

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670555

研究課題名(和文) 常温灌流保存による脂肪肝グラフト再生への挑戦：肝摘出後の脂肪肝改善は可能か？

研究課題名(英文) Challenge to revival of steatotic liver graft by machine perfusion preservation

研究代表者

秦 浩一郎 (Hata, Koichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90523118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食餌性にラットの50%程度の大滴性脂肪肝モデルを作成し使用した。まず、脂肪肝グラフトに対する室温(20-25℃)灌流保存の効果を検討した。今日の標準的保存方法である単純冷却保存と比較して、灌流保存群では微小循環の改善、酸化ストレス障害の軽減、ミトコンドリアの保護効果が確認された。カルニチン、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニストなど脱脂肪化促進候補因子を室温灌流保存液に添加したが、明らかな脱脂肪化所見は認められなかった。灌流温度の上昇や酸素運搬体の必要性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Almost 50% macrosteatotic liver was induced by dietary protocol in rat. At first, we confirmed that subnormothermic (20-25℃) machine perfusion preservation (SMP) protects steatotic livers from preservation/ reperfusion injury compared with static cold preservation, in terms of oxidative stress, mitochondrial damage, and microcirculatory disturbance, resulted in maintenance of functional & morphological viability. In the next step, we investigated defatting power of SMP with drug facilitating fatty acid oxidation and triglyceride secretion, like carnitine and peroxisomal proliferator-activated receptor. However, SMP didn't show little effect on defatting. Increase perfusion temperature and usage of oxygen carrier may be required for defatting.

研究分野：肝移植

キーワード：脂肪肝 灌流保存 肝移植 脱脂肪化

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は、その冷保存(虚血)温再灌流傷害に対する脆弱性がグラフト機能不全を引き起こすため、30%以上の大滴性脂肪肝グラフトの移植利用は敬遠されてきた。

肝移植は末期肝疾患に対する唯一の根治的治療として確立しているが、世界的規模で進行する深刻なドナー不足が問題となっており、これまでは移植不適応として除外されてきた脂肪肝や心停止後ドナー肝などの境界グラフトへの適応拡大が注目されている。

本邦ではこれまで99%以上の肝移植を生体ドナーに依存してきたが、2010年の臓器移植法改正により脳死肝移植が増加しつつあり、今後益々その割合が増加していくと予想される。さらに食生活を始めとする生活習慣の欧米化に伴い、本邦でも脂肪肝罹患率が増加しており、必然的に脳死ドナー肝の脂肪変性が問題となる。日本臓器移植ネットワークによると、2010年には32例の、2011年には44例の臓器提供があったが、それぞれ4例、7例の肝臓が医学的理由により移植を断念されている。実際当科でも、2010年の法改正以降に21例の脳死下肝摘出を施行したが、内4例で30%以上の大滴性脂肪肝が認められ、移植を断念している。また、移植し得た17例のうち、3例に10~30%の大滴性脂肪肝が認められている。このように脂肪肝の移植利用が可能となれば、新たなドナープールとして期待できる。

肝移植における肝グラフト保存は、1980年代後半にUniversity of Wisconsin (UW) 液、Histidin-tryptophan-ketoglutarate (HTK) 液が開発されて以来、これらの保存液による単純冷却保存がgold standardのまま変化も改善もみられていない。しかしながら、単純冷却保存では組織の冷却傷害、温再灌流傷害が明らかとされており、保存による臓器傷害は必発である。正常肝では臨床上問題となることは少ないが、特に障害肝である境界グラフトの利用にあたってはそれが致命的となりうる。

この単純冷却保存の限界を打開するために今日注目されているのが、移植グラフトを冷却しない、温再灌流に暴露させない灌流保存方法である。灌流保存では、臓器保存中のグラフトへの酸素・栄養の投与、保存中のgraft viabilityの評価が可能であり、虚血再灌流傷害からの保護効果は数多く報告されている。さらに灌流保存に期待される効果として、障害肝の再生可能性が考えられている。

2. 研究の目的

本研究では脂肪肝グラフトの移植利用を目指し、灌流保存による脂肪肝の再灌流障害からの保護、および体外脱脂肪化を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット脂肪肝モデルの作成：

雄生 Wistar ラット(体重 250-300g)を用

いた。2日間の絶食の後に無脂肪高炭水化物食を摂取させ、食餌性脂肪肝を誘導した(文献1)。犠死により肝腫大(図1)、トリグリセリド含有量の上昇を確認し(図2)、また検鏡像により組織学的に脂肪肝を証明した(図3)。

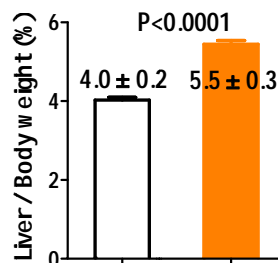


図1 ラット脂肪肝モデル：肝臓/体重比

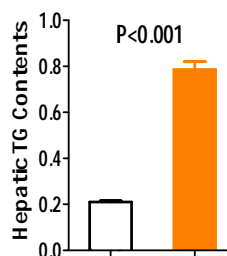


図2 ラット脂肪肝モデル：トリグリセリド含有量

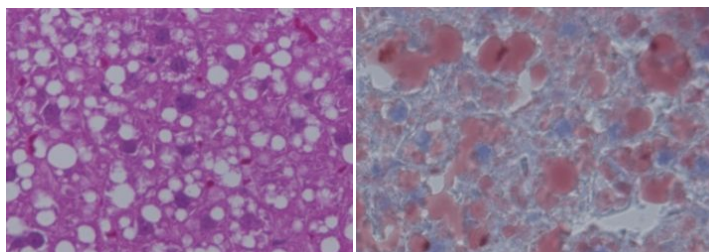


図3

(2) 灌流保存装置：

図4の装置を用いた。回路内を温度管理された灌流液が循環し、Oxygenatorにより酸素が持続的に供給される。灌流液は肝動脈、門脈に留置したカテーテルより一定流量で肝臓内に注入され、下大静脈より回路内に戻る。胆管に留置したカテーテルより産生された胆汁を回収する。

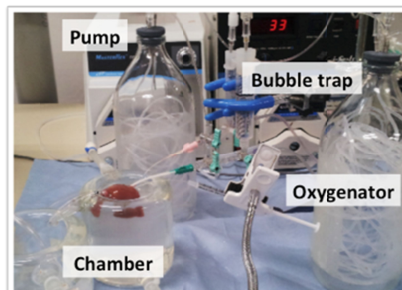


図4 灌流保存装置

(3) 保存 / 再灌流障害からの保護効果の検討 :

ラット脂肪肝を室温 (20-25) 灌流保存 (SMP) 群、4 浸水冷却保存 (CS) 群の 2 群に割り付けた (保存時間 4 時間)。保存後に灌流装置を用いて *Ex vivo* で臓器機能を評価した (文献 2)。

(5) 脱脂肪化の有無に関する検討 : 灌流保存液にペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト, カルニチン, AMP キナーゼ活性化剤, カフェインなどを種々の濃度, 組合せで添加し, 肝組織所見, 肝組織中の TG 量, 灌流液中 TG/VLDL/ケトン体濃度などを評価する。

4. 研究成果

(1) 室温灌流保存 (SMP) による脂肪肝の保護効果 :

SMP 群では CS 群と比較し, 有意に灌流液中の肝逸脱酵素が減少した (図 5)。また, ミトコンドリア逸脱酵素 (GLDH) は有意に減少した。またヒアルロン酸クリアランスは高い傾向が見られた。臓器機能について, 保存後の胆汁産生量は SMP 群で有意に増加した (図 6)。

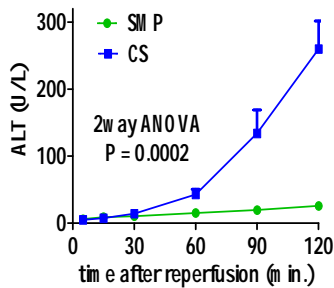


図 5 肝逸脱酵素

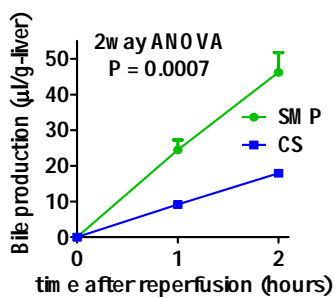


図 6 胆汁産生量

また再灌流後の HMGB-1 は CS 群に比べ SMP 群で有意に抑制されていた (図 7)。

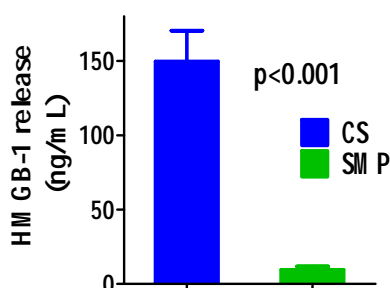


図 7 HMGB-1

酸化ストレスマーカーである thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) は SMP 群において CS 群よりも有意に低値であった (図 8)。また抗酸化作用の指標となる glutathione は SMP 群において有意に高値であった (図 9)。

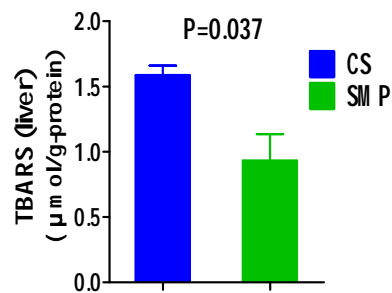


図 8 TBARS

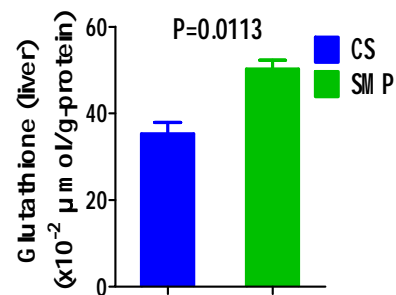


図 9 肝組織中 Glutathione

また, 保存後の組織の ATP 含有量は SMP 群において有意に上昇していた (図 10)。

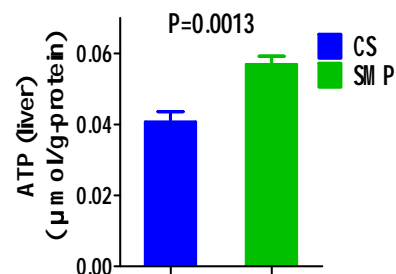


図 10 肝組織中 ATP 含有量

光学顕微鏡を用いて、組織学的検討を行った。H.E.染色像においてCS群では組織の浮腫、空胞形成、類洞拡張を認めたが、SMP群においてはそれらの変化は軽減されていた。電子顕微鏡を用いて細胞内微細構造を検討したところ、CS群ではミトコンドリアミトコンドリアの膨化、類洞内皮の破綻を認めたが、SMP群ではこれらの変化は抑制されていた(図11)。

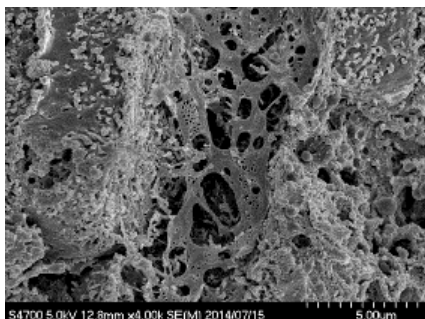
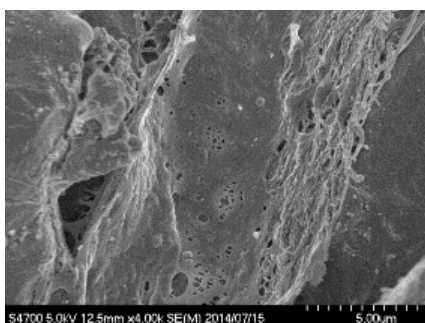


図11 電子顕微鏡写真
上:SMP 下:CS

以上の結果より、室温灌流保存は摘出脂肪肝の保存による障害を最小限とし、摘出脂肪肝の肝臓移植への適応拡大につながる方法であると考えられた。

(2) 脱脂肪化の有無に関する検討：

室温灌流保存液にペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト、カルニチン、AMPキナーゼ活性化剤、カフェインを種々の濃度、組合せで添加したが、肝組織所見による脂肪肝の軽減、肝組織中のTG量の減少は認められなかった。

脱脂肪のためには肝細胞代謝の維持が必要であり、室温(20-25℃)ではなく、体温(35-37℃)まで灌流温度を上げる必要性が考えられた。酸素運搬体を含まない無細胞灌流液では灌流液中の持続的な乳酸値の上昇が認められ、酸素運搬体の必要性が示唆された。

<引用文献>

(1) Delzenne NM. A new model of acute liver steatosis induced in rats by fasting followed by refeeding a high carbohydrate-fat free diet. *Biochemical and morphological analysis. J Hepatol* 1997;26(4):880-885.

(2) M Bessems. The isolated perfused rat liver; standardization of a time-honoured model. *Laboratory animals* 2006 ;40 :236-246

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6件)

岡村裕輔、秦浩一郎、田中宏和、稲本道、門野賢太郎、久保田豊成、平尾浩史、影山詔一、上本伸二 「脂肪肝グラフトに対する室温灌流保存の保護効果」第115回日本外科学会定期学術集会 2015年04月16日~2015年04月18日 名古屋市、愛知県

岡村裕輔、秦浩一郎、田中宏和、平尾浩史、久保田豊成、稲本道、門野賢太郎、影山詔一、上本伸二 「Subnormothermic machine perfusion of >30%macro-steatotic livers; a new savior for expanding donor pool?」第70回日本消化器外科学会総会 2015年07月15日~2015年07月17日 浜松市、静岡県

Y.Okamura, K.Hata, H.Tanaka, H.Hirao, T.Kubota, O.Inamoto, K.Kadono, S.Kageyama, B.M.Doorschodt, R.H. Tolba, S.Uemoto 「Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30%Macrosteatotic Livers;A New Means to Expand the Donor Pool?」European society for surgical research 2015年06月10日~2015年06月13日 Liverpool, UK

Yusuke OKAMURA, Koichiro HATA, Hirokazu TANAKA, Hirohumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Osamu INAMOTO, Kentaro KADONO, Shoichi KAGEYAMA, Benedict M Doorschodt, Rene H Tolba, and Shinji UEMOTO 「Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30%Macro- Steatotic Livers; A New Means to Expand the Donor Pool?」European society for organ transplantation 2015年09月13日~2015年09月16日 Brussels, Belgium

岡村裕輔, 秦浩一郎, 田中宏和, Nigmat Yermek, 玉木一路, 稲本道, 久保田 豊成, 平尾浩史, 上本伸二 「室温灌流保存- ラット同所性全肝移植モデルの作成」第 42 回日本臓器保存生物医学会 2015 年 11 月 13 日~ 2015 年 11 月 14 日 盛岡市、岩手県

秦浩一郎, 岡村裕輔, 田中宏和, 平尾浩史, 久保田豊成, 稲本道, 玉木一路、岡島英明、海道利実、上本伸二 (招待講演招待講演) 第 42 回日本臓器保存生物医学会 2015 年 11 月 13 日~ 2015 年 11 月 14 日 盛岡市、岩手県

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 浩一郎 (HATA, Koichiro)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 90523118

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40252449