

博士学位論文

学位論文題目 体外臓器灌流下の腎臓再生に関する基礎研究
Basic research on the regeneration of damaged kidney under ex vivo machine perfusion

生体情報システム科学専攻

氏名 小倉亮介

主査：中村真人 教授 (指導教員)

副査：篠原寛明 教授

：北村寛 教授

目次

- 1章 要旨
- 2章 序論
- 3章 研究目的
- 4章 初期灌流液組成の検討
- 5章 機械灌流腎臓に対する抗浮腫薬効果の検討
- 6章 腎臓画像評価法：超音波エコーによる糸球体の観測の検討
- 7章 腎機能評価法の開発：イヌリン、PSP、FITC 標識アルブミン負荷試験による腎機能検査法
- 8章 腎機能評価法の開発：血管収縮薬を用いた血管機能評価法
- 9章 機械灌流腎臓に対する血管拡張薬効果の検討
- 10章 細胞移植実現に向けた基礎研究
- 11章 総括
- 12章 Future Works
- 13章 謝辞
- 14章 参考文献
- 15章 Appendix

1章 要旨

人工透析治療を受けている患者人口は年々増加し、2016年の時点で33万人にも上る。種々の疾患で腎臓が傷害され腎不全に陥った場合、尿を作るネフロン（腎小体）の細胞も構造自体も失われるため、自然治癒することはない。腎臓移植を受けなければ、一生人工透析を受けるしかない。透析治療はあくまで体内に溜まった水や老廃物を排出する治療でしかなく、週に何回もの透析が必要で、日常生活の Quality of Life (QOL) も満足いくものではない。同時に医療費の圧迫も問題になっている。依然、腎移植が最終治療手段となっているが、移植臓器は圧倒的に不足しており、希望者数に対し移植件数はわずか13%足らずで、しかもその大部分は生体腎移植で、家族親族は大きな犠牲を払っている。腎臓を再生する治療法は未だないに等しい。

この問題に対して、医工学の観点から、新規治療法の開発として、機能不全に陥った腎臓を生体外で灌流培養を行い、集中治療を施し再生させる方法の開発を目指し、取り組んだ。本研究では「体外長期腎臓灌流培養技術の開発」、「灌流培養中の腎機能評価法の開発」、「灌流腎臓治療法の開発」の3つを大きなテーマとして研究を進めてきた。

第一に体外長期腎臓灌流培養技術の開発として、まず企業との共同研究で灌流培養装置の開発を行った。「灌流量」「灌流圧」「灌流液温度」を常時モニタリング可能にし、灌流圧を設定しフィードバック機構を持たせることで自動的に適切な灌流量に調節することが可能になった。また、人工肺を取り付け灌流液への酸素付加も可能にした。灌流液だけの灌流では pH 低下や乳酸値上昇がみられたが、赤血球を添加することで、それらを防止する効果があることを確認した。

第二に、集中治療を行うにあたり、治療法の効果判定には、体外臓器灌流下の腎臓の灌流状態や機能を定量的に評価する技術が必要であると考えた。そこで、まず、低侵襲かつリアルタイムで評価が可能な超音波エコー装置を用いて、灌流下の腎臓の循環動態の評価及び微細構造の形態評価を試みた。その結果、腎臓内の血行動態の観察及び、糸球体の観察を確認した。これまでに超音波エコーを用いて灌流腎臓の微小血管の可視化・評価をした報告[1-3]や、急性腎障害の予測ツールとしてエコーを用いた研究報告[4]はあるがエコーによる糸球体の定量評価は例がなく、独自の研究成果である。腎機能検査については、臨床で行われている「イヌリン負荷試験」と「PSP (Phenolsulfonphthalein) 負荷試験」に着目し、臨床プロトコルを灌流培養用に改良し、時間経過による各検査薬の濃度変化やクリアランスを求めた。また、蛋白尿が見られたため、ウシ血清由来のアルブミンに蛍光試料である Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC-1) をラベル化したアルブミンを作製し、灌流液に添加し、尿中に排泄されるアルブミン量の定量化を行った。これらの結果、尿中の負荷試験薬濃度変化やクリアランス値から近位尿管や糸球体ろ過量の障害、また、尿中にアルブミンの定量から、糸球体の濾過能に障害が示された。さらに、腎血管の反応を調べるために血管拡張剤としてベラパミルやニトログリセリン、血管収縮薬であるアドレ

ナリンを投与して血行動態の変化を測定した。血管拡張剤を用いることで、灌流量増加の傾向が見られ、安定した灌流量確保に有効であることが示された。アドレナリン投与では、灌流時間によってアドレナリンの効果発現の時間変化に違いが見られ、臓器の機能評価にアドレナリンが有効である可能性が示唆された。

第三に腎治療の開発として間葉系幹細胞（MSC）による治療法に着目し、間葉系幹細胞（MSC）による腎臓の再生を目指し、屠殺ブタから脂肪組織由来間葉系幹細胞の採取方法を確立し、間葉系幹細胞（MSC）の同定を行った。幹細胞の採取のために初代培養の条件として、コラゲナーゼの作用時間や遠心分離時間、そして遠心力の条件を変更して検討した。その結果、間葉系幹細胞採取に適した遠心速度や時間などの条件を絞り込むことができた。また、細胞の同定方法として、抗 CD105 抗体と von Willebrand Factor (vWF) による免疫染色法と、フローサイトメーターを利用した方法で同定を行った。得られた細胞は CD105 を発現していたのに対して、vWF は未発現であり、フローサイトメトリーによる同定では、初代培養された細胞の均一な集団においては、CD105 が発現した細胞が 9 割を超えていることが確認された。

以上、機能不全に陥った腎臓を生体外で灌流培養を行い、集中治療を施し再生させる方法の開発を目指して研究を開始し、上記の結果を得た。腎臓再生への道のりは長いですが、体外臓器灌流下の腎臓再生に向けた研究を大きく前進させることができた。

2 章 序論

2.1 臓器移植の現状とその問題点

臓器移植とは、病気や事故によって臓器が機能しなくなった場合に、健全な臓器を移植して機能を回復させる医療である[5]。

我々の体にある臓器は、それぞれ、我々が生命を維持し生命活動を営むための重要な機能を担っている。それらの臓器が障害され、その機能が十分働けなくなった場合、様々な病的な症状が現れ、生命が危機に瀕する。そのような病態を臓器不全という。早く臓器機能を復帰させねば、次々臓器が障害され、やがて多臓器不全となり生命が失われる。臓器不全はきわめて重篤な病態である。通常、内科的、外科的な治療で集中管理し対応するが、効果がない場合も少なくない。そのような場合には、臓器機能を代替するしか救命の道はない。人工臓器がそれを目指して開発されてきた。人工心臓や人工腎臓、いわゆる透析医療などである。しかし、人工臓器はまだまだ生化学的、生物学的な機能の代替はできない。例えば透析医療の場合、体内に溜まった老廃物や水を一時的に排除することどまり、毎週3回透析で除去する必要がある。あくまで対症療法であり、これを患者は一生継続しなければならないのである。それで、最終的な根本治療として、健全に働く臓器を埋め込み、治療する移植医療がある。最後の砦となる治療法である。

また、移植された患者さんは臓器不全から脱して、きわめて元気になる。社会復帰する患者も多い。臓器を取り換える治療は、きわめて大きな治療効果をもたらす。

臓器移植の問題点：

このように臓器不全には劇的な効果を示す臓器移植医療であるが、問題点は少なくない。

- ドナー臓器不足：待機せねばならない時間は年々延長している。
- 生命倫理的問題：脳死問題、心理的問題、社会的問題、宗教的・哲学的問題
- 医学的問題：拒絶反応、免疫抑制剤

等があげられている。我々は特にドナー不足の問題点を解決すべく研究を進めている。

臓器移植の現状：

日本における移植希望登録者数や臓器移植の現状は、日本臓器移植学会、臓器移植ネットワークなどから統計資料が公表されている[6,7]。

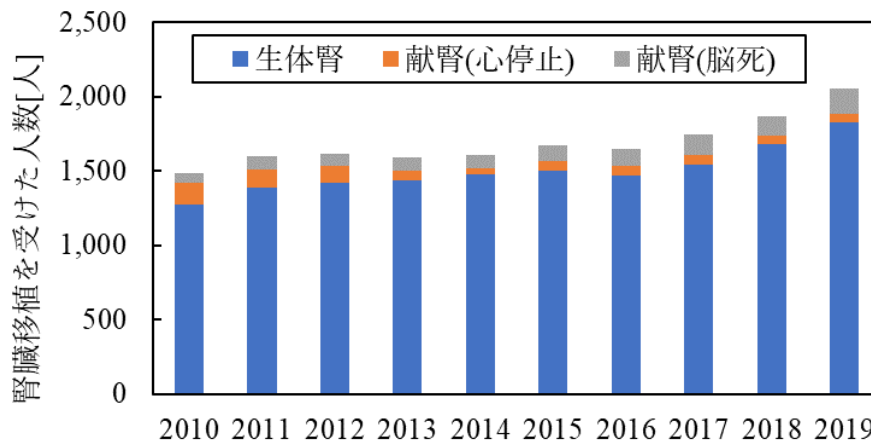


Fig. 1 直近 10 年の腎移植実施症例数

(腎移植臨床登録集計報告 (2020) 2019 年実施症例の集計報告と追跡調査結果 改変)

Fig. 1 は、直近 10 年の腎移植実施症例数の推移である。腎臓の移植希望者は 13000 人[6] に対し、移植件数は多い年でも 1900 件程度[8]であり、残りの 1 万人以上は希望しても受けることが出来ない。献腎からの腎移植は 200 足らずで、腎不全患者が献腎による移植が行われるまで平均 15 年待機期間を有するともいわれている[9]。加えて、生体腎とは生体腎移植のことであるが、健康な人からの臓器提供である。臓器提供の決断と勇気はとうていいまねできるものではないが、何と毎年 1400 人も健康な人がその決断をし、臓器を提供している。

2.2 透析医療

移植を除いて腎不全患者への治療法としては、人工透析（血液透析、腹膜透析）が挙げられる。腎臓の機能が低下すると体内で生じた不要物（尿毒素）を尿から体外へ排泄できなくなり体内に溜まってくる。また水分や電解質の調節もできなくなってくる。人工透析は透析によって溜まった不要物を除去し、水分電解質の調整を行う治療である。溜まったら除去する対症療法的な治療であるため、定期的に週に 3 回一回数時間必要となるうえ、食事制限や水分制限も必要となる。長時間治療に拘束されることで、患者の生活の質 (Quality of Life :QOL) 低下も避けられない[10]。障害された腎臓の回復は通常期待できないため、患者さんは一生涯透析生活となる。

さらに透析医療は今、社会的にも問題になってきている。患者数は年々増加し、今や 30 万人を超えている。医療費の面で見ると 1 人当たりの年間積算医療費は血液透析患者では約 481 万 4,400 円、腹膜透析患者で約 631 万 4,400 円[11]、年間総医療費は血液透析療法 1.44 兆円、腹膜透析療法 600 億円で、透析患者だけで 2 兆円を占める。国民総医療費の総額は 40 兆円であるから、そのうちの 2 兆円を透析医療が占め、しかも患者数はどんどん増えていることから、今後、透析医療が医療費を圧迫していくことは深刻な社会問題である。

このように、移植医療、透析医療の問題解決は日本の急務ということができる。

また、移植が行われている欧米でも、臓器不足は深刻な問題となっている。これまで助かっていた患者が臓器不足で助からなくなってきたため、臨床現場の関係者もその解決策には真剣である。

近年マージナル臓器の利用、および臓器灌流保存が注目されている。

2.3 マージナル臓器の利用

移植法の改正に伴い脳死ドナーからの提供が増えてきたものの、提供臓器はいつも利用できる臓器ばかりとは限らない。移植条件を満たすドナーは標準的ドナーと称され、移植医療に利用される。しかし、提供者の年齢が高齢化しているとか、他の臓器の病気を抱えている場合など、条件から外れるドナーは、臓器が使える可能性のある場合は拡大適応ドナーと呼ばれる[12]。このように、移植に使えるかどうか、どの程度まで許容するか境界領域にある場合の臓器をマージナル臓器という。現在、マージナル臓器は使えないと判断されたら廃棄されている。

ここでもし、そのようなマージナル臓器が何らかの処置をすることで条件を良くして利用できるようになったら、臓器移植で救われる患者の数は激増する。ドナー臓器の不足が深刻化している中、マージナル臓器の活用はドナー臓器不足の解決への一助となることが期待される。

マージナル臓器をそのまま浸漬保存しても劣化していきただけであり[13,14]、特に日本の腎移植の現状においては上記でも述べたが、心停止ドナーからの提供に依然大きく支えられている。

2.4 臓器保存法：単純低温浸漬保存と低温灌流保存

現在、臨床において主流な移植用臓器の保存方法は臓器保存液を用いて臓器内の血液、血栓等を洗い流し、同時に臓器内温度を下げ、臓器保存液に浸漬し0-4℃下で保存する単純低温親戚保存法になる。しかし、近年低温の灌流液を、臓器灌流装置を用いて臓器内を灌流液で循環させながら保存する低温灌流保存法の優位性が報告されている[15]。

臓器の虚血障害が生じる要因となる工程として以下の8つにわけることが出来る[16]。

1. 脳死確認時
2. 脳死後の循環動態が不安定な時期
3. 摘出手術時
4. 動脈遮断～臓器灌流時
5. 単純冷却浸漬保存時
6. 移植操作時
7. 再灌流時

8. 移植後の循環動態が不安定な時期

単純低温浸漬保存は上記の条件4の場面で、体温下で血流が停止している状態の期間（温阻血時間）を可能な限り短くすることを目的として行われている。しかし、単純低温浸漬保存にはいくつかのデメリットが存在する。

まず1つ目は細胞構造の破壊である。細胞膜には細胞の構造を維持する役割があるが、低温下にあると細胞膜の脂質層が変化し細胞膜が不安定になり、結果として水などの物質が細胞内に透過しやすくなり細胞の膨化が起こるといわれている[17]。

2つ目は細胞内アデノシン三リン酸（Adenosine triphosphate: ATP）の減少である。低温下ではミトコンドリアの活性が低下しアデノシン二リン酸（Adenosine diphosphate: ADP）を産生する酵素活性が低下するためATP産生が停止してしまう。そのため、細胞内のATPが枯渇していくことが分かっている[17]。これらの問題を解決すべく、保存液には細胞の細胞膨化防止剤、移植後のATP産生を促すためにアデノシンやグルタチオンといった代謝前駆物質が添加されている[16]。しかしながら、保存液にこのような薬剤を添加していても臓器内に十分な酸素・栄養素がいきわたらないため、保存時間が長くなればなるほどダメージが蓄積され、臓器の状態は悪化していつてしまう[18]。

一方、低温灌流保存は臓器に安定して酸素や栄養を供給することが可能な保存法である[16]。また、灌流中の流量、圧力の計測や保存液中の逸脱酵素を測定することで臓器のViabilityや機能を判定することができるため、移植後の管理に有効である[19–21]。このことから浸漬保存と比較して長期間の保存に向いているといえる。温阻血時間が15~20分以上、保存時間が24時間を超える場合は低温灌流保存が優れているという報告[22]や、24時間保存では灌流保存と浸漬保存に有意差は確認されなかったものの、48時間保存では灌流保存の方が機能、組織学的所見とも浸漬保存より有意差をもって優れていたという報告[23]もある。

また、オランダ、ベルギー、ドイツなどの多施設大規模比較試験結果の報告では、同一死体腎ドナーの腎臓を単純冷却保存、もう一方の腎臓を低温持続灌流保存とし臨床実験を行ったところ、低温持続灌流保存法にて保存した腎臓が移植後臓器機能障害（Delayed Graft Function: DGF）日数の短縮やDGF発生率の減少、移植後透析の早期離脱、移植臓器の長期生着率の優位性が示された[19]。また、Balupuriらは心停止後蘇生不能となった症例でも近位尿細管の障害マーカーとして知られている α GSTなどの判定法を用いる事によりViability判定を行わずに移植していた時代よりもドナー数が増え、移植後成績が向上したと報告している[24]。これらの報告から低温浸漬保存より低温灌流保存法の有効性が認識され、現在、臓器灌流法による臓器保存法が注目され、「臓器灌流法」「Machine Perfusion」などがキーワードとなり、また一方で、移植医療の臨床にも臓器灌流装置の開発・実用化が世界的に始まっている。

臓器保存法において臓器灌流が効果的である理由

移植を行う上で避けて通れないのが臓器の保存である。

臓器灌流保存法を行う意義として以下の内容が期待される。

- ① 臓器内を灌流することで液性因子をはじめ、活性酸素種といった臓器に対して害になる物質の除去が可能になり、臓器内の障害の軽減が期待される。
- ② 臓器灌流液や、臓器のパラメータを適切に管理し持続灌流することで臓器に必要な酸素や栄養素といったものを安定的に供給することが出来る。
- ③ 必要に応じて薬剤投与が可能である。
- ④ 浸漬保存と比較して生体内環境に近づけることが出来る。
- ⑤ 浸漬保存と比較して臓器内温度の管理が容易である。

①では、血管内に存在する血栓を洗い流すことが可能である。血栓は臓器内循環動態を阻害し、臓器の細部への酸素不足、栄養不足といった問題を引き起こす。また、虚血再灌流で組織が障害される理由として活性酸素が原因となっていることが知られているが、臓器内の血管内にはそのような物質が多く含まれている。臓器灌流でそれらを洗い流すことができる。腎保存においても温阻血障害や高齢ドナーの場合持続灌流を推奨する論文が多数存在する[25]。

②では、灌流中の流量、圧力等機能評価をするうえで必須のパラメータをリアルタイムで計測が可能であり、臓器の状態を常に把握することが出来ることから、今なにが臓器に必要なのかを診断でき、適切に投与することが出来る。

③では、②同様適宜必要な薬剤を投与できるため、臓器の機能維持及び回復に効果的である。

④では、臓器内を生体の血液循環同様灌流液の循環があり、浸漬保存と異なり栄養、酸素、液性因子等適宜供給され、老廃物は洗い流すことが出来るという観点からも生体内の環境を再現できるといえる。

⑤では浸漬保存では浸漬させる保存液の温度によって調節はできるものの、臓器内温度の調節は困難である。また、復温を考えると灌流液温を自在にコントロールできる方が臓器ストレスを抑えることが出来る。

また、Renkens らは DGF (Delayed Graft Function:移植腎機能発現遅延) 期間が長期予後に影響するとし、これを短縮する方法として持続灌流保存法を選択している[26]。

上記のように、臓器灌流は、障害を最低限に抑え、移植後の合併症の回避、グラフト生着率の上昇に有効であるという灌流の効果と、臓器灌流によって臓器の状態を推測する情報が得られるという計測への効果、さらに灌流における様々なパラメータを維持したり能動的に制御したりできる制御性のメリットがある、ということができよう。

今後、移植分野におけるマージナル臓器を安全に使用していく為に、臓器灌流保存装置、灌流保存技術の進歩発展が望まれている。

2.5 体外臓器灌流を用いた腎臓再生医療

臓器移植医療分野で注目されている臓器灌流だが、我々はこの技術を再生医療の分野に応用させられるのではないかと考えている。

再生医療とは、体外で人工的に培養した細胞を患者の体内に戻すことで臓器などが失った機能を回復させることや、体外で人工的に構築した組織を患者に移植することで、損傷した臓器や組織を再生させ機能回復させたりする医療のことである[27]。

臓器灌流を用いた腎臓再生医療は、マージナル臓器などの移植が困難である腎臓に対して灌流によって機能回復させ、移植可能の状態に近づけることを目的としている[28]。臓器再生に向けて様々な方法が研究されており、K.-C. Lin らの研究では急性腎障害を起こさせたラットに対して脂肪由来間葉系幹細胞(adipose-derived mesenchymal stem cells : ADMSC)や幹細胞由来細胞外小胞を静脈投与することで、再灌流障害から腎臓を保護できるという報告がされた[29]。また、M. Gregorini らの研究ではラットの腎臓を温虚血に暴露したのち骨髓由来間葉系幹細胞や幹細胞由来細胞外小胞を添加した Belzer 溶液で 4°C,4 時間の機械灌流を行うことで、細胞生存に不可欠な酵素機構を維持し虚血性損傷から保護し、再灌流障害からも保護できることが報告された[30]。さらに、S.-F. Ko らの研究では induced Pluripotent Stem cells(iPS 細胞)由来の間葉系幹細胞を静脈投与することで再灌流障害から保護される報告[31] があるなど、灌流と細胞投与の併用が腎臓の再生に効果があることが示唆されている。さらに、ビタミン C やビタミン E には腎臓における酸化ストレスの軽減、血管新生の促進などの効果があることが報告されている[32,33]。また、ビタミン B によって再灌流障害が生じた腎臓機能・形態を改善することが報告されている[34]。これらの報告から灌流培養を用いた腎臓の再生・治療が可能であると考えられ、臓器の低下した機能を灌流培養によって改善させ移植に用いることや、人工透析患者の腎臓を灌流培養によって機能改善させ、患者自身に移植させるといったことが可能になれば、ドナー不足問題を大きく解消できるのではないかと考える。

2.6 体外臓器灌流治療における長期灌流の重要性

損傷部位の再生を期待して灌流中に脂肪由来間葉系幹細胞 (MSC)や幹細胞を培養する際に産生されるエクソソームといった因子などを灌流液に添加することで臓器を損傷から保護が可能であるといった報告がされている[29,30,35]。しかし、これらの報告では灌流時間が数時間と短いことや、幹細胞投与後すぐに移植を行っているため臓器機能が体外で回復したかどうか定かでない。体外灌流下において、幹細胞や幹細胞由来因子等で臓器機能回復を図るのであれば、細胞増殖に必要とする期間は灌流を続ける必要があると考える。A. Weissenbacher らの研究では、尿を再循環させて常温機械灌流を行うことで血行動態や灌流液中の酸塩基の安定性が維持され、24 時間の機械灌流を可能にさせるという報告がされた[36,37]。しかし、研究室の先行研究より屠殺場から採取したブタ腎臓を用いて 24 時間の常温機械灌流を行った際に灌流量が次第に低下していくことが確認されており、灌流量の

低下は臓器へ送達される栄養や酸素不足を引き起こす可能性があるため安定した灌流量を確保することが臓器再生を図るうえで重要であると考えます。

2.7 臓器灌流での再生医療

当研究室では長期灌流と並行して、我々は機能不全に陥った臓器を体外へと取り出し、その臓器に対して細胞移植や、薬を塗布したりすることで集中的に治療を行うことを目的とする方法を模索している。体外にて灌流培養をしつつ治療を行うため、他の臓器への影響がなく、体内での治療において効果が薄かったり、他臓器に影響を与えるため利用できなかったりした治療が可能になると考えられる。実際、現在研究されている方法の中で、その臓器に対して機能回復を促進するような細胞を移植すること[38,39]や、薬剤を直接投与することで臓器機能の回復を目指すといったものがある[40]。この方法では臓器を一から作成する必要がないという利点がある。このような成果が報告されてきているが、現状の腎臓病の治療は、悪化防止のみで失われた腎組織の機能を取り戻す治療ではない。再生医療においても細胞や細胞スフェロイドを移植できてもその後の組織形成はすべて生体と運に任せるしかなく、有意な策はない。

そこで我々は、移植における究極の治療法を提案する。(Fig. 2) これは、臓器不全に陥った臓器を臓器灌流装置にて体外で長期間体外灌流培養を行っている間にその臓器に対して薬物治療・細胞移植などの集中治療を施すことにより「臓器の再生」をし、また患者の体内に戻すというアイデアである。このアイデアが実現すれば患者の数だけドナー臓器が存在するという状況が生まれるため、ドナー臓器不足の問題が完全に解決すると期待される。腎不全になった腎臓の組織は時間経過とともに悪化していくことから組織の画像的な評価は非常に重要である。

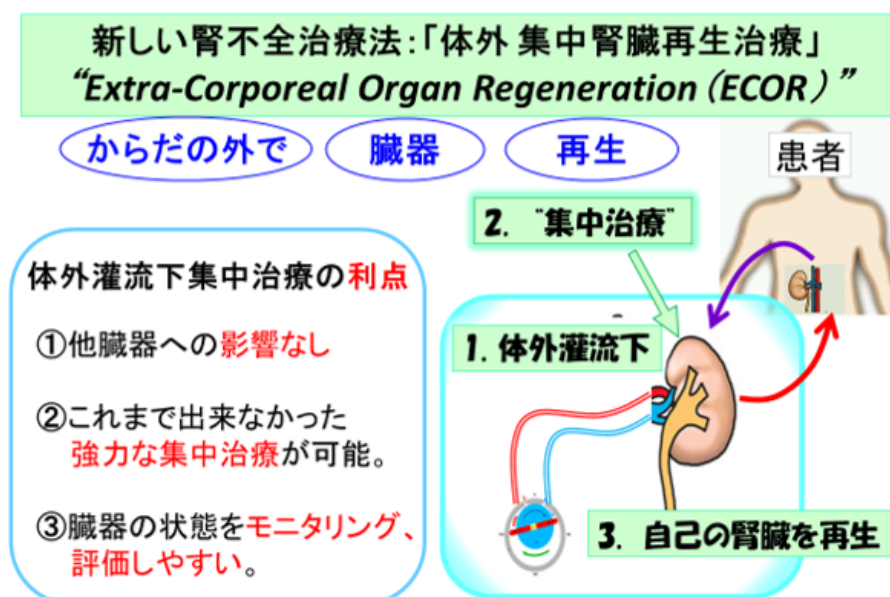


Fig. 2 腎治療コンセプト概略図

2.8 灌流腎臓の評価法

臓器の治療には効果的に治療できているかを判断するために、臓器の状態を評価する必要がある。臨床の現場では腎臓の評価にはクレアチニンクリアランスや血清尿素窒素(BUN : Blood Urea Nitrogen)などの代謝産物の分析が用いられている[41]。しかし、これらの評価法は灌流液にそれぞれを加えないと灌流臓器の評価には用いることが出来ない。その為、有効な評価方法を確立することが必要である。また、灌流臓器の評価にはアスパラギン酸トランスフェラーゼ(Aspartate transaminase : AST)や乳酸デヒドロゲナーゼ(Lactate dehydrogenase : LDH)などの逸脱酵素を分析し細胞の障害の程度を評価する報告が多い[42-44]。しかしこれらは、ドナー臓器の障害の程度を評価するパラメータであり、急性期の評価に限られる。

臓器再生の評価に有効な方法が必要である。次に、先述の評価法は腎臓から得られる逸脱酵素や代謝産物を分析し、評価方法が提案されているが現在画像による評価基準というものがない。体外に取り出された臓器内に血栓等により血管梗塞があると灌流液が届かなくなり、最悪の場合には臓器の壊死を引き起こす。そのため灌流中の臓器の循環動態を知る必要がある。また、治療や灌流培養を行い腎臓に何かしらの影響があった場合、灌流腎の構造や循環動態を評価する必要がある。その上で画像評価は必要でありかつ重要である。

循環評価を行うにあたり方法がいくつかあるが、本研究では超音波エコーに着目した。当研究室ではこれまでの研究で循環評価を行う際には目視、MRIを使用していた。目視では灌流後に腎臓を切り開き血栓の有無を目視で観察する方法である。目視は簡便であるものの侵襲してしまう問題がある。MRIでは造影剤を流し観察する方法である。MRIは非侵襲であるが装置が大きく、灌流後にしか評価が行えない。灌流状態は灌流前後に限らず、灌流中に評価出来ることが重要であるためリアルタイムかつ非侵襲に評価することが可能な超音波エコーを用いた画像評価法の開発を行った。

特に腎臓はネフロン、糸球体といった構造があり、そこで血液のろ過、尿の生成が行われる。腎不全ではこの構造が障害されている。したがって、腎臓再生には、ネフロン・糸球体の再生が必須であること、そしてその再生を客観的に判定する方法を見出すことが必要である。バイオプシーだと貴重な腎臓を傷つけてしまう。そこで、第6章ではネフロン・糸球体の評価を目的に、超音波検査、蛍光観察を用いて、血管造影を行い、腎臓内の糸球体の検出、定量的機能評価手法の開発を目指す。腎臓の糸球体の定量的な評価が可能になれば、病的腎臓の評価とともに、将来的に、腎臓再生治療の効果判定、再生腎の再移植の判定指標の作成にもつながる。さらに体外灌流による腎臓の集中再生治療装置システムを開発する際に有効な計測評価システムのハードウェア、ソフトウェアの開発に貢献が期待される。

3章 研究目的

現在の腎不全患者に対する主な治療法は腎移植と透析療法の二種類ある。腎移植にはドナー臓器の不足や生体の犠牲が必要となってしまう問題があり、透析療法は日々の透析治療により生活の質が下がってしまうことや、根本的な治療にはならない問題がある。更に腎臓は、その構造的複雑性から現状において臓器の作製や、機能の再生が非常に難しい臓器と言われており、革新的な腎臓再生技術の開発が必要とされている。

我々は、腎不全の患者、腎臓移植を受けたくても受けられない患者のために、前述のように、体外臓器灌流技術を用いた新しい腎臓治療法として、体外での腎臓の集中的再生治療法を開発を目指している。そして、これを実現させるためには、以下の大きな3つのテーマの開発が必要と考え取り組んでいる。

- ①体外における長期腎臓灌流培養技術の開発
- ②灌流培養中の腎機能の評価法の開発
- ③灌流腎臓の集中再生治療法の開発

本研究では上記背景のもと、

①への対策として

4章 初期灌流液組成の検討

5章 機械灌流腎臓に対する抗浮腫薬効果の検討

②への対策として

6章 腎臓画像評価法：超音波エコーによる糸球体の観測の検討

7章 腎機能評価法の開発：PSP、イヌリン、FITC 標識アルブミン負荷試験による腎機能検査法

8章 腎機能評価法の開発：血管収縮薬を用いた血管機能評価法

9章 機械灌流腎臓に対する血管拡張機能の検討

③への対策として

10章 細胞移植実現に向けた基礎研究

以上の研究項目を設定し実験を行った。

4章 腎臓初期灌流実験：初期灌流液組成検討

4.1 背景と目的

本章では、体外腎臓灌流における最初の操作、初期灌流による臓器内血液 Wash Out (W.O.)効果の検討を行った。体内から摘出された臓器血管内には、灌流を行う際に微小循環障害の原因となる因子が多く存在している。臓器灌流を行う前にそれらは初期灌流で W.O.する必要がある[45]。これまで臓器灌流研究の分野であり検討されてこなかった初期灌流であるが、現在は臓器移植のドナー適用拡大が進み、心停止後摘出臓器も移植へ利用する試みがなされてきている。そのため今後は心停止後摘出臓器に対しても効果的に血液を W.O.出来るよう、初期灌流の検討が必要であると考えている。

今回我々は初期灌流液の組成に注目し、効果的な血液 W.O.法の検討を行った。初期灌流に使用されている灌流液は乳酸リンゲル液や、Euro-Collins (EC)液、Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK)液、University of Wisconsin(UW)液などがある[36,46,47]。その中で今回我々は、臓器灌流液のゴールドスタンダードといわれている UW 液を用い、その液組成の検討をした。

UW 液は様々な試薬を用いて調整している[48]。Fig. 3 の中の1つ、コロイド成分であるヒドロキシエチルデンプン (HES)は、赤血球を凝集させる作用があり、初期灌流液として使うには不適であるのではないかと報告がなされた[49,50]。そのため HES の代替となるコロイド成分が必要とされ、UW 液のコロイド成分をポリエチレングリコール (PEG)に変えたところ、赤血球凝集作用が弱くなり、初期灌流に使うための UW 液には HES より PEG が良いとする報告がされている[51]。しかしこの報告は、実際に臓器への初期灌流を行ったものではない。

そこで我々は実際に心停止後摘出したブタ腎臓を用いて、UW 液のコロイド成分の違いによる腎臓内血液 W.O.効果の比較検討を行った。

組成	Amount [g/L]
アデニン(遊離塩基)	0.68
塩化カルシウム(二水和物)	0.068
グルコース(+)	1.8
グルタチオン(還元)	0.92
HEPES(遊離酸)	2.38
HES	50
グルコン酸マグネシウム	1.13
マンニトール	5.4
リン酸カリウム(一塩基)	3.4
D-リボース	0.75
グルコン酸ナトリウム	17.45
水酸化ナトリウム	0.7

Fig. 3 細胞外液組成 UW 液の組成

(Bridge to Life 社 Instruction for Use, Belzer MPS Organ Preservation Solution 改変)

4.2 実験

4.2.1 実験内容

UW 液の組成の 1 つである HES の代わりに PEG を用いて初期灌流による W.O.効果の検討を行った。比較した灌流液条件は、UW 液、UW 液の HES を含まない UW-HES 液、UW 液の HES を PEG に代替した UW+PEG 液である。UW+PEG 液は PEG の濃度を 10 g/L、25 g/L にした 2 種類の液を検討した。

以下の実験器具および材料を使用して実験を行った。

実験材料

灌流液

以下の各灌流液に、血栓溶解剤であるウロキナーゼ（ウロキナーゼ静注用 240000IU、持田製薬、日本）を 24000IU に調整し、1 mL 添加した。

- UW 液 1 L (粘度：2.77 mPa・s)
- UW-HES 液 1 L (粘度：1.4 mPa・s)
- UW+PEG 液(PEG 20 kDa 25 g) 1 L (粘度：2.61 mPa・s)
- UW+PEG 液(PEG 20 kDa 10 g) 1 L (粘度：1.7 mPa・s)

灌流臓器

- 屠殺場ブタの腎臓（心停止後約 2 時間経過）

実験器具

- 灌流培養装置（澁谷工業との共同研究）
- 動脈カニューレ（サフィード延長チューブ、TERUMO、日本）
- 電子天秤（FZ-5000i A&D、日本）

実験試薬

- 血栓溶解剤（ウロキナーゼ静注用 240000IU、持田製薬、日本）

実験条件

灌流圧：100 mmHg 以内

灌流液温度：22°C

実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタから腎臓を取り出し、実験室へ搬送。
2. 搬送後、余分な脂肪等を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行う。
3. 灌流前に腎の重量を測定する。

4. 実験に使うそれぞれの UW 液 1 L に血栓溶解剤としてウロキナーゼを 24000IU 添加したものを、腎動脈から灌流装置にて灌流する。
5. 灌流後、腎の重量を測定、灌流後の写真を撮影する。
6. HE 染色のため、腎臓切片を作製し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。
7. 顕微鏡にて HE 染色サンプルを観察する。

評価項目

初期灌流した腎臓の血液 W.O.効果の評価は、以下の4つの点で評価した。

- ①残存血液のマクロ評価（肉眼的所見）
 - ②残存血液のミクロ評価（光学顕微鏡所見）
 - ③初期灌流パラメータ（灌流量と血管抵抗）
 - ④初期灌流前後における腎重量変化
-
- ①残存血液のマクロ評価では、初期灌流後に目視で確認できた残血部位の比較検討をした。画像解析ソフト(GIMP 2)を使用し、腎面積に対する赤い残血部位の割合を数値化し、比較した。
 - ②残存血液のミクロ評価では、初期灌流後腎臓の切片を Hematoxylin Eosin (HE)染色し、顕微鏡にて腎糸球体内に残る赤血球数を計測し比較した。糸球体 40 個の赤血球数をカウントし糸球体 1 個の赤血球数を求めた。

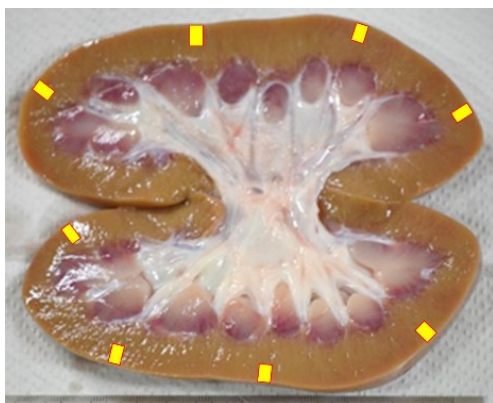


Fig. 4 切片採取場所(黄色箇所)

- ③初期灌流終了直前に測定した灌流圧、灌流量、それから算出した血管抵抗といった灌流パラメータから灌流状態の比較を行う。
- ④初期灌流前後の腎重量を測定し、腎組織に残る水分(浮腫)の比較を行う。

4.2.2 実験結果

①：残存血液のマクロ評価

UW 液

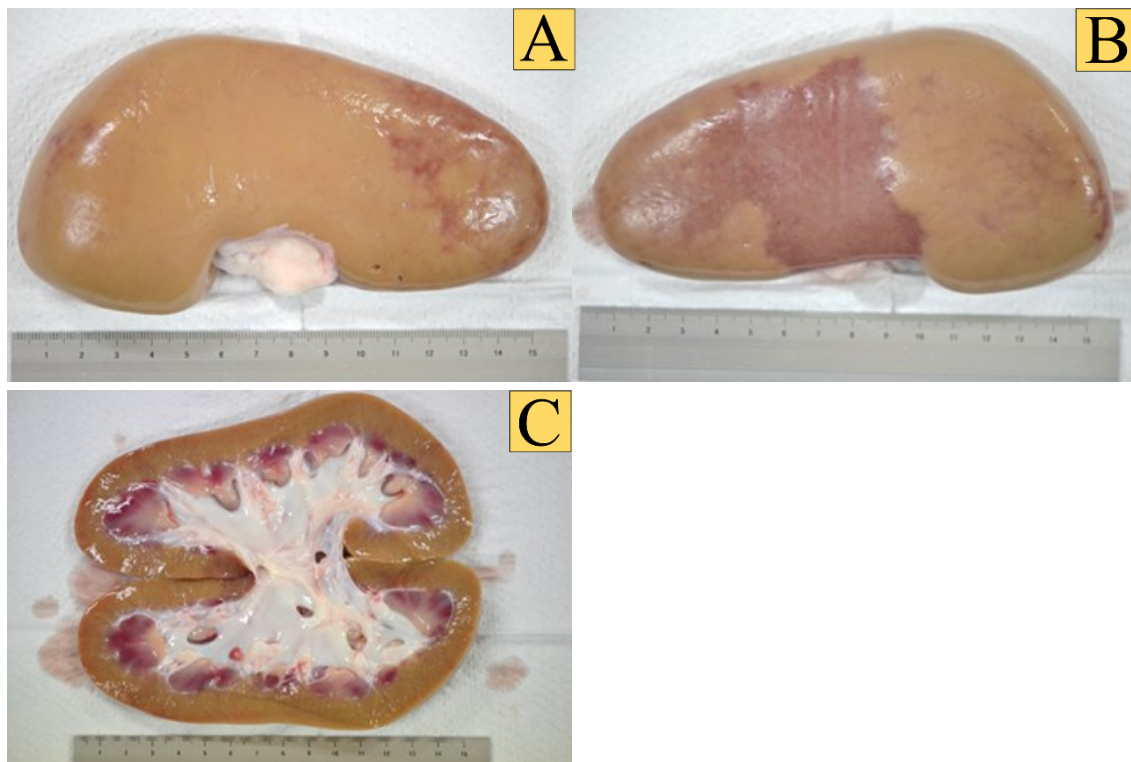


Fig. 5 UW 液の初期灌流後の腎臓写真 (A:表、B:裏、C:断面)

UW-HES 液

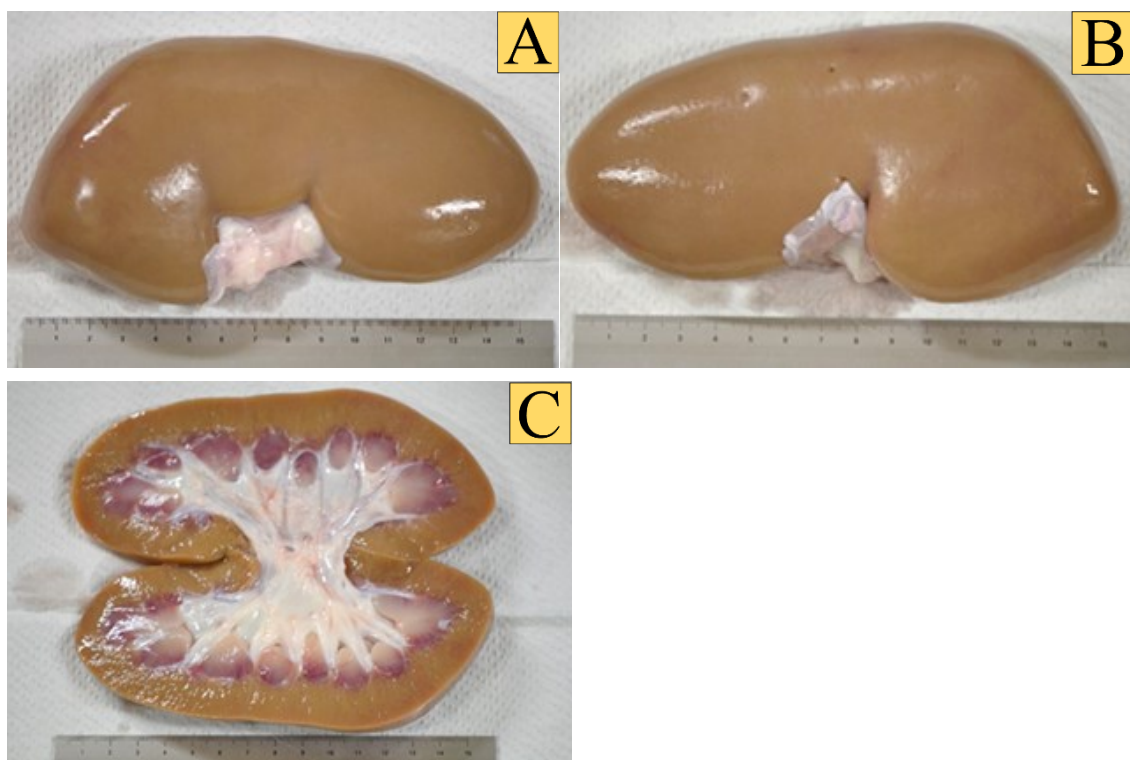
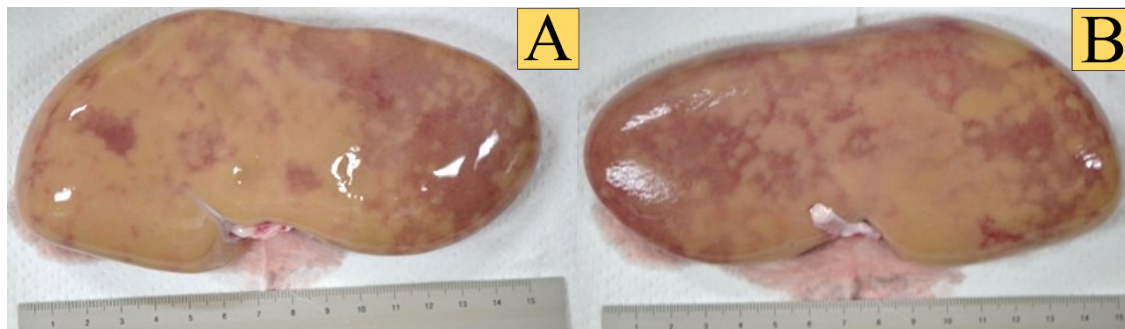


Fig. 6 UW-HES 液の初期灌流後の腎臓写真 (A:表、B:裏、C:断面)

UW+PEG 液 (PEG 25 g)



初期灌流後の腎臓(表)

初期灌流後の腎臓(裏)



初期灌流後の腎臓(断面)

Fig. 7 UW+PEG 液 (PEG 25 g) の初期灌流後の腎臓写真 (A:表、B:裏、C:断面)

UW+PEG 液 (PEG 10 g)

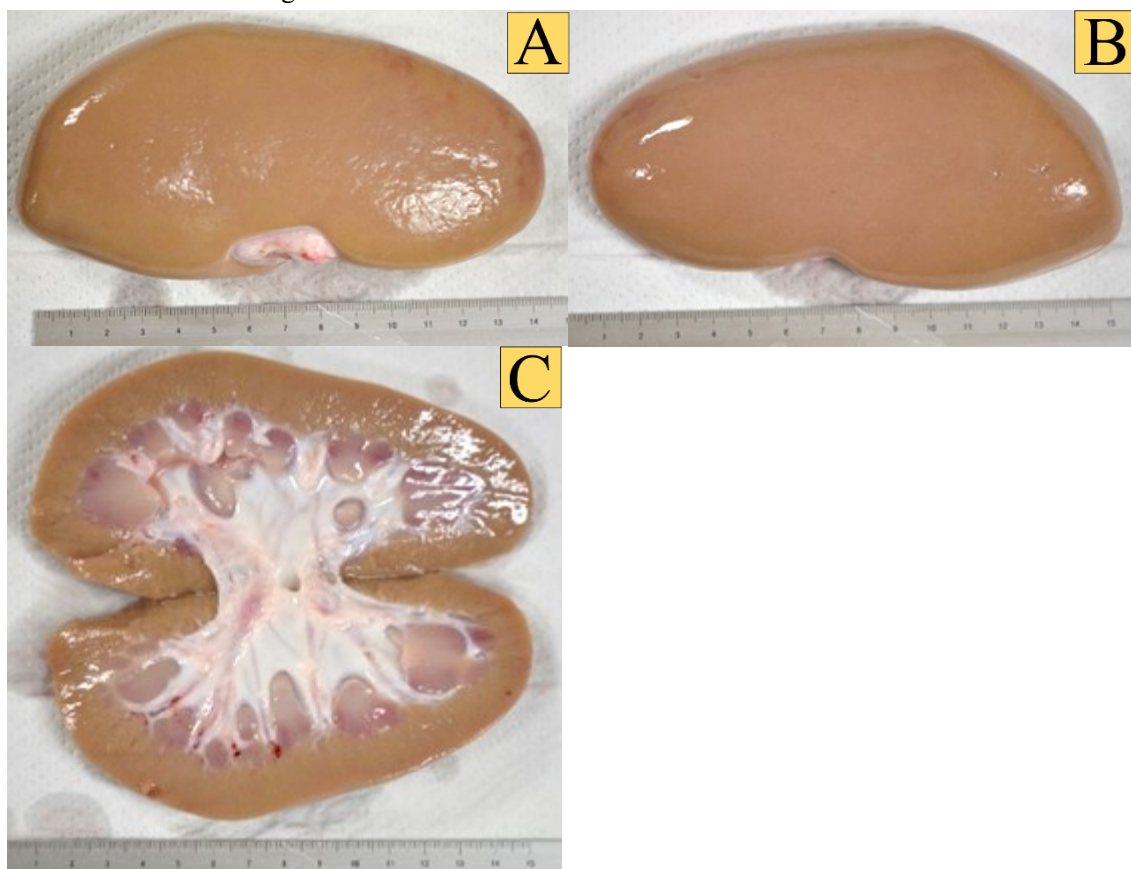


Fig. 8 UW+PEG 液 (PEG 10 g) の初期灌流後の腎臓写真 (A:表、B:裏、C:断面)

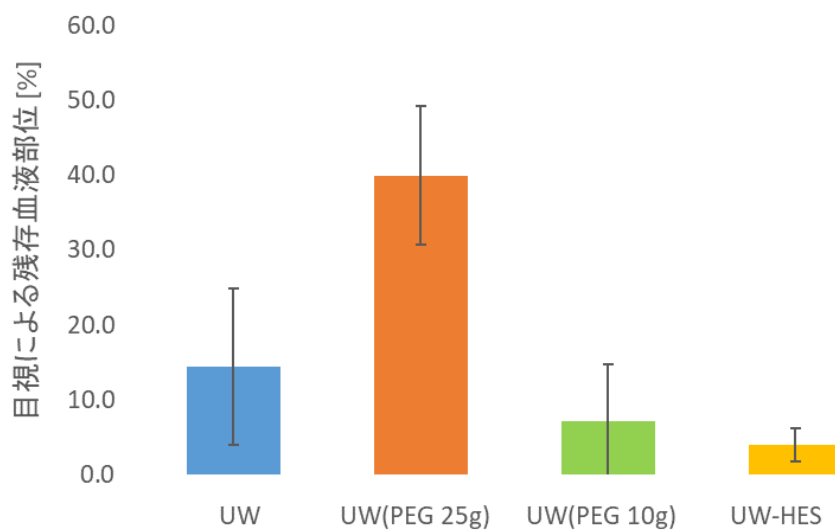


Fig. 9 目視による残存血液部位 (n=3)

結果

初期灌流後に観察された残血部位は、UW+PEG (25 g) 液が最も多く、続いて UW 液、UW+PEG (10 g) 液、UW-HES 液の順に多かった。UW 液や UW+PEG (25 g) 液といったコロイド成分が多く含まれている液において、残血部位が多くなる傾向があることが考えられる。

②：残存血液のマイクロ評価

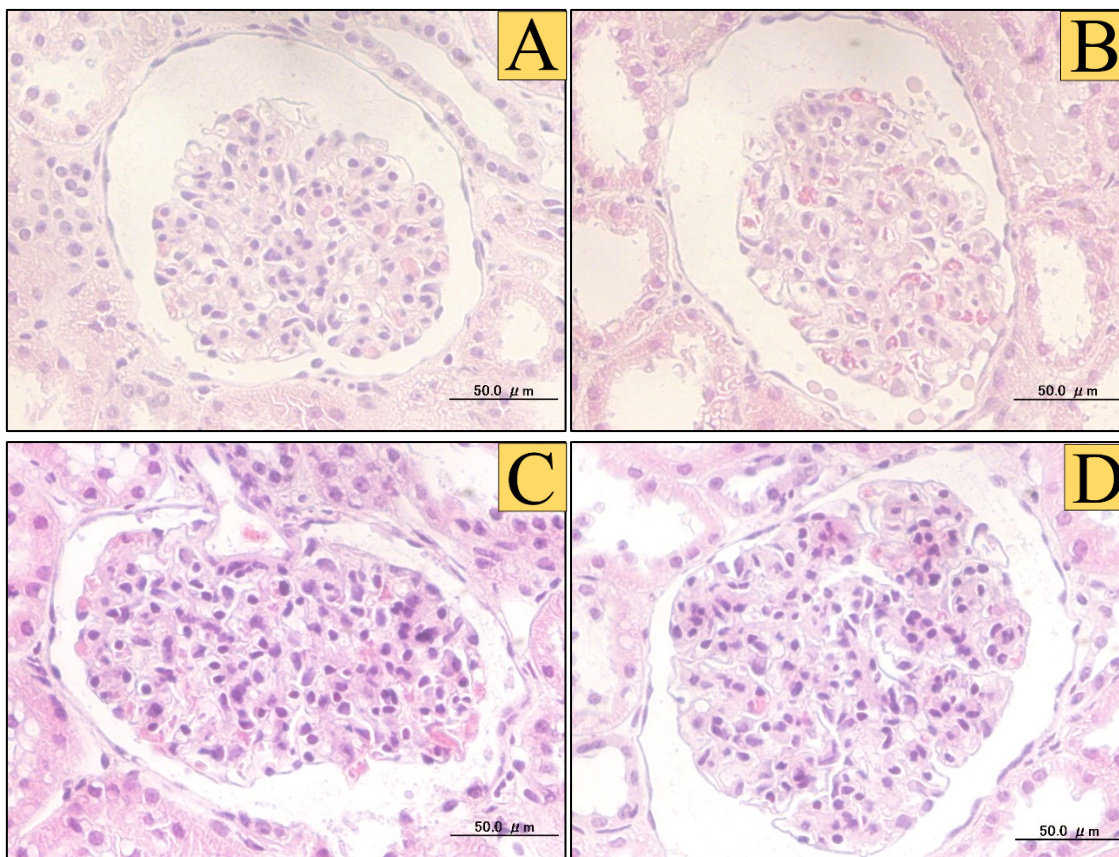


Fig. 10 初期灌流後の腎臓糸球体 HE 染色画像 (×400)

A:UW 液、B:UW-HES 液、C:UW+PEG 液 (PEG 25 g)、D:UW+PEG 液 (PEG 10 g)

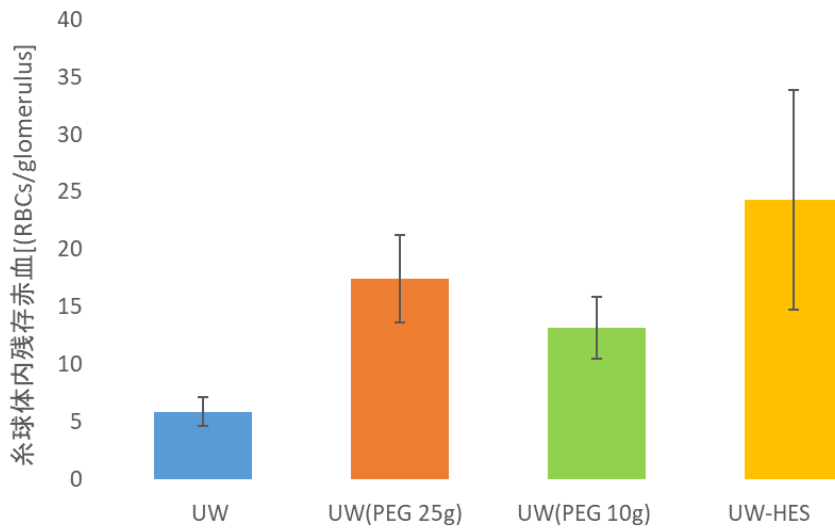


Fig. 11 糸球体内残存赤血球数のグラフ (n=3)

結果

初期灌流後に観察された糸球体内に残る赤血球数は、UW-HES液が最も多く、続いてUW+PEG (25 g) 液、UW+PEG (10 g) 液、UW液の順に多かった。

③：灌流パラメータ（灌流量と血管抵抗）

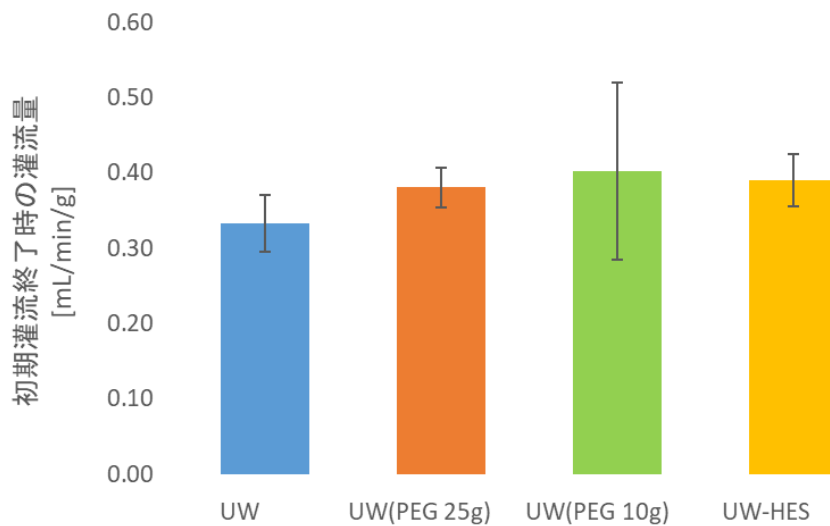


Fig. 12 腎 1 g 当りに流れる灌流量 (n=3)

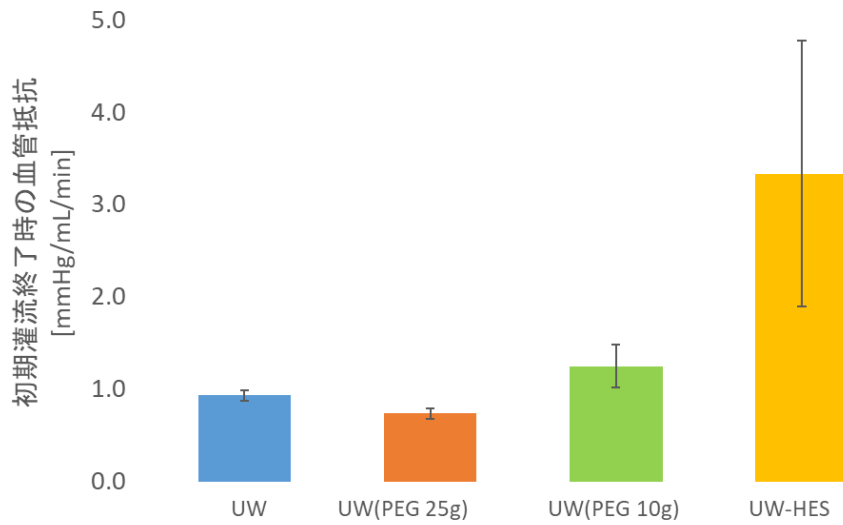


Fig. 13 腎臓の血管抵抗の値 (n=3)

結果

灌流量はすべての灌流液においてそこまで大きな違いは見られなかった。しかし、血管抵抗の値に関してはコロイド成分が含まれている UW 液、UW+PEG (25 g) 液、UW+PEG (10 g) 液といった灌流液群の方が UW-HES 液に比べ低いことが分かった。

④：初期灌流前後における腎重量変化

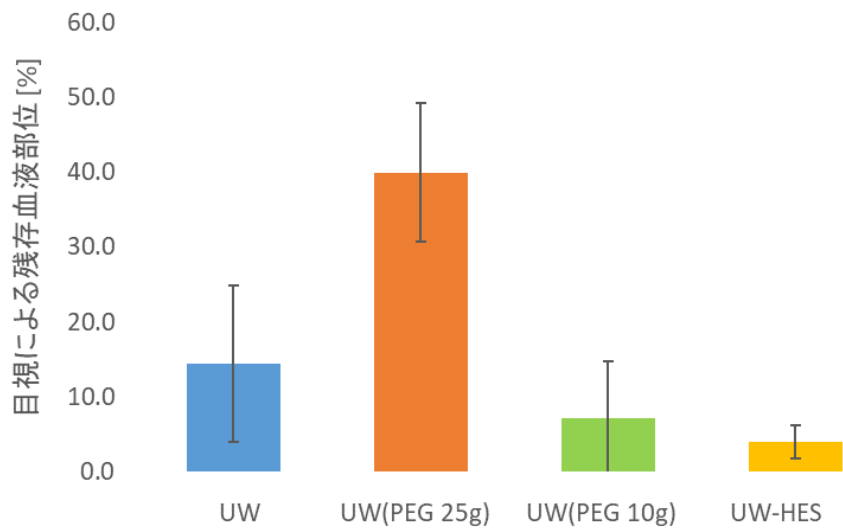


Fig. 14 初期灌流前後における腎重量変化 (n=3)

結果

初期灌流前後の腎重量変化は、UW-HES 液が最も大きく、続いて UW+PEG (10 g) 液、UW+PEG (25 g) 液、UW 液の順に大きかった。

4.3 考察とまとめ

今実験は UW 液に含まれるコロイド成分の違いによって、初期灌流における臓器内血液 W.O.効果に違いがあるか検討をした。灌流液に含まれているコロイド成分は、臓器組織の浮腫を防ぐ目的のため入れられている[52]。Fig. 14 から、コロイド成分が多く含まれている UW 液の方がより腎重量変化が少ないことが明らかになり、臓器組織の浮腫を防げていると考えられる。また Fig. 13 の血管抵抗値のデータもふまえて考えると、臓器組織の浮腫が起き、血管が周辺の組織から圧迫されることで血管が収縮し、灌流液が流れにくくなり灌流中の血管抵抗が上昇してしまうということが示唆され、初期灌流中においても灌流液にコロイド成分は必要であると考えられる。

しかし、Fig. 9 のデータからコロイド成分を多く含んだ灌流液 (UW、UW+PEG (25 g))液は、初期灌流後に大きな残血部位を残していることが観察された。これはコロイド成分が多く含まれている灌流液粘度は UW 液 : 2.77 mPa・s、UW+PEG (25 g) 液 : 2.61 mPa・s であり、これは UW-HES 液 : 1.4 mPa・s、UW+PEG (10 g) 液 : 1.7 mPa・s と比べ液粘度が高いため、残血が多く流れにくくなった血管には灌流しにくくなっているということが考えられる。しかし血管に流れさえすれば、Fig. 11 のデータからコロイド成分が含まれている UW 液、UW+PEG (25 g)液、UW+PEG (10 g)液の方が、UW-HES 液より効果的に血管内の赤血球を W.O.出来ることが示唆された。

4.4 結論

摘出された腎臓内に残っている血液、サイトカイン、活性酸素や血栓の除去を効果的に行うために、異なる灌流液組成にて初期灌流の検討を行った。結果として腎臓全体の血液が抜けていること、糸球体内赤血球も UW-HES 液より少ないことから、今実験で比較した 4 種類の灌流液の中で、最も初期灌流に適している、血液 W.O.効果が優れているものは UW+PEG 液 (10 g) であることが示唆された。

今実験では UW 液が糸球体内赤血球を最も洗い流すデータが得られているが、腎臓全体の血液を洗い流せていないこと、HES の赤血球凝集作用が報告されている[49]ことからコロイド成分には PEG を用いた方が良いと考える。ただし、今回の初期灌流の検討では 1 L の灌流液で行ったが、肉眼的に多くの腎臓で血液が抜けていることが確認できているものの一部の腎臓で血液の抜けが不十分であることが確認されたため、安全性を考慮し今後の実験では 2 L の灌流液で初期灌流を行う事とした。

5章 機械灌流腎臓に対する抗浮腫薬効果の検討

5.1 背景と目的

過去の実験から、灌流を続けると、腎臓に浮腫が生じ重量が増加し膨潤することと、それに伴って灌流量が低下していく問題が生じていた。浮腫は屠殺による細胞や組織の虚血性障害の結果、もしくは再灌流を行ったための再灌流障害による細胞組織の傷害により生じてくると考えられる。浮腫により組織が膨潤すると、灌流血管を圧迫し、血管の狭窄や閉塞が生じる。その結果灌流量の減少が生じてくることが考えられる。十分な灌流量が維持できなくなることは臓器に対して栄養や酸素といった培養に欠かせない因子を送達することを難しくさせ、長期に培養することが出来ない。そのため、これらの解決は臓器灌流を用いた新規治療法の開発において最も解決すべき課題の1つである。

これらのことから、浮腫に対しては、臨床で脳浮腫に対する治療として行われる治療に準じて、マンニトール及びグリセロール（グリセリン）の投与およびステロイドを灌流中に投与し、効果を検討した。マンニトールやグリセロールは高浸透圧性の輸液として細胞内から細胞外へ水分の移動を促す効果が期待できる。一方、ステロイドは、細胞内の炎症反応を抑え細胞膜の透過性亢進を抑制する働きがあり、屠殺後、虚血で障害された細胞の浮腫を抑制する効果が期待できる。これらの原理を利用して臓器の細胞から余剰な水分を排出させ浮腫を防ぐことを目的とした。

5.2 実験

以下の3つの実験を行った。

実験 1:マンニトール投与試験

実験 2: グリセロール投与試験

実験 3:デカドロン投与試験

5.2.1 実験 1（マンニトール投与試験）：実験内容

24時間の長期灌流中にマンニトール溶液を、ペリスタポンプを用いて灌流液に滴下し、血行動態および腎臓の重量、長さ、高さ、面積を測定し、浮腫に対する効果を検討した。

以下の実験器具および材料を使用して実験を行った。

5.2.2 実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓(心停止後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・ 灌流培養装置 (澁谷工業との共同研究)
 - ・ サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
 - ・ 電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
 - ・ ペリスタポンプ (ATTO, 日本)
 - ・ クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアテック株式会社, 日本)
 - ・ 恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
 - ・ 人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
 - ・ Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
 - ・ エアーポンプ
- ・ MUW 液 : Modified University of Wisconsin (MUW 液)をベースに組成を一部変更した溶液を使用した。組成を以下に示す。この UW 液にはコロイド成分としてポリエチレングリコール (PEG)が用いられている。従来の UW 液にはヒドロキシエチルデンプン (HES)を用いるが、臓器灌流において HES より PEG を用いた灌流で成績が良いという報告[51]があるため、当研究室では PEG を使用している。また、PEG の分子量や濃度を比較した際に 20 kDa, 15 g/L の条件が保存に対して優位であることが報告されている[53]。

組成	Amount [g/L]
アデニン	0.68
グルコース	1.8
塩化カルシウム	0.068
グルタチオン	0.92
HEPES	2.38
PEG	15.4
マンニトール	5.4
リン酸カリウム	3.4
グルコン酸マグネシウム	1.13
D-リボース	0.75
グルコン酸ナトリウム	17.45
水酸化ナトリウム	pH 7.4

Fig. 15 MUW 液の組成

以下の実験器具および材料を使用して実験を行った。

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ マンニトール溶液
 - ・ ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
 - ・ ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)
 - ・ ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

灌流条件

- ・ 初期灌流圧: 80 mmHg
- ・ 初期灌流温度: 25°C
- ・ 長期灌流圧: 60 mmHg
- ・ 長期灌流温度: 36°C

灌流回路概要図

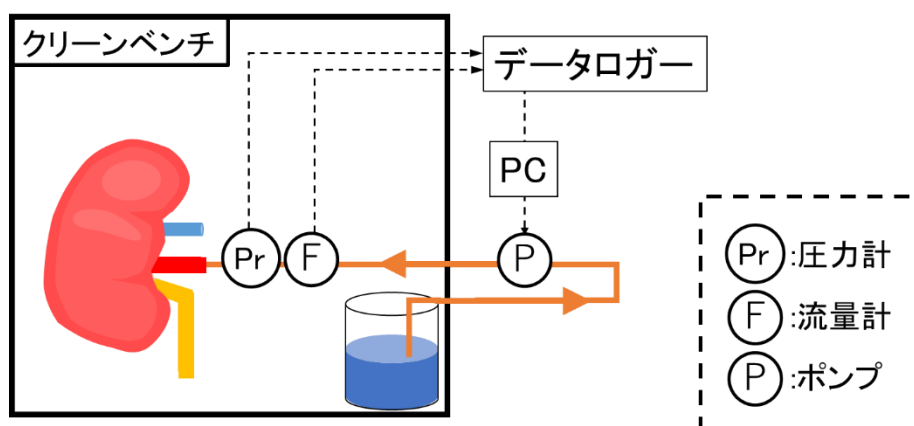


Fig. 16 初期灌流時回路模式図

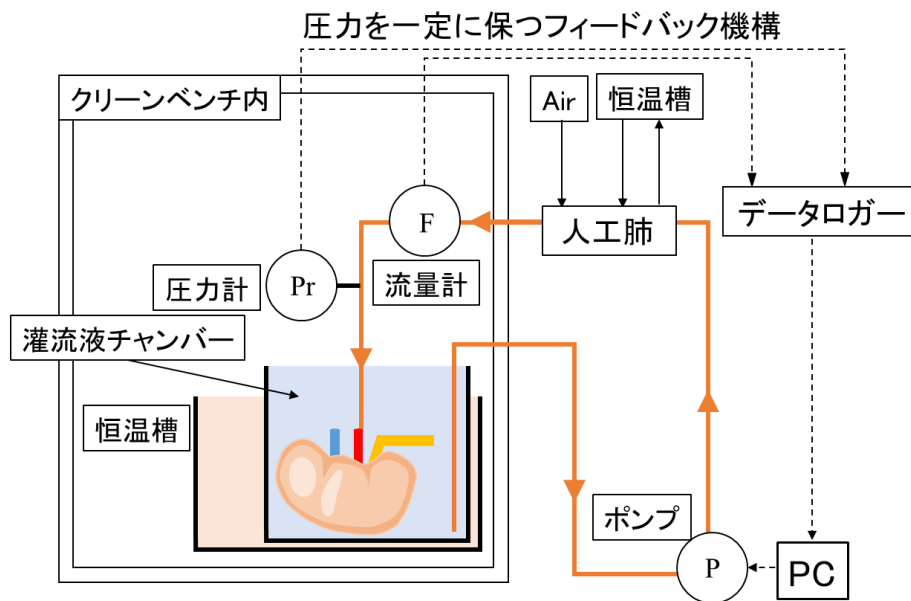


Fig. 17 長期灌流時回路模式図

5.2.3 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ (240,000 IU/10 mL) を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と白血球除去フィルターとして Sepacell Integra[®] CA を取り付けした。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で 24 時間灌流を行った。
7. 初期灌流前後、長期灌流 3 時間後及び灌流 6 時間おきに腎重量の測定・写真撮影を行った。
8. 6 時間おきに灌流液交換を行い、抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。
9. マンニトール溶液投与条件とスケジュールを Fig. 18 に示す。
今回使用した腎臓は 1 個である。

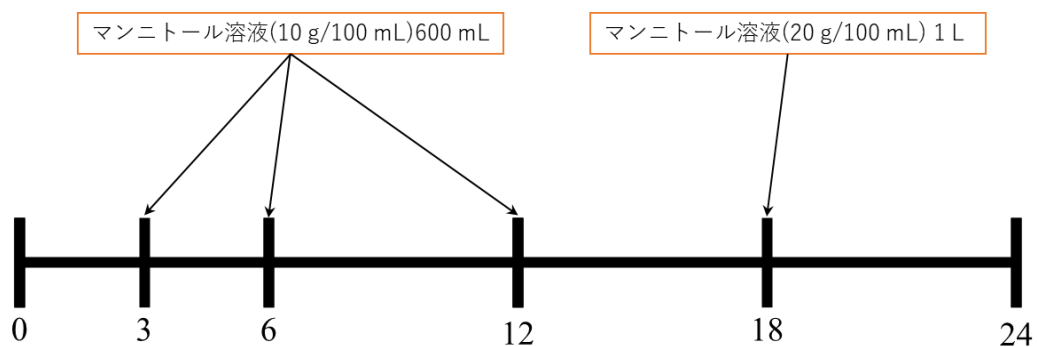


Fig. 18 タイムスケジュール

5.2.4 結果

初期灌流の血行動態および血管抵抗を Fig. 19,20 に示す。

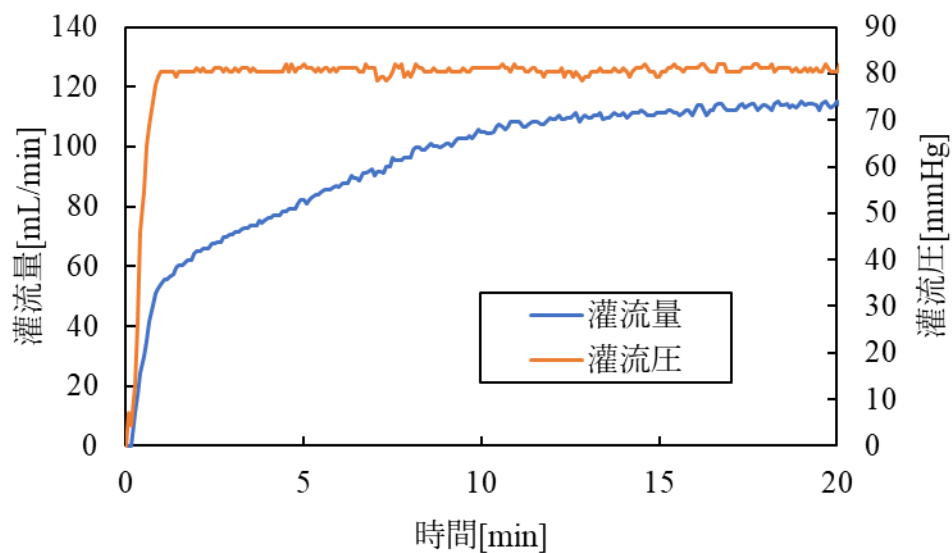


Fig. 19 血行動態の経時変化

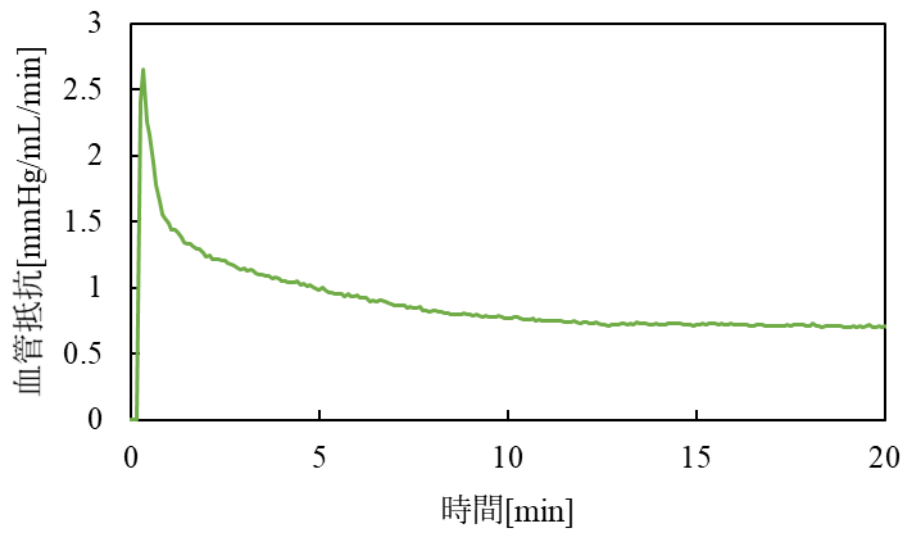


Fig. 20 血管抵抗の経時変化

次に Fig. 21,22 に初期灌流前後の腎臓画像を示す。



Fig. 21-1 初期灌流前



Fig. 21-2 初期灌流後



Fig. 22-1 初期灌流前



Fig. 22-2 初期灌流後

灌流圧は 80 mmHg に維持され、腎臓内の血液や血栓が抜けていくにつれて灌流量は上昇した。Fig. 21,22 から初期灌流によって臓器内の血液が抜けていることが確認できた。

Fig. 23,24 に長期灌流中の血行動態および血管抵抗を示す。

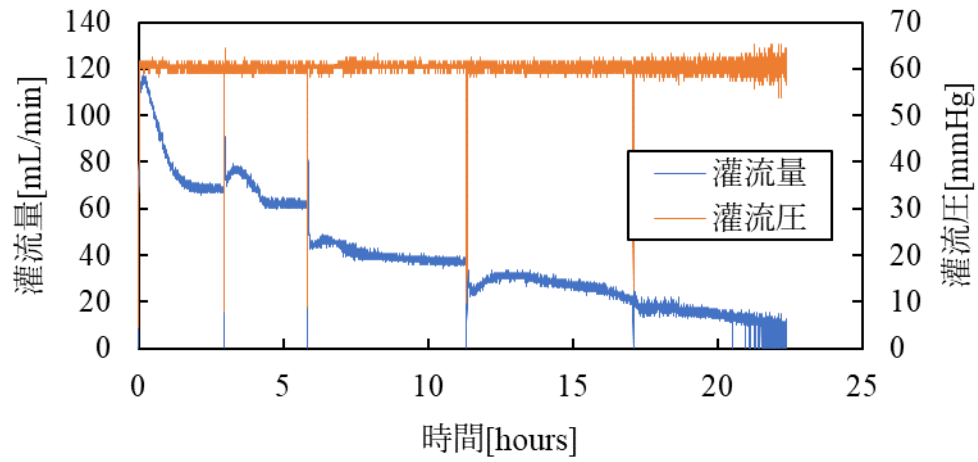


Fig. 23 血行動態の経時変化

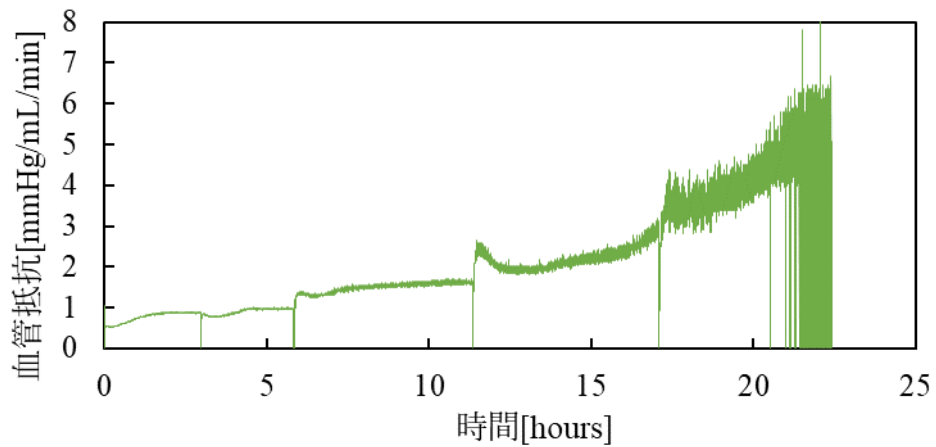


Fig. 24 血管抵抗の経時変化

Fig. 23 より灌流量が時間の経過に伴い低下した。また、灌流圧の制御が低灌流量になるにつれてブレが大きくなることが解った

Fig. 25-29 に各時間の腎臓の写真を示す。



Fig. 25-1 灌流 3 時間後

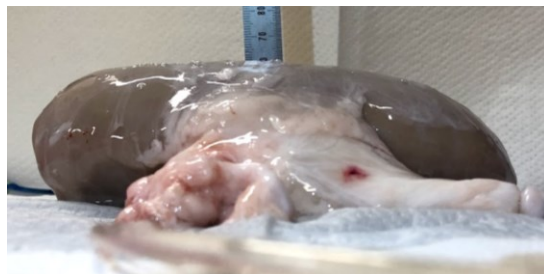


Fig. 25-2 灌流 3 時間後



Fig. 26-1 灌流 6 時間後



Fig. 26-2 灌流 6 時間後



Fig. 27-1 灌流 12 時間後



Fig. 27-2 灌流 12 時間後

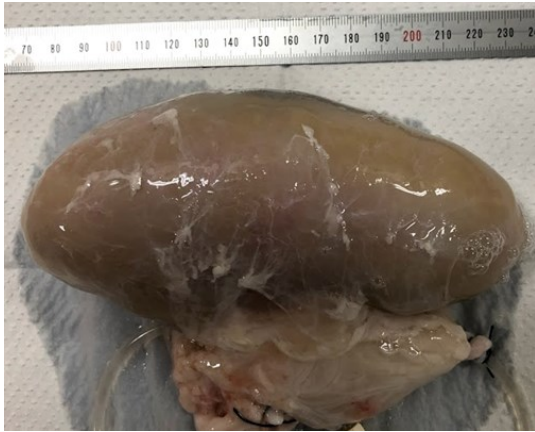


Fig. 28-1 灌流 18 時間後

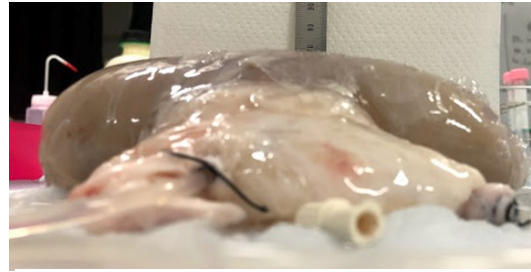


Fig. 28-2 灌流 18 時間後



Fig. 29-1 灌流 24 時間後



Fig. 29-2 灌流 24 時間後

Table 1 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	3時間経過	6時間経過	12時間経過	18時間経過	24時間経過
腎重量[g]	213.2	292.52	393.0	410.5	430.7	431.9	440.7
腎長さ[cm]	14.3	16.2	17.0	16.6	17.3	16.3	16.9
腎高さ[cm]	3.5	4.5	5.5	6.6	6.8	5.7	6.8
腎面積[cm ²]	74.9	94.2	101.9	94.3	99.3	92.0	101.6

Table 1 の値をグラフに示す。

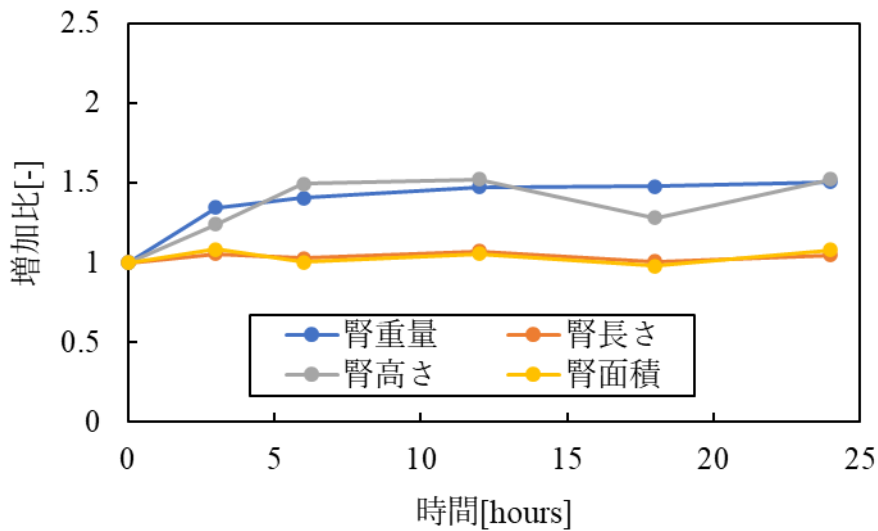


Fig. 30 腎臓パラメータの経時変化

初期灌流後のパラメータを1.0として増加比を算出した。灌流24時間後で面積、長さに変化は見られなかったものの腎重量、腎高さは増加が確認された。

5.2.5 実験2 (グリセロール投与) : 実験内容

グリセロール溶液を灌流液に混合し長期灌流を行い、血行動態および腎臓の重量、長さ、高さ、面積を測定し、浮腫に対する効果を検討した。

以下の実験器具および材料を使用して実験を行った。

5.2.6 実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・ 屠殺場ブタの腎臓 (心停止後2~3時間経過)

実験器具

- ・ 灌流培養装置 (渋谷工業との共同研究)
- ・ サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・ 電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
- ・ クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアータック株式会社, 日本)
- ・ 恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・ 人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・ Sepacell Integra[®] CA (白血球除去フィルター, 川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ 10%グリセロール溶液
- ・ ウロキナーゼ(ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ・ ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)
- ・ ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

灌流条件

- ・ 初期灌流圧:80 mmHg
- ・ 初期灌流温度:25°C
- ・ 長期灌流圧:60 mmHg
- ・ 長期灌流液温度:36 °C

灌流回路概要図

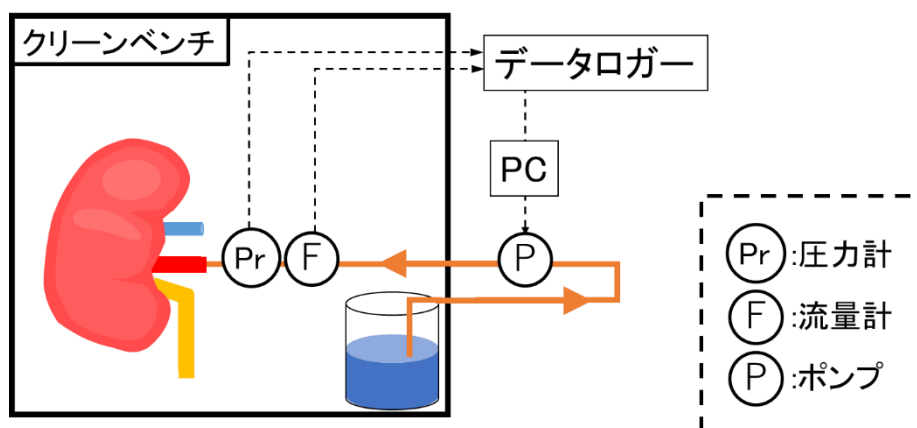


Fig. 31 初期灌流時回路模式図

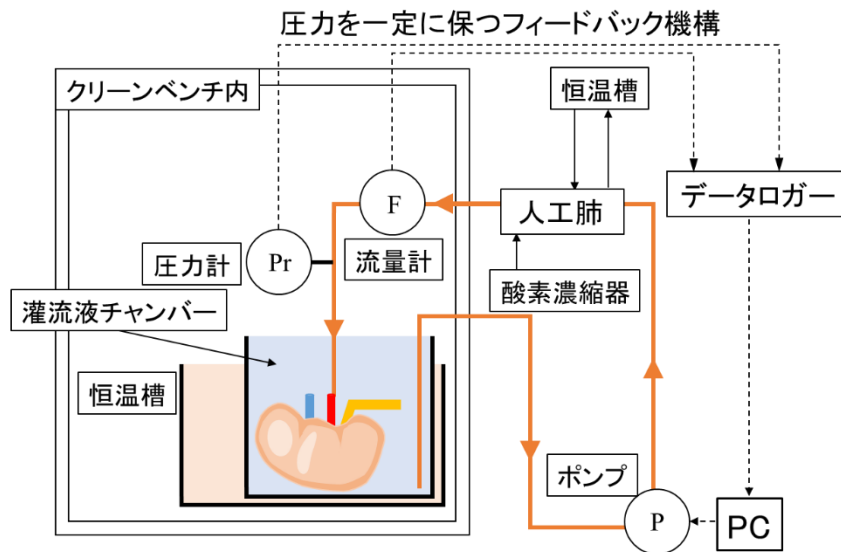


Fig. 32 長期灌流時回路模式図

5.2.7 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ(240,000 IU/10 mL)を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と Sepacell Integra[®] CA を取り付けた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で 24 時間灌流を行った。
7. 初期灌流前後、長期灌流 3 時間後及び灌流 6 時間おきに腎重量の測定・写真撮影を行った。
8. 6 時間おきに灌流液交換を行い、抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。
9. 長期灌流には MUW 液を 2 L 使用しグリセロール溶液は MUW 液 1 L に対して 100 mL の 10%グリセロール溶液を添加した。

5.2.8 結果

初期灌流の血行動態および血管抵抗を Fig. 33,34 に示す。

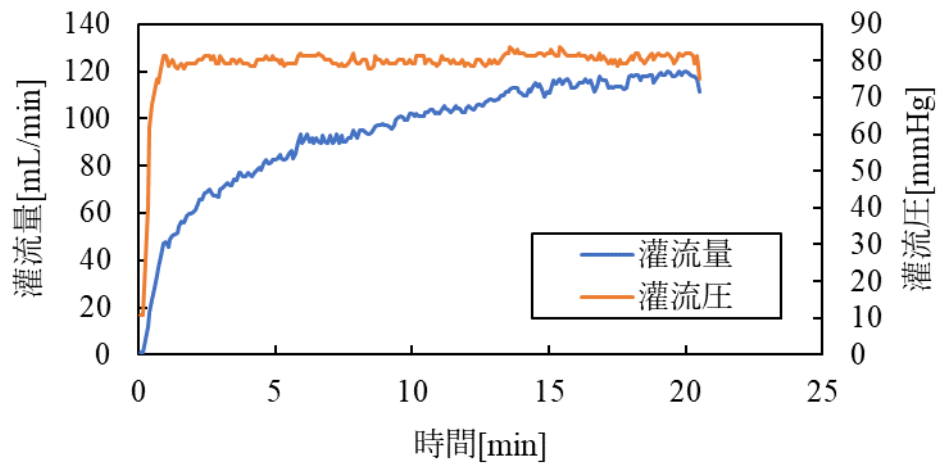


Fig. 33 血行動態の経時変化

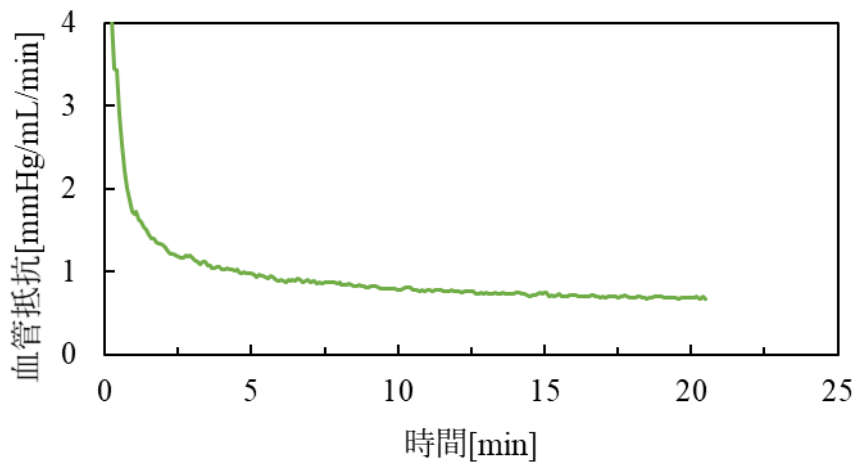


Fig. 34 血管抵抗の経時変化

また、Fig. 35,36 に初期灌流前後の腎臓画像を示す。

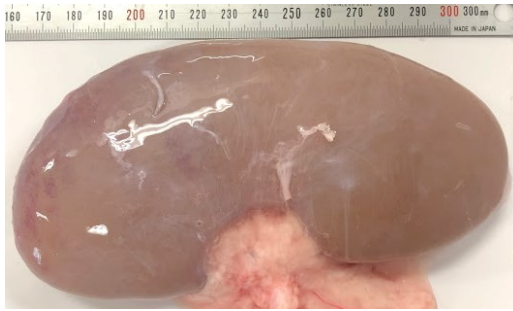


Fig. 35-1 初期灌流前



Fig. 35-2 初期灌流前



Fig. 36-1 初期灌流後



Fig. 36-2 初期灌流後

Fig. 35 より最初から腎臓内部に残血は少なかったと考えられる。

Fig. 36,37 に長期灌流中の血行動態および血管抵抗を示す。

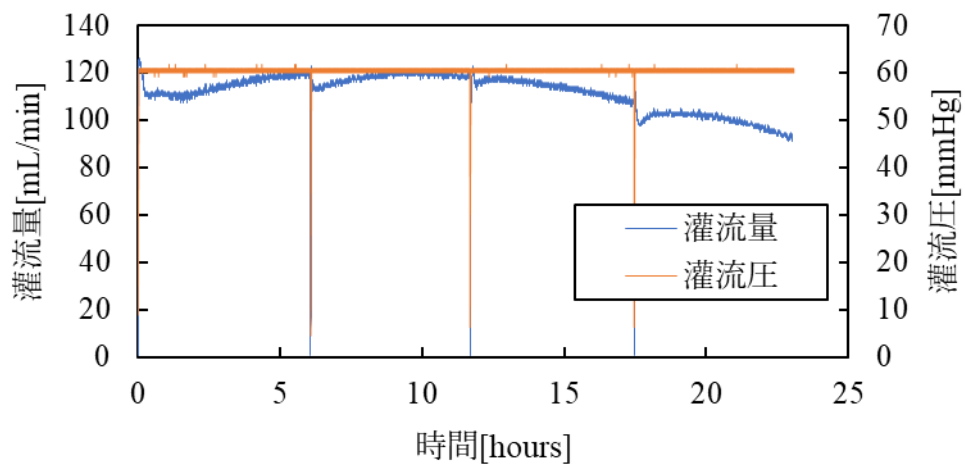


Fig. 36 血行動態の経時変化

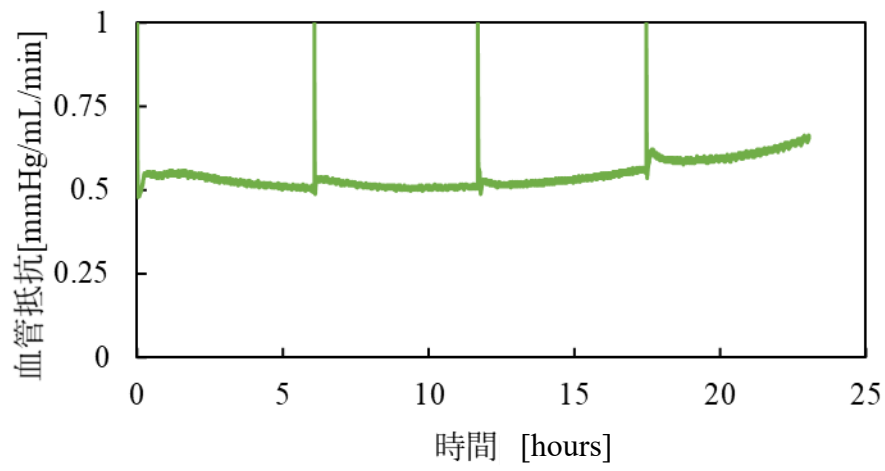


Fig. 37 血管抵抗の経時変化

Fig. 38- 41 に各時間の腎臓の写真を示す。



Fig. 38-1 灌流 6 時間後



Fig. 38-2 灌流 6 時間後



Fig. 39-1 灌流 12 時間後



Fig. 39-2 灌流 12 時間後



Fig. 40-1 灌流 18 時間後



Fig. 40-2 灌流 18 時間後



Fig. 41-1 灌流 24 時間後



Fig. 41-2 灌流 24 時間後

次に Table 2 に腎臓重量、長さ、高さ、面積の変化を示す。

Table 2 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	6時間経過	12時間経過	18時間経過	24時間経過
腎重量[g]	236.6	306.6	463.6	448.0	442.3	437.2
腎長さ[cm]	16.1	16.3	17.9	17.5	17.7	18.0
腎高さ[cm]	3.3	4.3	4.8	4.2	4.8	5.1
腎面積[cm ²]	99.8	104.2	124.4	121.9	114.5	120.9

Table 2 の値をグラフに示す。

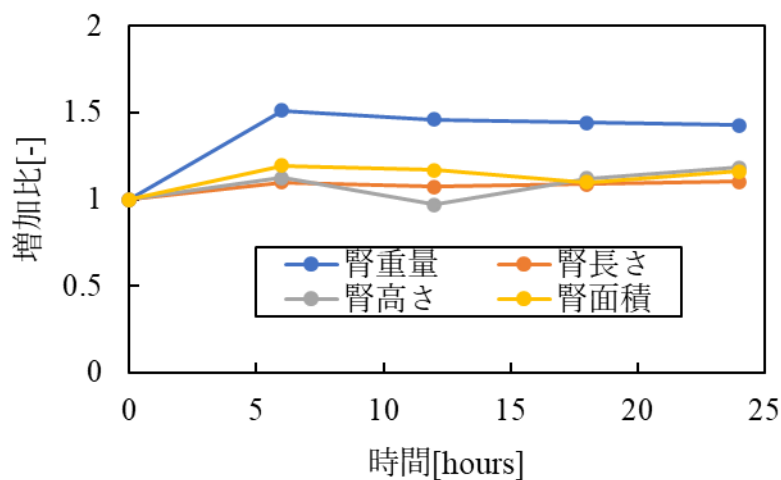


Fig. 42 腎臓パラメータの経時変化

初期灌流後のパラメータを 1.0 として増加比を算出した。灌流 24 時間後で面積、長さに変化は見られなかったものの重量の増加がみられ、灌流量の低下とともに重量が低下した

5.2.9 実験 3 (デカドロン投与) : 実験内容

灌流液にデキサメタゾン製剤であるデカドロンを投与し、腎臓の重量、長さ、高さ、面積を測定し、浮腫に対する効果を検討した。

5.2.10 実験試料・器具および試薬

以下の実験器具および材料を使用して実験を行った。

実験試料

- ・ 屠殺場ブタの腎臓(心停止後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・ 灌流培養装置(渋谷工業との共同研究)
- ・ サフィード(サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・ 電子天秤(FZ-5000i A&D, 日本)

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ・ デカドロン注射液 6.6 mg(アスペンジャパン株式会社)

灌流回路概要図

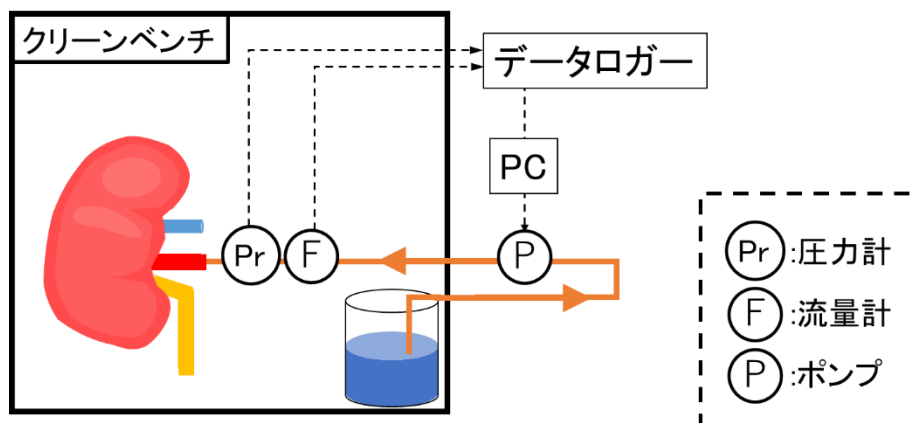


Fig. 43 灌流回路概要図

5.2.11 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
 2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
 3. 初期灌流に用いる MUW 液 2 L にウロキナーゼ(240,000 IU/10 mL)を 2 mL 添加した。
 4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
 5. 灌流回路に人工肺と白血球除去フィルターとして Sepacell Integra[®] CA を取り付けした。
 6. 初期灌流後、灌流圧 80 mmHg、2 L の MUW 液で灌流した。
 7. 2 回目灌流後、デカドロン 1 バイアルを添加した MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で灌流した。
 8. それぞれの灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。
- 今回使用した腎臓は 1 個である

5.2.12 結果

初期灌流の血行動態および血管抵抗を Fig. 44,45 に示す。

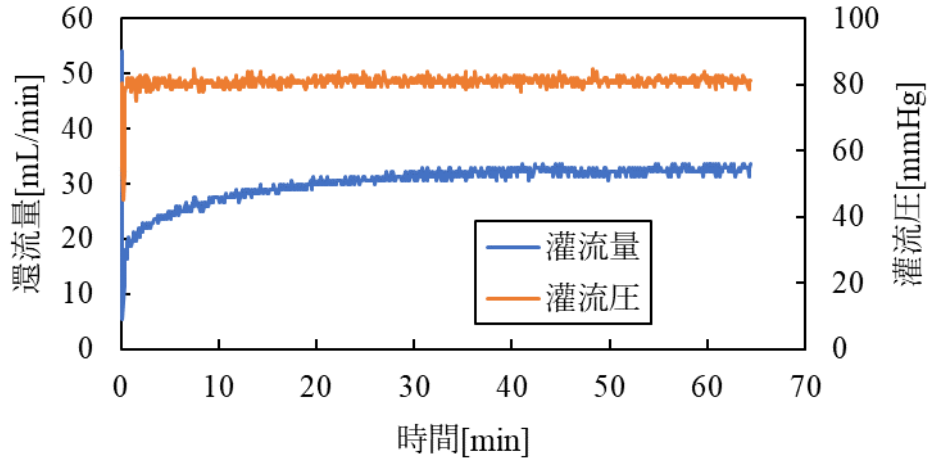


Fig. 44 血行動態の経時変化

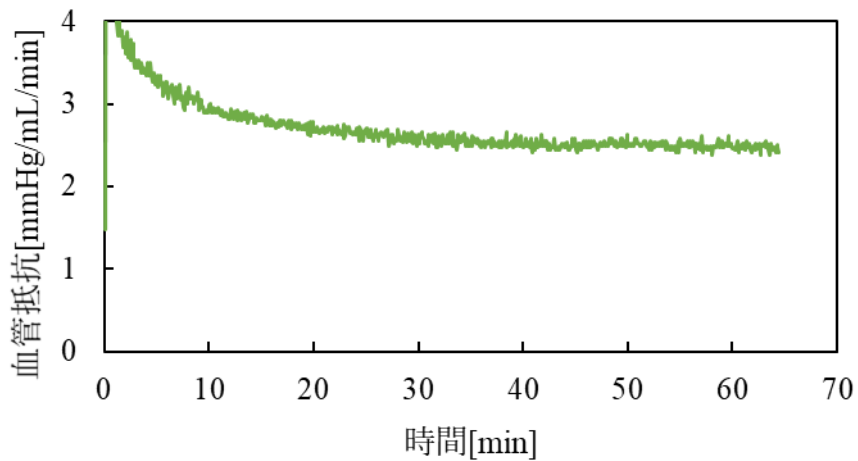


Fig. 45 血管抵抗の経時変化

圧力制御のもと、灌流量が低かったため血管抵抗値が 2 mmHg/mL/min 以上と高く出た。

次に Fig. 46,47 に初期灌流前後の腎臓画像を示す。

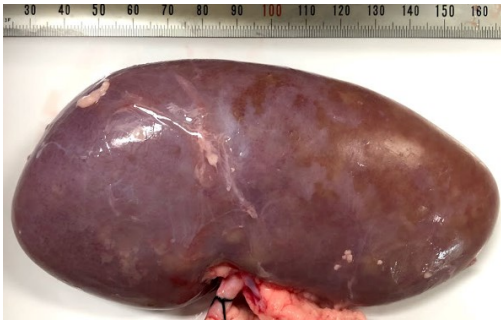


Fig. 46-1 初期灌流前



Fig. 46-2 初期灌流前

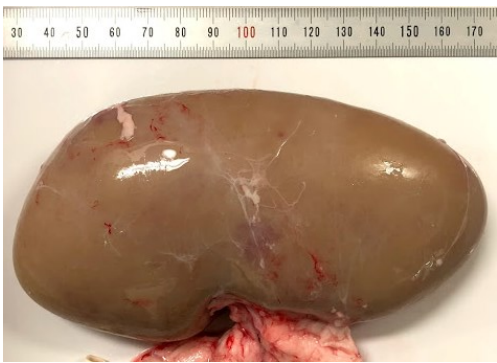


Fig. 47-1 初期灌流後



Fig. 47-2 初期灌流後

灌流量は低かったが血の抜けはよく目視による残血はあまりみられなかった。

Fig.48,49 にデカドロン投与前後の灌流における血行動態および血管抵抗を示す。

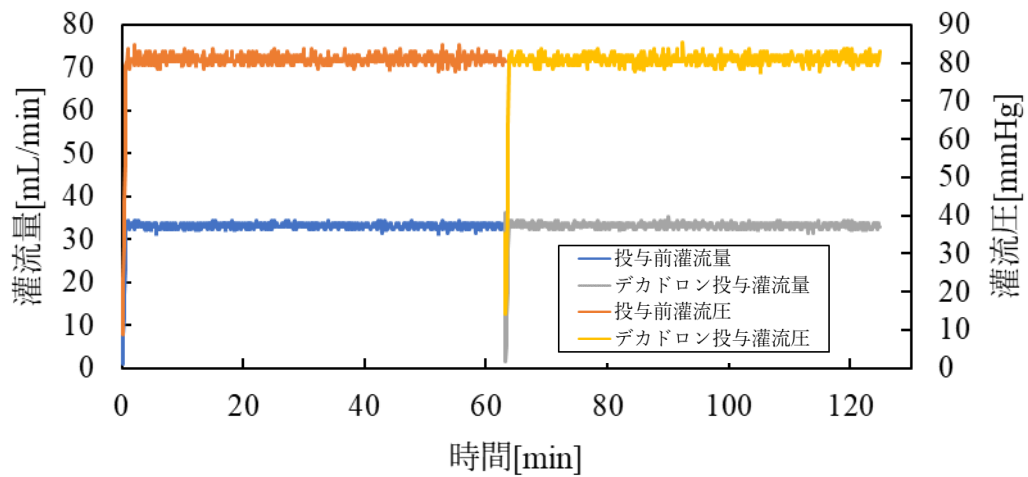


Fig. 48 血行動態の経時変化

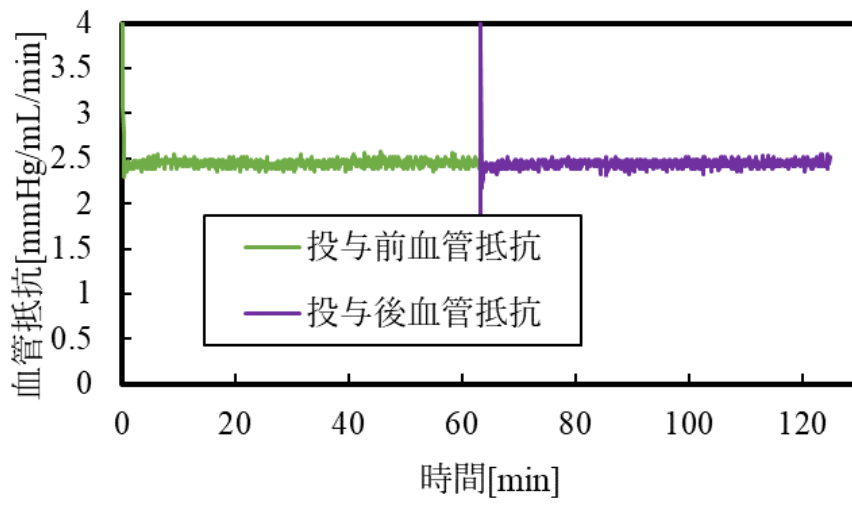


Fig. 49 血管抵抗の経時変化

デカドロンを添加して灌流を行っても灌流量や灌流圧に変化は見られなかった。

Fig. 50,51 に各灌流後の腎臓の写真を示す



Fig. 50-1 デカドロン未添加灌流後



Fig. 50-2 デカドロン未添加灌流後



Fig. 51-1 デカドロン添加灌流後



Fig. 51-2 デカドロン添加灌流後



Fig. 51-3 デカドロン添加灌流後

次に Table 3 に腎臓重量、長さ、高さ、面積の変化を示す。

Table 3 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	デカドロン投与前	デカドロン投与後
腎重量[g]	192.6	256.3	266.1	273.8
腎長さ[cm]	14.2	14.3	14.3	14.8
腎高さ[cm]	3.5	4.0	4.0	4.0
腎面積[cm ²]	79.3	83.9	82.9	90.0

また、Table 3 よりそれぞれの増加比を Fig. 52 に示す。

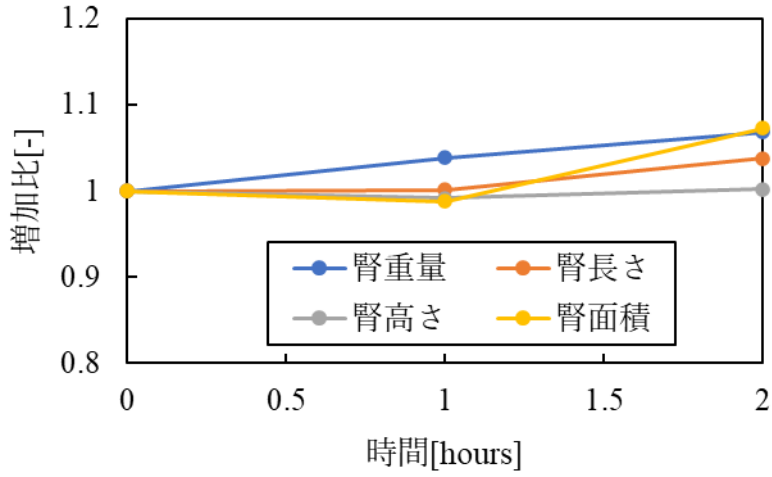


Fig. 52-1 腎臓パラメータの経時変化

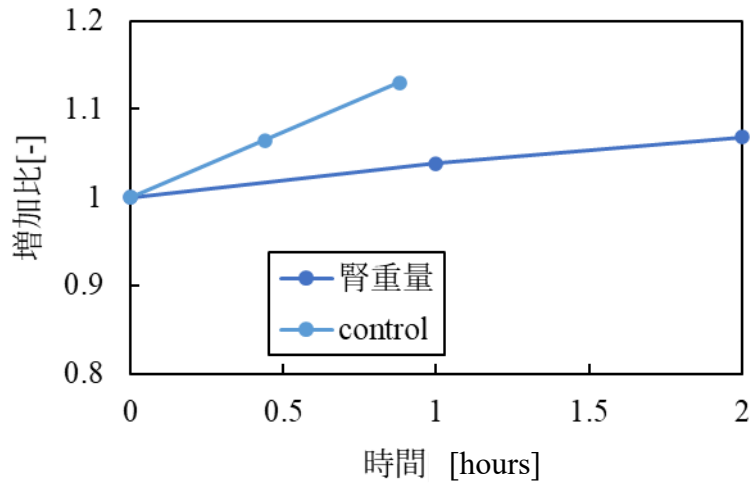


Fig. 52-2 腎重量の比較

どのパラメータにおいても増加比が 10%以下であった。
また、腎重量において control と比較して重量増加を抑制される傾向が示唆された。

5.3 考察とまとめ

今回、灌流腎臓の浮腫を改善するために、臨床で浮腫に用いるマンニトールとグリセロールの投与を試みた。屠殺場から採取された腎臓のため、腎臓それぞれに個体差が大きいことや、試行回数が限られているといった条件ではあるが、マンニトール投与を行った灌流では、灌流量の低下および腎臓重量の増加が生じていたためにマンニトールの追加投与に効果は見られない可能性が高い。また、Lv Fang らの報告によると、マンニトールの累積投与量は機能が低下した腎には悪影響を与える[54]ことから、浮腫抑制には使用しない方がよいと考えられる。

次にグリセロール投与では、灌流量の低下をマンニトール投与と比較すると抑制できたと考えるが、灌流量が約 120 mL/min から約 90 mL/min 程度へ低下した。これは 25%の減少である。次に、腎重量の増加比についてはマンニトール、グリセロール投与の間に差が見られなかった。このため、灌流量の低下に腎重量の変化は大きく関与しない可能性が示唆されたことから、灌流量の低下には他に原因があると考えられる。Magali Araujo らによって、酸化ストレスによって生じた活性酸素種(Reactive Oxygen Species : ROS)によって腎血管が収縮すること[55] が報告されている。また、炎症反応により血管透過性が増加することも報告されている[56]。

次に、デカドロンを投与した実験では、灌流量および腎重量の変化がマンニトールやグリセロールに比べて小さかった。灌流時間が違うため一概には言えないが、デカドロンは腎臓の浮腫に対して効果があることが示唆された。デカドロンは抗炎症作用と同じように、虚血により傷害された細胞の細胞膜透過性変化を抑制するなどの効果が作用した可能性がある。

5.4 結論

長期灌流にて生じる浮腫に対して、マンニトール、グリセロール、デカドロンについて検討し、デカドロンの効果が期待される結果が得られた。本実験系では屠殺場から入手した腎臓であるため、血流停止による組織低酸素による細胞の障害に伴う様々な炎症反応物質が血管や組織に作用していることが考えられるため、デカドロン投与は浮腫抑制に有効である可能性があると考えられる。

長期灌流培養を実現するためには、引き続き長期灌流にて生じる腎臓の浮腫の原因探索及びその対策は重要な課題として検討していく必要がある。

6章 腎臓画像評価法：超音波エコーによる糸球体の観測の検討

6.1 背景と目的

体外腎臓灌流培養技術を用いた新しい腎臓治療法を開発するにあたって、治療法の効果を判定するには、腎臓の形態学的な評価法及び、機能的な評価法の開発は必須である。

そこで、本章では、低侵襲でかつリアルタイムで構造観察が可能な超音波エコー検査に着目し、体外灌流培養中の腎臓の形態学評価法について検討した。

腎臓はネフロン・糸球体という構造があり、そこで血液のろ過、尿の生成が行われる。一個の腎臓には100万個のネフロンがあるといわれているが、腎不全ではこの構造が障害され、機能するネフロンの数が失われている[57]。したがって、腎臓再生には、ネフロン・糸球体の再生が必須であること、そしてその再生を客観的に判定する方法を見出すことが必要である。そこで本実験では、超音波エコーを用いて灌流下の腎臓のネフロン・糸球体の観察及び定量的評価を試みた。

まずそのためには、ネフロン・糸球体という微細な構造を超音波エコーで観察する必要がある。糸球体のサイズは約100 μm といわれるが、そのような微小構造の観察は通常の超音波検査では対象とされていない。超音波エコーの解像度・分解能が糸球体サイズの構造を観察するのに対応できるのか調査する必要がある。そこで、ガラスビーズを用いて超音波エコーの解像度・分解能の検討を行った。

また、いかにしてネフロン・糸球体構造を超音波エコーで観察するかの検討が必要である。そこで、超音波血管造影（コントラストエコー法）に着目し、糸球体の造影を試みた。

6.2 実験

6.2.1 使用した超音波エコー装置の分解能の検討：実験内容

超音波エコーの解像度・分解能の検討を行うために、ガラスビーズの観察を行った。

糸球体より小さなサイズの粒子径のガラスビーズを準備し、それを水中に投入し、超音波エコー装置にて観察を行った。また、腎臓内でも同様に観察できるか腎臓の血管内にガラスビーズを注入し超音波エコー装置にて観察を行った。

6.2.2 実験試料・器具および試薬

以下の実験試薬および実験器具を準備した。

実験材料

- ・ガラスビーズ 38-53 μm (AGSB-320、アズワン、大阪)

実験器具

- ・薬さじ
- ・プラスチック容器
- ・超音波診断装置 SONIMAGE HS1 PRO (KONICA MINOLTA、日本)
使用プローブ：L11-3 (中心周波数 7 MHz)

6.2.3 実験方法

以下の手順で実験を行った。

- 1.プラスチック容器に水を入れ、ガラスビーズを適量入れた。
- 2.プローブの先端を水に漬け、観察した。(この時、プローブにジェルを付け、上からラップすることで、プローブが水に直接触れないようにした。)
- 3.ガラスビーズは比重が大きく、沈殿する為、薬さじで攪拌しながら撮影した。

6.2.4 結果

Fig. 53 は超音波エコー装置 (SONIMAGE HS1 PRO)によって取得できた画像になる。

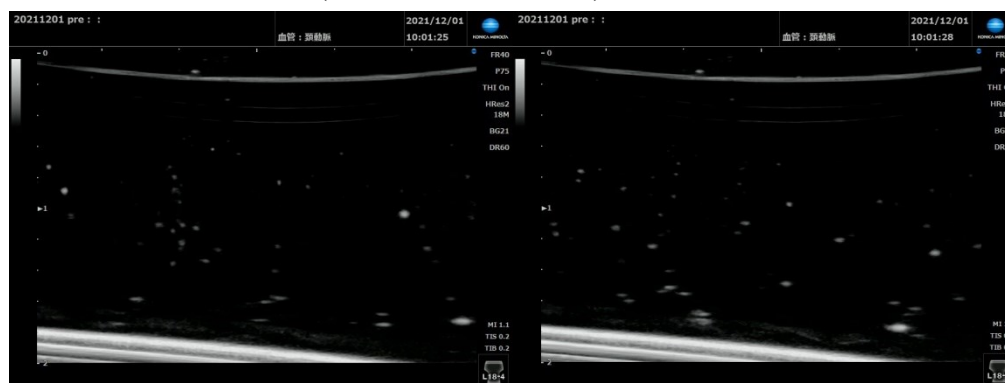


Fig. 53 超音波エコー装置 (SONIMAGE HS1 PRO)によって観察されたガラスビーズの粒子

超音波エコー装置 (SONIMAGE HS1 PRO) によって浮遊するガラスビーズが観察された。ただし、画像から小さいサイズのガラスビーズを選び直径を測定したところ $0.153 \pm 0.064 \text{ mm}$ であった。ガラスビーズの大きさは $0.038 \sim 0.053 \text{ mm}$ であるため、実際のサイズよりも大きく確認された。これはエコー装置の輝度による表示能力の影響かと考えられるが確実にガラスビーズが観察された。

6.2.5 エコー装置を用いた腎臓内におけるガラスビーズの観察：実験内容

前述の水中でのガラスビーズに対し超音波エコー装置を用いて観察できることを確認した。本実験では腎臓の血管内でガラスビーズが観察できるかを確認すると共に、糸球体を

観察できるだけの性能があるかどうかを検討した。また、ガラスビーズの濃度を 1.0×10^3 個/mL と 10 個/mL の 2 パターンで実験を行った。

6.2.6 実験試料・器具および試薬

以下の実験試薬および実験器具を準備した。

実験試料

- ・ 屠殺場ブタの腎臓(身体死後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・ 超音波診断装置 SONIMAGE HS1 PRO (KONICA MINOLTA、日本)
使用プローブ : L11-3 (中心周波数 7 MHz)
- ・ 灌流培養装置(渋谷工業)
- ・ サフィード(サフィード延長チューブ、TERUMO、日本)
- ・ 50 mL シリンジ(SS-50ESZ、TERUMO、日本)

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ 生理食塩水
- ・ ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ・ ガラスビーズ 38-53 μm (AGSB-320、アズワン、大阪)

実験条件

初期灌流条件

- ・ 灌流圧:80 mmHg
- ・ 灌流液温度:25 $^{\circ}\text{C}$

エコー条件

撮影条件

・ 銀深型バット内に MUW 液を入れ、腎臓にスポンジを使用して固定する。プローブに超音波ジェルを塗布し、上からサランラップを巻き、腎臓に直接プローブを当てた。

6.2.7 実験方法

以下の手順で実験を行った。

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。

3. 初期灌流に用いる MUW 液 1L に対してウロキナーゼ (240,000U/10 mL) を 1 mL 添加した。
4. MUW 液 2L で初期灌流を行い、ブタ腎臓の血管内を wash out した。
5. 初期灌流後、撮影条件をもとに超音波エコー装置での撮影準備を行った。
6. 予め 1.0×10^3 個/mL または 10 個/mL になるように希釈したガラスビーズ溶液をシリンジに 50 mL 充填した。
7. 動脈ラインからガラスビーズを流し、B モードで観察した。

6.2.8 結果

(1) ガラスビーズ溶液濃度 (: 1.0×10^3 個/mL) 50 mL 注入の場合

ガラスビーズを注入した際、超音波エコー装置にて血管内を動く粒子を確認できた。

造影動画の一部分を Fig. 54 に示し、造影箇所を拡大画像を Fig. 55 に示す。

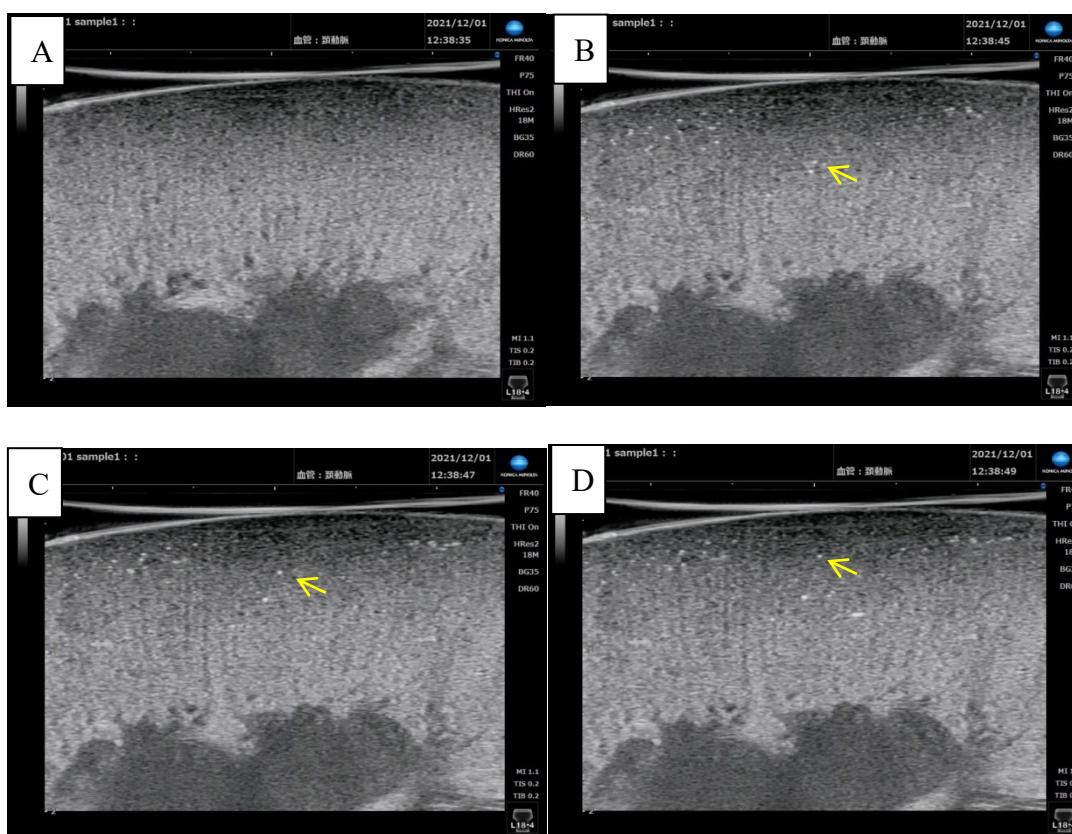


Fig. 54 造影画像 (濃度 : 1.0×10^3 個/mL)

A: 造影前 0 [s] B: 10 [s]後 C: 12 [s]後 D: 14 [s]後

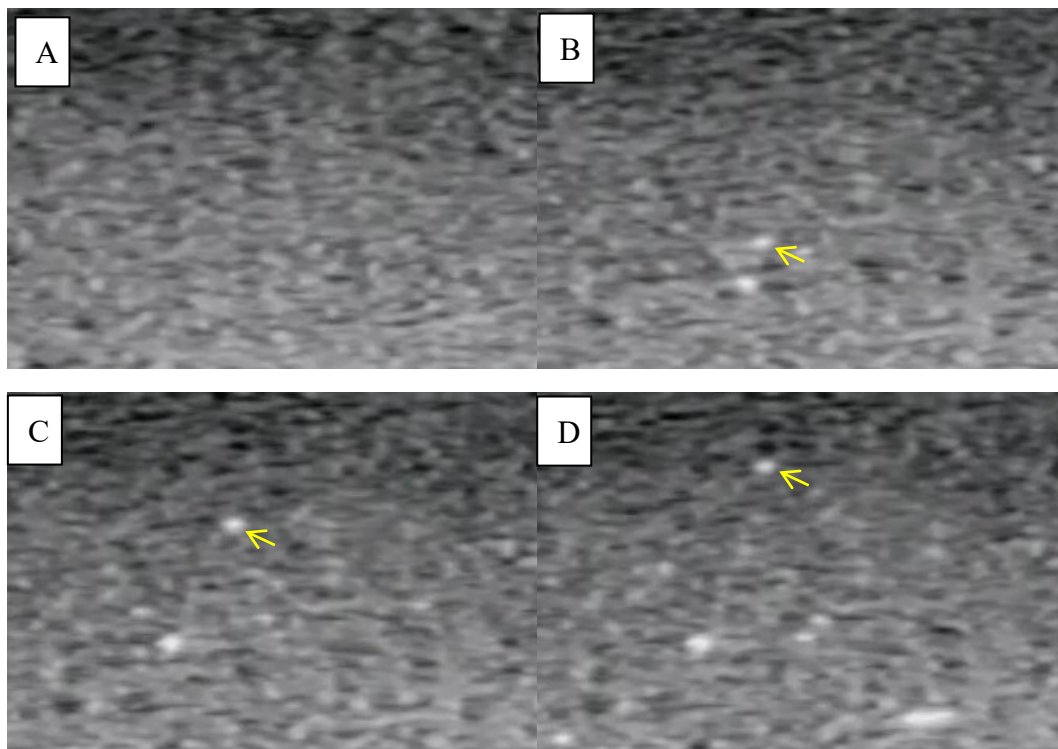


Fig. 55 Fig. 54 の拡大画像(濃度 : 1.0×10^3 個/mL)
A: 造影前 0 [s]の拡大画像 B: 10 [s]後の拡大画像
C: 12 [s]後の拡大画像 D: 14 [s]後の拡大画像

(2) ガラスビーズ溶液濃度 (: 10 個/mL) 50 mL 注入の場合

(1)同様に、ガラスビーズを注入した際、血管内に動く粒子が観察された。

造影動画の一部分を Fig. 56 に示し、造影箇所を拡大画像を Fig. 57 に示す。

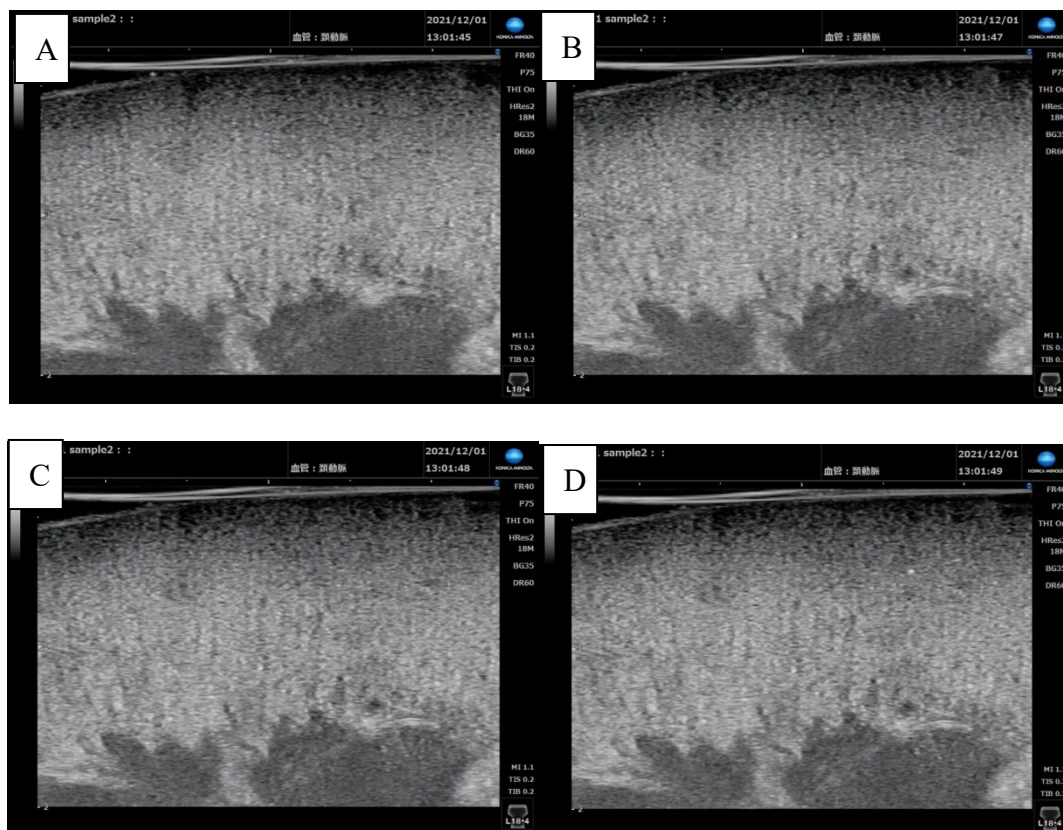


Fig. 56 造影画像 (濃度 : 10 個/mL)

A:造影前 0 [s] B: 3 [s]後 C: 4 [s]後 D:5 [s]後

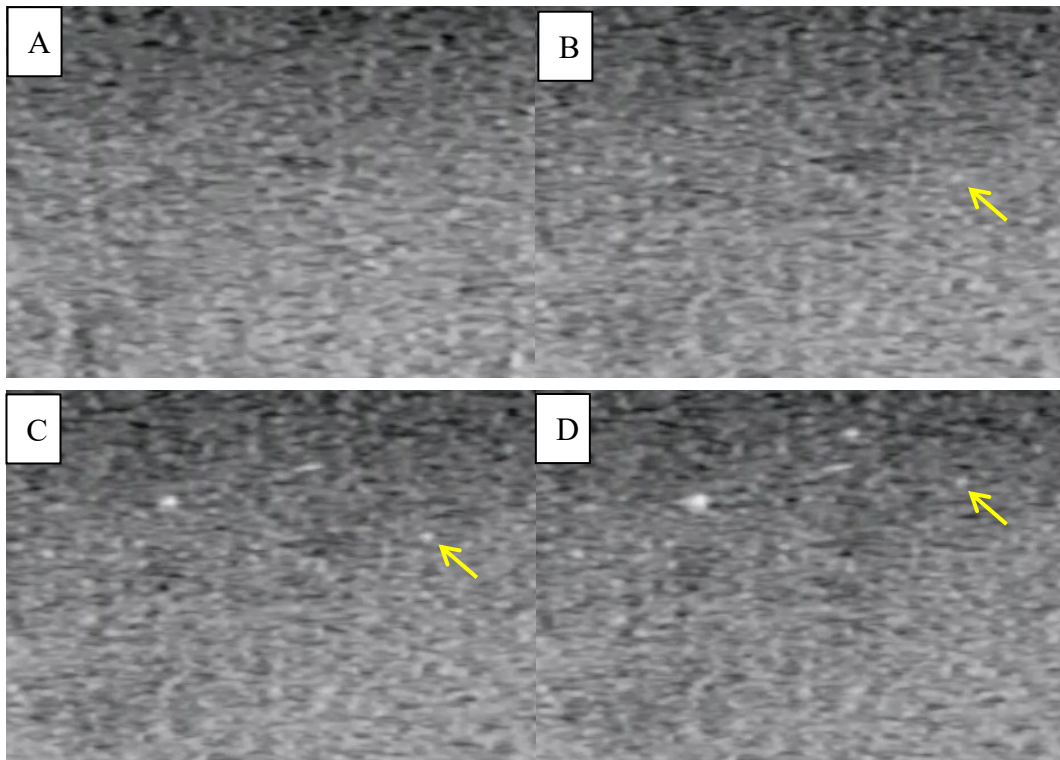


Fig. 57 Fig. 56 の拡大画像(濃度 : 10 個/mL)
 A: 造影前 0 [s]の拡大画像 B: 3 [s]後の拡大画像
 C: 4 [s]後の拡大画像 D: 5 [s]後の拡大画像

Fig. 54-57 から腎臓内にて超音波エコー装置によりガラスビーズと考えられる血管内を動く粒子が濃度 1.0×10^3 個/mL、10 個/mL の両方の条件で観察することができた。

6.2.9 エコー観察による糸球体の同定及び定量評価：実験内容

糸球体を観察するために、臨床で用いられている超音波血管造影剤を用いて血管造影を試みた。その際、造影される映像が糸球体であることを確認するために、同時に蛍光インクも流し、実体顕微鏡で腎臓の断面図の観察、及び組織切片を作製し組織の観察を行った。

実験材料

灌流液

- ・ MUW 液 2 L
- ・ 腎内フラッシュ溶液 50 mL (0.9%生理食塩水)

灌流臓器

- ・ 屠殺場ブタの腎臓 (心停止後約 2 時間経過)

実験器具

- ・灌流培養装置（澁谷工業との共同研究）
- ・動脈カニューレ（サフィード延長チューブ、TERUMO、日本）
- ・超音波診断装置 SONIMAGE HS1 PRO（KONICA MINOLTA、日本）
使用プローブ：L11-3 (中心周波数 7 MHz)
- ・実体顕微鏡 SZX7（OLYMPUS、日本）
- ・蛍光顕微鏡 Biozero BZ-8000

実験試薬

- ・超音波診断造影剤 ソナゾイド（第一三共、日本）
- ・蛍光インク spotliter 補充インク（PILOT、日本）

灌流臓器

- ・屠殺場ブタの腎臓（心停止後約 2 時間経過）

実験方法

以下の手順にて実験を行った。

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ(240,000 IU/10 mL)を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 初期灌流後造影剤を動脈から投与し、直後生理食塩水で造影剤を腎内に流し込んだ。
6. 超音波診断装置 SONIMAGE HS1 PRO、使用プローブ：L11-3(中心周波数 7 MHz)、B モードにて測定での撮影後実体顕微鏡にて腎臓の断面の蛍光観察を行った。
7. 組織標本を作製し HE 染色した切片を蛍光顕微鏡にて観察を行った
8. 研究室で開発した DSA 変換ソフトを用いてエコー画像の造影部分の抽出を行った。
9. 研究室で開発した Python 上で OpenCV, matplotlib, numpy, os のライブラリを組み込んだプログラムを用いてエコー画像の皮質部分及び糸球体部分を抽出し、解析した。

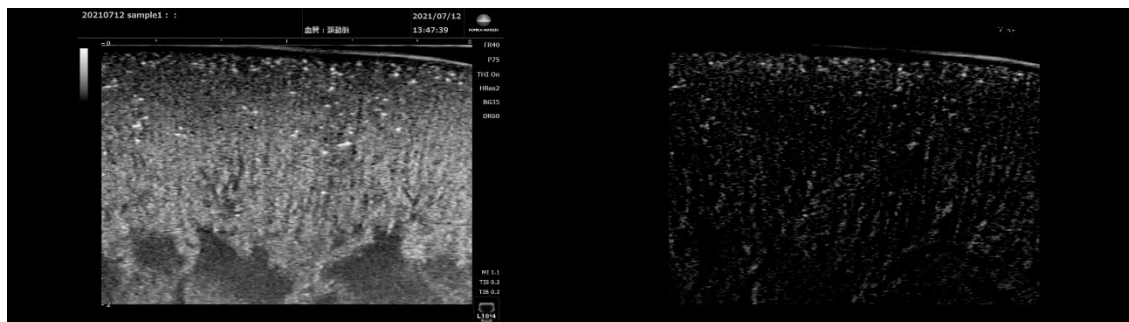
Python で作成したプログラムのコードは appendix の章に載せた。

今回は腎臓を 5 つ使用し実験を行った。

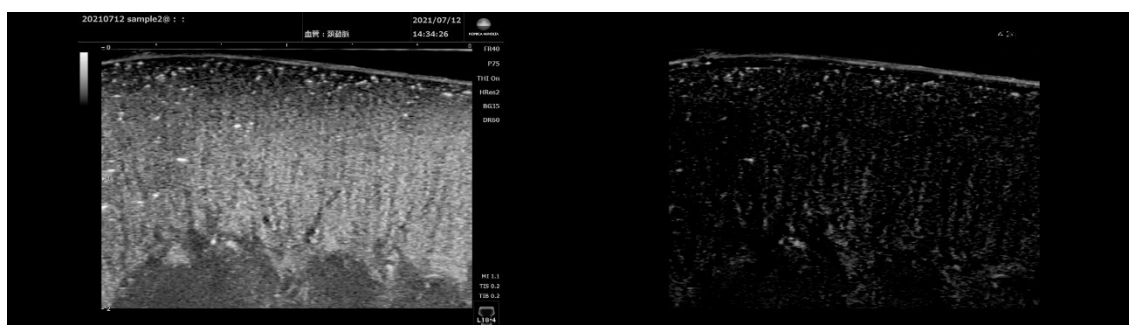
灌流条件

- 初期灌流压:80 mmHg
- 灌流液温度:25 °C

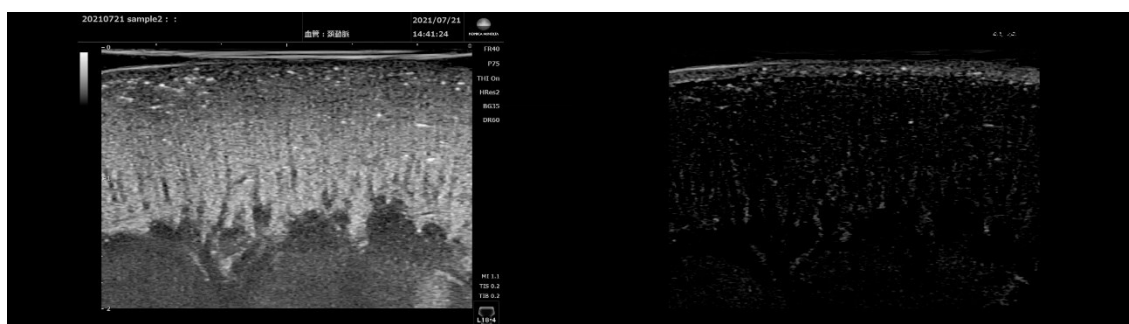
6.2.10 実験結果



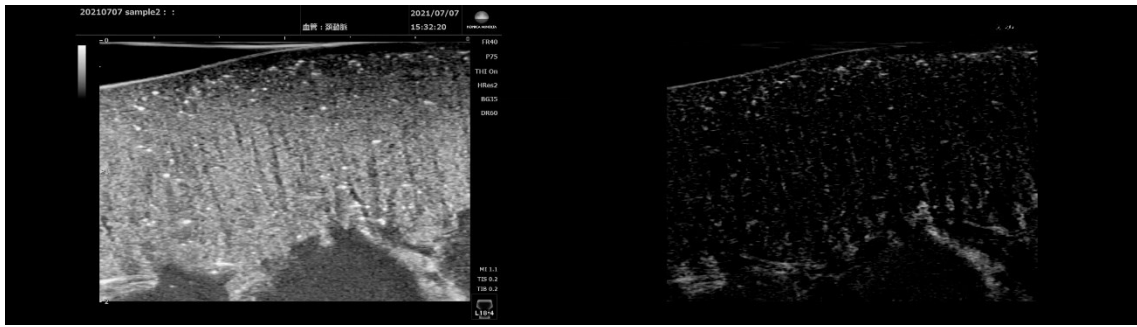
(Sample 1)



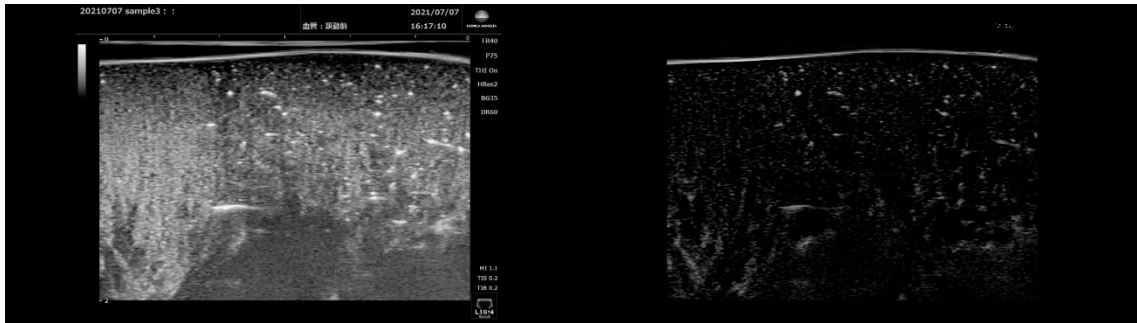
(Sample 2)



(Sample 3)



(Sample 4)



(Sample 5)

Fig. 58 各サンプルの造影後エコー画像(左)および DSA 変換画像(右)

DSA 変換により、造影された箇所及びドット状の造影が明瞭になった。

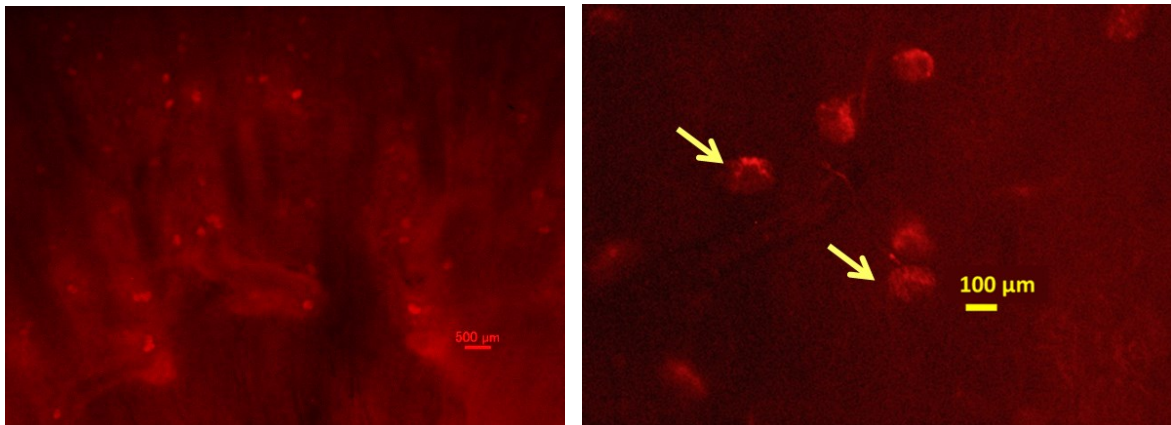


Fig. 59 実体顕微鏡による蛍光画像

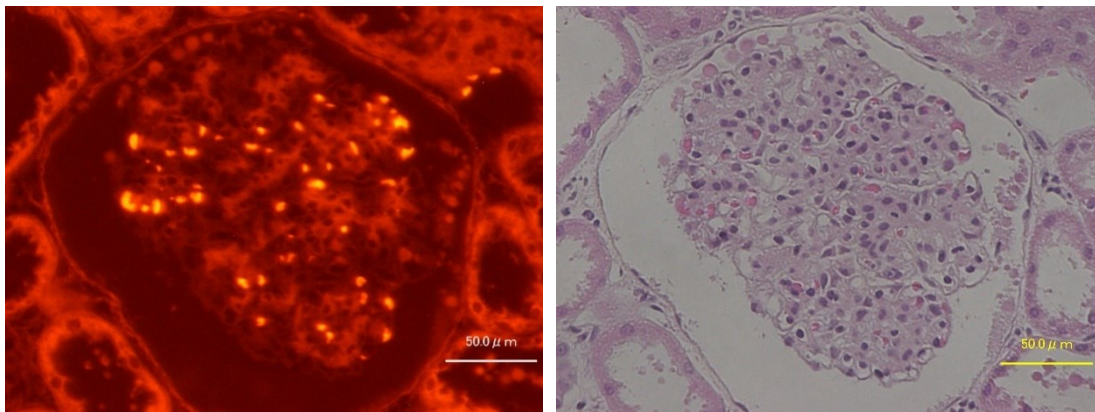
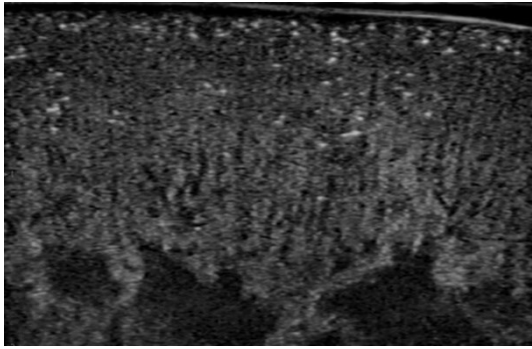


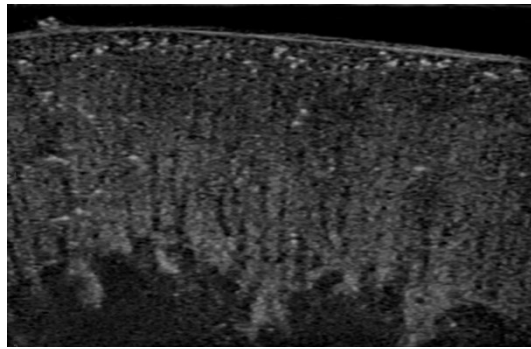
Fig. 60 蛍光顕微鏡画像

今回作成した造影剤に含まれる蛍光色素が糸球体部分の毛細血管に残存していることが確認された。

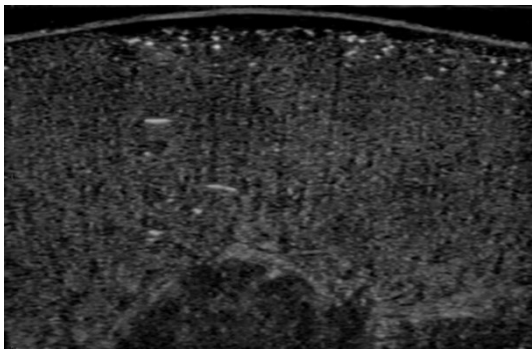
次に、糸球体の定量評価を行うためにエコー画像を、自作プログラムを用いて糸球体の抽出を試みた。まず、腎臓エコー画像全体の輝度分布を明らかにするために空間領域で輝度情報を定量的に可視化した。8bit grayscale で、0~256 の階調とした輝度情報のみを持つ画像として取り込み、その後エコー画像における腎臓表示部分のみを取り出すために画像左部から 50 pixel、画像右部から 65 pixel、画像上部から 75 pixel、画像下部から 49 pixel の範囲でトリミングを行った。トリミング後の画像を Fig. 61 に示す。Fig. 62 では造影後のエコー画像全体の輝度分布を明らかにするために空間領域で輝度情報を定量的に可視化した。Fig. 63 も同様に輝度値をもとにヒストグラムを作成し、Fig. 64 で対数グラフをプロットした。



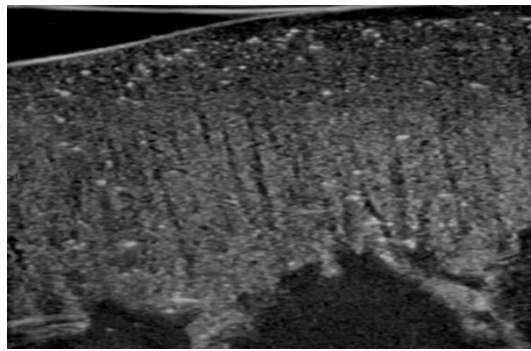
(a) sample 1



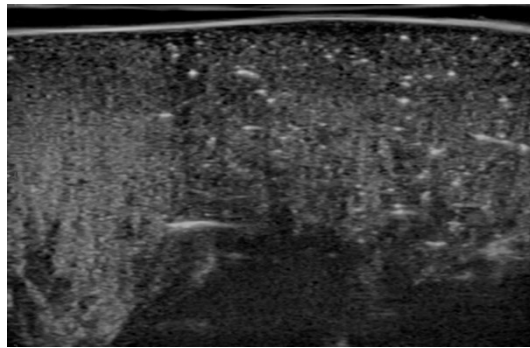
(b) sample 2



(c) sample 3

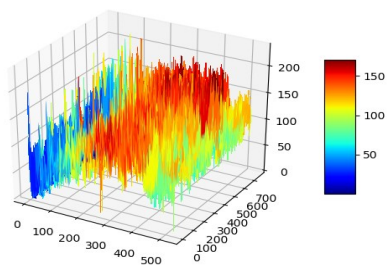


(d) sample 4

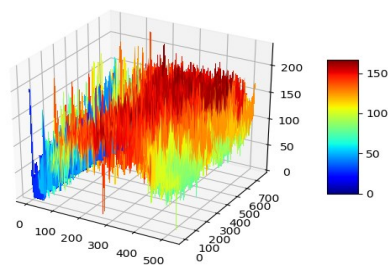


(e) sample 5

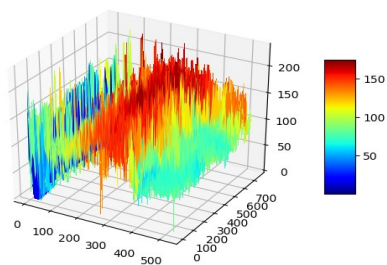
Fig. 61 各サンプルのトリミング後画像



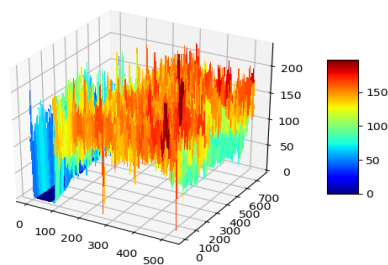
(a) Sample 1



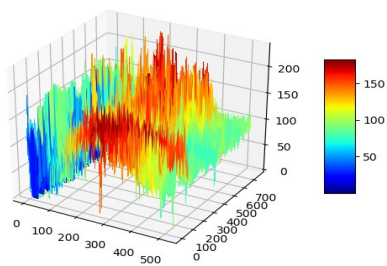
(b) Sample 2



(c) Sample 3

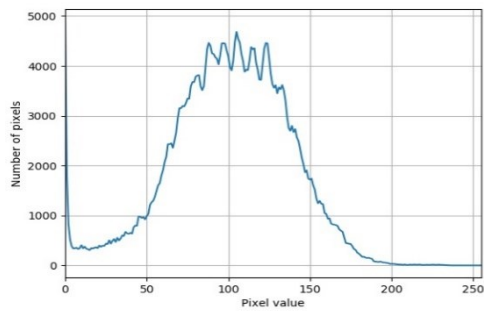


(d) Sample 4

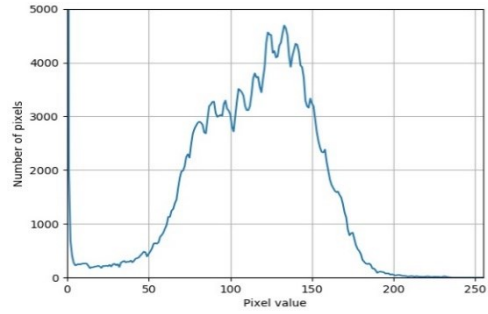


(e) Sample 5

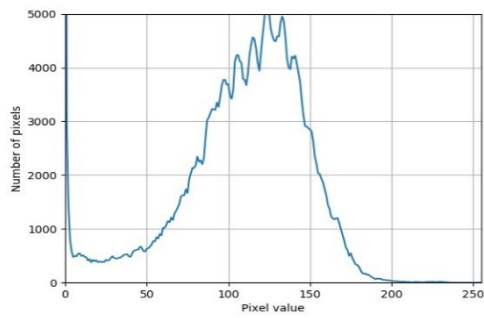
Fig. 62 各サンプルの造影後エコー画像の輝度値を3次元カラーマッピングした画像



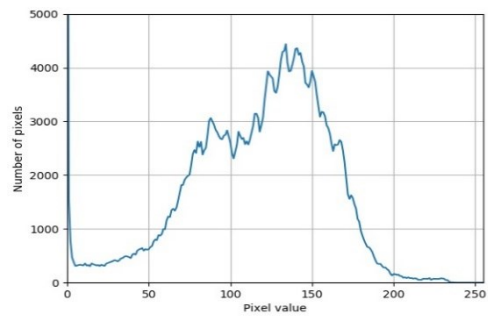
(a) Sample 1



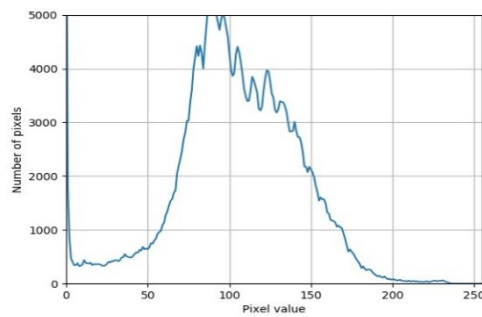
(b) Sample 2



(c) Sample 3

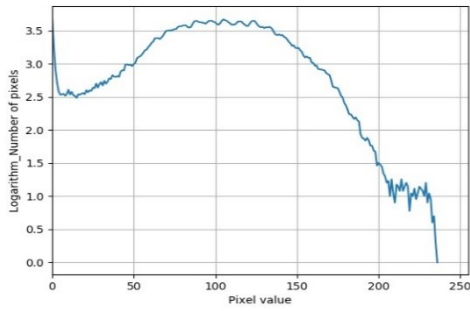


(d) Sample 4

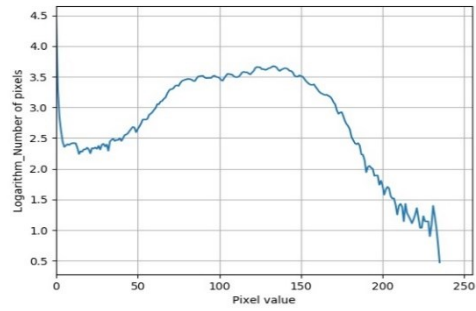


(e) Sample 5

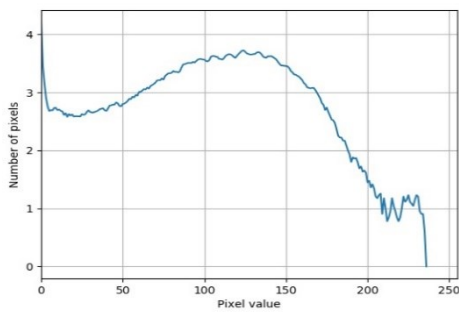
Fig. 63 Fig. 62 におけるヒストグラム



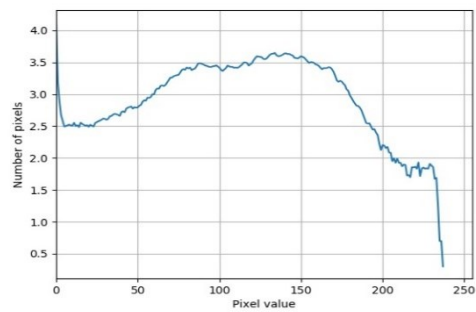
(a) Sample 1



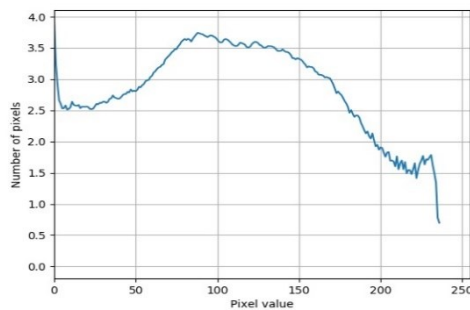
(b) Sample 2



(c) Sample 3



(d) Sample 4



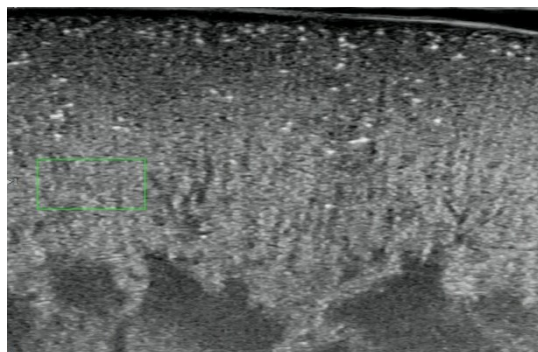
(e) Sample 5

Fig. 59 Fig. 58 のデータを対数プロットしたグラフ.

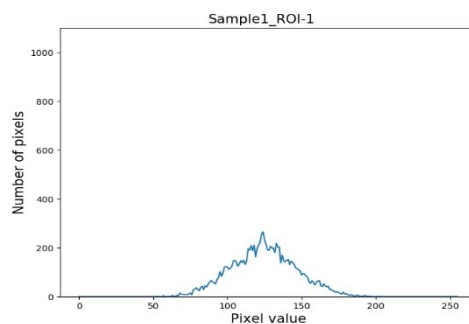
Fig. 62-64 から同様の輝度帯域の分布が確認された。

続いて、皮質の領域を抽出するための閾値を決める作業を行った。
 前述したトリミング後のエコー画像配列から皮質と思われる ROI(Region of Interest)を 150 × 75 pixel で抽出し、ROI をオリジナル画像とマージしたものを出力した。各サンプルからそれぞれ 5 つずつの ROI を抽出し、5 つのサンプル合計で 25 の ROI を獲得することがで

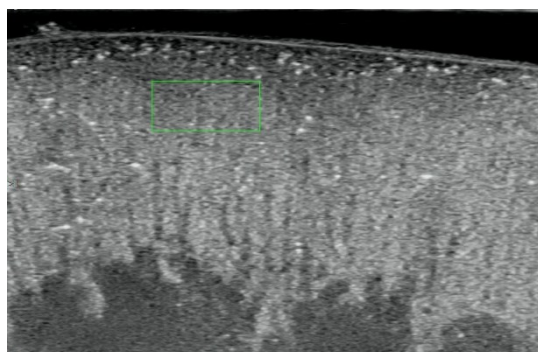
きた。25 の ROI の配列を母集団とし、ヒストグラムを作成することで皮質が示す輝度分布を
獲得した。これら画像を Fig. 65 に示し、総和ヒストグラムを Fig. 66 に示す。



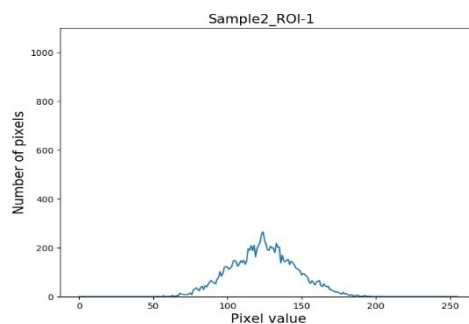
(a) Sample 1 の ROI マージ画像



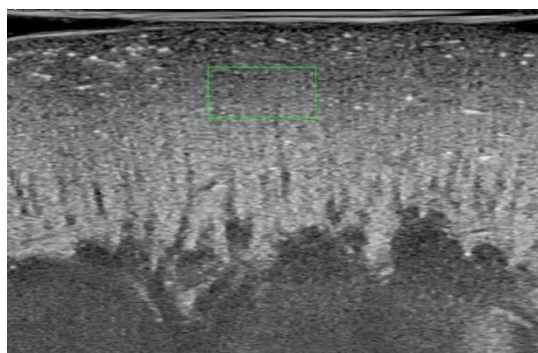
(a') Sample1_ROI 1_histogram



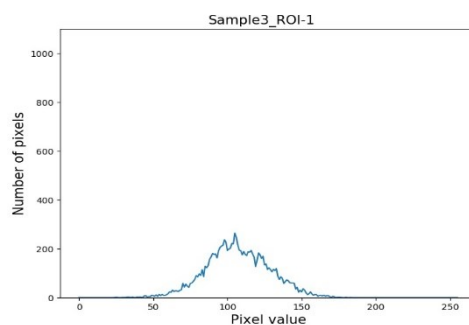
(b) Sample 2 の ROI マージ画像



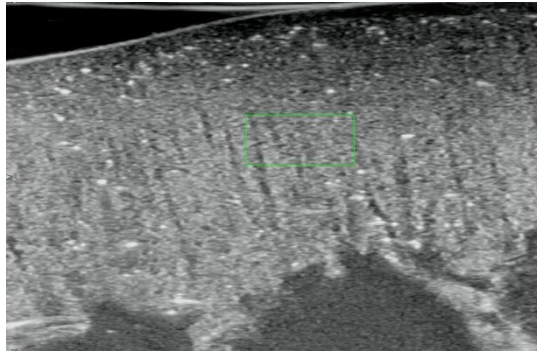
(b') Sample 2_ROI 1_histogram



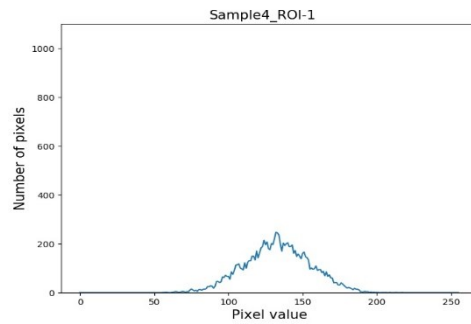
(c) Sample 3 の ROI マージ画像



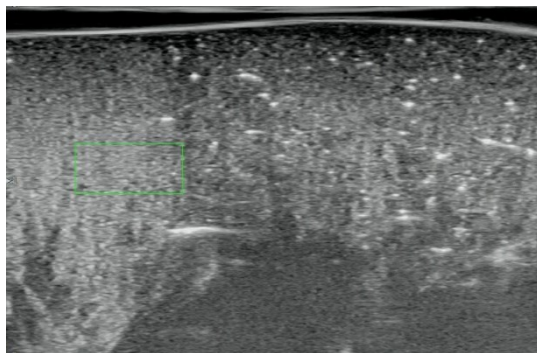
(c') Sample 3_ROI 1_histogram



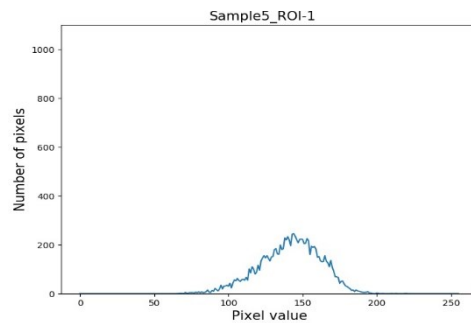
(d) Sample 4 の ROI マージ画像



(d') Sample 4_ROI 1_histogram

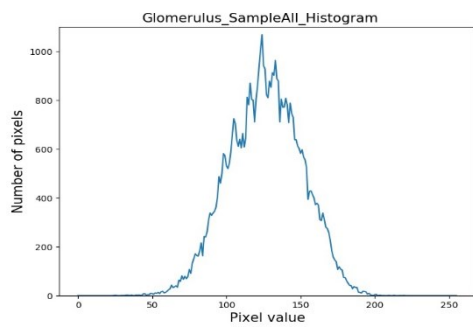


(e) Sample 5 の ROI マージ画像

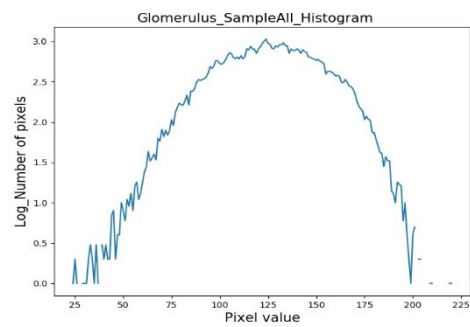


(e') Sample 5_ROI 1_histogram

Fig. 65 皮質部分の ROI ヒストグラム



(a) ヒストグラム

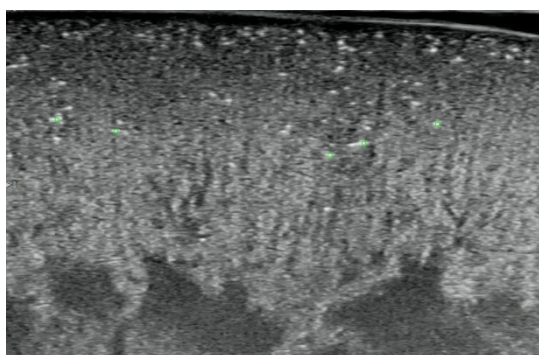


(b) 対数ヒストグラム

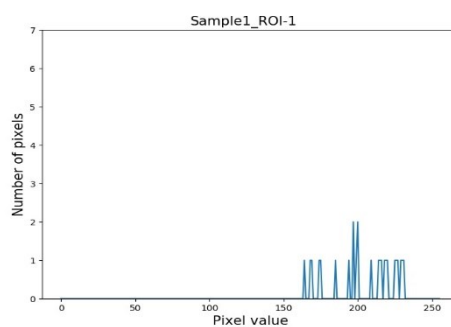
Fig. 66 皮質 ROI 総和ヒストグラム

輝度分布に含まれる最も小さい輝度値から、本実験では皮質の領域抽出を行う際の閾値は 50 に決定した。

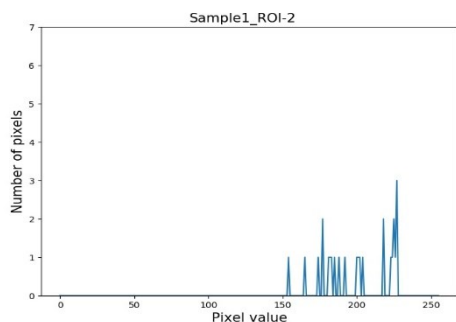
次に、糸球体の領域を抽出するための閾値を決めた。皮質の抽出と同様にトリミング後のエコー画像配列から糸球体と思われる ROI(Region of Interest)を 5×5 pixel で抽出し、ROI をオリジナル画像とマージしたものを出力した。各サンプルからそれぞれ 5 つずつの ROI を抽出し、5 つのサンプル合計で 25 の ROI を獲得することができた。25 の ROI の配列を母集団とし、ヒストグラムを作成することで糸球体を示す輝度分布を獲得した。これらの画像を Fig. 67 に示し、総和ヒストグラムを Fig. 68 に示す。



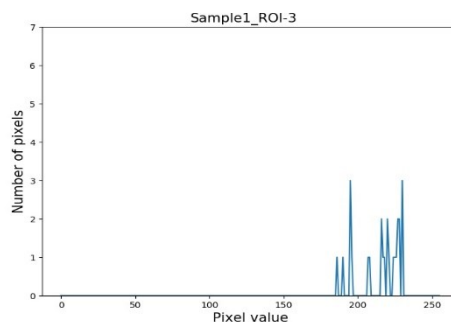
(a) Sample 1 の ROI マージ画像



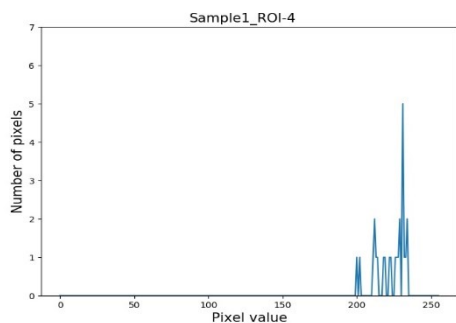
(a'-1) Sample 1_ROI 1_histogram



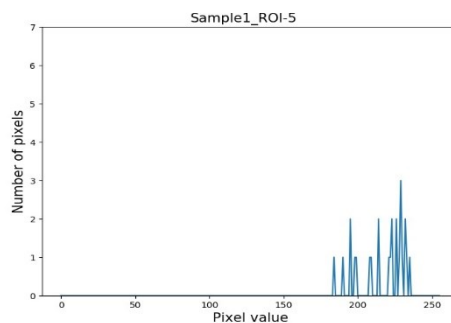
(a'-2) sample 1_ROI 2_histogram



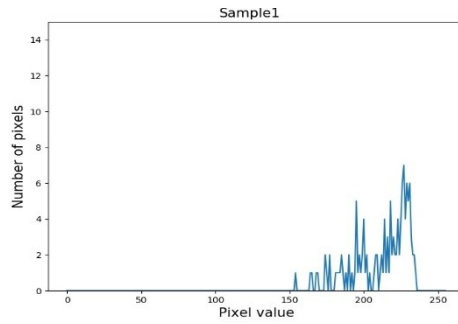
(a'-3) sample 1_ROI 3_histogram



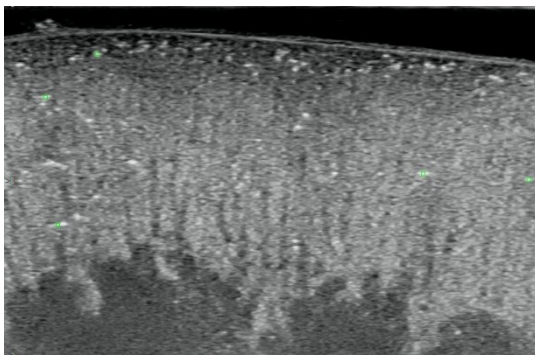
(a'-4) sample 1_ROI 4_histogram



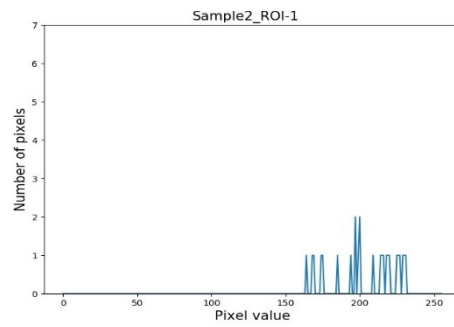
(a'-5) sample 1_ROI 5_histogram



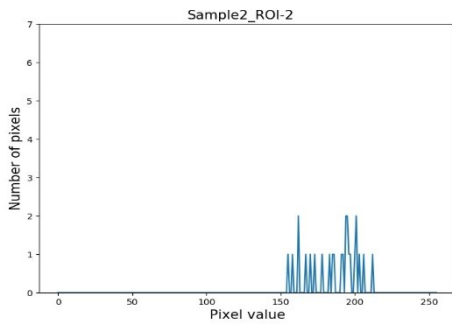
(a'')Sample 1_sum total_histogram



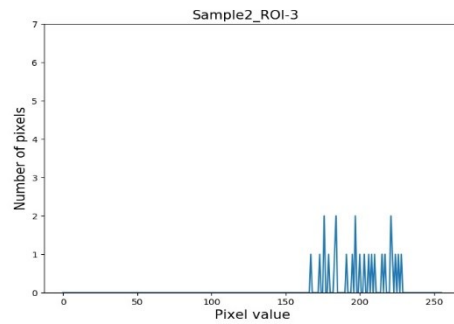
(b) Sample 2 の ROI マージ画像



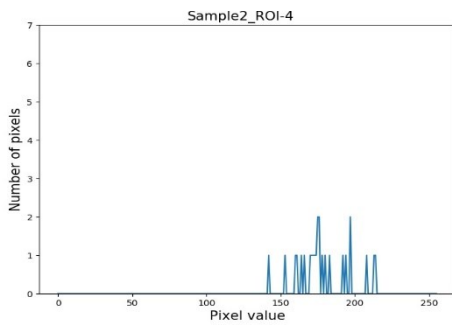
(b'-1) Sample2_ROI 1_histogram



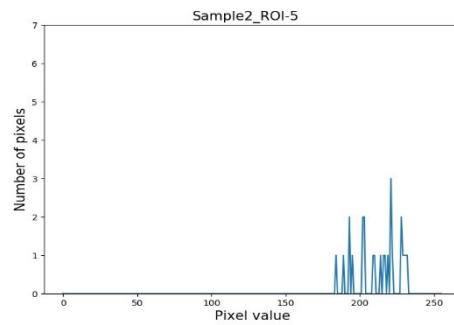
(b'-2) Sample 2_ROI 2_histogram



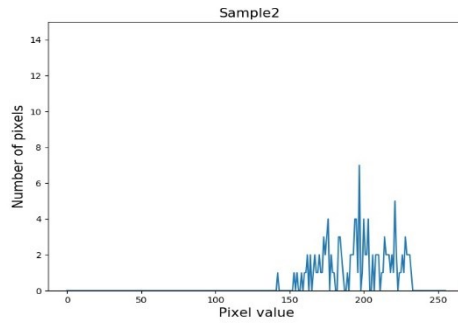
(b'-3) Sample 2_ROI 3_histogram



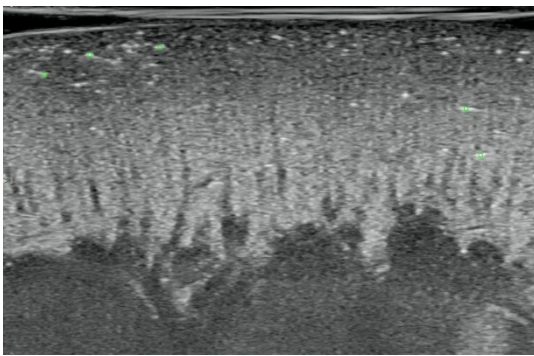
(b'-4) Sample 2_ROI 4_histogram



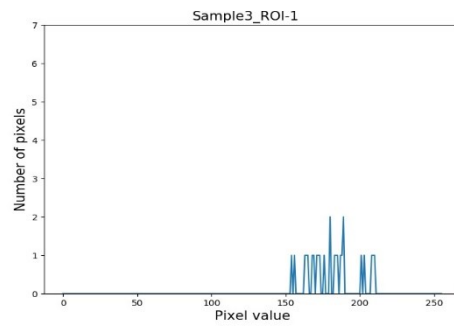
(b'-5) Sample 2_ROI 5_histogram



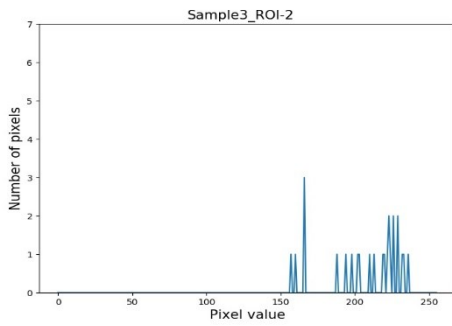
(b'')Sample 2_sum total_histogram



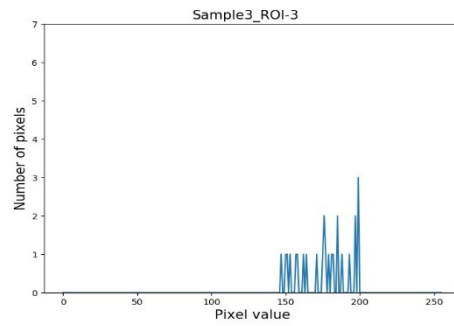
(c) Sample 3 の ROI マージ画像



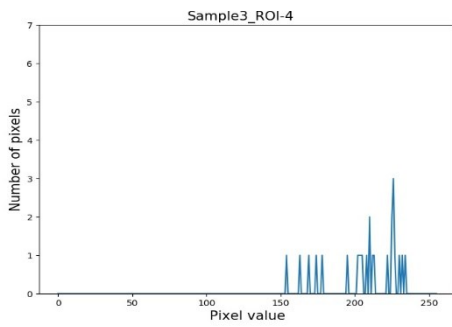
(c'-1) Sample 3_ROI 1_histogram



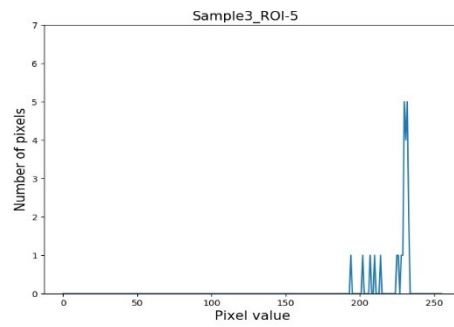
(c'-2) Sample 3_ROI 2_histogram



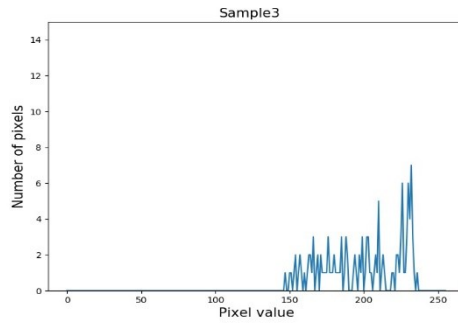
(c'-3) Sample 3_ROI 3_histogram



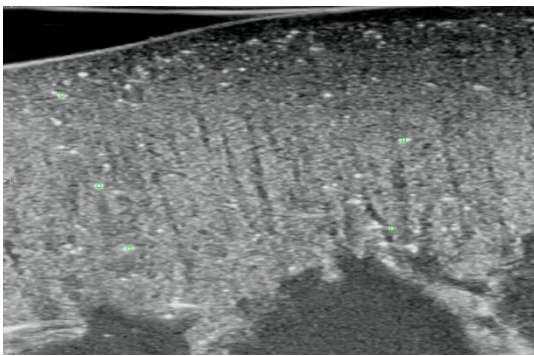
(c'-4) Sample 3_ROI 4_histogram



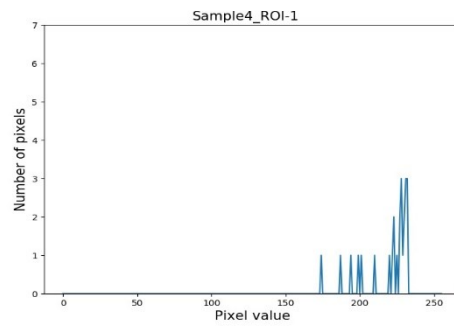
(c'-5) Sample 3_ROI 5_histogram



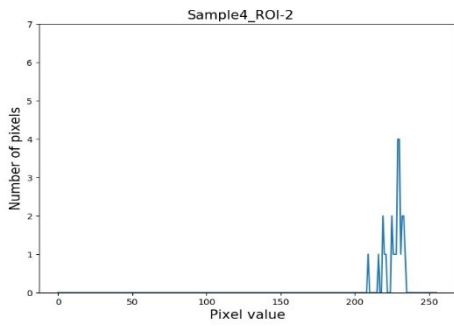
(c'')Sample3_sum total_histogram



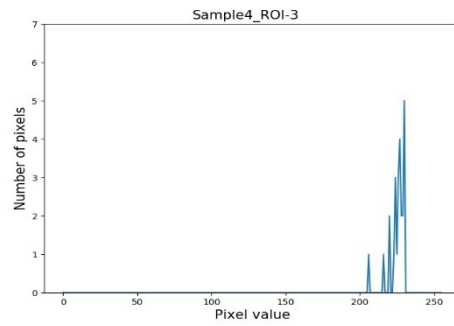
(d) Sample 4 の ROI マージ画像



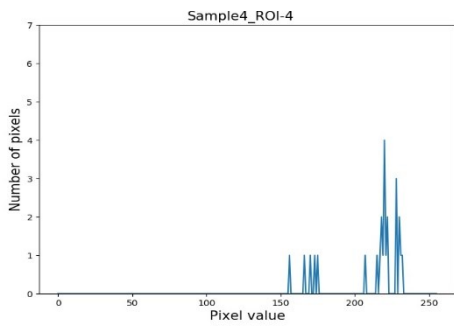
(d'-1) Sample 4_ROI 1_histogram



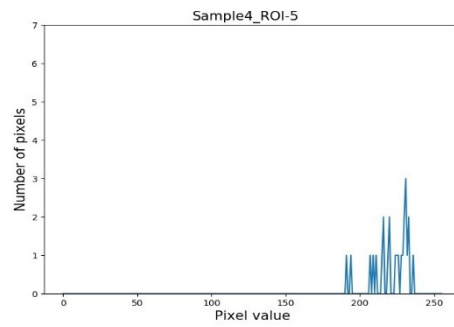
(d'-2) Sample 4_ROI 2_histogram



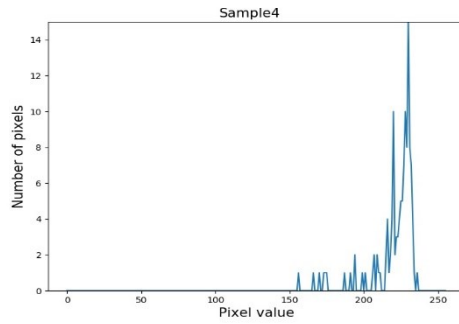
(d'-3) Sample 4_ROI 3_histogram



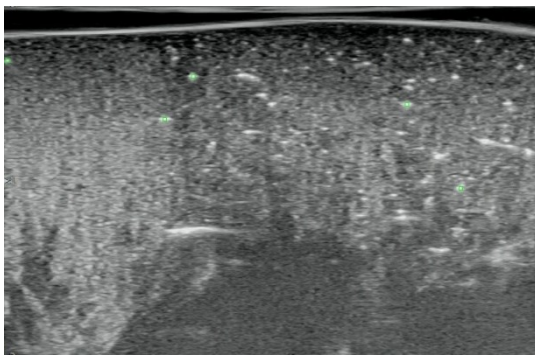
(d'-4) Sample 4_ROI 4_histogram



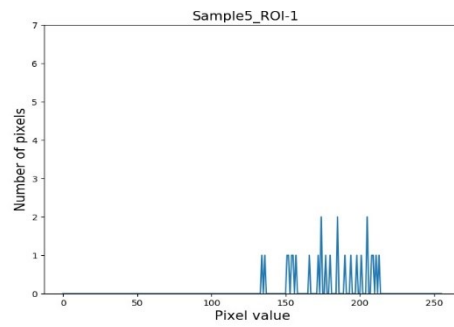
(d'-5) Sample 4_ROI 5_histogram



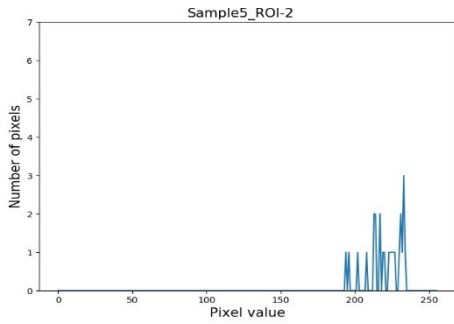
(d'')Sample 4_sum total_histogram



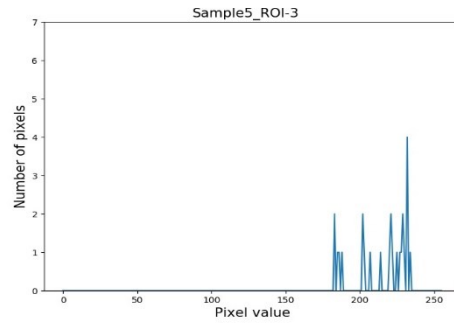
(e) Sample 5 の ROI マージ画像



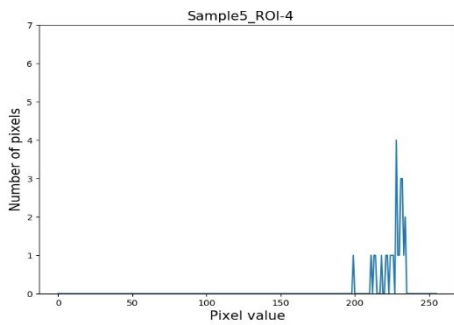
(e'-1) Sample 5_ROI 1_histogram



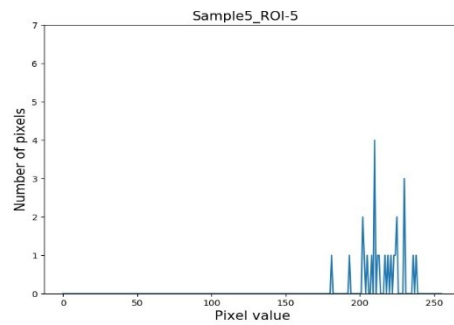
(e'-2) Sample 5_ROI 2_histogram



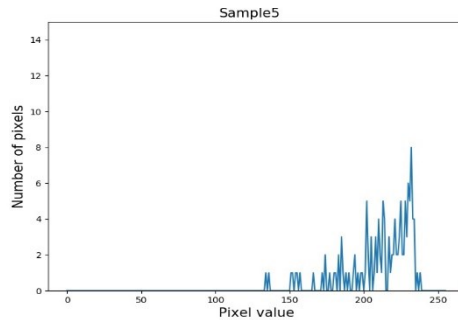
(e'-3) Sample 5_ROI 3_histogram



(e'-4) Sample 5_ROI 4_histogram

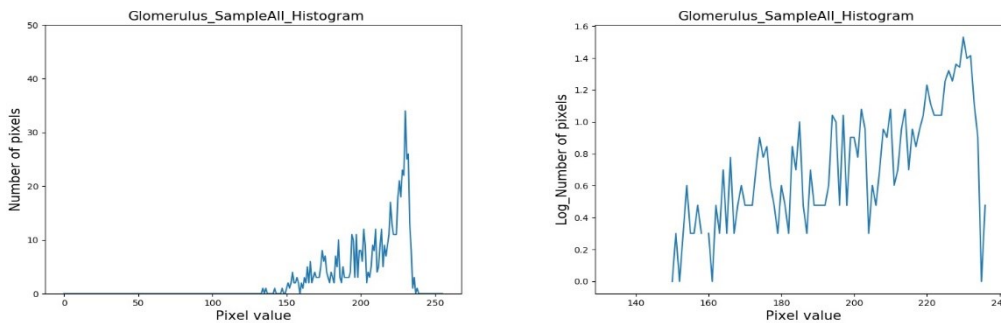


(e'-5) Sample 5_ROI 5_histogram



(e'')Sample 5_sum total_histogram

Fig. 67 糸球体の ROI ヒストグラム



(a) ヒストグラム

(b) 対数ヒストグラム

Fig. 68 糸球体 ROI 総和ヒストグラム

輝度分布に含まれる最も小さい輝度値から、本実験では糸球体の領域抽出を行う際の閾値は 130 に決定した。

次に皮質の領域抽出を行った。

前処理として、まず Fig. 61 で示したトリミングを行ったエコー画像において、エコー画像特有のノイズを除去するために Rolling ball algorithm を 300 pixel で適用した。続いて検出物の輪郭を滑らかに抽出するためにガウシアンフィルタを 5×5 のカーネルサイズで適用(標準偏差 15pixel)した。

皮質の抽出処理では、前処理を行った画像に対して、閾値を 50 と設定して 2 値化処理を行い、領域を抽出した。その後、領域の結合と細かいノイズ除去を行うために、Dilation 演算と Erosion 演算をそれぞれ 9×9 のカーネルサイズ、Iteration:1 で適用した。最後に Closing 処理を 5×5 のカーネルサイズ、Iteration:1 で適用し、抽出した領域内の穴埋め処理を行った。また、除去しきれなかったノイズをカウントしないように 100000 pixel 以上の領域を対象に計測処理を行った。これを Fig. 69 に示す。

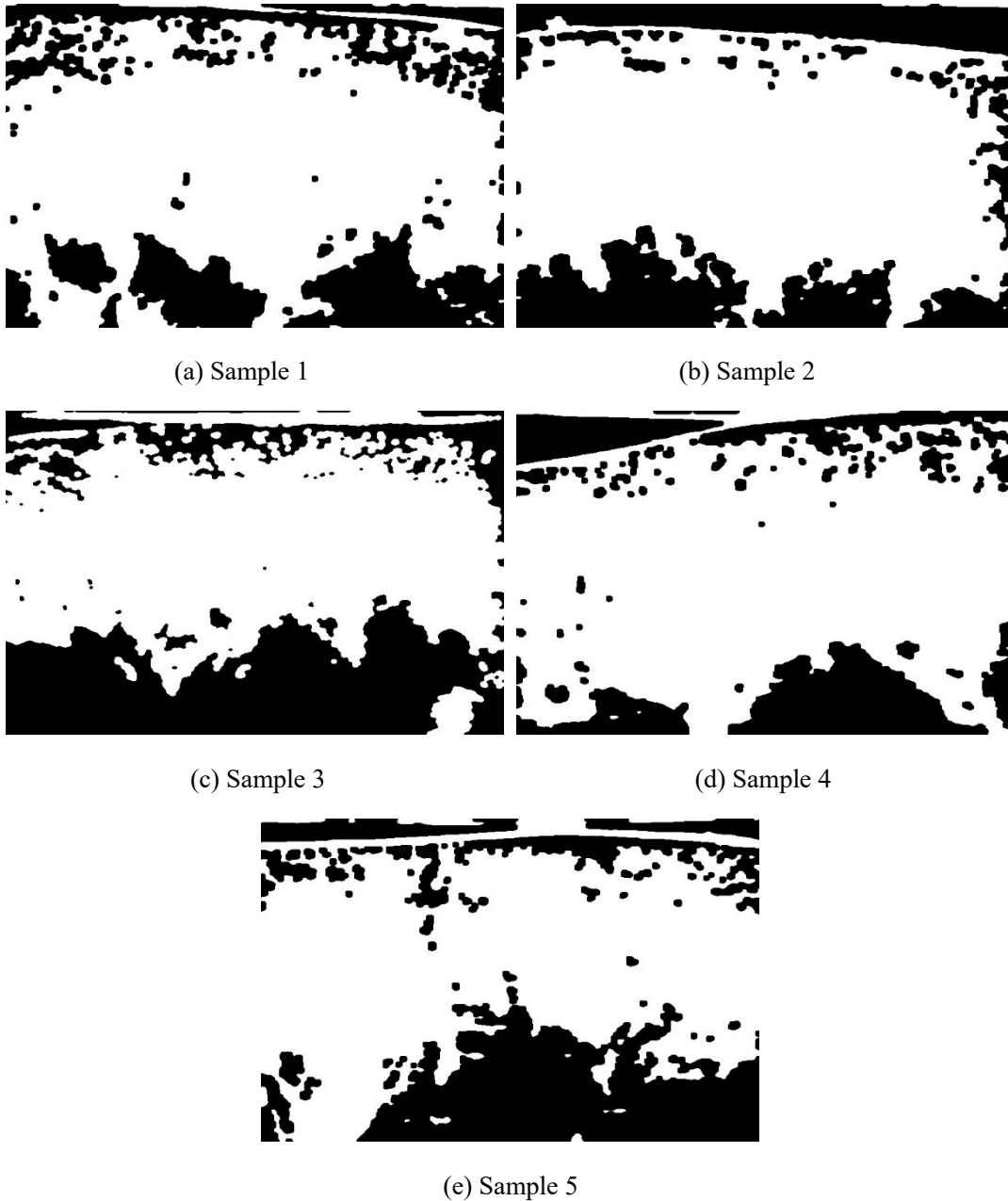


Fig. 69 皮質領域抽出後の画像

二値化処理後の3回のモルフォロジー演算により、滑らかで形状を保持した輪郭を取得し、皮質部分の抽出を行うことが出来た。

糸球体の抽出では前処理を行った画像に対して、閾値を130と設定して二値化処理を行い、領域を抽出した。抽出した領域の誤検出を防ぐために、糸球体の実際の大きさを判断基準としてノイズの除去を行った。具体的には、抽出した輪郭内部の面積が3 pixel から27 pixel の範囲のみを計測対象とした。これらの画像を Fig. 70 に示す。これは実際の糸球

体が $100\ \mu\text{m}$ から $200\ \mu\text{m}$ 程度であるという既知の情報にもとづいて、抽出した領域内部の面積を真円近似した際に直径が $80\ \mu\text{m}$ から $220\ \mu\text{m}$ となるように設定している。また、画像における画素数と実際のスケールとの換算は $26.3\ \text{pixel/mm}$ という対応値をもとに行った。



(a) Sample 1

(b) Sample 2



(c) Sample 3

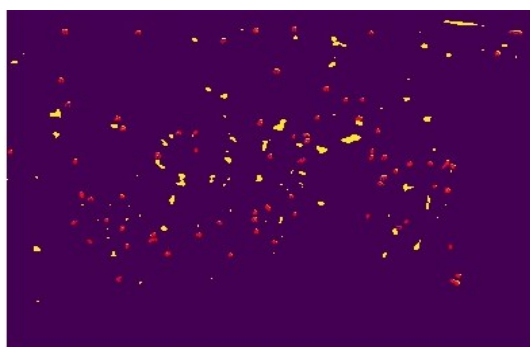
(d) Sample 4



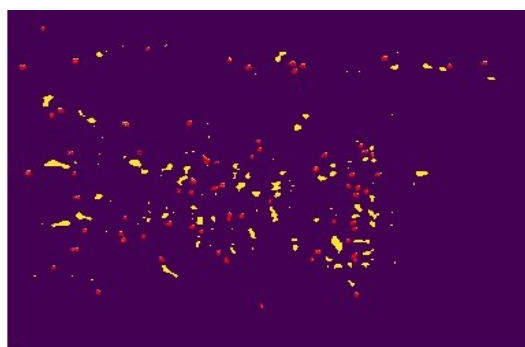
(e) Sample 5

Fig. 70 糸球体領域抽出後の画像

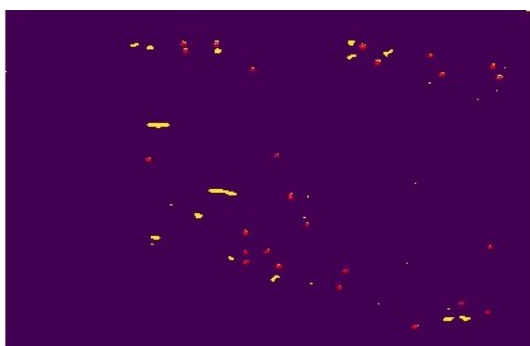
Fig. 71 に糸球体のカウントを行った結果を示す。



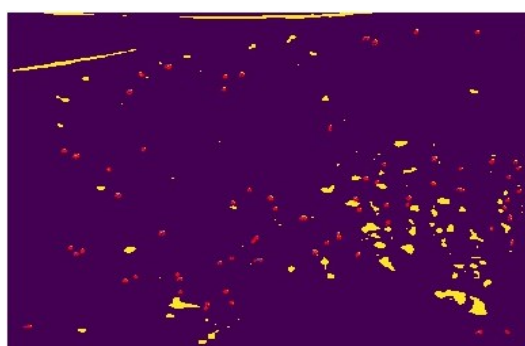
(a) sample 1



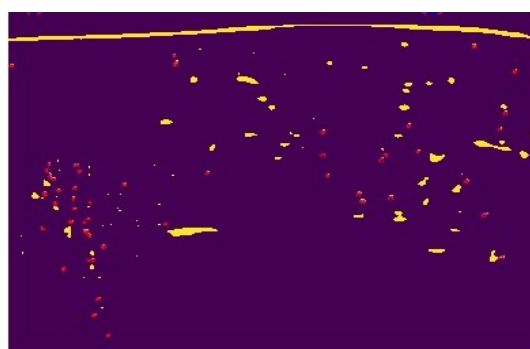
(b) sample 2



(c) sample 3



(d) sample 4



(e) sample 5

Fig. 71 糸球体領域抽出後カウント画像

皮質領域及び糸球体領域の輪郭内部のピクセル数をカウントすることでそれぞれの面積及び、皮質に対する糸球体の面積割合を Table 4 に示す。また、それぞれの糸球体の面積と個数を Table 5 に示す。

Table 4 各サンプルにおける皮質、糸球体の面積、糸球体の個数、皮質 10000 pixel 当たりの糸球体の個数

サンプル番号	皮質 [pixel]	糸球体 [pixel]	糸球体数 [個]	皮質10000 pixel当 たりの糸球体数 [個]
sample1	248200	476.5	39	1.57
sample2	242220.5	443	40	1.65
sample3	229993	1340.5	112	4.87
sample4	259265.5	518.5	41	1.58
sample5	211168.5	408	31	1.47
平均値	238170	637	52.6	2.21
標準偏差	16480	353	29.91	1.32

Table 4 のデータをもとにグラフに示す。

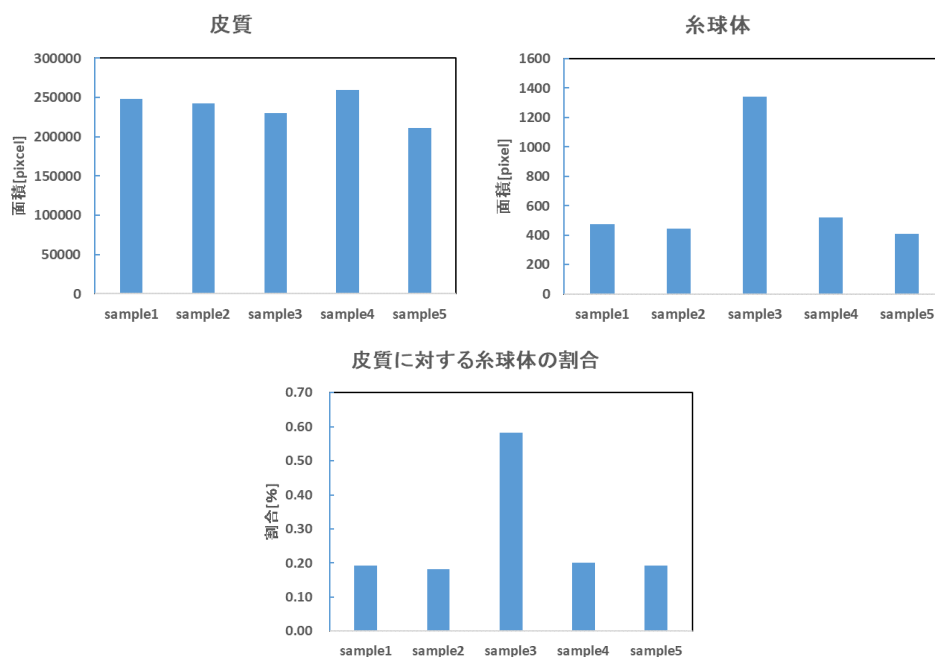


Fig. 72 皮質及び糸球体の面積と皮質に対する糸球体の割合

Table 5

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
糸球体の数	39	40	112	41	31
面積 [pixel]	476.5	443	1340.5	518.5	408

Table 5 のデータをもとにグラフに示す。

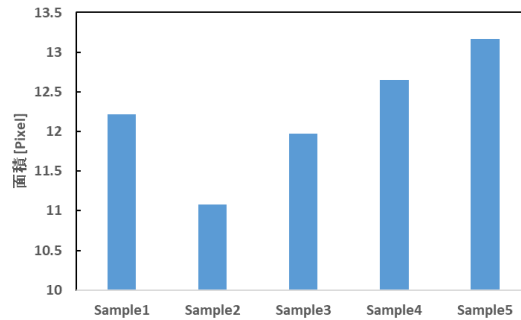


Fig. 73 糸球体 1 個に対する面積

腎臓の個体差、虚血による血管内の状態により数にばらつきはあるが糸球体の検出をすることができた。

6.3 考察とまとめ

超音波エコー装置にて糸球体サイズの構造物を観察できるかについて、ガラスビーズを用いて検討を行ったところ、今回使用したエコー装置（SONIMAGE HS1 PRO, KONICA MINOLTA、日本）使用して観察した結果、粒子径 38-53 μm のガラスビーズを水中及び腎臓内で観察できることが確認でき、糸球体の観察の可能性が確認できた。

そして、糸球体観察のために超音波造影剤を用いた血管造影を行った結果、皮質領域に糸球体の造影像が検出することが出来た。蛍光色素を同時に使うことで、糸球体の蛍光造影像を確認できたことから、超音波エコーでみられた造影像は糸球体であると確認できる。

更に、画像解析を加えることで、糸球体数のカウント、糸球体の密度の定量評価が出来る可能性が示せた。

超音波エコー検査は、低侵襲かつリアルタイムでの灌流腎臓の内部構造の観察及び、造影剤による血流状態の評価、更に今回、糸球体の造影及び、画像評価による定量評価の可能性が示されたことにより、灌流腎臓の構造の評価及び腎機能の客観的評価に有用であることが確認できた。腎臓の再生治療の前後での比較や再生過程での変化の観察評価に利用できると思われる。腎臓再生を客観的、定量的に判定する指標、さらに再生した腎臓の再移植を決める基準となる指標を作ることにもつながるであろう。

今回、当研究室にて開発したプログラムを用いることで、糸球体の検出により定量評価を行うことが出来た。ただし、超音波エコーでの検出は造影剤を検出している為、造影剤

が到達していない糸球体や、造影剤が流れ去った後の糸球体は静止画からは検出できない。従って、現状の画像解析方法における課題点として、エコーによる皮質断面画像に存在している糸球体を漏れなく抽出するには、灌流中の動画すべてを対象に解析を行う必要がある。

また、今回の手法から得られる定量的なデータと実際の腎機能との相関性があるかも今後検討していく必要がある。

6.4 結論

体外腎臓灌流培養技術を用いた新しい腎臓治療法を開発するにあたって、治療法の効果を判定するには、腎臓の形態学的な評価法及び、機能的な評価法の開発は必須である。

そこで、コントラストエコーによる体外灌流培養中の腎臓の形態学評価法について検討した。今回ソナゾイドを用いたコントラストエコーにより描出された糸球体から、体外灌流下にある腎臓の糸球体の描出及び定量評価の可能性が示せた。

7章 腎臓機械灌流実験：腎機能評価法の検討

7.1 背景と目的

前章にも述べた通り、体外腎臓灌流培養技術を用いた新しい腎臓治療法を開発するにあたって、治療法の効果を判定するには、腎臓の形態学的な評価法及び、機能的な評価法の開発は必須である。

しかし、腎臓の体外機械灌流において様々な研究報告があるが、灌流腎の腎機能そのものを詳細に評価している研究は少なく、またその評価法の検討もあまり行われていない。そこで、腎臓の機能評価に焦点を当て、薬物負荷試験による腎臓の機能評価を試みた。

まず、糸球体濾過量の検査としてイヌリン負荷試験、尿細管機能の検査としてフェノールスルホンフタレイン (PSP)負荷試験、そして糸球体の濾過機能障害の検査として FITC-1 ラベル化アルブミン負荷試験を試みた。

7.2 実験

今回検討した負荷試薬は以下の3つである。

実験1：イヌリン負荷試験

実験2：フェノールスルホンフタレイン (PSP)負荷試験

実験3：FITC-1 ラベル化アルブミン負荷試験

実験1,2：イヌリン負荷試験・フェノールスルホンフタレイン (PSP)負荷試験

7.2.1 実験内容

・イヌリン負荷試験概要：腎機能検査薬であるイヌリンは血漿タンパクと結合せず、体内でも代謝されず糸球体で自由に濾過され、尿細管で分泌・再吸収が無い物質である。そのためイヌリン負荷試験は糸球体濾過量を検査するものである[58]。

・PSP 負荷試験概要：腎機能検査薬（フェノールスルホンフタレイン：PSP）は、体内で代謝されず、ほとんどが腎のみから排出される。血液中の6%のPSPが糸球体から濾過され残りの94%は近位尿細管から排泄される[59]。そのためPSP負荷試験は近位尿細管の機能及び尿路通過状態を検査するものである。

実験材料

灌流液

- ・初期灌流液 2 L (MUW液+ウロキナーゼ 48,000 IU)
- ・負荷試験液 2 L (MUW+PSP 6 mg, イヌリン 4000 mg)
- ・無負荷灌流液 2 L (MUW液)

灌流臓器

- ・屠殺場ブタの腎臓（心停止後約 2 時間経過）

実験器具

- ・灌流培養装置（澁谷工業との共同研究）
- ・動脈カニューレ（サフィード延長チューブ、TERUMO、日本）
- ・電子天秤（FZ-5000i A&D、日本）
- ・U-5100 形レシオビーム分光光度計 3J2-0020（日立ハイテクノロジーズ、日本）

実験試薬

- ・腎機能検査薬（フェノールスルホンフタレイン注 0.6%、第一三共、日本）
- ・腎機能検査薬（イヌリド注、富士薬品、日本）
- ・血栓溶解剤（ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本）
- ・水酸化ナトリウム（富士フィルム和光純薬、日本）

灌流条件

初期灌流圧：80 mmHg

灌流圧：60 mmHg

灌流液温度：22℃

実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 搬送後に余分な脂肪等を剥離し、腎動脈、尿管へカニューレーションを行う。
3. 初期灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ(240,000 IU/10 mL)を 2 mL 添加した。
4. 初期灌流後、負荷試験液で灌流し、その後無負荷灌流液で灌流をする。この間腎からの尿を随時採液する。
5. 採液した尿サンプルを分光光度計にて吸光度測定し、PSP 濃度を求めた。イヌリン濃度測定は株式会社 BML に委託した。

分光光度計による PSP 濃度測定条件

データモード：ABS

計測波長：558 nm

縦軸上限：3.000

縦軸下限：0.000

スキャン速度：200 nm/min

初期待ち時間 (Sec.)：0

データ間隔：高分解

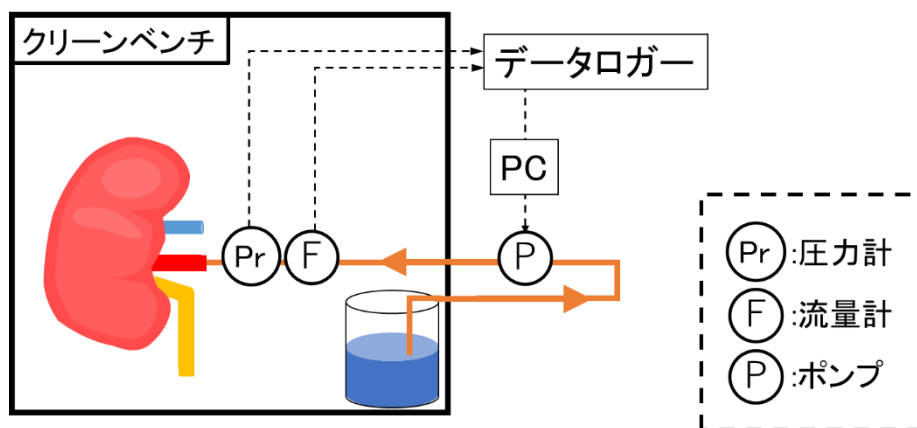


Fig. 74 灌流時回路模式図

7.2.2 実験結果

3つの腎サンプル（サンプル1, 2, 3）について、尿中に排泄したイヌリンとPSPの負荷試薬量を測定時間毎に求め、Fig. 76,77と79,80,および82,83にそれぞれ示した[60]。同時にイヌリン及びPSPのクリアランス値を求めこちらもFig. 78,81,84に示した[60]。

また、各クリアランス値は以下の式を用いて算出した[60]。

$$\frac{(\text{尿中試験薬濃度} \times \text{単位時間当たりの尿量})}{\text{血中試験薬濃度}} = \text{クリアランス値}$$

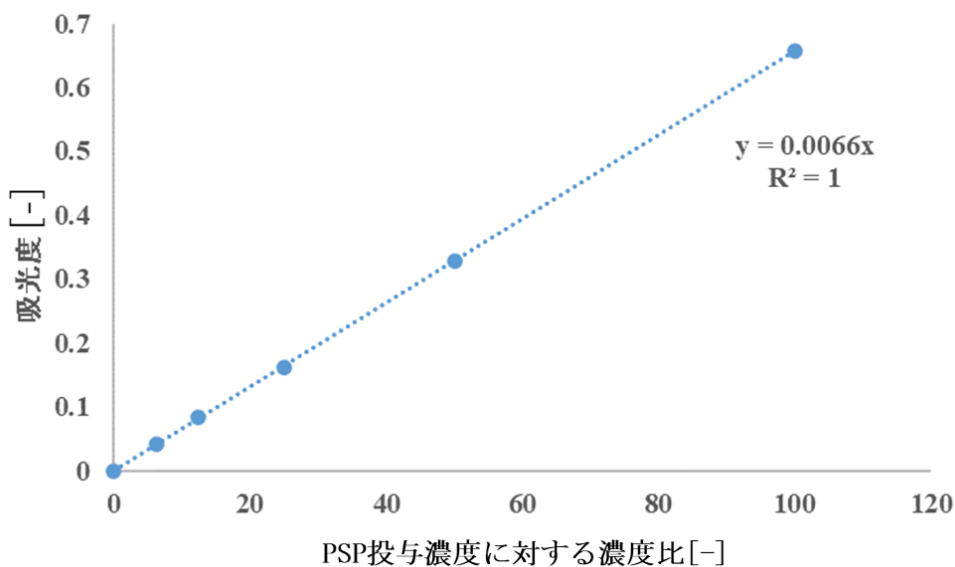


Fig. 75 PSP 負荷試験における検量線

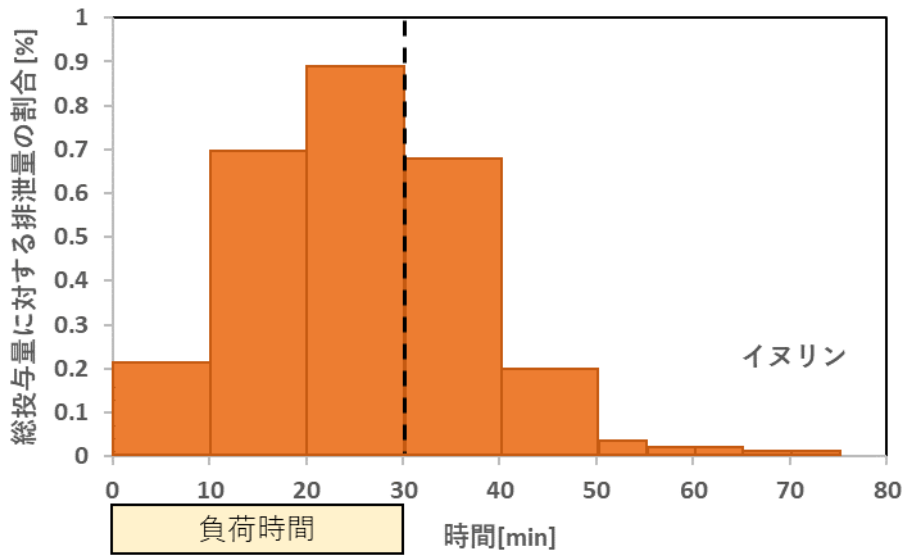


Fig. 76 全投与負荷試薬量に対する各時間のインスリン排泄量割合[60] (Sample 1)

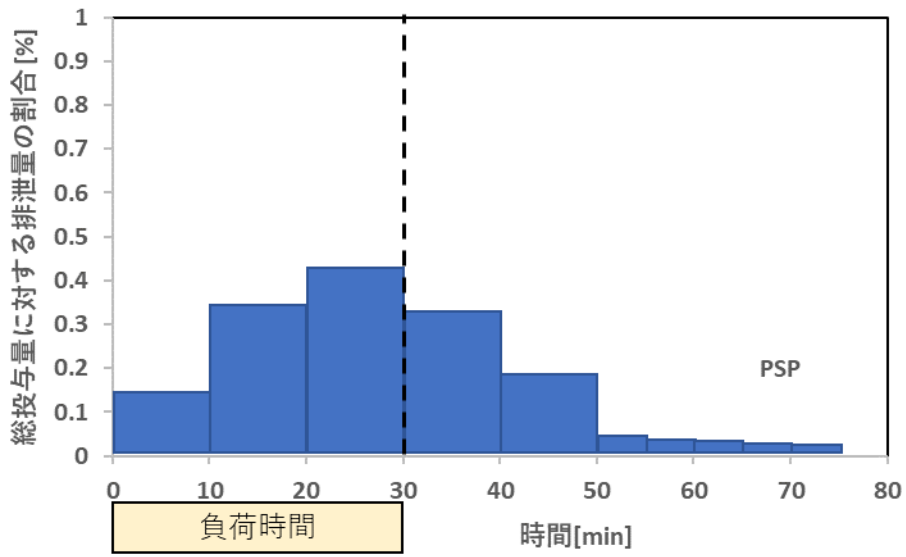


Fig. 77 全投与負荷試薬量に対する各時間の PSP 排泄量割合[60] (Sample 1)

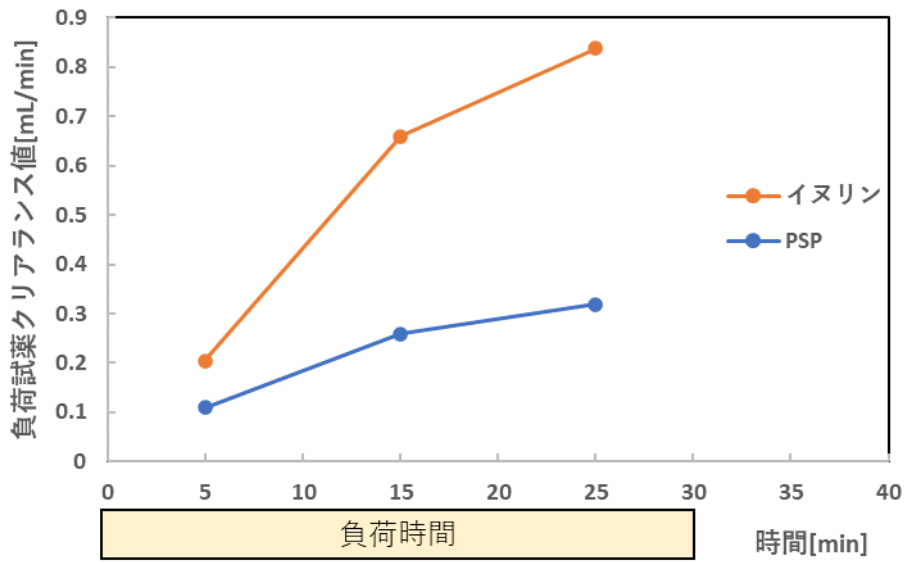


Fig. 78 負荷試験クリアランス値の変化[60] (Sample 1)

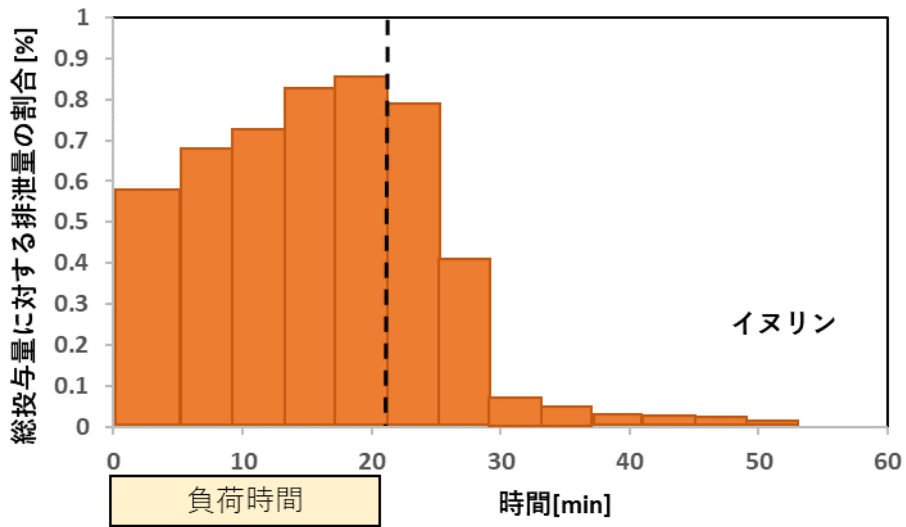


Fig. 79 全投与負荷試験量に対する各時間のイヌリン排泄量割合(Sample 2)

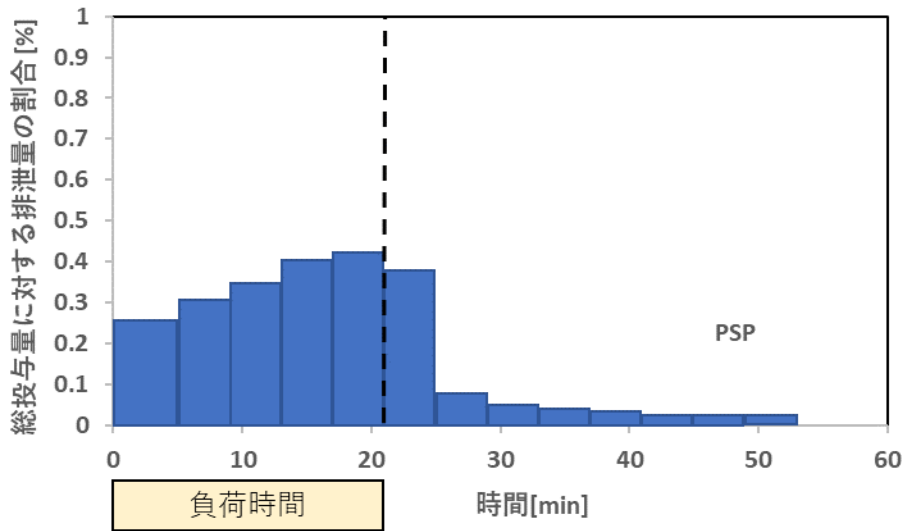


Fig. 80 全投与負荷試薬量に対する各時間の PSP 排泄量割合 (Sample 2)

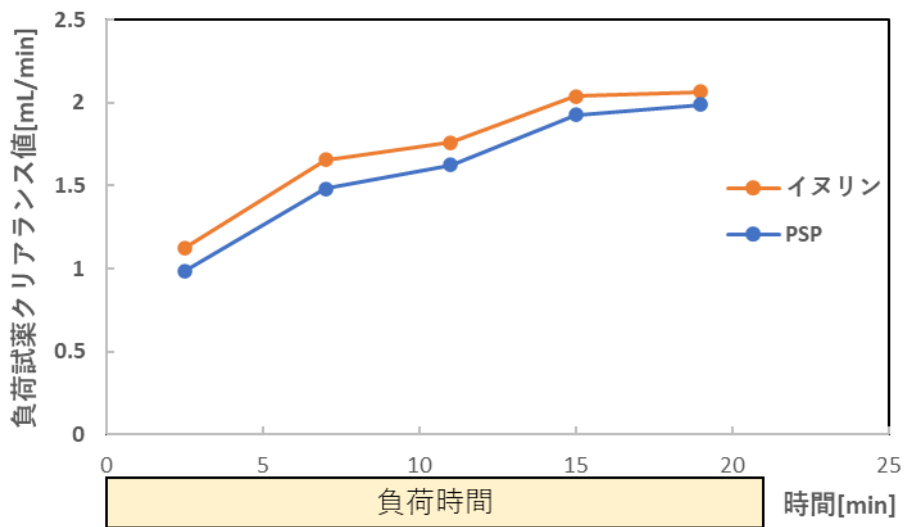


Fig. 81 負荷試薬クリアランス値の変化 (Sample 2)

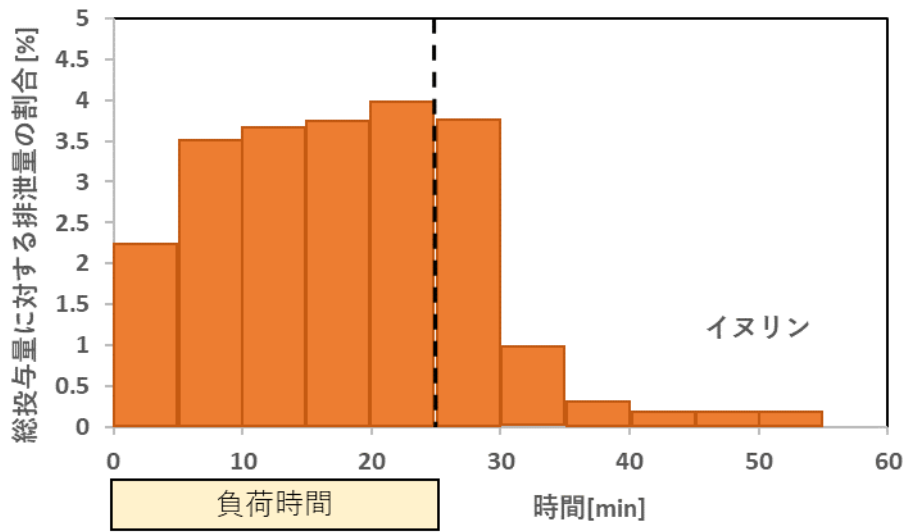


Fig. 82 全投与負荷試薬量に対する各時間のインスリン排泄量割合(Sample 3)

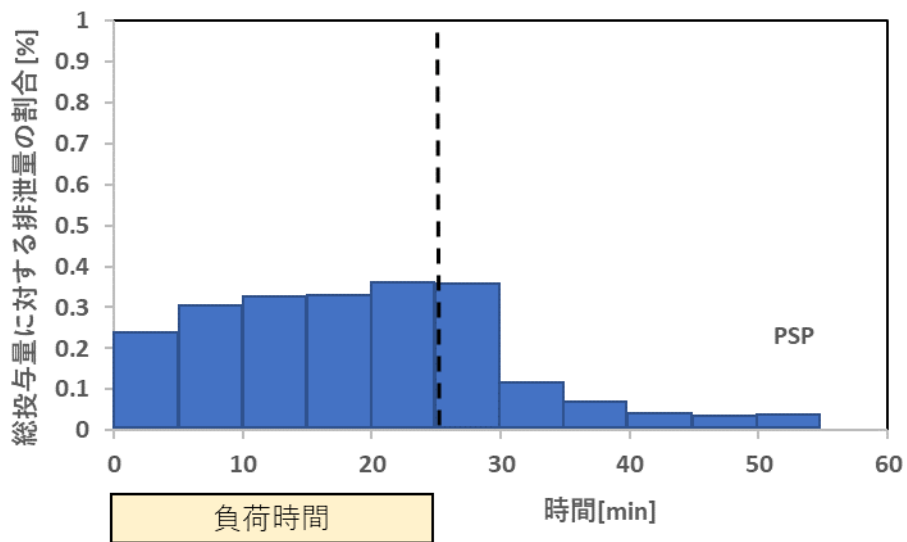


Fig. 83 全投与負荷試薬量に対する各時間の PSP 排泄量割合(Sample 3)

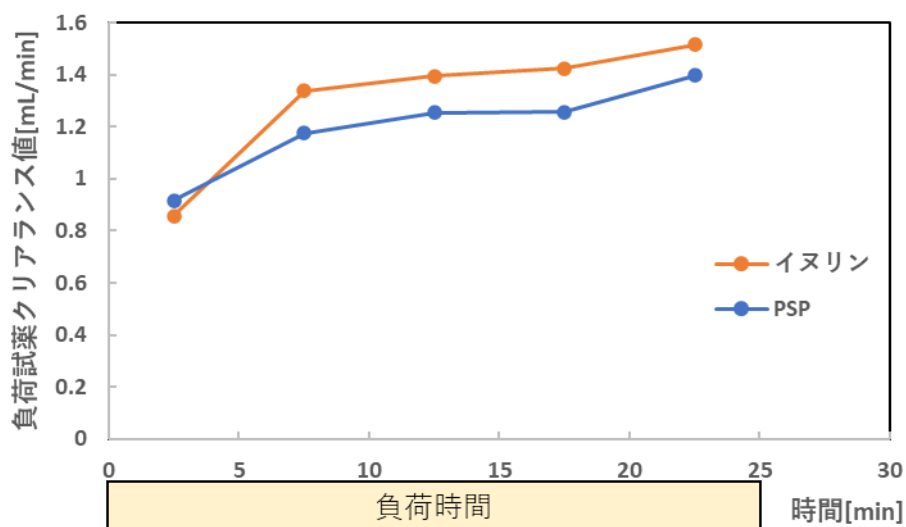


Fig. 84 負荷試薬クリアランス値の変化 (Sample 3)

Fig. 76,77,79,80,82,83 にある点線のタイミングで負荷試薬含有 MUW 液と負荷試薬を含まない MUW 液の交換を行った。

Table 6 各負荷試薬の全投与量に対する全排泄量の割合及びクリアランス値

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	平均値	標準偏差
イヌリンの全投与量に対する全排泄率	0.028	0.051	0.229	0.103	0.090
PSPの全投与量に対する全排泄率	0.016	0.024	0.022	0.021	0.004
最大イヌリンクリアランス値	0.839	2.067	1.516	1.474	0.502
最大PSPクリアランス値	0.319	1.990	1.397	1.235	0.692

7.3 考察とまとめ

負荷試薬であるイヌリンと PSP の排泄割合のグラフからイヌリンと PSP の最大尿中排泄量は個体差があるものの、いずれも負荷開始 20~30 分後に起こり、負荷終了後急速に減少することが示された。負荷試薬クリアランスにおいては、負荷期間中のみ算出となる。今回行った負荷試験において負荷試薬は腎臓への通過は一度のみであり、一回の負荷で腎機能の測定が可能になることが示唆された。

今回、イヌリンと PSP はほぼ類似の反応がみられたが、本来なら、PSP 負荷試験の場合尿細管からの分泌により尿中への排泄量（排泄割合）はイヌリンよりも多くなることが推察されるが、今回は見られなかった。その理由として、屠殺による虚血によって尿細管が障害されていた可能性が高いこと、室温での灌流を行っての負荷試験であったことから低体温の影響で尿細管の機能が低下していたことが考えられる。従って、今後、尿細管の詳細な検討、37-38℃の体温下での負荷試験を行う必要がある。

7.4 結論

体外灌流下の腎機能を評価するために、イヌリン負荷試験、PSP 負荷試験を行い、イヌリン排泄率、PSP 排泄率、イヌリンクリアランス値、PSP クリアランス値を求めたが、これらは定量的な評価項目として有効である可能性がある。また、イヌリンクリアランス値及びPSP クリアランス値からすると、負荷試験を行った腎臓は糸球体濾過能、尿細管分泌能に障害が疑われた。

7.5 実験3：FITC-1 ラベル化アルブミン負荷試験

7.5.1 実験内容

FITC-アルブミン負荷試験概要：アルブミンは生体内に存在するタンパク質のひとつであり、分子量は約 69,000 程である。腎臓の糸球体は分子量 60,000 以下の物質が濾過されるため、健全な腎臓であればアルブミンは基本的には尿中には出てこない[57]。しかし、障害を受けている腎臓の糸球体ではアルブミンが尿中へ漏出することが考えられる。そのため本負荷試験は糸球体の濾過機能評価を目的として行う。アルブミンは測定するために FITC-1(Fluorescein isothiocyanate isomer-1)を修飾し蛍光測定した。FITC-1 は以下の構造であり(Fig. 85)、NCS (イソチオシアネート) 基とタンパク質のアミノ基と反応し、水に溶けることで強い黄緑色蛍光 ($\lambda_{ex}=495 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em}=520 \text{ nm}$) を示すものである。

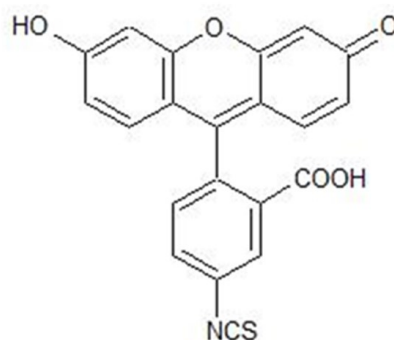


Fig. 85 Fluorescein-4-isothiocyanate isomer-1 (FITC-1) の構造式

実験材料

灌流液

- ・初期灌流液 2 L (MUW+ウロキナーゼ 48,000 IU)
- ・負荷試験液 2 L (MUW 液+FITC-アルブミン 200 mg)
- ・無負荷灌流液 2 L (MUW 液)

灌流臓器

- ・屠殺場ブタの腎臓 (心停止後約 2 時間経過)

実験器具

- ・ 灌流培養装置（澁谷工業との共同研究）
- ・ 動脈カニューレ（サフィード延長チューブ、TERUMO、日本）
- ・ 電子天秤（FZ-5000i A&D、日本）
- ・ 蛍光分光光度計（FP-777W、日本分光、日本）

実験試薬

- ・ ウシ血清由来アルブミン（富士フィルム和光純薬、日本）
- ・ FITC-1（Sigma、米国）
- ・ 炭酸緩衝液
- ・ 血栓溶解剤（ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本）

灌流条件

初期灌流圧：80 mmHg

灌流圧：60 mmHg

灌流液温度：22°C

実験方法

- ・ 炭酸緩衝液の調整

1. 炭酸緩衝液の準備（～400 mL）
2. 炭酸ナトリウムを 5.3 g/500 mL で調製する。
3. 炭酸水素ナトリウムを 4.2 g/500 mL で調製する。
4. 炭酸ナトリウムを 150 mL 程度分注する。
5. pH 測定をしながら炭酸水素ナトリウムを添加し、pH10 に合わせる。

- ・ FITC-1 の標識をアルブミンに行う

6. 準備した炭酸緩衝液にアルブミン 20 g 溶かす。
7. 6.のアルブミン溶液に FITC-1 を 40 mg 溶かす。
8. 透析を行い、凍結乾燥後遮光し冷凍保存する。

- ・ FITC-アルブミン負荷試験

9. 屠殺場にて屠殺されたブタから腎臓を取り出し、実験室へ搬送。
10. 搬送後に余分な脂肪等を剥離し、腎動脈、尿管へカニューレーションを行う。
11. 初期灌流液を腎動脈から灌流装置にて灌流する。
12. 初期灌流後、負荷試験液で灌流、その後無負荷灌流液で灌流をする。この間腎からの尿を随時採液する。

13. 負荷試験液及び採液した尿サンプルを蛍光分光光度計により、495 nm の波長で励起させ 520 nm の蛍光を測定した。

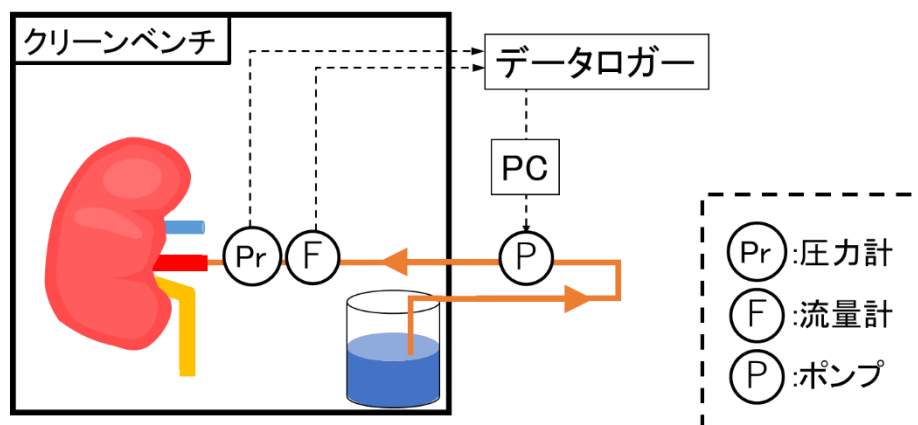


Fig. 86 灌流時回路模式図

7.5.2 実験結果

3つの腎サンプルをもとに尿中に漏出した負荷試験薬量を測定時間毎に算出し、グラフに示した[60]。

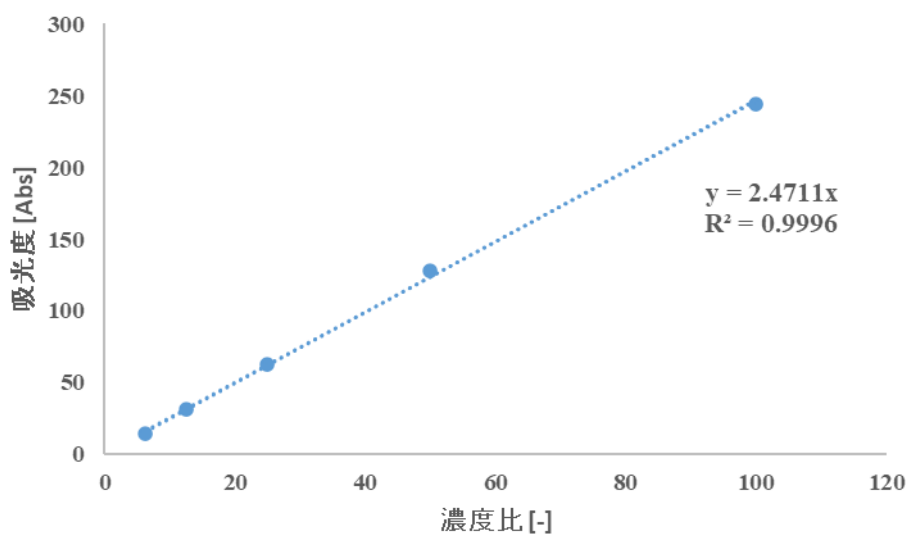


Fig. 87 FITC-アルブミン負荷試験における検量線

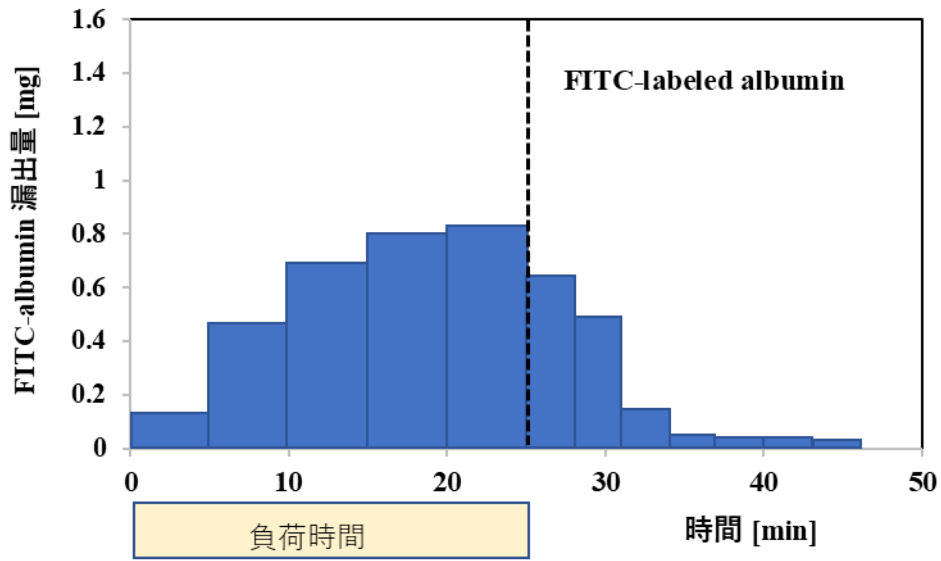


Fig. 88 全投与負荷試薬量に対する各時間の FITC 標識アルブミン漏出量の変化 [60]
(Sample 1)

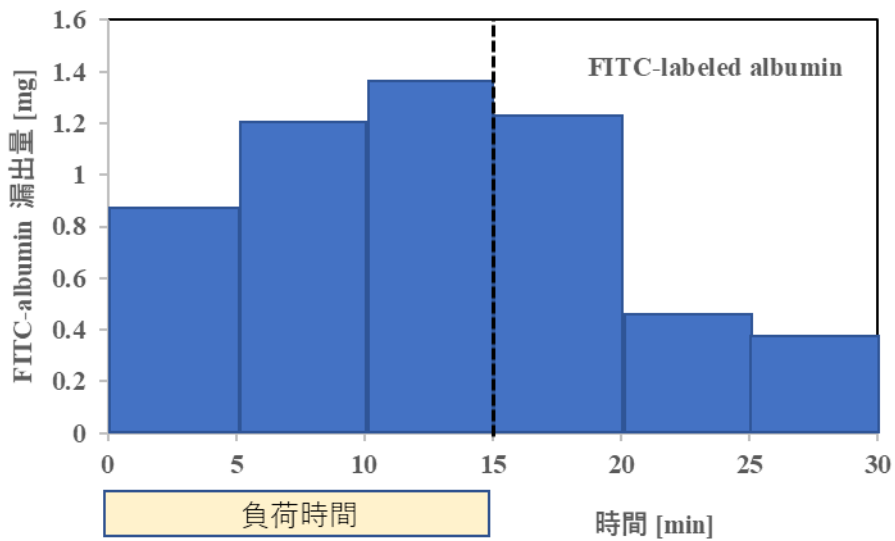


Fig. 89 全投与負荷試薬量に対する各時間の FITC 標識アルブミン漏出量の変化
(Sample 2)

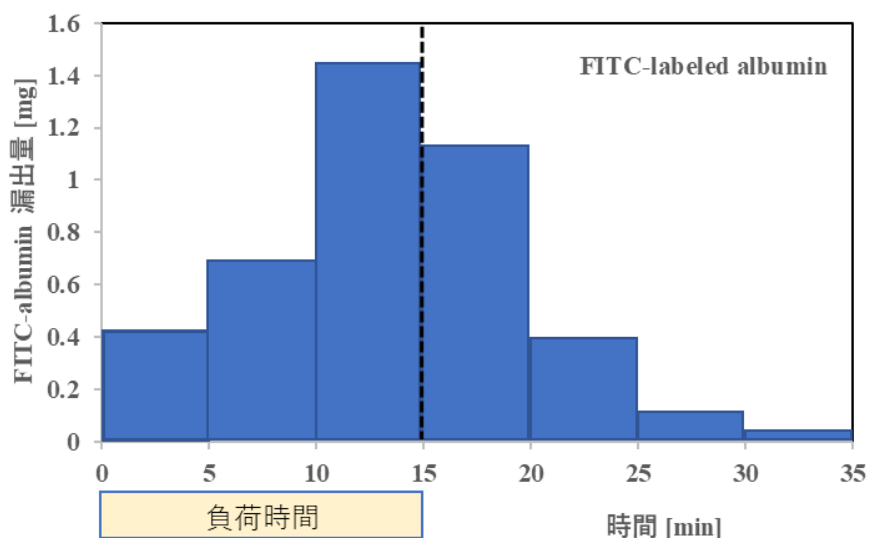


Fig. 90 全投与負荷試薬量に対する各時間の FITC 標識アルブミン漏出量の変化 (Sample 3)

Table 7 FITC-アルブミンの全投与量に対する全漏出量の割合[60]

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	平均値	標準偏差
FITC-アルブミンの全投与量に対する全漏出率	0.022	0.027	0.021	0.023	0.003
最大FITC-アルブミンクリアランス値	0.828	0.902	1.449	1.060	0.277

7.6 考察とまとめ

FITC-アルブミンを負荷した結果、尿中に FITC-アルブミンが漏出していることが確認された。先にも述べたが、健常な腎臓であればアルブミンは基本的には尿中には出てこない。この結果から、使用しているブタ腎は糸球体糸球体がかかなりの重度の障害を受け、糸球体の物理的バリアー機能が低下し、灌流液中の FITC-アルブミンが尿中に漏出していることが考えられる。

7.7 結論

FITC-アルブミン負荷試験により、負荷試験を行った腎臓から FITC-アルブミンが尿中に漏出していることが確認された。臨床での 1 つの腎臓が 1 日に排泄する尿中タンパク質は 50-150 mg/day であり、sample 3 の結果を例に出すと、負荷時間 15 分で 2.56 mg の漏出が認められ、これは基準値を大きく上回る結果になった。

このことから実験に使用した腎臓全てにおいて糸球体が重度の障害を受け、糸球体濾過能のひとつである物理的バリアー能が低下していることが示唆された。また、クリアランス値を求めたことによって、糸球体濾過能の障害の程度を評価するのに役立つことが示唆された。

8章 機械灌流腎臓に対する血管収縮薬を用いた血管機能評価法の検討

8.1 背景と目的

前章では、腎臓の機能を評価するための薬物負荷試験としてイヌリン、PSP、FITC-アルブミンの負荷試験による腎機能評価を行ってきた。次に、腎臓の血管機能の評価として、血管収縮剤であるアドレナリンを用いた血管の薬物応答による評価法の開発を目指した。アドレナリンは血管平滑筋の α_1 受容体を刺激することで血管が収縮する。

8.2 実験

今回行った実験は以下の二つである

実験 1:短期灌流中のアドレナリン投与試験

実験 2:長期灌流中のアドレナリン投与試験

8.2.1 実験 1 (短期灌流中のアドレナリン投与): 実験内容

機械灌流中の腎臓に血管収縮薬であるアドレナリンを投与し、血行動態を測定することで血管機能評価を行う。

実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓(心停止後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・灌流培養装置(渋谷工業との共同研究)
- ・サフィード(サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・電子天秤(FZ-5000i A&D, 日本)
- ・クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアテック株式会社, 日本)
- ・恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- ・MUW 液
- ・ボスミン 1 mg/1 mL (アドレナリン製剤, 第一三共株式会社, 日本)
- ・生理食塩水
- ・ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU, 持田製薬, 日本)
- ・ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)

- ・ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

灌流条件

- ・初期灌流圧:80 mmHg
- ・初期灌流温度:25°C
- ・アドレナリン投与時灌流圧:60 mmHg
- ・アドレナリン投与時灌流液温度:36 °C

灌流回路概要図

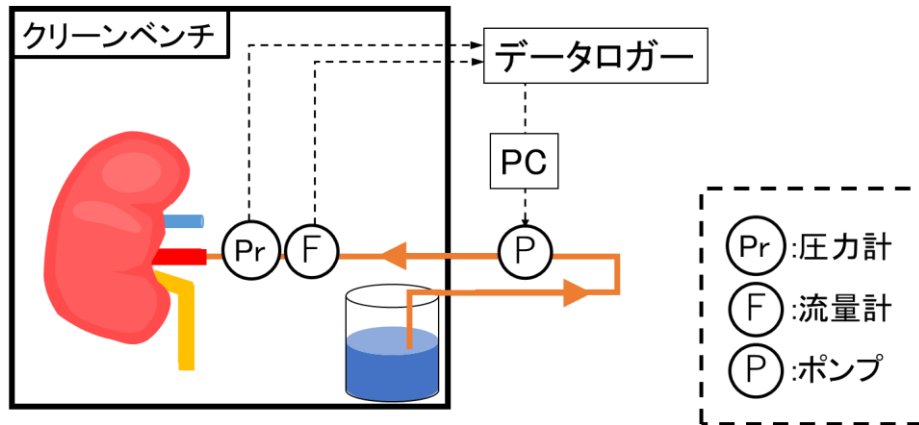


Fig. 91 初期灌流時回路模式図

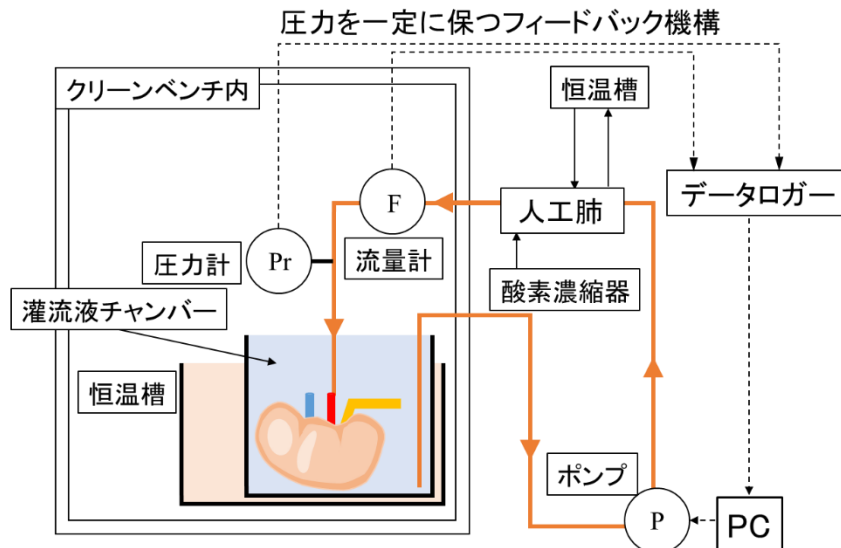


Fig. 92 アドレナリン投与時灌流回路概要図

実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ(240,000 IU/10 mL)を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と Sepacell Integra[®] CA を取り付けた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で灌流を行った。
7. 灌流開始後灌流量が安定したところで、アドレナリンを投与した
8. 初期灌流前後とアドレナリン投与した灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。
抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。

8.2.2 結果

初期灌流の結果を Fig. 93,94 に示す。

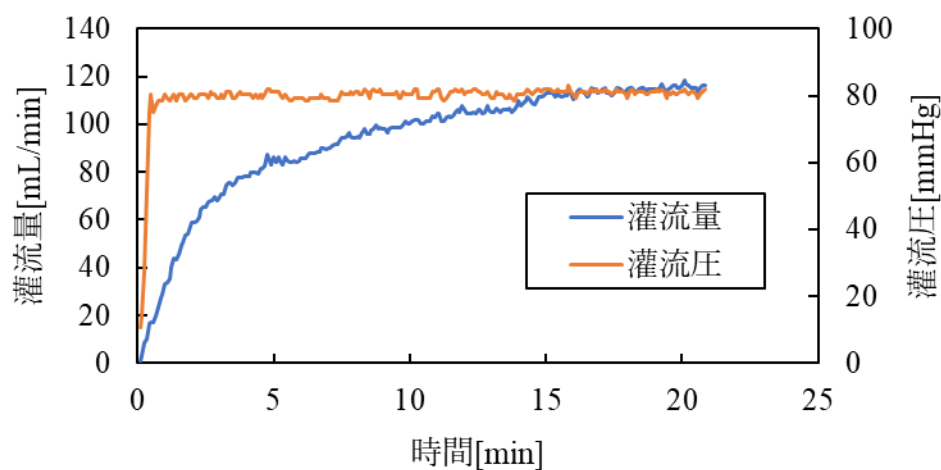


Fig. 93 血行動態の経時変化

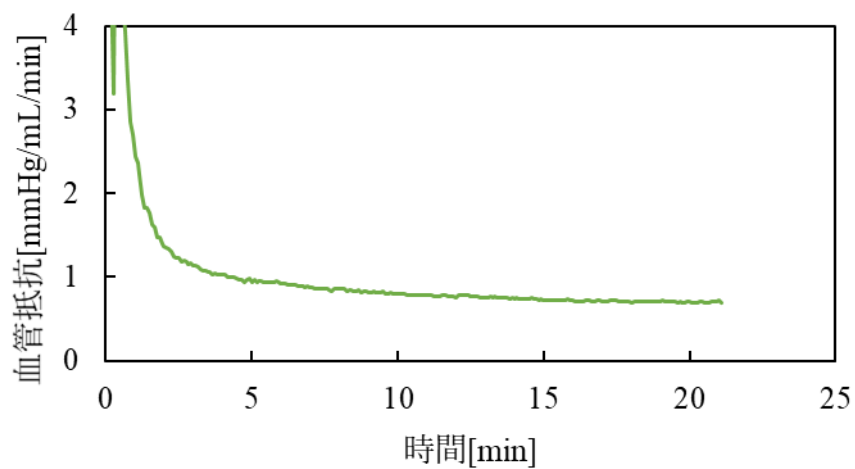


Fig. 94 血管抵抗の経時変化

Fig. 95,96 に初期灌流前後の写真を示す。



Fig. 95-1 初期灌流前



Fig. 95-2 初期灌流前



Fig. 96-1 初期灌流後



Fig. 96-2 初期灌流後

Fig. 93 に示した灌流結果より腎臓内の血液や血栓が抜けるに伴い灌流量が増加した。

次に Fig. 97,98 にアドレナリン投与を行った時の灌流結果を示す[60]。黒矢印はアドレナリンを投与したタイミングである。

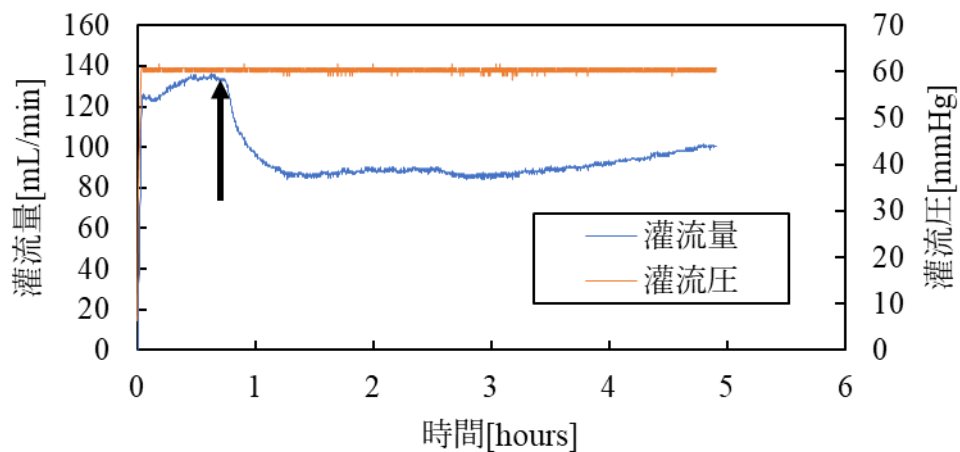


Fig. 97 血行動態の経時変化[60]

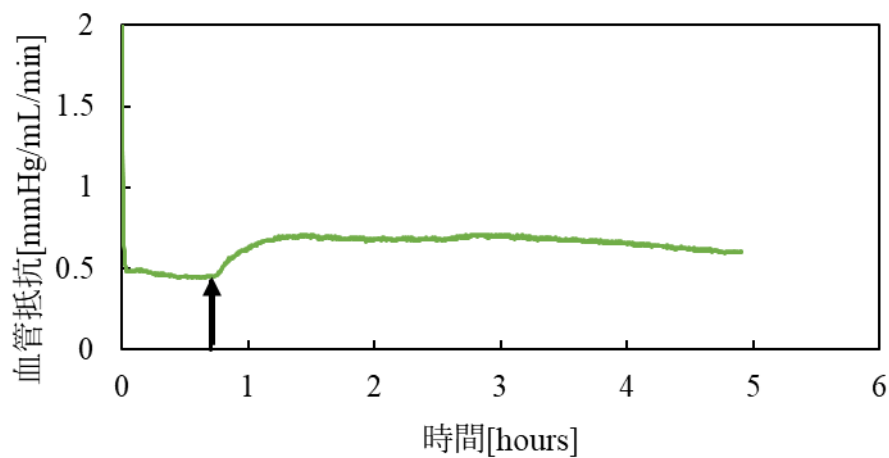


Fig. 98 血管抵抗の経時変化[60]

アドレナリンを投与してから灌流量が大きく低下したが、灌流を続けると次第に灌流量が増加した。

Fig. 99 に灌流後の腎臓写真を示す。



Fig. 99-1 アドレナリン灌流後



Fig. 99-2 アドレナリン灌流後

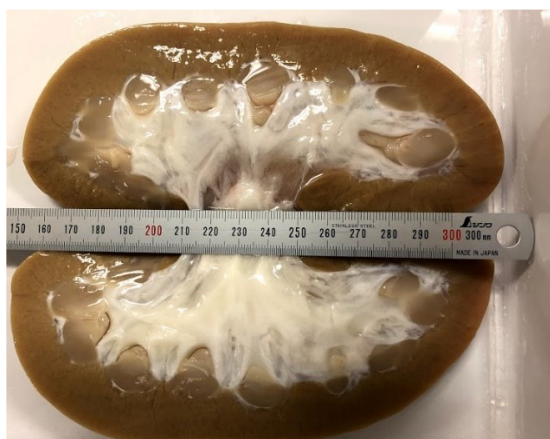


Fig. 99-3 アドレナリン灌流後

Table 8 に腎臓重量、長さ、高さ、面積を示す

Table 8 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	アドレナリン投与後
腎重量[g]	221.3	341.8	438.4
腎長さ[cm]	15.2	16.5	17.4
腎高さ[cm]	3.3	4.4	5.8
腎面積[cm ²]	83.3	106.7	120.0

Table 8 より、この時初期灌流後の値を1とし、それぞれの増加比を Fig. 100 に示す。

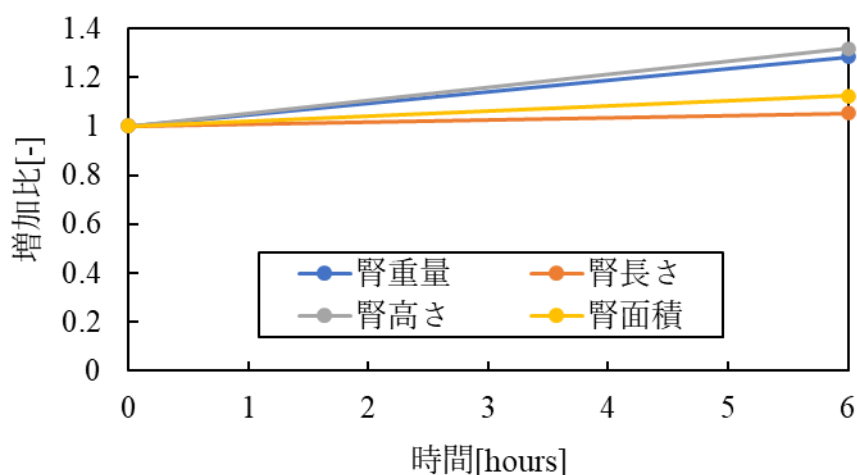


Fig. 100 腎臓パラメータの経時変化

腎面積は約 10%の増加がみられたが、腎長さはほぼ変化が見られなかった。腎重量と腎高さは約 30%の増加がみられた。

8.2.3 実験 2 (長期灌流中のアドレナリン投与) : 実験内容

持続灌流中の腎臓に血管収縮薬であるアドレナリンを投与し、血行動態を測定することで血管機能が保存されているかどうか評価を行う。

実験試料・器具および試薬

実験器具

- ・ 灌流培養装置 (渋谷工業との共同研究)
- ・ サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・ 電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
- ・ クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアータック株式会社, 日本)
- ・ 恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・ 人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・ Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ ボスミン 1 mg/1 mL (アドレナリン製剤, 第一三共株式会社, 日本)
- ・ 生理食塩水
- ・ ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU, 持田製薬, 日本)

- ・ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)
- ・ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

灌流条件

- ・初期灌流圧: 80 mmHg
- ・初期灌流温度: 25°C
- ・持続灌流圧: 60 mmHg
- ・持続灌流温度: 36°C
- ・アドレナリン投与時灌流圧: 60 mmHg
- ・アドレナリン投与時灌流液温度: 36 °C

灌流回路概要図

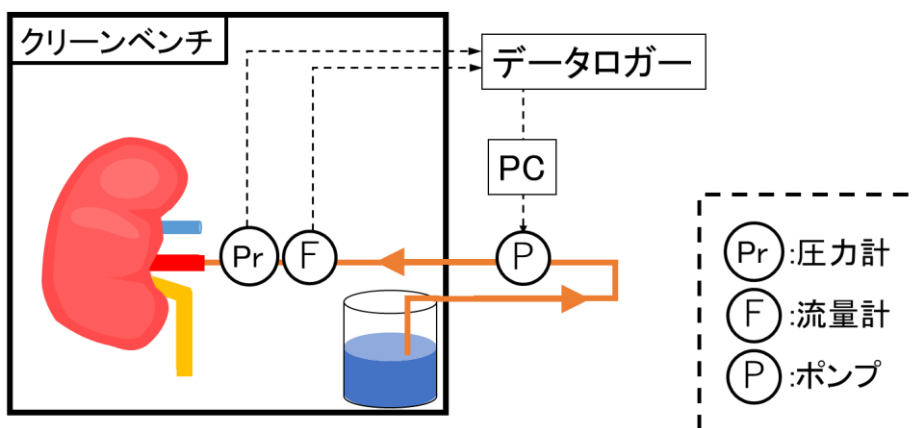


Fig. 101 初期灌流時回路模式図

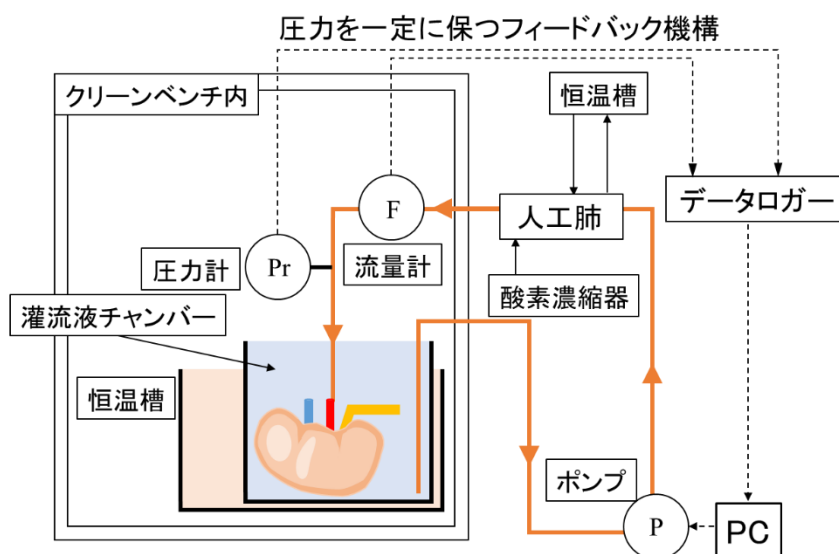


Fig. 102 アドレナリン投与時灌流回路概要図

実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる UW 液 1 L に対してウロキナーゼ(240,000 U/10 mL)を 1 mL 添加した。
4. UW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺とセパセルを取り付けた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で持続灌流を行った。
7. 灌流 18 時間後に、灌流量が安定したところでアドレナリンを投与した
8. 初期灌流前後、灌流 6 時間置きおよびアドレナリン投与した灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。
 抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。

8.2.4 結果

初期灌流の結果を Fig. 103,104 に示す。

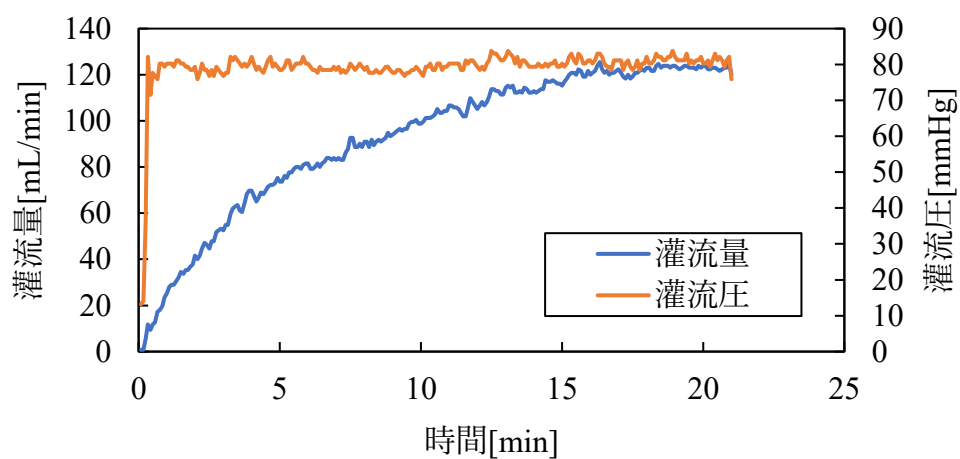


Fig. 103 血行動態の経時変化

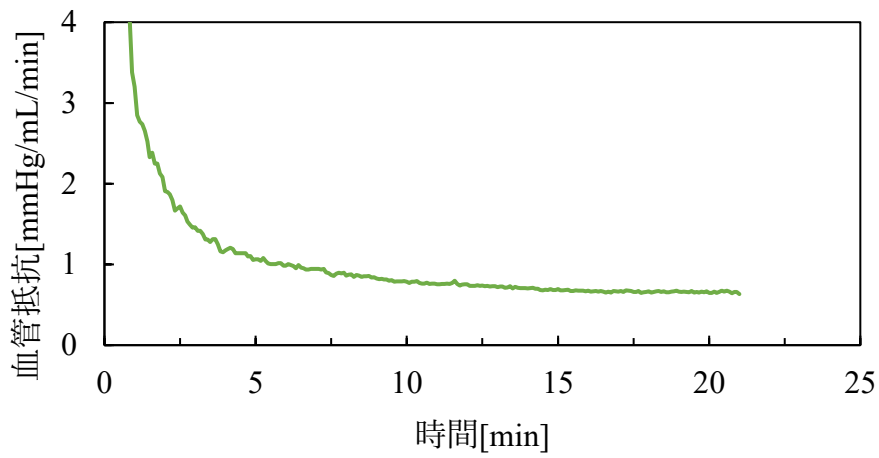


Fig. 104 血管抵抗の経時変化

Fig. 105,106 に初期灌流前後の写真を示す。



Fig. 105-1 初期灌流前



Fig. 105-2 初期灌流前



Fig. 106-1 初期灌流後



Fig. 106-2 初期灌流後

Fig. 103 に示した灌流結果より灌流量が次第に増加した。これは Fig. 105,106 に示した写真から腎臓内の血液や血栓が洗い流されたためである。

次に Fig. 107,108 にアドレナリン投与を行った時の灌流結果を示す[60]。黒矢印はアドレナリンを投与したタイミングである。

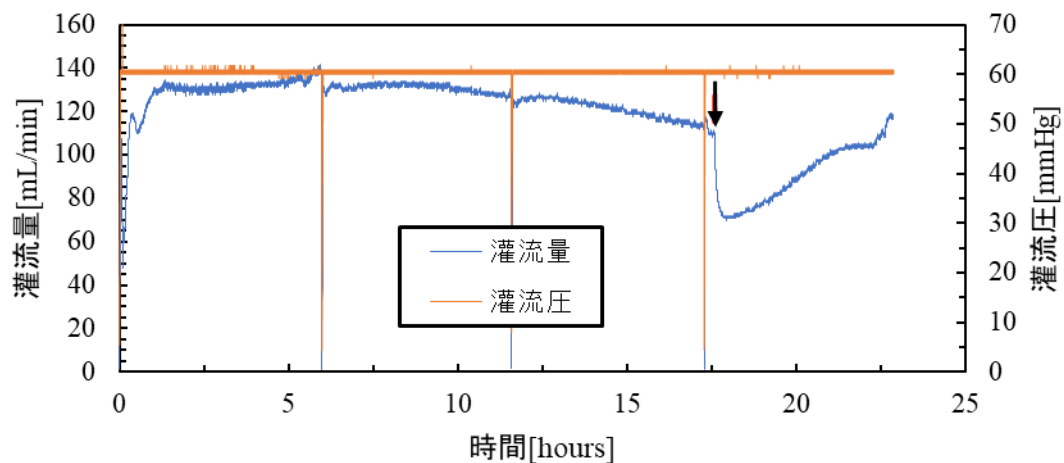


Fig. 107 血行動態の経時変化[60]

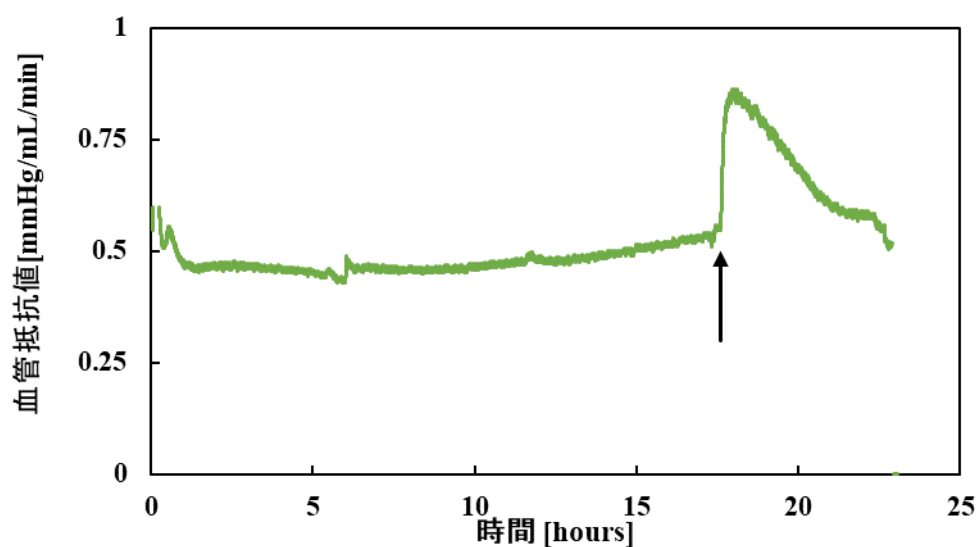


Fig. 108 血管抵抗の経時変化[60]

アドレナリンを投与してすぐに灌流量が大きく低下したことから、血管は収縮したと考えられる。

Fig. 109-112 に各時間の腎臓写真を示す。



Fig. 109-1 灌流後 6 時間



Fig. 109-2 灌流後 6 時間



Fig. 110-1 灌流後 12 時間



Fig. 110-2 灌流後 12 時間



Fig. 111-1 灌流後 18 時間



Fig. 111-2 灌流後 18 時間



Fig. 112-1 灌流後 24 時間



Fig. 112-2 灌流後 24 時間

次に Table 9 に腎臓重量、長さ、高さ、面積の変化を示す。

Table 9

	初期灌流前	初期灌流後	6時間経過	12時間経過	18時間経過	24時間経過
腎重量[g]	246.3	390.7	561.5	614.8	597.0	640.5
腎長さ[cm]	16.1	18.2	20.5	19.9	19.3	18.4
腎高さ[cm]	4.2	5.6	6.4	6.4	6.6	6.6
腎面積[cm ²]	89.6	121.7	156.6	147.0	142.8	131.3

Table 9 よりそれぞれのパラメータの増加比を Fig. 113 に示す。

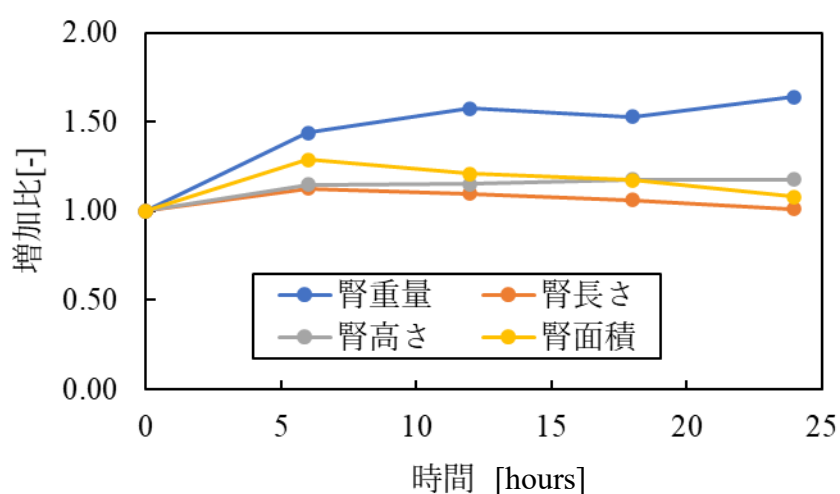


Fig. 113 腎臓パラメータの経時変化

増加比は初期灌流後を 1.0 として計算した。腎臓重量が大きく増加したが、その他のパラメータについては大きな増加は見られなかった。

8.3 考察とまとめ

アドレナリンを用いて灌流腎の血管収縮反応の検討を行った。灌流装置は灌流圧を一定に保つフィードバック機構があるので、アドレナリンによって血管が収縮すると灌流量は大きく低下する。

灌流を始めてすぐにアドレナリンを投与した実験も、18 時間の灌流を行ってから投与した実験も、どちらも灌流量は大きく低下する反応が見られた。このことは、血管系細胞が生存しており血管収縮した反応であることから、虚血 3 時間程経過した障害腎においても、さらに 18 時間灌流した腎臓においても血管の収縮機能、血管系細胞の生存が確認できる。この反応は、長期培養において腎臓の状態の有効な評価法として期待される。

8.4 結論

アドレナリンを用いて灌流腎の血管収縮反応の検討を行った。アドレナリンを投与すると迅速な血管収縮による血管抵抗の上昇がみられた。

また、屠殺場で入手した腎臓においても血管応答性がみられたことから血管系の細胞が生存し機能していることが示された。

また、灌流時間の違いでアドレナリンの血管抵抗上昇の効果が持続する時間の長さに差が認められたことから、血管応答性に着目した腎血管系の評価ができる可能性が示唆された。

9章 機械灌流腎臓に対する血管拡張薬効果の検討

9.1 背景と目的

血管収縮剤であるアドレナリン負荷試験にて血管応答性がみられた。そこで本章では、血管拡張剤としてカルシウム拮抗剤のベラパミルおよび硝酸薬であるニトログリセリンを用いた灌流実験を行った。血管収縮は、血管平滑筋に存在するカルシウムチャネルを介して細胞内にカルシウムイオンが流入し細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することで生じるため、ベラパミルはこのカルシウムチャネルに作用し血管収縮を阻害することで血管が拡張される[61]。細動脈系の拡張作用を期待する。また、硝酸薬であるニトログリセリンは分子内から一酸化窒素 (NO)を遊離し、血管平滑筋内のサイクリック GMP を増加させることで血管拡張を引き起こす[62]。静脈系の血管拡張作用もあり灌流量増加が期待できる。

このように作用機序の異なる血管拡張薬を用いて、血管拡張作用が認められ、灌流量の低下を抑制ないし灌流量を増加させることは可能なのかを検討した。

9.2 実験

以下の2つの実験を行った。

実験 1:ベラパミル投与試験

実験 2:ニトログリセリン投与試験

9.2.1 実験 1 (ベラパミル投与) : 実験内容

灌流回路概要図

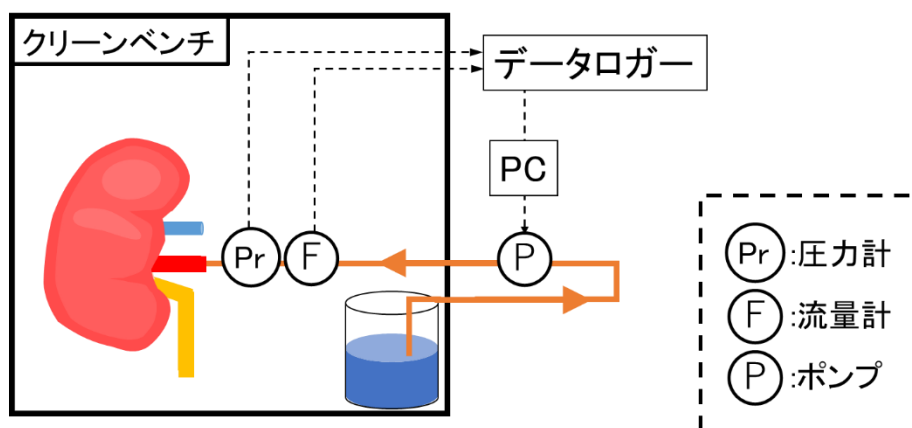


Fig. 114 初期灌流時回路模式図

9.2.2 実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓 (心停止後 2～3 時間経過)

実験器具

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓 (心停止後 2～3 時間経過)

実験器具

- ・灌流培養装置 (渋谷工業との共同研究)
- ・サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
- ・クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアータック株式会社, 日本)
- ・恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- ・MUW 液
- ・ベラパミル塩酸塩静注 5 mg (タイヨー)
- ・ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ・ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)
- ・ポピラール消毒液 10% (ポピドシヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

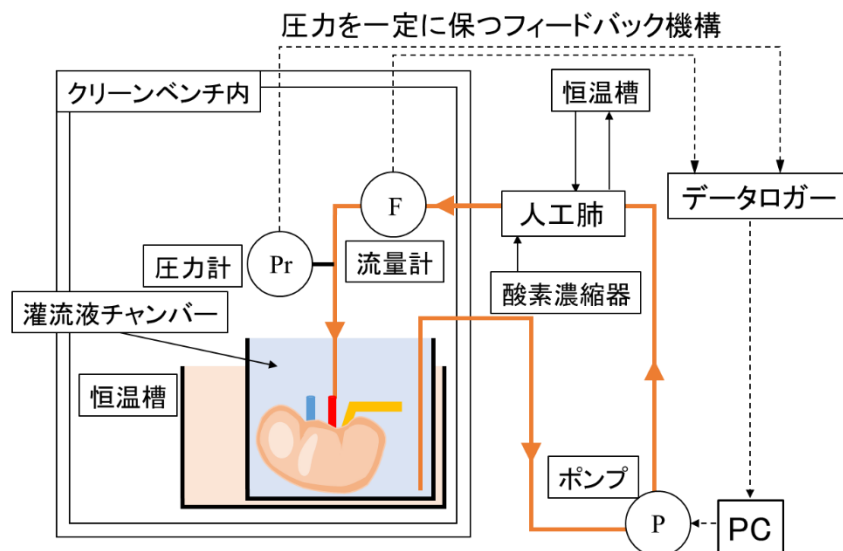


Fig. 115 ベラパミル投与時灌流回路概要図

9.2.3 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ (240,000 IU/10 mL) を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と Sepacell Integra[®] CA を取り付けけた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で灌流を行った。
7. 灌流開始後灌流量が安定したところで、生理食塩水で希釈したベラパミルを、シリンジポンプを用いて投与した。この時の投与速度は (5 mg/50 mL)/h とした。
8. 初期灌流前後とベラパミル投与した灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。

9.2.3 結果

初期灌流の血行動態および血管抵抗を Fig. 116,117 に示す。

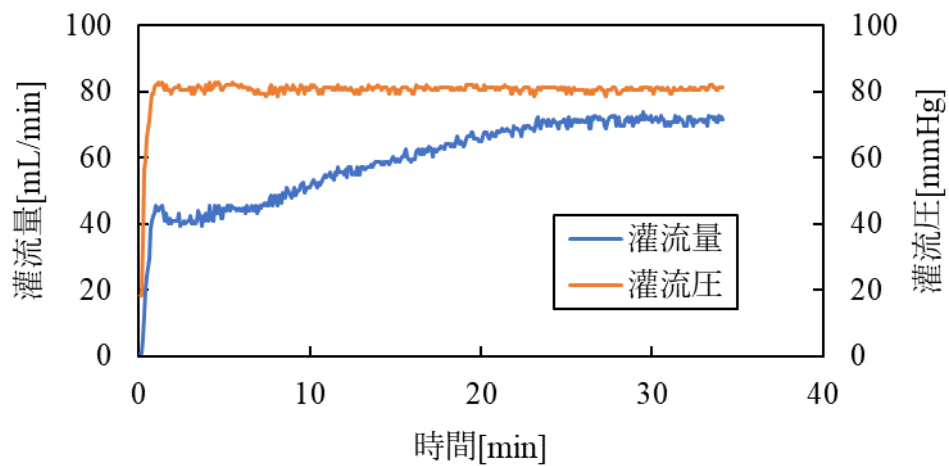


Fig. 116 血行動態の経時変化

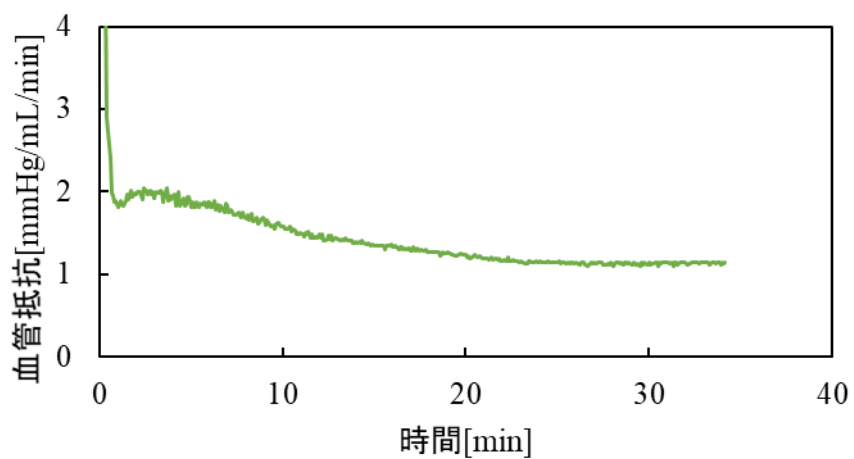


Fig. 117 血管抵抗の経時変化

次に初期灌流前後の腎臓写真を Fig. 118,119 に示す。



Fig. 118-1 初期灌流前



Fig. 118-2 初期灌流前

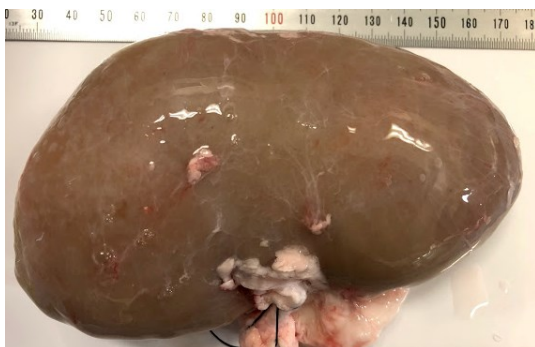


Fig. 119-1 初期灌流後



Fig. 119-2 初期灌流後

今回使用した腎臓は残血が少なく、灌流量は約 70 mL/min 程度で安定した。

次にベラパミル投与中の血行動態および血管抵抗を Fig. 120,121 に示す。黄色線はベラパミルを投与した期間を示す。

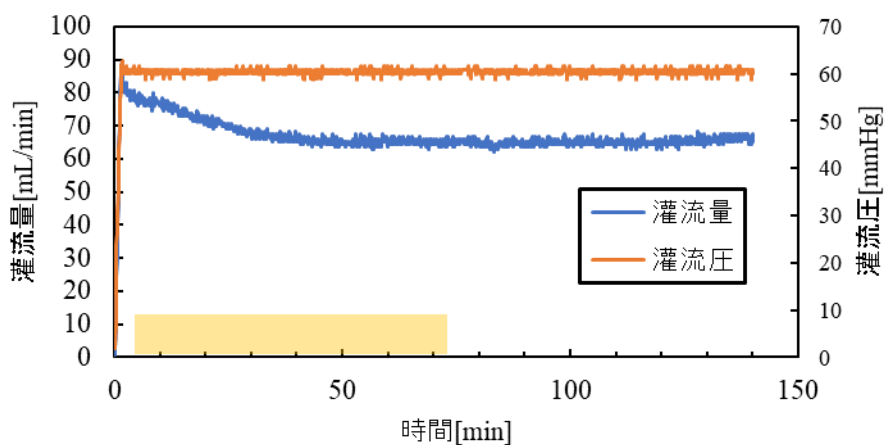


Fig. 120 血行動態の経時変化

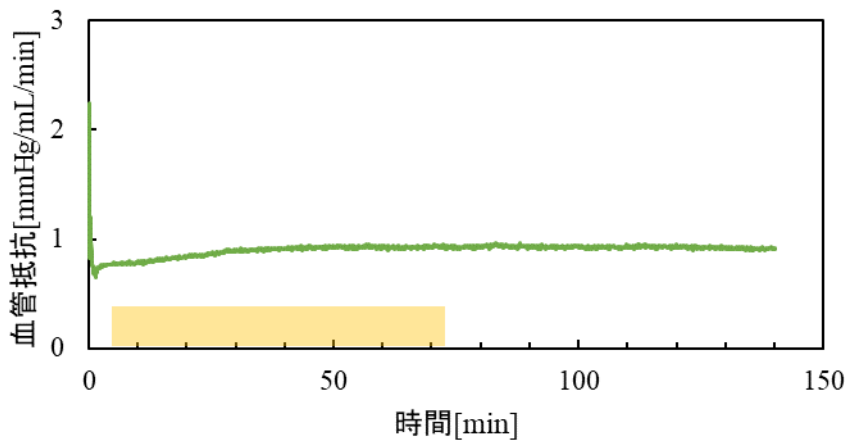


Fig. 121 血管抵抗の経時変化

Fig. 122 にベラパミル投与後の腎臓写真を示す



Fig. 122-1 ベラパミル投与後



Fig. 122-2 ベラパミル投与後

安定時の血管抵抗を比較すると初期灌流で約 1.14 mmHg/mL/min、投与中で約 0.928 mmHg/mL/min となったことから血管が拡張された可能性が示唆される。

しかし、灌流時間が短いからか、灌流量が上昇した傾向は見られなかった。

Table 10 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	ベラパミル投与後
腎重量[g]	245.5	292.6	406.5
腎長さ[cm]	14.0	15.9	16.3
腎高さ[cm]	3.8	4.7	5.1
腎面積[cm ²]	85.0	115.9	114.4

Table 10 よりそれぞれの増加比を Fig. 123 に示す。

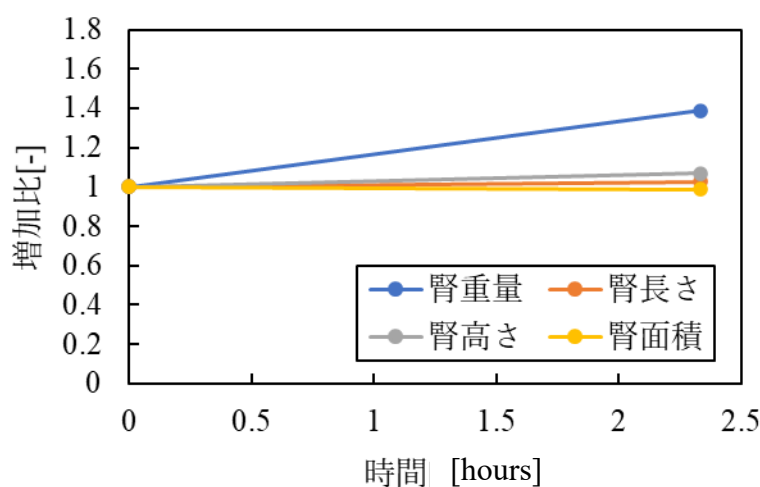


Fig. 123 腎臓パラメータの経時変化

増加比は初期灌流後を 1.0 として計算した。腎重量が大きく増加した。血管拡張により血管透過性が亢進した可能性がある。また、点滴投与では灌流液中濃度の上昇が緩やかであるため、効果の発現が確認しづらかったため、次にボラス投与で行うことにした。

9.2.4 実験 1-2 ベラパミル投与（ボラス投与）：実験内容

実験内容

灌流を開始して灌流量が安定した時にベラパミルを投与し灌流量の変化を測定する。また過去の実験からより長い時間灌流した時の血行動態を観察するために 6 時間の灌流を行った。

9.2.5 実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓 (心停止後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・灌流培養装置 (渋谷工業との共同研究)
- ・サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
- ・クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアータック株式会社、日本)
- ・恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- MUW 液
- ベラパミル塩酸塩静注 5 mg (タイヨー)
- ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤、日医工株式会社、日本)
- ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤、日興製薬株式会社、日本)

灌流条件

- 初期灌流圧:80 mmHg
- 初期灌流温度:25°C
- ベラパミル投与時灌流圧:60 mmHg
- ベラパミル投与時灌流液温度:36 °C

灌流回路概要図

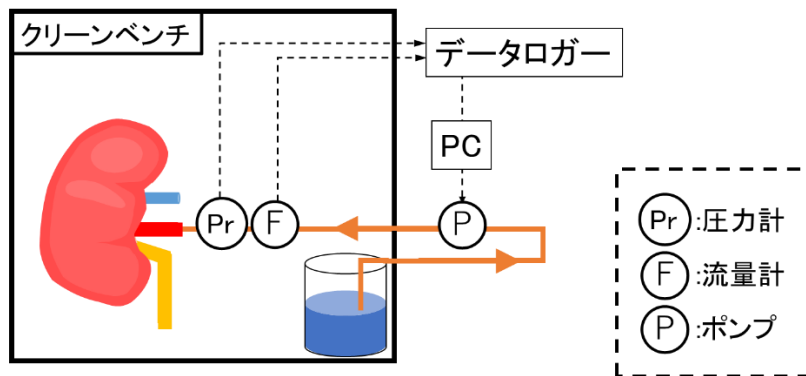


Fig. 124 初期灌流時回路模式図

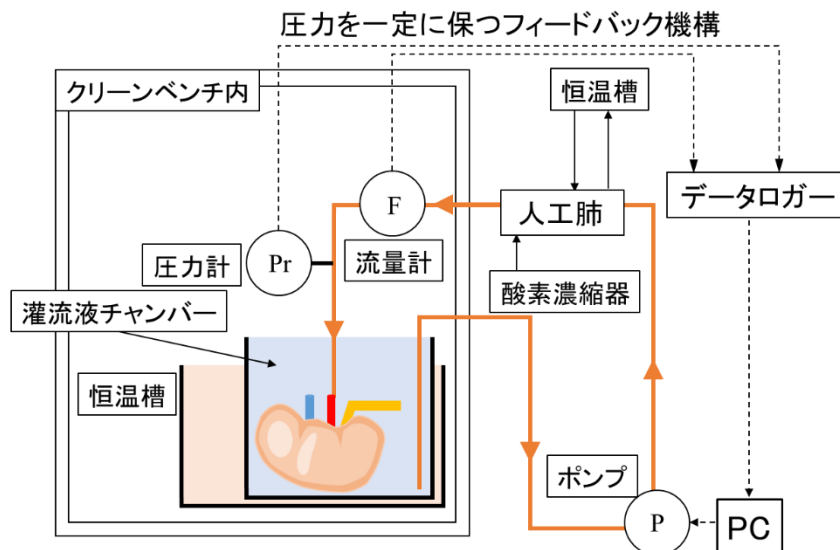


Fig. 125 ベラパミル投与時灌流回路概要図

9.2.6 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ (240,000 IU/10 mL) を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と Sepacell Integra[®] CA を取り付けた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で灌流を行った。
7. 初期灌流後 2 L の MUW 液で灌流を開始し、灌流開始後灌流量が安定したところで、ベラパミルをボース投与した。
8. 初期灌流前後とベラパミル投与した灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。

9.2.7 結果

初期灌流の血行動態および血管抵抗を Fig. 126,127 に示す。

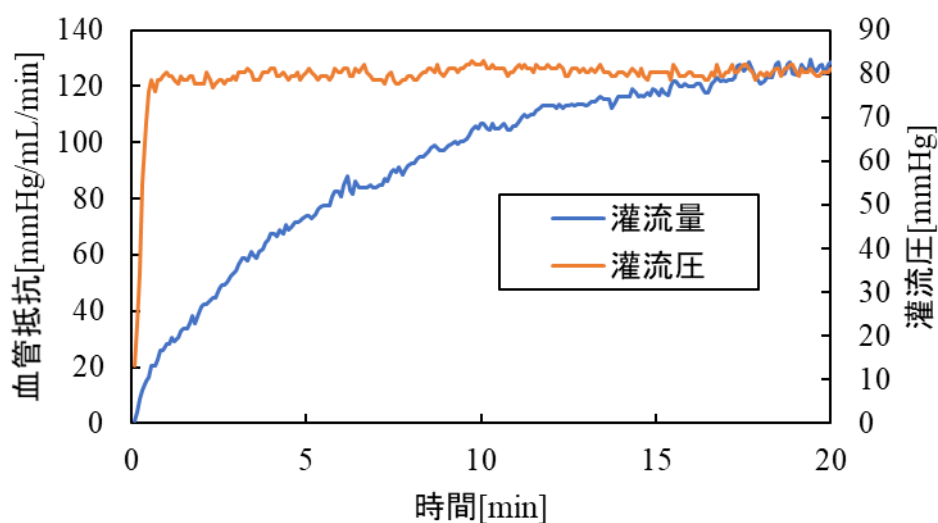


Fig. 126 血行動態の経時変化

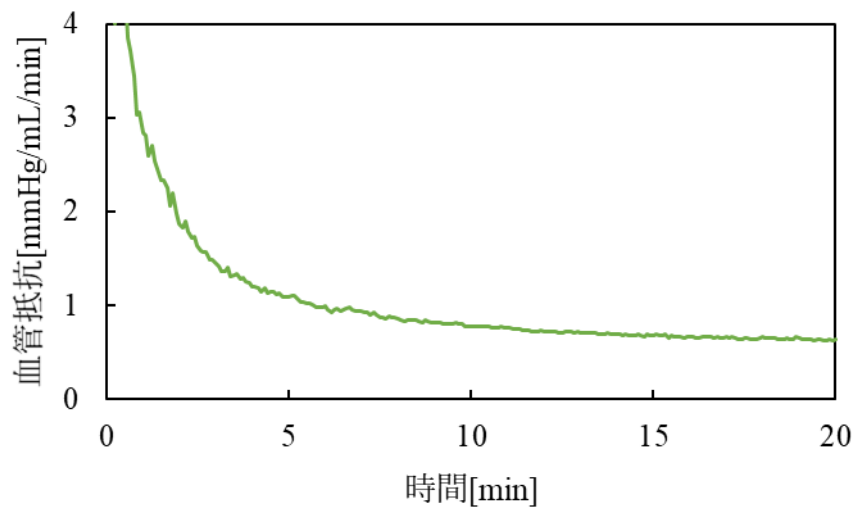


Fig. 127 血管抵抗の経時変化

次に初期灌流前後の腎臓写真を Fig. 128,129 に示す。

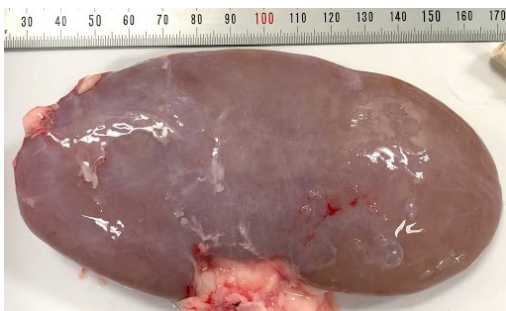


Fig. 128-1 初期灌流前

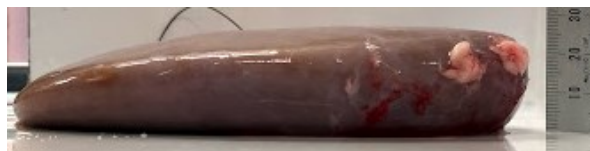


Fig. 128-2 初期灌流前

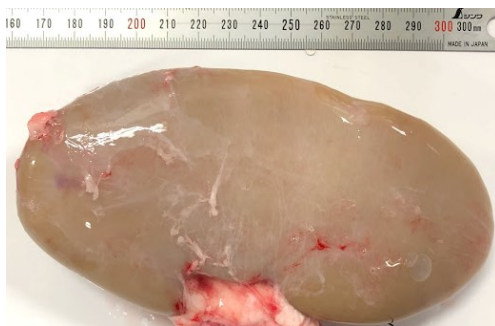


Fig. 129-1 初期灌流後



Fig. 129-2 初期灌流後

今回使用した腎臓は初めから血の抜けがよく、灌流量が灌流後すぐに安定した。

次にベラパミル投与中の血行動態および血管抵抗を Fig. 130,131 示す。黒い矢印はベラパミルを投与したタイミングを示す。

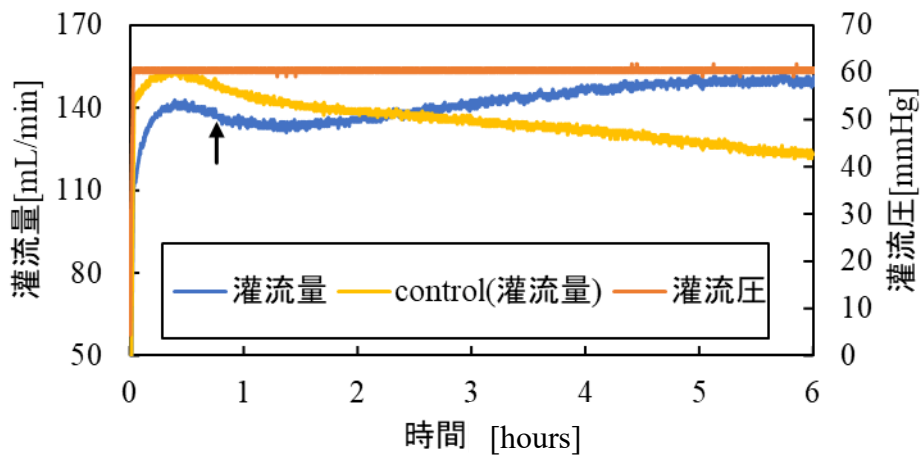


Fig. 130 血行動態の経時変化

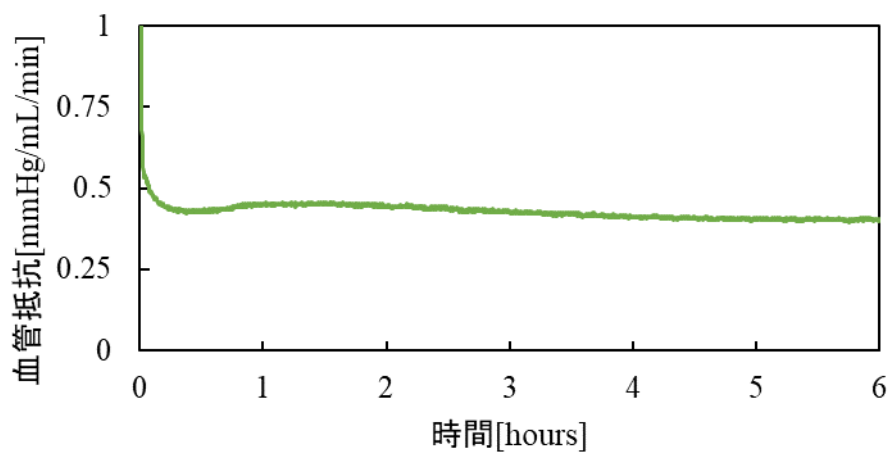


Fig. 131 血管抵抗の経時変化

ベラパミルを投与してからおよそ1時間後に灌流量が、約 130 mL/min から約 150 mL/min まで上昇した。また、control と比較して灌流量低下を抑制できたことが分かった。

Fig. 132 にベラパミル投与後の腎臓写真を示す



Fig. 132-1 ベラパミル投与後



Fig. 132-2 ベラパミル投与後

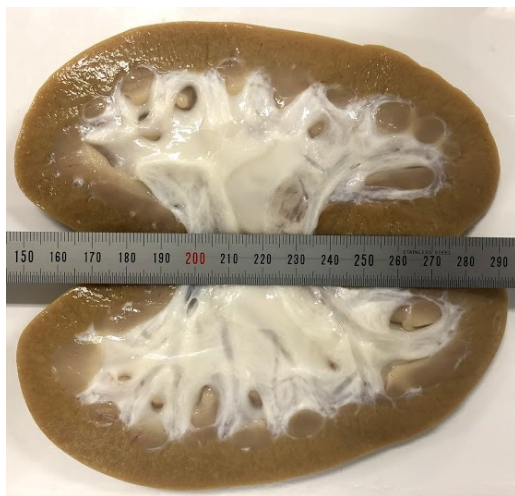


Fig. 132-3 ベラパミル投与後

Table 11 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	ベラパミル投与後
腎重量[g]	184.6	246.4	344.9
腎長さ[cm]	14.5	15.4	16.9
腎高さ[cm]	2.8	3.7	4.3
腎面積[cm ²]	82.7	96.2	113.6

Table 11 より各パラメータの増加比を Fig. 133 に示す。

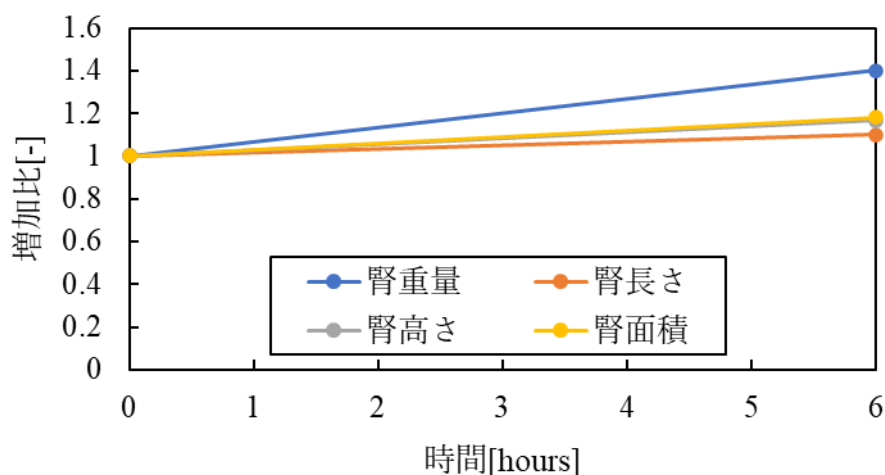


Fig. 133 腎臓パラメータの経時変化

この時の増加比は初期灌流後を 1.0 として計算している。腎長さや腎高さの増加は約 10%であった。腎重量の増加比が最大であり約 40%であった。血管拡張剤により、血管透過性が上昇した可能性が考えられる。

9.2.8 実験 2 ニトログリセリン投与 (ボラス投与) : 実験内容

灌流を開始して灌流量が安定した時にニトログリセリンを投与し灌流量の変化を測定する。

9.2.9 実験試料・器具および試薬

実験試料

- ・屠殺場ブタの腎臓 (心停止後 2~3 時間経過)

実験器具

- ・灌流培養装置 (渋谷工業との共同研究)
- ・サフィード (サフィード延長チューブ, TERUMO, 日本)
- ・電子天秤 (FZ-5000i A&D, 日本)
- ・クリーンベンチ (L-VG-1301L, 日本エアテック株式会社、日本)
- ・恒温槽 (TR-1A, AS ONE, 日本)
- ・人工肺 (POLYSTAN, Denmark)
- ・Sepacell Integra[®] CA (川澄化学工業株式会社, 日本)
- ・ハイサンソ TO-90-3Ex (酸素濃縮装置, 帝人ファーマ株式会社, 日本)

実験試薬

- ・ MUW 液
- ・ ニトログリセリン注 1 mg/2 mL [HK] (光製薬株式会社, 日本)
- ・ ウロキナーゼ (ウロキナーゼ静注用 240000 IU、持田製薬、日本)
- ・ ピペラシリンナトリウム注射用 2 g (合成ペニシリン製剤, 日医工株式会社, 日本)
- ・ ポピラール消毒液 10% (ポビドンヨード製剤, 日興製薬株式会社, 日本)

灌流条件

- ・ 初期灌流圧:80 mmHg
- ・ 初期灌流温度:25°C
- ・ ニトログリセリン投与時灌流圧:60 mmHg
- ・ ニトログリセリン投与時灌流液温度:36°C

灌流回路概要図

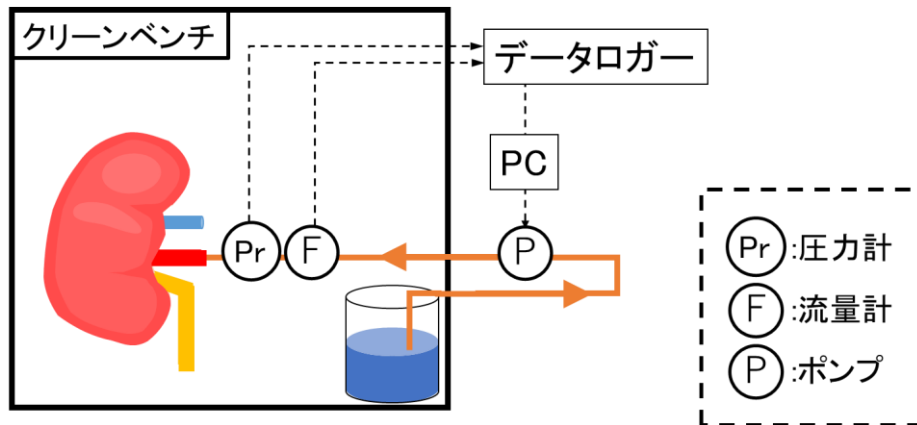


Fig. 134 初期灌流時回路概要図

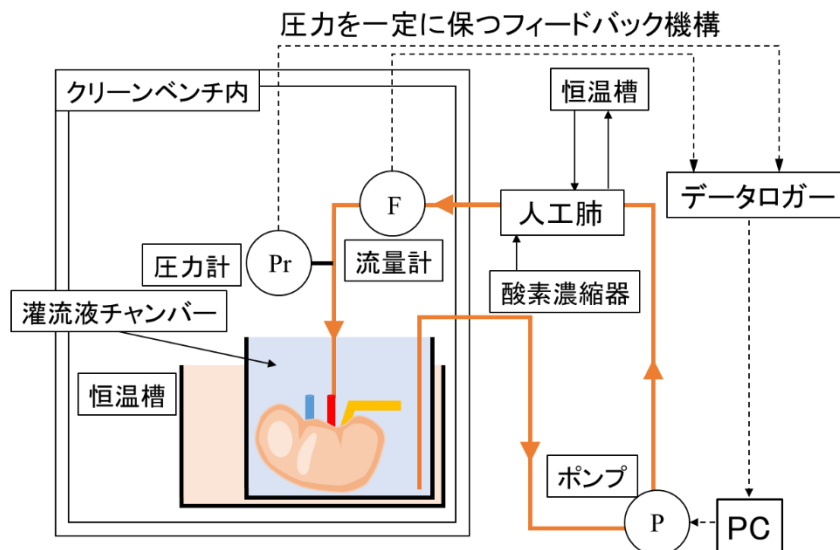


Fig. 135 ベラパミル投与時灌流回路概要図

9.2.10 実験方法

1. 屠殺場にて屠殺されたブタより腎臓を取り出し、実験室へ運搬した。
2. 運搬された腎臓から余分な脂肪を剥離し、腎動脈へカニューレーションを行った。
3. 灌流に用いる MUW 液 2 L に対してウロキナーゼ (240,000 U/10 mL) を 2 mL 添加した。
4. MUW 液 2 L、灌流圧 80 mmHg で初期灌流を行った。
5. 灌流回路に人工肺と Sepacell Integra[®] CA を取り付けた。
6. 初期灌流後、灌流圧 60 mmHg で灌流を行った。
7. 灌流開始後灌流量が安定したところで、ニトログリセリンをボラス投与した。
8. 初期灌流前後とニトログリセリン投与した灌流後に腎重量の測定・写真撮影を行った。
抗生剤としてピペラシリンナトリウムを投与した。

9.2.11 結果

初期灌流の結果を Fig. 136,137 に示す。

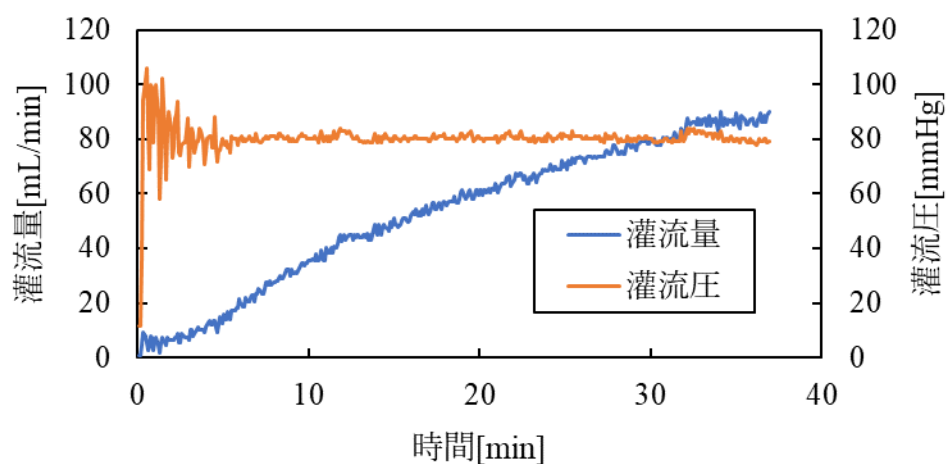


Fig. 136 血行動態の経時変化

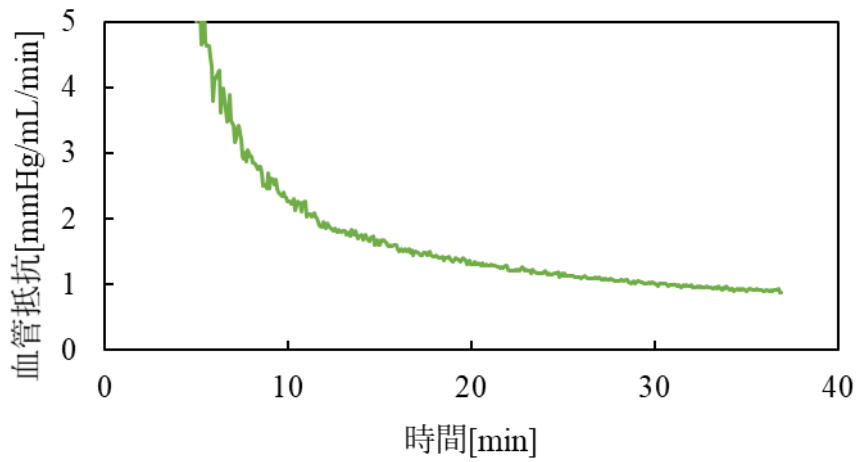


Fig. 137 血管抵抗の経時変化

次に初期灌流前後の腎臓写真を Fig. 138,139 に示す。



Fig. 138-1 初期灌流前



Fig. 138-2 初期灌流前



Fig. 139-1 初期灌流後



Fig. 139-2 初期灌流後

今回使用した腎臓は初め灌流圧が安定しなかったが、次第に安定し灌流量が安定した。しかし、若干の残血が目視で確認された。

次にニトログリセリン投与中の血行動態と血管抵抗を Fig. 140,141 に示す。黒矢印は投与したタイミングを示す。

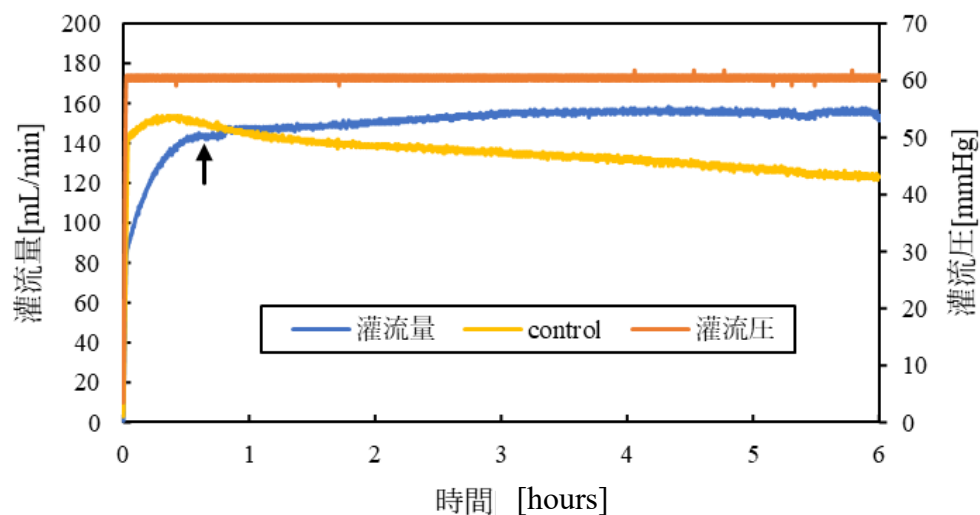


Fig. 140 血行動態の経時変化

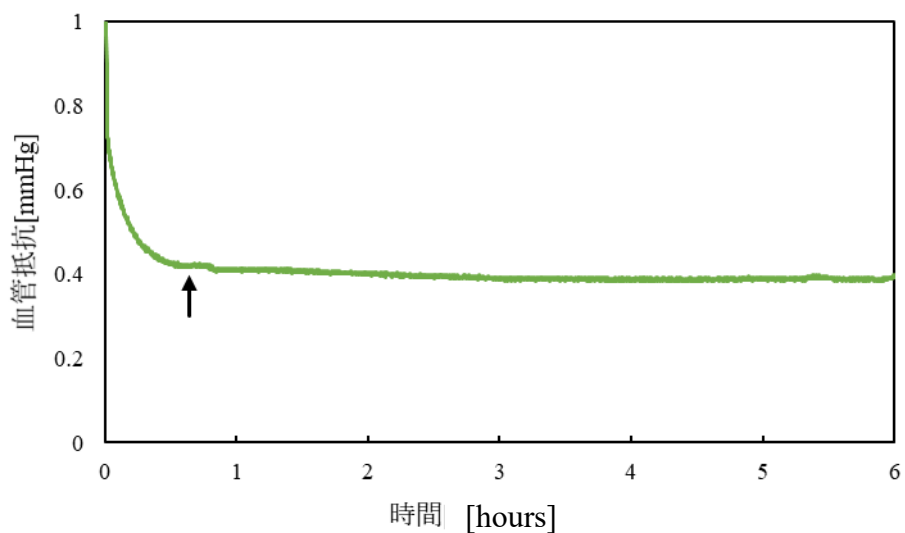


Fig. 141 血管抵抗の経時変化

初めから灌流量が高く 140 mL/min 程度であった。ニトログリセリンの投与後灌流量は 150 mL/min 程度まで上昇し、その後 155 mL/min 程度まで上昇した。また、control と比較して灌流量低下を抑制できたことが分かった。

Fig. 142 にニトログリセリン投与後の腎臓写真を示す



Fig. 142-1 ニトログリセリン投与後



Fig. 142-2 ニトログリセリン投与後

Table 10 に腎臓重量、長さ、高さ、面積を示す

Table 12 腎臓パラメータ

	初期灌流前	初期灌流後	ニトログリセリン投与後
腎重量[g]	153.3	230.0	307.9
腎長さ[cm]	13.8	14.8	15.7
腎高さ[cm]	2.7	3.4	4.3
腎面積[cm ²]	73.1	91.2	104.3

Table 12 より各パラメータの増加比を Fig. 143 に示す。

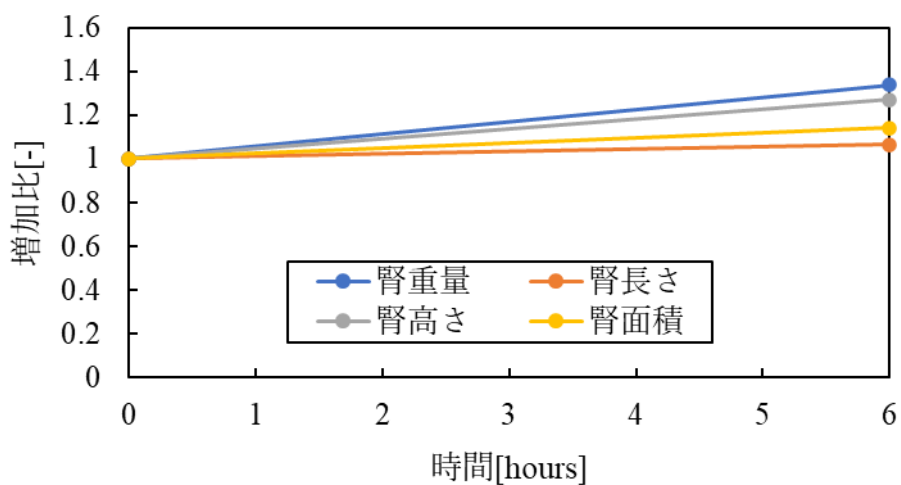


Fig. 143 腎臓パラメータの経時変化

増加比は初期灌流後を 1.0 として計算している。腎長さや腎高さの増加は約 10%であった。腎重量の増加比が最大であり約 30%であった。血管拡張剤により、血管透過性が上昇した可能性が考えられる。

Fig. 130,140 の流量の変化を、拡張剤投与時を 100%とし投与 10 分前から灌流終了までの流量の増加比を算出し、流量が上昇している様子をより分かりやすくしたものを Fig. 144,145 に示す[60]。

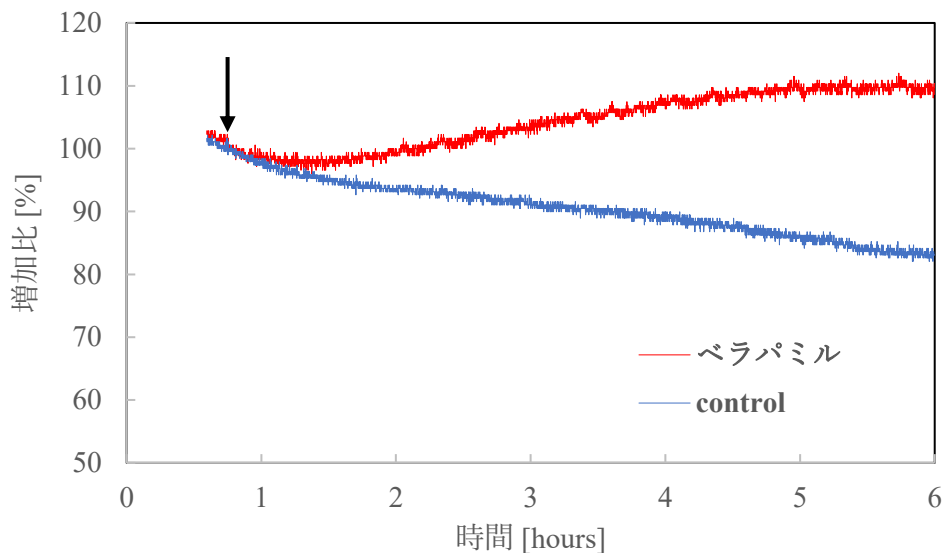


Fig. 144 時間経過による流量の増加比[60]

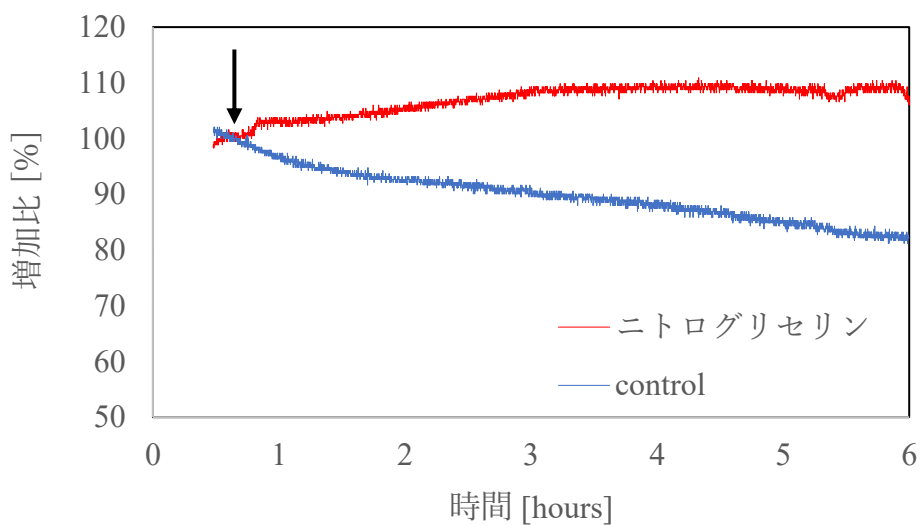


Fig. 145 時間経過による流量の増加比[60]

9.3 考察とまとめ

今回の実験では動脈系への拡張作用が強いベラパミルと静脈系への拡張作用が強いニトログリセリンというそれぞれ作用機序の違う血管拡張薬を用いた。共に、投与後灌流量が増加する反応が見られた。どちらの増加比も約 10%程度ではあったが、灌流量増加は血管拡張の作用の結果であることから、血管系の細胞の応答が確認できた。

ベラパミルの方がニトログリセリンより作用が生じるまでにかかる時間が長かったが、それは、動脈系、静脈系への作用の違いから差が生じたと考えられる。これらの特性の違いから併用することでさらに高い拡張機能が期待出来るかもしれない。

また、どちらにせよ血管拡張剤により腎臓への血流増加がみられていることから、体外灌流腎臓培養において、血流量を増やすことで、腎臓の長期灌流培養への有効性がある可能性がある。長期灌流の灌流液の組成に追加するという選択肢が考えられる。

9.4 結論

前章にてアドレナリンによる血管収縮反応がみられたため、血管拡張剤においても血管応答性がみられるか血管拡張剤であるベラパミルとニトログリセリンを用いて血管拡張効果の検討を行った。

どちらの薬剤においても灌流量の増加が認められたことから血管拡張作用があると判定できるため、血管機能の評価に有用である。更に長期灌流培養の際に灌流量の低下に対する効果が期待できると示唆された。

10 章腎臓再生のための細胞移植療法の基礎検討

10.1 背景と目的

これまでの実験から、ブタ腎を体外で灌流培養を行い集中治療するために長期間培養を可能にする技術の開発及び、機能評価法の開発を行ってきた。本章では、集中再生治療法の一つとして細胞移植に着目した。

そこで、我々の実験環境からブタ腎周辺脂肪組織を入手することが容易であったことからブタの脂肪組織由来の間葉系幹細胞を利用することを考えた。将来的に間葉系幹細胞の移植を行うために、前実験として幹細胞の採取法確立と採取した細胞が間葉系幹細胞であることを示すために間葉系幹細胞の同定を行った。

屠殺ブタの脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞の初代培養技術を確立することは、我々自身でブタの脂肪組織由来間葉系幹細胞を準備調達できるようになるという意義があり、屠殺されて心停止後長時間経過したブタの脂肪組織からの初代培養技術を確立することは、臨床における心停止ドナーからのマージナル腎臓再生においても、同じドナーからの脂肪組織由来幹細胞を採取するための有効な実験モデルになるといえる。

10.2 実験

1. 屠殺ブタからの脂肪組織由来間葉系幹細胞採取法の検討
2. 初代培養によって採取された細胞の同定 (免疫染色による同定)
3. 初代培養によって採取された細胞の同定 (フローサイトメータによる同定)

10.2.1 実験 1 (脂肪組織由来幹細胞採取法の検討) : 実験内容

採取した豚脂肪から幹細胞を採取し、培養するために、遠心分離の時間や遠心力といった条件検討を行った。

10.2.2 実験試料・器具及び試薬

実験試料

屠殺場ブタの腎臓(心停止後 2~3 時間経過)周辺の脂肪組織

試薬・器具

- ・ DMEM (High-Glucose)培地 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- ・ Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)
- ・ エタノール (山善製薬, 大阪, 日本)
- ・ ポビドンヨード製剤 (日興製薬株式会社, 岐阜, 日本)
- ・ コラゲナーゼ (300 units/mg) (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)

- ・ コニカル遠心チューブ 50, 10 mL (アズワン株式会社, 大阪, 日本)
- ・ 血清入り培地 A : D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose)
- ・ 血清入り培地 B : D-MEM (10 v/v% FBS, 3v/v%P/S(+), High-glucose)
- ・ 無血清培地 C : D-MEM (3 v/v%P/S(+), High-glucose)
- ・ 0.9 %生理食塩水

10.2.3 実験方法

1. 屠殺場から入手したブタ腎周囲の脂肪を採取し、組織表面をポビドンヨードにて消毒を行い、エタノールと生理食塩水で洗浄を行った。
2. 洗浄した脂肪組織をハサミで切除し、メスで細切れにした。
3. 刻んだ脂肪組織を、コラゲナーゼを (300 units/mg) (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を含む無血清培地 (D-MEM:3 v/v%P/S(+), High-glucose) 20 mL が入った 50 mL 遠心チューブに 10 mL 程度加えた。
4. 37°Cにて 60 分間恒温槽で振盪を行った。
5. チューブ内用液をガーゼ付きの漏斗にとおして、D-MEM (10 v/v% FBS, 3v/v%P/S(+), High-glucose) が 20 mL 入った 50 mL 遠心チューブに分注した。
6. 細胞入りの懸濁液を遠心分離した。
7. 遠心後の溶液について、上清液とペレットをそれぞれ回収し、37°C・5%CO₂環境下にて培養を行った。

検討する条件は 22°C,遠心力を文献[63]を参考に 600, 800, 1600, 2400 G の 4 条件、遠心時間を 10, 20 min の 2 条件でそれぞれ変更して検討した。

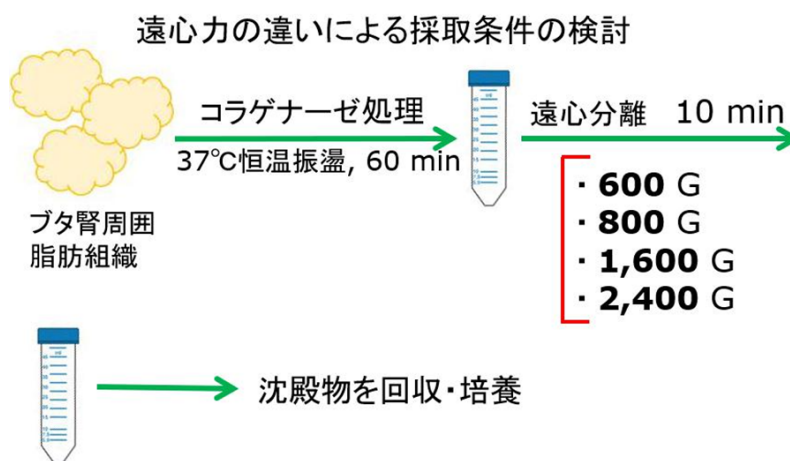


Fig. 146-1 遠心力の違いによる条件検討時の流れ

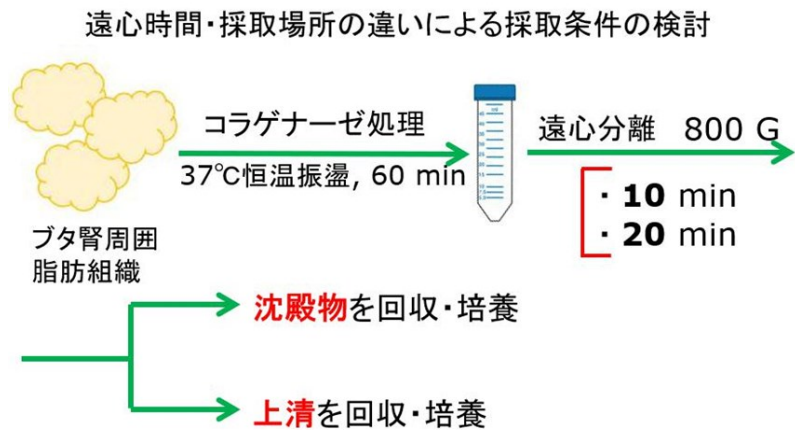


Fig. 146-2 遠心時間と細胞収集箇所の違いによる条件検討時の流れ

10.2.4 結果

Fig. 147,148 は遠心条件を 600, 800, 1600, 2400 G の 4 条件に設定した際の培養 1 日目と 22 日目の培養画像である。

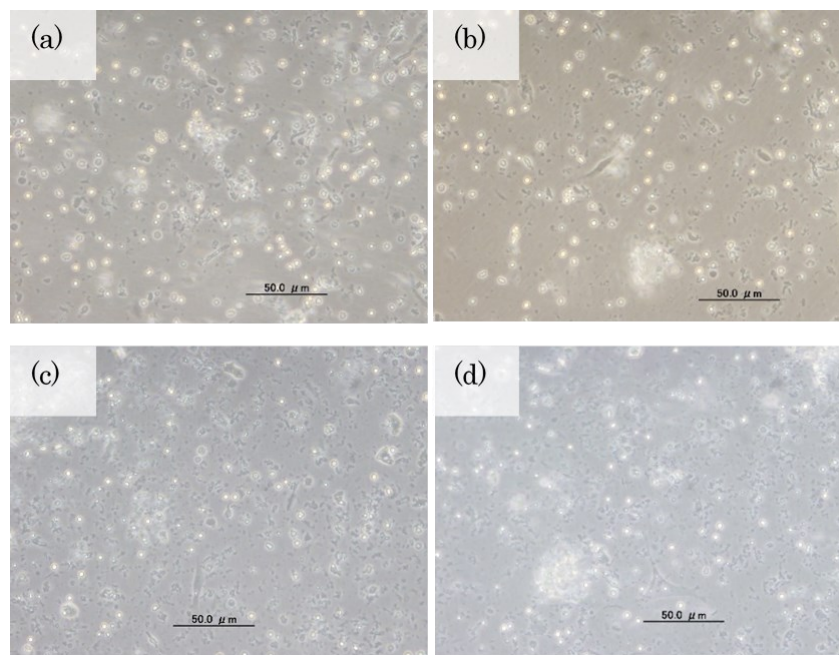


Fig. 147 遠心力の違いにおける培養画像 (Day1) (スケールバー : 50 μ m)
(a)600 G (b)800 G (c) 1600 G (d) 2400 G での画像

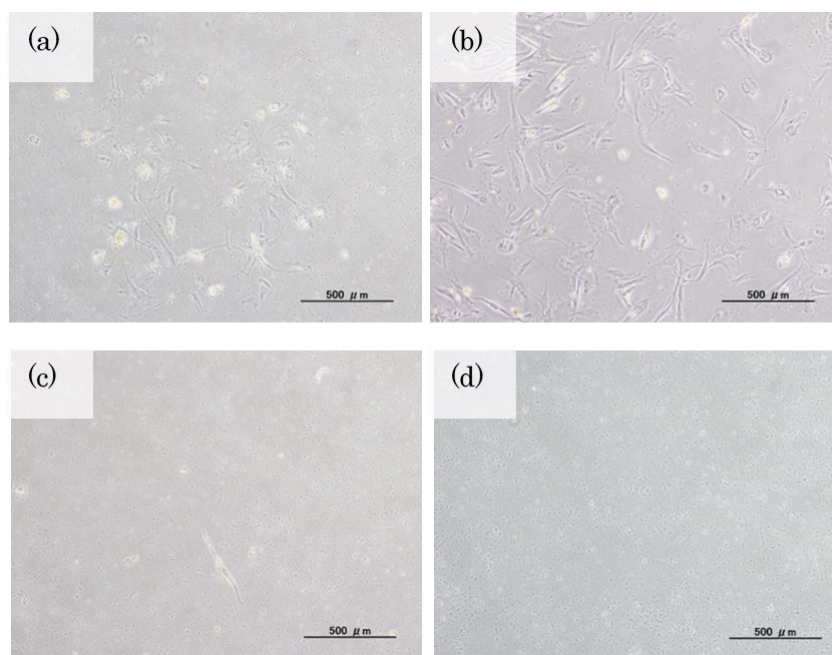


Fig. 148 遠心力の違いにおける培養画像 (Day22) (スケールバー : 50 μm)
(a)600 G (b)800 G (c) 1600 G (d) 2400 G での画像

培養した細胞は、600 G と 800 G にて遠心分離を行ったものは 22 days 後に幹細胞様の細胞が見られるが、1600 G と 2400 G にて遠心分離を行ったものは 22days 後には細胞の存在が確認されなかった。上記の結果から 600 G より 800 G の方が多く細胞が存在していることが確認できたため、次の条件検討では 800 G での遠心条件で遠心時間の検討を行った。

Fig. 149 では 800 G の遠心条件で、遠心時間を 10 分と 20 分の 2 条件で行い、遠心後の上清液と沈殿物をそれぞれ採取し、培養した画像である。

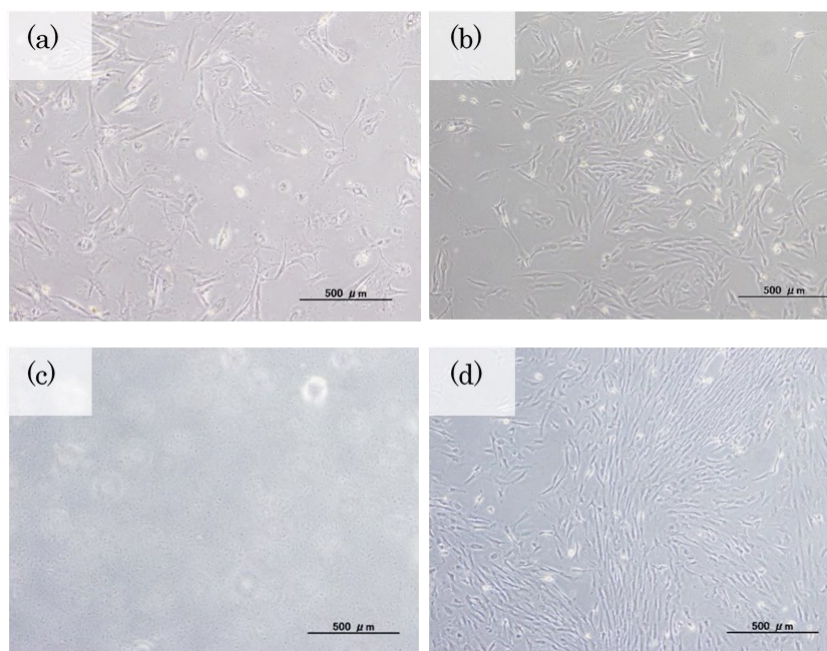


Fig. 149 遠心時間・細胞収集場所の違いを示す培養画像 (Day14)
 (a)10 min・上清液(b)10 min・沈殿物 (c)20 min・上清液
 (d)20 min・沈殿物での培養画像

Fig. 149 の結果から遠心時間が 10 分の場合上清、沈殿物共に細胞が存在していることが確認された。一方 20 分の遠心では沈殿物の方にのみ細胞が存在していたことから、20 分の遠心をかければ細胞を落としきることが出来ることがわかった

10.2.5 実験 2 (免疫染色による間葉系幹細胞の同定) : 実験内容

今回豚脂肪組織から採取し、培養した初代培養細胞は間葉系幹細胞だけではなく、内皮細胞や線維芽細胞といった他の細胞である可能性がある。そのため、培養した細胞を、免疫染色を用いることで細胞の同定を行う必要がある。今回は、抗 CD105 抗体と von Willebrand Factor (vWF)による免疫染色を行うことで、採取した細胞が間葉系幹細胞であるかどうかの検討を行った。抗 CD105 抗体による染色では、間葉系幹細胞や血管内皮細胞が染色される。

一方 vWF による染色では血管内皮細胞やその腫瘍、骨髄巨核球が染色される。このことから、この 2 種類の染色を行い、CD105 抗体で発現が認められ、vWF にて発現が認められなかった場合、その細胞は間葉系幹細胞であるといえる。

10.2.6 使用試薬および機器

- DMEM (High-Glucose)培地 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)

- Penicillin-Streptomycin (P/S) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)
- 0.25%トリプシン-2.65 mM EDTA・Na (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- リン酸緩衝液 (1×PBS)
- コニカル遠心チューブ 50, 10 mL (アズワン株式会社, 大阪, 日本)
- 血清入り培地 A : D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose)
- 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業株式会社, 大阪, 日本)
- ゼラチン (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- 0.1%Triton-X 100 (Sigma, 米国)
- Anti-CD105 抗体[MEM-229](FITC)(ab53318)
- 10 µg/ml ヘキスト (hoechst 33342, Cambrex Corporation, New Jersey, USA)
- PBS/ 1%BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- 10%中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 日本)
- von Willebrand Factor (vWF) (Alexa Fluor 488 蛍光)

10.2.7 実験方法

1. 初代培養したディッシュ内の培地を PBS で洗浄し 0.25%トリプシン-2.65 mM EDTA・Na (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を 2 mL 加え 37°C で 3 分程度静置した。
2. ディッシュから細胞が剥がれたら、D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose) を 8 mL 加えトリプシンを不活化させた。
3. 回収した細胞懸濁液を 10 mL のコニカル遠心チューブに入れ 5°C, 200 G で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを全て取り除いた。
4. D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose) に細胞を再懸濁し、必要な細胞数となるように懸濁液を取り、事前に準備したゼラチンコーティングを行った 35 mm ガラスボトムディッシュに細胞を播種し、細胞が定着するまで培養した。
5. 培養ディッシュ内の培地を全て取り除き PBS で洗浄を 3 回行った。
6. 細胞を 10%中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 日本) にて室温で 30 分間固定し、固定した細胞を PBS で洗浄を 3 回行った。
7. 0.1%Triton-X 100 (Sigma, 米国) を加え、室温で 5~10 分静置し、その後 PBS にて洗浄を 3 回行った。
8. Anti-CD105 抗体[MEM-229](FITC)(ab53318)を PBS/ 1%BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で 20 倍希釈した溶液と、von Willebrand Factor (vWF) (Alexa Fluor 488 蛍光)を添加し 20 倍に希釈した溶液をディッシュに 100 µL 添加した。

1次抗体を用いた染色をする際に、10 $\mu\text{g/ml}$ ヘキスト (hoechst 33342, Cambrex Corporation, New Jersey, USA) 500倍希釈の溶液を1%BSA溶液で調製したものを合わせて100 μL 加えて核対比染色を行った。

10.2.8 結果

Fig. 150 (a)(b)はHoechst 33342とvon Willebrand Factor (vWF) (Alexa Fluor 488 蛍光)で染色された初代培養した細胞の画像を示す。また、Fig. 150 (c)(d)はポジティブコントロールとしてヒト臍帯静脈内皮細胞をvWFによって染色したものを示す。

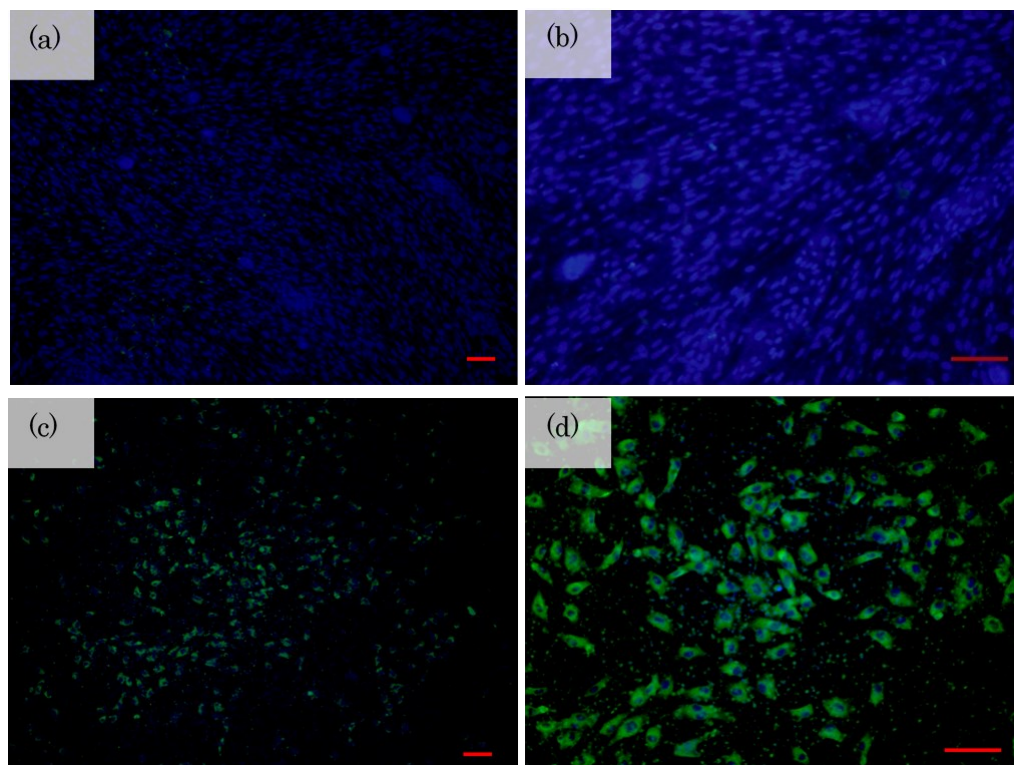


Fig. 150 (a)(b)初代培養した細胞を免疫染色した画像 (スケールバー : 100 μm)

(c)(d) ヒト臍帯静脈内皮細胞を免疫染色した画像 (スケールバー : 100 μm)

Fig. 151 は培養した細胞に対してHoechst 33342とAnti-CD105抗体[MEM-229](FITC)(ab53318)にて免疫染色を行った画像を示す。

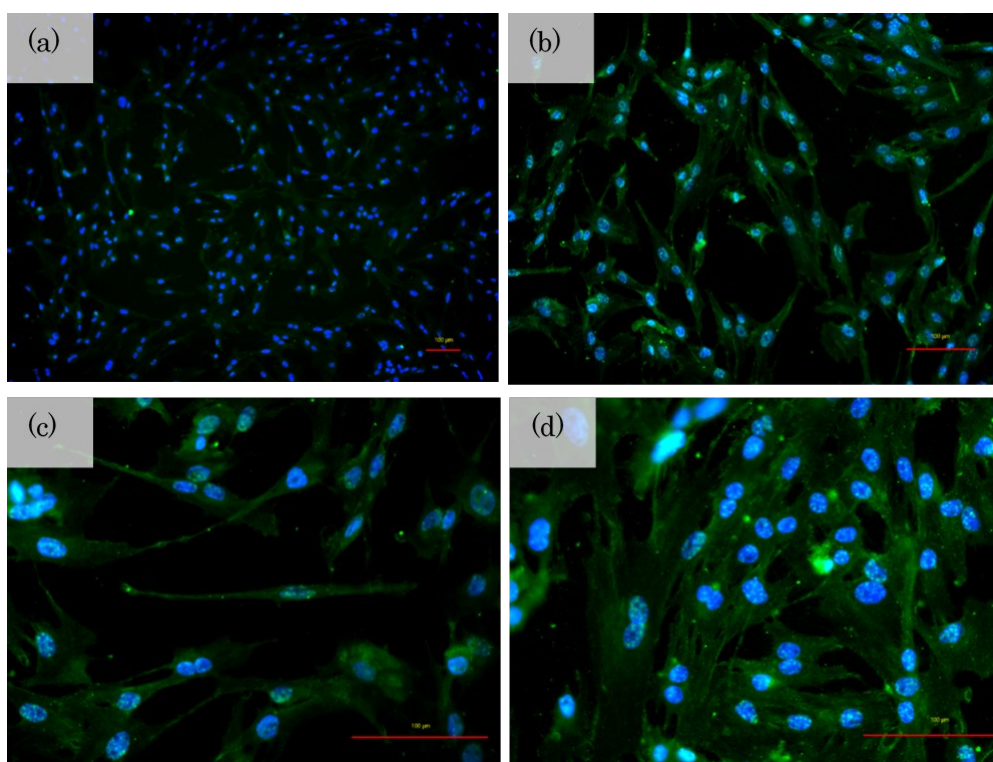


Fig. 151 初代培養した細胞を免疫染色した画像 (スケールバー : 100 μ m)

10.2.9 実験3 (フローサイトメーターによる間葉系幹細胞の同定) : 実験内容

実験1,2より、屠殺ブタから脂肪由来の間葉系幹細胞の採取及び培養が可能になった。また、免疫染色の結果から採取し、培養した細胞の中に間葉系幹細胞が含まれていることが分かった。そこで実験3ではフローサイトメーターによる分析を行い、培養した細胞にどれくらい間葉系幹細胞が含まれているか定量評価することを目的とした。

10.2.10 使用試薬および機器

DMEM (High-Glucose)培地 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)

- Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)
- Penicillin-Streptomycin (P/S) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA)
- 0.25%トリプシン-2.65 mM EDTA・Na (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- リン酸緩衝液 (1×PBS)
- コニカル遠心チューブ 50, 10 mL (アズワン株式会社, 大阪, 日本)
- エッペンドルフチューブ 2mL (エッペンドルフ, ドイツ)
- 血清入り培地 A : D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose)
- Anti-CD105 抗体 (Green) [MEM-229](FITC)(ab53318)

- monoclonal Isotype control (FITC)(ab81197)
- PBS/ 1%BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)
- BD FACSCanto™II フローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン, 米国)

10.2.11 実験方法

1. 初代培養したディッシュ内の培地を PBS で洗浄し 0.25%トリプシン-2.65 mM EDTA・Na (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を 2 mL 加え 37°C で 3 分程度静置した。
2. ディッシュから細胞が剥がれたら、D-MEM (10 v/v% FBS, 1 v/v%P/S(+), High-glucose) を 8 mL 加えトリプシンを不活化させた。
3. 回収した細胞懸濁液を 10 mL のコニカル遠心チューブに入れ 5°C, 200 G で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを全て取り除いた。
4. BS/ 1%BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) に細胞を再懸濁し、細胞数を 2.0×10^6 個/95 μ L となるように調製し、懸濁液に Anti-CD105 抗体 [MEM-229](FITC)(ab53318)を 5 μ L 加え 20 倍希釈となるようにした。
5. 良く混合し遮光して 4°C, 1 時間で静置した。
6. 静置後 2 ml の PBS/ 1%BSA 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で細胞を洗浄したものを、4°C, 300-400 G, 5 分の条件で遠心分離を行い、上清を除去した。
7. 0.5%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) に細胞を再懸濁し、BD FACSCanto™II フローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン, 米国)により解析を行った。
8. ネガティブコントロールとして monoclonal Isotype control (FITC)(ab81197)を前実験において培養した細胞に、Anti-CD105 抗体を用いた実験と同条件で加え解析を行った。

10.2.12 結果

Fig. 141-1 は Anti-CD105 抗体を加えた際の FSC-SSC プロットを示すグラフであり、Fig. 141-2 はネガティブコントロールにおける FSC-SSC プロットを示すグラフである。

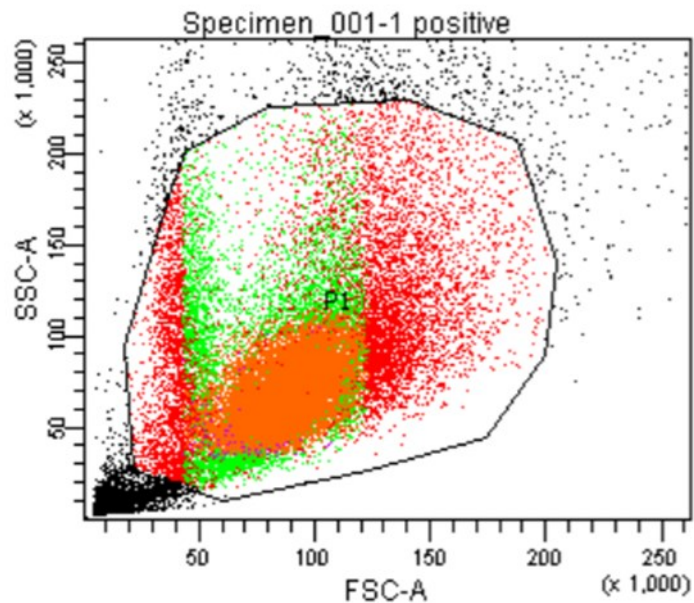


Fig. 152-1 Anti-CD105 抗体を加えた細胞における FSC-SSC プロット図

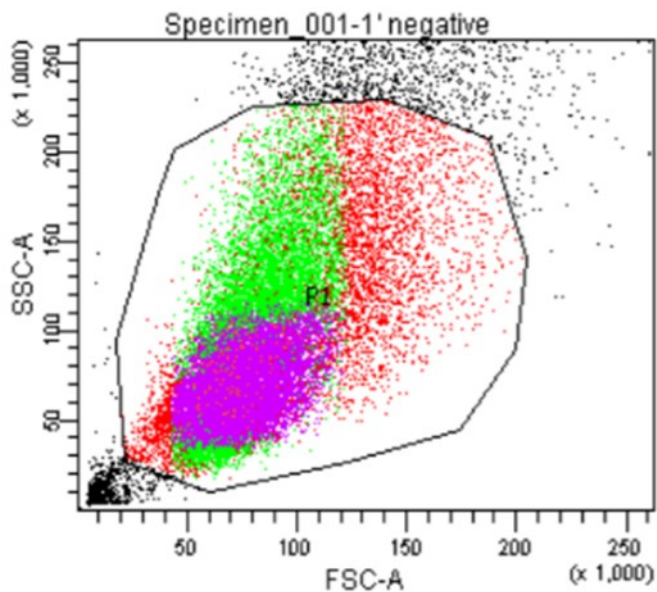


Fig. 152-2 monoclonal Isotype control を加えた細胞における FSC-SSC プロット図

Fig. 152-1,2 において、黒枠で囲まれた部分はフローサイトメーターにて分析を行った細胞集団を示す。また Fig. 152-1 におけるオレンジ色の部分、Fig. 152-2 における紫色の部分 は、均一な細胞集団での FITC の蛍光強度を分析した範囲である。

フローサイトメーターにおける前方散乱シグナル (FSC) は、前方にある細胞により屈折された光で、細胞の粒子や大きさが大きくなるほど FSC は大きくなる。また、側方散乱

光（SSC）は細胞により屈折した光であり通常、細胞の粒度や複雑性が増すほど SSC は大きくなる。Fig. 152-1,2 における細胞分布を見ると、培養した細胞の大きさやその粒子性にバラツキがあることが確認された。

Fig. 153-1 は Fig. 152-1 で示した Anti-CD105 抗体を加えた細胞における細胞分布と、細胞集団ごとの細胞の個数を示すグラフである。

Fig. 153-2 は Fig. 152-2 で示した monoclonal Isotype control を加えた細胞における細胞分布と、細胞集団ごとの細胞の個数を示すグラフである。

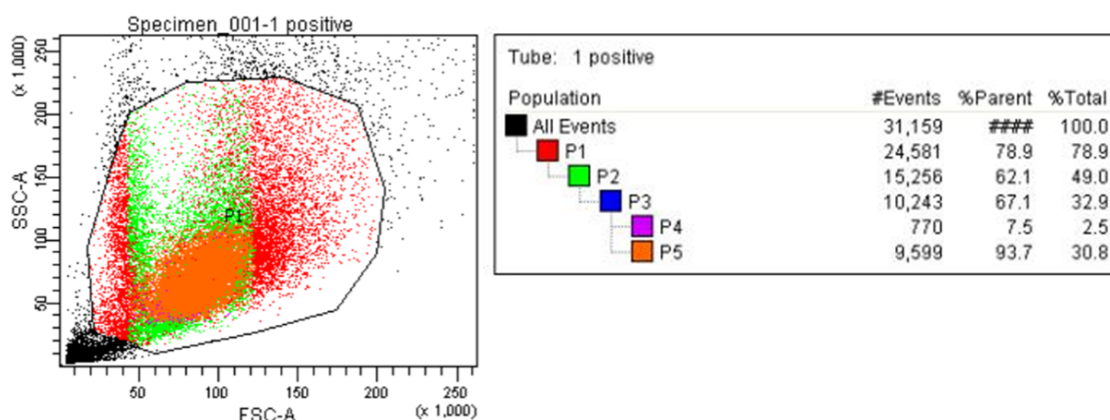


Fig. 153-1 Anti-CD105 抗体を加えた細胞の細胞分布と細胞集団ごとの細胞の個数を示すグラフ

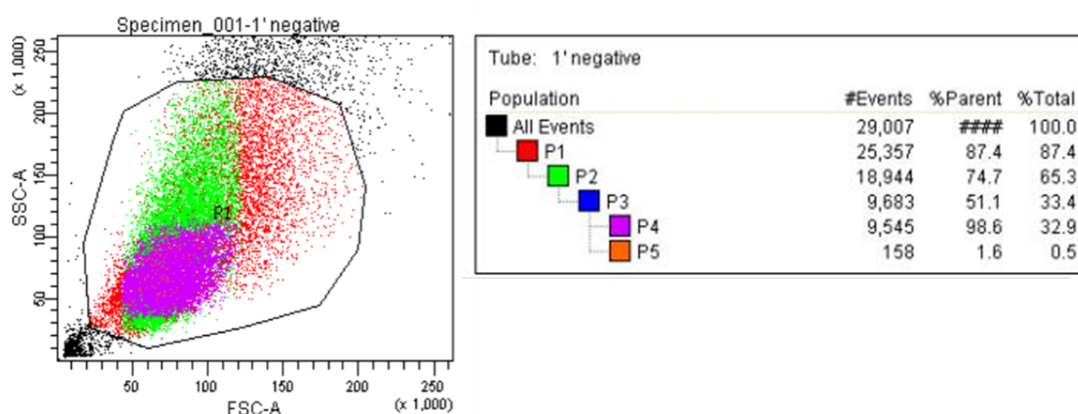


Fig. 153-2 monoclonal Isotype control を加えた細胞の細胞分布と細胞集団ごとの個数を示すグラフ。

Fig. 153-1,2 の右側のグラフでは、各細胞集団において分析された細胞の個数を示す。それぞれ約 3×10^4 個の細胞が分析され、その中で、将来的に安全かつ効率的な細胞治療を行うことが出来るように、均一な細胞集団の解析を行った。次の実験では細胞の大きさや粒子性が均一な細胞集団（P4+P5）について、FITC の蛍光強度を分析した。

Fig. 154-1 は、培養した細胞に Anti-CD105 抗体を加えた際の FITC の蛍光強度を示すグラフである。

Fig. 154-2 は、培養した細胞に monoclonal Isotype control を加えた際の FITC の蛍光強度を示すグラフである。

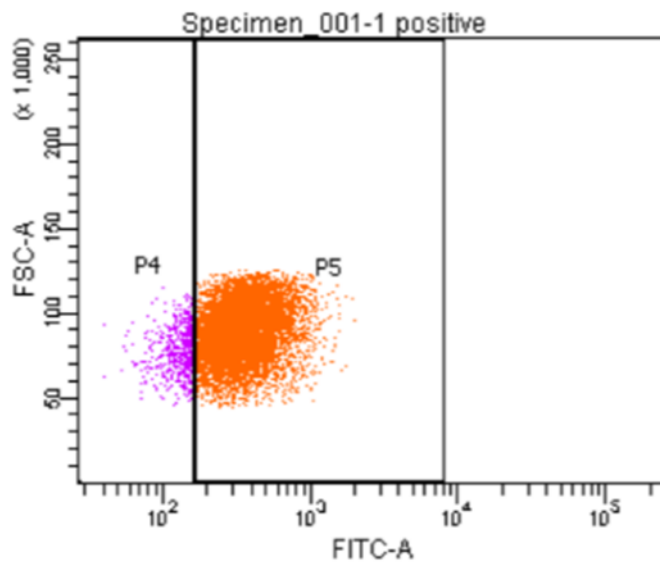


Fig. 154-1 Anti-CD105 抗体を加えた細胞における FITC 蛍光強度

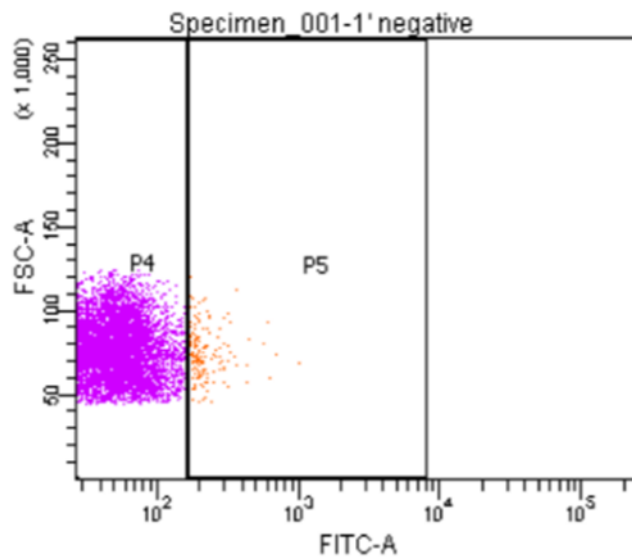


Fig. 154-2 monoclonal Isotype control を加えた細胞における FITC 蛍光強度

Fig. 154-1,2 において紫色の部分は FITC による蛍光反応が見られなかった部分であり、オレンジ色の部分が FITC による蛍光反応が見られた部分である。Fig. 154-1 のグラフよ

り、Anti-CD105 抗体に FITC を標識したものを培養した細胞に加えると、FITC による蛍光反応が見られたことから、培養した細胞は陽性であると考えられる。

Fig. 155 は、Fig. 154-1,2 の結果から、フローサイトメーターによって分析された細胞の Anti-CD105 抗体への発現の割合を示す。一部の細胞集団では 9 割程度の細胞が CD105 発現をすることが確認された。

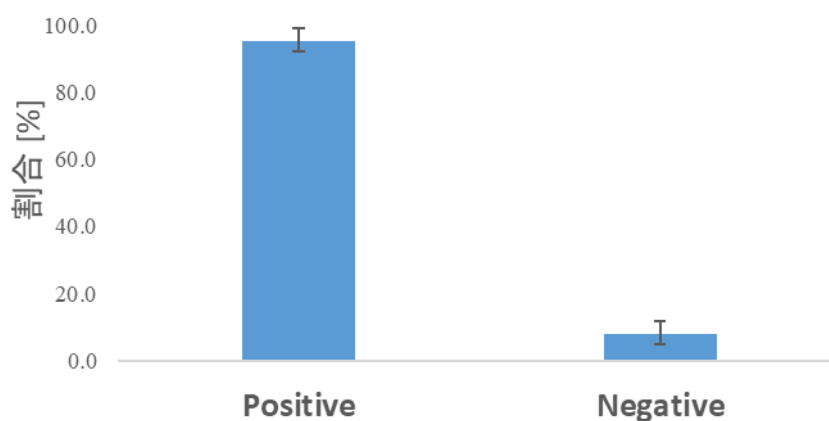


Fig. 155 フローサイトメーターにより分析された細胞の抗 CD105 抗体への発現の割合 (n=3)

10.3 考察とまとめ

本実験では、屠殺ブタの腎周辺の脂肪組織由来間葉系幹細胞の初代培養の確立を試みた。

実験 1 では、細胞の回収の条件を検討した。一般的な細胞の初代培養プロトコールでは細胞を回収する条件として 300~400G にて 3~10 分ほどで細胞が沈殿物として回収されているが、本実験では試行錯誤した結果、至適な条件として 22°C, 800 G, 20 min が得られた。これにより、本研究で用いる屠殺ブタの脂肪から細胞を初代培養するための条件とした。

実験 2 では、免疫染色による間葉系幹細胞の同定を試みた。培養された細胞は、血管内皮細胞に発現する vWF では染色されず、間葉系幹細胞や血管内皮細胞に対して発現する CD105 抗体では染色された。これより、屠殺されたブタの脂肪から採取された細胞には間葉系幹細胞が含まれていることが考えられる。

実験 3 において培養したブタの細胞に対して、フローサイトメーターによる細胞の分析を行った。Fig. 154 の結果から、Anti-CD105 抗体を加えなかったネガティブコントロールにて観測された細胞集団に対して、Anti-CD105 抗体を加えた細胞集団では FITC によって蛍光された細胞集団が観測された。更に、初代培養された細胞の一部の集団では、約 9 割の細胞が CD105 発現を示すことが確認された。

10.4 結論

屠殺ブタの腎周辺の脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞の初代培養を行い、脂肪組織由来間葉系幹細胞の採取、免疫染色、フローサイトメーターの解析により初代培養した細胞が脂肪組織由来間葉系幹細胞であると同定することができた。

こうして得られた脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて、今後腎臓再生治療法の研究開発に応用していける。

11章 総括

本研究では体外臓器灌流下の腎臓再生に関する基礎研究として、長期培養法、腎臓機能評価法、腎治療法をテーマに実験を行ってきた。

長期灌流培養のテーマでは、初期灌流液組成の検討を行い、灌流液組成の改良に成功した。

灌流腎に対しての抗浮腫薬の検討では、マンニトールとグリセロール及びデカドロンを検討したが、マンニトール、グリセロールの効果はみられなかったがデカドロンの効果は期待できると示唆された。これらの成果から2日以上培養への目途が立ち、より長期間の灌流培養への可能性が見いだせた。

腎臓の評価法の検討では、超音波エコーによる糸球体の観測を行い、コントラストエコーにより糸球体の観察に成功し、定量化することが出来るようになった。更に、薬物負荷試験ではイヌリン、PSP、FITC-アルブミン負荷試験を行い、排泄率、クリアランス値を求めた。これらは糸球体濾過量、尿細管機能、糸球体からの漏出の評価項目として有用性が示された。これらの成果から体外灌流下腎の腎機能を定量評価することが可能になり、再生治療の評価、腎機能が回復した後の移植への判定としても利用が可能になる。

アドレナリン負荷及び、ベラパミル、ニトログリセリン負荷により血管反応を見ることで、血管系細胞の生存及び血管機能が評価できることが示された。これらの成果から本実験で使用した灌流腎の生存が確認され、病腎としての実験モデルとしても有用である

細胞移植実現に向けた基礎研究では脂肪組織から初代培養する方法の確立に成功し、免疫染色及びフローサイトメーターにて同定を行った結果、初代培養した細胞の大半が脂肪組織由来間葉系幹細胞であることを確認できた。これらの成果から、細胞移植を行うための材料として脂肪由来間葉系幹細胞を用意することができた。

以上の研究成果は、体外長期灌流下での腎臓再生治療法の研究開発を大きく前進させたといえるのではないかと思われる。

12章 Future Works

今回行った実験は以下の研究テーマに沿って行われた。

- ①体外における長期腎臓灌流培養技術の開発
- ②灌流培養中の腎機能の評価法の開発
- ③灌流腎臓の集中再生治療法の開発

今後の展望として、それぞれの研究テーマについて以下に記す。

①体外における長期腎臓灌流培養技術の開発として、まず初期灌流法の開発である。

臓器内の血液が残存することは腎臓の機能を傷害するため、より効果的かつ効率的な前処理方法の開発を行っていく必要がある。次に、灌流装置の開発である。現時点で圧力センサーによるフィードバック機構のおかげで、灌流圧を一定にした灌流を行うことができている。しかし、今後1週間、1か月と培養期間を延長していくためにはできる限りの人的負担を減らしていかなければならない。そのためにも次世代型の灌流装置では灌流操作のオートメーション化を進めていく必要がある。

次に②灌流培養中の腎機能の評価法の開発として、コントラストエコーでの糸球体の定量化及び、工学的な解析を行っていく必要がある。

今回の研究で、糸球体の描出が可能になったが、すべての糸球体を描出するには至っていない。画像解析の部分でも更なる解析条件の最適化や、灌流中の腎臓の糸球体の状態を評価できるように改良していく必要がある。

薬剤負荷試験（腎機能検査、血管作動薬）を用いた機能評価法の検討では定量的に評価ができるようになってきたが、まだ指標となるものを未だ導き出せていないため、より多くのデータを解析し導き出していく必要がある。また、腎機能を多角的に評価するためにも今後の検討項目として利尿剤を用いた負荷試験や、ホルモン剤を用いた負荷試験の検討、特に糸球体濾過量や腎組織の障害とレニンやエリスロポエチンのデータに相関性がないかを検討し、定量評価及び指標の導出を並行して行っていく必要がある。

最後に③灌流腎臓の集中再生治療法の開発として幹細胞移植法の基礎研究を行った。

今回はブタ脂肪由来間葉系幹細胞の初代培養により採取した細胞に対し、免疫染色及びフローサイトメーターで同定を行ったことで、採取し培養した細胞がブタ脂肪由来間葉系幹細胞であることを明らかにした。今後は脂肪由来間葉系幹細胞だけでなく、骨髄由来間葉系幹細胞の採取を行い腎臓への移植を目指していくことを考えている。そのためにも、細胞の移植法の検討や、細胞移植だけでなく増殖因子や Drug Delivery System を利用した治療法の開発も同時に進めていくことが必要である。

最後に本研究で行った実験系すべてにおいて、サンプルサイズが依然小さく統計的な分析を行うところまで至っていない。そのため同条件にてサンプル数を増やし、統計的な有意性を明らかにしていく必要がある。

13章 謝辞

本博士研究を進めるにあたっては、同専攻中村真人教授には指導教官として本研究にあたってご指導して頂いた。

富山大学学術研究部工学系黒岡武俊准教授並びに富山大学学術研究部工学系岩永進太郎助教授には研究計画をはじめ、ご指導して頂いた。

食肉センターの皆様には本研究を行う上で欠かせないブタの腎臓を提供して頂いた。実験に使える状態で腎臓を提供していただいたことを心より感謝の気持ちを述べたい。

同専攻篠原寛明教授には副査としての立場から本研究への意見だけでなく、研究者としてのあるべき姿等研究内容以外の部分でも助言をいただいた。

富山大学附属病院腎泌尿器科北村寛先生には副査、腎臓の専門家としての立場から移植の現状等の意見を頂いた。

学術研究部工学系長谷川英之教授には、超音波エコー装置の貸与及び、超音波計測に関するアドバイスをいただいた。

国立成育医療研究センター研究所先進医療開発室共同研究員松野直徒先生、絵野沢伸先生、並びに東京都立大学小原弘道先生には臓器灌流に関する助言、研究に関する貴重な助言を頂いた。心より感謝申し上げます。

臓器灌流共同研究プロジェクト先の株式会社澁谷工業の皆様には灌流装置と透析装置の提供をして頂き、研究全般において協力して頂いた。

御器谷財団には研究資金の助成を頂いた。

最後に、本研究室メンバーには本研究に関する全面的支援を頂いた。ここに感謝申し上げます。

14 章 参考文献

1. Ma, F.; Cang, Y.; Zhao, B.; Liu, Y.; Wang, C.; Liu, B.; Wu, T.; Song, Y.; Peng, A. Contrast-Enhanced Ultrasound with SonoVue Could Accurately Assess the Renal Microvascular Perfusion in Diabetic Kidney Damage. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 2891–2898, doi:10.1093/ndt/gfr789.
2. Schmitz, V.; Schaser, K.-D.; Olschewski, P.; Neuhaus, P.; Puhl, G. In Vivo Visualization of Early Microcirculatory Changes Following Ischemia/Reperfusion Injury in Human Kidney Transplantation. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* **2008**, *40*, 19–25, doi:10.1159/000107683.
3. Tsuruoka, K.; Yasuda, T.; Koitabashi, K.; Yazawa, M.; Shimazaki, M.; Sakurada, T.; Shirai, S.; Shibagaki, Y.; Kimura, K.; Tsujimoto, F. Evaluation of Renal Microcirculation by Contrast-Enhanced Ultrasound with Sonazoid as a Contrast Agent. *Int. Heart. J.* **2010**, *51*, 176–182, doi:10.1536/ihj.51.176.
4. Wang, L.; Mohan, C. Contrast-Enhanced Ultrasound: A Promising Method for Renal Microvascular Perfusion Evaluation. *J. Transl. Intern. Med.* **2016**, *4*, 104–108, doi:10.1515/jtim-2016-0033.
5. 第46回臓器移植委員会 資料2 P5.
6. 移植希望登録者数 | 日本臓器移植ネットワーク Available online: <https://www.jotnw.or.jp/data/kidneys.php> (accessed on 26 April 2021).
7. データで見る臓器移植 | 一般の方 | 一般社団法人 日本移植学会 Available online: <http://www.asas.or.jp/jst/general/number/> (accessed on 19 May 2021).
8. 腎移植臨床登録集計報告(2020) 2019年実施症例の集計報告と追跡調査結果.
9. 移植希望者の待機年数 | 日本臓器移植ネットワーク Available online: <https://www.jotnw.or.jp/explanation/07/05/> (accessed on 19 May 2021).
10. 治療法について | 腎臓病について | 一般社団法人全国腎臓病協議会 Available online: <https://www.zjk.or.jp/sp/detail/page/23#anchor29> (accessed on 19 May 2021).
11. 各臓器移植分野における医療経済 腎臓移植の医療経済.
12. 臓器移植におけるマージナルドナーとは? ドナーの善意を大切にするための努力.
13. Metzger, R.A.; Delmonico, F.L.; Feng, S.; Port, F.K.; Wynn, J.J.; Merion, R.M. Expanded Criteria Donors for Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2003**, *3*, 114–125, doi:<https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x>.

14. Brasile, L.; Stubenitsky, B.M.; Booster, M.H.; Arenada, D.; Haisch, C.; Kootstra, G. Hypothermia – a Limiting Factor in Using Warm Ischemically Damaged Kidneys. *Am. J. Transplant.* **2001**, *1*, 316–320, doi:<https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2001.10405.x>.
15. Belzer, F.O.; Southard, J.H. The Future of Kidney Preservation. *Transplantation* **1980**, *30*, 161–165, doi:10.1097/00007890-198009000-00001.
16. 教偉福寫; 敬劍持; 伸絵野沢; 武秀浅野 移植のための臓器摘出と保存; 丸善出版: 東京, 2012;
17. Belzer, F.O.; Southard, J.H. Principles of Solid-Organ Preservation by Cold Storage. *Transplantation* **1988**, *45*, 673–676, doi:10.1097/00007890-198804000-00001.
18. Iwai, S.; Kikuchi, T.; Kasahara, N.; Teratani, T.; Yokoo, T.; Sakonju, I.; Okano, S.; Kobayashi, E. Impact of Normothermic Preservation with Extracellular Type Solution Containing Trehalose on Rat Kidney Grafting from a Cardiac Death Donor. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e33157, doi:10.1371/journal.pone.0033157.
19. Moers, C.; Smits, J.M.; Maathuis, M.-H.J.; Treckmann, J.; van Gelder, F.; Napieralski, B.P.; van Kasterop-Kutz, M.; van der Heide, J.J.H.; Squifflet, J.-P.; van Heurn, E.; et al. Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 7–19, doi:10.1056/NEJMoa0802289.
20. Matsuno, N.; Sakurai, E.; Tamaki, I.; Furuhashi, K.; Saito, A.; Zhang, S.; Kozaki, K.; Shimada, A.; Miyamoto, K.; Kozaki, M. Effectiveness of Machine Perfusion Preservation as a Viability Determination Method for Kidneys Procured from Non-Heart-Beating Donors. *Transplant. Proc.* **1994**, *26*, 2421–2422.
21. Matsuno, N.; Sakurai, E.; Uchiyama, M.; Kozaki, K.; Miyamoto, K.; Kozaki, M.; Nagao, T. Role of Machine Perfusion Preservation in Kidney Transplantation from Non-Heartbeating Donors. *Clin. Transplant.* **1998**, *12*, 1–4.
22. Pegg, D.E. An Approach to Hypothermic Renal Preservation. *Cryobiology* **1978**, *15*, 1–17, doi:10.1016/0011-2240(78)90002-0.
23. 高橋公太 腎保存の研究, 第1編 持続低温灌流保存と単純冷却保存の比較検討 日腎誌 第XXIII巻 第4号 pp.440 (1981)
24. Balupuri, S.; Buckley, P.; Snowden, C.; Mustafa, M.; Sen, B.; Griffiths, P.; Hannon, M.; Manas, D.; Kirby, J.; Talbot, D. The Trouble with Kidneys Derived from the Non Heart-Beating Donor: A Single Center 10-Year Experience. *Transplantation* **2000**, *69*, 842–846, doi:10.1097/00007890-200003150-00029.

25. 松野直徒 機能再生からみた臓器保存学-心停止ドナーと臓器保存-今日の移植 Vol.26 No.5 (2013)
26. Renkens, J.J.M.; Rouflart, M.M.J.; Christiaans, M.H.L.; van den Berg-Loonen, E.M.; van Hooff, J.P.; van Heurn, L.W.E. Outcome of Nonheart-Beating Donor Kidneys with Prolonged Delayed Graft Function after Transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2005**, *5*, 2704–2709, doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01072.x.
27. ライフサイエンスの広場|用語解説 Available online: <https://www.lifescience.mext.go.jp/others/word.html> (accessed on 12 May 2021).
28. Blum, M.F.; Liu, Q.; Soliman, B.; Dreher, P.; Okamoto, T.; Poggio, E.D.; Goldfarb, D.A.; Baldwin, W.M.; Quintini, C. Comparison of Normothermic and Hypothermic Perfusion in Porcine Kidneys Donated after Cardiac Death. *J. Surg. Res.* **2017**, *216*, 35–45, doi:10.1016/j.jss.2017.04.008.
29. Lin, K.-C.; Yip, H.-K.; Shao, P.-L.; Wu, S.-C.; Chen, K.-H.; Chen, Y.-T.; Yang, C.-C.; Sun, C.-K.; Kao, G.-S.; Chen, S.-Y. Combination of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSC) and ADMSC-Derived Exosomes for Protecting Kidney from Acute Ischemia–Reperfusion Injury. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *216*, 173–185.
30. Gregorini, M.; Corradetti, V.; Pattonieri, E.F.; Rocca, C.; Milanesi, S.; Peloso, A.; Canevari, S.; De Cecco, L.; Dugo, M.; Avanzini, M.A. Perfusion of Isolated Rat Kidney with Mesenchymal Stromal Cells/Extracellular Vesicles Prevents Ischaemic Injury. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 3381–3393.
31. Ko, S.-F.; Chen, Y.-T.; Wallace, C.G.; Chen, K.-H.; Sung, P.-H.; Cheng, B.-C.; Huang, T.-H.; Chen, Y.-L.; Li, Y.-C.; Chang, H.-W. Inducible Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy Effectively Protected Kidney from Acute Ischemia-Reperfusion Injury. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 3053.
32. Bleilevens, C.; Doorschodt, B.M.; Fechter, T.; Grzanna, T.; Theißen, A.; Liehn, E.A.; Breuer, T.; Tolba, R.H.; Rossaint, R.; Stoppe, C. Influence of Vitamin C on Antioxidant Capacity of In Vitro Perfused Porcine Kidneys. *Nutrients* **2019**, *11*, 1774.
33. Daghini, E.; Zhu, X.-Y.; Versari, D.; Bentley, M.D.; Napoli, C.; Lerman, A.; Lerman, L.O. Antioxidant Vitamins Induce Angiogenesis in the Normal Pig Kidney. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2007**, *293*, F371–F381.
34. Li, F.; Bahnson, E.M.; Wilder, J.; Siletzky, R.; Hagaman, J.; Nickekeit, V.; Hiller, S.; Ayesha, A.; Feng, L.; Levine, J.S. Oral High Dose Vitamin B12 Decreases

- Renal Superoxide and Post-Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Redox Biol.* **2020**, *32*, 101504.
35. Lindoso, R.S.; Collino, F.; Bruno, S.; Araujo, D.S.; Sant'Anna, J.F.; Tetta, C.; Provero, P.; Quesenberry, P.J.; Vieyra, A.; Einicker-Lamas, M. Extracellular Vesicles Released from Mesenchymal Stromal Cells Modulate MiRNA in Renal Tubular Cells and Inhibit ATP Depletion Injury. *Stem Cells Dev.* **2014**, *23*, 1809–1819.
 36. Weissenbacher, A.; Lo Faro, L.; Boubriak, O.; Soares, M.F.; Roberts, I.S.; Hunter, J.P.; Voyce, D.; Mikov, N.; Cook, A.; Ploeg, R.J. Twenty-Four-Hour Normothermic Perfusion of Discarded Human Kidneys with Urine Recirculation. *Am. J. Transplant.* **2019**, *19*, 178–192.
 37. Weissenbacher, A.; Voyce, D.; Ceresa, C.D.; Soares, M.F.; Roberts, I.S.; Hunter, J.P.; Cook, A.; Ploeg, R.J.; Coussios, C.C.; Friend, P.J. Urine Recirculation Improves Hemodynamics and Enhances Function in Normothermic Kidney Perfusion. *Transplant. Direct* **2020**, *6*.
 38. Feng, Z.; Ting, J.; Alfonso, Z.; Strem, B.M.; Fraser, J.K.; Rutenberg, J.; Kuo, H.-C.; Pinkernell, K. Fresh and Cryopreserved, Uncultured Adipose Tissue-Derived Stem and Regenerative Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **2010**, *25*, 3874–3884, doi:10.1093/ndt/gfq603.
 39. Saad, A.; Dietz, A.B.; Herrmann, S.M.S.; Hickson, L.J.; Glockner, J.F.; McKusick, M.A.; Misra, S.; Bjarnason, H.; Armstrong, A.S.; Gastineau, D.A.; et al. Autologous Mesenchymal Stem Cells Increase Cortical Perfusion in Renovascular Disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2017**, *28*, 2777–2785, doi:10.1681/ASN.2017020151.
 40. van Leeuwen, O.B.; Ubbink, R.; de Meijer, V.E.; Porte, R.J. The First Case of Ischemia-Free Organ Transplantation in Humans: A Proof of Concept. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2018**, *18*, 2091, doi:10.1111/ajt.14869.
 41. 検査方法について | 腎臓病について | 一般社団法人 全国腎臓病協議会 (全腎協) Available online: <https://www.zjk.or.jp/kidney-disease/inspection-method/> (accessed on 12 May 2021).
 42. Kathis, J.M.; Echeverri, J.; Linares, I.; Cen, J.Y.; Ganesh, S.; Hamar, M.; Urbanellis, P.; Yip, P.; John, R.; Bagli, D. Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Following Static Cold Storage—Brief, Intermediate, or Prolonged

- Perfusion for Optimal Renal Graft Reconditioning? *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 2580–2590.
43. Kathis, J.M.; Hamar, M.; Echeverri, J.; Linares, I.; Urbanellis, P.; Cen, J.Y.; Ganesh, S.; Dingwell, L.S.; Yip, P.; John, R. Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion for Graft Quality Assessment Prior to Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2018**, *18*, 580–589.
 44. Kathis, J.M.; Cen, J.Y.; Chun, Y.M.; Echeverri, J.; Linares, I.; Ganesh, S.; Yip, P.; John, R.; Bagli, D.; Mucsi, I. Continuous Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Is Superior to Brief Normothermic Perfusion Following Static Cold Storage in Donation after Circulatory Death Pig Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 957–969.
 45. 直徒松野; 弘道小原; 俊彦平野; 伸絵野沢 臓器保存から臓器蘇生へ. *Organ Biol.* **2013**, *20*, 165–168, doi:10.11378/organbio.20.165.
 46. 't Hart, N.A.; van der Plaats, A.; Leuvenink, H.G.D.; Wiersema-Buist, J.; Olinga, P.; van Luyn, M.J.A.; Verkerke, G.J.; Rakhorst, G.; Ploeg, R.J. Initial Blood Washout during Organ Procurement Determines Liver Injury and Function after Preservation and Reperfusion. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2004**, *4*, 1836–1844, doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00580.x.
 47. Hoyer, D.P.; Gallinat, A.; Swoboda, S.; Wohlschläger, J.; Rauen, U.; Paul, A.; Minor, T. Subnormothermic Machine Perfusion for Preservation of Porcine Kidneys in a Donation after Circulatory Death Model. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **2014**, *27*, 1097–1106, doi:10.1111/tri.12389.
 48. Belzer MPS® UW Machine Perfusion Solution | Instructions for Use. *Bridge Life Ltd.*
 49. Morariu, A.M.; Vd Plaats, A.; V Oeveren, W.; 'T Hart, N.A.; Leuvenink, H.G.D.; Graaff, R.; Ploeg, R.J.; Rakhorst, G. Hyperaggregating Effect of Hydroxyethyl Starch Components and University of Wisconsin Solution on Human Red Blood Cells: A Risk of Impaired Graft Perfusion in Organ Procurement? *Transplantation* **2003**, *76*, 37–43, doi:10.1097/01.TP.0000068044.84652.9F.
 50. van der Plaats, A.; 't Hart, N.A.; Morariu, A.M.; Verkerke, G.J.; Leuvenink, H.G.D.; Ploeg, R.J.; Rakhorst, G. Effect of University of Wisconsin Organ-Preservation Solution on Haemorheology. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **2004**, *17*, 227–233, doi:10.1007/s00147-004-0705-8.
 51. Mosbah, I.B.; Franco-Gou, R.; Abdennebi, H.B.; Hernandez, R.; Escolar, G.; Saidane, D.; Rosello-Catafau, J.; Peralta, C. Effects of Polyethylene Glycol and Hydroxyethyl Starch in University of Wisconsin Preservation Solution on Human

- Red Blood Cell Aggregation and Viscosity. *Transplant. Proc.* **2006**, *38*, 1229–1235, doi:10.1016/j.transproceed.2006.02.068.
52. Southard, J.H.; Belzer, F.O. The University of Wisconsin Organ Preservation Solution: Components, Comparisons, and Modifications. *Transplant. Rev.* **1993**, *7*, 176–190, doi:10.1016/S0955-470X(05)80025-4.
53. Giraud, S.; Thuillier, R.; Codas, R.; Manguy, E.; Barrou, B.; Valagier, A.; Puichaud, A.; Badet, L.; Nicolas, E.; Eugene, M. The Optimal PEG for Kidney Preservation: A Preclinical Porcine Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 454.
54. Fang, L.; You, H.; Chen, B.; Xu, Z.; Gao, L.; Liu, J.; Xie, Q.; Zhou, Y.; Gu, Y.; Lin, S. Mannitol Is an Independent Risk Factor of Acute Kidney Injury after Cerebral Trauma: A Case–Control Study. *Ren. Fail.* **2010**, *32*, 673–679.
55. Araujo, M.; Wilcox, C.S. Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 74–101.
56. 福原茂朋 血管透過性のダイナミックかつ巧妙な制御を可能にするシグナル伝達系. *J. Jpn. Biochem. Soc.* **2017**, *89*, 368–376.
57. Grams, M.E.; Astor, B.C.; Bash, L.D.; Matsushita, K.; Wang, Y.; Coresh, J. Albuminuria and Estimated Glomerular Filtration Rate Independently Associate with Acute Kidney Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 1757–1764, doi:10.1681/ASN.2010010128.
58. 今井圓裕、堀尾勝、安田宣成 金井正光監修 奥村伸生、戸塚実、矢富裕 編 16 章腎機能検査, *臨床検査法提要改定第34版* 金原出版株式会社 2015; 1500-1501
59. 金井泉著、金井正光編 二瓶 宏, 17 章腎機能検査, *臨床検査法提要改定第30版* 金原出版株式会社 1996; 1463
60. Ogura, R.; Kurooka, T.; Iwanaga, S.; Nakamura, M. Functional Assessment of Extracorporeally Perfused Kidneys Using Drug Loading Tests. *Organ Biol.* **2022**, *29*, 29–38.
61. 日経メディカル処方薬事典 心抑制型カルシウム拮抗薬（ジルチアゼム、ベラパミル）の解説 | 日経メディカル処方薬事典 Available online: <https://medical.nikkeibp.co.jp/inc/all/drugdic/article/556e7e5c83815011bdcf832a.html> (accessed on 12 May 2021).
62. CGMP - 薬学用語解説 - 日本薬学会 Available online: <https://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi?cGMP> (accessed on 12 May 2021).
63. Okura, H.; Komoda, H.; Fumimoto, Y.; Lee, C.-M.; Nishida, T.; Sawa, Y.; Matsuyama, A. Transdifferentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stromal

Cells into Insulin-Producing Clusters. *J. Artif. Organs* **2009**, *12*, 123–130,
doi:10.1007/s10047-009-0455-6.

15 章 Appendix

本論文 6 章にて使用したエコー画像解析プログラムのコードを記載する。

腎臓のエコー画像解析 ソースコード

①皮質の領域抽出

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import math, cv2
from cv2_rolling_ball import subtract_background_rolling_ball
import csv
import os
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
from PIL import Image, ImageOps
from matplotlib import cm
from scipy.optimize import curve_fit

input_dir = "./echo_current_0827"
output_dir = "./echo_output_0827"
os.makedirs(output_dir, exist_ok=True)

#カラー画像で読み込み
da1 = cv2.imread(input_dir + "/1.jpg")
da2 = cv2.imread(input_dir + "/2.jpg")
da3 = cv2.imread(input_dir + "/3.jpg")
da4 = cv2.imread(input_dir + "/4.jpg")
da5 = cv2.imread(input_dir + "/5.jpg")

#グレースケール化
data1 = cv2.cvtColor(da1, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data2 = cv2.cvtColor(da2, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data3 = cv2.cvtColor(da3, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data4 = cv2.cvtColor(da4, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data5 = cv2.cvtColor(da5, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
```

```

#エコー情報以外をトリミング
#グレーのトリミング
imgs1 = data1[75 : 599, 50 : 799]
imgs2 = data2[75 : 599, 50 : 799]
imgs3 = data3[75 : 599, 50 : 799]
imgs4 = data4[75 : 599, 50 : 799]
imgs5 = data5[75 : 599, 50 : 799]

#sample1
S1ROI1 = data1[303:378, 92:242]
#sample2
S2ROI1 = data2[183:258, 252:402]
#sample3
S3ROI1 = data3[162:237, 330:480]
#sample4
S4ROI1 = data4[244:319, 385:535]
#sample5
S5ROI1 = data5[281:356, 146:296]

## numpy でヒストグラムの算出
S1hist1, bins = np.histogram(S1ROI1.ravel(),256,[0,256])
S2hist1, bins = np.histogram(S2ROI1.ravel(),256,[0,256])
S3hist1, bins = np.histogram(S3ROI1.ravel(),256,[0,256])
S4hist1, bins = np.histogram(S4ROI1.ravel(),256,[0,256])
S5hist1, bins = np.histogram(S5ROI1.ravel(),256,[0,256])

#ヒストグラムの総和
SampleAllHist = S1hist1 + S2hist1 + S3hist1 + S4hist1 + S5hist1

#総和に対して対数を取る
log10_AllHist = np.log10(SampleAllHist)

#Sample1 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)

```

```

fig1 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig1.suptitle("Sample1_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, S1hist1)
fig1.savefig(output_dir + "/S1ROI1.jpg")

#Sample2 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig7 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig7.suptitle("Sample2_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, S2hist1)
fig7.savefig(output_dir + "/S2ROI1.jpg")

#Sample3 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig13 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig13.suptitle("Sample3_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, S3hist1)
fig13.savefig(output_dir + "/S3ROI1.jpg")

#Sample4 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig19 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig19.suptitle("Sample4_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)

```

```
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, S4hist1)
fig19.savefig(output_dir + "/S4ROI1.jpg")
```

```
#Sample5 のグラフ処理
```

```
#グラフの作成 ROI1
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig25 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig25.suptitle("Sample5_ROI-1", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, S5hist1)
fig25.savefig(output_dir + "/S5ROI1.jpg")
```

```
#Sample1 から Sample5 までの全てのヒストグラム
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig31 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig31.suptitle("Glomerulus_SampleAll_Histogram", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 1100)
plt.plot(x, SampleAllHist)
fig31.savefig(output_dir + "/SampleAllHist.jpg")
```

```
#Sample1 から Sample5 までの全てのヒストグラムに対数を取る
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig32 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig32.suptitle("Glomerulus_SampleAll_Histogram", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Log_Number of pixels", fontsize=15)
plt.plot(x, log10_AllHist)
fig32.savefig(output_dir + "/LogSampleAllHist.jpg")
```

```

#2 次関数にフィッティング
# x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
# fitting = np.polyfit(x, log10_AllHist, 2)
# print(fitting)
## 得られたパラメータ ak からカーブフィット後の波形を作成
# y_fit = fitting[0] * x ** 2 + fitting[1] * x + fitting[2]
# fig33 = plt.figure(figsize=(8, 6))
# fig33.suptitle("QuadraticFunction" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
# plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
# plt.ylabel("Log_Number of pixels", fontsize=15)
# plt.plot(x, y_fit)
# fig33.savefig(output_dir + "/QuadraticFunction.jpg")

# def func2(param,x,y):
#     residual = y - (param[0]*x**2 + param[1]*x + param[2])
#     return residual
# x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)

# param_ini = [3,125,5]
# popt, pcov = curve_fit(func2, bins, log10_AllHist, p0=param_ini)
# print(popt)
# fitting = func(bins, popt[0],popt[1],popt[2])
#糸球体セグメント領域を描画
#Sample1 の描画
#ROI1
cv2.rectangle(da1,
               pt1=(92, 303),
               pt2=(242, 378),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss1 = da1[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample1Seg.jpg", imgss1)

#Sample2 の描画

```

```
#ROI1
cv2.rectangle(da2,
               pt1=(252, 183),
               pt2=(402, 258),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss2 = da2[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample2Seg.jpg", imgss2)
```

#Sample3 の描画

```
#ROI1
cv2.rectangle(da3,
               pt1=(330, 162),
               pt2=(480, 237),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss3 = da3[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample3Seg.jpg", imgss3)
```

#Sample4 の描画

```
#ROI1
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(385, 244),
               pt2=(535, 319),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss4 = da4[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample4Seg.jpg", imgss4)
```

#Sample5 の描画


```
#ROI1
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(146, 281),
               pt2=(296, 356),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss5 = da5[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample5Seg.jpg", imgss5)
```

②糸球体の領域抽出

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import math, cv2
from cv2_rolling_ball import subtract_background_rolling_ball
import csv
import os
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
from PIL import Image, ImageOps
from matplotlib import cm

input_dir = "./echo_current_0827"
output_dir = "./echo_output_0827"
os.makedirs(output_dir, exist_ok=True)

# 画像読み込み
# org_img1 = Image.open(input_dir + "/1.jpg")
# org_img2 = Image.open(input_dir + "/2.jpg")
# org_img3 = Image.open(input_dir + "/3.jpg")
# org_img4 = Image.open(input_dir + "/4.jpg")
# org_img5 = Image.open(input_dir + "/5.jpg")
## グレースケール化
# img1 = ImageOps.grayscale(org_img1)
# img2 = ImageOps.grayscale(org_img2)
# img3 = ImageOps.grayscale(org_img3)
# img4 = ImageOps.grayscale(org_img4)
# img5 = ImageOps.grayscale(org_img5)
## 配列化
# data1 = np.array(img1)
# data2 = np.array(img2)
# data3 = np.array(img3)
# data4 = np.array(img4)
# data5 = np.array(img5)
# data = np.array(org_img1)
```

```

#data = np.array(img1)
#imgs = data[75 : 599, 50 : 799]

#カラー画像で読み込み
da1 = cv2.imread(input_dir + "/1.jpg")
da2 = cv2.imread(input_dir + "/2.jpg")
da3 = cv2.imread(input_dir + "/3.jpg")
da4 = cv2.imread(input_dir + "/4.jpg")
da5 = cv2.imread(input_dir + "/5.jpg")

#グレースケール化
data1 = cv2.cvtColor(da1, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data2 = cv2.cvtColor(da2, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data3 = cv2.cvtColor(da3, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data4 = cv2.cvtColor(da4, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
data5 = cv2.cvtColor(da5, cv2.COLOR_BGR2GRAY)

#エコー情報以外をトリミング
#グレーのトリミング
imgs1 = data1[75 : 599, 50 : 799]
imgs2 = data2[75 : 599, 50 : 799]
imgs3 = data3[75 : 599, 50 : 799]
imgs4 = data4[75 : 599, 50 : 799]
imgs5 = data5[75 : 599, 50 : 799]

#sample1
S1ROI1 = data1[237:242, 118:123]
S1ROI2 = data1[254:259, 200:205]
S1ROI3 = data1[290:295, 499:504]
S1ROI4 = data1[272:277, 546:551]
S1ROI5 = data1[243:248, 649:654]

#sample2
S2ROI1 = data2[324:329, 632:637]
S2ROI2 = data2[401:406, 122:127]

```

```
S2ROI3 = data2[209:214, 105:110]
```

```
S2ROI4 = data2[144:149, 177:182]
```

```
S2ROI5 = data2[333:338, 779:784]
```

```
#sample3
```

```
S3ROI1 = data3[175:180, 105:110]
```

```
S3ROI2 = data3[145:150, 168:173]
```

```
S3ROI3 = data3[134:139, 266:271]
```

```
S3ROI4 = data3[226:231, 693:698]
```

```
S3ROI5 = data3[296:301, 713:718]
```

```
#sample4
```

```
S4ROI1 = data4[206:211, 130:135]
```

```
S4ROI2 = data4[342:347, 181:186]
```

```
S4ROI3 = data4[436:441, 223:228]
```

```
S4ROI4 = data4[273:278, 606:611]
```

```
S4ROI5 = data4[406:411, 590:595]
```

```
#sample5
```

```
S5ROI1 = data5[154:159, 52:57]
```

```
S5ROI2 = data5[178:183, 311:316]
```

```
S5ROI3 = data5[242:247, 271:276]
```

```
S5ROI4 = data5[220:225, 609:614]
```

```
S5ROI5 = data5[346:351, 684:689]
```

```
## numpy でヒストグラムの算出
```

```
S1hist1, bins = np.histogram(S1ROI1.ravel(),256,[0,256])
```

```
S1hist2, bins = np.histogram(S1ROI2.ravel(),256,[0,256])
```

```
S1hist3, bins = np.histogram(S1ROI3.ravel(),256,[0,256])
```

```
S1hist4, bins = np.histogram(S1ROI4.ravel(),256,[0,256])
```

```
S1hist5, bins = np.histogram(S1ROI5.ravel(),256,[0,256])
```

```
S1histSUM = S1hist1 + S1hist2 + S1hist3 + S1hist4 + S1hist5
```

```
S2hist1, bins = np.histogram(S1ROI1.ravel(),256,[0,256])
```

```
S2hist2, bins = np.histogram(S2ROI2.ravel(),256,[0,256])
```

```
S2hist3, bins = np.histogram(S2ROI3.ravel(),256,[0,256])
```

```

S2hist4, bins = np.histogram(S2ROI4.ravel(),256,[0,256])
S2hist5, bins = np.histogram(S2ROI5.ravel(),256,[0,256])
S2histSUM = S2hist1 + S2hist2 + S2hist3 + S2hist4 + S2hist5

S3hist1, bins = np.histogram(S3ROI1.ravel(),256,[0,256])
S3hist2, bins = np.histogram(S3ROI2.ravel(),256,[0,256])
S3hist3, bins = np.histogram(S3ROI3.ravel(),256,[0,256])
S3hist4, bins = np.histogram(S3ROI4.ravel(),256,[0,256])
S3hist5, bins = np.histogram(S3ROI5.ravel(),256,[0,256])
S3histSUM = S3hist1 + S3hist2 + S3hist3 + S3hist4 + S3hist5

S4hist1, bins = np.histogram(S4ROI1.ravel(),256,[0,256])
S4hist2, bins = np.histogram(S4ROI2.ravel(),256,[0,256])
S4hist3, bins = np.histogram(S4ROI3.ravel(),256,[0,256])
S4hist4, bins = np.histogram(S4ROI4.ravel(),256,[0,256])
S4hist5, bins = np.histogram(S4ROI5.ravel(),256,[0,256])
S4histSUM = S4hist1 + S4hist2 + S4hist3 + S4hist4 + S4hist5

S5hist1, bins = np.histogram(S5ROI1.ravel(),256,[0,256])
S5hist2, bins = np.histogram(S5ROI2.ravel(),256,[0,256])
S5hist3, bins = np.histogram(S5ROI3.ravel(),256,[0,256])
S5hist4, bins = np.histogram(S5ROI4.ravel(),256,[0,256])
S5hist5, bins = np.histogram(S5ROI5.ravel(),256,[0,256])
S5histSUM = S5hist1 + S5hist2 + S5hist3 + S5hist4 + S5hist5

#ヒストグラムの総和
SampleAllHist = S1histSUM + S2histSUM + S3histSUM + S4histSUM + S5histSUM

#総和に対して対数を取る
log10_AllHist = np.log10(SampleAllHist)

# ヒストグラムの中身表示
print(S1hist1)
print(S1hist2)
print(S1hist3)

```

```
print(S1hist4)
print(S1hist5)
print(S1histSUM)
print(S2hist1)
print(S2hist2)
print(S2hist3)
print(S2hist4)
print(S2hist5)
print(S2histSUM)
```

```
#Sample1 のグラフ処理
```

```
#グラフの作成 ROI1
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig1 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig1.suptitle("Sample1_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S1hist1)
fig1.savefig(output_dir + "/S1ROI1.jpg")
```

```
##グラフの作成 ROI2
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig2 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig2.suptitle("Sample1_ROI-2" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S1hist2)
fig2.savefig(output_dir + "/S1ROI2.jpg")
```

```
##グラフの作成 ROI3
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig3 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig3.suptitle("Sample1_ROI-3" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
```

```

plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S1hist3)
fig3.savefig(output_dir + "/S1ROI3.jpg")

##グラフの作成 ROI4
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig4 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig4.suptitle("Sample1_ROI-4" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S1hist4)
fig4.savefig(output_dir + "/S1ROI4.jpg")

##グラフの作成 ROI5
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig5 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig5.suptitle("Sample1_ROI-5" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S1hist5)
fig5.savefig(output_dir + "/S1ROI5.jpg")

##グラフの作成総和
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig6 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig6.suptitle("Sample1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 15)
plt.plot(x, S1histSUM)
fig6.savefig(output_dir + "/S1_SUM.jpg")

```

```

#Sample2 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig7 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig7.suptitle("Sample2_ROI-1" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S2hist1)
fig7.savefig(output_dir + "/S2ROI1.jpg")

#グラフの作成 ROI2
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig8 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig8.suptitle("Sample2_ROI-2" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S2hist2)
fig8.savefig(output_dir + "/S2ROI2.jpg")

#グラフの作成 ROI3
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig9 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig9.suptitle("Sample2_ROI-3" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S2hist3)
fig9.savefig(output_dir + "/S2ROI3.jpg")

#グラフの作成 ROI4
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig10 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig10.suptitle("Sample2_ROI-4" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)

```



```

plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S2hist4)
fig10.savefig(output_dir + "/S2ROI4.jpg")

#グラフの作成 ROI5
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig11 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig11.suptitle("Sample2_ROI-5", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S2hist5)
fig11.savefig(output_dir + "/S2ROI5.jpg")

#グラフの作成総和
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig12 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig12.suptitle("Sample2", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 15)
plt.plot(x, S2histSUM)
fig12.savefig(output_dir + "/S2_SUM.jpg")

#Sample3 のグラフ処理
#グラフの作成 ROI1
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig13 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig13.suptitle("Sample3_ROI-1", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S3hist1)

```

```

fig13.savefig(output_dir + "/S3ROI1.jpg")

#グラフの作成 ROI2
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig14 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig14.suptitle("Sample3_ROI-2" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S3hist2)
fig14.savefig(output_dir + "/S3ROI2.jpg")

#グラフの作成 ROI3
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig15 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig15.suptitle("Sample3_ROI-3" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S3hist3)
fig15.savefig(output_dir + "/S3ROI3.jpg")

#グラフの作成 ROI4
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig16 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig16.suptitle("Sample3_ROI-4" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S3hist4)
fig16.savefig(output_dir + "/S3ROI4.jpg")

#グラフの作成 ROI5
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig17 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig17.suptitle("Sample3_ROI-5" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)

```

```
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S3hist5)
fig17.savefig(output_dir + "/S3ROI5.jpg")
```

```
#グラフの作成総和
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig18 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig18.suptitle("Sample3", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 15)
plt.plot(x, S3histSUM)
fig18.savefig(output_dir + "/S3_SUM.jpg")
```

```
#Sample4 のグラフ処理
```

```
#グラフの作成 ROI1
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig19 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig19.suptitle("Sample4_ROI-1", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S4hist1)
fig19.savefig(output_dir + "/S4ROI1.jpg")
```

```
#グラフの作成 ROI2
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig20 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig20.suptitle("Sample4_ROI-2", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S4hist2)
```

```

fig20.savefig(output_dir + "/S4ROI2.jpg")

#グラフの作成 ROI3
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig21 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig21.suptitle("Sample4_ROI-3", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S4hist3)
fig21.savefig(output_dir + "/S4ROI3.jpg")

#グラフの作成 ROI4
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig22 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig22.suptitle("Sample4_ROI-4", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S4hist4)
fig22.savefig(output_dir + "/S4ROI4.jpg")

#グラフの作成 ROI5
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig23 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig23.suptitle("Sample4_ROI-5", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S4hist5)
fig23.savefig(output_dir + "/S4ROI5.jpg")

#グラフの作成総和
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig24 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig24.suptitle("Sample4", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)

```

```
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 15)
plt.plot(x, S4histSUM)
fig24.savefig(output_dir + "/S4_SUM.jpg")
```

```
#Sample5 のグラフ処理
```

```
#グラフの作成 ROI1
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig25 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig25.suptitle("Sample5_ROI-1", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S5hist1)
fig25.savefig(output_dir + "/S5ROI1.jpg")
```

```
#グラフの作成 ROI2
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig26 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig26.suptitle("Sample5_ROI-2", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S5hist2)
fig26.savefig(output_dir + "/S5ROI2.jpg")
```

```
#グラフの作成 ROI3
```

```
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig27 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig27.suptitle("Sample5_ROI-3", x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S5hist3)
```

```

fig27.savefig(output_dir + "/S5ROI3.jpg")

#グラフの作成 ROI4
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig28 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig28.suptitle("Sample5_ROI-4" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S5hist4)
fig28.savefig(output_dir + "/S5ROI4.jpg")

#グラフの作成 ROI5
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig29 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig29.suptitle("Sample5_ROI-5" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 7)
plt.plot(x, S5hist5)
fig29.savefig(output_dir + "/S5ROI5.jpg")

#グラフの作成総和
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig30 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig30.suptitle("Sample5" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 15)
plt.plot(x, S5histSUM)
fig30.savefig(output_dir + "/S5_SUM.jpg")

#Sample1 から Sample5 までの全てのヒストグラム
x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig31 = plt.figure(figsize=(8, 6))

```

```

fig31.suptitle("Glomerulus_SampleAll_Histogram" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=15)
plt.ylim(0, 50)
plt.plot(x, SampleAllHist)
fig31.savefig(output_dir + "/SampleAllHist.jpg")

```

#Sample1 から Sample5 までの全てのヒストグラムに対数を取る

```

x = np.linspace(0, 255, 256, dtype=int)
fig32 = plt.figure(figsize=(8, 6))
fig32.suptitle("Glomerulus_SampleAll_Histogram" , x=0.5, y=0.92, size=15, weight=2)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=15)
plt.ylabel("Log_Number of pixels", fontsize=15)
plt.plot(x, log10_AllHist)
fig32.savefig(output_dir + "/LogSampleAllHist.jpg")

```

#糸球体セグメント領域を描画

#Sample1 の描画

#ROI1

```

cv2.rectangle(da1,
              pt1=(118, 237),
              pt2=(123, 242),
              color=(0, 255, 0),
              thickness=1,
              lineType=cv2.LINE_4,
              shift=0)

```

#ROI2

```

cv2.rectangle(da1,
              pt1=(200, 254),
              pt2=(205, 259),
              color=(0, 255, 0),
              thickness=1,
              lineType=cv2.LINE_4,
              shift=0)

```

#ROI3

```

cv2.rectangle(da1,
               pt1=(499, 290),
               pt2=(504, 295),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

#ROI4
cv2.rectangle(da1,
               pt1=(546, 272),
               pt2=(551, 277),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

#ROI5
cv2.rectangle(da1,
               pt1=(649, 243),
               pt2=(654, 248),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

imgss1 = da1[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample1Seg.jpg", imgss1)
#Sample2 の描画
#ROI1
cv2.rectangle(da2,
               pt1=(632, 324),
               pt2=(637, 329),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

#ROI2
cv2.rectangle(da2,

```



```

        pt1=(122, 401),
        pt2=(127, 406),
        color=(0, 255, 0),
        thickness=1,
        lineType=cv2.LINE_4,
        shift=0)

#ROI3
cv2.rectangle(da2,
              pt1=(105, 209),
              pt2=(110, 214),
              color=(0, 255, 0),
              thickness=1,
              lineType=cv2.LINE_4,
              shift=0)

#ROI4
cv2.rectangle(da2,
              pt1=(177, 144),
              pt2=(182, 149),
              color=(0, 255, 0),
              thickness=1,
              lineType=cv2.LINE_4,
              shift=0)

#ROI5
cv2.rectangle(da2,
              pt1=(779, 333),
              pt2=(784, 338),
              color=(0, 255, 0),
              thickness=1,
              lineType=cv2.LINE_4,
              shift=0)

imgss2 = da2[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample2Seg.jpg", imgss2)
#Sample3 の描画
#ROI1
cv2.rectangle(da3,
              pt1=(105, 175),

```

```
pt2=(110, 180),  
color=(0, 255, 0),  
thickness=1,  
lineType=cv2.LINE_4,  
shift=0)
```

```
#ROI2
```

```
cv2.rectangle(da3,  
pt1=(168, 145),  
pt2=(173, 150),  
color=(0, 255, 0),  
thickness=1,  
lineType=cv2.LINE_4,  
shift=0)
```

```
#ROI3
```

```
cv2.rectangle(da3,  
pt1=(266, 134),  
pt2=(271, 139),  
color=(0, 255, 0),  
thickness=1,  
lineType=cv2.LINE_4,  
shift=0)
```

```
#ROI4
```

```
cv2.rectangle(da3,  
pt1=(693, 226),  
pt2=(698, 231),  
color=(0, 255, 0),  
thickness=1,  
lineType=cv2.LINE_4,  
shift=0)
```

```
#ROI5
```

```
cv2.rectangle(da3,  
pt1=(713, 296),  
pt2=(718, 301),  
color=(0, 255, 0),  
thickness=1,  
lineType=cv2.LINE_4,
```

```

        shift=0)
imgss3 = da3[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample3Seg.jpg", imgss3)
#Sample4 の描画
#ROI1
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(130, 206),
               pt2=(135, 211),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI2
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(181, 342),
               pt2=(186, 347),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI3
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(223, 436),
               pt2=(228, 441),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI4
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(606, 273),
               pt2=(611, 278),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

```

```

#ROI5
cv2.rectangle(da4,
               pt1=(590, 406),
               pt2=(595, 411),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
imgss4 = da4[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample4Seg.jpg", imgss4)
#Sample5 の描画
#ROI1
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(52, 154),
               pt2=(57, 159),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI2
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(311, 178),
               pt2=(316, 183),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI3
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(271, 242),
               pt2=(276, 247),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)
#ROI4

```

```
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(609, 220),
               pt2=(614, 225),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

#ROI5
cv2.rectangle(da5,
               pt1=(684, 346),
               pt2=(689, 351),
               color=(0, 255, 0),
               thickness=1,
               lineType=cv2.LINE_4,
               shift=0)

imgss5 = da5[75 : 599, 50 : 799]
cv2.imwrite(output_dir + "/Sample5Seg.jpg", imgss5)
```

③皮質・糸球体の計測(カウント)

```
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import math, cv2
from cv2_rolling_ball import subtract_background_rolling_ball
import csv
import os
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
from PIL import Image, ImageOps
from matplotlib import cm

input_dir = "./echo_current_0827"
output_dir = "./echo_output_0827"
os.makedirs(output_dir, exist_ok=True)

def adjust(img, alpha=2.0, beta=0.0):
    # 積和演算を行う。
    dst = alpha * img + beta
    # [0, 255] でクリップし、uint8 型にする。
    return np.clip(dst, 0, 255).astype(np.uint8)

def draw_contours(closing, contours2, ax):
    """輪郭の点及び線を画像上に描画する。
    """
    ax.imshow(closing)
    ax.set_axis_off()

    for i, cnt in enumerate(contours2):
        # 形状を変更する。(NumPoints, 1, 2) -> (NumPoints, 2)
        cnt = cnt.squeeze(axis=1)
        # 輪郭の点同士を結ぶ線を描画する。
        ax.add_patch(plt.Polygon(cnt, color="b", fill=None, lw=0.5))
        # 輪郭の点を描画する。
        ax.plot(cnt[:, 0], cnt[:, 1], "ro", mew=0, ms=1)
```

```

# 画像読み込み
org_img = Image.open(input_dir + "/3.jpg")
# グレースケール化
img = ImageOps.grayscale(org_img)
# 配列化
data = np.array(img)
imgs = data[75 : 599, 50 : 799]

# データ表示
fig = plt.figure()
ax = fig.add_subplot(111, projection='3d')
X,Y = np.mgrid[:imgs.shape[0], :imgs.shape[1]]
surf = ax.plot_surface(X, Y, imgs, cmap=cm.jet,
                      linewidth=0, antialiased=False)
ax = plt.gca(projection='3d')
ax.plot_surface(X,Y,imgs,cmap=cm.jet,edgecolor=None,rcount=15,ccount=15)
fig.colorbar(surf, shrink=0.5, aspect=5)
plt.show()
# img.png という画像を保存しています。
fig.savefig(output_dir + "/test.png")

## numpy でヒストグラムの算出
hist, bins = np.histogram(imgs.ravel(),256,[0,256])

##対数を取る
log10_hist = np.log10(hist)
# ヒストグラムの中身表示
print(log10_hist)
# グラフの作成
plt.xlim(0, 255)
plt.plot(log10_hist)
plt.xlabel("Pixel value", fontsize=10)
plt.ylabel("Number of pixels", fontsize=10)
plt.grid()

```

```

# ヒストグラムのグラフを保存
plt.savefig(output_dir + "/test.jpg")

imgu, background = subtract_background_rolling_ball(imgs, 300, light_background=False,
                                                    use_paraboloid=False, do_presmooth=True)
# gaussian blurring with a 5x5 kernel
cups_preprocessed = cv2.GaussianBlur(imgu, (5,5), 15)

#Original 画像を出力
cv2.imwrite(output_dir + "/Oritest.jpg", imgs)
#前処理終了後の画像を出力
cv2.imwrite(output_dir + "/Pretest.jpg", cups_preprocessed)

#####皮質の抽出#####
# 閾値の設定
threshold = 50

# 二値化(閾値 60 を超えた画素を 255 にする。)
ret, img_thresh = cv2.threshold(cups_preprocessed, threshold, 255, cv2.THRESH_BINARY)

# カーネルを作成する。
kernel = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_ELLIPSE, (9, 9))
#収縮
syuku = cv2.erode(img_thresh, kernel)
#膨張
bou = cv2.dilate(syuku, kernel)

# クロージングカーネルを作成する。
kernel2 = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_ELLIPSE, (5, 5))
#closing
closing = cv2.morphologyEx(bou, cv2.MORPH_CLOSE, kernel2)

#皮質抽出後の画像を出力
cv2.imwrite(output_dir + "/Region3.jpg", closing)

#####糸球体の抽出#####

```



```

# 閾値の設定
thresholds =130

# 二値化(閾値 130 を超えた画素を 255 にする。)
ret, img_threshs = cv2.threshold(cups_preprocessed, thresholds, 255, cv2.THRESH_BINARY)
#収縮
syukus = cv2.erode(img_threshs, kernel)
#膨張
bous = cv2.dilate(syukus, kernel)
#closing
closings = cv2.morphologyEx(bous, cv2.MORPH_CLOSE, kernel2)

#糸球体抽出後の画像を出力
cv2.imwrite(output_dir +"/Glomerulus3.jpg",img_threshs)

# 輪郭を抽出する。
contours, hierarchy = cv2.findContours(
    img_threshs, cv2.RETR_EXTERNAL, cv2.CHAIN_APPROX_SIMPLE
)
#100 micro~200 micro
#contours2 = list(filter(lambda x: 22 >= cv2.contourArea(x) >= 5, contours))
#80micro~220micro
contours2 = list(filter(lambda x: 27 >= cv2.contourArea(x) >= 3, contours))
#80 micro~120micro
#contours2 = list(filter(lambda x: 7 >= cv2.contourArea(x) >= 3, contours))
#80micro~200micro
#contours2 = list(filter(lambda x: 22 >= cv2.contourArea(x) >= 3, contours))
for s, cnt in enumerate(contours2):
    # 輪郭の面積を計算する。
    area = cv2.contourArea(cnt)
    print(f'contour: {s}, area: {area}')

fig, ax = plt.subplots(figsize=(5, 5))
draw_contours(img_threshs, contours2, ax)
plt.show()
fig.savefig(output_dir + "/Glo_count3.jpg")

```

```
with open(output_dir + '/Glomerulus3.csv', 'w') as f:
    for i, cnt in enumerate(contours2):
        # 輪郭の面積を計算する。
        area = cv2.contourArea(cnt)
        writer = csv.writer(f)
        writer.writerow([f'{area}'])
```