

学位論文題名

Effect of High concentrations of bile Acids
on Cultured Hepatocytes

(培養肝細胞に対する高濃度胆汁酸の影響)

学位論文内容の要旨

高濃度の胆汁酸の肝細胞障害性については数種類の個々の胆汁酸についての報告が有る。MTT assayによる生存率低下、培養液中に逸脱したAST・LDH・蛋白・培養液濁度による膜障害、形態学によるapoptosis・necrosis、ミトコンドリアのATP量、ミトコンドリアの電子伝達系機能、細胞内胆汁酸量の測定などがなされているが、胆汁酸が臨床問題となるか否かは明らかにされていない。肝不全患者の血清中には多数の胆汁酸が増加し、そのうち特にコール酸(C)、ケノデオキシコール酸(CDC)、デオキシコール酸(DC)及びその抱合体は肝細胞障害性を来すと報告されている。ラット肝細胞を用いた培養胆汁酸の膜障害の報告では、タウロケノデオキシコール酸(TCDC)投与による培養液中LDHの逸脱が0.1mMから容量依存性に出現、臨界ミセル濃度の2mMになると障害は急激に増強、また胆汁酸投与によりMTT値が急激に低下する濃度から検討した臨界ミセル濃度は各種胆汁酸によって異なるとされる。しかしこれらの報告は単一胆汁酸の障害性を検討したものであり、実際の血清中には様々な種類の胆汁酸が様々な比率で混合していることから、複数を混合した胆汁酸の障害性を検討することが重要である。また臨床例では、総C/CDC比(遊離および抱合型コール酸の和と、遊離および抱合型ケノデオキシコール酸の和との比)が上昇しない肝不全症例は予後不良であり、C/CDC比は劇症肝炎と急性肝炎を鑑別する鋭敏な指標であり死亡する症例ではC/CDC比が上昇しない、など予後判定の指標としての報告がある。しかし現在まで添加する胆汁酸の総C/CDC比が培養肝細胞の肝特異的機能に与える影響は検討されていないため、本検討ではこれらを明らかにすることを目的とした。胆汁酸のうちGC(グリココール酸)、TC(タウロコール酸)、GCDC(グリコケノデオキシコール酸)、TCDCは肝不全時に血清中において正常の40-100倍に上昇し、ヒトとラットは胆汁酸組成に差があるがともに肝細胞障害で血清GCDC、TCDCが増加する。そこでこの4種の胆汁酸から2種を混合した培養液6群について、総胆汁酸(TBA) 2mMでラット肝細胞を5日間培養し、培養肝細胞に対する肝細胞障害性をMTT assayと肝特異的機能から検討した。初代培養肝細胞はコラゲナーゼ灌流法により、8から9週齢、250-300gの雄性ウ

ィスターラットから得た肝実質細胞をWilliams' E(WE)培地で24時間培養し、その後胆汁酸を含むWE培地に置換し培養を継続した。肝細胞の生存率は胆汁酸添加の1日目にMTT assayを用いて測定した。MTT値=(測定値-バックグラウンド値)/(コントロール値-バックグラウンド値)×100とした(値は吸光度)。肝特異的機能の障害の指標として胆汁酸添加の1、3、5日目に糖新生能、尿素合成能、DNA量、培養液中ALT値を測定、形態を観察し、胆汁酸構成及び総C/CDC比との関連を検討した。測定結果は、MTT値はMann-Whitney's U testで、その他はrepeated measures analysis of variance

(Scheffe's F)で解析し、 $P < 0.05$ を有意とした。MTT値はGCDC+TCDC群はTBA 1mMでは低下せず、TBA 2mMで低下した。他の群はTBA 1mMでも2mMでも低下しなかった。また過去の単独胆汁酸(GC、TC、GCDC、TCDC)の研究ではTBA 1mMおよび1.5mMではどの群もMTT値の低下が無く、TBA 2mMではGCDC、TCDCで低下、GC、TCでは低下が無かった(未発表)。以上の所見より、MTT値からみたviabilityに対する障害度はGCDC≧TCDC>GC≧TCであり、GCDCとTCDCは単独でも一緒でもTBA 2mMでは同程度の生存率の低下を来たしていた。DNA量はGCDC+TCDCではDay3より低下し漸減したが、他の群は実験経過中は高値を保っていた。培養液中ALTは、GCDC+TCDC群(TBA 2mM)で上昇し膜障害を起していると考えられるが、他の群は有意な上昇が無く膜障害は軽度と考えられた。糖新生能は、GCDC+TCDCはday 1において著明に低下した。GC+TCは対照とほぼ同じであった。Day3から他の群も有意差は無いが種々の程度に低下したが、特に胆汁酸種による傾向は無かった。尿素合成能については、GCDC+TCDCで著明に低下し、Day1からほぼ0に等しい値であった。1mMのGCDCを含むその他の群すなわちGC+GCDC、TC+GCDC群でも尿素合成能が軽度低下した。しかしこれらの群ではALTの上昇やDNA・糖新生能の低下を認めなかった。つまりこれらの群ではALTの上昇がないこと、またDNA量が維持されていることより、細胞膜障害が無く、細胞は生きているが尿素合成能が選択的に障害されたと考えられる。一方GCDCを含まない群、すなわちGC+TC、TC+TCDC、GC+TCDCでは、ALTの上昇やDNA・糖新生能・尿素合成能の低下は無かった。GCDCによる尿素合成能の障害は糖新生能よりも低濃度から出現しやすく、尿素サイクルの酵素は糖新生経路の酵素より容易に障害される為と考えられる。以上より、2mMでは、尿素合成能から見た障害度はGCDC>TCDC>GC≧TCであった。劇症肝炎を含め臨床例ではTBA 2mMという濃度はまれであるが、実際の組成に近い胆汁酸の、臨界ミセル濃度における、肝特異的機能に与える影響について検討した。胆汁酸は肝細胞のapoptosisをきたすと言われ、GCDCは0.1mM以下で肝細胞のapoptosisを、0.25mM以上でnecrosisを来すとしている。自験例で1mMのGCDCを含む群について調べると、GCDC+TCDC群では形態的にnecrosisを来し、糖新生能、尿素合成能、DNAも低下、培養液中ASTIは上昇しており、その機序は細胞壊死による肝機能の廃絶と考える。TC+GCDC、GC+GCDCでは軽度のnecrosisがあった。また1mMのTCDCを含むGC+TCDC、TC+TCDCも軽度のnecrosisを来たしており、1mMのTCDCもnecrosisをきたすと考えられた。GC+TCはControlと同様でnecrosisを来たしていなかった。投与胆汁酸の総C/CDC比

と肝細胞障害の関係を見ると、総C/CDC比が0の場合、MTT値、糖新生能、尿素合成能、DNA量、培養液中ALTは全て悪化した。総C/CDC比が1で1mMのGCDCを含む場合、尿素合成能のみ障害された。総C/CDC比が無限大ならば肝細胞障害は無かった。TBA 2mMの場合、GCDCとTCDCは混合しても単独でも、著明な肝細胞障害を来していた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Effect of High concentrations of bile Acids on Cultured Hepatocytes

(培養肝細胞に対する高濃度胆汁酸の影響)

高濃度の胆汁酸の肝細胞障害性については数種類の個々の胆汁酸についての報告がこれまでなされていた。肝不全患者の血清中に増加する胆汁酸の一部に肝細胞障害性が報告されているが、複数を混合した胆汁酸の障害性は検討されていない。臨床例では総C/CDC比(遊離型および抱合型コール酸の濃度の合計と、遊離型および抱合型ケノデオキシコール酸の濃度の合計の比)の予後判定の指標としての報告があるが、総C/CDC比が培養肝細胞の合成能に与える影響は検討されていない。そこで申請者は、胆汁酸を2種混合した培養液でラット肝細胞を培養し肝の合成能に与える影響を検討した。コラゲナーゼ灌流法により雄性ウィスターラットから得た肝実質細胞をWilliams' E(WE)培地で24時間培養し、その後劇症肝炎時に増加するグリココール酸(GC)、タウロコール酸(TC)、グリコケノデオキシコール酸(GCDC)、タウロケノデオキシコール酸(TCDC)のうち2種を等量添加し総胆汁酸量(TBA) 2mMとしたWE培地で培養を継続した。肝細胞の生存率は胆汁酸添加の1日目にMTT assayを用いて測定した。胆汁酸添加の1、3、5日目に糖新生能、尿素合成能、細胞内DNA量、培養液中ALT値を測定し、同時に形態を観察した。MTT値はGCDC+TCDCはTBA 1mMでは低下せず、TBA 2mMで低下した。他の群はTBA 1mMでも2mMでも低下しなかった。糖新生能はGCDC+TCDCがday 1において有意に低下した。尿素合成能はGCDC+TCDC、GC+GCDC、TC+GCDCがday 1とday3において有意に低下した。細胞内DNA量はGCDC+TCDCがday3において有意に低下した。培養液中ALTは、GCDC+TCDCで有意に上昇し膜障害を起していると考えられたが、他の群は有意な上昇が無く膜障害は軽度と考えられた。形態的には、GCDC+TCDCでは著明な形態変化を来した。GC+TCはControlと同様であり、その他の群では中等度の形態変化を来した。胆汁酸の肝障害性は個々の濃度が低くても複数混合すると出現し、総C/CDC比の低い胆汁酸の組み合わせは培養肝細胞に対する障害が高度であった。

公開発表にあたって副査の第2外科加藤教授から胆汁酸2種を等量混合した理由、高度肝障害がある場合の4種胆汁酸の濃度、人工肝応用時の高濃度胆汁酸への対処法、本実験モデルの中でapoptosisを来す条件についての質問があった。申請者は混合が一番基本的な1:1の混合実験から施行したこと、正常時と劇症肝炎時の今回検討した4種胆汁酸の値、人工肝のバイオリアクターに肝不全血漿を通す前の吸着を検討していること、今回の濃度ではnecrosisを来たしておりapoptosisに留まる条件は検討出来なかったことを回答した。続いて、主査の第3内科浅香教授から急性肝炎ならびに劇症肝炎症例でのGCDCとTCDCの血中濃度、2種混合実験における障害性の原因は濃度と比率のどちらか、3種以上組み合わせた場合の障害性、ウルソ添加による障害性の軽減効果、肝癌細胞への胆汁酸の添加についての質問があった。申請者は劇症肝炎時のTBAと個々の胆汁酸濃度について数値を示し、障害性の原因は濃度と比率の両方が関与しておりTBA 2mM以上かつ構成成分としてCDC群を多く含むことが障害性を来す条件であること、TCDC添加による培養液中LDH逸脱と細胞内TCDC上昇がUDCの同時添加で抑制されること、肝癌細胞への添加は今後の課題であることを回答した。続いて、副査の第1外科藤堂教授から総C/CDC比と劇症肝炎の病態との関係、G/T比についての質問があった。申請者はコール酸合成に至る酵素の活性低下により合成障害が起ること、並びにG/T比の意味について回答した。再び主査の第3内科浅香教授から、本研究の結果は診断と治療のどちらに使用するのか、胆汁酸が劇症肝炎治療のdominant factorになりうるか、障害性が強く濃度の高い胆汁酸の抑制による劇症肝炎の治療についての質問があった。申請者は診断と治療の両方に成り得ること、胆汁酸の抑制は今後の課題であることについて概ね妥当に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。