

原著

# 四塩化炭素投与によるラットの急性肝障害に対する 促肝細胞増殖因子 ( pHGF ) の治療効果

## II . 細胞膜障害の抑制

戴 威<sup>1</sup> 佐藤 茂<sup>2</sup> 浅野 伍朗<sup>1</sup><sup>1</sup> 日本医科大学病理学第2教室<sup>2</sup> 日本医科大学中央電子顕微鏡研究施設

### The Protective Effect of Hepatocyte Growth-Promoting Factor ( pHGF ) Against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Rats II. Protective Effects on Cell Membrane Injury

Wei Dai<sup>1</sup>, Shigeru Sato<sup>2</sup> and Goro Asano<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pathology and <sup>2</sup>Central Institute for Electron Microscopic Researches, Nippon Medical School

#### Abstract

To examine the protective effects of hepatocyte growth-promoting factor ( pHGF ) against carbon tetrachloride ( CCl<sub>4</sub> ) induced acute liver injury in rats, the pathological changes were observed by light and electron microscopy, and the serum GOT and GPT levels were measured. Acute liver injury was produced by the injection of CCl<sub>4</sub> ( 2 ml/kg BW ) in two groups of animals, of which one received pHGF ( 300 μg/kg BW ) via the tail vein after 4 hrs. In the group treated with CCl<sub>4</sub> alone, serum GOT and GPT were significantly elevated ( 1280 ± 228 and 187 ± 73 IU/l, respectively ) 6 hrs after injection, indicating the induction of liver injury by CCl<sub>4</sub>. They reached a peak ( 3836 ± 654 and 1022 ± 230 IU/l, respectively ) at 48 hrs and declined thereafter, but did not completely recover after 72 hrs. PAS-negative cells were observed around the central veins after 6 hrs and most of the hepatocytes were PAS-negative at 12 hrs. PAS-positive cells began to appear and increased in number after 24 hrs. There were scarcely any PAS-negative cells remaining in the lobules after 72 hrs. In the group treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF, serum GOT and GPT levels were significantly lower than in the CCl<sub>4</sub>-treated group, and abundant PAS-positive hepatocytes were observed. Also, all hepatocytes were PAS-positive ( as in normal liver ) after 72 hrs. Administration of pHGF resulted in a decrease in the ultrastructural changes in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver injury such as vacuolation, cisternae formation and dilatation of the rough endoplasmic reticulum. These results suggest that pHGF acts to stabilize cell membranes, thereby providing protection against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury( J Nippon Med Sch 2001; 68: 154 - 164 )

Key words: acute liver injury, carbon tetrachloride, ultrastructure, pHGF, liver function

## 緒言

張ら<sup>1,2</sup>は1991年に乳児豚の肝臓から肝細胞を増殖する物質を抽出して促肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth-promoting Factor, pHGF)と命名した。pHGFは乳児豚以外にヒト乳児や乳児家兔の肝細胞内に顆粒状で存在することがpHGFのモノクローナル抗体を用いて証明されている<sup>3</sup>。このことはpHGFが豚以外にも哺乳類の乳児全般に存在していることを証明したものと考えられる。

一方、肝細胞増殖因子(HGF)が知られている<sup>4,5</sup>。HGFは増殖促進因子、運動促進因子および形態形成因子などの多機能を持つことが知られている<sup>6-8</sup>。ラットに四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を投与する実験からpHGFはHGFより肝細胞の増殖力が高いことを我々はすでに報告した<sup>9</sup>。また、pHGFは伊東細胞からの線維芽細胞への形質転換を抑制することによりCCl<sub>4</sub>による肝線維化を抑制することもあわせて報告し、pHGFはHGFの肝障害に対する保護作用<sup>10-12</sup>と同様の作用を有することを示した<sup>9</sup>。また、培養実験からHGFはインターフェロン-γによる肝細胞のアポトーシスを抑制する<sup>13</sup>。pHGFもCon. A投与による肝細胞のアポトーシスを抑制するという報告がある<sup>14</sup>。このようにpHGFはHGFとは異なった物質であるが同様の機能を持つことが示されている。pHGFの分子量は10.7 kDa<sup>1</sup>であり、HGF(82 kDa)<sup>6,15</sup>、hepatic stimulates substance(12.4 kDaと17.5 kDa)<sup>6</sup>、あるいはHGF-activator(34 kDa)<sup>7</sup>とは異なった分子量を示している。

現在、pHGFは中国において広く肝炎患者に治療薬として用いられている。pHGFは急性あるいは慢性肝炎に対してより、激症肝炎に優れた効果があることが認められており、激症肝炎患者の致死率を半分に下げたとの報告がある<sup>2</sup>。pHGFの激症肝炎に対する治療効果は前述のような肝細胞の再生や線維化抑制によるものとは簡単には考えられない。そこで、CCl<sub>4</sub>を用いて実験的に急性肝炎を発症させ、その早期にpHGFがどのような作用により肝細胞を保護するのかあるいは肝細胞障害を回復させるのかを形態学的に追究することを目的として以下の実験を行った。生化学的研究によりCCl<sub>4</sub>投与後肝細胞の細胞膜障害は生化学的に5分から2時間以内で起っていることが報告されている<sup>18</sup>。しかし、CCl<sub>4</sub>投与2時間後では超微形態的变化は軽微である<sup>19</sup>。そこで、CCl<sub>4</sub>投与4時間後にpHGFを投与した。

## 材料および方法

ウイスター系雄性ラット(体重180~200g)85匹をCCl<sub>4</sub>単独群25匹、pHGF単独群25匹およびpHGF治療群25匹に分けた。また、無処置のラット10匹を正常群とした。オリーブ油に溶解した50% CCl<sub>4</sub>(2 ml/kg BW)を腹腔内に1回のみ投与し、CCl<sub>4</sub>投与4時間後にpHGF(300 μg/kg BW, 広東省陽江製薬会社, 中国)を尾静脈より1回投与した。CCl<sub>4</sub>投与6, 12, 24, 48, 72時間後にこれら3群につきそれぞれ5匹ずつを屠殺し、血清を生化学的検査用に保存し肝組織を採取して光学および電子顕微鏡用の試料とした。また、正常群は2匹ずつ検体に供した。光学顕微鏡観察のために、肝臓標本は中性ホルマリン液にて固定後パラフィン包埋し、1.5 μmの切片を作製し、PAS染色を行った。電子顕微鏡観察には試料を2.5% グルタルアルデヒド液にて固定し、1% 四酸化オスミウム液で後固定した。常法にしたがってアルコール系列により脱水し、Epok 812樹脂にて包埋した。試料はMT 5000型ウルトラミクロトームでダイヤモンドナイフにより超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色して、透過型電子顕微鏡にて観察した。血液生化学的検査にはラット屠殺時にエーテル麻酔下で心臓から採血した血液を遠心分離(3000 rpm, 5分間)し、血清を得た。肝障害による肝臓からの逸脱酵素の指標として、血清GOTをMDH-UV法、GPTをLDH-UV法により測定した。

## 結果

### 1. 血中のGOTおよびGPTの変動

正常群、pHGF単独群、CCl<sub>4</sub>単独群とpHGF治療群において経時的に血中のGOTおよびGPTの変動を検索した。正常群とpHGF単独群ではほぼ同様であり、正常群のGOT値は130 ± 4.5 IU/l, GPT値は45 ± 3.6 IU/lであり、pHGF単独群投与6時間後それぞれGOT値は132 ± 8.1 IU/l, GPT値は46 ± 4.7 IU/lであった(Fig. 1)。CCl<sub>4</sub>単独群では投与6時間後、すでにGOTは1249 ± 229 IU/l, GPTは180 ± 73 IU/lであり、正常群と比べて顕著な増加を見た(p < 0.01)。このようにGOTとGPTはその後増加しCCl<sub>4</sub>単独群48時間後には最高値を示し(GOT 3836 ± 654, GPT 1022 ± 230 IU/l), 72時間後では低下傾向を示した。pHGF治療群では6時間後にはGOTおよびGPT値はpHGF単独群に比して有意な増加を示したが(p <

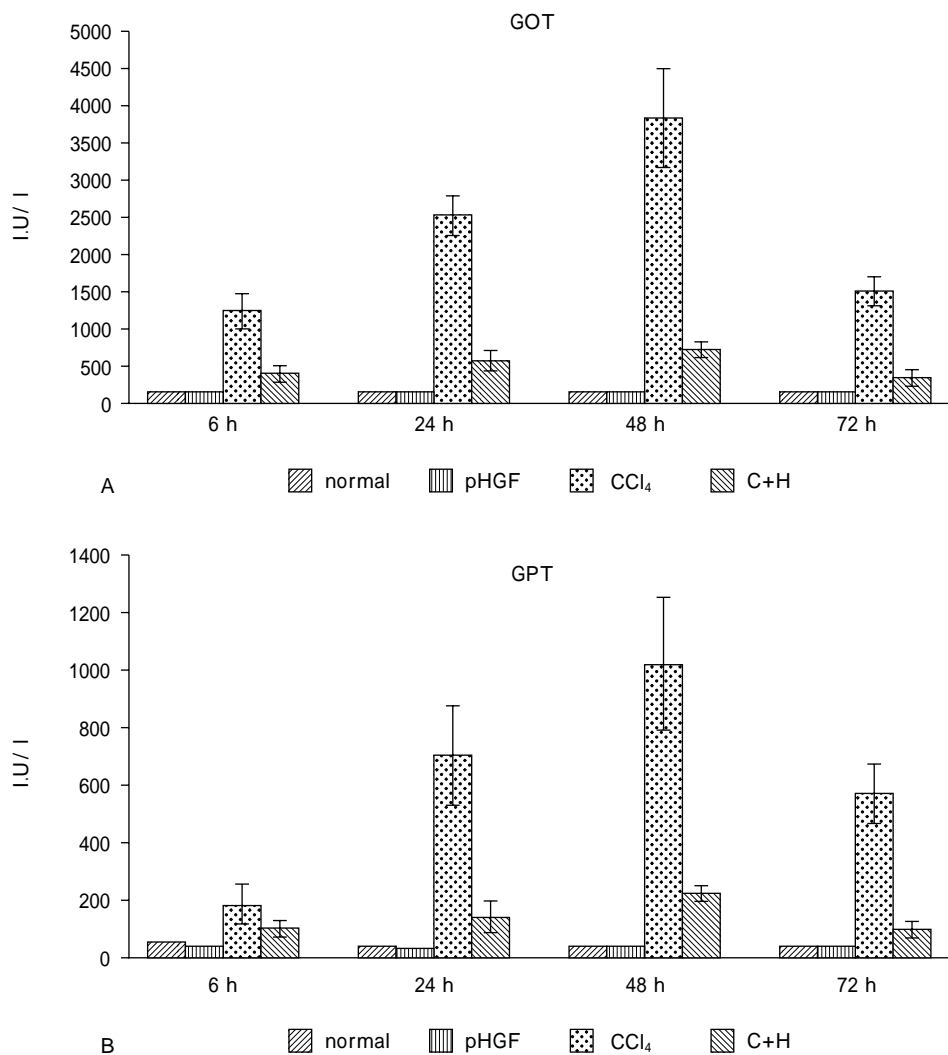


Fig. 1 Effect of pHGF treatment on serum levels of GOT and GPT after CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. A: There is significant difference between the groups treated with CCl<sub>4</sub> alone and treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF ( $p < 0.01$ ), and between the groups treated with pHGF alone and group treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF ( $p < 0.05$ ) at each time point in the level of serum GOT. Data is expressed as mean  $\pm$  SD. B: There is significant difference between the groups treated with CCl<sub>4</sub> alone and treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF ( $p < 0.01$ ) and between the groups treated with pHGF alone and group treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF ( $p < 0.05$ ) at each time point in the level of serum GPT. Data is expressed as mean  $\pm$  SD.

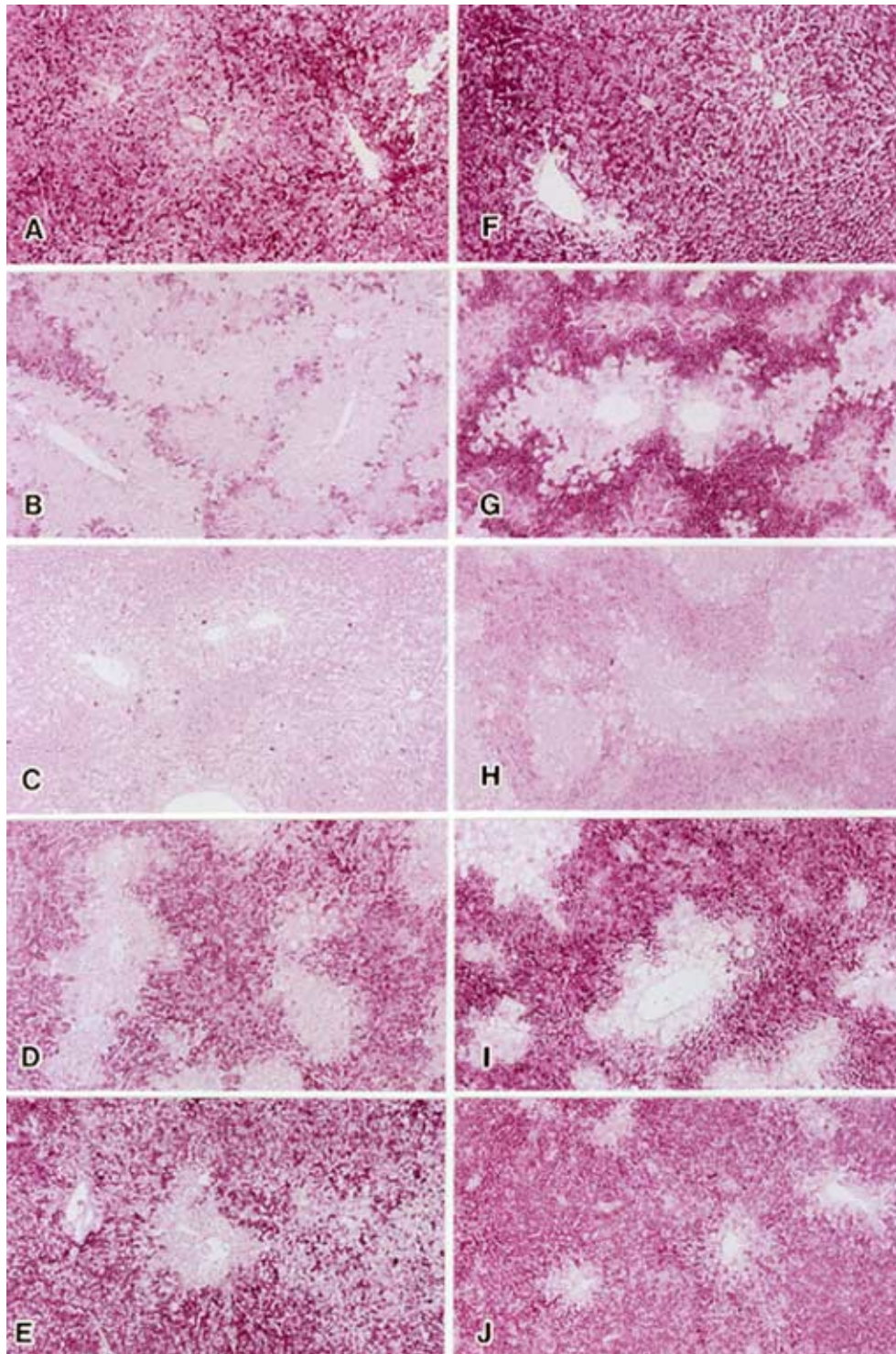
▨ normal: normal group, ▨ pHGF: group treated with pHGF alone, ▨ CCl<sub>4</sub>: group treated with CCl<sub>4</sub> alone, ▨ C + H: group treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF.

Fig. 2 Light micrographs show signs of liver damage by PAS staining.  $\times 40$ . A: In normal group, all hepatocytes are PAS-positive. B-E: Light micrographs show signs of liver injury in the group treated with CCl<sub>4</sub> alone, by PAS staining. B: Six hours post-administration, PAS negative cells are observed over a large area around the central veins. C: Twelve hours post-administration, most hepatocytes are PAS-negative. D: Twenty-four hours post-administration, a few PAS-positive cells are observed around the portal tract. E: Seventy-two hours post-administration, most hepatocytes are PAS-positive the same as in normal liver, and PAS-negative cells are scarcely seen in the lobules. F: In the group treated with pHGF alone, all hepatocytes are PAS-positive similar to those in normal liver. G-J: Light micrographs show signs of liver injury in the group treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF by PAS staining. G: Six hours, a few PAS-negative hepatocytes are seen around the central veins. H: Twelve hours, PAS-positive cells are seen around the portal tract. I: Twenty-four hours, PAS-negative cells are seen around the central veins. J: Seventy-two hours, all hepatocytes are PAS-positive the same as in normal liver.

0.05), CCl<sub>4</sub> 単独群に比べると有意な減少が見られた ( $p < 0.05$ ). pHGF 治療群は CCl<sub>4</sub> 単独群と同様に 48 時間で最高値 (GOT  $731 \pm 106$ , GPT  $230 \pm 30$  IU/l) を示し (Fig. 1), 72 時間で低下傾向を示した. これら GOT と GPT の値は CCl<sub>4</sub> 単独群と比して低値をした.

## 2. PAS 染色による光学顕微鏡的観察

正常群肝組織を PAS 染色で観察すると,すべての肝細胞が PAS 陽性であった. PAS 陽性細胞には強陽性細胞と中等度陽性細胞が見られた (Fig. 2A). CCl<sub>4</sub> 単独群において,投与 6 時間後では中心静脈を中心に PAS 陰性の肝細胞が広い範囲にわたり観察された (Fig. 2B). 12 時間後では門脈域周囲にわずかに PAS





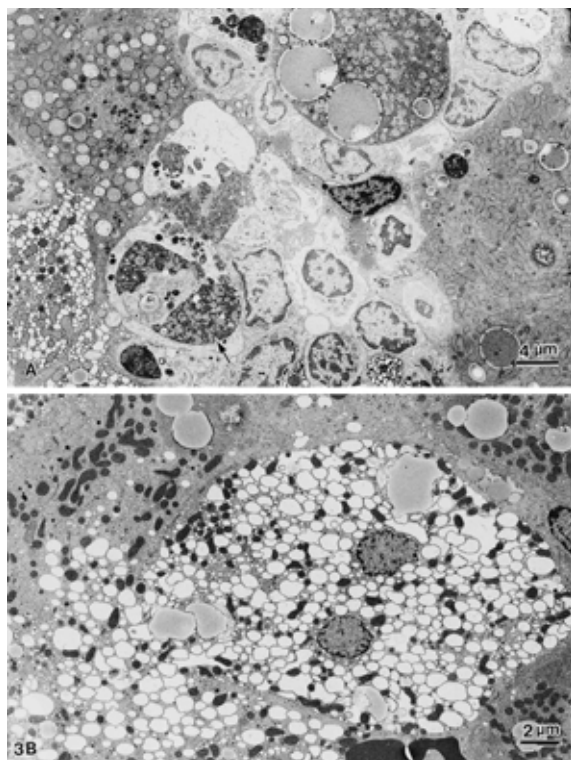


Fig. 3 Electron micrographs show liver damage in the group treated with  $\text{CCl}_4$  alone at 6 hrs.  
 A: The Councilman body (arrow) in Kupffer cells and many lymphocytes are seen in the sinusoid. B: Not only vacuolated hepatocytes and dilated rough endoplasmic reticulum but also normal hepatocytes are seen.

弱陽性細胞が認められるが、すべての肝細胞はPAS陰性であった(Fig. 2C)。24時間と48時間後ではほぼ同様の所見であった。すなわち、中心静脈周囲に多数のPAS陰性細胞が残存していた。また、小葉全体に散在性にPAS陰性細胞が見られるが、12時間後と比べてPAS染色で強および中等度陽性細胞が増加していた(Fig. 2D)。72時間後では中心静脈周囲にはPAS陰性細胞が残存していた。また、小葉全体にPAS陰性細胞は散在性に残存していたが、48時間後と比べて強陽性細胞が増加していた(Fig. 2E)。

pHGF単独群では正常肝組織とほぼ同様のPAS陽性所見であった(Fig. 2F)。pHGF治療群においては6時間後で中心静脈周囲のPAS陰性肝細胞は $\text{CCl}_4$ 単独群より少なかった(Fig. 2G)。12時間後では中心静脈周囲にPAS陰性細胞が見られるが、PAS染色で弱および中等度陽性細胞の数は $\text{CCl}_4$ 単独群より多かった(Fig. 2H)。24時間と48時間後ではPAS陰性細胞は中心静脈周囲に残存するが、 $\text{CCl}_4$ 単独群と比べて陽性細胞の数は多かった(Fig. 2I)。72時間後では中心静脈周囲にわずかにPAS陰性細胞が観察されるが、小葉全

体はほぼ正常に近いPAS陽性像であった(Fig. 2J)。

### 3. 透過型電子顕微鏡的観察

$\text{CCl}_4$ 単独群において、6時間後では中心静脈周囲の類洞にはKupffer細胞に取り込まれているCouncilman体形成が観察された(Fig. 3A矢印)。また、類洞は拡大し、多数のリンパ球と単球が認められた(Fig. 3A)。肝細胞には粗面小胞体の拡張を伴う変性像が見られた。しかし、すべての肝細胞が障害を受けたのではなく、ほぼ正常と思われる肝細胞も多数観察された(Fig. 3B)。また、粗面小胞体の変性による拡張は大きく三つに分類された。空胞変性している肝細胞の細胞質には粗面小胞体の空胞化の他に拡張したゴルジ装置と滑面小胞体が観察された(Fig. 4A)。シスターナを形成している肝細胞の細胞質には滑面小胞体が凝集して出来た小体が観察された(Fig. 4B)。粗面小胞体が拡張している肝細胞の細胞質には粗面小胞体内に蛋白性顆粒を含有していた(Fig. 4C)。また、これらの変性している肝細胞にはグリコーゲン顆粒が消失していた(Fig. 4A-C)。12時間後では中心静脈周囲に融解壊死した肝細胞、リンパ球、単球、好中球および出血が観察された(Fig. 5)。肝細胞の粗面小胞体の空胞形成は $\text{CCl}_4$ 単独群では48時間後まで観察された(Fig. 6)。中心静脈周囲の融解壊死した肝細胞は72時間後でも観察された。

pHGF治療群は $\text{CCl}_4$ 投与4時間後にpHGFを投与した。その2時間後には肝細胞の粗面小胞体の変性による拡張は空胞化とシスターナが両方出現しているものと拡張している粗面小胞体のみを示すものが認められた(Fig. 7A)。前者の肝細胞の細胞質にはゴルジ装置より作られた顆粒、少量のグリコーゲン顆粒の蓄積および滑面小胞体の凝集が観察された(Fig. 7B)。後者では細胞内に多量のグリコーゲン顆粒の蓄積、拡張したゴルジ装置および滑面小胞体の凝集による小体が観察された(Fig. 7C)。また、粗面小胞体の単位膜からポリゾームが遊離した脱顆粒像(degranulation of rough endoplasmic reticulum)が観察された(Fig. 7D)。このような粗面小胞体の脱顆粒像は $\text{CCl}_4$ 単独群、pHGF治療群とともに6、12時間後に認められた。 $\text{CCl}_4$ 単独群とpHGF治療群とともに12時間後で類洞にCouncilman体形成が観察された。 $\text{CCl}_4$ 単独群と比べてpHGF治療群は類洞における炎症細胞の浸潤は少ない。また、6時間後で観察されなかった肝細胞の空胞変性が12時間後ではわずかに出現しており、48時間後まで観察された。このような細胞ではグリコーゲン顆粒が消失していた(Fig. 8)。24時間では中心静脈周囲

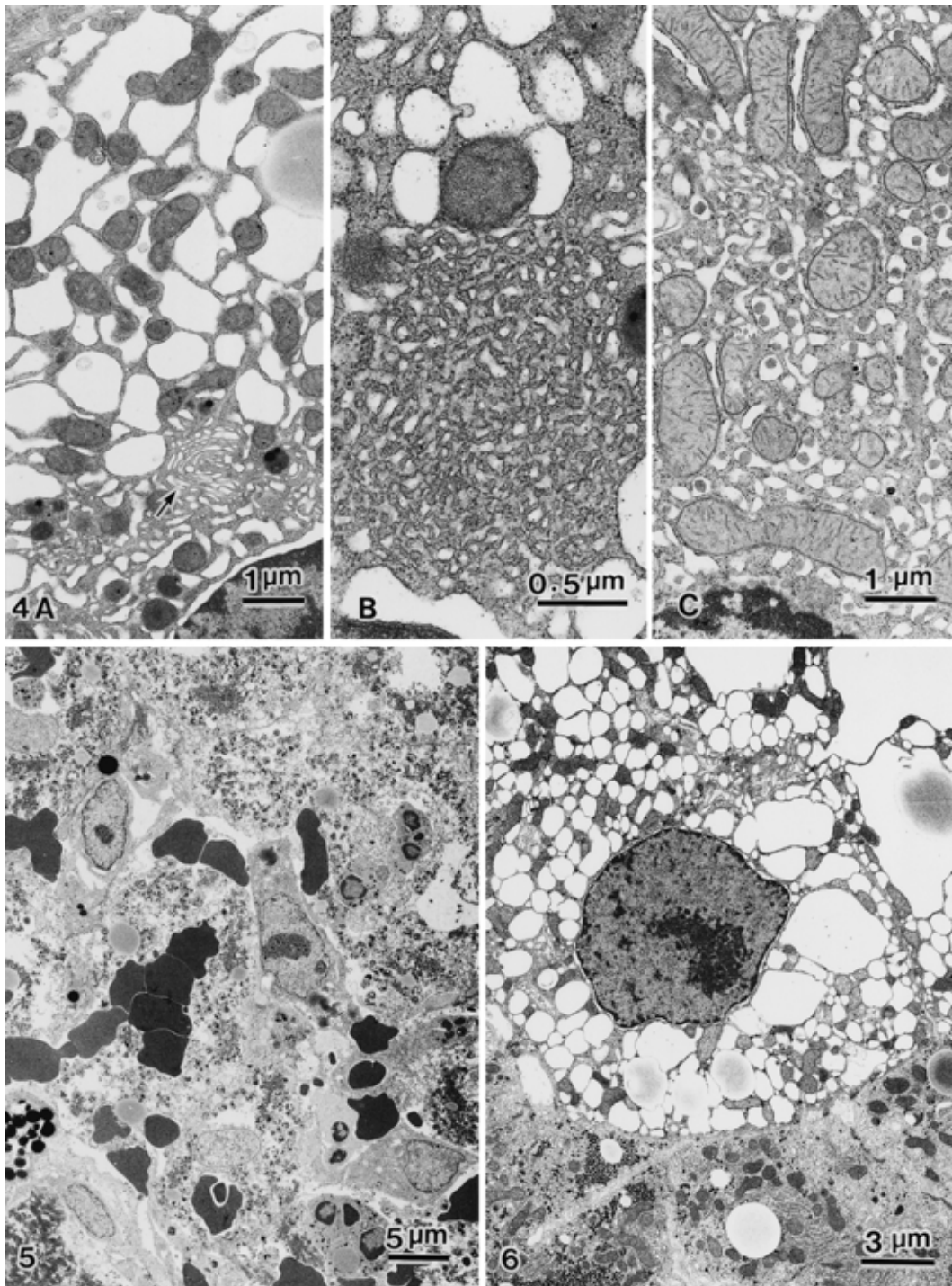


Fig. 4 Six hours, damages of the rough endoplasmic reticulum in hepatocytes are observed in the group treated with  $\text{CCl}_4$  alone. A: Vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and swollen Golgi complex (arrow) are observed in hepatocytes. B: Cisternae of the rough endoplasmic reticulum are seen. C: Granules of protein in the rough endoplasmic reticulum are observed.

Fig. 5 Twelve hours, lytic necrosis of hepatocytes, infiltration of monocytes and neutrophils, hemorrhage are observed around the central veins in the group treated with  $\text{CCl}_4$  alone.

Fig. 6 Forty-eight hours, vacuolated hepatocytes are seen in the group treated with  $\text{CCl}_4$  alone.

に肝細胞の融解壊死や出血が見られた (Fig. 9).  $\text{CCl}_4$  単独群と比較して pHGF 治療群では 48 時間後に多数の肝細胞の有糸分裂像が観察された (Fig. 10). 72 時間

後では肝細胞は正常像として観察された. pHGF 単独群ではすべての時期において正常像を示した. PAS 染色による光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察の結果を

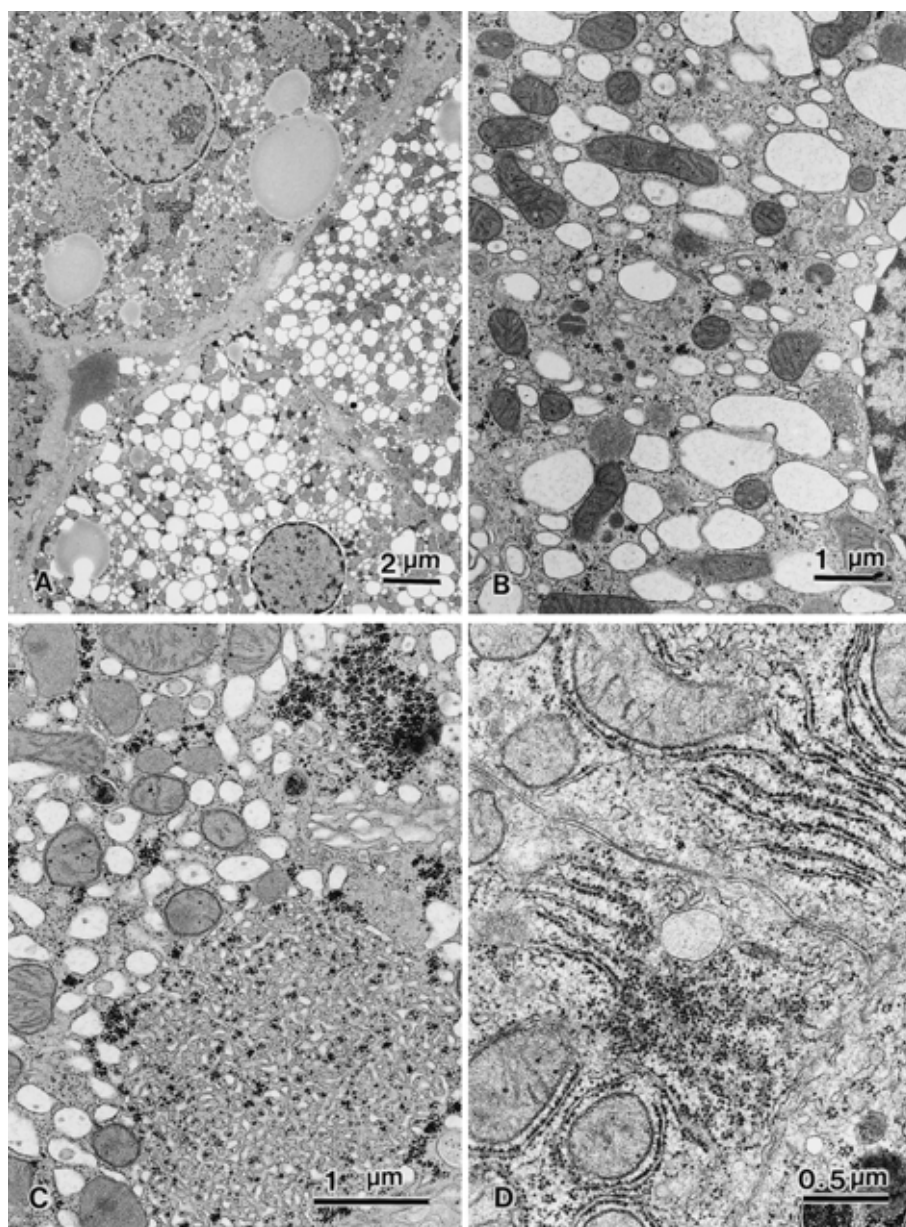


Fig. 7 Electron micrographs show liver damage at 6 hrs in the group treated with  $\text{CCl}_4$  followed by pHGF. A: Vacuolation and cisternae of rough endoplasmic reticulum are seen in the same hepatocyte. B: Granules from Golgi complex and glycogen granules are observed. C: Many glycogen granules and aggregated smooth endoplasmic reticula are observed. D: Degranulation of the rough endoplasmic reticulum is observed.

Table 1 にまとめた。

### 考 察

#### 1. $\text{CCl}_4$ による細胞膜障害と肝細胞壊死

$\text{CCl}_4$  が血液中に入るとフリーラジカルとなり肝細胞の細胞膜を障害することが知られている<sup>20-26</sup>。  $\text{CCl}_4$  投与による肝細胞壊死には2つの形態があり、凝固壊死と融解壊死が見られた。凝固壊死は小葉から離脱し

た肝細胞が類洞腔で Councilman 体として観察された。その多くは Kupffer 細胞により取り込まれている。この Councilman 体は単独で観察され、融解壊死のように集団で観察されることはない。凝固壊死は  $\text{CCl}_4$  単独群と pHGF 治療群においても6時間後と12時間後に見られるが、その数は少なく、24時間以後では観察されなくなる。 $\text{CCl}_4$  投与6時間後では肝細胞は中心静脈周囲を中心に空胞変性が惹起される。空胞は粗面小胞体が拡張して形成される。さらに12時間後の中心

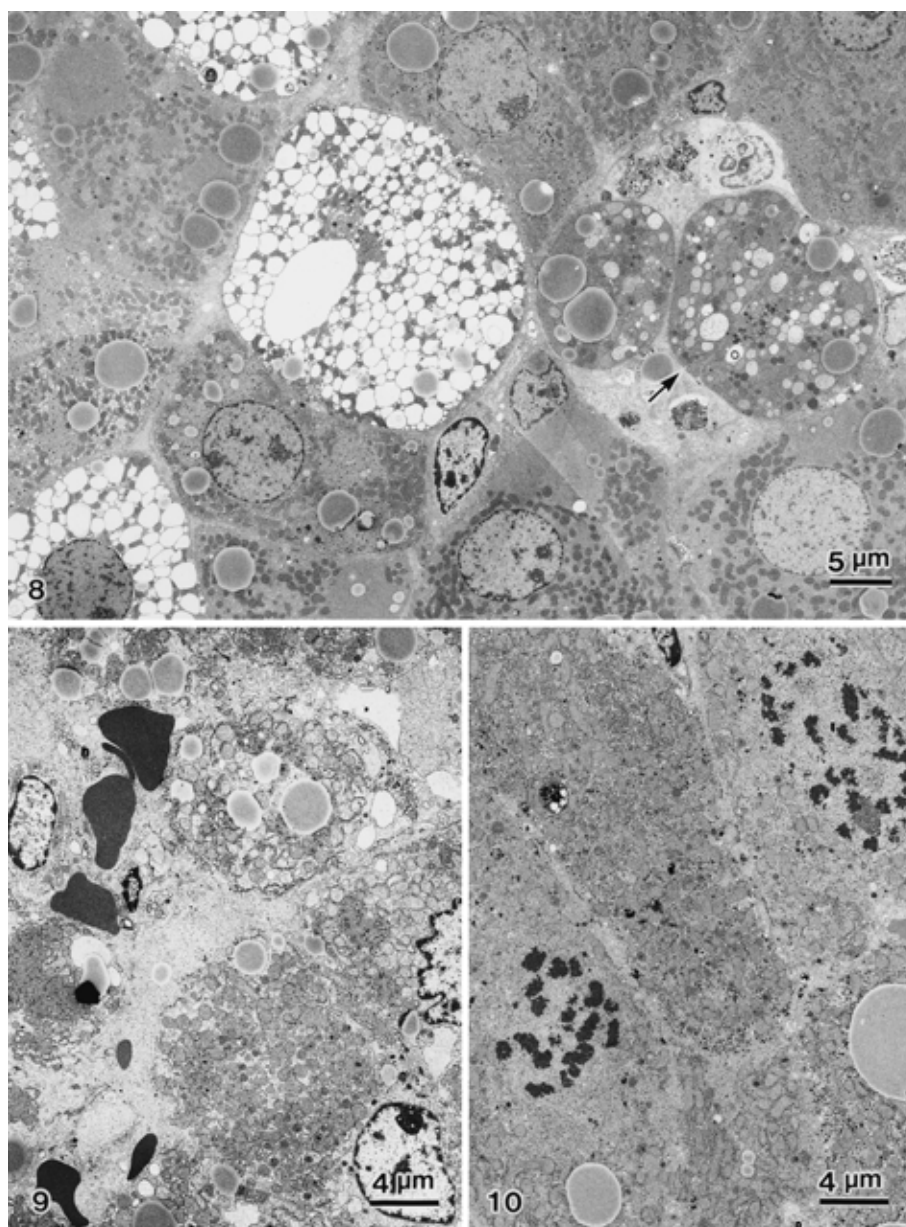


Fig. 8 Twelve hours, the Councilman body ( arrow ) and vacuolated hepatocytes are seen in the group treated with  $\text{CCl}_4$  followed by pHGF

Fig. 9 Twenty-four hours, lytic necrosis of hepatocytes are observed in the group treated with  $\text{CCl}_4$  followed by pHGF

Fig. 10 Forty-eight hours, many mitotic hepatocytes are evident in the group treated with  $\text{CCl}_4$  followed by pHGF

静脈周囲では肝細胞の空胞変性のみならず肝細胞の融解壊死像が多数観察されるようになった。このことは  $\text{CCl}_4$  投与後空胞変性した肝細胞が融解壊死に陥ることを示唆している。空胞変性は  $\text{CCl}_4$  により細胞膜障害が起こり凝固壊死とは逆に細胞内に水分が入り込むことにより惹起される。このことは空胞変性を示す肝細胞が正常と比べて大型化していることから推察できる。

## 2. GOP 値と GPT 値の変動

$\text{CCl}_4$  単独群において血中の GOT と GPT 値を測定すると 6 時間後にはすでに高値を示し、その後 48 時間で最高値となり 72 時間後には下降する。このような  $\text{CCl}_4$  投与後の GOT や GPT の値の変動は知られており<sup>27-31</sup>、今回の実験結果と良く一致している。このような GOT、GPT 値の変動の傾向は pHGF 治療群においても同様であるが、 $\text{CCl}_4$  単独群と比べて GOT、GPT 値の低下は著明であった。血清 GOT、GPT の値は炎症



Table 1 Pathological changes of hepatocytes in the groups treated with CCl<sub>4</sub> alone and treated with CCl<sub>4</sub> followed by pHGF

	CCl <sub>4</sub> groups			t-treatment of pHGF groups		
	glycogen granule	Vacuolation	lytic necrosis	glycogen granule	Vacuolation	lytic necrosis
6h	+	++	-	++	±	-
12h	±	+	++	+	+	-
24h	+	+	++	++	+	+
48h	++	+	++	++	±	+
72h	++	-	+	+++	-	±

glycogen granule: + a few, ++ several, +++ normal (a amount of glycogen granule in hepatocytes)  
 vacuolation of hepatocytes: + a few, ++ several (5-10% of the total hepatocytes), lytic necrosis of hepatocytes: + a few, ++ several (10-20% of the total hepatocytes)

などによる細胞膜障害,あるいは肝細胞の壊死により上昇すると考えられる.今回の観察結果からも肝細胞の空胞変性や壊死像と一致して GOT, GPT の値が変動した.すなわち, CCl<sub>4</sub> 投与 6 時間後ですでに GOT, GPT の値は正常と比べて増加が著明である.しかし,同時期では肝細胞の融解壊死像は観察されず,肝細胞の変性は細胞膜障害に伴う粗面小胞体の拡張やグリコーゲン顆粒の消失である.このことは血中 GOT, GPT 増加が肝細胞壊死のみで起こるのではなく,肝細胞の膜障害によっても増加することを示している.肝細胞の融解壊死像は CCl<sub>4</sub> 単独群では 12 時間後, pHGF 治療群では 24 時間後に出現する.この肝細胞の融解壊死に伴って GOT, GPT の値はさらに高値となっている. CCl<sub>4</sub> 投与 72 時間後でも GOT, GPT の値は正常群と比べて高値である.このことは同時期の中心静脈周囲に融解壊死した肝細胞が残存していることから裏づけられる.

### 3. グリコーゲン顆粒の消失

G-6-P はグリコーゲン形成に関与する酵素であり,粗面小胞体に局在しており, CCl<sub>4</sub> 投与 15 分後で G-6-P の活性が低下し始め,1 時間後では門脈域周囲の肝細胞のみに G-6-P の活性が見られるとの報告がある<sup>32,33</sup>. 今回の実験から CCl<sub>4</sub> 投与 6 時間後では PAS 陽性の肝細胞は門脈域周囲に残存するのみであり,上記の組織化学的に G-6-P を検索した結果<sup>34</sup>と一致していた. pHGF 治療群では 6 時間後,すなわち pHGF 投与 2 時間後であるにもかかわらず CCl<sub>4</sub> 単独群と比較して PAS 陽性細胞は多数残存している.また,12 時間後では CCl<sub>4</sub> 単独群ではほとんどの肝細胞が PAS 陰性である.しかし, pHGF 治療群では PAS 陽性細胞は門脈域周囲に多数残存していた.このことは pHGF が CCl<sub>4</sub> による G-6-P の失活をある程度抑制したものと考

えられ, G-6-P が局在している粗面小胞体の変性を抑制している電顕的所見とも一致している. CCl<sub>4</sub> 単独群において 24 時間後では PAS 陽性細胞が出現する.このことはグリコーゲン形成が再び開始したことを示唆している.しかし,72 時間後においても PAS 陰性細胞が散在的にみられ完全には回復していない. pHGF 治療群では 72 時間後にはほぼ完全に回復している.

### 4. 粗面小胞体の障害

CCl<sub>4</sub> 投与 6 時間後では,粗面小胞体の変性による拡張から,肝細胞障害は 3 型に分類された. I 型は粗面小胞体が大きく拡張し,空胞化している細胞である.この細胞はゴルジ装置や滑面小胞体も拡張している. II 型は粗面小胞体が拡張しシスターナを形成している細胞である.このような細胞では細胞内に滑面小胞体の凝集した小体が観察される. III 型は拡張した粗面小胞体内に蛋白顆粒が出現している細胞である.これら I, II, III 型の細胞にはグリコーゲン顆粒が消失している.また,粗面小胞体の拡張以外にも CCl<sub>4</sub> 投与により粗面小胞体の変性が観察された.すなわち,粗面小胞体のポリゾームが脱顆粒している細胞である.この肝細胞はグリコーゲン顆粒の消失や粗面小胞体の拡張像は認められない.

pHGF 治療群 6 時間後においても CCl<sub>4</sub> 単独群 6 時間後と同様に細胞障害が認められる.しかし, CCl<sub>4</sub> 単独群と比較してすべての細胞にグリコーゲン顆粒が認められる.そして, pHGF 治療群では粗面小胞体の空胞あるいはシスターナはともに CCl<sub>4</sub> 単独群より小型である.その後 pHGF 治療群においても空胞変性した肝細胞が増加している.空胞変性が見られる肝細胞障害像は CCl<sub>4</sub> 単独群と同様に 48 時間後まで観察されたが, pHGF 治療群ではその数 CCl<sub>4</sub> 単独群と比較して少ない.これらの事実は CCl<sub>4</sub> による肝細胞膜障害を

pHGF がある程度抑制したものと考えられる。

Edward<sup>35</sup> は CCl<sub>4</sub> 投与により肝細胞内で合成されるアルブミンとファイブロネクチンを合成するアミノ酸が減少することを報告した。小原ら<sup>36</sup> は肝細胞のアルブミン遺伝子発現が CCl<sub>4</sub> によって低下することを示した。これらのことは CCl<sub>4</sub> で障害を受けた肝細胞は蛋白合成が阻害されることを明確にしたものと言える。しかし、III 型の障害を受けた肝細胞には粗面小胞体内に蛋白顆粒が増生している。pHGF 治療群ではこのような蛋白顆粒の出現は少ない。この蛋白あるいは糖蛋白がどのような役割を示すかは明確ではない。しかし、障害を受けた肝細胞のみに合成されることから何か細胞修復に関与している可能性があるものと考えられる。粗面小胞体の脱顆粒像がみられる肝細胞は CCl<sub>4</sub> 単独群、pHGF 治療群の両群において 6、12 時間後に認められる。この変化は CCl<sub>4</sub> 以外に抗生物質 (puromycin など) を投与したマウス肝臓にも見られている<sup>37</sup>。

#### 5. CCl<sub>4</sub> による肝障害に対する pHGF の治療効果

CCl<sub>4</sub> 投与により急速に肝細胞内のグリコーゲン顆粒の消失と空胞変性が発生する。そして、空胞変性に引き続いて肝細胞の融解壊死が惹起される。これら変性あるいは壊死した肝細胞は PAS 陰性細胞として光顕的に観察されるものである。これら CCl<sub>4</sub> による肝障害は pHGF により良く抑制されている (Table 1)。前述したように CCl<sub>4</sub> はフリーラジカルとなり、肝細胞の細胞膜や粗面小胞体の単位膜を障害する。これらのことから CCl<sub>4</sub> 投与による肝細胞の膜構造障害を pHGF が安定化させ、保護したものと考えられる。

pHGF は HGF と同様に肝細胞の増殖能を高めたり、肝線維化を抑制することにより肝炎を治癒させることが動物実験から証明されている<sup>9</sup>。しかし、今回の実験結果から、pHGF は肝細胞の細胞膜や粗面小胞体の単位膜を保護することにより、肝機能障害を軽減させる作用があることが強く示唆された。

#### 結 語

ラットに CCl<sub>4</sub> を投与して実験的に急性肝炎を惹起させ、pHGF の治療効果を生化学的および形態学的に検索した。

1) pHGF 治療群は CCl<sub>4</sub> 単独群と比べて血清中の GOT と GPT の値を低下させた。

2) pHGF は CCl<sub>4</sub> による肝細胞のグリコーゲン顆粒の減少を抑制し、回復を促進した。

3) pHGF は CCl<sub>4</sub> 投与による肝細胞の空胞変性や、引

き続き発生する融解壊死を抑制した。

これらのことから CCl<sub>4</sub> 投与による肝障害に対して pHGF は細胞膜や粗面小胞体の単位膜障害を保護することが示唆された。

本研究を行うにあたり、技術指導および御協力頂きました中央電子顕微鏡研究施設の安達彰子、佐佐木喜広技術員および中央電子顕微鏡研究施設の皆様に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

1. Zhang Y, Chen G, Kong X, Zheng G, Yang F, Hu J: Purification and application of pHGF in liver disease patients. *J Clin Hepatol* 1991; 7: 15-19 (Chinese)
2. Zhang Y, Kong X, Zheng G, Chen G, Yang E: Evaluation of hepatocyte growth-promoting factors in treating 1687 cases of fulminant hepatitis (brief report). *Chinese Med J* 1995; 108: 928-929.
3. Kong X, Zhang Y, Zhou Q, Zhen G, Yang L, Zhang C, Xiao X: Establishment of monoclonal antibody against promoting hepatocyte growth factor and their immunohistochemical studies. *Chinese Journal of Pathophysiology* 1994; 10: 165-168 (English abstract)
4. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-1459.
5. Russell WE, McGowan JA, Bucher NLR: Partial characterization of hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* 1984; 119: 183-192.
6. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342: 440-443.
7. Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Gohda E, Daikuhara Y, Kitamura M: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 967-973.
8. Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit Rev Oncol* 1992; 3: 27-54.
9. Sato S, Dai W, Liu X, Asano G: The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: an ultrastructural study. *Med Electron Microsc* 1999; 32: 184-192.
10. Okano J, Shiota G, Kawasaki H: Protective action of hepatocyte growth factor for acute liver injury caused by D-galactosamine in transgenic mice. *Hepatology* 1997; 26: 1241-1249.
11. Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T, Higashio K: Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996; 24: 636-643.
12. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP,

- Rogler CH: Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat storing cells. *Hepatology* 1992; 15: 5-11.
13. Morita M, Watanabe Y, Akaike T: Protective effect of hepatocyte growth factor on interferon-gamma-induced cytotoxicity in mouse hepatocytes. *Hepatology* 1995; 21: 1585-1593.
  14. Lu L, Wang F, Jia Y, Pan Y, Li J, Yu Y, Zhang Y: The influence of pre-treatment with pHGF on the Fas antigen expressions in mouse hepatocyte damages induced by Con-A. *J Shang Hai Immu* 1998; 18: 332-333. (English abstract)
  15. Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6489-6493.
  16. LaBrecque DR, Steele G, Fogerty S, Wilson M, Barton J: Purification and physiol-chemical characterization of hepatic stimulator. *Hepatology* 1987; 7: 100-106.
  17. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N: Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1993; 268: 10024-10028.
  18. Rao K, Recknagel RO: Early onset of lipoperoxidation in rat liver after CCl<sub>4</sub> administration. *Expl Mol Pathol* 1968; 9: 271-278.
  19. Reynolds ES: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol* 1963; 19: 139-156.
  20. Villarruel MC, Castro JA: Irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal phospholipids. Free radical nature of the reactive specie and alterations in the physio-chemical properties of the target fatty acids. *Res Comm Chem Pathol and Pharm* 1975; 10: 105-116.
  21. Uehleke H, Hellmer KH, Tabarelli S: Binding of <sup>14</sup>C-carbon tetrachloride to microsomal proteins in vitro and formation of CHCl<sub>3</sub> by reduced liver microsomes. *Xenobiotica* 1973; 3: 1-11.
  22. Slater TF: Free-radical mechanisms in tissue injury (Review article) *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
  23. Ansari GAS, Mollen MT, Reynolds: Evidence for in vivo covalent binding of CCl<sub>3</sub>· Derived from CCl<sub>4</sub> to cholesterol of rat liver. *Biochem Pharm* 1982; 31: 3509-3510.
  24. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL: Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac Ther* 1989; 43: 139-154.
  25. Mansuy D, Beaune P, Crestell T, Lange M, Leroux J-P: Evidence for phosgene formation during liver microsomal oxidation of chloroform. *Biochem Biophys Res Commum* 1977; 79: 513-517.
  26. Reynolds ES, Thiers RE, Vallee BL: Mitochondrial function and metal content in carbon tetrachloride poisoning. *J Bion Chem* 1962; 237: 3546-3551.
  27. Honma T, Suda M: Changes in plasma lipoproteins as toxicity markers for carbon tetrachloride, chloroform, and dichloromethane. *Industrial Health* 1997; 35: 519-531.
  28. Takayama F, Egashira T, Kudo Y, Yamanaka Y: Effects of anti-free radical interventions on phosphatidylcholine hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. *Biochemical Pharmacology* 1993; 46: 1749-1757.
  29. Egashira T, Nagai T, Kimba Y, Murayama F, Goto S, Kudo Y, Sudo S, Kono T, Yamanaka Y: An injury of the liver caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Folia Pharmacol Japan (Eng Abstr)* 1991; 97: 339-350.
  30. Adachi Y, Horii K, Suwa M, Tanihata M, Ohba Y, Yamamoto T: Serum glutathione transferase in experimental liver damage in rats. *Gastroenterologia Japonica* 1981; 2: 129-133.
  31. Nakanishi Y, Okuda T, Abe H: Effects of geraniin on the liver in rats III-correlation between lipid accumulations and liver damage in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Natural Medicines* 1999; 53: 22-26.
  32. Recknagel R, Litteria M: Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver. *Am J Pathol* 1960; 36: 521-531.
  33. Recknagel R, Lombardi B: Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to a new hypothesis regarding the pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation. *J Biol Chem* 1961; 236: 564-569.
  34. Chauveau J, Moule Y, Rouiller C, Scheebeli J: Isolation of smooth vesicles and free ribosomes from rat liver microsomes. *J Cell Biol* 1962; 12: 17-29.
  35. Edward A, Smuckler M, Oscar A, Iseri N, Earl P, Benditl M: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. *J Exp Med* 1962; 116: 55-71.
  36. 小原啓彦, 桑波田雅士, 加藤章信, 岡 達三: 四塩化炭素急性肝障害ラットにおけるアルブシン遺伝子発現の調節機構. *肝臓* 1995; 36: 289-295.
  37. Reid I, Shinozuka H, Sidransky H: Polyribosomal disaggregation induced by puromycin and its reversal with time: An ultrastructural study of mouse liver. *Lab Invest* 1970; 23: 119-129.

( 受付 : 2000 年 7 月 11 日 )

( 受理 : 2000 年 10 月 11 日 )