

虚血傷害の新しい治療概念の創出 ～実用化に向けたin vivoでの検討

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・外科治療学講座／教授]
古川 博之 [北海道大学大学院医学研究科・置換外科・再生医学講座／特任教授]
鈴木 友己 [北海道大学大学院医学研究科・置換外科・再生医学講座／特任助教]

背景・目的

臓器移植は末期臓器不全の根治療法として普及してきたが、ドナー不足と移植後の成績向上が求められている。われわれは細胞骨格の維持、エネルギー代謝の維持、細胞内 Ca^{2+} 増加の阻害、細胞・臓器浮腫の阻害、を主作用とする新規臓器保存液を開発した。これまでに、需要の高い心、肝と冷保存限界の短い小腸を中心にその効果を in vitro で検証してきた。本課題の目的は新規臓器保存液の効果を ex vivo, in vivo で検証し、臨床応用に向けた基礎的な検討を行うとともに、さらなる改良を目指すものである。

内容・方法

[ラット心移植] Lewis rat を用いた同種同系、異所性心移植モデルを作成した。冷保存せずに直ちに移植(CT群)、あるいは、UW 液、新液1(MEUDMS 液)、各々で体内灌流、摘出し、同じ液に 4°C で 6, 12, 24, 36 時間冷保存した(計9群)。7日グラフト生存、病理組織を比較した(各 n=5)。

[ラット肝冷保存、単離肝灌流(IPRL)] SD rat を用いた肝冷保存・再灌流モデルを作成した。冷保存せずに直ちに灌流(CT 群)、あるいは、HTK 液、新液2(HTKD 液)、各々で体内灌流、摘出し、同じ液に 4°C で 24 時間冷保存した(計3群)。IPRL 条件：灌流液は Krebs Henseleit Bicarbonate buffer(KHB)，定圧(8cmH₂O)，37°C，550 < pO₂ < 650mmHg，で 90 分の再灌流を行った(各 n=5)。門脈流量、胆汁産生量、臓器浮腫を比較した。

結果・成果

結果

[ラット心移植]

7日グラフト生存：冷保存時間が 12 時間以下では全群 100% であった。24 時間冷保存では UW 群(4/5), MEUDMS 群(5/5), 36 時間冷保存では UW 群(2/7), MEUDMS 群(4/6) であった。

24 時間冷保存・移植後 7 日目の線維置換(Masson trichrome 染色)：MEUDMS 群で有意に軽減されていた。

24 時間冷保存・移植後の触診及びエコーによるグラフト機能(%FS)：MEUDMS 群で有意に改善されていた。

24 時間冷保存・移植後 24 時間の壞死領域(TTC 染色)：MEUDMS 群で有意に縮小されていた。

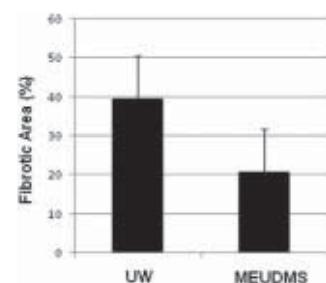
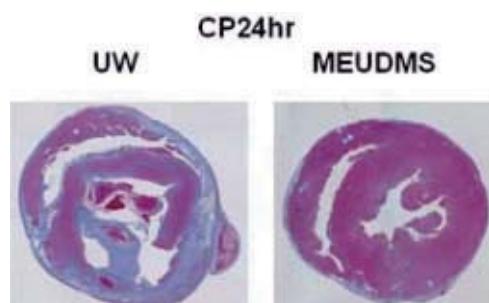
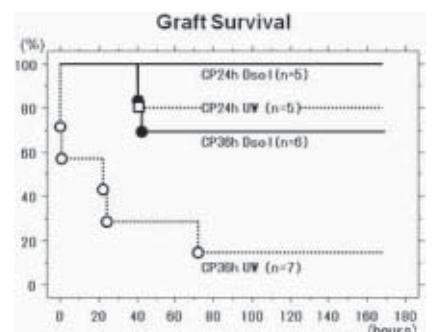
24 時間冷保存・移植後 12 時間の血液生化学：血清 CPK, CPK-MB, LDH, GOT, Toroponin-T は MEUDMS 群で有意に減少した。

[ラット肝冷保存、単離肝灌流(IPRL)]

心移植で劇的な効果を認めた MEUDMS 液は肝冷保存・IPRL モデルおよびラット肝移植モデルでは UW と比較して、心臓などの有意な臓器保護効果を示さなかった。MEUDMS は UW 液をベースとした改良液であるが、今回は HTK 液をベースとした改良液(HTKD 液)を検討した。

オリジナルの HTK 液では終始門脈血管抵抗が高く、定圧条件下では門脈流量が著明に減少したのに対し、HTKD 液は再灌流直後から門脈血管抵抗が低く、末梢まで直ちに灌流され、門脈流量は HTK 液と比較して有意に増加した。灌流終了時の肝重量増は HTKD 液では軽度であったのに対し、HTK 液では有意に増大した。

[成果] 新規臓器保存液は心、肝の冷保存・再灌流による傷害を軽減することが明らかになった。これまでに行ってきた、心筋、肝細胞、小腸上皮、気管上皮の細胞株での低温、低酸素傷害、および復温、再酸素化傷害に



対する保護効果を ex vivo, in vivo で証明することに成功した。本報告書には詳細を記載しないが、新液の効果は、グルコースの取り込み増加、解糖促進、酸化的リン酸化促進、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇阻害、アクチン脱重合阻害などの現象によることを示唆する in vitro の結果も得ている。詳細なメカニズム解析は現在進行中であるが、in vitro, ex vivo, in vivo での効果が揃ったことは、本液の実用性の可能性が極めて高いことの証明になると考えられる。

今後の展望

小動物肝、腎移植で効果を発揮する新液の開発(改良)を引き続き行い、前臨床試験(大動物実験)への移行を目指す。また、実用化に向けて必須となる企業との共同開発のために、特許の出願要件を地固めする。具体的には、新規臓器保存液の組成について、その新規性の確実性を精査する。さらに、タンパクレベル(2次元電気泳動)、遺伝子レベル(cDNA array)で解析し、既知のパスウェイのどこに作用しているのかを明らかにするとともに、臓器保護における新規遺伝子、タンパクの関与の可能性を摸索する。