

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591518
 研究課題名 (和文) 大量肝切除および病態肝の肝切除における肝不全発症の早期予知とその臨床応用
 研究課題名 (英文) The early detection and clinical application of acute liver failure caused by major hepatectomy in the rat.
 研究代表者
 甲斐 真弘
 宮崎大学・医学部・講師
 40264378

研究成果の概要：

胆道癌に対する拡大肝切除は、術後の肝不全の誘因となりうる。正確な残存肝予備能の把握と術後肝不全の早期予知およびその防止は臨床上重要な課題である。われわれは、閉塞性黄疸ラットモデルおよび大量肝切除ラットモデルを用いてビリルビンおよび胆汁酸代謝や有機アニオントランスポーターの発現の変化を検討してきた。閉塞性黄疸ラットモデルでの検討結果から、胆汁外瘻と比較して胆汁内瘻による減黄の有用性が示唆された。また、大量肝切除ラットモデルでの検討結果から、肝切除術後の胆汁流量や胆汁酸排泄量の変化、有機アニオントランスポーターの発現の変化が術後肝不全発症を早期に予知するうえでの指標となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆道外科学、有機アニオントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

胆嚢癌や肝門部胆管癌などは進行例が多く、根治のために大量肝切除を要する症例が少なくない。肝予備能をこえた大量肝切除は正常肝でも術後の肝不全発症の誘因となりうる。また肝予備能が低下した状態にある閉塞性黄疸や肝硬変などの病態肝では、肝切除術後の肝不全の発生率が高い。したがって術前の正確な残存肝予備能の把握と術後肝不全の早期予知およびその防止は臨

床上きわめて重要な課題である。

肝切除術後の胆汁酸排泄能の低下にもなる肝機能障害の遷延や肝再生能低下が肝不全発症の大きな誘因であると推測される。われわれは硬変肝や閉塞性黄疸肝の動物実験モデルを作成し、肝硬変における肝切除後の肝再生を増殖因子や転写因子などから解析するとともに閉塞性黄疸肝において肝切除後の C/EBP と Cyclin E の低下を認め肝再生障害の原因

として報告した (Biochem Biophys Res Commun 2001;280:640, 2002;292:474). また肝予備能については動脈血中ケトン体比や肝組織中アデニンヌクレオチドから肝ミトコンドリアの機能を, コレステロール 7 α 水酸化酵素活性や血清中 7 α ヒドロキシコレステロールから肝ミクロソームの機能を, 血中ヒアルロン酸やフィブロネクチンから網内系の機能を総合的に解析し, 肝切除前後の肝機能や肝不全を予知するための指標として検討してきた (Surgery 1994;116:544). 閉塞性黄疸については術前胆汁内瘻が減黄しない群や術前外瘻群に比較して有意に肝切除術後の残肝再生と機能は良好であり (Annals of Surgery 1999;230:655), 胆汁酸が肝予備能の改善に寄与することを示唆した. また临床上での減黄良好例と不良例においてその相違を胆汁酸合成能の点から解析し報告した (Hepatology 1994;20:95). さらに閉塞性黄疸の減黄後の予備能に biliary ICG 排出試験が有用であることも報告してきた (World J Surg 2002;26:457).

上記のような研究成果から, われわれは肝切除術後の胆汁酸排泄能の低下にとともなう肝機能障害の遷延や肝再生能の低下が肝不全発症の大きな誘因であること, また腸管内の胆汁の存在が肝再生と深く関与しているのではないかと推測している. 大量肝切除術後や硬変肝, 黄疸肝などの病態肝における肝切除術後の有機アニオントランスポーター (ntcp, oatp, Bsep, Mrp2, Mrp3) の発現の変化および胆汁酸との関係について解析することは, ビリルビンや胆汁酸排出障害の機序の解明に有用で, これは術後肝不全の病態の解明や肝不全発症の早期予知につながると考える. そこでまずわれわれは, 大量肝切除ラットモデルおよび閉塞性黄疸ラットモデルを用いて有機アニオントランスポーターの発現の変化を検討した. 急性肝不全モデルとしての大量肝切除ラットモデルを用いた肝予備能評価においては 90%肝切除群と 70%肝切除群との間で排泄型の有機アニオントランスポーターである mrp2 および mrp3 の肝切除術後の発現変化様式が異なり, 術後肝不全発症の早期指標の一つとなる可能性が示唆され, 引き続き詳細な検討を要する. また閉塞性黄疸ラットモデルでの有機アニオントランスポーター発現変化の検討においては, 閉塞性黄疸の期間により各トランスポーターの発現変化が異なることが示唆された. 現在蛋白の発現変化を検討中である.

2. 研究の目的

今回の研究の目的は引き続き術後肝不全

発症の機序解明と早期予知, 肝予備能の改善の検討に主眼をおき, 有機アニオントランスポーターの発現の詳細な変化をとくに大量肝切除モデルおよび閉塞性黄疸モデルで検討する. また各種胆汁酸が有機アニオントランスポーターの発現に与える影響について解析する.

まず, 1) 肝不全モデルとして 90%肝切除モデルを作成し, 70%肝切除群との間でトランスポーターの経時的な発現の変化を mRNA レベルと蛋白の両者を用いて比較解析する. 2) 閉塞性黄疸モデルを作成し, 胆汁内瘻と外瘻とで肝切除術後の胆汁酸トランスポーターの発現の変化を解析する.

3) 閉塞性黄疸による肝予備能低下状態における各種胆汁酸 (UDCA, CDCA, DCA, CA) 投与が有機アニオントランスポーターの発現と血中および胆汁中胆汁酸をどのように変化させるかを解析する. 閉塞性黄疸後, 胆汁外瘻状態として各種胆汁酸を投与し各種有機アニオントランスポーターの発現と血中・胆汁中胆汁酸を解析する. 4) とくに進行胆道癌症例における肝切除術時に切除肝を一部採取し, 有機アニオントランスポーターの mRNA レベルを解析し, 術後肝不全発症の機序解明と臨床レベルでの応用可能な肝不全早期予知の検討をおこなう.

上記において有機アニオントランスポーターの発現とともに, 血中および胆汁中胆汁酸分析, コレステロール 7 α 水酸化酵素の mRNA レベルと酵素活性, 血清総胆汁酸, 血清総ビリルビン, 血清トランスアミナーゼ, 胆道系酵素を測定する. 肝不全発症に関与する有機アニオントランスポーターの変化を明らかにするとともに肝不全発症の早期予知の指標としてとくにトランスポーターの発現レベルが利用しうるか否かを解析する. また胆汁酸投与がトランスポーターの発現に及ぼす影響について解析する.

本研究の特色は, 大量肝切除における肝不全発症モデルおよび閉塞性黄疸モデルでの有機アニオントランスポーターの発現の変化を明らかにすることにより, 肝不全発症の機序の解明および肝不全発症の早期予知の解明となりうる点で臨床きわめて重要である. また胆汁うっ滞肝における肝障害の発生機序と肝予備能の改善をとくに有機アニオントランスポーターと胆汁酸との関わりにおいて分子生物学的レベルで解明しようとする点において, 临床上大きな問題となる減黄不良例の機序の解明とその肝予備能の改善法の解明につながると考える. 生体内に内在する胆汁酸による肝予備能の制御はきわめて重要である.

3. 研究の方法

研究計画・方法

(平成 18 年度)

I. 1) 大量肝切除術後肝不全モデルにおける有機アニオントランスポーターの発現の解析

術後肝不全モデルとして大量肝切除ラットモデルを作成する。Sham 手術, 70%肝切除および 90%肝切除の 3 群を作成し, 術後経時的に犠牲死させ肝臓, 胆汁, 血液を採取する (甲斐, 大内田)。トランスポーター (ntcp, oatp, Bsep, Mrp2, Mrp3) の発現をノーザンブロット, サザンブロット, 免疫染色で解析し, さらに胆汁中胆汁酸分析, コレステロール 7 α 水酸化酵素の mRNA レベルと酵素活性, 血清総胆汁酸, 血清総ビリルビン, 血清トランスアミナーゼ, 胆道系酵素を測定し 70%肝切除群と拡大肝切除後肝不全モデルとしての 90%肝切除群と比較検討する。測定は肝切除後 3 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間, 48 時間, 72 時間でおこなう。とくにトランスポーターの発現の変化を解析することにより, 肝不全発症の機序の解明とともに早期予知および治療法の検討をおこなう (甲斐, 近藤)。

2) 閉塞性黄疸モデルを作成し, 胆汁内瘻と外瘻とで肝切除術後の有機アニオントランスポーターの発現の変化を解析する (甲斐, 永野)。

3) 各種胆汁酸の有機アニオントランスポーターの発現に対する影響の解析

次いで閉塞性黄疸による肝予備能低下状態において各種胆汁酸 (UDCA, CDCA, DCA, CA) 投与がトランスポーターの発現にどのような影響を有するかを検討する。閉塞性黄疸ラットを作製し, 1 週間の黄疸後, 胆汁外瘻状態とする。各種胆汁酸を投与して胆汁酸プールの置換をおこなった後に 70%肝切除をおこなう (甲斐, 大内田)。術後経時的にトランスポーターの発現をノーザンブロット, サザンブロット, 免疫染色で解析する (甲斐, 永野)。さらに胆汁中胆汁酸分析, コレステロール 7 α 水酸化酵素の mRNA レベルと酵素活性, 血清総胆汁酸, 血清総ビリルビン, 血清トランスアミナーゼ, 胆道系酵素の測定をおこなう (甲斐, 近藤)。代謝面からはコレステロール, 胆汁酸代謝のそれぞれの key enzyme である HMG CoA 還元酵素とコレステロール 7 α 水酸化酵素に対する影響を mRNA レベルと酵素活性で解析する (甲斐, 近藤)。

4) とくに進行胆道癌症例における肝切除術時に切除肝の一部を採取し, 有機アニオントランスポーターの mRNA レベルを解析し, 症例間で比較検討する。これにより術

後肝不全発症の機序の解明と臨床レベルでの応用可能な肝不全早期予知の検討をおこなう (甲斐, 近藤, 大内田, 永野)。

以上のような解析には DNA/RNA 定量における超微量測定が必要で, 分光光度計一式 (アマシヤムバイオサイエンス・Ultrospec3300pro) を申請した。

II 動物実験に関しては, 学内の倫理委員会に実験計画を提出し, 承認を得たうえでおこなう。臨床例については切除組織, 血液, 胆汁などの解析があるため十分なインフォームドコンセントをおこなう。必要であれば倫理委員会に手続きをとる。

(平成 19 年度)

上記の研究を続行するとともに臨床でも閉塞性黄疸, 肝硬変などの症例の肝切除標本を用いて同様の解析をおこなう (甲斐, 大内田)。とくに閉塞性黄疸における減黄不良例と良好例については ICG の胆汁中排泄試験をおこない検討 (Am J Surg 2000; 179; 161, World J surg 2002; 26: 457) してきたが, さらに分肝機能評価としても検討する。

閉塞性黄疸に関しては, 術前胆汁内瘻が減黄しない群や術前外瘻群と比較して有意に肝切除術後の残肝再生と機能は良好であった (Annals of Surgery 1999; 230: 655)。術前の胆汁内瘻の残肝機能に対する分子生物学的解析をさらにすすめる。胆汁内・外瘻モデルを作成し, 有機アニオントランスポーター (ntcp, oatp, Bsep, Mrp2, Mrp3) の発現の違いを中心に検討する (甲斐, 永野)。

(平成 20 年度)

上記の研究を続行するとともに臨床でも閉塞性黄疸, 肝硬変などの症例の肝切除標本を用いて同様の解析をおこなう (甲斐, 大内田)。さらに肝硬変を既報 (Surgery 1994; 116: 544) のごとく thioacetamide で作成し, 肝切除後に経時的に肝組織を採取し, 有機アニオントランスポーター (ntcp, oatp, Bsep, Mrp2, Mrp3) の発現の発現の変化を解析する (甲斐, 近藤)。

4. 研究成果

胆道癌に対する拡大肝切除は, 残存肝予備能の限界に近い大量肝切除となることも多く, 正常肝であっても術後の肝不全の誘因となりうる。特に閉塞性黄疸や肝機能障害を有する病態肝における肝切除術はさらに術後肝不全の発生率が高く, 術前の正確

な残存肝予備能の把握と術後肝不全の早期予知およびその防止は臨床上きわめて重要な課題である。

われわれは、大量肝切除ラットモデルおよび閉塞性黄疸ラットモデルを用いてビリルビンおよび胆汁酸代謝や有機アニオントランスポーター（取り込み系の ntcp, oatp, 排泄系の Bsep, Mrp2, Mrp3 など）の発現の変化を検討してきた。これらの一部は原著論文(J Surg Res 2006; 134: 81-86)として発表し、また以下のような結果を主要な学会（第 105 回日本外科学会, 第 60 回日本消化器外科学会）や厚生労働省の班会議(平成 18 年度肝内結石症に関する調査研究班第 1 回打ち合わせ会)で発表してきた。現在論文を作成し、投稿中である。

1) 閉塞性黄疸ラットモデルでは、胆管閉塞により Mrp2, Bsep, oatp および ntcp の発現低下と Mrp3 の発現亢進が認められた。1 週間の閉塞性黄疸後、胆汁外瘻あるいは内瘻により胆管閉塞を解除すると発現が低下していた Mrp2 は亢進し、発現が亢進していた Mrp3 は低下した。胆汁外瘻と内瘻を比較すると内瘻の方が有意に Mrp2 の発現亢進と Mrp3 の発現低下が認められ、内瘻による減黄の有用性が示唆されている。

2) 術後急性肝不全モデルとして大量(90%)肝切除ラットモデルを用いた肝予備能評価をおこなった。術後 48 時間の生存率は 90%肝切除群は 50%, 70%肝切除群は 100%であった。90%肝切除群は 70%肝切除群に比べて術後早期(6 時間)に胆汁流量および胆汁中胆汁酸排泄の有意な低下がみられた(J Surg Res 2006; 134: 81-86)。また 90%肝切除群と 70%肝切除群との間で肝切除術後の有機アニオントランスポーターの発現変化の様式が異なり、90%肝切除群では Mrp3 の mRNA および蛋白の発現低下を認め、70%肝切除群との間に有意な違いを認めた。これらの結果から肝切除術後の胆汁流量や胆汁酸排泄量の変化、有機アニオントランスポーターの発現の変化が術後肝不全発症を早期に予知するうえでの指標となる可能性が示唆された。

また、臨床面においても進行胆道癌、とくに進行胆嚢癌における肝切除範囲(術式)と予後との関係を解析し、進展度別の至適術式を検討した。これらの結果については主要学会(第 45 回日本癌治療学会総会, 第 62 回日本消化器外科学会, 第 69 回日本臨床外科学会総会, 第 43 回日本胆道学会学術集会)で報告するとともに原著論文(J Gastrointest Surg 2007; 11:1025-1032)として発表

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 13 件)

1. Chijiwa K, Imamura N, Ohuchida J, Hiyoshi M, Nagano M, Otani K, Kai M and Kondo K: Prospective randomized controlled study of gastric emptying assessed by ¹³C-acetate breath test after pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy: Comparison between antecolic and vertical retrocolic duodenojejunostomy. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 16(1): 49-55, 2009.
2. Kondo K, Chijiwa K, Kai M, Otani K, Nagaike K, Ohuchida J, Hiyoshi M and Nagano M : Surgical strategy for hepatocellular carcinoma patients with portal vein tumor thrombus based on prognostic factor. Journal of Gastrointestinal Surgery, 13(6): 1078-1083, 2009.
3. Kondo K, Chijiwa K, Funagayama M, Kai M, Otani K and Ohuchida J: Differences in long-term outcome and prognostic factors according to viral status in patients with hepatocellular carcinoma treated by surgery. Journal of Gastrointestinal Surgery, 12(3):468-476, 2008.
4. Kondo K, Chijiwa K, Funagayama M, Kai M, Otani K and Ohuchida J: Hepatic resection is justified for elderly patients with hepatocellular carcinoma. World Journal of Surgery, 32(10):2223-2229, 2008.
5. Otani K, Chijiwa K, Kai M, Ohuchida J, Nagano M, Tsuchiya K and Kondo K: Outcome of surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. Journal of Gastrointestinal Surgery, 12(6):1033-1040, 2008.
6. Uchiyama S, Chijiwa K, Hiyoshi M,

- Ohuchida J, Kai M, Nagano M, Nagaike K, Kondo K, Akiyama Y and Kataoka H: Unusual segmental stricture of the lower common bile duct mimicking bile duct cancer.
Journal of Gastrointestinal Surgery, 12(1):199-201, 2008.
7. 旭吉雅秀, 千々岩一男, 大内田次郎, 今村直哉, 永野元章, 甲斐眞弘, 近藤千博: 磁石圧迫吻合術後経過良好な術中胆道損傷による総肝管完全閉塞の1例.
胆道, 22(4):558-562, 2008.
8. Kai M, Chijiwa K, Ohuchida J, Nagano M, Hiyoshi M and Kondo K: A curative resection improves the postoperative survival rate even in patients with advanced gallbladder carcinoma.
Journal of Gastrointestinal Surgery, 11(8): 1025-1032, 2007.
9. 甲斐眞弘, 千々岩一男, 長沼志興, 近藤千博, 大谷和広, 大内田次郎, 永野元章, 旭吉雅秀: 膵石症に対する体外衝撃波結石破碎療法(ESWL).
膵臓, 22(6):681-690, 2007.
10. Chijiwa K, Kai M, Nagano M., Hiyoshi M, Ohuchida J and Kondo K: Outcome of radical surgery for stage IV gallbladder carcinoma.
Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 14(4):345-350, 2007.
11. Chijiwa K, Ohuchida J, Hiyoshi M, Nagano M, Kai M and Kondo K: Vertical retrocolic duodenojejunostomy decreases delayed gastric emptying after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy.
Hepato-Gastroenterology, 54(78): 1874-1877, 2007.
12. Kondo K, Chijiwa K, Nagano M, Hiyoshi M, Kai M, Maehara N, Ohuchida J, Nakao H and Ohkawa Y: Comparison of seven prognostic staging systems in patients who undergo hepatectomy for hepatocellular carcinoma.
Hepato-Gastroenterology, 54(77):1534-1538, 2007.
13. Uchiyama S, Chijiwa K, Hiyoshi M, Nagano M, Ohuchida J, Nagaike K, Kai M, and Kondo K: Mucin-producing bile duct tumor of the caudate lobe protruding into the common hepatic duct.
Journal of Gastrointestinal Surgery, 11(11): 1570-1572, 2007.
- [学会発表] (計 件)
1. Kai M, Chijiwa K and Otani K: Prognostic factors and diagnosis of extent of the bile duct cancer.
2nd Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association, 2009. 3. 25-27, 2009 Bangkok, Thailand 3/27
2. Otani K, Chijiwa K, Kai M, Nagano M and Ohuchida J: The indication of bile duct resection without hepatectomy for treatment of hilar cholangiocarcinoma.
2nd Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association, 2009. 3. 25-27, 2009 Bangkok
3. 甲斐眞弘, 千々岩一男, 永野元章, 大内田次郎, 近藤千博, 大谷和広, 長池幸樹, 旭吉雅秀, 今村直哉: pT2 胆嚢癌における術式選択.
第70回日本臨床外科学会総会, 2008. 11. 27-11. 29, 東京.
4. 甲斐眞弘, 千々岩一男, 旭吉雅秀, 大内田次郎, 近藤千博, 大谷和広, 長池幸樹, 永野元章, 今村直哉, 矢野公一: 術後良性胆道狭窄の病態と病態に応じた至適治療法の検討.
第44回日本胆道学会学術集会, 2008. 9. 18-9. 20, 名古屋.
5. 甲斐眞弘, 千々岩一男, 永野元章, 大内田次郎, 近藤千博, 大谷和広, 佐野浩一郎, 旭吉雅秀, 今村直哉, 矢野公

一：胆嚢癌における進展度別外科治療の問題と対策。
第63回日本消化器外科学会総会，
2008.7.16-7.18，札幌。

6. 甲斐眞弘，千々岩一男，永野元章，大内田次郎，近藤千博，大谷和広，佐野浩一郎，内山周一郎，旭吉雅秀，今村直哉，矢野公一：進行胆嚢癌の進行度別生存率と長期生存例からみた至適術式の検討。
第20回日本肝胆膵外科学会・学術集会，
2008.5.28-5.30，山形。

7. 甲斐眞弘，千々岩一男，永野元章，大内田次郎，近藤千博，大谷和広，佐野浩一郎，内山周一郎，旭吉雅秀，今村直哉，矢野公一：進行胆嚢癌長期生存例から至適術式の検討。
第108回日本外科学会定期学術集会，
2008.5.15-5.17，長崎。

8. Uchiyama S, Chijiwa K, Hiyoshi M, Imamura N, Nagano M, Ohuchida J, Nagaike K, Kai M and Kondo K: Clinicopathological analysis of ampullary lesions treated by wide ampullectomy.
8th World Congress of the International Hepato Pancreato Biliary Association. 2.27-3.2, 2008, Mumbai.

9. Nagaike K, Chijiwa K, Uchiyama S, Nagano M, Hiyoshi M, Ohuchida J, Kai M and Kondo K: Clinicopathological analysis of lymph node metastases in cases of the cancer of the major duodenal papilla.
8th World Congress of the International Hepato Pancreato Biliary Association. 2.27-3.2, 2008, Mumbai.

[図書] (計 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者
甲斐，眞弘
宮崎大学・医学部・講師

(2) 研究分担者
千々岩 一男 90179945
近藤 千博 10244196
大内田 次郎 10363590

(3) 連携研究者