

肝再生の生体制御機構における  
応答とその操作による  
肝細胞増殖誘導に関する研究

(63480283)

平成元年度科学研究費補助金〔一般研究(B)〕研究報告書

平成2年3月

研究代表者 水戸 昶郎  
(旭川医科大学医学部)

肝臓は半分以上失われてもラットでは約1週間で、ヒトでは1～3か月後には元の大きさに復元する。この再生現象は肝のみならず多くの生物現象に共通したものであるが、高等動物においては肝臓がもっとも顕著である。

この肝再生は肝細胞の分裂増殖にほかならないが、その始動は急激であり、また数週間後には何事もなかったように終焉するきわめてスマートな増殖制御機構が働いている。このように肝再生はきわめてダイナミックな現象ではあるが、その基本はまさに細胞生物学現象である。一方、この再生状態を正確に把握し、その誘導促進をはかることが、肝外科をはじめ種々の肝障害の治療の根幹をなしていることから、肝疾患の治療に携わる臨床医にとっても肝再生は古くからの研究課題の一つでもあった。しかしこれまでの半世紀にわたる多くの先覚者の努力にもかかわらず、再生メカニズムは十分解明されていない。

その大きな理由は、これまでの研究が肝のみの局所的因子、現象の検索に終始していたことによると思われる。

本研究では肝再生は中枢神経、免疫、さらには内分泌と各生体反応系の有機的な連係調節機構に支配され、それによって発現される生体中枢と肝、門脈系を中心とした局所の応答現象であるというこれまでとは全く異なる次元からのアプローチを試みた。生体反応については、中枢神経の肝再生時の活動変化に焦点をあわせ、主として電気生理学的手法により検索した。同時に組織化学的方法により肝再生支配神経の同定と、肝の求心性支配神経である迷走神経肝臓枝の遮断による神経回路の存在の有無とその機能的役割について追求した。さらに神経細胞伝達物質とくに視床下部モノアミンの同定とその代謝について検索し、これらの実験結果をもとに肝再生の中枢神経支配機構についても解析した。一方、肝細胞はIN VITROにおいても分裂増殖すること、またインスリン、グルカゴンに代表される門脈内および血小板から遊出される肝再生促進因子によってその分裂増殖が促進されることなどからも、肝再生には肝細胞独自の、そして体液性因子による制御機構も作用していることも事実である。独自に開発した肝細胞脾内移植実験モデルでの移植肝細胞の分裂増殖はきわめて緩徐な持続的増殖としてとらえられ、上述した肝細胞独自の制御機能と、門脈内因子の関与について検索するうえで恰好の実験モデルとなった。最後に、網内系の主たる役割を担っているKupffer細胞機能と肝再生との関連性について、肝細

胞の環境因子の影響という観点から検索した。その結果についても併せて報告する。

本研究から興味にある多くの事実がえられ、肝再生についての新しい視点が開かれたと自負するが、最終的に中枢と局所の制御機構の有機的な関連性については今後の究明課題となった。諸先生方ご意見、ご批判をおおぎ、本研究をより充実したものとするべくさらに検索をすすめたい。

本研究成果は共同研究者の他に大学院学生の精力的な研究協力の賜である。むしろ彼らが積極的に研究を推進したといえる。深謝する同時に、さらなる発展を期待したい。

## 研 究 組 織

研究代表者：水戸廸郎	(旭川医科大学医学部	教授)
研究分担者：草野満夫	(旭川医科大学医学部	講師)
加藤一哉	(旭川医科大学医学部	助手)
河野 透	(旭川医科大学医学部	助手)
研究協力者：近藤啓史	(旭川医科大学医学部	助手)
稲葉 聡	(旭川医科大学医学部	大学院)
西田靖仙	(旭川医科大学医学部	大学院)
紀野修一	(旭川医科大学医学部	助手)

## 研 究 経 費

昭和63年度	3, 900千円
平成元年度	1, 700千円
計	5, 600千円

## 研 究 発 表

### 1. 学会誌等

#### 投稿雑誌

1. 日本外科学会雑誌 90(2);250-257,1989  
網内系賦活によるラット部分肝切除後の肝再生増強効果  
加藤一哉 葛西真一 水戸廸郎
2. 外科治療 60(1);271-279,1989  
肝癌の集学的治療—肝切除を中心として  
草野満夫 水戸廸郎
3. 消化器科 10(1);33-40,1989  
肝癌肝切除後の再発—生物学的悪性度からみた背景因子と対策  
草野満夫 水戸廸郎
4. 肝臓 30(3);345-351,1989  
脾内移植肝細胞の細胞動態と肝再生因子の影響  
草野満夫
5. 肝臓 29(5);637-642,1988  
FCMによるパラフィン包埋組織の細胞核DNA量測定法  
紀野修一 草野満夫 水戸廸郎
6. 肝臓 29(6);771-779,1988  
肝部分切除後の肝実質細胞の増殖に及ぼす副交感神経性因子の役割  
紀野修一
7. 肝臓 26(12);1715-1716,1985  
肝再生機構における自律神経系の役割についての研究  
河野 透 草野満夫 水戸廸郎
8. 医学のあゆみ 137(11);861-866,1986  
肝再生時における中枢神経系の役割  
水戸廸郎 河野 透 森 茂美
9. 臨床肝臓病学  
肝臓の特異的療法  
水戸廸郎 草野満夫

10. 肝類洞壁細胞研究の進歩 2;181-185,1989

F C MによるKupffer 細胞の貪食能の解析

加藤一哉 山口秀則 草野満夫

学会発表

1. 24th Congress of European Society for Surgical Research

Prognostic significance of nuclear DNA content in  
hepatocellular carcinoma

M.Kusano, A.Kushibe, M.Mito

2. 25th Congress of European Society for Surgical Research

Monoamine metabolism in hypothalamus after partial  
hepatectomy in rats studied with a microdialysis technique

S.Inaba, M.Mito, S.Mori

3. 第25回日本肝臓学会総会

F C Mを利用したKupffer 細胞貪食能の新しい解析法

加藤一哉 草野満夫 水戸廻郎

4. 第13回器官形成学会—シンポジウム

脾内肝組織構築過程における脾内内皮細胞の役割

草野満夫

5. 第67回日本生理学大会

ラット肝部分切除後早期における視床下部モノアミン代謝

稲葉 聡 水戸廻郎 森 茂美

6. 第15回急性肝不全治療研究会

F C Mによる四塩化炭素急性肝障害及び肝再生の解析

木下 透 草野満夫 水戸廻郎

7. 第7回FCM-cell Biology研究会

In vivo Brdu pulse labelling法による再生肝細胞動態の解析

木下 透 草野満夫 水戸廻郎

8. 第2回肝再生研究会

肝再生機能における自律神経系の役割

河野 透 草野満夫 水戸廻郎

## A. 肝切除時にみられる生体反応の検索—中枢神経系

生体の一部が失われたとき、その再生現象が最も顕著に現われるのは、物質代謝の中心である肝臓である。すなわちこれは内部環境の恒常性維持に不可欠な存在である肝臓に賦与された特性にほかならない。内部環境の恒常性の維持、ホメオスターシスが、各種生体反応系の活動によるとの観点にたてば、恒常性の維持の一環といえる再生現象をとらえるために、これら生体反応系の役割を解明することが必須である。

さて生体反応系の肝再生時における重要性については、Insulin に代表される体液性因子の解明が積極的にすすめられているのに対し、神経性因子の関与に関する究明は、約30年前までは皆無に等しいものであった。

しかしながら、1960年代以降電子顕微鏡の導入、Falk-Hillap 法による catecholaminergic 神経の同定法の開発などにより、肝内神経支配の研究も飛躍的に前進することとなった。特に交感神経の分布については門脈・肝動脈の血管壁に分布することが明らかとなったが、肝再生との関連では生理的二重血行支配下にあるため大きな役割をもっていないとする意見が大勢を占めている。

一方副交感神経系はその解剖学的分布が肝実質であることが明らかとなり、各種代謝調節特に直接肝再生と関連する核酸代謝に大きな影響をもつことが注目され、肝再生に対する自律神経系の影響を解明する上で、この機能を知ることが重要な課題となった。

沖中らは、腹部迷走神経切除により肝切後の肝再生率が有意差をもって低下することを報告し、肝実質を支配する副交感神経系が肝再生機構に重要な役割を担っている可能性を初めて示唆した。また、Lamar らは迷走神経切除により、残存肝細胞のDNA合成亢進の開始が対照に比べ有意に遅れ、かつピーク値も著しく抑えられると報告した。

このように、末梢神経系へのアプローチにより、副交感神経系の肝再生に対する影響はある程度解明されてきたものの、より正確な作用について論じるためには中枢神経系についての解析が必要である。しかしながらこの種の研究は皆無に等しく、そこで私たちは組織化学的手法・電気生理学的手法を用いてこれらの解析を積極的におこなってきたのでここに報告する。

## I. 組織化学的手法による肝再生制御神経細胞の同定。

### (a) H R P 法

#### < 方法 >

今回はHRP (Horseradish Peroxidase) をWister系Rat の迷走神経肝臓枝の切断中枢端より取り込ませ、48時間後灌流固定しその後脳幹の連続切片を作製し標識細胞及び神経終末の脳幹内分布の同定を試みた。

#### < 結果 >

延髄左側の迷走神経背側核の外側1/3 に沿って、約150-200 個の紡錘形をした標識細胞を認めた。また、迷走神経背側核内の標識細胞だけでなく、非標識細胞にも近接して多数の標識神経終末が認められた。(b) W G A - H R P 法

#### < 方法 >

さらに標識能力が40倍であるWGA (Wheat Germ Agglutinin)-HRPを用い同様に脳幹の標識細胞の同定を行なった。

#### < 結果 >

標識細胞は両側の視床下部外側野に限局して約50-100個認められた。さらに、両側の視床下部室傍核と弓状核に多数の標識神経終末が同定できた。これらの結果から、肝再生機能の調節などに延髄迷走神経背側核と視床下部外側野という二つの中枢が関与し、それぞれが有機的連関をもって存在していることが推測された。

## 2. 中枢神経活動電位の誘導・記録

私たちは組織学的に解析した神経回路網の存在を機能的面から証明するために電気生理学的を用いて検索した。

### (a) 迷走神経肝臓枝の電気刺激

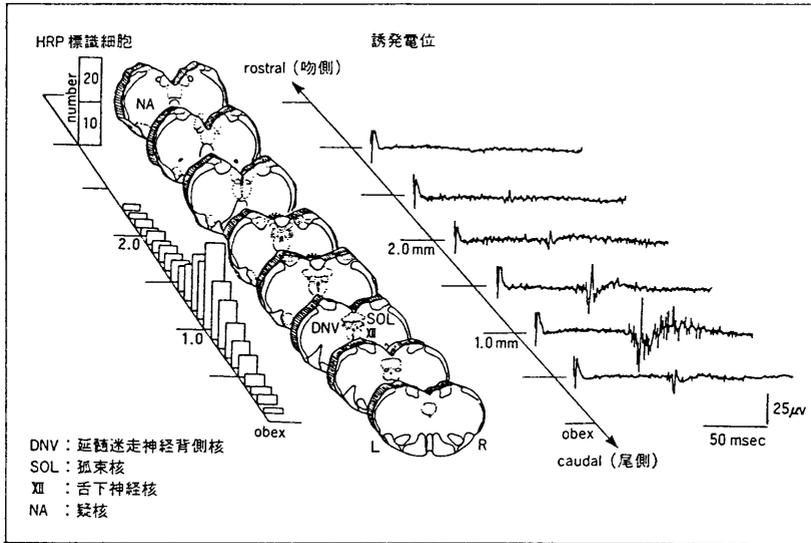
#### <方法>

Wister 系Rat の迷走神経肝臓枝に電気刺激用の双極銀線電極を装着したのち、頭部を脳固定装置に固定しHRP 標識細胞が多数認められた延髄左側迷走神経背側核に微小ガラス管電極を挿入し、肝枝の微小電気刺激で誘発される誘発電位を導出記録した。

#### <結果>

肝枝の電気刺激に対応し持続約10-70msec の多峰性の誘発電位が約80-100 msecの潜時で認められた。またこの誘発電位の振幅・持続は標識細胞数の分布

に比例していた。(図1)



延髄迷走神経背側核 (DNV) 内の HRP 標識細胞数と肝枝電気刺激応答誘発電位記録

図 1

### (b) 視床下部外側野の電気刺激

#### <方法>

WGA-HRP 標識細胞が同定された視床下部外側野に微小電気刺激を加え、延髄左側迷走神経背側核から誘発電位を導出・記録した。

#### <結果>

視床下部外側野の電気刺激に対応し迷走神経背側核から約20-40msec の潜時に単峰性の誘発電位が記録された。

### 3. 肝切除時の中枢神経活動電位の記録

同定しえた延髄左側迷走神経背側核内の神経細胞は、通常2-4pulses/s の安定した自発発射活動を有しているが、肝再生時にどのような動態を示すか検討

を行なった。

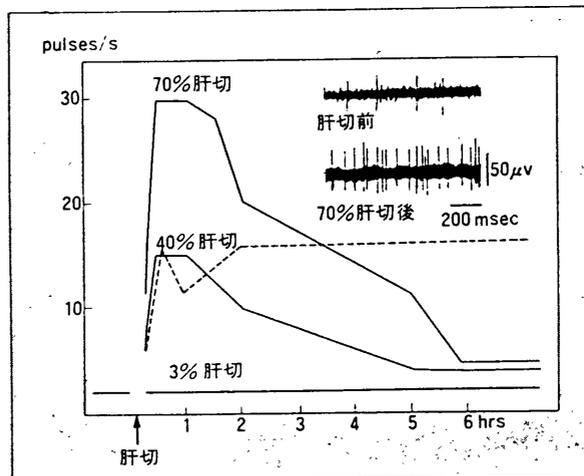
〈方法〉

Wister系Rat に3・40・70%肝切を施行した群及び開腹手術のみのsham手術群において手術後の迷走神経背側核での神経細胞の自発発射活動を導出した。

〈結果〉

70%肝切群では肝切直後より神経細胞の活動発射頻度は20-40pulses/sへと急増し、1時間そのピークを維持した後、前値に回復した。40%肝切群ではその発射頻度は肝切直後より10-20pulses/sと、70%肝切群に比べ中等度の増加を示した。

しかしながらDNA合成をはじめとする肝再生現象が惹起されない3%肝切群及びsham手術群では発射頻度の増加を認めなかった。(図2)



肝切前後の迷走神経背側核ニューロンの活動変化

実線：左側迷走神経背側核ニューロン

破線：右側迷走神経背側核ニューロン

#### 4. 肝切除時の膵臓・小腸支配神経活動電位の記録

肝再生初期時における膵臓・小腸の神経活動を記録し肝再生の門脈系臓器に対する影響を調べた。

##### <方法>

肝臓支配神経細胞を同定したのと同様の方法で、延髄右側迷走神経背側核内の膵臓・小腸支配神経細胞の肝切前後における自発発射活動を導出した。

##### <結果>

神経細胞の自発発射頻度は、肝切前に4-6pulses/sであったのに対し肝切後には10-20pulses/sと増大し、その後これを維持した。

#### 5. 特殊蛍光標識物質を用いた中枢神経内肝膵連関の組織学的検索

そこで私たちは、肝再生制御細胞の自発発射活動の亢進が、膵臓支配神経細胞の自発発射活動の亢進をもたらす結果から、両者の解剖学的連関の存在の有無を確認するために、特殊蛍光標識物質を用いて解析を行なった。

##### <方法>

HRPを用いて肝再生制御細胞を同定したのと同様の方法にて迷走神経肝臓枝に赤色、膵臓枝に緑色標識物質を取り込ませ、それぞれの脳内神経細胞及び神経突起・神経終末を標識した。

##### <結果>

延髄迷走神経背側核内には、赤色に染色された肝由来の神経細胞・緑色に染色された膵由来の神経細胞が認められた。さらに両者は非常に近接して存在し電子顕微鏡を使った検索によりシナプス接合が確認され、脳内における肝膵連関の存在を解剖学的に証明することができた。(図3)

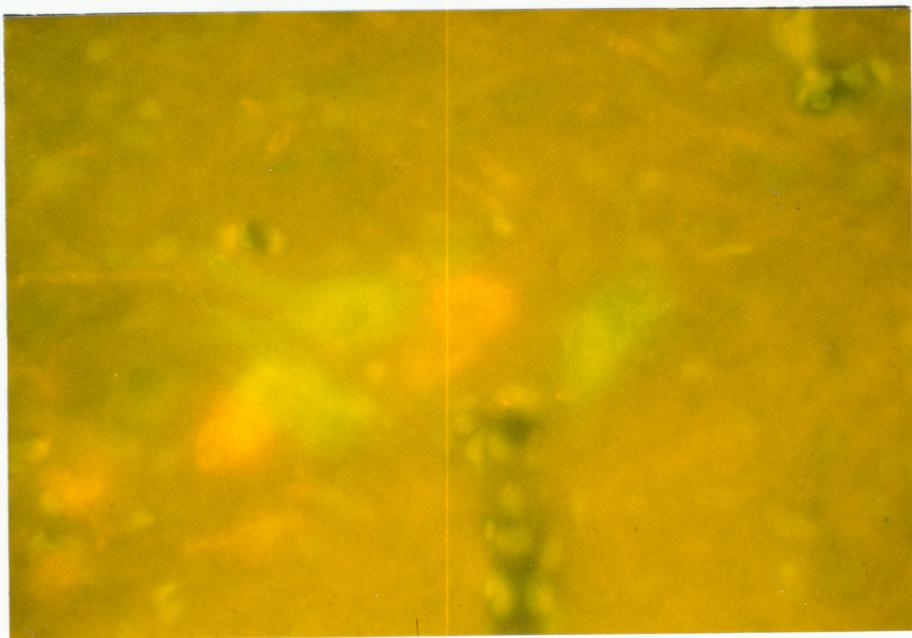


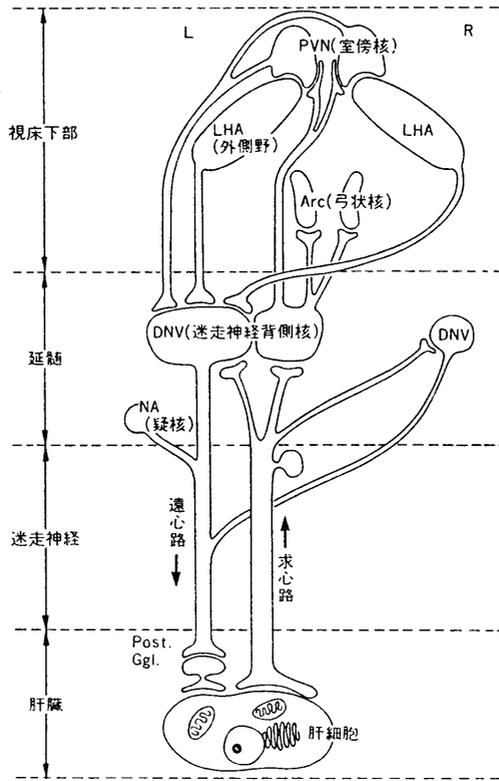
図 3

## 6. まとめ

今回私たちは組織学的及び電気生理学的検索により、肝臓・延髄・視床下部の線維連絡を機能的に証明し、肝臓と延髄迷走神経背側核、背側核と視床下部との間の独立した閉鎖神経回路網の存在を明らかにした。

この事実は背側核から肝臓への出力が肝臓からの求心性信号によってもフィードバック的に調節されている可能性を示唆している。また視床下部がより上位中枢として、迷走神経背側核と肝臓の神経回路網の働きを修飾していることが考えられる。視床下部は摂食中枢など様々な中枢として内臓諸器官の機能を調節していることが明らかにされており、肝臓との神経回路網の存在も肝臓機能の恒常性を保つ上で興味深い存在であり、これらの機能的役割についての解明が必要と考えられる。さらに肝再生時に肝臓の支配神経細胞と門脈系臓器支配神経細胞の活動に強い相関が認められたが、この門脈系臓器がInsulin・

小腸由来因子など主だった体液性因子の分泌に強く関与していることから、この活動の変化が神経性因子と体液性因子の接点となる可能性を示すものである。(図4)



肝臓と脳の間で同定した神経回路網の模式図

図 4

## 7. まとめ

肝再生機構を自律神経系の視点から解析した結果、中枢神経系がその「初期認識」「始動」に重要な役割を果たしていることが明らかとなったが、今後はさらに研究をすすめて、従来神経性因子とは切り離して考えられていた体液性因子など各種生体反応系との関連について解明していくことが必要である。

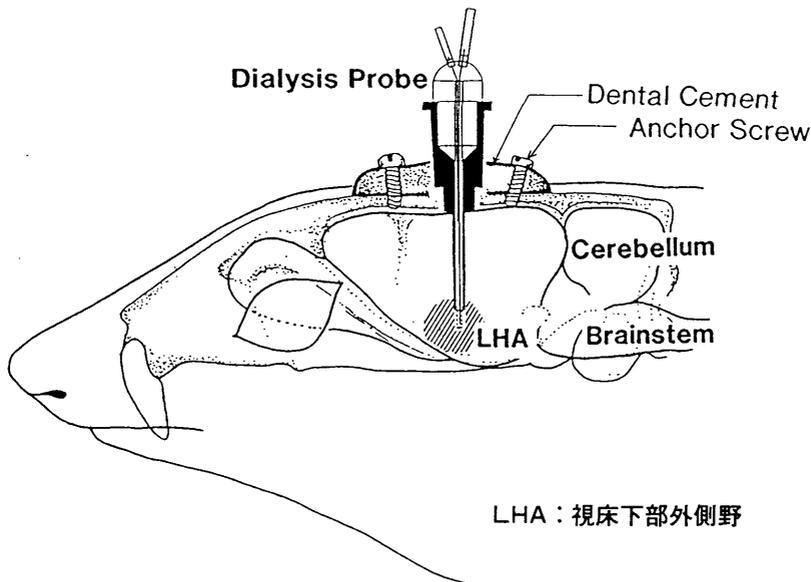
## B. 肝再生時の神経細胞伝達物質の同定

肝部分切除後早期における視床下部モノアミン代謝の解析

— Microdialysis 法による —

<目的> 肝再生時における脳内神経伝達物質の変動動態の解析を試みた。本実験では、迷走神経肝臓枝の上位中枢である視床下部外側野に着目し、肝部分切除後早期の再生過程にともなうモノアミン代謝の変動動態を解析した。その方法として、無麻酔下で動物の行動を観察しながら脳局所の細胞間隙に放出される神経伝達物質とその代謝産物を半透膜を介して連続的に測定できる microdialysis 法を用いた。

<方法> 実験には、一定の日内周期（明期 5:00-19:00）で飼育したウイスター系雄性成熟ラット（250g-350g）を用いた。まず、測定の前1-3日前に脳透析プローベの外筒を視床下部外側野に埋め込み固定した（図5）。測定日、先端に半透膜（外径 250 $\mu$ m, 分画分子量 5000, 長さ 2.0mm）を有する自作の脳透析プローベを外筒内に刺入し透析を開始した。透析液にはリンゲル液を用い、2 $\mu$ l/minの流速で灌流した。灌流は30分毎に手術前1.5時間、手術後6時間連続的に行なった。回収した透析液の分析は電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフを用いて行ない、モノアミンとその代謝産物を分離、測定した。70%肝部分切除群とシャム群の2群を経時的に比較検討した。



LHA：視床下部外側野

<結果>透析液の分析においては、Norepinephrine (NE)と、Dopamine (DA)の代謝産物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), Homovanillic acid (HVA), 及び Serotonin (5-HT) の代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の4種類が主に検出された(図6)。NE, DOPAC, HVAの3種類は、両実験群において明らかな差は認められなかった。5-HIAAは、肝切除群において肝部分切除約90分後から有意な増加を示した(図7)。

セロトニン代謝動態の指標となる5-HIAAの増加は、少なくとも視床下部外側野におけるセロトニン代謝が、肝部分切除後早期の再生過程において亢進していることを示している。

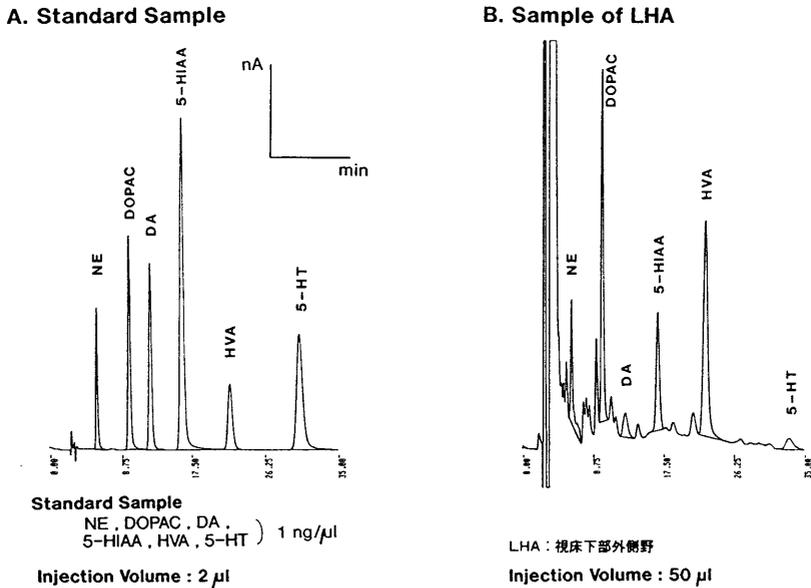


図 6

### D. 5-HIAA

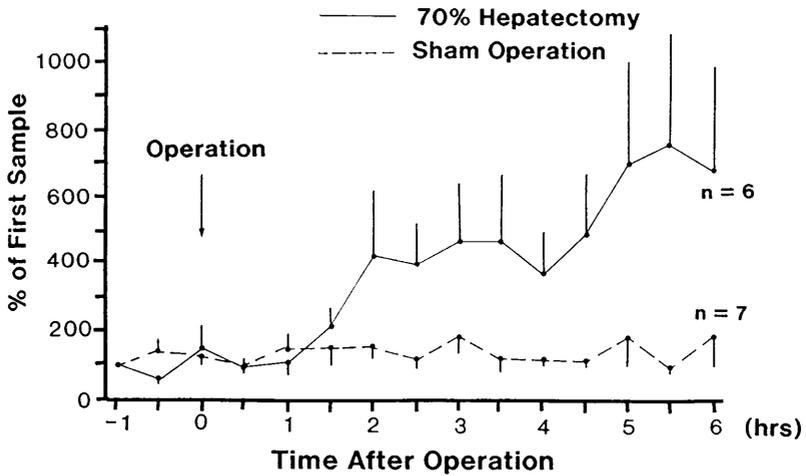


図 7

(以下の研究成果については発表論文の別冊を添付したので参照されたい。)

C. 肝部分切除後の肝実質細胞の増殖に及ぼす副交感神経の役割

(添付別冊-1)

D. 脾内移植肝細胞の細胞動態と肝再生因子の影響

(添付別冊-2)

E. 網内系賦活によるラット肝部分切除後の肝再生増強効果

(添付別冊-3)

## 本研究のまとめ

肝再生は肝組織の欠損、肝細胞障害時にみられる代償修復現象である。この肝再生を促進し、肝機能の早期回復を計ることが急性、慢性肝障害の治療の中心となる。本研究は肝再生は中枢神経を中心とした各生体反応系と肝の局所的制御との有機的な連係調節機構に支配され、それによって発現される生体の応答現象、すなわち肝再生現象を従来の概念とは全く異にする”生体の恒常性破綻に対する生体および局所的反応”という新しい概念に基づいたものである。今回、組織学的及び電気生理学的検索により、肝臓・延髄・視床下部の線維連絡を機能的に証明し、肝臓と延髄迷走神経背側核、背側核と視床下部との間の独立した閉鎖神経回路網の存在を明らかにした。この事実から背側核から肝臓への出力が肝臓からの求心性信号によってもフィードバック的に調節されている可能性が示唆された。この事実は迷走神経肝臓枝の切断実験において、肝再生が遅延するという事実からも確認し得た。さらに迷走神経肝臓枝の上位中枢である視床下部外側野に着目し、肝部分切除後早期の再生過程にともなうモノアミン代謝をも解析し、視床下部外側野におけるセロトニン代謝が、肝部分切除後早期の再生過程において亢進していることも証明し得た。一方、肝再生時に肝臓の支配神経細胞と門脈系臓器支配神経細胞の活動との相関を認めた。この事実から門脈系臓器由来のInsulin・小腸由来因子など体液性因子の関与も示唆された。この体液性因子については宿主肝切除後の脾内移植肝細胞の増殖促進、クッパー細胞の網内系賦活による再生促進現象として追試確認しえた。肝再生は自律神経系を中心とした中枢と、肝と門脈系の局所因子との二重制御機構支配下の現象であること、そして中枢神経系がその「初期認識」「始動」に関与していること、再生維持には神経性因子以外に種々の体液性因子などが関与していることが明かとなったが、これらの相互作用については今後さらに検討する必要があると考えられた。