

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論 文 名 : 臓器保存液による灌流がラット骨格筋及び  
血管内皮の保存に及ぼす影響  
Effect of perfusion with preservation solutions on  
skeletal muscle and vascular endothelium

著 者 名 : 土田 徹 Toru Tsuchida

指導教官名 : 整形外科科学講座教授 高 木 克 公

審査委員名 : 小児外科学講座 担当教授 猪俣 裕 紀 洋  
外科学第一講座 担当教授 川 筋 道 雄  
臨床検査医学講座担当教授 岡 部 紘 明  
病理学第二講座 担当教授 竹 屋 元 裕

2002 年 3 月

## Table of Contents (目次)

1. 要旨	4
2. 発表論文リスト	8
3. 謝辞	9
4. 略語一覧	10
5. 研究の背景と目的	12
5) - 1 四肢同種移植の現状	12
5) - 2 主要臓器の保存方法	13
5) - 3 四肢、特に骨格筋の保存方法	15
5) - 4 実験の目的	16
6. 実験方法	18
6) - 1 実験動物	18
6) - 2 動物の準備	18
6) - 3 統計処理	19
7. 実験 1 保存液により灌流することは骨格筋保存に有効なのか？	19
7) - 1 骨格筋内 adenosine 5-triphosphate (ATP)	19
7) - 2 血清中 creatine kinase, creatine phosphokinase (CPK)	20
7) - 3 局所血流量測定	20
7) - 4 実験方法	21
7) - 5 実験結果	25

7) -6 考察	36
8. 実験 2 四肢の血管内皮は UW 液による灌流で影響を受けるのか？	38
8) -1 血管内皮依存性血管弛緩反応	38
8) -2 endothelium derived nitric oxide (EDNO)	38
8) -3 prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ )	39
8) -4 endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)	39
8) -5 実験方法	41
8) -6 実験結果	44
8) -7 考察	50
9. 結語	52
10. 参考文献	53

## 要旨

### 〔目的〕

肝、腎などの臓器移植では、通常臓器保存方法として、保存液により灌流後、浸漬保存が行われている。しかし四肢骨格筋の有効な保存方法はまだ明確になっておらず、特に灌流の有効性はまだ明確でない。そこで今回の研究では、ラット切断肢の灌流を行い、骨格筋保存に対する影響について検討した。

### 〔方法〕

実験 1 ; Lewis 系ラットの後肢を大腿中央部で切断し、Euro-Collins (EC) 液もしくは University of Wisconsin (UW) 液を用いて灌流することにより、4 時間または 5 時間の室温保存を行った。灌流圧は 40cm-gravity または 100cm-gravity とした。保存終了後、ヒラメ筋を採取し筋内 ATP 量を測定した。次に別のラットを用いて同様の方法で後肢を保存した後、別の同系ラットへ移植した。血流再開 24 時間後にヒラメ筋内 ATP 量の測定と、血清中 CPK 量の測定を行った。

実験 2 ; 実験 1 と同様にラット後肢を大腿中央部で切断し、UW 液灌流で 5 時間の室温保存を行った。保存終了後、大腿動脈をリング状に採取し、organ chamber 内で内皮由来血管弛緩物質による血管弛緩反応を測定した。また別のラット後肢を用いて 5 時間灌流保存後、移植して 24 時間後に大腿動脈で同様の測定を行った。

### 〔結果〕

実験 1 ; UW 灌流群では、5 時間保存になると EC 灌流群、非灌流群と比較して、有意に筋内 ATP 量を維持することができた。灌流圧を 100cm-gravity にあげて同様の保存を行うと、EC 灌流群、UW 灌流群ともに筋内 ATP 量の保存効果が高くなった。移植後、非灌流群では血流再開早期から血流量の反応性増加

が見られたが、UW 灌流群では、血流は回復せず健側よりも低い状態であった。

血流再開 24 時間後のヒラメ筋内 ATP 量は、非灌流群では回復したが、UW 灌流群では回復せず、逆に低下した。このため ATP 量が逆転し、UW 灌流群のほうが有意に低くなった。血清中 CPK 量も UW 灌流群のほうが有意差を持って高くなり、筋組織障害が悪化したことが示唆された。

実験 2；血管弛緩率は UW 灌流群で有意に低下していた。移植後は UW 灌流群でさらに低下が著明となった。cyclooxygenase と nitric oxide syntase の inhibitor 存在下（prostacycline と nitric oxide の産生を抑制）では、非灌流群はまだ弛緩反応が残存したのに対し、UW 灌流群ではそのほとんどが消失した。

#### 〔考察〕

骨格筋の保存に対し、UW 液による灌流は有効性を示したが、移植後の血流低下を引き起こし、その結果筋障害はむしろ悪化した。灌流することで血管内皮障害が引き起こされたのではないかと考え、実験 2 で血管内皮機能を調査したところ、UW 液による灌流は血管内皮機能を障害し、中でも prostacycline と nitric oxide 以外の内皮由来血管弛緩物質、おそらく内皮由来過分極因子（EDHF）の作用を特に障害することが分かった。

#### 〔結論〕

UW 液による灌流は虚血中の骨格筋 viability を維持するには有効であったが、再灌流後の血流低下を引き起こし、結果的に viability を増悪させた。UW 液は血管内皮機能、中でも EDHF に由来する反応を障害するため、これが血流低下の一因となっている可能性がある。

## Abstract

*Background:* Despite an established preservation method for major organs by perfusion following immersion at hypothermia, a standard preservation technique for skeletal muscle is still a matter of controversy. The purpose of this study is to examine the effect of perfusion on the preservation of skeletal muscle in amputated limbs.

### *Experiment 1*

*Materials and methods:* The rat hindlimbs were amputated for perfusion with Euro-Collins (EC) or University of Wisconsin (UW) solution at different perfusion pressures (40cm or 100cm-gravity). After certain ischemic periods (4 hours or 5 hours), the skeletal muscle viability was determined by measuring the tissue content of adenosine triphosphate (ATP). In separate study, the amputated hindlimbs that had been perfused with UW solution were transplanted to another isogeneic rats. ATP in the muscle and serum CPK were measured after 24 hr reperfusion.

*Result:* The UW solution perfusion group maintained better ATP levels than the EC solution group when the ischemic period was extended to 5 hours. A perfusion pressure of 100cm-gravity was more effective for preserving muscle viability than 40cm-gravity with both EC and UW solutions. ATP of UW solution perfusion group was significantly decreased after 24-hour of reperfusion, although that in the no perfusion group recovered. Reperfusion blood flow in the UW solution perfusion group was significantly lower than that in the no perfusion group.

*Discussion:* UW solution is adequate to preserve muscle viability. However, muscle injury is increased after reperfusion probably due to diminution of blood supply. We hypothesized that UW solution perfusion deteriorated vascular endothelial function, which might be cause of diminution of blood supply.

### *Experiment 2*

*Materials and methods;* The amputated hindlimbs were preserved with or without UW solution perfusion for 5 hours. Thereafter, those were transplanted to another isogeneic rats. Vascular endothelial function of femoral artery rings were measured before and after 24 hr reperfusion in the presence or absence of indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) and L-NMMA (nitric oxide synthase inhibitor). TEA

(calcium activated potassium channel inhibitor) was also used to verify the vasodilator function of femoral artery.

*Result:* Relaxant responses to ACh in the UW solution perfusion group were significantly reduced before and after 24 hr reperfusion compared to the no perfusion group and mostly abolished by indomethacin and L-NMMA administration. Residual relaxant responses to ACh in the no perfusion group were effectively attenuated by TEA infusion.

*Discussion:* These results indicate that the perfusion with UW solution reduces the endothelium-derived relaxation of femoral artery. Especially, that impairs the non-cyclooxygenase and non-EDNO-mediated (presumably EDHF-mediated) relaxation, although has little influence on EDNO-mediated relaxation.

*Conclusion:* Skeletal muscle injury is augmented by UW solution perfusion probably due to the deterioration of vascular endothelial function, resulting in blood supply diminution.

## 2) 発表論文リスト

Tsuchida T, Kato T, Yamaga M, Ikebe K, Irie H, Takagi K.

Effect of perfusion during ischemia on skeletal muscle in rat hindlimb.

Journal of Surgical. Research. Vol. 101, No. 2, 238-241, 2001



### 3) 謝辞

研究の機会を提供され、御指導いただきました熊本大学医学部整形外科学講座  
高木克公教授、加藤悌二助手ならびに熊本リハビリテーション病院山鹿眞紀夫  
先生に心より感謝いたします。また、様々な御教授、御協力をいただいたすべ  
ての方々に御礼申し上げます。

#### 4) 略語一覧

EC: Euro-Collins

UW: University of Wisconsin

ATP: adenosine 5-triphosphate

CPK: creatine phosphokinase

AA: arachidonic acid

XD: xanthine dehydrogenase

XO: xanthine oxidase

$O_2^-$ : superoxide anion

SOD: superoxide dismutase

Fe: 鉄イオン

$H_2O_2$ : hydrogen peroxide

$OH^\cdot$ : hydroxyl radical

EDRFs: endothelium derived relaxing factors

EDNO: endothelium derived nitric oxide

$PGI_2$ : prostaglandin  $I_2$ , prostacyclin

EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

COX: cyclooxygenase

NOS: nitric oxide synthase

L- arg: L- arginine

ACh: acetylcholine

NE: norepinephrine

L-NMMA: N<sup>G</sup>-methyl L-arginine

TEA: tetraethylammonium

K<sub>Ca</sub> channel: Ca activated K channel

K-H solution: Krebs-Hensilate solution

## 5) 研究の背景と目的

### 5) -1 四肢同種移植の現状

臓器移植法が成立し、脳死での臓器移植が日本でも行われるようになった。今後ますます発展していくものと思われる。整形外科領域においても、最近フランス、アメリカと相次いで脳死手の移植が行われた (1,2)。しかし四肢の移植では、腎臓、肝臓等外科領域での移植と比較して、まだ解決すべき問題点が多い。

#### ●四肢同種移植を行う際の問題点

1. 虚血後再灌流障害の抑制 : 臓器が許容保存時間内に移植されても、血流再開とともに爆発的に活性酸素が発生し、組織障害が増悪する。四肢移植の目的は、生着することではなく機能することなので、このいわゆる再灌流障害を最小限に抑制する必要がある。
2. 移植四肢の保存方法 : 四肢では骨格筋が虚血に最も弱く、長時間虚血にさらされた筋組織を移植することは replantation toxemia (再灌流による多臓器不全) を引き起こす危険性がある。骨格筋の保存許容時間を延長することができれば移植手術はより安全に行え、適応も広がる。腎、肝等の移植外科領域では、標準的な臓器保存方法が確立されているが、骨格筋の保存方法に関する研究は少なく、有効な方法も明確にされていない。

3. 移植四肢の拒絶反応：現在の移植医療では術後の免疫抑制が不可欠である。

しかし四肢は生命維持のために必要な器官ではないため、長期に渡る免疫抑制療法はその副作用の面から否定的な意見があることも事実である。

四肢同種移植を外科領域の移植と同様に、より一般的なものとするためには上記問題点を克服する必要がある。

今回の研究では上記 2) 移植四肢の保存方法について調査を行った。

#### 5) -2 主要臓器の保存方法

1960 年代後半から 70 年代にかけて Dr. Collins らが開発した Euro-Collins (EC) 保存液は、細胞内組成（高  $K^+$ 、低  $Na^+$ ）と浸透圧維持のための高濃度の glucose を含有するという特徴を持ち、組織を灌流後、冷却浸漬保存するというシンプルな方法で、移植腎臓の保存時間を飛躍的に向上させた (3,4,5)。しかし他の臓器ではこの保存液でも十分な保存効果は得られなかった。1980 年代に入り、University of Wisconsin (UW) 保存液が開発され、これにより腎臓だけでなく肝臓 (6)、脾臓 (7) の 24 時間以上の安全な保存が可能となった。現在もっとも一般的に臓器保存で使用されているのはこの UW 液である。

UW 液の特徴は、EC 液と同様に細胞内組成で、浸透圧維持のために glucose の代わりに lactobionate と raffinose さらにコロイドの hydroxyethyl starch を含んでいることである。臓器にはそれぞれ代謝特異性があり、腎臓では浸透圧維持に有効な glucose も、肝臓では容易に細胞膜を透過するため、保存臓器の cell swelling を抑制することができなかった(8)。肝臓、脾臓の保存では lactobionate と

raffinose が cell swelling の抑制に最も重要な働きをしていると考えられている(9)。UW 液にはこのほか（どの程度保存効果に貢献しているのかは定かではないが）血流再開後の ATP 産生のための基質として adenosine が、抗酸化剤として glutathione や allopurinol が加えられている。

hydroxyethyl starch の効果についてはまだはっきりとした結論がでていない(10)。灌流時に細胞間質の浮腫を抑制するためにこの物質は加えられているが、これが加わることで同時に非常に溶液の粘調性が高くなる。灌流液の高粘調性は速やかな初期灌流を妨げ(11)、また血管内皮を障害する可能性もある(12)。

UW 液の登場により、臓器保存時間は飛躍的に向上したが、これもまた万能の保存液ではなかった。心臓や肺の保存にはまだ限界があり、心臓ではまだ低温での灌流浸漬保存での許容時間は数時間に限られる。高濃度の  $K^+$  は血管内皮障害を引き起こし(13)、微小循環を障害する(14)ことが知られており、高  $K^+$  組成である UW 液は冠動脈の血管内皮障害を引き起こすことが報告されている(15,16)。実際の心臓移植で、移植後の動脈硬化が高  $K^+$  の UW 液保存群のほうが、低  $K^+$  の stanford 液保存群よりも多かったとする報告もなされている(17)。最近電解質組成を換えて粘調度を下げた新しい保存液の心臓(18)や肺(19)の保存への有効性が報告されており、この分野での最適な保存液は、まだ開発途上にあるといえる。

このように臓器にはそれぞれ代謝特異性があるため、移植医療においては、それぞれの臓器の特性に適した保存液を使用すべきである。

表 1, 臓器保存液の組成

Component	UW solution (mmol/l)	EC solution (mmol/l)
KCl	-	15
NaOH	29	-
KOH	125	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	42.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25	15
MgSO <sub>4</sub>	5	-
Glucose	-	194
Hydroxyethyl starch (g/l)	50	-
Lactobionate acid	100	-
Raffinose pentahydrate	30	-
Adenosine	5	-
Allopurinol	1	-
Glutathione	3	-
Osmolarity (mOsm)	320	400
pH	7.4	7.2

#### 5) - 3 四肢、特に骨格筋の保存方法

四肢では骨格筋が虚血に最も弱く、長時間虚血にさらされた筋組織を移植することは replantation toxemia (再灌流による多臓器不全) を引き起こす危険性がある。またたとえ生着しても機能しなければ、移植の意味が失われる。骨格筋の保存許容時間を延長することができれば移植手術はより安全に行え、術後の機能向上につながり、適応も広がる。腎、肝等の移植外科領域では、前述したように標準的な臓器保存方法が確立されているが、骨格筋の保存方法に関する研究は少なく、有効な方法も明確にされていない。EC 液(20) や UW 液 (21,22) による冷却浸漬保存の有効性は証明されているが、組織を灌流することに関し

ては議論がある。Arai らは EC 液でラット後肢を灌流後浸漬保存した群と浸漬保存のみ行った群を比較して、灌流することで後肢の生着率が低下したと報告している(23)。Harashina らも、ヘパリン入り生理食塩水などを用いて、灌流の有害性を報告している(24)。一方、Gordon らは UW 液による低温拍動性持続灌流が切断後肢の骨格筋保存に有効であることを示し(25)、Ablove らは高エネルギーリン酸や抗酸化剤を灌流することでラット後肢の生着率が上がったと報告している(26)。

これらの相反する結果は、それぞれ灌流液や灌流方法に違いがあることが原因であると考えられる。前項でも述べたように、臓器にはそれぞれ代謝特異性があるため、これまでに開発された保存液が、骨格筋保存のためにも最適であるとは限らないであろう。今後同種四肢移植を発展させていく上で、骨格筋の標準的な保存液、保存方法を確立することは重要である。

#### 5) - 4 実験の目的

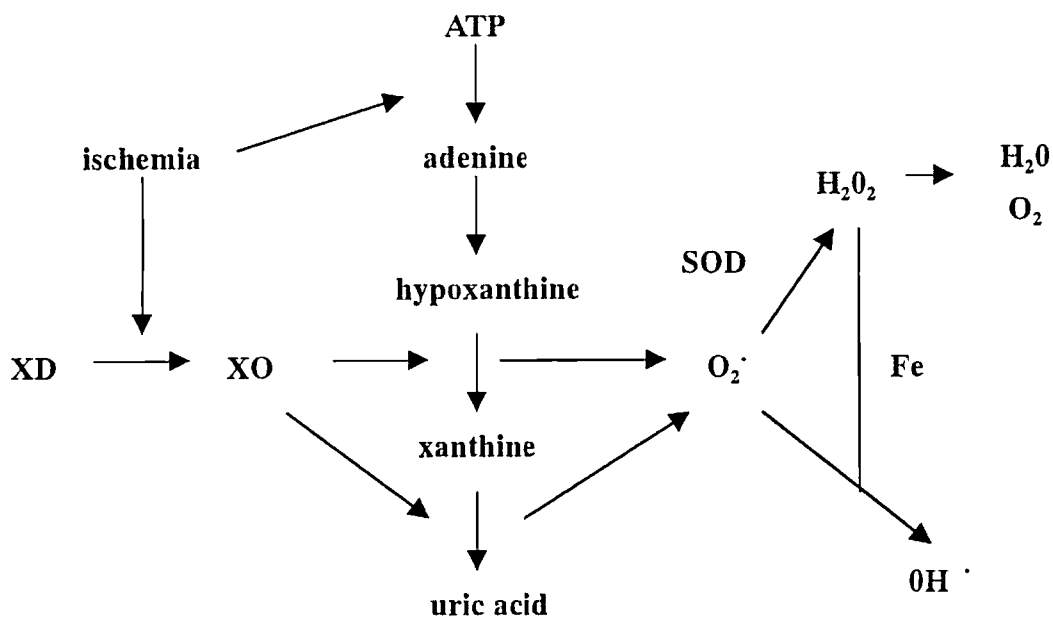
保存方法として組織を灌流する意義には、以下のようなことが考えられている。

4. 灌流することにより、組織全体に保存液が拡散し、急速に冷却することができる。保存する組織が大きい場合は、浸漬保存だけでは組織深部の保存は難しく、さらに灌流の重要性が増すものと思われる。
5. 組織が虚血に陥ると、ATP が分解されて hypoxanthine になる。また細胞内の xanthine dehydrogenase が xanthine oxidase に変換される。血流が再開して



酸素が供給されると、hypoxanthine は xanthine oxidase の触媒で xanthine に分解されるが、そのとき superoxide radical が爆発的に発生する。superoxide は鉄イオンの触媒のもと、より毒性の強い hydroxyl radical に変換される(27)(図1)。現在のところ、これが虚血後再灌流障害の主因であると考えられており、再灌流障害を抑制するためには血管内に残された血液 (hemoglobin, Fe) は灌流により除去すべきである(28)。

図 1, 虚血後再灌流に伴う活性酸素の産生



XD: xanthine dehydrogenase XO: xanthine oxidase  $O_2^-$ : superoxide anion

SOD: superoxide dismutase Fe: 鉄イオン  $H_2O_2$ : hydrogen peroxide

$OH^\cdot$ : hydroxyl radical

6. 灌流液の電解質組成や浸透圧の調節により、細胞膜を介してのイオンの移動ならびに細胞内浮腫を防止する。

四肢は皮膚に覆われており、体積も大きいので、灌流は重要であると考えられるが、これまで同じ条件で灌流方法、灌流液の効果を比較した論文はない。そこで今回の実験では、現在臨床応用されている保存液を用いてラット切断後肢を灌流し、骨格筋保存に対する効果を調査した。

## 6) 実験方法

### 6) - 1 実験動物

体重 270～330g の雄 Lewis 系ラットを用い、Guide for Care and Use of Laboratory Animals に準じて研究を行った。1 ケージ一匹で飼育を行い、ラットフードと水は自由に与えた。飼育室の照明は午前 8 時より午後 8 時まで室内灯を使用し、夜間は暗室とした。実験室は室温 25℃とし、午前 9 時より午後 8 時までの間に実験を行った。

### 6) - 2 動物の準備

すべてのラットはペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg の腹腔内投与によ

6. 灌流液の電解質組成や浸透圧の調節により、細胞膜を介してのイオンの移動ならびに細胞内浮腫を防止する。

四肢は皮膚に覆われており、体積も大きいので、灌流は重要であると考えられるが、これまで同じ条件で灌流方法、灌流液の効果を比較した論文はない。そこで今回の実験では、現在臨床応用されている保存液を用いてラット切断後肢を灌流し、骨格筋保存に対する効果を調査した。

## 6) 実験方法

### 6) - 1 実験動物

体重 270～330g の雄 Lewis 系ラットを用い、Guide for Care and Use of Laboratory Animals に準じて研究を行った。1 ケージ一匹で飼育を行い、ラットフードと水は自由に与えた。飼育室の照明は午前 8 時より午後 8 時まで室内灯を使用し、夜間は暗室とした。実験室は室温 25℃とし、午前 9 時より午後 8 時までの間に実験を行った。

### 6) - 2 動物の準備

すべてのラットはペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg の腹腔内投与によ

り麻酔を行った。実験中は麻酔維持のために必要があれば 15 mg/kg の追加腹腔内投与を行った。

### 6) - 3 統計処理

統計学的解析は ATP, CPK, については（一元配置分散分析（one-way ANOVA）にて行い、有意差が認められた場合は各組み合わせについて Fisher's PLSD 検定による多重比較検定をおこなった。血流測定（Laser Doppler flowmeter）と内皮依存性血管弛緩反応に関しては repeated-measures ANOVA を用いた。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

## 7) 実験 1 保存液により灌流することは、骨格筋保存に有効なのか？

### 7) - 1 骨格筋内 adenosine 5-triphosphate (ATP)

ATP は細胞内代謝に必須の高リン酸化合物で、様々な研究において組織の viability の指標として使用されている。筋組織が虚血に陥ると、好気性代謝経路である細胞の TCA cycle は停止し、ATP の産生は嫌気性解糖に依存することになる。嫌気性解糖で作られる ATP は、好気性条件下と比較すると非常に少ないので、虚血時間とともに筋内 ATP は徐々に減少していく。ある一定時間(critical time)内に血流が再開して、十分な酸素が供給されれば、再び TCA cycle が動き始めて ATP は徐々に回復してくる。しかしそのまま酸素が供給されなければ ATP は枯渇し、細胞は壊死する。この時点で血流が再開しても ATP の産生は起

り麻酔を行った。実験中は麻酔維持のために必要があれば 15 mg/kg の追加腹腔内投与を行った。

### 6) - 3 統計処理

統計学的解析は ATP, CPK, については（一元配置分散分析（one-way ANOVA）にて行い、有意差が認められた場合は各組み合わせについて Fisher's PLSD 検定による多重比較検定をおこなった。血流測定（Laser Doppler flowmeter）と内皮依存性血管弛緩反応に関しては repeated-measures ANOVA を用いた。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

## 7) 実験 1 保存液により灌流することは、骨格筋保存に有効なのか？

### 7) - 1 骨格筋内 adenosine 5-triphosphate (ATP)

ATP は細胞内代謝に必須の高リン酸化合物で、様々な研究において組織の viability の指標として使用されている。筋組織が虚血に陥ると、好気性代謝経路である細胞の TCA cycle は停止し、ATP の産生は嫌気性解糖に依存することになる。嫌気性解糖で作られる ATP は、好気性条件下と比較すると非常に少ないので、虚血時間とともに筋内 ATP は徐々に減少していく。ある一定時間(critical time)内に血流が再開して、十分な酸素が供給されれば、再び TCA cycle が動き始めて ATP は徐々に回復してくる。しかしそのまま酸素が供給されなければ ATP は枯渇し、細胞は壊死する。この時点で血流が再開しても ATP の産生は起

こらないことになる。Idstrom らはラットの四肢骨格筋における ATP の回復は 4 時間虚血後では見られたが、6 時間虚血後にはもはや見られなかったと報告している(29)。池辺はラット後肢虚血モデルで 6 時間虚血では no reflow 現象が高頻度 to 起こることを示しており(30)、ラットの四肢骨格筋におけるこの critical time は室温で 4～6 時間であると考えられる。

#### 7) – 2 血清中 creatine kinase, creatine phosphokinase(CPK)

この酵素は



という化学反応を触媒する酵素で、筋肉のエネルギー代謝に大きく関与している。CPK はほとんどが筋組織に局在することから、血清 CPK の上昇は筋組織の炎症や壊死の存在を示す一次的指標になる。

#### 7) – 3 局所血流量測定

Laser doppler flowmeter

組織に照射したレーザー光の散乱光の一部を受光し、そのパワースペクトルを分析することで組織血流状態を求める。このパワースペクトルは、レーザー光の一部が動いている赤血球に衝突し、その散乱光が周波数変調（ドップラーシフト）されることによって形成される。したがって、レーザー組織血流計で測定される血流情報は赤血球からの散乱光によるものであり、パワースペクトル

の大きさ、一次モーメントなどから組織血流量や組織血液量に比例した値を求めることができる。

## Colored microsphere

従来の放射性 microsphere は、保管場所や廃棄方法に規制があり、扱いにくかったが、colored microsphere の開発により局所血流測定がより簡便に行えるようになった。colored microsphere は均一な直径を持ち、特殊染料で正確に染色されている。左心房に注入された microsphere は血液と均一に混合されながら全身に散乱し、各臓器の循環血流量に比例して微小血管系に止まる。その単位組織あたりの分量の比をとれば、組織の血流量比がわかる。またある流量で回収したりファレンス血液中の分量との比率により、局所血流の絶対量が算出できる。

## 7) - 4 実験方法

### 7) - 4 - 1 保存時間が骨格筋に及ぼす影響

Lewis ラットの後肢を大腿中央部で切断し、生理食塩水に浸したガーゼで覆って、そのまま室温で保存した。実験群を 3 群に分けて、保存時間をそれぞれ 3 時間、4 時間、5 時間とした。保存終了後、ヒラメ筋を採取し、筋内 ATP 量の測定を行った。

#### 7) - 4 - 2 保存液の種類が骨格筋に及ぼす影響

大腿中央部で切断した Lewis ラットの後肢の大腿動脈に 24 ゲージカテーテル(Insyte-N, Becton Dickinson, U.S.A.)を接続し、持続的に保存液を用いて灌流した。灌流圧は 40cm-gravity (40cm の高さから灌流液を自然滴下) とした。これは大腿静脈からの自然排液が見られる (切断後肢内から血液を wash out することのできる) 最低限の圧力である。保存時間は 4 または 5 時間とした。保存終了後、ヒラメ筋を採取し、筋内 ATP 量の測定を行った。実験は保存液の種類で、以下の 2 群に分けて行った。

EC 灌流群 ; Euro-Collins 溶液を用いて灌流した。

UW 灌流群 ; University of Wisconsin 溶液を用いて灌流した。

#### 7) - 4 - 3 灌流圧が骨格筋に及ぼす影響

前述した EC 灌流群、UW 灌流群の灌流圧を 100cm-gravity に変更して同様の保存を行った。保存時間は 5 時間とした。保存終了後、ヒラメ筋を採取し、筋内 ATP 量の測定を行った。

#### 7) - 4 - 4 保存終了後の血流再開 (ischemia-reperfusion) が骨格筋に及ぼす影響

切断後肢をそのまま室温で保存、もしくは 100cm-gravity で UW 液を用いて灌流保存し、別の同系ラットへ大腿動静脈を吻合して移植した。後肢の虚血時間は合計 5 時間となるようにした。血流再開後、初期の 2 時間は Laser doppler



flowmeter (ALF21D, ADVANCE, Japan) を用いて下腿筋内の血流を測定した。

24 時間後、再びラットを麻酔してヒラメ筋を採取し、筋内 ATP 量の測定を行った。また同時に静脈血を採取し、血清中 CPK 量も計測した。

#### 7) - 4 - 5 血流再開後早期の筋内血流量

Laser doppler での測定結果を確認するために、別のラットを用いて colored microsphere 法による腓腹筋、及びヒラメ筋内の血流比を測定した。

7) - 4) - 4)と同様に切断後肢をそのまま室温で保存、もしくは 100cm-gravity で UW 液を用いて灌流保存し、別の同系ラットへ大腿動静脈を吻合して移植した。polyethylene 製カテーテルを左の頸動脈を通して左心室へ挿入し、血流再開 30 分後に 0.3ml(約 900,000 個)の microsphere(DAY-TRAK, Triton, San Diego, CA) を one shot で注入した。実験終了後ヒラメ筋を採取して、専用の組織溶解液を用いて完全に筋組織を溶解させ、専用のフィルターを用いて溶解液から microsphere を抽出した。次に microsphere から染料を抽出するため 0.4ml の dimethylformamide を加え、遠心分離した後、その上清液の吸光度を測定した。結果は吸光度の実験側 / 健側を算出して、筋血流の健側比として表した。

#### 7) - 4 - 6 筋内 ATP 量の測定

採取したヒラメ筋は、液体窒素を用いて急速凍結させ、後日の計測まで-70℃で保存した。

凍結した組織に、あらかじめ冷却しておいた 0.9M perchoric acid を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジネートを作成した。このホモジネートを 3000 回転で 10 分間遠心分離し、上清液に 2M 水酸化カリウムを加えて pH を約 6.5 に整えたものを ATP 測定の試料とした。

あらかじめ作成しておいた Triethanolamine / K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / MgSO<sub>4</sub> / EDTA / glycerate 3-phosphate 溶液 2.5ml に β-NADH 溶液 0.05ml と測定試料 0.4ml を加えた溶液の 339nm での吸光度(A1)を測定した。さらにこの溶液に phosphoglycerate kinase / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 混合懸濁液を加えて反応を進めた後、再び吸光度 (A2) を測定した(31)。

$$\text{Muscle contents of ATP} = \frac{(A1-A2) \times V}{\epsilon \times d \times v \times \rho} \quad \text{mmol/g tissue}$$

V; assay volume    ε ; absorbance coefficient    d; light path    ρ ; mass concentration

#### 7) - 4 - 7 血清中 CPK 量の測定

健側の大腿静脈より採取した血液を、3000 回転で 10 分間遠心分離し、血清のみを-70℃で保存した。測定は SRL 株式会社へ委託して行った。

## 7) - 5 実験結果

### 7) - 5 - 1 保存時間が骨格筋に及ぼす影響

3,4,5 時間保存後のヒラメ筋内 ATP 量はそれぞれ  $1.81 \pm 0.20 \mu\text{mol/g tissue}$ ,  $1.41 \pm 0.18 \mu\text{mol/g tissue}$ ,  $0.49 \pm 0.18 \mu\text{mol/g tissue}$  であり、これは健側の約 56%、44%、15%であった。筋内 ATP 量は保存時間の延長とともに低下し、特に保存時間が 4 時間を超えると急速に低下していくことが示された(Fig. 1)。

### 7) - 5 - 2 保存液の種類が骨格筋に及ぼす影響

EC 灌流群では、4 時間、及び 5 時間保存後のヒラメ筋内 ATP 量はそれぞれ  $1.07 \pm 0.10 \mu\text{mol/g tissue}$  (健側の約 35%)、 $0.59 \pm 0.12 \mu\text{mol/g tissue}$  (同約 19%) となった。EC 灌流群と非灌流群の間には統計学的な有意差は認められなかった。UW 灌流群では、4 時間保存後のヒラメ筋内 ATP 量は  $1.25 \pm 0.19 \mu\text{mol/g tissue}$  (健側の約 42%) であり、非灌流群の間に統計学的有意差を認めなかったが、5 時間保存後では  $1.10 \pm 0.10 \mu\text{mol/g tissue}$  (同約 34%) であり、これは非灌流群よりも有意に高かった( $P < 0.01$ ) (Table 1, Fig. 2)。

### 7) - 5 - 3 灌流圧が骨格筋に及ぼす影響

灌流圧を 100cm-gravity にすると、非常に速やかな ( $1 \sim 2\text{ml/min}$ ) 血液の wash out が行われた。EC 灌流群、UW 灌流群の ATP 量はそれぞれ  $1.01 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$

tissue、 $1.37 \pm 0.12 \mu \text{mol/g tissue}$  となり、これは 40cm-gravity 灌流群よりも有意に高かった( $P < 0.01$ )(Table 2, Fig. 3)。

#### 7) - 5 - 4 保存終了後の血流再開(ischemia-reperfusion)が骨格筋に及ぼす影響

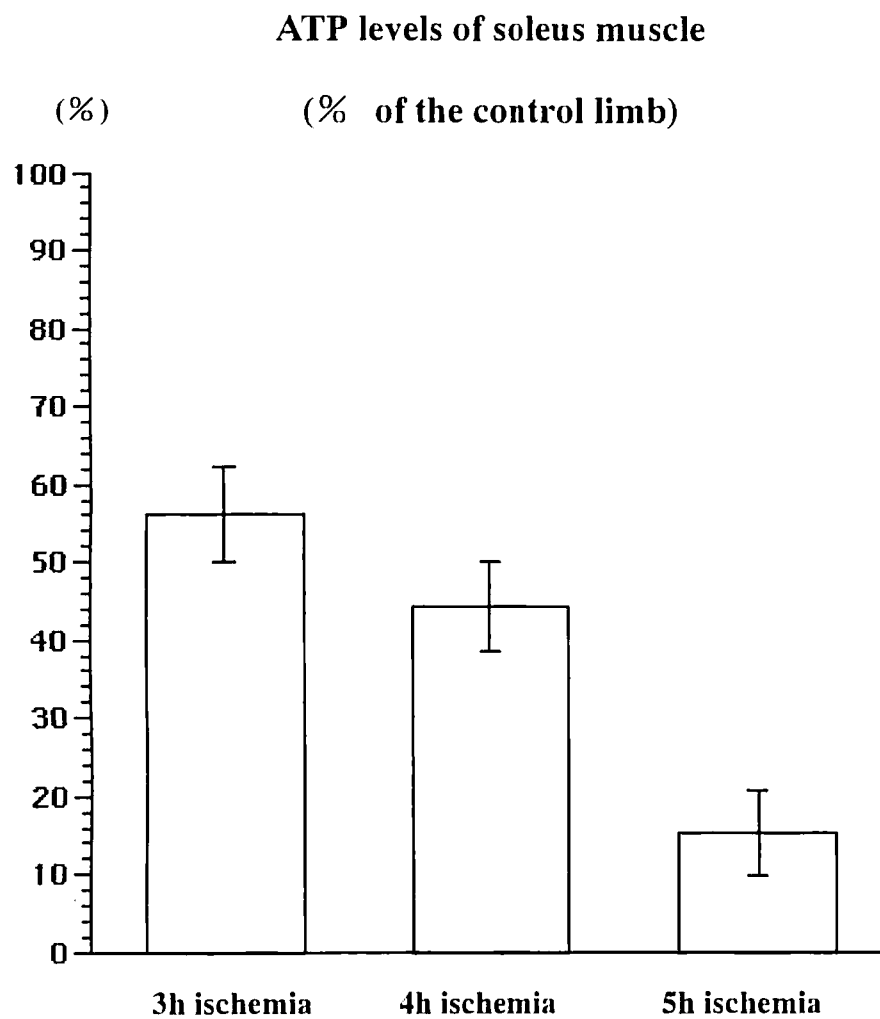
筋内 ATP 量は非灌流群では血流再開によって回復が見られたが、UW 灌流群では逆に血流再開前よりも低下した。この結果、24 時間 reperfusion 後の ATP は UW 灌流群は  $0.94 \pm 0.54 \mu \text{mol/g tissue}$ 、非灌流群  $1.65 \pm 0.30 \mu \text{mol/g tissue}$  となり、UW 灌流群の方が有意に低い値を示した(Fig. 4)。

血清中 CPK は UW 灌流群が 4682 IU/l、非灌流群が 1967 IU/l と UW 灌流群の方が有意に高い値を示した(Fig. 5)。

#### 7) - 5 - 5 血流再開後早期の筋内血流量

Laser doppler flowmeter を用いて測定した血流量は、非灌流群では早期より増加し、血流再開後 30 から 45 分にかけてをピークとする反応性充血が認められたが、UW 灌流群では健側よりも低いままで回復しなかった(Fig. 6)。

microsphere 法を用いた血流再開 30 分後の血流量測定でも、非灌流群では、健側比が腓腹筋  $2.69 \pm 1.36$ 、ヒラメ筋  $1.55 \pm 0.84$  と反応性充血が認められたのに対し、UW 灌流群では健側比が腓腹筋  $0.36 \pm 0.14$ 、ヒラメ筋  $0.30 \pm 0.19$  と血流が回復していないことが確認された(Table 3)。



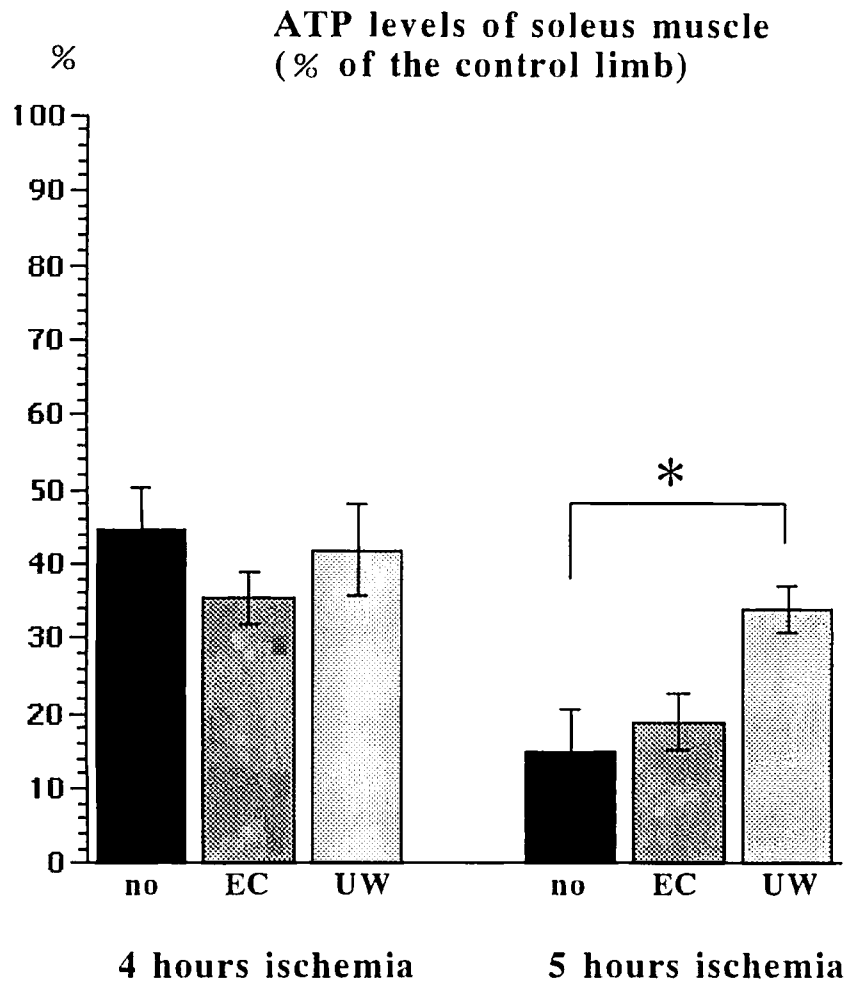
**Figure 1,** Tissue ATP levels of soleus muscle at different ischemic duration.

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviations. n=4 in all groups.

	ATP( $\mu$ mol/g tissue)	
	Control	Experiment
4 h ischemia		
no perfusion	$3.17 \pm 0.14$	$1.41 \pm 0.18$
EC perfusion	$3.04 \pm 0.16$	$1.07 \pm 0.10$
UW perfusion	$2.98 \pm 0.11$	$1.25 \pm 0.19$
5 h ischemia		
no perfusion	$3.23 \pm 0.09$	$0.49 \pm 0.18$
EC perfusion	$3.10 \pm 0.22$	$0.59 \pm 0.12$
UW perfusion	$3.24 \pm 0.16$	$1.10 \pm 0.10^*$

**Table 1,** Tissue ATP levels of soleus muscle with different perfusates at different ischemic duration.

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations. n=4 in all groups. \* P<0.01 vs. no perfusion group.



**Figure 2,** Tissue ATP levels of soleus muscle with different perfusates.

Tissue ATP levels in the EC perfusion group were not significantly different from those in the no perfusion group. After 5 hours of ischemia, tissue ATP levels in the UW perfusion group were significantly greater than those in the no perfusion group. Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations. no: no perfusion group EC: EC perfusion group. UW: UW perfusion group.  $n=4$  in all groups.  $*P<0.01$  vs. no perfusion group.

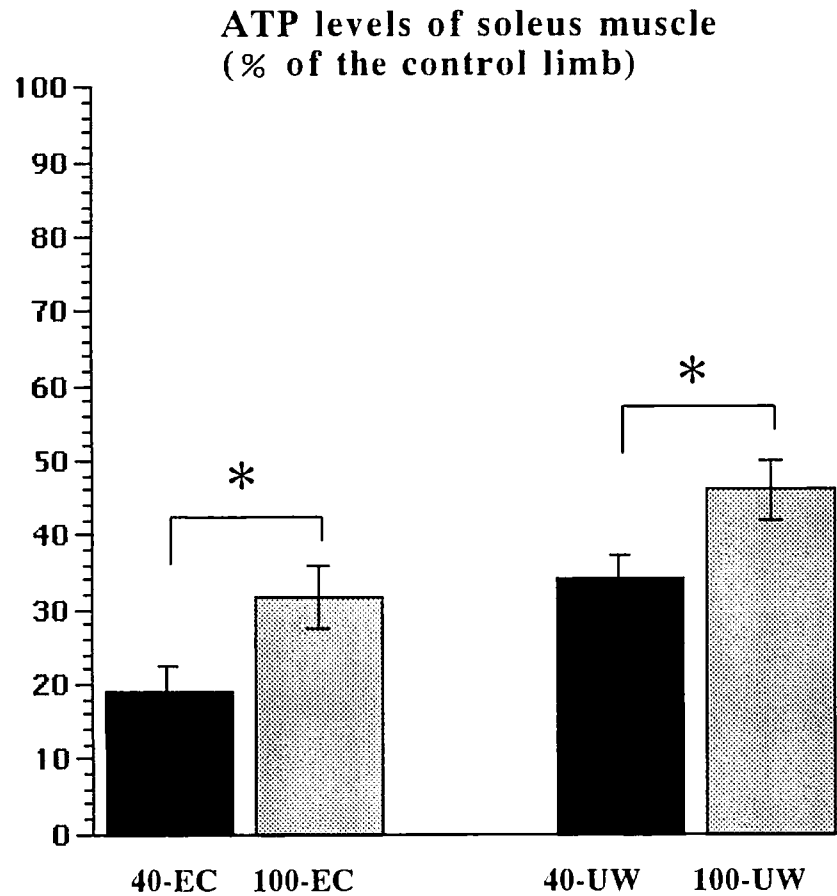
	ATP( $\mu$ mol/g tissue)	
	Control	Experiment
EC perfusion		
40	3.10 $\pm$ 0.22	0.59 $\pm$ 0.12
100	3.17 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.13*
UW perfusion		
40	3.24 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.10
100	2.98 $\pm$ 0.24	1.37 $\pm$ 0.12*

**Table 2,** Tissue ATP levels of soleus muscle at different perfused pressures.

Data are expressed as means $\pm$ standard deviations. 40: 40cm-gravity perfusion group.

100: 100cm-gravity perfusion group. n=4 in all groups. \* P<0.01 vs. 40cm-gravity perfusion group

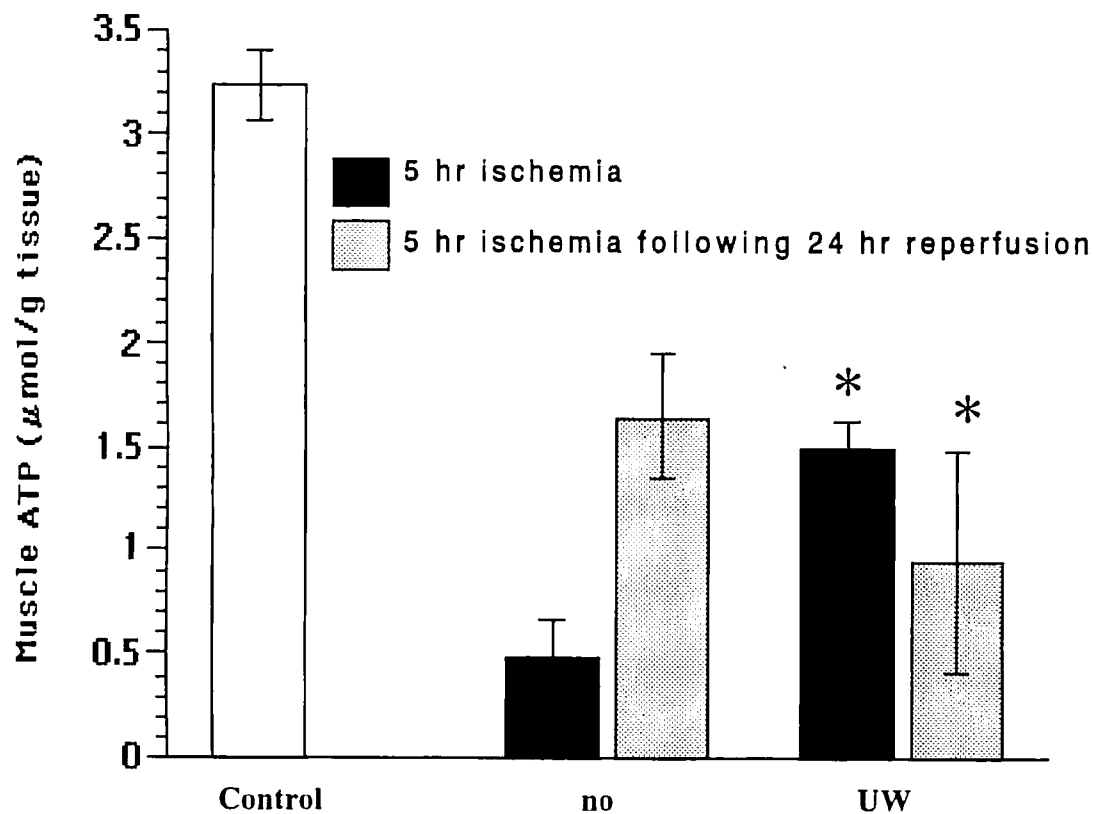




**Figure 3,** Tissue ATP levels of soleus muscle at different perfused pressures.

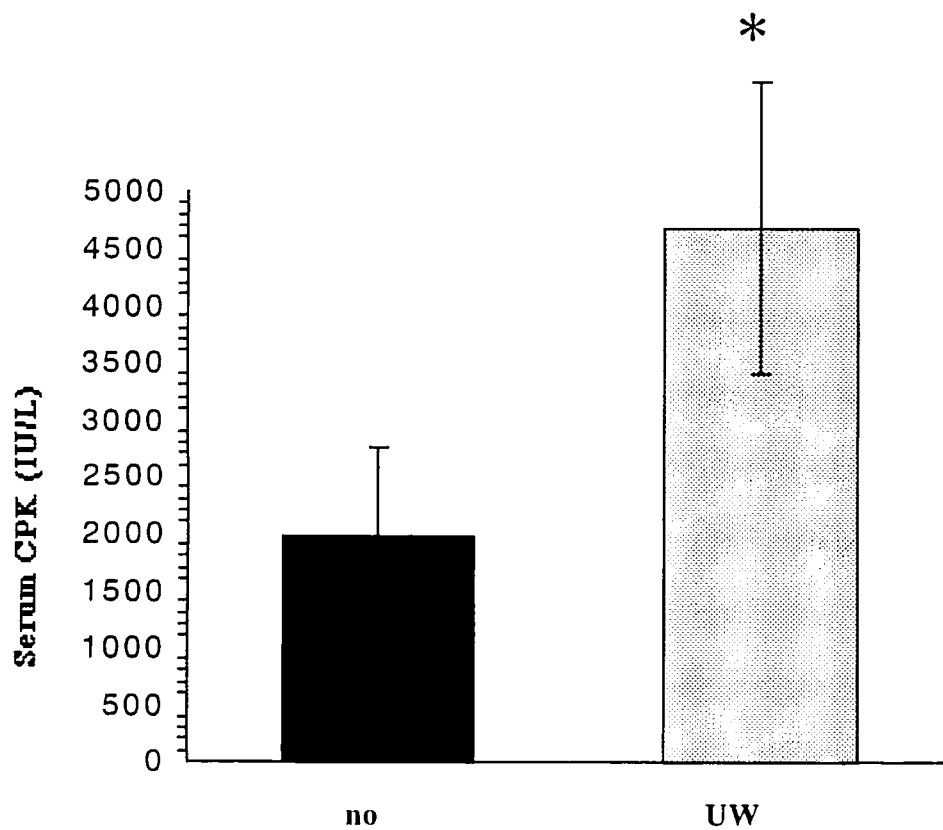
Tissue ATP levels in each 100cm-gravity perfusion group were preserved better than those in each 40cm-gravity perfusion group. 40-EC, 40-UW: 40cm-gravity perfusion group. 100-EC, 100-UW: 100cm-gravity perfusion group. n=4 in all groups.

\*  $P < 0.01$  vs. 40cm-gravity perfusion group.



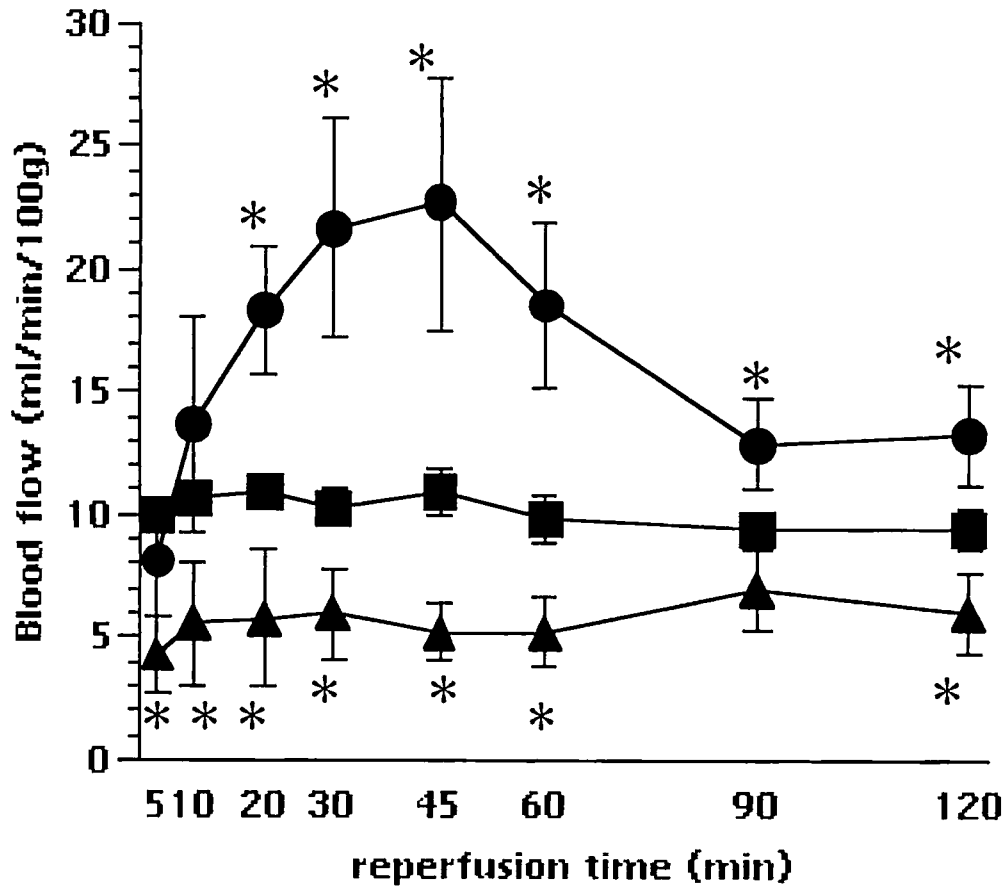
**Figure 4,** Tissue ATP levels of soleus muscle after 24 hr reperfusion

After 5 hr of ischemia, ATP levels in the UW perfusion group were significantly greater than those in the no perfusion group. However, after 5 hr of ischemia following 24 hr of reperfusion, those in the UW perfusion group were significantly lower than those in the no perfusion group. Data are expressed as means  $\pm$  SD. no: no perfusion group UW: UW perfusion group. Control means the amount of ATP in the contralateral soleus muscle, which hasn't damaged by ischemia.  $n=6$  in all groups. \*  $P<0.01$  vs. no perfusion group.



**Figure 5,** Serum CPK

The serum levels of CPK in UW perfusion group were significantly higher than in no perfusion group ( $P < 0.05$ ) no: no perfusion group UW: UW perfusion group Data are expressed as means  $\pm$  SD.  $n=6$  in all groups.



**Figure 6,** Reperfusion blood flow after transplantation.

Reperfusion blood flow in the no perfusion group (●) was gradually increased and peaked after 30-45 minutes of reperfusion. The peaked flow was  $240 \pm 30\%$  of contralateral hindlimb (■). That in the UW perfusion group (▲) was lower than that in contralateral hindlimb during the first two hours of reperfusion. Data are expressed as means  $\pm$  SE.  $n=6$  in all groups. \*  $P < 0.05$  vs. contralateral hindlimb

	Gastrocnemius		Soleus	
Ratio E/C	No perfusion	UW perfusion	No perfusion	UW perfusion
	$2.69 \pm 1.36$	$0.36 \pm 0.14$	$1.55 \pm 0.84$	$0.30 \pm 0.19$

**Table 3,** Blood flow ratio of experimental to contralateral control limb

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations.. n=4 in all groups.

## 7) - 6 考察

ラット骨格筋では虚血 4~5 時間で急速な ATP の低下を示すことが分かった。EC 液による灌流では骨格筋の ATP 保存に対する効果を認めなかったが、UW 液による灌流は、この虚血 4~5 時間で起こる急速な ATP の低下を抑制して虚血 5 時間後の骨格筋 ATP を有意に維持することができた。これまでラット後肢の骨格筋保存には EC 液と UW 液の効果に有意差はないとする報告がなされているが(32,33)、これらの実験は浸漬保存であり、灌流は行われていない。切断後肢を保存する場合、骨格筋は皮膚や筋膜に覆われ深部に存在するため、保存効果を挙げるためには灌流が必要であるものと考えられた。

灌流圧も骨格筋 ATP の保存効果に大きな影響を受けることが分かった。今回の実験では 40cm-gravity、100cm-gravity の 2 種類の圧のみの調査であるが、高い方が骨格筋 ATP の保存効果は大きかった。40cm-gravity という灌流圧は、大腿静脈からの自然排液が見られる最低限の圧として採用したが、この条件では保存液が十分末梢まで循環しているかどうか明らかではない。灌流圧が十分でなければ循環が不均衡となり保存効果が失われることは他の臓器で報告されており(11,12)、特に UW 液は粘調度が高いため、その傾向がつよいものと考えられる。しかし灌流圧が高すぎると逆に血管内皮障害を引き起こすことが危惧される(12)。実験動物、組織、保存液の種類によって適切な灌流圧が異なるものと考えられ、さらに詳しい調査が必要である。

以上の結果をまとめると、今回の実験モデルにおける最適の骨格筋保存条件は、1)保存液；UW 溶液、2)保存時間；5 時間、3)灌流圧；100cm-gravity ということになる。そこで 7) - 2) - 4)では、この条件で保存した後肢を別の同系ラッ

トへ移植して血流を再開させ、虚血後再灌流の影響を調べた。非灌流群では血流再開後速やかに反応性血流増加が起こったが、UW 灌流群では血流の回復が見られず、健側よりも低いままであった。この結果血流再開後 24 時間の時点で非灌流群では筋内 ATP 量の回復が見られたが、UW 灌流群では逆に血流再開前よりも低下し、ATP 量の逆転が起こった。この結果は血清中 CPK の測定によっても確かめられた。血流再開後 24 時間での血清中 CPK は UW 灌流群で有意に高く、これは筋組織障害が非灌流群よりも強いことを示している。

以上の結果より UW 保存液により灌流することは、骨格筋保存に有効であることが分かったが、虚血後再灌流時の血流を阻害するため、移植後に組織障害が悪化するものと考えられた。

血流が低下した原因は何であろうか？ 血管内皮は現在 NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF という 3 つの血管弛緩因子を産生して局所の血流調節を行っていることが知られている。これらの因子の産生、もしくは働きが障害されれば、術後の血管 spasm、組織血流の低下が惹起され、最終的な移植成績に悪影響を及ぼすものと考えられる。UW 液による灌流が切断後肢の血管内皮機能を障害しているのかもしれない。ラットの aorta を用いた実験では、UW 液は血管内皮機能の保存にも有効であったと報告されているが(34,35)、ブタの冠動脈を用いた実験では UW 液は血管内皮機能を低下させることが報告されている(15,36)。このように動物種や調査する血管によって一致した結果が得られておらず、ラット四肢の血管を用いて同様の実験を行った報告は、我々の知る限りにおいてはまだない。そこでこの仮説を確かめるために、次に血管リングを用いて血管内皮機能を調査することにした。

## 8) 四肢の血管内皮は UW 液による灌流で影響を受けるのか？

### 8) - 1 血管内皮依存性血管弛緩反応

血管内皮は様々な血管作動因子を産生して局所の血流調節を行っており、この中で内皮由来血管弛緩因子 (endothelium derived relaxing factors, EDRFs) としては endothelium derived nitric oxide (EDNO)、prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ )、endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)があることが知られている(37)。これらの因子は acetylcholine, Bradykinin などの刺激で血管内皮より産出されるため、organ bath 内で、血管リングを用いてこれらの物質を投与したときの血管弛緩反応を測定する方法が、血管内皮機能を調査する方法として広く行われている。

### 8) - 2 endothelium derived nitric oxide (EDNO)

1980 年、Furchugott らにより endothelium derived relaxing factor (EDRF)が発見され (38)、その後、その正体が nitric oxide (NO)であることが確認された (39)。EDNO は様々な物理的、科学的な刺激で血管内皮で産生され、血管平滑筋に作用して細胞内 cGMP を上昇させることで平滑筋の弛緩作用を表す。EDNO は局所の循環の調節に非常に重要な役割を果たしており、正常な遊離が障害されれば循環障害の一因となる。EDNO のうち、血管内腔側に遊離されたものは、血小板の凝集と白血球及び血小板の接着を抑制し(40)、血栓形成の予防にも重要な働きがある。また長期的には血管平滑筋細胞の増殖能を抑制することから動脈硬化を予防する働きもあるのではないかと考えられている。



EDNO は血管内皮で L- arginine を基質として、NO 合成酵素 (NO syntase, NOS ) によって生成される。そこで、organ bath を用いて弛緩反応を測定する実験では、EDNO の産生を抑制したい場合に L- arginine の構造類似体 (L- methyl arginine など) を NOS 阻害薬として使用する。

#### 8) – 3 prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ )

化学物質が内皮の受容体に結合して phospholipase A2 を活性化し、膜のリン脂質より arachidonic acid を遊離する。ここから cyclooxygenase を介して様々な prostanoid が産生されるが、血管内皮で作られるのはおもに  $\text{PGI}_2$  である。 $\text{PGI}_2$  は平滑筋内 cAMP を上昇させることで血管平滑筋を弛緩させる。よって  $\text{PGI}_2$  もまた EDRFs の一つである。 $\text{PGI}_2$  もまた血管内腔側では血小板の凝集を抑制する。organ bath を用いた実験では Prostacyclin の作用を抑制するために、cyclooxygenase 阻害薬 (indomethacin など) を使用する。

#### 8) – 4 endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)

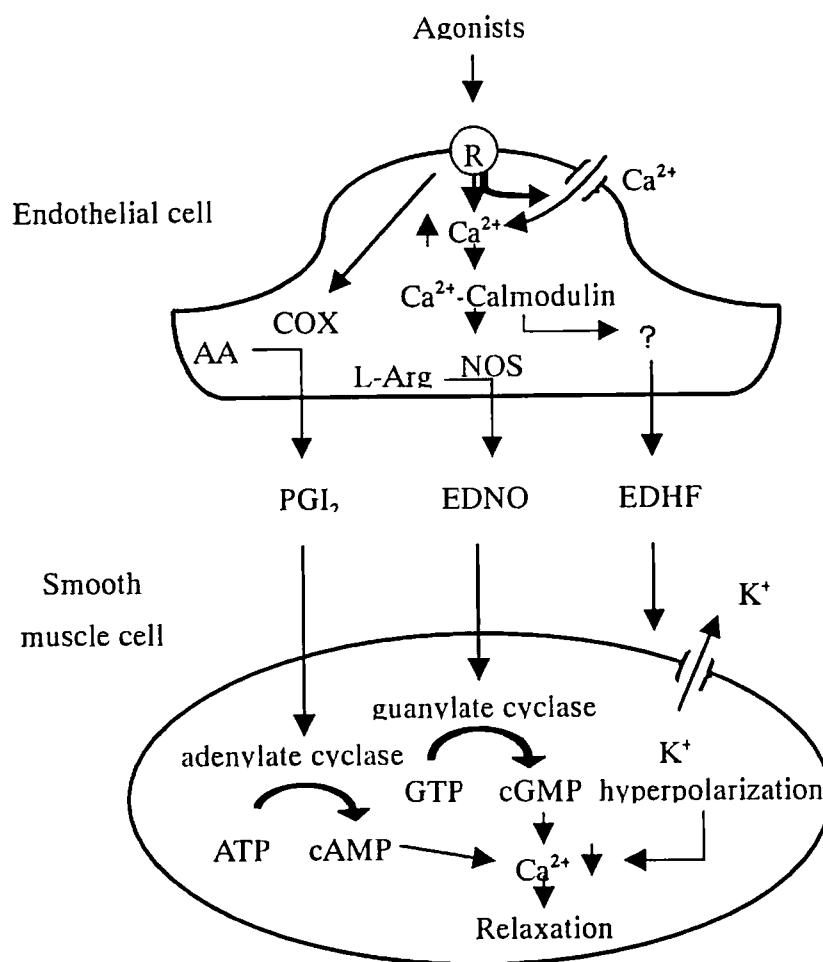
前述したように内皮依存性血管弛緩反応は EDNO や  $\text{PGI}_2$  が cGMP や cAMP を介して引き起こすと考えられている。しかし血管の種類によっては acetylcholine などの化学的刺激で引き起こされる内皮依存性血管弛緩反応は NOS と cyclooxygenase を抑制しても消失しないことが分かり、しかもそれは細胞内の cGMP や cAMP の増加を伴わないことも確認された。これは EDNO や prostacyclin 以外になにか平滑筋を弛緩させる因子が、血管内皮から放出されて

いることを示唆している。この因子はまだその正体が同定されていないため、その（平滑筋細胞膜を過分極させる）働きから内皮由来過分極因子（endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF）と呼ばれている。

EDHF は K channel を開くことで平滑筋弛緩作用を表すと考えられているが、どのタイプの K channel が関与しているかについてはまだはっきりしていない。ある動物では EDHF の作用を apamin (small conductance Ca activated K channel blocker) が抑制するが、別の動物では、完全に抑制するためには apamin と charybdotoxin(voltage sensitive K channel blocker)が必要であった。Ca activated K channel ( $K_{Ca}$  channel) の抑制作用を有する tetraethylammonium(TEA)もまた EDHF の作用を抑制する。血管によっては Glibenclamide が EDHF による過分極を抑制するので、ATP sensitive K channel が関与するとも報告されている (41)。

EDHF は EDNO や  $PGI_2$  と異なり、まだ物質としてとらえられておらず、特異的な阻害薬も見つかっていない。現時点では NOS と cyclooxygenase の inhibitor に抵抗性の内皮依存性血管弛緩(過分極)反応が EDHF 産生の指標とされている。

図 2, Endothelium derived relaxing factors (EDRFs)の産生



## 8) - 5 実験方法

### 8) - 5 - 1 UW 液による灌流が、血管内皮依存性血管弛緩反応に及ぼす影響

実験は control 群、非灌流群、UW 灌流群の 3 群で行った。control 群ではラット後肢を大腿中央部で切断し、すぐに膝窩動脈の直前で大腿動脈を 2.5mm の長さで採取した。非灌流群では切断後肢を室温で 5 時間保存した後、同様に大腿動脈を採取した。UW 灌流群では切断後肢を UW 液を用いて持続的に灌流して

(100cm-gravity) 5時間保存した後、同様に大腿動脈を採取した。

#### 8) - 5 - 2 灌流圧が血管内皮に及ぼす影響

灌流圧が高すぎると血管内皮は障害される。UW 液は成分に含まれる hydroxyethyl starch により非常に粘調性が高くなっており、灌流するときの shear stress はより大きくなるものと考えられる。そこで切断後肢を灌流できる最低限の圧力である 40cm-gravity で 5 時間灌流したあと、8) - 2) - 1)と同様に大腿動脈を採取した。

#### 8) - 5 - 3 保存終了後の血流再開(ischemia-reperfusion)が血管内皮に及ぼす影響

切断後肢をそのまま室温で保存、もしくは 100cm-gravity で UW 液を用いて灌流保存し、別の同系ラットへ大腿動静脈を吻合して移植した。後肢の虚血時間は合計 5 時間となるようにした。血流再開 24 時間後、再びラットを麻酔して 8) - 5) - 1)と同様に大腿動脈を採取した。

#### 8) - 5 - 4 血管内皮依存性血管弛緩反応の測定

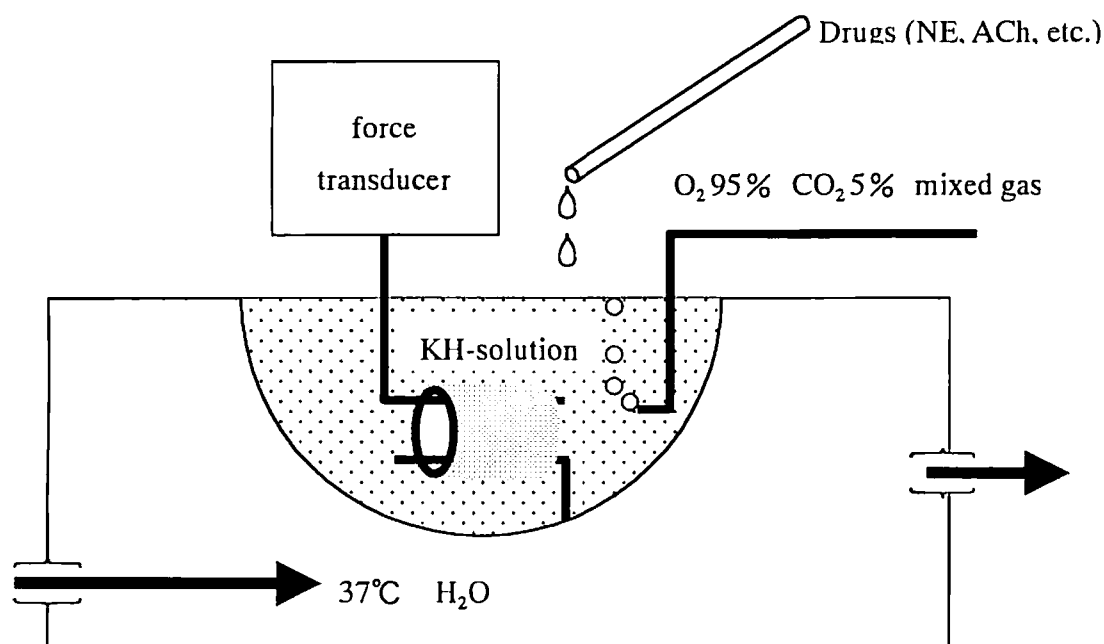
採取した動脈リングは冷却した Krebs-Hensilate (K-H) solution に浸して、その中で血管内皮を傷害しないように気をつけながら周囲の結合組織を除去した。準備のできたリングは、37℃で酸素化した K-H solution を満たした organ chamber 内で、force transducer に接続された(図 3)。実験は、K-H solution を入れ替えな

から血管張力が安定するまで 30 分～1 時間ほど待機してから開始した。

まず 1.0g の tension をあらかじめ与えた状態で、 $10^{-6}$  mol の norepinephrine を chamber 内に投与した(予備実験においてこれらの血管リングは約 1.0g の preload をかけることで norepinephrine に対する最大の収縮反応が得られることが分かった)。張力が安定した後、 $10^{-7} \sim 10^{-5}$  mol の acetylcholine を段階的に投与した。

Norepinephrine 投与後の収縮力を 100% として acetylcholine による弛緩反応を血管弛緩率として評価した。測定終了後、cyclooxygenase 阻害薬である indomethacin  $10^{-5}$  mol と NO 合成酵素阻害薬である  $N^G$ -monomethyl L-arginine (L-NMMA)  $10^{-4}$  mol を先に chamber 内に加えた状態で、同様に acetylcholine による血管弛緩反応の測定を行った。また 8) - 2) - 3) ではさらに  $K_{Ca}$  channel 阻害薬である tetraethylammonium (TEA)  $10^{-3}$  mol を chamber 内に加えて acetylcholine による血管弛緩反応測定を繰り返した。

図 3, Organ bath 内での内皮依存性血管弛緩反応の測定



## 8) - 6 実験結果

### 8) - 6 - 1 UW 液による灌流が、血管内皮依存性血管弛緩反応に及ぼす影響

ACh に対する最大弛緩率は control 群で  $97.3 \pm 2.7\%$ 、非灌流群で  $97.0 \pm 2.8\%$  であった。これらの 2 群間には統計学的有意差は認められなかった。これに対し、UW 灌流群の最大弛緩率は  $76.7 \pm 4.7\%$  であり、これは他の 2 群と比較して有意に低下していた( $P < 0.01$ )。Indomethacin 単独の投与では、この血管弛緩反応に有意な変化は認められなかった。さらに L-NMMA を加えて血管弛緩反応を測定したところ、それぞれの群で有意差をもって弛緩率が低下した(Fig. 7)。

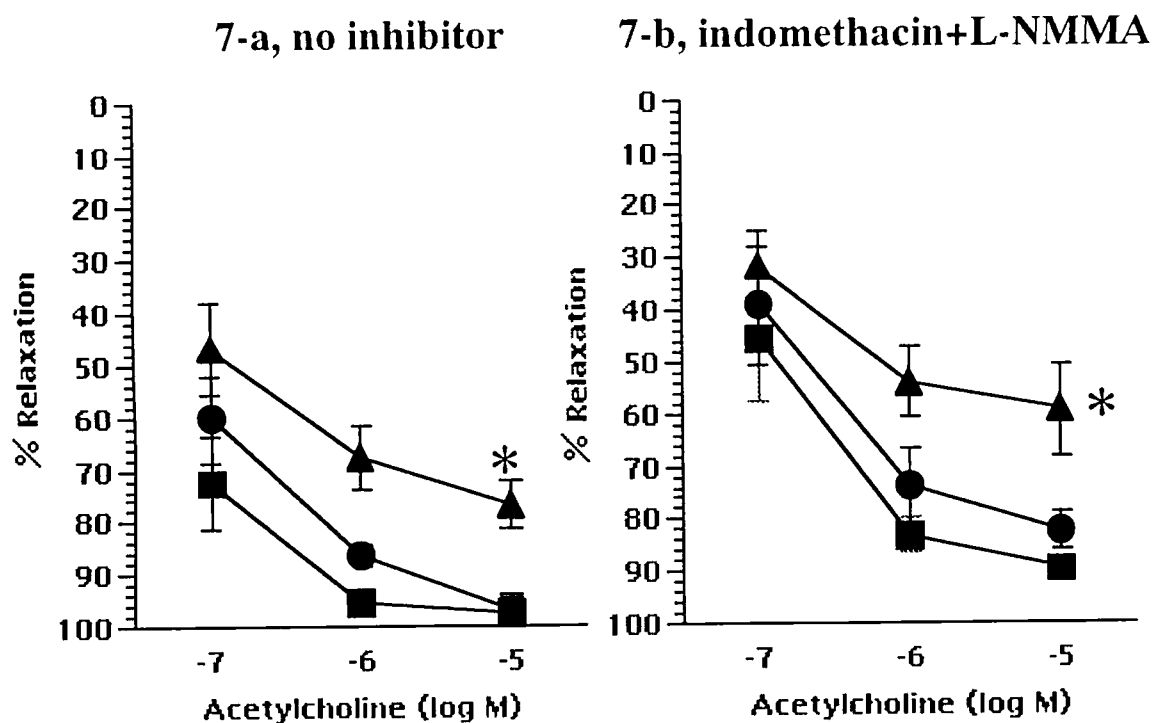
### 8) - 6 - 2 灌流圧が血管内皮に及ぼす影響

40cm-gravity 灌流群の最大弛緩率は  $63.2 \pm 10.6\%$ 、L-NMMA 存在下で  $61.9 \pm 8.7\%$  であった。これは 100cm-gravity 灌流群と比較して統計学的有意差は認められなかった(Fig. 8)。

### 8) - 6 - 3 保存終了後の血流再開(ischemia-reperfusion)が血管内皮に及ぼす影響

24 時間の血流再開後、ACh に対する血管弛緩反応は、非灌流群、UW 灌流群ともに低下した。UW 灌流群の血管弛緩反応は、indomethacin と L-NMMA を加えることで、そのほとんどが消失した。これに対し、非灌流群の血管弛緩反応は、若干抑制されたのみであった(Fig. 9)。

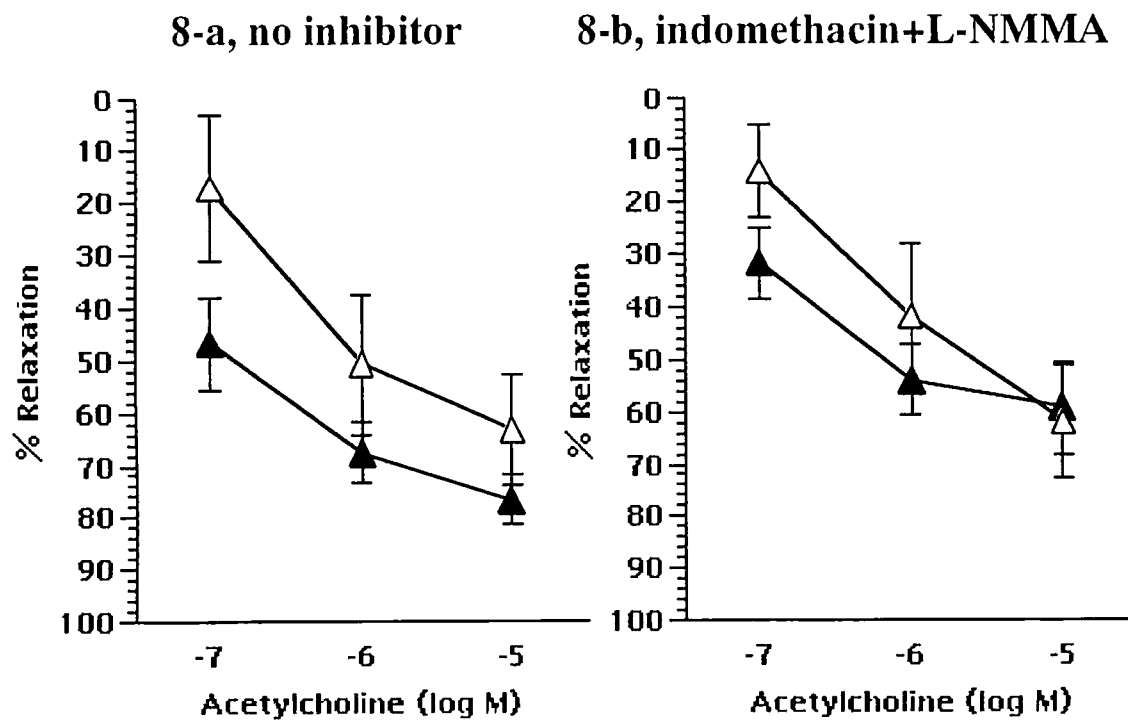
非灌流群で残存した血管弛緩反応は、さらに TEA を加えることで、その大部分を抑制することができた(Fig. 10)。



**Figure 7,** The relaxant responses to ACh during the contractions induced by norepinephrine after 5 hr of ischemia.

The relaxant responses in UW perfusion group (▲) were significantly lower when compared to the freshly harvested control (■) and no perfusion group (●) (Fig.7-a). L-NMMA (in the presence of indomethacin) had an inhibitory effect on ACh-induced relaxation (Fig.7-b). Data are expressed as means  $\pm$  SE.  $n=6$  in all groups. \*  $P < 0.01$  vs. control group

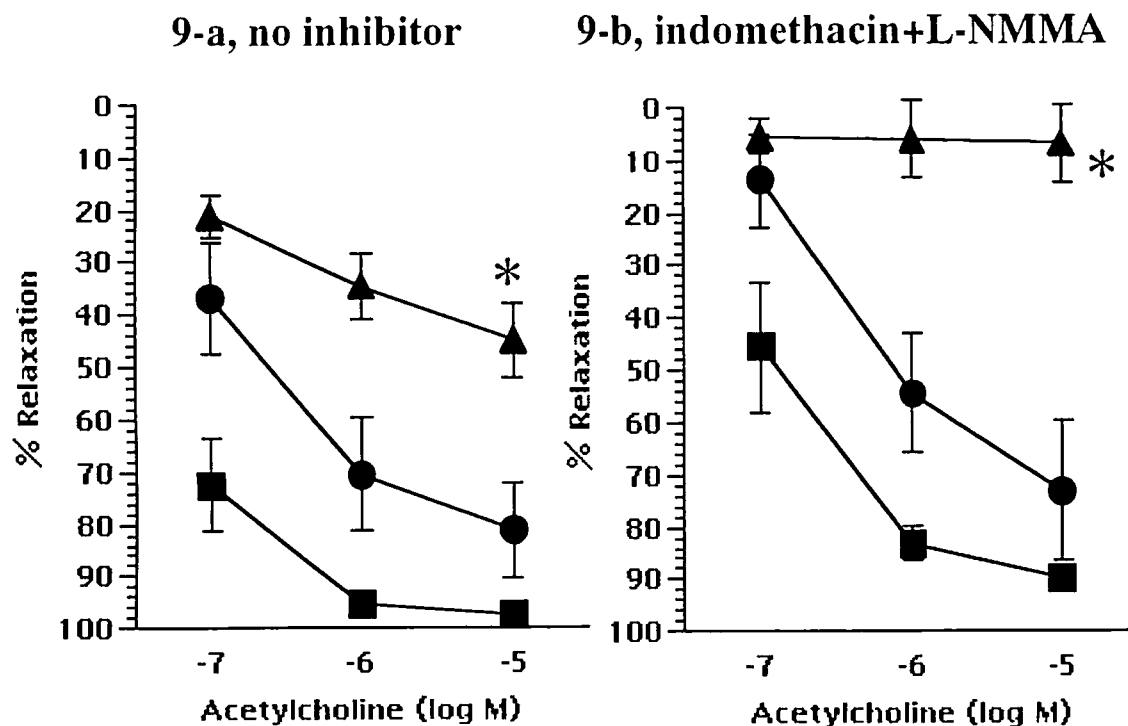




**Figure 8,** The relaxant responses to ACh after 5 hr of UW solution perfusion at different pressure.

7. : UW perfusion at 100cm-gravity group     $\Delta$ : UW perfusion at 40cm-gravity group

No significant difference in relaxant responses to ACh was observed between these two groups. Data are expressed as means  $\pm$  SE. n=6 in all groups.

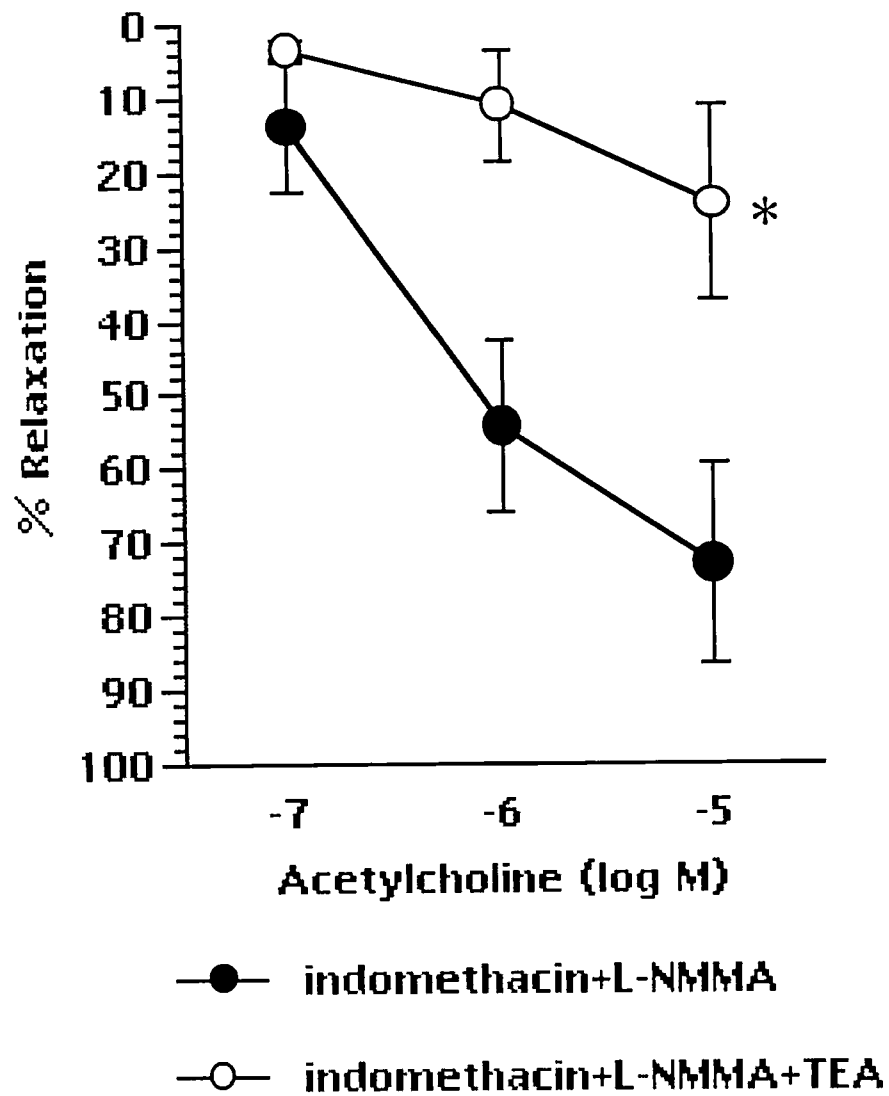


**Figure 9,** The relaxant responses to ACh during the contractions induced by norepinephrine after 5 hr of ischemia following 24 hr of reperfusion.

The relaxant responses in the UW perfusion group were significantly lower than that in the no perfusion group after 24 hr reperfusion (Fig.9-a). Those were almost completely abolished by indomethacin plus L-NMMA, in contrast to the no perfusion group in which responses were partially attenuated (Fig.9-b).

■: freshly harvested control    ●: no perfusion group    ▲: UW perfusion group

Data are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.01$  vs. no perfusion group  
n=6 in all groups.



**Figure 10,** The residual relaxant responses in the no perfusion group after 5 hr of ischemia following 24 hr of reperfusion

Those were effectively attenuated by TEA infusion.

Data are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.01$  vs. indomethacin+L-NMMA group

n=6 in all groups

## 8)-7 考察

UW 灌流群で血管内皮依存性血管弛緩反応の低下を認めたのに対し、非灌流群では変化は見られなかった。これは 5 時間の虚血のみでは大腿動脈の血管内皮機能に変化は起こらないが、UW 液で灌流することで障害が引き起こされることを示している。Indomethacin 単独では血管弛緩反応にほとんど変化が見られなかったことから、大腿動脈の血管弛緩反応には prostacyclin はほとんど関与していないことが分かる。L-NMMA は 3 群とも同程度に血管弛緩反応を抑制したが、まだ大部分の弛緩反応が残存した。前述したように血管内皮は NO、PGI<sub>2</sub>、EDHF という 3 つの血管弛緩因子を産生して局所の血流調節を行っているので、そのうち NO、PGI<sub>2</sub> の産生を抑制して残った弛緩反応は、EDHF 由来の反応ということになる。よってラットの大腿動脈の血管内皮依存性血管弛緩反応は、その大部分を EDHF 由来の反応に依存しているといえることができる。また Indomethacin と L-NMMA 存在下でも UW 灌流群の血管弛緩反応が非灌流群よりも有意に低下していたことより、UW 液による灌流は主に EDHF 由来の反応を障害しているといえる。

灌流圧が高すぎると血管内皮は障害される。UW 液は成分に含まれる hydroxyethyl starch により非常に粘調性が高くなっており、灌流するときの shear stress はより大きくなるものと考えられる。今回の実験の結果、灌流圧を十分に下げた状態でも UW 液によって血管弛緩反応の低下が引き起こされたことから、100cm-gravity という圧が高すぎて血管内皮が障害されたのではないことがわかる。UW 液による灌流という行為が大腿動脈の血管内皮障害を引き起こすものと考えられた。

24 時間の血流再開後、UW 灌流群では、血管弛緩反応の低下が著明となり、さらに indomethacin と L-NMMA によって、残存する弛緩反応のほとんどが消失した。非灌流群でも血管弛緩反応の低下が見られたが、indomethacin と L-NMMA を投与してもまだ最大で 73%もの血管弛緩が得られた。これは虚血後再灌流によって非灌流群の EDHF の障害は少ないが、UW 液灌流群の EDHF は非常に強く障害されることを示している。なぜこのような差が生まれたのかについては、今回の実験だけでは分からない。EDRFs の血管弛緩反応に関与する比率は、血管の大きさ、臓器によって大きく異なり、大腿動脈では EDHF の関与が非常に大きいことが報告されている (44,45)。また EDHF は EDRFs のなかで最も虚血に強い因子であり(46)、EDNO の back up として働いている可能性が報告されている(47)。5 時間虚血後の後肢では、EDHF の局所血流調節に対する重要性が非常に大きくなっており、UW 液で内皮が障害を受けることによって再灌流早期の血流低下が引き起こされ、それがさらに内皮障害を悪化させていくのかもしれない。EDHF はその存在は強く示唆されていながらも、いまだ正体が解明されておらず、その作用も分かっていない(48)。血管弛緩作用以外にも重要な EDHF の作用がある可能性も否定できないであろう。

前述のように EDHF は平滑筋の K-channel を開口することにより、弛緩作用を発揮すると言われているが、いくつかある K-channel のうち、どの種類の channel を介するのかについては意見の一致を見ていない。非灌流群で indomethacin と L-NMMA 投与後も残存していた弛緩反応は、TEA の投与によって、かなりの部分が抑制されたことより、ラットの大腿動脈では、すべてではないが  $K_{Ca}$  channel が EDHF の作用に関与していることがわかった。

## 9) 結語

- UW 液による持続灌流は虚血中の骨格筋 viability を維持するには有効であったが、再灌流後の血流低下を引き起こし、結果的に viability を増悪させた。
- UW 液は血管内皮機能、中でも EDHF に由来する反応を障害し、これが血流低下の一因となっている可能性がある。

切断四肢、その中でも骨格筋の保存のために灌流という行為が有効であるのかについて、いろいろな条件で実験を行って見たが、少なくとも現在使われている保存液をそのまま四肢の灌流液として使うことに関しては問題があるようである。今回の結果から UW 液は筋組織そのものを保存するには有効であることが分かったので、小さな組織であれば冷却浸漬保存の効果が期待できるであろう。しかし四肢など複合組織の保存では、骨格筋は深部にあり、皮膚、筋膜などで覆われているため、保存時間延長のためには、灌流という行為は不可欠なものと考えられる。四肢の保存方法についての研究は他の臓器と比較してまだ未解明の部分が非常に多く、今後四肢の特性に合わせた保存液の開発が必要であろう。

## 参考文献

1. Jones JW. Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville hand transplant team. New England Journal of Medicine 2000; 343: 468.
2. Francois CG, Breidenbach WC, Maldonado C, et al. Hand transplantation: comparisons and observations of the first four clinical cases. Microsurgery 2000; 20: 360.
3. Collins GM, et al. Kidney preservation for transportation – initial perfusion and 30 hours ice storage –. Lancet 1969; 2: 1219.
4. Tanaka W. Storage and transport of 83 human kidney by simple hypothermia. Transplantation 1971; 12: 348.
5. Squiffet JP, et al. Safe preservation of human renal cadaver transplants by Euro-Collins solution up to 50 hours. Transplant. Proc. 1981; 13: 693.
6. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, et al. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. Transplantation 1988; 46: 517.
7. Wahlberg JA, Love R, Landegard L, et al. 72-hour preservation of the canine pancreas. Transplantation 1987; 43: 5.
8. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45: 673.

9. Collins GM. What solutions are best ? Overview of flush solutions. Transplantation Porocceeding 1997; 29: 3543.
10. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. Transplantation 1988; 46: 512.
11. Kobayashi Y, Galvao FHF, Nomoto M, Murase N, Takeyoshi I, Starzl TE, Todo S. Influence of graft perfusion pressure on graft viability after small bowel preservation and transplantation. Transplant. Proc. 1996; 28: 2598.
12. Molina JE, Galliani CA, Einzig S, Bianco R, Rasmussen T, Clack R. Physical and mechanical effects of cardioplegic injection on flow distribution and myocardial damage in hearts with normal coronary arteries. J. Thoracic. Cardiovasc. Surg. 1989; 97: 870.
13. Mankad PS, Chester AH, Yacoub MH. Role of potassium concentration in cardioplegic solutions in mediating endothelial damage. Ann. Thorac. Surg. 1991; 51: 89.
14. Keller MV, Geddes L, Spotnitz W, Kaul S, Duling BR. Microcirculatory dysfunction following perfusion with hyperkalemic hypothermic cardioplegic solution and blood reperfusion. Circulation 1991; 84: 2485.
15. Ge ZD, He GW. Comparison of University of Wisconsin and ST. Thomas' hospital solutions on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function in coronary micro-arteries. Transplantation 2000; 70: 22.



16. Cartier R, Pellerin M, Hollmann C, Pelletier C. Effect of pressure and duration of hyperkalemic infusions on endothelial function. *Ann. Thorac. Surg.* 1993; 55: 700.
17. Drinkwater DC, Rudis E, Laks H, et al. University of Wisconsin versus Stanford cardioplegia and the development of allograft vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant.* 1995; 14: 891.
18. Mohara J, Morishita Y, Takahashi T, Oshima K, Yamagishi T, Takeyoshi I, Matsumoto K. A comparative study of celsior and university of Wisconsin solutions based on 12-Hr preservation followed by transplantation in canine models. *J. Heart Lung Transplant.* 1999; 18: 1202.
19. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, et al. A comparison of the new preservation solution celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation* 1999; 67: 152.
20. Kihira M, Miura T, Ishiguro N. Preservation of skeletal muscle in tissue transfers using rat hindlimbs. *Plast. Reconstr. Surg.* 1991; 88: 275.
21. Heijden EPA, Kroese ABA, Werker PMN, Dejong GMB, Bär PR, Kon M. Function of rat skeletal muscles after storage at 10°C in various preservation solutions. *Clinical science* 1998; 94: 271.
22. Heijden EPA, Kroese ABA, Stremel RW, Bär PR, Kon M, Werker PMN. Contractile properties of rat skeletal muscles following storage at 4°C. *Clinical science* 1999; 97: 45.
23. Arai K, Hotokebuchi T, Miyahara H, Mohtai M, Kitadai HK, Sugioka Y, Kaibara N. Successful long-term storage of rat limbs. *Int. Orthop.* 1993; 17: 389.

24. Harashina T, Buncke HJ. Study of washout solutions for microvascular replantation and transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 56: 542.
25. Gordon L, Levinsohn DG, Borowsky CD, et al. Improved preservation of skeletal muscle in amputated limbs using pulsatile hypothermic perfusion with University of Wisconsin solution. *J. Bone Joint Surg.* 1992; 74-A: 1358.
26. Abrove RH, Moy OJ, Peimer CA, Severin CM, Sherwin FM. Effect of high-energy phosphates and free radical scavengers on replant survival in an ischemic extremity model. *Microsurgery* 1996; 17: 481.
27. Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. *Clin. Orthop.* 1995; 314: 122.
28. Rosen HM, Silvjak MJ, McBrearty FX. The role of perfusion washout in limb revascularization procedures. *Plast. Reconstr. Surg.* 1987; 80: 595.
29. Idström JP, Soussi B, Elander A, Bylund-fellenius AC. Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: H1668.
30. Ikebe K, Kato T, Yamaga M, Hirose J, Tsuchida T, Takagi K. Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. *J. Surg. Res.* 2001; 99: 1.
31. Jaworek D, Welsch J. Adenosine 5'-Triphosphate. In H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, and M. Graßl (eds.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Third Edition. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1985, Pp. 340-346.

32. Yokoyama K, Kimura M, Itoman M. Rat whole-limb viability after cold immersion using University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *Transplantation* 1996; 62: 884.
33. Kimata I, Kino Y, Ishiguro N, Miura T, Kihira Y. 複合組織移植における骨格筋の保存に関する実験的研究 -UW 液と Euro-Collins 液の比較- *J. Jpn. Orthop. Assoc.* 1993; 67: 1449.
34. Ingemansson R, Sjöberg T, Massa G, Steen S. Long-term preservation of vascular endothelium and smooth muscle. *Ann. Thorac. Surg.* 1995; 59: 1177.
35. Abebe W, Cavallari N, Agrawal DK, Rowley J, Thorpe PE, Hunter WJ, Edwards JD. Functional and morphological assessment of rat aorta stored in University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *Transplantation* 1993; 56: 808.
36. Pearl JM, Laks H, Drinkwater DC, Sorensen TJ, Chang P, Aharon AS, Byrns RE, Ignarro LJ. Loss of endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1994; 107: 257.
37. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999; 31: 61.
38. Furchugott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 299: 373.
39. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524.

40. May GR, Crook P, Moore PK, Page CP. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 102: 759.
41. Suzuki H, Yamamoto Y, Fukuda H. 内皮細胞由来過分極因子と血管弛緩 *Folia Pharmacol. Jpn.* 1998; 112: 195.
42. Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H1090.
43. Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Lin MY, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J. Vasc. Res.* 1999; 36: 311.
44. Kato T, Bishop AT, Tu YC, Wood MB. Function of the vascular endothelium after hypothermic storage at four degrees Celsius in a canine tibial perfusion model. *J. Bone and Joint Surg.* 1998; 80-A: 1341.
45. Chan ECH, Woodman OL. Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischemia and reperfusion in dog coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 126: 925.
46. Feletou M, Vanhoutte PM. The alternative: EDHF *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999; 31:15.