

氏名	飯島 裕生
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 439 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	臓器保存液の複合組織移植における切断肢保護効果
論文審査委員	(委員長) 教授 花園 豊 (委員) 教授 菅原 康志 講師 佐久間 康成

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

筋肉量の多い切断肢は 6-8 時間が再接着の限界と考えられている。血流再開までに長時間を要すると、生着が困難となるばかりか、阻血壊死した筋組織から漏出した嫌気性代謝産物やカリウムが血流再開時に体内に流れ込み、急性腎不全やショック状態を引き起こすことが知られている(虚血再灌流障害)。つまり、再接着において筋組織の阻血性壊死の進行を抑えることは非常に重要である。腎臓や肝臓などの内臓臓器移植では、臓器保存液が一般的に使用されている一方で、切断肢再接着では、これまで動物実験において十分な臓器保存液の有用性が確認されておらず、実際の臨床でも保存液は使用していない。今日においても切断肢の保存法は湿ったガーゼ浸して氷冷するといった 70 年以上前からの手法が用いられている。今回我々は既存の臓器保存液を用いて、ラット下肢移植におけるその有用性を機能的、組織形態学的に評価した。

### 2 研究方法

Luciferase-transgenic (Luc-Tg) ラットの大腿四頭筋を直径 8mm、高さ 3mm、重さ 0.5g の円柱状に切り出し、ET-Kyoto (ETK) 液、University of Wisconsin (UW) 液、Lactated Ringer (LR) 液にそれぞれ浸し 4℃で保存し、筋肉の活性をバイオイメージングで経時的に測定した。また、HE 染色で組織形態学的に評価した。さらに、ETK 液、UW 液、LR 液に浸した LEW ラット切断肢を 6 時間または 24 時間 4℃で保存後に同系下肢移植を行った。移植後 1 時間で血清 CPK、AST、ALT、LDH、Cr、BUN、K を測定した。また、移植後 8 週の時点で電気生理学検査を行い、移植肢の坐骨神経を電気刺激し、前脛骨筋での筋波形の潜時と振幅を測定した。さらに摘出した前脛骨筋の筋湿重量を測定し、HE 染色、マッソントリクローム染色で組織形態学的な評価を行った。

### 3 研究成果

Luc-Tg ラットを用いた阻血筋組織の評価においては ETK 群と UW 群は LR 群と比較して長時間発光強度が保たれており、筋組織内 ATP 量の保持が確認された。また、病理組織標本においても ETK 群と UW 群は LR 群に比べ細胞傷害や細胞間浮腫が少なかった。ラット下肢移植実

験では、6時間保存群の生存率は3群とも100%であった。電気生理学検査では潜時に3群に差はなかったが、振幅はLR群で有意に低値となった。また前脛骨筋の筋湿重量もETK群と比較してLR群では有意に低値であった。組織学的にはマッソントリクローム染色で青染される線維化の面積に3群間で有意差はなかったが、筋線維横径はETK群と比較してLR群で有意に小さかった。一方、24時間保存下肢移植において生存率は80%(ETK群)、80%(UW群)、37.5%(LR群)とLR群で有意に低かった。移植後1時間の血清CPK値はLR群で有意に高値となった。さらに組織学的にLR群は筋萎縮、線維化が著明であり、電気生理学検査も評価不能であった。一方でETK群、UW群では潜時、振幅ともに6時間保存時と同等の値を示した。

#### 4 考察

これまで筋組織や複合組織移植の保存に関する動物実験の報告では、臓器保存液の使用や保存温度、組織灌流の効果などを調べている。臓器保存液での移植前灌流は臓器移植においては一般的であるが、切断肢に関しては灌流の効果は結論が出ていない。また四肢切断などの外傷は病院外で起こるため、その搬送時の灌流操作は困難である。

今回の実験では細胞外液型のETK液と細胞内液型のUW液を利用した。下肢移植後の血液検査でK値がETK液とUW液で有意差があった。高K血症は虚血再灌流障害によるショックの危険因子となるため、筋組織の保存では細胞外液型保存液の安全性が高いと考えられる。さらにETK液はその組成が化学的に安定しており、3年以上の常温保存が可能である。一方、UW液は冷所保存が必須でグルタチオンの酸化のために早期使用の必要がある。切断肢など不慮の事故では、救急車内や診療所などに備蓄可能なETK液が有用と考える。

再接着の成功は、移植肢の生着だけでなく、その機能回復も重要である。Songはラット下肢移植後に電気生理学検査で機能的評価を行った。我々も臓器保存液の保存効果を機能的に評価するために電気生理学検査を行った。この評価法は筋肉の機能回復だけでなく、神経再生も結果に影響を及ぼす可能性があるが、今回の結果では筋萎縮や線維化と相関性が示された。

一つ目の実験では、筋組織の活性を評価するためにLuc-Tgラットを利用した。この評価法は基質投与後にLuc-Tgラット筋組織の発光量を測定し、間接的に筋肉内ATP量を測定している。バイオイメージングでの発光強度と細胞活性の相関性は以前我々のグループが報告した。Luc-Tgラットを用いた評価法は同一の筋組織の活性を経時的に追跡可能であり、臓器保存液の保存効果を比較する今回のような実験では非常に有用な評価法であった。

24時間保存での下肢移植ではCPK値、K値はLR群で高値となり、移植後死亡率も高率となったのはLR群での筋組織が虚血再灌流障害を起こし、さらに腎不全、心不全に至ったためと考えられた。対照的にETK群、UW群は筋組織を虚血から保護することで生存率を保ったと推察された。

#### 5 結論

腹腔内臓器保存液であるETK液とUW液は筋肉や複合組織である切断下肢に対して優れた保存効果を示した。保存した切断肢は移植後8週の電気生理学的検査と病理組織学的検査で優れた下肢機能を示した。さらにETK液、UW液ではLR液と比較して移植後のCPK値は抑えられ、

虚血再灌流障害による死亡を防ぐ可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

筋肉量の多い切断肢の再接着は、切断後 6-8 時間以内が望ましい。虚血時間は再接着の成功や機能予後に大きく影響する。今回、申請者は、臓器保存液の切断肢保護効果を検証した。ラット下肢移植実験では 6 時間保存、24 時間保存いずれも臓器保存液である ETK 液、UW 液で優れた保存効果がみられた。さらに 24 時間保存実験では虚血再灌流障害を予防する可能性が示唆された。

再接着に向けた切断肢の保存に関しては、この 70 年間ほとんど変化がなかったとあってよい。本論文はこの分野で嚆矢を放つ意欲的なものであった。切断肢の保存液を変えるだけで、その再接着結果は大きく変わる。困難な実験だったと思うが、申請者の整形外科医としての技術に加え、組織学的方法や機能生理学的方法によって有意性のあるデータを示した。ラットで実施した研究だけに説得力があった。それでも人に比べればサイズはまだ小さいかもしれないが、マウス実験より説得力がある。本成果の臨床現場への応用が期待される。

## 最終試験の結果の要旨

学位審査会では、審査委員から数々の質問やコメントが出され、活発な討議が行われた。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、学位を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。