

氏 名 武 田 佳 久  
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)  
 学位記番号 医 博 第 2094 号  
 学位授与の日付 平 成 11 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当  
 研究科・専攻 医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻  
 学位論文題目 Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor  
 (ラット脂肪肝における冷保存後の肝細胞, 類洞内皮細胞の形態的变化及び肝細胞増殖因子の保護作用に関する研究)  
 (主査)  
 論文調査委員 教 授 山 岡 義 生 教 授 田 中 紘 一 教 授 今 村 正 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

肝移植においてドナーが脂肪肝である場合(ドナー肝の約25.8%), primary nonfunction graftの発生率が高く, 移植成功率は正常肝に比べると著しく減少する。しかし, この原因はいまだ明らかでなく, 対策も確立していない。今回の研究は, ラット脂肪肝を用いて, 冷保存後の肝細胞と類洞内皮における傷害を検討することによりその原因を明らかにし, 新しい傷害防止法を創出することを目的として行われた。

200~250gの雄性Wistar ratにコリン欠乏食(以下CDD)を7日投与し, 脂肪肝を作成した後, UW(University of Wisconsin)液にて0, 4, 24 hrs 4℃の肝冷保存を行った。対照群は正常肝の冷保存群とした。冷保存後, 類洞構造と内皮を走査型電子顕微鏡で, また肝細胞と類洞内皮の断面を透過型電子顕微鏡で観察した。これらの観察から, 正常肝では, 類洞構造が索状かつ直線状で, 類洞内皮はfenestraが見られ, よく維持されていた。冷保存後はmicrovilli, blebの増加と類洞内皮の剥離がみられたが類洞構造は比較的保たれていた。脂肪肝では冷保存なしでも類洞腔の狭小化と索状配列の破壊, microvilli, blebと類洞内皮の剥離がみられた。これらは冷保存時間の延長に伴い高度となり24hr冷保存では広範な類洞内皮の剥離と類洞構造の崩壊が認められた。また, 肝細胞は, 正常肝では24hr冷保存でも軽度の浮腫と少数の小脂肪滴が見られるだけであるが, 脂肪肝では4hr冷保存後, 脂肪滴が大きく増加し, 24hr冷保存になると脂肪滴は巨大化して細胞内器官が辺縁に圧排され, 細胞外へ脱出するものも認められた。さらに, 肝内脂肪の変化をSUDANⅢによる脂肪染色で観察したところ, 脂肪肝では脂肪滴が, 冷保存に伴い著明に増大した。次いで, 肝細胞傷害の指標に冷保存肝再灌流直後の流出液中のALTを, 類洞内皮傷害の指標に再灌流20分後のHyaluronic acid uptake rate(以下HUR)を測定した。0hr冷保存肝では, 正常肝, 脂肪肝のALT(mean±SEM)は, 各々 $3 \pm 0.1$ ,  $9 \pm 5.0$  (IU/L), 4hr冷保存肝では $7 \pm 5.0$ ,  $313 \pm 65.8$  (IU/L)となり, 脂肪肝4hr冷保存のみ著明な上昇を認めた( $P < 0.005$ )。正常肝と脂肪肝のHUR(mean±SEM)は, 0hr冷保存肝では各々 $5.5 \pm 0.25$ ,  $3.3 \pm 0.1$  ( $\mu\text{g}/\text{g}/\text{hr}$ ), 4hr冷保存肝では $4.1 \pm 0.1$ ,  $2.6 \pm 0.13$  ( $\mu\text{g}/\text{g}/\text{hr}$ )となり, 0, 4hr冷保存ともに脂肪肝でHURの減少が見られた( $P < 0.05$ )。

以上より, 脂肪肝は冷保存後, 脂肪滴の増大が見られ, 肝細胞傷害が著明となり, 肝類洞構造及び類洞内皮も正常肝に比し冷保存で高度に傷害された。

これらの傷害を軽減するため, 肝細胞増殖因子human recombinant hepatocyte growth factor(以下hrHGF)をCDD 7日投与したラットに冷保存6時間前に門脈内に $100 \mu\text{g}/\text{body}$ 投与し, さらに $300\text{ng}/\text{ml}$ となるようにUW液に混入して4hrs冷保存後, 同様の方法でhrHGFの効果をCDD 7日投与し4hr肝冷保存した非投与群と比較した。hrHGF投与群では非投与群に比し肝細胞内の脂肪滴が縮小され, また類洞構造, 内皮ともによく維持され, 灌流液中のALTは $67 \pm 13.1$  (IU/L)と減

少し ( $P < 0.01$ ), HURは $4.35 \pm 0.63$  ( $\mu\text{g/g/hr}$ ) と上昇した ( $P < 0.05$ )。

以上の結果より, hrHGFの投与は脂肪肝冷保存後の肝細胞, 類洞内皮傷害を軽減すると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

肝移植においてドナーが脂肪肝である場合, 無機能肝の発生率が高く, 移植成功率は正常肝に比べると低い。しかし, この原因はいまだ不明で, 対策も確立していない。本研究は, ラット脂肪肝を用いて, 冷保存後の肝細胞と類洞内皮傷害を検討することにより無機能肝の発生原因を明らかにし, その防止法を工夫することを目的として行った。

脂肪肝は, ラットにおいてコリン欠乏食により作成して, 肝冷保存を行った。電顕像では, 脂肪肝の場合, 冷保存なしでも類洞の不整, 類洞内皮の剥離が見られた。これらは冷保存期間の延長に伴い高度となり, 24hr冷保存では類洞内皮の広範囲の剥離を認めた。また, 脂肪肝では脂肪滴が, 冷保存期間の延長に伴い著明に増大した。

次いで, 肝細胞傷害の指標に再灌流直後の流出液中のALTを, 類洞内皮傷害の指標にヒアルロン酸取り込み率 (HUR) を測定した。ALTは, 脂肪肝冷保存で著明な上昇を認め, HURは脂肪肝で有意に減少した。

従って, 脂肪肝では冷保存後, 肝細胞傷害が著明となり, 類洞内皮も正常肝に比し冷保存で高度に傷害されると考えられた。

そして, 脂肪肝ラットに肝細胞増殖因子 (hrHGF) を門脈内と保存液に投与して非投与群と比較した。hrHGF投与群では脂肪滴が縮小され, 類洞内皮もよく維持され, 灌流液中のALTは有意に減少し, HURは有意に上昇した。

従って, hrHGFの投与は脂肪肝冷保存後の肝細胞, 類洞内皮傷害を軽減すると考えられた。

以上の研究は, 脂肪肝移植における無機能肝発生の機序解明に貢献し, 移植成功率の上昇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11年2月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。