

氏 名	井ノ本 琢也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1750 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Changes in glucose transporter 2 and carbohydrate-metabolizing enzymes in the liver during cold preservation and warm ischemia (冷保存, 温保存中のラット肝臓内における GLUT2 および糖代謝酵素の変化) (主 査)
論文調査委員	教 授 田 中 紘 一 教 授 千 葉 勉 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

肝移植の成功には、グラフトの viability がよく保たれている事が必要不可欠である。グラフトの viability に影響を与える因子として、グラフトの冷保存時間及び温虚血時間があげられる。

肝細胞の主なエネルギー源であるグルコースは、Glucose Transporter 2 (GLUT2) により肝細胞内に取り込まれた後、解糖、糖新生、ペントースリン酸経路の 3 つの経路で代謝される。今回我々は、解糖の律速段階であるグルコキナーゼ (GK)、ホスホフルクトキナーゼ (PFK)、ビルビン酸キナーゼ (PK)、糖新生の律速段階であり PFK, GK と逆の経路を触媒するフルクトース 2, 6 ビスホスファターゼ (FBPase)、グルコース 6 ホスファターゼ (G6Pase)、ペントースリン酸経路の律速段階であるグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) の 6 つの酵素活性及び GLUT2 蛋白, mRNA が冷保存, 温虚血及び再灌流時にラット肝でどのように変化するかを解析し、これらの変化のパターンにより移植前のグラフトの障害度を評価できるか検討した。

材料と方法

雄の Wistar ラットより肝を摘出し以下の如く 4 群に分けた。コントロール群 (C 群): 肝摘出のみ, 冷保存群 (P 群): 4°C の UW 液に単純浸漬保存 (24時間, 48時間), 温虚血群 (W 群): UW 液に浸し 37°C に加温 (60分, 120分) 及び冷保存後温虚血群 (PW 群): 24時間冷保存後 37°C に加温 (60分, 120分)。ラットでは肝移植の成功の為に冷保存では 24 時間, 温虚血では 60 分が限度であると報告されており, 冷保存 24 時間, 温虚血 60 分を肝の部分傷害, 冷保存 48 時間, 温虚血 120 分を肝の完全傷害と見なした。これら各群の各ポイントで採取した肝組織にて, ウサギ抗ラット GLUT2 抗体を用いてウェスタンブロッティング, ヒト GLUT2 cDNA を用いてノザンブロッティングを行い, 酵素法で GK, PFK, PK, FBPase, G6Pase, G6PDH の活性を測定した。

結果と考察

GLUT2 蛋白, mRNA 及び PK, FBPase, G6Pase, G6PDH 活性は P 群, W 群共に, 有意な変化を認めなかった。これより, 48 時間までの冷保存及び 120 分までの温虚血では, 細胞内への糖輸送, 糖新生, ペントースリン酸経路は傷害されないと考えられた。

これに対し, 解糖系は P 群, W 群ともに傷害された。これよりグラフト肝の糖代謝は解糖系が傷害された結果糖新生に傾くと考えられた。また, その傷害パターンは温度依存的であり, P 群では GK 活性のみが [1.33 ± 0.23 IU/g 蛋白 (0 時間), 0.70 ± 0.17 (24 時間, $p < 0.05$), 0.57 ± 0.12 (48 時間, $p < 0.01$)], W 群では PFK 活性のみが [4.37 ± 0.06 IU/g 蛋白 (0 分), 2.67 ± 0.15 (60 分, $p < 0.0001$), 1.53 ± 0.06 (120 分, $p < 0.0001$)] 有意に減少した。さらに, 冷保存と温虚血を組み合わせた PW 群でも, GK 活性は冷保存中のみ, PFK 活性は温虚血中のみ有意に下がり, これらの変化は時間依存的であった。

以上より, 冷保存と温虚血では解糖系の傷害される部位が違い, グラフト肝の GK, PFK 活性を測定することによりに

り冷保存時間と温虚血時間を別々に測り、グラフト肝傷害の程度及びグラフト肝の viability を移植前に推定できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝移植の成功には Graft 肝の viability がよく保たれていることが必須であるが、現在これを移植前に正確に測る方法はない。

本研究では、冷保存、温虚血による Graft 肝障害時の糖代謝の変化を解析し、移植前に Graft 肝の viability が評価できるかが検討された。Rat 肝を用い 4℃での冷保存（24時間、48時間）、37℃での温虚血（60分、120分）時の肝細胞膜の糖輸送能を Glucose transporter 2 の蛋白及び mRNA で、解糖能を Glucokinase, Phosphofructokinase, Pyruvate kinase 活性で、糖新生能を Fructose 1,6-bisphosphatase, Glucose 6-phosphatase 活性で、ペントースリン酸経路を Glucose 6-phosphate dehydrogenase 活性で観察している。

冷保存及び温虚血時共に解糖のみ傷害された。ただし冷保存時には Glucokinase 活性のみが、温虚血時には Phosphofructokinase 活性のみが時間と共に有意に低下した。冷保存後に温虚血を加えても、Glucokinase 活性は冷保存中のみ、Phosphofructokinase 活性は温虚血中のみ有意に低下した。以上の結果は Graft 肝の Glucokinase, Phosphofructokinase 活性の測定により冷保存時間と温虚血時間を別々に測り、Graft 肝の viability を移植前に推定できる可能性を示唆している。

以上の研究は Graft 肝内の糖代謝の解明に貢献し、肝移植における Graft 肝 viability の移植前評価法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月28日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。