＜原 著＞

肝細胞再生におよぼすアルコールの影響

民野 均 根井 仁一 高田 昭*

要 旨：アルコールの肝再生に及ぼす影響を明らかにするために、急性および慢性アルコール投与ラットについて、70%部分肝切除後の肝細胞再生に対して、アルコールがいかなる影響を示すかを検討した。肝細胞の再生能は、肝細胞 DNA への³H-thymidine の取り込み、autoradiography による肝細胞核の labeling index および flow cytometry による遊離肝細胞分裂各周期の細胞分布状態より分析した。急性アルコール投与によって、肝細胞 DNA 合成の遅延と細胞周期 S 期の細胞の増加の遅延がみられた。また、慢性アルコール投与によって DNA 合成の抑制および S 期の細胞の減少がみられたが、これらのことは、アルコールが肝細胞の再生に対して抑制的に働くことを示しており、このアルコールによる肝細胞再生抑制作用は肝障害の進展に重要な役割を果たしていると推定された。

索引用語： 肝細胞再生 アルコール 部分肝切除 DNA 合成 細胞分裂周期

はじめに

近年、わが国においても飲酒量の増加に伴ってアルコール性肝疾患が増加してきており、それに対する対策が大きな社会問題となりつつある¹⁾。従来よりのアルコール性肝疾患の発生機序に関する研究は、大部分がアルコールの直接的な肝障害作用の面から行われてきている。すなわち、アルコールの肝障害作用はアルコールの代謝亢進に伴う肝内の代謝位相の変動、ないしはアルコールの代謝産物の作用に関連していると考えられている。しかしながら、肝障害に対するアルコールの影響を考える場合には、その肝障害作用の面からのみでなく、肝障害の修復、とくに肝細胞再生に及ぼす影響の面から考察することが必要となってくる。アルコールの肝再生に及ぼす影響についての研究は比較的少なく、しかも、その成績は必ずしも意見の一致がみられず、相反する報告もみられている²⁻⁶⁾。そこで、本研究では、アルコールが70%部分的肝切除後の肝細胞再生に対していかなる影響をおよぼすかを、急性および慢性アルコール投与ラットについて検討することとした。

対象および方法

(1) 急性アルコール投与実験法

実験動物は体重200g 前後の雌の Wistar 系ラット

123匹を使用し、一晚絶食の後、Higgins and Anderson の方法⁹⁾に準じて70%部分的肝切除術を施行した。アルコールの投与方法は肝切除後1時間目に体重1kg 当り3g のエタノールを腹腔内へ投与する1回投与方法と、術後2時間目より4時間毎に体重1kg 当り1.5, 1.0, 0.7, および0.7g のエタノールをそれぞれ投与する少量4回投与方法の2つの方法で行なった。なお、対照群には等カロリーのブドウ糖液を同様の操作で投与した。少量4回投与方法の実験スケジュールは Fig. 1 に示すごとくである。

(2) 慢性アルコール投与実験法

実験動物は体重170~180g の雌の Wistar 系ラット 56匹を使用し、総カロリーの36%がアルコールになるように処方した液体飼料¹⁰⁾を投与したアルコール群と、アルコールと等カロリーの糖質で置換した非アルコール群の2群に分けて4週間飼育した。なお、アルコール群を pilot group として group pair feeding を行ない、両群が等カロリーを摂取するようにした。液体飼料の投与は肝切除12時間前まで行ない、肝切除は急性実験に準じて行なった。なお、肝を切除する時間は急性・慢性実験とも午前9時から11時の間に行なった。

(3) 肝再生能の評価

急性・慢性実験のいずれにおいても肝細胞の再生能の評価は、肝切除直後、24, 36, 48および72時間目にラットをそれぞれ屠殺して行なった。すなわち、ラット

* 金沢医科大学消化器内科

Fig. 1 Experimental schedule for the acute multiple dose experiment.

トを屠殺する1時間前に $100\mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidineを腹腔内へ投与し、摘出肝の一部からSchneider and Grecoの方法¹¹⁾でDNAを抽出し、肝細胞DNAへの ^3H -thymidineの取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定するとともに、中心葉から作成した組織標本についてMacDonald and Malloryの方法¹²⁾に準じてautoradiographyを行ない、肝細胞核のlabeling indexを算定した。DNAの定量はBurtonの方法¹³⁾に従って行ない ^3H -thymidineの取り込みはDNA 1mg当りのカウント数で表した。また、labeling indexは肝細胞核1,000個当りについて ^3H -thymidineでラベルされている肝細胞核の数として算定した。

さらに、肝再生能の評価法の一つとして、コラゲナーゼ処理して作成した遊離肝細胞核をpropidium iodide (Sigma Chem. Comp., U.S.A.)で染色¹⁴⁾して、オルト社製cytofluorography system 50H (Ortho Diagnostic Systems Inc., U.S.A.)を用いてhistogramを描かせると同時に、Friedら¹⁵⁾の数式に基づいたFujikawa-yamamotoの方法¹⁶⁾に従ってマイクロコンピュータを用いて細胞分裂各周期の細胞の分布状態を分析した。

成績

(1) 急性アルコール投与実験

アルコールの大量1回投与法と少量4回分割投与法について、血中エタノール濃度を比較してみると(Fig. 2), 体重1kg当り3gのエタノールの1回投与では、血中エタノール濃度は 300mg/dl 以上を示し、ラットは泥酔ないしはショック状態となり死亡するものもみられた。一方、4回に分けてエタノールを投与する方法では、血中エタノール濃度は $120\sim 200\text{mg/dl}$ の値を16時間以上にわたって持続し、しかも、ラットは対照群と変わらない行動を示した。以上の検討結果から、以

Fig. 2 Serial changes of blood ethanol levels after partial hepatectomy in the acute single and multiple dose experiments.

Fig. 3 Serial changes in liver weight in the acute multiple dose experiment.

下の実験は主として少量4回アルコール投与法で行なった。

少量4回投与法での肝切除後の各時点での残存肝重量をみると(Fig. 3), アルコール群、対照群ともほぼ直線的な増加を示し、48および72時間後では対照群で肝重量が重い傾向を示したが、いずれの時点においても推計学的に有意の差はみられなかった。 ^3H -thymidineの肝細胞のDNAへの取り込み量は、Fig. 4に示すごとくで対照群では24時間後に最高値を示し、同じ時点での少量4回投与アルコール群より明らかに高く、36時間後では低下を示した。一方、アルコール群は36時間後に最高値を示し、対照群に比して最高値に達する時間の遅延がみられた。大量1回アルコール投与法と少量4回アルコール投与法の ^3H -thymidineの取り込みを比較すると(Fig. 5), 大量1回アルコール投与では ^3H -thymidineの取り込み量が最高値に達する時間が、少量4回投与よりさらに遅延

Fig. 4 Time course of incorporation rates of ^3H -thymidine into hepatic DNA in the acute multiple dose experiment. Numbers of rats in each experimental period were the same as shown in Fig. 3.

Fig. 6 Time course of labeling indices of hepatic nuclei in the acute multiple dose experiment. Numbers of rats in each experimental period were the same as shown in Fig. 3.

Fig. 5 Time course of incorporation rates of ^3H -thymidine into hepatic DNA in the acute single and multiple dose experiments.

していた。なお、大量1回投与の36時間目以降の実験ラット数は、当初4匹であったが、2匹が実験途中で死亡した。少量アルコール投与法での autoradiography の成績 (Fig. 6) は、 ^3H -thymidine の DNA への取り込み量とまったく同様の結果を示し、対照群では24時間後に、アルコール群では36時間後にそれぞれ最高値を示した。

遊離肝細胞の DNA を propidium iodide で染色し、cytofluorograph で分析した histogram では、肝切除直後のそれは正常肝と同様の pattern を示し、2倍体で G_1 期に当る大きな peak と、4倍体で G_2+M 期に当る小さな peak が明瞭に認められ、両者は S 期で繋がっていた。対照群の24時間目以降では、 G_1 と G_2+M 期との間の谷間が消失して、全体で一つの幅の広い peak を形成し、 G_1 期以降の時相の細胞が増加し、

DNA の合成が盛んになっていることが示された。一方、アルコール群では24時間後で G_1 期と G_2+M 期の間が bridge した形の histogram を示し、36時間後になって対照群の24時間後に相当する一つの peak となっており、48時間後の histogram は対照群、アルコール群とも類似した pattern となっていた (Fig. 7)。この変化を Fried らの数式¹⁵⁾に従って解析し、各分裂周期の細胞の分布状態をみると、S 期の細胞の占める比率の推移は、 ^3H -thymidine の DNA への取り込み量および autoradiography での labeling index の推移と同様で、対照群では24時間後で最高値を示したが、アルコール群では最高値に達したのは36時間後であった。一方、 G_1 期の細胞は S 期の細胞と反対の動態を示し、対照群では24時間後で、アルコール群では36時間後で最低値を示し48時間後にはほぼ元に戻っていた。 G_2+M 期の細胞は実験経過を通じて、対照群、アルコール群で大きな変化はみられなかった (Fig. 8)。なお、cytofluorograph を使用しての分析は各時点で2匹ずつのラットについて行なったが、両ラットの成績はほぼ類似していたので、各分裂周期での比率は、2匹のラットの平均値で表した。

(2) 慢性アルコール投与実験

アルコールおよび対照群ラットの体重の推移についてみると、いずれの時点においても対照群の体重がアルコール群に比して重い傾向が認められたが、推計学的に有意な差ではなかった (Fig. 9)。肝切除後の残存肝重量の経時的変化では、両群でともにほぼ直線的な増加が認められたが、対照群での重量が各時点でとも

Fig. 7 Serial changes in DNA histograms after partial hepatectomy in the acute multiple dose experiment.

Fig. 8 Serial changes in the cell populations at different phases of the cell cycle in the acute multiple dose experiment. Each point represents average of two rats.

に重い傾向を示し、特に48および72時間後では、その差は推計学的にも有意であった(Fig. 10). しかし、単位体重当りで算定すると、その差は有意とはいえない

Fig. 9 Body weight gains for each group during the chronic experiment.

Fig. 10 Serial changes in liver weight after partial hepatectomy in the chronic experiment.

かった。

^3H -thymidine の肝 DNA への取り込みは、肝切除直後では両群間に差は認められなかった。しかし、対照群では、その後、24時間後で ^3H -thymidine の肝 DNA への急速な取り込みの増加がみられ、それ以後は明らかな低下を示し、72時間後では、肝切除直後と同じレベルまで復帰した。一方、アルコール群では、36時間後に最も高い値を示したが、その値は対照群にみられるほど高度なものでなく、明らかな peak を形成したとはいえなかった。また、アルコール群では72時間後も肝切除直後の値まで復帰しなかった(Fig. 11). 肝切除後の autoradiography の結果は ^3H -thymidine の肝 DNA への取り込み量の推移ときわめて近似し、対照群では24時間目で、アルコール群では36時間目で最高値を示したが、アルコール群の増加は、それほど明瞭なものではなかった (Fig. 12).

Fig. 11 Time course of incorporation rates of ^3H -thymidine into hepatic DNA in the chronic experiment. Numbers of rats in each experimental period were the same as shown in Fig. 10.

Fig. 12 Time course of labeling indices of hepatocytic nuclei. Numbers of rats in each experimental period were the same as shown in Fig. 10.

肝細胞核の DNA histogram をみると、肝切除直後では両群とも前述の正常肝の histogram とほぼ同様の pattern を示した。24時間後の対照群では幅の広い一峰性の peak を示し、S 期の細胞の増加が著明なことが示唆された。一方、アルコール群の24時間後では、第1峰と第2峰の間に、S 期の細胞の増加によって bridge している histogram となっており、S 期の細胞の増加はそれほど著明でないと考えられた。36時間後では両群ともほぼ同じような pattern が得られ、48時間後では、対照群は明らかな二峰性となり、肝切除直後の pattern に類似していたが、アルコール群では依然として一峰性の peak を示すにとどまっていた (Fig. 13)。各分裂周期の細胞の分布状態をみてみると、Fig. 14 のごとくとなり、肝切除直後では両群とも

Fig. 13 Serial changes in DNA histograms after partial hepatectomy in the chronic experiment.

Fig. 14 Serial changes in the cell populations at different phases of the cell cycle after partial hepatectomy in the chronic experiment. Each point represents average of two rats.

各周期の細胞の分布は類似していたが、対照群では24時間後の S 期の細胞の比率の明らかな増加と、G₁期の細胞の比率の明らかな低下がみられ、48時間後には肝切除直後の分布に近い形態に復していた。一方、アル

コール群では、24時間後にはS期の細胞の比率の増加が認められているが、対照群にみられるほど明瞭なものではなく、36時間後には最も高い値を示したが、48時間後においても肝切除直後の pattern に復帰しなかった。また、G₁期の細胞の比率もこれに対応し、48時間後においても低い値を示した。なお、慢性実験での cytofluorograph の分析も各時点で2匹ずつのラットを使用して行ない、ほぼ等しい結果が得られた。

考 案

正常ラット肝での部分的肝切除後の肝の再生状態を経時的に観察した報告は多く、肝の再生は肝切除8~12時間目よりはじまり、22~24時間目に peak に達することが、³H-thymidine の肝細胞 DNA への取り込みないしは autoradiography を用いた方法で証明されている¹⁷⁾。われわれの実験でも、70%部分的肝切除を行ない、アルコールを投与しなかった対照群では、急性および慢性実験とも、肝細胞核への DNA の取り込みおよび autoradiography による肝細胞核の labeling index の成績は24時間後に最高値を示し、従来から報告されている成績^{7,12)}と一致するものであった。

アルコールの肝細胞再生に及ぼす影響については、再生を抑制するとの報告²⁻⁵⁾と抑制しないとの報告⁶⁻⁸⁾とがあり、意見の一致をみていない。このような差の生ずる原因としては、アルコールの投与量、投与方法、さらには肝細胞再生の評価方法などに差のあることによっていると考えられる。今回の急性アルコール投与実験では、1回アルコール投与と4回分割アルコール投与の2方法で行なったが、3g/kg のアルコールの1回投与では、血中エタノール濃度は300mg/dl 前後でラットは泥酔状態となり、生理的状态を保っていたとは考えられなかった。一方、少量4回分割アルコール投与ではエタノール濃度は16時間後まで120mg/dl を保ち、対照群のラットと変わらない行動を示し、より生理的に近い状態にあると考えられた。この投与方法でのアルコール群の肝の再生は対照群に比して、12時間の遅延を示した。Wands ら²⁾は6g/kg のアルコールを4時間毎に3回分割投与し、48時間目まで³H-thymidine の肝 DNA への取り込みがみられず、アルコールは肝の再生を抑制したとしており、今回の成績も結論では一致しているが、彼らの実験ではアルコールの投与量が多く、血中エタノール濃度も405mg/100 ml と記載されており、かなり生理的状态からはずれていたことが推測される。このような状態は1回投与実験の状態と類似しており、肝再生に対しては、アル

コール以外の因子、特に肝循環動態の変動の影響も考慮しなければならないと考えられる。

急性アルコール投与が肝の再生を抑制しないとする成績は Craig⁹⁾、Frank ら⁷⁾によって報告されている。Frank ら⁷⁾は2.69g/kg のアルコールを8時間毎に3回投与し、48~72時間後に³H-thymidine の取り込みの明らかな peak をみたが、アルコール投与群では肝重量、蛋白量および中性脂肪の増加がみられ、また肝の総 DNA 量が対照群と変化がないため、急性アルコール投与は肝の再生を障害しないと結論づけている。しかしながら、近年、Baraona ら¹⁸⁾は、急性アルコール投与は肝の蛋白分泌を障害し、そのため肝細胞内の蛋白、中性脂肪の蓄積が起こるとしており、このことは肝重量や肝蛋白量などの増加は肝再生の指標になりえないことを示していると考えられる。また、Duguay ら⁵⁾は肝再生の指標としては、肝の総 DNA 量より³H-thymidine の取り込み量が有用であるとしており、Frank ら⁷⁾の成績もアルコールが肝の再生を抑制していると考えるのが妥当と考えられたが、いずれにしても、肝細胞再生に対するより直接的な評価法で判断すべきであろう。

近年、flow cytometry の進歩によって核 DNA の分析が可能となり、細胞動態解析に利用されるようになってきており、肝細胞の動態分析にも応用されている。Digernes ら¹⁹⁾によれば、70%部分的肝切除後の³H-thymidine の肝細胞核への取り込みおよび autoradiography の labeling index の成績とS期の細胞の占める比率の変化は良く相関し、flow cytometry による分析で、肝細胞の再生状態が解析できるとしている。われわれもオルソ社製 cytofluorography system 50H を使用し、Fried の計算式¹⁵⁾に従って細胞分裂周期の状態を分析し、S期の細胞の推移を検討したのであるが、その結果は、³H-thymidine の取り込みや autoradiography でみられたのとまったく同様の成績で、アルコールによってS期の細胞の増加が明らかに遅延した。このS期の細胞の増加が遅延していることは、DNA の合成の遅延していることであり、遊離肝細胞のレベルでも、アルコールによる肝細胞の再生抑制が明確に解析しうることを示しているといえるようである。この成績はアルコールないしはその代謝産物であるアセトアルデヒドがDNAの合成阻害に働いていることを意味しているが、アルコールないしアセトアルデヒドがDNA合成のどの部分に働くかは未知の問題である。近年、fetal alcohol syndrome として知ら

れている疾患においても、胎児の中枢神経系でのDNA合成障害が、その疾患の原因であるとする成績³⁾も報告されており、アルコールないし、その代謝産物が全身的にDNAの合成阻害に働く可能性が示唆されている。

慢性アルコール投与ラットでは、70%部分的肝切除後の肝再生は、ほぼ完全に抑制されたが、このように慢性アルコール投与ラットでは、肝細胞の再生抑制が強く、その作用も長時間続くと推定され、ヒト生検肝でアルコール性と非アルコール性肝障害でのlabeling indexを比較し、アルコール性肝障害ではlabeling indexが低値を示したとするLeevyら²⁰⁾の報告を支持していると考えられる。

慢性アルコール投与でも肝の再生が抑制される機序はDNAの合成障害であると考えられるが、いかなる機序でアルコールが抑制的に働くかは不明である。しかし、Makowkaら⁴⁾は再生肝のcytosol分画がアルコールによる肝抑制を回復することを明らかにしており、今後は、これらの物質の作用機序の解明が問題となってくると考えられる。いずれにしても、今回の研究ではアルコールがDNA合成障害を介して肝細胞の再生を抑制することが遊離肝細胞レベルの解析からも明確になったのであるが、肝疾患の病態は肝細胞の障害と再生との均衡によって決められるので、アルコールによる肝細胞の再生抑制作用は、アルコール性肝障害のみならず、他の原因における肝障害時にも重要な問題となってくると考えられる。さらに、禁酒はアルコールによる肝細胞の再生抑制を解放することになるが、このような抑制解放に伴う肝細胞再生の亢進が、病的状態、特に発癌などの際には、どのような意義を持つかも、今後検討すべき問題と考えられる。

むすび

以上のごとく、急性のアルコール投与によって、肝細胞DNA合成の遅延とS期の細胞増加の遅延が、慢性アルコール投与によってDNA合成の抑制およびS期の細胞の減少がみられたが、これらのことはアルコールは肝細胞の再生を抑制することを示しており、この肝細胞再生抑制作用は肝障害の進展に重要な役割を果たしていると推定された。

なお、本論文の要旨は第70回日本消化器病学会総会および第20回日本肝臓学会総会において発表した。

文 献

1) 武内重五郎, 奥平雅彦, 高田 昭, 他: わが国にお

けるアルコール性肝障害の実態—全国集計の成績から—。日消誌 76: 2178—2185, 1979

- 2) Wands JR, Carter EA, Bucher NLR, et al: Inhibition of hepatic regeneration in rats by acute and chronic ethanol intoxication. *Gastroenterology* 77: 528—531, 1979
- 3) Dreosti IE, Ballard FJ, Belling GB, et al: The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and on fetal development in the rat. *Alcoholism Clin Exp Res* 5: 357—362, 1981
- 4) Makowka L, Falk RE, Hardy M, et al: Reversal of ethanol-induced inhibition of hepatic regeneration by regenerating liver cytosol. *Surgical Forum* 32: 181—183, 1981
- 5) Duguay L, Coutu D, Hetu C, et al: Inhibition of liver regeneration by chronic alcohol administration. *Gut* 23: 8—13, 1982
- 6) Craig J: Effects of ethanol and ethionine on DNA synthesis during experimental liver regeneration. *J Stud Alcohol* 36: 148—157, 1975
- 7) Frank WO, Rayyes AN, Washington A, et al: Effect of acute ethanol administration upon hepatic regeneration. *J Lab Clin Med* 93: 402—413, 1979
- 8) Orrego H, Crossley IR, Saldivia V, et al: Long-term ethanol administration and short- and long-term liver regeneration after partial hepatectomy. *J Lab Clin Med* 97: 221—230, 1981
- 9) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 20: 186—202, 1931
- 10) Takada A, Matsuda Y, Takase S: Effects of dietary fat on alcohol-pyrazole hepatitis in rats: The pathogenetic role of the nonalcohol dehydrogenase pathway in alcohol-induced hepatic cell injury. *Alcoholism Clin Exp Res* 10: 403—411, 1986
- 11) Schneider WC, Greco AE: Incorporation of pyrimidine deoxyribonucleosides into liver lipids and other components. *Biochim Biophys Acta* 228: 610—626, 1971
- 12) MacDonald RA, Mallory GK: Autoradiography using tritiated thymidine. Detection of new cell formation in rat tissues. *Lab Invest* 8: 1547

- 1562, 1959
- 13) Burton K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62: 315—323, 1956
 - 14) Krishan A: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66: 188—193, 1975
 - 15) Fried J: Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry. *Comput Biomed Res* 9: 263—276, 1976
 - 16) Fujikawa-yamamoto K: A method for the cell cycle analysis by a microcomputer. *金医大誌* 9: 105—112, 1984
 - 17) Bucher NLR: Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 15: 245—300, 1963
 - 18) Baraona E, Pikkarainen P, Salaspuro M, et al: Acute effects of ethanol on hepatic protein synthesis and secretion in the rat. *Gastroenterology* 79: 104—111, 1980.
 - 19) Digernes V, Brønstad G, Sand TE, et al: The proliferative response of rat liver parenchymal cells after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 15: 521—528, 1982
 - 20) Leevy CM: *In vitro* studies of hepatic DNA synthesis in percutaneous liver biopsy specimens. *J Lab Clin Med* 61: 761—779, 1963

Effects of ethanol on hepatocytic regeneration

Hitoshi TAMINO, Jinichi NEI and Akira TAKADA*

The effects of ethanol on hepatocytic regeneration were studied in rats. With acute administration of ethanol, DNA synthesis and commencement of the S phase of the cell cycle in hepatocytes after partial hepatectomy were delayed. For chronic ethanol administration, DNA synthesis after partial hepatectomy was clearly reduced and commencement of the S phase was retarded. These results indicate that both acute and chronic administrations of ethanol inhibit hepatocytic regeneration.

* Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kanazawa Medical University (Ishikawa)