

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791511

研究課題名(和文) 磁場環境下凍結装置を用いた新しい臓器保存技術の確立と臓器移植への応用

研究課題名(英文) The supercooling technology in preservation of organ grafts

研究代表者

渡邊 稔彦 (Watanabe, Toshihiko)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・外科

研究者番号：50306734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：単純臓器保存による磁場環境下による臓器障害の組織学的検討として、各保存法における保存液中の生化学的検査では、CPK・troponin-Iが過冷却凍結群で有意に低値であった。組織学的には過冷却凍結では心筋の組織構造は保たれていた。各保存法後の移植グラフトの機能評価では、移植後HTK保存液に比べ過冷却凍結では高い心拍再開率が認められ、これは虚血再灌流障害が軽度であることにより裏付けられた。過冷却凍結保存は従来の保存法に比べ、形態学的・機能的に臓器障害が軽度であり、将来的な臓器移植医療のスタンダードとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Current medical transplantation confronts major problems such as the shortage of donors and geographical restrictions that inhibit efficient utilization of finite donor organs. We investigated whether a strategy which best preserves organ grafts can be achieved by the use of a novel refrigerating chamber, which is capable of establishing a supercooled and unfrozen state stably by generating an electrostatic field in its inside. When mice heart was stored in the supercooled conditions, the levels of major biochemical markers leaked from the preserved organs were significantly lower than in the ordinary hypothermic storage. No apparent tissue damages were observed histologically after the supercooled preservation. After heart transplantation, rate of re-heart beating in supercooled condition was significantly higher. Our results suggest that the use of this supercooling refrigerator improves organ preservation and may provide an innovative technique for human organ transplantation.

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：過冷却凍結 臓器保存 臓器移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

本邦における臓器移植の動向

臓器移植は免疫抑制療法の進歩によって、臓器不全の一治療法として確立された。本邦では1997年10月に臓器移植法が成立したものの、脳死ドナーの数は極めて限られている上に、年齢は15歳以上という年齢制限があったため、特に小児患者には脳死移植は非現実的で、ドナー不足により死亡する移植待期患者は年々増加していた。本年7月に、臓器移植法改正法が施行され、本人に生前の拒否の意思表示がない限り家族の同意で臓器提供ができるようになり、これに伴いドナーの年齢制限が撤廃された。成人はもちろん小児患者への臓器移植の機会も大きく拡大されることとなり、事実、法改正後の脳死下臓器提供件数は著しい伸びを示している。そこで、脳死移植の更なる増加を想定した移植医療の体制整備が喫緊の課題である。

これまでの移植臓器保存

移植臓器保存での不可避的障害として、臓器摘出までの温阻血障害、冷保存中障害および移植後の再灌流障害の3段階の障害について、これらを軽減・改善するための研究が進められてきた。現在、代謝レベルを可能な限り低下させ、酸素欠乏障害を回避した、単純浸漬冷却保存(0~4℃)が最もコストパフォーマンスに優れるとされている。臓器保存液はUV solutionやHTK solutionが、最も信頼性の高いスタンダードな臓器保存液として定着している。しかしながら、臓器保存時間は腎臓で3日間、肝臓、脾臓で20時間、心臓で4~6時間、肺で8~12時間が限度というのが現状であり、移植までの保存時間としては十分とは言えず、脳死患者発生後のレシピエント候補者の選定、臓器摘出から搬送、候補者への移植までのプロセスは非常に緊迫したスケジュールが余儀なくされている。

新たに登場した磁場環境下凍結技術

これまで臓器・組織の長期間保存を可能にするため様々な凍結保存法が試みられてきたが、臓器の凍結保存は不可能とされてきた。細胞や組織の凍結保存において、細部内の氷晶形成や細胞内液濃縮による高張障害が問題となる。心臓弁、皮膚、骨、脾臓などの組織は凍結保存が可能となったが、体積の大きい臓器ではすべての部分を一定条件下で凍結させることが難しいため、いまだ成功していない。

近年日本国内の食品凍結技術開発企業(アビー株式会社)が、磁場環境下において食品を凍結することで解凍後も品質を維持することが可能な技術(CAS法)を開発し、生鮮食品分野において、食品の旨み成分の保持をすることが実用化された。一般的に凝固点を

超えても物質が凍結しない現象を「過冷却現象」というが、過冷却凍結保存は、臓器全体を-10~-20℃前後でも凍らない“過冷却状態”を維持し、そこから瞬間的に凍結させる技術とされる。完全には臓器が凍結しない温度帯での過冷却状態での保存方法は、冷却下よりもさらに代謝レベルを低下させることができ、凍結による細胞障害も回避できるため注目されているが、動物実験レベルのデータも極めて不足している。

これまでの研究成果と発想の経緯

東京大学医学部形成外科学教室の三原誠らは、早くからこの技術の医療分野への応用に着手し、これまでに「超微小血管外科技術を用いた精巣移植・精巣凍結の可能性」や「女性器癌患者における卵巣凍結と妊孕性再建」などの実績を重ね、さらに近年ではiPS細胞凍結保存に至るまで多岐に渡っている。研究代表者は、これまでに小動物を用いた臓器移植または移植免疫に関する実験を進めてきたが、今回磁場環境下凍結技術を我々のマイクロサージェリーによる臓器移植技術と融合することにより、斬新で画期的な臓器保存・移植の技術の確立・実用化が可能ではないかとの着想に至った。

(2) 学術的独創点・予想される結果と意義

磁場環境下凍結技術を臓器移植に応用して、より長時間・高品質な臓器保存が可能になれば、これまで脳死移植ドナー・レシピエントの“Region(臓器搬送可能地域)”の概念がなくなり、各臓器の移植候補者は地理的要因によって失っていた臓器移植を受けられる機会が増加し、また余裕を持ってマッチングのより良好な候補者を選択できることから移植成績の向上につながる事が予想される。さらに凍結保存が完成すれば、バンキング可能な「臓器医薬品」が実現する。さら我が国においてはいまだ脳死移植は発展途上であるが、我が国発の過冷却凍結保存技術による臓器移植法が確立できれば、脳死移植が中心である欧米の移植医療にも大きな変革をもたらす事が考えられる。

2. 研究の目的

現在の移植医療は慢性的なドナー不足という大きな問題に直面している。現行の臓器保存技術では地理的な要因による効果的な臓器分配が困難であり、臓器保存時間の延長はドナー不足解消に大きく寄与すると考えられる。近年、本邦食品業界において磁場環境下で凍結することで、鮮度・食感を保つ技術が開発され、この技術の医療分野への応用が着手されている^{1,2}。革新的な低温保存技術を小動物を用いたマイクロサージェリーによる臓器移植技術と融合することにより、画期的な臓器保存・移植の技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 磁場環境下による臓器障害の組織学的検討(単純臓器保存)

実験モデル

実験動物として Brown Norway ラット(BN、200~220g)を用い、24時間の絶食の後にイソフルレン麻酔下で、各臓器(心臓・肝臓・小腸・腎臓・肺)を冷ヘパリン加乳酸リンゲル液にて灌流した後、通常の移植臓器摘出(donor organ harvesting)の手順に従って摘出し、各々HTK保存液、通常凍結、磁場環境下凍結の3群に分けて一定時間保存する。なお、実験の進行上、マウスが適当となればマウスを対象とする場合がある。

実験群

1. HTK保存液: 各臓器をHTK保存液に単純浸漬して、-4で保存する。
2. 通常凍結: 冷ヘパリン加乳酸リンゲル液に浸漬して、-80度の超低温冷蔵庫で保存する。
3. 磁場環境下凍結保存: 冷ヘパリン加乳酸リンゲル液に浸漬して、磁場強度を0.1mT、1mT、10mTの3レベルで設定し、-30で保存する。これらの凍結および保存時の温度変化は、データロガーによってin situに分析する。

観察項目・時期

1. グraftの組織学的障害の検討:
各保存群において、心臓・肝臓・小腸・肺は24時間、腎臓は72時間保存したのち(上記群では30の生理食塩水にて解凍した後)10%ホルマリン固定し、HE染色標本作製し、各臓器の実質の障害の程度を評価する。
摘出グラフトは今後実際の臓器移植モデルへ発展してゆくため、実際の移植手術時の重要な吻合部となる血管断端(心臓:大動脈・肺動脈、肝臓:門脈・下大静脈・腹部大動脈、小腸:腹部大動脈・門脈、腎臓:腹部大動脈・下大静脈、肺:肺動脈・肺静脈)の血管内皮障害、内皮の解離の有無を評価する。また肝臓、腎臓、肺では生理的管腔(肝臓:胆管、腎臓:尿管、肺:気管支)についても同様に障害の程度を比較する。
2. 保存液中の生化学的マーカーの分析(担当:絵野沢)
各群の保存液に含まれる保存臓器より漏出した生化学的マーカーを測定することにより、臓器障害を評価する。(心臓:CK-MB, AST, LDH、肝臓:AST, ALT, LDH、小腸:CPK, calprotectin、腎臓:AST, LDH、肺:CPK, AST)

(2) 磁場環境下凍結による移植グラフトの機能評価(保存臓器移植)

実験モデル

実験動物として、レシピエントにBNラット、またはLewisラット(LEW、220~250g)を用い、24時間の絶食の後にイソフルレン麻酔下で、顕微鏡下に上記各群から得られたドナーラット(BN)の各臓器(心臓・肝臓・小腸・腎臓・肺)の移植手術を行う。実験効率向上のため、上記実験で組織障害が軽度で移植手術後にグラフトの機能が期待できる臓器から開始する。また生存率を少しでも向上するため、臓器移植はすべて異所性で行うこととする。実験の進行上、マウスが適当となればマウスを対象とする場合がある。

実験群

1. syngenic model:
BN BNの同種同系間の異所性移植を施行。(拒絶反応を起こさない群。)
2. allogenic model:
BN LEWの同種異系間の異所性移植を施行。免疫抑制剤は投与しない。(急性拒絶反応を起こす群。)

観察項目・時期

1. syngenic model: 虚血再灌流障害の検討:
異所性臓器移植を施行後、6時間・24時間後に犠死させ、各臓器(心臓・肝臓・小腸・腎臓・肺)グラフトの虚血再灌流障害の程度を評価する。

1. 組織学的検討: HE染色を行い、虚血再灌流障害の程度をスケール分類する。
2. Myeloperoxidase(MPO)活性: 臓器への好中球浸潤の指標として、MPO活性の定量化を行う。
3. サイトカイン産生: RT-PCR法により、炎症性サイトカイン(IL-1、TNF- α)、Th1サイトカイン(IFN- γ 、IL-2)およびTh2サイトカイン(IL-4、IL-6、IL-13)の定量を行う。
4. タンパク発現定量: Western Blot法により、caspase-3、NF- κ B、Bcl-2、Bcl-xl、actinを測定する。
5. アポトーシス: Tunnel染色を行い高倍率像(x400)でのTunnel陽性細胞のカウントを行う。
6. 血清中生化学的マーカー: 血清中AST、ALT、LDH、CPKの定量を行う。

4. 研究成果

(1) 磁場環境下による臓器障害の組織学的検討(単純臓器保存)

実験動物とモデルの決定

移植技術が単純で成功率の高い心臓をまず行うべき臓器として選択した。balb/cマウスの心臓を摘出し、通常凍結(冷ヘパリン加乳酸リンゲル液に浸漬し、-80の超低温冷蔵庫で保存)HTK保存液(HTK保存液に単純浸漬して、-4で保存)過冷却凍結

(冷ヘパリン加乳酸リンゲル液に浸漬し、0.1mT の磁場強度をかけ-30 で保存) の 3 群に分けて 24 時間、72 時間の保存を行った。

各保存法における保存液中の生化学的検査

通常凍結 : HTK 保存液 : 過冷却凍結の順に、CPK(IU/L) = 14521 : 8541 : 453、troponin-I(pg/mL)=1157:638:427 と過冷却凍結群で有意に低値であった。

組織学的障害の程度

H-E 染色にて通常凍結群では、心筋組織中に空隙が形成され大動脈に内膜剥離が認められた。HTK 保存液では心筋組織の融解壊死が認められたが脈管系の組織構造は保たれていた。過冷却凍結では、心筋の組織構造は保たれており、脈管系にも異常所見を認めなかった。

(2) 移植グラフトの機能評価 (臓器保存は 1 日、3 日、7 日)

移植後の心拍再開率

通常凍結ではどの保存時間でも心拍の再開は認められなかった。HTK 保存液、過冷却凍結では、1 日保存では心拍の再開がすべて認められたが、3 日、7 日では HTK 保存液では心拍の再開が見られなかったが、過冷却凍結では 3 日で 50%、7 日で 20% に心拍の再開を認めた。

移植 3 時間後の組織中の Myeloperoxidase 活性

心拍の再開を認めた HTK 保存液、過冷却凍結群にて分析を行い、HTK 保存液では、1.25(umol/mg protein)、過冷却凍結では 0.65 と過冷却凍結群で有意に低値であった。

1 日保存後の Tunnel 染色

通常凍結 : HTK 保存液 : 過冷却凍結の順に、apoptotic cells(number of positive cells/HPF)=17.6:7.8:3.2 と、過冷却凍結で有意に低値であった。

移植後 3 時間後の caspase-3 発現定量

心拍の再開を認めた HTK 保存液、過冷却凍結群にて western blot 法を行い、過冷却凍結では HTK 保存液と比べ、活性が少なかった。

RT-PCR 法による炎症性サイトカイン定量
心拍の再開を認めた HTK 保存液、過冷却凍結群にてグラフト中のサイトカインの定量を行い、TNF- α (%GAPDH) = 121:82.3、IL-2=68.3:42.8、IL-6=58.3:36.9 と過冷却凍結では HTK 保存液と比べサイトカイン産生は有意に低値であった。

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)

(雑誌論文)(計 12 件)

1. Yamada K, Kanamori Y, Tanaka H, Fujino A, Watanabe T, Takeda N, et al. Congenital prepubic sinus associated with a urachal remnant: report of a case. Surg Today 2013; 43: 1330-1332.
2. Takahiro Shimizu, Toshihiko Watanabe, Kaori Sato, Michinobu Ohno, Masataka Takahashi, Toshiko Takezoe, Yasushi Fuchimoto, Yutaka Kanamori. Primary great saphenous vein aneurysm in a five-year-old boy. J Pediatr Surg Case Report 2014; 1: 4-5.
3. Toshihiko Watanabe, Masataka Takahashi, Kensuke Shoji, Koji Yamada, Waka Yamada, Hideaki Tanaka, Hideo Ishihama, Ippei Miyata, Akihiko Saitoh, Yutaka Kanamori. Human parechovirus-3 infection mimicking Hirschsprung-associated enterocolitis. J Pediatr Surg Case Report 2014 in press
4. Ohno M, Tanaka H, Watanabe T, Sato K, Takahashi M, Yamada K, Yamada W, Shioda Y, Mori T, Matsuoka K, Fuchimoto Y, Kanamori Y. Giant infantile immature teratoma derived from the hepatoduodenal ligament: report of a case. J Pediatr Surg Case Report 2013; 1: 301- 303. DOI:org/10.1016/j.epsc.2013.08.006.
5. Watanabe T, Takahashi M, Amari S, Ohno M, Sato K, Tanaka H, et al. Olive oil enema in a pre-term infant with milk curd syndrome. Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society 2013; 55: e93-95.
6. Tanaka H, Arai K, Fujino A, Takeda N, Watanabe T, Fuchimoto Y, et al. Treatment for hypergranulation at gastrostomy sites with sprinkling salt in paediatric patients. Journal of wound care 2013; 22: 17-18, 20.
7. Takahashi M, Watanabe T, Tanaka H, Yamada W, Yamada K, Fuchimoto Y, Nosaka S, Kanamori Y. Cecal volvulus associated with mobile cecum in Cornelia de Lange syndrome: Report of a case. Open J Pediatr 2013; 3: 96-98. doi:10.4236/ojped.2013.32018
8. Takahashi M, Watanabe T, Sato K, Ohno M, Yamada K, Takezoe T, Fuchimoto Y, Ohkita H, Matsuoka K, Kanamori Y. Congenital median raphe cysts: Coexistence of cystic lesions and canal like lesions. Open J Pediatr 2013; 3; 274-275.

9. Yamada K, Kanamori Y, Tanaka H, Fujino A, Watanabe T, Takeda N, et al. Congenital prepubic sinus associated with a urachal remnant: report of a case. Surg Today 2012.
10. Yang J, Riella LV, Chock S, Liu T, Zhao X, Yuan X, Watanabe T, et al. The novel costimulatory programmed death ligand 1/b7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. J Immunol 2011; 187: 1113-1119.
11. Watanabe T, Nakano M, Yamazawa K, Maeyama K, Endo M. Neonatal intestinal volvulus and preduodenal portal vein associated with situs ambiguus: Report of a case. Surg Today 2011; 41: 726-729.
12. Riella LV, Watanabe T, Sage PT, Yang J, Yeung M, Azzi J, et al. Essential role of PDL1 expression on nonhematopoietic donor cells in acquired tolerance to vascularized cardiac allografts. Am J Transplant 2011; 11: 832-840.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Toshihiko Watanabe, Fumiko Yoshida, Masaharu Mori, Etsuji Ukiyama, Miwako Nakano, Masao Endo: Incidence and characteristics of contralateral manifestation in children with unilateral inguinal hernia after laparoscopic completely extraperitoneal repair. IPEG's 22nd Annual Congress for Endosurgery in Children, Beijing, China 2013.6.20
2. 渡辺稔彦、山田耕嗣、山田和歌、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、田中秀明、淵本康史、伊藤玲子、新井勝大、金森豊：IFALD を呈する新生児外科疾患に対する Fishoil の役割(シンポジウム1 小児消化器疾患の栄養管理)。第28回日本静脈経腸栄養学会、金沢、2013.2.21
3. 渡辺稔彦、大野通暢、淵本康史：Congenital pouch colon の1例。慶應小児外科グループ症例検討会、東京、2013.3.9
4. 渡辺稔彦、山田耕嗣、山田和歌、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、田中秀明、

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

淵本康史、新井勝大、川原央好、位田忍、金森豊：消化管蠕動不全に対する経胃瘻的空腸栄養ボタンの有効性。第27回日本小児ストーマ・排泄管理研究会、神戸、2013.5.18

5. 渡辺稔彦、山田耕嗣、山田和歌、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、田中秀明、淵本康史、船山理恵、伊藤玲子、新井勝大、金森豊：新生児外科疾患における3系脂肪製剤の役割。第50回日本小児外科学会学術集会、東京、2013.5.31
6. 渡辺稔彦、山田和歌、高橋正貴、大野通暢、田中秀明、杉林里佳、住江正大、和田誠司、左合治彦、中村知夫、伊藤裕司、淵本康史、金森豊：出生前診断された嚥胞性肺疾患の疾患別胎内動態と予後に関する検討。第49回日本周産期・新生児医学会総会、横浜、2013.7.15
7. 渡辺稔彦、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、杉林里佳、住江正大、和田誠司、左合治彦、中村知夫、伊藤裕司、淵本康史、金森豊：当院における最重症の横隔膜ヘルニアの治療成績と今後の課題(シンポジウム8 出生前診断された先天性横隔膜ヘルニアの治療戦略)。第49回日本周産期・新生児医学会総会、横浜、2013.7.15
8. 渡辺稔彦、清水隆弘、竹添豊志子、右田美里、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、樋口昌孝、川崎一輝、住江正大、和田誠司、左合治彦、中村知夫、伊藤裕司、淵本康史、金森豊：肺葉外肺分画症の臨床的特徴。第24回日本小児呼吸器外科研究会、東京、2013.10.25
9. 渡辺稔彦、清水隆弘、高橋正貴、大野通暢、佐藤かおり、山田耕嗣、竹添豊志子、樋口昌孝、川崎一輝、淵本康史、金森豊：肺葉外肺分画症に対して胸腔鏡下手術を施行した2例。第26回日本内視鏡外科学会総会、福岡、2013.11.28
10. 渡辺稔彦、清水隆弘、右田美里、竹添豊志子、高橋正貴、佐藤かおり、大野通暢、清谷知賀子、森鉄也、松本公一、淵本康史、金森豊：oncologic emergency を呈した縦隔ラブドイド腫瘍の1例。第4回信濃町小児がんクラスター症例検討会、東京、2013.12.18

〔図書〕(計 0 件)

(1)研究代表者

渡辺稔彦 (WATANABE, Toshihiko)

独立行政法人 国立成育医療研究センター 外科

研究者番号：50306734

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし