

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19591515
 研究課題名（和文）
 大動物肝切除モデルにおける肝のトランスポーター発現解析とその制御に関する研究
 研究課題名（英文）
 Analysis of the hepatic transporter expression and the research regarding the control in the large animal hepatectomy model
 研究代表者
 永山 稔（NAGAYAMA MINORU）
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40398326

研究成果の概要：

豚肝切除術後に LPS を投与した感染症併発モデルを作成し、そのメカニズムとプロテアーゼインヒビター投与による肝障害抑制効果を検討した。実験群Ⅰ．肝門部血流遮断＋25%肝切除、実験群Ⅱ．実験群Ⅰ＋微量 LPS を 6 時間持続静注、実験群Ⅲ．実験群Ⅱ＋メチル酸ナフエモスタット（NM）投与。肝切除後感染症併発モデルでは肝組織に necrosis や apoptosis による肝組織障害を惹起し、NM 投与による肝保護効果を認めた。胆汁うっ滞に対する肝トランスポーター発現の関与は、本研究では結論は見いだせなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：

- (1) 術後黄疸 (2) 胆汁うっ滞 (3) MRP2
 (4) LPS (5) 肝門部血流遮断 (6) 感染症併発モデル
 (7) プロテアーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

近年、肝臓外科は新しい手術手技や手術デバイスの開発、さらに周術期管理の進歩により、以前と比較して安全に行われようになってきた。一方、我が国では肝細胞癌は年々増加しており、肝切除術の対象となる肝細胞癌も増加傾向にある。一般に肝細胞癌に対しての治療は内科的な凝固療法、動脈化学塞栓術と外科としての肝切除術があるが、腫瘍径が

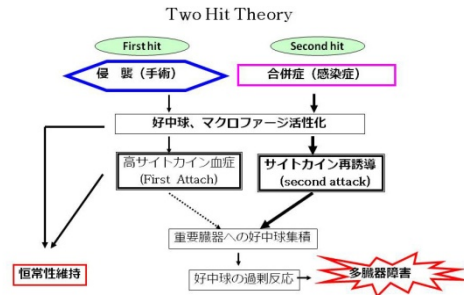
3cmを越える腫瘍では内科的治療は限界があり、肝予備能が肝切除に耐えられるのであれば肝切除が施行されるべきで、肝細胞癌の増加に伴って肝切除症例もさらに増加すると思われる。しかしながら、肝細胞癌が発生する背景肝はほとんどが慢性肝炎か肝硬変であり、そのような背景肝に対して肝切除術を施行すると、時に術後に黄疸に代表される肝機能低下が発生し、さらに感染症などの合併

症が加わると肝不全に陥り死に至る場合がある。肝予備能低下症例においては技術的に切除可能な腫瘍でも、術後の黄疸・肝不全を危惧して切除不能例とされる症例も少なくない。一方、大腸癌、直腸癌などの遠隔転移として肝転移が多い悪性腫瘍も増加傾向にあり、3個以上の腫瘍を有する患者でも3区域切除のような大量肝切除術を施行することで転移巣を全て切除し得る症例も増えてきている。しかながら、このような大量肝切除症例においては術後黄疸や腹水貯留などの合併症が発生し、術後長期に渡る入院が必要となる症例も散見される。このように今後も我が国の罹患状況を考えると、肝切除術が必要な患者は益々増加すると思われ、肝切除術を一層安全に行えるように外科医はさらなる技術の開発、周術期管理の進歩を目指さなくてはならない。

肝臓外科において最も重要で臨床的に解決すべく問題点は術後黄疸に代表される胆汁うっ滞の予防と治療である。近年、胆汁うっ滞発生させる因子が徐々に解明されてきており、炎症、薬剤、妊娠、先天性などの多くの胆汁うっ滞病変、高ビリルビン血症において肝細胞のトランスポーターの関与が明らかになってきた。ビリルビンの輸送に関しては **Multidrug resistance protein 2(MRP2)** が関与することが分かっており、例えば **lipopolysaccharide (LPS)** 投与によって **MRP2** の毛細胆管膜上への局在が変化することが報告されている。臨床的には閉塞性黄疸で **PTBD** を受けた患者で減黄効果が低い症例で肝組織の **MRP2** の発現低下が指摘されている。肝切除術後胆汁うっ滞の機序解明とその予防を解明するのは重要と考えられる。

胆汁うっ滞に関する研究としてはほとんどが実験動物として小動物であるラット、マウスを用いた検討である。従来、報告されている小動物肝切除モデルは実際の臨床で行われている肝切除とは手技においては極めて乖離していること、ラットでは胆嚢がないため実験モデルとしてはその妥当性に疑問が生じること、など問題点が多い。このような問題点が指摘されている小動物肝実験の結果を臨床に応用することは必ずしも妥当ではないと思われる。われわれが、肝臓外科における問題点を解明するために一貫して臨床により近い実験モデルとして使用してきた大動物である豚を用いて実験は、人間により近いモデルとして、極めて有用と考えている。

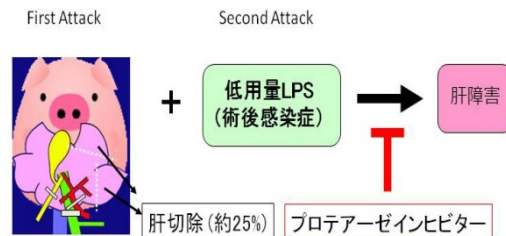
臨床では、肝切除術後に合併症として感染症が発症すると黄疸が発症し、肝不全に移行することをときに経験する。術後感染症が強く関与する術後肝不全発生の要因として、**Two hit theory** が提唱されている。



肝切除術後に感染症が発生した場合の肝組織の変化は非常に興味ある臨床的課題であり、われわれがこれまでに用いてきたモデルを応用することにより、より臨床に即したかたちでの肝切除術後感染症モデルを作成することが可能と考えられる。

2. 研究の目的

豚を用いて、25%肝切除術後に合併症として感染症を併発した時に起こる肝障害については、血压等に変動を起ささない程度の低容量 **LPS** を肝切除後に投与することで、**two hit theory** に基づいた肝切除後感染症モデルとし、手術後経時的に肝組織を採取して臓器障害の発生を検討する。さらに、これらのモデルにおけるプロテアーゼインヒビターの肝障害抑制効果を検討するとともに、肝組織の **MRP2** の発現の解析を行うことを目標とする。



3. 研究の方法

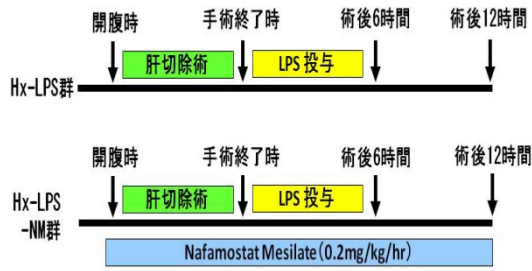
(1) 実験モデル

作成したモデルに従い、肝切除などの手術実験とそれら侵襲による血液生化学的肝障害の変化について検討を行った。本研究における実験群は、以下の通りとした。

①実験群Ⅰ．体重約 20kg の豚を用いてプリングル法としての肝門部血流遮断 (15 分間遮断、5 分間開放) を計 8 回 (総阻血時間 120 分) 併用する 25%肝切除を施行して一次侵襲とする。

②実験群Ⅱ．実験群Ⅰに加えて、術後に **LPS(0.05 μg/kg/min)** を 6 時間微量持続静注して二次侵襲とする。

③実験群Ⅲ．実験群Ⅱに加えて、メチル酸ナファモスタット (NM) 投与群として、肝切除開始時から手術終了まで持続静注する。



(2) 測定項目

①血液検査

測定時間：

開腹時、最後のプリングル終了時、
プリングル終了6、12時間後

測定項目：

血算（白血球、血小板など）、
生化学(ASTなど)、血液ガス分析、
血中サイトカイン値

②肝組織採取

採取時間：

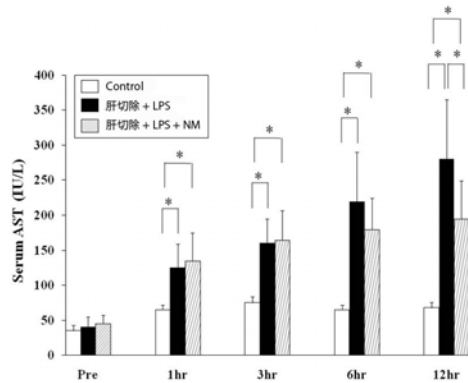
開腹時、最後のプリングル終了時、
プリングル終了6、12時間後

検索法：H-E染色、免疫染色

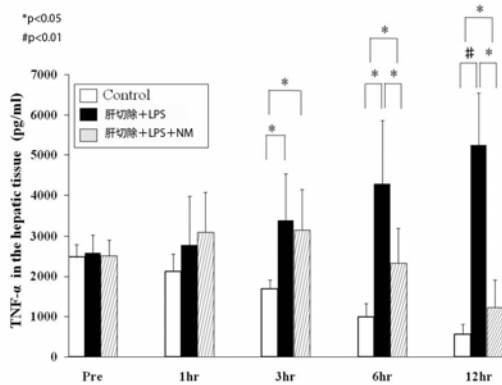
4. 研究成果

実験群間での比較を以下に示す。

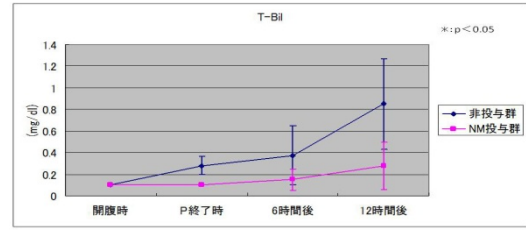
①AST: AST値はNM投与群で非投与群と比較して有意に低値を示した (p<0.05)。



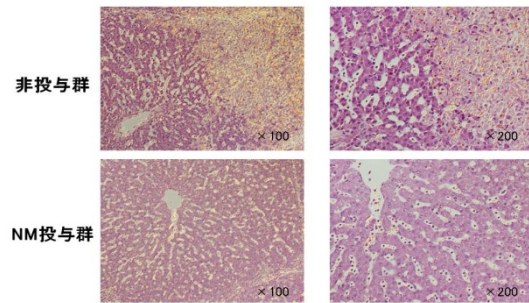
②TNF-a: TNF-aはNM非投与群と比較して有意に低値を示した。



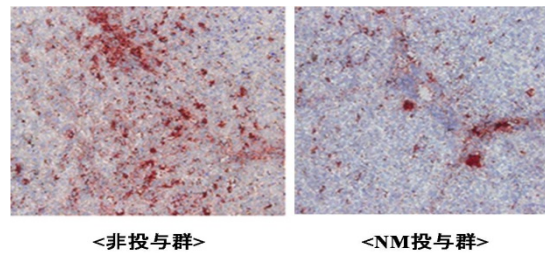
③T-Bil: 血清T-Bil値はNM投与群で非投与群と比較して有意に低値を示した (p<0.05)。



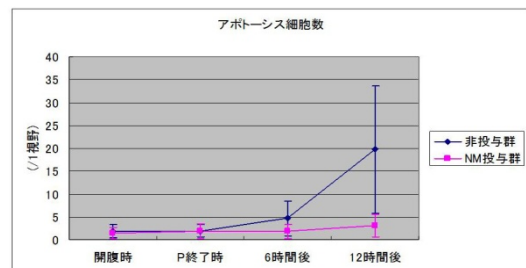
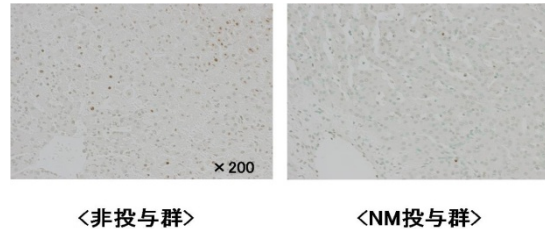
④H-E染色: Pringle終了12時間後の肝組織はNM投与群で、類洞の拡張・うっ血が軽減されており、肝組織壊死による障害は軽度であった。



⑤Trombocyte染色: NM非投与群では類洞内に血小板血栓を認め、微小循環不全を生じていたが、NM投与により軽減されていた。



⑥アポトーシス陽性細胞数: 12時間後のアポトーシス陽性細胞はNM投与群で低値を示した。



⑦MRP-2 抗体を用いた MRP2 染色では、群間での染色性、および経時的変化に明らかな差は認めなかった。

⑧結果のまとめ：我々が作成した肝切除後感染症併発モデルでは、血小板血栓による末梢循環不全や高サイトカイン血症が原因となって、肝組織に necrosis や apoptosis による肝組織障害を惹起すると考えられた。プロテアーゼインヒビターである NM は血小板凝集障害、炎症性サイトカイン産生抑制、などの作用を持つことが報告されており、肝切除後感染症併発モデルによって引き起こされる肝障害は NM を投与することにより有意に軽減された。

胆汁うっ滞に対しては NM 投与群と非投与群とで総ビリルビン値が NM 投与群で低値であったことから、肝トランスポーター発現低下の関与が本研究でも疑われたが、結論は見いだせなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, Shibata T, Kaji S, Nagayama M, Meguro M, Mitaka T, Hirata K. Impaired liver regeneration with humoral and genetic disturbances in urinary trypsin inhibitor-deficient mice. Liver Int 2009 in press. (査読あり)
- ② Mizuguchi T, Nagayama M, Meguro M, Shibata T, Kaji S, Nobuoka T, Kimura Y, Furuhata T, Hirata K. Prognostic impact of surgical complications and preoperative serum hepatocyte growth factor in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy. J Gastrointest Surg 2009; 13: 325-33. (査読あり)
- ③ Mizuguchi T, Katsuramaki T, Nagayama M, Meguro M, Shibata T, Kaji S, Hirata K. Rapid recovery of

postoperative liver function after major hepatectomy using saline-linked electric cautery.

Hepatogastroenterology. 2008; 55: 2188-92. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 目黒 誠、水口 徹、梶 晋輔、柴田稔人、孫 誠一、永山 稔、川本雅樹、西舘敏彦、沖田憲司、今村将史、信岡隆幸、山口浩司、木村康利、古畑智久、平田公一。肝切除後の敗血症作成モデルにおける肝循環不全にプロテアーゼインヒビターは有効か？第 45 回 日本腹部救急医学会総会、2009 年 3 月 13 日、東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 稔 (NAGAYAMA MINORU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：40398326

(2) 研究分担者

平田 公一 (HIRATA KOICHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50136959

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：30347174

木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80311893

目黒 誠 (MEGURO MAKOTO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：50448601