日消外会誌　25（3）：786～792，1992年

閉塞性黄疸肝の肝切除後再生におよぼす prostaglandin-E_1誘導体の影響

千葉大学医学部第1外科
木村　文夫　宮崎　勝　宇田川郁夫　越川　尚男
伊藤　博　海保　隆　松本　潤　磯野　敏夫
鈴木　裕之　奥井　勝二

ラットを用いて閉塞性黄疸を作製し，5日および14日の閉塞期間の後，68%肝部分切除を施行した．再生肝のDNA合成能および肝切除前後の肝蛋白合成能を測定しprostaglandin-E_1誘導体（PG）がこれらに与える影響について検討した．DNA合成能はin vitroで^{3}H-thymidineの取り込みにより，また，肝蛋白合成能は^{14}C-leucineの取込みにより測定した．閉塞5日群のDNA合成能は著しく抑制され，閉塞14日群ではさらに強い抑制を示した（$p<0.01$）．閉塞5日群の肝蛋白合成能は強い亢進を示し，閉塞14日群ではさらに著しい亢進を示した（$p<0.01$）．正常肝の肝切除後の蛋白合成能は肝切除前に比べ著しい亢進を示したが，黄疸肝の肝切除後には肝切除前に比べむしろ低下した．PGはin vitroで黄疸肝のDNA合成能と肝蛋白合成能を亢進させ，黄疸肝において肝細胞保護効果を持つ可能性が示された．

Key words: obstructive jaundice, liver regeneration after partial hepatectomy, hepatic protein synthesis, DNA synthesis in regenerating liver, prostaglandin-E_1 derivative

緒　言

閉塞性黄疸（閉黄）症例に対する外科手術では術後の合併症の発生率が高く[1]，特に閉黄肝に対する肝切除では高ビリルビン血症を主体とする術後肝不全の発生が問題となる．

閉黄肝では胆汁酸やビリルビンの蓄積による肝細胞障害[2]や肝組織血流の低下[3]が起きているとされており，これが肝切除後再生の抑制の一因と考えられる[4]．今回，閉黄肝における肝切除後肝再生の抑制機構を明らかにする目的で，ラットを用い，肝DNA合成能および肝蛋白合成能の面より検討した．また，近年，肝細胞保護作用および肝再生促進作用が示唆されているprostaglandin（PG）に注目し閉黄肝の肝切除後肝再生におよぼす影響についても合わせて検討した．

対象と方法

（1）実験動物

Wistar系雄性ラット（300～350g）を用い，千葉大学医学部中央動物舎にて飼育した．（室温25℃，照明AM 5：00～PM 7：00）

（2）閉塞性黄疸ラットの作製と減黄モデル

ラットをエーテル吸入麻酔下に開腹し，胆管に外径0.8mm，内径0.5mmのビニールチューブ（Dural Plastics & Engineering, Australia）を挿入したのち肝門部に固定し，遠位部を盲端として胆管を閉塞し，閉黄ラットを作製した．胆管閉塞5日間および14日間の2群の閉塞期間を設け，再開腹しビニールチューブを開放し十二指腸内に誘導することにより胆管十二指腸瘻を作製し減黄した．

（3）肝切除後再生肝DNA合成能

胆管閉塞5日群および14日群について，内瘻化と同時にHigginsら[5]の方法に準じ，68%肝部分切除を施行した．再生肝DNA合成能はVerlyら[6]およびMiuraら[7]の方法により測定した．すなわち，肝切除後22時間目にラットの再生肝を速やかに摘出し，auto slicerを用いて厚さ0.5mmの肝スライスを作製した．これをin vitroで〔^{3}H〕-thymidine 20μCi（New England Nuclear）含有のHanks液5ml，37℃，95%O_2＋5%CO_2下で2時間培養し，肝切除後24時間目の肝DNA中への〔^{3}H〕-thymidineの取込みによりDNA

＜1991年11月20日受理＞別刷請求先：木村　文夫
〒280　千葉市亥鼻1－8－1　千葉大学医学部第1外科

合成能を測定した．結果はd.p.m/OD_{600}×1,000で表示した．

(4) 肝蛋白合成能の測定

胆管閉塞5日および14日の黄疸肝，さらに肝切除後に肝蛋白合成能がピークとなる48時間目の再生肝[8)9)]について，以下の方法により肝蛋白合成能を測定した．Hasselgrenら[10)]およびSorrellら[11)]の方法に準じて，厚さ0.5mmの肝スライスを作製し，in vitroで〔^{14}C〕-leucine（New England Nuclear）を10μCi含有するRPMI buffer 3ml中で，37℃，95%O_2＋5%CO_2下で3時間培養した．培養60分，120分，180分の各時点で肝スライスのhomogenateおよび培養液より蛋白分画を抽出し，各蛋白分画への〔^{14}C〕-leucineの取込みを経時的に測定した．肝スライスの蛋白分画中への取込みを肝細胞性蛋白合成能（hepatocellular protein synthesis以下HPS）とし，培養液の蛋白分画への取込みを肝分泌蛋白合成能（secretory protein synthesis以下SPS）とし，結果はd.p.m/mg proteinで表示した．

(5) 肝蛋白合成能および肝DNA合成能におよぼすPG-E_1誘導体の影響

培養液にPG-E_1誘導体（16s, 18s-Ethano-20-ethyl-6-oxo-PGE_1 L-leucineamide)を10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}g/mlの各濃度で添加し，〔^{14}C〕-leucineおよび〔^{3}H〕-thymidineとともに培養し，肝蛋白合成能と肝DNA合成能におよぼす影響を測定した．

結　果

(1) 再生肝DNA合成能

胆管閉塞5日群で内瘻化と同時に肝切除を施行した場合，再生肝のDNA合成能(924±368, Mean±S.D.)は，正常肝の再生肝（1,652±444）に比べ有意に抑制された($p<0.01$)．また，閉塞14日群の再生肝のDNA合成能（600±48）は，閉塞5日群に比べさらに強い抑制を認めた（$p<0.05$）(**Fig. 1**)．

(2) 閉黄肝における肝蛋白合成能

胆管閉塞5日群の培養180分のHPS値は1,157±218と正常肝の758±83に比べ153%に亢進した（$p<0.01$）．また，閉塞14日群のHPS(1,601±409)は正常肝に比べ211%に亢進し，閉塞5日群よりも有意（$p<0.05$）な亢進を示した（**Fig. 2**）．

同様に，培養180分のSPSは，閉塞5日群(1,750±231）で正常肝（904±84）の194%に（$p<0.01$），閉塞14日群（3,371±1,201）では373%まで亢進しており（$p<0.01$），やはり閉塞14日群は閉塞5日群に比べより強い亢進（$p<0.05$）を示した（**Fig. 2**）．

Fig. 1 The inhibition of hepatic DNA synthesis in the rats with obstructive jaundice

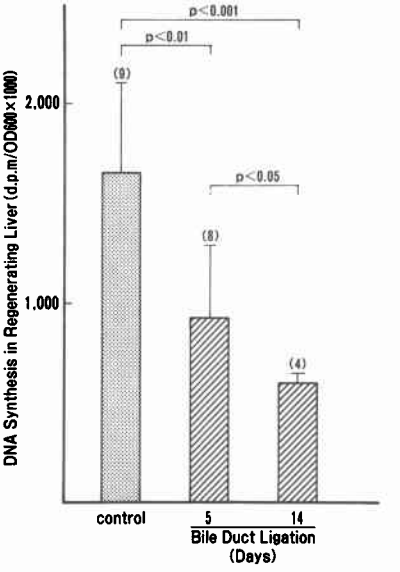
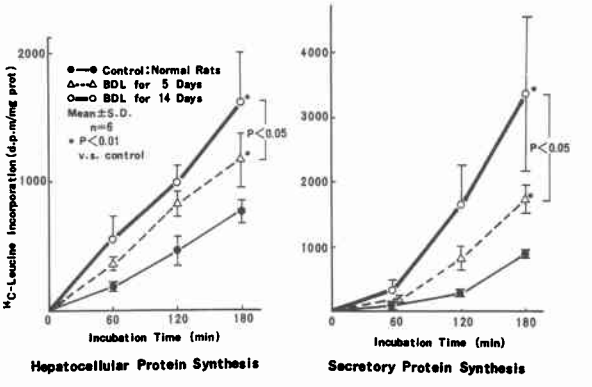


Fig. 2 Hepatocellular protein synthesis and secretory protein synthesis in obstructive jaundiced rats. BDL : bile duct ligation

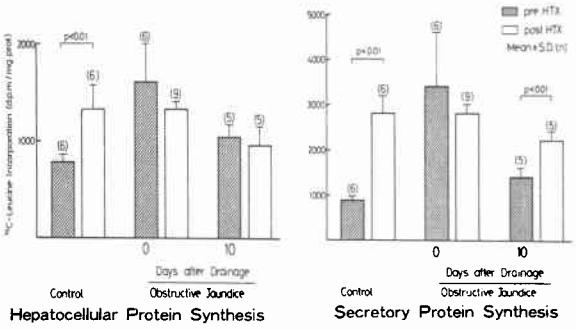


(3) 肝切除後再生肝における蛋白合成能

正常肝の肝切除後48時間の再生肝ではHPS, SPSともに肝切除前に比べ著明な亢進を示した．すなわち，再生肝のHPS(1.360±262)は肝切除前のHPS(758±84）に比べ179%に亢進し（$p<0.01$），SPS（2,822±346）は肝切除前（904±84）に比べ312%とより著明な亢進を示した（$p<0.01$）（**Fig. 3**）．

これに対して，閉塞14日群の黄疸肝では減黄と同時に肝切除を行った場合，再生肝のHPS(1,323±80)お

Fig. 3 Changes in hepatocellular protein synthesis and secretory protein synthesis after 68% partial hepatectomy in the rats with obstructive jaundice. HTX : 68% partial hepatectomy



よびSPS（2,749±306）が肝切除前のHPS（1,609±409）およびSPS（3,371±1,201）に比べいずれも低値を示し，肝切除後の亢進は認められなかった(**Fig. 3**).

また，減黄後10日目に肝切除を行った場合，HPSには肝切除前後で変化が見られないが，SPSには肝切除後に有意の亢進が認められた（**Fig. 3**).

（4）正常肝のHPS，SPSにおよぼすPG-E_1誘導体の影響

正常肝のHPSはPG-E_1誘導体により上昇傾向を示し，10^{-8}g/mlの濃度でHPSが903±100と対照群（756±43）に比べ有意の亢進（$p<0.05$）を示した．一方，SPSは10^{-8}g/mlで亢進傾向を示したが有意差は認められなかった（**Fig. 4**).

（5）肝切除後再生肝の蛋白合成能におよぼすPG-E_1誘導体の影響

正常肝の肝切除後48時間の再生肝に対してPG-E_1誘導体は10^{-7}g/mlの濃度でHPSを1,530±129と対照群（1,398±65）に比べ亢進させる傾向を示したが有意差は認められなかった．また，SPSを10^{-7}g/mlの濃度で4,529±200と対照群（3,643±454）に比べ有意（$p<0.05$）に亢進させた（**Fig. 5**).

胆管閉塞14日目に内瘻化と同時に肝切除を施行した場合，その再生肝に対して，PG-E_1誘導体は10^{-8}g/mlの濃度でHPSを1,495±211，SPSを3,428±246とそれぞれの対照群（HPS：1,225±169，SPS：2,848±415)に比べ亢進させる傾向を示したが有意差は認められなかった（**Fig. 6**).

（6）再生肝DNA合成能におよぼすPG-E_1誘導体の影響

PG-E_1誘導体の添加により再生肝DNA合成能は上昇を認め，10^{-8}g/mlの濃度で正常肝の再生肝DNA合成能を1,798±182と対照群（1,484±152）に比べ有意（$p<0.05$)に亢進させた(**Fig. 7**)．また，10^{-9}g/mlの濃度で胆管閉塞14日群の再生肝DNA合成能を855±65と対照群（742±59）に比べ有意（$p<0.05$）に亢進させた（**Fig. 8**).

Fig. 4 The effect of PG-E_1 derivative on hepatocellular protein synthesis and secretory protein synthesis in normal rats

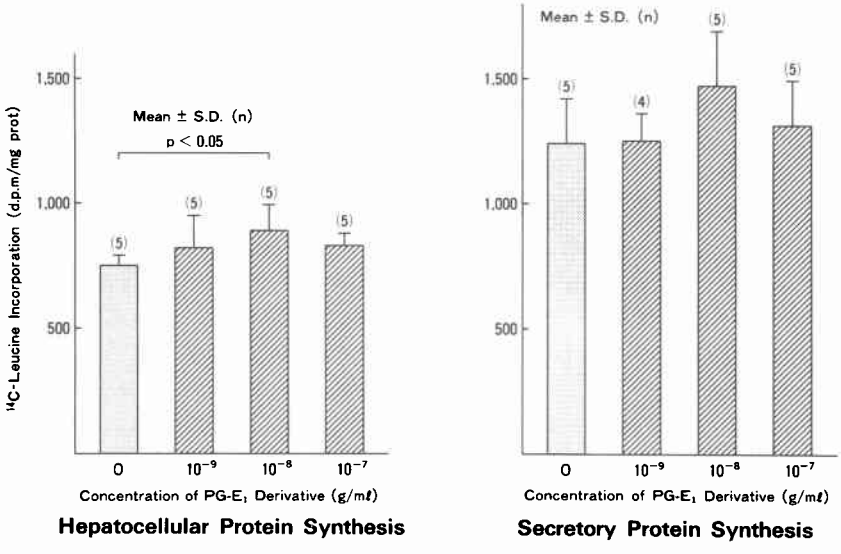


Fig. 5 Effects of PG-E_1 derivative on hepatocellular protein synthesis and secretory protein synthesis of the regenerating liver after partial hepatectomy in normal rats. HTX: 68% partial hepatectomy

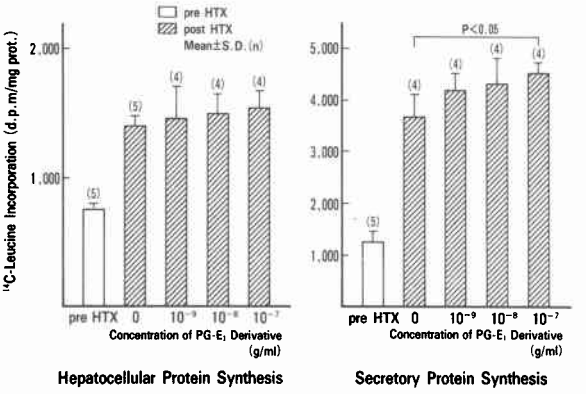


Fig. 6 Effects of PG-E_1 derivative on hepatocellular protein synthesis and secretory protein synthesis of the regenerating liver after partial hepatectomy in rats with obstructive jaundice. HTX: 68% partial hepatectomy

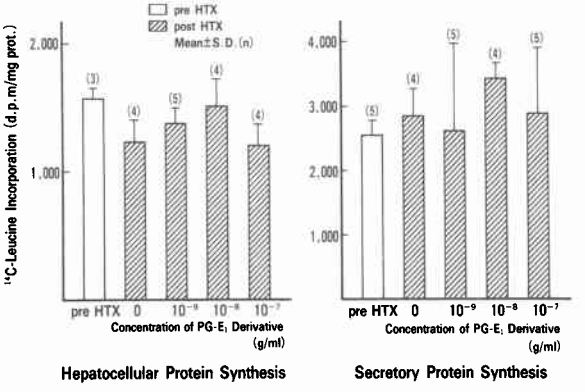


Fig. 7 Effects of PG-E_1 derivative on DNA synthesis after partial hepatectomy in normal rats

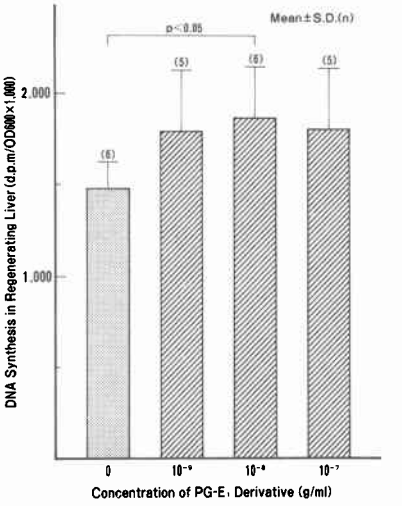
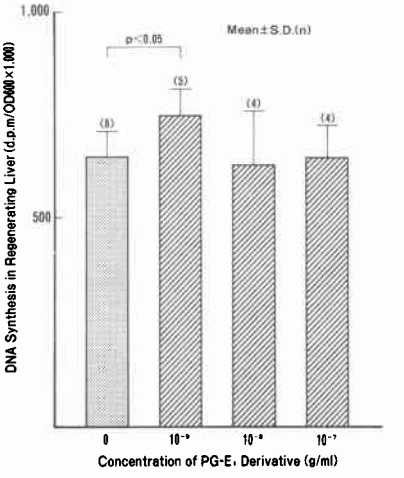


Fig. 8 Effects of PG-E_1 derivative on DNA synthesis after partial hepatectomy in rats with obstructive jaundice



考　察

閉黄肝では，肝切除後再生肝におけるDNA合成能が著しく抑制され，閉塞5日群では対照群の58%に，閉塞14日群では36%まで抑制されていた．本実験ではDNA合成能を肝切除後24時間の時点で測定したわけであるが，向山[12]は正常肝と同様に閉黄肝でも肝切除後24時間目にDNA合成能のピークが認められると報告している．また向山も閉黄肝の減黄後の肝切除後再生においてDNA合成能が有意に抑制されると報告している[12]．これに対して，閉黄肝の蛋白合成能は著しく亢進し，閉塞5日群ではHPS, SPSがおのおの対照群の153%, 194%に亢進し，閉塞14日群ではさらに211%, 373%まで亢進を認めた．

従来，閉黄肝では肝ミトコンドリア機能やマイクロゾーム機能の障害[2)13)]が報告されており，ビリルビンや胆汁酸の蓄積がその原因とされている[2)14)]．また，閉黄肝では肝組織血流の低下[3)]も報告されており，さまざまな因子が肝切除後再生に抑制的に作用しているものと考えられる．しかし，これらのことからDNA合成能の低下と肝蛋白合成の亢進を同時に説明することは困難である．

アルブミンをはじめ血中の蛋白の大部分が肝の分泌蛋白として合成されているが，閉黄時のSPSの亢進は肝分泌蛋白合成の総量の増加を示している．閉黄肝の組織では肝細胞の壊死や炎症細胞浸潤が認められ[4]，SPSの亢進の主体は急性期蛋白合成の増加によるものと推測される．HPSは肝細胞の構造蛋白の合成と肝分泌蛋白の前駆体の合成を含むが，閉黄肝では肝細胞障害，肝組織障害に対する修復や代謝のための構造蛋白の前駆体の増加によりHPSの亢進が起きているものと考えられる[15]．このようなenergy-requiring biosynthesisの亢進は肝細胞におけるATP合成がある程度保たれていることを示すものであり，同時に肝細胞のエネルギー予備能を著しく低下させているものと考えられる．

正常肝の肝切険後再生では，DNA合成に基づく肝再生のための構造蛋白合成の亢進と，肝のfunctioning massの減少に対する代償性の分泌蛋白の合成亢進が起きていると考えられる[14]．黄疸肝では肝蛋白合成，特に分泌蛋白の合成亢進による肝細胞のエネルギー予備能の低下が起きており，そのために肝切除後再生肝のDNA合成能が低下したものと思われる．再生肝のDNA合成能の低下は肝再生のための構造蛋白合成の低下を来し，またエネルギー予備能の低下は再生肝での代償性の分泌蛋白合成亢進を困難にし，その結果HPS, SPSの亢進がほとんど起きていないものと考えられる．そして，減黄時間の経過とともに肝蛋白合成能の亢進状態が消失し，再生肝のDNA合成能と肝蛋白合成能の回復が認められると推測される．このように黄疸肝では，肝蛋白合成亢進によるエネルギー負荷状態が存在するために，再生肝でのDNA合成能および蛋白合成の亢進が著しく抑制されるものと考えられた[15]．

PGは，近年，その細胞保護作用が注目され，肝においては特にPG-E群およびPG-I群が，CCl_4[16]，D-Galactosamine[17]，Ethanol[18]，ANIT[19]などの薬物性肝障害や阻血[20]に対して障害防止作用のあることが報告されている．

今回の検討では，in vitroの培養系においてPG-E_1誘導体を添加することにより正常肝の蛋白合成能の亢進，正常肝の肝切除後再生肝の蛋白合成能の亢進，さらに，閉黄肝の肝切除後再生肝の蛋白合成能の亢進を認めた．また，正常肝，黄疸肝いずれにおいても，肝切除後再生肝のDNA合成能を軽度ながら亢進させることが示され，PG-E_1誘導体が正常肝および閉黄肝の肝切除後再生時の肝細胞に対してin vitroにおいて細胞保護効果を示していると考えられた．

Balintら[21]はPG-I_2がラットの肝蛋白合成能を亢進させることを報告しており，Shim[22]はPG-E_1, PG-E_2, PG-$E_2\alpha$, PG-A_2がラビットの肝でのハプトグロビン合成を亢進させると報告している．宮崎ら[17]はラットを用い，D-GalactosamineおよびMMCによる障害肝においてPG-E_1誘導体のin vivoでの投与が肝切除後再生肝のDNA合成能の抑制を軽減したと報告している．この場合PGは，障害前投与においてのみDNA合成能を促進しており，肝細胞障害を軽減させることにより再生促進作用を示したと考えられる．志村ら[23]はラットのD-Galactosamine障害肝において，肝切除時にPG-E_1をin vivoで投与し，再生肝の組織内cyclic AMP値とATP値が有意に上昇したと報告している．このATP値の上昇の機序は明らかではないが，ATP値の上昇は肝切除後再生肝でのエネルギー代謝[24]を改善し，DNA合成能および肝蛋白合成能に促進的に働くと考えられる．特に，黄疸肝の肝切除後再生肝においては，肝エネルギー代謝は今回の実験で示したように危機的状況にあると考えられ，PGによる肝細胞ATP値の上昇作用が再生肝のDNA合成能や蛋白合成能の抑制を改善したものと考えられる．また，PG-E群がin vitroで各種培養細胞のadenyl cyclase活性を上昇させることにより細胞内のcyclic AMP値を上昇させることがSamuelsonら[25]により報告されており，さらに，このcyclic AMPの上昇がDNA合成能の上昇をもたらすことも報告されている[26]．

いずれにせよ，閉黄肝の肝切除後再生肝の蛋白合成能とDNA合成能の抑制は，PG-E_1誘導体の投与により改善されることが示唆され，臨床上，閉黄肝の肝切除時の有用な治療手段としても期待される．

文　献

1) Koyama K, Takagi Y, Ito K et al: Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice. Am J Surg 142: 293—299, 1981
2) Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F et al: Mechanism of cholestasis. Gastroenterology 60: 888—897, 1971
3) 藤井康史：閉塞性黄疸における肝組織血流の変動に関する実験的研究．広島大医誌　37：75—98, 1989
4) 木村文夫，宮崎　勝，宇田川郁夫ほか：閉塞性黄疸解除後における肝切除後肝再生に関する基礎的検討．日消外会誌　23：1842—1849, 1990

5) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. Arch Pathol 12: 186—202, 1931
6) Verly WG: The hepatic chalone. Natl Cancer Inst Monogr 38: 175—184, 1951
7) 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
8) 河田 滋, 宮崎 勝, 志村賢範ほか：肝臓および腸管の同時合併切除の肝再生に与える影響に関する基礎的研究．日消外会誌 20：2544—2549, 1987
9) Hultin T, Decken A: The incorporaton in vitro of labeled amino acids into the proteins of regnerating rat liver. Exp Cell Res 13: 83—87, 1957
10) Husselgren PO, Almersjö O, Gustavsson B et al: Amino acid incorporation into liver proteins during short-term ligation of the hepatic artery in the dog. Eur Surg Res 11: 366—380, 1979
11) Sorrell MF, Tuma DJ, Schafer EC et al: Role of acetaldehyde in the ethanol-induced impairment of glycoprotein metabolism in rat liver slices. Gastroenterology 73: 137—144, 1977
12) 向山憲男：肝再生に関する実験的研究—閉塞性黄疸解除後の肝切除ラットについて—．日消外会誌 14：1427—1435, 1981
13) 小山研二, 伊藤賢司, 音波 剛ほか：閉塞性黄疸肝のミトコンドリア機能について．肝臓 20：579—586, 1979
14) Okamoto Y, Akamatsu N: Synthesis in vitro of glycoprotein in regenerating rat liver. Biochim Biophys Acta 498: 272—281, 1977
15) 木村文夫, 宮崎 勝, 宇田川郁夫ほか：閉塞性黄疸解除後の肝切除後肝再生と肝蛋白合成能に関する検討．日外会誌 92：689—696, 1991
16) 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
17) 宮崎 勝, 藤本 茂, 志村賢範ほか：障害肝の肝切除におけるプロスタグランディンE_1の効果に関する基礎的検討．日消外会誌 17：1551—1556, 1984
18) Makowka L, Falk RE, Cohen MM et al: Protective effect of 16,16-dimethyl prostaglandin E_2 on acute ethanol-induced inhibition of hepatic regeneration. Surg Forum 33: 183—186, 1982
19) Stachura J, Tarnawski A, Ivey KJ et al: 16, 16-dimethyl prostaglandin E_2 protection of rat liver against acute injury by galactosamine, acetoaminophen, ethanol and ANIT. Gastroenterology 80: 1349, 1981
20) Araki H, Lefer AM: Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. Am J Physiol 238: 176—181, 1980
21) Balint GA, Varro V: Cytoprotective effect of prostacyclin and protein synthesis. Acta Physiol Hungarica 61: 115—122, 1983
22) Shim BS: Increase in serum haptoglobin stimulated by prostaglandins. Nature 259: 326—327, 1976
23) 志村賢範, 宮崎 勝, 越川尚男ほか：障害肝の肝切除時における Prostaglandin-3 投与の意義に関する基礎的検討．日外会誌 86：1618—1624, 1985
24) Kamiyama Y, Ozawa K, Honjo I: Changes in mijtochondrial phosphorylative activity and adenylate energy charge of regenerating rabbit liver. J Biochem 80: 875—881, 1976
25) Samuelsson BS, Goldyne M, Graström E et al: Prostaglandins and thoromboxanes. Ann Rev Biochem 47: 997—1029, 1978
26) Rozengurt E, Collins MKL, Keehan M: Mitogenic effect of prostaglandin E_1 in Swiss 3T3 cells: role of cyclic AMP. J Cell Physiol 116: 379—384, 1983

Effects of Prostaglanding-E_1 Derivative on Regenerating Liver after Partial Hepatectomy in Rats with Obstructive Jaundice

Fumio Kimura, Masaru Miyazaki, Ikuo Udagawa, Hisao Koshikawa, Takashi Kaiho, Jun Matsumoto, Toshio Isono, Hiroyuki Suzuki and Katsuji Okui
The First Department of Surgery, Chiba University School of Medicine

We examined the relationship between DNA synthesis and protein synthesis of regenerating liver after partial hepatectomy in rats with obstructive jaundice and determined the effects of a PG-E_1 derivative on liver regeneration under that condition. The bile duct of rats were ligated and 5 or 14 days later partial hepatectomy and

choledocho-duodenostomy were performed to relieve the obstruction. Twenty-four hours later, (^{3}H)-thymidine incorporation by hepatic DNA was significantly lower in the jaundiced rats than in the controls that received partial hepatectomy alone. However, (^{14}C)-leucine incorporation by hepatic proteins was markedly increased in the jaundiced rats. Hepatic protein synthesis was also increased 48 hours after partial hepatectomy in the normal rats, but there were no significant changes in the jaundiced rats. PG enhanced the DNA synthesis and the hepatic protein synthesis of the regenerating liver inhibited by obstructive jaundice. We concluded that the preceding energy-requiring responses in obstructive jaundiced liver, such as enhancement of hepatic protein synthesis, resulted in the reduction of hepatic DNA synthesis and in the lack of an additional increase in hepatic protein synthesis as responses to the further insult of partial hepatectomy.

Reprint requests: Fumio Kimura The First Department of Surgery, Chiba University School of Medicine
1-8-1 Inohana, Chiba City, 280 JAPAN