日消外会誌　16（6）：953～959，1983年

高度障害肝に対する膵ホルモンの有効性に関する基礎的研究
—D-galactosamine ラット障害肝に対する膵ホルモンの有効性に関する実験的研究—

奈良県立医科大学第1外科（指導：白鳥常男教授）
吉　川　　高　志

STUDIES ON THE EFFECT OF PANCREATIC HORMONE ON SEVERE LIVER DAMAGE
—EXPERIMENTAL STUDIES ON THE EFFECT OF PANCREATIC HORMONE ON GALACTOSAMINE-INDUCED HEPATITIS OF RATS—

Takashi YOSHIKAWA
First Department of Surgery, Nara Medical University
(Director : Prof. Tuneo Shiratori)

高度肝障害患者に外科的侵襲を加えた場合に発生する肝不全などの術後合併症を防止する有効な治療法を探究する目的で，今回はD-galactosamine投与ラット障害肝モデルを用いて，Insulin, Glucagonの濃度と比率により作成した対照群を含む7つの実験群の各組成液を，直接門脈内に持続投与し，投与後24，48時間目に屠殺して，その障害肝に対する効果を検討した．GOT，GPT，Total Bilirubin, Albumin，肝体重比および組織学的検索では，有意の差は対照群との間にほとんど認めず，肝に対する庇護作用はみられなかった．しかし，DNA合成能ではInsulin 0.5U/kg/day群が組成液投与後24，48時間目とも，対照群より有意の高値をとり，この群の肝再生に対する有効性が明らかにされた．

索引用語：D-galactosamine, Insulin, Glucagon，肝再生，門脈内持続投与

はじめに

高度肝障害患者に外科的侵襲を加えた場合，肝不全などの重篤な合併症が高率に発生する．その合併症の発生を防止するためには，障害肝の修復や再生を促す術後療法が必要である．

近年，門脈内因子，特に膵ホルモンであるInsulin, Glucagonの肝再生に対する重要性が，Starzl[1]の門脈血流路変更モデル，Price[2], Whittemore[3], Bucher[4]らの門脈域臓器切除モデル，Fisher[5]の肝移植モデル，およびLeffert[6]の組織培養実験などを通じて，明らかにされてきた．臨床的にも，沖田[7]らがInsulin, Glucagonの肝再生に対する促進的効果と肝細胞壊死抑制作用に注目し，急性および慢性肝不全例に対し応用している．

しかし，Insulin, Glucagonが門脈血中で肝の再生や修復に最も効果のある量と比率，さらに再生過程に合致する投与時期に関してはいまだ明確にされていない．

今回，われわれは，門脈内へ持続投与されたInsulin, Glucagonが，肝の再生や修復に対し，最も効果を表わす投与量と比率を求めることを目的として，この基礎研究を企画した．すなわち，D-galactosamine投与ラット肝障害モデルを用いて，直接門脈内に持続的に各種濃度と比率のInsulin, Glucagonを投与して，その障害肝の再生や修復に対する効果を検討したので報告する．

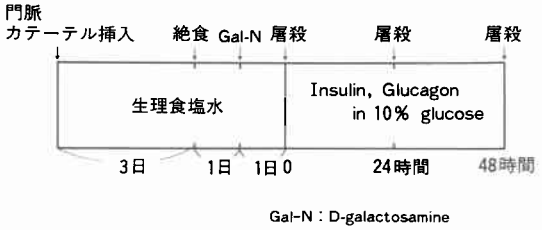
実験方法

1．実験動物ならびに飼育条件

体重150～200gのWistar系雄性ラットを用い，実験前1週間は日本クレア製標準固型飼料で飼育した．

2．D-galactosamine肝障害ラット作成法およびIn-

図1　実験方法



sulin, Glucagon 投与方法

門脈本幹にシラスコンチューブ（ダウコーニング社製，size 0.5～1.0mm）の先につけた26G 皮内針を直接刺入し，外科用接着剤アロンアルファAで固定する．同チューブを皮下を通じて背部より体外へ導出する．ラットを生理的状態で飼育するために，Cannular free through Swivel を用いて持続注入ポンプ（シャープ製 PIP-21 または MP-21）に接続する．図1のごとく，初めの5日間は生理食塩水を1日5 ml の割合で門脈内に持続投与する，生理食塩水を投与しはじめて4日目に，前日より24時間絶食させておいたラットの腹腔内に，生理食塩水で溶解し1N NaOH で中和した D-galactosamine HCl（Sigma 社）を，体重 1kg あたり1,000mg 投与して肝障害を作成した．

D-galactosamine 投与後1日目より生理食塩水のかわりに，表1のごとく，10% glucose（基礎液）のみの対照群を含めて，Insulin, Glucagon の濃度と比率により作成した7つの実験群の各組成液を1日5 ml の割合で投与した．初めに，この実験に供じたラットは108匹であるが，一定の肝障害のラットを実験に供するため，血清 GOT 300以上，GPT 100以上のラットを今回の検討の対象とした．

すなわち各実験群の対象とするラット数は，I群（対照群）：20匹，II群（Insulin 2U/kg/day）：16匹，III群（Insulin 0.5U/kg/day）：14匹，IV群（Glucagon 2mg/kg/day）：10匹，V群（Glucagon 0.5mg/kg/day）：10匹，VI群（Insulin 2U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day）：16匹，VII群（Insulin 4U/kg/day＋glucagon 2mg/kg/day）：14匹の計72匹である．

表1　実験群

Ⅰ：対照群＝10% glucose（基礎液）投与群
Ⅱ：Insulin 2U/kg/day投与群
Ⅲ：Insulin 0.5U/kg/day投与群
Ⅳ：Glucagon 2mg/kg/day投与群
Ⅴ：Glucagon 0.5mg/kg/day投与群
Ⅵ：Insulin 2U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day投与群
Ⅶ：Insulin 4U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day投与群
Ⅱ～Ⅶ群は，10% glucoseにInsulin，Glucagonを溶解して投与する

3．検索項目および検索方法

ラットを図1のごとく，各組成液投与前，投与後24，48時間目に屠殺し，以下の検索を行った．

1）血液生化学的検査

ラットの下大静脈より屠殺時に血液を採取し，血清 GOT, GPT, Total Bilirubin, Albumin を測定し肝障害の指標とした．

2）肝体重比

屠殺時の肝重量を同時期のラットの体重で除して求めた．

3）肝の DNA 合成能（DNA specific activity）

ラットの腹腔内に ^{3}H-thymidine 1μCi/g・体重を投与し，1時間後に屠殺して肝を1g 採取した．

DNA の分画抽出は Scott の変法[8]に準じて行った．すなわち，ラットの肝 1g を細切した後，5 ml の0.25 M Sucrose-5% Citric acid 溶液を加え，Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザーでホモジネートした．次いで，0.3N　PCA 溶液で酸可溶性燐酸化合物を Ethanol および Ethanol-Ethel（3：1）溶液で燐脂質を除去した後，1N PCA 溶液を加えて，70℃40分間加熱して水解することにより，核酸を抽出分離した．

抽出液の一部で放射活性を測定し，他の一部で DNA の定量を行った．

DNA に取り込まれた thymidine の放射活性は核酸抽出液0.5ml を，10ml のシンチレーション溶液 Univer-Gel（PPO, POPOP, Nonionic Surfactant in xylene）に加え，シンチレーションカウター（Packard, Model 3320）で測定した．

また，抽出液中の DNA 量は diphenylamine 法[9]で定量した．

同容の抽出液中のカウント数を，DNA 量で除して，比活性（cpm/μg DNA）を求め，DNA 合成能を表わ

表2　肝障害の分類

肝細胞壊死の範囲と炎症の程度に基づいて，肝障害の程度を6段階に分類している。

Grade of liver damage	Percentage of liver cells affected	Type of damage
0	0	nil
1	1-5	Increased leucocyte infiltration and lytic necrosis.
2	5-10	Focal necrosis or necrosis in the periportal area together with bile ductule proliferation.
3	10-30	Central necrosis.
4	30-50	Sub-massive necrosis.
5	50-100	Massive necrosis.

す指標とした．

4）病理組織学的検索

肝は10%ホルマリンで固定し，HE染色を行った．肝障害の程度は表2のごとく，肝細胞壊死の範囲と炎症の程度に基づいたPickering[10]のGradingにより分類した．

実験成績

1．血液生化学的検査

1）血清GOT

血清GOTは図2のごとく，Ⅰ群（対照群）を除く各群が各組成液投与開始後24時間目にピークの値をとる傾向を認めたが，Ⅰ群（対照群）は24時間目で他群に比べ，最も低値をとり漸増傾向を示した．

しかし，各組成液投与開始後24，48時間目のGOT値にはⅠ群（対照群）と各群の間に有意差はなく，また同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによるGOT値の有意差は認めなかった．

2）血清GPT

血清GPT値は図3のごとく，Ⅰ群（対照群）が各組成液投与開始後24時間目で，他群に比べ低値をとり，やや漸増傾向を示すのに対し，他の群はすべて24時間目にピークの値をとる傾向があった．

図2　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目の血清GOTの変化
24，48時間目において，Ⅰ群（対照群）と各群の間には有意差はなく，また，同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによる有意差は認めなかった．

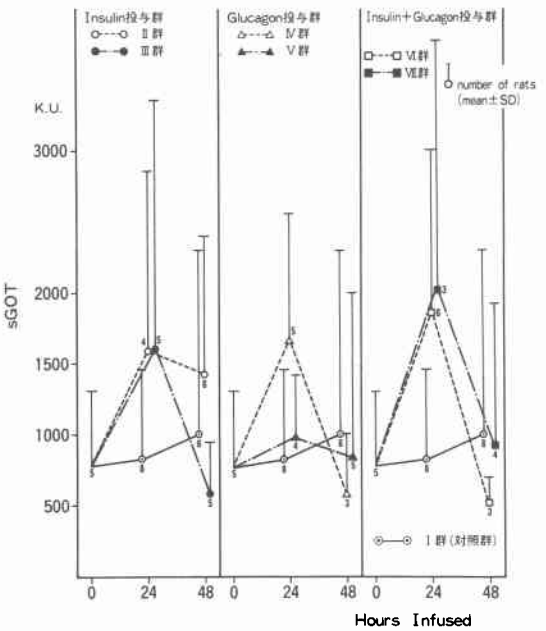


図3　各組成液注入前，注人開始後24，48時間目の血清GPTの変化
24，48時間目において，Ⅰ群（対照群）と各群の間には有意差はなく，また，同一薬剤間にも濃度や比率の違いによる有意差は認めなかった．

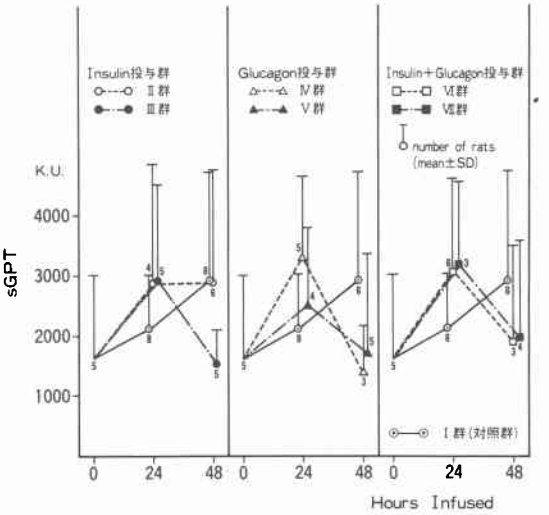
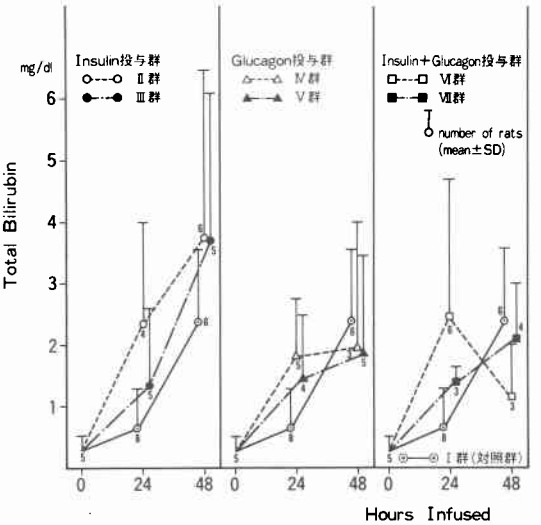


図4　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目のTotal Bilirubinの変化
24，48時間目において，Ⅰ群（対照群）と各群の間には有意差はなく，また，同一薬剤間にも濃度や比率の違いによる有意差は認めなかった．



しかし，各組成液投与開始後24，48時間目のGPT値にはⅠ群（対照群）と各群の間に有意差はなく，また同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによるGPT値の

有意差は認めなかった.

3) Total Bilirubin

Total Bilirubin 値は図4のごとく，VI群（insulin 2U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与群）を除く各群が漸増傾向を示した.

各組成液投与開始後24，48時間目の Total Bilirubin 値には，I群（対照群）と各群の間に有意差はなく，また同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによる Total Bilirubin 値の有意差は認めなかった.

4) 血清 Albumin

血清 Albumin 値は図5のごとく，II群(Insulin 2U/kg/day 投与群）およびV群（Glucagon 0.5mg/kg/day 投与群）を除く各群が軽度減少傾向を示した.

各組成液投与開始後24, 48時間目の Albumin 値にはI群（対照群）と各群の間に有意差はなく，また同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによる Albumin 値の有意差は認めなかった.

2. 肝体重比

肝体重比は図6のごとく，III群（Insulin 0.5U/kg/day 投与群）およびV群（Glucagon 0.5mg/kg/day 投与群）を除く各群が，各組成液投与前値に比べ，投与後48時間目において低値をとる傾向があった.

I群（対照群）との比較では，II群（Insulin 2U/kg/day 投与群）が24時間目に有意の低値（$p<0.05$）をとる以外，I群（対照群）と各群の間に肝体重比の有意差は認めなかった.

また同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによる肝体重比の有意差は認めなかった.

3. DNA 合成能（DNA specific activity）

DNA specific activity は図7のごとく，各組成液投与開始後24時間目で，I群（対照群）に比べ，II群（Insulin 2U/kg/day 投与群），III群(Insulin 0.5U/kg/day 投与群）および VII 群（Insulin4U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与群）の各群が有意の高値を示した（$p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.025$).

各組成液投与後48時間目では，III群（Insulin 0.5U/kg/day 投与群）のみが，I群（対照群）に比し有意の高値を示した（$p<0.05$).

また同一薬剤間の比較では24時間目で，VII群（Insulin 4U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与群）がVI群（Insulin 2U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与群）に比べ，有意の高値を示した（$p<0.05$).

48時間目ではIII群（Insulin 0.5U/kg/day 投与群）がII群（Insulin 2U/kg/day 投与群）に，VII群（Insulin 4U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与群）がVI群（Insulin 2U/kg/day＋Glucagon 2mg/kg/day 投与

図5　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目の血清 Albumin の変化
24，48時間目において，I群（対照群）と各群の間には有意差はなく，また，同一薬剤間にも，濃度や比率の違いによる有意差は認めなかった.

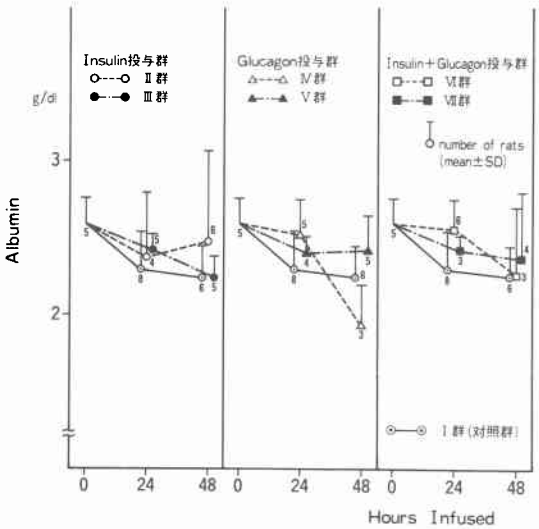


図6　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目の肝体重比の変化
24時間目において，II群がI群（対照群）に対し，有意の低値（$p<0.05$）をとる以外，I群と各群の間に有意差は認めなかった．また，同一薬剤間にも，濃度や比率の差による有意差は認めなかった.

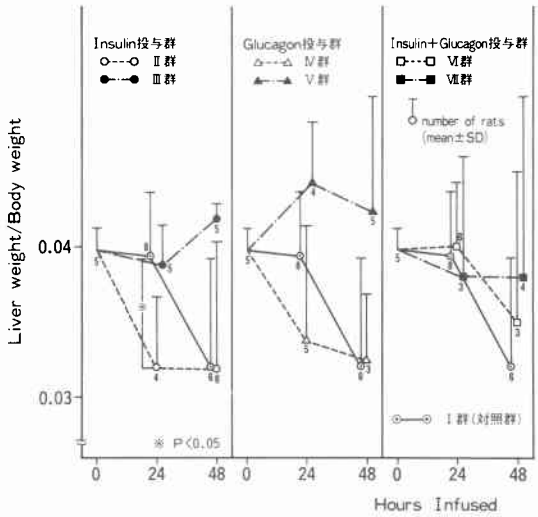


図7　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目の肝DNA specific activityの変化
24時間目において，I群（対照群）に比べ，II，III，VII群が有意の高値を示した（$p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.025$）．48時間目ではI群に比べ，III群が有意の高値を示した（$p<0.05$）．また同一薬剤間の比較では，24時間目で，VII群がVI群に比べ有意の高値を示した（$p<0.05$）．48時間目では，III群がII群に，VII群がVI群に比べ，各々有意の高値を示した（$p<0.05$, $p<0.05$）

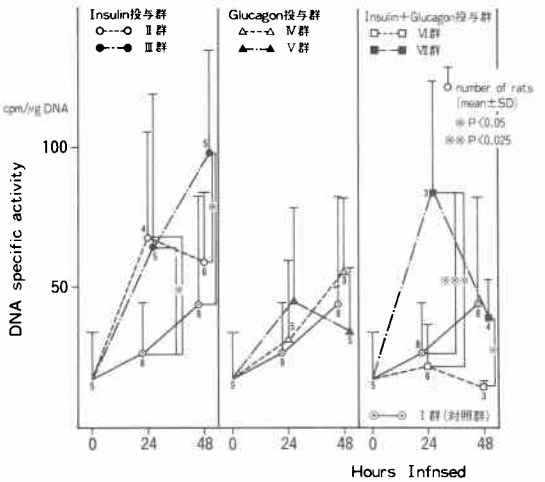
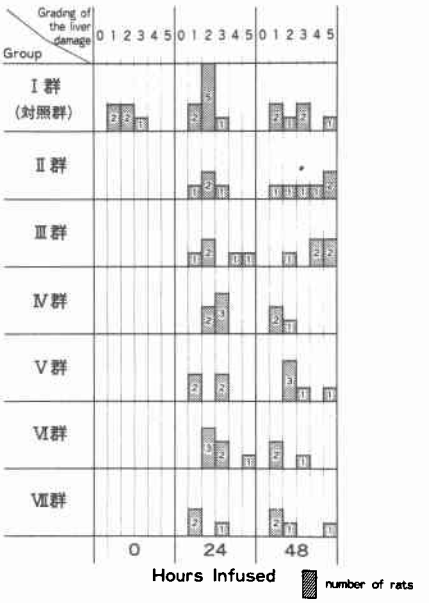


図8　各組成液注入前，注入開始後24，48時間目のgrade別ラット数
PickeringのGradingに基づいて，各Grade別のラット数により各薬剤の効果を検討したが，組織の増悪あるいは改善には，統計学的に一定の傾向を認めなかった．



群）に比べ，おのおの有意の高値を示した（$p<0.05$, $p<0.05$）

4．病理組織学的検索

Pickering[10]のGradingに基づいて図8のごとく，各Grade別ラット数により，各薬剤の効果を検討したが，組織の改善あるいは増悪には統計学的に一定の傾向を認めなかった．

考　察

D-galactosamineによる肝障害は，Keppler[11]，Lesch[12]，Decker[13]の他，多数の報告[14)~19)]がみられ，人のウイルス肝炎に類似した血液学的，組織学的変化を起こす薬剤として注目されてきた．その肝障害の本態は，細胞内UTPの減少によるRNA合成，蛋白合成の低下とGlycogenの減少からくるenergy不足[11)18)]，および細胞膜の障害[17)19)]によるものとされている．

われわれは，沖田[20]の方法に準じ，D-galactosamine 1,000mg/kg•体重をラットの腹腔内に投与し，激症肝炎類似のモデルを作成して，その門脈内に直接Insulin, Glucagonを投与した．

門脈内因子に関しては，近年多くの研究が[1)~6)]様々な実験モデル，方法を用いてなされており，それらの実験を通じて，門脈内因子，とくに膵ホルモンであるInsulin, Glucagonの肝再生に対する重要性が認識されてきた．

Bucher[4]は門脈域臓器全摘除を行ったラットに肝切除を施行し，外頸静脈より種々の量と比率のInsulin, Glucagonを投与して，残存肝のRNA合成能を検討している．その結果によれば，Insulin, Glucagonおのおの単独では肝再生に対する効果はみられず，両ホルモンの同時投与が肝再生に対して有効であったと報告している．

一方，Starzl[21]は門脈下大静脈吻合を行った犬の左門脈内にInsulin, Glucagonを持続投与したところ，Insulin単独投与群にのみ肝左葉の萎縮を減少させる効果があったと報告している．さらにこの報告の中でStarzlは少量のGlucagonをInsulinと同時投与しても，Insulinの作用は増強されず，一方大量のGlucagonの同時投与は逆にInsulinの作用を減弱させたと述べている．

沖田[20]はD-galactosamineによるラットの激症肝炎類似モデルにInsulin, Glucagonを腹腔内投与して，

肝細胞壊死の進展阻止効果を認めたと報告している.

Farivar[22]はmurine hepatitis virusによる劇症肝炎ラットの腹腔内にInsulin, Glucagonを持続投与したところ, Insulin, Glucagonの同時投与した群の生存率が最も良かったと報告している.

このように, Insulin, Glucagonが肝再生に対して有効であるということは, 各報告者の意見の一致するところであるが, その最適な投与量と比率についてはいまだ明確でなく, 定説がないのが現状である.

今回われわれが行った実験では, D-galactosamine障害肝の再生に対してはDNA specific activityからみて各組成液投与後24, 48時間を通じて, Insulin 0.5 U/kg/dayの門脈内持続投与のみが有効であった. さらに同じInsulin投与でも, Insulin 0.5U/kg/dayがInsulin 2U/kg/day投与より, 48時間目で, DNA specific activityの値が有意の高値を示した. このことは, Insulinの肝再生に対する有効性を示すと同時に, 肝再生に対してInsulinが効果を発揮するには, 至適な濃度の選定が必要であることを示唆するものと考える.

一方, Insulinの投与経路の違いによる影響については, Stevenson[23]がイヌに6時間2mlの割合で, 0.012～0.10U/kg/hrのInsulinを末梢静脈と門脈の両経路より投与して, 末梢血中のglucose, phosphate, pottassium, non-esterified fatty acidおよびInsulin値の変動について検討している. これらのうち, Insulin値の変動についてみると, 末梢投与ではInsulinの投与量が増加するのに比例して, 末梢血中のInsulin値も増加している. しかし, 門脈投与では少量から中等量のInsulin投与で, 末梢血中のInsulin値は投与前値よりも低い値をとり, 大量のInsulin投与でようやく末梢血中のInsulin値の増加を認めている. このことは, 門脈内に投与された少量から中等量のInsulinは大部分が肝で利用, 分解されることを示唆しており, 同じ量のInsulinを両経路より投与した場合, 門脈内に投与されたInsulinの方が, より直接肝に作用して, 肝再生に対しても効果的ではないかと推測される. 今後, この点に関しては検討していきたいと考えている.

また, 直接門脈本幹に各組成液を持続投与するため, 門脈血流量が増加することによる生体への影響については, Blake[24]が, ラットの門脈内に, glucoseを1時間2mlの割合で注入したところ, 腎のsodiumの排泄が増加したと述べているだけである.

Starzl[21]やStevenson[23]もイヌに, おのおの25ml/day, 8ml/dayの割合で各薬液を門脈内に投与しているが, その生体に対する影響について特に述べていない.

われわれの実験における門脈内注入量は5 ml/dayであるので, 門脈血流増加による生体への影響はごくわずかであると考えている.

結　語

D-galactosamine投与ラット激症肝炎類似モデルに, 各種濃度と比率のInsulin, Glucagonを, 門脈内に持続投与して, 肝再生に対する促進的効果と肝庇護作用を検討した.

その結果, 血液生化学的検査, 肝体重比, および肝の組織像からは, いずれのInsulin, Glucagonの投与群にも肝に対する庇護作用はみられなかったがDNA合成能からは, Insulin 0.5U/kg/dayの門脈内持続投与のみが肝再生に対して有効であるとの結論を得た.

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲を賜った白鳥常男教授, また直接御指導, 御援助いただいた深井泰俊助教授, 吉田英晃博士に深謝する. また, 御支援, 御協力を頂いた教室の諸兄に謝意を表する.

本論文の要旨は第82回日本外科学会総会において発表した.

なお, 本研究の一部は文部省科学研究費によってなされたことを付記する.

文　献

1) Starzl TE, Halgrimson CG, Francavilla FR et al: The orign, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. Surg Gynecol Obstet 137: 179—199, 1973
2) Price JB Jr, Takeshige K, Max MH et al: Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration. Surgery 72: 74—82, 1972
3) Whittemore AD, Kasuya M, Voorhees AB Jr et al: Hepatic regeneration in the absence of portal viscera. Surgery 77: 419—426, 1975
4) Bucher NLR, Swaffield MN: Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. Proc Nat Acad Sci USA 72: 1157—1160, 1975
5) Fisher B, Szuch P, Fisher ER: Evaluation of a humoral factor in liver regeneration utilizing liver transplants. Cancer Res 31: 322—331, 1971
6) Leffert HL: Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII. Humoral control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration. J Cell Biol 62: 792—801,

1974
7) 沖田　極, 相部　剛, 加屋　茂ほか：肝疾患治療薬の作用に関する基礎的研究.(3). glucagon-insulin 療法による急性, 慢性肝不全の治療. 肝臓 19：854—861, 1978
8) Konishi Y, Denda A, Takahashi S et al: Effect of chemical carcinogens on pancreatic DNA synthesis in vivo. Gann 67：781—786, 1976
9) Burton K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J 62：315—323, 1956
10) Pickering RW: A comparison between the morphologic changes in the livers of hamsters and rats after galactosamine treatment and their correlation with altered serum transaminase levels. Arzneim-Forsch 27：1684—1687, 1977
11) Keppler D, Lesch R, Reutter W et al: Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. Exp Molec Path 9：279—290, 1968
12) Lesch R, Reutter W, Keppler D et al: Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: Autoradiographic and biochemical studies in rats. Exp Molec Path 12：58—69, 1970
13) Decker K, Keppler D: Galactosamine induced liver injury. In: Progress in liver disease (IV). Edited by Popper H and Schaffner F, Grune & Stratton Inc, New York, 1972, p183—199
14) Shinozuka H, Farber JL, Konishi Y et al: D-galactosamine and acute liver injury. Fed Proc 32：1516—1526, 1973
15) Konishi Y, Shinozuka H, Farber JL: The inhibition of rat liver nuclear ribonucleic acid synthesis by galactosamine and its reversal by uridine. Lab Invest 30：751—756, 1974
16) 小西陽一, 伝田阿由美, 丸山博司ほか：Galactosamine による実験的肝障害に関する研究. Minophagen Med Rev 25：166—173, 1980
17) El-Mofty SK, Scrutton MC, Serroni A et al: Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. Am J Pathol 79：579—595, 1975
18) 野田健一：D-galactosamine 肝炎の成因に関する研究. 肝臓 17：874—884, 1976
19) 野田健一, 沖田　極, 武波俊彦ほか：D-galactosamine 肝炎における細胞膜障害とその修復. 肝臓 19：339—345, 1978
20) 沖田　極, 野田健一, 福本陽平ほか：肝疾患治療薬の作用に関する基礎的研究(2). 重症肝炎の治療を目的とした glucagon-insulin 療法の基礎的研究. 肝臓 19：848—853, 1978
21) Starzl TE, Watanabe K, Porter KA et al: Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. Lancet I：821—825, 1976
22) Farivar M, Wands JR, Isselbacher KJ et al: Effect of insulin and glucagon on fulminant murine hepatitis. New Engl J Med 295：1517—1519, 1976
23) Stevenson RW, Parsons JA, Alberti KGMM: Insulin infusion into the portal and peripheral circulations of unanesthetized dogs. Clin Endocrinol 8：335—347, 1978
24) Blake WD, Ulfendahl HR: Hepatic portal vein infusion of glucose on sodium excretion. Acta Physiol Scand 105：304—311, 1979