

肝再生制御機構の生体工学的アプローチによる解析に関する研究

(59570526)

昭和60年度科学研究費補助金(一般研究(C))研究成果報告書

昭和61年3月

研究代表者 葛西真一

(旭川医科大学医学部)

は し が き

生体の物質代謝の中核である肝臓は、極めて複雑多岐にわたる機能を有する臓器である。従って、ひとたび重篤な機能不全に至れば致死的事であることは、日常臨床上しばしば経験する。一方、肝臓は他臓器にはみられないような極めて旺盛な再生能力を有しているため、この再生能力を賦活化することにより救命しうる可能性はある。しかしながら、この肝臓の再生機構あるいはその制御のメカニズムは今日なお明らかではない。肝再生の引き金因子、再生の補助因子なども多数報告されているが、未だ一致した見解はない。本研究の目的は、初代肝細胞培養系ならびに in-vivo動物実験によって、多方面からこの肝再生の現象を捉え、これらの諸成績を解析することによって、肝再生の制御機構を解明することである。

研究組織

研究代表者：	葛 西 眞 一	(旭川医科大学医学部、講師)
研究分担者：	水 戸 勉 郎	(旭川医科大学医学部、教授)
	棟 方 隆	(旭川医科大学医学部、助手)

研究経費

昭和59年度	1, 100千円
昭和60年度	500千円
計	1, 600千円

研究発表

口頭発表：

1. Tetu Yamamoto, Shinichi Kasai, et al: The role of superoxide in initiation of hepatic regeneration.
第19回ヨーロッパ研究外科学会。 昭和59年4月9日。
2. 沢 雅之, 葛西眞一, 他: 脾内胎児肝移植法を用いた肝再生の研究。
第21回日本肝臓学会総会。 昭和60年6月13日。
3. 山口秀則, 水戸勉郎, 他: 肝再生時における肝細胞回転について。
第44回北海道外科学会。 昭和61年2月22日。

研究 成 果

1. 初代培養肝細胞に対する肝切後血清, インスリン, グルカゴン添加の効果に関する検討.

1. 方 法

i) 初代培養肝細胞の作成

体重約200gのWistar系雄性ラットを用いた。エーテル麻酔下に開腹し、門脈内カニューレを挿入し、 Ca^{++} , Mg^{++} -free ハンクス液で血液をwash-outし、肝を摘出して再灌流システムの金アミの上に肝を置き、ついで0.05%のコラゲナーゼ含有ハンクス液を用いて循環灌流を行った。約10分間灌流後肝をペトリディッシュに移し、ハサミを用いて細切し、冷ハンクス液で3回細胞を遠沈洗浄し、得られた細胞は10%牛胎児血清を含むイーグルMEM培養液に浮遊した。ついで、肝細胞 5×10^5 ずつになるようにplastic dishに移し、37°CのCO₂ インキュベーター内で24時間培養した。

ii) 各種溶液の添加法

24時間培養後、培地を各実験目的に応じて変更し、同時に ^3H -チミジン $2 \mu\text{Ci}/\text{dish}$ を添加し、16時間後に細胞を取り除き、液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定した。

肝切除後の血清は、エーテル麻酔下にHiggins & Andersonの方法に従って70%の肝部分切除を行い、24, 48, 72時間後に屠殺して血清を採取し、10%濃度で使用した。

インスリンは 3×10^{-4} モルを、グルカゴンも同様の量を添加した。

2. 成 績

肝切除後の血清を加えた場合の放射能活性は、24時間後血清 $23,242 \pm 1,556\text{cpm}$ 、48時間後血清 $18,406 \pm 1,585\text{cpm}$ 、72時間後血清 $18,406 \pm 2,466\text{cpm}$ で、対照は $16,343 \pm 1,404\text{cpm}$ であり、肝切約24時間後の血清添加群におけるDNA合成が最も高かった。

また、インスリン添加群は $31,081 \pm 3,827\text{cpm}$ 、グルカゴン添加群は $6,855 \pm 1,775\text{cpm}$ で、この時の対照群

は $18,046 \pm 1,346$ cpmであった。

3. 小 括

肝切除後血清中に、肝再生因子が存在するであろうことは以前より知られていたことであり、我が成績も同様な所見を示した。ただ、肝切除後何時間目の血清が良いかについては、24時間目あるいは48時間目、さらには72時間目と一定の見解が得られていない。また、DNA合成のピークがこの血清添加後何時間目になるかについても多数のバラツキがある。これらは、経験的にみるとラットの種類、年齢、飼育環境により影響されるようである。

また、インスリンやグルカゴンのような膵ホルモンが肝再生に強く影響することも、近年指摘されてきており、臨床においてもその使用が検討されている。とくに、急性肝不全時のインスリン・グルカゴン療法として応用されているが、その成績は必ずしも期待されたほど向上していない。われわれの実験系でも、インスリンは確実にDNA合成を促進させるが、グルカゴンはむしろ逆の成績であり、また両ホルモンの比も検討してみたが、有意の効果を確認することができなかった。

II. A群型溶連菌の菌体成分OK-432を用いた肝再生に関する検討。

1. 目 的

OK-432は、生体に投与することにより網内系を活性化することが知られており、制癌剤との併用による免疫賦活剤として、臨床的にも使用されている。

さて、肝臓は肝実質細胞としての肝細胞と網内系細胞であるクッパー細胞より成り立っている。この網内系細胞の機能が、肝再生にいかなる影響を及ぼすかを検討した。

2. 方 法

動物は体重約200gのWistar雄性ラットを用いた。肝切除はHiggins & Anderson法に従い、70%

肝切除を施行した。網内系を活性化させるために、肝切24時間前にOK-432を腹腔内投与しまた不活性化されるためには、メチルパルミテート2mg/kgをやはり肝切24時間前に静脈投与した。

³H-チミジンは、屠殺2時間前に腹腔内に投与し、肝DNA量はSchmidt-Thannhanser-Schneider法にて測定し、放射能活性はシンチレーション・カウンターで測定し、cpmで表現した

3. 成績

i) OK-432の正常肝に及ぼす効果。

OK-432を5ならびに20KE/匹、単独で投与した場合のDNA合成能を測定したところ、Table 1.のように両群に有意の変化はみられなかった。

ii) OK-432およびメチルパルミテート投与によるDNA合成能の変動。

対照群では、肝切24時間目にDNA合成のピークを示したが、OK-432を5KE投与した群ではDNA合成が早く始まり、そのピークも20時間と早まった。一方、メチルパルミテート投与群ではDNA合成の立ち上がりが遅く、そのピークも大部遅れることが判明した(図-1)。

4. 小括

肝再生に網内系の機能が影響しているであろうことは、網内系機能の極めて低下した場合の肝障害の重篤性などから知ることができる。このメカニズムは今日なお不明であるが、クッパー細胞の賦活化によりプロスタグランディンの合成活性が高まること、あるいは血中のエンドトキシンのような中毒性物質を浄化して、肝臓を取り巻く環境を良くすることなどが示唆されている。我々は現在プロスタグランジン合成を抑制した場合に肝細胞がどうなるかを研究中であり、いずれかの影響が大か判明するであろう。

		24hr	48hr	96hr
OK432	5KE	9.05±0.85	17.3±4.3	8.2 ±0.49
OK432	20KE	15.5	16.5	15.2

Table 1. [^3H] thymidine up take in the normal liver (单位: dpm/mg DNA)

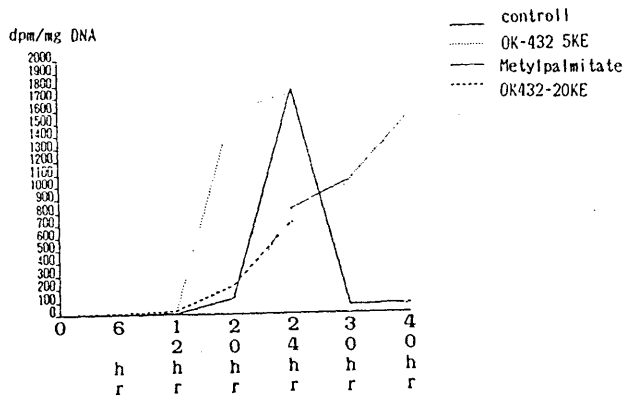


Fig. 1 Change of DNA synthesis after 68% hepatectomy

Ⅲ. 肝再生における活性酸素の意義.

1. 目的

肝再生のinitiation機構に、活性酸素が関与しているかどうかを検討するために、70%肝部分切除の後に活性酸素を選択的に減少させるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を投与し活性酸素の減少による影響をみた。

2. 方法

体重250~300gのWistar雄性ラットを用い、エーテル麻酔下に前述法による70%肝切除を行った。肝切除後SODとしてのOrgoteinを投与し、屠殺2時間前に³H-チミジンを投与してDNA合成を測定した。図-2に実験のプロトコールを示す。

3. 成績

i) 血清SOD濃度の変化.

15mg/kgのOrgoteinを腹腔内投与された後の血清SOD濃度の変化を図-3に示す。15分以内に急激に増加し、3時間目をピークとして低下する。

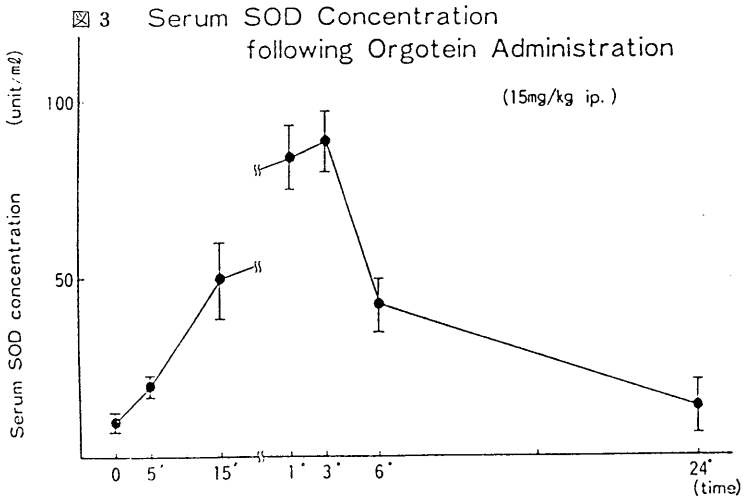
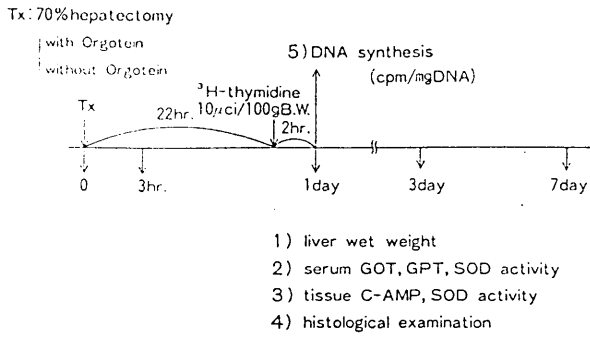
ii) 肝重量の変化.

Orgoteinの有無にかかわらず、肝重量は1週目で術前の約80%に回復した(図-4)。

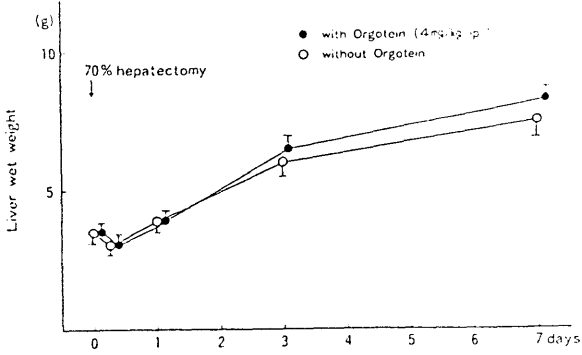
iii) S-GOTの変化.

肝細胞の部分的障害により遊離したGOTは、1週目でピークを示し、3日目にはほぼ正常値に復した。Orgoteinの有無は関係なかった(図-5)。

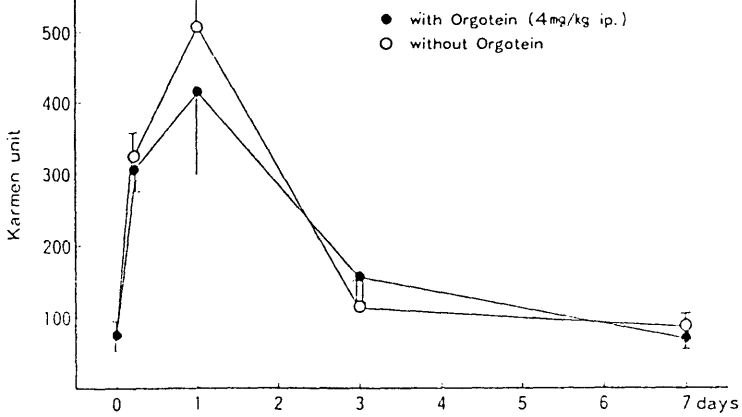
☒ 2 EXPERIMENTAL PROTOCOL



☒ 4 Liver Weight following Partial Hepatectomy



☒ 5 Serum GOT following Partial Hepatectomy



iv) S-GPTの変化.

血中のGPTは、肝切後直ちに上昇を示すが、やはり3日目にはほぼ正常値に復した。Orgoteinは影響しなかった(図-6)。

v) 残存肝C-AMPの変化.

Orgoteinを投与しない対照群では、肝切後直ちに組織中のc-AMPは上昇し、3日目には正常値となる。一方、Orgotein使用群では肝切直後c-AMPは減少し、その後徐々に正常値へと上昇した(図-7)。

vi) 残存肝のSODの変化.

肝切直後軽度上昇し、1日目で逆に最低となり、以後少しずつ上昇を示した。しかしながら、これらの変化は有意ではなかった(図-8)。

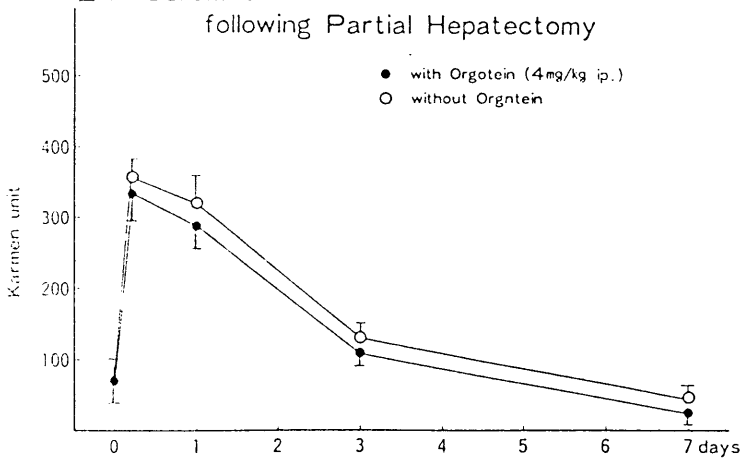
vii) 残存肝のDNA合成に及ぼすSODの効果.

肝切除後のDNA合成能は、Orgoteinの投与によって非投与群の約70%に低下した。これは $P < 0.01$ で有意であった(図-9)。

4. 小 括

活性酸素は、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生系においては重要な役割をするが、逆に細胞障害性に働くことも多い。これが肝再生の引き金となるとすれば、肝切に伴う細胞障害によって産生された細胞膜におけるアラキドン酸回路の活性化がその原因となるかもしれない。Orgoteinによって、この活性酸素が取り除かれたために、細胞膜のアラキドン酸回路が働かず、c-AMPも上昇しないために、プロスタグランジン系も再生へと反応しないのであろう。この点を明らかにすべく、より詳細な検討を継続中である。

☒ 6 Serum GPT following Partial Hepatectomy



☒ 7 C-AMP Concentration in Rat Liver following Partial Hepatectomy

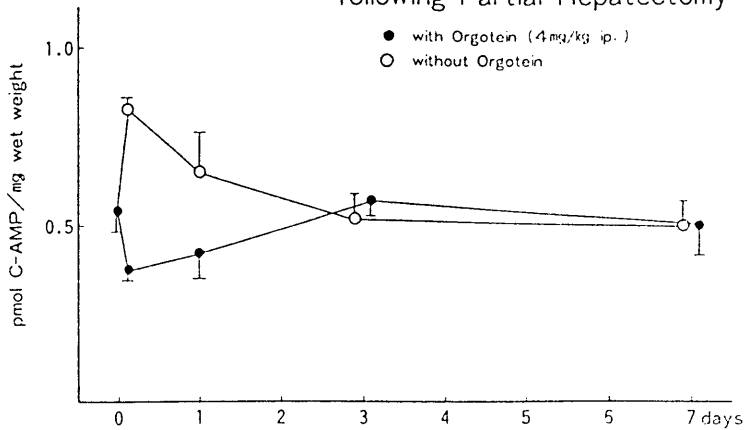


图 8 SOD Concentration in Rat Liver following Partial Hepatectomy

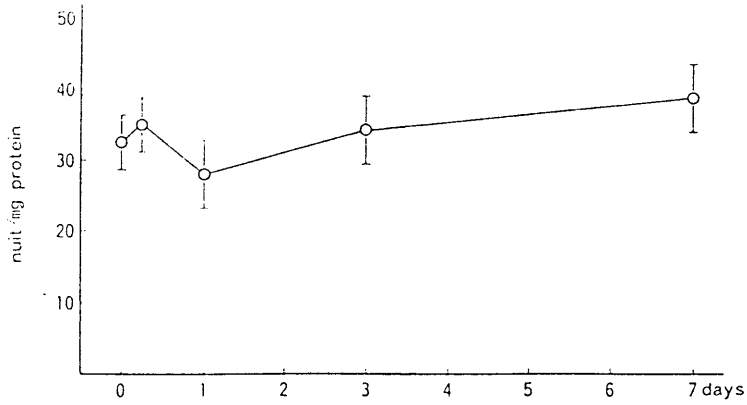


图 9 Effect of Orgotein(SOD) on DNA Synthesis

Addition	Partial hepatectomy	n	DNA Synthesis (cpm/mg DNA)
None	-	4	$8.02 \pm 2.14 \times 10^2$
None	+	7	$11.1 \pm 2.95 \times 10^4$
Orgotein (4 mg/kg)	+	9	$7.46 \pm 1.48 \times 10^4$ (P < 0.01)

IV. 脾内胎児肝移植による肝再生の検討.

1. 目的

脾内に移植された胎児肝組織は、旺盛な分化・分裂増殖を示し、本来のin-vivoの状態と同様の発展段階を示す。そこで、この実験モデルを用いて、宿主ラットに肝切や Eck手術を加え、脾内移植胎児肝がどのような影響を受けるか検討した。

2. 方法

胎児肝は、胎生18～20日目の近交系Wistarラットより摘出し、直径0.5mm大の小組織片に細切後、22ゲージ注射針を用いて同系ラットの脾内に注入した。移植後10～14日目に、前述の方法に従った70%肝切除群、さらにこの残存肝が大きくなるように、ガーゼで包んだ機械的再生抑制群、そしてエック手術群を作製し、DNA合成能、インスリン濃度の測定などを行なった(図-10)。

3. 成績

i) 肝切後肝重量と脾内胎児肝DNA.

宿主肝重量を体重で除した相対的肝重量と、脾内移植胎児肝細胞のDNA合成の関係をみると(図-11)、宿主肝重量の回復につれてDNA合成は低下する。

ii) 脾内胎児肝のDNA合成能

各群の脾内に移植された胎児肝細胞のDNAを経時的に観察した(図-12)。シャム群は全く変化を示さなかったが、肝切群は1日目に高いピークを示し、以後徐々に低下し、7日目にはほぼ前値に復した。一方、エック群は1日目に示した高値を、1週以後も同様に維持し続けることが判明した。

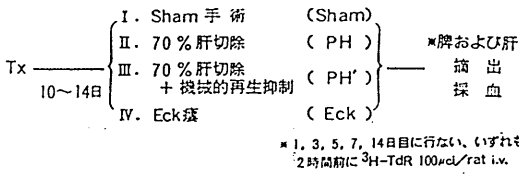
図 10 [方 法]

・胎児肝

胎生 18~20 日目の近交系 Wistar ラットより肝臓を摘出し、直径約 0.5 mm 大の組織片に細切し、Hanks 氏液で洗浄後、組織片浮遊液作製。

・脾内移植

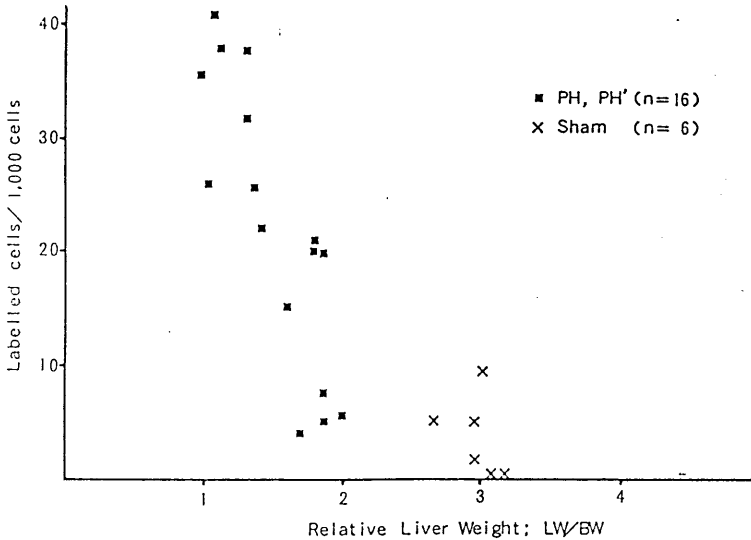
同系ラットの脾内に、22G 注射針を用いて約 0.2 ml の組織片浮遊液を直接注入。

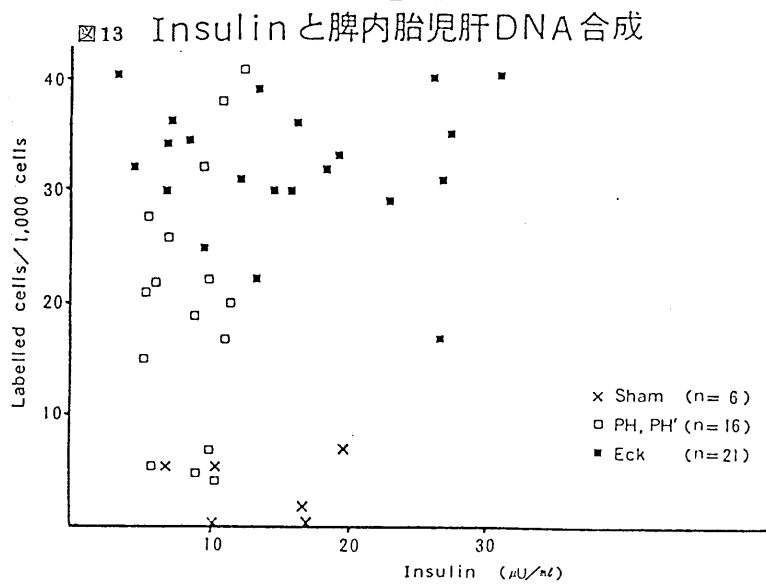
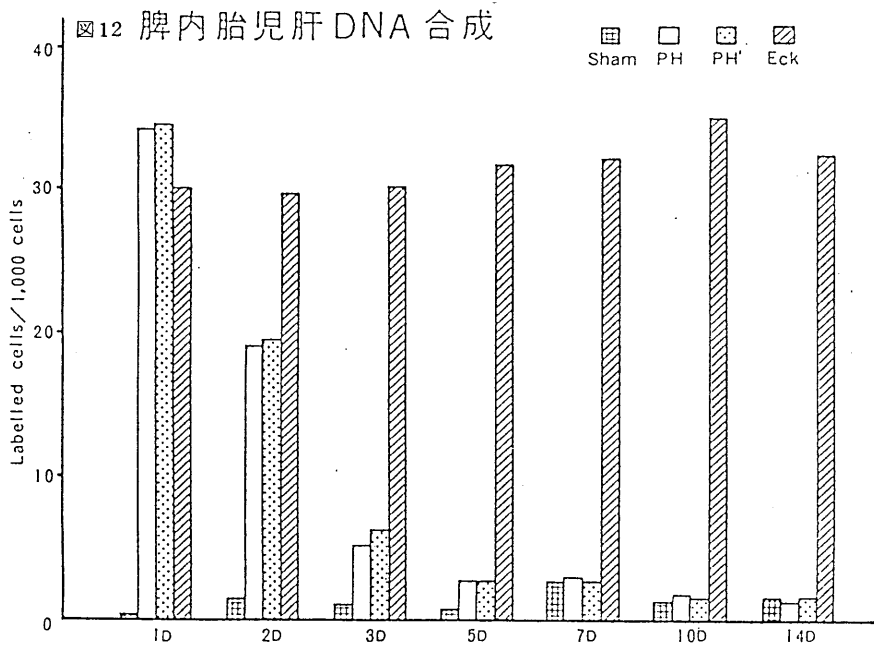


1. HE および PAS 染色
2. Autoradiography (Dipping 法)
3. 血液生化学
4. Insulin (RIA 法)

{ サクラ NR-M2 液体乳剤
露出: 4 日、3 週間
Labelled cell: 銀粒子 4 ケ以上

図 11 肝切後肝重量と脾内胎児肝 DNA 合成





iii) 血中インスリンの変化

エック群の旺盛な脾内胎児肝のDNA合成能が、末梢血中のインスリン濃度と何らかの関係があるかどうかを検討した(図-13)。しかしながら、肝切群では比較的インスリン濃度の低いにもかかわらずDNA合成は広く分布し、またエック群では比較的血中インスリン濃度が高いにもかかわらず同様にDNA合成能は広く分布し、インスリン濃度とDNA合成能の直接的な関係は明らかではなかった。

4. 小 括

宿主肝切除により、宿主肝と同様に脾内胎児肝においても早期からの変化は同様であり、またエック手術により、移植肝のDNA合成のみが高値を維持したという興味のある事実は、宿主肝の縮小による液性因子が、脾内移植肝細胞の増殖に極めて第一義的であることを示す。これは、ラット個体からみた全体的な肝機能量の維持という一種のホメオスタージスのメカニズムの基にあることを示唆するものと考えられる。

V. 肝再生時の細胞回転

1. 目 的

細胞増殖に伴うDNA量を細胞集団の全体像として把握し、かつ分裂像と対比して検索できる方法として、flow cytometry (FCM) は極めて有意義なものである。そこで、肝切後の変化を中心に検索した。

2. 方 法

肝細胞分離法は、研究項目(I)の場合と同様である。DNA蛍光染料としては Propidium Iodideを使用し、昭和電工製 flow cytometer CS-20により、488nm励起による630nm光を測

図 14 肝細胞分離法

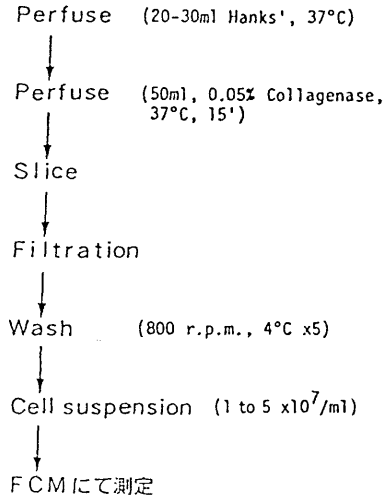
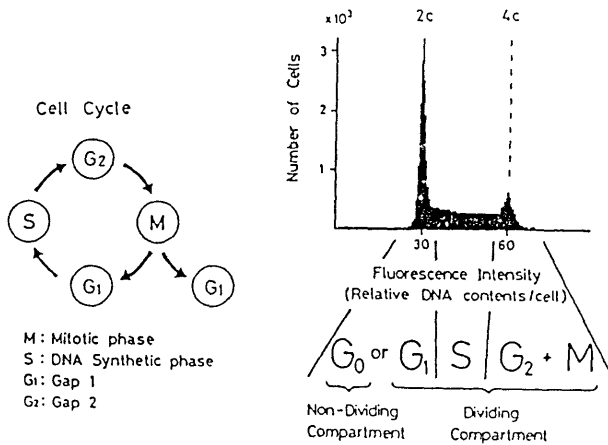


図 15 FCM測定によるDNAヒストグラムと各細胞周期との関係



定した (図-14)。

70%肝切は前法と全く同様であり、FCM測定によるDNAヒストグラムと各細胞周期との関係を図-15に示す。G₀-G₁は2Cに、G₂+Mは4Cに、そしてSは2Cと4Cの間に位置する。

3. 成績と小括

70%肝切除後のDNAヒストグラムをみると (図-16)、肝切12時間目より2Cが減少し、4C、さらには8Cの著増を示し、1週間後にむけて復元してゆく。これを、G₀+G₁、S、G₂+Mの動きとして図示すると (図-17)、G₀+G₁は肝切後第1、2病日に最も少なく、以後回復を示し、G₂+Mはこれと全く逆の動きをすることがわかる。Sは1日目に高値を示し、以後その値を維持する。

以上の変化をみると、肝切直後から約1週間にわたる細胞回転の様子が極めて明瞭に把握することが可能である。肝切によって、2Cの細胞群が一期に4C、8Cへと動いていく有り様が良くわかる。今回は肝切のみしか報告しなかったが、エックなどの変化も極めて興味あるところである。

図16 肝切除後肝細胞のDNAヒストグラム

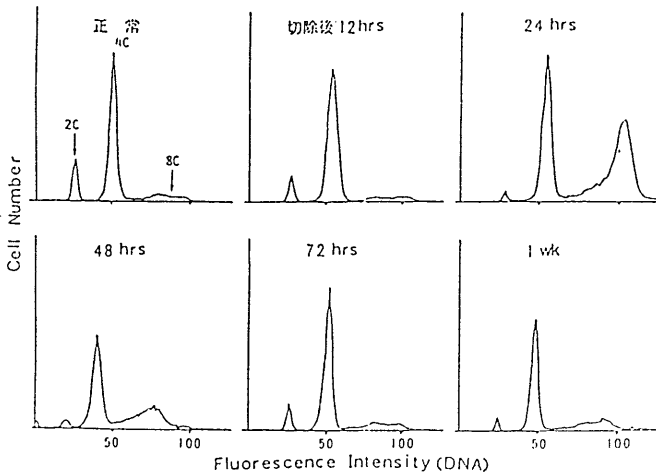
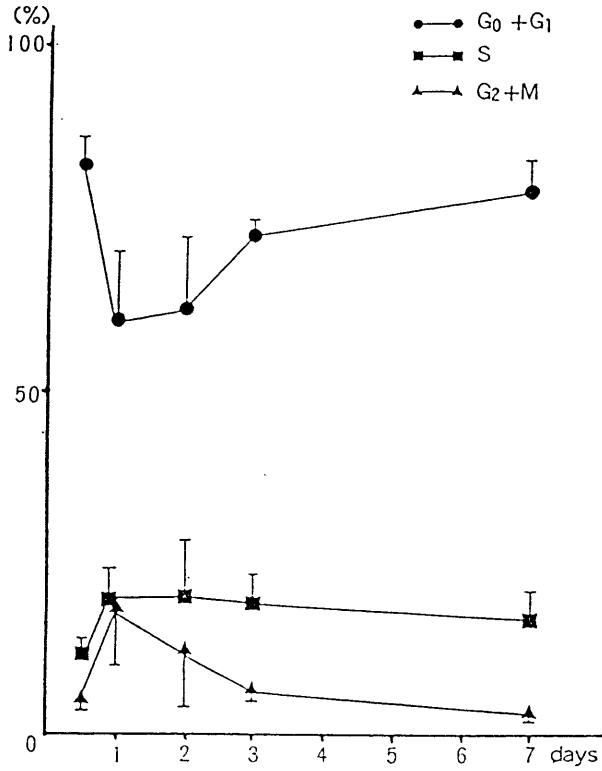


図 17 肝切除後細胞回転各期の変動



VI. 総括

生体の代謝機能を担う肝臓は、その80%を切除しても、自分の再生能力でもとの大きさに回復することができる。昔から、この脅威的な再生のメカニズムを解明する努力が続けられているが、なお解決されていない。ひとつの理由として、in-vitroにおける単純な実験モデルがなかったことがあげられる。肝細胞の初代培養法も、コラゲナーゼ消化法が開発されてから成功するようになったと言っても良く、今日でもcell cultureのシステムでは分裂・増殖を営ませることは難しい。我々は、細胞培養系、flow cytometry

あるいは脾臓内移植法などの様々な方法からのアプローチを試みた。その結果、 initiator としての活性酸素の意義、flow cytometryでみられた再生時の 2 C, 4 C, 8 C の各populationの意義、脾内移植実験でみられた肝再生も、ホメオスタージスの枠内で変動することなどの新知見が得られた。

一方、Howard & Pelc が提唱した細胞周期という概念も、LajthaらによるG₀ 期の存在や、Smith & Martin の transition probability model という新しい細胞増殖制御の考え方によって、新たなる展開を見せ始めている。G₀ 期にある肝細胞が、肝切除という増殖の誘導機転によってこの cell cycle を進行するという扱え方は、flow cytometry の data とも一致しそうである。しかしながら、エック手術時にみられたようなホメオスタージスの影響下にある場合には、どうなるであろうか。この点、今後検討する問題として大変興味のあるところである

以上、肝再生の制御機構に関して、in-vitro, ex-vivo, in-vivoの実験モデルにより検討を加え報告した。