

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591397

研究課題名（和文） 急性期の障害肝細胞における肝細胞死・再生の指標となる血漿メチオニン値に関する研究

研究課題名（英文） Higher serum methionine levels as a predictive factor in patients with irreversible fulminant hepatic failure

研究代表者

佐藤 和重（ SATO KAZUSHIGE ）

東北大学・病院・助教

研究者番号：40375043

研究成果の概要（和文）：劇症肝炎とは、正常の肝臓に短期間で広汎な壊死が生じ肝不全症状が出現する病態である。非代償性肝硬変症では血漿アミノ酸濃度が変化して、分岐鎖アミノ酸濃度が低下し、芳香族アミノ酸濃度が増加する。本研究ではアセトアミノフェン(APAP)を動物へ投与し肝不全モデルを作成した。APAP 投与後 36 時間後に 90%致死率を認める動物では、投与後 12 時間後（100%生存）に AST、ALT、メチオニン、アルギニン値が有意に高値に示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Fulminant hepatic failure (FHF) is characterized by acute massive liver necrosis in the absence of chronic liver disease, and also shows an imbalance of the amino acid levels that results from the acute necrosis of hepatocytes. In this study, we investigated the plasma free amino acid profiles in rats with FHF. Acute liver injury was induced by an intragastric administration of 4-hydroxyacetanilide (APAP) diluted in saline in doses of 7.5 and 3.75 g of APAP per kg b.w. Animals were sacrificed at 1, 6, 12 and 24 hours after treatment. The pre-treatment amino acid profiles of plasma were typical for hepatic failure, with abnormally high levels of phenylalanine, and tyrosine and decreased levels of valine, leucine, and isoleucine. In addition, the levels of many other amino acids such as alanine, lysine, glutamine, methionine, or arginine increased. Among these increased serum amino acids levels, a significant increase of the serum methionine levels was observed in rats with FHF who died, compared to those with FHF who survived after treatments. The markedly increased serum levels of methionine may be associated with the severity of liver damage, which could lead to impaired liver regeneration and multiple organ failure in patients with FHF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科学、肝臓

キーワード：メチオニン、急性肝不全、細胞死、肝再生

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎とは、ウイルス感染、薬物などが原因で、正常の肝臓に短期間で広汎な壊死が生じ、進行性の黄疸、出血傾向及び精神神経症状（肝性脳症）などの肝不全症状が出現する病態である。わが国では、「初発症状出現から8週以内にプロトロンビン時間が40%以下に低下し、昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症を生じる肝炎」と定義されている。厚生労働省の研究班の全国調査によれば年間100例前後の症例が登録されており、1990年以降の年間発生数はほぼ一定と推定されている。内科的救命率は50%未満であり、肝移植による治療が必要になることが多い。治療開始5日後に肝移植適応ガイドライン（日本急性肝不全研究会）に従って予後を再予測し、死亡と予測された場合に肝移植を実施しているのが現況である。脳症が出現した時点で、年齢やプロトロンビン時間などから、患者の“予後”を判定する。全ての症例で肝移植が必要か否か基礎実験を含めエビデンスはない。一方、非代償性肝硬変症では血漿アミノ酸濃度が変化して、分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）濃度が低下し、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）濃度や、メチオニン（Met）濃度が増加することは知られているが、急性期の肝障害によるアミノ酸濃度の変化について検討した研究はない。

2. 研究の目的

1991年より現在まで東北大学病院移植・再建・内視鏡外科において135例の肝臓移植手術がおこなわれている。135例中、劇症肝

炎と診断されて肝臓移植をおこなった症例は11例（8.1%）であった。劇症肝炎と診断されて紹介されてきた症例は24例であり、これらの症例のうち、感染症・多臓器不全をみとめず当病院の肝移植適応委員会にて肝移植の適応を協議した症例は17例であった。17例中11例に対し生体肝移植、他6例は生体肝移植ドナーがいなかったため脳死肝移植登録となり内科的治療が継続された。内科的治療を継続した6例中3例が内科的治療に奏功し救命されたが、他3例は脳死ドナーが出現せず死亡した。一方、生体肝移植をおこなった11例中10名は救命された。以上の17例の治療開始前（血漿交換、血液濾過透析）と治療開始後5日目の血漿アミノグラムより、肝移植の適応ありと判断されたが最終的に内科的治療に奏功した3例の治療後5日目の血漿メチオニン値が正常濃度近くまで低下していた。また、肝移植をおこなった症例中、治療開始後5日目に最も高値であった2例は術後病理所見より *super-acute fulminant hepatitis* と診断され、正常肝細胞の残存を認めなかった。以上より各種アミノ酸のなかでメチオニン濃度が、一般的に病態を示唆するプロトロンビン時間、総ビリルビン値よりの早期に肝細胞の状態（残存肝細胞の細胞死あるいは再生）を反映している可能性が示唆された。血清メチオニン値が残存肝細胞の再生指標のひとつとなる可能性が示唆された。以上の臨床結果を動物実験モデルで確認するために、急性肝不全に至る急性型肝障害モデルラットを用いて、血漿メチオニン値が（i）肝細胞障害程度と関連し、（ii）末期肝不全状態の残存肝細胞の再生の指標

となる可能性を検討した。

3. 研究の方法

容量依存性の肝障害物質であるアセトアミノフェンをラットに投与したモデルを用いて研究をおこなう。急性肝不全にあるラットの肝細胞の状態を肝細胞死あるいは再生肝細胞（分裂能を有する肝細胞）を以下に述べる方法にてスコア化し、血漿メチオニン値、総ビリルビン値、プロトロンビン時間を中心に相関関係を検討することにより、血漿メチオニン値が障害後の残存肝組織の再生あるいは細胞死の指標となる可能性を検証する。

【肝病理のスコア化】摘出した肝臓切片を10%ホルマリンにて固定しHE染色から肝壊死をスコア化する。障害度 0：障害なし、障害度 1：数個の肝細胞障害のみ、障害度 2：中心静脈周囲に 1-2 列の肝細胞壊死を認める、障害度 3：中心静脈周囲 2-3 列の肝細胞壊死を認める、障害度 4：中心静脈周囲 4-5 列の肝細胞壊死を認める、障害度 5：5 列以上の中心静脈周囲壊死と出血を伴う

【急性肝不全モデルラットの作成】12時間絶食管理の後、アセトアミノフェン（APAP, 4-hydroxyacetanilide）を、7.5g/kg(high dose 群)および 3.75g/kg(low dose 群)を経口投与し、ラットの肝不全モデルを作成する（*Journal of Hepatology* 1996; 25: 183-190）。投与後 1 時間、6 時間、12 時間後に大型ガラス瓶にてジエチルエーテルを吸入させ麻酔導入し、開腹し大動脈より採血後、肝臓を採取し実験に用いる。

【血液・生化学検査および血清アミノ酸分析】血清 0.5ml を同量の 4%スルホサリチル酸にて除蛋白後、その上清を自動アミノ酸分析器 HITACHI L-8500 にて測定する。血清生化学・凝固検査としてアルブミン値（BCG

法）、総ビリルビン値（アズビリルビン法）、AST、ALT（UV 法）、プロトロンビン時間等を計測する。プロトロンビン時間、総ビリルビン値を含め生化学検査、凝固検査と血漿メチオニン値との相関関係を検討する。

4. 研究成果

High dose 群では 24 時間以内に 50%のラットが死亡、36 時間以内には 70%のラットが死亡した。病理組織像は Zone 1 を中心とした肝細胞の壊死が確認された。全体の肝病理スコア値は 4.2 ± 0.8 。血漿メチオニン値は 24 時間以内に肝不全による死亡したラットでは $1021 \pm 112 \mu\text{mol/l}$ 、肝病理スコア値は 4.5 ± 0.4 、36 時間以内に死亡した症例では $441 \pm 132 \mu\text{mol/l}$ 、肝病理スコア値は 3.9 ± 0.4 であった。プロトロンビン時間（PT-INR）、総ビリルビン値（T-Bil）、アルブミン値（Alb）は 2 群間では有意差を認めなかった。24、36 時間でそれぞれ、PT-INR が 3.9 ± 1.1 、 4.1 ± 0.8 、T-Bil が 8.9 ± 1.1 、 $9.9 \pm 2.9 \text{ mg/dL}$ 、Alb が 1.7 ± 0.6 、 $2.1 \pm 1.2 \text{ g/dL}$ であった。

36 時間以降生存したラットを 72 時間後に剖検した。生存症例では病理学的には肝細胞の再生所見をみとめ血漿メチオニン値は $72 \pm 33 \mu\text{mol/l}$ 、肝病理スコア値は 2.2 ± 0.9 であった。PT-INR が 1.5 ± 0.4 、T-Bil が $7.9 \pm 1.5 \text{ mg/dL}$ 、Alb が $2.7 \pm 0.6 \text{ g/dL}$ であった。

次に、血漿メチオニン値が肝不全死を予測し得る指標になるか検討するために、APAP 投与量を減らし以下の実験をおこなった。low dose 群ラットでは生存率は 100%（投与後 24 時間）、50%（投与後 36 時間）、10%（投与後 48 時間）であった。投与後 12 時間後の摘出肝病理スコア値は 3.5 ± 0.9 であり、病理組織学的検査では高度の肝障害像を認めた。投与後 12 時間の血漿アミノ酸分析ではメチオニン値が $694 \pm 221 \mu\text{mol/L}$ とアルギニン

値 $297 \pm 21 \mu\text{mol/L}$ が無処置群と比較し有意に高値であった。一方、投与後 12 時間後の AST、ALT 値は無処置群と比較し $221 \pm 321 \text{ IU/L}$ 、 $199 \pm 221 \text{ IU/L}$ と無処置群と比較し有意に高値であった。投与後 12 時間後の T-Bil、PT-INR 値は $1.2 \pm 0.5 \text{ mg/dL}$ 、 0.8 ± 0.2 で無処置群では $1.1 \pm 0.7 \text{ mg/dL}$ 、 0.9 ± 0.3 であり、有意差を認めなかった。APAP 投与後の生存に関して Receiver operating characteristic (ROC) 解析をおこなった。血漿メチオニン値とアルギニン値が生存に関して有意となり、AUC はそれぞれ、0.932、0.837 であった。また、cut-off 値は、血漿メチオニン値では $112.2 \mu\text{mol/L}$ (sensitivity; 92.9%、specificity; 87.5%) とアルギニン値では $212.1 \mu\text{mol/L}$ (sensitivity; 92.5%、specificity; 82.5%) であった。非代償性肝不全に至るラットでは血漿メチオニン値あるいはアルギニン値が有意に高値を示すことが明らかになった。

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 1 件)

- ① Sato K, Fukushima D, Doi H, and Satomi S. Higher serum methionine levels as a predictive factor in patients with irreversible fulminant hepatic failure Transplantation proceedings in press (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Sato K, Fukushima D, Doi H, and Satomi S. Serum methionine levels as early predictors for survival in patients with fulminant hepatic failure. International

Congress of the Transplantation Society
Vancouver, Canada, 15, August 2010.

- ② Sato K, Fukushima D, Doi H, and Satomi S. Higher serum methionine levels as a predictive factor in patients with irreversible fulminant hepatic failure. 24th international congress of the transplantation society Berlin, Germany, 18, July 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和重 (SATO KAZUSHIGE)
東北大学・病院・助教
研究者番号：40375043

(2) 研究分担者

里見 進 (SATOMI SUSUMU)
東北大学・病院・教授
研究者番号：00154120

武田 郁央 (TAKEDA IKUO)
東北大学・病院・教授
研究者番号：90420033

(3) 連携研究者