

腎臓移植の研究

IX. Perfluorochemical emulsion を用いた
腎低温灌流保存の実験的研究

長崎大学医学部泌尿器科学教室（主任：斉藤 泰教授）

松 崎 幸 康

STUDY ON RENAL TRANSPLANTATION

IX. EXPERIMENTAL STUDY ON KIDNEY PRESERVATION WITH
PERFLUORO-CHEMICAL EMULSION AT LOW TEMPERATURE

Yukiyasu MATSUZAKI

*From the Department of Urology, Nagasaki University, School of Medicine**(Director: Prof. Y. Saito, M.D.)*

The unilateral kidney of mongrel dog was removed and flushed out with modified Collins C₃ solution, and then preserved by pulsatile perfusion machine (MOX-100) at low temperature of 4–6°C. During the perfusion, systolic pressure was controlled below 60 mmHg. After a 48-hr or 72-hr preservation, the kidney was autotransplanted to the iliac fossa of the same dog. The perfusate consisted of cryoprecipitated plasma (CPP) of the dogs supplemented with or without 5 W/V % perfluorochemical emulsion (FC-43). At an early stage, our CPP formed fibrin mass easily, thus being very unstable. But silicagel treatment of the CPP improved stability.

Twenty six kidneys were perfused for preservation, but perfusion of 7 kidneys was stopped by decreased perfusion flow and increased perfusion pressure. Eight kidneys were lost due to technical failure of transplantation or infection after autotransplantation; 11 kidneys were used as planned. The 48-hr preservation group contained 2 cases of FC (+) and 2 cases of FC (–). Each group had one survival case. The 72-hr preservation group contained 6 cases of FC (+), and one case of FC (–). Three cases survived in the FC (+) group and one case survived in the FC (–) group. Survival cases maintained enough perfusion flow which was above 0.3 ml/min. g. kidney. Weight gains of the preserved kidneys during 72-hr preservation were $13 \pm 19\%$ in FC (+) and $21 \pm 17\%$ in FC (–) group, but had no relation to preservation condition. Concentration of lactic acid dehydrogenase (LDH) which was released from damaged cells into the perfusate increased with prolongation of perfusing time, but without relation to preservation condition. Histological examination of autotransplanted kidney revealed a milder change in the FC (+) than FC (–) group.

Thus, it is clear that the viability of the kidney during perfusion at a low temperature can be estimated by perfusion flow (ml/min. g. kidney): Good preservation needs sufficient perfusion flow.

Key words: Renal transplantation, Hypothermic perfusion

はじめに

慢性腎不全患者の治療として、死体腎移植の進歩、普及が要請されている。現在、腎臓の保存には、低温

浸漬保存と低温灌流保存の2つの方法がおこなわれている。浸漬保存では、保存中の腎の viability の判定は困難であり、また阻血時間が長い時、栄養および酸素の供給の面から、腎の damage を回復すること

は困難と考えられる。いっぽう、灌流保存では、灌流中に viability の判定材料としてのさまざまな情報が得られ、栄養、酸素の補給および老廃物除去の面でも、より長時間保存の可能性がある¹⁻³⁾。当教室では堀らが酸素運搬体である perfluorochemical (FC-43) emulsion を用いて、腎の常温および低温灌流保存実験をおこなってきた⁴⁾。著者は長時間の腎保存と保存中の viability 判定の示標を検討する目的で、犬腎の低温灌流保存および自家移植実験をおこなった。

実験材料および方法

実験動物として 12~23 kg の雑種成犬を用いた。thiamiral 静脈麻酔下に、経腹腔的に一側腎を摘出した。摘出腎を washout し、48時間または72時間保存をおこない、再度 washout した後、同一犬の大腿皮下で、保存腎の腎動静脈を大腿動静脈にそれぞれ吻合し、尿管は膀胱に吻合して、自家移植をおこなった。移植後1週間目に対側腎を摘出した。

実験群は灌流時間および灌流液中の perfluorochemical (FC-43) emulsion (以下 FC と略す) 添加の有無によって分けた。48時間保存 FC (+) 群2例、48時間保存 FC (-) 群4例、72時間保存 FC (+) 群15例、72時間保存 FC (-) 群5例である。

washout 液は 4°C の modified Collins C₃ 液 (Collins M^R : ミドリ十字社製) に、heparin を 5,000 U/L 添加した液 200~400 ml を用い、100 cmH₂O の圧でおこなった。

灌流は MOX-100 型拍動性灌流装置 (Waters 社

製) を使用した。拍動は 60/min 温度は 4~6°C、灌流圧は 60 mmHg を越えないように調節した。灌流液の酸素化は membrane oxygenator へ 95% O₂, 5% CO₂ の混合ガスを 320 ml/min 流入しておこなった (Fig. 1)。

灌流液はイヌの Cryoprecipitated plasma を base に FC を 5 w/v% となるように添加した液を用いた (Table 1)。Cryoprecipitated plasma の作製法は Belzer らの方法に準じた^{6,7)}。灌流液の浸透圧は 50%ブドウ糖液にて 290~340 mOsm/L に調節した。灌流液量は約 500 ml とした。

計測および観察事項：腎重量は、腎摘時、washout 後、灌流後に測定した。灌流中は灌流圧と流量を経時的に測定した。灌流液中の逸脱酵素をみるために、経時的に灌流液の sampling をおこなった。対側腎摘後、血清クレアチンを経時的に測定し、生着の有無

Table 1. Composition of the perfusate

Cryoprecipitated Plasma	400ml
FC - 43 Emulsion	100ml
Insulin	40U
Procaine HCl	200mg
MgSO ₄	0.24g
Decadron	4mg
ABPC	100mg
FC - 43	5 W/V%
Na ⁺	110~145mEq/l
K ⁺	4.0~16mEq/l
Osmolality	290~340mOsm/l

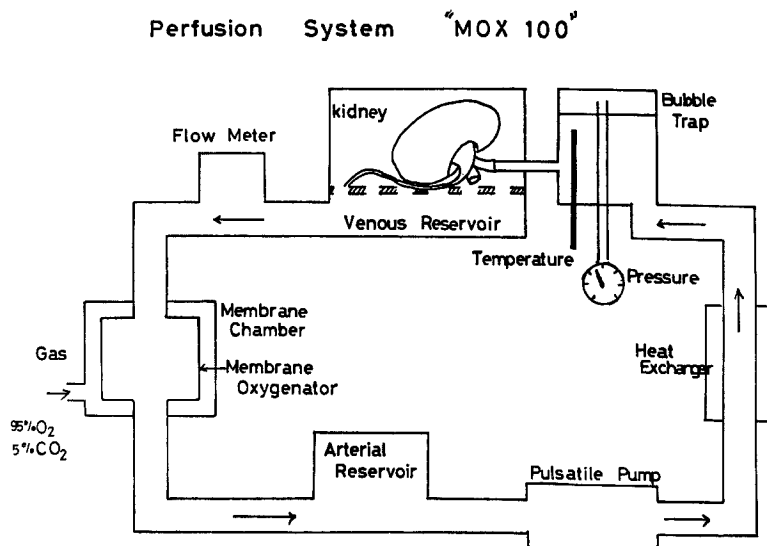


Fig. 1. Perfusion system

Table 2. Result of the experiment

		Perfusion number	Stopped perfusion	Failed transplantation	Contralateral nephrectomy	Survived number
48 hr	FC(+)	2	0	0	2	1
	FC(-)	4	2	0	2	1
72 hr	FC(+)	15	4	5	6	3
	FC(-)	5	1	3	1	1
Total		26	7	8	11	6

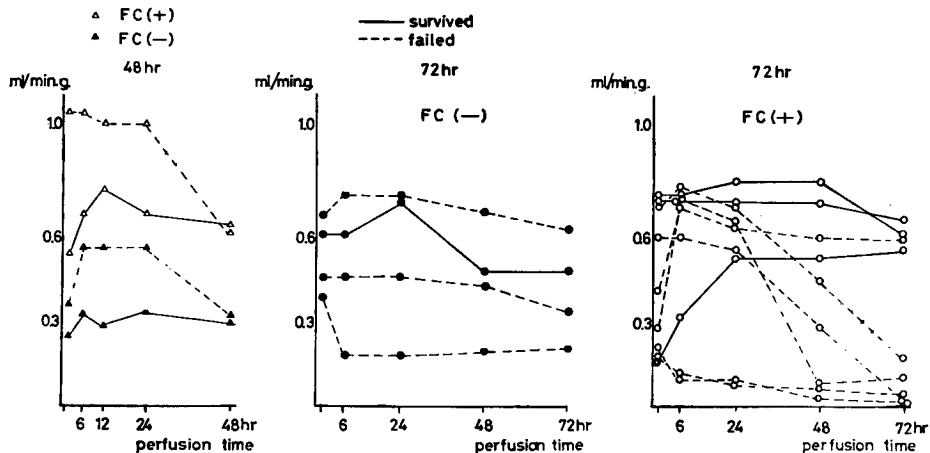


Fig. 2. Perfusion flow

をみた。移植腎の組織標本作製し、組織学的検査をおこなった。

結 果

1. 実験成績

総計26個の腎の灌流をおこなったが、保存中に灌流圧が上昇し、流量がほとんどなくなった7例は、灌流を途中で中止した。移植手術時の血管吻合の失敗、創感染、犬の体力の減退などで脱落して対側腎摘まで施行できなかったものが、72時間保存群に8例あった。保存腎が生着したのは、48時間保存ではFC(+), FC(-)群ともに2例中1例ずつ、72時間保存ではFC(+)群が6例中3例、FC(-)群は1例中1例であった(Table 2)。

2. 灌流量

予定の灌流を終了した例につき、摘出時の腎重量当たり1分間の灌流量(以下流量と略す)を経時的に記録した。48時間保存では4例とも0.3 ml/min.g. 以上の流量が保たれた。72時間保存ではFC(+)群の中に流量が初めから低いものや、24時間を過ぎてから急に低下するものがあった。48時間保存FC(+)の生着例のみ流量が0.3 ml/min.g. であったが、その他

の生着例はすべて、灌流終了まで流量が低下せず、0.5 ml/min.g. 以上に保たれた(Fig. 2)。

3. 灌流抵抗

灌流圧(mmHg)を流量(ml/min.g.)で除し、灌流の抵抗として算出した。48時間保存FC(-)群の生着例は高い抵抗値を示したが、他の生着例は灌流の抵抗は上昇していなかった(Fig. 3)。

4. 腎重量増加率

26個の腎重量は摘出時21 gから68 g, 平均38 gであった。腎重量増加率をwashoutによるものと、灌流によるものとに分け、次式により算出した。

washoutによる増加率(%) =

(washout後の腎重量-腎摘時の腎重量) × 100 / 腎摘時の腎重量

灌流による増加率(%) =

(灌流後の腎重量-washout後の腎重量) × 100 / 腎摘時の腎重量

washoutによる腎重量増加率は0~40%の範囲にあり、平均28±8%であった。灌流による腎重量増加率は、灌流時間、FCの有無に関係なく、-16%から42%の範囲であった。72時間保存のFC(+)群(n=11)が平均13±19%に対し、FC(-)群(n=4)で

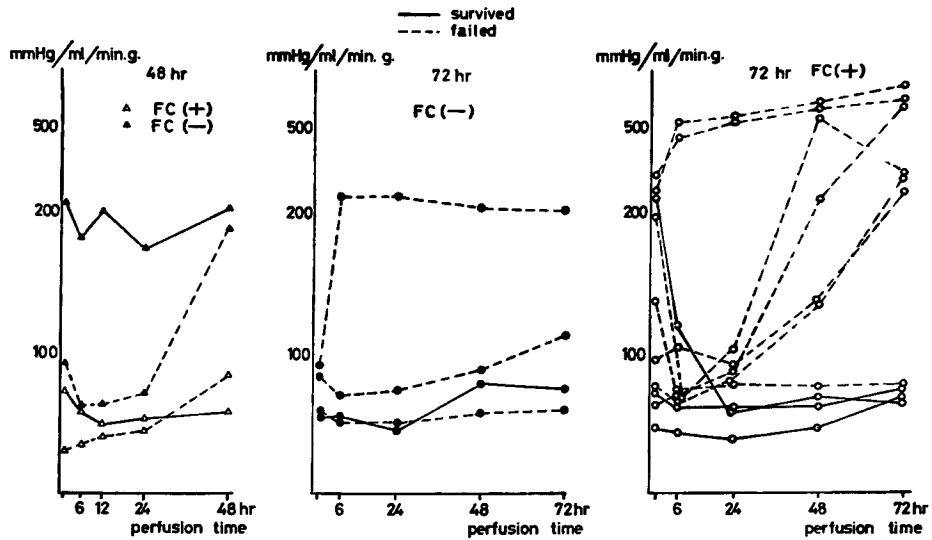


Fig. 3. Perfusion resistance

Table 3. Relationship between weight gain and perfusion condition and survival

Preservation time	FC	Weight gain by washout (%)	Weight gain by perfusion (%)	Perfusion condition	Survival
48 hr	FC(+)	36	- 2	good	0
		35	15	good	
	FC(-)	28	—	—	0
		24	13	good	
		32	—	—	
		24	14	good	
		28	—	—	
		24	—	—	
72 hr	FC(+)	13	- 2	good	0
		31	41	poor	
		25	-16	poor	
		33	—	—	
		29	3	poor	
		29	6	fair	
		36	- 7	fair	
		33	—	—	
		26	33	poor	
		25	16	good	
	FC(-)	11	14	fair	0
		0	13	good	
		40	42	good	
		22	0	good	
	FC(-)	49	42	good	0
		27	24	fair	
		27	18	good	
		35	—	—	

perfusion condition good: 0.3ml/min. g <
 fair: 0.1 <, < 0.3ml/min. g
 poor: < 0.1ml/min. g

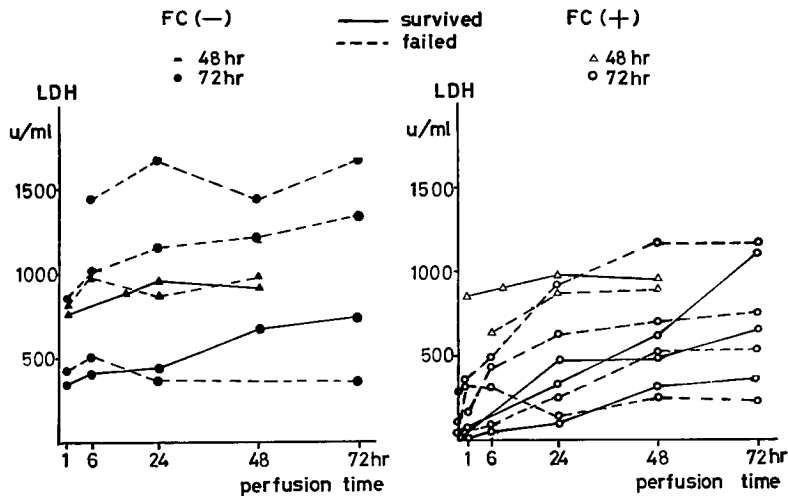


Fig. 4. LDH level of perusate

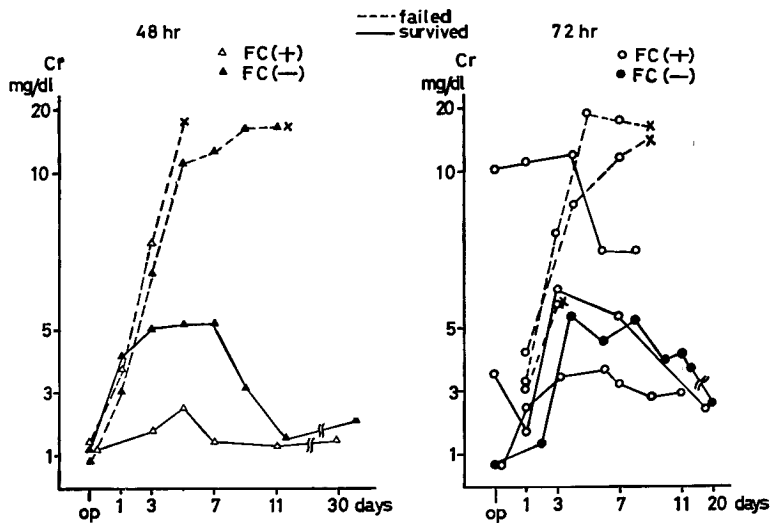


Fig. 5. Creatinine level of dog serum after renal autotransplantation

は平均 $21 \pm 17\%$ であったが、 $p < 0.05$ で有意差はなかった。灌流状態および生着と腎重量増加との関係はなかった (Table 3)。

5. 灌流液中の LDH

灌流液中の LDH 値は経時的に上昇傾向にあった。72時間保存終了時の LDH 値は最低 220 U/L から最高 1,670 U/L であった (Fig. 4)。生着と LDH 値との関係はなかった。FC (+) 群の方が FC (-) 群より絶対値は低かったが、経時的な推移には差がなかった。

6. 血清クレアチニン値

移植腎生着の判定として対側腎摘後の血清クレアチ

ン値の推移をみた。48時間保存の生着例では FC (+) 群の1例が、最高 2.6 mg/dl まで、FC (-) 群の1例が最高 5.3 mg/dl までそれぞれ上昇し、以後下降した。72時間保存の生着例では、FC (+) 群の1例は術後4日目に 12.8 mg/dl まで上昇したが、6日目に 7.5 mg/dl に下降した。他の2例はそれぞれ 6.3 mg/dl, 3.8 mg/dl を最高にして下降した。FC (-) 群の生着した1例は最高 5.4 mg/dl まで上昇し、以後下降した。非生着例は対側腎摘出後移植腎機能を発現することなく、血清クレアチニン値は上昇し、尿毒症にて死亡した (Fig. 5)。

7. 組織学的検査

Table 4. Histological changes of the perfused kidney

		48 hr				72 hr			
		FC(+)		FC(-)		FC(+)		FC(-)	
survival		+	-	+	-	+	+	-	+
glomerulus	diameter of glomerulus(μ)	110	150	130	130	130	130	150	130
	capillary dilatation	-	-	-	-	-	-	+	+
	increase in matrix	-	-	+	+	-	+	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-
tubule	dilatation	-	+	-	+	-	-	+	+
	atrophy	-	+	-	+	-	-	-	-
	degeneration	-	+	-	+	-	-	-	-
inters-titium	edema	-	+	-	-	-	-	+	-
	fibrosis	-	+	+	+	-	-	-	-

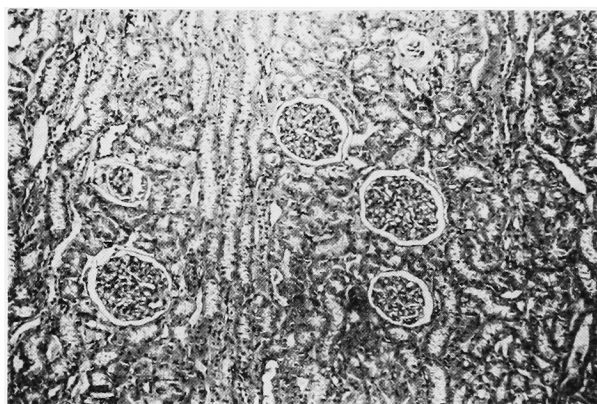


Fig. 6. Histological observation of autotransplanted kidney of survived dog, preserved 72 hr, with FC(+) perfusate. Morphology of tubules is well maintained. HE (100x)

生着した例は犠牲解剖時の、非生着例は死後の腎組織の糸球体、尿細管、間質の変化の程度を観察した (Table 4)。生着例の腎の組織変化は軽く、とくに尿細管、間質の形態は良く保たれていた。生着例において FC (+) 群の変化が軽かった (Fig. 6)。非生着例では尿細管、間質の変化が生着例よりも強かった。

考 察

1 実験方法について

腎保存の良否を判定する方法としての移植生着実験には問題が多い。この方法は移植手術という因子が加わるために、保存状態が良くても生着が得られない場合が起こりうる。しかし、腎移植の研究の一環としておこなっているので、保存腎は生体に移植して機能させ、それによって生命が保てるかという最大の意味があり、実用的にも腎保存の目的は真にこの点にあ

る。したがって、ヒトの腎移植の際、移植後に利尿が得られないとき、血液透析をおこなうのと同じ意味で、本実験においても対側健腎を1週間だけ残した。これによって急性尿細管壊死に陥っている保存腎に、回復のための時間を与え、回復力の残っているものを救うことができると判断した。しかし、自家移植と対側腎摘とを、時期をずらしておこなう場合、あまりに長く対側健腎が存在すると、damage を受けた移植腎が、廃用萎縮をおこす恐れがあり、この点も考慮しなければならない。

2 灌流液について

灌流液は Belzer ら^{6,7)}の作製方法による Cryoprecipitated plasma (以下 CPP と略す) を用いた。犬の血液から CPP を作製する際に、plasma の滲過に長時間を要したり、同じ操作にもかかわらず、作製ごとに fibrin mass を生ずるものと生じないものがある。

り、CPP の不安定性を痛感した。そこで Toledo-Pereyra ら⁹⁾の方法に準じて脱 fibrinogen のためにシリカゲル処理をおこない、fibrin mass は生じなくなった。さらにシリカゲル処理を加えて作製した灌流液を用いた時は、流量も良く保たれた。初期の実験で灌流が不良となった原因に、灌流液の側にも問題があったと考えられる。

3 灌流液への FC 添加について

低温灌流保存の灌流液に、酸素運搬体である FC⁹⁾を添加することに意味があるかないか、問題の残るところである。Levy¹⁰⁾によると、8°C 以下の低温では常温時の 5% 以下の酸素消費しかなく、それから考えれば 4~6°C の低温において、酸素運搬体を灌流液に添加する必要はないと思われる。実際、本邦でも尾崎ら²⁾が FC を添加しない灌流液を用いて 5 日間の低温灌流保存に成功している。さらに、Southard ら¹¹⁾は、低温灌流保存中の酸素供給は細胞のミトコンドリアの呼吸に害を及ぼすと述べている。いっぽう Ross ら¹²⁾は 30 分間温阻血の加わった腎の低温保存の際、酸素ガスを直接静脈から送入し、24 時間保存に良好な成績を発表している。低温保存において供給すべき酸素量は、まだよく解明されていないようである。

しかし、灌流液に FC を添加する理由として、Berkowitz ら^{13,14)}のいうように FC を 0.1 μ 以下の微粒子としてとらえ、微粒子が腎内循環に良い効果をもたらす、腎の保存状態を良好にするということがあげられる。さらに FC 添加の意義は、灌流液中に、人工合成物を 20% 容量加えることにより、作製および入手が困難な生物製材である CPP を少しでも減らすことができるという点である。

4 腎の viability の判定について

保存中または移植する前に、腎の viability を判定することは重要なことである。灌流不能な腎を移植しても、腎血流を得ること、ましてや腎機能を得ることは期待できない^{4,6)}。灌流状態の悪化は細胞の膨化によって血管内腔が狭くなったり、細胞の壊死脱落によって血管が閉塞するためと考えられる³⁾。そこで、どの程度の流量が得られれば、生着が可能か、最小限に必要な流量が究明されるべきである。本実験では、灌流時の動脈側に加わる圧を 60 mmHg 以下に調節した^{2,16)}。4~6°C の低温では、高い圧をかけて灌流をおこなうと細胞の膨化がおこり、血管抵抗も高まり、血管内膜の injury をひきおこす恐れがある³⁾。また灌流状態の悪くなった腎に、さらに圧をかけて灌流しても、いっそう血管内膜の injury を増大させるのみである。また、流量の測定は、一時点だけでなく

時間的経過もみる必要がある。著者の実験では、長時間になるにつれて流量は低下傾向にあり、時間とともに急激に流量が低下するものは生着が得られず、保存が不良と判断された。48 時間保存では灌流終了時の流量が 0.3 ml/min.g. 以上なければ生着が得られなかった。流量が急に低下することなく、ある一定のレベル以上あることが、保存腎の生着にとって必要条件であり、保存時間が長くなるほど、流量が保たれることを確認することが必要である。流量は移植前に得られる情報であり、以下にあげる諸因子が流量との相関、さらに、生着との相関からみて、viability の判定示標になりうるかいなかを検討した。

a. 灌流抵抗について

灌流抵抗は灌流中の灌流圧と流量から算出したが、実際は灌流圧をほとんど 60 mmHg に固定したために、抵抗は流量と逆数の関係となった。腎血管抵抗によって流量が支配されるが、観察の面からは灌流圧を一定に保てば、灌流量によって充分判定可能で、流量をみれば、抵抗を計算するまでもないと考えられた。

b. 腎重量増加について

保存時間の延長とともに、細胞膜の安定性が崩れ、細胞は膨化すると考えられるため¹⁵⁾、腎重量の増加を調べた。しかし、腎重量増加率はさまざまで、灌流状態および生着との相関は見出せず、viability の判定の示標としては不適当と考えられた。

c. 灌流液中の LDH について

灌流液中の LDH を細胞からの逸脱酵素として観察した^{5,17,18)}。灌流液として CPP を用いているため、初めから灌流液中にも LDH 活性があり、その値もまちまちで、単に LDH 活性の絶対値をみるよりも、時間的な推移をみる必要がある。LDH 活性が全般的に高いのは、閉鎖循環式で灌流液の総量が 500 ml であったためと考えられる。LDH 活性は経時的に上昇するが、とくに初めの 24 時間の上昇が著明で、これは腎摘の際の温阻血などによる細胞障害のためと考えられる。灌流状態が不良で、当然保存状態も良くないと思われる例で、LDH 活性が低いままの例があり、障害を受けた部分がまったく灌流されていないためとも考えられる。灌流液中の FC の有無による差としては、一般的に FC (+) 群の LDH 活性が低いようであるが、初めの CPP に存在する LDH 活性が、FC emulsion にて希釈されている点から、そのまま比較はできない。LDH 活性の上昇の推移をみたが、生着、灌流状態との相関ははっきりせず、viability の示標としては実際的には、流量という示標を超えるまでには至らないと判断された。

5 移植腎の組織学的変化について

保存後移植された腎の組織学的変化を検討する際、組織は保存の状態のみならず、血管吻合、尿管膀胱吻合の手術手技、さらに術後の犬の全身状態の影響を受け、そのための変化もあることを考慮しなければならない。生着例は移植して日数がたち、組織変化が修復され、尿管や間質にほとんど変化がみられなかった。いっぽう、生着しなかった例には尿管や間質の変化が強かった。FC 添加による差としては、FC (－) 群に比べ、生着例、非生着例ともに尿管および間質の変化が少なく、灌流液中の FC が保存腎の尿管の変化を防止する効果があるのではないかと考えられる。

ま と め

長時間の腎保存と保存中の腎の viability 判定の指標を検討する目的で、cryoprecipitated plasma を base に酸素運搬体である perfluorochemical emulsion を添加したものを灌流液として用い、犬腎の低温灌流保存実験をおこなった。

1. 48時間保存では、FC (＋) 群、FC (－) 群ともにそれぞれ1例ずつ生着犬が得られた。灌流状態および保存中の腎重量増加には、FC 添加による差はみられなかったが、FC (＋) 群の方が灌流液中の LDH 活性はより低く、生着例の腎機能も良好で、移植腎の組織学的変化も軽微であった。

2. 72時間保存では、FC (＋) 群6例中3例が生着し、FC (－) 群は1例中1例が生着した。灌流状態および腎重量増加については FC 添加による差は認めなかった。組織学的検査では FC (＋) 群の方が尿管の変化が軽かった。

3. 保存中の腎の viability の判定には、単位時間、単位重量当たりの腎灌流量の経時的観察がもっとも有用で、灌流圧を高くすることなく、灌流量が最後まで保たれることが、腎の良好な低温灌流保存の必要条件と考えられた。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜った齊藤泰教授に心から感謝の意を示します。またご指導、ご協力をいただいた進藤和彦助教授および教室員各位、病理組織のご教示を賜った原研病理の関根一郎助教授（主任：西森一正教授）に深く感謝の意を表する。

本論文の要旨は第16, 17回日本移植学会総会、第8回臓器保存研究会および第7, 8回日本低温医学研究会において発表した。

文 献

- 1) Belzer FO and Southard JH: The future of kidney preservation. *Transplantation* **30**: 161~165, 1980
- 2) 尾崎 梓・深尾 立・佐野元昭・岡林隆夫・岩崎 洋治: 120時間イヌ腎保存。移植 **16**: 177~179, 1981
- 3) Pegg DE An approach to hypothermic renal preservation. *Cryobiology* **15**: 1~7, 1978
- 4) 堀 建夫: 腎臓移植の研究, VI Perfluorochemical emulsion を用いた室温下腎灌流保存の実験的研究。泌尿紀要 **26**: 127~136, 1980
- 5) Hori T, Matsuzaki Y, Kuniyoshi M, Kaki-moto S, Shindo K, Kondo A and Sekine I: Experimental study on kidney preservation by perfusion with perfluorochemical emulsion at low temperature. *低温医学* **6**: 1~6, 1980
- 6) Belzer FO, Ashby BS and Dunphy JE: 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* **2**: 536~539, 1967
- 7) Belzer FO and Kount SL Preservation and transplantation of human cadaver kidneys. A two-year experience. *Ann Surg* **172**: 394~404, 1970
- 8) Toledo-Pereyra LH, Condie RM, Malmberg R, Simmons RL and Najarian JS: A fibrinogen-free plasma perfusate for preservation of kidneys for one hundred and twenty hours. *Surg Gynecol Obstet* **138**: 901~905, 1974
- 9) 光野孝雄: 人工血液について。Medical Postgraduate **13**: 1~16, 1975
- 10) Levy MN: Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic perfused kidney. *Am J Physiology* **197**: 1111~1114, 1959
- 11) Southard JH, Senzig KA, Hoffmann RM and Belzer FO: Toxicity of oxygen to mitochondrial respiratory activity in hypothermically perfused canine kidneys. *Transplantation* **29**: 459~461, 1980
- 12) Ross H and Escott ML Gaseous oxygen perfusion of the renal vessels as an adjunct in kidney preservation. *Transplantation* **28**:

- 362~364, 1979
- 13) BerKowitz HD, Mendham L and Miller L D: The Importance of circulatory micro-particles for optimal renal perfusion. Surg Forum 24: 293~295, 1973
- 14) Berkowitz HD, McCombs P, Sheety S, Miller LD and Slovirer H: Fluorochemical perfusates for renal preservation. J Surg Res 20: 595~600, 1976
- 15) 高谷俊一・本田 宏・丸山 章・田中正彦・佐藤浩一・山本 実・鯉江久昭：保存腎の viability 判定に関する実験的研究——低濃度造影剤を用いた保存腎血管撮影法の検討——移植 16: 169~176, 1981
- 16) 尾崎 梓・佐野元昭・深尾 立・岩崎洋治：長期イヌ腎灌流保存の問題点. 低温医学 6: 7~12, 1980
- 17) 雨宮 浩・中島伸之・本宮善恢・松尾好祥・松山正経・岡島英五郎・宮島哲也・樋口玲子・新谷聰：腎保存の研究(1)——ヒト腎灌流保存時の諸変化について——. 移植 15: 166~169, 1980
- 18) 松尾好祥・雨宮 浩・松山正経・宮島哲也・新谷聰・樋口玲子・渡辺一男・本宮善恢・伊集院真澄・岡島英五郎：腎保存の研究(2)——犬腎灌流保存時の諸酵素の変化について——. 移植 15: 261~264, 1980

(1984年2月14日受付)