

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670630

研究課題名(和文) 高静水圧印加・非凍結超低温下での革新的肺保存法のミニブタモデルによる開発

研究課題名(英文) Establishment of novel lung preservation method in a stable unfrozen state under high pressurized condition

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高圧の印加により、液体を不凍結状態に保ったまま液体を超低温に保つことが可能であることは、水の固液平衡曲線から示されている。本研究ではこの自然現象の移植医療への応用を目指し、圧力印加・不凍結状態(過冷却状態)で、従来よりも長時間の肺の低温保存方法の確立を目指す実験を、前臨床研究としてMHC確立クラウン系ミニブタを用いたMHC不適合間肺移植実験により行った。30-60MPaを一過性に肺に印加した後に肺移植を行ったものの、組織学的にも肺胞内出血や浮腫などの虚血再灌流障害を呈する急性移植肺機能不全状態に陥り、末梢気管支に残存する空気に対する圧力の影響を回避する方法の確立が必要であることが示唆された。

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 the freezing point by highly-pressurizing the solution. To clarify the effects of high pressure on the lung, we performed MHC-matched lung transplantation in CLAWN miniature swine using the pulmonary grafts preserved under high pressure (30-60 MPa). The lung grafts preserved under pressurize (subzero non-frozen condition) showed severe ischemia-reperfusion injury after orthotopic left lung transplantation suggesting that the control of remaining air in the lung graft could be the most important to establish this new organ preservation method.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：移植・再生医療 臓器保存 高圧 非凍結 クラウン系ミニブタ 肺移植 前臨床研究 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

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するドナー不足は依然深刻な問題である。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重要な点となる。

臓器保存期間の延長と移植医療向上への寄与

現在の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臨床的な虚血許容時間は、肺では 8 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、2) 感染症検査や臓器機能検査には時間が不十分、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、という問題が生ずる。これらの問題は提供臓器を移植に用いる機会を失うこと、急性あるいは慢性臓器不全発生の危険性を高める危険性があ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、医療体制として大きな問題である。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。

高圧下非凍結領域に着目した新たな臓器保存法の可能性

温度を 10 度低下させることで細胞のエネルギー代謝は半分となるため、より長期保存に適した状況になると考えられ、凍結・融解は臓器傷害を引き起こすため、非凍結状態を保持しながら臓器を低温に維持することが臓器保存では必要となる。水は 1 気圧では 0 度で凍結するが、凝固温度は加圧により低下させることが可能で、水の固液平衡曲線に従うと、圧力下では 0 度以下でも凍結しない高圧非凍結領域が存在し、100MPa (約 1000 気圧) では -9 度、200MPa では -20 度でも水は凍結しない。この高圧下非凍結領域に注目し、組織に傷害を与える凍結・融解過程のない非凍結状態で、従来法より低温での臓器保存が、細胞や臓器保存期間を飛躍的に延長する革新的な手法になるという着想に至った。

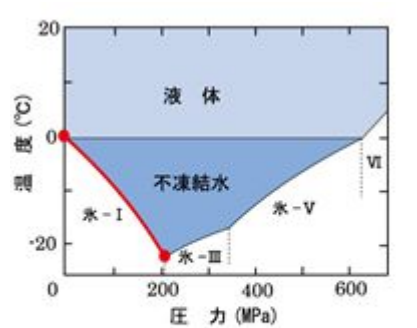


図 1. 水の固液平衡曲線：200MPaの高圧下では -20°C でも水は凍らない

2. 研究の目的

本研究は、高圧非凍結領域を臓器保存法に応用し、非凍結状態で長時間にわたり臓器の超低温保存を可能にする、という全く新しいアイデアに基づくものである。組織傷害を起こさず凍結や融解過程のない非凍結状態で、従来よりも低温での臓器保存が可能となれば、10 度の温度低下が臓器・細胞のエネルギー代謝を半分に抑制するという点からも、臓器や細胞の保存期間を飛躍的に延長しうる革新的な手法となることが期待される。

一方で、非凍結低温状態を保つためには、臓器を高圧環境に置く必要が生ずるが、超高压環境に暴露された臓器は、(1) 細胞内微小器官、膜などの構造的破壊、(2) タンパクなどの高分子構造の破壊、(3) 細胞膜構造における酵素系の失活、等によって、細胞が機能を不可逆的に喪失することが懸念される。これまで高圧処理技術は、研究協力者小林らにより食品加工方法として様々な食品の加工・保存方法の開発に応用されてきた。その過程で、高圧処理そのものでは 100MPa の空気は 1/1000 に体積が圧縮されるのに対し、水は 3% しか圧縮せず体積変化が殆どないという特徴を有し、200 MPa の加圧によっても赤血球が破壊ないことが示されていた。しかし、多細胞の集合体である臓器が、実際にどの程度の圧力に耐え、さらに機能を維持し生体活動が可能かについては、全く検討されていない。加えて、肺のように空気を含有し、高圧による体積変化を受ける臓器が、高圧下でどのような動態を示すかについては不明である。

研究背景 に示すように、高圧下非凍結領域に着目した方法は、新たな臓器保存法として移植医療の向上に直結すると考えられる。しかし、どの程度の高圧環境に暴露されても臓器は正常機能を維持するのか、あるいは長時間にわたり高圧下で超低温保存した臓器は、移植後に正常に機能を果たすかという点を含め、特に肺移植領域における研究報告は皆無である。そこで本、前臨床大動物実験として、免疫学的背景の一致した主要組織適合性抗原 MHC 確立クラウンミニプタを用いた研究によって、高圧 (および過冷却状態) にお

かれた肺が、肺移植後に通常の機能を果たしうるかを明らかにすることを目的とする研究を立案した。

3. 研究の方法

水の固液平衡曲線から、高圧を負荷することにより、非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・非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に着手する。前臨床MHC 確立ミニプタ肺移植モデルを用い、各種圧力条件、温度条件、臓器保存時間に設定した肺をMHC 適合間移植することによって、それぞれの保存条件下での臓器の機能評価をはかる。目的1では、高圧による体積変化を受ける肺において、圧力や温度への耐応性を、特に肺の空気含有程度に応じて評価する。目的2では、どの程度の長時間にわたり、高圧・超低温保存した肺が移植後に正常機能を果たしうるかを評価し、高圧冷却臓器保存システムの有効性と条件の上限を明らかにする。これらの知見を基に、移植医療の向上に結び付く新たな臓器保存方法の確立に着手する。

具体的な方法として、60MPa (-6 度でも非凍結)の高圧負荷後の肺が、実際に正常機能を維持しているかという点を、高圧負荷後の肺をMHC 適合動物に移植することで明らかにする。この際、通常の移植肺保存では、肺の残存空気が長期保存に有効であることから肺を虚脱させない点を考慮し、含気を維持した肺 (Group 1a) と、高圧による肺の体積変化を最小限に抑えるため、完全虚脱させた肺 (Group 1b) の2群を比較検討し、高圧保存時の肺の至適含気条件を明らかにする。

実験動物や移植方法あるいは術後免疫抑制療法として、本実験では、保存後の移植臓器の機能を、拒絶反応 (アロT細胞応答) の影響を最低限にした状態での評価を可能とするために、MHC 確立クラウンミニプタのMHC 適合間の組み合わせを用いた同所性左肺移植を、既に申請者が確立した手法によって行う (Sahara H. Transplantation 2010)。マイナー抗原への反応を抑えるため、少量の免疫抑制剤を12日間持続投与する (FK506: 血中濃度 10-15 ng/mL)。

移植肺は、グラフト肺静脈血ガス分析、定期的な生検や胸部X線 (移植後2時間、2、7、14、28、56、84日) により評価する。血清・病理学的評価については、光顕、電顕による評価によって、移植臓器への浸潤細胞や、IRIの詳細な評価として、臓器・血清での炎症性 (IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1) /抗炎症性 (IL-10/TGF-) サイトカイン、接着因子 (ICAM-1) 発現、酸化ストレス指標評価を行う。これらについては血清を用いた評価も併せて行う。更に、臓器内ATP/ADP/AMP測定により低温下でのエネルギー代謝評価を行う。End pointは移植臓器の3か月以上の生着、あるいは画像・生検による完全な機能不全と設定する。

4. 研究成果

目的1に掲げる「高圧による肺損傷が生じない圧力レベルを明らかにする実験」を行った。60MPaを一過性に肺に付加した際は、組織学的には肺実質は正常に保持されていることを確認した後に、60MPa印加後の肺をMHCが適合したミニプタに対し、同所性左肺移植を行った。その結果、移植肺再灌流60分後には移植肺から泡沫状の痰の排出が生じ移植肺は機能不全を呈した。組織学的にも肺胞内出血や浮腫などの強い虚血再灌流障害の所見を認めた。

この所見を受けて、30MPaを一過性に肺に印加した後に肺移植を行ったものの、60MPaの際と同様に、組織学的にも肺胞内出血や浮腫などの虚血再灌流障害を呈する急性移植肺機能不全状態に陥った。

一方で、腎臓や心臓などの実質臓器では30-60MPaの圧力印加後であっても移植臓器は正常に機能するという知見を得ていることから、肺の特性である空気含有条件によって、圧力の影響がどのように変化するかについて基礎実験を行った。この結果、気管に対しては空気を含ませた状態で圧力を印加しても、肉眼的にも組織学的にも気管の断裂所見はなく正常状態が維持されることが明らかとなった。肺実質では圧力印加前後で末梢気道主体の病変が生じていたこととあわせて、末梢気管支に残る空気に対する圧力の影響を回避するための手法の確立が必要であることが示唆される結果となった。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計4件)

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・シンポジウム3「畜産研究から実験用プタへの橋渡しおよび応用研究」高圧下過冷却状態での革新的臓器保存法 - 前臨床クラウン系ミニプタモデルを用いた産学共同前臨床研究・第3回日本先進医工学プタ研究会・2015.10.16-17 (16)・東京都千代田区 (日本大学会館)。

佐原寿史、関島光裕、三浦宏平、河合昭浩、脇 詩織、岩永健裕、市成ゆりか、清水 章、山田和彦・臓器横断的ワークショップ1「臓器移植における新規技術・機器の導入」高圧下過冷却状態での革新的臓器保存法 - 前臨床クラウン系ミニプタモデルによる開発・第51回日本移植学会総会・2015.10.1-3・熊本市 (ホテル日航熊本)。

山田和彦 . クラウンミニブタの医用ミニブタとしての有用性 - 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ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト . 2015.3.25. 鹿児島市 (鹿児島大学).

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 . シンポジウム「医用ミニブタ研究を用いた企業との共同研究」. クラウンミニブタを用いた産学共同前臨床研究の成功例 (A-STEP 産学共同促進ステージ). 第 3 回公開シンポジウム先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト . 2015.3.25. 鹿児島市 (鹿児島大学).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 00256942