

審査の結果の要旨

氏名 田中秀明

本研究は、近年本邦を中心に症例数が急増している成人間生体部分肝移植において問題となる過小グラフト、すなわちグラフトサイズ mismatches における病態解明の手段として、ラットを用いた 20%部分肝移植モデルの確立を試みたものである。更にこのモデルを用いて、冷保存中のグラフトにアデノウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する *ex vivo* 遺伝子導入法を組み合わせた。この方法により 20%部分肝グラフトへの **hepatocyte growth factor (HGF)** 遺伝子の導入を行い、移植後の部分肝グラフトの増大と機能回復に与える影響を検討し、以下の結果を得ている。

1. 20%部分肝移植モデルは、**syngeneic** ラットの組み合わせで行った。まずドナー肝の中葉、左葉および尾状葉を切除した後、20%重量に相当する右葉をグラフトとして摘出した。特に中葉および左葉切除の際は、門脈左枝を結紮切離し両葉を虚血にした上で、根部を3回に分けて結紮切離することで、切除断端よりの出血もしくは肝静脈部の狭窄を予防した。レシピエントにおける手技は **Kamada** 法による **two cuff method** に準じて移植を行った。この際著者が考案した以下の工夫を加えることにより、手術手技としてより安定したものにする事ができた。すなわち、門脈とグラフト下部下大静脈のカフ柄をともに切離することで、術後に起こるグラフトの増大に起因するカフ柄による門脈の圧迫、また、それによる門脈狭窄もしくは門脈血栓症を予防した。グラフト下部下大静脈のカフ柄についても、それ自身が増大するグラフトの一部に食い込み、障害を与えることを防ぐため切離を行った。ステントにより開通した胆管については、術後に胃や十二指腸などの腸管がグラフト周囲に強固に癒着する際に不自然にねじれが起こ

り、その状態でのグラフト増大に伴う胆管への圧迫が相まって、術後高頻度に胆管狭窄もしくは閉塞が起こることが判明した。これを解決するために、胆管ステント部を、生理的位置に近い場所で、門脈のカフに6-0絹糸で固定するという手技上の工夫を行った。これにより術後生存率100%を得、術後T.Bil濃度はほぼ1mg/dl以下で安定して推移することが示された。このモデルにおける術後のグラフト重量の増大は、術後1週間目で全肝の85%、2週間目には全肝の96%までの回復を示したが、血漿アルブミン値は約3.3g/dlと低値が続いた。

2. 上記ラット20%部分肝移植モデルを使って、冷保存中のグラフトにアデノウイルスベクターを用いて遺伝子を導入するex vivo遺伝子導入法を行った。バックテーブルにて、 1×10^9 plaque forming unit(pfu)のアデノウイルスベクターを、レシピエントより摘出した20%部分肝の門脈から灌流し、グラフト内にtrapさせた状態でcold bath内でincubateした。その間にレシピエントの手術を始め、全肝摘出前の準備を行った。グラフトを30分間incubateした後に、グラフト門脈より生理食塩水で残存したベクターをflush outし、以後は上記のごとく移植手術を行った。 β -galactosidase遺伝子を挿入したベクター(AxCALacZ)を用いて、ex vivo遺伝子導入した群(LacZ ex vivo群)で、グラフトへの導入効率をX-gal染色にて検討した。比較のためex vivoでは導入を行わず、等量のベクターを手術直後にレシピエントに静脈注射した群(LacZ iv群)も検討した。グラフトでのX-gal陽性率は、LacZ iv群が術後1日目、3日目にそれぞれ11%、38%であったのに対し、LacZ ex vivo群はそれぞれ36%、69%と有意に高値を示した。またLacZ ex vivo群では他臓器での発現が殆ど認められなかったが、LacZ iv群では特に脾臓での発現が顕著であった。またLacZ iv群はLacZ ex vivo群と比較して抗アデノウイルス抗体価の上昇が早期から認められた。静注法に比べex vivoでの導入は、ウイルスベクターが全身のリンパ組織に暴露されにくく、したがってベクターに対する宿主の免疫反応が起きにくいことが示された。

3. この方法によりHGF遺伝子の導入を行い、移植後の部分肝グラフトの増大と機能

回復に与える影響を検討した。ラット HGFcDNA を組み込んだベクター(AxCAHGF) 1×10^9 pfu を導入した群(HGF ex vivo 群)で、ウエスタン・ブロット法によって HGF 蛋白が増加していることが認められた。HGF ex vivo 群は LacZ ex vivo 群と比較してグラフト重量の増加は認められなかったが、BrdU 染色では陽性率が他群を上回っていた。血漿中アルブミン値は術後 1, 3, 7 日目の全てにおいて LacZ ex vivo 群より有意に高値を示し、術後 7 日目には生食群と比較しても有意に高値を示し、HGF 遺伝子導入によりアルブミン合成能の著明な促進効果が得られることが示された。

以上、本論文は、20%部分肝移植モデルの手技に、アデノウイルスベクターを用いた ex vivo での HGF 遺伝子導入法を組み合わせることにより、部分肝の再生が促進されることを示した。この部分肝移植モデルは、部分肝に対する拒絶反応や虚血再灌流障害などの負荷を検討する実験への応用が可能であり、臨床の成人間部分肝移植における様々な病態の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。