

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670557

研究課題名(和文) 大動物モデルによる高圧下における不凍結超低温域に着目した新たな臓器保存法の開発

研究課題名(英文) New organ preservation method under pressurized, non-frozen condition: Preclinical study using CLAWN miniature swine

研究代表者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授

研究者番号：40241103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：水の固液平衡曲線から、高圧を負荷することにより、不凍結状態を保ったまま液体を超低温に保つことが可能である現象を応用し、高圧下・不凍結状態での長期臓器低温保存方法の確立を目指す研究を前臨床実験としてミニブタを用いて行った(腎臓：60-120 MPa；心臓：30-60 MPa)。この結果、設定した圧力以下であれば、腎臓および心臓ともに臓器障害を生ずることなく、非凍結領域で臓器を保存しうることが明らかとなり、新たな臓器保存法確立の可能性が開かれた。

研究成果の概要(英文)：To extend organ preservation time, we attempted to establish a new preservation method in a stable unfrozen state below its freezing point by pressurizing the solution. To clarify the effects of high pressure on the kidney and heart, we performed kidney/heart transplantation in CLAWN miniature swine using the grafts preserved under high pressure (kidney: 60-120 MPa; heart: 30-60 MPa). Both kidney and heart grafts preserved under pressurized, subzero non-frozen condition had sufficient function after orthotopic kidney/heterotopic heart transplantation indicating that this method could be the novel strategy to extend organ preservation time.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生医療 前臨床実験 高圧 臓器保存 腎移植 心移植 ミニブタ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ドナー不足解消のためのドナー適応拡大とドナー臓器保護対策の重要性

重篤な臓器不全に対する移植医療はすでに確立したものであるが、現在の約 12,000 人の移植希望登録者に対し、ドナー不足は依然として深刻な問題である。マージナルドナーや心停止ドナーなど、条件の悪い臓器を用いた移植へと適応が拡大されているが、ドナー臓器傷害による虚血再灌流傷害等の急性臓器不全や、免疫学的因子の活性化による急性拒絶や慢性拒絶の誘因となることが懸念される。ドナー臓器を適切な状態に保つということは、移植後短期だけでなく慢性期成績の向上のためにも重要な点となる。

### (2) 臓器保存期間の延長と移植医療向上

現在、移植医療で通常に行われる臓器保存液を用いた冷却浸漬保存法では、臓器摘出から移植後血流再開までの虚血許容時間は、最も短い心臓では 4 時間、最も長い腎臓でさえ 24 時間とされる。従って、1) 急なドナー発生や遠隔地レシピエントには時間的猶予がないこと、2) 感染症検査や臓器機能検査には時間が不十分であること、3) レシピエントの体調把握やドナーに対する免疫学的反応性評価が不十分となること、など、多くの問題が生ずる。これらの問題は提供臓器を移植に用いる機会を失う可能性や、急性臓器もしくは慢性臓器不全発生の危険性を高めうるなどの問題を伴う。また殆どの移植が緊急手術として行われる現状も、医療体制を考える上では大きな問題である。臓器保存時間の飛躍的延長はこれらの問題解決に大きく寄与し、より安全かつ高品質の移植医療に直結することが期待される。

## 2. 研究の目的

臓器保存では、代謝レベルを低下させ、酸素欠乏傷害を回避する低温保存が臨床移植医療の臓器保存の基本とされている。本研究では、高圧下では 0 以下でも液体が凍結しない高圧不凍結領域が存在することに着目し、従来よりも更に低温でありながら、凍結・融解に伴う組織傷害を生じない臓器保存法の開発に着手する。この高圧下での不凍結・超低温保存技術の移植医療への応用が可能であるか、という点に焦点をあて、主要組織適合性抗原 MHC 確立ミニプタを用いた前臨床移植実験モデル(腎臓、心臓)を用い、1) 高圧による組織傷害が生じない圧力レベルを明らかにし(目的 1) 更に、2) 高圧下に長時間の超低温保存を行った臓器の移植後機能の評価(目的 2)を行い、本法による長期臓器保存の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成 25 年度

高圧下では液体を不凍結状態に保つことが可能であり、長期間の臓器保存に適した低

温状態を維持しうる可能性があるが、高圧下で臓器が構造学的にも機能的にも正常に維持されるかについて評価するため、比較的虚血許容時間が長く、臨床移植数の多い腎臓に焦点をあてた試験を開始した。

- 加圧条件・方法： 研究協力者が高圧処理食品の開発に使用実績のある高圧保存装置や加圧・冷却システムを用い、60MPa、90MPa、120MPa の一過性加圧(低温)負荷を行った。
- 加圧後の臓器評価(自家腎移植)： 容器内で上記高圧(低温)負荷をかけた後、直ちに自家移植手技によって自己体内に戻し、腎臓の機能を評価した。対側の腎臓は摘出し、高圧負荷腎臓のみでの機能評価とした。
- 腎臓評価項目： 血清 Cre 測定、定期的な腎生検による病理学的評価、浸潤細胞の評価、電顕による詳細な構造の評価(加圧負荷前後、移植後 2 時間、2、7、14、28、42、63 日後)。
- エネルギー代謝評価： 移植臓器内の ATP、ADP、AMP の測定による評価。
- 臓器・血清の炎症性変化評価： 血清での ELISA 法や生検検体を用いた RT-PCR により炎症性サイトカイン(IL-1、TNF- など)や接着因子などにより評価。

### (2) 平成 26 年度

平成 25 年度に得られた結果である「腎臓は最大 60MPa (-4 前後)の圧に耐えることができること」をもとにして(研究成果の項を参照)研究を進めた。これまでの我々のミニプタ移植実験では、臓器保存液として細胞外液型の ETK 液を用いてきたが、超低温冷却保存の際の細胞膜破壊程度によっては細胞内液組成の保存液 UW 液の方が、効果が高い可能性も考えられるため、細胞外液組成と細胞内液組成の保存液による効果の差異を比較評価した。更に、臨床移植数の多い腎臓に焦点をあてた試験とともに、現在臓器保存の許容時間が最も短い心臓についても検討を開始した。従って、平成 26 年度は(1)60MPa/-4 で腎臓を 24 時間保存した際の腎移植について、特に高圧保存の際に用いる臓器保存液の検討という観点からの評価、(2)腎臓と同様に、心臓保存の際の臓器耐圧能評価、を中心に検討を行った。

#### 腎移植

- 腎移植に用いる臓器保存液： 加圧後の臓器評価(自家腎移植)： 容器内で上記高圧(低温)負荷をかけた後、直ちに自家移植手技によって自己体内に戻し、腎臓の機能を評価した。対側の腎臓は摘出し、高圧負荷腎臓のみでの機能評価とした。
- 腎臓加圧・保存条件： 平成 25 年度に得られた結果をもとに、60MPa (-4)の設定で 24 時間保存を行った。
- 腎移植の手法および評価項目： 平成 25 年度と同様の手法を用いた。

#### 心移植

- 加圧条件・方法：高圧保存装置や加圧・冷却システムを用いて、30MPa、45MPa、60MPaの一過性加圧（低温）を心臓に対して印加した。
- MHC 適合間異所性心移植：高圧・冷却保存により長時間臓器保存を行った心臓について、腹部に異所性に心移植を行った。術後は12日間低濃度タクロリムスを持続投与した。
- 心移植に用いる臓器保存液：市販のHTK液を使用した。
- 移植心臓評価：拍動触知、移植心理め込み電極を用いた持続的心電図モニタリング、移植心臓は血清トロポニンTやBNP、により機能を評価した。また、開腹、移植心針生検により得られた検体を、病理学的に評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成25年度

容器内で以下の高圧（低温）負荷をかけた後、直ちに自家移植手技によって自己体内に戻し、腎臓の機能を評価した。この際、対側の腎臓は摘出し、高圧負荷腎臓のみでの機能評価を行った。

60MPa / (-3.7 あるいは -4.2 ) の負荷では腎臓は障害を受けないことを、移植前の病理検査で確認することができた。さらにこの条件で高圧負荷を行った腎臓を、自家移植により元の個体に戻し腎臓の長期機能評価を行ったところ、移植直後から正常機能（尿生成）を呈し、またこの自家移植腎臓は2か月以上にわたり良好な移植腎機能を示した。更に、経時的な腎生検によって、組織学的にも正常と同様の腎臓であることが示された。

一方、90MPa あるいは 126MPa の負荷をかけた腎臓は、糸球体は正常であるものの、尿細管は高度に障害されていることが、加圧後の腎臓組織生検により明らかとなった。この腎臓を自家移植により元の個体に戻したところ、移植した腎臓は血流が乏しく、高度の鬱血や出血、壊死所見を呈し、機能を示さなかった。

以上の結果、腎臓は最大 60MPa（理論上は -6 で不凍結。今回の実験では -4 前後で実施）の圧に耐えることができること、また高圧を負荷した際の腎臓は特に尿細管が障害を受けることを明らかにした。これは従来の冷蔵保存より約 10 の低温保存（エネルギー消費 1/2）が可能であることを示す大きな成果が得られた。

##### (2) 平成26年度

##### 腎移植実験

60MPa / -4 で24時間保存した腎臓は移植初期から尿生成を認め良好な血流を示すが、その際に保存液として UW 液を用いた方が、ETK 液を用いた場合よりも良好な結果が得られることが明らかとなった。高圧条件での腎

臓保存の際には UW 液の方が ETK 液よりも優れる可能性があること、さらに至適臓器保存液の検討を行う必要性が示唆される結果であった。

##### 心移植実験

心臓では、30MPa ( -2 )、45MPa ( -3 ) の圧を一過性に付加した場合は、高圧付加心臓を他の MHC 適合動物の腹部に異所性心移植を行った後も、60日にわたり正常に機能することが明らかとなった。しかし、60MPa を付加した際は、術後5日目に心室性不整脈が誘導されること、またこの際の組織所見として局所的な心筋障害を認めており、これが不整脈誘発の原因となること、が示された。

以上のように、今回の検討を通じて、今後さらに、腎臓移植・心臓移植において、この手法を用いた場合、どのくらいの時間にわたり臓器保存が可能であるのか、また保存の際にどのような臓器保存液を用いることが適当であるのか、などについて詳細な検討が必要であるものの、高圧下・不凍結超低温域での新たな臓器保存法の可能性を示す結果が得られた。

#### 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）

〔学会発表〕（計2件）

山田 和彦：クラウンミニプタの医用ミニプタとしての有用性 - 医用動物としての重要性：サイズ・MHC・遺伝子改変性・Available reagent - . 第3回公開シンポジウム先進医用ミニプタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト . 2015年3月24日 . 鹿児島大学 . 鹿児島県鹿児島市 .

小林 篤、大原 絵里、三浦 清豊、徳長 靖、山崎 彬、佐原 寿史、山田 和彦：クラウンミニプタを用いた産学共同前臨床研究の成功例 . 第3回公開シンポジウム先進医用ミニプタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト . 2015年3月24日 . 鹿児島大学 . 鹿児島県鹿児島市 .

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：生体構成物の非凍結保存輸送方法  
発明者：山田和彦、佐原寿史、山崎彬、小林篤、徳長靖、大原絵里  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2014-109436  
出願年月日：平成26年5月27日  
国内外の別：国内

名称：生体構成物の非凍結保存輸送装置  
発明者：山田和彦、佐原寿史、山崎彬、小林  
篤、徳長靖、大原絵里  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2014-109437  
出願年月日：平成 26 年 5 月 27 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xentx/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・教授

研究者番号：40241103

### (2) 研究分担者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・准教授

研究者番号：90452333

### (3) 研究協力者

小林 篤 (KOBAYASHI, Atsushi)