

PPB-3-145 ラット肝類洞再構築における mTOR および MIF の発現に関する実験的検討

前野 博, 比良英司, 小野隆司, 山野井彰, 山口峰一, 永井 聡, 小野田敏尚, 山本佳生, 山本 徹, 永末直文 (高根大学第2外科)

ラット肝再生中の虚血現象が肝内皮細胞再構築を促す可能性を HIF-1 α の発現, 血管新生因子発現で示した。一過性の虚血性変化で誘導される mTOR と MIF の肝再生への影響を検討した。ラット 70% 肝切除後再生肝の類洞内皮細胞の血管密度を免疫染色で評価した。western blot 法で HIF-1 α , VEGF と β -tubulin, mTOR, MIF を HIF-1 α , VEGF と β -tubulin を RT-PCR 法にて評価した。肝細胞及び内皮細胞の増殖は各々肝切除後 24, 72 時間で高値を示した。血管密度は肝切除後 72 時間まで減少し, 168 時間では復元した。HIF-1 α の発現は肝切除後 6-36, 72-120 時間で高値を示し, VEGF は 120 時間で高値, β -tubulin は切除後発現した。mRNA は HIF-1 α は 24, 72 時間, VEGF は 48, 72 時間, β -tubulin は 48, 96 時間で増加した。mTOR は肝切除後 72 時間で一過性に減少した。MIF は肝切除早期(12-36 時間), 168 時間で上昇した。肝切除後の一過性虚血が HIF-1 α を発現し血管新生因子を誘導すると考えた。mTOR は細胞増殖, 大きさを規定し, 群塊形成期の肝細胞増殖と一致して発現が低下した。MIF は細胞増殖・維持への関与が知られ, 肝細胞増殖に先行して上昇し, 類洞再構築後も上昇し続けた。mTOR, MIF も肝再生の制御に関与する事が示唆された。

PPB-3-146 門脈枝塞栓術後の非塞栓葉再生に関する基礎的実験

笹本彰紀, 二村雄次, 柳野正人, 湯浅典博, 小田高司, 新井利幸, 西尾秀樹, 江畑智希

(名古屋大学大学院器官調節外科)

【目的】経皮経門脈枝塞栓術後の血流変化に伴い非塞栓葉の門脈内皮は持続伸展される。実験的に内皮細胞に持続伸展を加え NF- κ B を介し肝再生の trigger である IL-6 が分泌された。今回は NF- κ B 活性化へ至る経路を調べた。【方法】阻害剤を加えた後ヒト臍帯内皮細胞に持続伸展刺激を加えた。更に, 細胞内 Ca²⁺ 動態変化と NF- κ B の活性化との関係についても調べた。【結果】1) integrin 阻害ペプチド (GRGDNP), PLC 阻害剤 (U73122), PKC 阻害剤 (H7) で NF- κ B の活性は阻害された。2) thapsigargin (TG)・EGTA で細胞内・外 Ca²⁺ を枯渇させた状態では NF- κ B の活性は阻害され, TG で細胞内 Ca²⁺ を枯渇させた状態, 又は EGTA で細胞外 Ca²⁺ を枯渇させた状態では阻害されなかった。3) PKC の活性は GRGDNP, U73122 の投与, TG・EGTA で細胞内・外 Ca²⁺ を枯渇させた状態では阻害された。4) 伸展刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は TG・EGTA で細胞内・外 Ca²⁺ を枯渇させた状態では認めず, TG で細胞内 Ca²⁺ を枯渇させた状態, 又は EGTA で細胞外 Ca²⁺ を枯渇させた状態では認めた。【総括】NF- κ B の活性化は integrin を介すシグナル伝達にはじまる Ca²⁺ 依存性 PLC/PKC 経路は重要な役割を果たしていることが示唆された。

PPB-3-147 ラット肝不全モデルに対するヒト肝芽腫細胞株を用いた細胞療法に関する研究

播本憲史, 島田光生, 北川 大, 伊藤心二, 辻田英司, 前原伸一郎, 武富紹信, 田中真二, 調 憲, 前原喜彦

(九州大学大学院消化器・総合外科)

【はじめに】今回我々は改良型ヒト肝芽腫細胞株 HepG2 のラット肝不全モデルにおける有用性について報告する。【方法】検討 1: HepG2/tk 株の樹立 自殺遺伝子 HSV/tk を stable transfection し, ガンシクリル高感受性を有する HepG2/tk を作製した。樹立した株の肝特異機能を検討した。検討 2: HDAC 阻害剤と PPAR γ ligand の併用療法による HepG2/tk 株の分化誘導 HepG2/tk 株を単層培養し, HDAC 阻害剤と PPAR γ ligand 添加後のアンモニア代謝能, アルブミン分泌能を検討した。検討 3: 分化誘導株を用いたラット肝不全モデルへの細胞治療 樹立した株をラット臍帯内へ 5x10⁷ 個注入した後 1 日目に 90% 肝切除を行い, 細胞無し群, HepG2/tk 株群, HepG2/tk 株 + 併用療法群で生存率を比較した。【結果】検討 1: HepG2/tk は単層培養で臨床治療域 (0.1 μ g/ml) の GCV で死滅した。検討 2: 併用療法により単位細胞当たりのアンモニア代謝能が約 2 倍, アルブミン分泌能が約 3 倍向上した。検討 3: HepG2/tk 株 + 併用療法群は細胞無し群に比べ生存率が向上した。【まとめ】新たに樹立した HepG2/tk は更なる分化誘導を加えることで人工肝臓や細胞移植の有用な細胞源となりうる。

PPB-3-148 マウス ES 細胞由来肝細胞の濃縮と奇形腫発生の予防

神代祐至¹⁾, 寺本研一¹⁾, 田中雄二郎²⁾, 齊藤佳子²⁾, 朝比奈欣治²⁾, 寺岡弘文²⁾, 有井滋樹¹⁾

(東京医科歯科大学肝胆外科¹⁾, 東京医科歯科大学難治研病態生化学²⁾, 東京医科歯科大学附属病院総合診療部³⁾)

ES 細胞から肝細胞を分化誘導できれば, 細胞移植医療の細胞源として有望である。我々はマウス ES 細胞由来胚様体 (EB) 中での機能的な肝実質細胞への分化誘導と, 9 日目 EB から単離した細胞移植で肝臓への生着を報告しているが, 奇形腫発症は防止できていなかった。今回我々は EB から肝細胞を濃縮すると同時に, 奇形腫の原因となる未分化な細胞を取り除くことが可能か検討した。EB を単層培養とした後, Percoll により細胞を分画し, それぞれの分画でアルブミン, Oct3/4 の mRNA の発現を検討した。アルブミン陽性かつ Oct3/4 陰性分画の細胞を移植したマウスでは奇形腫は認められなかった。さらにこの分画から肝細胞を濃縮するため MACS を行った。Percoll 密度勾配遠心, MACS 後の細胞にはアルブミン陽性細胞が約 30% 含まれており, 尿素合成能も有していることを確認した。これらの結果より機能的な肝細胞の濃縮と奇形腫の形成を防止することができたと考えられた。現在, 肝障害マウスにこの細胞を移植し, 肝機能が改善するかどうかについても検討中である。

PPB-3-149 免疫隔離膜内肝細胞の長期凍結保存方法の確立とその応用

青木武士, 古泉友丈, 安田大輔, 泉田欣彦, 金正鎬, 華 魯純, 村井紀元, 清水喜徳, 加藤博久, 草野満夫

(昭和大学一般消化器外科)

(目的) 今回免疫隔離膜内肝細胞の長期凍結保存方法の確立およびそれらを用いた新たな人工肝臓モジュールとしての可能性を報告する。(方法) ラット肝細胞をマイクロカプセル化し, 直ちに液体窒素素にて凍結保存した。(実験 1) 120 日間凍結したカプセルを経時的に解凍し, 組織学的評価, 薬物代謝能を検討。(実験 2) 1 週間凍結カプセルを 2 週間培養, 肝特異的代謝能, 組織学的にその機能を評価。(実験 3) ヒト肝細胞をマイクロカプセル化し同様な方法にて 90 日間凍結保存し, 経時的に解凍後組織学的評価。(実験 4) ラジアルフローバイオリアクターへ凍結保存免疫隔離膜内肝細胞を loading し, 肝特異的代謝能, 組織学的検討。(結果) (実験 1) カプセル内ラット肝細胞は viability を維持し ALB, PAS に陽性発現し, OAT2, CYP の発現を認め, (実験 2) 培養後もその肝特殊代謝機能を維持し (実験 3) 少なくとも 90 日間 viable であり, ALB の発現を維持。(実験 5) 少なくとも 24 時間肝特異的代謝能を維持した。(考察) 免疫隔離膜内ラットおよびヒト肝細胞をその機能を失わず長期凍結可能であり, また体外肝補助システムとして機能しうることが示唆された。

PPB-3-150 肝細胞癌に対する肝切除後 10 年以上の長期生存例の検討

片寄 友, 海野倫明, 力山敏樹, 及川昌也, 山本久仁治, 小野川徹, 阿部友哉, 大塩 博, 藪内伸一, 松野正紀

(東北大学大学院消化器外科学)

【目的】肝細胞癌切除例において 10 年以上の長期生存を得るための条件, 治療法を検討することとした。【症例】症例は 1973 年から 2001 年 12 月までの最長 3 年以上の経過観察をした肝切除例 176 例を用いた。そのうち 5 年以上生存例が 36 例あり, そのうち 5 年から 10 年で死亡した 11 症例を A 群, 10 年以上生存した 14 例を B 群として検討した。【結果】ウイルスマーカーは, 差は認められなかった。肝機能に関しては全例 Child-Pough 分類で A。また ICG, 血小板, Alb, 総ビリルビン, PT に差はなく, 腫瘍因子にも差はなかった。術式は A 群部分切除 7 例, 区域切除 4 例, B 群は部分切除 5 例, 区域切除 1 例, 葉切除以上 8 例であった。無再発生存期間は A 群が 35 年であるのに対して, B 群は 12 年で, 10 年以上の長期生存例は無再発例が多いことがわかる。つまり, 再発後の治療で長期生存を得ているのは無く, 初回切除の治療方針および手術時の状況に予後が既定されているとも考えられる。【まとめ】これまでの既存の治療では良い結果が得られないと考えられ, 今後肝移植など新規治療の工夫により長期生存を図る必要があると考える。

PPB-3-151 肝切除後 10 年以上経過した肝細胞癌症例の検討

坂東 正¹⁾, 渋谷和人¹⁾, 野澤聡志¹⁾, 塚田一博¹⁾, 霜田光義²⁾

(富山医科薬科大学第 2 外科¹⁾, 氷見市民病院外科²⁾)

【目的】切除可能例における肝細胞癌外科治療成績は他の治療を凌駕しているが, 5 年生存が得られても異時性多発病変や併存肝病変の悪化がみられる場合もあり検討が必要である。【方法】肝切除後 10 年以上経過した 38 症例に関して検討した。【成績】男性 31 例女性 7 例で平均年齢は 58 才であった。死亡は 29 例で, 原病死が 14 例で肝不全死は 7 例であった。累積生存率は 5 年 43.4%, 10 年 26.1% であった。累積非再発率は 5 年 22.4%, 10 年 11.2% であった。術後 5 年以上の生存が得られたのは 15 例 39.4% で, 8 例が生存中で, 無再発生存は僅か 3 例であった。15 例中 12 例は, 平均 48 カ月で再発しており, 5 年経過後の再発は 3 例に認められた。再発時からの平均生存期間は 72 カ月で, 再発までの期間より長く最長 14 年であった。再発 12 例はいずれも肝内再発で, 単発が 8 例で内 4 例には再切除を施行し, その他の症例に対しては chemolipiodolization を中心とした内科的な治療を施行した。chemolipiodolization を予防的に施行した症例で予後の延長が認められた。【結論】肝細胞癌の長期予後は再発後の再切除も含めた治療による生存期間の延長が重要であり, 予防的 chemolipiodolization も有用な方法と考えられた。

PPB-3-152 当科における肝癌治療後 10 年以上生存例の検討

齊藤琢己, 石崎 彰, 大沼 淳, 吉川大太郎, 山崎弘貴, 唐崎秀則, 稲垣光裕, 小原充裕, 紀野修一, 葛西真一

(旭川医科大学第 2 外科)

当科での初回肝癌治療後 10 年以上生存例は 10 例, 男性 9 例, 女性 1 例, 平均年齢は 52 \pm 7 歳。肝炎ウイルスマーカーは HBV 陽性が 5 例, HCV 陽性が 5 例, 背景肝は肝硬変 5 例, 慢性肝炎 3 例, 正常肝 2 例, 初回治療に手術を選択した例が 9 例, 1 例は Vp3 症例でリザーバー動注療法を選択, 術式は左葉切除 2 例, 亜区域切除 3 例, 部分切除 4 例, 初回単発例は 7 例, 初回治療時の最大腫瘍径は 5.0 \pm 4.3cm, 10 例中 3 例で初回治療後, 無再発生存中, 初回治療から再発までの期間は 7 例中 3 例で 8 年以上であり, 平均 5.6 年, 外科的切除後に再発を認めた 6 例は, 再発時に肝切除を含む外科的治療 (1 例は再々肝切除, 2 例は再肝切除) を行った。1 例は腹腔内転移に対して摘出術を施行, 1 例は肺転移に対して肺切除も施行, 4 例では TAE, PEIT を含む集学的治療を行った。死亡した 6 例中 4 例が原病死, うち 3 例で門脈腫瘍栓を伴う diffuse な HCC を発症し死亡, Vp3 症例はリザーバー動注と TAE を繰り返して施行し, 10 年 10 ヶ月後他病死, 肝病変再発を認めた場合, 積極的な外科的治療を含む集学的治療により予後の延長が期待できると思われた。Vp3 症例でもリザーバー動注を含む治療により長期生存が得られる可能性もあると思われた。