

原 著

肝静脈合併肝切除後の残肝うっ血および肝機能低下領域の動物モデルの作成と
組織学的検討¹東京女子医科大学消化器外科²東京女子医科大学先端生命医科研究所

ム	ハン	アライズミ	シュンイチ	ヤマシタ	シンゴ
穆	瀚 ¹	有泉	俊一 ¹	山下	信吾 ¹
カナイ	ノブオ	スズキ	タカシ	ヤマモト	マサカズ
金井	信雄 ²	鈴木	孝司 ²	山本	雅一 ¹

(受理 平成25年8月8日)

Development of an Animal Model for Hepatectomy with Hepatic Vein Resection and Pathological Evaluation
of the Dysfunctional Area and the Congestive Area in the LiverHan MU¹, Shunichi ARIIZUMI¹, Shingo YAMASHITA¹,
Nobuo KANAI², Takashi SUZUKI² and Masakazu YAMAMOTO¹¹Department of Surgery, Institute of Gastroenterology, Tokyo Women's Medical University²Institute of Advanced Biomedical Engineering and Sciences, Tokyo Women's Medical University

Aim: Liver dysfunction and congestion of the middle hepatic vein area in the remnant liver after hepatectomy combined with middle hepatic vein trunk resection has been reported in human liver cancers. In this study, we investigated the remnant liver with an animal experiment model to evaluate its histological difficulty in the human body. **Methods:** In 2 pigs, EOB contrast agent was injected under general anesthesia. After laparotomy, the hepatic vein was ligated. Abdominal closure was performed after a congestive area was observed. The congestive area was examined on EOB-MRI after 1 week. Meanwhile, its histological finding was also investigated. **Results:** Liver congestion areas developed in 2 pigs after hepatic vein ligation. Histologically, congestion was observed in the central vein of the lobule. Fatty degeneration and necrosis of hepatocytes were observed around the central vein. **Conclusion:** An animal experiment model of liver congestion areas after hepatectomy combined with hepatic vein trunk resection require the same effort as in humans. The difficulties in human liver dysfunction and congestion of the middle hepatic vein area could be histologically evaluated through this model.

Key Words: congestion, dysfunction, EOB-MRI, miniature pig, liver

緒 言

肝癌に対する中肝静脈を含む肝葉切除後には、残肝内の中肝静脈の環流域がうっ血する。このうっ血領域は、人体においては残肝で評価する必要があり、また臨床的に大きな問題がないために組織学的検討はなされてこなかった^{1)~3)}。しかし生体肝移植においては、レシピエントで移植肝のうっ血で死亡例が報告され、ドナーでもうっ血による肝再生障害が報告され、中肝静脈のうっ血による様々な問題があらためて報告されている^{4)~6)}。

ガドキセト酸ナトリウム (Gd-EOB-DTPA : 以下

EOB) 造影 magnetic resonance imaging (MRI) 検査は、従来のダイナミックスタディに加え、肝細胞造影相という肝細胞機能画像の撮影が可能となった画期的で新しい検査である。EOBは細胞外液に分布し肝細胞膜に存在するトランスポーター (organic anion transporting polypeptide 8 : OATP-8) を介して肝細胞内に取り込まれ、約50%が胆道系に排泄される⁷⁾。この性質を利用した肝細胞造影相は、肝腫瘍の診断だけでなく、肝細胞機能の評価が可能である^{8)~11)}。我々は、肝癌に対する中肝静脈を含む肝葉切除後には、残肝にうっ血領域がみられ、このうっ血

領域の肝細胞機能が低下することをEOB造影MRIによって明らかにした¹²⁾。しかしこの肝細胞機能低下領域の組織学的検討は人体では困難でありこれまでなされていない。そのためには動物モデルの作製が必要であり、動物実験によりうっ血領域と肝機能低下領域の組織学的検討を行った。

材料および方法

1. 動物実験

生後6ヵ月のメスのミニブタ2頭(体重は19.0kgおよび19.6kg)を用いた。ブタを購入後1週間観察し異常がないことを確認した。全身麻酔下にEOB造影MRIを撮影し、開腹後、肝静脈を結紮しうっ血モデルを作製した。肝静脈結紮1週間後に再度全身麻酔下にEOB造影MRIを撮影した。EOB造影MRI撮影後、安楽殺を行い、うっ血葉と正常肝葉を採取し組織学的検討を行った。

2. 麻酔法

キシラジン(2mg/kg)とブトルファノール(0.2mg/kg)で鎮静させ、耳静脈から麻酔剤[ケタラール®(ケタミン)2mlとドミトール®(塩酸メデトミジン)2mlの混合液]を注射し気管内挿管した。実験中は55%酸素で換気を行い、心拍数が一定なことを継続的にモニターした。

3. EOB造影MRI

麻酔下にEOB造影MRIを撮影した。EOB造影MRIは、肝静脈結紮の直前と肝静脈結紮1週間後に撮影した。造影前、脂肪抑制T1強調像、T2強調像、ダイナミックスタディ(造影後30秒、120秒)、肝細胞造影相を撮影した。造影剤(プリモビスト、0.1ml/kg)は反対側の耳静脈から1ml/秒で注入し、10mlの生理食塩水を追加した¹³⁾。MRIは0.3T、MR装置エアリスエリート(AIRIS EliteII、日立メディコ社製)を使用した。うっ血領域はT2強調像で高信号となるため、うっ血領域と非うっ血領域の信号強度を測定した¹²⁾¹⁴⁾。また肝細胞造影相におけるうっ血領域と非うっ血領域の信号強度(EOB取り込み率)を測定した¹²⁾。信号強度は信号雑音比(signal-to-noise ratio, SNR=対象領域/背中筋肉組織)で測定した⁸⁾。

4. 肝静脈結紮方法

疼痛反応がないことを確認した後に開腹し、分葉した内側左葉の肝静脈を結紮した。ドップラー超音波で肝静脈のうっ血を確認し閉腹した。1週間後に再度EOB造影MRI撮影した。撮影直後に安楽殺を行った。再開腹し肝静脈を結紮した内側左葉と正常の内側右葉を摘出した。

5. 組織学的検討

摘出した肝葉はホルマリン固定した後、肝静脈根部周囲と末梢のパラフィンブロックを作製した後に5μmの薄切切片を作製した。組織学的評価は、HE染色による肝細胞の変化とヒトに特異性の高い抗OATP-8抗体(Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany)を用いて免疫染色を行った。

この実験は東京女子医科大学実験動物倫理委員会の許可を得て行った(審議済整理番号11-76)。

結果

1. EOB造影MRI所見

肝静脈結紮前には肝葉による信号強度に差はなかった。肝静脈結紮後の内側左葉は、正常肝葉と比較しT2強調像で高信号であった。肝静脈内も強く高信号となり血栓を認めた(Fig. 1a)。2頭のうっ血した内側左葉のSNR(27.1と18.8)は、正常肝葉のSNR(11.9と10.6)よりそれぞれ高値であった。うっ血した内側左葉は、肝細胞造影相で低信号でありEOBの取り込みが低下し肝細胞機能が低下していた(Fig. 1b)。肝細胞機能低下した内側左葉のSNR(16.4, 16.5)は正常肝葉のSNR(23.6, 20.1)より低値であった。うっ血領域と肝機能低下領域はそれぞれ一致していた。

2. 再開腹所見と組織学的所見

EOB造影MRIでうっ血し肝機能低下していた内側左葉は、再開腹時の観察で暗赤色に変色していた(Fig. 2a)。内側左葉の組織像は、2頭とも小葉の中心静脈内に赤血球が充満しうっ血と一部にPTAH染色でフィブリンを認め血栓を認めた(Fig. 2b)。1頭は中心静脈周囲の肝細胞の脂肪化と変性を認めた(Fig. 2b, c)。別の1頭は、中心静脈周囲の肝細胞の核が消失し肝細胞壊死を認めた(Fig. 2d)。中心静脈内のうっ血、肝細胞壊死、脂肪変性は、肝静脈根部周囲の肝組織と末梢の肝組織のいずれにもみられた。1頭では門脈内にも血栓とうっ血を認めた。抗OATP-8抗体による免疫染色は、ヒト肝細胞でみられる肝細胞膜が陽性とならず判定不可能であった。

考察

肝癌に対する中肝静脈を含む肝葉切除後には、残肝の中肝静脈の環流域がうっ血し肝細胞機能の低下があることを報告した¹²⁾。しかしこのうっ血領域や肝細胞機能低下領域の組織をみるためには肝生検が必要で人体には侵襲的である。そこで動物モデルを作製し、うっ血領域と肝機能低下領域の組織像を検討した。肝静脈結紮により肝葉はうっ血し暗赤色を

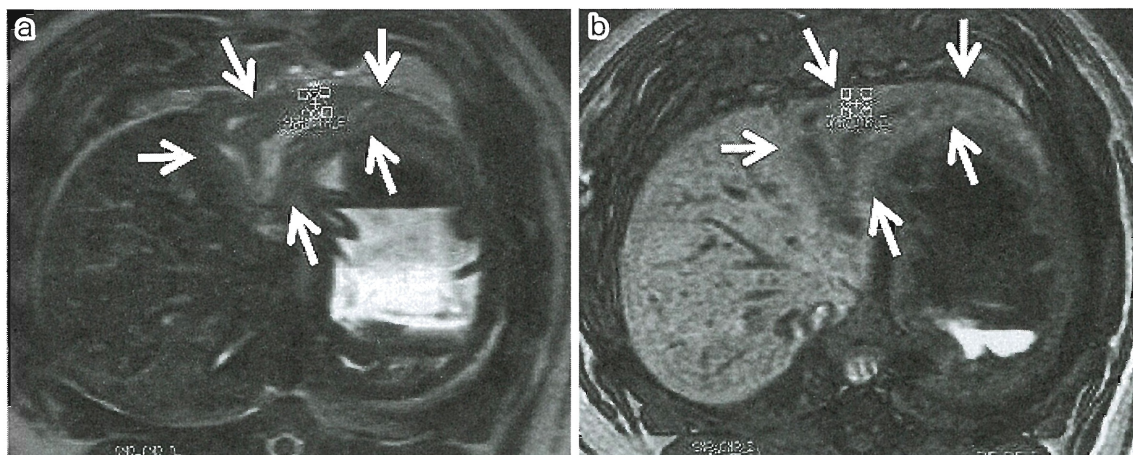


Fig. 1 After ligation of the first pig's left hepatic vein, the congestive area of the left section showed hyper-intensity on T2-weighted images (a: arrows) and the dysfunctional area showed low-intensity on hepatobiliary images (b: arrows).

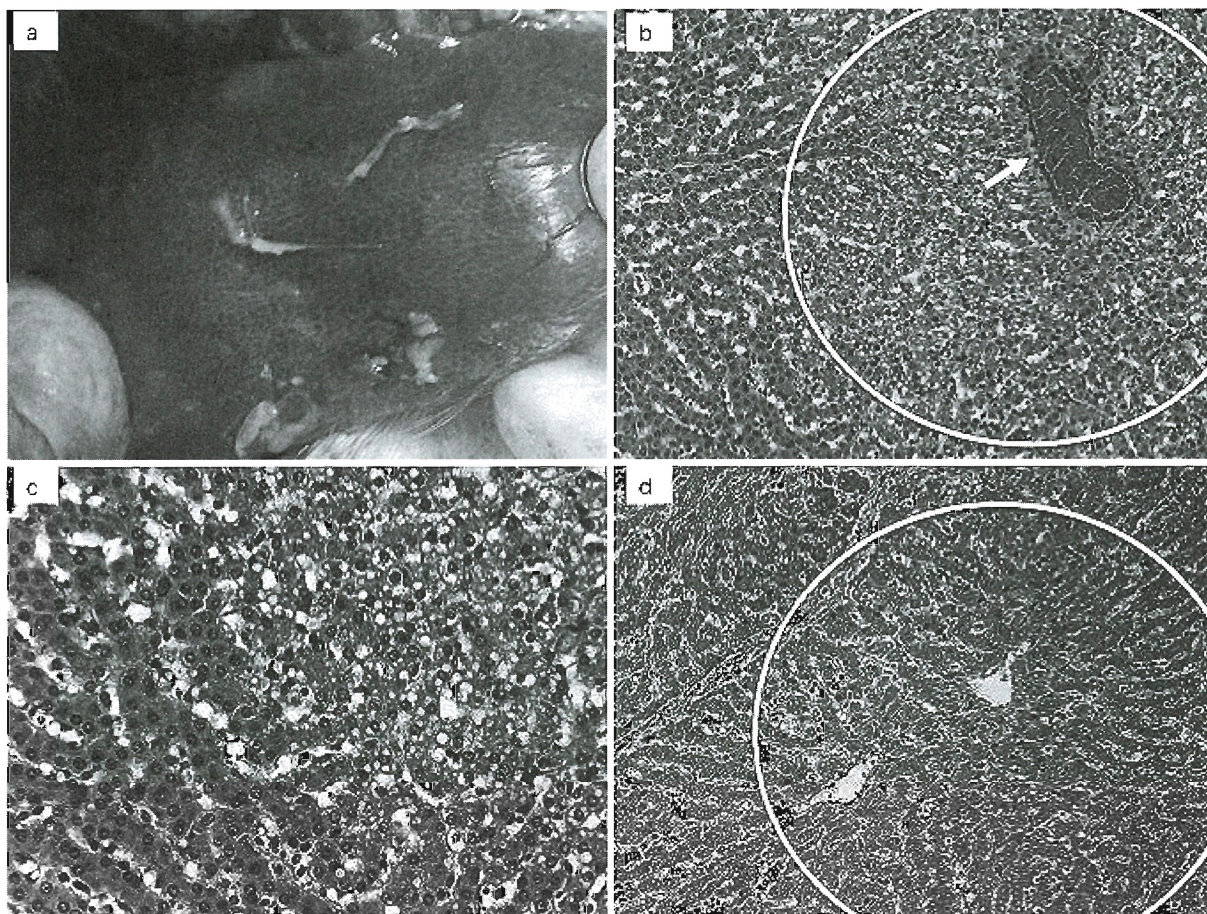


Fig. 2 The color of the congestive area after hepatic vein ligation is darker than the normal liver. Histological findings showed thrombosis in the central vein (b: arrow, HE 20×). Hepatocytes around the central vein showed fatty degeneration due to the congestion (b: circle, and c, HE 40×). Hepatocytes of the other pig showed necrosis (d: circle, HE 20×).

呈していた。組織学的には小葉の中心静脈内にうっ血と、一部に血栓形成を認め、中心静脈周囲の肝細

胞壊死と脂肪変性を認めた。

残肝のうっ血領域はCTやMRIで評価が可能で

ある^{14)~16)}。うっ血領域はMRIのT2強調像で高信号となることが報告されている¹⁴⁾。我々も中肝静脈を含む肝葉切除後にEOB造影MRIを撮影し、18例中15例で残肝にうっ血領域を認めた¹²⁾。さらにうっ血領域より広範囲な肝細胞機能低下が18例中16例でみられたことを報告した¹²⁾。しかし肝細胞機能低下領域の組織学的評価が必要であった。今回の組織学的検討により、肝小葉の構造の中心である中心静脈内にうっ血があり、この周囲の肝細胞壊死と脂肪変性を認めた。これらの肝細胞では、肝細胞膜に存在するEOB造影MRIのトランスポーターであるOATP8の発現の低下が予測される。しかし抗OATP8抗体を用いた免疫染色では、ヒトで見られるような肝細胞膜が陽性とならず判定が不可能であった。ブタにおけるOATP8の発現はmRNAの測定など考慮する必要がある。

動物による肝のうっ血モデルはこれまでにイヌやラットで行われた報告がある¹⁷⁾¹⁸⁾。いずれも肝静脈を結紮しうっ血モデルを作製している。これらの動物モデルでは、術直後に出現したうっ血が、1~2週間すると肝実質内に形成される肝静脈系副血行路の形成によりうっ血が解除されていた。本実験はうっ血モデルはもちろんだが、人体でみられた術後の変化をEOB造影MRIで確認し、その領域の組織学的変化を検討する必要があった。そこで分葉しており肝静脈間の副血行路の形成ができづらいブタ肝臓で実験した。1週間後ではあるが、人体でと同様なうっ血領域と肝細胞機能低下領域がEOB造影MRIで確認され、組織学的にもうっ血領域が確認された。ブタ肝臓によるうっ血モデルは、長期間うっ血が継続される可能性が示唆された。

肝静脈合併切除後のうっ血所見は術後1~2ヵ月で改善されるが、3ヵ月後もうっ血領域の肝再生は障害されている。しかし人体で最もうっ血領域が問題となるのは、肝葉切除に中肝静脈を合併切除した直後の予想外の肝不全である。残肝のうっ血領域のために実際の残肝容量より機能的残肝容量が減るからである。今回の検討で、うっ血領域では肝細胞壊死や脂肪変性がみられた。これらの肝細胞の機能は低下していることが予測される。したがって肝静脈合併切除によるうっ血領域を見込んだ肝機能評価が必要になる。

結 論

本動物実験は、人体における中肝静脈合併肝切除後と同様な残肝うっ血モデルの作製が可能であっ

た。動物におけるうっ血領域は、人体と同様にEOB造影MRIで肝細胞機能が低下していた。また本動物実験により人体では評価が困難なうっ血領域と肝機能低下領域の組織学的評価が可能であった。

謝 辞

本実験にご協力いただいた竹田一礼氏(東京女子医科大学先端生命医科研究所)、中本秀和氏[(株)日立メデイク]に感謝申し上げます。

文 献

- 1) **Ou QJ, Hermann RE**: The role of hepatic veins in liver operations. *Surgery* **95**: 381-391, 1984
- 2) **Beppu M, Fukuzaki T, Mitani K et al**: Hepatic subsegmentectomy with segmental hepatic vein sacrifice. *Arch Surg* **125**: 1170-1175, 1990
- 3) **Morioka D, Tanaka K, Sekido H et al**: Disruption of the middle hepatic vein is not crucial for liver regeneration of the remnant liver after right hemihepatectomy for hepatic tumors. *Ann Surg Oncol* **13**: 1560-1568, 2006
- 4) **Maema A, Imamura H, Takayama T et al**: Impaired volume regeneration of split livers with partial venous disruption: a latent problem in partial liver transplantation. *Transplantation* **73**: 765-769, 2002
- 5) **Fan ST, De Villa VH, Kiuchi T et al**: Right anterior sector drainage in right-lobe live-donor liver transplantation. *Transplantation* **75**(3 Suppl): S25-S27, 2003
- 6) **Lee S, Park K, Hwang S et al**: Congestion of right liver graft in living donor liver transplantation. *Transplantation* **71**: 812-814, 2001
- 7) **Narita M, Hatano E, Arizono S et al**: Expression of OATP1B3 determines uptake of Gd-EOB-DTPA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **44**: 793-798, 2009
- 8) **Saito K, Kotake F, Ito N et al**: Gd-EOB-DTPA enhanced MRI for hepatocellular carcinoma: quantitative evaluation of tumor enhancement in hepatobiliary phase. *Magn Reson Med Sci* **4**: 1-9, 2005
- 9) **Utsunomiya T, Shimada M, Hanaoka J et al**: Possible utility of MRI using Gd-EOB-DTPA for estimating liver functional reserve. *J Gastroenterol* **47**: 470-476, 2012
- 10) **Motosugi U, Ichikawa T, Sou H et al**: Liver parenchymal enhancement of hepatocyte-phase images in Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging: which biological markers of the liver function affect the enhancement? *J Magn Reson Imaging* **30**: 1042-1046, 2009
- 11) **Tajima T, Takao H, Akai H et al**: Relationship between liver function and liver signal intensity in hepatobiliary phase of gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging. *J Comput Assist Tomogr*

- 34: 362-366, 2010
- 12) **Mu H, Ariizumi S, Katagiri S et al:** A Dysfunctional Area in the Remnant Liver After Hemihepatectomy with Middle Hepatic Vein Resection for Liver Cancers. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* doi: 10.1002/jhbp.5. [Epub ahead of print] 2013
 - 13) **Zech CJ, Vos B, Nordell A et al:** Vascular Enhancement in Early Dynamic Liver MR Imaging in an Animal Model: Comparison of Two Injection Regimen and Two Different Doses Gd-EOB-DTPA (Gadoxetic Acid) With Standard Gd-DTPA. *Invest Radiol* **44**: 305-310, 2009
 - 14) **Yamamoto H, Maetani Y, Kiuchi T et al:** Background and clinical impact of tissue congestion in right-lobe living-donor liver grafts: a magnetic resonance imaging study. *Transplantation* **76**: 164-169, 2003
 - 15) **Kim BS, Kim TK, Kim JS et al:** Hepatic venous congestion after living donor liver transplantation with right lobe graft: two-phase CT findings. *Radiology* **232**: 173-180, 2004
 - 16) **Park E, Lee JM, Kim SH et al:** Hepatic venous congestion after right-lobe living-donor liver transplantation: the added value of delayed-phase imaging on CT. *J Comput Assist Tomogr* **31**: 181-187, 2007
 - 17) 北澤 正, 中村 達, 室 博之: 肝切除における肝静脈温存の意義に関する臨床ならびに実験的研究—特に Segment VII + VIII 切除術について—. *日外会誌* **89**: 863-870, 1988
 - 18) 杉本武巳, 具 英成, 斎藤洋一: 肝静脈合併肝切除における術前肝静脈血流遮断の有用性についての実験的検討. *日消外会誌* **30**: 1714-1719, 1997
-