

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19908

研究課題名(和文)新規臓器保存液を用いたラット肝臓保存効果の検討について

研究課題名(英文)To develop a novel preservation solution for rat liver graft

研究代表者

重田 孝信(Shigeta, Takanobu)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態外科部・医師

研究者番号：60560331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット同所性肝移植モデルを樹立した上、6、12時間保存の検討を行った結果、再灌流後3時間後のAST、ALT、LDHは、HTK液、UW液群に比してSS-液群での有意な肝障害抑制効果を認めなかった。肝臓保存効果を高めるために、ヒスチジン、PEG、マグネシウム塩、グルタミン酸を添加し、SS-液の改良を行った。その結果改良したSS-液24時間保存で、最長3日間の生存が得られた。しかしながら、同条件下のUW液群では14日以上の結果が得られた。以上の結果より、肝移植におけるSS-液を用いた肝臓保存の有効性は確認出来なかった。肝臓保存にはSS-液の成分を抜本的な成分改良が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In first year, we established the rat orthotopic liver transplantation model. The AST, ALT and LDH after 3 hours of reperfusion in the 6 hours or 12 hours preservation, there is no liver injury suppression effect was observed in the SS-II solution group as compared with the HTK and UW solution group. In the second year, to improve liver preservation effect, we added the histidine, PEG, MgCl₂ and glutamate to the SS-II solution. As a result, survival up to 3 days was obtained in the modified SS-II solution group after 24 hours preservation. However, the survival up to 14 days was obtained in the UW solution group under the same conditions. From the above results, it was impossible to confirm the effectiveness of liver preservation using SS-II preservation solution in the rat liver transplantation model. We conclude that it seems necessary to improve the fundamental component of SS-II solution for liver organ preservation.

研究分野：臓器移植

キーワード：臓器移植 保存液

1. 研究開始当初の背景

臓器移植において虚血再灌流障害は避けることができない合併症である。摘出された臓器は酸素供給がなくなり ATP が低下、細胞膜の Na⁺/K⁺-ATPase の働きが低下するために Na⁺と Cl⁻が濃度勾配に従って水とともに細胞内へ移動し、細胞浮腫を引き起こし、細胞の崩壊へ至る。また移植後に酸素化された血液が再灌流する際に、フリーラジカル(活性酸素)が過剰産生され組織障害を引き起こされる。移植臓器の血管内皮細胞はフリーラジカルの他にも再灌流時にさまざまな炎症性サイトカインを産生することが知られており、局所の炎症反応を惹起する。そのため虚血再灌流障害が移植後の急性拒絶反応や慢性拒絶反応に影響を与えることが報告されている(J Invest Surg. 2014; 27(6):366.)。

冷阻血時間は移植の成否を左右する重要な因子で、心移植においてはドナーの心臓を摘出後 4-5 時間以内に移植する必要がある。比較的虚血時間が長くても移植可能とされる肝移植においても、冷阻血時間が長期予後に影響する重要な因子であることが報告されている(Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2014 Apr;13(2):125)。本邦においては深刻なドナー不足が問題となっており、脳死肝移植を希望して登録した人のうち、実際に本邦で脳死肝移植を受けることができた人は 241 名(12%)に過ぎない(臓器移植ファクトブック 2014)。ドナー不足は日本だけではなく、欧米も同様で、以前は移植の対象にならなかった高齢者、糖尿病患者、肝機能低下患者、心停止後などの患者もドナー候補とされるようになった(マージナルドナー)。そのようなマージナルドナーからの肝移植では、移植しても機能をしないこと(primary nonfunction)も多く、肝機能予後も悪いことが知られている。また、現在本邦の肝移植においては、1980 年代に開発された University of Wisconsin solution (UW 液)を用いた単純浸漬保存法が主流である。

われわれのグループは新たな臓器保存液である SBI-Seiku solution (SS-液:特許 6292640)を開発し、安価で作成も容易な日本発の臓器保存液として将来の臨床応用を目指している。まず第一歩として、マウス心移植モデルで SS-液の有効性について検証した(Transplantation. 2016;100(5):1032)。C57BL/6 (B6: H-2Kb)マウスから心臓を摘出、一般的な心筋保存液である Histidine-Triptophan-Ketoglutarate solution (HTK 液)もしくは SS-液に一定時間単純浸漬保存し、同系レシピエントの腹部に移植した。HTK 液もしくは SS-液に 24 時間保存後に移植された心臓はいずれも 100 日以上生着したが、48 時間保存では、HKT 液群で血流再開後も全ての移植心の心拍が再開しなかったのに対し、SS-群では約 7 割の移植心が 100 日以上拍動を続けた。

24 時間保存後に移植した心臓グラフトを再度摘出し解析したところ、HKT 液群と比較して、SS-液群では酸化ストレスが抑制され、マクロファージや好中球の浸潤が軽減、炎症性サイトカインの産生が抑制されていることを確認した。

2. 研究の目的

マウス心移植モデルでは、固有心はそのままにドナー心臓を腹部に移植、体表から拍動を触知して生着期間を評価しており、実際の心機能を評価することは難しい。一方、ラット肝移植モデルでは固有肝を摘除するため、AST/ALT、 γ -GTP 等の測定などにより、移植した肝臓の機能を正確に評価することが可能である。申請者を含むわれわれのグループはこれまでに虚血再灌流障害に対し水素ガスが有効であることに着目し、ラット腎臓移植モデルにおいて、従来 UW 液による単純浸漬保存法と比較して、水素含有保存液による単純浸漬保存法(Transplantation 2012; 94(1):14-21.)が有用であることを示した。また、ラット小腸虚血再灌流モデルにおいて、腸管内に水素含有液が小腸虚血再灌流障害の軽減に有効であることを示した(Transplantation 2015; 99(3):500-7.)。

本研究はマウス心移植ですでに有効性が確認されている新規臓器保存液である SS-液を、将来の臨床応用に向けて、ラット肝移植モデルで検証することを目的とする。本研究は、UW 液よりも虚血再灌流傷害を軽減し、保存期間の延長、移植肝臓の機能を維持する新たな保存液の開発を目的としている。

3. 研究の方法

ラット同系肝移植モデルにおいて、6、12、24 時間、HTK 液、UW 液もしくは SS-液に単純浸漬保存したドナー肝を移植することにより、SS-液が UW 液と比較し、臓器保存可能時間を延長するか、肝機能を改善するか検討するとともに、SS-液が虚血再灌流障害を軽減する機序を明らかにする。ドナーラットから肝臓を採取し、UW 液もしくは SS-液に単純浸漬保存した後に同系ラットに移植することで、肝臓に対する効果を評価する。また異系肝移植モデルにおいて、SS-液が虚血再灌流障害を軽減することで、その後の免疫反応にどのように影響を与えるかを検討する。

4. 研究成果

初年度では、ラット同所性肝移植モデルを樹立した上、6 時間冷保存(HTK 液 vs SS-液)、再灌流後 3 時間採血において肝逸脱酵素の平均値を比較したところ、AST (395 vs 396), ALT (297 vs 368), LDH (1118 vs 867)となり、いずれも有意差は認めなかった。一方、12 時間保存においては、再灌流後 3 時間後、(UW 液 vs SS-液)、AST (952 vs 2370), ALT (1232 vs 3520), LDH (7400 vs

22480)となり、SS-液群で有意に肝障害を認められた。また、SS-液保存液で行った症例において、胆汁産生不良、ドナー経大動脈灌流時の肝表面、またレシピエント再灌流時の肝表面の所見は灌流不良・障害と考える肉眼的所見を認め、採血データに一致する所見であった。

上記結果を踏まえて、次年度では、浸透圧の調整を含めた肝臓保存効果を高めるために、ヒスチジン、ポリエチレングリコール、マグネシウム塩、グルタミン酸を添加し、SS-液の改良を行った。その結果、改良したSS-液 24 時間保存において、最長 3 日間の生存が得られた。しかしながら、同条件下の UW 液にて 14 日以上保存効果が得られた。

以上より、肝移植モデルにおける SS- 保存液を用いた 6、12、24 時間保存における有効性は得られなかった。これは、本来心臓保存を目的として開発された SS- 保存液は、肝臓保存に適しておらず、抜本的な保存液の成分改良が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

(1) Narumoto S, Sakamoto S, Uchida H, Sasaki K, Shigeta T, Fukuda A, Nosaka S, Irie R, Yoshioka T, Kasahara M. Necrotizing enterocolitis in the setting of milk allergy after pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2018 Feb;22(1). doi: 10.1111/petr.13096.

(2) Shigeta T, Sakamoto S, Sasaki K, Uchida H, Narumoto S, Fukuda A, Kasahara M. Optimizing hepatic venous outflow reconstruction for hepatic vein stenosis with indwelling stent in living donor liver retransplantation. *Pediatr Transplant*. 2017 Dec;21(8). doi: 10.1111/petr.13044

(3) Uchida H, Sakamoto S, Fukuda A, Sasaki K, Shigeta T, Nosaka S, Kubota M, Nakazawa A, Nakagawa S, Kasahara M. Sequential analysis of variable markers for predicting outcomes in pediatric patients with acute liver failure. *Hepatol Res*. 2017 Nov;47(12):1241-1251. doi:10.1111/hepr.12859

(4) Kasahara M, Sakamoto S, Sasaki K, Uchida H, Kitajima T, Shigeta T, Narumoto S, Hirata Y, Fukuda A. Living donor liver transplantation during the first 3 months of life. *Liver Transpl*. 2017 Aug;23(8):1051-1057. doi:10.1002/lt.24743

(5) Sasaki K, Sakamoto S, Uchida H, Narumoto S, Shigeta T, Fukuda A, Ito R, Irie R, Yoshioka T, Murayama K, Kasahara M.

Liver Transplantation for Mitochondrial Respiratory Chain Disorder: A Single Center Experience and Excellent Marker of Differential Diagnosis.

Transplant Proc. 2017 Jun; 49(5): 1097-1102.

doi: 10.1016/j.transproceed.2017.03.065

(6) Kanazawa H, Fukuda A, Sato M, Ishimori S, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Mali VP, Sakamoto S, Ishikura K, Kasahara M.

Successful resumption of peritoneal dialysis following living donor liver transplantation in children with end-stage renal disease.

Pediatr Transplant. 2017 May;21(3).

doi: 10.1111/petr.12897.

(7) Rahayatri TH, Uchida H, Sasaki K, Shigeta T, Hirata Y, Kanazawa H, Mali V, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M.

Hyperammonemia in ornithine transcarbamylase-deficient recipients following living donor liver transplantation from heterozygous carrier donors.

Pediatr Transplant. 2016 Feb;21(1).

doi: 10.1111/petr.12848.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1)北嶋俊寛、阪本靖介、佐々木健吾、内田 孟、重田孝信、成本壮一、福田晃也、笠原群生
葛西手術後胆道閉鎖症に対する生体肝移植の適応・成績と移植後予後不良因子の検討
葛西手術後胆道閉鎖症に対する生体肝移植の適応・成績と移植後予後不良因子の検討
第 72 回日本消化器外科学会総会 2017 年 7 月 20-22 日 (石川)

(2)齊藤順平、石原里美、重田孝信、福田晃也、笠原群生、石川洋一
日本薬剤学会第 32 年会
2017 年 5 月 10-13 日 (埼玉)

(3)重田孝信
各施設における抗体関連拒絶反応の経験
ワーキンググループミーティング・脳死肝移植研究会
2017 年 2 月 3 日 (東京)

(4)福田晃也、佐々木 健吾、内田孟、重田孝信、金澤寛之、成本壮一、鈴木達也、水田耕一、堀川玲子、笠原群生
小児肝移植ドナープール拡大のための脳死分割肝移植・メープルシロップ尿症患者からの生体ドミノ肝移植の現状

第 116 回日本外科学会定期学術集会
2016 年 4 月 14-16 日 (大阪)

(5)重田孝信、佐々木 健吾、内田 孟、成本
壮一、 福田晃也、阪本靖介、伊藤玲子、笠
原群生

γGTP 値が正常である小児胆汁鬱滞性肝疾患
症例に対する肝移植の経験

2016 年 7 月 2 日

第 33 回日本小児肝移植研究会 (岐阜)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

重田孝信 (SHIGETA Takanobu)

国立研究開発法人国立成育医療研究セン
ター, 臓器・運動器病態外科部, 医師

研究者番号 : 60560331