

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390316

研究課題名(和文) 医工薬学連携によるマージナルドナーに対応する新しい臓器保存方法の開発

研究課題名(英文) A development of novel organ preservation technology for marginal donor-

研究代表者

松野 直徒 (Matsuno, Naoto)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00231598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,000,000円、(間接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：1. 肝臓及び腎臓対応保存装置の作製2. 細胞外液型組成の液を作製3. 肝臓、腎臓保存中の機能判定を生化学的、流体力学的に行った4. 温阻血障害を加えた肝臓による移植実験：温阻血30分までは単純冷却保存よりも本法が良いことを証明5. 復温持続灌流保存の有用性：温阻血60分のブタ肝臓、腎臓を用いて行った。冷温から温度を上げる(22度)必要性を証明。6. 復温灌流保存による温阻血障害を加えた肝臓による移植実験：温阻血60分の肝臓を用いて移植実験を行い復温保存の優位性を明らかにした。世界で初めて大型動物を用いた肝臓移植モデルにおいて22度までの復温灌流保存しかも初代の保存装置を用いた成功例を報告した。

研究成果の概要(英文)：1:Development of original perfusion machine for liver and kidney.2:Development of extracellular type of machine perfusion solution.3:Possibility of pre-transplant viability assessment during perfusion preservation by effluent enzyme,changing of perfusion flow and pressure,essentially hepatic arterial pressure.4:Application for pig liver transplantation model;Superiority of hypothermic liver perfusion for 30min.of warm ischemic in jury and 4hour hypothermic preservation compared to static cold preservation.5:Superiority of rewarming preservation up to 22 for porcine 60min.of warm ischemic liver or kidney graft,interms of increasing ratio of effluent enzymes,flow gain,renal tissue resistance,and low level of tissue mRNA level of iNOS,IFN.6:Application for pig liver transplantation with use of 60min,warm ischemic liver graft.Rewarming machine preservation showed better reperfusion injury and survival in pig liver transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：移植医療 マージナルドナー 臓器保存 臓器灌流保存

(1) 研究開始当初の背景

欧米においては腎臓用低温持続灌流保存装置が実用化され、単純冷却保存との比較において多施設共同比較臨床試験で有用性が報告 (Moers, N Engl J Med, 2009) され多くの施設で普及してきている (Song RS, Am J Transplantation 2008)。肝保存に関しても、臨床での有用性が報告 (Guarrera, Am J Transplantation, 2010) されている。しかし、これらは臓器保存が主眼であり、臓器の機能回復・蘇生までを視野に入れた医療機器は存在していない。一方、移植臓器は低温保存という常識を変え腎臓でも肝臓でも常温での持続灌流保存による臨床例が成功している (Nicolson M, L Am. L Transplantation, 2013)。しかし、灌流液に血液を使用するなど安全面においても克服すべき問題は多い。

(2) 研究の目的

臓器移植の分野では深刻なドナー不足のため、適応条件を拡大し、マージナルドナー(移植可能限界の付近と評価されるドナー)からの移植がさかんになってきている。しかし、マージナルドナーからの移植は、術後に機能不全を起こすなどのリスクも高い。従って、マージナルドナーに対応する新しい臓器保存法を開発することは急務であると考えられる。本研究では、医工薬学の連携により、臨床に使用可能な新たな肝灌流保存法を開発をめざす。具体的には、1) 灌流条件評価のための肝血流コンピューターシミュレーションモデルの構築、2) 同モデルによる持続灌流保存条件の評価、3) 流体工学的見地から肝臓に適した灌流装置の開発、4) マージナルドナーの持続灌流保存に適した臓器保存液の開発、5) ブタ肝移植による持続灌流保存装置、保存液の評価、を行う。

(3) 研究の方法

肝臓血流シミュレーションモデル構築：昨年度、CT を用いて構築した肝血流コンピュー

ターシミュレーションでは、肝臓の位置、向き、周囲温度、灌流液の流速、など単一条件であった。本年度は、生理的条件により合致する条件にてモデル構築を行う。

温阻血障害肝を用いた持続灌流肝保存の研究：昨年度は保存装置の基本形を作成した。また障害肝として出血性ショック、呼吸停止、心停止モデルである温阻血 30 分モデル、総阻血時間 4 ~ 5 時間での肝移植では本保存方法の有効性確認した。さらに温阻血 60 分モデルにおいて冷温保存よりも本保存方法の特徴を生かして室温保存へ復温させることにより虚血再灌流障害を予防できることを見出した。今年度は温阻血障害を 60 分から 90 分、120 分と伸ばしこの知見が再現できるかについて検討する。また評価項目として組織 ATP 濃度、電子顕微鏡などを評価項目に加えていく。さらに保存温度を変更することに伴い保存条件の検討、特に灌流流量、灌流圧の再検討が

今年度必要となる。さらに室温保存に適切な保存液の検討、特に栄養素、供給酸素濃度、抗酸化剤について改良を加える予定である。栄養素については分子鎖アミノ酸を考えている。保存装置に関して工業デザイン化を検討する。

ブタ肝移植モデルの改良：昨年度はレシピエントブタの無肝期において門脈血流を受動的バイパスで迂回させていたが、腸管のうっ血が十分に避けられていたとはいえないため、本年度は、遠心血液ポンプを用いて能動的に迂回させる。また、移植後の生体活性 (vital sign) について、より詳細な観察をもとに客観的指標を策定し、移植術の総合的評価を深める。

小動物用灌流保存装置の作成と灌流保存液組成の改良：ラット肝の灌流保存が可能な装置を作成し、灌流保存液組成の探索的スクリーニングを可能とする。保存液は、昨年度の改良 UW 液を基本とし、polyethylene

glycol, dexamethasone、水素水、など臓器保存での有益性が示唆される物質を加える。評価は、灌流保存時の逸脱酵素、肝臓が取り込むプローブ薬剤の kinetics、などによる。

(4) 研究成果

末期臓器不全に対する移植医療における臓器提供者不足を解消するために心停止ドナーを用いるべく保存方法の改良として臨床応用をめざした肝臓持続灌流保存装置を作製し、保存液を改良した。さらにブタを用いて保存条件、保存液の検討を行った。また同所性に肝臓移植を行いその効果について確認した。

臓器保存装置の作製：既に報告されているラット、イヌなどの保存装置を参考に灌流流量、灌流圧を定めた。5時間程度の低温保存において組織学的に障害は見られなかった。保存中の酸素に関しては使用した群において良好な経過を示した。

保存液の検討：腎臓用に作製された灌流保存液を参考に独自に作成した。細胞内液型よりも細胞外液型において良好な移植成績を示した。

低温保存中の viability の評価：保存中に静脈より流出する逸脱酵素、特に AST, LDH、ヒアルロン酸は温阻血が長時間であればより高値に検出されることが判明した。また保存中の肝動脈圧の継時的変化を見ることにより障害の程度を判定できることが判明した。

温阻血障害を加えた肝臓による移植実験 (1): 出血性ショック+呼吸停止+心停止後に摘出された肝臓を用いて低温保存および移植実験を行った。このようなモデルで温阻血障害 30 分までであれば単純冷却保存方法よりも移植後の経過が良好であることを虚血再灌流後 3 時間までの採血データ (AST, LDH, 乳酸など) および肝生検像において示した。しかし温阻血 60 分に延長すると本保存方法の優位性は見られなかった。

復温保存の試み: 温阻血 60 分のブタ肝臓、腎臓を単純冷却 2 時間後ののち低温持続灌流保存へ移行すると 2 度 C まで 2 時間かけて復温持続灌流する群を比較した。後者において、流量の確保、組織血管抵抗の軽減、組織逸脱酵素の増加率、さらに組織中の IFN, TNF, iNOS などにおいて mRNA の低下を確認した。温阻血障害の強い臓器に冷温障害が強くなり subnormothemia まで温度を調節して保存することの重要性を見出した。

6 復温保存による温阻血障害を加えた肝臓による移植実験 (2): (1) の温阻血 60 分の肝臓を用いて 2 時間単純冷却、2 時間装置による機械灌流保存を行い比較した。低温保存群に比較して復温群において術後 2 時間の肝機能の軽減、生存率の改善を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Matsuno N, Kobayashi E: Challenges in machine perfusion preservation for liver grafts from donation after circulatory death, *Transplant Res* 2(19), 2013

Shigeta T, Matsuno N, Obara H, Kanazawa H, Tanaka H, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Mizunuma H, Enosawa S: Impact of rewarming preservation by continuous machine perfusion: improved post-transplant recovery in pigs. *Transplant Proc* 45:1684-89, 2013
Obara H, Matsuno N, Shigeta T, Hirano T, Enosawa S, Mizuhara H: Temperature controlled machine perfusion system for liver. *Transplant Proc* 45:1690-92, 2013

Hsu HC, Matsuno N, Machida N, Enosawa S: Improved Recovery of Hepatocytes Isolated From Warm Ischemic Rat Liver by Citrate Phosphate Dextrose (CPD) -Supplemented

Euro-Collins Solution. Cell Medicine
5(2-3):97-101(5), 2013
Shigeta T, Matsuno N, Huai-Che H, Obara
H, Mizunuma H, Hirano T, Uemoto
S, Enosawa S: A basic consideration for
porcine liver preservation using a
novel continuous machine perfusion
device. Transplant Proc
44/942-945, 2012

Obara H, Matsuno N, Enosawa S, Shigeta
T, Huai Che H, Hirano T, Muto M, Kasahara
M, Uemoto S, Mizunuma H: Pretransplant
screening and evaluation of liver graft
viability using machine perfusion
preservation in porcine
transplantation. Transplant Proc
44:959-961, 2012

Shigeta T, Matsuno N, Obara H, Mizunuma
H, Kanazawa H, Tanaka H, Fukuda
A, Sakamoto S, Kasanara M, Uemoto
S, Enosawa S: Functional recovery of
donation after cardiac death liver
graft by continuous machine perfusion
preservation in pigs: Transplant Proc
44:946-947, 2012

[学会発表](計10件)

松野直徒 他, 肝臓移植のための灌流温
度制御機械灌流蘇生装置: 第50回日本人
工臓器学会 2012.11.22(福岡)

松野直徒 他, 移植用肝臓における灌流
液料のコンピューター解析: 第30回日本
低温医学会総会 2012.11.23(福岡)

松野直徒 他, 肝臓灌流復温保存におけ
る最適流量検討: 第39回日本臓器保存生
物医学会定期学術集会 2012.11.16(福島)

松野直徒 他, 肝実質細胞への流体力学
的負荷に関する検討: 第39回日本臓器保
存生物医学会定期学術集会
2012.11.16(福島)

松野直徒 他, 心停止ドナーからの肝移

植-吹きウオン式持続灌流保存の有用
性: 第48回日本移植学会総会
2012.9.20(名古屋)

松野直徒 他, 心停止ドナーからの肝移
植に対する臓器保存液の開発と復温式持
続灌流保存の研究: 第112回日本外科学
会定期学術集会サージカルフォーラム
2012.4.12(千葉)

松野直徒 他, 多臓器に対応可能な持続
灌流保存装置の開発: 第38回日本臓器保
存生物医学会学術集会 2011.11.25(仙
台)

松野直徒 他, 多臓器対応可能な持続灌
流保存装置の開発と移植前機能評価: 第
47回日本移植学会総会 2011.10.6(仙
台)

松野直徒 他, 独自に開発した肝臓用持
続灌流保存装置による心停止後摘出肝移
植の研究: 第111回日本外科学会定期学
術集会 2011(紙上開催)

松野直徒 他, 肝臓移植のための灌流温
度制御機械灌流蘇生装置: 第50回日本
工臓器学会 2012.11.22(福岡)

[図書](計1件)

— 松野直徒, 小林英司: 腎臓移植における
灌流装置および灌流保存液. 腎疾患治療
薬マニュアル2013-14: 腎と透析(74) 増
刊号: P.877-88

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野直徒(国立成育医療研究センター先端医
療開発室)

研究者番号: 00231598

(2) 研究分担者

小原弘道(首都大学東京理工学研究科)

研究者番号: 00305424

水沼博(首都大学東京地工学研究科)

研究者番号: 20117724