

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591522

研究課題名（和文） ET-Kyoto 液による胸腹部多臓器同時ハーベスト法の開発

研究課題名（英文） Development of a method for simultaneous multiple thoracic and abdominal organ procurement using ET-Kyoto solution

研究代表者

趙 向東（Zhao Xiangdong）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00444464

研究成果の概要（和文）：本研究は、臓器保存液 ET-Kyoto 液（ET-K 液）を利用し、臓器毎に臓器保存液が異なるため煩雑化した多臓器ハーベストを効率的に行う方法の開発を行った。ラット心臓、腎臓および小腸移植モデルを確立し、胸腹部臓器別灌流ハーベスト方法、至適灌流条件についての検討を行った。これに基づき、ET-K による腎臓および心臓保存効果についてラット移植モデルを使って検討した。腎臓の保存について、ET-K は HTK 液より優れた効果を示し、UW 液と同等の効果を証明した。心臓では HTK 液と同等の効果を示した。さらに、ラットランゲンドルフ心臓灌流モデルにより、ET-K は心臓左室機能に対して、良好な保存効果を示した。

研究成果の概要（英文）：Currently, different preservation solutions are utilized for the procurement and preservation of different organs. In the present study, a novel method was developed by using ET-Kyoto solution (ET-K) alone for multiple organs. Rat heart, kidney and small bowel transplantation models were established and the methods for flushing and procurement of both thoracic and abdominal organs were discussed. The efficacy of ET-K on kidney and heart preservation was evaluated using rat transplantation models. In the renal preservation, ET-K has shown superior to HTK and comparable to UW. In the cardiac preservation, the effect of ET-K was equal to that of HTK. Furthermore, the left ventricular function was well preserved by ET-K as evaluated with Langendorff rat heart perfusion model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：臓器保存、移植・再生医療、トランスレショナルリサーチ、外科

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器ハーベストは臓器毎に臓器保存液が異なり、またドナー臓器血管灌流においても異なる方法で行われている。基本的には

臓器保存液の特性や各臓器に適した灌流方法に基づくものであるが、多臓器を同時に臓器提供される臨床において非効率的な面もある。

(2) 京都大学は独自に ET-Kyoto 液(ET-K 液)を開発した。当初、肺保存液として開発されたが、腎臓(ラット *ex vivo* 灌流モデル)、皮膚および筋肉フラップ、そして膵島の保存においても有効性が証明されている。この ET-K 液は細胞保護効果のある非還元二糖類トレハロースを含む細胞外型保存液で、粘性・カリウム濃度ともに低く、化学的にも安定しているため常温での保存が可能である。以上から ET-K 液が多臓器保存に適した臓器保存液と考えるが、移植モデルによる証明が必要である。

2. 研究の目的

ET-K 液の臓器保存効果を胸腹部の全臓器において確認する必要がある。まず本研究ではラット心臓、腎臓と小腸の移植モデルを確立する。同時に各臓器における至適灌流方法や至適保存方法に検討を行い、臓器特異性について検討する。次に ET-K 液を使用し胸腹部多臓器ハーベスト法を確立させ、*in vivo* ラット臓器移植モデルを用いて虚血再灌流傷害や臓器機能の評価を行う。そして ET-K 液を使用した胸腹部多臓器同時ハーベスト法の有用性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 胸腹部臓器ハーベスト手順

ドナーラットは Diethyl Ether 吸入で麻酔する。開胸、開腹したのち heparin を静注する。そして灌流装置と圧モニターを用いて腎動脈以下の大動脈により一定の圧力で冷却した臓器保存液を腹部臓器に灌流させる。また同時に胸部大動脈を遮断し、一定の圧力で心臓を灌流する。灌流時間と血管抵抗を測定し至適灌流方法の検討を行う。

(2) 心臓移植

心臓グラフトを臓器保存液で冷保存後に異所性、すなわちレシピエントラットの腹部へ移植する。グラフトの大動脈と肺動脈はレシピエントラット腹部大動脈と下大静脈にそれぞれ吻合する。

(3) 腎臓および小腸移植

腎臓および小腸グラフトを臓器保存液で冷保存後、同所性に移植を行う。

(4) *Ex vivo* 灌流装置

臓器保存液で冷保存後の心臓、ランゲンドルフ心臓灌流装置で再灌流を行い、保存効果を生理学的および組織学的に評価する。

(5) 冷保存後グラフト組織中生体エネルギー変化の検討 (HPLC 法)。

(6) 組織学的評価

① apoptosis (TUNEL 法)

② グラフトの線維化 (Masson's trichrome 染色)、それぞれについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) ラット心臓、腎臓および小腸移植モデルを確立した。特に、腎移植モデルでは、尿管再建の方法、stent 法と suture 法について検討した。保存再灌流障害を受けた尿管の再建では、ステントの使用は尿管閉塞の危険度が suture より高いことがわかった。次に ET-K による腎臓の保存効果についてラット腎移植モデルを使って検討した。Lewis ラットの腎臓を 4°C の ET-K で灌流し、ET-K 液中で 4°C にて 1、12、24、30 時間保存後に同系腎移植を行った。通常カリウム濃度の高い細胞内液型保存液 UW 液など、移植前にはリンゲル液で wash out する必要がある。低カリウムである ET-K は wash out を必要としなかった。以上の各時間保存後、移植後の 7 日間生存率について検討を行った。1、12、24 時間保存後は 100% 生存率で、腎臓に対して、良好な保存効果を示した。30 時間は生存率有意に低くなった (25%) が、UW と同等の保存効果を達成した。

(2) 胸腹部臓器別灌流ハーベスト方法、至適灌流条件についての検討

胸腹部臓器ハーベスト時の灌流圧について検討した。ラットの腎臓を 4°C の ET-K で高圧あるいは低圧で *in situ* 灌流し、1、18、24 時間保存後に同系移植を行った。ET-K で 1 時間あるいは 18 時間保存後、灌流圧力と関係なく、高圧群と低圧群の生存率は 100% でした。長期保存の 24 時間では、低圧灌流群だけが生存することがわかった。また、心臓と肝臓の灌流圧力についても同様に、高圧灌流より低圧灌流において生存率が高いことが示された。

(3) ET-K による腎臓保存効果の検討

ラットの腎臓を ET-K、UW 液、HTK 液中で 24 時間保存後に腎移植を行った。ET-K と UW 液 24 時間保存後全例生存し、HTK 群より生存率は有意に高かった。組織中 ATP と Energy charge は ET-K において UW と有意な差を認めなかったが、HTK より有意に高値であった (図 1)。HTK 群と比べ ET-K 群と UW 群では移植 1、3 日後の血中 creatinine と BUN 値が低く腎障害が軽微であった。再灌流 3 時間後の HE 染色において尿細管傷害の抑制が認められ、TUNEL 染色では Apoptosis が少なかった (図 2)。移植後 14 日目における Masson's trichrome 染色においてグラフトの線維化が ET-K 群と UW 群で同様であった (HTK 群は生存例なし) (図 3)。Real-time RT-PCR では

細胞接着分子 ICAM-1 mRNA の発現量が ET-K 群と UW 群で HTK 群と比べ抑制された。

以上の結果から、ラット腎保存に関して ET-K は HTK 液より優れた効果を示し、UW 液と同等の効果を示すと考えられた。ET-K は新たな腎保存液となり得る。

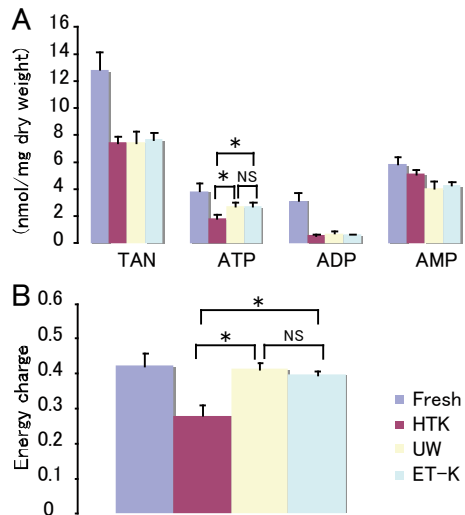


図1 冷保存後グラフト組織中生体エネルギー変化

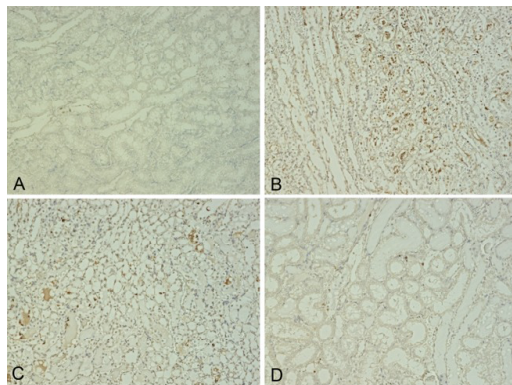


図2 TUNEL染色 A, fresh群; B, HTK群; C, UW群; D, ET-K群.

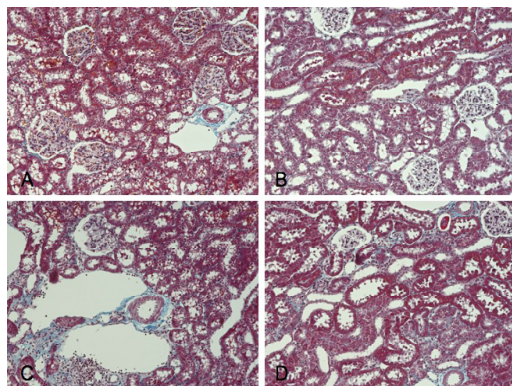


図3 Masson's trichrome染色 A, 正常対照; B, fresh群; C, UW群; D, ET-K群.

(4) ET-Kによる心臓の保存効果の検討

ラットランゲンドルフ心臓灌流モデルおよびラット心臓移植モデルを使って検討した。摘出したラット心臓を ET-K と HTK 液に 6 時間保存後、ランゲンドルフ装置に取り付け、37°C の Krebs-Henseleit buffer が 60 分間再灌流した。左室機能 (心拍数、左心室発生圧、心筋仕事量) を測定した。再灌流の 60 分後に、ET-K 群と HTK 群は左室収縮能差がなかった (図 4)。さらに、ラット心臓移植モデルで、18 時間保存後、移植後グラフトの生存率は 100% で、心臓に対して、良好な保存効果を示した。

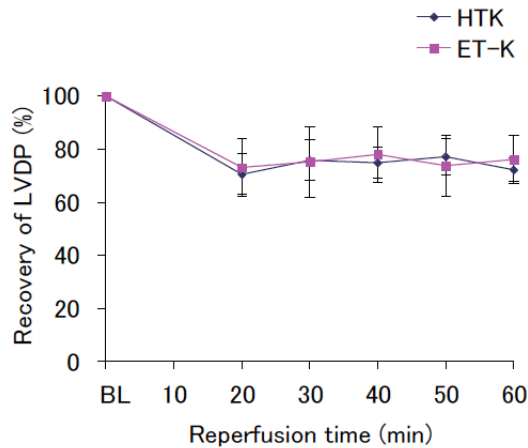


図4 左心室発生圧 (LVDP) の変化率
BL, baseline. BL の値を 100% で表示。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hori T, Nguyen JH, Zhao X, Ogura Y, Hata T, Yagi S, Chen F, Baine AM, Ohashi N, Eckman CB, Herdt AR, Egawa H, Takada Y, Oike F, Sakamoto S, Kasahara M, Ogawa K, Hata K, Iida T, Yonekawa Y, Sibulesky L, Kuribayashi K, Kato T, Saito K, Wang L, Torii M, Sahara N, Kamo N, Sahara T, Yasutomi M, Uemoto S. Comprehensive and innovative techniques for liver transplantation in rats: a surgical guide. World J Gastroenterol. 2010;16(25): 3120-3132. 査読あり
- ② Nafady-Hego H, Li Y, Ohe H, Zhao X, Satoda N, Sakaguchi S, Wood K, Uemoto S, Koshihara T. The generation of donor-specific CD4+CD25++CD45RA+ naive regulatory T cells in operationally tolerant patients after pediatric living-donor liver transplantation.

Transplantation 2010; 90 (12): 1547-1555. 査読あり

- ③ Yoshitomi M, Koshihara T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, Miyagawa A, Sakashita H, Tsuruyama T, Ueda M, Okamoto S, Wood K, Sakaguchi S, Manabe T, Uemoto S. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation. Transplantation 2009; 87 (4): 606-614. 査読あり
- ④ Zhang J, Chen F, Zhao X, Aoyama A, Okamoto T, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Cui Y, Bando T, Date H. Nebulized phosphodiesterase III inhibitor during warm ischemia attenuates pulmonary ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant. 2009; 28 (1): 79-84. 査読あり
- ⑤ Okamoto T, Nakamura T, Zhang J, Aoyama A, Chen F, Fujinaga T, Shoji T, Hamakawa H, Sakai H, Manabe T, Wada H, Date H, Bando T. Successful sub-zero non-freezing preservation of rat lungs at -2 degrees C utilizing a new supercooling technology. J Heart Lung Transplant. 2008;27(10):1150-7. 査読あり
- ⑥ Satoda N, Shoji T, Wu Y, Fujinaga T, Chen F, Aoyama A, Zhang J, Takahashi A, Okamoto T, Matsumoto I, Sakai H, Li Y, Zhao X, Manabe T, Kobayashi E, Sakaguchi S, Wada H, Uemoto S, Tottori J, Bando T, Date H, Koshihara T. Value of FOXP3 expression in peripheral blood as rejection marker after miniature swine lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2008; 27 (12): 1293-1301. 査読あり
- ⑦ Zhao X, Koshihara T, Nakamura T, Tsuruyama T, Li Y, Bando T, Wada H, Tanaka K. ET-Kyoto solution plus Dibutyl Adenosine Monophosphate is Superior to University of Wisconsin Solution in Rat Liver Preservation. Cell Transplant 2008; 17: 99-109. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① Zhao X, Fujinaga T, Li Y, Bando T,

Wada H, Date H. Prolonged Rat Kidney Preservation with ET-Kyoto Solution: Comparison with Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate and University of Wisconsin Solutions. American Transplant Congress 2011, April 30 - May 4, 2011, Philadelphia, PA, USA

- ② 藤永卓司、中島大輔、阪本 仁、趙 向東、佐藤寿彦、陳 豊史、庄司 剛、園部 誠、阪井宏彰、板東 徹、伊達洋至：ET-Kyoto 液を使用した肺移植症例の検討。京都臓器保存セミナー 2011 年 3 月 19 日 京都市
- ③ 板東 徹、和田洋巳、中村隆之、藤永卓司、陳 豊史、趙 向東、大角明宏、中島大輔、阪本 仁、庄司 剛、阪井宏彰、伊達洋至：ET-Kyoto 液の開発と臓器機能保存学講座 5 年の歩み。京都臓器保存セミナー 2011 年 3 月 19 日 京都
- ④ 藤永卓司、中島大輔、阪本仁、趙向東、陳豊史、庄司剛、阪井宏彰、板東徹、伊達洋至 臓器保存の現状と将来の展望 肺移植における肺保存の現状と新たな肺保存方法の検討 第 37 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2010 年 11 月 20 日 新潟市
- ⑤ 趙向東、藤永卓司、陳豊史、板東徹、和田洋巳、伊達洋至 ラット腎保存における ET-Kyoto 液と histidine-tryptophan-ketoglutarate 液および University of Wisconsin 液の比較 第 46 回日本移植学会総会 2010 年 10 月 22 日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

趙 向東 (Zhao Xiangdong)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00444464

(2) 研究分担者

藤永 卓司 (Fujinaga Takuji)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00444456

陳 豊史 (Chen Fengshi)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00452334

板東 徹 (Bando Toru)
京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20293954

伊達 洋至 (Date Hiroshi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60252962