

## 熱ストレスによる肝 heat shock protein 72の誘導と その肝阻血再灌流障害の軽減効果について

秋田大学第1外科

粕谷 孝光 佐藤 勤 佐藤 泰彦  
草野 智之 浅沼 義博 小山 研二

Heat shock protein (HSP) 誘導により肝阻血再灌流障害が軽減されるか否かを確認するため、1) 正常および肝硬変ラットに熱ストレス (HS) を加え、その後の肝組織内 HSP72蛋白質量を immunoblot 法にて経時的に測定した。2) HSP 誘導群と非誘導 (対照) 群で肝阻血再灌流を行い、肝細胞核 DNA 損傷度とミトコンドリア (m)-GOT 値を検索し肝障害度を比較した。その結果、1) 43°C, 15分間の HS 後48時間で HSP72誘導量は正常肝、硬変肝で対照の各3.9倍, 3.5倍と最大に達した。2) HS 48時間後に60分肝血行遮断し再灌流1時間後の肝細胞核 DNA 損傷度と m-GOT 値を調べたところ、正常肝では対照群と比べ HSP 誘導群で有意に低値であり、この障害軽減効果は、HSP 誘導阻害剤の Quercetin 前投与により阻害された。一方、硬変肝では HSP 誘導による障害軽減効果を認めなかった。したがって、正常肝では、あらかじめ HS を加えることにより阻血再灌流障害を軽減することが可能で、その機序として HSP 誘導が重要と考えられた。

**Key words:** heat shock protein, ischemia-reperfusion injury, DNA damage

### はじめに

肝臓手術に際し、出血量を減少させるため、肝流入血行の一時的遮断がしばしば行われるが、これに起因する肝障害は重要な問題である。特に肝予備能の低下している肝硬変症例では、この障害から術後肝不全に至る場合も少なくない。逆に、この肝障害を軽減する方法があれば、肝硬変患者に対してもより積極的な手術が可能になり、手術成績の向上が期待される。

一方、あらかじめ軽度の熱ストレスを受けた細胞が、引き続いて受ける致死的な熱ストレスに対して耐性を得て高い生存率を示す、いわゆる温熱耐性現象<sup>1)</sup>が知られている。この時、細胞内には heat shock protein (HSP) が誘導・増加しており、これが細胞保護あるいは傷害防御作用<sup>2)3)</sup>に関わるものと考えられている。HSP は、原核生物から高等哺乳動物に至るまで良く保存されている蛋白質で、熱ストレスをはじめとする種々のストレスによって各種臓器の細胞内に誘導合成される<sup>4)~6)</sup>。特に HSP70ファミリーは平常時の正常細胞に構成的に存在し、蛋白質の折り畳みや会合状態を

制御して機能的構造体の形成を助けたり、蛋白質の細胞内輸送や膜透過性を保つ<sup>7)~9)</sup>一方で、ストレスにตอบสนองして速やかに誘導合成され、ストレスによって生じた変性蛋白質の疎水性表面に結合しこれらの凝集を抑えたり、元の機能を持つ蛋白質に再生させる働きを有する<sup>10)11)</sup>。

したがって、何らかの方法であらかじめ HSP を誘導しておくこと、その後の侵襲による細胞、組織ひいては臓器の障害が軽減されることが予想され、この性質を利用すると前述した手術時の肝障害を軽減させる可能性がある。

以上を背景として、まず実験1として正常および肝硬変ラットに全身加温による熱ストレス後の肝細胞での HSP72の誘導状況を検索し、次に加えるストレスに対する耐性が得られる至適時期を設定する。次に実験2において、熱ストレスをあらかじめ負荷しておくことで、肝の阻血・再灌流障害を防御・軽減しうるか否かを検討し、肝臓外科における HSP 誘導の意義を明らかにする。

なお、本研究は、秋田大学医学部動物実験委員会の承認を受け、同動物実験施設で行った。

## 実験1. ラット正常肝および硬変肝における熱ストレス負荷によるHSP72誘導状況の検討

### 1. 材料および方法

実験動物は、8週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。

#### 1) 肝硬変作成法

0.04%の thioacetamide (TAA, Wako, Osaka) 水溶液を飲料水として5か月間自由に摂取させ肝硬変ラットを作成した<sup>12)</sup>。TAA は実験の2週間前から休薬した。

#### 2) 熱ストレス負荷法

pentobarbital 麻酔下にラットを腋窩の深さまで43°C, 44°C, 45°Cの恒温槽に各3匹を15分間浸漬した。45°Cでは3匹とも熱ストレス負荷中に死亡し、44°Cでは2匹が熱ストレス負荷中に、1匹が熱ストレス終了後麻酔から回復しないまま死亡した。43°Cでは3匹とも熱ストレス負荷後も麻酔から回復しその後も生存したため、43°C, 15分を熱ストレスの条件とした。

#### 3) 肝実質温および直腸温の測定

正常肝ラット3匹を用い、43°C, 15分の熱ストレス負荷による肝実質温および直腸温の経時的变化を測定した。開腹し肝中葉に温度センサー (TC503-0300, Mallinckrodt Anesthesiology, El Paso, Texas, USA) を刺入・固定し、温水が腹腔内へ流入しないよう開腹創を密に縫合・閉鎖した。また、別の温度センサーを直腸内へ挿入し肝実質温と直腸温を同時にデジタル温度計 Mon-a-therm® Model 6510 (Mallinckrodt Anesthesiology, El Paso, Texas, USA) を用いて測定した。

#### 4) 検索材料の採取

熱ストレス負荷前および負荷後6, 12, 24, 48, 72, 120時間経過した正常および肝硬変ラット各3匹をエーテル麻酔下に開腹し、肝を摘出した。摘出肝を二分して一方を-80°Cにて凍結保存し、他方を10%ホルマリンで4°C, 24時間固定した後、パラフィン包埋した。また、HSPの誘導合成を転写レベルで阻害するとされる Quercetin<sup>13)</sup> (Wako, Osaka) 80mg/kg を熱ストレス負荷直前に腹腔内投与し、同様の検索を行った。

#### 5) 肝HSP72の量的変化の検索法

凍結保存した肝のHSP72の量的変化を immunoblot 法で検討した。抗HSP72抗体は、ウシ脳より分離精製したHSP72をウサギに免疫して作成したものを、秋田大学生化学第2講座伊藤英晃助教授から供与された。この抗体は、原核生物から哺乳動物細胞のHSP72と種を越えて交差反応するが、HSP73とは交差反応し

ない<sup>14)</sup>。

肝0.4gを4°CのTris緩衝液内でhomogenizeした後、4°C, 18,500×gで10分間遠心した。ここで得た可溶性画分を試料溶液(0.125M Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol 2.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-mercaptoethanol)で4倍に希釈し、100°Cにて5分間加熱処理して蛋白分析用試料とした。この試料を蛋白濃度を調整した後に、9%SDS polyacrylamideゲル内をLaemli緩衝液(50mM Tris, 0.25M glycine, 0.1%SDS, pH 8.3)にて定電流をかけて電気泳動した<sup>15)</sup>。

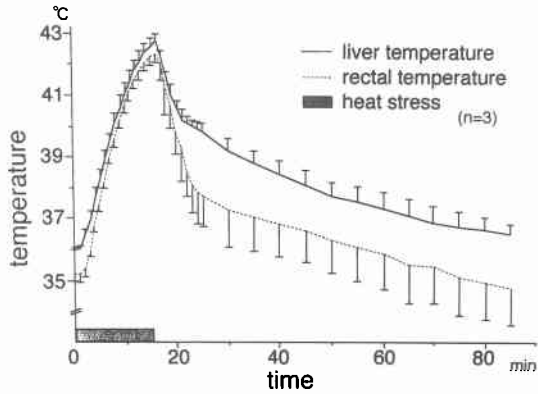
電気泳動した蛋白はTowbin法<sup>16)</sup>にてimmunoblotを行った。すなわち、泳動終了後の9%SDS polyacrylamideゲルにプロット緩衝液(25mM Tris, 0.2M glycine, 5% methylalcohol pH 8.3)内で定電流をかけてPVDF膜(Nippon Milipore Kogyo Co Ltd, Yonezawa)に転写した。次いで、7%スキムミルクにて1時間非特異的な抗体結合をブロックし、500倍希釈の前出の抗HSP72抗体を室温下で2時間反応させた後、プロット洗浄液(10mM Tris, 0.125M NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)にて非結合性抗HSP72抗体を洗浄した。さらに、2次抗体として1,000倍希釈 peroxidase 標識抗ウサギIgG抗体を室温下で2時間反応させた後、プロット洗浄液にて洗浄し、50mM Tris-HCl, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)にて発色させた。得られたバンドはデンシトメーターで定量化した。陽性対照は、本抗体作成に用いたウシ脳より分離精製したHSP72を同一ゲル内で同時に電気泳動したものとした。

#### 6) HSP72の局在変化の検索

パラフィン包埋ブロックから4μmの切片を作成し、前出の抗体を用いてHSP免疫組織染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

まず、標本をキシレンにて脱パラフィンした後、アルコール列、水列にて親水化した。次いで、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, methanol, 内因性 peroxidase および avidin-biotin blocking kit (Vector Lab Inc, Burlingame, USA)にて内因性 avidin-biotin ブロックを行った。1次抗体は500倍希釈抗HSP72抗体を用い、反応に際し非特異的結合を防止するためウシ血清アルブミン(Sigma, St Louis, USA)およびヤギ血清(Vector Lab Inc, Burlingame, USA)とともに4°Cにて一晩反応させた後、ABC kit (Vector Lab Inc, Burlingame, USA)を用い、2次抗体として抗ウサギIgG抗体、さらに、

**Fig. 1** Changes in liver and rectal temperature along with hot water immersion of 43°C for 15 minutes in rats with normal livers.



peroxidase 標識 avidin-biotin 複合体をそれぞれ室温化にて1時間反応させ、0.01% $H_2O_2$ 、0.05%DABにて発色させた。以上の免疫組織切片に近接する切片にhematoxylin-eosin (H-E)染色を行い観察した。また、HSPの染色状況を定量化するために、切片上の任意の10視野で100個以上の細胞について核染色細胞数ならびに細胞質染色細胞数を求め、その百分率の平均値を核および細胞質HSP染色率とした。

統計学的有意差検定には unpaired t-test を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

2. 結果

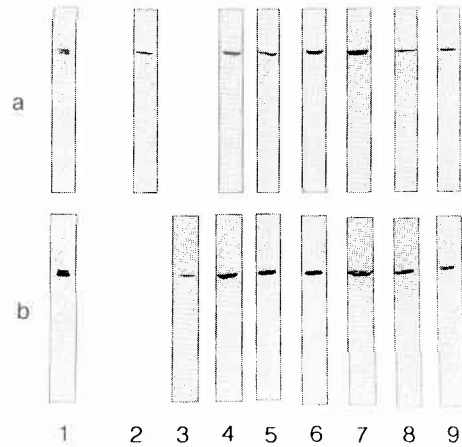
1) 熱ストレス負荷による肝実質温および直腸温の変化

負荷前の肝実質温の平均は36.0°C、直腸温の平均は35.2°Cであった。熱ストレス負荷中は両者とも毎分平均0.4°Cずつ上昇し、負荷終了直後に肝実質温が42.7°C、直腸温が42.3°Cに達した後次第に低下した。肝実質温が42°C以上に保たれていたのは4分間であった (Fig. 1)。

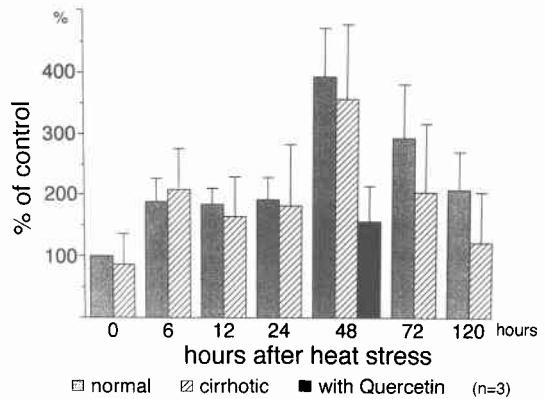
2) 熱ストレスによる肝細胞内 HSP72相対量の変動

Fig. 2 に immunoblot で検出された各時間の肝 HSP72 のバンドを示す。陽性対照として用いたウシ脳 HSP72 と同じ位置にバンドが検出され、本研究で用いた抗 HSP72 抗体がラット肝 HSP72 と交差反応する事が確認された。これら HSP72 のバンドをデンストメーターを用いて定量し、熱ストレスを加えない正常肝を100とする相対値で表した結果を Fig. 3 に示す。正常肝、硬変肝ともに熱ストレスから48時間後に肝 HSP72 量が最高値に達し正常肝では対照の約3.9倍に、また硬

**Fig. 2** HSP72 immunoblots in normal livers (lane a) and cirrhotic livers (lane b) after heat stress. 1: bovine HSP72 and HSP73 (positive control), 2, 3: before heat stress, 4: 6hours after heat stress, 5: 12hours after heat stress, 6: 24hours after heat stress, 7: 48hours after heat stress, 8: 72hours after heat stress, 9: 120hours after heat stress.



**Fig. 3** Changes in amount of HSP72 in normal and cirrhotic livers after heat stress. The closed column indicated the amount of HSP72 in normal liver with Quercetin 48hours after heat stress.



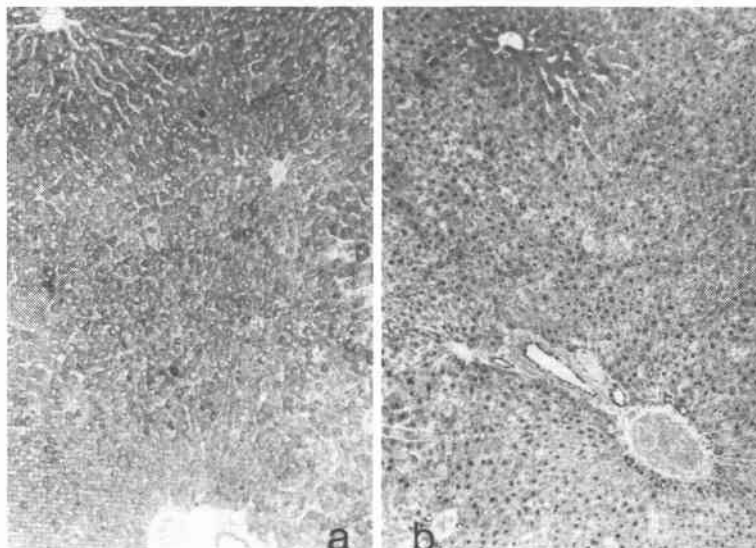
変肝では約3.5倍に増加し以後漸減した。正常肝に Quercetin を投与した場合、熱ストレス48時間後の HSP72 量は対照の1.6倍にとどまった。

3) 熱ストレス負荷による HSP72局在の変化と肝組織像

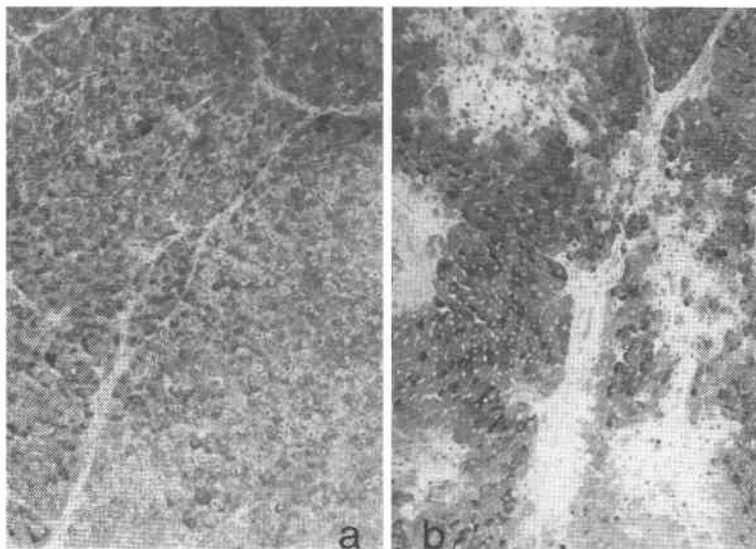
免疫組織染色による HSP72 の局在変化は、正常肝では、熱ストレス前は細胞質内に限局し、核にはほとん

**Fig. 4** HSP72 immunostaining in normal liver ( $\times 25$ )

a : before heat stress, b : 48hours after heat stress

**Fig. 5** HSP72 immunostaining in cirrhotic liver ( $\times 25$ )

a : before heat stress, b : 48hours after heat stress



ど見られなかった。しかし、熱ストレス6時間後から一部の細胞で核内にも認められ12時間後には、細胞質と核内とでほぼ同程度に染色され、48時間では核内が染色される細胞がより多く見られた。72時間以降でも核内で染色される細胞が見られたが、時間の経過とともにその割合は減少した (Fig. 4a, 4b)。一方、硬変

肝では、熱ストレス負荷前から核内に染色される細胞が存在した (Fig. 5a)。熱ストレス負荷後は、主として核内に強く染色されるもの、胞体内に強く染色されるもの、ほぼ同等に染色されるものがその結節により、あるいは同一結節内でも異なっていた (Fig. 5b)。

**Table 1** に正常肝および硬変肝における熱ストレス

**Table 1** Anti-HSP 72 antibody positive ratio of nuclei and cytoplasm in normal and cirrhotic livers before and after heat stress

		normal liver	cirrhotic liver
nucleus	before HS	4.4±5.8	19.1±6.2
	after HS	64.2±6.7	21.6±13.1
cytoplasm	before HS	19.5±10.7	14.7±6.9
	after HS	41.1±8.9	37.7±19.8

HS: heat stress, \* $p < 0.01$ , n.s.: no significant difference

前と熱ストレス負荷48時間後の核および細胞質 HSP 染色率を示す。細胞質 HSP 染色率は、正常肝、硬変肝ともに熱ストレスにより有意に上昇した。一方、核 HSP 染色率は、正常肝では熱ストレス前の4.4%から熱ストレス後の64.2%に有意に上昇したが、硬変肝では熱ストレス前から19.1%の核が染色されており、熱ストレスによる有意な上昇はなかった。

また、H-E 染色標本の光顕による観察では、正常肝、硬変肝ともに熱ストレス後に組織学的な変化は見られなかった。

### 3. 実験1のまとめ

1) 43°C, 15分の熱ストレス負荷によってラットの正常肝、硬変肝とも、HSP72は量的に同程度に誘導され、熱ストレスの負荷48時間後に最大になった。HSP 誘導阻害剤の Quercetin を正常肝に投与した場合、熱ストレス負荷後の HSP72の増加は抑制された。

2) 43°C, 15分の熱ストレス負荷によって誘導される HSP72の細胞内局在は、正常肝では熱ストレス負荷前は細胞質にわずかに認められたものが負荷後には核に集積した。一方、硬変肝では負荷前から核に集積が見られ、熱ストレス負荷後の分布は不均一、核集積も正常肝のように有意ではなかった。

以上から、次のストレスである肝の阻血・再灌流は、HSP72が最大量誘導されている熱ストレス負荷後48時間を経てから加えるのが適切と考えられた。

### 実験2. HSP 誘導による肝阻血・再灌流障害の軽減効果について

熱ストレス負荷48時間後に正常肝および硬変肝の70%の領域の流入血行を一時的に遮断・再灌流し、それによる肝細胞核 DNA 損傷度と mitochondria (m)-GOT を検索し、あらかじめ HSP を誘導しておくことで障害が軽減されるか否かを検討した。

#### 1. 方法

##### 1) 実験動物と方法

43°C, 15分間の熱ストレス負荷後48時間を経た正常および肝硬変ラット (HSP 誘導群) および Quercetin 80mg/kg を熱ストレス負荷直前に腹腔内に投与する正常ラット (HSP 合成阻害群) を作成し、熱ストレスを負荷しない正常および硬変肝ラットを対照として用いた。各群のラットをエーテル麻酔下に開腹し、肝左葉と中葉の流入血行 (肝の70%領域に相当) を60分間遮断し、遮断終了時および再灌流1時間後に各群3匹ずつのラットを採血後に犠牲死させ、肝を採取した。採取した血液は血清を分離後、肝細胞障害の指標として m-GOT を測定した。

##### 2) 肝細胞核 DNA 損傷度の測定

肝細胞核 DNA 損傷度を in situ nick translation (ISNT) 法<sup>17)18)</sup>を用いて測定した。まず、肝臓を5mm角に切り出し dry ice-acetone を用いて OCT-compound (Miles, Elkhart, USA) 内に包埋し、5μm の凍結切片を作成した。nick translation 反応液 (50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP (Takara, Kyoto), 200U/ml DNA polymerase I (endonuclease free, Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany), 0.75 μM [<sup>3</sup>H]-TTP (100Ci/mM, Amersham, Tokyo), 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 2-mercaptoethanol, 0.05mg/ml bovine serum albumin) と 37°C 下、60分間反応させた。反応終了後、冷暗所で5日間オートラジオグラフィを行い、DNA 損傷部位を肝細胞核内の黒色の grain として可視定量化した。光学顕微鏡下での観察は、門脈周囲、中間帯、中心静脈周囲の各領域で任意の100個の核の grain 数の総和、すなわち核300個あたりの grain 数として表現した。

##### 3) 統計学的処理

統計学的有意差検定には unpaired t-test と  $\chi^2$  test を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

#### 2. 結果

##### 1) 正常肝における阻血・再灌流障害

阻血・再灌流後の肝細胞核 DNA 損傷度は、阻血終了時には対照群と HSP 誘導群とに差を認めなかったが、再灌流1時間後には対照群に対し、HSP 誘導群で有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。また、HSP 誘導合成阻害群では、再灌流1時間後の核 DNA 損傷度は、対照群のそれとほぼ同値であり、HSP 誘導群より有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。再灌流1時間後の血清 m-GOT 値は、HSP 誘導群で対照群よりも有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。HSP 誘導合成阻害群の m-GOT 値は、対

**Table 2** DNA injury of hepatocellular nuclei and serum m-GOT value in normal livers at the end of 60 min-ischemia and 1 hour after reperfusion

		DNA damage (grains/300nuclei)	m-GOT (MU/ML)
at the end of ischemia	HS(-)	3,712.7±131.9	95.0±96.3
	HS(+)	3,753.5±245.4	35.3±7.8
		n.s.	n.s.
one hour after reperfusion	HS(-)	5,075.3±844.6	159.0±24.8
	HS(+)	3,378.0±399.0	78.0±20.3
	HS(+)+Q	5,393.0±614.9	151.7±27.5
		*	*
		**	*

m-GOT : mitochondrial GOT, HS : heat stress, Q : quercetin, n.s. : no significant difference, \*p<0.05, \*\*p<0.01

**Table 3** DNA injury of hepatocellular nuclei and serum m-GOT value in cirrhotic livers at the end of 60 min-ischemia and 1 hour after reperfusion

		DNA damage (grains/300nuclei)	m-GOT (MU/ML)
at the end of ischemia	HS(-)	3,490.0±149.3	238.3±248.7
	HS(+)	3,925.5±153.4	105.7±49.7
		n.s.	n.s.
one hour after reperfusion	HS(-)	4,720.0±147.0	92.0±44.6
	HS(+)	4,392.0±534.2	130.3±86.3
		n.s.	n.s.

m-GOT : mitochondrial GOT, HS : heat stress, n.s. : no significant difference

照群のそれに近似し、HSP誘導群よりも有意に高かった ( $p<0.05$ ) (Table 2).

## 2) 硬変肝における肝阻血・再灌流障害

硬変肝の対照群およびHSP誘導群の肝細胞核DNA損傷度は、阻血終了時、再灌流1時間後のいずれも両群間に有意差は認められなかった。血清m-GOT値も、同様に再灌流1時間後の対照群とHSP誘導群との間に有意差は認められなかった (Table 3).

## 考 察

熱ストレスを加えた場合にHSPが誘導される温度は、種によって、また同一種でも細胞によって異なることが知られている。哺乳動物の細胞においては、43°Cより低い加温ではその加温中にHSPの産生が起こるが、43°C以上では加温中にはHSPの産生は見られず加温後に当初の温度に戻るとHSPが誘導されることも報告されている<sup>19)20)</sup>。本実験では、この境界である43°Cを15分間持続することを選択し、この負荷が生体ならびに肝に対して著しい負荷にならないことを第一に確認した。この誘導条件下では、熱ストレス後に肝実質温が42°C以上に保たれていたのは4分間と短い。HSP72は正常肝、硬変肝ともに熱ストレスから48時間後に各3.9倍、3.5倍に増加し、HSP誘導を目的とする前処置として適切と考えられた。

さて、本研究で行った肝細胞核DNA損傷度の測定

は、肝の再生能力をも加味した障害度の評価法として有用であり、組織像などに変化のみられない早期にも障害を検出しよう鋭敏な方法である<sup>21)22)</sup>。われわれはこれまでに、ラット肝阻血・再灌流による肝細胞核DNA損傷が、阻血60分の場合、阻血終了時ならびに再灌流1時間後に最高値に達し以後漸減するとの成績を得ている<sup>23)24)</sup>。そこで、60分の阻血終了時との再灌流1時間後の肝細胞核DNA損傷度とm-GOT値をHSP誘導群ならびに対照群の2群間で比較した。その結果、まず正常肝では、再灌流1時間後の肝細胞核DNA損傷度とm-GOT値は、HSP誘導群では誘導していない対照群に比べて有意に低い結果が得られた。すなわち、正常肝において、熱ストレスによるHSP誘導は、肝阻血・再灌流障害を軽減させることが明らかになった。

この細胞保護作用は、あらかじめHSP誘導合成を阻害するQuercetinを投与しておく、熱ストレスを同様に与えても核DNA損傷とm-GOT値上昇が軽減されなかったことから、温熱に関連する非特異的な効果ではなく、HSPによる効果であると考えられる。しかし、今回検討したHSP72以外のHSPが関与する可能性もあり、またHSP72が単独であるいは他の因子と協同して核DNA損傷を軽減したり、細胞膜の損傷を防御するのかが否かも明らかでない。ラットの心筋において熱ストレス後48時間で組織内カタラーゼ含量が著

明に増加したとの報告<sup>25)</sup>もあり、それ以外にも現時点で認識されていない細胞防御機序や障害の軽減機構の存在についても今後検討を要すると考えられる。

一方、硬変肝については、HSP72の誘導量やその時間的变化は正常肝と同様であり、肝硬変でもストレスにตอบสนองしHSPが増加する機能が存在することが示唆された。しかしながら、硬変肝においては、阻血・再灌流後の肝細胞核DNA損傷度やm-GOT遊出は、正常肝のようにHSPの誘導によって軽減されなかった。この理由として、われわれは硬変肝でのHSP72誘導状況の不均一性をあげたい。正常肝の熱ストレス後のHSP72の細胞内局在は、細胞質から核内に移行し、48時間後には全体の64%の細胞で核にHSP72が陽性であった。一方、硬変肝で誘導されたHSP72の細胞内局在は、正常肝のごとく均一ではなく、核内、細胞質内のそれぞれにみられ、誘導量の最も増加する48時間後にも核染色率は19%にとどまった。また、教室の草野ら<sup>26)</sup>は、種々の方法の温水浸漬後の肝組織homogenateを可溶性画分と非可溶性画分とに分けてHSP72誘導量を測定したところ、核や細胞内小器官を含む非可溶性画分での誘導が著明であったことを確認している。したがって、HSP72は主として核に誘導された状態でその細胞防御機能を発揮しようとする推察される。また、HSP72の誘導は、肝硬変の結節内での分布状態も不均一であった。これらの不均一性の原因は不明であるが、硬変肝を構成する個々の細胞が、周囲の環境などによってストレスに対する反応性や抵抗性に違いがあるためとも考えられた。

肝阻血・再灌流障害は正常肝の場合は今回の実験のように、HSP72の誘導がその防御に有効である可能性は示されたが、硬変肝に対するその効果は証明できなかった。本邦における肝細胞癌患者の約85%が肝硬変を合併していることを考えると、HSP誘導による肝障害軽減の臨床応用のためにも、今後、HSP72の誘導条件を変えることによってその有効性を見出せるか否か検討する必要がある。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに貴重な抗体をご提供下さった秋田大学医学部生化学第2講座、伊藤英晃助教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Gerner EW, Schneider MJ: Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 256 : 500—502, 1975
- 2) Mizzen LA, Welch WJ: Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein

- synthesis activity and regulation of heat-shock protein 70 expression. *J Cell Biol* 106 : 1105—1116, 1988
- 3) Welch WJ, Mizzen LA: Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol* 106 : 1117—1130, 1990
- 4) Itoh H, Tashima Y: The stress (heat shock) proteins. *Int J Biochem* 23 : 1185—1191, 1991
- 5) 伊藤英晃: ストレス蛋白質に関する研究. *秋田医* 17 : 913—926, 1990
- 6) Lindquist S, Carig EA: The heat shock protein. *Annu Rev Genet* 22 : 631—677, 1988
- 7) Deshaies RJ, Kock BD, Washburne WM et al: A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptide. *Nature* 332 : 800—805, 1988
- 8) Chirico WJ, Waters MG, Blobel G: 70k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332 : 805—810, 1988
- 9) Kang PJ, Ostermann J, Shilling J et al: Requirement for hsp 70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348 : 137—143, 1990
- 10) Hightower LE: Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 66 : 191—197, 1991
- 11) Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M: The *E. coli* dnaK gene product the hsp 70 homolog can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62 : 939—944, 1990
- 12) 菊池 淳, 小山研二, 大和田康夫ほか: Thioacetamideによる実験的肝硬変の機能と形態に関する研究. *肝臓* 28 : 53—61, 1987
- 13) Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H et al: Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* 12 : 3490—3498, 1992
- 14) Itoh H, Tashima Y: Physicochemical property of bovine brain 73-kDa stress protein. *Int J Biochem* 25 : 69—77, 1993
- 15) Laemli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227 : 680—685, 1970
- 16) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 76 : 4350-4354, 1979
- 17) Shibata S, Asanuma Y, Koyama K et al : Detection of  $\beta$  cell-specific DNA damage in streptozotocin-treated rats by in situ nick translation with immunostaining of  $\alpha$  cells. *Pancreas* 10 : 354-359, 1995
- 18) Saito T, Asanuma Y, Shibata S et al : Evaluation of DNA injury in Langerhans' cells after warm ischemia of the pancreas in rat. *Transplant Proc* 28 : 1984-1986, 1996
- 19) Hickey ED, Weber LA : Modulation of heat-shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery. *Biochemistry* 21 : 1513-1521, 1982
- 20) Burdon RH, Slater A, McMahon M : Hyperthermia and the heat-shock proteins of HeLa cells. *Br J Cancer* 45 : 953-963, 1982
- 21) 武正寿明 : ニックトランスレーション法を用いて測定したラット肝細胞核内 DNA 損傷と修復合成との関係. *秋田医* 16 : 309-318, 1989
- 22) 佐藤 勤, 浅沼義博, 武正寿明ほか : 肝実質細胞, 非実質細胞の核 DNA 損傷・修復からみた肝保存法の評価. *移植* 26 : 349-357, 1991
- 23) Sato T, Koyama K, Takemasa T et al : Damage and repair of hepatocyte nuclear DNA after hepatic inflow occlusion. *Hepatogastroenterology* 39 : 252-256, 1992
- 24) Sato T, Asanuma Y, Kusano T et al : Difference in hepatic tissue oxygenation between total vascular exclusion and inflow occlusion of the liver and the possible role of hepatic venous blood under liver ischemia. *Dig Surg* 15 : 15-20, 1998
- 25) Karmazyn M, Mailer K, Currie RW : Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am J Physiol* 259 : 424-431, 1990
- 26) 草野智之, 佐藤 勤, 浅沼義博ほか : 温水浸漬による肝 HSP72誘導量と肝障害防御効果との関連. *日消外会誌* 31 : 1692, 1998

### Induction of Heat Shock Protein 72 by Heat Stress and its Protective Effect Against Ischemia-reperfusion Injury of the Rat Liver

Takamitsu Kasuya, Tsutomu Sato, Yasuhiko Sato, Tomoyuki Kusano,  
Yoshihiro Asanuma and Kenji Koyama  
Department of Surgery, Akita University School of Medicine

To clarify the protective effect of induced heat shock protein (HSP) on hepatic ischemia-reperfusion injury, we determined the HSP 72 content and distribution after heat stress in normal and cirrhotic livers of rats by immunoblotting and immunostaining using anti-HSP 72 antibody, and then investigated DNA damage of the hepatocellular nuclei and measured the serum mitochondrial (m)-GOT value following inflow occlusion. The amount of HSP 72 was the highest 48 hours after the heat stress in both normal and cirrhotic livers, which was 3.9 times as high as in normal liver and 3.5 times as high in the cirrhotic liver as the pretreatment value. As for liver injury after inflow occlusion for 60 min in normal livers, there were no statistical differences in DNA damage and m-GOT values between the control and the HSP 72-induced group at the end of inflow occlusion. However, one hour after reperfusion, those damages were significantly lower in the HSP 72-induced group than in the control. On the other hand, in cirrhotic livers, there were no significant differences between the control and the HSP 72-induced group either at the end of ischemia or one hour after reperfusion. Consequently, it was concluded that a hepatic ischemia-reperfusion injury can be reduced by the preinduction of HSP 72 in normal livers but not in cirrhotic livers.

**Reprint requests:** Takamitsu Kasuya Department of Surgery, Akita University School of Medicine  
1-1-1 Hondo, Akita, 010-8543 JAPAN