

令和元年6月26日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06497

研究課題名(和文)ブタ糖尿病合併脂肪肝モデルの確立と積極的機械還流による虚血再灌流障害の克服

研究課題名(英文)The effects of machine perfusion preservation for pig steatotic liver

研究代表者

大原 みずほ (Ohhara, Mizuho)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：80596304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：雑種ブタに高脂肪投与に加えて、臍臓摘出を行い、脂肪肝を作成することを試みた。また、移植臓器としての脂肪肝に適する保存法として機械灌流保存を試み従来の単純冷却保存と比較した。評価系として、体温条件下での血液灌流によって、移植を模擬し、各種酵素、ならびに病理評価などを行った。また、脂肪肝の虚血障害状態を流動力学、形態学などの面から評価した。結果、機械灌流保存の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

積極的な機械肝臓灌流により、臨床応用の可能性のある脂肪肝の機能評価法を確立し、さらには臓器灌流保存法を発展させた臓器灌流機能保存、回復システムへの展開を図ることで、従来は移植を断念せざるを得なかった脂肪肝を移植可能とすることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Utilization of steatotic liver would greatly contribute to the expansion of the donor organ pool. To assess potential methods and effect, porcine steatotic livers were perfused and evaluated ex vivo isolated liver perfusion system. Porcine steatotic graft was made by special high fat nutrition or total pancreatectomy. All livers were perfused with newly developed machine perfusion(MP)system. The grafts were perfused for 4 hrs with modified UW-gluconate solution. Group1: Grafts were preserved with simple cold storage for 4 hrs. Group2:All grafts were evaluated by isolated ex vivo perfusion system with use of diluted autologous blood for 2 hrs.(Results)Both of portal vein and hepatic artery pressure was remarkably higher in group1. AST and LDH were also high in CS group and increase in 120 min. after reperfusion in group1.(Conclusion)Potentially, steatotic liver preserved with machine perfusion preservation may help the recovery of function.

研究分野：外科学一般

キーワード：Organ preservation machine preservation steatotic liver

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末期臓器不全患者の治療法として臓器移植医療は救命のみならず QOL の向上・医療費の抑制の視点などから、高い期待がある。しかし、待機患者数と提供数の乖離は国際的にも大きな課題であり、ドナー不足は深刻な状態である。この解決策の一つとして、脂肪肝などの機能劣化のリスクを有する Expanded criteria donor (ECD) 特に脂肪肝を受け入れ、適応拡大が求められている。しかし、これらのマージナルな臓器は標準的な臓器に比し Viability が低下しており、また虚血再灌流障害も高頻度に出現する。臓器機能を良好に保存・維持し、更には機能回復・蘇生が可能な技術として臓器内に保存液を灌流する機械灌流保存に注目がある。

欧米では、腎臓用低温持続灌流保存装置が実用化され、単純冷却保存との多施設共同での比較臨床試験により灌流保存の有用性が報告 (Moers, N Engl J Med, 2009) され、広く普及した技術となりつつある。また、肝臓についても低温灌流保存の有用性 (Guarrera, AmJT, 2010) や、体温条件下でヒト赤血球を用いた持続灌流保存の移植報告 (R. Ravikumar AmJT, 2016) さらに、ヨーロッパでの各 100 例の単純冷却保存と灌流保存の複数施設での比較試験による有効性の速報 (国際移植学会総会 TTS2016, 香港) がなされ、世界的にも大きな期待が集まっている。特に、最近、欧米では、代表的マージナルグラフトである脂肪肝の有効利用のために低温あるいは常温での機械還流の有効性を示す報告が見られるようになった (Transplantation 2013, Am J Transplantation 2015 2016) 。しかし、低温障害や、灌流液に血液を使用するためなど克服すべき課題も多い。一方、積極的に温度管理、酸素を付加した低温灌流 (Dutkowski, Ann. Surgery, 2016) などの報告など、灌流温度と酸素管理と灌流条件の検討が議論されているものの、マージナルドナーに適切な手法はなく精力的な研究が求められている。

2. 研究の目的

移植医療の大きな課題の一つであるドナー臓器不足解決のために脂肪肝などのマージナルな臓器の移植適用拡大に大きな期待がある。特に肝臓移植においては虚血再灌流障害の克服のために新しい技術が必要不可欠である。本研究では、酸素管理が重要な肝臓に着目し、先行研究を行っている機械灌流保存法を発展させ、新たなブタ糖尿病合併症脂肪肝モデルを用いた積極機械灌流法により虚血再灌流障害を克服することを最終目的とする。具体的には、糖尿病合併脂肪肝モデルを確立し、医工の横断型連携によって工学的酸素消費動態数値流体モデルによる解析、移植を模擬した体温血液灌流による評価ならびにブタを用いた同所性移植による検証を行い、臨床への展開を目指した技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) より安価で確実に作成できる、高脂肪食併用膵臓摘出ブタ病合併脂肪肝モデルの確立

文献などにより考案し、かつ実験ブタが食する高脂肪食投与 (3 週間) に加えて、膵臓摘出を外科的に行い、経過を観察する。採血、肝生検、脂肪染色などを行う。

(2) 脂肪肝グラフトを用いた、灌流保存中の工学的なアプローチによる温度管理に応じた圧、流量、酸素消費、供給条件などの検討

開発された臓器灌流保存装置は、肝臓では門脈・肝動脈の 2 系統、腎臓では 2 個の腎臓が同時灌流可能で、灌流液の温度管理、流量や拍動・非拍動などの灌流条件管理、保存液性成分、酸素添加が可能な装置である。本研究では、既に先行研究において、大型実験動物 (ブタ) を用いて、研究用試作機灌流装置により実験が行われている (研究業績参照)。灌流蘇生液は、腎臓で用いられてきている UW (University of Wisconsin)-gluconate 液を基本としつつも、血管内

皮にあたる剪断の影響を極力小さく可能な低粘度とし、温度変化に対応する。コンピュータを用いた数値流体解析と酸素動態特性解析による最適、流量、酸素供給条件、圧力動態を探る。あわせて、コンピュータ解析によって、灌流中の酸素消費動態ならびに温度管理灌流条件の網羅的探索をおこない積極的介入による至適灌流条件を検討する。

(3) 臨床への展開をふまえた自己血による脂肪肝グラフトの虚血再灌流、および移植実験

保存状況の評価として、体温条件(37℃)での血液灌流によって、移植を模擬し、保存時同様に各種酵素、ならびに分子生物学評価、病理評価などをおこない適切な灌流条件を探索する。これらによって体温域までの臓器保存温度における障害抑制効果を解析し内皮などの虚血障害状態を流体力学(圧、流量、血管抵抗の変化など、形態学(光顕、免疫染色)分子生物学(mRNA, IL-1, IL-6, TNF, IFN)などの面から評価する肝機能のほか酸化ストレスマーカーMDA、アポトーシス、組織内サイトカイン(mRNA, IL-1, IL-6, TNF, IFN)、組織(光顕・電顕)組織ATPなどを精査する。

4. 研究成果

(1) ブタ脂肪肝モデルの作製

実験1; 雑種ブタ10kgを5頭購入し、臍臓摘出を行った。2頭に組織学的に脂肪肝を認めた。ただし、感染などで死亡するブタも存在した。

実験2; ブタを10kgで購入し、高脂肪、及び高脂肪食に炭水化物(コーンスターチ)を今秋させた食事で脂肪肝作製が可能かについて体重約30kgまで観察した。約1か月に血清コレステロール値は350~400mg/dlとなりLDHも600~900mg/dlとなり生化学的変化は見られた。しかしながら、これを肝生検してもグリコーゲン沈着が顕著で大きな脂肪滴は見られなかった。さらに臍臓全摘を行ったところ、グリコーゲン沈着は変わらないものの、血糖の上昇とともにLDH、コレステロール値は低下した。

実験3; 1~2か月程度では脂肪肝はできないと考え、マイクロミニブタ(富士マイクラ)を購入し、高師紡食を作成(オリエンタル酵母)6か月間、投与飼育した。この結果、AST, LDHは正常値であったが、ALPは450IU/L、総コレステロール値281mg/dlと高値を認めた。しかしながら肝生検では脂肪滴は認められるものの顕著とは言えなかった。

(2) 脂肪肝に対する灌流保存の有効性

実験4; 一方、肝臓を体外で還流する装置を開発し、試作機を作成した。開発された臓器灌流保存装置は、肝臓では門脈・肝動脈の2系統、同時灌流可能で、灌流液の温度管理、流量や拍動・非拍動などの灌流条件管理、保存液性成分、酸素添加が可能な装置である(図1、図2)。この装置を用いて、単純冷却保存、および作成した機械還流保存について実験3の肝臓を用いて、再灌流モデルにより評価した。すなわち、灌流中の酸素消費動態ならびに還流液中の肝逸脱酵素、温度管理灌流条件の網羅的探索を行い灌流保存の状態を評価した。保存状況の評価として、自己血液を用いた体外再灌流(図3)による評価を確立し(Yoshikawa R et al; Annals of Transplantation 2018), 本実験にも用いた。まず、機械還流保存中の肝臓評価は、AST1480~1500IU/L、LDH840IU/L またヒアルロン酸20mg/dlと高値であり、過去の実験データであるが正常肝と比較すると障害肝であることが示唆された。一方、保存方法の違いによる検討では、移植外科領域では一般的な、単純冷却保存では再灌流1時間までは、AST633, 1392IU/Lに

対し、機械還流保存した肝臓は 338, 1170IU/L と低値を示した、同様の傾向は LDH (427 vs 208IU/L), ALP (109 vs 48 IU/L)でも認められた。また組織中 ATP の上昇も機械灌流群で認められた。今後は、コリン欠乏の高脂肪食を作成し、脂肪肝ブタの確立を試みるとともに引き続き灌流保存の有用性を検証したい。

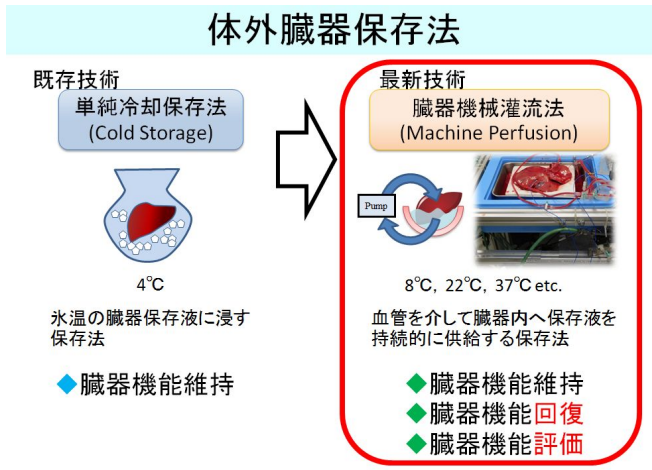


図 1：対外臓器保存方法

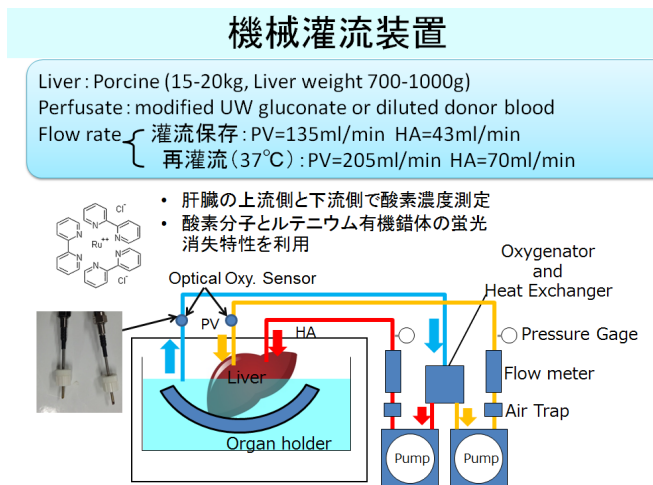


図 2：機械灌流装置

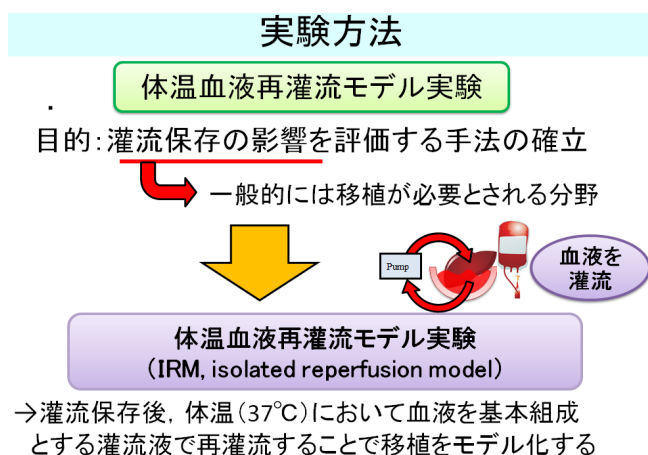


図 3：実験方法

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松野 直徒

ローマ字氏名：(MATSUNO, naoto)

研究協力者氏名：小原 弘道

ローマ字氏名：(OBARA, hiromichi)

研究協力者氏名：古川 博之

ローマ字氏名：(FURUKAWA, hiroyuki)

研究協力者氏名：西川 祐司

ローマ字氏名：(NISHIKAWA, yuuji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。