

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10207

研究課題名(和文) 血流影響下での同種心臓弁・血管移植後石灰化に対する炭酸ランタンによる抑制法の検証

研究課題名(英文) Lanthanum carbonate inhibits aortic allograft calcification in circulatory transplant models

研究代表者

山内 治雄 (Yamauchi, Haruo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60726735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】若年者への心臓血管ホモグラフト移植後は、グラフト石灰化促進による耐久性の問題が未解決である。今回、腎不全治療薬のリン酸バインダー(炭酸ランタン)によるグラフト石灰化抑制効果を、血流影響下のウサギ大動脈移植モデルで検証した。【方法】ドナー大動脈をレシピエント頸動脈へ移植し8週後に犠牲死した。炭酸ランタン含有飼料を術後1,2,4,8週間投与し、通常飼料を投与した対照群と比較した。【結果】対照群に比べランタン群では2週以上投与でグラフト石灰化が抑制された一方で、8週投与群では成長障害が認められた。【結語】移植後急性期に限定したリン抑制は副作用なくホモグラフト石灰化を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：<OBJECTIVES> Limited durability of a cardiovascular homograft due to accelerated calcification in young recipients is an unsolved problem. We hypothesized that phosphate binder, lanthanum carbonate (LC) inhibits calcification of a transplanted homograft, and examine this hypothesis by circulatory transplant rabbit model. <METHODS> Donor aortas were transplanted to carotid arteries of recipients. All the recipients were euthanized after 8 weeks and the homograft were explanted. LC group rabbits were fed by a diet containing LC for 1, 2, 4, 8 weeks postoperatively followed by feeding normal diets. The results were compared with those from control group rabbits which were fed by a normal diet. <RESULTS> Homograft calcification was inhibited in the LC group by giving LC for at least 2 weeks, but growth retardation was seen in the rabbits with LC for 8 weeks. <CONCLUSIONS> Short-term LC may safely inhibit aortic homograft calcification without significant side effects.

研究分野：医師薬学

キーワード：同種心臓弁・血管移植 石灰化 リン酸バインダー

1. 研究開始当初の背景

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、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、当施設で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、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。

2. 研究の目的

(実験1)これまで当科の先行研究のlimitationであった「皮下移植モデル」を解決する目的で、若年ウサギを用いて「血流影響下モデル」を確立することとした。本来は遺伝子発現解析や分子生物学的解析が行いやすいマウスやラットでの実験が望ましいが、例えば離乳期の生後3週程度のラットは体重が50~60g程度の大きさであるため、血流を維持した血管吻合モデルの確立やデバイスをを用いた流量の測定は技術的に困難と判断し、本実験では実験動物としてウサギを用いる方針とした。若年ウサギの大動脈を用いて、既報にはない移植手術時及び摘出時にグラフトの流量を定量評価し、大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立を行う。また、これにより若年ウサギにおける大動脈ホモグラフトが移植後に最も石灰化する時期を評価し、石灰化モデルの適正な観察期間を

決定する。

(実験2)「若年者の大動脈ホモグラフト移植後石灰化は、炭酸ランタンの投与により有害事象なく抑制することができる」という仮説をもとに、リン吸着薬である炭酸ランタンをレシピエントに投与し、投与期間毎にグループ分けを行って、大動脈ホモグラフト移植後の石灰化を定性的・定量的に評価する。また、炭酸ランタンによる有害事象についても検討する。これにより適正な炭酸ランタン投与期間を検討する。

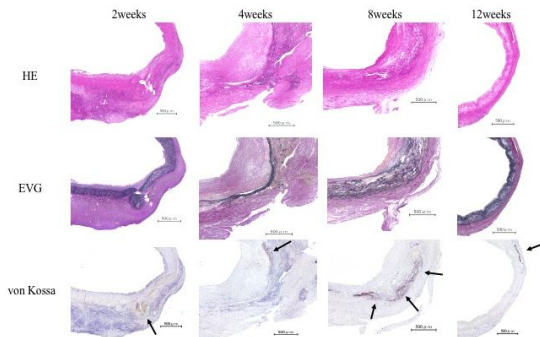
3. 研究の方法

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、新鮮グラフトで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。

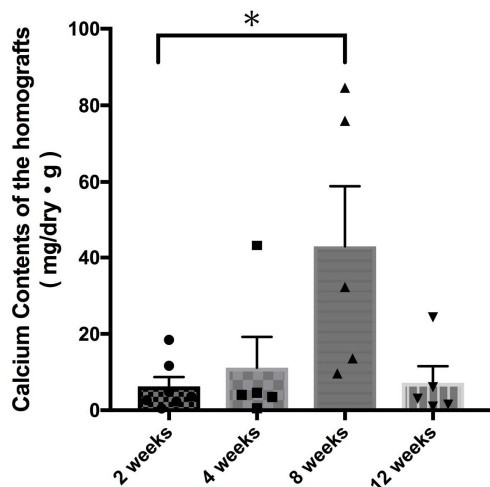
4. 研究成果

(実験1)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、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 週群では著名な内膜肥厚を認めた。



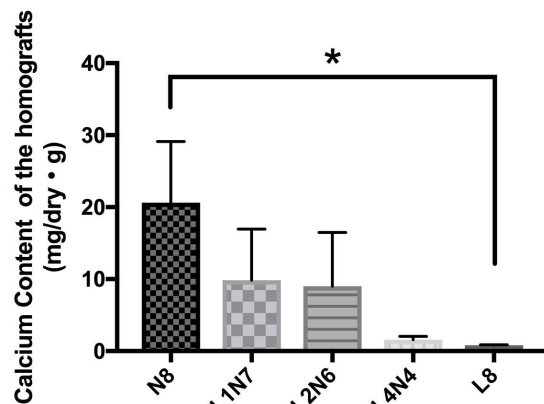
内膜・中膜比測定すると、2 週群で 0.63 ± 0.12 、4 週群で 1.77 ± 0.34 、8 週群で 1.66 ± 0.35 、12 週群で 0.38 ± 0.18 であり、全体の平均値に有意差を認めた ($P=0.0034$)。大動脈ホモグラフト中のカルシウム定量値 ($\text{mg/dry} \cdot \text{g}$) は、2 週群: 6.26 ± 2.44 、4 週群: 11.18 ± 8.06 、8 週群: 43.23 ± 15.67 、12 週群: 7.18 ± 4.38 であり、術後 2~8 週にかけては上昇傾向を認め、12 週で減少に転じた。



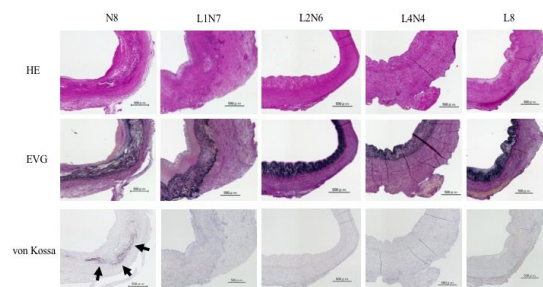
血液学的検査では、血漿中のカルシウム濃度 (mg/dL) は、2 週群: 14.2 ± 0.3 、4 週群: 14.1 ± 0.2 、8 週群: 13.2 ± 0.4 、12 週群: 13.8 ± 0.2 であり、各群間で有意差を認めていないことから ($P=0.23$)、血漿カルシウム濃度は成長に伴い変動は認められなかった。一方、血漿無機リン濃度 (mg/dL) は、2 週群: 7.99 ± 1.0 、4 週群: 7.76 ± 0.7 、8 週群: 6.96 ± 0.6 、12 週群: 5.84 ± 0.5 であり、ピアソンの相関係数において $r=-0.407$ の有意な負の相関を認めた ($P=0.019$)。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) 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

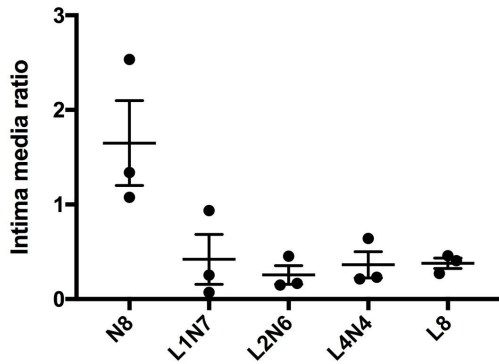
入時~術後 8 週間の全期間において通常飼料 (Normal diet) を投与した群を N8 群、5%炭酸ランタン (Lanthanum carbonate) 含有飼料を搬入時~術後 1 週間 + 通常飼料を 7 週間投与した群を L1N7 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時~術後 2 週間 + 通常飼料を 6 週間投与した群を L2N6 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時~術後 4 週間 + 通常飼料を 4 週間投与した群を L4N4 群、5%炭酸ランタン含有飼料を搬入時~術後 8 週間投与した群を L8 群とした。大動脈ホモグラフトの石灰化定量値 ($\text{mg/dry} \cdot \text{g}$) 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、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名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。

対照群に比べランタン群では2週以上投与でグラフト石灰化が抑制された一方で、8週投与群では成長障害が認められた。移植後急性期に限定したリン抑制は副作用なくホモグラフト石灰化を抑制できる可能性がある。今回、より実臨床に近い血流影響下大動脈移植モデルにおいてリン酸バインダーの有効性が示された。

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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

岡村賢一、山内治雄、木下修、井戸田佳史、益澤明広、縄田寛、小野稔 若年ウサギを用いた血流影響下大動脈ホモグラフト移植後石灰化モデルの確立. 第 57 回日本脈管学会 (2016 年)

Kenichi Okamura, Haruo Yamauchi, Osamu Kinoshita, Minoru Ono. Short-term Lanthanum Carbonate Safely Inhibits Aortic Allograft Calcification and Intimal Hyperplasia in a Rabbit Circulatory Transplant model. AHA scientific session 2017, Anaheim, USA

岡村賢一、山内治雄、木下修、星野康弘、益澤明広、木村光利、縄田寛、平田康隆、小野稔 若年ウサギを用いた血流下大動脈ホモグラフト移植後石灰化に対する炭酸ランタン投与の有用性 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会 (2017 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 治雄 (Yamauchi, Haruo)
東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60726735

(2)研究分担者

小野 稔 (Ono, Minoru)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：40270871

木下 修 (Kinoshita, Osamu)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40598512

益澤 明広 (Masuzawa, Akihiro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30709572

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()