

学 位 論 文 要 旨

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

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

岩井 聡美

SATOMI IWAI

平成 25 年度

2013

慢性腎不全(CKD)によるネコの死亡率は、13歳以上のネコで死因の約50%を占める。CKDに陥ると根治は望めず、継続的治療や投薬ストレス、最終的には尿毒症による痙攣発作などにより死に至る。CKDの根治的治療法の一つとして腎移植があるが、多くの外科獣医師にとって簡単に行える手技ではないため、マイクロサージカル技術を習得するための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られている。また、現在の獣医療では実験ネコをドナーとした生体間移植のみであり倫理的背景が大きな問題となっている。この問題を克服するため、心停止後の患者ネコをドナーとした腎移植へ変遷していく必要がある。しかし、血流停止後時間経過した極限状態にある腎臓(マージナル腎)を用いると、移植後に深刻な虚血/再灌流傷害(IRI)が生じ、急性拒絶反応、機能不全が高率に発生する。現在、冷保存が一般的な移植腎の保存法であるが、マージナル腎にも適しているかは検討されていない。また、保存液の電解質組成は保存中の腎臓の細胞浮腫に関与することが知られており、移植後の血液再灌流時に引き起こされる細胞崩壊に影響を与えることから、マージナル腎に適した保存液の温度、電解質組成、および、移植後のIRIによる臓器損傷の軽減方法に対しても検討が必要である。

この研究の目的は、ネコにおける生体間腎移植を安全に行うとともに、ドナーのリスクを検討した。さらに、ネコのマージナル腎移植を最終目標とし、ラット腎移植モデルを用いた基礎的研究として、心停止後時間経過して適用限界を超えたマージナル腎の機能を蘇生しうる最適な保存条件を検討すること、およびMSCs投与によるマージナル腎の移植後の機能や個体生存性への影響、または副作用の発生についての検討である。

I. 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

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。

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。

吻合練習後にネコを用いた実験的生体間腎移植を行ったところ、安全に遂行することが可能であった。

よって、本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。

II. ネコ生体間腎移植におけるドナーリスクの検討

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症例に遭遇した。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、ドナーの危険性は高まった。

また、腎臓を提供したネコの長期経過を追った2例では、腎機能の悪化が認められた。

以上より、ネコにおいても生体ドナーのリスクは存在し、死体腎移植などの代替を検討する必要があると考えられた。

III. 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

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。

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、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、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。全ての群の移植後腎機能は、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 2 時間保存したのち、腎重量を測定した。ETK は温度依存性に保存による組織浮腫を軽減することが明らかとなった。

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。

IV. ラット心停止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

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。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。以上より、移植腎が機能するためには、再灌流後早期にエネルギー状態が回復する必要があると考えられた。

V. 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

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。MSCs全身投与方法では、レシピエントラットの生存性に影響しなかった。しかし、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。一方、MSCsの腎動脈局所投与方法では、MSCsを投与した群(MSC(+))において、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。LacZ染色では、腎動脈から投与されたMSCsは移植後24時間目まで尿細管に存在し、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、MSCsの投与経路は、局所投与することでより安全に効果が得られる可能性が示唆された。

本研究により、ネコ生体間腎移植を安全に実施するために、ラット練習法は有効であった。しかし、生体腎臓移植は、生体ドナーのリスクがあることが明らかとなった。そのため、死体腎移植の基礎的検討を行ったところ、マージナル腎の保存には、細胞外液型組成の保存液を用いて常温保存することにより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可能であった。また、移植前にMSCsを腎動脈から局所投与することにより、安全に腎機能の改善効果が得られる可能性が示唆された。