

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790485
研究課題名 (和文) ラットモデルを用いた新規肝性脳症モデルの開発と解析
研究課題名 (英文) A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behaviour disorder.

研究代表者
瀬川 誠 (SEGAWA MAKOTO)
山口大学・医学部附属病院 助教
研究者番号：70423390

研究成果の概要：

ラットを用いた急性肝不全に伴う肝性脳症モデルを開発し、肝性脳症の機序に関する基礎的研究を行った。研究の中で、脳アストロサイトが産生する s100b 蛋白が肝性脳症のマーカーとして有用であることを見いだした。また、臨床的にも肝性脳症を伴う劇症肝炎時に血清 s100b が上昇することを確認し、s100b 蛋白が肝性脳症における有用なマーカーとなる可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝性脳症、モデル、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎や肝硬変末期の肝不全患者は、肝不全に基づく多彩な神経症状を呈する肝性脳症を発現する。肝性脳症の主因は、高アンモニア血症であり、肝臓におけるウレアサイクルのアンモニア処理の低下、血液脳関門の破綻によるアンモニアの脳障害、等の関与が推察されているが、アンモニア以外の肝性脳症起因为物質の関与も示唆されており、これら

を含めた肝性脳症の病態の全体像は、依然として不明である。

また、劇症肝炎では、重篤な肝不全、多臓器不全から生じる高度の意識障害を認め、人工呼吸管理、持続的濾過透析、血症交換による凝固因子の補充を行い、肝機能の回復を待つ一方で、意識回復を目的に肝性脳症惹起因子の除去を目的に持続的濾過透析を行っている。最近の救命率は、生体肝移植の導入に

より、救命率の改善が認められるものの、ドナーの確保の問題等から、全症例に行える一般的な治療と言える状況には至っていない。また、肝性脳症が進行し、脳浮腫を来す結果、神経障害や昏睡状態を合併した症例は、移植後脳障害が改善しないことから、移植適応外となる。そのため、肝補助療法に加え、脳浮腫を予防し、肝性脳症に対する治療法の開発が急務と言える。

研究開始当初、肝性脳症の基礎的な検討を進める上で必須である肝性脳症動物モデルが確立されておらず、基礎的な検討が十分になされていない状況であった。

2. 研究の目的

我々は、肝性脳症ラットモデルを作成し、異常行動を定量化する系を確立すること、次に、このモデルを用いた肝性脳症の発症機序に関する基礎的検討を行うこと目的とした。

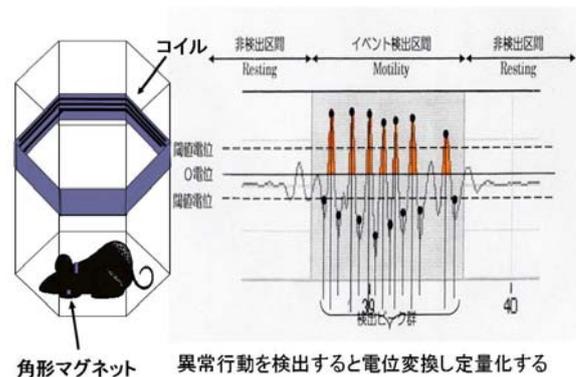
3. 研究の方法

(1)急性肝不全・肝性脳症モデルの作成

(Liver Int. 2008 Jan;28(1):117-25)

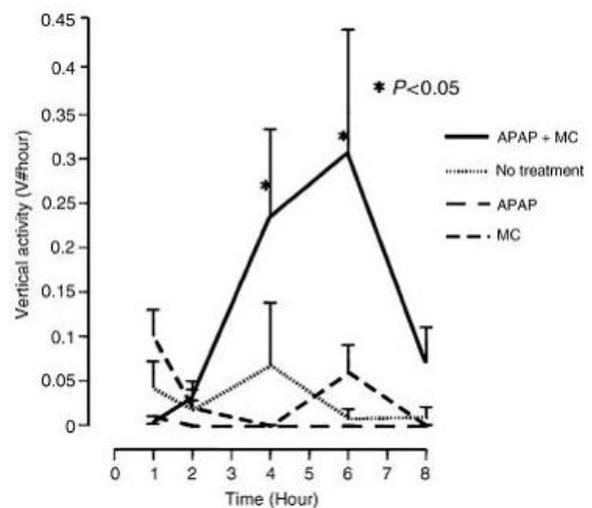
3-Methylcholanthrene (MC) 併用アセトアミノフェン (APAP) 誘発ラット急性肝不全モデルを利用して行動異常を伴う肝性脳症モデルを作成した。このモデルは投与量を変えることで任意の一定時間で肝障害を誘発させ行動変化を惹起するため、肝性脳症モデルとして使用し、投与量と異常行動の相関関係を検討した。異常行動の定量化には、スクラッチシステムを使用した。このシステムは、ラットに外科的な処置をせず、マグネットを背中など負担のかからない場所に貼り付けるという作業のみでラットの動きを定量化できる簡便な方法である。

異常行動の検出装置 (スクラッチテストシステム)



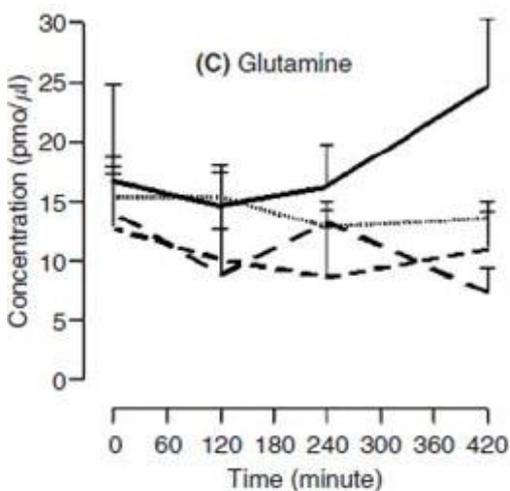
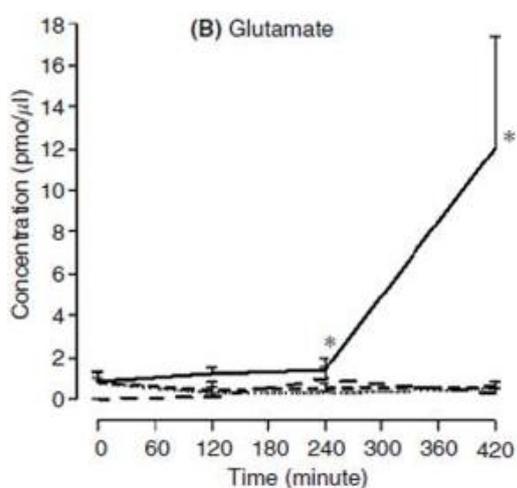
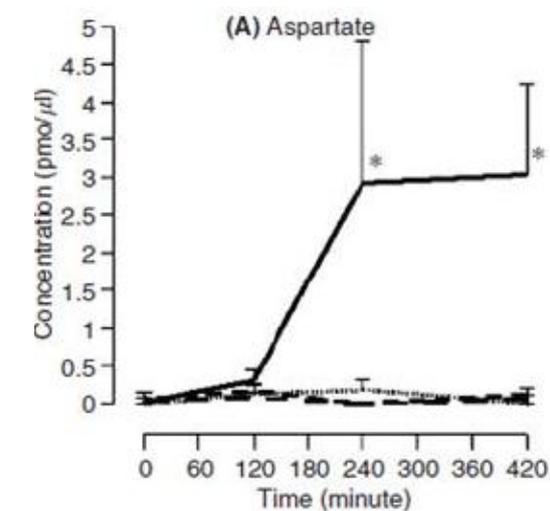
(2)急性肝不全における異常行動の定量化

3-Methylcholanthrene (MC) とアセトアミノフェン (APAP) を投与後、4-7 時間の間に、垂直方向へのジャンプ回数が著明に増加した。6 時間の時点では 38 倍に達した。



(3)脳内アミノ酸の変化の検討

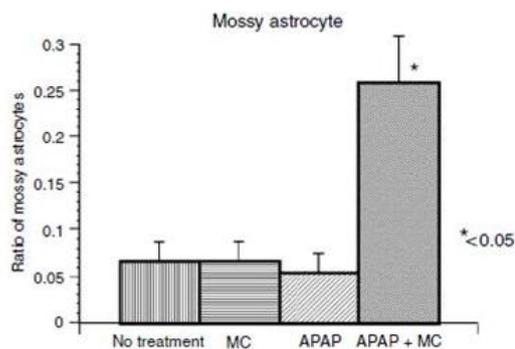
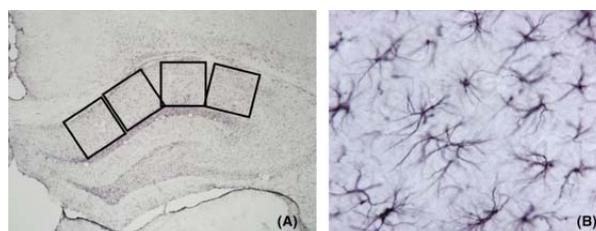
脳組織の生化学的検討から、ジャンプ行動の間、グルタミン酸とアスパラギン酸が4時間後からシナプス間隙で増加することを確認した。グルタミン酸は7時間の時点で23.9倍、アスパラギン酸は4時間の時点で16.1倍に増加したが、グルタミンは変化を認めなかった。



— APAP + MC
 No treatment
 - - - APAP
 - · - MC
 * $P < 0.05$

(4) 急性肝不全におけるアストロサイトの観察

海馬における Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫染色を行い、GFAP 陽性アストロサイトの細胞を検討した。アストロサイトは、アンモニアを代謝するグリア細胞である。急性肝不全・肝性脳症ラットモデルにおいては、アストロサイトは、樹状の枝が増生する形態の変化が生じることを観察し、mossy astrocyte と命名した。このアストロサイトの形態変化が、肝性脳症の発症に関与している可能性が示唆された。

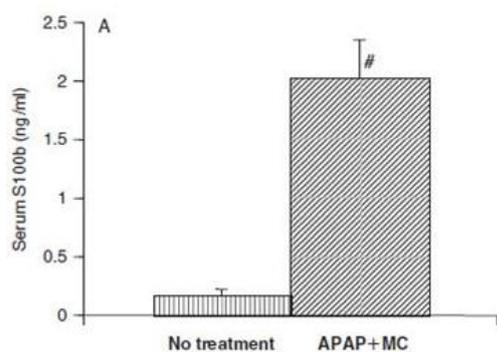


(5) 急性肝不全における血液中 S100 蛋白 (Liver Int. 2008 Jan;28(1):146-7.)

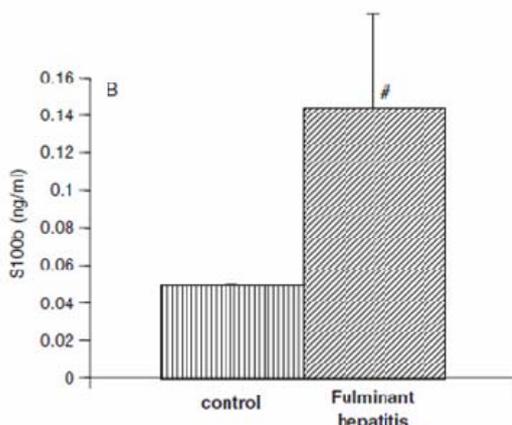
s-100 蛋白は、脳虚血など脳アストロサイトの異常活性化に伴って産生、分泌される特異的蛋白であり、高濃度では、神経細胞、アストロサイト自身にも作用し、炎症性因子の発現を増加させ、病態の悪化に関与している。脳梗塞等の脳障害において血清、髄液中の濃度が増加することから、脳障害の診断マーカーとしてその重要性が注目されている。

我々は、急性肝不全・肝性脳症ラットモデルにおける血清 s100B 蛋白を測定し、s100 蛋

白が増加していることを見いだした。



さらに、我々は、急性肝不全における肝性脳症の診断への応用を検討し、劇症肝炎患者（肝性脳症を合併）では、血清 s100B 蛋白が増加していることを見いだした。



4. 研究成果

急性肝不全・肝性脳症ラットモデルを確立した。このラットモデルを用いた基礎的検討の中で、異常行動時に出現するアストロサイトの形態的変化が肝性脳症の発症に関与している可能性が考えられた。

さらに、アストロサイトが産生する S100b 蛋白が肝性脳症発症時の有用なマーカーであることを見いだした。このマーカーは、肝性脳症を合併した劇症肝炎患者の血清 S100b 蛋白が上昇していることも判明し、劇症肝炎における脳症発症予測をする上で有用なマ

ーカーに成りうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Isobe-Harima Y, Terai S, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. Liver Int. 2008 Jan;28(1):146-7.
- 2) Isobe-Harima Y, Terai S, Miura I, Segawa M, Murata T, Itamoto K, Taura Y, Shinoda K, Sakaida I. A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behaviour disorder. Liver Int. 2008 Jan;28(1):117-25.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Yumiko Harima, Shuji Terai, Izumi Miura, Makoto Segawa, Tomoaki Murata, Kazuhito Itamoto, Yasuho Taura, Koh Shinoda, Isao Sakaida A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behavior disorder Sixth JSH Single Topic Conference 2007 年 9 月 28 日 岩手
- 2) 磯部夕美子、寺井崇二、三浦泉、瀬川誠、坂井田功 急性肝不全時の異常行動を伴う肝性脳症モデルでの神経性アミノ酸、組織学的変化の検討 第 43 回 日本肝臓学会総会 2007 年 5 月 31 日 東京

[図書] (計 0 件)
なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 誠 (SEGAWA MAKOTO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70423390

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし