

氏名 (本籍)	足立 尊 仁 (愛知県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 339 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	The characterization of certain hepatocyte-proliferating and/or protective factors induced by the sensitization of freezing-thawing hepatic tissue
審査委員	(主査) 教授 佐 治 重 豊 (副査) 教授 武 藤 泰 敏 教授 野 澤 義 則

### 論 文 内 容 の 要 旨

組織損傷により誘導される炎症性サイトカインなどのメディエータの中にはTGF- $\beta$ やEGFなどの増殖因子も含まれており、その多寡により組織修復か臓器障害かが規定されると考えられている。ところで悪性腫瘍の凍結手術時には、凍結融解された腫瘍壊死組織が長く体内に停滞し持続的な抗原刺激を行うが、この場合、少量凍結時には抗腫瘍免疫機構が誘導され腫瘍増殖を抑制するが、大量凍結時には逆に負の免疫活性増強状態となり腫瘍増殖を促進させる可能性が指摘され、教室でもこの現象の存在を種々検討・確認してきた。ところで、拡大肝切除時や硬変併存肝癌手術時の術後肝障害発生時、あるいは炎症性疾患などに伴う肝不全発症時には速やかな肝再生が必要であるが、現段階では優れた治療法は確立されていない。そこで、上記凍結融解処理時の腫瘍増殖促進作用にヒントを得て、肝組織を凍結融解処理することにより肝細胞に対し増殖促進作用を示すナチュラル型の増殖因子が誘導されると仮定して、その増殖促進作用の存在を確認した上で、肝細胞に対する保護作用の可能性をも併せて検討した。すなわち、凍結融解処理肝組織で感作したラット血清(感作血清)が初代培養肝細胞の増殖を促進させることを確認した。また、四塩化炭素による肝細胞傷害に対してMTT assayおよび肝細胞培養上清中へのAST, ALT, LDHなどの酵素逸脱量から凍結感作血清の保護作用の可能性を評価した。その結果、凍結感作血清は肝細胞増殖促進作用のみではなく、障害肝細胞に対しても保護作用を示す可能性が示唆された。

#### 研究対象と研究方法

Fisher系344雄性ラット肝臓を3~5mm角に細切し、液体窒素を用い-180℃で2回凍結融解操作を行った後、その約2,000mgを同系ラット大腿部皮下へ注入移植し、1, 7, 14, 21日目に採血、分離した血清を凍結感作血清として実験に供した。また、酵素灌流法により採取したラット初代培養肝細胞(viability 90%以上)を5% FCSとインスリンおよびデキサメタゾン添加WE培地で前培養後、無血清、無ホルモン添加培地で後培養した。次いで、培地内に凍結感作血清を添加して一定期間培養後、肝細胞増殖活性を<sup>3</sup>H-thymidineを用いた複製DNA合成活性から評価し、さらに健常血清、70%肝切除後24時間目に採取した肝切除後血清、および10ng/mlの肝細胞増殖因子(rh-HGF)をそれぞれ添加し同様方法で増殖活性を測定後互に比較検討した。また、肝細胞障害は四塩化炭素を添加した培地で作製し、その障害程度をMTT assayおよびAST, ALT, LDHの培養上清中への逸脱量から評価した。

#### 研究結果

1. 凍結感作後1, 7, 21日目に採取した血清を添加した場合、肝細胞増殖活性は観察されなかったが、14日目に採取した血清を添加した場合には有意( $p < 0.01$ )の増殖活性を示した(無添加群の3.8倍)。
2. 凍結感作後14日目の血清を添加した場合には濃度依存性に肝細胞の増殖促進が観察された。
3. 肝細胞の増殖活性は、凍結感作血清添加時が健常血清に比べ有意( $p < 0.01$ )の高値を示したが、70%肝切除後血清とはほぼ同程度で、肝細胞増殖因子(rh-HGF 10ng/ml)より若干低値であった。
4. MTT assayにおいて、四塩化炭素は濃度依存性かつ添加時間依存性に肝細胞を障害した。

5. 肝細胞培養時に四塩化炭素を添加し12時間前培養後、凍結感作血清を添加するとMTT assay上、肝細胞障害の抑制が観察された。
6. 四塩化炭素障害時の培養上清中AST, ALT, LDH値の逸脱量は凍結感作血清添加により軽減し、肝細胞の保護作用の存在が示唆された。

#### 考察と結語

術後肝障害や肝不全に対する、肝再生の促進や肝保護の対策は重要な課題である。本研究においては、凍結融解処理肝組織を大腿部皮下に感作すると、宿主血清中に肝細胞増殖促進様因子および肝細胞保護因子が誘導される可能性が示唆された。ところで、肝細胞増殖因子 (rh-HGF) にも細胞増殖活性および細胞保護作用の存在が報告されている。しかし、実際の治療に際してのrh-HGF使用は癌細胞の増殖促進や肝細胞の癌化などの副作用の可能性が高く問題視されている。本研究では内因性に肝細胞の増殖促進や保護作用を有する因子の誘導が可能で、ナチュラル型因子として理想的な誘導法と推察している。なお、感作血清中には、種々の増殖因子やサイトカインなどのメディエータが多種混在しているため、これらが宿主生体防御系全般を調節、保持しながら肝細胞の再生・保護に役立っているものと推測されるので、今後各因子の生物学的特徴を蛋白レベルで解析する予定である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者足立尊仁は、肝組織を凍結融解処理後、ラット大腿部皮下へ注入移植感作することにより宿主血清中にrh-HGFで10ng/mlに近似する肝細胞増殖様因子の誘導に成功した。また、その証を肝細胞初代培養時の複製DNA合成活性の増強と四塩化炭素障害時の逸脱酵素の産生抑制程度から評価した。これらの研究結果は、術後肝障害や肝不全に対する新しい治療法の可能性を示唆するもので、肝臓病学の向上に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

The characterization of certain hepatocyte-proliferating and/or protective factors induced by the sensitization of freezing-thawing hepatic tissue

Surgery Today, 1997年発行予定