

原 著

SHR の腎移植モデルを用いた実験的高血圧に関する研究

第1報 実験モデル作製の方法と成績

東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター 第三外科学教室 (主任: 太田和夫教授)

ミツ ノ カン イチ
光 野 貫 一

(受付 昭和59年12月26日)

Study of Experimental Hypertension with Renal Transplantation of SHR

I Establishment of Experimental Model

Kanichi MITSUNO

Department of Surgery, Kidney Center (Chief: Prof. OTA)
Tokyo Women's Medical College

The availability of spontaneously hypertensive rat (SHR) has made that the species of choice for renal transplantation studies in hypertension. The purpose of this paper is to describe the technical procedures which we have found most uniformly adaptable in renal transplantation of the rat. SHR, Wistar rat and F_1 hybrids (F_1) of both rats were used throughout the study.

After the preparation under pentobarbital anesthesia, the abdomen was entered. The left kidney was mobilized by placing 9-0 silk ties to the upper and lower pole. The left ureter was traced to the bladder and tied.

These three ties were used for the fixation of the kidney following grafting. After aorta and vena cava was tied in central and peripheral side of the left renal artery and vein, the left kidney was perfused with heparinized saline via aorta.

The host animal was operated under pentobarbital anesthesia. The aorta and vena cava, below the renal bifurcation, were dissected and completely clamped longitudinally in order to receive the donor's aorta and vena cava, and was anastomosed in end to side fashion. The ureter was anastomosed with ureterocystostomy.

F_1 was transplanted from SHR and autokidneys were nephrectomized on the third postoperative day.

The major cause of death was technical errors and F_1 with SHR kidney survived more than 100 days with good renal function.

緒 言

わが国における死因統計で脳血管疾患, 心疾患が上位を占めるようになって久しいが, それらの背景にある高血圧症はその多岐にわたる合併症のゆえに, そして, 極めて高い罹病率のため, その原因を究明し予防対策をたてるべき最重要疾患の一つとして位置づけられている。

なかでもその80%を占める本態性高血圧症について, 各方面より研究・解析がなされているが,

とくに腎臓ならびにそれをめぐる諸因子は高血圧発現機序に重要な役割を果していると考えられ, 従来より種々の因子に細分され研究がなされてきた¹⁾。

しかし, 高血圧症における whole organ としての腎の意義づけをする研究は極めて限られている。腎の臓器全体として生体に与える影響を検討するためにはどうしても高血圧モデル動物を使った実験が必要となってくるが, 自然界では臨床的

にみられる高血圧に類似した病態をしめす動物はえられずその実施は困難であった。しかし、岡本らは1962年に血族交配によって自然発症高血圧ラット (SHR) を分離することに成功し、この面での道を開いた²⁾。

われわれの企図した実験は、この SHR 腎を正常血圧ラットに移植し、その個体の血圧の推移を検討することにより、SHR 腎がそもそもの個体や生理的環境を離れ、他の個体に移植された場合、血圧に対しどの程度の影響を及ぼしうるかを調べることに、この実験系における高血圧の発症に腎がどのように関与しているかを分析しようというものである。

SHR を用いる腎移植は手技的にも極めて困難であったが、種々の工夫をこらすことにより実験モデルとして作製することに成功したので、第1報として技術的な面を中心に報告する。

対象ならびに方法

1. 対象

実験動物として、SHR および Wistar ラット、ならびに雄 SHR と雌 Wistar 間の交配より作成した F₁ 雑種 (F₁) を用いた。13週齢において、SHR を donor または recipient として Wistar および F₁ との間で腎移植を施行し生存期間を観察した。

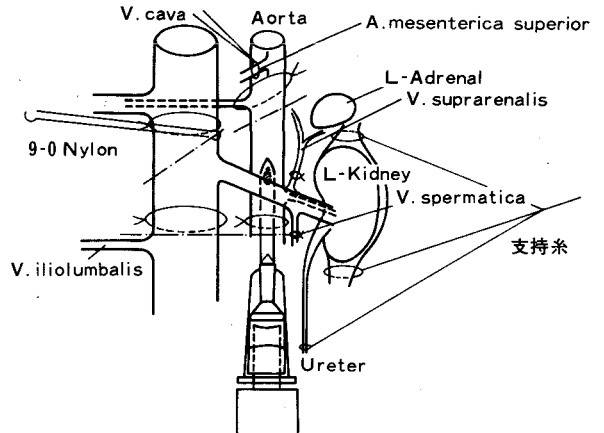
腎機能は各群ともクレアチニンが 1.5mg/dl 以下をもって正常とし、それ以上の場合は棄却した。

2. ラットにおける腎移植の手技

1) donor の準備

正中切開にて開腹し、右腹壁を右側に牽引し、腸を同側に圧排する。通常、上腸間膜動脈は右腎動脈の反対側より分岐しているが、広い視野をうるためにこれを2重結紮し切断する。

腎周囲脂肪組織を図1に示したように上下極において結紮し、この糸を保持することにより、全過程を通じて腎を“non-touch”の状態で作動が行なえるようにする。つぎに、結紮し保持している上下極の脂肪組織をのぞき腎周囲を剝離し、腎を右側に反転する。このようにして腎動脈を露出し、これを注意深く腎静脈ならびに下大静脈から分離し、ついで左副腎動脈を腎動脈の近くで結紮切断する。



graft(左腎)摘出の状態を示し、wash out の後に、破線部を切断する

図1 ラットにおける腎移植の術式(1)

そこまできたら大動脈を腎動脈分岐部の上下で周囲組織から遊離し、腰椎動・静脈の分枝をバイポーラを用いて凝固切断する。

ついで下大静脈を図のように右腎静脈と腸腰静脈の間で結紮し、ただちに大動脈も対応する部位で結紮する。その際に注射針を大動脈に挿入し固定のうえ、下大静脈を破線の部位で切開し、4℃の生理食塩液5mlで腎を灌流した後針を抜去し、ただちに結紮する。引きつづき尿管を膀胱に向かって追跡し、これを結紮切断、この結紮糸も支持として残しておく。

切除に先立ち下大静脈の切開部上端に9-0ナイロン糸をかけ、切断後の位置関係を示すための目印とする。大動脈は左腎動脈の中樞側の破線で示した部位で切断する。

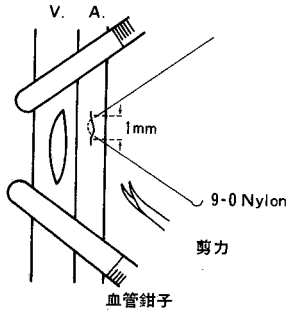
2) recipient の準備

正中切開で開腹し、大動脈と下大静脈とを左腎動脈の末梢側でそれぞれ分離する。吻合に際し邪魔になる睾丸動・静脈を2カ所にて結紮、切断しておく。

3) 移植の操作

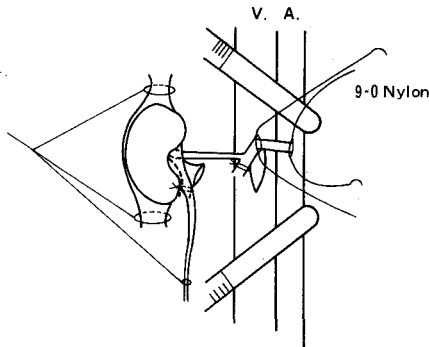
移植は recipient の腹部大動脈ならびに下大静脈にグラフトの腹部大動脈および下大静脈の一端を端側吻合することにより行なう。

すなわち、まず、recipient の大動脈と下大静脈を左腎動脈の末梢側で血管鉗子を用いて血流遮断



recipientの腹部大動脈、静脈の処理を示す。動脈は1mmのholeを作り、veinは縫代を残し、なるだけ大きく切開する。

図2 ラットにおける腎移植の術式(2)



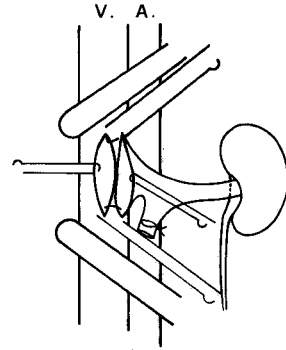
9-0 Nylonを用いて、端一側吻合する。

図3 ラットにおける腎移植の術式(3)

し、下大静脈に9-0ナイロン糸をかけ牽引しつつmicrosurgery用剪刀で約5mmの縦切開を加え、また、大動脈にも同様な操作を行ない約1mmの切開を加え、それぞれを吻合口とする(図2)。

吻合はまず動脈側より行なう。recipientの吻合口の上下端に9-0ナイロン糸をかけ、これをそれぞれのdonor側の動脈中枢側の前壁ならびに後壁の中央にかけて結紮固定し、この2本の糸を支持として端側の連続縫合を行なう。縫合は固定糸の針の付いている側を用いて外膜側より5~6針で連続縫合し、つぎに、腎を右側にはん転し後壁を同様に外膜側より縫合する(図3)。

ついで静脈側にうつるが固定糸のかけ方は最初の2針で動脈側とまったく同様にかけ、さらにそれぞれ前壁中央に同じく9-0の支持糸をかけ、これは結紮せずに左右に引き分け後壁の視野を広



9-0 Nylonを用いて、両端と中間点に支持糸をかけ、後壁より吻合する。

図4 ラットにおける腎移植の術式(4)

げる。

縫合は固定に用いた9-0ナイロン糸の針のついている側を用い、これを内針とし内膜側より連続縫合する。中枢側まで達したら針を外針として外膜側より連続で縫いあげて行く。縫合が終了したら遮断を解除し、縫合部位を軽く圧迫し止血する(図4)。

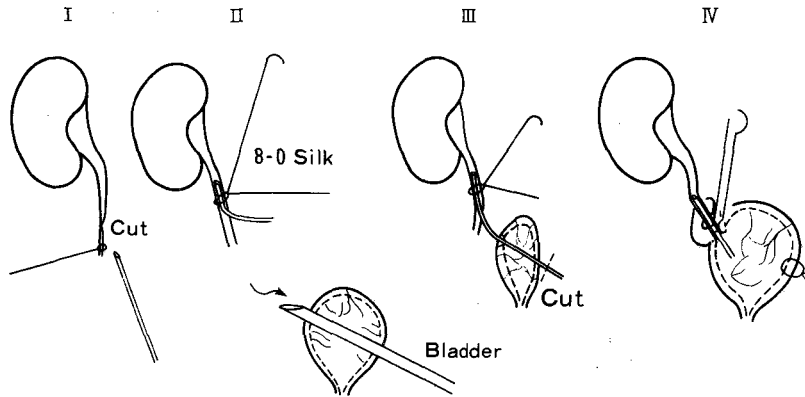
つぎに尿路は尿管膀胱吻合により再建するが、まず、尿管内にカテーテルを挿入し、これを8-0絹糸で固定する(図5のI)。ついで膀胱内にカテーテルを留置するために、膀胱を注射針で貫通させ、その針内にカテーテルを挿入し針ごと尿管を引き抜く(図5のII)。

この操作でカテーテルが膀胱を貫通し、一部が膀胱壁より外に出るが、この余分なカテーテルを引き出し切断することによりカテーテルを膀胱内へ落とす(図5のIII)。このようにしてカテーテルと尿管結紮部を膀胱壁に固定することができる(図5のIV)。

写真1は終了時の状態を示す。なお、自己腎は移植後3日目に摘出する。

3. 組織染色法

腎のH.E.染色をヒトの腎臓の場合と同様に行なった。すなわち、①脱パラフィン・水洗、②カラッチのヘマトキシリン染色、③0.5%塩酸アルコール分別、④流水・水洗、⑤0.5%エオジン洗色、⑥脱水、透徹、封入の手順である。



- I. 尿管を切開しstent catheterを挿入し、固定する。
- II. 次に、Bladderを注射針を用いて貫通。その中にstentを入れる
- III. 注射針を引き抜くとstentは膀胱を横断する。stentを切断短縮。
- IV. 入口部固定し、出口部に縫合糸をかけてstentを切断する。

図5 ラットにおける腎移植の術式(5)

表1 Survival times of allograft.

Donor	Recipient	Survival times(days)	mean(days)±S.D.
SHR	Wistar	4,4,5,5,5,6,7,8,8,9, 9,9,11,12,12,13,13,14,15,16,	9.25±3.71
Wistar	SHR	2,3,3,7,7,8,	6±2.60
SHR	F ₁ -hybrid	6,7,7,7,8,8,9,9,10,11, 11,15,15,18,19,20,24,30,38,39, >100,>100,>100,>100,	29.6±32.7
F ₁ -hybrid	SHR	3,3,5,5,5,6,6,6,7,	5.1±1.3

成 績

1. 腎移植後の生存期間

SHR腎をWistarラットに移植した場合の平均生存日数は 9.3 ± 3.7 日であり、F₁に移植した場合の平均生存日数は100日以上生存した4匹を加えると 29.2 ± 37.2 日以上であった。

一方、SHRをrecipientにした組合せでは、donor腎としてWistarラットを用いた場合は平均 6 ± 2.6 日で、F₁の場合は 5.1 ± 1.3 日であった(表1)。

2. 組織学的所見

SHR腎をWistarラットに移植後7日目にえ

られた腎の特徴的な組織所見は、小動脈中膜の著明な肥厚、一部の拡張を伴った尿細管の著しい変性およびその周囲間質の高度な小円形細胞浸潤であった。このほか糸球体にもヒアリン変性などが認められた(写真2)。

しかし、SHR腎をF₁に移植し、長期生着した腎の組織標本には、小動脈の中膜に同じく著明な肥厚を認めるが、小円形細胞浸潤を伴わず、また、尿細管、糸球体にも変化は見られなかった(写真3)。

考 察

ラット腎移植実験の特徴は、inbred strainの利

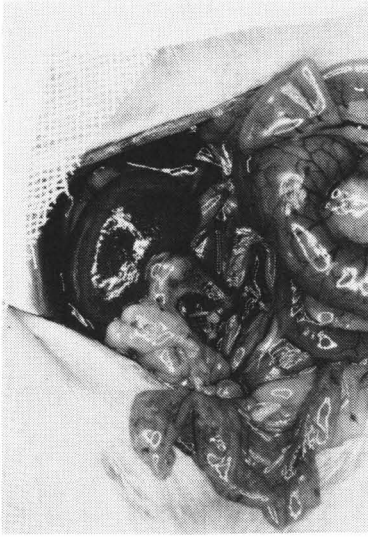


写真1 吻合終了時。動・静脈は端側吻合し、uretero-cystostomyを行なっている。

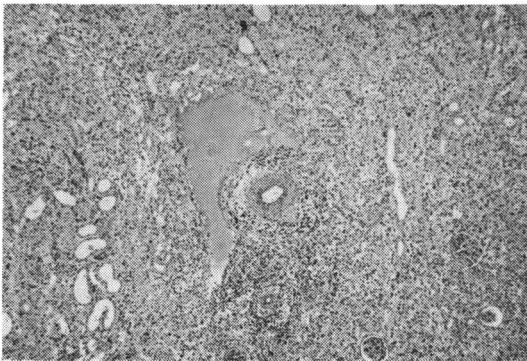


写真2 SHR腎の拒絶反応時の組織像(HE染色400×)。小円形細胞浸潤が著明で、一部尿細管の破壊が認められる。小動脈の肥厚は著しい。

用できることであり、また習熟すれば手技的にも容易であり安定した成績をうることができる。手技についてはLeeら³⁾の記載したものが基本であるが細部についてはその後Gonzales⁴⁾、Salamn⁵⁾、野沢⁶⁾、高崎⁷⁾により様々な改良、工夫がなされている。

移植術の成否を左右するものは血管吻合と尿路再建であるが、前者については大動脈、下大静脈をカフ状に切除するよりも、方法の項に記載したように両者を切断し、その一端を用いて端側吻合

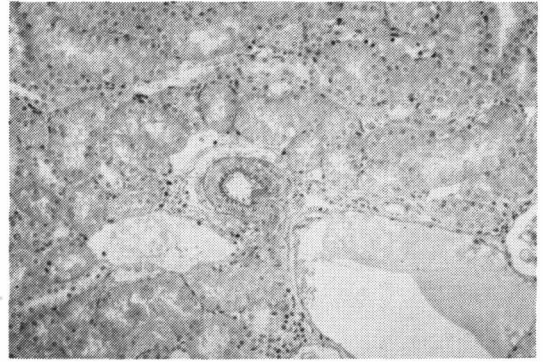


写真3 SHR腎の長期生着時の組織像(HE染色500×)。拒絶反応を思わせる所見はない。小動脈の肥厚は認められる。

した方が容易である。血流再開後に出血がある場合には圧迫止血のみで充分であった。

尿路再建にはuretero-cystostomyを用いた方が簡単で成功率も高かった。なお、カテーテルとしてはSilastic Medical Grade Tubing 0.012 inch IDがもっとも適しており、他のもので代用はできなかった。われわれの実験においても、これを用いることにより尿漏れや尿路障害は減少している。

ラット間の腎移植においては主要組織適合抗原であるR抗原系が問題⁸⁾となり、R抗原不適合では全例が急性拒絶を示すのに対し、non-R抗原不適合では大部分が長期生着すると考えられている。SHRはWistar-Kyotoラット中の高血圧を起こす個体を代々交配することにより作られた高血圧発症ラットでありSHR腎をWistar-Kyotoラットへ移植を行なうことができるならば理想的実験モデルと考えられる。しかし、通常のWistar-Kyoto自身も軽度血圧上昇を示すばかりでなく、SHRと同様に抵抗性が弱く、腎移植後の長期生存は困難であった。

SHR腎をWistarラットに移植した場合の平均生存日数は、 9.25 ± 3.71 日と短く、また死因は急性拒絶反応であり、本実験の目的には適していないことが判明した。

そのため、われわれはSHRとWistarラット間で交配を行ないF₁を作製し移植を行なった。

SHR腎をF₁に移植した場合、7日前後の死亡

例では尿管損傷などによる尿漏れが原因であり、それ以後の死因は尿管通過障害による腎機能低下と考えられ組織学的には拒絶反応は明らかでなかった。

F₁腎をSHRに移植した場合は尿漏れ、感染はなかったがSHR自体の脆弱性に基因していると思われる死亡が多かった。

結 論

SHR腎をWistarラットとSHRとの間にできたF₁に移植する腎移植手技を確立した。

移植されたSHR腎は長期にわたって生着し組織学的にも強い移植免疫反応は認められなかった。

本実験モデルは高血圧の発生機序を解明するために長期にわたり種々の分析を行なううえで極めて有用なものと考えられる。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わった恩師太田和夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、適切な御助言、御協力をいただいた腎臓内科杉野信博教授ならびに泌尿器科学東間紘助教授

および教室の諸兄に謝意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, K. and Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Jpn Circ J* 27 282~293 (1963)
- 2) Tanase, H., Suzuki, Y. and Ooshima, A.: Genetic analysis of blood pressure in spontaneously hypertensive rat. *Jpn Circ J* 34 119~1212 (1970)
- 3) Lee, S.: An improved technique of renal transplantation in the rat. *Surgery* 61 771~776 (1967)
- 4) Gonzalez, E.E., Nathar, P. and Miller, B.E.: A method for transplantation of the rat kidney. *Ann NY Acad Sci* 99 795~798 (1962)
- 5) Salaman, J.R.: Renal transplantation in the rat. *Br J Surg* 56 818~821 (1969)
- 6) 野沢真澄・榎本勝之・Lee, S., Orfolf, M.J.: ラットにおける腎臓移植—単腎および両腎移植の手術手技. *移植* 12(4) 245~248 (1987)
- 7) 高崎 登・長谷川信雄・岡田茂樹・他: ラット腎移植における手術手技. *移植* 14(5) 283~288 (1980)
- 8) 平野哲夫: 近交系ラットの同種腎移植 (1). *移植* 11(5) 143~147 (1977)