

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 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：2014～2016

課題番号：26670686

研究課題名(和文) 肝移植再灌流血漿中の血管拡張物質の探索

研究課題名(英文) Investigation of the vasodilator involved in post reperfusion syndrome in liver transplantation

研究代表者

正田 丈裕 (SHODA, Takehiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60335263

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)：肝移植では、ドナーの肝臓の門脈と肝静脈をレシピエントの血管に吻合した後に血液を灌流するが、その際異常な低血圧が引き起こされる。この現象は再灌流症候群と称されている。再灌流症候群は、冷却された保存液で満たされていた肝臓の血管内を血液が通った後に全身に流れる際に血管弛緩物質が全身に流れるためと考えられる。

今回、再灌流症候群の血管弛緩物質の本態を探索した結果、アデノシン三リン酸(ATP)がその候補として浮上したが、まだ確定には至っていない。

PRSは肝移植患者の術後死亡率や有病率と関連するといわれており、そのメカニズムを解明することは肝移植患者の予後を改善することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Post reperfusion syndrome (PRS) is a serious complication during liver transplantation (LT) surgery that typically occurs after portal vein declamping and reflow of blood through liver graft vessels. PRS is mainly characterized by rapid decrease of blood pressure which is probably caused by some vasodilators released by reperfusion.

We tried to elucidate the vasodilating substance using plasma samples obtained from patients during post reperfusion period in LT. The result has suggested that adenosine triphosphate (ATP) is the candidate for the vasodilators.

PRS is closely related postoperative mortality and morbidity of LT patients. That is why the elucidation of the PRS mechanism could lead to LT patients' prognosis.

研究分野：麻酔学

キーワード：肝移植 再灌流症候群 弛緩性血管作動物質

## 1. 研究開始当初の背景

肝移植では、冷却保存したグラフト肝をレシピエント肝静脈、次いで門脈と吻合後に肝血流を再灌流させるが、その際に起こる血行動態の急激な変化を再灌流症候群

(post-reperfusion syndrome : PRS) と称する。PRS における血行動態の変化としては、著明な体血圧の低下(収縮期血圧が50mmHg 以下になることもある)、肺動脈圧の上昇が特徴的である。PRS の原因として、肝血流再開時に放出される何らかの血管作動物質が関与していることが考えられるが、これまでに唯一、ブラジキニンが原因物質であるという報告があった。

(1)われわれは、モルモット胸部大動脈摘出血管のリング状標本に対して、肝移植再灌流時に採取した血液から得られた血漿(以下、再灌流後血漿)が、再灌流直前の血漿(以下、再灌流前血漿)にはない内皮依存性血管平滑筋弛緩反応を引き起こすことを明らかにした。この事実は、再灌流後血漿中には、再灌流前には存在しなかった何らかの血管弛緩物質が存在することを示唆する。さらに、既報にあったPRS に対するブラジキニンの関与の有無を明らかにするため、血管内皮に存在するブラジキニンB2 受容体拮抗薬の効果を検討した。その結果、再灌流後血漿のモルモット大動脈標本に対する内皮依存性血管平滑筋弛緩反応は、ブラジキニンが原因物質ではないことが示唆された。以上より、肝移植におけるPRS の原因物質は明らかにすべく研究を開始した。

(2)過去の他施設での臨床研究では、肝移植中の冷虚血時間および無肝期における門脈下大静脈シャントの有無が予測因子としてPRSの発生と関連することが報告されている。しかしながら、この報告は冷虚血時間が8時間以上の脳死肝移植における結果であり、それが短い生体肝移植術ではPRSの発生はみ観察されなかった、としている。それに対して我々

の施設では、ほとんどの症例で冷虚血時間が3時間以内の生体肝移植であるにもかかわらず、PRSが一定の割合でみられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、肝移植術中に発生するPRSの原因究明を目標とする。すなわち、血管平滑筋張力に対する効果を指標に、肝移植再灌流後の血液中に存在する可能性がある血管平滑筋弛緩物質を探索し、その本態を明らかにする。それによって、肝移植再灌流時に起こる異常低血圧の原因究明をし、肝移植患者の予後を改善させることが最終目的である。

また、臨床的な見地からPRSの原因を探るため、過去の麻酔記録データを解析して生体肝移植術におけるPRS発生の予測因子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1)肝移植術を受ける患者からインフォームドコンセントを取得した後、生体肝移植手術時の再灌流前後に血液を肺動脈から採取した。すぐに遠心し、血漿を-80 で保存した。それを以下の実験系で血管サンプルに投与し、血管の収縮弛緩反応を観察した。

実験動物から摘出した血管から螺旋状条片を作製して、マグヌス管内の生理的栄養液中に懸垂した。管内に薬物や血漿を投与することによって生ずる等尺性張力変化をレコーダーに記録し解析した。弛緩反応を観察する場合は、1アゴニストであるフェニレフリンやプロスタグランジンF2 等で血管を前収縮させた後に血漿や拡張性血管作動薬を投与した。拮抗薬を投与する場合は、弛緩物質を投与する5分前にサンプルに添加した。投与した拮抗薬は、ブラジキニン(B2)受容体拮抗薬(HOE140)、ヒスタミン(H1)受容体拮抗薬(クロルフェニラミン)、ATP(P2Y1)受容体拮抗薬(MRS2179)である。また、血管弛緩反応が内皮依存性反応であるかどうかを同定するために、内皮を擦過することによって除

去した血管条片で反応をみるか、あるいは一酸化窒素合成酵素阻害剤であるNG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を前投与することによって検討した。

(2)2010年1月から2011年12月までの2年間に我々の施設で施行された生体肝移植術100例における、PRSの発生率とその予測因子について検討した。PRSの予測因子候補としては、レシipient年齢、性、BMI、Child-Purh分類、Meld score、術前Cr値、術前eGFR、無肝期時間、ドナー年齢、レシipient体重1kgあたりのグラフト重量、冷虚血時間、温虚血時間、無肝期における下大静脈 門脈シャント作成の有無を挙げた。

#### 4. 研究成果

(1)モルモット大動脈血管条片サンプルに、肝移植再灌流前後の血漿を添加し、その反応を観察した。高用量(血漿1ml)では再灌流前後の双方の血漿で内皮非依存性の弛緩反応がみられたが、低用量では再灌流後の血漿のみ内皮依存性弛緩反応がみられ、再灌流前の血漿の添加では観察されなかった。内皮除去標本では、同じ用量でも収縮反応がみられた。この結果、再灌流後血漿には前血漿には存在しない内皮依存性弛緩物質が存在するが、同時に血管収縮および内皮非依存性弛緩物質も存在することが示唆された。

(2)この内皮依存性弛緩反応に対するB2受容体、H1受容体、P2Y1受容体の関連性を検討した。その結果、P2Y1受容体拮抗薬であるMRS2179のみが、再灌流後血漿の内皮依存性弛緩反応を抑制した。またATPを同じ血管標本に作用させると、同様に内皮依存性弛緩反応を示し、その反応はMRS2179によって拮抗された。ADPIは弛緩反応を示さなかった。この結果は、再灌流血漿中に含まれる血管弛緩物質がATPである可能性を示唆している。

(3)しかしながら、この結果の定量性をみるために別の患者血漿で実験を繰り返したところ、再現性に乏しかった。すなわち、再灌流

前の血漿でも内皮依存性の弛緩反応があり、それがP2Y1受容体拮抗薬で抑制された実験や再灌流前後の両方の血漿で弛緩反応がみられず、逆に収縮反応が観察された実験もあった。

動物種や血管の種類によって発現する受容体の種類が異なることも考慮し、マウスやラットの血管や腸間膜動脈、頸動脈を血管サンプルとして使用しても結果は安定しなかった。以上の結果から、患者血漿を使用した実験には限界があるという結論に至った。手術中の患者血漿には様々な血管作動物質が存在すると考えられる。再灌流直後の血漿中にも、血管拡張物質以外に、投与されているノルアドレナリンやフェニレフリンも存在するであろうし、代償的に放出されている内因性のカテコラミン、エンドセリン等の血管収縮物質も存在する可能性がある。摘出血管が収縮するか弛緩するかは、それら血管作動性分子の質的かつ量的総和で決定されるため、効果が安定しなかったと考えられる。再灌流直後にはそれら血管収縮物質の作用を凌駕するような血管拡張物質が放出すると考えられるが、使用する摘出血管にその受容体が存在しなければその後の実験は成立しない。当初の予備実験で、血漿によって血管拡張する現象が観察されたため、この実験系を使用することを考えたが、再現性が得られなかったことにより、その後の実験の障害になった。

肝移植に使用されるグラフトは冷却された保存液を血管内灌流し保存されるが、その際に血管内皮が損傷し、再灌流によってATPが放出されることは十分考えられる。しかしながら、ATPは分解が速いこと、さらに採血する際にずり応力で赤血球からATPが放出されること等によりATPの増減が実験の際に増減することが考えられ、この仮説は今回の実験系では検証できなかった。

(4)2010年1月から2011年12月までの2年間に我々の施設で施行された生体肝移植術100例における、PRSの発生率とその予測因子につい

て検討した。その結果、PRSは20例で発生した。しかしながら、PRS発生の予測因子として以前報告された、冷虚血時間および門脈 下大静脈シャントの有無はPRSと関連はみられず、唯一年齢のみが関連した。ロジスティック回帰分析の結果、年齢が10歳増加するとPRSの発生頻度は1.5倍に増加した。(表1)

この結果は、生体肝移植でみられたPRSは、脳死肝移植でみられるPRSと機序が異なることを示唆する。冷虚血時間が長い脳死肝移植では、その虚血時間内にグラフト内に血管弛緩物質が産生、蓄積し、門脈再灌流の際にPRSを発生されると考察されるが、冷虚血時間が2時間以内という短時間となる生体肝移植では、血管弛緩物質の蓄積は限定的であると考えられる。ただ、PRSの発生は決してゼロではなく、レシピエントの血管の加齢性変化がその一因であることが示唆された。

	total	PRS-	PRS+	p
age	50.5(32-59)	48(28-58)	56(50-60)	0.0243
male /female	50/54	40/43	10/11	0.9625
recipient BMI	21.9(19.5-24.2)	21.7(19-24.1)	22(20.6-25.7)	0.1685
Child Pugh	9/27/68	8/22/53	1/5/15	0.7209
MELD	16.4(10.7-21.7)	16.2(10.5-22.4)	17.1(13.4-20.5)	0.8206
preoperative GFR	83(56.5-123)	84.1(55-148)	79.8(60.2-97.9)	0.4332
preoperative creatinine	0.7(0.5-0.98)	0.7(0.5-1)	0.7(0.55-0.9)	0.7881
無肝期時間	172(121-242)	171(120-234)	195(137-267)	0.3251
donor graft age	46(36-53)	45.5(36-52)	51(31.5-56)	0.6202
グラフト重量1kgあたり	8.9(7.0-11.4)	8.72(6.94-11.43)	9.77(8.02-11.18)	0.2727
duration of warm ischemia	37.5(32-47)	38(32-46)	36(30.5-56)	0.7062
duration of cold ischemia	145(61-200)	145(60-193)	151(66.5-303)	0.4111
PC shuntあり	47(45.2%)	37(44.6%)	10(47.6%)	0.8025

表1 PRS発生の予測因子の検討

## 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

正田 丈裕 (SHODA, Takehiro)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60335263

### (2) 研究分担者(1年目のみ)

岡村 富夫 (OKAMURA, Tomio)  
滋賀医科大学・医学科・教授  
研究者番号：70152337

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )