

障害肝の肝切除におけるプロスタグランジン E₁ の 効果に関する基礎的検討

千葉大学医学部第1外科

宮崎 勝 藤本 茂 志村 賢範 遠藤 文夫
菅沢 寛健 高橋 修 栗原 正利 河田 滋
越川 尚男 宇田川郁夫 奥井 勝二

PROTECTIVE EFFECTS OF PROSTAGLANDIN E₁-DERIVATIVE ON REGIONAL ANTICANCER AGENT-AND D-GALACTOSAMINE-INDUCED INHIBITION OF LIVER REGENERATION AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

Masaru MIYAZAKI, Shigeru FUJIMOTO, Takenori SHIMURA

Fumio ENDOH, Hirotake SUGASAWA

Osamu TAKAHASHI, Masatoshi KURIHARA, Shigemi KAWADA

Hisao KOSHIKAWA Kunio UDAGAWA and Katsuji OKUI

First Department of Surgery School of Medicine Chiba University

プロスタグランジン E₁ (PG)の障害肝の肝切除時における保護効果を基礎的に検討した。ラットを用い肝動脈より MMC 1.6mg/kg 注入, および D-Galactosamine (D-Gal) 800mg/kg 投与の2種の障害肝を作製し, 24時間後に各々68%肝部分切除を施行した。① SGOT, SGPTは障害肝切除後著増するが, PG群で軽減傾向を認めた。② 肝切除後 DNA 合成能は両障害肝共に PG群で有意の亢進を示した(p<0.05)。③ 肝切除後生存率では D-Gal 投与群で肝切後3, 6, 6日において PG群が有意の高い生存率を示した(p<0.05)。以上より PGE₁が障害肝の肝切除において肝細胞を保護し, 切除後の DNA 合成が抑制されず, 円滑に行われるものと考えられた。

索引用語: プロスタグランジン, 肝細胞保護効果, 肝再生, 肝切除

緒 言

プロスタグランジン (PG) が消化管腔粘膜において種々の潰瘍形成刺激物に対して消化管粘膜を直接に保護し潰瘍形成を予防する事が知られており, この PG の作用は細胞保護効果 (cytoprotection) と呼ばれている^{1)~3)}。しかしながら近年 PG の細胞保護効果は消化管腔臓器に限らず, 肝⁴⁾⁵⁾, 腎⁶⁾, 膵⁷⁾などの実質臓器において発揮され, 各種薬剤による臓器障害をも予防することがわかってきた。

肝臓における PG の保護効果は Staclura ら⁵⁾により CCl₄ の肝細胞壊死に対して 16-16-dimethyl PGE₂ が

有効であることが示され, その他 Aflatoxin⁸⁾, ethanol⁹⁾, ANIT¹³⁾等の障害肝に対しても有効であったとの報告がなされている。このような肝細胞保護効果は細胞障害を受けた後の回復を促進させる効果あるいは肝細胞が障害を受ける時点での障害防止効果より成り立っていると考えられている。外科領域において臨床問題となる障害肝における肝切除では, 肝細胞総量の減少および機能面での低下の量的, 質的障害が加わる事により肝機能不全に陥入しやすく, その時点における肝細胞を保護する作用を有する手段の研究は極めて重要な課題である。そこで著者は肝細胞保護効果が認められている 16-16 dimethyl PGE₂ を用いて, 障害肝の肝切除後の再生にいかなる影響を与えるかを著者の開発した in vivo isolated liver perfusion モデ

<1984年5月9日受理>別刷請求先: 宮崎 勝
〒280 千葉市美浜1-8-1 千葉大学医学部第1外科

ル¹⁰⁾¹¹⁾において検討し、肝切除後の再生を促進させる効果があることを報告した¹²⁾。今回はさらに臨床応用すべく PGE₁ の誘導体で long acting な PGE₁ を用い臨床治療モデルである高濃度制癌剤肝動脈内注入および薬物性肝障害である D-ガラクトサミン (D-Gal) の二つの障害肝の部分肝切除後再生に与える効果を基礎的に検討した。

実験方法

(1) 実験動物

350~400g の雄性 ウィスター系ラット 75匹を用いた。ラットは千葉大学医学部中央動物舎にて室温 25°C、照明は 5am~7pm まで点灯した。

(2) 経カテーテル肝動脈 MMC 注入法

ペントバルビタール静脈麻酔下に著者の開発した in-vivo の肝灌流法に準じ¹¹⁾、ラットを腹部正中切開にて開腹し、総肝動脈を露出する。次に胃十二指腸動脈への薬剤の注入を防ぐ目的でこれを結紮し、総肝動脈血流が固有肝動脈のみに注入するようにさせた後、総肝動脈内に注入用カテーテル(内径 0.28mm, 外径 0.61mm) を挿入、留置させた(図 1)。0.9%NaCl 溶液にて肝内血液を送り出した後 Mitomycin-C (MMC) 1.6mg/kg を約 5 分間に注入した。同投与量はラットの肝組織が耐える量であることを既報のデータより決定した¹⁰⁾¹¹⁾。薬剤注入後にカテーテルを抜き総肝動脈を結紮して閉腹し、手術を終了した。

(3) D-ガラクトサミン (以下 D-Gal) 肝障害の作成

ラットを 16 時間以上絶食させた後に D-Gal (Sigma 社) 800mg/kg 体重を 0.9%NaCl 溶液に溶解し (pH 7.0) 腹腔内へ one shot 投与した。

図 1 ラットにおける肝動脈内カテーテル挿入法

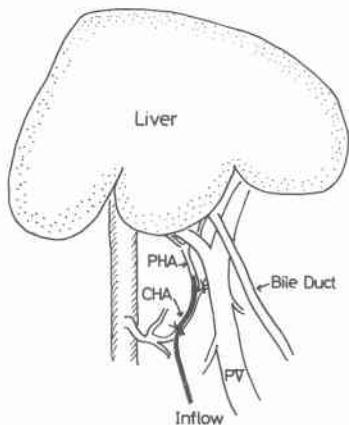
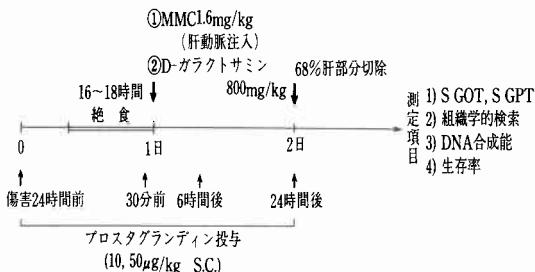


図 2 実験方法



(4) 実験スケジュール (図 2)

経カテーテル肝動脈注入 (Trans-catheter Arterial Infusion [TAI]) 施行群および D-Gal, 800mg/kg 投与群のおの24時間後にエーテル麻酔下に腹部正中切開にて開腹し、68%肝部分切除を施行した。新しく開発された long-acting プロスタグランジン E₁ 誘導体 (17 (S), 20-Dimethyl-trans- Δ^2 -prostaglandin E₁, α -cyclodextrin) は肝切除前 48 時間 (傷害作成 24 時間前)、TAI および D-Gal 投与 30 分前、6 時間後、24 時間後の計 4 回にわたり 10 μ g/kg、および 50 μ g/kg を皮下投与した。測定項目は肝切除後 1, 2, 5, 7, 14 日目に経時的血液を採取し、SGOT, SGPT 値を STA-test Wako (和光純薬工業) を用い Reitman-Frankel 法に基づいて測定した。また同時に肝切除後 15 日まで生存率を観察し、死亡例および 15 日生存ラットを殺し肝を速やかに取り出し 10% buffered formalin 液に浸しヘマトキシリン・エオシン染色し組織学的検索に供した。DNA 合成能の測定は肝部分切除後 22 時間目にラットを断頭ト殺し肝を取り出し、68%肝部分切除後 24 時間目の肝 DNA への ³H-Thymidine (以下 ³H-TdR と略す) の取り込みにより測定した。

結果の統計学的処理は Students't テストおよび X²-テストによった。

実験結果

(1) 血清 GOT, GPT 値の変動

D-Gal 800mg/kg 腹腔内投与 24 時間後に、68%肝部分切除施行例で、その後の SGOT と SGPT の変動を表 1 に示してある。生食群では肝切 1 日後より SGOT, SGPT とともに高値を示し、2 日目にはピークに達する。以後漸減し、14 日目にはほぼ正常値に復する。PG 群でも同様に肝切 2 日目にピークを示しその値は生食群との間に差を認めず、ほぼ同様の肝細胞障害がおこっていることを示している。

一方 TAI にて MMC 1.6mg/kg 注入群ではやはり

表 1 SGOT, SGPT 値の変動

測定項目	治療	肝 切 除 後 日 数				
		1	2	5	7	14
D-ガラクトサミン 800mg/kg*	生 食 ^b	715 ± 59 ^b	1560 ± 240	420 ± 188	430 ± 101	290 ± 116
	PG 10μg/kg ^b	550 ± 212	1390 ± 311	230 ± 102	280 ± 131	181 ± 107
SGPT	生 食	347 ± 136	980 ± 208	280 ± 140	320 ± 150	150 ± 49
	PG 10μg/kg	256 ± 179	913 ± 170	180 ± 98	280 ± 98	102 ± 78
MMC 1.6mg/kg (肝動脈内注入)*	生 食	890 ± 390	1850 ± 408	310 ± 40	330 ± 171	230 ± 123
	PG 50μg/kg	715 ± 155	1530 ± 380	280 ± 87	260 ± 126	230 ± 108
SGOT	生 食	415 ± 205	1170 ± 490	230 ± 40	180 ± 86	240 ± 101
	PG 50μg/kg	355 ± 125	745 ± 205	230 ± 93	210 ± 78	150 ± 95

a: D-ガラクトサミンおよびMMCの肝動脈注入後、24時間目に68%肝部分切除を施行した。
 b: Mean ± S.D. (n=4-5)
 c: PGE₁-誘導体は肝障害作製前24時間、30分、および作製後6時間、24時間の計4回の皮下注入を行った。

D-Gal と同様に SGOT, SGPT は68%部分肝切除後24時間目に増加し、2日目にピークに達する。以後漸減しやはり14日目に正常値に復する。PG群は生食群に比べ2日目のピーク値が低く押えられている傾向を示すが、両群間に有意差を認めなかった。

(2) 再生肝のDNA合成能への影響

TAI (MMC 1.6mg/kg 注入) 障害肝のDNA合成能は生食群689 ± 150 (n=5), PG 10μg/kg 群, 854 ± 221 (n=5), PG 50μg/kg 群1,162 ± 284 (n=5) でPG群で高い値を示したが、特にPG 50μg/kg 群で p < 0.05の有意差を示した。

D-Gal 800mg/kg のDNA合成能は生食群426 ± 117 (n=4), PG 10μg/kg 群1,152 ± 350 (n=7), PG 50μg/kg 群971 ± 347 (n=5) であり、PG群は10, 50μg/kg 群ともに生食群に比し有意 (p < 0.05) の高値を示す(図3)。

(3) 組織学的影響

D-Gal 800mg/kg 投与後68%部分肝切除施行群では肝組織の小葉内に中等度の壊死巣を認め、また炎症性細胞浸潤も存在する。肝細胞の索状構造は乱れ、肝炎の所見に一致する偽胆管の増生も認められたが、PG群と生食群の間に光顕的に明らかな差を認めえなかった。

(4) 生存率への影響

MMC 1.6mg/kg TAI 後に68%部分肝切除を施行した後のラット生存率を見ると図4に示すごとく、PG群が生食群に比べ死亡に至るまでの日が延長している傾向を認めるが、手術後のどの日数においても両群間に有意差を認めえなかった。一方D-Gal 800mg/kg 障害肝の68%部分肝切除後の生存率ではPG群が3, 4, 6日目にしておおの p < 0.05の有意差をもって生

図 3 68%肝部分切除後のDNA合成能

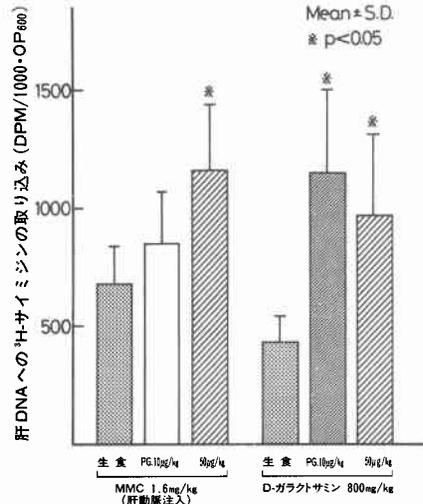


図 4 MMC 1.6mg/kg 肝動脈注入肝の68%肝部分切除後の生存率

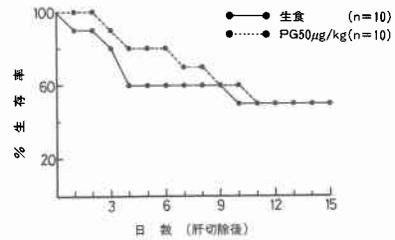
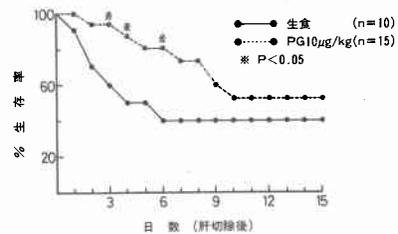


図 5 D ガラクトサミン800mg/kg 投与の68%肝部分切除後の生存率



食群に比べ高い生存率を示した(図5)。

考 察

アスピリンやインドメサシンといった非ステロイド性抗炎症剤を正常人に連続投与すると胃粘膜よりの出血がおこることはよく知られているが¹³⁾、ラットにおいて同様の実験を行った場合、胃粘膜障害発現以前に粘膜中の PGE₂ 量が減少していることが示され¹⁴⁾、この事が粘膜障害の原因の一つとなると考えられてい

る。Ahlquist さんも十二指腸潰瘍患者においては正常人に比べて十二指腸粘膜が酸負荷に対して生理的に起こる PG 合成が低下していることを証明しえた。一方 Robert は¹⁶⁾ラットにアルコールや塩酸を経口投与し、胃粘膜壊死を起こさせ、この変化が投与前に PG を投与しておく事により予防しうることを認め、かつこの作用が酸分泌を介していないことより、胃粘膜に対する PG の細胞保護作用 (Cytoprotection) と称した。このような消化管粘膜に対する PG の効果は胃粘膜のみではなく、膵管¹⁷⁾、小腸³⁾、の粘膜にもおよび、各種傷害に対し PG が細胞保護効果を持つことが明らかにされてきた。

近年 PG が消化管腔粘膜のみでなく、肝⁴⁾⁵⁾、腎⁶⁾、脾⁷⁾、などの実質臓器に対しても種々の障害物質に対して障害防止効果の存在することが報告されている。特に作用時間の長い 16—16 dimethyl PGE₂ において CCl₄⁴⁾⁵⁾、D-ガラクトサミン⁹⁾、エタノール¹⁰⁾、ANIT⁹⁾ などの薬剤性肝障害に対し強い肝細胞保護効果 (Hepatocytoc-protection) があることが報告されている。Ruwart ら⁶⁾は腎に対し、また Manabe ら⁷⁾は脾に対して同様に 16—16 dimethyl PGE₂ が効果を示す事を報告している。また 16—16 dimethyl PGE₂ に限らず PGE₁ がアルコールによるラットの脂肪変性¹⁹⁾を、また PGI₂ がネコの肝の isolated perfusion において虚血に対して肝細胞を保護すること²⁰⁾を報告している。

著者も 16—16 dimethyl PGE₂ を用いて肝の in-vivo isolated liver perfusion モデルにおける温熱障害および制癌剤による dose-dependent な肝障害モデルでの肝細胞保護効果をすでに報告してきた¹²⁾。このモデルは極めて臨床的な肝障害モデル¹¹⁾であり、薬剤性肝障害だけでなく、治療的手段としての肝障害モデルにおいても PG が保護効果を示したことは極めて重要な事と言えよう。今回の実験において著者らは臨床応用を目的として代謝酵素である 15—Hydroxy prostaglandin Dehydrogenase によって不活化されない PGE₁ 誘導体、17 (S), 20-Dimethyl-Trans Δ^2 -prostaglandin E₁ \cdot α -cyclodextrin を用いて肝細胞保護効果があるかを臨床モデルとしての障害肝の肝切除後再生肝に与える影響により検討を試みた。今回の結果では SGOT, SGPT の程度よりみる限りこの PGE₁ 誘導体は 16—16 dimethyl PGE₂ 程障害防止効果は強くないようであるが、DNA 合成能においては薬剤性肝障害である D-Gal および治療モデルである MMC の TAI の両群において PGE₁ 誘導体の投与により DNA 合成

能抑制軽減が認められた。生存率においては D-Gal 肝障害において有意の生存率の上昇効果をもたらした。いずれにせよ、PGE₁, E₂ がこのように障害肝の肝切除後再生において、生存率においてまで好結果をもたらすだけの肝再生促進効果を示すことは明白である。しかしこの DNA 合成能の促進はすでに示したように正常肝の肝切除後 DNA 合成能を促進させないこと、障害前投与においてのみ PG が切除後再生を促進すること¹²⁾より、PG が直接的に DNA 合成を促進させるのではなく、障害前投与により各種障害に対し肝細胞保護作用を示し、その結果肝細胞機能が強く障害されることなく次の切除後再生の抑制が軽減されると考えられる。この際の PG の肝細胞保護効果のメカニズムは現在まだ明白となっていないが、ほぼすべての肝細胞壊死は細胞膜の欠損によって引き起こされる事実²¹⁾より、これらの PG の肝細胞保護作用は細胞膜の安定化によっていると考えられている。Araki ら²⁰⁾も PGI₂ がネコの肝灌流モデルにおいて、ライソゾーム膜の安定化をおこすことにより肝細胞保護をすることを報告している。著者の 16—16 dimethyl PGE₂ の実験結果¹²⁾からも同様の機序が推察されたが、今回の実験においては肝細胞膜障害を示す SGOT, SGPT の値では明らかな効果認めないにもかかわらず、DNA 合成能、生存率で肝細胞保護効果を示したことより PG のその機序が細胞膜安定化のみでなく、何か他の biochemical な反応を介して肝細胞機能を維持させている可能性が考えられた。

肝障害モデルにおいて PG の効果の機序を考察する際に常に念頭に置かなければならないことは、肝障害物質の吸収遅延、毒性物質への代謝あるいは活性化の遅延、障害物質あるいは毒性代謝産物の分解促進、その結果の肝細胞壊死発現の遅延といった問題である。多くの薬剤性肝障害モデルを用いた in-vivo の実験では常にこの点が不明確に陥入しやすい。そのため著者らは in-vivo の肝灌流モデル¹⁰⁾¹¹⁾を用い肝へ直接に物理的および化学的に障害を与えることにより、吸収、代謝、分解といった問題点を解決しえた。特に物理的 (温熱による) 障害モデルで PGE₂ が障害保護効果を示したことは PG のその効果の機序を推察する上において重要な結果である¹²⁾。今回の実験では薬剤といっても臨床的治療モデルである肝動脈内への高濃度の制癌剤注入を行いその結果引き起こされる障害およびその後の肝切除後再生能を促進することを示したのは PG の臨床応用上の効果強く意義づける結果といえ

よう、同時に施行した D-Gal 障害肝での同様の PG の効果の機序が先に述べた吸収、活性化、分解などの間接的効果を介していない可能性が強く示唆されたが今後この機序についてはさらに検討していく予定である。

このような肝、腎、膵などの実質臓器に対する PG の細胞保護作用の報告は 16-16-dimethyl PGE₂ が多く、その他 PGE₂, PGI₂ を用いた研究が見られる。今回の実験では PGE₁ derivative を用いたが、PGE₁ は一般に肺で急速に不活化されるといわれるが、Golub ら²²⁾ はヒトの場合肺での代謝は 2/3 にとどまり、1/3 は全身循環へ達すると報告している。下肢動脈硬化症の治療においては末梢静脈投与により十分な効果発現があることが示されている²³⁾。この事は PGE₁ が肺を 1 回通過することによって代謝されてもなおかつ有効な血中濃度を維持しえることを示しているといえよう。今回の著者らの用いた PGE₁ 誘導体は代謝酵素である 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase によって不活化されない性質を有しており、十分な血中濃度を長時間にわたり保ちうると予想される。このような不活化されにくい、PGE₁ および E₂ 誘導体の使用は臨床応用上極めて重要な点と考えられる。

結 語

ラットにおいて臨床治療モデルである肝動脈内高濃度 MMC 注入肝障害および薬物性肝障害である D-Gal 投与後に 68% 肝部分切除を行い、PGE₁ 長時間作用型誘導体を用いその肝障害および肝切除後再生に与える影響を検討した。

1) SGOT, SGPT は TAI (MMC 1.6mg/kg) および D-Gal 800mg/kg 群共に PG 投与により有意差は認めないか軽減傾向を示した。

2) 68% 肝部分切除後の DNA 合成能では両障害モデルとも PG 投与群が生食群に比し著明に ($p < 0.05$) DNA 合成能を促進した。

3) 生存率においては TAI (MMC 1.6mg/kg) 群は明らかな差を示さないが、D-Gal 800mg/kg 群では 3, 4, 6 日(肝切除)において PG 群が有意に高い値を示した。

4) 以上の結果より PGE₁ は障害肝の切除後再生を促進させることが確認され臨床に極めて有用な手段となりうる可能性が示唆された。

文 献

1) Robert A, Nezamis A, Lancaster C et al: Cytoprotection of prostaglandins in rats: Pre-

vention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology* 77: 433-443, 1979

- 2) Clifts S, Meiners D, Kaminski DL: Effect of topical 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ on intragastric pH in acutely ill patients. *J Surg Res* 32: 382-389, 1982
- 3) Lancaster C, Robert A: Intestinal lesions produced by prednisolone: Prevention (cytoprotection) by 16,16-dimethyl prostaglandin E₂. *Am J Physiol* 235: E703-708, 1978
- 4) Ruwart MJ, Kalaja GJ, Friedle NM et al: Protection against CCl₄-induced liver damage by 16,16-dimethyl PGE₂. *Gastroenterology* 80: /1266-0000, 1981
- 5) Stachura J, Tarnawski A, Ivey KJ et al: Prostaglandin protection of carbon-tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 81: 211-217, 1981
- 6) Ruwart MJ, Rush BD, Friedle NM et al: Protective effects of 16,16-dimethyl PGE₂ on the liver and kidney. *Prostaglandins* 21: (Suppl): 97-102, 1981
- 7) Manabe T, Steer ML: Protective effects of PGE₂ on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 78: 777-781, 1980
- 8) Ruwart MJ, Rush BC, Friedle NM: 16,16-dimethyl PGE₂ partially prevents necrosis due to aflatoxin in rats. *Gastroenterology* 82: 1167-0000, 1982
- 9) Stachura J, Tarnawski A, Ivey KJ et al: 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ protection of rat liver against acute injury by galactosamine, acetaminophen, ethanol and ANIT. *Gastroenterology* 80: 1349-0000, 1981
- 10) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al: Hyperthermochemotherapy in in-vivo isolated perfusion of the rat liver. *Cancer* 51: 1254-1260, 1983
- 11) 宮崎 勝, 藤本 茂, 遠藤文夫ほか: 新しいラットの in vivo isolated liver perfusion 法による hyperthermochemotherapy の肝への影響. *肝臓* 53: 633-640, 1983
- 12) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al: Protection of thermochemotherapeutic-induced lethal acute hepatic necrosis in the rats by 16,16-dimethyl prostaglandin E₂. *J Surg Res* 34: 415-426, 1983
- 13) 蝶野慎治: 薬剤性消化管病変における内因性 prostaglandin の意義について. *日消病会誌* 78: 2295-2301, 1981
- 14) Kontrek SJ, Piastucki L, Brzozowski T et al:

- Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers. *Gastroenterology* 80 : 4-9, 1981
- 15) Ahlquist DA, Dozois RR, Zinsmeister AR et al : Duodenal prostaglandin synthesis and acid load in health and in duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 85 : 522-528, 1983
 - 16) Robert A : Cytoprotection of prostaglandins. *Gastroenterology* 77 : 761-767, 1979
 - 17) Tweedie JH, Mosley JG, Austin JL et al : Effect of 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ on aspirin-induced permeability changes in the pancreatic duct. *Am J Surg* 141 : 22-27, 1981
 - 18) Makowka L, Falk RE, Cohen MM et al : Protective effect of 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ on acute ethanol-induced inhibition of hepatic regeneration. *Surg Forum* 33 : 183-000, 1982
 - 19) Wilson D, Engel J, Wong R : Prostaglandin E₁ (RGE₁) prevents alcohol-induced fatty liver. *Clin Res* 21 : 829-000, 1973
 - 20) Araki H, Lefer AM : Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol* 238 : H176-181, 1980
 - 21) Popper H : Morphologic features of hepatocellular necrosis in human disease. In D Keppler (ed), *Pathogenesis and Mechanism of Liver Cell Necrosis*. Lancaster MTP Press Ltd., St Leonard House 1975, p15-24
 - 22) Golub M : Mechanism of prostaglandins A₁ and E₁ in man. *J Clin Invest* 56 : 1404-1410, 1975
 - 23) Carlson LA, Olsson AG : Intravenous prostaglandin E₁ in severe peripheral vascular disease. *Lancet* 9 : 810-000, 1976
-