

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791266

研究課題名（和文） 移植用臓器高圧乾燥保存法の確立およびその機序の解明に関する研究

研究課題名（英文） The establishment of a high-pressure gas preservation method, and the elucidation of mechanism.

研究代表者

畑山 直之（HATAYAMA NAOYUKI）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80534792

研究成果の概要（和文）：一酸化炭素（CO）と酸素（O₂）を用いた保存法において、臓器を保存液に浸漬せずにガスに直接曝露することがガスの保存効果を最も引き出すことを明らかにした。この結果は、CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧保存法が臨床応用へ発展する上で、重要な学術的基盤になると考えられる。また、同様の方法で、ラット切断後肢が1週間保存できることを明らかにした。心臓に限らず、四肢においても高圧保存法が有効であったことは、この保存法の汎用性を示している。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that exposure of organs into high-pressure CO and O₂-mixed gas without immersion in stock solution leads to the maximum cell-protective effects of gas for preservation. This result is important to show the scientific evidence and apply for clinical cases. In addition, we succeeded in rat limb preservation for one-week by using high-pressure CO and O₂-mixed gas. The result indicates that high-pressure CO and O₂-mixed gas is widely useful to organ preservation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：移植外科学、臓器保存

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトの臨床移植治療は、年々増加する移植待機患者に対して提供される臓器不足の問題が深刻化している。その大きな理由

の一つに臓器の保存時間の短さが挙げられる。臓器の供給体制を改善させるため、長時間の臓器保存技術の確立が切望されている。研究代表者は、全く新しい臓器の保存法で

ある一酸化炭素(CO)と酸素(O₂)を用いた高圧乾燥保存法を開発し、ラットの心臓を用いて、最長 48 時間保存後蘇生という結果を得ている。しかし、そのメカニズムについては明らかにしておらず、現象論にとどまっているのが現状である。

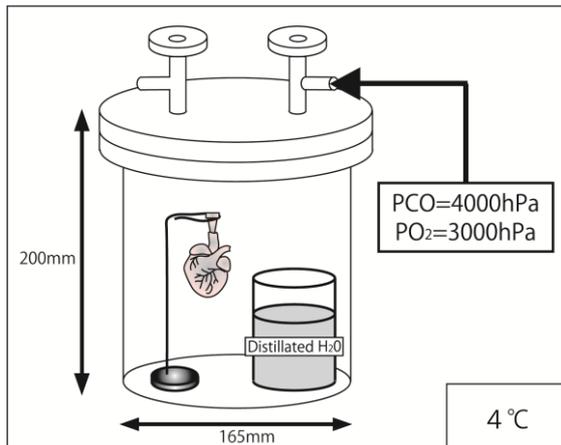
2. 研究の目的

本研究では、ラット頸部異所性心移植モデルを用い、①高圧乾燥保存法のより最適な条件を検討し、保存後のラット心臓の機能を評価する。②マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による機序の解明。③高圧保存法他臓器への適応を検討。これらを検討することで高圧保存法を臓器保存の方法として確立し、将来臨床応用へと発展させていきたい。

3. 研究の方法

(1) 高圧保存法のより良い保存条件の検討及び、保存後の心臓の機能評価

保存条件を3つの項目「(a)湿度の保持が必要かどうか、(b)保存ガスに圧力が必要かどうか、(c)保存液に浸漬する必要があるかどうか」に振り分け、ラットの心臓を48時間保存後、頸部異所性心移植にて評価した。移植後、グラフト心臓の心拍数、重量を測定し、HE染色による組織学的評価、fluoro-deoxy-glucose(FDG) – positron-emission-tomography(PET)による保存心臓における糖の取込みを画像診断的に評価した。



(2) マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による機序の解明

ラット心臓を用い、高圧保存後のサンプル

採取後 RNA を抽出し、蛍光物質で標識、プローブを作製した。その後、マイクロアレイにハイブリシ、保存心臓における mRNA 発現プロファイルを検討した。比較には Control 群、高圧保存群、陰性対照群の3群にて検討した。

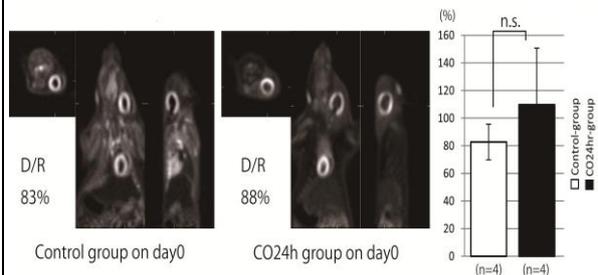
(3) 高圧保存法他臓器への適応を検討

ラットの切断後肢を保存対象とし、心臓保存において最適条件であった高圧保存法にて保存した。その後ラット後肢移植モデルを用いて他家移植し、その適応を検討した。離断した後肢を高圧保存にて、経時的に保存時間を延長し、検討した。移植後 90 日間、生着するかどうかを観察した。また、移植から 90 日後のラット後肢を画像診断的、電気生理学的、組織学的／評価をそれぞれ行った。

4. 研究成果

(1): CO と O₂ の混合ガスによる高圧保存においては、湿度を保持し、保存ガスで圧力を加えて、保存液に浸漬させず、ガス中に臓器を直接曝露することが重要であることを見出した。この結果は、CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧保存法が臨床応用へ発展する上で、重要な学術的基盤になると考えられる。

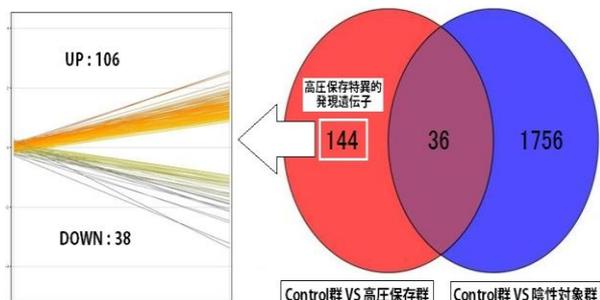
この最適条件下での高圧保存法を Control (保存せず摘出後即移植) と比較した。その結果、高圧保存法にて 24 時間保存後であっても心拍数、重量、HE 染色による組織学的評価において、Control と有意差が認められないことが分かった。また FDG-PET による画像診断的機能評価においても同様に、高圧保存法で 24 時間保存後であっても、Control (保存せず摘出後即移植) と糖の取込みに有意差は認められないことが分かった。これらの評価により、CO と O₂ の混合ガスによる高圧保存は 24 時間保存後であっても Control と変わらない機能を保つことが分かった。



(2): 発現解析ソフト Gene Spring を用い、発現データの二次元クラスター網羅的遺伝子発現解析を行った。Control 群、高圧保存群、陰性対照群それぞれの群を比較し、高圧保存法に特異的な候補遺伝子を 100 数十個見つけた。そのうち Control 群と比較した発現

増強遺伝子 (Fold change 2.0<) が 106 個、発現減弱遺伝子 (Fold change 2.0<) が 38 個であった。現在、Pathway 解析にて、それらの遺伝子を解析中である。

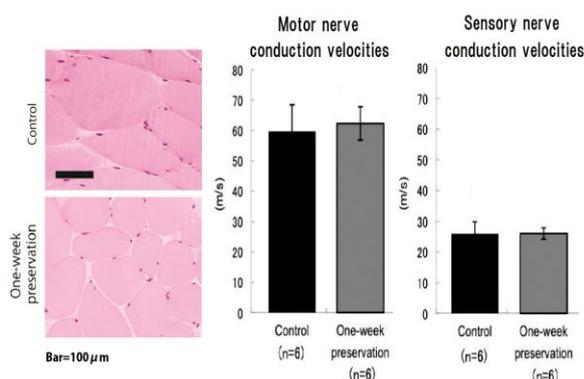
今回明らかとなった特異的な発現遺伝子の機能を調べることで、高圧保存法のメカニズムの一端を解明することができるだろう。



(3): 現在、動物実験や臨床における切断指の保存限界時間は 24 時間、前腕部など筋を多く含む切断肢においては 6 時間が一般的である。ラットの切断後肢においては、24 時間を超える保存時間の報告はない。

ラットの切断後肢を CO と O₂ による高圧保存法にて保存したところ 1 週間という長期保存に成功した。移植後 90 日間以上の生着を確認している。その後、Control (保存せずに離断後即移植) と機能を比較したところ、1 週間保存群では筋の委縮は見られたが、神経伝達速度による評価では、遠心性・求心性ともに有意差はなかった。

ラット後肢を 1 週間保存できたことは、非常に大きな進歩であると思われる。また、心臓だけでなく、四肢においても CO と O₂ を用いた高圧保存法が有効であったことは、この保存法の汎用性を示したといえる。



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 1 件)

(1) 畑山 直之、平井 宗一、内藤 宗和、寺山 隼人、曲 寧、伊藤 正裕、臓器保存におけるメディカルガスの可能性：一酸化炭素 (CO) と酸素 (O₂) を用いた高圧保存法、Organ Biology、査読無、Vol.20、2013、印刷中

[学会発表] (計 4 件)

- ① 畑山 直之、移植用臓器における高圧保存法の可能性、118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013/3/28-30、香川
- ② 畑山 直之、臓器保存におけるメディカルガスの可能性～一酸化炭素 (CO) と酸素 (O₂) を用いた高圧保存法～、第 39 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2012/11/16-17、福島
- ③ 畑山 直之、第 167 回東京医科大学医学会総会、CO と O₂ を用いた高圧保存法におけるラット心臓の機能的評価、2011/6/4、東京
- ④ 畑山 直之、ラット摘出心臓による CO を用いた高圧乾燥保存法の保存限界とメカニズム、第 37 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2010/11/19-20、新潟

[その他]

(1) 賞罰

- ① 畑山 直之、ラット摘出心臓による CO を用いた高圧乾燥保存法の保存限界とメカニズム、第 37 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2010/11/19-20、新潟学会賞受賞
- ② 畑山 直之、臓器保存におけるメディカルガスの可能性～一酸化炭素 (CO) と酸素 (O₂) を用いた高圧保存法～、第 39 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2012/11/16-17、福島 会長賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑山 直之 (HATAYAMA NAOYUKI)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：8 0 5 3 4 7 9 2

(2) 研究協力者

梨井 康 (LI XIAO-KONG (KO))
国立成育医療研究センター研究所・RI 管理室・室長
研究者番号：6 0 3 2 1 8 9 0

犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)
放射線医学総合研究所
分子イメージング研究センター・研究員
研究者番号：70399830

内藤 宗和 (NAITO MUNEKAZU)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：10384984

平井 宗一 (HIRAI SHUICHI)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：70516054

伊藤 正裕 (ITOH MASAHIRO)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：00232471