Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Protection against ischemia/reperfusion injury by the cavitary two-layer method in canine small intestinal transplantation with reduction of reactive oxygen species

柿木，啓太郎

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2005-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3403
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003403

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 119 】

氏　　名・（本　籍）	柿木　啓太郎	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第１６７２号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成１７年３月２５日	

【 学位論文題目 】

Protection against ischemia / reperfusion injury by the cavitary two-layer method in canine small intestinal transplantation with reduction of reactive oxygen species
（２層法保存による移植小腸グラフトの虚血再環流障害軽減効果）

審　査　委　員

主 査　教　授　尾原　秀史
教　授　久野　高義
教　授　横野　浩一

背景と目的

近年臓器移植は、新しい免疫抑制法の開発や手術手技の向上などにより、その成績は飛躍的に改善してきた。しかしながら虚血再還流障害は依然として臓器移植における重要な問題となっている。虚血再還流障害は臓器移植において不可避な過程であり、移植後早期より移植臓器が機能せず再移植が必要となる primary non-function の重要な決定因子となっている。さらに虚血再還流障害による組織障害はグラフトの免疫原性を増加させ、急性及び慢性拒絶反応を惹起し、結果的に長期の移植成績に影響してくることが臨床的に報告されている。

虚血再還流障害を抑制する点において、臓器保存法は非常に重要な役割を担っている。我々は、酸素化 Perfluorochemical (PFC)と University of Wisconsin (UW)液を用いた 2 層法を開発し、その有用性を報告してきた。近年 2 層法は膵移植及び膵島移植時の膵保存に臨床応用され、特に膵島移植時の膵保存においては標準的保存法として世界的に広く用いられるようになった。2 層法のメカニズムについては、犬膵移植モデルにおいて検討を重ねてきたが、保存中、臓器は PFC より直接酸素化されることにより UW 液中の adenosine を基質として持続的に adenosine triphosphat(ATP)を産生していることが証明された。保存中におこる細胞内 ATP の枯渇は、ATP 依存性イオンチャンネルの失調、hypoxanthine や xanthine oxidase の蓄積など様々な生化学的変化をきたす。保存中に起こるこれらの変化はすべて、再還流後の活性酸素種の生成に関与しており、活性酸素種は直接移植臓器に障害を与えるだけでなく、NO、cytokine、chemokine、endothelin など様々な mediator を介した炎症反応を惹起し、さらには細胞死や遠隔臓器への障害などを引き起こす。グラフトを酸素化し、ATP を産生させることのできる 2 層法は、保存中の有害な変化を抑制し、結果として虚血再還流障害を軽減できる可能性があると考えられる。

今回我々は、2 層法の虚血再還流障害軽減効果について犬小腸移植モデルを用いて検討した。

方法

ビーグル犬を用いた同種異所性小腸移植モデルを作成した。ドナーより約 40cm の部分空腸を摘出し、UW 液 (Group 1)または 2 層法 (Group 2)にて 24 時間保存した後に同種移植した。対照群として小腸摘出後、保存なしで直ちに移植した群 (Group 3)を設けた。移植は、グラフトの上腸間膜動静脈をレシピエントの右外腸骨動静脈に吻合し、グラフト腸管の両端は腹壁に外瘻とした(Thiry-Vella loop)。移植後レシピエントには免疫抑制剤を投与した。

2 層法保存については、小腸グラフト内腔に UW 液を満たした後、酸素化 PFC に完全に浸漬し、4℃とした。保存中は PFC に 95%酸素、5%二酸化炭素混合ガスを持続供給(50-100ml/min)した。

上記モデルを用いて以下の 2 つの実験系を行った。

実験系 1 では短期の移植成績を評価するため、移植後 7 日目のレシピエント生存率と移植小腸機能を各群で比較検討した。移植小腸機能については、ブドウ糖、アセトアミノフェン吸収試験を行った。

実験系 2 では、虚血再還流障害を移植直前及び移植後 1, 2, 4 時間目で検討した。血清生化学検査として、移植小腸、肝、腎への障害を評価するため血清 LDH、CK、GOT、GPT、Cr を測定した。虚血再還流障害に関与する因子として移植小腸粘膜内 ATP 濃度、lipid peroxidation (LPO)濃度を測定した。組織学的検査は移植小腸を hematoxylin-eosin 染色し、粘膜障害の程度を Park の分類を用いて評価した。また虚血再還流障害によりアポトーシスに至ったグラフト粘膜細胞を TUNEL 染色で検出した。

結果

実験系 1

7 日生存率は、Group 1、 2、 3 それぞれ、2/7(29%)、7/7(100%)、7/7(100%)でり、2 層法保存群で有意に良好であった。UW 保存群の死亡例の剖検では重度のグラフト腸管出血と肺障害を認めた。また 7 日目の移植小腸の吸収試験による Functional success rate は Group 1、 2、 3 それぞれ、0/7(0%)、7/7(100%)、7/7(100%)であり、2 層法保存群で良好なグラフト機能を認めた。

実験系 2

血液生化学的検査では再還流後 1、2、4 時間で、小腸障害を示唆する血清マーカーである CK 及び LDH 値が Group 1 に比べて Group 2 では有意に低値であった。その他の測定値に有意差は認めなかった。

グラフト腸管粘膜の ATP 濃度は、24 時間保存後 Group 1 に比べて Group 2 で

は有意に高値であり、UW 保存群では ATP 濃度の著しい低下を認めたが、2 層法保存群では、24 時間保存中でも生体内と同程度の ATP 濃度が維持されていた。また再還流後においても Group 2 では Group 3 と同様に早期に ATP 濃度の回復を認めた。一方 Group 1 の UW 保存群では移植後 ATP の回復が遅延しており、低値であった。

再還流後の組織障害の中心的役割を担う活性酸素種のひとつである移植小腸粘膜内 LPO 濃度については、移植後 4 時間で、Group 2 では Group 1 に比べて有意に低値であった。

Park の分類を用いた移植小腸の組織学的検討では、Group 2 では Group 1 に比べて粘膜障害が有意に抑制されていた。また粘膜細胞のアポトーシスについても同様に Group 2 では抑制されていた。

考察

上記の結果より 2 層法は従来の UW 液による保存に比べて虚血再還流障害を軽減し、短期の移植成績を改善したことが犬小腸移植モデルで証明された。

2 層法では 24 時間の保存中、小腸グラフトへの直接の酸素化により ATP 濃度を生体内と同程度に保ち、再還流後は ATP 濃度の早期回復が認められた。これらの実験結果より、2 層法が保存中、また再還流後もミトコンドリア機能を良好に保つことが示唆された。更に再還流後の活性酸素種である LPO の発生を抑制して、再還流障害を軽減していることが、血清生化学的検査及び、組織学的検査からも示唆された。一方従来の UW 保存においては、虚血再還流によるグラフトの障害による機能不全だけでなく、死亡したレシピエントの剖検より重度の肺障害が明らかになり、虚血再還流障害による遠隔臓器への障害が示唆された。

臓器移植における虚血再還流障害は、無酸素下の保存中に起こる細胞内外の有害な変化と、酸素が再供給される再還流後の活性酸素種の生成による組織障害や、全身炎症反応で、グラフト生着の重要な決定因子の一つとなっている。特に小腸移植では虚血再還流障害による小腸グラフトの障害は、primary non-function や急性拒絶の引き金になるばかりか、Bacterial translocation に起因する感染症の誘発の点から非常に重要な問題である。臨床での臓器移植において保存及び再還流は不可避な過程であり、移植成績向上のために臓器保存法は非常に重要な役割を担っている。

2 層法の虚血再還流障害軽減のメカニズムの全容は未だ明らかにされていないが、グラフト酸素化能により保存時の有害な生化学的変化を最小限にすることで、再還流時の活性酸素種の発生を抑制する可能性が示唆された。一般的な臓器移植時の虚血再還流障害の機序として、保存中 ATP は速やかに分解され AMP、adenosine、イノシンを経て細胞内 hypoxanthine 濃度が上昇する。一方組織内 ATP の枯渇により細胞膜機能が低下し、透過性が亢進して細胞内へカルシウムイオンが流入する。カルシウムイオンにより protease が活性化され、xanthine oxidase へと変換される。この状態で再還流より酸素が供給されると大量の活性酸素種が発生し組織障害が生じるとされている。2 層法ではグラフトの持続的な酸素化におより細胞内 ATP 濃度を生体内と同程度に保つことから、細胞膜機能を保持し、この hypoxanthine、xanthine oxidase を介した活性酸素種の発生を抑制している可能性が示唆された。また活性酸素はミトコンドリア膜の障害によりミトコンドリア自体が破壊された時にも発生するとされている。以前の犬膵移植モデルの研究からも 2 層法ではミトコンドリアの構造、機能をよく保っていることが証明されており、ミトコンドリア機能を維持することにより再還流障害を抑制している可能性も示唆された。グラフトの酸素化能を有した 2 層法は、臓器移植時の虚血再還流障害を抑制する点から非常に理想的な保存法と考えられた。

結語

2 層法は犬小腸移植モデルにおいて、虚血再還流障害を抑制し短期の移植成績を改善した。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1669 号	氏 名	柿木啓太郎
論文題目	Protection against ischemia / reperfusion injury by the cavitary two-layer method in canine small intestinal transplantation with reduction of reactive oxygen species 2層法保存による移植小腸グラフトの虚血再環流障害軽減効果		
審査委員	主 査	尾崎孝史	
	副 査	久野高義	
	副 査	横野浩一	
審査終了日	平成 17年 3 月 10 日		

（要旨は1、０００字～2、０００字程度）

論文要旨

（背景と目的）

臓器移植において虚血再還流障害は依然として重要な問題である。虚血再還流障害は primary non-function の重要な決定因子となっているだけでなく、グラフトの免疫原性を増加させ、急性及び慢性拒絶反応を惹起し、結果的に長期の移植成績に影響してくることが臨床的に報告されている。

虚血再還流障害を抑制する点において、臓器保存法は非常に重要な役割を担っている。我々は、酸素化 Perfluorochemical (PFC)と University of Wisconsin (UW)液を用いた 2 層法を開発し、その有用性を報告してきた。2 層法では保存中、臓器は直接酸素化され、UW 液中の adenosine を基質として持続的に adenosine triphosphat(ATP)を産生していることが証明された。グラフトを酸素化し、ATP を産生させることのできる 2 層法は、保存中の有害な細胞内変化を抑制し、結果として虚血再還流障害を軽減できる可能性があると考えられる。

今回我々は、2 層法の虚血再還流障害軽減効果について犬小腸移植モデルを用いて検討した。

（方法）

ビーグル犬を用いた同種異所性小腸移植モデルを作成した。ドナーより約 40cm の部分空腸を摘出し、UW 液 (Group 1)または 2 層法 (Group 2)にて 24 時間保存した後に移植した。対照群として保存なしで直ちに移植した群 (Group 3)を設けた。

2 層法保存は、小腸グラフト内腔に UW 液を満たした後、酸素化 PFC に完全に浸漬し、95%酸素、5%二酸化炭素混合ガスを持続供給(50-100ml/min)した。

上記モデルを用いて以下の 2 つの実験系を行った。

実験系 1 では短期の移植成績を評価するため、移植後 7 日目のレシピエント生存率と移植小腸機能を各群で比較検討した。

実験系 2 では、虚血再還流障害についての検討を行った。血清生化学検査として、血清 LDH、CK、GOT、GPT、Cr を測定した。虚血再還流障害に関与する因子として移植小腸粘膜内 ATP 濃度、lipid peroxidation (LPO)濃度を測定した。組織学的検査は粘膜障害の程度を Park の分類を用いて評価した。グラフト粘膜細胞のアポトーシスを TUNEL 染色で検出した。

（結果）

実験系 1

7 日生存率は、Group 1、 2、 3 それぞれ、2/7(29%)、7/7(100%)、7/7(100%)でり、2 層法保存群で有意に良好であった。Group 1 の死亡例の剖検でグラフト腸管出血と肺障害を認めた。Functional success rate は Group 1、 2、 3 それぞれ、0/7(0%)、7/7(100%)、7/7(100%)であり、2 層法保存群で良好なグラフト機能を認めた。

実験系 2

血液生化学的検査では再還流後 4 時間で、CK 及び LDH 値が Group 1 に比べて Group 2 では有意に低値であった。

グラフト腸管粘膜 ATP 濃度は、24 時間保存後 Group 1 に比べて Group 2 では有意に高値であり、2 層法保存群では、生体内と同程度の ATP 濃度が維持されていた。また再還流後においても Group 2 では Group 3 と同様に早期に ATP 濃度の回復を認めた。

移植小腸粘膜内 LPO 濃度については、再還流後 4 時間で、Group 2 では Group 1 に比べて有意に低値であった。

移植小腸の組織学的検討では、Group 2 では Group 1 に比べて粘膜障害が有意に抑制されており、粘膜細胞のアポトーシスは Group 2 では抑制されていた。

（考察）

上記の結果より 2 層法は従来の UW 液による保存に比べて虚血再還流障害を軽減し、短期の移植成績を改善したことが犬小腸移植モデルで証明された。

2 層法では 24 時間の保存中、小腸グラフトへの直接の酸素化により ATP 濃度を生体内と同程度に保ち、再還流後は ATP 濃度の早期回復が認められた。更に再還流後の活性酸素種による障害を抑制して、再還流障害を軽減していることが、血清生化学的検査及び、組織学的検査からも示唆された。

（結語）

2 層法は犬小腸移植モデルにおいて、虚血再還流障害を抑制し短期の移植成績を改善した。

本研究は、犬小腸移植モデルにおいて、2 層法が従来の UW 液による保存に比べて移植後の虚血再還流障害を軽減し、短期の移植成績を改善したことを明らかにした最新の知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位をえる資格があると認める。