日消外会誌　31（5）：1065～1072，1998年

凍結融解処理肝組織前感作による切除後肝の再生作用と四塩化炭素障害肝に対する保護作用の検討

岐阜大学第2外科
竹内　賢　渡辺　敦　足立　尊仁
加藤　元久　佐治　重豊

凍結融解処理肝組織（FTHT）を皮下移植・感作することによりある種の肝細胞増殖因子（HGF）が誘導されるが，その作用をラット30％肝切除後の肝再生能と四塩化炭素肝障害に対する保護作用から推察した．その結果，1）肝再生能は30％肝切除にFTHT感作を併用すると，DNA合成能，細胞増殖能，肝湿重量は有意の高値を示し高い肝再生能が示唆された．2）四塩化炭素による肝障害時にFTHT感作を併用すると肝逸脱酵素の増加が有意に抑制され，直接的な肝保護作用の存在が示唆された．3）血清hepatocyte growth factor値は，30％肝切除群（3ng/ml前後）に比べFTHT感作群では14日目に20ng/ml前後と有意の高値を示した．以上の結果，FTHT前感作は肝切除後の肝再生を有意に促進し，薬物学的肝障害に対し保護作用を示す可能性が示唆された．

Key words: freeze-thawed hepatic tissue, hepatocyte growth factor, CCl_4-induced hepatic damage, hepatectomy, hepatocyte protective effects

はじめに

教室では凍結融解処理を施した肝組織（freeze-thawed hepatic tissue，FTHT）をラット大腿部皮下へ移植感作することにより，宿主血清中にある種の肝細胞増殖因子が誘導され，これが脾内移植肝細胞の生着と増殖を促進する可能性を明らかにし種々報告してきた[1)~3)]．すなわち，増殖促進作用はFTHT感作後14日目の血清が最も強く[1)]，ナチュラル型のhepatocyte growth factor（HGF）類似作用を示すこと[2)3)]，などである．そこで今回，FTHT感作後14日目の血清を用い，30％部分肝切除後の肝細胞増殖促進作用と四塩化炭素肝障害後の保護作用の可能性につきラットを用い実験的に検討した．

対象と方法

1．実験動物

7週齢の雄性Fisher系344ラット（130g～150g）を用いた．

2．感作血清の作製法

ラットをエーテル吸入麻酔下に開腹後，無菌的に肝臓を摘出し約1～2mm角に細切後，液体窒素に浸漬して2回急速凍結，自然融解（室温）を繰り返してFTHTを作製した．次いで，この約2gを同系ラット大腿部皮下に移植・前感作後，14日目に腹部大動脈直接穿刺法にてethylenediamine tetraacetic acid（EDTA）添加血液として採取し，4°C，200g，20分間遠心分離した上清を凍結感作血清（FTHSS：FTHT sensitized serum）として以下の実験に供した．

3．部分肝切除法

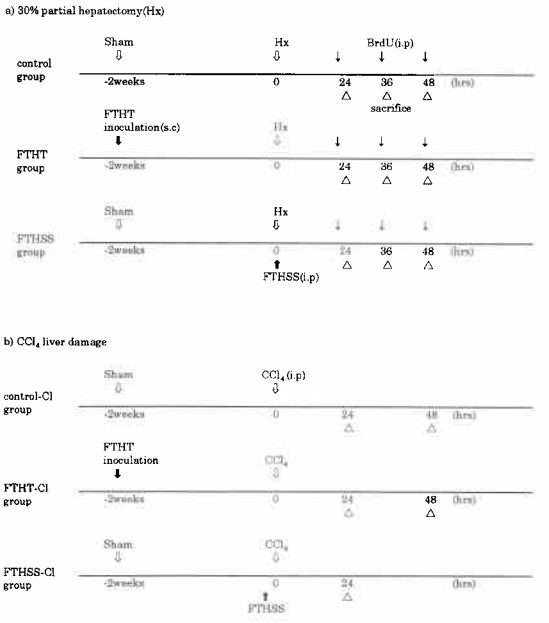
ラットを開腹後Higginsら[4)]の手技に従い肝臓を30％部分切除した．実験群は，1）前感作のための手術に対するsham手術として皮膚切開，縫合（以下，sham手術と略記）後14日目に部分肝切除したcontrol群，2）FTHTで前感作後14日目に部分肝切除したFTHT群，3）sham手術後14日目に部分肝切除し，同時に2mlのFTHSSを腹腔内に投与したFTHSS群の3群である（**Fig. 1a**）．

4．四塩化炭素急性肝障害の作製法

四塩化炭素（CCl_4）をオリーブ油で希釈して50％溶液を作製し，腹腔内にCCl_4量で0.5ml/kgを注入し急性肝障害を作製した．実験群は，1）sham手術後14日目にCCl_4溶液を腹腔内投与したcontrol-Cl群，2）FTHT感作後14日目にCCl_4を腹腔内投与したFTHT-Cl群，3）sham手術後14日目に2mlの

＜1998年1月14日受理＞別刷請求先：竹内　賢
〒500-8705　岐阜市司町40　岐阜大学第2外科

Fig. 1 Out line of experimental schedules.
a) effects of liver regeneration for 30% partial hepatectomy. b) Hepatic protective effects for CCl_4 administration.
Hx : partial hepatectomy. △ : sacrifice. ↓ : BrdU was given intraperitonealy two hours before sacrifice. ⬇ : FTHT was inoculated subcutaneusly two weeks before Hx. ⬆ : FTHSS was injected intraperitonealy.



FTHSS を腹腔内投与し 2 時間後に CCl_4 溶液を腹腔内投与した FTHSS-Cl 群の 3 群である（**Fig. 1b**）.

5. 検討項目

1）部分肝切除群：FTHT の肝再生に及ぼす影響は Bromo-deoxyuridine（BrdU）と Proliferating cell nuclear antigen（PCNA）の免疫組織染色所見から算定した labeling index（LI）値および残肝湿重量とその体重比で検討した．すなわち，部分肝切除後24，36，48時間目に犠牲死させ，残肝湿重量とその体重比を測定後，摘出肝を 2 分割し BrdU と PCNA の免疫組織染色用に供した．

2）四塩化炭素急性肝障害群：FTHT の肝再生に及ぼす影響は PCNA LI と各種血中逸脱酵素量の変動から推察した．すなわち，control-Cl 群と FTHT-Cl 群は24，48時間後に，FTHSS-Cl 群は24時間後にそれぞれ犠牲死させ，肝湿重量と体重比の測定，および，血清 GOT，GPT，LDH，ALP，T-bil，NH_3値を測定し，摘出肝は PCNA 免疫組織染色用に供した．

6. 免疫組織染色の方法

各標本は hematoxylin eosin（HE）染色後，肝の病理組織学的所見を観察したうえで，以下の染色を行った．

1）BrdU 染色：犠牲死の 2 時間前に生理食塩水で溶解した100mg/kg の BrdU を腹腔内投与後肝臓を摘出し，70%冷エタノール溶中で24時間固定後パラフィン包埋し，4μm の薄層切片を作製した．脱パラフィン後0.3%H_2O_2含メタノール液中で30分間内因性ペルオキシダーゼを除去し PBS 洗浄後，2N 塩酸中で 1 時間 DNA を変性させ，ほう酸緩衝液で中和した．次いで抗 BrdU 抗体（DAKO Co.）を用い 1 時間反応させ avidin-biotin peroxydase complex（ABC）法で染色，diamino-benzidine（DAB）法で発色させた．

2）PCNA 染色：摘出肝を20%緩衝ホルマリン液で48時間固定後パラフィン包埋し4μm の薄層切片を作製後，脱パラフィン，内因性ペルオキシダーゼ除去し PBS 洗浄後，電子レンジにてマイクロウエーブ処理した．次いで DAKO EPOS 抗 PCNA 抗体キットを用いて 1 時間反応させ DAB で発色・染色した．など，LI は光学顕微鏡下で100倍に拡大後，陽性細胞数をオリンパス社製 color image analizer で測定し肝細胞1,000個中の陽性細胞数を‰表示した．なお，正常肝組織を100倍視野で観察した肝細胞数は，5 標本の平均で1,093.6個であった．そこで今回，便宜的に100倍視野中の肝細胞数を1,000個として算出した．

7. HGF の検索時期と測定法

control 群，FTHT 群，FTHT-Cl群は前感作直後，24時間，3，5，7，14，21日目に尾静脈血を採取し，1/10量の77mM EDTA 添加0.15M NaCl 溶液と混和し，4℃で200×g，20分間遠心分離した上清を用い HGF を測定した[5]．また，30%部分肝切除群，FTHT 群，および四塩化炭素肝障害群では24，36，48時間目に血清を同様に採取し HGF を測定した．なお測定はラット HGF EIA キット（特殊免疫研究所）を用いた．

本研究で得られた測定値は，すべて平均値(mean)±標準偏差（S.D.）で表わし，統計学的解析は Student's t 検定を用い，5%未満を有意差ありと判定した．

結　果

1. 30%部分肝切除後の肝再生に及ぼす FTHT の影響

1）BrdU LI : BrdU LI 値は control 群では経時的漸増がみられた．これに対して FTHT 群および

Table 1 Serial changes in labeling index of BrdU(a) and PCNA(b) after partial hepatectomy(Hx) following the treatments with FTHT or FTHSS

a) BrdU labeling indexes(‰)

	24hrs	36hrs	48hrs
control group(30%Hx)	9.9±4.8[a] (n=5)	28.3±20.0[b] (n=5)	42.7±7.7[c] (n=5)
FTHT group	32.7±20.2[d] (n=5)	53.7±17.3[e] (n=5)	53.8±13.6[f] (n=5)
FTHSS group	22.0±6.3[g] (n=3)	50.7±9.8[h] (n=3)	41.0±14.1[i] (n=3)

b) PCNA labeling index (‰)

control group(30%Hx)	66.4±7.9[j] (n=5)	97.6±29.4[k] (n=5)	113.0±10.2[l] (n=5)
FTHT group	146.7±14.7[m] (n=5)	154.8±28.8[n] (n=5)	122.0±14.1[o] (n=5)
FTHSS sroup	104.7±37.1[p] (n=3)	115.7±16.8[q] (n=3)	104.0±14.4[r] (n=3)

Data showed as mean±S.D. d)-a), g)-a), n)-k) : $p<0.05$, m)-j) : $p<0.01$.

FTHSS群は36時間目にピークが認められ，何れの時間もcontrol群に比べ高値を示し，とくに24時間目のFTHT群（32.74±20.16‰，以下，単位省略）およびFTHSS群（22.0±6.25）はcontrol群（9.86±4.84）に比べ有意（$p<0.05$）の高値を示した（**Table 1a**）.

2）PCNA LI：PCNA LI値はcontrol群で経時的漸増がみられた．各群間ではFTHT群の24，36時間目はcontrol群に比べ有意（それぞれ146.7±14.7と66.4±7.9：$p<0.01$，154.8±28.8と97.6±29.4：$p<0.05$，単位はいずれも‰）に高値であった（**Table 1b**）.

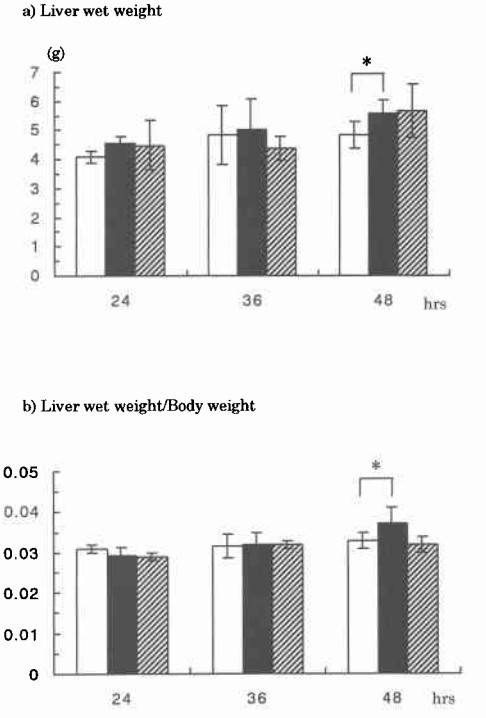
3）残肝湿重量と体積比：残肝湿重量は，30%部分肝切除後24，36時間目では各群間で差はみられなかったが，48時間目ではFTHT群（5.55±0.52g，以下，単位省略）とFTHSS群（5.68±0.92）はcontrol群（4.84±0.48）に比べ明らかに増大し，統計学上FTHT群とcontrol群との間に有意差がみられた（$p<0.05$）．また体重比は，部分肝切除後48時間目でFTHT群（0.037±0.004）はcontrol群（0.033±0.002）に比べ有意（$p<0.05$）の高値を示した（**Fig. 2**）.

2．四塩化炭素肝障害に対する保護作用としてのFTHTの効果

今回用いたCCl_4腹腔内投与法では，規定の犠牲死期間まで全匹生存可能であった．

PCNA LI値はFTHSS-Cl群で若干低値を示したが，各群間で差はみられなかった（**Fig. 3a**）．なお，HE染色による肝の病理組織学的所見では各群間で明らかな差はみられなかった．

Fig. 2 Serial changes of wet weight of the liver after 30% partial hepatectomy. □: control group (30%Hx) (n=5), ■: FTHT group (n=5), ●: FTHSS group (n=3), *$p<0.05$.

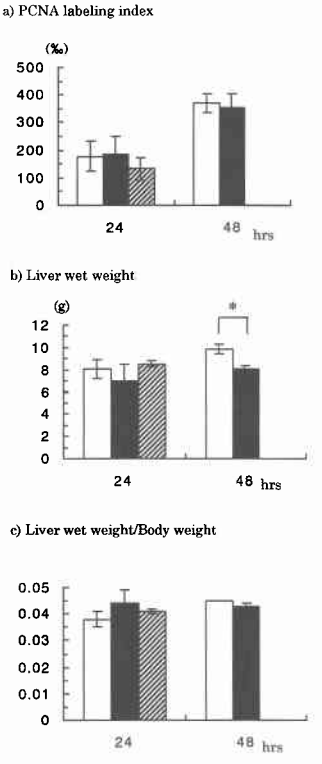


肝湿重量はCCl_4投与後24時間目では各群間で差はみられなかったが，48時間目ではcontrol-Cl群

(9.89±0.46g) はFTHT-CL群 (8.07±0.28g) に比べて有意 ($p<0.01$) の高値を示した．一方，体重比ではCCl_4投与48時間目でcontrol-Cl群(0.045±0.00)，FTHT-Cl群 (0.043±0.001) で有意差は認められなかった (**Fig. 3b, c**)．

血液生化学的検査所見では，24時間目でT-bil, GOT, GPT, LDHはcontrol-Cl群が最も高値を示し，とくにGOT, GPT, LDHはFTHT-Cl群に比べ有意(それぞれ30,256±5,950と20,408±6,200，22,824±4,251と13,736±4,952，91,428±24,750と48,938±22,333) の高値を示した (いずれも $p<0.01$，単位はIU/l)．一方，ALP, NH_3は逆にFTHT群の方が若干高値を示したが，各群間で有意差はみられなかった．また，control-Cl群のLDHはFTHSS-Cl群に比べ有意 (91,428±24,750と41,760±38,400：$p<0.01$) の高値であったが，他の逸脱酵素はFTHT-Cl群とFTHSS-Cl群との間に差はみられず，48時間後には各群とも低下し，肝障害の急速な回復が観察された(**Fig. 4**)．

Fig. 3 Serial changes in liver wet weight and PCNA labeling index after CCl_4 administration following the treatment with FTHT or FTHSS. □: control-Cl group (n=8), ■: FTHT-Cl group (n=8), ●: FTHSS-Cl group (n=6). *$p<0.01$.



3. HGF誘導能から評価したFTHTの効果

FTHTを皮下移植すると末梢血中にHGFが3日目頃から検出可能となり，5～7日目をピークとし14日目頃まで約20ng/ml前後の値を維持後漸減し，21日目には約5ng/mlに低下した．しかし，非凍結肝組織を同様皮下移植した場合には，HGFの経時的な増加傾向は観察されなかった (**Fig. 5**)．

一方，ラット肝臓を部分切除すると数時間以内にHGFが誘導される．その程度は30%切除したcontrol群では36時間後頃より2ng/ml前後検出可能であったが，FTHT群の場合は24時間目から検出可能となり，control群より若干高値を示したが，両群間で有意差はみられなかった (**Table 2a**)．

CCl_4腹腔内投与の場合は，24時間目に15.18±5.21 ng/mlのHGFが誘導されたが，FTHTを併用投与したFTHT-Cl群では10.66±10.98ng/mlと若干の低値を示した (**Table 2b**)．

考　察

悪性腫瘍に対する凍結手術は，直接的な腫瘍破壊以外に壊死組織が抗原刺激となり免疫反応を誘導して，遠隔転移巣の縮小がみられることから大変注目された治療法である[6)7)]．しかし，凍結融解処理抗原は可溶化抗原で，抑制細胞を誘導しやすく[8)]，とくに抗原過剰状態時にはhigh zone tolerenceを引き起こし，腫瘍増殖や転移を促進する可能性が危ぐされている[9)]．その理由として，T細胞は抗原刺激によりIL-2, IFNなどのサイトカインを産生して分化・増殖するが，この過程で過剰な抗原刺激が続くと逆にアポトーシスが誘導されT細胞増殖が抑制される結果，免疫抑制状態におかれると考えられている[10)]．以上の観点から，教室では凍結融解処理肝組織を皮下移植・感作することにより宿主に誘導される負の免疫活性が，脾内移植肝細胞の生着と増殖を促進すると仮定し種々の検索を重ねてきた．その結果，FTHT前感作ならびにその感作血清は脾内移植肝細胞の生着と増殖を促進させること，この作用がある種の肝細胞増殖因子によること，などを明らかにしてきた[1)~3)]．しかし，同じ着想のもとに試みられた報告がないため，肝細胞増殖因子の存在に関しても考察困難であるが，極めて独自性の高い発想と考えている．そこで，今回，30%肝切除後の肝再生に及ぼす影響からFTHTの肝細胞増殖作用の存在を確認し，四塩化炭素肝障害時の肝逸脱酵素から肝保護作用

Fig. 4 Changes in cytosolic enzyme activities of rats on 24, 48 hours after CCl_4 administration following the treatment with FTHT or FTHSS. ●●: normal healthy rats (n=3), ●●: control-Cl group (n=8), ●●: FTHT-Cl group (n=8), ●●: FTHSS-Cl group (n=6). **p<0.01. Data showed as mean±S.D.

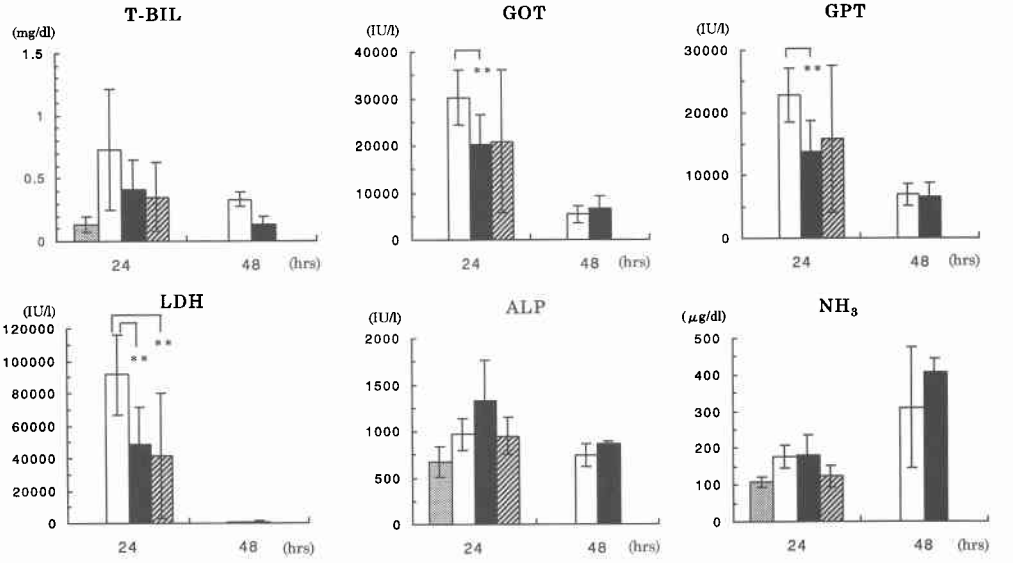


Fig. 5 Serial changes of HGF concentration in the rats serum after presensitization with FTHT. ○=rats inoculated with non freezing-thawing hepatic tissue (n=3). ●=rats inoculated with FTHT (n=3). *p<0.05.

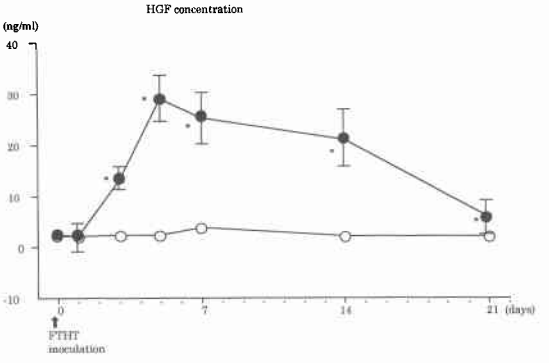


Table 2 Changes in HGF concentration after partial hepatectomy(a) and after CCl_4 administration(b)

a) partial hepatectomy HGF concentration(ng/ml)

	24hrs	36hrs	48hrs
control group (30%Hx)	0.09±0.22 (n=5)	1.66±2.21 (n=5)	2.67±1.27 (n=5)
FTHT group	2.75±3.81 (n=5)	2.21±3.12 (n=5)	1.07±1.06 (n=5)

b) CCl_4 administration

control-Cl group	15.18±5.21 (n=6)
FTHT-Cl group	10.66±10.98 (n=6)

の可能性を検索し，上記諸結果を得たわけである．

A．部分肝切除後の肝再生に及ぼす影響について

DNA合成能をBrdU LI値で検討した結果では，24時間目でFTHT群はcontrol群に比べ有意の高値を示した．一方，PCNA LIで評価した細胞増殖活性は24,36時間目でcontrol群に比べFTHT群が有意の高値を示した．残肝湿重量と体積比で肝切後の再生過程を観察すると，24，36時間目には各群間で差はみられなかったが，48時間目にはcontrol群に比べFTHT群が有意の高値を示した．以上の結果，30%肝切除時にFTHT感作を併用すると，非併用群に比べ高い肝再生能が誘導されると推察された．

一般に肝細胞は，肝切除や急性肝障害などの組織障害により肝非実質細胞から肝細胞増殖因子（HGF）が誘導され肝再生が始まる．すなわち，HGFは肝クッパー細胞，類洞壁内皮細胞，伊東細胞などからパラクリン機構を介して[11)12)]，肝臓以外の肺，脾臓などからエンドクリン機構を介して誘導される[13)]．また同時に

epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)-α, acidic fibroblast growth factor (aFGF) などが誘導され，ともに肝再生に関与すると考えられている．これに対し，TGF-β は直接的に肝細胞増殖を抑制あるいは間接的に HGF 誘導を抑制して肝再生を停止させると報告されている[14)15)]．ところで70%部分肝切除時には著者らの検討を含め24時間前後をピークに約10ng/ml の HGF が誘導され，肝の DNA 合成は若干遅れて36～48時間目にピーク値を示す[16)]．しかし，30%部分肝切除時には HGF は36時間目頃より緩徐に誘導され，肝の DNA 合成は70%肝切除群に比べ低値であるが，72時間目頃にピーク値を示すと報告されている[17)]．今回の検討結果からも，30%肝切除時に FTHT 感作を併用すると，DNA 合成が比較的早期から高レベルで始まり，70%肝切除時と同様36～48時間目にピーク値を示した．これは30%肝切除による HGF に，FTHT 由来の肝細胞増殖様因子が相乗的に作用した結果，48時間目には70%肝切除群に相当する DNA 合成能が誘導されたためと推察している．この過程を血清 HGF 値から推察すると，30%肝切除群では36時間目以降に低値ではあるが経時的に漸増する傾向を，FTHT 群では24時間目に有意の高値を示し，以後，漸減する傾向が観察された．すなわち，FTHT 感作により肝細胞増殖様因子が24時間以内に誘導され，肝切除後の肝再生に関与したが，宿主肝では合算された HGF 値を認識し，フィードバック機構により36時間目以降で低値のままとなった可能性を推察している．

B．四塩化炭素肝障害時の肝保護作用に及ぼす影響について

CCl_4は主として細胞膜におけるカルシウムポンプを障害して肝細胞を破壊する．この場合，障害後すみやかに HGF が誘導され12～24時間後にピーク値を示し，肝切除時に比べ早期から肝再生が開始されると報告されている[16)]．本研究での肝湿重量は FTHT 群が control 群に比べ有意の低値を示したが，体重比，PCNA LI 値は各群間で差がみられなかった．なお，HE 染色では肝の中心静脈域を中心に広範囲の壊死巣が観察されたが，各群間で差はみられなかった．

血液生化学的検査では T-bil, GOT, GPT, LDH は24時間目に control 群が FTHT 群に比べ最も高い値を示し，とくに GOT, GPT, LDH で有意差がみられた．しかし，48時間後には各逸脱酵素とも低下し，肝障害の急速な回復が示唆された．すなわち，CCl_4投与により肝細胞に広範な壊死が惹起され，細胞浮腫により肝湿重量が増加し，逸脱酵素が著明に増加した．しかし，FTHT 感作併用時には HGF 以外にナチュラル型のメディエータも保護作用的に働いた結果，細胞浮腫と逸脱酵素の過剰産生が抑制された可能性を推察している．また，血清 HGF 値からこの過程を推察したが，24時間目で FTHT 群の方が control 群に比べ若干低値を示した．HGF は in vitro および in vivo でも抗肝炎作用を示すと考えられているが[17)]，重症肝障害発生時には HGF のクラアランスが不良となり，見かけ上，血清 HGF 値が高値を示す[18)]．著者らの検討でも，FTHT 前感作群は CCl_4投与による HGF 産生に加え FTHT からの HGF が加算され control 群より高値を示す筈であるが，逆に若干低値を示した．この理由として両群間の障害肝組織における HGF の産生とクリアランス量に差が生じた結果と考えている．すなわち FTHT 前感作群では肝保護作用により CCl_4による肝障害が軽減されたため，障害肝組織における HGF 産生は低くおさえられ，逆にクリアランスは低下しないため結果的に HGF 値が低値となったと考えている．なお，ALP と NH_3は FTHT 群で逆に増加傾向を示した．この理由として，FTHT 感作後14日目の血清では GOT, GPT, LDH 値は正常範囲内であるが，ALP と NH_3が高値を示した．それゆえ FTHT を移植・感作すると，FTHT の吸収過程において ALP と NH_3が一過性に増加すると考えられ，CCl_4肝障害による ALP と NH_3の増加量に加算されるため，FTHT 群では control 群より高値を示したと推察している．

C．FTHT 感作により誘導される肝細胞増殖様因子の特徴について

FTHT を皮下移植後血清中 HGF 値を経時的に測定すると，5～7日目には30ng/ml 前後の HGF が誘導され，21日後でも5ng/ml 前後の誘導が観察された．足立ら[19)]は FTHT 移植後の吸収過程を組織学的に検索し，移植後2～3週目で完全に吸収されると述べている．すなわち，急速凍結により細胞内液は急速な氷晶化により高浸透圧状態となる．この状態で緩徐融解が働くと細胞内・外液に浸透圧格差が生じ細胞が損傷される[20)]．この損傷細胞から大量の可溶化抗原が遊離し血中に吸収されてマクロファージに貪食される．マクロファージから情報伝達された宿主は，この大量の可溶化抗原を自己肝に重度の肝障害が発生したと誤認し，主にインジュリンを介したエンドクリン機構により，宿主肝が無損傷状態にあるにもかかわらず肝細胞

増殖様因子が誘導されたと想定している．

HGFは1989年に中村ら[21]によって1次構造が決定され，recombinant-HGFを用いたその後の研究で，HGFは肝細胞増殖以外にも多様な生物活性を示すこと[22]，HGFは正常細胞に対しては増殖促進活性を，腫瘍細胞に対しては癌腫によって増殖促進に働く場合と増殖抑制に作用する二面性があること[23)24]，などが明らかになった．一方，FTHT感作により誘導されるナチュラル型増殖因子はHGF以外にさまざまな活性因子を含有していると推察されるが，著者らはHGF以外にTGF-α[25]，EGF[26]，aFGF[15]，インジュリン[27]などを想定している．教室の宇野ら[28]はFTHT由来増殖因子の性格を種々分析・報告したが，今後アミノ酸レベルでの解析が必要と考えている．なお，臨床的応用としては肝拡大切除時にFTHTで感作するか，あるいは残肝の一部を直接凍結融解することによりHGFを中心としたナチュラル型の肝細胞増殖様因子が誘導可能となるので，術後の肝再生の促進あるいは肝障害（薬物性を含む）に対する保護作用の面でも有用であり，応用範囲は極めて広いと考えている．

文　献

1) 加藤元久：脾内移植肝細胞の増殖促進法としての凍結融解処理肝組織前感作法の有用性に関する実験的研究．岐阜大医紀　40：435—458，1992
2) 宇野郷三：凍結融解処理肝組織感作血清の肝細胞増殖促進作用に関する研究(I)．岐阜大医紀 44：246—254，1996
3) 加藤元久，足立尊仁，宇野郷三ほか：凍結融解肝組織感作ラット血清の肝細胞増殖作用について．日外科系連会誌　21：178—181，1996
4) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. Arch Pathol 12：186—202，1931
5) 安藤　勤，高井茂治，古味信彦ほか：四塩化炭素投与によって誘発した急性肝障害ラット血漿中の肝細胞増殖因子(HGF)様の肝再生促進因子の部分精製とその性質の検討．肝臓　33：238—244，1992
6) Soanes WA, Ablin RJ, Gonder MJ: Remission of metastatic lesions following cryosurgery in prostatic cancer: Immunologic considerations. J Urol 104：154—159，1970
7) 佐治重豊，坂田一記：悪性腫瘍凍結手術後の免疫反応について．Oncologia　20：68—78，1987
8) 山下徹郎：凍結外科による癌転移の促進．日外会誌　80：1399—1402，1980
9) Matsumura K, Sakata K, Saji S et al: Antitumor immunologic reactivity in the relatively early period after cryosurgery. Cryobiology 19：263—272，1982
10) Critchfield JM, Racke MK, Carlos J et al: T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. Science 263：1139—1143，1994
11) Kinoshita T, Tashiro K, Nakumura T: Marked increase of HGF mRNA in non-patenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins. Biochem Biophys Res Commun 165：1229—1234，1989
12) Noji S, Tashiro K, Koyama E: Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by INSITU hybridization. Biochem Biophys Res Commun 173：42—47，1990
13) Yanagita K, Nagaike M, Ishibashi H: Lung may have an endcrine function producting hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. Biochem Biophys Res Commun 182：802—809，1992
14) Michalopoulos G: HGF and liver regeneration. Gastroenterol Jpn 28：36—39，1993
15) Kan M, Huang J, Mansson PE et al: Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 86：7432—7436，1989
16) Kinosita T, Hirao S, Matsumoto K: Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. Biochem Biophys Res Commun 177：330—335，1991
17) Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y et al: Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo. Hepatology 16：1227—1235，1992
18) Tsubouchi H, Kawakami S, Hirono S et al: Prediction of outcome in fulminant hepatic failure by serum human hepatocyte growth factor. Lancet 340：307，1992
19) 足立尊仁，竹内　賢，永田　緑ほか：凍結融解処理肝組織感作による肝細胞増殖因子の誘導と感作部病理所見の検討．日外科系連会誌　22：740—743，1997
20) Bank H, Mazur P: Visualization of freezing damage. J Cell Biol 57：729—742，1973
21) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M et al: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature 342：440—443，1989

22) Jin L, Pang YYS, Joseph A et al: Rat placental hepatocyte growth factor/scatter factor: purification, characterization, and developmental regulation. Proc Soc Exp Biol Med **204**: 75—80, 1993
23) Kan M, Zhang G, Zarnegar R et al: Hepatocyte growth factor/Hepatopoietin A stimulates the growth of rat kidney proximal tubule epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV-40 transformed RPTE. Biochem Biophys Res Commun **174**: 331—337, 1991
24) Higashi K, Shima N, Goto M et al: Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblasts and hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun **170**: 397—404, 1990
25) Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI et al: Transforming growth factor-α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-α, and hepatocyte growth factor. Hepatology **18**: 1422—1431, 1993
26) Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. Proc Natl Acad Sci USA **83**: 6489—6493, 1986
27) Matumoto K, Tajima H, Hamanoue M et al: Identification and characterization of "injurin," an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 3800—3804, 1992
28) 宇野郷三, 佐治重豊, 加藤元久ほか：凍結融解処理肝組織感作血清の肝細胞増殖促進作用に関する研究(II). 岐阜大医紀 **44**: 255—263, 1996

Studies on Hepatocytotrophic Effects of the Factors Induced by Inoculation with Freeze-thawed Hepatic Tissue in Hepatectomized Rats and a Protective Effect Against CCl_4-induced Hepatic Damage

Makoto Takeuchi, Atsushi Watanabe, Takahito Adachi,
Motohisa Kato and Shigetoyo Saji
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

We have investigated whether some kinds of hepatocyte growth factor are induced in rats by inoculation with freeze-thawed hepatic tissue (FTHT). In the present study, its hepatocytotrophic effects for 30% partial hepatectomized rats and its protective effect against CCl_4-induced hepatic damage were examined. The following results were obtained. 1) When FTHT was inoculated before 30% partial hepatectomy, the liver wet weight, DNA synthesis and liver regeneration were significantly higher than in the control rats without FTHT. 2) When FTHT was inoculated in rats with CCl_4-damaged livers, the levels of serum cytosolic enzyme activities (GOT, GPT, LDH) were significantly lower ($p<0.01$) than those in the control. 3) The mean serum HGF level was about 20 ng/ml two weeks after FTHT inoculation, and it was higher than that of the 30% partial hepatectomized rats (about 3 ng/ml). The above results suggest that inoculation of FTHT might induce some kinds of hepatocyte growth factor, and have protective activity against CCl_4-induced hepatic damage.

Reprint requests: Makoto Takeuchi Second Department of Surgery, Gifu University, School of Medicine
40 Tsukasamachi, Gifu, 500-8705 JAPAN