

肝切除術後の高ビリルビン血症の病態 —胆汁中ビリルビン亜分画分析とその意義—

山形大学第1外科

石山 秀一 布施 明 田中 丈二 浦山 雅弘
五十嵐幸夫 須藤 幸一 平井 一郎 塚本 長

肝切除術後の黄疸の病態を解明するために胆汁中のビリルビン亜分画を高速液体クロマトグラフィー法にて分析した。胆道癌切除21例のうち非肝切除8例を対照群、肝切除例で術後2週後も血清総ビリルビン値が2mg/dl以下にならなかった5例を黄疸群、その他8例を非黄疸群とした。胆汁は胆汁外瘻より経日的に採取した。術後3群とも第1日目に bilirubin diglucuronide (BDG) が減少し、それに対応して bilirubin monoglucuronide monoglucoside および monoxyloside (BGG+BGX) が増加した。この変化の大きさは対照群<非黄疸群<黄疸群で、対照群、非黄疸群では5~7日目にはほぼ術前値に復したが黄疸群では2週後も有意の差を示した。抱合酵素の異常あるいは基質の変化によって、BDG からより親水性の弱い BGG+BGX の割合が増加するために肝細胞膜からの分泌輸送が阻害され、黄疸が遷延するものと考えられた。ビリルビン亜分画は肝切除術後黄疸の病態把握にいい指標となりうると思われた。

Key words: hyperbilirubinemia, bilirubin conjugates, hepatectomy, bile duct cancer, high performance liquid chromatography

はじめに

肝門部胆管癌あるいは進行胆嚢癌の根治手術は、その浸潤様式および肝門部の解剖学的特性から広範肝切除術を必要とすることが多い。広範肝切除術の安全性は向上しつつあるが、いまなお術後の高ビリルビン(以下、Bil と略記)血症にしばしば遭遇し、そのまま肝不全に移行することがある。この術後黄疸についての研究は古くから行われてきたが、その詳細はまだまだ明らかではなく対策も確立していない。著者らはこの肝切除術後の高 Bil 血症の病態を解明するために、胆道癌に対する肝切除術後に経時的に胆汁の Bil 亜分画分析を行い以下の知見を得た。

対象および方法

1. 対象

対象は胆道癌切除21例である。そのうち下部胆道癌(Vater 乳頭部癌2例を含む)で膵頭十二指腸切除を行った6例および胆嚢癌で拡大胆嚢摘出術を行った2例の計8例を対照群とした。他の13例は肝門部胆管癌

で肝切除を行った症例(以下、肝切除群と略記)である。この肝切除群13例のうち、術後14日を経過しても血清総 Bil 値(以下、T-Bil と略記)が2mg/dl以下にならなかった5例(肝 S₁₋₄₋₅切除: 1, 拡大肝葉切除4例)を黄疸群、他の8例(肝 S₁₋₄₋₅切除2, 拡大肝葉切除6例)を非黄疸群とした。

なお、術前閉塞性黄疸を呈した症例は経皮経肝胆道ドレナージ(以下、PTBD と略記)を行い、減黄をはかって手術を行ったので術前 T-Bil 値は21例全例2.0 mg/dl以下であった。また、術後に、少なくとも画像診断で胆道の閉塞性機転を疑わせた症例はいなかった。

術前 PTBD を行った症例は対照群4例、肝切除群12例であった。これらの症例で PTBD tube より術前に採取した胆汁の細菌培養は対照群では3例、肝切除群では12例に陽性であった。細菌培養陽性の症例の術後のドレインからは、1~2週間、胆汁培養で同定された菌が検出されたが、全症例で特に外科的処置の必要なほどの膿瘍形成はみられなかった。

2. 胆汁の Bil 亜分画分析

術前は PTBD tube、術後は手術中に挿入した胆汁外

瘻 tube より経日的に胆汁を採取した。胆汁は採取後ただちに氷冷し遮光した。

胆汁の亜分画分析は Yamashita ら¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、まず採取した胆汁に最終濃度 4% となるように ascorbic acid を加えた後、胆汁に対して 3 倍量の acetone を加えて Bil を抽出した。これを 1,800g で 5 分間遠心した後、その上清に対して 4 倍量の 0.1M sodium acetate 液を加え、Millex SR filter (0.5 μ m, Milipore, Bedford, MA, USA) を用いて濾過した。この濾過液の 20~80 μ l を高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略記) カラム (C18- μ Bondapak column, 30 \times 3.9mm i.d., Waters, Milford, MA, USA) にかけて、移動相として 0.5mM pentanesulphonate を含む 0.1M sodium acetate (pH 4.0) と acetonitrile を用いて逆相 HPLC を行った。分析時間は 60 分で、acetonitrile 濃度を 0~35 分で 20~48%, 35~45 分で 48~90% の gradient をかけ、残りの 10 分は 90% で維持して 450nm の吸光度でモニターした。

3. 統計学的処理

平均値は平均値 \pm 標準誤差値で表示し、3 群間の検定には Fisher の PLSD テストを用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

1. 血清 T-Bil 値の推移

血清 T-Bil 値は 3 群とも術後第 1 日目に上昇した。対照群、非黄疸群ではその後、徐々に正常化した。黄疸群では 14 日目以降も高 Bil 血症が続いた (Fig. 1)。

2. 胆汁中 Bil 亜分画の変動

1) 対照群、術前の胆汁中 Bil 亜分画分析パターン：対照群症例 (61 歳、男性、下部胆管癌症例)、術前の胆汁中 Bil 亜分画は 5 つの主ピークを示した (Fig. 2)。これらの分画は親水性の高い順に、bilirubin diglucuronide (以下、BDG と略記)、bilirubin monoglucuronide monoglucoside (以下、BGG と略記)、bilirubin monoglucuronide monooxyloside (以下、BGX と略記)、2 種の bilirubin monoglucuronide (以下、BMG と略記；endovinyll, C₈, および exovinyll, C₁₂) に相当する¹⁾ (Table 1)。BGG と BGX, BMG の endovinyll および exovinyll はときに明確に分画することが不可能であったので、以下これらの主ピークを BDG, BGG+BGX, BMG の 3 群にわけて検討した。

2) 胆汁中 Bil 亜分画の変動

① 症例

Fig. 1 Postoperative changes in serum total bilirubin

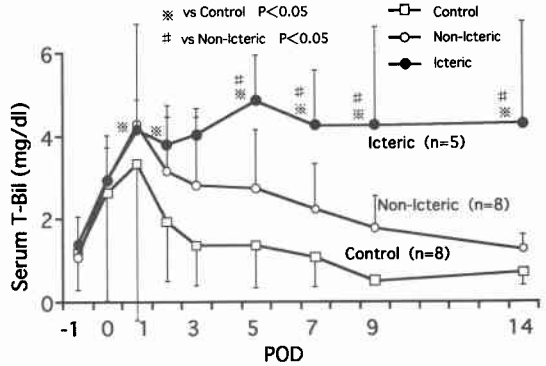


Fig. 2 Preoperative bile bilirubin subfractionation by HPLC in the 61-year-old male patient with lower bile duct cancer

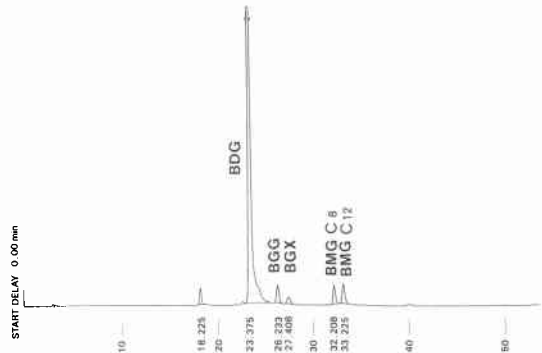


Table 1 Bilirubin subfraction

1	Bilirubin Diglucuronide (BDG)
2	Bilirubin Monoglucuronide Monoglucoside (BGG)
3	Bilirubin Monoglucuronide Monooxyloside (BGX)
4	Bilirubin Monoglucuronide (endovinyll) (BMG C ₈)
5	Bilirubin Monoglucuronide (exovinyll) (BMG C ₁₂)

(1) 対照群：61 歳、男性。下部胆管癌にて臍頭十二指腸切除術を行った。術後第 1 日目に軽度の血清 Bil 値の上昇を認め、約 10 数% の BDG の減少、BGG+BGX の増加を見たが、3 日目には正常に復した (Fig. 3)。

(2) 黄疸群①：76 歳、男性。肝門部胆管癌にて拡大右葉切除術を行った。血清 T-Bil 値が術後第 1 日目に 5.3mg/dl に上昇し、第 12 日目には 10.1mg/dl まで上昇した。BDG は第 1 日目に術前の 73.3% から 46.7% に減少し、その後も低値で推移した。これに対応して

Fig. 3 Postoperative changes in bile bilirubin sub-fractions in the 61-year-old male patient of control group after pancreatoduodenectomy for distal bile duct cancer

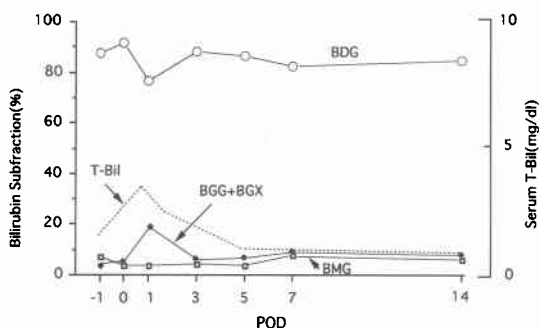
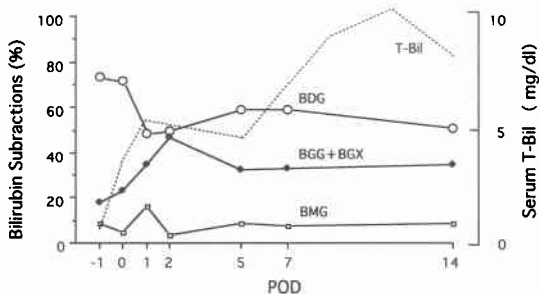


Fig. 4 Postoperative changes in bile bilirubin sub-fractions in the 76-year-old male patient of icteric group after extended hepatic lobectomy for proximal bile duct cancer



BGG+BGX が増加し高値が持続した。BMG は第 1 日目に軽度の上昇を示したのみであった。本症例は12 日目より prednisolone, prostaglandin E₁ を投与したが、血清 T-Bil 値が正常化するのに約 2 か月を要した (Fig. 4)。

(3) 黄疸群②：77歳, 男性. 肝門部胆管癌で S₁₋₄₋₅ 切除を行った。術前, 術後第 1 日目, 第 5 日目の chromatograph を示す (Fig. 5)。BDG が術前の 81.4% から第 1 日目には 38.3% に著明に減少, BGG+BGX が 7.2% から 48.2% に増加した。血清 T-Bil 値は第 1 日目に 3.5mg/dl, 第 5 日目に 6.5mg/dl に上昇したが、5 日目の胆汁中 Bil 亜分画は BDG; 60.4%, BGG+BGX; 27.1% と改善傾向にあったため経過を観察したところ, 15日目には血清 T-Bil 値が 2.5mg/dl となった。

② 各群における胆汁中 Bil 亜分画の変動

Fig. 5 Perioperative changes in bile bilirubin sub-fractions in the 77 year-old male patient performed S₁₋₄₋₅ subsegmentectomy for proximal bile duct cancer

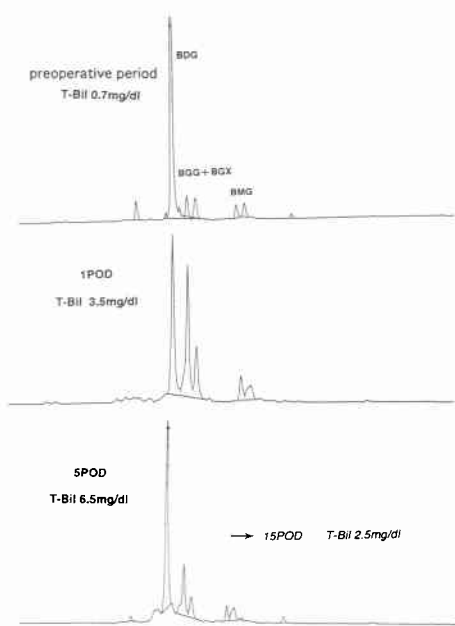
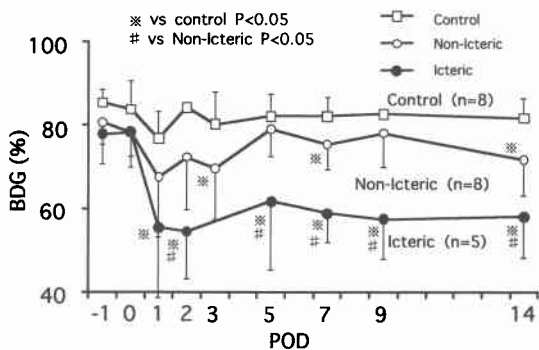


Fig. 6 Postoperative changes in BDG



(1) BDG の変動：術前値は対照群 85.3±3.0, 非黄疸群 80.6±5.3, 黄疸群 77.8±7.2% で有意差はないが黄疸群で低い傾向があった。術後第 1 日目には 3 群とも BDG が減少した (対照群; 76.8±6.4, 非黄疸群; 67.4±14.3, 黄疸群; 55.4±16.6%。対照群 vs 黄疸群, p<0.05)。対照群では 2 日目には術前値に回復し, 非黄疸群でも 5 日目には回復傾向にあったが, 黄疸群では低値が持続し第 14 日目にも有意な低値を示した (Fig. 6)。

(2) BGG+BGX の変動：BGG+BGX の術前値は

Fig. 7 Postoperative changes in BGG+BGX

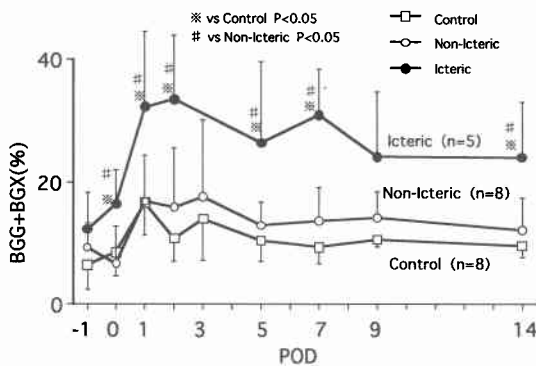
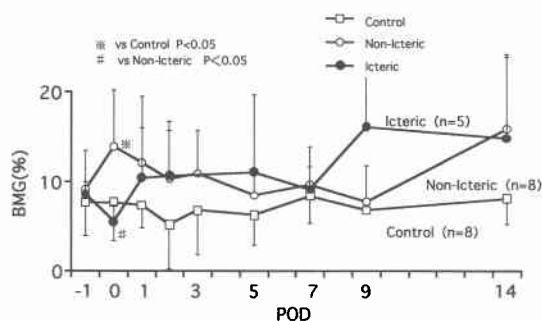


Fig. 8 Postoperative changes in BMG



対照群: 6.5 ± 4.0 , 非黄疸群: 8.5 ± 4.0 , 黄疸群: $12.3 \pm 6.0\%$ で有意差はないものの, 黄疸群で高値であった。対照群, 非黄疸群の術後の変動は軽度であったが, 黄疸群では第1日目から2日目にかけて高値(第1日目: 32.2 ± 12.3 , 第2日目: $33.4 \pm 10.4\%$)を示し, 以後14日目まで有意な高値が持続した (Fig. 7)。

(3) BMGの変動: BMGは術前値に各群で差はなく一定の有意な変動を認めなかった (Fig. 8)。

考 察

肝門部胆管癌や進行胆嚢癌では手術の根治性を保つために広範肝切除が必要となることが多い。肝切除は近年, 安全な手術手技として確立し, その適応範囲も拡大されてきた。しかしながら, いまなお術後の高 Bil 血症に遭遇することがしばしばであり, ときにそのまま肝不全に移行することがある。肝炎や過大侵襲による絶対的な機能的肝細胞量不足が原因となる肝不全でも高 Bil 血症を呈するが, これは間接 Bil の上昇が特徴的で, 通常みられる肝切除術後の高 Bil 血症とは性質が異なるように思われる。この肝切除術後の高 Bil 血症については古くから研究されてきたが, 発生機序

やその対策についての詳細ははまだ不明である。

われわれは胆道癌に対する肝切除術後の胆汁中 Bil 亜分画分析を行うことにより, 肝切除術後に胆汁中の Bil 組成が変化することを明らかにした。高 Bil 血症が遷延した症例では術前より BDG が低値を示す傾向があり, かつ術後にはより著明な減少を示した。このとき, この BDG の減少に対応するように BGG+BGX が増加していた。すなわち, 胆汁中の Bil のうち2個のグルクロン酸 (以下, GA と略記) を持つ BDG が減少し, 1個の GA と glucose, あるいは xylose が結合した BGG や BGX が増加しており, 胆汁中の Bil は親水性の高いものから低いものへ, 割合が変化していた。

胆汁中の Bil 亜分画を行うと, ヒトでは通常, 抱合された Bil がほとんどで, なかでも BDG が圧倒的に多く約80%を占める。BGG+BGX と BMG はそれぞれ10%程度で非抱合型の Bil はほとんど検出されない(1%前後)²⁾。Bil は肝細胞のミクロソームで GA 抱合をうけた後, 肝細胞外に分泌輸送されるが, 細胞膜通過には GA 抱合が不可欠である。これは GA 分子が細胞膜に存在する特異的な担体に結合するためか, あるいは抱合によって内因性の水素結合が壊されることにより, 親水性の陰イオンに親和性をもつ担体系に輸送されやすくなるからだと言われている³⁾。

いずれにせよ, 細胞膜に存在する担体によって細胞膜を通過するためにはより親水性が高く, GA 分子2個を有する BDG が, BGG や BGX よりも有利であると考えられる。したがって, BDG が減少し, BGG+BGX が増加すると肝細胞からの Bil 輸送が障害され, 高 Bil 血症が惹起される可能性が高く, これが肝切除術後の高 Bil 血症の原因であると考えられる。肝切除術後の高 Bil 血症において, 胆管閉塞がないにもかかわらず, 直接 Bil が優位な高 Bil 血症がしばしばみられることはこの推論を裏づけるものであると思われる。

Bil の GA 抱合反応は Uridine diphosphate-glucuronosyl transferase (以下, UDP-GT と略記) の触媒の下に Uridine diphosphate-glucuronic acid (以下, UDP-GA と略記) を基質として行われる⁴⁾。したがって, 肝切除術後の胆汁中 Bil 亜分画異常の原因は, この反応を触媒する酵素である UDP-GT の異常か, 基質の変化によるものと想定される。

UDP-GT はミクロソームの内膜に局在する膜結合性タンパクである。UDP-GT とミクロソーム脂質膜とは密接に関係しており, phospholipase で処理すると

活性が低下する。また、UDP-GA 濃度にも影響をうけ、非抱合型 Bil や BMG を基質とした場合、BDG の産生は UDP-GA の濃度上昇とともに増加することが知られている⁵⁾。

広範肝切除術後の残肝機能の障害の原因のひとつとして循環障害あるいは再灌流障害による膜の障害があげられる。膜の障害がおこって膜脂質の integrity がそこなわれると、UDP-GT の活性が阻害されることは容易に推察される。

一方、UDP-GA は UDP-glucose を基質に UDP-glucose dehydrogenase の作用によって生成されるが、この反応には NAD⁺ を補酵素として必要とする。一般に GA 抱合を阻害する物質として、エタノール、乳酸、ソルビトールなどがあげられており、これらの物質はすべて細胞内の NAD⁺ pool を減少させるものである⁶⁾。NAD⁺ の減少はこれらの物質の作用のみならず、細胞内の ATP/ADP 比、あるいは energy charge を低下させる要因があればいかなることによってもおこりうる⁷⁾。

肝切除術後に残肝の energy charge が低下することはよく知られており、その原因のひとつは機能的肝細胞数の減少と旺盛な肝再生によるとされている⁸⁾。また、門脈圧亢進によって肝血流量が減少すると energy charge の低下、NAD⁺ pool の減少がおこる。Adachi ら⁹⁾はラットを用いた実験で上腸間膜静脈の一時的な閉塞によって肝内の UDP-GA 濃度が低下することを示し、Kamisako ら¹⁰⁾は Salicylamide 投与による UDP-GA の減少によって胆汁中 Bil 亜分画の異常が起ることを示した。

一方、閉塞性黄疸症例では胆汁の細菌感染の頻度が高く、術後の Bil 亜分画の変化も細菌の影響をうけている可能性が考えられる。しかし、今回の症例のうち肝切除群で PTBD を行った症例全例で胆汁中細菌培養が陽性であり、術後には黄疸群、非黄疸群ともドレインの排液から胆汁培養で同定された細菌が検出された。したがって、細菌感染だけでは両群間の違いを説明できないため、なお検討が必要である。

これらの事実を総合すると、肝切除術後には UDP-GT の活性を変化させたり、UDP-GA の生成を阻害する因子が種々ある。これらが単独、あるいは複数で作用することによって、胆汁中の Bil 亜分画に異常がおこり、高 Bil 血症が惹起されるものと考えられる。

この Bil 亜分画の異常は Fig. 5 の症例にみられるように血清 T-Bil 値の変化に先だつてみられる傾向が

あり、また、この異常が持続すると高 Bil 血症も持続した。したがって、胆汁中 Bil 亜分画の分析は術後高 Bil 血症の重症度、あるいは治療効果判定の指標としても有用である可能性がある。

以上、肝切除術後の胆汁中 Bil 亜分画分析を行って肝切除後の高 Bil 血症の病態について考察した。

本研究は厚生省がん助成金の援助をうけた。

本研究の要旨は第46回日本消化器外科学会総会(福井)で発表した。

文 献

- 1) Yamashita M, Adachi Y, Yamamoto T: Analysis of bilirubin conjugates in human bile by column liquid chromatography. *J Chromatogr* 375: 386-391, 1986
- 2) Yamashita M, Adachi Y, Yamamoto T: Analysis of bilirubin conjugates in human bile by column liquid chromatography—Changes in their composition in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2: 181-190, 1987
- 3) Billing HB: Bilirubin metabolism. Edited by Schiff L, Schiff ER. *Diseases of the liver*. 6th edition. Lippincott, Philadelphia, 1987, p103-127
- 4) Jansen PLM, Mulder GJ, Burchell B et al: New developments in glucuronidation research: Report of workshop on "Glucuronidation, its role in health and disease". *Hepatology* 15: 532-544, 1992
- 5) 神坂和明, 古要俊也, 上杉 孝: 肝 UDP グルクロニトランスフェラーゼと抱合. *肝・胆・膵* 17: 201-206, 1988
- 6) Moldeus P, Andersson B, Norling A: Interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in isolated hepatocyte. *Biochem Pharmacol* 27: 2583-2588, 1978
- 7) Aw TY, Jones DP: Secondary bioenergetic hypoxia. *J Biol Chem* 257: 8997-9004, 1982
- 8) 小澤和恵: ミトコンドリアから肝臓外科へ. *メディカルトリビューン*, 東京, 1989
- 9) Adachi Y, Kamisako T, Yamamoto T: The effects of temporary occlusion of the superior mesenteric vein or splenic vein on biliary bilirubin and bile acid excretion in rats. *J Lab Clin Med* 118: 261-268, 1991
- 10) Kamisako T, Adachi Y, Yamamoto T: Effect of UDP-glucuronic acid depletion by salicylamide on biliary bilirubin excretion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 380-382, 1990

Pathogenesis of Hyperbilirubinemia after Major Hepatectomy
—Analysis of Bile Bilirubin Subfractionations by
High Performance Liquid Chromatography—

Shuichi Ishiyama, Akira Fuse, Joji Tanaka, Masahiro Urayama, Yukio Igarashi,
Koichi Sutoh, Ichiro Hirai and Masaru Tsukamoto
The First Department of Surgery, Yamagata University, School of Medicine

In order to investigate the pathogenesis of hyperbilirubinemia after major hepatectomy, we studied 21 patients with biliary tract cancer. Those patients were divided into three groups: a non-hepatectomy control group (n=8), and non-icteric (n=8) and icteric (n=5) hepatectomy groups. In the icteric group, the serum bilirubin level was above 2.0 mg/dl even two weeks after surgery. Bile bilirubin subfractionations were analyzed by HPLC. The proportions of bilirubin diglucuronide (BDG) decreased on the first postoperative day in all three groups, whereas those of bilirubin monoglucuronide monoglucoside (BGG) and monoxylsode (BGX) increased. The grade of this abnormality was most severe in the icteric group among the three groups. In the icteric group, these changes were kept at significant levels compared with both the control and non-icteric groups. These changes could cause difficulty in bilirubin transport across the cell membrane of hepatocytes so that hyperbilirubinemia might occur after major hepatectomy. The analysis of bile bilirubin subfractionations seemed useful for the evaluation of hyperbilirubinemia after major hepatectomy.

Reprint requests: Shuichi Ishiyama First Department of Surgery, Yamagata University School of
Medicine
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata, 990-23 JAPAN
