

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25861709

研究課題名(和文)切断肢高压ガス保存法の機序の解明と臨床への応用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of high pressure gas preservation method for clinical application in amputated limb preservation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メディカルガスを用いた高压ガス保存法によって、ラット後肢を保存液に浸漬せずに長時間保存できることを明らかにした。さらに、保存に用いた一酸化炭素(CO)、キセノン(Xe)、そして亜酸化窒素(N₂O)がもつ保存効果の機序の一端を解明した。これら結果は、高压ガス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、ブタ切断四肢においても長時間保存できることを明らかにした。保存の対象が大きくなっても保存が可能であったことは、高压ガス保存法がヒトに応用可能である可能性を示唆したと言える。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that exposure of rat amputated hind limbs into high-pressure medical gas without immersion in stock solution made it possible to long-term preservation. In addition, we revealed a part of mechanisms which carbon monoxide, xenon and dinitrous monoxide gas has cytoprotective effect for preservation. These results are important to show the scientific evidence and apply for clinical cases. Furthermore, we succeeded in pig amputated limb preservation by using high-pressure medical gases. This result indicates that high pressure gas preservation method can apply to organs of large animal and to have application potentiality in clinical scene.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再建外科学 臓器保存 高压ガス

1. 研究開始当初の背景

現在、マイクロサージェリーの技術の進歩に伴って、指、耳、頭皮、顔面、陰茎などの再接着術が可能となり、その適応範囲は広がっている。一方で、切断された指や肢の保存時間の制限は未だに厳しく、一般的に室温で6時間以内、冷却した場合には24時間以内に再接着することが望ましいとされている。そのため、切断肢移植の更なる成功率の向上のためには、臓器の質を保ち、かつ長期に保存する技術を開発することが大変重要である。最近、報告者は一酸化炭素(CO)と酸素(O₂)の混合ガスを用いた高圧ガス保存法を新たに開発し、ラット後肢を用いた実験で1週間保存した。その後、同系のラットに移植して生着させることに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、)まずCOとO₂を用いた高圧ガス保存法にてラット後肢の1週間保存移植、生着の再現性を確認し、さらにガスによる保存のメカニズムを解明したい。また、CO以外のメディカルガスとしてキセノン(Xe)は、細胞保護効果をもつことが報告されており、また安全性の高いガスとしてよく知られている。)そこでXeを用いた高圧ガス保存法によりラット後肢を保存移植し、切断肢への保存効果を確認し、さらにそのメカニズムを解明したい。そして、)前臨床試験として大動物の四肢を高圧ガス保存法にて保存し、保存対象が大きくなっても高圧ガス保存法が応用可能であるか、その評価をしたい。今回、報告者はメディカルガスを用いた高圧ガス保存法のメカニズムを解明し、大動物の四肢へと応用、そしてこの保存方法の臨床への展開を目指したい。

3. 研究の方法

(1) 保存・移植後の移植肢の生着

ラット後肢をCOやXeを用いた高圧ガス保

存法にて保存後、移植し、移植肢の生着を確認する。何らかの理由により移植肢への血流が遮断されると、数日で壊死が起こり爪の先が黒くなるので、これを不生着とし、生着を判断する。

(2) 遺伝子学的アプローチによるメカニズムを解明

保存に関わる作用機序は、抗炎症、抗アポトーシス、抗酸化などの細胞保護関連の効果が主に挙げられる。現在まで細胞保護に関わるmRNAの発現についてはよく知られており、各種プライマーを用いてReal-Time RT-PCRにより、その発現を解析する。ラット後肢をCOやXeを用いた高圧ガス保存後、移植し、60～90分後にサンプルを採取し、total RNAを抽出し、Real-Time RT-PCRにて各種プライマーによる発現を確認し、比較検討、解析を実施する。

(3) 大動物への応用

前臨床試験として、大動物(ブタ)の四肢を、ラット後肢にて検討したもっとも優れた条件を用いた高圧ガス保存法にて保存する。保存後、電気刺激により筋電図、筋収縮を確認し、大動物においても高圧ガス保存法が応用可能かどうか検討する。

4. 研究成果

(1) COとO₂による高圧ガス保存法にて1週間保存後、移植、生着の再現性が得られた。さらにReal Time RT-PCRによりCOとO₂保存による高圧ガス保存法のメカニズムの一端を解明することができた。COで高圧ガス保存した群は、1週間保存した後でも炎症性サイトカインの発現がNormal(健常の後肢からのサンプル)と比較し、有意差のない値を示した。また細胞死関連のmRNAの発現では、Normalよりも有意に低い値を示した。

(2) Xe、亜酸化窒素(N₂O)による高圧ガス保存法によりラット後肢を保存移植し、生着

に成功した。

臨床への展開を考慮し、より安全性の高い、毒性のない Xe を保存ガスとして選択した。さらに、既に臨床で使用されている亜酸化窒素(N₂O)=笑気ガスを保存ガスとして使用を試みた。それぞれのガスによる保存でラット後肢 3 日間保存移植そして生着に成功した。さらに、これまでの高圧ガス保存ではガスによる圧力をかけていたが、今回 1 気圧(大気圧)で、一切圧力をかけずに Xe ガス保存、N₂O ガス保存にて保存に成功した。これらの結果は、圧力をかけず且つ毒性のないガスを保存に用いたことで安全性が確保され、より臨床への応用に近づいたと考えられる。

(3) Xe、N₂O を用いた高圧ガス保存法のメカニズムを Real Time RT-PCR によりその一端を解明した。

Xe 保存では一部の炎症性サイトカインの発現が Normal と比較して減少していた。N₂O ガス保存では、抗酸化反応を促進させる酵素の一種である GST や Mn-SOD の発現が Normal と比較して有意に上昇していることが認められた。ガスがもつ保存肢への作用機序の一端を解明し、学術的な基盤を作ったことにより、高圧ガス保存法が臨床へと繋がると考えられる。特に、N₂O は細胞保護を目的として使用された報告はなく、その効果は明らかにされていない。既に臨床で使用されている N₂O は、今回の結果からその細胞保護効果と機序を証明することができれば、より簡便に臨床現場で保存ガスとして使用が可能になるだろう。

(4) 大動物(ブタ)の四肢を高圧ガス保存法にて保存後、電気刺激による筋収縮を確認した。

ブタ前腕を切断し、24 時間ガス保存後、電気刺激を行ったところ、収縮を確認することができた。保存後のブタ前腕にて収縮を確認

できたことは、保存対象がより大きな部位であっても保存が可能であることを示唆している。ヒトでは切断 ” 指 ” など小さい部位よりも手・前腕など大きな部位の切断 ” 肢 ” は、再接着後の生着率・予後が悪い。ブタ前腕を用いたこの結果は、これらの改善に繋がっていくものと考えられる。

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)

畑山直之、2014 国際移植学会 World Transplantation Congress, San Francisco 2014 、東京医大誌 73(1), 53-54 2015 査読なし

[学会発表] (計 7 件)

畑山直之、高圧気相保存法による臓器保存、第 42 回日本臓器保存生物医学学会学術集会、2015.11.13-14、岩手

畑山直之、Functional evaluation of rat heart transplanted after preservation in a high-pressure carbon monoxide and oxygen mixed gas、東京医科大学記念館ポスター発表会、2015.2.25、東京

畑山直之、Functional evaluation of rat heart transplanted after preservation in a high-pressure carbon monoxide and oxygen mixed gas、第 174 回東京医科大学医学会総会、2014.11.1、東京

Hatayama Naoyuki、Functional evaluation of rat heart transplanted after preservation in a high-pressure carbon monoxide and oxygen mixed gas、World Transplant congress、2014.7.26-31、San Francisco

畑山直之、Successful long-term preservation of rat limbs by a combination of high-pressure carbon

monoxide and oxygen for replantation、
第 119 回日本解剖学会・全国学術集会、
2014.3.27-29、栃木

畑山直之、移植用臓器における高圧保存
法の可能性、東京医科大学記念館ポスタ
ー発表会、2013.11.28、東京

畑山直之、CO₂ と O₂ および CO と O₂ の混
合ガスを用いた高圧気相保存法、第 40
回日本臓器保存生物医学会学術集会、
2013.11.9-10、東京

〔その他〕

(1) 賞罰

畑山直之、Functional evaluation of rat
heart transplanted after preservation in
a high-pressure carbon monoxide and oxygen
mixed gas、第 174 回東京医科大学医学会総
会、2014.11.1、東京 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 : 80534792

(2) 研究協力者

松下 正之 (MATSUSHITA MASAYUKI)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号 : 30273965

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 : 60321890

荒木 淳 (ARAKI JUN)
東京大学・医学部附属病院・病院診療医
研究者番号 : 00508088

内藤 宗和 (NAITO MUNEKAZU)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10384984

平井 宗一 (HIRAI SHUICHI)
東京医科大学・医学部・准教授
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