

学位論文題名

Does Heavy Water Attenuate Cold Preservation and Reperfusion Injury of Canine Kidney?

(72時間保存イヌ腎移植モデルを用いた重水の虚血再灌流障害に対する効果の検討)

学位論文内容の要旨

(背景と目的) 腎移植は末期腎不全患者においては、最善の治療ではあるが移植後の Delayed Graft Function (DGF) はいまだ 25-30%に発症しグラフト生存に深刻な影響を与える。腎臓における冷保存とその後の再灌流にともなう障害は急性尿細管壊死を来し DGF の原因である。虚血再灌流障害を軽減するために様々な保存液が開発されてきたが、DGF を完全には抑制していない。重水 (D_2O) は、水素の重同位体であり、生体においては、細胞内への Ca^{++} 流入の減少、細胞膜の安定化、そしてミトコンドリアの機能障害などを抑制すると報告されており虚血再灌流障害を軽減する可能性があるとして報告されている。当科でも D_2O を保存液に加えることでラットの心移植での虚血再灌流障害抑制を認めた。しかしながら D_2O の腎における虚血再灌流障害への効果は確立されていない。

(材料と方法)

in vitro: University of Wisconsin solution (UW) と histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) に加えて HTK の H_2O の 30%を D_2O に置換した液 (HTKD) を用いた。イヌ腎細胞由来の Madin-Darby Canine Kidney epithelial cell line (MDCK) を用いて 96 ウェルプレートに MDCK を 5×10^4 /ウェル播種した。培地を保存液に置換し、有酸素下 72 時間および低酸素下 36 時間の冷保存後に LDH、MTT、ATP を測定した。

in vivo: 雌性のビーグル犬 (体重; 8-12kg) (n=11) を無作為に 2 群に分けた。全身麻酔下に左腎を摘出し 72 時間 4°C で HTK もしくは HTKD に冷保存し、再度全身麻酔下に自家腎移植を行なった。再灌流後右腎は摘出した。生存日数、尿量、血液尿生化学所見および腎の病理組織で効果を評価した。

(結果)

in vitro: LDH 測定により冷保存後の死細胞を評価したところ 72 時間の有酸素下および 36 時間の低酸素下の両条件下において HTK と比較し、HTKD で有意に死細胞数が減少したが、UW において最も死細胞数が少なかった。MTT 測定においては 72 時間の有酸素下では HTK と比較し HTKD が有意に高かったが、低酸素下では両保存液の間に有意差を認めなかった。両条件下において UW は有意差を持って高値を呈した。次に ATP を測定すると HTKD と UW は HTK より有意に高い値であったが、低酸素下では HTK と HTKD との間に有意差は認めしたが、UW は HTK、HTKD の両保存液より有意に高値であった。これらより有酸素下において HTKD は HTK と比較し細胞保存に効果がある可能性が示唆されたが、低酸素下ではその効果が減弱すると考えられた。

in vivo: 自家腎移植後 14 日間の観察を行なった。HTK および HTKD の両群共に嘔吐、水溶性下痢、食思不振などの尿毒症症状を呈した。HTK 群では 6 匹中 4 匹が、HTKD 群では 5 匹全頭が 14 日以内に DGF とそれに伴う腎不全により死亡した。両群共に術後乏尿であった。移植後の BUN、血清 creatinine は経時的に著増した。FENa は両群共に 1% 以上であり腎性腎不全の所見であった。尿中 NAG/creatinine 比は両群において有意差なく近位尿細管障害を示唆する所見であった。14 日目の義死時もしくは死亡時の腎の組織においては両群共に重度の急性尿細管壊死を呈していた。

(考察)

近年の臓器保存の発達にも関わらず未だ腎移植後 20-30%に DGF が発症する。当施設でのラットの心臓保存の研究および他施設の報告より D_2O には虚血再灌流障害を抑制し臓器保存に寄与する可能性があると考えられたため今研究を行なった。

D_2O の生化学的特性により、虚血再灌流障害にともなうミトコンドリア機能障害、細胞内へのカルシウム流入、カルパインの活性化そして細胞骨格の破壊等を抑制することが考えられる。今研究では *in vitro* において HTK に D_2O を加えることで ATP 量は保たれミトコンドリア障害を軽減したことを証明したが、この効果は無酸素下では、UW と比較し減弱した。細胞内へのカルシウム流入もまた冷保存に伴う重篤な障害であり、当施設でのラットの心臓の冷保存とその後の移植実験において、保存液に D_2O を加えることで冷保存による細胞内のカルシウム濃度上昇やカルパインと Caspase3 の活性化を抑制することを報告した。更に D_2O に特徴的な solvent isotope effect による細胞骨格の安定化も諸処の報告で述べられている。これら様々なメカニズムにより重水は細胞の冷保存障害を抑制すると考えられるため、イヌの腎臓を用いた大動物における腎の冷保存および移植実験を行なった。

イヌの冷保存後自家腎移植実験においては残念ながら HTK 液に D_2O を加えても DGF の発症を抑制することは困難であった。その理由を考察すると、一つは HTK 液そのものが UW と比較し長時間保存では虚血再灌流障害を抑制する効果が減少することが考えられる。これは UW には抗酸化作用のあるグルタチオンとアロプリノールが添加されているが HTK にはそれらの組成がなく保存時間の延長に伴う虚血による活性酸素障害を抑制する効果が減弱することが可能性として示唆される。次に *in vitro* の実験において確認された様に冷保存時に低酸素になることで D_2O の効果が減弱された可能性も考えられる。実際、細胞を 72 時間冷保存する際には酸素は常に 110-130mmHg で供給されるが、イヌから摘出した腎は冷保存中に低酸素状態となり最終的に 5mmHg 以下となる。これにより低酸素下でのミトコンドリアの呼吸障害から活性酸素が産生されグラフトに障害を与える可能性が考えられる。実際に、当科において施行したほぼ同様の条件下で行なわれた HTK を用いた 72 時間のイヌ腎冷保存実験では Radical scavenger である Edaravone を用いることで虚血再灌流障害を抑制する効果が示されたことより冷保存による虚血やそれに伴う活性酸素を制御することが HTK を用いる際には肝要と考えられた。

(結語) イヌの腎冷保存においては、HTK に重水に加えるだけでは、虚血再灌流障害を抑制するのは困難だが、保存時に酸素を加えることや抗酸化剤を用いることでその臓器保護作用が増強される可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 居 喜 郎
副 査 教 授 平 野 聡
副 査 教 授 武 富 紹 信
副 査 准教授 神 山 俊 哉

学位論文題名

Does Heavy Water Attenuate Cold Preservation and Reperfusion Injury of Canine Kidney?

(72時間保存イヌ腎移植モデルを用いた重水の虚血再灌流障害に対する効果の検討)

腎移植のグラフト生存に深刻な影響を与える Delayed Graft Function(DGF)はその主たる原因が、臓器の冷保存と血流再開に伴う虚血再灌流障害 (ischemic and reperfusion injury: IRI) である。これを軽減するため様々な保存液が開発されてきたが、DGF を完全には抑制していない。重水は生体内における細胞内の Ca^{2+} 流入の減少、細胞膜の安定化、ミトコンドリア機能維持などの作用により IRI を軽減する可能性があり臓器保存での応用が期待できる。我々は *in vitro* としてイヌ腎細胞由来の細胞株 (MDCK) を用いて重水の保存効果を検討した。保存液としては UW と HTK に加え HTK の H_2O の 30% を D_2O に置換した液 (HTKD) を用いた。これらで細胞を保存し、有酸素下 72 時間および低酸素下 36 時間の 2 条件の冷保存を行い効果の検討を行なった。また動物実験としてはイヌを用いた自家腎移植実験を行なった。摘出した腎臓は HTK もしくは HTKD に 72 時間 4°C で冷保存し移植後 14 日間の観察を行なった。*in vitro* の結果、1) 冷保存後の死細胞は HTK に重水を加えることで減少し、2) 有酸素下 72 時間では HTK に重水を加えることで MTT 値は HTK より高値を示したが、低酸素下では重水の効果は認めなかった。1) と 2) において UW は HTK、HTKD より高い細胞保護効果を示した。3) 保存後の ATP 量は、HTK に重水を加えると UW よりも高い量を維持したが低酸素下ではその効果は認めなかった。4) 保存した細胞を LPS、4-HNE、 H_2O_2 にて刺激したところ、HTK に重水を加えることで UW と同等に細胞内 Ca^{2+} の流入を抑制した。5) 保存した細胞を電子顕微鏡で観察したところ、HTKD で保存した細胞は細胞骨格が保たれていた。6) イヌの腎移植実験では HTK 群では 6 匹中 4 匹が、HTKD 群では 5 匹全てが 14 日以内に DGF を呈し死亡した。術後の尿量、血液尿生化学所見では両群に差は認めなかった。死亡時の腎組織では両群ともに重度の急性尿細管壊死を呈していた。これらの結果より、HTK に重水を加えることで、常酸素下では IRI によるミトコンドリア機能障害、

細胞内への Ca^{2+} 流入、細胞骨格の破壊を抑制することを認めたが、一方動物実験では臓器保護効果は認めなかった。その原因として臓器の浸漬保存は長期の低酸素下での保存であり、これは、*in vitro* でも観察されたように低酸素下では HTKD の効果が減弱することと相関している可能性がある。これよりイヌの腎冷保存において HTK に重水を加えるだけでは IRI 抑制は困難であるが保存時に酸素を供給することでその臓器保護作用が増強される可能性が示唆された。

発表後、副査の平野教授より 1) DGF と IRI の関連性 2) 臓器保存液の改良により DGF は改善するのか 3) ラット心移植実験との結果の乖離の原因 4) UW の重水化の検討の有無の質問があり、申請者は 1) 2) に対して IRI と DGF は強く相関しており保存液を改良することで IRI が軽減し DGF を予防出来、3) 基となった保存液が異なること、4) UW の欠点を補う HTK の特性を活かすため HTK を選択したと回答した。次に主査の松居教授より 1) 臓器の 72 時間冷保存を選択した理由。2) 細胞の 72 時間冷保存を選択しなかった理由の質問があり、申請者は 1) 72 時間冷保存により冷保存障害が顕著になるため、2) 細胞での 72 時間低酸素保存では細胞が全滅し評価が不能になるためと回答した。副査の神山准教授よりは 1) 重水のメカニズムの評価法、2) 重水の臨床応用に対しての具体策などが質問され、申請者は 1) 今実験では現象を捉えているだけであり詳細なメカニズム解明は今後の課題とすること 2) 灌流保存に重水を用いることで臨床応用が期待出来ると返答した。最後に副査の武富教授より 1) 臓器保存液の臨床での使用状況 2) UW の高粘稠度の原因 3) 病理所見の時期や移植直後の生検の検討の有無の質問があり、申請者はそれらに対して 1) 欧米における使用傾向を 2) hydroxyethyl starch がその原因であり 3) 義死時もしくは死亡時の病理所見であり、移植直後の生検は出血等の危険性が高く IRI 以外で死亡する可能性があるため行なわなかったと返答した。いずれの質問にも妥当な回答をなし得た。

本研究により重水を臓器保存に用いる利点の証明ならびに臨床応用への課題が確認された。この論文は重水の IRI への効果とその有効性を示唆したことで高く評価され、今後の臓器保存において重水を用いた IRI 軽減への効果が期待される。

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。