日消外会誌　27（10）：2212～2219，1994年

門脈血流変換による門脈動脈化の実験的研究
―肝再生への影響―

鹿児島大学第2外科学教室（主任：平　明教授）
本　坊　健　三

イヌを用い，本来の門脈血流を維持した新しい門脈血流変換モデルで肝再生について検討した．50%肝切除群（A群；n=9）をコントロールとし門脈血流変換＋50%肝切除群（B群；n=9）とを比較した．72時間後の肝重量の増加率を湿重量，乾燥重量で求めDNA合成期細胞を染色してlabeling index（L.I.）を算出し肝再生を評価した．A群では著変なかったがB群では術前，術直後および72時間後に門脈血流量/心拍出量は25.1±4.1%，46.5±5.4%，37.7±5.5%，門脈血酸素分圧は59.9±2.5mmHg，73.2±7.3mmHg，70.7±5.5mmHgと上昇した．肝の増加率は湿重量でA群76.4±10.6%，B群103.3±13.0%，乾燥重量でA群55.9±9.4%，B群57.8±9.8%であった．L.I.（おのおのn=7）はA群34.7±1.7，B群51.4±3.8で両群間に有意差を認めた．本来の門脈血流を含有した門脈血流変換モデルを使ったこの実験結果より門脈動脈化と門脈流量の増大が肝再生に促進的に作用すると考えられた．

Key words：　arterialaization of the portal blood, liver regeneration, portal blood flow diversion

はじめに

門脈血流変換の実験はさまざま行われているがその意義・目的は一様ではない．こうした門脈血流変換の実験の中に門脈動脈化がある．従来の門脈動脈化実験の多くはSchillingら[1]の肝動脈結紮時の肝虚血壊死の防止策やFisherら[2]の門脈動脈化実験のように肝動脈血流の欠如または本来の門脈血の肝への流入を遮断ないし変更した状況下で行われている．我々は本来の門脈血を維持し門脈動脈化を意図した全く新しいタイプの門脈血流変換モデルを作成した．この実験モデルに50%肝切除を加え肝再生への影響，効果を検討した．

材料と方法

予備実験をおこない50%の肝切除量を確認するため8頭のイヌで先に，左2葉と方形葉を切除，残存する右2葉と尾状葉，およびその突起との重量を比較した（**Table 1**）．重量比はほぼ1：1で，50%肝切除は左2葉と方形葉切除で達せられることが判明した．

実験のプロトコールを示す（**Table 2**）．体重15～22kgの雑種成犬を用い，A群（n=9）で50%肝切除を，B群（n=9）で門脈血流変換＋50%肝切除を行った．まずpentobarbital sodium 25mg/kgを静注後，気管内挿管し，New portレスピレーターに接続し調管呼吸を行い術中はpentobarbitalを適宜適量追加し，乳酸化リンゲル液を輸液した．

門脈血流変換モデルは次のように作成した．腹部正中切開で開腹後，腎静脈末梢側の下大静脈を結紮切断し，その末梢側断端と上腸間膜静脈本幹を端側吻合（cavo-mesenteric venous shunt）し，次に鼠径靱帯より末梢側の右大腿動静脈で側々吻合（femoro-femoral arteriovenous shunt）による瘻を作成した（**Fig. 1**）．動静脈瘻の吻合口径は約5mmに設定した．下大静脈と上腸間膜静脈の吻合時には腎下部大動脈および上腸間膜動脈を約10分間遮断した．血管吻合には，いずれも6-0ポリプロピレン糸を使用し連続縫合を行った．

このモデルに左2葉と方形葉切除による50%肝切除を付加した．対照のA群で50%肝切除のみを行った．

術後は両群ともに絶食にし，頸静脈より輸液ルートを確保，72時間にわたり体重10kg当りアミノ酸15g，ブドウ糖100g/dayの量をIntravenous hyperalimentationとして投与し一定の栄養管理を行った．また両群ともCephalosporine系のCefmetazole sodium 50mg/kg/dayを投与した．

＜1994年6月8日受理＞別刷請求先：本坊　健三
〒890　鹿児島市桜ケ丘8―35―1　鹿児島大学第2外科

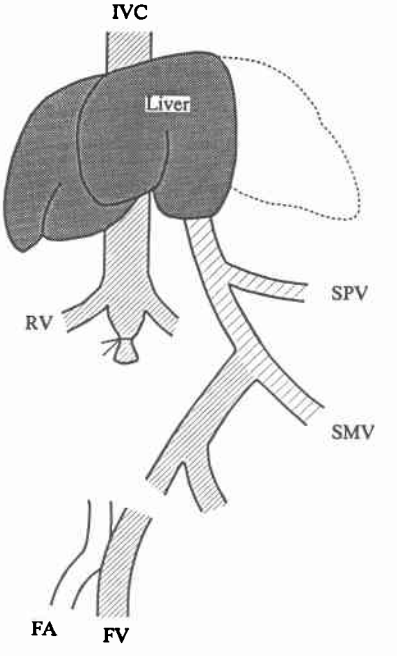
Table 1 Weight ratio of the residual liver and the resected liver in dogs

	Residual liver Rt. two lobes+caudate lobe (g)	(%)	Resected liver Lt. two lobes+quadrate lobe (g)	(%)
No. 1	275	(46.2)	320	(53.8)
No. 2	195	(48.8)	205	(51.2)
No. 3	290	(49.2)	300	(50.8)
No. 4	175	(52.2)	160	(47.8)
No. 5	138	(47.9)	150	(52.1)
No. 6	145	(50.0)	145	(50.0)
No. 7	230	(48.9)	240	(51.1)
No. 8	170	(48.6)	180	(51.4)
Mean±SD		49.0±1.7		51.0±1.7

Table 2 Protocol of this experimental study

	for 72 hours	
A Group (50% Hepatectomy)		
B Group (50% Hepatectomy +Diversion)	I.V.H. →	sacrifice

Fig. 1 The schema of this new portal blood diversion model
IVC : inferior vena cava, RV : renal vein, SPV : splenic vein SMV : superior mesenteric vein, FA : femoral artery, FV : femoral vein



実験で行った検査は以下の通りである．

1．血行動態

術中心電図を連続して監視した．動脈圧は頸動脈でステーサムトランジューサーP23dbで観血的に測定した．門脈血流量（portal venous flow：以下，PVFと略記）には日本光電社製電磁血流計（MFV-2100）を用い，プローブ（FB形）を門脈本幹に装着した．門脈圧は上腸間膜静脈の末梢枝より門脈本幹まで挿入し留置した内径2mmのポリエチレン管を介し門脈肝門部の高さを0点として水柱圧で測定した．心拍出量は頸静脈から挿入した5Fスワンガンツカテーテルにより熱希釈法でCardiac Output computer Model 9520（Edwards）で測定した．頸動脈よりの動脈血酸素分圧をほぼ100mmHgに保ち門脈血酸素分圧を測定した．測定にはコーニング社製血液ガス分析機Model 170を用いた．これらの計測は術前，術直後および72時間後のSacrificeした時に行った．

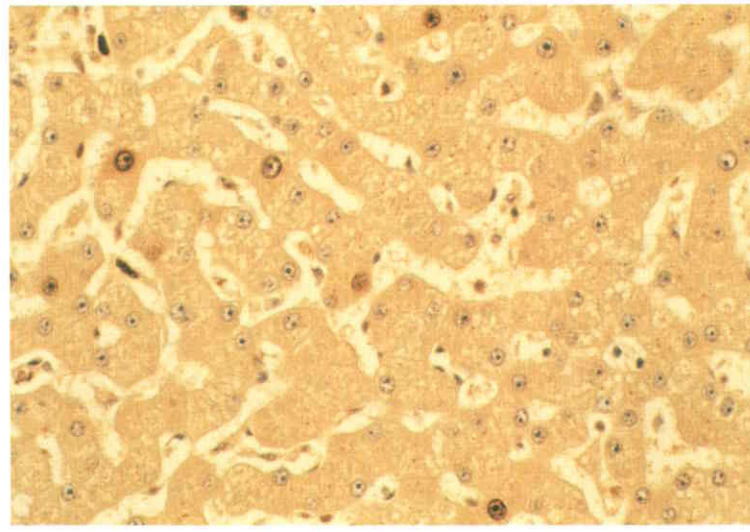
2．血液検査

術前，術後24時間および72時間目に末梢血，生化学，血液凝固系検査を行った．

3．肝再生の評価

肝再生の評価は肝重量の増加率とDNA合成期細胞の標識率（labeling-index）によった．肝重量の増加率〔72時間後の肝重量と切除時残肝重量との差/切除時残肝重量×100〕は湿重量，乾燥重量で示した．50%肝切除なので切除時残肝重量は切除肝重量と等しいとみなした．また乾燥重量は各切除肝の一部を摂氏80度の恒温装置で3日間乾燥し算出した．DNA合成期細胞の標識にはThymidineのanalogueである5-BROMO-2′-DEOXYURIDINE（以下，BrdUと略記）を使用した．Sacrificeの2時間前にBrdU 10mg/kgを静注しSacrifice後，肝組織を70%エタノール固定しパラフィ

Fig. 2 DNA synthesizing hepatocytes which incorporated bromodeoxyuridine (BrdU) are clearly stained by means of avidin-biotin complex method (×50)



ン包埋し切片を抗 BrdU 抗体を用いた酵素抗体間接法で染色し DNA 合成期細胞を Labeling して標識率〔labeling index：以下，L.I. と略記〕(肝細胞1,000個あたりの標識細胞数) を算定した．測定しえたのは各群とも7頭であった．誤差を少なくするため1検体につき10回の L.I. を数えその平均をだした (Fig. 2)．

4．病理組織学的評価

各群の72時間後の肝組織をホルマリンで固定後 hematoxiline eosin 染色し検鏡した．

5．統計学的解析

それぞれの値は測定値より算出した平均値±SD で表した．各群の平均値間の有意差の検定は t-検定により行った．

結　果

1．血行動態

術前の門脈圧は A 群9.3±1.4cmH_2O (mean±SD)，B 群10.4±1.3cmH_2O で差を認めなかった．術直後は A 群14.3±2.0cmH_2O，B 群17.5±2.3cmH_2O で72時間後は A 群11.1±1.8cmH_2O，B 群14.4±1.8 cmH_2O と変化した (**Fig. 3**)．

門脈血流量/心拍出量 (PVF/CO) は A 群では術前値と術直後および72時間後の値に変化はなかったが B 群では術前の25.1±4.1%が，術直後46.5±5.4%，72時間後37.7±5.5%と高値を維持した (**Fig. 4**)．

動脈血酸素分圧 (PaO_2) を約100mmHg に保った時の門脈血酸素分圧 ($PpvO_2$) は B 群では術前59.9±2.5

Fig. 3 Post operative changes of portal pressure in the two groups.

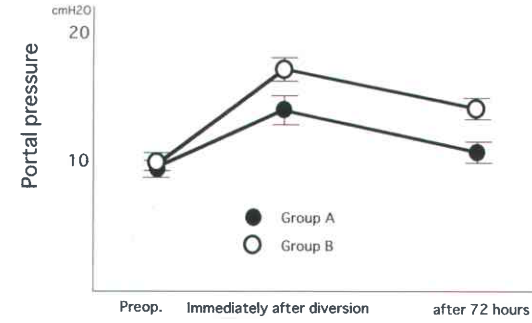


Fig. 4 Post operative changes of Portal Venous Flow/Cardiac Output (PVF/CO) in the two groups

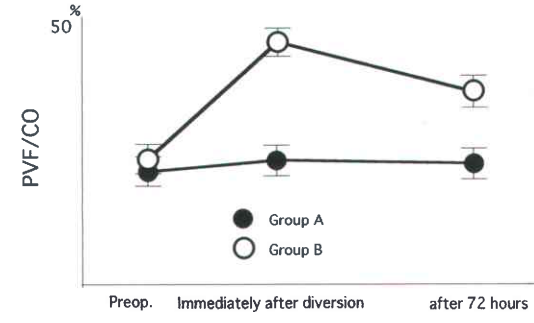


Fig. 5 Post operative changes of Portal venous oxygen partial pressure in the two groups

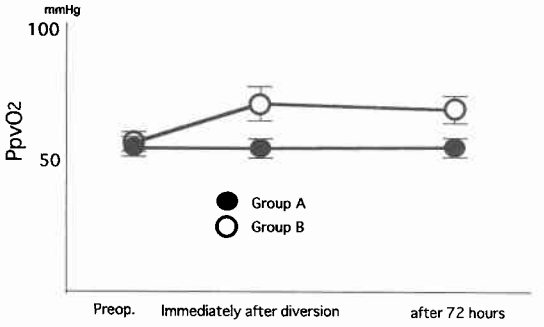
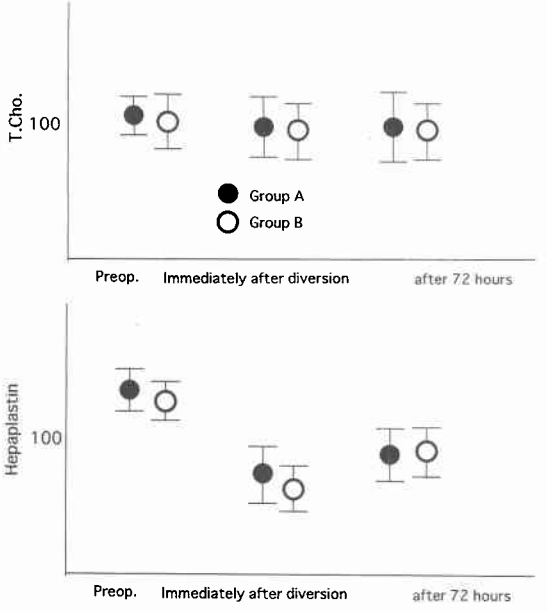


Fig. 6 Post operative changes of Total Cholesterol value (T. Cho.) and Hepaplastin value in the two groups



mmHg，術直後73.2±7.3mmHg，72時間後70.7±5.5 mmHg で，A 群では術前術後および72時間後の値に差はなかった（**Fig. 5**）.

2．血液検査

Total cholesterol（T. Ch），ヘパプラスチンなどの時間的推移は A，B 両群間に有意の差を認めなかった（**Fig. 6**）.

3．肝再生の評価

湿重量は A 群76.4±10.6%，B 群103.3±13.0%で，乾燥重量は A 群55.9±9.4%，B 群57.8±9.8%でともに B 群で増加していた（**Fig. 7**）. L.I.（おのおの n=7）は A 群34.7±1.7，B 群51.4±3.8で両群間に有意差（$p<0.01$）を認めた（**Fig. 8**）.

Fig. 7 Comparison of regeneration ratio in the Wet and Dry weight of the two groups

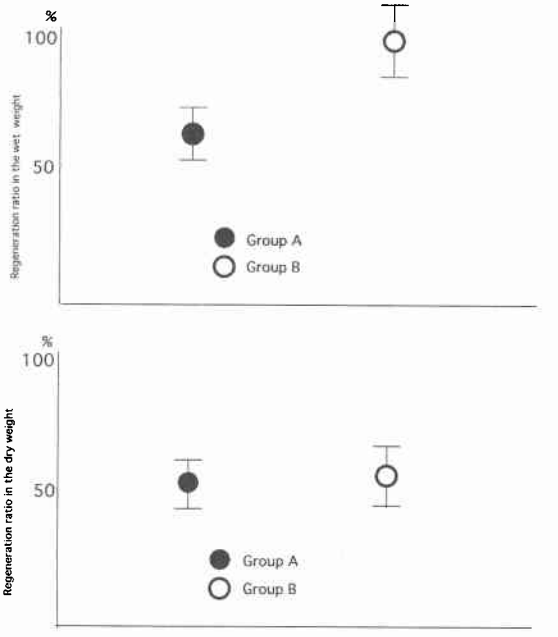
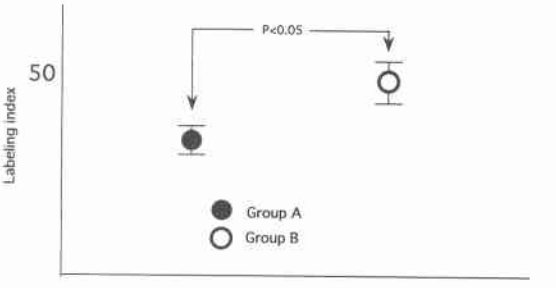


Fig. 8 Comparison of the regeneration ratio in the Labeling Index of the two groups



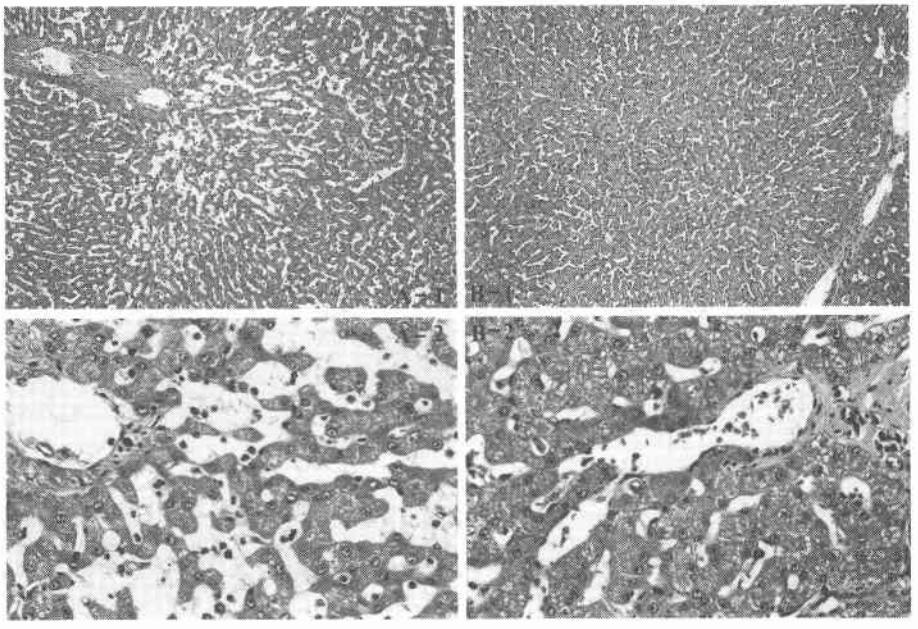
4．病理組織学的検討

A，B 両群の弱拡大像から強拡大像を示す（**Fig. 9**）. 両群ともグリソン梢の末梢門脈は拡張しているが中心静脈の拡張は認めなかった．A 群では部分的に micro abscess を認めるが B 群では認めなかった．また A 群の類洞は拡張していたが B 群では類洞の拡張はなかった．

考　察

門脈血流変換実験は門脈体循環短絡術，肝再生促進因子をめぐる一連の研究[3,4]，門脈動脈化法など多様で

Fig. 9 Histology of the regenerated liver at the autopsy ; Group A : A-1 (×25), A-2(×100) and Group B : B-1 (×25), B-2(×100). (H & E stain)



ある．この中で門脈血の動脈化は肝動脈結紮時の肝虚血壊死の防止策や短絡術式である門脈下大静脈吻合後の肝機能低下を防止する目的で研究されてきた[1)5)]．

門脈動脈化のために門脈血流変換術式を利用した方法の多くは，本来の門脈血の肝への流入を遮断ないし変更している．また必ずしも肝血流量の増加を目的とはしていない．これに対し本実験モデルは肝への本来の門脈血流を維持しながら，これに動脈血を付加したもので[6)]全く新しい方式といえる．さきに教室の中山[7)]はこの実験モデルの循環動態を検討し門脈血流量は2～3倍に増大し門脈血酸素分圧は有意に上昇するが門脈圧の高度上昇はないこと，またこの門脈血流変換モデルでイヌの肝動脈を結紮しても生存することを報告している．

今回の実験では肝再生への影響を調べるため50%肝切除を加え，栄養条件を一定として[8)]コントロール群と比較した．この方法ではカロリー窒素比が167となった．イヌの肝再生能は多くの文献で72時間後に最大反応が認められるとされている[9)~11)]ので，その時での肝細胞中の合成期細胞を BrdU 用い Label し，その L.I. を比較した[12)13)]．

肝再生率の湿重量での比較は，A 群より B 群のほうが著明に高く，乾燥重量でも A 群より B 群が高かったが，湿重量では両群間の水分含量に大きな差があった．しかし L.I. でも B 群が有意に高い値を示し，B 群で活発な細胞合成が行われ，肝再生が旺盛であることも示された．

この時両群とも肝切除部の肝臓が100%再生しているわけではないが B 群の門脈圧は術直後の17.5±2.3 cmH_2O から72時間後には14.4±1.8cmH_2O と低下した．急激な門脈圧の上昇により門脈から静脈へのシャントの形成と肝再生に伴う血管床の増大が考えられた．一方，72時間後でも A 群には変化はみられなかった．

従来，肝再生にたいし門脈血流の量的因子を重視する Blood flow theory と，門脈血中の質的因子を重視する Humoral theory とが論議されてきた．

Blood flow theory では，Child ら[3)]の門脈下大静脈交差吻合を行い，門脈血のかわりに下大静脈血を供給しても十分再生するという報告や，Fisher ら[2)]の門脈動脈化の実験で門脈血自体を流入させなくても，系統静脈や動脈血によって門脈血行を維持すれば良好な肝再生が得られるとした報告がある．しかし水本ら[14)]が行った Child 法の追試では正常肝の再生率(80～90%)に及ぼす，53%の再生率にとどまった．

Humoral theory では古くは1931年，Mann ら[15)]の

肝切除時端側門脈下大静脈吻合により門脈血をBypassすると，残存肝が再生しないことより肝再生には門脈血が必要とした報告がある．またBucherら[16]は門脈血中のhumoral factorの存在を指摘し，同様にMarchioroら[17]は門脈血中にHepatotrophic factorの存在を示唆した．さらにStarzlら[18]はその門脈性因子をインスリンであるとした．一方，Priceら[19]は肝再生にグルカゴンが必要因子であるとした．Fisherら[20]は回腸末端切除犬では肝再生が阻害されることより，回腸末端に由来する肝再生促進因子があるとした．最近では，岡部ら[21]はラット70%肝切除後に小腸粘膜可溶性分画中に分離肝細胞をtransformさせる因子があると報告している．また坪内[22]らは劇症肝炎患者の血清中よりヒト肝細胞増殖因子（human hepatocyte growth factor）を見いだし，それが脾臓内に存在することを明らかにしている．これらの知見から門脈血中に何らかの肝再生因子が存在するとすることはほぼ共通の認識と考えてよい．

一方，先に述べたように門脈動脈化は古くは肝動脈結紮時の肝虚血壊死の防止策として研究されてきた．1950年Schillingら[1]はイヌで肝動脈結紮後，その切離断端を門脈に植え込む方法で門脈の動脈化を行い，耐術例は全例，長期生存させえたことを報告している．また1972年Lipschultzら[23]は，腎静脈と門脈を吻合し，肝動脈結紮後の肝壊死を予防することが可能であったとしている．これらはいずれも門脈血の酸素濃度を増大させることで肝動脈結紮後の肝の低酸素状態を改善し，肝の壊死を阻止しえたものとして推論されている．本実験では肝動脈は開存し，本来の門脈血流に加え下大静脈血と動脈血流が門脈内に流入している．肝動脈と門脈との血流量はおのおの25%と75%とされるが，酸素の供給量に関しては各50%を占めるとされる[24]．今回，72時間後の再生肝の組織標本でA群の全例で類洞に浸潤細胞と部分的micro abscessを認めているが，B群ではこうした所見は認められていない．また両群ともに末梢門脈の拡張はあるが，中心静脈は正常状態にある．A群の類洞は拡張し，B群の拡張は著明ではない．この機序については不明であるが，高酸素濃度でかつ高流量の門脈血の存在が肝の壊死を早期より阻止していることは確認出来た．

肝切除後には門脈圧は上昇し，肝血流量は減少するという報告が多い．この肝血流量の減少は術後の肝不全の発生の重要な要因となるとされ，野浪[25]は臨床的に肝硬変合併例では肝切除後の肝血流低下が肝不全を招来するが，Dobutamineを投与して循環を維持すると肝不全が減少するとのべている．本実験の門脈血流変換モデルで中山[7]はcardiac outputがA-V fistulaのため約1.5倍に増加していることを示している．今回の実験ではPVF/COは術前と比較し，術直後は約1.8倍で72時間後は約1.5倍を示した．したがってPVFは実際には2～3倍にも増加している．これに加え門脈血の酸素分圧は約60mmHgから70mmHgと上昇し，門脈血が運ぶ酸素量は極めて多量となる．しかも術直後は50%肝切除なので単位肝重量あたりの酸素量はさらに2倍にもなり，この門脈血流変換モデルではコントロール群に比べてはるかに多量の酸素が残存肝に供給されていることになる．

本実験モデルは肝再生に必要とされる本来の門脈血の存在下で門脈血の動脈化を可能にした．その結果，肝壊死が阻止されること，BrDUを用いたDNDA合成期細胞のL.I.は有意に上昇し，肝再生に促進的に働いていることが判明した．本モデルは門脈領域での病態生理の研究や肝外科の発展に有用と考えられる．

稿を終わるにあたり御指導，御校閲を賜った平　明教授に深く感謝するとともに，病理組織学について懇切なる御指導を賜った第2病理学教室佐藤栄一教授，蓮井和久講師に心より感謝します．また田中紘輝助教授をはじめ大野隆，上村亮三氏らの御協力を感謝します．

本研究は文部省科学研究03770764によった．

本研究の一部は第37回日本消化器外科学会総会で発表した．

本研究は鹿児島大学医学部附属動物実験施設において所定の規則に従って行われたものであることを付記する．

文　献

1) Schilling JA, Mckee FW, Wilt W: Experimental hepatico-portal arteriovenous anastomosis. Surg Gynecol Obstet **90**: 473—480, 1950
2) Fisher BC, Russ C, Updergraff H et al: Effect of increased hepatic blood flow upon liver regeneration. Arch Surg **69**: 263—270, 1954
3) Child CG, Barr D, Holswade GR et al: Liver regeneration following portacaval transposition in dogs. Ann Surg **138**: 600—608, 1953
4) Starzl TE, Porter KA, Kashiwagi N et al: Portal hepatotrophic facter, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. Surg Gynecol Obstet **141**: 843—858, 1975
5) Adamsons RJ, Butt K, Lyers S et al: Portacaval shunt with arterialization of the portal vein by means of a low flow arteriovenous

fistula. Surg Gynecol Obstet **146**：869—876, 1978
6) 平　明：新しい門脈血流変換：門脈動脈化法. 消外 11：1838—1839, 1988
7) 中山博美：門脈血流変換の実験的研究. 日外会誌 **91**：491—499, 1990
8) 末永昌宏：肝切除後の再生に関わる門脈性因子について実験的研究—とくにアミノ酸の果たす役割について. 日外会誌 **84**：424—436, 1983
9) Starzl TE, Francavilla A, Porter KA et al: Liver regeneration in dogs. Morphologic and chemical changes. J Surg Res **25**：409—419, 1978
10) Starzl TE, Francavilla A, Porter KA et al: The effect of splanchnic vicera removal upon canine liver regeneration. Surg Gynecol Obstet **147**：193—207, 1978
11) Kahn D, Hickman R, Terblanche J et al: Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs—The response to different resection sizes. J Surg Res **45**：176—180, 1988
12) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡部　昌ほか：BrdU (Bromodeoxyuridine)モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. 医のあゆみ**135**：510—513, 1985
13) Lainier TL, Berger EK, Eacho PL: Comparizon 5-bromo-2-deoxyuridine and [3H] thymidine for studies of hepatocellular proliferation irodents. Carcinogenesis **10**：1341—1343, 1989
14) 水本竜二, 本庄一夫：肝血行二重支配の意義. 日臨 **28**：409—416, 1970
15) Mann FC, Fishbach FC, Gay JK et al: Experimental pathology of the liver. Studies III, IV and V. Arch Pathol **12**：787—835, 1931
16) Bucher NLR, Scott JF, Aub JC: Regeneraton of the liver in parabiotic rats. Cancer Res **11**：457—465, 1951
17) Marchioro TL, Porter KA, Brown BL et al: The effect of partial portacaval transposition on the canine liver. Surgery **61**：723—730, 1967
18) Starzl TE, Halgrimson CG, Francavilla FR et al: The origin, hormonal nature and action of hepatotrophic substance in portal venous blood. Surg Gynecol Obstet **137**：179—197, 1973
19) Price JB, Takeshige K, Max MH et al: Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration. Surgery **72**：74—82, 1972
20) Fisher B, Szuch P, Levine M et al: The intestine as a source of a portal blood factor responsible for liver regeneration. Surg Gynecol Obstet **137**：210—214, 1973
21) 岡部和彦, 渡部勇通四郎, 清水昭一：小腸粘膜由来の肝再生因子. 肝臓 **26**：1708—1710, 1985
22) 坪内博仁, 中山宏幸, 弘野修一ほか：劇症肝炎—肝再生の調節タンパク質ヒト肝細胞増殖因子. 肝胆膵 **21**：53—59, 1990
23) Lipschultz LI, Raezer DM, O'Connell JR et al: Prevention of liver necrosis after hepatic artery ligation by renal vein-portal vein shunt. J Surg Res **3**：109—112, 1972
24) Conolly WB, Belzer FO, Dunphy JE: Safe hepatic artery occlusion in dogs. Surgery **66**：772—774, 1969
25) 野浪敏明：肝切除後の全身血行動態および酸素需給動態に冠する研究—術後管理における hyperdynamic state の意義について. 日外会誌 **86**：148—159, 1985

Effect of the Arterialized Portal Blood Flow on Liver Regeneration —An Experimental Study—

Kenso Honbo
The Second Department of Surgery, Kagoshima University Faculty of Medicine

Two experimental groups, dogs with hepatectomy with or without portal blood arterialization, were studied from the aspects of hemodynamics and hepatic cell regeneration. Arterilization of the portal blood was accomplished with two surgical procedures, femoral arterio-venous and cavomesenteric venous shunt formation. The native portal blood flow was maintained. Fifty percent hepatectomized dogs with or without these shunts were managed under intravenous hyperalimentation for 72 hours. Hemodynamic changes were studied at pre- and post-operation, and at autopsy. At 72 hours after the operation, liver regeneration was estimated as the change in weight of the residual liver. The labeling index of liver cells obtained from counting S-phase hepatic cells stained by BrdU immunostaining was simultaneously pursed. Portal pressure was insignificantly elevated after shunt formation. The ratio of portal venous flow to cardiac output and portal venous PO_2 increased significantly. An increment in liver weight was

seen in both dry and wet measurements at 72 hours after operation. The labeling index showed significant change. Liver with portal blood arterialization revealed prominent regeneration in comparison with hepatectomy alone. The experiment clarified that arterialization of the portal blood by means of shunt formation under maintenance of the native flow provided significant augmentation of liver cel regeneration. It is considered that this procedure is a useful method by which to rescue hepatic cell ischemia, and will become a tool to accelerate hepatic cell regeneration.

Reprint requests: Kenso Honbo The Second Department of Surgery, Kagoshima University School of Medicine
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890 JAPAN