

肝移植後肝障害成立に対する肝類洞内凝固及び  
腸内細菌の関与

新 井 雅 裕

肝移植後肝障害成立に対する肝類洞内凝固及び腸内細菌の関与

新 井 雅 裕

## 緒 言

肝移植の術後には様々な合併症が生じ得るが、時に、移植片が機能不全に陥り、再移植を余儀なくされる場合が存在する。脳死肝移植においては、その10—20%に、このような再移植が必要となる(1-4)が、原因としては、急性及び慢性的の拒絶反応、肝動静脈血栓・門脈血栓に伴う血流障害、原病の再発などが挙げられる(4)。しかし、これらいずれにも分類されない原因不明の、術直後より発生する移植片機能不全の存在が知られており、Primary Graft Nonfunction (PNF)と呼ばれている。PNFは脳死肝移植症例の2—10%に出現し(4-7)、再移植以外に救命手段が存在しないことから、その成立機序の解明及び治療法の確立が重要な課題となっている。

PNFの成立には、ドナー及びレシピエントの様々な因子の寄与が推定されている。ドナーの高齢令、及びグラフトにおける脂肪沈着は、PNF成立の危険因子となるが、グラフトの冷保存時間もまた、PNFの成立に関与することが明らかにされている(5-8)。すなわち、グラフトの保存時間が長くなる程、本症の合併率が上昇する。また、PNFと診断された肝の組織所見は、小脂肪滴の沈着、及び虚血障害を示唆する、肝細胞のballooningや凝固壊死を主体とする(4,9,10)。これらのことより、PNFの成立には、虚血ないしそれに引き続く血液再灌流に起因する虚血・再灌流障害が、重要な役割を担うと考えられる(11-13)。肝臓は肝実質細胞と、微小循環である類洞を構成する非実質細胞群から構成されるが、虚血・再灌流による障害は、非実質細胞群に顕著に出現する。その第一の特徴は、類洞内皮細胞障害である。肝構成細胞の中では、類洞内皮細胞が最も虚血・再灌流による障害を受け易いとされる(14)。更に、障害された類洞内皮細胞に対する白血球や血小板の接着が、類洞腔を狭小化し、微小循環障害を介して肝壊死の一因になると考えられている(15,16)。また、肝における虚血・再灌流障害の第二の特徴は、クッパー細胞の活性化である(17,18)。類洞内に常在するマクロファージであるクッパー細胞は、活性化すると、サイトカインや活性酸素などの放出を介して、様々な肝障害の成立に関与することが知られている(19)。肝移植後においても、活性化クッパー細胞が肝障害の成立因子になることが、クッパー細胞抑制剤を用いた検討結果から明らかとなっ

ている(20-23)。以上のごとく、PNFの成立には、虚血・再灌流に起因する類洞内皮細胞障害とクッパー細胞の活性化が重要な役割を占めると考えられている。

劇症肝炎はPNF類似の広汎肝壊死を組織学的特徴とし、そのラットモデルでは、虚血・再灌流モデル同様、類洞内皮細胞の障害とクッパー細胞の活性化が観察される(24-31)。更に、ラット劇症肝炎モデルでは、これら類洞壁細胞の変化が類洞内凝固を介して肝壊死成立に間与することが明らかとなっている。一般に、血管内皮細胞はトロンボモジュリンをはじめとする種々の抗凝固因子を産生することで血液凝固を抑制し、円滑な血液循環を維持するべく作用している。一方、マクロファージ系細胞は外因系凝固の開始因子であるTissue Factor (TF)を発現しており(32)、活性化するとその発現量を増加し、凝固促進的に作用する(33-35)。ラット劇症肝炎モデルの類洞では、活性化したクッパー細胞のTF活性は増加しており(36)、更に内皮細胞障害も存在することから、凝固・抗凝固の平衡状態は破綻し、易凝固性が出現する。その結果、類洞内凝固が発生し、微小循環障害を介して広汎肝壊死が成立する(24-28)。ところで、肝移植後の患者では、肝血流の再開直後から血中トロンピン・アンチトロンピン(AT) III複合体(TAT)濃度の上昇が観察され(37、38)、凝固亢進状態が存在すると考えられる。肝移植後には、虚血・再灌流に起因する類洞内皮細胞障害とクッパー細胞の活性化が存在することから、移植肝類洞においても、凝固・抗凝固平衡状態の破綻から類洞内凝固が生じ、術後の凝固亢進状態を惹起していることが推定される。これらのことより、PNFの成立に対し、肝類洞内凝固による微小循環障害が関与すると想定した。

また、肝部分切除後のラットにエンドトキシンを投与することで誘発する劇症肝炎モデルでは、クッパー細胞の活性化は、残肝に対する腸内細菌由来物質の負荷増大によってもたらされる(27、39)。肝移植手術に際しては、門脈血流の遮断は避けられない過程であり、腸管への血流鬱滞は腸管壁の物質透過性を亢進させる(40)ことから、肝移植後には、腸管内物質の肝への負荷は増大すると考えられる。実際、門脈血流の一時的な遮断は、腸管内グラム陰性桿菌由来と考えられるエンドトキシンの門脈血中濃度を上昇させる(41、42)。また、肝移植後の患者では、血中エンドトキシン濃度は著明な高値を示し、その程度にはPNFの発生率との間に相関が認められる(43)。従って、門脈血流遮断を原因とする腸内細菌由来物質の肝への負荷

増大が、クッパー細胞の活性化を介して、肝移植後肝障害の成立に関与することも推定される。

以上より、肝移植後早期に出現する肝障害の成立に対する、肝類洞内凝固と腸内細菌由来物質の関与を検討し、肝移植後のPNFの成立予防に対する抗凝固療法及び腸内殺菌の有用性を調べるため、以下の実験を行なった。

## 方 法

【動物】Fisher 系雄性ラット（180—220g）（日本生物材料センター、厚木）を正常飼育条件下で、摂食、摂水は自由として飼育し、実験に供した。

【実験1】肝移植後肝障害成立における肝類洞内凝固の関与

(1) 肝移植後の類洞における凝固・抗凝固平衡の検討

ラットに以下の処置を施し、各実験群を作成した。

(A) 保存/再灌流群；ラット肝移植法と同様に肝を摘出後、1℃の University of Wisconsin (UW) 液 (Du Pont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) 中に浸漬、保存した。24時間後、肝をUW液中より取り出し、37℃、酸素吹き込み下のMEM液（日本製薬、東京）を10mL/minの速度で門脈より灌流した。

(B) 肝血流遮断群；肝移植法と同様の麻酔下に開腹後、固有肝動脈を結紮。陰茎静脈よりヘパリン200単位を静注後、血管クランプにて門脈血流を遮断。20分後にクランプを除去し、血流を再開した。

(C) 移植群；無処置ラットをドナー及びレシピエントとして、肝移植を施行した。グラフトは、1℃の生理食塩液中に1時間浸漬保存後、使用した。

(D) 保存/移植群；無処置ラットをドナー及びレシピエントとして、肝移植を施行した。グラフトは1℃のUW液中に24時間浸漬保存後、使用した。

いずれの群も、再灌流もしくは血流再開1時間後に、クッパー細胞を単離しTF活性を測定、また肝におけるトロンボモジュリン発現を免疫組織学的に検討した。なお、対照として無処置ラットを用いた。

## (2) 移植肝における類洞内凝固成立の検討

無処置ラットをドナー及びレシビエントとして、肝移植を施行した。グラフトは1℃のUW液中に18時間浸漬保存後、使用した。移植5時間後に、肝を摘出し電顕観察に供した。

## (3) 肝移植後の肝障害及び血液凝固異常に対する抗凝固療法の効果の検討

実験(2)と同様に、肝移植を施行した。肝移植直後、及び12時間後に、200単位/2mL生理食塩液/kgのATⅢ濃縮製剤(アンスロピンP;ヘキストジャパン、東京)ないし同量の生理食塩液を陰茎静脈より投与した。移植24時間後に、エーテル吸入麻酔下に開腹。下大静脈より血液を採取し、血漿ATⅢ活性、TAT濃度及び血清ALT活性を測定した。また、肝を摘出し、組織学的検討を行なった。

## 【実験Ⅱ】肝移植後肝障害成立における腸内細菌由来物質の関与

ラットに125万単位/5mL精製水/kgの硫酸ポリミキシンB(ファイザー製薬、東京)ないし同量の精製水を1日1回、7日間連日、経口チューブを用いて投与し、最終投与24時間後に以下の実験に供した。

(1) 門脈血中エンドトキシン濃度及び硫酸ポリミキシンB濃度に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討

肝移植法と同様の麻酔下に開腹後、固有肝動脈を結紮。陰茎静脈よりヘパリン200単位を静注後、血管クランプにて門脈血流を遮断。20分後にクランプを除去し、血流を再開した。30分後に門脈より血液を採取し、血清エンドトキシン濃度及び硫酸ポリミキシンB濃度を測定した。

(2) 移植肝クッパー細胞のTF活性に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討

無処置ラットをドナー、上記の処置を施したラットをレシビエントとして、肝移植を施行した。グラフトは、1℃のUW液中に18時間浸漬保存後、使用した。移植1時間後にクッパー細胞を単離し、TF活性を測定した。

(3) 肝移植後の血清TNF $\alpha$ 濃度及び肝障害に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討

実験(2)と同様の肝移植24時間後に、エーテル吸入麻酔下に開腹。下大静脈よ

り血液を採取し、血清ALT活性、TNF $\alpha$ 濃度を測定した。また、肝を摘出し、組織学的検討を行なった。

#### 【ラット肝移植法】

ラット肝移植はKamadaらの方法(44)に従って、以下のごとく行なった。

ドナー手術；5 mg/kg のネブタールを腹腔内注射後、エーテル吸入にて麻酔を維持した。腹部横切開にて開腹後、肝を周囲組織より遊離し、固有肝動脈を結紮、切離。総胆管内に、十二指腸側よりポリエチレンチューブを挿入し、固定後、十二指腸端を切離した。陰茎静脈よりヘパリン300単位静注後、門脈より1℃の10単位ヘパリン含有生理食塩液10 mL、次いで1℃の保存液10 mLを10 mL/minの速度で灌流した。肝を摘出し、保存液中に浸漬した後、門脈及び肝下部大静脈に吻合用のカフを装着した。

レシピエント手術；同様の麻酔下に、腹部正中切開にて開腹。肝を周囲組織より遊離し、固有肝動脈を結紮、切離。総胆管内に、肝側よりポリエチレンチューブを挿入し、固定後、肝端を切離した。グラフトを保存液中より取り出し、門脈より1℃の生理食塩液を10 mL/minの速度で1分間灌流して、保存液を洗い流した。その後、レシピエントの肝を摘出し、グラフトと置換した。肝上部大静脈は連続縫合で、肝下部大静脈及び門脈については、対応する血管内にカフを挿入し固定することで、血流を再建した。胆管は、それぞれの遊離端に固定したチューブ同士を差し込み吻合した。2層縫合にて閉腹した後、100 mg/kgのペニシリンを筋注し、手術を終了した。

#### 【クッパー細胞の単離】

クッパー細胞の単離は、既報(31)に従って、以下のごとく行なった。

ネブタール50 mg/kgの腹腔内注射による麻酔下に開腹。下大静脈よりヘパリン200単位静注後、Ca<sup>2+</sup>不含ハンクス液（日本製薬、東京）を5分間、0.05%コラダナーゼ（type 1: Worthinton Biochemical Corp., Freefold, NJ, USA）含有ハンクス液を15分間、更に0.1%プロナーゼ（科研製薬、千葉）含有ハンクス液を5分間、10 mL/minの速度で門脈より灌流した。灌流液はいずれも37℃

に加温し、酸素吹き込み下で使用した。肝を摘出し、メスにて細切後、コラゲナーゼ及びブロナーゼを同様の濃度で含有したハンクス液に浮遊し、30分間振盪培養した。得られた細胞浮遊液を洗浄後、18%メトリザマイド (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) 含有ハンクス液に浮遊し、 $1.4 \times 10^6$  細胞/mLにて15分間遠心した。上層の細胞を回収し、洗浄後、加熱により非働化した牛胎児血清を10%含有したDMEM液 (日本製薬、東京) に浮遊し、 $2 \times 10^6$  細胞/mLに調製。1mLを直径35mmのプラスチックディッシュに播種し、1時間培養後、非付着細胞を洗浄によって、除去。非付着細胞数を計測し、付着細胞数を算出した。付着細胞は10%牛胎児血清含有DMEM液にて、更に18時間培養した。

得られたクッパー細胞の viability 及び purity は、トライバンプルー排泄法、エステラーゼ染色法にて確認し、それぞれ98%以上及び95%以上であった。

#### 【TF活性の測定】

単離したクッパー細胞は18時間培養後、 $1 \mu\text{g/mL}$  のエンドトキシン (E. coli O26:B6由来リポ多糖, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 存在下、非存在下で更に5時間培養した。Cell Scraper (Costar corporation, Broadway Cambridge, MA, USA) を用いて、細胞をディッシュより剥離、回収後、凍結し、測定まで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

クッパー細胞のTF活性は、96穴プレートを使用し、Hisheの方法(45)に従って測定した。融解した細胞浮遊液 $50 \mu\text{L}$ をトリス塩酸2カルシウム緩衝液(0.2M Tris, 0.015M  $\text{CaCl}_2$ , pH7.3)  $100 \mu\text{L}$ と混和し、 $37^\circ\text{C}$ で5分間加温。人血液凝固第9因子複合体 (PPSB-HT; 日本製薬、東京)  $50 \mu\text{L}$ を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で10分間加温。その $50 \mu\text{L}$ をトリス EDTA 緩衝液(0.7M Tris, 2.5mM EDTA, pH8.4)  $300 \mu\text{L}$ と混和し、反応を停止した。その $175 \mu\text{L}$ を発色基質S-2222 (Kabi Diagnostica, Stockholm, スウェーデン)  $25 \mu\text{L}$ に添加し、 $37^\circ\text{C}$ で3分間加温した。50%酢酸 $25 \mu\text{L}$ 添加によって、発色反応を停止し、 $410 \text{nm}$ の吸光度をELISAリーダーで読み取った。活性化ウサギ脳トロンボプラスチン (Simplastin; Organon Teknika Corp., Durham, NC, USA) を用いて作製した標準曲線からTF活性を算出し、 $10^6$ 細胞当たり

の活性化トロンボプラスチン濃度として表わした。

#### 【組織学的検討】

免疫組織学的検討；エーテル吸入麻酔下に開腹。門脈より生理食塩液を灌流して脱血した後、肝を摘出。OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN, USA) に包埋し、液体窒素中で凍結し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。5  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製し、Vectastain ABC キット (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) を使用し、ヒト・トロンボモジュリンに対するポリクローナル抗体 (帝人、東京) を1次抗体として、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法にて免疫染色を施行した。尚、同濃度の非免疫ウサギ IgG を1次抗体の対照として使用した。発色反応、及び対染色は、それぞれ、0.01% hydrogen peroxide 含有0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride (Vector Labs)、及び4% methylgreen を用いて行なった。

肝壊死の程度の検討；摘出肝をホルマリン固定後、パラフィン包埋した。切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行ない、光顕観察を行なった。肝壊死の程度は、以下の4段階にて評価した。Grade 0；凝固壊死の観察されないもの、Grade 1-3；凝固壊死が肝小葉面積のそれぞれ5%以下、5-10%、10%以上のもの。

電顕による検討；エーテル吸入麻酔下に開腹。経門脈的に生理食塩液を灌流して脱血した後、1.5% グルタルアルデヒド液にて灌流固定した。肝を細切し、2% オスミウム酸にて2時間、後固定。系列エタノールにて脱水した後、エポキシ樹脂に包埋。超薄切し、日立H-800透過型電子顕微鏡にて観察した。

#### 【血清ALT活性、TNF $\alpha$ 、エンドトキシン、硫酸ポリミキシンB濃度及び血漿ATIII活性、TAT濃度の測定】

血清ALT活性、及び血清TNF $\alpha$ 、エンドトキシン濃度は、市販のkit (Iatron Laboratories Inc., 東京, Genzyme Co., Cambridge, MA, USA, ENDOSPECY-TEST; 生化学工業、東京) を使用して測定した。血清硫酸ポリミキシンB濃度は *Bordetella bronchiseptica* を用いた bioassay 法(46,47)にて測定した。血漿A

TⅢ活性及びTAT濃度は、それぞれ Testzym ATⅢ-2 kit (Daiichi Pure Chemicals Co., 東京) 及び Enzygnost TAT kit (Behringwerke, Marburg, Germany) を使用し、正常ヒト血漿を標準として測定した。

## 結 果

### 【実験Ⅰ】肝移植後肝障害成立における肝類洞内凝固の関与

#### (1) 肝移植後の類洞における凝固・抗凝固平衡の検討

##### ①単離クッパー細胞のTF活性(表1)

エンドトキシン非存在下でのTF活性は、保存/再灌流群においては、無処置群と差を認めなかったが、肝血流遮断群、移植群、保存/移植群においては、無処置群に比べ高値を示した。エンドトキシン存在下でのTF活性は、いずれの群でもエンドトキシン非存在下での値に比べ有意に上昇した。その値は、肝血流遮断群、保存/移植群においては、無処置群と差を認めなかったが、移植群、保存/再灌流群においては、無処置群に比べ有意に高値であった。

表 1. 単離クッパー細胞の Tissue Factor 活性

	Tissue Factor 活性 ( $\mu\text{g}$ トロンボプラスチン/ $10^6$ cells)	
	エンドトキシン	エンドトキシン
	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
無処置群	79 $\pm$ 34	293 $\pm$ 79
保存/再灌流群	124 $\pm$ 45	765 $\pm$ 45 **
肝血流遮断群	236 $\pm$ 56 *	360 $\pm$ 56
移植群	315 $\pm$ 45 **	776 $\pm$ 236 **
保存/移植群	169 $\pm$ 79 *	360 $\pm$ 124

平均 $\pm$ 標準偏差 (ラット数=4)

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs 無処置群 (Student's  $t$  test)

## ②類洞内皮細胞のトロンボモジュリン発現

トロンボモジュリンに対する免疫組織染色の結果は、各群3匹のラットにおいて同様の傾向を示した。また、1次抗体の対照として用いた非免疫ウサギIgGでは、染色性は認められなかった。

無処置群では、類洞内皮細胞に軽度な、大血管内皮細胞に強度な発現を認め(図1 a)、移植群、肝血流遮断群においても、同様な所見が認められた。保存/移植群では、類洞内皮細胞における発現は顕著に減少しており(図1 b)、保存/再灌流群においても同様であった。

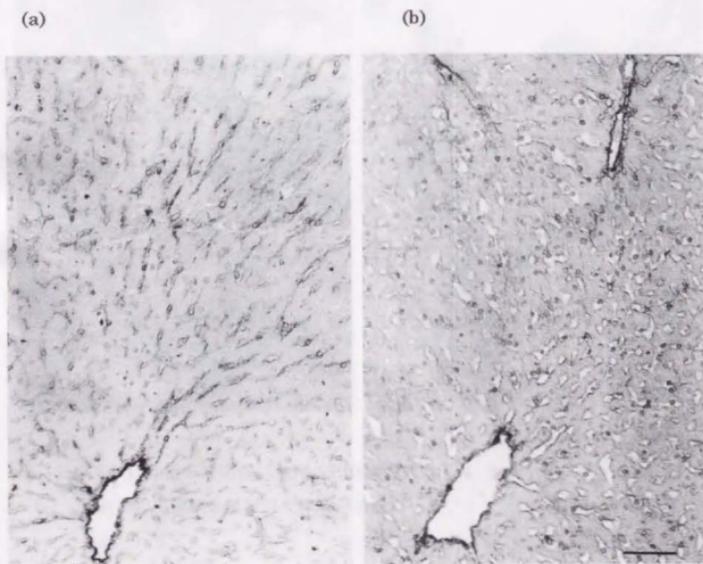


図1. ラット肝におけるトロンボモジュリン発現 (bar=50  $\mu$ m)

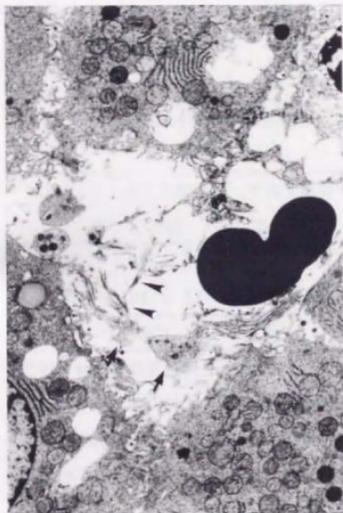
(a) 無処置群      (b) 保存/移植群

(2) 移植肝における類洞内凝固成立の検討

電顕観察の所見は、3匹のラットにおいて同様であった。

肝移植5時間後の類洞では、内皮細胞の断裂像が観察され、その周囲に23 nm間隔の特徴的な縞模様を有したフィブリンの沈着が認められた(図2)。

(a)



(b)



図2. 肝移植5時間後における肝類洞の電顕所見 (bar=200 nm)

- (a) 類洞内皮細胞の障害(矢印)と類洞内へのフィブリン(矢頭)沈着が認められる。
- (b) (a)の矢頭部分の拡大像。フィブリンは、23 nm間隔の特徴的な縞模様を有している。

(3) 肝移植後の肝障害及び血液凝固異常に対する抗凝固療法の効果の検討 (表2)

肝移植24時間後において、対照群では、血漿ATⅢ活性は正常の40%以下に低下し、血漿TAT濃度は著明高値を示した。また、血清ALT活性は4000 KU以上と高値を示し、組織学的にGrade3の肝壊死を5/6、Grade2を1/6に認めた。ATⅢ投与群では、血漿ATⅢ活性は正常値以上に回復し、血漿TAT濃度は対照群に比べ更に高値を示した。また、血清ALT活性は対照群に比べ有意に低値を示し、組織学的肝壊死の程度も、Grade1が4/6、Grade2が2/6と有意に軽度であった。

表2. 肝移植24時間後の肝障害と血液凝固異常に対するATⅢ投与の効果

	ATⅢ活性	TAT濃度	ALT活性	肝障害の程度 (Grade)			
	(%)	( $\mu\text{g/L}$ )	(KU)	0	1	2	3
対照群	34 $\pm$ 11 *	150 $\pm$ 91	4392 $\pm$ 1190	0	0	1	5 <sup>b</sup>
ATⅢ群	194 $\pm$ 71 **	633 $\pm$ 461**	1775 $\pm$ 537**	0	4	2	0*
正常値 <sup>c</sup>	105 $\pm$ 6	2 $\pm$ 1	19 $\pm$ 5				

\*平均 $\pm$ 標準偏差 (ラット数=6)    <sup>b</sup>ラットの数

<sup>c</sup>正常ラット5匹における平均 $\pm$ 標準偏差

\*  $p < 0.05$  vs 対照群 (Mann Whitney's rank sum test)

\*\*  $p < 0.01$  vs 対照群 (Student's  $t$  test)

【実験Ⅱ】肝移植後肝障害成立における腸内細菌由来物質の関与

(1) 門脈血中エンドトキシン濃度及び硫酸ポリミキシンB濃度に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討 (表3)

門脈血流の一時的な遮断によって、門脈血中エンドトキシン濃度は著明な高値を示したが、硫酸ポリミキシンB前投与群では、対照群に比べ有意に低値であった。また、いずれのラットにおいても門脈血中硫酸ポリミキシンB濃度は検出限界 (1 U/mL) 以下であった。

表 3. 門脈血流通断後の門脈血中エンドトキシン濃度及び硫酸ポリミキシンB (PB) 濃度に対するPB前投与の効果

	エンドトキシン濃度 (pg/mL)	PB濃度 (U/mL)
対照群	307 ± 49 *	<1
PB群	133 ± 103 *	<1
正常値 <sup>b</sup>	6.9 ± 3.7	—

\* 平均±標準偏差 (ラット数=4)

<sup>b</sup> 正常ラット9匹における平均±標準偏差

\* p < 0.01 vs 対照群 (Student's t test)

(2) 移植肝クッパー細胞のTF活性に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討 (表4)

移植肝より単離したクッパー細胞のTF活性は、エンドトキシン存在下、非存在下いずれにおいても、無処置ラットに比べ高値を示した。また、硫酸ポリミキシンB前投与群におけるTF活性は、エンドトキシン添加の有無にかかわらず、対照群に比べ有意に低値であった。

表 4. 移植肝クッパー細胞のTissue Factor 活性に対する硫酸ポリミキシンB (PB) 前投与の効果

	Tissue Factor 活性 ( $\mu$ g トロンボプラスチン/ $10^6$ cells)	
	エンドトキシン	エンドトキシン
	0 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
対照群	338 ± 45	653 ± 56
PB群	214 ± 11 *	439 ± 34 *
無処置群	79 ± 34	293 ± 79

平均±標準偏差(ラット数=4)

\* P < 0.05 vs 対照群 (Student's t test)

(3) 肝移植後の血清TNF $\alpha$ 濃度及び肝障害に対する、硫酸ポリミキシンB前投与の効果の検討(表5)

肝移植24時間後において、レシビエントの血清TNF $\alpha$ 濃度は、正常ラットに比べ著明な高値を示した。また、血清ALT活性は4000KU以上に上昇し、組織学的にGrade3の肝壊死を3/6、Grade2を3/6に認めた。硫酸ポリミキシンB前投与群では、血清TNF $\alpha$ 濃度及び血清ALT活性は、それぞれ対照群の1/4、1/3と有意に低値を示し、また組織学的肝壊死の程度もGrade1が4/6、Grade2が2/6と有意に軽度であった。

表5. 肝移植24時間後の血中TNF $\alpha$ 濃度及び肝障害に対する硫酸ポリミキシンB(PB)前投与の効果

	TNF $\alpha$ 濃度 (pg/mL)	ALT活性 (KU)	肝障害の程度 (Grade)			
			0	1	2	3
対照群	95 $\pm$ 52*	4068 $\pm$ 1348	0	0	3	3 <sup>b</sup>
PB群	21 $\pm$ 11**	1353 $\pm$ 496**	0	4	2	0*
正常値 <sup>c</sup>	<15	19 $\pm$ 5				

<sup>a</sup> 平均 $\pm$ 標準偏差(ラット数=6)

<sup>b</sup> ラットの数

<sup>c</sup> 正常ラット6匹における測定値

\*  $p < 0.05$  vs 対照群 (Mann-Whitney's rank sum test)

\*\*  $p < 0.01$  vs 対照群 (Student's  $t$  test)

## 考 察

血管内皮細胞は、血液凝固を抑制して円滑な血液循環を維持するため、種々の抗凝固因子を産生している。中でもトロンボモジュリンはトロンビンを不活化するので、非常に重要な抗凝固因子と考

えられている(48)。一方、マクロファージ系細胞は外因系凝固の開始因子であるTF(32)を発現することで凝固促進的に作用する。特に活性化した状態では、その発現量を増加し、微小循環内における血液凝固に関与する可能性が示唆されている(33-35)。肝の微小循環である類洞には、常在マクロファージであるクッパー細胞が存在し、血液凝固の開始因子になり得る。移植肝の類洞においては、虚血・再灌流を原因として、類洞内皮細胞の障害とクッパー細胞の活性化が生じている(14、17、18、49)ことから、凝固・抗凝固の平衡状態が破綻している可能性が推定される。そこで初めに、単離クッパー細胞のTF活性、及び類洞内皮細胞のトロンボモジュリン発現を検討し、肝移植後の類洞内における凝固・抗凝固平衡状態の評価を試みた。

ラット肝移植モデルを用いて、長期生存が得られる生存条件下で肝移植を施行した移植群と、術後数日以内に死亡する非生存条件下で肝移植を施行した保存/移植群を作製した。また、肝移植の際に避けられない病態である、虚血・再灌流及び門脈血流遮断による影響を調べるため、冷保存後の肝をMEM液で灌流した保存/再灌流群及び、ラット肝移植術時とほぼ同様に門脈血流を20分間遮断した肝血流遮断群を作製した。移植群におけるクッパー細胞のTF活性は、培養液へのエンドトキシン添加の有無にかかわらず、無処置群クッパー細胞に比し高値であった。エンドトキシン非存在下でのTF活性は、肝血流遮断群で高値を示したことから、移植群におけるエンドトキシン非存在下での活性上昇は、門脈血流鬱滞に起因する現象と推定された。門脈血流鬱滞は、腸管壁の物質透過性を亢進させる(40)ことから、門脈血流の一時的遮断の後には、腸管内物質の肝への負荷は増大すると考えられる。腸管内物質の肝への過剰負荷はクッパー細胞を活性化する(39)。従って、肝移植後におけるTF活性上昇は、門脈血流遮断による、腸管内物質の肝への過剰負荷がクッパー細胞を活性化したことによると考えられた。一方、エンドトキシン存在下におけるTF活性は、保存/再灌流群において高値を示した。移植群において、グラフトは摘出後、門脈と肝下部大静脈へのカフ装着、及びレシピエントの肝摘出に要する約1時間、1℃の生理食塩液中に浸漬される。1時間の冷処血は再灌流後のクッパー細胞の活性化に十分な時間である(18)ことから、移植群におけるエンドトキシン存在下でのTF活性上昇は、虚血・再灌流によるクッパー細胞の活性化に起因する現象と考えられた。グラフトをUW液中に24時間冷保存後移植した保存/

移植群では、移植群と同程度ないし、より以上の門脈血流鬱滞及び虚血・再灌流の影響を被ると考えられる。しかし、保存/移植群では、クッパー細胞のT F活性はエンドトキシン存在下、非存在下いずれも、移植群に比べ低値を示した。保存/移植群では移植群に比べ、血流再開後出現する肝壊死が顕著である。壊死巣においては、通常フィブリンが形成されるが、その際T Fが消費され減少したことが原因の一つとして推定された。以上より、肝移植後の類洞では、門脈血流遮断や虚血・再灌流を原因として、クッパー細胞の凝固活性は上昇していると考えられた。次に、類洞内皮細胞におけるトロンボモジュリン発現は、移植群、肝血流遮断群では無処置群と同様であったが、保存/移植群、保存/再灌流群では低下していた。従って、類洞内皮細胞のトロンボモジュリン発現は、U W液中での保存及び再灌流を原因として低下すると考えられた。これらの事から、肝移植後の類洞では、凝固・抗凝固平衡の破綻が生じ、易凝固性が出現すると推定された。

ラット劇症肝炎モデルでは、類洞内の凝固・抗凝固平衡の破綻が類洞内凝固を惹起し、微小循環障害を介して広汎肝壊死の原因となる。そこで、肝移植後の類洞においても、実際に血液凝固が生じ、肝移植後肝障害成立に関与しているか否かを検討した。移植後24時間は必ず生存するように、グラフトの冷保存時間を18時間に設定した。この条件下では、血清ALT活性は術後6時間目以降に急激に上昇する。肝移植後に類洞内凝固が生じ、微小循環障害を介して肝障害の原因となるのであれば、それは広汎な肝細胞壊死に先行して出現すると推定される。そこで、移植5時間後に電顕観察を施行した。図2に示す如く、肝移植後の類洞には、23nm間隔の特徴的な縞模様(50)を有したフィブリンの沈着が認められた。従って、肝移植後の類洞には、凝固・抗凝固平衡の破綻の結果、広汎な肝細胞壊死に先行して、フィブリン沈着が生じることが明らかとなった。更に、この類洞内フィブリン沈着が肝移植後肝障害の原因になるか否かを検討するため、レシピエントに抗凝固療法を施行した。一般に、抗凝固療法にはヘパリンが頻用されるが、ヘパリンは、トロンビン不活化作用を有するAT IIIの補助因子であり、AT IIIとトロンビンの結合反応を促進することで抗凝固作用を発揮する(51,52)。また、AT IIIは肝において産生されるため、重症肝障害時には、その産生低下から血漿濃度は低下する(53,54)。本モデルにおいても、表2に示すように肝移植24時間後の血漿AT III活性は、正

常値の40%以下に低下していた。このような場合におけるヘパリンの使用は、ATⅢの消費、枯渇を招き、類洞内凝固による肝障害を増悪させる可能性を有する(26)。そこで本実験では、抗凝固療法薬としてATⅢ濃縮製剤を使用した。肝移植後のラットでは、血漿ATⅢ活性の低下と共に、血漿TAT濃度の著明な上昇が認められたが、ATⅢ投与によって、血漿ATⅢ濃度は正常値以上に回復し、血漿TAT濃度は、更に上昇した。このことから、肝移植後には、ATⅢ欠乏のために不活性化されない非結合状態のトロンピンが豊富に存在する状態、すなわち凝固亢進状態が存在すると確認された。また、ATⅢによる抗凝固療法が、肝移植24時間後の肝障害の程度を有意に改善したことから、肝移植後に出現する凝固亢進状態が術後早期の肝障害の原因になると考えられた。

肝移植後の凝固亢進状態の原因としては、従来、術後に生じる肝動脈や門脈内の血栓症が想定されてきた。肝動脈血栓は肝移植後患者の4-26%に生じ(55)、しばしばグラフトの機能不全をもたらす再移植の原因となる(4)が、門脈血栓の発生は稀とされている(56)。本実験では、肝動脈再建を伴わないラット肝移植法(44)を採用しており、また、術後の門脈内血栓は肉眼的に一度も確認されなかった。従って、本実験においては、肝動脈や門脈内の術後血栓症の影響は無視し得ると考えられた。また、肝移植後に生じるような、広汎な肝細胞障害の場においては、壊死組織内にもフィブリンの沈着が出現し、術後の凝固亢進状態の原因と成り得る。しかし、壊死組織内のフィブリン沈着は、肝細胞壊死の結果であり、原因とはなり得ない(25)。従って、肝移植後の凝固亢進状態は、類洞内フィブリン沈着に起因するものであると推定された。これらのことより、肝移植後に出現する類洞内凝固が術後早期の肝障害因子であり、抗凝固療法がPNFの成立予防に有用であると推定された。

次に、移植肝クッパー細胞のTF活性上昇が門脈血流遮断に起因することに注目した。肝移植時の門脈血流の一時的遮断は、腸内細菌由来物質の肝への負荷増大を招くと考えられる。また、ラット劇症肝炎モデルにおいては、腸内細菌由来物質の肝への負荷増大がクッパー細胞を活性化し、肝障害成立の原因となる(27,39)。従って、肝移植後においても、腸内細菌由来物質の肝への負荷増大がクッパー細胞の活性化を介して、肝障害成立の原因になることが想定される。そこで、腸内殺菌を

受けたラットを使用して、この仮説を検討した。ラットの腸内殺菌は、グラム陰性桿菌に対し強力な抗菌作用と、エンドトキシン吸着作用を合わせ持つ硫酸ポリミキシンB(57-59)を7日間経口投与することで行なった。硫酸ポリミキシンBは腸管から非吸収性の物質であるが、マクロファージに対し、その活性化に必要なプロテインキナーゼを阻害する作用を持つ(60,61)。そこで、硫酸ポリミキシンBのクッパー細胞に対する直接作用を否定するため、門脈血流の一時的遮断における門脈血中硫酸ポリミキシンB濃度を測定した。血中濃度は、全例において測定感度以下であり、プロテインキナーゼ阻害作用を有する濃度(61)には達していなかった。また、門脈血流の一時的遮断によって、門脈血中エンドトキシン濃度は著明に上昇したが、硫酸ポリミキシンB投与群では、対照群に比べ有意に低値であった。従って、レシピエントに対する硫酸ポリミキシンBの前投与は、門脈血流の一時的遮断に起因する、肝移植後の腸内細菌由来物質の肝への負荷増大を抑制すると考えられた。

肝移植後には、マクロファージが産生する細胞障害性因子であるTNF $\alpha$ (62)の血中濃度は上昇し、レシピエントへの抗TNF $\alpha$ 抗体の投与が肝移植後肝障害を改善することから、TNF $\alpha$ は肝移植後肝障害の成立因子の一つと考えられる(63)。そこで、血清TNF $\alpha$ 濃度と単離クッパー細胞のTF活性を測定し、腸内細菌由来物質が肝移植後のクッパー細胞機能に及ぼす影響を評価した。肝移植後には、血清TNF $\alpha$ 濃度とクッパー細胞のTF活性は共に高値を示したが、硫酸ポリミキシンB前投与群では、いずれも対照群に比べ有意に低値を示し、更に、肝移植後肝障害も有意に軽度であった。従って、肝移植後においては、門脈血流遮断に起因する腸内細菌由来物質の肝への負荷増大がクッパー細胞の活性化を介し、肝移植後肝障害成立に関与すると考えられた。

臓器移植後の患者では、術後早期の死亡にグラム陰性桿菌及び真菌感染に基づく合併症が強く寄与する(64,65)。肝移植後の患者において、非吸収性の抗生物質を用いた、これら微生物に対する選択的腸内殺菌は、術後感染症の減少から移植後の死亡率改善に有効であると報告されている(66-68)。しかし今回の成績は、レシピエントに対する選択的腸内殺菌が、クッパー細胞の凝固活性や細胞障害性を低下させ、肝移植後肝障害を改善することで、直接、移植後の成績を改善する可能性を持つことを示した。

## 結 語

肝移植後には、類洞内の凝固・抗凝固平衡の破綻に起因する類洞内凝固の成立や、手術操作に伴う、腸内細菌由来物質の肝への負荷増大に起因するクーパー細胞の活性化が、術後早期の肝障害成立の原因になると考えられた。従って、抗凝固療法や腸内殺菌が肝移植後肝障害の抑制に有用であると考えられ、Primary Graft Nonfunctionの予防に役立つ可能性が示唆された。

- 1) Maddrey WC, Van Thiel DH. Liver transplantation: an overview. *Hepatology* 1988; 8: 948-959.
- 2) Busuttil RW, Colonna JO, Hiatt JR. The first 100 liver transplants at UCLA. *Ann Surg* 1987; 207: 387-402.
- 3) Krom RA, Wiesner RH, Rettke SR. The first 100 liver transplants at the Mayo Clinic. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 84-94.
- 4) Quiroga J, Colina I, Demetris AJ, Starzl TE, Van Thiel DH. Cause and timing of first allograft failure in orthotopic liver transplantation: A study of 177 consecutive patients. *Hepatology* 1991; 14: 1054-1062.
- 5) Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoofman RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation- A multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55: 807-813.
- 6) Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertel M. Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 829-838.
- 7) Colquhoun SD, Busuttil RW. Graft failure: cause, recognition, and treatment. In: Busuttil RW, Klintmalm GB, ed. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 607-616.
- 8) Furukawa H, Todo S, Imventarza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti-Foglieni C, Broznick B, Bryant J, Day R, Starzl TE. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 1991; 51: 1000-1004.
- 9) Ray RA, Lewin KJ, Colonna J, Goldstein LI, Busuttil RW. The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: A clinical histologic correlation of 34 liver transplants. *Hum pathol* 1988; 19: 835-848.
- 10) Colina F, Lopez-Carreira M, Moreno E, Garcia I, Corral MA, Fiano C, Garcia-Munoz H, Gomez-Sanz R. A clinicopathologic review of 8 liver graft primary nonfunctions. *Hepato-gastroenterology* 1995; 42: 212-221.
- 11) Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 1995; 108: 1317-1320.
- 12) Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion

injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53: 957-978.

13) Fujiwara K, Mochida S, Ohno A, Arai M. Possible cause of primary graft non-function after orthotopic liver transplantation: A hypothesis with rat models. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: S88-S91.

14) Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989; 10: 292-299.

15) Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51: 959-965.

16) Cywes R, Brendan J, Mullen M, Stratis MS, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. *Transplantation* 1993; 56: 316-323.

17) Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13: 83-95.

18) Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 1994; 14: 234-240.

19) Winwood PJ, Arthur MJP. Kupffer cells: Their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Seminars in Liver Dis* 1993; 13: 50-59.

20) Takei Y, Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990; 50: 14-20.

21) Marzi I, Cowper K, Takei Y, Lindert K, Lemastes JJ, Thurman RG. Metyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in rat. *Transpl Int* 1991; 4: 215-220.

22) Kozaki K, Egawa H, Bermudez L, Keefe EB, So SK, Esquivel CO. Effect of pentoxifylline pretreatment on Kupffer cells in rat liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 1079-1082.

23) Motoyama K, Kamei T, Nakafusa K, Ueki M, Hirano T, Arima T, Konomi K,

Tanaka M. Donor treatment with gadolinium chloride improves survival after transplantation of cold-stored livers by reducing Kupffer cell tumor necrosis factor production in rats. *Transplant Proc* 1995; 27: 762-764.

24) Fujiwara K, Ogata I, Ohta Y, Hirata K, Oka Y, Yamada S, Sato Y, Masaki N, Oka H. Intravascular coagulation in acute liver failure in rats and its treatment with antithrombin III. *Gut* 1988; 29: 1103-1108.

25) Hirata K, Ogata I, Ohta Y, Fujiwara K. Hepatic sinusoidal cell destruction in the development of intravascular coagulation in acute liver failure in rats. *J Pathol* 1989; 158: 157-165.

26) Yamada S, Ogata I, Hirata K, Mochida S, Tomiya T, Fujiwara K. Intravascular coagulation in the development of massive hepatic necrosis induced by *Corynebacterium parvum* and endotoxin in rats. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 293-298.

27) Mochida S, Ogata I, Hirata K, Ohta Y, Yamada S, Fujiwara K. Provocation of massive hepatic necrosis by endotoxin after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 1990; 99: 771-777.

28) Mochida S, Ohno A, Arai M, Tamatani T, Miyasaka M, Fujiwara K. Role of adhesion molecules in the development of massive hepatic necrosis in rats. *Hepatology* 1996; 23: 320-328.

29) Arai M, Mochida S, Ohno A, Ogata I, Fujiwara K. Sinusoidal endothelial cell damage by activated macrophages in rat liver necrosis. *Gastroenterology* 1993; 104: 1466-1471.

30) Ogata I, Mochida S, Fujiwara K. Formazan formation in hepatic macrophages after nitro blue tetrazolium perfusion into rat liver. *Biomed Res* 1988; 9: 113-117.

31) Mochida S, Ogata I, Ohta Y, Yamada S, Fujiwara K. In situ evaluation of the stimulatory state of hepatic macrophages based on ability to produce superoxide anions in rats. *J Pathol* 1989; 158: 67-71.

32) Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71: 1-8.

33) Car BD, Slauson DO, Suyemoto MM, Dore M, Neilsen NR. Expression and kinetics of induced procoagulant activity in bovine pulmonary alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 1991; 17: 939-957.

34) Geczy CL, Farram E, Moon DK, Meyer PA, Mckenzie IFC. Macrophage

procoagulant activity as a measure of cell-mediated immunity in the mouse. *J Immunol* 1983; 130: 2743-2749.

35) Conkling PR, Greenberg CS, Weinberg JB. Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U973 and peripheral blood monocytes. *Blood* 1988; 72: 128-133.

36) Arai M, Mochida S, Ohno A, Ogata I, Obama H, Maruyama I, Fujiwara K. Blood coagulation equilibrium in rat liver microcirculation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res* 1995; 80: 113-123.

37) Harper PL, Luddington RJ, Jennings I, Reardon D, Searman MJ, Carrell RW, Klink JR, Smith M, Rolles K, Calne Y. Coagulation changes following hepatic revascularization during liver transplantation. *Transplantation* 1989; 48: 603-607.

38) Bakker CM, Metselaar HJ, Gomes MJ, Prote RJ, Groenland TN, Schalm SW, Terpstra OT, Stibbe J. Intravascular coagulation in liver transplantation - Is it present or not? A comparison between orthotopic and heterotopic liver transplantation. *Thromb Haemostas* 1993; 69: 25-28.

39) Mochida S, Ohta Y, Ogata I, Fujiwara K. Gut-derived substances in activation of hepatic macrophages after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 1992; 16: 266-272.

40) Kawamoto S, Tashiro S, Miyauchi Y, Inoue M. Mechanism for enterohepatic injury caused by circulatory disturbance of hepatic vessels in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 629-635.

41) Oclay I, Kitahama A, Miller RH, Drapanas T, Trejo RA, Di Luzio NR. Reticuloendothelial dysfunction and endotoxemia following portal vein occlusion. *Surgery* 1974; 75: 64-70.

42) Gans H. Effect of ligation of the hepatic artery or occlusion of the portal vein on the development of endotoxemia. *Surg Gyneco & Obsteri* 1974; 139: 689-692.

43) Yokoyama I, Todo S, Miyata T, Selby R, Tzakis AG, Starzl TE. Endotoxemia and human liver transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21: 3833-3841.

44) Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1979; 28: 47-50.

45) Hische EAH, Tutuarima JA, van der Helm HJ. Spectrophotometry of tissue

- thromboplastin in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1981; 27: 1427-1430.
- 46) Kunin CM, Bugg A. Recovery of tissue bound polymyxin B and colistimethate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 137: 786-790.
- 47) Craig WA, Kunin CM. Dynamics of binding and release of the polymyxin antibiotics by tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 184: 757-765.
- 48) Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743-4746.
- 49) Ohno A, Mochida S, Arai M, Fujiwara K. Fat-storing cell abnormalities associated with endothelial cell damage after cold ischemia in UW solution. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 861-865.
- 50) Kay D, Cuddigan BJ. The fine structure of fibrin. *Br J Haematol* 1967; 13: 341-347.
- 51) Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973; 248: 6490-6505.
- 52) Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin. *Nature* 1973; 246: 355-357.
- 53) Verstraete M, Vermeylen J, Collen D. Intravascular coagulation in liver disease. *Annu Rev Med* 1974; 25: 447-455.
- 54) Laursen B, Mortensen JZ, Frost L, Hansen KB. Disseminated intravascular coagulation in hepatic failure treated with antithrombin III. *Thromb Res* 1981; 22: 701-704.
- 55) Langnas AN, Marujo W, Stratta RJ, Wood RP, Shaw BW. Vascular complications after orthotopic liver transplantation. *Am J Surg* 1991; 161: 76-83.
- 56) Lerut J, Tzakis AG, Bron K, Gordon RD, Iwatsuki S, Esquivel CO, Makowka L, Todo S, Starzl TE. Complications of venous reconstruction in human orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 1987; 205: 404-414.
- 57) Newton BA. The properties and mode of action of polymyxin. *Bacteriol Rev* 1956; 20: 14-27.
- 58) Craig WA, Turner JH, Kunin CM. Prevention of the generalized Schwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. *Infect Immunity* 1974; 10: 287-292.

- 59) Ingoldby CJH.. The value of polymyxin B in endotoxemia due to experimental obstructive jaundice and mesenteric ischaemia. *Br J Surg* 1980; 67: 565-567.
- 60) Somers SD, Weiel JE, Hamilton TA, Adams DO. Phorbol esters and calcium ionophore can prime murine peritoneal macrophages for tumor cell destruction. *J Immunol* 1986; 136: 4199-4205.
- 61) Mazzei GJ, Katoh N, Kuo JF. Polymyxin B is a more selective inhibitor for phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase than for calmodulin-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109: 1129-1133.
- 62) Männel DN, Moore RN, Mergenhagen SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (Tumor-Necrotizing Factor). *Infect Immun* 1980; 30: 523-530.
- 63) Goto M, Takei Y, Kawano S, Tsuji S, Fukui H, Fushimi H, Nishimura Y, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T. Tumor necrosis factor and endotoxin in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992; 16: 487-493.
- 64) Rifkind D, Marchioro TL, Waddell WR, Starzl TE. Infectious diseases associated with renal homotransplantation: I. Incidence, types and predisposing factors. *JAMA* 1964; 189: 397-407.
- 65) Starzl TE, Koep LJ, Halgrimson CG, Hood J, Schroter GPJ, Porter KA, Weil R III. Fifteen years of clinical liver transplantation. *Gastroenterology* 1979; 77: 375-388.
- 66) Wiesner RH, Hermans PE, Rakela J, Washington II JA, Perkins JD, DiCecco S, Krom R. Selective bowel decontamination to decrease gram-negative aerobic bacterial and candida colonization and prevent infection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1988; 45: 570-574.
- 67) Wiesner RH. Selective bowel decontamination for infection prophylaxis in liver transplantation patients. *Transplant Proc* 1991; 23:1927-1928.
- 68) Raakow R, Steffen R, Lefebvre B, Bechstein WO, Blumhardt G, Neuhaus P. Selective bowel decontamination effectively prevents gram-negative bacterial infections after liver transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 1556-1557.



centimeter  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



### Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak