

Fig. 2. Changes in perioperative serum type IV collagen levels in patients with normal liver, chronic hepatitis, or cirrhosis.

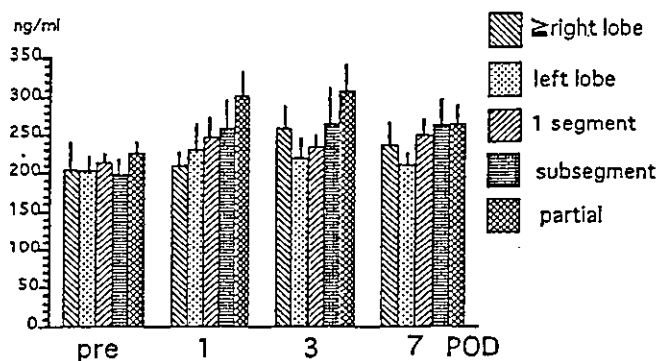


Fig. 3. Changes in perioperative serum type IV collagen levels according to the type of hepatic resection.

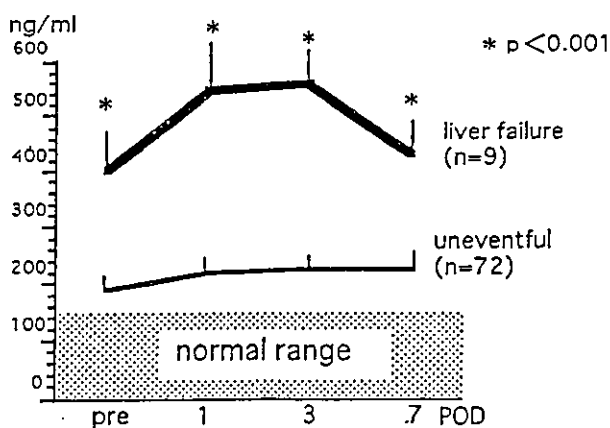


Fig. 4. Changes in perioperative serum type IV collagen levels in patients with or without postoperative liver failure.

300 ng/ml). The cutoff point of 150 ng/ml is the upper limit of the normal range of this assay system; the 25th percentile of this study was 140 ng/ml, calculated by the quantile (100th percentile 870 ng/ml; 0 percentile 61 ng/ml). The cutoff point of 300 ng/ml (twofold the normal range) also approximates 270 ng/ml as the

75th percentile of this study. As shown in Figure 5, operating time and intraoperative blood loss were significantly larger in group III than in groups I or II, although the percentage of minor operations (less than one segmentectomy) tended to be high in group III. These results suggest that operative stress tends to be larger for patients with an elevated preoperative serum type IV collagen level, irrespective of the type of operation.

Figure 6 shows the incidence of postoperative liver failure in the three groups classified by the preoperative type IV collagen level. In group I there were no patients with postoperative liver failure. In groups II and III, however, postoperative liver failure occurred in 11.6% and 44.4% of cases, respectively. There was a statistically significant difference between groups I and III ($p = 0.0001$), although the difference were not significant for group I versus II and group II versus III.

Discussion

Although much knowledge has accumulated regarding the features of hepatic fibrosis due to chronic damage, few studies have examined dynamic alterations following acute stress to the liver. Furthermore, it is still unknown how to evaluate the serum markers of hepatic fibrosis as new indicators of hepatic function, especially in a situation when cirrhotic patients undergo surgical interventions. Our interest was focused on perioperative changes in serum type IV collagen levels during hepatic resection for patients with chronic liver damage.

In the present study, the preoperative serum type IV collagen level was significantly elevated in patients with liver cirrhosis. This is similar to the results of other conventional liver function tests, as the ICGK value, serum total bilirubin level, prothrombin activity, cholinesterase activity, and platelet count in the peripheral blood were significantly deteriorated when compared to those in patients with a normal liver. However, the preoperative serum type IV collagen level significantly correlated only with the ICGK value and cholinesterase activity with low correlation coefficients; it was not correlated with other conventional liver function tests. These results suggest that type IV collagen level does not always parallel the results of conventional liver function tests. In some cases the serum type IV collagen levels were markedly elevated despite many conventional liver function test results being in or near the normal range. Such findings suggest that the serum type IV collagen level has a different, additional significance when evaluating the preoperative liver condition.

The present study indicated that the serum type IV collagen level changes in response to surgical stress during liver resection, especially when the preoperative levels are already elevated, as seen in cirrhotic patients. The size of the resected hepatic mass was not the primary factor influencing the postoperative serum type IV collagen level. Patients with postoperative liver failure exhibited significantly higher preoperative type IV collagen levels, and the levels markedly increased after liver resection. There were statistically significant differences in preoperative serum type IV collagen level, ICGK value, serum bilirubin level, cholinesterase activity, and operative stress (represented by the operating time and blood loss) between the patients with and without postoperative liver failure. Among these parameters, blood loss and type IV collagen level were found to be independent risk factors as the result of variable selection using the backward method in a multivariate logistic regression model. These results indicate that

Table 4. Preoperative type IV collagen level, conventional liver function tests, operative time, and blood loss in patients with and without postoperative liver failure.

Parameter	Uneventful course (n = 72)	Liver failure (n = 9)	<i>P</i> _{uni}	<i>P</i> _{multi}
Operative time (hr)	6.2 ± 0.3	10.1 ± 1.5	0.0033	
Blood loss (L)	1.5 ± 0.2	5.5 ± 1.4	0.0005	0.0118
Laboratory test				
Type IV collagen (ng/ml)	192 ± 9	403 ± 82	0.0070	0.0566
ICGK	0.146 ± 0.007	0.100 ± 0.010	0.0178	
Total bilirubin (mg/dl)	0.65 ± 0.03	1.20 ± 0.23	0.0034	
Prothrombin activity (%)	97.9 ± 2.2	92.9 ± 5.0	NS	
Fibrinogen (mg/dl)	327 ± 15	290 ± 47	NS	
Cholinesterase (IU/L)	180 ± 9.7	103 ± 19.8	0.0157	
Platelet count (× 10 ⁴ /mm ³)	15.5 ± 0.8	10.9 ± 1.6	NS	

*P*_{uni}: values calculated by univariate logistic regression model; NS: not significant (*p* > 0.05); *P*_{multi}: values calculated by multivariate logistic regression model. In this procedure, blood loss and type IV collagen were indicated to be independent risk factors as the result of variable selection using the backward method. Furthermore, an equation [log (P/1 - P)] = -6.0480 + 0.165 (type IV collagen, ng/ml) + 0.429 (blood loss, L) was obtained, where P is the predictive value for the postoperative liver failure. Accordingly, P = (e^y/1 + e^y), where y = -6.0480 + 0.165 (type IV Collagen, ng/ml) + 0.429 (blood loss, L).

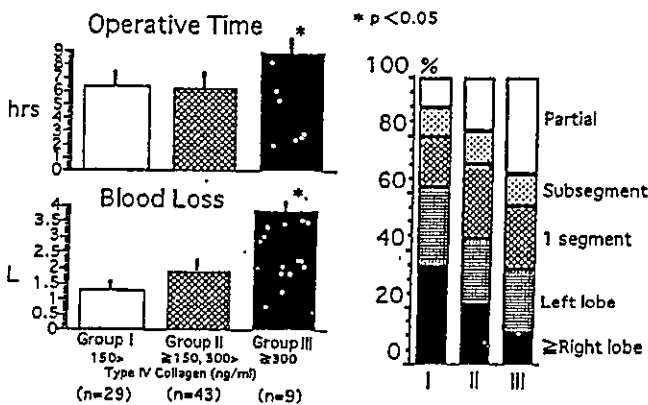


Fig. 5. Operating time, intraoperative blood loss, and percent of various types of liver resection in three groups of subjects classified according to preoperative serum type IV collagen level: group I, within normal range (150 >, ng/ml); group II, moderately elevated (≥ 150, 300 >, ng/ml); group III, markedly elevated (≥ 300 ng/ml).

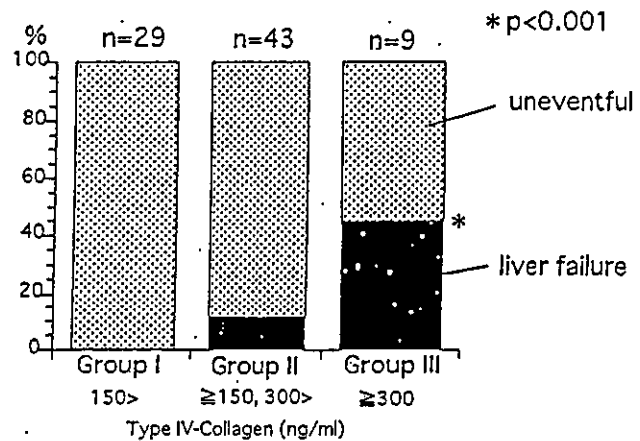


Fig. 6. Incidence of postoperative liver failure in three groups according to the preoperative type IV collagen level: Group I, within the normal range (< 150 ng/ml); group II, moderately elevated (≥ 150, 300 >, ng/ml); and group III, markedly elevated (≥ 300 ng/ml).

when the preoperative serum level of type IV collagen is elevated, it should be taken into account as an important risk factor for hepatic resection irrespective of the results of other conventional liver function tests. Furthermore, it was clarified, as shown in Figures 5 and 6, that surgical stress is greater, irrespective of the size of the resected hepatic mass and the increased incidence of postoperative liver failure, when the preoperative serum type IV collagen level is elevated to > 300 ng/ml.

Numerous mechanisms seem to be involved in the increased serum type IV collagen level associated with chronic liver damage. Type IV collagen in Disse's space of the liver, existing in a free and soluble form, increases and precipitates there, forming a so-called basement membrane-like structure in cirrhotic liver. During the process of advancing to liver cirrhosis, soluble type IV collagen also appears in the bloodstream. Therefore the serum levels of type IV collagen seem to reflect the severity of the fibrosis or the process of fibrosis in injured liver. These speculations were consistent with the report by Murawaki et al., who showed that the serum type IV collagen level increases with the

development of chronic liver disease [11]. That group also reported that serum markers, including type IV collagen, correlated strongly with the histologic degree of periportal change (with or without bridging hepatocellular necrosis) and with the degree of liver fibrosis.

The activity of stellate cells in Disse's spaces plays a key role in producing extracellular matrix (ECM), such as type IV collagen. The important trigger is intrahepatic inflammation of various origins [12]. Inflammatory cells such as leukocytes, macrophages, lymphocytes, and platelets are mobilized from other tissues and gather in the damaged portions of the liver [13]. When inflammation occurs in the liver, proinflammatory cytokines, adhesion molecules, platelet-derived growth factor, transforming growth factor-β, fibroblast growth factor, and others influence the proliferation of ECM-producing cells or induce gene expression for the formation of ECM in those cells [13-15]. When acute stress is induced in the damaged liver, as is seen with liver resection in cirrhotics, such phenomena would be accelerated and result in a marked increase in the serum type IV collagen level. Accordingly,

serum type IV collagen is not only a marker of established hepatic fibrosis but also a parameter strongly associated with an active reaction of ECM-producing cells induced by intrahepatic inflammation due to chronic damage or acute stress to the liver. Perioperative changes in serum type IV collagen level seen in patients with liver failure might support this consideration.

Conclusions

The present study indicates that the preoperative type IV collagen level in the serum is significantly elevated in cirrhotic patients, and its elevation to more than 300 ng/ml is a critical sign when performing liver resection even if other conventional liver function tests are within an acceptable range. Thus the perioperative serum type IV collagen level is a useful predictor of the risk of hepatic resection in cirrhotic patients.

Résumé. Le collagène de type IV, un des marqueurs sériques pour la fibrose hépatique, a été mesuré en périopératoire chez des patients avec et sans lésion hépatique chronique afin de déterminer si les modifications de ce paramètre correspondant à une agression hépatique aiguë pouvaient prédire le risque chirurgical de la résection hépatique. Le taux sérique de collagène de type IV a été significativement plus élevé en cas de cirrhose hépatique. Il y avait une corrélation significative entre le taux de collagène de type IV et le test de clairance au vert d'indocyanine et l'activité en cholinestérase, bien que les coefficients de corrélation n'étaient pas très élevés. La taille de la masse hépatique réséquée n'était pas le principal facteur influençant le taux sérique postopératoire de collagène de type IV. Chez les patients porteurs de cirrhose hépatique, le taux sérique de collagène de type IV était significativement plus élevé comparé aux taux en cas de foie normal ou de foie d'hépatite chronique. On a constaté une insuffisance hépatique postopératoire dans 0%, 11.6% et 44.4% des cas lorsque les taux sériques de collagène de type IV étaient, respectivement, <150, ≥150-299 et ≥300 ng/ml. En cas d'insuffisance hépatique postopératoire, les taux sériques de collagène de type IV étaient significativement plus élevés en pré et en post-opératoire, comparés à ceux sans cet incident. Parmi les tests de fonction hépatique préopératoires, le taux de collagène est un facteur de risque indépendant pour l'insuffisance hépatique postopératoire. Ainsi, doser le taux sérique de collagène de type IV semble être utile pour prédire le risque opératoire de la résection hépatique en cas de lésion hépatique chronique.

Resumen. El colágeno tipo IV, uno de los marcadores séricos de fibrosis hepática, fue determinado perioperatoriamente en pacientes con y sin daño hepático, con el propósito de investigar si los cambios en este parámetro en respuesta a estrés hepático agudo pueden predecir el riesgo quirúrgico de una resección hepática. Los niveles séricos de colágeno tipo IV se encontraron significativamente elevados en los casos de cirrosis hepática. Se halló una correlación significativa entre los niveles séricos de colágeno tipo IV y la prueba de depuración de verde indocianina (VIC) y la actividad de colinesterasa, aunque los coeficientes de correlación no aparecieron muy altos. El tamaño de la masa hepática resecada no fue el factor primario de influencia sobre los niveles postoperatorios de colágeno tipo IV. En los pacientes con cirrosis hepática, los niveles postoperatorios de colágeno tipo IV aparecieron significativamente elevados en comparación con los casos de hígado normal y de hepatitis crónica. Se presentó falla hepática postoperatoria en 0%, 11.6% y 44.4% en los pacientes con niveles preoperatorios de colágeno tipo IV de <150, ≥150-300 y ≥300 ng/ml, respectivamente. En los casos de falla hepática postoperatoria, los niveles séricos de colágeno tipo IV

aparecieron significativamente elevados tanto pre como postoperatoriamente. Entre las diferentes pruebas de función hepática, el colágeno tipo IV demostró ser un factor independiente de riesgo de falla hepática postoperatoria. Por consiguiente, la determinación perioperatoria del nivel sérico de colágeno tipo IV parece ser útil en la predicción del riesgo en pacientes con lesión crónica del hígado que deban ser sometidos a resección hepática.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Chikuma Hamada for assistance with the statistic analyses in this study. This work was supported in part by a grant from the Scientific Research Fund of the Ministry of Education, Sport and Culture, Japan.

References

- Hernandez AM, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix: components and distribution in normal liver. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.* 1993;423:1-11
- Trinchet JC, Hartmann DJ, Pateron D, et al. Serum type I collagen and N-terminal peptide of type III procollagen in chronic hepatitis: relationship to liver histology and conventional liver test. *Hepatology* 1991;12:139-144
- Niemelae O, Risteli L, Sotaniemi EA, et al. Type IV collagen and laminin-related antigens in human serum alcoholic liver disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 1985;15:132-137
- Sotaniemi EA, Niemelae O, Risteli L, et al. Fibrotic process and drug metabolism in alcoholic liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1986;40:46-55
- Tanikawa K. Serum marker for hepatic fibrosis and related liver pathology. *Pathol. Res. Pract.* 1994;190:960-968
- Yamada S, Suou T, Kawasaki H, et al. Clinical significance of serum 7S collagen in various liver diseases. *Clin. Biochem.* 1992;25:467-470
- Hahn E, Wick G, Pencev D, et al. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 1980;21:63-71
- Hernandez AM, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 1995;9:1401-1410
- Obata K, Iwata K, Ichida T, et al. One step sandwich enzyme immunoassay for human type IV collagen using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* 1989;181:293-303
- Matsumoto E, Murawaki Y, Ooshima A. Increased amount of serum type IV collagen peptide in human liver fibrosis as determined by enzyme-immunoassay with monoclonal antibodies. *Acta Pathol. Jpn.* 1989;39:217-223
- Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, et al. Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver diseases: relationship to liver histology. *Hepatology* 1994;20:780-787
- Friedman S, Bissell M. Hepatic fibrosis: new insights into pathogenesis. *Hosp. Pract.* 1990;15:43-50
- Rojkind M, Kershenovich D. The extracellular matrix, fibrosis and cirrhosis. Amsterdam, Elsevier Science, In the *Liver Annual*, vol. 6, Arias, IM, Wilson, JHP, Frenkel, M, editors, 1987:302-333
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. In situ hybridization for procollagen type I, III, and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 1989;10:84-92
- Fabris C, Pirisi M, Falletti E, et al. Prediction of serum markers of fibrosis by levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in acute and chronic liver disease. *Clin. Biochem.* 1994;27:407-412

星細胞による肝細胞増殖制御

宇山直樹^{*1)}, 河田則文^{*2)}, 奥山裕照・髙原康行・山岡義生^{*1)}

Rat stellate cells regulate proliferation of rat hepatocytes in culture

This study was aimed to reveal the stellate cell-derived factors that regulate hepatocyte proliferation in culture. Rat hepatocytes and stellate cells were cultured in serum-free Williams-E medium. We used hepatocyte mono-culture and two different co-cultures of hepatocytes and stellate cells; 1) co-culture on the same surface (Co-mix.) and 2) co-culture without contact between hepatocytes and stellate cells using a culture insert (Co-sep.). Changes in the number and the DNA synthesis of hepatocytes was estimated. Although the number of hepatocyte decreased to 76% of the original at 48 h after starting mono-culture, it was kept at 106% in Co-mix. and increased to 135% in Co-sep. The hepatocyte DNA synthesis was enhanced by carbenoxolone, gap junction blocker, in Co-mix. and reduced by NK 1 in each co-culture. PD 153035, an EGF receptor specific inhibitor, had no effect. Heparitinase-I (20 mU/ml) and sodium cholate (25 mM) reduced the hepatocyte DNA synthesis in Co-sep. to 71%. Activation of MAPK was induced in hepatocytes stimulated by conditioned mediums. These results indicated that hepatocyte proliferation was stimulated in the presence of stellate cells through HGF, extracellular heparan sulfate, and heparan sulfate proteoglycan, and might be negatively regulated by gap junction-dependent mechanism.

Rec. 3/18/2002, Acc. 5/30/2002, pp481~487

Naoki Uyama^{*1)}, Norifumi Kawada^{*2)},

Hiroaki Okuyama・Yasuyuki Shimahara・Yoshio Yamaoka^{*1)}

key words : hepatocyte, stellate cell, HGF, heparan sulfate, heparan sulfate proteoglycan

肝細胞の再生に肝非実質細胞(クッパー細胞, 星細胞, 類洞内皮細胞, 胆管上皮細胞など)が重要な役割を果たすことは広く知られている。最近, 非実質細胞のなかで最も肝細胞近傍に存在し, 細胞外マトリックス, 種々の増殖因子や炎症性メディエーターなどを産生する星細胞の役割が, 肝再生や線維化との関連から注目されている。正常肝に存在する星細胞は, 細胞体内にビタミンAを含有し, 類洞内皮と肝細胞に挟まれた空間(Disse腔)に存在している(静止期星細胞)。また, 星細胞は長い樹状突起を有し, 類洞を肝細胞側から取り巻いて pericyte として機能し, 肝微小循環を調節することも示されている。また, その樹状突起の一

部は肝細胞にも接着しており, 肝細胞-星細胞間の情報伝達に深く関わっている可能性が指摘されている。

しかし, 障害肝の星細胞, あるいは, プラスチックディッシュ上で培養された星細胞では, 細胞内のビタミンA含量が著減し, 活発に増殖を開始するとともに種々の細胞外マトリックスを産生するようになることが知られている(活性化星細胞)。これらの一連の変化は“星細胞の活性化”と称され, その際細胞内の平滑筋 α アクチンの発現が高度となり, 筋線維芽細胞(myofibroblast)としての性格を獲得する。

星細胞が肝細胞の再生に関与する機構には, ①星細胞によるサイトカインや増殖因子の産生と分泌, ②星細胞による細胞外マトリックスの産生, ③肝細胞-星細胞間の細胞接触による調節, などが関与すると考えられる。

*1) Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University 京都大学大学院医学研究科消化器外科学講座

*2) Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆脾病態内科学講座

星細胞は、肝細胞増殖因子である上皮増殖因子(epidermal growth factor: EGF), 肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)やトランスフォーミング増殖因子アルファ(transforming growth factor- α : TGF- α)などを産生し、肝細胞の増殖に関与することが指摘されている¹⁻⁴⁾。

また、非実質細胞が産生する細胞外マトリックス物質も肝細胞の増殖・分化に関わる可能性が報告されている。特に、星細胞は基底膜成分であるラミニンやIV型コラーゲン、プロテオグリカン、さらには線維状コラーゲンであるI型コラーゲンを産生する。星細胞は解剖学的に肝細胞と接触しており、星細胞が産生するこれらの細胞外マトリックス物質が肝細胞索の類洞側域に沈着して肝細胞機能に影響を及ぼすことは容易に推測される。実際、ラミニンを含むEHS(Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor)ゲル上で培養された肝細胞は形態がよく保たれ、チトクロームP-450の活性およびアルブミン産生能とも長期にわたり維持されると報告されている⁵⁾。また、ラミニンのように細胞外マトリックスが細胞増殖効果や増殖因子機能の調節・修飾を行う可能性も報告されている。

一方、ヘパリンとよく似た構造を持つヘパラン硫酸(heparan sulfate: HS)のようなグリコサミノグリカン(二糖の繰り返し構造からなる酸性多糖)やコア蛋白質に一つ以上のヘパラン硫酸が結合したヘパラン硫酸プロテオグリカン(heparan sulfate proteoglycan: HSPG)のように増殖因子の効果を調節・修飾するものもある。HSPGには、パルカンのように分泌型のHSPG以外にシンデカンのような細胞膜型HSPGがある。細胞表面上に存在するHSPGは、そのHS鎖にHGFやFGFを結合させ、組織における増殖因子の貯留・濃縮、さらには分解阻止に働くと考えられている⁶⁾。また、HSや分泌型HSPGは、HGFやFGFなどのヘパリン結合性増殖因子と結合し、増殖作用を増強することも報告されている⁷⁾。

細胞間結合にはタイト結合のように細胞相互を結びつける結合とギャップ結合のようにイオンや

その他の分子を移動させるための結合の2種類がある。ギャップ結合は、コネクシンなどの膜貫通型蛋白が結合してつくられる細胞間チャンネルで、1 kDa以下の小分子を隣接する細胞に直接伝えることによって、細胞の増殖や分化に関わっているとされている。肝細胞は、コネクシン26と32を発現して、肝細胞間ギャップ結合を形成している。非実質細胞においては、星細胞がコネクシン43を発現しているが、星細胞間および星細胞-肝細胞間におけるギャップ結合は分離培養細胞において認められているものの、生体内における発現とその意義については詳細な検討がない⁸⁾。

以上のようなメカニズムによって星細胞は肝細胞の再生に大きく関わる可能性がある。本稿では、このように多様な働きを持った星細胞が肝細胞の増殖・分化に及ぼす役割およびそのメカニズムについて概説する。

肝細胞/星細胞共培養における肝細胞増殖の変化

肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割に関する研究として、立野らの報告がある。立野らはラットから分離した非実質細胞分画に存在する小型肝細胞を血清、EGF、ニコチンアミド、L-アスコルビン2リン酸、ジメチルスルホキシドを含んだ培養液中で培養したところ、小型肝細胞を分化能および増殖能を維持しながら長期培養できることを示した。その際、小型肝細胞のコロニー周囲に存在していた星細胞が、小型肝細胞の分化能および増殖能の維持に関連している可能性があることを報告している⁹⁾。

筆者らは、成熟肝細胞の増殖に星細胞が関与しているかどうかについて、肝細胞単独培養群、細胞接触を伴う共培養群、細胞接触を伴わない共培養群を作成し、各細胞の経時的形態変化について調べた(図1)。単独培養肝細胞は時間経過とともに細胞が伸展していくが、接着細胞数は減少していった。細胞接触を伴う共培養群の培養開始12時間後では、肝細胞とその周囲の静止期星細胞が星細胞の突起で接触していた。共培養開始48時間後、肝細胞周囲の星細胞は活性化し、肝細胞と星

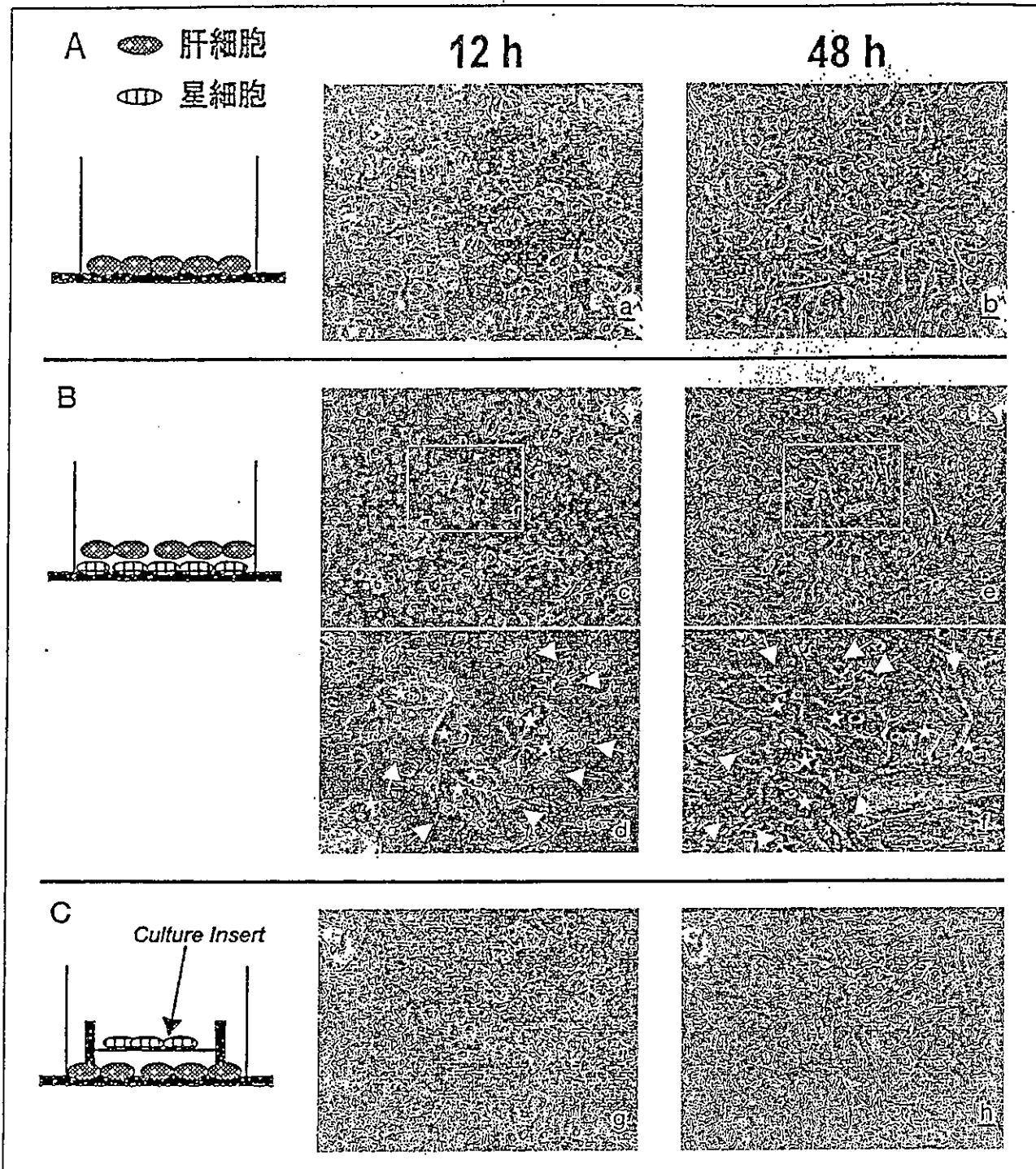


図1 共培養のシエーマおよび経時的形態変化

- A: 肝細胞単独培養
 a: 開始後12時間後, b: 開始後48時間後, 細胞は進展するが, 接着肝細胞数は減少している。
 B: 細胞接触を伴う共培養
 c: 開始後12時間後×100, d: 開始後12時間後×300, 星細胞は時間とともに肝細胞周囲に集積する, 矢印は星細胞, 星印は肝細胞, e: 開始後48時間後×100, f: 開始後48時間後×300, 時間とともに星細胞はtransformationを起こし, 肝細胞周囲を囲む, 肝細胞数は維持されている, 星印は肝細胞, 矢印は星細胞。
 C: 細胞接触を伴わない共培養
 g: 開始後12時間後×100, h: 開始後48時間後×100, 肝細胞数の著大な増加を認めた。

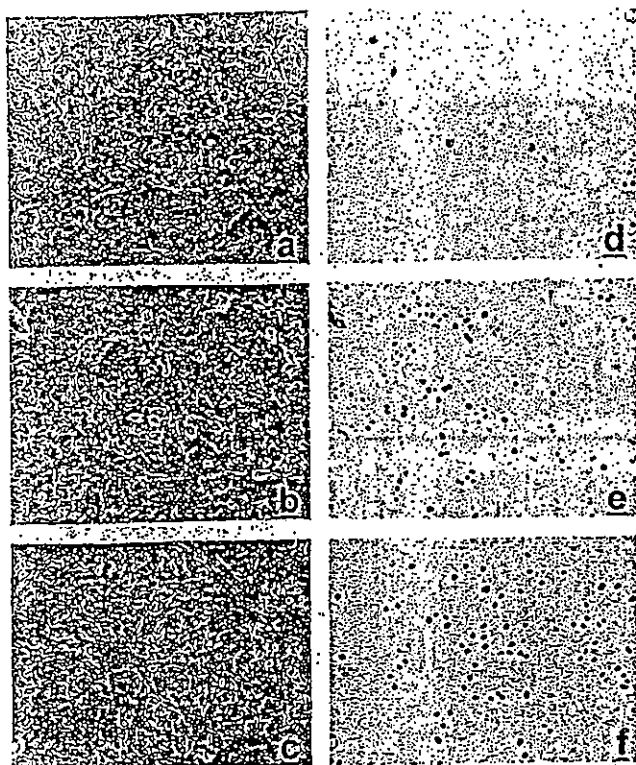


図2 単独培養および共培養のBrdU染色像
培養開始48時間後のBrdU染色。
a, d: 肝細胞単独培養
a: 位相差顕微鏡像×100. d: 明視野像×100
b, e: 細胞接触を伴う共培養
b: 位相差顕微鏡像×100. e: 明視野像×100
c, f: 細胞接触を伴わない共培養×100
c: 位相差顕微鏡像×100. f: 明視野像×100
単独培養に比べ、細胞接触を伴う共培養および
細胞接触を伴わない共培養の肝細胞のほうが
DNA合成能が亢進している。

細胞の細胞体間に細胞接触を認めた。細胞接触を伴わない共培養群では、時間が経つにつれ、肝細胞は腫大・伸展していくのが観察された。

肝細胞単独培養群では、経時的に細胞数は減少して48時間後、96時間後には、培養開始時のそれぞれ76.3%、48.6%にまで減少した。一方、細胞接触を伴う共培養群では肝細胞数の有意な増加は認めなかったが、単独培養群に比べ生存細胞数が48時間後に有意に維持された(106%)。興味深いことに、細胞接触を伴わない共培養群では48時間後において肝細胞数は135%と有意に増加し、また他群と比較しても有意に肝細胞数が維持されることが明らかとなった。以上の結果はBrdUの取込みにより評価した肝細胞DNA合成能でも確認された(図2)。

以上のことから、肝細胞は星細胞と共培養することによって無血清下でも増殖することが明らかとなった。また、星細胞と肝細胞との接触が必要とされないことから、星細胞が産生・分泌する物質が肝細胞の増殖に関わる可能性があることが判明した。

細胞接触の関与

Rojkindらは、肝細胞と星細胞を共培養すると肝細胞-星細胞間にギャップ結合が形成されると報告している⁹⁾。細胞膜状ギャップ結合の形成を阻害するといわれているカルベノキソロン($C_6H_4O_7Na_2$, $10 \mu g/ml$)を細胞接触を伴う共培養に添加したところ肝細胞のDNA合成能は約1.5倍に増加した。しかし、肝細胞単独培養や肝細胞+HGF($10 ng/ml$)添加培養および細胞接触を伴わない共培養では、肝細胞のDNA合成能はカルベノキソロンで影響されなかった。

本知見は、肝細胞-星細胞間のギャップ結合が肝細胞の増殖を抑制している可能性を示唆し非常に興味深い。

肝細胞の増殖を刺激する星細胞由来の因子はなにか？

(1) 細胞増殖因子

星細胞が産生する生理活性因子のなかで肝細胞に対して増殖的に作用するものとしてHGF, EGF, TGF- α が報告されている^{2,3)}。そのなかでも、最も肝細胞増殖活性が強いHGFは特に静止期星細胞に発現しており、活性化とともに発現が減弱する。HGFの持つ多様な生理活性はすべてc-Met受容体を介して伝達されると考えられている。c-Met受容体はリガンドと結合した後、チロシンキナーゼを活性化し自己リン酸化される。その後、さまざまなシグナル伝達アダプター(PLC γ , Grb2)が会合し、増殖刺激が核へと伝達される。その主要な経路はGrb2-Ras-MAPK経路である。また、PI3 Kinaseの活性化も肝細胞増殖に関与していると報告されている。

HGFが共培養における肝細胞維持に関与するかどうかについて検討した。はじめに培養開始後

72時間の単独培養および共培養群における HGF の受容体である c-Met 受容体の発現に関して調べたところ発現量に変化はなかった。つぎに星細胞単独培養、細胞接触を伴う、あるいは伴わない、共培養おのおのの培養上清中 HGF 濃度は、それぞれ 3.7, 5.6, 2.4 ng/ml であった。分離した肝細胞にさまざまな濃度のリコンビナントラット HGF を添加して無血清下で 48 時間培養した後、肝細胞 BrdU L. I. を調べたところ、5 あるいは 50 ng/ml の HGF による肝細胞 BrdU L. I. は、14% と 44% であった。

この結果から細胞接触を伴わない共培養群の HGF 濃度は 2.4 ng/ml しかないにもかかわらず、BrdU L. I. が、HGF の最大効果を超えていることが判明した。また、HGF の拮抗剤である NK 1 の両共培養群における肝細胞 DNA 合成能への効果を調べたところ、両共培養群とも約 60% にまで減少し HGF の関与が考えられた。

他の肝細胞増殖因子である EGF と TGF- α は EGF 受容体を介して増殖刺激を細胞に伝達する。EGF 受容体もリガンドと結合した後、チロシンキナーゼを活性化し自己リン酸化される。その後、さまざまなシグナル伝達アダプター (PLC γ , Shc, Grb 2 など) が会合し、増殖刺激が伝達される。その主要な経路は Shc-Grb 2-Ras-MAPK 経路である。単独培養群および共培養群の肝細胞における EGF 受容体の発現は両群に差はなかった。また、EGF 受容体の阻害剤である PD 153035¹⁰⁾ には肝細胞増殖抑制効果はみられなかった。

星細胞単独培養、細胞接触を伴う共培養、細胞接触を伴わない共培養おのおのの培養上清によって培養肝細胞に p 42/p 44 MAPK 活性化が誘導されるが、その活性化は MEK の阻害剤である PD 98059 によって抑制されるものの、PD 153035 では抑制されなかった。

以上の結果から星細胞由来肝細胞増殖因子としては EGF や TGF- α よりもむしろ HGF が主として関与していることが判明した。しかしながら、HGF のみでは細胞接触を伴わない共培養による肝細胞増殖促進効果は説明できず、星細胞が産生分泌する因子のなかで上記以外の因子が関わって

いる可能性があると考えられた。

(2) 細胞外マトリックスの関与

星細胞は、コラーゲンやラミニン以外にヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンや分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンを産生・分泌する¹¹⁾。ヘパラン硫酸や分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンには HGF の増殖効果を高める効果があると報告されている。事実、分離肝細胞をヘパラン硫酸およびパールカン存在下に HGF で刺激し、肝細胞の DNA 合成能を調べると、ヘパラン硫酸およびパールカン (1 μ g/ml) はともに単独では肝細胞増殖効果はないものの、HGF 存在下にて肝細胞増殖効果を約 1.5 倍に高めた。

そこでヘパラン硫酸の分解酵素であるヘパリチナーゼ (20 mU/ml)¹²⁾ を肝細胞単独培養および共培養に添加し肝細胞の DNA 合成能について調べた。単独培養および単独培養に HGF (10 ng/ml) を添加した実験では、ヘパリチナーゼの効果はないものの、共培養における肝細胞の DNA 合成はヘパリチナーゼにより 71% にまで減弱した。また、プロテオグリカンの合成阻害剤である亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂, 25 mM)¹³⁾ を用いても同様の結果が得られた。

以上より、共培養において星細胞が産生するヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンや分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンが肝細胞増殖に関与していることが考えられた。

(3) その他のメディエーターの関与

上記の実験で細胞接触を伴わない共培養における肝細胞の増殖効果は培養液中の HGF 濃度とヘパラン硫酸およびパールカンの相乗効果だけでは説明できず、他の因子の関与が考えられる。一つの候補として、FGF-1 があげられる。FGF-1 は培養肝細胞の DNA 合成能を高めるといわれているが、その効果は HGF や EGF の効果よりは弱い。しかし、ラット肝部分切除 4 時間後より劇的に FGF-1 の発現が亢進し、またその発現の亢進は肝細胞および非実質細胞の両分画で認められていることから肝再生になんらかの重要な働きを行っている可能性が示唆されている¹⁴⁾。

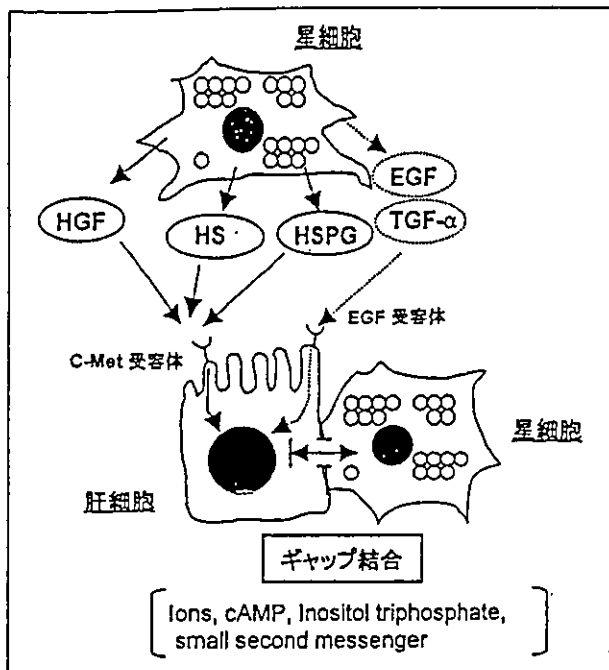


図3 星細胞による肝細胞増殖機構
肝細胞は星細胞由来のHGFおよびヘパラン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの作用によって増殖した。また、星細胞と肝細胞の細胞接触によって肝細胞の増殖は抑えられ、その作用は両細胞間に存在するギャップ結合による可能性が考えられた。
HS：ヘパラン硫酸
HSPG：ヘパラン硫酸プロテオグリカン

一方、プロスタノイドも一因子として候補にある。一般に、プロスタノイドは非実質細胞で産生され、炎症性サイトカインなどに反応して放出され肝細胞に作用すると考えられている¹⁵⁾。実際、星細胞においてもPGF_{2α}、PGD₂、PGI₂、PGE₂、LTC₄、LTB₄が産生されていることが報告されている。そのなかには、PGF_{2α}、PGE₂のようにEGFなどの増殖因子の作用を強めると報告されているものもあり、肝再生に重要な働きを行っている可能性が考えられる。

また、星細胞はビタミンA代謝に関与しており¹⁶⁾、ビタミンAの代謝の代謝物であるレチノイドもまた組織の分化・増殖に関与する可能性が指摘されている¹⁷⁾。しかし、筆者らの検討したところ、レチノイド自体には単独およびHGFの存在下においても肝細胞増殖効果は認められなかった。

共培養におけるアルブミン産生能について

Rojkindらは、インスリン、グルカゴン、プロラクチン、成長ホルモン、EGF、リノレイン酸、銅、セレンウム、亜鉛を含む独自の細胞培養液を用いて肝細胞を星細胞と共培養すると肝細胞の分化マーカーの一つであるアルブミン産生能が維持されると報告している⁸⁾。筆者らは、無血清下にて成熟肝細胞を星細胞と共培養しても同じ現象が得られるかを各培養群で調べた。培養開始後の24時間では、星細胞単独培養、細胞接触を伴う共培養、細胞接触を伴わない共培養群の肝細胞当りのアルブミン産生能は、2.9、3.0、4.2 μg/10⁵ cells/dayで各群に有意差はなかった。つぎの24時間のアルブミン産生能も、1.4、2.4、2.7 μg/10⁵ cells/dayで各群に有意差はなかった。

以上より、肝細胞のアルブミン産生能に関しては、星細胞よりも培養液中に添加されたインスリン、グルカゴン、プロラクチン、成長ホルモン、EGF、リノレイン酸、亜鉛、銅などが肝細胞のアルブミン産生能の維持に必要であると考えられた。

おわりに

これまで成熟肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割について調べた筆者らの検討から、図3のような模式図が考えられる。星細胞が産生するHGFなどの増殖因子やヘパラン硫酸・分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスが肝細胞の増殖を促進させ、一方で肝細胞-星細胞間の細胞接触によって形成されるギャップ結合を介して肝細胞の増殖を抑制させる可能性が示唆された。しかし、星細胞が産生するHGFとヘパラン硫酸・分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスだけで共培養の肝細胞増殖は説明できず、他の増殖因子やco-factorおよび未知の因子の関与をさらに明らかにしていかなければならない。

今後、さらに成熟肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割およびそのメカニズムについて検討することによって、急性期・慢性期肝疾患の治療および肝細胞移植や人工肝臓の作製に必要なヒト肝細胞の大量培養法の確立に大きく寄与すること

が推測される。

文 献

- 1) Maher JJ : Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 91 : 2244-2252, 1993.
- 2) Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE : 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* 15 : 5-11, 1992.
- 3) Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, Jones A : Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 269 : 19667-19670, 1994.
- 4) Matsumoto K, Nakamura T : Hepatocyte growth factor(HGF) as tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239 : 639-644, 1997.
- 5) Iredale JP, Arthur MJ : Hepatocyte-matrix interactions. *Gut* 35 : 729-732, 1994.
- 6) Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB : Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107 : 743-751, 1988.
- 7) Zioncheck TF, Richardson L, Liu J : Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270 : 16871-16878, 1995.
- 8) Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P : Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 146 : 1508-1520, 1995.
- 9) Tateno C, Yoshizato K : Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 148 : 383-392, 1996.
- 10) Bos M, Mendelsohn J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J : PD 153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin Cancer Res* 3 : 2099-2106, 1997.
- 11) Gallai M, Kovalszky I, Knittel T, Neubauer K, Armbrust T, Ramadori G : Expression of extracellular matrix proteoglycans perlecan and decorin in carbon-tetrachloride-injured rat liver and in isolated liver cells. *Am J Pathol* 148 : 1463-1471, 1996.
- 12) Naka D, Ishii T, Shimomura T, Hishida T, Hara H : Heparin modulates the receptor-binding and mitogenic activity of hepatocyte growth factor on hepatocytes. *Exp. Cell Res* 209 : 317-324, 1993.
- 13) Humphries DE, Silbert JE : Chlorate : a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem Biophys Res Commun* 154 : 365-371, 1988.
- 14) Berry MN, Edwards AM : Mechanisms of hepatocyte growth regulation by hormones and growth factors. *The Hepatocyte Review*. (Berry MN, Edwards AM), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000, p 209-246.
- 15) Kan M : The fibroblast growth factor family. *Liver Growth and Repair*. (Strain AJ, Diehl AM), Chapman and Hall, London, 1998, p 240-260.
- 16) Pinzani M : Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 66 : 387-412, 1995.
- 17) Sporn MB, Roberts AB : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 43 : 3034-3040, 1983.

HIF

京都大学大学院医学研究科消化器外科

藤井 英明・山岡 義生

Hideaki Fujii

Yoshio Yamaoka

(教授)

京都大学再生医科学研究所

廣瀬 哲朗

Tetsuro Hirose

はじめに

組織の恒常性維持には血液供給が不可欠であることは周知のとおりで癌細胞とてもその例外ではない。通常癌組織内は腫瘍血管の異常に基づき低酸素状態であり数mm以上の腫瘍増殖には血管新生が必須であることはよく知られていたが、癌細胞が低酸素状態に適應し、血管新生を伴って増殖するメカニズムはこれまで不明であった。近年、このメカニズムを説明するkey分子として転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)が注目されている。

HIF-1 の作用機序

HIF-1 は basic helix-loop-helix (bHLH)-PASファミリーに属する転写因子で、恒常発現している HIF-1 β サブユニットと低酸素やインスリン様増殖因子・肝細胞増殖因子などの増殖刺激により誘導される HIF-1 α からなる2量体である¹⁾(図1)。細胞質に存在する HIF-1 α は常酸素環境下では腫瘍抑制タンパクである von Hip-

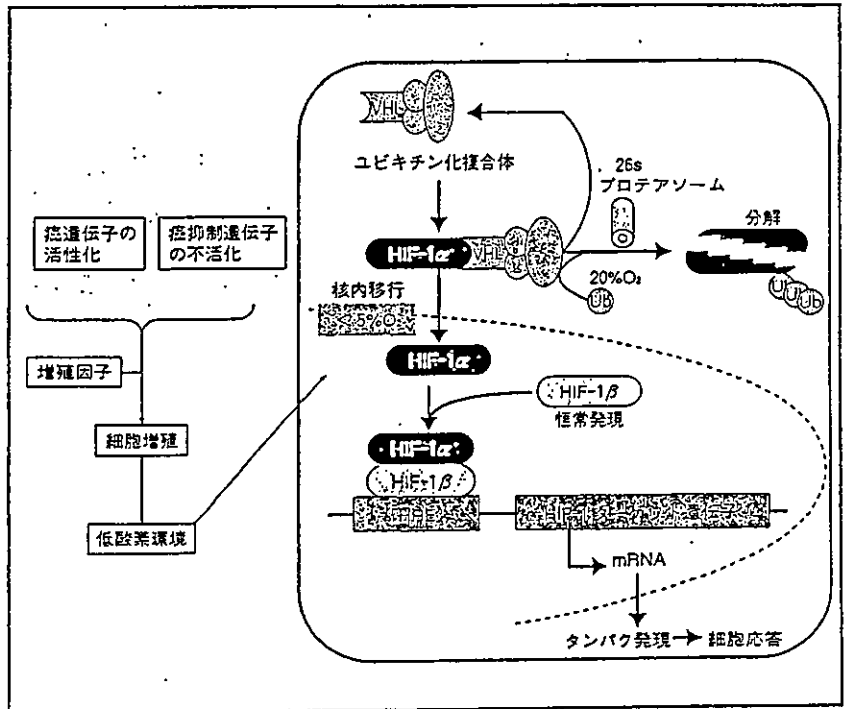


図1 HIF-1 および低酸素応答遺伝子発現の調節

(文献8より改変引用)

pel Lindau (VHL)タンパクなどで構成されるユビキチン化複合体により分解される²⁾が、低酸素環境下では核内に移行して HIF-1 β サブユニットと結合する結果、転写因子 HIF-1 を形成する。形成された HIF-1 は HRE (低酸素応答領域)を有する遺伝子に

結合することによりその転写を誘導し、結果的に血管新生や解糖系酵素等の遺伝子発現(表1)を促進させることで細胞を低酸素環境に適應させている³⁾。

表1 HIF-1による転写調節を受ける遺伝子群

HIF-1ターゲット遺伝子	
赤血球産生	erythropoietin
鉄代謝	transferrin, transferrin receptor, ceruloplasmin
血管新生	vascular endothelial growth factor, Flt-1 (VEGF receptor 1), plasminogen activator-1, adrenomedullin, endothelin-1, nitric oxide synthase-2, heme oxygenase-1, α 1B-adrenergic receptor
糖質エネルギー代謝	glucose transporter-1, glucose transporter-3, hexokinase 1, hexokinase 2, phosphofructokinase L, aldolase A and C, glyceraldehyde-3-phospho dehydrogenase, pyruvate kinase M, phosphoglycerate kinase-1, enolase-1, lactate dehydrogenase A, adenylate kinase-3, triosephosphate isomerase
細胞増殖・分化	insulin-like growth factor binding protein-1, -2 and -3, transforming growth factor- β 3, p 21, Nip 3, Cyclin G 2, 1, differentiated embryo chondrocyte 1, insulin-like growth factor II
pH調節	carbonic anhydrase 9 and 12
マトリックス代謝	poly(4-hydroxylase- α), collagen type V- α 1
ネガティブフィードバック	p 35, sjj

(文献6より改変引用)

肝癌細胞株における HIF-1 活性の検討

これまでの研究により、癌を含む腫瘍細胞では HIF-1 活性が上昇しており¹⁾、さらに脳腫瘍や乳癌では組織型や予後と相関しているとの報告も認められる¹⁰⁾¹¹⁾。消化器外科領域において肝細胞癌は、経皮的肝動脈塞栓療法が治療法の1つとして確立されているように血流豊富な腫瘍である。さらに、TAE 施行後の残存癌組織からの肝細胞癌再発も少なくなく、肝癌においても低酸素環境下での適応・増殖に HIF-1 活性が関与している可能性が高いと考えられた。実際われわれが行った正常およびミュータント HRE を持つ luciferase プラスミドをレポータ

ー遺伝子として利用した luciferase assay では、*in vitro* 低酸素環境下における肝癌細胞株の HIF-1 活性に細胞株間で差を認め(図2)、さらに HIF-1 活性に比例して VEGF や LDHA (lactate dehydrogenase A) などの低酸素応答遺伝子の発現にも差異を認めた。また HIF-1 活性の高いものほど低酸素環境下での高い増殖力(³H-Thymidine 取り込み能)を示したことから(図2)、肝癌においても HIF-1 活性が低酸素環境下での生存・増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし一方では、乳癌などで見られた組織学的悪性度と HIF-1 活性との明らかな相関はわれわれの実験では確認できなかった。

HIF-1 活性と癌関連遺伝子

さらに、HIF-1 活性を制御している因子に関する最近の研究では、IF-1 α の分解が癌抑制遺伝子である p 53 により制御されているとの報告¹²⁾や、癌遺伝子 V-SRC や C-SRC が HIF-1 活性を誘導するという報告もある¹³⁾。これら発癌の原因となる遺伝子変化に伴って HIF-1 活性が変化して、低酸素環境に適応したものが選択的に生存・増殖していくと考えられている。

おわりに

このように HIF-1 は癌の発生と関連するとともに、局所の環境適応や増殖に重要な働きをしており、今後の癌治療でターゲットの1つになると考

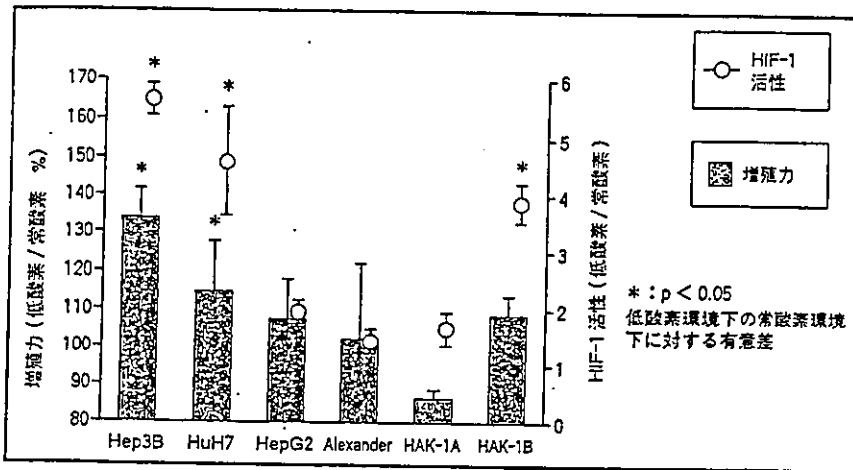


図2 ヒト肝癌細胞株における HIF-1 活性および増殖能

えられる。その一方で、血管新生阻害をターゲットとした近年の癌治療戦略には、血流遮断による癌細胞の障害の結果、HIF-1 活性の高い癌細胞の選択的増殖を誘導するというジレンマが存在し¹⁾、さらに HIF-1 自体をターゲットとして現在考えられている HIF-1 デコイや VHL タンパクを利用した治療もその上流遺伝子の選択的誘導を助長することにより治療抵抗性の強い癌を増殖させうる可能性を含んでいる。しかし、血管新生阻害をターゲットとした治療が有望な癌治療方法の一つなのは確かであることから、今後は HIF-1 やそれに関連する癌遺伝子や癌抑制遺伝子を含めた総合的な治療戦略が必要になると考えられる。

文献

1) Folkmann J : Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92 : 94-95, 2000
 2) Wang GL, Jiang BH, Semenza GL, et al : Hypoxia-inducible-factor 1 is

a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5510-5514, 1995
 3) Feldser D, Agani F, Semenza GL, et al : Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59 : 3915-3918, 1999
 4) Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, et al : Hepatocyte growth factor signaling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 22 : 1363-1371, 2001
 5) Cockman ME, Masson N, Maxwell PH, et al : Hypoxia-inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275 : 25773-25741, 2000
 6) Huang LE, Gu J, Schau M, et al : Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 7987-7992, 1998

7) Maxwell PH, Christopher WP, Ratcliffe PJ, et al : Activation of HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11 : 293-299, 2001
 8) Semenza GL : Hypoxia-inducible factor 1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Mol Med* 7 : 345-350, 2001
 9) Talks K, Turley H, Ratcliffe PJ, et al : The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157 : 411-421, 2000
 10) Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, et al : Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in human brain tumors : association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 88 : 2606-2618, 2000
 11) Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al : Levels of hypoxia-inducible factor 1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 93 : 309-314, 2001
 12) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, et al : Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 14 : 34-44, 2000
 13) Jiang BH, Agani F, Passaniti A, et al : V-SRC expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1 : involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57 : 5328-5335, 1997
 14) Blagosklonny MV : Hypoxia-inducible factor : Achilles' heel of antiangiogenic cancer therapy. *Int J Oncol* 19 : 257-262, 2001

II. 各種器械による肝離断

2. CUSA と水流滴下式バイポーラによる肝離断*

山本雄造
猪飼伊和夫
山本成尚

波多野悦朗
畷原康行

寺嶋宏明
山岡義生**

【要旨】安全な肝実質切離は目的としている切離面を確実に捉え、切離面に現れるグリソン鞘枝・肝静脈などの重要な構築物がなんであるかを確認できることによりはじめて達成される。CUSA と水流滴下式バイポーラによる肝離断は各ステップにおいて切離している構造物を常に無血野に直視下で確認しながら手術をすすめることができることに特徴がある。本稿ではこの2つの器械を効率よく使用するためのコツをこれまでの経験をもとに解説する。

はじめに

安全な肝実質切離技術に求められる要件は出血量を最小限におさえること、目的としている切離面を確実に捉え、グリソン鞘枝・肝静脈などの重要な構築物が切除側、残存側のどちらに位置しているかを確認できること、切離後に胆汁漏をきたさないことに集約される。以上の要件を満たす切離を簡便に行うためのデバイスとして各種器械が考案され、実際に使用されているがそれぞれ長所・短所が存在する。実際には術者の慣れ、器械の特性に応じた使用法の工夫が結果に大きく影響を与えるため、どの方法が優れているかなど優劣をつけられらるものではない。

われわれは、CUSA による肝実質組織破碎と

キーワード：肝実質切離、バイポーラ、CUSA

* Liver parenchymal transection using CUSA and bipolar cautery with water dripping system

** Y. Yamamoto (講師), I. Ikai (講師), E. Hatano, H. Terajima, N. Yamamoto, Y. Shimahara (助教授), Y. Yamaoka (教授)：京都大学医学研究科消化器外科。

吸引により切離面に現れるグリソン鞘枝・肝静脈を順次バイポーラで焼灼・切離していく方法を過去10年にわたって用いている。その理由は、1) 切離している構造物を常に直視下に確認でき、冒頭に述べたすべての要件を満足できること、2) 術者がいろいろなデバイスを持ちかえる必要がなく、離断の進行が極めてスムーズであること、3) disposable のパーツを使用しないので極めて低コストで行えることなどである。

I. 器械の準備

1. CUSA

CUSA の特性については他稿に譲る¹⁾。CUSA はハンドピースまでのコードが太く、比較的堅いため、術野へのセッティングで使い勝手が大きくかわる。ハンドピース先端が剣状突起より約10cm 頭側に居るように位置を調整し、患者の足側で敷布の中央にコードを固定する。これにより術中のコードのたわみに煩わされることがない。

2. バイポーラ

市販のバイポーラをそのまま肝実質切離に使用すると焼灼部で炭化した凝血塊がバイポーラのブレードに付着して、ブレードを組織から離すときに細い肝静脈の枝などを再び損傷するため有効な止血を得にくい。われわれは、市販のバイポーラのブレード内側面に内径1mmほどのパイプを取り付けたものを考案して使用している(図1)²⁾。このパイプに点滴セットを接続し、パイ

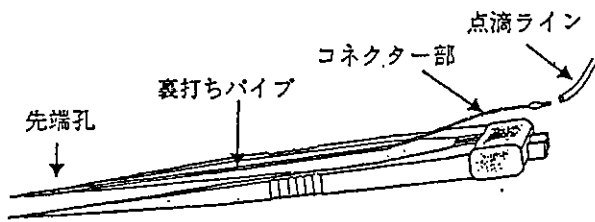
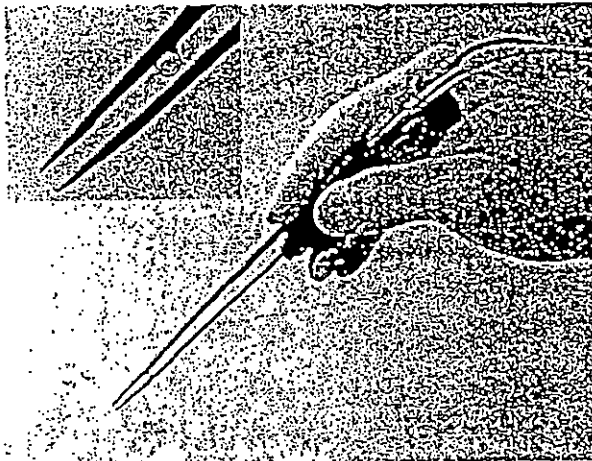


図1. 水流滴下式バイポーラの構造

市販のバイポーラを図のように先端から水滴を滴下できるように改造している。

ポーラの先端部分から常時1秒間に1~2滴の生理食塩水が滴下されるようにして、炭化した凝血塊の付着が起こらないように工夫している。

II. 基本操作

術者は患者の右側に立ち、患者に平行に頭側方向を向いて肝の切離線を足側からのぞき込むように位置する。肝の被膜はCUSAでの破碎が困難であるため電気メスであらかじめ凝固切開しておく。切離線の両端に3-0プロリール™糸を用いて牽引糸を掛け、第二助手にこの左側の牽引糸を尾側に牽引させる。このとき肝円索切離端につけた2-0の絹糸を第二助手と一緒に引かせると肝が肋弓から引き出されて術野を真上から直視できるようになる(図2)³⁾。術者は左手で右側の牽引糸を足側・右側に牽引することにより、細かなグリソン鞘枝・肝静脈を引きちぎらないように離断面の間隔を調整する。

CUSAのチップを上からなで下ろすように何回か擦り、切離面のきっかけを作製する。切離面

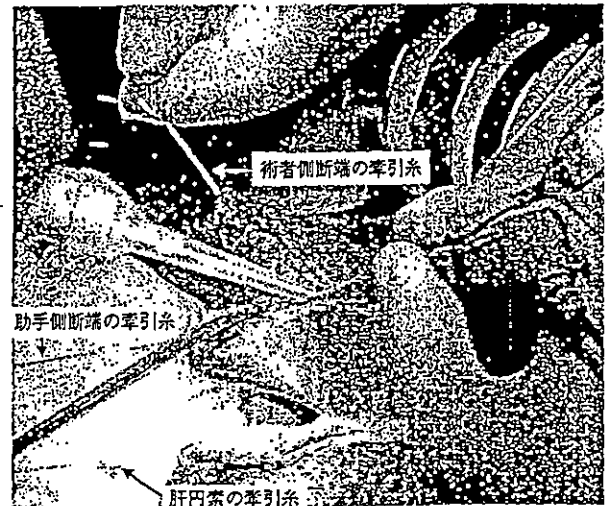


図2. 術野の展開

切離線の両端に牽引糸をおき、術者は右側の牽引糸をコントロールし、第二助手に左側の牽引糸を尾側に引かせると肝が肋弓から引き出され術野を真上から直視できる。

が左右に分れはじめたら横走る索状物をハンドピースのチップで引きちぎらないように注意しながら結紮切離に必要な約5mmの長さに渡って手前から順次露出するように周囲の肝実質を破碎してゆく。

第一助手は水流滴下式バイポーラを右手に、ハサミを左手に持ち、CUSAで露出された索状物をバイポーラで焼灼のうえハサミで鋭的に離断するのが基本的とする(図3)。露出された索状物が1.5~2.0mmより太いグリソン鞘枝の場合は3-0絹糸にて、肝静脈の場合は4-0絹糸で結紮し切離する。時間の節約のために切除肝側にはヘモクリップを使用するが、術後のCT検査等で診断の邪魔にならないように残存肝側にはヘモクリップは使用しない。また、5mm以上の場合は安全のため4-0プロリール糸にて縫合結紮している。以上の操作を肝縁側より順次、肝静脈の下大静脈への流入部に向けて繰り返すことにより肝切離を行うわけであるが、本法では末梢レベルの血管をも直視下で焼灼し切離するため、実質切離にPringle法のような流入血流遮断を要しないことが特徴である。一見時間がかかるように思われる



図3. 実質の切離

CUSAで露出された索状物を第一助手がバイポーラで焼灼のうえハサミで鋭的に離断する。左手のハサミは切る作業だけでなく、バイポーラで焼灼する際に術野を展開するためのヘラとして用いる。また、ハサミで組織を切離する際には逆に通電していないバイポーラで組織を固定する。

が、殆どの脈管はその末梢レベルでバイポーラにより処理される。このため結紮を要する部位は限られており、それほど実質離断に時間を要しない^{2,4)}。また、術者と第一助手の協調作業が守られる限りにおいて術野が血液で汚染されることもなく、肝の切離後に別途止血操作を行う必要もないために肝切除全体に要する時間は結果として長くない。

III. 離断をより安全・確実にするためのコツと工夫

1. 術野の吸引

第一助手がバイポーラにて焼灼している間、第二助手が吸引器で、術者がCUSAの吸引を利用してバイポーラから滴下する生理食塩水および血液を術野から除去すると効率のよい焼灼が得られ、凝塊付着による組織とバイポーラの接着も防止できる。

2. CUSAによる十分な露出

バイポーラによる索状物の凝固切離は肝実質と一緒にを行うと凝塊を形成してバイポーラのブレードを離すときに未焼灼の組織を引きちぎり出血を

誘発するため、CUSAで完全に周囲の実質組織から分離された後に索状物のみを焼灼するのがコツである。

3. 切離面の確保

実質の離断がミリ単位ですすめられるので、区域の境界となる肝静脈の壁をきちんと確認して、その半周を露出しつつ追いかけてゆくことが可能である。離断がある程度進むと、奥のところで再び離断面の両端に糸をかけて均等に引くようにする。この糸を一定のテンションで引いて術野を確保する方法は切離面を目的のプレーンで真っ平らに保つために極めて有効である。肝を術者の左手に抱え込んだり切離面をおさえたりすると、特に柔らかい肝臓の場合には切離面がゆがみ、目標の切離ラインを見失う原因になる。

4. 第一助手のハサミ

第一助手は左手のハサミを切る作業だけではなく、術野を展開するためのヘラとして用い、バイポーラで焼灼する際にブレードの近位部が手前の組織に触れてそこでショートしないようにする。また、ハサミで切離する際には逆に通電していないバイポーラで組織を固定して左手でも安定して切離できるようにする。

5. 術者と助手の協調

出血させないために大切なことは、術者と助手がまったく別個のところで仕事をしないことである。助手は常にCUSAの先端を追いかけるように動き、そこで索状物が露出されたらすぐにそれを処理するようにする。術者と別のところでわずかな出血を止めようと助手が勝手な作業をしていると切離のリズムが崩れるばかりでなく、新たな出血点を生じさせる原因になる。

6. 切離面に索状物の分岐部が現れた時

切離の途中でやや太めのグリソン鞘枝や肝静脈の一部が現れ、CUSAでその後面の肝実質破碎を行っても簡単には切離面の間できれいな橋渡しとならないことがある。この場合にはちょうど切離面に分枝が存在していることが多く、そのまま剝離鉗子ですくおうとすると分岐した枝を突き刺して思わぬ出血をみる。それがグリソン鞘枝である場合には切離面の中枢側に当たる側をもう少し



図4. バイポーラによる肝離断面の止血

少し広めに挟んで、バイポーラの腹で出血点全体をお湯の中で煮詰めるようにして蛋白を凝固させる。組織が白く凝固してきたらゆっくりと矢印のようにバイポーラを手前に滑らせるようにひくとブレードへの組織の固着もなく効率的に止血できる。

深く破碎吸引し、1本になっているところで結紮の上、さらに末梢側を破碎吸引して2本の枝を確實に出してから別々に結紮し切離するのがよい。肝静脈の枝である場合にはいったん肝静脈本管側で枝を引き抜くと止血は極めて困難となり無駄な出血ばかりでなく、それ以上の切離を進める妨げとなるためさらに注意を要する。決してやみくもに剝離鉗子を通したり、挟んだりしてはならない。肝静脈を裂かないように細心の注意を払いながらまず切離面の末梢側に当たる側でやや広く破碎吸引を行うと2本の枝が現れるからそれぞれの枝を露出結紮する。これにより陰圧系である肝静脈本管側も血管径が収縮し、周囲の肝実質との分離が容易となる。その後改めて本管側の枝をCUSAで全局にわたり露出し結紮するとうまくいく。短気を起こしてfinger fracture法のように出口のわからない肝実質内に一気に剝離鉗子を通すことは厳に慎むべきである。

7. 離断面からの出血に対する処理

肝切離に際しては、出血している血管は確認されないが離断面に滲むような出血が生じる現象を経験するであろう。モノポーラ電気メスで表面を

焼いている手術をよく見かけるが、焼けた血液が炭化して真っ黒になった断面から同様の出血が続き、いつまでも止血できない状況に陥りやすい。このような場合には水流滴下式バイポーラで少し広めに挟んで、バイポーラの腹で出血点全体をお湯の中で煮詰めるようにして蛋白を凝固させるという操作が効果的である(図4)。離断面を焼いて白く凝固してきたらゆっくりとバイポーラを手前に滑らせるようにひくとブレードへの組織の固着もなく効率的に止血することができる。

8. 肝静脈末梢小枝の止血

肝静脈の末梢枝が切離線で橋渡しとなっていて、バイポーラで焼灼したにもかかわらずうまく止血が得られないときにバイポーラ焼灼にこだわって焼き切ると余計に出血の原因になることがある。このような場合には思い切って先にハサミで切離した後に7.の離断面の処置に準じて止血をしたほうがうまくいく。

9. 肝静脈末梢枝の引き抜き損傷

肝静脈系の出血がみられた場合、CUSAの扱いによりその末梢枝が本管より引き抜けていることが多々存在する。この場合にむやみに鉗子で挟んで止血しようとするとかえって損傷部位の裂け目を大きくして止血に難渋することとなる。バイポーラで1, 2度その部を焼灼したほうが止血が得られることが多い。しかし、バイポーラでの止血がすぐに有効に働かない場合に焼灼を重ねると組織がもろくなり、その後の縫合を困難にするので、止血しにくいときはあまり深追いせずに周囲の組織を5-0のプロリン糸で寄せるように縫縮したほうが賢明である。特に、引き抜け部が肝静脈の本管にかかる場合はあわてずにCUSAで本管側壁を露出して、引き抜けた部位を6-0プロリン糸で縫合閉鎖する。

おわりに

以上、CUSAと水流滴下式バイポーラで肝実質離断を効率的に行うための注意と工夫についてわれわれの経験から述べた。いずれにしてもCUSA、バイポーラともに道具であり、その真価は術者と助手双方がそれぞれの特性を理解して使

用するときに初めて現れることを念頭において使用すべきである。

◆ ◆ ◆ 文献 ◆ ◆ ◆

- 1) 山本雄造, 猪飼伊和夫, 森本泰介ほか: 超音波外科用吸引装置の有効, 安全な使い方. 臨床外科 54: 465-469, 1999
- 2) Yamamoto Y, Ikai I, Kume M et al: New simple technique for hepatic parenchymal resection using a cavitron ultrasonic surgical

aspirator and bipolar cautery equipped with a channel for water dripping. World J Surg 23: 1032-1037, 1999

- 3) 山本雄造, 山岡義生: 肝細胞癌の手術—適応, 手技, 成績—拡大左葉切除. 消化器外科 24: 793-801, 2001
- 4) 山岡義生, 山本雄造: 臓器切除器機にベストはあるか—2. パイポーラピンセット (+超音波メス). 手術 55: 1375-1379, 2001

肝右3区域切除術

Right hepatic trisegmentectomy (Right trisectionectomy)

山本 雄造

Yuzo Yamamoto

山岡 義生

Yoshio Yamaoka

京都大学大学院医学研究科消化器外科

術 前

■手術適応

右3区域切除術は肝臓の右葉前区域・後区域、左葉内側区域を一括して切除し、左葉外側区域を温存する術式である。したがって、良性・悪性の肝腫瘍、胆嚢癌、肝門部胆管癌、炎症性疾患、肝外傷などで、病変が肝右3区域にまたがる場合が適応である。しかしながら、切除肝体積の一番大きな術式でもあり、残肝の機能的予備力が十分でない場合には適応とはならない。

■術式の選択

一般に、この術式が適応となる症例では腫瘍自体の占める体積が大きく、しかも左外側区域が代償性に肥大していることが多い。問題となるのは、対象が小型で多発性の転移性肝癌であったり、胆嚢癌の浸潤である場合には切除肝に占める腫瘍の体積が小さく、失われる正常肝の体積は全体の約70%以上に及ぶため、残肝の機能的予備力が十分であることを術前検査より確認しておかないと術後肝不全の危険が高くなる。したがって、肝硬変症例は本術式の適応となることはまずなく、われわれの施設では全肝切除症例の4.5% (37/825) を占めるにすぎない。

右3区域切除は基本的には尾状葉の切除を含めないが、肝門部胆管癌で病変が胆管左枝にかかる場合には尾状葉も全切除するのが普通である。

■術前検査

1) 肝機能的予備力

術前に施行すべき検査項目は、血液生化学、Child-Pugh分類、ICG K値、O-GTT、凝固線溶系機能検査などであり、他の広範囲肝切除術とかわるところはない。追加で行うべき検査は、残肝体積をできるだけ正確に評価するために、CTなどによるvolumetryを行っておく。これを参考にして、全体の

肝機能から術後の残肝機能が十分にとれるかどうかを検討する必要がある。

2) その他の検査

エコー、CT、MRI、血管造影にて腫瘍の占居部位、進展度、ことに肝左葉内への肝内転移の有無を詳細に調べ、解剖学的切除の可能性および根治性を検討する。肝細胞癌症例で右3区域切除を要するような症例では門脈腫瘍栓や肝静脈腫瘍栓を合併していることも多く、これらの精査や食道静脈瘤の検索も加えておくべきである。

■術前処置

肝右3区域切除を行うにあたっての特有な術前処置はなく、一般の肝切除の場合と同様でよい。術前に肝庇護療法などを要する症例は、本術式の適応とはなりがたい。術後に残肝への代謝負荷を下げる意味でコロン・プレバレーションとしてラクツロースシロップの投与を術前3日ほど行うが、経口摂取も前日夜まで許可し、術前のIVH管理などは要しない。

残肝の機能的体積が十分でないと判断された場合には、術前に経皮経肝右門脈枝塞栓術(PTPE)を施行して、左葉の代償性肥大を図っておくことが有効といわれている。正常肝で外側区域の体積が小さすぎる場合には、この処置後約3週間で代償性肥大が得られるが、肝炎・肝硬変を伴う肝細胞癌症例ではその効果にも限度がある。

■インフォームド・コンセントの要点

一般的な肝切除に伴う危険・合併症の説明として、出血・感染・胆汁漏のほか、切除量が大いことによる術後肝不全の可能性につき、十分な説明と理解を得ておくことが大切である。

術 後

■術後管理

肝右3区域に特有の術後管理はなく、一般の肝切除と基本的に同様でよい。しかし、肝機能予備力の限界ぎりぎりまで切除している症例が多いことから、肝不全の誘発因子が生じないようにする細心の注意が必要である。

1) 輸液管理

輸液管理も通常の肝切除と同様である。術後数日間5～10%のブドウ糖輸液を基本とし、過剰な free water を投与しないように注意しつつ、消化管出血を起こさないように H₂ blocker の投与を行う。腹水・胸水のコントロールと尿量の確保ができるように、血漿アルブミン値を3.5～4.0mg/dl に保つため、濃縮アルブミン製剤の補充が必要な場合もある。術後の凝固系機能の検査でPTの延長などがみられる場合には、新鮮凍結血漿の補充も考慮する。

経口摂取が可能となれば、できるだけ早期に経口摂取に移行する。

2) 疼痛管理

術後早期には蛋白合成能低下などの理由により、胸水などを生じやすい。制限された呼吸運動は無気肺などの合併症を引き起こしやすく、感染を誘発しやすいため、疼痛を十分に緩和することが重要である。また、腹腔内の死腔も大きいいため、ここに fluid collection を作りやすい。ドレナージをよくして膿瘍を形成しないようにするためにも、早期離床が勧められる。このためにも疼痛管理は重要である。また、早期離床は腸管運動の再開を早め、肝再生を促すための経口摂取を早期に開始する、腸内細菌によるアンモニアの産生を抑制する、胆汁の腸管へのドレナージを促進して肝断端からの胆汁漏発生を抑制するなど重要である。われわれは硬膜外チューブの留置により、積極的な疼痛緩和に努めている。

■注意すべき合併症と対策

1) ドレーンと腹腔内膿瘍

右横隔膜下にデュープルドレーンを2本、肝断端にペンローズドレーンを置いている。胆道再建などが無い限り、術後出血がないことが確認できればデュープルドレーンは術後3～4日で抜去、ペンローズドレーンは断端よりの胆汁漏がなければ術後1週間を目安に抜去している。腹水のコントロールなどを目的にドレーンを長期留置することは、感染から術後肝不全を

誘発しやすく危険である。

術後発熱が持続するようであれば膿瘍の存在を疑い、エコー、CTにて積極的に検索を行い、必要とあらばエコー穿刺下にドレナージする。

2) 肝不全

術後予防的にBCAA製剤などの投与を行う必要はない。実際に動脈血中アンモニアの高値が認められた場合の対症療法としての投与とは異なる。経口摂取を早期に開始することは、感染源となる静脈ラインをなくすばかりでなく、インスリン分泌を促して肝の再生を促し、肝不全の発症を予防するためにも重要である。

右3区域切除の場合、肝不全発症の原因として左肝静脈の流出障害による out-flow block であることがある。手術時に残肝が右側に rotate しないように固定しておくことも重要であるが、疑われる場合には至急にドップラーエコーにて肝血流を確認し、必要とあればこれを是正する。