

のである。

今年度は1)凍結保存ヒト肝細胞における細胞内カルシウム濃度やホルモン応答などの生理学的特性について検討するとともに、2)ヒト肝 cDNA ライブラリーより新規に単離したアリル ST の cDNA (ST1B2 cDNA) がヒトの生体内における T3 の代謝に特異的に関与するアリル ST 分子種であるかを検討した。また、これら分子種に対する抗体を用い、各々の分子種のヒト肝含量を定量し、肝可溶性画分における硫酸抱合活性との相関性を比較した。3) わが国におけるヒト組織の供給体制と実施に向けた検討項目、について検討した。

## B. 研究方法

### B-1 凍結ヒト肝細胞についての研究

ヒト単離肝細胞サスペンションは株式会社ケーエーシを通じて、凍結標本の二つのロット (HH-018, HH-022) を得た。この肝細胞は International Institute for the Advancement of Medicine (IAM) がヒト肝をコラゲナーゼ処理することにより単離したもので、液体窒素の気相中に凍結保存されたものである。使用にあたっては凍結細胞の入ったチューブを室温の水の中につけ、凍結を解いた。次に Poly-L-Lysine (MW: 75,000~150,000) を塗布した直径 25mm のカバーガラス上に約  $10^6$  cells/ml 細胞液 100 $\mu$ l を滴下し、約 20 分間静置し、細胞をカバーガラス面に接着させた。その後溶液をパスツールピペットで吸引し、5% ウシ胎児血清を含む Williams' E 培地 1.0ml を加え、実験に使用するまで、37°C の炭酸ガスインキュベータ中に置いた。

細胞の観察、および各種パラメータの測定は共焦点レーザー顕微鏡ニコン RCM8000 を用いて行った。この顕微鏡は高出力アルゴンレーザーを励起光源として用いて、高分解能蛍光顕微鏡像を取得する装置であるが、今回レーザー光源による DIC 像の取得が可能となるようにノマルスキー微分干渉装置(DIC)を開発装着し、さらにはビデオコントラスト増強装置を用いて画像処理することにより、生細胞の細胞形態を詳細に検討することを可能にした。レンズは 40 倍の水浸対物レンズ (開口数 1.15) を用いた。顕微鏡観察は 32°C で行った。

細胞内遊離カルシウムイオン濃度はカルシウム蛍光プローブ indo-1 を細胞内に取り込ませて測定した。はじめに indo-1 の膜透過型誘導体で

あるアセトキシメチル体 (indo-1/AM) 1mM DMSO 溶液 5 $\mu$ l を溶解補助剤 Pluronic F-127 の 5% DMSO 溶液 1 $\mu$ l と攪拌させた後、1ml のクレブスリンゲル HEPES 溶液 (KRH 液) に懸濁させた。ついで、上記の細胞の培養液を吸引した後、indo1/AM 液と交換し、遮光下、室温で振盪しながら約 1 時間インキュベートした。次に細胞の付着したカバーガラスを、底をくりぬいたプラスチックシャーレの底部に接着させ、KRH 溶液を加えて顕微鏡のステージ上に置いた。画像は 351nm で励起し、400~440nm および 440nm 以上の二つの波長域の蛍光強度を測定し、その蛍光強度比像を得た。蛍光強度比から細胞内カルシウムイオン濃度への換算は in situ キャリブレーション法を用いて行った (Bioimages, 2, 7-14 (1994))。

その他、ミトコンドリアの形態は細胞を Rhodamine 123 0.5 $\mu$ M で処置し、染色像として捉えた。

### B-2 ヒト肝硫酸転移酵素に関する研究

#### 材料

ヒト肝サンプル (H75, H90, H100, H102, H112 および H116) は Dr. Charles A. Tyson (SRI International Toxicology Laboratory) から供与された。

#### 発現ベクターの構築

大腸菌および哺乳動物発現ベクターに挿入するためのインサート cDNA (6xH ST cDNA) は、ST1A1、ST1B1 もしくは ST1C1 cDNA を鋳型としそれぞれに対応する 5' (ST-Lys) プライマーおよび 3' (ST-3') プライマー (Table 6-1) を用いた PCR により得た。

#### リコンビナント酵素 (6xH ST) の大腸菌による発現および精製

構築した発現プラスミドは、大腸菌株 M15[REP4] 細胞に塩化ルビジウム法にて導入した。得られた形質転換株は、150 mg/ml アンピシリンおよび 25 mg/ml カナマイシンを含む LB 培地にて 37°C にて一晩培養した。この培養液を 50 倍希釈により抗生物質を含む LB 培地に接種し、OD600 が 0.7~0.9 になるまで 37°C にて培養した後、超音波破碎後、10,5000 x g、60 分間遠心し、その上清を可溶性画分として得た。この可溶性画分に Ni-NTA アガロースカラムにて精製した。

#### リコンビナント酵素 ((D6xH)ST) の調製

6xH ST の融合部位は EK により特異的に切

断した。

### リコンビナント酵素 (ST/COS-1) の哺乳動物細胞による発現

構築した発現プラスミド (pCMV4-6xH ST) は、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法により精製し、COS-1 細胞にエレクトロポレーション法にて導入した。トランスフェクションした細胞はさらに 2 日間培養後、超音波破碎後、10,5000 x g、60 分間遠心し、その上清を可溶性画分として得た。

### ラット肝可溶性画分の調製

7 日、17 日、26 日、および 34 日齢、9 週齢および 2 年齢の雌雄 SD ラット (日本エスエルシー) を用い肝可溶性画分を調製した。これら可溶性画分は -80°C にて保存した。なお、タンパクの濃度は、Bradford の方法により、BSA を標準物質として定量した。

### 抗 6xH ST 抗体の作製

精製 6xH ST1A1、6xH ST1B1 もしくは 6xH ST1C1 (100 mg) をフロインドの完全アジュバントと 1:1 の容量にて混合し、New Zealand 白色ウサギ (日本エスエルシー) に皮内免疫し、抗 6xH ST 抗体を作成した。

### 硫酸抱合活性の測定

a-ナフトール、b-ナフトール、p-NP、ドパミン、T3、E2 および DHEA に対する硫酸抱合活性は Sekura らの方法<sup>93)</sup>に準じ、<sup>[35S]</sup>PAPS 存在下、反応により生成した基質の標識硫酸抱合体を薄層クロマトグラフィー (TLC) により分離し、その放射活性を測定することにより定量した。

酵素の速度論的解析は Lineweaver-Burk プロットによる線形回帰解析により行った。

## C. 研究結果

### C-1 凍結ヒト肝細胞の viability に関する研究

#### ヒト肝細胞の形態観察

解凍直後の HH-018 細胞のノマルスキー微分干渉(DIC)像の特徴としては細胞内に直径数ミクロンの脂肪滴と思われる顆粒が観察されることである。数時間培養した初代培養ラット肝細胞では細胞内部にミトコンドリアをはじめとする細胞内オルガネラ像が明瞭にみえるのに対して HH-018 ヒト肝細胞では、細胞質中の多くを上記顆粒が占め、細胞内オルガネラは明瞭ではなかった。

そこで、特異的にミトコンドリアに集積する蛍光プローブ rhodamine 123 で染色したところ、一定の染色像は得られた。この染色像はラット

正常肝細胞のミトコンドリア染色像に比較して輪郭が明瞭ではないものの、細胞を脱共役剤の CCCP で処置すると rhodamine 123 の集積像が消えることから、ミトコンドリアを特異的に染色しているものと考えられた。

一方 HH-022 は 2 チューブについて試したが、どちらもカバーガラスへの細胞接着が悪く、ほとんどの細胞が浮遊状態にあった。かろうじて接着していた細胞については細胞形態は HH-018 と同様で、脂肪滴と思われる顆粒が観察された。さらに rhodamine 123 の染色像においても、かろうじて接着した細胞の 50%のみプローブの局在が観察され、それ以外の細胞では明瞭な染色像がみられず、多くの細胞ではミトコンドリアが脱分極状態にあることが示唆された。

### 細胞内カルシウムイオン濃度

ヒト肝細胞にカルシウム蛍光プローブ indo-1 を取り込ませると、脂肪滴様の顆粒には indo-1 は取り込まれなかった。顆粒の径はミクロン単位であり、共焦点レーザー顕微鏡を用いて顆粒領域の識別は十分に可能であるが、indo-1 の蛍光強度比の疑似カラー像では、画像のノイズのため顆粒部分を明瞭に識別できる像とはならないため、顆粒周辺の測定値は不正確なものとなった。しかしながら、顆粒領域以外の細胞質領域の蛍光強度比は明瞭に画像化され、HH-018 細胞では細胞間の測定値のばらつきは大きくなかった。この細胞をイオノマイシン 10 $\mu$ M で処置すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を反映した蛍光強度比の大きな上昇が認められた。また細胞外のカルシウムイオンを除き、さらに 1mM EGTA を加えた溶液中でイオノマイシン 10 $\mu$ M を加えると、細胞内カルシウムイオン濃度の低下を反映した蛍光強度比の減少が観察された。

次に上記の蛍光強度比の最大値と最小値を用いて in situ キャリブレーション法により、細胞内カルシウムイオン濃度を求めた。カバーガラスに接着した HH-18 細胞の中で約 5%の細胞は indo-1 を取り込んでおらず、細胞死の状態にあった。また 8%は濃度は極めて高く、600nM 以上という値を示した。しかし 80%近くの細胞は 100~300nM という正常値を示した。さらに顕微鏡のステージ上で 1 時間インキュベートしても、細胞内カルシウムイオン濃度は安定しており、70%以上の細胞では 100~300nM の範囲にあった (Fig.1)。

一方 HH-022 細胞の場合は、上記で述べたようにカバーガラスへの接着が悪く、かろうじて付着している細胞の場合でも、35%の細胞は indo-1 を取り込まなかった（あるいは漏出してしまっていた）。また細胞内カルシウムイオン濃度でも、100~300nM の範囲にあるものは付着していた細胞の 40%に過ぎなかった。さらにこの細胞を 1 時間、顕微鏡ステージ上でインキュベートすると、細胞内カルシウムイオン濃度は次第に上昇する傾向にあり、100~300nM の範囲にある細胞は 25%程度に減少した。

#### ホルモン性刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇反応

HH-018 細胞では、細胞内カルシウムイオン濃度は極めて安定した状態にあったので、 $\alpha$ -アドレナリン性刺激剤のフェニレフリン刺激を行って、細胞内カルシウムイオンの濃度変化を画像化してみた。その結果、細胞個々で刺激から上昇するまでの時間は異なるものの、約 80%の細胞で濃度上昇が観察された。さらに濃度上昇を詳細に画像化してみると、細胞によって形質膜近傍の特定の領域から上昇が始まり、細胞全体に上昇が伝搬するように伝わる、カルシウムウェーブ現象が観察された。

#### C-2 ヒト肝硫酸転移酵素に関する研究 ヒト ST 分子種の異種細胞発現

ST1A3、ST1A5、ST1B2、ST1E4 および ST2A3 の酵素化学的性質を明らかにするために、大腸菌からリコンビナント酵素 (6xH ST) を得た。また、これら 6xH ST は、ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。これら精製酵素は、電気泳動上の移動度が異なっており、その分子量はそれぞれ 34.0 (6xH ST1A3)、36.5 (6xH ST1A5)、34.5 (6xH ST1B2)、36.0 (6xH ST1E4) および 37.0 kDa (6xH ST2A3) であった。また、6xH ST1A5、6xH ST1B2、6xH ST1E4 および 6xH ST2A3 をウサギに免疫して得た抗体を用い、これら 6xH ST の抗体に対する反応性をウエスタンブロット解析により比較した。なお、抗 6xH ST1A5 および抗 6xH ST1E4 抗体は、他の 6xH ST と程度に差は認められたが、交叉性を示したため、反応前にそれ以外の 6xH ST で免疫吸収したものを使用した。その結果、免疫吸収した抗 6xH ST1A5 抗体は、6xH ST1A3 および 6xH ST1A5 と反応し、それ以外の 6xH ST とは反応しなかった。また、抗 6xH

ST1B2、免疫吸収した抗 6xH ST1E4 および抗 6xH ST2A3 抗体は、それぞれ対応する 6xH ST とのみ反応し、それ以外の 6xH ST とは反応しなかった。

6xH ST の融合部位は、EK により特異的に切断した。この融合部位を切断したタンパク ((D6xH)ST) は上記アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この (D 6xH)ST の電気泳動上での移動度は、6xH ST の移動度より 2.0 kDa 程小さい移動度を示した。さらに、(D 6xH)ST と 6xH ST とで上記で示した抗体との反応性に差があるかをウエスタンブロット解析により検討した結果、両バンドはほぼ同一の発色強度を示した。また、ヒト肝可溶性画分中において ST1A3 (32.0 kDa)、ST1A5 (34.5 kDa)、ST1B2 (32.5 kDa)、ST1E4 (34.0 kDa) および ST2A3 (35.0 kDa) タンパクが各々対応する抗体により検出され、その移動度は対応する (D 6xH)ST と同一移動度を示した。

#### ヒト ST 分子種の硫酸抱合活性の比較

ヒト ST 分子種の硫酸基供与体である PAPS に対する酵素学的速度定数 ( $K_m$  値および  $K_{cat}$  値) を比較した。PAPS に対する ST1B2 の  $K_m$  値 (0.87 mM) は、ST1A3 (0.51 mM) および ST1A5 (1.00 mM) の  $K_m$  値とほぼ同レベルの値を示した。しかしながら、ST1E4 (2.84 mM) および ST2A3 (4.81 mM) の  $K_m$  値は、ST1B2 の  $K_m$  値と比べそれぞれ約 3.3 および 5.5 倍大きい値を示した。

さらに、これら分子種の基質特異性を比較するために、それぞれの酵素の代表的基質として報告されている *p*-NP、ドパミン、T3、E2 および DHEA に対する酵素学的速度定数を算定し、その結果を基質ごとにまとめた (表 1)。

(i) *p*-NP: これら 5 分子種は全て *p*-NP に対する硫酸抱合活性を有していたが、その程度にはかなりの差が認められた。この基質に対する ST1A3 の  $K_m$  値 (0.41 mM) はこれら 5 分子種のなかで最も低く、その値は他の分子種と比べ 2~4 桁もの差があった。ST1 ファミリーに属する分子種のなかで ST1A3 に次いで *p*-NP に対し高い親和性を示したのは ST1B2 ( $K_m$ , 21.2 mM) であり、さらに、ST1E4 ( $K_m$ , 96.2 mM)、ST1A5 ( $K_m$ , 361.2 mM) の順であった。アルコール性水酸基を有する基質のみに硫酸抱合活性を示すと考えられていた ST2A3 にも高基質濃度下で *p*-NP に対する活性が検

出されたが、その  $K_{cat}/K_m$  値 ( $0.07 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) は ST1A3 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $1,072.8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) と比べ 5 桁もの差があった。

(ii) ドパミン：ドパミンに対しては ST1 ファミリーに属する全ての 4 分子種が硫酸抱合活性を示したのに対し、ST2A3 には活性は認められなかった。この基質に対する ST1A5 の  $K_m$  値 ( $7.1 \text{ mM}$ ) はこれら 4 分子種のなかで最も低く、次に低い値を示した ST1A3 の  $K_m$  値 ( $100.0 \text{ mM}$ ) と比べ 2 桁もの差があった。さらに、ST1B2 および ST1E4 の  $K_{cat}/K_m$  値 (それぞれ  $0.07 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) は ST1A5 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $404.9 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) と比べ 4 桁もの差があった。

(iii) T3：T3 もドパミンと同様に ST1 ファミリーに属する全ての 4 分子種が硫酸抱合活性を示したが、ST2A3 にその活性は認められなかった。この基質に対する ST1B2 の  $K_m$  値 ( $46.2 \text{ mM}$ ) はこれら 4 分子種のなかで最も低く、その値は他の分子種と比べ 1~2 桁の差があった。また、ST1B2 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $9.0 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) は ST1A3 ( $1.8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )、ST1A5 ( $2.8 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) および ST1E4 ( $8.2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) の  $K_{cat}/K_m$  値と比べ 1.1~5.1 倍の差があった。

(vi) E2：E2 に対しては ST1B2 以外の全ての 4 分子種にその硫酸抱合活性が認められた。この基質に対する ST1E4 の  $K_m$  値 ( $0.25 \text{ mM}$ ) はこれら 4 分子種のなかで最も低く、その値は他の分子種と比べ 1~3 桁もの差があった。さらに、ST1E4 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $975.2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) は ST1A3 ( $32.5 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )、ST1A5 ( $0.08 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) および ST2A3 ( $3.2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) の  $K_{cat}/K_m$  値と比べそれぞれ 1、4 および 2 桁もの差があった。

(v) DHEA：DHEA に対しては ST1E4 および ST2A3 のみにその硫酸抱合活性が認められた。この基質に対する ST1E4 の  $K_m$  値 ( $0.70 \text{ mM}$ ) は ST2A3 の  $K_m$  値 ( $3.3 \text{ mM}$ ) と比べ 4.7 倍低い値を示した。しかし、ST1E4 の  $K_{cat}$  値 ( $0.17 \text{ min}^{-1}$ ) は ST2A3 の  $K_{cat}$  値 ( $1.04 \text{ min}^{-1}$ ) と比べ 6.1 倍低い値を示したため、ST2A3 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $314.2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) は ST1E4 の  $K_{cat}/K_m$  値 ( $244.9 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) とほぼ同じ値を示した。

ヒト ST 分子種の熱安定性および阻害剤の効果  
タンパクの熱に対する安定性はその高次構造と密接に関係している。また、ST1A3 および

ST1A5 においてはそれらの熱安定性は非常に異なり、ST1A3 は熱安定型、ST1A5 は熱不安定型として知られている<sup>5, 50, 82)</sup>。そこで ST1B2 における熱安定性を T3 に対する硫酸抱合活性を指標に検討した。なおコントロールとして、ST1A3 と ST1A5 における熱安定性をそれぞれ p-NP およびドパミンに対する硫酸抱合活性を指標に検討した。その結果、ST1B2 は他の分子種に比べ熱に対して安定でその硫酸抱合活性が 50% 阻害される温度は  $51.0$  度であった。また、ST1A3 および ST1A5 においてはその温度はそれぞれ  $45.0$  および  $42.5$  度であった。

一方、ST1A3 および ST1A5 において競合的阻害剤である DCNP による阻害程度に差があり、ST1A3 は ST1A5 と比べ DCNP による阻害が顕著であるとされている<sup>5, 50, 82)</sup>。そこで ST1B2 における DCNP による阻害を T3 に対する硫酸抱合活性を指標に検討した。なお、ST1A3 と ST1A5 の p-NP およびドパミンに対する硫酸抱合活性における DCNP による阻害をコントロールとした。その結果、ST1B2 は DCNP による阻害を受け難く、その硫酸抱合活性が 50% 阻害される濃度 ( $IC_{50}$  値) は  $400 \text{ mM}$  であった。また、ST1A3 は ST1B2 と比較すると DCNP による阻害を受けやすく、 $IC_{50}$  値は  $6 \text{ mM}$  であったのに対し、ST1A5 の  $IC_{50}$  値 ( $350 \text{ mM}$ ) は ST1B2 のそれとほぼ同レベルであった。

#### ヒト ST 分子種の肝における発現

ヒト ST 分子種の肝での発現含量を調べるため 6 個体のヒト肝可溶性画分におけるそれぞれの分子種の定量をそれぞれの抗体を用いたウエスタンブロット解析により行った。なお、標品には対応する (D6xH)ST を用いた。抗 ST1A5 抗体を用いることにより、ST1A3 ( $32.0 \text{ kDa}$ ) および ST1A5 ( $34.5 \text{ kDa}$ ) はヒト肝可溶性画分 ( $1 \text{ mg}$ ) 中、それぞれ  $1.37 \pm 0.27 \text{ mg}$ 、 $0.09 \pm 0.03 \text{ mg}$  と定量された。ST1B2 ( $32.5 \text{ kDa}$ ) の含量は、 $0.21 \pm 0.19 \text{ mg/mg}$  であった。ST1E4 ( $34.0 \text{ kDa}$ ) および ST2A3 ( $35.0 \text{ kDa}$ ) は、それぞれ  $0.15 \pm 0.14 \text{ mg/mg}$  および  $4.88 \pm 0.19 \text{ mg/mg}$  であった。また、今回用いたサンプルにおけるウエスタンブロット解析の結果から、それぞれの分子種の含量に個体差が認められた。その結果を S.D. に対する平均値のパーセントで表し数値化したところ、ST1E4 が 93%、ST1B2 が 90% と他の分子種と比べ非常に大きな値を示したのに対し、

ST1A5 が 33%、ST1A3 が 20% および ST2A3 が 4% という値を示した。このように、それぞれの分子種の含量に個体差が認められたが、ST1B2 および ST1E4 の含量の個体差はそのなかでも顕著であった。なお、全ての分子種の含量に著しい性差は今回の検討において認められなかった。

#### ヒト ST 分子種の肝含量と硫酸抱合活性の相関性

6 個体のヒト肝可溶性画分における各々のヒト ST 分子種の含量と *p*-NP、ドパミン、T3、E2 および DHEA に対する硫酸抱合活性との相関性を調べた (Figure 1)。なお、ヒト肝可溶性画分による各々の基質に対する硫酸抱合活性の測定には、リコンビナント酵素の速度論的解析から得た結果をもとに、各基質において最小  $K_m$  値の 2~10 倍の濃度に設定した。最大比活性が得られる基質濃度条件を適応した。その結果、ST1A3 含量と *p*-NP に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.99$ )、ST1A5 含量とドパミンに対する硫酸抱合活性 ( $r=0.95$ )、ST1B2 含量と T3 に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.96$ )、ST1E4 含量と E2 に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.88$ ) および ST2A3 含量と DHEA に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.78$ ) との間に高い相関性が認められた。また、ST1A3 含量と E2 に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.90$ ) および ST1B2 含量と *p*-NP に対する硫酸抱合活性 ( $r=0.96$ ) との間にも高い相関性が認められた。

#### C-3 わが国におけるヒト組織の供給体制と実施に向けた検討項目

厚生省は平成 9 年 12 月 10 日に出された厚生大臣の諮問「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」を受けて、平成 9 年 12 月 12 日の第 3 回厚生科学審議会総会において、先端医療技術評価部会に付議することとなり、堂部会に「ヒト組織の研究開発利用に関する専門委員会」を設置することとなった。同専門委員会は、医学、薬学、倫理、報道などの各分野から推薦された有識者により構成され (委員長: 東海大学医学部長 黒川 清教授)、第 1 回会議は平成 10 年 2 月 24 日に開催された。それ以後、同年 7 月 3 日までに通算 5 回の会議を開き、各専門領域の立場から毎回数時間に及ぶ活発な議論が展開された。第 2 回会議では、この領域の経験者として日本製薬工業協会 (製

薬協) と HAB 協議会の代表がヒアリングを受けた。本委員会は 5 回という異例の早さで最終報告書をまとめ、先端医療技術評価部会に報告した。同部会では特に大きな指摘はなかった。同年 12 月 15 日の厚生科学審議会総会で報告し承認された後、翌日、厚生大臣へ答申された。これにより、我が国としては、手術ヒト組織の医薬品開発への利用に対してようやく道が開かれた。その後ヒューマンサイリンス振興(HS)財団に委託され、具体的な施策については、目下同財団を中心に検討が進められている。これとは別に、ヒト組織に関する二つの研究班がスタートした。一つは、厚生省科学研究補助金によるものであり (班長: 昭和大学医学部安原一教授)、他は HS 財団のプロジェクトとしてである (班長: 国立衛研大野泰雄部長)。私はヒト組織の医学、薬学における基礎研究に関わったささやかな経験と、米国の現状などを参考にして図の様な私案を考えた。わが国においてこれが定着するためには多くの関門をクリアしなければならず、未だかなりの時間がかかるものと考えられる。以下にその問題点と検討項目を列挙する。

- 1) 医療機関の協力ネットワークの設立と円滑な運営をどうするか。
- 2) 患者へのインフォームドコンセントの内容、説明をどうするか。
- 3) 医療機関において入手した手術組織 (正確には種々の検査に用いた残余物) の処理を現場でどの様に処理するか (人手、作業項目)。
- 4) 医療機関から Reserch Resource Center(RRC) (仮称) への運搬をどうするか (人手、費用)。
- 5) RRC においては少なくとも図に挙げた業務が必要である。
- 6) RRC においては、一定の条件で手術組織を保存し、品質の保証 (バリデーション) が必要である。
- 7) 手術組織の場合、量的にいかにして十分量を確保するか。
- 8) 厚生大臣答申に盛り込まれた様に、2 年後の臓器移植法見直しに際して、移植不適合肝の有効利用を国として積極的に検討する。
- 9) RRC では手術ヒト組織の取扱い者のバイオハザードについて十分に配慮しなければならない。肝細胞癌などでは移植肝と異なりウイルス感染者の場合が少なくない
- 10) RRC から製薬企業への供給手段をどうするか (人手、費用)

11)すべての業務に関わる経費負担を受益者負担の原則で行うか、あるいは国策として国が一部負担するか。

#### D. 考察

今回用いた細胞は、HH-018、HH-022 ともにラット肝細胞（5週令）では通常みられない脂肪滴と思われる顆粒を細胞内に多く含んでいた。また DIC 像を観察するとラット肝細胞では細胞内で小さな顆粒が動く様が画像化されるが、これらヒト肝細胞では脂肪滴様の顆粒に細胞内オルガネラが圧迫されるような状態になっており、細胞内の動きはほとんど観察されなかった。ミトコンドリア染色像では HH-018 はほとんどの細胞で明瞭な像が観察されたが、HH-022 では半数近くの細胞では rhodamine 123 の局在は観察されず、ミトコンドリアに膜電位がない、すなわち細胞のエネルギー産生が極めて落ちていることを示唆していた。HH-018 にしても、ミトコンドリア像の輪郭が明瞭ではなく、何らかの障害が生じている可能性が考えられた。このように、形態から見る限りはラットと大きく異なる部分があるが、HH-018 は 67 才、HH-022 は 76 才の女性から得られたものであり、一方ラットの実験は 5 週令という若齢動物を用いており、各種条件が大きく異なっているため、今回の結果から「ヒトとラットの違い」、あるいは「凍結の影響」というようには結論づけることはできない。

HH-018 細胞では、細胞内カルシウムイオン濃度は、きわめて安定した状態にあることが明らかとなった。すなわち、顕微鏡ステージ上という細胞にとって厳しい条件にもかかわらず、これらイオン濃度は 1 時間で大きく変化することはなかった。また多くの細胞において細胞内カルシウムイオン濃度はホルモン性刺激によって明瞭な上昇を示した。このことは、この細胞では、細胞の基本的機能である細胞内イオン濃度調節機構が正常な状態にあることを示唆している。一方 HH-022 細胞の場合、細胞内カルシウムイオン濃度も、形態像同様に異常を示しており、比較的濃度の高い細胞が多く、ステージ上でインキュベートするにつれて濃度上昇が生じた。

以上のように、今回主に検討した細胞内イオン濃度調節という点では、ヒト凍結肝細胞は良好な状態に保ちうるということが明らかとなった。しかしロットによって結果が異なることも示され

た。したがって医薬品の安全性評価に用いる場合、適切なロットの選別が重要になると考えられる。

ヒト肝より単離した ST1B2 cDNA がコードするタンパクは、ヒトにおける T3 の代謝に関与する ST 分子種であることを示した。しかしながらヒトにも多くの分子種が様々な組織に存在し、さらにこれら分子種は重複した基質特異性を示すことも明らかとなっている。また、旧来の精製タンパクの検討から、ST1A 分子種も T3 に対し活性を示すことが報告されている (44)。そこで、ST1B2 が実際にヒトの生体内における T3 の代謝に関与するアリル ST 分子種であるかどうかは、他の分子種との T3 の硫酸抱合活性の比較および生体内におけるそれらの寄与に関する検討が必要であると考えられた。

初めに、これら 5 分子種の酵素化学的性質についてリコンビナント酵素を用いて検討を行った。ST1B2 タンパクの電気泳動上での移動度 (32.5 kDa) は他の ST と異なっており、他の ST の移動度は、ST1A3 (32.0 kDa)、ST1A5 (34.5 kDa)、ST1E4 (34.0 kDa) および ST2A3 (35.0 kDa) であった。また、これら分子種の基質特異性を比較したところ、p-NP に対しては ST1A3、ドパミンに対しては ST1A5、T3 に対しては ST1B2、E2 に対しては ST1E4、DHEA に対しては ST2A3 が高い親和性を有していた。さらに、熱安定性および DCNP による阻害実験の結果から、ST1B2 は熱に安定で、DCNP による阻害がかかりにくい分子種であると示された。このことは ST1B1 の示したパターンと非常に良く似ており、ST1B サブファミリーに属する分子種共通の性質として保存されている可能性が示唆された。

p-NP は、酵素学的速度定数の比較から、ST1A3 がこの基質代謝に寄与する可能性が予想され、これらの肝含量と硫酸抱合活性との間には高い相関性が認められた。しかし、次に p-NP に対し親和性の高かった ST1B2 においても肝含量と硫酸抱合活性との間には高い相関性が認められた (表 1)。このことから、ST1A3 だけでなく ST1B2 も p-NP の代謝に寄与している可能性が示唆された。ドパミンは、酵素学的速度定数の比較から、ST1A5 がこれらの基質代謝に寄与する可能性が予想され、これらの肝含量と硫酸抱合活性との間には高い相関性が認められた。さらに、他の分子種との間には高い相関性が認められなかったことから、ST1A5 がド

パミンの代謝に寄与していると考えられた。また、E2 についても、ST1E4 がこれらの基質代謝に寄与する可能性が酵素学的速度定数の比較から予想され、さらに、ST1B4 の肝含量と E2 に対する硫酸抱合活性との間には高い相関性が認められた。しかし、次に E2 に対し親和性の高かった ST1A3 においても肝含量と硫酸抱合活性との間には高い相関性が認められた (表 1)。このことから、ST1E4 だけでなく ST1A3 も E2 の代謝に寄与している可能性が示唆された。さらに DHEA の場合は、この基質に活性を示した ST1E4 と ST2A3 の  $K_{cat}/K_m$  値は、同レベルの値を示し、この基質代謝における寄与を酵素学的速度定数の比較のみでは難しいと考えられた。しかし、DHEA に対する硫酸抱合活性は ST2A3 の肝含量とのみに高い相関性が認められ、ST1E4 の肝含量とは相関性が認められなかった。以上のことから、各々の ST の肝含量は、*in vivo* におけるそれぞれ基質代謝の寄与を検討するうえで重要なファクターであると考えられた。

そこで、T3 の代謝に寄与する分子種の同定を目標に検討した結果、T3 に対する  $K_m$  値をこの基質に活性を示した 4 分子種 (ST1A3、ST1A5、ST1B2 および ST1E4) 間で比較すると、ST1B2 の  $K_m$  値 (46.2 mM) はこれら 4 分子種のなかで最も小さく T3 に対して一番親和性が高いことが示された。しかしながら、ST1B2 の  $K_{cat}$  値 ( $0.78 \text{ min}^{-1}$ ) は他の 3 分子種よりも小さかったため、それらの  $K_{cat}/K_m$  値は、同レベルの値を示した。そのため、T3 の代謝に寄与する分子種の同定は単純に酵素学的速度定数の比較のみでは難しいと考えられた。そこで、これら分子種のタンパク含量と肝可溶性画分による T3 に対する硫酸抱合活性との間での相関性について検討した。その結果、ST1B2 の肝含量と T3 に対する硫酸抱合活性との間に高い相関性 ( $r=0.96$ ) が認められた。一方、他の 3 分子種はこれらの方に高い相関性が認められなかった ( $r<0.70$ )。以上のことから、ST1B2 は、ST1 ファミリーに属する他の 3 分子種よりも T3 の代謝に寄与していることが強く示唆された。

リコンビナント酵素の酵素学的速度定数の比較およびヒト肝可溶性画分における個々の ST の肝含量と T3 に対する硫酸抱合活性との相関性という観点から T3 の代謝に寄与するヒト ST 分子種の同定を試みた。各々の分子種の正確な含量は免疫吸収により他の分子種と交差反応

しない抗体および各々の (D6xH)ST を標準物質として使用することにより初めて可能となった。さらに、ヒト肝可溶性画分における硫酸抱合活性の測定に用いた基質濃度は、リコンビナント酵素の速度論的解析から得た結果をもとに、各基質において最小  $K_m$  値の 2~10 倍の濃度に設定し、各酵素の基質選択性を高めたものである。もし、今まで報告されている高い基質濃度を用いた場合、複数の分子種によりその反応が触媒されることにより、得られた相関性の値は正確なものとはいえない。これらのことより、今回得られた相関性に関するデータは精度の高いものであると考えている。また、今回作製した抗体を用いたヒト肝可溶性画分における T3 に対する硫酸抱合活性阻害実験もこの基質代謝の寄与を説明するうえで有効な手段であると考えられ、今回作製した全ての抗体で阻害効果はどの系においても認められなかった。現在までに、ST において抗体による阻害効果が認められたという報告例はなく、今後、精製抗体を用いて同様に検討を試みるなど実験系の改良により改善点を見いだす必要がある。

## E. 結論

凍結ヒト単離肝細胞について、細胞の微細形態、細胞内イオン濃度に関して検討した。細胞内には脂肪滴様の顆粒が数多くあり、細胞質領域のかなりの空間を占めており、細胞内オルガネラが明瞭には確認できない状態にあった。しかし、細胞内イオン濃度調節は正常に働いており、ホルモン性刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇も正常に生じた。しかしロットによっては細胞内イオン濃度は正常ではなく、医薬品の安全性評価へこれらの細胞を使用するにあたっては、ロットを選別することが重要であると考えられた。

ヒト肝組織およびリコンビナント酵素を用い T3 の代謝に関与する ST 分子種の同定を試みた。初めに ST1B2 および現在までに報告されているヒト ST 分子種の酵素化学的性質についてリコンビナント酵素を用いて検討を行った。ST1B2 の電気泳動上での移動度 (32.5 kDa) は他の ST と異なっていた。また、これら分子種の基質特異性を比較したところ、T3 に対し ST1B2 が最も高い親和性を示すことが明らかとなった。さらに、熱安定性および DCNP による阻害実験の結果から、ST1B2 は他の分子種と比べ熱に安定で、さらに DCNP によって阻害さ

れ難い分子種であることが示された。この結果は、ST1B1 の酵素化学的性質と非常に類似していた。さらに、これら分子種に対する抗体を用い、各々の分子種の肝含量を定量し、肝可溶性画分における T3 硫酸抱合活性との相関性を比較したところ、この活性は ST1B2 の肝含量との間にのみ高い相関性を示した。以上の結果から、ST1B2 は、ヒト生体内における T3 の代謝に関与する ST 分子種であることが示唆された。

T3 は硫酸抱合化を受けることにより内環の脱ヨード化反応が促進され、生体内からそのホルモンがもつ生物学的活性を消失する。すなわち、硫酸抱合化はこのホルモンの不可逆的な不活性化を導く重要な反応であると考えられている。しかしながらこの基質代謝に関与する ST 分子種の同定は現在までにどの動物種においてもなされていなかった。本研究により、ラットにおける T3 の代謝に関与する ST 分子種は、ST1B1 および ST1C1 であることを示した。さらに、ヒトにおける T3 の代謝に関与する ST 分子種は ST1B2 であることを示した。

厚生省は「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」について厚生科学審議会を中心に鋭意検討し、平成 10 年 12 月 16 日に厚生大臣へ答申された。これにより、我が国としては、手術ヒト組織の医薬品開発への利用が公式に認められ、欧米に次いで遅ればせながらその道が開かれた。本答申の具体的な実施についてはヒューマンサイエンス(HS)振興財団に委託され、目下同財団を中心に検討が進められている。しかし、今後、わが国においてヒト組織を医学、薬学の基礎研究に用いるためには多くの関門をクリアしなければならず、未だかなりの時間がかかるものと考えられる。以下にその問題点と検討項目を列挙する。

1. 医療機関の協力ネットワークの設立と円滑な運営

2. 患者へのインフォームドコンセント

3. 医療機関において入手した手術組織（正確には種々の検査に用いた残余物）の処理（人手、作業項目）

4. 医療機関から Reserch Resource Center(RRC)（仮称）への手術組織の運搬（人手、費用）

5. RRC における手術組織の品質保証（バリデーション）

6. 2年後の臓器移植法見直しに際して、移植不適合肝の基礎研究への有効利用に関する法改正

7. すべての業務に関わる経費負担を受益者負担の原則で行うか、あるいは国策として国が一部負担するか

問題点としては上記の種々の機能を運営する人的資源と財政基盤の確保が保証されなければならない。さもなければ、今回の政策は机上の空論となり折角の画期的事業に展開が停滞することになりかねない。今後の前進を切に願うものである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Y. Ohno, M. Sunouchi, A. Miyajima, Y. Ogawa, T. Umemura, T. Inoue, K. Nagamatsu, Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B11 in the liver of dogs treated with CNP. *Reviews in Toxicol.* 2, 47-51 (1998)

2) K. Uchida, S. Nagai, K. Shimada, Y. Ohno, and Y. Kamikawa, Responsiveness of human and guinea-pig isolated arteries to  $\alpha$ -agonist in-vitro, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4, 349-353 (1998)

3) Ken-ichi Fujita, Kiyoshi Nagata, Eriko Watanabe, Miki Shimada and Yasushi Yamazoe. (1999) Bacterial expression and functional characterization of a rat thyroid hormone sulfotransferase ST1B1, *Japanese Journal of Pharmacology*, in press.

3) Ken-ichi Fujita, Kiyoshi Nagata, Shogo Ozawa, Hironobu Sasano and Yasushi Yamazoe. (1997) Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases, *Journal of Biochemistry*, 122, 1052-1061.

4) Ken-ichi Fujita, Kiyoshi Nagata, Toru Yamazaki, Eriko Watanabe, Miki Shimada and Yasushi Yamazoe. (1999) Enzymatic characterization of human cytosolic sulfotransferases; Identification of ST1B2 as a thyroid hormone sulfotransferase, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, in press.

### 2. 学会発表

1) 紅林秀雄, 大野泰雄、IBP(iprofenfos)の代謝 (1)ラット及びヒト肝ミクロソームを用いた代謝、日本薬学会(1999,3)



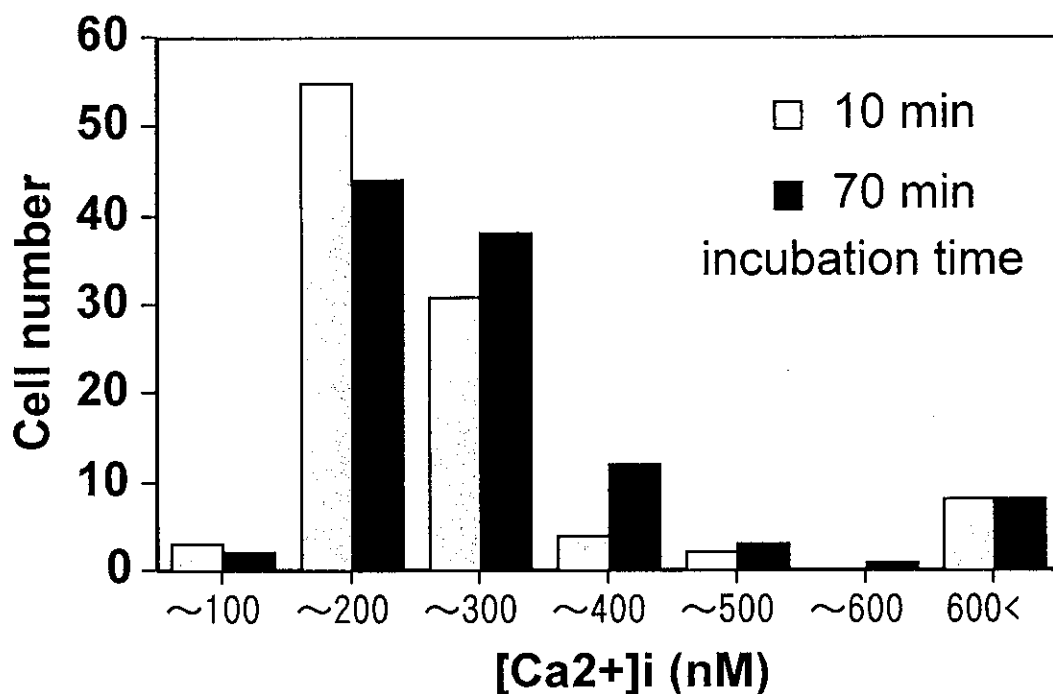


Fig.1 ヒト単離肝細胞（ロット HH-018）の細胞内カルシウムイオン濃度測定は顕微鏡のステージにおいて10分後と70分後に行った。

Table 4-3. correlation coefficients between cytosolic contents of STs and sulfation activities in human livers

	<i>p</i> -NP	dopamine	T <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>	DHEA
ST1A3	0.987	0.496	0.689	0.900	ND <sup>a</sup>
ST1A5	0.636	0.948	0.551	0.647	ND
ST1B2	0.964	0.581	0.958	ND	ND
ST1E4	0.756	0.302	0.597	0.883	0.428
ST2A3	0.390	ND	ND	0.657	0.780

<sup>a</sup>ND, not determined.

表1 ヒト肝臓可溶性分画の硫酸転移酵素の分子種毎の含量と転移活性との間の相関

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究：

手術材料採取法（術式）に関する研究

分担研究者：伊藤 洋二 昭和大学医学部第二外科学教室

研究の要旨

本研究を推進するに当たり、手術に関する同意を得た後に本研究に関する文書および口頭での説明を行った後、自由意思で手術材料の提供に同意した2例の患者からの肝臓試料採取を施行し、その一部を本研究事業の試料とした。本研究では、肝臓試料の採取は、転移性肝癌1例、原発性肝癌1例の計2例を対象に行った。転移性肝癌の切除は、肝部分切除に近い術式で行い、腫瘍が大きく、ほぼ後区域が切除された。手術時間5時間10分、阻血時間約75分、出血量504ml、輸血量0mlであった。一方、原発性肝癌の切除は、Pringle法（15分 clamp、5分 declamp）を4回施行して、肝実質をキューサーを用いて切離した。右肝静脈は肝内において切離し、切離断端は縫合閉鎖した。手術時間5時間40分、出血量785ml、輸血量400mlであった。

分担研究者：伊藤 洋二  
昭和大学医学部第二外科学教室

A. 研究目的

本研究を推進するに当たり、手術に関する同意を得た後に本研究に関する文書および口頭での説明を行った後、自由意思で手術材料の提供に同意した2例の患者からの肝臓試料採取を施行し、その一部を本研究事業の試料とした。また、本研究では、手術材料の採取を行うに当たり、診療目的での手術における切除での、組織の有効利用への可能性の評価を行うため、一切本研究のための術式選択、切除法の修飾等を行わず、あえて通常診療の範囲でどの程度の状態で手術材料が得られるのかに関しての検討を目的とした。

B. 研究方法

本研究において、肝切除により得られた手術材料（ヒト肝）を試験研究の試料とするが、この肝切除の術式について概説する。現在のところ、肝癌の2症例に対し、肝切除を施行したが、これも含めて、報告する。

1. 肝切除に必要な解剖

1) 肝の固定

肝は左右の三角間膜、肝冠状間膜、肝鎌状間膜、肝円索などにより、横隔膜や腹壁に固定されている（図1）。

2) 肝の脈管

肝臓の流入血管は門脈と肝動脈であり、流出血管は肝静脈である（図2）。肝内において門脈、肝動脈、胆管は互いに併走し、これら三管は Glisson 鞘と呼ばれる結合織内に存在する。

3) 肝区域

肝の脈管のうち、胆管、肝動脈および門脈などの Glisson 系主要分枝の境界には肝静脈が存在し、Glisson 系を単位とする肝区域が設定出来る。胆嚢床と下大静脈を結ぶ線を Cantlie 線と呼び、これにより肝は左葉と右葉に分けられている。左葉はさらに肝鎌状間膜と肝円索によって外側区域と内側区域に分けられ、右葉は右肝静脈を境界として前区域、後区域に分けられ、肝臓は全体として4区域に大別される（図3）。

Couinaudは肝全体を8つの肝区域に分けて

いる (図4)。

## 2. 肝切除の種類

肝切除は肝部分切除と肝広範切除の2つに大別される。肝部分切除は通常、肝区域よりも小範囲の肝切除で下記のものがある (図5)。

1) 楔状切除：腫瘍を含めて肝実質を楔状に切除する方法で、肝辺縁に近い病変が適応となる。肝生検などにも用いる。

2) 円形切除 (核出術)：肝下縁から離れた横隔膜近くに存在する小腫瘍の摘出に用いる。

3) 割断：割断は肝内主要脈管分岐部を避ける位置で行う (図6)。

肝広範切除 (1区域以上の切除) の主なものは次のようなものである (図7)

1) 外側区域切除：従来は左葉切除と言われた。

2) 内側区域切除

3) 前区域切除

4) 後区域切除

5) 肝左葉切除：内側区域と外側区域の切除

6) 肝右葉切除：前区域と後区域の切除

7) 拡大肝右葉切除：肝右葉と内側区域 (一部) の切除である。肝右葉と内側区域を全部切除するときは右3区域切除と呼ぶ。(亜区域切除については別項で述べる。)

## 3. 阻血法 (Pringle 法)

肝実質切離時、切離断端からの出血を減らすため、肝門部で門脈本幹、肝動脈、胆管または左右分岐部でいずれかの一側にテープをかけ、チューブを通して、血液を遮断する方法で、通常15分遮断、5分解除を繰り返して切離を行う (図8)。

## 4. 肝切離に用いる機器

1) 超音波吸引器 (CUSA)：ハンドピース先端の振動子を約20kHzで振動させ、組織を破碎乳化し、吸引除去する。0.5mm以上の太さの脈管は温存される。

2) マイクロ波メス：マイクロ波により肝組織は誘電され、生じるエネルギーで加熱され、凝固する。この止血効果は良好であるが、凝固による壊死部分に感染を起こしたり、胆汁漏が発生したりすることがある。

## 5. 肝部分切除

1) 楔状切除 (図9)

切除範囲の周辺に止血結をかけ、その内側を楔状に切除する。肝切離縁をあわせて肝縁縫合を行う。

2) 円形切除 (核出術)

腫瘍より1cm離して逆さまにした円錐体を想定して切除して行く (図10)。

3) 割断：病巣の存在する肝領域を垂直に切離する肝部分切除である。肝実質を直割的に切断するため、肝内の脈管主枝を損傷する危険性がある場合は適用されない。

## 6. 肝広範切除

主な術式について概説する。

1) 外側区域切除

肝鎌状間膜および肝円索より外側の領域の切除で、以前は左葉切除とも言われた (図11)。まず、外側区域を遊離し、門脈臍部の前面の肝実質を切離してゆき、左肝動脈の外側枝を結紮切離 (図12)。次に門脈臍部左側で門脈枝、胆管枝を結紮、切離。さらに実質切離を下大静脈寄りに進め左肝静脈を結紮切離し、外側区域切除を完了する (図13)。

2) 肝左葉切除 (左2区域切除)

Cantlie線より右側の領域の切除である (図14)。まず、肝左側の遊離を行い、胆摘を施行する。胆摘の理由は以下の3点である。・肝門部の視野がよくなる・TAE、動注療法を行う時に胆嚢炎、胆嚢壊死を回避することが出来る・胆嚢管より、チューブ挿入し、胆汁漏の有無の確認が出来る。肝十二指腸間膜を剥離し、左肝動脈、左門脈を結紮、切離 (図15)。次にPringle法を施行しながら、肝実質を切離して行き、左肝静脈、左肝管を切離し、断端はそれぞれ縫合閉鎖する (図16)。

3) 右葉切除

Cantlie線より右側の領域の切除である (図17)。肝右葉を遊離し、肝門部処理をする。胆摘を行い、肝十二指腸間膜を剥離し、右肝管を結紮、切離。続いて右肝動脈、門脈右枝も切離し、門脈切離断端の縫合閉鎖する (図18)。肝の下大静脈騎乗部から直接下大静脈に流入する4~7本の短肝静脈枝を尾側より結紮、切離してゆく (図19)。次にPringle法を施行しつつ、脈管結により生じた変色域の境界を目安にして、肝実質を切離してゆく。最後に右肝静脈根部を切離し、切離断端は縫合閉鎖

する。

#### 4) 前区域切除と後区域切除

肝右葉を遊離し、胆摘を行う。肝門部を処理して、グリソン鞘周囲を剥離し、グリソンの前・後区域枝にテーピングを行う(図 20)。テープをしめると前区域、後区域がそれぞれ変色するので、その境界をマーキングして肝実質を切離してゆく(図 21)。肝静脈に接するように実質を切離し、グリソン系枝を結紮、切離する。肝静脈の分枝のみ切離して、肝静脈本幹は温存する。

#### 7. 系統的亜区域切除

肝癌症例では肝内転移を起こしやすい同一担癌門脈枝領域を含めて切除することは意義があり、門脈血流分布に従った系統的亜区域切除は理に適っている。亜区域については種々の考え方があり、統一されたものはないが、一応、couinaud の 8 区域に分ける分類に従い、それぞれを 1 つの亜区域として考える。手術手技としては基本的には肝門側において腫瘍の存在する領域に分布するグリソン鞘 3 次分枝を切断した後、変色した肝実質の境界部を切離してゆく(図 22、図 23)。肝静脈本幹は残存肝に付け、切除肝からの分枝のみ結紮、切離する。尾状葉については、図 24 のように 3 部に分類され、腫瘍の位置、大きさにより Spiegel 部切除、突起部切除、尾状葉単独全切除などが行われる。

### C. 結果、考察

本研究における肝切除症例

1) 症例 1 : 75 歳、女性。左乳癌術後、肝転移(肝 S6~7、単発、径 5 cm)。両側肋弓下切開に上方正中切開を追加し、開腹した。肝 S6~7 に鶏卵大の腫瘍を認め、横隔膜へ浸潤していた。術中エコーにて腫瘍の大きさ、位置を確認。肝の表面は平滑で、辺縁は鋭であった。手術操作はまず腫瘍と横隔膜の間の癒着を剥離した。肝円索を結紮、切離し、右副腎との癒着も剥離。次に冠状靭帯、右三角間膜を切離し、肝右葉を授動した。胆摘施行後、肝十二指腸間膜にtapingをした。腫瘍より 1 cm 以上離して、切除線をつけ、Pringle 法(15 分 clamp、5 分 declamp)を 5 回くり返し、キューサ

ーを用いて肝実質を切離した。後区域のグリソンを結紮、切離し、右肝静脈の分枝を結紮、切離し、後区域を切除した(図 25)。次に横隔膜浸潤部を切除したが、開胸になったため、胸腔ドレナージを施行し、穿孔部を縫合閉鎖した。なお、本例は肝部分切除に近い術式と考えられるが、腫瘍が大きく、ほぼ後区域が切除された。手術時間 5 時間 10 分、出血量 504 ml、輸血量 0 ml であった。摘出標本(図 26)。

症例 2 : 52 歳、男性。肝細胞癌(S5~8、単発、径 7 cm)、C 型肝炎。両側肋弓下切開に上方正中切開を追加し、開腹。肝表面は比較的平滑であった。術中エコーにて、肝 S7~8 に径 6 cm のモザイクパターンを呈する腫瘍を認めた。肝右葉を授動し、肝十二指腸間膜にtapingした。肝門部で右肝管、右肝動脈、門脈右枝を分離し、tapingした(図 27)。胆摘を施行し、下大静脈の短枝群を結紮、切離してゆく。右肝管、右肝動脈、門脈右枝を結紮、切離。門脈切離断端は縫合閉鎖した。肝外側区域が小さいため、肝実質の切離線はカントリー線よりやや右側とした。Pringle 法(15 分 clamp、5 分 declamp)を 4 回施行して、肝実質をキューサーを用いて切離してゆく。右肝静脈は肝内において切離し(図 28)、切離断端は縫合閉鎖した。手術時間 5 時間 40 分、出血量 785 ml、輸血量 400 ml であった。摘出標本を示す(図 29)。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的所有権の取得状況

#### 1. 特許取得

#### 2. 実用新案登録

なし

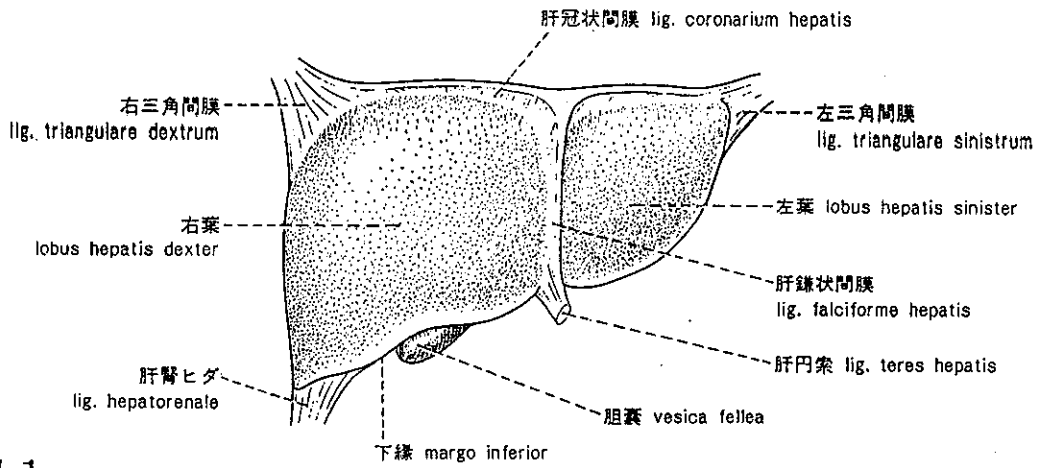


図 1

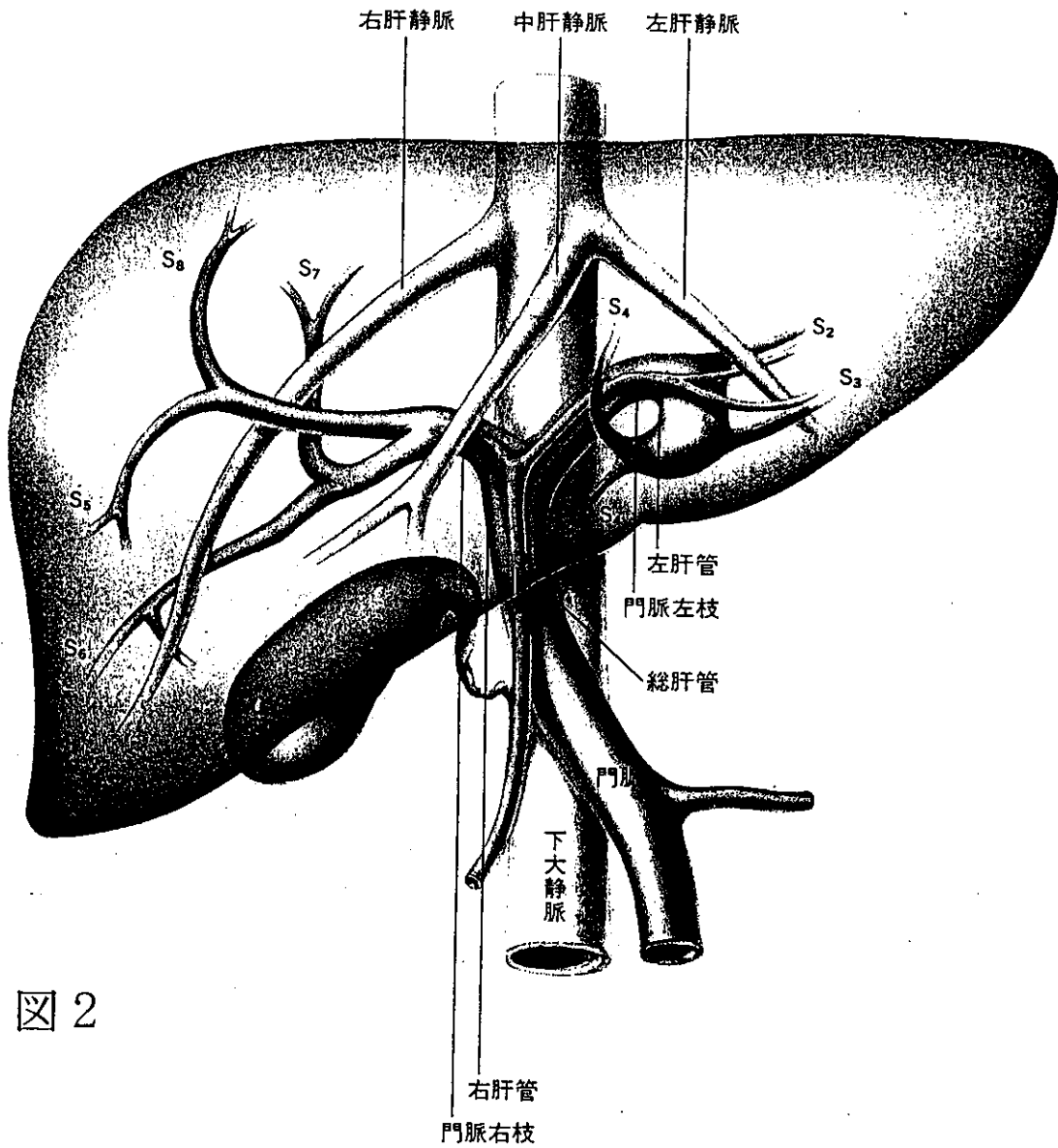


図 2

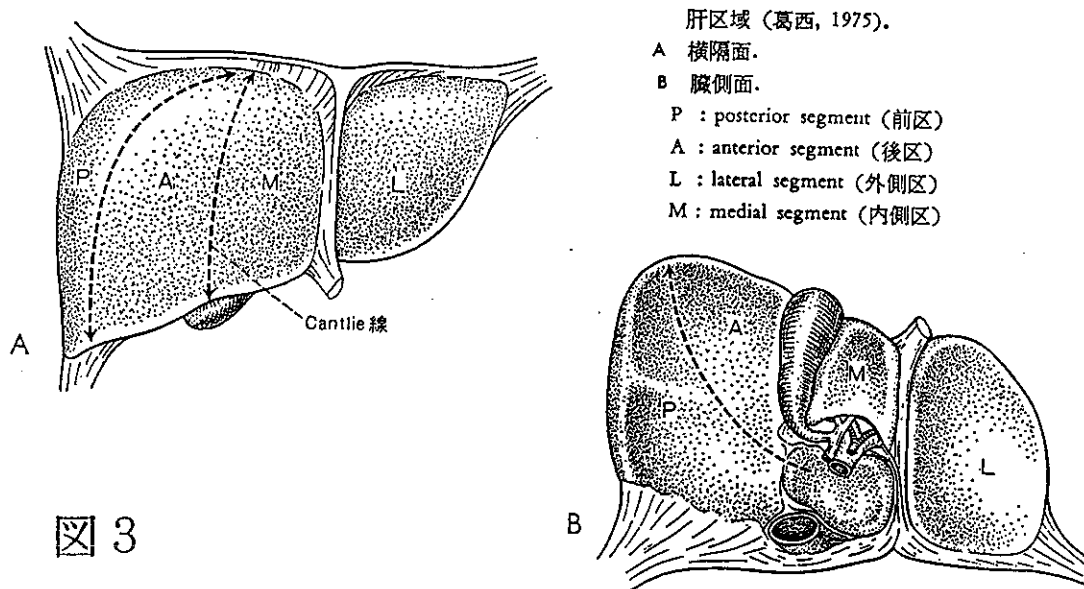
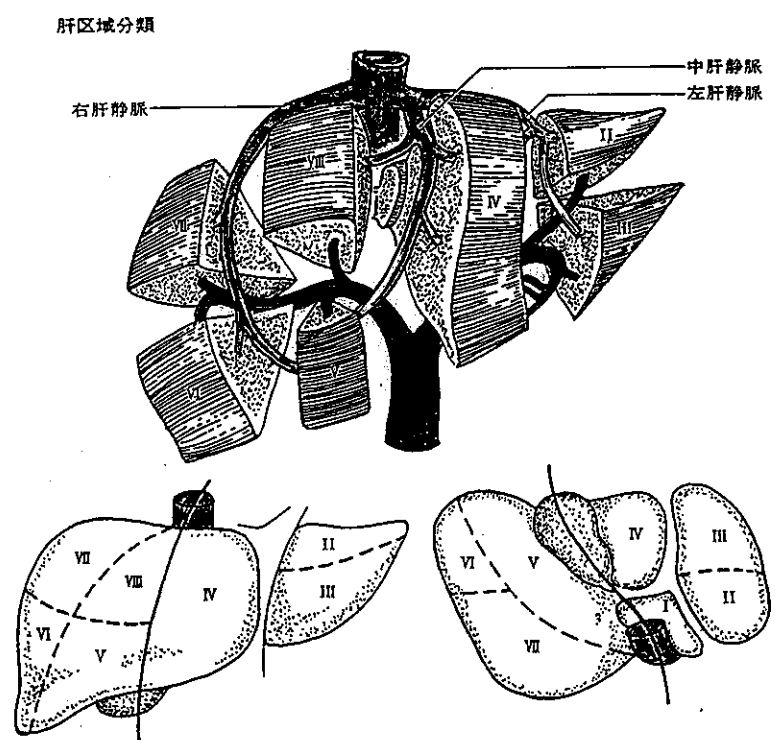
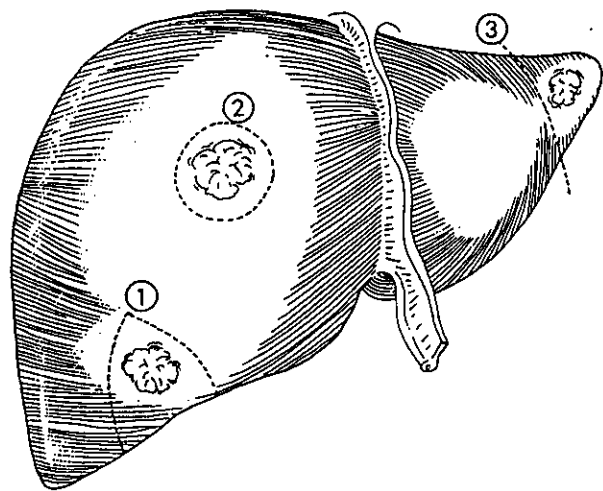


図 3



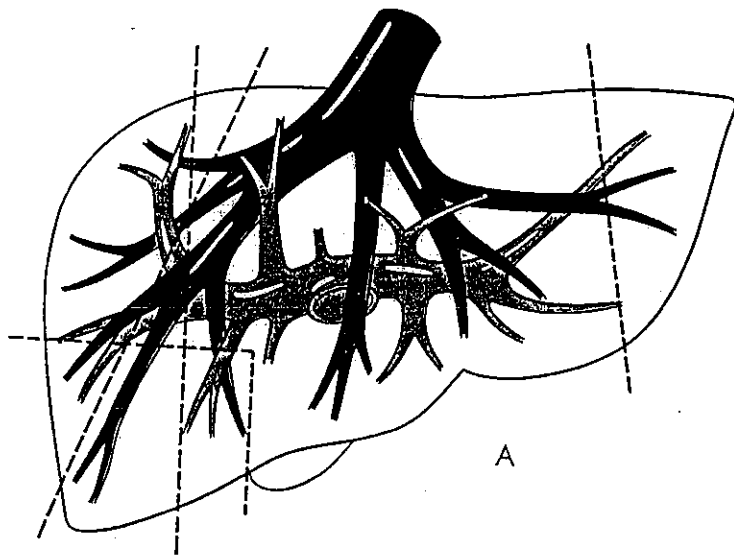
Couinaud の肝区域 [文献 2] より引用]

図 4



- ① 楔形切除
- ② 円形切除(核出術)
- ③ 割断切除

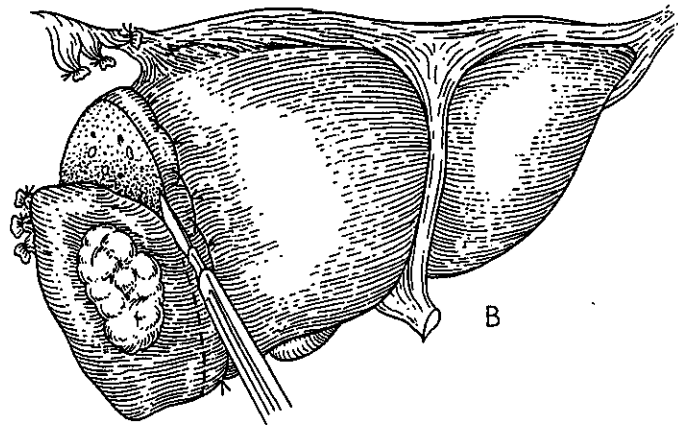
図 5



割断.

- A 割断は肝内主要脈管分岐部を避ける位置で行なう。
- B 切除範囲の辺縁に止血結紮をかけて、その外側を切離する。

A



B

図 6

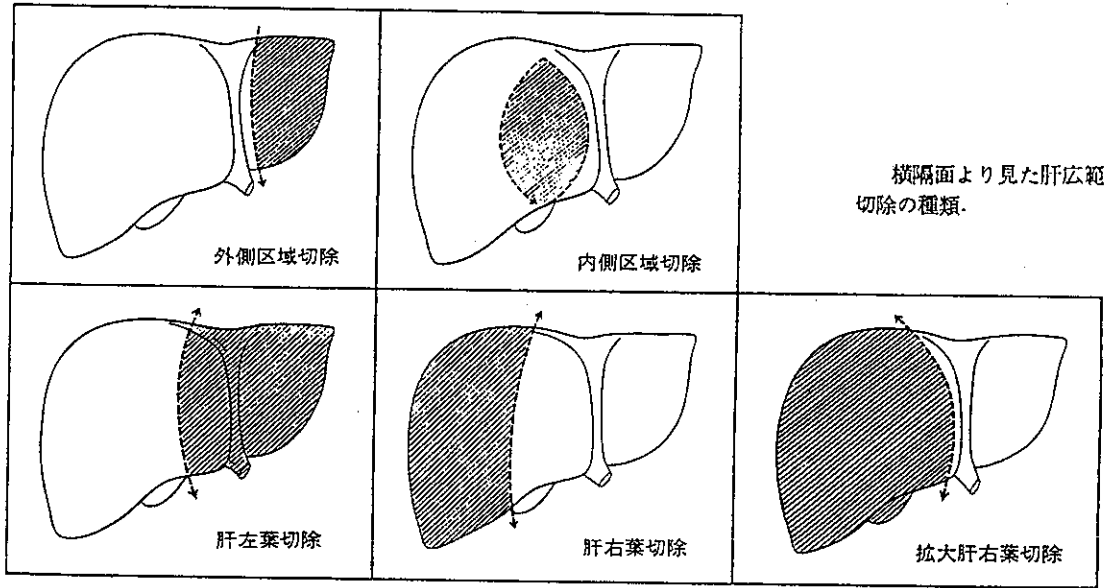


図 7

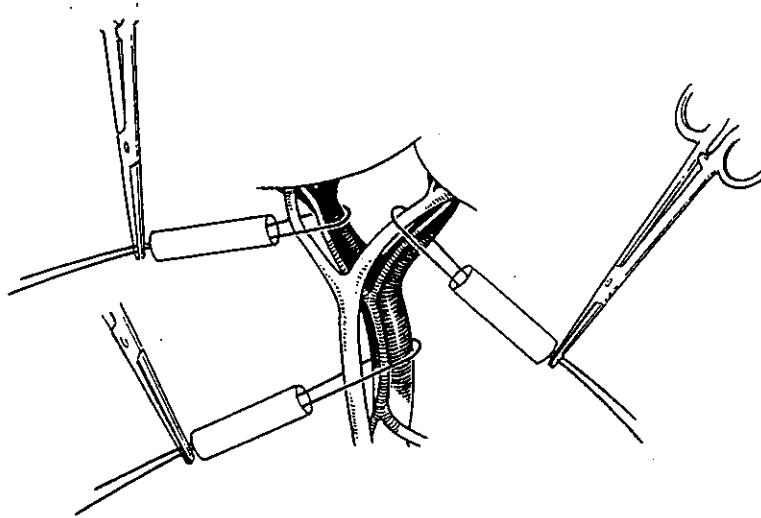


図 8 Pringle 法による肝門部脈管遮断



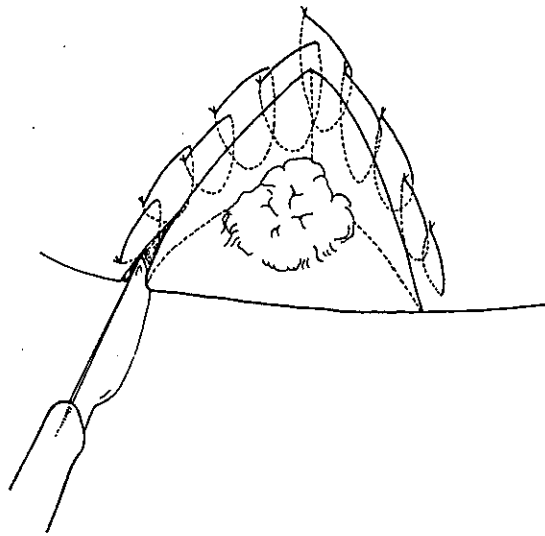
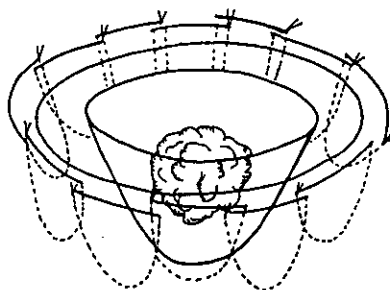


図 9 楔状切除術



円形切除(核出術)  
 切除予定線より 5mm 程度外周にデキソン糸  
 をかけ縫縮し、切除をすすめる。

図 10

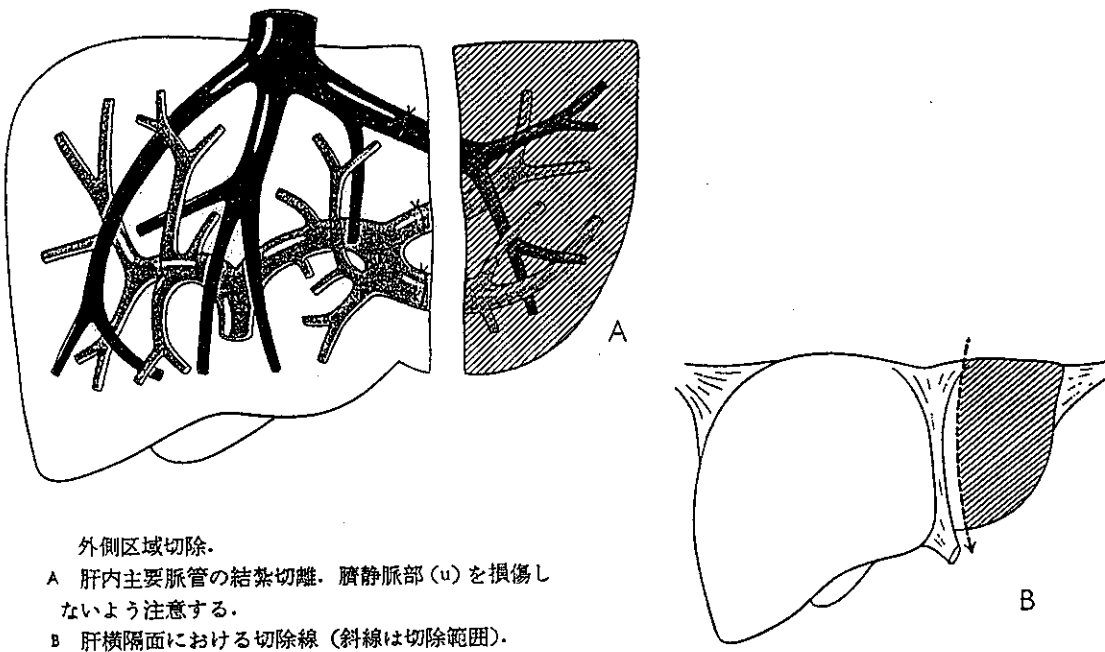


図 1 1

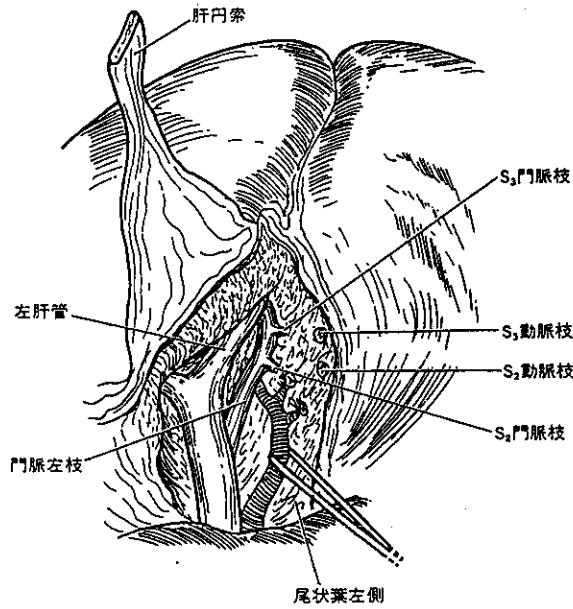


図 1 2

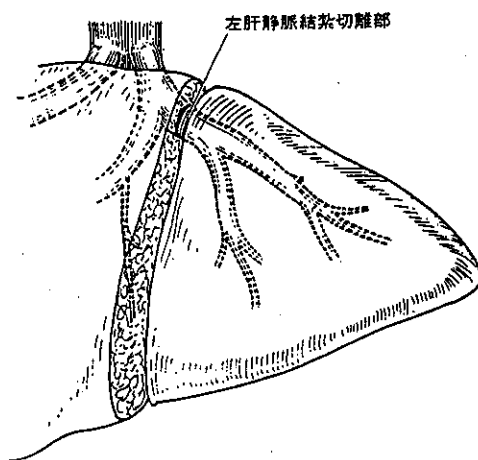


図 1 3

中・左肝静脈の分枝と左肝静脈の結紮切離

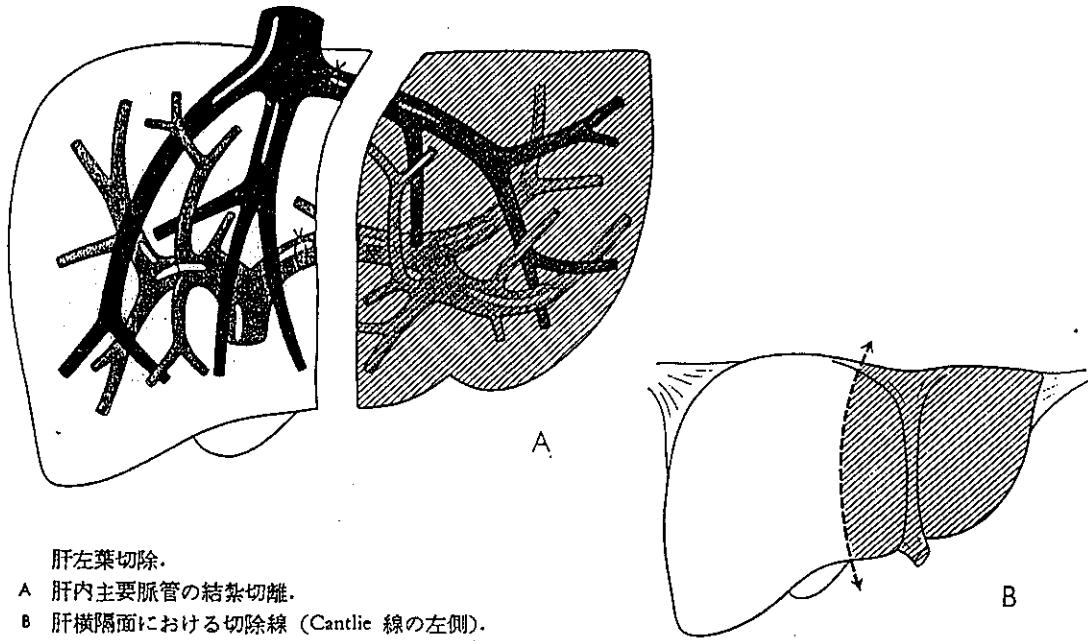


図 1 4

肝左葉切除.  
 A 肝内主要脈管の結紮切離.  
 B 肝横隔面における切除線 (Cantlie 線の左側).

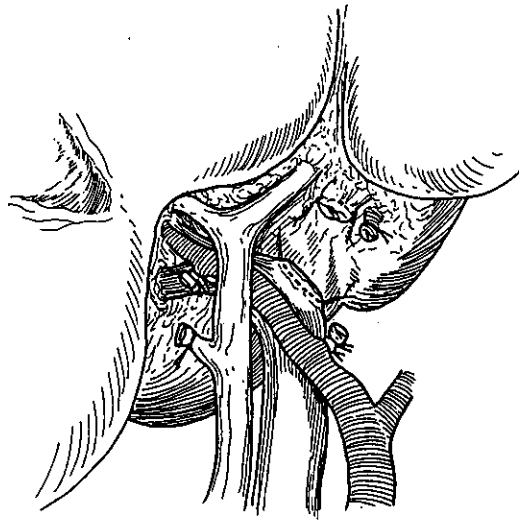


図 1 5

左肝動脈, 左門脈の離断, 断端処理

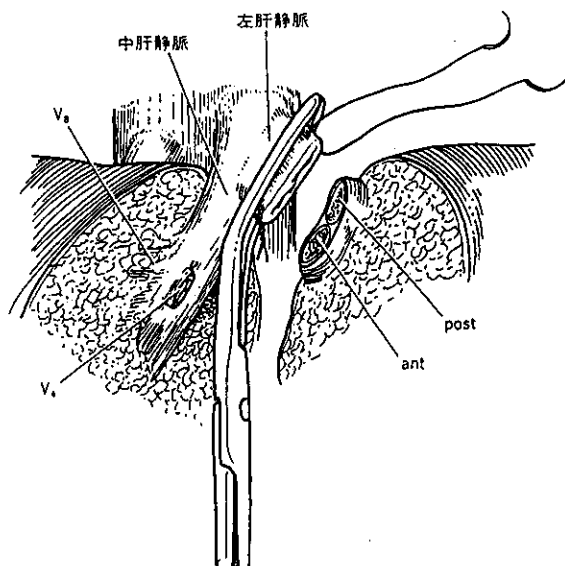
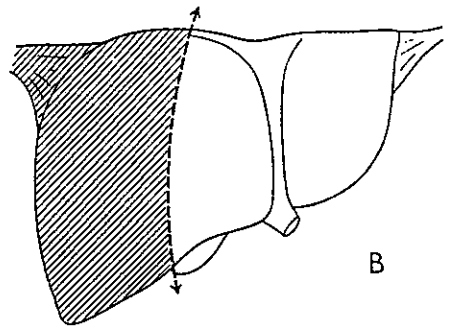
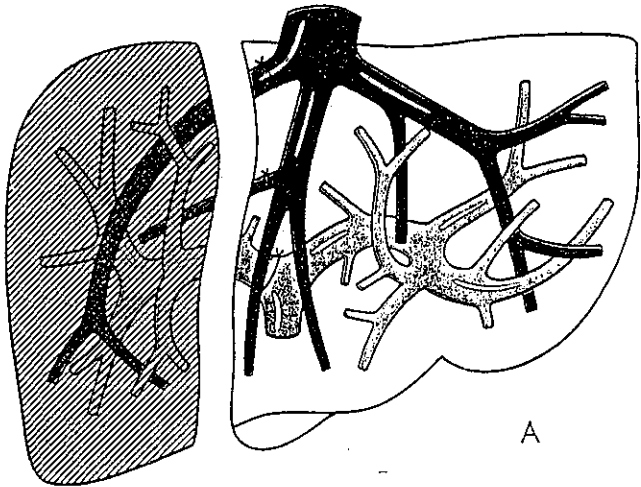
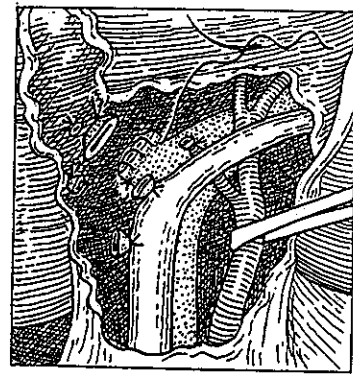
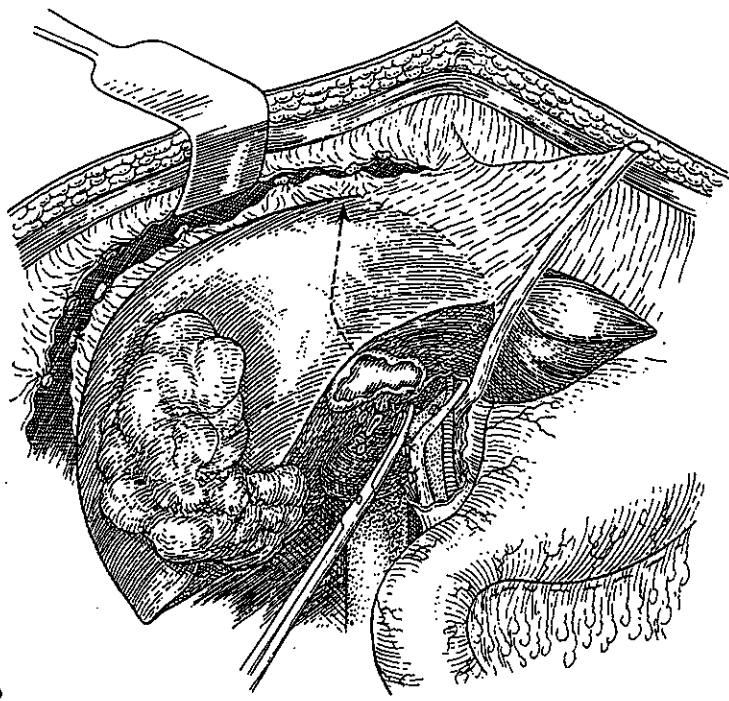


図 1 6

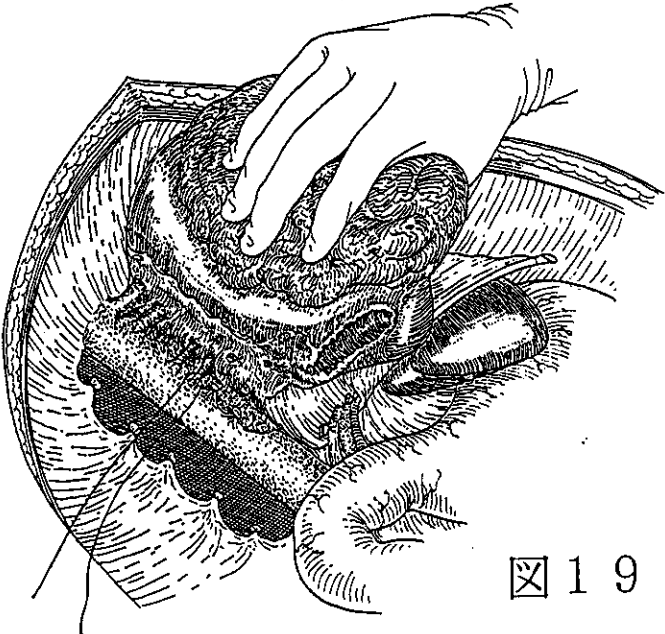
左肝静脈の離断, 断端処理



17 肝右葉切除.  
 A 肝内主要脈管の結紮切離.  
 B 肝横隔面における切除線 (Cantlie 線の右側).



18 肝動脈右枝を結紮切離したのち門脈右枝を切離し血管縫合で閉鎖する。矢印は肝切離線。



大静脈溝部を剝離して肝静脈短枝群を露出し、結紮切離していく。