

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861101

研究課題名(和文) 常温酸素化還流装置を用いた死体分割肝移植の臨床応用への研究

研究課題名(英文) A novel split liver protocol using the subnormothermic oxygenated circuit system in a marginal donor procedure

研究代表者

岡田 憲樹 (Okada, Noriki)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：40611786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：当初の研究目的である新たな肝分割プロトコルを考案することを目標に研究を行った。まず常温酸素化灌流の適切な保存条件の検索として常温酸素化灌流における酸素運搬体の必要性について検討し、酸素運搬体を配合した方がグラフト保存効果が高いことが示唆された。そこで、この常温酸素化灌流装置を用いて、脳死ドナータモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植法について検討を行った。その結果、現在臨床で行われている冷保存を用いた分割肝移植法に比較して、常温酸素化灌流装置を用いた方がグラフト保存効果が高いことが示唆された。この技術により脳死ドナーグラフト不足が解消されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was performed with the goal of devising a new split liver protocol. First, as the research of appropriate condition of subnormothermic oxygenated perfusion, the necessity of the oxygen carrier was examined. It is suggested that the oxygen carrier makes higher graft preservative effect. Second, a novel split liver protocol using the subnormothermic oxygenated circuit system in a porcine model was performed. This study revealed that the subnormothermic oxygenated circuit system is more effective than cold storage which has been used in clinical situation in split liver protocol. This protocol may help to overcome the lack of brain-death donor liver graft.

研究分野：肝移植

キーワード：常温酸素化灌流 肝移植 臓器保存 分割肝移植

1. 研究開始当初の背景

2010年7月より本邦で改正臓器移植法が施行され、15歳以下の小児からの臓器提供が可能になった。しかしながら2012年12月時点(日本臓器移植ネットワーク発表)、15歳未満の小児脳死ドナーは2例であり、小児脳死移植の困難さを物語っている。従って、日本での小児の脳死移植は、分割肝移植に委ねるしかないが、多くの移植施設は、分割肝移植に消極的である。分割肝移植は1つの臓器から2人の患者を救命できる効果的な方法であるが、肝臓の分割操作を伴うその技術的難易度は高い。研究開始当初より現在も大きく状況は変化していないが、脳死肝移植における分割肝移植はおよそ7%程度しか施行されていない。一方で、脳死肝グラフトは不足しており、毎年多くの患者が肝移植を受けられずに死亡している。

2. 研究の目的

近年、世界的な臓器不足を背景に、マージナルグラフトの利用を目的とした常温酸素化灌流が注目されている。本邦でも脳死グラフトが不足しており、生体グラフト提供が困難な場合は、待機中に死亡する症例も少なくない。小児でも同様だが、本邦では小児脳死ドナーの臓器提供は少なく、成人脳死ドナーの分割肝移植が小児脳死肝移植のグラフト源となっている。脳死分割肝移植は、1つの肝臓から2人を救命できる効果的な方法だが、現在臨床で行われている単純冷却保存下肝分割は primary non-function のリスクから、その適応条件は制限されている。そこで、常温酸素化灌流のさらなる有用性の検討として常温酸素化灌流装置を用いた脳死分割肝移植法について検討した。

3. 研究の方法

実験 常温酸素化灌流における酸素運搬体の必要性についての検討
常温酸素化灌流を用いた分割肝移植には、より臓器保存効果の高い常温酸素化灌流装置が必要不可欠である。しかし、これまで臨床で行われてきた冷保存とは概念を逸するため、その保存条件について検討する必要がある。常温酸素化灌流における保存条件のキーポイントは酸素化であると考え、酸素運搬体の必要性について検討した。
脳死ドナーを想定したブタからグラフト肝を摘出し、常温酸素化灌流を行12時間行い、その間のグラフトの状態について観察した。常温酸素化灌流において、酸素運搬体としてドナーブタ全血を10%含む灌流液を用いるモデルとドナーブタ全血を含まない灌流液を用いるモデルを作成し比較した。

実験 常温酸素化灌流中のアミノ酸代謝についての検討

実験 において酸素運搬体の必要性について確認したので、さらに、その保存中のアミ

ノ酸代謝について検討した。

脳死ドナーを想定しブタからグラフト肝を摘出し、実験で用いた常温酸素化灌流装置を用いて、常温酸素化灌流を5時間行い、その間のアミノ酸濃度の変化について検討した。

実験 脳死ドナーブタモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植法についての検討

ドナーとしてマイクロミニブタ、レシピエントとして三元雑種ブタを用いて、脳死ドナーを想定し肝摘出後、分割肝を用いた異所性肝移植実験を行った。冷保存群(n=5)と常温酸素化灌流群(n=5)に分け、肝グラフトを100分間保存し、保存中50分が経過した時点で肝分割を行った。保存後は異所性肝移植を施行し、12時間観察した。

常温酸素化灌流

灌流液は酸素運搬体としてブタ全血を10%混注した肝細胞培養液を用いた。灌流液は酸素化し、門脈から5-10mmHg、肝動脈から20-30mmHgで灌流した。肝グラフトは20の生理食塩水に浮かべて保存した。

レシピエント手順

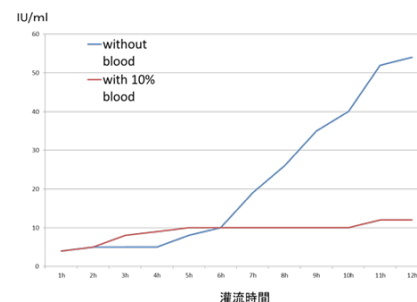
レシピエントブタは、右腎を摘出し、肝グラフトの肝下部大静脈を右腎静脈へ、肝動脈を右腎動脈へ、門脈はレシピエントブタの門脈へ吻合した。その後全身麻酔を維持し、12時間生存実験とした。

4. 研究成果

実験

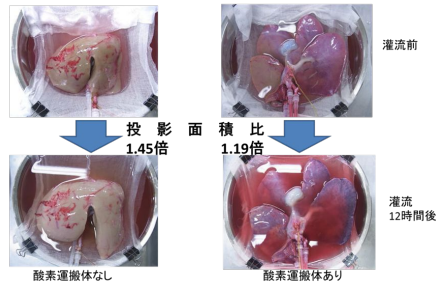
灌流液中の肝逸脱酵素は灌流開始後6時間まではどちらのモデルも上昇無く経過していたが、7時間後より酸素運搬体を配合していないモデルでは上昇傾向を認めた。一方、酸素運搬体を配合したモデルではその後も上昇傾向は認めなかった。

灌流液中の肝逸脱酵素



肉眼的浮腫については、酸素運搬体を配合しなかったモデルでは投影面積比 1.45 倍へ膨化したが、酸素運搬体を配合したモデルでは 1.19 倍であった。

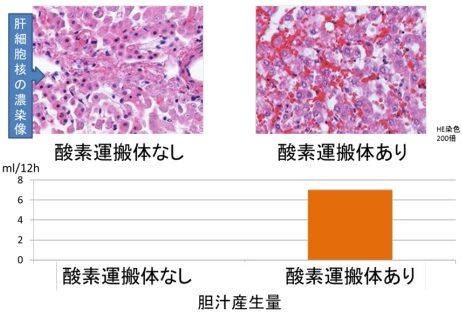
肉眼的所見



また、酸素運搬体を配合しなかったモデルは胆汁産生を認めなかったのに対し、酸素運搬体を配合したモデルでは 7ml/12 時間の胆汁産生を認めた。

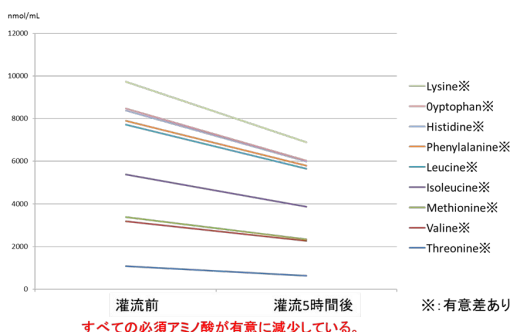
病理学的評価では、酸素運搬体を配合しなかったモデルは肝細胞の核濃縮像を認めたが、酸素運搬体を配合したモデルでは認めなかった。

灌流12時間後の組織所見と胆汁産生



実験

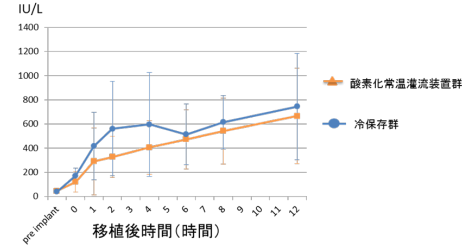
測定したアミノ酸は、有意に上昇したものが 6 種類、有意ではないが上昇したものが 11 種類、有意に低下したものが 15 種類、変化がなかったものが 9 種類であった。すべての必須アミノ酸は有意な低下を認めた。尿素サイクルに関わるアミノ酸では、尿素、オルニチンは有意に上昇したが、アルギニンは有意に低下していた。本実験の結果では、特に必須アミノ酸が有意に低下し、また尿素も有意に上昇しており、常温酸素化灌流において、肝グラフトはアミノ酸を代謝していることが示された。



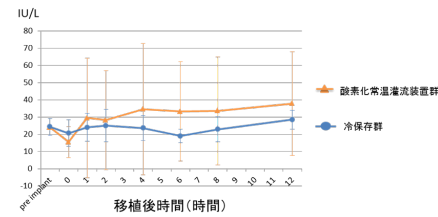
実験

血液検査：異所性肝移植後 12 時間の肝逸脱酵素は有意な差を認めなかった。

AST



ALT

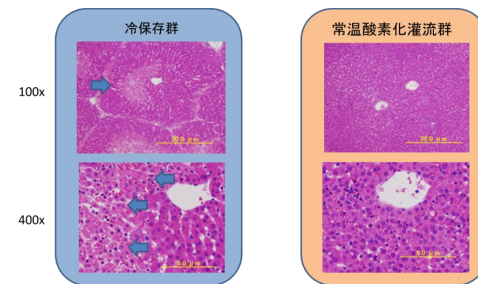


病理学的評価

H-E 染色

異所性肝移植術後 12 時間後において、常温酸素化灌流群では大きな変化がなかったが、冷保存群では肝静脈周囲の肝細胞脱落と核の濃縮像が観察された。Suzuki's score は異所性肝移植 12 時間後において、冷保存群は 5.8 ± 1.1 に対し常温酸素化灌流群では 3.6 ± 1.5 と有意に低かった ($p=0.03$)。

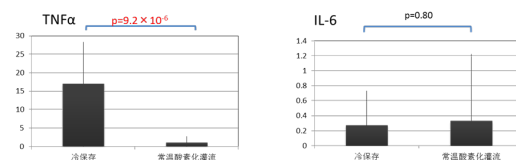
100 分間保存後



免疫染色

100 分間保存後の TNF 陽性細胞数は冷保存群で有意に多かった。IL-6 染色は有意差は認めなかった。異所性肝移植 12 時間後は、いずれも有意差は認めなかった。

免疫染色陽性細胞数



まとめ

今回の実験では、脳死分割肝移植における肝グラフトの保存について常温酸素化灌流の有用性を示した。また肝分割手技において、冷保存群では肝内の脈管を同定しながら分

割することが困難であり肝移植後離断面からの出血コントロールに難渋したが、常温酸素化灌流群においては出血点を同定しながら分割することが可能であり肝移植後離断面からの出血は少量であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Noriki Okada, Koichi Mizuta, Masamitsu Oshima, Naoya Yamada, Yukihiro Sanada, Yoshiyuki Ihara, Taizen Urahashi, Jun Ichikawa, Takashi Tsuji, Shuji Hishikawa, Takumi Teratani, Eiji Kobayashi

A novel split liver protocol using the subnormothermic oxygenated circuit system in a porcine model of a marginal donor procedure, Transplantation Proceedings, 査読あり, 47(2), 2015, 419-426

DOI:

10.1016/j.transproceed.2014.10.053.

〔学会発表〕(計 1 件)

Noriki Okada, Koichi Mizuta, Masamitsu Oshima, Takumi Katano, Yuta Hirata, Naoya Yamada, Yukihiro Sanada, Yoshiyuki Ihara, Taizen Urahashi, Jun Ishikawa, Takashi Tsuji, Shuji Hishikawa, Takumi Teratani, Eiji Kobayashi

Amino acid metabolism as viability assessment of liver grafts in a porcine model during ex vivo normothermic machine perfusion

The Transplantation Society, 2016.8.19-23

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田憲樹 (Okada Noriki)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号: 40611786

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: