

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006 -2008

課題番号：18390341

研究課題名（和文） 肝移植手術におけるカルペリチドの効果

研究課題名（英文） The effect of human atrial natriuretic peptide in liver transplantation

研究代表者

菅原 寧彦 (SUGAWARA YASUHIKO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 90313155

研究成果の概要：カルペリチド投与により、阻血再灌流障害が著明に軽減される可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2007 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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： 肝移植 - カルペリチド - 阻血再灌流

1. 研究開始当初の背景

肝移植は末期肝疾患に対する有効な治療法として確立している。本邦では脳死肝グラフトが得られにくいいため、ほとんどが生体ドナーから部分的なグラフトを確保している。近年の集計によると成人例は現在まで約 1500 例施行されているが、累積生存率は約 70% にとどまっている。レシピエントは生存期間が 1 年程度の症例に限定されており、術前の状態は必ずしも良好ではないのは事実である。しかし、生体肝移植が生体ドナーの精神的、肉体的な多大な犠牲の上に成り立っている医療であることを鑑みるに、70% という成績は大変不満足な結果と考えざるを得ない。

この原因の一つに、申請者は十分な大きさのグラフトを確保できない点を指摘した (Sugawara Y, Makuuchi M, et al. Small-for-size grafts in living-related liver transplantation. J Am Coll Surg 2001; 192: 510-3)。グラフトサイズが不十分であると、レシピエントのいわゆる metabolic demand に対応しきれないばかりでなく、相対的に高い門脈圧にグラフトが暴露されることにより、阻血再灌流障害が大きな問題としてクローズアップされる。実際成人例では、術後長期間 (2 週間から 1 ヶ月) cholestasis が継続し、術後管理が難渋することが多い。したがって、成人肝移植では、

移植後の阻血再灌流障害を如何に軽減せしめるかが大きな課題となる。

カルペリチドは、心筋や血管平滑筋細胞内のcGMPを増加させる作用が知られており(図1)急性心不全の治療薬として使用されている。その一方で阻血再灌流障害にも有効であるとの報告もされている。申請者はラット温阻血モデルでカルペリチドと類似のホスホジエステラーゼ選択的阻害剤投与により阻血再灌流障害が著明に軽減されることを発見した(Kobayashi T, Sugawara Y, et al. Effects of amrinone on the rat hepatic ischemia-reperfusion injury. J Hepatol 2002; 37: 31-8)。また肝硬変肝切除に伴う温阻血再灌流障害においても同様な結果を得た(Orii R, Sugawara Y, et al. Amrinone enhances indocyanine green elimination in cirrhotic patients. Brit J Anaesth 2000; 85: 389-95)

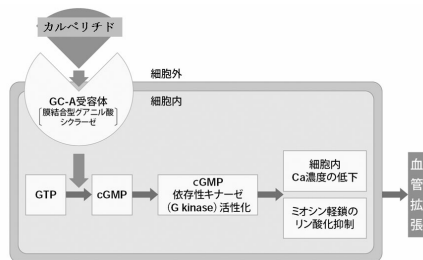


図1 カルペリチドの作用機序

2. 研究の目的

以上のような結果を背景に実際に当科で施行されている、成人生体部分肝移植においてカルペリチドにより阻血再灌流障害が軽減され、さらに術後成績の向上に結び付けたいというのが本研究の動機である。ラット温阻血モデルではインターロイキン8やインターフェロン等のケモカインの発現が抑えられていることから、急性拒絶反応に対する効果も期待できる。まず、ラット同所肝移植モデルで、カルペリチドにより再灌流障害、拒絶反応が軽減されるか確認する。

3. 研究の方法

Rat 冷阻血 + 温阻血 + 再灌流モデルを作成した。すなわち、ラット間で Kamada 法に準じて、同所性肝移植を施行する。生体部分肝移植に近いモデルを目指し、ドナーは Wistar 系雄性ラット 4 週齢、200g 程度、レシピエントは 6 週齢 Lewis 系雄性ラット、300g 程度を選択する。全肝グラフトは摘出後、冷生理的食塩水で経門脈的に還流した後、UW 液に 1 時間保存する。全肝グラフト摘出後、すばやく、レシピエント手術に入る。全

肝摘出後に、カフ法を用いて、マイクロスコop下にて、肝静脈、門脈を再建する。肝動脈は最後に再建する。

レシピエントラットの左外頸静脈にポリエチエンチューブ(PE-90)をカニューレションし、再灌流後 120 分間、0.01、0.03 でカルペリチドの持続静注を行う。プラセボ群では生理的食塩水を 8ml/kg/hr で投与する。

測定項目は以下のとおりである。

心拍出量、血圧、脈拍等の血行動態、グラフト血流

グラフト組織中の cAMP、細胞間接着因子(ICAM-1)、アポトーシス(TUNEL 法) 各種サイトカイン(TNF およびインターロイキン 1、6、8、12) 誘導型 NO 合成酵素

血液中の ICAM-1、肝逸脱酵素(AST、ALT)、血小板凝集能、各種サイトカイン、NO

の血行動態に関しては、ポリエチエンチューブ(PE-50)を右頸動脈にカニューレションし、気管挿管し、人工呼吸器 Ugo Basil 7025 下で管理する。さらに胸骨正中切開をおき、上行大動脈周囲に電磁式プローブ(Skalar MDL 1401)を装着する。血圧、脈拍は右頸動脈のカニューレションチューブから、心係数は電磁式プローブから出力する。グラフト血流はグラフト左葉上にレーザー Doppler 計(膜型、ALF2100)を置き、測定する。再灌流後 4 時間の観察を行う。人工呼吸器および電磁式プローブは現有的のもので対応する。各群 N=10 でデータ集積を行った。

グラフト組織のサンプリングは、グラフト左葉から行う。再灌流後 1 時間、2 時間、4 時間のタイムスケジュールで、各時間に各群 N=5 で設定する。一部はスナップフローズンとし、RNA の抽出用とする。これからは、ICAM-1、各種サイトカイン、誘導型 NO 合成酵素の分析を RT-PCR もしくはノーザンブロット法で行う。一部はパラフィン包埋とし、組織学的分析のほか、酵素抗体法による TUNEL 法でアポトーシスの程度を半定量する。

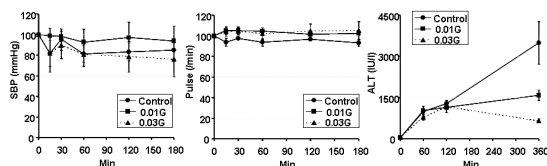
血液データはグラフト組織のサンプリングと同様なタイミングで各群 N=5 で設定する。採血後、血清を抽出し、-80 度で保存する。後に、ICAM-1、肝逸脱酵素(AST、ALT)、各種サイトカイン、NO を測定する。血小板凝集能はアデノシン 2 リン酸を 100 umol/L の濃度に加え、血小板凝集を誘導した後、光学凝集計(MEK-6158)にて測定する。光学凝集計(MEK-6158)は新たに購入する必要

がある。動物実験はすべて東京大学動物実験施設にて同施設動物実験倫理規定に準じて施行した。

4. 研究成果

カルペリチド群では阻血前60分より再灌流後120分間0.01 および0.03 で持続静注を行った(各群N=10)。プラセボ群では生理的食塩水を投与した(N=5)。肝組織血流量、血圧、心拍出量等のhemodynamicの因子を検討するとともに、肝組織中のcAMP、肝逸脱酵素、血小板凝集能、細胞間接着因子(ICAM-1)の変化、アポトーシスの有無を測定した。ICAM-1はmRNA、タンパクレベルを、ノーザンブロット法、ウエスタンブロット法、免疫染色で検討した。さらに各群の10日間生存率を検討した。血行動態に対し、カルペリチドは変化を及ぼさなかった。

またカルペリチド群では、肝組織血流量の増加がレーザードップラー上認められたほか、再灌流後6時間のアミノトラスフェラーゼ値は対象群と比べて0.01群、0.03群で著明に減少していた。cAMPの減少の抑制、血小板凝集能の低下、ICAM-1 RNA発現レベルの減少を認めた。10日生存率は対象群、0.01群、0.03群で40%、100%、100%であった。cAMPと肝組織血流量の各群の変化を下図に示す。カルペリチド投与により、阻血再灌流障害が軽減されている可能性が示唆された。



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56件)査読すべてあり。
[平成20年]

1. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis* 2008;10(2):110-6.

2. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Yamashiki N, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Outcome of living donor liver transplantation for post-Kasai biliary atresia in adults. *Liver Transpl* 2008;14(2):186-92.

3. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Akamatsu N, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Makuuchi M. Biliary complications in right lateral sector graft live donor liver transplantation. *Transpl Int* 2008;21(4):332-9.

4. Inoue Y, Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Intraoperative ultrasound guided portal venous thrombectomy in living donor liver transplantation recipient surgery. *Transpl Int* 2008;21(5):428-33.

5. Kishi Y, Sugawara Y, Matsui Y, Akamatsu N, Makuuchi M. Late onset portal vein thrombosis and its risk factors. *Hepatogastroenterol* 2008;55(84):1008-9.

6. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Makuuchi M. Bloodstream infection after living donor liver transplantation. *Scand J Infect Dis* 2008;40(6-7):509-16.

7. Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Togashi J, Matsui Y, Makuuchi M. Heparin-induced thrombocytopenia after liver transplantation. *Transplant Proc* 2008;40(5):1518-21.

8. Hashimoto T, Miki K, Imamura H, Sano K, Satou S, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sinusoidal perfusion in the veno-occlusive region of living liver donors evaluated by indocyanine green and near-infrared spectroscopy. *Liver Transpl* 2008;14(6):872-80. 9. Kaneko J, Sugawara Y, Matsui Y, Makuuchi M. Spleen size of live donors for liver transplantation. *Surg Radiol Anat* 2008;30(6):515-8.

10. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Portal vein complications after adult-to-adult living donor liver. *Transplantation*. *Transpl Int* 2008;21(12):1136-44.

11. Tamura S, Sugawara Y, Kaneko J, Togashi J, Matsui Y, Yamashiki N, Kokudo N, Makuuchi M. Recurrence of cholestatic liver disease after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2008;14(33):5105-9.

12. Matsui Y, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Tamura S, Togashi J, Makuuchi M, Kokudo N. Living donor liver

transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res* 2008;38(10):987-96.

13. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Colonization and/or infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after living donor liver transplantation: a case control study. *BMC Infect Dis* 2008;8(1):155.

[平成 19 年]

14. Tamura S, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Makuuchi M. Recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation. *Liver Int* 2007;27(1):86-94.

15. Dulundu E, Sugawara Y, Kaneko J, Kishi Y, Akamatsu N, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Short hepatic vein reconstruction in biliary atresia patients with absent inferior vena cava. *Clinical Transpl* 2007;1:13-17.

16. Hashimoto T, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Motomura N, Takamoto S, Makuuchi M. One orifice vein reconstruction in left liver plus caudate lobe grafts. *Transplantation* 2007;83(2):225-7

17. Satou S, Sugawara Y, Tamura S, Kishi Y, Kaneko J, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Three-dimensional computed tomography for planning donor hepatectomy. *Transplant Proc* 2007;39(1):145-9.

18. Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M. Histologic eosinophilia as an aid to diagnose acute cellular rejection after living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2007;21(2):214-8.

19. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Makuuchi M. *Clostridium difficile*-associated diarrhea after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2007;13(14):2072-6.

20. Tsujino T, Kawabe T, Sugawara Y, Makuuchi M, Omata M. Response to drs. Tada, yazumi, and chiba. *Am J Gastroenterol* 2007;102(6):1331-2.

21. Hashimoto T, Sugawara Y, Makuuchi M. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of living donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Liver Transpl*

2007;13(6):938-9.

22. Kishi Y, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Matsui Y, Makuuchi M. Blood eosinophilia after living donor liver transplantation for hepatitis C virus-related cirrhosis. *Transplant Proc* 2007;39(5):1540-3.

23. Tsujino T, Sugawara Y, Kawabe T, Makuuchi M, Omata M. Foreign body (suture thread) in the bile duct after living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007;13(7):1065-6.

24. Kyoden Y, Sugawara Y, Kaneko J, Kishi Y, Akamatsu N, Makuuchi M. Hepatofugal portal flow after living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterol* 2007;54(76):1164-6.

25. Kaneko J, Sugawara Y, Yanhong Q, Makuuchi M. Education and Imaging. Hepatobiliary and pancreatic: extended directional power Doppler ultrasonography in liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(8):1345.

26. Hashimoto T, Kokudo N, Hasegawa K, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Reappraisal of duct-to-duct biliary reconstruction in hepatic resection for liver tumors. *Am J Surg* 2007;194(3):283-7.

27. Takemura N, Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Liver transplantation using hepatitis B core antibody-positive grafts: review and university of Tokyo experience. *Dig Dis Sci* 2007;52(10):2472-7.

28. Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Tokyo University series. *Dig Dis* 2007;25(4):310-2.

29. Akamatsu N, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Makuuchi M. Preemptive treatment of fungal infection based on plasma (1 → 3)beta-D: -glucan levels after liver transplantation. *Infection* 2007;35(5):346-51

30. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Makuuchi M. Impact of live donor age (>or=50) on liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39(10):3189-93.

31. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Impact of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage postoperatively after living donor liver transplantation. *Transplant*

Proc 2007;39(10):3271-5.

32. Oue Y, Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Role of protocol ultrasonography for detecting biliary stricture in adult living donor liver transplantation. *BioScience Trends* 2007;1(1):62-65.

[平成 18 年]

33. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kishi Y, Matsui Y, Kaneko J, Makuuchi M. T-tube drainage for biliary stenosis after living donor liver transplantation. *Transplantation* 2006;81(2):293-5.

34. Okazaki M, Asato H, Takushima A, Nakatsuka T, Sarukawa S, Inoue K, Harii K, Sugawara Y, Makuuchi M. Hepatic artery reconstruction with double-needle micro-suture in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12(1):46-50.

35. Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Nojiri K, Omata M, Makuuchi M. Selection of liver-transplant candidates for adult-to-adult living donor liver transplantation as the only surgical option for end-stage liver disease. *Liver Transpl* 2006;12(7):1077-83.

36. Ishizawa T, Sugawara Y, Hasegawa K, Ikeda M, Tamura S, Makuuchi M. Extent of hepatectomy on splenic hypertrophy and platelet count in live liver donors. *Clinical Transpl* 2006;20(2):234-8.

37. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Matsui Y, Hasegawa K, Imamura H, Kokudo N, Makuuchi M. Hemophagocytic syndrome after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2006;38(5):1425-8.

38. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Imamura H, Kokudo N, Makuuchi M. Regeneration and function of hemiliver graft: right versus left. *Surgery* 2006;139(6):765-72.

39. Satou S, Sugawara Y, Matsui Y, Kaneko J, Kishi Y, Imamura H, Kokudo N, Makuuchi M. Preoperative estimation of right lateral sector graft by three-dimensional computed tomography. *Transplant Proc* 2006;38(5):1400-3.

40. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Kakeno J, Togashi J, Makuuchi M. Renal impairment after living donor liver transplantation. *Transplant Proc*

2006;38(5):1474-6.

41. Ishizawa T, Sugawara Y, Hasegawa K, Ikeda M, Makuuchi M, Akahane M, Ohtome K. Hepatobiliary and pancreatic: Splenic artery aneurysm after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(7):1213.

42. Sugawara Y, Makuuchi M, Tamura S, Matsui Y, Kaneko J, Hasegawa K, Imamura H, Kokudo N, Motomura N, Takamoto S. Portal vein reconstruction in adult living donor liver transplantation using cryopreserved vein grafts. *Liver Transpl* 2006;12(8):1233-6.

43. Kaneko J, Sugawara Y, Maruo Y, Sato H, Tamura S, Imamura H, Kokudo N, Makuuchi M. Liver transplantation using donors with Gilbert syndrome. *Transplantation* 2006;82(2):282-5.

44. Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Impact of incidentally found hepatocellular carcinoma on the outcome of living donor liver transplantation. *Transpl Int* 2006;19(9):720-5.

45. Sugawara Y, Kaneko J, Makuuchi M. Cyclosporin a for treatment of hepatitis C virus after liver transplantation. *Transplantation* 2006;82(4):579-80.

46. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Matsui Y, Kaneko J, Makuuchi M. Efficacy of mycophenolate mofetil for steroid-resistant acute rejection after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2006;12(30):4870-2.

47. Tsujino T, Isayama H, Sugawara Y, Sasaki T, Kogure H, Nakai Y, Yamamoto N, Sasahira N, Yamashiki N, Tada M, Yoshida H, Kokudo N, Kawabe T, Makuuchi M, Omata M. Endoscopic management of biliary complications after adult living donor liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2006;101(10):2230-6.

48. Hashimoto T, Sugawara Y, Tamura S, Hasegawa K, Kishi Y, Kokudo N, Makuuchi M. Estimation of standard liver volume in Japanese living liver donors. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(11):1710-3.

49. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Hasegawa K, Makuuchi M. Late-onset acute rejection after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2006;12(41):6674-7.

50. Tamura S, Sugawara Y, Kaneko J, Yamashiki N, Kishi Y, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Systematic grading of surgical complications in live liver donors

according to Clavien's system. *Transpl Int.* 2006;19(12):982-7.

51. Dulundu E, Sugawara Y, Kishi Y, Akamatsu N, Kaneko J, Makuuchi M. Model for end stage liver disease score does not predict graft survival after living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterol* 2006;53(71):781-2.

52. Nishi H, Hanfusa N, Kondo Y, Nangaku M, Sugawara Y, Makuuchi M, Norii E, Fujita T. Clinical outcome of thrombotic microangiopathy after living donor liver transplantation treated with plasma exchange therapy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:811-9.

53. Dulundu E, Sugawara Y, Kishi Y, Akamatsu N, Kokudo N, Makuuchi M. Phrenic vein dissection in partial liver graft harvesting. *Hepatogastroenterol* 2006;53(71):778-80.

54. Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M. New-onset diabetes mellitus after living donor liver transplantation: possible association with hepatitis C. *Transplant Proc* 2006;38(9):2989-92.

55. Akamatsu N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Togashi J, Makuuchi M. Impact of celiac axis stenosis on living donor hepatectomy. *Transplant Proc* 2006;38(9):2948-50.

56. Aramaki O, Sugawara Y, Kokudo N, Takayama T, Makuuchi M. Branch patch reconstruction in living donor liver transplantation: arterialization of grafts with replaced type arteries. *Transplantation* 2006;82(11):1541-3.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅原寧彦 (SUGAWARA YASUHIKO)
東京大学・医学部付属病院・准教授

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし