

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	合地 美香子
<p>学位論文題目</p> <p>A Novel Preservation Solution Containing Quercetin and Sucrose for Porcine Kidney Transplantation (ブタ腎移植を用いたケルセチンとスクロースを含む保存液についての研究)</p> <p>共著者名</p> <p>加藤文法、鳥海飛鳥、川越智子、四谷収一、石井大介 大谷将秀、西川祐司、古川博之、松野直徒</p> <p>Transplantation Direct Volume 6 - Issue 12 e624 2020年</p> <p>研究目的</p> <p>臓器移植において臓器保存液は、UW (University of Wisconsin) 保存液がゴールドスタンダードとなっている。また保存方法に関しては単純冷却 (CS) が主流な中、ドナーの適応拡大と技術の進歩により機械灌流保存が安全で効果的な方法となってきている。特に低温酸素化灌流 (HOPE) は有望な保存方法といわれており、中でもCS後に1-2時間の短時間の低温酸素化機械灌流を行う方法はより臨床的な方法であるとされている。ケルセチン (Que) には抗酸化作用や抗炎症作用など様々な作用があり、またスクロース (Suc) はCSに効果的との報告もある。この研究では、腎細胞への低温障害に対するQueとSucの保護効果を評価し、ブタ腎自家移植モデルにおいてQueとSucを添加した保存液を用いたCSおよびHOPEにより腎臓の保存状態を改善できるかどうかを検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>BHK-21細胞 (シリアンハムスター、腎臓) 10.0×10^3 cells/wellを37°Cで培養したのちにQue [33.1 μM、3.3 μM、0.33 μM] およびSuc [0.1 M] を含むCS用のUW液と機械灌流 (MP) 用のUW液中にそれぞれ4°Cで3日間保存した。その後吸光度により細胞生存率を測定した。</p> <p>ブタ腎自家移植モデルでは、摘出した左腎移植片を3つの条件下で保存した。G1 ; CS用のUW液による24時間のCSのみの保存。 G2 ; CS用のUW液による22時間のCSとMP用のUW液による2時間のHOPEによる保存。 G3 ; G2と同じように保存され、Que [33.1 μM] とSuc [0.1 M] が各保存液に添加された。</p>			

保存後に右腎を摘出して、左腎移植片の静脈と下大静脈を端側吻合した後に、腎動脈と腹部大動脈を端側吻合した。最後に尿管と膀胱を吻合して自家移植をした。移植後7日間飼育しその後犠牲死させた。評価項目は腎障害の程度の指標として経時的に血中Cre値を測定した。また、酸化ストレスマーカーとして移植後1日目と2日目に血中過酸化脂質 (LPO) を測定した。犠牲死させたブタ腎の病理組織をEGTIスコアリングシステムに従ってスコアリングし腎損傷を評価した。機械灌流によるRenal resistance (RR) 値は血管抵抗を示し腎移植の生存率を反映しているといわれており、圧力/流量として計算されその変化量 Δ RRを評価した。また組織浮腫の評価目的にCS中の腎臓の総重量の変化率を評価した。

成 績

4°Cで3日間保存したBHK-21細胞 (10.0×10^3 cells/well) は、CS用UW液単剤での保存では $0.92 \pm 0.07 \times 10^3$ cells/wellに、MP用UW液単剤での保存では $2.31 \pm 0.07 \times 10^3$ cells/wellに減少した。それに対してCS用UW液にQue [$33.1 \mu\text{M}$]とSucを添加した保存液での保存では $3.83 \pm 0.21 \times 10^3$ cells/wellに、CS用UW液にQue [$3.3 \mu\text{M}$]とSucを添加した保存液での保存では $4.19 \pm 0.16 \times 10^3$ cells/wellになった。またMP用UW液にQue [$33.1 \mu\text{M}$]とSucを添加した保存液での保存では $3.57 \pm 0.21 \times 10^3$ cells/wellに、MP用UW液にQue [$3.3 \mu\text{M}$]とSucを追加した保存液での保存では $3.83 \pm 0.38 \times 10^3$ cells/wellになり、それぞれの単剤と比べて低温障害に対して有意な細胞保護を示した。

ブタ腎自家移植モデルでは、移植後7日目の各群の生存率 (平均生存日数) は、G1で40% (5.4 ± 1.8 日)、G2で80% (6.4 ± 1.3 日)、G3で80% (6.8 ± 0.4 日)であった。犠牲死させる前に死亡した原因として尿毒症が考えられた。経時的なCre値では各群有意差は認められなかったが、最終血中Cre値はG1で 17.2 ± 8.6 mg/dL、G2で 13.6 ± 9.9 mg/dL、G3で 7.3 ± 2.9 mg/dLであり、G1と比べてG3はCre値が有意に低かった。また、移植後2日目の血中LPOは、G1で 5.3 ± 0.67 nmol/mL、G2で 4.7 ± 0.58 nmol/mL、G3で 4.3 ± 0.46 nmol/mLであり、G1と比べてG3は血中LPOが有意に低かった。腎組織を内皮・糸球体・尿細管・間質でそれぞれスコアリング (EGTIスコアリングシステム) をして合計スコアを比べたところG1で 11.70 ± 0.85 、G2で 8.78 ± 1.73 、G3で 6.75 ± 2.17 であり、G1と比べてG3はスコアが有意に低かった。HOPEによるRRの変化については、G2で 5.27 ± 3.87 mmHg/mL/min、G3で 12.59 ± 2.41 mmHg/mL/minでG3のRRの減少量はG2の減少量よりも有意に大きかった。CSによる腎重量の変化率はCS用UW液の保存液で $10.9 \pm 3.0\%$ の減少、CS用UW液にQueとSucを添加した保存液で $19.5 \pm 7.5\%$ の減少であり有意に重量が減少した。

考 案

CSは腎移植で最も広く用いられている保存方法だが、CSが長時間になると早期移植片機能不全などが引き起こされる。これは保存中の虚血が酸化ストレスやアポトーシスを引き起こしているためと考えられている。フラボノイド化合物の1つであるQueはin vitroにおいて優れた抗酸化作用が示されており、また腎虚血再灌流障害に関連するアポトーシスを防ぐことが示唆されている。

今回のin vitroではCS/MP用のUW液それぞれにQueとSucを添加することにより細胞保護効果が大きくなったが、Que濃度を0.33 μ Mに下げると保護効果は急激に減弱した。したがって、ブタ腎自家移植モデルでは腎代謝、尿や滲出液による保存液の希釈などを考慮してQue濃度は33.1 μ Mに設定した。

今回、酸化ストレスマーカーとしてLPOを用いたが、Queの代謝半減期は11-28時間といわれているため、移植後1日目と2日目に測定した。移植後2日目においてG1と比べてG3が有意に減少しており、Queにより酸化ストレスが抑制されていたと考えられる。

機械灌流においてはその特性上様々なパラメーターを用いて保存中に評価することが可能である。今回QueとSucを添加することによりRRの減少量が大きかったが、Queは血管内皮依存性弛緩作用と平滑筋における弛緩作用の両方に影響と与えると報告されており、Queの血管拡張作用によってRRが低下したと考えられる。

虚血再灌流障害では組織の浸透圧の変化により細胞浮腫を引き起こす。また、低温での保存は臓器保存において重要な要素であるが、逆にエネルギー依存性ATPアーゼの阻害などにより更なる細胞浮腫を誘発する。今回Sucを添加することによりCSにおいて細胞浮腫の予防が示唆された。これはSucの分子サイズが342と大きいために効果的に不浸透性物質として機能した可能性がある。

結 論

我々は初めて臓器移植のための臓器保存においてQueとSucの有用性を検討した。今回の結果は、UW液にQueとSucを添加することにより腎臓の保存状態を改善することができ、腎臓移植の成績向上に寄与する可能性があることが示唆された。

引 用 文 献

1. Ahlenstiel T, Burkhardt G, Köhler H, et al. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney Int.* 2003;63:554–563.
2. Ahmad N, Pratt JR, Potts DJ, et al. Comparative efficacy of renal preservation solutions to limit functional impairment after warm ischemic injury. *Kidney Int.* 2006;69:884–893.
3. Shadan L, Bin L, Qionong G, et al. Cold preservation with hyperbranched polyglycerol-based solution improves kidney functional recovery with less injury at reperfusion in rats. *Am J Transl Res.* 2017;9:429–441.

参 考 论 文

1. Ishii D, Matsuno N, Gochi M, et al. Applicability of hypothermic oxygenate machine perfusion preservation for split-liver transplantation in a porcine model: an experimental study. *Ann Transplant.* 2020;25:e919920.
2. Kato F, Gochi M, Kawagoe T, et al. The protective effects of quercetin and sucrose on cold preservation injury in vitro and in vivo. *Organ Biology.* 2020;27:207–215.