

阻血下肝灌流における肝類洞内皮細胞障害および Nafamostat mesilate による障害抑制効果

千葉大学第1外科

安田 典夫 宮崎 勝 飯沼 克博
大塚 将之 中島 伸之

ラットを用い in situ での60分間肝血行遮断下の分離肝灌流を行い、各種灌流液による肝保護効果の生化学的および組織学的検討により行った。肝灌流は1ml/min/kg の速度で25°C乳酸リンゲル液(25°C LR 群)、4°C乳酸リンゲル液(4°C LR 群)、Nafamostat mesilate (10 μ g/ml) 添加25°C乳酸リンゲル液(25°C NM 群)、NM (10 μ g/ml) 添加4°C Lactate Ringer 液(4°C NM 群) 4°C University of Wisconsin solution 液(UW 群)の5群とした。NM 添加群で灌流液中 s-GOT, TXB₂, 6-keto-PGF_{1 α} の上昇が NM 非添加群に比べ有意に抑制された。組織学的にはすべての灌流群で無灌流群に比べ肝細胞の腫脹が有意に抑制され、UW 群で最も強い抑制をみた。また無灌流群でみられる類洞内皮細胞の連続性の消失および類洞内皮小孔の拡大は NM 非添加群では抑制されず、NM 群において明らかな抑制がみられた。阻血肝での肝灌流において NM 添加は類洞内皮細胞障害を抑制することにより微小循環を維持しその結果、肝細胞保護効果をもたらすと考えられた。

Key words: hepatic perfusion, Nafamostat mesilate, hepatic ischemia, sinus endothelial cell

緒 言

下大静脈や肝静脈へ浸潤したり、下大静脈腫瘍栓を伴う高度進行の悪性腫瘍の手術において肝の流入流出血行を完全遮断する total hepatic vascular exclusion (以下、THVE)法はこれら進行肝癌の切除に際し、肝部下大静脈の剝離、切除を安全に行いうる有用な方法である¹⁾。しかし、THVE のみで長時間にわたる肝阻血を行った場合、肝臓の強い温阻血障害が引き起こされる。この温阻血障害の軽減の目的で臨床的に現在 in situ の体内分離肝灌流法などが用いられ、その有用性が報告されている²⁾³⁾。しかしながら in-situ で行うために肝臓を摘出保存する場合と異なり、UW 液などの臓器保存液は使用しづらく、極力肝阻血時間を短縮させることが臨床的にせまられる。そこで今回、阻血肝の血流停止時に発生すると予想される類洞内循環障害を、微小血栓形成に伴い発生する TXB₂, 6keto PGF_{1 α} , PGE₂ のプロスタノイドの変動の面および組織学的な面より検討を加えた。さらに肝灌流による障害防止効果が Nafamostat mesilate の添加により影響され

るかを併せ検討した。

材料および方法

(1) 実験動物

実験動物は Wistar 系雄性ラット (250~350g) を用いた。千葉大学医学部中央動物舎(室温; 25°C, 照明; 午前5時~午後7時)に餌、水の自由摂取下に、7日以上の飼育後、12時間の絶食期間を設けた後、実験に供した。

(2) ラット体内分離肝灌流モデルの作製

ラットはペントバルビタール麻酔 (16mg/kg; 腹腔内投与) 下に開腹、既報のごとく⁴⁾⁵⁾、門脈幽門枝に、外径0.80mm の塩化ビニル製チューブ (DURAL PLASTIC & ENGINEERING, AUSTRALIA) を門脈本幹合流部まで挿入し、灌流液の流入口とし、門脈本幹を遮断した。下大静脈を腹腔内にて肝臓上部および肝臓下部腎静脈分岐上部で遮断し、肝動脈、胆管も遮断し、肝臓を全身血行より完全に分離した。肝臓下部下大静脈に外径2mm のチューブ(アトム社ポリスチレン製)を挿入し、肝静脈の灌流液の流出口とした。

60分間の肝阻血を行い阻血肝に対し各種灌流液による肝灌流を行い、対照として60分間の無灌流群を設けた。

Table 1 s-GOT, m-GOT and Cathepsin D levels in perfusate

	s-GOT (KU/ml)	m-GOT (KU/ml)	Cathepsin D (U/ml min)
no perfusion	84.8±53.8 *	2.75±1.50	1.76±0.70
25°C LR	21.3±10.0	2.14±0.38	0.61±0.38
4°C LR	17.2±7.9	2.20±0.45	1.22±1.26
25°C NM	8.3±4.6	2.00±0	1.02±0.53
4°C NM	6.25±3.4	2.00±0	0.63±0.33
UW	17.8±7.0	2.83±1.60	1.38±0.26

Mean±SD *p<0.05 vs any other group
N=4

灌流群は1ml/min/kgの速度で25°C Lactate Ringer液(以下25°C LR群), 4°C Lactate Ringer液(以下4°C LR群), 25°C Lactate Ringer液にNafamostat Mesilate(鳥居薬品;フサン®)を10μg/mlの濃度で添加した液(以下25°C NM群), 4°C Lactate Ringer液にNafamostat Mesilateを10μg/mlの濃度で添加した液(以下4°C NM群), 4°C University of Wisconsin solution (BELZER UW; E. I. du Pont de Nemours and Company)(以下UW群)を用いた。60分後すべてのクランプを開放して阻血を解除し, あらかじめ肝部下大静脈内に挿入留置したカテーテルより肝臓上部および肝臓下部大静脈を遮断下に5分間の肝臓よりの流出される血液を採取した。

(3) 灌流液の測定

肝阻血終了直後の流出液中のs-GOT, m-GOT, Cathepsin D, TXB₂, PGE₂, 6keto PGF_{1α}, c-AMPにつき測定した。s-GOTはReitman-Frankel法により測定し, 単位はKarmen単位で表示した。カテプシンD活性の測定はAnsonら⁶⁾の方法に従い, 単位体積あたりの活性値で表示した。

TXB₂, 6keto PGF_{1α}, PGE₂, c-AMPはおのおのradioimmunoassay法にて測定した。

(4) 組織学的検討

肝灌流終了時の肝組織を採取し, 10%中性ホルマリンで固定後, ヘマトキシリン・エオジン染色し光学顕微鏡下に組織所見を対比した。同時に同部位を3%グルタルアルデヒド・0.1%カコジル酸緩衝液で固定し, 1%オスミウム酸で後固定したものをエポン包埋し, 中間帯を選び, 透過型電子顕微鏡での観察に供した。また, エポン包埋組織を1μmの厚さに薄切し, トリジンブルー染色後, 肝細胞の腫脹度を定量化するための肝実質細胞面積比を測定した。すなわち, 単位面積あたりに占める全肝細胞の面積の割合をコン

ピューター連動の画像解析装置(Aspect Ver. 4.0)を用いて計測した。

(5) その他

数値はmean±SDで表記し, 統計学的検討は多群比較では分散分析(ANOVA)を用い, 2時間の比較ではStudent t検定を用いて行い, p<0.05をもって有意とした。

結 果

(1) 肝灌流液中の生化学検査値

肝阻血灌流60分後各群の灌流液中s-GOTの値は無灌流群で灌流を行った5群すべてに対して有意に高い値を示した(p<0.05)(Table 1)。また25°C LR群と4°C LR群間には差をみないが25°C LR群, 4°C LR群ともに各NM添加群において有意のs-GOTの低下を認めている(p<0.05)。しかしながらカテプシンD, m-GOT値では無灌流群に対しどの灌流群においても抑制傾向はみられるが明らかな差異はみられなかった。

灌流液中各種プロスタノイドおよびc-AMPの値を比較すると, TXB₂, 6keto PGF_{1α}では, 無灌流群は他灌流群すべてに比べ有意に高値を示している(p<0.001)(Table 2)。また4°C NM群, 25°C NM群では4°C LR群, 25°C LR群に比べTXB₂は有意の低下を示し(p<0.05), また同時に6keto PGF_{1α}の低下も認められている(p<0.05)。また4°C NM群はUW群に比較してもTXB₂, 6keto PGF_{1α}の低下は有意であった(p<0.05)。一方PGE₂値はUW群において高値を示し, 他5群に比べ有意に高値を示した(p<0.01)。またc-AMP値も, UW群は高値を示し, 他の5群に比べ有意に高値を示した(p<0.01)。PGE₂, c-AMPではNM添加群と非添加群の間に全く差異はみない。

(2) 体内分離肝灌流群の肝組織所見

Table 2 TXB₂, 6keto-PGF_{1α}, PGE₂ and c-AMP levels in perfusate

	TXB ₂	6keto-PGF _{1α}	PGE ₂	c-AMP
no perfusion	18,800±3,580*	908±127*	256±102	0.60±0
25°C LR	1,502±398	235±67	49±32	0.60±0
4°C LR	2,088±905	297±166	226±179	0.65±0.11
25°C NM	665±542	98±70	119±97	0.60±0
4°C NM	709±383	83±31	39±51	0.60±0
UW	5,113±2,992	190±95	622±347**	2.97±2.03**

Mean±SD
N=4 *p<0.001 vs perfusion group **p<0.01 vs any other group

Fig. 1a Histological findings of liver tissue after 60 minutes ischemia without perfusion (Hematoxylin and eosin stain. ×33)

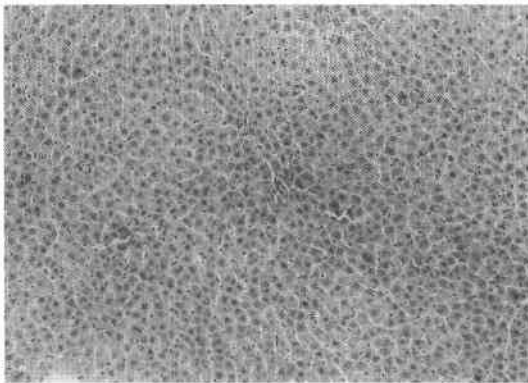
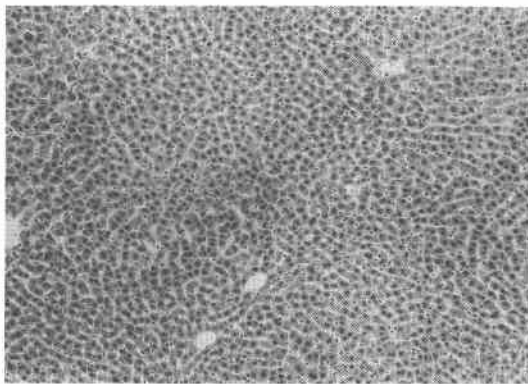


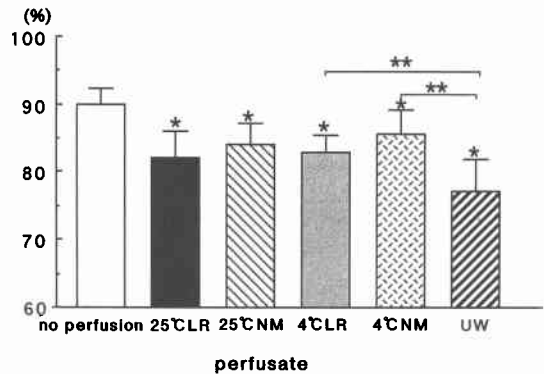
Fig. 1b Histological findings of liver tissue after liver perfusion for 60 minutes with 4°C UW (Hematoxylin and eosin stain. ×33)



無灌流群の60分間の阻血直後の肝組織像では肝細胞の腫脹が著明で類洞の狭小化が見られ、好酸性変性、核の濃縮を示す細胞が散在している (Fig. 1a).

一方、灌流群においてはすべての群で肝細胞の好酸

Fig. 2 Morphometric analysis of hepatocytes volume after liver perfusion for 60 minutes



data was shown as mean±SD
n = 4 * p < 0.01 vs no perfusion
** p < 0.01

性変性は認められないが、肝細胞腫脹は軽度認められた。しかし UW 群では肝細胞腫脹は極めて軽微であった (Fig. 1b)。画像解析での肝細胞面積比は無灌流群では灌流群すべてに比べ有意な (p<0.01) 肝細胞面積比の増大が見られた (Fig. 2)。また UW 群は 4°C LR 群、4°C NM 群に比べおのおの p<0.01 の有意な面積比の低下を示し、灌流群の中で最も強い肝細胞面積比の増大の抑制が示された。

無灌流群の透過電子顕微鏡所見では、類洞内皮細胞の高度な腫脹および連続性の消失がみられ、類洞内には Bleb が充満していた (Fig. 3a)。それに対し 4°C LR 群、4°C NM 群では類洞内皮細胞の腫脹は軽減され、連続性も維持されていた。しかし LR 単独では類洞内皮細胞小孔が拡大し、類洞内 Bleb 形成の抑制はみられなかった。NM 添加群では類洞内皮細胞小孔の拡大は抑えられ、類洞内の Bleb 形成もみられず、Disse 腔側の microvilli もよく保たれているのが観察された (Fig. 3b, 3c)。一方、UW 群は類洞内皮細胞の腫脹は

Fig. 3a Electromicroscopic views of sinusoid after 60 minutes ischemia without perfusion (bar=1 μ m)

EC: endothelial cell, B: bleb, H: hepatocyte, SL: sinusoidal lumen, ER: erythrocyte

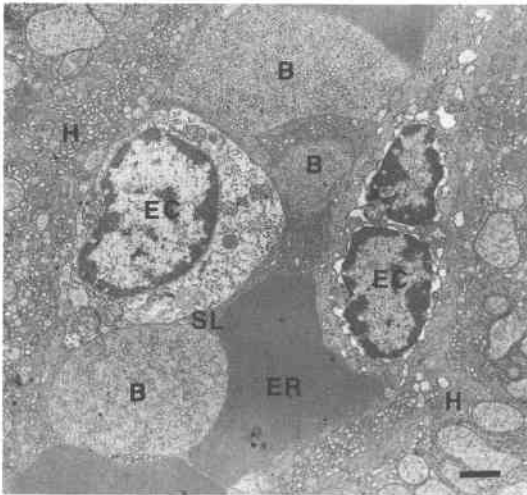


Fig. 3b Electromicroscopic views of sinusoid after 60 minutes perfusion with 4°C LR (bar=1 μ m)

EC: endothelial cell, B: bleb, H: hepatocyte

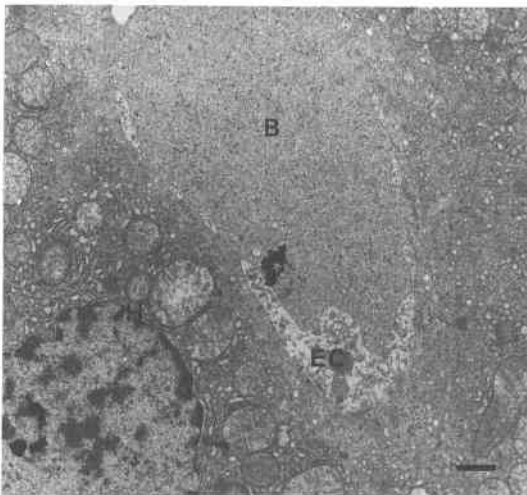


Fig. 3c Electromicroscopic views of sinusoid after 60 minutes perfusion with 4°C NM (bar=1 μ m)

EC: endothelial cell, H: hepatocyte, SL: sinusoidal lumen, D: space of Disse, MV: microvilli

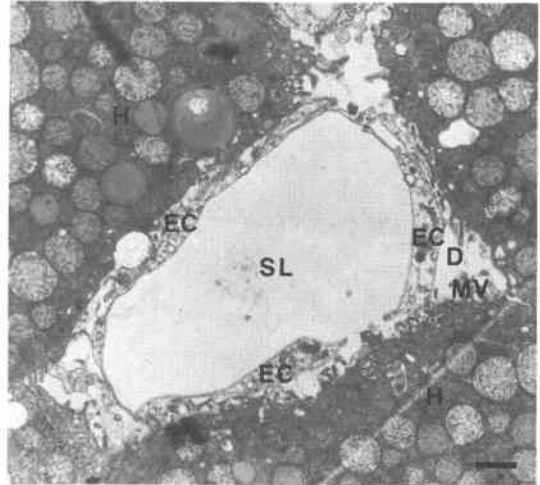
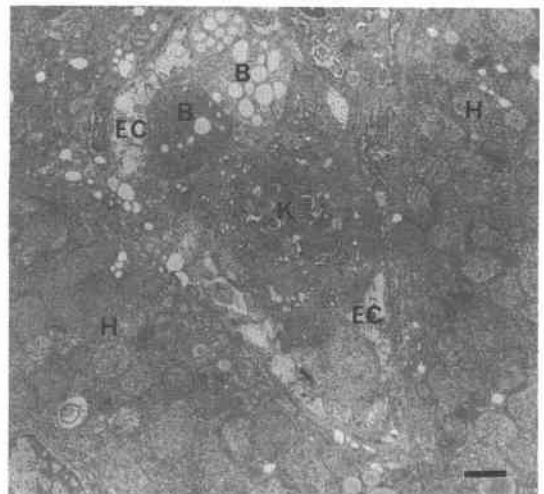


Fig. 3d Electromicroscopic views of sinusoid after 60 minutes perfusion with 4°C UW (bar=1 μ m)

EC: endothelial cell, B: bleb, H: hepatocyte, K: Kupffer cell



他の灌流群と同様軽減されていたが、連続性は消失し、類洞内 Bleb 形成も認められた (Fig. 3d).

考 察

近年、肝臓外科手技の進歩により、腹部下大静脈や肝静脈へ浸潤した癌腫に対しても hepatic vascular

exclusion 法¹⁾や biopump を用いた体外循環下の体内分離肝灌流法²⁾³⁾により安全な切除が行えるようになり、大量出血を避けるとともに、肝細胞保護の目的とした手段が臨床応用されてきている。これら肝切除時

の肝阻血時間の限界はいまだ十分には明らかにされておらず、Fortner ら⁷⁾は臨床例において肝切除時に体内分離肝灌流を応用し、120分間の肝阻血が可能であることを報告している。しかしながらこの報告においても肝切除量と肝阻血灌流時間に関しては明らかにされていない。また肝切除対象例の肝機能障害度による許容時間の差異についての報告は Nagasue ら⁸⁾により硬変肝における体内分離肝灌流法の臨床例での有用性が報告されているくらいで、長時間の阻血時の安全性に関するデータはほとんどないといえる。

進行肝胆道癌において、下大静脈や肝静脈などの再建を要する場合はその阻血時間も長くなり、十分な安全策を講じた上で肝阻血下の肝切除を行うべきであり、その意味で Biopump 下の体外循環を用いた体内分離低温肝灌流法の意義があるといえる。本研究ではその体内分離肝灌流に用いる灌流液である乳酸リンゲル液に、抗凝固作用、抗血栓作用を有し微小循環確保に有用性が期待される Nafamostat mesilate⁹⁾を併用し、その効果をラットを用いた in-situ の肝灌流モデルにおいて、肝内微小循環における抗血栓性および抗凝固性を生化学的ならびに組織学的レベルにおいて肝細胞および類洞内皮細胞障害に与える影響を検討した。本実験データからわかるように灌流液中へ流出される s-GOT 値でみる肝細胞障害度は無灌流群が最も強く、それに比べ肝灌流を行った群はすべて有意に肝細胞障害は軽減されており、さらに NM 添加によりその効果は増強されていた。しかしながら m-GOT, Cathepsin D においては s-GOT のような灌流による障害の抑制傾向はまったく認められていない。これはこれら酵素の細胞外逸脱には s-GOT の場合のような細胞膜の透過性亢進程度による逸脱ではなく、細胞膜の破綻すなわち細胞壊死レベルの障害により初めて逸脱されるためと考えられる¹⁰⁾。すなわち本実験で行った60分間肝阻血では肝細胞壊死のじゃっ起は通常ほとんど無いと予想される。TXB₂, 6keto PGF_{1α} の灌流液への遊出は阻血下肝灌流時の肝内微小循環において形成される微小血栓により TXB₂ は血小板より放出され、それに対し反応性に血管内皮細胞より 6keto PGF_{1α} が産生放出されてきたものと考えられる¹¹⁾。すなわち TXB₂ および 6keto PGF_{1α} の値は本モデルにおいて肝内で形成された微小血栓の多寡に依存すると考えられる。その観点からみると、肝灌流群でのこれらの値は無灌流群と比較するとその低下は著明であり、NM 添加を行うことにより微小血栓形成の抑制効果がより一層増

強されたと考えられる。その結果 s-GOT 値の低下で表される肝細胞障害も軽減されたものと判断しうる。

NM に関しては抗凝固作用以外に蛋白分解酵素阻害作用があり、とくに阻血細胞膜において活性化される phospholipase A₂ に対しても強い酵素阻害作用を有することが示されている¹²⁾。この phospholipase A₂ 阻害により細胞膜リン脂質の分解により生成されるアラキドン酸生成を抑制し、その結果 TXB₂ や、6keto PGF_{1α} といった cyclo-oxygenase 系のプロスタノイドの産生が低下したという機序も十分考えられる。NM のこの効果を臓器保存液として広く有用性が示され頻用されている UW 液を用いた肝灌流と比較したわけであるが、灌流時に遊出されてくる s-GOT, TXB₂ や 6keto PGF_{1α} の値からみると NM 群が UW 群に比べその抑制効果が強くみられていた。Clavien ら¹³⁾は肝臓の冷保存時の障害での類洞内皮細胞剥離に可溶性物質の関与を示しており、蛋白分解酵素阻害剤によりこの障害が抑制しうることを報告している。NM の蛋白分解酵素阻害作用がこの点で作用を示し、肝阻血時の類洞内皮細胞障害の軽減効果をもたらしたことが推測された。

一方、肝細胞面積比すなわち肝細胞腫脹の程度と各種灌流液の関係では従来の報告¹⁴⁾にみられるように、UW 液の肝細胞腫脹抑制効果は極めて著明であることが同様に示された。この効果は灌流液中の生化学値とは全く相関しないものであり、UW 液の特異な高浸透圧性による細胞浮腫抑制効果と考えられる。すなわち肝阻血時の類洞内皮細胞障害機構に関与することなく直接、肝細胞浮腫を抑制しているものであり、NM にはこのような肝細胞浮腫抑制効果はみられなかった。すなわち NM と UW による肝阻血時肝灌流での肝細胞保護効果は NM が肝類洞内皮細胞障害抑制を介したものが主であるのに対し、UW では肝細胞に対する直接の効果特に肝細胞浮腫の抑制がおもな作用機構と考えられた。電顕での検討においても肝臓の類洞内皮細胞の観察では LR 群や UW 群では内皮細胞の連続性の欠如や内皮小孔の拡大が認められているのに対し NM 群におけるこれら類洞内皮細胞障害の抑制が極めて著明であることが確認された。

阻血時の肝細胞障害発生機構において従来いわれていた、阻血再灌流障害および阻血中の類洞内皮細胞を中心とした微小循環障害が大きな役割を持つことが近年報告¹⁵⁾されてきており、再灌流前の阻血時における類洞内皮細胞障害を極力軽微に抑えることはその後の

再灌流障害の発生を含めて極めて重要なことと考えられる。本実験では実地臨床で用いている *in situ* の阻血下肝灌流時の肝障害を基礎的に検討したわけであるが、LR や UW による灌流を行っていても強い類洞内皮細胞障害がじゃっ起され、その結果、微小循環における血栓形成ひいては肝細胞障害も誘導されていると判断された。これらに対し NM の添加による肝灌流時には極めて強い類洞内皮細胞障害の抑制効果を示し、かつ阻血時の類洞内微小血栓形成を軽減し、微小循環を良好に保ちえていると考えられた。NM による肝細胞障害の軽減効果はこれら微小循環改善作用に大きく依存していると思われ、肝阻血時の肝灌流に際し NM 添加による灌流は類洞内皮細胞障害の軽減として有用と考えられ、現在我々は進行肝胆道癌の HIHP 下肝切除に際し NM を用いた肝灌流を行っている。本実験データで示したように阻血時の肝灌流における類洞内皮細胞障害に対し NM は強い抑制効果を示したことよりこの面からの検討が期待される。

また本実験で肝細胞腫脹の抑制効果の最も顕著であった UW 群では特異的な変化として、灌流液中への PGE₂ および c-AMP の遊出の増加がみられた。UW 液中に含まれる ATP 前駆物質である Adenosine が阻血時の ATP 消費下での ATP 生成亢進に寄与していると考えられる¹⁶⁾が、それが細胞内シグナル伝達物質である c-AMP の産生上昇として表れていると考えうる。PGE₂ は肝臓にその肝細胞保護効果が Stachura¹⁷⁾により示されており、また PGE の肝細胞保護効果発現には肝細胞内の c-AMP の上昇が関与するといった報告も見られている¹⁸⁾。本実験ではほかのプロスタノイドに比べ UW 群で PGE₂ のみが顕著に上昇しており、cyclo-oxygenase 系の産生促進とは考えにくく、UW 液による直接的な間葉系細胞での PGE₂ 産生亢進であると思われるが、その詳細は不明である。

以上、*in-situ* の阻血下肝灌流時には、LR 液の肝灌流下でも極めて強い類洞内皮細胞障害がじゃっ起されており、その結果、肝細胞障害が誘導されることが考えられるが、その際 NM 添加により類洞内皮細胞障害は著明に軽減され、微小循環改善により肝細胞保護効果もたらされるものと期待される。

文 献

- 1) 宮崎 勝, 宇田川郁夫, 越川尚男ほか: 腹腔内 Total hepatic vascular exclusion 法. 手術 43: 535—539, 1989
- 2) 小山研二, 鹿嶋秋五, 浅沼義博: 肝血行遮断下分離

低温灌流法の確率とその応用. 日消外会誌 21: 1211—1214, 1988

- 3) 宮崎 勝, 伊藤 博, 海保 隆ほか: 体内分離肝灌流下の肝切除の検討. 手術 47: 549—553, 1993
- 4) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al: Reversal of lethal, chemotherapeutically induced acute hepatic necrosis in rats by regenerating liver cytosol. Surgery 94: 142—149, 1983
- 5) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al: Protection of thermo-chemotherapeutic-induced lethal acute hepatic necrosis in the rat 16, 16-dimethylthyl prostaglandin E2. J Surg Res 34: 415—426, 1983
- 6) Anson ML: The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. J Gen Physiol 20: 65—574, 1936
- 7) Fortner JG, Shin MH, Kinne DW et al: Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion. Ann Surg 180: 644—652, 1974
- 8) Nagasue N, Yukasa H, Sehiro S et al: Tolerance of the cirrhotic liver normothermic ischemia. Am J Surg 147: 772—775, 1984
- 9) 程塚佳子, 藤山佳秀, 馬場忠雄ほか: フサンの血小板抑制作用. 診療と新薬 29: 31—32, 1992
- 10) Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F et al: Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. Hepatology 6: 701—707, 1986
- 11) 溝口靖紘: 肝のアラキドン酸代謝とその生理的意義. 現代医療 23: 665—708, 1991
- 12) 岩城正広: フサンの酵素阻害作用. 診療と新薬 29: 28—30, 1992
- 13) Clavien A, Sanabria S, Upadhaya R et al: Evidence for the existence of a soluble mediator of cold preservation injury. Transplantation 56: 131—142, 1993
- 14) Neville J, Ralf S, Susanne L et al: Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. Transplantation 46: 517—522, 1988
- 15) Rao P, Walsh T, Makowka L et al: Purine nucleoside phosphorylase A new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. Hepatology 11: 193—198, 1990
- 16) Toda S, Nevy J, Yanaga K et al: Extended preservation of human liver grafts with UW solution. JAMA 261: 711—714, 1989
- 17) Stachura J, Tarnowski A, Ivey KJ et al: Prostaglandin protection of carbon-tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. Gas-

troenterology 81 : 211-217, 1981

18) 志村賢範, 宮崎 勝, 越川尚男ほか: 障害肝の肝切

除時における Prostaglandin-E1 投与の意義に関する基礎的検討. 日外会誌 86 : 1618-1624, 1985

Endothelial Cell Damage during Liver Ischemia and Protection using Hepatic Perfusion with Nafamostat Mesilate in Rats

Norio Yasuda, Masaru Miyazaki, Katsuhiko Inuma,

Masayuki Ohtsuka and Nobuyuki Nakajima

First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

In situ isolated liver perfusion was done during liver ischemia for 60 minutes in the rats. The effect of various perfusates and nafamostat mesilate (NM) on hepatic ischemic damage, especially on sinus endothelial cell damage, was assessed. Five different perfusate groups were assessed: group A (lactated Ringer [LR] at 25°C), group B (LR at 4°C), group C (LR with NM of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 25°C), group D (LR with NM of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 4°C), group E (University of Wisconsin solution at 4°C). The addition of NM in liver perfusion markedly inhibited the increases in GOT, TXB₂, 6 keto PGF_{1 α} in the perfusate. The swelling of hepatocytes was significantly suppressed in group E. However, the sinus endothelial cell damage was most remarkably reduced by addition of NM (group C and D). Hepatic perfusion with NM might achieve its hepatoprotective effect by reducing sinus endothelial cell damage during liver ischemia.

Reprint requests: Masaru Miyazaki The First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

1-8-1 Inohana, Chuoku, Chiba, 260 JAPAN
