

# 肝線維化率からみた硬変肝切除後の肝再生能に関する実験的研究

福島県立医科大学第2外科

畠山 優一 小野 俊之 阿部 力哉

肝硬変合併肝細胞癌の肝切除に関しては肝再生能の評価も必要と考える。今回、TGF- $\beta$ の発現像である肝線維化に注目し、その程度を半定量的に求める肝線維化率が硬変肝切除後の肝再生能の術前予測に有用かを検討した。Wistar系雄性ラットにチオアセタマイドを投与して肝硬変ラットを作製した。他ラットには生食のみを投与した。これらに2/3肝部分切除を施行して切除肝の標本にアザン染色を行い、自動画像解析装置により肝線維化率を求めた。一方、肝切24あるいは48時間後に屠殺し、残肝標本よりBrdU標識率を求め肝再生能の指標とした。こうして得た肝線維化率とBrdU標識率との関係を検討すると全ラットを対象にしても(おのおの $r = -0.64, -0.60$ )、肝硬変ラットのみを対象にしても(おのおの $r = -0.50, -0.53$ )、肝線維化率とBrdU標識率の間には有意な負の相関( $p < 0.05$ )が認められ、肝線維化率の測定は硬変肝切除後の肝再生能の評価に有用と考えられた。

**Key words:** hepatic fibrosis, liver resection, liver cirrhosis, hepatic regeneration activity, automated image analysis

## I. 緒言

肝細胞癌は各種治療法の開発により生存率の向上が得られてきている。各種の治療法の中でも肝切除術は、最も根治性の期待される治療法である。現在は多くの施設で肝細胞癌のみならず転移性肝癌に対しても肝切除術が行われているが、肝切除後の肝不全の発症は臨床上極めて重要な問題である。これは本邦の肝細胞癌の約90%が慢性肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患を合併し、肝機能障害を有している<sup>1)2)</sup>ことに起因している。そのため特に硬変肝の切除の際には全身的な耐術能に加え、術後肝不全の防止のため術前に慎重な肝機能の検討が必要である。

現在、いくつかの施設より独自の肝臓の耐術能の評価法が報告されている<sup>3)~6)</sup>。これらの多くは肝臓の機能的予備力を見るもので、術後早期の肝臓の耐術能の評価が中心になっている。当科でも硬変肝切除の際には、報告されている評価法のいくつかを参考にして術前の肝機能の評価を行って、以前よりも術後肝不全の発生は減少した一方で、術後早期に耐術しても肝再生能の不良による肝不全で在院死する症例も認められる。そこで硬変肝の切除に際しては術前の肝臓の耐術能の評価として、肝再生能の評価も加える必要がある

と考えられる。

著者は硬変肝切除後の肝再生能の予測に有用な種々の因子の1つとしてtransforming growth factor- $\beta$ (以下、TGF- $\beta$ )の発現像と考えられる肝線維化に注目し、肝線維化率が硬変肝切除後の肝再生能の術前予測に有用であるかを検討することを目的とした。肝線維化率は自動画像解析装置を用いて半定量的に客観的に測定した。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物

実験には40匹の5週齢のWistar系雄性ラット(Japan SLC, Inc.)を用いた。

### 2. 実験動物の飼育

ラットは附属研究所実験動物研究室において、7時より19時までの12時間の照明、室温 $22 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ のもとで飼育した。餌はマウス・ラット固形飼料CE-2(日本クレア株式会社)を用い、自由摂水・摂食とした。

### 3. 肝硬変ラットの作成

上記のラットのうち30匹に対して、4%チオアセタマイド200mg/kgを週3回、10週間、ip投与して肝硬変ラットを作成した。また10匹には生理的食塩水(生食)のみを投与し対照群とした。

### 4. 肝部分切除手術

チオアセタマイドあるいは生食の投与を終えたラッ

トにネンブタール麻酔をした後、開腹して Higgins らの方法<sup>7)</sup>に従って2/3肝部分切除術を施行した。

チオアセタマイド投与群では投与後10週目に3匹が、手術直後に1匹が死亡した。生食投与群では手術後に1匹が死亡した。そのため以下の検討は、チオアセタマイド投与ラット26匹と生食投与ラット9匹について行った。

## 5. 肝線維化率の測定

### ① 組織染色

摘出した切除肝は重量を測定した後、20%ホルマリンに固定しパラフィンに包埋した。包埋した切除肝の左外側葉より3 $\mu$ 厚の切片を作成しH.E染色およびアザン染色を行った。H.E染色ではそれぞれの硬変肝の病理組織学的像を確認した。

アザン染色は朝隈により報告されているアザン染色法の変法<sup>8)</sup>に準じて施行した。すなわちキシレンおよびエタノールによる脱パラフィンを行い、渡辺の考案<sup>9)</sup>した10%重クロム酸カリウム水溶液と10%トリクロロ酢酸水溶液の等量混合液である媒染剤に15分間浸漬した後、オレンジG水溶液に5分間、アゾカルミンG水溶液に15分間浸漬して核、細胞質などの実質を染色した。続いてリンタングステン酸水溶液に5分間浸漬することにより分別を行い、アニリン青水溶液に15分間浸漬して膠原線維を主体とした間質を染色した。

### ② 自動画像解析

自動画像解析装置はColor Image Processors SPICCA-II (日本 Avionics 社)、PC-9801FS (NEC) コンピューターおよびImage Command 5098 (日本 Avionics 社) ソフトウェアを使用した。

肝線維化率の測定は次の通り行った。まずアザン染色した標本を顕微鏡下に、観察している視野をノーマル入力とコントラストを出すための積分入力により画像解析装置の画面に取り込みを行った。次に「色彩抽出法」<sup>10)</sup>により画面を見ながらアニリン青で青紫色に染色されている部位を指定して、コンピューターに選択した色を記憶させて選択色の部位と非選択色の部位に二値化処理(以下、binalization)を行った。取り込んだ視野全体における選択色の占める面積の割合(線維化率(%))=選択色の占める面積÷取り込んだ視野全体の面積×100)を求めた。それぞれ5視野を検討し、その平均を肝線維化率とした。

### 6. BrdU 標識率の測定

BrdU 標識率は次の通り測定し、肝再生能の指標とした。肝切除の24時間後にチオアセタマイド投与ラッ

ト13匹と生食投与ラット5匹を、48時間後にそれぞれ13匹と4匹を大量ネンブタール注入により屠殺した。屠殺の1時間前にプロモデオキシウリジン(以下、BrdU)50mg/kgを腹腔内に投与した。屠殺後、残肝を摘出し重量を測定した後70%アルコールにて固定し、パラフィンに包埋した。残肝のうち右外側葉より3 $\mu$ 厚の切片を作成し、抗BrdU単クローン抗体による免疫組織染色を行った。すなわちキシレン、エタノールによる脱パラフィン後、0.3% $H_2O_2$ メタノールによる内因性ペルオキシダーゼブロックを行い、0.1N塩酸に30分間、2N塩酸に60分間浸漬することにより一重鎖変成処理を施行した。0.1M 硼酸ソーダにより中和した後、抗BrdUマウス単クローン抗体(DAKO社、20倍希釈)を用いて切片で4°Cのもと一晚、抗原抗体反応を行った。その後ビオチン標識抗マウス免疫グロブリン・兔抗体(DAKO社、300倍希釈)を37°C下60分間反応させた後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(DAKO社)を37°C下60分間反応させ、さらに発色基質として3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB)を用い、S-ABC法による免疫染色を行った。なお、対比核染色にはMayer's Hematoxylinを用いた。免疫染色された標本にて2,000個以上の肝細胞を数え、その中に占めるBrdU標識細胞の割合を求めBrdU標識率とした。

### 7. 肝線維化率とBrdU標識率

チオアセタマイドおよび生食を投与したラットの全例と、H.E染色により病理組織学的に肝硬変と診断したラットについて、切除肝の肝線維化率と肝切24時間および肝切48時間後の残肝のBrdU標識率との関係を検討した。

### 8. 統計学的検討

統計学的検討はPC-9821As(NEC)コンピューター、SPSS for Windows (SPSS Japan Inc.)ソフトウェアを用いて行った。2群間の平均値の差はStudent t検定により、また2群間の相関関係はSpearmanの相関関係を求めて検討した。検定に際しては $p < 0.05$ をもって有意とした。

なお、本実験は福島県立医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

## III. 結 果

### 1. 切除肝の病理組織学的所見

ラットの正常肝ではヒトの正常肝に比較して、小葉間組織では小葉間動脈、小葉間門脈、小葉間胆管を認めるのみで小葉間結合組織は目立たず小葉が密になっ

て組織を構築していた。チオアセタミドの投与を行ったラットの肝臓では、やや大小不同のある multilobular 様の偽小葉による小葉の改築が認められ、それを囲むように偽小葉間組織、とくに線維成分の増生が起こっており長与の乙型の肝硬変像を呈した (Fig. 1)。

### 2. 切除肝の肝線維化率

アザン染色を行うことにより組織中の膠原線維は青紫色に、細網線維は淡青色に染色された。一方、核は赤色に、細胞質は淡赤色に染色された。これにより組織は間質の領域は青色系に、実質は赤色系に明瞭に区別することができ、正常肝と硬変肝を容易に区別するのみならず、間質の領域を自動画像解析装置により認識できた (Fig. 2a, b, c)。これにより測定した肝線維化率は、チオアセタミド投与のラットでは最低4.36%、最高35.61%を示し平均 $17.04 \pm 7.64\%$ であった。一方、生食を投与したラットでは最低0.21%、最高0.70%で平均 $0.51 \pm 0.16\%$ であった。チオアセタミド投与群では生食投与群に比べ有意に肝線維化率は高値を示した ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3)。

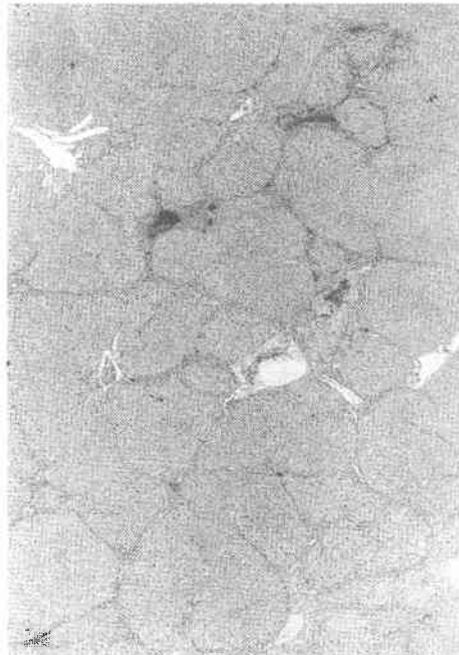
### 3. 残肝の BrdU の取り込み

BrdU 標識細胞は、核内が免疫組織染色で茶色を呈することにより確認することができた。生食を投与したラットの残肝では、BrdU 標識細胞は肝小葉の周辺に多く、中心に少ない傾向があった (Fig. 4a)。チオアセタミドを投与したラットの残肝では、BrdU 標

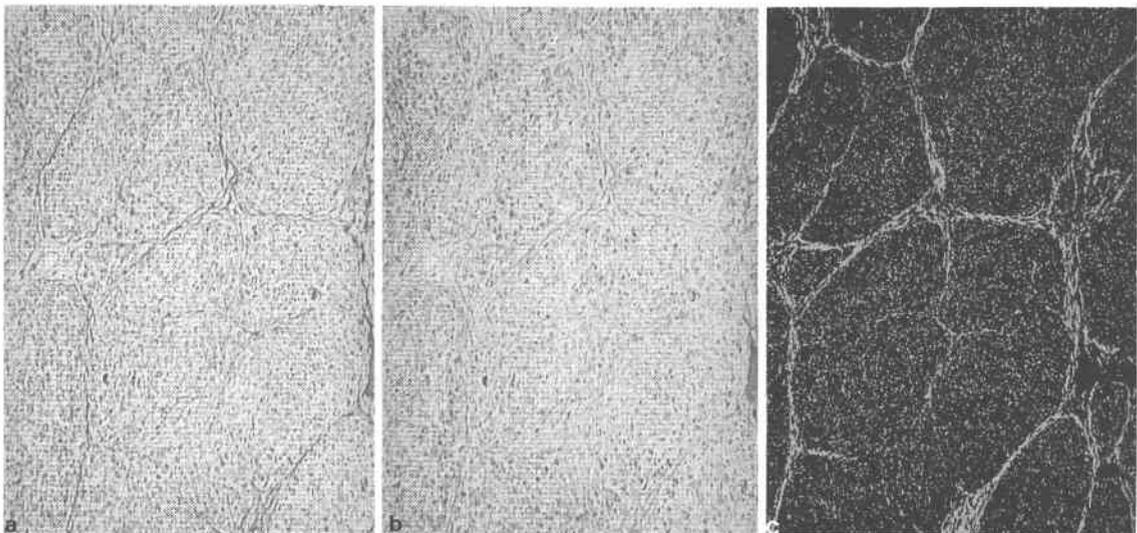
識肝細胞は偽小葉内で不均一に分布していた (Fig. 4b)。

生食投与群の肝切24時間後の BrdU 標識率は最低

**Fig. 1** Microscopic feature of the liver in rats treated with intraperitoneal administration of thioacetamide. Liver cirrhosis is shown on the tissue (H.E. staining,  $\times 10$ )



**Fig. 2** Automated image analysis of hepatic fibrosis index on Azan-stained liver tissue  
a: Input, b: Binalization, c: Calculation of hepatic fibrosis index



28.77%, 最高53.61%, 平均 $45.39 \pm 11.42\%$ であり, 肝切48時間後では最低11.13%, 最高16.60%, 平均 $13.74 \pm 2.26\%$ であった。一方, チオアセタミドの投与群の肝切24時間後のBrdU標識率は最低7.92%, 最高59.80%, 平均 $32.61 \pm 14.15\%$ であり, 肝切48時間後では最低5.09%, 最高15.17%, 平均 $9.56 \pm 2.59\%$ であった。

#### 4. 肝線維化率とBrdU標識率との関係

チオアセタミドを投与したラットおよび生食を投与したラットの全例における肝線維化率とBrdU標識率との関係を見ると, 肝切24時間後では $r = -$

$0.64$  ( $p = 0.003$ ), 肝切48時間後では $r = -0.60$  ( $p = 0.005$ )と有意な負の相関関係が認められた (Fig. 5, 6)。

H.E染色による組織学的な切除肝の所見は生食を投与したラットでは正常肝と判断され, チオアセタミドを投与したラットでは2例が組織学的には慢性肝炎の像を呈し, 肝線維化率が7%以下であった。この2例を除いたチオアセタミド投与ラットは組織学的に肝硬変と診断され, 肝線維化率は7%以上であった。硬変肝のみを対象にして肝線維化率とBrdU標識率との関係を見ると, 肝切24時間後では $r = -0.50$  ( $p = 0.048$ ), 肝切48時間後では $r = -0.53$  ( $p = 0.037$ )であった (Fig. 7, 8)。硬変肝のみを対象とした場合においても肝線維化率とBrdU標識率の間には有意な負の相関関係が認められた。

#### IV. 考 察

本邦における肝細胞癌の特徴として, その多くが慢性の肝疾患を合併していることがあげられる。日本肝癌研究会の報告では肝細胞癌手術症例の73.7%に, 剖検症例の82.1%に肝硬変を合併していると報告されている<sup>1)2)</sup>。肝癌の治療法の多くは肝臓に侵襲的であるため, その背景にある慢性の肝疾患に起因する肝臓の機能障害あるいは機能低下を無視することはできない。そのため本邦の各施設においては肝癌治療, 特に肝切

Fig. 3 Comparison of hepatic fibrosis index between rats treated with intraperitoneal administration of thioacetamide and saline

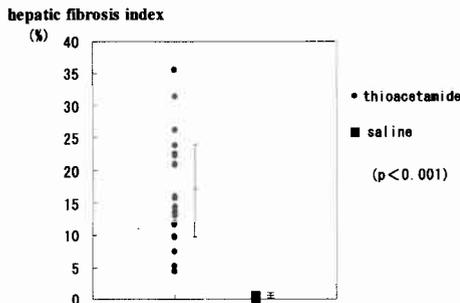
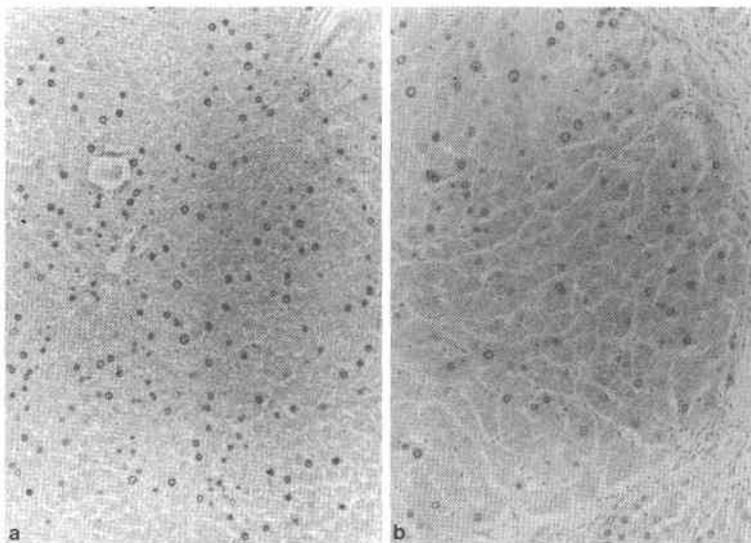
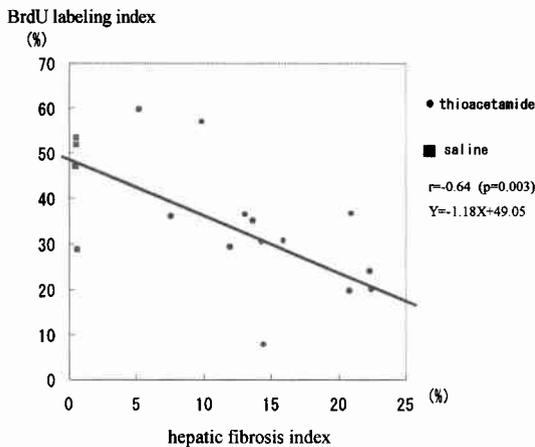


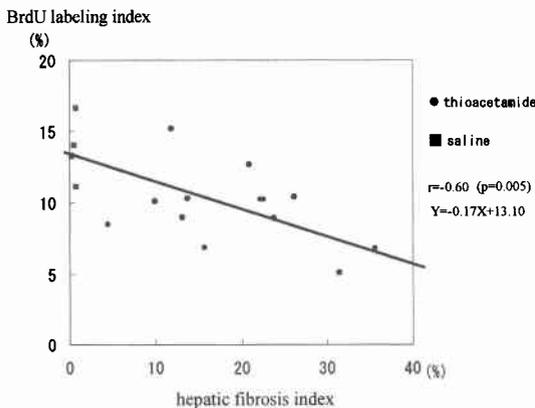
Fig. 4 Immunohistological staining for BrdU of residual liver tissue in rats at 24 hr after partial hepatectomy ( $\times 40$ )  
a: rats treated with intraperitoneal administration of thioacetamide, b: doses of saline



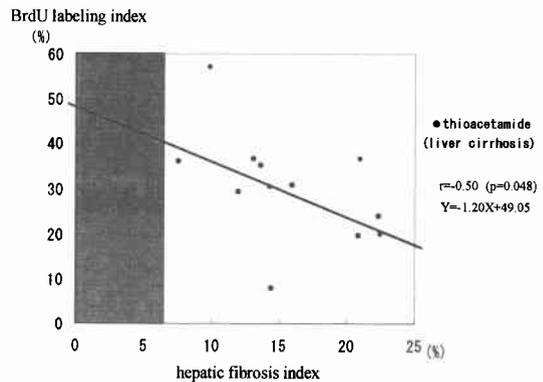
**Fig. 5** Correlation between hepatic fibrosis index and BrdU labeling index of all rats at 24hr after partial hepatectomy



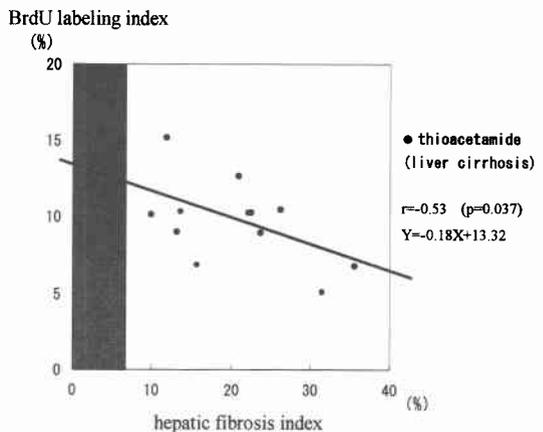
**Fig. 6** Correlation between hepatic fibrosis index and BrdU labeling index of all rats at 48hr after partial hepatectomy



**Fig. 7** Correlation between hepatic fibrosis index and BrdU labeling index of rats with histopathologically liver cirrhosis (hepatic fibrosis index > 7) at 24hr after partial hepatectomy



**Fig. 8** Correlation between hepatic fibrosis index and BrdU labeling index of rats with histopathologically liver cirrhosis (hepatic fibrosis index > 7) at 48hr after partial hepatectomy



除のための肝機能の評価法の研究が進められている。なかでも小澤らの動脈血中ケトン体比を用いた耐術能の判定、肝機能のモニタリング法<sup>3)</sup>、岡本らの重回帰予後得点式による評価法<sup>4)</sup>、水本らの総合的 risk の算出による手術危険度の判定<sup>5)</sup>、野口らの残存肝 Rmax による残存肝予備力の評価法<sup>6)</sup>は、肝臓の機能的予備力に着目した評価法として有用と考えられる。

当科でも肝細胞癌の治療、特に肝切除手術に際しては、これらの優れた評価法を参考にして肝臓の機能的予備力を中心に術前評価を行っている。しかし実際には術後早期は耐術しても、術後、1か月以降に難治性

腹水の出現や肝機能の異常をきたして6か月以内に肝不全状態に陥って在院死する症例もある。術後早期の予後判定のみならず長期予後の予測も重要と考えられる。肝切除後長期予後は肝再生と密接に関係しているため、特に硬変肝の肝切除においては術前に残存肝の再生能を評価することができれば臨床上極めて有用である。しかしこれまで肝再生能の評価法については若干の報告が見られる<sup>11)12)</sup>のみで、まだ確立した方法はない。

昨今、肝硬変の病態について分子生物学的な研究が行われ、肝硬変の形成に関係しているサイトカインの

ネットワークについても徐々に解明されつつある。松本らは肝硬変の発症機構のモデルとして、長期的な肝障害があることにより、主に肝臓の非実質細胞において TGF- $\beta$  が慢性的に産生される。これは hepatocyte growth factor (HGF) の産生を抑制することにより、また直接作用し肝実質細胞の増殖を抑制する。一方、TGF- $\beta$  はオートクリン機構で肝非実質細胞に作用し、膠原線維などの細胞間物質の産生を促し肝臓の線維化を促進すると報告されている<sup>13)</sup>。肝細胞の増殖抑制、すなわち肝再生の抑制と肝臓の線維化は TGF- $\beta$  を介して進行すると考えられる。

著者は肝切除後の肝再生能を術前に予測しうる因子として、硬変肝の形成、肝細胞の増殖抑制に関係している TGF- $\beta$  のいわば発現像と考えられる肝臓の線維化に注目した。線維化の程度による硬変肝切除後の肝再生能の術前評価法としての有用性について研究した。

肝臓の線維化の程度の評価法として、従来より肝生検や肝切除した組織を特殊染色して、それを鏡検して判断する方法が行われている。しかしこの方法による線維化の程度の診断は診断者の主観によって影響され、より客観的に評価する方法が必要である。また膠原線維をより選択的に染色する特殊染色も求められる。組織の膠原線維染色法としては、ファン・ギーンソン染色法、マッソン・トリクローム染色法、アザン染色法などがあるが、著者は比較的簡便なアザン染色法を用いた。アザン染色法では膠原線維は濃い青色に、細網線維は淡い青色に、そして細胞の核は赤色に、細胞質は淡い赤色に分別染色される。画像解析装置では取り込んだ画面上で、色を選択して binalization をする観点から、アザン染色による青と赤の明瞭な色分けは膠原線維の検出に大変有用である。アザン染色で使用するアニリン青は再溶出させてその量を測定するとコラーゲン I, III の量と相関すると報告されており<sup>14)</sup>、青く染色された領域の面積はコラーゲン I, III の量を反映していると考えられる。自動画像解析装置による膠原線維の検出は肝線維化の程度をほぼ定量的に測定していると考えられる。硬変肝切除後の肝再生能の評価のため、術前に肝生検で採取した組織標本にアザン染色を行い、自動画像解析装置を用いて肝線維化率を短時間に、簡便に、客観的に測定することは臨床的に極めて有用と考える。著者は組織染色にアザン染色を用いたが、Jimenez らはファン・ギーンソン染色法で使用する picric acid の代わりに sirius red を用いて

膠原線維を染色し、その他の蛋白を fast green を用いて染色する方法を考案している<sup>15)</sup>。この方法では sirius red によりコラーゲン I, III に加え、コラーゲン IV も染色される点でアザン染色よりも有用との報告<sup>14)</sup>がある。肝臓の間質を構成する膠原線維は主にコラーゲン I, III であるが、コラーゲン IV も含有していることより、染色の手間を考慮に入れなければこの方法も有用と考えられる。

今回の検討では肝再生能の指標として BrdU 標識率を用いた。プロモデオキシウリジン (BrdU) はチミジンの類似物で、核酸を構成する一要素として S 期の細胞の DNA 中へ取り込まれる性質を有する。核内に BrdU を含む細胞、すなわち BrdU 標識細胞は S 期にある増殖活性を有する細胞としてとらえられる。ラットでは部分肝切除後の肝再生は残肝細胞の増殖活性によって決定されるため、BrdU 標識率をもって肝再生能の指標とした。肝切除後の残存細胞が S 期に入ると報告されている<sup>16)</sup>手術24時間後にチオアセタマイド投与ラット13匹と生食投与ラット5匹を、48時間後にそれぞれ13匹と4匹を大量ネブタール注入により屠殺した。切除肝の肝線維化率と肝再生能の指標として測定した BrdU 標識率とを肝切24時間および48時間後の時点で検討すると、統計学的に有意な負の相関関係が得られた、つまり正常肝より硬変肝へ線維化率が増加するにつれて、術後の肝再生能が減少することを示している。しかしこれは正常肝も対象に入れた関係であり、当然の結果とも言える。そこで次に硬変肝、すなわち肝線維化率7%以上のラット肝を対象にして肝線維化率と BrdU 標識率との関係を検討した。肝切24時間後でも48時間後でも、肝線維化率と BrdU 標識率との間には統計学的に有意な負の相関関係が認められ、硬変肝の中でも線維化率の増加に応じて肝再生能が低下することが示唆された。これにより硬変肝では術前の生検によって肝線維化率を測定することにより、肝切除後の残肝の再生能を評価できると考えられる。

肝線維化の程度を肝生検によらず血液検査のみで知ることができるならば、さらに非侵襲性で有用である。現在最も注目されているのは N-terminal propeptide of type III procollagen (以下、PIIIP) であるが、PIIIP は肝臓の線維化の程度とよく相関するとの報告がある<sup>17)~21)</sup>。しかし、肝線維化の程度よりも肝硬変の臨床病期に相関して変動しているとの反対意見もある<sup>22)</sup>。その他ラミニン、ヒアルロン酸なども単独では肝線維

化の程度を測定することは困難であると考えられる。Shimadaらは末梢血中の血小板数, 性別, HPT, Pugh's score, ICG R15の値を組み合わせた関数式により Fibrosis score を求めて, 肝線維化の程度を推測しようと試みている<sup>23)</sup>。

今回, 硬変肝切除の際に, 肝生検により組織を採取して自動画像解析装置を用いて半定量的に測定する肝線維化率が術後の残肝の再生能を予測できるかどうか, ラットで硬変肝を作って基礎的実験を行った。その有用性は確認することができたが, この肝線維化率が肝組織内 TGF- $\beta$  と相関するかどうかの検討は行っていない。今後は実際の臨床における本法の意義を検討していくつもりである。

本論文の要旨は, 第95回日本外科学会総会(1995年4月, 名古屋市)ならびに第46回日本消化器外科学会総会(1995年7月, 福井市)において発表した。

#### 文 献

- 1) The liver cancer study group of Japan: Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. *Ann Surg* 211: 277-287, 1990
- 2) 日本肝癌研究会: 原発性肝癌に関する追跡調査—第10報—。肝臓 34: 805-813, 1993
- 3) 小沢和恵, 浮草 実, 戸部隆吉: 代謝動態からみた肝切除の適応決定。日消外会誌 13: 84-89, 1980
- 4) 岡本英三, 山中若樹, 加藤年啓: 肝細胞癌の外科的治療。癌と化療 16: 40-45, 1989
- 5) 水本龍二, 野口 孝: 肝予備力と治療法の選択。消病セミナー 26: 5-18, 1987
- 6) 野口 孝, 水本龍二, 中川 毅: 肝切除限界並びに肝再生能の画像診断による術前評価。日画像医誌 3: 723-741, 1984
- 7) 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
- 8) 朝隅蓉子: 結合組織の染色。アザン染色法。Med Technol 5: 1022-1025, 1977
- 9) 渡辺恒彦: ある媒染剤について。組織技術研究会誌 3: 1-5, 1974
- 10) 日本アビオニクス株式会社編: イメージコマンド5098取扱説明書。日本アビオニクス株式会社, 東京, 1992, p243-247
- 11) Nakatsukasa H, Nagy P, Everts RP et al: Cellular distribution of transforming growth factor- $\beta$ 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 85: 1833-1843, 1990
- 12) Macintosh EL, Gauthier T, Pettigrew NM et al: Hepatic fibrosis as predictor of hepatic regeneration activity after partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 17: 307-309, 1993
- 13) 松本邦夫, 中村敏一: 肝再生, 肝の線維化と TGF- $\beta$ 。実験医 10: 1892-1897, 1992
- 14) 中村仁美, 高松正剛, 中野 博: 線維染色標本の画像解析による肝内コラーゲン定量法。肝臓 34: 212-218, 1993
- 15) Jimenez W, Pares A, Caballeria J et al: Measurement of fibrosis in needle liver biopsies: Evaluation of a colorimetric method. *Hepatology* 5: 815-818, 1985
- 16) 佐貫和俊, 沖田 極, 村上不二夫ほか: 抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた新しい S 期肝細胞の同定法。肝臓 27: 1632-1632, 1986
- 17) Sato S, Nouchi T, Warner TM et al: Liver fibrosis in alcoholics. *JAMA* 256: 1471-1473, 1986
- 18) Savolainen ER, Goldberg B, Leo MA et al: Diagnostic value of serum procollagen peptide measurements in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 8: 384-389, 1984
- 19) Rojkind M: The blue glass and the predictive value of serum amino-terminal propeptide of type III procollagen as a marker of liver fibrosis. *Hepatology* 4: 977-978, 1984
- 20) Galambos MR, Collins DC, Galambos JT: A radioimmunoassay procedure for type III procollagen: its use in the detection of hepatic fibrosis. *Hepatology* 5: 38-42, 1985
- 21) Tanaka Y, Minato Y, Hasumura Y et al: Evaluation of hepatic fibrosis by serum proline and aminoterminal type III procollagen peptide level in patients with chronic liver diseases. *Dig Dis Sci* 31: 712-717, 1986
- 22) Plebani M, Burlina A: Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin Biochem* 24: 219-239, 1991
- 23) Shimada M, Matsumata T, Adachi R et al: Estimation of degree of liver cirrhosis using a fibrosis score; a multivariate analysis of clinical parameters and resected specimens. *Hepatogastroenterology* 41: 177-180, 1994

## The Grade of Hepatic Fibrosis as a Predictor of Regeneration Activity after Partial Hepatectomy to Liver Cirrhosis in the Rat

Yuichi Hatakeyama, Toshiyuki Ono and Rikiya Abe

The Second Department of Surgery, Fukushima Medical College

Liver resection is the most effective method of therapy for hepatocellular carcinoma. We need accurate information about the liver function before liver resection, because most patients with hepatocellular carcinoma have associated liver cirrhosis in Japan. It has recently been reported that Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), which promotes liver fibrosis and suppresses the growth of hepatocytes, is related to the development of liver cirrhosis. So we focused our attention on liver fibrosis resulting from TGF- $\beta$ , and investigated whether the extent of hepatic fibrosis (hepatic fibrosis index) might be correlated with hepatic regeneration activity after partial hepatectomy in rats with thioacetamide-induced liver disease. Two groups of male Wistar rats (5 wk old) (10 to 30/group) were treated for 10 wk by weekly intraperitoneal administration of thioacetamide (200 mg/kg, 3 times/wk) or saline. All rats then underwent 70% hepatectomy under pentobarbital anesthesia. Hepatic regeneration activity was determined 24 and 48 hours after partial hepatectomy by means of bromodeoxyuridine incorporation into DNA. The hepatic fibrosis index was semiquantitatively calculated at the time of partial hepatectomy by automated images analysis on Azan-stained liver tissue. A significant inverse correlation was found between the hepatic fibrosis index and DNA synthesis in all rats (thioacetamide-treated and saline-treated) 24 and 48 hours after partial hepatectomy ( $r = -0.64$  and  $-0.60$ , respectively;  $p < 0.05$ ), and also an inverse correlation existed even in the rats with treated thioacetamide ( $r = -0.50$  and  $-0.53$  at 24 and 48 hr, respectively). In conclusion, it is considered that the preoperative quantitation of hepatic fibrosis by automated image analysis will enable us to predict hepatic regeneration activity after cirrhotic liver resection.

**Reprint requests:** Yuichi Hatakeyama The Second Department of Surgery, Fukushima Medical College  
1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-12 JAPAN

---