



Objective and rapid assessment of pancreas graft viability using ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with two-layer cold storage method

吉川, 卓郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3409

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003409>

※ 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。



【 1 2 5 】

氏 名・(本 籍) 吉川 卓郎 (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1678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 】

Objective and rapid assessment of pancreas graft viability
using ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy
combined with two-layer cold storage method
(二層法を併用した ³¹P-NMR による膵グラフトの viability 評価)

審 査 委 員

主 査 教 授 大北 裕
教 授 南 康博
教 授 春日 雅人

<背景と目的>

近年、膵臓移植は1型糖尿病に対する究極の治療法として確立され、1年グラフト生着率は83%に達し、良好な成績を上げている。しかし移植待機者の増加によるドナー不足は国内外で深刻な状態である。したがって現状の脳死ドナーからの臓器提供だけでなく温阻血障害が加わった心停止ドナーからの提供および移植成績の向上が望まれる。障害膵の程度の評価が極めて重要となるが、現状ではドナーの状況や摘出膵の肉眼的所見から障害程度を移植医が主観的に評価しており、客観性や正確性に欠ける。今後は、障害程度を短時間かつ正確に評価できる客観的手法が不可欠である。

一方、教室で開発された二層法は、高濃度酸素溶解能を有する perfluorochemical (以下PFC)をUniversity of Wisconsin (以下UW)液と組み合わせることで、保存中の膵臓に直接酸素を供給し、ATPの合成を促進し、その結果長期保存を可能にしながら、温阻血障害膵の機能回復効果も証明されている。さらに二層法保存後の膵組織内ATP (保存中の膵のATP合成能)が移植後の生着率を反映することをHPLCを用いて立証し、組織内ATPの測定により移植前にグラフトのviabilityを判定できることを証明した。しかしグラフト膵組織の部分切除が必要で、またHPLCでATP濃度を測定するのに数時間がかかるため臨床応用は困難である。そこで二層法の特徴を生かし、保存中に合成されるATPなどのリン酸代謝産物を二層法を併用した ^{31}P -NMR (以下二層法併用 ^{31}P -NMR)を用いてグラフトに侵襲を加えずに測定することで、グラフトの障害程度を移植前に短時間で正確に客観評価し、移植後生着の予測が可能であるか検討した。

<方法>

ビーグル犬を全身麻酔下に開腹し膵鉤部を摘出した。摘出膵は腹腔内に留置することで温阻血を負荷した。1群は温阻血なし、2群では60分、3群では120分の温阻血を負荷した後に二層法で24時間、4℃で保存した。続いて径25mmのNMRチューブ内にあらかじめ酸素化しておいたPFC 3mlと生理食塩水 5mlにより作成した二層法中に保存後の膵グラフトを静置し(比重により生理食塩水とPFCは二層を形成し膵グラフトは自動的にその中間に位置することになる)、NMRチューブ内の膵グラフトのまわりをP-25プローブがとりまくように設定した。二層法併用 ^{31}P -NMRにより得られたスペクトルでは α 、 β および γ ATPに加えてPi、phosphomonoester、phosphodiesterなど7つのピークを認めた。各信号の強度は各々のピークについてローレンツ関数に変換を行うことで、その面積を計算した。その値を用いてPiに対するATPの相

対比を算出することにより、各群の膵グラフトのviabilityを評価した。一方、教室のイヌ自家膵臓移植のデータでは温阻血0分および60分後の24時間二層保存では100%の生着が可能であったのに対し、温阻血120分後に24時間二層保存を加えても全く生着しなかった。そこで、そのデータに基づいて1群および2群を生着群、3群を非生着群として、Piに対するATPの相対比についてROC解析を行いカットオフ値の設定による移植後生着予測の可能性についても検討した。

<結果>

測定は1検体あたり約5分と短時間で計測可能であった。1、2および3群のviabilityの評価については、Pi/ γ ATP比が各々 0.73 ± 0.21 、 1.62 ± 0.34 、 2.41 ± 0.75 、Pi/ β ATP比が各々 1.03 ± 0.43 、 2.31 ± 0.76 、 3.30 ± 0.94 で、各比とも3群間各々に有意差を認め($p < 0.05$)、臓器障害の程度が各比に反映されていた。移植後生着予測の評価については、生着群と非生着群のPi/ γ ATP比が各々 1.18 ± 0.54 および 2.41 ± 0.75 で、Pi/ β ATP比は各々 1.67 ± 0.89 および 3.30 ± 0.94 であり、いずれの比についても2群間に有意差を認めた($p < 0.05$)。さらに、この2群間で各比についてROCカーブを用いて解析したところ、適正なカットオフ値はそれぞれPi/ γ ATP比が1.6、Pi/ β ATP比が2.2であり、生着予測の可能性における感度(sensitivity)は共に75%、特異度(specificity)は100%および90%、有効度(accuracy)は共に83%であった。

<考察>

あらゆる臓器移植において移植前のグラフトのviability評価は移植医の主観的な評価に委ねられている。その成績を向上させ、ドナー臓器の有効利用を図るためには客観的、低侵襲かつ短時間で可能な評価法が必須である。ドナー臓器のviabilityを評価する際にはATPなどのエネルギー代謝産物が一つの指標として利用されているが、従来の測定法であるHPLCを用いれば数時間を要し、さらにグラフト臓器を部分的に切除する必要があるため、臨床応用は困難である。

さてNMRは細胞内の物質代謝や細胞膜の機能などを非侵襲的に判定することが可能である。特に ^{31}P -NMRはATPなどのリン酸代謝産物を測定することで、これまで膵臓だけでなく心臓、肝臓および腎臓などの臓器において保存臓器の状態変化や移植後の機能変化などの評価に広く利用されており、その有用性が示されてきた。しかし大半の実験系が機械的な灌流による酸素化もしくはエネルギー産生を評価することにより行われている。膵保存においては機

械的な灌流保存はその強い血管内皮傷害のため、臨床的にはあまり有効な保存法とはいえない。教室で開発された二層法は単純浸漬保存でありながら保存中に酸素化および ATP 産生が可能な保存法であり、臓器の viability を損なうことなく NMR と併用することが可能である。今回の検討では、二層法併用 ^{31}P -NMR により得られた膵グラフトの評価は、 $\text{Pi}/\gamma\text{ATP}$ および $\text{Pi}/\beta\text{ATP}$ を測定することにより十分に臓器障害の程度を反映し、かつ一定の感度、有効性をもって移植後生着の指標となり得た。

<結語>

二層法保存でのみ可能なグラフト内での ATP 合成能を利用し、二層法併用 ^{31}P -NMR を用いることで、移植前の障害膵グラフトの viability を客観的かつ短時間で評価し、さらに移植成績を予測できる可能性が示唆された。

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1679号	氏 名	吉川卓郎
論文題目	Objective and rapid assessment of pancreas graft viability using ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with two-layer cold storage method 二層法を併用した ^{31}P -NMR による膵グラフトの viability 評価		
審査委員	主 査 大北 裕 副 査 南 康博 副 査 春日 雅人		
審査修了日	平成17年 3 月 2 日		

(要旨は 1,000 字 2,000 字程度)

臓器移植は1型糖尿病に対する究極の治療法として確立されてきた。しかし移植待機者の増加によるドナー不足は国内外で深刻な状態である。したがって現状の脳死ドナーからだけでなく温阻血障害が加わった心停止ドナーからの臓器提供および移植成績の向上が望まれる。障害臓の程度の評価は現状ではドナーの状況や摘出臓の肉眼的所見など移植医の主観的な評価に委ねられている。今後は、障害程度を短時間かつ正確に評価できる客観的手法が不可欠である。そこで、教室で開発された二層法の特性を生かし、保存中に合成されるATPなどのリン酸代謝産物を二層法を併用した ^{31}P -NMR（以下二層法併用 ^{31}P -NMR）を用いてグラフトに侵襲を加えずに測定することで、グラフトの障害程度を移植前に短時間で客観評価し、移植後生着の予測が可能であるか検討した。

ビーグル犬を全身麻酔下に開腹し臓器部を摘出した。1群は温阻血なし、2群では60分、3群では120分の温阻血を負荷した後に二層法で24時間、4°Cで保存した。保存後に二層法併用 ^{31}P -NMRにて臓組織内のリン酸代謝産物を測定した。 Pi に対する β および γ -ATPの相対比を算出することにより、viabilityを評価した。一方、教室のイヌ自家臓器移植のデータでは温阻血0分および60分後の24時間二層法保存では100%の生着が可能であったのに対し、温阻血120分後に24時間二層法保存を加えても全く生着しなかった。そこで、そのデータに基づいて1群および2群を生着群、3群を非生着群として、移植後生着予測の可能性についても検討した。

測定は1検体あたり約5分と短時間で計測可能であった。1、2および3群のviabilityの評価については、 $\text{Pi}/\gamma\text{ATP}$ 比が各々 0.73 ± 0.21 、 1.62 ± 0.34 、 2.41 ± 0.75 、 $\text{Pi}/\beta\text{ATP}$ 比が各々 1.03 ± 0.43 、 2.31 ± 0.76 、 3.30 ± 0.94 で、各比とも3群間各々に有意差を認め（ $p < 0.05$ ）、臓器障害の程度が各比に反映されていた。移植後生着予測の評価については、生着群と非生着群の $\text{Pi}/\gamma\text{ATP}$ 比が各々 1.18 ± 0.54 および 2.41 ± 0.75 で、 $\text{Pi}/\beta\text{ATP}$ 比は各々 1.67 ± 0.89 および 3.30 ± 0.94 であり、いずれの比についても2群間に有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。ROCカーブを用いて解析したところ、適正なカットオフ値はそれぞれ $\text{Pi}/\gamma\text{ATP}$ 比が1.6、 $\text{Pi}/\beta\text{ATP}$ 比が2.2であり、生着予測の可能性における感度（sensitivity）は共に75%、特異度（specificity）は100%および90%、有効度（accuracy）は共に83%であった。

NMRは細胞内の物質代謝や細胞膜の機能などを非侵襲的に判定することが可能である。特に ^{31}P -NMRはATPなどのリン酸代謝産物を測定することで、保存臓器の状態変化や移植後の機能変化などの評価に広く利用されてきた。二層法は単純浸漬保存でありながら

保存中に酸素化およびATP産生が可能な保存法であり、臓器のviabilityを損なうことなくNMRと併用することが可能である。今回の検討では、二層法併用 ^{31}P -NMRにより得られた臓グラフトの評価は、 $\text{Pi}/\gamma\text{ATP}$ および $\text{Pi}/\beta\text{ATP}$ を測定することにより十分に臓器障害の程度を反映し、かつ一定の感度、有効性をもって移植後生着の指標となる可能性が示唆された。

本研究は、臓器移植において移植前に二層法を併用した ^{31}P -NMRを用いることで、臓グラフトのviabilityを客観的、非侵襲的かつ短時間に評価し移植成績を予測できる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。