

Effects of 5-Lipoxygenase Pathway Inhibitor on Liver Regeneration in Normal and Icteric Liver

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8454

肝切除後肝再生時のロイコトリエン B₄の変動と 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の肝再生に 及ぼす影響についての実験的研究

—正常肝および閉塞性黄疸肝での検討—

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

谷 卓

ロイコトリエン (leukotriene, LT) は、生体内において炎症および免疫反応に関与していることが明らかにされつつあり、肝では細胞障害に関与する可能性が指摘されている。しかし、LT と肝再生との関連については不明である。そこで、肝切除後肝再生時の LTB₄の変動と 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の肝再生に及ぼす影響について実験的に検討した。ラットにおいて正常肝および閉塞性黄疸肝70%切除群を作成し、肝再生時における血中 LTB₄値の推移を検討するとともに、5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤 AA-861 (2, 3, 5-trimethyl-6-(-12-hydroxy-5, 10-dodecadiynyl)-1, 4-benzoquinone) を投与し、肝再生時の血中 LTB₄値、血清トランスアミナーゼ値および DNA 合成能に及ぼす影響について検討した。血中 LTB₄値は、正常肝切除群において、肝切除後12, 24時間に上昇を認め、AA-861 の投与により上昇が有意に抑制された。閉塞性黄疸肝切除群においては、肝切除前より血中 LTB₄値の上昇を認め肝切除後も高値を維持した。AA-861 の投与により血中 LTB₄値は AA-861 非投与群より全般に低下し、肝切除後48時間において有意に低値を示した。血清トランスアミナーゼ値の推移では、正常肝切除群、閉塞性黄疸肝切除群とも、AA-861 投与群において肝切除後12時間、24時間で非投与群よりも有意に低値を示した。DNA 合成能として 5-ブロモデオキシウリジン標識率 (bromodeoxyuridine labeling index, BrdU L. I.) を測定し検討したが、正常肝切除群において、AA-861 投与群では非投与群に比べて肝切除後24, 48時間で有意に BrdU L. I. の上昇が認められた。閉塞性黄疸肝切除群においても、AA-861 投与群では非投与群に比べて肝切除後12, 24時間で BrdU L. I. は有意に上昇していた。以上より、肝切除後の肝再生における LTB₄の関与が示唆されるとともに、5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤 AA-861 の投与により、肝切除後早期の DNA 合成促進と炎症反応の改善が認められ、正常肝および閉塞性黄疸肝での肝切除後の肝再生におけるその有効性が推測された。

Key words hepatectomy, liver regeneration, leukotriene (LT), 5-lipoxygenase pathway inhibitor

肝予備能評価法の発達や手術手技、術後管理技術の向上にともない肝切除後の肝不全発生頻度は低下してきている。しかし、硬変肝や閉塞性黄疸肝などの障害肝においては、肝切除術後に肝不全を発生する症例が少なくなり、残存肝の機能、とくに肝再生のメカニズムの解明が重要な課題である。

近年肝再生とアラキドン酸代謝産物との関連が注目され、トロンボキサン (thromboxane, TX) A₂などのシクロオキシゲナーゼ代謝産物との関連については多くの報告がある^{1)~4)}。一方リポキシゲナーゼの代謝産物については、5-リポキシゲナーゼ代謝産物であるロイコトリエン (leukotriene, LT) が、生体内における炎症および免疫反応に関与していることが明らかにされつつあり^{5)~9)}、肝では細胞障害に関与する可能性が指摘されている^{10)~11)}。しかし、LT と肝再生との関連については不明である。

本研究では、ラット正常肝70%切除モデルを作成し LT の中の一つである LTB₄の血中レベルを測定することにより肝再生時の生体内における LT の変動を検討するとともに、5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤を投与して、肝切除後肝再生に及ぼす影響を検討した。さらに、障害肝モデルとして閉塞性黄疸肝70%切除モデルを作成し、血中 LTB₄の変動と 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤の閉塞性黄疸肝再生に及ぼす影響についても併せて検討したので報告する。

材料および方法

I. 正常肝切除群

体重 200~250g のウィスター系雌性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (ABBOTT, North Chicago, USA)

平成5年4月14日受付, 平成5年6月2日受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotin complex; BrdU, 5-bromodeoxyuridine; DMSO, dimethyl sulfoxide; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; IL, interleukin; L. I., labeling index; LT, leukotriene; NK, natural killer; PG, prostaglandin; T-Bil, total-bilirubin; TX, thromboxane

25mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔により次の実験群を作成した。

I-A) 正常肝70%切除群 (n=7): 腹部正中切開にて開腹し、Higgins-Anderson の方法¹²⁾により70%肝切除を施行した。

I-B) 正常肝70%切除+ AA-861 投与群 (n=7): 肝切除前日、肝切除直後、および肝切除後24時間に5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤 AA-861(2,3,5-trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadienyl)-1,4-benzoquinone) (武田薬品工業, 大阪) 20mg/kg をジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (和光純薬, 大阪) 0.2ml に溶解して皮下投与した。

尚、I-A 群には DMSO 0.2ml を肝切除前日、肝切除直後、および肝切除後24時間に皮下投与した。

II. 閉塞性黄疸肝切除群

正常肝切除群と同様にウィスター系雌性ラットを用い以下の実験群を作成した。

II-A) 閉塞性黄疸肝70%切除群 (n=7): 開腹後胆管を膵管合流部よりも肝臓側にて結紮切断して閉塞性黄疸を作成し、胆管結紮後7日に再開腹して70%肝切除を施行した。

II-B) 閉塞性黄疸肝70%切除+ AA-861 投与群 (n=7): 閉塞性黄疸肝切除前日、肝切除直後、および肝切除後24時間に AA-861 20mg/kg を DMSO 0.2ml に溶解して皮下投与した。

尚、II-A 群には DMSO 0.2ml を閉塞性黄疸肝切除前日、肝切除直後、および肝切除後24時間に皮下投与した。

III. 測定項目および測定方法

正常肝切除群では、肝切除前、肝切除後12, 24, 48時間に開腹し、下大静脈より採血し、血清総ビリルビン (total bilirubin, T-Bil) 値、血清グルタミンオキサロ酢酸トランスアミナーゼ (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) 値、血清グルタミンピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvic transaminase, GPT) 値、LTB₄ 値を測定した。LTB₄ の測定は、ヘパリン加全血に4倍量の冷却エタノールを加えて除蛋白を行った後、遠心機にて4℃, 2,000rpm, 15分間、遠心して得られた上清を

測定まで-20℃以下にて保存した。上清を SEP-PAC C18 カラムで抽出後、高速液体クロマトグラフィにて分離精製した後、LTB₄ ラジオイムノアッセイキット (アマシヤム ジャパン, 東京) を用いて測定した。

各時点において採血後犠牲死させ残存肝湿重量を測定した。また、肝切除時に測定した切除肝重量から推定した全肝重量より残存肝重量/推定全肝重量を求めて肝重量回復率とした。

また、開腹前1時間に5-ブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) (武田薬品工業) 20mg/kg を腹腔内に投与し、採血犠牲死させたのち残存肝を摘出して10%ホルマリンに固定し、以下のように BrdU 染色を行った。摘出された残存肝のパラフィン包埋ブロックより6μm 切片を作成し、脱パラフィン後2N 塩酸に室温30分間浸漬し DNA の変性処理を行った。0.1M ホウ酸ナトリウムにて塩酸を中和し0.05% プロテアーゼ処理後、10%正常ヤギ血清に30分間反応させたのち、抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Oxnard, USA) (×30) に2時間反応させた。ついでビオチン化マウス免疫グロブリン G 抗体 (Tago, Burlingame, USA) (×10) に1時間反応させたのち、アビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin complex, ABC) (Vector, Burlingame, USA) に30分間反応させた。染色は3-3' ジアミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) 溶液を用い、水洗後、ヘマトキシリンにて対比核染色を行った (図1)。光学顕微鏡にて1,000個の肝細胞を観察し、その中で BrdU 取り込みにより核が褐色に着色している細胞数を求め BrdU 標識率 (BrdU labeling index, BrdU L. I.) (%) を算定した。

閉塞性黄疸肝切除群では、胆管結紮前、閉塞性黄疸肝切除前、閉塞性黄疸肝切除後12, 24, 48時間の各時点で、正常肝切除群と同様の測定を行った。

測定値はすべて平均値±標準偏差 (mean±SD) で示した。統計学的検定は Student t-検定を用い、危険率5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。

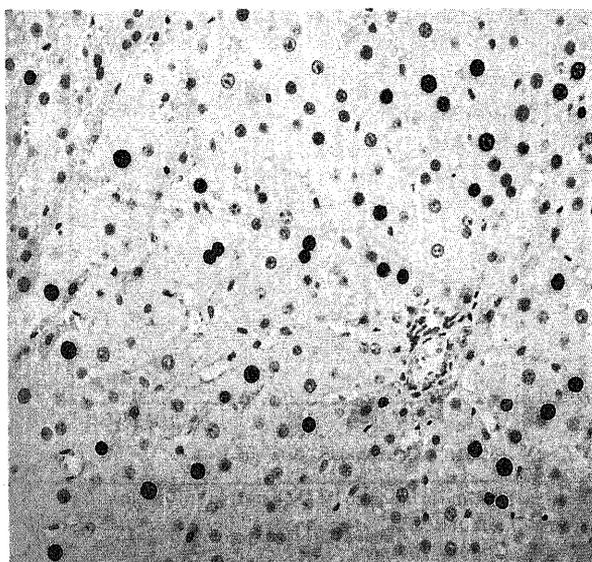


Fig. 1. Light micrograph of the rat liver stained immunohistochemically with BrdU-anti-BrdU techniques. The brownish nuclei labeled with BrdU are seen in this field. (×200)

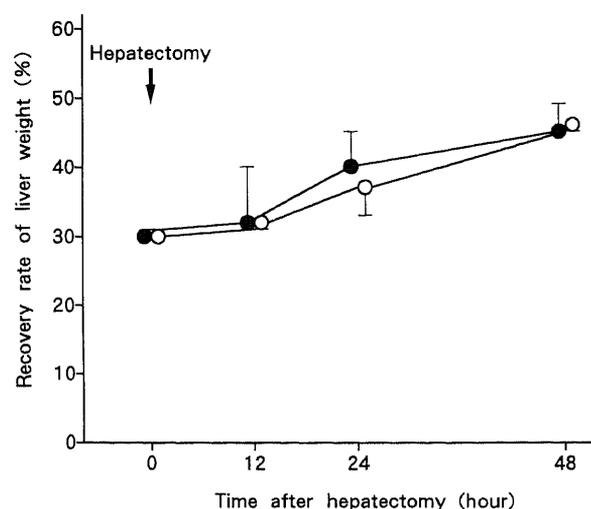


Fig. 2. Changes in liver weight recovery rates after 70% hepatectomy in normal liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean±SD.

成 績

1. 正常肝切除群

1. 肝重量回復率の推移

I-A 群, I-B 群ともに肝切除後経時的に増加を認めるものの, 両群間に有意差は認められなかった (図 2).

2. 血清 T-Bil 値の推移

両群ともに血清 T-Bil 値の変動は認めなかった.

3. 血清 GOT 値の推移

GOT 値は, 両群とも肝切除後12時間目でピークを示し以後低下した. I-B 群では I-A 群に比べ全般に GOT 値は低値で推移し, 肝切除後12時間で I-A 群 907±173IU/l, I-B 群 495±98 IU/l, 24時間で I-A 群 637±88IU/l, I-B 群 338±28IU/l と I-B 群が I-A 群に比べ有意に ($p < 0.01$) 低値を示した (図 3).

4. 血清 GPT 値の推移

GPT 値は, GOT 値と同様に I-B 群が I-A 群に比べ低値で

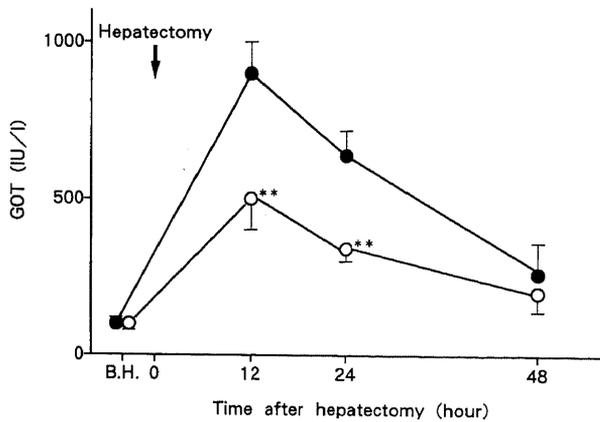


Fig. 3. Changes in serum GOT concentrations before and after 70% hepatectomy in normal liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each Value represents the mean±SD. **, $P < 0.01$ compared to non-treated group; B. H., before hepatectomy.

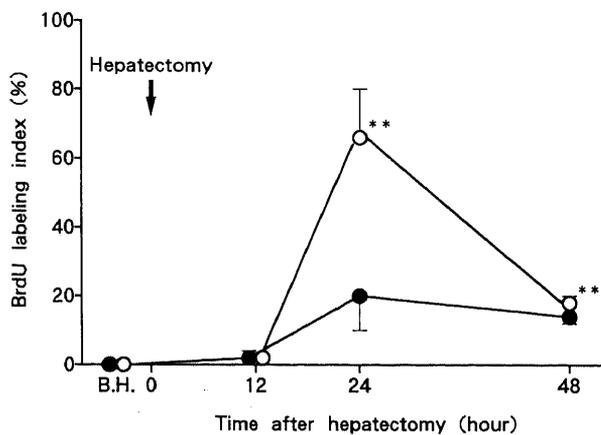


Fig. 4. Changes in BrdU L.I. before and after 70% hepatectomy in normal liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean±SD. **, $P < 0.01$ compared to non-treated group; B. H., before hepatectomy.

推移し, 肝切除後24時間で I-A 群 213±71IU/l, I-B 群 105±26IU/l と I-B 群が有意に ($p < 0.01$) 低値を示した.

5. BrdU L. I. の推移

BrdU L. I. は, 両群とも肝切除後24時間にピークを示したのち, 48時間に低下したが, 肝切除後24時間, 48時間において I-B 群では 66.2±13.5%, 17.9±1.9% であり, I-A 群での 19.1±8.3%, 14.0±1.9% に比べ有意に ($p < 0.01$) 高値を示した (図 4).

6. 血中 LTB₄ 値の推移

LTB₄ 値は, I-A 群において, 肝切除後12時間では 1788±1621pg/ml, 24時間では 1729±1686pg/ml と高値を示し, 48時間では 582±231pg/ml と低下した. 一方, AA-861 を投与した I-B 群では, 肝切除後12時間では 190±35pg/ml, 24時間では 282±90pg/ml, 48時間では 290±35pg/ml といずれ

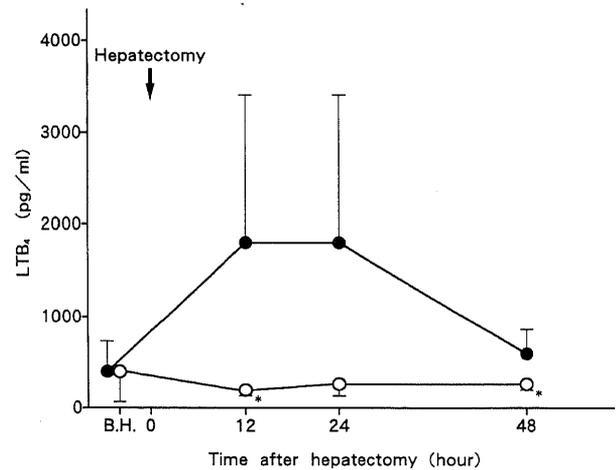


Fig. 5. Changes in blood LTB₄ concentrations before and after 70% hepatectomy in normal liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean±SD. *, $p < 0.05$ compared to non-treated group; B. H., before hepatectomy.

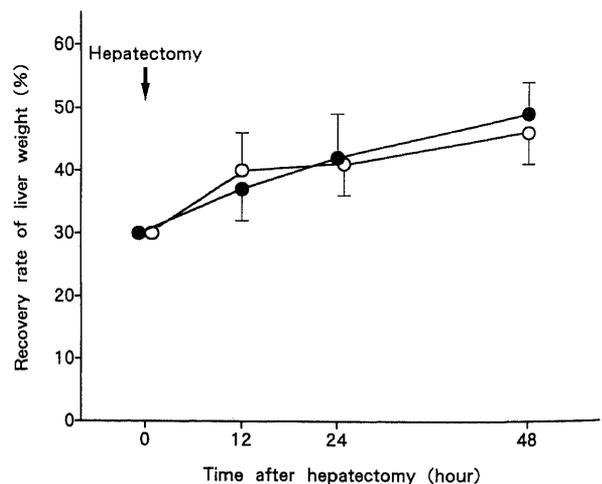


Fig. 6. Changes in liver weight recovery rates after 70% hepatectomy in icteric liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean±SD.

の時点でも I-A 群よりも低値であり、12, 48時間目において I-A 群に比べて有意に ($p < 0.05$) 低値を示した (図 5).

II. 閉塞性黄疸肝切除群

1. 肝重量回復率の推移

肝重量回復率の推移をみると、正常肝切除群におけると同様に肝切除後経時的に増加を認めるものの、両群間には有意差は認められなかった (図 6).

2. 血清 T-Bil 値の推移

血清 T-Bil 値は、両群ともに胆管の結紮切断により肝切除前に高値を示し肝切除後も低下することなく、肝切除による変動は認められなかった (図 7).

3. 血清 GOT 値の推移

GOT 値は、両群ともに肝切除後12時間および24時間で高値

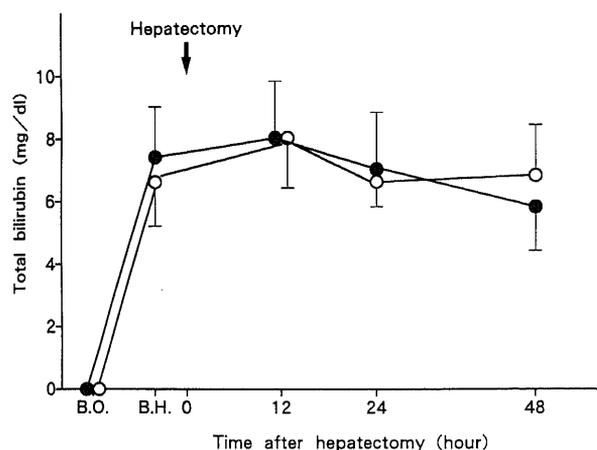


Fig. 7 Changes in serum total bilirubin concentrations after bile duct obstruction and subsequent 70% hepatectomy in icteric liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean \pm SD. B.O., before bile duct obstruction; B.H., before hepatectomy.

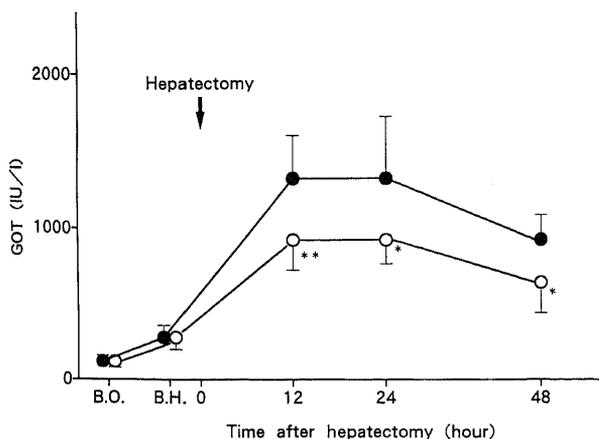


Fig. 8. Changes in serum GOT concentrations after bile duct obstruction and subsequent 70% hepatectomy in icteric liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ compared to non-treated group; **, $p < 0.01$ compared to non-treated group; B.O., before bile duct obstruction; B.H., before hepatectomy.

を示し48時間で低下した。GOT 値は肝切除後12時間において II-A 群では 1350 ± 269 IU/l, II-B 群では 932 ± 242 IU/l ($p < 0.01$), 24時間において II-A 群では 1371 ± 372 IU/l, II-B 群では 940 ± 181 IU/l ($p < 0.05$), 48時間において II-A 群では 910 ± 153 IU/l, II-B 群では 679 ± 248 IU/l ($p < 0.05$) であり、II-B 群が II-A 群に比べて有意に低値であった (図 8).

4. 血清 GPT 値の推移

GPT 値は、両群ともに GOT 値と同様の推移を示し、肝切除後12時間において II-A 群では 177 ± 40 IU/l, II-B 群では 124 ± 24 IU/l ($p < 0.01$), 24時間において II-A 群では 205 ± 83 IU/l, II-B 群では 127 ± 55 IU/l ($p < 0.05$) であり、II-B 群が II-A 群に比べ有意に低値を示した。

5. BrdU L. I. の推移

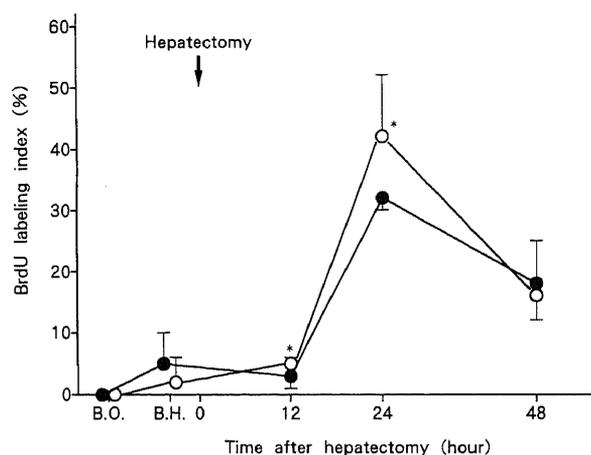


Fig. 9. Changes in BrdU L.I. after bile duct obstruction and subsequent 70% hepatectomy in icteric liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ compared to non-treated group; B.O., before bile duct obstruction; B.H., before hepatectomy.

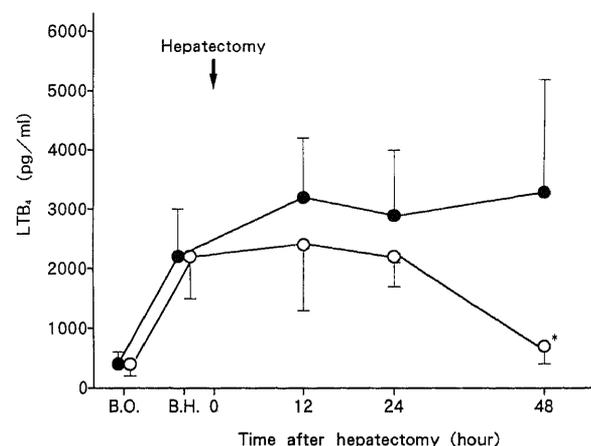


Fig. 10. Changes in blood LTB₄ concentrations after bile duct obstruction and subsequent 70% hepatectomy in icteric liver. ○—○, AA-861 treated group; ●—●, non-treated group. Each value represents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ compared to non-treated group; B.O., before bile duct obstruction; B.H., before hepatectomy.

BrdU L. I. は、両群ともに、肝切除後24時間にピークを示したのち、48時間に低下した。肝切除後12時間において II-A 群では $2.8 \pm 2.8\%$ 、II-B 群では $5.3 \pm 0.8\%$ 、24時間において II-A 群では $32.2 \pm 1.6\%$ 、II-B では $41.5 \pm 11.1\%$ であり、II-B 群が II-A 群より有意に ($p < 0.05$) 高値を示した (図9)。

6. 血中 LTB_4 値の推移

LTB_4 値は、閉塞性黄疸を作成することによって両群において上昇した。II-A 群では肝切除前より肝切除後48時間まで高値のまま推移したが、II-B 群では肝切除後24時間までは高値ながら II-A 群に比べ低値であり、また肝切除後48時間で低下し II-A 群に比べ有意に ($p < 0.05$) 低値を示した (図10)。

考 察

肝切除後や肝障害後の肝再生の制御機構については従来インスリンやグルカゴンの門脈性因子の役割が強調されてきた¹⁵⁻¹⁷。Bissell ら¹⁸による成熟ラット肝細胞の初代培養に引き続いた培養肝細胞を用いた研究によって、門脈性因子以外の肝細胞増殖調節因子の解明が行われている。Nakamura ら¹⁹⁻²¹はラット血小板由来の肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor) を報告している。

一方、アラキドン酸カスケードにおける種々の代謝産物の生理活性が明らかにされ、これらの代謝産物と肝再生との関連が注目されている。中でもシクロオキシゲナーゼ代謝産物と肝再生の関連については多数の報告がある。Miura ら¹²は、肝再生がシクロオキシゲナーゼ阻害物質であるアスピリン、インドメサシンの投与により抑制されることを示すと同時に、均質化された再生肝細胞の上清中に肝切除後の早期に TXB_2 が著しく増加することより TXA_2 が肝再生のトリガーの一つである可能性を示唆している。Rixon ら³は、ラット肝切除モデルにおいて、肝切除後数時間以内にプロスタグランジン (prostaglandin, PG) と TX の合成阻害剤であるメフェナム酸、ハイドロコチゾン、デキサメサゾンを投与することにより、再生肝細胞の DNA 合成は阻害されずに核分裂が阻害されることを示し、さらにこの阻害作用がアラキドン酸投与により消失することを示し、PG や TX が肝再生の核分裂期に関与している可能性を報告している。

しかし、シクロオキシゲナーゼ系とともにアラキドン酸の代謝経路であるリポキシゲナーゼ代謝産物と肝再生の関連については現在のところほとんど報告がみられない。リポキシゲナーゼ代謝産物の生理作用については 5-リポキシゲナーゼ代謝産物である LT を中心に解明されつつある。LT は、 LTB_4 と、従来アナフィラキシー関連遅発反応物質 (slow reactive substance)-A として知られている LTC_4 、 D_4 、 E_4 に大別される²²。 LTB_4 は多核白血球の遊走、リソソーム酵素分泌や O_2^- 産生等に関与し炎症細胞浸潤や局所炎症反応を惹起亢進する⁹ とともに、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞活性の増強、インターロイキン (interleukin, IL) 1, 2 の産生や γ -インターフェロンの産生増強作用を有し免疫系にも深く関与する²³⁻²⁵。 LTC_4 およびその代謝産物である LTD_4 、 E_4 は、微小血管透過性を亢進させ組織の浮腫を惹起し^{26,27}、さらに LTB_4 には劣るが IL-1 の産生を増強する²⁵。

これら LT の産生細胞としては、 LTB_4 では主として好中球^{28,29}、単球³⁰、マクロファージ³¹などがあげられ、 LTC_4 系では、好酸球^{28,29}、単球³⁰、肥満細胞³¹などがあげられる。肝では

クップセル細胞で LTB_4 、 LTC_4 系ともに産生され^{32,33}、肝細胞での LTB_4 産生が報告されている³⁴。生体内分布動態では、LT は胆汁中に認められ、胆道系からの排出後腸肝循環を示し、閉塞性黄疸など胆汁うっ滞状態では肝内に蓄積することが知られている³⁵。

一方、免疫系と肝再生については近年その関連が報告されている。小野ら³⁶は肝切除により脾細胞より IL-2 産生が亢進し、NK 細胞などの活性が増加することを報告している。さらに Stipan ら³⁷は、肝切除後の再生肝において、肝類洞内皮細胞およびクップセル細胞にクラス II 抗原が発現することを報告し、佐藤ら³⁸は、この抗原発現が免疫抑制剤を投与することにより抑制されることを報告している。これらの抗原提示細胞が肝における LT の主たる産生細胞であること、LT が様々な生理作用を有し免疫系とも深く関与すること⁹⁻¹¹ より、肝再生と LT との間に何らかの関連があると推測される。

本研究においては 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害剤である AA-861 を肝切除ラットに投与することにより、LT と肝再生との関連について研究した。さらに障害肝モデルとして閉塞性黄疸肝モデルを作成し、障害肝切除後の肝再生における LT の影響についても検討した。障害肝モデルとして閉塞性黄疸肝を用いたのは、LT が主として胆汁中に排出されるという生体内での分布および動態の面からと、臨床では胆道系悪性腫瘍において閉塞性黄疸肝の肝切除が増加し、術後の肝不全が問題となっているからである。

正常肝切除群における成績では、5-リポキシゲナーゼ系の代謝産物である血中 LTB_4 値は、肝切除後12、24時間の早期に上昇することが示された。 LTB_4 の上昇が好中球や単球などの炎症細胞の肝への浸潤、活性化により産生されたものか、あるいは肝内マクロファージであるクップセル細胞の活性化により産生されたものかについては不明であるが、肝切除後の肝再生の早期の過程に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、この上昇は AA-861 20mg/kg の投与により有意に抑制された。

血清トランスアミナーゼ値は、GOT、GPT とともに AA-861 を投与することによって AA-861 非投与群に比べて有意に低値を示し、AA-861 投与による 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害が肝内での炎症反応の改善に有効であった。AA-861 による肝での炎症軽減効果については、Mizoguchi ら¹¹は、*Propionibacterium acnes* 加熱死菌処理マウスにリポ多糖体を静脈注射すると肝組織中の LTB_4 、 C_4 が増加し、マウスの死亡率は高くなるが、AA-861 を投与することにより死亡率は低下すると報告している。さらに阪上ら¹⁰は、非 A 非 B 型慢性肝炎患者では末梢静脈血中の LTB_4 が上昇していることを指摘し、また門奈ら³⁹は、非 A 非 B 型慢性肝炎患者に AA-861 を投与することにより、血清トランスアミナーゼ値の改善がみられたことを報告している。本研究での成績と同様に、AA-861 による 5-リポキシゲナーゼ代謝阻害は、肝における炎症反応を改善する効果を有すると考えられる。

本研究では肝再生の指標として S 期細胞率をあらわす BrdU L. I. を算定し、残存肝の DNA 合成能を検討したが、肝切除後24時間および48時間において BrdU L. I. は AA-861 投与群で非投与群に比べ有意に高値を示し、AA-861 投与により肝切除後の DNA 合成が促進されることが示された。これは 5-リポキシゲナーゼの代謝阻害により LT の炎症作用や免疫作用などの生

理作用が抑制された結果と推測されるが、LTB₄あるいは LTC₄系のいずれが肝再生に関与しているかについては不明である。

LT は種々の標的細胞のレセプターを介してその作用を発現することが明らかにされている^{40)~42)}。木岡ら⁴³⁾は、肝細胞には LTC₄のレセプターは存在するが LTB₄のレセプターは存在しないことを報告している。また溝口ら⁴⁴⁾により、試験管内実験で LTC₄が直接肝細胞障害を誘発することが明らかにされている。このことより LTB₄は炎症細胞や免疫担当細胞を介して間接的に、LTC₄はそれに加え肝細胞に直接的に作用して肝再生に関与していると推測される。

本研究では障害肝での肝切除後の肝再生を検討する目的で閉塞性黄疸肝切除モデルを行った。本実験では、肝ミトコンドリア機能障害が出現する胆管結紮切断後 7 日目に肝切除を施行した⁴⁵⁾⁴⁶⁾。閉塞性黄疸肝の再生については多くの報告がある。Higgins ら⁴⁷⁾および Mann ら⁴⁸⁾は、閉塞性黄疸肝切除後の肝再生は正常肝切除後の肝再生に比べ低下すると報告している。Cameron⁴⁹⁾は、ラットの肝細片を大網に自家移植した場合、正常ラットの肝細片では肝細胞の増殖を認めるが、閉塞性黄疸ラットの肝細片では肝細胞の増殖を認めなかったと報告している。一方、Ferguson ら⁵⁰⁾は、肝重量、蛋白含量、細胞分裂活性より検討し、正常肝よりも閉塞性黄疸肝切除後の再生力は強いと報告し、Weinbreit⁵¹⁾も胆管結紮は肝実質細胞の再生を抑制しないと報告しており、閉塞性黄疸の再生については意見の一致を見ず不明な点が多い。

本研究では血清トランスアミナーゼ値は、正常肝切除群と同様に閉塞性黄疸肝切除群でも AA-861 投与群で有意に低値を示し、閉塞性黄疸肝切除においても 5-リポキシングナーゼ代謝阻害によって炎症反応の改善が得られることが示された。また、BrdU 染色では、閉塞性黄疸作成により両群とも肝切除前に S 期細胞の出現を認め、山内ら⁵²⁾の報告と同様に胆汁うっ滞による肝障害によって肝再生が刺激されることが示唆された。さらに、BrdU L. I. での検討では、閉塞性黄疸肝切除後 12 時間、および 24 時間で AA-861 投与群が非投与群に比べ有意に高値を示し、正常肝切除群と同様に 5-リポキシングナーゼ代謝阻害により DNA 合成が促進されることが示唆された。

一方、血中 LTB₄ 値は、両群とも閉塞性黄疸により肝切除前に有意に高値を示しており、胆管結紮による胆汁の腸管内排泄の中断により LTB₄の上昇が認められた。LTB₄は、肝切除後 12 時間、24 時間までは AA-861 投与群が非投与群に比べやや低値を示すものの両群とも高値で推移した。血中 LTB₄ 値に差が認められない肝切除後 12、24 時間において血清トランスアミナーゼ値や BrdU L. I. が AA-861 投与群において良好であったことより、LTB₄よりも LTC₄系が閉塞性黄疸肝切除後の肝再生や肝の炎症反応により大きな影響を与えていることが示唆されたが、これは、閉塞性黄疸肝切除という特殊性によるものか、あるいは AA-861 の投与量によるものかについては不明であり今後の検討が必要と考えられる。また Trams ら⁵³⁾のラットの胆管結紮後の肝組織の経時的変化についての報告では、胆管閉塞後 3 日では肝細胞の壊死と再生像を認めるものの、経過とともに肝細胞壊死が増加し、閉塞後 28 日には著明な壊死が目立ち肝細胞の再生像は認められなくなる。木村ら⁵⁴⁾も、黄疸肝切除後の DNA 合成能は胆管閉塞 5 日間よりも 10、14 日間のほうが著明に抑制されており、胆管閉塞解除後も DNA 合成能が長期にわたり抑

制されたと報告している。閉塞性黄疸期間と肝再生には密接な関連があり、5-リポキシングナーゼ代謝阻害が閉塞性黄疸肝再生に及ぼす効果をみるうえでも、さらに長期の胆管閉塞期間のモデルによる検討が必要であると考えられる。

結 論

ラットにおいて正常肝および閉塞性黄疸肝 70% 切除群を作成し、肝再生時における血中 LTB₄ 値の推移を検討するとともに、5-リポキシングナーゼ代謝阻害剤 AA-861 を投与し、肝再生時の血中 LTB₄ 値、血清トランスアミナーゼ値および DNA 合成能に及ぼす影響について検討し、以下の成績をえた。

1. 血中 LTB₄ 値は、正常肝切除群において、肝切除後 12、24 時間に上昇を認め、AA-861 の投与により上昇が有意に抑制された。

2. 閉塞性黄疸肝切除群においては、肝切除前より血中 LTB₄ 値の上昇を認め肝切除後も高値を維持した。AA-861 の投与により血中 LTB₄ 値は AA-861 非投与群より全般に低下し、肝切除後 48 時間において有意に低値を示した。

3. 血清トランスアミナーゼ値の推移では、正常肝切除群、閉塞性黄疸肝切除群とも、AA-861 投与群において肝切除後 12 時間、24 時間で非投与群よりも有意に低値を示した。

4. BrdU L. I. の検討からは、正常肝切除群では、肝切除後 24 時間をピークとする DNA 合成の亢進が認められた。AA-861 投与群では非投与群に比べて肝切除後 24、48 時間で有意に BrdU L. I. の上昇が認められた。

5. 閉塞性黄疸肝切除群では、正常肝切除群と同様に肝切除後 24 時間をピークとする BrdU L. I. の上昇が認められた。AA-861 投与群では非投与群に比べて肝切除後 12、24 時間で BrdU L. I. は有意に上昇していた。

以上より、肝切除後の肝再生における LTB₄ の関与が示唆されるとともに、5-リポキシングナーゼ代謝阻害剤 AA-861 の投与により、肝切除後早期の DNA 合成促進と炎症反応の改善が認められ、正常肝および閉塞性黄疸肝での肝切除後の肝再生におけるその有効性が推測された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御指導、御教示をいただいた泉良平博士、および教室の諸兄に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は第 32 回日本消化器病学会大会 (奈良) にて発表した。

文 献

- 1) Miura, Y. & Fukui, N.: Prostaglandins as possible triggers on liver regeneration after partial hepatectomy. *Cell. Mol. Biol.*, 25, 179-184 (1979).
- 2) 三浦義彰, 福井紀子: 肝再生のきっかけ. *千葉医学*, 57, 99-104 (1981).
- 3) Rixon, R. H. & Whitfield, J. F.: An early mitosis-determining event in regenerating rat liver and its possible mediation by prostaglandins or thromboxane. *J. Cell. Physiol.*, 113, 281-288 (1982).
- 4) McNeil, G. E., Chen, T. S. & Leevy, C. M.: Reversal of ethanol and indomethacin-induced suppression of hepatic DNA synthesis by 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂.

Hepatology, 5, 43-46 (1985).

5) Samuelsson, B.: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220, 568-575 (1983).

6) Goodwin, J. S.: Regulation of T cell activation by Leukotriene B₄. *Immunol. Res.*, 5, 233-248 (1986).

7) Atluru, d. & Goodwin, J. S.: Leukotriene B₄ causes proliferation of Interleukin 2-dependent T cells in the presence of suboptimal levels of Interleukin 2. *Cell. Immunol.*, 99, 444-452 (1986).

8) Mangino, M. J., Jendrisak, M. D. & Brunt, E.: Eicosanoid synthesis inhibition and renal allograft function. *Transplantation*, 45, 902-907 (1988).

9) Jordan, M. L., Carlson, A., Hoffman, R. A. & Simmons, R. L.: Lipoxygenase pathway inhibition impairs the allograft response. *Surgery*, 102, 248-255 (1987).

10) 阪上吉秀, 溝口靖紘, 河田則文, 久保田広志, 関 守一, 小林絢三, 申 東桓, 武田 弘, 木岡清秀, 市川裕三, 森澤成司, 門奈丈之, 山本祐夫: 慢性肝炎患者における末梢静脈血中ロイコトリエンについて. *炎症*, 8, 247-249 (1988).

11) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Seki, S., Kobayashi, K., Yamamoto, S. & Morisawa, S.: Protective effects of a leukotriene inhibitor in an experimental massive hepatic cell necrosis model. *Gastroenterol. Jpn.*, 23, 263-267 (1988).

12) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Path.*, 12, 186-202 (1931).

13) Bucher, N. L. & Swaffield, M. N.: Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 72, 1157-1160 (1975).

14) Bucher, N. L. & Swaffield, M. N.: Synergistic action of glucagon and insulin in regulation of hepatic regeneration. *Adv. Enz. Regul.*, 13, 281-293 (1975).

15) Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. & Fisher, E. R.: A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science*, 171, 575-577 (1971).

16) 菅原克彦, 三谷 進: 肝再生時の肝臓相関に関する基礎的研究. *日外会誌*, 78, 989-993 (1977).

17) 藤原研司, 佐藤 讓: GI 療法の理論的・実験的裏付け. *肝胆膵*, 17, 799-805 (1988).

18) Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Meyer, U. A.: Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional Studies. *J. Cell Biol.*, 59, 722-734 (1973).

19) Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A.: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1450-1459 (1984).

20) Nakamura, T., Teramoto, H. & Ichifara, A.: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 6489-6493 (1986).

21) Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A., Kaise, N. & Nishino, T.: Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *Febs Lett.*, 224, 311-316 (1987).

22) Samuelsson, B.: Leukotrienes and related compounds. *In* O. Hayashi & S. Yamamoto (eds.), *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, 15th ed., p1-9, Raven Press, New York, 1985.

23) Bray, R. A. & Brahmi, Z.: Role of lipoxygenation in human natural killer cell activation. *J. Immunol.*, 136, 1783 (1986).

24) Jordan, M. L., Hoffman, R. A. & Simmons, R. L.: Leukotriene B₄ augments IL-2-dependent proliferation of T lymphocyte clones. *Transplant. Proc.*, 18, 224 (1986).

25) Weller, P. F., Lee, C. W., Foster, D. W., Corey, E. J., Austen, K. F. & Lewis, R. A.: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes human eosinophils: predominant production of leukotriene C₄. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 7626-7630 (1983).

26) Verhagen, J., Bruynzeel, P. L. B., Koedam, J. A., Wassink, G. A., Boer, M., Terpstra, G. K., Kreukniet, J., Veldink, G. A. & Vliegthart, F. G.: Specific leukotriene formation by purified human eosinophils and neutrophils. *Febs Lett.*, 168, 23-28 (1984).

27) Williams, J. D., Czop, J. K. & Austen, K. F.: release of leukotrienes by human monocytes on stimulation of their phagocytic receptor for particulate activators. *J. Immunol.*, 132, 3034-3040 (1984).

28) Lewis, R. A. & Austen, K. F.: The biologically active leukotrienes. *J. Clin. Invest.*, 73, 889-897 (1984).

29) Perez, H. D., Roll, F. J., Bissell, D. M., Shak, S. & Goldstein, I. M.: Production of chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes by cultured rat hepatocytes exposed to ethanol. *J. Clin. Invest.*, 74, 1350-1357 (1984).

30) Rola-Pleszczynski, M.: Immunoregulation by leukotrienes and other lipoxygenase metabolites. *Immunol. Today*, 6, 302-307 (1985).

31) Rola-Pleszczynski, M. & Lemaire, I.: Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol.*, 135, 3958-3961 (1985).

32) Rola-Pleszczynski, M., Bouvrette, L., Gingras, D. & Girard, M.: Identification of interferon- γ as the lymphokine that mediates leukotriene B₄-induced immunoregulation. *J. Immunol.*, 139, 513-517 (1987).

33) Decker, K. & Birmelin, M.: Ca²⁺ mediates phagocytosis-evoked eicosanoid synthesis in Kupffer cells. *In* P. Braquet, R. P. Garay, J. C. Frolich & S. Nicosia (eds.), *Prostaglandins and Membrane Ion Transport*, 1st ed., p113-118, Raven Press, New York, 1984.

34) Haggmann, W., Steffan, A. M., Kirn, A. & Keppler, D.: Leukotrienes as mediators in Frog Virus 3-induced hepatitis in rats. *Hepatology*, 7, 732-736 (1987).

35) Keppler, D., Haggmann, W., Rapp, S., Denzlinger, C. & Koch, H. K.: The relation of leukotrienes to liver injury.

Hepatology, 5, 883-891 (1985).

- 36) 小野 稔, 卜部貴光, 紙谷晋吾, 雁木淳一, 田中紀章, 折田薫三: 肝部分切除による腫瘍および自己細胞に対する免疫応答の誘導. 消化器と免疫, 17, 119-123 (1986).
- 37) Stipan, J., Biserka, R. S., Mira, C. & Nives, J.: Class II antigen induction in the regenerating liver of rats after partial hepatectomy. Transplantation, 44, 165-168 (1987).
- 38) 佐藤好信, 井上純雄, 長尾 桓, 吉田圭介, 秋山暢夫, 武藤輝一: 再生肝組織におけるクラス II 抗原の発現と Cyclosporine の影響. 日消外会誌, 24, 172 (1991).
- 39) 門奈丈之, 溝口靖紘, 河田則文: アラキドン酸カスケードと肝障害. 肝胆膵, 19, 191-200 (1989).
- 40) Baud, L., Koo, C. H. & Goetzi, E. J.: Specificity and cellular distribution of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene C₄. Immunology, 62, 53-59 (1987).
- 41) Goldman, D. W. & Goetzi, E. J.: Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. J. Exp. Med., 159, 1027-1041 (1984).
- 42) Hogaboom, G. K., Mong, S., Hsiao-Ling, W. & Crooke, S. T.: Peptideleukotrienes: Distinct receptors for leukotriene C₄ and D₄ in the guinea pig lung. Biochem. Res. Commun., 116, 1136-1143 (1983).
- 43) 木岡清英, 溝口靖紘, 市川裕三, 阪上吉秀, 小林絢三, 森沢成司, 山本祐夫: ラット分離肝細胞のロイコトリエンレセプターについて. 肝臓, 32, 63-66 (1991).
- 44) 溝口靖紘, 久保井広志, 李 載, 申 東桓, 宮島慶治, 阪上吉秀, 関 守一, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司: 肝障害の誘導におけるロイコトリエンの関与. 肝臓, 28, 119 (1987).
- 45) 菅原克彦, 河野信博, 三谷 進, 岩月 淳, 長尾 桓, 金高伸也: 閉塞性黄疸のもたらす肝障害と外科的治療効果の病態

生理. 日消外会誌, 10, 736-742 (1977).

- 46) 大柳治正, 山下修一, 関田幹雄, 白川 勝, 中谷正史, 奥村修一, 手嶋和彦, 光野孝雄: 閉塞性黄疸の病態生理と新しい Parameter について. 日外会誌, 75, 1175-1177 (1974).
- 47) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver VI. Restoration of the liver after partial surgical removal and ligation of the bile duct in white rats. Arch. Path., 14, 42-49 (1932).
- 48) Mann, F. C., Fishback, F. C., Gay, J. G. & Green, G. F.: Experimental pathology of the liver, studies III, IV & V. Arch. Path., 12, 787-793 (1931).
- 49) Cameron, G. R.: Liver regeneration and biliary obstruction. J. Path. Bact., 41, 283-288 (1935).
- 50) Ferguson, C. C., Rogers, C. S. & Vars, H. M.: Liver regeneration in the presence of common bile duct obstruction. Am. J. Physiol., 159, 343-350 (1949).
- 51) Weinbren, K.: The effect of bile duct obstruction on regeneration of the rat's liver. Br. J. exp. Path., 34, 280-289 (1953).
- 52) 山内英生, 小山研二, 柏村征一, 松尾靖司, 高木 靖, 武藤 功, 音羽 剛, 大内清昭, 姉崎 功, 佐藤寿雄: Morphometry からみた外科的黄疸肝の病態. 日外会誌, 75, 1174 (1974).
- 53) Trams, E. G. & Symeonidis, A.: Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. Am. J. Pathol., 33, 13-27 (1957).
- 54) 木村文夫, 宮崎 勝, 宇田川郁夫, 越川尚男, 奥井勝二: 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).

Effects of 5-Lipoxygenase Pathway Inhibitor on Liver Regeneration in Normal and Icteric Liver Takashi Tani, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 450—458 (1993)

Key words hepatectomy, liver regeneration, Leukotriene, 5-lipoxygenase pathway inhibitor

Abstract

Leukotriene (LT) has been shown to play a key role in inflammation and immunological response *in vivo*. It also seems to be involved in various hepatic cellular disorders. However, the relation between LT and liver regeneration remains unknown. This study was therefore designed to experimentally examine the change in LTB_4 during liver regeneration following hepatectomy and the effect of a lipoxygenase pathway inhibitor on liver regeneration. In rats with normal liver or obstructive jaundice liver (icteric liver), blood LTB_4 levels, serum transaminase values and DNA synthetic capability were determined chronometrically during liver regeneration following 70% hepatectomy. Blood LTB_4 concentrations increased 12 and 24 hours after hepatectomy in rats with a normal liver. The increases in LTB_4 concentrations were significantly inhibited by AA-861. In rats with icteric liver, blood LTB_4 increased even before hepatectomy, and remained at high levels after hepatectomy. These levels were lower in AA-861-treated rats than those in untreated rats, and were significantly lower even 48 hours after hepatectomy. Serum transaminase values were also significantly lower in AA-861-treated rats with normal or icteric liver than those in untreated rats. As an estimation for DNA synthetic capability, 5-bromodeoxyuridine labeling index (BrdU L. I.) was determined. BrdU L. I. was higher 24 and 48 hours after hepatectomy in AA-861-treated rats with a normal liver as compared with untreated rats. In AA-861-treated rats with icteric liver, BrdU L. I. was significantly higher 24 hours after hepatectomy than in untreated rats. These results indicate the involvement of LT in liver regeneration after hepatectomy. Based on the evidence that administration of the 5-lipoxygenase pathway inhibitor AA-861 promotes DNA synthesis and represses inflammatory reaction soon after hepatectomy, it is suggested that AA-861 effectively promotes liver regeneration after excision of normal and icteric liver.