

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461939

研究課題名(和文)心停止ドナーによる肝移植のための新規保存液を用いたグラフト灌流保存法の開発

研究課題名(英文)The study of organ preservation solutions and oxygenated machine perfusion preservation with temperature controlled for porcine DCD liver graft

研究代表者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI, Masahiko)

旭川医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：30374333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：深刻な臓器提供者不足の中で期待のかかる心停止ドナー肝の還流保存に関してブタを用い、最適な灌流液、温度や灌流条件の検討を行った。成果としては、保存温度上昇とともに、酸素消費量は上昇し、門脈圧、動脈圧が低下する傾向が見られた。灌流液中AST,LDH,ヒアルロン酸と負の相関のあることが判明し、shear strssの軽減が示唆された。また、臓器灌流保存のHESを含んだ灌流保存液は、心停止肝においては必ずしも良好な保存組成成分とは言えないことが判明した。人工赤血球を用いた灌流保存液は、灌流中の門脈圧の上昇、肝動脈圧の上昇が優位に抑えられ心停止ドナー肝還流保存の有効な酸素供給方法として考えられた。

研究成果の概要(英文)：Utilization of grafts from donors after cardiac death (DCD) would greatly contribute to the expansion of the donor pool. To assess potential effect, porcine livers procured after 60 minutes of warm ischemic time were perfused and preserved. Study 1; The effects of subnormothermic preservation(SNP) with machine preservation(MP) Study 2;Evaluation of HES or PEG in UW gluconate solution of porcine liver grafts Study 3; Impact of solution containing artificial oxygen carrier hemoglobin vesicles(AOC).Results 1; According to increase the preservation temperature, more oxygen consumption was required and portal vein pressure was decreased. The changes of AST, LDH and hiarulonic acid were lowest in SNP. Potentially, SNP is expected to help the recovery of function. Results 2; Effluent enzyme of AST and LDH were lower in PEG group HES may not be effect as a MP solution. Results 3; MP solution containing with AOC is expected to use the recovery the function.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：心停止ドナー 肝臓保存 灌流保存方法 人工赤血球含有灌流液

1. 研究開始当初の背景

欧米では、腎臓用低温持続灌流保存装置が実用化され、単純冷却保存との多施設共同での比較臨床試験により灌流保存の有用性が報告 (Moers, N Engl J Med, 2009) され、広く普及した技術となっている。また、肝臓に関しても低温灌流保存の有用性 (Guarrera, AmJT, 2010) が報告され、世界的にも大きな期待が集まっている。しかし、灌流液に血液などを使用するためには克服すべき課題も多く、血液の代替物としての酸素運搬体の活用が求められている。一方、DCD (Donation After Cardiac Death) 臓器の移植適用への期待も大きいものの、このような移植可能限界領域のマージナルドナーに最適な臓器保存液、臓器保存方法については確立されたものはない。申請研究グループでは、既に機械灌流保存装置 [特願 2011-035, A0IN 1/02] を作成し、主にブタを用いた肝臓の保存・移植実験をおこない多くの研究成果を報告した。その結果、灌流中の肝動脈圧パターンで臓器 Viability の外挿の可能性 (Obara, Matsuno ほか transpl Proc. 2012) を見出し、さらに心停止後摘出された肝臓に関しては保存温度を特に 22 °C とい subnormothermia まで冷温から復温させることによって虚血障害を軽減し肝臓の ATP を回復させ、酸素の需要が増加することを見出している (Shigeta . Matsuno Transpl Proc. 2013) これら事実は臓器蘇生への鍵となるものと考えられる。

2. 研究の目的

臓器還流保存方法を軸として、ブタ心停止ドナーモデルを用い、最適化された臓器保存液を探索するとともに温度と酸管理に注目して研究を行うことを目的とする。DCD (Donation After Cardiac Death) 臓器の移植適用への期待も大きく、酸素を付加した低温灌流 (Dutkowski, Ann. Surgery, 2016) などの報告など、灌流温度と酸素管理と灌流条件の検討が議論されている。一方、酒井、東

らはヒトヘモグロピンを用いた備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球の研究を行っており、酸素運搬体として灌流保存液に含有させるという共同研究を 2015 年より行うこととなり研究の一つの柱ともなった。

以上より、研究期間内において下記 3 つのテーマで研究を行った。

研究 1 ; 心停止ドナー肝臓における温度と酸素供給の研究

研究 2 ; UW 液に含まれる HES の心停止ドナー肝還流保存に対する有効性に関する研究

研究 3 ; 人工赤血球含有還流保存液を用いた心停止ドナー肝臓の還流保存の有効性の研究

3. 研究の方法

研究 1

独自に作製した門脈・肝動脈の 2 系統に同時灌流可能な肝保存用の灌流システムを用い、強い温阻血障害を加えたブタ肝臓の保存実験を行った。灌流システムは門脈、肝動脈、灌流液管理用の 3 系統の流路系ならびに臓器用チャンバにより構成され酸素は動脈回路から供給される。体重 20kg 前後のブタ肝臓を摘出して本装置により 4 時間保存した。灌流液は UW-gluconate 液変法とした。(1 群) 温阻血時間(WIT)0 分 (2 群) WIT60 分 (3 群) WIT60 分で 8 度から徐々に 22 °C まで復温の 3 群で、酸素消費量、逸脱酵素、組織中サイトカインや ATP の変化を検討した。

研究 2

ブタ (体重 20kg) を用いた、心停止後 60 分(WIT60)で肝臓を摘出し作製した灌流液 modifyUW - gluconate 液で HES を含まないで PEG に置き換えた灌流液による保存群および、欧米で市販されている HES を含む灌流用保存液群を比較した。灌流時間は 4 時間で行い逸脱酵素、灌流門脈圧、動脈圧などで比較した。

研究 3

ブタ（体重 20kg）を用いた、心停止後 60 分(WIT60)で肝臓を摘出し UW 液による単純冷却保存 4 時間、WIT 660 で人工赤血球を含有しない 4 時間室温灌流液群。WIT60 で人工赤血球含有灌流液による 4 時間室温灌流群を比較検討した。組織中 ATP, サイトカイン、灌流門脈圧、動脈圧を比較検討した。

あわせて、工学的なアプローチによるコンピュータ解析によって、灌流中の酸素消費動態ならびに灌流条件の網羅的探索をおこない最適酸素供給条件、積極灌流条件を検討する。

4 . 研究成果

研究 1

保存終了時の逸脱酵素である各群各々、AST (IU/L) 238.5, 3285.0, 1980.0、LDH (IU/L) 340.0, 3270.0, 4295.0 ヒアルロン酸は 9 以下、20.0, 29.5. であり、低温灌流に比較し、復温灌流群において逸脱酵素は低値を示した。また、温度上昇とともに、肝臓の産所消費量は上昇し、一方、門脈圧、動脈圧が低下する傾向が見られた。この結果は、機能評価である、AST, LDH, ヒアルロン酸と負の相関のあることが判明し、shear stress の軽減が示唆された。一方、復温群は低温群に比し組織内 mRNA (iNOS, TNF, IL1) の発現抑制を見た。低温灌流群の組織像は一部の Disse 腔の拡大、肝細胞索は膨化し、著明な脂肪滴がみられたが、復温灌流群において軽度であった。電顕において低温灌流群群では空泡の拡大、ミトコンドリアの膨大などがみられた。以上、温阻血障害肝の肝保存は、持続灌流保存法を利用し低温から一気に血流再開することを避け、かつ酸素運搬体による相乗効果が期待されることとなり、研究 3 へつながることとなった。

研究 2

保存中、門脈圧、肝動脈圧力は両群ともに低下傾向であったが、有意差は見られなかった。保存中の逸脱酵素 AST, LDH はともに PEG 群において低値であり、特に AST において

は有意差がみられた。Viscosity に関しては、両群ともに温度上昇に従い低下したが、有意差は見られなかった。【結語】心停止ドナーからの臓器灌流保存において HES を含んだ灌流保存液は、肝臓においては必ずしも良好な保存環境とはいえない。

研究 3

保存中、肝動脈圧力の減少率、保存中の逸脱酵素(AST, LDH)時間変化量は、両群ともに有意差はなかった。保存中酸素消費量に関して有意な差は認めなかった。門脈圧の上昇、肝動脈圧の上昇は優位に抑えられた。【結語】心停止ドナーからの臓器保存において人工赤血球を用いた灌流保存液は、臓器を回復させ、機能再生の糸口になる可能性が示唆された。今後は、移植手術を模してドナー血液による再灌流によって虚血再灌流粗油買いモデルを作成して、虚血再灌流の抑制という点で検討を加える予定。特に、組織中 TNF, IFN の mRNA の発現は再灌流後 1 時間、2 時間で現在検討中である。

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 7 件)

Furukori M, Matsuno N, Watanabe K, Hagiwara M, Shonaka T, Imai K, Meng LT, Obara M, Nishikawa Y, Furukawa H. Subnormothermic machine perfusion preservation with rewarming for donation after cardiac death liver grafts in pigs. *Transpl Proc.* 48(4):1239-43. 2016
DOI:10.1016

Meng LT, Matsuno N, Watanabe K, Furukori M, Obara H, Boshimoto H, Watanabe T, Furukawa H. Scanning Electron Microscopy Findings of Machine Perfused Liver Graft After Warm Ischemia between hypothermic and Rewarming machine Perfusion in Pigs.

Transpl Proc.48(7)2467-2470.2016

DOI:10.1016

Taniguchi M, Shimamura T, Todo S, Furukawa H. Small-for-size syndrome in living-donor liver transplantation using left lobe graft. Surg Today. 45(6)663-671. 2015

DOI:10.1007/s000595-014-0945-x.

松野直徒, 小原弘道, 古郡茉里子, 渡邊賢二, 田崎嘉一, 渡部剛, 西川祐司, 絵野沢伸, 古川博之. 複合的戦略による心停止ドナーからの移植臓器有効利用の研究-灌流型臓器保存を中心にした機能再生の試み-Organ Biology22 (2) 19-25. 2015

内田浩一郎, 谷口雅彦, 川原敏靖, 今井浩二, 小西菜々美, 萩原正弘, 渡邊賢二, 宮本正之, 鈴木達也, 石井大介, 松野直徒, 古川博之. 【最新肝臓学-基礎と臨床の最新研究動向-】肝臓治療とインフォームドコンセント 肝臓手術におけるインフォームドコンセントの要点(特集)日本臨床外科学会雑誌73増1 最新肝臓学 767-771. 2015

Kato K, Taniguchi M, Iwasaki Y, Sasahara K, Nagase A, Onodera K, Matsuda M, Inaba Y, Kawakami T, Higuchi M, Kobayashi Y, Furukawa H. Tomography-gastro-colonography for percutaneous endoscopic gastrostomy using a helical computed tomography. Am J Surg. 210(2)374-381. 2015

DOI:10.1016/j.amjsurg.2014.10.029.

谷口雅彦, 深井原, 鈴木達也, 内田浩一郎, 古川博之. 肝移植におけるNF- κ B活性の功罪 肝胆膵68. 563-568. 2014

〔学会発表〕(計7件)

古川博之. 脳死下多臓器摘出講習「肝臓」

第52回日本移植学会総会(招待講演)2016年9月29日-10月1日東京.

松野直徒, 小原弘道, 田崎嘉一, 鈴木智之, 西川祐司, 佐武由康, 古郡茉里子, 高橋博之, 庄中達也, 酒井宏水, 古川博之. 我が国から発信する人工赤血球含有灌流液による心停止肝の灌流保存. 第34回日本肝移植研究会2016年7月7日-8日北海道旭川市

松野直徒, 小原弘道, 森戸規之, 岡田陽子, 孟玲童, 西川祐司, 古川博之. 心停止ドナーからの肝臓灌流保存における温度条件の検討 第34回日本肝移植研究会2016年7月7日-8日北海道旭川市

松野直徒, 古郡茉里子, 渡邊賢二, 北健吾, 萩原正弘, 庄中達也, 小原弘道, 渡部剛, 西川祐司, 古川博之. マージナルドナーからの移植臓器の有効利用 灌流型肝保存による機能再生をめざした研究 第116回日本外科学会的学術集会. シンポジウム. 2016年4月14日大阪

Hagiwara M, Matsuno N, Furukori M, Watanabe K, Shonaka T, Imai K, Matsunami M, Kanazawa H, Kasahara M, Furukawa H. Applicability of combined of extracorporeal support and temperature controlled machine perfusion preservation for DCD liver procurement. Cast2015. Singapore. August23-26. 2015

Meng LT, Matsuno N, Watanabe K, Furukori M, Obara H, Kuchimoto H, Watanabe T, Furukawa H. Electron microscopic recovery of preserved livers following warm ischemia Improvement by machine perfusion preservation. Transpl Proc. CAST2015. Singapore. August23-26. 2015

Hanada D,Uchida K,Suzuki T,Matsuno
N,Tanigushi M,Furukawa H.Posine cytokine
profile associated with ischemia
reperfusion injury in liver
transplantation using donoation after
cardiac death.World Transplant Congress
2014.San Francsisco.July26-31.2014

〔図書〕(計1件)

Tanigushi M,Furukawa H.
Capter 11;ECD for adult liver
transplantation,marginal
donors.Springer.123-131.2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 雅彦 (TANIGUCHI, Masahiko)
旭川医科大学・医学部・客員准教授
研究者番号：30374333

(2)研究分担者

古川 博之 (FURUKAWA, Hiroyuki)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：70292026

深井 原 (FUKAI, Moto)
北海道大学・医学研究科・特任助教
研究者番号：60374344