

学 位 論 文 題 名

血液灌流 discordant 異種移植心モデルにおける心機能の検討

学位論文内容の要旨

I 研究目的

discordant 異種心臓移植モデルとして用いられてきた異所性心臓移植では、心機能の評価を十分にできないという欠点がある。本研究では、ラットの動脈血をポンプにより脱血し、その血液をモルモット摘出心に灌流し、灌流後の血液をラットの静脈に返血する、いわゆるサポートラットを用いた血液灌流回路を discordant 異種心臓移植モデルとして開発した。このモデルを使用して、超急性拒絶反応時の心機能を測定すると共に、補体成分 C 3 を消費させる Cobra Venom Factor (CVF) をサポートラットに投与し、C 3 が拒絶時の心機能にどのように関与しているかを検討した。

II 実験材料および方法

1) 実験は以下の 4 群に分け、A 群（サポートラット、ラット摘出心灌流群 $n = 6$ ）、B 群（サポートモルモット、モルモット摘出心灌流群 $n = 6$ ）、C 群（サポートラット、モルモット摘出心灌流群 $n = 6$ ）、D 群（サポートラット、モルモット摘出心灌流、CVF0.2mg/kg 腹腔内投与群 $n = 6$ ）とした。ラット摘出心は 350 回/分、モルモット摘出心は 300 回/分心拍数を定め、灌流量は 3 ml/分の定常流とした。左室内バルーンを挿入し、左室拡張末期圧を 10mmHg とし、左室収縮末期圧 (LVESP) および冠灌流圧 (CPP) を 2 時間測定した。途中、LVESP が 20mmHg 未満となるものは心停止と定めて灌流を中止した。異種間灌流の C、D 群で C 3 量、免疫グロブリン IgM 量を一元放射免疫拡散法 (SRID) で測定した。モルモット心灌流の B、C、D 群では灌流心の単位体重当たりの乾燥重量および心筋組織水分含有量を測定、算出した。

$$\text{心筋組織水分含有量} = (\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量}$$

これとは別に各群と同じ組み合わせで灌流を行なってヘマトキシリンエオジン (HE) 染色で病理組織像を観察し、C、D 群に関しては抗 C 3 抗体、抗 IgM 抗体により免疫蛍光染色を行った。

2) 上記 C 群に同条件の 9 例を追加し計 15 例として、discordant 異種間灌流における LVESP、

CPP と灌流から心停止までの時間（心機能継続時間）の関係を調べた。

3) 危険率0.05未満を有意とし、数値は平均値±標準誤差で表示した。

Ⅲ 結 果

1. LVESP および CPP

A群、B群では測定120分以内に LVESP が20mmHg 未満となる例は1例もなかった。A群の LVESP は灌流10分 94.3 ± 25.1 mmHg, 120分 87.0 ± 11.5 mmHg と両者に有意差はなかった。B群においても10分 34.5 ± 4.6 mmHg, 120分 56.5 ± 4.8 mmHg と灌流120分で LVESP が低下することはなかった。CPP はA群で灌流120分の値 77.2 ± 10.7 mmHg となり10分の値 49.7 ± 3.9 mmHg よりも上昇した。B群では10分の 41.7 ± 3.7 mmHg, 120分 41.5 ± 4.7 mmHg となり両者で有意差はなかった。C群では、6例中4例が120分以内に心停止した。C群の10分の LVESP は 53.3 mmHg ± 17.0 mmHg, CPP は 85.8 ± 7.0 mmHg となり LVESP は明らかに大きくB群と有意差を示さなかったがCPP はB群よりも高値を示した。CVF を投与したD群ではC群に比較して有意にC 3 量が低下したが、IgM は有意差はなかった。D群では120分以内に心停止する例は1例もなく、LVESP は10分 43.2 ± 7.2 mmHg, 120分 61.3 ± 10.2 mmHg。CPP は10分 45.0 ± 5.5 mmHg, 120分 57.0 ± 7.3 mmHg であった。LVESP, CPP は共に10分と120分の値に有意差はなく、灌流10分の CPP はC群と比較して低値を示した。10分及び120分の LVESP, CPP はそれぞれB群の値と有意差はなかった。

2. discordant 異種間灌流の LVESP および CPP と心機能継続時間の関係

C群に同条件の9例を追加した計15例では、灌流10分に2例が心停止し3例が120分灌流時にも拍動していた。120分を越えて機能していた3例を除く12例での10分 LVESP と心機能継続時間は Spearman の相関係数 $r = 0.85$, 10分 CPP と心機能継続時間は $r = -0.72$ であった。さらに10分時心停止2例を除いた10例での10分以後の LVESP 上昇率（（最終圧－10分時圧）／時間）と心機能継続時間は $r = 0.88$ となったが、10分以後 CPP 上昇率と心機能継続時間は有意な相関関係を示さなかった。

3. 乾燥重量、心筋組織水分含有量

C群の単位体重当たり乾燥重量はB、D群よりも高値を示した。心筋組織水分含有量はB、C、D群間で有意差を示さなかった。

4. 病理組織学的所見（HE 染色、免疫蛍光染色）

HE 染色で、C群に血管周囲、組織間の出血および浮腫を認めた。他群はほぼ正常像を呈した。

免疫蛍光染色では、C群で、血管周囲にC 3、IgMの沈着を認めた。D群では、C 3は極く少数の血管で染まり、IgMはC群と同様の所見であった。

IV 考 察

同種間の2時間灌流でLVESP、CPPはdiscordant異種間灌流に比較して安定していた。discordant異種間灌流ではLVESPは著明に低下し、CPPは上昇した。それらの変化は10分以内に既に大部分が進行していることが示された。超急性拒絶反応は本モデルにより心機能ではLVESPの低下、CPPの上昇としてあらわれることが示された。CVF投与によるC 3量の低下は上記のLVESPの低下およびCPPの上昇を少なくとも2時間、ほぼ完全に抑制した。また、そのLVESP、CPPの値はモルモット間灌流とほぼ等しい値を示した。このことは、超急性拒絶反応を抑制すれば同程度の心機能を有するdiscordant異種心臓移植が機能面からは可能であることを示唆した。単位体重当たり心乾燥重量がC群で高値を示したことは病理像と併せ考察すると出血の量を反映しているものと考えられ、乾燥重量が超急性拒絶反応の指標となりうることが示された。一方、心筋組織水分含有量はB、C、D群で有意差はなく、心筋組織水分含有量は本モデルでは超急性拒絶反応の指標とするのは困難であると考えられた。C群の灌流5分での免疫蛍光染色で選択的に血管周囲にC 3およびIgMの沈着を認めたことは、超急性拒絶反応が血管の傷害を起点として生ずることを示唆した。

V 結 論

サポート小動物を使用した血液灌流回路を応用し、discordant異種心臓移植モデルとして移植心の心機能について検討した。

1. 超急性拒絶反応は心機能ではLVESPの低下およびCPPの上昇として示された。
2. C 3を低下させることによりLVESPの低下およびCPPの上昇は2時間、ほぼ完全に抑制された。
3. C 3を低下させることによりモルモット心はラット血液によっても、モルモット血液によると同程度の収縮能を示した。
4. サポート小動物を使用した血液灌流回路モデルは、discordant異種心臓移植の実験モデルとして有用であることが示された。LVESPの低下、CPPの上昇および心乾燥重量の増加は、超急性拒絶反応の指標となりえた。さらに薬物などによる超急性拒絶反応の抑制程度を評価する上でこれらの指標が有用であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 劔 物 修

心臓移植の基礎的研究において心臓移植後の心機能を評価する場合に、従来用いられてきた異所性心臓移植では十分に行いえなかった欠点を解決する方法が求められてきた。本研究では、新たなモデルとしてラットの動脈血をポンプにより脱血し、モルモット摘出心に灌流し、灌流後の血液をラットの静脈に返血させて、いわゆるサポートラットを用いた血液灌流回路を discordant 異種心臓移植モデルとして開発し、心機能について検討した。実験は4群に分け、A群 (n = 6); ラット間灌流, B群 (n = 6); モルモット間灌流, C群 (n = 6); サポートラット, モルモット心異種間灌流, D群 (n = 6); Cobra Venom Factor (CVF) 0.2mg/kgを腹腔内投与したサポートラット, モルモット心異種間灌流とした。SRID 法にてD群のサポートラットの補体成分C3がC群に比べ減少しているのを確認した。冠灌流量を3ml/分とし、モルモット心は300回/分、ラット心は350回/分にペースングした。実験結果は、A群、B群、D群では2時間、それぞれほぼ安定した左室収縮末期圧 (LVESP) と冠灌流圧 (CPP) を示したが、C群では6例中4例が120分以内に心停止した。また10分後の LVESP はばらつきが大きくB、D群と有意差を示さなかったが、CPP は高値を示した。C群に9例を追加して15例とし、LVESP と CPP についてそれぞれの心機能継続時間との相関関係を検討した。120分を越えて機能した3例を除く12例では10分後の LVESP と心機能継続時間は正の相関、CPP は負の相関を示した。さらに灌流10分で心停止した2例を除く10例において10分以後の LVESP 上昇率は心機能継続時間と正の相関を示したが、CPP 上昇率は有意な相関を示さなかった。心乾燥重量は出血を反映してC群で高値があったが、心筋組織水分含有量はB、C、D群で有意差はなかった。病理組織像ではC群で間質内出血と浮腫を認め、免疫染色では血管周囲にC3およびIgMの沈着を認めた。以上の結果から本モデルは discordant 異種心臓移植モデルとして有用であり、LVESP、CPP、心乾燥重量は超急性拒絶反応の程度を示す指標となることが示唆された。

口頭発表において小林教授より超急性拒絶反応における補体成分C3の関与、心筋傷害、血管傷害、白血球、凝固系因子の変動など、劔物教授より超急性拒絶反応の発症時間、DP/DTの検索、臨床応用可能な補体抑制薬など、安田教授より超急性拒絶反応の基本的機序、今後の免疫

抑制法などについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。また、小林、劔物両教授には個別に審査を受け合格と判断された。本研究は異種心臓移植の場合の心機能検索法として新たなモデルを開発し、超急性拒絶反応と補体成分C3との関与を検討して新たな知見を加えたものであり、学位授与に値すると考える。