

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21689035

研究課題名 (和文) 次世代の移植肝灌流保存法の開発に向けた至適条件の網羅的解析

研究課題名 (英文) The Development of Normothermic Perfusion Preservation and "Post-conditioning" Methods in Liver Transplantation

研究代表者

秦 浩一郎 (HATA KOICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90523118

研究成果の概要 (和文)：

肝移植は末期肝不全患者に対する救命手段として本邦でも定着したが、臓器保存法はこの 20 年間、単純浸漬冷保存法のまま改善をみない。今回、定圧式経門脈/肝動脈灌流保存装置を開発し、保存中に臓器の状態を改善させる "Post-conditioning" 効果を、Isolated Perfused Rat Liver にて評価した。その結果、常温灌流保存は類洞壁細胞の保護効果が高い事が示唆され、更なる保存液の改良が必要ではあるものの、"Post-conditioning" 法の実現可能性が示された。脳死移植は年々増加しており、臓器の長期保存法の開発は急務であるが、本研究はその一助となるものと考えらる。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we developed a pressure controlled perfusion preservation system, and evaluated the "Post-conditioning" effects in perfusion preservation with Isolated Perfused Rat Liver. It is plausible that normothermic perfusion preservation may preserve/improve the liver function better than cold storage, which is the gold standard preservation method, with protecting hepatic sinusoids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：灌流保存、肝移植、ADAMTS13

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓移植は末期肝不全患者に対する救命手段として定着し、本邦でも年間約 500 例に及ぶ肝移植手術が施行されるまでになった。1997 年の臓器移植法の施行以来、脳死肝移植も行われるようになったが依然少数で、現在でも我が国の肝移植の実に 99% が生体移植であり、これが欧米他国の現状と大きく異

なる本邦の特徴である。

一方、臓器移植を成功させるには、(1) 機能がよく温存された臓器を摘出し、(2) 移植後に充分機能すべく保存し、(3) 安全確実に手術を行い、(4) 免疫抑制を含めた術後管理を徹底すること尽きる。生体間での移植がほとんどを占める本邦の現状を鑑みれば、上記 (1) はドナー選択の時点で問題はない

はずである。また、近年の手術手技の進歩や機器の発達により、臓器摘出術や吻合手技(3)は徐々に問題とならなくなっている。さらに、Cyclosporin や FK-506 など近年の革命的な免疫抑制剤の進歩により、レシピエントの術後管理もクリニカル・パスを導入できるまでになった。すなわち(2)臓器保存法の改良が、依然、移植肝の生着・機能を決定する最重要課題の一つであると云える。

現在までに報告されている臓器保存法は、大別すると、(1)単純浸漬冷保存法と、(2)灌流保存法の2法に集約される。臓器保存中も組織に必要な酸素や栄養素を供給できる灌流保存法は理論的には優れるものの、運搬が困難という観点から広く臨床応用されるには至らず、この20年、臓器保存法は未だ単純浸漬冷保存法のまま改善を見ない。

## 2. 研究の目的

本邦で99%を占める生体移植では臓器を運搬する必要が無く、その全てを設備の整った手術室内で完結できる。

この本邦の現状に即し、生体移植に即時応用可能な、新たな灌流保存法を開発し、さらには灌流保存中にストレス応答を惹起させ、種々の薬剤やガスを作用させることで、グラフト臓器を、より機能的に優れた状態に保つ、“Post-conditioning”法を開発する事が、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

Wistar系ラットを用いて、以下の実験を行った。

(1)初年度は保存肝の状態を効率的に調べるべく、Isolated Perfused Rat Liver (IPRL)検査系を確立した。同時にこのIPRLを応用し、実際の肝摘出後back tableにおける操作・器具を出来る限り模した(=即時臨床応用可能な)定圧式経門脈/動脈灌流保存装置を作成した。

(2)次年度は、同灌流保存装置を用いて、肝灌流保存の至適条件を網羅的に解析した。現在のGold standardである、Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK)液を用いた単純冷保存90分+温虚血30分を対照群とし、灌流保存群として重炭酸リンゲル (BCR)液、HTK液、ET-Kyoto (ETK)液を用いた灌流保存120分を施行した。肝機能はIPRLにて評価した。

(3)肝細胞のみならず肝類洞壁細胞の保護効果を評価する指標として、肝星細胞で産生されるADAMTS13に着目し、IPRL中におけるADAMTS13活性測定法を開発した。

(4)(3)に平行し、“Post-conditioning”法の開発の一環として、急性心不全に対する

循環改善薬であるolprinoneを用いた肝類洞保護効果を検討した。グラフト肝を摘出後、4℃のHTKにolprinoneをloading-doseにおける血中トラブ濃度、およびその3倍濃度となるよう添加し、24時間浸漬冷保存した。それらをIPRLにてHTK単独群と比較・検討した。

## 4. 研究成果

### (1)【IPRLおよび定圧式経門脈/肝動脈灌流保存装置肝の開発】

現在市販されているIPRL装置は酸素化、温度調整、灌流圧モニタリングといった様々な機構を持つため、1台あたりの購入費用は数百万円に及ぶ。今回我々は、医療用ディスプレイ機器を組み合わせる事で、諸機能を最低限有しつつ、コストは1/10以下となるIPRL装置を自作、更にこれを応用し、定圧での灌流が可能な保存装置を開発した(図1)。

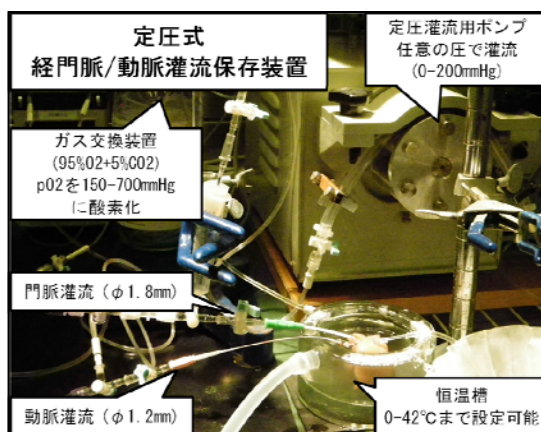


図1 定圧式経門脈/肝動脈灌流保存装置

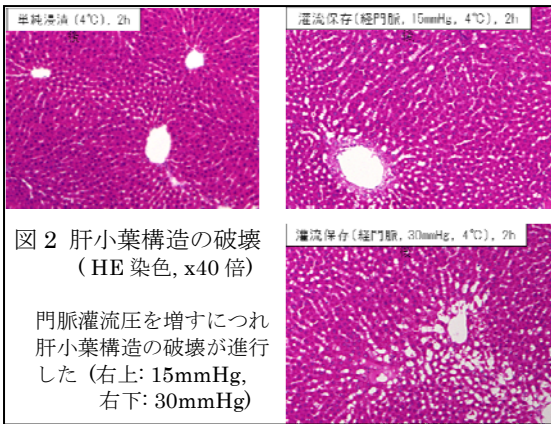
これら装置のコスト以外の利点は以下の通りである：①機構の大部分がディスプレイ機器のため、メンテナンスが容易である。②実際に臨床でグラフト肝摘出後の灌流時に用いている器具、手技を模しており、灌流保存の効果が明らかとなれば、直ちに臨床応用可能である。また、ラット全肝移植の手技を習得するには約1年の期間が必要とされているが、IPRLの手技自体は1週間程度で習得でき、約1ヶ月で手技上のバラツキもほぼなくなった。装置の開発に約1年を要したため、この2年間で施行した症例数は十分なものとは言えないが、今後実験の大幅なスピードアップが期待できる。

### (2)【灌流保存の至適条件の網羅的解析】

ラット全肝グラフトを用い、現在臨床で使用されている臓器保存液であるHTK液を用いた単純冷保存90分+温虚血30分を対照群とした。HTK、ET-Kyoto液(ETK)、およびBicarbonate Ringer液(BCR)を用いた灌流

保存 120 分を、灌流経路（門脈、動脈、門脈+動脈）、灌流圧（5、15、30、60、120、200 mmHg）、灌流温度（4、10、25、37℃）、灌流液 pO<sub>2</sub>（50、150、400、600 mmHg）のパラメータを変化させ施行、門脈圧、酸素消費量、肝逸脱酵素、胆汁産生量、光顕組織像を比較した。ここに挙げたパラメータの組み合わせだけで 864 通りあるため、本研究期間内で全ての組み合わせを網羅的に解析する事は出来なかったが、以下の知見が得られた：

①4℃においては灌流液の種類、経路に関わらず、肝逸脱酵素、胆汁産生量などは対照群と同等であったが、灌流圧が高くなる程、肝小葉構造の破壊が認められた（図 2）。



②保存中の肝代謝の状態を確認すべく、灌流温度と、肝酸素消費との関係を調べた。

(i) 4℃保存下にあってもグラフト肝の酸素消費量は 0.15 μmol/g-liver/min 程度はあり、適切な灌流液を低圧で灌流する事によりグラフト肝の viability を更に上昇させることが可能であると考えられた。

(ii) 灌流温度が上昇するにつれグラフト肝の酸素消費量は上昇した。グラフト肝の酸素要求を満たすべく肝静脈酸素分圧（全身では肺動脈酸素分圧に相当）に留意し各パラメータを変化させたところ、動脈灌流のみの場合は 10℃を超えた所で急激に肝静脈酸素分圧が低下した。灌流圧を 200mmHg まで上昇させるも、灌流量は最大 0.6ml/g-liver/min 程度にとどまり、肝静脈酸素分圧は殆ど回復しなかった。IPRL で肝逸脱酵素は大幅に上昇し、肝細胞の脱落が認められた。

(iii) 門脈灌流のみの場合は 25℃を超えた所で肝静脈酸素分圧が低下した。灌流圧を 30mmHg まで上げることで肝静脈酸素分圧は回復したが、その後の IPRL では肝逸脱酵素の上昇こそ認めなかったものの、類洞は著明に拡張し、小葉構造の破壊が認められた。

(iv) 灌流温度を 37℃まで上昇させた場合、確認した全ての群で対照群より悪成績であった。

以上より、常温での灌流保存を考える場合

には、門脈灌流に動脈灌流を追加する事が望ましいと考えられた。特に 37℃では、全ての細胞が活性化するため、酸素・栄養の需要が急激に増加する。現在の灌流保存ではその需要を十分に賄えていない事が予想された。この時もっとも改善が必要な要素はやはり保存液の組成であろう。研究計画の時点で灌流保存液の候補としていた Polyso1 は、現在、特許の問題で市販化の道が閉ざされており、今後新たな灌流保存液の開発が必要である（図 3）。

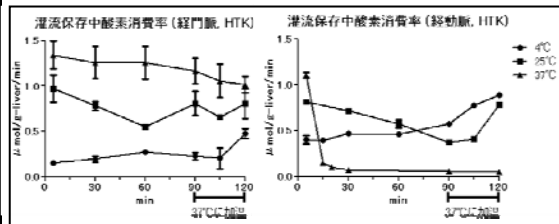


図 3 灌流中の肝酸素消費量の変化

③BCR 群のみ、37℃、200mmHg の動脈灌流で保存時間を 15 分、30 分、45 分、60 分とした群を作成し、IPRL で評価したところ、保存時間 30 分までは肝機能は保たれていた。すなわち BCR であっても短時間であれば 37℃の動脈灌流保存が可能である事が示唆された。この事は極めて重要な意味を持つ。37℃の BCR であれば、レシピエントの体内に入ったとしても大きな問題にはならない。すなわち、動脈灌流保存を続けながらグラフト肝をレシピエントに put in し、肝静脈および門脈を吻合すれば、温阻血時間を完全にゼロとする事が可能になると期待される。今後更に研究を進め、BCR 単剤での灌流保存の限界を追求したい。

### (3) 【肝類洞傷害の指標としての肝組織中 ADAMTS13 活性測定法の開発】

現在のところ、肝類洞内皮細胞や星細胞といった肝非実質細胞を臓器保存中に評価する実験系は未だ十分に確立されていない。そこで、当研究室で筆者らが明らかにしてきた、虚血再灌流による肝類洞壁細胞障害や、肝移植後血栓性微小血管障害 (Thrombotic microangiopathy: TMA) に関する知見 (Hori T, Hata K, et al, “Thrombotic microangiopathy-like disorder after living-donor liver transplantation: A single-center experience in Japan”, World J Gastroenterol, 2011 Apr 14; 17(14):1848-57) を元に、肝類洞壁細胞の保護効果の指標として、肝類洞/血管内皮障害によって生じる unusually large von Willebrand factor multimer (ULVWFM) と、肝星細胞で主に産生される、ULVWFM の特異的切断酵素である ADAMTS13 のバランスに着目し（図 4）、IPRL 中に肝組織液の ADAMTS13 活

性を測定する事で肝類洞壁細胞障害を評価出来るのではないかと考え、以下の実験を行った。

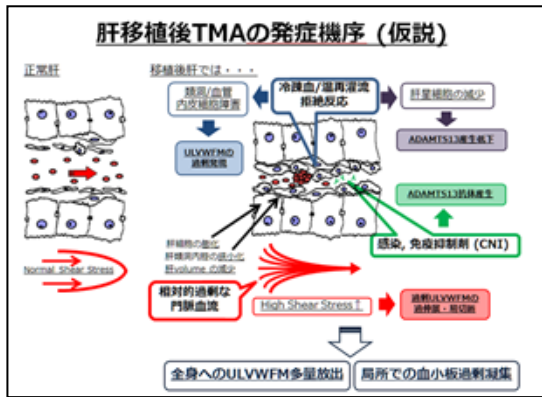


図4 肝移植における類洞障害のメカニズム

Wistar ラットを3群 (A群: 全肝疎血 30分、B群: 70%部分肝疎血 120分、C群: sham 手術) に分け、術後2時間後の血漿および肝を採取、生化学および組織学的検査と血漿および組織液のADAMTS13活性との相関を調べた。血漿および臓器組織液のADAMTS13活性測定には、小亀らが開発したFRETS-VWF73による蛍光ELISA法を用いた (Kokame et al, "FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay:", Br J Haematol, 2005; 129, 93-100)。

①A群、B群ともに肝逸脱酵素の著明な上昇を認めた一方で、血小板数の減少および肝類洞内皮細胞障害の指標とされるヒアルロン酸の上昇は、B群では著明であったもののA群では比較的軽微であった (図5)。温疎血温再灌流による類洞内皮障害は、肝細胞障害に比べて軽微である可能性が示唆された。

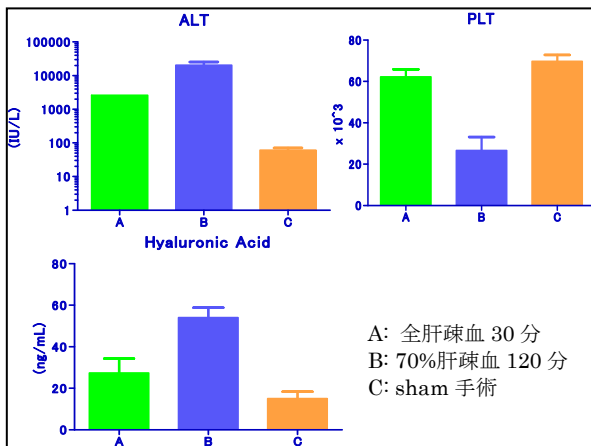


図5 肝細胞障害 (ALT) と類洞内皮障害 (PLT, HA)

②血漿のADAMTS13活性は、組織学的検査で内皮障害が強かったB群において著明に低下していた。一方、肝組織液のADAMTS13活性を測定したところ、B群において、疎血側の肝組織液のみ著明なADAMTS13活性低下を認

めたが、非疎血肝ではADAMTS13活性は保たれていた (図6)。組織液ADAMTS13活性を測定する事により、肝臓における局所的な内皮障害を測定出来る可能性が示唆された。これらの知見を元に、今後、肝非実質細胞の保護効果を、IPRLを用いて明らかにしていきたい。

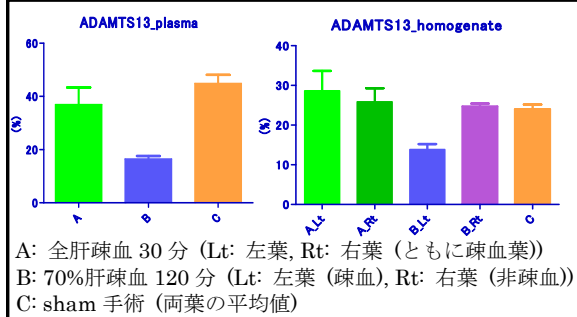


図6 血漿と肝組織液 ADAMTS13 活性の相関

#### (4) 【“Post-conditioning”法の開発に向けた取り組み】

肝グラフト保存のGold standardである単純冷浸漬においてしばしば問題となる、再灌流後のグラフト機能不全 (Primary non-function; PNF) は、グラフトの冷保存時間が長い症例で好発し、類洞内における微小循環障害が関与すると推定されている。急性心不全に対する循環改善薬として臨床使用されているolprinoneの、単純冷浸漬時における”Post Conditioning”効果を、IPRLを用いて検討した。

ラット肝を摘出後、4°CのHTKにolprinoneを臨床におけるターゲット血中濃度 (A群)、およびその3倍濃度 (B群)となるよう添加し、24時間浸漬冷保存した。それらをIPRLにてHTK単独群 (C群)と比較した。

門脈圧において、olprinone群は濃度依存的に低値を維持し、肝類洞内微小血管拡張作用が示された。またolprinone群は濃度依的に胆汁を多く産生し (A群:  $3.34 \pm 0.61$ , B群:  $6.427 \pm 0.96$ , C群:  $0.81 \pm 0.29 \mu\text{l/g-liver/h}$ )、胆汁中に排泄される胆汁酸量も高値 (A群:  $5.79 \pm 2.02$ , B群:  $6.497 \pm 1.672$ , C群:  $0.49 \pm 0.20 \text{ nmol/g-liver}$ )を示した (図7)。

Olprinoneは肝組織内の微小循環を改善することで、Graft “Post-Conditioning”の一役を担う可能性が示された。

#### (5) 【総括】

2010年に改正臓器移植法が施行されて以降、我が国でも急速に脳死移植の数が増加している。これに伴い、必然的に臓器の保存時間は延長しており、保存中の臓器活性の維持および移植直後の冷疎血/温再還流障害の軽減が今後大きな課題となる事は間違いない。

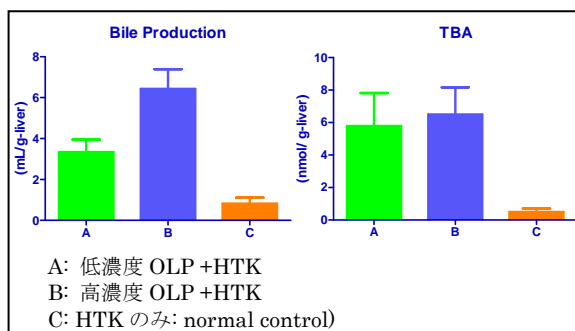


図7 OLPを用いた“post-conditioning”による胆汁産生/胆汁酸排泄効果

また、圧倒的に提供される臓器が不足している現状において、脂肪肝などの、いわゆる“marginal graft”の状態を臓器摘出後に整える“Post-conditioning”法は、我が国のみならず世界中の臓器不足を解消する切り札の一つとなりうる。

現在、主に世界中で研究されている灌流保存は、比較的小型化しやすい低温定流量還流装置を用いたものが多いが、本研究でも示唆された様に、(1) 低温では臓器の代謝活性は大きく抑制されているため、酸素や栄養の供給は必要不可欠ではない、(2) 冷疎血温再灌流による類洞壁細胞障害を軽減するためには、常温保存が望ましい、(3) 肝臓は体内における最大の化学工場であり、常温すなわち活性化された状態で保存する事によってこそ、保存中に肝機能の再生を促す、“Post-conditioning”が効果的なものとなる、といった点を考慮すると、解決すべき課題は山積しているものの、やはり常温灌流保存を追求する事が重要であると考えられる。

本研究を更に進める事が、臓器移植の新たな扉を開く一助になるものと確信している。

## 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8件)

①Hori T, Kaido T, Hata K, et al (23人中7番目). Thrombotic microangiopathy-like disorder after living-donor liver transplantation: A single-center experience in Japan. World J Gastroenterol. 2011 Apr 14;17(14):1848-57. 査読有

②Kaido T, Mori A, Hata K, et al(7人中4番目). Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Living Donor Liver Transplantation: What is the Current Optimal Approach to Prevent Recurrence? World J Surg. 2011 Jun;35(6):1355-9. 査読有

③Iida T, Kaido T, Hata K, et al(10人中

5番目). Posttransplant bacteremia in adult living donor liver transplant recipients. Liver Transpl. 2010 Dec;16(12):1379-85. 査読有

④Kaido T, Mori A, Hata K, et al (8人中4番目). Impact of enteral nutrition using a new immuno-modulating diet after liver transplantation. Hepatogastroenterology. 2010 Nov-Dec;57(104):1522-5. 査読有

⑤Kaido T, Mori A, Hata K, et al(9人中6番目). Impact of pretransplant nutritional status in patients undergoing liver transplantation. Hepatogastroenterology. 2010 Nov-Dec;57(104):1489-92. 査読有

⑥Hori T, Oike F, Hata K, et al(17人中5番目). Liver transplantation for congenital biliary dilatation: a single-center experience. Dig Surg. 2010;27(6):492-501. 査読有

⑦Hori T, Nguyen JH, Hata K, et al(31人中18番目). Comprehensive and innovative techniques for liver transplantation in rats: a surgical guide. World J Gastroenterol. 2010 Jul 7;16(25):3120-32. 査読有

⑧Iida T, Kaido T, Hata K, et al(10人中5番目). The rare insertion of b4 with trifurcated portal vein in live donor. Transplantation. 2010 May 15;89(9):1163-4. 査読有

[学会発表] (計1件)

① Hirokazu Tanaka, Koichiro Hata, “ADAMTS13, von Willebrand factor cleaving protease, activity and liver graft preservation; -how to reduce the risk for thrombotic microangiopathy-“, the 46th annual European Society for Surgical Research congress, 2011.5.28, Aachen, Germany

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 浩一郎 (Hata Koichiro)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 90523118