

学 位 論 文 題 名

室温下灌流法における腎の保存，及び Conditioning と
機能判定に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

臓器移植が定着するに従い、臓器の保存及び、移植臓器の不足が問題となっている。臓器保存は、低温下で代謝を抑制しつつ保存する単純浸漬保存と低温灌流保存がある。しかし、いずれの方法でも、移植前に保存臓器の機能の再現性の評価について問題が少なくなく、非侵襲的かつ迅速な判定法の開発が望まれている。

一方、代謝下の常温保存や中等度の低温（mild hypothermia）保存は、適切な灌流条件が明らかになれば、理論的には長時間の保存や保存臓器のviability 判定が可能である。しかし、条件となる酸素担体、酸素化法、臓器保護のための灌流圧や添加基質に問題があり、いまだ解決されていない。

以上より、著者は、低温保存での保存時間が限界に近づいていること、低温そのものの障害が指摘されていること、さらに、移植前のviability 判定が不可能であること等の問題を解決する目的で、腎の室温（24℃）下灌流保存による、長時間保存、障害腎のconditioning、保存腎のviability 判定の可能性等について実験的に検討した。

II. 実験方法

1. 室温灌流液の作成

基本的に細胞外液組成であり、pHは7.40に調製し、浸透圧は320mOsm

とした。添加物として、グルコース、アミノ酸、3%のフルオロカーボン乳剤 (FC-43)、allopurinol、superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol (PEG-SOD) 及びdexamethasone を加えた。

2. 実験動物と腎摘出法

体重2.5~3.5kg のウサギ (日本白色種) を用いた。腎摘出を行った後、経動脈的に4℃のヘパリン加乳酸リンゲル液でwash outした。

3. 灌流回路と灌流条件

1) 灌流回路と酸素化法

回路は、灌流液リザーバー、ローラーポンプ、膜型人工肺、臓器チャンバーより成る。酸素化には純酸素を1ℓ/minの流量で供給した。

2) 灌流圧と灌流方法

至適灌流圧を検討する目的で、50mmHgと80mmHgの2群について検討した。

4. 実験群

I 群：灌流圧50mmHg、温阻血0分群 (n=5)

II 群：灌流圧80mmHg、温阻血0分群 (n=6)

III 群：灌流圧80mmHg、温阻血30分群 (n=6)

IV 群：灌流圧80mmHg、温阻血35分群 (n=8)

V 群：灌流圧80mmHg、温阻血40分群 (n=6)

VI 群：UW液内24時間冷却(4℃)保存群 (n=6)

5. 検索項目と測定方法

①灌流量、②灌流圧、③灌流液ガス分析、④尿量、⑤尿中電解質、尿pH、⑥灌流前後の腎重量、⑦腎の病理組織学的検査。

有意差検定はunpaired t test で行った。

III. 成績

1. I 群

5例中3例は経過中に回路内圧が上昇し、実験の継続は困難であった。

2. II 群 (温阻血0分)

灌流液の酸素分圧は450mmHg 以上を保った。全例で灌流直後より利尿

を認め、全経過を通して安定した利尿が得られた。尿pHは、6時間後に最低値の $6.55 \pm 0.14 \Delta \text{pH}$ となった。尿中Na値は4時間後、最低値の $55.0 \pm 22.9 \text{mEq/L}$ になり、以後漸増した。尿中K値は、最初の2時間で $50.0 \pm 6.4 \text{mEq/L}$ の最高値となった。

HE染色では、糸球体の構築は良好に保たれ、尿細管上皮に扁平化や脱落の所見を認めなかった。また、Al-P染色では、尿細管の胞体内に酵素反応が紫赤色に濃染され、良好なviabilityが示された。

3. III群（温阻血30分）の成績

全例で良好な利尿を認め、尿組成はII群とほぼ同様の経過をたどった。

組織学的にはII群とほぼ同様であったが、尿細管胞体の扁平化がわずかに認められた。

4. IV群（温阻血35分）

8例中3例が利尿不良であった。尿量はII群よりやや少ない傾向であった。尿組成はII、III群よりやや劣る傾向であったが、有意差はなかった。組織学的には、尿細管胞体の扁平化が認められた。

5. V群（温阻血40分）

6例中3例では利尿不良であり、残りの3例では尿組成にばらつきが大きく、不安定であった。組織学的に全体の構築は比較的良好に保たれていたが、酵素組織化学染色では、明らかに染色性が劣っていた。

6. VI群（UW24時間）

6例全例で良好な利尿を認め、尿量もII～V群に比して有意に多かった。尿のpH、Na値はII群に比して有意に高く、K値は有意に低かった。組織化学染色では、IV群とほぼ同等の染色性が保たれていた。

IV. 考 察

灌流液の酸素担体のFCは、組織障害性が報告されているため3%の低値に設定し、膜型人工肺を用いることで十分な酸素化が得られた。灌流液には各種の添加物を必要に応じて加えたが、添加物が多くなれば、灌流条件の検討が複雑になるため、将来的には、整理してもよい物質があることも考えられた。また、保存臓器の種類によって、組成が異なるこ

とがあると考えられた。

一方、灌流圧は、保存臓器の物理的障害を避け、なおかつ十分な酸素や基質を供給するために、極めて重要な条件である。50mmHgでは血管系には良いが、組織の維持には不十分であった。80mmHgは血管系の障害も発生せず、組織の代謝も良好に維持された。

温阻血 0 分群と 30 分群は、灌流後、良好な尿の排出をみた。しかし、30 分群の尿量は 12 時間後に減少し、Na は 0 分群に比較し高く、以後は低くなった。また、35 分温阻血群は 38% が無尿であった。すなわち、本法により、障害腎を識別することが出来たことになる。さらに、40 分温阻血群では 50% に無尿がみられ、温阻血時間の延長に伴って、臓器障害が進んだといえる。

UW24 時間保存群では、全例に良好な利尿を認め、尿量も多く、急性腎不全回復時の利尿期の如きであった。このことは、本法が再現されるべき保存腎の機能をよく表現していると考えられた。

一方、conditioning の面から成績を検討すると、温阻血群で利尿を認めた例では、4～6 時間で尿の各種組成が最良となり、conditioning 効果がみられた。しかし UW 群ではこの効果は 1 例にのみ認められた。

本来、保存臓器を conditioning するのみであれば、長時間の灌流は不要である。むしろ、2 時間程度で、細胞障害を修復できるのが望ましい。このためには、アミノ酸を含め灌流液の組成を工夫する必要がある。今回の実験では、保存を目的としつつ、合わせて conditioning 効果を検討したが、将来的には、この問題を分離して検討すべきと考えられた。

V. 結 論

1. 本灌流法により、腎の室温保存が可能になった。2. 温阻血 30～40 分の障害腎の conditioning が可能であった。3. 24 時間冷却保存腎の一部で conditioning 効果を認めた。4. 本法により移植前に、保存腎の viability を的確に把握することができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 劔 持 修

副 査 教 授 齋 藤 和 雄

学 位 論 文 題 名

室温下灌流法による腎の保存、及びConditioningと
機能判定に関する実験的研究

臓器保存法には、代謝を抑制する冷却浸漬保存法と低温持続灌流法が実用化されている。しかし、これらの方法では、代謝基質の供給が困難なために保存時間に限界があること、また低温に長時間さらされるために移植後に機能の発現が遅れたり、障害が残ったりすること、さらに、移植前に保存臓器のviabilityが判定できないことなどが問題となる。これらの問題点を克服する可能性のある保存法として、代謝を維持しながら保存する方法が検討されている。この方法では、至適条件で灌流できれば、理論的には長時間の保存が可能であり、また、灌流中に臓器のviabilityを判定したり、conditioningすることも可能と考えられる。これが常温又は室温灌流保存法であり、理想的には、生体により近い条件が与えられれば良いことになる。しかし、条件となる酸素担体、酸素化法、臓器保護のための至適灌流圧や添加基質などに問題があり、いまだ至適条件は明らかでない。以上の観点から、実験的に、24℃の室温下灌流法で、長時間の保存、障害腎や保存腎のconditioningとviability判定の可能性について検討した。

方 法

ウサギを用いて、腎を摘出後灌流した。灌流液には3%のフルオロカーボン(FC-43)を加え、中空糸型の膜型人工肺に毎分1Lの酸素を供給し、灌流液を酸素化した。灌流時間は12時間とした。灌流回路は、恒温槽、ポンプ、人工肺、回路内圧計、臓器チャンバーなどから構成されている。

灌流液：灌流液は細胞外液組成を基本とした。UW液の組成を参考にし、必要に応じて各種の添加物を加えた。エネルギー源をグルコースとし、組織修復のためにアミノ酸を加えた。また、再灌流時に発生する活性酸素に対して、アロプリノールとPEG-SODを加えた。膜安定化剤にはステロイドを、酸素担体として3%のFC-43を加えた。最終的なpHは7.40、浸透圧は320mOsm/Lとした。

実験群：Ⅰ群：温阻血0分、灌流圧50mmHg (n=5)、Ⅱ群：温阻血0分、灌流圧80mmHg (以下の群の灌流圧は全て80mmHg) (n=6)、Ⅲ群：温阻血30分 (n=6)、Ⅳ群：温阻血35分 (n=8)、Ⅴ群：温阻血40分 (n=6)、Ⅵ群：4℃ UW液内浸漬 (n=6) とした。

尚、Ⅰ群とⅡ群の成績から、今回の灌流圧は80mmHgとした。

結 果

1) 尿量：Ⅱ群とⅢ群では、全体を通してⅡ群の尿量が多く、Ⅲ群では温阻血30分の影響が現われたものと考えられた。Ⅵ群は有意に尿量が多かった。

2) 尿pH：Ⅱ群と温阻血負荷群とを比較すると、温阻血障害の影響は明らかであり、障害の程度に応じてpHの上昇を認め、この傾向は全経過を通じて持続した。しかも8時間後のⅡ群のpHと、4時間後のⅢ群のpHがほぼ同値であり、30分の温阻血の影響が4時間の時間差で表現された。Ⅵ群のpHは全体に高値で推移し、冷却保存の影響が考えられた。

3) 尿中Na：Ⅱ群、Ⅲ群ともNaの良好な再吸収能を反映して低値であった。Ⅱ群とⅣ群、Ⅴ群間では、温阻血障害の影響で後者が高値であった。Ⅵ群は、

pHと同様、全体に高値であった。

4) 尿中K：Ⅱ群、Ⅲ群ともに良好なK排泄能を反映して高値であった。Ⅵ群は全体に低値であった。

5) conditioning効果：各群の尿pH、尿中Na値、尿中K値の2時間毎の平均値をみると、多くの群で2時間後から4または6時間後にかけて、pHの低下、Na値の低下、K値の上昇が認められた、したがって、この時間帯にconditioning効果が現われたものと考えられた。

6) 病理組織学的所見：12時間灌流後のHE染色では糸球体や尿細管の構築は良好に維持されていた。また酵素組織化学染色のAI-P染色でも良好な染色性が保持されていた。

結 論

本法により、ウサギ腎の室温下での保存が12時間以上可能であった。また、温阻血30～40分の障害腎のconditioningが可能であり、本法による保存腎や障害腎の灌流中のviabilityの判定が可能であった。

審査に当たって、劔物教授より、灌流液の酸素分圧、フリーラジカルに対するSODの効果、腎組織内のpH測定について、齋藤教授より、成績の統計学的意義に関してなどの質疑があり、申請者はおおむね妥当な回答を行った。

本研究は、室温灌流法による臓器の長時間保存への道を開いたこと、灌流保存中の臓器のviability判定が可能になったこと、また本法によるconditioning効果が示唆されたことなどの新知見が示され、学位授与に値すると考えた。