

氏 名	かわしままさひろ 川島正裕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2214 号
学位授与の日付	平成 12 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	Cytoprotective effects of nitroglycerin in ischemia reperfusion induced lung injury (肺虚血再灌流傷害に対するニトログリセリンによる細胞保護効果)

論文調査委員 (主 査) 教 授 鈴 木 康 弘 教 授 井 上 一 知 教 授 和 田 洋 已

論 文 内 容 の 要 旨

〔背景〕肺移植は末期呼吸不全に対する治療手段として確立しているが、ドナー不足と虚血再灌流傷害が深刻な問題となっている。一酸化窒素 (NO) は組織 cGMP を上昇させ、血管拡張や好中球の血管壁への接着、遊走の抑制により血管の機能を維持している。血管内皮細胞より放出される NO は虚血再灌流中に大量に発生する活性酸素種 (ROS) と反応する。その結果 NO は消去され、血管機能は低下する。また ROS は組織傷害と DNA の損傷をもたらす。血管拡張剤であるニトログリセリン (NTG) は NO ドナーとして働き、肺移植の動物実験ではグラフト肺の機能改善が報告されている。しかし虚血再灌流傷害に対する NTG の肺組織保護効果についてその機序は不明である。本研究では体外循環式 (ex vivo) ラット肺灌流モデルを用いて、肺の冷保存・虚血再灌流傷害に対する NTG の効果を検討した。

〔対象と方法〕

実験には体重 280-300 g の雄ルイスラットを使用した。保存液への NTG の添加と冷虚血 (4°C, 15 時間) の有無により、ラットは 3 群に分けられた。Fresh 群 (n=7) では ET-Kyoto 液でラット肺血管床をフラッシュしたのち心肺ブロックを摘出し、直ちに左肺を 60 分間再灌流した。ET-Kyoto 液は、非還元性二糖類トレハロース、細胞外液型電解質組成、膠質浸透圧物質ハイドロキシエチルスターチを特徴とする臓器保存液である。

NTG (-) 群 (n=10) では ET-Kyoto 液で、NTG (+) 群 (n=10) では ET-Kyoto 液+NTG (0.44 mM) でそれぞれ肺血管床をフラッシュし、心肺ブロックを 4°C で 15 時間浸漬保存した後、再灌流を行った。再灌流は 100% O₂ 換気下に ex vivo ラット肺灌流モデルを用いて 60 分間行った。回路灌流血液は低 O₂ 混合ガスで換気される脱酸素化肺で静脈血化されたのち保存肺を灌流し酸素化された後、再び脱酸素化肺へと戻された。3 群以上の統計学的検討は ANOVA 及び Student-Newman-Keuls 検定を、2 群では Student's t 検定を用い、危険率 5% 以下を持って有意差とみなした。また、データは平均値±標準誤差で示す。

〔結果〕

NTG (+) 群は NTG (-) 群に比べ再灌流中の肺シャント率と最高気道内圧が有意 ($p < 0.05$) に低値であった。肺水腫の指標となる再灌流終了時の肺湿乾重量比は NTG (+) 群が NTG (-) 群に比べ有意 ($p < 0.05$) に低値であった。一方 NTG による肺動脈における血管拡張作用と好中球の血管への浸潤抑制はみられなかった。組織 cGMP レベルは冷保存、再灌流を通し低下したか、NTG (+) 群では冷保存中に cGMP レベル保たれ、NTG (-) 群に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値であった。酸化ストレスによる DNA 傷害のマーカーのひとつである 8-OHdG に対するモノクローナル抗体 N 45.1 にて再灌流後肺を免疫染色した。気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺動脈内皮細胞のいずれでも NTG (-) 群が最も強く染色された。これら免疫組織標本を用いた DNA 傷害の定量方法 (8-OHdG Index) では肺胞上皮細胞>肺動脈内皮細胞>気管支上皮細胞の順で傷害が見られ、全ての箇所でも NTG によりこれら DNA 傷害は有意 ($p < 0.05$) に軽減された。

[結論]

NTG の臓器保存液並びに灌流液への添加により虚血再灌流による肺傷害に対し細胞保護効果がみられた。その機序の少なくとも一部は酸化ストレスによる DNA 傷害の軽減によることが示された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植後の虚血再灌流障害は、最も急性期に起こりうる克服されねばならない課題である。一酸化窒素 (NO) は、血管拡張作用や抗酸化作用を有するために、臓器移植後の虚血再灌流障害を抑制することが報告されているが、機序については詳細に検討されていない。本申請者は NO ドナーであるニトログリセリン (NTG) の肺冷保存後再灌流障害に対する抑制効果とその機序を明らかにする目的でラット肺 ex vivo 灌流モデルを用いて、臓器保存液 ET-Kyoto 液への NTG 投与群と非投与群の傷害の程度を比較した。NTG の投与により冷保存中の組織 cGMP 値の維持と再灌流後の肺機能改善が示された。活性酸素による DNA 傷害の産物である 8-OHdG に対する免疫組織学的検討により、酸化ストレスによる DNA 傷害は肺胞上皮細胞>肺動脈内皮細胞>気管支上皮細胞の順で高度であることが定量化され、何れの部位においても NTG の投与により DNA 傷害の軽減が示された。即ち、NTG により肺の虚血再灌流傷害は軽減され、その機序のひとつとして酸化ストレスによる DNA 傷害の抑制が示された。

以上の研究はこれまで不明であった肺虚血再灌流傷害における DNA 傷害の局在の分布と、その傷害に対する NTG の細胞保護効果が示された点に意義があり、これにより肺移植後の虚血再灌流傷害の予防と、酸化傷害の評価を用いた治療効果判定や予後の研究発展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、本学位申請者は、平成 12 年 2 月 9 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。