

論文の内容の要旨

論文題目 若年ウサギを用いた血流下大動脈ホモグラフト石灰化モデルの確立と
炭酸ランタンによる治療効果の検討

氏名 岡村 賢一

【背景】ホモグラフトとは、亡くなられた人体（ヒト）から提供された「組織」を、同種（ホモ）であるヒトに移植するグラフト（組織片）のことで同種心臓弁・血管組織とも言われる。心臓大血管領域においては、大動脈弁ホモグラフト・下行大動脈ホモグラフト・腹部大動脈ホモグラフト・肺動脈弁ホモグラフトなどが用いられ、その特徴として人工弁や人工血管と比べて血栓ができにくく、感染に強いなどの特徴がある。これらの特徴から、大動脈弁ホモグラフトは主に感染性大動脈疾患に用いられ、肺動脈弁ホモグラフトは主に先天性心疾患で用いられている。一方で、大動脈弁ホモグラフトは石灰化に伴うグラフト変性により耐久性に限界があることが知られ、特に若年者で多いことが知られている。これまで長年に渡り石灰化抑制の治療方法が考案され、これまでの大動脈ホモグラフトの移植後石灰化のメカニズムは免疫応答が主体とされてきた。一方で、成人に比べ若年者で石灰化が強く発現するメカニズムは未解明のままであったが、当科の先行研究で若年ラットの大動脈ホモグラフト皮下移植モデルにおいて、若年者の生理的な高リン血症が、若年者での石灰化発現のメカニズムであることを証明した。さらに同様のモデルを用いて、腎不全患者に対する高リン血症の薬剤であるリン吸着薬のうち、炭酸カルシウムと炭酸ランタンを投与し、比較検討したところ炭酸ランタンは高カルシウム血症を生じることなくホモグラフト石灰化抑制効果があることが示された。しかしながら、移植手術時及び摘出時に血流を測定した血流下大動脈ホモグラフト移植モデルは確立されておらず、また血流下モデルにおいて炭酸ランタン投与によるホモグラフト石灰化抑制を検討した報告はない。今回、我々は若年ウサギを用いて血流下大動脈ホモグラフト石灰化モデルを確立するとともに、炭酸ランタンによる治療効果と有害事象の検討を行うことを本研究の目的とした。

【方法】全てのウサギは離乳直後の生後6週で搬入し、1週間の慣らし期間を置いたのちに生後7週で手術を行った。ドナーを New Zealand White rabbit (NZW)、レシピエントを Japanese White rabbit (JW) として、NZW の下行大動脈・腹部大動脈を摘出して、フレッシュグラフトで JW の頸動脈にブリッジ状に吻合し移植を行った。モデル確立の実験では、観察期間を2週・4週・8週・12週としてグラフトを摘出した。大動脈ホモグラフト中の石灰化定量

値は原子吸光度法により測定した。定性的には von Kossa 染色で石灰化を評価した。摘出した大腿骨の長さ・骨密度・骨強度を測定し骨軟化の評価を行った。血液学的検査では、ヘマトクリット・血漿カルシウム濃度・血漿無機リン濃度・血漿乳酸脱水素酵素 (LDH) 濃度・血漿アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度を測定した。内膜肥厚の指標として、内膜・中膜比を最大肥厚部分で測定した。統計検定は GraphPad Prism7 を用いて、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。

【結果】実験 1 では、大動脈ホモグラフト移植後石灰化の適切な観察期間を決定するために、移植手術から 2 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後に大動脈ホモグラフトを摘出する方針とした。手術時点でのレシピエント体重、手術時間、頸動脈遮断時間、ケタミン投与量、キシラジン投与量、生理食塩水の点滴量、大動脈ホモグラフトの流速及び PI、腹部大動脈数(%)に有意差を認めなかった。大動脈ホモグラフト摘出時の各群におけるホモグラフト全体の開存率は、2 週群：87.5%、4 週群：62.5%、8 週群：62.5%、12 週群：62.5%と各群で有意差を認めなかった($P=0.68$)。しかし、各群における腹部大動脈ホモグラフトと下行大動脈ホモグラフトの開存率は、2 週群でそれぞれ 75%・100%、4 週群で 50%・75%、8 週群で 50%・66.7%、12 週群で 0%・100%であり、全ての術後観察期間において下行大動脈ホモグラフトが腹部大動脈ホモグラフトに比べ良好な開存率を示した。次に、開存例について大動脈ホモグラフト摘出時の各パラメータを見ると。体重増加は成長に伴い相関係数 $r=0.94$ で有意な正の相関を認めた($P<0.001$)。摘出時の大動脈ホモグラフト流速・PI・腹部大動脈数は、各群で有意差を認めなかった。病理組織学的には、von Kossa 染色において 2~8 週群では強い石灰化を認めたが、12 週群ではごく軽度の石灰化を認める程度であった。EVG 染色では、2 週群と 8 週群で内膜の軽度肥厚を認め、4 週群では著大な内膜肥厚を認めた。内膜・中膜比測定すると、2 週群で 0.63 ± 0.12 、4 週群で 1.77 ± 0.34 、8 週群で 1.66 ± 0.35 、12 週群で 0.38 ± 0.18 であり、全体の平均値に有意差を認めた($P=0.0034$)。大動脈ホモグラフト中のカルシウム定量値 (mg/dry・g)は、2 週群： 6.26 ± 2.44 、4 週群： 11.18 ± 8.06 、8 週群： 43.23 ± 15.67 、12 週群： 7.18 ± 4.38 であり、術後 2~8 週にかけては上昇傾向を認めたが、12 週で減少に転じた。血液学的検査では、血漿中のカルシウム濃度 (mg/dL)は、2 週群： 14.2 ± 0.3 、4 週群： 14.1 ± 0.2 、8 週群： 13.2 ± 0.4 、12 週群： 13.8 ± 0.2 であり、各群間で有意差を認めていないことから ($P=0.23$)、血漿カルシウム濃度は成長に伴い変動は認められなかった。一方、血漿無機リン濃度 (mg/dL)は、2 週群： 7.99 ± 1.0 、4 週群： 7.76 ± 0.7 、8 週群： 6.96 ± 0.6 、12 週群： 5.84 ± 0.5 であり、ピアソンの相関係数において $r=-0.407$ の有意な負の相関を認めた ($P=0.019$)。すなわち、これにより若年者ほど血漿無機リン濃度が高値であることが本研究においても証明された。

実験2では、実験1で得られた結果から、グラフトは下行大動脈・術後観察期間を8週間で統一し、炭酸ランタン含有飼料の投与期間により以下のようにグループ分けを行った。搬入時～術後8週間の全期間において通常飼料（Normal diet）を投与した群をN8群、5%炭酸ランタン（Lanthanum carbonate）含有飼料を搬入時～術後1週間＋通常飼料を7週間投与した群をL1N7群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時～術後2週間＋通常飼料を6週間投与した群をL2N6群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時～術後4週間＋通常飼料を4週間投与した群をL4N4群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時～術後8週間投与した群をL8群とした。大動脈ホモグラフトの石灰化定量値（mg/dry・g）は、N8群： 20.62 ± 8.50 、L1N7群： 9.85 ± 7.10 、L2N6群： 9.00 ± 7.41 、L4N4群： 1.54 ± 0.48 、L8群： 0.80 ± 0.10 であり、多重比較検定を行うとN8群に対してL8群で $P=0.0034$ と有意に低下していた。その他のL1N7群で $P=0.17$ 、L2N6群で $P=0.15$ 、L4N4群で $P=0.089$ といずれの群においても石灰化定量値がN8群に比べ減少する傾向を認めた。病理組織学的にも、N8群では強い石灰化を認めたが、L1N7群・L2N6群・L4N4群・L8群では明らかな石灰化の所見を認めなかった。内膜中膜比は、N8群： 1.65 ± 0.45 、L1N7群： 0.42 ± 0.26 、L2N6群： 0.26 ± 0.10 、L4N4群： 0.36 ± 0.14 、L8群： 0.38 ± 0.06 であり、nが少なく有意差は得られなかったが、炭酸ランタンの短期投与においても著大な内膜肥厚の抑制効果があることが示唆された。血液学的検査では、血漿カルシウム濃度（mg/dL）は、N8群： 13.7 ± 0.3 、L1N7群： 13.4 ± 0.2 、L2N6群： 14.1 ± 0.3 、L4N4群： 14.1 ± 0.1 、L8群： 14.5 ± 0.4 であり各群間の平均値で有意差を認めなかった（ $P=0.067$ ）。無機リン濃度（mg/dL）は、N8群： 6.1 ± 0.5 、L1N7群： 6.5 ± 0.4 、L2N6群： 6.1 ± 0.4 、L4N4群： 5.8 ± 0.4 、L8群： 3.1 ± 0.2 であり、N8群に対してL8群で有意に低値であった（ $P=0.0030$ ）。その他の群は、N8群に対して有意差を認めなかった。LDH濃度（IU/L）は、それぞれN8群： 151 ± 14 、L1N7群： 192 ± 14 、L2N6群： 223 ± 32 、L4N4群： 172 ± 14 、L8群： 205 ± 61 であり、群間の平均値に有意差を認めなかった。ALP濃度（IU/L）は、 326 ± 13 、L1N7群： 344 ± 18 、L2N6群： 353 ± 32 、L4N4群： 282 ± 24 、L8群： 281 ± 40 と、L4N4群及びL8群で低下傾向ではあったが統計学的な有意差を認めなかった。ヘマトクリット値は、N8群： 34.0 ± 0.5 、L1N7群： 32.6 ± 0.6 、L2N6群： 34.2 ± 0.2 、L4N4群： 31.2 ± 0.7 、L8群： 20.7 ± 6.2 であり、L8群がN8群に対して有意に低値であった（ $P=0.039$ ）。長期炭酸ランタン投与による有害事象として、体重増加不良・大腿骨の成長不良・骨密度低下・骨強度低下・貧血を認めた。大動脈ホモグラフト石灰化定量値の外れ値に注目すると、炭酸ランタン投与にもかかわらず強く石灰化する症例を認めた。多変量解析の結果、炭酸ランタン飼料摂取量と摘出時グラフト流速の2つが大動脈ホモグラフト移植後石灰化に関わる独立した因子であった。

【結語】本研究では、若年レシピエントにおける大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対して、短期間（本研究では2週間以内）の炭酸ランタン投与は、成長障害や骨軟化症などの合併症を最小限に抑えつつ、大動脈ホモグラフトの石灰化を抑制するとともに、内膜肥厚も抑制し開存率の向上にも寄与することが証明された。一方で、炭酸ランタンの長期投与（本研究では4週以上）による慢性的な低リン血症は、体重増加不良・骨軟化・貧血などの有害事象を引き起こすことが判明した。また、得られたデータを多変量解析することで、炭酸ランタンの投与量に加えて、大動脈ホモグラフト摘出時のグラフト内血液の流速も石灰化に影響する独立した因子であることが示唆された。