



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Expanded Criteria Donor 肝グラフトに対する機械灌流法の至適条件の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	坂本, 聡大
Description	配架番号 : 2828
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15894号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92067
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAKAMOTO_Sodai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 坂本 聡大

学 位 論 文 題 名

Expanded Criteria Donor 肝グラフトに対する機械灌流法の至適条件の検討 (Exploration of the Optimal Conditions in Hypothermic Machine Perfusion for Liver Grafts Retrieved from Circulatory Death)

【背景と目的】

肝移植は末期肝不全に対する唯一の根治治療だが、慢性的な臓器提供数の不足が問題となっている。臓器提供不足の解決策として脂肪肝や心停止肝グラフトなどの Expand Criteria Donor (ECD) 肝グラフトの利用法が検討されている。しかし、ECD 肝グラフトは虚血再灌流傷害が増強され、そのままでは移植に用いることができない。特に心停止肝グラフトは温阻血再灌流傷害の抑制が必要である。現在、Ex vivo Machine Perfusion (MP) が虚血再灌流傷害の抑制を企図した研究が精力的に行われている。UW-MP 液を用いた低温機械灌流 [Hypothermic Machine Perfusion (HMP)] は、ミトコンドリアの電子伝達系複合体 (Electron Transport Chain Complex) を保護してミトコンドリア傷害を低減し、虚血再灌流傷害の抑制に寄与することが報告され、欧米では臨床試験で有効性が報告された。しかし、灌流液や灌流時間などの HMP における詳細な条件検討は実施されていないのが実情である。HMP の有効性の向上のため、門脈抵抗の低減や抗酸化作用をもつ水素ガスの効果や、灌流液の温度変化に伴う pH の変化とそれに伴う有効性の変化に着目して実験を計画した。本研究の目的は HMP における至適条件を模索し、その条件を採用した新規灌流液を開発し、作用機序を解明することである。

【材料と方法】

すべての動物実験は「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。雄 Wistar rat (8 週令) を購入し、1 週間以上飼育後に実験に使用した。Wistar rat を絶食なしで実験に供し、イソフルラン吸入にて麻酔を導入し、開腹・開胸、横隔膜切開により心停止させた。心停止 30 分後に門脈にカニューレションし、ヘパリン 1000 IU/kg を含む 4℃ の冷生食 50ml を門脈より注入して肝を脱血、摘出した。第一章では心停止 30 分後に摘出した肝を UW 液 (4℃) で単純冷保存した群を CS 群 (n=6) とし、心停止 30 分後に摘出肝を 7-10℃ の UW-MP 液で HMP (3 時間) した群を MP 群 (n=6) とし、どちらも IPRL で再灌流 (37℃、90 分) して比較検討した。第二章では第一章と同様に心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10℃ の UW-MP 液で 3 時間の HMP した群を MP 群とし、HMP 時に水素ガスを加えた群を MP-H₂ 群として、IPRL で再灌流して比較検討した。第三章では心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10℃ の UW-MP 液で 3 時間の HMP した群を MP 群、同様の HMP 中の灌流液を pH 7.6、7.8、8.0 に調整した群をそれぞれ MP-pH 7.6 群、pH 7.8 群、pH 8.0 群とし、HMP 終了後に IPRL で再灌流して比較検討した。第四章では心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10℃ の UW-MP 液で HMP (3 時間) した群を MP 群、HMP 中の灌流液の pH を 7.8 に調整した群を MP-pH 7.8 群、新規灌流液 FJH を用いて HMP した群を MP-FJH 群として、IPRL で再灌流して比較検討した。FJH は既存の灌流液を参考に、至適 pH を維持することを主目的としてバッファーを調整して作成した新規灌流液である。

【結果】

<第一章> CS 群と比較して MP 群では肝逸脱酵素活性が有意に低下した。しかし門脈抵抗、酸素消費率、胆汁産生量、病理所見における細胞傷害やアポトーシスの割合では差を認めなかった。<第二章> MP 群と比較して MP-H₂ 群では肝逸脱酵素活性、門脈抵抗、酸素消費率、胆汁

産生量に有意差を認めなかった。一方で病理所見では、肝末梢領域における細胞傷害やアポトーシスの割合が減少した。＜第三章＞ MP 群と比較して MP-pH 7.8 群の AST が有意に低減した。胆汁産生量においても MP-pH 7.8 群が最も高値であった（有意差なし）。また、MP 群と比較して MP-pH 7.8 群では HMP 中の FMN 濃度の上昇が有意に抑制された。＜第四章＞ では MP 群や MP-pH 7.8 群と比較して MP-FJH 群で有意に再灌流時の門脈抵抗が低下し、肝逸脱酵素活性の低下と酸素消費率の上昇を認めた。また、病理所見ではアポトーシス陽性細胞率が有意に低下した。オスミウム浸軟走査電子顕微鏡所見では、ミトコンドリア内部のクリステが密に観察され、形態が保持されていた。MP 群と比較して MP-FJH 群では HMP 中に灌流液中 FMN 濃度の上昇が有意に抑制された。

【考察】

心停止肝における UW-MP 液を用いた HMP は、単純冷保存と比較して再灌流時の肝逸脱酵素活性が低下し、虚血再灌流傷害を部分的に抑制した。本研究においても HMP の有効性は確認され、門脈抵抗の低減や抗酸化作用をもつ水素ガスを用いることで HMP の有効性の向上を図った。HMP に水素ガスを加えることで、肝逸脱酵素活性や胆汁産生量などの再灌流時のパラメータに変化は認めなかったものの、病理所見における末梢領域の細胞傷害やアポトーシス陽性細胞率が低下した。これらの所見は水素ガスが門脈抵抗の低下には至らなかったものの、肝末梢領域における血管抵抗低減に寄与することが示唆された。次に低温環境における灌流液の至適 pH を検討した。HMP に用いた UW-MP 液はリン酸バッファーを主なバッファーであり、温度変化に伴う pH の変化が小さい。一方、血液の pH はイミダゾール基の解離定数が温度により変化することを反映し、温度が 1℃低下する毎に 0.0147 ずつ上昇する。この温度と pH の関係に生物学的に意義があると考え、7～10℃の HMP における至適 pH を検討するため第三章の実験を計画した。その結果、pH 7.8 の HMP で肝逸脱酵素活性がさらに低下し、胆汁産生量の増加傾向を認めた。また、その作用機序としてミトコンドリアにおける電子伝達系複合体 I を構成する FMN の灌流液への漏出が抑制されることが示された。また、電子顕微鏡所見におけるミトコンドリアのマトリックス、クリステの形態保持からも、HMP 時の相対的なアシドーシスを是正により電子伝達系複合体の保護による虚血再灌流傷害の抑制が示唆された。ここまでの結果から、HMP（7～10℃）における灌流液の至適 pH は 7.8 と考えられた。より安定して効果の高い臓器修復効果を得るために血液に近い温度 - pH 変化をする新規灌流液を作成し、第四章の実験を行った。UW-MP 液による HMP と比較して新規灌流液による HMP では有意に再灌流時の門脈抵抗値が低下し、肝逸脱酵素活性の低下や酸素消費率の上昇、アポトーシスの減少を認め、その有効性が確認された。第三章と同様に FMN 濃度の低下や電子顕微鏡所見から、移植前に体外でミトコンドリアの電子伝達系複合体を強力に保護することが、再灌流後に起こる細胞傷害を低減し、虚血再灌流障害を抑制すると考えられた。

【結論】

心停止肝に対する UW-MP 液を用いた HMP は臓器修復効果を認めるが、向上の余地がある。7～10℃の HMP で至適 pH は 7.8 であり、HMP 時にこの至適 pH を維持することで虚血再灌流傷害が低減した。その機序としてミトコンドリアの電子伝達系複合体の保護効果が考えられた。至適 pH を維持するバッファーを用いた新規灌流液ではその効果の増強が得られ、虚血再灌流傷害がより強力に抑制された。