

学 位 論 文 題 名

Calcium mobilization in liver transplantation
graft with warm ischemia

(温阻血移植肝におけるカルシウム動態についての研究)

学位論文内容の要旨

肝移植において不可避とされる虚血再灌流障害の機序に関しては、フリーラジカル、過酸化脂質、プロスタノイド、好中球などの関与が報告されているが、カルシウムの肝細胞内への流入と蓄積もその一因とされている。一方、臨床肝移植におけるドナー肝供給不足の解決策のひとつとして心停止後ドナーからの肝提供が始められているが、この方法が一般的になるためには、ドナー肝に温阻血が負荷され虚血再灌流障害が惹起された場合の肝機能に関する詳細な検討が必要である。当該研究の一環として、ブタ肝移植モデルを用い、ドナー肝への温阻血負荷の有無による肝内のカルシウム代謝の相違を検討した。

24回のブタ同所性肝移植を行った。麻酔前投薬として塩酸ケタミンと硫酸アトロピンを筋注し、サイアミラルナトリウムで導入し気管内挿管の後笑気とエンフルレンで維持した。200IU/kgのヘパリンを静注して全身ヘパリン化を行った。ドナー手術では、腹部大動脈より500ml、門脈より2,000mlのユーロコリンズ液を流して肝灌流を行った。レシipient手術には、移植肝の再灌流から門脈再建までの間肝に動脈血を流す一時的門脈動脈化(PA)法を採用した。免疫抑制剤は投与しなかった。動脈血は開腹時、PA開始時、PA中、門脈再灌流60分後に採取した。移植肝灌流液(4mEq/lのイオン化カルシウムを含む室温乳酸リンゲル液15ml/kg体重)は最初と最後の30mlを各々採取した。PAによる初期灌流血(5ml/kg体重)とPA中の肝静脈血も採取した。血清GOT(KU/l)はマリン酸デヒドロゲナーゼ紫外線法で、血清mGOT(IU/l/37℃)はプロテアーゼ法で、イオン化カルシウム(mEq/l)はイオン選択電極法でそれぞれ測定した。胆汁(ml)はPA開始後90分間にわたり採取した。胆汁中カルシウム量(mg)は原子吸収分光法で測定した。実験群は温阻血時間により0分をI群(n=9)、30分をII群(n=8)、60分をIII群(n=7)とした。温阻血は塩化カリウムの心腔内注射によりブタを死亡させた後、手術台の上に放置することによった。推計学的検討には、分散分析(クラスカル・ワリスの検定)、多重比較(ScheffeのU検定)またはノンパラメトリック法(Mann-WhitneyのU検定)を用い、危険率5%以下をもって有意とした。

生存期間はI群は全例4日以上であり、うち3例は14日生存し犠牲死させた。II群では4例が2日以上生存したが、残り4例は12時間以内に死亡した。III群は全例30時間以内に死亡した。背景因子では、総阻血時間、無肝期、v-vバイパス時間、PA流量、PA中門脈圧、

輸血量は群間に差がなかったが、PA時間はI群がII群に比して有意に長かった。血清GOT値はPA中においてII群 ($871.1 \pm 194.9 \text{ KU/l}$) およびIII群 ($786.31 \pm 112.1 \text{ KU/l}$) で増加し、さらに門脈再灌流60分後も高値が持続しており ($840.8 \pm 202.6 \text{ KU/l}$ および $819.7 \pm 119.0 \text{ KU/l}$)、いずれの測定点でもI群 ($157.9 \pm 17.0 \text{ KU/l}$ および $245.1 \pm 31.1 \text{ KU/l}$) に比して有意に高値であった。灌流液・初期灌流血・肝静脈中でもII、III群の値は全ての測定点でI群に比して有意に高値であった。イオン化カルシウム値は、動脈血では常に群間に差を認めなかったが、灌流液初期30mlにおいては、I群の値 ($1.58 \pm 0.19 \text{ mEq/l}$) はIII群の値 ($0.92 \pm 0.15 \text{ mEq/l}$) に比して有意に ($P=0.0284$) 高値であった。また初期灌流血では、I群 ($2.24 \pm 0.08 \text{ mEq/l}$) はII群 ($1.65 \pm 0.10 \text{ mEq/l}$) とIII群 ($1.59 \pm 0.19 \text{ mEq/l}$) に比して有意に ($P=0.0129$ および $P=0.0118$) 高値であった。門脈再灌流後90分間の胆汁排泄量は、I群 ($3.42 \pm 0.79 \text{ ml}$) がII群 ($0.44 \pm 0.24 \text{ ml}$) およびIII群 ($0.52 \pm 0.43 \text{ ml}$) に比して有意に ($P=0.0017$ および $P=0.0038$) 高値であった。II群の生存群と非生存群の比較では、mGOT値には差がなかったが、イオン化カルシウム値では初期灌流血で生存群 ($2.00 \pm 0.08 \text{ mEq/l}$) が非生存群 ($1.29 \pm 0.07 \text{ mEq/l}$) に比して有意に ($P=0.0209$) 高値であった。また、胆汁排泄量も生存群 ($0.83 \pm 0.40 \text{ ml}$) が非生存群 ($0.05 \pm 0.05 \text{ ml}$) に比して有意に ($P=0.0304$) 高値であった。

肝障害におけるカルシウムの関与を文献的に考察すると、肝細胞レベルでは細胞内へのカルシウム流入は細胞死に至る一般的かつ最終的な経路である。培養肝細胞では低酸素状態で細胞外カルシウムの流入により細胞質内カルシウム濃度は定常的に増加する。遊離肝灌流モデルではカルシウム流入により多量の酵素逸脱が起こるが、カルシウムの過剰負荷は虚血再灌流障害に一義的ではないとの報告もある。虚血再灌流モデルではカルシウム蓄積の程度は虚血障害の程度を反映すると言われる。カルシウム拮抗剤は理論上はカルシウム流入による肝細胞障害を軽減するはずであるが、現在のところ完全に抑制できる薬剤は見いだされていない。

これに対して、肝移植モデルを用いて移植肝におけるカルシウム動態をみた報告はみられない。大動物モデルでは移植肝内のカルシウムの動きを細胞レベルで解析する方法論がないため、今回の実験では移植肝におけるカルシウムの流入と流出の総和の差異を検討することで移植肝全体でのカルシウムの動態を推定した。その結果、温阻血が負荷された移植肝ではPAによる血流再開後短時間に多量のイオン化カルシウムが移植肝に蓄積しており、その傾向は温阻血時間が長い群でより顕著であった。また、30分温阻血肝の移植では非生存群でより多量のカルシウム蓄積がみられたことから、カルシウム蓄積量は移植肝の生着にとって最も重要な因子の一つであると考えられる。しかし、このカルシウム流入は非常に短時間で起こるため、移植肝がPAにより再灌流される頃には平衡状態に達しており、PA中や再灌流後60分ではイオン化カルシウム濃度に差は認められない。移植肝へのカルシウム流入が完全に阻止できないとしても、蓄積したカルシウムを迅速に胆汁中に移行させ得れば、肝細胞を障害から守ることができるであろう。従って、カルシウム蓄積による細胞障害を軽減するためには、血流再開早期に細胞内に流入するカルシウムを極力ブロックするか、流入したカルシウムを速やかに胆汁中に流出させることが重要で、このような働きを持つ薬剤の開発が待たれる。

また、温阻血限界に関しては、30分温阻血群で生存、非生存が半々であったことと、

生存群ではカルシウム蓄積が有意に少なかったことから、30分が温阻血限界と考えられた。また、GOT値、mGOT値、胆汁排泄量は生存群と非生存群で有意差がなかったことから、移植肝から流出するイオン化カルシウム値は移植肝生着の可能性をみる上で良い指標になると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Calcium mobilization in liver transplantation graft with warm ischemia

(温阻血移植肝におけるカルシウム動態についての研究)

肝移植において不可避とされる虚血再灌流障害の機序に関しては、カルシウムの細胞内への流入と蓄積がその一因とされている。そこで申請者はブタ肝移植モデルを用い、ドナー肝への温阻血負荷の有無による肝内のカルシウム代謝の検討を行った。レシピエント手術には一時的門脈動脈化 (PA) 法を採用した。動脈血は開腹時、PA 開始時、PA 中、門脈再灌流 60 分後に、移植肝リンス液は最初と最後の 30ml を各々採取した。PA による初期灌流血と PA 中の肝静脈血も採取した。血清 GOT、血清 mGOT、イオン化カルシウム (Ca^{2+})、胆汁排泄量、胆汁中 Ca 量を測定した。温阻血 0 分を I 群 ($n = 9$) とし、温阻血 30 分を II 群 ($n = 8$)、温阻血 60 分を III 群 ($n = 7$) とした。I 群は全例 4 日以上生存したが、III 群は全例 30 時間以内に死亡した。II 群では 4 例が 2 日以上生存したが、残り 4 例は 12 時間以内に死亡した。血清 GOT 値は II、III 群で PA 中以降急激に増加し、I 群に比して有意に高値であった。灌流液・初期灌流血・肝静脈中では II、III 群の値はいずれの測定点でも I 群に比して有意に高値であった。 Ca^{2+} 値は、動脈血では常に群間に差を認めなかった。灌流液初期 30ml においては、I 群の値は III 群の値に比して有意に高値であった。また初期灌流血では、I 群の値は II 群の値と III 群の値に比して有意に高値であった。門脈再灌流後 90 分間の胆汁産生量は、I 群が II、III 群に比して有意に高値であった。II 群の生存群と非生存群の比較では、mGOT 値には差がなかったが、 Ca^{2+} 値では初期灌流血で生存群が非生存群に比して有意に高値であった。胆汁産生量も生存群が非生存群に比して有意に高値であった。カルシウムの動きを全体としてみると、移植肝血流再開後短時間に多量のイオン化カルシウムが移植肝に蓄積しており、その傾向は温阻血時間が長い群でより顕著であった。従って、カルシウム蓄積による細胞障害を軽減するためには、血流再開早期に細胞内に流入するカルシウムを極力ブロックするか、流入したカルシウムを速やかに胆汁中に流出させることが重要で、このような働きを持つ薬剤の開発が待たれる。また、温阻血限界に関しては 30 分が上限と考えられ、移植肝から流出する Ca^{2+} 値は生存の可能性をみる上で良い指標になると考えられた。

審査にあたって加藤教授から II 群の生存群と非生存群間のモデル上の均一化、カルシ

ウム拮抗剤による細胞内への Ca^{2+} 流入の防止、細胞内からの Ca^{2+} 流出を促進する薬剤、心臓死の場合の急速冷却による虚血時間の短縮、PA 法で肝を再灌流した場合の動脈血流による肝障害などについての質問があった。申請者は均一化については問題がないこと、文献上細胞内への Ca^{2+} 流入をある程度防止することによりドナー肝の生着を延長し得たとの報告はあるが完全に防止することは不可能であること、 Ca^{2+} 流出を促進する薬剤としては UDCA が有望であること、このモデルではある程度の温虚血が負荷されて肝の受けるダメージが大きい状態を想定していること、PA 法はシドニーグループが当初より臨床応用しており生着率その他に遜色はないことなどを回答した。続いて、浅香教授よりこの実験での肝障害における肝実質細胞の関与の程度、最終的な肝細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は原因か結果か、肝障害の指標は GOT よりも GPT ではないか、胆汁排泄の肝障害による二次的低下の可能性についての質問があった。申請者は本実験は肝を一種のブラックボックスと考えて Ca^{2+} の入りと出のみをみているためいずれの障害が主かについては証明できないこと、原因か結果かについても同様に証明できないこと、ブタでは肝障害の指標として GPT の方が特異的であること、胆汁排泄は文献的に肝障害の程度を鋭敏に表すことなどを回答した。次いで、主査より細胞内外のカルシウムの代謝と分布についての質問があった。申請者は細胞内外での濃度勾配と、細胞内のカルモデュリン、ミトコンドリア、小胞体における分布について明解に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。