

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06238・19K21336

研究課題名(和文)心停止肝移植におけるパーフルオロカーボンを用いた新しい臓器灌流保存法の開発研究

研究課題名(英文)Development of new graft preservation for donation after cardiac death liver grafts.

研究代表者

奥村 晋也(Okumura, Shinya)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70830032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：心停止後ドナーからの肝移植(心停止肝移植)はドナーの不足を補う新しい肝移植医療として注目されているが、移植後の肝障害が強く、予後不良である。本研究では、ラット肝移植モデルを用いて、臓器保存中にグラフト肝に酸素化を行うことで、心停止肝グラフト機能の改善を目指した。ラット心停止肝移植モデルを確立し、心停止時間を段階的に設定した心停止肝グラフトを使用し、肝移植後の虚血再灌流傷害の評価を行った。臓器保存中にグラフトの酸素化を付与することにより、一定のグラフト機能の改善を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心停止後ドナーからの肝移植(心停止肝移植)はドナーの不足を補う新しい肝移植医療として注目されているが、移植後の肝障害が強く、予後不良であり、わが国ではまだ認可に至っていないのが現状である。グラフト機能を改善する新しい臓器保存法を開発することで、心停止肝移植が安全に施行できるようになれば、より多くの患者を肝移植により救命できることが期待できる。さらに、生体ドナーの負担軽減に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The outcomes of liver transplantation from donation after cardiac death (DCD) donors remain poor due to severe liver ischemia injury. In the present study, we used a rat model simulating DCD liver transplantation, and we aimed to improve the DCD liver graft function by graft oxygenation during liver preservation.

We established a rat DCD liver transplantation model. The liver ischemia-reperfusion injury after liver transplantation was investigated using rat DCD liver transplantation model. The transplanted liver graft function was improved by graft oxygenation.

研究分野：肝移植

キーワード：臓器保存 心停止肝移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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であり、移植を必要とする患者数は年々増加しているが、一方でドナーの不足が深刻な課題である。脳死肝移植が積極的に行われている欧米諸国においても、肝移植待機患者数に比べて脳死ドナー数は圧倒的に不足しているのが現状である。日本では脳死ドナーの不足を生体ドナーに頼っているのが現状であるが、欧米諸国では心停止後ドナーが脳死ドナーに代わる新しいドナー候補として注目されており、近年は心停止後ドナーからの肝移植(心停止肝移植)が徐々に行われるようになってきた。しかしながら、心停止肝移植の術後にはグラフト機能不全(特に移植直後にグラフトが全く機能しなくなる原発性グラフト機能不全、胆管内皮細胞が虚血により壊死して広範囲の胆管障害を引き起こす虚血性胆管障害)を高率に発症し、術後成績は脳死肝移植に比べて極めて不良であることが課題であり、その改善策が強く望まれている。心停止肝移植では、移植肝グラフトが、長時間にわたって虚血・低酸素状態という特殊な環境下に置かれる。この長時間の虚血・低酸素状態がグラフト機能不全の最も大きな原因と考えられる。欧米ではすでに臨床において心停止肝グラフトが使用されているが、術後成績が不良であることから、日本ではまだ認可されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、ラット心停止肝移植モデルを用いて、臓器保存液に高い酸素溶解能と酸素運搬能を備えるパーフルオロカーボン(PFC)を使用してグラフト肝に十分な酸素化を行うことで、心停止肝グラフト機能の改善を目指す。グラフト肝の機能改善に効果的な臓器保存法の研究を行う。

3. 研究の方法

ラット心停止肝移植モデルを確立する。ドナーラットの心停止後の肝臓を摘出し、臓器保存時間後に、レシピエントラットに全肝移植する実験モデルを確立する。

心停止時間を30分から60分まで段階的に設定し、心停止時間の違いによる虚血再灌流障害の程度について評価を行う。

通常の単純冷保存(UW液)によるコントロール群と、PFCを用いて酸素化を行った治療群で、移植後の肝虚血再灌流傷害の程度についての評価を行う。

検討項目は、移植後3時間及び6時間における肝逸脱酵素(AST, ALT)、胆道系酵素であるビリルビン・ALP、血管内皮障害マーカーであるヒアルロン酸、脂質酸化ストレスのマーカーであるMDAを測定する。血漿中の各種サイトカインをLuminex assayにて評価する。HE染色により肝細胞の壊死・空胞形成・うっ血アポトーシスの程度をスコア化(Suzukiスコア)し評価する。TUNEL免疫染色によりアポトーシスの程度をスコア化する(TUNEL Index)。電子顕微鏡検査により類洞内皮細胞の障害の程度、微小胆管の絨毛の障害の程度を比較する。PCRおよびWestern Blotにより肝組織中のアポトーシス関連遺伝子/タンパク、肝再生関連遺伝子/タンパクの発現定量を行う。ミトコンドリア機能の評価としてATP量の測定を行う。2週間生存させ、生存率の比較を行う。以上の検討により、PFCによるグラフト肝の酸素化により、グラフト機能を改善できるかどうかの検討を行う。

4. 研究成果

ラット心停止肝移植モデルを確立した。心停止時間を30分から60分の間で段階的に設定した心停止肝グラフトを使用した。臓器保存後に、レシピエントラットに実際に心停止肝グラフトを全肝移植し、移植後の虚血再灌流傷害の程度について評価を行った。

30分のドナー心停止時間では致死モデルとはならず、コントロール群でもレシピエントラットは全例生存可能であった。心停止時間を段階的に延長すると、50分以上で虚血再灌流傷害が高度となり、致死的な実験モデルとなった。

30分の心停止時間モデルで、移植後早期の虚血再灌流傷害の程度について検討を行った。さらに、50分の心停止時間モデルでは、生存率の検討を行った。

臓器保存中にPFCを用いて酸素化を行った群と、通常の単純冷保存群(UW液)での比較検討を行った。

移植後早期の肝逸脱酵素(AST, ALT)、胆道系酵素(ビリルビン・ALP)、血管内皮障害マーカー、脂質酸化ストレスマーカーの測定結果では、PFC使用群において虚血再灌流傷害の軽減が認められた。血漿中のサイトカインアッセイ(炎症性サイトカイン)、HE染色による虚血再灌流傷害のスコアリング(Suzukiスコア)では、壊死の程度の改善が認められた。TUNEL免疫染色によるアポトーシスのスコアリング(TUNEL Index)でも、PFC使用群で虚血再灌流傷

害の軽減（アポトーシスの軽減）が認められた。電子顕微鏡による類洞内皮細胞の傷害、微小胆管の絨毛の傷害も、コントロール群に比べて治療群で改善が認められた。以上の結果から、臓器保存中に PFC を用いたグラフトの酸素化を付与することにより、一定のグラフト機能の改善を確認した。生存率の検討では、PFC 使用群で、長期生存率の改善を確認した。

今後の課題は、臓器保存法の改善により、さらにグラフト肝の機能改善を目指すことができるかどうか、という点にある。臓器保存中の機械灌流保存法のプロトコルの改善、ドナー体内でのグラフトの酸素化等により、さらにグラフト機能の改善を目指せる可能性があるため、引き続き臓器保存法の開発研究を進めていく。これらの検討により、心停止時間を延長しても移植可能なグラフトとして使用できるようになる可能性がある。また、臓器保存時間の延長が可能となる可能性もある。本実験モデルを使用し、心停止時間の延長がどの程度まで可能か、臓器保存時間の延長がどの程度まで可能かの検討を引き続き行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----