

氏 名	いそ 磯	わ 和	のり 理	たか 貴
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1899 号			
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻			
学位論文題目	Trehalose-containing solutions enhance preservation of cultured endothelial cells. (トレハロースを含む臓器保存液の内皮細胞保存効果に関する研究)			
論文調査委員	(主 査) 教授 田中 紘一 教授 人見 滋樹 教授 山岡 義生			

論 文 内 容 の 要 旨

背景及び目的：臓器移植の臨床応用において、ドナー臓器の供給不足は深刻な問題となっている。遠方の地域から供給されるドナー臓器の移植手術を成功させるために臓器の保存時間を延長させる、より優れた臓器保存液の開発が期待されている。非還元性の 2 糖類であるトレハロースを含む新しい保存液、すなわち細胞外液型の ET-Kyoto 液と細胞内液型の IT-Kyoto 液が開発され、ET-Kyoto 液は 20 時間のイヌ肺保存実験において Euro-Collins 液より優れていることが示された。一方ウイスコンシン大学液は肝の保存において有効な効果が示され、肺移植においても臨床的に使用されつつあるすぐれた保存液である。本研究では、マウス由来の培養内皮細胞を用いて、ET-Kyoto (ET-K) 液、IT-Kyoto (IT-K) 液、Euro-Collins (EC) 液及びウイスコンシン大学 (UW) 液の細胞の冷保存効果を、trypan blue exclusion 法及び MTT assay 法を用いて比較検討した。

対象及び方法：(Trypan blue exclusion 法) マウス由来の内皮細胞の cell line (F-2) を 6well のプレート上で培養した後、対象とする 4 種の保存液に交換し、4℃で 24 時間および 48 時間冷保存した。その後プレートから剝離し、Trypan blue を用いて、生細胞、死細胞を count し、全細胞数に対する生細胞数の割合を viability とした。1 種の保存液につき 3 個の well を使用し、同様の実験を 3 度行った。(MTT assay 法) F-2 を 96-well のプレートで培養した後、対象とする 4 種の保存液に交換した。4℃で冷保存後 24 時間から 168 時間まで 24 時間毎に内皮細胞の viability を MTT assay 法を用いて評価した。フォルマザンの生成量は分光光動計を用いて 570 nm での光学密度 (O.D.) として数量化した。1 種の保存液につき 5 個の well を使用し、その平均値を求めた。

統計学的解析は t 検定を用いて行った。P<0.05 をもって有意差ありとした。

結果：(Trypan blue exclusion 法) 24 時間冷保存後の ET-K 群、IT-K 群、EC 群、UW 群の viability はそれぞれ $56.2 \pm 1.9\%$ 、 $73.7 \pm 2.3\%$ 、 $39.9 \pm 4.9\%$ 、 $62.8 \pm 2.3\%$ (ET-K, IT-K, UW vs EC; $p < 0.05$, IT-K vs ET-K; $p < 0.05$) であった。48 時間冷保存後の ET-K 群、IT-K 群、EC 群、UW 群の

viability はそれぞれ $49.5 \pm 4.7\%$, $59.5 \pm 0.7\%$, $29.2 \pm 2.5\%$, $55.3 \pm 7.6\%$ (ET-K, UW vs EC; $p < 0.05$, IT-K vs EC; $p < 0.01$) であった。ET-K, IT-K, UW 群が EC 群より viability が有意に高かった。24時間冷保存後で IT-K 群が ET-K 群より viability が有意に高かったが、48時間後では ET-K 群, IT-K 群, UW 群の間に有意差は認められなかった。

(MTT assay 法) 48時間冷保存後の ET-K 群, IT-K 群, EC 群, UW 群の optical density は, 0.366 ± 0.0066 , 0.358 ± 0.0044 , 0.336 ± 0.011 , 0.362 ± 0.0019 (ET-K, UW vs EC; $p < 0.05$) で, 120時間冷保存後の ET-K 群, EC 群, UW 群の optical density は, 0.303 ± 0.0038 , 0.269 ± 0.0034 , 0.186 ± 0.011 , 0.265 ± 0.0066 であった (ET-K vs UW, $p < 0.05$; ET-K vs IT-K, $p < 0.01$; ET-K, IT-K, UW vs EC, $p < 0.01$)。48時間以降 ET-K 群, UW 群が EC 群より有意に optical density が高く, 72時間以降 ET-K 群が IT-K 群より有意に optical density が高く, 120時間以降 ET-K 群が UW 群より有意に optical density が高かった。24時間以降168時間まで IT-K 群と UW 群の間に有意差は認められなかった。

結論: 培養内皮細胞を用いた, 細胞の冷保存効果において, ET-K 法が UW 液よりすぐれていること, IT-K 液は UW 液と同等の効果をもつこと, ET-K, IT-K とも EC 液よりすぐれた効果をもつことが示された。

論文審査の結果の要旨

【背景及び目的】トレハロースを含む新しい保存液, ET-Kyoto 液の有効な臓器保存効果が, 従来よりイヌを用いた動物実験で示されてきた。しかし, より簡便で安価な評価法が求められている。内皮細胞はあらゆる移植臓器に存在する, 保存液と直接接する細胞であり, 臓器再灌流後の微少循環とも深く関わっている。本研究では, マウス由来の培養内皮細胞を用いた臓器保存液の新しい簡便な評価系を確立し, この方法を用いて ET-Kyoto 液の冷保存効果の有効性を示した。

【対象及び方法】培養内皮細胞を ET-Kyoto (ET-K) 液, IT-Kyoto (IT-K) 液, Euro-Collins (EC) 液及びウィスコンシン大学 (UW) 液の 4 種の保存液内で冷保存し, Trypan blue exclusion 法, MTT assay 法を用いて, 細胞の viability を評価した。

【結果】(Trypan blue exclusion 法), 24時間, 48時間冷保存後でともに, ET-K 群, IT-K 群, UW 群の viability は EC 群より, 有意に高かった (24時間; ET-K, IT-K, UW vs EC; $p < 0.05$, 48時間; ET-K, UW vs EC; $p < 0.05$, IT-K vs EC; $p < 0.01$)。24時間冷保存後で IT-K 群が ET-K 群より viability が有意に高かった (IT-K vs ET-K; $p < 0.05$) が, 48時間後では ET-K 群, IT-K 群, UW 群の間に有意差は認められなかった。(MTT assay 法) 48時間以降 ET-K 群, UW 群が, EC 群より (ET-K, UW vs EC; $p < 0.05$), 96時間以降 ET-K 群が IT-K 群より (ET-K vs IT-K; $p < 0.01$), 120時間以降 ET-K 群が UW 群より (ET-K vs UW; $p < 0.05$), 有意に viability が高かった。24時間以降168時間まで IT-K 群と UW 群の間に有意差は認められなかった。

以上の研究は培養内皮細胞を用いた臓器保存液の新しい簡便な評価系を確立し, ET-Kyoto 液の有効性を明らかにした点で, 肺移植の臨床に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。