

|           |                                                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | おおまさみつぐ<br>大 政 貢                                                                                                                              |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学)                                                                                                                                     |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2684 号                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付   | 平成 16 年 3 月 23 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    | Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model<br>(グリシンは体外循環式再灌流モデルにおいてラット肺冷保存後の再灌流傷害を軽減する) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 米 田 正 始      教 授 三 嶋 理 晃      教 授 和 田 洋 巳                                                                                        |

### 論 文 内 容 の 要 旨

臨床肺移植は末期呼吸不全に対する治療法として本邦においても確立されてきつつある。しかし、肺の冷保存許容時間は短く、これは依然として解決しないドナー不足の一因でもある。また、肺移植後の虚血再灌流障害は約20%に生じるとされ、今尚、移植早期の重大な合併症の一つであり、そのメカニズムは依然として明らかにされていない。そこで、我々は既に開発した保存液を改良する事で、肺冷保存許容時間の更なる延長と虚血再灌流障害の改善、更にはそのメカニズムの検討を行なうことで臨床肺移植の改善及び発展につなげたいと考えた。

非必須アミノ酸であるグリシンは、腎臓、肝臓における虚血再灌流時の細胞保護効果が報告されているが、肺についてはこれまでのところ報告がない。また、虚血再灌流障害におけるアポトーシスの役割は未だ十分には検討されていない。今回、グリシンを我々が開発した保存液に添加し、冷保存した肺を再灌流することで、グリシンの肺冷保存後の虚血再灌流障害に対する影響を検討し、更に再灌流後肺組織を用いて虚血再灌流障害とアポトーシスについての検討を行った。

方法；Lewis rat を用い、我々が既に開発した保存液 (Extracellular-type trehalose containing solution, 以下 ET-K) にて、肺動脈をフラッシュ後、保存しなかった群、ET-K にてフラッシュ後15時間冷保存した群、ET-K にグリシン 5 mM を加えフラッシュ後、15時間冷保存した群の 3 群を実験群とした。それぞれを体外循環式肺再灌流モデル回路にて、60分間再灌流し、その間、シャント率、肺動脈圧、気道内圧を10分毎に測定し、再灌流終了後の肺組織の肺湿乾重量比を比較した。また、灌流後の肺組織を酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG に対する抗体 mAb45.1 にて特殊染色し、再灌流後の酸化ストレスの程度を比較評価した。また、再灌流後肺組織のアポトーシスの程度を TUNEL 法にて比較検討後、アポトーシスと酸化ストレスとの相関関係を検討した。最後に、再灌流後肺組織の TNF- $\alpha$  mRNA の発現を PT-PCR 法にて検索した。統計解析は ANOVA, Scheffe's multiple comparison test にて行った。

結果；肺動脈圧、肺湿乾重量比では、グリシン添加による有意差は認められなかったが、シャント率、気道内圧は再灌流開始30分以後、グリシン添加群が非添加群よりも有意に優れており、グリシンは肺冷保存後の虚血再灌流障害を改善していた。また、グリシン添加群は明らかに酸化ストレスが抑制されており、アポトーシスも有意に抑制されていた。アポトーシスと酸化ストレスの程度は明らかに相関していた。再灌流の肺組織には TNF- $\alpha$  mRNA は発現しておらず、このモデルにおけるアポトーシスは TNF- $\alpha$  に無関係に生じると考えられた。

結語；グリシンは、酸化ストレスを軽減し、アポトーシスを TNF- $\alpha$  を経由しない経路で抑制する事で肺冷保存後の虚血再灌流障害を改善すると考えられた。また、アポトーシスの抑制が虚血再灌流障害を改善する可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

臨床肺移植は治療法として確立されているが、移植後の虚血再灌流障害は重大な合併症の一つである。

今なお、早期の虚血再灌流障害におけるアポトーシス、サイトカインの役割は不明である。また、非必須アミノ酸のグリ

シンには $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入抑制による細胞保護効果が期待できる。本実験では、保存液ET-Kを用いRat肺を15時間冷保存した群、グリシン添加ET-Kを用い15時間冷保存した群、コントロールしての非保存群のそれぞれを体外循環式肺再灌流回路にて60分間再灌流し、肺生理学データを計測した。次に灌流後の肺組織を酸化ストレスのマーカーの8-OHdGに対する抗体、また、TUNEL法にて免疫染色し、酸化ストレス、アポトーシスを比較検討し、更に再灌流直と極早期に出現するTNF- $\alpha$  mRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。その結果、グリシンは肺冷保存後の虚血再灌流障害を改善し、酸化ストレス、アポトーシスを有意に抑制していた。アポトーシスと再灌流障害、酸化ストレスの程度はそれぞれ相関していた。また、再灌流後の肺組織にはTNF- $\alpha$  mRNA発現していなかった。グリシンは、酸化ストレスを軽減し、アポトーシスをTNF- $\alpha$ を経由しない経路で抑制する事で肺冷保存後の早期虚血再灌流障害を改善すると考えられた。

以上の研究は肺冷保存後の虚血再灌流障害の解明に貢献し肺移植の進歩に寄与する所が多い。

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16年1月13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。