

虚血/再灌流障害における
HBO の apoptosis 抑制と細胞増殖効果の検討

2016 年 3 月

九州保健福祉大学大学院

(通信制) 保健科学研究科

博士 (後期) 課程

保健科学専攻

D211007・右田 平八

要旨

虚血/再灌流障害における HBO の apoptosis 抑制と細胞増殖効果の検討

Hyperbaric oxygen therapy to suppresses apoptosis and promote renal tubular regeneration after renal ischemia/reperfusion injury in rats.

保健科学研究科博士（後期）課程

D211007 右田 平八

キーワード：高気圧酸素治療, 虚血/再灌流障害, 抗 Ki-67 抗体, アポトーシス, TUNEL 法

key words : hyperbaric oxygen therapy, ischemia-reperfusion injury, Ki-67, apoptosis, TdT-mediated dUTP nick end labeling

【目的】

急性腎障害 (AKI) は急激な腎機能の低下の結果、体液の恒常性が維持できなくなった状態である。AKI の生命予後は悪く、特に尿細管壊死によるものでは、原因を除去しても直ちには腎機能が回復せず有効な手段はないと報告されている。AKI が持続する場合には、腎機能の低下から深刻な病態へと進行することが知られている。有川らは、AKI を含む多臓器不全に対して HBO が有効であることを報告しているが、AKI 治療ガイドラインによる腎臓の治療に HBO は推奨されていない。このような背景から、本研究では、HBO の適応疾患として AKI に着目した。HBO は、虚血/再灌流 (I/R) 障害における尿細管損傷、および炎症の重症度を軽減することが先行研究で示されている。しかし、HBO による細胞死の抑制と細胞増殖の亢進については検証されていない。

今回、腎 I/R 障害に対する HBO の影響を確認するため、組織の形態観察に加えて、TUNEL と抗 Ki-67 抗体を用いてそれぞれ apoptosis と細胞増殖について検討した。

【対象および方法】

1. 実験動物と対照群

SD ラットを無作為に Sham 群、I/R 群、I/R +HBO 群の 3 群 (各群 n = 10) に選んで行った。動物飼育室では急激な温度と湿度変化が起きないように温度 (24 ~ 26℃) と湿度 (40 ~ 70%) を空調管理し、餌と水は自由に摂取した。I/R の 24 時間、48 時間後に安楽死させて標本作製した。当該の動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号 1973 年) を遵守し、九州保健福祉大学内の動物実験委員会の承認 (受付番号 25105) を得て行った。特記する利益相反 (COI) はない。

2. 外科的手順

ラットの麻酔は、ペントバルビタール (pentobarbitone: 50 mg/kg) を注射器で腹腔内に

投与し、術野の剃毛、皮膚をエタノール消毒後に直腸温度が 34 ～ 36°C に維持するように加温テーブル上に置いて体温調節した。痛覚が無いことを確認して、腹部正中切開を実施した。右腎摘出には、尿管と腎動静脈をそれぞれ糸で 2 ヶ所結索し、結索した中間をハサミで切断し、副腎や脂肪等を剥離して腎臓を摘出した。次に左腎動静脈を非外傷性クリップ (Fine Science Tools Inc., Foster City, CA) で 30 分間クランプすることにより虚血を誘導した。クランプを解除した後、1 分以内の再灌流を視覚的に確認して切開部を縫合した。Sham ラットは同様に開腹して腎臓を露出したが、右腎摘出と左腎虚血を行わずに腹部を縫合した。

3. HBO 処置

I/R +HBO 群は動物実験用 HBO 装置 (Barotec Hanyuda P-5100 Tokyo, Japan) を使用して 2.5 気圧下 (酸素濃度 100%) で 60 分間の HBO 処置を施行した。

4. HE 染色

病理組織の一般的染色法である HE 染色を用いて、細胞および組織構造を光学顕微鏡で全体像の把握を行い、組織の形態観察を目的に行った。

5. apoptosis 標識

apoptosis の標識には、TUNEL を用いた。染色は、ラベリング反応、次いで抗体反応、発色反応の各工程で行い、封入後に光学顕微鏡で観察し、四塩酸塩 (3,3'-Diaminobenzidine, Tetrahydrochloride: DAB) による反応で核内に黒褐色に発色を認めるものを陽性とした。

6. 抗 Ki-67 抗体二重染色

Ki-67 は細胞周期関連核タンパク質で、増殖中の細胞で発現する。増殖を休止している G 0 期においては存在しないので、細胞増殖のマーカーとして用いられている。染色は、抗 Ki-67 抗体で 1 次反応させ、Alexa 488 Rabbit で 2 次反応させた後に核染色 (DAPI) を行った。陽性細胞は抗 Ki-67 抗体と DAPI を組合せ、蛍光観察で発光した陽性細胞のみをカウントした。

7. 組織形態観察

標本を、デジタルカメラを備えた光学顕微鏡を用い、接眼レンズ (10x) に対物レンズ (10x、20x、40x) を組合せて各群の皮質、髄質を観察した。観察記録として、それぞれの皮質、髄質をデジタルカメラで撮影し、撮影条件を露出時間 1.2 秒、ISO 感度 400 とし、JPEG ファイル方式で保存した。TUNEL と Ki-67 陽性細胞数は 1 標本中の計測を 10 視野で行い、全標本の 1 視野 (240 mm × 180 mm) 毎の平均値を求めた。

8. 統計分析

数値は平均値 ± 標準偏差 (mean ± SD) で表示し、グラフは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で示した。統計学的解析には、統計ソフトウェア Stat Mate IV (ATMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。TUNEL 陽性細胞数と Ki-67 陽性細胞数の計測は、Sham 群、I/R 群、I/R +HBO 群で行った。3 群間の比較には、Tukey 法を用いた。

有意水準 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

1. HE 染色

I/R 24 時間後の皮質の観察では、エオジンに濃染し、微絨毛を有する大型細胞からなる近位尿細管と細胞境界明瞭な遠位尿細管を観察した。I/R と I/R +HBO の皮質の尿細管と腎小体の形態変化は明瞭には観察されなかった。髓質では、I/R の尿細管の膨化、近位尿細管の刷子縁・基底陥入の消失が観察された。また、脱落細胞による壊死様の核変化、尿細管腔の拡張、尿管腔の崩れが観察された。I/R +HBO の髓質は尿細管組織が比較的良好に保たれていた。

2. TUNEL 陽性細胞

TUNEL は、Sham の皮質と髓質で発現が観察されなかった。I/R の皮質では、尿細管上皮細胞で多く観察された。また、髓質でも尿細管上皮細胞に TUNEL 陽性細胞を多く観察した。I/R +HBO では、皮質と髓質に発現を観察したが、I/R に比べて発現が少なかった。I/R +HBO は、皮質と髓質で I/R と比較して発現数の減少が認められた。

皮質および髓質において、I/R +HBO 群は I/R 群と比較し、apoptosis を有意に抑制した。

3. Ki-67 陽性細胞

Sham の抗 Ki-67 抗体の発現は、皮質と髓質の尿細管上皮で少数が散在的に観察された。I/R は皮質と髓質で発現が観察された。I/R +HBO は発現した細胞が I/R に比べて多く観察された。I/R +HBO は、皮質と髓質で I/R と比較して発現数の増加が認められた。

皮質での有意差は、Sham と I/R に有意差があった。また、Sham と I/R +HBO で有意差があった。I/R と I/R +HBO に有意差があった。髓質での有意差は、Sham と I/R で有意差があった。また、Sham と I/R +HBO で有意差があった。I/R と I/R +HBO に有意差があった。

【考察】

HBO を腎 I/R 後に行うことで、apoptosis は有意に抑制された。腎組織の形態観察では、I/R 群は壊れた組織が頻繁に観察され、I/R +HBO 群では I/R に比べて崩れた組織が少なく観察された。一因として、低酸素組織への酸素供給は、組織周囲の血液循環に依存しており、HBO によって上昇した酸素拡散能と増加した溶解型酸素によって低酸素組織に酸素供給が効率よく供給されたと考えられる。

apoptosis については、apoptosis 陽性細胞を TUNEL で評価したところ、I/R と比べて I/R +HBO で有意に抑制されていた。HBO で処置したラットは I/R に比べて TUNEL が少ないことから、apoptosis の抑制に関与していることが推察された。また、apoptosis について、Sharples らは、造血因子である erythropoietin (EPO) の産生で I/R 障害後の apoptosis を減少したという EPO の抗 apoptosis 効果を報告した。その機序として、I/R 障害に起因する caspase-3、caspase-8、および caspase-9 の活性を抑制することを証明している。

これらを今回の実験と照合すると、HBO が造血因子に係わることから apoptosis 抑制に関連していることが推測される。しかし、現段階では、HBO が apoptosis 開始段階の

caspase-8 と実行段階の caspase-3 を活性抑制することは確認されていない。抗 Ki-67 抗体については、I/R の抗 Ki-67 抗体の発現は少なく、I/R +HBO では、I/R に比べて多く発現した。I/R には尿細管の崩れが多いことから、早期に細胞周期に進行すると予測したが発現は少なかった。これは、I/R により損傷を受けた核の細胞周期が長くなり、修復前に細胞死に至ることが推測された。I/R の尿細管細胞増殖のダイナミックな評価には、抗 Ki-67 抗体が有効である。しかし、染色強度をどのレベルで陽性とするかによって陽性率が大きく変わることが懸念される。

I/R 障害に選択した腎臓は他臓器と比べると解剖学的、機能的に複雑であり、未解明な部分が多い。しかし、HBO は細胞障害とその回復過程において重要な役割を果たす蓋然性があり、細胞組織に正常な尿細管、または残存した上皮細胞を量的、機能的に残すことが腎障害の進行を抑制する上で重要である。

【結論】

腎 I/R 障害に対して行う HBO は、I/R 障害後の apoptosis を抑制し、尿細管上皮細胞の再生を亢進させる可能性がある。

Abstract

D211007 Heihachi MIGITA

Background: Renal ischemia/reperfusion (I/R) injury remains a major cause of acute kidney injury (AKI). In addition, I/R injury induced tissue inflammation, necrosis and apoptosis.

Apoptotic cell death has been documented in animal models and human biopsies after renal I/R, and inhibition of apoptotic signaling and cell death ameliorates the associated injury and inflammation in a murine model.

Wen et al demonstrated in the study using the monoclonal antibody, Ki-67 that tubular cell regeneration and proliferation were important element of renal recovery in AKI.

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is defined as a treatment in which a patient intermittently exposed to 100% oxygen while the treatment chamber is pressurized to a tow ATA. HBO has been used in medical conditions with a proven efficacy in a limited number of disorder. However, the effects of HBO on apoptosis and proliferative activity after I/R injury have not been fully understood. We studied possible beneficial effects of HBO on apoptosis and tubular cell regeneration after renal I/R injury in rats.

Material and Methods: Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into three groups: sham, sham operated rats; I/R, animals submitted to I/R; and I/R +HBO; I/R rats exposed to HBO. Tubule cell apoptosis was confirmed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) assay. Cellular proliferation activity was determined using anti-Ki-67 antibody.

Results: Significant decrease in apoptotic cells and increase in proliferative reaction were observed in I/R +HBO group compared to I/R group.

Discussion: Several studies showed the beneficial effects of HBO on the histopathological changes after renal I/R. Cellular death that occurs after I/R injury was morphologically divided into apoptosis and necrosis, both of which is positioned as different cellular death. The apoptotic cells show the various morphological changes as chromatin aggregation, fragmentation of DNA, and cell membrane blebs in the early stage and finally disappear by phagocytosis.

By continuing the death of two types of cells, renal failure is sustained and leads to poor prognosis. Apoptosis in the caspase cascade, initiator and effector are stimulated to cause to activate the cascade and induce irreversible apoptosis. That the distal tubule is easily injured by I/R is consistent with previous study by Kreisberg *et al.* although exact mechanism might not be fully explained at the moment.

Apoptotic cells by TUNEL method 24 hours after I/R injury were significantly observed in the distal tubule of the cortex and medulla in I/R groups, not observed in I/R+HBO group suggesting that HBO treatment inhibited the activity of caspases.

The following several studies support our findings in this study.

Sharples E *et al.* reported biochemically and histologically that erythropoietin prevented caspase-3,-8, and -9 activation *in vivo* and reduced apoptotic cell death caused by renal I/R in rats. Wang W *et al.* showed that netrin-1, a diffusible laminin-related protein, protected renal tubular epithelial cells against renal I/R by suppressing apoptosis and increasing proliferation in transgenic mice. In addition, suppression of apoptosis induced by renal I/R prevented inflammation using a murine model. Wen X *et al.* described that tubular cell regeneration and proliferation is important element of renal recovery in acute renal injury. The mechanisms involved in the protection by HBO against renal I/R remains unclear. However, HBO would attenuate apoptosis through the caspase cascade after I/R injury in the ischemic region.

Further studies will be necessary to elucidate the precise mechanism of HBO and repaired pathway including apoptosis after renal I/R injury.

Conclusion: We demonstrated that HBO suppressed apoptosis which caused inflammation after renal I/R and promoted the tubular cell regeneration. HBO has protective effects against AKI caused by renal I/R thorough the inhibition of apoptosis.

目次

虚血/再灌流障害における HBO の apoptosis 抑制と細胞増殖効果の検討.....	2
I. 要約	3
II. 緒言	6
略語一覧	8
III. 材料及び方法.....	9
1. 実験動物と対照群	10
2. I/R モデルラット作製.....	10
3. 外科的手順.....	11
4. HBO の施行	12
5. 標本作製	14
6. HE 染色.....	15
7. TUNEL	15
8. 抗 Ki-67 抗体染色.....	16
9. 組織形態解析	17
10. 統計分析	17
IV. 結果	18
1. HE 染色.....	19
2. TUNEL 陽性細胞	20
3. 抗 Ki-67 抗体陽性細胞.....	22
V. 考察	24
VI. 結論	27
引用文献.....	29
謝辞	31

虚血/再灌流障害における HBO の apoptosis 抑制と細胞増殖効果の検討

I. 要約

【目的】

高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy: HBO) は、腎虚血/再灌流 (ischemia / reperfusion: I/R) 障害における尿細管損傷および炎症の重症度を軽減することが先行研究で示されている。しかし、HBO による細胞死の抑制と細胞増殖の亢進については述べられていない。今回、I/R に対する早期の HBO の影響を確認するため、組織標本を作製して形態観察を行い、免疫染色法を用いて apoptosis と細胞増殖について検討した。

【対象と方法】

SD 系雄性ラットを無作為に Sham 群、I/R 群、I/R 後に HBO で処置した (I/R +HBO) 群の 3 群に選んで行った。I/R は右腎摘出後に左腎動静脈を非外傷性クリップで 30 分間虚血した後、再還流を行った。I/R +HBO は虚血開始から 60 分後に 2.5 気圧の HBO を行った。I/R の 24 時間後、48 時間後に安楽死させて標本を作製した。組織の染色は、形態観察に hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。apoptosis 標識には断片化 DNA 末端標識法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling: TUNEL) を行った。細胞増殖の標識には抗 Ki-67 抗体染色法を用いた。標本の観察には光学顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。TUNEL 陽性細胞数、および Ki-67 陽性細胞数について、3 群間で比較した。有意水準 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

HE 染色では、I/R の皮質の形態変化は明瞭に観察されなかった。髄質では、尿細管の崩れの形態変化を観察した。I/R +HBO では、皮質の形態変化は明瞭に観察されなかった。しかし、髄質では、I/R に比べて尿細管組織が比較的良好に保たれていた。TUNEL は、I/R の皮質と髄質に多くの発現を認めた。I/R +HBO 群では、I/R と比較して、皮質と髄質に発現の減少が認められた。抗 Ki-67 抗体の発現は、皮質で Sham と I/R、I/R +HBO の双方に有意差があった。また、I/R と I/R +HBO にも有意差があった。髄質では、Sham と I/R、I/R +HBO の双方に有意差があった。また、I/R と I/R +HBO にも有意差があった。I/R と比較すると I/R +HBO は皮質と髄質に発現の増加が認められた。

【考察】

HBO を腎 I/R 後に行うことで apoptosis は有意に抑制された。腎組織の形態観察では、I/R 群では崩れた組織が頻繁に観察され I/R +HBO 群では I/R 群に比べて崩れた組織が少なく観察された。apoptosis 発現、Ki-67 の発現において腎臓障害に対して有意に作用したと考えられた。腎組織の形態観察では、低酸素組織への酸素供給が HBO で行われたと推測した。よって、I/R +HBO では、組織の崩れが抑えられる傾向を示した。

TUNEL では HBO が apoptosis を抑制していることが推測された。しかし、現段階では、HBO が apoptosis に関連することは確認されていない。抗 Ki-67 抗体の発現は尿細管細胞増殖のダイナミックな評価に有効であった。しかし、染色強度の選定基準で陽性率が大きく変わることが懸念される。確実性を高めるには、抗 Ki-67 抗体の発現とフローサイトメトリーのデー

タと照合して検討する必要がある。あるいは、細胞周期の初期に発現する蛋白 (minichromosome maintenance protein: MCM) に対する免疫染色と組み合わせて検討する必要がある。今回の検証から、HBO には細胞増殖を強化する可能性がある。しかし、細胞が再生するためには組織の崩壊か脱分化がなければならない。本研究ではその状態を見ていないため、今後更なる研究が必要である。そして、I/R モデル自体における差異で虚血時間やタイミング、HBO の開始時間、HBO 施行回数等、詳細な検討も必要である。HBO は細胞障害とその回復過程において重要な役割を果たす蓋然性があり、細胞組織に正常な尿細管、または残存した上皮細胞を量的、機能的に残すことが腎障害の進行を抑制する上で重要である。

【結語】

腎 I/R 障害に対して行う HBO は、I/R 後の apoptosis を抑制し、尿細管上皮細胞の再生を亢進させる可能性がある。

Ⅱ. 緒言

19 世紀中期のフランスの生理学者 Paul Bert (1833 - 1886) は異常な気圧に関する研究で偉大な業績を挙げて“father of pressure physiology”と讃えられ¹⁾、高気圧生理学と治療学の基礎を築いた。そして、高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy: HBO) の効用、酸素中毒などについて研究を行った。その後、HBO は欧米に拡大し、多くの HBO 装置が作られて呼吸器疾患や循環器疾患等の治療に応用されるようになった。1960 年にオランダの Boerema らは、HBO の酸素化機序を証明するために赤血球がほとんどない虚血状態でブタの生存を報告した²⁾。さらに、1962 年に HBO 装置内で世界初の先天性心疾患の手術を行った³⁾。これを契機に HBO 装置内に手術室を設けた大型の装置が各国で建造された。1970 年代には HBO の嫌気性感染症への効果も示され、一酸化炭素中毒や虚血性疾患から外傷などに対する救急・集中治療へと拡大した。現在では、HBO が虚血性疾患に奏功する特殊な酸素療法として認識されている。

本邦での HBO は、1966 年 (昭和 41 年) に名古屋大学の橋本義雄らが第 1 回高気圧環境医学研究会を開催した。そして、2015 年に第 50 回日本高気圧環境・潜水医学会を迎えるに至った。1989 年には国家資格として臨床工学技士法が施行され、臨床工学技士が HBO 装置の操作を担うことで迅速に HBO が施行されるようになった。適応症例⁴⁾も脳梗塞や急性循環障害等の救急領域で効果が認められるようになった。しかし、有効性を客観的に全て実証するまでには至っていない。

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) の分類のうち、腎前性および腎性は急激な血流障害の結果、腎機能が低下し体液の恒常性が維持できなくなった状態である。AKI の生命予後は、AKI と診断された患者全体の死亡率が 50%であり、機能回復せずに再び悪化して血液浄化療法を受ける患者が 30%を占める⁵⁾。特に尿細管壊死によるものでは、原因を除去しても直ちには腎機能が回復せず有効な手段はないと報告⁶⁾されている。2013 年の腎不全を病因とした日本の透析療法患者数は 309,946 人で透析療法導入患者数は 38,024 人であった⁷⁾。年間の死亡患者数は 30,708 人であることから、腎不全から透析療法が導入されても予後は不良である。疫学的にも AKI が持続する場合には腎機能の低下から深刻な病態へと進行する⁸⁾ことが知られている。有川らは、AKI を含む多臓器不全 (multiple organ failure: MOF) に対して HBO が有効であることを報告^{9), 10)}しているが、AKI 治療ガイドラインによる腎臓の急性期の治療に HBO は推奨されていない¹¹⁾。このような背景から、本研究では、HBO の適応疾患として AKI に着目した。

AKI の病態の一つに血液虚血再灌流時に発生する急性尿細管壊死がある。これは、早期にプログラムされた生理的かつ病理的な細胞死の apoptosis と病理的な細胞死である necrosis によることが動物モデル、および生検によって検証されている。HBO は、虚血/再灌流 (ischemia/reperfusion: I/R) 障害における尿細管損傷、および炎症の重症度を軽減することが先行研究^{12), 13)}で示されている。しかし、HBO による細胞死の抑制と細胞増殖の亢進については検証されていない。今回、腎 I/R 障害に対する HBO の影響を確認するため、組織の形態観察に加えて、断片化 DNA 末端標識法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling: TUNEL) と抗 Ki-67 抗体を用いてそれぞれ apoptosis と細胞増殖について検討した。

略語一覧

本論文において以下の略語を用いた。

略語	原語	意味
AKI	: acute kidney injury	急性腎障害
BSA	: bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
DAB	: 3,3' -Diaminobenzidine, Tetrahydrochloride	発色基質、四塩酸塩
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole	核染色法
EPO	: erythropoietin	エリスロポエチン・造血因子
HBO	: hyperbaric oxygen therapy	高気圧酸素治療
HE	: hematoxylin and eosin stain	ヘマトキシリン・エオジン
I/R	: ischemia / reperfusion	虚血 / 再灌流
IgG	: immunoglobulin G	免疫グロブリン G
MCM	: minichromosome maintenance protein	ミニ染色体維持タンパク質
MOF	: multiple organ failure	多臓器不全
NO	: nitric oxide	一酸化窒素
PB	: phosphate buffer	リン酸緩衝液
PBS	: phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
ROS	: reactive oxygen species	活性酸素種
SD	: Sprague-Dawley	スプラッグ ドーリー ラット
SOD	: superoxide dismutase	抗酸化酵素
TUNEL	: TdT-mediated dUTP nick end labeling	断片化 DNA 末端標識法

Ⅲ. 材料及び方法

1. 実験動物と対照群

Sprague-Dawley (SD) ラットを無作為に Sham 群 (n = 10)、I/R 群 (n = 10)、I/R 後に HBO で処置した I/R +HBO 群 (n = 10) の 3 群に選んで行った。動物飼育室では急激な温度と湿度変化が起きないように温度 (24 ~ 26℃) と湿度 (40 ~ 70%) を空調管理し、餌と水は自由に摂取した。I/R の 24 時間後 (各群 n = 5)、48 時間後 (各群 n = 5) に安楽死させて標本作製した。当該の動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号 1973 年) を遵守し、九州保健福祉大学内の動物実験委員会の承認 (受付番号 25105) を得て行った。特記する利益相反 (COI) はない。

2. I/R モデルラット作製

I/R モデルは、高山らの実験方法¹⁴⁾を参考にして作製した。高山らは、右腎摘出後に 2 週間の回復期間を設けたが、本実験では、I/R 急性期の腎臓の変化を観察するため HBO を I/R 開始から 60 分後に実施した。また、腎臓の代償を否定する目的で右腎摘出後に左腎の I/R を行った。

3. 外科的手順

ラットの麻酔は、ペントバルビタール (pentobarbitone: 50 mg/kg) を注射器で腹腔内に投与した。その後、術野の剃毛、皮膚をエタノールで消毒した。ラットの直腸温度が 34 ~ 36°C に維持するように加温テーブル上で体温調節した。痛覚が無いことを確認して、腹部正中切開を実施した。右腎摘出には、尿管と腎動静脈をそれぞれ糸で 2 ヶ所結索し、結索した中間をハサミで切断して副腎や脂肪等を剥離し、腎臓を摘出した。次に左腎動静脈を非外傷性クリップ (Fine Science Tools Inc., Foster City, CA) で血流を 30 分間クランプすることにより虚血腎を作製した。クランプを解除した後、1 分以内の再灌流を視覚的に確認して切開部を縫合した。Sham ラットは同様に開腹して腎臓を露出したが、右腎摘出と左腎虚血を行わずに腹部を縫合した (図 1)。

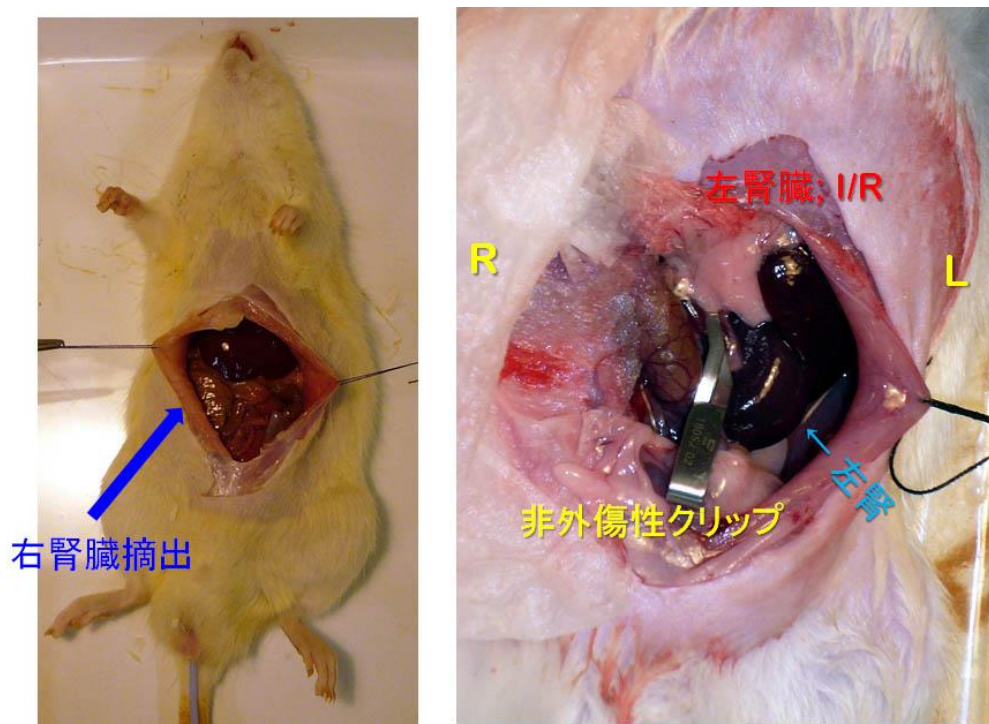


図 1. SD 系雄性ラットの I/R 術中手技

腹部切開した左右の皮膚に糸を掛けて開き、術野を確保した。露出した臓器は目的部位以外に触れないように注意し、術中の乾燥を来さないように生理食塩水に浸したガーゼで覆った。

4. HBO の施行

- 1) HBO 装置 : 動物実験用 HBO 装置 (Barotec Hanyuda P-5100 Tokyo, Japan) を使用した。装置の規格は、横楕円筒形単室でアクリル樹脂と耐蝕アルミニウム構造、内径 201 mm × 有効長 450 mm、内容積 15.2 L、設計圧力 3.5 絶対気圧 (atmosphere absolute : ATA) 、重量 20 kg、加圧用ガスは医療用酸素を用いた (図 2)。
- 2) HBO 処置 : I/R 開始から 60 分後に HBO 装置内にラットを収容し、100% 酸素で装置内を 5 分間ガスパーズした後、減圧排気用微量流量計を調整して 10 分で処置圧の 2.5 ATA まで加圧した。装置換気量は 5 l/min とした。
- 3) HBO 終了 : 2.5 ATA で 60 分間保圧した後に 10 分かけて減圧し、大気圧と平衡したところで大気解放して HBO を終了した (図 3)。



図 2. 動物実験用 HBO 装置の外観と 2.5 ATA で処置を受ける I/R +HBO ラット
装置換気量は収容した動物の呼気 CO₂ の再呼吸を来さない程度に加圧ガス量を調整した。

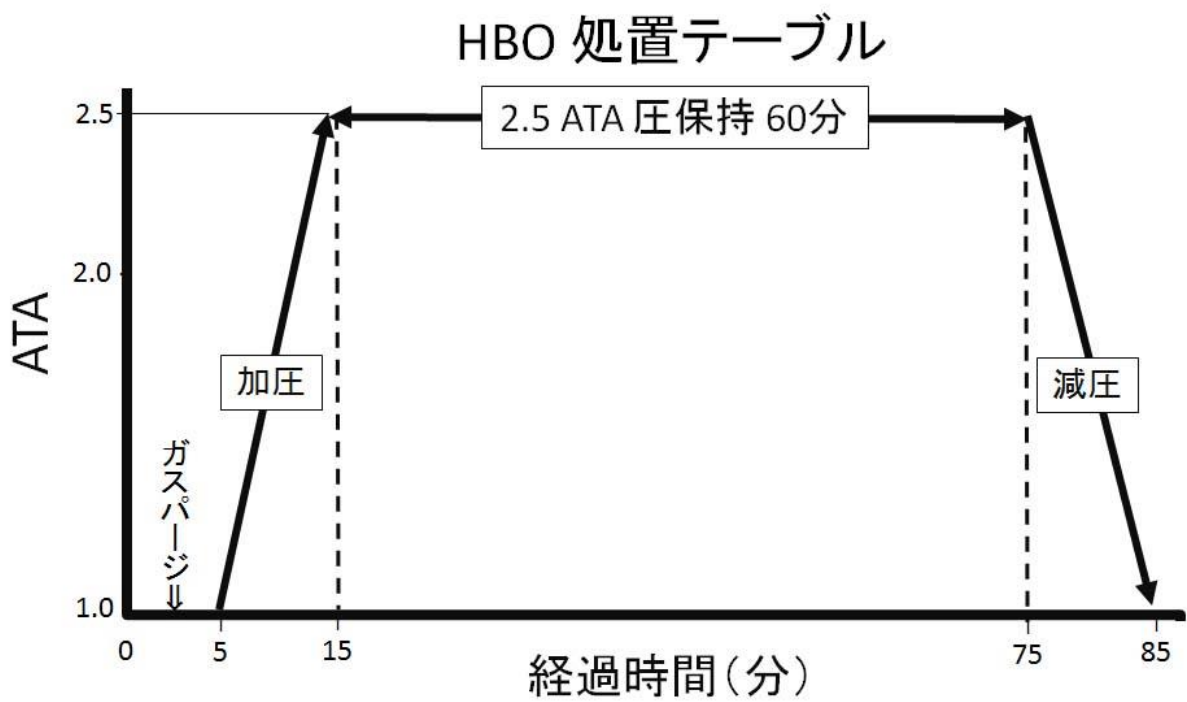


図 3. 動物実験用 HBO 装置の処置テーブル

HBO の処置テーブルは臨床で使用されている一般的な治療テーブルとした。

5. 標本作製

1) 組織の還流固定手順

- ①瀉血： ラットを麻酔し、側胸壁を肋骨・皮膚とも一括して縦に切開した。次に横隔膜を切り離して前胸壁を上方に開き、抗凝固剤（ヘパリンナトリウム 200 単位 /ml）を注射器で 1 ml 心室へ投与した。次いで、500 ml の補液バッグに 0.01 M リン酸緩衝 0.9% NaCl 溶液（PBS, pH 7.4）を充填し、補液ラインと注射針を接続した。心尖から大動脈にむかって注射針を刺入し、PBS を 1 分程度流し、全身還流が終了した時点で右心耳を切開して瀉血した。
- ②還流固定： 右心耳から出る液に血液が混じらない程度の PBS を灌流させた後、固定液として作製した 4% Paraformaldehyde (0.1M PB, pH 7.4) を補液バッグに充填した。輸液ラインを切り替えて 20 分間灌流させて固定を終了した。
- ③腎臓の摘出： 腎茎からハサミで離断して摘出した。腎臓は前頭断面に 2 分割して固定液に浸漬した後、保冷剤と一緒にクーラーボックスに入れて振盪機（マルチシェーカー、EYELA）で 16 時間振盪した。切片標本は 2 切片で 2 標本作製し、そのうち片方を予備標本とした。

2) パラフィン浸透手順

- ①脱水と脱脂： パラフィン切片作製の腎臓組織片に含む水分と脂肪分を除去する目的で行った。浸漬は、濃度 50% エタノール（30 分×4 回）、70% エタノール（30 分）、80% エタノール（30 分）、90% エタノール（30 分）、100% エタノール（60 分×3 回）の順に室温で行った。
- ②脱アルコール： 脱アルコール剤には中間剤（レモゾール、和光純薬）を用いて室温で 60 分浸漬した。これを 3 回繰り返した。
- ③パラフィン包埋： 60℃ に設定したパラフィン溶融器中で溶融した硬パラフィン（60℃）に 30 分浸漬した。パラフィン置換して、これを 3 回繰り返した。

3) パラフィン切片作製手順

- ①トリミング： パラフィン包埋した組織（パラフィンブロック）を組織周囲までナイフで削りトリミングした。
- ②切り出し： パラフィンブロックを回転式マイクローム（RV-240、大和光機）の固定装置に取り付け、刃角 8 度で切削厚 4 μ m に設定して組織が露出するまで切削した。
- ③乾燥： 切り出した切片は卵白グリセリンを塗布したスライドガラス上に少量の蒸留水を張って並べ、40℃に暖めたパラフィン伸展器上で乾燥させた。標本は 2 切片で予備を含む各 2 標本作製した。

4) 凍結切片作製手順

- ①氷晶防止処理： 2 分割した腎臓の 1 片のみを凍結切片作製用とした。切片は 20% ショ糖に 0.05% アジ化ナトリウム含有の 0.1 M PB で 3 回洗浄した後、4℃ の冷蔵庫で 12 時間浸漬した。
- ②ラット腎臓の凍結： 切片を皮質から乳頭の組織が得られるようにトリミングした。プラスチック

ク包埋皿 (クリオモルド、サクラファインテックジャパン) に入れ、その上から室温の包埋剤の O.C.T コンパウンド (サクラファインテックジャパン) を入れ -80°C のエタノールに浮かべて急速凍結した。切片は -80°C の冷凍庫で保管した。

③切り出し： クリオスタット (CM1860、 Leica 社) を用いて、庫内を -20°C の設定下で凍結組織切片を約 $10\ \mu\text{m}$ 厚に切り出し、スライドガラス (0.01% ポリ L リジンコーティング) 上に貼り付けた。

④風乾と洗浄： 保管した標本を冷風ドライヤーで 30 分間乾燥させ、PBS に浸漬して振盪機で 5 分間洗浄した。これを 3 回行った後に染色工程を行った。

6. HE 染色

1) 染色手順

①脱パラフィン処理： パラフィン切片の標本をレモゾール、100% エタノール、90% エタノール、80% エタノール、70% エタノールの順に室温で 5 ~ 10 分間ずつ浸漬して脱パラフィンを行った。

②HE 染色： 脱パラフィン後の標本を流水中で水洗した後、ヘマトキシリン染色液を室温で 5 分染色した。その後、流水中で 20 分以上水洗し、エオジン染色液で 3 分染色した。

②脱水： 脱水は、70% エタノール、80% エタノールに数秒ずつ浸漬した後、90% エタノールに 3 分間、次に 100% エタノールに数秒ずつ 2 回の浸漬の順で脱水した。その後、レモゾールに数分ずつ 2 回浸漬して透徹した。

③封入： スライドガラス上の切片に非水溶性封入剤 (ソフトマウント、和光純薬) を 1 滴ほど滴下して気泡が入らないようにカバーガラスを貼り付け、封入後はマッペ上に並べて乾燥させた。

7. TUNEL

1) apoptosis 標識

パラフィン切片の組織標本から、apoptosis 細胞の検出に汎用されている菱川らの TUNEL^{15), 16), 17)}を用いて apoptosis 細胞の標識を行った。

2) TUNEL 手順

TUNEL の手順は、Gavrieli ら¹⁸⁾の原法と同様に proteinase K による前処理を用いて行った。

①薄切・脱パラフィン処理： パラフィンプロックをトリミングし、回転式ミクロトームを用いて $5\ \mu\text{m}$ 厚で切り出し、シランコーティングスライドガラス上に切片を貼り付けた。この標本をキシレン、100% エタノール、90% エタノール、80% エタノール、70% エタノールに順に室温で 5 ~ 10 分間ずつ浸漬して脱パラフィンを行った。

②賦活化处理： 37°C に加温した 0.2 M PB で洗浄後、標本を 15 分間 PBS 中の $10\ \mu\text{g/ml}$

proteinase K (TAKARA BIO INC) で反応させた。

- ③ブロッキング： 標本を 0.3% 過酸化水素 (H_2O_2) を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを室温で 30 分行い、ブロッキング後 PBS で洗浄した。
- ④ラベリング反応： 1.5 mM CoCl_2 、0.5 μM biotin-16-dUTP、20 μM dATP ならびに 0.1 mM dithiothreitol を含むラベリング反応調整液 50 μl (TdT Enzyme 5 μl + Labeling Safe Buffer 45 μl , TAKARA BIO INC) を標本の切片上にのせ、乾燥しないよう 37°C の湿潤箱中で 90 分間反応させた。次に、50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄して反応を停止させた。なお、TdT を加えない緩衝液で同様の操作を行った標本を別に作製し、これを陰性コントロールとした。
- ⑤抗体反応： 標本を洗浄後に 5% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) で調整した正常ヤギ IgG 抗体 (500 $\mu\text{g/ml}$) を室温で 60 分反応させ、PBS で洗浄した。引き続き、ペルオキシダーゼ標識の抗 biotin ヤギ抗体を 5% BSA で 100 倍に希釈したものを室温で 60 分反応させた。
- ⑥発色反応： PBS で調整した 0.075% Brij L23 溶液 (Sigma-Aldrich) で洗浄後、抗 biotin ヤギ抗体に標識したペルオキシダーゼを発色基質 (3,3'-Diaminobenzidine, Tetrahydrochloride: DAB) と H_2O_2 で発色させた。
- ⑦対比染色： 0.5 v/v% メチルグリーン溶液に室温で 5 分反応させ、PBS で洗浄した。
- ⑧組織切片の脱水、透徹、封入：脱水は 70% エタノール、90% エタノールに各 10 秒間を 2 回浸漬して脱水し、トルエンに 10 秒間を 2 回浸漬して透徹し封入した。
- ⑨検鏡： 光学顕微鏡で観察し、DAB で核内に黒褐色に発色を認めるものを TUNEL 陽性とした。

8. 抗 Ki-67 抗体染色

1) 抗 Ki-67 抗体陽性細胞標識

抗 Ki-67 抗体は細胞増殖と細胞周期のマーカー¹⁹⁾として用い、抗 Ki-67 抗体陽性細胞として標識した。

2) 染色手順

- ①ブロッキング： 凍結切片のスライド標本を抗原賦活化処理と一次抗体等の非特異的吸着を防ぐ目的でブロッキング溶液を作製した。溶液は、1% ウシ血清アルブミン (BSA、和光純薬) と 0.5% ゼラチン (cold water fish skin, Sigma)、および界面活性剤 (0.2% Triton X-100、和光純薬) に 0.05% アジ化ナトリウムを含有し PBS で溶媒したもの (PBS TNBfG) とした。PBS TNBfG を切片上に添加して 4°C の冷蔵庫で 12 時間反応した。試薬の使用量は染色エリアを免疫組織化学用パップペン (リキッドブロッカー、大道産業) でマーキングして、必要量を計測した。尚、陰性コントロールはブロッキングのみとした。
- ②一次抗体反応： 抗 Ki-67 抗体 (NB600-1209, Novus Biologicals) を PBS TNBfG で 1,000 倍希釈

してマーキング域の切片上に 40 μ l 滴下した後、室温で乾燥しないように湿潤箱に置いて 30 分間ゆっくり振盪した。次に、4°C の冷蔵庫で 12 時間反応させた。

③一次抗体反応停止：一次抗体液を除去して PBS に浸漬して室温で 10 分間ゆっくりと振盪した。これを 3 回繰り返した。

④二次抗体反応：二次抗体は Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa, Fluor® 488) を PBS TNBfG で 2,000 倍希釈した。これをマーキング域の切片上に 40 μ l 滴下し、遮光箱に入れて室温で 60 分間ゆっくり振盪して反応させた。

⑤二次抗体反応停止：二次抗体液を除去して PBS に浸漬して遮光箱に入れ、室温で 5 分間ゆっくりと振盪した。これを 3 回繰り返した。

⑥核染色：DAPI は膜損傷の有無に係わらず細胞内に透過し、核酸を染色することで細胞核を同定することから、蛍光陽性細胞核の確定目的で行った。DAPI を PBS で 5,000 倍に希釈し、40 μ l を切片上に滴下し、遮光箱に入れて室温で 1 分間ゆっくり振盪して反応させた。

⑦核染色反応停止：PBS に浸漬して遮光箱に入れ、室温で 5 分間ゆっくりと振盪した。これを 3 回繰り返した。

⑧封入：スライドガラス上の切片に蛍光減衰防止剤入りの封入剤 (Mountant PermaFluor, Thermo) を滴下してカバーガラスを貼り付け、封入後はマッペ上に並べて乾燥させた。

⑨検鏡：光学顕微鏡で蛍光観察し、細胞核に発光を認めるものを陽性とした。

9. 組織形態解析

標本を、デジタルカメラ (DP71, オリンパス) を備えた光学顕微鏡 (BX51, オリンパス) を用い、接眼レンズ (10x) に対物レンズ (10x, 20x, 40x) を組合せて各群の皮質、髄質を観察した。観察記録として、それぞれの皮質、髄質をデジタルカメラで撮影し、撮影条件を露出時間 1.2 秒、ISO 感度 400 とし、JPEG ファイル (1,360 × 1,024 pixel) 方式で保存した。TUNEL と Ki-67 陽性細胞数は 1 標本中の計測を 10 視野で行い、全標本の 1 視野 (240 mm × 180 mm) 毎の平均値を求めた。

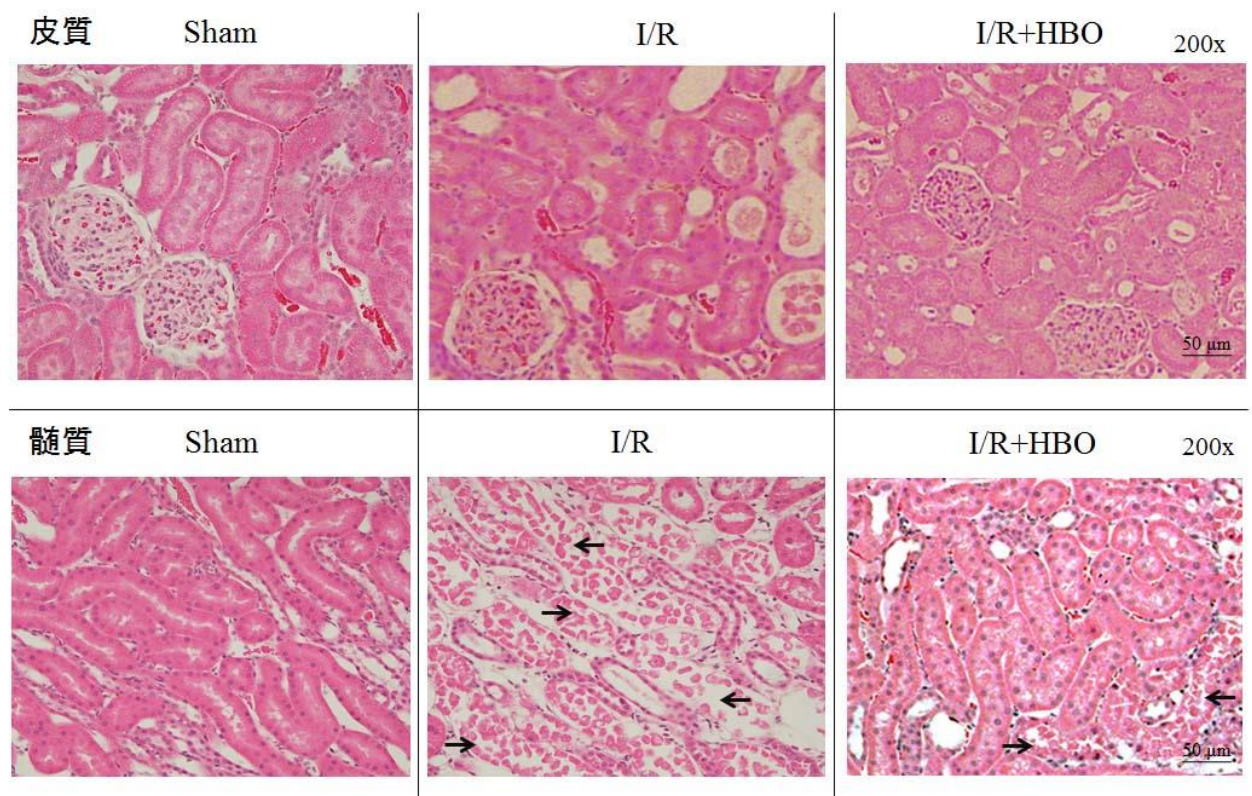
10. 統計分析

数値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表示し、グラフは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。統計学的解析には、統計ソフトウェア Stat Mate IV (ATMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。TUNEL 陽性細胞数と Ki-67 陽性細胞数の計測は、Sham 群、I/R 群、I/R +HBO 群で行った。3 群間の比較には、Tukey 法を用いた。有意水準 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

IV. 結果

1. HE 染色

I/R 24 時間後の HE 染色像の代表的なものを図 4 に示した。皮質の観察では、エオジンに濃染し、微絨毛を有する大型細胞からなる近位尿細管と細胞境界明瞭な遠位尿細管を観察した。I/R と I/R +HBO の皮質の尿細管と腎小体の形態変化は明瞭には観察されなかった。髓質では、矢印の先部分とその周囲の I/R の尿細管の膨化、近位尿細管の刷子縁・基底陥入の消失が観察された。また、脱落細胞による壊死様の核変化、尿細管腔の拡張、尿管腔の崩れが観察された。I/R +HBO の髓質は尿細管組織が比較的良好に保たれていた。



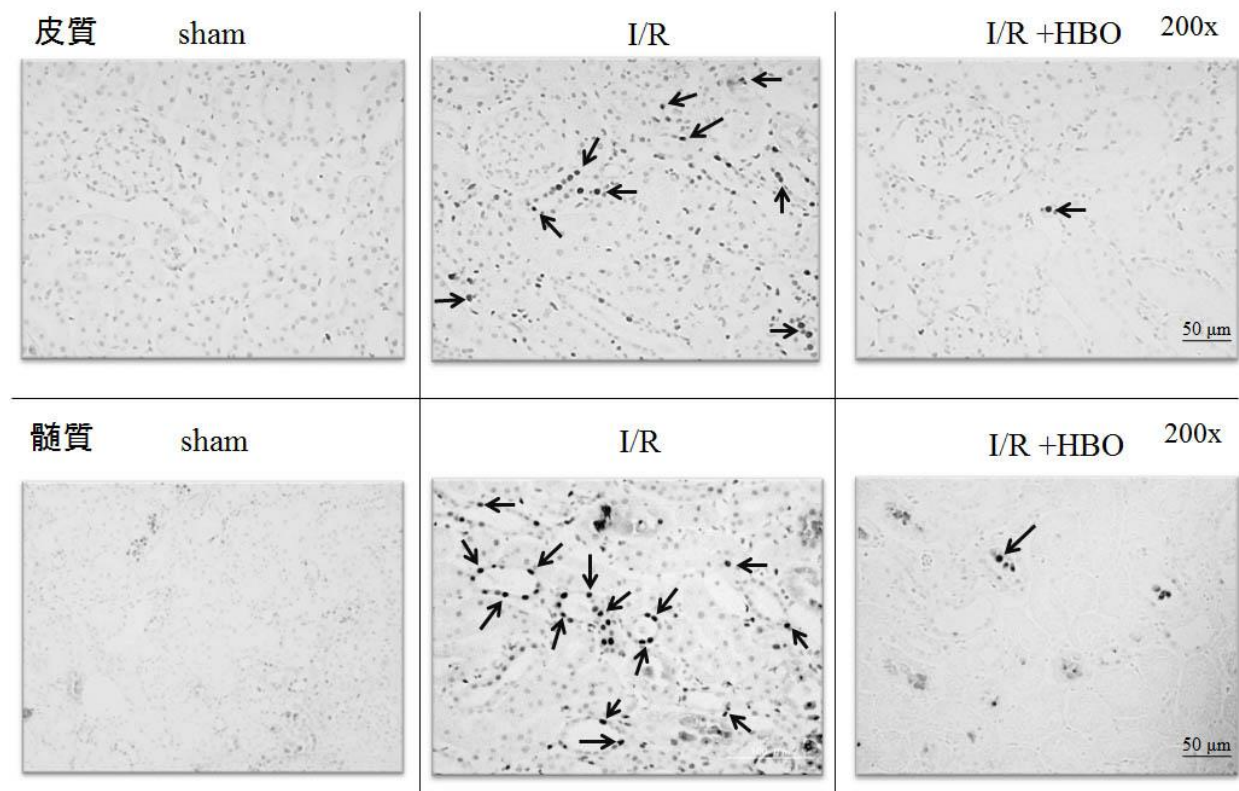
240 mm × 180 mm 解像度 200 pixel / inch

図 4. I/R 24 時間後の HE 染色像 (200x)

図上段は光学顕微鏡による皮質の腎小体と周囲組織の観察像、図下段は髓質の尿細管の観察像

2. TUNEL 陽性細胞

1) I/R 24 時間後の TUNEL で apoptosis 標識された皮質と髄質の代表的なものを図 5 に示した。矢印の先部分とその周囲の黒褐色の点様は TUNEL 陽性細胞の発現を表し、apoptosis 標識細胞を示す。TUNEL 陽性細胞は、Sham の皮質と髄質で発現が観察されなかった。I/R の皮質では、尿細管上皮細胞で多く観察された。また、髄質でも尿細管上皮細胞に TUNEL 陽性細胞を多く観察した。I/R +HBO では、皮質と髄質に発現を観察したが、I/R に比べて発現が少なかった。



240 mm × 180 mm 解像度 200 pixel / inch

図 5. I/R 24 時間後の TUNEL による陽性細胞の発現 (200x)

図上段は光学顕微鏡による皮質の観察像、図下段は髄質の観察像

2) TUNEL 陽性細胞発現数を皮質、髄質に分類して図 6 にグラフで示した。

TUNEL 陽性細胞の発現数を Sham 群と I/R 群、I/R +HBO 群で計測した。結果は、Sham 群は計測されなかった。Sham 群は I/R を実施していないので、TUNEL 陽性細胞の発現がないと推測された。

I/R 群については、皮質が 21.2 ± 8.5 /視野であった。髄質は 47.9 ± 18.0 /視野であった。I/R +HBO 群に比べて、皮質と髄質に TUNEL 陽性細胞の発現数に有意差があり、髄質に TUNEL 陽性細胞の発現数の有意差があった。I/R は髄質に多くの TUNEL 数を計測したことで、髄質に apoptosis が発生していると推測された。

I/R +HBO では、皮質が 1.0 ± 0.1 /視野であった。髄質は 1.5 ± 0.2 /視野であった。I/R 群に比べて、I/R +HBO は、皮質に TUNEL 数の有意差があり、髄質に TUNEL 数の有意差があった。I/R +HBO は皮質、髄質での TUNEL 数は I/R に比べて少ないことが認められ、I/R +HBO は皮質、髄質での apoptosis の発生が抑制されたと推測された。

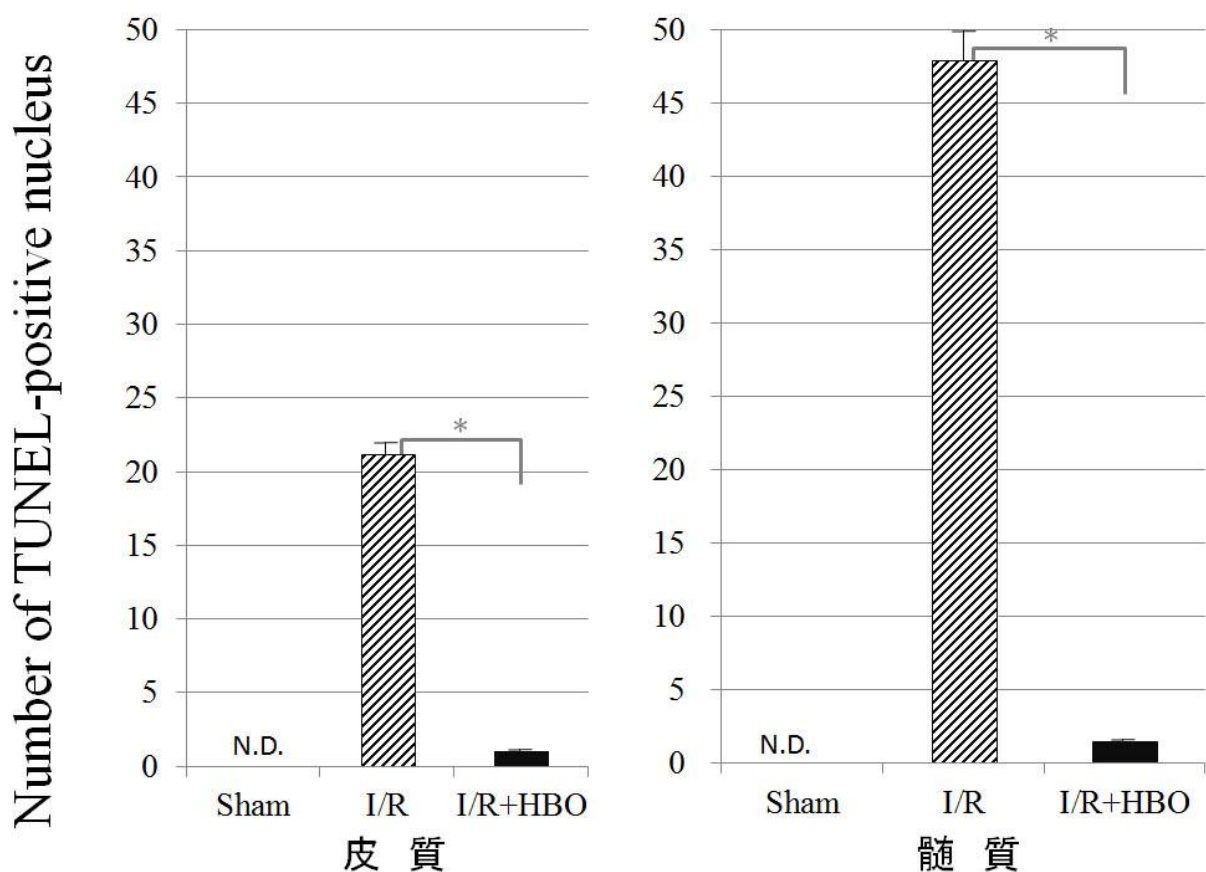


図 6. TUNEL 陽性細胞発現数 (1 視野の平均数、エラーバーは SE で表示)

N.D. : not detected.

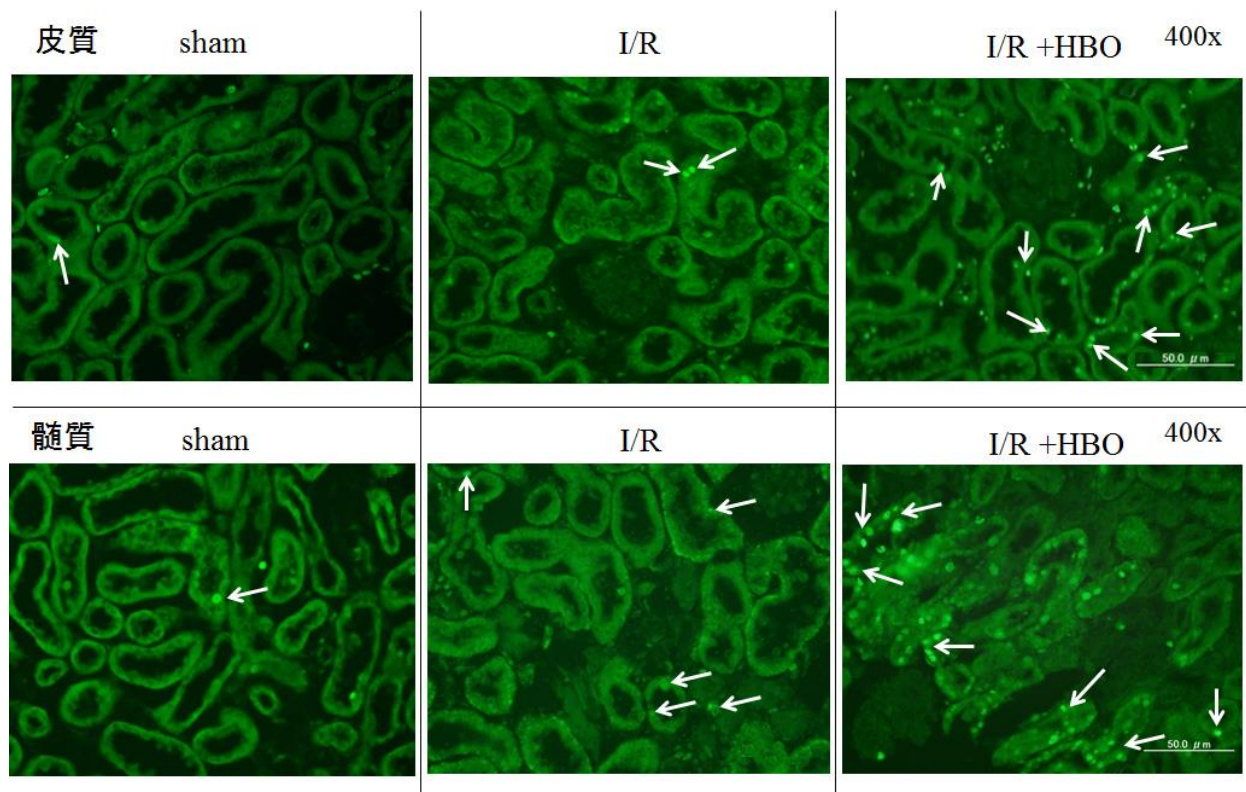
各群動物数 $n = 5$, 1 標本中 10 視野で計測した。

I/R と I/R +HBO 群間で有意差あり ($p < 0.05^*$)

3. 抗 Ki-67 抗体陽性細胞

1) I/R 48 時間後の皮質と髓質の Ki-67 染色像の代表的なものを図 7 に示した。

矢印の先部分とその周囲は蛍光観察で緑色に強く発光した抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現を示す。Sham の抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現は、皮質と髓質の尿細管上皮で少数が散在的に観察された。I/R は皮質と髓質で矢印部の発現が観察された。I/R +HBO は矢印部の発現した細胞が I/R に比べて多く観察された。



240 mm × 180 mm 解像度 200 pixel / inch

図 7. I/R 48 時間後の抗 Ki-67 抗体染色、皮質 (400x)、髓質 (400x)

図上段は皮質の蛍光観察像、図下段は髓質の蛍光観察像

2)抗 Ki-67 抗体陽性細胞数を皮質、髄質に分類して図 8 にグラフで示した。

抗 Ki-67 抗体陽性細胞数を Sham 群と I/R 群、I/R +HBO 群で計測した。結果は、Sham 群は、皮質が 0.5 ± 0.7 /視野であった。髄質は 0.4 ± 0.8 /視野であった。Sham 群は I/R を実施していないので、抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現が少ないと推測された。

I/R 群は、皮質が 1.9 ± 0.8 /視野であった。髄質は 5.2 ± 0.7 /視野であった。I/R +HBO 群に比べて、I/R 群は皮質に抗 Ki-67 抗体陽性細胞数の有意差があり、髄質に抗 Ki-67 抗体陽性細胞数の有意差があった。I/R 群は I/R +HBO 群と比較して、抗 Ki-67 抗体陽性細胞数が少ないことから、皮質と髄質で細胞増殖の発生が起き難いと推測された。

I/R +HBO 群では、皮質が 17.7 ± 0.9 /視野であった。髄質は 10 ± 0.6 /視野であった。I/R 群に比べて、I/R +HBO 群は皮質および髄質に抗 Ki-67 抗体陽性細胞数の有意差があった。I/R +HBO 群は I/R 群と比較して、抗 Ki-67 抗体陽性細胞数が多いことから、皮質と髄質で多くの細胞増殖が発生していることが推測された。

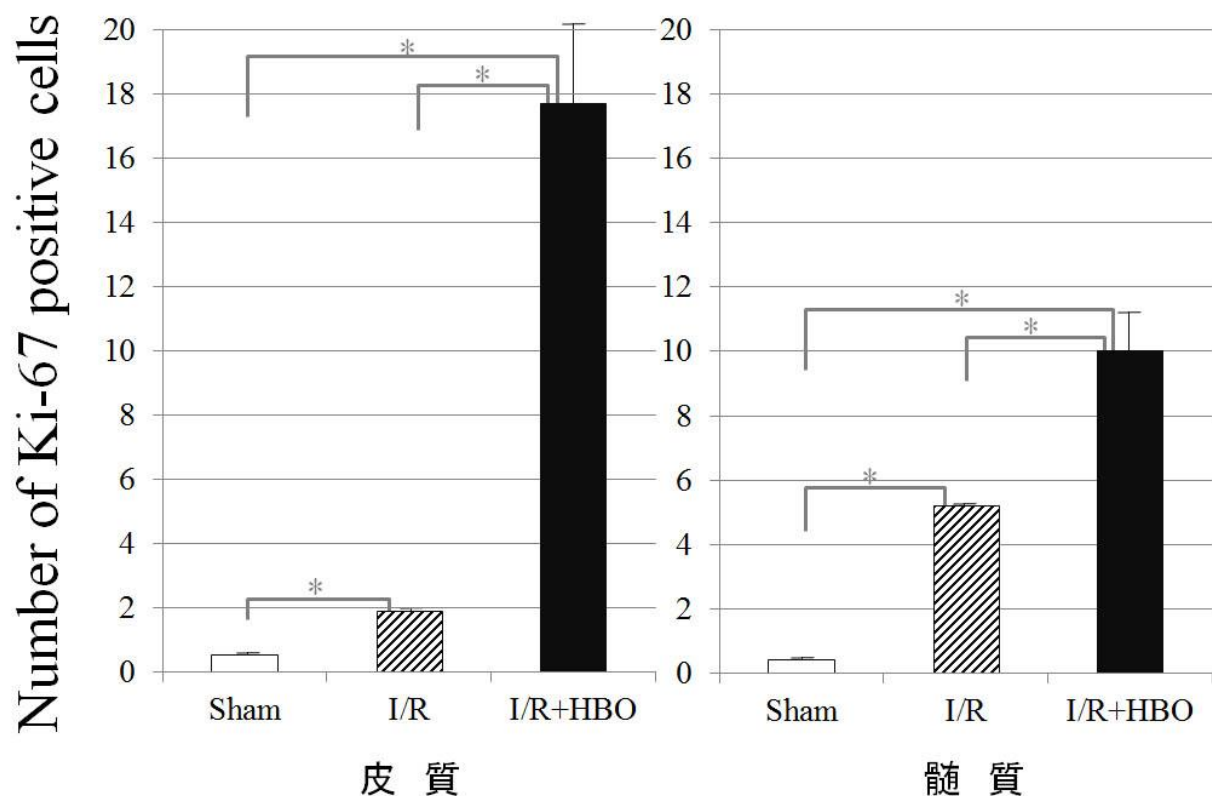


図 8. 抗 Ki-67 抗体陽性細胞数 (1 視野の平均数、エラーバーは SE で表示)

各群動物数 $n = 5$, 1 標本中 10 視野で計測した。

皮質と髄質の Sham、I/R、I/R +HBO の 3 群間で有意差あり ($p < 0.05^*$)

V. 考察

HBO を腎 I/R 後に行うことで、apoptosis は有意に抑制された。腎組織の形態観察では、I/R 群は崩れた組織が頻繁に観察され、I/R +HBO 群では I/R に比べて崩れた組織が少なく観察された。一因として、低酸素組織への酸素供給は、組織周囲の動脈血の血液循環に依存しており、HBO によって上昇した動脈血酸素分圧による酸素拡散能と動脈血中に増加した溶解型酸素によって低酸素組織に酸素供給が効率よく供給されたと考えられる。

I/R 群は、低酸素組織への酸素供給の大半が組織周囲の動脈血中のヘモグロビンに結合した結合型酸素に依存していることである。I/R +HBO 群でも同様に結合型酸素に依存されるが、相違点は HBO で酸素化された血液が循環することである。酸素の組織への受渡しは拡散でのみ行われるため、HBO によって上昇した動脈血酸素分圧は組織の酸素の拡散スピードを加速させる。さらに、血漿中に溶解した酸素も増加していることから、低酸素組織への酸素供給が効率よく行われると考えられる。しかし、酸素供給による組織の形態的な影響は、I/R 後に産生される活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) による障害²⁰⁾が伸展することが懸念される。今回の実験では、HBO で増加することが確認されている抗酸化酵素 (superoxide dismutase: SOD)²¹⁾が作用して ROS を分解することが推測された。よって、I/R +HBO では、組織の崩れが抑えられる傾向を示したと考えられた。

apoptosis については、apoptosis 陽性細胞を TUNEL で評価したところ、I/R と比べて I/R +HBO で有意に抑制されていた。apoptosis を起こした細胞はクロマチンの凝集、DNA の断片化、細胞膜の bleb (突起物) 形成などの形態変化を早期に示し、周囲の貪食細胞に貪食・分解されることが知られている。この形態を光学顕微鏡で観察するには限界があった。そこで、TUNEL を用いて apoptosis 標識で可視化し、評価を行った。HBO で処置したラットは I/R に比べて TUNEL 発現が少ないことから、apoptosis の抑制に関与していることが推察された。先行研究で報告のある I/R モデル実験では、持続虚血腎は主に necrosis が生じること。I/R 腎では apoptosis が有意に生じることを多くの研究で証明している^{22), 23), 24)}。今回の実験において、I/R では、尿細管細胞に多くの apoptosis が発生していることを TUNEL の発現によって確認した。しかし、I/R +HBO では TUNEL の発現が少ない。これは、HBO の酸素化機序²⁵⁾によって一部が説明される。繰り返しになるが、HBO は酸素拡散能を高めて、増加した溶解型酸素と相乗して酸素を組織に供給する。HBO は TUNEL 発現を抑制することで、I/R の組織壊死が改善される報告^{26), 27)}とも整合している。

apoptosis について、Sharples らは、造血因子である erythropoietin (EPO) の産生で I/R 障害後の apoptosis を減少したという EPO の抗 apoptosis 効果を報告した。その機序として、I/R 障害に起因する caspase-3、caspase-8、および caspase-9 の活性を抑制することを証明している²⁸⁾。これらを今回の実験と照合すると、HBO が造血因子に係わることから apoptosis 抑制に関連していることが推測される。しかし、現段階では、HBO が apoptosis 開始段階の caspase-8 と実行段階の caspase-3 を活性抑制することは確認されていない。

抗 Ki-67 抗体陽性細胞については、I/R の抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現は少なく、I/R +HBO では、I/R に比べて多く発現した。I/R には尿細管の崩れが多いことから、早期に細胞周期に進行すると予測したが発現は少なかった。これは、I/R により損傷を受けた核の細胞周期が長くなり、増殖前に細胞死に至ることが推測された。

I/R の尿細管細胞増殖のダイナミックな評価には、一般的に使用される抗 Ki-67 抗体が有効である。しかし、染色強度をどのレベルで陽性とするかによって陽性率が大きく変わることが懸念される。確実性を高めるには、抗 Ki-67 抗体の発現とフローサイトメトリーのデータと照合して検討する必要がある。あるいは、細胞周期の初期に発現する蛋白 (minichromosome maintenance protein: MCM) に対する免疫染色と組み合わせて検討する必要がある。

今回のデータには示していないが、他の検証で HBO を施行したラットの I/R 7 日後も皮質、髓質で抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現を認めている。このことから、HBO には細胞増殖を強化する可能性がある。しかし、細胞が再生するためには組織の崩壊か脱分化がなければならない。本研究ではその状態を見ていないため、今後更なる研究が必要である。加えて、I/R モデル自体における差異で虚血時間やタイミング、HBO の開始時間、HBO 施行回数等、詳細な検討も必要である。

I/R 障害に選択した腎臓は、他臓器と比べると解剖学的、機能的に複雑であり、未解明な部分が多い。しかし、HBO は細胞障害とその回復過程において重要な役割を果たす蓋然性があり、細胞組織に正常な尿細管、または残存した上皮細胞を量的、機能的に残すことが腎障害の進行を抑制する上で重要である。

VI. 結論

腎 I/R 障害に対して行う HBO は、I/R 後の apoptosis を抑制し、尿細管上皮細胞の再生を亢進させる可能性がある。

今後、更なる研究を進めて、I/R 障害が局所だけでなく二次的に全身の主要臓器に障害をきたす遠隔臓器障害、とくに脳・肺・肝・腎などに対して HBO の障害抑制と再生亢進効果が期待される。そして、AKI、腎移植、尿細管障害の軽減と心筋梗塞、脳梗塞などに対する再灌流療法後や臓器移植後に HBO が第一選択の併用療法として臨床応用されることを期待したい。

引用文献

1. K K. Jain. Textbook of Hyperbaric Medicine 5th revised and updated edition 2009. www.hypermed.com.au/Clinical%20Research/Jain%20Text.pdf (2014;10/10 アクセス)
2. Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WH, et al. Life without blood. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 1960;104:949-954.
3. Boerema I, Meije NG. Observations during operation on deeply cyanotic young children breathing oxygen at three atmospheres absolute. *Pediatric Surgery* 1962;52:796-799.
4. 榊原欣作：高気圧酸素治療の基礎と臨床、医学書院 2009; 2-21.
5. Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, et al. Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. *Am J Med*. 2005;118:827-832.
6. Finn WF. Recovery from acute renal failure. Brenner BM(ed) *Acute Renal Failure*, Philadelphia: WB Saunders. 1983;753-774.
7. 日本透析医学会：2013 年末の慢性透析患者に関する基礎集計 <http://docs.jsdt.or.jp/overview/> (2014; 8/23 アクセス)
8. 菱田明：急性腎不全、日本内科学会雑誌 2002; 91(5)82-86.
9. 有川和弘：高気圧療法と適応疾患、総合臨牀 1999 ;48(7): 1815-1816.
10. 有川和宏、岩谷博明、堂籠博：術後肝不全と HBO、高圧医誌 2004;1:41-45.
11. 窪田達也、勝屋弘忠、丸川征四郎、他：クリティカルケア・マニュアル 集中治療管理指針、学研メディカル秀潤社 1995;191-196.
12. Ilhan H, Eroglu M, Inal V, et al. Hyperbaric oxygen therapy alleviates oxidative stress and tissue injury in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 2012;34(10):1305-1308.
13. Gurer A, Ozdogan M, Gomceli I, et al. Hyperbaric oxygenation attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Proc*. 2006;38(10):3337-33340.
14. 高山淳二、高岡昌徳、松村靖夫：ラットおよびマウスにおける腎機能低下モデルの簡便な作製方法 急性および慢性腎不全モデル、日薬理誌 2008;131:37-42.
15. Hishikawa Y, Tamaru N, Ejima K, et al. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer: its inhibitory role in the induction of apoptosis possibly through the overexpression of Bcl-2. *Arch Histol Cytol*. 2004;67(5):455-464.
16. Adams JC. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(6):775.
17. Choijookhuu N, Hino S, Oo PS, et al. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor beta in mouse duodenal epithelium. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(4):499-507.
18. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119(3):493-501.

19. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: Histopathology. 1990;17(6):489-503.
20. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. The Journal of clinical investigation. J Clin Invest. 1984;74(4):1156-1164.
21. Rubinstein I, Abassi Z, Milman F, et al. Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischemic kidney. Nephrol Dial Transplant. 2009;24:428-436.
22. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980;68:251-306.
23. Allen J, Winterford C, Axelsen RA, et al. Effects of hypoxia on morphological and biochemical characteristics of renal epithelial cell and tubule cultures. Ren Fail. 1992;14(4):453-460.
24. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. Am J Pathol. 1992; 140(4):831-838.
25. Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, et al. Hyperbaric oxygen therapy. JAMA. 1990;263(16):2216-2220.
26. Strauss MB, Hargens AR, Gershuni DH, et al. Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittent hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome. J Bone Joint Surg Am. 1983;65(5):656-662.
27. Nylander G, Lewis D, Nordstrom H, et al. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg. 1985;76(4):596-603.
28. Sharples EJ, Patel N, Brown P, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. J Am Soc Nephrol. 2004;15(8):2115-2124.

謝辭

本論文の作成にあたり、麻酔科医で私の指導教授の吉武重徳博士には終始適切な助言で丁寧に指導頂きました。また、臨床家であることの意義、医療の本質とあきらめない気概について、本日に至るまでご教授を頂きましたことに感謝を申し上げます。そして、本研究の遂行にあたってご協力を賜りました皆様に心より感謝したいと思います。本当にありがとうございました。