

## 論 文 要 旨

The Protective Effects of Carbon Monoxide Against Hepatic Warm Ischemia-Reperfusion Injury in MHC-Inbred Miniature Swine.

MHC 確立クラウン系ミニブタ肝臓温虚血再灌流  
障害に対する一酸化炭素の保護効果

室川 剛廣

**【序論及び目的】**

慢性的かつ圧倒的な移植臓器不足を克服するため、臓器提供時の適応が拡大されているが、その一例として心停止下ドナーからの臓器提供が挙げられる。腎移植においては既に臨床的に普及しており、移植後の成績も脳死ドナーからの腎移植に比較して遜色がないとされている。しかし、肝臓移植においては大きく異なり、肝切除などの手術時に生ずる肝虚血再灌流障害は、術後肝機能障害の遷延や肝不全など重篤な合併症を引き起こすことが知られており、特に心停止下臓器提供によるものである際は、心停止に伴う温虚血時間の条件が移植成績を大きく左右することから、その対策として様々な研究が行われている。その一つとして、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用などを有する一酸化炭素 (Carbon Monoxide: CO) に着目した研究が行われてきた。我々はこれまでに、COによる大動物肺虚血再灌流障害の抑制効果 (Sahara et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010/Sahara et al. Transplantation. 2010) を示してきたが、肝虚血再灌流障害に対する CO の有効性は小動物報告に限られる。今回我々は前臨床大動物実験として、ミニブタを用いた肝虚血再灌流モデルを作成し、急性期から慢性期における CO の有効性と安全性および作用機序の解明を目的として、本研究を行った。

**【材料及び方法】****肝温虚血再灌流モデル**

クラウン系ミニブタ用いて、全身麻酔下に開腹を行い、門脈と固有肝動脈を 45 分間遮断し肝温虚血を誘導した後に、遮断を解除する肝温虚血再灌流障害モデルを作成した。肝血流遮断中は、致死的な腸管うっ血や血圧低下の回避を目的として、脾静脈および右外頸静脈にカテーテルを挿入しバイパス回路を作成し、遠心ポンプを用いて体外灌流を行った。

**実験群**

上記実験モデルを用いて、6 頭のクラウン系ミニブタを、手術開始から再灌流後 2 時間 まで計 345 分間にわたり CO を経気道的投与 (血中 CO-Hb 濃度を 15%前後に調整) した CO 群 (n=3) と CO 吸入を行わない対照群 (n=3) に分け、肝温虚血再灌流前後の状態を以下の項目で比較検討した。

**肝機能評価**

血液生化学検査で AST、ALT、LDH、T-bil 値を経時的 (手術開始直後、再灌流後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、2 日後から 7 日後の連日、14 日後、30 日後) に測定し、肝機能評価を行った。

## 病理組織学的評価

肝楔状切除による生検を、手術開始直後、再灌流後 2 時間後、および 4 日後（全身麻酔下に小開腹で施行）に行い、H-E 染色による肝障害の評価を行った。また TUNEL 染色により肝細胞のアポトーシスの評価を行った。

## 血清炎症性サイトカインの評価

採取検体の凍結保存血清を用いて、ELISA 法により血清 TNF- $\alpha$ 、HMGB1、IL-6 を経時的（手術開始直後、再灌流後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、2 日後）に測定した。

### 【結果】

#### 安全性評価

両群で手術時の平均血圧に有意差を認めなかった（対照群 vs CO 群：肝血流遮断直前平均血圧；103  $\pm$  6.4 mmHg vs 93  $\pm$  2.6 mmHg, 再灌流後 2 時間平均血圧；72  $\pm$  0.7 mmHg vs 67  $\pm$  1.0 mmHg,  $p = 0.27$ ）。CO 群全頭において、観察期間中に CO 吸入による呼吸器系・循環器系・活動性などに対する明らかな副作用は確認されなかった。

#### 肝機能評価

対照群では術後 4 日にかけての著明な AST、ALT、LDH、T-bil の上昇を認めたが、CO 群では全ての項目で有意に上昇が抑制された（対照群 vs CO 群：peak AST；2224  $\pm$  326 U/L vs 456  $\pm$  81 IU/L,  $p < 0.0001$ , peak ALT；98  $\pm$  50 vs 23  $\pm$  5 IU/L,  $p = 0.029$ , peak LDH；1915  $\pm$  406 U/L vs 1157  $\pm$  110 U/L,  $p = 0.0086$ , peak T-bil；0.7  $\pm$  0.03 mg/dl vs 0.4  $\pm$  0.03 mg/dl,  $p = 0.001$ ）。

## 病理組織学的評価

再灌流 2 時間後の肝生検で、対照群では HE 染色像で広範な出血、鬱血、壊死、空胞変性、好中球浸潤など高度の虚血再灌流障害像とともに TUNEL 染色で広範な肝細胞のアポトーシスを認めるのに対し、CO 群ではこれらの障害像は非常に軽度であった。術後 4 日目の肝生検では、対照群では上記の虚血再灌流障害像およびアポトーシスの残存を認めるのに対し、CO 群ではほぼ正常像への改善がみられた。CO 投与による肝温虚血再灌流障害の抑制効果や抗アポトーシス効果が示された。

## 血清炎症性サイトカイン

再灌流後早期から上昇する TNF- $\alpha$  と HMGB1 は CO 投与により有意に抑制された（対照群 vs CO 群：peak TNF- $\alpha$ ；6376  $\pm$  690 pg/ml vs 2213  $\pm$  691 pg/ml,  $p = 0.005$ , peak HMGB1；163  $\pm$  56 ng/ml vs 21  $\pm$  7 ng/ml,  $p = 0.0010$ ）。IL-6 は統計学的には有意差はないものの CO 群において低値を示した（対照群 vs CO 群：peak IL-6；5036  $\pm$  802 pg/ml vs 2434  $\pm$  751 pg/ml,  $p = 0.1390$ ）。

### 【結論及び考察】

ミニブタを用いた前臨床大動物実験により、低用量 CO の経気道的投与が副作用を生ずることなく肝温虚血再灌流障害の抑制効果を示すことを明らかにした。CO による抗アポトーシス効果と抗炎症性効果が本実験における作用機序の一つであることが示唆された。本研究の結果を踏まえ、今後は臨床医療を模したミニブタ心停止下臓器提供による肝移植モデルを作成し、CO の有効性と安全性評価を行い、移植医療における新たな治療法の確立を目指す。