

原 著

肝転移成立における肝虚血再灌流の影響

東京医科大学外科学教室 (指導: 小柳泰久主任教授)

園田 一郎 青木 達哉 葦沢 龍人

血行性肝転移成立における肝虚血再灌流の影響を類洞内皮の ICAM-1発現の面から検討した。肝右葉虚血・腫瘍細胞非投与 (A)群では虚血側に ICAM-1の発現増強を認めた。肝非虚血・腫瘍投与 (B)群では12例中5例に肝転移を認めたが、右葉と中・左葉との間に転移結節に有意差は認めなかった。肝右葉虚血・腫瘍投与 (C)群と肝中・左葉虚血・腫瘍投与 (D)群では虚血側の転移結節は非虚血側に比較し有意に多く (C群: $p < 0.05$, D群: 片側検定 $p < 0.05$)、虚血側の ICAM-1発現増強が非虚血側と比較し有意に認められた。抗 ICAM-1抗体投与 (E)群では虚血側と非虚血側との間に転移結節数の有意差はなかった。以上により肝虚血再灌流による類洞内皮の ICAM-1発現増強に伴い、肝転移成立が促進されることが強く示唆され、また抗 ICAM-1抗体の投与による肝転移抑制の可能性が示された。

はじめに

従来、我々の教室では虚血前と再灌流後の intercellular adhesion molecule-1 (以下、ICAM-1と略記)の肝類洞内皮発現を Western-Blotting 法を用いて定量的に測定し、再灌流後の発現増強を報告してきた¹⁾。一方、臨床的に消化器癌の肝転移成立において ICAM-1を含む種々の接着分子が関与し、肝転移症例におけるそれら接着分子の血清値が非肝転移症例と比較して、有意に高値であることも多数報告されている²⁾⁻⁴⁾。

本研究では虚血再灌流後の ICAM-1増強の成績を踏まえ、転移性肝癌成立に及ぼす肝虚血再灌流の影響を実験モデルを用いて、肝類洞内皮における ICAM-1発現の面から研究した。

対象と方法

1. 実験動物および腫瘍

動物は、体重250~300gのF344雄性ラット(日本クレア)を使用し、腫瘍細胞はACL-15ラット大腸腫瘍株(理化学研究所)を用いた。

腫瘍細胞の培養は37°C CO₂インキュベーターオートクレーブ内で、250mlトラディショナルタイプ・フラスコに10% Fetal Bovine Serum Qualified (FBS)-RPMI 1640 (0.01% Antibiotic-antimycotic 添加) 20mlを培養液として行った。

2. 実験モデルおよび実験群

ラットはすべての実験群においてエーテル麻酔下に開腹した。

肝部分虚血再灌流モデルは肝右葉もしくは肝中・左葉への門脈枝および動脈枝を同時に30分間クランプ後再灌流し作製した。

ACL-15腫瘍細胞浮遊液はRPMIを加え 1.0×10^6 cells/mlに調節し、この腫瘍細胞浮遊液1mlを脾臓被膜下に投与した。

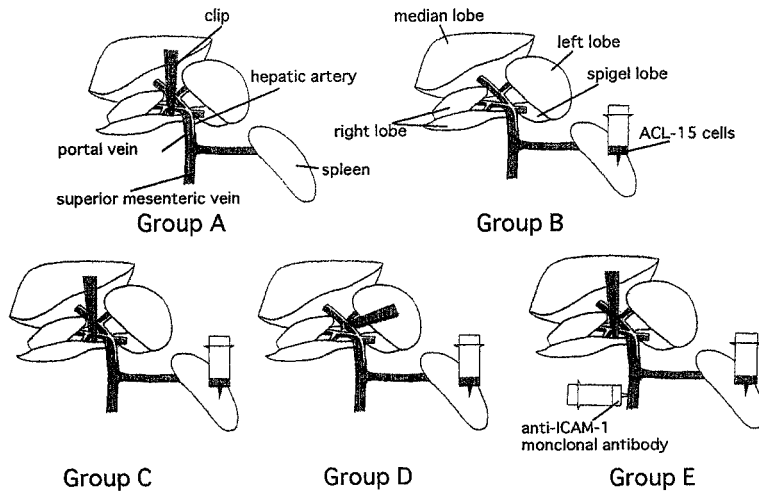
実験群はA群:肝右葉虚血・腫瘍細胞非投与群 (n=30), B群:肝非虚血・腫瘍細胞投与群 (n=36), C群:肝右葉虚血・腫瘍細胞投与群 (n=12), D群:肝中・左葉虚血・腫瘍投与群 (n=12), E群:肝右葉虚血・抗 ICAM-1抗体投与・腫瘍細胞投与群 (n=5)の5群とした (Fig. 1)。

A群は肝右葉虚血再灌流後、B群は腫瘍細胞浮遊液1mlを投与後、閉腹した。C群は肝右葉虚血再灌流後、D群は肝中・左葉虚血再灌流後、腫瘍細胞浮遊液1mlを投与したのち閉腹した。E群は肝右葉虚血再灌流5分後に、上腸間膜静脈分枝より anti-rat ICAM-1 monoclonal antibody (1A29 Y SEIKAGAKU CORPORATION) 0.8mg/kgを投与した。その後、腫瘍細胞浮遊液1mlを投与し閉腹した。

3. 肝類洞内皮 ICAM-1発現の検出分析 Western Blotting 法は鈴木ら¹⁾の方法に準じて施行した。泳動に供するサンプル溶液は蛋白質濃度を400 μ g/mlに調整し、量を1laneあたり100 μ gに統一して泳動を行った。また、同じ個体の開腹直後とラット犠死時の虚血側お

<2000年12月19日受理> 別刷請求先: 園田 一郎
〒160 0023 東京都新宿区西新宿6 7 1 東京医科大学外科学第三講座

Fig .1 Group A : Animals underwent 30 minutes of right-lobe ischemia by clamping. Group B : Animals were given splenic ACL-15 cells injection. Group C : After animals underwent 30 minutes of right-lobe ischemia, they were given splenic injection. Group D : After animals underwent 30 minutes median- and left-lobe ischemia, they were given splenic injection. Group E : After animals underwent 30 minutes of right-lobe ischemia, they were given anti-ICAM-1 monoclonal antibody through the superior mesenteric vein. And they were given splenic injection 5 minutes later.



よび非虚血側の検体は電気泳動・転写膜へのプロット・抗体処理・検出の際の条件を同じにするため同一泳動面で隣接させて電気泳動を行い、同一転写膜上で抗体処理を行い比較した。評価は小島⁹⁾による NIH Image を用いた電気泳動の画像解析法に準じ、NIH Image 1.61/fat を使用して90kD のバンドの平均濃度を測定した。虚血側と非虚血側の ICAM-1 発現の比較は開腹直後の90kD の ICAM-1 のバンドを基準とし、虚血側値/開腹直後値の比、非虚血側値/開腹直後値の比を求めて評価した。

4. 検討項目

A 群：再灌流直後，2，24時間後，1，2，3 週後にラットを犠牲させ，虚血側および非虚血側の Zone 1 および Zone 3における肝細胞の空胞変性，肝細胞索の乱れ，肝類洞の拡張を Hematoxylin-Eosin(以下，H.E. と略記)染色により比較した。なお，Zone 3(中心静脈周囲)，Zone 1(グリソン鞘周囲)は松本ら⁶⁾の血行力学的ポテンシャル勾配に基づく分類に従った。また，Western-blotting 法より類洞内皮の平均 ICAM-1 発現濃度比を計測した。

B 群：脾内投与 1，2，3 週後の脾結節および肝表面の転移結節数を計測した。

C および D 群：脾内投与 3 週後の肝虚血側および非虚血側の肝表面の転移結節数および脾結節の有無，類洞内皮の ICAM-1 発現濃度比，を比較した。さらに，肝虚血側の転移結節数と ICAM-1 発現濃度比の関連性を検討した。

E 群：脾内投与 3 週後の肝虚血側および非虚血側の肝表面の転移結節数を計測した。

5. 統計学的解析方法

B，C，D，E 群における肝右葉と肝中・左葉の転移結節数の比較および C，D 群における肝右葉と肝中・左葉の ICAM-1 発現濃度比の比較は Mann-Whitney の U 検定を用いた。また，各群の転移率の比較は Fisher の直接確率法を用いた。C，D 群における虚血側の転移結節数と ICAM-1 発現濃度比の関連性を調べるには Spearman の順位相関を用いた。なお，有意水準は便宜的に 0.05 に設定した。また，平均結節数は平均値 ± 標準偏差 (mean ± S. D.) で表示した。

成 績

1. A 群

(1) 肝細胞の空胞変性

最も顕著なのは虚血側 Zone 3 の中心静脈周囲の空胞変性であり，再灌流 2 時間後に 5 例中 4 例に認めら

れた。しかし、再灌流1週後には消失した。虚血側 Zone 1の肝細胞では再灌流2時間後に5例中1例に認められたが、再灌流24時間後には消失した。非虚血側 Zone 3の肝細胞では再灌流24時間後に5例中1例に認められた。非虚血側 Zone 1において、空胞変性は見られなかった (Table 1)。

(2) 肝細胞索の乱れ

虚血側 Zone 3では再灌流2時間後に5例中4例に肝細胞索の乱れが認められた。その後減少したが、再灌流1週後に5例全例に認められ、2峰性のピークを形成した。再灌流3週後にも5例中1例で明らかな乱れを認めた。虚血側 Zone 1でも再灌流2時間後に5例中4例に認められ、その後乱れが減少したが、再灌流2週後に再度増加し、再灌流3週後にも乱れを認めた。非虚血側 Zone 3および Zone 1では軽度に乱れを認めた (Table 1)。

(3) 肝類洞の拡張

最も顕著に認められたのは虚血側 Zone 3の類洞で、再灌流2時間後には5例全例に認められた。その後徐々に減少し、再灌流2週後には消失した。虚血側 Zone 1では再灌流2時間後に5例中3例に認められた。非虚血側 Zone 1の類洞においては変化を認めなかった (Table 1, Fig. 2)。

(4) 平均 ICAM-1発現濃度比

再灌流2時間後、24時間後、2週後、3週後においては非虚血側に比較し虚血側に ICAM-1発現の増強傾向

を認めたが、再灌流直後、1週後においてはほとんど差はなかった (Table 2, Fig. 3)。

2. B群

脾内腫瘍細胞投与1週後には脾結節は12例全例に認められたが、肝転移は認められなかった。

2週後には脾結節は12例全例に認められ、12例中3例 (25.0%) に肝転移 (平均総結節数 3.75 ± 9.35 個) を認めた。これら3例の肝右葉と中・左葉の転移結節数はそれぞれ10と21, 5と8, 0と1個であった。肝右葉の転移率は16.7%, 平均結節数は 1.25 ± 3.11 個であり、肝中・左葉の転移率は25.0%, 平均結節数は 2.50 ± 6.26 個であった。肝右葉と肝中・左葉の転移率を比較すると肝中・左葉の転移率が高い結果となったが、有意差は認めなかった。また、肝右葉の転移結節数と肝中・左葉の転移結節数との間に有意差は認められなかった。

脾内投与3週後では脾結節は12例全例に認められ、12例中5例 (41.7%) に肝転移 (平均総結節数 4.25 ± 9.63 個) を認めた。肝右葉の転移率は41.7%, 平均結節数は 1.75 ± 3.70 個、肝中・左葉の転移率は33.3%, 平均結節数は 2.50 ± 5.99 個であった。肝右葉と肝中・左葉の転移率を比較すると肝右葉の転移率がやや高い結果となったが、有意差は認められなかった。また、肝右葉と中・左葉の転移結節数の間に有意差は認められなかった (Table 3)。

3. C群 (右葉虚血)

(1) 肝表面転移結節数

Table 1 Pathological finding of the liver ischemia-reperfusion injury immediately and on 2 hours, 24 hours, 1 week, 2 weeks and 3 weeks after reperfusion in Group A. 5 cases in each of the terms were evaluated.

Pathological finding			Immediately	2 hours	24 hours	1 week	2 weeks	3 weeks
Vacuolation	R(I)	Zone 3	0	4/5	1/5	0	0	0
		Zone 1	0	1/5	0	0	0	0
	M.L(N-I)	Zone 3	0	0	1/5	0	0	0
		Zone 1	0	0	0	0	0	0
Disorder of the liver cell cords	R(I)	Zone 3	0	4/5	2/5	5/5	4/5	1/5
		Zone 1	0	4/5	2/5	1/5	3/5	2/5
	M.L(N-I)	Zone 3	0	1/5	1/5	1/5	0	0
		Zone 1	0	0	0	1/5	0	1/5
Sinusoidal dilatation	R(I)	Zone 3	0	5/5	2/5	1/5	0	0
		Zone 1	0	3/5	2/5	1/5	0	0
	M.L(N-I)	Zone 3	0	1/5	1/5	0	0	0
		Zone 1	0	0	0	0	0	0

R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes.(I) : ischemic lobes.

(N-I) : nonischemic lobes.

Fig. 2 Pathological finding of hepatic ischemia-reperfusion injury in Group A (H-E stain)

A : Almost normal liver tissue(Zone 3) B : Vacuolation of liver cells. On 2 hours after ischemia-reperfusion, ischemic lobe (Zone 3) C : Sinusoidal dilatation. On 24 hours after ischemia-reperfusion, ischemic lobe (Zone 3) D : Disorder of the liver cell cords. On 2 weeks after ischemia-reperfusion, ischemic lobe (Zone 3)

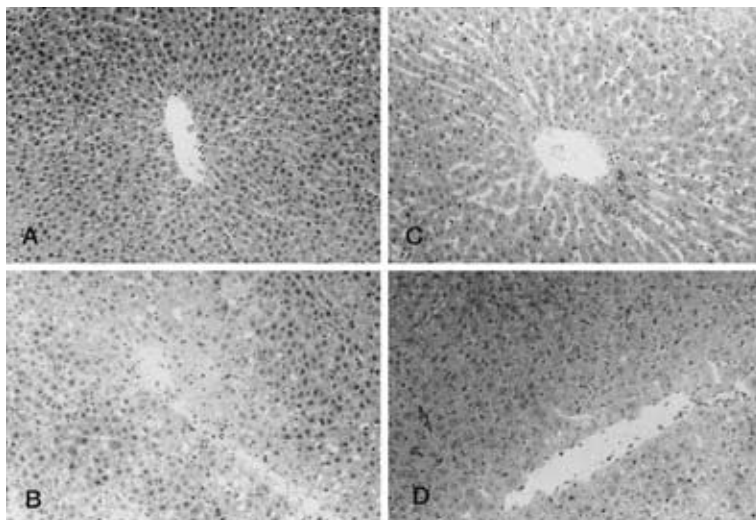


Table 2 The rate of ICAM-1 expression on the sinusoidal wall immediately and on 2 hours, 24 hours, 1 week, 2 weeks and 3 weeks after reperfusion in Group A. 2 of 5 cases in each of the terms were evaluated with means of Western blotting method.

Case	Immediately		2 hours		24 hours	
	R (I)	M. L (N-I)	R (I)	M. L (N-I)	R (I)	M. L (N-I)
1	1.17	1.12	1.37	1.21	1.51	1.28
2	1.22	1.45	1.41	1.09	1.96	1.76

Case	1 week		2 weeks		3 weeks	
	R (I)	M. L (N-I)	R (I)	M. L (N-I)	R (I)	M. L (N-I)
1	0.81	0.89	1.37	1.25	1.64	1.18
2	1.14	1.16	1.79	1.51	1.21	1.16

R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes. (I) : ischemic lobes.
(N-I) : nonischemic lobes.

12例中11例(91.7%)に肝転移(平均総結節数 10.75 ± 12.11 個)を認めた。肝右葉(虚血側)には11例(91.7%)の転移を認め、平均結節数は 8.33 ± 9.45 個であった。肝中・左葉(非虚血側)には8例(66.7%)の転移を認め、平均結節数は 2.42 ± 3.37 個であった。右葉(虚血側)

と中・左葉(非虚血側)の転移率を比較すると、有意差は認められなかったが、転移結節数は右葉(虚血側)が中・左葉(非虚血側)に比較し有意($p < 0.05$)に多かった。また、肝転移の認められた11例中10例(90.1%)は右葉(虚血側)に転移結節を多く認めた。脾結

Fig .3 The expression of ICAM-1 on the sinusoidal wall on 2 hours, 24 hours, 2 weeks and 3 weeks after ischemia-reperfusion in Group A. One of 2 cases in each of the terms was shown. We contrasted the ICAM-1 expression of ischemic lobe to pre-ischemic lobe with that of nonischemic lobe to preischemic lobe.

pre. : preischemic lobe.(I) : ischemic lobe.(N-I) : nonischemic lobe.

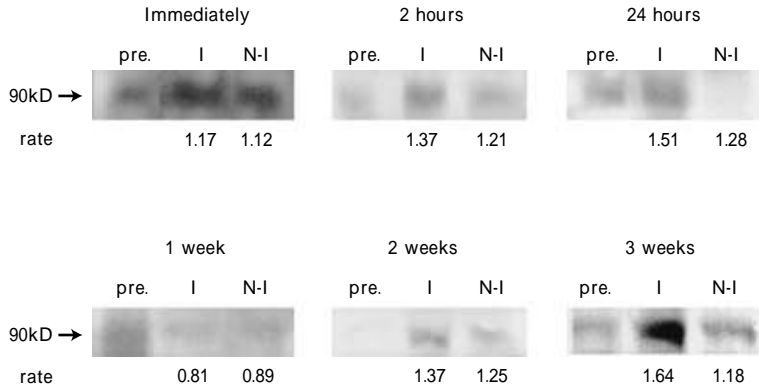


Table 3 The number of tumor foci, finding the surface of the liver in 1 week, 2 weeks and 3 weeks after splenic injection of ACL-15 cells in Group B. There was no significant difference between the number of foci on right lobes and that on median and left lobes.

Case	After 1 week			After 2 weeks			After 3 weeks		
	R	M. L	Spleen	R	M. L	Spleen	R	M. L	Spleen
1	0	0	+	10	21	+	13	21	+
2	0	0	+	5	8	+	2	4	+
3	0	0	+	0	1	+	3	2	+
4	0	0	+	0	0	+	1	3	+
5	0	0	+	0	0	+	2	0	+
6	0	0	+	0	0	+	0	0	+
7	0	0	+	0	0	+	0	0	+
8	0	0	+	0	0	+	0	0	+
9	0	0	+	0	0	+	0	0	+
10	0	0	+	0	0	+	0	0	+
11	0	0	+	0	0	+	0	0	+
12	0	0	+	0	0	+	0	0	+
mean ± S.D	0	0		1.25 ± 3.11	2.50 ± 6.26		1.75 ± 3.70	2.50 ± 5.99	
	N.S.			N.S.			N.S.		
metastases(%)	0%	0%		16.67%	25.00%		41.67%	33.33%	
	N.S.			N.S.			N.S.		

N.S.: no significant R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes.

節は12例全例に認められた (Table 4).

(2) ICAM-1発現濃度比

虚血前と再灌流後の比較では肝右葉 (虚血側) に ICAM-1発現が増強されたものは12例中11例 (91.7 %) であり , 非虚血側に増強されたものは12例中 7 例

(58.3%) であった . これら ICAM-1発現増強率の間に有意差は認められなかった . 平均 ICAM-1発現濃度比は右葉 (虚血側) が 1.33 ± 0.35 , 中・左葉 (非虚血側) が 0.99 ± 0.15 で , 右葉 (虚血側) の平均 ICAM-1発現濃度比が有意 ($p < 0.01$) に高値であった (Table 4 , Fig.

Table 4 The number of tumor foci finding the surface of the liver and the rate of ICAM-1 expression on the sinusoidal wall in Group C. The number of tumor foci in ischemic lobes was significantly higher than that in non-ischemic lobes($p < 0.05$, Mann-Whitney's U test)

Case	The number of tumor foci		The rate of ICAM-1 expressions		Spleen
	R (I)	M. L (N-I)	R (I)	M. L (N-I)	
1	32	6	2.22	1.04	+
2	20	11	1.37	1.01	+
3	14	1	1.12	0.91	+
4	9	5	1.00	0.81	+
5	8	1	1.30	0.94	+
6	4	1	1.28	0.70	+
7	3	3	1.22	0.94	+
8	3	2	1.60	1.17	+
9	3	0	1.10	1.01	+
10	2	0	0.95	1.01	+
11	2	0	1.64	1.27	+
12	0	0	1.16	1.01	+
mean ± S.D	8.33 ± 9.45	2.50 ± 3.34	1.33 ± 0.35	0.99 ± 0.15	
	*		**		
rate(%)	91.7%	66.7%	91.7%	58.3%	
	N.S.		N.S.		

N.S.: no significant R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes.
 (I): ischemic lobes. (N-I): nonischemic lobes.

* $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$

4).

(3) 虚血側の転移結節数と ICAM-1発現濃度比
 右葉(虚血側)の転移結節数と ICAM-1発現濃度比との間には有意な関連を認めた ($r=0.615$, $p < 0.05$).

4. D群(中・左葉虚血)

(1) 肝表面転移結節数

12例中10例(83.3%)に肝転移(平均総結節数13.42 ± 19.58個)を認めた. 肝右葉(非虚血側)には7例(58.3%)に転移を認め, 結節数は3.75 ± 6.37個であった. 肝中・左葉(虚血側)には10例(83.3%)に転移を認め, 結節数は9.67 ± 13.36個であった. 中・左葉(虚血側)では右葉(非虚血側)と比較して転移の頻度に有意差はなかったが, 転移結節数は中・左葉(虚血側)に多い傾向があった(片側検定 $p < 0.05$). また, 10例の転移結節数はいずれも右葉(非虚血側)に比べ多かった. 脾結節は12例全例に認められた(Table 5).

(2) ICAM-1発現濃度比

虚血前と比較し肝中・左葉(虚血側)に ICAM-1発現が増強されたものは12例全例(100.0%)であり, 右葉(非虚血側)の12例中6例(50.0%)に比較し有意($p < 0.05$)に高率であった. 平均 ICAM-1発現濃度比は

中・左葉(虚血側)で1.38 ± 0.33, 右葉(非虚血側)で1.01 ± 0.13であり, 中・左葉(虚血側)の平均 ICAM-1発現濃度比が有意($p < 0.001$)に大であった(Table 5, Fig. 5).

(3) 虚血側の転移結節数と ICAM-1発現濃度比

中・左葉(虚血側)の転移結節数と ICAM-1発現濃度比との間には有意な関連を認めた ($r=0.683$, $p < 0.05$).

5. E群(右葉虚血, 抗 ICAM-1抗体投与)

(1) 肝表面転移結節数

5例中3例(60.0%)に肝転移(平均総結節数4.40 ± 5.32個)を認めた. 肝右葉(虚血側)に転移を認めた3例(60.0%)の平均結節数は1.80 ± 2.49個で, 肝中・左葉(非虚血側)に転移を認めた3例(60.0%)の平均結節数は2.60 ± 2.88個であった. 肝中・左葉と肝右葉の転移率および転移結節数に有意差は認められなかった. 脾結節は5例全例に認められた(Table 6).

考 察

虚血再灌流障害は出血性ショック, 血栓症などにより虚血状態となった組織 細胞に血流が再開した場合, 局所および全身臓器に生じる病態であり, 肝臓外科領

Fig . 4 A : This is the horizontal section of liver after 3 weeks from splenic injection. White tumor foci were developed in the center of the right lobe. B : In H-E. stain of ischemic lobe, we detected liver metastases histologically. C : The expression of ICAM-1 on the sinusoidal wall was greater ischemic lobe of nontumor than pre-ischemic lobe, but it was not greater nonischemic lobe than preischemic lobe. Pre. : preischemic lobe. I : ischemic lobe. N-I : nonischemic lobe.

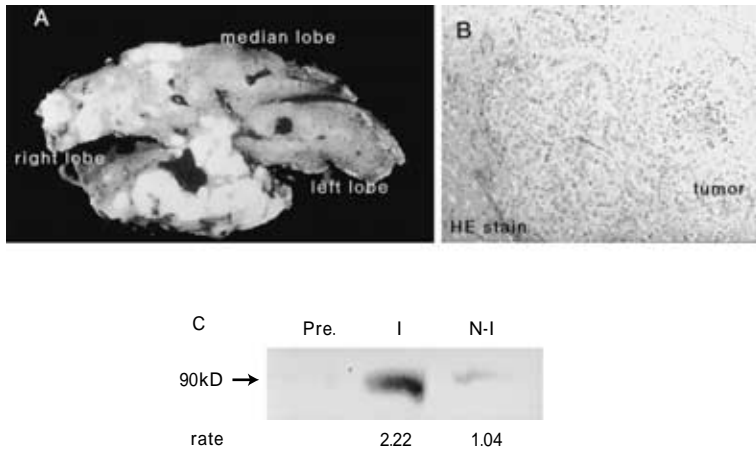


Table 5 The number of tumor foci finding the surface of the liver and the expression of ICAM-1 on the sinusoidal wall. The number of tumor foci in ischemic lobes was significantly higher than that in non-ischemic lobes($p < 0.05$, Mann-Whitney 's U test)

Case	The number of tumor foci		The rate of ICAM-1 expressions		Spleen
	R (N-I)	M. L (I)	R (N-I)	M. L (I)	
1	23	48	1.12	1.90	+
2	5	22	1.10	1.68	+
3	4	9	0.71	2.05	+
4	4	7	0.96	1.13	+
5	3	7	1.17	1.44	+
6	4	6	0.98	1.30	+
7	2	7	0.97	1.27	+
8	0	4	1.07	1.20	+
9	0	3	1.03	1.10	+
10	0	3	0.89	1.24	+
11	0	0	1.19	1.26	+
12	0	0	0.97	1.02	+
mean \pm S.D	3.75 \pm 6.37	9.67 \pm 13.36	1.01 \pm 0.13	1.38 \pm 0.33	
	N.S.		***		
rate(%)	58.3%	83.3%	50.0%	100.0%	
	N.S.		*		

N.S.: no significant R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes.
: 1 , -tailed P value (N-I): nonischemic lobes.(I): ischemic lobes.

* $p < 0.05$
*** $p < 0.001$

Fig . 5 A : This is the horizontal section of liver after 3 weeks from splenic injection. White tumor foci were developed in the center of the median and left lobes. B : In H-E stain of ischemic lobe, we detected liver metastases histologically. C : The expression of ICAM-1 on the sinusoidal wall was greater ischemic lobe of nontumor than preischemic lobe, but it was not greater nonischemic lobe than preischemic lobe.
Pre. : preischemic lobe. I : ischemic lobe. N-I : nonischemic lobe.

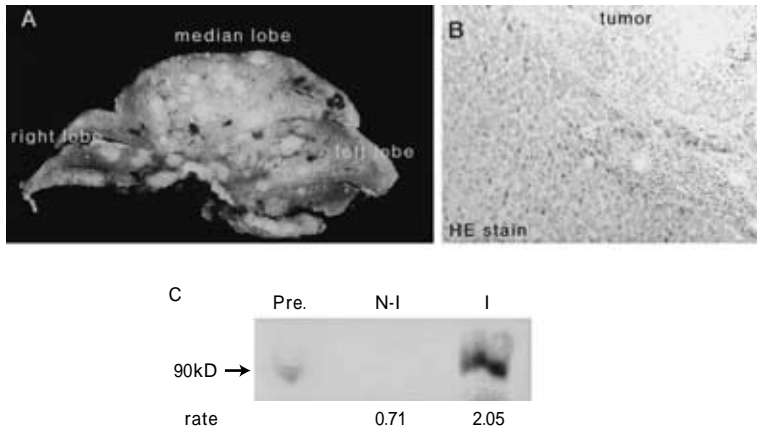


Table 6 The number of tumor foci finding the surface of the liver in Group E. There was no significant difference between the number of foci on ischemic lobes and that on non-ischemic lobes.

Case	R (I)	M. L (N-I)	Spleen
1	6	7	+
2	2	3	+
3	1	3	+
4	0	0	+
5	0	0	+
mean ± S.D	1.80 ± 2.49	2.60 ± 2.88	
	N.S.		
metastases(%)	60.00%	60.00%	
	N.S.		

R : right hepatic lobe. M.L : median and left hepatic lobes.
(I) : ischemic lobes. (N-I) : non-ischemic lobes.
N.S.: no significant

域では肝切除術，肝移植などの際に認められる．

本研究では肝虚血再灌流が転移性肝癌の成立に及ぼす影響を，癌細胞(ACL-15)の脾内注入による肝転移モデルを用い，転移結節数・転移率の比較により検討した．塩谷ら⁷⁾は20分と30分の肝中・左葉虚血モデルを用いて肝転移促進効果の検討を行い，30分虚血群に有

意に転移が多いことを報告しており，本実験においては虚血時間を30分間とした．また，虚血再灌流下の肝類洞内皮における ICAM-1発現とともに，抗 ICAM-1抗体投与による転移抑制効果を検討した．抗 ICAM-1抗体量は Kuzume ら⁸⁾に準じて0.8mg/kg とし，上腸間膜静脈分枝より投与した．

肝虚血再灌流障害と ICAM-1 発現との関連については、従来多くの報告がある¹⁾⁹⁾⁻¹⁰⁾。鈴木ら¹⁾は肝虚血再灌流後の類洞内皮における ICAM-1 の発現増強と、類洞壁への白血球着着の相関性について報告している。Kuzume ら⁸⁾は肝虚血再灌流モデルにおいて、抗 ICAM-1 抗体の投与により、非投与群と比較し有意に障害領域の減少を認めたと報告している。すなわち、肝虚血再灌流後類洞内皮上の ICAM-1 発現増強に伴う好中球着着が肝細胞障害を生じさせる要因の一つであることを示唆している。

虚血再灌流障害の組織学的変化を Vinay ら¹¹⁾は虚血の程度で可逆的損傷と不可逆的損傷が生じると報告している。不可逆的損傷に陥った細胞は後に凝固壊死の形態をとり、可逆的損傷を受けた細胞は早期に Hepatocyte Growth Factor (以下、HGF と略記) などの肝再生因子により修復を開始し、その後 transforming growth factor- β (TGF- β) などの因子により一部の細胞はアポトーシスに陥りながら肝全体の修復を終了すると考えられている¹²⁾。

肝虚血再灌流障害の組織学的所見に関して、本研究では細胞質内の空胞変性¹³⁾、類洞拡張¹²⁾、肝細胞索の乱れ¹⁾、の3項目について検討した。肝細胞の空胞変性および類洞拡張は虚血側の中心静脈周囲 (Zone 3) に強く認められたが、再灌流1週後には障害は軽度となった。肝細胞索の乱れは虚血側の Zone 3 に強く認められ、さらに再灌流3週後にも認められた。

虚血再灌流後急性期における ICAM-1 発現のメカニズムは大きく2つの過程から考慮されている。ひとつは虚血再灌流後類洞壁の Kupffer 細胞が刺激され、tumor necrosis factor- α (以下、TNF- α と略記)、interleukin-1 (以下、IL-1 と略記)、interferon- γ (IFN- γ) などのサイトカイン¹³⁾¹⁴⁾の産生により、血管内皮細胞上に ICAM-1 の発現を増加させる過程である。また、TNF- α 、ケモカイン、IL-8、platelet activating factor (PAF) などが、好中球に貯蔵されているインテグリン (CD 11/CD 18) を細胞膜上に誘導しその発現を増強させる。そして好中球上のインテグリン (リガンド着着分子) と肝類洞内皮上のレセプター着着分子 ICAM-1 の着着が認められるようになる。われわれは本実験モデルより虚血再灌流後に好中球表面に発現増強するインテグリンが Mac-1 であることを確認し報告している¹⁵⁾。

他のメカニズムは、これら着着した好中球から分泌される好中球エラスターゼの作用や、活性酸素放出により活性化された単球からの monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 刺激による ICAM-1 発現の増強

である¹⁰⁾。

ICAM-1 の発現は虚血再灌流後2時間後より3週間まで虚血側の肝類洞内皮による強く認められた。

従来、癌の血行性転移は癌細胞の①原発巣からの離脱と血管内への遊離、②血管内での移動、③末梢血管内皮への着着、④基底膜および結合組織内への浸潤、という段階を経て成立すると考えられている¹⁶⁾。神奈木¹⁷⁾はこの段階(③)のうち癌細胞と末梢血管内皮との着着には、2段階のシステムがあるとしている。第1段階ではセレクチンと糖鎖抗原を介する脆弱な着着が行われ、続いて、血管内皮細胞の産生する HGF, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) などのサイトカインにより、癌細胞のインテグリンが活性化され、第2段階のインテグリン系の分子による着着が生じるといふ。すなわち、類洞内皮の E セレクチンと癌細胞上のシアリルルイス抗原の着着が生じた後、類洞内皮上に ICAM-1 が発現増強され、また血管内皮から産生されたさまざまなサイトカインにより癌細胞上の Leucocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1)、Mac-1 が活性化され、より強固な着着¹⁸⁾が生じるものと思われる。われわれも胃癌および大腸癌の臨床例で、肝転移群と非肝転移群における各種着着分子の血清値を比較検討し、肝転移群では E セレクチン、ICAM-1、Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) 糖鎖抗原の sialyl-Lewis^x (sLe^x)、sialyl-Lewis^x (sLe^x) などの着着分子が有意に高値であることを報告している⁴⁾。

肝非虚血・腫瘍細胞投与群 (B 群) では、2週間後には12例全例に脾結節を形成していたが、肝転移は3例にのみ認められ、週を増すごとに転移率は上昇した。すなわち、ACL-15 腫瘍細胞は肉眼的、組織学的に肝転移を成立させるまで少なくとも2週間を要する。

肝部分虚血再灌流下 (C 群および D 群) では、非虚血側と比較し虚血側に肝転移巣の形成が有意に多く、また虚血側 (虚血再灌流3週間後) の ICAM-1 発現も有意に高かった。さらに、虚血側の転移結節数と ICAM-1 発現濃度比との間に有意な相関が認められた。この結果は、A 群における ICAM-1 発現が虚血再灌流2時間後より増強している成績とあわせ、肝転移成立において ICAM-1 の発現増強が促進的に作用したことを強く示唆する。つまり、肝虚血側には再灌流後から継続的に ICAM-1 の発現増強を認め、癌細胞が類洞内皮に着着しやすい環境が形成され、最終的に虚血側の肝転移

Fig . 6 The contrast with the number of tumor foci finding the surface of right hepatic lobe.

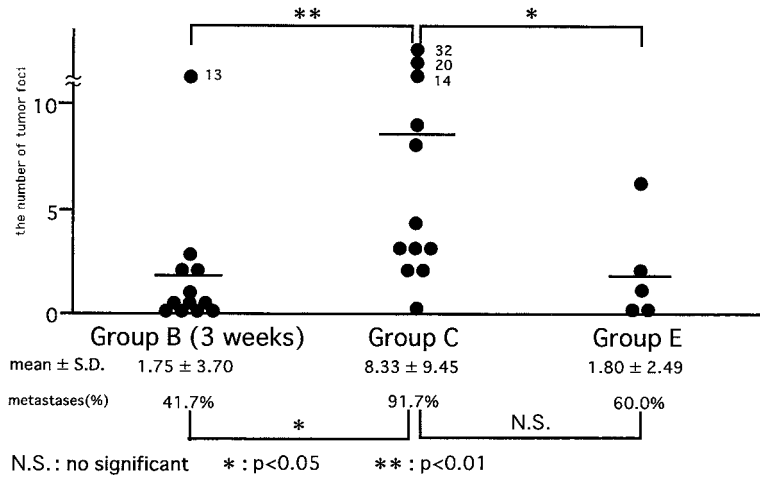
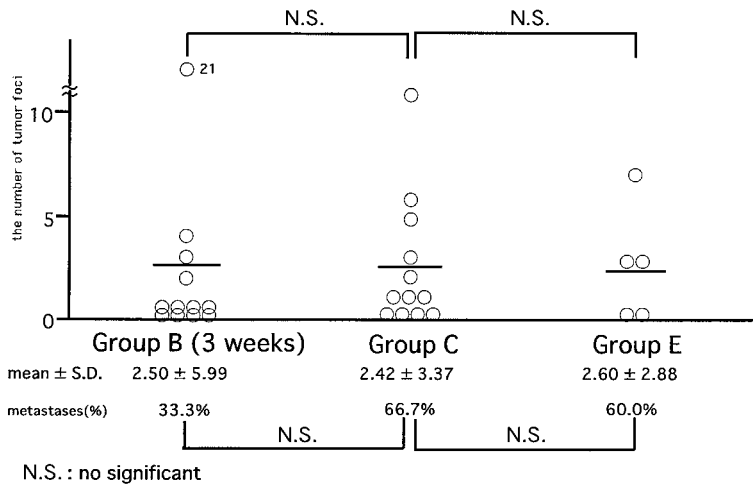


Fig . 7 The contrast with the number of tumor foci finding the surface of median and left hepatic lobes.



結節数との間に正の相関が認められたものと考えられる。

肝右葉の転移率および転移結節数を比較するとC群(虚血群)はB群(非虚血群)に対し有意(転移率は $p < 0.05$ 転移結節数は $p < 0.01$)に多く、またE群(虚血+抗ICAM-1抗体投与群)に対しても有意(転移率は有意差なし、転移結節数は $p < 0.05$)に多かった(Fig. 6)。さらに、E群では著しく平均結節数が減少し、B群3週後の平均結節数とほぼ等しい値となった。つまり、抗ICAM-1抗体投与により再灌流直後より虚血

側のICAM-1発現が抑制され肝転移の形成が抑制されたものと考えられる。B群の結果より肉眼的に肝転移を2週後から認めたが、培養された腫瘍細胞は脾臓被膜下投与直後から血行性に肝類洞内皮に徐々に到達しているものと考えられる。また、肝転移が形成された症例すべてに脾結節を認めたことから、脾内に移植され増殖した腫瘍細胞が離脱し継続的に血行性に移動し、肝類洞内皮に接着、肝細胞へ浸潤し転移が形成された可能性が十分考えられる。

B群3週後とD群とを比較した場合、D群の虚血側

は転移結節数 ($p < 0.01$), 転移率 ($p < 0.05$) とも有意に高値であった。

一方, B群3週後, C群の非虚血側およびE群の非虚血側それぞれの間の転移結節数および転移率には有意差が認められなかった (Fig. 7)。しかし, D群の転移結節数および転移率が高値の傾向にあり, 部分虚血再灌流モデルにおいては虚血側のみならず, 非虚血側へも何らかの影響が及ぶことも考慮された。

以上, 本実験の成績より肝の虚血再灌流に基づき類洞内皮のICAM-1発現が増強され, 肝転移成立が促進されることが明らかとなった。

この実験結果は, 臨床的に長時間のPringle法を併用することが, 残肝部への肝転移成立を促進させる可能性を示唆する。そのため, 肝切除の際, できるだけ非切除領域には虚血性変化を加えないことが, 臨床的に肝要と思われる。

稿を終えるにあたり, 御懇篤な指導を賜りました東京医科大学外科学第3講座故木村幸三郎名誉教授, 御校閲いただいた小柳泰久教授に深甚なる謝意を捧げます。また, 終始御協力下さった教職員各位に心より感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第98回日本外科学会総会 (1998年4月10日), 第11回日本肝胆膵外科学会 (1999年5月19日) において報告した。

文 献

- 1) 鈴木芳明, 青木達哉, 葦沢龍人: 肝虚血再灌流障害下における Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) 発現に関する研究. 東京医大誌 55: 187-200, 1997
- 2) Tang DG, Honn KV: Adhesion molecules and tumor metastasis: An update. Invasion Metastasis 14: 109-122, 1994-95
- 3) Fujita S, Watanabe M, Kubota T et al: Alteration of expression in integrin $\beta 1$ subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. Cancer Lett 91: 145-149, 1995
- 4) 葦沢龍人, 園田一郎, 小柳泰久ほか: 消化器癌の肝転移成立における接着分子の役割. 消癌の発生と進展 9: 305-308, 1997
- 5) 小島清嗣: NIH Image を用いた電気泳動パターンの解析. コンピューターサイエンス 1: 17-23, 1994
- 6) 松本武四郎, 小森 亮, 真柄直郎ほか: 肝の基本構造に関する二, 三の問題 病的変容理解の基礎として. 肝臓 20: 223-248, 1979
- 7) 塩谷雅文, 具 英成, 斎藤洋一: 肝転移に及ぼすラット肝虚血再灌流の影響について. 日消外会誌 29: 977-982, 1996
- 8) Kuzume M, Nakano H, Kumada K et al: A monoclonal antibody against ICAM-1 suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Eur Surg Res 29: 93-100, 1997
- 9) 山下晋矢, 青木達哉, 葦沢龍人: 移植肝細胞の再灌流時における viability の検討. 東京医大誌 53: 701-714, 1995
- 10) Yamaguchi Y, Matsumura F, Takeya M et al: Monocyte chemoattraction protein-1 enhances expression of intercellular adhesion molecule-1 following ischemia-reperfusion of the liver in rats. Hepatology 27: 727-734, 1998
- 11) Vinay K, Ramzi SC, Stanley LR: 細胞の損傷と適応. 森 亘, 桶田理喜監訳. ロビンズ基礎病理学 1 第5版. 廣川書店, 東京, 1994, p3-29
- 12) 廣瀬哲朗, 飯室勇二, 山岡義生: 肝移植と肝再生におけるアポトーシス関連遺伝子発現の変化. 石井裕正編. 消化器病とアポトーシス. 消化器病セミナー74. へるす出版, 東京, 1999, p173-187
- 13) Colletti LM, Burtch GD, Remick DG et al: Production of tumor necrosis factor alpha and development of pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. Transplantation 49: 268-273, 1989
- 14) Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al: Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. Circulatory Shock 42: 104-209, 1994
- 15) 多村幸之進, 葦沢龍人, 園田一郎ほか: 肝虚血再灌流モデルにおける好中球接着分子 LFA-1, Mac-1 発現. 日外会誌 100: 74, 1999
- 16) Fidler IJ: Selection of successive tumor lines for metastasis. Nat N BIOL 242: 148-149, 1973
- 17) 神奈木玲児: 細胞接着分子としての糖鎖抗原. 日外会誌 97: 100-105, 1996
- 18) Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R et al: Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. J Clin Invest 92: 3038-3044, 1993

The Influence of Liver Ischemia-Reperfusion on the
Development of Hepatic Metastases in Rat

Ichiro Sonoda, Tastyu Aoki and Tatsuto Ashizawa
Department of Surgery, Tokyo Medical University
(Director : Prof. Yasuhisa Koyanagi)

We evaluated the hypothesis that hepatic ischemia-reperfusion injury contributes to liver metastasis, and determine whether expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the sinusoidal wall increased under such conditions. Subjects were divided into 5 groups, A to E. In group A involving 30 minutes of right-lobe ischemia by clamping, ICAM-1 expression was greater in the ischemic lobe than in the nonischemic lobe. In group B involving splenic ACL-15 cells injection, 5 of 12 subjects developed liver metastasis, but no statistically significant difference was seen between the right and median and left lobes in the number of tumor foci. In group C involving 30 minutes of right-lobe ischemia plus splenic injection and group D involving 30 minutes median- and left-lobe ischemia plus splenic injection, ICAM-1 expression of in the ischemic lobe was significantly greater than that in the nonischemic lobe, with the number of tumor foci in the ischemic lobe significantly higher than that in the nonischemic lobe(group C : $p < 0.05$; group D : $p < 0.05$ 1,-tail P) In group E involving 30 minutes of right-lobe ischemia plus splenic injection 5 minutes after anti-ICAM-1 monoclonal antibody given through the superior mesenteric vein, no statistically significant difference was seen between the ischemic and nonischemic lobes in the number of tumor foci, suggesting that hepatic ischemia-reperfusion injury accelerates liver metastasis and that ICAM-1 may be associated with the development of hematogenous hepatic metastasis.

Key words : ischemia-reperfusion injury, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) hematogenous hepatic metastasis

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 177 188, 2001]

Reprint requests : Ichiro Sonoda Department of Surgery, Tokyo Medical University
6 7 1 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 0023 JAPAN
