

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号：20790933
 研究課題名 (和文) 新規の過冷却臓器保存法の開発と豚肝移植への応用について
 研究課題名 (英文) New development of the overcooling organs preservation method and the application to the pig liver transplant
 研究代表者
 目黒 誠 (MEGURO MAKOTO)
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50448601

研究成果の概要 (和文) : 我々は新規の保存法である過冷却グラフト保存法の開発のため、基礎的実験を行った。グラフト肝の一部 (1cm 角ほどの肝臓組織片) を UW 液に入れ、過冷却状態を検証してみたが、 -5°C 以下になると UW 液が凝固してしまい臓器保存不可能であった。そこで、 -4°C で 15 時間保存した群と従来法である 4°C で保存した群とで比較検討した。 -4°C で保存した群で有意に UW 液中の AST/ALT 値が低値であったことから、 -4°C での臓器保存が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The graft is gathered from the donors in the liver transplantation and the graft preservation until transplanting it to the recipients is very important. We have experimented for the development of the overcooling graft preservation method that was a new preservation method. The UW liquid was not able to preserve the graft when becoming -5°C or less, because the UW liquid had frozen. A part of the graft liver (liver tissue of about 1cm corner) was put in the 10 ml-UW liquid, and the overcooled state was verified. Then, it made comparative study by the groups that preserved the liver graft tissue for 15 hours at -4°C and at 4°C . The AST/ALT values of the UW liquid in the -4°C group were significantly lower than those in the 4°C group. It was suggested that the liver grafts preservation of -4°C was useful. Moreover, we had actually performed the liver transplantation by using the hypor female pigs (n=6) (about 20 kg weight). The donor liver graft was removed, and the trimmings of the hepatic vein, the portal vein, and the hepatic artery were performed in the back table. And then, the liver graft was transplanted to the recipient pigs using the extracorporeal circulation. Though it was the final goal to transplant the liver graft that was preserved in the overcooling UW liquid, we could not perform it because the overcooling method of the whole liver graft was very difficult. The effectiveness of protease inhibitor (Fusan) had been examined in the pig model of the hepatectomy under the pringle maneuver. The liver injury was protected by the protease inhibitor in the ischemia reperfusion model of the pig. It is speculated that the protease inhibitor is also effective in the liver transplantation after preserving in the overcooling state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学、臓器保存、PROKEPT®、過冷却装置、肝臓移植

1. 研究開始当初の背景

肝移植領域においてドナーからグラフトを採取しレシピエントに移植するまでの間のグラフト保存状態は非常に重要である。現行での 4℃臓器保存よりも保存温度を低く設定しても電磁波をかけて固体化させずに零下の状態でも液体のまま保存できる過冷却装置（プロケプト）を入手し新しい臓器保存法の開発を企画した。

2. 研究の目的

肝移植医療の質の向上を求めて、新規の肝グラフト保存法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 豚肝同所性異種移植実験

雌豚を用いて実際に肝移植実験を行った。実験はドナー肝を摘出し、バックテーブルで肝脈管（肝静脈、門脈など）をトリミングとした。レシピエントでは体外循環下に採取されたグラフト肝を移植し再灌流とした（肝上部下大静脈→肝下部下大静脈→門脈→再灌流→肝動脈→十二指腸胆嚢吻合の順で吻合再建）。実際にはグラフト肝全体を UW 液に入れ過冷却状態で保存した後にレシピエントに移植する実験を行うことが最終ゴールであったが、手技的に困難であったため施行できなかった。しかし、対照群としての移植実験はグラフト肝を UW 液に 4℃で保存としたのち合計 6 回の豚肝移植実験を施行したが、いずれも 24 時間後まで生存可能であり犠牲死とした。

(2) 過冷却装置を用いた限界低温温度の検討実験

10ml の UW 液の中に 1cm 角の豚肝組織片を入れて過冷却装置（プロケプト）内で最低温度-15℃にまで設定して行った。-4℃、-5℃、-10℃、-15℃に設定していずれも 15 時間の観察を行った。

(3) 新規過冷却肝臓組織保存における AST/ALT 値の検討

上記（2）の実験で行った同様の方法（10ml の UW 液の中に 1cm 角の豚肝組織片を入れて過冷却装置（プロケプト）内で保存）で、-5℃以下では UW 液が凍ってしまったので、-4℃（過冷却状態）保存群と 4℃保存群とで 15 時間保存後の UW 液中の AST/ALT 値の比較検討を行った。

(4) 肝阻血再灌流肝切除モデルにおけるプロテアーゼインヒビター（フサン）の効果について

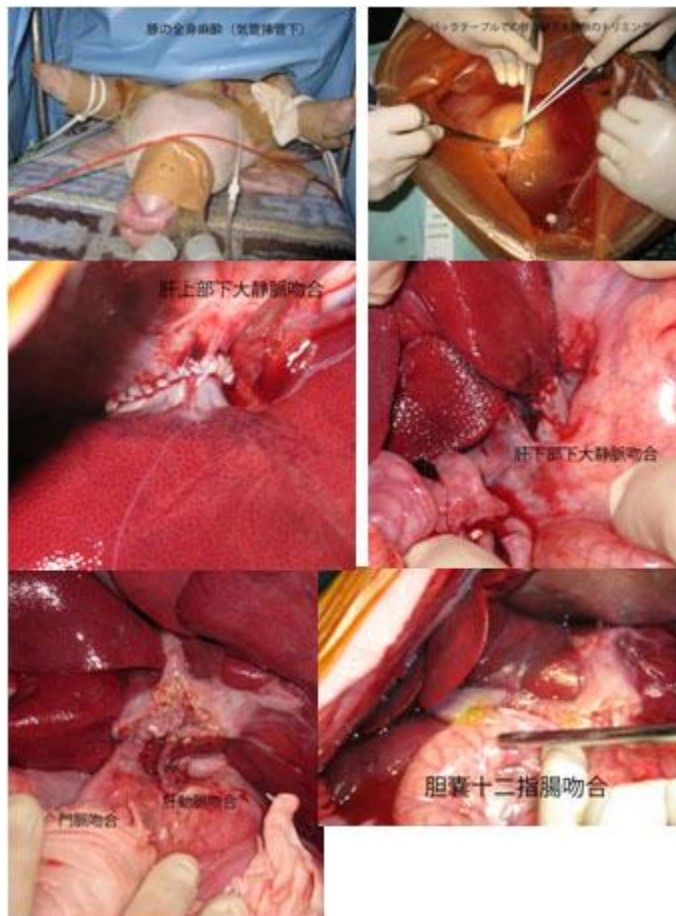
雌豚を全身麻酔下に開腹とし、肝門部の阻血再灌流（pringle maneuver、15 分阻血 5 分再灌流）8 回施行下に肝臓の 1/4 を肝切除した。その後の血清 AST/ALT 値や肝組織（HE 染色、TUNEL 染色など）の検索を行った。これを対照群とし、阻血再灌流前よりフサンを投与開始とし肝切除を行った群を新たに設定してフサンの阻血再灌流障害抑制効果を観察とした。

4. 研究成果

(1) 豚肝同所性異種移植実験

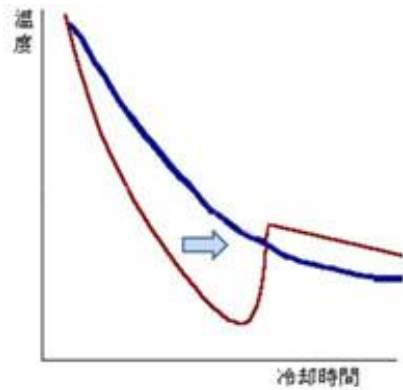
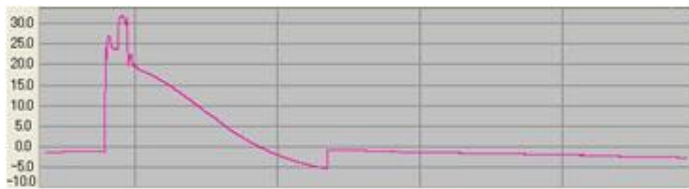
合計 8 回の豚肝移植実験は移植後 24 時間生存を確認し安定してチームとして施行可能であることが確認された。

写真は豚 20kg 前後の全身麻酔（気管挿管下）の様子である。セボフルレン+笑気での吸入麻酔下に実験を試行した。



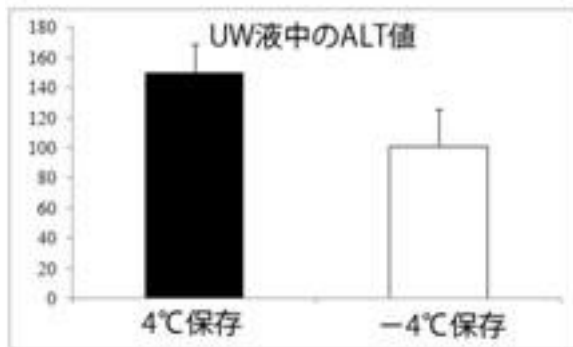
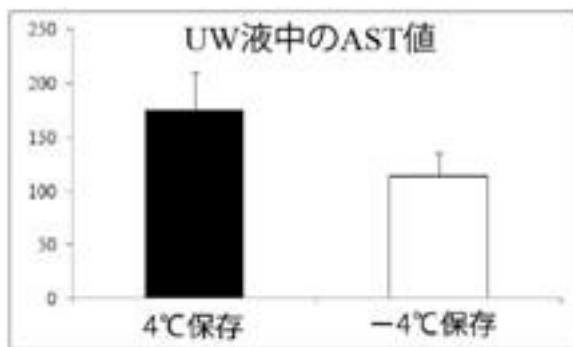
(2) 過冷却装置を用いた限界低温温度の検討実験

図は、-15℃に設定して過冷却装置（プロケプト）に 10ml の UW 液の中に 1cm 角の豚肝組織片を入れたものを入れて温度モニターを行った結果の温度曲線である。-5℃になった途端に UW 液の温度が 0℃付近にまで急上昇しているのがわかる。この時点で UW 液は凍結し液体から凍った状態へと変化した。それ以後は-15℃になるまで下図赤線のように徐々に温度は低下していった。一方、青線では温度の急上昇なく液体の状態のまま徐々に設定温度まで低下していた。



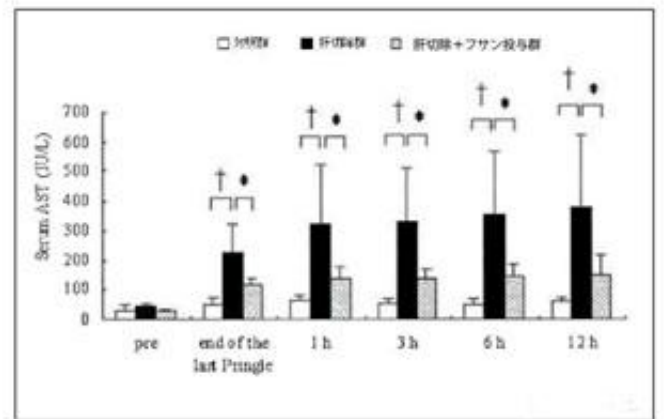
(3) 新規過冷却肝臓組織保存における AST/ALT 値の検討

10ml の UW 液の中に 1cm 角の豚肝組織片を入れて過冷却装置 (プロケプト) 内で -4°C に設定し 15 時間保存した群と従来の 4°C で 15 時間保存した群とで保存後の UW 液中の AST/ALT 値を比較検討した。 4°C 保存群 ($n=6$) と -4°C 保存群 ($n=6$) とで UW 液中の AST/ALT 値を比較すると、 $175 \pm 35/150 \pm 19$ (IU/L) vs $114 \pm 21/101 \pm 25$ と -4°C 保存群で有意に低値であった (下図を参照)。

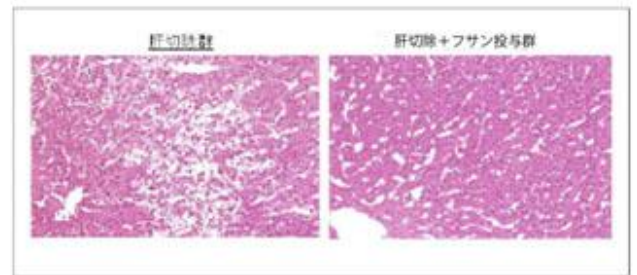


(4) 肝阻血再灌流肝切除モデルにおけるプロテアーゼインヒビター (フサン) の効果について

8回 pringle 下の肝切除を行うと下図のように血清 AST 値が有意に上昇するが、フサン投与により有意に肝障害抑制効果が認められた。フサン投与群における肝切除後 12 時間での肝組織 HE 染色では、阻血再灌流障害の抑制効果が認められた (下図)。



Pringle(計8回)下肝切除モデルにおける血清AST値



Pringle(計8回)下肝切除モデルにおける肝組織障害(HE染色像)

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3件)

1. Meguro M, Mizuguchi, Kawamoto M et al. Surgical benefits of liver hanging maneuver for hepatectomy of huge liver tumor. Tumor Research 44: 1-8, 2009.
2. 目黒 誠、水口 徹、梶晋輔、他 肝切除後の豚敗血症作成モデルにおける肝循環不全とプロテアーゼインヒビター. Surgery Frontier 16 巻 110-114, 2009.
3. Meguro M, Mizuguchi T, Hirata K, et al. Analysis of hepatectomy for malignant liver tumors that have invaded the inferior vena cava. World J Surg 33: S170, 2009.

[学会発表] (計5件)

1. 目黒 誠、水口 徹、中村幸雄、他. 熱凝固が及ぼすラット肝切除後の血清サイトカイン変動と肝再生への影響について. 第46回日本腹部救急医学会総会 2010年3月, 富山

2. 目黒 誠、水口 徹、柴田稔人、他. 熱凝固が及ぼす肝切除後の血清サイトカイン変動と肝再生への影響について. 第15回外科侵襲とサイトカイン研究会 2009年12月, 東京.
3. Meguro M, Mizuguchi T, Hirata K, et al. Analysis of hepatectomy for malignant liver tumors that have invaded the inferior vena cava. 43rd World Congress of the International Society of Surgery ISS/SIC, Sep., 2009. Adelaide, Australia
4. 目黒 誠、水口 徹、梶晋輔、他. 肝切除後の豚敗血症モデルにおける肝循環不全にプロテアーゼインヒビターは有効か. 第45回日本腹部救急医学会総会 2009年3月, 東京
5. 目黒 誠、水口 徹、柴田稔人、他. ラット小型肝細胞を用いた肝再生置換の誘導に関する実験的検討. 第14回外科侵襲とサイトカイン研究会 2008年12月, 盛岡.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0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0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

目黒 誠 (札幌医科大学 医学部 助教)

研究者番号 : 50448601

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :