

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592028

研究課題名(和文)同種心臓弁・血管移植後石灰化に対するリン酸バインダーを用いた抑制法の開発

研究課題名(英文)Phosphate binders inhibit calcification of aortic and cardiac valve allografts.

研究代表者

木下 修(Kinoshita, Osamu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40598512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】同種心臓弁・大動脈移植後石灰化をリン酸バインダーが抑制するという仮説をたて動物実験で検討した。【方法】BNラットの大動脈をLEWラットの腹部皮下に移植し、通常飼料(N群)、炭酸ランタン(LC)含有飼料(L群)、炭酸カルシウム(CC)含有飼料(C群)の3群に分け各群9匹とし、移植14日後に犠牲死として評価した。【結果】L群とC群で定性的にも定量的にもN群と比べ移植片の石灰化は少なかった。L群よりもC群で有意に高カルシウム血症がみられた。【結語】高リン血症治療薬であるLCおよびCCは移植後石灰化を抑制した。血清カルシウム濃度の変化を考慮すると、LCの方が安全に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：<OBJECTIVES> We hypothesized that phosphate binders, lanthanum carbonate (LC) and calcium carbonate (CC), inhibit calcification of implanted aortic allografts (AAs) in young recipients, and verified this hypothesis. <METHODS> Aorta was harvested from BN rat and implanted into subcutaneous space of LEW rat. Recipient rats were divided into group-N (g-N), group-L (g-L), and group-C (g-C). G-N was fed by normal diets (ND), g-L by ND plus LC, g-C by ND plus CC. The implanted AAs were explanted 2 weeks after implantation and serum sample was taken at sacrifice. <RESULTS> Calcification was significantly inhibited in g-L and g-C than in g-N, qualitatively and quantitatively. Serum Ca of g-C was significantly higher than that of g-N and g-L. Both LC and CC reduced serum Pi significantly. <CONCLUSIONS> Phosphate binders, LC and CC, inhibit calcification of implanted AAs in young rat subdermal implantation model. CC induced significant hypercalcemia and LC has a more potential for clinical use.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

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

同種心臓弁・血管は抗感染性・抗血栓性において人工弁・人工血管より優れ、心臓血管外科領域においては重症感染性心内膜炎・感染性大動脈瘤、人工弁感染症・人工血管感染症、および一部の先天性心疾患で最後の切り札的な使われ方をしている。肝臓外科領域では生体肝移植における静脈系の再建に同種静脈が用いられ、適切な大きさ・形状の静脈片を用いて迅速に再建できることで移植片のうっ血を回避し、また、生体ドナー手術の安全性を高めるのにも貢献している。これら同種心臓弁・血管は心停止後のドナーより提供・摘出され、抗菌処理・トリミングを行った後、液体窒素の気相下で凍結保存して必要時に SHIPPING される。

心臓外科領域では、大動脈弁位の弁輪膿瘍を伴う人工弁感染に対して、同種大動脈基部組織を用いた大動脈基部置換術が行われ、その術前状態の重篤さからは概ね妥当な治療成績であるが、長期的には移植片の劣化などにより再手術を要する例も少なくない。移植後遠隔期には移植片の石灰化が問題となることも多く、同種大動脈移植後石灰化は若年患者において、より高頻度に、より早期に生じてくるのが臨床的に知られており、若年患者の生理的高リン血症がその一因であるとの報告がある。一方、リン代謝は腸管からの吸収と尿中への排泄が大きな割合を占めるが、尿中へのリン排泄が不十分となる慢性腎不全患者で高リン血症が問題となることが多く、腸管からのリン吸収抑制を目的としたリン酸バインダーが慢性腎不全患者には用いられている。

### 2. 研究の目的

上記のような背景をもとに、リン酸バインダーが同種大動脈移植後石灰化を抑制するとの仮説を立て、ラットを用いた動物実験にてこの仮説を検証することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

リン酸バインダーは、近年臨床使用開始された炭酸ランタンと、古くから使用されている炭酸カルシウムを用いた。

4 週齢 BN ラットの動脈を摘出し、直ちに 4 週齢 LEW ラットの腹部皮下に移植した。移植後に与える餌が、通常の餌 (ND)、3% の割合で炭酸ランタンを混じた餌 (3%La)、3% の割合で炭酸カルシウムを混じた餌 (3%Ca) の 3 群に分け各群 9 匹とし、移植 14 日後に犠牲死として移植片と血漿を採取した。移植片の一部はホルマリン固定後、HE 染色、EVG 染色、Von-Kossa 染色を行って病理組織学的に評価した。石灰化の主成分であるリン酸カルシウムを黒染する Von-Kossa 染色において、石灰化の程度を 4 段階の Calcification Score

(0:石灰化なし~3:半周以上石灰化あり)を定めて半定量的に比較検討した。石灰化の定量的評価法として、摘出した移植片を過酸化水素水と硝酸で完全に溶解し、原子吸光度分析法によってカルシウム含有量を測定した。また、血漿中のカルシウム濃度とリン濃度を測定した。数値データは平均±標準誤差で表し、群間の比較には t 検定を用いて  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

なお、この実験に先立ち、リン酸バインダーの含有量や犠牲死までの期間を多数設定して予備実験を行って最適な実験条件を検討し、その結果、含有量 3%、犠牲死まで 14 日間で実験の個体数を増やして検討した。

### 4. 研究成果

病理組織学的には、HE 染色および EVG 染色において、ND 群の多くで中膜弾性板の破壊が見られ、同部位では Von-Kossa 染色で強い石灰化が見られた。一方、リン酸バインダー投与群である 3%La 群と 3%Ca 群ではそのような中膜構造の破壊は軽度であった (図 1)。

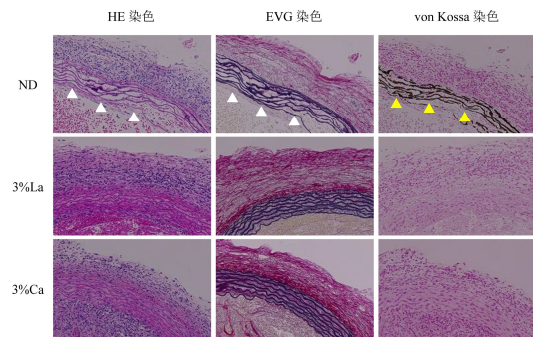


図 1 病理組織像 (HE、EVG、von-Kossa)

Von-Kossa 染色において定めた Calcification Score は ND 群:  $2.6 \pm 0.2$ 、3%La 群:  $1.2 \pm 0.4$ 、3%Ca 群:  $0.8 \pm 0.4$  で、リン酸バインダー投与群で有意に低値であった (図 2)。

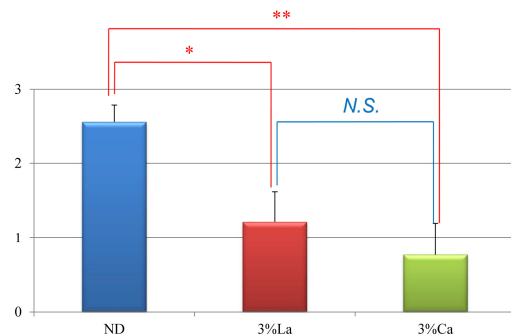


図 2 Calcification Score

Box: 平均、Bar: 標準誤差、n=9

\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

移植片の乾燥重量あたりのカルシウム含有量 (mg/dry・g) は、ND 群: 48.9±8.7、3%La 群: 15.8±3.4、3%Ca 群: 8.9±3.4 で、これも有意にリン酸バインダー投与群で低値であり、リン酸バインダー投与による石灰化の抑制が示唆された (図 3)。

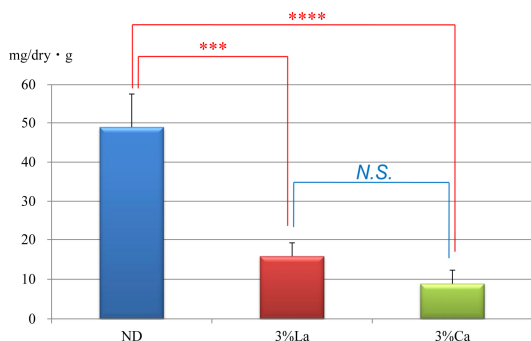


図 3 移植片組織中カルシウム含有量  
Box: 平均、Bar: 標準誤差、n=9  
\*\*\*p < 0.001、\*\*\*\*p < 0.0001

血漿 P 濃度 (mg/dl) と血漿 Ca 濃度 (mg/dl) は、ND 群 / 3%La 群 / 3%Ca 群でそれぞれ、15.4±0.3 / 12.5±0.5 / 11.7±0.4、11.5±0.3 / 12.2±0.2 / 13.5±0.4 であり、ND 群と比べ 3%La 群と 3%Ca 群では同等の血漿 P 濃度低下がみられ (図 4)、3%Ca 群は ND 群および 3%La 群と比べ有意に血漿 Ca 濃度が高値であった (図 5)。

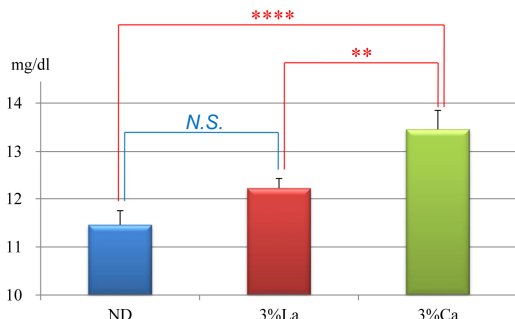


図 4 血漿 Ca 濃度  
Box: 平均、Bar: 標準誤差、n=9  
\*\*p < 0.01、\*\*\*\*p < 0.0001

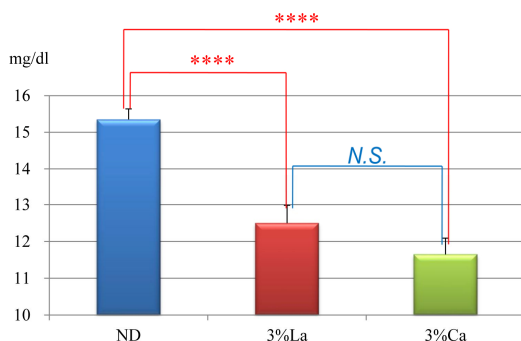


図 5 血漿 P 濃度  
Box: 平均、Bar: 標準誤差、n=9  
\*\*\*\*p < 0.0001

血漿 Ca 濃度と血漿 P 濃度の積 (Ca×P; mg<sup>2</sup>/dl<sup>2</sup>) は、ND 群: 176.5±6.8、3%La 群: 152.3±4.9、3%Ca 群: 157.5±8.8 であった。ND 群が最も高く、3%La 群では ND 群より有意に低値であった。3%Ca 群は ND 群よりも低値であったものの、2 群間に統計学的有意差はみられなかった (図 6)。

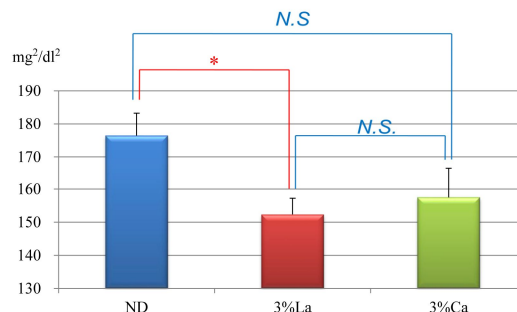


図 6 血漿 Ca 濃度 × 血漿 P 濃度  
Box: 平均、Bar: 標準誤差、n=9  
\*p < 0.05

実験結果よりラット同種異型大動脈皮下移植モデルにおいて、リン酸バインダーである炭酸ランタンおよび炭酸カルシウムは同種大動脈移植後石灰化を抑制することが示唆された。炭酸カルシウム投与群では有意な血漿 Ca 濃度の上昇があり、高 Ca 血症による有害事象が危惧され、炭酸ランタンの方が安全に使用できる可能性があると考えられた。

## 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 5 件)

齋藤 綾、小野 稔、【ここまで進んだ先端医療】外科治療 同種心臓弁・血管、臨床と研究、査読無、88 巻、2011、410-414  
DOI:

齋藤 綾、本村 昇、【移植医療の新展開】各論 組織 同種心臓弁・血管組織移植、外科、査読無、73 巻、2011、1198-1200  
DOI:

Saito A, Motomura N, Hattori O, Kinoshita O, Shimada S, Saiki Y, Kyo S, Ono M. Outcome of surgical repair of aorto-esophageal fistulas with cryopreserved aortic allografts. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 査読有、14 巻、2012、532-537

DOI: 10.1093/icvts/ivr154

Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S. Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. The Journal of Thoracic and Cardio

-vascular Surgery, 査読有、145 巻、2012、522-530

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2012.03.010

齋藤 綾、本村 昇、【感染症症候群(第 2 版)[下]-症候群から感染性単一疾患までを含めて-】敗血症(sepsis、セプシス)、心血管系感染症 心血管系感染症 人工血管感染症、日本臨床、査読無、別冊感染症症候群(下)、2013、65-68

DOI:

〔学会発表〕(計 11 件)

服部 理、織田 乃梨子、田村 純人、齋藤 綾、関 美智子、木下 修、嶋田 正吾、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東京大学医学部附属病院組織バンク、ドナー情報対応休止から再開に至るまでの活動状況、第 10 回日本組織移植学会学術集会、2011 年 8 月 6 日、東京

織田 乃梨子、服部 理、田村 純人、齋藤 綾、関 美智子、木下 修、嶋田 正吾、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東京大学医学部附属病院組織バンク 2004-2010 年におけるシッピング活動状況、第 10 回日本組織移植学会学術集会、2011 年 8 月 6 日、東京

近藤 良一、齋藤 綾、川島 大、本村 昇、小野 稔、Homograft 置換術後に生じた感染性心内膜炎に対し、Bentall 手術を施行した 1 症例、第 10 回日本組織移植学会学術集会、2011 年 8 月 6 日、東京

Aya SAITO, Osamu HATTORI, Michiko SEKI, Yuji SANPEI, Shinichi OZAKI, Haruo YAMAUCHI, Osamu KINOSHITA, Minoru ONO, Noboru MOTOMURA、Cryopreserved Aortic Valve Allograft for Critical Infective Endocarditis - 13-year Follow-up Result-, Society for Low Temperature Biology, 2012 年 10 月 11 日、London, UK

服部 理、関 美智子、三瓶 祐次、田村 純人、齋藤 綾、木下 修、嶋田 正吾、尾崎 晋一、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東大組織バンクドナー情報対応地域拡大に至るまで、第 11 回日本組織移植学会学術集会、2012 年 08 月 04 日、東京

関 美智子、服部 理、三瓶 祐次、田村 純人、齋藤 綾、木下 修、嶋田 正吾、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東京大学医学部附属病院組織バンク 2004-2011 年におけるシッピング活動状況、第 11 回日本組織移植学会学術集会、2012 年 08 月 04 日、東京

三瓶 祐次、関 美智子、服部 理、田村 純人、齋藤 綾、木下 修、尾崎 晋一、山内 治雄、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東京大学医学部附属病院組織バンクドナー情報対応地域拡大後の現状と展望、第 12 回日本組織移植学会総会・

学術集会、2013 年 8 月 3 日、さいたま市 関 美智子、服部 理、三瓶 祐次、田村 純人、齋藤 綾、木下 修、尾崎 晋一、山内 治雄、菅原 寧彦、小野 稔、国土 典宏、本村 昇、東京大学医学部附属病院組織バンク部の業務における最近の工夫、第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会、2013 年 8 月 3 日、さいたま市

本村 昇、田村 純人、齋藤 綾、服部 理、関 美智子、三瓶 祐次、小野 稔、国土 典宏、組織バンクの運営基盤について 東大組織バンクの運営基盤、第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会、2013 年 8 月 3 日、さいたま市

服部 理、田村 純人、関 美智子、三瓶 祐次、齋藤 綾、本村 昇、臓器提供と組織提供の連携-脳死ドナーにおける臓器・組織同時提供症例の報告、第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会、2013 年 8 月 3 日、さいたま市

服部 理、田村 純人、関 美智子、三瓶 祐次、齋藤 綾、本村 昇、臓器提供と組織提供の連携、第 49 回日本移植学会総会、2013 年 9 月 6 日、京都府

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

本村 昇 (MOTOMURA, Noboru)  
東京大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 40332580

齋藤 綾 (SAITO, Aya)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 10431868

(3) 連携研究者

なし