

論 文 内 容 要 旨

題目 The Kampo medicine “Daikenchuto (TU-100)” prevents bacterial translocation and hepatic fibrosis in a rat model of biliary atresia

(漢方薬の大建中湯は胆道閉鎖症ラットモデルにおけるバクテリアルトランスロケーションと肝線維化を抑制する)

著者 Keigo Yada, MD, Hiroki Ishibashi, MD, PhD, Hiroki Mori, MD, PhD, FACS, Yuji Morine, MD, PhD, FACS, Chengzhan Zhu, MD, Rui Feng, MD, Toru Kono, MD, PhD, FACS, Mitsuo Shimada, MD, PhD, FACS
平成 28 年発行 Surgery に発表予定

内容要旨

胆道閉鎖症は、乳児の閉塞性黄疸を来す重要な疾患の一つである。肝門部空腸吻合術（葛西手術）が行われるが、術後の肝線維化進行により肝移植がしばしば必要となる。

近年、bacterial translocation (BT) が肝星細胞 (hepatic stellate cell: HSC) における toll-like receptor 4 (TLR4)、transforming growth factor beta (TGFβ) シグナルを介して肝線維化に寄与することが報告された。一方で、大建中湯 (TU-100) は近年、抗炎症作用などが注目され、我々も絶食ラットおよび抗癌剤 Camptothecin-11 (CPT-11) 投与ラットにおける BT や小腸粘膜障害に対する TU-100 の予防効果について報告してきた。

今回、胆道閉鎖症の動物モデルとして最も歴史が古く、広く用いられてきた総胆管結紮 (bile duct ligation: BDL) ラットモデルにおける BT を TU-100 が抑制し、結果として TLR4-TGFβ シグナル抑制および肝線維化抑制に寄与するのではないかと考え、以下の検討を行った。

In vivo での検討: 6 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、Control 群・BDL 群・BDL+TU-100 群の 3 群に分けた (各 n=8)。BDL 群・BDL+TU-100 群においては、BDL 後 3・7・14 日目に犠死させた。

In vitro での検討: BDL 術後 7 日目に肝臓を採取し、two step collagenase 法および層遠心分離法を用いて HSC を単離した。HSC は 3 時間の前培養の後に、各種濃度の TU-100 および構成生薬 (人參・山椒・乾姜) を投与し、alpha smooth

muscle actin (α SMA)・collagen type I alpha 1 (*Col1a1*)・tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*TIMP1*) の mRNA 発現を評価した。また、 α SMA に関しては western blot による蛋白発現についても評価した。得られた結果は以下の如くである。

〈In vivo での検討〉

1. BDL+TU-100 群において、3・7・14 日目の GOT 値および GPT 値が BDL 群と比較し低値であり、肝組織中の tumor necrosis factor-alpha (TNF α) の mRNA 発現は 3・7・14 日目ともに BDL+TU-100 群において BDL 群と比較して抑制された。
2. BDL+TU-100 群において、7・14 日目の BT 発生率および、3・7・14 日目の小腸絨毛数・高さが BDL 群と比較して抑制・保持された。
3. BDL+TU-100 群において、肝臓の線維化および α SMA/TGF β /TLR4 発現は、特に術後 14 日目において BDL 群と比較して抑制された。

〈In vitro での検討〉

1. TU-100 投与群では、 α SMA・*Col1a1*・*TIMP1* の mRNA 発現が抑制された。
2. 3 つの生薬投与による検討では、山椒・乾姜は α SMA・*Col1a1*・*TIMP1* の mRNA 発現を抑制した一方、人參は α SMA・*Col1a1* の mRNA 発現を抑制した。
3. Western blot では、TU-100 および 3 つの生薬はすべてで α SMA の発現抑制効果を示した。

これらの結果から、TU-100 は胆道閉鎖症ラットにおいて、BT ならびに HSC を抑制し肝障害・肝線維化を軽減させる可能性が示唆された。TU-100 は胆道閉鎖症患者における肝線維化を抑制し、予後改善に寄与する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1293号	氏名	矢田圭吾
審査委員	主査 丹黒 章 副査 常山幸一 副査 石澤啓介		

- 題目 The Kampo medicine “Daikenchuto (TU-100)” prevents bacterial translocation and hepatic fibrosis in a rat model of biliary atresia (漢方薬の大建中湯は胆道閉鎖症ラットモデルにおけるバクテリアルトランスロケーションと肝線維化を抑制する)
- 著者 Keigo Yada, MD, Hiroki Ishibashi, MD, PhD, Hiroki Mori, MD, PhD, FACS, Yuji Morine, MD, PhD, FACS, Chengzhan Zhu, MD, Rui Feng, MD, Toru Kono, MD, PhD, FACS, Mitsuo Shimada, MD, PhD, FACS
平成28年発行 Surgery に発表予定
(主任教授 島田光生)
- 要旨 胆道閉鎖症は乳児の閉塞性黄疸を来す疾患で、肝門部空腸吻合術が行われるが、肝線維化進行によりしばしば肝移植が必要となる。近年、bacterial translocation (BT) が肝星細胞 (hepatic stellate cell: HSC) の toll-like receptor 4 (TLR4)、transforming growth factor beta (TGFβ) を介して線維化に寄与すると報告された。大建中湯 (TU-100) は抗炎症作用などが注目され、申請者らも絶食や抗癌剤投与ラットの BT や小腸粘膜障害に対する TU-100 の予防効果について報告してきた。今回、胆道閉鎖症モデルとして総胆管結紮 (bile duct ligation: BDL) ラットを用い BT や肝線維化に対する TU-100 の効果を検討した。
- 1) 6週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、Control、BDL、BDL+TU-100 の3群 (各 n=8) に分け、肝傷害、BT 発生率、小腸の組織所見、肝組織中 tumor necrosis factor-alpha (TNFα)、TLR4、TGFβ、alpha smooth muscle actin (αSMA) の mRNA 発現、ならびに αSMA の染色面積と TLR4 の陽性細胞数を比較検討した。

2)BDL7日目に肝臓を採取、HSCを単離し、TU-100と構成生薬(人参・山椒・乾姜)を投与し、 α SMA、*collagen type I alpha 1 (Colla1)*、*tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)*のmRNA発現を、 α SMAに関してはwestern blotによる蛋白発現を評価した。

得られた結果は以下の如くである。

- 1) TU-100投与群には3・7・14日目のAST値、ALT値および肝組織中TNF α mRNA発現が低かった。
- 2) TU-100投与群で7・14日目のBT発生と3・7・14日目の小腸絨毛高と数の減少が抑制された。
- 3) TU-100投与群で14日目の肝線維化および α SMA、TGF β mRNA発現と α SMA染色面積、3・7・14日目のTLR4mRNA発現とTLR4陽性細胞数も少なかった。
- 4) TU-100投与群では α SMA、*Colla1*、*TIMP1*のmRNA発現が濃度依存的に抑制された。
- 5) 山椒と乾姜は α SMA、*Colla1*、*TIMP1*のmRNA発現を、人参は α SMA・*Colla1*のmRNA発現を濃度依存的に抑制した
- 6) TU-100および3つの構成生薬で α SMAの蛋白発現抑制効果を示した。

以上の結果は大建中湯が胆道閉鎖症における新たな治療薬になる可能性を示唆しており、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。