

虚血性肝障害の発生機序と予防

竹井謙之* 川野 淳*
房本英之* 鎌田武信*

はじめに

肝臓は、生体において物質の合成、代謝機能の中心的役割を果たしているが、それゆえに非常にエネルギー需要が大きい臓器であり、短時間の虚血に対しても感受性が高く、速やかに組織学的・機能的障害が招来される。肝虚血は、様々な病態に合併するが、とりわけ広範囲の肝切除術や肝移植では不可避である。肝切除術では、出血を最小限にするため肝血流の一時遮断が繁用されている。一方、肝移植においては、ドナー肝は保存液中に浸漬冷保存され、臓器は長時間の cold ischemia の状態におかれることになる。最近、新しい臓器保存液の登場により、保存可能時間は改善されたが、長時間保存後の肝グラフト機能不全、いわゆる“primary nonfunction”の発生を完全に予防するには至っていない。また、脳死状態のドナーは、循環動態が不安定になっていることが多く、臓器獲得時すでに肝臓が虚血状態におかれていることもありうる。以上の例をとってみても、虚血による肝障害の発生機序を明らかにし、虚血性肝障害を予防する方策を確立することは、重症肝障害に悩む患者に大きな光明をもたらすことになる。

虚血ストレスによる臓器障害機序の研究については、長年にわたり、多くの研究者の努力の集積がある。とりわけ、最近は臓器移植との関連からその重要性がいっそう増している。それにもかかわらず、私たちはまだ、虚血による臓器障害機序の全貌の解明というゴールからは遙かに遠く離れた所にいるといわざるを得ない。加えて、「虚血

性肝障害の発生機序と予防」という大テーマを余すことなく論ずることは、とても私の力のおよぶところではない。本稿では虚血時の細胞障害の機序について最近の知見に触れ、次いで臓器レベルの考察では、肝移植におけるグラフト障害の病態とその予防法の現況に焦点を絞り、私たちの成績を中心に概括する。

1. 肝細胞における hypoxic injury の機序とその予防

細胞死の機序に関する2つの仮説

あらゆる細胞は、好気性の代謝を営んでおり、虚血時の低酸素状態では、細胞により虚血に対する脆弱性に差異はあるとしても、エネルギーレベルの速やかな低下と共に、最終的には細胞の“integrity”に破綻が生じ、細胞死に至る。細胞障害の機序については、細胞内カルシウムのホメオスタシスの破綻が重要な関与をしていることが広く認められている。Farber らの説¹⁾によると、虚血で酸素の供給が阻害されると、ATP 産生が低下して細胞膜に存在するカルシウム輸送系の機能低下が起こる。またミトコンドリアの膜電位の消失によりミトコンドリア内に蓄積されたカルシウムの放出が起こり、細胞内カルシウム濃度が増大する。生理的な条件、例えばホルモンに対する細胞内カルシウムの増加は、せいぜい 1000 μM までであるが、細胞障害機転の働く場合は、mM のオーダーまで上昇する。このため細胞内プロテアーゼ活性が異常に亢進し、細胞内の蛋白変性を招来したり、細胞の integrity を維持するうえで欠かせない細胞骨格の変性により細胞膜上に bleb の形成が起こり、その bleb の破綻により非可逆的な細胞障害 (=細胞死) が導かれる。この

*大阪大学第一内科

説を支持する成績として, Thurman らは灌流肝を用い, 低濃度のカルシウム拮抗剤 nitrendipine が hypoxia による肝細胞障害を軽減することを報じている²⁾.

一方, 細胞内カルシウムの上昇が, 細胞死に至る“final common pathway”であるという説には反論もある. Lemasters らは, 単一肝細胞を, cyanide と iodoacetate 存在下のいわゆる‘chemical hypoxia’の状態におき, digitized video microscopy を用いて細胞内カルシウムと細胞形態の変化を検討した³⁾. 結果は, 細胞膜の bleb 形成は, 細胞内カルシウムの上昇の開始よりはるかに早期に出現し, 細胞死が確認される時点まで, 細胞内カルシウムの上昇は起こらないというセンセーショナルなものであった. 彼らの仮説によれば, ATP の枯渇によって, エネルギーを使用しながら合成・分解という, ダイナミックな平衡状態にある細胞骨格に変性もたらされ, この結果細胞膜の一部に脆弱な部位が出現, bleb となって成長し, ついに巨大化した bleb の崩壊という形で不可逆性の細胞障害が導かれる. この説の立場に立てば, 細胞内カルシウムの増加は, 細胞膜の破壊による結果にすぎないということになる.

低酸素下における細胞死のメカニズムとしてどちらが正しいかについては今後の検討が必要であろう. しかし, いずれにしてもエネルギー産生が阻害され, 細胞内で利用可能な ATP が減少することが引き金になっていることには違いがない. 理論的には, 無酸素条件下でも ATP が産生されるシステムがあれば細胞は虚血ストレスに耐えられるはずである.

現在, 虚血時のエネルギー産生源として利用が考えられているのが fructose である. 灌流肝を用いた実験では, fructose は2時間に及ぶ hypoxia においても, 肝細胞障害の発生を完全に抑制した⁴⁾. Fructose は, 肝細胞膜を自由に透過し, fructose に対し低 Km 値を示す fructokinase によって解糖系で分解され, 効率良く ATP を生成するため, hypoxia 時の肝細胞エネルギー代謝を改善すると考えられている⁴⁾.

pH paradox

酸素の利用障害が生じたとき, ATP の分解にともなう水素イオンの産生によって細胞内の pH

は低下する. 従来, この hypoxia 時のアシドーシスは細胞障害をいっそう増悪される方に作用すると考えられていた. これに対し, 最近 Lemasters 一派は, 単離肝細胞を‘chemical hypoxia’の状態におき, 培養液の pH が細胞の障害過程に及ぼす影響を検討している^{5,6)}. 培養液の pH を7.4より, 6.1まで段階的に下げることにより細胞内 pH を低下させ, 長時間の hypoxia において細胞内 pH を微酸性で維持すると, LDH 遊出は有意に抑制されていた. さらに微酸性の細胞内環境は, 細胞質に存在するプロテアーゼの活性化を阻止することにより cytoprotective な作用を発現することも明らかにされた(図1). 彼らは細胞内アシドーシスはむしろ細胞が低酸素

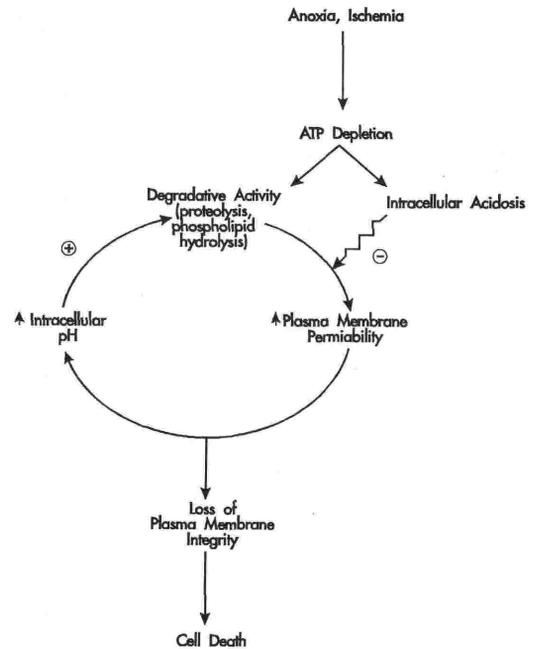


図1 細胞内 pH と虚血時の細胞障害の進展機序 (Lemasters らの仮説)

虚血ストレス時の ATP 枯渇は細胞内アシドーシスとプロテアーゼやフォスホリパーゼなどの活性化を惹起する. 細胞内アシドーシスはこれらの酵素の活性を阻害することにより細胞保護作用を示す. しかし, 細胞保護は完全ではなく究極的には細胞膜障害が招来され, 水素イオンが細胞外へ流出する. 結果として細胞内 pH は上昇し, その細胞保護作用が消失するため, 細胞死に至るプロセスに拍車がかかる. (文献6より)

状態に対して示す adaptation であって、低酸素状態におかれた細胞を障害から保護すると考えている。

2. 臓器レベルでの虚血障害の機序とその予防

虚血障害における肝の特異性

肝臓に限ったことではないが、細胞レベルの事象をそのまま臓器にスケールアップして敷衍する事はできない。臓器を構成する細胞の種類によって虚血ストレスに対する脆弱性が異なり、また、虚血によって障害されるまでに至らなくともその機能に修飾を受けることがある。そして、これらの諸細胞の特長・差異が相互に関与し合って、臓器としての虚血に対する反応性を規定している。とりわけ肝臓は複雑な構築を持った臓器であり、肝小葉は肝実質細胞と、内皮細胞や Kupffer 細胞など非実質細胞からなる類洞システムの二つの系から構成されている。実質細胞は、物質の代謝、合成に中心的役割を果たしているが、一方、類洞システムは、酸素や栄養を輸送し、また肝細胞で代謝・合成された物質を運び去っている。肝臓がその多彩な機能を維持して行くためには、肝細胞と類洞システムの両者の役割が不可欠である。

しかし、肝においては後で述べるように、類洞を構成する細胞群の虚血反応性が高く、類洞システムへの障害が、肝微小循環障害を招来し、これがまた局所の低酸素化に拍車をかけるという、一種の悪循環を形成することにより病変が進展する。また、臓器レベルでの虚血障害では、純粋に虚血時に引き起こされる障害のみならず、血流再灌流時に発生する障害の関与も劣らず重要である(いわゆる reperfusion injury)⁷⁾。

肝実質細胞と非実質細胞の虚血耐性

最近の検討により、グラフト冷保存(cold ischemia)およびその後の肝移植において、類洞内皮細胞の障害や Kupffer 細胞の活性化などの現象が起こることが明らかになってきた。これらの現象は、それぞれが関与し合って虚血障害の成立と進展の機序に参加している。

(a) 類洞内皮細胞障害と微小循環

Euro-Collins 臓器保存液(4°C)中での保存時間が肝実質細胞および非実質細胞の viability に及ぼす影響を調べた。図2に示したとおり、肝実質細胞は cold ischemia には比較的耐性で、24時間

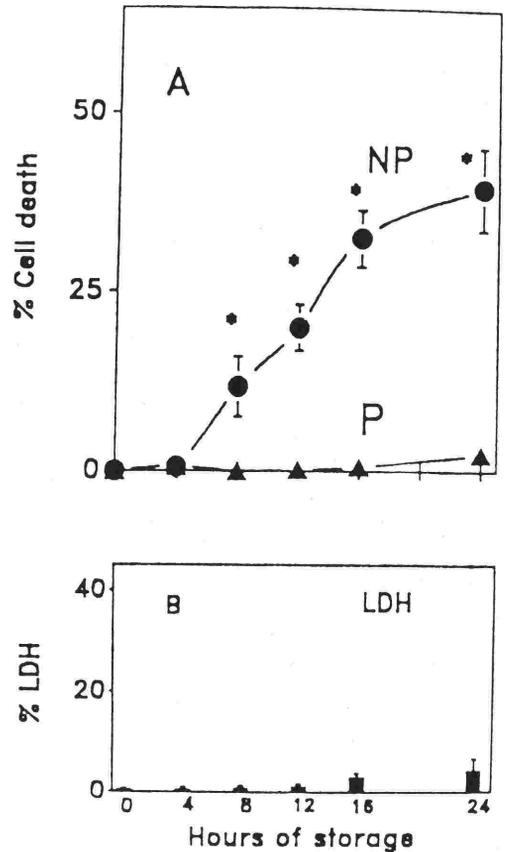


図2 Cold ischemia が分離肝細胞の viability に及ぼす影響
肝実質細胞(P)と非実質細胞(NP)をEuro-Collins 溶液にてインキュベーションを行った。非実質細胞は実質細胞に比べて、ischemia に対しはるかに脆弱であることが分かる。(文献8)より)

の保存後でも、ほとんど viability は損なわれていない。ちなみに、このような長時間保存後ではグラフトとしての viability はすでに失われている(すなわちレシピエントに移植されても生着しない)。

一方、類洞内皮細胞を含む非実質細胞においては、保存開始後早期から細胞障害が出現する。すなわち、非実質細胞にもたらされた障害の程度がグラフトの viability を決定する重要な因子であることを示している⁸⁾。私たちは、このようにしてもたらされた内皮細胞障害が、肝微小循環の変化を惹起し、肝移植時のグラフト障害機序に関与するのではないかと考え、生体顕微鏡システムを用いてラットの同所性肝移植後の類洞血流の検討

を行ってきた^{9,10}). Acridine orange により標識された多核白血球は、コントロール (非移植) 肝では、速度約 500 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で類洞内を滑らかに移動した。一方、Euro-Collins 液に1時間保存後 (生存条件) 移植された肝では、術後4時間後には白血球速度はすでに半減しており、4時間保存群 (非生存条件) では、さらに一層の減少が認められた。また、4時間保存群では1時間保存群に比し、類洞壁への白血球の粘着現象が著しく亢進していた (図3)。Propidium iodide 標識によって判定した細胞 viability の検討では、4時間保存群では、術後4時間ですでに、広範な壊死細胞の出現を認めた。以上の結果は、臓器の冷保存・再灌流に際して、内皮細胞障害が起こり、血流速度の低下、白血球粘着現象などの微小循環障害が出現し、組織への酸素供給を阻害することによってグラフト障害を招来したものと考えられる。

(b) Cold ischemia による Kupffer 細胞の活性化

前述のごとく、移植後の微小循環の変化には白血球の動態が深く関与している。白血球の内皮細

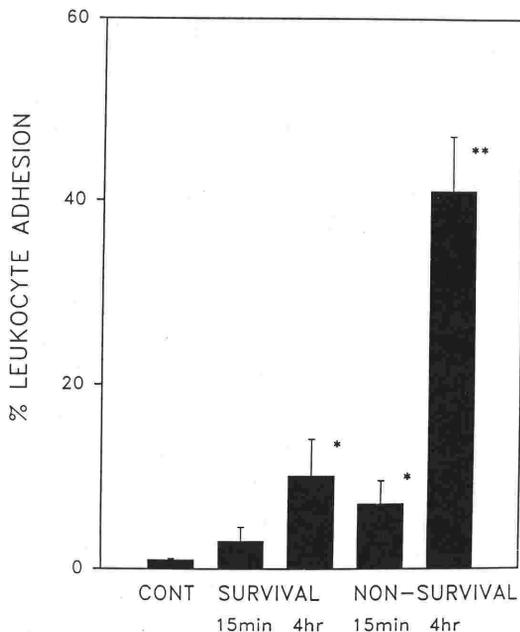


図3 移植後の肝類洞壁への白血球粘着
グラフトを Euro-Collins 溶液にて1時間 (SURVIVAL) あるいは4時間 (NON-SURVIVAL) 保存を行った後、移植し体顕微鏡により、肝類洞壁への白血球粘着現象を解析した。(文献9)より転載)

胞への粘着は活性マクロファージ (M ϕ) や好中球より放出される種々のプロテアーゼやラジカルにより内皮細胞表面が損傷を受けたり、サイトカインによって接着分子の発現が起こることによって惹起される。そこで、cold ischemia が、非実質細胞の一つである肝の resident M ϕ である Kupffer 細胞の機能修飾に及ぼす効果について検討した¹¹⁻¹³). 肝は Euro-Collins 液にて4-24時間の冷保存を行ない、保存終了時のグラフト Kupffer 細胞の活性化度をコロイドカーボンの貪食能により評価した。グラフトの Kupffer 細胞の活性化度は、冷保存時間に比例して増加した。長時間 (>4時間) 保存群の移植後2時間のグラフト肝の走査電顕像では、Kupffer 細胞の形態的活性化、内皮細胞傷害が認められ (図4-上段) さらにこれらの変化の程度は保存時間に依存していた。

また、レシピエントの上肝下大静脈血で測定した tumor necrosis factor (TNF) 値は術直後より保存時間に依存して上昇しており、活性化した Kupffer 細胞が TNF を産生したと考えられた¹⁴). Kupffer 細胞機能を抑制することが知られている methyl palmitate であらかじめドナーラットを処置しておく、Euro-Collins 4時間の保存後でも、Kupffer 細胞の活性化は防止され、レシピエントの生存時間も有意に延長した¹⁵). またプロテアーゼ阻害剤を保存液に添加することによってもグラフトの予後は改善した¹²). 以上の結果は、グラフトの冷保存中に、Kupffer 細胞の活性準備状態が進み、移植時の再灌流に際して活性化した Kupffer 細胞より、TNF やプロテアーゼ等の toxic mediators の放出が起こることにより、内皮細胞をはじめとするグラフト障害がもたらされると考えられる (図5)。

カルシウム拮抗剤 nisoldipine のグラフト保護効果

Kupffer 細胞の活性は、細胞内カルシウム濃度の上昇によって惹起されるとされる。そこで、カルシウム拮抗剤が Kupffer 細胞の活性化を抑制し、グラフトの予後を改善するのではないかと考えた。Euro-Collins 液に dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤 nisoldipine (Niso) を添加し、4時間の保存後、グラフト Kupffer 細胞の活性化度の指標としてコロイドカーボンの摂取率を測定すると、Niso の濃度に依存して Kupffer 細胞の活

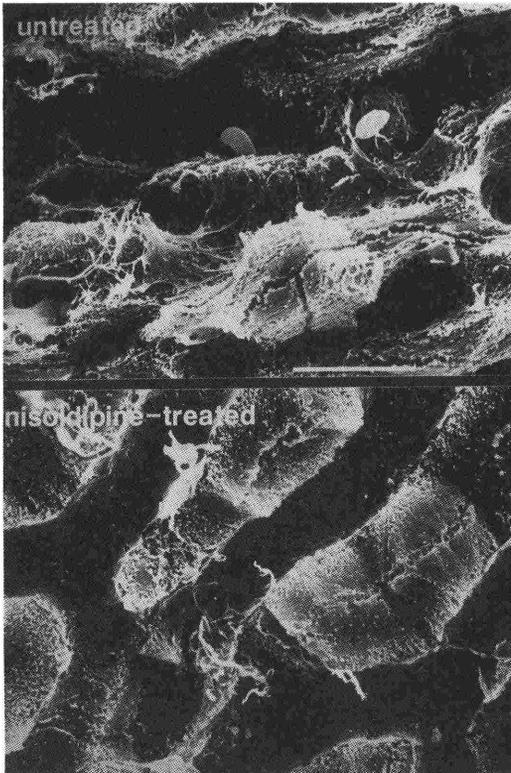


図4 冷保存・移植後のグラフト類洞電顕像
Lewis ラット肝を、Euro-Collins 溶液中に4時間浸漬保存後、レシピエント (Lewis) に移植した。移植2時間後、グラフトの類洞を走査電顕にて観察した。上段 (コントロール) では、内皮細胞の広範な傷害、実質細胞の萎縮が認められた。一方、保存液に nisoldipine ($1.4 \mu\text{M}$) を添加すると (下段)、これらの変化は軽微に抑えられていた。(文献¹²) より転載)

性は抑制され、 $1.4 \mu\text{M}$ ではカーボン摂取率は約1/3まで減少した (図6)。一方、Euro-Collins に4時間保存群ではレシピエントの平均生存時間は約1日に留まっていたのに対し、Niso $1.4 \mu\text{M}$ を添加した群では、生存日数は25日と有意に延長した (図7)。Niso はまた、移植後の血清 GOT のピーク値を半減させ、組織学的にも内皮細胞障害、実質細胞障害を抑制した (図4下段)。さらに上肝下大静脈血中 TNF 濃度の上昇は Niso 添加により有意に抑制されていた¹⁶⁾。また Marzi らは生体顕微鏡による検討で、Niso が白血球の類洞への粘着現象を減少させることを見いだしてい

る¹⁷⁾。以上のように、カルシウム拮抗剤は臓器レベルでは Kupffer 細胞の活性化を制御することにより肝グラフト保護効果を発現する (図5)。なお、肝細胞などの non-excitabile な細胞にカルシウムチャンネルが存在するかどうかについては従来明かではなかったが、最近教室の脇岡らによって、Kupffer 細胞の細胞膜上には、電位依存性カルシウムチャンネルが実際に存在することが証明された¹⁸⁾。

微小循環障害とエンドセリン

内皮細胞障害や Kupffer 細胞の活性現象の他に、虚血再灌流後の微小循環障害機序にはいくつかの因子が関与していることが明らかになりつつある。その一つに肝類洞系の vasoconstriction が挙げられる。私たちは、肝表面からの反射光のスペクトル分析により、組織のヘモグロビン量と酸素飽和度の測定を可能とする臓器反射スペクトル法を開発し¹⁹⁾、微小循環動態の解析に応用している。ラット肝に60分の温阻血を加え、再灌流したときの肝局所血液量と酸素化指標の変動を検討すると、再灌流直後には、局所血液量、酸素化指標とも著明に低下しており、微小循環系の血液量低下 (血管床の減少、すなわち vasoconstriction を示唆する) によって、組織への酸素供給が減少し、組織の低酸素化をもたらしたと考えられる。実際、24時間後には肝細胞壊死が広範に認められた²⁰⁾。また再灌流5分後の組織酸素化指標の回復率が75%を超えるかどうかを予後を判定する有用なパラメーターになりうることも明らかになった²¹⁾。

エンドセリンは内皮細胞で産生される強力な血管収縮物質である²²⁾。最近、エンドセリンレセプターが肝細胞膜に同定され、エンドセリンが肝臓においても血管作動性物質として微小循環の制御に関与していることが示唆された^{23,24)}。私たちの行った実験では、ラット肝に60分温阻血を与えた後再灌流すると、再灌流直後より上肝下大静脈血中エンドセリンは上昇を開始し、24時間にわたってコントロール値の5-6倍の高値を維持した。一方、再灌流前にラットに抗エンドセリン抗体を投与すると、肝組織酸素化指標は虚血前の80%以上まで回復し、組織障害も著明に抑制されていた。すなわち、エンドセリンは虚血再灌流障害の成因に関与していることが示唆された²⁰⁾。さらに、肝移植モデルにおいてもエンドセリンが術後の微小

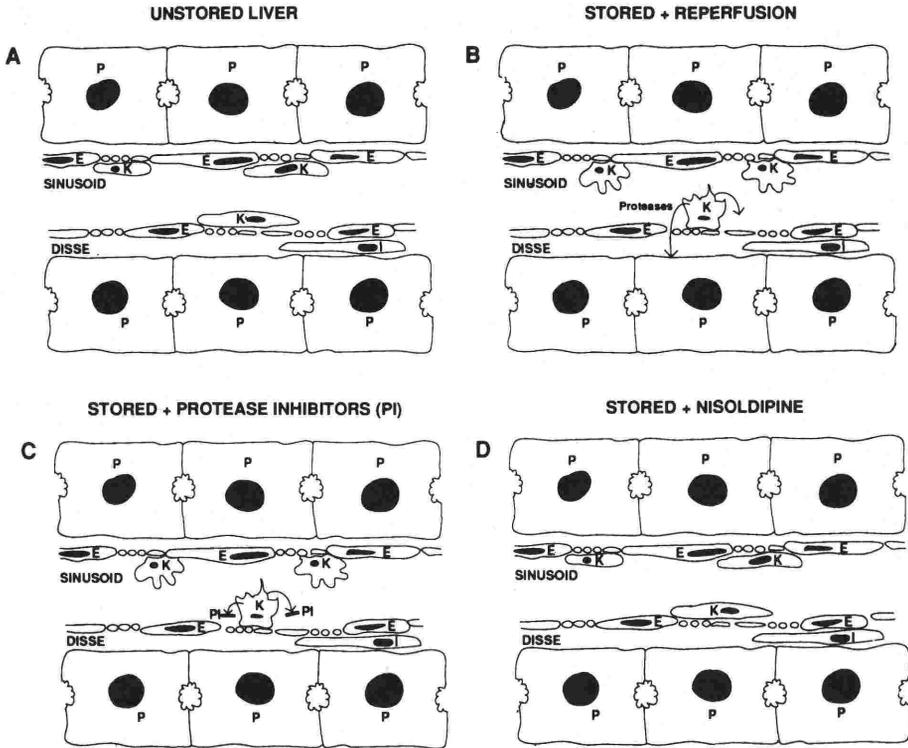


図5 肝移植におけるグラフト障害機序における Kupffer 細胞の役割
 長時間の冷保存及び再灌流後, Kupffer 細胞 (K) の活性化が惹起され, 活性化 Kupffer 細胞よりプロテアーゼなどのメディエーターが放出され, グラフトの障害を引き起こす (図B). Protease inhibitor (PI) は, プロテアーゼを阻害することにより (図C), またカルシウム拮抗剤 nisoldipine は Kupffer 細胞の活性化を抑制し (図D) グラフト保護効果を発現する.

循環障害の成因に関与するという成績も得ており²⁵⁾, これらの結果から抗エンドセリン療法が虚血操作にともなう微小循環障害を予防することが期待される.

温リンガー溶液灌流

冷保存中のグラフトの血管系は低温による直接の効果としても vasoconstriction の状態にあると考えられる. 私たちは, この点に注目し, implantation 直前にグラフトを, 温リンガー (37°C) 溶液で灌流する試みを行った²⁶⁾. この操作は予想通り, 肝血管抵抗を減少させ, 肝への血流の回復を促進した. さらに, 長時間保存後のグラフトの生存率が劇的に改善することが認められた.

また, 温リンガー灌流操作は冷リンガー灌流群で認められた血栓の形成, Kupffer 細胞の活性化を阻害することも明らかとなった. 加えて, 温リンガー灌流後は, 血中 TNF の上昇が抑制され,

肺胞腔内への出血等の肺障害所見も有意に改善していた. 以上の結果は, 温リンガーによる灌流が, 熱力学的な現象として血管抵抗を減少させるに留まらず, 微小循環・凝固系の制御や, サイトカイン分泌などの生体現象そのものに温度が関わっていることを示唆しており, 今後肝臓移植学における新しい分野を開拓していく可能性を示唆している.

Organ Rinse solution の開発

臓器保存液は細胞内液に近いイオン組成 (特に高カリウム) を有するため, レシピエントに移植される直前に細胞外液組成を持つリンガー溶液などを用いて灌流除去する必要がある. しかし, 保存そのものがうまくいっても, この最後の操作によって再灌流に起因する障害がグラフトに発生してしまうという矛盾があった²⁷⁾. UW 溶液などの新しい臓器保存液の登場に代表されるように,

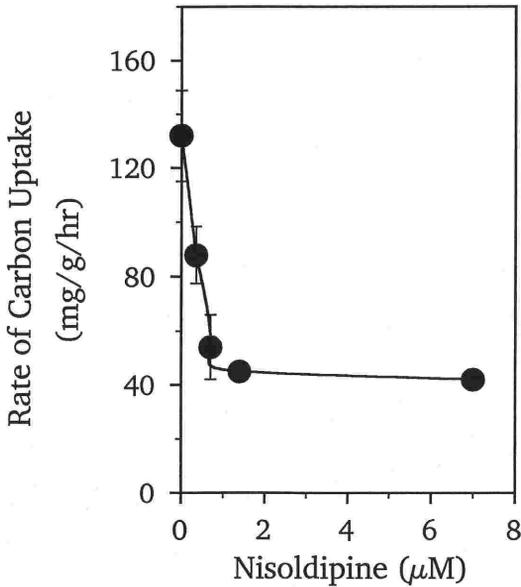


図6 カルシウム拮抗剤 nisoldipine がグラフト Kupffer 細胞の食能に及ぼす効果
 グラフトを, nisoldipine (0-8 μM) 添加 Euro-Collins 溶液中に 4 時間浸漬保存後, Kupffer 細胞の活性化を示す指標として, コロイドカーボンの摂取率を測定した. Nisoldipine は濃度依存性に Kupffer 細胞の活性化を抑制している. (文献12) より)

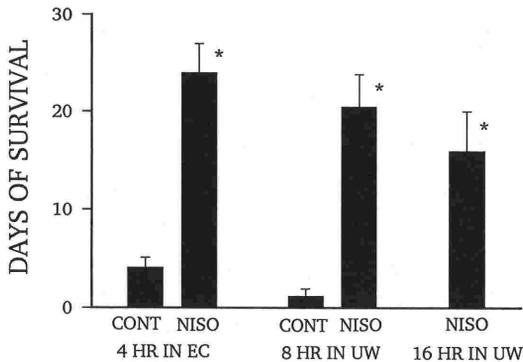


図7 Nisoldipine (NISO) のグラフトの予後に及ぼす効果
 グラフトを Euro-Collins 溶液にて 4 時間あるいは UW 溶液にて 8 及び 16 時間の保存を行った. Nisoldipine はそれぞれグラフトの生存時間を有意に延長した. (文献12) より)

なかった.

私たちは臓器を再灌流時の障害から保護しようとする様々なストラテジーを“臓器灌流液 Organ Rinse Solution”というアイデアに結実させようと考え, North Carolina の Thurman, Lemasters らのグループと共同開発を行った^{28, 29)}. Organ Rinse Solution (Carolina Rinse Solution...CRS) の組成は図8に示したとおりである.

CRS は, 灌流液としての目的のためイオン組成は細胞外液に準じており, 間質の浮腫を防止する oncotic support として hydroxyethyl starch が添加されている. さらに hypoxia 時のエネルギー源として fructose, 再灌流障害を予防する目的として抗酸化剤 (allopurinol, glutathione), 微小循環改善のために血管拡張剤 (adenosine), そして Kupffer 細胞の活性化を阻害するカルシウム拮抗剤等を含有する. また微弱酸性の cytoprotective 作用を利用するために, pH 6.5 に設定してある. グラフトの温度は, 移植手術中次第に上昇するが, 図9に示したように 25°C では, Euro-Collins 溶

NaCl	115mM
KCl	5mM
CaCl ₂	1.3mM
KH ₂ PO ₄	1mM
MgSO ₄	1.2mM
Allopurinol	1mM
Desferrioxamine	1mM
Glutathione	3mM
Nicardipine	2 μM
Adenosine	1mM
Fructose	10mM
Glucose	10mM
Hydroxyethyl Starch	50g/l
Insulin	100U/l
pH	6.5
mOsm/l	290-305

図8 Carolina Rinse Solution の組成

cold ischemia から臓器を保護しその保存時間の改善を目指す技術の開発にはめざましい進歩がみられるが, 臓器保存終了後の再灌流障害の重要性については, これまでほとんど顧みられることは

液, UW 溶液に比し, はるかに優れた細胞保護効果を有することがわかる. 実際, ラットの肝移植モデルでは CRS は強力な微小循環改善作用およびグラフト保護作用を有することが示された(図10). すでに, 米国 Mayo Clinic では, CRS の臨床肝移植への応用が始まっており, その有用性が評価されつつある. Preliminary な報告では CRS は術後の transaminase の上昇を有意に抑制することが伝えられている³⁰⁾. 興味深いのは, CRS を 37°C に加温して warm rinse として用いるとそのグラフト保護効果がさらに増強されるということである.

おわりに

血流遮断や肝移植時の虚血ストレスによってもたらされる肝障害の成立には, 様々な要因が関与していることが明らかになりつつある. とりわけ, 内皮細胞や Kupffer 細胞など類洞壁細胞の障害, 機能修飾は虚血性肝障害の発生機序に大きな役割をはたしている. 肝類洞細胞および微小循環系の機能保持により, 肝を虚血障害から保護しようと

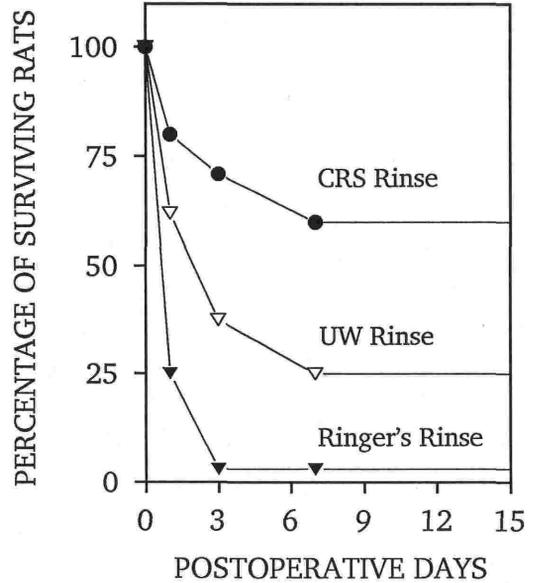


図10 CRS のグラフト生存に及ぼす効果
CRS による移植前のグラフト灌流は, UW や Ringer 溶液による灌流に比し, グラフトの子後を有意に改善した.(文献28)より

するアプローチが臓器保存における新しい展開として注目される.

文 献

- 1) Farber, J. L., Young, E. E.: Accelerated phospholipid degradation in anoxic rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 211: 312-320, 1981.
- 2) Thurman, R. G., Apel, E., Badr, M., et al.: Protection of liver by calcium entry blockers. *Ann. New York Acad. Sci.* 522:757-770, 1988.
- 3) Lemasters, J. J., DiGiuseppi, J., Nieminen, A. -L., et al.: Blebbing, free Ca⁺⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325:78-81, 1987.
- 4) Anundi, I., King, J., Owen, H., et al.: Fructose prevents hypoxic cell death in liver. *Am. J. Physiol.* 253:G390-G396, 1987.
- 5) Gores, G. J., Nieminen, A. -L., Fleishman, K. E., et al.: Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 255:C315-C322, 1988.
- 6) Gores, G. J., Nieminen, A. -L., Wray, B. E., et al.: Intracellular pH during 'chemical hypoxia' in cultured rat hepatocytes: protection by intracellular acidosis against the onset cell death. *J. Clin. Invest.* 83:386-396, 1989.
- 7) Tsuji, S., Kawano, S., Takei, Y., et al.: Free radical-related digestive disorders: Basic concepts and clinical aspects. *Journal Hepato-*

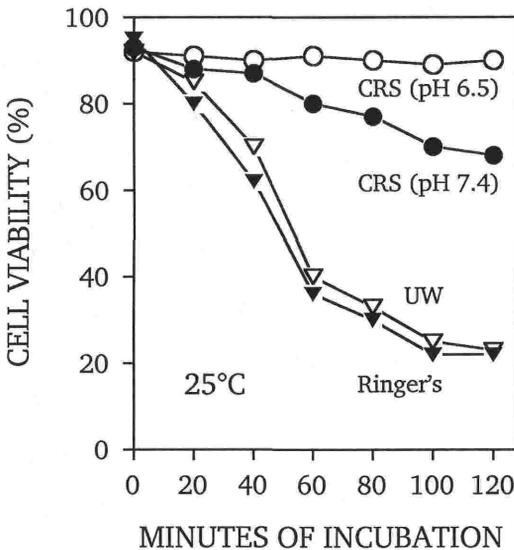


図9 Hypoxia における Carolina Rinse Solution (CRS) の細胞保護効果

分離肝細胞を, CRS, Ringer's, UW 溶液中にて 25°C, hypoxia の状態でインキュベーションした. CRS は UW, Ringer's に比し, 細胞保護効果に優れている. 微酸性 (pH 6.5) が, CRS の細胞保護効果に寄与していることがわかる.

- Gastroenterology, 1992; in press.
- 8) Marzi, Zhong, Z., Lemasters, J. J., et al.: Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation: the importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 48:463-468, 1989.
 - 9) Takei, Y., Marzi, I., Gao, W., et al.: Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 51: 959-965, 1991.
 - 10) Takei, Y., Marzi, I., Gores, G. J., et al.: Application of video microscopy to transplanted rat livers. In: Herman, B., Jacobson, K., eds. *Optical microscopy for biology*. Wiley-Liss, New York 487-496, 1990.
 - 11) Thurman, R. G., Lindert, K. A., Takei, Y., et al.: Activation of Kupffer cells following liver transplantation. In: Wisse, E., Knook, D. L., McCuskey, R. S., eds. *Cells of the hepatic sinusoids*. The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands 358-363, 1991.
 - 12) Takei, Y., Marzi, I., Kauffman, F. C., et al.: Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 50:14-20, 1990.
 - 13) Takei, Y., Marzi, I., Kauffman, F. C., et al.: Prevention of early graft failure by the calcium channel blocker, nisoldipine: Involvement of Kupffer cell. *Transplant Proc* 22:2101-2, 1990.
 - 14) Goto, M., Takei, Y., Kawano, S., et al.: Tumor necrosis factor and endotoxin are involved in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries following orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992; in press.
 - 15) Marzi, I., Cowper, K., Takei, Y., et al.: Methyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant International* 4: 215-220, 1991.
 - 16) Savier, E., Shedlofsky, S. I., Swim, A. T., et al.: The calcium channel blocker nisoldipine minimizes the release of tumor necrosis factor and interleukin-6 following rat liver transplantation. *Transplant International* 1992; in press.
 - 17) Marzi, I., Walcher, F., Harbauer, G., et al.: Kupffer cell activation and leukocyte adhesion following liver transplantation can be reduced by the calcium-channel blocker nisoldipine. *Eur. Surg. Res.* 23:95, 1991.
 - 18) Hijioka, T., Rosenberg, R. L., Lemasters, J. J., et al.: Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels. *Molecular Pharmacology* 41: 435-440, 1992.
 - 19) Sato, N., Hayashi, N., Kawano, S., et al.: Hepatic hemodynamics in patients with chronic hepatitis or cirrhosis assessed by organ-reflectance spectrophotometry. *Gastroenterology* 84:611-616, 1983.
 - 20) Goto, M., Takei, Y., Kawano, S., et al.: Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. in submission.
 - 21) Goto, M., Kawano, S., Takei, Y., et al.: Hepatic tissue oxygenation as a predictive indicator for ischemia-reperfusion liver injury. *Hepatology* 15: 432-437, 1992.
 - 22) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
 - 23) Serradell-Le, Gal. C., Jouneaux, C., Sanchez-Bueno, A., et al.: Endothelin action in rat liver: receptors, free Ca⁺⁺ oscillations, and activation of glycogenolysis. *J. Clin. Invest.* 87:133-138, 1991.
 - 24) Okumura, S., Takei, Y., Kawano, S., et al.: Endothelin-1 regulates oxygen delivery to the liver *in vivo*. in submission.
 - 25) Nishimura, Y., Takei, Y., Kawano, S., et al.: Endothelin-1 as a mediator of microcirculatory perturbation following orthotopic liver transplantation in the rat. in submission.
 - 26) Takei, Y., Gao, W., Hijioka, T., et al.: Rinsing liver grafts with warm Ringer's solution increases survival by improving hepatic microcirculation. *Transplantation* 52:225-230, 1991.
 - 27) Thurman, R. G., Marzi, I., Seitz, G., et al.: Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 46:502-506, 1988.
 - 28) Gao, W., Takei, Y., Marzi, I., et al.: Carolina rinse solution—A new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 52:417-424, 1991.
 - 29) Gao, W., Takei, Y., Marzi, I., et al.: Carolina rinse solution increases survival time dramatically after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 23:648-650, 1991.
 - 30) Sanchez-Urdazpal, L., Gores, G. J., Lemasters, J. J., et al.: The Carolina rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation. *Gastroenterology* 102: A879, 1992.