

博士論文

植物性フラボノイド（ケンフェロールおよびケルセチン）による
過冷却・低温障害防止効果を用いた超長時間心臓保存の確立

尾崎 晋一

要旨

心移植時のドナー心の保存環境・保存時間は、心移植後の心機能に大きく影響する。低温環境下で心臓を保存し心筋の代謝を低下させることは、心筋保護に大きな役割を果たしており、過冷却物質であるケンフェロール(KF7G)の過冷却効果を用いた低温下でのラット心保存が報告されているが、本研究では低温環境下で引き起こされる低温障害を緩和するために、KF7Gに加えて低温障害防止効果を持つケルセチン(Qu)を保存液に添加し、ラット同種異所性心移植モデルを用いて心保存効果を検討した。ラットのドナー心を-5℃下で、①University of Wisconsin (UW)液、②UW 液+KF7G(100μg/ml)、③UW 液+KF7G(100μg/ml)+Qu(1μg/ml)の3種類の保存液内でそれぞれ24・30時間保存し移植後に評価した。肉眼的、組織学的評価では24時間保存群でQu使用群がその他の群と比較し有意に良好なviabilityを示し、-5℃という低温下でKF7Gによる過冷却効果とQuによる低温障害防止効果が示された。

序文

今日の心臓外科手術は、人工心肺の進歩とともに、いかにして安全に心停止を得て、心停止の間に心筋を保護しながら手術を行うかという点に重きを置いて発展してきた。1960年代に Cooley らは単純に大動脈を遮断することで冠血流を一時的に途絶させ心停止を得て大動脈弁置換術を施行した。彼らはこうした経験の中で、遮断を解除し再灌流を行っても心臓が拘縮して拍動しない症例、いわゆる”Stone heart”について検討をしたところ、冠血流を再開しても拘縮する原因を術中の冠血流途絶による虚血であると報告した[1]。また心臓を安全に止めることについて 1955年に Dennis らは高濃度カリウム (257mEq/L) を用いた心停止液を開発し、1957年 Donald らにより初めて心臓手術に臨床応用された。それ以降改良・修正が加えられており、高濃度カリウムは非常に有効な心停止薬剤として多くの心筋保護液に使用されている。このような効果的な心筋保護の研究が進み、Gerald らは有効な心筋保護に必要な基本原則を提唱した[2]。1、心停止をして心収縮を止める。2、低温にする。3、エネルギー生成に必要な基質を供給する。4、pH を適正に保つ。5、心筋細胞の浮腫を予防する。6、細胞膜やミトコンドリアを傷害するフリーラジカルの除去である。

これらのなかでも虚血による心筋障害を軽減する方法とし、心筋酸素消費量を減らすという考えから、心臓を停止させて収縮によるエネルギー損失を減らす

ということと、心臓を冷却して代謝に消費されるエネルギー損失を減らすということが重要である。特に心臓の酸素需要量は電氣的機械的心停止により拍動心の 10% まで減少することから[3,4]、心拍動を再開させず、心停止を維持しておくことは重要である。その心停止下で心筋保護液として用いられているものに University of Wisconsin(UW)液や Celsior 液などが挙げられる。保存液の開発当初は、冷却保存する際に細胞膜の Na-K ポンプが破壊されるため、高カリウム濃度・低ナトリウム濃度の細胞内液と同様の組成のものが有利であるとの考えられており、Belzer らにより開発された UW 液が使用されるようになっていった。近年では心移植の領域では Celsior 液などの高ナトリウム濃度・低カリウム濃度の細胞外液タイプの臓器保存液でも非常に良好な成績を得ている (Table 1)。しかしこれらの保存液の改良が進んでも、搬送時の臓器虚血時間に関しては、肺の 8 時間、肝臓の 1 2 時間と比較すると、現在の心臓の虚血許容時間は 4 - 6 時間と非常に短い[5,6]。Russo や Lima らはこの虚血時間の長さが、心移植の成績に関与しているとも報告している[7,8]。またこれらの保存液をベースとして様々な添加物質を投与する試みが行われている。臓器保存中の虚血障害や再灌流障害の抑制による保存効果を期待し、Sukehiro らによる犬を用いたカルシウムチャンネル遮断薬[9]や Jung らによるラットを用いた抗酸化物質メラトニン[10]、Luo らによるラットを用いた VEGF(vascular endothelial

growth factor)[11]などの増殖因子が保存液への添加される試みもなされてきているが、これらは動物実験の段階であり臨床では未だ行われていない。また臓器保護においては、最適な臓器保存温度も重要な問題である。現在臨床においては人工心肺を用いた心臓手術は、低体温下で行われることが一般となっている。また心臓移植において、保存液に浸漬したドナー心を氷冷下に輸送することが現在一般的な臓器保存方法として定着している。低温環境下では細胞・組織の代謝は抑制され、細胞内エネルギーの損失が減少することで臓器保存につながると考えられている[12]。つまり理論上は低温であればあるほど、その細胞内エネルギーの損失は抑制される。しかし、実際には過剰な低温環境による臓器凍結が生じた場合には、構成細胞は縮小しその **viability** は著しく損なわれる。そこで凍結することなく、可及的低温状態にすることによって細胞の代謝を抑えることのできる、過冷却下の臓器保存が注目されることになった。過冷却下の臓器保存には過冷却を促進する物質“過冷却物質”の存在が不可欠であり、これまで **ethylene glycol** [13]や **antifreeze protein**[14-16]などの物質が臓器保存液に添加され、その効果が検討されてきた。

今回実験に用いたケンフェロール (**Kaempferol 7-O-β-D-Glucopyranoside** : **KF7G**、分子式： $C_{21}H_{20}O_{11}$ 、分子量 448.38) (**Figure2A**)は植物性フラボノイドの一種で、**Fujikawa** らがシベリア地方に自生する樹木の氷点下温度への適応機

序に関する研究の過程でその抗氷核形成活性を報告した[17-20]。Kaempferol の 7 位にグルコースが結合した化学構造をしており、このグルコースの結合と過冷却促進効果との関係が推測されているが、その機序は明らかとなっていない。KF7G は抗酸化作用をもち、健康食品や食品添加物としてすでに認可された物質であり、心筋保護作用 や虚血再灌流障害抑制作用 についての報告も見られる。

Shimada らは、この KF7G の持つ過冷却効果の有効性を、ラット腹部異所性同種心移植モデルを用いて報告している [21]。彼らは UW(University of Wisconsin)液に KF7G を添加して、UW 液使用群と、UW 液+KF7G 群とに分け、保存温度を+4°C、-2°C、-5°Cに、保存時間を 18 時間、24 時間、30 時間に設定し、KF7G の有効性を検討した。臨床現場では、臓器保存液は細胞内液タイプの UW 液以外にも細胞外液タイプの Celsior 液が使用されているが、彼らは予備実験において同一条件下で比較したところ UW 液が優れていたため保存液として UW 液を使用したとしている。まず収縮を評価するために、収縮の程度を 0(no contraction), 1(poor or sporadic contractions), 2(poor to moderate contractions), 3(moderate to good contractions), and 4 (excellent contractions)の 5 段階でスコアリングしたところ、収縮は 18・24・30 時間のすべての保存時間で、+4°C保存群と比較し-2°C保存群が有意に良好であった。し

かし-2℃より更に低い温度である-5℃保存群では+4℃保存群よりも収縮が悪いという結果となった(Figure1)。この報告から、-2℃群では過冷却効果により凍結せずに有効に心臓が保存できたが、-5℃群では低温障害の影響が、有効な過冷却効果を上回ってしまったことが再灌流後の収縮が不良であった原因と考えられた。また-5℃保存群では 24 時間保存群と比較し 30 時間保存群は収縮が著しく悪いため、UW+KF7G の有効な保存時間は 24 時間から 30 時間の間にあると考えられた。

そこで私は、-5℃で保存する際に過冷却効果の有効性を上回ってしまう低温障害を、何らかの物質を添加することで防止できないかと考えた。Fujikawa らは植物フラボノイドの一種であるケルセチンが低温障害防止効果をもつことを報告した。このケルセチン (分子式： $C_{15}H_{10}O_7$ 、分子量：302.24) (Figure2B)は配糖体もしくは遊離した形でミカンなどの柑橘類やタマネギなどの多くの植物に含まれている。黄色をしており古くから染料としても用いられてきた。近年はヒスタミン生成や遊離などに関与する経路を抑制する抗炎症作用・抗酸化作用を示すことが明らかになっており[22-24]、細胞増殖に関与する酵素の阻害作用を持つため抗がん剤としても研究が進んでいる[25-27]。

本研究では植物性フラボノイドであるケンフェロールとケルセチンを心筋保護液に添加し、ケンフェロールのもつ過冷却効果そしてケルセチンのもつ低温障

害防止効果の二重効果を期待し、ラット同種異所性心移植モデルを用いて検討した。

方法

研究全体を、細胞を対象とした *in vitro* である実験 1 と、ラットを用いた *in vivo* である実験 2、そして保存心筋 *viability* 定量評価のための実験 3 に分け、以下にその方法を順に述べる。

実験 1 方法

1、+4、-5℃下でのケンフェロール、ケルセチンの細胞保護効果

序文で述べたように、現在の心移植のドナー心搬送時の保存温度は 4℃である。通常哺乳類の細胞は 4℃という低温状態では低温障害を受けるが、その耐性は種類によって大きく異なる。ヒト大動脈由来血管内皮細胞やマウス胎児線維芽細胞は低温状況下に比較的強く死滅するまでに 5-7 日程度を要するといわれ、またヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞やラット肝細胞などでは 3 日前後とされている。今回低温環境下での実験において、ケンフェロール・ケルセチンの保護

作用や保存条件を短時間でスクリーニングするために、低温障害に感受性の強い Human promyelocytic leukemia cells (HL-60) を用いることとした。予備実験では添加物質を用いずに 4°C で保存したところ HL-60 は約 24 時間で死滅した。この HL-60 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC)) を用いて、UW 液 (アステラス製薬) に添加するケンフェロールおよびケルセチン (Cayman chemical Japan) の濃度を 0.01、0.1、1.0、10、100 μ g/ml に設定し +4°C および -5°C での生存細胞数を測定し、細胞保護効果を検討した。生存細胞数の測定は、前もって作成した細胞数と吸光度との標準線 ($R^2=0.9995$) (R^2 は相関係数) を作成し、生存細胞数 = $56375 \times$ 吸光度 から算定した。Molecular Devices 社のプレートリーダー SPECTRA MAX250 で 450nm の波長で吸光度測定を行った。

2、ケンフェロール、ケルセチンの細胞毒性

ケンフェロールおよびケルセチンの細胞毒性を評価した。ただし UW 液は細胞内型のイオン組成で構成されており、通常の培養条件 (37°C) では殆ど細胞は死滅し試験化合物に由来する細胞毒性は評価できないことから、10% FCS-RPMI 液中での 37°C、24 時間培養後の細胞に対する効果を評価した。FCS (Fetal Calf Serum) は Thermo Scientific 社より、RPMI-1640 培地は SIGMA 社より購入し、RPMI-1640 培地に FCS を 10% 加えて調製した。KF7G も Q も添加していないコントロールの生存細胞数に対する HL-60 細胞の細胞生存率を求めた。

実験 1 結果

1-1、+4°Cにおける細胞保護効果 (Figure3A)

ケンフェロール単独では UW 液中、試験した濃度範囲(0.01~100 μ g/ml)において殆ど低温障害に対する保護作用は見られなかったが、ケルセチン単独では UW 液中において低温障害に対し用量に依存した細胞保護効果が見られた。またケルセチン(100 μ g/ml)とケンフェロールとの併用により、高い細胞保護効果が見られた。

1-2、-5°Cにおける細胞保護効果 (Figure3B)

ケルセチン(100 μ g/ml)とケンフェロールとの併用において、4°C低温保存時のような相乗効果は見られなかったが、ケルセチンは UW 液中において低温障害に対する用量に依存した細胞保護効果が見られた。

2、ケンフェロール、ケルセチンの細胞障害性 (Figure3C)

ケンフェロールでは 0.01~100 μ g/ml の濃度において殆ど細胞毒性は見られなかった。またケルセチンでは 1~100 μ g/ml の濃度範囲で用量に依存した細胞毒性が見られた。

実験 1 小括

-5℃下でケンフェロールとケルセチンの併用により、凍結させることなく、さらに、低温環境に伴う細胞障害が防止できる可能性が示唆された。この結果を踏まえ実験 2 として、過冷却効果を有するケンフェロールと、低温障害防止効果をもつケルセチンを UW 液に添加し、ラット同種異所性心移植モデル(Figure 4)を用いて *in vitro* での効果を検討した。

実験 2 方法

1. ラット腹部大動脈-下大静脈異所性心移植モデル

(1) ドナー心摘出 (心筋保護・心保存) (Figure 5A)

本研究で動物実験を行うに当たり、東京大学大学院医学研究科動物実験委員会に計画書を提出し承認を得た (承認番号: 医-P-11-094)。また実験を行う際は規約に則り、実験動物を愛護的に扱った。

ラットは、ドナーに 8 週齢のオス、レシピエントに 9 週齢のオスを用いた (オリエンタル酵母)。搬入から手術までに 1 週間の間隔をおき、飼料は **Certified diet**(オリエンタル酵母)を与えた。これらのラットを用いて、今回の実験にはドナー心の上行大動脈と、レシピエントの腹部大動脈とを吻合し、ドナー心の肺

動脈とレシピエントの腹部下大静脈とを吻合するラット同種異所性心移植モデルを用いた。

ペントバルビタール（共立製薬）（投与量 45mg/kg）の腹腔内投与により全身麻酔を行った後、仰臥位にして腹部正中切開を施行した。下大静脈より全採血を行った後、横隔膜を切開して胸腔を開放し胸骨を正中切開した。胸腺摘除後、大動脈周囲を剥離し腕頭動脈分岐直後で切断し、切断孔から心筋保護液を緩徐に注入し順行性に冠動脈へ心筋保護液を投与して心停止を得た。急激な心筋保護液の注入により大動脈逆流を起こして左室が伸展したり、右室が伸展しないように注意した。肺動脈を左右肺動脈分岐直前で切断し、下大静脈および上大静脈・肺静脈を 4-0 絹糸で結紮し十分に心内の血液を除去した後に保存液に浸漬しプログラムフリーザー（SC-DF25 ディープフリーザー、TWINBIRD 社）で-5°Cに保存した。摘出は短時間であり冠動脈内も保存液で洗浄するため術中に全身のヘパリン化は行わなかった。保存時間については 24 時間および 30 時間とした。保存液は以下の 3 種類とした。University of Wisconsin（UW）液単独（group U）、UW+ケンフェロール(100µg/ml,KF7G)（group K）、UW+KF7G(100µg/ml)+ケルセチン(1µg/ml)（group Q）で、心臓 1 つにつき保存液 15ml に浸漬した（Figure5B）。ケンフェロール、ケルセチンは少量の DMSO(SGMA-ALDRICH 社)で溶解した。DMSO の保存液中の最終濃度が

0.01%となるようにした。ラットは 24 時間保存、30 時間保存でそれぞれ各群で n=6(合計 36 匹)とした。

(2) レシピエントラットに対する心臓移植(Figure 8)

麻酔は心摘出時と同様に行った。ラットを仰臥位とし、腹部を正中で切開した。腹部の大動脈および下大静脈を剥離し、その後腎動脈直下の動静脈を一括で C 型の遮断鉗子を用いて遮断し、まず大動脈前面を切開し吻合孔を作成した。手術用顕微鏡観察下で、9-0 黒ナイロン糸 (ベアーメディック社) を用いて、ドナー心の大動脈と連続吻合後、下大静脈に吻合孔を作成し同じく 9-0 黒ナイロン糸でドナー心の肺動脈と連続吻合した。その後速やかに遮断を解除し、遮断解除後、5 分間心収縮の程度を観察した後、一旦腹壁を縫合閉鎖し麻酔から覚醒させた。その後 2 時間後に再度麻酔を行って再開腹し心収縮を観察後移植した心臓を摘出し、短軸に 4 分割した。予備実験においてヘパリンを使用しなくとも手術 30 分以内であれば遮断部の血栓は認めず、ヘパリンによる易出血性のリスクを考慮し、全身のヘパリン化は行わなかった。

2. 評価

(1) 視覚的収縮評価

心移植後、その吻合部からの出血や収縮の程度の安定性を確認するためにまず心臓を 15 分間再灌流し持続的に観察した。15 分間の再灌流ののち、移植心の拍動をビデオテープで撮影し、post-transplant cardiac contractility として Amir らの viability score[22]を参考に、半定量的に以下の基準でスコア化した。0(no contraction)、1(poor or sporadic contractions)、2(poor to mild contractions)、3(mild to moderate contractions)、4 (moderate to good contractions)、5(good contractions)、6(excellent contractions) (Table 2)。次に 3-0 黒ナイロン(ベアーメディック社)で、腹膜と筋肉、皮膚を閉じて一旦閉腹し麻酔から覚醒させた。その後移植された心臓が十分に再灌流された状態を観察するために、再灌流後 120 分で同様に腹腔内に麻酔を投与し全身麻酔を行った後、再開腹して心臓の拍動をビデオテープで撮影し、再灌流 15 分後と同様にスコアリングを行った。スコアリングに関しては、同僚の心臓外科医に依頼し、動画がどの群の心臓かを提示せずに見てもらいスコアを付けてもらった。数値は平均±標準誤差で表し、各群間の比較はノンパラメトリック検定(Mann-Whitney test) (JMP(8.0.1), SAS Institute Japan)で行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

(2) 心拍数

15 分間の再灌流ののち、移植心の拍動をビデオテープで撮影し、統計処理を容易にするため以下の基準で heart rate score として心拍数（心室の拍動）をスコア化した(Table2)。ラットの正常心拍数は 350 回/分前後といわれているため、0(0 回/分)、1(1~40 回/min)、2(41-80 回/min)、3(81-120 回/分)、4(121-160 回/分)、5(161-200 回/分)、6(201-240 回/分)、7(241-280 回/分)、8(281-320 回/分)、9(321-360 回/分)、10(361-400 回/分)とした(Table 1)。また再灌流後 120 分も同様に評価を行った。数値は平均±標準誤差で表し、各群間の比較はノンパラメトリック検定(Mann-Whitney test) (JMP(8.0.1), SAS Institute Japan)で行い、 $P<0.05$ を統計的に有意と判定した。

(3) ヘマトキシリン—エオジン染色

24 時間 10%ホルマリン固定した組織を、パラフィン包埋し切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色により、再灌流後の心臓の状態を組織学的に観察した。顕微鏡は BZ-9000(KEYENCE 社)を用いた。

実験 2 結果

1、ラットの体重および手術時間

ドナーラットの体重は 290-300g で、レシピエントラットの体重は 330-350g で

あった。また手術時間は約 30 分であった。心筋保護液注入後速やかに心臓は停止した。術中もしくは術後観察が終わるまでに死亡したラットはいなかった (Table3)。

2、視覚的収縮評価

-5°C、24 時間・30 時間保存下では、すべての群で保存液の凍結は認めなかった。

24 時間保存では再灌流後、group U は心全体に表面の凹凸を認め心筋内に出血を起こしていた (Figure 7a)。再灌流後 15 分の時点では表面は平滑で色調も褐色で収縮を認めていても、再灌流 2 時間後では収縮は悪くなり、表面色調も暗黒色に変化しているものを認めた。group K や group Q では部分的には group U と同所見を認めるものの、全体的には表面は平滑で再灌流 2 時間後の表面の色調も褐色であるものが多かった (Figure 7b,c)。30 時間保存では、どの群とも表面は暗黒色に変化し、心筋内で出血していると考えられた。また有効な収縮ができず、心内に血液が充満し、心臓の拡大を認めた。一部心筋で収縮・拍動を認めるものの各群で大きな視覚的な差異は認めなかった (Figure 8)。

Viability score (平均値±標準誤差) では、24 時間保存した群において、再灌流 15 分後では、group K:1.8±0.5 と group Q:2.8±0.5 との間では収縮に明らかな差は認めなかった。しかし group U:0.8±0.4 と group Q:2.8±0.5 との間には

視覚的収縮に有意差を認めた($p=0.01$)。また再灌流 2 時間後では、group Q: 2.1 ± 0.4 は、group U: 0.6 ± 0.4 、group K: 0.8 ± 0.4 と比較し有意に収縮は良好であった($p=0.03$)(Figure 9a)。

30 時間保存した群では、再灌流 15 分後、再灌流 2 時間後とも group Q は他の群と比較し有意差はなかった(Figure 10a)。

(2) 心拍数(Figure 9b, Figure 10b)

24 時間保存した群において、heart rate score (平均値 \pm 標準誤差) は、再灌流後 15 分時は group Q: 4.8 ± 0.5 は group U: 1.8 ± 0.6 と比較し、有意に心拍数は高かった($p=0.04$)。しかし group K: 2.8 ± 0.8 と比較すると有意差はなく、また再灌流後 120 分では group Q は他群と比較し有意差を認めなかった。しかし 24・30 時間保存群で再灌流後 120 分において、心拍数は group Q > group K > group U で心拍数が高い傾向となった。

3、HE 染色

HE 染色では 24 時間、 -5°C 保存下では、group U では明らかに細胞は膨化し、観察した広範囲で出血を起こしており、視覚的評価と所見は一致していた

(Figure 11a)。しかし group K と group Q に関しては一部出血を起こしていたものの、細胞の構造・配列は比較的保たれており、HE 染色上は細胞構造がどの程度保たれているかについてその違いを区別することはできなかった(Figure 11b,c)。30 時間、-5℃保存下では各群とも観察した広範囲で組織の配列は乱れて、出血していた(Figure 12)。

実験 2 小括

-5℃保存下では、30 時間保存群より 24 時間保存群で収縮は良好であった。また 24 時間保存群では、group U と比較し、group K・group Q で収縮が良好であった。group U は明らかにネクロシスにより出血を伴った細胞構造の破壊・配列の乱れを認めたが、group K と group Q では一部そのような領域はあるものの、概ね正常であることが多かった。視覚的な収縮評価は group Q が有意に良好であり、この違いがアポトーシスの程度に表されるのではないかと考え、この 24 時間保存の group K・group Q の 2 群を比較するため、アポトーシスの程度を定量化することとした。まず組織切片に TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色を行って、アポトーシス陽性細胞数を 2 群間で比較することとした。さらにより詳細な定量評価法として Western blotting を行い、以下に述べるポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ 1 (PARP-1) を評価

した。アポトーシスの経路において、主な反応のひとつとしてはカスパーゼの活性化と、それによるカスパーゼ基質の切断が挙げられるが、その中でポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ 1 (PARP-1 : 116kDa) は、正常時は DNA 修復や DNA の安定化に関与しており、アポトーシス時はその初期にカスパーゼによって切断される(Figure 13)。この際のカスパーゼ切断フラグメント(cleaved PARP, 89kDa)の検出により初期のアポトーシスを特異的に検出することができる。今回採取した心筋内の、アポトーシス関連蛋白である cleaved PARP の量を Western blotting を用いて比較することとした。

実験 3 方法

1、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色

24 時間保存した group K と group Q から採取し 24 時間ホルマリン固定した組織(各 n=6、合計 12)を、パラフィン包埋し切片を作成した。検出キット (Roche Diagnostics, Japan) の添付文書に従って染色を行った。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて対比染色した。1つの移植心から 2 枚の組織切片を選び、それぞれ左室心筋の中隔を 0 時、自由壁を 6 時としたときの 5~7 時に相当する位置で適当に選んだ 20 箇所を 400 倍視野で観察

し、TUNEL 陽性細胞の総数を数え、それを比較した。蛍光顕微鏡 (BZ-9000,KEYENCE 社) を用いて観察し、青色の背景に緑色に蛍光を発する核をもつ細胞を TUNEL 陽性細胞と判定し、アポトーシス細胞とみなした。 -5°C 、24 時間保存における group K と group Q のアポトーシス陽性細胞数を Mann-Whitney 検定により比較し、 $p<0.05$ を有意とした。

2、Western blotting

アポトーシスを定量化するために、Western blotting を用いて cleaved PARP 蛋白を測定することとした。24 時間保存した group K と group Q から採取し凍結保存しておいた心筋(各 $n=6$ 、合計 12)の質量を測定し、その 10 倍量の Lysis buffer (20 mM Tris-HCL (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、1 mM phenylmethysulfonyl fluoride、50 mM NaF、10 mg/ml antipain、10 mg/ml leupeptin、10 mg/ml aprotinin、1 mM sodium vanadate)を加えて用手的にサンプルを充分砕き、その後 sonication をおこなった。 4°C 、15000 回転、20 分間の遠心をおこない上清を採取し、Western blotting で解析した。各 well には総蛋白量で 200 μg を流した。1 次抗体として抗ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)抗体(Roche Diagnostics K.K., Japan)を、2 次抗体として Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc ,Japan) を使用

し、アポトーシスによって増加する cleaved PARP タンパクを測定し、正常心筋 (UW 液で心停止後すぐに凍結保存させた心臓) での cleaved PARP の量との比を Mann-Whitney 検定により比較検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。検出されたバンド強度は Image J 1.40 software (NIH, USA.) を用いて解析した。タンパク量のコントロールには ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) を用いた。

実験 3 結果

1、 TUNEL 染色

-5°C, 24 時間保存した場合、アポトーシスを起こしたとみなされる細胞数 (平均値 ± 標準誤差) は、group K: 155 ± 32 個、group Q: 83 ± 45 個で、group K と比較し、group Q で有意に少なかった ($p = 0.04$) (Figure 14, 15)。

2、 Western blotting

-5°C, 24 時間保存した場合、シグナル強度比は、group K: 2.6 ± 0.3 、group Q: 1.5 ± 0.1 で、group K と比較し、group Q で有意に低値であった ($p = 0.02$) (Figure 16)。

実験3 小括

-5℃、24時間保存での group K と group Q とを TUNEL 染色および Western blotting を用いてアポトーシスを定量化して比較したところ、group K と比較し group Q はアポトーシスの程度が有意に低かった。

考察

<ケンフェロールとケルセチン>

Shimada や Fujikawa らはケンフェロール は抗酸化作用と過冷却作用を併せ持つと報告している[21]。過冷却作用とは、ある物質のもつ凝固点よりも低い温度となっても、その物質が凝固せず液体のまま存在できる作用のことである。過冷却効果により、臓器保存においてその代謝を抑えることで細胞内エネルギーの損失を抑制する。Van't Hoff の公式 ($Q_{10}=(k_2/k_1)^{10/(t_2-t_1)}$) によると、心臓の温度を 10℃低下させると心筋の酵素反応は約 50% 減少すると言われている[19]。しかしながら、一度凍結してしまうと、細胞は縮小し、再灌流時にその viability は著しく低下する。嶋田らは、この過冷却効果を利用して心保存を行い、+4℃保存よりも-2℃の環境下で心保存が良好に行われる可能性を報告した。しかし、ケンフェロールを用いても-2℃と-5℃とを比較した際には、-5℃ではラット心筋の収縮は悪く、アポトーシスの程度はより強く認められた。これは-5℃

は過冷却効果よりも、低温による障害が強くなったためと考えられた。凍結を防止しても保存温度が低すぎれば、低温障害が惹起されることが考えられる。低温障害には、凍結や低温による機械的な障害や高浸透圧による障害が挙げられるが、嶋田らの実験でケンフェロールの過冷却効果により心臓は凍結していないことを考えると凍結しない場合でも、臓器・細胞によってその低温度に対する耐性は異なっているため、低温による細胞膜の透過性亢進や細胞蛋白の変化によって引き起こされると考えられている。ただし低温が最も影響している細胞が、心筋細胞なのか血管内皮細胞のか正確な部位は不明としている。またそのメカニズムに関しては、細胞レベルでの報告は散見されるが、組織における詳細な機序はわかっていない。またケルセチンの低温障害防止効果についても詳細な機序を説明した報告はない。

保存温度に関して Amir らは antifreeze protein を用いて -1.3°C での過冷却心保存の有効性についての報告[28-30]をしており、前述の嶋田らはケンフェロールを用いて -2°C での過冷却心保存の有効性を報告している[21]。本研究では、ケンフェロールのもつ過冷却効果により凍結させることなく保存液を -5°C まで低下させた上で、その -5°C という超低温下という環境により起こり得る低温障害を、基礎実験において低温障害防止効果を示したケルセチンを用いて緩和することができた。現時点では臨床において 4 時間程度の心虚血時間であるが、今

回ラット同種異所性心移植モデルを用いて心保存は-5°C下で24時間保存は可能であった。しかし収縮および拍動に関しては、ケルセチンを使用しても正常収縮の約半分程度であった。予備実験を行ったところ、UW液で心停止後すぐに移植をした心臓の収縮は、viability scoreで5から6であり、UW液で心停止後UW液に浸漬して+4°C下で6時間保存した心臓の収縮は4から6であった。ケルセチンはある程度の効果はあるものの、心筋細胞や血管細胞の低温耐性に対して十分とは言い難い結果であった。収縮の改善がなされるように保存環境の更なる検討が必要である。

また今回の実験により24時間保存と30時間保存を比較しても収縮に大きな差があると思われる。group Qに限っては、viability scoreは24時間保存群 2.8 ± 0.5 、30時間保存群 0.7 ± 0.3 と半分以下になっている。長時間の低温状況下で細胞・組織にケルセチンによる低温障害防止効果を上回る障害がでたと考えられるが30時間という長期保存の間に保存液内の物質の劣化などが原因でUW液内のpHが変化していることも考えられるため、pH変化による心保存への影響も検討していく必要がある。pH変化によるケンフェロールおよびケルセチンへの影響も併せて今後検討していくべき課題の一つである。

また過冷却保存の際に注意しなければならない点は、氷核形成物質を残さないことである。本研究では摘出心を保存液に浸漬する前に、心表面や冠動脈内

に血球成分が残存しないように保存液で十分に洗浄を行った。しかし微細な血管内の血球成分は完全には洗浄できていない可能性がある。この残存した血球成分が氷核形成物質となり、周囲の細胞障害を引き越した可能性が考えられた。

<実験モデルについて>

心筋の収縮を評価する方法としては、異所性心移植モデル以外にも、*in vitro* のモデルやランゲンドルフ装置を用いたモデル、同所性移植モデルがある。再灌流障害を原因であると考えられている白血球や血小板などの循環血液成分による影響も評価することができる点でランゲンドルフを用いたモデルや *in vitro* モデルよりも優れていると考えられることから、本研究ではラット同種異所性心移植モデルを用いた。また今回保存状態を視覚的な収縮評価および TUNEL 染色・Western blotting によるアポトーシスの定量評価により行ったが、収縮評価に関しては、心エコーによる収縮評価や圧測定による評価も有効であると考えられた。今回腹部に移植した心臓を、エコーを用いて腹壁から観察を試みたが、エコープローブの圧迫により吻合部の変形を来し冠血流が阻害されて収縮の悪化と徐脈を来したためエコーでの観察は断念した。

<アポトーシス定量による評価>

本研究では、心保存状態を評価するためにアポトーシスの定量化を行い比較し

た。Valen らの報告では、アポトーシスの定量化は心虚血評価を行うための一般的な方法の一つであるとしている[31]。予備実験において group U は明らかにネクローシスにより出血を伴った細胞構造の破壊・配列の乱れを認めたが、group K と group Q では一部そのような領域はあるものの、概ね正常であることが多かった。視覚的な収縮評価は group Q が有意に良好であり、この違いがアポトーシスの程度に表されるのではないかと考えた。本実験ではそのアポトーシスの定量化を TUNEL 染色と Western blotting を用いて行った。TUNEL 染色は in situ で DNA 断片化の検出によりアポトーシス細胞を検出できる。HE 染色では 24 時間保存において group K と group Q の違いが明確とはならなかった。一方で、TUNEL 染色を行ってアポトーシス陽性細胞をカウントして比較することにより、group Q で有意にアポトーシスが少ないということが明らかとなった。この点で本方法は有効な手段であったと思われる。

またアポトーシス初期にカスパーゼによって切断されるアポトーシス関連蛋白の一つである cleaved PARP[32]を、Western blotting を用いて検出した。これは TUNEL 染色の結果と一致していた。今後、cleaved PARP 以外にも、Bcl-2、Bcl-6 などその他のアポトーシス関連タンパクの評価も必要であると考えている[33-35]。

ケンフェロールは新たにその過冷却効果が発見された物質であるが、その過冷

却促進効果の詳細な機序は不明であり、同時にケルセチンに関しても、低温障害を緩和する作用の機序は今後の研究を待たねばならない。併せて、移植後心の肉眼的評価や TUNEL 染色、Western blotting は半定量的な評価であり、検者によるバイアスがかかることや観察範囲が極めて制限的であることなどの制約がある。今後、大型動物を使用した同所移植により、心エコーや圧測定など血行力学的な保存心の評価が必須であると考ええる。

<今後の展望>

本実験では UW 液にケンフェロールとケルセチンを併用することで、UW 液のみや、UW+ケンフェロールと比較し、-5℃下で 24 時間保存において良好な収縮を得ることができた。しかし収縮としては不十分であり、保存中の保存液の劣化、特に保存液中の pH の変化が及ぼす影響について更なる検討が必要である。また今回はラットを用いた同種異所性心移植モデルを用いたが、更に大きな動物による検証が必要である。

結論

今回の実験によりラット同種異所性心移植モデルを用いて、ケンフェロールおよびケルセチンといった植物性フラボノイドがもつ過冷却効果および低温障害防止効果による非凍結超低温下での心保存を行うことが可能であった。本研究により、ケンフェロールおよびケルセチンは心移植の臨床場面においても移植心保存に有効となる可能性が示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻心臓外科学分野 小野稔教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多大なる御高配と御指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻心臓外科学分野 本村昇准教授に深く感謝致します。

本研究を開始するにあたり、その基礎となる過冷却物質および低温障害防止効果についての新しい知見を御教授頂き、丁寧に御指導頂いた北海道大学大学院農学研究院環境資源学部門森林資源科学分野樹木生物学研究室 藤川清三教授に心より感謝致します。

参考文献

- [1] Baroldi G, Milam JD, Wukasch DC, Sandiford FM, Romagnoli A, Cooley DA.:Myocardial cell damage in "stone hearts".J Mol Cell Cardiol. 1974 Aug;6(4):395-9.
- [2] Buckberg GD. Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage.J Thorac Cardiovasc Surg. 1987 Jan;93(1):127-39.
- [3]Bernhardt W. , Schwarz, H. F. & Mallic k, N. :Elective hypothermic cardiac arrest in normotermic animals, Ann. Surg. , 153, 43-51(1961).
- [4] Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL, Goldstein SM, McConnell DH, Cooper N.: Studies Of the effect of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 73, 87-94(1977) .
- [5] Heck CF, Shumway SJ, Kaye MP. The Registry of the International:Society for Heart Transplantation: sixth official report--1989. J HeartTransplant 1989;8:271-6.
- [6]Thomas FT, Szentpetery SS, Mammana RE, Wolfgang TC, Lower RR. :Long-distance transportation of human hearts for transplantation. Ann

Thorac Surg 1978;26:344-50.

[7] Russo MJ, Chen JM, Sorabella RA, et al. The effect of ischemic time on survival after heart transplantation varies by donor age: an analysis of the United Network for Organ Sharing database. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:554-9.

[8] Lima B, Rajagopal K, Petersen RP, et al. Marginal cardiac allografts do not have increased primary graft dysfunction in alternate list transplantation. *Circulation* 2006;114:I27-32.

[9] Sukehiro S, Dyszkiewics W, Minten J, Wynants J, Van Belle H, Flameng W. Catabolism of high energy phosphates during long-term cold storage of donor hearts: effects of extra- and intracellular fluid-type cardioplegic solutions and calcium channel blockers. *J Heart Lung Transplant* 1991;10:387-93.

[10] Jung FJ, Yang L, Harter L, et al. Melatonin in vivo prolongs cardiac allograft survival in rats. *J Pineal Res* 2004;37:36-41

[11] Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997;64:993-8.

- [12] Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, Mentzer RM, Jr. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1983-7.
- [13] Elami A, Gavish Z, Korach A, et al. Successful restoration of function of frozen and thawed isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:666-72, 72 e1.
- [14] Rubinsky B, Arav A, Hong JS, Lee CY. Freezing of mammalian livers with glycerol and antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:732-41.
- [15] Soltys KA, Batta AK, Koneru B. Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I antifreeze protein. *J Surg Res* 2001;96:30-4.
- [16] Wang T, Zhu Q, Yang X, Layne JR, Jr., Devries AL. Antifreeze glycoproteins from antarctic notothenioid fishes fail to protect the rat cardiac explant during hypothermic and freezing preservation. *Cryobiology* 1994;31:185-92.
- [17] Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshida M, Arakawa K, Fujikawa S. Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum*

japonicum) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell Environ* 2008;31:1335-48.

[18]Kuroda K, Kasuga J, Arakawa K, Fujikawa S. Xylem ray parenchyma cells in boreal hardwood species respond to subfreezing temperatures by deep supercooling that is accompanied by incomplete desiccation. *Plant Physiol* 2003;131:736-44.

[19]Kasuga J, Mizuno K, Arakawa K, Fujikawa S. Anti-ice nucleation activity in xylem extracts from trees that contain deep supercooling xylem parenchyma cells. *Cryobiology* 2007;55:305-14.

[20]Kasuga J, Fukushi Y, Kuwabara C, et al. Analysis of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity of flavonol glycosides. *Cryobiology* 2010;60:240-3.

[21]Shimada S, Fujikawa S, Motomura N, et al.:Successful introduction of novel supercoolant, Kaempferol 7-O-beta-D-glucoopyranoside(KF7G), to sub-zero non-freezing rat heart preservation. *LOW TEMPERATURE MEDICINE* 36(2): 20 -24 2010

[22] Weng Z, Zhang B, Asadi S, Sismanopoulos N, Butcher A, Fu X, Katsarou-Katsari A, Antoniou C, Theoharides TC.:Quercetin is more

effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS One*. 2012;7(3):e33805.

[23] Hattori M, Mizuguchi H, Baba Y, Ono S, Nakano T, Zhang Q, Sasaki Y, Kobayashi M, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H.: Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine H1 receptor via suppressing protein kinase C- δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells. *Int Immunopharmacol*. 2013 Feb;15(2):232-9.

[24] Townsend EA, Emala CW Sr.: Quercetin acutely relaxes airway smooth muscle and potentiates β -agonist-induced relaxation via dual phosphodiesterase inhibition of PLC β and PDE4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Sep;305(5):L396-403.

[25] Azevedo MI, Pereira AF, Nogueira RB, Rolim FE, Brito GA, Wong DV, Lima-Júnior RC, de Albuquerque Ribeiro R, Vale ML.: The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 2013 Oct 23;9(1):53.

[26] Casella ML, Parody JP, Ceballos MP, Quiroga AD, Ronco MT, Francés

DE, Monti JA, Pisani GB, Carnovale CE, Carrillo MC, de Luján Alvarez M.:Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. Mol Nutr Food Res. 2013 Oct 1.

[27] Pozsgai E, Bellyei S, Cseh A, Boronkai A, Racz B, Szabo A, Sumegi B, Hocsak E.:Quercetin Increases the Efficacy of Glioblastoma Treatment Compared to Standard Chemoradiotherapy by the Suppression of PI-3-Kinase-Akt Pathway. Nutr Cancer. 2013 Sep 13.

[28] Amir G, Rubinsky B, Basheer SY, et al. Improved viability and reduced apoptosis in sub-zero 21-hour preservation of transplanted rat hearts using anti-freeze proteins. J Heart Lung Transplant 2005;24:1915-29.

[29] Amir G, Rubinsky B, Horowitz L, et al. Prolonged 24-hour subzero preservation of heterotopically transplanted rat hearts using antifreeze proteins derived from arctic fish. Ann Thorac Surg 2004;77:1648-55.

[30] Amir G, Horowitz L, Rubinsky B, Yousif BS, Lavee J, Smolinsky AK. Subzero nonfreezing cryopresevation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. Cryobiology 2004;48:273-82.

[31] Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac

function and viability. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S656-60.

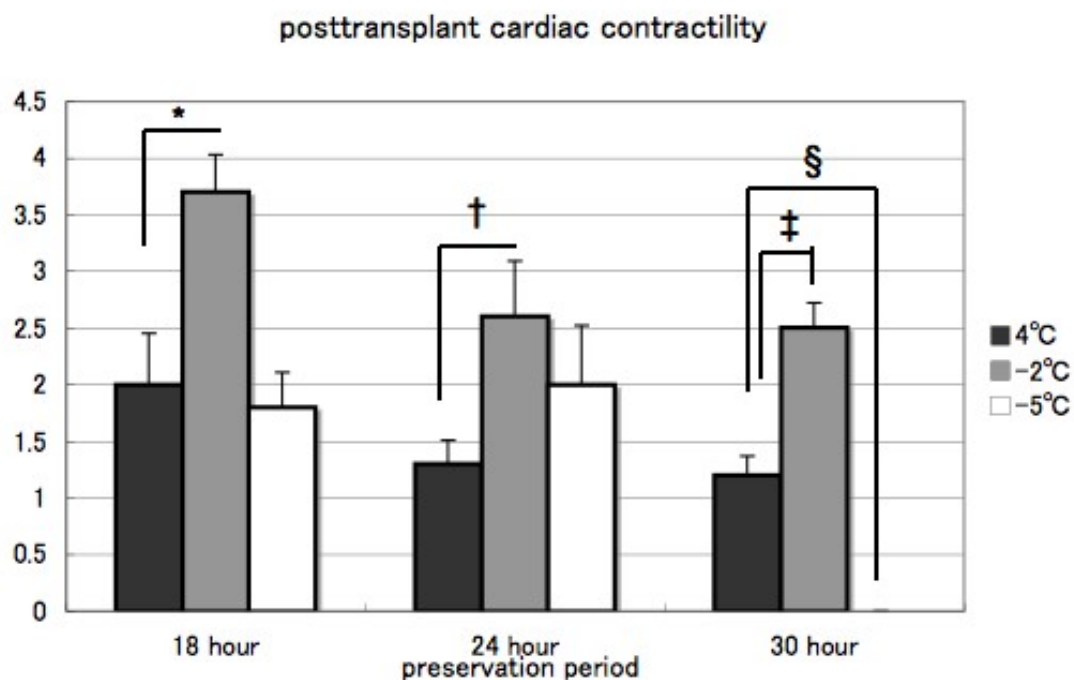
[32] Fiorillo C, Pace S, Ponziani V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase activation and cell injury in the course of rat heart heterotopic transplantation. *Free Radic Res* 2002;36:79-87.

[33] Tsao T, Shi Y, Kornblau S, Lu H, Konoplev S, Antony A, Ruvolo V, Qiu YH, Zhang N, Coombes KR, Andreeff M, Kojima K, Konopleva M. Concomitant inhibition of DNA methyltransferase and BCL-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in acute myelogenous leukemia cells. *Ann Hematol.* 2012 Dec;91(12):1861-70.

[34] García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* 2012 Nov;19(11):1733-40.

[35] Kook S, Zhan X, Cleghorn WM, Benovic JL, Gurevich VV, Gurevich EV. Caspase-cleaved arrestin-2 and BID cooperatively facilitate cytochrome C release and cell death. *Cell Death Differ.* 2013 Oct 18.

Figure 1 ケンフェロール添加による有効性

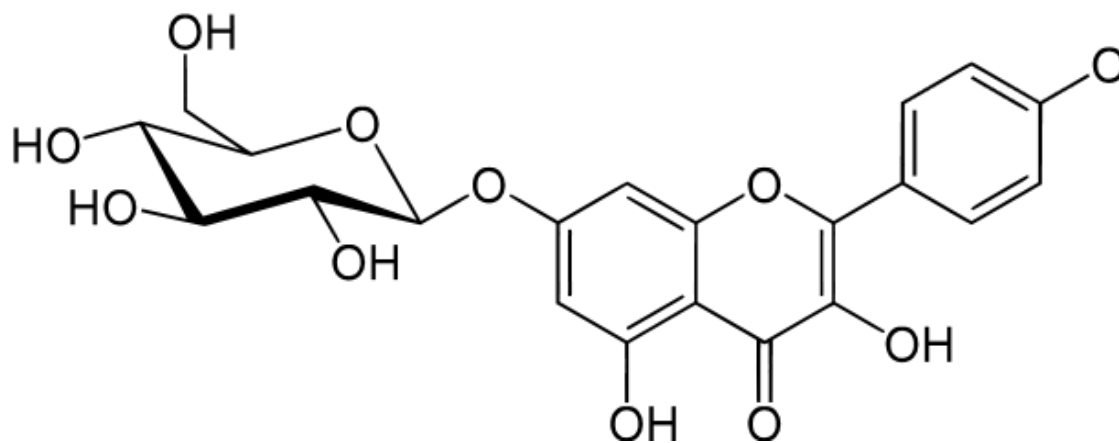


(Shimada ら. LOW TEMPERATURE MEDICINE 36(2): 20 -24 2010 より引用)

UW 液に KF7G を添加した保存液を使用し、保存温度 4°C・-2°C・-5°C、保存時間 18 時間・24 時間・30 時間での収縮を比較したところ、全ての保存時間で-2°C 保存群が 4°C 保存群を有意に良好であった。しかし-5°C 保存群は-2°C 保存群と比較し有意な収縮は得られなかった。注)収縮の程度は 0(no contraction), 1(poor or sporadic contractions), 2(poor to moderate contractions), 3(moderate to good contractions), and 4 (excellent contractions)の 5 段階で評価されている。

Figure 2 ケンフェロールおよびケルセチンの構造式

(A)Kaempferol



(B)Quercetin

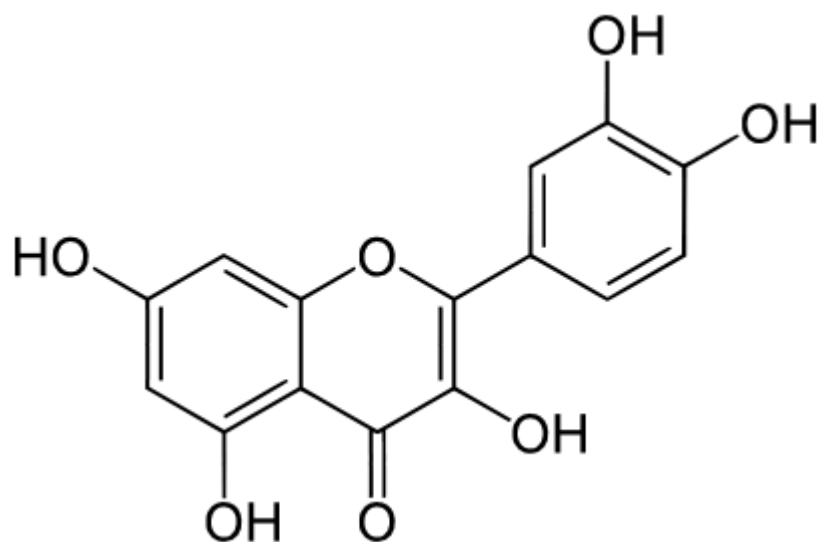
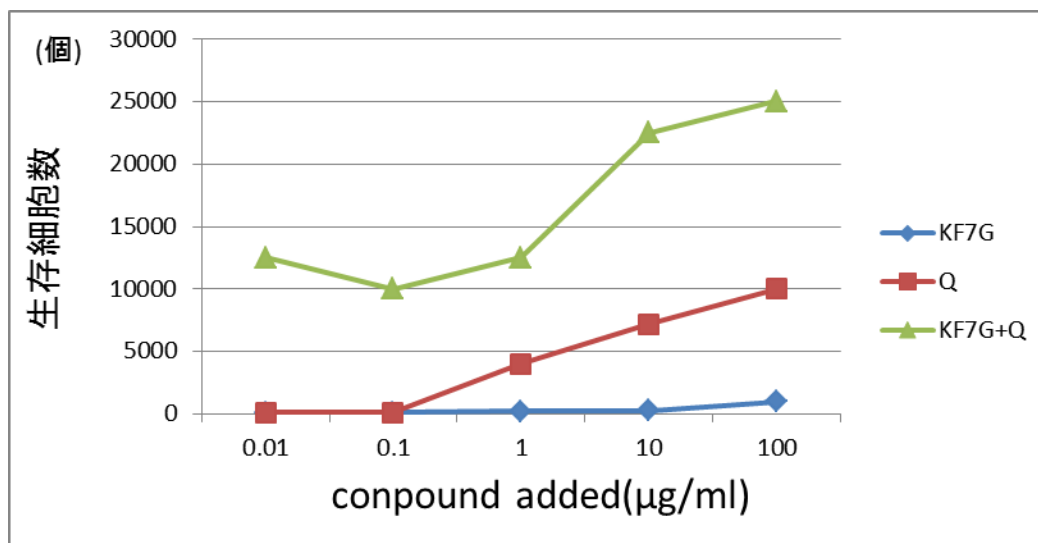


Figure3

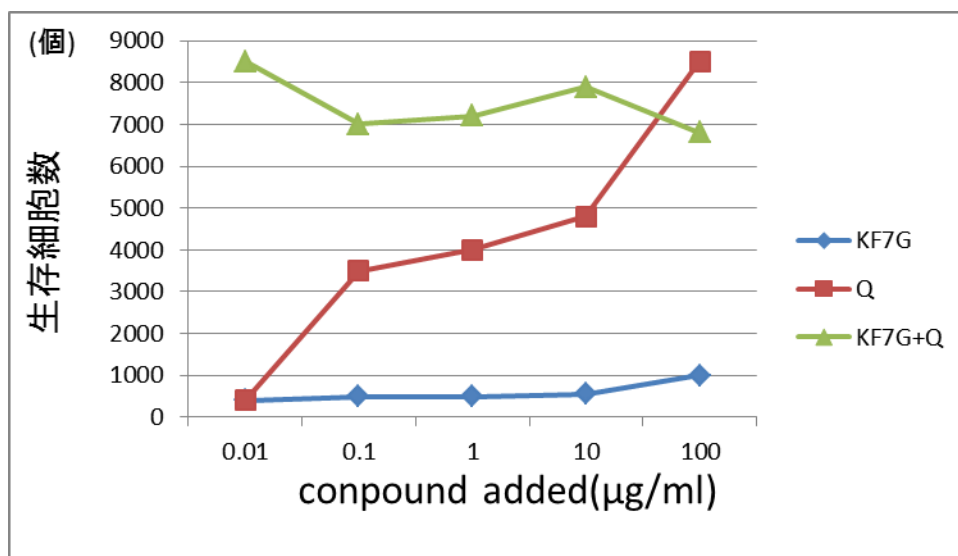
(A) 4°Cにおける細胞障害保護効果



ケンフェロール単独では UW 液中、試験した濃度範囲(0.01~100 μg/ml)において殆ど低温障害に対する保護作用は見られなかったが、ケルセチン単独では UW 液中において低温障害に対し用量に依存した細胞保護効果が見られた。またケルセチン(100 μg/ml)とケンフェロールとの併用により、高い細胞保護効果が見られた。

Figure3

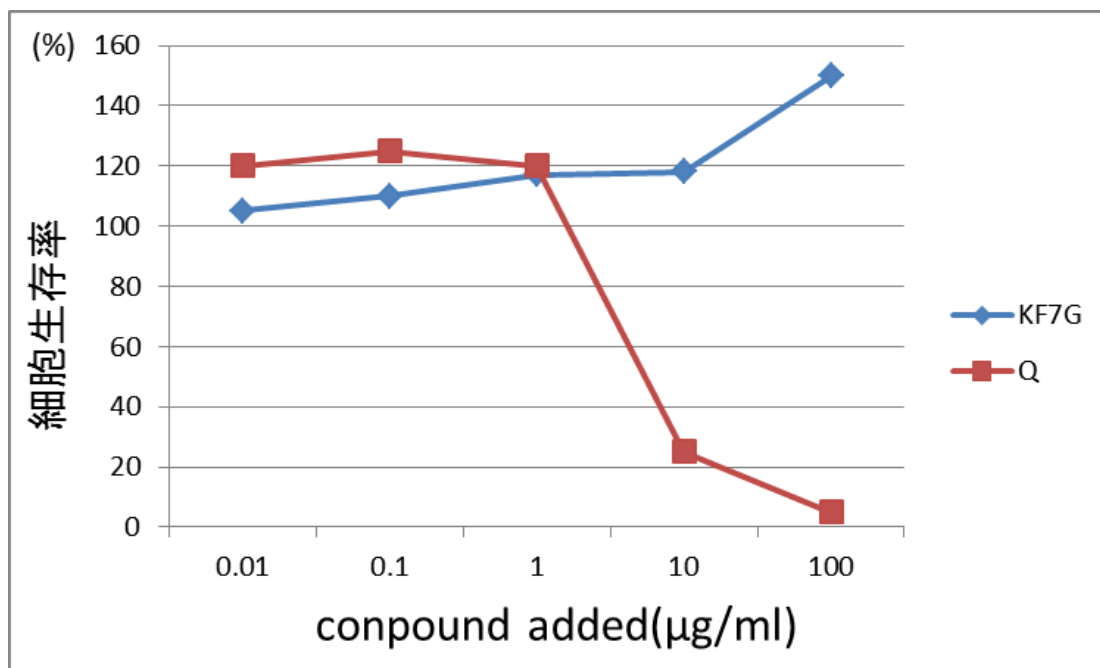
(B)-5°Cにおける細胞障害保護効果



ケルセチン(100 μg/ml)とケンフェロールとの併用において、4°C低温保存時のような相乗効果は見られなかったが、ケルセチンは UW 液中において低温障害に対する用量に依存した細胞保護効果が見られた。

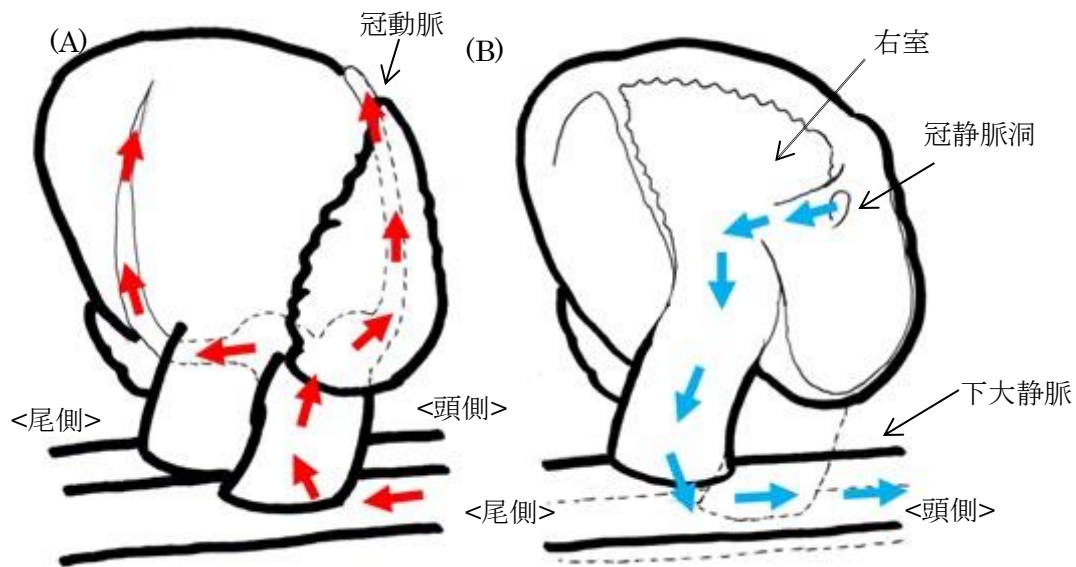
Figure3

(C) ケンフェロールおよびケルセチンの細胞毒性



ケンフェロールでは 0.01~100 μ g/ml の濃度において殆ど細胞毒性は見られなかった。またケルセチンでは 1~100 μ g/ml の濃度範囲で用量に依存した細胞毒性が見られた。

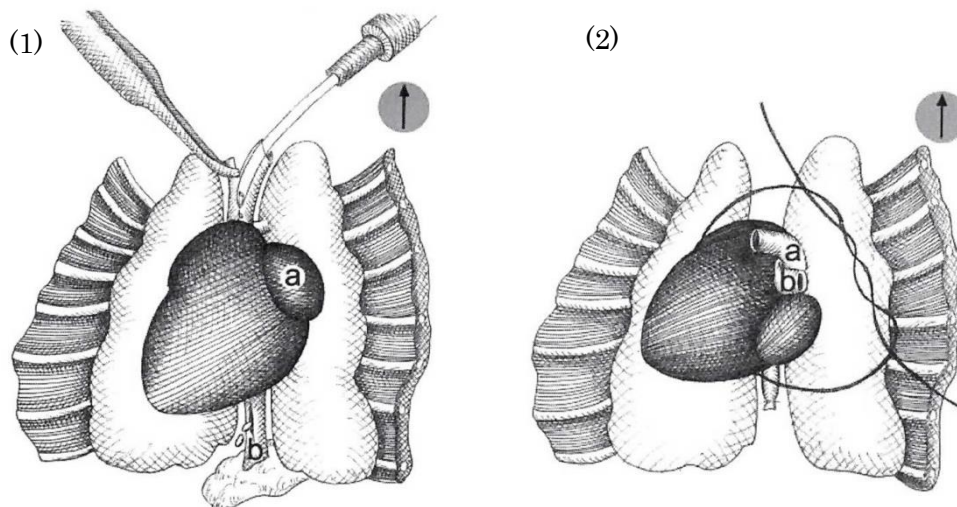
Figure 4 ラット同種異所性心移植モデルにおける血液の流れ



- (A) レシピエントの腹部大動脈に吻合されたドナーの上行大動脈から、冠動脈に向かって血液が供給される。
- (B) 冠動脈に供給された血液は冠静脈洞から三尖弁を通過して右室を通り、ドナーの肺動脈からレシピエントの下大静脈へ血液が循環する。

Figure 5 摘出手順

(A)心摘出



(1)ドナー大動脈切断孔から保存液を緩徐に注入する。(a:左房、b:下大静脈)

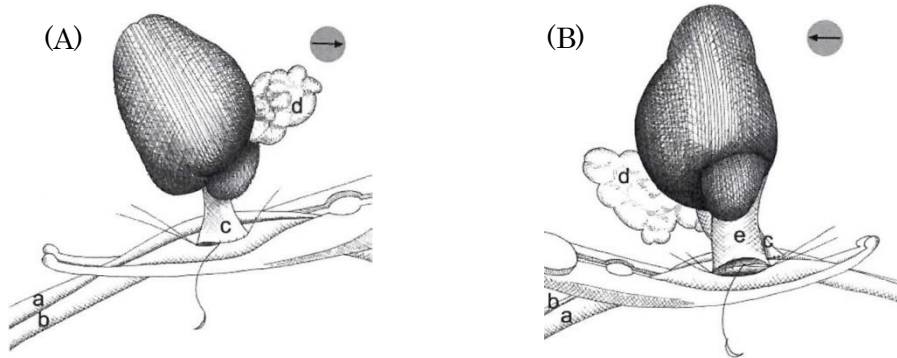
(2)下大静脈は別に結紮し上大静脈、肺静脈はまとめて結紮する。(a:上行大動脈、b:肺動脈) (Arben Dedja et al., Heterotopic cardiac Xenotransplantation in rodents : Report of a technique in a hamster-to-rat model, *Microsurgery*. 2005;25(3):227-234 より引用)

(B)摘出心の保存液への浸漬



各保存液で心停止後は速やかに 15ml の保存液が入った容器に入れて-5℃に設定した deep freezer に入れて保存を開始した。

Figure 6 移植手順

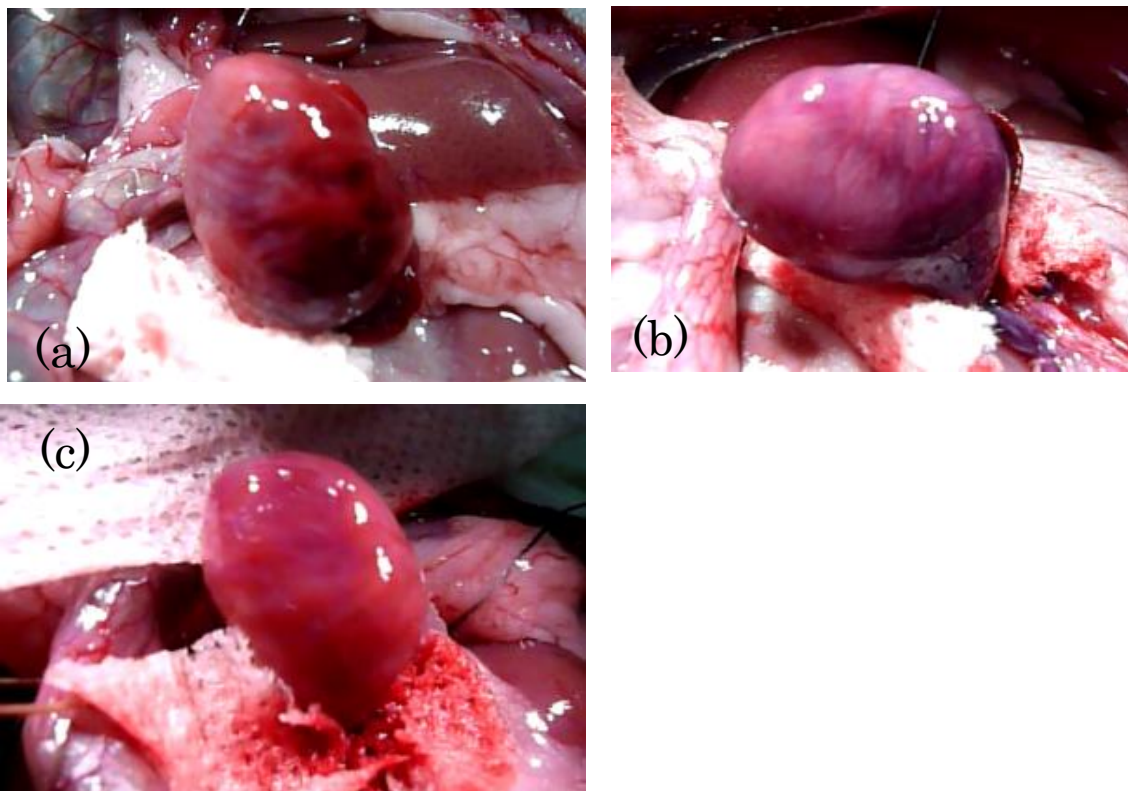


(A)ドナーの上行大動脈をレシピエントの腹部大動脈に吻合する。(a:レシピエント腹部大動脈、b:レシピエント腹部下大静脈、c:ドナー上行大動脈、d:結紮切離された上・下大静脈、肺静脈)

(B)ドナーの肺動脈をレシピエントの腹部下大静脈に吻合する。(e:ドナー肺動脈)

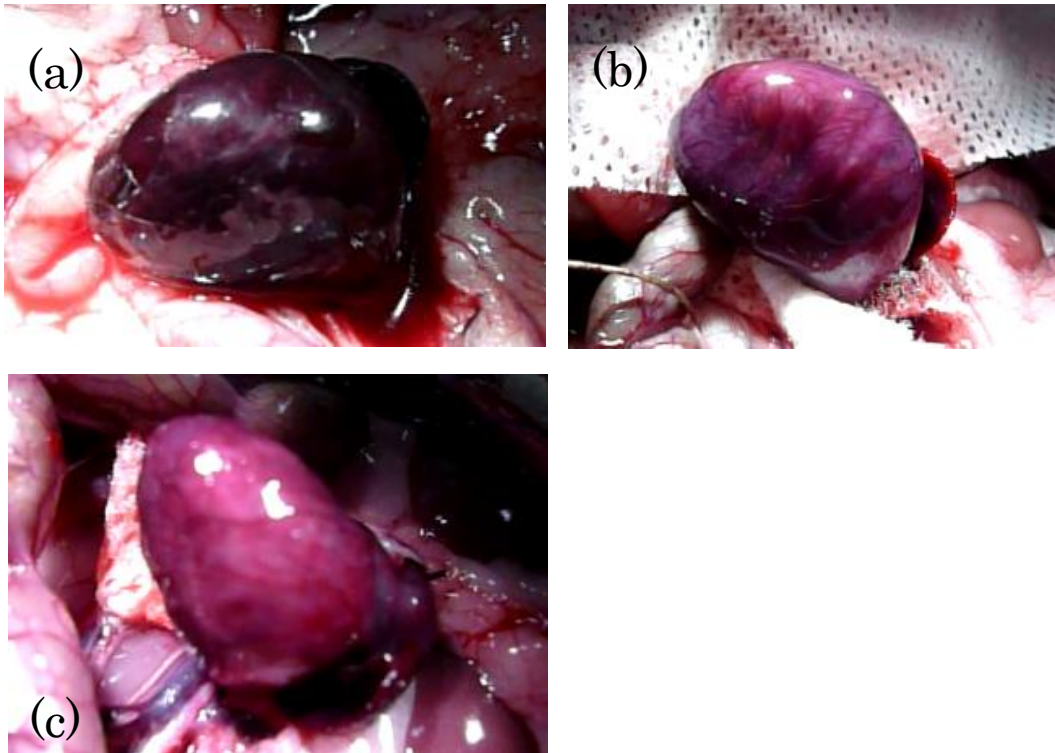
(Arben Dedja et al.,Heterotopic cardiac Xenotransplantation in rodents:Report of a technique in a hamster-to-rat model,Microsurgery.2005;25(3):227-234 より引用)

Figure 7 -5°C 、24 時間保存群の、再灌流後 120 分の移植心



- (a) UW 液保存群：表面はやや凹凸あり。所々に出血を認める。
- (b) UW+KF7G 保存群：表面は比較的平滑。触診上心筋は比較的柔らかい。
- (c) UW+KF7G+Q 保存群：表面は比較的平滑。触診上心筋は柔らかい。

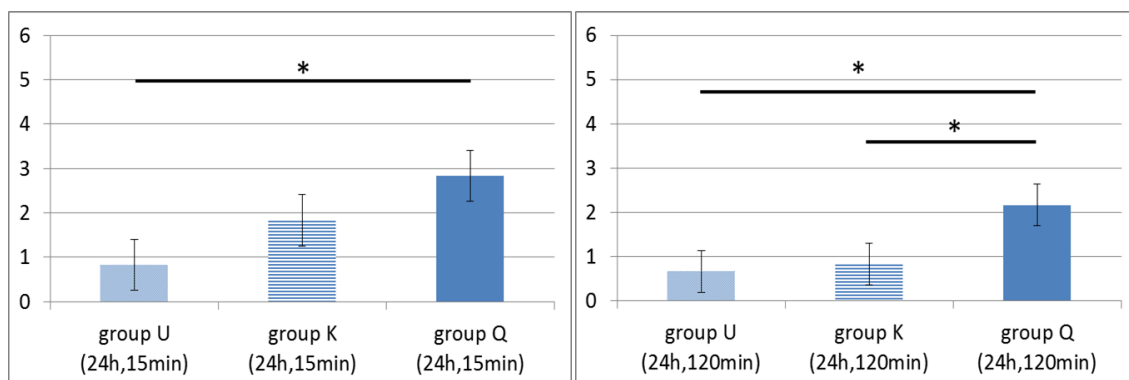
Figure 8 -5°C、30 時間保存群の、再灌流後 120 分の移植心



- (a) UW : 表面は平滑だが心筋内部に出血を認め黒色に変化している。血液を送り出せず心臓は大きく拡大している。触診上心筋は硬い。
- (b) UW+KF7G : 表面は比較的平滑。暗赤色で中等度心拡大を認め、触診上心筋は硬い。
- (c) UW+KF7G+Q : 表面は比較的平滑。暗赤色で中等度心拡大を認める。触診上心筋は硬い。

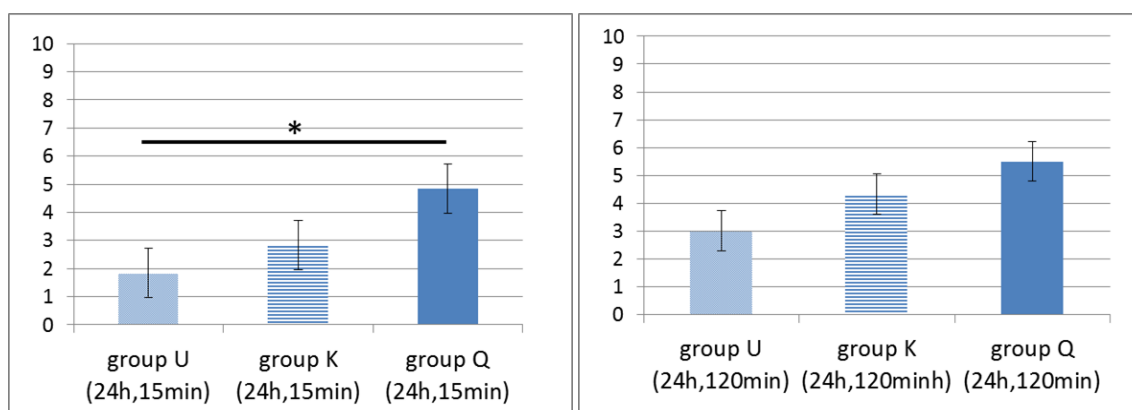
Figure 9 24 時間保存後の再灌流後 15 分・2 時間の viability score、heart rate score

(a)再灌流後 15 分、120 分の group U、K、Q の viability score の比較。



-5°C下で24時間保存した場合、viability scoreは再灌流後15分ではgroup Q > group Uで有意に良好であり、再灌流後120分ではgroup Qは、group U、group Kと比較し有意に良好であった。

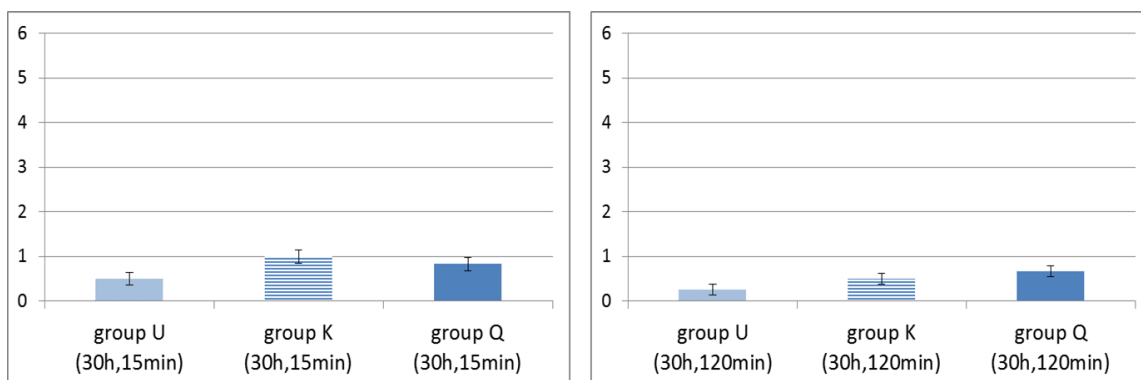
(b)再灌流後 15 分、120 分の group U、K、Q の heart rate score の比較。



-5°C下で24時間保存した場合、有意差は出なかったものの heart rate scoreはgroup Q > group K > group Uで良い傾向にあった。

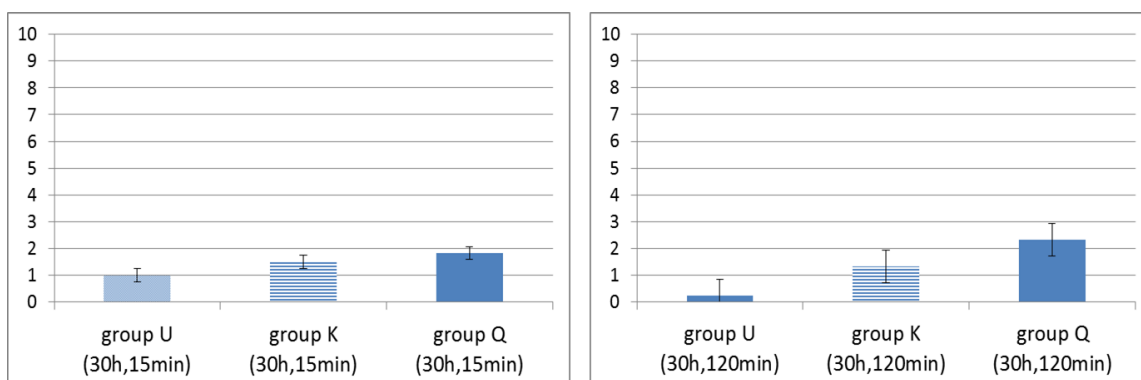
Figure 10 30 時間保存後の再灌流後 15 分・120 分の viability score、heart rate score

(a) 再灌流後 15 分、120 分の group U、K、Q の viability score の比較



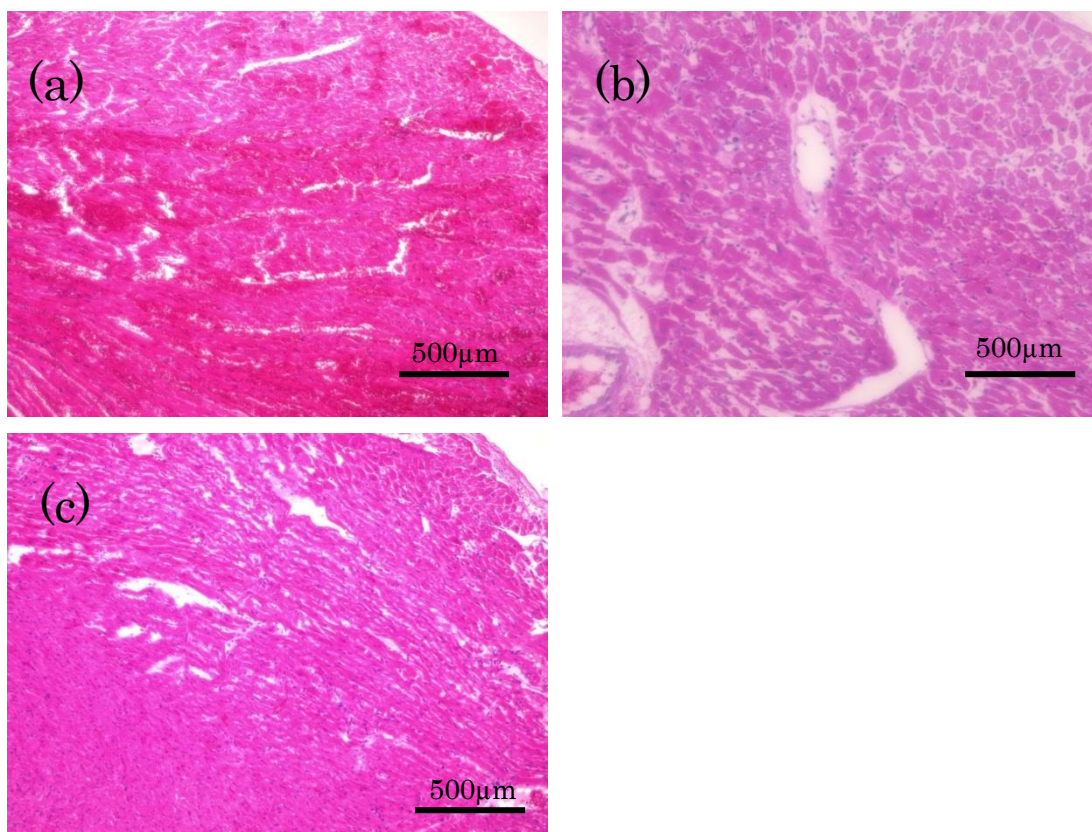
-5°C下で 30 時間保存した場合、全ての群で viability score は「1」を下回るものが多かった。120 分再灌流後 group Q > group K > group U で収縮が良い傾向はあるが有意差は得られなかった。

(b) 再灌流後 15 分、120 分の group U、K、Q の heart rate score の比較



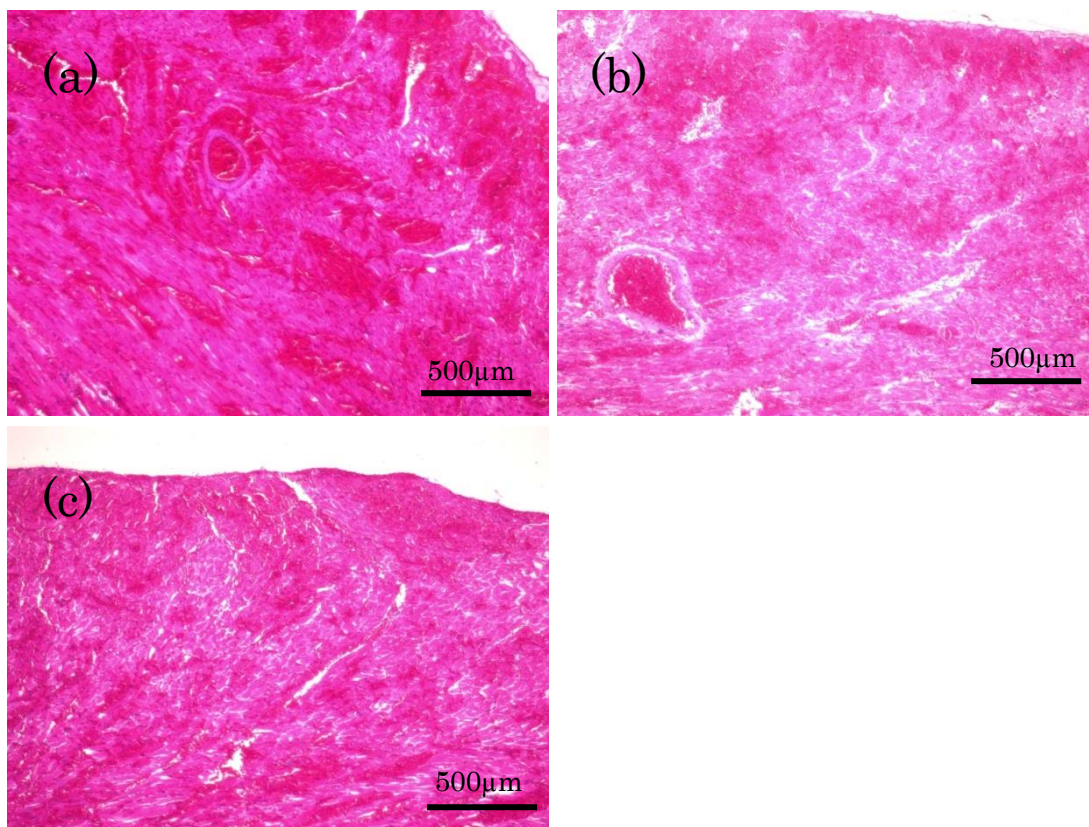
-5°C下で 30 時間保存した場合、各群間で有意差は出なかったものの、group Q > group K > group U で heart rate score は良い傾向となった。また group Q のみにおいて再灌流後 15 分と比較して再灌流後 120 分の方が heart rate score は良い傾向であった。

Figure 11 Hematoxyline-Eosine 染色(-5°C,24 時間保存) (200 倍)



- (a) UW : ほぼ全視野にわたって細胞の膨化・破壊を認め、細胞間内に出血を認める。
- (b) UW+KF7G : 一部細胞の膨化・破壊を認めるものの、組織の構築は概ね保たれている。
- (c) UW+KF7G+Q : 一部細胞の膨化・破壊を認めるものの、組織の構築は概ね保たれている。

Figure 12 Hematoxyline-Eosine 染色(-5°C,30 時間保存) (200 倍)

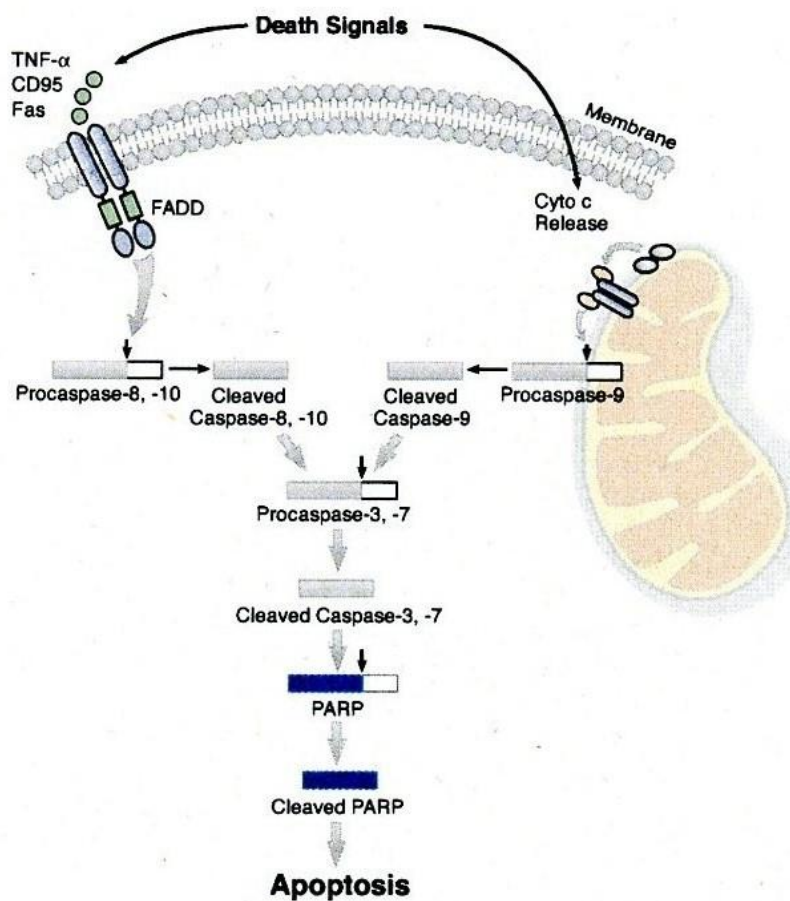


(a)UW : ほぼ全視野にわたって細胞の膨化・破壊を認め、細胞間内に出血を認める。

(b)UW+KF7G : ほぼ全視野にわたって細胞の膨化・破壊を認め、細胞間内に出血を認める。

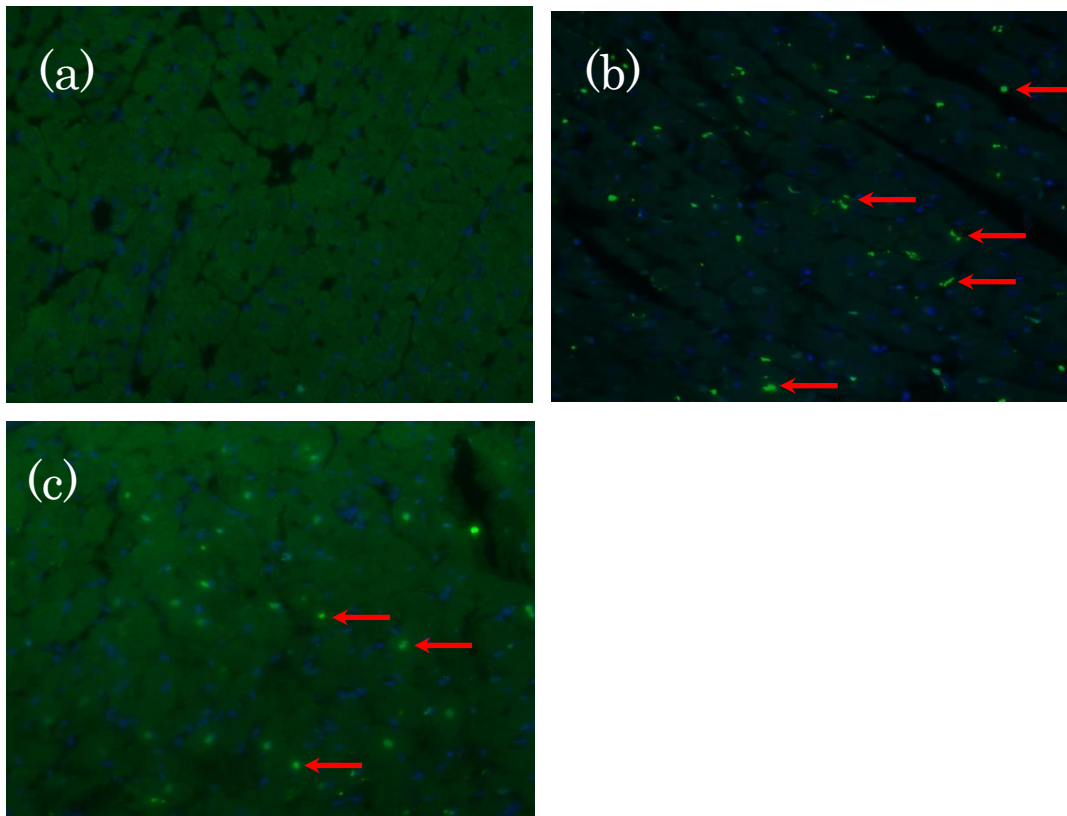
(c)UW+KF7G+Q : (a)(b)と同様にほぼ全視野にわたって細胞の膨化・破壊を認め、細胞間内に出血を認める。

Figure 13 アポトーシスと cleaved PARP 生成の流れ



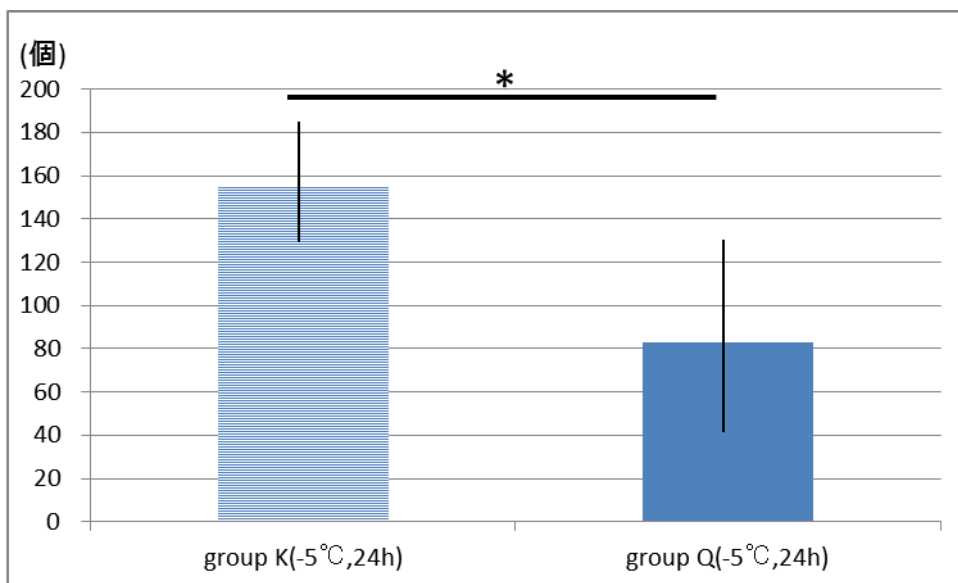
(Cell Signaling cleaved PARP antibody 添付文書より引用)

Figure 14 TUNEL 染色 (400 倍) (矢印はアポトーシス陽性細胞の 1 例)



- (a) UW で心停止後すぐに取り出した心臓
- (b) Group K
- (c) Group Q

Figure 15 -5°C、24 時間保存における、group K、Q のアポトーシス陽性細胞数の比較

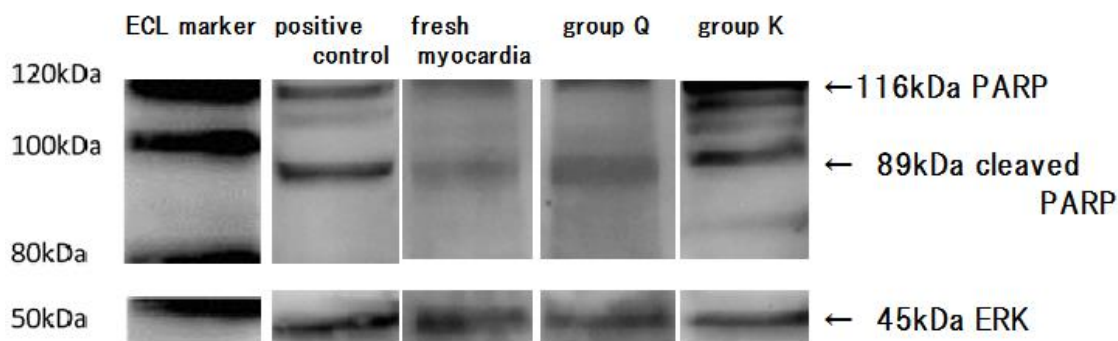


Mean±SE(個/20 視野)

-5°C、24 時間保存した group K、group U (各 n=6、合計 12)について TUNEL 染色を行った。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて対比染色した。1つの移植心から2枚の組織切片を選び、それぞれ左室心筋の中隔を0時、自由壁を6時としたときの5～7時に相当する位置で適当に選んだ20箇所を400倍視野で観察し、TUNEL陽性細胞の総数を数え、それを比較した。蛍光顕微鏡を用いて観察し、青色の背景に緑色に蛍光を発する核をもつ細胞をTUNEL陽性細胞と判定し、アポトーシス細胞とみなした。2群間をMann-Whitney検定により比較し、 $p < 0.05$ を有意とした。その結果アポトーシスを起こしたとみなされる細胞数(平均値±標準誤差)は、K群は 155 ± 32 個、Q群は 83 ± 45 個で、K群と比較し、Q群で有意に少なかった。

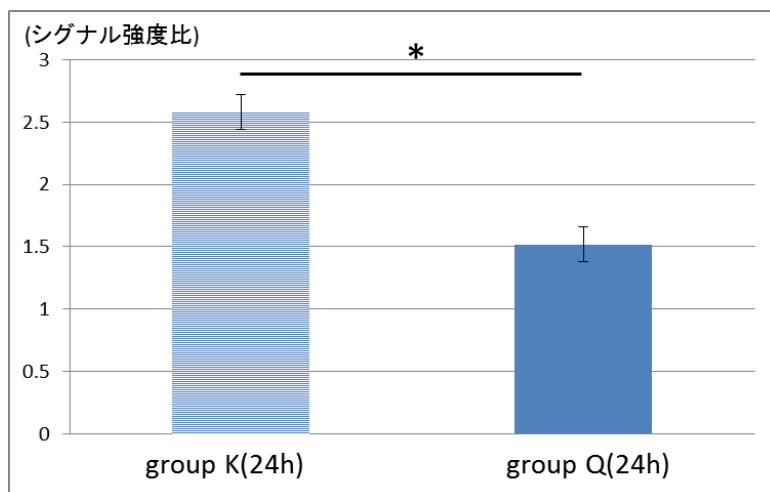
Figure 16

(a)Western blotting



24 時間保存した group K と group Q から採取し凍結保存しておいた心筋(各 n=6、合計 12)について Western blotting を施行した。1 次抗体として抗ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)抗体を、2 次抗体として Goat anti-rabbit IgG-HRP を使用した。タンパク量のコントロールには ERK を用いた。

(b)signal intensity の比較



24 時間保存した group K と group Q の心筋(各 n=6、合計 12)を、Western blotting を用いて、アポトーシスによって増加する cleaved PARP タンパクと正常心筋での cleaved PARP のバンド強度を測定しその比を Mann-Whitney 検定により比較検討した。シグナル強度比は、group K:2.6±0.3、group Q:1.5±0.1 であり、group K と比較し、group Q で有意に低値であった(p=0.02)。

Table 1. UW 液と Celsior 液の組成

		UW 液	Celsior 液
HES	g/L	50	0
Histidine	mmol/L	0	30
Mannitol	mmol/L	0	60
Lactobionate	mmol/L	105	80
Raffinose	mmol/L	30	0
Glutamic acid	mmol/L	0	20
Phosphate	mmol/L	25	0
Glutathione	mmol/L	3	3
Allopurinol	mmol/L	1	0
Adenosine	mmol/L	5	0
Sodium	mmol/L	27	100
Potassium	mmol/L	125	0
Potassium chloride	mmol/L	0	15
Calcium chloride	mmol/L	0	0.25
Magnesium chloride	mmol/L	0	13
Magnesium sulfate	mmol/L	5	0

UW 液は、低ナトリウム濃度・高カリウム濃度で細胞内液タイプの臓器保存液である。一方で Celsior 液は高ナトリウム濃度・低カリウム濃度であり細胞外液タイプの臓器保存液である。(HES : hydroxyethyl starch)

Table 2. viability score および heart rate score

Viability score	
contraction	score
no	0
poor or sporadic	1
poor to mild	2
mild to moderate	3
moderate to good	4
good	5
excellent	6

Heart rate score	
heart rate (beat/minute)	score
0	0
1~40	1
41~80	2
81~120	3
121~160	4
161~200	5
201~240	6
241~280	7
281~320	8
321~360	9
261~400	10

Table 3. ドナー・レシピエントラットの体重および吻合時間

(a)24 時間保存群のラット体重及び手術時間

24 時間保存		U群	K群	Q群
体重(g)	ドナー	299.4±2.4	300.4±7.9	300.2±6.9
	レシピエント	343±8.8	334±18.3	342±18.3
手術時間(分)	上行大動脈-腹部大動脈吻合	16.4±2.0	16.4±2.0	14±0.7
	肺動脈-下大静脈吻合	14.4±0.5	14.6±0.5	11.8±2.0

(平均値±標準誤差)

(b)30 時間保存群のラット体重及び手術時間

30 時間保存		U群	K群	Q群
体重(g)	ドナー	290.4±2.2	298.4±5.9	300.1±6.6
	レシピエント	345±8.2	330±6.3	332±12.3
手術時間(分)	上行大動脈-腹部大動脈吻合	15.4±2.0	15.4±2.0	14±0.5
	肺動脈-下大静脈吻合	13.4±0.6	13.6±0.6	12.8±1.0

(平均値±標準誤差)