

## 2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2002年 3月 11日

財団法人 日中医学協会  
理事長 殿

研究者氏名 金 玉蘭   
所属機関名 高知医科大学 第一病理学教室  
指導責任者氏名 円山 英昭  
職 名 大学院生  
所 在 地 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮  
電 話 088-880-2331 内線 2632

### 1. 研究テーマ

肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について

### 2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表  ・ 無 (学会名・演題)

第2回 細胞病理談話会: Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管再形成と髄外造血の相関について

第33回日本臨床電子顕微鏡学会: 肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序について

第15回肝臓洞壁細胞研究会: 肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について—Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラット肝の病理学的観察

第91回日本病理学会総会: Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管の再形について

(2) 学会誌等に発表した論文  ・ 無 (雑誌名・論文名)

Virchows Archiv

Tissue remodelling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine

投稿中

### 3. 今後の研究計画

1. 肝壊死後の再構築の際、血管新生と線維化における mast cell の免疫反応と肝組織内での分布を統計学的にまとめ、mast cell と組織変化間の関係に対して病理学的に検討を行う。
2. 同モデルでの肝星細胞初代培養上で分子病理学観察を行い、肝星細胞の活性化と線維化機序に関わるサイトカインの network を調べる。
3. 今までの研究結果をもとにして、同実験モデルで観察した亜広範性肝壊死後の血管新生についてまとめを行い、論文を完成させる。

### 4. 指導責任者の意見

金玉蘭殿は現在、本学の大学院生命医学専攻、病理病態制御部門の二年生（私費留学生）です。貴協会より平成13年度研究助成をいただき、とくに本年度の研究テーマである『DMNによるラット肝組織の傷害とその再構築機序』について新知見を見出し、『Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管再形成と髄外造血の相関』、『肝星細胞 (HSC) の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について—Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラット肝の病理学的観察』などについて、それぞれ研究会（東京大学、埼玉医科大学）、および学会（長崎）で発表を行い、内容は『Tissue remodelling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine』としてまとめ、Virchows Archiv に投稿しました。なお、分子生物学的実証に欠けていますが壊死巣内の血管新生についても angiogenesis や vasculogenesis 以外の“幹細胞”的細胞による類洞形成が示唆されており、研究の意義は大きく、研究の一層の進展が期待されます。優れた研究資質を有する金玉蘭殿の指導者として、適切な指導と研究環境の設備についてさらに責任を果たしたいと考えます。

指導責任者氏名 円山 英昭



### 5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

## 肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と

### 組織の再構築について

研究者氏名 金玉蘭  
中国所属機関 延辺大学医学院附属病院病理科  
日本研究機関 高知医科大学第一病理学教室  
指導責任者 教授 円山 英昭  
共同研究者 黒田直人、張彦虎、戸井慎、林芳弘、宮崎恵利子、郭麗梅

#### 要 旨

肝線維化では成因の如何を問わず、肝細胞傷害局所で活性化した HSC が線維化の進展、増強に中心的役割を果たす。一方、これまで、HSC が壊死、脱落した急性亜広範性肝壊死後の線維化機序についての報告はない。今回、DMN 大量1回投与による HSC 壊死脱落巣における線維化機序を病理学的に観察した。7 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹に、1%DMN 50mg/kg を腹腔内に 1 回注射し急性 DMN 肝傷害モデルを作成した。注射後 6, 12, 24, 30, 36 時間及び 2, 3, 5, 7, 14 日に肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン固定後、各実験群及び無処置対照群とも HE、鍍銀染色及び  $\alpha$ -SMA、BrdU の免疫染色を行い、また、全例肝組織の一部を電顕観察した。肝臓は投与 12 時間より小壊死巣が生じ、36 時間後には亜広範性出血性肝壊死の像（全域  $\alpha$ -SMA 陰性）を呈する。 $\alpha$ -SMA 陽性の活性化 HSC は 5 日目になり、初めて、壊死部と遺残した実質の境界部に出現し、不完全に残存した鍍銀線維に沿って壊死部内に伸展する。7 日目、実質内には瀰漫性に筋線維芽細胞の増生が見られる。BrdU と  $\alpha$ -SMA の二重染色では実質内で BrdU 陽性の筋線維芽細胞が散見された。投与 14 日後には線維化がさらに進展、増強する一方で、炎症細胞浸潤は消褪し、細束状の C-C bridging fibrosis の像を呈する。HSC の壊死脱落を伴う亜広範性肝壊死では遺残部の肝組織内の HSC および壊死巣内の中心静脈周囲の間質細胞が活性化され、筋線維芽細胞化し、壊死巣内に遺残した鍍銀線維の網工に沿って移動、伸展して、壊死後性線維化に関与し再生肝細胞と共に組織の再構築にあずかる。

**Key Words** 肝星細胞、組織再生、肝線維化、Dimethylnitrosamine、ラット

#### 緒 言：

肝線維化では成因の如何を問わず、肝細胞傷害局所でサイトカインの相互作用により活性化した HSC が線維化の進展、増強に中心的役割を果たす(1-5)。一方、これまで、HSC が壊死、脱落した急性亜広範性肝壊死後の線維化機序についての報告はない。今回、DMN 大量1回投与による HSC 壊死脱落巣における線維化を伴う肝組織の再構築の機序を病理学的に観察した。

#### 対象と方法：

7 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹(180-200g)に、1%DMN 50mg/kg を腹腔内に 1 回注射し急性 DMN 肝傷害モデルを作成した。注射後 6, 12, 24, 30, 36 時間及び 2, 3, 5, 7, 14 日 (n=3) に肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン固定後、各実験群及び無処置対照群 (n=3) とともに HE 染色、鍍銀染色、PAS 染色、D-PAS

染色、鉄染色、Naphthol AS-D chloroacetate (N AS-D CA) esterase 染色及び $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA; 1A4, DAKO)、rat macrophage (ED-1, ED-2, Serotec, oxford, England)、bromodeoxyuridine (BrdU; Bu20a, DAKO)の免疫染色 (SAB 法) を行い、また、全例肝組織の一部を電顕観察した。

## 結 果:

DMN 投与6時間より、(N AS-D CA) esterase 染色陽性の好中球が肝類洞内および類洞内皮に付着する形で認められ、次後、次第に数を増す。肝壊死巣は投与12時間より zone 3 及び 2 に散在する径約50 $\mu$ m、境界不整の小壊死巣として生じ、好中球および ED-1 陽性の macrophage の浸潤も増強する。36時間後には肝壊死の強さと範囲は最大となり Zone 3-2 に広がる亜広範性壊死の像をする (図1)。壊死巣では肝細胞のみならず類洞内皮や HSC も一様に壊死して、鍍銀線維網のみが不完全に遺残した状態で、多量の壊死肝細胞、浸潤した ED-1 陽性 macrophage, 好中球、リンパ球や血小板などが認められる出血性壊死の像を示し、壊死巣は全域 $\alpha$ -SMA 陰性である (図2)。壊死部では、次後、ED-1 陽性 macrophage の数量の増加と対照的に壊死肝細胞や赤血球が減少し、壊死組織の処理が進行する。DMN 投与5日目になると壊死巣は macrophage の他には部分的に残存した細い鍍銀線維片と少数の赤血球などをいれた形状不整な組織空隙 (punched-out lesion) となり、壊死巣と肝実質の境界は明瞭となる。この時期になり、壊死巣に接する肝実質の辺縁部に実質の表面を被うように $\alpha$ -SMA 陽性の活性化 HSC (筋線維芽細胞) が初めて出現し、以後、壊死巣内に残存した鍍銀線維に沿って芽出状に伸展する (図3)。7日目では壊死巣内の中心静脈周囲や肝実質内 (BrdU 陽性肝細胞の数が増加) に $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞の増生が認められる。肝実質内の $\alpha$ -SMA 陽性細胞の分布は瀰漫性であり、一部は BrdU 陽性の像を示す (図4)。

以後、壊死巣は再生肝細胞により次第に置換されるが Zone 3 には筋線維芽細胞や増生した鍍銀線維、膠原線維、siderophage, ceroid macrophage を含めた炎症細胞の浸潤像を伴う肉芽組織が形成され、その後、線維束が伸展し、DMN 投与14日後には隣接する中心静脈域をつなぐ細索状の C-C bridging fibrosis が形成される (図5)。

## 考 察:

DMN 1回大量投与による亜広範性出血性壊死では壊死巣内の HSC はすべて壊死、脱落している。この事実は壊死部の HSC が肝細胞の壊死後、短時間内に、筋線維芽細胞化 ( $\alpha$ -SMA 強陽性) するヒトの massive and submassive hepatic necrosis 例 (6) や四塩化炭素の急性肝傷害実験モデル例とは著しく異なっている (7)。DMN による HSC の壊死脱落巣では壊死組織の処理後、中心静脈周囲や壊死巣に接する肝実質の表面に $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞が出現し、遺残した鍍銀線維に沿って伸展する。一方、肝実質内の HSC の一様な $\alpha$ -SMA 陽性像や $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup> 細胞の散在像は壊死巣内に伸展する $\alpha$ -SMA 陽性細胞の由来を考える際、示唆に富む所見であり、壊死巣内の $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞は遺残肝実質内の HSC に由来し、活性化して、壊死巣内に遺残した鍍銀線維の網工に沿って移動、伸展して肝細胞の再生に必要な類洞壁の再構築の関与する一方で、不完全再生部では C-C bridging fibrosis の形成にあずかると考えられる。なお、従来の四塩化炭素や DMN などの化学物質の反復頻回投与による線維化モデルでは新旧の病変が混在し、投与期間が長い場合細胞や組織に適応現象が生じるなど、病理組織像の性状や成立機序が複雑であったが、DMN 1回大量投与モデルでは肝壊死から線維化を伴う肝組織の再構築までの変化が時間の経過につれ一元的に観察される利点がある。

## 参考文献:

1. Friedman SL: The cellular basis of hepatic fibrosis—Mechanisms and treatment strategies. N Engl J

Med 24 : 1828-1835, 1993

2. Tsukamoto H : Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 23 : 911-916, 1999
3. Olaso E, Friedman SL : Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 29 : 836-847, 1998
4. Failli P, Defranco RMS, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, Batignani G, Guerra CT, Laffi G, Gentilini P, Pinzani M : Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 119 : 479-492, 2000
5. Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A, Milani S, Rosso MD : Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatol* 29 : 868-878, 1999
6. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, Miyazaki E, Hara H: Sequential changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. *Vichows Archiv* 426: 95-101, 1995
7. Pritchard DJ, Wright MG, Sulsh S, Butler WH: The assessment of chemically induced liver injury in rats. *J Appl Toxicol* 7: 229-236, 1987

図の説明

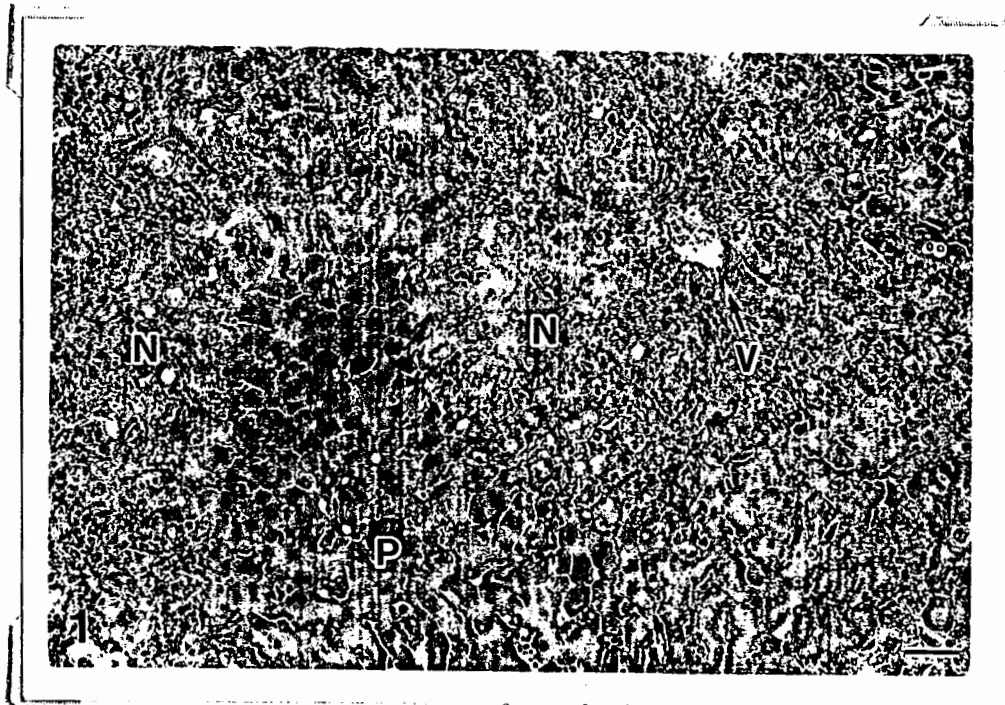


図1. DMN 投与 36 時間. HE 染色. 36 時間目には投与 12 時間目より生じた Zone 3 を中心とした出血や好中球浸潤を伴う形状不整、境界不明瞭な肝細胞凝固壊死巣が最高の強さと広がりを示すようになり、壊死巣内にはマクロファージが多数浸潤し、壊死組織や赤血球を貪食する。N: 壊死巣、P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=40  $\mu$ m

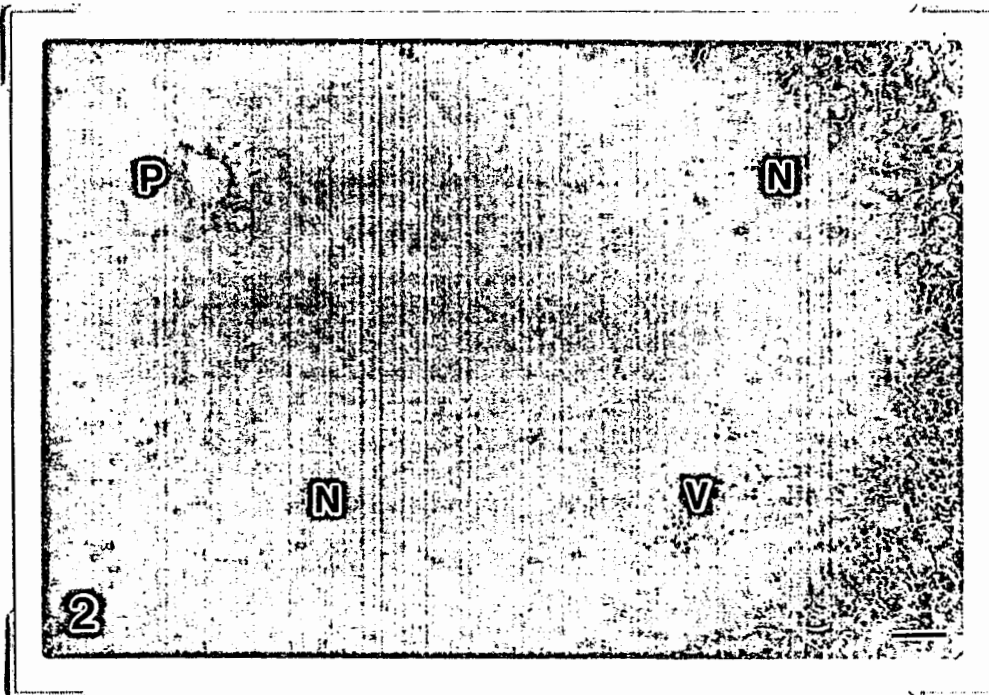


図2. DMN 投与 36 時間目.  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 免疫染色。筋線維芽細胞に形質を転換した $\alpha$ -SMA 陽性肝星細胞は壊死巣内 (N) には認められない。P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=40  $\mu$ m

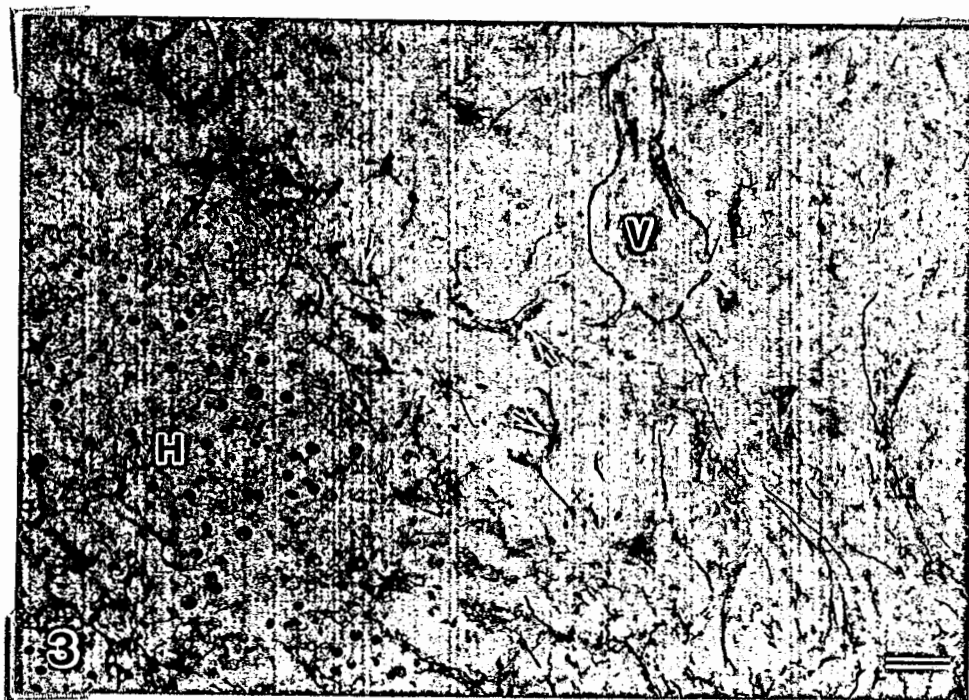


図3. DMN 投与 5日目. 鍍銀染色 (黒色) と $\alpha$ -平滑筋アクチン (茶色) 2重染色.  $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞は (矢印) 壊死と遺残した実質の境界部に出現し、不完全に残存した鍍銀線維に沿って壊死部に伸展する。H: 肝実質、V: 中心静脈 Bar=80  $\mu$ m

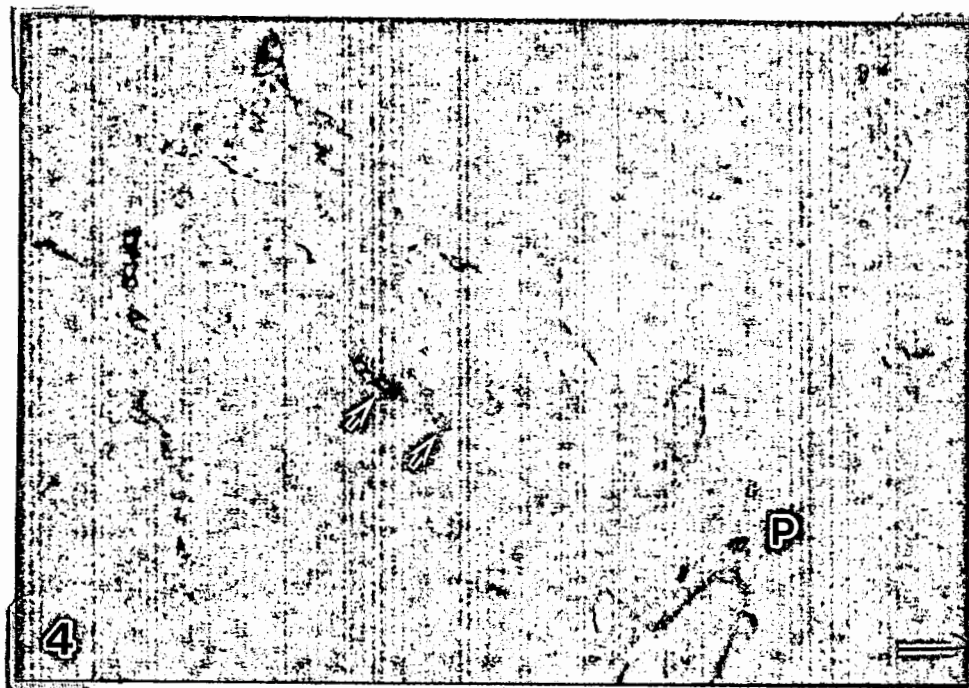


図4. DMN 投与 7日目. BrdU (茶色) と $\alpha$ -平滑筋アクチン (ブルー) 2重染色. 壊死巣周囲の肝実質内では $\alpha$ -平滑筋アクチンとBrdU陽性の筋線維芽細胞 (矢印) が散見される。P: 門脈域 Bar=40  $\mu$ m

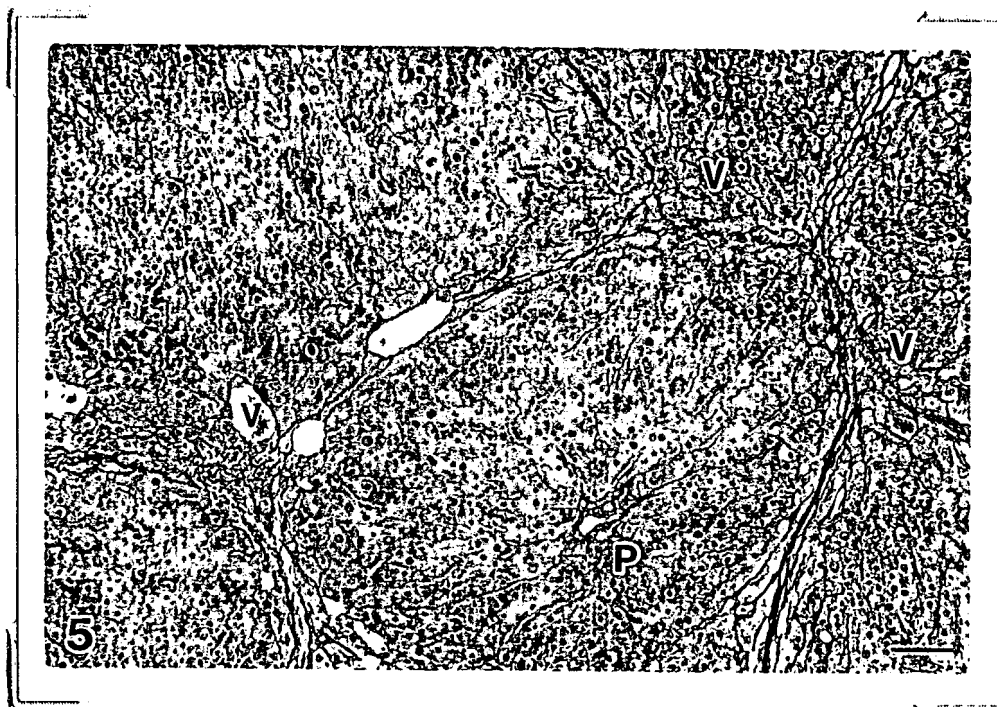


図5. DMN 投与 14 日目.  $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性筋線維芽細胞は中心静脈周囲、およびその部分から伸展する細い新生線維化束で認められる。P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=80  $\mu$ m

注：本研究は、2001年8月4日「第2回細胞病理談話会」、2001年9月28日「第33回日本臨床電子顕微鏡学会」、2001年12月15日「第15回肝臓洞壁細胞研究会」にて口演発表。

作成日：2002年3月11日