

氏名(本籍)	なか の より たか 中野 順 隆 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4859 号		
学位授与年月日	平成 20 年 11 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Platelet Dynamics in the Early Phase of Postischemic Liver <i>In Vivo</i></b> (虚血再灌流後早期の肝微小循環における血小板動態)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	兵 頭 一之介
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	堀 哲 夫
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	大 川 敬 子
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	三 輪 佳 宏

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

肝切除術や移植後に発生する肝臓の虚血再灌流障害のメカニズムとして、肝マクロファージである Kupffer 細胞と好中球との関連が報告されている。一方で、血小板は、これまでその止血・凝集機能のみに注目されていたが、近年は炎症反応の調節因子としての機能に関する報告が多くなっている。しかし、これまでに Kupffer 細胞と血小板を *in vivo* において評価を行った報告は認められない。そこで、著者らは *in vivo* 肝虚血再灌流モデルを用いて Kupffer 細胞の有無と血小板動態の関連 (i) 集積する血小板数; ii) 集積する血小板の小葉内分布; iii) 血管径および灌流状態の変化; iv) 接着因子との関与) を生体顕微鏡により観察し検討を行った。

### (方法)

雄性 Wistar rat 220 ~ 250 g を Kupffer 非除去 + 虚血群 (KC+ 群) および Kupffer 除去群 + 虚血群 (KC- 群) の 2 群に分けた。ラットに Pentobarbital (50 mg/Kg) 腹腔内投与し全身麻酔を導入し、60 分毎に 10 mg/kg を静脈投与し麻酔を維持した。ラットに気管切開を行い、挿管し人工呼吸管理とした。保温盤を用いラットの体温を 37 度に維持した。内径頸動脈および総頸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、持続動脈圧測定および持続輸液を行った。ラットを仰臥位とし、腹部横切開にて開腹した。肝周囲靭帯を切離し呼吸による肝移動を最小限にできるよう肝左葉を脱転し、正立型蛍光顕微鏡にステージングし観察した。C12MDP を虚血 48 時間前に静脈投与しラット肝 Kupffer 細胞を除去した。比較対象のため KC+ 群では、48 時間前に生理食塩水を投与した。C12MDP 投与により 95% 以上の肝 Kupffer 細胞の除去効果を認めた。蛍光標識血小板は、同種別個体より抽出し Rhodamine6G により体外標識化し、観察時の 5 分前に  $1 \times 10^8$  個 (ラット循環血小板数の約 1% 量に相当) を投与した。観察は、正立型生体顕微鏡を用い、肝虚血前、再灌流後 0, 30, 60, 120 分後の集積血小板数および分布、類洞径、非灌流類洞を測定した。ラット肝 Kupffer 細胞 (ED-2 抗体) および接着因子 P-selectin (CD-62P) を再灌流後 120 分の固定組織にて染色し発現、分布を測定した。上記観察時間毎に肝障害の指標である肝酵素 (ALT) を測定した。電子顕微鏡を行い再灌流後 120 分の肝類洞細

胞の変化を観察した。

(結果)

虚血再灌流極早期より血小板は肝類洞内皮に集積し、その後も経時的に増加を認めた。門脈末梢から類洞領域に多く集積を認め、Kupffer細胞の分布に相関していた。Kupffer細胞の除去は、早期に集積する血小板数を著明に抑制し、微小循環障害、特に類洞内皮への障害を抑制した。再灌流早期では、代表的な血小板接着因子である、P-セレクチンの発現は認めず、早期集積する血小板への接着因子の影響を認めなかった。

(考察)

Kupffer細胞と血小板には強い関連性があり、その後に誘発される肝障害への関与が示唆された。一方で、再灌流早期では、肝類洞における血小板集積と接着因子の関与は小さいと考えられた。血小板の集積増加による肝障害への関与は不明なままであり、今後の課題と考えられた。

(結論)

虚血再灌流後、血小板の集積は白血球に先行し、この血小板集積には肝Kupffer細胞の存在が重要である。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では肝臓の虚血再灌流障害時のKupffer細胞と血小板との関連が報告されている。審査では、血小板の蛍光標識法とその活性に与える影響、観察における呼吸移動によるズレを抑える工夫、類洞内で20秒静止する血小板のカウントの仕方、類洞径の測定法、摘牌との関係、P-selectin以外の接着因子の関与、血小板の動態がKupffer細胞の活性化と肝障害の指標となる点について審査委員からの質疑を受けたが、著者はその内容をよく理解し妥当な説明を行った。今後は、血小板にフォーカスを当てた研究データを、さらに積み重ねていくことが必要であると考えられる。

学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。