

## ラット90%肝切除後肝再生の抑制に関する検討

千葉大学医学部第1外科

安藤 克彦 宮崎 勝 伊藤 博  
海保 隆 安蒜 聡 中島 伸之

切除限界を越えた肝切除後の病態を明らかにする目的で、ラット90%肝切除を行い検討した。生存率は70%肝切除群(A群, n=34)は100%に対し、90%肝切除群(B群, n=60)は72時間目で55.5%と有意の低下を認めた(p<0.05)。血清 GOT, 総ビリルビン値はB群で有意に高く、動脈血中ケトン体比は全経過を通じB群で有意な低値を示した(p<0.05)。一方、血中エンドトキシン値は24時間目にB群で一過性の上昇を示した(p<0.01)。肝DNA合成能は24時間目にB群でA群に比べ有意な抑制をみた(p<0.01)。しかしB群の24時間以上生存ラットは48時間目にDNA合成能のピークを示し、72時間目までその亢進は遷延した。以上、90%肝切除ラットでは術後早期の肝細胞障害および肝再生抑制を認め、肝再生は遅延した。この肝再生抑制、遅延にはエンドトキシン値の一過性の上昇および肝エネルギー代謝障害が強く関与している可能性が示唆された。

**Key words:** partial hepatectomy, liver regeneration, endotoxin, arterial ketone body ratio, DNA synthesis in the liver

### 緒言

肝臓には再生という独特の能力があり、かつその再生力は極めて旺盛である。しかしながら肝切除量には限界があり、それを越える切除がなされた場合には生体は死に至る。肝悪性腫瘍に対して肝切除を行う際に、その根治性を求めるがため、肝切除量が切除限界に近づいたりあるいは越える場合が想定される。もし切除限界の拡大がなされれば肝癌の切除適応がさらに拡がる可能性がある。しかし致死的な拡大肝切除後の病態についてはいまだに不明な点が多く、その報告も少ない<sup>1)</sup>。そこで今回我々は、致死的な拡大肝切除後の肝再生と、肝エネルギー代謝を反映しうる動脈血中ケトン体比<sup>2)</sup>(arterial ketone body ratio: 以下、AKBR と略記)および血中 endotoxin (以下、Et と略記)の関係について実験的に検討した。

### 対象と方法

#### (1) 実験動物

Wistar 系雄性ラット(日本 SLC, 体重140~160g) 94匹を用い、千葉大学医学部中央動物舎(室温25°C, 照明 AM5:00~PM7:00)にて、水、固形飼料(日本クレア CE-2)の自由摂取下に少なくとも7日間飼育

後実験に供した。

#### (2) 実験方法

ラットを術前夜より16時間絶食(水分は自由摂取)後、エーテル吸入麻酔下に開腹し、70%(A群, n=34)および90%(B群, n=60)肝切除を行い、術後は20%ブドウ糖液と固形飼料を与えた。70%肝切除は Higgins & Anderson<sup>3)</sup>の方法にしたがった。90%肝切除は Gaub ら<sup>4)</sup>の方法にしたがい、尾状葉のみを残した。術後24, 48, 72時間目にエーテル麻酔下に再開腹し、腹部大動脈より約3mlヘパリン採血を行い、さらに再生肝を摘出した。

#### (3) 検索項目

1. 再生肝DNA合成能: Verly ら<sup>5)</sup>の方法に準じて測定した。すなわち、摘出した再生肝を auto slicer を用いて厚さ0.5mmの切片にし、これを in vitro にて <sup>3</sup>H-thymidine 20 $\mu$ Ci (New England Nuclear) 含有の Hanks 液5ml, 37°C, 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>下で2時間インキュベートし、肝DNA中への<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みによりDNA合成能を測定した。結果は、dpm/OD<sub>600</sub>×10<sup>3</sup>で表示した。

2. AKBR: ケトレックス「三和」(三和化学研究所)を用いて、KETO-340 II (三和化学研究所)にて測定した。

3. 血中 Et 値: エンドスペシー(生化学工業株式会

<1994年2月9日受理>別刷請求先: 安藤 克彦  
〒260 千葉市中央区亥鼻1-8-1 千葉大学医学部第1外科

社)を用いて、比色法にて測定した。

4. 血清 GOT および総ビリルビン値: GOT 値はエステーナーテストワコーを用い、また総ビリルビン値はビリルビン B-II テストワコー(いずれも和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

5. 肝重量再生率: 切除肝重量より切除前の推測肝重量を計算し、それに対する再生肝重量の%を求めた<sup>6)</sup>。

6. 測定値は Mean±S.D. で示し、A および B 群の2群間比較においては Student の t 検定にて、また生存率は Kaplan-Meier 法にて示し、generalized Wilcoxon 検定にて判定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

(1) 累積生存率

B 群の術後24, 48, 72時間累積生存率は、83.3, 66.7, 55.5%であり、A 群の100%に対して有意に低値を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1)。

(2) 肝重量再生率

残肝重量は術後24, 48, 72時間目には B 群で、それぞれ術前値の  $20.7 \pm 2.7$ ,  $31.2 \pm 5.1$ ,  $40.9 \pm 4.6\%$  にまで回復した。一方、A 群では  $52.8 \pm 7.8$ ,  $56.7 \pm 5.0$ ,  $72.9 \pm 5.4\%$  であった ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 2)。

(3) 血清 GOT および総ビリルビン値

血清 GOT 値は、術後24時間目に B 群は、 $3,246 \pm 516$  (Karmen U) と A 群の  $920 \pm 205$  に対し著明な上昇

Fig. 1 Comparison of survival rates between 70% and 90% hepatectomized rats.

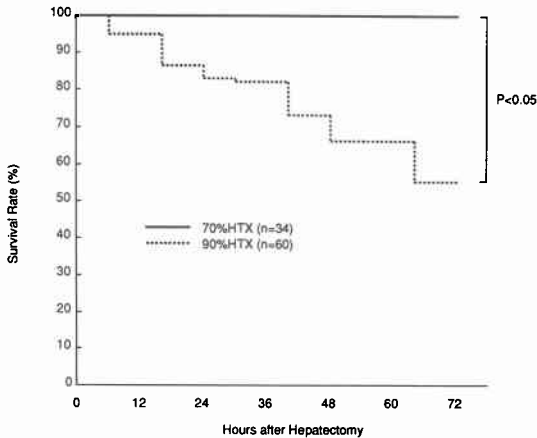


Fig. 2 Changes in regenerating liver weight after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.

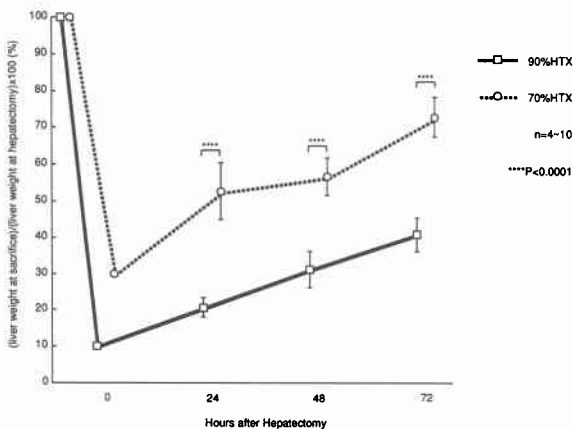


Fig. 3 Changes in serum GOT concentrations after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.

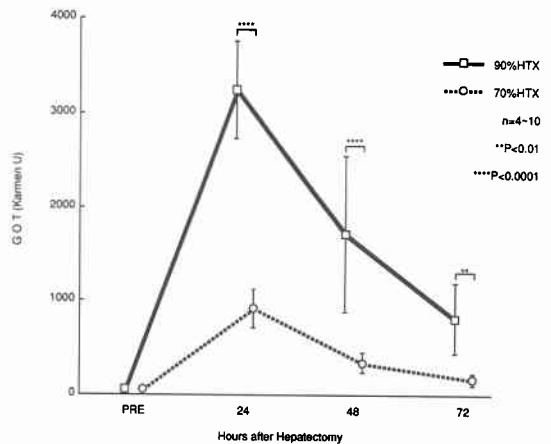
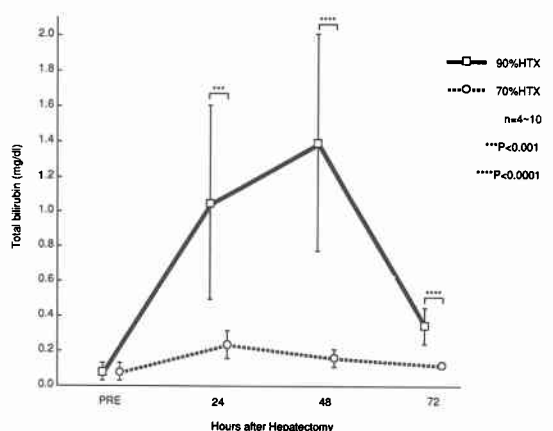


Fig. 4 Changes in serum total bilirubin concentrations after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.



を認めた ( $p < 0.0001$ )。その後漸減するが、B群は有意な高値を示した (Fig. 3)。また血清総ビリルビン値は、B群で術後24, 48, 72時間目すべてに有意な上昇を認め、48時間目にピークを示した ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 4)。

(4) 肝 DNA 合成能

再生肝 DNA 合成能は、術後24時間目にA群は  $1,009 \pm 405$  とピークを示したのに対し、B群は  $555 \pm 108$  とA群に比べ低値を示した ( $p < 0.01$ )。しかしながら48時間目にはB群では  $1,714 \pm 266$  と上昇を示し、A群との間に差異を認め ( $p < 0.0001$ ) ピークの遅延が認められ72時間目においてもB群ではその亢進が遷延

Fig. 5 Changes in DNA synthesis in the regenerating liver after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.

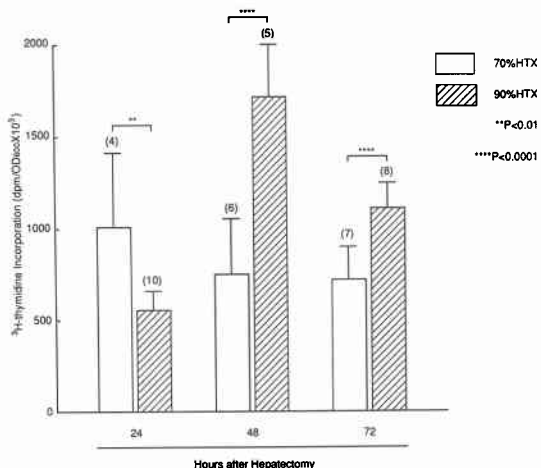


Fig. 6 Changes in arterial ketone body ratio after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.

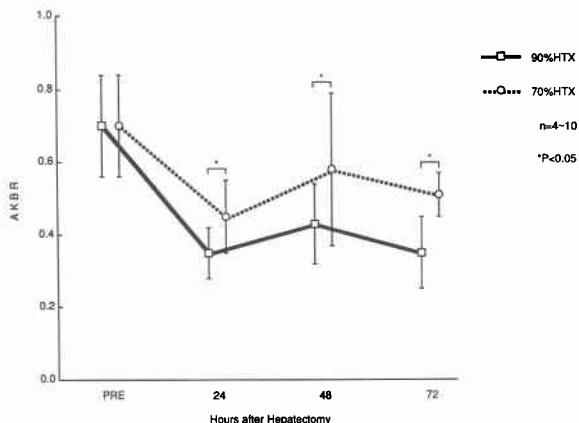
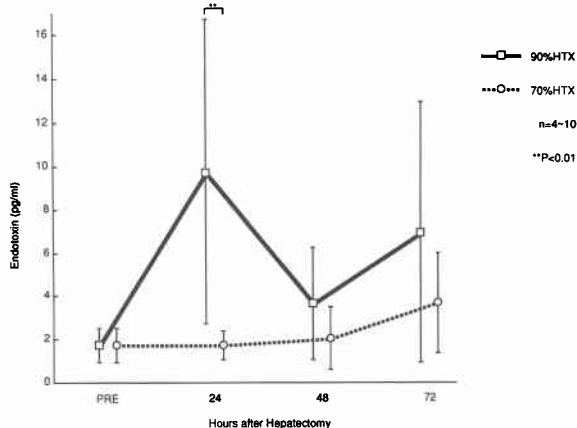


Fig. 7 Changes in endotoxin concentrations of peripheral arterial blood after 70% and 90% partial hepatectomy in rats.



していた ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 5)。

(5) AKBR

肝エネルギーレベルを示す AKBR は術後、前値に比べ両群とも低下するが、その程度は B 群においてより強く、24, 48, 72時間目の各時点において有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6)。

(6) 末梢血 Et 値

末梢血 Et 値の術後経過は A 群では明らかな変動をみないのに対し、B 群では24時間目に上昇し、 $9.8 \pm 7.0$  (pg/ml) と A 群の  $1.7 \pm 0.7$  に比べ有意の高値を示した ( $p < 0.01$ )。しかしながらその上昇は一過性で、48, 72時間目には両群間で差異をみない (Fig. 7)。

考 察

肝臓は再生という独特の能力を有し、かつその再生力は極めて旺盛で、ラットでは70%肝切除後10~14日で切除前の肝重量に復帰する<sup>3)</sup>。しかし切除量にも限界があり、Tuczek ら<sup>7)</sup>はラットで90%肝切除を行い、40時間以内に残存肝は再生を生じることなく全例死亡し、ラットが生存するためには残存肝は10~18%必要であると報告した。その後、ラット90%肝切除後にテストステロン<sup>8)</sup>やブドウ糖<sup>4)</sup>を投与すると、10%の残存肝においても再生が生じ生存しうることが証明されたが、10%の残存肝では依然死亡率は高く、死に至る機序に関して明確な報告は少ない。

川崎ら<sup>1)</sup>はラット90%肝切除後には血中 Et 量が上昇し、内因性 Et による残存肝の障害が引き起こされたと報告している。拡大肝切除後には残存肝重量の極

端な減少に伴ってクッパー細胞数も減少する。そしてクッパー細胞がその約80~90%を占める<sup>9)</sup>網内系機能総量の低下の結果<sup>10)</sup>、内因性 Et が全身循環系に流出し、血中 Et 値が上昇することは十分予想される。しかし本実験では、90%肝切除後の血中 Et 値は、70%肝切除後に比べ術後24時間目においてのみ一過性の有意の上昇を認めたものの、48、72時間目には差異を示しなかった。この一過性の Et 値上昇の理由として、肝重量の変化をみると、90%肝切除の場合、24時間目では切除前重量の20%であるが、48時間目まで生存したラットでは31%、72時間まで生存したラットでは41%と回復していた。すなわち、24時間目の20%肝重量では機能的な影響が関与するとしても内因性 Et を取り込み、処理するに必要な最低限の肝重量に達していないことが1つ考えられる。他の要因として、90%肝切除後早期には肝内血管床の減少による門脈圧の上昇<sup>11)</sup>に伴い腸管粘膜のバリアー破綻による Et の透過性亢進が起こるため<sup>12)</sup>、一過性の上昇が引き起こされることも予想される。また一方、この門脈圧の上昇により類洞内皮障害が引き起こされ、そのことが術後24時間目の網内系機能低下に関与していることも考えられる。しかしながら48時間目には肝重量のある程度の増大により肝内血管床の増大が起こり、肝内微小循環障害も軽減され、肝網内系機能の回復も重量と共に引き起こされるとも考えられる。しかしながら48時間目においては、GOT、総ビリルビン値でみる肝細胞障害は依然強く認められ生存率も低下し続けている。DNA合成能の遅延した亢進が認められるものの AKBR は低下したままであり肝のエネルギー代謝障害の状態<sup>2)</sup>が続いたままと考えられる。そのため72時間目まで生存率は低下し続けていったものと思われる。すなわち DNA 合成能の亢進およびある程度の重量回復が認められるにもかかわらず、AKBR で示されるエネルギーチャージのレベルが極めて低い危機的な状態にあると思われる。

一方、肝切除後の Et 血症の発現とその再生肝への影響という点に関して Shirai ら<sup>13)</sup>は、臓器型 Shwartzman 反応の関与を指摘しており、Mochida ら<sup>14)</sup>も同様に Et により刺激され活性化されたクッパー細胞や肝マクロファージが類洞内皮細胞障害を引き起こし、広範肝壊死を来すとしている。本実験においても90%肝切除後24時間目の一過性の高 Et 血症により活性化されたクッパー細胞および肝マクロファージが肝再生抑制機構に関与していることは十分考えうる。この部

分肝切除後再生過程において、lipopolysaccharide で刺激されたクッパー細胞が TNF- $\alpha$ <sup>15)</sup>、IL-1<sup>16)</sup>、IL-6<sup>17)</sup>などのさまざまなサイトカイン産生能に変動を来すことが報告されているが、その詳しい役割や機序については今後の検討を待たねばならない。

一般に肝 DNA 合成能は70%肝切除後では24時間目にピークを迎えるとされているが<sup>18)</sup>大量(80~90%)肝切除後には本実験データと同様肝再生の開始は遅延するという報告が多い<sup>19)20)</sup>。10~70%肝切除後の肝 DNA 合成能のピークは肝切除量に相関するという報告<sup>18)</sup>がある。一方、Minuk ら<sup>21)</sup>は70%と90%肝切除後の肝再生能に有意差はなく、肝再生能には限界があると述べている。しかし今回の結果では90%肝切除後48時間以上生存しえたラットの肝 DNA 合成能はピークを示し、その値は著明で、そのようなラットでは肝再生の開始とピークは遅延するものの、70%肝切除群に比べより強い DNA 合成能の亢進を示しうるということが認められた。

以上より、ラットにおける90%肝切除後には早期の肝再生が抑制され、それにより致死的となると判断される。しかしながら生存しえたラットでは遅延した再生のピークがみられるものの、肝機能障害は残存している。この肝再生抑制に一過性の Et 値の上昇および肝エネルギー代謝障害が強く関与しているものと考えられた。

#### 文 献

- 1) 川崎康彦, 宮良球一郎, 伊佐 勉 ほか: ラット90%肝切除後の残存肝におよぼす内因性エンドトキソンの影響に関する実験的研究. 日消外会誌 22: 1778-1782, 1989
- 2) Ukikusa M, Ozawa K, Shimahara Y et al: Changes in blood ketone body ratio. Their significance after major hepatic resection. Arch Surg 116: 781-785, 1981
- 3) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol 12: 186-202, 1931
- 4) Gaub J, Iversen J: Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. Hepatology 4: 902-904, 1984
- 5) Verly WG: The hepatic chalone. Natl Cancer Inst Monogr 38: 175-184, 1973
- 6) Fishback FC: A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. Arch Pathol 7: 955-977, 1929
- 7) Tuzcek HV, Rabes H: Verlust der Prolifer-

- ationsfähigkeit der Hepatozyten nach subtotaler Hepatectomie. *Experientia* 27 : 526, 1971
- 8) Vic P, Saint-Aubert B, Astre C et al: Complete liver regeneration in one-stage 90% hepatectomized rats treated with testosterone. *Hepatology* 2 : 247–248, 1982
  - 9) Saba TM: Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med* 126 : 1031–1052, 1970
  - 10) Wang XD, Soltesz V, Andersson R et al: Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 per cent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 80 : 66–71, 1993
  - 11) Lee SS, Hadengue A, Girod C et al: Reduction of intrahepatic vascular space in the pathogenesis of portal hypertension. In vitro and in vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 93 : 157–161, 1987
  - 12) Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE et al: Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 17 : 1081–1085, 1993
  - 13) Shirai M, Shiga J, Mori W: A study on the mechanism of acute hepatic necrosis following partial resection of the liver. *Acta Pathol Jpn* 37 : 1127–1134, 1987
  - 14) Mochida S, Ogata I, Hirata K et al: Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 99 : 771–777, 1990
  - 15) Callery MP, Kamei T, Flye MW: Kupffer cell tumor necrosis factor- $\alpha$  production is suppressed during liver regeneration. *J Surg Res* 50 : 515–519, 1991
  - 16) Goss JA, Mangino MJ, Flye MW: Kupffer cell autoregulation of IL-1 production by PGE<sub>2</sub> during hepatic regeneration. *J Surg Res* 52 : 422–428, 1992
  - 17) Goss JA, Mangino MJ, Flye MW: Prostaglandin E<sub>2</sub> production during hepatic regeneration downregulates Kupffer cell IL-6 production. *Ann Surg* 215 : 553–560, 1992
  - 18) Bucher NLR, Swaffield MN: The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* 24 : 1611–1625, 1964
  - 19) Weinbren K, Woodward E: Delayed incorporation of <sup>32</sup>P from orthophosphate into deoxyribonucleic acid of rat liver after subtotal hepatectomy. *Br J Exp Pathol* 45 : 442–449, 1964
  - 20) Zieve L, Anderson WR, Lindblad S: Course of hepatic regeneration after 80% to 90% resection of normal rat liver. Comparison with two-lobe and one-lobe hepatectomy. *J Lab Clin Med* 105 : 331–336, 1985
  - 21) Minuk GY, Gauthier T, Benarroch A: Changes in serum and hepatic polyamine concentrations after 30%, 70% and 90% partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 12 : 542–546, 1990

### Inhibition of Hepatic Regeneration after 90% Partial Hepatectomy in Rats

Katsuhiko Ando, Masaru Miyazaki, Hiroshi Ito, Takashi Kaiho, Satoshi Ambiru and Nobuyuki Nakajima  
First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

To reveal the pathophysiology after extended partial hepatectomy, we investigated serum endotoxin levels (Et), arterial ketone body ratio (AKBR) and DNA synthesis in the regenerating liver after 70% and 90% partial hepatectomy in rats. Survival rate was 55.5% at 72 hours after 90% partial hepatectomy (n=60), while all rats survived after 70% partial hepatectomy (n=34) (p<0.05). After 90% partial hepatectomy, serum GOT and total bilirubin concentrations were elevated remarkably (p<0.01) and AKBR was depressed significantly (p<0.05) through all postoperative times in comparison with 70% partial hepatectomy. Et after 90% partial hepatectomy showed transient increase at 24 hours postoperatively, while no significant change was observed after 70% partial hepatectomy (p<0.01). Hepatic DNA synthesis after 90% partial hepatectomy was significantly depressed at 24 hours postoperatively (p<0.01) but peaked 24 hours later than after 70% partial hepatectomy. Furthermore, its prolonged acceleration lasted at 72 hours postoperatively. It is concluded that both severe injury and depressed proliferation of hepatocyte were observed in the early stage after 90% partial hepatectomy in rats, and transient elevation of Et and hepatic energy crisis are suggested to relate to this depressed and delayed hepatic regeneration.

**Reprint requests:** Katsuhiko Ando First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260 JAPAN