

虚血傷害の新しい治療概念の 創出と実用化～多臓器での効果比較

深井 原 [北海道大学病院/医員]
藤 堂 省 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
古川 博之 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
尾崎 倫孝 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
山下 健一郎 [北海道大学大学院医学研究科/助教]
熊谷 純 [名古屋大学大学院工学研究科/准教授]

背景・目的

【背景】 移植医療においてドナー不足は深刻な問題である。心停止後ドナーの臓器は阻血再灌流傷害が強く安全に利用できないが、これを解決できればドナー源は増加する。

肝の冷保存中には、①細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、②エネルギー源の供給停止と ATP 欠乏、 Na^+ と水の流入、③細胞骨格タンパク質の脱重合、が促進される。低温、低酸素下でこれらを阻害できれば、傷害が軽減されるはずである。われわれは新規保存液を作成し、劇的な細胞保護に成功した。

【目的】 新液が種々の臓器の冷保存状態を改善するか、臓器特異性があるか、また、細胞保護の機序、を明らかにすること。

内容・方法

【内容・方法】 新規臓器保存液(特許出願予定)は細胞外液組成 S1Na、細胞内液組成 S1K を作成し、Euro Collins (EC) 液、EC 液を細胞外液組成に改変したもの(ECNa)、各々にインスリンを添加した S1NaI、S1KI、ECI、ECNaI および UW 液と比較検討した。

- グルコースの取り込みに対する新液の効果：マウス肝細胞株(AML12)を成長培地で一晚培養しサブコンフルエントとした。蛍光グルコースアナログ 2-NBDG(25 μM)を各種保存液に添加して 4℃ 大気下で 30、60、180 分静置した。30-60 分での平均取り込み速度、0-60 分の取り込み総量を、細胞に取り込まれた 2-NBDG の蛍光強度から算出した。
- 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇刺激に対する新液の効果：AML12 を 35mm ガラスボトムディッシュに培養し、蛍光 Ca^{2+} 指示薬(Fluo4-AM)を loading した。培地を 4℃ の各種保存液に交換し、4℃、1 時間静置後、蛍光顕微鏡に設置し H_2O_2 (1mM) を添加した。蛍光強度の推移を CCD カメラで記録した。
- 肝冷保存における臓器保護効果：ラットの肝、小腸を各種保存液で体内灌流、摘出し、24、36 時間冷保存し、病理組織所見を比較した。

結果・成果

【結果・成果】

a) 2-NBDG の平均取り込み速度(30-60 分； $\Delta \text{MFI} \times 10^{-4}/\text{min}$)；[有意差 S: $P < 0.05$, NS: $p > 0.05$]

EC 液 vs. S1K (6.5 ± 3.3 , **13.8 ± 4.2** ; S) ECI 液 vs. S1KI (1.1 ± 4.9 , 9.2 ± 3.2 ; S) ECNa 液 vs. S1Na (5.5 ± 3.6 , 9.5 ± 3.9 ; NS) ECNaI 液 vs. S1NaI (-1.7 ± 2.7 vs. 5.8 ± 2.8 ; S)。UW 液は EC 液よりも取り込みが遅かった。

2-NBDG の取り込み総量(60 分間)：30 分後の EC 液での値を 100% とした。

60 分後には EC 液 vs. S1K (118.0 ± 8.2 , **$137.2 \pm 12.4\%$** ; S)、ECI 液 vs. S1KI (101.0 ± 5.2 , $118.7 \pm 5.8\%$; S)、ECNa 液 vs. S1Na (113.0 ± 4.4 , $124.9 \pm 9.5\%$; S)、ECNaI 液 vs. S1NaI ($97.6 \pm 7.3\%$, $107.9 \pm 6.2\%$; S)

EC 液、ECNa 液はリン酸バッファー、グルコース(+2-NBDG)のみからなり、インスリンを添加すると、4℃ ではグルコースの取り込みが阻害された。一方、S1K、S1Na ではそれぞれ EC、ECNa 液よりも有意にグルコースの取り込みが促進された。インスリンを添加すると(S1KI、S1NaI)、グルコースの取り込みの促進作用が阻害されたものの、なお EC 液よりも有意に増加した。

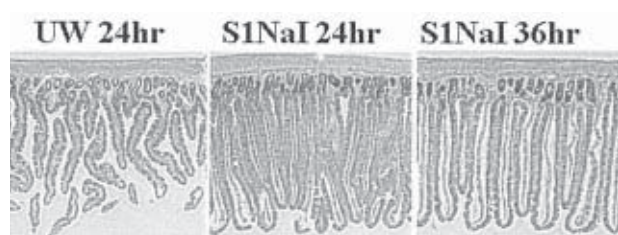
以上の事実から、1) S1K、S1Na の有効成分は低温保存下でグルコースの取り込みを促進する、2) 低温保存下でインスリンはグルコースの取り込みを阻害する、3) S1K、S1Na の有効成分はインスリンによる低温保存下でのグルコース取り込み阻害作用を阻害する、と考えられた。

われわれの以前の検討で、S1K、S1Na は AML12(肝細胞株)、IEC6(小腸上皮細胞株)、Beas-2B(気管上皮細胞株)の冷保存による細胞傷害(細胞死、アポトーシス)を軽減し、生存細胞数を増加させる(MTT)ことが分かっている。この保護作用はインスリンによって著明に増強されることから、S1K、S1Na の有効成分とインスリンの相乗(相加)作用は、グルコースの取り込みとは異なる経路の関与が強く示唆された。

b) UW 液、EC 液では H_2O_2 を添加後約 5 秒から細胞内の蛍光強度が増強し、約 10-13 秒後に最大強度になった。一方、新液では蛍光強度の増強は完全に阻害された。テストした全ての保存液は Ca^{2+} を含有しない液であり、 H_2O_2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は小胞体からの放出によるものと推察された。すなわち、新液は IP3 受容体/小胞体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を完全に阻害したと考えられる。

c) 24、36 時間冷保存後の肝の病理組織像には UW 液と同様であった。ED、UW 液で小腸を冷保存すると、24 時間で粘膜上皮の多くが脱落し、Grade3 の傷害であった。一方、S1NaI では粘膜上皮が保持され、Grade1 の傷害であった。36 時間保存でも構築を維持していた。冷保存で最も傷害されやすい臓器の一つである小腸で、これ

ほどまでの劇的な効果を認めた。



今後の展望

新液の細胞保護効果、臓器保護効果を既存の保存液と比較し、体外灌流や移植などのモデルを用いてその有用性をさらに検証する。本実験に幾つかの検討を加えて、有効成分の作用点を明確にし、特許の申請要件(進歩性)を確保したい。さらに、各種臓器の大動物移植実験(前臨床試験)を目指し、最終的には脳梗塞、心筋梗塞後の細胞浮腫、細胞死への応用も視野に入れて開発を進めていきたい。将来的には単独では大型の研究開発が期待しにくい比較的少数の疾患、病態(脊髄損傷、脳低体温治療など)への適応拡大を模索したい。