

ぐ定着・普及させることは難しいように思う。しかし、少なくとも移植実施施設においては実施するべく努力が必要と考える。

今回の定点観測の成果を鑑みると、これを継続すると共に分析結果を対策及びシステムの改善に結びつけるような提案をし、その効果を分析することで、わが国の医療事情に応じた基準が作れると考える。

E. 結論

院内感染防止とそのための施設管理システムは施設のレベルに大きな差があるが、移植実施施設の現場ではそれ相応の対策がとられ、管理されている。この研究を更に発展させて、ガイドラインを施設基準にアップグレードする必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・日本臨床環境医学会会誌(1998)
第7巻第2号 PP124
- ・移植施設・提供施設の院内感染防止対策と移植管理システムに関する研究
- ・日本臨床環境医学会会誌(1998)
第7巻第2号 PP124
- ・院内感染起因菌のオゾンガス殺菌特性防菌防黴 27:359-367(1998)
- ・臓器移植提供施設の院内感染防止対策と施設管理システムに関する研究
平成10年度「免疫・アレルギー等研究事業」報告書 P63-81(1998)

2. 学会発表

- 日本臨床環境医学会
1998年6月11日～12日
- ・院内感染防止におけるアルコール製剤の役割

移植実施施設の病院感染対策と施設管理システム に関するガイドライン

本ガイドラインでは移植実施施設が移植医療を実施するとき、感染症対策とその管理システムに関して満たしていなければならない水準を示す。

1. 施設、設備等

移植医療における感染症対策という観点からみて、実施施設が建築学的構造上備えておかなければならない要件として絶対的条件はないと考える。設備としては管理体制を含めてクリアーしておかなければならない一定の水準がある。

(1) クリーンルーム

骨髄移植を実施する場合に専用の無菌病棟、バイオクリーン病室（空気洗浄度がクラス 100）が望まれるが、ベッドアイソレーターを使ってベッド上のみクラス 100 に維持して実施可能である。臓器移植の場合はバイオクリーン病室を必ずしも必要としない。外国の例をみると前室のある個室があればベターだが、専用の個室を定めている程度である。免疫抑制剤抵抗性の拒絶反応の治療をする場合にクリーンルーム（クラス 1 万以下）があると感染症の合併を少なくすることができるので、できれば 1.2 室クリーンルームを設置しているのが望ましい。この場合も、ベッドアイソレーターで対処は可能である。ここにいうクリーンルームは、社会保険・老人保健診療報酬に定める無菌治療室または日本病院設備協会規格 HEAS-02（1989）の清浄度Ⅱ・清潔区域 A に相当する環境を指す。一般の病棟内にクリーンルームを設置する場合、構造上は前室を持つことが望ましい。

(2) 社会保険・老人保健診療報酬で規定する無菌治療室管理

空気洗浄度がクラス 1 万以下で滅菌水の供給が常時可能である等の要件を満たす病室において、医師等の立ち入り、物資の供給等の際にも無菌状態が保たれるように管理することとある。看護体制として新看護または基準看護を行っていること、自家発電装置を有していることも条件となっている。

(3) 感染症治療室

病院感染症の対策として感染症治療室があることが望ましいが、構造上規定通りの感染症治療室は我が国ではあまり普及していない。臓器移植に不可欠ではない。

感染症治療室は病室と前室を持つこと。病室および前室は陰圧に保つことができ、前室が最も低圧に保たれること。前室を陰圧に保つダクトは他の系統から独立して、排出口に至るまでに除菌のためのフィルターを有すること。トイレおよび洗面台を室内に持ち汚物処理が室内で可能であること。できれば浴室またはシャワー室を内に持つこと。必要に応じてガウンテクニックを実施できること。

(4) 院内感染防止対策の設置基準

移植実施施設として院内感染防止対策加算が可能 な施設基準を満たしていることは必要であろう。

- ・病院であること
- ・MRSA の感染を防止するにつき十分な設備を有していること
- ・MRSA の感染を防止するにつき十分な体制が整備されていること

(5) 感染症に関する検査設備

移植実施施設としては起炎菌の検索、感受性テストおよび画像検査が常時可能であることが必要がある。一般に行われている細菌、真菌、ウイルス、原虫の検査（塗抹検鏡、培養、抗体価）以外に別表 1 にあげる感染源の検索体制を整えておく（必ずしも施設内で検査できるとは限らないが、外注等ルートを確認する）必要がある。

2. 清潔度の維持・管理

(1) 移植後のクリーン度の目安

移植後、退院までの患者の環境をどの程度クリーンにしておくべきか、どのような管理システムでそれが達成できるかは移植臓器によって異なる。骨髄移植が高度の清潔度を必要とすることは当然だが、

臓器移植の場合あえて順位をつけると肺（心肺）、心、肝、脾、腎の順であろう。

表2に心臓の場合の標準的な基準例を示す。

(2) 清掃

特に移植実施施設として特別な清掃の基準はない。

クリーンルーム内については

- ・床掃除は汚れるたびに汚染者（医師、看護婦）がオスバンで清拭。
- ・定期的掃除は1.3回/日、クリーン度にあわせて行う。
- ・床の清拭は薬剤塗布器（ネスガード®）にて3日に1回行う。
消毒薬には0.3%アノン液 または0.2%ハイアミンを使用する。
薬剤塗布器は清潔区域のグレード毎に、バイオクリーンおよび感染症室には各部屋に専用器を設置することが望まれる。

(3) 消毒

- ・床 個室：患者退院後、清拭した後80%アルコール噴霧。次の入室まで間隔がある場合、入室前に同上を実施。

総室：入室患者がいない時、同上。

バイオクリーンユニット：オゾン薫蒸

（ホルマリン薫蒸がより有効だが、完全密封、専用の排気設備が必要。外国では発癌性があるためホルマリンの使用は禁止されている）。ベッド、移動用ストレッチャーなど必要物品を同時に薫蒸

感染症併発時：患者退出後、清拭し、リパルスを多い目に噴霧。

- ・物品/機器、ドアノブ

患者退院後、80%アルコールで清拭

- ・呼吸管理関連機器、機材

人工呼吸器：ホスクリンで消毒（25分）、不可の場合はオスバンで清拭（消毒日時確認）。フィルター、蛇腹はディスポを使用。

加湿器は使用しない。ジャクソンシースはガス滅菌したものを使用。吸引セットはディスポと

し、吸引ピンは毎日交換。中央配管接続部の加湿器は滅菌したものを毎日交換。

- ・自動注入ポンプ：アルコール消毒

- ・交換台：専用台を設置（入室前にアルコール清拭）

(4) クリーンルームの清潔度維持

移植患者を収容中の注意については患者の状態、施設の事情によるが、前述のクリーン度I、III度の場合は米国CDCのStandard Precautionsの実行でよいと考える。IV度以上では以下のような点を考慮する必要がある。

- ・薬品の混合について：原則としてクリーンルーム内で行う。

- ・薬品棚の内容：緊急薬品及びその日に使う予定のものだけとする。

- ・食事の滅菌

III, IV度：電子レンジを室内に設置し、できるものは加熱する。

V度：滅菌食をさらに電子レンジで加熱する。

- ・患者の衣類：滅菌の必要はないが新しいものとする。必要時は紫外線ロッカーに入れて滅菌する。

- ・トイレ：クリーンルーム専用のポータブル便器と紙を使用。

- ・体重測定：クリーンルーム専用のヘルスメーターを用いる。

- ・入室者の履物：クリーンルーム用のスリッパにはきかえる。

- ・入室者のガウン

III度：毎朝ディスポの清潔ガウンを用意する。

IV度：毎朝ディスポの清潔ガウンを用意する（同上）。使用後は紫外線ロッカーに吊りさげておく。

V度：その都度清潔ガウンを用いる。

- ・入室制限

III, IV度：医療スタッフも同時には最高5人まで、家族は同時に2人まで計

4人、一回10分。

V度：医療スタッフも原則として2人まで。家族は面会禁止。但し、室外との会話用に電話機を設置する。

・手洗い

入室時ガウンに着替えて水洗後、アルコールまたは強酸水による手洗いを励行する。

V度は手袋を着用する。

・レントゲン撮影、エコー

風下からベッドに近づくことを原則とする。

轍の跡はオスバンで消毒する。出来れば専用ポータブル装置を設置。カバーをかけておく。

V度ではカセットは滅菌した覆布につつんで使用する。

・TV（消毒、リモコンつき）、ラジオ、新聞、雑誌等の持ち込み

III, IV度：不潔、又は他の病室経由でなければ許可する。

V度：原則として禁止（バイオクリーンユニットには常設）

・食物の持ち込み

III, IV度：case by case（常識的な範囲内）

V度：原則として禁止

・ネブライザー、インスピロンは原則として使用しない。O₂カニューラ、流量計中のO₂洗浄器を使う。

3. モニタリング

移植医療を実施する施設においては、院内感染事故の発生を最小限に抑える努力が必要である。基本的には感染源対策、感染経路対策、感受性集団対策につきるが、院内環境の把握、検証とそれに基づく管理システムの構築が必要である。施設内の、特に移植患者の導線を考慮した環境調査としての定期的モニタリングを実施することが重要である。地域、医療サイズ、病院の役割等施設差があるし、予算を伴うものなので、モニタリング計画は標準化は

困難だが、次章の調査結果等を参考に各施設に適した計画を提示し、実行するべきであろう。以下に（財）北里研究所・北里院内感染対策協議会仕様のモニタリングを例示する。

(1) モニタリングの対象

1) 手術部（手術室、前室、手洗い、器材室、ナースステーション、ホールなど）

2) ICU

3) 病棟（病室、廊下、ナースステーション、ロビー、トイレ、洗面所、汚物処理室等）

(2) 調査内容、項目

1) 拭き取り検査

緑膿菌、MSSA、MRSAを汚染指標菌とする

2) 空気環境検査

浮遊粒子数、浮遊細菌数、室内温度&湿度、室間差圧、風量

3) 水質検査（微生物検査）

手洗い水、透析水を中心に一般細菌数算定、グラム染色

(3) 検査方法

1) 汚染指標菌検出、培養

- ・付着菌の採取方法：2mLの生理食塩水を浸した滅菌拭き取りブースを滅菌ピンセットで把持し、付着細菌採取箇所（10cm x 10cm）を強く拭き取る。ブースは指標菌が選択的に増殖できる培地の入った容器にいれ、36°C・20時間培養し、検査原材料とする。
- ・指標菌の培養は微生物分離・同定マニュアル（SOP-9）に基づいて行う。

2) 浮遊粒子数測定

- ・微粒子計測器 Laser Particle Counter TF-500（日本カノマックス）を用い、
- ・室内空気を15分間吸引し、
- ・空気1ft³中の0.3、0.5、1.0、3.0、5.0 μm径の粒子数を測定。

3) 浮遊細菌数測定

- ・MGサンプラーにハートインフージョン寒天培地をセットし、

- ・28.3 L/分の吸引量で15分間室内空気を吸引
- ・37°C・48時間培養後のコロニー数から1ft³中の細菌数を算出する。

4) 水質試験 (微生物検査)

- ・各所の手洗い水 1000 mL を採取
- ・0.3μm のフィルターを通し、一般細菌数を測定
- ・各分離培地を用いて 緑膿菌、大腸菌群、MSSA、真菌 の有無を検定

(4) 評価方法

- ・微生物環境調査に関する評価

評価段階 A : 汚染は少ない。

- 1) 指標3菌種の検出率が全国平均 (北里院内感染対策協議会の調査結果) 以下であること。
- 2) 清潔区域からMRSAが検出されないこと。
- 3) 各清浄度区域の測定箇所 評点が5以下であること。

B : 準清潔区域で軽度の汚染がみられる。

- 1) 2菌種の検出率は全国平均以下であること。(特にMRSAは全国平均以下であること。)

C : 清潔区域も汚染されている

- 1) 2菌種の検出率が全国平均を上回っている。
- 2) 1菌種が突出して全国平均を上回っている。

- ・空気環境調査に関する評価

日本病院設備協会規格 HEAS-02 (1998、表3) に基づいて評価する

4. ターゲットサベイランス

米国と英国では、全ての入院患者を対象とした全病的サベイランスは実施が困難、効率が悪いという理由で否定されており、ターゲットを定めたサベイランスを推奨している。器具関連院内感染症の

発生率調査などが一般的である。移植実施施設の場合、移植後の肺感染症等をターゲットとするサベイランスを今後導入する必要があるであろう。

5. 病院感染対策活動

(1) 感染症対策のための委員会/組織

施設によって呼称は異なるが、防疫対策委員会、院内感染防止対策委員会といった委員会が我が国でも多くの施設で設置されている。院内感染防止対策加算を申請するためには、病院長直属のMRSA感染症対策委員会が設置されていなければならない。委員会であるから、院内感染防止の対策案を立案し、審議・決定する目的で組織されている場合もあるが、表4の様な業務を担っている委員会も多い。後者の場合は米国や英国の病院に設置が義務づけされているICT (infection control team、和名では感染症対策部?)に近い。移植医療を実施する施設は業務を伴う委員会組織またはICTの組織を持つ必要があるであろう。

(2) ICTの活動と権限

イギリス厚生省の定義ではICTは次の様な権限を持つ。

- 1) 24時間体制で感染対策に関して医療上、看護上の決定をする
- 2) あらゆる階層の職員にアドバイスを与える
- 3) 職員教育
- 4) サベイランスに対する責任を有する
- 5) 環境衛生、機器購入、病院建築に関して発言権をもつ

我が国と米国、英国では感染対策の歴史的背景が異なるので、全てそのまま模倣することはできないが、universal precaution, standard precaution, の実践とICTの設置くらいは施設標準として必要と考える。(表4)

ガイドライン

表 1 移植に関する感染源検索

感 染 源	測 定 物	測 定 法
CMV	IgG, IgM 抗体	酵素免疫/免疫蛍光抗体間接法
	early antigen	免疫染色
	DNA	PCR
	mRNA (再燃時)	NASBA
	mRNA	in situ hybridization
EBV	IgG, IgM 抗体	免疫蛍光抗体間接法
	early antigen	
	nuclear antigen	
	DNA	PCR
アデノウイルス type II		EIA
		PCR
パルボウイルス	DNA	PCR
HHV-6	DNA	PCR
RSV	ウイルス蛋白 F	
カンジダ	抗原	
	エンドトキシン	
	β -D-グルカン	
アスペルギルス	抗体	ELISA
	抗原 galactomannan	Pastorex latex agglutination test
クリプトコッカス	ネオホルマンス抗体	ELISA
	抗原 capsular polysaccharide	Pastorex latex agglutination test
レジオネラ	DNA	PCR
ニューモシスチス・カニ	DNA	PCR
	菌体成分	免疫組織染色

ガイドライン

表 2 移植患者の要するクリーン度

クリーン度*	I 度	II 度	III 度	IV 度	V 度
収容場所	病室	病室	クリーンルーム	クリーンルーム	クリーンルーム
一般入室制限	無	有	有	有	有
家族面会制限*	無	無	1回/日	1回/日	不可
医療従事者制限	無	無	無	有	有
看護体制(観察)	定時	定時	定時	定時	定時
胸部レ線	外来	外来	病撮	病撮	無 [@]
靴履替、帽子	無	無	有	有	有
ガウン**	無	無	着用	着用	着用
マスク	着用	着用	着用	着用	着用
手洗***	有	有	有	有	有
外出時マスク	着用	着用	--	--	--
トイレ	室外	室外	室内	室内	室内
シャワー	可	可	不可	不可	不可

- # クリーン度
- I 度：外来通院中の移植患者の再入院時
 - II 度：術後退院前の安定期、外来通院中に感染症疑いにて入院する時
 - III 度：一般病棟（ICUから転棟の翌日以降）
 - IV 度：ICU入室中、および急性拒絶反応時
 - V 度：重症の急性拒絶反応のとき

* 面会：一度に2人までとする。

** ガウン：IV 度の場合は使い捨ての清潔ガウンを着用する。

III 度の場合も捨てのガウンを着用する。いずれも毎朝新しいものと交換し、使用後は紫線ロッカーに吊りさげておく。枚数は入室者を制限するために5枚までとする。

*** 手洗い：入室時滅菌水にて水洗後、ガウンに着替え、手に80%アルコール塗布。

但し V 度の場合は通常の手洗いの後手袋を着用する。

@ 胸部レ線：感染を疑わせる所見があるときは病撮を行う。

ガイドライン

表3 清浄度判定基準
 (日本病院施設協会 病院空調設備の設計・管理指針HEAS-02 (1998))

清浄度	ゾーン名称	浮遊粒子数 個/ft ³	浮遊細菌数 個/ft ³	室名	換気回数	室内圧の 正負	温度	湿度
医療ゾーン								
I	高度清潔区域	100	0.3	層流式手術室 バイオクリーンユニット	20	正	22-26	45-60
II	清潔区域	10,000	6.0	手術室	20	正	22-26	45-60
				器械展開室	15	正		
				NICU	10	正		
				無菌製剤室	15	正		
				中央材料部滅菌部	15	正		
III	準清潔区域	100,000	6.0	未熟児室	10	正	24-26	50-60
				手術部一般区域	10	正		
				ICU病室	10	正		
				外来手術室	10	正		
				特殊検査室	10	正		
				中央材料部一般区域	10	正		
IV	一般区域	-	6~15	CCU	6	常	25-27	50-60
				通常新生児室	10	常		
				看護室		常		
				病室		常		
				診察室		常		
				待合室		常		
				ICU前室		正		
V	汚染管理区域	-	-	微生物検査室		負	-	-
				RI検査室		負		
				感染症病室		負		
				中央材料部の汚染区域	排気10	負		
				解剖室	排気10	負		
				汚物処理室		負		
一般ゾーン								
VI	一般区域	-	6~15	事務室	6	正	25-27	50-80
				会議室	6	正		
				厨房	排気20	正		
				一般食堂	6	正		
				医局	6	正		
				研究室	4	正		
VII	汚染拡散防止区域	-	-	一般便所	排気10	負	-	-
				洗濯仕分け室	排気10	負		
				塵芥処理室	排気10	負		

表 4 院内感染症防止委員会に期待される業務

-
1. 病院長の直属機関として委員会を設置し、外科部門、内科部門、看護部門、検査部門、病院管理部門などの代表者で構成し、院内感染防止を施設全体の問題としてとらえる
 2. 病院内にサベイランス組織網をつくり、院内感染の発生状況を把握する。必要に応じて、院内感染発生原因の疫学調査も行う
 3. 院内感染防止マニュアルの作成
 4. 院内環境汚染の実体把握と対策
 5. 職員の教育と手洗いなどの実践
 6. 抗菌剤使用状況の把握と薬剤耐性動向の監視
 7. 医療廃棄物対策
 8. 医療保障訴訟問題への対応
-

(出典：医学書院 標準微生物 川名林治監修 165)

監督機関及び院内感染対策委員会への提言

-
1. 感染対策マニュアル実施状況の確認機関の設置
 2. 感染対策マニュアル実施状況の確認及び指導監督者の設置（部外者）
 3. 院内環境汚染調査の実施状況の届出の義務化
 4. 院内環境汚染調査実施の義務化（内部・外部どちらでもよい）
 5. 移植手術者の人数制限
 6. 移植患者病室の隔離（高度清潔クラスにする）
 7. 移植手術の特殊性・重要性の再確認（医師の意識啓蒙）
 - イ) ドアの開閉（手術中の出入禁止）
 - ロ) 無駄な動き
 - ハ) 空調管理基準のアップ（基準値以下の状態を維持）
-

分担研究報告

研究課題 移植臓器の生着率向上に関する研究—長期移植腎の生着向上に関する研究

分担研究者	大島伸一	名古屋大学医学部教授
研究協力者	吉開泰信	名古屋大学医学部教授
	石橋道男	奈良県立医科大学講師
	小野佳成	名古屋大学医学部助教授

研究要旨 移植腎の長期生着向上を図る目的で (1) 移植腎予後に影響を与える因子の解明を行い、ドナーの年齢、ドナーの死因、レシピエントの移植前高血圧の既往、慢性拒絶反応、晩期急性拒絶反応等が示唆された。(2) 長期移植腎生着患者における免疫状態の解析から患者リンパ球に co-stimulatory signal の障害が生じ移植腎に対する無あるいは低反応が生じている可能性が考えられた。(3) 慢性拒絶反応の発生機序について臨床例の組織学的検討とラット腎移植慢性拒絶反応モデルから検討し、慢性拒絶反応は緩徐な免疫反応により血管炎がわずかずつ起こり、その変化が緩徐なゆえにレシピエントの増殖性変化が主体となり血管内膜、中膜の肥厚により糸球体の硬化や間質の繊維化が生じ移植腎機能が廃絶すると考えられ、マクロファージがその発症、進行に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(i) 研究目的

近年、臓器移植の分野でも強力な免疫抑制剤の開発、臨床応用により生体腎移植、死体腎移植ともに腎移植後 1~2 年の移植腎生着率は大幅に向上し、それぞれ 90%、85% を越えている。一方、長期移植腎生着に関しては、5 年生着率で生体腎移植で 70%、死体腎移植で 50% とまだ改善の余地があり、世界的な移植臓器の不足と相まって、現在、長期移植腎生着の向上が重要な課題となっている。この問題を解決する目的で以下の検討を行った。

- 1) 長期移植腎生着に阻害する因子を死体腎移植例のデータ・ベースから多変量解析により検討した。
- 2) 移植腎の長期生着の免疫学的な要件を明らかにするために長期移植腎生着例のリンパ球の costimulatory 関連分子発現状況を検索した。
- 3) 慢性拒絶反応の発症及び進行機序を明らかにするために、(i) 慢性拒絶

反応合併例での臨床経過と組織学的変化の解析を行い、特に晩期急性拒絶反応との関係を検討した。また、(ii) ラットモデルでの慢性拒絶反応のエフェクター細胞の同定及び移植腎阻害進行の機序を検討した。更に、腎障害進行のエフェクター細胞の検索を行った。

B. 研究方法

(1) 長期移植腎生着阻害因子の解明

私共が経験した 1 次死体腎移植でシクロスポリンあるいはタクロリムスで免疫抑制を行った 314 例のデータベースから予後に影響を与えると思われる、ドナーの年齢、性、死因、阻血時間、組織適合度、レシピエントの年齢、性、移植時体重、移植前輸血歴、移植前高血圧症、急性尿細管壊死、早期、晩期急性拒絶反応、慢性拒絶反応等の因子について Cox 比例バサードモデルにより多変量解析を行った。

(2) 移植腎の長期生着の免疫学的要件の解明

(i) 拒絶反応の合併のない移植腎機能が正常な HLA 1 パブタイプ適合生体腎移植 93 例を対象として末梢血リンパ球の costimulatory signal 関連分子の発現状態をフローサイトメトリーにて検索した。また、CD4 陽性細胞の CD28 分子の発現状況を抗 CD4 抗体と抗 CD28 抗体を用いたツーカーフローサイトメトリーにて検索した。CD4 陽性細胞数に対する CD28 分子の発現のない CD4 陽性細胞数の割合を % で算出した。

対象患者の移植腎生着期間は 1 年から 25 年、平均 11 年であった。免疫抑制療法はアザチオプリン、シクロスポリン、あるいはタクロリムスとステロイドの 2 剤、あるいはそれにミゾリピンを加えた 3 剤でなされていた。

(ii) 上記検索を行った生体腎移植例のうち 5 年以上移植腎生着例 38 例を対象として、ドナーと third party に対するリンパ球混合培養(MLC)を行った。MLC は患者末梢血から Ficoll-Hypaque 法で分離した単核球を responder cell としてドナー及び third party の末梢血から同様に分離した単核球に 3000R の放射線照射を行い stimulator cell として、120 時間培養し、3H サイジジンの取り込みを計測し、stimulation index(S. I.)を算出した。

(iii) 上記検索を行った生体腎移植例のうち 5 年以上移植腎生着例で移植時に 16 歳以上の 61 例を対象としてその測定後 2 年間で慢性拒絶反応を発症した 8 例と移植腎機能が安定している 53 例で CD28 陰性 CD4 陽性 T 細胞の割合を比較した。

(3) 慢性拒絶反応の発症、進行機序の解明

(i) シクロスポリンあるいはタクロリムスで免疫抑制を行い 1982 年から 1997 年

までに私共が施行した死体腎移植のうち移植腎が 1 年以上生着した 182 例を対象として慢性拒絶反応合併例の臨床経過、特に、晩期急性拒絶反応の合併例との関係を中心に慢性拒絶反応発症に至るまでの経時的な組織学的変化をバンフ分類に従って検討した。

(ii) ラット腎移植モデル (F344 → Lewis) の慢性拒絶反応で組織免疫化学及び分子生物学的手法を用いエフェクター細胞の同定を行った。また、ラット尿管閉塞モデルでの腎障害進行の機序をエフェクター細胞の免疫組織学的な検索とマクロファージ抑制剤である γ ラクトンの投与から検討した。

C. 研究結果

(1) 長期移植腎生着阻害因子の解析

長期移植腎生着を阻害すると思われる前記 16 要因のうち、 $P < 0.05$ で、移植腎長期生着を障害した要因はドナー年齢 (55 歳以上) (図 1) ドナー死亡原因 (脳血管障害) (図 2)、レシピエント移植前高血圧症の既往歴有 (図 3)、急性尿細管壊死や晩期急性拒絶反応、慢性拒絶反応の合併有であった。それらの 5 年移植腎生着率と 95% 信頼区間、危険率を表 1 に示した。

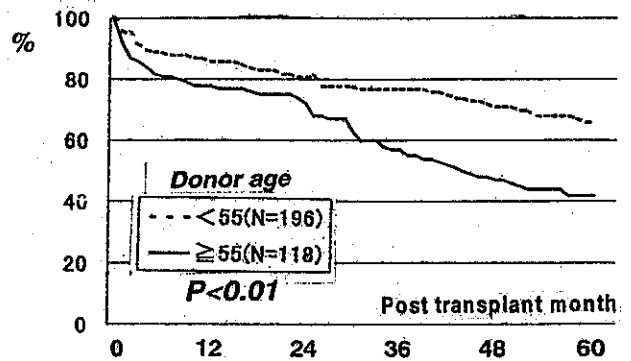


図 1

また、高齢者ドナーから提供された例の移植腎の移植腎正着の解析から、

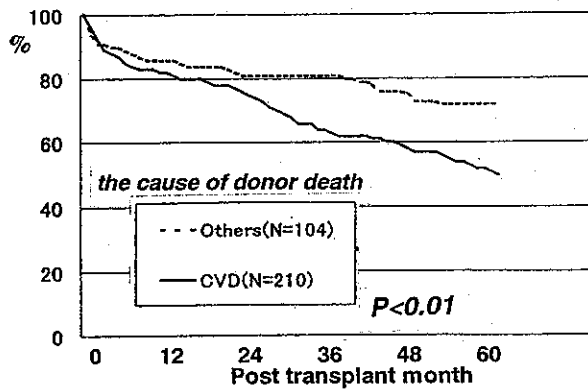


図 2

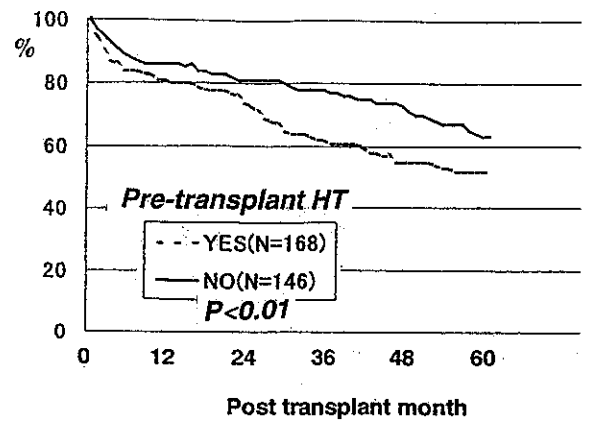


図 3

	Favorable(n)	Unfavorable(n)	P	R.R.	95% CI
ドナー年齢※	< 55 (196)	≥ 55 (118)	.000	1.482	1.262-1.740
ドナー性	Male (189)	Female (125)	.211	1.107	.944-1.299
ドナー死亡原因※	Others (104)	脳血管障害 (210)	.001	1.482	1.219-1.802
レシピエント年齢	< 35 (100)	≥ 35 (214)	.926	1.0008	.838-1.175
レシピエント性	Female (103)	Male (211)	.248	1.108	.931-1.319
透析期間(月)	< 60 (171)	> 60 (143)	.578	1.046	.892-1.227
移植前輸血	Yes (229)	No (85)	.844	1.019	.845-1.229
移植後高血圧症※	No (146)	Yes (168)	.001	1.308	1.110-1.541
移植回数※	1 (300)	> 1 (14)	.028	1.459	1.041-2.046
免疫抑制	FK (40)	CyA (274)	.347	1.147	.862-1.526
HLA AB mismatch	0.1 (110)	> 1 (204)	.994	1.001	.846-1.183
HLA DR mismatch	0 (185)	> 0 (129)	.052	.052	.998-1.371
温阻血時間(分)	< 30 (288)	≥ 30 (20)	.334	1.145	.870-1.507
死体内灌流時間(分)	< 60 (109)	≥ 60 (205)	.297	1.089	.927-1.280
総阻血時間(分)	< 400 (90)	≥ 400 (224)	.193	1.123	.943-1.339
早期急性拒絶反応	No (107)	Yes (83)	.289	1.338	.781-2.294
晚期急性拒絶反応	No (156)	Yes (34)	.000	3.973	2.285-6.908
慢性拒絶反応	No (155)	Yes (67)	.000	7.905	4.484-13.947

表 1

移植時体重 55Kg 未満のレシピエントに移植された腎では 5 年生着率 73% であるのに対し、55Kg 以上のレシピエントに移植した群では 36% と有意に劣ることを明らかにした($p < 0.05$) (図 4)。

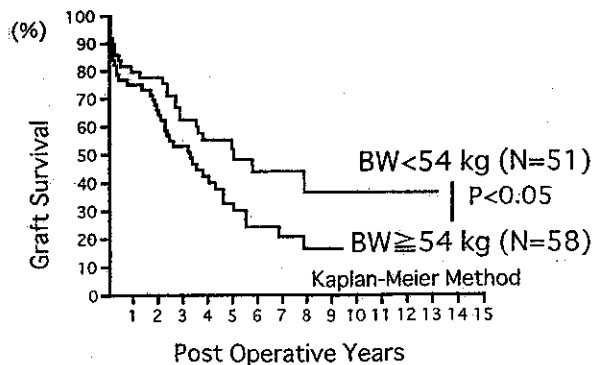


図 4

(2) 移植腎の長期生着への免疫学的要件の解明

リンパ球の costimulatory signal 関連分子である CD 2 と CD 11 分子の発現は腎移植患者では健康人や透析患者と変わらず、CD28 分子の発現のみ、それらに比較し低下していた (図 5)。

腎移植患者の末梢血リンパ球の CD28 陰性 CD4 陽性細胞の割合は 2% から 87%、平均 22% であり、CD28 陰性 CD4 陽性細胞の割合と移植腎生着期間との関係を図 1 に示したが、CD28 陰性 CD4 陽性細胞の割合は移植腎生着期間が延長するにしたがって有意に増加し ($r=2.17$ $p < 0.001$)、移植腎生着期間 5 年以上群は移

植後5年未満群、透析患者、健康人に比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図6)。

長期移植腎生着例でのco-stimulatory signal関連表面抗原

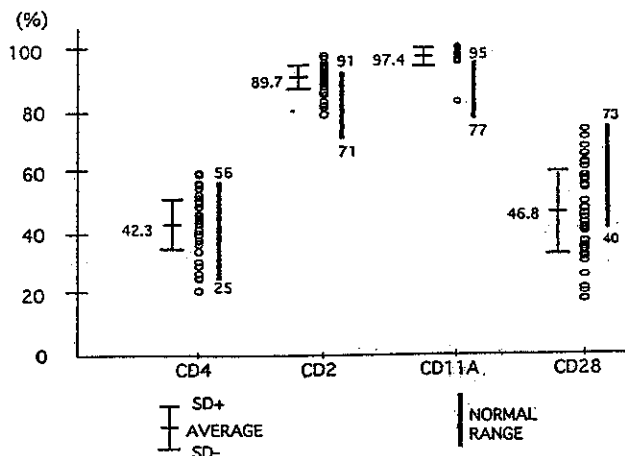


図5

移植腎生着患者でのCD4(+)/CD28(-)細胞表面抗原出現と移植腎生着期間

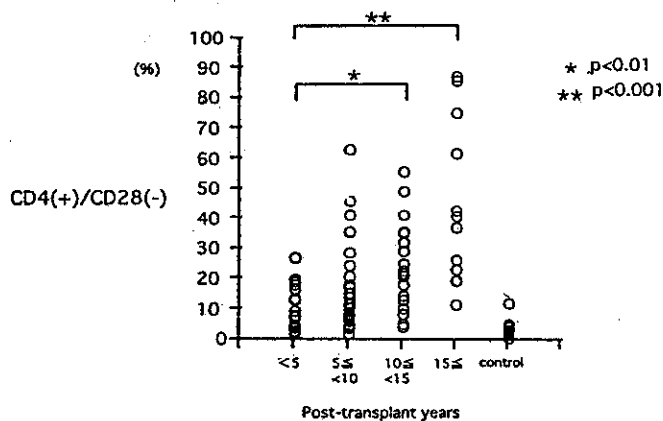


図6

ドナー、third party に対する MLC 反応については、ドナーに対する MLC 反応では術前の同検査に比較し、32 例のうち 25 例(78%)で低下がみられ、他の 7 例(22%)では増加がみられた。低下群の CD28 陰性 CD4 陽性細胞の割合は平均 27%、また、増加群では平均 23%で両群に有意差はみられなかった。third party

に対する MLC 反応では表 2 に示したように CD28 陰性 CD4 陽性細胞の増加すると MLC-SI 値が低下する傾向が認められた ($p < 0.02$)。

CD4(+)/CD28(-)cells	MLC-SI ≤ 5	MLC-SI > 5
≥ 23%	8	10
< 23%	2	18

表2

移植時の年齢が 16 歳以上で移植腎機能が安定し、5 年以上移植腎が生着している生体腎移植例 61 例のうち、CD 28 陰性 CD 4 陽性細胞の検索施行後 2 年間に慢性拒絶反応を合併した例が 8 例あり、その CD 28 陰性 CD 4 陽性 T 細胞の割合は 6%から 14%、平均 10%であった。慢性拒絶反応の合併をみていない他の 53 例では 4%から 87%、平均 30%で慢性拒絶反応合併例で低い傾向を認めた。 ($p=0.03$)。

(3)慢性拒絶反応の病因の解明

(i) 死体腎移植 182 例のうち 73 例が移植腎機能を喪失したが、うち 58 例(80%)は慢性拒絶反応によるものであった。58 例のうち 30 例(52%)は慢性拒絶反応による移植腎機能廃絶までに晩期急性拒絶反応を合併していた。うち 23 例 39 回のエピソード移植腎生検の組織学的変化をバンフ分類に基づき急性拒絶反応変化、慢性拒絶反応変化に分類すると図 7 となり、晩期急性拒絶反応を重ねるたびに慢性拒絶反応でみられる糸球体病変、血管病変、間質病変の進行が認められた。また、晩期拒絶反応合併からの推測移植腎生着率は晩期急性拒絶反応 1 回合併症群では移植腎生着率が 50%を下廻る期間が 3.8 年、2 回、3 回合併群では 1.5 年、1.6 年と晩期急性拒絶反応

の合併回数が増加するに従い予後が悪くなる傾向が認められた (図 7,8)。

晩期急性拒絶反応症例の組織学的慢性拒絶反応変化

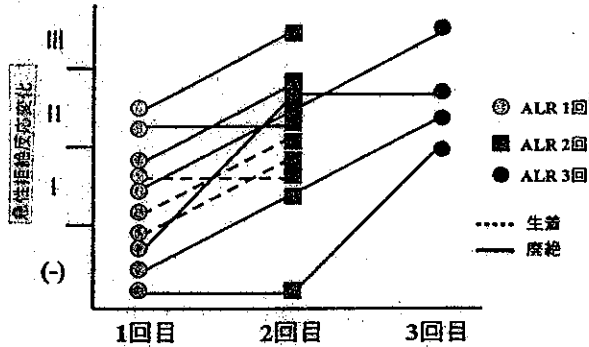


図 7

晩期急性拒絶反応合併回数と推定移植腎生着率

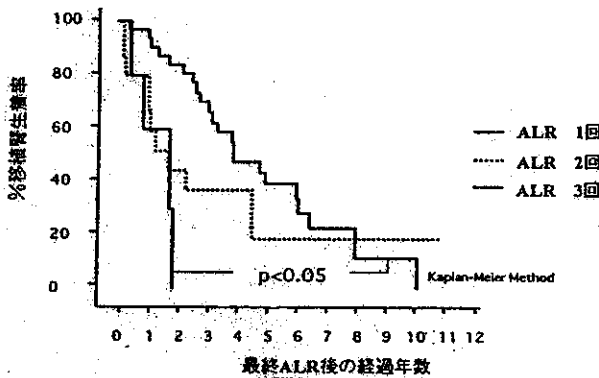


図 8

慢性拒絶反応モデルラットで移植腎に免疫組織化学的検討により ED1 マクロファージの出現が、また、PCR 法により移植腎組織に MCP1、NOS1、IFN- γ 、TGF β 、TGF α 等のサイトカインの発現がみられ、慢性拒絶反応のエフェクター細胞としてマクロファージが関与している可能性が示唆された。更に、このモデルラットにマクロファージの抑制剤である γ -ラクトンを投与すると上記の変化が観察されず、また、移植腎機能の低下、

タンパク尿や糸球体の硝子化、動脈壁の肥厚、間質の繊維化等の組織学的変化もみられなかった。尿管閉塞ラットモデルでは、ラット腎移植モデルの慢性拒絶反応のエフェクター細胞である ED1 マクロファージ以外に CD 11b/CD 18 陽性のマクロファージやナチュラルキラー細胞がエフェクター細胞として認められた。また、この尿管閉塞モデルラットによる γ -ラクトンを投与すると腎機能の障害が軽減された (図 9,10,11)。

蛋白尿 (mg/day)

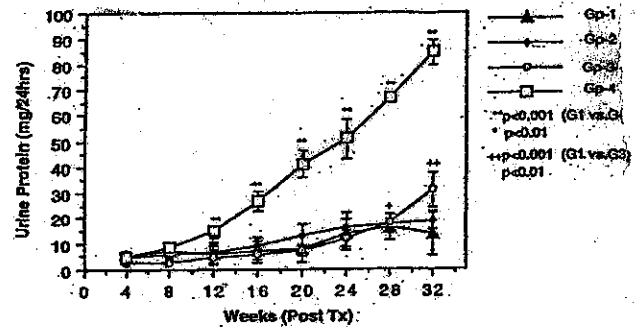
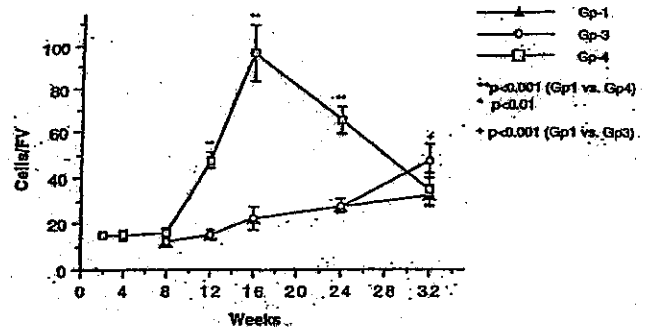


図 9

浸潤マクロファージ



ED1+ macrophage infiltration into the allografted kidneys (cells/field of view) was decreased in the kidneys of gamma-lactone-treated hosts.

図 10

サイトカインmRNAの発現

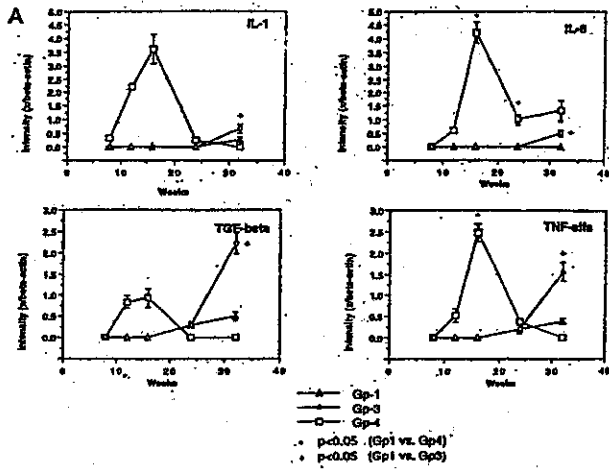


図 11

D. 考察

移植腎の長期生着の向上のために各種の臨床的、基礎的研究がなされている。臨床的には私共が行ったような過去に施行に施行した腎移植例のデータベースからの長期生着阻止因子の解析と新しい免疫抑制剤を使った慢性拒絶反応の発症を抑制する免疫抑制療法の開発及び免疫学的寛容を目的とした骨髄細胞の投与を併用する免疫操作の開発である。今回の研究では腎移植例 55 歳以上高齢者ドナー、脳血管障害による死亡ドナー、レシピエントの移植前高血圧症、急性尿管管壊死、晩期急性拒絶反応、慢性拒絶反応等の合併、レシピエントの移植時の体重、長期生着阻止因子として明らかになったが、これらの因子以外に移植後の高血圧症、シクロスポリンの慢性腎毒性、糖尿病、高脂血症の存在が報告されている。私共が新たに明らかにした因子はレシピエントの体重と晩期急性拒絶反応であった。レシピエントの体重については最近になり Brenner らの提唱した hyperfiltration theory から注目を浴びている。晩期急性拒絶反応については晩期

急性拒絶反応合併例の組織学的推移の検討で述べるが、今回の検討では高齢者ドナーからのネフロンが少ない high risk の腎臓を 55Kg 未満体重のレシピエントに移植した場合には体重 55Kg 以上のレシピエントに移植した場合と比較して移植腎生着が逆に有意に優り、high risk ではない腎臓を移植した場合と同じような移植腎の生着が得られる事を明らかにしており、このことは高齢者ドナーからの腎臓のみならず、強い阻血障害をうけた腎臓や脳血管障害で死亡したドナーからの腎臓等の high risk ドナーからの腎臓の利用法を示唆するものとして興味深い。私共は晩期急性拒絶反応が、移植腎機能を障害し、慢性拒絶反応の原因として最も重要なひとつと考えている。

動物モデルで co-stimulatory signal に関与するリンパ球表面に存在する CD2、CD11a、CD28 分子の障害により慢性拒絶反応が抑制され末梢性免疫寛容が誘導されることが知られている。私共はヒトの長期移植腎生着例の末梢血リンパ球の co-stimulatory signal に関与する CD2、CD11a、CD28 分子の発現状況を検索し、長期移植腎生着例、特に 10 年以上移植腎生着例でリンパ球表面の CD28 分子の発現が著しく減少していることを明らかにした。

また、長期移植腎患者の末梢血リンパ球の抗 CD4、抗 CD28 抗体によるツーカーフローサイトメトリーを用いてリンパ球のうち同種移植における免疫応答の中心的役割を果たすヘルパー T 細胞 (CD 4 陽性細胞) の CD 28 分子の発現が障害されていること、この障害が移植腎生着期間に相関し生着期間が長くなるに従って CD 4 陽性細胞の CD 28 分子の発現が低下することを明らかにした。更に、CD 28 陰性 CD 4 陽性細胞が多くみられた 5

年以上生着患者の末梢血リンパ球のアロ抗原に対する MLC 反応が低下していることを確認した。また、5 年以上移植腎が生着した生体腎移植例で CD 28 陰性 CD4 陽性 T 細胞の出現が多い症例で慢性拒絶反応が生じにくいことを確認した。以上よりヒトの移植腎の長期生着にリンパ球、特にヘルパー T 細胞の CD 28 分子の発現障害が関与している可能性が示唆され、ヒトの移植腎においても移植腎生着にマウスモデルで観察されている co-stimulatory pathway の障害による末梢性免疫寛容が関与している可能性が推察された。

慢性拒絶反応については現在のところ正確な病因は不明であり、ドナー抗原に対する何らかの免疫反応により生ずると考えられている。病理組織学的には間質の繊維化と糸球体の硝子化を伴う血管内膜の増生と中膜の肥厚がみられ、臨床的には高血圧とタンパク尿を伴う緩徐な腎機能の低下がみられ、最終的には移植腎機能の廃絶に至る。一方、晩期急性拒絶反応は腎移植後 3 ヶ月以降に発症する急性拒絶反応で臨床的には腎機能の低下、高血圧とタンパク尿がみられ、組織学的にはリンパ球の浸潤を伴う間質の浮腫と血管炎がみられる。その大部分は、ステロイドの大量投与に反応し、移植腎機能の低下は停止するが、完全に回復することは少ないことが知られている。

今回の検討では、(1) 晩期急性拒絶反応合併例の多くは慢性拒絶反応となり移植腎機能の廃絶に至ること (2) 晩期急性拒絶反応を繰り返すことにより糸球体硬化、間質の繊維化、血管内膜と中膜の増殖性変化が進行していくことが明らかになった。特に糸球体硬化、間質の繊維化、血管内膜と中膜の増殖性変化は慢性拒絶反応でみられる組織学的所見と一致

しており、慢性拒絶反応では時間的には緩徐で急性拒絶反応と異なるため、血管炎よりは増殖性変化が主体となっているものの急性拒絶反応と同じような免疫反応によって生じている可能性も考えられた。しかし、この問題については晩期急性拒絶反応により移植腎機能が阻害され、すなわちネフロンが減少し、残存ネフロンに負荷がかかり、糸球体の硝子化、間質の組織化が生じたとも考えられる。これらの晩期急性拒絶反応でみられる組織像は慢性拒絶反応でみられる変化と区別をつけることが困難であり、今後、晩期急性拒絶反応や慢性拒絶反応合併症例の移植腎組織に生じている変化を生検組織を用いてエフェクター細胞のみならず炎症でみられる各種調節因子の面から解明する必要があることが示唆された。

ラットの慢性拒絶反応モデルの移植腎の組織学的検討により ED1-マクファージが慢性拒絶反応の発生、進行に関与している可能性が示唆され、更に、腎臓の障害を引き起こす尿管閉塞ラットモデルの腎臓の組織学的検討からもマクローファージの関与が示唆された。また、尿管閉塞モデルでみられた CD 11b/CD 18 分子陽性反応は、その分子のリガンドとして ic 3b、フィブリノーゲン、赤血球抗原などを認識するもので、毛細血管や血管内皮上に液性因子も加えたりリガンドが存在する場合に細胞障害性に作用することも考えられる。そのためヒトの腎移植の慢性拒絶反応においても CD 11b/CD 18 陽性細胞—マクローファージやナチュラルキラー細胞がエフェクター細胞として作用している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Azuma, H., Nadeau, K., Ishibashi, M and Thilley, K.L. :

- Prevention of functional structural and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 60: 1577-1582,1995.
- 2) Ohshima,S.,Ono,Y. et al. : Immunosuppressive treatment of primary cadaveric renal transplant patients receiving kidneys from non-heart beating donors. *Artificial Organs* 2(10): 221-227,1996.
 - 3) Furukawa,T.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.: Multivariate analysis of factors affecting cadaver kidney allograft survival in the chronic stage. *TransplProc.* 28 (3):1565-1567,1996.
 - 4) Mizutani,K.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al. : Cadaveric kidneys from older donors and their effective use in transplantation: a risk factor for long-term graft survival. *TransplProc.* 29:113-115,1997.
 - 5) Ono,Y.,Ohshima,S., et al.: Depressed expression of CD28 antigen on lymphocyte in long term kidney transplant patients. *TransplProc.*, 30, 1164-1166, 1998.
 - 6) Mizutani,K.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.: Low MLR stimulation index and depressed CD28 antigen recipients. *TransplProc.*,30,2970-2973,1998.
 - 7) 大島伸一、小野佳成：「長期移植腎の生着向上に関する研究」厚生省「平成 9 年度免疫アレルギー事業」報告書、1998.
 - 8) Mizutani,K.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.: Usage of high-risk donors in non-heart-beating cadaveric kidney transplantation: is an older donor available? *Transpl. Proc.*,31,2843-2846,1999.
 - 9) Hattori,R., Ono,Y., Ohshima,S. et al.: Long-term outcome of kidney transplants from non-heart-beating donors: multivariate analysis of factors affecting graft survival. *TransplProc.*,31,2847-2850.
 - 10) Tajre,L.C., Martin,X., Ishibashi,M. et al.: In vivo effects of monoclonal antibodies rat beta(2) integrins on kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 87,32-38,1999.
 - 11) Ishibashi,M., Miyamoto,S., Nojima,M. et al. : Elimination of the adverse effects of tacrolimus-based induction therapy by a 5-day exposure of optimal steady-state blood concentration in renal transplant patients in the early postoperative period. *TransplProc.*31(7),2761-2762,1999.
 - 12) 大島伸一、小野佳成：「長期移植腎の生着向上に関する研究」厚生省「平成 10 年度免疫アレルギー事業」報告書、1999.
- 2.学会発表
- 1) 近藤哲志、小野佳成、水谷一夫、絹川常郎、上平 修、近藤隆夫、服部良平、古川 亨、大島伸一：移植腎の免疫寛容に関する研究。第 33 回 日本移植学会総会、1997.9.18.
 - 2) 水谷一夫、小野佳成、松浦 治、山田 伸、近藤哲志、近藤厚生、絹川常郎、竹内宣久、服部良平、藤田民夫、西山直樹、大島伸一：死体腎における poor risk donor の検討。第 47 回日本泌尿器科中部総会、1997.11.10.
 - 3) Kondo,T., Ono,Y. ,Mizutani,K., Kamihira,O. : Unresponsiveness of MLR long-term renal transplant. 5th Asian Society of Transplantation, 1997.12.5.
 - 4) Ono,Y.,Hattori,R.,Kamihira,O.,Mizutani,K.,Ohtsuka,K.,Ohshima,S: Depressed expression of CD28 antigen on lymphocyte in long-term kidney transplant patients. The International Congress on Immunosuppression in Oelando,1997.12.12.
 - 5) 水谷一夫、小野佳成、絹川常郎、服部良平、上平 修、古川 亨、近藤隆夫、大島伸一：生体腎移植長期生着例におけるリンパ球の表面マーカーの変化と免疫寛容の検討。第 34 回日本移植学会総会、1998.12.2.
 - 6) Kamihira,O.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.: Successful use of graft from marginal donors in non-heart beating renal transplantation. 6th Asian Society of Transplantation, 1999.9.5.21.
 - 7) Kato,M., Ono,Y., Ohshima,S. et al.: In-situ renal cooling for kidney transplantation from non heart-beating donors. 6th Asian Society of Transplantation, 1999.9.5.

- 8) Tanaka,K.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.:The effect of donors age on living related kidney transplantation. 6th Asian Society of Transplantation, 1999.9.5.20.
- 9) Hattori,R., Ohshima,S., Ono,Y. et al.:Long-term outcome of kidney transplant using non-heart beating donor: multivariate analysis of pre-transplant factors affecting the graft survival. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplantation Surgeons. 1999.5.21.
- 10) Mizutani,K.,Ono,Y.,Ohshima,S. et al.:Outcome of kidneys from older donors in non-heart-beating cadaveric transplantation and their effective use. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplantation Surgeons. 1999.5.20.
- 11) Ono,Y., Mizutani,K. Ohshima,S. et al.: Impaired costimulatory pathway (CD 28 antigen) of lymphocytes in long-term kidney transplant patients. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplantation Surgeons. 1999.5.21.
- 12) 近藤隆夫、小野佳成、水谷一夫、絹川常郎、松浦 治、大島伸一：1 年以上生着した献腎移植における移植腎機能廃絶症例の検討。第 32 回日本腎移植臨床研究会、1999.3.4.

研究課題 臓器搬送の立場から見た保存条件に関する研究

分担研究者	門田守人	大阪大学医学部第二外科教授
研究協力者	矢永勝彦	松山赤十字病院検査部長
	古川博之	北海道大学医学部第一外科助手

研究要旨 虚血・再灌流或いは保存・再灌流による臓器障害につき、in vivo 及び in vitro の系で検討を行った。1) 血管内皮細胞の虚血傷害は細胞内カルシウム濃度の上昇→細胞質プロテアーゼ・カルパインの活性化→細胞骨格の破壊というプロセスで進行すること、2) Adenosine の輸送阻害剤が肝虚血・再灌流傷害を抑制すること、3) IL-1 β ・TNF- α 合成阻害剤が肝低温保存・移植による傷害を抑制することが明らかとなった。

はじめに

死体臓器移植においては臓器摘出と移植手術が別個の施設で行われることから、虚血傷害とその後の再灌流傷害を抑制することが、生体臓器移植の場合よりも更に重要となる。米国における経験から、低温保存時間の延長はいわゆる primary nonfunction の発生率及び再移植率の増加につながる事が知られている。本年度の研究では、培養人血管内皮細胞を用いた in vitro の系で細胞内カルシウムとカルパインに着目して細胞傷害の機序の検討を進めるとともに、犬肝虚血・再灌流、ラット肝低温保存・移植の2つの系で臓器障害の抑制に関する研究を行った。

1. 血管内皮細胞の虚血傷害の機序の検討

A. 研究目的

昨年までの本研究において、肝細胞の oxidative stress による細胞傷害には細胞内カルシウム濃度の上昇に伴う細胞質プロテアーゼ・カルパインの活性化が重要であることを示してきた。本年度は、血管内皮細胞の虚血傷害の機序につき、細胞内カルシウムの空間的・時間的变化を中心に検討した。

B. 研究方法

HUVEC を収容するチャンバーを含む閉鎖回路を作成し、窒素で bubbling した液で灌流することにより虚血を導入した。細胞内カルシウム濃度は、Ca²⁺ 指示蛍光色素 fluo-3 を用いて共焦点レーザー顕微鏡で測定した。ミトコンドリア膜電位を Rhodamine 123 で、細胞の viability を PI 染色にて評価した。また、Rhodamine-Phalloidin で F-actin を、活性型カルパイン抗体でカルパインの活性化を検討した。

C. 研究結果

Bleb を形成する細胞においては、その形成部位に一致して、先行する細胞内カルシウム濃度の上昇を認めた。一方、bleb を形成しない部位においては、カルシウム濃度の上昇を認めなかった。細胞の viability の低下は、bleb 形成に遅れて始まった。また、bleb 形成部位に一致して F-actin の集積とカルパインの活性化を認めた。更に、カルパインの基質である ezrin の染色性の低下がみられた。

D. 考察

虚血内皮細胞傷害は、細胞内カルシウムの上昇→カルパインの活性化→細胞骨格

の破壊、の順で進行することが示された。

2. Adenosine 輸送阻害剤による肝虚血・再灌流傷害の抑制

A. 研究目的

昨年の本研究において、Adenosine 輸送阻害剤 Dipyridamole による犬肝虚血・再灌流傷害の抑制を報告した。本年は、その有効性の機構につき解析を行った。

B. 研究方法

ビーグル犬において、2時間の肝完全虚血・再灌流を行った。治療として、adenosine 輸送阻害剤である dipyridamole を虚血前に 0.25 mg/Kg (high 群)、0.1 mg/Kg (medium 群)、又は 0.05 mg/Kg (low 群) 投与した(何れも n=6)。再灌流後の血清 ALT、血小板数、肝組織 adenine nucleotides 量 (HPLC 法)、肝組織 cAMP 量 (RIA)、肝組織浸潤好中球数 (HE 染色)、肝静脈血中 thromboxane B₂ 濃度 (ELISA)、2週間後の生存率を治療群と対照群 (n=12) で比較した。

C. 研究結果

生存率は、対照群が 25%、high 群・low 群が 16%であったのに対し、medium 群では 100%であった。Medium 群で ALT の上昇、血小板数の低下は最も抑制され、肝静脈血中 thromboxane B₂ 濃度も最も低かった。肝組織 ATP 量、肝組織 cAMP 量は high 群で最も高かった。

D. 考察

Adenosine 輸送阻害剤 Dipyridamole による犬肝虚血・再灌流傷害の抑制が確認された。但し、その機序については cAMP 濃度の維持のみにては説明できず、異なる作用を持つ2種類の adenosine 受容体の親和性の差による可能性を考え、検討中である。

3. IL-1 β ・TNF- α 合成阻害剤を用いた肝低温保存・移植による傷害の抑制

A. 研究目的

一昨年の本研究において、TNF- α のアンチセンス導入により肝の低温保存・移植による傷害を抑制しうることを示した。本年度は、IL-1 β ・TNF- α 合成阻害剤の効果を検討した。

B. 研究方法

ラット肝を摘出後 UW 液中で 48 時間低温保存し、同系ラットに同所性移植した。投与群は、門脈再灌流直後に IL-1 β ・TNF- α 合成阻害剤 FR167653 を 1 mg/kg 投与し、対照群は生理食塩水のみを投与した。移植後の血清 AST、ALT を測定した。また、肝組織中の IL-1 β 、TNF- α mRNA を RT-PCR にて検討した。HE 染色により肝組織所見を検討し、また、tissue factor の発現を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

門脈再灌流 4、12 時間後の血清 AST、ALT は、投与群で低い傾向があった。再灌流 12 時間後の肝組織所見は、対照群では肝細胞の microvesicular steatosis と類洞の鬱血、類洞構造の破壊が著明であったが、投与群ではこれらの変化が軽微であった。投与群では IL-1 β 、TNF- α mRNA の発現の著明な低下を認めた。対照群では類洞内皮細胞及び Kupffer 細胞に tissue factor の強い発現を認めたが、投与群で類洞内皮に僅かな発現をみるのみであった。1週間後の生存率は、対照群の 12.5% (1/8) に対し、投与群は 75% (6/8) と有意に高率に生存した。

D. 考察

IL-1 β ・TNF- α 合成阻害剤 FR167653 は、48 時間低温保存肝移植後のラットの

生存率を有意に改善した。FR167653 は炎症性サイトカインの産生を抑制するだけでなく、再灌流後の tissue factor 発現を間接的に抑制し、肝内の microcirculation を改善することが示唆された。

E. 結論

虚血・再灌流、或いは低温保存・再灌流による傷害の最終的な細胞内機構として、細胞内カルシウム濃度上昇→カルパイン活性化が重要な役割を演ずることを示した。また、傷害の進行経過の色々な段階をブロックすることにより傷害の抑制が可能であることを示した。保存条件の改善が特に重要な位置を占める本邦の脳死臓器移植においては、今後、傷害の最終機構におけるブロック、多段階のブロックの両方の視点で研究を進め、至適保存条件を決定して行かなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda M, Ariyoshi H, Sakon M, et al: A role for local calcium gradients upon hypoxic injury in human umbilical vein endothelial cell. (Cell Calcium 24 (1): 498-57, 1998)
- 2) Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, et al: Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. (J Am Coll Surg 188 (1): 43-52, 1998)
- 3) Soejima Y, Yanaga K, Nishizaki T, et al: Effect of specific neutrophil elastase inhibitor on ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. (J Surg Res 86: 150-154, 1999)
- 4) 梅下浩司、門田守人：肝保存の実際とその理論的背景. (外科 61 (10): 1071-1075, 1999)

2. 学会発表

- 1) Aono Y, Ariyoshi H, Sakon M, et al: Localized $[Ca^{2+}]_i$ gradients and cytoskeletal reorganization in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) upon hypoxic injury. (XVII International Society on Thrombosis and Haemostasis 1999.8)
- 2) Sakon M, Wang M, Umeshita K, et al: The inhibitory effect of steroid on cytokine production and μ -calpain activation in hepatic ischemia-reperfusion injury. (DDW 1999.5)
- 4) Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, et al: Prostaglandin E_1 analogue (G501) inhibits oxidative stress induced hepatocyte injury by suppressing the activation of calpain- μ and protein kinase $C\alpha$. (DDW 1999.5)
- 5) Magata S, Taniguchi M, Suzuki T, et al: Adenosine A_1 receptor antagonist attenuates ischemia-reperfusion injury of the liver. (18th American Society of Transplantation)
- 6) 梅下浩司、左近賢人、岸本慎一ら： Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素 calpain- μ に着目した肝虚血再灌流傷害の機構解析と傷害抑制の試み. (第99回日本外科学会総会 1999.3)
- 7) 岸本慎一、梅下浩司、左近賢人ら：ステロイドによる肝虚血再灌流傷害の抑制— Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の活性化からみた検討. (第99回日本外科学会総会 1999.3)
- 8) 青野泰久、有吉秀男、左近賢人ら：虚血細胞障害と細胞内遊離カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) 動態の関連. (第27回日本血管外科学会 1999.5)