

講座

心臓移植のための心臓保存法の現況

浅利 秀男* 石原 昭*

緒 言

世界初の心臓移植が、1967年、Barnard ら¹⁾によって行われ、その後2～3年の間に欧米諸国において多くの報告があるが、内包する種々の困難な問題のために、心臓移植は1970年代は、数施設で継続されるのみとなっていた。スタンフォード大学の Shumway グループは頭初より、基礎的、臨床的心臓移植を進めてきた。彼らは1968年より1981年までに206例の心臓移植を行い、1968～1973年(66例)では、1, 2, 3, 4, 5年生存率が44%, 35%, 27%, 21%, 18%であったものが、1974～1981年(140例)ではそれぞれ63%, 55%, 51%, 44%, 39%と移植成績の向上を認め、また最長例は12年を経過しているという²⁾。これらの実績に多くを学び、また新しい免疫抑制剤 Cyclosporine A の登場に期待をよせつつ、幾多の問題を残しながらも、近年、心臓移植は再び盛んになりつつある。死に直面した重症心疾患患者に対して、心臓移植が最終の治療手段であることを考慮すれば、本邦においてもその必要性は強調されるべきものと思われる。10年あるいは20年遅れたといわれる本邦における心臓移植研究も、事実近年になり急激に活性化されつつある。著者の一人、浅利は最近約2年間、ニューヨーク州立大学 Rapaport 教授のもとで臓器移植について研究に従事する機会を得た。移植研究分野、とくに心臓保存を中心とした臓器保存分野の研究状況につい

て、最近の文献的考察を加えて、心臓保存の問題点について概説したい。

1. 心臓保存の問題点

心臓移植の成功と普及のためには、移植免疫の解明や手術手技の確立はもとより、心臓保存法の開発は重要な研究課題である。綿密な組織適合検査や遠隔地からの運搬を可能にするためにも、より長時間にわたり、より良質な機能を維持するための心臓保存法が求められている。これらを目標としての心臓移植のための心臓保存法の研究には、①心臓摘出までの臓器提供者(以下 Donor と呼ぶ)の状態が摘出心に及ぼす影響、②死体心臓の蘇生法、③摘出心臓の保存法、④保存後心機能判定法、などが含まれる。現在、脳死の判定基準が確立し、認められている欧米諸国³⁾にあっては、臓器保存の研究課題は前述の③④に重点がおかれている。一方本邦においても死の判定基準設定についての委員会も設置され、この問題に対して機運は高まってきているものの、少なくとも基準が明確にされるまでは、前述の①②についても十分検討を行っていくことが必要と考えられる。本稿ではこれらを踏えて心臓移植のための心臓保存の研究の推移を概観し、現時点において、どのような方法で、何時間くらいまで心臓保存が可能となっているかを中心に考察する。

2. Donor の病態が Donor 心に及ぼす影響

Donor の死戦期の病態が Donor 心に与える障

*北里大学医学部胸部外科

害の検討は、心臓摘出後の保存条件の検討と同様に重要である。Donor 心の受ける障害は死亡様式のちがいで異なってくる。Lundsgaard-Hansen ら⁴⁾は、ウサギを使って、窒息死、脱血死、エーテル過剰投与死の3種類について、心停止15、30、60分後の心筋組織のATP含有量などの心筋代謝学的検討を行っている。それによると、脱血死、エーテル過剰投与死、窒息死の順でDonor心の障害は強かったとしている。Cooper⁵⁾のイヌを用いた実験によると、脱血死による停止心の蘇生は、心停止後45~60分で可能であったが窒息死によるそれに30分ですでに非可逆性障害であったとされている。さらに心停止の30分後における両者の蘇生状態を心機能で観察すると、窒息死の方が脱血死の心臓に比較して、とくにその収縮性において障害が著しいことが示されている。これらの違いは窒息死における心臓は低酸素環境において、負荷の増大する循環系の維持を最後まで強いられるが、脱血死では低酸素状態の進行とともに、循環負荷は少なくなることにであると推察されている。脳死の問題が大きく関与するところであるが、心臓が拍動している状態で心臓摘出が可能となればDonor心の状態は最良であることには論を待たない。その状態で心臓摘出が不可能となれば、心停止を待たねばならない。この場合、考慮しなければならない研究課題である。前述したスタンフォード大学では、心臓が拍動している状態で、心臓摘出が行われている。

Donorのショック状態がDonor心に与える影響についてみると、Rikker ら⁶⁾は、イヌを用いて心停止直前に30分と2時間のショック状態(大動脈圧40mmHg)をつくり、心停止後さらに30分間の温阻血時間において、心臓を摘出し、同種同所性心臓移植を行った実験で、その生存率をみると心停止前に2時間のショック状態をもったDonor心での生存はないことを示した。Griep ら⁷⁾は臨床心臓移植の検討より、心臓摘出前のDonorの状態に移植後、心機能に及ぼすおもな因子は、年齢とショック状態(とくに心停止)の既往の有無であるとしている。

Donorの脳障害がDonor心に与える影響はまだ十分な検討がなされていない。日常の臨床においても、クモ膜下出血、頭蓋内感染、脳内腫瘍病

変などの際、心電図変化のあらわれることは経験されている。Greenhoot ら⁸⁾によると、これらの心電図変化は、脳の刺激によって招来され、長時間の刺激は心筋壊死を起こすことを示し、過剰な交感神経系の興奮が原因のひとつであろうとしている。しかしながらGriep らによるDonor 22例の臨床的検討によると脳障害が移植後の心機能に影響を与えたという事実は認められない。この脳障害の心臓に及ぼす影響に関しては、Donor候補者の多くが脳障害患者であることを考えると、今後より一層の検討が必要と思われる。

3. 死体心臓の蘇生法

臓器としての心臓がどの程度のアノキシアに耐えて蘇生されるかという興味ある観点についてみると、Copeland ら⁹⁾は、イヌにおいて所定時間のアノキシアの後、人工心肺または他のイヌを用いて再灌流させて蘇生状態を検索している。それによると30分のアノキシアでは15分の再灌流で回復がみられ、6時間後にはアノキシア前と同じ程度の回復をみ、45分のアノキシアでは再灌流2時間で一部は回復、あるものは回復せず、また60分のアノキシアでも45分の場合と同様であったとしている。これらの所見は心機能の回復の程度と相関したとし、45分未満のアノキシアであれば、心臓の障害は可逆的で蘇生しうるとしている。この30分~45分が一般的にアノキシアの限界とされている。この時間を越えるための補助的手段の開発が臓器保存分野で進められている。死体心の蘇生法としては、1895年Langendorffの冠灌流による蘇生が、*in vitro*での心蘇生の最初とされている。Domikhov¹⁰⁾による死後1~2時間の心蘇生の報告もあるが、Shumway ら¹¹⁾の陽圧呼吸と人工心肺を用いての死後60分間の停止心で70%の心蘇生、2時間では心機能の回復はみられなかったとしている。Liotta ら¹²⁾は脱血死後、全身灌流法にて死後5~79分の心蘇生に18例全例成功している。Lasar と Buckberg ら¹³⁾はアミノ酸を含んだ心停止液で再灌流すると45分のアノキシアを持った心臓でも心機能がよく維持されることを示している。現在のところ蘇生可能な死後時間は定説はないが、45分が一般的である。

4. 虚血に伴う細胞障害

虚血中に進行し、死に向かう心筋細胞の形態学的変化は、筋原線維の弛緩、グリコーゲンの進行性喪失、核クロマチンの凝集、そしてミトコンドリアの変化（マトリックススペースの増大、クリステの破壊、大きな顆粒の出現、膨隆やがて破裂）などである。代謝学的な変化は ATP の不十分な生産、補酵素の喪失乳酸の蓄積、著明な浮腫、電解質変化（細胞内 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} の増大、 K^+ 、 Mg^{2+} の減少）などである。これらの変化はイスの心臓では約15分後にはじまり60分くらいで完了し、この時点でほとんどの細胞は死に至る¹⁴⁾。虚血細胞障害が進行する中において、いつからが非可逆性変化がはじまるかという、いわゆる point of noreturn を明確にとられることは臓器保存にとって欠かせないところであるが、未だ定説はなく、今後の研究成果に期待するところである。ATP 減少でみると 15, 30, 45, 60分での虚血組織内の ATP は、35, 9, 7, 5%と虚血前のレベルに比較して減少する。ATP の減少と非可逆性障害の進行が平行していることが示されている¹⁴⁾。虚血障害のいくつかの原因としては、細胞性アンドロシス¹⁵⁾、ライソゾームの変化¹⁶⁾筋小胞体の Ca^{2+} 遊離機構の破壊¹⁷⁾などがあげられている。アノキシアによって起こる pH の低下がライソゾームから水解酵素の細胞内への遊離を起こすといわれているが、今のところ虚血中のライソゾーム変化は障害の一次的な原因ではないともいわれ¹⁷⁾議論の多いところである。最近、虚血細胞障害の進行に関与する Ca^{2+} 依存性酵素の活性化に細胞内カルモデュリン¹⁸⁾が大きく関与している可能性を示唆する報告がある¹⁹⁾。つまり Ca^{2+} は単独では諸酵素を活性化せず、カルモデュリンと結合して、 Ca^{2+} ・カルモデュリン複合体となつてはじめて諸酵素を活性化することが示されている²⁰⁾。そのひとつの例として Ca^{2+} ・カルモデュリン複合体がホスフォリパーゼを活性化し、膜のリン脂質を分解する結果、ライソゾーム膜障害を起こさせるのではないかとされている¹⁹⁾。虚血細胞障害の可逆性から非可逆性変化への移行の過程はまだ明らかでないが、主として細胞膜の障害が関与しており、膜の強靱性を保護することが、虚血細胞障

害の進行を遅らせるのではないかとされている¹⁷⁾。臓器保存分野において膜安定物質の保護的効果を期待する研究が盛んに行われているのが現状である。

5. 心臓保存法

心筋の非可逆性変化の明らかな原因は未だ議論の多いところであるが、障害は心臓の代謝に必要な物質を十分に供給できないために生ずることは事実である。したがって非可逆性障害の進行を遅延させるか、防止するために組織の代謝率を下げるか、あるいは酸素や栄養素を供給させ、しかも代謝率を低下させることが臓器保存にとっては必須の手技手段となる。代謝率を下げることによって期待される保存期間は代謝率をどの程度まで下げるかによって決定される。冷却（単純低体温）と化学的代謝抑制物質および膜安定物質の使用は虚血障害の進行を遅らせる。灌流による酸素と栄養素の供給は長期保存を約束する可能性をもっている。またすべての生物学的活性を停止させようとする冷凍保存は無制限の保存時間を期待できるかもしれない。これらの保存法、① 単純冷却保存法、② 灌流保存法、③ 冷凍保存法、について述べる。

① 単純冷却保存法：もっとも単純な保存法で、低温による細胞の代謝率の低下を期待しての保存法である。代謝率の低下の程度は10℃で90%といわれている²¹⁾。心機能の回復が可能とされる程度からみた虚血許容時間は、37℃で10分間であるものが、10℃以下では60分、2～4℃の生食水の中では6～8時間と延長するとされている²²⁾。低温がアノキシアに対して偉大な保護作用を示すが、それに加えて薬物の使用、または保存液の組成によって、より代謝率を下げることを示されている。Melrose²³⁾によって提唱された高K液の虚血細胞障害に対する保護効果を得る保存液、また、いわゆる細胞内液に類似した保存液（Collins 液²⁴⁾、Sacks 液²⁵⁾）などがある。Reitz ら²⁶⁾によると Collins 液を用い4℃にて24時間保存後、心臓移植を行い、その心機能の良好な回復をみている。24時間生食水で保存したものでは心機能の回復はみられておらず、保存液の組成の重要性を裏づけている。現在まで細胞内液に類似したイオン組成

の液が保存液として良好とされているが、各イオン濃度、滲透圧、pH などについても定説はなく、いろいろと検討されているのが現状である。現時点で多く使用されている Collins 液と Sacks 液の組成を表 1 に示す。

表 1. 代表的な臓器保存液

	Collins C ₂ 液	Sacks 液
Na ⁺	10mEq/L	15mEq/L
K ⁺	115 "	143 "
Mg ²⁺	60 "	16 "
Cl ⁻	15 "	16 "
Ca ²⁺	—	—
HCO ₃ ⁻	10 "	38 "
SO ₄ ²⁺	60 "	—
Phosphate	100 "	120 "
Glucose	140mM	—
Mannitol	—	206mM

表 2. 膜安定物質と代謝抑制物質

A) 膜安定物質	
	Methylprednisolone
	Allopurinol
	Chlorpromazine and Trifluoperazine
	Glutathione
	Phenoxybenzamine
	Chloroquine
	Calcium
	Cholesterol
B) 代謝抑制物質	
	Allopurinol
	Hypoxanthine
	Chlorpromazine
	Methylprednisolone
	Magnesium sulfate
	Oxalic acid and malonic acid

代謝抑制物質または膜安定物質としては、表 2 にみるように種々検討されている²⁷⁾。これらは虚血前に投与されると、より保護的效果があるといわれている。最近では Ca²⁺ 拮抗薬、ATP 製剤、カルモデュリン抑制物質²⁸⁾などの薬物の保護的效果についての研究が盛んに行われている。現在のところ単純冷却保存法は、これらの種々の研究成果の組み合わせによって24時間の保存が可能となっている。

② 灌流保存法：灌流保存法では灌流液の組成、温度、灌流圧などが問題となる。Toledo-Pereyra²⁹⁾によると、7, 15, 30℃のそれぞれで24時間保存後の異所性心臓移植でその生着率をみると、100%, 60%, 0%であったとし、灌流法においても低温の重要性を強調している。至適温度に関しては、液の組成によるともいわれている³⁰⁾。現在までのところ Copeland³¹⁾や Proctor³²⁾によって24~72時間の保存が得られている。また室温で6~9日間保存に成功したという報告もある³³⁾。しかしながら高い確率で、長期保存を成功させるには、灌流液の組成、温度、灌流圧、などの検討が今後さらに必要と思われる。

③ 冷凍保存法：細胞の冷凍保存の進歩に比較して、冷凍生物学的手法を用いての冷凍心臓保存法は、まだ確立されていない。これは心臓の大きさと形および種々の細胞の混在のため、至適冷凍条件が得られないためである³⁴⁾。-20℃、-78℃または-196℃などの冷凍温度の問題、冷凍速度および解凍速度の問題、凍害保護物質〔グリセロールまたは DMSO (dimethyl sulfoxide)]の使用法³⁵⁾、保存液のイオン濃度および滲透圧の問題³⁶⁾および thermal ショックの問題³⁷⁾などについて研究が進められている。これまでのところ、この保存法による保存後、良好な心機能を備えた心臓はえられてない^{36, 37)}。

以上要約すると、数時間の保存は単純冷却保存法で可能である。この保存時間は高 K⁺、低 Na⁺の保存液で24時間までは可能である。灌流保存法では最長9日間の保存成功例の報告もあるが、24~72時間の保存が高率の成功を収めている。冷凍保存法による成功例はまだ得られていない。

6. 保存後心機能判定法

Donor 心が移植後、レシピエントの生命を維持しうる機能をもっているかどうかを適格に判定することは、心臓移植を成功させるためには必須の事柄である。残念ながら、現在のところ正確に判定する唯一の方法はない。表 3 にまとめた種々の手段を用いて総合的に判断されている。臨床応用にあたっては、動物実験において同所性移植を行って完全に生命を維持できた保存条件の範囲内で行っていくというのが実際の現状である。正確な判定法の開発がのぞまれるところである。

表 3. 保存後心機能判定法

- ① 摘出前の状況：温阻血時間の有無
- ② 灌流状態：灌流圧、液の変化（酵素、pH、乳酸、など）
- ③ 組織学的検査
- ④ 生理学的検査（心機能判定回路を用いて）
 - (i) 心拍数 (ii) 心拍出量 (iii) 左室仕事量
 - (iv) 電気的活動性 (v) 血管抵抗
- ⑤ 細胞試験（細胞の生存性をみる基本手法）
 - (i) Cell-cell tight junction
 - (ii) membrane permeability
 - (iii) Cytoplasmic enzyme activity
 - (iv) membrane transport
 - (v) energy metabolism
 - (vi) cell volume regulation
 - (vii) growth or survival in culture

結 語

心臓移植のための心臓保存分野での研究課題について述べた。これらの課題は本邦においても広く行われている腎臓移植分野にもあてはまり、移植学の進歩と確立にとって重要な課題となっている。本邦での心臓移植を可能、普及させるためには、脳死の判定基準の確立とその容認が急務である。いかに長期保存の技術を進歩させても完全な停止心を蘇生させて心臓移植を成功させるのには大変な努力を必要とすると考えられる。

なお、本稿の発表の機会を与您にいただき、ご指導を賜った北里大麻酔科劔物修助教授（現東邦大学医学部麻酔科学教室教授）に感謝します。

文 献

- 1) Barnard, C.N.: A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S. Afr. Med. J.* **41**: 1271~1274, 1967.
- 2) Pennock, J.L., Oyer, P.E., Reitz, B.A., Jamieson, S.W., Bieber, C.P., Wallwork, J., Stinson, E.B., Shumway, N.E.: Cardiac transplantation in perspective for the future. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **83**: 168~177, 1982.
- 3) Veith, F.J., Stuart, F.P., Cranford, R.E., Tendler, M.D.: New developments in the use and recognition of brain death in the United

- States and other countries. *Transplant. Proceed.* **13**: 689~692, 1981.
- 4) Lundsgaard-Hansen, P., Schilt, W., Heitmann, L., Oroz, M., Buchler, A., Lemeunier, A.: Influence of the agonal period on the postmortem metabolic state of the heart. *Ann. Surg.* **174**: 744~754, 1971.
- 5) Cooper, D.K.C.: A simple method of resuscitation and short-term preservation of the canine cadaver heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **70**: 896~908, 1975.
- 6) Rikkers, L.F., Chartrand, C., Angell, W.W.: Donor shock and its influence on canine cadaver heart transplants. *Chest* **59**: 428~432, 1971.
- 7) Griep, R.B., Stinson, E.B., Clark, D.A., Dong, E., Shumway, N.E.: The cardiac donor. *Surg. Gynecol. Obstet.* **133**: 792~798, 1971.
- 8) Greenhoot, J.H., Richenbach, D.D.: Cardiac injury and subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **30**: 521~531, 1969.
- 9) Copeland, J., Kosek, J.C., Hurley, E.J.: Early functional and ultrastructural recovery of canine cadaver hearts. *Circulation* (Suppl. 2) **37**, **38**: 188, 1968.
- 10) Demikhov, V.P.: Experimental transplantation of vital organs. Authorized translation from the Russian by Basil Haigh. New York: consultant Bureau, 1962.
- 11) Wuerflein, R.D., Shumway, N.E.: Resuscitation and function of the cadaver heart. *Circulation* (Suppl. 3) **34**: 241~242, 1966.
- 12) Liotta, D., Ross, J.N., Mayfield, E.: Resuscitation and preservation of the canine heart for homotransplantation. In: Organ Perfusion and Preservation. Edited by J.C. Normans, Appleton-Cantury-Crofts, New York, p.251~253, 1968.
- 13) Lazar, H.L., Buckberg, G.D., Manganaro, A.M., Becker, H.: Myocardial energy replenishment and reversal of ischemic damage by substrate enhancement of secondary blood cardioplegia with amino acids during reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **80**: 350~359, 1980.
- 14) Jennings, R.B., Hawkins, H.K., Lowe, J.E., Hill, M.L., Klotman, S., Reimer, K.A.: Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am. J. Pathol.* **92**: 187~214, 1978.
- 15) Ricciutti, M.A.: Lysosomes and myocardial cellular injury. *Am. J. Cardiol.* **30**: 498~504, 1972.
- 16) Fox, A.C., Hoffstein, S., Weissman, G.: Lysosomal mechanisms in production of tissue damage during myocardial ischemia and effects of treatment with steroids. *Am. Heart J.* **91**: 394~399, 1976.

- 17) Schmartz, A., Wood, J. M., Allen, J. C., Barnet, E. P., Entman, M. L., Goldstein, M. A., Sordhl, L. A., Suzuki, M.: Biochemical and morphological correlates of cardiac ischemia. *Am. J. Cardiol.* **32**: 46~61, 1973.
- 18) Cheung, W. Y.: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**: 19~27, 1980.
- 19) Trump, B. F., Berezesky, I. K., Cowley, R. A.: The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia. Edited by R. Cowley and B. F. Trump, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 6~46, 1982.
- 20) Carafoli, E.: Membrane transport and the regulation of the cell calcium levels. In: Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia. Edited by R. Cowley and B. F. Trump, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 95~112, 1982.
- 21) Furman, G. J., Fuhrman, F. A.: Effect of temperature on metabolism of glucose *in vitro*. *Am. J. Physiol.* **207**: 849~858, 1964.
- 22) Lower, R. R., Stofor, R. C., Hurley, E. J., Dong, E., Cohn, R. B., Shumway, N. E.: Successful homotransplantation of the canine heart after anoxic preservation for seven hours. *Am. J. Surg.* **104**: 302~308, 1962.
- 23) Melrose, D. G.: Elective cardiac arrest. *Lancet* **2**: 21, 1955.
- 24) Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M., Terasaki, P. I.: Kidney preservation for transportation. *Lancet* **1**: 1219~1220, 1969.
- 25) Sacks, S. A., Petritsch, P. H., Kaufman, J. J.: Canine kidney preservation using a new perfusate. *Lancet* **1**: 1024~1025, 1973.
- 26) Reitz, B. A., Brody, W. R., Hickey, P. R., Michaellis, L. L.: Protection of the heart for 24 hours with intracellular (high K⁺) solution and hypothermia. *Surg. Forum* **25**: 149~151, 1974.
- 27) Chatterijee, S. N.: Pharmacologic agents of potential value in protecting kidney from ischemic damage. *Transplant. Proceed.* **9**: 1579~1582, 1977.
- 28) Asari, H., Anaise, D., Bachvaroff, R. J., Sato, T., Rapaport, F. T.: Preservation techniques for organ transplantation. *Transplant.* **37**: 113~114, 1984.
- 29) Toledo-Pereya, L. H., Chee, M., Lillehei, R. C.: Effect of temperature upon heart preservation for transplantation. *Cryobiol.* **15**: 551~556, 1978.
- 30) Athreya, B. H., Coriell, L. L., Greene, A. E., Lehr, H. B.: *In vitro* preservation of functioning rabbit heart in a depolarised state at +4°C. *Cryobiol.* **5**: 403~408, 1969.
- 31) Copeland, J. G., Stinson, E. B.: Evaluation of hypothermic perfusion for 24 hour preservation of canine heart. *Transplant. Proceed.* **6**: 311~313, 1974.
- 32) Proctor, E., Matthews, G., Archiband, J.: Acute orthotopic transplantation of hearts stored for 72 hours. *Thorax* **26**: 99~102, 1971.
- 33) Linask, J., Votta, J., Wills, M.: Perfusion preservation of hearts for 6 to 9 days at room temperature. *Science* **199**: 299~301, 1978.
- 34) Alink, G. M., Verheul, C. C., Offerijns, F. G. J.: Isolation and low temperature preservation of adult rat heart cells. *Cryobiol.* **14**: 399~404, 1977.
- 35) Karow, A. M., Jr., Webb, W. R., Stapp, J. E.: Preservation of heart by freezing. *Arch. Surg.* **92**: 575~581, 1965.
- 36) Fahy, G. M., Karow, A. M., Jr.: Ultrastructure-function correlative studies for cardiac cryopreservation. *Cryobiol.* **14**: 418~423, 1977.
- 37) Armitage, W. J., Pegg, D. E.: Cryoprotection of rabbit heart. In: Organ Preservation II, D. E. Pegg and I. A. Jacobsen, Eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 175~192, 1979.