

Cyclic Nucleotides (cyclic AMP & GMP) の 障害肝切除後の肝再生における意義

千葉大学医学部第1外科, *第1生化学

宮崎 勝 藤本 茂 藤田 摂子* 遠藤 文夫
志村 賢範 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

CHANGES IN CYCLIC NUCLEOTIDES (CYCLIC AMP AND CYCLIC GMP) OF REGENERATING LIVER FOLLOWING PARTIAL HEPATECTOMY IN D-GALACTOSAMINE-INJURED LIVER

Masaru MIYAZAKI, Shigeru FUJIMOTO, Setsuko FUJITA,
Fumio ENDOH, Takanori SHIMURA, Hirotake SUGASAWA,
Osamu TAKAHASHI, Masatoshi KURIHARA, Shigemi KAWADA,
Hisao KOSHIKAWA, Ikuo UDAGAWA and Katsuji OKUI

First Department of Surgery .
Department of Biochemistry School of Medicine Chiba University

D-Gal (D-Galactosamine)障害肝において、68%肝切除を施行し、DNA 合成能と肝組織内 c-AMP, c-GMP の関係について検討した。再生肝の DNA 合成能は D-Gal に Dose-dependent に抑制され、600 mg/kg 以上で有意差 ($p < 0.001$) を示した。c-AMP は肝切除群で非肝切除群に比べ15分、6時間、18時間目にピークを示し、その値は D-Gal 投与量に反比例し、肝障害の軽度な程、高値を示した。c-GMP は15分、15時間目で肝切除群にピークを認め、同様に D-Gal 投与量に反比例した値を示した。D-Gal 障害肝の肝切除後再生において、肝組織内、cyclic nucleotides の値と、DNA 合成能は良く相関した。

索引用語：肝切除、肝再生、Cyclic Nucleotides (cyclic AMP & GMP), DNA 合成

I. 緒 言

硬変合併肝癌において肝切除術を施行する際、肝機能予備力の低下により手術不能と判定されたり、術後肝不全を併発して死亡する症例に遭遇する。そこで障害肝の肝切除術に対する機能的肝予備力を正確に評価する検査法や、肝切除後の再生を促進させ術後肝不全の発生を予防する手段の研究は非常に重要な問題であり現在多くの施設で検討されている。しかしその際に、障害肝の肝切除後再生の病態を明確に把握することにより、それらの研究は有意義になされると考えられる。現在まで正常肝の肝切除後再生に関しては基礎的にか

なり解明されてきており、cyclic nucleotides 特に cyclic AMP の肝細胞内での上昇が ornithine decarboxylase, thymidine kinase 活性上昇に連なって DNA 合成に先立ち起こることが必要とされている(図1)^{1)~3)}。しかしながら障害肝において肝切除を施行した際にこれら cyclic nucleotides がどのように変動し、またそれが DNA 合成の抑制とどのように関係するかは現在解明されていない。今回著者らはこの点を動物実験において解明すべく、基礎的検討を行ったので報告する。

II. 研究方法

実験動物として Wistar 系雄性ラット(体重125~150g)を用いた。ラットは購入後空調の飼育室にて少なくとも7日間、固型食にて飼育後実験に供し

<1984年10月17受理> 別刷請求先：宮崎 勝
〒280 千葉市亥鼻1-8-1 千葉大学医学部第1外科

図1 再生肝におけるDNA合成経路の想定図

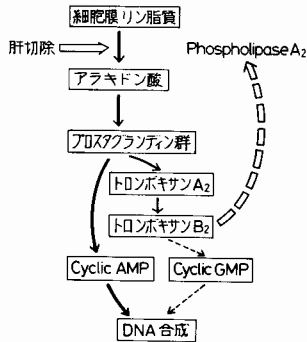
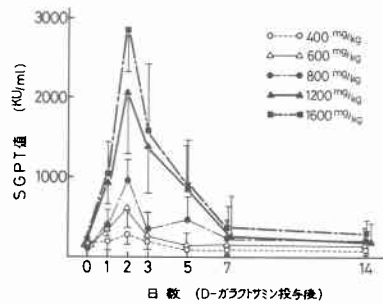


図2 D-Gal 肝障害による血清GPTの推移



た、ラットを20時間以上絶食させた後D-Galactosamine (D-Galactosamine HCl, Sigma 社) (以下D-Gal)を0.9% NaCl 溶液に溶解し、400, 600, 800, 1,200, 1,600mg/kg をおののラット腹腔内投与した。D-Gal 投与による肝傷害度の判定は同一ラットより薬剤投与後1, 2, 3, 5, 7日と経時的に採血し、SGOT, SGPT を測定、また組織学的検索により判定した。肝部分切除後の再生肝のDNA合成への影響を見るために、D-Gal 投与後24, 36, 48時間後の3つの異なる時点において68%の肝部分切除を施行し、切除後24時間目の³H-thymidineの肝DNA中の取り込みを測定した。³H-thymidineの取り込みはVerlyおよび三浦らの変法¹⁴⁾に準じ測定を行った⁵⁾。再生肝をラットを屠殺後に取り出し、電動のマイクロームにより0.5 mmに肝をスライスする。20μCiの[³H]-thymidineとHank's液の入った25mlのErlenmeyer大試験管に肝スライス片2枚を入れ、95%O₂, 5%CO₂下に37°C 2時間恒温水槽にて振とうする。インキュベーション終了後、酸不溶性分画中のDNAへの放射活性を測定しDPM/OD 600×1,000, にて示した。肝組織内のcyclic AMP, GMPの測定は肝部分切除後15, 30分, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18時間にわたって行った。肝組織の採取はMacManusらの方法³⁾に準じ液体窒素を用い採取し、保存した。測定はradio immunoassay キット(YAMASA)を用い施行した。

III. 成績

(1) 血清GPTの推移

D-Galを400~1,600mg/kg腹腔内投与した後のラットの血清GPTの推移を図2に示しているが、1日目には急上昇して800mg/kg以上ではさらに上昇が続き、2日目にピークになる。すべての群とも3日目には減少しはじめている。SGPTの値はD-Galの投与

量に依存した値を示しているのが明白であり、D-Galの投与量により障害度の異なった肝障害が得られると考えられた。

(2) D-Gal 障害肝の切除後DNA合成能

D-Galによる障害肝において、68%肝切除後のDNA合成能がどの程度抑制されるかを検討するために、D-Gal投与後24, 36, 48時間の3つの異なる時期に肝部分切除を施行したDNA合成の結果を図3に示した。D-Gal前投与により肝部分切除後のDNA合成は抑制されるが、その抑制はD-Gal投与後24時間目に肝部分切除した群において最も抑制されており、かつD-Galのdose-dependentな抑制であった。よってこの24時間の間隔を以後の実験デザインとして決定した。図4はD-Galの5種類の異なる投与量別のDNA合

図3 D-Gal 投与と肝切除の間隔がDNA合成能に与える影響

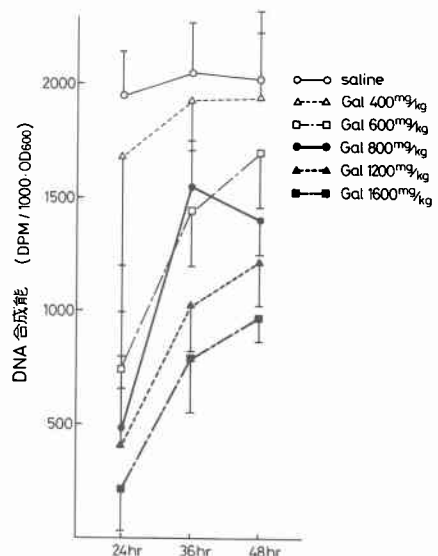
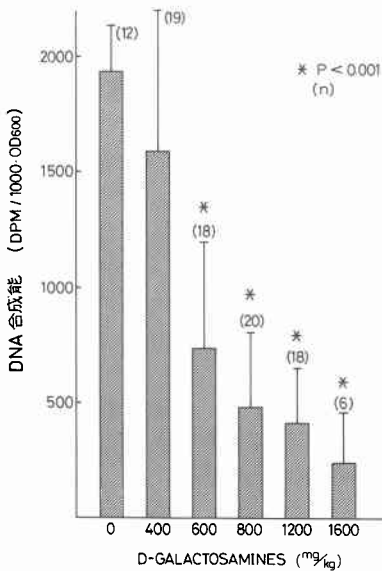


図4 D-Gal 障害肝の肝切除後 DNA 合成能



成能を示したものであるが、400mg/kg 投与では有意な抑制を示さないが、600mg/kg 以上では $p < 0.01$ の著明な抑制を示しており、D-Gal の投与量に比例して抑制が強まっている。

(3) 肝組織内 Cyclic Nucleotides 値の変動

D-Gal 0, 400, 800mg/kg と程度異なる障害肝を作製し、24時間後に68%肝切除を施行し、経時的な肝組織内 c-AMP, c-GMP 値を表1, 2に示した。肝切群は非肝切群に比べ全経過を通じ c-AMP, c-GMP ともに高値を示しているが、c-AMP では15分、6時間、18時間において肝切群が非肝切群に比べ著明に高値を示している。図5はその3時点における c-AMP 値を図に示したものであるが、非肝切群に比べ肝切群は有意に高値を示しているが、特に非肝障害の生食群において

表1 肝組織内 c-AMP 値の変動

肝切除後 時間	肝 切 除 群				非肝切除群
	生 食	D-Gal 400mg/kg	D-Gal 800mg/kg	D-Gal 800mg/kg	
0	580 ± 45*	615 ± 63	632 ± 33	628 ± 40	
15分	870 ± 67	783 ± 90	812 ± 86	635 ± 45	
30分	730 ± 30	770 ± 94	501 ± 36	525 ± 35	
1時間	885 ± 106	833 ± 160	773 ± 122	782 ± 47	
2時間	805 ± 95	840 ± 84	845 ± 106	772 ± 156	
3時間	837 ± 70	995 ± 333	920 ± 93	860 ± 166	
6時間	1235 ± 134	847 ± 177	814 ± 56	767 ± 150	
9時間	1440 ± 240	1070 ± 167	1140 ± 40	1215 ± 115	
12時間	1320 ± 187	1314 ± 80	1393 ± 222	1280 ± 155	
15時間	1310 ± 72	1373 ± 114	1250 ± 108	1123 ± 101	
18時間	2025 ± 184	1933 ± 175	1697 ± 128	1453 ± 104	
24時間	1525 ± 417	1310 ± 248	1409 ± 220	1276 ± 205	

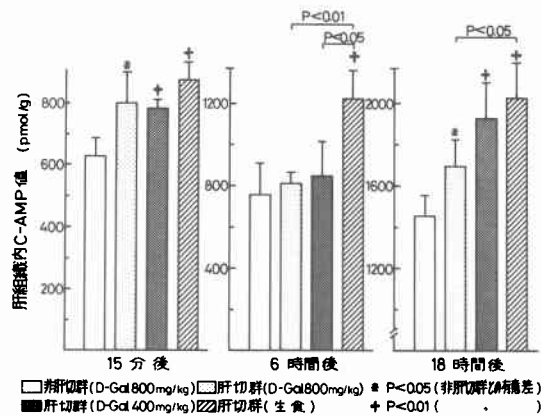
a : Mean ± SD (n=4) (pmol/g)

表2 肝組織内 c-GMP 値の変動

肝切除後 時間	肝 切 除 群			非肝切除群
	生 食	D-Gal 400mg/kg	D-Gal 800mg/kg	
0	8.4 ± 1.1 ^a	9.0 ± 1.0	9.2 ± 1.6	8.8 ± 0.9
15分	13.6 ± 1.6	10.5 ± 1.0	9.8 ± 1.9	7.8 ± 3.3
30分	7.9 ± 0.6	9.2 ± 1.2	9.0 ± 1.0	8.1 ± 1.5
1時間	10.8 ± 1.4	10.6 ± 0.9	10.1 ± 1.7	8.3 ± 2.6
2時間	8.0 ± 2.5	8.3 ± 1.7	6.9 ± 0.2	8.0 ± 1.5
3時間	9.2 ± 1.7	8.9 ± 1.2	8.5 ± 1.7	8.3 ± 2.2
6時間	9.3 ± 2.0	7.7 ± 1.4	7.5 ± 0.4	8.1 ± 0.6
9時間	9.4 ± 0.7	9.2 ± 0.8	9.0 ± 0.9	9.3 ± 1.1
12時間	9.4 ± 1.8	10.8 ± 0.3	9.8 ± 1.0	10.4 ± 0.6
15時間	16.6 ± 2.9	13.8 ± 2.9	10.4 ± 1.6	9.4 ± 0.7
18時間	11.8 ± 4.2	9.4 ± 1.9	10.4 ± 1.2	10.3 ± 3.1
24時間	10.0 ± 0.5	11.0 ± 2.2	9.4 ± 1.5	8.8 ± 1.9

a : Mean ± SD (n=4) (pmol/g)

図5 肝切除後の肝組織内 cyclic AMP 値の比較



著明な高値を認めており、D-Gal 800mg/kg 群は D-Gal 400mg/kg 群に比べ c-AMP の上昇度が抑制されているのが明らかである。一方 c-GMP では15分、15時間に肝切群でピークを示し図6に示すようにやはり生食群(非肝障害群)で肝切後最も非肝切群に比べ著明な差を示し、D-Gal 投与群では肝切後の15分、15時間での c-GMP の上昇が抑制されている。

図6 肝切除後の肝組織内 cyclic GMP 値の比較

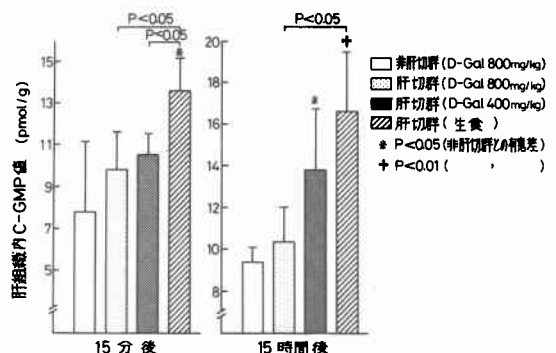


図7 症例1

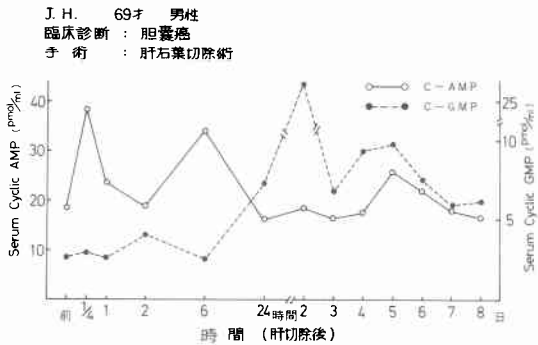
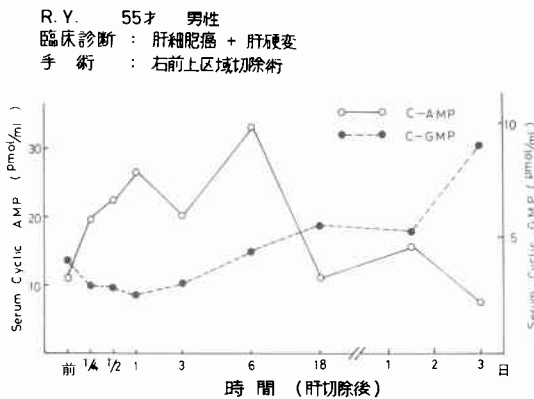


図8 症例2



(4) 臨床例

症例1は69歳の男性で、胆嚢癌の肝臓浸潤を伴った症例であり、肝機能には腫瘍による以外の異常を認めない。手術は肝右葉切除を施行した。肝切除後の血清中の cyclic AMP は15分と6時間、5日と3つのピークを示した。一方 cyclic GMP は2日目に著しいピークを示しているのがわかった。動物実験におけるのと同様に cyclic AMP 値が15分、6時間でピークを認めたことはきわめて興味深い。

症例2は肝硬変に肝細胞癌を合併した60歳の男性であり、右前区域切除を施行した。図8に示すように cyclic AMP は2つのピークを示すが、1時間と6時間であった。一方 cyclic GMP は症例1と同様に肝切除後24時間は余り変動を示さないが、3日目にピークを示した。しかしながら cyclic AMP と GMP もそのピークの値を比較すると明らかに症例1の正常肝に肝切除を施行した方が高い値をとっていた。

IV. 考 察

肝臓は肝切除後に再生をおこすということはよく知

られているが、ネズミでは2/3の肝切除を行うと10日~14日で元の肝重量に回復する⁵⁾⁶⁾。しかしその機序についてはいまだすべてが解明されたわけではない。近年外科的に肝切除術は普及し、肝再生、特に障害肝における肝再生の問題が重視されるようになった。正常肝においては、MacManus³⁾により肝切除後に肝組織内 cyclic AMP が上昇し、2.5時間と12時間の2つのピークを示すことが報告された。そして cyclic AMP の上昇につき ornithine decarboxylase, thyrosine aminotransferase, thymidine kinase 活性の上昇、そして DNA 合成がおこってくるとされている¹⁾²⁾。また Miura ら⁷⁾は cyclic AMP より cyclic GMP がより強く肝再生の初期に Trigger として働いているのではないかというデータを報告している。組織化学的検索においては肝切除後 cyclic AMP は肝細胞内で上昇を示すが、cyclic GMP は上昇を示さないが細胞内分布が特異的に変化し、この cyclic GMP の変化も肝再生において重要な役割を果しているとしている⁸⁾。in vitro の培養細胞を用いた系でも cyclic AMP の上昇が DNA 合成に連なることが報告⁹⁾され、cyclic AMP の上昇と DNA 合成とは密接な関係にあると考えられる。

今回の著者らの実験では D-Gal 障害肝を用いたが、Lesch ら¹⁰⁾は肝切除後に D-Gal を投与すると、その肝再生において G₁期、S期に作用し DNA 合成抑制を認めている。本実験では D-Gal を肝切除前に投与して RNA 合成低下および蛋白合成低下による肝細胞障害を作製した状態で肝切除術を施行した。この際 D-Gal の肝細胞障害は SGPT 値でみると12時間目で上昇し、48時間目でピークに達し4~5日目にはほぼ前値に復するので、肝切除を D-Gal 投与の何時間後に行った場合に最も障害が強くなるかが問題となる。今回の結果では、D-Gal 障害のピークとなる48時間目に肝切除を施行するより、24時間目に肝切除を行ってその24時間後の DNA 合成能を測定した方が最も強い抑制が示されることが明らかにされた。つまり G₁期が D-Gal による障害のピークにある条件より S 期に D-Gal 障害のピークがある方が抑制が強いということが認識された。

D-Gal 投与量とその肝細胞膜障害の程度が Dose-dependent に出現することはすでに明らかにされているが、本実験では D-Gal 肝障害の程度と再生肝の DNA 合成の抑制度が Dose-dependent に相関することが示された。このような肝障害の程度に差を認め、

かつ肝切除後再生もそれに応じて抑制される障害肝の再生過程において、DNA合成能のpleiotypic response¹¹⁾の1つである肝細胞内cyclic AMPおよびGMPの上昇がやはり抑制制度に応じた値を示したことは大変興味深い。しかもD-Gal障害群でのcyclic AMP値およびGMP値の抑制がすでに示したように反応発現の遅延によるものでない点は重要であり、障害肝の肝切除後再生におけるDNA合成抑制は肝組織内のcyclic nucleotidesの値に応じた変化をすることが明らかになった。この事実は臨床上障害肝患者の肝切除後の肝不全対策としていかなる治療手段が有用であるかを検討する際の研究過程においてcyclic nucleotidesの変動が重要なparameterとなりうると考えられた。

本論文で呈示した症例では末梢血清中のcyclic nucleotidesの動きを肝切除後に検索したものであり、末梢血清中の変動を解析することは多くの問題を含むが、Liljenquistら¹²⁾は人間のcirculating cyclic AMPは肝由来のものが主であるとしている。こういった事実を利用して池田ら¹³⁾、中本ら¹⁴⁾はglucagonによる末梢血中cyclic AMPの変動が術前の肝機能予備力として役立つとしている。

先に示したように肝切除後の再生肝が正常肝の症例では硬変肝の場合に比べcyclic AMPの15~30分と6時間目のピークがより高値を示した。またcyclic GMPでは動物実験の肝組織内の値と異なり2~3日目にピークが出現しているが、やはり正常肝症例の方が高い値を示している。今後臨床例の多くについて同様の検索を行って判定する必要があるが、肝切除後の肝細胞内のcyclic nucleotidesの動きが再生能に大きくかわっている可能性が臨床例においても強く示唆された。

現在著者らの検討している肝再生促進物質¹⁵⁾や、肝障害防御因子¹⁶⁾などについてもその機序を明らかにする目的で肝組織内cyclic nucleotidesとの関係について今後検索を進めていく予定である。

V. 結 語

障害肝の切除後再生能の抑制制度は肝切除後の比較的早期の肝細胞内cyclic nucleotidesの動きときわめて一致した値を示した。

今後障害肝の切除後再生の研究において、cyclic nucleotidesの変動にも注目していく必要があると考えられた。

本論文の要旨は第22回日本消化器外科学会総会において

発表した。

文 献

- 1) Miura Y, Fukui N: Prostaglandins as possible triggers for liver regeneration after partial hepatectomy. A Review Cellular & Molecular Biol 25: 179-184, 1979
- 2) Miura Y, Fukui N, Kanzaki Y, et al: Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in isolated perfused liver after partial hepatectomy. Adv Enzyme Regul 16: 195-203, 1978
- 3) MacManus JP, Feanks DJ, Youdale T, et al: Increases in rat liver cyclic AMP concentrations prior to the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy or hormone infusion Biochem Biophys Res Comm 49: 1201-1207, 1972
- 4) Verly WG: Thd hepatic chalone. natl Cancer Inst Monogr 38: 175-184, 1973
- 5) von Meister V: Rekreation des Lebergewebes nach abtragung ganzer leberlappen. Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur Allgemeinen Pathologie. Ziegler, E (Ed) Gustav, Fischer, Stuttgart, 1984
- 6) 菅沢寛健, 宮崎 勝, 藤本 茂ほか: 肝切除後の再生マーカーとしてのアミノピリン呼吸テストの意義に関する基礎的検討. 日消外会誌 17: 677, 1984
- 7) Miura Y, Iwai H, Sakata R, et al: Involvement of cyclic GMP in the initial stage of hepatocytes proliferation. M Biochem 80: 291-297, 1976
- 8) Koide Y, Earp HS, Ong SH, et al: Alternations in the intracellular distribution of cGMP and guanylate cyclase activity during rat liver regeneration. J Biol Chem 253: 4439-4445, 1978
- 9) Rozengurt E, Collins MK, Keehan M: Mitogenic effect of prostaglandin E₁ in Swiss 3T3 cells: Role of cyclic AMP. J Cell Physiol 116: 379-384, 1983
- 10) Lesch R, Schuchhardt C, Reutter W: The effect of D-galactosamine on the proliferative response of normal and partially hepatectomized rat liver: Liver Regeneration after Experimental Injury, Lesch R, Reutter W (Ed) New York 1975, p85-88
- 11) Miura Y, Fukui N: Pleiotypic responses of regenerating liver. Adv Enzyme Regul 14: 393-405, 1976
- 12) Liljenquist JE, Bomboy JD, Lewis SB, et al: Effect of glucagon on net splanchnic cyclic

- AMP production in normal and diabetic men. *J Clin Invest* 53 : 198—204, 1974
- 13) 池田雄裕, 柿田 章, 泰沼 侃ほか: 障害期肝における肝広汎切除の耐術能に関する実験的研究—グルカゴン負荷と血中 C-AMP を中心に—. *医のあゆみ* 107 : 168—170, 1978
- 14) 中本 実, 森永泰良, 成瀬 勝ほか: 肝切除術の肝予備能判定に対するグルカゴン負荷テストの意義—とくに cyclic AMP の変動. *日消外会誌* 17 : 873—881, 1984
- 15) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE, et al: Reversal of lethal chemotherapeutically induced acute hepatic necrosis in rats by regenerating cytosol. *Surgery* 94 : 142—150, 1983
- 16) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE, et al: Protection of thermochemotherapeutic-induced lethal acute hepatic necrosis in the rat by 16,16-dimethyl prostaglandin E₂. *J Surg Res* 34 : 415—426, 1983
-