



Title	ラットの心臓死ドナー肝における水素ガスによる虚血再灌流障害軽減効果に関する研究
Author(s)	石川, 隆壽
Description	配架番号 : 2429
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13373号
Issue Date	2018-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13373
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72394
Type	doctoral thesis
File Information	Takahisa_Ishikawa.pdf



学位論文

ラットの心臓死ドナー肝における水素ガスによる
虚血再灌流障害軽減効果に関する研究
(Studies on the effect of amelioration of
ischemia reperfusion injury by hydrogen
gas in rat livers from donors after
cardiac death)

2018 年 12 月

北海道大学

石川 隆壽

学位論文

ラットの心臓死ドナー肝における水素ガスによる
虚血再灌流障害軽減効果に関する研究
(Studies on the effect of amelioration of
ischemia reperfusion injury by hydrogen
gas in rat livers from donors after
cardiac death)

2018 年 12 月

北海道大学

石川 隆壽

目次

発表論文目録および学会発表目録・	1 頁
要旨・	2 頁
略語表・	5 頁
緒言・	6 頁
方法・	9 頁
結果・	15 頁
考察・	28 頁
総括および結論・	31 頁
謝辞・	32 頁
利益相反・	32 頁
引用文献・	33 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Ishikawa T, Shimada S, Fukai M, Kimura T, Umemoto K, Shibata K, Fujiyoshi M, Fujiyoshi S, Hayasaka T, Kawamura N, Kobayashi N, Shimamura T, Taketomi A.

Post-reperfusion hydrogen gas treatment ameliorates ischemia reperfusion injury in rat livers from donors after cardiac death: a preliminary study.

Surg Today. 2018 Jul 6.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- 1) 石川 隆壽, 深井 原, 若山 颯治, 島田 慎吾, 梅本 浩平, 藤好 真人, 山下 健一郎, 嶋村 剛, 武富 紹信
心臓死ドナーグラフトにおける水素ガスの肝保護効果の検討
第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 16 日・大阪

要旨

【背景と目的】肝移植は末期肝疾患の根治療法だが、慢性的なドナー不足は世界的に重要な課題である。ドナー源拡大のために心停止後ドナーからの臓器提供が（Donation after Cardiac Death; DCD）などの従来の適応基準を逸脱したグラフトの利用が注目されている。これらのグラフトは虚血再灌流障害（IRI）に対して脆弱であり、移植後にグラフト機能不全を起こしやすい。この理由として DCD グラフトを用いた肝移植では、心停止による温虚血（低酸素）、その後の冷虚血（低温、低酸素）、再灌流（再加温、再酸素化）の 3 段階で障害が進行する。エネルギー欠乏と低温により、能動輸送の停止（ATPase 依存性ポンプ）と、引き続く Na^+ 、 Ca^{2+} の蓄積、 Ca^{2+} 依存性の障害性タンパク質の活性化が惹起され、タンパク分解、活性酸素種生成、細胞骨格タンパク質脱重合等が起こる。低温ではこれらの変化は類洞内皮細胞、クッパー細胞で起こり、炎症や微小循環障害のトリガーとなる。温虚血では肝細胞も傷害され、再灌流時にクッパー細胞やリンパ球、好中球、血小板の活性化と相まって、活性酸素種、炎症性サイトカイン・ケモカインの放出、類洞収縮、凝血や血球塊の形成を介して、酸化ストレス、微小循環障害、細胞死シグナルが増強される。再灌流時の治療で水素ガス（Hydrogen gas; H_2 ）は医用ガスとして近年注目され、ラットやマウスの肺、心臓、腎臓、小腸、肝臓などで IRI を軽減し、様々な実験系で抗酸化、抗炎症、抗アポトーシスが報告された。当研究室では、長期冷保存後のラット肝臓の再灌流時に H_2 を投与し、IRI の軽減に成功した。しかし、より高度の障害が惹起される DCD 肝の冷保存後再灌流における、再灌流時 H_2 投与の有効性は検討されていない。

本研究の目的は 1) DCD 肝の冷保存後再灌流において再灌流時 H_2 投与の有効性を評価し、2) H_2 の肝保護作用機序を明らかにすることである。

【材料と方法】

動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、当該実験倫理委員会の承認のもと実施した。ラットを深麻酔により心停止させ、30 分後に門脈にカニューレーションし、1000IU のヘパリンを含む室温の生理食塩水で肝臓を脱血した。その後、4°C の University of Wisconsin (UW) 液でフラッシュ後に肝臓を摘出し、同液に浸漬し冷保存した。4 時間後にグラフトを単離肝灌流装置（Isolated Perfused Rat Liver; IPRL）で 90 分間、再灌流した。

実験群は 3 群を作成した（各 $n=6$ ）。対照群（CT）：心停止をさせずに肝臓を摘出し、冷保存せずに直ちに再灌流した。無治療群（NT）：30 分の温虚血（心停止）後、4 時間冷保存し、再灌流した。水素投与群（ H_2 ）：NT 群と同様の条件で肝臓を摘出、冷保存し、再灌流時に H_2 を投与した。

IPRL の条件は、グルコースとタウロコール酸ナトリウムを添加した Krebs

Henseleit bicarbonate buffer (KHB) を用い、再循環システム、12cmH₂O で定圧灌流した (総量 300mL)。KHB は、IPRL において広く使用されている、細胞外液を模した晶質緩衝液である。KHB はハミルトン肺で酸素化した (450< pO₂<550 mmHg)。H₂ 群ではガラスボトルに封入した水素飽和させた KHB を総流量の 4%を側管から投与した。

灌流中に門脈抵抗 (portal vein resistance; PVR)、胆汁産生量 (uL/g liver /90min)、酸素消費率 (Oxygen consumption rate; OCR) を評価した。再灌流後の灌流液中 AST、ALT、LDH 活性を測定した。再灌流後の肝組織の組織障害[ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色]、アポトーシス[terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL 染色]、ATP 量、GSH/GSSG 比、過酸化脂質量を測定した。また、再灌流後の肝組織の細胞質の MKK4、JNK、caspase3、c-Fos、c-Jun、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK、PI3k、PDK1、Akt、mTOR をウエスタンブロット法で評価した。

【結果】

- 1) 肝障害：肝障害 (HE 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色)、再灌流後 90 分の灌流液 ALT、LDH 活性が、H₂ 群では NT 群と比較し有意に低下した。
- 2) 微小循環：PVR は H₂ 群では NT 群と比較し有意に低下した。
- 3) ミトコンドリア機能：灌流後 90 分の ATP 産生量、OCR は H₂ 群では NT 群と比較し有意に増加した。
- 4) 肝の統合的機能：胆汁産生量は H₂ 群では NT 群と比較し有意に増加した。
- 5) レドックスと過酸化脂質：GSH/GSSG は H₂ 群では NT 群と比較し還元側へシフトした。過酸化脂質量は群間に有意差を認めなかった。
- 6) 炎症・細胞死、生存シグナル：H₂ 群では NT 群と比較し、MKK4、JNK のリン酸化、Caspase3 の分解 (活性化)が抑制された。その他の炎症に関連するシグナル (c-Fos、c-Jun、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK)、生存に関連するシグナル (PI3k、PDK1、Akt、mTOR) のリン酸化は NT 群と H₂ 群の間に有意差を認めなかった。

【考察】

本研究ではラット DCD 肝の冷保存後の再灌流に対する再灌流時の H₂ 投与が IRI を軽減することを示した。H₂ 投与により微小循環の改善、ミトコンドリア機能の維持、適切なレドックス状態の維持が認められた。その結果、細胞死が抑制され、グラフト障害が軽減され、統合的な肝機能が改善された。H₂ は MKK4-JNK 経路による障害を抑制することが初めて示された。本研究はグラフト因子のみの評価だが、今後、移植モデルで H₂ の効果を検証し、レシピエント因子に対する効果も検討する必要がある。

【結論】

H₂ の再灌流時投与は、ラット DCD 肝の冷保存後再灌流における IRI を軽減した。MKK4-JNK 経路の抑制がその作用に関与することが明らかになった。

略語表

ATP: adenosine triphosphate
ALT: alanine aminotransferase
AST: aspartate aminotransferase
CPA: cardio pulmonary arrest
DCD: donation after cardiac death
ECD: expanded criteria donor
GSH: reduced glutathione
GSSG: oxidized glutathione
H₂: hydrogen gas
4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal
IRI: ischemia reperfusion injury
IPRL: isolated perfused rat liver
JNK: c-jun N terminal kinase
KHB: Krebs-Henseleit Bicarbonate buffer
LDH: lactate dehydrogenase
LPO: lipid peroxidation
MDA: malondialdehyde
MKK4: mitogen-activated protein kinase 4
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NHBD: Non-heart beating donor
OCR: oxygen consumption rate
PNF: primary non function
PVR: portal vein resistance
ROS: reactive oxygen species
SCD: standard criteria donor
SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase

緒言

肝移植は末期肝疾患に対する根治療法であり、移植後の 5 年生存率は約 80% である。2018 年 6 月 30 日時点で本邦の肝移植の待機患者 2842 人でそのうち 1204 人 (42%) が待機中に死亡した。また脳死肝移植の希望者のうち 16% が脳死肝移植を受け、16.8% は生体肝移植へ切り替えており、ドナー不足は深刻である。(日本臓器移植ネットワーク)。

ドナー源拡大のため欧米では、心停止後ドナー (Donation after Cardiac Death ; DCD あるいは Non-heart beating donor ; NHBD) や脂肪肝などの標準的な適応基準から逸脱したドナー (ECD ; Expanded Criteria donor) からの臓器提供が注目されている。実際、DCD グラフトの割合はベルギー (18%)、オランダ (21%)、イギリス (13%)、アメリカ (10%) と徐々に増加している (Monbaliu et al., 2012, Orman et al., 2013)。これらの国々で利用される DCD グラフトは Maastricht 分類の category3 (延命処置の中止による心停止)、category4 (脳死状態下での心停止) に分類される controlled NHBD が多い (Kootstra et al., 1995, Muiesan et al., 2005)。その理由は、温虚血時間が遷延すると、UW 液 (University of Wisconsin solution) による単純冷保存では深刻な虚血再灌流障害 (Ischemia and Reperfusion Injury; IRI) を回避できず、移植後早期のグラフト機能不全、胆道合併症の頻度が上昇するからである (Foley et al., 2005, Karp et al., 2011)。

DCD グラフトを用いた肝移植では、心停止による温虚血 (低酸素)、その後の冷虚血 (低温、低酸素)、再灌流 (再加温、再酸素化) の 3 段階で障害が進行する。エネルギー欠乏と低温により、能動輸送の停止 (ATPase 依存性ポンプ) と、引き続く Na^+ 、 Ca^{2+} の蓄積、 Ca^{2+} 依存性の障害性タンパク質の活性化が惹起され、タンパク分解、活性酸素種生成、細胞骨格タンパク質脱重合等が起こる。低温ではこれらの変化は類洞内皮細胞、クッパー細胞で起こり、炎症や微小循環障害のトリガーとなる (Sundberg et al., 1991)。温虚血では肝細胞も傷害され、再灌流時にクッパー細胞やリンパ球、好中球、血小板の活性化と相まって、活性酸素種、炎症性サイトカイン・ケモカインの放出、類洞収縮、凝血や血球塊の形成を介して、酸化ストレス、微小循環障害、細胞死シグナルが増強される (Fukai et al., 2005)。

近年、DCD グラフトの IRI 軽減法として臓器灌流が注目されている。臓器灌流は臓器摘出後に体外灌流することで、酸素や栄養を持続的に供給し老廃物の除去を行いながら細胞の代謝機能を維持し保存することにより、虚血再灌流障害の軽減とグラフトの改善を試みるものである。また臓器灌流法は灌流温度により Normothermic (体温である 37°C 付近)、Subnormothermic (室温である 25°C

付近)、Hypothermic (低温である 4℃付近) に分けられており、臓器の酸素消費量は灌流温度の低下に合わせて指数的に減少し、37℃で 100%とすると 20℃では 30%、4℃では 10%程度になるとされている。それ故 Normothermic や subnormothermic では赤血球のような酸素運搬体が必要と考えられているが、Hypothermic では灌流液に酸素を溶存させるだけで十分とされ、酸素運搬体は必要ないとされている。各々の灌流条件、灌流液などの検討がなされている最中であるが、それぞれの方法は単純冷保存と比較し良好な結果が得られており、海外では臨床試験が進んでいる(Dutkowski et al., 2015, Nasralla et al., 2018)。

その背景には、従来行われてきた再灌流時治療や臓器保存液の改良の限界が認識され、グラフトの修復、コンディショニングが研究対象になったことがある。しかし、どのようにグラフトを処置しようと、「再灌流」は不可避であり、再灌流時に起こる障害性反応の軽減法は普遍的に必要なである。

近年、再灌流時の治療として水素ガス (Hydrogen gas; H₂) が注目されている。H₂ は空気中で 4.7%以下では爆発の危険性がないとされる。危険濃度に満たない低濃度 H₂ 投与による脳の IRI 軽減効果が報告されて以来(Ohsawa et al., 2007)、肺(Kawamura et al., 2013)、心臓(Sun et al., 2009)、小腸(Zheng et al., 2009)、腎臓(Abe et al., 2012)、肝臓(Fukuda et al., 2007, Liu et al., 2010)の IRI 軽減効果、抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス作用が報告された。また、種々の病態に対する広範な有効性も報告された (図 1)。しかし、その詳しい機序、作用点は未解明な部分が多く残されている。

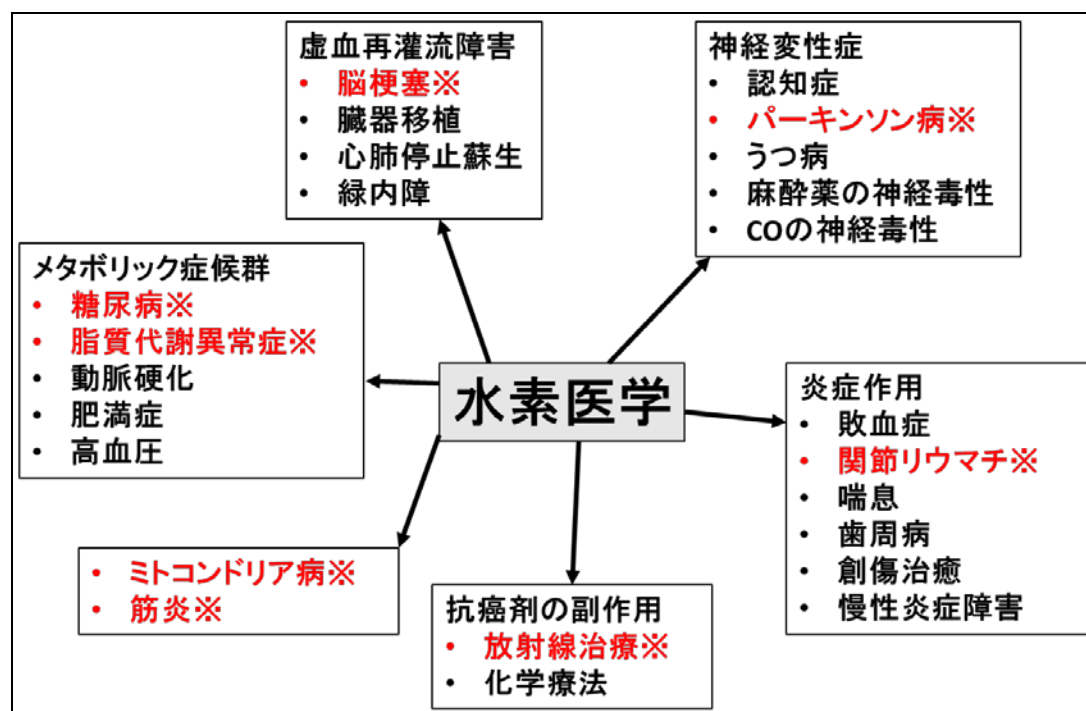


図 1 動物実験または臨床試験によって水素の様々な予防効果や治療効果が

報告された疾患。※のついた疾患はすでに臨床試験で論文として発表されている。(太田, 2015)より引用。一部改変。

H2 は最も細胞障害性の高い活性酸素種の水素原子ラジカル ($\cdot\text{OH}$) を還元するラジカルスカベンジャーの作用を有し、*in vitro* の系ではスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等の活性の低い安定な活性酸素種とは反応しないことが報告されている(Ohsawa et al., 2007)。活性の低い安定な活性酸素種はシグナル伝達や免疫機構において重要な役割を担っており、過剰な活性酸素種の消去は副作用が伴う。このため障害性の高い活性酸素種のみを消去する水素の作用は安全性が高いとされている。H2 のマウスの肝臓の虚血再灌流障害を抑制した報告では酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) の減少と組織障害を軽減させていた (Fukuda et al., 2007)。臓器移植への適用として小腸の移植モデルに対して H2 は肝臓と同様に MDA の減少を認めるとともに、IL-1 β 、IL-6、TNF α などの炎症性メディエーターの発現を抑制していた (Zheng et al., 2009)。肺移植モデルでは酸化ストレスマーカーの抑制と Bcl-2 及び Bax の発現が増加していた (Kawamura et al., 2013)。これらの報告が示すように H2 の作用機序は未解明な部分が多い。

教室では、長期冷保存肝に対する再灌流時 H2 投与の有効性、抗酸化効果、レドックス状態の還元性維持等の効果を報告した (Shimada et al., 2016)。そこで、再灌流時の H2 投与による抗酸化、レドックス制御の標的となり得る障害機転に着目した。c- jun N-terminal kinase (JNK) は酸化ストレス、炎症性サイトカインにより活性化されるシグナル分子であり、ラットの肝移植モデルの IRI に関与する (Uehara et al., 2004)。また、持続的な JNK の活性化はアポトーシスやミトコンドリア機能不全によるネクローシスを引き起こす (King et al., 2009, Uehara et al., 2005)。しかし、DCD グラフトの IRI における JNK 活性の役割、再灌流時 H2 投与の効果は検討されていない。そこで本研究では、DCD 肝グラフトにおける再灌流時 H2 投与の有効性、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

方法

1 薬品と試薬

入手先を記載していない試薬は和光純薬株式会社（大阪、日本）より購入した。水素ガスは北海道エアーウォーター株式会社（札幌、日本）より購入した。

2 動物

本研究は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、北海道大学動物実験倫理委員会の承認の下で実施した。オスの **Sprague-Dawley** ラットを 6～7 週齢（220～260g）で三共ラボサービス株式会社（東京、日本）より購入し、本学大学院医学研究科附属動物実験施設内で 2 日以上飼育した後に実験に供した。

3 DCD 肝モデルと実験デザイン

ラットは水、標準固形飼料を自由に摂取させ、絶食させずに実験に供した。イソフルラン吸入による全身麻酔下に腹部を切開後、横隔膜を切開し、呼吸停止、心停止とした。心停止を確認後 30 分待機し、門脈に 16G カニューレ（ニプロ、大阪、日本）を留置し、経門脈的に 1000IU のヘパリン（Mochida Pharmaceutical Co. LTD、東京、日本）を含む室温の生理食塩水で灌流し、脱血した。引き続いて 10ml の氷冷の University of Wisconsin solution（UW 液）で灌流し、臓器内の血管床の液を置換した。胆管に PE-10 カニューレ（Intramedic、Clay Adams、NJ、USA）を留置し、肝臓を摘出した。実験群は 3 群を作成した（各 n=6）。対照群（CT）：心停止させずに肝を摘出し、冷保存せずに直ちに再灌流した。30 分の心停止後に UW 液中で 4 時間冷保存し、再灌流する群は、無治療群（NT）：再灌流時に H₂ を投与しない、水素投与群（H₂）：再灌流時に H₂ を投与する、を作成した（図 2）。

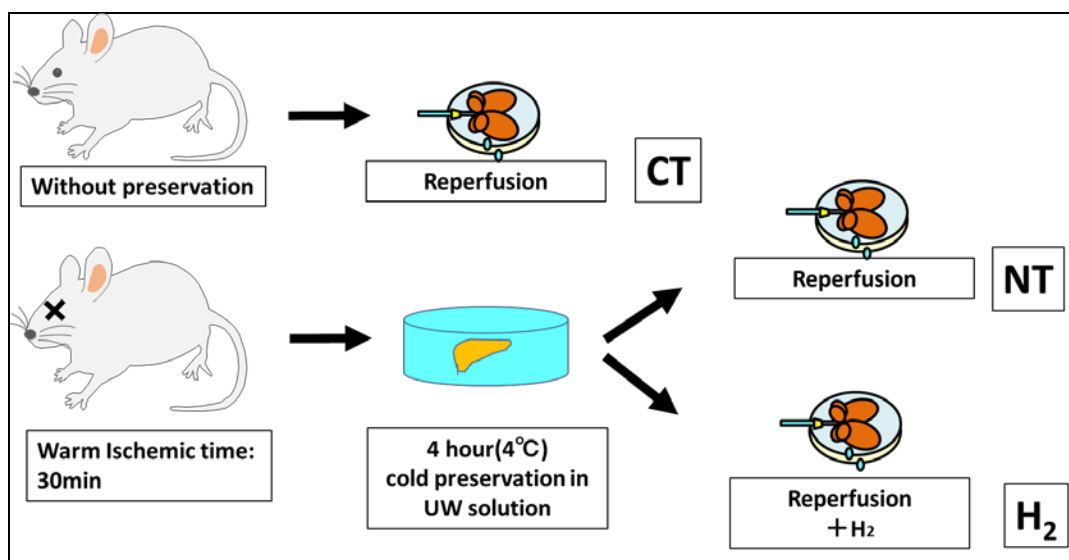


図 2 DCD 肝モデル

CT 群：心停止させずに肝を摘出し、冷保存せずに直ちに再灌流した。心停止群は 30 分の心停止後、肝を摘出し UW 液中で 4 時間冷保存（cold storage）した。その後の再灌流時に水素を投与しない群（NT）、投与する群（H₂）を作成した。

WI : warm ischemia

4 ラット単離肝灌流（Isolated Perfused Rat Liver; IPRL）

IPRL の条件は、Bessemis らの方法に沿って設定した(Bessemis et al., 2006)。グルコース(197mg/dL)とタウロコール酸ナトリウム(0.3mM)を添加した 300ml の Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) を循環回路で灌流した。KHB は、IPRL において広く使用されている、細胞外液を模した晶質緩衝液であり、組成は 121.0mM NaCl、1.3mM CaCl₂、1.0mM NaH₂PO₄、13.5mM KCl、1.2mM MgCl₂、1.2mM NaHCl₂ である。灌流液はハミルトン肺で酸素化し、pO₂ を 450～550 mmHg に調節した。酸素分圧はラピットラボ 348EX 血液ガス分析装置（SIEMENS, Munich, Germany）で測定した。灌流条件は、37°C、定圧灌流(12cmH₂O)とした。H₂ 群ではガラスボトルに封入した水素飽和させた KHB を側管から灌流回路に滴下し、総流量の 4% となるように投与した。灌流時間は 90 分とした。灌流中に門脈抵抗（portal vein resistance; PVR）、胆汁産生量、酸素消費率（Oxygen consumption rate; OCR）を測定した。肝臓の前後の灌流液中の pO₂ の差を肝重量で除した値を OCR とした（図 3）。

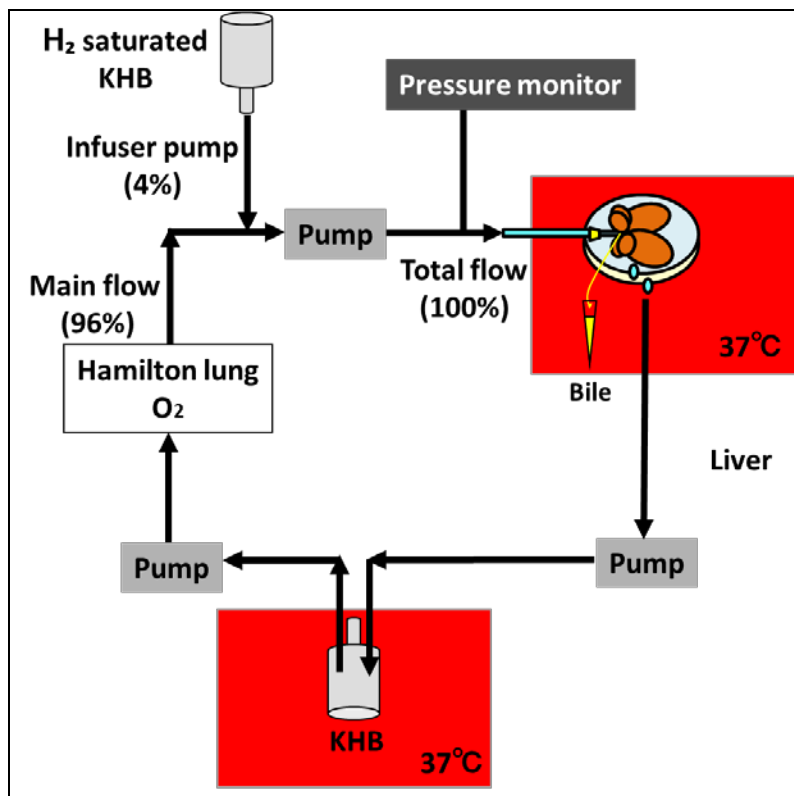


図3 ラットの単離肝灌流装置

37℃の KHB を酸素化し、循環回路で 90 分、定圧灌流 (12cmH₂O) した。水素飽和させた KHB を側管から投与し、主回路の 4%の流速とした。再灌流中は灌流液の採取、胆汁産生量の測定、灌流圧と流速のモニターを行った。

5 サンプルの採取

再灌流 90 分後 (R90) に灌流を終了し、肝組織を採取し、直ちに液体窒素内で凍結し、測定までの間-80℃で保管した。また、一部は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋ブロックとした。ATP 測定用の試料は再灌流終了後 5 秒以内に液体窒素に投入し (freeze clamp)、測定までの間液体窒素内に保管した。再灌流 30 分後および 90 分後の灌流液を採取した。

6 灌流液中の AST、ALT、LDH 活性の測定

R90 の AST、ALT、LDH 活性を日立自動分析装置 7020 (日立ハイテクノロジー、東京、日本)で測定した。肝臓の障害は再灌流終了時の酵素漏出として表される：酵素漏出 (IU / g) = (R90 活性) [IU / l] × 灌流液容量[l] / 肝臓重量[g]。

7 病理組織学的評価と TUNEL 染色

R90 の肝組織のパラフィン包埋組織を薄切しヘマトキシリンエオジン (HE) 染色後に光学顕微鏡で観察した。組織障害の評価は一人の病理医が盲検下で行った。TUNEL 染色はパラフィン包埋切片を光学 Apoptosis Detection System(Promoega, Madison, WI)を用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。TUNEL 陽性細胞数を総細胞数で除して apoptotic index を算出した。各サンプルの 4 視野を強拡大視野 (×200) で観察し、その平均値を比較した。

8 ATP の測定

R90 の凍結組織をポリトロンホモジナイザー (Kinematica, Inc. NY) を用いてホモジナイズした。肝組織重量当たり 20 μ l/ mg となるよう溶液を調整した。遠心分離後 (2200rpm、10 分、4℃)、上清を K₂CO₃ で中和し、再度遠心分離した (2200 rpm、10 分、4℃)。上清 (20 μ l) を高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) (Eicom、京都、日本) に注入し、検出波長 254nm の吸光を測定した。HPLC の分析条件は Fukai らの方法に準じ (Fukai et al., 2005)、 μ mol/ g wet liver として表した。

9 グルタチオンのレドックス状態の評価

R90 の凍結肝組織を 5%スルホサリチル酸中でホモジナイズし、遠心分離した (8000xg、10 分、4℃)。上清を 10 倍希釈し測定試料とした。GSSG リサイクリングアッセイによって総グルタチオン (GSH+GSSG)と GSSG のみを別々に測定した (Fukai et al., 2005)。総グルタチオンの測定は、上記の試料と Glutathione reductase, NADPH, DTNB をインキュベート後に、TNB の発色による 405nm の吸光度変化をモニターした。GSSG のみの測定は、試料に 2-vinylpyridine を添加して GSH と反応させて枯渇させた後に、同様に測定した。吸光度変化速度 ($\Delta OD / \Delta t$) と GSH 量を用いて検量線を作成した。グルタチオンのレドックス状態は、還元型グルタチオン GSH と酸化型グルタチオン GSSG のモル比 (GSH / GSSG) で表した。

10 過酸化脂質の評価

R90 の凍結肝組織の Malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)を LPO586 kit (Oxis International, Foster City, CA) を用いて測定した。肝組織を butylated hydroxytoluene (0.05%) 含有 Tris-HCl (20 mM) でホモジ

ナイズし、遠心分離した (3000xg、10 分、4°C)。上清を試薬とインキュベート後、上清の吸光度を測定した。データは nmol 4-HNE equivalent per g of wet tissue weight で表した。

11 western blot 法

R90 の凍結肝組織を lysis buffer でホモジナイズし、遠心分離(1000xg、10 分、4°C)後の沈殿を核画分、上清を細胞質画分とし、-80 °Cで保存した。lysis buffer の組成は以下の通りである : Tris HCl (25) (pH 7.5)、NaCl (150) 、 EDTA-2Na (5) 、 NaF (10) 、 sodium orthovanadate (10) 、 1% Nonidet P-40、100x protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。タンパク濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて測定した。常法の如く、タンパク抽出液に Sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer を添加後に熱変性させ、Any-kD pre-cast gel (Bio-Rad Hercules, CA, United States) に 40 ug/well のタンパクを loading した。polyacrylamide gel electrophoresis で展開し、Polyvinylidene difluoride 膜へ転写し、1 次抗体、2 次抗体(horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG 抗体) と室温で反応させた。化学発光検出試薬 West Dura (Thermo Scientific) を添加し、化学発光検知器 Chem Doc XRS® (Bio-Rad) を用いてバンドの輝度を測定した。タンパク量は、 α -tubulin、GAPDH のバンド輝度により補正した。リン酸化の程度を比較するため、リン酸化部位に対する抗体、非リン酸化部位に対する抗体の両者で得られた輝度値の比を算出した (phospho/pan)。

一次抗体は CST (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)もしくは Abcam (Cambridge, United Kingdom) より購入した (表 1)。2 次抗体は 1:5000 の濃度で使用した。炎症・細胞死に関連するシグナルとして MKK4、JNK、caspase3、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK、c-fos、c-jun、生存に関連するシグナルとして PI3k、PDK1、Akt、mTOR を測定した。

表 1 使用した一次抗体

抗体	動物種	希釈率	メーカー
p-MKK4	Rabbit	1:1000	CST
pan-MKK4	Rabbit	1:1000	CST
p-JNK	Rabbit	1:1000	CST
pan-JNK	Rabbit	1:1000	CST
caspase3	Rabbit	1:1000	CST
p-ASK1	Rabbit	1:1000	Abcam
pan-ASK1	Rabbit	1:1000	Abcam
p-p38 MAPK	Rabbit	1:1000	CST
p-c-Fos	Rabbit	1:1000	CST
p-c-Jun	Rabbit	1:1000	CST
p-ERK1/2	Rabbit	1:1000	CST
p-p90RSK	Rabbit	1:1000	CST
p-PI3k	Rabbit	1:1000	CST
p-PDK1	Rabbit	1:1000	CST
p-Akt	Rabbit	1:1000	CST
p-mTOR	Rabbit	1:1000	CST
GAPDH	Rabbit	1:1000	CST
α -Tublin	Rabbit	1:1000	CST

12 統計学的解析

数値は平均±標準偏差で示した。t 検定もしくは片側 ANOVA で有意差を検定した。p 値は 0.05 未満を有意とした。統計解析には Stat View 5.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC) を使用した。

実験結果

予備実験

ラットモデル

本実験の信頼度に関わる要素は、ストレスの程度や IPRL による灌流の再現性、動物の個体差が挙げられる。ストレスの程度は心停止中の臓器温度、心停止から冷保存までの所要時間、冷保存時間、手術による操作（物理的刺激）に規定され、これらの安定化が求められる。これらの再現性を実現したうえで、IPRL による灌流条件、protocol の厳密な再現性が次の関門となる。臓器の設置位置による門脈への張力、温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度（ $\approx$ pH）の安定化が求められる。

実際には、ラットの肝摘出の手術手技の習得、安定化が最重要課題であり、15 例を要した。続いて IPRL による 90 分の灌流のデータをとれるようトレーニングを積み、20 例で肝の摘出から灌流機器のマネージメントが可能になった。

臓器灌流モデル

教室では、以前の実験で長期冷保存後（肝摘出後 48 時間の冷保存）の再灌流時 H₂ 投与の有効性を報告した。そこで DCD 肝に対する海外を中心に研究されている臓器灌流によるグラフト修復と再灌流時の水素投与を組み合わせた方法の有効性の検討を行うこととし、まず臓器灌流モデルの条件検討を行った。灌流条件はいまだ統一された見解はなく、灌流温度、灌流液、時間を設定する必要があり、まず灌流温度は酸素運搬体を必要としない Hypothermic（低温）の臓器灌流に着目し 4℃に設定した。臓器灌流には従来の保存液ではなく臓器灌流専用の灌流液が必要であるが、HTK（histidin-tryptophan-ketoglutarate）液と UW 液の臓器灌流用の灌流液である UW-MPS（UW-machine perfusion solution）を使用した。臓器灌流の時間は既報を元に 1 時間と設定した（Dutkowski et al., 2006）。最初は前述の二種類の灌流液の比較を行った。長期冷保存肝に対して臓器灌流を行い各灌流液の有効性を比較検討した。ラットの肝臓を摘出し 48 時間冷保存し再灌流した群（CS 群）、48 時間冷保存し、引き続き UW-MPS による臓器灌流を 1 時間行い再灌流した群（MPS 群）、HTK 液による臓器灌流を行った群（HTK 群）を比較した。各群において胆汁産生量は有意差を認めなかったが、門脈抵抗は MPS 群と比較し HTK 群で有意に改善を認めたため、臓器灌流における灌流液は HTK 液を選択した（図 4）。

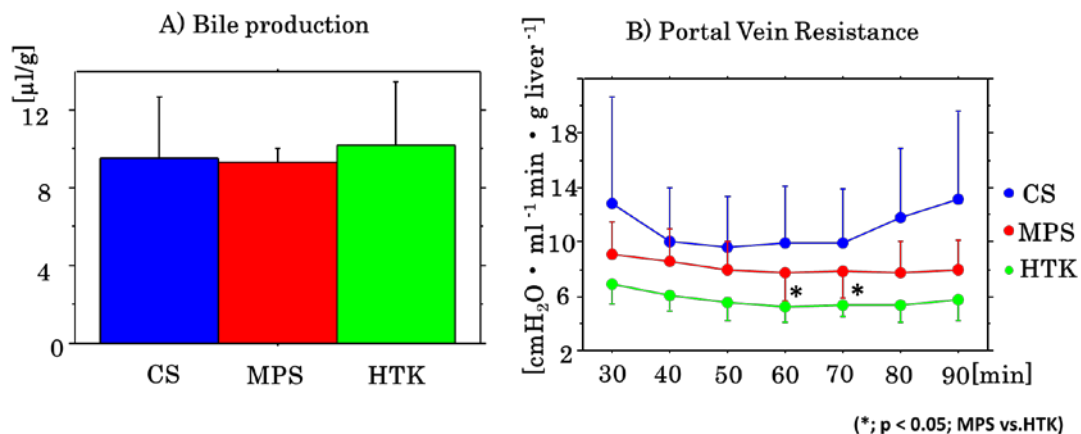


図 4 臓器灌流の灌流液の比較による胆汁産生量と PVR

CS(Cold storage) : 正常肝を摘出後 48 時間冷保存し、再灌流した。MPS : 正常肝を摘出後 48 時間冷保存し、UW-MPS で 1 時間の臓器灌流した後再灌流した。HTK : MPS と同条件で灌流液を HTK とした。胆汁産生量は各群有意差なく、PVR は MPS 群と比較し HTK 群で有意に改善した。

続いて DCD 肝に対する HTK 液による臓器灌流の有効性の検討を行った。DCD 肝モデルは 30 分の心停止時間を設け、UW 液による 4 時間の冷保存後に再灌流する群(CS)と HTK 液による 4 時間の低温臓器灌流後に再灌流する群(HOPE)、対照群として正常肝を摘出後直ちに再灌流する群(CT)を作成し各群の胆汁産生量及び門脈抵抗を比較したが、HTK 液による臓器灌流の有効性を示せなかった (図 5)。臓器灌流において諸家の報告と同等の有効性を示すことができず (Olschewski et al., 2003, Dutkowski et al., 2006)、その第一の原因は灌流液と考えられるものの、有効性が報告されているその他の灌流液は市販されておらず入手するのが難しく、これ以上の臓器灌流モデルの条件検討は現時点では困難と判断した。

臓器灌流モデルの作成は今後の検討課題とし、水素単独での有効性の検討を行うこととし、ECD である脂肪肝もしくは DCD 肝における再灌流時の水素投与の有効性を検討することとした。

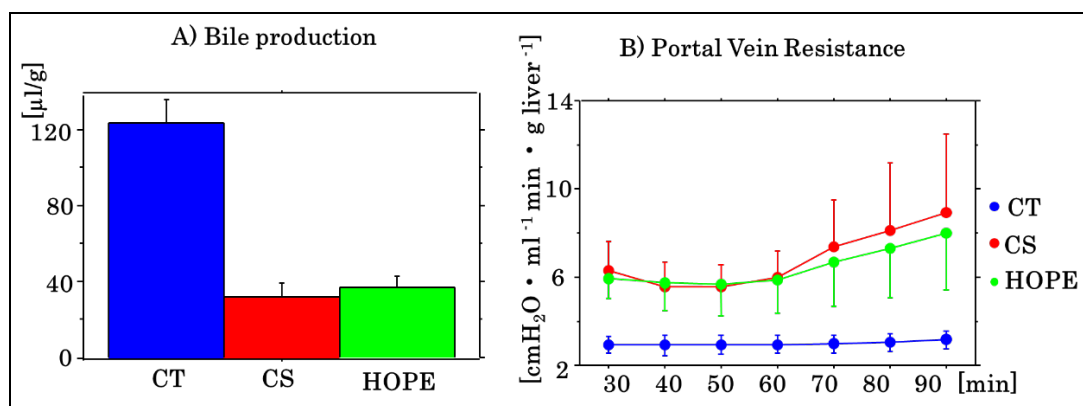


図5 DCD 肝モデルに対する臓器灌流の胆汁産生量と PVR

CT(Control) 群：正常肝を摘出後、冷保存せずに直ちに再灌流した。CS(Cold storage) 群：DCD 肝を摘出後 4 時間冷保存し、再灌流した。HOPE (Hypothermic oxygenated perfusion)群：DCD 肝を摘出後 4 時間低温臓器灌流し、再灌流した。胆汁産生量に有意差を認めず、PVR も CS 群と HOPE 群で有意差を認めなかった。

脂肪肝モデル

当初は脂肪肝と DCD 肝の両モデルにおける再灌流時 H₂ 投与の有効性を検証する予定であった。まず、2 日間絶食の後、3 日間高炭水化物食を給餌する脂肪肝モデルを作成した。脂肪肝を摘出後直ちに再灌流する群、24 時間冷保存後に再灌流する群、24 時間冷保存後の再灌流時に水素を投与する群を作成し比較した。脂肪肝は 50%以上の肝細胞が脂肪化した severe (macro) steatosis であり、正常肝の約 1.3 倍の重量であった。肝臓の腫大と自重により脈管が圧迫され、門脈抵抗が強く、定圧灌流では流量が確保できなかった。それ故、定量灌流としたが、初期から門脈抵抗が高く、灌流と共に抵抗が漸増し、灌流自体がグラフトを傷害する印象があった。灌流液の濁りと泡が著明に生じ、崩壊した細胞の断片や脂質成分のミセル等が生じ、これらが門脈に再流入する際に微小塞栓を生じることが懸念された。透析やフィルターの改良など、脂肪肝用にカスタマイズする必要があると考えられた。実際、灌流データは胆汁産生量をはじめとする治療の有効性を示しえず (図 6)、脂肪肝を用いた検討を中止した。

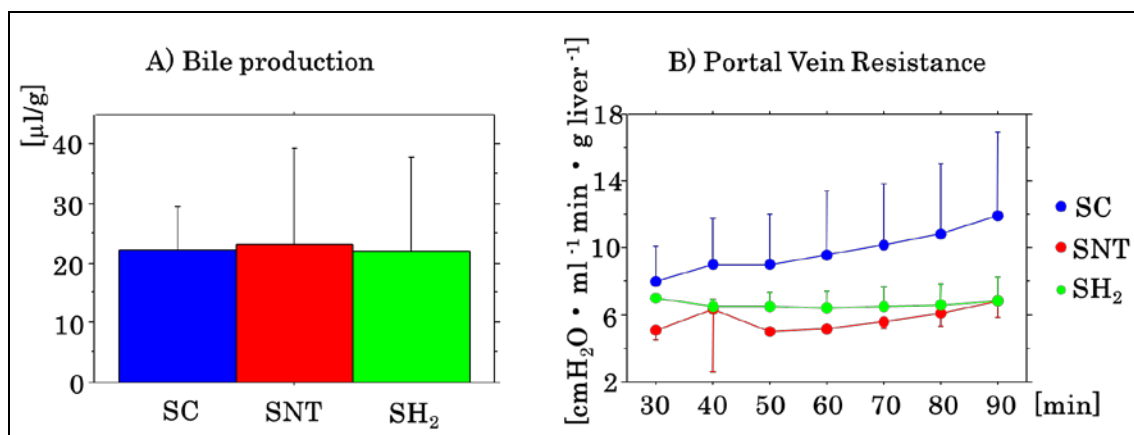


図 6 脂肪肝モデルの胆汁産生量と PVR

SC(Steatosis control) 群：脂肪肝を摘出後、冷保存せずに直ちに再灌流した。
 SNT(Steatosis non-treatment) 群：脂肪肝を摘出後 24 時間冷保存し、再灌流した。
 SH₂ (Steatosis H₂)群：脂肪肝を摘出後 24 時間冷保存し、再灌流時に H₂ を投与した。胆汁産生量に有意差を認めず、PVR も SNT 群と SH₂ 群で有意差を認めなかった。

DCD 肝の冷保存再灌流モデルの作成

ラットの DCD モデルは、横隔膜を切開して、気胸による呼吸停止から心停止を誘導した。横隔膜切開の 5 分後下行大動脈をクランプし、腹腔動脈、門脈への血流を遮断した時点から、心停止と定義した。

肝の脱血方法を検討した。以前に行った長時間冷保存モデルでは血栓が生じないため、腹部大動脈からカニューレーションして生理食塩水を灌流することで肝の脱血が可能であった。しかし DCD モデルでは同様に行うと脱血が不十分だったので、20cm の高さから門脈灌流により脱血した。

心停止時間を検討した。ラットの DCD 肝は 30 分、45 分の報告が多い。45 分以上の心停止ではグラフト障害が強く、臓器修復が困難なためと考えられる。臨床でも心停止時間は 30 分以内が適応とされるので、本研究では心停止時間は 30 分、45 分を検討した。

検討の結果、心停止 45 分では胆汁がほとんど産生されず、治療効果の評価には不適であった (図 7)。心停止 30 分では正常肝の約 3 割の胆汁産生があり、治療の有効性を評価し得た。冷保存時間は実臨床での臓器の輸送時間を考慮し、その最短時間として 4 時間を選択した。

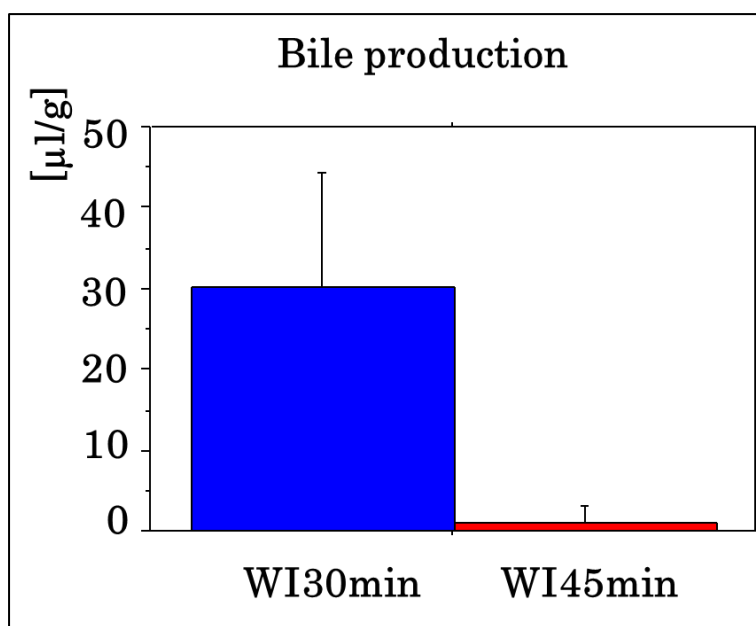


図 7 冷保存することなく 90 分再灌流した際の胆汁産生量の比較
 温虚血時間 30 分では胆汁が産生されたが、45 分では胆汁はほとんど産生されなかった。正常肝の摘出直後に灌流した場合には、 $124 \pm 13 \mu\text{L/g}$ の胆汁が産生される。

水素の投与方法、濃度、安全性

以前の長期冷保存肝モデルで主回路の 4% の流量で十分な IRI 軽減効果が得られたので、本実験でも同様の条件とした。投与方法も前実験と同様に水素ガス飽和させた KHB をガラスボトルに封入し、側管から輸液ポンプを用いて持続投与した。水素濃度は空気中で 4.7% を超えると爆発の危険性がある(Ohsawa et al., 2007)。H₂ を 4% の速度で灌流すると理論的には 29.3 μM の水素が含まれ、肝臓の手前での実測値は 11.5 μM であった(Shimada et al., 2016)。仮に 29.3 μM の水素ガスが全て流路外に漏出した場合のリスクを見積もってみた。3 mL/min/g, 肝重量 12g, 90 分の灌流では、総流量は 3240 mL、29.3 μmol/L の H₂ 溶存液中の H₂ は 94.93 μmol である。1 モルの気体の体積を 22.4 L と近似すると、H₂ の 94.93 μmol は 2.126 mL である。すなわち、全システムを 45 mL の容積中に密封しなければ、漏出 H₂ 濃度は 4.7% を超えない。これらの考察から、本実験モデルでは爆発の危険はないと言える。

本実験

1. 肝障害の評価

①組織学的所見

R90 の肝組織の HE 染色像を比較した。CT 群では肝小葉構造が保たれ、空胞化や核の膨化や凝集、うっ血や出血、炎症細胞浸潤をほとんど認めず、ほぼ正常の形態であった。NT 群では肝細胞の空胞化及び壊死が著明であった。H2 群ではこれらの変化が軽減された (図 8)。

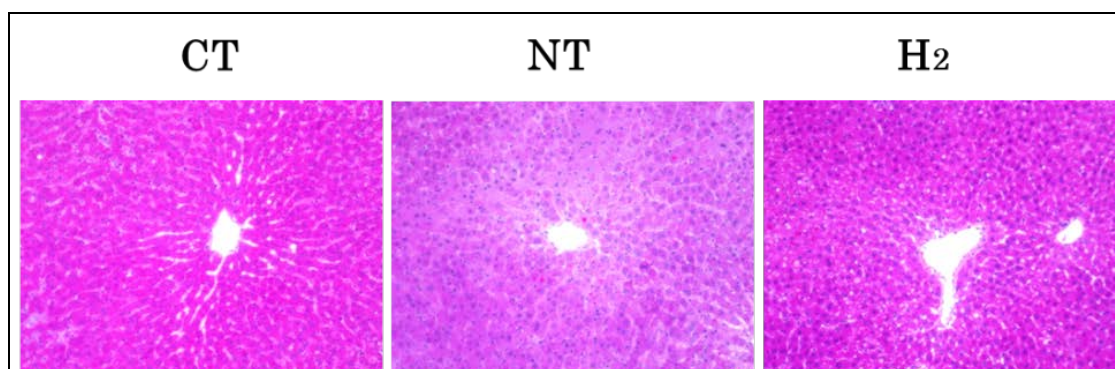


図 8 病理組織学的所見

再灌流後 90 分の HE 染色 ($\times 20$)。CT 群はほぼ正常である。NT 群では肝細胞の空胞化、壊死が著明であった。これらの変化は H2 群では抑制された。(基礎論文より引用。一部改変)

②肝逸脱酵素

R90 の灌流液の AST、ALT、LDH 活性を比較すると CT 群 $[0.70 \pm 0.43$ 、 0.13 ± 0.05 、 0.08 ± 0.04 (IU/g liver)]では低値であったが、NT 群では、有意に上昇した。ALT と LDH は H2 群 $[0.83 \pm 0.24$ 、 1.25 ± 0.75 (IU/g liver)]では NT 群 $[1.47 \pm 0.61$ 、 4.01 ± 2.44 (IU/g liver)]に対する上昇を有意に軽減した。AST は群間に有意差を認めなかった ($p = 0.08$) (図 9)。

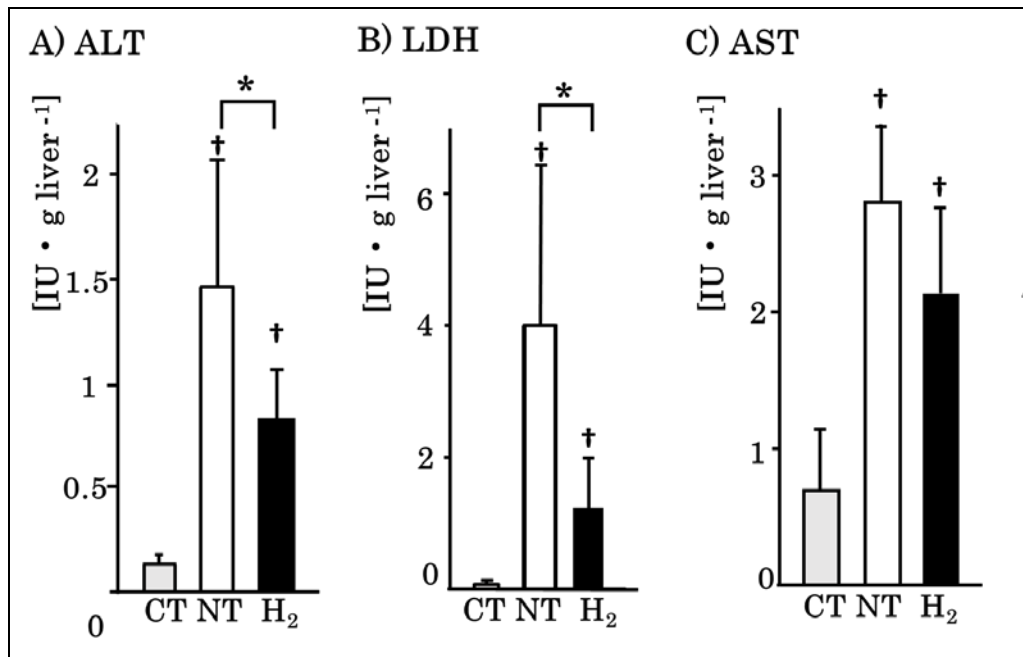


図 9 肝逸脱酵素

ALT、LDH、AST のいずれも CT 群では低値であったが、NT 群では有意に上昇した。ALT と LDH は H₂ 群では NT 群に対する上昇を有意に軽減した。AST は群間に有意差を認めなかった(ALT) (A, $p < 0.05$), (LDH) (B, $p < 0.05$) and (AST) (C, $p = 0.08$) [$n = 6$, means; * $p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's t test), † $p < 0.05$ (vs. CT, Student's t test)] (基礎論文より引用)

③アポトーシス

CT 群では TUNEL 陽性細胞は軽度認めるのみであった [2.6 ± 1.5 (細胞/強拡大視野)] (図 10A)。NT 群では多数の TUNEL 陽性細胞を認めたが [17.6 ± 7.2 (細胞/強拡大視野)] (図 10A)、H₂ 群では TUNEL 陽性細胞率の上昇が有意に抑制された [5.9 ± 2.7 (細胞/強拡大視野)] (* $p < 0.05$) (図 10A, B)。

A)

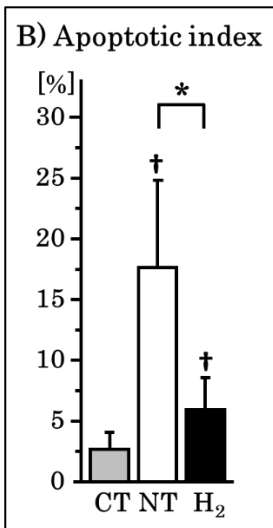
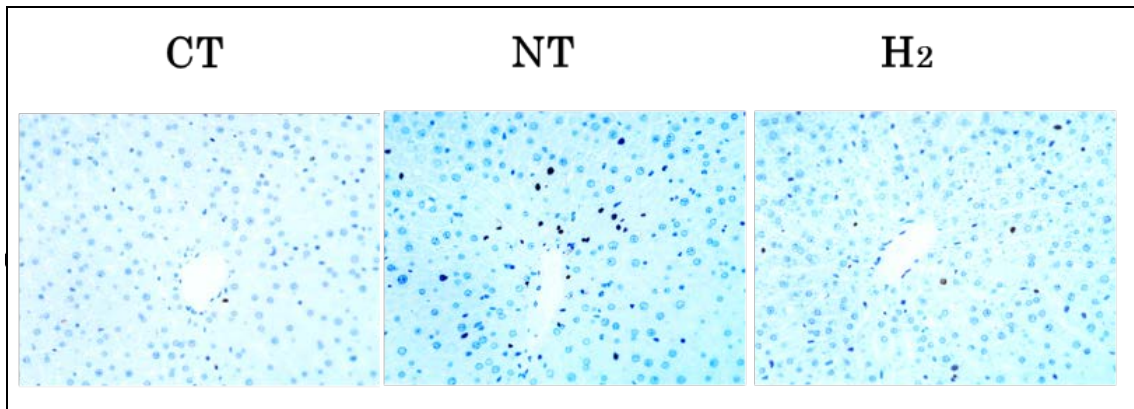


図 10 TUNEL 染色と Apoptotic index

TUNEL 染色。CT 群では TUNEL 陽性細胞数は少なかった。NT 群では多数認め、H₂ 群では NT 群に対する Apoptotic Index の上昇を有意に抑制した (B) ($p < 0.01$)。[$n = 6$, means; $*p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's t test), $\dagger p < 0.05$ (vs. CT, Student's t test)] (基礎論文より引用。一部改変)

2. 肝微小循環

灌流中の門脈の抵抗を測定し肝微小循環を検討した。

CT 群では PVR は灌流を通して最も低い状態を維持しており、微小循環が保たれていた。NT 群では、灌流を通して高い状態であった。H₂ 群では NT 群に対する上昇を有意に抑制した($*p < 0.05$) (図 11)。この結果から H₂ 群では NT 群と比べて微小循環が保たれていることを示した。また NT 群および H₂ 群では灌流時間の経過とともに PVR の漸増がみられた。

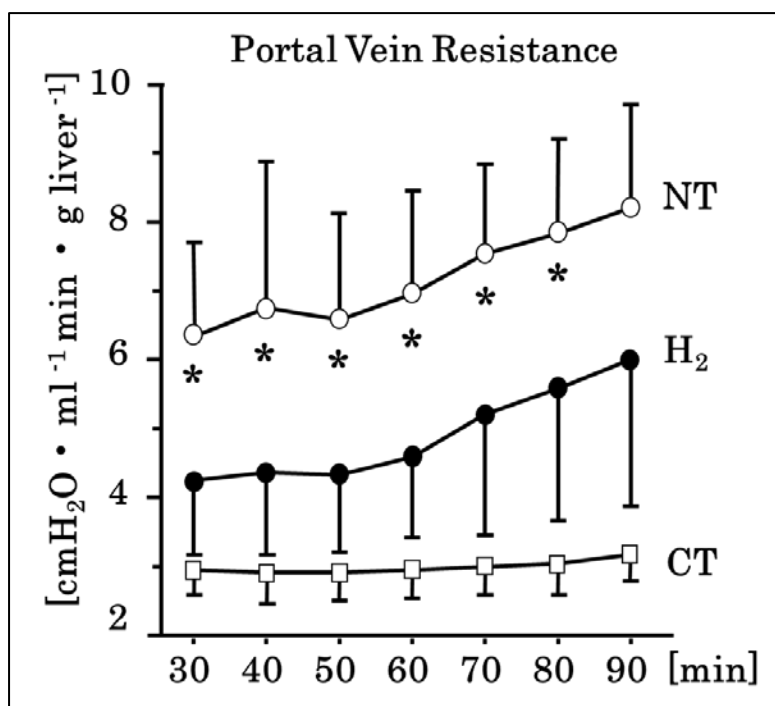


図 11 PVR

PVR は CT 群で最も低い状態を維持していた。NT 群で灌流を通して高い状態であった。H₂ 群では NT 群に対する上昇を有意に抑制した ($p < 0.05$)。[$n = 6$, means; $*p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's *t* test)] (基礎論文より引用。一部改変)

3. ミトコンドリア機能

ミトコンドリアは、呼吸により酸素を消費し、また主に電子伝達系で ATP を産生する。OCR 及び ATP 産生量を測定し検討した。

R90 の OCR は CT 群で最も高かった ($1.31 \pm 0.15 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$)。NT 群では有意に減少した ($0.86 \pm 0.21 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$)。H₂ 群 ($1.20 \pm 0.25 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$) では、NT 群に対する減少を有意に軽減した ($*p < 0.05$) (図 12A)。

R90 の肝組織の ATP は CT 群で 0.30 ± 0.05 ($\mu\text{mol/g liver}$) であった。NT 群では 0.13 ± 0.03 ($\mu\text{mol/g liver}$) であり有意に減少した。H₂ 群では NT 群に対する減少を有意に軽減した 0.24 ± 0.08 ($\mu\text{mol/g liver}$) ($*p < 0.05$) (図 12B)。この結果から H₂ 群では NT 群に比べて ATP が維持されていることを示した。

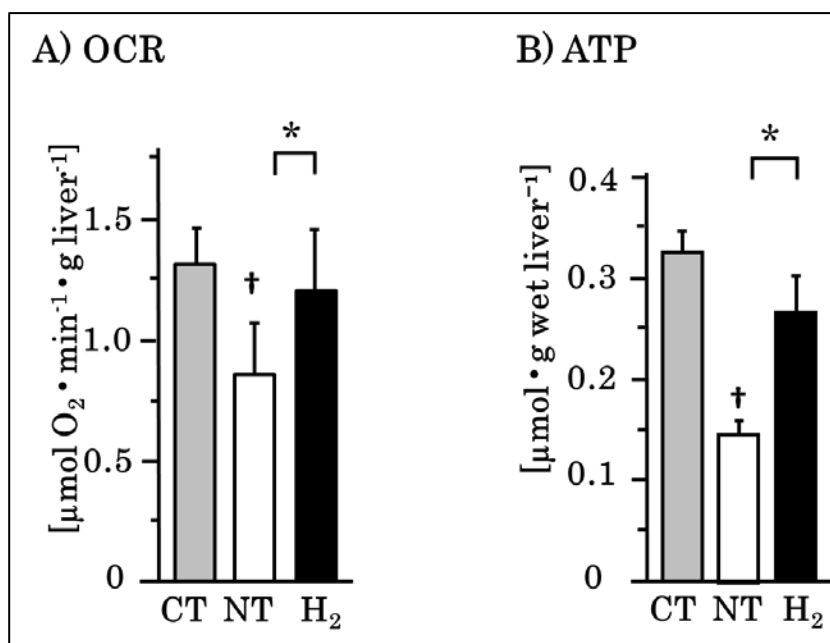


図 12 ミトコンドリア機能

R90 の OCR は CT 群で最も高かった。NT 群では有意に低下した。H₂ 群では NT 群に対する減少を有意に軽減した (* $p < 0.05$)。R90 の ATP は CT 群が最も高かった。NT 群では有意に減少した。H₂ 群では NT 群に対する減少を有意

に軽減した (* $p < 0.05$)。[$n = 6$, means; * $p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's t test), $\dagger p < 0.05$ (vs. CT, Student's t test)] (基礎論文より引用。一部改変)

4. 肝統合的機能

R90 での胆汁産生総量によって肝の統合的機能を評価した。CT 群では 124 ± 13 ($\mu\text{l/g liver}$) であった。NT 群では 30 ± 14 ($\mu\text{l/g liver}$) と有意に減少した。H₂ 群では 52 ± 7 ($\mu\text{l/g liver}$) と NT 群に対する減少を有意に軽減した (* $p < 0.05$) (図 13) この結果から H₂ 群では NT 群に比べて統合的機能を維持していることを示した。

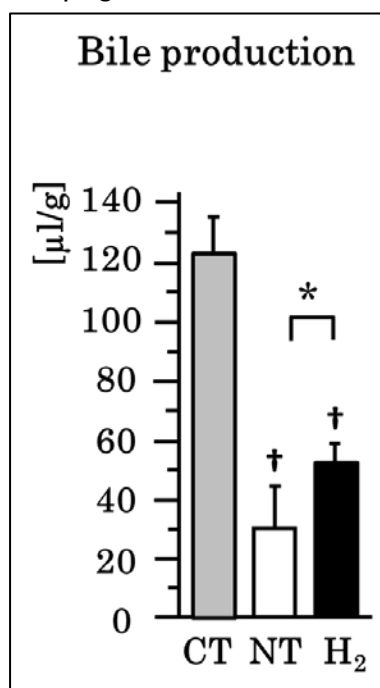


図 13 胆汁産生量

再灌流 90 分間の胆汁産生の総量を計測した。[$n = 6$, means; * $p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's t test), $\dagger p < 0.05$ (vs. CT, Student's t test)] (基礎論文より引用。一部改変)

5. レドックスと酸化ストレス

レドックス状態と過酸化脂質

還元型および酸化型グルタチオンの分子比 (GSH / GSSG) は CT 群で 40 ± 21 であったが、NT 群では (19 ± 6) と減少した。H2 群 (35 ± 13) では NT 群に対する減少は有意に軽減した (* $p < 0.05$) (図 14A)。この結果は H2 群においてレドックス状態が還元側へシフトしていることを示している。この結果は H2 群では NT 群に比べて抗酸化能を維持していることを示唆した。

また肝組織中の過酸化脂質 [Malondialdehyde (MDA) と 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の和] を測定したが、群間に有意差を認めなかった (図 14B)。

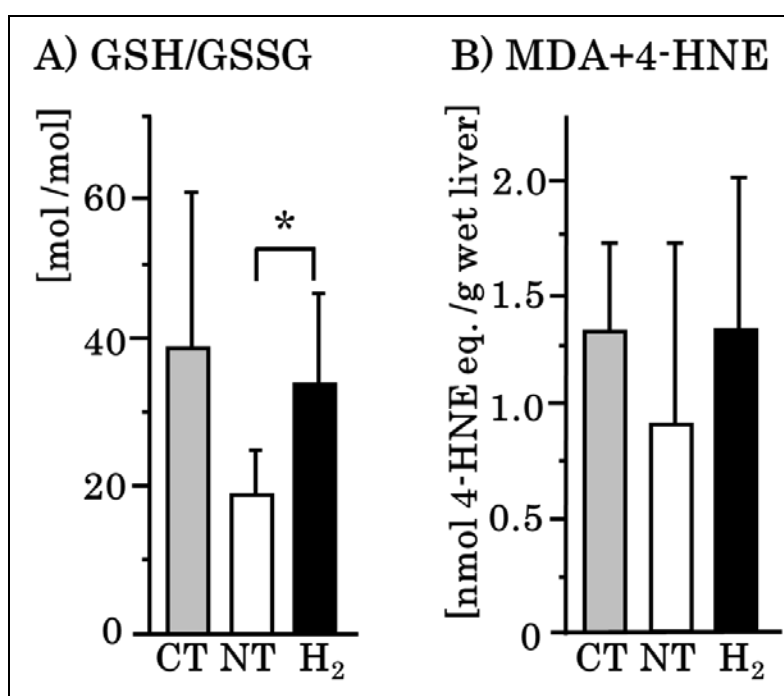


図 14 レドックス状態と過酸化脂質

R90 におけるグルタチオンおよび過酸化脂質を測定し評価した。[$n = 6$, means; * $p < 0.05$ (NT vs. H2, Student's t test)] (基礎論文より引用。)

6. 細胞死及び炎症関連シグナル

①MKK4-JNK 経路、caspase3

炎症関連シグナルは、細胞質の MKK4-JNK 経路をウェスタンブロット法で調べた。NT 群では、CT 群と比較しリン酸化が増強していた。H2 群では、NT 群に対する発現の上昇を有意に抑制した。(* $p < 0.05$) (図 15A、B)。MKK4-JNK

経路の下流のアポトーシスに関連するシグナルである Cleaved caspase3 は、CT 群と比較し NT 群では発現が著明に増強していた。H2 群では、NT 群に対する発現を有意に抑制した。 (* $p < 0.05$) (図 15C)

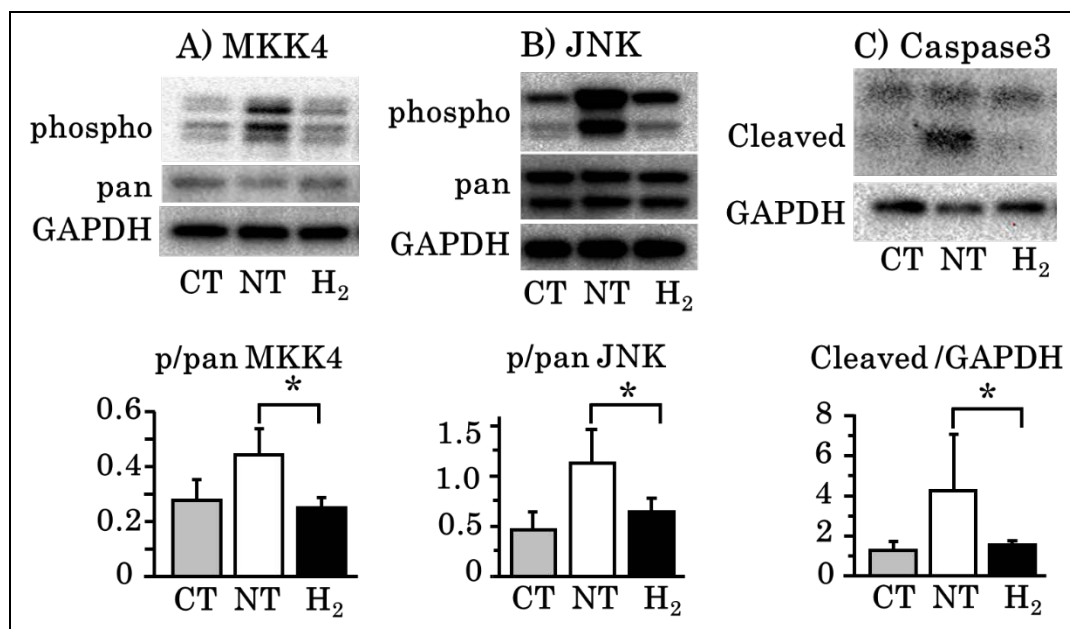


図 15 MKK4、JNK のリン酸化及び cleaved caspase3 の発現

MKK4 及び JNK のリン酸化は H2 群では NT 群に対する発現の増強を有意に抑制した。Cleaved Caspase3 も H2 群では NT 群に対する発現の増強を有意に抑制した。[$n = 6$, means; * $p < 0.05$ (NT vs. H₂, Student's t test)] (基礎論文より引用。)

② その他のシグナル

その他の炎症に関連するシグナル(c-Fos、c-Jun、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK)、生存に関連するシグナル(PI3k、PDK1、Akt、mTOR)のリン酸化は NT 群と H2 群を比較したが、群間で有意差を認めなかった(図 16)。

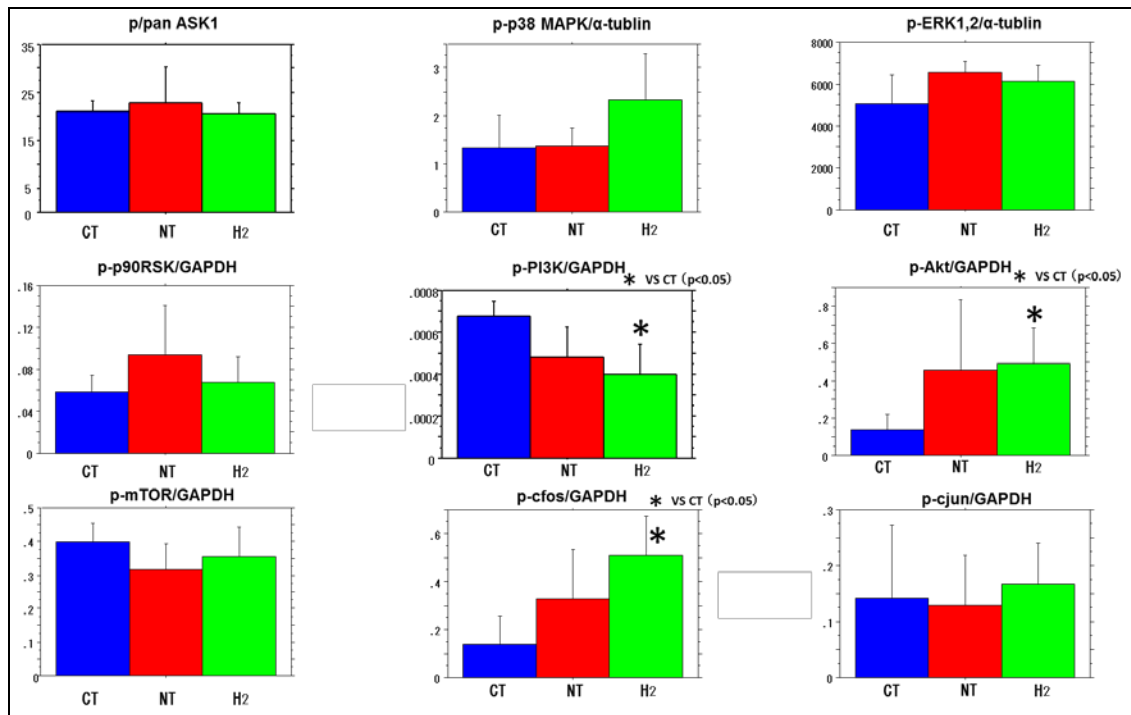


図 16 炎症に関連するシグナルと生存に関連するシグナルの発現

NT 群と H2 群の比較で、群間に有意差を認めなかった。

[n = 6, means; *p < 0.05 (vs. CT, Student's t test)]

考察

本研究では、ラットの DCD 肝の冷保存後再灌流に対する再灌流時の H₂ の投与が IRI を軽減することを示した。H₂ の投与により微小循環の改善、ミトコンドリア機能の維持、適切なレドックス状態の維持、細胞死が抑制された。その結果、グラフト障害が軽減され、非投与群に比べ統合的な肝機能の指標である胆汁産生量が改善した。H₂ の保護効果の正確なメカニズムは依然として完全には明らかにされていないが、本研究で H₂ が MKK4-JNK 経路による障害を抑制することを初めて報告した。

H₂ は、高血圧のラット(Zheng et al., 2012)およびブタの DCD 肺(Haam et al., 2015)の血管抵抗を減少させた。本研究でも、H₂ の投与により PVR の低下を認め、微小循環の改善を示した。以前の長期冷保存肝のモデルでは、90 分の再灌流で PVR はほぼ増加しなかった。しかし本実験では灌流時間とともに PVR は増加した。そこで IPRL の灌流液の回路内のインラインフィルターを観察すると、内皮細胞もしくは脱落した細胞とみられる組織が、以前の長期冷保存肝のモデルと比べてより多く観察された。DCD 肝では障害が強く、前述の細胞片が通常肝あるいは長期冷保存肝より多いと予測されるため、フィルターにトラップされず通過する可能性のある小さな細胞片が PVR の漸増を引き起こしたと推測した。

GSH は抗酸化剤として体内で働きその際に GSSG に変換される。GSSG は、タンパク質チオールとの結合で遊離 GSH を減少させ、抗酸化剤としての機能を低下させ、酸化ストレスを増強させる。肝の温虚血再灌流においてミトコンドリア機能が維持されると、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) および ATP が維持され、再灌流後早期に GSH および GSH / GSSG が共に回復し、その後の障害が抑制される(Fukai et al., 2005)。本実験でも GSH/GSSG、ATP が迅速に回復し、組織障害を軽減した。一方、脂質過酸化 (LPO) は、無治療群で正常よりも減少傾向であり、また治療群で増加傾向であった。そのため本実験の DCD 肝のモデルでは、既報のラジカルスカベンジャーが H₂ の主作用とは考えにくい(Ohsawa et al., 2007, Shimada et al., 2016)。LPO の初期生成物である脂質ヒドロペルオキシドは、低酸素下でも生成されるが、MDA および 4-HNE は、ヒドロペルオキシドの分解によって酸素依存的に生成される。したがって、低酸素の条件下では MDA および 4-HNE が低値であることと、LPO が低値であることが必ずしも相関しない。それ故、H₂ の微小循環の改善による酸素供給の増加は、ROS の産生増加と脂質ヒドロペルオキシドからの HNE 生成効率を上昇させ、逆に無治療群では酸素供給の低下により、HNE の生成効率が低下したと推測された(Fukai et

al., 2005)。これらの結果は、H₂の主作用がラジカルスカベンジャーよりもむしろ微小循環の改善であることを示している。

一般に好気性代謝の増加は、酸素の一部が ROS 産生に利用されることが懸念される(Schild et al., 1997)。本研究では、H₂により、GSH / GSSG 比が保たれ、LPO は増加せず、ATP の維持及び胆汁産生量が改善したことから、OCR の上昇は酸化的障害の増強を意味するとは考えにくい。これらの結果から、H₂はミトコンドリア機能を保護し、ミトコンドリア障害および酸化ストレスを抑制したと考えられた。

H₂は、マウス(Fukuda et al., 2007)およびブタ(Matsuno et al., 2014)において、温虚血の肝の IRI を改善した。またラットの長期冷保存肝に対する再灌流中の H₂の投与も IRI を軽減させた(Shimada et al., 2016)。本研究では DCD 肝に対して H₂が IRI を軽減させることを示した。DCD 肝は同じ時間の単純冷保存もしくは灌流保存法を施行した直後には組織学的所見の違いはあまり見られないが、再灌流により障害が顕在化する。したがって、特に単純冷保存後の再灌流では著明にグラフトが障害されるため、再灌流後早期に進展する細胞死シグナルの抑制が必要である(Nassar et al., 2016)。一方で肝の IRI におけるミトコンドリア依存性アポトーシス(Bradham et al., 1997, Uehara et al., 2005)は、JNK によって促進され、その後ミトコンドリアに転写されることで ROS の産生が増幅され肝の障害が増強される(Chambers et al., 2011)。JNK を抑制することでラットの心臓(Chambers et al., 2013)やラットの肝移植モデルの IRI を軽減することが報告されている(Uehara et al., 2004)。本研究では、H₂群において細胞死シグナルに関連する JNK および MKK4 のリン酸化を抑制し、それに加えてアポトーシスと cleaved caspase3 の発現も抑制した。MKK4 と JNK は酸化ストレスを受けて急速にミトコンドリアに移行し、その後酸化ストレスを増強するため(Chambers et al., 2013, Hanawa et al., 2008)、H₂がミトコンドリア上でいかに作用するかを調べるのが重要である。しかし、重度の損傷を受けた組織におけるミトコンドリアの単離が困難であったため、ミトコンドリアにおける MKK4-JNK を評価できず、ミトコンドリアの生物学的応答は本実験の検討課題である。

IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの血中濃度は再灌流後 3 時間以内に上昇し(Shimada et al., 2015)、その後も高発現を維持する(Nakamitsu et al., 2001)。H₂は敗血症モデルにおいて TNF α および HMGB1 レベルを抑制する(Zheng et al., 2016)。本実験での炎症に関連するシグナル c-Fos、c-Jun、ASK1、p38MAPK、ERK1 / 2、p90RSK 及び生存に関連するシグナル PI3k、PDK1、Akt、mTOR のリン酸化を評価したが、NT 群と H₂群の群間で有意差を認めなかった。このモデルにおける炎症関連のシグナルに群間で有意差を認めなかった原因は、血球の不在、灌流液による約 30 倍の希釈 (対生体内循環量)、および再灌流時

間が 90 分と短期間であったことがあげられ、炎症のカスケードが起こりにくい状態であったと推測した。

本研究ではラットの DCD 肝の冷保存後再灌流における H₂ の再灌流時投与の効果を解析した。H₂ の投与は DCD 肝に対する IRI を軽減した。H₂ は微小循環の改善とミトコンドリア機能の維持に作用し、それにより適切なレドックス状態を維持し、細胞死の抑制をもたらした。また H₂ は MKK4-JNK 経路による障害を抑制することが示唆された。

総括および結論

1) 本研究全体から得られた新知見

ラットの DCD 肝の冷保存後再灌流における再灌流時 H2 投与の効果

1. DCD 肝の冷保存後再灌流において再灌流時 H2 の投与は IRI を軽減した。
2. H2 は微小循環の改善およびミトコンドリア機能を維持することで、適切なレドックス状態を維持し、細胞死を抑制した。
3. H2 は MKK4-JNK 経路の活性化を抑制した。

2) 新知見の意義

H2 が DCD 肝に対して IRI の軽減効果を示し、MKK4-JNK 経路の活性化を抑制することが明らかになった。H2 の作用機序は完全には明らかにされていないが、H2 の作用点を解明する一助になるはずである。

3) 今後の研究、課題

本研究の問題点として H2 の作用をグラフト因子のみを評価していることである。したがってレシピエント因子の影響は未解明のままであり、グラフト生着率の検証、血液成分との相互作用等を解明するためには、肝移植モデルを用いた精査が必要である。また、臨床応用を実現するためには、小動物移植モデルでの H2 の至適投与方法や時期、大動物移植モデルでの有効性の検証が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究の御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室Ⅰ 武富紹信教授、深井原特任講師に謝意を表します。また卓越した技術により実験を終始支援して頂きました堀米正敏、小林希、三好早香の諸氏、ならびに貴重な御助言と技術的な御指導を賜りました同講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

ABE, T., LI, X. K., YAZAWA, K., HATAYAMA, N., XIE, L., SATO, B., KAKUTA, Y., TSUTAHARA, K., OKUMI, M., TSUDA, H., et al. (2012). Hydrogen-rich University of Wisconsin solution attenuates renal cold ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 94, 14-21.

BESSEMS, M., T HART, N. A., TOLBA, R., DOORSCHODT, B. M., LEUVENINK, H. G., PLOEG, R. J., MINOR, T. & VAN GULIK, T. M. (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim*, 40, 236-246.

BRADHAM, C. A., STACHLEWITZ, R. F., GAO, W., QIAN, T., JAYADEV, S., JENKINS, G., HANNUN, Y., LEMASTERS, J. J., THURMAN, R. G. & BRENNER, D. A. (1997). Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology*, 25, 1128-1135.

CHAMBERS, J. W. & LOGRASSO, P. V. (2011). Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation. *J Biol Chem*, 286, 16052-16062.

CHAMBERS, J. W., PACHORI, A., HOWARD, S., IQBAL, S. & LOGRASSO, P. V. (2013). Inhibition of JNK mitochondrial localization and signaling is protective against ischemia/reperfusion injury in rats. *J Biol Chem*, 288, 4000-4011.

DUTKOWSKI, P., FURRER, K., TIAN, Y., GRAF, R. & CLAVIEN, P. A. (2006). Novel short-term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg*, 244, 968-976; discussion 976-967.

DUTKOWSKI, P., POLAK, W. G., MUIESAN, P., SCHLEGEL, A., VERHOEVEN, C. J., SCALERA, I., DEOLIVEIRA, M. L., KRON, P. & CLAVIEN, P. A. (2015). First Comparison of Hypothermic Oxygenated

PERfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis. *Ann Surg*, 262, 764-770; discussion 770-761.

FOLEY, D. P., FERNANDEZ, L. A., LEVERSON, G., CHIN, L. T., KRIEGER, N., COOPER, J. T., SHAMES, B. D., BECKER, Y. T., ODORICO, J. S., KNECHTLE, S. J., et al. (2005). Donation after cardiac death: the University of Wisconsin experience with liver transplantation. *Ann Surg*, 242, 724-731.

FUKAI, M., HAYASHI, T., YOKOTA, R., SHIMAMURA, T., SUZUKI, T., TANIGUCHI, M., MATSUSHITA, M., FURUKAWA, H. & TODO, S. (2005). Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver. *Free Radic Biol Med*, 38, 1372-1381.

FUKUDA, K., ASOH, S., ISHIKAWA, M., YAMAMOTO, Y., OHSAWA, I. & OHTA, S. (2007). Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 361, 670-674.

HAAM, S., LEE, S., PAIK, H. C., PARK, M. S., SONG, J. H., LIM, B. J. & NAKAO, A. (2015). The effects of hydrogen gas inhalation during ex vivo lung perfusion on donor lungs obtained after cardiac death. *Eur J Cardiothorac Surg*, 48, 542-547.

HANAWA, N., SHINOHARA, M., SABERI, B., GAARDE, W. A., HAN, D. & KAPLOWITZ, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem*, 283, 13565-13577.

KARP, S. J., JOHNSON, S., EVENSON, A., CURRY, M. P., MANNING, D., MALIK, R., LAKE-BAKAAR, G., LAI, M. & HANTO, D. (2011). Minimising cold ischaemic time is essential in cardiac death donor-associated liver transplantation. *HPB (Oxford)*, 13, 411-416.

KAWAMURA, T., WAKABAYASHI, N., SHIGEMURA, N., HUANG, C. S., MASUTANI, K., TANAKA, Y., NODA, K., PENG, X., TAKAHASHI, T.,

- BILLIAR, T. R., et al. (2013). Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 304, L646-656.
- KING, L. A., TOLEDO, A. H., RIVERA-CHAVEZ, F. A. & TOLEDO-PEREYRA, L. H. (2009). Role of p38 and JNK in liver ischemia and reperfusion. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 16, 763-770.
- KOOTSTRA, G., DAEMEN, J. H. & OOMEN, A. P. (1995). Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc*, 27, 2893-2894.
- LIU, Q., SHEN, W. F., SUN, H. Y., FAN, D. F., NAKAO, A., CAI, J. M., YAN, G., ZHOU, W. P., SHEN, R. X., YANG, J. M., et al. (2010). Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice. *Liver Int*, 30, 958-968.
- MATSUNO, N., WATANABE, R., KIMURA, M., IWATA, S., FUJIYAMA, M., KONO, S., SHIGETA, T. & ENOSAWA, S. (2014). Beneficial effects of hydrogen gas on porcine liver reperfusion injury with use of total vascular exclusion and active venous bypass. *Transplant Proc*, 46, 1104-1106.
- MONBALIU, D., PIRENNE, J. & TALBOT, D. (2012). Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *J Hepatol*, 56, 474-485.
- MUIESAN, P., GIRLANDA, R., JASSEM, W., MELENDEZ, H. V., O'GRADY, J., BOWLES, M., RELA, M. & HEATON, N. (2005). Single-center experience with liver transplantation from controlled non-heartbeating donors: a viable source of grafts. *Ann Surg*, 242, 732-738.
- NAKAMITSU, A., HIYAMA, E., IMAMURA, Y., MATSUURA, Y. & YOKOYAMA, T. (2001). Kupffer cell function in ischemic and nonischemic livers after hepatic partial ischemia/reperfusion. *Surg Today*, 31, 140-148.
- NASRALLA, D., COUSSIOS, C. C., MERGENTAL, H., AKHTAR, M. Z., BUTLER, A. J., CERESA, C. D. L., CHIOCCHIA, V., DUTTON, S. J., GARCIA-VALDECASAS, J. C., HEATON, N., et al. (2018). A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature*, 557, 50-56.

NASSAR, A., LIU, Q., FARIAS, K., BUCCINI, L., BALDWIN, W., BENNETT, A., MANGINO, M., IREFIN, S., CYWINSKI, J., OKAMOTO, T., et al. (2016). Impact of Temperature on Porcine Liver Machine Perfusion From Donors After Cardiac Death. *Artif Organs*, 40, 999-1008.

OHSAWA, I., ISHIKAWA, M., TAKAHASHI, K., WATANABE, M., NISHIMAKI, K., YAMAGATA, K., KATSURA, K., KATAYAMA, Y., ASOH, S. & OHTA, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 13, 688-694.

OLSCHEWSKI, P., TOLBA, R., AKBAR, S. & MINOR, T. (2003). Use of HTK solution for hypothermic machine perfusion: an alternative for the preservation of less than optimal donor livers?--An experimental study in rats. *Transplant Proc*, 35, 767.

ORMAN, E. S., BARRITT, A. S. T., WHEELER, S. B. & HAYASHI, P. H. (2013). Declining liver utilization for transplantation in the United States and the impact of donation after cardiac death. *Liver Transpl*, 19, 59-68.

SCHILD, L., REINHECKEL, T., WISWEDEL, I. & AUGUSTIN, W. (1997). Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J*, 328 (Pt 1), 205-210.

SHIMADA, S., FUKAI, M., WAKAYAMA, K., ISHIKAWA, T., KOBAYASHI, N., KIMURA, T., YAMASHITA, K., KAMIYAMA, T., SHIMAMURA, T., TAKETOMI, A., et al. (2015). Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*, 45, 892-903.

SHIMADA, S., WAKAYAMA, K., FUKAI, M., SHIMAMURA, T., ISHIKAWA, T., FUKUMORI, D., SHIBATA, M., YAMASHITA, K., KIMURA, T., TODO, S., et al. (2016). Hydrogen Gas Ameliorates Hepatic Reperfusion Injury After Prolonged Cold Preservation in Isolated Perfused Rat Liver. *Artif Organs*, 40, 1128-1136

SUN, Q., KANG, Z., CAI, J., LIU, W., LIU, Y., ZHANG, J. H., DENOBLE, P.

J., TAO, H. & SUN, X. (2009). Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med* (Maywood), 234, 1212-1219.

SUNDBERG, R., AR'RAJAB, A., AHREN, B. & BENGMARK, S. (1991). The functional effects of suppression of hypothermia-induced cell swelling in liver preservation by cold storage. *Cryobiology*, 28, 150-158.

UEHARA, T., BENNETT, B., SAKATA, S. T., SATOH, Y., BILTER, G. K., WESTWICK, J. K. & BRENNER, D. A. (2005). JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol*, 42, 850-859.

UEHARA, T., XI PENG, X., BENNETT, B., SATOH, Y., FRIEDMAN, G., CURRIN, R., BRENNER, D. A. & LEMASTERS, J. (2004). c-Jun N-terminal kinase mediates hepatic injury after rat liver transplantation. *Transplantation*, 78, 324-332.

ZHENG, H. & YU, Y. S. (2012). Chronic hydrogen-rich saline treatment attenuates vascular dysfunction in spontaneous hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*, 83, 1269-1277.

ZHENG, X., MAO, Y., CAI, J., LI, Y., LIU, W., SUN, P., ZHANG, J. H., SUN, X. & YUAN, H. (2009). Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic Res*, 43, 478-484.

Zheng, Y. & Zhu, D. (2016). Molecular Hydrogen Therapy Ameliorates Organ Damage Induced by Sepsis. *Oxid Med Cell Longev*, Epub 2016 Jun 20.

太田, 成. (2015). 水素医学の創始、展開、今後の可能性 広範な疾患に対する分子状水素の予防ならびに治療の臨床応用へ向かって. *生化学*, 87, 82-90.

日本臓器移植ネットワーク <https://www.jotnw.or.jp/> アクセス日：2018 年 8 月 1 日