

肝転移に及ぼすラット肝虚血再灌流の影響について

神戸大学第1外科

塩谷 雅文 具 英成 斎藤 洋一

肝虚血-再灌流障害によるラット腹水肝癌(AH-130)の肝転移促進効果を検討した。ラットをI群：単開腹群 (n=8), II群：20分肝虚血群 (n=7), III群：30分肝虚血群 (n=8)に分けた。肝虚血にはII, III群とも中葉と左葉の支配動脈および門脈を一括遮断した。I群は開腹10分後に, II, III群は虚血解除10分後に AH130腫瘍浮遊液(1×10^6 cells/ml)を陰茎静脈より1ml投与した。10日後に犠死させ肝臓の肉眼的転移個数および単位肝重量あたりの腫瘍結節数(MI, 個/g・肝重量)を右葉および中葉+左葉で比較した。I群では右葉のMIは 0.6 ± 0.7 (mean \pm SD), 中葉+左葉は 1.0 ± 1.3 で差はなかった。II群の右葉のMIは 1.0 ± 1.1 であったのに対し, 虚血群では 3.4 ± 2.8 と有意に高値を示した($p < 0.05$)。III群でも虚血, 非虚血葉のMIはおおの17.5 \pm 15.2および6.7 \pm 7.3となり明らかな差を認めた ($p < 0.05$)。中葉+左葉のMIはI群よりII群が, II群よりIII群が有意に高かった ($p < 0.05$)。以上より肝虚血-再灌流障害により血行性肝転移が促進される可能性が示唆された。

Key words: hepatocellular carcinoma, ischemia-reperfusion injury, hepatic metastasis

はじめに

血流が途絶し虚血が遷延すると血流再開後に進行性の臓器障害を来す。この現象は再灌流障害と呼ばれ活性酸素など諸種の因子による微小循環系の障害が引き金となっているとの見方が有力となっている¹⁾²⁾。肝臓においてもラジカルスカベンジャー³⁾や抗酸化剤⁴⁾の投与で虚血再灌流障害が軽減することから活性酸素の関与が指摘されている。また虚血再灌流障害は肝切除時の肝血行遮断法や肝移植における臓器保存法など肝臓の外科的治療と密接な関連性を有しており⁵⁾⁶⁾、病態の解明は今後ますます重要になると考えられる。

肝癌に対しては外科的切除が第1選択肢となっている。しかし肝細胞癌では治療切除例でも高率な残肝再発を来し⁷⁾⁸⁾治療成績の向上を阻む要因となっている。他方、肝癌では肝移植後も高率な肝再発が報告されている^{9)~11)}。その原因としては潜在的な遠隔転移の存在や免疫抑制剤による影響などが主として推測されている⁹⁾が依然として不明な点が少ない。そこで著者らは肝切除、肝移植に共通する要因として肝虚血、再灌流に着目した。本検討では肝癌の肝転移形成に及ぼす肝虚血再灌流の影響についてラットの腹水肝癌AH130¹²⁾を用い基礎的検討を行った。

対象と方法

(1) 実験動物および腫瘍

動物は、7週齢雄のドンリユウラット(日本SLC, 体重250~300g)を用い、腫瘍はラット可移植肝癌AH130(東北大学加齢研究所より分与)を用いた。AH130腫瘍細胞は、ラット遊離腹腔内で継代後7日目の腹水を採取し以下の方法により腫瘍細胞浮遊液を作成した。

まずラット腹腔内より血性腹水をヘパリン添加採取し、1,000rpm, 5分間で遠心分離した。上澄みを吸引排除後 phosphate buffered saline (PBS) を添加し細胞を懸濁させ、遠心分離した。懸濁、遠心分離をさらに2回反復したのち、PBS中に腫瘍細胞を浮遊させ、0.3% trypan blue を添加、染色し、生細胞数 1×10^6 cells/mlとなるよう調整した。

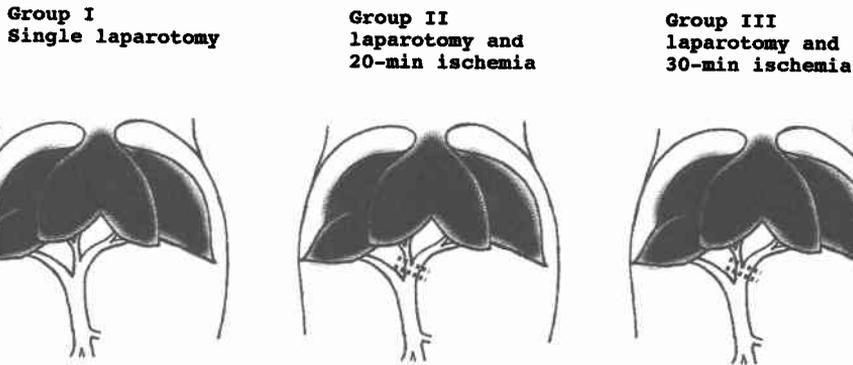
(2) 実験モデルおよび実験群

ラットは術前夜より絶食とし水分は自由摂取させた。pentobarbital sodium (5mg/100g 体重) を腹腔内に投与し全麻下に開腹した。ついで陰茎背静脈よりヘパリンを200IU/bodyの割合で投与した。肝虚血は肝門部で中葉、左葉へ流入する門脈および肝動脈を血管用クリップで同時に遮断する部分肝虚血とした。実験群は肝虚血の有無および虚血時間によりI群：単開腹群 (n=9), II群：20分肝虚血群 (n=9), およびIII群：30分肝虚血群 (n=9) の3群とした (Fig. 1)。

<1996年1月10日受理>別刷請求先：具 英成
〒650 神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部第1外科

Fig. 1 Experimental Design

Group I, simple laparotomy; group II, 20-min ischemia; group III, 30-min ischemia. ■■■: site of vascular clamp.



AH130腫瘍の移植は 1×10^6 cells/ml に調整した腫瘍細胞浮遊液1ml を、I 群では開腹10分後に、II, III群では虚血解除10分後に27G 注射針を用い陰茎背静脈から1分間で投与した。

(3) 検討項目

腫瘍移植後10日目に犠死させ肺表面の転移個数を算定した。また肝転移については肝重量を測定したのち10%ホルマリン液で摘出肝を固定し各肝葉ごとに3mmの厚さで長軸方向に平行に細切し断面における肉眼的腫瘍結節数を算定した。その際、右葉、中葉+左葉に分けて総和を算出しそれぞれの転移結節個数とした。また単位肝重量あたりの転移個数を Metastatic Index (MI, foci/g · liver tissue) と定義し、右葉および中葉+左葉に分けて算出し各群間で比較した。

(4) 統計学的処理

数値は平均値±標準偏差にて表記し、2群間の有意差検定は Student's t test を用い危険率0.05未満をもって有意差ありと判定した。

結 果

(1) 生存日数および生存率

I, II群で3日目に死亡例をそれぞれ1例、II, III群で7日目にそれぞれ1例認めたが他は全例とも犠死させるまで10日間生存した (Table 1)。なお肝虚血を加えたII, III群で虚血中腸管系のうっ血は全例とも認めなかった。

(2) 肺転移の有無および個数

肝虚血の有無、時間にかかわらず全例とも両側の肺に直径約1mm 大の結節性転移を多数認めた。I, IIおよびIII群の肺表面の転移個数はそれぞれ 65.2 ± 23.8 , 72.2 ± 15.6 , 59.9 ± 9.0 個で各群間で差を認めなかった

Table 1 10 days survival rates

| Group | 10 days survival Number of animals (%) |
|-----------------|--|
| Group I (n=9) | 8 (89%) |
| Group II (n=9) | 7 (78%) |
| Group III (n=9) | 8 (89%) |

Table 2 Lung metastases in each group

| Group | Lung metastases (number of foci per lung)* |
|-----------------|--|
| Group I (n=8) | 65.2 ± 23.8 |
| Group II (n=7) | 72.2 ± 15.6 |
| Group III (n=8) | 59.9 ± 9.0 |

*Values are expressed as mean±S.D.

(Table 2).

(3) 肝転移個数および MI

(a) 肝転移個数

肝表面において I 群ではどの肝葉にも1~3mm 大の0~3個の少数の転移しか認めなかったがII, III群では1~3mm 大の転移結節を多数認めた (Fig. 2)。各群における全肝転移個数は I 群, 10.6 ± 13.2 個, II群, 41.3 ± 31.2 個, III群, 175.6 ± 159.6 個となり虚血時間が長くなるにつれ全肝転移個数は明らかな増加を示した ($p < 0.05$) (Table 3)。右葉と中葉+左葉に分けて肝転移個数を算出すると右葉においては I 群, 1.6 ± 1.9 個, II群, 3.0 ± 3.1 個, III群, 20.4 ± 20.6 個となり非虚血葉でもIII群では他の2群に比べて明らかな転移個数の増加を認めた ($p < 0.05$)。他方、中葉+左葉で

Fig. 2 Photomicrograph of the rat liver 10 days after inoculation of AH130 cells.

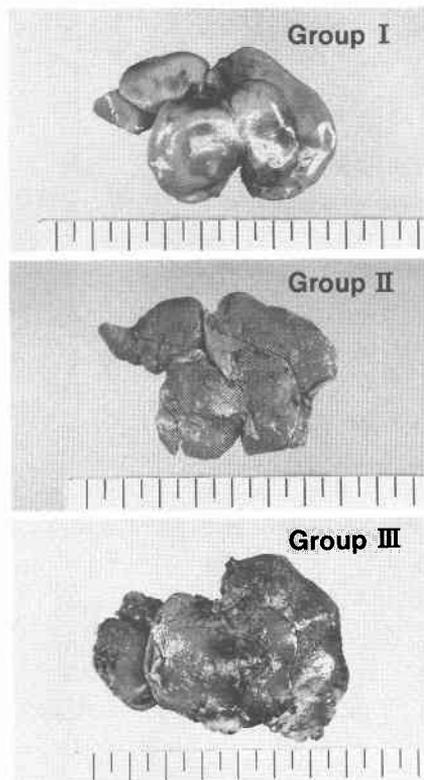


Table 3 Liver metastases in each group

| Group | liver metastases (number of foci per liver)* |
|-----------------|--|
| Group I (n=8) | 10.6±13.2 |
| Group II (n=7) | 41.3±31.2 |
| Group III (n=8) | 175.6±159.6 |

*Values are expressed as mean±S.D. **p<0.05

は I 群, 9.0±11.4個, II 群, 38.3±29.0個, III 群, 154.9±134.3個となり I, II, III 群の順に明らかな転移個数の増加を認めた (p<0.05) (Table 4).

(b) MI

I 群では右葉, 中葉+左葉の MI はそれぞれ 0.6±0.7個/g・liver tissue および 1.0±1.3個/g・liver tissue であり部位による差はなかった. II 群では右葉は 1.0±1.1個/g・liver tissue, 中葉+左葉では 3.4±2.8個/g・liver tissue と虚血葉で明らかに転移の増加を認めた (p<0.05). III 群でも同様に右葉は 6.7±7.3個/g・liver tissue, 中葉+左葉では 17.5±15.2個/g・liver tissue と

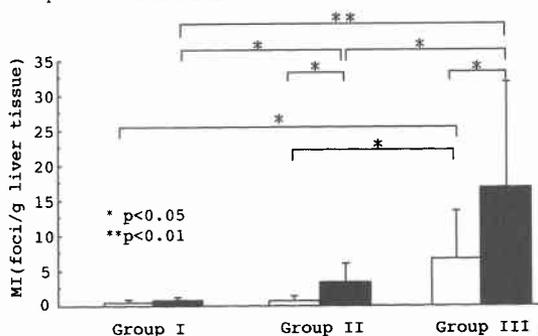
Table 4 Liver metastases in ischemic and non-ischemic liver lobes

| Group | right lobe (number of foci)* | median plus left lobes (number of foci)* |
|-----------|------------------------------|--|
| Group I | 1.6±1.9 | 9.0±11.4 |
| Group II | 3.0±3.1 | 38.3±29.0 |
| Group III | 20.4±20.6 | 154.9±134.3 |

*Values are expressed as mean±S.D.

**p<0.05

Fig. 3 Metastatic Index (MI). Metastatic Index was defined as number of tumor foci per gram liver tissue. Values are expressed as mean±SD. □, MI of the right lobe; ■, MT of the left plus median lobes.



虚血葉で明らかに高値を示した (p<0.05) (Fig. 3). また中葉+左葉については I 群より II 群が, II 群より III 群のほうが有意に高値を示した (p<0.05). 一方, 非虚血葉の右葉については III 群は I, II 群に比べて明らかに高値を示したが, I, II 群間での差は明らかでなかった.

考 察

肝細胞癌に対しては外科的切除が第 1 治療選択となっているが治癒切除例でも高率な残肝再発を来し成績向上を阻む主要因となっている⁷⁸⁾. 一方, 肝移植は 1963 年に Starzl ら⁹⁾により末期肝疾患の治療法として導入されて以来, 肝細胞癌に対しても積極的に実施されてきた⁹⁾. しかし肝移植後の再発が 50~80%⁹⁾¹⁰⁾と高率なため小肝癌や fibrolamellar type の特殊例を除き近年, 適応から除外する施設が一般的となっている¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾. こうした中で最近, polymerase chain reaction (PCR) を用いた α -fetoprotein mRNA の検出により肝細胞癌例では末梢血中に癌細胞が流出している可能性が指摘され, 肝移植や肝切除後の再発との関連性が注目されている¹⁵⁾. しかしながら血中に流出

した腫瘍細胞が着床、転移に至るまでの再発機序には依然として不明な点が多い。そこで著者らは肝切除、肝移植の両者に共通する要因として肝虚血再灌流障害に着目し今回の検討を行った。

血行転移の成立までには原発巣からの腫瘍細胞の離脱に始まって、流血中への移動、新たな部位での着床、増殖といったいくつかの段階を経なければならない¹⁶⁾。今回はこれらのうち流血中の腫瘍細胞が血管内皮に接着し着床、増殖に至るまでの過程で肝虚血再灌流障害が及ぼす影響について検討した。その際、腫瘍細胞および投与経路としては肝細胞癌に対する肝移植や肝切除後の再発を想定しラット肝癌由来の AH130 を陰茎背静脈から全身投与した。AH130は Mizutani ら¹⁷⁾の検討により肝組織親和性が高く門脈内投与では 1×10^5 個の投与細胞数で高率に肝転移を来すことが知られている。しかし本検討では 1×10^5 個を投与した予備実験では全例とも肉眼的に肝転移を認めなかったことから静脈内投与の場合には 1×10^6 個程度の腫瘍細胞数が必要と考えられた。なお全身投与の場合肝転移は肺転移による 2 次的な修飾を受ける可能性が推測される。しかし今回の検討では各群間で肺転移数に有意差はなく、部分肝虚血の有無や程度によって肝に到達する腫瘍細胞数に差は生じないと考えられた。

また肝虚血モデルとしては中葉、左葉を支配する流入血行のみを遮断する部分肝虚血モデルを用いた。Nauta ら¹⁸⁾によるとこのモデルでは90分以内の血行遮断であれば大半のラットは生存し、腸管系のうっ血を回避しようと報告されている。今回の検討でも虚血時間が20分と30分の群において生存率に差はなくいずれも良好に耐術した。また肉眼的に腸管系のうっ血は認められず実験成績への腸管系のうっ血による影響はないと考えられた。肝虚血再灌流による組織障害の機序としては、虚血中の微小血管系の血栓形成や anoxia による細胞障害¹⁹⁾および再灌流時の機械的ストレスや活性酸素などによる細胞障害²⁾の2つの要因が主として考えられている。そこで本検討では虚血葉における血栓形成の影響を除外する目的でヘパリンを使用した。ヘパリンは血管内移入細胞の凝集を阻害し転移を減少させるとの報告²⁰⁾がみられるが、今回は全例とも同量投与しており各群間の転移個数の比較には影響を与えないと考えられた。他方、虚血時間についてはラット肝では20分の虚血再灌流によって間質の著明な浮腫と毛細胆管の拡張、Disse 腔の開大や類洞内皮細胞の腫大などの形態学的変化²¹⁾を来すことが明らかにされ

ている。さらに虚血時間が延長するとこれらの可逆的変化から類洞内皮の脱落や断裂など不可逆的な形態学的変化が生じる²²⁾。これらの報告とともに本検討では肝切除術で頻用されている Pringle 法を念頭におき20分および30分の肝流入血行遮断による肝転移促進効果について検討した。

血管内皮に接着したのち腫瘍細胞が血管外に遊出する際の barrier は臓器によって異なることが知られている。すなわち肝臓以外の諸臓器では血管内皮の barrier を通過したのち腫瘍細胞はさらに血管基底膜を越える必要がある。これに対し明瞭な基底膜がない肝類洞では腫瘍細胞が血管内皮を通過すれば血管外への脱出が完了する²³⁾。したがって他臓器に比べ肝臓は腫瘍細胞がいったん血管内皮に接着すればより着床しやすい臓器であることが推測される。肝転移モデルにおける転移程度の評価には肝表面の転移個数²⁴⁾、腫瘍体積の占有率²⁵⁾などが用いられているが腫瘍細胞の肝臓への着床、生着について比較する目的で今回は腫瘍結節の大小については考慮せず断面の転移結節個数の総和を比較した。

まず中葉と左葉の肝転移個数についてみると、I、II、III群の順に有意に高値となった。肺転移個数は各群で差はなかったことから肺を通過した腫瘍細胞は虚血葉で、しかも虚血時間が長いほどより多く着床したと考えられた。肝葉の大きさを考慮し単位肝重量あたりの転移個数 MI で比較した場合にも II、III群では虚血葉が非虚血葉に比べ明らかに高値となった。これに対し虚血なしの I 群の MI は部位による差はなかった。以上のことから虚血再灌流障害の有無や程度によって腫瘍細胞の着床、ひいては転移巣の形成が異なってくると考えられた。

肝虚血再灌流による肝転移促進効果の機序を考える上で Kawaguchi ら²⁶⁾の電顕による形態学的検討が注目される。彼らは AH130細胞を尾静脈内に投与し腫瘍細胞と類洞内皮細胞との接着の様子を観察している。それによると 100 \AA 程度の細胞接着面の gap や腫瘍細胞の細胞質突起が内皮細胞表面の pinocytotic vesicle へ進入する形態像が正常の細胞どうしの接着と異なる特徴として報告されている。他方、最近こうした腫瘍細胞と類洞内皮の接着に諸種の接着分子が関与しているとの報告²⁷⁾がなされ注目されている。さらに虚血障害が種々の接着因子の発現を増強することが明らかとなっている²⁸⁾。これらを総合すると虚血再灌流障害は腫瘍が血管内皮へ接着し着床に至る段階で重要な影響

を及ぼしている可能性が推測される。

さらに今回の検討で注目された点として非虚血葉のMIは、I群とII群で差がなかったもののIII群は他群に比べ明らかな高値を示した。以前より悪性腫瘍に対する外科的侵襲は腫瘍の転移や発育を促進する可能性²⁹⁾が指摘されている。Sabaら³⁰⁾はラットの腸切除モデルでは手術侵襲により細網内皮系の血中腫瘍細胞への細胞毒性が低下することを報告している。肝臓はKupffer細胞や、Natural killer細胞など非実質細胞に富みそれ自体防御機構において重要な役割を担っていることが知られている³¹⁾。最近Okaら³²⁾は肝臓のKupffer細胞を軸とした腫瘍に対する防御活性は手術侵襲により低下するとの報告を行っている。したがってIII群の非虚血葉で見られた転移の増加には虚血葉における微小循環系の障害のほかに虚血再灌流という手術侵襲に伴う肝臓および全身の腫瘍免疫の低下が関与している可能性が推測されさらに検討を要する点と考えられた。

文 献

- 1) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 94: 428-432, 1983
- 2) McCord JM: Oxygen derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985
- 3) Nordström G, Seeman T, Hasselgren P: Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 97: 679-683, 1985
- 4) Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H et al: Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ₁₀. *Surgery* 91: 631-637, 1982
- 5) Belzer FO, Southard JH: Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676, 1988
- 6) Kalyoglu M, Stratta RJ, Sollinger HW et al: Clinical results in liver transplantation for extended preservation. *Transplant Proc* 21: 1342-1343, 1989
- 7) 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
- 8) 佐々木洋, 今岡真義, 梶谷誠三ほか: 肝細胞癌における残肝再発の要因。外科 54: 1048-1054, 1992
- 9) Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH et al: Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 2: 614-636, 1982.
- 10) Ringe B, Prichlmayr R, Wittekind C et al: Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: Experience with liver resection and transplantation in 198 patient. *World J Surg* 15: 270-285, 1991
- 11) Bismuth H, Chiche L, Adam R et al: Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg* 218: 145-151, 1993
- 12) 小田島成和: 腹水肝癌の樹立。長崎医学会誌 38: 428-445, 1963
- 13) Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S et al: Experience in 1000 Liver transplants under cyclosporin-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 20: 19-33, 1988
- 14) Olthoff KM, Millis JM, Resove MH et al: Is liver transplantation justified for the treatment of hepatic malignancies? *Arch Surg* 125: 1261-1268, 1990
- 15) Matsumura M, Niwa Y, Kato N et al: Detection of α -fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20: 1418-1425, 1994
- 16) 松浦成昭: 癌転移の分子機構。杉山武敏編。分子病理学。文光堂, 東京, 1993, p496-473
- 17) Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R et al: Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 65: 794-797, 1992
- 18) Nauta RJ, Tsimoyannis E, Uribe M et al: The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213: 137-142, 1991
- 19) Toledo-Pereyra LH, Suzuki S: Cellular and biomolecular mechanisms of liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 26: 325-327, 1994
- 20) Maat B, Hilgard P: Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastatic effects in different model systems. *J Cancer Res Clin Oncol* 101: 275-283, 1981
- 21) 川元俊二, 田代征記, 神本行雄ほか: 虚血再循環による肝類洞内皮細胞障害と活性酸素病態。今日の移植 5: 167-173, 1992
- 22) Grana L, Saldana M, Donellan WL et al: Immediate and long-term effect of acute hepatic ischemia. *Arch Surg* 97: 500-513, 1968
- 23) 川口隆憲, 杉野 隆, 佐久間敦子ほか: 癌転移の成立と血管。臨科学 22: 590-596, 1986
- 24) 山村卓也, 赤石 治, 花井 彰ほか: 肝転移予防における持続門注療法の有用性についての実験的検討。癌と治療 18: 1889-1893, 1991
- 25) 中江史郎, 多淵芳樹, 斎藤洋一: 家兎 VX2 腫瘍の

- 肝転移成立過程と制癌剤 MMC・ADR の肝転移抑制効果に関する研究. 神戸大医紀 49 : 69-83, 1988
- 26) Kawaguchi T, Endo M, Tobai S et al: Behavior pattern of rat ascites tumor cells arrested in liver sinusoids: An electron microscopic study. Jpn J Cancer Res 70 : 277-290, 1979
- 27) Torii A, Harada A, Nakao A et al: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in hepatocellular carcinoma. J Surg Oncol 53 : 239-242, 1993
- 28) Steinhoff G, Behrend M, Pichlmayr R et al: Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: overview on expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules. Hepatology 18 : 440-453, 1993
- 29) Eggermont AMM, Steller EP, Sugarbaker PH: Laparotomy enhances intraperitoneal tumor growth and abrogates the antitumor effects of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. Surgery 102 : 71-78, 1987
- 30) Saba TM, Antikatzides TG: Decreased resistance to intravenous tumor-cell challenge during reticuloendothelial depression following surgery. Br J Cancer 34 : 381-389, 1976
- 31) Bouwens L, Jacobs R, Wisse E: Natural cytotoxicity of rat hepatic natural killer cells and macrophages against a syngenic colon adenocarcinoma. Cancer Immunol Immunother 27 : 137-141, 1988
- 32) Oka M, Hazama S, Suzuki M et al: Depression of cytotoxicity of nonparenchymal cells in the liver after surgery. Surgery 116 : 87-882, 1994

Accelerating Effect of Ischemia and Reperfusion on Hepatic Tumor Metastases in Rat Livers

Masafumi Shiotani, Yonson Ku and Yoichi Saitoh
First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine

This study was undertaken to test the hypothesis that ischemia-reperfusion injury of the liver contributes to hepatic metastases of rat ascitic hepatoma (AH130). Sprague-Dawley rats underwent either a sham operation consisting of only a laparotomy (group I, n=8) or a laparotomy and 20-minute (group II, n=7) or 30-minute ischemia (group III, n=8) of the median and left hepatic lobes by clamping of the hepatic artery and portal branches. After a 10-minute stabilization period after laparotomy (group I) or the start of reperfusion (groups II and III), the animals received an intravenous injection of 1 ml of a suspension of AH130 cells (1×10^6 cells/ml) via the dorsal penile vein. Ten days later, the animals were sacrificed and the macroscopic metastatic foci were counted. In addition, the metastatic index (MI), as defined by the number of tumor foci per gram of liver tissue, in the right lobe and in the median plus left lobes was compared. In group I, MIs were 0.6 ± 0.7 (mean \pm SD) and 1.0 ± 1.3 tumor foci/g of liver tissue, respectively, in the right and the median plus left lobes, showing similar values in the two regions. However, in group II, the MI of the median plus left lobes (3.4 ± 2.8) was significantly higher than that of the nonischemic right lobe (1.0 ± 1.1 , $p < 0.05$). In group III, MIs were 17.5 ± 15.2 and 6.7 ± 7.3 , respectively, in the ischemic and nonischemic lobes, also showing a statistically significant difference between the two regions ($p < 0.05$). Furthermore, in the median plus left lobes, the longer the duration of ischemia, the higher the MI ($p < 0.05$). These results suggest that ischemia-reperfusion injury of the liver accelerates the risk of hematogenous metastasis to the liver.

Reprint requests: Yonson Ku First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, 650 JAPAN