

Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus

著者	犬塚 和徳
発行年	2008-03-17
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/55">http://hdl.handle.net/10271/55</a>

doi: 10.1016/j.surg.2007.03.002

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第499号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	犬塚和徳		
論文題目	Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus (携帯型耐圧保存装置を用いたラット切除小腸の保存に対する高圧酸素化パーフルオロケミカルとウィスコンシン液の効果)		

## 論文内容要旨

No.1

光先端医学専攻	氏 名	犬塚和徳
論文題目	Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus (携帯型耐圧保存装置を用いたラット切除小腸の保存に対する高圧酸素化パーフルオロケミカルとウイスコンシン液の効果)	
<p>[はじめに]</p> <p>小腸移植の成績を左右する要因に臓器保存法があるが、小腸の恒常性を保存中に維持するためにはエネルギー産生を促すための十分な酸素が継続的に供給される必要がある。一方、Perfluorochemical(PFC)は高圧下で酸素化するとより大量の酸素を溶存できる。この特性を活かし、高圧酸素化 PFC と University of Wisconsin(UW)臓器保存液を用いた切除小腸の組織保護効果を実験的に検討した。</p> <p>[材料ならびに方法]</p> <p>携帯型の臓器保存用耐圧容器を作成した。酸素透過性に優れたシリコンゴム製の袋にラットの切除回腸を 100 mL の UW 液と共に密封し、PFC または UW 液を満たした容器内に入れ、以下の 3 つの方法で保存した。P-5 群: 容器内の PFC を 5 気圧で高圧酸素化し保存、P-1 群: 容器内の PFC を 1 気圧で酸素化し保存、C 群: UW 液のみで保存。各群とも 4℃で 12、24、48、72 時間と保存した。保存小腸の保護効果を評価するため、組織酸素代謝の指標として組織 ATP 量をルシフェリン/ルシフェラーゼ法で測定した。また粘膜バリアー機能の指標として everted gut sac model を用いて蛍光高分子 (fluorescence dextran 4: FD4, MW 4000Da) の腸管壁透過性を測定した。さらに組織像を腸管虚血障害の指標である Chiu 分類で評価した。次に各臓器保存法において切除小腸の組織内でのエネルギー代謝を検討するため、UW 液中の酸素分圧、二酸化炭素分圧、乳酸値を各保存時間で測定した。さらに P-5 群の 72 時間保存で UW 液を 24 時間毎に交換した場合の効果を組織 ATP 量と腸管壁透過性で評価した。統計学的解析には一元または二元配置分散分析を用いた。ただし UW 液の 24 時間毎交換の有無による比較には Mann-Whitney 検定を用いた。p &lt; 0.05 を統計学的有意とした。</p> <p>[結果]</p> <p>組織 ATP 量(nmol/mg protein、mean±SD)は P-5 群では 12 時間: 72±35、24 時間: 57±36、48 時間: 35±34 であり、P-1 群(58±29、27±8、22±8: p &lt; 0.05)と C 群(32±18、13±11、4±5: p &lt; 0.001)より有意に高かった。しかし、72 時間では P-5 群、P-1 群、C 群の組織 ATP 量は 7±3、9±3、3±1 と各群間に有意差を認めなかった。FD4 の腸管壁透過性(nL/min/cm)は P-5 群で 12 時間: 12±5、48 時間: 30±5 であり、P-1 群(21±3、39±7: p &lt; 0.05)、C 群(33±11、49±11: p &lt; 0.001)より有意に透過性亢進は抑制された。しかし、72 時間では P-5 群、P-1 群、C 群の腸管壁透過性は 44±15、43±6、51±9 と各群間に有意差を認めなかった。組織学的に P-5 群は P-1 群、C 群より 72 時間までは小腸粘膜の虚血性変化が軽微であった。72 時間後の P-5 群</p>		

の UW 液中の酸素分圧は  $1814 \pm 85$  mmHg と高値を維持していた。一方、P-5 群の UW 液中の二酸化炭素分圧は 72 時間保存で  $5.2 \pm 0.6$  mmHg と徐々に増加しており、P-1 群 ( $3.9 \pm 0.3$  mmHg:  $p < 0.001$ ) や C 群 ( $2.8 \pm 0.3$  mmHg:  $p < 0.001$ ) より有意に高かった。P-5 群の UW 液中の乳酸値は 72 時間保存で  $1.5 \pm 0.2$  mmol/L と蓄積は緩やかであり、P-1 群 ( $1.9 \pm 0.2$  mmol/L:  $p < 0.05$ ) や C 群 ( $2.1 \pm 0.2$  mmol/L:  $p < 0.001$ ) より有意に低かった。P-5 群の 72 時間保存で UW 液を 24 時間毎に交換した場合の組織 ATP 量と腸管壁透過性は  $8 \pm 4$  nmol/mg protein、 $41 \pm 15$  nL/min/cm であり、UW 液を交換しなかった場合と有意差を認めなかった。

[考察]

小腸は虚血再灌流障害を受けやすく、臨床的には摘出後 12 時間以内に移植が行われている。今回、我々は臓器の運搬に有利な携帯型耐圧容器を作成し、エネルギー基質と酸素供給源として UW 液と高圧酸素化 PFC を用いる移植臓器保存法を考案した。この方法でラットの切除小腸を保存したところ、組織 ATP 量や腸管壁透過性、組織学的な評価から、従来の単純浸漬保存法(C 群)や 1 気圧酸素(純酸素)下での酸素化 PFC による保存法(P-1 群)と比較して 48 時間までで有意な保護効果が得られた。UW 液中の有意な二酸化炭素分圧の上昇と乳酸値の蓄積抑制から、P-5 群では他群より保存小腸に十分な酸素が供給され、組織中の好氣的代謝がより良好に維持されたと考えられる。しかし、保存時間が 72 時間に及ぶと十分に酸素が供給される環境であったにもかかわらず、P-5 群の組織 ATP 量と腸管壁透過性は他の保存法と同程度まで悪化した。原因として UW 液の変性や組織排出物の蓄積などの外的要因を考え、P-5 群の UW 液を 24 時間毎に交換して 72 時間保存してみたものの改善は得られなかった。このことから、切除小腸の保存期間が延長するに従い、たとえ十分な酸素と栄養を供給し続けても、生体下とは異なり酸素代謝が働かないような細胞レベルでの物理的または化学的変化が起きていると推測された。

[結論]

高圧酸素化 PFC と UW 液を用いた臓器保存法により 48 時間まででラット切除小腸の良好な保護効果が得られた。そのメカニズムとして、より多くの酸素供給により切除小腸の組織中の酸素代謝が維持されることが考えられた。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

No.1

報 告 番 号	医博第 4 9 9 号	氏 名	犬 塚 和 徳
論文審査担当者	主 査 浦 野 哲 盟 佐 藤 重 仁 牛 山 知 己		
<p>小腸移植の成績は臓器保存法により左右される。小腸の <i>viability</i> を維持するために十分な酸素が継続的に供給される必要がある。申請者は、高圧下で酸素化することにより大量の酸素を溶存できる Perfluorochemical (PFC) を用い、高圧酸素化 PFC と University of Wisconsin (UW) 臓器保存液の切除小腸保護効果を検討した。</p> <p>実験には独自に開発した携帯型の臓器保存用耐圧容器を使用した。酸素透過性に優れたシリコンゴム製の袋にラットの切除回腸を 100mL の UW 液と共に密封し、PFC 液または UW 液を満たした容器内に入れ、以下の 3 つの方法で保存した。P-5 群：容器内の PFC を 5 気圧で高圧酸素化し保存、P-1 群：容器内の PFC を 1 気圧で酸素化し保存、C 群：UW 液のみで保存。各群とも 4℃ で 12、24、48、72 時間保存した。保存小腸の保護効果を評価するため、組織酸素代謝の指標として組織 ATP 量をルシフェリン/ルシフェラーゼ法で測定し、粘膜バリアー機能の指標として腸管壁の透過性を everted gut sac model で測定した。組織像は腸管虚血障害の指標である Chiu 分類で評価した。また切除小腸組織内でのエネルギー代謝を検討するため、UW 液中の酸素分圧、二酸化炭素分圧、乳酸値を各保存時間で測定した。</p> <p>組織 ATP 量 (nmol/mg protein, Mean±SD) は P-5 群で 12 時間 (72±35)、24 時間 (57±36)、48 時間 (35±34) であり、P-1 群 (58±29, 27±8, 22±8: p&lt;0.05) と C 群 (32±18, 13±11, 4±5: p&lt;0.001) より有意に高値を示した。しかし、72 時間では P-5 群、P-1 群、C 群の組織 ATP 量は 7±3, 9±3, 3±1 と有意差を認めなかった。腸管壁透過性 (nL/min/cm) は P-5 群で 12 時間及び 48 時間後、P-1 群 (p&lt;0.05) 並びに C 群 (49±11: p&lt;0.001) より有意に低値を示した。しかし、72 時間後では有意差を認めなかった。虚血に伴う小腸粘膜の組織学的変化は P-5 群において P-1 群、C 群に比し 72 時間まで軽微であった。72 時間後の P-5 群の UW 液中の酸素分圧は 1814±85 mmHg と高値を維持していた。P-5 群の UW 液中の二酸化炭素分圧は経時的に増加し、72 時間で 5.2±0.6 mmHg と、P-1 群 (3.9±0.3 mmHg, p&lt;0.001) や C 群 (2.8±0.3 mmHg,</p>			

p<0.001) より有意に高値を示した。一方 P-5 群の UW 液中の乳酸値は 72 時間で  $1.5\pm 0.2$  mmol/L と、P-1 群 ( $1.9\pm 0.2$  mmol/L, p<0.05) や C 群 ( $2.1\pm 0.2$  mmol/L, p<0.001) より有意に低値を示した。

これより申請者は、独自に開発した携帯型耐圧容器による UW 液と高圧酸素化 PFC を用いる移植臓器保存法は、組織 ATP 量や腸管壁透過性、組織学的な評価から、従来の単純浸漬保存法と比較して 48 時間まで有意な保護効果が得られたとしている。これは十分量供給される酸素を用いた組織中の好氣的代謝によるとしている。72 時間後において残存酸素量は十分であったにもかかわらず、組織 ATP 量と腸管壁透過性が悪化した原因は現時点では不明で今後の課題としている。

審査委員会は、独自に開発した携帯型耐圧容器を用いて、申請者が新規な移植臓器保存方法を開発しその有用性を詳細な検討により明らかにした点を高く評価した。またその保存方法の実用性も高く評価した

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 酸素が血液よりも PFC 液に溶解しやすい理由は何か
- 2) 高圧酸素療法は 2.5-3 気圧で行われるが、5 気圧にした理由は何か
- 3) 加圧により細胞はどのように変化するか
- 4) 腸管の長さや重量を一定にしたか
- 5) UW 液の組成と緩衝能について
- 6) UW 液中のブドウ糖濃度はどれだけか
- 7) ATP 産生の減少と乳酸産生の増加は平行しているか
- 8) ATP、乳酸、CO<sub>2</sub> のうち腸管壁透過性亢進にもっとも影響するのは何か
- 9) 腸管壁透過性測定に及ぼす漿膜の影響について
- 10) 100% 酸素 5 気圧で活性酸素種産生が悪影響する可能性について
- 11) 十分量の酸素が残存する 72 時間後に viability が低下する理由は何か
- 12) 容器はどのように冷却するか
- 13) 他の臓器保存への応用は可能か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。