

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861064

研究課題名(和文) 門脈阻血に伴う多臓器うっ血の周術期における影響と多臓器相関

研究課題名(英文) Relationship between portal venous congestion and functions of splanchnic organs

## 研究代表者

林 泰寛 (Hayashi, Hironori)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20543656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝胆膵・移植外科領域で頻発する門脈うっ血の影響とその軽減につき、ラットモデルにて研究を行った。門脈うっ血により、小腸粘膜を中心とした障害を受けるが、うっ血による前処置(congestive preconditioning; CPC)を行うことにより、障害は軽減、かつ生存率も有意に改善し、その有用性が示された。また、CPCによる抗アポトーシス経路の誘導が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In clinical settings of hepato-pancreato-biliary and liver transplant surgery, portal venous congestion (PVC) is common pathophysiology. Therefore, effect and therapeutic approach for PVC was investigated by rat model. Intestinal mucosa was injured by PVC via apoptosis. By the induction of congestive preconditioning (CPC), intestinal mucosal injury and survival rate were significantly improved. The anti-apoptotic pathways was suspected to be involved in this availability, based on the result from immunohistochemical analysis.

研究分野：肝胆膵・移植外科学

キーワード：小腸 門脈 肝臓 うっ血 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

肝切除において、肝へ流入する血流の遮断による調節は、いわゆる Pringle 法として安全に手術を行うための必要不可欠な手技となっている。また、膵胆道系の悪性腫瘍に対する門脈合併切除再建を要する手術や肝移植においては、再建を行っている間、門脈血流を遮断することが必要不可欠である。

このような手技の有用性、安全性に関する報告は数多く報告されており、肝組織を用いた基礎的研究や、その結果から種々の介入が行われている。これらの研究の多くは肝の阻血およびその後の再灌流に対する対応に主眼を置いて研究が行われており、当施設においても、ischemic preconditioning, 冷阻血, あるいは各種薬剤投与の有用性を種々の観点から検討報告してきた。

しかし、これらの検討は肝臓における変化のみに注目して多くの検討が進められており、門脈血流の遮断に伴う小腸、膵臓および脾臓の変化に関して検討された報告は少ない。一方で、これらの臓器はうっ血に伴い、その臓器そのものに大きな変化を来すことは想像に難くない。さらに、小腸、膵臓および脾臓を灌流した血液は門脈血流に乗って、阻血後の肝に流入することから、各臓器においてうっ血を来した後の変化は阻血再灌流後の肝障害に対して促進的に働く可能性が高いと考えられる。

これらの病態は、うっ血の程度の差こそあれ内科的疾患における門脈圧亢進症や、大量肝切除後や障害肝切除後の門脈圧亢進症においても考慮されるべき病態である。すなわち、これら門脈血流のうっ滞に伴う小腸、膵臓および脾臓における病態の解明は、広く応用し得る結果となる可能性が高いと考えられる一方で、詳細な検討がなされていない領域であると考えられる。

特に近年、小腸の機能は注目を集めており、単に栄養吸収の場としてのみならず、免疫学的に重要な役割を担っていることが再認識されている。また、小腸における種々の変化は、その粘膜の表面積の広さから、変化が増幅され、肝に影響を与えるのではないかと類推される。

そこで今回、申請者らはラット門脈遮断モデルを用い、これまでの諸家の報告から有用と考えられる種々の前処置を行ったモデルとの比較検討を行うことにより、小腸のうっ血による障害の機序あるいは実地臨床に発展させ得る治療法の解明、検討を目的として研究を行う。また、これらの検討から、より安全かつ低侵襲な消化器外科手術の実現を目標として、さらなる研究への足掛かりとすべく考察、検討を行う。

## 2. 研究の目的

(1)ラットを用いた門脈阻血による小腸うっ血モデルの作成

小腸のうっ血に伴う小腸粘膜の変化に関

する報告は少数ながらも何篇か報告されており、まとめると小腸粘膜は TNF- $\alpha$  を介した apoptosis を引き起こし、うっ血の解除あるいは抗 apoptosis 作用を有する薬剤により改善を認めるとされている。

申請者らは、基礎実験としてうっ血に伴う変化が apoptosis によるものであることを下記的手段にて確認する。また、病態を改善せしめる手段(以下に述べる以外の薬剤など)を選択するための基礎実験として、以下の所見を基に検討を行う。

HE 染色による病理学的所見, apoptosis 関連タンパクに対する抗体を用いた免疫組織学的所見, ラットモデルの生存率。

(2)新規治療法の基礎的研究とその効果の解析

上記の検討から、以下の新規治療法が有用となる可能性があり、その効果を検討することにより、実地臨床での新規手術法あるいは治療法へ発展させることを目標として検討を行う。

門脈遮断による preconditioning。

これらの手法は他の apoptosis を来す病態、あるいは血管内皮障害を来し、血栓形成から微小循環障害を介して臓器障害を来す過程において上記の手段が臓器保護に有用であったことを我々は報告し、あるいは現在研究中である。これらの機序を鑑みるに、小腸のうっ血に対する上記の治療法は有用である可能性が高く、また、実地臨床にも応用可能である可能性が高いと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1)ラット門脈遮断モデルにおける小腸粘膜の変化の評価

ラット門脈遮断モデルにおける小腸のうっ血に伴う粘膜障害の形態学的評価を行い、小腸粘膜細胞の apoptosis に注目して評価を行う。その際に、肝臓に対する血流減少の影響を最小限にすることを目的として、門脈のみの遮断を行うモデルを作成する。門脈の阻血時間は 30 分間とし、再灌流後の生存率を評価した。また、再灌流直後、2 時間後および 6 時間後にモデル動物を安楽死せしめ、小腸、肝臓および肺の病理組織上の変化を評価した。

(2)門脈遮断による preconditioning の導入による抗 apoptosis 能獲得とその影響の評価

ラットモデルにおいて、30 分間の門脈遮断小腸うっ血に先行し門脈の 5 分間阻血 5 分間灌流を 3 回繰り返す前処置 (Congestive preconditioning; CPC) 群を作成し、それと比較する目的で上記 a 群を control 群として、有用性を生存率から比較検討を行う。また、病理組織および免疫組織学的手法を用いてその有用性の詳細を検討する。

## 4. 研究成果

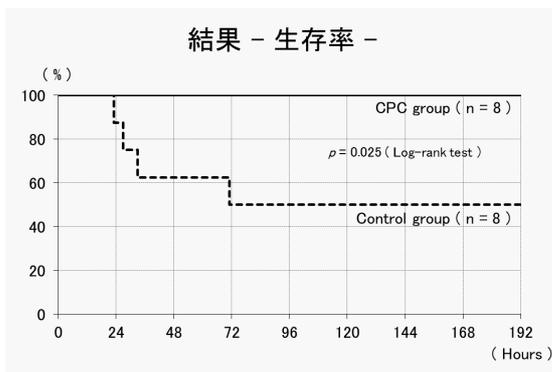
(1)ラット門脈遮断モデルにおける評価

ラット門脈阻血モデルを作成し、生存率と

組織学的所見の検索を行った。ラット門脈30分間阻血後再灌流モデルの1週間生存率は50%であった。また、小腸の組織学的検討では、絨毛構造の破壊と粘膜の浮腫を認めた。(2)CPC有用性の評価

CPCの方法としては5分阻血5分灌流を3回繰り返す(計30分)方法を考案した。Control(全処置なし)群と比較して1週間生存率は有意に改善(100% vs 50%:  $p < 0.05$ )した(図1)。

図1



また、両群間の小腸組織像について比較検討を行った。再灌流後6時間経過の検体においてCPC群はControl群と比して小腸の絨毛構造が保たれていた。これをPark scoreにて定量化し評価したところ、有意な改善を示したものと考えられた( $p < 0.01$ )(図2)。

図2a

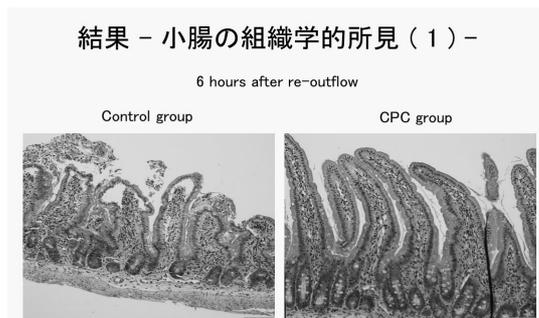
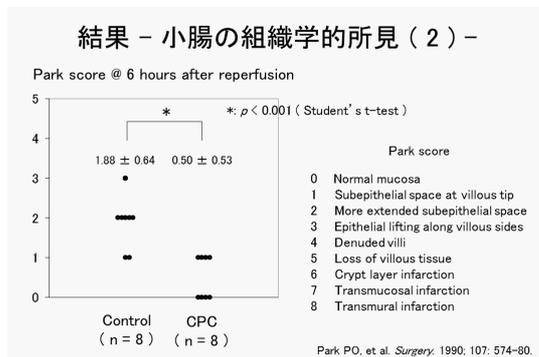


図2b



さらに、これらの差異に関して、うっ血に伴う小腸障害はapoptosisに関連したもので

あるという従来の報告を踏まえ、両群のapoptosis関連物質について免疫組織化学的検討を行った。Apoptosisそのものの評価としてTUNEL法と抗ss-DNA抗体(図3)による免疫染色法を行った。Apoptosisそのものに差は認められなかった。しかし、抗Cleaved caspase-3抗体および抗Bcl-xL抗体による免疫染色(図4,5)において、CPC群では抗apoptosis的な変化が強く認められた。一方で、肝組織像においてもCPC群において肝障害の程度は軽かったが、肺の組織像に差は認められなかった(図6)。

図3

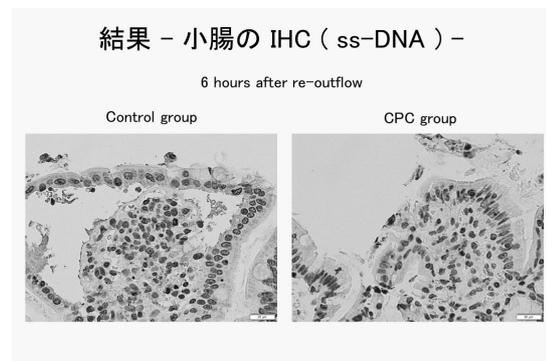


図4

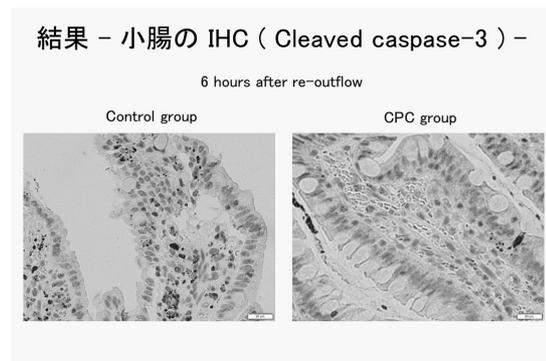
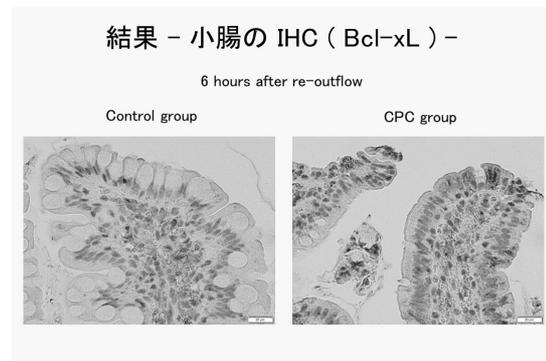
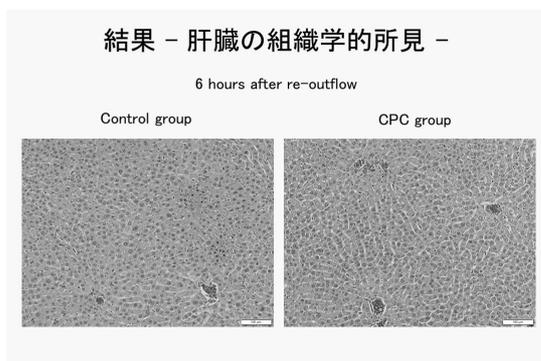


図5



以上の結果から、ラット門脈うっ血モデルにおいて、短時間の門脈うっ血と還流を繰り返すcongestive preconditioningの門脈うっ血に伴う小腸障害に対する有用性が示された。門脈血のうっ血により小腸が

図 6



apoptosis を介した障害を受けること、その障害を CPC によって有意に改善せしめることが可能であり、その機序は抗 apoptosis 的な変化の誘導が示唆された。小腸のうっ血を回避する術式の開発が最も望まれる一方、CPC も簡便な手技でありながら小腸に対して保護的に働くため、その詳細の解明と活用が期待される。

#### 引用文献

Makuuchi M, Mori T, Gunven P, et al. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1989;130:824-831.

Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, et al. Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. *Ann Surg.* 1993;217:82-91.

Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, et al. Ischemia-reperfusion injury in liver transplantation-from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:79-89.

Funaki H, Shimizu K, Harada S, et al. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation.* 2002;74:551-556.

Sheen-Chen SM, Su FI, Tang RP, et al. Cellular changes in hepatocytes and intestinal endothelium after hepatoduodenal ligament occlusion and protective effects of caspase inhibition. *Ann Surg.* 2011;253:561-565.

Ueda S, Yamanoi A, Hishikawa Y, et al. Transforming growth factor-beta1 from the spleen exerts a growth inhibitory effect on liver regeneration in rats. *Lab Invest.* 2003;83:1595-1603.

Wu B, Fujise T, Iwakiri R, et al. Venous congestion induces mucosal apoptosis via tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cell death in the rat small intestine. *J Gastroenterol.* 2004;39:1056-1062.

Bedirli A, Sakrak O, Soyuer I, et al. Portosystemic shunt prevents apoptosis in

rat intestinal mucosa caused by total hepatic ischemia. *Eur Surg Res.* 2004;36:293-299.

Takeshita M, Tani T, Harada S, et al. Role of transcription factors in small intestinal ischemia-reperfusion injury and tolerance induced by ischemic preconditioning. *Transplant Proc.* 2010;42:3406-3413.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

林泰寛, 高村博之, 蒲田亮介他. ラット小腸うっ血モデルにおける congestive preconditioning の有用性. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 15 日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

今後、学会発表を進め、英語論文にて本成果を報告する予定である。

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

林 泰寛 (HAYASHI Hironori)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号:

20543656

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし