

# 劇症肝炎におけるTTV感染の関与

昭和大学医学部・第二内科 三田村 圭二  
協同研究者：柴田 実，馬場俊之  
昭和大学藤が丘病院・消化器内科  
井上和明，関山和彦  
与芝 眞  
川崎社会保険病院・内科  
上野幸久  
九州大学医学部・第二外科  
吉住朋晴，矢永勝彦  
神奈川歯科大学・内科  
森實敏夫

## はじめに

1997年にTTウイルス (TTV) が発見され，新しい肝炎ウイルスの候補として検討されている<sup>1)</sup>。今回，劇症肝炎におけるTTV感染の関与を検討した。

## 対 象

劇症肝炎56例 (男性33例，女性23例，年齢平均46.4±14.7歳)，他の肝疾患277例 (男性172例，女性105例，年齢平均53.2±16.9歳)，健常者200例 (男性106例，女性94例，年齢平均42.2±14.4歳)の血清および劇症肝炎17例，急性肝炎5例，慢性肝炎3例の肝組織を対象とした。他の肝疾患は急性肝炎32例 (男性19例，女性13例，年齢平均38.3±15.1歳)，慢性肝炎139例 (男性85例，女性54例，年齢平均48.2±16.1歳)，肝硬変106例 (男性68例，女性38例，年齢平均±歳)である。

## 方 法

1. TTV DNAの検出：血清100  $\mu$ lおよび肝組織20~30mgよりDNAを抽出し，Okamotoらが報告したプライマー<sup>2)</sup>を用いてnested PCR法により検出した。  
2. 解析内容：TTVの疾患別頻度を求め，疾患およびサブグループ別感染頻度の差を $\chi^2$ 乗検定による単変量解析で検討した。劇症肝炎，他の肝疾患および健常人におけるTTV感染に関連する因子，および劇症肝炎におけるTTV感染の説明因子については，年齢，性，病因，肝疾患・病型，輸血歴，HGV感染の6つの選択変数を設定し，Logistic Regression解析による多変量解析で検討した。単変量解析ではP値が0.05以下，多変量解析ではR-squareが0.30以上を有意とした。なお，劇症肝炎については前医の診療録を調査し，転院前の血液製剤の使用の影響 (投与16例；非投与25例；不明15例)を補正した検討も加えた。

## 結 果

1. 健常者におけるTTV感染  
健常人の50例 (25%)にTTV DNAが検出され，年齢と有意な相関が認められた ( $P < 0.0001$ ) (図-1)。TTV陽性例の年齢は平均51±12歳，陰性例は39±14歳であった。TTV陽性例の血清GPT値は9~37 IU/lに分布し，平均18±7 IU/lでトランスアミナーゼ値の異常は認められなかった。
2. 各種疾患におけるTTV感染  
劇症肝炎では33例 (59%)に，他の肝疾患では53例 (31%)にTTV感染が認められた (表-1)。健常対照との比較では，劇症肝炎でTTV感染が有意に高頻度に認められた ( $P < 0.001$ )。さらに，劇症肝炎のTTV感染は他の肝疾患よりも有意に高頻度に認められた ( $P < 0.001$ )。他の肝疾患のサブグループ分類を行うと，肝硬変のTTV感染が38%と健常者と比べ有意に高率であった ( $P < 0.05$ )。しかし肝硬変と健常者との間には有意な年齢差が存在し，年齢を補正すると有意差は認められなかった。
3. 劇症肝炎におけるTTV感染  
非A非B非C型劇症肝炎のTTV陽性率は25例中19例 (76%)，既知の肝炎ウイルスが同定された劇症肝炎では31例中14 (45%)と，前者の方が有意に高値であった ( $P = 0.02$ ) (表-2)。
4. 劇症肝炎における血液製剤の使用とTTV感染  
前医で血液製剤の使用が明らかな劇症肝炎の14例 (88%)，非使用例の12例 (48%)，不明例の7例 (47%)にTTV感染が認められ，血液製剤使用例のTTV感染が有意に高頻度であった (それぞれ $P = 0.01$ ， $P = 0.02$ ) (表-3)。
5. 血液製剤非使用劇症肝炎における病因別TTV感染  
血液製剤非使用例のみで検討すると，非A非B非C型劇症肝炎では75%と既知の肝炎ウイルスが同定された劇症肝炎では35%と前者の方がTTV感染が高率な傾向が認められたが，統計学的に有意な水準には達しなかった ( $P = 0.06$ ) (表-4)。
6. 血液製剤非使用劇症肝炎と対照のTTV感染  
血液製剤非使用劇症肝炎のTTV感染頻度 (48%)は他の肝疾患の感染頻度 (31%)との間に差は認められなかった ( $P = 0.08$ )が，健常者より有意に高率であった ( $P = 0.02$ )。(表-5)
7. 対象全体においてTTV感染に関連する因子  
劇症肝炎，他の肝疾患，健常者を合わせた483例を対象に，年齢，性，病因，肝病変，輸血歴およびHGV感染を説明変数として，Logistic Regression解析により，TTV陽性に寄与する因子を検討した。年齢は連続変数 (歳)として扱い，性は男性/女性，病因はA型

／B型／C型／非A非B非C型，肝病変は劇症肝炎／急性肝炎／慢性肝炎／肝硬変／肝疾患なし，輸血歴およびHGV感染は有り／無し／不明とそれぞれを名義変数として扱った。年齢，性および肝病変に有意差が認められ，年齢では高齢に，性では男性に，肝病変では劇症肝炎にTTV感染が高率なためと推定された。しかし全体としてR-squareが0.0872と低値のため，これら6因子はTTV感染を説明しうる因子として認められない。(表-6)

#### 8. 劇症肝炎においてTTV感染に関連する因子

劇症肝炎56例において，年齢，性，病因，病型，前医輸血およびHGV感染を説明変数として，Logistic Regression解析により，TTV感染に寄与する因子を検討した。なお，病型は劇症肝炎急性型／亜急性型，前医輸血はあり／なし／不明とした。病因および前医輸血に有意差が認められ，非A非B非C型と前医で輸血を受けた劇症肝炎例にTTV感染が高率なためと推定された。しかしR-squareが0.2197と低値のため，これらの説明変数はTTV感染を説明しうる因子として認められなかった。(表-7)

#### 9. 肝組織TTVDNA陽性率

肝組織TTVDNAは劇症肝炎で6例(18%)に検出され，急性肝炎および慢性肝炎では検出されなかった。

(表-8)

#### 10. 生体肝移植がなされた劇症肝炎

生体肝移植がなされた劇症肝炎4例を検討した。症例は，男性1例，女性3例，年齢が26歳～50歳，1997～1998年に発症し，保存的治療が無効のため九州大学第二外科で生体肝移植が行われた。全例nested-PCR法で既知の肝炎ウイルスが同定されず非A非B非C型と診断された。移植前の血清と移植時に摘出した病的肝よりTTVDNAを検出したところ，血清では全例に検出されたが，摘出した肝組織では再生部からは検出されず，1例で壊死部からTTVDNAが検出された。

(表-9)

### 考 案

わが国の劇症肝炎のおおよそ50%，急性肝炎の20%，慢性肝炎および肝硬変の10%では既知の肝炎ウイルスが同定されず，その病因に未知の肝炎ウイルスの関与が推定されている。輸血後肝炎患者の血清をrepresentational difference analysis法で解析する検討によって，1997年にウイルス由来と考えられる遺伝子(N22クローン：500塩基長)が分離された<sup>1)</sup>。この遺伝子を有するウイルスはTTウイルス(TTV)と暫定的に呼称され，非A～非G型ウイルス肝炎の病因ウイルスの候補として検討されている。TTVは約4Kbの一本鎖DNAを遺伝子として有し，

既知のウイルスのなかではパルボウイルスと近似している。Okamotoら<sup>2)</sup>が報告したプライマーを用いたnested-PCRでTTVは，わが国の供血者の12%<sup>2)</sup>，欧米の供血者の1～2%<sup>3,4)</sup>，英国の健常者の10%に検出され<sup>5)</sup>，わが国の非A～非G型劇症肝炎の47%<sup>2)</sup>，欧米の非A～非G型劇症肝炎の19～27%<sup>3,4)</sup>に検出されると報告された。TTVは非A～非G型肝炎のみでなく，供血者や健常者からも高率に検出されることより，肝炎の病因となりうるか疑問が提起されている<sup>6)</sup>。今回の検討ではTTVは健常者の25%に検出され，健常者では加齢と共に感染頻度が有意に上昇していた。また，健常者におけるTTV陽性例に肝機能異常者が認められず，わが国の成人にはTTV陽性無症候性キャリアが高率に存在することが示唆された。劇症肝炎56例では59%にTTV感染が認められた。劇症肝炎例の病因分類では，非A非B非C型劇症肝炎で76%，前医で血液製剤が使用された劇症肝炎では88%，血液製剤非使用の非A非B非C型劇症肝炎では75%にTTV感染が認められ，病因が非A非B非C型および前医で血液製剤を使用した例にTTV感染が高率であった。劇症肝炎の血清TTVは前医での血液製剤の使用の影響を受けており，測定時期に注意する必要が認められた。血液製剤非使用劇症肝炎では48%にTTV感染が認められ，健常者より有意に高頻度であった。血液製剤非使用劇症肝炎と健常者の年齢はほぼ一致しており，年齢差の影響は少ないと推定された。両者のTTV感染頻度に相違が存在した理由は不明であるが，これだけでTTVが劇症肝炎の病因であると断定することはできない。TTV感染には種々の交絡因子の影響が関与すると考えられ，Logistic Regression解析による多変量解析で病因的意義を検討した。劇症肝炎，他の肝疾患および健常者と劇症肝炎のみを対象とした2つの群において，6つの説明変数(年齢，性，病因，肝病変・病型，輸血歴，HGV感染)を選択し，TTV感染との関連を検討した。年齢が高齢，性が男性，病因が非A非B非C型，肝病変が劇症肝炎，劇症肝炎で前医輸血ありで有意差が認められ，TTV感染との関連が示唆された。しかし，両群ともR-squareが統計学的な有意水準には達せず，これらの因子はTTV感染と関連はなく，TTV感染は今回検討した説明変数以外の未知の因子によって規定されていると推定された。今後，TTV感染の自然史，遺伝子変異および宿主側要因との関連などを検討し，病原性の有無を検討する必要がある。劇症肝炎，急性肝炎，慢性肝炎における肝組織TTVDNAは血清中よりも検出頻度が低値であった。また，生体肝移植がなされた非A非B非C型劇症肝炎の4例では血清にはTTVDNAが全例で検出されたが，摘出された肝組織では1例で壊死部からTTVDNAが検出され，肝再生部からは検出されなかった。これらの成績はTTVが肝臓で増殖し，

血中よりも肝臓中に大量に存在するという報告<sup>2)</sup>に反する成績であり、さらなる検討が求められる。なお、肝移植例は全例が前医で血漿交換の治療を受けており、血清TTV陽性は治療の影響とも考えられ、劇症肝炎の病因とは断定できなかった。

### 結 語

劇症肝炎におけるTTV感染は健常者および他の肝疾患よりも有意に高頻度に認められたが、輸血の影響を補正すると他の肝疾患とは有意差が認められなかった。多変量解析ではTTV感染と劇症肝炎には関連は認められず、TTV感染は今回検討した選択変数（年齢、性、病因、肝病変・病型、輸血歴、HGV感染）以外の因子に規定されいと推定された。

### 参 考 文 献

1) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K et al: A novel virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in

posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241:92-97, 1997.

- 2) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N et al: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 10:1-16, 1998.
- 3) Simmonds P, Davidson F, Lycett C et al: Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 352:191-195, 1998.
- 4) Charlton M, Adjei P, Poterucha J et al: TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 28:839-842, 1998.
- 5) Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG et al: Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 352:195-197, 1998.
- 6) Cossart Y: TTV a common virus, but pathogenic? *Lancet* 352:164, 1998.

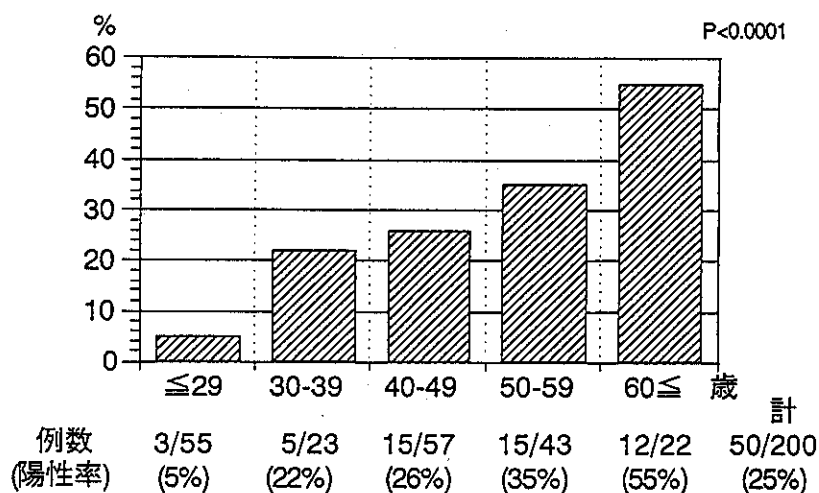


図1 健常人におけるTTVDNAの頻度

表1 各種肝疾患における血清TTVDNAの検出

疾患	年齢(歳)	TTVDNA陽性	P value*	Odds比*
劇症肝炎	46±15	33/56(59%)	<0.001	4.3
他の肝疾患	53±17	86/277(31%)	n.s.	1.35
急性肝炎	35±15	8/32(24%)	n.s.	1
慢性肝炎	48±16	38/139(27%)	n.s.	1.13
肝硬変	64±11	40/106(38%)	<0.05	1.82
健常者	42±14	50/200(25%)		

\*: compared to normal controls (  $\chi^2$  -test)

n.s. : not significant

FH vs other liver diseases : P<0.001

表2 劇症肝炎におけるTTVDNA感染

病因	年齢(歳)	TTVDNA陽性	P value*	Odds比*
非A非B非C型	48±15	19/25(76%)	0.02	3.85
A~C型	45±15	14/31(45%)		

\*:  $\chi^2$  -test (non-A,non-B,non-C vs A~C)

表-3 劇症肝炎における血液製剤の使用とTTVDNA

血液製剤	TTVDNA陽性	P value*	Odds比
+	14/16(88%)		
-	12/25(48%)	0.01	0.132
不明	7/15(47%)	0.02	0.125

\*: compared to patients treated with blood products (  $\chi^2$  -test)

表4 血液製剤非使用劇症肝炎におけるTTVDNA

病因	TTVDNA陽性	P value*	Odds比*
非A非B非C型	6/8(75%)	0.06	5.5
A~C型	6/17(35%)		

\*:  $\chi^2$ -test (non-A,non-B,non-C vs A~C)

表5 血液製剤非使用劇症肝炎と対照のTTVDNA

疾患	年齢(歳)	TTVDNA陽性	Pvalue*	Odds比*
劇症肝炎	42±13	12/25(48%)		
他の肝疾患	53±17	86/277(31%)	0.08	0.488
健常者	42±14	50/200(25%)	0.02	0.361

\*: compared to FH untreated with blood products ( $\chi^2$ -test)

表6 TTV感染に関連する因子

Factor	Type	P value
年齢	Numeric (Years)	0.012
性	Nominal (M/F)	0.0173
病因	Nominal (*)	0.3051
肝病変	Nominal (**)	0.0064
輸血歴	Nominal (+/-)	0.2239
HGV感染	Nominal (+/-)	0.2016

(肝疾患283例, 健常人200例)

\*: HAV, HBV, HCV, non-A,non-B,non-C

\*\* : FH, AH, CH, LC, Normal Liver

R-square = 0.0872

表7 劇症肝炎におけるTTV感染に関連する因子

Factor	Type	P value
年齢	Numeric (Years)	0.1394
性	Nominal (M/F)	0.5937
病因	Nominal (*)	0.0401
病型	Nominal (**)	0.1167
前医輸血	Nominal (***)	0.0306
HGV感染	Nominal (+/-)	0.7408

\*: HAV, HBV, HCV, non-A,non-B,non-C

\*\* : acute, subacute,

\*\*\*: +, -, unknown

R-square = 0.2197

表8 肝組織TTVDNA陽性率

疾患	例数	血清TTV	肝組織TTV
劇症肝炎	17	6 (35%)	3 (18%)
急性肝炎	5	3 (60%)	0
慢性肝炎	3	0	0

表9 生体肝移植がなされた劇症肝炎

性	年齢	病因	血清TTVDNA	摘出肝組織TTVDNA		転帰
				壊死部	再生部	
女	32	NANBNC	+	-	-	生存
男	26	NANBNC	+	-	-	生存
女	50	NANBNC	+	-	-	生存
女	42	NANBNC	+	+	-	生存

# 広汎肝壊死の成立機序：マクロファージの肝浸潤におけるオステオポンチンを介したchemokine network

埼玉医科大学・第三内科 藤原 研司  
協同研究者：持田 智，川島ルミ子  
稲生実枝

## はじめに

劇症肝炎，特に脳症出現までの期間が短い急性型は，病理組織学的には広汎肝壊死を特徴とし，肝類洞内凝固による微小循環障害がその原因と考えられる<sup>1)</sup>。ラット劇症肝炎モデルでは，類洞内凝固は2種類の機序により成立する<sup>2)</sup>。活性化クッパー細胞や肝マクロファージがTNF- $\alpha$ や活性酸素などの細胞障害性を産生し<sup>3, 4)</sup>，類洞内皮細胞を障害する場合と<sup>5)</sup>，これら細胞で血液凝固を開始するtissue factor活性が高度となり<sup>6)</sup>，類洞内皮細胞との間での血液凝固平衡が破綻する場合である<sup>7-9)</sup>。この機序の差異は肝マクロファージの活性化機構に依存しており，IL-18，IFN- $\gamma$ などのcytokineの作用で活性化する場合に細胞障害性因子の発現が高度となり<sup>10)</sup>，tissue factor発現の増強には腸管からのbacterial translocationが関与していることが明かとなった<sup>11, 12)</sup>。しかし，何れの機序でも，類洞内凝固の成立には肝マクロファージと類洞内皮細胞間の相互作用が重要な役割を果たしており<sup>13)</sup>，肝炎劇症化を予防するためには，マクロファージの活性化機構とともに肝への浸潤機序を解明することが必須である。

オステオポンチンはRGD配列を有する細胞外マトリックスであり<sup>14)</sup>，腎や骨に発現し，これら臓器におけるカルシウム沈着に関与している<sup>15)</sup>。しかし，最近，本因子はマクロファージに対してchemokineとしても作用することが明らかになった<sup>16, 17)</sup>。マクロファージの浸潤に関与するchemokineとしては，MCP-1及びMIP-1 $\alpha$ が知られており，障害肝においてこれらの発現が検討されてきた<sup>18-20)</sup>。従来，正常肝にはオステオポンチンの発現が認められないとされてきたが<sup>19)</sup>，本因子が細胞外マトリックスでありかつchemokineであることを考慮すると，病態肝では活性化した類洞壁細胞がこれを発現し，MCP-1やMIP-1 $\alpha$ とともにマクロファージの肝浸潤に関与している可能性がある。ラット及びマウスモデルを用いてこの可能性を追求した。

## 1. 正常ラット肝におけるオステオポンチンの発現

抗ラット単クローン抗体を用いて免疫組織学的検討では，正常ラットの肝にはオステオポンチンの染色性が認められなかった<sup>21)</sup>。正常肝はNorthern blottingでも

オステオポンチンmRNAの発現が見られなかったが，quantitative-competitive RT-PCRを行うと $3.125 \times 10^{-4}$  attomole/ $\mu$ L程度の軽微な発現が観察された。そこで，肝より各構成細胞を単離し，Northern blottingを行ったところ，肝細胞やクッパー細胞はオステオポンチンのmRNAを発現していないが，3日間培養して純度がほぼ100%になった星細胞には発現が見られることが判明した<sup>21)</sup>。培養3日後の星細胞は活性状態がquiescentに近く，生体内の細胞と機能が類似している。従って，正常肝では星細胞が軽微ながらオステオポンチンを発現している可能性があり，今後，*in situ hybridization*法による検討が必要と考えられた。

## 2. 四塩化炭素障害ラット肝におけるオステオポンチンの発現

ラットに四塩化炭素を投与すると1から3日後に中心静脈周囲に肝壊死巣が出現し，内部にクッパー細胞やマクロファージが浸潤する。肝壊死巣内のこれらマクロファージ系細胞や星細胞は活性化しており，cytokineや細胞外マトリックスを多量に産生する<sup>3, 22)</sup>。しかし，3日以降はこれら細胞の活性状態が低下し，これに伴い肝壊死巣は吸収され，肝組織像は7日後までに正常に復する。Competitive RT-PCRによる検討では，四塩化炭素障害肝におけるオステオポンチンのmRNA発現は1日後より増強し，2日後をピークに正常肝の $10^2 \sim 10^4$ 倍と高度になった<sup>21)</sup>。そこで，四塩化炭素投与2日後に単離したクッパー細胞や肝マクロファージ及び星細胞でNorthern blottingを行ったところ，これら細胞はオステオポンチンmRNAの発現が顕著であった<sup>21)</sup>。また，肝壊死巣内のマクロファージや星細胞におけるオステオポンチンの発現は，免疫組織染色により蛋白レベルでも確認され，更に，免疫電顕により染色性はGolgi装置に観察されることが明かとなった<sup>21)</sup>。以上より，肝壊死巣では活性化したクッパー細胞や肝マクロファージ及び星細胞がオステオポンチンを産生すると考えられた。一方，Transwell-Chamberを用いた検討により，組換え型ヒトオステオポンチンがマクロファージのみならずラットより単離したクッパー細胞の遊走を誘導することを証明している<sup>21)</sup>。従って，肝障害が生じると，先ず，壊死巣内部で活性化したクッパー細胞や星細胞がオステオポンチンを発現して，非壊死巣のクッパー細胞や流血中の単球の浸潤を誘導すると推定される。更に，これら浸潤細胞もオステオポンチンを発現するようになり，壊死巣内へのマクロファージ浸潤はカスケード的に進行すると推測された。

### 3. *P. acnes*死菌投与ラットにおけるオステオポンチンの発現

ラットに*P. acnes*死菌を静注すると、3日以降にマクロファージの肝浸潤が顕著となり、7日後にはこれら細胞による肉芽腫が形成される<sup>3, 4)</sup>。これら肝マクロファージは高度に活性化しており<sup>3)</sup>、ラットに少量のエンドキシンを静注した際には、類洞内皮細胞障害、類洞内凝固による広汎肝壊死が成立する<sup>4, 5)</sup>。従って、本モデルでは壊死の成立に先行してマクロファージの肝浸潤が生じることから、四塩化炭素障害肝とは浸潤機構に差異が存在する可能性がある。そこで、死菌を投与したラット肝においてオステオポンチン mRNA の発現を cRT-PCR により経時的に評価したところ、発現は1日後より増強し、3日後を最大に正常肝の10倍まで高度となることが判明した。この発現は、その後一旦減弱したが、マクロファージの活性化が顕著となる7日目には再び増強した。また、単離肝構成細胞を用いた Northern blotting や免疫組織染色により、死菌投与ラット肝でオステオポンチンを発現しているのはクッパー細胞や肝マクロファージであることが判明した。従って、本モデルでは、死菌を貪食したクッパー細胞がオステオポンチンを発現し、マクロファージの肝浸潤を誘導、更にこれら浸潤細胞も活性化するとオステオポンチンを発現するようになるかと推定された。一方、死菌を貪食したクッパー細胞は IL-18 の発現も増強し、これが Th1 細胞における IFN- $\gamma$  産生を誘導し、クッパー細胞や肝マクロファージの活性化が生じる<sup>10)</sup>。従って、死菌投与ラットでは、クッパー細胞を中心に、マクロファージの活性化機構と浸潤機構がリンクして進行すると推定された。

### 4. オステオポンチンを中心とした chemokine network

四塩化炭素や *P. acnes* 死菌を投与したラットの肝では、オステオポンチンのみならず、MCP-1 や MIP-1 $\alpha$  の mRNA 発現も高度となる。従って、マクロファージの肝浸潤には多数の chemokine が関与している可能性があり、その network におけるオステオポンチンの担う役割につき、マウスを用いて検討した。

マウスのオステオポンチン遺伝子には polymorphism が存在する<sup>21)</sup>。Allele A の遺伝子型を有するマウスでは、感染症などの生体反応によりオステオポンチン mRNA の発現が誘導されるが、Allele B または C のマウスでは発現が軽微である<sup>23)</sup>。この遺伝子型の差異はリッケッチャ感染に対する感受性と密接に関連しており、Allele A のマウスは抵抗性であるが、B、C のマウスでは致死性であり、これはオステオポンチンによるマクロファージ誘導の有無に起因していると

考えられている<sup>24)</sup>。そこで、この遺伝子型の異なるマウスを用いて、マクロファージの肝浸潤に対するオステオポンチンの役割を検討した。

Allele A の遺伝子型である BALB/cJ マウスに *P. acnes* 死菌を静注すると、7日後にはラットの場合と同様に、肝に多数のマクロファージが浸潤し、肉芽腫が観察されるようになった。しかし、Allele B の C3H/HeJ マウスでは死菌投与後の肉芽腫形成は軽微であり、マクロファージの肝浸潤は明かに軽減していた。これらマウスの肝で cRT-PCR により MCP-1 及び MIP-1 $\alpha$  の mRNA 発現を評価したところ、何れも死菌投与1日以降より発現が高度となり、その程度は両マウス間で差異が認められなかった。*In vitro* では MCP-1 や MIP-1 $\alpha$  はマクロファージの遊走を促進するのは明かであるが、死菌投与後の肝マクロファージ浸潤において、これら chemokine の意義は決して大きくなく、むしろオステオポンチンが中心的役割を担っていると考えられた。現在、クッパー細胞や星細胞におけるオステオポンチンの発現調節機構を、これら chemokine との関連で検討している。

### 結 語

障害肝では壊死巣内の活性化クッパー細胞や肝マクロファージ及び星細胞がオステオポンチンを発現し、これがマクロファージの肝浸潤の要因となる。また、ラットの劇症肝炎モデルでは、まず、クッパー細胞がオステオポンチンを発現し、肝障害の原因となるマクロファージの浸潤を誘導していることが明らかになった。これら病態肝では MCP-1 や MIP-1 $\alpha$  の発現も増強するが、これらによる chemokine network においてオステオポンチンは中心的役割を担っていると推定された。

### 参 考 文 献

- 1) Fujiwara K, Okita K, Akamatsu K, et al. *Gastroenterol Jpn* 23:423-427, 1988.
- 2) Mochida S, Ohno A, Arai M, et al. *J Gastroenterol Hepatol* 10:S38-S42, 1995.
- 3) Mochida S, Ogata I, Ohta Y, et al. *J Pathol* 158:67-71, 1989.
- 4) Yamada S, Ogata I, Hirata K, et al. *Scand J Gastroenterol* 24:293-298, 1989.
- 5) Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. *Gastroenterology* 104:1466-1471, 1993.
- 6) Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. *Thromb Res* 80:113-123, 1995.
- 7) Mochida S, Ogata I, Hirata K, et al. *Gastroenterology* 99:771-777, 1990.



- 8) Yamanobe F, Mochida S, Ohno A, et al. *Thromb Res* 85:493-501, 1997.
- 9) Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. *Hepatology* (in press).
- 10) Toshima K, Mochida S, Ishikawa K, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 246:731-735, 1998.
- 11) Mochida S, Ohta Y, Ogata I, et al. *J Hepatol* 16:266-272, 1992.
- 12) Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. *Hepatology* 27:123-127, 1998.
- 13) Mochida S, Ohno A, Arai M, et al. *Hepatology* 23:320-328, 1996.
- 14) Ruoslahti E, Pierschbacher MD. *Science* 238:491-497, 1987.
- 15) Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, et al. *Microbiol Immunol* 41:641-648, 1997.
- 16) Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. *Trend Cardiovasc Med* 5:88-95, 1995.
- 17) Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, et al. *Am J Pathol* 152:353-358, 1998.
- 18) Marra F, DeFranco R, Grappone C, et al. *Am J Pathol* 152, 423-430, 1998.
- 19) Xu Y, Rojkind M, Czaja MJ. *Gastroenterology* 110: 1870-1877, 1996.
- 20) Adams DH, Hubscher S, Fear J, et al. *Transplantation* 61:817-825, 1996.
- 21) Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
- 22) Ogata I, Mochida S, Tomiya T, et al. *Hepatology* 14:361-367, 1991.
- 23) Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. *Clinical Rev Immunol* 13:225-246, 1993.
- 24) Patra R, Freeman GJ, Singh RP, et al. *J Exp Med* 170:145-161, 1989.

## 劇症肝炎における人工肝補助療法の適応と限界の再評価：神奈川・東京多施設検討

帝京大学医学部附属溝口病院・第四内科 賀古 眞

協同研究者：永井孝三, 岩崎 浩

藤川博敏, 金原 猛

菊池健太郎, 北沢絵里子

阿部和裕, 宮川 浩

### はじめに

劇症肝炎の支持療法として人工肝補助（ALS）は広く普及している。一方、大量の凍結血漿（FFP）を使用することなどより、主に医療費の面から施行回数が制限される傾向にある。そこで今回、より適切なALS療法の確立を目的に多施設症例をレトロスペクティブに病型、ALS技法、施行回数と予後との関連につき検討を行った。

### 対象と方法

東京、神奈川で劇症肝炎の治療を行っている8施設（表-1）を中心に形成された神奈川・東京劇症肝炎ネットワークに過去10年間集計された劇症肝炎126例中ALSが行われた115例を対象とした。その内訳は急性型55例（男性30例、平均年齢45.4才、女性25例、同39.6才）、亜急性型60例（男性37例、平均年齢43.7才、女性23例、同48.7才）である。ALSは血漿交換（PE）+血液濾過透析（HDF）を主体に、一部PE単独、ないしHDF単独で行われているが、初回はFFP40単位、HDF置換液20lで行い、臨床経過を観察しながら増減している。集計された症例の病型、選択されたALSの技法、施行回数、予後、死亡例ではその死亡原因を解析した。

### 結 果

#### 1. 急性型劇症肝炎におけるALSの有効性と施行回数

劇症肝炎急性型のALS開始時平均昏睡度は2.8度であり、開始時昏睡度と救命率には相関はなかった。ALSの覚醒効果は、I度以下まで改善した症例は39例で覚醒率70.9%であり、救命例は31例で救命率は56.4%であった（表-2）。I度以下まで覚醒したが救命できなかった症例は9例でその死亡原因は、感染症3例、出血2例、DIC1例、ARDS1例、不整脈1例、門脈血栓症1例であり、肝不全死は認めなかった。ALSの手法としては、PE+HDFが主に行われたが、PE単独、PE+HDF、HDF単独間に、救命率に差はなかった。しかしながらPE単独例では、平均施行回数が短く、PE単独例は軽症例が多かった可能性がある。ALS施行回数は平均7.3回であったが、14回までは救命率が高

く、急性型で救命率を向上させるためには14回までは継続すべきと考えられた(表-3)。

## 2. 亜急性型劇症肝炎におけるALSの有効性と施行回数

劇症肝炎亜急性型のALS開始時平均昏睡度は2.2度で、急性型同様開始時昏睡度と救命率には相関はなかった。ALSの覚醒効果はI度で開始された13例を除くと覚醒例は28例で、覚醒率60.9%であり、救命例は14例、救命率は23.7%であった。ALSにてI度以下まで覚醒したものの救命できなかった症例は27例であり、その死亡原因は肝不全が11例、感染症8例、出血、腎不全、DIC、不明が各々2例であった(表-4)。ALSの技法としてはPE単独に比し、PE+HDF施行例では有意に救命率は高かった(表-5)、施行回数と救命率には明らかな関連は見られなかったが、20回以上の長期施行例にも少なからず救命例を認めた(表-6)。

### 考察・結論

一般に劇症肝炎は予後不良な疾患とされている。当初より急性型と亜急性型の予後の違いが指摘されていたが<sup>1)</sup>、近年強力なALS装置の開発によりこの傾向はより顕著となっている。急性型では救命率が80%に近い報告もあり<sup>2)</sup>、予後不良とは言い難い現状にある。本研究が覚醒率70.9%、救命率56.4%と比較的低率に留まったのは多施設症例集計による過去10年間の検討であるためと考えられたが、ALSで覚醒が得られたものの死亡した症例に肝不全はなく、合併症対策を万全にすることにより救命率を覚醒率に近づけることは十分に可能であると考えられた。一部に発症早期より強力な肝補助を開始しても覚醒しない例が存在するが、それを除けば急性型はALSを主体とした集中治療により救命可能な病態と考えられた。その際、果たして何回ALSを施行する必要があるかは症例により異なるが、14回までは救命率50%以上を示しており、急性型では少なくとも2週間の継続は認められるべきものと思われた。

表1 協同研究施設

昭和大学藤が丘病院消化器内科  
 帝京大学第4内科  
 横浜市立大学第3内科  
 東京女子医科大学消化器病センター  
 東邦大学第2内科  
 昭和大学第2内科  
 自衛隊中央病院内科  
 社会保険中央病院内科

亜急性型では覚醒率60.9%、救命率23.7%と較差があり、覚醒したものの死亡した症例の死亡原因のうち肝不全が11例(40.7%)と第1位であった。このことは亜急性型ではALS単独の限界を示すものであり、全国集計でも、その救命率は10%にも満たない<sup>3)</sup>。近年、劇症化を予知し早期にインターフェロン、シクロスポリン、ステロイドパルス療法など肝炎対策を併用することにより、亜急性型においても良好な救命率が報告されている<sup>4)</sup>。本研究は過去10年間の総計であり、肝炎対策が充分に行われたとは言い難い症例が多いことが低い救命率に反映したと考えられる。肝移植が生体肝移植以外、遅々として進展しない我が国の現状では今後も肝炎対策の確立が救命率向上のポイントとなるが、その際、肝不全状態の期間を強力なALSで全身状態を良好に保つことが必須である。この観点からALSはPE単独では充分とは言えず、持続濾過透析ないし血漿濾過透析を併用することの有用性が本研究で明らかとなった。施行回数は当然、20回を超える症例も少なくなく保険医療制度下でのcost-benefitの問題が残るが、現時点では例え、移植を選択するとしてもbridge useとしてかなりの期間ALSが不可欠であり許容期間の延長が期待される。

### 参考文献

- 1) 高橋善弥太：劇症肝炎の診断基準，第12回犬山シンポジウム，中外医学社，東京，p110，1981。
- 2) 井上和明，関山和彦，与芝 真：劇症肝炎における血液浄化法の評価と限界，肝臓39:872，1998。
- 3) 鈴木一幸，佐藤俊一：我が国における劇症肝炎の治療の現況と将来，肝臓39:872，1998。
- 4) 与芝 真，関山和彦，井上和明他：劇症肝炎の早期診断と早期治療，厚生省特定疾患難治性の肝疾患調査研究班平成9年度研究報告，75，1998。

表2 A.L.S.の覚醒効果と救命率(急性型)

昏睡度	I	II	III	IV	V
例数	39	9	0	6	1
救命数	30	1	0	0	0
				覚醒効果	70.9%
				救命率	56.4%

表3 A.L.S.施行回数と救命率(急性型)

施行回数	~4	5~9	10~14	15~19	20~
例数	8	23	8	2	6
救命数	6	12	5	1	1
救命率(%)	75	52.2	62.5	50	16.7
				救命例の平均施行回数	7.3±6.2

表4 A.L.S.の覚醒効果と救命率（亜急性型）

昏睡度	I	II	III	IV	V
例数	41	9	4	5	0
救命数	14	0	0	0	0
	覚醒効果 60.9%				
	救命率 23.7%				

表5 A.L.S.の選択（亜急性性）

	例数	平均施行回数(日)	覚醒効果	救命率(率%)
PE単独	10(4)*	8.3(4~16)	3(50%)	1(10)
PE+HDF	48(9)*	15.8(2~40)	27(69.2%)	12(24.5)
HDF単独	1	2	1	1

(\*)昏睡度I度でA.L.S.が行われた症例数

表6 A.L.S.施行回数と救命率（亜急性型）

施行回数	~9	10~19	20~29	30~
例数	16	18	10	4
救命数	4	3	4	1
救命率(%)	25	16.7	40	25
救命例の平均A.L.S.施行回数17.1(5~40)				

## 劇症肝炎発症における肝細胞アポトーシスとsensitization機構に関する研究

岐阜大学医学部・第一内科 森脇 久隆

協同研究者：永木正仁，大澤陽介

杉山昭彦，大西弘生

岐阜大学医学部・生化学 中島 茂

### はじめに

tumor necrosis factor (TNF) /TNF受容体とFasリガンド/Fasを介するシステムが多くの細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。マウスにTNF<sup>1)</sup>や抗Fas抗体<sup>2)</sup>を投与すると同様に広範な出血性肝細胞障害が惹起され、マウスは死に至ることが報告されている。これら分子の受容体を介するシグナル伝達経路には、おもにcaspaseと呼ばれるプロテアーゼの活性化による共通のプロテアーゼカスケードが存在していることが示されているが、一方、TNFの場合、caspase以外にも転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することが知られている<sup>3)</sup>。そこで今回、肝細胞死におけるTNF- $\alpha$ /TNF受容体についてFasリガンド/Fasシステムと対比して検討し、さらに肝細胞アポトーシスに対するsensitization機構に関して実験的検討を行った。

### 方 法

マウスにTNF- $\alpha$ あるいは抗マウスモノクローナルFas抗体 (Jo2) を単独または少量のGalNと併用して腹腔内に投与し、血清ALTおよび肝組織所見を検討した。また、

GalN, TNF- $\alpha$ , GalN+TNF- $\alpha$ , Fas抗体をマウスに投与 (TNF- $\alpha$ は静脈内投与) した後、経時的に血清ALTを測定し、肝組織をTUNEL法にて染色することでapoptosis細胞の検討を行った。さらに肝において、TNF受容体 (TNFR) 1 (p55) およびTNFR2 (p75) mRNAの発現をノーザンブロット法にて経時的に検討した。GalN+TNF- $\alpha$ 投与マウスに及ぼすTNFR1およびTNFR2抗体の効果を検討した。GalN, TNF- $\alpha$ , GalN+TNF- $\alpha$ 投与マウスの肝臓における遺伝子発現の違いをmRNA fingerprinting analysis using arbitrarily primed PCR (RAP) 法<sup>4)</sup>を用いて検索した。RAP法は45種類のarbitrary primerを用いて行い、差の見られたバンドについてはノーザンブロットで確認した後、ベクターに組み込んで塩基配列を決定した。

### 結 果

TNF- $\alpha$ と抗Fas抗体を単独またはGalNと併用投与した際の血清ALT値を検討したところ、TNF- $\alpha$ は単独では5mgの投与でも全く肝障害を引き起こさないのに、GalNと併用投与すると0.5mgで肝障害を惹起した。一方、抗Fas抗体は単独、併用とも10mg以上の投与で肝障害が惹起され、軽度のGalNとの併用効果がみられるが、TNF- $\alpha$ に比較するとGalNによる肝障害の増強作用は軽微であった。TUNEL法を用いてアポトーシス細胞を検討したところ、GalN, TNF- $\alpha$ 単独では肝細胞にアポトーシスは全く誘導されなかった。GalN+TNF- $\alpha$ 投与マウスにおいて、投与3時間後より肝細胞にアポトーシスが認められ、5時間後には血清ALTの中等度上昇とアポトーシス肝細胞数の増加が認められ、その後に広範な肝細胞障害の像

が観察された(表)。Fas抗体投与マウスにおいても同様に、肝細胞でのアポトーシスの誘導を契機とした広範な出血性肝細胞障害が惹起されたが、その発現はGalN+TNF- $\alpha$ より早期に認められた。

GalN, TNF- $\alpha$ , Fas抗体投与後の肝におけるTNF受容体mRNAの発現をノーザンブロット法にて検討した。GalNを投与すると30分後より3時間後までTNFR1 mRNAの発現の増強が認められた。一方、TNFR2 mRNAの発現には大きな変動は認められなかった。次に、GalN+TNF- $\alpha$ 投与マウスに抗TNFR1抗体および抗TNFR2抗体を投与し肝障害に及ぼす影響を検討したところ、抗TNFR1抗体の投与により肝細胞障害は抑制されたが、抗TNFR2抗体の投与では抑制効果は認められなかった。

RAP法によって特徴的な発現を示した12個の遺伝子について検討を行い、その中でもラジカルスカベンジャーであるselenoprotein P mRNAの発現がGalN投与3時間後をピークとして上昇し、さらにその発現はTNF- $\alpha$ の併用により増強された。

#### 結論・考察

TNF- $\alpha$ およびFas抗体はともに、肝細胞にアポトーシスを誘導することによって急性肝不全を惹起するが、TNF- $\alpha$ により誘導されるアポトーシスは、Fasシステム系とは異なり、肝細胞がGalNによりsensitizeされることが必要であること、アポトーシスの誘導に時間を要すること等の相違が認められた。つまりTNF- $\alpha$ による肝細胞死の誘導には、攻撃因子とともに、肝細胞のsensitization、つまり肝細胞が準備状態にあることが必要であると考えられた。肝細胞sensitization機構の解明を目的として、GalN投与後の肝臓でのTNF受容体の発現を遺伝子レベルで検討した。TNF受容体には分子量55kDaのTNFR1と75kDaのTNFR2の2種類の受容体が存在することが知られている<sup>5)</sup>がGalN投与後、肝においてTNFR1 mRNAの発現のみが早期に観察され、GalNによる肝細胞のsensitizationには、TNFR1が誘導されることが重要であると考えられた。また、肝細胞アポトーシスおよび肝細胞sensitizationでの細胞内シグナルを検討する目的で、GalN, TNF- $\alpha$ , GalN+TNF- $\alpha$ 投与マウスの肝臓における遺伝子発現の違いをRAP法を用いて検索したところ、ラジカルスカベンジャーであるselenoprotein P mRNAの発現がGalN投与3時間後をピークとして上昇することが認められた。近年、転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化がアポトーシスを抑制することが知られている<sup>6)</sup>し、一方、ラジカルはNF- $\kappa$ Bを活性化する<sup>7)</sup>ことが知られている。これらのことより、ラジカルやNF- $\kappa$ Bが肝細胞sensitizationに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al: Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF- $\alpha$  requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994; 153: 1778-1788.
- 2) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364:806-809.
- 3) Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- 4) Welsh J, Chada K, Dala SS, et al: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucl Acid Res* 1992; 20: 4965-4970.
- 5) Vandenaebelle P, Declercq W, Beyaert R, et al: Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995; 5:392-399.
- 6) Beg AA, Baltimore D: An essential role of NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 1996; 274:782-784.
- 7) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10:2247-2258.

表. 肝障害と肝細胞アポトーシス

	Time (h)	ALT (IU/L)	アポトーシス細胞 (%)
GalN	3	42	0
TNF- $\alpha$	3	50	0
GalN/TNF- $\alpha$	3	53	3
GalN	5	45	0
TNF- $\alpha$	5	42	0
GalN/TNF- $\alpha$	5	1275	23
GalN	8	53	0
TNF- $\alpha$	8	58	0
GalN/TNF- $\alpha$	8	15117	55
Anti-Fas	1	30	1
Anti-Fas	2	5583	38
Anti-Fas	3	11433	52

## バイオ人工肝の開発

岐阜大学医学部・第一内科 森脇 久隆

協同研究者: 永木正仁, 内木隆文

大西弘生

慶北大学・外科

金 良一

テルモ研究開発センター

三木敬三郎, 石山晴生

平原一郎, 高橋啓明

応用生化学研究所

四童子好広, 小島久典

### はじめに

バイオ人工肝の開発には、肝細胞に長期間、高度の肝細胞特異的機能を発現させるコンパクトな体外灌流システムの確立が最も重要である。我々は細胞外マトリックスによる肝細胞分化機能発現作用に注目し、種々の細胞外マトリックスを検討した結果、基底膜類似成分で構成されるEHS (Engelbreth-Holm-Swarm) ゲルが、最も長期間、肝細胞特異的遺伝子の発現を維持し、さらにその作用は転写制御因子であるhepatocyte nuclear factor (HNF)-1並びに-4を介して制御されていることを報告してきた<sup>1)</sup>。今回、EHSゲルを応用したバイオ人工肝モジュールの臨床応用を目標に、大型哺乳動物を用いて本

バイオ人工肝の有効性を検討するとともに、バイオ人工肝への応用を目的に、HNF-4を肝細胞に遺伝子導入することで、より高度の肝細胞特異的機能を発現するスーパー肝細胞の確立を目指している。

### 方 法

約10kgのSD系ブタより、肝細胞を分離した後、 $10^8$  cells/mlの濃度になるようEHS gelに懸濁し、ホロファイバーのextracapillary spaceに充填した。虚血性肝不全ブタは、約40kgのブタを用い、門脈下大静脈吻合後、肝動脈を結紮離断し、肝への血流をすべて遮断することで作製した。血流遮断8時間後、バイオ人工肝モジュール (n=4) およびブタ肝細胞を含まないホロファイバー (n=4) を連結し、体外灌流を行い、その治療効果として生存期間、血液生化学データを測定した。

アデノウイルスのE1a, E1b, E3を欠失させて作製した非増殖性アデノウイルスのE1部分にCAGプロモーターを有したラットHNF-4遺伝子を組み込んだベクターを作製し(図)、ラット初代培養肝細胞とヒト肝癌株細胞であるHep G2細胞やHuH7細胞に感染させ、細胞内のHNF-4をウエスタンブロット法で、培養液中のアルブミン濃度をELISA法にて測定した。

### 結 果

モデル作製後の生存時間はバイオ人工肝群 (n=4) :

26.0±8.8時間, コントロール群 (n=4) : 18.6±10.5時間であり, 生存時間には有意差を認めなかった。しかし, バイオ人工肝群ではバイオリクター装着後より低下していた重炭酸イオン濃度は上昇し, 循環動態の安定が得られた。一方, コントロール群では重炭酸イオン濃度の上昇はみられず, 血圧は低値のまま推移した。また, バイオ人工肝群において, 人工肝モジュールを装着後より, 上昇していた血液アンモニア値の低下が認められたが, コントロール群ではアンモニア濃度の低下は認められなかった。(表)。

HNF-4を遺伝子導入されたラット初代培養細胞においてHNF-4の発現の増加と培養液中アルブミン濃度の上昇が認められた。また, Hep G2細胞やHuH7細胞でも培養液中へのアルブミン分泌の増加が認められた。

### 結論・考察

細胞の分化形質は特異遺伝子の発現によってもたらされている。分化した細胞で特定の遺伝子が発現するための機構として, 細胞特異的な転写因子複合体の構築がある。例えばアルブミン遺伝子の発現は, エンハンサー領域において種々の転写制御因子によって制御されていることが判明している<sup>2)</sup>。既に我々は, 細胞外マトリックスによる肝細胞の分化機能の発現, 維持が転写制御因子であるhepatocyte nuclear factor (HNF) -1並びに-4を介して制御されていることおよび種々の細胞外マトリックスの中でEHSゲルが, 最も長期間, 肝細胞特異的遺伝子の発現を維持することを報告してきた<sup>1)</sup>。転写制御因子HNFを制御するEHSゲルを応用したホロファイバー型モジュールは, 急性虚血性肝不全ブタに対して血液中のアンモニアや乳酸を有効に代謝しており, 体外灌流型ハイ

ブリッド人工肝の実現に向けて大きな可能性を持つ魅力あるシステムであると考えられた。

細胞特異遺伝子の発現調節は転写レベルにおいて比較的少数の中心的な制御因子によって調節を受けているため, そのヒエラルキーの上位に位置する遺伝子を誘導することにより, より多くの遺伝子を一度に誘導することが可能であると考えられる。そこで我々は, 転写制御因子であるHNF-4を肝細胞に遺伝子導入することで分化形質を高度に発現したスーパー肝細胞を確立し, それをバイオ人工肝に応用しようとして試みている。ラットHNF-4遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターは, ラット初代培養肝細胞やヒト肝癌株細胞において, HNF-4遺伝子の発現, アルブミン分泌の増加を誘導することにより, スーパー肝細胞の確立ならびにバイオ人工肝への応用に有望であると考えられた。

### 参考文献

- 1) Nagaki M, Shidoji Y, Yamada Y, et al: Regulation of hepatic genes and liver transcription factors in rat hepatocytes by extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:38-43.
- 2) Xanthopoulos KG, Prezioso VR, Chen WS, et al: The different tissue transcription patterns of genes for HNF-1, C/EBP, HNF-4, protein factors that govern liver-specific transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:3807-3811.

図. アデノウイルスゲノムDNAとアデノウイルスベクター

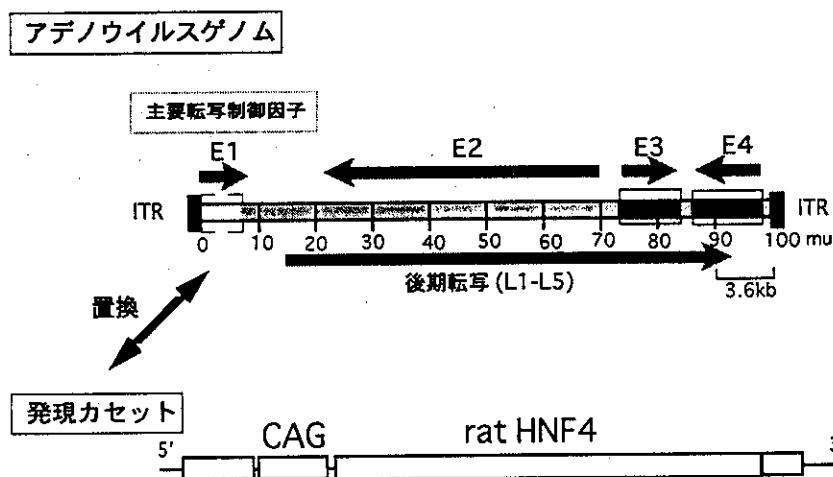


表. 急性虚血性肝不全ブタにおける生化学検査所見

	0 h	コントロール		バイオ人工肝	
		8 h	12 h	8 h	12 h
Glucose (mg/dL)	196	235	196	277	304
Albumin (g/dL)	3.6	3.2	3.1	3.5	3.2
AST (IU/L)	68	539	562	372	818
ALT (IU/L)	39	53	62	45	64
Total bilirubin (mg/dL)	0.6	0.9	0.7	0.6	0.7
Prothrombin time (s)	12.3	14.1	16.7	13.2	21.1
Creatinine (mg/dL)	1.7	2.8	3.1	1.6	1.9
pH	7.49	7.25	7.26	7.20	7.35
NH <sub>3</sub> (μg/dL)	73	368	388	537	412

## B型劇症肝炎とMannose-binding protein値・変異との関連

自衛隊中央病院・内科 箱崎 幸也

大阪大学微生物研究所

三谷圭二, 小針伸一

藤岡高広, 大庭健一

白浜龍興, 若宮伸隆

昭和大学藤が丘病院・内科

与芝 真, 関山和彦

### はじめに

近年の分子生物学の著しい進歩により, T/Bリンパ球や免疫グロブリンなど特異性の高い免疫認識システムばかりでなく, 非特異免疫(NK細胞/補体など)が感染症に対する基礎免疫を担っていることが明らかにされている<sup>1,2)</sup>。レクチンには植物レクチンと動物レクチンの2種類があり, 特に動物レクチンの基礎免疫に重要な役割が明らかになりつつある。現在動物レクチンは, ①マンナン結合蛋白(Mannose-binding protein: MBP), ②コングルチニン, ③CL-43, ④肺サーファクタントや羊水中に存在するサーファクタント蛋白A, ⑤サーファクタント蛋白Bの5種類が発見され, Ca<sup>2+</sup>要求性の糖認識領域とコラーゲン様構造をもちコレクチン(collectin)と呼ばれている<sup>3)</sup>。特にMBPは, 人でのMBP欠損症でMBP補充療法が有効と報告され, ウイルスや細菌に対す

る基礎免疫に重要な役割を果たしていることが確認されている。

Thomas HCら<sup>4)</sup>は, Caucasianの成人期のB型肝炎ウイルス(以下HBV)感染の転帰とMBPの変異とが相関することを報告している。一方日本成人におけるHBV感染とMBPとの相関は未だ明らかでなく, 劇症肝炎での宿主因子としてのMBPの検討もなされていません。今回我々は, 日本人におけるB型急性・劇症・慢性肝炎症例で血清MBP濃度とMBP遺伝子型との関連性について検討を行った。

### 対象と方法

HBs抗原陰性かつ肝機能検査基準範囲内の130例を正常対照とし, B型急性肝炎17例(重症型10例), B型慢性肝炎37例, B型肝炎ウイルスに起因する劇症肝炎38例の計220症例で検討を行った。劇症肝炎症例の内訳では, 急性HBV感染が17例(急性型16例・亜急性型1例)であり, 死亡症例は6例(35%)であった。HBVキャリアによる劇症肝炎症例は21例で, 亜急性型が19例・急性型1例・LOHF1例であり, 死亡例は13例(62%)であった。年齢・性別等の背景因子に, 有意差は認められなかった(Table 1)。

血清MBP測定は, ELISA(サンドイッチアッセイ)法にて行った。MBP変異の有無は, Thomasらに準じてPCR法で増幅し制限酵素による切断とdirect sequencingにより調べた(Table 2)。測定は, 各種疾患の入院診断時

の保存血清で行い、2群の比較はStudent's T検定 (Welch's method) を用い、3群以上の比較はKruskal-Wallis検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 1. 各種疾患における血清MBP値の比較

正常対照例とHBVに起因する各種病態における血清MBP値は、正常対照例 $1.04 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$ であった。各種疾患の比較検討では、急性肝炎例では $1.42 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ で最も高値であった。慢性肝炎例では $1.38 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ 、劇症肝炎例では $1.26 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ であった (Fig. 1)。急性HBV感染とHBキャリアからの劇症肝炎例では、正常対照例に比し高値であったが有意差はなく、各種疾患群間でMBP値に差は認められなかった。B型急性肝炎/急性肝炎(重症型)・急性HBV感染による劇症肝炎例のMBP値では、急性肝炎(重症型)が $1.49 \mu\text{g/ml}$ と最も高値であった (Fig. 2)。今回対象とした劇症肝炎38例では、生存19例・死亡19例であった。生存例のMBP値は $1.58 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ であり、死亡例のMBP値 $0.79 \pm 0.95 \mu\text{g/ml}$ と比較し有意に低値であった ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 3)。

### 2. 各種疾患におけるMBP遺伝子型の比較

正常対照と各種疾患におけるMBP遺伝子型です。今回の検討では、遺伝子変異としてはコドン54のみの変異が検出され、Thomas HCらの報告とは異なりコドン52/57の変異は認められなかった。Thomas HCらの既報の如く、B型慢性肝炎例では正常対照と比し、野生株の比率が低くヘテロが若干高率であったが有意差は認められなかった。劇症肝炎例では、正常対照例と同様の傾向であった (Table 3)。

劇症肝炎例での死亡/生存例での遺伝子型の検討では、死亡例でややヘテロが高率に出現する傾向にあったが、有意差はなかった (Table 4)。

## 考案・結論

ウイルスに対するコレクチンの作用には、(1)直接作用、(2)補体系を利用する経路、(3)オプソニン化による排除があるとされているが、詳細な生理的機能は未だ不明である。さらに、HBV感染の転帰とMBPの変異とが相関する<sup>4)</sup>ことやMBPがHBVの持続感染を阻止することが報告<sup>5)</sup>され、MBPとHBV感染との密接な関連が報告されている。しかし未だ、HBV起因性の劇症肝炎とMBP値・遺伝子型との関連については報告されていない。今回我々は、日本人においてHBV起因性の急性肝炎・慢性肝炎・劇症肝炎症例で、MBP値・遺伝子型との関連について検討を行った。

CaucasianではMBP変異とHBV感染の予後が関連<sup>4)</sup>す

ることが報告されているが、今回の検討ではコドン54のみの変異がみられ、急性肝炎・劇症肝炎例では正常対照例とはほぼ同様の変異傾向であった。本邦のB型慢性肝炎例では正常対照と比し、野生株の比率が低くヘテロが若干高率であったが有意差はなく、MBP変異とHBV感染の病態との関連は認められなかった。

HBV起因性肝炎における血清MBP値では、急性肝炎例>慢性肝炎例>劇症肝炎例と急性肝炎例で最も高値であった。各種疾患・正常対照間でMBP値に、有意差は認められなかった。しかし、今回対象としたHBV劇症肝炎38例(生存19例・死亡19例)で、生存例のMBP値は $1.58 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ 、死亡例 $0.79 \pm 0.95 \mu\text{g/ml}$ であり、劇症肝炎死亡例では有意に低値であった ( $P < 0.0001$ )。さらに、有意差はなかったが、死亡例では生存例と比しややヘテロが高率認められた。死亡例でのMBP値の有意な低下は、元々個体の基礎免疫力の低下、MBPの産生の場である肝の広範壊死の反映やMBPクリアランスの低下等が考えられた。この原因については、今後慎重な検討を要するものと考えられた。また、MBP測定は劇症肝炎診断時であり、MBP値は劇症肝炎の予後予測に有用なマーカーになりうる可能性が示唆された。

コレクチンの基礎免疫効果が効力を発揮できず、劇症肝炎が重症化し死亡する可能性も考えられるが、今後更に症例を積み重ね検討することが重要と思われた。

## 参 考 文 献

- 1) Super M, Thiel S, Lu J, et al.: Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*: ii:1236, 1989.
- 2) summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, et al.: Mannan-binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet*: 345:886, 1995.
- 3) 若宮伸隆, 鈴木定彦: レクチンによるウイルス感染防御. *臨床免疫*29(4):508-513, 1997.
- 4) Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, et al.: Mutation of gene for mannan-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*: 348:1417-1419, 1995.
- 5) Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CEM, et al.: Association between an MHC Class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 332:1065-1069: 1995.



Table 1 Pretreatment characteristics

	n	Sex	Age	Type	Prognosis
Control (HBsAg —)	130	102 : 28	45 (25~58)		
Acute HBV	17	15 : 2	32 (21~48)	Acute 10 Severe 7	
Chronic HBV	37	30 : 7	41 (21~54)		
Fulminant hepatitis	38	17 : 11	35 (20~53)		
Acute HBV	17	11 : 6	31 (20~45)	Acute 16 Subacute 1	Death 6
HBV career	21	16 : 5	37 (25~53)	Subacute 19 Acute 1/LOHF 1	Death 13

Table 2 Method of Measurement of serum MBP and Mutations of the MBP

(1) Serum MBP were measured by sandwich ELISA system.

- 1) Coating with rabbit recombinant human MBP (expressed in CHO cells) Ab (IgG fraction; 10 microgram/ml)
- 2) Blocking with BlockAce
- 3) Sample dilution x 100 and x 1000
- 4) Development with biotinylated rabbit recombinant MBP-CRD Ab
- 5) Substrate system of ABC-kit (HRP)
- 6) Sensitivity x 100 --- 0.03-1 microgram/ml  
x 1000 --- 0.03-1 microgram/ml
- 7) Standard/ affinity-purified native human MBP/ 0.716 microgram/ml  
estimation of the MBP concentration by SDS-PAGE and Coomassie staining

(2) Mutations of the MBP gene were measured by Thomas' method.

- 1) Genomic DNA was extracted from blood, and exon 1 of MBP was amplified by PCR
- 2) Mutations were analysed by sequence-specific oligonucleotide hybridisation
- 3) Codon 52 heterozygotes were confirmed by site-directed mutagenesis PCR and direct DNA sequencing

Fig.1 Serum MBP in patients with acute, chronic or Fulminant hepatitis and HBsAg-negative controls

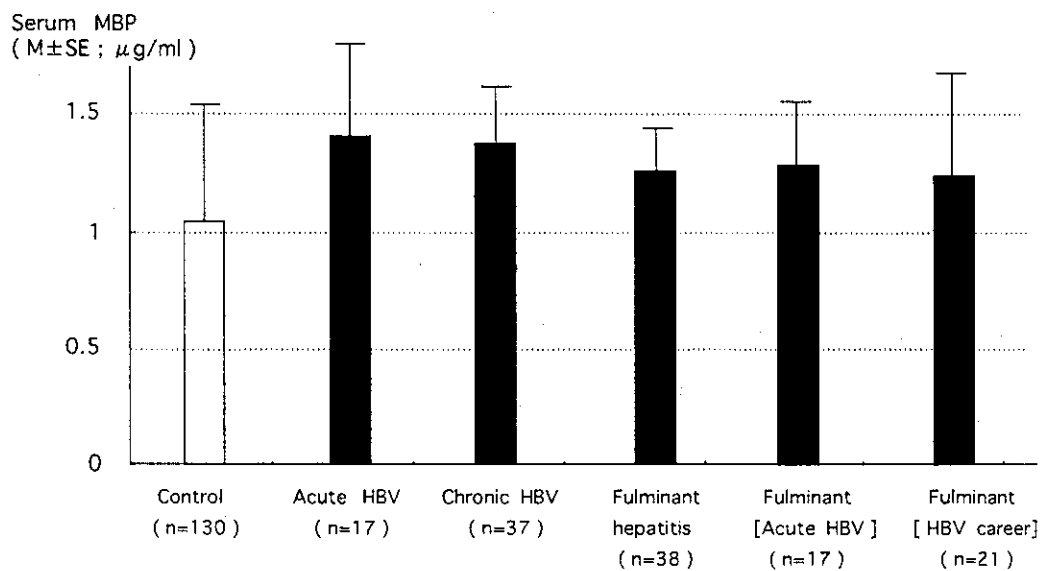


Fig.2 Serum MBP in patients with acute or Fulminant hepatitis

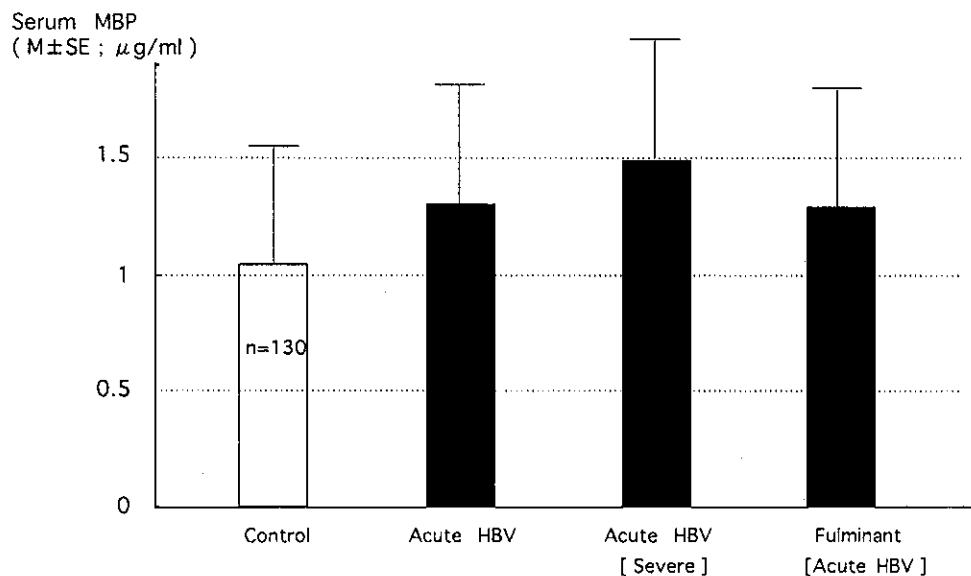


Fig.3 Serum MBP in patients with Fulminant hepatitis

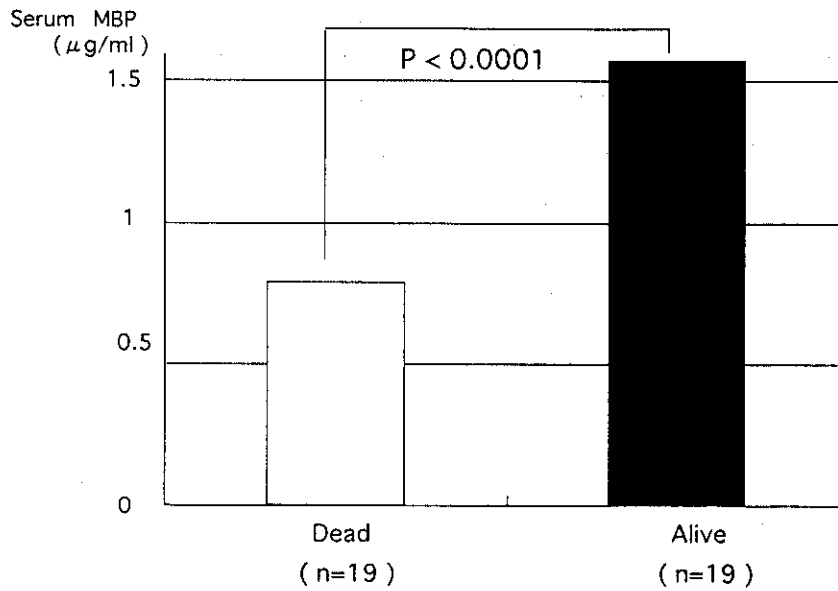


Table 3 Observed MBP genotypes in patients with acute, chronic or Fulminant hepatitis and HBsAg-negative controls

	n	Codon 54 mutation in MBP			
		W/W	W/m	m/m	-
Control	130	85 (65)	25 (19)	13 (10)	7 (5)
Acute HBV	17	9 (53)	4 (24)	3 (18)	1 (5)
Chronic HBV	37	19 (51)	11 (30)	3 (8)	4 (11)
Fulminant hepatitis	38	25 (66)	6 (16)	3 (7)	4 (11)
Acute HBV	17	12 (70)	2 (12)	1 (6)	2 (12)
HBV carrier	21	13 (62)	4 (20)	2 (9)	2 (9)

( ) : %

Table 4 MBP genotypes in patients with Fulminant hepatitis  
—compared with alive and dead—

	n	Codon 54 mutation in MBP			
		W/W	W/m	m/m	—
Control	130	85 (65)	25 (19)	13 (10)	7 (5)
Fulminant hepatitis	38	25 (66)	6 (16)	3 (7)	4 (11)
Acute HBV	17	12 (70)	2 (12)	1 (6)	2 (12)
HBV career	21	13 (62)	4 (20)	2 (9)	2 (9)
Alive	19	14 (73)	2 (11)	1 (5)	2 (11)
Dead	19	11 (58)	4 (22)	2 (10)	2 (10)

( ) : %

## 呼気中アンモニア測定装置の開発

富山医科薬科大学医学部・第三内科 渡辺 明治  
協同研究者：桑原芳弘，清水幸裕  
樋口清博

### はじめに

高アンモニア血症は、肝性脳症だけでなく脳浮腫を誘起する要因となることから、その早期診断と治療にとって極めて重要な検査である。しかし、血液脳関門を介して脳内に輸送されるアンモニア、すなわち神経毒作用を発揮するガス状アンモニア (NH<sub>3</sub>) は、血液中にごく一部しか含まれず、その大部分はイオン状アンモニア (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) からなっている。そこで本研究では、呼気中アンモニア (NH<sub>3</sub>) 濃度を分別定量する方法を開発し、肝性脳症の程度 (昏睡度) や脳浮腫の程度 (頭蓋内圧, ICP) との相関性を明らかにすることを目的とする。今日まで、電気化学式センサー法によって、終末呼気を用いる測定装置を試作し、呼気中アンモニア濃度の臨床意義について検討してきた。しかし再現性が悪く、パーキングに長時間を要するなどの問題点が生じた。今回、それらを改良し、終末呼気を用いる検知管式の呼気中アンモニア測定器 (breath ammonia analyzer) を新たに開発し<sup>1), 2), 3)</sup>、測定上の基礎的検討を行うとともにその臨床的有用性について検討した。

### 対象と方法

1. 呼気中NH<sub>3</sub>測定器 (breath ammonia analyzer) の開発については、原理的に最もシンプルで安定した結果が

得られる検知管方式がよいと考えられた。そこで、これまで検討されていなかったアンモニア検量線に及ぼす気体 (空気) の湿度、温度、検知管通過の流速などの影響について基礎的検討を行った。呼気を用いる検量線の定量性が確認された後に、血中pHを変化させ、骨格筋でアンモニアを産生させる強い運動負荷 (トレッドミル) を行った前後の血中アンモニア (NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 濃度と呼気中アンモニア (NH<sub>3</sub>) 濃度の同時測定を行い、両者の相関性について観察した。さらに肝疾患例における呼気中アンモニア濃度を測定し、その臨床的意義についても検討した。

### 結 果

1. ヒトの呼気をサンプルとして用いた検量線はこれまででなかった。そこで、呼気に近似した条件下での定量性を確認する必要がある。すなわち、一定濃度のアンモニアを含む標準ガスの湿度 (90%) と温度 (摂氏25-37度) 及び検知管を通過する気体流速 (100~200ml/分) を特殊装置を用いて変化させ、アンモニア検量線を作成した。その結果、(図1) に示すように、アンモニア濃度1~8 ppmの範囲で湿度90%、温度摂氏37度、流速200ml/分とヒト呼気中アンモニア測定に近似した条件下で定量性が確認された。強運動時にみられる呼気中NH<sub>3</sub>濃度の増加と血液中乳酸濃度または動脈血pHとの関連性を明らかにし、血中アンモニア濃度が一定でも呼気中NH<sub>3</sub>濃度の高い場合のあることを確認した。肝疾患例における血中アンモニア濃度と呼気中NH<sub>3</sub>濃度を同時に測定し、横軸に血中アンモニア濃度、縦軸に呼気中NH<sub>3</sub>濃度の各濃度をプロットし、正常値と異常値の境界に線を