〈原 著〉

劇症肝炎患者血清の胆汁分泌機構におよぼす影響

福本 陽平 新開 泰司 沖田 極 竹本 忠良*

Robin D Hughes Christopher D Gove Roger Williams**

要 旨：劇症肝炎患者の血中に蓄積する中等大分子量の中毒性物質が、脳細胞膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性や、白血球細胞の Na^+ の移動を阻害することが報告されている。一方、胆汁分泌機構における肝細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase の役割について、最近では Na^+ と胆汁酸の共輸送という観点から、胆汁酸の肝での移送に関与していると推察されるようになった。そこで、本報では昏睡期の劇症肝炎患者血清より、細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を低下させる物質を抽出し、ラット門脈内に持続的に投与することによって、胆汁分泌に与える影響を検討した。その結果、ラットの胆汁分泌量は減少傾向を示し、胆汁中への胆汁酸の排泄は対照群に比べ有意に低下した。これらの事実は、肝細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase がむしろ胆汁中への胆汁酸の分泌に介在するという説を支持する結果となった。

索引用語：胆汁分泌 胆汁酸 劇症肝炎 Na^+ , K^+ -ATPase

はじめに

劇症肝炎患者の主な死因である脳浮腫が、脳細胞膜における Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害による Na^+ の蓄積に起因すると推測され^{1,2)}、また、共同研究者の Williams らは、すでに昏睡期の劇症肝炎患者血中に含まれる中毒性物質が、ヒトの白血球細胞の Na^+ の移送や³⁾、ラット脳細胞膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害することを報告してきた⁴⁾。

一方、肝細胞膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性の局在については、現在なお議論の残るところであるが、肝細胞への胆汁酸のとりこみは、 Na^+ と共輸送によって流入すると考えられることから、肝細胞の Na^+ , K^+ -ATPase は、むしろ胆汁酸の移送に介在するのではないかと推察されるようになった^{5,6)}。

本報では、この点をさらに明らかにする目的から、ヒト白血球細胞やラット脳細胞膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害する血清成分を既報の方法により^{3,4)}、昏睡期の劇症肝炎患者血清より抽出し、大量にラットの門脈より持続的に注入して、胆汁分泌および胆汁中への胆汁酸排泄における影響を検討した。さらに、この抽出成分を、Sephadex G-25により分画し、同様の方法によって投与することにより、あわせて胆

汁中への胆汁酸分泌に対する影響について検索を加えた。

実験方法

対象は halothane による薬剤性の劇症肝炎で死亡した昏睡度 V 度の患者(症例 1)血清を、Amicon PE10 膜を用いて窒素ガスにより ultrafiltration (Amicon model 402) を行い、分子量 10,000 daltons 以下の血清成分を抽出した。この抽出成分を 15 ml ずつ凍結し、ただちに凍結・乾燥を行った (Freeze Mobile 6, Virtis Ltd)。一方、正常人 6 名から採取した血清をブールし、同様の方法により抽出して、対照検体とした。これらの検体は実験直前まで、 -20°C 以下に保存した。抽出した患者血清と正常人血清はともに 6 検体ずつ用意し、ラット 12 匹を用いて検討した。

さらに、paracetamol による劇症肝炎で死亡した昏睡度 V 度の 3 名の患者(症例 2, 3, 4)血清を、別々に同様の方法により分離、抽出して保存し、ラット 3 匹に投与した。これらの実験結果は、症例 1 の結果と合わせて検索を行った。

また、ultrafiltration 後の血清成分を、さらに Sephadex G-25 (Pharmacia Ltd) によるカラムクロマトグラフィーで分画し、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害作用が最もつよいことを確認している^{3,4)}、2 分画を動物実験に用いた。対象血清は、前出の 4 名の劇症肝炎患者とブールした正常人血清の 8 検体である。

* 山口大学第 1 内科

** Liver Unit, King's College Hospital

〈受付日 60 年 10 月 31 日〉

ultrafiltration後の血清成分は各々15mlをSe-phadex G-25カラム(内径2.5cm, 高さ80cm)にかけ, 0.1mol NH₄ HCO₃緩衝液(pH 7.9)を用いて, 溶出液を5mlずつ採取した。分析は冷室で行い, 吸光度は205nmと254nmで吸光度曲線を描出した。吸光度曲線から得られた各々の分画は, アンモニウムイオンを除くため, 2回ずつ凍結・乾燥をくり返し-20℃以下で実験直前まで保存した。実験にはtube No. 74, 75, 76のNo. 5分画とtube No. 105, 106, 107のNo. 7分画を使用し, 患者4名と正常人4検体から分画した合計16検体をラット16匹に投与して実験を行った。

胆汁分泌におけるこれらの血清成分の影響については, Wistar系雄性ラット(250~300g)を用いて, 以下の方法により検討した。ラットは, 実験前に約8時間絶食し, 水のみを投与した。Pentobarbital(50mg/kg)を腹腔内に投与して麻酔後, 総胆管内にビニールチューブを充分深く挿入し, 一時クリップにて閉腹した。胆汁分泌量が安定した後, 10分間毎に90分目まで胆汁を採取した。採取開始から30分目に再び開腹し, 腸間膜静脈内へすばやくカニューレを挿入し, 腹部を縫合閉腹した。このカニューレより, 自動注入器を用いて各々の血清成分の注入を行った。凍結, 乾燥状態で保存したそれぞれの検体は注入直前に生食1.8mlで溶解し, 55 μ l/分(1.65ml/30分)のゆっくりとした速度で, 30分間持続的に投与した。採取した胆汁は, 胆汁量を計測した後に-20℃以下に凍結し, あとで胆汁中の胆汁酸(酵素法-ステログノスト3 α), ナトリウム, カリウム(炎色反応)量を測定した。

結 果

まず, 劇症肝炎患者症例1および正常人の血清から得られた, 中等分子量の血清成分をラット門脈内に持続投与した結果, 正常血清成分投与群(正常群)にくらべ, 患者血清成分投与群(患者群)で, 胆汁分泌量は(Fig. 1), 血清成分投与開始後より低下する傾向を示し, 投与終了後の10分目では, 正常群に比して有意の差をもって低下した。また, その後の患者群の胆汁分泌量は徐々に増加した。しかしながら, 門脈内投与前後の胆汁量との間には差は認められなかった。胆汁中への胆汁酸の排泄量は(Fig. 2), 血清成分投与開始後の20分, 30分目と, 投与終了後の10分, 30分目で, 患者群では正常群にくらべて有意の差をもって低下した。しかし, 胆汁中胆汁酸濃度は(Table 1), 患者群では正常群より低い値を示したが, 有意の差はみられなかった。一方, 胆汁中のNa⁺, およびK⁺排泄量は,

Fig. 1 The effect of fulminant hepatic failure (FHF) serum on rat hepatic bile flow. Each point represents the mean $\pm$ S.E.. *; $p < 0.05$ compared to normal serum.

Fig. 2 The effect of FHF serum on rat bile acid output in bile. Each point represents the mean $\pm$ S.E.. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ and ***; $p < 0.001$ compared to normal serum.

患者群で Na⁺が門脈内投与30分目に, K⁺は投与終了後10分目に一時的に低下したが, 濃度は(Table 1)いず

Table 1 Changes of the levels of bile acid, sodium and potassium in bile in the administration of serum ultrafiltrates (<10,000) from normal control and FHF patients.

Sampling Time (min)	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
Bile Acid Concentration (m mol/l)									
Control(n=6)	33.7±1.2	30.6±1.6	28.0±1.0	27.0±1.9	27.9±2.2	26.9±1.7	27.1±2.2	25.3±1.3	24.5±2.0
FHF 1# (n=6)	37.9±3.3	33.6±2.9	29.1±1.3	26.5±1.5	26.6±1.8	24.0±1.1	22.9±1.5	24.3±2.2	21.3±1.7
FHF 2##(n=4)	32.8±1.8	31.3±1.2	28.5±0.9	25.6±0.6	24.0±1.2	22.3±1.2	21.3±1.2	20.8±1.5	20.2±0.7
Na⁺ Out Put (μ mol/10min·g liver)									
Control(n=6)	3.08±0.14	3.09±0.15	3.09±0.17	2.94±0.19	3.11±0.22	3.21±0.24	3.36±0.22	3.36±0.18	3.15±0.15
FHF 1# (n=6)	2.84±0.16	3.03±0.22	3.03±0.22	2.95±0.14	2.65±0.11	2.73±0.13	2.73±0.11	3.03±0.22	3.08±0.23
FHF 2##(n=4)	3.16±0.15	3.12±0.08	3.09±0.11	2.89±0.14	2.89±0.17	2.94±0.10	2.95±0.08	3.03±0.04	3.14±0.11
Na⁺ Concentration (m mol/l)									
Control(n=6)	163.7±5.0	159.8±3.6	158.0±2.4	158.2±1.8	159.8±2.8	162.0±3.3	161.2±2.6	160.5±1.6	160.6±2.2
FHF 1# (n=6)	161.9±2.4	161.5±2.6	159.8±3.1	161.2±1.6	165.2±1.8	165.2±1.4	164.5±2.0	164.7±2.3	163.8±2.3
FHF 2##(n=4)	159.4±1.6	159.4±1.6	159.2±0.7	160.3±1.1	163.8±1.4	165.3±1.7	167.6±2.7	163.0±1.4	163.2±0.5
K⁺ Out Put (μ mol/10min·g liver)									
Control(n=6)	0.103±0.005	0.110±0.007	0.113±0.007	0.107±0.008	0.115±0.009	0.115±0.010	0.119±0.009	0.127±0.011	0.120±0.005
FHF 1# (n=6)	0.094±0.004	0.108±0.007	0.114±0.010	0.107±0.007	0.096±0.002	0.097±0.003	0.096±0.002	0.108±0.007	0.108±0.007
FHF 2##(n=4)	0.113±0.008	0.115±0.005	0.113±0.007	0.104±0.008	0.101±0.009	0.097±0.006	0.097±0.005	0.101±0.005	0.105±0.006
K⁺ Concentration (m mol/l)									
Control(n=6)	5.46±0.26	5.68±0.22	5.76±0.20	5.76±0.29	5.86±0.27	5.80±0.21	5.75±0.12	6.03±0.29	6.11±0.22
FHF 1# (n=6)	5.70±0.12	5.86±0.11	5.92±0.14	5.79±0.15	5.67±0.19	5.47±0.22	5.51±0.24	5.42±0.22	5.44±0.19
FHF 2##(n=4)	5.35±0.23	5.76±0.26	6.00±0.31	5.96±0.16	6.01±0.14	5.90±0.18	5.86±0.20	5.90±0.26	5.76±0.23

FHF 1# : FHF patient Case 1

FHF 2## : FHF patients Case 1, 2, 3 and 4

*Statistical significance $p < 0.05$ **BILE FLOW**
(μl/10min·g liver) **Fig. 3** The effect of FHF serums on rat hepatic bile flow. Each point represents the mean±S.E..

れも正常群との間で有意の差を示さなかった。

次に、症例 2, 3, 4 の患者血清投与実験での成績に、症例 1 の成績 (平均値) を合せて、4 例の劇症肝炎患

BILE ACID OUT PUT
(μ mol/10min·g liver) **Fig. 4** The effect of FHF serums on rat bile acid output in bile. Each point represents the mean±S.E.. **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ compared to normal serum.

者群で検討すると、胆汁分泌量 (Fig. 3)、胆汁中への胆汁酸排泄量 (Fig. 4) は、症例 1 での結果とほぼ同様

Fig. 5 Elution profiles of serum ultrafiltrate (<10,000daltons) on Sephadex G-25 shown as the % transmission of light in normal control (upper) and FHF patient (lower). Star means five fold of % transmission comparing to basal % transmission.

の変化がみられた。すなわち、胆汁分泌量には有意の差は認められないものの、患者群では低下傾向がみられ、一方、胆汁中への胆汁酸分泌は、血清成分投与開始後の30分目と、投与終了後の10分、20分目に、患者群では正常群にくらべて有意の差をもって低下した。胆汁中胆汁酸濃度も患者群で低値を示したが有意差はなく、胆汁中 Na^+ 、 K^+ 量は、排泄量および濃度のいずれにも差はみられなかった (Table 1)。

分子量10,000daltons以下の血清成分を、Sephadex G-25で分画すると、Fig. 5に示すようなピークが認められた。これらのピークのうちNo. 4, 5, 5A, 6, 7は正常群に比して患者群で著明に増加した。

これらの分画の内No. 5とNo. 7分画を、同様の方法で、門脈から肝内に注入した結果、No. 5およびNo. 7とともに、胆汁分泌量は (Fig. 6, Fig. 8)、患者群で

正常群に比べて有意の低下がみられた。しかし、門脈内投与前後の分泌量では、有意の変化を示さなかった。一方、胆汁中への胆汁酸分泌量は (Fig. 7, Fig. 9)、いずれも、血清成分の投与開始後20分、30分目と、投与終了後の10分目に、患者群では正常群に比して、有意の差をもって低下した。しかし、胆汁中の胆汁酸濃度には (Table 2)、差はみられなかった。また、 Na^+ 、 K^+ 量は、分画No. 5の投与開始後30分目に、分画No. 7の投与後半と終了後10分目で、患者群の低下が認められたが、濃度には (Table 2)、差はなかった。

分画No. 5とNo. 7では門脈内投与後の胆汁酸排泄曲線が、正常群および患者群でも異ったパターンを示した。分画No. 7では、正常群、患者群ともに胆汁酸分泌は上昇する傾向がみられた。

Fig. 6 The effect of FHF peak No 5 chromatographed on Sephadex G-25 from serum ultrafiltrate on rat hepatic bile flow. Each point represents mean $\pm$ S.E.. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to normal serum.

Fig. 8 The effect of FHF peak No 7 chromatographed on Sephadex G-25 from serum ultrafiltrate on rat hepatic bile flow. Each point represents mean $\pm$ S.E.. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to normal serum.

Fig. 7 The effect of FHF peak No 5 chromatographed on Sephadex G-25 from serum ultrafiltrate on rat bile acid output in bile. Each point represents the mean $\pm$ S.E.. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to normal serum.

Fig. 9 The effect of FHF peak No 7 chromatographed on Sephadex G-25 from serum ultrafiltrate on rat bile acid output in bile. Each point represents the mean $\pm$ S.E.. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ compared to normal serum.

Table 2 Changes of the levels of bile acid, sodium and potassium in bile in the administration of peak No. 5 and No. 7 chromatographed on Sephadex G-25 from serum ultrafiltrates of normal controls and FHF patients.

Sampling Time (min)	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
Bile Acid Concentration (m mol/l)									
Peak 5-N # (n=4)	34.6±0.4	32.3±0.6	32.3±0.9	30.4±0.6	29.6±0.5	26.9±0.5	24.2±0.9	23.5±1.2	21.4±1.4
Peak 5-P # (n=4)	35.4±1.8	33.4±1.4	31.3±0.5	28.4±1.1	26.4±1.4	24.8±1.4	23.4±1.3	22.4±1.4	20.9±1.4
Peak 7-N # (n=4)	34.6±1.6	32.6±1.3	30.7±1.0	27.9±1.0	27.0±0.8	27.9±1.2	27.8±1.1	25.8±0.5	24.9±0.7
Peak 7-P # (n=4)	34.7±1.3	32.2±1.0	31.3±0.5	26.4±0.9	26.3±0.5	25.7±0.5	26.6±0.6	22.9±2.4	22.9±2.4
Na⁺ Out Put (μ mol/10min·g liver)									
Peak 5-N # (n=4)	3.07±0.14	3.03±0.09	2.90±0.13	2.80±0.13	2.91±0.14	3.10±0.07	3.14±0.11	3.13±0.11	3.08±0.09
Peak 5-P # (n=4)	3.11±0.05	3.07±0.08	3.07±0.10	2.80±0.08	2.75±0.06	2.74±0.04	2.83±0.07	2.92±0.04	2.91±0.06
Peak 7-N # (n=4)	3.10±0.06	3.13±0.13	3.13±0.12	3.00±0.04	3.12±0.05	3.28±0.03	3.31±0.04	3.27±0.13	3.30±0.15
Peak 7-P # (n=4)	3.04±0.11	3.09±0.12	3.00±0.11	2.86±0.11	2.79±0.05	2.86±0.09	2.87±0.07	2.94±0.09	2.96±0.07
Na⁺ Concentration (m mol/l)									
Peak 5-N # (n=4)	162.3±1.3	160.8±1.9	160.0±2.1	158.5±2.3	157.8±1.7	156.5±1.3	157.5±0.9	157.8±1.3	156.5±1.7
Peak 5-P # (n=4)	163.5±1.4	159.8±1.0	161.8±0.9	160.8±0.5	161.3±0.6	159.0±0.4	160.5±1.0	160.3±1.6	157.8±0.8
Peak 7-N # (n=4)	160.5±2.2	159.5±1.0	160.8±1.3	156.8±1.1	156.5±1.9	158.0±0.6	159.0±2.2	157.0±1.5	157.8±2.8
Peak 7-P # (n=4)	160.0±0.7	160.8±1.3	160.5±1.3	158.5±1.5	158.3±0.6	158.5±1.2	158.3±1.4	157.8±0.5	156.5±0.9
K⁺ Out Put (μ mol/10min·g liver)									
Peak 5-N # (n=4)	0.104±0.006	0.105±0.005	0.101±0.006	0.100±0.007	0.103±0.004	0.115±0.005	0.116±0.008	0.117±0.008	0.116±0.007
Peak 5-P # (n=4)	0.102±0.004	0.105±0.005	0.108±0.005	0.100±0.005	0.099±0.003	0.094±0.006	0.104±0.014	0.101±0.008	0.103±0.006
Peak 7-N # (n=4)	0.103±0.006	0.108±0.010	0.111±0.010	0.109±0.007	0.119±0.007	0.126±0.006	0.127±0.006	0.129±0.008	0.130±0.010
Peak 7-P # (n=4)	0.105±0.001	0.110±0.002	0.110±0.002	0.105±0.004	0.104±0.002	0.106±0.001	0.106±0.002	0.110±0.003	0.111±0.004
K⁺ Concentration (m mol/l)									
Peak 5-N # (n=4)	5.47±0.11	5.55±0.15	5.52±0.17	5.65±0.22	5.80±0.22	5.80±0.20	5.80±0.17	5.87±0.18	5.87±0.18
Peak 5-P # (n=4)	5.40±0.27	5.47±0.25	5.70±0.27	5.75±0.33	5.77±0.37	5.55±0.41	5.55±0.38	5.55±0.34	5.60±0.38
Peak 7-N # (n=4)	5.35±0.25	5.47±0.32	5.57±0.21	5.67±0.25	5.95±0.23	6.05±0.25	6.10±0.25	6.17±0.34	6.20±0.33
Peak 7-P # (n=4)	5.52±0.19	5.75±0.26	5.81±0.15	5.85±0.21	5.91±0.16	5.85±0.15	5.85±0.20	5.92±0.15	5.87±0.18

N # : Normal control

P # : FHF patients

*Statistical significance $p < 0.05$ **Statistical significance $p < 0.01$

考 案

共同研究者の Williams らは、すでに、昏睡期の劇症肝炎患者血清に含まれる成分により、正常人白血球細胞における Na^+ の移動が阻害され、この血清を活性炭カラムに通すと、その阻害作用は減弱することを報告している³⁾。また、正常ラット脳細胞膜のウアバイン感受性 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が、昏睡期の同患者の脳脊髄液や血清によって低下することも認めている⁴⁾。さらに、Amicon PE 10 膜で ultrafiltrate した分子量 10,000daltons 以下の劇症肝炎患者血清を Sephadex G-25 で分画した血清分画でも、 Na^+ の移動の阻害や、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の低下作用のあることを発表した^{3,4)}。これらの成績は劇症肝炎患者の血中に蓄積する中毒性物質の代謝面に与える影響の重要性を示す傍証となった^{7,8)}。

本報では、胆汁分泌機構の一端を解明しようという試みから、細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害する劇症肝炎患者血清を用いて、胆汁分泌機構に対する影響についての検討を行った。患者血清からの中等大分子

量の物質の抽出は、Williams らの方法で行い、かつ同実験施設を利用した。Sephadex G-25 で分画されるピークのうち、患者群で著明に上昇する No. 3, 4, 5, 7 は、いずれも白血球細胞での Na^+ の移動、脳細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害効果が認められている^{3,4)}。最近の報告では、急性肝不全患者の血中で増加する中毒性物質の分子量は 1,000~1,500daltons であるといわれ⁹⁾、実験動物における急性肝不全モデルでも、1,000~4,000daltons の物質が上昇しているとされている^{10,11)}。本報で分画したピーク No. 3, 4, 5, 7 の分子量は、ビタミン B_{12} をカラムにかけた Williams らの実験結果から³⁾、500~1,500daltons であった。

今回の実験では、急性肝不全に近い状態を作る目的で、ほぼラットの血液量に近い量の 15ml の血清より分画された成分を濃縮し、門脈から持続的に注入を行った。また、門脈血流に対する影響を考慮して、投与した液量は極めて少く、投与速度も遅くした。その結果、いずれの動物実験においても、胆汁への胆汁酸の分泌は、正常群に対して患者群で有意の差をもって

低下した。胆汁量も一部の患者群では正常群に比して有意の差をもって減少したが、門脈内投与前の基礎分泌量とは差がなく、分泌量の低下にまでは至らなかった。これは、実験に用いたラットでは、肝のクッパー細胞が正常に機能し、分泌量に差を示すほどの影響にまでおよばなかったことが推測される。また、正常肝における paracellular pathway からの分泌で代償されることも考えられる。

肝細胞における胆汁酸やアミノ酸、無機および有機イオンのとり込み、排泄には、いくつかの仮説が示されているが^{5,12)}、肝内とジソイド側の電気ポテンシャルが、肝内で負となることから、陽イオン性物質は肝内に流入しやすく、陰イオン性物質は流入し難いとされている。そこで、胆汁酸も有機陰イオン性物質であるので、その流入はNa⁺との共輸送で行われると考えられるようになった^{12,13)}。この輸送機構は、当然Na⁺ポンプであるNa⁺, K⁺-ATPaseの影響をうけるため、最近、この観点から改めて胆汁酸の移送とNa⁺, K⁺-ATPaseとの関連性が検討されている。

すでに、Keeffeらは¹⁴⁾、thyroid hormoneやphenobarbital, ethinylestradiol, propylene glycolなどをラットに投与し、肝細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase活性と胆汁の胆汁酸非依存性分泌とを検討した。その結果、Na⁺, K⁺-ATPase活性は胆汁酸非依存性分泌よりも、むしろ依存性分泌との関連性が強いのではないかと推測している。また、胆汁酸の腸管における吸収細胞である回腸細胞を用いたWilsonらの実験では¹⁵⁾、ラットの分離回腸細胞のグリココール酸のとり込みは、ウアインによる細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase活性の阻害の程度と平行して低下し、methyl predonisolonによるNa⁺, K⁺-ATPase活性の上昇とともに増加することを発表した。さらに、これにはNa⁺の存在が必要であった。

その後、Van Dykeらは¹⁶⁾、ラット灌流肝を用いて、灌流液中のイオンを交換することにより、Na⁺とタウロコール酸依存性胆汁分泌との関連性を証明し、胆汁酸依存性胆汁分泌には膜のNa⁺, K⁺-ATPaseを介するNa⁺の役割の重要性を指摘した。一方、胆汁酸非依存性胆汁分泌には、直接的および間接的にもbicarbonateが関与しているのではないかと述べている。

これらの報告は、いずれも肝細胞膜Na⁺, K⁺-ATPaseは、胆汁酸非依存性胆汁分泌よりもむしろ胆汁酸依存性分泌に関与すると推測するものであるが、本報における我々の実験成績も、患者血中に蓄積する

中毒性物質が、肝細胞膜のNa⁺, K⁺-ATPase活性を阻害し、肝細胞での胆汁酸のとり込みや移送を抑制したと考えれば非常につごうがよい。

これには、当然、肝細胞膜におけるNa⁺, K⁺-ATPase活性の局在が問題となるところで、sinusoidal-lateral面にこの酵素活性が存在することが望ましい。歴史的にはまず、canalicular説が最初にだされたが、最近では、sinusoidal-lateral存在説を主張するBoyer一派の実験成績が多くの支持を得ている^{17,18)}。近ごろ発表されたモノクローナル抗体を用いて行ったcanalicular面局在説に対しても¹⁹⁾、その後Boyerらは反論を加えている²⁰⁾。

本報での実験結果から、劇症肝炎患者の血中に存在する中等大の分子量を有する中毒性物質により、胆汁中への胆汁酸の分泌が抑制されることが明らかとなった。肝細胞における胆汁酸の分泌機構には、多くの問題が残されており、胆汁分泌に関するparacellular pathwayの役割とともにその解明がいそがれる。

結 論

昏睡期の劇症肝炎患者血中に蓄積する中等大分子量の物質を、ラット門脈内に注入することにより、胆汁中への胆汁酸の排泄が抑制された。このような劇症肝炎患者の血清から抽出される中等大分子量の中毒性物質は、細胞膜のNa⁺, K⁺-ATPase活性を阻害することから、肝細胞における胆汁酸の移送と、膜酵素Na⁺, K⁺-ATPaseの関連性が推測された。

本実験の大部分はR. Williamsの指導のもとに、King's College(London)で行った。ここにそれを明記し深謝するしだいである。

文 献

- 1) Alan AN, Wilkinson SP, Poston L, et al: Intracellular electrolyte abnormalities in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 72: 914-917, 1977
- 2) Alan AN, Poston L, Wilkinson SP, et al: A study in vitro of the sodium pump in fulminant hepatic failure. *Clin Sci and Mol Med* 55: 355-363, 1978
- 3) Sewell RB, Hughes RD, Poston L, et al: Effects of serum from patient with fulminant hepatic failure on leucocyte sodium transport. *Clin Sci* 63: 237-242, 1982
- 4) Seda HWM, Hughes RD, Gove CD, et al: Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity

- by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 4 : 74—79, 1984
- 5) Boyer JL: New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. *Physiol Review* 60 : 303—326, 1980
 - 6) Erlinger S: Does Na^+ , K^+ -ATPase have any role in bile formation?. *Am J Physiol* 243 : G243—G247, 1982
 - 7) Canalese J, Gimson AES, Davis M, et al: A controlled trial of dexamethasone and mannitol for the cerebral oedema of fulminant hepatic failure. *Gut* 23 : 625—629, 1982
 - 8) Gimson AES, Ede R, Braude S, et al: Fulminant hepatic failure and artificial liver support. *Gastroenterologia Japonica* 17 : 144—162, 1982
 - 9) Lever HW, Klausmann J, Goubeaud G, et al: Middle molecules in the serum of patients and rats with liver failure. Influence of sorbent haemoperfusion. *In*: Artificial liver support, Edited by G Brunner, FW Schmidt. Springer-Verlag, New York, 1981, p96—102
 - 10) Faguer P, Delorme ML, Denis J, et al: Demonstration of middle molecules in plasma and brain during experimental acute hepatic encephalopathy. *Am Soc Artif Organs J* 3 : 153—159, 1980
 - 11) Bloch P, Delorme ML, Rapin JR, et al: Reversible modification of neurotransmitters of the brain in experimental acute hepatic coma. *Surg Gynecol Obstet* 146 : 551—558, 1978
 - 12) Thalhammer T, Fuchs R, Deterlik M, et al: Hepatocellular electrolyte transport and bile secretion. *In*: *Hepatology*, Edited by H Brunner, H Thaler. Raven Press, New York, 1985, p319—327
 - 13) Blitzer BL, Boyer JL: Cellular mechanism of bile formation. *Gastroenterology* 82 : 346—367, 1982
 - 14) Keeffe EB, Scherschmidt BF, Blankenship NM, et al: Studies of relationships among bile flow, liver plasma membrane Na^+ , K^+ -ATPase and membrane microviscosity in the rat. *J Clin Invest* 64 : 1590—1598, 1979
 - 15) Wilson FA, Treanor LL: Studies of relationships among bile acid uptake, Na^+ , K^+ -ATPase, and Na^+ gradient in isolated cells from rat ileum. *Gastroenterology* 81 : 54—60, 1981
 - 16) Van Dyke RW, Stephens JE, Scherschmidt BF: Effects of ion substitution on bile acid-dependent and independent bile formation by rat liver. *J Clin Invest* 70 : 505—517, 1982
 - 17) Boyer JL, Allen RM, Ng OC: Biochemical separation of Na^+ , K^+ -ATPase from a "Purified" light density, "Canalicular"-enriched plasma membrane fraction from rat liver. *Hepatology* 3 : 18—28, 1983
 - 18) Klassen CD, Watkins JB: Mechanism of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol Review* 36 : 1—67, 1984
 - 19) Schenk DB, Leffert HL: Monoclonal antibodies to rat Na^+ , K^+ -ATPase block enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 5281—5285, 1983
 - 20) Blitzer BL, Boyer JL: Localization of Na^+ , K^+ -ATPase on the hepatocyte plasma membrane. *Gastroenterology* 87 : 1206—1210, 1984

Effects of serum from patients with fulminant hepatic failure on bile flow

Yohei FUKUMOTO, Yasuji SHINKAI, Kiwamu OKITA, Tadayoshi TAKEMOTO*,
Robin D HUGHES, CHRISTOPHER D GOVE and Roger WILLIAMS**

Substances which inhibit the Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat brain cell membrane have been found out among toxins in the circulation of patient with fulminant hepatic failure (FHF). In this examination, the effect of middle molecular serum substances from FHF patients on bile secretion was evaluated using rat. Serum ultrafiltrates and elution peaks chromatographed on Sephadex G-25 from ultrafiltrate of FHF patients were infused into rats portal vein. As a result, bile acid output in bile was reduced significantly as compared to normal control after administration of serum substances. More recently, it is strongly suggested that bile acid uptake into the hepatocyte is a coupled transport with sodium maintained by the Na^+ , K^+ -ATPase. Thus, the results in this study seem to support a hypothesis that Na^+ , K^+ -ATPase play an important role in coupling transport of bile acid and resulting in the so-called bile acid-dependent bile flow.

* 1st Division, Department of Internal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine (Ube)

** Liver Unit, King's College Hospital (London)