

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591405

研究課題名(和文)心停止ドナーを用いた肝移植に対する新しい治療戦略 - 温粗血時間の限界への挑戦

研究課題名(英文)Challenge of extending warm ischemic time in rat liver transplantation from cardiac death donors

研究代表者

小倉 靖弘 (Ogura, Yasuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号：20335251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：心停止ドナー肝の長期の温虚血による移植肝障害による不良な移植成績の問題には、虚血再灌流障害をいかに抑える事ができるかが重要である。心停止ドナーからの移植肝に対して、冷保存時間中に肝静脈から酸素を投与しながら保存する方法(VSOP)が有効であることが動物実験で確認されている一方で、虚血再灌流障害軽減を目的とした一酸化窒素ガス(NO)投与の有用性が報告されている。ラット心停止ドナーモデルで温粗血時間の限界の検討を行った。保存液中で肝グラフトに対してVSOPとNOを投与する実験を行い、心停止ドナーからの移植肝に保護作用を有することが証明されたが、保存時間の延長という目的は達成できなかった。

研究成果の概要(英文)：Liver transplant outcomes using grafts donated after cardiac death (DCD) remain poor. Our goal of this study was to extend the warm ischemic time in rat liver transplantation from DCD donors. For this purpose, it is important to control the ischemic/reperfusion (I/R) injury after transplantation. There are a couple of reports to prevent I/R injury, and we applied venous systemic oxygen persufflation (VSOP) and nitric oxide (NO) gas administration. Using rat liver transplantation models from 60 minutes DCD donors, VSOP-NO treatment could effectively decrease the damage of I/R injury, leading to the better survival. However, we failed to extend the warm ischemic time by this methods. There may be a limitation in these graft reconditioning procedures, further investigation to understand this phenomena is required.

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：心停止ドナー 肝移植 温粗血時間

1 研究開始当初の背景

末期肝疾患に対する治療としての肝移植術は必須の治療選択となっているが、現在の肝移植医療においては国内・国外ともに慢性的なドナー不足のため、生体ドナーや脳死ドナーという現在用いられているドナー以外の選択肢として、心停止ドナーからの肝移植が、肝移植医療におけるドナー不足を解消する手段として期待されている。しかしながら、心停止ドナーからの臓器摘出における各手順の特殊性から、心停止ドナーからの臓器摘出における肝臓に加わる長期の温虚血は移植肝機能を大きく障害し、移植成績は極めて不良である。

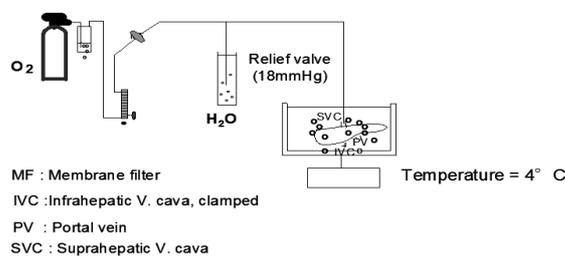
この心停止ドナーからの肝臓移植の問題を克服するために、長期の粗血時間に伴う虚血再灌流障害をいかに抑制することができるかが不可欠な課題となっている。長期の粗血時間に伴う虚血再灌流障害を抑えることができれば、心停止下の臓器提供を増加させることが可能となるため、実臨床において極めて有用な方法である。

2 研究の目的

近年、心停止ドナーからの移植肝に対して、冷保存時間中に肝静脈から逆行性に酸素を投与しながら保存する方法：Venous Systemic Oxygen Persufflation (VSOP、図1) が有効であることが動物実験で確認されている。

図 1

Venous-systemic O₂-persufflation (VSOP)



一方で、肺高血圧の治療や、心臓並びに肺移植において虚血再灌流障害の軽減を目的とした一酸化窒素ガス(NO)投与の有用性が報告されている。

そこで当該研究ではラット心停止ドナーモデルを用いて、温粗血時間の限界の検討、そして保存液中で肝グラフトに対してVSOPを用いて酸素並びにNOを投与することが、心停止ドナーからの移植肝にいかなる影響を与えるかを検討することとした。これらが心停止ドナー肝の虚血再灌流障害を軽減させることが出来れば、心停止ドナーを用いた肝移植の新しい治療戦略となることを目的とした。

3 研究の方法

当該研究ではラット心停止ドナーモデルを用いて、温粗血時間の限界の検討、そして保存液中で肝グラフトに対してVSOPを用いて酸素並びにNOを投与することが、心停止ドナーからの移植肝にいかなる影響を与えるかを検討する計画であった。

当初の実験計画では、温粗血時間 0、1、2、4 時間に設定して各群を設定し、各移植群の生存率やグラフト障害の程度を評価することとし、また、各種血液検査を加えて、肝機能の状態や肝機能に障害を与えるサイトカインなどについても、評価を加えることとした。

4 研究成果

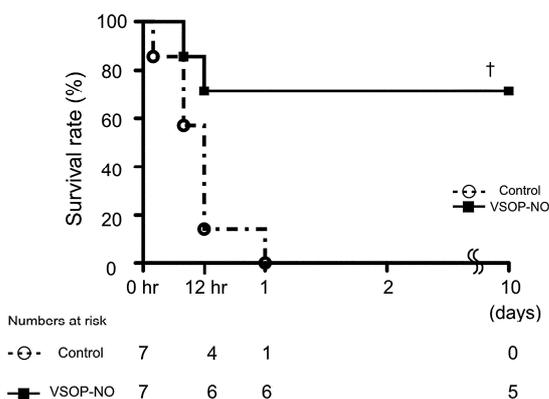
当初計画では心停止ドナーの肝臓の温粗血時間を0、1、2、4時間と徐々に延長する予定であったが、現行の実験方法では実験条件をふりわけてみても、温粗血時間の限界時間が予想より短く、2時間以上の群での動物生存自身が困難であることが判明した。

そのため、結果的には、コントロール群と温粗血時間 60分以下の実験系に限っての動物実験となった。

まず、肝移植後の生存率について調べてみた。グラフト肝に何もコンディショニングを行わないコントロール群では、60分心停止ドナー

からのグラフト肝を用いると、12時間後の生存率は14.3%と極めて低く、24時間後には全例死亡した。それに対して、60分心停止ドナーからのグラフト肝にVSOPとNOを併用した実験群では、12時間後の生存率は71.4%と高く、10日後の生存率も71.4%で、生存率に有意な改善を認めた(図2)。

図2 .60分心停止グラフトを用いた肝移植ラット生存率(○:コントロール群、■:VSOP-NO群)



次に病理学的検討を行った。

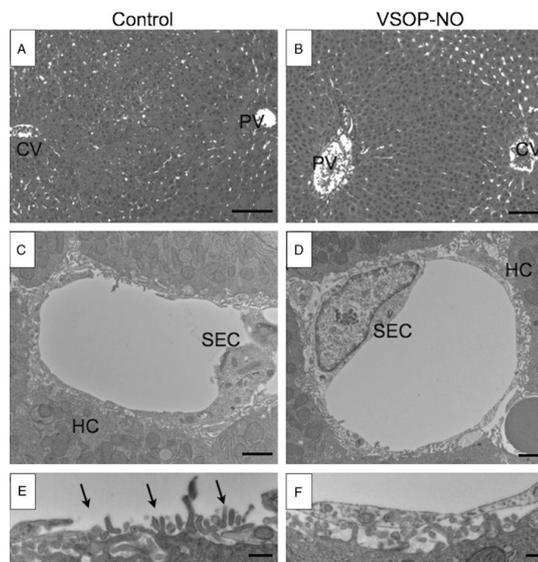
60分心停止ドナーからのグラフト肝を用いた肝移植ラット症例で、心停止ドナーグラフトのコントロール群とVSOP-NO実験群の組織学的な比較検討では、H&E染色においては、コントロール群では空胞化などの障害が確認されたのに対して(図3 A)、VSOP-NO群ではほぼ正常構造が保たれていた(図3 B)。

また、電顕像では、コントロール群で、sinusoidal epithelial cellの破壊像が著明に見られたのに対して(図3 C, E)、VSOP-NO群ではそれらの構造は良く保たれていた(図3 D, F)。

これらの実験結果は、VSOP-NOによるコンディショニングが、ラット心停止ドナーモデルでの60分の長期温粗血からの肝虚血再灌流障害からの保護作用を有している可能性を示している。

図3 .A, B: H&E 染色、C-F: 電顕像

CV: 中心静脈域、PV: 門脈域、HC: 肝細胞、SEC: 類洞内皮細胞



次に、やや温粗血時間を短い(心停止時間30分)条件としたラット心停止ドナー肝移植実験モデルで、血液検査をみると、肝機能検査においても、VSOP-NO群での臓器保存効果が示される結果となった。肝逸脱酵素としてのALT値は、コントロール群が著明に上昇していたのに対して、VSOP-NO群では低値で推移した。特に、心停止グラフト肝移植後6時間、1日のところのデータに、大きな差が確認された。

これらの結果も、VSOP-NOには、心停止ドナー肝の長時間温粗血による臓器障害に対する臓器保存効果があるものと判断された。

ALT (IU/ml)の肝移植後の推移

	2時間	6時間	1日	3日
コントロール群	2770 ± 151	4084 ± 1197	1896 ± 303	234 ± 93
VSOP-NO群	2035 ± 261	1088 ± 261	457 ± 43	205 ± 92

また、障害に関与している mRNA の発現をみると、TNF- α 、endothelin-1 (ET-1)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)などで、VSOP-NOによる発現の抑制が確認された。

TNF- α (% β -actin)の肝移植後の推移

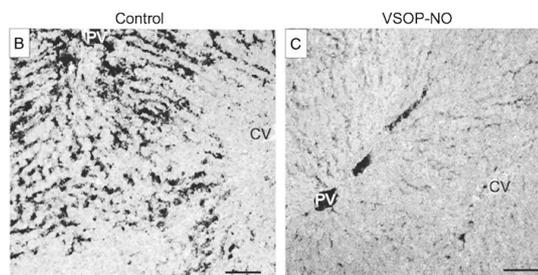
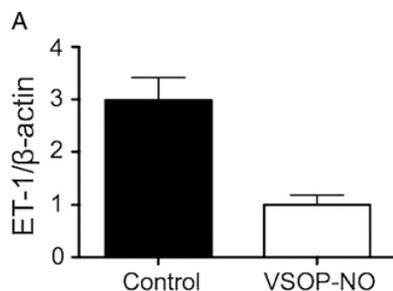
	2時間	6時間	1日	3日
コントロール群	40.6 ± 12.2	115.1 ± 21.8	31.0 ± 6.1	18.4 ± 2.3

VSOP-NO群	21.9± 7.9	23.1± 8.9	18.5± 5.7	22.4± 6.2
ET-1 (% -actin)の肝移植後の推移				
	2時間	6時間	1日	3日
コントロール群	16.0± 5.6	21.0± 2.9	8.0± 1.0	1.7± 0.3
VSOP-NO群	3.1± 0.6	6.1± 0.9	1.4± 0.3	1.7± 0.3
iNOS (% -actin)の肝移植後の推移				
	2時間	6時間	1日	3日
コントロール群	7.1± 2.4	4.4± 1.0	2.7± 1.4	3.2± 0.8
VSOP-NO群	1.4± 0.3	2.4± 0.7	2.3± 0.8	1.7± 0.5

最後に、血管内皮の障害の評価として、Endothelin-1 (ET-1)の mRNA の測定と免疫組織染色による比較検討を行った。

まず、ET-1 については、60 分心停止ドナーからのグラフト肝コントロール群では、ET-1 mRNA の発現が強度であったのに対して、VSOP-NO を用いると、ET-1 mRNA の発現は有意に抑制されることが判明した(図 4 A)。また、60 分心停止ドナーからのグラフト肝を用いて肝移植 2 時間後のグラフト肝を、DNA 障害のマーカーとなる 8-OHdG を用いて免疫染色を行ったところ、コントロールの肝臓では障害を示す染色陽性細胞が著明に出現したのに対して、VSOP-NO 群では染色陽性の障害細胞が顕著に抑制されることが判明した(図 4 B、C)。

図 4



(CV:中心静脈域、PV:門脈域)

以上の結果より、心停止ドナーという温粗血時間長いドナーを用いた肝移植での許容範囲を増大させる新しい肝移植の治療戦略の可能性が示唆された。

これまでの実験結果の限界としては、実験当初はVSOP-NOによってグラフト肝障害を強力に抑制することにより、温粗血時間(保存時間)を延長させることを目標といていた。しかしながら、その目標を達成することが出来なかったため、今後の更なるメカニズムの解明やより強力な臓器保存方法の発見が課題となった。

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)

[学会発表](計1件)

1. ラット心停止ドナー肝移植に対する一酸化窒素を用いた臓器保存効果 影山詔一、小倉靖弘、上本伸二ほか11名、平成25年4月11日、マリンメッセ福岡(福岡市)、第113回日本外科学会定期学術集会

6. 研究組織

(1)研究代表者

小倉 靖弘 (OGURA, Yasuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号: 20335251

(2)研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)

京都大学 医学系研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40252449