

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10151

研究課題名(和文)小腸移植における高圧ガス保存法の応用：再灌流障害軽減と免疫抑制作用の可能性

研究課題名(英文)The application of high pressure gas preservation method in small intestine transplantation

研究代表者

畑山 直之(Hatayama, Naoyuki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80534792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：移植医療は、日常的な治療方法として確立しているが、小腸移植は、他の臓器に比べて生着率・生存率が低い。虚血に弱い小腸は、保存限界時間が6から8時間と短い。摘出小腸を虚血から守り、障害を抑制するような保存技術が望まれている。
我々は、一酸化炭素と酸素の混合ガスを用いた高圧ガス保存法という新たな臓器保存法を開発し、これを小腸の保存に応用した。ラット・イヌの小腸は、24時間という長期保存において、粘膜は一部剥離していたが、活発な蠕動運動が確認された。高圧ガス保存法は、管腔臓器において、臓器の大きさに関わらず、保存効果を発揮することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The transplantation medicine has been established as a common approach to therapy. However, it is difficult to storage the small intestine and survival rate after transplantation is lower than other organs. The limitation time of storage for isolated small intestine is very short (6 to 8 hours), because of the weakness against ischemia. Therefore, the novel methods for avoiding the ischemia injury are desired.

Recently, we developed a new organ preservation method using mixed high pressure gas of carbon monoxide and oxygen. The aim of this study is to preserve the small intestine in this method. In the long-term (24h) preservation of rat and dog's small intestine, although the part of mucosa was dropped, active peristaltic movement was confirmed. These results indicated that the preservation method using mixed high pressure gas is useful for the small intestine regardless of the size.

研究分野：臓器保存

キーワード：高圧ガス保存法 一酸化炭素 酸素 虚血再灌流障害 小腸 ラット イヌ

1. 研究開始当初の背景

移植医療は、欧米を中心に普及しており、日常的な治療方法として確立している。本邦では 2010 年に臓器移植法が改訂され、その数は増加傾向にある。そのうち小腸移植は、日本国内では 2011 年 6 月までに 18 例の患者に対し、20 回行われている。近年の移植技術の向上、新しい免疫抑制剤の開発による成績向上を背景に症例数が今後増加してくるものと考えられる。しかし、小腸移植は他の移植に比べて未だ生着率・生存率が低いのが現状である。これらの原因の一つとして、小腸は虚血に弱く、臨床では University of Wisconsin (UW) 液による浸漬保存法において、他の臓器と比較しても機能的に安全圏とされる保存限界時間が 6～8 時間と短い。また再灌流障害・拒絶反応を起こしやすい臓器としても知られている。臨床において、短時間の保存であっても、小腸を一時的な虚血から守り、かつ再灌流障害・拒絶反応を抑制するような技術が望まれている。

報告者らは一酸化炭素 (CO) と酸素 (O₂) の混合ガスを用いた高圧ガス保存法 (PCO = 4000 hPa + PO₂ = 3000 hPa) を新たに開発し、ラットの心臓では 48 時間、四肢では 1 週間、それぞれ保存後に移植し、生着することに成功している。この高圧ガス保存法を用いれば、摘出臓器の虚血再灌流障害を軽減し、臓器の質を保ち、長期に保存することが可能である。報告者は CO と O₂ を用いた高圧ガス保存法を小腸に応用し、小腸移植における再灌流障害の軽減の可能性を検討したい。

2. 研究の目的

本研究では、1) 小腸に対する CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧ガス保存法の確立を行う。報告者は、これまで高圧ガス保存法により、心臓 (心筋)、四肢 (骨格筋) にて、既存の保存法よりも長期的に機能を保存できる結果を得てきた。そこで、ラット小腸を高圧ガス保存法で保存し、評価、検討を行う。

つぎに 2) 高圧ガス保存法の大動物臓器への応用の可能性を探っていく。これまでの実験で、高圧ガス保存法が大きな実質臓器の深部に対して、浸透性が低く、保存効果が下がることが示唆されている。そこで、内腔からもガスをアプローチできる管腔臓器を対象に、臓器の内腔をガスで満たして高圧ガス保存することによる、大動物臓器へのガスの浸透性と保存効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) まずラット小腸では、CO と O₂ の高圧ガス保存後の平滑筋を標的として、保存後の電気生理学的評価を行なった。ラット小腸を用いた電気生理学的評価には、マグヌス管を使用した。ラットから小腸を空腸側と回腸側からそれぞれ 4 cm 切断し、CO と O₂ を用いた高圧ガス保存法にて 1、3、5、7 日と経時的に保存した。

(2) 大動物臓器への応用として、イヌの小腸を対象に高圧ガス保存法による保存を実施し、同所性移植を行った。既存の保存法である UW 液による浸漬保存法を対照群とした。それぞれ 24 時間保存した後、同所性自家移植を行い、再灌流後の肉眼所見と蠕動運動の比較を行なった。

(3) 内腔からガスをアプローチできる臓器としてラット・イヌ小腸、さらにラット・イヌ肺の保存を試みた。ラット小腸の粘膜を標的として実験を行なったが、粘膜上皮は、虚血に敏感かつ代謝が盛んな部位であり、評価が安定しなかった。そこで、上皮として比較的脆弱な肺胞上皮を標的に保存を行なった。ラット小腸を高圧ガス保存法にて 24 時間保存し、移植から 90 分後に組織学的評価を行なった。ラット・イヌ肺は、摘出後に肺の内腔へ保存ガスを換気し、高圧ガス保存で 24 時間保存した。

4. 研究成果

(1) 高圧ガス保存された小腸は、7 日保存後においても正常な腸管運動が見られ、アセチルコリンによる刺激で、摘出直後の小腸と変わらない収縮が確認できた (図 1)。今回、ラット小腸の結果では、腸管の平滑筋を長期に保存しても、その運動機能を保持していることを示した。

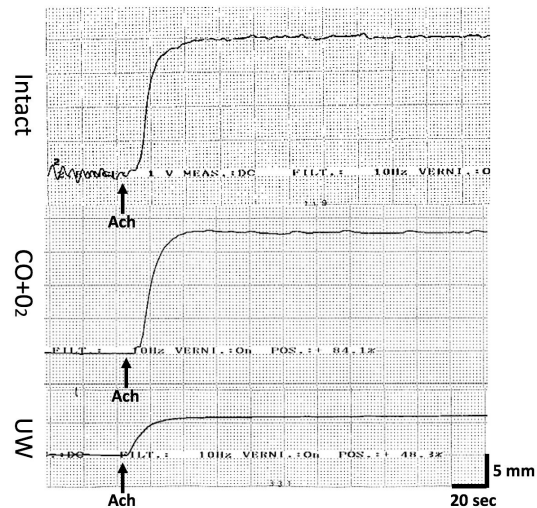


図 1 マグヌス管による小腸の収縮

(2) イヌ小腸においても、高圧ガス保存法にて 24 時間保存後も移植後の血流は良好で、蠕動運動を確認することができた。再灌流直後から約 1 分で蠕動運動が見られ、その立ち上がりの早さと活発な動きを確認できた。UW 浸漬保存群では、血色が悪く、蠕動運動は確認できなかった。

(1)(2) の結果から、虚血再灌流障害の軽減、高圧ガス保存法の平滑筋への応用、また大きな臓器への応用の可能性が示唆された。臨床において、移植前の腸管の質をより良く保つことは、生着率の改善、術後の一時的な人工肛門や胃瘻および腸瘻の早期離脱が可能となり、患者の日常生活への早期復帰

に貢献するだろう。

(3) 高圧ガス保存法により保存したラット小腸は、比較的粘膜の形態は保たれていたが、部分的に剥離が見られ、評価の安定性を欠いた。一方で、ラット肺保存の結果では、肺の内腔にガスを換気した群は、しななかった群と比較し、移植 90 分後の浮腫と肺胞内出血を抑えた(図 2)。さらに Real-Time RT-PCR の結果では、TNF、IL-6、IL-1、iNOS の発現を有意に抑えることがわかった。

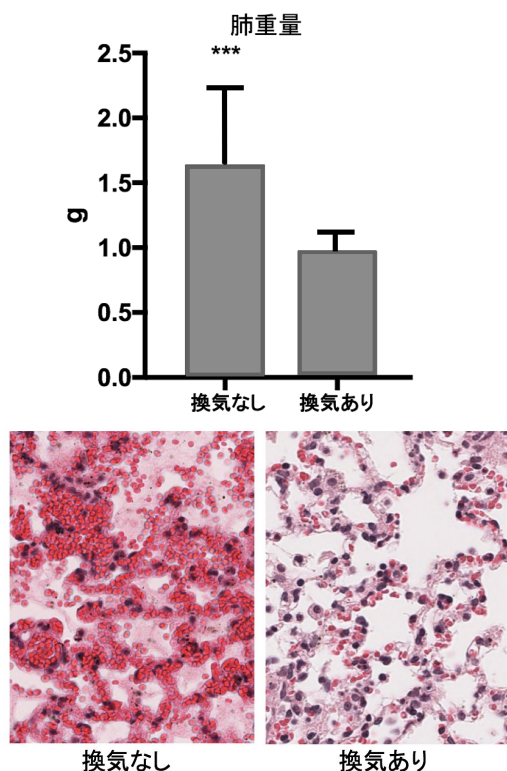


図 2 保存・移植後の肺重量と組織像

さらに、イヌ肺を同様の方法で保存し、同所性移植を行い、3 時間までの血液ガス分析を比較した。肺の内腔にガスを換気した群は、PaO₂、PaCO₂、Lactate、PIP を正常値に保ち、状態は良好であった。一方で、換気しなかった群は、移植 1 時間までの Lactate と 3 時間後の PaCO₂ が高値を示した(図 3)。

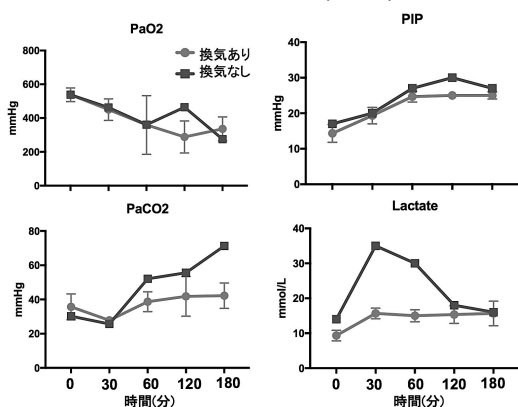


図 3 保存・移植後の血液ガス分析

ラット・イヌ肺の結果では、ガスを内腔から曝露し、高圧ガス保存法で保存することで、肺の機能を保ち、保存効果が上がることが分かった。臨床応用への可能性を示せたと考える。今後、粘膜をより安定して保存できる方法を確立していく。

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)

Hatayama N, Hirai S, Naito M, Terayama H, Araki J, Yokota H, Matsushita M, Li XK, Itoh M. Preservation of rat limbs by hyperbaric carbon monoxide and oxygen. 査読あり、Sci Rep. 2018 Apr 26;8(1):6627.

Hirai S, Hatayama N, Naito M, Nagahori K, Kawata S, Hayashi S, Qu N, Terayama H, Shoji S, Itoh M. Pathological effect of arterial ischaemia and venous congestion on rat testes. 査読あり、Sci Rep. 2017 Jul 14;7(1):5422.

Yi K, Hatayama N, Hirai S, Qu N, Hayashi S, Kawata S, Nagahori K, Naito M, Itoh M. Development of heterotopic transplantation of the testis with the epididymis to evaluate an aspect of testicular immunology in rats. 査読あり、PLoS One. 2017 May 5;12(5):e0177067.

Abe T, Yazawa K, Fujino M, Imamura R, Hatayama N, Kakuta Y, Tsutahara K, Okumi M, Ichimaru N, Kaimori JY, Isaka Y, Seki K, Takahara S, Li XK, Nonomura N. High-pressure carbon monoxide preserves rat kidney grafts from apoptosis and inflammation. 査読あり、Lab Invest. 2017 Apr;97(4):468-477.

Hatayama N, Inubushi M, Naito M, Hirai S, Jin YN, Tsuji AB, Seki K, Itoh M, Saga T, Li XK. Functional evaluation of rat hearts transplanted after preservation in a high-pressure gaseous mixture of carbon monoxide and oxygen. 査読あり、Sci Rep. 2016 Aug 26; 6:32120.

～ 他共著 3 件。いずれも査読あり。

[学会発表](計 5 件)

畑山 直之、平井 宗一、横田 紘季、矢倉 富子、福重 香、中野 隆、内藤 宗和、高圧

ガスを用いた新たな移植臓器の保存方法、
第 123 回 日本解剖学会総会、2018
畑山 直之、平井 宗一、横田 紘季、矢倉 富
子、福重 香、内藤 宗和、高圧ガスを用い
た臓器保存の試み第 53 回 日本移植学会
総会 2017
畑山 直之、平井 宗一、内藤 宗和、伊藤 正
裕、中野 隆、高圧気相保存法による移植
用臓器の保存 第 76 回 日本解剖学会中
部支部学術集会 2016
(招待講演) 畑山 直之、曲 寧、林 省
吾、平井 宗一、倉升 三幸、永堀 健太、
小川 夕輝、高橋 薫平、伊藤 正裕、ラッ
トにおける異所性精巣移植の試み、第 121
回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016
(招待講演) 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
物医学会 2015

〔図書〕(計 1 件)

畑山 直之 他、中外医学社出版、実践 臨床
生殖免疫学、2 章各論 男性不妊症と免疫、
精巣移植、2018 ; 252-255

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：生体材料の保存方法、生体材料の生産
方法、生体材料、移植材料、移植方法および
生体材料の保存装置

発明者：畑山 直之、内藤 宗和、平井 宗一、
伊藤正裕

権利者：住友精化株式会社

種類：公開特許公報(A)

番号：特開 2018-16654(P2018-16654A)

取得年月日：2018 年 2 月 1 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

畑山 直之 (HATAYAMA NAUYUKI)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80534792

(2)研究分担者

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：60321890

松野 直徒 (MATSUNO NAOTO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：00231598

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)
愛知医科大学・医学部・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