

氏 名	にし たい りゅう た 西 躰 隆 太
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2402 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 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 器 官 外 科 学 講 座 消 化 器 外 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Influence of Extracorporeal Porcine Liver Perfusion on Non-Human Primates: Minimizing Hemolysis Improves Subsequent Survival. (ブタ全肝型人工肝臓の霊長類への影響: 溶血の抑制は予後を改善する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 田 中 紘 一 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

＜目的＞本研究の目的は、ブタ全肝型人工肝臓の前臨床試験として、霊長類を用いてその安全性を検討することである。

＜方法1＞7頭の11.5～20.5kgの健康なドグエラヒヒを用い、うち1頭は供血用とした。ブタ肝臓(292±39g: mean±SD)は人工肝臓システムの中で、門脈、動脈から一定流量のヒヒ全血で灌流した。人工肝臓システムとヒヒは50ml/minの流量で直接交差灌流した。またヒヒ血液のACTは200～250秒に調節し、人工肝臓システムにはプロスタグランジン E₁(2ng/min/g liver)を持続投与した。交差灌流はブタ肝臓に以下3点のいずれかが認められた時に中止した。1) 動脈灌流圧200mmHg以上または門脈灌流圧60mmHg以上への上昇, 2) 肝表面からの出血, 3) 胆汁産生量の5μl/hr/g liver以下への低下。経時的にヒヒ血液を採取して生化学データ、血清ヘモグロビン、補体価を計測した。ブタ肝臓・死亡したヒヒの剖検臓器は組織学的に検討した。

＜結果1＞一例目は10時間の交差灌流が可能であったが、ヒヒに高度の肉眼的溶血が起こり、血清ヘモグロビンが47mg/dLまで上昇したため中止した。その後ヒヒは乏尿となり、2日後に急性腎不全のため死亡した。組織学的には、ブタ肝臓内に著明な微少血栓形成が認められ、剖検ヒヒ腎臓に血栓形成と広範囲な尿細管壊死が認められた。腎不全の原因として溶血が考えられたため、肉眼的溶血も灌流中止条件に加えてさらに5例の交差灌流を行った。灌流時間は最長6時間まで(4.4±1.2時間)と短縮したが、血清ヘモグロビンの上昇は14.8±5.8mg/dLまでに抑制できた。灌流後のブタ肝臓内には血栓形成を認めず、またヒヒに腎機能障害も認めなかった。灌流中には溶血の他、血小板数の著明な低下と貧血、軽度の補体価の低下を認めたが、1ヶ月以内に前値に回復し、以後血液生化学データに変化はなかった。これら5例のヒヒは全例大きな合併症なく1年以上生存した。

＜方法2＞ヒヒへの免疫学的影響及び溶血の機序について検討するため、flow cytometryによりヒヒ末梢血リンパ球サブセット・表面抗原の解析、ヒヒ血漿中抗ブタ抗体価の測定を行った。またELISA法によりヒヒ血漿中に混在するブタ抗体の検出を行い、溶血への関与を検討した。

＜結果2＞ヒヒ抗ブタIgM・IgG抗体価は灌流開始後3日目まで低下し、1週間から1ヶ月高値を示す傾向があった。しかしヒヒ末梢血T細胞のCD4/CD8サブセットの比に変化はなく、活性化マーカーであるCD25・CD69やB細胞分化マーカーであるCD23陽性率に変化を認めなかった。ヒヒ血漿中に微量のブタIgG、IgMが灌流中から1週間後まで検出されたことから、ブタ抗体によりヒヒ赤血球が溶血した可能性が考えられたが、in vitroではブタ抗体に感作されたヒヒ赤血球にヒヒ血清を加えても溶血は惹起されなかった。従って、異種交差灌流がヒヒに及ぼす免疫学的影響は軽微であり、またヒヒ赤血球に対する直接の異種免疫反応は溶血の原因ではないことが示唆された。

＜考察＞本研究により、溶血がブタ全肝型人工肝臓の重要なリスクファクターであることが明らかとなり、灌流時間の短縮によって溶血を抑制すれば宿主に重篤な合併症を引き起こさないことが判明した。また溶血は、異種免疫反応に起因するブタ肝臓洞内皮細胞障害とそれに伴う微少血栓形成により、ヒヒ赤血球が障害されたためであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はブタ全肝型人工肝臓の臨床応用のための前臨床研究として、ブタ全肝型人工肝臓を霊長類（ヒヒ）と直接交差灌流にすることにより霊長類への安全性について検討されたものである。

ブタ全肝型人工肝臓と健常ヒヒの直接交差灌流を10時間施行した第1例目ではヒヒに高度の肉眼的溶血が認められ、ヒヒは溶血に起因する急性腎不全のため死亡した。以後の5例の交差灌流では溶血が発現した時点で交差灌流を中止することにより、ヒヒは一過性の血小板の低下、貧血、軽度の補体価の低下をきたしたものの、腎機能障害などの重篤な合併症は発現せず1年以上生存した。しかし、交差灌流時間は 4.4 ± 1.2 時間と短縮した。灌流中のヒヒ血漿中に微量のブタ IgM, IgG を検出したが、致死の合併症を誘発した溶血の原因として、ヒヒ赤血球に対するブタ抗体の直接的な免疫学的反応によるものではなく、異種免疫反応に起因するブタ肝類洞内皮細胞障害とそれに伴う微少血栓形成がヒヒ赤血球に障害を引き起こしたためであることを明らかにした。さらに、交差灌流前後におけるヒヒの末梢血リンパ球の解析（CD4/CD8, CD20, CD69, CD23）では有意な変化はなく、ヒヒに対する免疫学的影響は軽微であった。また、ヒヒ抗ブタ抗体価は1週間後に一過性に上昇したが、次第に低下し1年後には正常に復していた。

以上の研究はブタ全肝型人工肝臓の前臨床研究として臨床応用のために危険因子の解明に貢献し、重症肝不全の治療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4月17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。