

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19891

研究課題名(和文)水素を用いた肝境界グラフト臓器保存戦略—肝再生と障害の観点から

研究課題名(英文)The preservation of the marginal graft using hydrogen super rich saline

研究代表者

小川 絵里(OGAWA, ERI)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30440506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの虚血再灌流モデルにおいて本研究で検討した水素投与条件では虚血再灌流障害の軽減効果は認めなかった。ラット同所性全肝移植モデルを作成して長期生存を確認した。また肝細胞癌に対する肝移植後の肝癌再発モデル作成を開始した。今後は境界グラフトモデルも含めて水素水による虚血再灌流障害の軽減効果を検証していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Our basic data has not shown that the effect of hydrogen super rich saline in our hepatic pedicle clamping-induced ischemic reperfusion injury. We established orthotopic liver transplantation model in rat. All the grafted rats have survived for more than one hundred days. We have tried to make recurrence model for the rat liver transplantation for hepatocellular carcinoma. We have planned to verify the reduction effect of ischemic reperfusion injury by hydrogen super rich saline on the marginal graft model such as small-for-size graft and fatty liver transplantation model in addition to this model.

研究分野：肝移植

キーワード：虚血再灌流障害 肝移植後の肝癌再発 肝境界グラフト 水素含有臓器保存液 ラット同所性全肝移植

1. 研究開始当初の背景

我が国においては、慢性的なグラフト不足が大きな社会問題となっている。未だに年間約 2000 人近くの患者が肝移植適応がありながらも移植を受けることができず、亡くなっていると推定されている(日本移植学会ファクトブック 2014: p21)。脳死肝移植医療が定着している欧米においても臓器不足への対応から境界グラフトの使用が期待されている。境界グラフトとは「過小グラフト」や「心停止ドナーからのグラフト」、「脂肪肝グラフト」など提供者となれるぎりぎりの臓器をさすが、一般的な正常肝での脳死全肝移植に比べ、術後肝不全のリスクが高く、一般に術後成績は不良である。過小グラフトではレシピエントの体格に比べて相対的に小さなグラフトを使用することによる肝再生不良(過小グラフト症候群)が問題となり、心停止グラフトや脂肪肝グラフトでは虚血再灌流障害が強くなるのが成績不良の原因と考えられている。したがって、境界グラフトの移植成績向上のためには、虚血再灌流障害の軽減と肝再生の促進が必須である。

虚血再灌流障害に対して、以前より、一酸化炭素、硫化水素などのメディカルガスが有効であることが報告されてきた。さらに、われわれの施設では、境界グラフトの肝再生を促進させ、虚血再灌流障害を抑制する目的で、一酸化窒素を用いたガス灌流を用い、過小グラフト(Yagi S et al. *AJT* 2012;12:3406-13)、脂肪肝グラフト(Nagai K, Yagi S, et al. *Transplantation* 2013;95:78-84.)、心停止グラフト(Kageyama S, Yagi S, et al. *Transplantation* 2014;97:618-25.)でそれぞれ良好な成績を得て、国内外から注目されてきた(2011年ヨーロッパ実験外科学会 B. Braun Award 受賞)。

水素の虚血再灌流障害を軽減させる効果が、近年着目されている。水素の効果は活性酸素(ヒドロキシラジカル)に直接かつ選択

的に作用し、水を発生することで障害を軽減させ、また細胞障害の強い過酸化亜硝酸に対しても直接的に抑制をしていると考えられている(Buchholz BM et al. *Transplantation*. 2011;92:985-92)。肝における虚血再灌流障害の主な原因は活性酸素による組織障害であり、水素ガスによる障害軽減効果が期待される。

2. 研究の目的

現在の肝移植医療においては慢性的なドナー不足のため、いわゆる境界グラフトの移植が、ドナー不足を解消する手段として期待されている。当該研究では、小動物(ラット)を用いた肝境界グラフトモデル(過小グラフト・脂肪肝グラフト・心停止グラフト)を作成し、臓器保存時に水素含有臓器保存液を使用することにより、境界グラフトの viability を向上させる可能性につき詳細に検討し、臨床応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

- (1) SD ラットに対して、pedicle をクランプして、70%肝切除を行い、水素水(Hydrogen super rich saline: HSRS, 7ppm or 10ppm)を 5ml-10ml 門脈内投与して、虚血再灌流に関して水素水の濃度を 0ppm, 1ppm, 2ppm と濃度変化に伴う効果を評価した。
- (2) ラット肝癌モデルにおいて肝部分切除時の虚血時間の長さによって腫瘍発生率に差が生じ、虚血再灌流障害が肝癌発生に関与していると報告されている。そこで肝癌に対する肝移植後の肝癌再発モデルを作成し、水素水によるグラフト還流によって虚血再灌流障害の軽減効果による肝癌再発抑制について検証を行うこととした。

まず Lewis ラットを用いて同所性全肝移植モデルを作成した。

ドナー手術：全身麻酔下のラットに正中切開を加え、ヘパリン投与下に腹部大動脈からリンゲル液で還流し全肝摘出を行った。レシピエント手術：全身麻酔下に肝臓を摘出し、同所性に肝移植を行った。血行再建は肝上部および肝下部大静脈を手縫いで門脈は Cuff 法にて行った。胆管はステント法にて再建し、肝動脈は sleeve 法にて再建した（図 1）。



図 1

(3) 同モデルにおいて各脈管（門脈、肝静脈、肝動脈、胆管）の吻合後、経門脈的に肝癌細胞株(N1S1)を注入することによって肝移植後の肝癌再発モデルを作成し、水素含有リンゲル液還流群および水素非含有リンゲル液還流群に分類して術後 3 週間目に両群間での術後再発率、血清学的評価、組織学的評価を評価することとした。肝移植後の肝癌再発モデル作成のため、肝癌細胞株（N1S1）をそれぞれ 1×10^6 細胞(n=2)、 2×10^6 細胞(n=2)、 6×10^6 細胞(n=2)を経門脈的に注入した。

4. 研究成果

(1) 水素水の濃度に伴う血液生化学検査（AST, ALT, LDH, Bil）を表 1 に示す。本実験の条件では水素水の肝切除時の虚血再灌流障害に対する抑制効果は認められなかった。

	0ppm	1ppm	2ppm	p value	
				0 ppm vs 1 ppm	0 ppm vs 2 ppm
AST	763	1038	797	0.036	0.571
ALT	465	606	552	0.393	0.571
LDH	2816	4695	2880	0.036	0.571
Bil	0.3	0.5	0.5	0.571	0.786

表 1

(2) 同所性全肝移植モデルでは全例(n=5)で 100 日以上の生存を認めた（図 2）。

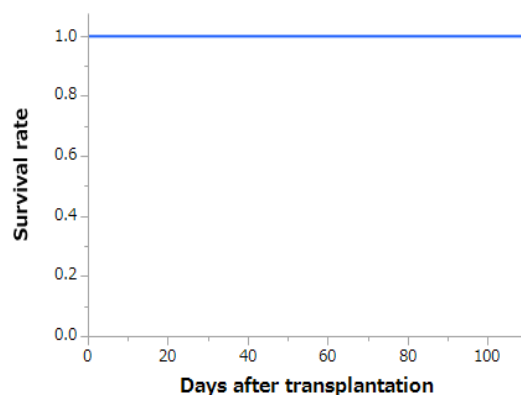


図 2

(3) 術後 3 週間目に犠牲死を行い、採血および肝臓組織を採取したが、いずれの群においても肝表面および肝臓内に腫瘍の形成は認めなかった。代表として 6×10^6 細胞注入群の術後 3 週間目の肝表面および肝断面写真（図 3、図 4）を示した。

図 3



図 4



各群における術後 3 週間目の血液生化学データおよび腫瘍マーカーのデータを表 2、表 3 に示した。

表 2

	AST	ALT	ALP	γ GTP	LDH	T-Bil	D-Bil	I-Bil
Control (n=3)	63	43	872	<3	195	0.2	0.1	0.1
1*10 ⁶ cell (n=3)	64	44	697	<3	369	0.2	0.1	0.1
2*10 ⁶ cell (n=3)	108	66	1321	<3	625	0.4	0.3	0.1
6*10 ⁶ cell (n=3)	101	57	1192	<3	600	0.3	0.1	0.2

表 3

	AFP	PIVKA II
Control (n=3)	<2	< 6
1*10 ⁶ cell (n=3)	<2	< 6
2*10 ⁶ cell (n=3)	<2	< 6
6*10 ⁶ cell (n=3)	<2	< 6

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 9 件)

“Coexistence of Bilirubin ≥ 10 mg/dL and Prothrombin Time-International Normalized Ratio ≥ 1.6 on Day 07: A Strong Predictor of Early Graft Loss after Living Donor Liver Transplantation.” Okamura Y, Yagi_S, Sato T, Hata K, Ogawa E, Yoshizawa A, Kamo N, Yamashiki N, Okajima H, Kaido T, Uemoto S. Transplantation. 2017 (in press)

“Living-donor liver transplantation for congenital biliary atresia with porto-pulmonary hypertension and moderate or severe pulmonary arterial hypertension: Kyoto University experience” Ogawa E, Hori T, Doi H, Segawa H, Uemoto S. Clin Transplant. 2014 Sep;28(9):1031-40.

“Living-donor liver transplantation for moderate or severe porto-pulmonary hypertension accompanied by pulmonary

arterial hypertension: a single-centre experience over 2 decades in Japan” Ogawa E, Hori T, Doi H, Segawa H, Uemoto S. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. 19(6), 638-649 (2012)

“The challenge of acute rejection in intestinal transplantation.” Yoshitoshi EY, Yoshizawa A, Ogawa E, Kaneshiro M, Takada N, Okamoto S, Fujimoto Y, Sakamoto S, Masuda S, Matsuura M, Nakase Y, Chiba T, Tsuruyama T, Haga H, Uemoto S. Pediatr Surg Int. 2012 Aug;28(8):855-9. Epub 2012 Jul 4.

「体重 4kg 未満乳児に対する生体肝移植術 10 例の報告」小川絵里 小川晃平 園田真理 高田斉人 岡本晋弥 上本伸二 日本小児外科学会雑誌 第 48 巻 4 号 710-715 2012.

“Laparoscopic Enucleation of a Gastroenteric Duplication Cyst Arising in a Pancreatic Tail that Did Not Communicate with the Pancreatic Duct: Report of a Case” Kohno M, Ikawa H, Konuma K, Masuyama H, Fukumoto H, Ogawa E, Takahashi S, Kurose N. Surgery Today. 2010;40:281-284.

出生前診断の倫理と実際 染色体異常の出生前診断 小川絵里 伊川廣道 高橋貞佳 押切貴博 福本泰規 増山宏明 河野美幸 小沼邦男 小児外科 第 41 巻 5 号 461-464 2009.

「知ってるようで知らない、これらの疾患の違い」Chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction syndrome (CIIPS) と megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome(MMIHS) 小川絵里 伊川廣道 高橋貞佳 押切貴博

福本泰規 増山宏明 河野美幸 小沼邦
男 小児外科 第41巻 4号 389-392
2009. (査読無)

17. 「**Budd-Chiari 症候群に対して緊急
生体肝移植を施行した1例**」小川絵里

笠原群生 木内哲也 尾池文隆 山本栄
和 小倉靖弘 藤本康弘 貝原聡 江川
裕人 田中紘一 移植(日本移植外科学
会雑誌) 第37巻 4号 177-181
2002.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 絵里 (OGAWA, Eri)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号： 30440506

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし