



A NOVEL SYSTEM FOR SMALL BOWEL PRESERVATION – CAVITARY TWO-LAYER(UNIVERSITY OF WISCONSIN SOLUTION/PERFLUOROCHEMICAL) COLD STORAGE METHOD

酒井, 哲也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-04-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2025

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002025>

※ 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・(本籍)	酒井哲也 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1508号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成8年4月10日
学位論文題目	A NOVEL SYSTEM FOR SMALL BOWEL PRESERVATION-CAVITARY TWO-LAYER(UNIVERSITY OF WISCONSIN SOLUTION/PERFLUORO-CHEMICAL) COLD STORAGE METHOD- (小腸保存に対する新しい方法-腔式二層(UW液/PERFLUORO-CHEMICAL)浸漬保存法-)
審査委員	主査 教授 齋藤洋一 教授 岡田昌義 教授 尾原秀史

論文内容の要旨

はじめに

小腸移植は、最近ようやく長期生存例の報告が散見されるようになったものの、腎臓や心臓、脾臓、肝臓等の他臓器の移植に比べ、その成績は未だ満足しうるべきものではない。その原因の一つには、小腸粘膜が虚血に対し高度に障害を受けやすく、そのため簡易でかつ信頼性の高い保存方法が確立されていない点にある。当教室で開発した二層単純浸漬保存法は、保存中のグラフトを酸素化することにより、従来の単純浸漬保存法に比べ、脾臓の長期保存を可能にした。さらにこれを管腔臓器の保存に応用した腔式二層単純浸漬保存法はラットの心臓の48時間保存を可能にした。今回、これをラット小腸に応用し、異所性部分小腸移植モデルにて小腸の長期保存における本法の有用性について検討した。

対象と方法

1. 実験動物

実験動物には体重250-350gのルイス系雄性ラットを用い、拒絶反応やGraft Versus Host Diseaseの影響を排除するため、同系移植モデルを用いた。

2. 移植手技

MonchikとRussellの方法に準じて異所性部分小腸移植を行った。グラフトは約15cmの部分空腸を、血管茎つまり門脈とAortic cuffのついた上腸間膜動脈と共に摘出した。摘出前には大動脈より4℃へパリン加生理食塩水でflushingし、摘出後には腸管内をGentamicin加生理食塩水で洗浄した。保存あるいは摘出直後、血管は顕微鏡下にグラフトのAortic cuffおよび門脈をそれぞれレシピエントの大動脈及び下大静脈に端側吻合し、腸管はThiry-Vella loopとして両端を腹壁に固定、開放し、異所性に移植を行った。

3. 腔式二層単純浸漬保存法

腔式二層法は、摘出したグラフトを大動脈より挿入したカニューレよりUW液でflushingした後腸

管腔内にもUW液を充たし、両端を閉鎖し、95%O₂、5%CO₂をbubblingした4°CPerfluorochemical液（以下、PFC）内に浸漬保存する方法である。グラフトは浮遊を避けるためwire netでPFC内に留置した。PFCは化学的、生物学的に安定した無色の高比重の脂溶性液体で、40～50vol%の高い酸素溶解度を有し、保存中のグラフトを酸素化するために用いた。

4. 実験方法

保存は前述の二層法で酸素を投与した1群と二層法でも酸素を投与しない2群、およびUW液による単純浸漬群の3群に分類した。保存時間は24及び48時間とし、酸素を投与した二層法24時間保存群を1A群、48時間保存群を1B群、酸素を投与しない二層法24時間保存群を2A群、48時間保存群を2B群、そしてUW液による単純浸漬保存法24時間保存群を3A群、48時間保存群を3B群とし、保存なしをコントロール群とした。

5. 評価

保存方法の評価は部分小腸移植後7日目のラット生存率及び保存直後および移植後7日目の組織学的所見で評価した。すべての生存ラットは移植後7日目には犠牲死され、グラフトは10%ホルマリン固定後hematoxylin-eosinで染色された。

結果

1. 7日間生存率

保存なし群の7日間生存率は100%であった。24時間保存後の7日間生存率はそれぞれ、1A群100%（5/5）、2A群67%（2/3）、3A群86%（6/7）であった。これに対し、48時間保存後の2B群、3B群の7日間生存率はそれぞれ20%（1/5）及び0%（0/5）であった。2B群の1例を除き、移植再灌流直後よりグラフト粘膜からの出血が続くと共に壊死がみられ、レシピエントラットはその多くが24時間以内に死亡した。しかしながら、酸素を投与した二層法48時間保存群（1B）では7例中6例86%の生存率を認めた。死亡した1例は、グラフト腸管からの出血が持続し術後3日目に死亡したが、その他の症例では腸瘻粘膜は一時的に軽度の鬱血を認めたものの、その後の色調は淡紅色となり、グラフトは生着した。

2. 病理組織学的所見

保存し移植されたグラフトはすべて保存再灌流障害により高度の障害を受けるが、1A群ではグラフトの粘膜は再生し、移植後7日目の病理組織像はコントロール群と同様の正常の粘膜構造を呈していた。1B群及び3A群は移植後7日目には絨毛高は高く、絨毛先端に吸収上皮細胞下の間隙をわずかに認めるものの絨毛の構造は良好に保持され、ほぼ正常の構造を呈していた。2B群及び3B群の剖検時の摘出標本は出血壊死像を呈していた。保存直後の病理組織像では、1B群及び3B群は1A群及び3A群に比し障害が高度であり、保存時間が長ければ長いほど虚血障害が高度であることが確認されたが、保存時間が同一であれば二層法（1群）と単純浸漬法（3群）との障害の差は認められなかった。

考察

臓器移植を成功させるという点において臓器保存は非常に重要な位置を占めるにもかかわらず、小腸の保存は他臓器に比べ、未だ確立されていないのが現状である。これまで実験動物での単純浸漬保存は24時間が限界であったが、臨床における保存時間の安全域を考慮すると、より長時間保存しうることが必要である。グラフトを酸素化することにより保存時間を延長しようとする観点から、Lillehei

らは高圧酸素とchlorpromazineを併施することで48時間保存を可能にしたが、技術及び装置の複雑性、煩雑性から一般に受け入れられるに至らなかった。またToledoらは持続灌流保存法で保存時間を延長させたが、煩雑なうえに灌流圧による血管内皮への障害が問題となった。このような経過から単純浸漬保存法が臨床の主体となっている。一方、我々が開発した二層法はこれらの方法と同様にグラフトを酸素化することにより、犬豚の96時間保存を可能にし、さらにこれを管腔臓器の保存に応用した腔式二層単純浸漬保存法はラットの心臓の48時間保存を可能にした。しかもこの方法は装置が簡単、単純で灌流保存に比し障害が軽微である。そこで今回、この保存法をラット小腸の保存に応用し、その有用性について検討した。その結果、異所性部分小腸移植モデルにおいてこの方法は48時間保存を可能にした。

ところで、小腸粘膜は一般に虚血に対し障害を受けやすいものの、再生能力も高く、ラットの虚血モデルでは虚血障害からの回復は2～7日間を要すると報告されている。しかしながら、保存状態が悪ければ、グラフトは急性壊死に陥り、腸管粘膜からの大量出血によりラットは死亡する。7日間生存したラットのグラフトはすべて正常構造を保持し、グラフトが壊死したまま7日間生存した例は認めなかった。逆に、正常な粘膜構造を保ったグラフトを有したまま、死亡したラットも認めなかった。それゆえ、保存方法の評価にラット7日間生存率と移植後7日目の組織学的検討を用いた。本実験においては保存直後のグラフトの組織学的検討も行ったが、保存時間が長ければ長いほど虚血障害が高度であることは確認された。しかし、保存時間が同一であれば、7日間生存率と移植後7日目の組織像で有意な差を認めた二層法（1群）と単純浸漬法（3群）との間に保存直後では組織障害に差は認めず、保存直後のグラフトの組織像はグラフトの生着率を反映しないと考えられた。

また、二層法でも酸素を投与しない群（2群）では48時間保存は困難であり、グラフトの酸素化が保存時のグラフトのviabilityを保持し、長期保存を可能にしたと考えられた。この酸素化はこれまで我々が犬豚やラットの心臓で報告してきたのと同様に、酸素で飽和されたPFCに接した小腸漿膜を通じて酸素が直接拡散し、グラフトが酸素化されると考えられる。また、保存液にはadenosineを含むUW液を用いているが、これは以前我々が報告した犬豚の報告で、二層法では保存中のグラフトにATPの基質としてのadenosineを投与することにより細胞維持に不可欠なATP合成を促し、延いてはグラフトのviabilityを改善することによるもので、予備実験の段階ではあるが、この小腸移植モデルでも酸素を投与した二層法では酸素を投与しない場合に比し、保存中の組織内ATP濃度は有意に高値を呈した（Transplant. Proc. in press）。しかしながら、enterocyteはエネルギー源としてグルタミンやケトン体等を用いていることから、今後は二層法における保存中のエネルギー源として何が適切であるかを検討していく必要があると思われる。

おわりに

我々は異所性部分小腸移植モデルにおいて、UW液を用いた二層法で保存中のグラフトを酸素化することにより、48時間まで保存時間を延長することを可能にした。今後、同所性全小腸移植モデルで生理学的機能検査を含めた検討を要するものの、小腸保存における二層法の有用性が示唆され、臨床応用への期待が寄せられるものと思われた。

論文審査の結果の要旨

小腸移植は、腎臓や心臓、脾臓、肝臓等の他臓器の移植に比べ、その成績は未だ満足しうるべきものではない。その原因の一つには、小腸粘膜が虚血に対し高度に障害を受けやすく、そのため簡易で

かつ信頼性の高い保存方法が確立されていない点にある。研究者は、当教室で開発した二層単純浸漬保存法をラット小腸に応用し、異所性部分小腸移植モデルにて小腸の長期保存における本法の有用性について検討した。

〔I〕実験方法と評価

実験動物にはルイス系雄性ラットを用い、MonchikとRussellの方法に準じて異所性部分小腸移植を行った。

腔式二層法は、摘出したグラフトを大動脈より挿入したカニューレよりUW液でflushingした後腸管腔内にもUW液を充たし、両端を閉鎖し、95%O₂、5%CO₂をbubblingした4°CPerfluorochemical液（以下、PFC）内に浸漬保存する方法である。

保存は前述の二層法で酸素を投与した1群と二層法でも酸素を投与しない2群、及びUW液による単純浸漬群の3群に分類した。保存時間は24及び48時間とし、酸素を投与した二層法24時間保存群を1A群、48時間保存群を1B群、酸素を投与しない二層法24時間保存群を2A群、48時間保存群を2B群、そしてUW液による単純浸漬保存法24時間保存群を3A群、48時間保存群を3B群とし、保存なしをコントロール群とした。

保存方法の評価は部分小腸移植後7日目のラット生存率及び保存直後および移植後7日目の組織学的所見で評価した。すべての生存ラットは移植後7日目には犠牲死し、グラフトは10%ホルマリン固定後、hematoxylin-eosinで染色された。

〔II〕結果

(1) 7日間生存率

保存なし群の7日間生存率は100%であった。24時間保存後の7日間生存率はそれぞれ、1A群100%、2A群67%、3A群86%であった。これに対し、48時間保存後の2B群、3B群の7日間生存率はそれぞれ20%及び0%であった。酸素を投与した二層法48時間保存群（1B）では86%の生存率を認めた。

(2) 病理組織学的所見

保存し移植されたグラフトはすべて保存再灌流障害により高度の障害を受けるが、1A群ではグラフトの粘膜は再生し、移植後7日目の病理組織像はコントロール群と同様の正常の粘膜構造を呈していた。1B群及び3A群は移植後7日目に絨毛高は高く、絨毛先端に吸収上皮細胞下の間隙をわずかに認めるものの絨毛の構造は良好に保持され、ほぼ正常の構造を呈していた。2B群及び3B群の剖検時の摘出標本は出血壊死像を呈していた。これらの成績から、UW液を用いた二層法で保存中のグラフトを酸素化することにより、48時間まで保存時間を延長することを可能にし、小腸保存における二層法の有用性が示され、臨床応用への可能性があるとの結論を導き出した。

本研究は、小腸移植について、その保存の問題を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腔式二層浸漬保存法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。