGFは、それ以前に Nakamura et alによりラット血小板から精製されたHGF<sup>7)</sup>と構造的に同一であり、in vitroでの強力な肝細胞DNA合成促進作用を有している。最近の報告では、in vivoにおいてもHGFは肝再生促進作用を認めたという<sup>8)</sup>。しかしながら、FHF患者では肝性昏睡度が高くなる程、血中HGFは高値であり、死亡群においても、むしろ生存群をはるかに上回る量のHGFが血中に存在していた<sup>9)</sup>。これらの症例では血中に肝再生促進因子が十分に存在するにもかかわらず肝機能の回復が遅延ないし欠如しており、新たな病態解明が待たれている。

液性の肝再生抑制物質がFHFで出現する可能性は、以前から考えられてきた<sup>10)</sup>。1970年代から1980年代前半にかけて、Haas, Hughes, GoveらによりFHF患者血清によるウサギ肝細胞接着阻害<sup>11)</sup>、新生児ラット培養肝細胞DNA合成抑制<sup>12)</sup>、および部分肝切除ラット残存肝遊離肝細胞におけるDNA合成抑制<sup>13)</sup>が報告された。しかし、そ

の後これらの抑制作用を有する物質を部分精製したという報告はなく、詳細については明らかにされていない。

著者は1985年 Hughes、Goveの属する研究室に留学し、FHF患者血中に肝再生抑制物質が存在するかどうか、また抑制物質が存在するならば肝再生促進因子とのバランスはどのようになっているか、とのテーマで研究を開始した。研究は、肝再生の旺盛な状態および肝再生が静止状態の動物にFHF患者血清を注射することから着手し、FHF患者血清が70%部分肝切除ラット残存肝のDNA合成をin vivoで抑制することを報告した<sup>14)</sup>。同血清注入により正常肝ラットでのin vivo DNA合成促進作用は認めなかった。この抑制活性はFHF患者間では、肝機能の回復が悪く予後不良とされる<sup>15)</sup> 病因患者群(非A非B型肝炎およびハロセン肝炎)において、予後が比較的良好な病因患者群(A型およびB型肝炎、パラセタモール肝障害)に比し有意に高値であった<sup>16)</sup>。更に血清を膜ろ過で分画したところ、抑制活性は10kD以下の分画に認められた<sup>14)</sup>。

以上のFHF患者における肝再生促進および抑制物質の研究の流れを基に、今回の研究を進めていった。1980年代半ば以降、初代培養肝細胞を用いた実験方法が確立し肝再生の研究は飛躍的に進歩した。今回の研究は、in vivoの系において分子量10kD以下のFHF患者血清分画に認められたDNA合成抑制活性を、初代培養肝細胞を用いて確認することから着手した。

### (対象および方法)

#### 実験材料

コラゲナーゼは和光純薬、William's medium E (WE)はフローラボラトリー社、インスリン (I) およびマウス上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor; EGF)はコラボラティブリサーチ社のものを用いた。ダルベッコ変法イーグル培地は日水製薬、ウシ胎児血清(FCS)はギブコ社製を用いた。[メチル-<sup>3</sup>H]チミジン(1TBq/mmol)と[<sup>3</sup>H-U]ロイシン(5.7TBq/mmol)はアマシャム社のものを用いた。NR-M2薬剤はコニカ社のものを用いた。PM10膜、セントリコン10およびセントリコン3はアミコン社より購入した。6穴プラスチック培養皿はコーニング社のものを用いた。リコンビナントhHGFは宮崎医大坪



内博仁先生と三菱化成株式会社のご好意によりいただいた。NIH3T3細胞は本学細菌学教室岩本愛吉先生がNIHのDr. S. Aaronsonより譲り受けたものをいただいた。

## 対象

### (1) イギリス人患者 プール血清ろ液

King's College Hospital (London)のLiver Failure Unitに入院したFHF患者9例(男性2名、女性7名)より、血清をTrey & Davidsonの定義<sup>1)</sup>による肝性脳症3度以上を呈した時点で採取した。採血時の臨床データを表1に示す。患者の平均年齢は36才(15才-63才)だった。FHFの病因はパラセタモール(acetaminophen)中毒2例、非A非B型肝炎1例、B型肝炎1例、ハロセン肝炎2例その他3例であった。健常者9名(男性5名、女性4名、平均年齢28.6才 範囲 23才-34才)より血清を採取し正常コントロールとした。血清は-70℃で保存した。

血清検体を解凍した後、各々3mlをプールし、FHF患者および正常者プール血清を作成した。プール血清を窒素ガス圧下でアミコンPM10膜で膜ろ過(カットオフ10kD)した。約80容量%がろ過された。得られたろ液をミリポアフィルター(0.2μm)で滅菌した後9分割し、凍結乾燥の後-20℃にて保存した。一本の凍結乾燥検体は元のプール血清3mlに相当するが、実験に際しては1mlのガラスイオン蒸留水に再溶解して使用した。

表1 血清採取時のイギリス人劇症肝炎患者の臨床背景

Case no.	Age (yr)	Sex	Pathogenesis	Coma grade	PT (INR)	Kidney failure*	Outcome
1	29	F	HBV	4	10.7	-	Died
2	15	M	Drug reaction	4	2.1	+	Died
3	30	F	NANB	4	14.8	-	Died
4	36	F	Acetaminophen	4	5.3	+	Died
5	63	F	Halothane	4	4.7	+	Died
6	30	F	Drug reaction	4	7.6	-	Died
7	27	F	Acetaminophen	4	4.5	-	Died
8	60	F	Halothane	3	3.4	-	Died
9	25	M	EBV	4	4.5	-	Died

NANB, non-A, non-B hepatitis; INR, international normalized ratio; EBV, Epstein-Barr virus.

In patients 4 and 7, blood levels of acetaminophen were 89 and 201 μg/ml, respectively, on admission to the referring hospital, and blood samples were taken on day 5 and day 4, respectively.

\*Urine volume < 300 ml/day, serum creatinine > 300 μmol/L.

## (2) 個々の日本人患者血漿ろ液

1981年から1990年の間に東大病院および昭和大学藤ヶ丘病院に入院した、犬山シンポジウムのFHF診断基準<sup>2)</sup>を満たす患者9例について初回血漿交換療法<sup>17)</sup>時の血漿を採取した。発症から血漿交換療法開始までは平均23日(3日-39日)であり、この時点までに全例がTrey & Davidsonの定義<sup>1)</sup>による肝性脳症2度以上を呈していた。患者の平均年齢は45才(30才-56才)であった。FHFの病因はウイルス肝炎8例(非A非B型またはC型6例、B型2例)、急性妊娠脂肪肝1例であった。検体採取時の臨床データおよび剖検例での肝重量を表2に示す。採取した血漿はただちに凍結し、-20℃で保存した。

血漿検体は、解凍後それぞれ2ml、セントリコン10カートリッジに入れ、4℃、5,000gで24時間膜ろ過(カットオフ10kD)した。セントリコン10とPM10の分画分子量は同じである。前者は小容量の検体の膜ろ過に用いられる。日本赤十字社製新鮮凍結血漿11ロットをセントリコン10で同様に膜ろ過し、正常コントロール血漿ろ液群とした。平均ろ液容量は原血漿の81%(79%-84%)であった。ろ液はミリポアフィルター(0.2μm)を通した後、-80℃で保存した。

表2 血漿採取時の日本人劇症肝炎患者の臨床背景

Case no.	Age (yr)	Sex	Pathogenesis	PT (INR)	Kidney failure <sup>c</sup>	Plasma exchange (days)	Coma grade	Outcome	Autopsy	
									Days <sup>b</sup>	Liver wt (gm)
1	46	M	HCV	1.38	-	34	4	Died	127	1,040
2	52	F	NANB	1.72	-	27	3	Died	47	950
3	55	M	HBV	1.72	-	28	3	Died	31	730
4	40	F	HCV	1.59	-	29	2	Died	51	320
5	30	F	HCV	1.51	-	20	2	Died	133	210
6	49	F	HCV	1.72	-	9	2	Survived		
7	56	F	HCV	1.90	-	14	3	Survived		
8	41	M	HBV	1.59	-	39	3	Died		ND
9	40	F	AFLP	1.55	+	3	2	Survived		

HCV, hepatitis C virus; INR, international normalized ratio; NANB, non-A, non-B hepatitis; AFLP, acute fatty liver of pregnancy; ND, not determined.

<sup>a</sup>Urine volume <300 ml/day, serum creatinine >300 μmol/L.

<sup>b</sup>Days from clinical onset.

## セントリコン3による血漿ろ液の分画

症例2および3(表2)の血漿ろ液それぞれ1.8mlをセントリコン3カートリッジに入れ、4℃、5,000gで24時間膜ろ過(カットオフ3kD)した。膜保持分画はカートリッジを反転倒置し遠心して回収した。保持分画、ろ過分画それぞれの肝細胞DNA合成への作用は、セントリコン10ろ液検体同様以下に述べる方法で測定した。



#### 成熟ラット肝細胞の初代培養

成熟雄性ウイスター系ラット (体重180-200g) からSeglenの方法<sup>18)</sup>により0.05%コラゲナーゼを用いて肝実質細胞を分離した。生存率はトリパンブルー排除で算定し、90%以上の生存率の細胞集団を実験に使用した。肝細胞は100U/mlペニシリン、100 $\mu$ g/mlストレプトマイシン(SM+PC)、5%FCSを含むWEに浮遊させ、直径35mmコーニング社6穴培養皿に $2 \times 10^4$ /0.2ml/cm<sup>2</sup>の密度で播き、5%CO<sub>2</sub>-95%空気の飽和水蒸気下37℃で単層培養した。

#### 培養手順

培養開始3時間後、SM+PC、5%FCSの他に $10^{-7}$ molインスリン、10ng/mlEGF (I+E)を含んだWE培地に培地交換し、培養皿に付着していない細胞を取り除いた。実験の一部は5%FCSを含まない培地で、一部はI+Eの代わりにリコンビナントhHGFを加えた培地で培地交換した。

臨床検体は、培養3時間目培地交換直後に添加した。3分の1に濃縮再溶解されたブール血清ろ液の成熟ラット肝細胞DNA合成への作用は、2.7%NaCl溶液を等容量添加し測定したベースラインDNA合成と比較した。一方血漿ろ液は、生理食塩水を等容量添加し測定したベースラインDNA合成と比較した。実験が2日以上に及ぶ場合、培地は24時間毎に交換した。肝細胞核数はNakamura et alの方法<sup>19)</sup>により算定した。

#### 成熟ラット肝細胞のDNA合成活性の測定

DNA合成活性の測定はMcGowan et alの方法<sup>20)</sup>によって行った。培養24ないし48時間目に37kBq/ml (100kBq/ $\mu$ mol)の<sup>3</sup>H]チミジンを培地に加えて37℃で2時間パルスラベリングを行い、DNAへの取り込みを測定した。ラベリング後、細胞層を氷冷生理食塩水で2回洗浄後10%トリクロル酢酸(TCA)および95%エタノールで洗浄し室温下で乾燥させた。乾燥後細胞をNaOHに溶解し、その一部をとり、蛋白質の定量と液体シンチレーションカウンターによる加熱TCA可溶分画の放射活性の測定を行った。蛋白質の定量は牛血清アルブミンを標準として用い、Lowry et alの方法<sup>21)</sup>で行った。DNA合成活性はdpm/ $\mu$ g蛋白質/時で表した。

#### オートラジオグラフィー

オートラジオグラフィーは以下のように行った。21時間<sup>3</sup>H]チミジン(37kBq/ml、100kBq/ $\mu$ mol)でラベル後、培養皿をPBSで2回洗浄し、Gendre液で固定した。Sakura NR-M2乳剤でディッピングを行い17日間暗室で露出させた。

#### 培養液中のLDH活性の測定

血液ろ液検体の細胞障害性の有無を検討する為、培養3時間目にブール血清ろ液 $50\mu\text{l}$ /培養皿または血漿ろ液 $450\mu\text{l}$ /培養皿を加えI+E、5%FCS存在下で更に23時間培養した。得られた培養上清を軽く遠心して浮遊細胞を取り除いた後、上清中のLDH活性をWorblewski et alの方法<sup>22)</sup>により測定した。

#### 成熟ラット肝細胞の蛋白合成活性の測定

蛋白合成活性は $^3\text{H}$ ロイシンの細胞内蛋白への取り込みにより求めた。培養手順に従って5%FCS、I+E添加WEで23時間培養した後、培地をFCSを含まないI+E添加WEに交換し、 $37\text{kBq}/\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ ロイシンを添加後更に3時間培養した。培養26時間目細胞層を氷冷生理食塩水で2回洗浄した後、 $1\text{N NaCl}$   $1.5\text{ml}$ で溶解した。肝細胞内蛋白中の $^3\text{H}$ ロイシン活性はNakamura et alの方法<sup>23)</sup>により測定し、 $\text{dpm}/\mu\text{g}$ 蛋白質/時で表した。

#### 線維芽細胞のDNA合成の測定

線維芽細胞のDNA合成活性は肝細胞と同様の手順で測定した。NIH3T3細胞を10% FCS、SM+PC添加ダルベッコ変法イーグル培地で継代培養した。実験に際しては、細胞を $1\times 10^4$ 個/ $\text{cm}^2$ で24時間新鮮な培地で培養した後、更に血清非存在下で24時間培養した。再び10%FCS添加培地に交換した後血漿ろ液を6-23容量%で培地中に添加した。

#### 統計

実験成績は平均 $\pm$ S.D.で表した。有意差検定はStudent's tテストを用い、危険率5%以下を有意差とした。



(成績)

成熟ラット初代培養肝細胞のDNA合成は、I+E刺激により培養開始24時間目には、I+E非刺激の場合に比し有意( $p < 0.001$ )に上昇し、48時間目に最大となった(図1A、1B)。5%FCSの添加によりDNA合成活性は、血清非添加に比べ時間経過不変で有意( $p < 0.01$ )に増加した(図1A)。肝細胞数は3日目の時点でよく維持されていた(図1B)。以上の検討より、臨床検体の肝細胞DNA合成活性への作用は、I+Eおよび5%FCSを加えた培地で、培養開始24時間目、あるいは48時間目、あるいはその双方の時点で測定した。この培養条件で40  $\mu$ l/wellまでの2.7%NaCl溶液の培養液への添加、あるいは600  $\mu$ l/wellまでの生理食塩水の添加は、DNA合成活性に有意の変動を与えなかった(データは省略した)。

図1A 成熟ラット初代培養肝細胞のDNA合成活性の時間経過

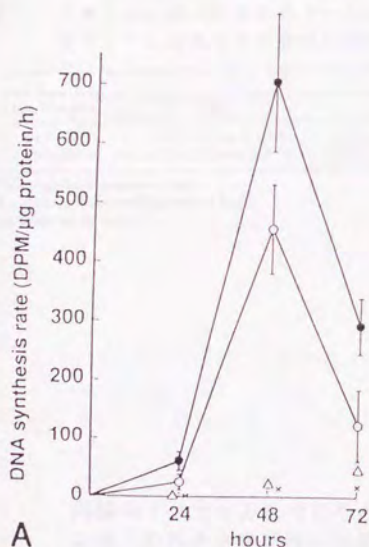
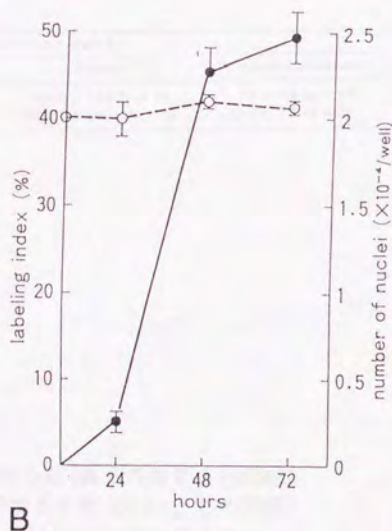


図1B 細胞数、ラベリングインデックスの時間経過



培養3時間目、以下の培地に交換した。

●: I+E, 5%FCS, WE ○: I+E, WE △: 5%FCS, WE

また、10mmol/L hydroxyureaを添加し(x)、

backgroundを測定した。m ± S.D. n=3

培養3時間目、培地をI+E, 5%FCS加WEに交換した。

○: 細胞数 ●: labeling index % m ± S.D. n=3

FHFプール血清ろ液40  $\mu$ l/well添加で、DNA合成活性はベースラインと比較しほぼ完全に抑制され、10mmol/Lハイドロキシウレア添加により求めた非特異的な $^3$ H]チミジン取りこみのレベルまで低下した(表3)。この抑制は用量依存性で、FHFプール血清ろ液2.7  $\mu$ l/wellで明かな活性が検出され、35  $\mu$ l/wellで最大となった(データは省略した)。一方、正常者プール血清ろ液40  $\mu$ l/wellを投与してもDNA合成活性はベースラインと差がなかった(表3)。以上の成績はオートラジオグラフィーによっても確かめられた。35  $\mu$ l/well FHF血清ろ液添加で、培養開始27時間目から48時間目にかけての $^3$ H]チミジンのラベリングインデックスは1%以下であった。ベースラインおよび正常者プール血清ろ液のラベリングインデックスはそれぞれ45.5% $\pm$ 1.9%と48.9% $\pm$ 3.3% (n=3)であった。

表3 イギリス人劇症肝炎患者プール血清ろ液(Mr<10kD)のラット肝細胞DNA合成抑制活性

$^3$ H] thymidine labeling (hr)	DNA synthesis (dpm/ $\mu$ g protein/hr)			
	FHF	Normal	Baseline	10 mmol/L hydroxyurea
24 to 26	4.5 $\pm$ 0.8 (n = 5) <sup>a</sup>	60.0 $\pm$ 16.9 (n = 5)	64.6 $\pm$ 16.6 (n = 5)	4.9 $\pm$ 0.9 (n = 4) <sup>b</sup>
48 to 50	10.2 $\pm$ 2.2 (n = 5) <sup>c</sup>	637.3 $\pm$ 220.1 (n = 5)	609.7 $\pm$ 106.1 (n = 5)	13.1 $\pm$ 7.8 (n = 3) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Data expressed as mean  $\pm$  S.D.

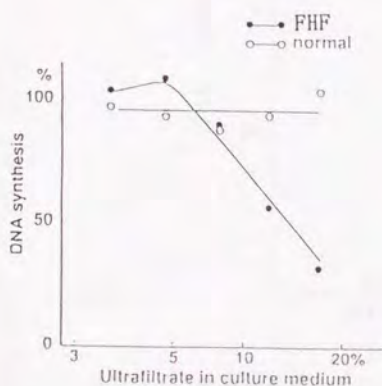
<sup>b</sup>p < 0.01 vs. baseline (Student's t test).

<sup>c</sup>p < 0.001 vs. baseline.

同様のアッセイ方法で日本人FHF患者血漿ろ液(表2の症例2)添加により、DNA合成活性は用量依存性に抑制された(図2)。この用量依存性の抑制はオートラジオグラフィーによっても確かめられた。同FHF患者血漿ろ液300および600  $\mu$ l/wellの添加によりベースライン(47%)はそれぞれ15%および1%以下に低下した。新鮮凍結血漿ろ液にはDNA合成抑制活性はみられなかった(図2)。

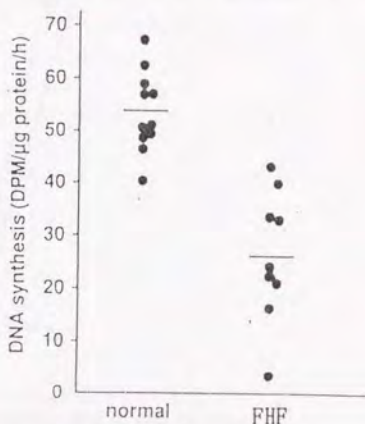


図2 劇症肝炎患者血漿ろ液(表2、症例2)のラット肝細胞DNA合成抑制活性



% of the baseline value, 2穴の平均値。

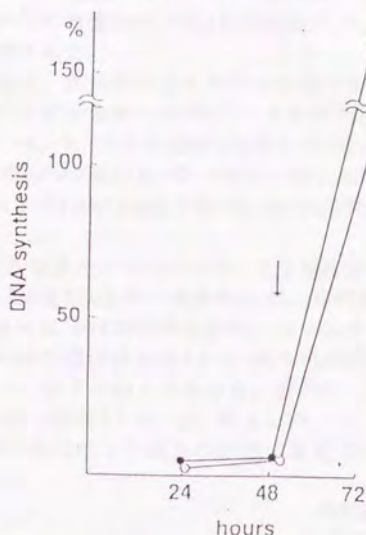
図3 日本人劇症肝炎患者個々の血漿ろ液のラット肝細胞DNA合成抑制活性



培養24時間目、2穴の平均値。

次に18容量%の検体添加量にて、個々の日本人患者血漿ろ液のDNA合成抑制活性を測定した。図3に示すように、培養開始24時間目のDNA合成活性は、FHF血漿ろ液群では  $27.0 \pm 12.5$  ( $n=9$ ) dpm/ $\mu$ g蛋白質/時であり、正常コントロール血漿ろ液群の  $53.9 \pm 7.6$  ( $n=11$ ) dpm/ $\mu$ g蛋白質/時に比し有意( $p<0.001$ )に低値であった。FHF患者群間では、初回血漿交換療法の時点で脳症3度および4度の患者検体は  $22.6 \pm 12.5$  ( $n=5$ ) dpm/ $\mu$ g蛋白質/時であり、脳症2度の患者検体の  $32.4 \pm 11.4$  ( $n=4$ ) dpm/ $\mu$ g蛋白質/時に比し低値の傾向を示したが、有意差には至らなかった。生存群、死亡群間の比較では、検体のDNA合成抑制活性には差はなかった。同様に、プロトロンビン時間とDNA合成抑制活性は相関しなかった( $r=-0.271$ )。

図4 劇症肝炎患者血清のラット肝細胞  
DNA合成抑制の可逆性



培養開始48時間目に患者検体ぬきの培地に交換(矢印)。

●:イギリス人劇症肝炎患者プール血清ろ液

○:日本人劇症肝炎患者(表2、症例2)血漿ろ液

% of the baseline value, 2次の平均値。

FHFプール血清ろ液あるいはFHF血漿ろ液添加により培養肝細胞数に有意の変化は生じなかった(データは省略した)。FHFおよび正常者プール血清ろ液添加培養液中のLDH活性はそれぞれ $31.7 \pm 5.5$  ( $n=7$ )、 $33.8 \pm 3.4$  ( $n=6$ )Uであり、ベースライン培養液の35Uに比し上昇はみられなかった。同様にFHF血漿ろ液および正常コントロール血漿ろ液添加の培養液でもLDH活性の上昇はみられなかった(データは省略した)。以上の成績に加え、DNA合成抑制は可逆的であった。図4に示すように、培養開始48時間目までFHFプール血清ろ液あるいはFHF血漿ろ液によりほぼ静止状態のレベルに抑制されていたDNA合成活性は、この時点で検体を除いた培地に交換すると、培養開始72時間目に急峻な上昇を示した。



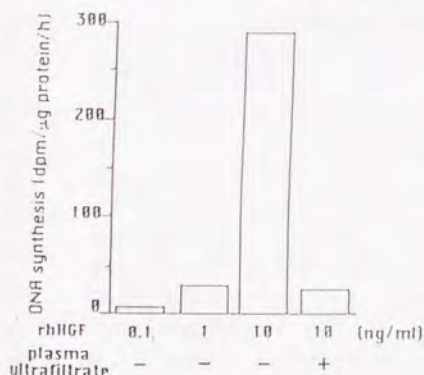
培養液中のFCSが抑制活性発現に必須かどうか検討する為、FCSを除いたI+E添加WE培地で同様の手順で培養した。表2の症例3の血漿ろ液450  $\mu$ l/well添加によりDNA合成活性はベースラインの14.3%  $\pm$  2.6% (n=3)に有意(p<0.001)に抑制された。FCSは補因子ではないことが示唆された。

抑制活性は、熱処理によりわずかに低下するものの、大半が保持された。70℃30分加熱したFHFプール血清ろ液40  $\mu$ l/well添加のDNA合成活性は、2.1  $\pm$  0.5 dpm/ $\mu$ g蛋白質/時 (n=3)であり、非加熱の0.4  $\pm$  0.1 dpm/ $\mu$ g蛋白質/時 (n=3)に比し上昇したもののベースラインの11.4  $\pm$  3.0 dpm/ $\mu$ g蛋白質/時 (n=3)に比しなお有意(p<0.01)に抑制された。

FHF血漿ろ液をセントリコン3により更に分画した。セントリコン10ろ液の97容量%以上がろ過されたが、抑制活性は膜の上に残ったわずかの容量中に約40%保持された。ベースラインDNA合成活性を100%とした時の膜保持分画(上)と膜ろ過分画(下)添加によるDNA合成活性は、以下の如くであった。症例2：上、43.9%  $\pm$  5.2%、下、28.8%  $\pm$  5.7%；症例3：上、52.6%  $\pm$  3.7%、下、27.3%  $\pm$  4.3%。セントリコン3膜ろ過での上下双方の分画に有意(p<0.001、n=3)の抑制活性がみられた。

FHF血漿ろ液は、I+EのみならずhHGFにより刺激されたDNA合成をも抑制した。図5に示すようにhHGFのDNA合成促進作用は10ng/mlで最大となった。この成績は、他の研究者の報告とも一致した。FHF血漿ろ液(表2、症例2)450  $\mu$ l/well添加によりこのDNA合成活性は、8.4%に抑制された。

図5 HGF刺激初代培養肝細胞のDNA合成活性に対する作用



—: 450  $\mu$ l/well生理食塩水を添加。  
2次の平均値。

FHFプール血清ろ液は肝細胞蛋白合成に影響を与えなかった。患者検体 $50\mu\text{l/well}$ を添加した群及び非添加群で、蛋白合成活性はそれぞれ  $80.5\pm 18.6$ 、 $81.7\pm 23.4\text{ dpm}/\mu\text{g蛋白質/時}$  ( $n=4$ )であった。 $20\mu\text{g/ml}$ シクロヘキシミドを加えて測定した非特異的な $[^3\text{H}]$ ロイシンのとりこみは $8.7\pm 3.1\text{ dpm}/\mu\text{g蛋白質/時}$  ( $n=4$ )であった。同様に、FHF血漿ろ液 $600\mu\text{l/well}$ 添加により $[^3\text{H}]$ ロイシンとりこみ活性は有意の変動を示さなかった(データは省略した)。

線維芽細胞(NIH3T3細胞)のDNA合成はFHF血漿ろ液(表2の症例2)により抑制されなかった。無血清培養の後FCS再添加とともに $450\mu\text{l/well}$ FHF血漿ろ液を添加し24時間培養した時点でのDNA合成活性は $2,460\pm 896\text{ dpm}/\mu\text{g蛋白質/時}$  ( $n=3$ )で、ベースラインの $2,348\pm 430\text{ dpm}/\mu\text{g蛋白質/時}$  ( $n=7$ )と不変であった。更に、同様の培養手順でFHFおよび正常コントロール血漿ろ液を用量を変えて(6-23%)投与したが、両群とも、いずれの用量においてもDNA合成活性はベースラインと比べ不変 ( $n=4$ )であった(データの詳細は省略した)。



### (考案)

イギリス人FHF患者のブール血清ろ液を用いた実験は、かつて著者が報告したこれらの患者個々の血清ろ液中のin vivo DNA合成抑制活性<sup>14) 16)</sup>を、in vitroの系で確認する為に行われた。オートラジオグラフィーの成績から、FHFブール血清ろ液の存在により、本来I+E刺激下で旺盛なDNA合成を行う肝細胞のほとんどすべてが、S期への細胞周期の進行を阻止されていることが示唆された。このDNA合成抑制は可逆的であり、蛋白合成の抑制や培養肝細胞の生存率の悪化の結果ではなかった。ブール血清を供給したFHF患者の中にはパラセタモール肝障害が2例含まれている。FHF患者でのアセトアミノフェンの体内半減期が5ないし15時間<sup>24) 25)</sup>であることを考えると、パラセタモールがブール血清ろ液中に残存し実験結果に影響を与えた可能性は否定される。

イギリスと異なり、日本ではFHFの治療として血漿交換療法が広く行われている<sup>26) 27)</sup>。この場合大量の血漿サンプルを研究に使えるという利点がある。成熟ラット初代培養肝細胞におけるDNA合成抑制活性は、日本人の個々のFHF患者から得た血漿ろ液にも認められた。DNA合成抑制活性が、患者血液中に存在する何らかの薬剤に由来する可能性は否定されよう。図3に示すように9例ほぼ全例に抑制活性を認めたが、これらの患者間で血漿交換療法開始前共通に使用されていた治療薬はなかった。Sanders et al.<sup>28)</sup>によるとヘパリンは初代培養肝細胞において1U/ml以上の濃度で細胞毒性を示した。ヘパリンは、血漿交換療法中1時間あたり1,000Uの割合で抗凝血剤として投与されていた。しかし、除去血漿中に含まれるヘパリン濃度は1U/ml以下と算定され、更にセントリコン10膜ろ過により大半はろ液中より排除されると考えられる<sup>29)</sup>。更に、我々は逆相系高速液体クロマトグラフィーを使ったFHF血漿ろ液の分析から、抑制活性はヘパリンの溶出位置に認められないことを確認した<sup>30)</sup>。

イギリスと日本の両国のFHF患者においてそれぞれ認められた血液中の抑制活性にはいくつかの共通の特徴がある。両者とも分子量10 kD以下の分画にみられ、可逆的であり(図4)、明かな細胞障害性や蛋白合成障害を伴わなかった。以上より両者の抑制活性は、おそらく共通の物質-抑制因子と呼んでいいかもしれない-に由来していると思われる。抑制活性のみかけ上の血中濃度はFHFブール血清ろ液の方がFHF血漿ろ液に比べ高い。この違いの理由とは明かではない。表1、2に示したプロトロンビン時間の差に反映されるようにイギリス人FHF患者群の方がより重篤な肝障害を有している結果かもしれない。更に、両国のFHFの病因の違いにも注目しなければならない。イギリスのFHFは薬剤性、日本のFHFはウイルス性が主体であり、この

差が血中抑制因子の総量及び性質に影響を及ぼしている可能性がある。また、日本人患者では血漿交換療法中連続して新鮮凍結血漿が投与されている。除去血漿は治療開始早期に採取しているとはいうものの、新鮮凍結血漿による希釈の結果、実際の患者血漿に比べ抑制活性が低めに現れている可能性がある。血清と血漿の違いは重要ではないと考える。初代培養肝細胞DNA合成を抑制する血小板由来の因子(platelet derived growth inhibitor; PDGI)がすでに同定されているが<sup>31)</sup>、あとで述べるようにこの因子は、分子量からセントリコン10膜ろ過により100%排除される。

本研究で認められた抑制因子は既報の抑制物質とは異なると考えられる。これまでにEGFまたはEGF+インスリンで刺激した成熟ラット初代培養肝細胞を用いてDNA合成抑制活性が報告されている物質で、FHF患者血液中にも微量ながらも存在する可能性があるものには、IL-6<sup>32)</sup>、IL-1 $\beta$ <sup>33)</sup>、TGF- $\beta$ <sup>34)</sup>、PDGI<sup>31)</sup>があげられる。これらの物質はいずれも分子量10kD以上であり、セントリコン10およびPM10膜をろ過されない。近年Woodman et al. はEGFのみならずHGFで刺激された初代培養肝細胞のDNA合成を抑制する新しい因子を報告した<sup>35)</sup>。この抑制因子は、部分肝切除後24時間目に残存肝より得られた非実質細胞の培養液中に認められた。しかし彼らの因子の部分精製分画はSDS-PAGEで分子量14から17kDの位置に溶出され、我々の扱っている分画よりも高い分子量領域に属すると思われる。一方、我々の検討した分子量10kD以下のFHF患者ろ液分画には、低分子量のいわゆる古典的トキシンが含まれる可能性がある。これらはメルカプタン等の低級脂肪酸、アンモニアであり、いずれもFHF患者血中で著増しているだけではなく、in vivoでのラット肝DNA合成抑制活性が報告されている<sup>36)37)</sup>。初代培養肝細胞に対するこれら古典的トキシンの作用は、アミノ酸代謝に関する報告が散見されるのみで<sup>38)</sup>、DNA合成を抑制するかどうか明かではない。しかしながらこれらのトキシンは揮発性である。凍結乾燥処理を加えなかったFHF血漿ろ液のみならず、凍結乾燥処理を加えているFHF患者プール血清ろ液やセントリコン3分画でも活性が認められたことから、我々の抑制因子は古典的トキシンとは異なる物質と考える。我々が注目したFHF患者血液中のこの分画では、いわゆる中分子量物質(分子量0.5-5kD)が正常人に比べて著増していることが報告されている<sup>39)40)</sup>。セントリコン3膜で抑制活性が100%阻止、あるいはろ過されなかった結果から、抑制因子は膜の分画分子量(3kD)に近い分子サイズを有する可能性が高い。しかし抑制活性が複数の物質から成り、低分子量の抑制物質によって活性が付加されている可能性も考えられる。抑制物質のさらなる特徴づけが必要である。

予備的な実験成績ではあるが、培養線維芽細胞のDNA合成は、



初代培養肝細胞のDNA合成を完全に抑制するFHF患者血漿ろ液濃度で抑制されなかった。このことからFHF患者ろ液の作用は、核酸サルベージ代謝経路におけるチミジンと低分子量イオンとの競合作用ではなく、むしろ肝細胞のDNA合成に特異的な抑制をみていると考えられる。

FHF患者血漿中には、初代培養肝細胞のDNA合成を逆に促進する活性がTsubouchi et alにより報告されている<sup>3) 4)</sup>。この発見が、hHGF同定へとつながった。我々の成績は、彼らの報告と矛盾しない。彼らは、培養液中に我々よりも少ない濃度(5容量%)でFHF患者血漿を添加している。初代培養肝細胞のDNA合成活性が最大になるHGF濃度は10ng/mlと報告されている<sup>4)</sup>。FHF患者血漿ろ液は18容量%の濃度でこの最大DNA合成活性を完全に抑制した(図5)。Tsubouchi et alによると、EIA法で測定されたFHF患者23人の血清hHGF濃度は $8.06 \pm 1.76$  ng/ml (平均 $\pm$ S.E.M.)である<sup>4)</sup>。我々の抑制活性はFHF患者血漿由来セントリコン10ろ液分画の代わりに患者全血漿を添加した際含まれるであろうhHGFにより刺激されるDNA合成を抑制すると考える。今後、我々の抑制因子の作用機序のさらなる解明が必要である。

#### (総括)

成熟ラット初代培養肝細胞のDNA合成を指標として劇症肝炎患者血中の肝細胞増殖抑制因子の存在について検討した。

イギリスの劇症肝炎患者9例のプール血清、あるいは血漿交換療法時に得られた日本の劇症肝炎患者9例の血漿を用いて、膜ろ過で分子量10kD以下のろ液分画を得た。劇症肝炎患者ろ液は、EGF+insulinにより刺激されたDNA合成を用量依存性にはほぼ静止状態に抑制した。この抑制は可逆的で、細胞障害や蛋白合成抑制を伴わなかった。正常者ろ液には抑制活性を認めなかった。抑制活性は加熱処理に対し安定であり、分画分子量3kDの膜ろ過では、阻止分画、ろ過分画双方に活性がみられた。

抑制活性は、肝細胞に特異的と考えられた。即ち、予備的実験ではあるが線維芽細胞(NIH3T3細胞)のDNA合成は患者ろ液により抑制されなかった。劇症肝炎患者血漿ろ液は、EGF+insulinのみならず肝細胞増殖因子(HGF)により最大に刺激された初代培養肝細胞DNA合成をも強力に抑制した。

これらの事実は、これまでに著者らが報告してきた劇症肝炎患者血清の同分画(分子量10kD以下)中のin vivo DNA合成抑制活性をうらづけるものである。本因子は、劇症肝炎患者において血中に肝再生促進因子が存在するにもかかわらず再生が遅延する事実を説明

する、重要な手がかりの一つである可能性がある。

(文献)

- 1) Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970;3:282-298.
- 2) 犬山シンポジウム記録刊行会: 劇症肝炎の診断基準 A型肝炎・劇症肝炎。中外医学社、東京、p.110, 1982.
- 3) Bucher NLR, Malt RA. Regeneration of the liver and kidney. Boston: Little, Brown, 1971:17-21.
- 4) Starzl TE, Terblanche J. Hepatotrophic substances. *Prog Liver Dis* 1979;6:135-151.
- 5) Johannes G and Johan I. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984;4:902-904.
- 6) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Takahashi K, Koura M, Hashimoto S, and Daikuhara Y. Human hepatocyte growth factor in plasma from patients with fulminant hepatic failure. *Exp Cell Res* 1986;166:139-150.
- 7) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugitama A, Tashiro K, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342:440-443.
- 8) Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y, Matsumoto K, Nakamura T. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent anti-hepatitis effect in vivo. *Hepatology* 1992;16:1227-1235.
- 9) Tsubouchi H, Hirano S, Ghoda E, Nakayama H, Takahashi K, Sakiyama O, Miyazaki H, et al. Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1989;9:875-881.
- 10) Jones EA, Schafer DF. Fulminant hepatic failure. In:



Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990:460-492.

11) Hughes RD, Cochrane AMG, Thomson AD, Murray-Lyon IM, Williams R. The cytotoxicity of plasma from patients with acute hepatic failure to isolated rabbit hepatocytes. *Br J Exp Pathol* 1976;57:348-353.

12) Haas TH, Holloway CJ, Osterthum V, Trautschold I. Hepatotoxic effects of sera from patients with fulminant hepatitis. *Br J Clin Biochem* 1981;19:283-286.

13) Gove CD, Hughes RD, Williams R. Rapid inhibition of DNA synthesis in hepatocytes from regenerating rat livers by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Br J Exp Patol* 1982;63:547-553.

14) Yamada H, Hughes RD, Gove CD, Williams R. Effects of fulminant hepatic failure serum on hepatic DNA synthesis in normal and partially hepatectomized rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1990;2:483-488.

15) O'Grady JG, Gimson AE, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterol* 1989;97:439-445.

16) Hughes RD, Yamada H, Gove CD, Williams R. Inhibitors of hepatic DNA synthesis in fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991;36:816-819.

17) Inoue N, Yoshida M, Yamazaki Z, Sasaki T, Sanjo T, Okada K, Oda T, et al. Continuous flow membrane plasma pheresis utilizing cellulose acetate hollow fibre in hepatic failure. In: Brunner G, Schmidt FW, eds. Artificial liver support. Berlin: Springer-Verlag, 1981:175-180.

18) Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.

19) Nakamura T, Tomita Y, Ichihara A. Density-dependent



growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. J Biochem 1983;94:1029-1035.

20) McGowan JA, Strain AJ, Bucher NL. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic AMP. J Cell Physiol 1981;108:353-363.

21) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.

22) Wroblewski F, LaDue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exp Biol Med 1955;90:210-213.

23) Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor-B on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. Biochim Biophys Res Commun 1985;133:1042-1050.

24) Prescott LF, Wright N, Roscoe P, Brown SS. Plasma paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage. Lancet 1971;1:519-522.

25) Gazzard BG, Hughes RD, Widdop B, Goulding R, Davis M, Williams R. Early prediction of the outcome of a paracetamol overdose based on an analysis of 163 patients. Postgrad Med J 1977;53:243-247.

26) 高橋善弥太、清水勝。劇症肝炎全国集計。厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班 昭和63年度研究報告 p.49-58 1988.

27) O'Grady JG, Gimson AE, O'Brien CJ, et al. Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. Gastroenterol 1988;94:1186-1192.

28) Sanders SW, Dukes GE Jr, Gray P, Tolman KG. Toxicity of heparin in isolated rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 1984; 33:2223-2226.

29) Centricon™ microconcentrators Operating instructions p.

11. a GRACE company publication No.1-259G 1990. W.R.Grace & Co. U.S.A.
- 30) Yamada H, Toda G, Ikeda Y, Hashimoto N, Kurokawa K, Yoshida M, Sugata F, et al. Partial purification and characterization of inhibitor of DNA synthesis in rat hepatocytes from blood of fulminant hepatic failure patients [Abstract]. *Hepatology* 1991;14:105A.
- 31) Nakamura T, Teramoto H, Tomita Y, Ichihara A. Two types of growth inhibitor in rat platelets for primary cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;134:755-763.
- 32) Huggett AC, Ford CP, Thorgeirsson SS. Effects of interleukin-6 on the growth of normal and transformed rat liver cells in culture. *Growth Factors* 1989;2:83-89.
- 33) Nakamura T, Araki R, Ichihara A. Interleukin-1B is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 1988;179:488-497.
- 34) Carr BI, Hayashi I, Braum EL. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type B transforming growth factor. *Cancer Res* 1986;46:2330-2334.
- 35) Woodman AC, Selden AC, Hodgson HJF. Partial purification and characterization of an inhibitor of hepatocyte proliferation derived from non-parenchymal cells after partial hepatectomy. *J Cell Physiol* 1992;151:405-414.
- 36) Ellis WR, Chu PK, Murray-Lyon IM. The influence of ammonia and octanoic acid on liver regeneration in the rat. *Clin Sci* 1979;56:95-97.
- 37) Zieve L, Shekleton M, Lyftogt C, Draves K. Ammonia, octanoate and a mercaptan depress regeneration of normal rat liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1985;5:28-31.
- 38) Bessman SP, Wang W, Mohan C. Ammonia inhibits insulin stimulation of the Krebs cycle: further insight into mecha-

nism of hepatic coma. *Neurochem Res* 1991;16:805-811.

39) Opolon P. Significance of middle molecules in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. In: Kleinberger G, Ferenci P, Riederer P, Thaler H, eds. *Advances in hepatic encephalopathy and urea cycle diseases*. Basel: Karger, 1984: 310-314.

40) Williams R. Fulminant hepatic failure. *Postgrad Med J* 1983;59:33-41.

41) Nakayama H, Tsubouchi H, Ghoda E, Koura M, Nagahama J, Yoshida H, Daikuhara Y, et al. Stimulation of DNA synthesis in adult rat hepatocytes in primary culture by sera from patients with fulminant hepatic failure. *Biomed Res* 1985;6:231-237.

42) Strain AJ, Ismail T, Tsubouchi H, Arakaki N, Hishida T, Kitamura N, Daikuhara Y, et al. Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1991;87:1853-1857.

43) Tsubouchi H, Niitani Y, Hirano S, Nakayama H, Ghoda E, Arakaki N, Sakiyama O, et al. Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 1991;13:1-5.



(謝辞)

今回の研究にあたり、終始御指導をいただきました東京大学第一内科 黒川 清教授、戸田剛太郎前助教授(現慈恵医科大学第一内科教授)、橋本直明博士および諸先生方に、また劇症肝炎患者検体収集とラジオアイソトープ施設使用に御配慮いただきました昭和大学藤ヶ丘病院消化器内科菅田文夫教授(当時、現相模台病院副院長)、与芝 真助教授および諸先生方に、また イギリス人劇症肝炎患者検体の収集に御協力いただきました King's College Hospital (London), Liver UnitのRoger Williams先生、Robin D Hughes博士、Chris D Gove博士および諸先生方に感謝いたします。岡 博前教授(現警察病院院長)には、本研究の基礎を築く段階で御指導を賜りました。ありがとうございました。

また、ヒトリコンビナントHGFを供与いただきました鹿児島大学医学部第二内科坪内博仁博士(当時、現宮崎医科大学第二内科教授)および、本研究に当初から暖かい励ましをいただきました岐阜大学医学部第一内科武藤泰敏教授にこの場をかりて御礼申し上げます。

最後に、昭和大学藤ヶ丘病院研究棟で、実験のお手伝いをしていただいた原利恵子嬢に感謝いたします。

