

学位論文題名

温阻血肝を用いたブタ同所性肝移植

—温阻血限界と viability 判定の指標について—

学位論文内容の要旨

I. はじめに

近年、肝移植の普及に伴いドナー不足が深刻な問題になっており、一つの解決策として心臓死ドナーからの臓器提供が考えられている。しかし、温阻血時間の限界やその障害の機構、障害をうけた移植肝の viability 判定法には未だ不明な点が多い。そこで心停止後の温阻血肝を用いたブタ肝移植実験により、温阻血限界と一般的な移植肝障害の指標である血清 glutamic oxalacetic transaminase (GOT) 値、血清ヒアルロン酸 (HA) 値、及び移植肝胆汁排泄量が温阻血移植肝の viability 判定の指標になりうるかについて検討を行った。

II. 対象と方法

1. 動物、実験群、全身管理及び手術手技：体重約20kgのブタ (LW) を用い、肝移植実験を温阻血時間により以下の3群に分け行った。I 群；0 分 (n=9)、II 群；30 分 (n=8)、III 群；60 分 (n=7)。II、III 群ではドナーを KCl 投与にて心停止させ肝を腹腔内に放置して温阻血肝を作成した。免疫抑制は行わなかった。ドナー肝は門脈及び動脈より冷ユーロコリンズ液で灌流を行いつつ摘出した。肝上部下大静脈吻合後、移植肝を室温リンゲル液でリンスし、一時的門脈動脈化 (portal vein arterialization: PA) 法で血流再開した。移植肝の初期灌流血 5ml/kg・体重を肝下部下大静脈より流出させた後、肝上部下大静脈をデクランプした。
2. 検討項目：レシピエントの生存を14日まで観察した。GOT 値を MDH-UV 法、HA 値を SBPA 法で測定し、血流再開後90分間の移植肝胆汁排泄量を測定した。開腹時、移植肝血流再開時、PA 中肝動脈血流再開直前、門脈再灌流60分、及び術後1、3、5、7日に動脈血を採取した。PA 中肝動脈血流再開直前に肝静脈から採血を行った。また、リンス排液および移植肝血流再開時の初期灌流血を採取した。
3. 統計学的検討：結果は平均値±標準誤差で示し、有意差検定は一元配置分散分析と Scheffé's F test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

III. 結 果

I 群は全例4日以上生存した。II 群は3頭が5日以上生存、1頭は2日目に、残りの4頭は12時間以内に死亡した。III 群では全例が5-30時間で死亡した。

動脈血 GOT 値は移植肝血流再開後に II、III 群で I 群に比べ高値を示したが、II 群と III 群の間には差を認めなかった。リンス排液、初期灌流血、肝静脈血でも同様であった。動脈血 HA 値は術中に上昇するが、その推移には3群間で差を認めなかった。初期灌流血及び肝静脈血 HA 値に差を認めず、これより算出した移植肝の HA 代謝率にも3群間で差を認めなかった。血流再開後90分間に胆汁排泄を認めたのは、I 群；9/9、II 群；5/8、III 群；2/7であり、胆汁排泄量

にⅠ群とⅡ、Ⅲ群との間で有意差を認めた。

レシピエントの生存と死亡がわかれたⅡ群を、12間以内に死亡したⅡ-A群(4頭)と、2日以上生存したⅡ-B群(4頭)にわけ検討した。有意差検定には Mann-Whitney検定を用いた。GOT値は動脈血、リンス排液、初期灌流血、肝静脈血のいずれにも差を認めなかった。動脈血、初期灌流血、及び肝静脈血中HA値にも群間に差を認めなかった。Ⅱ-B群は4頭全例に胆汁排泄を認めたのに対し、Ⅱ-A群は1頭のみであり、血流再開後90分間の胆汁排泄量に有意差を認めた。

IV. 考 案

今回の検討から、30分温阻血では半数のレシピエントの生命維持が可能であるのに対して、60分温阻血では生存が得られないことが明らかとなった。従来のブタを用いた移植実験では30分の温阻血でもなんらかの補助を行わなければレシピエントの生命維持は不可能とされてきた。今回の検討が諸家の報告と異なる点は術式にPA法を用いたことである。本法には、移植肝をレシピエントの腹腔内にいれてから血流再開までの腹腔内阻血時間が短縮できること、無肝時間が短縮できること、門脈の血流状態に左右されない安定した血流再開が可能などなどの利点がある。移植肝はレシピエントの腹腔内で血流再開までの間、体温により温められ障害が進行する。移植肝がすでに高度の阻血障害に陥っている温阻血肝移植ではその時間を短縮することが重要である。また、無肝期には門脈圧は時間とともに上昇することが報告されており、無肝時間を短縮することも重要と考えられる。本実験での腹腔内阻血時間は約25分、無肝時間は約30分であり、著者らの従来法での成績、腹腔内阻血時間：75.0±4.6分、無肝時間：77.0±4.6分(n=8、データ未発表)に比べ短縮することが可能であった。諸家の報告に比べて成績が改善されたのは、本法を用いたことによると考えられた。しかし、温阻血30分でのレシピエントの生存は半数であり、これが限界の時間と考えられた。

血清GOT値は肝温阻血障害の程度、viabilityを反映することが報告されており、臨床の肝移植でも移植肝障害の指標として広く用いられている。しかし、温阻血30分群と60分群との間の推移に差を認めず、温阻血30分での早期死亡例と生存例の間にも差を認めなかった。これより、GOTの術中の著明な上昇は移植肝が温阻血をうけた事を反映するものではあるが、そのviabilityを反映はしないことが明らかとなった。

血清HA値は類洞内皮細胞機能を反映すると考えられ、ラット肝移植では冷保存時の移植肝viabilityを反映するとされている。ブタ肝温阻血実験では2時間までの阻血では上昇した血清HA値は血流再開後ほぼ同時間で前値まで回復するとされている。今回、全例が生存したⅠ群でも門脈再灌流60分後の血清HA値は未だ高値であり、短時間の冷阻血でもHA値からみた類洞内皮細胞機能は障害をうけているものと考えられた。一方、30、60分の温阻血を有したⅡ、Ⅲ群での血清HA値の推移には差を認めず、さらにⅡ群での生存例と早期死亡例との間にも差を認めなかった。このことより、温阻血肝移植時にはHAは移植肝viabilityの指標にはなりえないものと考えられた。

血流再開後の胆汁産生は、ラットを用いた温阻血再灌流実験や温阻血肝移植実験でATPの回復と相関し、viabilityを反映すると報告されており、今回の結果はこれと一致した。

V. 結 語

一時的門脈動脈化法を用いたブタ同所性肝移植実験を行い、以下の結果を得た。

1. 30分の温阻血肝移植では8頭中4頭のレシピエントが生存可能であったが、60分では7頭全例早期に死亡した。
2. 術中の血清GOT値、HA値の推移は移植肝のviabilityを反映しなかった。
3. 血流再開後90分間の胆汁排泄量は移植肝のviabilityを反映した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 小 柳 和 彦

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

温阻血肝を用いたブタ同所性肝移植

— 温阻血限界と viability 判定の指標について —

近年、肝移植の普及に伴いドナー不足が深刻な問題になっており、一つの解決策として心臓死ドナーからの臓器提供が考えられている。しかし、温阻血時間の限界やその障害の機構、障害をうけた移植肝の viability 判定法、などには未だ不明な点が多い。本研究は心停止後の温阻血肝を用いたブタ肝移植実験により、移植肝の温阻血限界と、血清 glutamic oxalacetic transaminase (GOT) 値、血清ヒアルロン酸 (HA) 値、及び移植肝胆汁排泄量が温阻血移植肝の viability 判定の指標になりうるかについて検討したものである。

体重約20kgのブタ(LW)を用い、肝移植実験を温阻血時間により以下の3群に分類した。Ⅰ群；0分(n=9)、Ⅱ群；30分(n=8)、Ⅲ群；60分(n=7)。Ⅱ、Ⅲ群ではドナーをKCl投与にて心停止させ、肝を腹腔内に放置して温阻血肝を作成した。免疫抑制は行わなかった。ドナー肝は門脈及び動脈より冷ユーロコリンズ液で灌流を行いつつ摘出した。肝上部下大静脈吻合後、移植肝を室温リンゲル液でリンスし、一時的門脈動脈化(portal vein arterialization: PA)法で血流再開した。移植肝の初期灌流血5ml/kg・体重を肝下部下大静脈より流出させた後、肝上部下大静脈をデクランプした。

レシビエントの生存を14日まで観察した。GOT値をMDH-UV法、HA値をSBPA法で測定し、血流再開後90分間の移植肝胆汁排泄量を測定した。開腹時、移植肝血流再開時、PA中肝動脈血流再開直前、門脈再灌流後60分、及び術後1、3、5、7日に動脈血を採取した。PA中肝動脈血流再開直前には肝静脈から採血を行った。また、リンス排液および移植肝血流再開時の初期灌流血を採取した。

その結果、Ⅰ群は全例4日以上生存した。Ⅱ群は3頭が5日以上生存、1頭は2日目に、残りの4頭は12時間以内に死亡した。Ⅲ群では全例が5-30時間で死亡した。

動脈血 GOT 値は移植肝血流再開後にⅡ、Ⅲ群でⅠ群に比べ高値を示したが、Ⅱ群とⅢ群の間に差を認めなかった。リンス排液、初期灌流血、肝静脈血も同様であった。動脈血 HA 値は術中に上昇するが、その推移には3群間で差を認めなかった。初期灌流血及び肝静脈血 HA 値に差を認めず、これより算出した移植肝の HA 代謝率にも3群間で差を認めなかった。血流再開後90分間の胆汁排泄量はⅠ群とⅡ、Ⅲ群の間に有意差を認めた。

レシビエントの生存と死亡がわかれたⅡ群を、12時間以内に死亡したⅡ-A群(4頭)と、2日以上生存したⅡ-B群(4頭)にわけ検討した。GOT 値、HA 値ともに測定した全ての時点で群間に差を認めなかった。胆汁排泄量はⅡ-B群がⅡ-A群に比べ有意に多量であった。

以上より、PA法を用いたブタ温阻血肝移植実験では、30分の温阻血では半数のレシピエントの生存がえられ、その障害が境界領域であるのに対して、60分の温阻血ではレシピエントの生存は得られず、障害は不可逆的であると考えられた。また、術中のGOTの著明な上昇は移植肝が温阻血をうけた事を反映するものではあるが、そのviabilityを反映しないこと、温阻血肝移植時にはHAは移植肝viabilityの指標にはなりえないことが明らかとなった。一方、胆汁排泄量は移植肝viabilityの良い指標になるものと考えられた。

本研究により、移植肝に30分の温阻血があってもレシピエントの生命維持の可能性があり、温阻血肝移植時の移植肝viability判定の指標としての、血清GOT値、HA値、および移植肝胆汁排泄量の意義が明らかになったことは、温阻血肝移植の研究において有意義なものと考えられる。

さらに、本研究での成果を基礎として検討を重ねることにより、心停止後の臓器提供による肝移植が臨床においても日常の治療手段として普及することが期待された。

審査にあたって、小神教授より、手術術式に伴う手技上の問題点、灌流装置などを用いた血流再開以前のviability判定の可能性、臨床との相違及び臨床応用の可能性、人工肝臓を用いた移植肝補助の可能性についての質問があった。次いで、小野江教授から温阻血群における肝の組織障害の部位、アポトーシス及び免疫系の細胞の障害における役割についての質問があった。いずれの質問に対しても申請者は概ね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。