

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09306

研究課題名(和文) 水素豊富食塩水管腔内投与による小腸移植グラフト保存への新しいアプローチ

研究課題名(英文) A novel approach of intestinal graft protection: Intraluminal administration of hydrogen-rich water

研究代表者

中尾 篤典 (NAKAO, ATSUNORI)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：40648169

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)：小腸移植は、生体・脳死移植どちらも健康保険の適用となり、今後増加していくことが予想されるが、2019年10月の時点では本邦ではわずか30例の小腸移植が行われているのみで、欧米に大きく遅れている。これは、小腸が虚血再灌流に弱く、保存が難しいことも一因である。水素ガスは、抗酸化作用、抗炎症作用を有することが知られており、本研究では、臓器保存中に小腸グラフトの粘膜面から水素分子を投与する、より安全で臨床応用しやすい保存法についてラット小腸移植モデルを用いて検証した。水素を豊富に含む生食塩水のグラフト腸管内腔投与は、小腸移植における虚血再灌流障害を軽減することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの臓器保存の概念は、主に血管を灌流し、保存液を血管内より臓器に流し込むことであった。しかし、腸管は他の実質臓器と異なり、消化管管腔という特殊な構造をもつ。腸管粘膜は、バリア機能を担う重要な組織であるが、これまで小腸移植において消化管内腔をターゲットにした治療的戦略は研究されてこなかった。本研究の成果により、水素分子の腸管内腔へのアプローチという新しい治療戦略は、グラフト保存法の改良ばかりでなく、重症患者のBacterial Translocationへの応用の可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Small intestine transplantation, which is covered by health insurance for both living and brain-dead donors, is expected to increase in the future. However, as of October 2019, only about 30 cases of small intestine transplantation have been performed in Japan, significantly lagging behind Europe and America. One reason for this is the small intestine's vulnerability to ischemia-reperfusion injury and the difficulty in its preservation. It is known that hydrogen gas has antioxidant and anti-inflammatory effects. In this study, we tested a safer and more clinically applicable preservation method using a rat small intestine transplantation model, where hydrogen molecules were administered to the mucosal surface of the small intestine grafts during organ preservation. The administration of saline solution enriched with hydrogen into the graft lumen was found to mitigate ischemia-reperfusion injury in small intestine transplantation.

研究分野：臓器移植、虚血再灌流

キーワード：小腸移植 水素 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

小腸移植は、生命維持に必要な水分や栄養を腸管から吸収することができず、カテーテル感染や肝機能障害のために静脈栄養が継続できなくなった場合に適応となる。全世界の小腸移植患者の全体の約6割が18歳以下の小児症例であり、未来の経済活動を支える大切な世代に対する先進的な医療である。小腸移植は腸管機能不全で中心静脈栄養が行えなくなった患者に対して最後に残された治療であるが、虚血再灌流に弱く、多くの課題が残されたままになっている。虚血再灌流障害は慢性期の動脈硬化に大きく関与することが知られており、虚血再灌流障害の制御が術後早期ばかりでなく、移植後の長期予後にも影響を及ぼす。また、本邦では小腸移植が可能な施設もまだ限られており、遠方からの搬送などに対応することも必要である。そこで、小腸グラフトの保存方法を改良することで虚血再灌流障害を抑制することができれば、本邦の小腸移植医療に大きく貢献することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまでの臓器保存の概念は、主に血管を灌流し、保存液を血管内より臓器に流し込むことであった。しかし、腸管は他の実質臓器と異なり、消化管管腔という特殊な構造をもつ。腸管粘膜は、バリア機能を担う重要な組織であるが、これまで小腸移植において消化管内腔をターゲットにした治療的戦略は研究されてこなかった。本研究の目的は、難治性腸管不全に悩む患者に対する最後に残された治療とされる小腸移植の予後を向上させることである。2018年4月から小腸移植は、生体・脳死移植どちらも健康保険の適用となり、今後小腸移植は増加していくことが予想される。

3. 研究の方法

(1) 実験モデル

雄性 LEW ラットを用い、同種同系・同所性小腸移植モデルを作成する。イソフルランで吸入麻酔を行い、小腸グラフトは腔を生理食塩水で洗浄後、氷冷した生理食塩水の中に6時間保存する。水素含有生理食塩水は、市販のキットを用い、水素濃度を5ppmに調整して使用する。

(2) 実験群

レシピエントラットには血管縫合を行わず再灌流しない sham 群、再灌流した虚血再灌流群をそれぞれに作成し、計4つの実験群を作成する。移植時には小腸内腔に生理食塩水または水素含有生理食塩水を充填させる。

(3) 効果判定

虚血再灌流障害の効果判定は、生存実験、およびサンプル解析により行う。生存実験は移植後のレシピエントの体重測定を毎日行い、25%以上の体重減少をもって安楽死させる。安全性を確認したら、移植後3時間で安楽死せしめる実験群を別途作成し、血液、小腸を採取して、小腸からは病理組織標本、mRNA の抽出、蛋白抽出を行う。腸管透過性の測定は既報を参考に、蛍光デキストランの漏出を *ex vivo* にて測定する。移植後3時間の設定については、これまでに水素吸入モデルにより再灌流後3時間での変化が認められているため、本検討でも3時間を目安とした。さらに、mRNA、蛋白を用いてバリア機能に関連する ZO-1 や膜貫通型タンパク質のクローディング 1 (CLDN-1)などを Western blot などで測定し、水素の効果を判定した。

(4) 研究成果

水素豊富水をグラフトの管腔に注入し6時間冷保存したのち、同所性に移植し、3時間後の病理組織学的検討をヘマトキシリンエオジン染色で行った。図1に示すように、水素を含まないグラフトは、粘膜の脱落や出血を認めたが、水素豊富水を充填することで、これらの病理組織学的変化は有意に減少した。同様に、蛍光デキストランで測定した粘膜のバリア機能の低下も、水素豊富水で軽減させることができた。

また、再灌流後3時間のグラフトの炎症性マーカーをReal time RT-PCRで調べた。炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1、およびiNOS、COX-2のmRNAレベルは再灌流後3時間で著明に増加した。この増加は水素豊富水管腔内注入したグラフトでは、1/2以上に抑制され、水素豊富水のためグラフトの炎症カスケードが減衰していることを示した。組織の酸化ストレスマーカーであるMDA(マロンデアルデヒド)は、再灌流後3時間で増加するが、水素豊富水により優位に産生が抑制され、水素豊富水の抗酸化作用が明らかになった。グラフトの漿膜面の血流をドップラーで測定すると、水素豊富水を充填したグラフトでは血流が有意に保たれていた。

また、3時間後のタイトジャンクションに関連する分子であるZO-1やCLDN-1をウエスタンブロットで解析したところ、水素を含まないグラフトでは、CLDN-1は著明に減少したが、水素含有液を注入したグラフトでは有意に保たれていた。

レシピエントの生存を14日間モニターしたが、水素を含まない群では14日間の生存率は30.8%であったのに対し、水素含有水では、66.7%が生存した(図3)。

このように、管腔内、つまりグラフトの粘膜面に水素豊富生理食塩水を充填し、冷保存することにより、小腸グラフトの移植後虚血再灌流障害が軽減されることが示された。

図1 A. 病理組織学的検討 B. 病理学的スコア C. 腸管透過性

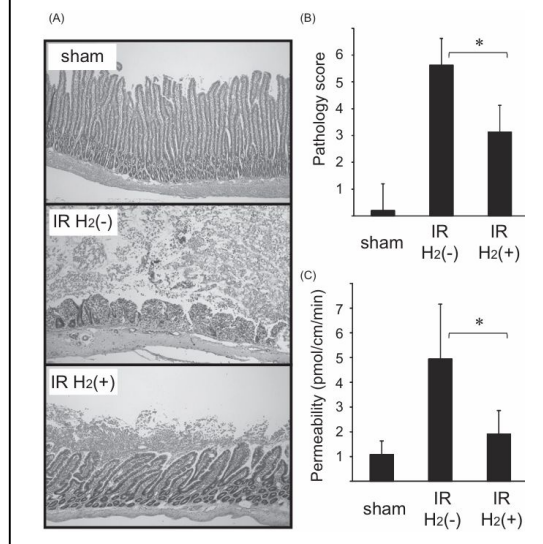


図2 ZO-1とCLDN-1のウエスタンブロット

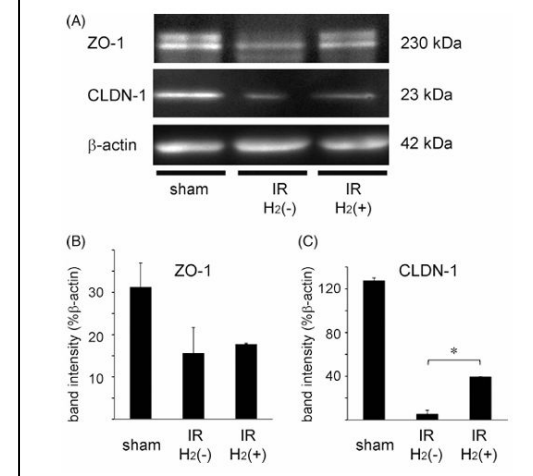
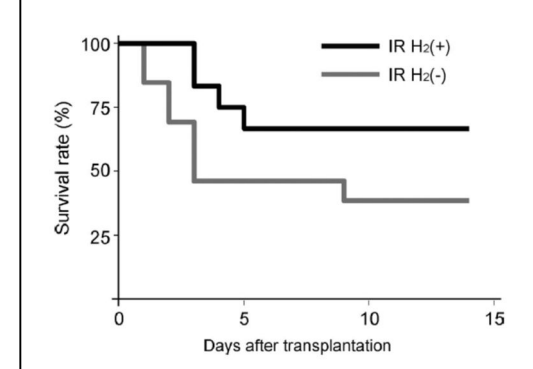


図3 レシピエントの生存曲線



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本浩嗣
2. 発表標題 ラット小腸移植モデルを使った水素含有生理食塩水の管腔内投与による臓器保護効果の検討.
3. 学会等名 第57回日本移植学会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	尾迫 貴章 (Osako Takaaki) (30573844)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師 (15301)	
研究分担者	石川 倫子 (Ishikawa Michiko) (40566121)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	
研究分担者	山田 太平 (Yamada Taihei) (00465684)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------