

学位論文題名

A Radical Scavenger, Edaravone, Protects Canine Kidneys from Ischemia-Reperfusion Injury after 72 Hours of Cold Preservation and Autotransplantation

(ラジカル消去因子、エダラボンはイヌの腎臓を使った72時間冷保存、自家移植のモデルで虚血再灌流障害から腎を保護する)

学位論文内容の要旨

【背景】腎移植では delayed graft function によってしばしば透析が導入される。その原因として第一に移植臓器に対する虚血再灌流障害が挙げられる。虚血再灌流障害を起こす要因のひとつである活性酸素種は虚血時、再灌流時に発生する。活性酸素種は臓器に直接・間接的に作用し、その機能を低下させる。

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, MCI-186) は1988年に in vivo で活性酸素種に対する作用が証明された free radical scavenger である。それ以後、ラットを使った実験で脳・心臓・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害に対する保護作用が示されている。さらに現在日本において脳梗塞後の治療薬として臨床の場で使用されている。

この虚血再灌流障害に対する効果をふまえ、この実験ではイヌの腎臓の72時間冷保存、自家移植モデルを使い、エダラボンのイヌの腎虚血再灌流障害に対する保護効果を検討した。

【方法】メスのハイブリッド犬(11-13kg)を使用した。手術はチオペンタールで導入したイヌを気管内挿管し全身麻酔下におこなった。正中切開にて開腹、左腎臓を尿管とともに遊離した後、1.25g マンニトールと10mg のフロセミドを静注15分後に血管を処理し腎を摘出。ヘパリンを5000U/l で混注したHTK液(histidine-tryptophan-ketoglutarate solution)でフラッシュ後、同液に4℃で保存した。72時間後、同イヌを麻酔し保存した腎臓を右の骨盤腔に自家移植した。再灌流の15分前より1.25g マンニトールと10mg のフロセミドを静注。腎動脈は右総腸骨動脈と端々吻合、腎静脈は総腸骨静脈と端側吻合。尿管は16Frのカテーテルを内腔に留置し外瘻とした。移植後30-35ml/kg/hrの補液をおこない、麻酔覚醒後より経口摂取を開始。術後3日目まで800mlの補液を行った。実験群は以下の4群とした。

- 1、対照群 (n=6) : 投薬なし
- 2、治療群 (n=6) : エダラボン 3mg/kg を腎臓採取直前まで30分かけて経静脈投与。保存液中に50 μM で混注。腎移植時、再灌流10分前から30分かけて3mg/kg を経静脈投与。

- 3、組織採取群 1 (n=4) : 対照群と同じ手術を施行、エダラボンの投薬なし。腎生検を再灌流後 15 分、1 時間、3 時間、24 時間後に施行。
- 4、組織採取群 2 (n=4) : 手術、エダラボンの投薬は治療群と同様。腎生検を再灌流後 15 分、1 時間、3 時間、24 時間後に施行。

観察期間は 14 日。観察項目は尿量、血清尿素窒素 (BUN)・クレアチニン (Cr)、尿中 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)、尿中電解質・Cr、腎組織血流量 (laser Doppler)、腎動脈血流量、腎組織 malondialdehyde (MDA)、腎組織 myeloperoxidase (MPO)、尿中 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG)、病理学的検討項目:ヘマトキシリンエオジン染色 (HE)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 染色、p-selectin 染色、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein isothiocyanate nick end labeling (TUNEL) 染色。数値は平均 $\pm$ SD で表記。p<0.05 をもって有意差ありとした。

【結果】生存は対照群 4/6、治療群 6/6。対照群の 2 頭はそれぞれ 7 日目、8 日目に腎不全で死亡。生存率に有意差なし。移植後、尿量は治療群で術後 5 日目まで増加傾向、それに比べ対照群は緩やかに増加した。術後 3, 4, 5 日目に有意な差を認めた。血清 Cr は対照群では移植後 7 日目まで増加、その後低下を始めるが、治療群では悪化の程度は軽度で 2, 3, 4, 5 日目に有意に低下。BUN には差は認められず。尿中 NAG/Cr, FENa, は治療群で移植後の悪化が抑えられており、それぞれ術後 2, 7 日目、1 日目に有意差を認めた。Cr は治療群で速やかな回復が見られ移植後 3, 4, 5 日目に有意差を認めた。腎組織血流量では移植後 180 分に治療群で高い傾向があるものの差は認めず。血管抵抗は 60 分、120 分、180 分で治療群が有意に低かった。酸化ストレスの指標である組織 MDA の増加は治療群で抑制されており移植後 1 時間で有意な差を認めた。尿中に排泄される 8-OHdG は尿 Cr との比で見ると再灌流後 3 時間、6 時間で有意に減少していた。病理組織学的には HE 染色で腎障害 (急性尿細管壊死) の程度は治療群で軽度な傾向があり、免疫染色では 4-HNE、P-selectin は治療群で移植後 1 時間で発現が減少していた。TUNEL 染色に差は認めなかったが、逆に移植 24 時間後には治療群で陽性細胞の数が増加していた。

【考察】72 時間イヌの腎冷保存自家移植モデルにおいて、エダラボンは活性酸素種によって引き起こされる虚血再灌流障害を緩和し移植後の腎機能を保護した。エダラボンはすでにラットの脳、心臓、肝臓、腎臓で虚血再灌流障害に対する保護作用が示されている。しかし、イヌの腎臓を使いその効果を明らかにした実験は報告がない。臓器移植において、活性酸素種は温阻血時、再灌流時、冷保存時に発生することが示されている。腎移植では活性酸素種は腎尿細管上皮または血管内皮細胞から生じ、直接・間接に細胞を障害し急性尿細管壊死を引き起こす。この実験では治療群において血清クレアチニン、尿量などに代表される指標からわかるように移植後の腎機能が保護されている。また有意差はないものの組織学的に治療群で急性尿細管壊死が軽減されている。組織 MDA 量や 4-HNE 免疫染色の発現が抑えられていることから、その機序として組織の酸化障害が抑制されたことがその要因であることがわかる。炎症による好中球の遊走は組織の MPO 量からは差がなかったが、治療により組織の P-selectin 発現の減少や、再灌流後の血流量の保護効果から、この薬剤は腎尿細管上皮細胞のみではなく血管内皮細胞をも保護した可能性がある。尿中の 8-OHdG

は治療群で減少しており、この尿中 8-OHdG は虚血再灌流障害時の酸化ストレスマーカーとしての可能性がある。アポトーシス細胞の数は移植腎の障害度を表しているという報告もあるが、障害の程度が大きく壊死の範囲が広い場合には逆にその数が少なくなるという報告もある。この実験では組織のサンプリング時間の問題もあるが、アポトーシス細胞の発現数はその障害度を正確に表していないかもしれない。

【結語】エダラボンはイヌの腎冷保存・再灌流時に発生する活性酸素種による腎細胞障害を抑制し、移植後の機能を保護した。将来、この薬剤は臨床の場で臓器の保存・移植に応用する可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也  
副 査 教 授 筒 井 裕 之  
副 査 教 授 藤 堂 省

## 学 位 論 文 題 名

### A Radical Scavenger, Edaravone, Protects Canine Kidneys from Ischemia-Reperfusion Injury after 72 Hours of Cold Preservation and Autotransplantation

(ラジカル消去因子、エダラボンはイヌの腎臓を使った72時間冷保存、  
自家移植のモデルで虚血再灌流障害から腎を保護する)

腎移植では delayed graft function によってしばしば透析を必要とする。その原因として臓器の摘出、保存、移植の過程で避けることのできない虚血・再灌流という状態を経ることによる障害、つまり虚血再灌流障害があげられる。その障害はカルシウムイオン増加等の細胞内環境の変化、内皮細胞と好中球の接着・活性化、サイトカインなどいくつかの要因が絡み合い生じているが、なかでも重要な働きをするものに活性酸素種がある。活性酸素種は虚血時、再灌流時に発生し、細胞を直接に障害したり、内皮細胞の接着因子を活性化させたり、サイトカインの産生を促したりすることで、移植後の臓器機能を低下させる。いくつかの抗酸化剤が虚血再灌流障害に効果を示しているが、そのどれもが治験薬であり、臨床で使用されるに至っていない。本研究では現在日本で脳梗塞後の治療薬として臨床で使用されているエダラボンという抗酸化剤を使用し、イヌの腎臓 72 時間冷保存、自家移植モデルでの腎虚血再灌流障害に対する保護効果を検討した。その結果エダラボンは冷虚血・再灌流時に発生する活性酸素種による腎尿細管、血管内皮細胞障害を軽減し、腎機能を保護した。

審査にあたっては、まず筒井教授より、(1) この薬剤は临床上、副作用として腎不全による死亡症例があるが、この実験での腎機能に対する影響についてどう考えているか、(2) 今後の臨床応用、(3) 酸化ストレスのマーカーは再灌流後もっと早い段階で捉えられないかについて質問があった。これに対し (1) 臨床での死亡例は合併症のある全身状態の不良な症例への投与で認められていること、この薬剤との直接の因果関係が証明された訳ではない。本実験では腎不全に対し使用し有害事象を認めていないが、臨床では 1 週間投与と投与方法に違いがあり、このことが副作用と関係がありうる可能性がある。(2) 脳梗塞のように発症時がはっきりせず、すぐに投与できない症例よりはむしろ、移植や、心血管疾患の治療のように、再灌流時に投与できる症例のほうがむしろ効果が期待できる。また当科では温阻血時間の長かった肝移植の患者に使用し効果があった。(3) 活性酸素種の発生は再灌流直後が多くそのときに組織障害が強いと思われるが、本実験での MDA 測定系の問題、大動物であり測定の point を増やすことの困難なこと、尿中においては採取

し計測できる量が確保できるまで時間がかかったなどの理由からこれ以上細かく正確な測定は困難であった、と解答があった。野々村教授から、(1)エダラボンの適正な投与時期、(2)アポトーシス細胞の発現について質問があった。これに対し(1)本実験はエダラボンの効果を見るために活性酸素種が発生する3ポイント、腎切除時、保存時、再灌流時に使用している。どのタイミングにおいてもっとも効果があるかの検討は必要であるが、活性酸素種の発生は再灌流直後が多いため、臨床での使用を考えると、この時が最も適していると考えられる。UW液には抗酸化剤が含まれている点を考えれば、さらには保存時にも使用するのがよいのではないのか。(2)アポトーシス細胞は再灌流後、24時間から48時間と遅いタイミングで捉えられてきている報告が多く、本実験でもさらに遅いタイミングで腎生検をしていればそれを適切に評価できた可能性がある、と解答があった。藤堂教授から、治療群で移植後腎血管抵抗が抑えられている理由について質問があった。これに対し、血管抵抗を規定する因子は腎輸入および輸出細動脈であり、虚血再灌流においてそのレベルの内皮細胞が障害されることで血管抵抗の増大が引き起こされている。理由として①保存によるその細胞の浮腫による機械的な血管内腔の閉塞、②血管拡張物質にたいする減少、相対的なエンドセリン等血管収縮物質の作用の効果増大、③好中球との接着、局所炎症の進行などが関与していることが知られているが、エダラボンが内皮細胞障害を保護した結果、腎血管抵抗の上昇が押さえられたと思われる。との解答があった。

この論文は脳梗塞以外でエダラボンの腎冷虚血再灌流障害に対する保護作用を示したことで高く評価され、今後移植等の分野で臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。