

肝切除後の再生肝における腫瘍増殖に関する研究

名古屋大学第2外科 (主任: 近藤達平教授)

馬 渕 秀 樹

A STUDY ON THE TUMOR GROWTH IN REGENERATIVE LIVER AFTER PARTIAL HEPATECTOMY

Hideki MABUCHI

2nd Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine

(Director: Prof. Tatsuhei Kondo)

癌の根治を目的として原発性肝癌や転移性肝癌に対して、積極的に肝切除が行われるようになってきた。当外科において肝切除を施行するも、癌巣の一部や娘腫瘍が取り残された症例で、残存腫瘍が急速に増大するのを経験した。その増大率は、測定間隔を約3カ月とし、60%以上の高値を示した。この解明のために、ラットにて70%肝切除群と肝非切除群とに分け、残存肝内に吉田肉腫を移植し³H-TdRを用いて、autoradiographyにて検討を加えた。肝非切除群においては、肝細胞及び腫瘍細胞では、標識率は5%以下であったが、肝切除群においては、肝細胞は10~20%、腫瘍細胞では50~60%の高値を示した。又、mitomycin C (MMC)は残存肝内の腫瘍に対してより効果を示した。

索引用語: 肝切除術, 肝腫瘍, 肝オートラジオグラフィ

結 言

近年、癌に対する診断技術の飛躍的進歩が原発性肝癌、転移性肝癌の診断に役立ち、又術前術後管理の向上により、癌の根治を目的とした広範囲原発性肝癌、転移性肝癌に対し、積極的に肝切除が行われるようになってきた。最近、名古屋大学第2外科において原発性肝癌及び、転移性肝癌症例で、肝切除を施行するも、癌巣の一部や娘腫瘍が取り残された症例で、残存腫瘍が急速に増大するのを経験した。このような残存肝において、癌巣が残存している場合に、癌巣は、再生肝と共に、どのような状態をとるのか、未だ一致した見解はない。本研究では、臨床例の観察に基き、これを解明するために、肝切除ラットの残存肝に吉田肉腫を移植し、残存腫瘍のモデル実験系を作成し、腫瘍の増殖状態と抗癌剤の影響に関し、実験的に検討を加えた。

臨床的観察

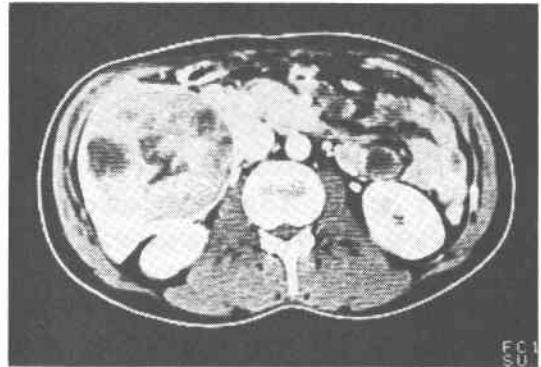
1. 症例

症例1: 源 ○康○, 42歳♂。

診断: computer tomography (CT) (図1)では、

<1984年12月12日受理> 別刷請求先: 馬渕 秀樹
〒465 名古屋市名東区にじが丘1-1-1 虹ヶ丘
マンション1409号

図1 症例1. 原発性肝癌 (術前CT)
前下区域と後下区域に分布する腫瘍像が認められる。



前下区域と後下区域に分布している腫瘍像が認められ、動脈造影 (図2) では前区域枝を主とし、後区域枝を含めて、栄養動脈が分布し、その末梢に突出型の原発性肝癌と診断した。

手術: 前、後区域の亜区域切除術 (昭和58年3月8日)。術中、残存肝内に娘腫瘍が認められ、迅速生検にて、hepatomaと診断した。

術後経過: 手術後1カ月の昭和58年4月2日、

図10 症例3. 転移性肝癌(術前動脈撮影)
右肝動脈の支配する全域に腫瘍濃染像が認められる。

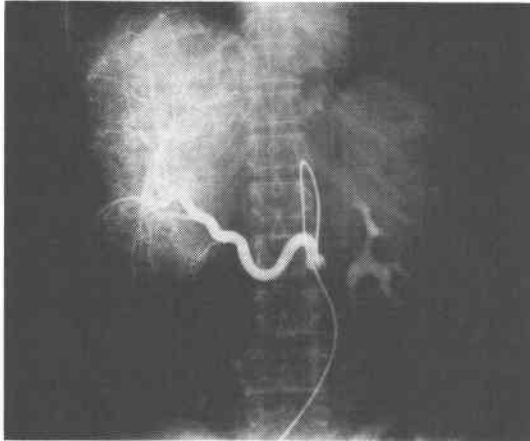


図11 症例3. 転移性肝癌(肝切除後4ヵ月CT)
残存肝は著明な再生増大を認め、切除断端に腫瘍の再発を認めた。

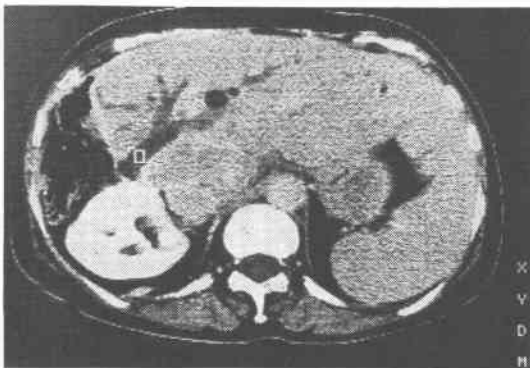


図12 症例3. 転移性肝癌(肝切除後7ヵ月CT)
肝腫大と共に著明な腫瘍の増大を認めた。

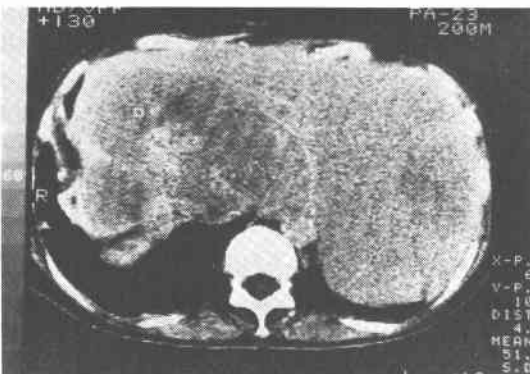


表1 増大率及び肝腫大の経過

症例1 (+75.2%)	1.5横指 (-)	4横指 (再発)	(死亡)	肝腫 (再発)	
症例2 (+63.5%)	3横指 (-)	5横指 (再発)	(死亡)		
症例3 (+73.6%)	2横指 (-)	5横指 (再発)	11横指 (再発)		(死亡)
(増大率)	OP	2	4	6	8ヵ月

測定にはCT上にて行い同一高にて測定した。測定期間は術後7ヵ月以内で測定間隔は約3ヵ月とした。増大率は3例共に60%以上の高値を示した。なお肝区域分類、命名は原発性肝癌取扱い規約⁷⁾に従った。

基礎的研究

1. 70%肝切除後の体重変化及び、肝再生能

(1) 実験目的

70%肝切除後の肝再生状態と肝再生に及ぼすmitomycin C (MMC) の影響を検討した。

(2) 実験方法

a. 動物：ラット(ドンリュウ) ♂約120g.

b. 肝切除：pentobarbital (1~2mg/100g) 腹腔内投与の麻酔下にて、肝臓を70%切除した。

c. 薬剤投与：MMCを尾静脈より、手術当日より4日間0.4mg/kg連続投与した。

d. 肝重量の測定方法：経日的に各群3匹ずつ、屠殺直後、体重及び肝臓の重量を測定した。

e. トリチュウムサイミジン (³H-TdR) の肝細胞内摂取率：単開腹群、肝切除群、肝切除+MMC投与群の3群に、経日的に各群3匹ずつ1μci/gの³H-TdRを腹腔内に投与し、1時間後屠殺し、肝組織を採取。肝組織200mgを鉢で泥状にし、2mlの1N-KOHを加えて37℃で1時間incubate、次いで、0.4mlの6N-HCLを加えてBoltexで攪拌後、96穴のマイクロプレートに0.1mlずつ分注し、これをAutomatic cell harvester (LABOMASH) でグラスファイバー紙上にharvestする。乾燥後50% trichloroacetic acidで酸化溶性物質を処理、シンチレーションバイアルに入れ、これに3mlのシンチレーション液(トルエン1.000ml, DP 0.3g, POPOP 300mg)を加え、24時間冷蔵庫で経過後に液体シンチレーションカウンター(ALOCA, LSC-751)でcpmを測定した。

(3) 実験成績及び小括

体重及び肝重量の変化を手術後 1, 3, 5, 7, 10, 14 日目に屠殺し、測定した。術後体重の変化は図13に示したごとく、単開腹群と肝切除群は著変はなく、肝切除+MMCの投与群でやや減少が認められた。肝重量は図14に示したごとく、肝切除後、早期に肝重量の増加が始まり、約10日で、肝切除群及び、肝切除+MMC投与群共に、ほぼ単開腹群の重量に復した。³H-TdR 摂取率は表 2 に示したごとく、肝切除群は手術翌日より急に上昇し、10日前後に正常値にまで下降した。肝切除+MMC投与群は、肝切除群に比べて、1~2日目に低値を示し、その後、徐々に正常に復した。

2. 肝切除が肝内腫瘍細胞の増殖能に与える影響について

図13 部分切除後の体重変化

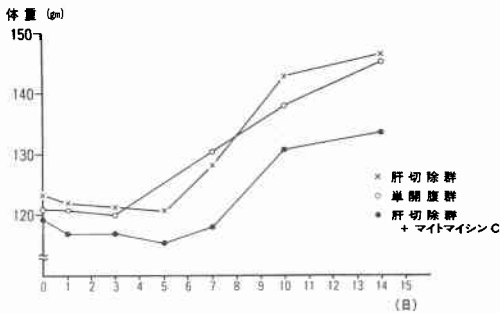


図14 残存肝重量の変化

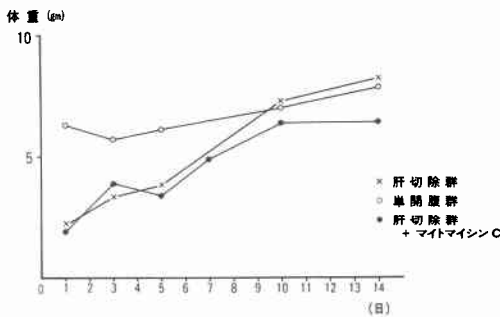


表 2 単開腹ラット及び部分肝切除ラットの肝への³H-TdRの摂取 (cpm)

	(cpm)					
	期 後 (日)					
	1	2	3	4	5	10
単開腹群	265±32	249±76	156±61	197±117	534±315	448±367
部分肝切除群	1325±4513	9289±1752	3811±738	3935±1294	2341±2254	499±149
部分肝切除群 + マイトマイシン C	8749±1256	456±856	3759±2178	2228±1573	1988±641	978±191

(1) 実験目的

肝切除の肝内腫瘍細胞増殖能に及ぼす影響

(2) 実験方法

a. ラット(ドンリュウ)♂, 約150g: 肝切除群の残存肝の実質内に対象として肝非切除群の肝実質内にそれぞれ吉田肉腫を移植した。

b. 腫瘍移植: 肝の右側葉に眼科用ハサミにより、約1mm³大に細切した吉田肉腫を約15mg, トロカー針を用いて注入し、注入点を指で押えそこに1滴のアロニアルファを滴下し止血した。

c. 腫瘍重量: 肝切除群と肝非切除群で腫瘍死した動物の肝臓より腫瘍組織を取り出して、秤量した。生存動物は移植後、14日目に屠殺して、その腫瘍重量を秤量した。

d. オートラジオグラフィ: 手術後、1, 2, 3, 4, 5, 10日目に各群 3匹に、pentobarbital 1~2mg/100g 腹腔内に注入し、麻酔させた後に、³H-TdRを1~2μci/g 腹腔内に注射した。次いで、1時間後に屠殺し、腫瘍を含めて肝臓を摘出し、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。切片は厚さ4μで作製し、100%キシレンにて脱パラ後 Autoradiographic Emulsion を約45℃の水に 7:3の割合にて希釈した液に dipping し、乾燥後、暗箱に納めて、約4℃の冷蔵庫内で4週間、露出させた。次いで、現像液に4分、定着液に10分浸し、水道水にて十分(約20分)に水洗した後に、H-E染色を行った。顕微鏡下において腫瘍部分は細胞数500コ、正常肝細胞部分においては1,000コ内の標識細胞を算定し、各々その割合をパーセントにし、標識率とした。

(3) 実験成績及び小括

a. 腫瘍重量: 表3に示したごとく、正常肝内に移植した腫瘍の発育に比べて、切除残存肝内に移植した腫瘍は著明に増殖して、両群間で p<0.01 有意差が見られた。これは、肝再生能の高まっている残存肝では、腫瘍細胞の増殖能力が明らかに高まっていることを示

表 3 肝臓に移植した腫瘍の増殖に関する部分肝切除の影響

群	n	体 重	切除肝重量	腫瘍重量	P
		(mean±SD) g	(mean±SD) g	(mean±SD) g	
単開腹群	15	203.7±64.24	/	0.5±0.96	<0.01
部分肝切除群	15	208.2±77.08	3.9±0.92	1.7±1.23	

した。

b. ³H-TdR 標識率：標識率を図15に示した。肝非切除群において肝細胞は、全期間を通して標識率は2%以下で、肝内の腫瘍細胞においても5%以下であった。これに対して、肝切除群において、肝細胞の標識率は1~5日間は、約10~20%と増加したが、10日目には2%以下に下降した。腫瘍細胞は、全期間を通して約50~60%と高値を示した。以上の結果は、肝非切除群に比べて肝切除群の肝細胞の増殖能は明らかに増大し、その状況下での腫瘍細胞の増殖能は、顕著に増大した。

3. 肝再生が皮下移植腫瘍に及ぼす影響

(1) 実験目的

肝の再生因子が肝外の腫瘍に対してどのような影響を及ぼすのかを検討した。

(2) 実験方法

肝切除ラットを2群に分け、一方は残存肝組織内に、他方は皮下組織内に15mgの吉田肉腫とトローカーで移植した。移植後14日に屠殺して両群の腫瘍重量を測定した。

(3) 実験成績及び小括

表4に示したごとく、両群内の腫瘍重量は明らかに差があり、 $p < 0.01$ であった。このことは、肝の再生因

表5 単開腹ラット及び部分肝切除ラットの肝臓への移植した腫瘍重量

	数	体重 (mean±SD)g	切除肝重量 (mean±SD)g	腫瘍重量 (mean±SD)g	有意差
Exp. I					
■ 部分肝切除群	13	139.9±9.42	3.0±0.33	2.1±2.58	なし
□ 全肝切除群	10	138.0±8.49	3.3±0.59	1.1±1.00	
Exp. II					
■ 部分肝切除群	18	125±10.21	—	2.1±1.98	なし
□ 全肝切除群	18	127±11.52	—	1.9±1.85	

子は、肝内の腫瘍の発育に影響を及ぼすが、肝外腫瘍に対してほとんど影響を与えないことがわかった。

4. 肝切除が肝内腫瘍の増殖に与える影響と抗癌剤の効果について

(1) 実験目的

肝切除の肝内腫瘍に対するMMCの効果と肝非切除肝内腫瘍に対するMMCの効果に関して比較した。

(2) 実験方法

実験は、肝非切除群と肝切除群とに分けた。吉田肉腫15mgを肝右葉側にてトローカーにて移植し、アロンアルファにて止血した。MMCは、0.2mg/kg尾静脈より、術直後より3日間投与した。移植後14日目で腫瘍重量を測定した。

(3) 実験成績及び小括

表5のごとく Exp I において肝部分切除群におけるMMC投与群と非投与群とで比較した。腫瘍重量は前者は1.1±1.00gm、後者は2.1±2.58gmで、投与群で腫瘍の縮小が見られた。しかし、両者間には、統計学的に有意の差は認められなかった。Exp II において、肝非切除群におけるMMC投与群と非投与群とを比較した結果、腫瘍重量は前者が、1.9±1.85gm、後者が2.1±1.98gmとほとんど両者間に差は認められなかった。以上の結果はMMCは残存肝内の腫瘍に対して、非切除肝内腫瘍に対するより以上の効果を表わすことを示す。

総括及び考察

原発性肝癌及び転移性肝癌に対する根治的手術例が診断技術、手術手技、及び術前術中術後管理の向上により、年々増加しているが、現在なお、残存肝内に癌巣を取り残す可能性は、皆無とは言えない。残存肝に癌巣が残っていた場合、又は、更に肝転移を起こした場合、その癌細胞の増殖能は、肝再生とともにどの程度影響を受けるものか、又、それに対する化学療法の効果について検討を加えた。臨床例の観察は、50%肝切除時において、癌巣の一部、又は、娘腫瘍を摘除で

図 15

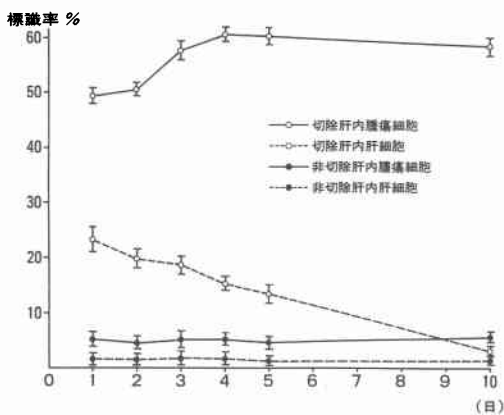


表4 腫瘍重量における部分肝切除の影響

	数	体重 (mean±SD) g	腫瘍重量 (mean±SD) g	P
皮下腫瘍	9	1325±6.94	0.7±0.63	<0.01
肝内腫瘍	9	130.6±8.28	1.8±0.61	

きず、残存肝に腫瘍を残存した例について行われた。肝切除後、再生肝の増殖は、CT、動脈撮影において認められるが、同時に、それと同等、あるいは、それ以上の速度で残存肝内腫瘍の増加が認められ、全例8カ月以内に死亡した。原発性肝癌症例に関する追跡調査²⁾によれば、手術を含めて種々の治療が行われているが、総括して、現状での1年生存率は20~30%であり、又、Cady³⁾は、肝転移巣をそのまま残して、原発巣(大腸癌)のみを切除した場合の平均生存期間は13カ月と報告している。今回の3症例は、癌の著明な増大のために、生存期間が8カ月以内と短かった。この現象の解明のために、再生肝における腫瘍の増殖状態を実験的に観察した。ドンリュウラットを用い、肝臓の中葉及び左側葉を切除することによって、約70%の肝切除が可能であるが、ラットで肝臓を70%以上切除すると、肝再生がさかんになることについては、Higgins⁴⁾の報告がある。本実験においても、切除後、肝再生は著しく増大し、約10~14日目で肝重量は単開腹群の重量に復し、同様の結果をえた。又、さらに、³H-TdR 摂取率は、術後翌日より急に上昇し、10日前後に正常値にまで復したことは肝再生が術後早期より急に進行し、約10日で正常に復したことを意味する。以上のことを基にして、ラットの右側葉に吉田肉腫を移植し、残存肝内の癌巣の発育状態を観察するために、オートラジオグラフィにて検討を加えた。本法は、Taylor⁵⁾によって開発され、DNA 前駆物質である Thymidine に³H をラベルした³H-TdR を生体内に投与することにより、DNA 合成期にある増殖細胞を標識し、その細胞増殖及び、細胞周期の解析に用いられる方法である。肝非切除群において、肝細胞は、全期間を通して標識率は2%以下で、肝内腫瘍細胞においても5%以下であった。肝切除群において、肝細胞の標識率は、1~5日間は、約10~20%と増加したが、10日目には2%に下降した。腫瘍細胞では、全期間を通して、約50~60%と高値を示した。以上の結果は、肝非切除群に比べて肝切除群の肝細胞の増殖能は、明らかに増大し、その状況下での腫瘍細胞の増殖能は、顕著に増加した。これは、肝切除によって、残存肝内腫瘍の発育が増大することを示す。一方、今回の実験において、肝の再生因子が肝外の腫瘍に対してほとんど影響を与えないことが判明した。再生肝に対する抗癌剤の影響に関して Nagasue⁶⁾らは5-Fu を、Gavosto⁷⁾らは6-MP などの代謝拮抗剤を早期に投与したところ、肝再生が抑制されたことから、これらの薬剤で、化学療法を行う時には、

肝再生が止まってから行った方がよいと警告している。しかし、本研究における、MMC の投与で、肝再生による影響を³H-TdR の uptake で観察したところ、一過性に抑制が起ったが、速やかに回復していた。また一方、肝実質内の腫瘍細胞は、早期より増殖がおこなっていることがオートラジオグラフィにて観察された。従って、再発防止のためには、出来るだけ早期に抗癌剤を投与することが望ましい。本研究により、肝切除後に、早期に投与する抗癌剤は、代謝拮抗剤より、MMC の様な速効性の薬剤がより良いと思われる。今回 MMC を用い、肝部分切除群における投与群と非投与群とで、抗腫瘍効果について比較し、明らかに投与群に腫瘍の縮小が見られた。以上、臨床例及び実験的検討を基に、肝切除時において、残存肝内に腫瘍を取り残したならば、その腫瘍はその再生肝と同等、又は、それ以上の速度で増殖を表わすことを示した。又、抗癌剤の投与は、術後早期に投与することが延命効果に有利であることを実験結果は示唆した。

結 論

吉田肉腫をラット(ドンリュウ♂)の肝臓に移植し、部分切除後の再生肝とともに、腫瘍細胞の増殖能について検討し、以下の知見をえた。

- (1) 70%肝切除すれば、肝重量は、約10~14日ではほぼ正常の重量に復した。³H-TdR の摂取率は、手術翌日より急に上昇し、10日前後に正常値まで下降した。
- (2) MMC 0.4mg/kg を術後4日間投与した。切除肝の肝細胞は、術後2日間、³H-TdR の摂取が障害されたが、3日後は、非投与切除肝の肝細胞と同様の値を示した。
- (3) 肝切除は、残存肝内に移植した腫瘍の発育を促進した。しかし、肝外に移植した腫瘍の発育には影響を及ぼさなかった。
- (4) 肝切除群においては、肝内腫瘍細胞の標識率は、50~60%と高値を示し、明らかに、肝非切除群の肝内腫瘍の標識率より高値を示した。
- (5) MMC の効果は、残存肝内に移植した腫瘍に対して、より効果を示した。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました当教室の近藤達平教授と直接御指導賜りました市橋秀仁講師に深甚なる謝意を表します。又、本研究に、御助言、御協力をいただいた、愛知医科大学第1外科の金光泰石講師と、当教室の末永昌宏助手に深く感謝します。

文 献

- 1) 日本肝癌研究会編：原発性肝癌取扱規約。東京、金

- 原出版, 1983, p3—20
- 2) 日本肝癌研究会: 原発性肝癌症例に関する調査.
肝臓 99: 433—440, 1978
 - 3) Cady B, Monson DO, Swinton NW: Survival of patients after colonic resection for carcinoma with simultaneous liver metastases. Surg Gyencol Obstet 131: 697—700, 1970
 - 4) Higgins, GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. Archives of Pathology 12: 186—202, 1931
 - 5) Tayler JH, Woods PS, Hughes WL: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using Tritium-labeled Thymidine. Proc Natl Acad Sci USA 43: 122—128, 1957
 - 6) Nagasue N, Kobayashi M, Iwaki A et al: Effect of 5-Fu on liver regeneration and metabolism after partial hepatectomy in the rat. Cancer 41: 435—443, 1978
 - 7) Gavosto F, Pileri A: The effect of administration of 6-mercaptopurine on nucleic acids and alkaline phosphatase of regeneration rat liver. Cancer 11: 222—225, 1965
-