

ネコ生体間腎臓移植のドナー問題と打開法としてのラット心停止（マージナル）

腎移植モデルを用いた腎蘇生法の開発

岩井 聡美

平成 25 年度

The problems on cat renal transplantation from living donor and  
the development of revitalization methods on rat kidney grafting from  
cardiac death (marginal) donors as a way out of living donors

SATOMI IWAI

2013

学位論文題目

ネコ生体間腎臓移植のドナー問題と打開法としてのラット心停止  
(マージナル) 腎移植モデルを用いた腎蘇生法の開発

---

氏名 岩井 聡美

審査委員

< 主査 >

樋口 誠一

(獣医内科学・教授)

< 副査 >

佐々木 宣哉

(実験動物学・教授)

< 副査 >

朴 天鎬

(獣医病理学・准教授)

< 副査 >

岡野 昇三

(獣医外科学・教授)

平成26年2月20日

---

北里大学大学院獣医学系研究科

## 目 次

序論	1
第1章 ネコ腎移植のためのラットを用いた練習法の開発と 実験的ネコ生体間腎移植の検討	4
Ⅰ. 緒言	4
Ⅱ. Experiment 1: ラットを用いたトレーニングプロトコールの作成	6
1. 材料と方法	6
a. 実験動物	6
b. ネコ腎移植のためのラットを用いた練習法	6
(1) 動脈吻合練習法	6
(2) 静脈吻合練習法	7
(3) 吻合後の評価法	7
(4) 統計学的解析	8
2. 実験結果: ラット練習法を用いた吻合練習後の評価	8
a. 動脈吻合練習法	8
b. 静脈吻合練習法	9
Ⅲ. Experiment 2: ネコ生体間腎臓移植の試み	10
1. 材料と方法	10
a. 実験動物	10
b. ネコ生体間腎移植における外科手技と周術期管理法	10
c. ドナーの腎血管奇形に対する外科的回避法	11
2. 実験結果: ネコ生体間腎臓移植における結果	11

a. ネコ生体間腎移植における吻合時間と移植技術の評価	11
b. 血管奇形移植腎の移植後の吻合部における評価	12
IV. 考察	13
VI. 小括	17
第2章 ネコ生体間腎移植におけるドナーリスクの検討	18
I. 緒言	18
II. Experiment 1: 2分岐腎動脈のドナーネコの1例	20
1. 材料と方法	20
a. 症例	20
b. 術式	20
2. 実験結果	22
III. Experiment 2: 腎臓提供後のドナーネコの長期経過観察	23
1. 材料と方法	23
2. 結果	23
IV. 考察	24
V. 小括	28
第3章 ラットマージナル腎移植モデルを用いた保存方法の検討	30
I. 緒言	30
II. 材料と方法	33
1. 実験動物	33
2. ドナーからの腎臓摘出法	33
3. 保存方法	33
4. ラットマージナル腎臓移植方法の開発	33

5. マージナル腎臓移植後の生存性と腎機能	34
a. Experiment 1: 心停止後の経過時間の違いにおける 影響	35
b. Experiment 2: 心停止後のマージナル腎における 保存温度の影響	35
c. Experiment 3: 心停止後のマージナル腎における 保存液組成の影響	35
6. 移植後の腎機能と病理組織学的線維化スコア	36
7. マージナル腎の腎重量に対する保存液と保存温度の影響	36
8. 統計学的解析	36
III. 実験結果	38
1. マージナル腎臓移植後の生存性と腎機能	38
a. Experiment 1: 心停止後の経過時間の違い	38
b. Experiment 2: 心停止後のマージナル腎の最適な 保存温度	38
c. Experiment 3: 心停止後のマージナル腎の最適な 保存液組成	39
2. 病理組織学的線維化スコア	40
3. 保存後の腎重量の変化	41
IV. 考察	42
V. 小括	45
第4章 ラットマージナルドナーから摘出した腎臓における エネルギー活性の検討	47
I. 緒言	47

II. 材料と方法	50
1. 実験動物	50
2. 保存腎のTotal adenine nucleotide値 (TAN)と Energy Charge (EC) の測定	50
3. 腎臓チップを用いた蛍光強度の定量	51
4. Luc-Tgラットを用いた移植腎の蛍光強度の定量	52
5. 統計学的解析	52
III. 実験結果	53
1. 保存腎のTANとEC	53
2. 腎臓チップを用いた蛍光強度	53
3. Luc-Tgラットを用いた移植腎の蛍光強度	54
IV. 考察	55
V. 小括	57
第5章 マージナル腎への間葉系幹細胞(MSCs)による 蘇生効果の検討	58
I. 緒言	58
II. 材料と方法	60
1. 実験動物	60
2. 脂肪組織由来間葉系幹細胞(AT-MSCs)の分離と培養	60
3. 心停止後マージナル腎移植法	61
II. Experiment 1: AT-MSCs の経静脈的全身投与方法	62
1. 方法	62
a. 移植後の生存性	62
b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出	62

2. 実験結果	62
a. 移植後の生存性	63
b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出	63
III. Experiment 2: AT-MSCs の経腎動脈的局所的投与方法	64
1. 方法	64
a. 移植後の生存性と腎機能	64
b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出	64
c. LacZ-陽性細胞の免疫組織化学的染色法	64
d. 移植腎における病理組織学的検査	65
e. 統計学的解析	66
2. 実験結果	66
a. 移植後の生存性と腎機能	66
b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出	67
c. LacZ-陽性細胞の免疫組織化学的染色法	67
d. 移植腎における病理組織学的検査	67
IV. 考察	69
V. 小括	74
総括	75
謝辞	80
参考文献	81
図	104



表

125

## 序論

慢性腎不全(CKD)によるネコの死亡率は高齢になるほど高く、13歳以上のネコでは死因の約50%を占める[39,107]。CKDに陥ると根治は望めず、多尿性の脱水による定期的な皮下点滴や投薬のストレス、胃潰瘍から生じる嘔吐や下痢などの消化器症状に起因する錯綜、エリスロポエチン産生低下による貧血、最終的には尿毒症による痙攣発作などにより死に至るとも苦しい経過をたどる[39]。CKDの根治に繋がる一治療法として腎移植があるが、現在獣医療で行われている腎移植は実験ネコをドナーとした生体間腎移植が主体であり、ドナーにおける倫理的背景が大きな問題となっている[19,68]。

一方、ヒト移植医療の領域では、透析を受けている末期腎臓病患者の延命とQuality of lifeの改善のために、腎移植が行われている[143]。しかしながら、ヒト生体間腎移植は減少傾向にあり、死体または脳死移植へ変遷している[75]。腎臓を提供するドナーのクライテリアを拡大した新たなプログラムが現れたにもかかわらず、生体ドナーの使用数は2004年をピークに減少しつつある[54,91,110,117,118,124,128]。これは、生体ドナーよりも、若齢なドナーなど、死亡したドナーからの腎臓提供を優先する新たな政策を遂行し始めていることによる[104]。ヒトにおいては、World Health OrganizationやWorld Medical Association、Council of Europeなどから、ドナーに対するさまざまなガイドライン、規定、公文などが公表されており、ドナーの生命倫理に関して許容しうるリスクのレベルを規定したクライテリアを設けている[27,28,144,145]。また、2008年のイスタンブール宣言では、不正な臓器提供の防止、生体ドナーの保護と安全確保のために、死体ドナーや脳死ドナーからの移植を世界的に拡大していくことを宣言していることも、生体ドナーが減少している一因と考えられる[75]。

しかしながら、臓器の需要と供給のギャップを埋め合わせるために、ドナーとして

は不適切とされてきた、高齢のドナー、心停止後 (Cardiac death; CD) のドナー、または、移植腎の長期生存性に有害な影響を与える可能性がある併発症をもつドナーなどからの臓器でさえも移植に使用しなければならない状況に陥っている [114,126,129,141]。このようなマージナルドナーからの臓器の使用が増加しているにもかかわらず、移植を待つ患者や移植を待っている間に死亡する患者の数も増え続けている [109]。このような心停止ドナーからの腎臓は、生体間や脳死移植と比較して、虚血/再灌流傷害をとっても受けやすい状態であり、移植臓器の初期機能不全や機能遅延が高率で発生する主な原因となっている [115,126]。

一般的に、冷保存の使用は、代謝や酸素要求量を低下させるために臨床で施行されている最も基本的な方法である [130]。例えば、常温灌流は、冷灌流と比べ微小循環から血液を早急に洗い流すことが可能であることに加え、常温保存は血管収縮を抑制し、血管上皮細胞や血液の細胞成分の細胞膜が硬化するのを防止する [14]。これらの作用は、虚血/再灌流傷害における重要なメカニズムである no-reflow 現象を改善することに役立つ [71]。

Extracellular-trehalose-Kyoto液 (ETK液) は本来、肺組織の保存液として開発された [8,66]。ETK液は高ナトリウム (Na) / 低カリウム (K) 組成で、細胞外液と類似しているため、高K組成によって引き起こされる血管収縮や細胞浮腫を防止する効果がある [113,148]。細胞内液型組成の保存液は、University of Wisconsin 液 (UW液) が代表的で、高カリウムによって血管収縮がおこり、再灌流後に臓器虚血が継続することがいわれている。上記のようにマージナル腎自体が、虚血/再灌流傷害を受けやすいことから、マージナル腎に適した保存条件を、さらに検討する必要があると考えられた。

一方、移植腎のエネルギー状態を検討するために、遺伝的にコードされた生物学的蛍光色素は、生体において時空間的組織変化を可視化する高性能なツールとして使用することができる。In vivoでのルシフェラーゼを用いた発光画像は、

ルシフェラーゼを発現する遺伝子組み換えレウスラット(LEW)と非侵襲性のバイオイメージングシステムを用いて撮影することができる[53,100]。ATPと蛍光強度の間に強い相関性があるために、ATPの活性度の変化を蛍光強度によって定量化することが可能である[53]。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells ; MSCs)は、多能性前駆細胞であり、増殖能や多くの異なった細胞株へ分化する多分化能を有している[35,108]。脂肪組織は再低侵襲な処置で豊富にそして容易に入手することが可能なため、MSCsの供給源としてはとても魅力的な組織である[150]。最近の報告では、脂肪組織由来のMSCs(AT-MSCs)を経静脈的に投与された患者のなかに、致死的な肺血栓塞栓症を生じた症例が確認された[31,43,44]。したがって、マージナル腎に対するMSCsの投与方法やその効果、副作用に関して、検討する必要性があると考えられた。

本研究では、ラットを用いたネコ腎移植に対するトレーニングプロトコルを作成し、ネコ生体間腎移植を速やかに実施することが可能かどうか評価した。さらに、ネコ生体ドナーのリスクについて検討した。次に、ネコにおける心停止後腎移植を最終目標に、ラットを用いた基礎的研究として、マージナル腎移植モデルを作成し、マージナル腎の保存条件の検討を行った。それをもとに、ラットのマージナル腎のエネルギー動態を解析することにより、移植後の生存性との関係を検討した。最後に、MSCsを投与することによって、マージナル腎の蘇生効果、または全身への影響について検討を行った。

## 第1章 ネコ腎移植のためのラットを用いた練習法の開発と実験的ネコ生体間腎移植の検討

### I. 緒言

効果的な免疫抑制剤の発達にともなって、ヒト[18]のみならず、ネコ[1,13,14,50,68,69,87]やイヌ[2,17,51,123]においても腎臓移植は非可逆的腎臓病に対する治療法の選択肢として確立されてきている。獣医臨床医学では、Gregoryらによって、腎臓移植が1987年にネコにおいて初めて実施され、成功を収めている[87]。それ以降、ヒト医療のみならず獣医臨床においても、腎臓移植は普及してきており、慢性腎臓病に罹患しているネコに対する治療法の一つとして、より一般的なものと考えられるようになった[69,87]。現在では、レシピエントの候補となりうるかどうかの規定があり、それにもとづいてネコの腎移植の成功率をあげる試みもされている[68]。さらに、獣医臨床においても、血液透析技術が導入されることによって[38]、術前、術後の尿毒症管理が行えるようになり、さらに安全な移植医療が実現している。

ネコにおける腎臓移植を成功に導くための3つの主要な要因として：1. 外科的技術、2. 免疫抑制プロトコール、そして、3. 血縁関係をもたない組織不適合性ドナーからの同種腎移植片を用いるための遂行能力が上げられる[50]。しかしながら、この腎臓移植の技術は、ほとんどの獣医師が行えるほど簡単な治療法ではない[2,69]。したがって、われわれは、ネコの腎臓移植を実施するために、微小外科(マイクロサージェリー)技術を修得することを目的として、トレーニングプロトコールを考案する必要があると考えた。これらの技術は、腎移植のみならず、超小型犬やネコにおける一般外科においても有用な技術である。

さらに、今回、ネコの腎臓移植のためにラットを用いたトレーニングプロトコールの

作成を試みた他の理由として、小動物獣医師として研究に用いるための実験ネコの数を減らしたいという倫理的そして合理的理由があげられる。さらには、血管のサイズを考慮した場合、ネコの腎動静脈に対してラットが最も適した実験動物であると考えられたためである。

そこで、本章では、Experiment 1として、ネコの腎臓移植に対する適正なトレーニングプロトコルを詳細に検討し、さらにそのテクニカル的な要因を評価することを目的とした。さらに、Experiment 2としてネコを用いて生体間腎移植を行うことによつて、手技が円滑にまた安全に行えるかどうかを検討した。

## II. Experiment 1 ; ラットを用いたトレーニングプロトコールの作成

### 1. 材料と方法

#### a. 実験動物

体重380~455gの雄のwild type Lewis (LEW) ラット、Brown Norway ラット、Wister ラットをチャールズリバー (CLEA Ltd.、静岡、日本)より購入し、実験に供した(n=59)。これらのラットは、温度、湿度を一定に保った状態で、明暗を12時間ごとに調整した飼育室で飼育し、餌と水は自由摂取可能な環境で管理した。全ての実験は、自治医科大学の動物倫理委員会によって承認され、動物福祉のために設定されたガイドラインに従って行った。

#### b. ネコ腎移植のためのラットを用いた練習法

##### (1) 動脈吻合練習法

ネコの腎臓移植では、ドナーから摘出した移植腎の腎動脈をレシピエントの外腸骨動脈と端々吻合する。ネコの腎動脈とラットの腹部大動脈がほぼ同じ直径であることから、練習法として、ラットの腹部大動脈を切離したのち、再建するという方法を実施した。ラットの腹部正中を切開したのち、腹部大動脈を腎動脈と外腸骨動脈の間で、後大静脈や周囲の脂肪と分離した(図 1,A-1)。微小な血管は電気焼烙器を用いて止血した。腎動脈と外腸骨動脈分岐部の間に血管クランプをかけて血流を遮断したのち、その間を切離した。血管内の血液をヘパリン加生理食塩液で洗い流した。9-0 ナイロン糸(ケイセイ医科工業株式会社、東京都、日本)を用いて腹側と背側に1糸ずつ単純結紮縫合し、その糸を支持糸として牽引した(図 1,A-2)。支持糸の間に単純結紮縫合を加

えていき(図 1,A-3)、片側面の縫合が終了したのち血管を反転させ、反対側面も同様に単純結紮縫合した。血管クランプを取りはずし、少量の出血は綿棒などを用いて圧迫止血して制御した。さらに、出血が止まらない場合は、出血部位を確定し、追針して止血した(n=40)。吻合練習後、狭窄は認められず、血流は良好であった(図 2)。

## (2) 静脈吻合練習法

ネコの腎移植における静脈の吻合では、レシピエントネコの腎静脈を、ドナーの外腸骨静脈へ端側吻合する。端側吻合の練習をするために、門脈体循環シャントモデル[20,76,81]を適用して、シャントグループを作成した。ラットの門脈と後大静脈をそれぞれ周囲脂肪から剥離し、微小な血管は電気焼烙器を用いて止血した。門脈の腸管側に血管クランプを装着したのち、肝臓付近で結紮、切離して血管内をヘパリン加生理食塩液で洗い流した(図 1,B-1)。次に、後大静脈に腎静脈と外腸骨静脈の間で血管クランプを装着して血流を遮断したのち、血管壁に約 2mm の切開を行った(この切開は門脈の直径よりやや大きめに実施した)。9-0 ナイロンを用いて両サイドに支持糸を単純結紮縫合して牽引したのち、はじめに後壁の血管壁を連続縫合した(図 1,B-2)。その後、前壁の血管壁も同様に連続縫合した。血管クランプを除去し、出血がないことを確認した。出血が認められた場合には、追針することによってコントロールした(n=16)。

## (3) 吻合後の評価法

動脈吻合モデルでは、吻合後 1 日目、3 日目、28 日目に安楽死し、吻合部を肉眼的または組織学的に評価した。



門脈体循環シャントモデルでは、生存性をもとにテクニックの評価を行った。吻合後は、体重測定をし、その変動を確認した。生存可能であったラットにおいては、吻合後 7 日目に安楽死し、肝臓重量を測定した。

コントロールグループとして、開腹術のみを行ったグループを作成し、同様に体重と吻合後 7 日目の肝臓重量を測定した ( $n=3$ )。

#### (4) 統計学的解析

統計学的解析として、門脈体循環シャントモデル実験において、体重と肝臓重量をスチューデントの  $t$ -検定を用いて解析した。

全ての結果は、 $P<0.05$ をもって統計学的有意差とみなした。

## 2. 実験結果 ; ラット練習法を用いた吻合練習後の評価

### a. 動脈吻合練習法

ラットの腹部大動脈の直径は、ラットの体サイズによっておよそ 2~3mm であった。切離した腹部大動脈を再吻合するために、血管径により 8-13 針を必要とした。全部で 40 個体の腹部大動脈を吻合し、出血をコントロールするために 2 匹は追針を必要とした。しかしながら、これらの吻合練習ののち、死亡したラットは認められなかった。

吻合部の肉眼的または病理組織学的所見を図 3,A に示した。肉眼的には、吻合後 1 日目と 3 日目において、縫合糸が血管壁表面に露出した状態であった。しかしながら、吻合後 28 日目まで観察した個体では、縫合糸が血管内皮によって被覆されていた。病理組織学的検査からも、吻合後 28 日目において、吻合部の内皮化は完了しており、表面は平滑となっていることが確認された。

#### b. 静脈吻合練習法

門脈体循環シャントモデルを16匹行ったのち、吻合後24時間以内に2匹が死亡した。1匹は縫合部の狭窄であり、もう1匹は吻合するための虚血時間が1時間以上経過したためだった。静脈吻合した実験結果を表1に示した。吻合後7日目において、シャントグループのラットの体重は、コントロールグループと比較して有意に減少した(92.9%±2.5% vs. 101.7%±3.4%;  $p<0.05$ )。シャントグループにおける肝臓重量は、コントロールグループと比較して軽い傾向を示した(2.5±0.3 g/100g Body Weight vs. 2.7±0.1 g/100g Body Weight;  $p=0.28$ )。

吻合部の組織学的検査では、縫合部における血管表面の上皮化が完全に終了した所見が認められた(図3,B)。

### Ⅲ. Experiment 2 ; ネコ生体間腎臓移植の試み

#### 1. 材料と方法

##### a. 実験動物

実験ネコとして、アメリカンショートヘアー、体重 2.15～2.9kg（平均 2.5kg）、ネコ後天性免疫不全症候群とネコ白血病陰性の雄を用いた（n=9）。これらは、それぞれレシピエントネコまたはドナーネコとして使用された。これらの実験ネコは、Harlan Sprague Dawley (Madison, WI, USA)から購入し、遠藤犬猫病院にて維持、管理された。自治医科大学の動物倫理委員会によって承認され、動物福祉のために設定されたガイドラインに従って行った。

##### b. ネコ生体間腎臓移植における外科手技と周術期管理法

アトロピン（0.03 mg/kg）と塩酸メデトミジン（0.05 μg/kg）を皮下投与し、鎮静化した。その後、塩酸ケタミン（5 mg/kg）を静脈内投与し、イソフルランの吸入麻酔と純酸素にて維持した。腹部正中切開したのち、ドナーより腎臓を摘出した。この摘出した移植腎は、移植までの間冷保存した。レシピエントも同様に麻酔導入したのち、腹部正中切開にて開腹し、外腸骨動静脈を分離して、移植床を作成した。外腸骨動脈は近位部に血管クランプを、遠位部に結紮を行い、その間を切離した。外腸骨静脈は、遠位と近位にクランプを装着して、その間に移植腎の静脈の直径よりやや大きめの切開を加えた。移植腎を腸骨窩におさめ、ラットを用いたトレーニングプロトコールと同様な方法で吻合を実施した。つまり、腎動脈と外腸骨動脈は、8-0 ナイロン（Eticon, Johnson & Johnson、東京、日本）を用いて、端々吻合で単純結紮縫合を行った。

一方、移植腎の腎静脈は外腸骨静脈へ、7-0 ナイロン (Eticon、Johnson & Johnson、東京、日本)を用いて連続吻合により端側吻合した(図 4) (n=7)。9-0 ナイロンを用いて尿管膀胱吻合術を行った(図 4)。移植後、これらのネコは、免疫抑制剤であるサイクロスポリンを 5 mg/kg を目安に最低血中濃度を測定しながら投与した(1日2回)。同時にプレドニゾロンは 1 mg/kg から開始し、漸減的に 0.3 mg/kg まで減量して維持した(1日2回)。移植後7日目に開腹し、肉眼的に移植腎を評価した。

c. ドナーの腎血管奇形に対する外科的回避法

移植腎の腎静脈が2本分岐している個体に遭遇した(n=2)。これらの個体は、自家移植を行って、移植手技の複雑性を確認した。

腎静脈が2分岐していたネコのうち1匹においては、腎静脈をそれぞれ1本ずつ、外腸骨静脈へ連続縫合を用いて端側吻合した(図 5, A)。

もう1匹のネコでは、1本目の腎静脈を外腸骨静脈へ端側吻合したのち、もう1本の腎静脈を1本目に吻合した腎静脈へさらに端側吻合した(図 5, B)。これらの吻合は連続吻合を用いた。

1. 実験結果 ; ネコ生体間腎臓移植における結果

a. ネコ生体間腎移植における吻合時間と移植技術の評価

移植時間は、温阻血時間が  $59.1 \pm 21.7$  分、動脈吻合時間が  $21.4 \pm 7.2$  分、静脈吻合時間が  $28.4 \pm 4.3$  分であった。

移植を行った7匹中2匹において、再灌流後に静脈吻合部の軽度の狭窄が認められた。しかしながら、再吻合し直すことによって、速やか

に血流を改善することが可能であった。

移植後 7 日目に開腹した際には、7 匹中 2 匹において軽度の水尿管が認められた(28.6%)。残りの 5 匹においては移植腎の色調、尿管に異常は確認されなかった。

b. 血管奇形移植腎の移植後の吻合部における評価

移植腎の腎静脈が 2 本存在した奇形ネコにおいて、それぞれの血管径は腎静脈が 1 本の正常なネコの血管径と比較して非常に細く、吻合には高い技術を要した。しかしながら、ラットを用いた吻合練習によって、特殊な症例に遭遇した場合においても即時に対応可能であった。これら 2 匹の再灌流後の血流は良好であり、移植腎の色調や尿管吻合部にも問題は認められなかった。

#### IV. 考察

近年、ネコの腎臓移植は非可逆的腎臓病に罹患しているネコのための治療オプションの一つの選択肢として考慮されてきている[1,13,14,50,68,69,87]。しかしながら、この治療法は、多くの獣医師にとって、いまだ簡単に行える手技ではない。したがって、われわれは、マイクロサージカル技術を習得するために、適切なトレーニングプロトコールが必要とされていると考えた。一方で、マイクロサージカルテクニックの適用は一般外科、関連性のある外科領域、そして実験的研究モデルにおいて、需要が高まってきている[20,74,140]。この傾向は、獣医学領域においても同様な状況である[4,62]。特に超小型犬やネコにおける一般外科においては、重要なテクニックとなり得る。しかしながら、臨床の現場で患者に手術を施す際には、マイクロサージカルテクニックを学ぶ機会や、トレーニングするための機会は、基本的に制限されてしまうのが現状である[20,74]。これら教育的マイクロサージェリーは前臨床トレーニングとよばれ、初期段階では患者に対して行うことはできない[74]。また、動物倫理の観点から、獣医学領域において、愛玩動物のネコと実験動物のネコの間に、生命の差はないと考えている。さらに、実験を行う際に、実験動物を用いるコストはとても重要な要素であり、トレーニングのために用いるコストには限界がある[74]。世界的に、倫理的配慮、動物愛護に関する法律、経済的観点から、実験動物の飼養頭数を減らす方向へ向かっている[140]。マイクロサージェリー初心者は、人工のモデルを使用してマイクロサージカル技術を修得することは可能であるが、出血などの血管におけるいくつかの生物学的特性をうまくシミュレーションすることはできない[140]。実験と臨床の間のギャップを埋めるために、生体動物を用いて練習することは、初心者にとって必要な場合も存在すると考えられる[140]。さらに、ラットの血管サイズ、特に腹部大動脈と門脈は、ネコの腎動静脈とほぼ同サイズである。したがって、これらの理由（動物倫理、血管サイズ、経済

性)から、われわれはネコの腎臓移植のためのトレーニングとしてラットを用いることが適していると考えた。したがって、ネコの尿管や血管の吻合など腎臓移植のためのテクニックのみならず、一般外科領域でも用いることが可能となるような、獣医外科医のためのマイクロサージカルテクニックのトレーニングプロトコルの考案を試みた。

Experiment 1 において、動脈吻合モデルでは、初期トレーニングとして、ラットの腹部大動脈を端々吻合にて単純結紮縫合する方法を考案した。その理由は、このトレーニング法がテクニック的なエラーを出血の有無によって、簡潔に検出することが可能だからである。それにより、容易にテクニックを評価することができる。病理組織学的検査では、動脈吻合部において温阻血時間が9時間以上となると、血管壁に不可逆的な変化が発生すると報告されている[98]。一方、温阻血時間が6時間以内の場合では、組織の生存性を温存することが可能であるといわれている[98]。今回、われわれが行った動脈吻合練習は20分以内と短時間であり、病理組織学的所見からも組織の変化は認められず、この練習法を用いることによって速やかに手技の習得がなされたと考えられた。

一方、静脈吻合を練習するために、連続縫合を用いて門脈体循環シャントモデルを作成した。このモデルでは、吻合後の死亡の有無によって、テクニック的なエラーを検出することが可能である。

Omokawaらは、ラットモデルを用いて門脈基部を結紮することによって、門脈圧が5倍に上昇することを示した[103]。Moriuraらは、実験的に人為的な門脈狭窄を作成したところ、血行動態的变化をもたらすことをつきとめた[97]。さらに、正常の2倍以上の急激な門脈圧亢進がおこると、心拍出量が24%も減少することを示した[97]。たとえば、肝臓がおよそ25%の心拍出量を受けているとすると、門脈に血管クランプを装着して血流を遮断することによって、約25%の動脈血流が間接的に減少すると推測することができる[49]。以上から、急激な門脈圧の亢進

が、肝動脈の低灌流を招来する要因となる[96]。後大静脈にクランピングする際においても、心臓への静脈血流入量は減少する(75%)[97]。これにより、心拍出量も徐々に減少するため、結果として早急に死にいたる原因となる[97]。このために、長時間の門脈狭窄が、高い死亡率につながる一因となることがわかる。しかしながら、Monchikらは、温阻血時間が1時間以内であれば、腸管に組織学的な悪影響を及ぼすことはないと報告している[96]。以上より、本研究における門脈体循環シャント術では、吻合部位の狭窄と長時間の温阻血時間が、2匹のラットの死亡原因であったと考えられた。さらに、門脈-後大静脈吻合後、全肝血液量は50%以上減少しており、肝機能障害の発生は吻合後の肝血流量の重篤な低下と関連があると報告されている[79]。これによって、肝重量と体重の減少が誘発されたと考えられた。

Experiment 2として、実験ラットを用いてマイクロサージェリーのための適切なトレーニングを行ったのち、われわれは実験的ネコ生体腎臓移植を実施することとした。2匹では再吻合を必要とされたが、前述したトレーニングプロトコールを行ったことによって、安全に移植手技を全うすることが可能であった。さらに、血管奇形の症例においても、それぞれの症例に対応した、応用性をもったテクニックによって、即時に血管吻合を成功させることができた。近年、腎臓を腸骨窩に移植すると、腎臓が捻転する可能性があることが報告されるようになり[50]、腎動脈を腹部大動脈へ、また腎静脈を後大静脈へ端側吻合する方法が用いられるようになってきた[13,14](図6)。われわれが考案したトレーニングプロトコールは、このネコの腎臓移植法に対しても有用な練習法であると考えている。また、上述したように、現在の日本の獣医臨床では、超小型犬が増加している。このような症例に対しても、マイクロサージカルテクニックを習得しておくことは意義がある。

以上より、われわれが考案したラットを用いたマイクロサージカルトレーニングプロトコールは、ネコの腎臓移植のための有用な練習法であることが示された。さらに、



この練習法を用いてマイクロサージカルテクニックを習得したことにより、ネコの腎臓移植を安全にかつ迅速に実施することが可能であった。

## VI. 小括

ラットの腹部大動脈の端々吻合、後大静脈を門脈へ端側吻合する方法を用いて、ネコ腎移植のための練習法を開発した。

ラットの血管サイズ、特に腹部大動脈と門脈は、ネコの腎動静脈とほぼ同サイズである。したがって、われわれはネコの腎臓移植のためのトレーニングとしてラットを用いることが適していると考えた。Experiment 1において、動脈吻合モデルでは、ラットの腹部大動脈を端々吻合にて単純結紮縫合する方法を、静脈吻合モデルでは連続縫合を用いて門脈体循環シャントモデルを作成する方法を考案した。動脈練習法は死亡例もなく、速やかに習得できた。静脈練習法では2匹の死亡を確認したが、それ以外は肉眼的、病理組織学的に吻合部の狭窄もなく、手技を全うすることが可能であった。

さらに、Experiment 2として、マイクロサージェリーののための適切なトレーニングを行ったのち、われわれは実験的ネコ生体腎臓移植を実施することとした。2匹では再吻合を必要とされたが、前述したトレーニングプロトコールを行ったことによって、安全に移植手技を全うすることが可能であった。さらに、血管奇形の症例においても、それぞれの症例に対応した、応用性をもったテクニックによって、即時に血管吻合を成功させることができた。

以上より、われわれが考案したラットを用いたマイクロサージカルトレーニングプロトコールは、ネコの腎臓移植のための有用な練習法であることが示された。さらに、この練習法を用いてマイクロサージカルテクニックを習得したことにより、ネコの腎臓移植を安全にかつ迅速に実施することが可能であった。

## 第2章 ネコ生体間腎移植におけるドナーリスクの検討

### I. 緒言

現在獣医療で行われている腎臓移植は、実験ネコをドナーソースとした生体間腎移植が主体であり、ドナーにおける倫理的背景が大きな問題となっている[19,68]。

一方、ヒト移植医療の領域では、死体腎移植や脳死移植へ移行し始めており、生体間腎移植は減少傾向にある[75]。腎臓を提供するドナーのクライテリアを拡大した、新たなプログラムが公表されたにもかかわらず、2004年をピークに生体ドナーの使用数は減少しつつある[54,91,110,117,118,124,128]。これは、以前はドナーとして用いられてこなかった、特に、死亡した若齢または幼若なドナーからの腎臓提供を、生体ドナーよりも優先する新たな政策を遂行し始めていることにも関連する[104]。ヒトにおいては、World Health OrganizationやWorld Medical Association、Council of Europeなどから、ドナーに対するさまざまなガイドライン、規定、公文などが公表されており、ドナーの生命倫理に関して許容しうるリスクのレベルを規定したクライテリアを設けている[27,28,144,145]。さらに、2008年のイスタンブール宣言では、不正な臓器提供の防止、生体ドナーの保護と安全の確保のために、死体ドナーや脳死ドナーからの移植を世界レベルで拡大していくことを宣言していることも、生体ドナーを減少させている一因と考えられる[75]。

ヒトでは、生体ドナーには危険が常につきまっており、そのために、ドナーは臓器提供の際には意思表示をしなければならない[95]。特に、レシピエントと感情的親密性が深ければ深いほど、リスクが高かったとしても、ドナーはそれを許容しうることが多いと報告されている[95]。ここでも、意思表示できないドナーネコにとって、生体ドナーの生命倫理の壁は高く、解決のみえない問題となっている。

ヒトにおいて、生体ドナーは、長期的または短期的死亡率の上昇だけでなく、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病への発展リスクも上昇する可能性が示唆されている[82,125]。特に、複数本の腎動脈をもつドナーにおいては、臓器提供後に本態性高血圧の発症する可能性が高まるという報告は、数多くなされている[32,33,46,47,86,102]。

一方、長期的にドナーネコの経過を観察した報告はない。また、ネコでは尿石症の発生率が高く[5,58]、片側腎しかもたないドナーネコにとって、腎盂や尿管に結石が閉塞を起こした場合、致命的となり得る。

以上から、獣医療における腎移植においても、生体ドナーにおけるリスクや倫理的側面をもう一度見直す必要性に迫られていると考えている。

本章では、Experiment 1として、移植腎動脈が2本あるドナーに遭遇し、ドナー、レシピエント両者のリスクに関して検討した。さらに、Experiment 2として、腎臓を提供したネコにおいて、長期的経過を観察することによって、片側腎となった場合の腎臓へ与える影響に関して考察した。

## II. Experiment 1 ; 2分岐腎動脈のドナーネコの1例

### 1. 材料と方法

#### a. 症例

レシピエントはオス、10ヵ月齢、体重36 kg、ドナーはオス、4歳齢、体重3.9 kgの実験猫を使用した。術前の血液検査(血球検査、生化学検査、FIV、FeLV)では、二匹ともに正常であった。これらの実験猫はHarlan Sprague Dawley Co. Ltd. (Madison, U.S.A.)より購入した。この実験は自治医科大学における動物実験指針に従っておこなった。

#### b. 術式

##### ・ 周術期管理

硫酸アトロピン(0.03 mg/kg)と塩酸メデトミジン(0.05 mg/kg)を皮下投与した後、塩酸ケタミン(5 mg/kg)を筋肉内投与して麻酔導入したのち、気管内挿管してイソフルレン1-1.5%と純酸素で維持した。撓側皮静脈に留置を確保し、術中は乳酸加リンゲル液を点滴投与(5-10 ml/kg)した。血圧は非観血的に15分ごとの測定を行った(BP100D、フクダ ME Inc.、東京、日本)。塩酸ドパミン(1-2  $\mu$ g/kg/min、iv)または塩酸ヒドララジン(2.5 mg/head、s.c.)投与により、血圧を維持した。ドナーでは腎臓摘出20分前に、レシピエントではクランプアウト20分前にマンニトール(1 g/kg、i.v.)を投与した。

##### ・ ドナー操作

ドナーを常法通りに開腹し尿管を分離した。尿管の切離は尿管開口部の膀胱壁を付属した状態で行った[92])。切開した膀胱壁

は5-0 PDS II (Johnson&Johnson co., Brussels, Belgium)にて2層に連続縫合したのち、尿道カテーテルから生理食塩液を膀胱内に注入し漏れがないことを確認した。

左腎動脈は腹部大動脈から直接2本分岐していた(図 7)。左腎動静脈の血管壁を傷つけないようそれぞれ分離した。右腎動脈の分岐部を傷つけないように腹部大動脈をクランピングしたのち、まず、腎静脈を後大静脈に近い部分で4-0シルクにて結紮して切断した。次に、腹部大動脈-左腎動脈分岐部の腹部大動脈を筒状にメッツェンバウム剪刀にて切断し、左腎を摘出した(図 8, A)。cold bath中で2本の腎動脈を灌流した。cold bath中で2本の腎動脈からヘパリン加生理食塩液で灌流した(図 8, B)。腎動脈が付着した腹部大動脈壁を約3×5cmの楕円形に形成した(図 8, C)。

腹部大動脈の再建は7-0 SURGIPRO (United States Surgical Corporation, Norwalk, U.S.A)にて腹部大動脈の両端に支持糸をかけたのち、後壁、前壁の順で連続縫合した(図 9)。クランプアウトし、出血のないことを確認し、常法通り閉腹した。

#### ・ レシピエント操作

外腸骨動静脈を分離し移植床を準備した。外腸骨静脈をクランプしたのち、グラフトの腎静脈と同径の切開を加えた。ヘパリン加生理食塩液で血管内部を洗い流し、グラフトを移植床へ置いた。静脈吻合では、腎静脈-外腸骨静脈吻合部の両端に 8-0 ETHILON (Johnson & Johnson co., Somerville, U.S.A)で支持糸をかけ、まず前壁を連続縫合した。次に腎臓を反転させ、後壁も連続縫合した。クランプアウトし、静脈吻合部からの出血がないことを確認した。

動脈吻合では、大動脈から外腸骨動脈への分岐部を斜めに切開し、グラフトの動脈と径を合わせた(図 10)。腎動脈-外腸骨動脈の吻合は、端々吻合にて後壁より8-0 ETHILONを用いて単純結節縫合で行った。縫合終了後、クランプアウトし出血のないことを確認した(図 11)。

膀胱の漿膜と筋層は電気メスで止血をしながら切開した。膀胱粘膜はマイクロ剪刀にて、尿管と同径に切開した。移植腎とレシピエントの膀胱壁を7-0 SURGIPROにて単純結節縫合したのち、尿道カテーテルから生理食塩液を膀胱内に満たし漏れないことを確認した。

移植した腎臓を腸骨窩に収め、腹横筋と腎臓を数カ所単純結節縫合し、腹壁固定した。常法に準じて閉腹した。

・ 術後の免疫抑制剤投与

術後はシクロスポリン( 3-5 mg/kg )とプレドニゾロン( 0.25-0.5 mg/kg )を12時間毎に経口投与し、シクロスポリンの血中トラフ濃度を500 ng/mlになるように調節した。

## 2. 実験結果

ドナー、レシピエント共に、再灌流後の血流は肉眼的には良好であり、動脈遮断の影響や吻合部狭窄による後肢の麻痺、硬直は認められなかった。術後1ヵ月目の移植腎の血管吻合部の開通は良好で(図 12)、病理組織学にも移植腎の糸球体や尿細管はほぼ正常な組織構造を保っていた(図 13)。

### III. Experiment 2 ; 腎臓提供後のドナーネコの長期経過観察

#### 1. 材料と方法

これまで、ネコ実験的生体腎臓移植を実施した際に腎臓を提供したドナーネコ(n=9)のうち、長期経過を観察できた2匹のネコにおいて、定期的に血中尿素窒素(Blood Urea Nitrogen ; BUN)、血清クレアチニン(Serum Creatinine ; Cre)を測定し、経時的、長期的に腎臓機能の変化を確認した。この2匹の実験ネコは雄のアメリカン・ショートヘアーであり、cat 1は2歳齢で、cat 2は4歳齢で腎臓を提供した。

#### 2. 結果

Cat 1では、腎臓提供後より、徐々にBUN、Creの上昇が認められた。8歳齢のころから、皮下点滴や投薬を継続することによって、腎機能を維持していたが、現在においても正常値より高い値で推移している(図14)。

Cat 2では、8歳齢ころまではほぼ正常範囲内で推移していたが、9歳齢のときに原因不明の急性の腎機能障害が認められた(図15)。一時は乏尿となり、生命維持も難しい状態と考えられた。しかしながら、プレドニゾロン(2 mg/kg, s.c.)、皮下点滴などの集中的な内科治療を行ったところ、一命を取り留めた。

また、2匹共に、尿石症の既往があり、処方食により維持している。



#### IV. 考察

本章では、ドナーのリスクに関して、実際に腎移植に関わったいくつかの生体ドナーの結果をもとに、短期的または長期的に経過を観察することによって検討することが目的である。

Experiment 1において、ドナーの左腎動脈は2本あり、それぞれ腹部大動脈から直接分岐していた。この2本の腎動脈を吻合する方法としては、① 2本ともドナーの外腸骨動脈に端側吻合する方法(図 16,A-1)、② 1本だけ端々吻合する方法(図 16,A-2)、③ 腎動脈が付属した状態で腹部大動脈壁ごと摘出し、レシピエントの腹部大動脈から外腸骨動脈への分岐部と端々吻合する方法(図 16,B)が考えられた。しかし、①は、血管径が細いため、狭窄や血栓形成の可能性が高かった。②は、2本の腎動脈をそれぞれ一本ずつ縫合する血管を確保出来なかった。そのため、③の方法を選択しなければならなかった。

レシピエントの外腸骨動静脈に腎動静脈を吻合する方法は12~62%の確率で後肢の麻痺、痛み、浮腫、低体温などを起こすといわれている[1,14]。しかし、今回のレシピエントでは、吻合による後肢への血流遮断や吻合部狭窄などによるこれらの症状は認められなかった。腹部大動脈を血流遮断したドナーにおいても、クランプアウト後の血流は良好で、後肢の麻痺や機能障害、冷感などの症状はみられなかった。ラットの報告では、6時間以内の腹部大動脈血流遮断は、組織の生存能力には影響しないといわれている[98]。今回の腹部大動脈、または外腸骨動脈の血流遮断時間はおよそ1時間であった。以上のことから、組織への傷害は最小限であり、機能障害が認められなかったと推察された。

通常、左腎が移植腎として適している理由は、左腎静脈が右腎静脈よりも長いからである[13,50]。吻合術を簡単にするためには、グラフトの腎動脈が1本であることが最良であり[50,68]、左腎動脈が2分岐している場合には右腎をグラフトと

して用いる場合もあるが[68]、今回の症例は右腎も2分岐していた。これにより、今回は2本の腎動脈を持っている左腎を移植せざるを得なかった。左腎動脈が2分岐している確率は10%程度であり[116]、両側とも腎動脈が複数発生することは臨床上まれである[68]。本来、移植に先立ち、ドナーの腎動脈の走行を確認することは大変重要である。人の腎移植においては、ドナーの摘出する腎臓を決定するために、術前に造影レントゲン検査やシンチグラフィーなどの検査により腎機能、腎臓への血管走行を確認している[18]。しかし、現在の猫腎移植の分野ではルーチンに行われず、開腹してから血管の確認をしているのが現状である[68]。過去には、ドナーのスクリーニング試験として、排泄性尿路造影法を行い、これにより推測する方法も用いられた[68]。しかし、これら検査が行われない理由として、ネコにおける造影検査では、血管が細いためはっきりとした血管走行が確認できない可能性が高いこと、シンチグラフィーはコストが高く腎移植のために行うには現実的でないことなどが挙げられる。これらのことから、開腹するまでドナーにおけるリスクを読み取ることができない危険性と常に隣り合わせであることがうかがえる。

通常、腎動脈が1本しかない場合、腎動脈を結紮して結紮部の腎臓側で切断する方法で行うが、腎動脈が2本ある場合は腎動脈の分岐している腹部大動脈壁の一部をパッチとして付属したままの状態でも腎臓を摘出する[68]。今回、我々もこの方法で行うことも検討したが、この症例では、大動脈パッチとして腎動脈を切離すと、切除範囲が大きくなるために縫合の際に大動脈が狭窄するおそれがあった。したがって、左腎動脈分岐部の大動脈を完全に切離し、切断部の頭側、尾側の腹部大動脈断端を端々吻合することにした。その結果、狭窄もなく、術後の血流も肉眼的には良好であり、本論文で述べた方法によりこの症例に良好な腎移植が行えたと考えられる。われわれが即座に対応しうるマイクロサージカルテクニックを習得していたために、このような症例を的確に移植することが可能であったが、しかしながら、大動脈の切断がドナーにとって大きなリスクとなることは否定で

きない。

ヒトにおいて、生体ドナーは、長期的または短期的に死亡率が上昇するといわれるだけでなく、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病に発展する可能性も上昇することが示唆されている[82,125]。特に、複数本の腎動脈をもつドナーにおいては、臓器提供後に本態性高血圧の発症するリスクが上昇するという多くの報告がなされている[32,33,46,47,86,102]。また、ヒトにおいて、複数本の腎動脈をもつ腎臓を移植することによって、吻合部の狭窄や血栓形成の発生率が上昇し、レシピエントにおける短期的または長期的移植成績が悪化するといわれている[11,52,119]。したがって、ドナーだけでなく、レシピエントにもリスクが波及する可能性を示唆している。

Experiment 2では、ドナーとなったネコの長期経過について検討した。ネコにおける尿石症の発生率はかなり高く、尿石による閉塞が発生した場合、後遺症として慢性腎臓病へ移行する確率も高いとされている[5,58]。ドナーとして腎臓を提供すると必然的に片側腎となり、残り一つの腎盂や尿管に結石が閉塞を起こした場合、致命的となる。今回の2匹においても、尿石症の既往があるため、このような状態に陥る可能性は高く、ドナーにおける一つのリスク要因である。さらに、ドナーネコにおいて長期的な経過観察をした報告はない。慢性腎不全の発症は10歳齢ころより高くなり始め、高年齢になるほど罹患率は高くなる[39]。15歳を超えると死因の50%を占めるともいわれている[39,107]。今回の結果から、2匹共に、より若い年齢で腎機能の悪化が認められ、治療が必要となり、腎臓提供が腎臓病発症リスクを高める可能性が示された。また、1匹のネコでは、急性に腎障害を発症して乏尿となり、一時は死亡するかと思われた。危機は脱したものの、現在でも2匹共に治療を継続しており、生体ドナーのリスクを明確化したケースであった。

腎移植は慢性腎不全と不可逆性急性腎不全に対する一治療法として確立しているが[13,68,69]、ドナーの安全性確保は重要なポイントである。今回の例のよ

うにリスクの高い症例が臨床上あり得ないとは言いきれず、応用性をもったマイクロ技術の修練が[60]必須であると考えられた。

本章では、ネコ生体ドナーにおけるリスクや生命倫理のハードルは、かなり高いことが明らかとなった。よって、獣医臨床においても生体ドナーから死体ドナーなどへの変遷が必要な時期に直面しており、これら多くの問題を乗り越える心停止後腎移植方法などの検討が急務であることが示唆された。

## V. 小括

現在獣医療で行われている腎臓移植は、実験ネコをドナーソースとした生体間腎移植が主体であり、ドナーにおける倫理的背景が大きな問題となっている。ヒトでは、生体ドナーには危険が常につきまっており、そのために、死体腎移植や脳死移植へ移行し始めており、生体間腎移植は減少傾向にある。一方、ネコ生体腎臓移植におけるドナーネコの長期的な経過観察をした報告はない。そこで、獣医療においても、生体ドナーにおけるリスクや倫理的側面をもう一度見直す必要性に迫られていると考えている。

Experiment 1として、腎動脈が腹部大動脈から直接2本分岐したドナーネコの1症例に遭遇し、ドナー、レシピエント両者のリスクに関して検討した。ヒトにおいて、生体ドナーは、長期的または短期的に死亡率が上昇するといわれるだけでなく、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病に発展する可能性も上昇することが示唆されている。特に、複数本の腎動脈をもつドナーにおいては、臓器提供後に本態性高血圧の発症するリスクが上昇することや、また、レシピエントにおいては吻合部の狭窄や血栓形成の発生率が上昇し、レシピエントにおける短期的または長期的移植成績が悪化するといわれている。今回、ドナーネコは腹部大動脈自体を切離して腎臓を摘出しなければならず、腎臓摘出と動脈再建はうまく実施できたが、ドナーの危険性はかなり高いものとなった。

さらに、Experiment 2として、腎臓を提供したネコにおいて、長期的経過を観察することによって、片側腎となった場合の腎臓へ与える影響に関して考察した。腎臓を提供したネコ(n=9)のうち長期的に経過観察可能であった2例では、腎臓提供後に腎機能の悪化が認められた。また、尿中に結晶が観察され、閉塞などのリスクも上昇する可能性を示唆した。

以上から、ネコ生体ドナーにおけるリスクや生命倫理のハードルは、かなり高いことが明らかとなった。よって、獣医臨床においても生体ドナーから死体ドナーなどへの変遷が必要な時期に直面しており、これら多くの問題を乗り越える心停止後腎移植方法などの検討が急務であることが示唆された。

### 第 3 章 ラットマージナル腎移植モデルを用いた保存方法の検討

#### I. 緒言

本章では、前 2 章の結果を受け、生体腎移植におけるドナーのリスクを回避すべく、死体腎移植の基礎的実験を行うことが目的であり、ネコにおけるマージナル腎移植を最終目標とし、その前臨床実験としてラットを用いた基礎的研究を実施することにある。

ラット腎移植モデルは、高度なマイクロサージェリーテクニックを要し、この腎移植モデルを作成するにあたって安定した結果をだせる状態であることが必要である。以前我々は、生存しているラットから腎臓を摘出して移植するというモデルを作成し、安定した結果を出すことに成功している[42]。この手法を用いて、心停止後時間経過したマージナル腎を移植するというモデルの作成を試みた。

一方、ヒトでは心停止後ドナーのカテゴリー分類が 4 つに分類されている[77]。このなかでも、生命維持治療を施されているドナーまたは脳死から心停止したドナーは、心停止までの状況をコントロールでき、移植までの時間をコントロールすることが可能である。しかしながら、心停止した状態で病院へ搬送された患者または心肺蘇生が不可能であった患者においては、臓器への虚血時間が長く、移植に不向きとされている[77]。このような心停止後時間経過したマージナルな腎臓は、移植成績の悪化や移植費用の増加など多くの問題をかかえている[109]。生体間や脳死移植と比較して、心停止ドナーからの腎臓は虚血／再灌流傷害を受けやすく、移植臓器の初期機能不全や機能遅延が高率で発生する主な原因となっている[115,126]。実際に、機能遅延が存在すると、急性拒絶反応の発生リスクが上昇し、移植後 5 年間における移植片の喪失率は 2 倍に達する[106,147]。

マージナル臓器の機能を維持するために、移植臓器の様々な保存法が開発、

推進されている[56,99,130,136]。最も一般的に用いられている保存法は冷保存であり、その理由として、代謝や酸素要求量を低下させることが可能であることと簡便であることがあげられる[130]。しかしながら、近年、常温での保存や灌流が再び提唱されるようになってきた[57,70,71,130,]。例えば、冷灌流と比較して、常温灌流することによって微小循環から血液を早急に洗い流すことが可能である[71]。また、常温保存は血管収縮を抑制し、血管上皮細胞や血液の細胞成分の細胞膜が硬化するのを防止するといわれている[71]。これらの作用は、虚血／再灌流傷害における重要なメカニズムである no-reflow 現象を改善することに役立つ[71]。一方、冷保存は復温する際に、急性尿細管壊死で観察される状態と類似した尿細管細胞の超微形態的な変化を誘発し、腎不全へと発展することが知られている[137]。

保存液は、細胞外液型組成と細胞内液型組成の大きく2つに大別することができる。細胞外液型組成保存液には Extracellular-Trehalose-Kyoto 液 (ETK 液) が存在する。ETK 液は本来、肺組織の保存液として開発された[8,66]。ETK 液はトレハロースとグルコネートを含有している。これら2つの異なる成分は細胞保護効果を有しており、細胞浮腫を防止するために役立っている[10,30]。ETK 液は高ナトリウム(Na)／低カリウム(K)組成で、細胞外液と類似しているため、高K組成によって引き起こされる血管収縮や細胞浮腫を防止する効果がある[113,148]。組織の線維化は細胞浮腫に関連していると考えられているため[40,113]、浮腫軽減効果は重要である。一方、細胞内液型組成保存液には、University of Wisconsin 液 (UW 液) や ETK 液を細胞内液型組成に変更した Intracellular-Trehalose-Kyoto 液 (ITK 液) が存在する。細胞内液型組成では、高カリウムによって誘発される血管収縮によって、再灌流後も長時間臓器虚血が継続するといわれている。さらに、ETK は、3年以上常温で保管できるなど、その他の多くの利点をもっている[148]。この長期保存性は、University of Wisconsin



(UW)液と比較して大幅なコスト削減をもたらすといったメリットを有している。

本章では、ネコに対する前臨床実験として、ラットを用いたマージナル腎移植モデルを作成し、マージナル腎に適した保存方法を検討する基礎的研究を行った。さらに、保存方法によって腎機能に影響を与える細胞浮腫についても検討した。

## II. 材料と方法

### 1. 実験動物

体重260～310gの雄のwild type Lewis (LEW) ラットをチャールズリバー (Breeding Laboratories、神奈川、日本)より購入し、実験に供した。これらのラットは、温度、湿度を一定に保った状態で、明暗を12時間ごとに調整した飼育室で飼育し、餌と水は自由摂取可能な環境で管理した。全ての実験は、北里大学と自治医科大学の動物倫理委員会によって承認され、動物福祉のために設定されたガイドラインに従って行った。

### 2. ドナーからの腎臓摘出法

ドナーラットをイソフルランで麻酔導入したのち安楽死し、23℃の室温に1または2時間静置した(表2、心停止後時間)。その後、左腎の腎動静脈をそれぞれ腹部大動脈と後大静脈の分岐部で切離し、できる限り血管の長さ確保した。尿管も同様に長めに分離し、切断して左腎を摘出した。

### 3. 保存方法

表2に提示したように、摘出した腎臓をそれぞれの保存液、保存温度、保存時間で保存し、レシピエントに移植した。それぞれの保存液の組成は表3に示した。保存温度を一定に保つために、4℃は冷蔵、23℃に室温を調整、37℃は恒温槽に入れてコントロールした。それぞれの保存時間が経過したのち、レシピエントに移植した。

### 4. ラットマージナル腎臓移植方法の開発

保存時間の間に、レシピエントをイソフルレンで麻酔導入し、移植を行っ

ている間維持した。レシピエントの腹部大動脈と後大静脈を分離し、移植腎の腎動静脈と同径の切開を加えた。レシピエントの左腎を摘出し、尿管は腎臓の基部で切断した。10-0 のナイロン糸(ケイセイ医科工業株式会社、東京都、日本)を用いて、移植腎の腎動脈を腹部大動脈へ、腎静脈を後大静脈へ連続縫合で端々吻合した。移植腎の尿管を腎盂に近い部位で切断し、レシピエントの尿管と11-0(ケイセイ医科工業株式会社、東京都、日本)のナイロン糸を用いて単純結紮縫合で端々吻合した[42]。最後に、右腎を摘出して、3-0 吸収糸(モノディオックス®、アルフレッサファーマ株式会社、大阪府、日本)にて連続縫合で閉腹した(図 17)。

#### 5. マージナル腎臓移植後の生存性と腎機能

心停止後の時間、移植腎の保存液、保存温度の違いによって、それぞれ実験を3段階に分類した。それぞれの実験の生存性と腎機能の結果について検討した。

ラットの生存は毎日同時刻に確認し、移植後14日目まで生存したラットは安楽死させた。

全血球計算(Complete Blood Count ; CBC)、血中尿素窒素(Blood Urea Nitrogen ; BUN)、血清クレアチニン(Serum Creatinine ; Cre)を測定するために(AU400、Beckman Coulter、Inc.、Brea、CA、USA)、移植前と移植後14日目まで2日おきに採血をおこなった。採取した血液は、CBCまたは血液生化学検査のために、EDTAまたはヘパリンナトリウムと混和した。EDTAと混和した血液を用いて採血直後にCBCの測定を行うとともに、ヘパリンナトリウムと混和した血液は3000 rpmで5分間遠心分離し血清を採取した。採取した血清は、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

a. Experiment 1: 心停止後の経過時間の違い

心停止させたドナーラットを 23℃の室温に一定時間静置したのち腎臓移植し、そのレシピエントラットが生存可能かを検討した。表 2 (Experiment 1)に示したように、心停止後 1 時間または 2 時間静置したドナーから左腎を摘出し、保存せずただちに、両腎を摘出したレシピエントラットに移植した。

b. Experiment 2: 心停止後のマージナル腎における保存温度の影響

細胞外液型組成の保存液の影響を調べるために、心停止後 1 時間の移植腎(以下、マージナル腎)を保存液の保存温度を変化させて 1 時間または 2 時間保存したのち、レシピエントにラット移植した(表 2、Experiment 2)。保存液は、細胞外液型組成液である Extracellular-Trehalose Kyoto 液(ETK 液 ; ETK 液<sup>®</sup>、大塚製薬工場株式会社、鳴門、日本)、ラクトリンゲル液(LR 液 ; 大塚製薬工場株式会社、鳴門、日本)を用いた。

c. Experiment 3: 心停止後のマージナル腎における保存液組成の影響

保存液の細胞外液型組成液(ETK 液)と細胞内液型組成液の比較をするために、マージナル腎を後述の保存液に 1 時間保存したのち、レシピエントラットに移植した(表 2、Experiment 3)。細胞内液型組成液として、Intracellular-Trehalose Kyoto 液 (ITK 液 ; 大塚製薬工場株式会社、鳴門、日本)、University of Wisconsin 液 (UW 液 ; ViaSpan<sup>®</sup>、DuPont Pharmaceuticals、Wilmington、DE、USA)を用いた。

## 6. 移植後の腎機能と病理組織学的線維化スコア

移植後 14 日目まで生存したラットの移植腎のみ、病理組織学的検査に供した。生存したラットを安楽死して移植腎を摘出し、10%ホルマリンに浸漬させて固定したのち、パラフィンにて包埋した。パラフィン包埋した検体を 2  $\mu\text{m}$  の厚さでスライスし、腎臓間質の線維化を評価するためにアザン染色を行った。以前報告されている方法に従って[78,131]、線維化を段階分けしてスコア化した。線維化の指標は、図 18 に示した。線維化なし(0)、線維化軽度(1)、線維化中程度(2)、線維化重度(3)とスコアを設定した。全ての標本を4人の観察者が盲目的に観察し、それぞれの標本に対して、一人あたり 20 視野の観察を行って評価した。

## 7. マージナル腎の腎重量に対する保存液と保存温度の影響

ヘパリン化したラットを麻酔下で頸椎脱臼し安楽死したのち、23°Cの室温で1時間静置した。左または右の腎臓を摘出したのち、腎動脈から4°CのETK液またはUW液で還流し、それぞれの腎臓の重量を測定した(この重量をコントロールとした)。次に、還流した保存液と同じ保存液を用いて、いくつかの保存温度(4°C、23°C、37°C)で2時間保存したのち、腎臓重量を測定した。腎臓重量は腎臓周囲に付着した液体成分を清布したのち、精密てんびんにて測定を行った。これらの測定値は、コントロールとのパーセンテージの差で表記した。

## 8. 統計学的解析

データは平均 $\pm$ SDで示した。生存曲線は、Kaplan-Meier法を用いて表記し、生存統計はLog-Rankテストによって行った。

BUN、Cre の反復測定値は、2 群間の場合はスチューデントの t-テスト、3 群または 6 群の場合はノンパラメトリック検定 (Kruskal-Wallis テスト) を用いて比較した。

病理組織学的スコアは、一元配置分散分析を用いて評価した。

腎重量の分散は、バートレット検定で等分散性の検定をしたのち、つづいてダネット検定を行った。それぞれの温度におけるグループ間の比較は、等分散性の検定を F 検定にて行ったのち、スチューデントの t-検定を用いて解析した。

全ての結果は、 $P < 0.05$  をもって統計学的有意差とみなした。

### III. 実験結果

#### 1. マージナル腎臓移植後の生存性と腎機能

##### a. Experiment 1: 心停止後の経過時間の違い

心停止後ドナーから摘出した腎臓を移植した全てのラットの生存性を表 2、図 19,A に示した。心停止したラットを 1 時間 (CD1h グループ) または 2 時間 (CD2h グループ)、23°C の室温に静置し、保存せずに直接レシピエントに移植すると、CD1h グループのみが生存可能であった。一方、CD2h グループのラットは、移植後 5 日以内に全て死亡した。よって、CD1h グループの生存率は、CD2h グループの生存率と比較して有意に延長した ( $p < 0.01$ )。

Experiment 1 の移植前後の BUN と Cre の変化を図 19,B, C に示した。生存可能であった CD1h グループにおける BUN と Cre の推移は、移植後 2 日目に最高値を示したのち、移植後 14 日目までにはほぼ正常値まで回復した。しかしながら、CD2h グループは生存期間中最後まで上昇し続ける傾向が認められた。CD1h グループでは、生存率の低い CD2h グループと比較すると、ピークの値も低く、回復する速度も速い傾向が確認された。

##### b. Experiment 2: 心停止後のマージナル腎の最適な保存温

Experiment 2 では、Experiment 1 の結果から、マージナル腎を細胞外液型組成の保存液を用いて保存時間、保存温度を変えてレシピエントラットに移植した。23°C の ETK 液で 1 時間保存したグループ (ETK23 グループ) は、平均生存期間が  $12.2 \pm 4.0$  日であり、そのほかの全てのグループの平均生存期間 (4°C の ETK 液で 1 時間保存したグループ

[ $3.7 \pm 0.6$  日]、 $37^{\circ}\text{C}$ の ETK 液で 1 時間保存したグループ [ $2.7 \pm 0.6$  日]、 $4^{\circ}\text{C}$ の LR 液で 1 時間保存したグループ [ $3.0 \pm 1.0$  日]、 $23^{\circ}\text{C}$ の LR 液で 1 時間保存したグループ [ $6.3 \pm 5.2$  日]、 $23^{\circ}\text{C}$ の ETK 液で 2 時間保存したグループ [ $3.3 \pm 1.3$  日])と比較して有意に延長した ( $p < 0.01$ ) (表 2、図 20,A)。

Experiment 2 の移植前後の BUN と Cre の変化を図 20B,B',C,C'に示した。生存可能であったレシピエントラットの BUN と Cre の推移は、移植後 2 日目に最高値を示したのち、移植後 14 日目までにはほぼ正常値まで回復した。生存率の高い ETK23 グループは、そのほかの生存率の低いグループと比較すると、ピークの値も低く、回復する速度も速い傾向が確認された。しかしながら、死亡したレシピエントラットの BUN、Cre の推移は、生存期間中最後まで上昇し続ける傾向が認められた。

これらの結果から、マージナル腎の生存能力を 1 時間延長させ、移植後のレシピエントラットの生存性を維持する最適な保存方法は、常温保存であることが示唆された。

### c. Experiment 3: 心停止後のマージナル腎の最適な保存液組成

Experiment 2 の結果より、マージナル腎を保存するためには常温保存が適していることが示唆された。したがって、Experiment 3 では、細胞外液型組成の ETK 液と比較するため、細胞内液型組成の ITK 液、UW 液を用いて、温度を変化させて検討した。 $4^{\circ}\text{C}$ の UW 液で 1 時間保存したグループ (UW4 グループ)において、生存可能であったレシピエントラットは 1 匹のみであり、平均生存期間は  $4.7 \pm 4.7$  日であった。しかしながら、 $23^{\circ}\text{C}$ の UW 液で 1 時間保存したグループ (UW23 グループ)は、移植後 5 日以上生存可能であったレシピエントラットは存在せず、平均



生存期間は  $3.0 \pm 1.1$  日であった。23°C の ITK 液で 1 時間保存したグループ (ITK23 グループ) は、UW4 グループ ( $p=0.09$ )、UW23 グループ ( $p<0.01$ ) と比較して明らかに高い生存率となった (図 21,A)。ETK グループと比較すると ITK23 グループ ( $9.5 \pm 4.3$  日) の生存性への効果は劣っているが、両群間に有意な差は認められなかった ( $p>0.05$ )。ETK23 グループと UW4 グループ ( $p<0.05$ )、UW23 グループ ( $p<0.01$ ) を比較すると、ETK23 グループにおいて有意に生存率が延長した (表 2、図 21,A)。

Experiment 3 の移植前後の BUN と Cre の変化を図 21 B、C に示した。生存可能であったレシピエントラットの BUN と Cre の推移は、移植後 2 日目に最高値を示したのち、移植後 14 日目までにはほぼ正常値まで回復した。生存率の高い ITK23 グループでは、そのほかの 2 グループと比較して、ピークの値も低く、回復する速度も速い傾向が確認された。しかしながら、死亡したレシピエントラットの BUN、Cre の推移は、生存期間中最後まで上昇し続ける傾向が認められた。

## 2. 病理組織学的線維化スコア

移植後 14 日目まで生存可能であったラットのみ、移植腎の線維化の度合を比較するために、アザン染色を行い評価した。病理組織学的スコアを図 18 に示した。CD1h グループ (Experiment 1)、ETK23 グループ (Experiment 2)、4°C の LR 液で 1 時間保存したグループ (LR23、Experiment 2)、UW4 グループ (Experiment 3) の線維化スコアはそれぞれ、 $2.0 \pm 0.4$ 、 $1.76 \pm 0.5$ 、 $1.57 \pm 0.6$ 、 $2.1 \pm 0.5$  であった。CD1h グループは生存率が高かったにもかかわらず、移植腎の線維化が激しく起こっており、重度の組織損傷が示唆された。これらグループ間の線維化スコアに有意な差

は認められなかったが、ETK23グループとUW4グループの線維化は、他のグループの線維化と比較して抑制された傾向にあった(図 22)。したがって、ETK液とUW液などの保存液を用いることによって、心停止後のマージナル腎の組織損傷を軽減する可能性が認められた。

### 3. 保存後の腎重量の変化

心停止後の腎臓重量の測定は、4℃、23℃、37℃におけるETK液、UW液を使用した場合に発生する組織浮腫を評価するために行った(図 23)。4℃のETK液で保存した腎臓と比較して、腎臓重量は23℃のETK液( $p<0.05$ )、37℃のETK液( $p<0.001$ )で保存した腎臓重量の方が有意に低下した。組織浮腫はUW液においても、4℃で保存した場合と比較して、23℃で保存した場合( $p<0.01$ )、37℃で保存した場合( $p<0.05$ )の両グループとも減少した。しかしながら、この浮腫軽減効果は、UW液と比べるとETK液の方が明らかに高い傾向が認められた。特に、37℃の保存温度で比較すると、ETK液で保存した場合、UW液で保存した場合よりも腎重量が有意に低下した( $p<0.001$ )。

#### IV. 考察

本章では、ネコの前臨床実験として、ラットを用いたマージナル腎移植モデルを作成し、マージナル腎の保存状況によって、レシピエントラットにおける生存性または移植腎機能の維持が可能かどうかの基礎的研究を行った。

ヒトにおいては、カテゴリー分類でⅢまたはⅣに相当する、心停止した状態で病院へ搬送された患者または心肺蘇生が不可能であった患者においては、臓器への虚血時間が長く、移植に不向きとされている[77]。これらマージナル臓器は、虚血/再灌流傷害を受けやいため、移植後成績の悪化をもたらし[19,124]、基本的には移植に用いない方針となっている[77]。しかしながら、ヒトにおいては臓器不足が深刻化しており、高齢ドナーや心停止後ドナー、または、移植腎の長期生存性に影響を与える併発症をもつドナーなどの臓器でさえも使用しなければならない状況に陥っている[114,126,129,141]。したがって、そのマージナル腎を蘇生する保存方法を検討する必要があると考えられた。

今回我々は、マージナル腎を常温保存する場合、ETK液を用いて保存することによって、その他のUW液やITK液を用いて保存した場合より生存率が向上することを明らかにした。この一つの理由として、保存液中のナトリウム/カリウム組成の違いが関与している可能性が考えられた。特に、ETK液の電解質組成は高ナトリウム/低カリウム組成となっており、細胞外液の組成と類似している(表3)。それとは逆に、UW液とITK液は低ナトリウム/高カリウム組成であり、細胞内液組成と類似した組成となっている(表3)[94]。さらに、Faureらは、ブタの自家腎臓移植モデルにおいて、臨床で一般的に用いられているUW液と、UW液を高ナトリウムに電解質組成を変更したバージョンを冷保存で用いて比較したところ、高ナトリウム組成に変更したUW液において糸球体濾過量、尿中タンパク質、腎臓間質の線維化、CD4+細胞の細胞浸潤が軽減されたと報告した[40]。これらの結果は、

我々が行ったETKグループとITKグループ間の生存率の比較において、ETKグループの方がITKグループよりも良好な生存率を示したことを支持している。したがって、細胞外液型組成の保存液において、細胞内液型組成の保存液と比較して、常温保存下ではマージナル腎の保存により適していたことを示すことが可能であった。

常温保存における重要なポイントの一つは、重篤な損傷を受けた臓器の細胞浮腫を防止することである。これまでの報告では、組織の線維化は細胞浮腫に関連していると考えられている[40,113]。興味深いことに、ETK液中に含まれるトレハロースやUW液中に含まれるラフィノースのような糖質は、細胞が浮腫に進行するのを阻止する能力がある。保存後の腎臓重量の違いは、虚血／再灌流傷害によって引き起こされる細胞浮腫によって影響される[73]。今回のわれわれが行った腎臓重量測定解析では、ETK液で保存することによって腎臓重量は温度依存性に減少した。一方で、UW液では腎臓重量減少効果はETK液と比較して弱かった。トレハロースは、一層性により側方向に拡散することができ、さらに、タンパクや核酸の安定化に関して、ラフィノースより遙かに優れていると報告されている[30,41,63,149]。また、相転移温度はETK液が24℃、ラフィノースが17℃であり[22,29]、トレハロースの入ったETK液が23℃の室温で使用するのに適していた可能性が考えられた。イヌとヒトにおける報告では、常温灌流は生命を維持させる機能をもたらしたのに対して、低温でも機械灌流では生存させることができなかった[16,57]。

本章の結果から、ラットにおいては心停止後1時間目までの腎臓(マージナル腎を)移植した場合、生存することが可能であることが示され、これをマージナル腎移植モデルとした。さらに、虚血／再灌流傷害を受けやすいマージナル腎を細胞外液型組成の保存液であるETK液を用いて保存することによって、移植までの時間を延長することが可能であった。さらに、ETKは温度依存性に細胞浮腫を軽減

させたが、37℃の保存では移植後にレシピエントラットが生存不可能であったため、マージナル腎の保存には、細胞外液型組成のETK液を常温で用いる保存法が最適であることが示された。

## V. 小括

生体ドナーのリスクを受け、ラットを用いて死体腎移植モデルを作成し、基礎的研究を試みた。

Experiment 1として、心停止後1時間、室温23℃で静置したラットから腎臓(マージナル腎)を摘出して移植されたレシピエントラットは全て移植後14日目まで生存したが、心停止後2時間静置したラットの腎臓を移植した群においては移植後5日以内に全て死亡した。

この結果より、Experiment 2として、マージナル腎を細胞外液型組成のETKとラクトリンゲルを用いて4,23,37℃で保存し、移植までの時間をさらに延長することが可能か検討したところ、23℃のETKで1時間保存した群(ETK23)はその他の群と比較して有意に生存率が向上し、マージナル腎の保存には常温保存が適している可能性が示唆された。

次に、Experiment 3として、細胞内液型組成のITKとUWを用いて、同様の検討を行った。全ての群において、ETK23よりも生存率が著名に短縮した。よって、マージナル腎の保存には細胞外液型が適している可能性を示した。

全ての実験を通して、全グループの移植後腎機能は、血中尿素窒素、クレアチニンともに移植後2日目に最高値を示し、14日目までにほぼ正常値まで回復した。

生存した個体における線維化スコアに有意差は認められなかった。

よって、マージナル腎の保存には細胞外液型保存液で常温保存することで保存時間を延長することができ、移植後の生存性を改善することが示唆された。

また、4,23,37℃に設定した保存液でマージナル腎を保存したのち、腎重量を測定した。ETK液は温度依存性に保存による腎重量を軽減させることが明らかとなった。腎重量の減少は、細胞浮腫の軽減を意味するために、ETK液は線維化

につながる細胞浮腫をも軽減する可能性を示唆した。

よって、マージナル腎の保存には、細胞外液型組成の ETK 液を常温で用いる保存法が最適であることが示された。

## 第4章 ラット心停止ドナーから抽出した腎臓におけるエネルギー活性

### I. 緒言

イメージング技術の近年の進歩は、リアルタイムに細胞または分子生物学的出来事を明らかにし、生体動物内で起こっている生物学的過程を理解する助けとなる。くらげ (*Aequorea Victoria*) から抽出された Green Fluorescent Protein (GFP) やホタル (*Photinus pyralis*) から分離された Luciferase のような、生存細胞におけるタンパク質の機能に関連した複雑な分子化学的過程をもつ分子タグであったとしても、その発展は過去10年間でめざましい変革をとげている[26,83]。特に、蛍光イメージングは生存細胞におけるさまざまな生物学的過程を研究するために、重要な機会を提供してくれる[25,26]。生物発光のレポーターは、哺乳動物の組織において、非常に強力な信号対ノイズ比をもっており、放出された発光シグナルは正常動物と比較することによって、非侵襲性解析装置を用いて定量化することができる。たとえば、細胞の分化や融合は、ダメージを受けた組織において機能的回復をもたらす可能性をもつ、複雑な一連の生物学的事象の最終結果である[3,15,48,90]。これらの生物学的事象が *in vivo* での細胞や組織移植によって検討されているため、観察期間を通して、細胞内運命の可視化は適切な細胞製造過程を必要とする。実際、蛍光染色を用いることは容易であるが、*in vivo* での細胞増殖や染色中の脱色などにより蛍光強度が減少することは、蛍光染色の欠点でもある。したがって、遺伝子的にコードされた生物学的発光プローブは、安楽死することなく生存している動物において、時空間的な細胞内運命を可視化するハイパフォーマンスなツールとして役立つことができる。

Luciferase (Luc) 発現 Lewis (LEW) transgenic (Luc-Tg) ラット [major histocompatibility complex haplotype: RT1] (図24) は、特に生物学的事象を



明らかにするために実用性がある。Luc-Tgラットは、全ての組織、臓器において、肉眼的にマーカー遺伝子を発現している[53]。一般的な皮膚移植を用いてLuciferaseに対する免疫学的抗原性を調べたところ、GFP-Tgラットと比較してLuc-Tgラットの方が低い免疫原性であることが示されている[53]。移植に用いる場合、この免疫原性の低さは有用である。光学的画像における近年の進歩と相乗効果をもたらすことによって、幹細胞生物学と臓器移植の生物医学的研究をより深く理解するために、Luc-Tgラットシステムは革新的な動物ツールと新たな基盤を提供することが可能である。

さらに、*In vivo*でのLuciferaseを用いたイメージング画像では、非侵襲性バイオイメージングシステムであるIn vivo imaging system (IVIS)を用いることによって、Luc-Tgラットの可視化が可能である[53,100]。ATP活性とLuciferaseによるルシフェリンの蛍光強度の間には強い相関があるため、蛍光強度と一致してATP活性の変化を定量化することができる[53]。今回、このシステムを用いて、移植腎の蛍光強度を測定した。

Energy Charge (EC)とは、三つのアデニル酸ヌクレオチドであるATP、ADP、AMPの細胞内濃度と直接的に関連がある[6]。この生物化学的指標は、適正な環境下では0.9と高い値を示すが、ストレス環境に置かれると急激に減少する。ECはATP、ADP、AMPの濃度比であり、理論上は0~1の間で変動する[112]。ECは、有機体やその一部に与えられた一時点でのエネルギーバランスを反映している[112]。また、結果の解釈として、EC調節のための全身性の生理機能もまた考慮に入れなければならない。それには、二つの酵素が関係しており、アデニル酸キナーゼと脱アミノ酵素である。これら二つの酵素システムが活性化すると、貯蔵されたアデニル酸を分解することでECの減少から細胞を保護する。AMP脱アミノ酵素によって分解されたAMPの低下を介して、total adenylate nucleotide (TAN)の貯蔵量を減少させ、ECを安定化させることができる[21]。

本章では、保存後または移植後のマージナル腎のエネルギー動態を解析することによって、移植後の生存性との関連を検討した。

## II. 材料と方法

### 1. 実験動物

体重260~300gの雄のwild type Lewis (LEW) ラット をチャールズリバー (Breeding Laboratories、神奈川県、日本)より購入し、実験に供した。これらのラットは、温度、湿度を一定に保った状態で、明暗を12時間ごとに調整した飼育室で飼育し、餌と水は自由摂取可能な環境で管理した。さらに、Luciferase-Transgenic (Luc-Tg) LEW ラットは、近郊系のnormalなLEWラット(チャールズリバー、Breeding Laboratories、神奈川県、日本)を交雑繁殖させることにより作出した[53]。これらラットの作出は、自治医科大学の実験医学センターで行われた。全ての実験は、北里大学と自治医科大学の動物倫理委員会によって承認され、動物福祉のために設定されたガイドラインに従って行った。

### 2. 保存腎のTotal adenine nucleotide値 (TAN)とEnergy Charge (EC) の測定

生存しているラットから摘出した腎臓 (Freshグループ、各グループ n=4)、または、心停止後1時間室温で静置したラットから摘出した腎臓 (CD1hグループ、各グループ n=4)を、ETK液またはUW液を用いて様々な温度 (4、23、37°C)で保存した。それらの腎臓組織を1g採取し、冷却した過塩素酸 (5ml)を加えたのち、ホモジナイズして遠心分離した。この上清を採取し、0.5 N トリエタノールアミン 2.0 M  $K_2CO_3$  を加えた後、遠心し分離した。コントロールとして、保存していないfreshな腎臓を用いた。ATP、ADP、AMPの測定のために、メタノール含有10 mM  $KH_2PO_4$ を含んだ移動相でUV260nmの波長により、それぞれの検体 50  $\mu$ lを15-cm Inertsil ODS-3 コラム (GL

Science Inc.、東京、日本)を用いた高速液体クロマトグラフィーシステムで測定した。これらの結果は、タンパク1mg中のnmolとして表した。

Total adenine nucleotide (TAN) と energy charge (EC)は、下記計算式をもとに算出した。

$$\text{TAN} = \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$$

$$\text{EC} = [\text{ATP} + (0.5 \times \text{ADP})] / [\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}]$$

### 3. 腎臓チップを用いた蛍光強度の定量

Luc-Tgラットに麻酔をかけ(各グループ n=7)、20%ヘパリン加生理食塩液を1ml、後大静脈または陰茎静脈から投与した。しばらく還流させたのち、ラットを放血してから腎臓を摘出し、冷却したPBSにて血液を洗い流した。腎臓チップとして、それぞれの腎臓から組織スライサーを用いて直径3mmの均等な組織サンプルを作成した。組織サンプルは、4℃に冷却した96穴プレートへ保存した。それぞれのプレートには、事前にETK液、UW液、生理食塩液(大塚製薬工場株式会社、鳴門、日本)を220 μlずつ満たしておいた。保存後の腎臓サンプルの蛍光強度は、これまでに報告されている方法から、プレートリーダー(Mithras LB940、Berthold Japan、東京、日本)を用いて、既定した時間に測定を行った[100]。プレートリーダーは冷所に保管し、蛍光強度は4℃で測定した。プレートリーダーに備わっているインジェクターを用いて、それぞれのウェルに20 μlのD-luciferin ( 2.29 mg/mL ) を添加した。それぞれのウェルの最終的なD-luciferinの濃度は0.19 mg/mLであり、検出時間は1秒とした。これらの測定は、蛍光強度として認識できるピークが確認されるまで自動的に繰り返した。測定後は速やかに保存液を交換して、次の測定に備えた(実験方法を図25に示した。)

#### 4. Luc-Tgラットを用いた移植腎の蛍光強度の定量

*In vivo*でのルシフェラーゼを用いたイメージング解析は、non-invasive bioimaging system IVIS (Xenogen, Alameda, CA, USA) と IVIS Living Image (Xenogen, Alameda, CA, USA) ソフトウェアパッケージを用いて実施した。前章と同様の腎臓移植法を用いて、生存しているLuc-Tgラットから摘出した腎臓、または心停止後1時間室温で静置したLuc-Tgラットから摘出した腎臓をそれぞれwild LEWラットに移植した。Luc-Tgラットからの移植腎の蛍光強度を検出するために、イソフルランで麻酔をかけたレシピエントラットの陰茎静脈からD-luciferin (Promega, Madison, WI, USA) を投与した(30 mg/kg/body weight ; PBSで15 mg/mlになるように溶解、希釈した)。シグナル強度は、光量子束として関心領域における蛍光面積の割合を定量化し、photons/s/cm<sup>2</sup>の単位であらわした[53,100]。

#### 5. 統計学的解析

TAN、EC、および群間の比較は、バートレット検定で等分散性の検定をしたのち、つづいてダネット検定を行った。それぞれの温度におけるグループ間の比較は、等分散性の検定をF検定にて行ったのち、スチューデントのt-検定を用いて解析した。

腎臓サンプルの蛍光強度は、一元配置分散分析を行ったのち、テューキーのポストホックテストによって検定した。

全ての結果は、 $P < 0.05$ をもって統計学的有意差とみなした。

### III. 実験結果

#### 1. 保存腎のTANとEC

それぞれの腎臓のTotal adenine nucleotide値 (TAN、nmol/mg protein)とenergy charge (EC)の結果を、それぞれ図26A,Bに示した。37°Cで保存したfresh腎のグループ(fresh37グループ)とCD1h腎の全ての保存温度において、4°Cと23°Cで保存したfresh腎のグループ(それぞれfresh4グループとfresh23グループ)と比較して、TAN値は低い傾向があった。特に、UW液での保存では、fresh37グループのTAN値はfresh4グループと比べ有意に低い値を示した( $p<0.05$ )。加えて、ETK液で保存したグループにおけるfresh23グループとfresh37グループのTAN値は、fresh4グループよりも有意に低値を示した(それぞれ、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ )。

ETK液を用いることによって、fresh37グループ、CD1h4グループ、CD1h23グループ、そしてCD1h37グループの腎臓のEnergy Charge (EC)は、fresh4グループ、fresh23グループと比較して高い傾向を示した。UW液を用いて保存した場合は、fresh23グループの腎臓のECはfresh4グループの腎臓のECより有意に低値であった( $p<0.05$ )。

#### 2. 腎臓チップを用いた蛍光強度

4°Cで保存した腎臓チップの蛍光強度の推移を図27に示した。UW液で保存したグループの保存開始後6時間目の蛍光強度( $55.54 \pm 17.21\%$ )は、ETKグループ( $34.00 \pm 37.33\%$ 、 $p<0.05$ )よりも有意に高かった。しかしながら、両グループの蛍光強度は、保存開始後24時間目ではほぼ同等の値となった(ETKグループ;  $26.17 \pm 18.63\%$ 、UWグループ;  $32.23 \pm 21.04\%$ 、 $p>0.05$ )。最終的に、ETKグループとUWグループの蛍光強度は、生理食

塩液グループと比較すると、全ての観察時間において有意に高い値を示した( $p<0.05$ )。

### 3. Luc-Tgラットを用いた移植腎の蛍光強度

CD1hの腎臓チップで観察されたものと類似して、Luc-Tgラットのfresh腎を移植されたレシピエントラット内の移植腎の蛍光強度は、移植後1時間目から早期に回復し始め、移植後1日目ではさらに蛍光強度が上昇し安定した(図28,A)。しかしながら、マージナル腎を移植し、最終的に生存不可能であったレシピエントラットの移植腎の蛍光強度は、移植後1時間目においても低値のまま変化しなかった(図28,B)。

#### IV. 考察

この章では、保存後または移植後のマージナル腎のエネルギー動態を解析することによって、移植後の生存性との関連を検討した。

*In vitro*における実験を行って、われわれはCD1hの腎臓とfreshの腎臓におけるTAN値が明らかに減少することを示した。低酸素状態の間に、AMPが触媒されて低減することによって二次的にTAN貯蔵量も減少し、AMPの蓄積量とECは安定化すると報告されている[6,138]。われわれの結果においても、前述の報告にあるような一般的な見解と一致したが、それぞれの保存温度におけるETK液とUW液の間に、ECの差は認められなかった。一方、脊椎動物が生存可能といわれているEC値は0.5-0.6であるが[6]、今回の結果は全てのグループにおいてこれよりも低値を示しており、移植腎の状態、保存液の種類や温度とは関係なく、保存することによってECは生存限界を下回ることがわかった。よって、全てのグループにおけるEC値はほぼ同値であったことから、われわれは保存中のEC値がマージナル腎を移植したあとのレシピエントの生存に、直接的に関与しているとはいえないと推察した。

腎臓チップの検討において、生理食塩液では保存後早期からエネルギー状態が低値を示すのに対して、保存液を用いることによって長時間エネルギー状態を維持することが可能であることがわかった。これは、エネルギー状態が高いとはいえないまでも、保存液を用いた方が移植後の成績に効果を示す可能性が示された。

心停止後1時間のLuc-Tgラットの腎臓をETK液で保存したマージナル腎移植モデルを使用することで、生存可能なレシピエントラットにおける再灌流後のATPの急速な上昇が重要であることを証明した。これにより、マージナル腎移植後の生存性を改善するための重要な鍵は、再灌流後のECの急速な回復であることが示



唆された。エネルギー状態は、温阻血とそれに続く再灌流によって影響を受ける[85]。適切な細胞内のATPは、危機的な傷害を与える再灌流期の間イオンの恒常性を再び回復させ、ATP依存性膜ポンプ機能を支持するために必要である[89]。冷保存は酸素供給を悪化させ、また、血管収縮を引き起こすアラキドン酸基質レベルの減少を遅延させる[121,122]。この血管収縮作用によって、冷保存後に再灌流しても血管拡張作用が弱くなるため、ECレベルの回復遅延を招来する[121,122]。冷保存は組織の壊死を引き起こし、さらに、冷保存後に引き続いて起こる再加温はアポトーシスを誘発する[121]。これは、組織の線維化がさらに進行する原因となる[121]。Salahudeenらは、死体ドナーからの移植腎が長時間冷虚血にさらされた場合、長期的な移植腎喪失の重要な予測因子となりうると報告している[120]。腎臓の $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaseはATPに特に影響を受けやすく、さらに、腎組織中でも近位尿細管におけるこの酵素活性はATP濃度に直接比例するといわれている[24]。したがって、低温状態が、近位尿細管の重篤な損傷を引き起こす原因となることがわかる。よって、われわれは、マージナル腎臓の生存に影響する最も重要な要因は、常温保存を用いることによって、血管収縮を軽減させてECを早期に回復させることと細胞浮腫を阻止することであると推察した。さらに、われわれは、エネルギー枯渇状態にあるマージナル腎臓を保存する目的のために、糖類(トレハロース)を用いて受動的な浮腫の予防をする方が、能動的な予防よりも効果的であることをあきらかにした。

以上から、本章では、前章のマージナル腎の保存には常温保存が適していることを裏付ける結果となり、移植後の生存性を改善するためには、再灌流後における移植腎の早急なエネルギー回復が重要な鍵となることが示唆された。

## V. 小括

本章では、保存後または移植後のマージナル腎のエネルギー動態を解析することによって、移植後の生存性との関連を検討した。

保存腎のEnergy Charge(EC)の解析では、生存しているラットから摘出したフレッシュな腎臓とマージナル腎を4,23,37℃のETKまたはUWで保存し、ECを算出した。ECは全ての群において生存限界以下の値を示し、移植直前の臓器のエネルギー活性はほぼ枯渇状態であることがわかった。よって、全てのグループにおけるEC値はほぼ同値であったことから、われわれは保存中のEC値がマージナル腎を移植したあとのレシピエントの生存に、直接的に関与しているとはいえないと推察した。

次に、Luciferase遺伝子を導入したLuciferase-Transgenic (Luc-Tg)ラットの腎臓から作成した組織チップを、ETK、UW、生理食塩水で保存した後、エネルギー活性の指標となる蛍光強度を測定した。ETK、UWの蛍光強度は生理食塩液と比較して有意に高値を維持したことから、保存液を用いることで移植腎のエネルギー状態をより良好に維持できる可能性を示した。

さらに、Luc-Tgラットの腎臓をwildラットに移植し、移植腎の蛍光強度をIVISにて測定した。移植後生存可能であったラットの移植腎の蛍光強度は、移植後1時間より上昇し始め、早期にエネルギー活性が回復した。よって、マージナル腎移植後の生存性を改善するための重要な鍵は、再灌流後のECの急速な回復であることが示唆された。

以上から、マージナル腎の保存には常温保存が適していることを裏付ける結果となり、移植後の生存性を改善するためには、再灌流後における移植腎の早急なエネルギー回復が重要な鍵となることが示唆された。

## 第5章 マージナル腎への間葉系幹細胞(MSCs)による蘇生効果の検討

### 1. 緒言

第3、4章において、マージナル腎が移植可能かどうかを検討した。本章では、移植後のマージナル腎の損傷をさらに低減させる方法について検討することとした。

心停止後の腎臓移植では良い移植成績をもたらさないことや、それによって移植に関わる医療費が高額になることから、現在のところ制限されてきているのが現状である[109,146]。一方では、ドナーの供給数を拡充するために、近年、心停止後に移植臓器を摘出するシステムが、多くの国々で行われ始めているのも事実である[34,72,84]。しかしながら、生体または脳死患者から摘出した腎臓と比較して、心停止患者からのマージナルな腎臓は明らかに虚血／再灌流傷害を引き起こす可能性が高く、これが移植臓器の初期機能不全や機能遅延を高率に引き起こす主因となる[115,126]。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells ; MSCs)は多岐にわたって研究されており、臓器移植のための治療法としての適用も検討されている。さらに、臓器移植に関連した虚血／再灌流傷害を防止するため、移植臓器へのMSCsの臨床応用も視野に入ってきている。MSCsは多能性前駆細胞であり、増殖能や多くの異なった細胞株へ分化する多分化能を有している[35,108]。脂肪組織は再低侵襲な処置で豊富にそして容易に入手することが可能なため、MSCsの供給源としてはとても魅力的な組織である[150]。近年、MSCsを用いた実験的、臨床的トリアルが、様々な疾患の治療として世界的に実施されてきている

[7,64,67,93,127,133,142]。しかしながら、最新の報告では、MSCs (MSCs) を経静脈的に投与された患者において、肺血栓塞栓症が発生し死に至った症例が報告された[31,43,44]。MSCsを局所投与することによって組織に生着させる方法は、MSCs移植後に継発するMSCs関連性血栓塞栓症の発生率を減少させる可能性があるかもしれないといわれている[111,132]。

本章では、第3章で確率したマージナル腎移植モデルを使用して、Experiment 1として、移植再灌流直後に全身性にMSCsを静脈内投与することによって、移植後のレシピエントラットの生存性に及ぼす影響、または全身性の影響について検討した。Experiment 2として、ドナーより摘出した移植直前の腎動脈よりMSCsを局所投与した際のレシピエントラットの生存性と腎機能への効果と、長期的な全身性への影響を検討した。

## II. 材料と方法

### 1. 実験動物

体重 260～310g の雄の wild type Lewis (LEW) ラット をチャールズリバー (Breeding Laboratories、神奈川、日本) より購入し、実験に供した。これらのラットは、温度、湿度を一定に保った状態で、明暗を12時間ごとに調整した飼育室で飼育し、餌と水は自由摂取可能な環境で管理した。さらに、Luciferase-Transgenic (Luc-Tg) LEW ラットと LacZ transgenic (LacZ-Tg) LEW ラットは、近郊系の normal な LEW ラット (チャールズリバー、Breeding Laboratories、神奈川、日本) を交雑繁殖させることにより作出した[133][134]。これらのラットの作出は、自治医科大学の実験医学センターで行われた。また、これらのラットは、自治医科大学実験医学センターと北里大学にて飼育、繁殖された。全ての実験は、北里大学と自治医科大学の動物倫理委員会によって承認され、動物福祉のために設定されたガイドラインに従って行った。

### 2. 脂肪組織由来間葉系幹細胞(AT-MSCs)の分離と培養

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose Tissue-derived MSCs : AT-MSCs) を採取するために、メスの Luc-Tg ラットまたは LacZ-Tg ラットから分離した脂肪組織を鋏と外科用メスを用いて、3mm 以下の小片に細かく分割した。脂肪と同量のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline ; PBS) (－) を加えて軽く混和することによって2層に分離した。上清 (幹細胞、脂肪細胞または血液を含んでいる) を PBS (－) で洗浄したのち、0.075% コラゲナーゼ (Type I) を含有する PBS (－) を用いて 37℃ で 1 時間軽く混和しながら酵素的に分離した。分離された組織は、10%ウシ

胎仔血清 (fetal bovine serum ; FBS) を加えた同量の  $\alpha$ MEM (GIBCO-BRL、東京、日本) と混合し、混合液を 2 層に分離するために室温で 10 分間静置した。下層を 1500 rpm、20°C、5 分間で遠心分離した。赤血球を取り除くために、細胞ペレットを 160 mM の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  に再懸濁させたのち、40 mm のメッシュフィルターを通過させて新たなチューブへ移した。 $\alpha$ MEM / 10% FBS を同量加えて細胞を再懸濁させたのち、遠心分離した。細胞が 70% から 80% 融合していた際には、それらを 0.05% トリプシン-EDTA (Invitrogen、東京、日本) で分離して採取し、 $26104 \text{ cells/cm}^2$  になるまで繰り返したのち、5 日間培養した。5 代から 8 代培養の MSCs のみを実験に使用した。

投与前に、AT-MSCs を  $1.0 \times 10^6 \text{ cells}/0.5 \text{ ml}$  となるように ETK 液で調整した。

### 3. 心停止後マージナル腎移植法

使用した LEW ラットの麻酔導入、維持には、イソフルランの吸入麻酔を用いた。ラット腎移植モデルとして、第 3 章で作成した移植モデルを使用した[61]。左腎臓(腎動脈、腎静脈、尿管を含む)を分離したのち摘出し、レシピエントラットに移植した[61]。移植腎として、心停止後 1 時間経過したマージナル腎を細胞外液型組成の Extra-cellular Trehalose Kyoto 液 (ETK 液 ; ETK 液<sup>®</sup>、大塚製薬工場株式会社、鳴門、日本) に 1 時間常温保存したマージナル腎を使用した。この保存時間中に、レシピエントラットをイソフルランで吸入麻酔し、腎臓を移植する移植床を作成した。移植法は、第 3 章で作成したモデルと同様に行った。

## II. Experiment 1: AT-MSCs の経静脈的全身投与方法

### 1. 方法

投与方法として、全身性投与の実験では、腎移植直後に陰茎静脈から投与した(n=6)。

#### a. 移植後の生存性

レシピエントラットの生存は毎日決まった時間に確認し、最長で移植後 14 日目まで観察した。移植後 14 日目まで生存したラットは安楽死させて、移植腎を摘出し、病理組織学的検査に供した。

#### b. Luc-TgラットのAT-MSCsを用いた導入遺伝子の検出

*In vivo* でのLuciferaseによる蛍光画像を撮影するために、生体を生きたまま撮影することが可能である非侵襲性IVISバイオイメージングシステム (Xenogen、Alameda、CA、USA) とIVIS Living Image (Xenogen、Alameda、CA、USA)ソフトウェアパッケージを用いた。レシピエントラットは、撮影直前に陰茎静脈よりD-luciferin (Promega、Madison、WI、USA)を投与した (30 mg/kg body weight ; PBSで15 mg/mlに溶解、希釈したものをを用いた)。発光信号の強度は、関心領域における発光強度 (photons/s/cm<sup>2</sup>/steradian) として定量化した [100]。

### 2. 実験結果

a. 移植後の生存性

両腎を摘出した LEW ラットに保存後のマージナル腎を移植し、再灌流直後に ETK に浮遊させた AT-MSCs ( $1.0 \times 10^6$  cells) を全身性に投与した (n=6)。AT-MSCs のこの投与量においては、肺血栓塞栓症を示唆するような直接的証拠は認められなかった。6 匹中 3 匹は移植後 7 日目以上生存したが、レシピエントの生存性に対して有利な効果はみられなかった (生存日数: 1、4、7、8、>14、>14)。

b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出

*In vivo* バイオイメージング画像では、静脈から投与された AT-MSCs は投与後ただちに肺でトラップされていた (図 29,A-1、B-1)。その後、AT-MSCs の数は投与後 5 日以内に測定限界以下まで低下した (図 29,A-2、B-2)。正常なラットに全身投与を行った以前の研究においても、MSCs の大量投与はしばしば致命的であった [59]。よって、次に全身性投与に関連した有害事象を改善する方法を検討するために、局所投与方法による実験を実施した。



### III. Experiment 2: AT-MSCs の経腎動脈的局所的投与方法

#### 1. 方法

局所投与の実験では、マージナル腎を保存したのち、血管吻合を行う直前に腎動脈から直接投与した(各グループ、n=8)。AT-MSCs を投与しなかった群は ETK 液のみを投与した。

##### a. 移植後の生存性と腎機能

生存性は Experiment1 と同様の方法で実施した。

血中尿素窒素 (BUN) と血清クレアチニン (Cre) を測定するために、移植前から移植後 2 日ごとに移植後 14 日目まで、尾静脈より血液を採取した (AU400、Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)。採取した血液は 3000 rpm で 5 分間遠心分離したのち、血清を分離した。

##### b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出

Experiment1 と同様の方法で実施した。

##### c. LacZ-陽性細胞の免疫組織化学的染色法

移植腎へ投与された LacZ-陽性 AT-MSCs を検出するために、腎移植後 24 時間目で安楽死させたのち、移植した腎臓を摘出した (n=2)。摘出した移植腎の凍結切片 (10  $\mu\text{m}$ ) を、室温で 10 分間、0.2% グルタルアルデヒドを用いて固定した。固定した切片を、1 mg/ml

5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside ( X-gal ; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 、さらに、PBS に溶解した 2 mM  $MgCl_2$  を含有した液体で、37°C、20 時間浸漬させた。

d. 移植腎における病理組織学的検査

これまでの報告によれば、組織の線維化は細胞浮腫と関連していると考えられており、また、細胞浮腫は虚血／再灌流傷害から引き起こされることが知られている[16,40,113]。したがって、組織の線維化度をスコア化して評価することとした。移植後 14 日目まで生存したラットは安楽死させ、移植腎を摘出した。これを 10%ホルマリンで固定したのち、パラフィンで包埋した。実質の線維化を評価するために、2  $\mu$ m のパラフィン包埋切片にアザン染色を行った。以前の報告にしたがって、BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence、大阪、日本)上の BZ-II Analyzer ソフトウェア (Keyence、大阪、日本)を用いて、間質全体の面積に対して相対的な間質コラーゲンの沈着面積を測定するため、1 切片あたり 20 ヶ所の皮質領域を高倍率視野で解析した。既定の色調をもつ画素数をそれぞれの切片において計数し、その後自動的に面積へ変換した。コントロールグループ (n=3)として、フレッシュな腎臓を移植したラットを用いた。

そのほかに、AT-MSCs を移植後に経静脈的に全身投与したグループ (n=3)と血管吻合直前に保存後のマージナル移植腎の腎動脈から投与したグループ (n=3)を作成した。AT-MSCs 投与後の長期経過を

観察するため、これらのラットのうち移植後 3 ヶ月目まで生存したラット（それぞれのグループにおいて  $n=2$ ）を用いて、移植腎やそのほかの臓器に奇形腫形成や異常が存在していないかを病理組織学的に確認した。

#### e. 統計学的解析

結果は、平均  $\pm$  SD として表した。統計解析として、連続するデータの場合はスチューデントの  $t$ -テストを用いて行い、非連続的なデータは Mann - Whitney 検定を使用した。

病理組織学的線維化スコアは、一元配置分散分析を用いて評価した。

全ての結果は、 $P<0.05$  をもって統計学的有意差とみなした。

## 2. 実験結果

### a. 移植後の生存性と腎機能

心停止後のマージナル腎に対して、AT-MSCs 局所投与における影響として、レシピエントラットの生存性を図 30 に示した。移植後 12 日目では生存率に有意なさはなかった。しかしながら、移植後 14 日目において、AT-MSCs を投与したグループの生存率（MSC(+)；75%）は、AT-MSCs 非投与グループ（MSC(-)；50%）と比較して高い傾向を示した。

生存したラットにおける BUN（MSC(+) グループ； $144.9 \pm 5.9$ 、MSC(-) グループ； $132.3 \pm 9.7$ ）と Cre（MSC(+) グループ；2.8

±0.1、MSC(-) グループ; 3.0±0.3) の値は、両群とも移植後 2 日目に同様な最高値を示した(図 31,A,A')。しかしながら、移植後 4 日目では、MSC(+) グループ (BUN; 89.7±7.6、Cre; 1.55±0.2) の測定値は、MSC(-) グループ (BUN; 135.4±18.2、Cre; 2.4±0.3) の測定値と比較して有意に減少した( $P < 0.05$ ) (図 31,B,B')。生存した全てのラットの BUN と Cre は、移植後 14 日目までにはほぼ正常値まで回復した。

b. Luc-Tg ラットの AT-MSCs を用いた導入遺伝子の検出

IVIS を用いた腎移植直後の蛍光強度を測定したところ、移植腎領域の蛍光陽性 AT-MSCs は、とても低い輝度として検出された。しかしながら、AT-MSCs は再灌流後 24 時間目まで停留していることが確認された(図 32,A)。しかしながら、移植後 7 日目のレシピエントラットにおける IVIS 像での蛍光陽性細胞は検出されなかった。

c. LacZ-陽性細胞の免疫組織化学的染色法

LacZ 染色では、移植後 24 時間目に安楽死させたレシピエントラットの移植腎において、投与された AT-MSCs が近位尿細管に残存していることが確認された(図 32,B)。しかしながら、長期生存したレシピエントラットにおける LacZ 染色標本において、LacZ 陽性細胞は検出されなかった。

d. 移植腎における病理組織学的線維化スコア

移植後 14 日目まで生存したラットにおける移植腎の線維化を、アザン染色を用いて検討し、間質全体に対する相対的な間質の線維化面積を算定した。AT-MSCs 投与グループ (MSC(+))グループ;  $19.98 \pm 3.30$ )、非投与グループ (MSC(-))グループ;  $26.3 \pm 4.31$ ) におけるそれぞれの線維化領域は、フレッシュな腎臓を移植されたコントロールグループ ( $9.5 \pm 0.69$ ) のスコアと比較して有意に上昇した ( $P < 0.05$ ) (図 33)。マージナル腎は線維化しており、重篤な組織損傷が発生したことを示唆した。MSC(+))グループと MSC(-))グループにおけるスコアに有意な差は認められなかったが ( $P > 0.05$ )、MSC(+))グループの線維化の度合は MSC(-))グループと比較して低い傾向を示した。

また、AT-MSCs 投与によって長期的に発生しうる影響を観察するために作成した移植ラットにおいて、移植後 3 ヶ月目の移植腎やそのほかの臓器に奇形腫形成、梗塞、そのほかの異常は検出されなかった。

#### IV. 考察

本章では、マージナル腎に対するAT-MSCsの投与経路の違いによって、その効果と副作用発現に相違が存在するかどうかを検討した。

心停止後ドナーを含めてマージナルドナープールを拡大するために、亜常温または常温灌流が、心臓、肝臓、肺、そして腎臓において大型動物モデルを用いて大規模に実施されている[114]。特に、Berendsenらは、虚血性に損傷を与えた肝臓(温阻血時間1時間)を亜常温の温度管理をすることによって、効果的に再生したことを示した[12]。Brasileらは、*ex vivo*で維持された犬の腎臓を酸素利用率を向上させた32°CのBelzer's液で温灌流すると、代謝率が上昇することを報告した[16]。さらに、ブタとヒトでの報告では、常温条件下で自動灌流システムを用いると、腎臓機能と腎臓の可移植性を回復させる可能性を示した[56,57]。さらに、われわれは、第3章において、マージナル腎の常温保存効果を明らかにした。そこで、さらにこのマージナル腎を蘇生させる方法として、AT-MSCsの投与を試みることとなった。

クローン病や急性の移植片対宿主病のような免疫障害に対して、自己または同種のMSCsを投与したヨーロッパの臨床試験において、MSCs投与が著しい治療効果を示したと報告された[23,36,37]。MSCs療法は、近年、臓器移植に対して治療として応用されていく方向を示しており[45]、固形臓器移植に関連した虚血/再灌流傷害を回避するために、マージナルドナーからの移植臓器に対しても、MSCs療法の臨床応用へ向け、期待が高まってきている。しかしながら、Eggenhoferらは、静脈から投与して、生存しているドナーMSCsが投与後24時間目まで肺に存在し、その後消失することを報告した[37]。これにより、レシピエント動物体内で、投与されたMSCsが長期間生存できない可能性が示唆された[55]。さらに、肝臓では、虚血/再灌流障害の誘導が、生存しているMSCsを肝臓へマ

マイグレーションするための誘発因子にならなかったと報告されている[55]。われわれの結果においても、経静脈的に投与されたAT-MSCsが投与後24時間から3日目までの間に肺から消失することを示しており、このことは全身性に投与されたAT-MSCsは投与後早期に死亡し、損傷を受けた移植腎へマイグレーションしなかった可能性を示唆した。

マウスを用いたMSCsの経静脈的投与の報告では、肺を起源として全身性に進行する全身性炎症反応が誘発されており[80]、一方で、AT-MSCsの静脈投与を受けたヒト患者のなかにも致死性肺血栓塞栓症が観察された症例が報告された[31]。近年、Tatsumiらは、マウスにおいてAT-MSCsが右心室と肺動脈周辺での血栓形成を引き起こし、投与直後から肺塞栓が開始することを報告した[132]。AT-MSCsの経静脈的投与後の死亡率と有害事象の発生は、投与細胞数依存性に増強されると考えられている。AT-MSCs誘発性肺血栓塞栓症によって引き起こされる死亡は、投与後24時間以内に発生する[132]。これら2つの研究結果の観点から、マージナル腎へ局所性にMSCsを投与する方法を用いることに焦点を絞った。また、われわれは他にも、ラット、ネコ、ブタの自己AT-MSCsを経静脈的に投与する実験も行った。AT-MSCsを複数回投与することによって、標的臓器へ幹細胞がマイグレーションするために、ラットでは実質的作用があると報告されているが[88]、われわれが別に設けた実験では、ラットとネコにおいて、肺塞栓症や心不全が誘因となって肺梗塞や死亡の危険性を上昇させた。また、われわれは、ブタのモデルを用いて、門脈と肺動脈へそれぞれ挿入したカテーテルからAT-MSCsを投与したところ、門脈圧と肺動脈圧の上昇を示した。したがって、心停止後ドナーからの臓器にAT-MSCsを投与して蘇生させる効果を検討するために、われわれは、血管吻合する直前に移植腎の腎動脈から体外でAT-MSCsを局所投与する方法を試みることとなった。われわれのラット心停止後腎移植モデルは、心停止したラットを1時間室温で静置してから腎臓を摘出し、さらに細胞

外液型組成の保存液であるETK液 (Extra-cellular Trehalose Kyoto液)を用いて1時間常温保存したのちレシピエントラットに移植する方法である。暖かい保存液 (トレハロースを含む細胞外液型保存液)を用いて臓器を還流すると、冷保存液と比較して微小循環から血液を急速に洗い流すことができる。これは、低カリウムであることと、保存液が温かいということから血管収縮を抑制し、さらに低温による血管上皮や血液の細胞成分の細胞膜が硬化するのを防止するためである[71]。これらの作用はno-reflow現象を改善させるため、虚血／再灌流傷害において重要なメカニズムである[71]。移植するマージナル腎にMSCsを投与するために、常温条件はMSCsからのサイトカイン放出においても有益な効果があると考えられている。

本研究において、AT-MSCs の全身性投与は肺血栓塞栓症を招来する可能性を示唆した。一方で、AT-MSCs の局所投与は肺血栓塞栓症による死亡を誘発しなかったことに加え、再灌流後も移植腎、特に近位尿細管に停留することがわかった。近位尿細管は、腎組織のなかでも虚血に対して最も感受性の高い部位であるため、損傷を受けやすい組織であるといわれている[24]。今回の実験で、LacZ染色では、AT-MSCs は常温保存したマージナル腎の尿細管にマイグレーションしたことがわかり、さらにIVIS像では、再灌流による傷害後24時間目まで移植腎に停留していたことが確認された。よって、局所投与されたAT-MSCs は、虚血によって損傷した尿細管周辺に集積した可能性が示唆された。この集積したAT-MSCs は、細胞増殖因子や線維芽細胞増殖因子のような保護効果のあるサイトカインを産生した可能性がある[9]。したがって、AT-MSCs 自身が再生するのではなく、サイトカインによる組織保護効果を発現していると考えられた。以前に報告したように[135]、今回の結果同様、このような停留した細胞は徐々に数を減らし、奇形腫形成などを生じる以前に消失すると考えられた。

MSCs療法の長期的な安全性や効果に関して、以下にあげるような報告はたい



へん重要である。局所的にまたは経静脈的に投与されたMSCsの作用として、組織再生、免疫調整、抗炎症効果などが考えられている。しかしながら、韓国以外で治療を受けた二人の韓国人患者が、幹細胞治療に関連した要因によって死亡したとの報告がなされた[31]。MSCs治療の主な危険因子の一つは、治療直後の肺血栓塞栓症である。生理食塩液や培養用メディアウムに浮遊させたMSCsは1時間以内に沈殿して凝集し始めるために、MSCs静脈内投与後の塞栓症に関連した合併症の発生リスクが上昇することを忘れてはならない。われわれのブタを用いた前臨床研究では、通常の生理食塩液(200 mL)に浮遊させたMSCsの経門脈的投与 ( $1 \times 10^7$  cell/kg) によって、投与後3日目に門脈塞栓が原因で死亡した。MSCs投与後、門脈圧は急速に24 mmHgまで上昇し、剖検した肝臓の病理検査では、門脈に巨大な血栓が存在していた。われわれの近年の研究において、商品化された静脈注射用溶液に一般的に含まれる成分で、MSCsの凝集を抑制する成分を確定することに成功した。これらの研究結果は、MSCs療法の急性期に発生する血栓症を回避するために非常に重要であり、今後は、MSCsを投与する前にMSCsの質や機能を精査することも必要であると考えられる。

MSCs療法が動物モデルを用いたいくつかの臓器において、線維化を軽減したことは報告されている[101,105,139]。しかしながら、骨髄由来自己幹細胞を直接腎臓に注入されたループス腎炎の症例において、治療後6ヶ月目で注入部位に血管骨髄増殖性病変を形成したとの報告もある[135]。Thirabanjasakらは、血管骨髄増殖性病変が生物学的能力をもつかどうかは定かでないが、これらの発生は幹細胞治療によって起こりうる合併症であることを示唆した[135]。今回の実験では、直接腎組織に注入する方法ではなく、腎動脈から投与することによって奇形腫などの発生は認められず、安全にMSCsを用いることができる可能性を示した。

加えて、われわれは、ラットにおける心停止後ドナーからのマージナル腎が移植

後に機能できるかどうかを、非侵襲性の機能的磁気共鳴断層撮影 (non-invasive magnetic resonance imaging ; MRI)を行うことにより予測できることも確認している[65]。このような手法をもちいて、機能性を確認したマージナル腎をさらに蘇生すべく、AT-MSCsを局所投与することは有用であると考えられた。

われわれの同系移植モデルからの免疫-病理組織学的結果は、局所投与されたAT-MSCsが心停止後ドナーからのマージナル腎における線維化を防止する傾向を示し、これらの細胞が腎機能を迅速に改善することに寄与したことがあきらかとなった。よって、臨床的同種移植において、MSCs療法が長期的な線維化を防ぐ可能性を支持した結果となった[105]。われわれの長期観察において、AT-MSCsの局所投与は、腎臓移植後3ヶ月目における奇形腫形成や梗塞などの有害事象を生じなかった。

したがって、本章では、AT-MSCsの局所投与は、全身性の経静脈的投与と比較して、レシピエントラットの生存性、移植腎の機能改善において、安全で、かつ有効な作用を示す可能性を示唆した。

われわれの成果は、心停止後ドナーからのマージナル臓器を損傷から蘇生することによって、ひいては生体ドナーの生命倫理問題やリスクを回避するための有用な治療法を提供する可能性をもつと考えられた。

## V. 小括

移植後のマージナル腎の損傷をさらに低減させる方法として、MSCsを腎移植後に全身投与または移植直前の腎動脈から局所投与したレシピエントラットの生存性と腎機能への効果、副作用に関して検討した。

Experiment 1として、移植再灌流直後に全身性にMSCsを静脈内投与することによって、移植後のレシピエントラットの生存性に及ぼす影響、または全身性の影響について検討した。MSCs全身投与はレシピエントラットの生存性に影響しなかったが、投与されたMSCsは投与後3日目まで肺に存在し、肺塞栓を起こす可能性が示された。

次にExperiment 2として、ドナーより摘出した移植直前の腎動脈よりMSCsを局所投与した際のレシピエントラットの生存性と腎機能への効果と、長期的な全身性への影響を検討した。MSCsを投与した群(MSC(+))は、MSCs非投与群(MSC(-))よりも生存性が向上した。移植後4日目では、MSC(+))群の腎機能はMSC(-)群と比較して有意に改善した。腎動脈から投与されたMSCsは移植後24時間目まで、IVIS画像では腎臓に、LacZ染色では尿細管に局在することが確認され、損傷を受けた部位に集積する可能性が示唆された。移植後3ヶ月目では、移植腎やその他の臓器にMSCs投与による奇形腫などは認められなかった。

以上より、AT-MSCsの局所投与は、全身性の経静脈的投与と比較して、レシピエントラットの生存性、移植腎の機能改善において、安全で、かつ有効な作用を示す可能性を示唆した。

## 総括

慢性腎不全(CKD)によるネコの死亡率は高齢になるほど高く、13歳以上のネコでは死因の約50%を占める。CKDの根治に繋がる一治療法として腎移植があるが、現在獣医療で行われている腎移植は実験ネコをドナーとした生体間腎移植が主体である。一方、ヒト生体間腎移植は減少傾向にあり、死体腎移植や脳死移植へ変遷している。獣医療では、生体間腎移植が主体であり、意思表示できないドナーネコにとって、生体ドナーの生命倫理問題の壁は高い。ヒト生体ドナーは死亡率の上昇だけでなく、高血圧などの発生リスクも上昇する可能性が示唆されており、獣医療においても、生体ドナーにおけるリスクや倫理的問題を見直さなければならない状況に迫られている。

本研究では、はじめに、ネコの生体間腎臓移植を安全に行うためのラットを用いた練習プロトコルを確立し、実際にネコ生体間腎移植が可能かどうかを検討したのち、生体ドナーのリスクについて考察した。次に、生体ドナーのリスクや倫理問題を回避すべく、ラットを用いたマージナル腎移植モデルを確立し、マージナル腎の保存法やエネルギー動態、蘇生法を検討するため、ネコの前臨床実験としてラットを用いた基礎的研究を実施した。

第1章では、ラットの腹部大動脈の端々吻合、後大静脈を門脈へ端側吻合する方法を用いて、ネコ腎移植のための練習法を開発した。ラットの血管サイズ、特に腹部大動脈と門脈は、ネコの腎動静脈とほぼ同サイズである。したがって、われわれはネコの腎臓移植のためのトレーニングとしてラットを用いることが適していると考えた。Experiment 1において、動脈吻合モデルでは、ラットの腹部大動脈を端々吻合にて単純結紮縫合する方法を、静脈吻合モデルでは連続縫合を用いて門脈体循環シャントモデルを作成する方法を考案した。動脈練習法は死亡例もなく、速やかに習得できた。静脈練習法では2匹の死亡を確認したが、それ以

外は肉眼的、病理組織学的に吻合部の狭窄もなく、手技を全うすることが可能であった。さらに、Experiment 2として、マイクロサージェリーのための適切なトレーニングを行ったのち、われわれは実験的ネコ生体腎臓移植を実施することとした。2匹では再吻合を必要とされたが、前述したトレーニングプロトコールを行ったことによって、安全に移植手技を全うすることが可能であった。さらに、血管奇形の症例においても、それぞれの症例に対応した、応用性をもったテクニックによって、即時に血管吻合を成功させることができた。以上より、われわれが考案したラットを用いたマイクロサージカルトレーニングプロトコールは、ネコの腎臓移植のための有用な練習法であることが示された。さらに、この練習法を用いてマイクロサージカルテクニックを習得したことにより、ネコの腎臓移植を安全にかつ迅速に実施することが可能であった。

第2章では、生体間腎臓移植における問題提起を行うことにより、生体ドナーのリスクや倫理的側面に関して検討を行った。Experiment 1として、腎動脈が腹部大動脈から直接2本分岐したドナーネコの1症例に遭遇し、ドナー、レシピエント両者のリスクに関して検討した。ヒトにおいて、生体ドナーは、長期的または短期的に死亡率が上昇するといわれるだけでなく、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病に発展する可能性も上昇することが示唆されている。特に、複数本の腎動脈をもつドナーにおいては、臓器提供後に本態性高血圧の発症するリスクが上昇することや、また、レシピエントにおいては吻合部の狭窄や血栓形成の発生率が上昇し、レシピエントにおける短期的または長期的移植成績が悪化するといわれている。今回、ドナーネコは腹部大動脈自体を切離して腎臓を摘出しなければならず、腎臓摘出と動脈再建はうまく実施できたが、ドナーの危険性はかなり高いものとなった。さらに、Experiment 2として、腎臓を提供したネコにおいて、長期的にドナーネコの経過を観察した報告はないため、それを検討することによって、片側腎となった場合の腎臓へ与える影響に関して考察した。腎臓を提供したネコ(n=9)のうち

長期的に経過観察可能であった2例では、腎臓提供後に腎機能の悪化が認められた。また、尿中に結晶が観察され、閉塞などのリスクも上昇する可能性を示唆した。以上から、ネコ生体ドナーにおけるリスクや生命倫理のハードルは、かなり高いことが明らかとなった。よって、獣医臨床においても生体ドナーから死体ドナーなどへの変遷が必要な時期に直面しており、これら多くの問題を乗り越える心停止後腎移植方法などの検討が急務であることが示唆された。

第3章では、生体ドナーのリスクを受け、ラットを用いて死体腎移植モデルを作成し、基礎的研究を試みた。Experiment 1として、心停止後1時間、室温23℃で静置したラットから腎臓(マージナル腎)を摘出して移植されたレシピエントラットは全て移植後14日目まで生存したが、心停止後2時間静置したラットの腎臓を移植した群においては移植後5日以内に全て死亡した。この結果より、Experiment 2として、マージナル腎を細胞外液型組成のETKとラクトリンゲルを用いて4, 23, 37℃で保存し、移植までの時間をさらに延長することが可能か検討したところ、23℃のETKで1時間保存した群(ETK23)はその他の群と比較して有意に生存率が向上し、マージナル腎の保存には常温保存が適している可能性が示唆された。次に、Experiment 3として、細胞内液型組成のITKとUWを用いて、同様の検討を行った。全ての群において、ETK23よりも生存率が著明に短縮した。よって、マージナル腎の保存には細胞外液型が適している可能性を示した。全ての実験を通して、全グループの移植後腎機能は、血中尿素窒素、クレアチニンともに移植後2日目に最高値を示し、14日目までにほぼ正常値まで回復した。生存した個体における線維化スコアに有意差は認められなかった。よって、マージナル腎の保存には細胞外液型保存液で常温保存することで保存時間を延長することができ、移植後の生存性を改善することが示唆された。また、4,23,37℃に設定した保存液でマージナル腎を保存したのち、腎重量を測定した。ETK液は温度依存性に保存による腎重量を軽減させることが明らかとなった。腎重量の減少は、細胞浮

腫の軽減を意味するために、ETK液は線維化につながる細胞浮腫をも軽減する可能性を示唆した。以上より、マージナル腎の保存には、細胞外液型組成のETK液を常温で用いる保存法が最適であることが示された。

第4章では、保存後または移植後のマージナル腎のエネルギー動態を解析することによって、移植後の生存性との関連を検討した。保存腎のEnergy Charge (EC)の解析では、生存しているラットから摘出したフレッシュな腎臓とマージナル腎を4,23,37℃のETKまたはUWで保存し、ECを算出した。ECは全ての群において生存限界以下の値を示し、移植直前の臓器のエネルギー活性はほぼ枯渇状態であることがわかった。よって、全てのグループにおけるEC値はほぼ同値であったことから、われわれは保存中のEC値がマージナル腎を移植したあとのレシピエントの生存に、直接的に関与しているとはいえないと推察した。次に、Luciferase遺伝子を導入したLuciferase-Transgenic (Luc-Tg)ラットの腎臓から作成した組織チップを、ETK、UW、生理食塩水で保存した後、エネルギー活性の指標となる蛍光強度を測定した。ETK、UWの蛍光強度は生理食塩液と比較して有意に高値を維持したことから、保存液を用いることで移植腎のエネルギー状態をより良好に維持できる可能性を示した。さらに、Luc-Tgラットの腎臓をwildラットに移植し、移植腎の蛍光強度をIVISにて測定した。移植後生存可能であったラットの移植腎の蛍光強度は、移植後1時間より上昇し始め、早期にエネルギー活性が回復した。よって、マージナル腎移植後の生存性を改善するための重要な鍵は、再灌流後のECの急速な回復であることが示唆された。以上から、マージナル腎の保存には常温保存が適していることを裏付ける結果となり、移植後の生存性を改善するためには、再灌流後における移植腎の早急なエネルギー回復が重要な鍵となることが示唆された。

第5章では、移植後のマージナル腎の損傷をさらに低減させる方法として、MSCsを腎移植後に全身投与または移植直前の腎動脈から局所投与したレシピ

エントラットの生存性と腎機能への効果、副作用に関して検討した。Experiment 1として、移植再灌流直後に全身性にMSCsを静脈内投与することによって、移植後のレシピエントラットの生存性に及ぼす影響、または全身性の影響について検討した。MSCs全身投与はレシピエントラットの生存性に影響しなかったが、投与されたMSCsは投与後3日目まで肺に存在し、肺塞栓を起こす可能性が示された。次に、Experiment 2として、ドナーより摘出した移植直前の腎動脈よりMSCsを局所投与した際のレシピエントラットの生存性と腎機能への効果と、長期的な全身性への影響を検討した。MSCsを投与した群(MSC(+))は、MSCs非投与群(MSC(-))よりも生存性が向上した。移植後4日目では、MSC(+ )群の腎機能はMSC(-)群と比較して有意に改善した。腎動脈から投与されたMSCsは移植後24時間目まで、IVIS画像では腎臓に、LacZ染色では尿細管に局在することが確認され、損傷を受けた部位に集積する可能性が示唆された。移植後3ヶ月目では、移植腎やその他の臓器にMSCs投与による奇形腫などは認められなかった。以上より、AT-MSCsの局所投与は、全身性の経静脈的投与と比較して、レシピエントラットの生存性、移植腎の機能改善において、安全で、かつ有効な作用を示す可能性を示唆した。

本研究より、心停止後ドナーからのマージナル臓器を損傷から蘇生することによって、ひいては生体ドナーの生命倫理問題やリスクを回避するための有用な治療法を提供する可能性が示唆された。



## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本論文のご懇切なる御高閲とご指導を賜りました自治医科大学先端医療技術開発センター 小林英司客員教授、寺谷工講師、慈恵医科大学腎臓高血圧内科 横尾隆教授、北里大学小動物第2外科学研究室 岡野昇三教授に謹んで感謝の意を表します。

適切な助言とご協力をいただいた自治医科大学消化器一般外科 笠原尚哉病院助教、小動物第1外科学研究室 左近允巖准教授に深謝いたします。

## 参考文献

1. Adin, C.A., Gregory, C.R., Kyles, A.E. and Cowgill, L. (2001). Diagnostic predictors of complications and survival after renal transplantation in cats. *Vet. Surg.* 30, 515-521.
2. Adin, C.A. (2006). Canine renal transplantation: the next steps. *Vet. Surg.* 35, 103-104.
3. Anderson, D.J., Gage, F.H. and Weissman, I.L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.* 7, 393-395.
4. Aper, R. and Smeak, D. (2003). Complications and outcome after thoracodorsal axial pattern flap reconstruction of forelimb skin defects in 10 dogs, 1989-2001. *Vet. Surg.* 32, 378-384.
5. Appel, S.L., Houston, D.M., Moore, A.E. and Weese, J.S. (2010). Feline urate urolithiasis. *Can. Vet. J.* 51, 493-496.
6. Atkinson, D.E. and Walton, G.M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 242, 3239-3241.
7. Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G.C. and Phinney, D.G. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Cell Biochem.* 89, 1235-1249.
8. Bando, T., Kosaka, S., Liu, C., Hirai, T., Hirata, T., Yokomise, H., Yagi, K., Inui, K., Hitomi, S. and Wada, H. (1994). Effects of newly developed

- solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 108, 92-98.
9. Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kawamata, M., Kato, T., Okochi, H. and Ochiya, T. (2008). IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 26, 2705-2712.
  10. Belzer, F.O. and Southard, J.H. (1986). Organ preservation and transplantation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 224, 291-303.
  11. Benedetti, E., Troppmann, C., Gillingham, K., Sutherland, D.E., Payne, W.D., Dunn, D.L., Matas, A.J., Najarian, J.S. and Grussner, R.W. (1995). Short- and long-term outcomes of kidney transplants with multiple renal arteries. *Ann. Surg.* 221, 406-414.
  12. Berendsen, T.A., Bruinsma, B.G., Lee, J., D'Andrea, V., Liu, Q., Izamis, M.L., Uygun, K. and Yarmush, M.L. (2012). A simplified subnormothermic machine perfusion system restores ischemically damaged liver grafts in a rat model of orthotopic liver transplantation. *Transplant. Res.* 1, 6.
  13. Bernsteen, L., Gregory, C.R., Kyles, A.E., Wooldridge, J.D. and Valverde, C.R. (2000). Renal transplantation in cats. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 15, 40-45.
  14. Bernsteen, L., Gregory, C.R., Pollard, R.E., Griffey, S.M. and Menwrath, V. (1999). Comparison of two surgical techniques for renal transplantation in cats. *Vet. Surg.* 28, 417-420.

15. Blau, H.M., Brazelton, T.R. and Weimann, J.M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-841.
16. Brasile, L., Stubenitsky, B.M., Maurits, H., Lindell, S., Araneda, D., Buck, C., Bradfield, J., Haisch, C.E. and Kootstra, G. (2002). Overcoming severe renal ischemia: the role of ex vivo warm perfusion. *Transplantation* 73, 897-901.
17. Broaddus, K.D., Tillson, D.M., Lenz, S.D., Niemeyer, G.P., Brawner, W.R., Welch, J.A. and Lothrop, C.D. Jr. (2006). Renal allograft histopathology in dog leukocyte antigen mismatched dogs after renal transplantation. *Vet. Surg.* 35, 125-135.
18. Browne, B.J. and Kahan, B.D. (1994). Renal transplantation. *Surg. Clin. North. Am.* 74, 1097-1117.
19. Case, J.B., Kyles, A.E., Nelson, R.W., Aronson, L., Kass, P.H., Klose, T.C., Bailiff, N.L. and Gregory, C.R. (2007). Incidence of and risk factors for diabetes mellitus in cats that have undergone renal transplantation: 187 cases (1986-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 880-884.
20. Cataldo, A.D. and Puleo, S. (1998). Three microsurgical courses in Catania. *Microsurgery* 18, 449-453.
21. Chapman, A.G. and Atkinson, D.E. (1973). Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J. Biol. Chem.* 248, 8309-8312.
22. Chen, T., Fowler, A. and Toner, M. (2000). Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology* 40, 277-282.

23. Ciccocioppo, R., Bernardo, M.E., Sgarella, A., Maccario, R., Avanzini, M.A., Ubezio, C., Minelli, A., Alvisi, C., Vanoli, A., Calliada, F., Dionigi, P., Perotti, C., Locatelli, F. and Corazza, G.R. (2011). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 60, 788-798.
24. Clausen, T., Van, Hardeveld, C. and Everts, M.E. (1991). Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol. Rev.* 71, 733-774.
25. Contag, C.H. and Bachmann, M.H. (2002). Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 235-260.
26. Contag, P.R., Olomu, I.N., Stevenson, D.K. and Contag, C.H. (1998). Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat. Med.* 4, 245-247.
27. Council of Europe: Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Conversion on Human Rights and Biomedicine. 1996. Available at: <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/html/164.htm>. Accessed April 1, 2012.
28. Council of Europe. Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine concerning Transplantation of Organs and Tissues of Human Origin. 24 January 2002. Available at: <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/186.htm>. Accessed March 21, 2013.

29. Crowe, J.H., Carpenter, J.F. and Crowe, L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73-103.
30. Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701-703.
31. Cyranoski, D. (2010). Korean deaths spark inquiry. *Nature* 468, 485.
32. Davies, E.R. and Sutton, D. (1966). Hypertension and multiple renal arteries. *Am. Heart J.* 71, 285-286.
33. Derrick, J.R. and Tyson, D.R. (1960). The association of aberrant renal arteries and systemic hypertension. *Surgery* 48, 907-912.
34. Domínguez-Gil, B., Haase-Kromwijk, B., Van, Leiden, H., Neuberger, J., Coene, L., Morel, P., Corinne, A., Muehlbacher, F., Brezovsky, P., Costa, A.N., Rozental, R. and Matesanz, R.; European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation. Council of Europe (CD-P-TO). (2011). Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transpl. Int.* 24, 676-686.
35. Dominici, M., Le, Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J. and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
36. Duijvestein, M., Vos, A.C., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidler, H.H., Verhaar, A.P., Fibbe, W.E., van, den, Brink, G.R. and

- Hommes, D.W. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 59, 1662-1669.
37. Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F.C., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., Baan, C.C., Dahlke, M.H. and Hoogduijn, M.J. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front. Immunol.* 3, 297.
38. Elliott, D.A. (2000). Hemodialysis. *Clin. Tech. Small Animal. Pract.* 15, 136-148.
39. Elliott, J., Rawlings, J.M., Markwell, P.J. and Barber, P.J. (2000). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. *J. Small. Anim. Pract.* 41, 235-242.
40. Faure, J.P., Baumert, H., Han, Z., Goujon, J.M., Favreau, F., Dutheil, D., Petit, I., Barriere, M., Tallineau, C., Tillement, J.P., Carretier, M., Mauco, G., Papadopoulos, V. and Hauet, T. (2003). Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass. *Biochem. Pharmacol.* 66, 2241-2250.
41. Fukuse, T., Hirata, T., Nakamura, T., Ueda, M., Kawashima, M., Hitomi, S. and Wada, H. (1999). Role of saccharides on lung preservation. *Transplantation* 68, 110-117.
42. Fujishiro, J., Kudou, S., Iwai, S., Takahashi, M., Hakamata, Y., Kinoshita, M., Iwanami, S., Izawa, S., Yasue, T., Hashizume, K., Murakami, T. and Kobayashi, E. (2006). Use of sphingosine-1-phosphate 1 receptor agonist,

KRP-203, in combination with a subtherapeutic dose of cyclosporine A for rat renal transplantation. *Transplantation* 82, 804-812.

43. Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W., Yerebakan, C., Li, W., Gaebel, R., Li, R.K., Vollmar, B., Steinhoff, G. and Ma, N. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc. Res.* 77, 370-376.
44. Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., Lundberg, M., Lundberg, M. and Caplan, A.I. (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169, 12-20.
45. Geissler, E.K. (2012). The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant. Res.* 1, 11.
46. Geyer, J.R. and Poutasse, E.F. (1962). Incidence of multiple renal arteries on aortography. Report of a series of 400 patients, 381 of whom had arterial hypertension. *J. Am. Med. Assoc.* 182, 120-125.
47. Glodny, B., Cromme, S., Wortler, K. and Winde, G. (2001). A possible explanation for the frequent concomitance of arterial hypertension and multiple renal arteries. *Med. Hypotheses.* 56, 129-133.
48. Graf, T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99, 3089-3101.
49. Greca, G., Astuto, M., Randazzo, V., Latteri, S., Lanteri, R. and Puleo, S. (2001). Effectiveness of porto-intracaval shunt reduces the negative



effects of portal and caval clamping in the rabbit. *Microsurgery* 21, 179-182.

50. Gregory, C.R., Gourley, I.M., Kochin, E.J. and Broaddus, T.W. (1992). Renal transplantation for treatment of end-stage renal failure in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 285-291.
51. Gregory, C.R., Kyles, A.E., Bernsteen, L. and Mehl, M. (2006). Results of clinical renal transplantation in 15 dogs using triple drug immunosuppressive therapy. *Vet. Surg.* 35, 105-112.
52. Guerra, E.E., Didoné, E.C., Zanotelli, M.L., Vitola, S.P., Cantisani, G.P., Goldani, J.C., Keitel, E. and Garcia, V.D. (1992). Renal transplants with multiple arteries. *Transplant. Proc.* 24, 1868.
53. Hakamata, Y., Murakami, T. and Kobayashi, E. (2006). "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 81, 1179-1184.
54. Hays, R. and Waterman, A.D. (2008). Improving preemptive transplant education to increase living donation rates: reaching patients earlier in their disease adjustment process. *Prog. Transplant.* 18, 251-256.
55. Hoogduijn, M.J., Roemeling-van, Rhijn, M., Engela, A.U., Mensah, F.K., Franquesa, M., de Bruin, R.W., Betjes, M.G., Weimar, W. and Baan, C.C. (2013). Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion. *Stem Cells* 22, 2825-2835.
56. Hosgood, S.A., Barlow, A.D., Yates, P.J., Snoeijs, M.G., van, Heurn, E.L. and Nicholson, M.L. (2010). A pilot study assessing the feasibility of a

- short period of normothermic preservation in an experimental model of non heart beating donor kidneys. *J. Surg. Res.* 171, 283-290.
57. Hosgood, S.A. and Nicholson, M.L. (2011). First in man renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion. *Transplantation* 92, 735-738.
58. Houston, D.M., Moore, A.E., Favrin, M.G. and Hoff, B. (2003). Feline urethral plugs and bladder uroliths: a review of 5484 submissions 1998-2003. *Can. Vet. J.* 44, 974-977.
59. Inoue, S., Popp, F.C., Koehl, G.E., Piso, P., Schlitt, H.J., Geissler, E.K. and Dahlke, M.H. (2006). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 81, 1589-1595.
60. Iwai, S., Endo, K. and Kobayashi, E. (2006). Training protocol for feline renal transplantation, using rat vascular anastomosis. *Microsurgery* 26, 8-12.
61. Iwai, S., Kikuchi, T., Kasahara, N., Teratani, T., Yokoo, T., Sakonju, I., Okano, S. and Kobayashi, E. (2012). Impact of normothermic preservation with extracellular type solution containing trehalose on rat kidney grafting from a cardiac death donor. *PLoS ONE* 7, e33157.
62. Jackson, A.H., Degner, D.A., Jackson, I.T., Miyawaki, T., Silverberg, B., Bradford, M. and Andrus, L. (2003). Deep circumflex iliac cutaneous free flap in cats. *Vet. Surg.* 32, 341-349.
63. Jain, N.K. and Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 18, 24-36.

64. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
65. Kaimori, J., Iwai, S., Hatanaka, M., Teratani, T., Obi, Y., Tsuda, H., Isaka, Y., Yokawa, T., Kuroda, K., Ichimaru, N., Okumi, M., Yazawa, K., Rakugi, H., Nonomura, N., Takahara, S. and Kobayashi, E. (2013). Non-invasive magnetic resonance imaging in rats for prediction of the fate of grafted kidneys from cardiac death donors. *PLoS ONE* 8, e63573.
66. Kajiwar, N., Taguchi, M., Saito, H., Nakajima, S., Hayashi, A., Kawate, N., Konaka, C., Wada, H. and Kato, H. (1996). Evaluation of a new solution containing trehalose for twenty-hour canine lung preservation. *Transpl. Int.* 9, 194-200.
67. Kanazawa, H., Fujimoto, Y., Teratani, T., Iwasaki, J., Kasahara, N., Negishi, K., Tsuruyama, T., Uemoto, S. and Kobayashi, E. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS ONE* 6, e19195.
68. Katayama, M. and McAnulty, J.F. (2002). Renal transplantation in cats: patient selection and preoperative management. *Conpend. Contin. Educ. Vet.* 24, 868-873.
69. Katayama, M. and McAnulty, J.F. (2002). Renal transplantation in cats: techniques, complications, and immunosuppression. *Conpend. Contin. Educ. Vet.* 24, 874-882.

70. Kay, M.D., Hosgood SA, Harper SJ, Bagul A, Waller HL, Rees, D. and Nicholson, M.L. (2007). Static normothermic preservation of renal allograft using a novel nonphosphate buffered preservation solution. *Transpl. Int.* 20, 88-92.
71. Kay, M.D., Hosgood, S.A., Harper, S.J., Bagul, A., Waller, H.L. and Nicholson, M.L. (2011). Normothermic versus hypothermic ex vivo flush using a novel phosphate-free preservation solution (AQIX) in porcine kidneys. *J. Surg. Res.* 171, 275-282.
72. Kim, J.M., Kim, S.J., Joh, J.W., Kwon, C.H., Song, S., Shin, M., Kim, B.N. and Lee, S.K. (2011). Kidney donation after cardiac death in Korea. *Transplant. Proc.* 43, 1434-1437.
73. Klausner, J.M., Paterson, I.S., Goldman, G., Kobzik, L., Rodzen, C., Lawrence, R., Valeri, C.R., Shepro, D. and Hechtman, H.B. (1989). Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am. J. Physiol.* 256, F794-802.
74. Klein, I., Steger, U., Timmermann, W., Thiede, A. and Gassel, H.J. (2003). Microsurgical training course for clinicians and scientists at a German university hospital: a 10-year experience. *Microsurgery* 23, 461-465.
75. 小林 英司 (2010). ポストイスタンブール宣言. *日本臨床* 68, 2229-2233.
76. Kobayashi, E., Kamada, N., Goto, S. and Miyata, M. (1993). Protocol for the technique of orthotopic liver transplantation in the rat. *Microsurgery* 14, 541-546.
77. Kootstra, G., Daemen, J.H. and Oomen, A.P. (1995). Categories of non-heart-beating donors. *Transplant. Proc.* 27, 2893-2894.

78. Kunter, U., Rong, S., Boor, P., Eitner, F., Müller-Newen, G., Djuric, Z., van, Roeyen, C.R., Konieczny, A., Ostendorf, T., Villa, L., Milovanceva-Popovska, M., Kerjaschki, D. and Floege, J. (2007). Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1754-1764.
79. Lambilliotte, J.P., Pector, J.C. and Verbeustel, S. (1973). Effect of portal arterializations on hepatic blood flow and ammonia clearance after end-to-side portacaval shunt. *Digestion* 9, 332-342.
80. Le, Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. and Ringdén, O.; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-1586.
81. Lee, S.H. and Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50, 668-672.
82. Lentine, K.L., Schnitzler, M.A., Xiao, H., Saab, G., Salvalaggio, P.R., Axelrod, D., Davis, C.L., Abbott, K.C. and Brennan, D.C. (2010). Racial variation in medical outcomes among living kidney donors. *N. Engl. J. Med.* 363, 724-732.
83. Lippincott-Schwartz, J. and Patterson, G.H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300, 87-91.

84. Liu, Z., Zhu, B., Yun, P., Wang, P., Wang, X. and Xu, H. (2008). Are we ready to utilize non-heart-beating donors for clinical allotransplantation in China? *Transplant. Proc.* 40, 1018-1020.
85. Luque, P., Alvarez-Vijande, R., Alcaraz, A., Aguilar, A., Alcoberro, J., Rodriguez, A., Gibanel, R., Calatrava, P., Helena, M., Llopis, J., Crisol, I., Solé, M., Farré, X., Talbot-Wright, R. and Carretero, P. (1999). Experimental study of the cellular energy charge in pig kidney transplants from non-heart-beating donors. *Transplant. Proc.* 31, 2352-2353.
86. Marshall, A.G. (1951). Aberrant renal arteries and hypertension. *Lancet* 2, 701-705.
87. Mathews, K.G. and Gregory, C.R. (1997). Renal transplantation in cats: 66 cases (1987-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211, 1432-1436.
88. Matsumoto, K., Yokoo, T., Matsunari, H., Iwai, S., Yokote, S., Teratani, T., Gheisari, Y., Tsuji, O., Okano, H., Utsunomiya, Y., Hosoya, T., Okano, H.J., Nagashima, H. and Kobayashi, E. (2012). Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 30, 1228-1235.
89. McAnulty, J.F. (1998). The effect of calcium on hypothermia-facilitated resuscitation of warm ischemic kidney tissue slices: a role for the mitochondrial permeability transition pore? *Cryobiology* 36, 12-19.
90. McKay, R. (2002). A more astonishing hypothesis. *Nat. Biotechnol.* 20, 426-427.

91. Melcher, M.L., Leiser, D.B., Gritsch, H.A., Milner, J., Kapur, S., Busque, S., Roberts, J.P., Katznelson, S., Bry, W., Yang, H., Lu, A., Mulgaonkar, S., Danovitch, G.M., Hil, G. and Veale, J.L. (2012). Chain transplantation: initial experience of a large multicenter program. *Am. J. Transplant.* 12, 2429-2436.
92. Mishina, M., Watanabe, T., Maeda, H., Fujii, K., Wakao, Y., Takahashi, M. and Ejima, H. (1996). Renal transplantation in cats with chronic renal failure. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 655-658.
93. Mizuno, H. (2010). Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 442-449.
94. Moen, J., Claesson, K., Pienaar, H., Lindell, S., Ploeg, R.J., McAnulty, J.F., Vreugdenhil, P., Southard, J.H. and Belzer, F.O. (1989). Preservation of dog liver, kidney, and pancreas using the Belzer-UW solution with a high sodium and low-potassium content. *Transplantation* 47, 940-945.
95. Molinari, M., Matz, J., Decoutere, S., El-Tawil, K., Abu-Wasel, B. and Keough, V. (2013). Live liver donors' risk thresholds: risking a life to save a life. *H.P.B. (Oxford)* Epub ahead of print.
96. Monchik, G.J. and Russell, P.S. (1971). Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 70, 693-702.
97. Moriura, S., Nimura, Y., Sato, T. and Shionoya, S. (1890). Effects of acute portal hypertension by portal venous stenosis on systemic hemodynamics in dogs. *Eur. Surg. Res.* 22, 113-119.

98. Moriyama, S., Utoh, J., Murai, Y., Hagiwara, S., Kunitomo, R., Nishi, K. and Kitamura, N. (2001). Functional, metabolic, and histological changes of vascular tissue after warm ischemia. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 7, 143-149.
99. Navarro, A.P., Asher, J., Sohrabi, S., Reddy, M., Stamp, S., Carter, N. and Talbot, D. (2009). Peritoneal cooling may provide improved protection for uncontrolled donors after cardiac death: an exploratory porcine study. *Am. J. Transplant.* 6, 1317-1323.
100. Negishi, K., Teratani, T., Iwasaki, J., Kanazawa, H., Kasahara, N., Lefor, A.T., Uemoto, S., Fujimoto, Y. and Kobayashi, E. (2011). Luminescence technology in preservation and transplantation for rat islet. *Islets* 3, 111-117.
101. Ninichuk, V., Gross, O., Segerer, S., Hoffmann, R., Radomska, E., Buchstaller, A., Huss, R., Akis, N., Schlöndorff, D. and Anders, H.J. (2006). Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int.* 70, 121-129.
102. Nomura, G., Kurosaki, M., Kondo, T. and Takeuchi, J. (1971). Essential hypertension and multiple renal arteries. *Am. Heart J.* 81, 274-280.
103. Omokawa, S., Asanuma, Y. and Koyama, K. (1990). Evaluation of hemodynamics and hepatic mitochondrial function on extrahepatic portal obstruction in the rat. *World J. Surg.* 14, 247-254.
104. Organ Procurement and Transplantation Network. Policy 3.5. Organ Distribution: Allocation of Deceased Kidneys. Available from



<http://OPTN.transplant.hrsa.gov/policiesAndBylaws/policies.asp>.

Accessed November 14, 2012.

105. Oyagi, S., Hirose, M., Kojima, M., Okuyama, M., Kawase, M., Nakamura, T., Ohgushi, H. and Yagi, K. (2006). Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J. Hepatol.* 44, 742-748.
106. Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M.H. and Remuzzi, G. (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364, 1814-1827.
107. Peterson, M.E. and Becker, D.V. (1995). Radioiodine treatment of 524 cats with hyperthyroidism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1422-1428.
108. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
109. Pomfret, E.A., Sung, R.S., Allan, J., Kinkhabwala, M., Melancon, J.K. and Roberts, J.P. (2008). Solving the organ shortage crisis: the 7th annual American Society of Transplant Surgeon's State-of-the-Art Winter Symposium. *Am. J. Transplant.* 8, 745-752.
110. Pradel, F.G., Suwannaprom, P., Mullins, C.D., Sadler, J. and Bartlett, S.T. (2008). Short-term impact of an educational program promoting live donor kidney transplantation in dialysis centers. *Prog. Transplant.* 18, 263-272.
111. Pratschke, S., Eder, M., Heise, M., Nadalin, S., Pascher, A., Schemmer, P., Scherer, M.N., Ulrich, F., Wolters, H., Jauch, K.W., Wöhling, D. and Angele, M.K. (2013). Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): a

- prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplant. Res.* 2:3.
112. Raffin, J.P. and Thébault, M.T. (1996). Modelization of coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP ratio: application to energy metabolism in invertebrate and vertebrate skeletal muscle. *C. R. Acad. Sci. III.* 319, 9-15.
113. Ramella, S.G., Hadj-Aissa, A., Barbieux, A., Steghens, J.P., Colpart, J.J., Zech, P. and Pozet, N. (1995). Evaluation of a high sodium-low potassium cold-storage solution by the isolated perfused rat kidney technique. *Nephrol. Dial. Transplant.* 10, 842-846.
114. Reddy, S.P., Brockmann, J. and Friend, P.J. (2009). Normothermic perfusion: A mini-review. *Transplantation* 87, 631-632.
115. Renkens, J.J., Rouflart, M.M., Christiaans, M.H., Van, Den, Berg-Loonen, E.M., Van, Hooffet, J.P. and van, Heurn, L.W. (2005). Outcome of non-heart-beating donor kidneys with prolonged delayed graft function after transplantation. *Am. J. Transplant.* 5, 2704-2709.
116. Rieck, A.F. and Reis, R.H. (1953). Variations in the pattern of renal vessels and their relation to the type of posterior vena cava in the cat *Felis domestica*. *Am. J. Anat.* 93, 457-474.
117. Rodrigue, J.R., Cornell, D.L., Lin, J.K., Kaplan, B. and Howard, R.J. (2007). Increasing live donor kidney transplantation: a randomized controlled trial of a home-based educational intervention. *Am. J. Transplant.* 7, 394-401.

118. Roth, A.E., Sönmez, T., Unver, M.U., Delmonico, F.L. and Saidman, S.L. (2006). Utilizing list exchange and nondirected donation through 'chain' paired kidney donations. *Am. J. Transplant.* 6, 2694-2705.
119. Roza, A.M., Perloff, L.J., Naji, A., Grossman, R.A. and Barker, C.F. (1989). Living-related donors with bilateral multiple renal arteries. A twenty-year experience. *Transplantation* 47, 397-399.
120. Salahudeen, A.K., Haider, N. and May, W. (2004). Cold ischemia and the reduced longterm survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int.* 65, 713-718.
121. Salahudeen, A.K., Huang, H., Joshi, M., Moore, N.A. and Jenkins, J.K. (2003). Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am. J. Transplant.* 3, 273-280.
122. Schilling, M., Saunder, A., Ametani, M., Southard, J.H. and Belzer, F.O. (1993). Prolonged kidney preservation by inhibition of arachidonic acid metabolism. *Transplant. Proc.* 25, 1629-1630.
123. Schmiedt, C., Penzo, C., Schwab, M., Dubielzig, R. and McAnulty, J. (2006). Use of capecitabine after renal allograft transplantation in dog erythrocyte antigen-matched dogs. *Vet. Surg.* 35, 113-124.
124. Segev, D.L., Gentry, S.E., Warren, D.S., Reeb, B. and Montgomery, R.A. (2005). Kidney paired donation and optimizing the use of live donor organs. *J. Am. Med. Assoc.* 293, 1883-1890.
125. Segev, D.L., Muzaale, A.D., Caffo, B.S., Mehta, S.H., Singer, A.L., Taranto, S.E., McBride, M.A. and Montgomery, R.A. (2010). Perioperative

- mortality and long-term survival following live kidney donation. *J. Am. Med. Assoc.* 303, 959-966.
126. Singh, R.P., Farney, A.C., Rogers, J., Zuckerman, J., Reeves-Daniel, A., Hartmann, E., Iskandar, S., Adams, P. and Stratta, R.J. (2011). Kidney transplantation from donation after cardiac death donors: lack of impact of delayed function on post-transplant outcomes. *Clin. Transplant.* 25, 255-264.
127. Song, S., Kamath, S., Mosquera, D., Zigova, T., Sanberg, P., Vesely, D.L. and Sanchez-Ramos, J. (2004). Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. *Exp. Neurol.* 185, 191-197.
128. Sullivan, C., Leon, J.B., Sayre, S.S., Marbury, M., Ivers, M., Pencak, J.A., Bodziak, K.A., Hricik, D.E., Morrison, E.J., Albert, J.M., Navaneethan, S.D., Reyes, C.M. and Sehgal, A.R. (2012). Impact of navigators on completion of steps in the kidney transplant process: a randomized, controlled trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 1639-1645.
129. Sung, R.S., Guidinger, M.K., Christensen, L.L., Ashby, V.B., Merion, R.M., Leichtman, A.B. and Port, F.K. (2006). Development and current status of ECD kidney transplantation. *Clin. Transpl.* 37-55.
130. Suthard, J.H. and Belzer, F.O. (1995). Organ preservation. *Annu. Rev. Med.* 46, 235-247.
131. Takeda, S., Takahashi, M., Sado, Y., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Shimizu, H., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ookawara, S., Asano, Y., Kusano, E. and Kobayashi, E. (2004). Prevention of glomerular crescent formation

- in glomerulonephritis by mycophenolate mofetil in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 2228-2236.
132. Tatsumi, K., Ohashi, K., Matsubara, Y., Kohori, A., Ohno, T., Kakidachi, H., Horii, A., Kanegae, K., Utoh, R., Iwata, T. and Okano, T. (2013). Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 203-209.
133. Teratani, T., Kasahara, N. and Doi, J. (2013). Use of mesenchymal stem cell-conditioned medium to activate islets in preservation solution. *Cell Med.* Epub ahead of print.
134. Teratani, T. and Kobayashi, E. (2012). In vivo bioimaging rats for translational research in cell and tissue transplantation. *Cell Med.* 3, 3-11.
135. Thirabanasak, D., Tantiwongse, K. and Thorner, P.S. (2010). Angiomyeloproliferative lesions following autologous stem cell therapy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1218-1222.
136. Treckmann, J., Moers, C., Smits, J.M., Gallinat, A., Maathuis, M.H., van, Kasterop-Kutz, M., Jochmans, I., Homan, van, der, Heide, J.J., Squifflet, J.P., van, Heurn, E., Kirste, G.R., Rahmel, A., Leuvenink, H.G., Pirenne, J., Ploeg, R.J. and Paul, A. (2011). Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death. *Transpl. Int.* 24, 548-554.
137. Tveita, T., Johansen, K., Lien, A.H., Myklebust, R. and Lindal, S. (2005). Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *A. P. M. I. S.* 113, 13-20.

138. Urbaitis, K.B. (1984). Effect of ischemia and hypertonic saline loading on renal adenine nucleotides. *Ren. Physiol.* 7, 22-31.
139. Wang, N., Li, Q., Zhang, L., Lin, H., Hu, J., Li, D., Shi, S., Cui, S., Zhou, J., Ji, J., Wan, J., Cai, G. and Chen, X. (2012). Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS ONE* 7, e43768.
140. Weber, D., Moser, N. and Roßlein, R. (1997). A synthetic model for microsurgical training: a surgical contribution to reduce the number of animal experiments. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 7, 204-206.
141. Welters, H.H., Brockman, J.G., Deller, R., Suwelack, B., Krieglsteina, C.F. and Senninger, N. (2006). Kidney transplantation using donors with history of diabetes and hypertension. *Transplant. Proc.* 38, 664-665.
142. Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 116, 3295-3302.
143. Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J. and Port, F.K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* 341, 1725-1730.
144. World Health Organization: Guiding principles on human organ transplantation. As endorsed by the sixty-third World Health Assembly in May 2010, in Resolution WHA63.22. Available at: [www.who.int](http://www.who.int).

[who.int/entity/transplantation/Guiding\\_PrinciplesTransplantation\\_WHA63.22en.pdf](http://who.int/entity/transplantation/Guiding_PrinciplesTransplantation_WHA63.22en.pdf). Accessed April 1, 2012.

145. World Medical Association: World Medical Association Statement on Human Organ Donation and Transplantation. Adopted by the 52nd WMA General Assembly in Edinburgh, Scotland during October 2000 and Revised by the WMA General Assembly, Pilanesberg, South Africa, October 2006. Available at:  
[www.wma.net/en/30publications/10policies/wma/index.html](http://www.wma.net/en/30publications/10policies/wma/index.html). Accessed April 1, 2012.
146. Yang, X.F., He, X., He, J., Zhang, L.H., Su, X.J., Dong, Z.Y., Xu, Y.J., Li, Y., and Li, Y.L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 18, 59.
147. Yarlagadda, S.G., Coca, S.G., Formica, R.N., Poggio, E.D. and Parikh, C.R. (2009). Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 1039-1047.
148. Yoshida, H., Okuno, H., Kamoto, H., Habuchi, T., Toda, Y., Hasegawa, S., Nakamura, T., Wada, H., Ogawa, O. and Yamamoto, S. (2002). Comparison of the effectiveness of ET-Kyoto with Euro-Collins and University of Wisconsin solution in cold renal storage. *Transplantation* 74, 1231-1236.
149. Zhu, B., Furuki, T., Okuda, T. and Sakurai, M. (2007). Natural DNA mixed with trehalose persists in B-form double-stranding even in the dry state. *J. Phys. Chem. B.* 111, 5542-5544.

150. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228.



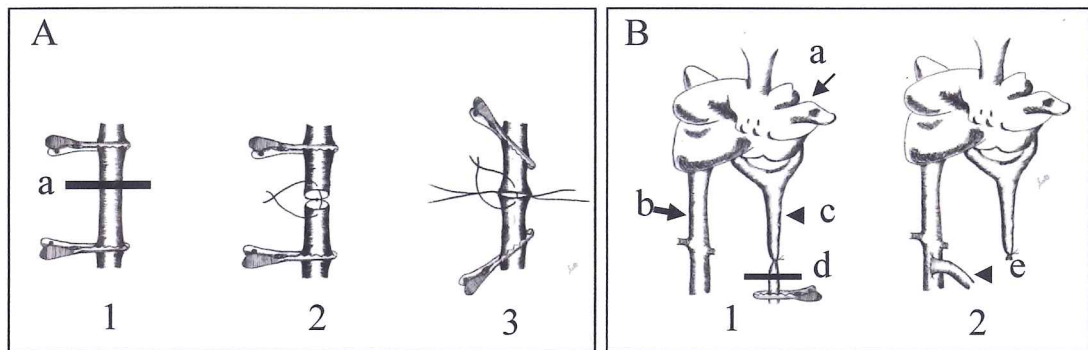


図1 血管吻合法

A;動脈吻合：単純結紮縫合を用いた端々吻合法

- (1) aの部位で腹部大動脈を切離
- (2) 背側と腹側に支持糸を設置し牽引
- (3) 支持糸の間に単純結紮縫合を追加(8-13針)

B;静脈吻合：連続吻合を用いた端側吻合法

- (1) 門脈を結紮し切離
- (2) 後大静脈に門脈と同径程度の切開を加え、後壁、前壁の順で連続縫合した

(a;肝臓、b;後大静脈、c;門脈、d;切離ライン、e;吻合部)



図2 吻合練習終了後の腹部大動脈と後大静脈

狭窄は認められず、血流は良好であった。

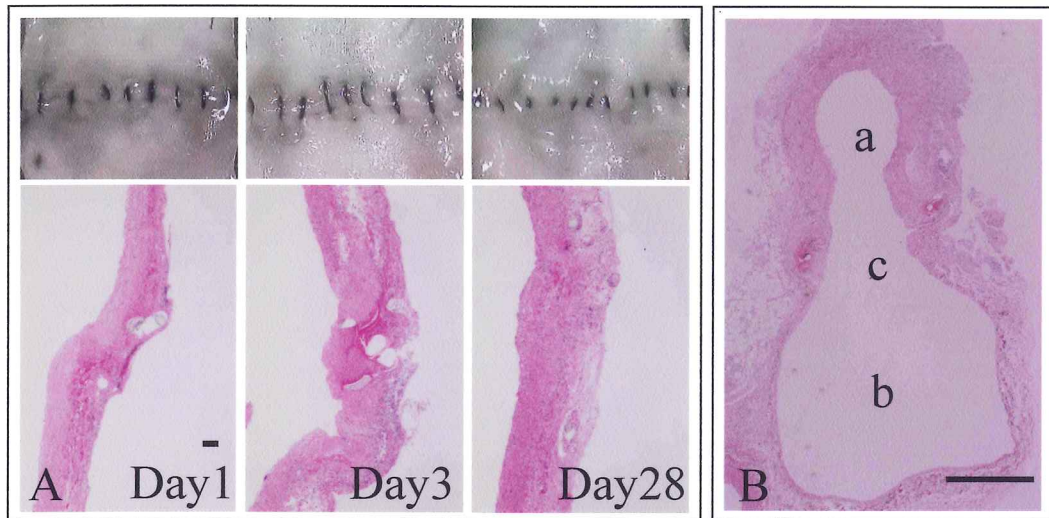


図3 血管吻合部の病理組織学的所見

- A; 単純結紮縫合で端々吻合した動脈吻合部(HE染色)  
 吻合後3日目までは縫合糸が表面に残存しているが、  
 吻合後28日目には内皮で被覆された。
- B; 連続縫合で端側吻合した静脈吻合部(HE染色)  
 吻合後7日目までに内皮で被覆された。
- Bar = 1mm。(a;門脈、b;後大静脈、c;吻合部)

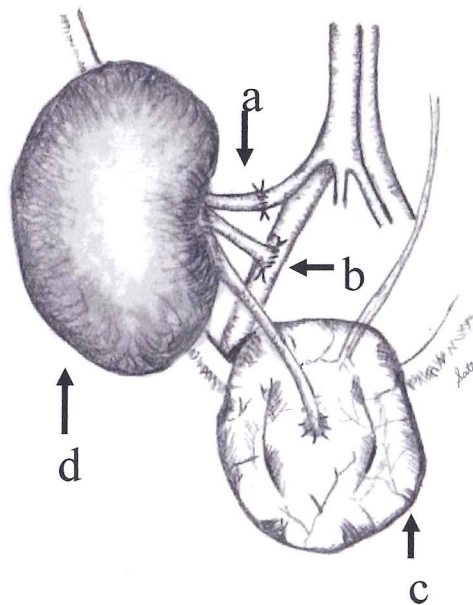
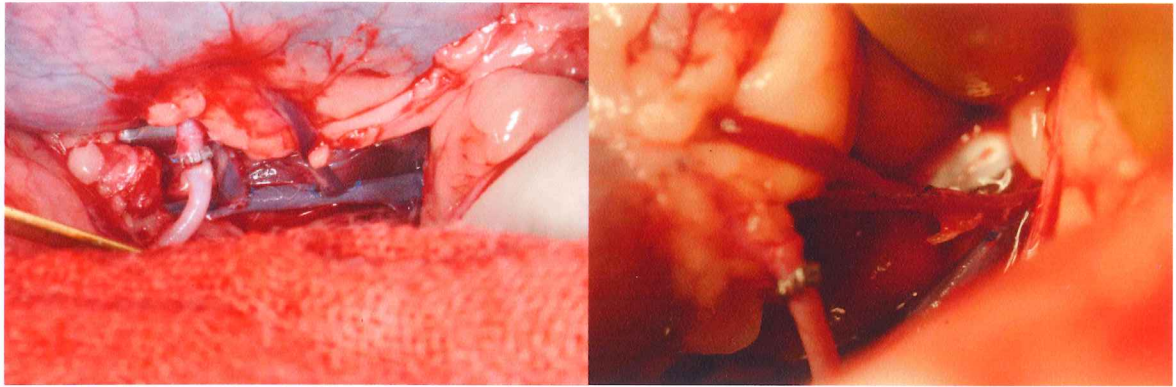


図4 ネコ腎移植法

腎動脈は外腸骨動脈へ連続縫合で端々吻合し、腎静脈は外腸骨静脈へ連続縫合で端側吻合した。

(a;動脈吻合部、b;静脈吻合部、c;膀胱、d;腎臓)



A

B

図5 2本の腎静脈をもつ2症例

A; 2腎臓脈をそれぞれ外腸骨静脈へ端側吻合

B; 1本の腎静脈を外腸骨静脈へ、もう1本を1本目の腎静脈に端側吻合

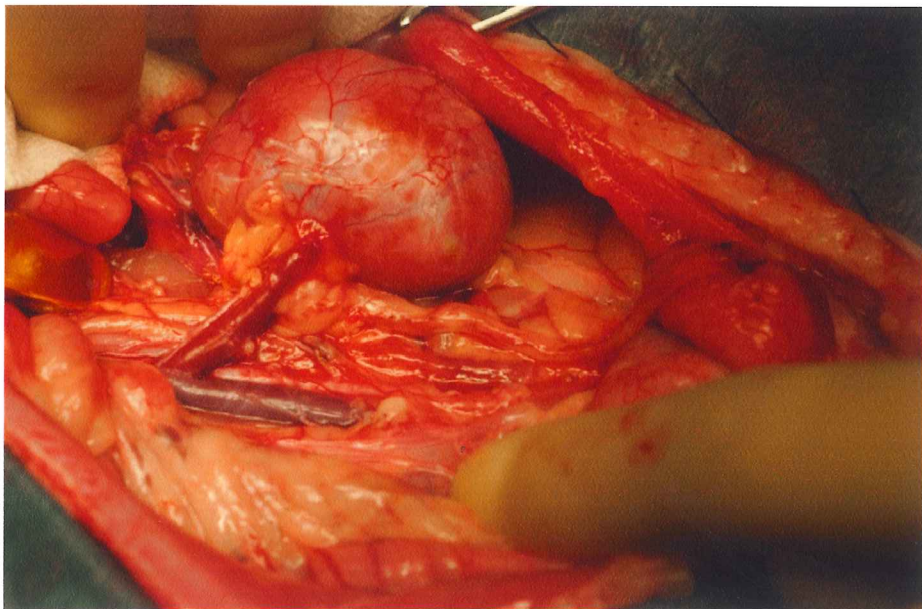


図6 新たなネコ腎移植法

腎動静脈は腹部大動脈と後大静脈にそれぞれ端側吻合した。  
尿管は新膀胱尿管吻合術を行った。

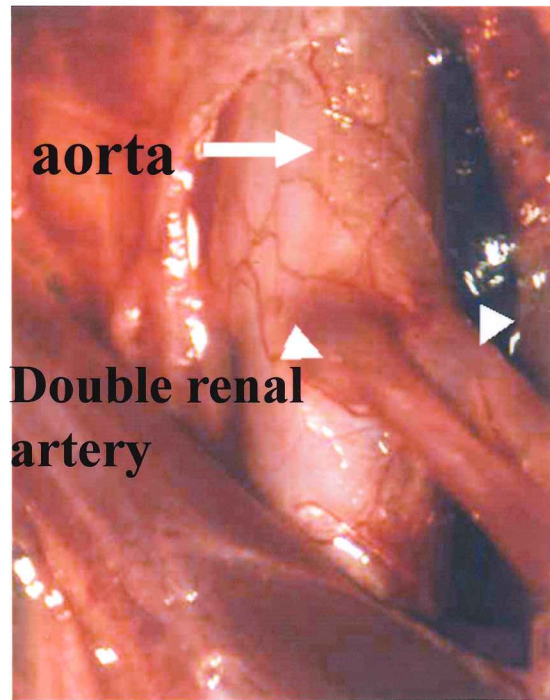


図7 2本の腎動脈が腹部大動脈から直接分岐していた。

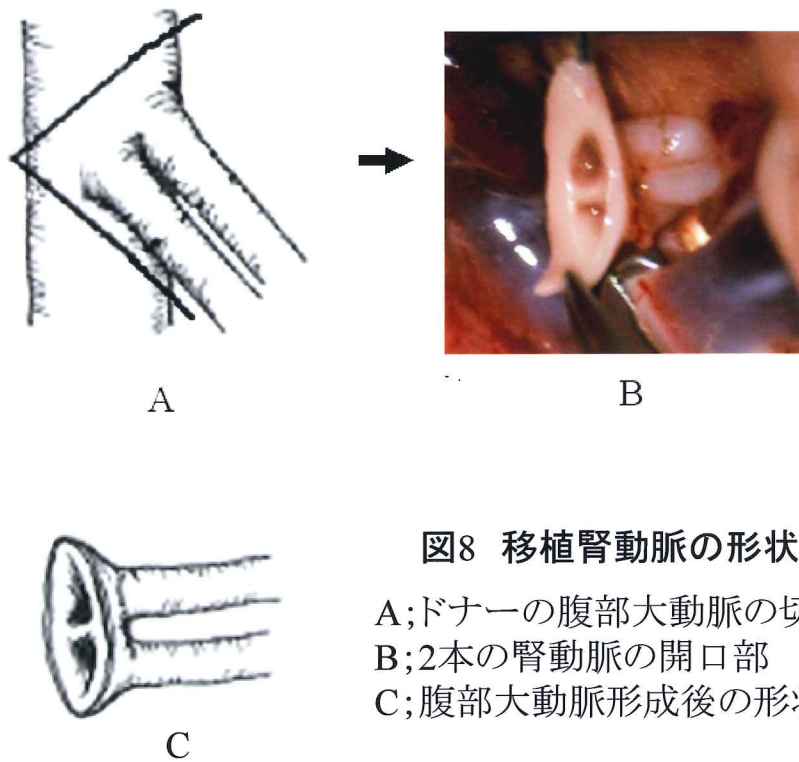


図8 移植腎動脈の形状

A;ドナーの腹部大動脈の切離ライン

B;2本の腎動脈の開口部

C;腹部大動脈形成後の形状

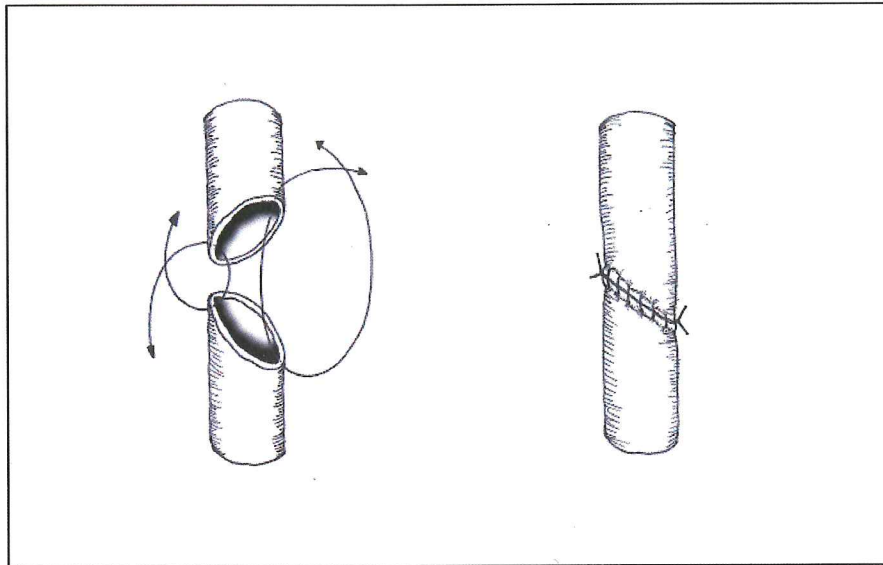


図9 ドナー腹部大動脈の再建法

ドナー腹部大動脈を反転して背側面を縫合することが不可能であったため、ドナー腹部大動脈は連続縫合で再建した。

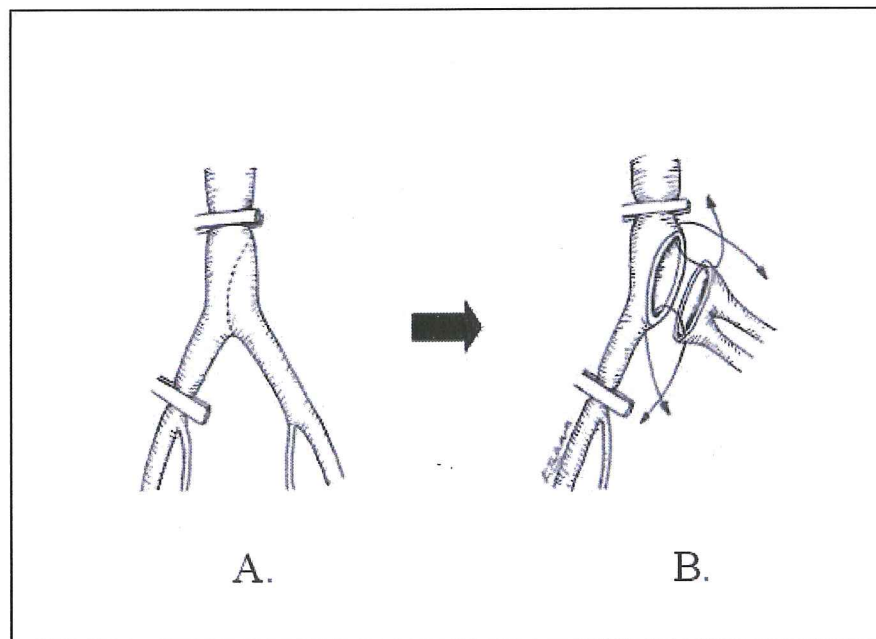


図10 レシピエントにおける動脈再建法

A; 形成後の移植腎動脈開口部と同経に外腸骨動脈分岐部を切離した。

B; 後壁、前壁の順に単純結紮縫合した。

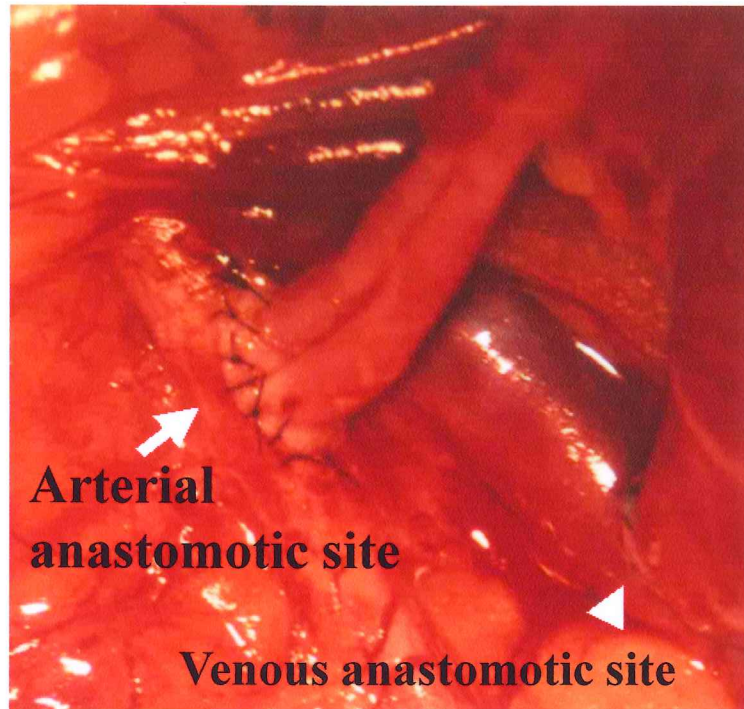


図11 レシピエントにおける動静脈吻合部

単純結紮縫合で吻合した。再還流後の血流は良好であった。

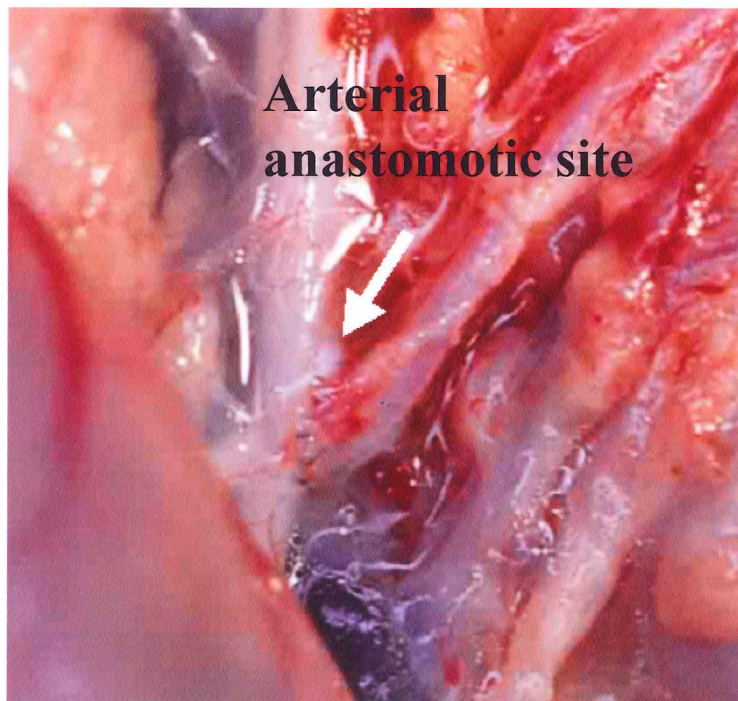


図12 剖検時の動脈吻合部

動脈吻合部には狭窄や血栓などは認められなかった。

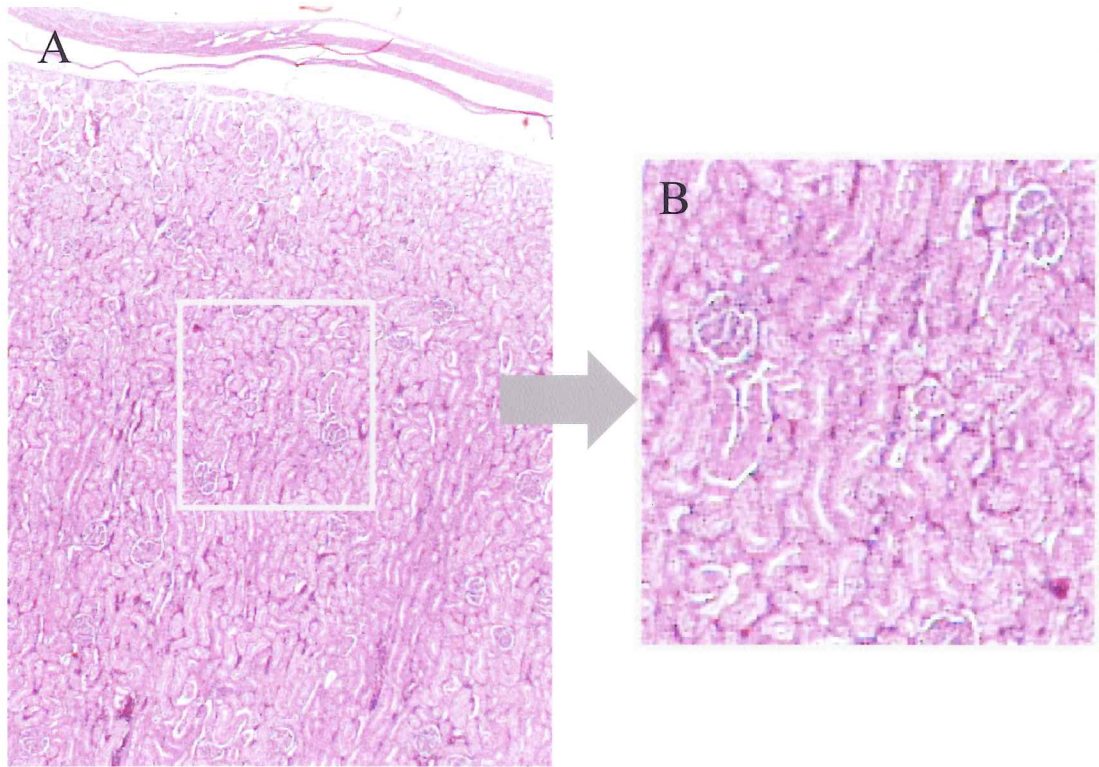


図13 移植腎の病理組織学的検査所見

移植後30日目の移植腎の組織学的構造は正常であった。  
(拡大倍率: A; ×20、B; ×100)

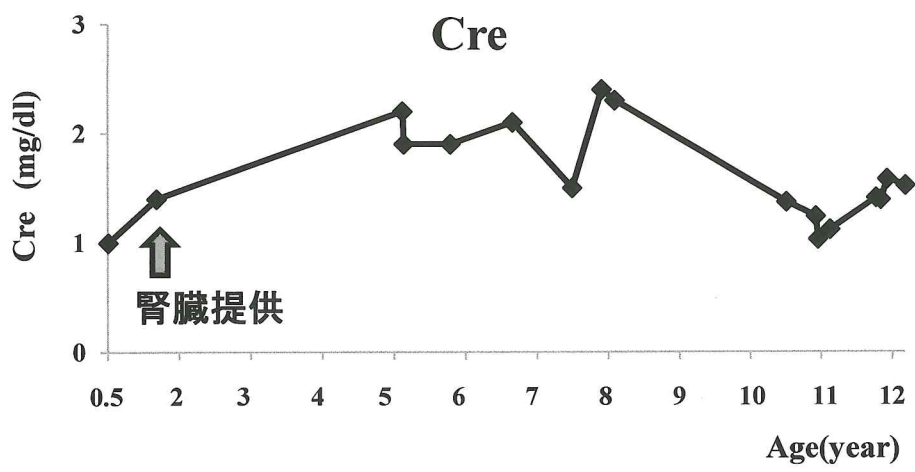
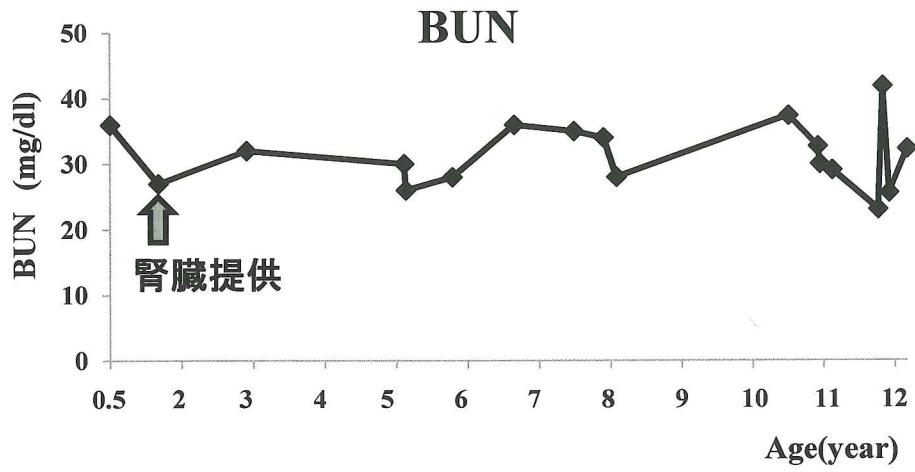


図14 ドナーとなったCat 1におけるBUN、Creの推移



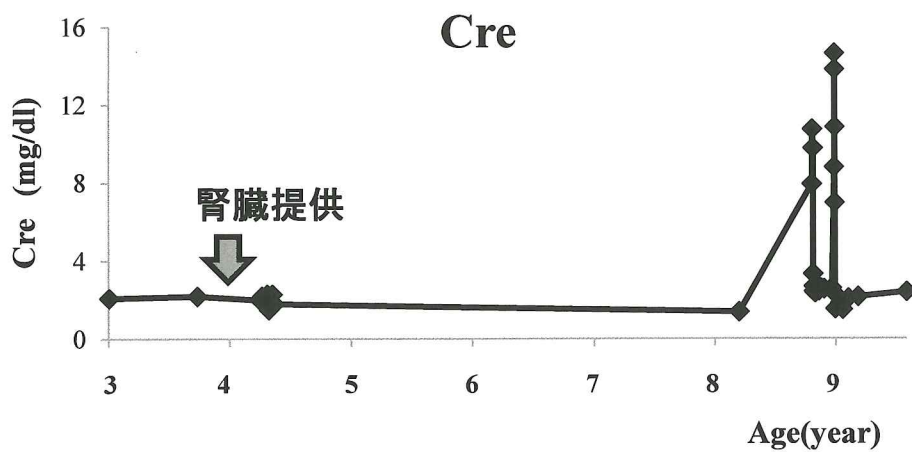
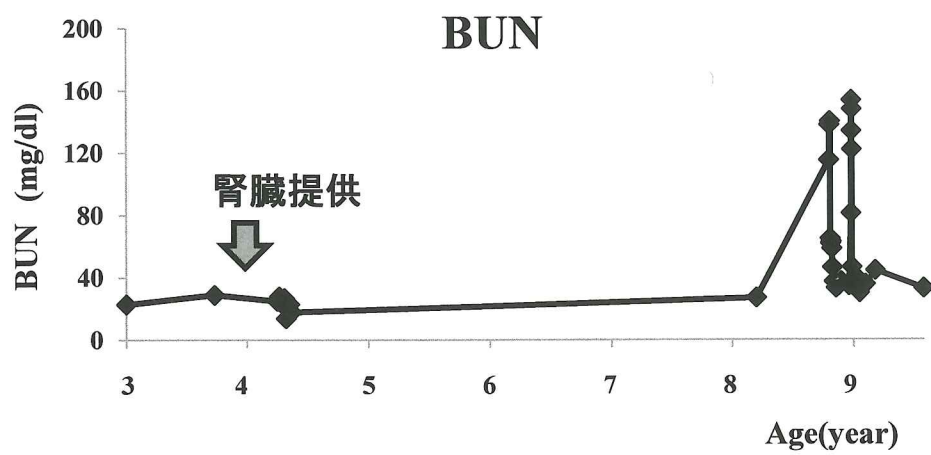


図15 ドナーとなったCat 2におけるBUNCreの推移

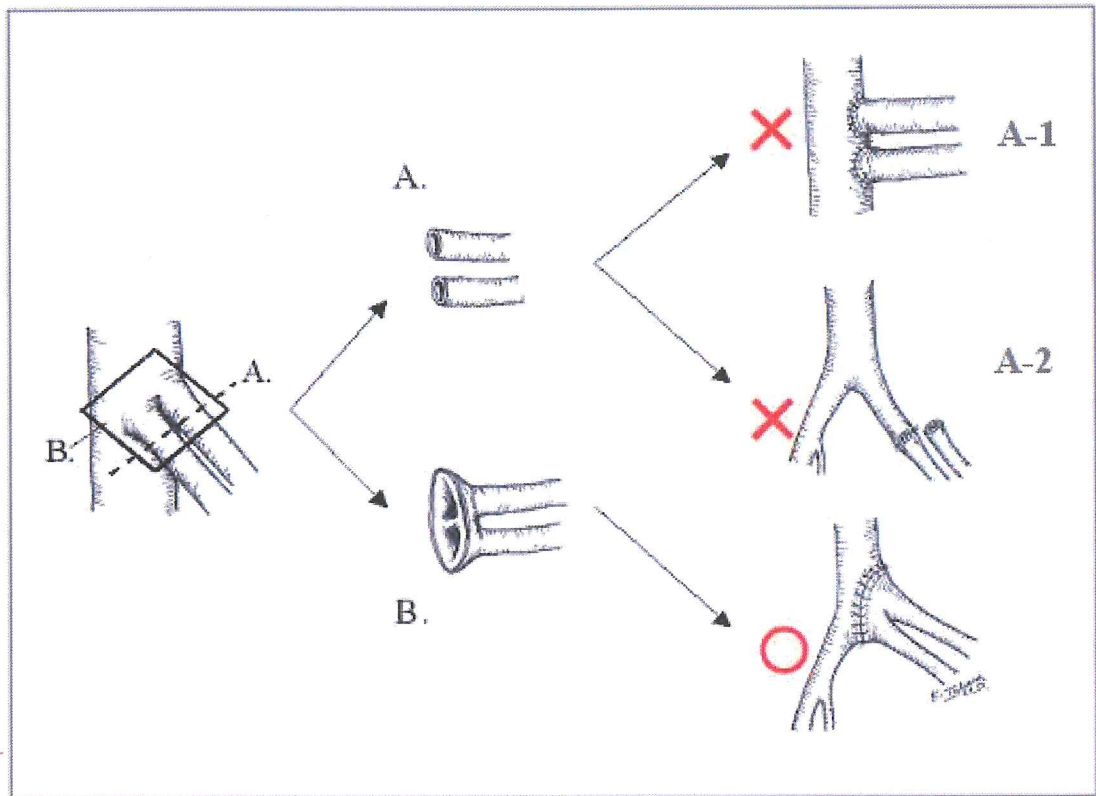


図16 吻合法の選択

- A-1; 移植腎動脈の直径が細すぎた。
- A-2; 2本の移植腎動脈をそれぞれ吻合する血管が確保できなかった。
- B; 外腸骨分岐部を移植腎動脈開口部の直径と合わせて切離し吻合した。

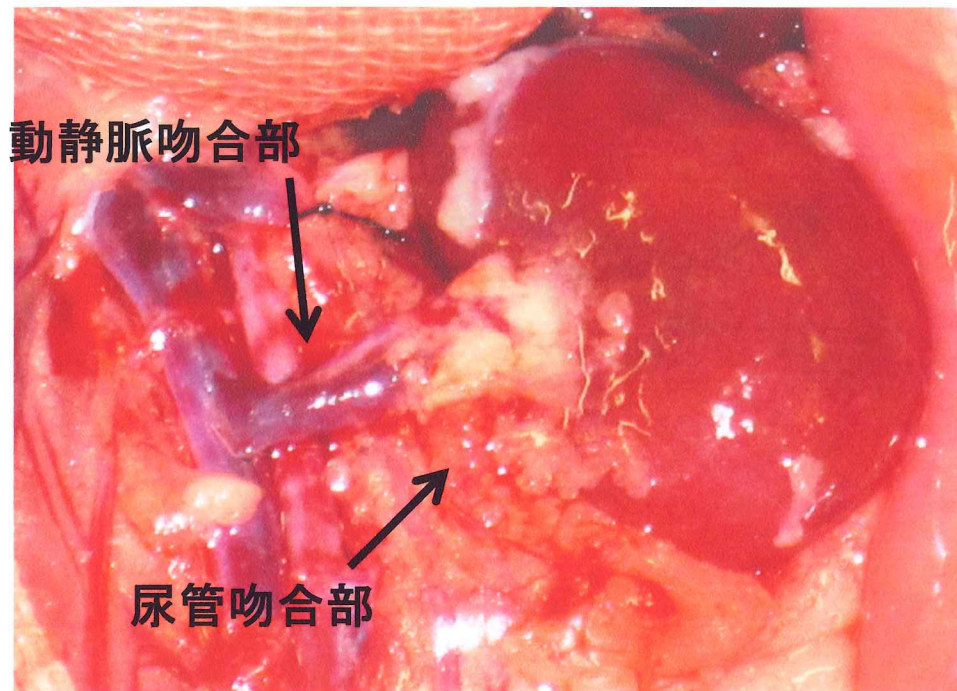


図17 ラットマージナル腎臓移植後

腎動静脈は腹部大動脈と連続縫合で後大静脈に端側吻合。  
尿管は腎門に近い部位で単純結紮縫合で端々吻合。

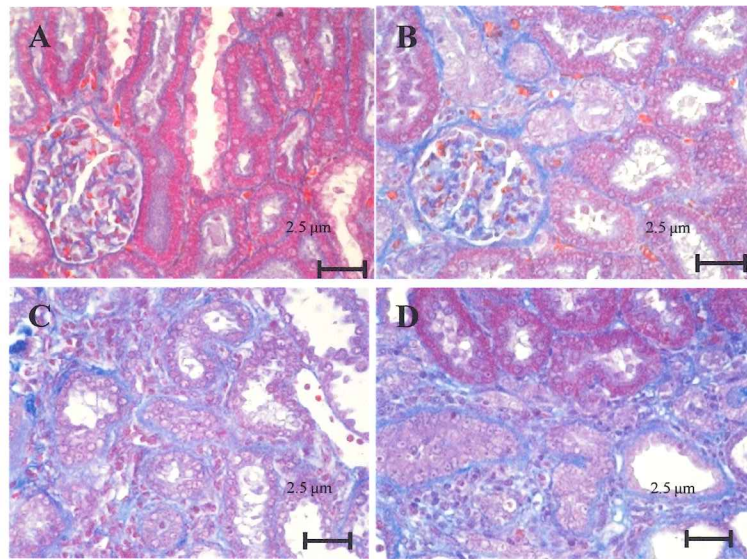


図18 病理組織学的線維化スコア

スコア:A;0=なし、B;1=軽度、C;2=中程度、D;3=重度。

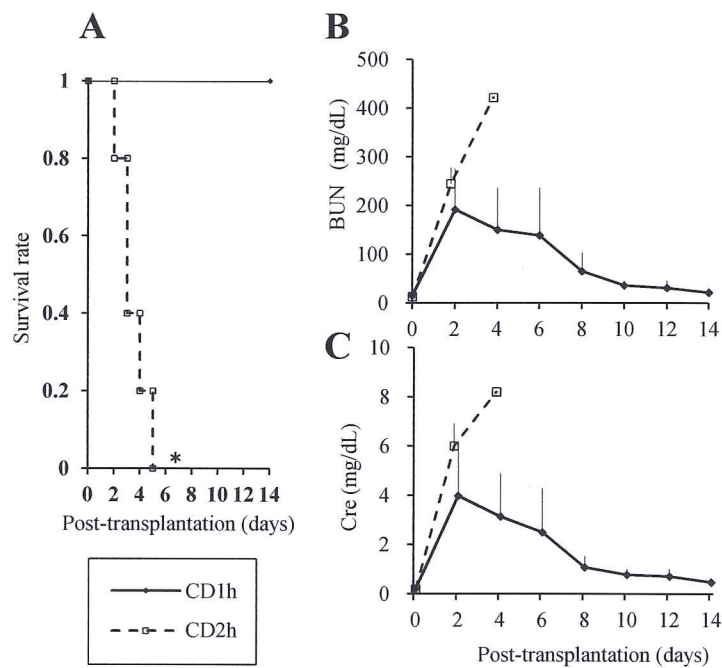


図19 Experiment 1における生存率とBUN、Creの変動

A;生存率:CD1hグループの生存率はCD2hグループと比較して有意に高かった(\*:p<0.01、Log-Rank test)。

B;BUN、C;Cre:生存したラットのBUN、Creは移植後14日目までにほぼ正常値まで回復した。

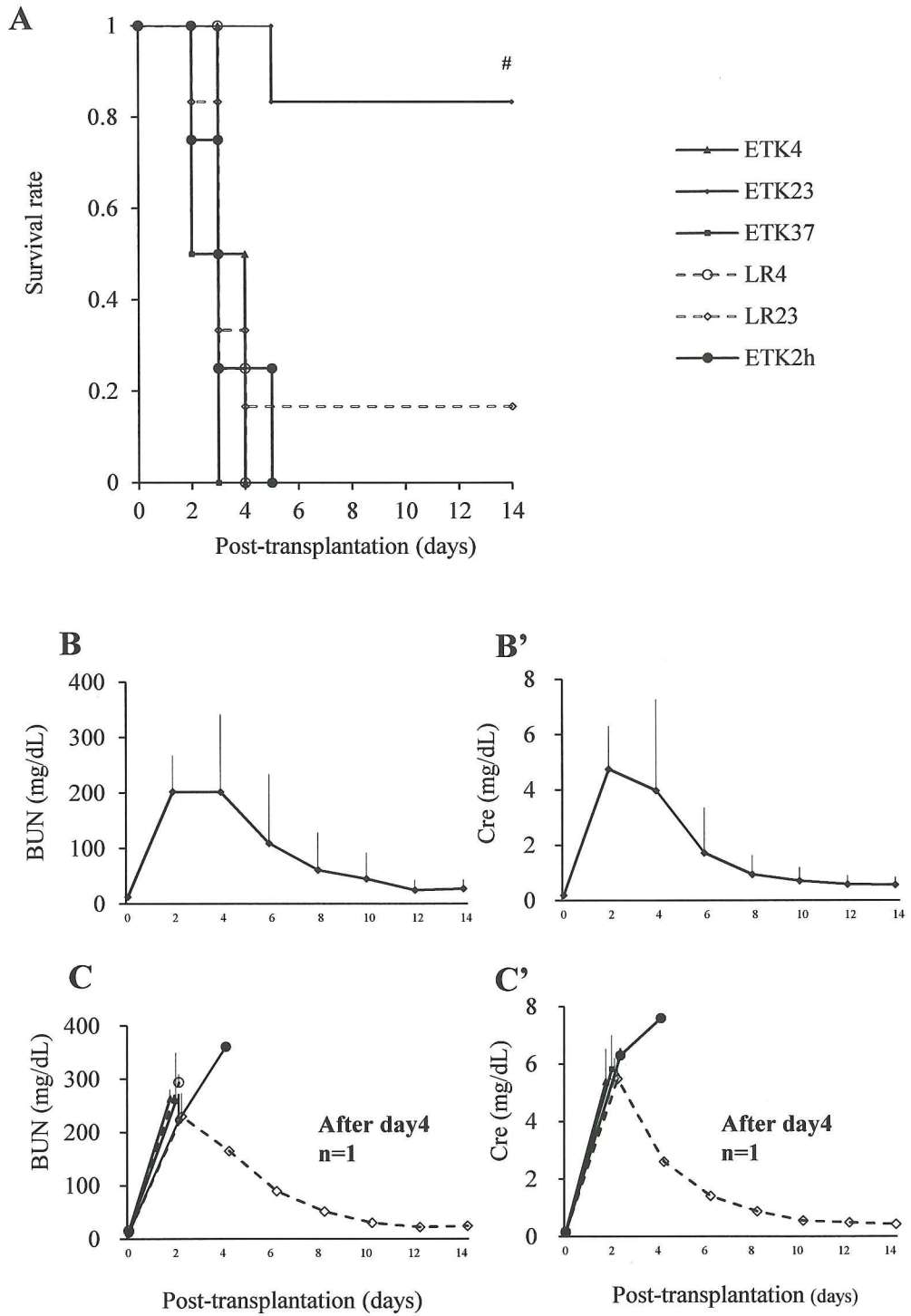


図20 Experiment 2における生存率とBUN、Creの変動

A; 生存率: ETK23グループの生存率は他のグループと比較して有意に延長した(#:  $p < 0.01$ , Log-Rank test)。B; BUN、B'; Cre: ETK23グループ。C; BUN、C'; Cre: その他のグループ。生存したラットのBUN、Creは移植後2日目をピークに、移植後14日目までにほぼ正常値まで回復した。

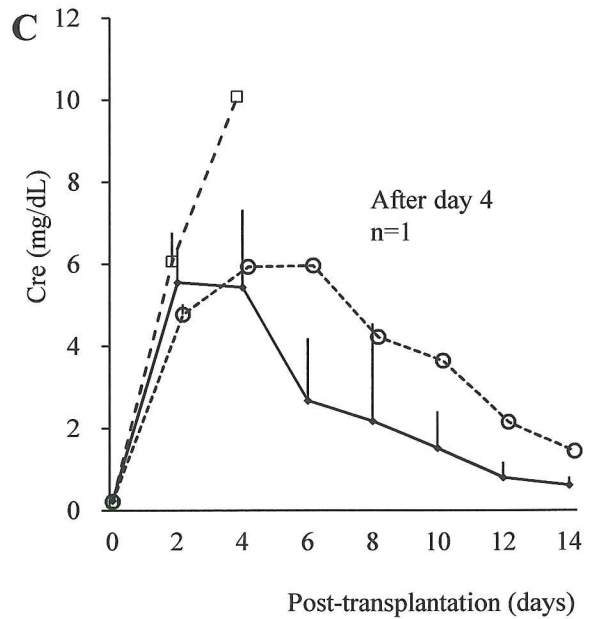
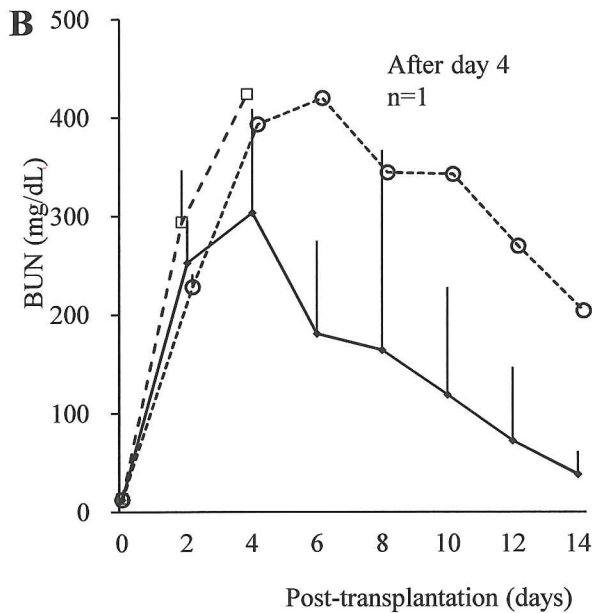
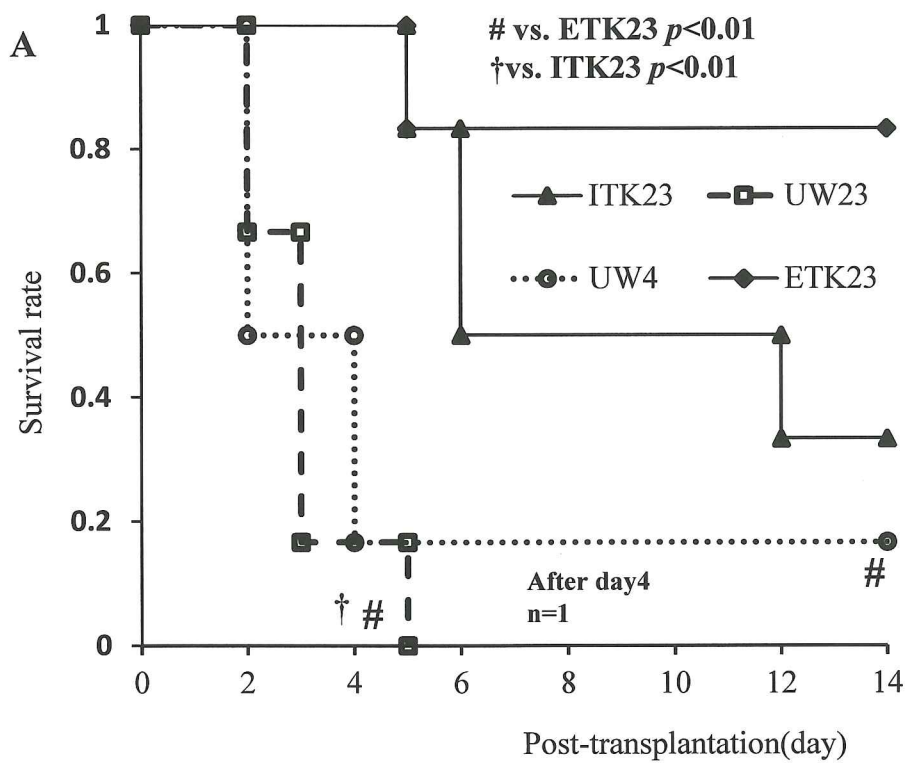


図21 Experiment 3における生存率とBUN、Creの変動

A; 生存率: ITK23の生存率はUW23と比較して有意に延長した(†vs. ITK23  $p < 0.01$ )。ETK23はUW4とUW23と比較して有意に延長した(# vs. ETK23  $p < 0.01$ )。B; BUN、C; Cre: 生存したラットのBUN、Creは移植後2日目 peaks に、移植後14日目までにほぼ正常値まで回復した。

図22 移植腎の病理組織学的検査  
における線維化スコア

移植後14日目に安楽死したラットの腎  
実質の線維化をスコア化した。線維化ス  
コアに有意差は認められなかったが、保  
存液を用いた方が線維化が軽度抑制さ  
れた。

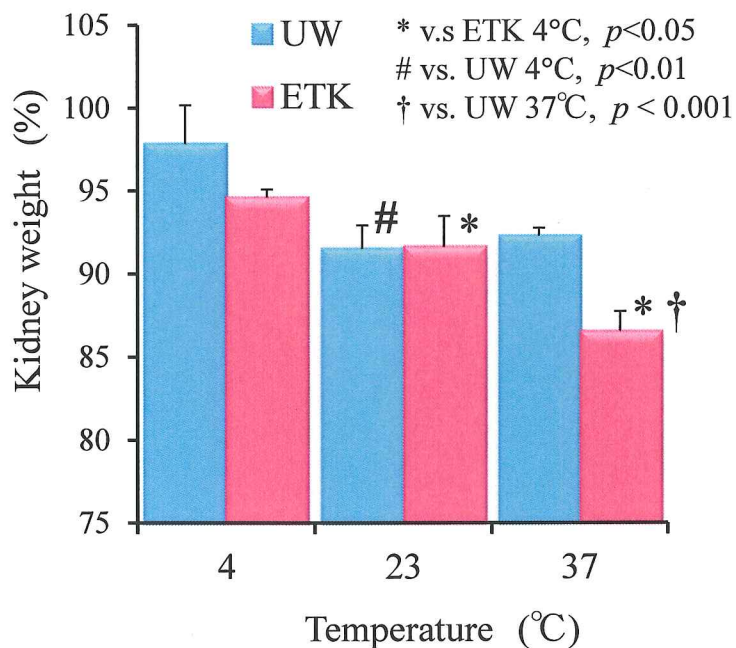
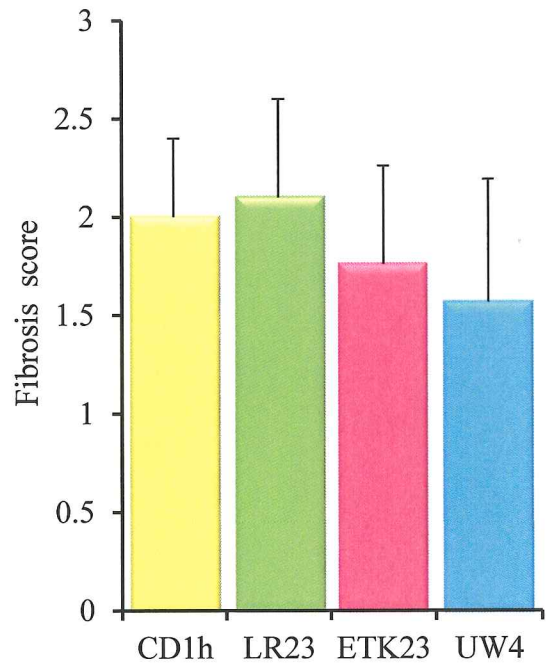


図23 マージナル腎保存後の重量変化

ETKは温度依存性に腎重量を有意に低下させた。  
37°Cでは、UWと比較してETKで有意に腎重量は軽量化した。

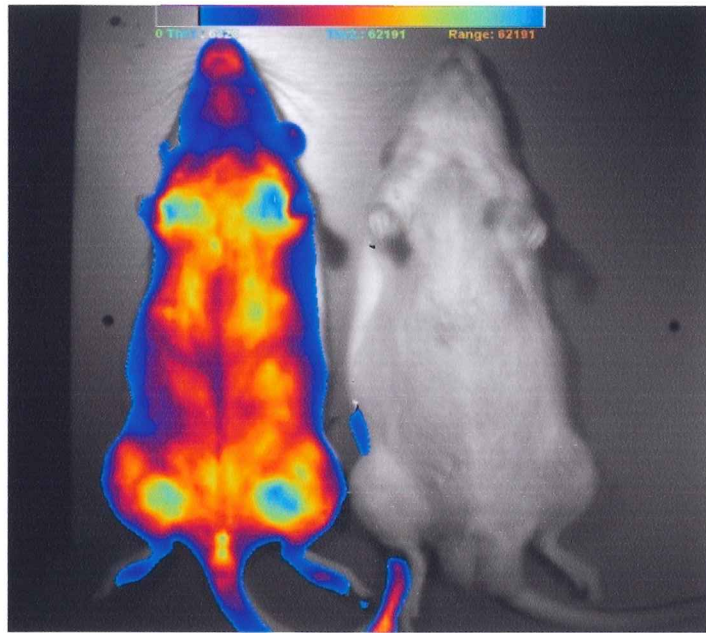


図24 Luciferase Transgenic Rat (Luc-Tg ラット)

Luciferase遺伝子を導入してあるため、Luciferinを投与することで、IVISイメージング装置によって蛍光強度を定量化できる。

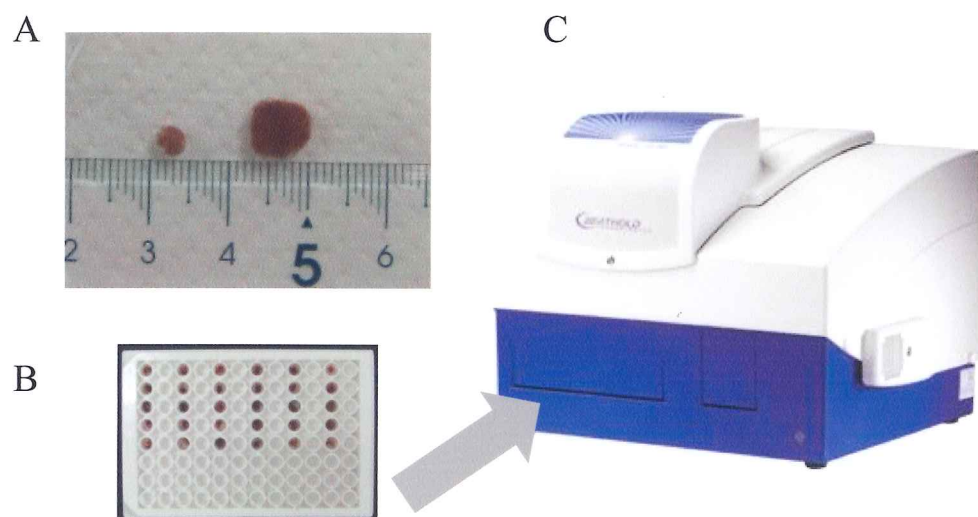


図25 腎臓チップを用いた蛍光強度の測定

- A; 3mm大にスライスした腎臓チップ
- B; チップと保存液を入れたプレート
- C; プレートリーダーにプレートを挿入



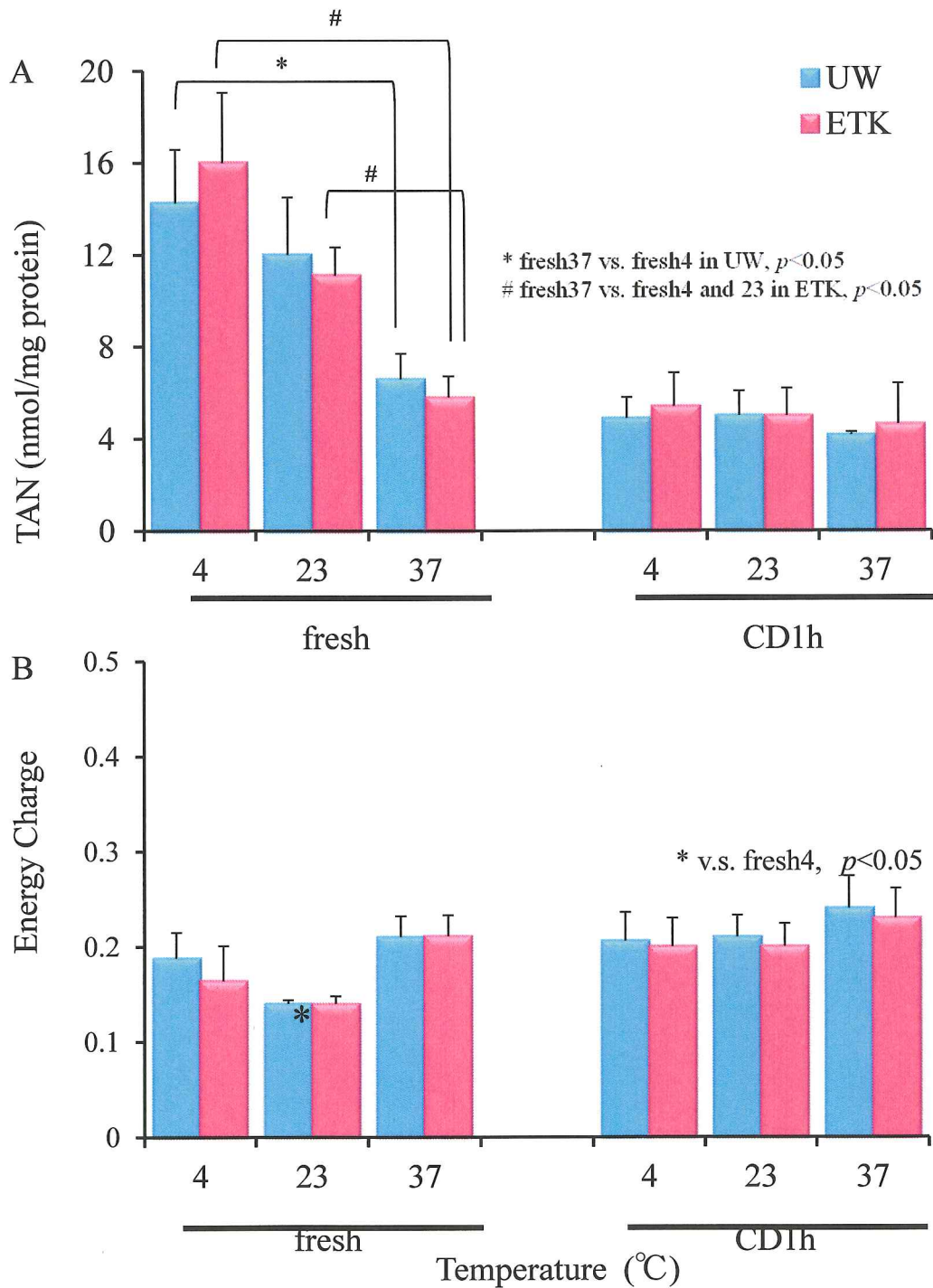


図26 保存腎におけるTANとECの解析

A; TAN: fresh腎は温度依存性に低下したが、CD1hの腎臓は全て低値を示した。

B; EC: 全てのグループにおいて低値を示した。

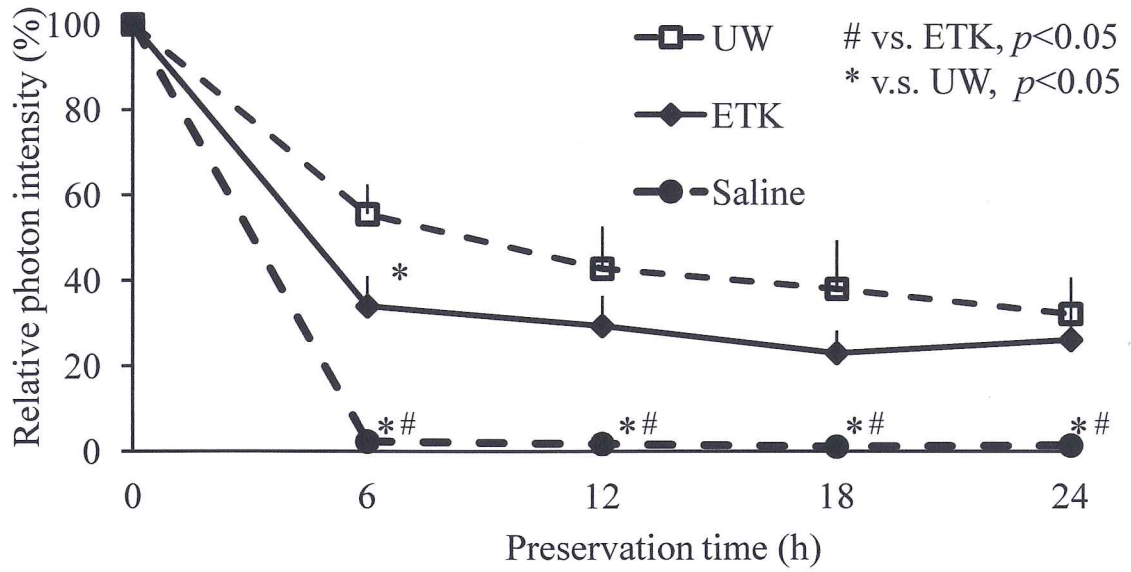


図27 腎臓チップの蛍光強度の測定

ETKとUWのグループは生理食塩液と比較して、全測定時間を通して有意に高い蛍光強度を示した。

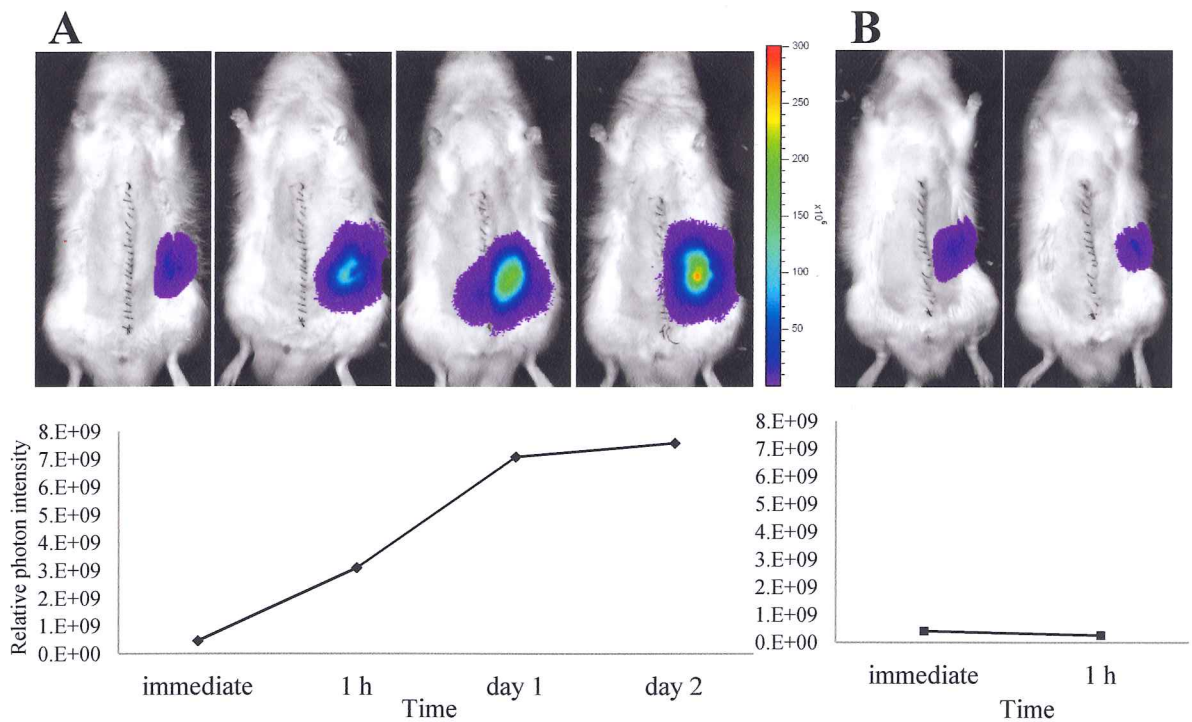


図28 マージナル腎移植ラットにおけるエネルギー動態

A; 生存可能ラット: 再還流後1時間目から早期にエネルギー状態は活性化し、その後も安定した。

B; 生存不可能ラット: 再還流後も全くエネルギー状態の回復が認められなかった。

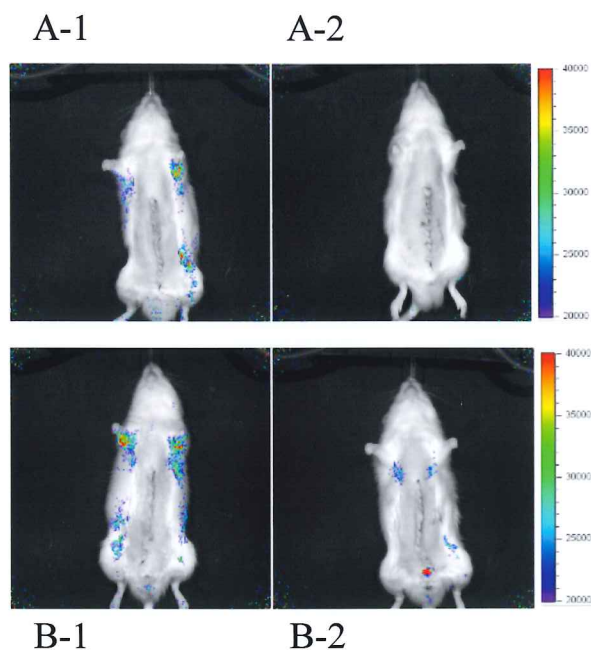


図29 全身投与後のAT-MSCsの体内動態

A-1,B-1; 経静脈的に全身投与されたAT-MSCsは投与後ただちに肺でトラップされた。  
 A-2,B-2; 投与後5日以内に、蛍光陽性細胞であるAT-MSCsは測定限界以下となった。

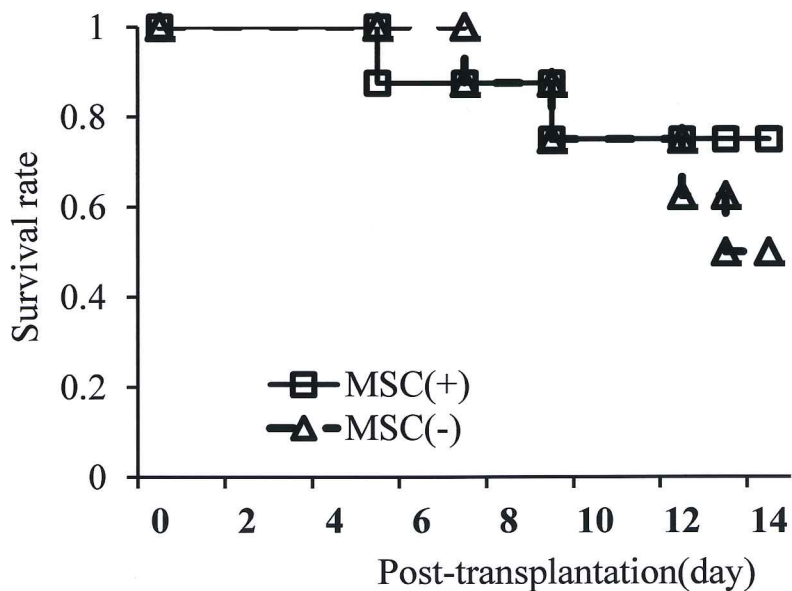
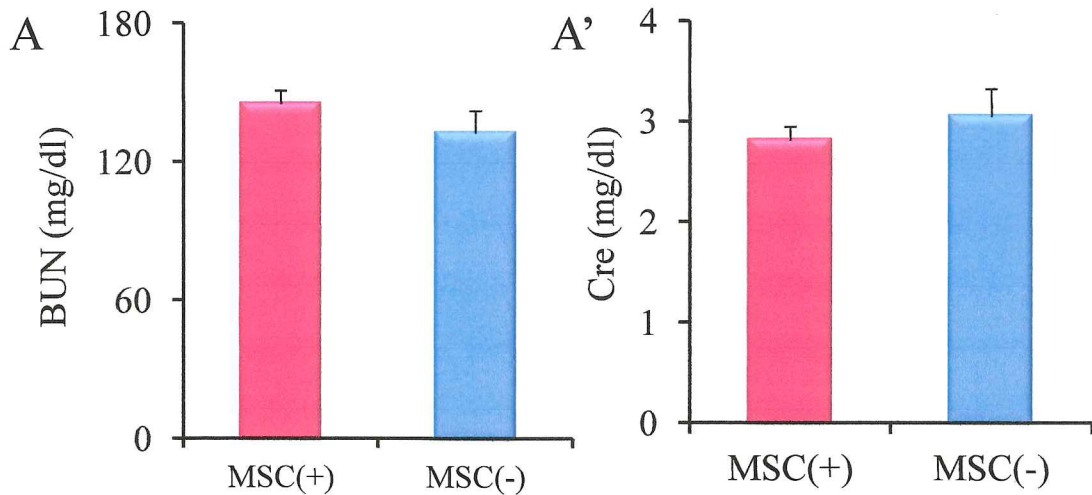


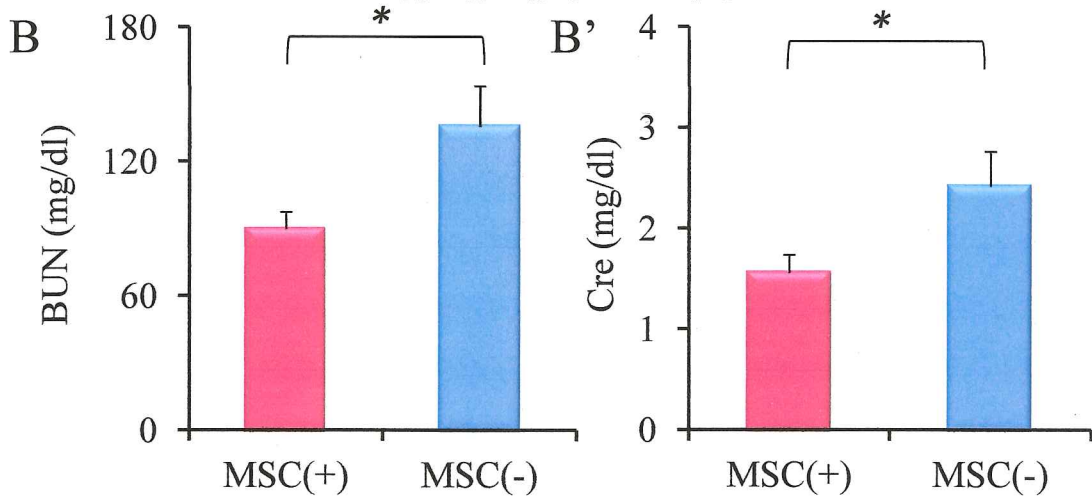
図30 局所投与した場合のレシピエントラットの生存率

移植後14日目において、MSC(+)グループの生存率は、MSC(-)グループと比較して高い状態を維持した。

## 移植後2日目



## 移植後4日目



\*  $P < 0.05$

図31 局所投与時のBUN、Creの変動

移植後2日目におけるA;BUN、A';Cre:移植後2日目では両グループ間に差は認められなかった。

移植後4日目におけるB;BUN、B';Cre:移植後4日目では、MSC(+)グループの方がMSC(-)グループと比較して有意にBUN、Creの低下が認められた。

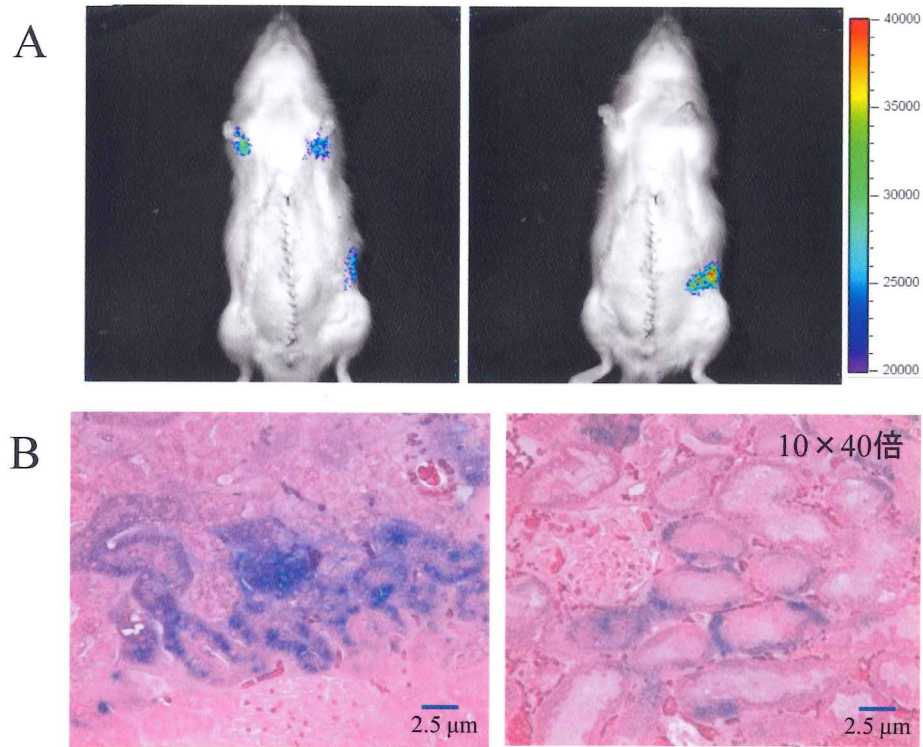


図32 局所投与後のAT-MSCsの局在性

- A; IVIS画像: 移植直前に移植腎動脈から局所投与したAT-MSCsは、移植後24時間目までは腎臓に局在した。  
 B; LacZ染色: 移植後24時間目に摘出した腎臓では、投与されたAT-MSCsが損傷を受けやすい近位尿細管に集積していた。

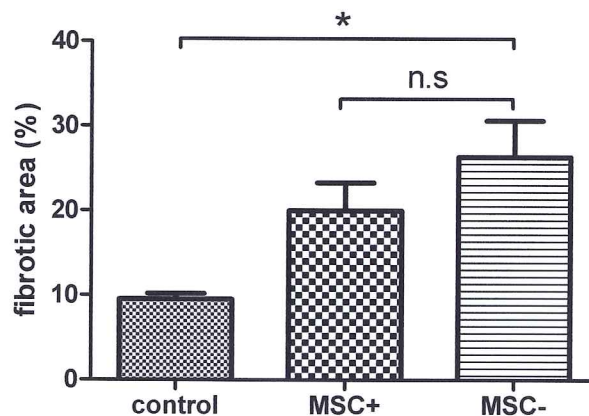


図33 移植腎の病理組織学的検査における線維化スコア

- Freshの移植腎と比較してマージナル腎は線維化スコアが有意に強く発生した (\*  $P < 0.05$ )。しかしながら、有意差は認められないまでも、MSC(+)グループの方がMSC(-)グループと比較して線維化を軽減する傾向が認められた。

表1 ラットを用いた静脈吻合練習後の体重と肝重量

n	Body weight (g) (A)	Body weight (%)	Liver weight (g) (B)	B/A × 100*	
コントロールグループ	3	279.0 ± 10.5	101.7 ± 3.4	7.6 ± 0.5	2.7 ± 0.1
シャントグループ	16	378.4 ± 65.7	92.9 ± 2.5	9.5 ± 1.8	2.5 ± 0.3

\* indicated the liver weight per 100g in weight of rats (g/100g B.W).

吻合後7日目において、シャントグループの体重はコントロールグループと比較して有意に減少した。

表2 保存条件による生存性の違い

	心停止後 時間(h)	保存条件			n	生存日数 (day)
		時間(h)	温度(°C)	保存液		
<b>Experiment 1</b>	1	0	-	-	5	>14, >14, >14, >14, >14
	2	0	-	-	5	2, 3, 3, 4, 5 <sup>*</sup>
<b>Experiment 2</b>	1	1	4	ETK	6	3, 3, 3, 4, 4, 4 <sup>#</sup>
	1	1	22-23	ETK	6	5, >14, >14, >14, >14, >14
	1	1	37	ETK	4	2, 2, 3, 3 <sup>#</sup>
<b>Experiment 3</b>	1	1	4	LR	4	3, 3, 3, 4 <sup>#</sup>
	1	1	22-23	LR	6	2, 3, 3, 3, 4, >14 <sup>#</sup>
	1	2	22-23	ETK	4	2, 3, 3, 5 <sup>#</sup>
<b>Experiment 3</b>	1	1	4	UW	6	2, 2, 2, 4, 4, >14 <sup>##</sup>
	1	1	22-23	UW	6	2, 2, 3, 3, 3, 5 <sup>#†</sup>
	1	1	22-23	ITK	6	5, 6, 6, 12, >14, >14

\* vs. CD1h  $p < 0.01$  using Log-Rank test.

# vs. ETK23  $p < 0.01$  using Log-Rank test.

## vs. ETK23  $p < 0.05$  using Log-Rank test.

† vs. ITK23  $p < 0.01$  using Log-Rank test.

ETK, ET-Kyoto solution; UW, University of Wisconsin solution;  
LR, lactate Ringer's solution; ITK, IT-Kyoto solution

表3 ETK、ITK、UW、LRにおける保存液組成の比較

	ETK	ITK	UW	LR
Na (mmol/L)	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	130
K (mmol/L)	<b>44</b>	<b>130</b>	<b>125</b>	4
Cl (mmol/L)	(-)	(-)	(-)	109
Mg (mmol/L)	(-)	(-)	5	(-)
Ca(mmol/L)	(-)	(-)	(-)	1.5
Gluconate (mmol/L)	<b>100</b>	106	(-)	(-)
Phosphate (mmol/L)	25	25	25	(-)
Sulfate (mmol/L)	(-)	(-)	5	(-)
Lactobionate (mmol/L)	(-)	(-)	100	(-)
Lactate(mmol/L)	(-)	(-)	(-)	28
Raffinose (mmol/L)	(-)	(-)	<b>30</b>	(-)
Adenosine (mmol/L)	(-)	(-)	5	(-)
Alloprinol (mmol/L)	(-)	(-)	1	(-)
Trehalose (mg/L)	<b>41</b>	41	(-)	(-)
Hydroxyethyl starch (gm/L)	30	30	50	(-)
Glutathione (mmol/L)	(-)	(-)	3	(-)
Osmorality (mOsm/L)	366	370	320	250