

硬さセンサーを用いた肝線維化の定量的評価に関する基礎的検討

福島県立医科大学第2外科, 日本大学工学部電気工学科*

小野 俊之 畠山 優一 原 潔 五十嵐 渉
佐藤 尚紀 小山 善久 井上 典夫 土屋 敦雄
阿部 力哉 尾股 定夫*

肝細胞癌は慢性肝炎や肝硬変を伴うため、手術に際し肝臓の切除量が制限される。この切除量を決定するためにさまざまな評価法が報告されてきたが、我々は肝臓の性状、すなわち肝臓の線維化の程度から肝臓の耐術能を評価する方法を報告してきた。本研究では生検せずに肝臓の線維化を定量化する試みとして、硬さセンサーを用いて肝臓の硬さを測定する意義を検討した。Thioacetamide(以下、TAA と略)を投与して肝硬変ラットを作成し、既報に従って肝線維化率を求めた。またセンサーでは、肝の硬さの指標として Δf , stiffness の値を得た。そしてそれらの相関関係を調べた。肝線維化率は Δf と $r=0.706$, $p<0.0009$, また stiffness と $r=0.850$, $p<0.0001$ であり、いずれも有意な正の強い相関関係を得た。すなわち硬さセンサーは肝の線維化を客観的に容易にかつ迅速に数量化する上で有用であると考えられた。

Key words: hepatic fibrosis, liver cirrhosis, hardness in liver

緒 言

本邦における肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を高率(70~80%)に合併している。肝癌切除にあたっては病巣切除と残肝の予備能との両面から考えなければならず、慢性肝疾患合併時には術後肝不全を避けるためにも、肝切除量が制限されることになる。1992年1月~1993年12月までの2年間で、本邦で報告されている原発性肝細胞癌13,381例中死亡総数は3,117例(不明例1,198例は除く)で、肝不全による死亡は1,014例(32.5%)に認められていた¹⁾。この中には肝切除時に肝機能の評価が不適切なため、肝不全となった症例も少なくないと推測される。術後の肝不全を回避するためには切除量の設定に十分な検討が必要と考えられる。これまで各施設よりさまざまな術前の評価法^{2)~4)}が報告されてきたが、慢性肝炎から肝硬変にいたる間質の変化に着目し、その線維化の進展を耐術能の評価に用いた報告はなかった。

我々は肝臓の線維化の程度を自動画像解析装置を用いた肝線維化率として評価する方法を報告してきた⁵⁾が、本研究では肝生検をすることなく線維化の程度を評価することを試み、硬さセンサーを用い肝臓の硬さ

を測定しその意義について基礎的に検討した。

材料および方法

1. 実験動物

実験には5週齢のWistar系雄ラット(Japan SLC, Inc)を32匹用いた。餌は固形資料CE-2(日本クレアKK)を用い、自由飲食水として飼育した。

2. 肝線維化モデルの作製および群分け

上記ラットにTAAを200mg/kg、週3回腹腔内に投与した。8, 10, 12週間の連続投与によって慢性肝炎から肝硬変にいたる各段階の肝線維化モデルを作製した。TAAの12週間投与をA群、10週間投与をB群、8週間投与をC群とし、生理食塩水(以下、生食と略)のみ12週間腹腔内に投与した対照群をD群とした。B群ではTAA投与前2週間、C群では4週間腹腔内に生食を投与し、いずれの群も腹腔内の総投与週数を12週間とした(Fig. 1)。

3. 標本採取

12週の投与スケジュールを経た後、ラットを全身麻酔下に開腹した。下大静脈にカニューレーションをして血清GPT, ALP, HPT, T-BilおよびPTを測定のため採血した後に、全肝を摘出した。

4. 硬さセンサー

硬さの測定には尾股⁶⁾の開発した硬さセンサーを用いた。センサーの基本的な原理は接触コンプライアン

<1997年1月8日受理>別刷請求先: 小野 俊之
〒960-01 福島市光が丘 福島県立医科大学第2外科

Fig. 1 Schedule of experimental model

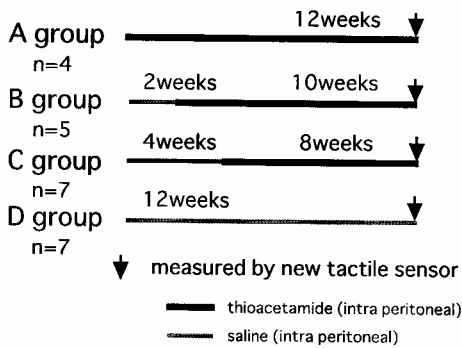
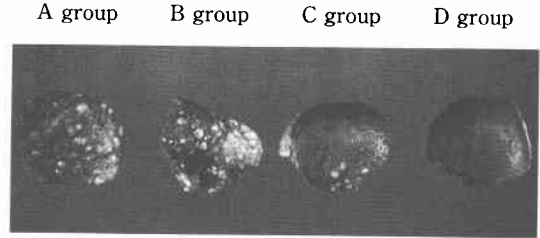


Fig. 2 Macroscopic findings of the liver in each group



ス法の1つで有限長棒の固有振動数が、付加される音響インピーダンスにより変化する現象を利用してゐる。センサー部は振動と検出素子により構成される。検出素子からの出力信号を増幅し異相フィルターを経て再び振動子へフィードバックすることで発振回路系としている。このセンサーを標本に接触させると回路系全体の共振周波数が変化する。センサー先端部が球形のため、押し当てている物質が軟らかければ接触面積が増大して質量効果となり共振周波数はマイナス側に増加し、硬ければ点接触となりスティフネス効果となるのでプラス側に増加する。このときの周波数変化量は付加された物質の硬さによって異なるのでそこから物質の硬さに関する特性が求められる^{6)~8)}。

すなわち、硬さセンサーより Δf および stiffness の測定値が得られ、これらを硬さの指標とした。 Δf は周波数の変位 (Hz) であり、stiffness は応力歪み反応 (g/cm) を表している。

5. 肝臓の硬さの測定

摘出した肝臓は直ちに左内側葉の任意の5~6か所で硬さセンサーでは Δf および stiffness を測定した。測定時は肝臓の表面の湿潤に注意し随時生食を散布し乾燥を避けた。

6. 肝線維化率の測定

摘出した肝臓を20%ホルマリンに固定後パラフィンに包埋して組織標本を作製した。はじめに HE 染色標本でそれぞれの病理組織像を観察した。次に既報のとおり肝線維化率の測定を行った⁹⁾。すなわち組織標本にアザン染色⁹⁾¹⁰⁾を行い、核および細胞質を赤色に、膠原線維を主体とした間質を青色に染色した。肝線維化率の測定には自動画像解析装置 Color Image Processor SPICCA-II(日本 Avionics 社)¹¹⁾を用い、アザン染色標本の顕微鏡像を装置に取り込んだ。さらに「色彩

注出法」により画面上の青く染色されている部位を指定してコンピューターに選択色を記憶させ、選択色の部位と非選択色の部位に二値化処理 (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割合を求め、8視野の平均値を肝線維化率 (%) とした。

7. 統計学的検討

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 の相関係数を求めて行った。p<0.05をもって統計学的に有意と判定した。

結 果

TAA の投与スケジュールを終えた23匹を実験に供した。A 群は8匹中4匹、B 群は8匹中5匹、C 群は8匹中7匹、D 群は8匹中7匹を用いた。残りの9匹は TAA の投与中に死亡した。

1) 肝の肉眼所見

A, B 群では多数の中~小の結節性変化が肝全体にわたりみられ、C 群での結節性変化の数は極めてわずかであった。D 群には結節形成がみられなかった (Fig. 2)。

2) 組織学的変化 (H.E 染色)

A 群 B 群では、大小不同の multilobular 様の偽小葉による小葉改築があり、それを囲むように偽小葉間組織、特に線維成分の増生がみられ三宅分類の乙型肝炎に相当した (Fig. 3a)。C 群では、グリソン鞘および中心静脈を中心に円形細胞の浸潤と一部に線維化が認められるが、小葉構造の改築はなく慢性肝炎の像 (Fig. 3b) を呈した。この結果から A 群、B 群を肝硬変群、C 群を慢性肝炎群とすることにした。対照の D 群は組織学的変化は認めず正常肝であった (Fig. 3c)。

3) 肝線維化率 (Hepatic Fibrosis Ratio : 以下、HFR と略)

各群の HFR の平均値は A 群が $8.7 \pm 3.7\%$ 、B 群が $10.1 \pm 4.2\%$ 、C 群が $4.2 \pm 1.6\%$ 、D 群が $0.6 \pm 0.5\%$ で

Fig. 3a Microscopic findings of the liver in the A and B group (H.E. ×25)
liver cirrhosis group

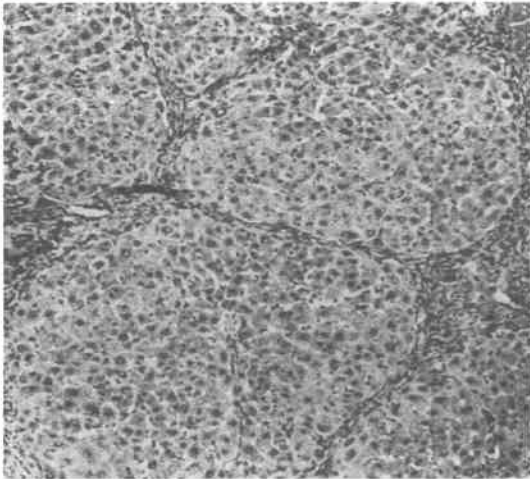


Fig. 3b Microscopic findings of the liver in the C group (H.E. ×25)
chronic hepatitis group

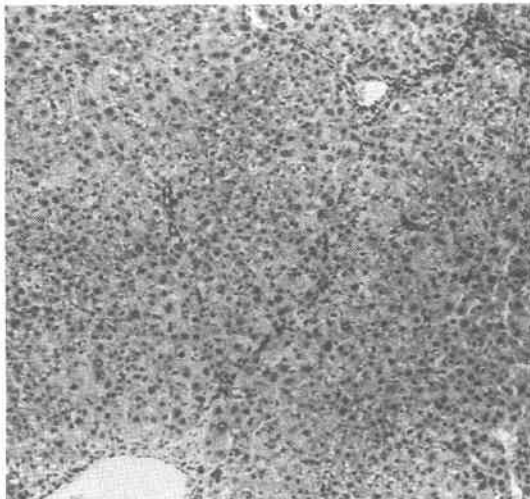


Fig. 3c Microscopic findings of the liver in the D group (H.E. ×25)
control group

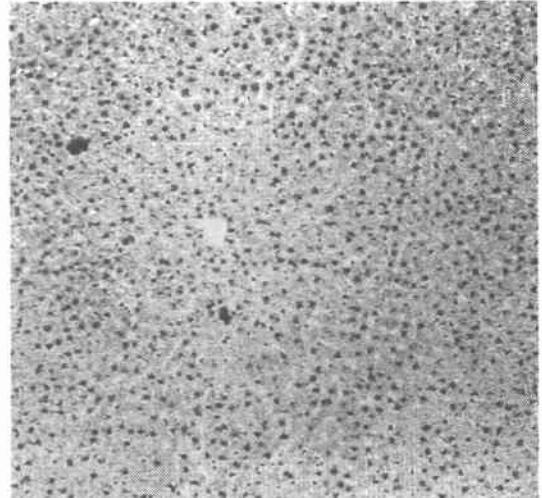


Table 1 Measurement of liver collagen content with Azan stained using computed color image analysis

group	Hepatic Fibrosis Ratio (%) (mean)
A	8.7
B	10.1
C	4.2
D	0.6

*p<0.01

Table 2 Measurement of the hardness in liver using new tactile sensor

group	Δf (Hz) (mean)	stiffness (g/cm) (mean)
A	-2,252.1	9.48
B	-2,233.2	9.97
C	-2,542.7	7.95
D	-2,920.6	5.43

*p<0.01

あった (Table 1)。肝硬変の A, B 群間には HFR に有意な差はなかったが、肝硬変群 (A, B 群)、慢性肝炎群 (C 群)、対照群 (D 群) のそれぞれの間には統計学的に有意差があった (AC 群間 $p=0.0168$, AD 群間 $p=0.0002$, BC 群間 $p=0.0063$, BD 群間 $p=0.0001$, CD 群間 $p<0.0001$)。以上により肝の線維化の程度は HFR で定量的に測定することができた。

4) 硬さセンサーの測定値

各群の Δf (Hz) および stiffness (g/cm) の測定値はおのおの A 群 $-2,252.1 \pm 286.6$ および 9.48 ± 1.07 , B 群 $-2,233.2 \pm 176.6$ および 9.97 ± 0.71 , C 群 $-2,542.7 \pm 298.6$ および 7.95 ± 0.77 , D 群 $-2,920.6 \pm 368.3$ および 5.43 ± 0.84 であった (Table 2)。 Δf は肝硬変 (A, B) 群と慢性肝炎 (C) 群との間は $p=0.0341$, 肝硬変 (A, B) 群と対照 (D) 群との間は $p=0.0004$

Fig. 4 Correlation between Δf and Hepatic Fibrosis Ratio in all rats

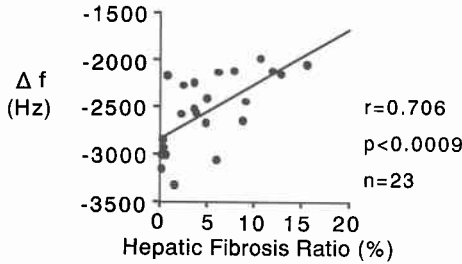
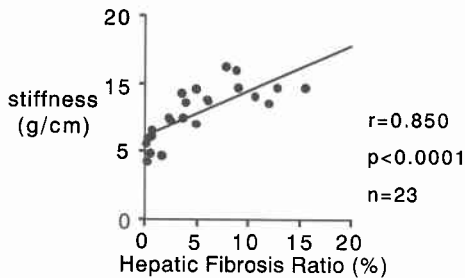


Fig. 5 Correlation between stiffness and Hepatic Fibrosis Ratio in all rats



であり、統計学的に有意差があった。また慢性肝炎(C)群と対照(D)群との間は $p=0.0567$ であり有意な差の傾向があった。Stiffnessでは肝硬変(A, B)群と慢性肝炎(C)群との間は $p=0.0007$ 、肝硬変(A, B)群と対照(D)群との間は $p<0.0001$ 、慢性肝炎(C)群と対照(D)群との間は $p<0.0001$ であり、いずれの間にも統計学的に有意差があった。すなわち線維化の程度が増すに伴い、硬さセンサーによって測定した Δf 、stiffnessの値がともに大きくなり肝臓の“硬さ”を反映する成績であった。

5) HFRと Δf およびstiffnessとの関係

HFRと Δf との間には $r=0.706$ 、 $p<0.0009$ と有意な正の強い相関関係が得られた(Fig. 4)。HFRとstiffnessとの間にも $r=0.850$ 、 $p<0.0001$ と有意な正の強い相関関係が得られた(Fig. 5)。以上の結果から Δf およびstiffnessはいずれも肝線維化率をよく反映しており、硬さセンサーは肝表面の硬さを測定することで、肝臓の線維化の程度を容易にしかも客観的に数量化することができた。

6) Δf と血液生化学的検査値の関係

A~D群の肝臓摘出時のGPT, ALP, HPT, T. Bil, PTと硬さセンサーで得た Δf との相関関係を調べた。 Δf とGPTでは $r=0.485$ 、 $p=0.008$ 、ALPとでは $r=$

0.675 、 $p=0.0002$ 、HPTとでは $r=-0.746$ 、 $p=0.0001$ と統計学的に有意な相関が得られた。 Δf とT. Bil, PTとの間には相関がなかった。

考 察

肝細胞癌は肝硬変などの慢性肝疾患を高率に合併するため、肝癌の手術に際し肝切除量の過剰が術後の肝不全を引き起こす原因となることがある。そのため肝臓自体の耐術能を適切に評価することが重要である。これまで肝切除量を決定するため、肝臓の予備能を中心とした機能的な評価法に関する研究が報告されてきた^{2)~4)}。これらの評価法は術後の肝不全を減少させることに大いに貢献してきた。肝硬変の程度は各種の臨床所見および血液生化学検査所見からある程度は類推することはできた。しかし、合併している慢性肝疾患の術前の評価が、肝臓の組織病理学的所見と解離していたり予測した術後経過と一致しないものもあり、組織学的所見を反映できる評価法が必要と考えられてきた。組織学的な線維化および炎症所見の程度を段階的にとらえ、スコア化させた histological activity index score (HAI score)¹²⁾のような評価法が1981年に報告された。しかしこれは観察者の主観に左右される面があつて、客観的な評価法はしがたいと考えられる。

そこで我々は肝臓の線維化と硬さということに着目し、さらに耐術能を評価することに応用できるかどうかを検討してきた。ラットで肝硬変モデルを作製後に肝部分切除を行い、肝組織標本にAzan染色を行い自動画像解析装置を用い線維化の程度を客観的に数量化して肝線維化率とした。さらに肝切除後の再生能をBrdU標識率からみると肝線維化率と有意な負の相関関係が得られ、肝線維化率は肝臓の再生能を評価し予測するのに有用であると結論した⁵⁾。しかしこれを臨床応用するには術前の肝生検による病理組織検査が必要となる。肝生検は侵襲的であり特に診断に時間を要することが問題となる。そこで肝生検を行わなくとも肝表面から肝の硬度を測定できれば、簡便性と迅速性との問題を解決できるのではないかと考えた。

つまり肝表面を硬さセンサーで走査することによって肝臓の線維の程度が数量化されることを研究の目的とした。

教室では尾股⁶⁾が開発した硬さ測定用触覚センサーを用いて、乳癌診断への臨床的応用を研究してきた。乳癌手術で摘出した標本を用いて測定した結果は本センサーは腫瘍、非腫瘍の区別だけでなく腫瘍組織型も判別することが可能であった^{7)~9)}。そこでこの硬さセ

ンサーを用いて“肝臓の硬さ”を測定することによって合併肝疾患を分類できるのではないかと考えた。まずこの硬さセンサーを肝表面に接触させ“肝臓の硬さ”を数値化できるかどうか検討した。硬さセンサーでは Δf およびstiffnessの2種の測定値を得ることができ、硬さの変化を Δf は周波数の変位としてとらえ、stiffnessは応力歪み反応からとらえたものである。いずれも正常肝臓、慢性肝炎、肝硬変と線維化が進行するにしたがい周波数変化量によって求められ、そこから標本の硬さに関する特性が得られた。測定値は正常肝、慢性肝炎、肝硬変のそれぞれの群間に統計学的に有意な差があり線維化(病的肝)の進行を反映していた。

さらに摘出標本で定量的に測定した肝線維化率との間には Δf およびstiffnessのいずれも有意な正の強い相関関係を見た。

すなわち硬さセンサーは、従来では簡易に得られなかった方法で、肝の線維化の程度を定量的に評価できると考えられた。しかもこの方法はリアルタイムかつ簡便であり侵襲性の少ない面でも優れていると考えられる。

文 献

- 1) 日本肝癌研究会：第12回全国原発性肝癌追跡調査報告(1992—1993)。日本肝癌研究会事務局，京都，1996
- 2) 岡本英三，山中若樹，加藤年啓：肝細胞癌の外科的

- 治療。癌と治療 16：40—45，1989
- 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 畠山優一，小野俊之，阿部力哉：肝線維化率からみた硬変肝切除後の肝再生に関する実験的研究。日消外会誌 29：691—698，1996
 - 6) 尾股定夫：圧電素子を利用した硬さ測定用触覚センサー。超音波 TECHNO 6：37—41，1992
 - 7) 原 潔，君島伊造，阿部力哉：硬さセンサーの乳癌診断への応用。乳癌の臨 11：78—79，1996
 - 8) Hara K, Motooka N, Omata S et al: Development of mammography instrument using new tactile sensor capable of sensing stiffness of tissue. Technical digest of the 14th Sensor Symposium: p101—104, 1996
 - 9) 朝隅啓子：結合組織の染色。アザン染色法。Med Technol 5：1022—1025，1977
 - 10) 三宅啓史：Thioacetamideによる実験的肝硬変の経時的形態像と数量化。聖マリアンナ医大誌 21：510—521，1993
 - 11) 日本アビオニクス株式会社編：イメージコマンド5098取り扱い説明書。日本アビオニクス株式会社，東京，1992，p243—247
 - 12) Knodell RG, Ishak KG, Black WC et al: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1：431—435，1981

A Trial Evaluation of Hepatic Fibrosis using New Tactile Sensor

Toshiyuki Ono, Yuichi Hatakeyama, Kiyoshi Hara, Wataru Igarashi,
Naoki Satou, Yoshihisa Koyama, Norio Inoue, Atsuo Tsuchiya,
Rikiya Abe and Sadao Omata*

Second Department of Surgery, Fukushima Medical College, College of Engineering
Nihon University*

We had reported that it was useful to evaluate of the degree of fibrosis in liver for determining the method of hepatectomy. In this study we examined the significance of measurement of the hardness in liver using new tactile sensor. Using the livers of rats that had been administrated thioacetamide (200 mg/kg, 3 times/week, intraperitoneal), we measured hepatic fibrosis ratio (HFR) by computed color image analysis and measured Δf and stiffness by new tactile sensor. We investigated correlation between HFR and Δf , stiffness. There was highly significant correlation between HFR and Δf ($r=0.791$, $p<0.0001$), stiffness ($r=0.844$, $p<0.0001$). Therefore new tactile sensor was very useful to appraise the hardness of liver simply and rapidly.

Reprint requests: Toshiyuki Ono Second Department of Surgery, Fukushima Medical College
1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-12 JAPAN