

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

ラット肝切除モデルにおける脾摘の門脈圧と 肝再生に与える影響

安藤太郎, 高原武志,
長谷川康, 新田浩幸, 佐々木章

岩手医科大学医学部, 外科学講座

(Received on January 15, 2016 & Accepted on February 24, 2016)

要旨

肝再生のメカニズムを検討する上で、門脈圧は密接に関わっているとされているが、門脈圧がどの程度なら効率的に肝再生が促進されるかなどその機序は明確になっていない。本研究では、肝切除時に伴う脾摘が門脈圧と肝再生に与える影響を検討するために、70%肝切除ラットモデルを作成し、脾摘群と非脾摘群に振り分けて比較した。2群間で術後継時的にCT検査を施行し肝再生率を、1.4Frの圧カテーテルを用いて肝切除前後・脾摘後・さらに術後経時的に門脈圧を、術後7日に血液検査を施行し肝障害度をそれぞれ比較した。両群とも肝切除後に門脈圧は上昇するが、脾摘群では門脈圧は脾摘直後に低下し、非脾摘群

と比べて術後一貫して有意に低値であった。また、脾摘群では、非脾摘群に比較して術後7日の肝再生率が有意に高く、AST・ALTが有意に低かった。肝切除後の肝再生に残肝の門脈圧の上昇が関与することはこれまで報告されてきており、今回の実験結果でも70%肝切除後に門脈圧の上昇を確認しこれが肝再生のトリガーの一つとなる事が示唆された。一方、脾摘を加えることによって門脈圧が低下した脾摘群で非脾摘群と比較して肝再生が有意に促進されたことから、肝切除後に生じる過度の門脈圧の上昇を避ける事が効率的な肝再生につながる事が示唆された。

Key words : *hepatectomy, splenectomy, portal vein pressure, hepatic regeneration*

I. 緒 言

肝細胞癌や大腸癌肝転移などの悪性腫瘍や肝血管腫などの良性腫瘍において肝切除は最も効果的な治療法であり、術後には肝臓の高い再生能により再肝切除も可能となる。また、生体肝移植は、ドナー及びレシピエントともに肝臓の再生能力を利用した治療法の一つである^{1,2)}。近年の手術手技と術後管理の進歩により肝切除も比較的 안전한治療選択肢となった。しかし、現在でも大量肝切除を必要とする場合、

高ビリルビン血症などの術後肝不全が起こることがある³⁻⁵⁾。大量肝切除後には残肝の肝血管床が極度に減少し、全門脈血流負荷が残存血管床にかかり静脈圧が上昇する。その結果、血管床の破綻をきたして肝不全を生じるとされている。また、生体肝移植において、グラフト肝とレシピエントの標準肝容積との割合が小さい場合には、術後 small-for-size syndrome (SFSS) が起こることがある。大量肝切除後の術後肝不全と SFSS は、同様の病態としてとらえることもできる。SFSS は、遷延する高ビリルビン血症、大量の難治性腹水、腎機能障害、低蛋白血症、凝固能異常、肝性脳症、易感染性など様々な病

Corresponding author: Taro Ando
andotaro08@gmail.com

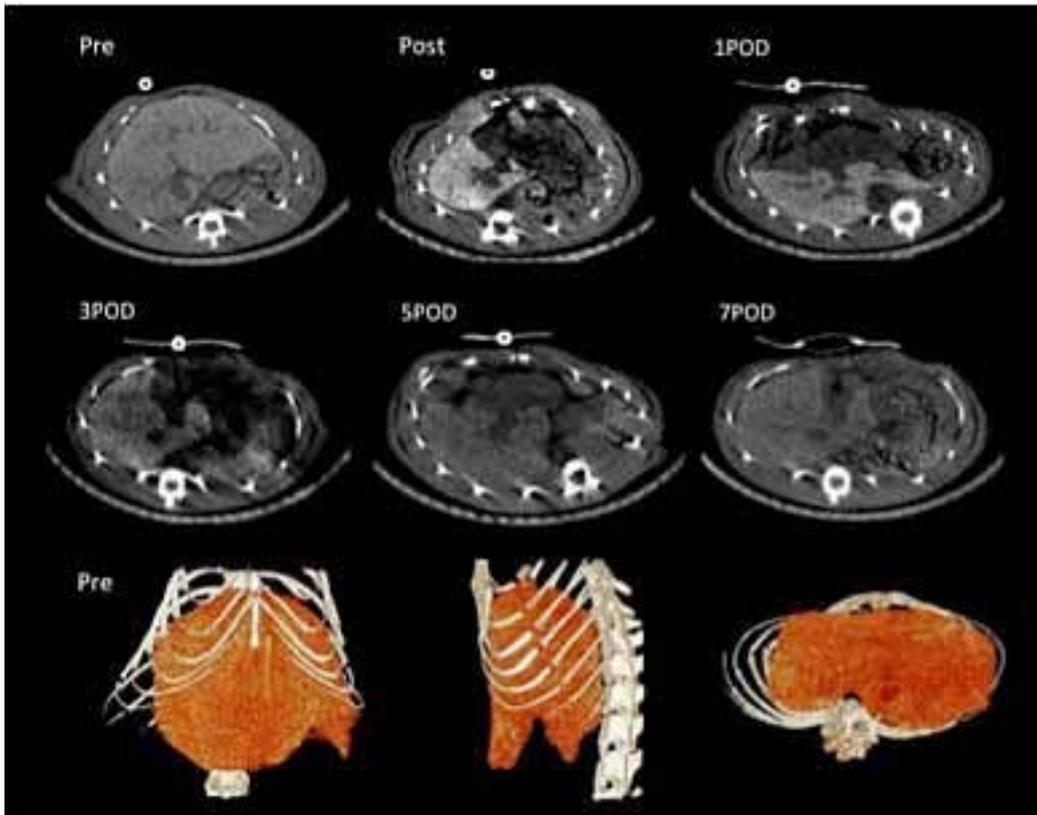


図1. 継時的なCT撮像による肝再生率を計測と3D構築像によるvolumetry

Pre:手術前, Post:70%肝切除後, 1POD:術後1日, 3POD:術後3日, 5POD:術後5日, 7POD:術後7日

態を示すとされている^{6,7)}。原因としては、過剰な門脈圧の上昇、肝静脈のうっ帯、肝細胞量の相対的不足による代謝、エネルギー産生と蛋白産生の障害などがある⁸⁾。

SFSSを予防するために様々な試みがなされてきたが、動物実験でも臨床においても脾摘を行うことで、移植後の生存率や肝再生率を高めることがわかってきた⁹⁾。脾摘による肝機能改善の機序には門脈圧の制御、肝内血流の変化、サイトカイン量の変化、血小板数の増加などの影響が考えられているが、未だに明確となっていない。本研究では、ラットの70%肝切除モデルを使用し、脾摘群と非脾摘群に分けて術後早期の門脈圧と肝再生率を比較し、肝切除後の脾摘による門脈圧変化と肝再生への影響を比較した。

II. 研究材料および方法

1. 実験計画

岩手医科大学動物実験委員会の審査で承認を得て実験動物の適正な取扱いのもと動物実験を行った。動物はWister系ラット雄性8~10週齢(210g~260g)を用いた。ラットは70%肝切除群(H群)8例と70%肝切除+脾摘群(HS群)8例との2群に分けた。手術時に腸間膜静脈から門脈内にカテーテルを挿入し肝切除前、肝切除後、脾摘後に門脈圧を計測した。また、肝再生を客観的に評価するために術前、術直後、術後1・3・5・7日にCTを撮像後にそのデータより肝容積を測定し、肝再生率を計測した。術後3・5・7日に門脈圧を計測した。また術後7日に血液生化学検査〔白血球数(μL), 赤血球数($\times 10^4/\mu\text{L}$), 血色素(g/

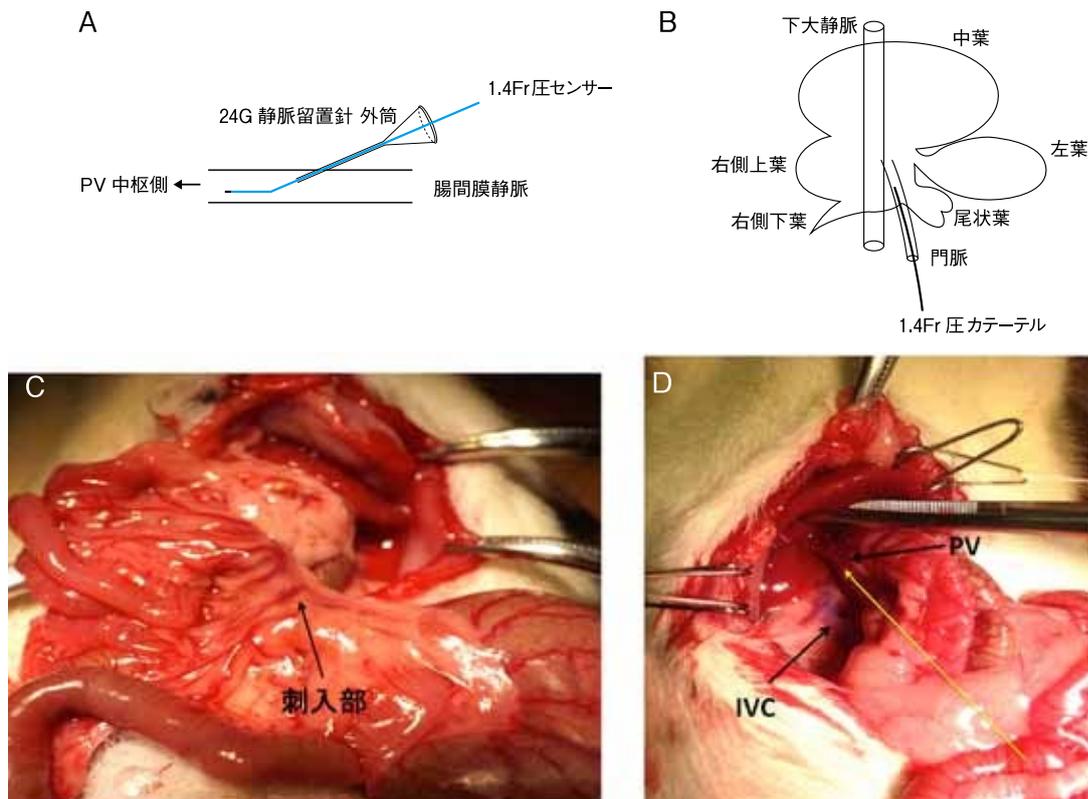


図 2. 門脈圧計測の手法

- A : 24G 静脈留置針外筒を使用した門脈圧カテーテルの静脈内への刺入法
- B : 門脈のカテーテル先端留置位置
- C : 回結腸静脈への刺入位置の写真
- D : 門脈本管のカテーテル位置の確認部位
(PV : 門脈, IVC : 下大静脈, 黄色矢印 : 圧カテーテル刺入方向)

dL), 血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$), AST (U/L), ALT (U/L), 総ビリルビン (mg/mL), アルブミン (g/dL)] を施行した.

2. 手術方法

手術はイソフルレンによる全身麻酔下 (酸素流量 0.5L/min, イソフルレン 2~3%) で施行した. 上腹部正中切開で開腹し, 肝周囲靭帯を切離後に肝を授動し, Higgins の方法を基本としながら肝離断には超音波凝固切開装置 (Harmonic Scalpel, Ethicon 社, ブルーアッシュ, 米国) を使用し, 中葉と左葉を切除し 70% 肝切除を施行した¹⁰⁾. HS 群では肝切除後に脾摘を施行した. 脾摘は, 胃脾間膜・脾結腸間膜を超音波凝固切開装置で切離後に, 脾門部で脾動静脈を一括に結紮し切離した.

3. 肝容積測定

肝再生率は CT を撮像後にそのデータより肝容積を測定し, 術前の全肝容量で除することで算出した. CT 撮像はイソフルレンによる全身麻酔下に小動物用 CT (eXplore RS80, GE Healthcare 社, ロンドン, 英国) を使用し呼吸と同期させて撮像を行い, 横隔膜直下の肝辺縁を明瞭に描出するように施行した. 単純 CT では肝は周囲臓器とのコントラストがつかず正確に描出されないことから, 肝臓辺縁を描出するために小動物用造影剤 (ExiTron nano 6000, Miltenyi Biotec 社, ケルン, ドイツ) を体重 1 g あたり 4 μl 使用して CT 撮像を行った. CT 撮像後画像はデータとして出力し, 3次元画像解析システム (VINCENT, Fuji Film 社, 東京,

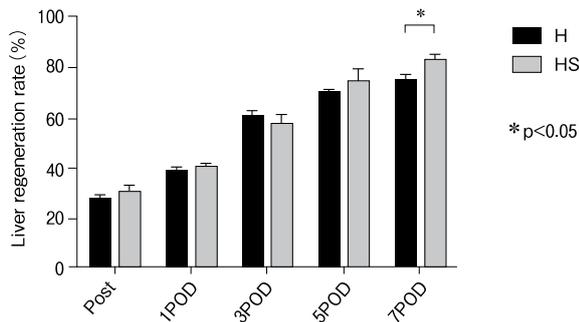


図3. 各群の継時的な肝再生率
 Post: 70% 肝切除後, 1POD: 術後1日,
 3POD: 術後3日, 5POD: 術後5日,
 7POD: 術後7日
 H: 肝切除群, HS: 肝切除 + 脾摘群

日本)を用いて肝容積を測定した。造影剤はアルカリ土類金属を原料としたナノ粒子でX線吸収を高め、肝臓のマクロファージであるクッパー細胞に速やかに取り込まれ経静脈的に排出されないため、小動物用造影剤の1回投与のみで投与後1週間は臓器の描出が可能となった(図1)。

4. 門脈圧測定

門脈圧測定は、1.4Frの圧センサーカテーテル(Millar Mikro-Tip SPR-671, Millar社, ヒューストン, 米国)を腸間膜静脈より挿入し、門脈本管に留置し計測した。Mikro-Tipカテーテルはデータ収集・解析システム(PowerLab, バイオリサーチ社, 東京)に接続し、継時的にモニタリングを行い記録した。開腹後に腸管を体外に引き出し、腸間膜静脈のなかで直線的に門脈に流入する分枝を選び先に24Gの静脈留置カテーテルを刺入した。それをガイドとして圧センサーカテーテルを静脈内に挿入し、肝門部付近の門脈の静脈壁越しに位置を確認して計測した(図2)。門脈圧は10分間持続してモニタリングし、その平均値をその時点での門脈圧と定義した。計測終了後は2つのカテーテルを抜去後に穿刺部位を圧迫し止血を得た。計測は肝切除前、肝切除後、脾摘後、術後3・5・7日に行った。

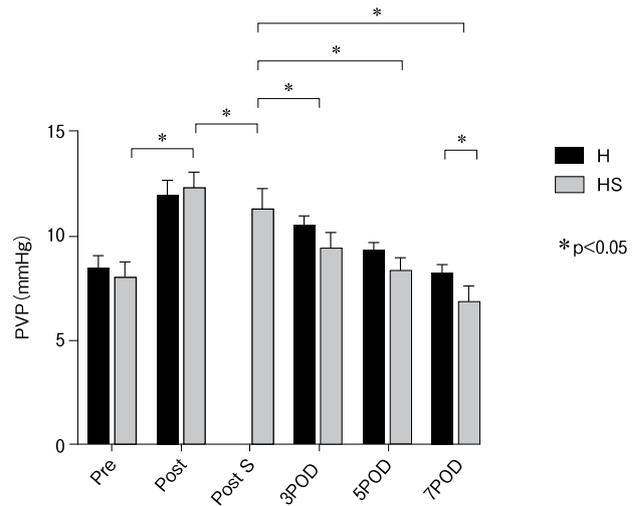


図4. 各群の70%肝切除後と脾摘後の門脈圧の推移
 Pre: 肝切除前, Post: 70% 肝切除後, Post S: 脾摘後,
 1POD: 術後1日, 3POD: 術後3日, 5POD: 術後5日, 7POD: 術後7日

5. 統計解析

数値は平均値±標準偏差で表した。H群とHS群との2群間の比較にはMann-WitneyのU検定を用いた。対応のある2対の比較にはWilcoxon検定を用いた。全ての統計解析はPrism (Prism 6 for Mac OS X, GraphPad社, サンディエゴ, 米国)で行った。p値が0.05未満を有意差ありとした。

III. 結果

1. 脾摘による肝再生率の変化

70%ラット肝切除モデルでは、H群(n=8)、HS群(n=8)ともに全例生存を認めた。肝切除後のCTによる残肝容積は術前の全肝容積の $29.4 \pm 4.3\%$ であり、70%肝切除手術が適正に行われていることが確認できた。H群の肝再生率は、術後1・3・5日で、 $38.9 \pm 3.9\%$ 、 $60.4 \pm 5.0\%$ 、 $69.9 \pm 2.9\%$ であり、HS群では、 $36.2 \pm 3.3\%$ 、 $60.7 \pm 8.9\%$ 、 $76.4 \pm 11.2\%$ であり、ともに肝再生を客観的に確認できた。術後7日において肝再生率は、H群($74.3 \pm 5.7\%$)と比較してHS群($82.9 \pm 4.5\%$)で有

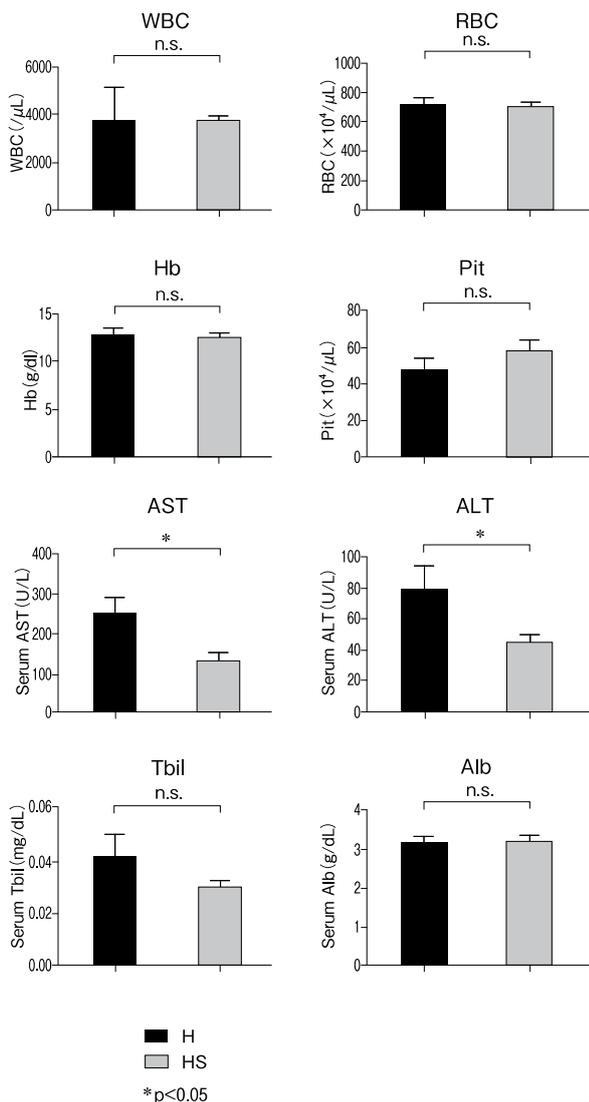


図5. 術後7日の血液検査所見

意な増加を認めた ($p=0.032$) (図3).

2. 脾摘によるPVP変化

肝切除前のPVPは 8.12 ± 1.98 mmHgであった。70%肝切除後は 12.03 ± 2.28 mmHgと有意な上昇を認めた ($p=0.003$)。HS群において脾摘前後でPVPを比較すると、 12.21 ± 2.30 mmHgから 11.24 ± 2.79 mmHgに有意に低下した ($p=0.016$)。術後3・5・7日のPVPを比較すると、H群で 10.12 ± 1.57 mmHg, 9.25 ± 1.03 mmHg, 8.16 ± 1.19 mmHg, HS群で 9.01 ± 1.77 mmHg, 7.97 ± 2.05 mmHg, 6.76 ± 2.09 mmHgであり、術後

一貫してHS群において有意に低値であった(術後3・5・7日 / $p=0.044 \cdot p=0.027 \cdot p=0.027$) (図4)。

3. 脾摘による血液生化学検査の変化

術後7日の血液検査では、白血球数とヘモグロビン値に有意な差を認めなかった。血小板数は、H群 ($47.1 \pm 25.9 \times 10^4/\mu\text{L}$) に対してHS群 ($58.3 \pm 28.7 \times 10^4/\mu\text{L}$) で有意差は認めないが高い傾向を認めた。

術後7日の生化学検査では、アルブミン値に有意差は認められなかった。血清トランスアミナーゼ (AST, ALT) 値と、血清総ビリルビン値を比較すると、AST値は、H群 250 ± 37 U/L, HS群 130 ± 20 U/Lで、H群に比較してHS群で有意に低値であった ($p=0.039$)。ALT値は、H群 79 ± 14 U/L, HS群 44 ± 4 U/Lで、AST値と同様にH群に比較してHS群で有意に低値であった ($p=0.024$)。血清総ビリルビン値は、H群 0.042 ± 0.008 mg/dL, HS群 0.03 ± 0.003 mg/dLで、H群において高い傾向を認めた (図5)。

IV. 考 察

本研究では、肝切除による門脈圧の変化とともに脾摘術を加えることでどのように門脈圧が変化し、肝再生に影響を与えるかに着目した。また、門脈圧を肝切除後・脾摘術後3・5・7日の門脈圧について同一個体で再度計測し、検討を加えた。これまで動物実験において肝臓の再生を評価するためにはどうしても個体を屠殺し、肝臓を摘出後に肝重量を計測しなければ不可能であった。本研究では、小動物用造影剤と小動物用CTを用い、シミュレーションソフトウェア Vincentを用いて残肝容積を継続的に測定することで、肝再生率を正確に測定することが可能であった。本研究で使用した小動物用造影剤は、肝臓のクッパー細胞に選択的に速やかに取り込まれ、経静脈的に排出されないため、1回の造影剤投与により術後1週間で複数回に

わたり, CT撮影が可能で同時に良好な肝と周囲臓器とのコントラストが得ることができた. また, 以前からの報告では, 門脈圧の計測は液体をカテーテルに充填する方法で行われていたが¹¹⁾, カテーテル内にエアバブルが入り信号に影響がでたり, 信号が減衰したり, カテーテル自体が短いために肝切除の妨げになることなどが問題であった. 本研究では, カテーテル先端に圧センサーがある Mikro-Tip カテーテルを使用することにより, 肝切除前後, 脾摘前後さらに術後の複数回にわたり, 高精度で安定した門脈圧を計測することができた. また, 同様のカテーテルを使用する方法では静脈壁に stay suture を加え, マイクロ剪刀で静脈壁を切離後にカテーテルを挿入する方法で行っている¹²⁾. 今回, 我々は静脈留置用カテーテルをガイドとした静脈内へのアプローチ方法を用いることで, 計測後の分枝の結紮が不要であり, 術後の門脈血流に影響の少ない計測方法を選択した.

本研究の結果では, 他の報告と同様に肝再生率の上昇と肝機能の改善が HS 群で認められた. この結果から, 肝切除後の早期には, 脾摘が肝再生の促進に影響を及ぼすことが示唆された^{13, 14)}. 肝切除後に肝再生が起こるメカニズムとして, Hepatocyte growth factor (HGF), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) といったサイトカインが関与することわかっている一方で, 門脈血行動態も密接に関与すると言われてきた¹⁵⁾. ラットの 70% 肝切除モデルとラットにおいて門脈-肝静脈シャント作成後に 70% 肝切除モデルの術後の肝再生を比較すると, 肝切除後に門脈圧が上昇しない後者では, ほとんど肝再生が起きていないことが報告されている. さらにこの報告では, 門脈圧の上昇が肝組織内での HGF の活性化に関与していると考えられている¹⁶⁾. 本研究ではラット 70% 肝切除モデルで H 群と HS 群の両方で全例肝切除後に門脈圧の上昇が認められ, 術後 7 日まで全例が生存した. また, HS

群において術後 7 日に肝再生の促進と肝機能障害の改善を認めた. 70% 肝切除後に上昇した門脈圧が脾摘により有意に低下し, 術後 3・5・7 日で HS 群の門脈圧は一貫して H 群と比較して有意に低値であった. つまり, 本研究でも 70% 肝切除後に門脈圧は上昇することで肝細胞が再生され, 一方脾摘を加えることによって門脈圧が低下した脾摘群で非脾摘群と比較して肝再生が有意に促進されたことから, 肝切除後に生じた過度な門脈圧上昇を脾摘することで抑えることが可能となり, より効率的な肝再生につながることを示唆された. また, 術後 7 日の血液検査所見で, AST・ALT が有意に HS 群で低値であったこと, 血清総ビリルビン値が低い傾向にあったことは, 門脈圧の低下と関連して考察すべきかどうかを今後肝組織を採取して検討する必要がある.

SFSS における過剰な門脈圧上昇の制御において, 門脈圧を下げるという意味で脾摘は非常に有用な選択ではあるが, 本研究でも明らかになったように肝再生を促進させるためには, 高すぎず低すぎない至適門脈圧の調整が必要である. 今後, 門脈圧の上限・下限が肝再生に与える影響を検討するために, ラット致死モデルである 90% 肝切除モデルや肝硬変モデルを作成し, 門脈血流動態の変化を検討することが課題となる. 臨床では, 末期肝不全患者において, 巨脾による出血傾向, 脾摘後門脈血栓, 脾摘後重症感染症, 臍液漏などの合併症に注意が必要であり, 特に術前からの凝固系の異常を認め, 術後早期から免疫抑制薬を使用する移植患者にとっては, 非常に重篤な合併症も存在するため脾摘の適応は慎重に選択する必要がある.

本研究で確立した実験手技を使用し, 今後サイトカインの推移を含めて門脈血行動態と肝再生の関係についてさらに追及していきたい.

利益相反: 著者に開示すべき利益相反はない.

References

- 1) **Haga J, Shimazu M, Wakabayashi G, et al.:** Liver regeneration in donors and adult recipients after living donor liver transplantation. *Liver Transplantation* **14**, 1718-1724, 2008.
- 2) **Cheng YF, Huang TL, Chen TY, et al.:** Liver graft regeneration in right lobe adult living donor liver transplantation. *Am J Transplant* **9**, 1382-1388, 2009.
- 3) **Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, et al.:** Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* **191**, 38-46, 2000.
- 4) **Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, et al.:** The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut* **54**, 289-296, 2005.
- 5) **Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, et al.:** Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* **236**, 397-407, 2002.
- 6) **Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, et al.:** Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* **356**, 1545-1559, 2007.
- 7) **Dahm F, Georgiev P and Clavien PA:** Small-for-size syndrome after partial liver transplantation definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* **5**, 2605-2610, 2005.
- 8) **Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, et al.:** The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut* **54**, 289-296, 2005.
- 9) **Yoshizumi T, Taketomi A, Soejima Y, et al.:** The beneficial role of simultaneous splenectomy in living donor liver transplantation in patients with small-for-size graft. *Transplant International* **21**, 833-842, 2008.
- 10) **Huang H, Deng M, Jin H, et al.:** Intraoperative vital and haemodynamic monitoring using an integrated multiple-channel monitor in rats. *Laboratory Animals* **44**, 254-263, 2010.
- 11) **Higgins G and Anderson R:** Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**, 186-202, 1931.
- 12) **Chichi X, Weiwei W, Tao Z, et al.:** Monitoring of Systemic and Hepatic Hemodynamic Parameters in Mice. *J Visualized Exper* **92**, 1-7, 2014.
- 13) **Kim J, Kim C-J, Ko I-G, et al.:** Splenectomy affects the balance between hepatic growth factor and transforming growth factor- β and its effect on liver regeneration is dependent on the amount of liver resection in rats. *J Korean Surg Soc* **82**, 238-245, 2012.
- 14) **Arakawa Y, Shimada H, Uchiyama H, et al.:** Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. *Hepatology Res* **39**, 391-397, 2009.
- 15) **Yagi S, Iida T, Taniguchi K, et al.:** Impact of portal venous pressure on regeneration and graft damage after living-donor liver transplantation. *Liver transplant* **11**, 68-75, 2005.
- 16) **Marubashi S, Sakon M, Nagano H, et al.:** Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt model. *Surgery* **136**, 1028-1037, 2004.

Effects of splenectomy on portal vein pressure and liver regeneration in a rat hepatectomy model

Taro ANDO, Takeshi TAKAHARA,
Yasushi HASEGAWA, Hiroyuki NITTA, and Akira SASAKI

Department of Surgery, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on January 15, 2016 & Accepted on February 24, 2016)

Abstract

Although portal vein pressure (PVP) has been reported to be closely associated with hepatic regeneration, the actual mechanism of portal circulatory dynamics that affects hepatic regeneration has not yet been elucidated. In this study, we evaluated the effects PVP and hepatic regeneration of a splenectomy following a major hepatectomy. Rats (n=16) received a 70% hepatectomy and were then divided into two groups: those receiving and those not receiving a splenectomy. A CT scan was performed on the day of the operation, as well as 1 day, 3 days, 5 days, and 7 days after the operation to monitor the hepatic regeneration rate. PVP measurements were taken with a 1.4Fr catheter pre/post operation, on the day of the operation, 3 days, 5 days, and 7 days after the operation. A blood examination for hepatic

injury evaluation was also carried out 7 days after the operation. The splenectomy group demonstrated a significantly higher hepatic regeneration rate 7 days after the operation, with lower AST and ALT levels. PVP increased significantly due to the hepatectomy, while the splenectomy had a definitive impact on decreased PVP immediately after the operation. As the splenectomy ameliorated the increased PVP that was induced by the 70% hepatectomy, it enhanced hepatic regeneration significantly. Therefore, our results suggested that a portal hyperdynamic state after a 70% hepatectomy was necessary for liver regeneration, and moreover, the increased PVP which was not too high, was more suitable for early liver regeneration after a major hepatectomy.
