

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591626

研究課題名（和文）冷保存前灌流及びプロスタグランジン E1 による肝温阻血再灌流障害抑制の試み

研究課題名（英文）The effect of oxygenated warm buffer perfusion with PGE1 before cold preservation on hepatic warm ischemia reperfusion injury.

研究代表者

赤松 順寛（AKAMATSU YORIHRO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：50302112

研究成果の概要（和文）：

脳死心停止した提供者から摘出した肝臓をそのまま冷たくして保存して（冷保存）移植した場合、肝臓の機能は著しく低下する。本研究では、心停止したラットから肝臓を摘出して、冷保存前に肝臓を酸素と血管拡張作用等を持つプロスタグランジン E1 を含んだ液を血液の代わりのように 30 分間肝臓の血管から流す新しい方法を試した。尚、方法として、実際に移植するのではなく、冷保存後に更に血液のかわりに酸素を含んだ液を一時間肝臓の血管から流して、胆汁の流れ、肝細胞の生死、肝細胞のミトコンドリアの状態を観察した。その結果、心臓が停止したラットから摘出した肝臓を冷保存前に酸素やプロスタグランジン E1 を与えると、心臓が動いているラットから摘出した肝臓と同等の機能が得られることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The liver grafts which are taken from the donors after cardiac death (DCD) and preserved immediately in cold solution show bad function after transplantation. In this study, we perfused rat livers from DCD before cold preservation with oxygenated warm buffer containing Prostaglandin E1 and observed bile production, liver cell death, mitochondrial function of liver cell and so on during reperfusion with oxygenated buffer. In the result, these treatments improved liver function of the livers from DCD after reperfusion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肝温阻血再灌流障害、プロスタグランジン E1、冷保存前灌流

1. 研究開始当初の背景

常温酸素化バッファーによる 30 分間の冷

保存前灌流（前灌流）が、心停止下摘出肝グラフトにおいてエネルギーステータスを改善し、温阻血再灌流障害を軽減することが報

告されている。しかしながら、前灌流のみでは心拍動下摘出グラフトのレベルまでの胆汁産生能の回復や細胞障害の軽減は認められなかった。本研究では更なる改善を目的に、様々な肝保護作用があるとされるプロスタグランジン E1 (PGE1) の前灌流液への添加効果をミトコンドリア機能と細胞死の検討を中心に行なった。

2. 研究の目的

ラット肝を用い ex vivo の灌流実験を行った。温阻血群では死戦期を経て 30 分の温阻血後直ちに 6 時間冷保存し 1 時間再灌流した。前灌流群では温阻血肝摘出後に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流し冷保存した。PGE1 群では前灌流液に PGE1 (10ng/ml) を添加した。各群の門脈流量・胆汁産生量・灌流中肝逸脱酵素・灌流液中炎症性サイトカイン・ミトコンドリア機能・アポトーシス関連蛋白の発現・JNK 活性・病理組織学的所見を比較検討した。

3. 研究の方法

ラット肝を用い ex vivo の灌流実験を行った。温阻血群では死戦期を経て 30 分の温阻血後直ちに 6 時間冷保存し 1 時間再灌流した。前灌流群では温阻血肝摘出後に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流し冷保存した。PGE1 群では前灌流液に PGE1 (10ng/ml) を添加した。各群の門脈流量・胆汁産生量・灌流中肝逸脱酵素・灌流液中炎症性サイトカイン・ミトコンドリア機能・アポトーシス関連蛋白の発現・JNK 活性・病理組織学的所見を比較検討した。

4. 研究成果

再灌流時の胆汁産生量・灌流液中の肝逸脱酵素は前灌流群で改善傾向を示し、PGE1 群で有意に改善した。又、PGE1 群では再灌流液中の TNF- α が有意に減少した (Figure 1)。

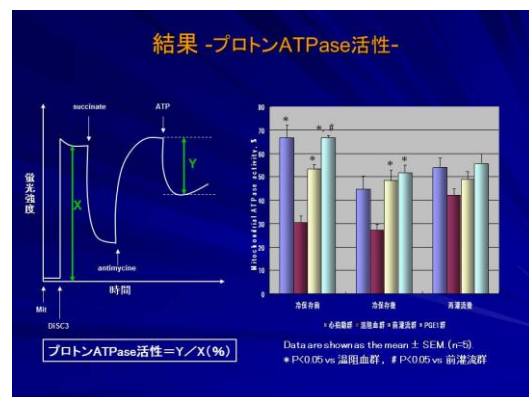
結果

Group	心拍動群	温阻血群	前灌流群	PGE1 群
門脈灌流量 (ml/g liver)	289.53 ± 25.49	211.59 ± 13.44	236.86 ± 9.64	263.21 ± 15.86
胆汁産生量 (μ L/g liver)	34.57 ± 2.93*	24.07 ± 1.69	30.05 ± 1.14	35.30 ± 2.63*
AST (Karmen units)	3.91 ± 0.26*#	7.85 ± 1.10	6.43 ± 0.55	4.46 ± 0.45*
ALT (Karmen units)	2.96 ± 0.15*	4.20 ± 0.31	3.55 ± 0.42	2.59 ± 0.14*
TNF- α (pg/ml)	12.59 ± 0.66*#	22.07 ± 1.76	21.51 ± 1.44	9.77 ± 3.12*
IL-1 β (pg/ml)	8.62 ± 1.15*#	16.38 ± 1.17	13.05 ± 1.11	11.60 ± 1.91

Data are shown as the mean \pm SEM (n=5).
* P<0.05 vs 温阻血群, # P<0.05 vs 前灌流群

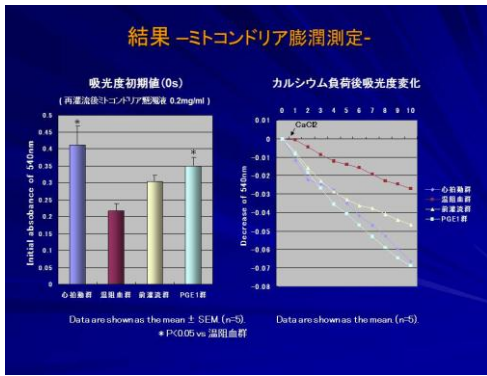
<Figure 1>

再灌流後のプロトン ATPase 活性は前灌流群と PGE1 群で改善傾向を示した (Figure 2)。

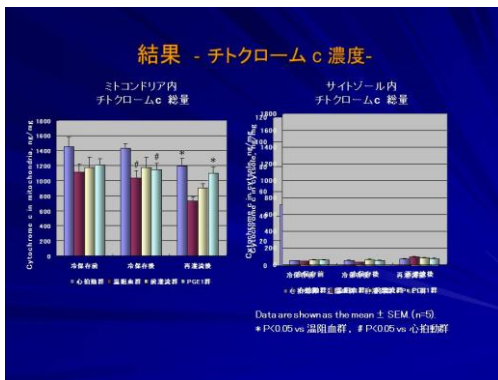


<Figure 2>

ミトコンドリアの膨潤, 及びミトコンドリアからのチトクローム c の漏出は前灌流群で抑制傾向を示し、PGE1 群ではどちらも有意に抑制された (Figure 3, 4)。

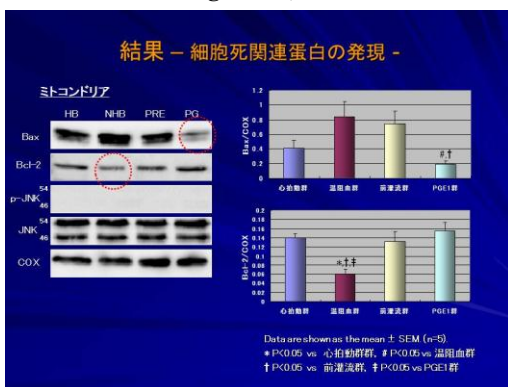


<Figure 3>

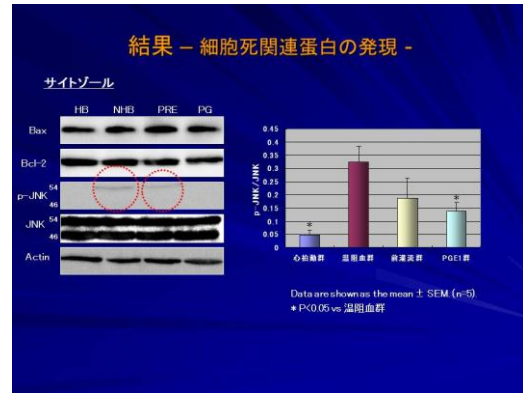


<Figure 4>

細胞死関連蛋白の検討では、温阻血群でミトコンドリアの Bcl-2 の発現が有意に低下し、PGE1 群で細胞質中の JNK の活性と Bax の細胞質からミトコンドリアへの移行が有意に抑えられていた (Figure 5, 6)。

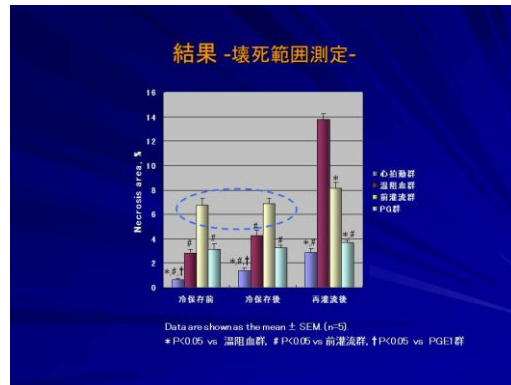


<Figure 5>

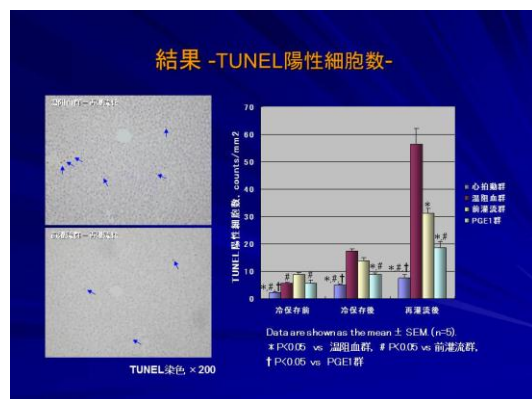


<Figure 6>

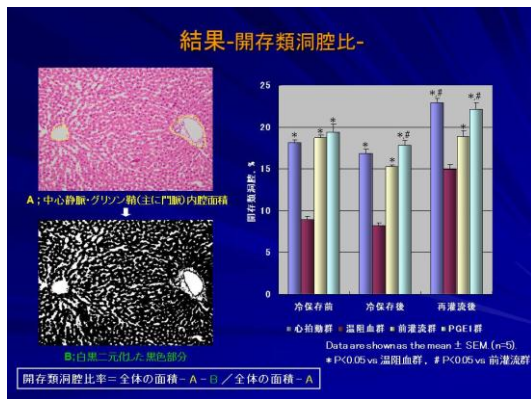
病理組織学的検討では、PGE1 群でネクロシス範囲と TUNEL 陽性細胞数の有意な減少を認め、開存類洞腔面積も温阻血群に比べ有意に改善していた。(Figure 7, 8, 9)



<Figure 7>



<Figure 8>



<Figure 9>

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)

① Y. Hara, Y. Akamatsu, Y. Kobayashi, T. Iwane, S. Satomi

Perfusion Using Oxygenated Buffer Containing Prostaglandin E1 before Cold Preservation Prevents Warm Ischemia-Reperfusion Injury in Liver Grafts from Non-Heart-Beating donor Transplantation Proceedings 42 , 3973-3976(2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 原 康之、赤松 順寛、小林 仁存、岩根 尊、里見 進

心停止肝グラフトに対する Prostaglandin E1 添加冷保存前灌流による機能改善効果とその機序に関する検討
第 29 回日本肝移植研究会
2011 年 7 月 22 日 仙台

② 原 康之、赤松 順寛、小林 仁存、岩根 尊、中村 篤司、里見 進

心停止ドナーからの肝グラフトに対する

Prostaglandin E1 添加冷保存前灌流による温阻血再灌流障害軽減に関する検討
第 46 回日本移植学会
2010 年 10 月 22 日 京都

③ Y.HARA, Y. Akamatsu, Y. Kobayashi, T. Iwane, S. Satomi,

Perfusion by oxygenated buffer containing prostaglandin E1 prior to cold preservation prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors.
第 23 回 International Congress of the Transplantation Society

2010 年 8 月 16 日 バンクーバー、カナダ

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 順寛 (AKAMATSU YORIHIRO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：50302112

(2) 研究分担者

宮城 重人 (MIYAGI SHIGEHITO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：00420042

武田 郁央 (TAKEDA IKUO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：90420033

里見 進 (SATOMI SUSUMU)
東北大学・病院・教授
研究者番号：00154120