

論 文 要 旨

Hydrogen Sulfide Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury in CLAWN Miniature Swine

〔 硫化水素によるクラウン系ミニブタ腎虚血再灌流障害抑制効果 〕

関島 光裕

【序論及び目的】

移植医療が抱える最大の問題である深刻なドナー不足に対し、より条件の厳しいドナーへの適応拡大や心停止ドナーへの適応拡大が推進されるが、条件の悪いドナーを用いた際には虚血再灌流障害 (Ischemic-reperfusion injury: IRI) による急性臓器不全、あるいは IRI によって免疫学的因子が活性化され、急性・慢性拒絶の発生が増加することが懸念される。IRI の制御はドナー拡大あるいは移植後成績の改善という点から重要な対策課題であるという問題意識に基づき、有毒ガスとして知られる硫化水素 (Hydrogen sulfide: H₂S) に着目した研究を行った。H₂S は、近年、生体内でも生産される情報伝達物質であることが明らかになるとともに、H₂S の外因性投与による抗炎症性作用や細胞保護作用が注目されている。これまでにマウスやラットを用いた研究によって腎臓 IRI 抑制効果が報告されているものの、大動物を用いた H₂S の生体投与による腎 IRI 抑制効果の検討は報告されていない。今回、前臨床大動物実験として、ミニブタを用いた腎臓 IRI モデルに対し、周術期に H₂S 投与を行うことによって、急性期・慢性期における H₂S 治療の有効性と安全性評価、および作用機序の解明を目的とし、研究を行った。

【対象動物及び実験方法】

対象動物

9 頭のクラウン系ミニブタを用いて実験を行った。全身麻酔下に左腎動静脈を 120 分間遮断し、左腎臓に IRI を誘導した。右腎臓は摘出し、障害を受けた左腎臓のみで術後経過を評価した。

実験群

以下の 3 群を設定し、H₂S 治療群に対しては、H₂S 供与体として硫化ナトリウム (Sodium sulfide: Na₂S) 溶液を投与した。

- ・ Group 1 (n=3) : Na₂S 投与を行わない対照群。
- ・ Group 2 (n=3) : 再灌流 10 分前から再灌流 30 分後にかけて計 40 分にわたり Na₂S を経静脈的に全身投与を行った群。
- ・ Group 3 (n=3) : 再灌流 10 分前から再灌流 30 分後にかけて計 40 分にわたり Na₂S を経腎動脈的に腎選択的投与を行った群。

Na₂S 投与群 (Group 2, 3) では、再灌流 10 分前から再灌流までに 1.1 mg/kg、また再灌流時から再灌流 30 分後にかけて 1.1 mg/kg、計 2.2 mg/kg の Na₂S を持続投与した。

腎機能評価

術後の血清クレアチニン値 (Cre) を経時的に測定し、術後 28 日目まで腎機能を評価した。

病理学的評価

経時的な腎生検 (術前、再灌流前、再灌流 2 時間後、2 日後、7 日後、14 日後、28 日後) を行い、H-E 染色によって腎障害の評価を行った。また 2 日後の検体を用い、尿細管組織のアポトーシ

スを TUNEL 染色により、さらに尿細管上皮の再生を PCNA 染色により評価した。

炎症性サイトカインの評価

血清炎症性サイトカインとして、IL-6、TNF- α 、HMGB1 を測定し (ELISA 法)、また組織における炎症性サイトカインについては、生検で得た腎組織を用いて IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現を測定した (RT-PCR 法)。

【結 果】

腎機能評価

非投与群 (Group 1) では 120 分の腎臓の温虚血および再灌流によって、術後 3 日をピークとする Cre 上昇を認めたものの、Na₂S 投与群 (Group 2、3) では非投与群 (Group 1) と比較し、腎虚血再灌流後の Cre 上昇は抑制され、特に腎選択的に Na₂S 投与を行った Group 3 では、Group 1 と比較し有意な Cre の上昇抑制を認めた (Group 1 vs Group 3 : 9.47 \pm 1.12 mg/dl vs 5.99 \pm 1.07 mg/dl ; 再灌流 3 日後, 8.64 \pm 1.57 mg/dl vs 4.43 \pm 0.79 mg/dl ; 再灌流 4 日後 ; p <0.05)。術後 14 日および 28 日を経た時点では全群で Cre は正常値であり統計学的な有意差を認めなかった。また、全症例において Na₂S 投与に伴う副作用は確認されなかった。

病理学的評価

術後 2 日目の腎生検標本において、非投与群 (Group 1) では尿細管上皮障害や尿細管拡張、細胞核の濃縮などの腎 IRI 所見を認めるのに対し、Na₂S 投与群 (Group 2、3) ではこれらの病像が明らかに抑制された。更に術後 7 日目の腎生検標本では Group 1 では病像は進展し、強い IRI 像を示すのに対し、Na₂S 投与群 (Group 2、3) では IRI 像の改善を認め、特に Group 3 ではほぼ正常に近い組織像への回復が示された。また Group 1 において、TUNEL 染色では尿細管上皮のアポトーシス亢進、および PCNA 染色では障害からの盛んな尿細管再生を認めるのに対し、Group 2、3 ではこれらの染色における陽性細胞数は少なく、特に Group 3 では陽性細胞はごくわずかに認めるのみであり、Na₂S 投与による IRI 抑制効果や抗アポトーシス効果が顕著であることが示された。

炎症性サイトカイン

Group 1 と Group 2 の比較では、各サイトカインの産生に有意差はなかったが、Group 2 と Group 3 の比較において血清 HMGB1 では再灌流後 1 時間、また血清 TNF- α では再灌流後 1、2 時間において有意に産生が抑制された (Group 2 vs Group 3 : HMGB1 ; 11.4 \pm 1.9 ng/ml vs 2.6 \pm 0.3 ng/ml, TNF- α ; 85.5 \pm 32.0 pg/ml vs 30.6 \pm 12.3 pg/ml、再灌流 1 時間後 ; p <0.05)。一方、IL-6 の産生については各群に有意差を認めなかった。また再灌流 2 時間後、2 日後の腎組織中炎症性サイトカイン IL-1 β の発現でも、再灌流 2 時間後 (Group 2 vs Group 3 : 14.4 \pm 3.2 vs 2.8 \pm 0.8 ; p <0.05)、術後 2 日後 (Group 2 vs Group 3 : 5.3 \pm 0.4 vs 0.9 \pm 0.3 ; p <0.05) の mRNA 発現が有意に抑制された。

【結論及び考察】

大動物を用いた前臨床実験によって、Na₂S 投与が副作用を生ずることなく、腎臓での IRI 抑制効果を有することを明らかにした。特に腎臓選択的な Na₂S 投与の方が全身投与よりも、局所的な炎症性サイトカイン産生抑制に寄与することによって強い腎 IRI 抑制効果があることを明らかにした。今後も系統立てた前臨床移植実験の継続によって、本実験で示した安全性の高い H₂S の臓器選択的投与によって新たな腎 IRI 治療法を確立し、移植医療への応用をはかる。