

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16285

研究課題名(和文)肝移植における常温酸素化灌流のグラフト肝保存効果の研究

研究課題名(英文) Study on the preservation effect of normothermic oxygenated perfusion in liver transplantation.

研究代表者

岡田 憲樹 (Okada, Noriki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：40611786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外液型電解質組成、糖濃度、アミノ酸濃度を調整した灌流液に、酸素運搬体としてブタ血液を0%、10%、30%、50%配合した灌流液を用いて、12時間の常温酸素化灌流保存実験を行った。酸素運搬体としてブタ血液配合濃度増加に伴って、灌流中のブタ肝の重量増加が明らかに抑えられる結果となった。ブタ血液配合濃度が0%のときはブタ肝は12時間の常温酸素化灌流後に 1.34 ± 0.06 倍へ重量増加がみられたが、血液配合濃度を50%まで増加させると 1.03 ± 0.04 倍まで抑制することができた。また病理学的にもブタ血液配合濃度増加に伴って類洞の拡張が抑えられており浮腫改善を示唆する所見であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、世界的な臓器不足を背景として移植可能な臓器を増加させる研究が求められている。肝移植におけるドナーは、生体ドナー、脳死ドナー、心停止ドナーの3種類があるが、心停止ドナーからの提供される肝グラフトは、ドナーの心停止後からグラフト摘出までの温阻血時間の影響のため移植後早期グラフト機能不全のリスクが高く、現在は利用されていない。脳死肝移植待機中に亡くなる患者も少なくなく、そのような患者に移植可能なグラフト供給数の確保が急務となっている。常温酸素化保存技術が進めば、これまで使用できなかった心停止ドナーグラフトや脂肪肝グラフトの使用ができるようになり、移植可能な臓器を増加させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A 12-hour normothermic oxygen perfusion experiment was conducted using perfusion solutions with adjusted extracellular fluid-type electrolyte composition, glucose and amino acid concentrations, and porcine blood as oxygen carrier at 0%, 10%, 30% and 50% concentrations. The results showed that the increase in porcine liver weight during perfusion was significantly reduced with increasing concentrations of porcine blood as oxygen carrier. At a porcine blood concentration of 0%, pig liver weight increased 1.34 ± 0.06 -fold after 12 h of normothermic oxygen perfusion, but decreased to 1.03 ± 0.04 -fold when the blood concentration increased to 50%. Pathology showed that the expansion of the sinusoids was suppressed with increasing porcine blood concentration, suggesting an improvement in edema.

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 常温酸素化灌流 グラフト保存

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な臓器不足を背景として、移植可能な臓器を増加させる研究が求められている。肝移植においては、生体ドナー、脳死ドナー、心停止ドナーから提供されるグラフトがあるが、心停止ドナーから提供されるグラフトは、心停止後からグラフト摘出までの温阻血時間の影響のため移植後早期グラフト機能不全のリスクが高く、海外のごく一部の施設でしか利用されていない。現在臨床ではグラフト肝の保存は単純冷保存法が用いられているが、生体内の条件に近い常温酸素化灌流保存技術が確立されれば、グラフトの質の改善を図ることができ、心停止ドナーグラフトの利用や脳死分割肝移植への応用が期待される。しかし常温酸素化灌流はこれまでの単純冷保存法に比較して灌流温、灌流圧、灌流液など調整が必要なパラメーターが多く、本邦では未だ実用化されていない。

2. 研究の目的

現在、脳死ドナーからの肝グラフト保存は、化学保存液(UW液)による冷却保存が実用されているが、この方法では、虚血および再灌流障害から生じる肝細胞障害のため、摘出から移植までの保存時間は最大12時間とされている。常温酸素化灌流によるグラフト肝保存効果は、マージナルグラフトとされる心停止肝移植において、グラフトの質の向上や、臓器保存時間の延長が期待されている。

当研究室においても、常温酸素化灌流保存に注目し、その応用的利用として、常温酸素化灌流装置を用いた分割肝移植について平成26~27年にかけて実験を行った。脳死ドナーから摘出した肝グラフトを用いた分割肝移植は、1つのグラフトから2人のレシピエントを救命できる優れた方法だが、冷保存下での体外肝分割操作は冷阻血時間の延長からグラフトの質を落とす一因となり、その適応は限られている。そのため本邦においても欧米においても脳死ドナーからの肝グラフトを分割して移植するのは10%以下となっている。そこでブタ肝を用いて、常温酸素化灌流の高いグラフト保存効果を用いて体外肝分割を行い、分割した肝を用いて異所性肝移植を行うことにより、その応用的利用について検討した。当研究室で開発した常温酸素化灌流装置は肝動脈、門脈より酸素化した灌流液を灌流し、肝静脈より灌流液を回収し、灌流液ボトルへ戻している。灌流液は肝細胞培養液として用いられるLeibovitz L15培地に酸素運搬体としてブタ血液を10%配合したものを用意した。常温酸素化灌流を用いた分割肝移植実験の結果は、冷保存群においては、肝グラフトにおいて肝静脈周囲の肝細胞脱落および、細胞の壊死を示唆する核の濃縮像を認めたと、常温酸素化灌流群においては、そのような所見を認めず、常温酸素化灌流保存の有用性を確認し、Transplantation Proceedings 誌に発表した(Okada N et al. Transplant Proc. 2015 Mar;47(2):419-26)。

一方で、その常温酸素化灌流における不安定性も認めた。この灌流液を用いた灌流においては、灌流中の肝グラフトは徐々に浮腫を認め、病理学的には類洞の拡張を認めた。そこで、灌流中の細胞の活動を確認するために、常温酸素化灌流におけるアミノ酸代謝について検討した。この実験では、上記実験と同様に酸素運搬体としてブタ血液を10%配合した灌流液を用いてブタ肝グラフトを常温酸素化灌流で5時間保存し、その前後でアミノ酸を測定した。その結果、肝臓の主な仕事の一つである窒素代謝を示唆する尿素窒素の上昇と、すべての必須アミノ酸の消費を認め、常温酸素化灌流においてその細胞の活動を確認した。この実験において、常温酸素化灌流中の細胞の活動を確認したので、次に冷阻血では必要とされていない酸素運搬体の必要性および、その濃度による保存効果の検討が必要であると考えられる。これらの諸条件を最適化することで、冷保存技術の限界とされる12時間を超える常温酸素化灌流保存の後に同所性肝移植をブタで成功させることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

基本灌流液は細胞外液型電解質組成の溶媒にアミノ酸とブドウ糖を溶解して作成する。そこに酸素運搬体として混注するブタ血液の濃度を0%、10%、30%、50%と段階的に引き上げていき、その保存効果を検討していく。また、保存効果が高かった酸素運搬体濃度において、灌流液中の酸素分圧を100-200、200-300、300-400mmHgと段階的に引き上げていき適切な酸素分圧を検索していく。常温酸素化灌流においては、酸素運搬体濃度が高すぎれば血栓症を引き起こすリスクが高く、一方で低すぎれば酸欠状態により肝グラフトの障害を来すリスクがある。その保存効果の評価については、肝細胞の破壊を示唆する灌流液の肝逸脱酵素(AST、ALT)の変化や、酸素消費量の変化、病理学的検討(肝細胞脱落および肝細胞核の濃縮、肝再灌流障害のスコアリング評価であるSuzuki's score)、胆汁排泄量、浮腫による重量変化など、実際に臨床で用いる際に、肝移植の現場において応用可能なものを重点的に検討していく。また、IL-6やTNFなど炎症反

応を反映するマーカーの測定や灌流前後のアミノ酸を測定し、その保存効果を検討していく。まず心停止ドナーの想定のもと、実験用ドナーブタから心停止後速やかに肝動脈、門脈、胆管、肝静脈を処理し摘出した肝臓を、冷保存（臨床で行われている UW 液を用いた単純冷保存）あるいは常温酸素化灌流において一定時間保存し、保存効果を検討する。

4 . 研究成果

実験計画に従いブタ肝灌流実験を行った。いずれの実験も細胞外液型電解質組成、糖濃度、アミノ酸濃度を調整した灌流液に抗凝固薬としてヘパリンを混注した灌流液に、酸素運搬体としてブタ血液を 0%、10%、30%、50% 配合した灌流液を用いて、12 時間の常温酸素化灌流保存実験を行った。いずれの実験も 12 時間の常温酸素化保存観察においてトラブルなく終了した。

以前に行った実験結果を加えて解析したところ、酸素運搬体としてブタ血液配合濃度増加に伴って、灌流中のブタ肝の重量増加が明らかに抑えられる結果となった。ブタ血液配合濃度が 0% のときはグラフトを想定したブタ肝は 12 時間の常温酸素化灌流後に 1.34 ± 0.06 倍へ重量増加がみられたが、血液配合濃度を 50% まで増加させると 1.03 ± 0.04 倍まで抑制することができた。また、病理学的にも、ブタ血液配合濃度増加に伴って類洞の拡張が抑えられており浮腫改善を示唆する所見であった。

現在はこの所見をもとに、学会発表を行い、論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田憲樹、寺谷工、眞田幸弘、大西康晴、菱川修司、佐久間康成、佐田尚宏
2. 発表標題 ブタ肝常温酸素化灌流保存における酸素運搬体の必要性について
3. 学会等名 第46回臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------