Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Ischemically damaged heart after preservation by the cavitary two-layer method as a possible donor in rat heart transplantation

加茂田，泰久

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2008-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4145
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004145

※ 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。

氏　　名	加茂田　泰久
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 1889 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 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Ischemically damaged heart after preservation by the cavitary two-layer method as a possible donor in rat heart transplantation(cavitary two-layer 保存法による温阻血心臓を用いたラット心移植の可能性について)

審　査　委　員

主　査　　教　授　大北　　裕
　　教　授　前川　信博
　　教　授　藤澤　正人

＜背景と目的＞

心移植は心不全の治療法の一つとしてとして、その成績は過去数年間で劇的に改善してきている。しかしながら移植ドナーの不足や保存方法・移植心の機能不全など、種々の問題が今なお残されている。

グラフトの移植後の機能不全においては、摘出時の温阻血障害が重要な因子であり、移植後の短期および長期成績に強い影響を及ぼす。しかし、心移植での温阻血とその後の保存条件の影響について調べた論文はほとんどみられない。心停止ドナーを含む Marginal donor からの心臓をグラフトとして用いるためには、温阻血障害を受けた心臓の保存法に関する基礎研究が不可欠である。

Cavitary two-layer（以下 CTL）法は、4℃の University of Wisconsin 液（以下 UW）で腔内を満たした心臓を perfluorochemical（以下 PFC）中に完全に浸漬させ、酸素を通気させながら保存する方法であり、心臓や小腸の冷保存法として極めて有望であると考えられている。CTL 法は移植心に十分な酸素を供給することにより、UW 液中の adenosine を使い、保存中に ATP 産生を可能にする方法で、ラット心移植モデルでは冷保存時間を最大 72 時間まで延長できた。一方、心臓は温阻血の影響をより受け易く、心臓の虚血性収縮を回避するには十分なATPを維持する必要があり、温阻血障害を受けた心臓にもCTL法が応用できるのではないかと考えられた。

本研究では、ラット心移植モデルにおいて CTL 法を用いることにより、温阻血障害をうけたグラフトがドナー心として有用であるかを検討した。

＜方法＞

雄性 Lewis ラットをドナーとレシピエントに用いた。麻酔下にヘパリンを加えた UW 液でドナーを灌流後、心臓を摘出しコントロール群（第 1 群）として摘出後にレシピエントの腹部に移植。第 2～4 群では移植心を体温（37℃）で 15 分間（a）もしくは 30 分間（b）留置した後、直ちに（第 2 群）もしくは UW 液にて 3 時間保存後（第 3 群）、CTL 法にて 3 時間保存後（第 4 群）に異所性に移植した。

まず、レシピエント (n=8) の生存状況を、心移植から 5 日後に評価した。次に、移植前のグラフトを凍結乾燥させた後に ATP、ADP、AMP を高感度液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて定量した。ATP+ADP+AMP でアデニンヌクレオチド総量 (TAN) を計算し、energy charge potential (ECP) は (ATP+1/2ADP)/TAN と定義した。また、血液を移植前と再灌流後 2、4、24 時間に採取し LDH、CK、AST を測定し、心臓の障害状態を評価した。更に、再灌流から 24 時間後と 5 日後に移植心を摘出し、H&E 染色及び Heat shock protein (以下 HSP) 60, 70 による免疫染色を行った。HSP の発現レベルは、陽性染色細胞の割合で計算した。

＜結果＞

1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b 群の 5 日間の生存率は、それぞれ 8/8、5/8、0/8、1/8、0/8、7/8、1/8 であった。3a 群と 4a 群間には生存率に有意差があった (P=0.010)。2、3、4 群で死亡した全ての動物では、移植グラフトに重篤な出血が認められた。

4a 群での保存後の組織内 ATP 濃度 (9.31 ± 0.80 μmol/dry weight) は、1 群 (9.31 ± 0.80 μmol/dry weight) と同程度まで有意に改善していたが、2a 群では、ATP 濃度の回復を認めなかった (3.39 ± 0.68 μmol/dry weight, P=0.011)。4a 群での TAN 濃度 (17.32 ± 1.85 μmol/dry weight) も、2a 群より高かった (9.64 ± 1.55 μmol/dry weight, p=0.017)。

再灌流 4 時間後における 4a 群の血清 CK 値 (4672 ± 1327.3 IU/l) は、2a 群 (12160 ± 1734.3 IU/l) のものより有意に低かった (p=0.029)。再灌流 4 時間後の血清 LDH 値 (2519.3 ± 238.5 IU/l) も 2a 群 (5426.0 ± 509.9 IU/l) より有意に低かった (p=0.029)。血清 AST レベルについては、いずれのグループでも有意な変化を認めなかった。

H&E 染色において、2 群と 3 群では、死亡動物の移植片に重篤な出血が認められたが、4a 群の移植片はほとんど出血を認めなかった。再灌流 24 時間後の 4a 群での HSP 70 の発現レベル (31.89 ± 6.05 %) は、2a 群 (58.39 ± 2.35 %) と比較して抑制されていた (p=0.008)。再灌流 24 時間後の 4a 群での HSP 60 の発現レベル (32.96 ± 8.42 %) も同様に 2a 群 (60.18 ± 7.21 %) と比較して抑制されていた (p=0.028)。

＜考察＞

臓器移植において、心停止ドナーや死戦期の長い marginal donor を活用することが、臓器不足を解消する一つの方法として注目されている。温阻血時間や冷保存時間が長くなると、移植しても虚血再灌流（以下 I/R）障害が生じる可能性が高くなり、その結果 primary nonfunction が生じる。

心臓の実験的 I/R モデルでは、耐容できる温阻血時間の限界については意見が分かれている。しかし、心移植モデルでこの問題を取り扱った論文は非常に少ない。本研究では、ラット心は 15 分間の温阻血に耐えられた。加えて、CTL 法を用いることで、虚血障害を受けた移植心を 3 時間冷保存することが出来たが、UW による単純保存法では、3 時間冷保存できなかった。このことは、CTL 法を用いれば、限界状態あるいは心停止の心移植片を使うことでドナープール

を増やせる可能性があることを示唆するものである。

心臓はとりわけ虚血障害を受けやすい。虚血が生じると、ミトコンドリアの抗酸化防御機能が障害をうけ、その結果細胞は酸化ストレスをより受けやすくなる。UW冷保存法では脂肪酸が蓄積すること、ならびにATPシンターゼが分子損傷を受けることでミトコンドリアの損傷が生じるものと考えられる。一方本研究では、保存期間中にCTL法がATPを再合成させることができ、虚血障害を受けた移植片をI/R障害から予防することが出来ることが示された。4a群では、2a群と比較して、CPKとLDHレベルが抑制され、ほとんど出血を認めなかった。このことは、虚血後に迅速にATPを再合成できることが、輸送後の回復段階で重要であることを示唆している。損傷を受けた細胞の修復プロセスにエネルギーを補給するのにATPが不可欠な役割を有するので、合成されたATPが温阻血損傷を受けた細胞を修復し、細胞を維持するのに有効に活用されていると考えられる。また、HSPが発現されると、ラットの心移植を含む様々な移植モデルで、I/R障害から防御される。一方他方の研究者は、HSPが発現されると、成績不良であることを示している。本研究では、HSP 60・70は1群に比して2aと4a群で有意に発現されていた。HSP - toll-like receptor（以下TLR）は免疫原性を高め、急性／慢性拒絶を加速化させる。しかし、HSPが誘導されると、I/R損傷に対する保護効果となる可能性があるが、HSP-TLR複合体は血管内膜の増殖を誘発し、その結果、慢性拒絶が生じる。HSPの発現と二層法におけるその役割については現在研究を行っている。

＜結語＞

ラットの心臓は15分間の温阻血に耐え、CTL法を用いることにより温阻血障害を受けた移植心を3時間冷保存することができた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1890 号	氏 名	加茂田 泰久
論文題目 Title of Dissertation	Cavitary two-layer 保存法による温阻血心臓を用いた ラット心移植の可能性について Ischemically damaged heart after preservation by the cavitary two-layer method as a possible donor in rat heart transplantation		
審査委員 Examiner	主 査 大北 裕 Chief Examiner 副 査 前川 信博 Vice-examiner 副 査 藤澤 正人 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20年 1月 16日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

心移植グラフトの移植後の機能不全においては、摘出時の温阻血障害が重要な因子であり、移植後の短期および長期成績に強い影響を及ぼす。しかし、心移植での温阻血とその後の保存条件の影響について調べた論文はほとんどみられない。心停止ドナーを含むMarginal donor からの心臓をグラフトとして用いるためには、温阻血障害を受けた心臓の保存法に関する基礎研究が不可欠である。Cavitary two-layer（以下CTL）法は、4℃のUniversity of Wisconsin液（以下UW）で腔内を満たした心臓をperfluorochemical（以下PFC）中に完全に浸漬させ、酸素を通気させながら保存する方法である．本研究では、ラット心移植モデルにおいてCTL法を用いることにより、温阻血障害をうけたグラフトがドナー心として有用であるかを検討した。

＜方法＞

雄性Lewis ラットをドナーとレシピエントに用いた。麻酔下にヘパリンを加えたUW液でドナーを灌流後、心臓を摘出しコントロール群（第1 群）として摘出後にレシピエントの腹部に移植。第2～4 群では移植心を体温（37℃）で15 分間（a）もしくは30 分間（b）留置した後、直ちに（第2 群）もしくはUW液にて3 時間保存後（第3 群）、CTL 法にて3 時間保存後（第4 群）に異所性に移植した。まず、レシピエント(n=8)の生存状況を、心移植から5 日後に評価した。次に、移植前のグラフトを凍結乾燥させた後にATP、ADP、AMP を高感度液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて定量した。ATP+ADP+AMP でアデニンヌクレオチド総量(TAN)を計算し、energy charge potential (ECP)は(ATP+1/2ADP)/TAN と定義した。また、血液を移植前と再灌流後2、4、24 時間に採取しLDH、CK、ASTを測定し、心臓の障害状態を評価した。更に、再灌流から24 時間後と5 日後に移植心を摘出し、H&E 染色及びHeat shock protein(以下HSP) 60, 70 による免疫染色を行った。HSP の発現レベルは、陽性染色細胞の割合で計算した。

＜結果＞

1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b 群の5 日間の生存率は、それぞれ8/8、5/8、0/8、1/8、0/8、7/8、1/8 であった。3a 群と4a 群間には生存率に有意差があった (P=0.010)。2、3、4 群で死亡した全ての動物では、移植グラフトに重篤な出血が認められた。4a 群での保存後の組織内ATP 濃度(9.31 ± 0.80 □mol/dry weight)は、1 群(9.31 ± 0.80 □mol/dry weight)と同程度まで有意に改善していたが、2a 群では、ATP 濃度の回復を認めなかった(3.39 ± 0.68 □mol/dry weight, P=0.011)。4a 群でのTAN 濃度(17.32 ± 1.85 □mol/dry weight)も、2a 群より高かった(9.64
± 1.55 □mol/dry weight, p=0.017)。再灌流4 時間後における4a 群の血清CK 値 (4672 ± 1327.3 IU/l)は、2a 群(12160 ± 1734.3 IU/l)のものより有意に低かった(p=0.029)。再灌流4 時間後の血清LDH 値(2519.3 ± 238.5 IU/l)も2a 群(5426.0 ± 509.9 IU/l)より有意に低かった(p=0.029)。血清AST レベルについては、いずれのグループでも有意な変化を認めなかった。H&E 染色において、2 群と3 群では、死亡動物の移植片に重篤な出血が認められたが、4a 群の移植片はほとんど出血を認めなかった。再灌流24 時間後の4a群でのHSP 70 の発現レベル(31.89 ± 6.05 %)は、2a 群(58.39 ± 2.35 %)と比較して抑制されていた(p=0.008)。再灌流24 時間後の4a 群でのHSP 60 の発現レベル(32.96 ± 8.42 %)も同様に2a 群(60.18 ± 7.21 %)と比較して抑制されていた(p=0.028)。

＜結語＞

ラットの心臓は15 分間の温阻血に耐え、CTL 法を用いることにより温阻血障害を受けた移植心を3 時間冷保存することができた。本研究は，従来ほとんど行われなかった，心移植での温阻血とその後の保存条件の影響について，ラット心移植モデルを使用してCTL 法は、温阻血障害をうけたグラフトでもドナー心として有用であることについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士(医学)の学位を得る資格があると認める。