



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15894
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92069
Type	doctoral thesis
File Information	SAKAMOTO_Sodai.pdf



学位論文

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)

2024年3月

北海道大学

坂本 聡大

学位論文

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)

2024年3月

北海道大学

坂本 聡大

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
背景	7 頁
方法	12 頁
結果	21 頁
考察	40 頁
結論	44 頁
謝辞	45 頁
利益相反	46 頁
引用文献	47 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。

1. Sodai Sakamoto, Hiroki Bochimoto, Kengo Shibata, Nur Khatijah Mohd Zin, Moto Fukai, Kosei Nakamura, Takahisa Ishikawa, Masato Fujiyoshi, Tsuyoshi Shimamura and Akinobu Taketomi
Exploration of Optimal pH in Hypothermic Machine Perfusion for Rat Liver Grafts Retrieved after Circulatory Death. *Journal of Clinical Medicine*. 12(11):3845. 2023
2. Moto Fukai, Sodai Sakamoto, Hiroki Bochimoto, Nur Khatijah Mohd Zin, Kengo Shibata, Takahisa Ishikawa, Shingo Shimada, Norio Kawamura, Masato Fujiyoshi, Sunao Fujiyoshi, Kosei Nakamura, Tsuyoshi Shimamura, and Akinobu Taketomi.
Hypothermic Machine Perfusion with Hydrogen Gas Reduces Focal Injury in Rat Livers but Fails to Restore Organ Function. *Transplantation Proceedings*.55(4):1016-1020. 2023
(Fukai and Sakamoto equally contributed to the manuscript)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 坂本聡大、深井原、柴田賢吾、島田慎吾、加藤紘一、藤好真人、若山顕治、石川隆壽、川村典生、嶋村剛、武富紹信 心停止ドナー肝に対する機械灌流における水素ガスの有効性の検討、第121回日本外科学会定期学術集会、幕張 2021
2. 坂本聡大、柴田賢吾、石川隆壽、藤好真人、巖築慶一、川村典生、渡辺正明、後藤了一、暮地本宙己、深井原、武富紹信 心停止肝に対する低温機械灌流の至適 pH の検討、第122回日本外科学会定期学術集会、熊本 2022

要 旨

【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) による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ーションし、ヘパリン 1000 IU/kg を含む 4°C の冷生食 50ml を門脈より注入して肝を脱血、摘出した。実験 1 として心停止 30 分後に摘出した肝を UW 液 (4°C) 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°C の UW-MP 液で HMP (3 時間) した群を MP 群 (n=6) とし、どちらも Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) で再灌流 (37°C、90 分) して比較検討した。次に実験 2 として心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10°C 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。実験 3 では心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10°C 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 pH7.6、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。実験 4 では心停止 30 分後に摘出した肝を 7-10°C 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、至適 pH を維持することを目的に開発した新規灌流液 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を調整して作成した新規灌流液である。

【結果】

実験 1 では 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て胆汁産生量が増加した。しかし門脈抵抗、酸素消費率、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。実験 2 では 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、肝細胞傷害を疑う所見やアポトーシスの割合が有意に減少した。実験 3 では 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。実験 4 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、肝内の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を主なバッファであり、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°C 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°C の HMP における至適 pH を検討するため実験 3 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 を構成するフラビンモノヌクレオチド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 時のアシドーシスの是正により、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°C) 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 FJH を作成し、実験 4 を行った。UW-MP 液による HMP と比較して新規灌流液 FJH 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。実験 3 と同様にフラビンモノヌクレオチド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。HMP に水素ガスを加えると肝細胞のアポトーシスを抑制する可能性がある。7~10°C 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。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMP	Adenosine Monophosphate
AMPK	Adenosine Monophosphate - activated protein Kinase
AST	Aspartate Transaminase
ATG5	Autophagy related 5
ALT	Alanine Transaminase
ATP	Adenosine Triphosphate
CO ₂	Carbon Dioxide
CS	Cold Storage
DCD	Donated after Circulatory Death
ECD	Expanded Criteria Donor
ETC	Electron transport chain complex
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	Flavin Mononucleotide
HE	Hematoxylin Eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] Ethanesulfonic acid
HMP	Hypothermic Machine Perfusion
HPF	High Power Field
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂	Hydrogen gas
IPRL	Isolated Perfused Rat Liver
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KHB	Krebs-Henseleit bicarbonate buffer
LDH	Lactate Dehydrogenase
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
MP	Machine perfusion
NMP	Normothermic Machine Perfusion
OCR	Oxygen Consumption Rate
OsO ₄	Osmium Tetroxide
PRKN	Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
PINK-1	Phosphatase and tensin homolog - Induced Kinase 1
PVDF	Poly Vinylidene Di-Fluoride
PVP	Portal Vein Pressure
PVR	Portal Vein Resistance

RF	Riboflavin
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscopy
SNMP	Sub-Normothermic Machine Perfusion
SQSTM-1	Sequestosome 1
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UW 液	University of Wisconsin solution
UW-MP	University of Wisconsin - for Machine Perfusion

背 景

肝移植は末期肝不全に対する唯一の根治治療である。世界的に肝移植数は増加傾向だが、移植待機患者は増加しており、慢性的な臓器提供数の不足が問題となっている (Burra et al., 2021)。本邦における脳死臓器提供数は、2010 年の臓器移植法改正により増加したものの、年間約 50-60 例と、依然として需要をはるかに下回っている。肝移植症例全体の実に 90% 以上が、健常者をドナーとする生体肝移植である (日本臓器移植ネットワーク)。移植臓器不足の解消のため、心停止ドナー肝 (Donated after Circulatory Death; DCD) や脂肪肝などの非標準的臓器 (Expanded Criteria Donor; ECD) が潜在的ドナーとして注目され (A. Schlegel et al., 2018)、安全な利用法の研究が行われている (Álvarez-Mercado et al., 2019; Schlegel et al., 2013)。ECD 肝グラフトは primary non function や delayed graft function などの発症リスクが高く (Dubbeld et al., 2010; van Rijn et al., 2018)、現在一般的に用いられている単純冷保存 (Cold Storage; CS) のみでは利用できず、安全性の向上が必須である (Monbaliu et al., 2012)。そのために機械灌流法 (Machine Perfusion; MP) が研究されている (Goldaracena et al., 2020; Schlegel et al., 2019)。肝臓の MP は門脈と肝動脈から持続的に灌流して酸素やエネルギー源を送達し、ミトコンドリアの好気代謝を促進し、乳酸蓄積を抑制する。さらに、ATP の分解抑制を介した活性酸素種の生成抑制、wash out による活性酸素種や乳酸等の代謝副産物の除去により ECD 肝グラフトの細胞環境を多面的に修復する (Dutkowski et al., 2006; Mergental et al., 2021; Nasralla, 2021)。MP は 37°C の常温機械還流 (Normothermic Machine Perfusion; NMP)、7-10°C 程度の低温機械灌流 (Hypothermic Machine Perfusion; HMP)、その中間である 25°C 前後の Sub-Normothermic Machine Perfusion; SNMP に分類される (Weissenbacher et al., 2019)。欧州では各種 MP の研究が進み、NMP では単純冷保存と比較してグラフト廃棄率の低下や平均保存時間の増加、肝機能障害の低下が示された (Nasralla et al., 2018; van Beekum et al., 2021; Watson et al., 2019)。HMP では単純冷保存と比較して術後胆管炎や動脈塞栓などの合併症が低減し、graft loss が減少した (de Goeij et al., 2021; Schlegel et al., 2013a; Zhang et al., 2019)。NMP と HMP のどちらも randomized clinical trial で有効性が示されており (Nasralla et al., 2018; van Rijn et al., 2021)、異なる温度での灌流の併用が有効なことも分かってきた (de Vries et al., 2019)。

現在、ドナー不足の解決策として DCD 肝の利用が注目されており、温虚血に伴う再灌流障害の進行を抑制する研究が進められている

(Michelotto et al., 2021; Quillin and Guarrera, 2018)。温虚血は短時間であっても、類洞内皮の損傷により、炎症性物質が局所で産生されて (アラキドン酸カスケード)、好中球浸潤、周囲のクッパー細胞等の炎症反応が惹起され、活性酸素種や TNF α が産生されて肝細胞の apoptosis や necrosis が起こる (Dogan and Aslan, 2011; Eltzschig and Eckle, 2011)。細胞死はさらに細胞内外のアシドーシスを惹起し、アシドーシスは活性酸素産生と電子輸送複合体 (Electron transport chain complex; ETC) の障害、ミトコンドリアの機能不全を経て、再灌流時に肝細胞に重篤な傷害を引き起こす。これらの事象は移植グラフトの機能低下やグラフトロスの主要因であり、「再灌流症候群」として知られている (Chouchani et al., 2014; Jaeschke and Woolbright, 2012; Schlegel et al., 2020)。HMP はこれら虚血再灌流傷害に対しする有効性が確認されている (van Leeuwen et al., 2021)。HMP はミトコンドリアの ETC の障害を防ぎ、ヌクレオチドプールのアップロードと効果的なコハク酸代謝によってミトコンドリアの再プログラミングを誘導することで、その後の再灌流傷害から保護すると報告されている (Karangwa et al., 2020; Muller et al., 2019; Schlegel et al., 2015)。

DCD などの ECD 肝に対する MP の臨床研究が進む一方で、灌流液や温度、時間、タイミング、酸素担体の有無、評価システムなどの灌流条件は一定ではなく、至適灌流条件は未だ定まっていない (Henry et al., 2012; Hu et al., 2020; Martins et al., 2022; Panayotova et al., 2020)。この至適灌流条件を模索するため、MP における基礎研究が必要である (Panayotova et al., 2020)。そこで本研究ではラットを用いた単離肝灌流法 (Isolated Perfused Rat Liver; IPRL) による再灌流を用いて、肝における MP の至適条件を検討した。まずラット肝の摘出手技および IPRL における再灌流の手技を確立した。IPRL と MP は温度制御法や灌流液種類などが異なるものの、概ね同様の回路と手順で行うため、IPRL の安定化により、MP の手技も安定することを確認した。この研究では、低流量での灌流、酸素担体が不要などの点で臨床に導入しやすい HMP (Schlegel et al., 2018) に着目した。従来 of CS と比較して HMP の有効性を確認し、それを元に至適条件を検討することとした。

まず、DCD 肝グラフトは、温阻血に伴い微小循環が著しく障害され、肝内血管抵抗が顕著に増加して門脈圧が上昇し、内皮細胞の傷害が生じる (Mihaylov et al., 2019)。また、酸化ストレスが強調され虚血再灌流傷害として肝細胞傷害が増強される (Stepien et al., 2017)。それを抑制するための方策として University of Wisconsin solution (UW 液) を改良した

University of Wisconsin - for Machine Perfusion (UW-MP)を用いた 7-10°C の HMP が用いられ、有効性が報告されている (Dutkowski et al., 2015, 2014)。UW-MP を用いた HMP がラットの DCD 肝の虚血再灌流傷害を低減することを仮説として実験を計画した。ラット肝を用いて DCD 肝モデルを作成し、UW-MP を用いた 3 時間の HMP を行った。その後移植による虚血再灌流を模した IPRL を用いて虚血再灌流傷害を評価した。

次に、水素ガス (Hydrogen gas; H₂)は既報において虚血再灌流における抗酸化作用が認められており (Tamaki et al., 2018)、ラット肝の再灌流時に投与することで門脈抵抗値の改善が確認されている (Ishikawa et al., 2018; Shimada et al., 2016, 2015)。H₂ を HMP に加えることで肝内の循環不全を改善し、再灌流傷害を低減することを仮説として実験を計画した。

実験を経験していく過程で、HMP 中の灌流液の pH が低温であるにもかかわらず低値であることに着目した。肝における HMP の灌流液として主に用いられている UW-MP 液は、国外の臨床試験で有効性が確認されている。この灌流液はリン酸バッファーを主なバッファーとして用いており、温度変化に伴う pH の変化が小さい。一方で、外部とのガス交換が遮断された血液の pH は、温度が 1°C 低下する毎に 0.0147 ずつ上昇する (Rosenthal, 1948)。これは主に血液の緩衝系のひとつであるヘモグロビン緩衝作用におけるイミダゾールの解離定数の特性によるものである。血液や各種バッファーにおける温度変化に伴う pH や解離定数の変動を図 10 に示す。

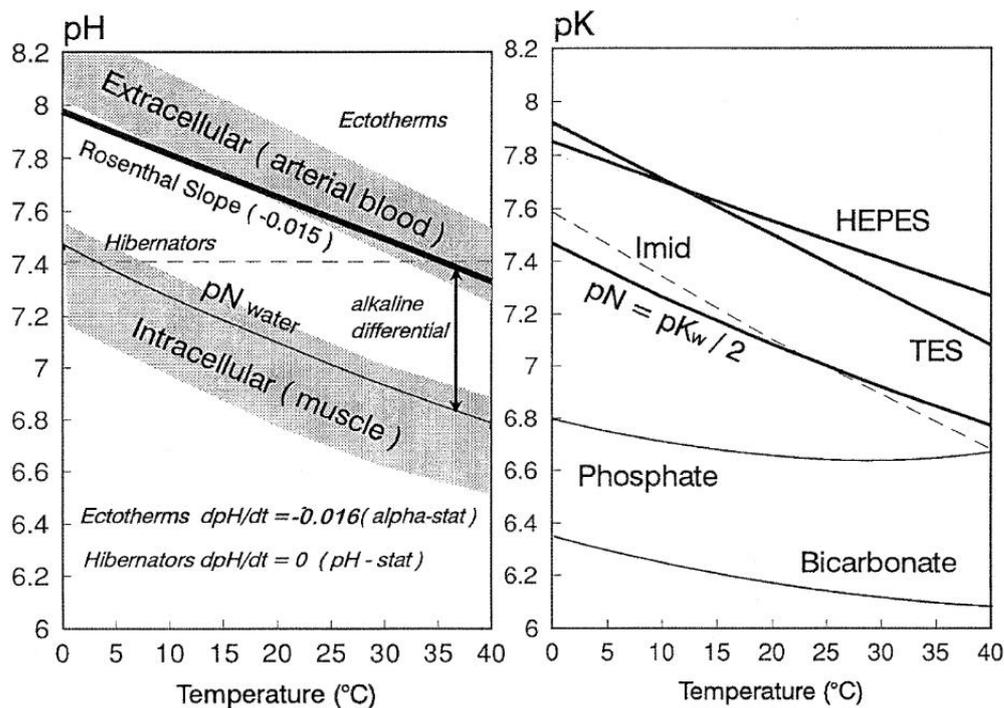


図1 左：細胞内液および外液の温度変化に伴う pH の変化、右：各種バッファーにおける温度変化に伴う解離定数の変化 (Baicu and Taylor, 2002)

この血液の温度に対する pH 変化の特性は、水の中性 pH の温度に対する変化とほぼ一致する。このため、7°Cの血液は pH 7.8 程度となり、HMP に使用している 7°Cで pH 7.4 以下の UW-MP 液とは大きな差がある。7-10°C程度の低温で H 7.4 に維持された場合、溶液の電離定数の変化により細胞内外の H⁺は増加し、acidosis の状態であると考えられる。理解すべき重要な事項として、そもそも、水の中性は一般的に pH 7.0 と認識されているが、それは 25°Cの温度の場合である。水 (H₂O)の解離定数 (pK_w)は、温度変化に応じて変化する。pH はあくまで水素イオン活量の逆数の対数であり、温度に伴い解離定数が変化する血液・体液などの溶解液では pH が 7.4 であることは必ずしも酸塩基平衡において中性ではないことを理解することが重要である。機械灌流に限らず生体における acidosis は、ATP 依存性 3Na⁺/2K⁺交換ポンプの停止と ATP 依存性 H⁺/K⁺ポンプによる細胞内から細胞外への K⁺移動による高カリウム血症や、解糖系酵素の活性低下による糖代謝阻害、アデニル酸シクラーゼ阻害から細胞内情報伝達物質である cyclic AMP の減少などから細胞傷害を引き起こすことが知られている (Helbling and Renner, 1998; Seifter and Chang, 2016; Stacpoole, 1997)。そこで、HMP 時の灌流液の pH に着目し、肝における HMP の至適 pH を検

討する。

低体温で生存できる生物において酸塩基平衡と温度変化に着目した pH の管理方法には 2 通りあることが知られている (Hoedemaekers and Van Der Hoeven, 2014)。血液の特性に合わせて温度低下に伴い pH を上昇させる管理法を α -stat strategy と呼ぶ。 α -stat は、低体温でも活動できる変温動物で用いられている (Truchot, 1973)。一方で、 $p\text{CO}_2$ を調整して、温度変化にかかわらず pH 7.4 のまま一定に保つ方法を pH-stat strategy と呼ぶ。pH-stat は冬眠する恒温動物で用いられている。医療における pH-stat と α -stat については、特に心臓血管手術時の麻酔管理や心停止後の低温管理において詳しく検討されてきた (Swan, 1984)。大血管手術などの脳虚血保護目的の低温管理における pH 調整は、 $p\text{CO}_2$ の調節により行われている。低温時に $p\text{CO}_2$ を上昇させて pH 7.4 前後に調整する pH-stat は、増加した CO_2 による血管抵抗の低減などにより有効な可能性がある (Abdul Aziz and Meduoye, 2010)。しかし一方で、acidosis はフリーラジカルによるミトコンドリア機能不全からの細胞傷害が指摘されている (Lin et al., 2019; Zha et al., 2022)。いずれにしても臓器保存における保存液や灌流液の pH にかかわる研究はわずかしかなかく (Ahmed et al., 2001; Baicu et al., 2006)、HMP 時の pH の至適域は不明である。我々は、細胞にとって最適な酸塩基平衡は、 H^+ の絶対濃度ではなく、 H^+ と OH^- の比によって決定されるという仮説を立てた。本研究の目的は、DCD 肝移植片に対する HMP の至適 pH を決定し、グラフト保護のメカニズムを解明することである。IPRL を用いてラット肝における HMP の至適 pH を検証する方針とした。

37°C における細胞内環境と細胞外環境の至適 pH をそれぞれ 7.200 と 7.400 とし pH が Rosenthal 因子 (-0.0147) に従って変化すると、7°C における細胞内液と細胞外液の pH 値はそれぞれ 7.641 と 7.841 になる。pH の変動やばらつきがあった場合、pH が至適域にいない時点での HMP の効果は減弱する可能性がある。細胞外液の至適 pH をこの Rosenthal 因子に近い $\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$ を示すバッファーを用いることで、より安定して効果的な臓器修復作用を示すことを仮説として当研究室で独自に新規灌流液 (FJH) を作成した。バッファーは、緩衝能が高く体液と似た温度変化に伴う解離定数の変動を示す HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) を中心に配合して作成した。HEPES は Good's buffer の一種であり強い緩衝作用を持つ。このバッファーは温度が下がると解離定数が減少する性質を示し、血漿に近い $\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$ の灌流液を作成することができると考えた。DCD 肝に対する HMP における FJH の有効性を検討する。

方 法

・ 試薬

特に記載のない試薬はすべて富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本)より購入した。UW 液 (Belzer UW®)と UW-MP (Belzer MPS®)は Bridge to Life (Europe) Ltd. (London, England)より購入した。

・ 実験動物

8 週令の雄 Wistar rat を三協ラボサービス株式会社 (札幌、日本)より購入し、1 ケージに 2 匹か 3 匹に分けて定常的な気候条件 (23±2°C、湿度 50±10%、12 時間の照明)で最低 1 週間飼育した。また、以下の組成の飼料 (MF、オリエンタル酵母工業、東京、日本)と水を自由に摂取させた。飼料 100 g 当たりの組成は、脂質 5.6 g, トコフェロール 9.1 mg, アスコルビン酸 5.5 mg, 鉄 12.2 mg, 銅 0.72 mg, 亜鉛 4.9 mg, セレン 0.45 ppm, リン脂質 816 mg であった。本研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」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。

・ 手順

雄の Wistar rat (9-12 週令、220-300 g)を絶食なしで実験に供し、イソフルラン吸入にて麻酔導入、維持した。開腹・開胸、両横隔膜切開して心停止させた。心停止 30 分後に門脈に 16 G カテーテル (ニプロ、大阪、日本)をカニューレションし、ヘパリン 1000 IU/kg を含む 4°Cの冷生食 50 ml を門脈より注入して脱血した。さらに、UW 液あるいは、UW-MP を各 20 ml を注入した。肝外胆管に PE-10 カテーテル (Intramedic, Clay Adams, NJ, USA)をカニューレションして、肝を摘出した。

・ HMP の条件

300 ml の UW-MP をクラッシュアイスと Pertier-type thermos-controller MC-1 (AS ONE, Osaka, Japan)を用いて 7-10°Cに調整し、4-5 cmH₂O の定圧で、再循環システムで 3 時間灌流した。ポンプには MINIPULS3 peristaltic pump (Gilson, Middleton, WI, USA)を用いた。灌流液はハミルトン肺を用いて酸素化し、実験を通して 450<pO₂<550 mmHg となるよう調整した。180 分の灌流中における門脈圧 (Portal vein pressure; PVP) (cmH₂O)、門脈抵抗 (Portal vein pressure; PVR) (cmH₂O/(ml/min/g liver))を計測した。

・ IPRL の条件

IPRL の条件は、Bessems らの方法に多少の修正を加えて設定した (Bessems et al., 2006; Shimada et al., 2019)。グルコースとタウロコール酸

Na を添加した Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) 300 ml を Pertier-type thermos-controller MC-1 で 37°C とし、回路全体をヘアドライヤを用いた自作の実験ボックスで 37°C に管理した。コントロール群では 8 cmH₂O、CS 群と MP 群では 12 cmH₂O の定圧で、再循環システムを用いて 90 分間灌流した。ポンプには MINIPULS3 peristaltic pump を用いた。灌流開始前に CO₂ をバブリングして KHB の pH を 7.35~7.45 に調整した。灌流液はハミルトン肺を用いて酸素化し、実験を通して 450 < pO₂ < 550 mmHg とするよう調整した。90 分の灌流中における門脈圧 (Portal vein pressure; PVP) (cmH₂O)、門脈抵抗 (Portal vein pressure; PVR) (cmH₂O/(ml/min/g liver))、90 分の灌流中の胆汁産生量 (μL/g liver) を計測・測定した。また、酸素消費率 (Oxygen Consumption Rate; OCR) を下記の通り算出した。

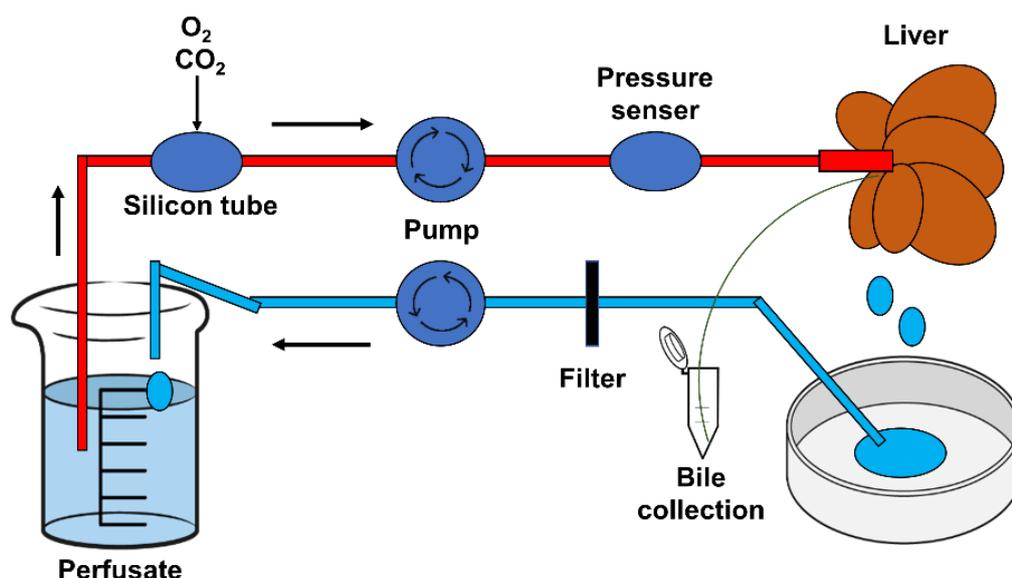


図 2 HMP および IPRL の回路構成

HMP と IPRL はどちらも 300ml の灌流液を使用し、ポンプで肝に再循環システムで灌流した。肝の手前に圧センサーを設置してそれぞれ設定した圧の範囲内になるよう灌流液の流量を調整した。酸素と二酸化炭素はシリコンチューブを用いて濃度を調整した。二酸化炭素はバブリングして追加し濃度を調整した。

実験 1：ラット DCD 肝に対する HMP の有効性の確認

心停止せずに *in vivo* で肝を脱血して摘出、直後に IPRL で再灌流

した群をコントロール群とした (CT 群 ; n=6)。実験手順の通り 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 4°C の UW 液で 3 時間の CS の後に IPRL で再灌流した群を CS 群 (n=6) とした。同様に 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行い、IPRL で再灌流した群を MP 群 (n=6) とした。HMP と IPRL の回路構成を図 1 に示す。実験プロトコルを図 3 に示す。統計検討は、JMP® 15 (SAS Institute Inc.) を用いて、Student の t 検定で行った。p<0.05 の場合を有意とした。

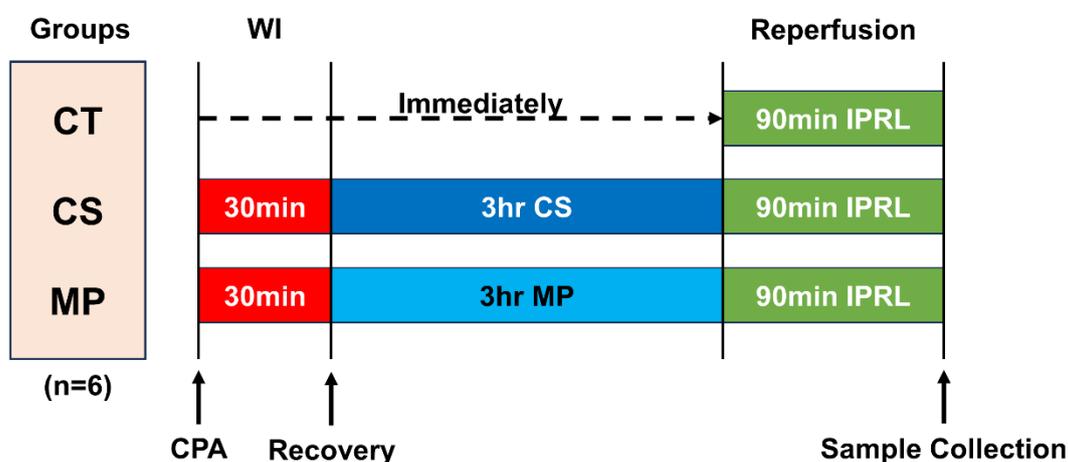


図 3 実験 1 プロトコル

コントロール群は心停止せずに *in vivo* で肝を脱血して摘出、直後に IPRL で再灌流した (CT 群)。CS 群は 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 4°C の UW 液で 3 時間の CS を行った。MP 群は 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行った。どの群も 90 分間の IPRL で再灌流して評価した。各群 n=6 で実験を行った。

実験 2 : HMP における H₂ 添加の有効性の検討

実験 1 と同様に 30 分の心停止後に肝を摘出し、7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行った群を MP 群 (n=6) とした。同様のプロトコルで、HMP 中に H₂ をバブリングさせて加えた UW-MP を 10 ml/h で回路の側管から投与した群を MP-H₂ 群とした。2 群とも HMP 後に 90 分間の IPRL で再灌流し、評価した。実験プロトコルを図 4 に示す。統計検討は、JMP® 15 (SAS Institute Inc.) を用いて、Student の t 検定で行った。p<0.05 の場合を有意とした。



図4 実験2プロトコール

MP 群は 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行った。MP-H₂ 群は MP 群と同様の HMP を、灌流液に H₂ を加えて行った。2 群とも 90 分間の IPRL で再灌流して評価した。各群 n=6 で実験を行った。

実験3：HMPにおける至適 pH の検討

実験 1・2 と同様に 30 分の心停止後に肝を摘出し、7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行った群を MP 群 (n=6) とした。同様のプロトコールで、HMP 中に UW-MP を 2 M NaOH でそれぞれ pH 7.6±0.05、pH 7.8±0.05、pH 8.0±0.05 に調整した MP-pH 7.6 群、MP-pH 7.8 群、MP-pH 8.0 群の計 4 群とした。4 群とも HMP 後に 90 分間の IPRL で再灌流し、評価した。実験プロトコールを図 5 に示す。なお、pH の調整は灌流開始前および灌流中に適宜行った。pH は LAQUAact (堀場製作所, 京都, 日本) を用いて 7-10°C の値を用いた。統計解析は JMP® 15 (SAS Institute Inc.) を用いて、MP 群を control とした Dunnett 検定で行った。p<0.05 の場合を有意とした。

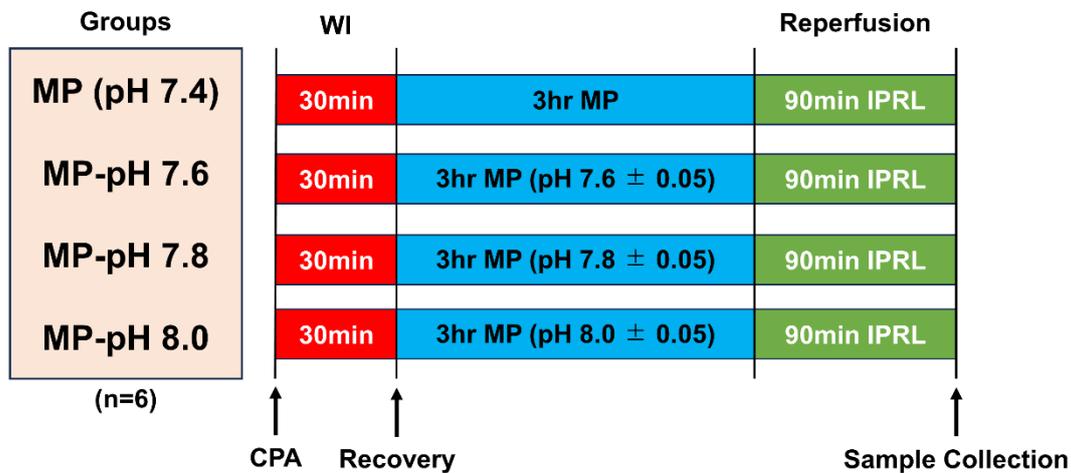


図 5 実験 3 のプロトコール

MP 群は 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 7-10°C の UW-MP で 3 時間の HMP を行った。MP-pH 各群は MP 群と同様の HMP を、灌流液に NaOH を加えて pH をそれぞれ pH 7.6、7.8、8.0 に調整した。すべての群で HMP 後に 90 分間の IPRL で再灌流して評価した。各群 n=6 で実験を行った。

実験 4 : HMP における新規灌流液 FJH の有効性の検討

至適 pH を保つ安定したバッファーを用いて開発した新規灌流液 FJH (表 1) を用いた HMP の有効性の検討を行った。FJH は HEPES などのバッファーを用いて、温度変化に伴って pH が血液と類似した変動をする特徴を持つ。30 分の心停止後に肝を摘出し、7-10°C の UW-MP 液で 3 時間の HMP を行った群を MP 群 (n=6) とした。同様のプロトコールで、HMP 中に UW-MP 液を 2M NaOH で pH 7.8±0.05 に調整した群を MP-pH 7.8 群 (n=6) とした。FJH で HMP を行った群を MP-FJH 群とした。3 群とも HMP 後に 90 分間の IPRL で再灌流し、評価した。FJH の組成を表 1 に示すが、FJH は特許出願を控えているため一部物質名を伏せて記載する。実験プロトコールを図 6 に示す。統計解析は JMP® 15 (SAS Institute Inc.) を用いて、Tukey-Kramer の HSD 検定で行った。p<0.05 の場合を有意とした。

Components	Dose (mM)
Lactobionic acid	26
KOH	9
NaOH	17
MgSO ₄	5
HEPES-based buffer	140
Antioxidants	4
Glucose	3
Amino acids	23
Antioxidants	4
Vasodilator	5
Impermeant	30
PEG35kd(g/l)	10

表 1 新液 FJH の組成

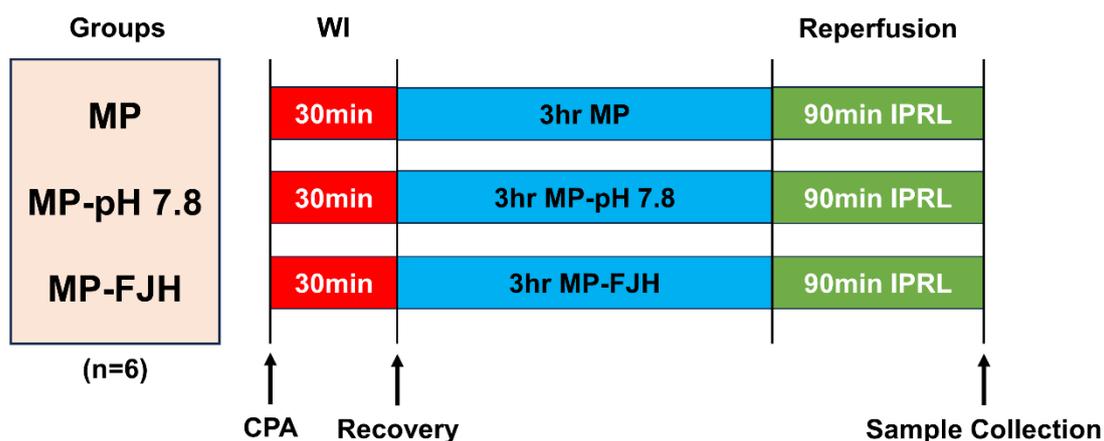


図 6 実験 4 のプロトコール

MP 群は 30 分の心停止後に肝を摘出し、その後 7-10°C の UW-MP 液で 3 時間の HMP を行った。MP-pH 7.8 群は MP 群と同様の HMP を、灌流液に NaOH を加えて pH をそれぞれ pH 7.8 に調整した。MP-FJH 群は FJH を灌流液に用いた HMP を 3 時間行った。すべての群で HMP 後に 90 分間の IPRL で再灌流して評価した。各群 n=6 で実験を行った。

・サンプル採取

再灌流終了時の肝重量を測定し、-80°C で冷保存するか、10%ホルマリンで固定してパラフィンに包埋した。また灌流液を再灌流開始後の 5 分、30 分、60 分、および再灌流終了時 (90 分) に採取した。灌流液中の肝

逸脱酵素活性として、aspartate transaminase; AST、alanine transaminase; ALT、lactate dehydrogenase; LDH を国際臨床化学連合基準測定操作法 (IFCC 法)を用いて札幌臨床検査センター (日本, 札幌)にて測定した。

・ IPRL の測定値

90 分間の灌流中の門脈抵抗; PVR を以下のように算出した。

$$PVR \text{ (cmH}_2\text{O/mL} \times \text{min} \times \text{g liver/mL)} = PVP \text{ (cmH}_2\text{O)} / \text{portal flow (mL/min/g liver)}$$

また、灌流液中の肝逸脱酵素活性は摘出時の肝重量で除した数値を計測した。以下の Ct は再灌流 t 分後の灌流液中の肝逸脱酵素活性値 (IU/L) で、V (L) は灌流液量 (0.3 L)、LW (g) は CS または MP 前の肝重量である。

肝逸脱酵素活性 (IU/g liver) = [Ct * V] / LW (g).

酸素消費率 (OCR) は以下の式を用いて算出した。

$$OCR \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{/min/g liver)} = (\text{Cin} - \text{Cout}) \times \text{portal flow (mL/min/g liver)}$$

Cin および Cout は、それぞれ肝流入前および肝流出後における灌流液の酸素濃度である。なお、 O_2 濃度 ($\mu\text{mol O}_2\text{/mL}$) = $p\text{O}_2$ (kPa) \cdot SO_2 (37°C) ($\mu\text{mol O}_2\text{/mL/kPa}$) である。 SO_2 (37°C) は、37°C における水への酸素溶解度であり、 SO_2 (37°C) = 0.01056 $\mu\text{mol O}_2\text{/mL/kPa}$ で計測した。

・ 病理学的所見およびアポトーシス

パラフィン包埋切片を Hematoxylin Eosin; HE 染色して肝細胞傷害の程度を評価した。また、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法による染色を行った。いずれの染色法も札幌総合病理研究所 (札幌、日本)で行った。TUNEL 染色は、肝細胞内の核が円形で茶褐色に濃染したものを陽性と判定した。アポトーシス比率の算出法として、Apoptotic Index を以下の通り設定した。Apoptotic Index は各サンプルにつき 3 強拡大視野 (High power field; HPF) を観察し、3 つの平均値とした。

$$\text{Apoptotic Index} = \text{TUNEL 陽性細胞数} / \text{HPF 内の全肝細胞数} \times 100 (\%)$$

・ オスミウム浸軟走査電子顕微鏡所見

オスミウム浸軟走査電子顕微鏡は Bochimoto らの手法に準じて行った (Bochimoto et al., 2017)。IPRL 終了時点の肝より小切片を切り出し、0.5%パラホルムアルデヒドと 0.5%グルタルアルデヒドのリン酸緩衝液中で氷上 30 分間の前固定を行った。洗浄後、前固定標本を遮光ガラス瓶に入れ、共同研究者に冷蔵で送付した。前固定された標本は 1%四酸化オスミウム (Osmium Tetroxide; OsO₄) に浸してリン酸緩衝液で洗浄、25%および 50%のジメチルスルホキシドに浸した後にアルミニウムブロックの上で凍

結した。その後、標本を 0.1%OsO₄ 中に再び 20°Cで 96 時間浸軟して細胞質タンパク質を除去した。標本を 1%OsO₄ で後固定し、タンニン酸と 1% OsO₄ で染色した後に脱水し、Es-2030 凍結乾燥機 (日立、東京、日本)で凍結乾燥し、金属板にマウントし、E-1010 イオンスパッタ (日立)で白金パラジウムをコーティングし、S-4100 走査型電子顕微鏡 (日立)で観察した。

・ High Performance Liquid Chromatography; HPLC

HMP の灌流液中の Flavin mononucleotide (FMN), Flavin adenine dinucleotide (FAD), および Riboflavin (RF) を HPLC 法により測定した。HMP の灌流液を純粋なメタノールと混合して脱タンパクし、続いて遠心分離とろ過を行った。得られた脱タンパク上清のアリコートに HPLC システムに直接注入した。HPLC システムは、GASTORR BG-42 degasser (フロム、東京、日本), L-7100 pump (日立ハイテク、東京、日本), model 234 autoinjector (GILSON Inc, Middleton, WI, USA)、ATC-10 カラムオーブン (エイコム、京都、日本)、L-7400 UV 検出器 (日立)、NOD-10 UV 検出器 (エイコム)、F-1050 蛍光分光光度計 (日立)、逆相 HPLC 分析用 C18 カラム InertSustain AQ-C18 (5 μm)およびガードカラム E (ジーエルサイエンス、東京、日本)を用いた。HPLC 条件は以下の通り： ODS カラム (EICOMPAK SC5-ODS; 3 μm, 150 × 4.6 mm)、カラムオーブン (40 °C)、UV-Vis 検出器 (254 nm)、蛍光検出器 (励起 445 nm、発光 530 nm)、移動相 (A: メタノール、B: 酢酸緩衝液として A/B=35/65、v/v)、酢酸緩衝液は脱イオン水 1L 中の 4M 酢酸ナトリウム (20 mL)と 50%酢酸 (10 mL)を混合して作成した。また、測定フローは 0.7 mL/min、サンプルの注入量は 25 μL とした。FMN、FAD、RF 含量は mmol/L で表した。

・ Western Blot

凍結組織を細断しガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズした。1%プロテアーゼ阻害剤と 1%ホスファターゼ阻害剤を混合した LysoPure™ Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit を用いて核、ミトコンドリア、細胞質に分画した。分画は遠心分離を用いた。ホモジネートを 600 ×g、4°Cで 10 分間遠心分離、最初のペレットを核分画とした。この上清を 15000 ×g、4°Cで 10 分間遠心分離した。得られた上清を細胞質分画、ペレットをミトコンドリア分画とした。各分画のタンパク質濃度は、Bicinchoninic acid assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を用いて測定した。

細胞質またはミトコンドリアタンパク質の 12 μg ごとに、標準的な SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate -

Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) に、7.5% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用い、Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) により低蛍光性ポリビニリデン・ジフルオリド (Poly Vinylidene Di-Fluoride : PVDF) メンブレンに転写し、希釈したプライマリー抗体 (1 : 1000) と 4°C で一晩インキュベートした。抗体は pan-AMPK- α 、phospho-AMPK- α 、pan-SQSTM-1、phospho-SQSTM-1、ATG5、PRKN、PINK-1、pan-JNK、および phospho-JNK を用いた。その後、メンブレンをホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 二次抗体 (1 : 5000) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 二次抗体 (1 : 1000) でインキュベートした。タンパク質バンドは化学発光検出器 Chemi Doc XRS® (Bio-Rad) で検出し、Total protein normalization によって標準化した。

結 果

実験 1：ラット DCD 肝に対する HMP の有効性の確認

・PVR

IPRL による再灌流中の門脈抵抗値は、CT 群で 5 cmH₂O/mL×min×g liver 前後であり、最も低値であった。CS 群では 8-9 cmH₂O/mL×min×g liver に上昇した。MP 群では約 10 cmH₂O/mL×min×g liver であり、CS 群よりも若干高値となったが、2 群間に有意差はなかった (図 7)。

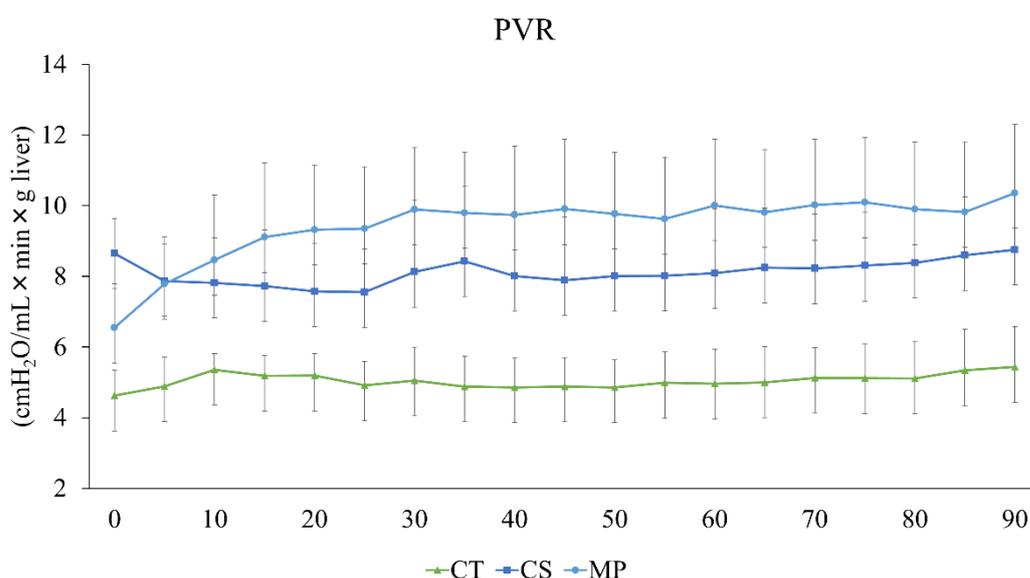


図 7 心停止肝モデルにおける CS と MP 後の再灌流時の門脈抵抗値の比較
心停止せずに脱血して摘出した CT 群の再灌流時の門脈抵抗値は有意に低値で推移した。心停止 30 分後に摘出して単純冷保存した CS 群後の再灌流時の門脈抵抗値と、同様に摘出後に低温機械灌流を行った MP 群では門脈抵抗値に有意差は認めなかった (各 n=6)。

・肝逸脱酵素活性

IPRL による再灌流 90 分後の灌流液中の肝逸脱酵素活性は、AST、ALT、LDH のすべて CT 群でそれぞれ 10.51 ± 2.30 、 1.81 ± 1.23 、 $0.91 \pm 0.31 \times 10^{-1}$ IU/g liver で最も低値であった。CS 群ではそれぞれ 35.54 ± 14.75 、 14.04 ± 6.92 、 $58.11 \pm 26.69 \times 10^{-1}$ IU/g liver と上昇した。一方で MP 群ではそれぞれ 21.42 ± 8.10 、 6.29 ± 3.71 、 $22.76 \pm 14.10 \times 10^{-1}$ IU/g liver であり、CS 群と比較して全て有意に低値となった (図 8a: 灌流液中 AST 活性、b: 灌流液中 ALT 活性、c: 灌流液中 LDH 活性)。

・酸素消費率

IPRLによる再灌流90分時点でのOCRは、CT群で $1.08 \pm 0.19 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ で最も高値であった。それに対し、CS群では $0.82 \pm 0.21 \text{ mol O}_2/\text{min/g liver}$ と低下した。MP群では $0.72 \pm 0.12 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ であり、2群間に有意差はなかった(図8d)。

・胆汁産生量

IPRLによる再灌流90分間の胆汁産生量は、CT群で $71.79 \pm 17.56 \mu\text{L/g liver}$ と最も多かった。それに対し、CS群では、 $11.76 \pm 3.21 \mu\text{L/g liver}$ であり胆汁産生量の低下を認めた。一方でMP群では、 $17.31 \pm 2.84 \mu\text{L/g liver}$ であり、CS群と比較して有意に増加した(図8e)。

・病理学的所見

IPRLによる再灌流90分後の病理所見では、CT群はHE染色で細胞傷害を疑う所見はほとんど認めなかった。それに対し、CS群とMP群では弱拡大像では細胞質の不均一な染色不良を認めた。強拡大像では多数のvacuolizationや細胞毎に不均一な染色があり、またnecrosisやapoptosisを疑う核の膨化または濃縮が確認された。TUNEL染色では、CT群でTUNEL陽性細胞を認めなかったが、CS群とMP群ともに多数のTUNEL陽性細胞を認めた。Apoptotic Indexは、CS群で $12.54 \pm 7.18 \%$ 、MP群で $14.24 \pm 6.38 \%$ であり、有意差を認めなかった。Apoptotic indexを図8fに示す。HE染色の病理所見を図9ABC、TUNEL染色の病理所見を図9DEFに示す。

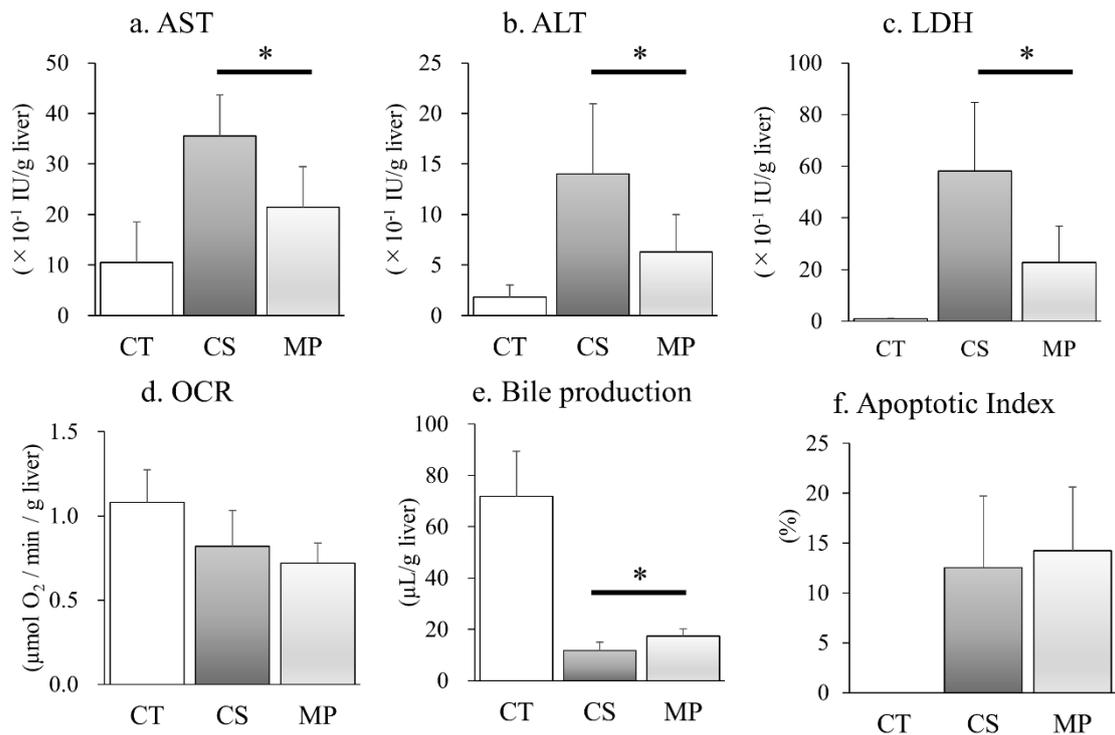


図 8 心停止肝モデルにおける CS と MP 後の再灌流時の肝逸脱酵素活性、酸素消費率、胆汁産生および Apoptotic index の比較

a-c: 再灌流後 90 分における灌流液中の肝逸脱酵素活性。全ての項目で CT 群が最も低値となった。MP 群は CS 群と比較して全て有意に低値となった。
 d: 再灌流 90 分時点の OCR。OCR は CT 群で最も高かった。CS 群と MP 群の間に有意差はなかった。
 e: 再灌流中の胆汁産生。胆汁産生量は CT 群で最も多かった。MP 群の胆汁産生量は CS 群より優位に増加した。
 f: TUNEL 染色で評価した Apoptotic index。CT 群では TUNEL 陽性細胞は検出されなかった。TUNEL 陽性細胞の比率は CS 群と MP 群に有意差はなかった。*: $p < 0.05$ を有意とした。

・ 走査電子顕微鏡所見

CT 群では細胞 1 つ 1 つの形態は保たれており、vacuolization を認めなかった。ミトコンドリアに注目するとクリステが豊富でありミトコンドリア内腔が密であった。また、細胞内に豊富なグリコーゲンが確認された。一方で CS 群では多数の vacuolization が認められ、クリステの構造が少なくなりミトコンドリア内腔が粗であった。グリコーゲンは認められなかった。MP 群では CS 群と概ね同様の形態が確認された (図 9G: CT 群の電子顕微鏡所見、図 9H: CS 群の電子顕微鏡所見、図 9I: MP 群の電子顕微

鏡所見)。

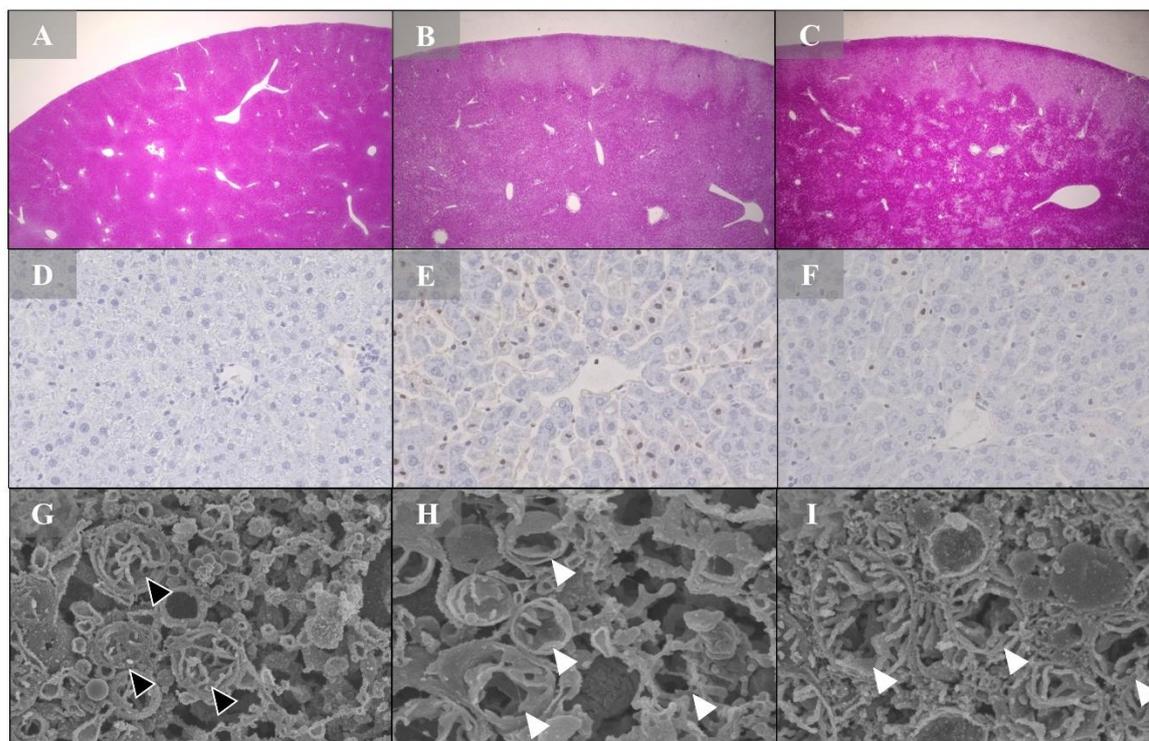


図 9 心停止肝モデルにおける CS と MP 後の再灌流後の病理所見および電子顕微鏡所見

A: CT 群の HE 染色。細胞傷害を疑う所見はほとんど認めなかった。B: CS 群と C: MP 群では弱拡大像では、肝細胞における細胞質の染色不良を認めた。D: CT 群の TUNEL 染色では TUNEL 陽性細胞を認めなかった。E: CS 群の TUNEL 染色と F: MP 群の TUNEL 染色では、ともに多数の TUNEL 陽性細胞を認めた。G: CT 群の電子顕微鏡所見。細胞の形態は保たれ、*vacuolization* を認めなかった。ミトコンドリア内腔はクリステが豊富で密であり、細胞内にグリコーゲンを豊富に認めた (▲)。H: CS 群の電子顕微鏡所見。多数の *vacuolization* が認められ、クリステの構造が少なくなりミトコンドリア内腔が粗であった (△)。グリコーゲンを認めなかった。I: MP 群の電子顕微鏡所見。CS 群と概ね同様の形態であり、内腔が粗なミトコンドリアが多く確認された (△)。

実験 2 : HMP における H₂ 添加の有効性の検討

実験 1 の結果、HMP を行うことで一定の虚血再灌流傷害抑制効果が確認された。しかし、実験 1 の HE 染色所見で肝細胞傷害が多く残存し

ていることを確認した。そのため、門脈抵抗値の低減や抗酸化作用を持つ水素ガス (H₂) に着目して実験を行った。

・PVR

IPRL による再灌流中の門脈抵抗値は、MP 群では約 10 cmH₂O/mL×min×g liver であった。MP-H₂群でも、8-10 cmH₂O/mL×min×g liver で推移しており、2群間に有意差はなかった。結果を図 10 に示す。

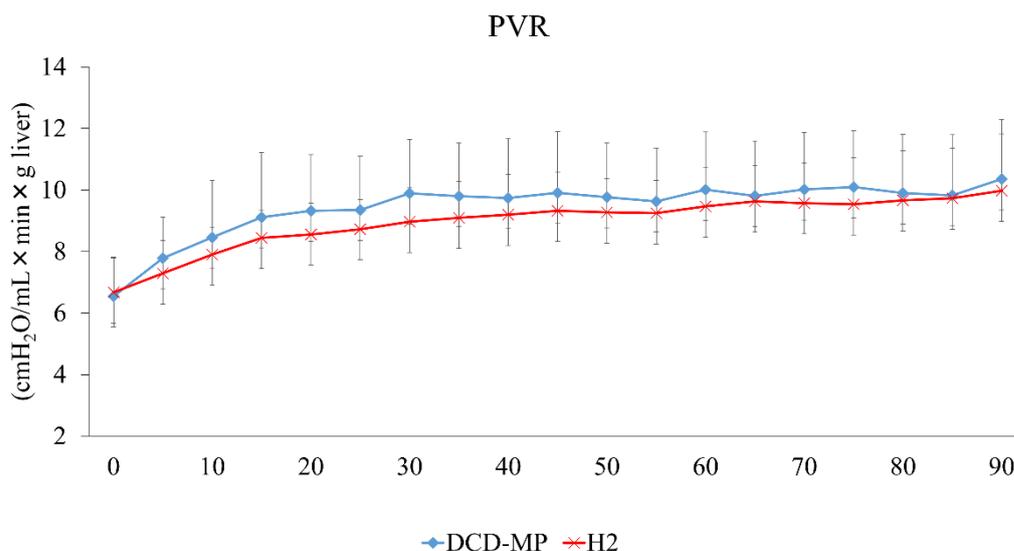


図 10 心停止肝モデルにおける MP の H₂ 添加の有無による再灌流時の門脈抵抗値の比較

心停止 30 分後に摘出して H₂ を用いずに低温機械灌流を行った MP 群後の再灌流時の門脈抵抗値と、同様に摘出後に H₂ を添加して低温機械灌流を行った MP-H₂ 群では、門脈抵抗値に有意差は認めなかった (各 n=6)。

・肝逸脱酵素活性

IPRL による再灌流 90 分後の灌流液中の肝逸脱酵素活性は、MP 群では AST、ALT、LDH がそれぞれ 21.42±8.10、6.29±3.71、22.76±14.10 × 10⁻¹ IU/g liver であった。それに対し MP-H₂ 群では、それぞれ 15.95±4.11、5.31±1.99、20.73±9.14 × 10⁻¹ IU/g liver であり、どの項目でも 2 群間に有意差はなかった (図 11 a: 灌流液中 AST 活性、b: 灌流液中 ALT 活性、c: 灌流液中 LDH 活性)。

・酸素消費率

IPRL による再灌流 90 分時点での OCR は、MP 群では 0.72±0.12 μmol O₂/min/g liver であった。MP-H₂ 群では 0.81±0.08 μmol O₂/min/g liver であり、2 群間に有意差はなかった (図 11d)。

・胆汁産生量

IPRL による再灌流 90 分間の胆汁産生量は、MP 群では 17.31 ± 2.84 $\mu\text{L/g liver}$ であった。MP-H₂ 群では 17.59 ± 2.69 $\mu\text{L/g liver}$ であり、2 群間に有意差はなかった (図 11e)。

・病理学的所見

IPRL による再灌流 90 分後の病理所見では、MP 群の HE 染色において、MP 群は LPF で肝辺縁に帯状に染色不良域を 5/6 例で認め、HPF で細胞質のまだらな染色性低下や多数の vacuolization を認めた。一方で MP-H₂ 群では LPF で肝辺縁の帯状の染色不良は 2/6 例でのみ認められた。HPF では細胞毎の不均一な染色は減少を認め、また necrosis や apoptosis の減少が示唆された。TUNEL 染色では、MP-H₂ 群で TUNEL 陽性細胞の減少を認めた。Apoptotic Index は、MP 群で 14.24 ± 6.38 %、MP-H₂ 群で 3.38 ± 2.50 % であり、有意差を認めた。Apoptotic index を図 11f に示す。HE 染色の病理所見を図 12AB、TUNEL 染色の病理所見を 12CD に示す。

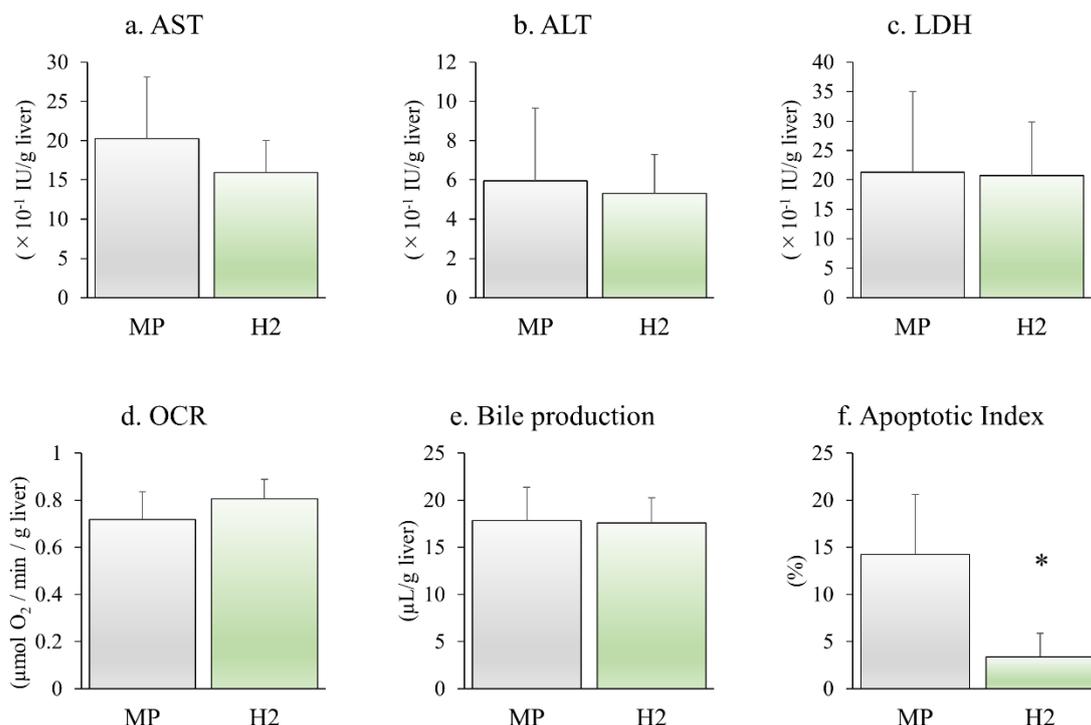


図 11 心停止肝モデルにおける MP の H₂ 添加による再灌流時の肝逸脱酵素活性、酸素消費率、胆汁産生、Apoptotic index の比較

a-c: 再灌流後 90 分における灌流液中の肝逸脱酵素活性。どの項目でも MP 群と MP-H₂ 群で有意差はなかった。 d: 再灌流 90 分時点の OCR。MP 群と MP-H₂ 群の間に有意差はなかった。 e: MP 群と MP-H₂ 群の間に有意差はな

かった。f: TUNEL 染色で評価した Apoptotic index。TUNEL 陽性細胞の比率は MP 群に対して MP-H₂ 群で有意差に低値であった。*: p<0.05 を有意とした。

・電子顕微鏡所見

MP 群と MP-H₂ 群は概ね同様の vacuolization が認められ、ミトコンドリアにおけるクリステ形態、ミトコンドリア内腔がどちらも比較的粗であることも著変はなかった (図 12E: MP 群の電子顕微鏡所見、図 12F: MP-H₂ 群の電子顕微鏡所見)。

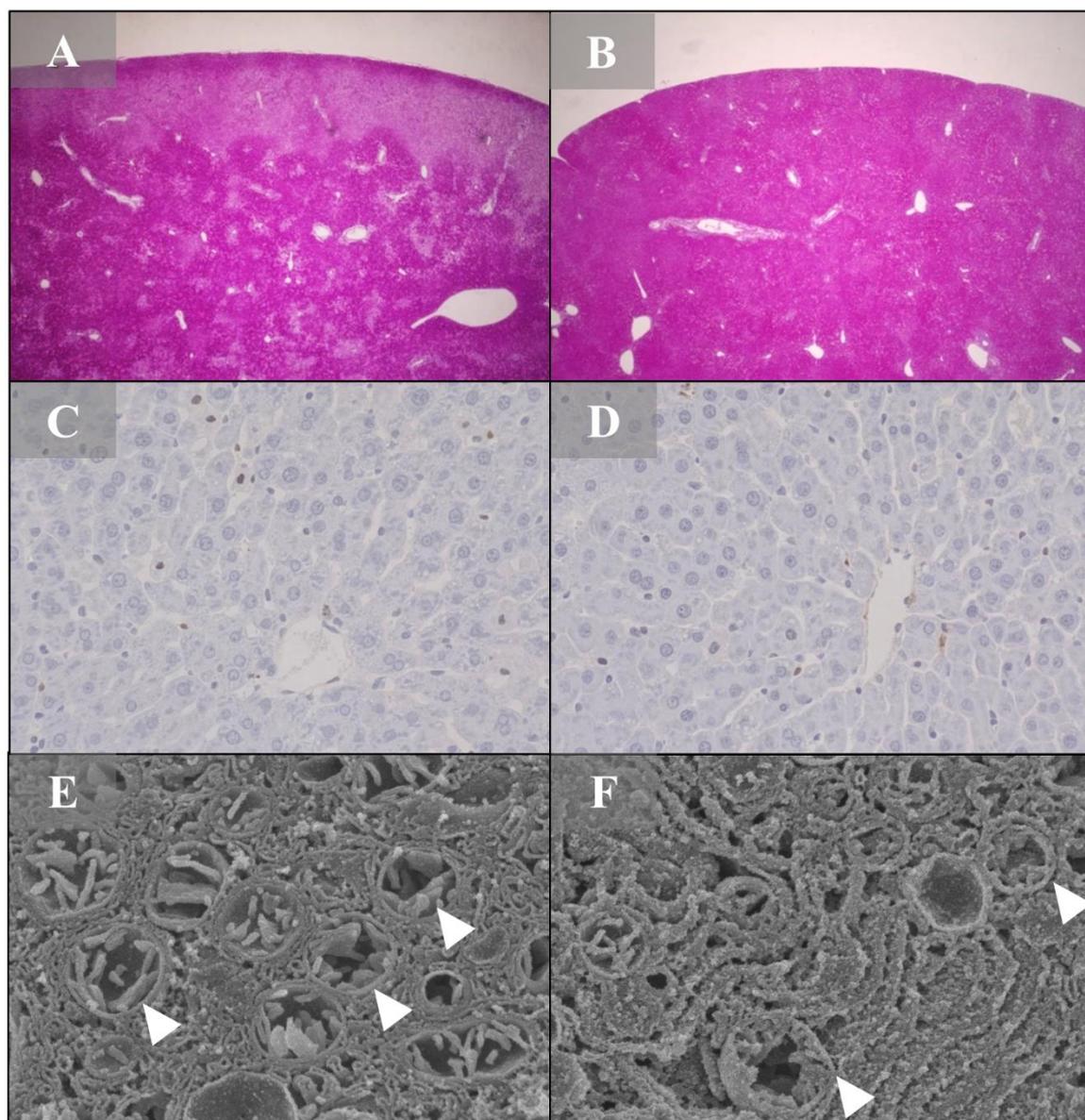


図 12 心停止肝モデルにおける MP の H₂ 添加による再灌流後の病理所見および電子顕微鏡所見

A: MP 群と B: MP-H₂ 群の HE 染色弱拡大像において、MP 群で肝細胞における細胞質の染色不良が目立ったが MP-H₂ 群では染色不良の改善が認められた。C: MP 群の TUNEL 染色では多数の TUNEL 陽性細胞を認めた。D: MP-H₂ 群の TUNEL 染色では MP 群と比較して TUNEL 陽性細胞の減少を認めた。E: MP 群の電子顕微鏡所見、F: MP-H₂ 群の電子顕微鏡所見。どちらも複数の vacuolization が認められ、ミトコンドリア構造ではクリステの構造が少なくミトコンドリア内腔が粗のものが多かった (△)。MP-H₂ 群では粗面小胞体の明瞭な構造が確認された。

実験 3: HMP における至適 pH の検討

HMP 実験を進めるなかで、UW-MP は低温時の pH が 7.4 で維持されることが確認され、温度変化に伴う pH 変化が乏しいことに着目した。既存の灌流液が至適 pH ではない可能性を考え、至適 pH を模索する実験を行った。

・ HMP 中の灌流液 pH

pH の調整を行わなかった MP 群の HMP における灌流液の pH は、7~10°C において pH 7.3-7.4 で推移した。pH を調整した MP-pH 各群では、図 13a に示すように目的通りに pH が調整された。

・ PVR

IPRL による再灌流中の門脈抵抗値は、MP 群では約 10 cmH₂O/mL×min×g liver であった。MP-pH 群でも、すべて 9-10 cmH₂O/mL×min×g liver で推移しており、有意差は認めなかった (図 13b)。

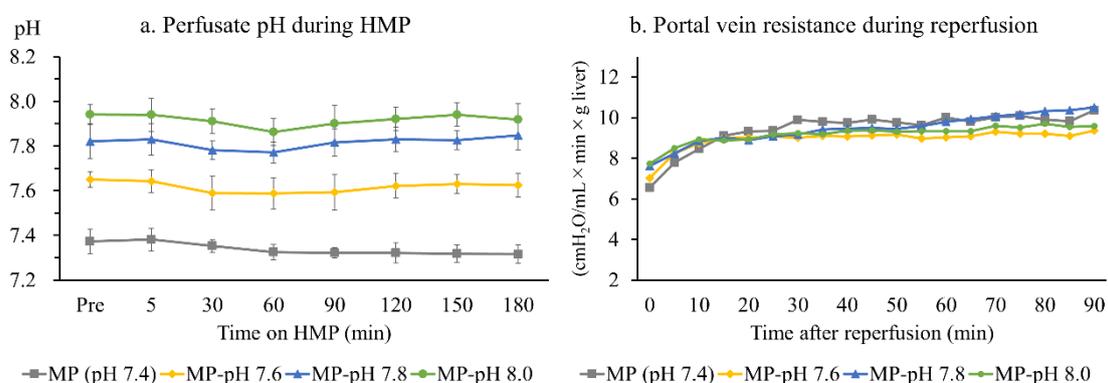


図 13 心停止肝モデルにおける HMP 時の pH 調整の推移および再灌流時の門脈抵抗値の比較

a: MP 群の 7~10°C の HMP における灌流液の pH は約 7.4 で推移した。pH を調整した MP-pH 各群では目的通りに pH が調整された。b: 心停止 30 分後に摘出して pH を調節せずに低温機械灌流を行った MP 群後の再灌流時の門脈抵抗値と、同様に摘出後に pH をそれぞれ調整して低温機械灌流を行った MP-pH 各群では、門脈抵抗値に有意差は認めなかった (各 n=6)。

・肝逸脱酵素活性

IPRL による再灌流 90 分後の灌流液中の肝逸脱酵素活性は、MP 群では AST、ALT、LDH がそれぞれ 21.42 ± 8.10 、 6.29 ± 3.71 、 $22.76 \pm 14.10 \times 10^{-1}$ IU/g liver であった。それに対し MP-pH 7.6 群では、それぞれ 14.42 ± 2.32 、 3.66 ± 1.76 、 $14.74 \pm 8.52 \times 10^{-1}$ IU/g liver、MP-pH 7.8 群では、それぞれ 11.64 ± 2.90 、 2.95 ± 0.68 、 $17.11 \pm 6.76 \times 10^{-1}$ IU/g liver、MP-pH 8.0 群では、それぞれ 17.46 ± 4.20 、 5.42 ± 2.49 、 $25.14 \pm 13.08 \times 10^{-1}$ IU/g liver であり、AST において MP 群と MP-pH 7.8 群に有意差を認めた (図 14a: 灌流液中 AST 活性、b: 灌流液中 ALT 活性、c: 灌流液中 LDH 活性)。

・酸素消費率

IPRL による再灌流 90 分時点での OCR は、MP 群では 0.72 ± 0.12 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ であった。MP-pH 7.6 群では 0.81 ± 0.12 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ 、MP-pH 7.8 群では 0.78 ± 0.06 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ 、MP-pH 8.0 群では 0.89 ± 0.19 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ であり、有意差は認めなかった (図 14d)。

・胆汁産生量

IPRL による再灌流 90 分間の胆汁産生量は、MP 群では 17.31 ± 2.84 $\mu\text{L/g liver}$ であった。MP-pH 7.6 群では 18.30 ± 4.94 $\mu\text{L/g liver}$ 、MP-pH 7.8 群では 23.03 ± 5.69 $\mu\text{L/g liver}$ 、MP-pH 8.0 群では 19.84 ± 3.30 $\mu\text{L/g liver}$ であり、MP-pH 7.8 群が最も高値であった (図 14e)。

・病理学的所見

IPRL による再灌流 90 分後の病理所見では、MP 群の HE 染色において多数の vacuolization と核の凝縮・膨潤、染色の不均一性が認められたが、MP-pH 群、特に MP-pH 7.8 ではこれらの所見は減少していた。TUNEL 染色では、MP-pH 群では TUNEL 陽性細胞数が減少する傾向にあったが、Apoptotic Index に有意な差はなかった。Apoptotic index を 14f に示す。HE 染色の病理所見を図 15ABCD、TUNEL 染色の病理所見を図 15EFGH に示す。

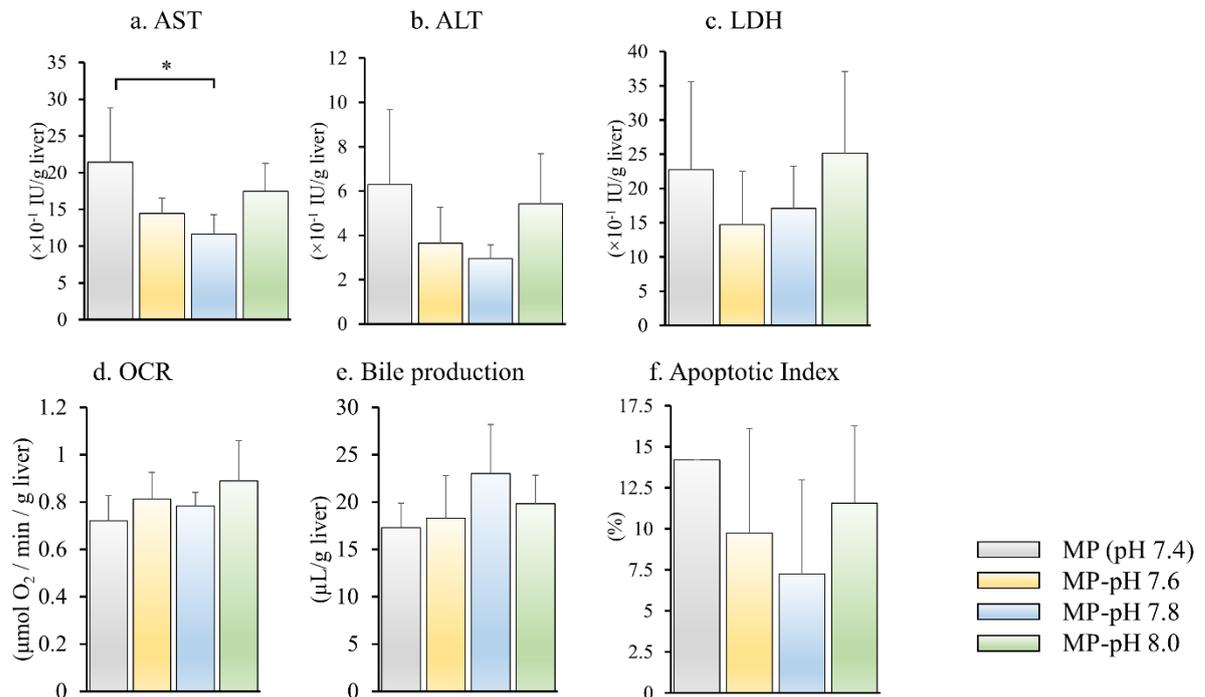


図 14 心停止肝モデルにおける HMP 時の pH の調整による再灌流時の肝逸脱酵素活性、酸素消費率、胆汁産生、Apoptotic index の比較

a-c: 再灌流後 90 分における灌流液中の肝逸脱酵素活性。AST において MP 群と MP-pH 7.8 群の間に有意差を認めた。ALT でも MP-pH 7.8 群が低下傾向を示したが、有意差はなかった。d: 再灌流 90 分時点の OCR。各群間に有意差を認めなかった。e: 再灌流 90 分間の胆汁産生量。各群間に有意差はなかったが、MP-pH 7.8 群で増加傾向を認めた。f: TUNEL 染色で評価した Apoptotic index。TUNEL 陽性細胞の比率に有意差はないが、MP-pH 7.8 群で最も低値であった。*: MP 群を control とした Dunnett 検定、 $p < 0.05$ を有意とした。

・電子顕微鏡所見

IPRL による再灌流 90 分後の電子顕微鏡所見において MP 群および MP-pH 群は、それぞれ低倍率で細胞の一般的な構造が保たれていた。しかし、ミトコンドリアに注目すると、グループ間でクリステの密度と構造に違いを認めた。MP 群のミトコンドリアは扁平な構造を持ち、棍棒状構造は少なく、クリステの密度は疎であった。MP-pH 7.6 群と pH 8.0 群では、これらのクリステ構造の一部が保たれていた。一方、pH 7.8 群では、棍棒状の構造と高密度のクリステが保たれた所見が多く確認された(図 15I: MP 群の電子顕微鏡所見、図 15J: MP-pH 7.6 群の電子顕微鏡所見、図 15K:

MP-pH 7.8 群の電子顕微鏡所見、図 14L: MP-pH 7.8 群の電子顕微鏡所見)。

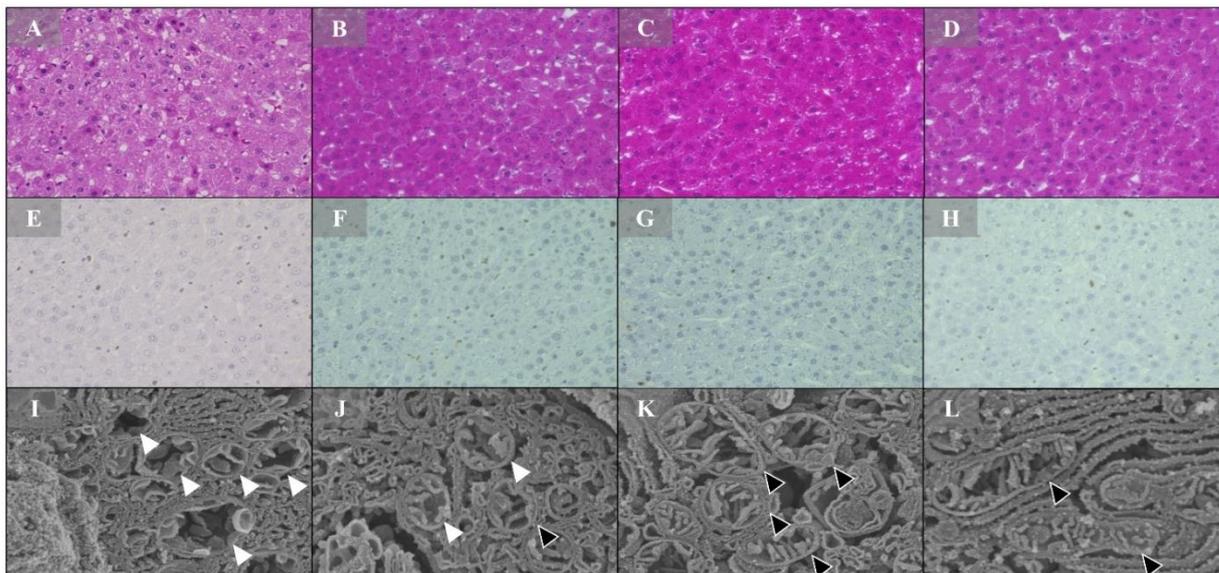


図 15 心停止肝モデルにおける HMP 時の pH の調整による再灌流後の病理所見と電子顕微鏡所見

A: MP 群、B: MP-pH 7.6 群、C: MP-pH 7.8 群、D: MP-pH 8.0 群の HE 染色強拡大像。MP 群の HE 染色において多数の vacuolization と核の凝縮・膨潤、染色の不均一性が認められたが、MP-pH 群、特に MP-pH 7.8 ではこれらの所見は減少していた。

E: MP 群、F: MP-pH 7.6 群、G: MP-pH 7.8 群、H: MP-pH 8.0 群の TUNEL 染色強拡大像。MP 群では多数の TUNEL 陽性細胞を認めた。MP-pH 各群の TUNEL 染色では MP 群と比較して TUNEL 陽性細胞の減少を認めたが、Apoptotic index に有意差はなかった。

I: MP 群、J: MP-pH 7.6 群、K: MP-pH 7.8 群、L: MP-pH 8.0 群の再灌流 90 分後の電子顕微鏡所見。MP 群および MP-pH 群はミトコンドリアのクリステの密度と構造に違いを認めた。MP 群のミトコンドリアは扁平な構造を持ち、棍棒状構造は少なく、クリステの密度は疎であった (Δ)。MP-pH 7.6 群と pH 8.0 群では、これらのクリステ構造の一部が保たれていた。一方、pH 7.8 群では、棍棒状の構造と高密度のクリステが保たれた所見 (\blacktriangle) が多く確認された。

・電子伝達系物質

ミトコンドリア傷害の指標として、HPLC を用いて HMP 灌流液中の FMN を測定した。すべての群で FMN は経時的に増加傾向を示し、HMP 終了時に最高値となった。特に MP 群の 180 分時点で最も高い値であ

る 5.07 ± 1.92 mmol/L となった。MP-pH 7.6 群、pH 7.8 群、pH 8.0 群では概ね同程度の推移となった。HMP 180 分の HMP 終了時の MP-pH 7.8 群の灌流液の FMN は 2.75 ± 1.37 mmol/L であり、MP 群と比較して有意差を認めた。同じ蛍光波長を用いて検出される他のビタミン B2 群である FAD および RF も測定したが、FAD と RF の推移は有意な変化を示さなかった (図 16)。

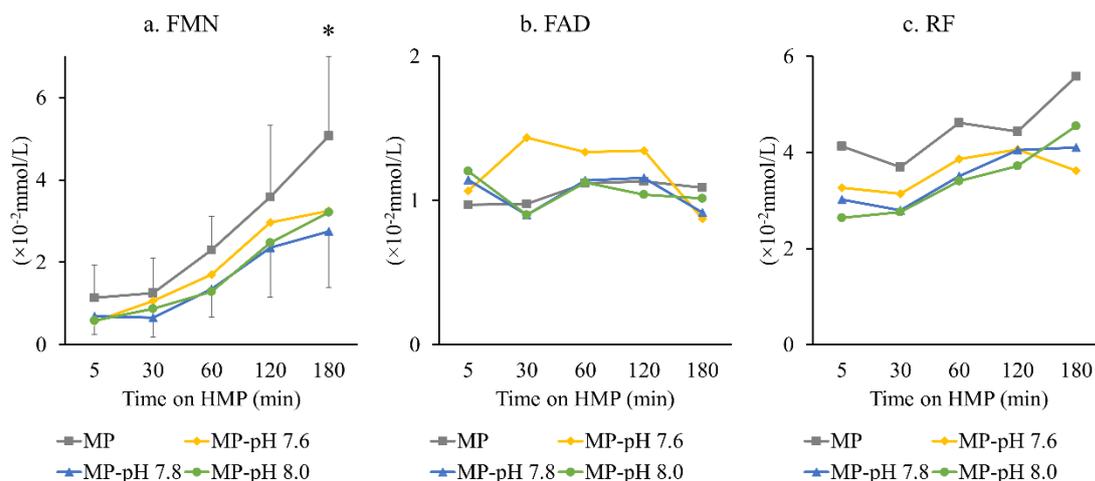


図 16 心停止肝モデルにおける HMP 時の pH の調整による FMN、FAD および RF の比較

HMP 灌流液中の FMN、FAD、RF を HPLC を用いて測定した。すべての群で FMN は経時的に増加傾向を示した。180 分時点の MP 群の FMN が最も高値となった。HMP 終了時の MP-pH 7.8 群の灌流液の FMN は、MP 群と比較して有意に低値となった。FAD と RF の推移は有意な変化を示さなかった。*: MP 群を control とした Dunnett 検定、 $p < 0.05$ を有意とした。

・オートファジーや炎症シグナル

細胞質タンパクにおける AMPK- α 、SQSTM-1、ATG5、ミトコンドリアタンパクにおける PRKN、および PINK-1 をウェスタンブロッティングで測定し、マクロおよびミクロオートファジーを評価した。AMPK- α および SQSTM-1 は、活性化シグナルの比率を示す phospho/pan で示した。ATG5、PRKN、PINK-1 は標準化したバンドシグナルを示す。いずれのシグナルにも群間差は認められなかった。細胞質およびミトコンドリアタンパクにおける MKK4-JNK 経路をウェスタンブロッティングで測定して炎症シグナルについて評価した。JNK は前述のように phospho/pan で示した。細胞質およびミトコンドリアの JNK は各群間に有意差はなかった (図 17)。

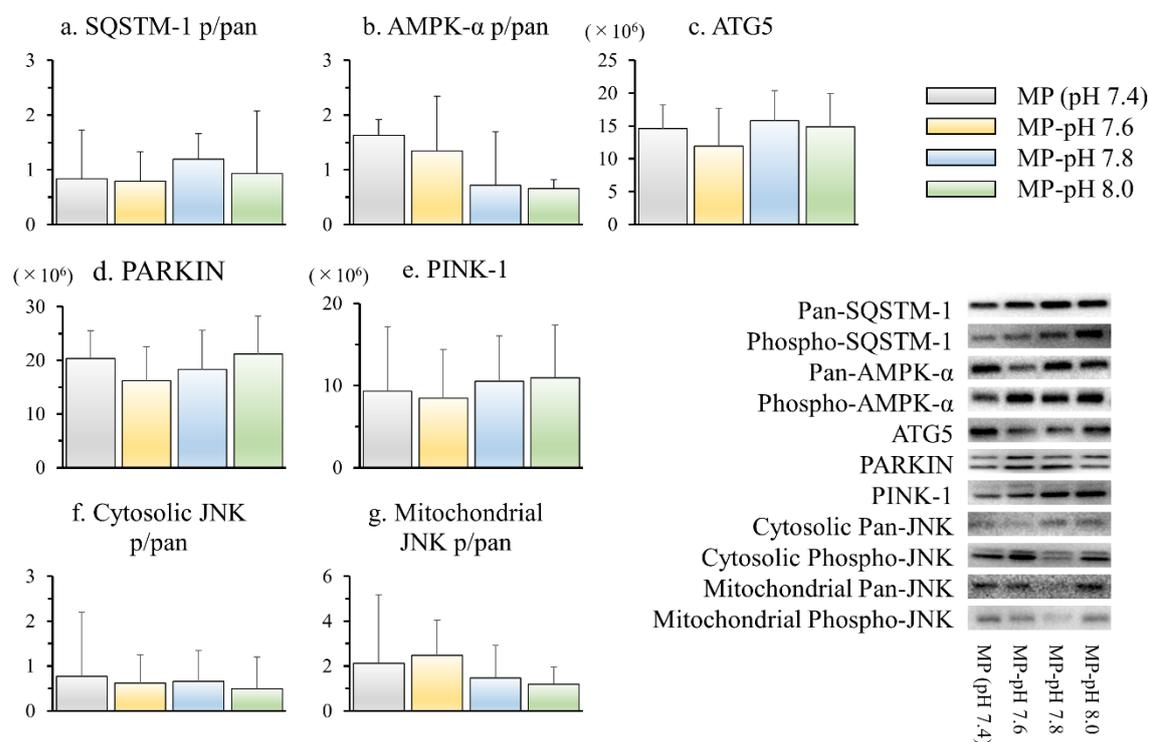


図 17 心停止肝モデルにおける HMP 時の pH の調整による再灌流後のオートファジーや炎症シグナルの比較

細胞質タンパクにおける AMPK- α 、SQSTM-1、ATG5、ミトコンドリアタンパクにおける PRKN、および PINK-1 をウェスタンブロッティングで測定した。AMPK- α および SQSTM-1 は、活性化シグナルの比率を示す phospho/pan で示した。ATG5、PRKN、PINK-1 は標準化したバンドシグナルを示す。いずれのシグナルにも群間差は認められなかった。細胞質およびミトコンドリアタンパクにおける MKK4-JNK 経路をウェスタンブロッティングで測定した。JNK は前述のように phospho/pan で示した。各群間に有意差はなかった。

実験 4 : HMP における新規灌流液 FJH の有効性の検討

実験 3 で HMP 中の至適 pH は 7.8 である可能性が示唆された。

HMP 中に pH が変動せず、至適 pH で維持されるよう新規灌流液 FJH を開発し、その有効性を確認する実験を行った。

・ HMP 中の灌流液 pH

pH の調整を行わなかった MP 群の HMP における灌流液の pH は、7~10°C において図 18a に示すように変動した。pH を調整した MP-pH 7.8 群では図 18a に示すように目的通りに pH を調整した。FJH で HMP を行った MP-

FJH 群では灌流中に調整を行わなかったが pH の変動が少なかった。

・ PVR

IPRL による再灌流中の門脈抵抗値は、MP 群では約 8cmH₂O/mL×min×g liver であった。MP-pH 7.8 群でも約 8-9cmH₂O/mL×min×g liver で推移した。一方で MP-FJH 群では約 6cmH₂O/mL×min×g liver で経過しており、多くの時間で MP 群と MP-pH 7.8 群と比較して有意差を認めた (図 18b)。

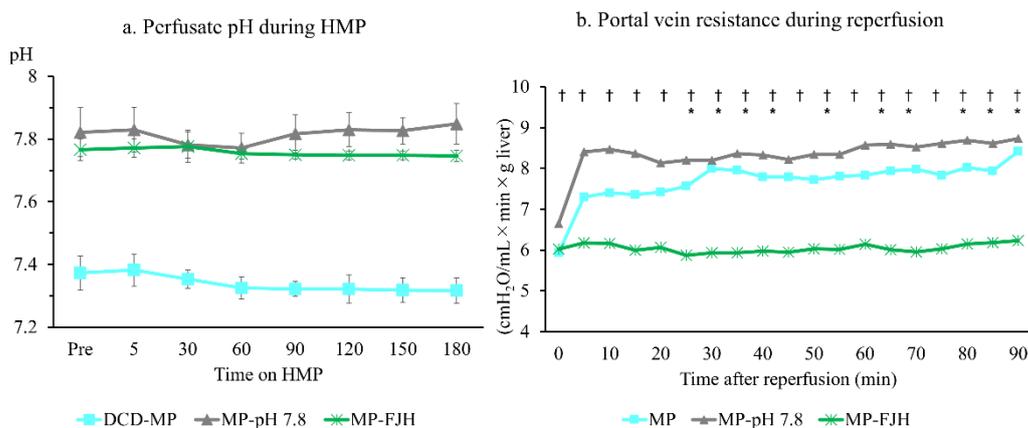


図 18 新液 FJH を用いた心停止肝モデルにおける HMP 時の pH の推移および再灌流時の門脈抵抗値の比較

a: MP 群の 7~10°C の HMP における灌流液は約 pH 7.4 で推移した。MP-pH 7.8 群では目的通りに pH が調整された。MP-FJH は HMP 中に pH の調整は行っていないが、約 pH 7.8 で推移した。b: 再灌流中の門脈抵抗値は、MP 群と MP-pH 7.8 群の間では有意差を認めなかった。一方で MP-FJH 群では多くの時間で MP 群と MP-pH 7.8 群と比較して有意差な低下を認めた。Tukey-Kramer の HSD 検定で $p < 0.05$ の場合を有意とした。*: MP 群と比較して $p < 0.05$ 。†: MP-pH 7.8 群と比較して $p < 0.05$ 。

・ 肝逸脱酵素活性

IPRL による再灌流 90 分後の灌流液中の肝逸脱酵素活性は、MP 群では AST、ALT、LDH がそれぞれ 18.78 ± 5.74 、 6.56 ± 2.63 、 $21.96 \pm 5.24 \times 10^{-1}$ IU/g liver であった。それに対し MP-pH 7.8 群では、それぞれ 13.02 ± 3.19 、 3.28 ± 0.97 、 $13.52 \pm 4.61 \times 10^{-1}$ IU/g liver、MP-FJH 群では、それぞれ 9.20 ± 1.42 、 1.46 ± 0.54 、 $3.18 \pm 1.33 \times 10^{-1}$ IU/g liver であった。AST では MP 群と MP-FJH 群に有意差を認めた。ALT では MP 群と比較して pH 7.8 群、FJH 群に有意差を認めた。LDH では MP 群と比較して pH 7.8

群、FJH 群に有意差を認め、pH 7.8 群と比較して FJH 群に有意差を認めた (図 19a: 灌流液中 AST 活性、b: 灌流液中 ALT 活性、c: 灌流液中 LDH 活性)。

- ・酸素消費率

IPRL による再灌流 90 分時点での OCR は、MP 群では 0.83 ± 0.087 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ であった。MP-pH 7.8 群では 0.86 ± 0.14 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ 、MP-FJH 群では 1.12 ± 0.13 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g liver}$ であり、FJH 群は MP 群と pH 7.8 群のどちらとも有意差を認めた (図 19d)。

- ・胆汁産生量

IPRL による再灌流 90 分間の胆汁産生量は、MP 群では 20.27 ± 1.89 $\mu\text{L/g liver}$ 、MP-pH 7.8 群では 22.08 ± 3.30 $\mu\text{L/g liver}$ 、MP-FJH 群では 21.39 ± 3.71 $\mu\text{L/g liver}$ であり、3 群間に有意差を認めなかった (図 19e)。

- ・病理学的所見

IPRL による再灌流 90 分後の病理所見では、第三章と同様に MP 群の HE 染色において vacuolization や核の凝縮・膨潤、染色の不均一性が確認されたが、pH 7.8 ではこれらの所見は減少していた。FJH 群ではこれらの所見はほとんど認められなかった。TUNEL 染色では、pH 7.8 群と FJH 群で TUNEL 陽性細胞数が減少する傾向を認めた。Apoptotic Index は MP 群と FJH 群に有意差を認めた。HE 染色の弱拡大像を図 19ABC、HE 染色の強拡大像を図 19DEF、TUNEL 染色の病理所見を図 19GHI に示す。

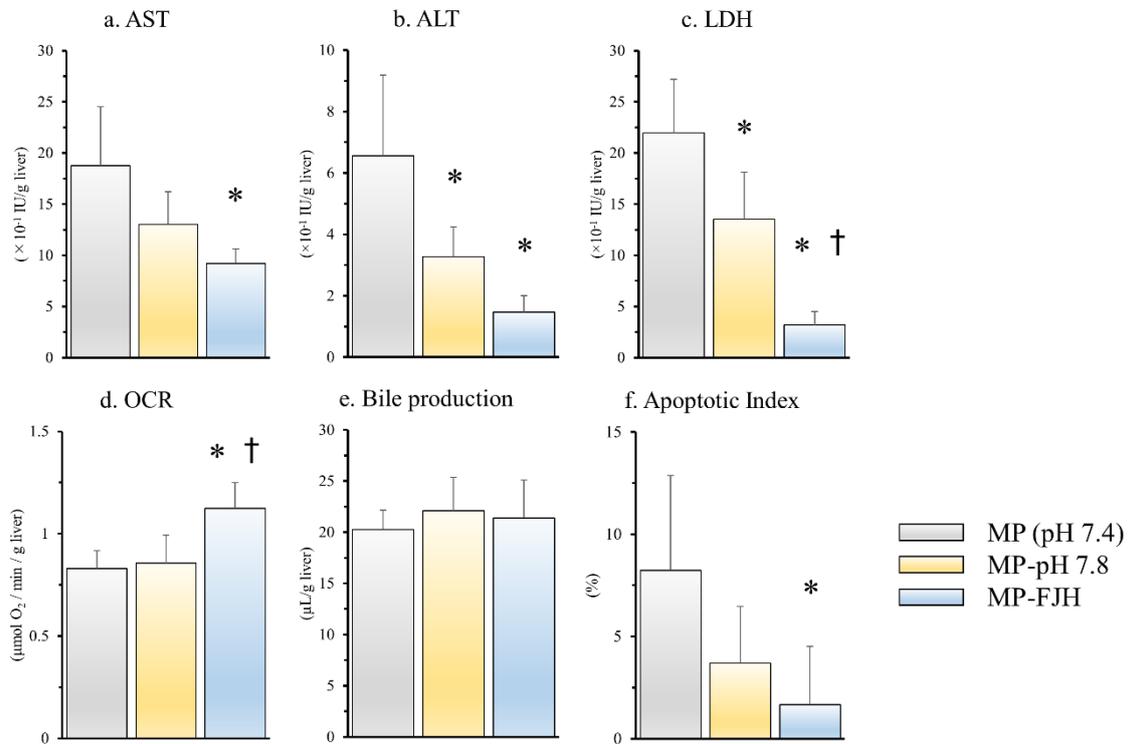


図 19 新液 FJH を用いた心停止肝モデルにおける HMP による再灌流時の肝逸脱酵素活性、酸素消費率、胆汁産生、Apoptotic index の比較

a-c: 再灌流後 90 分における灌流液中の肝逸脱酵素活性。AST において MP 群と MP-FJH 群で有意差を認めた。ALT は MP 群と比較して MP-pH 7.8 群と MP-FJH 群のどちらも有意な低下を認めた。LDH は MP 群と比較して MP-pH 7.8 群と MP-FJH 群のどちらも有意な低下を認め、MP-pH 7.8 群と MP-FJH 群の間でも有意差を認めた。d: 再灌流 90 分時点の OCR。MP-FJH 群は他の 2 群と比較して有意な上昇を認めた。e: 再灌流 90 分間の胆汁産生量。各群間に有意差はなかった。f: TUNEL 染色で評価した Apoptotic index。MP 群と比較して MP-FJH 群は有意に低値であった。Tukey-Kramer の HSD 検定で $p < 0.05$ の場合を有意とした。*: MP 群と比較して $p < 0.05$ 。†: MP-pH 7.8 群と比較して $p < 0.05$ 。

・電子顕微鏡所見

IPRL による再灌流 90 分後の電子顕微鏡所見において、第三章と同様に MP 群のミトコンドリアは扁平な構造を持ち、棍棒状構造は少なく、クリステの密度は疎であった。pH 7.8 群と FJH 群では、棍棒状の構造と高密度のクリステが保たれた所見が多く確認された(図 20J: MP 群の電子顕微

鏡所見、図 20K: MP-pH 7.8 群の電子顕微鏡所見、図 20L: MP-FJH 群の電子顕微鏡所見)。

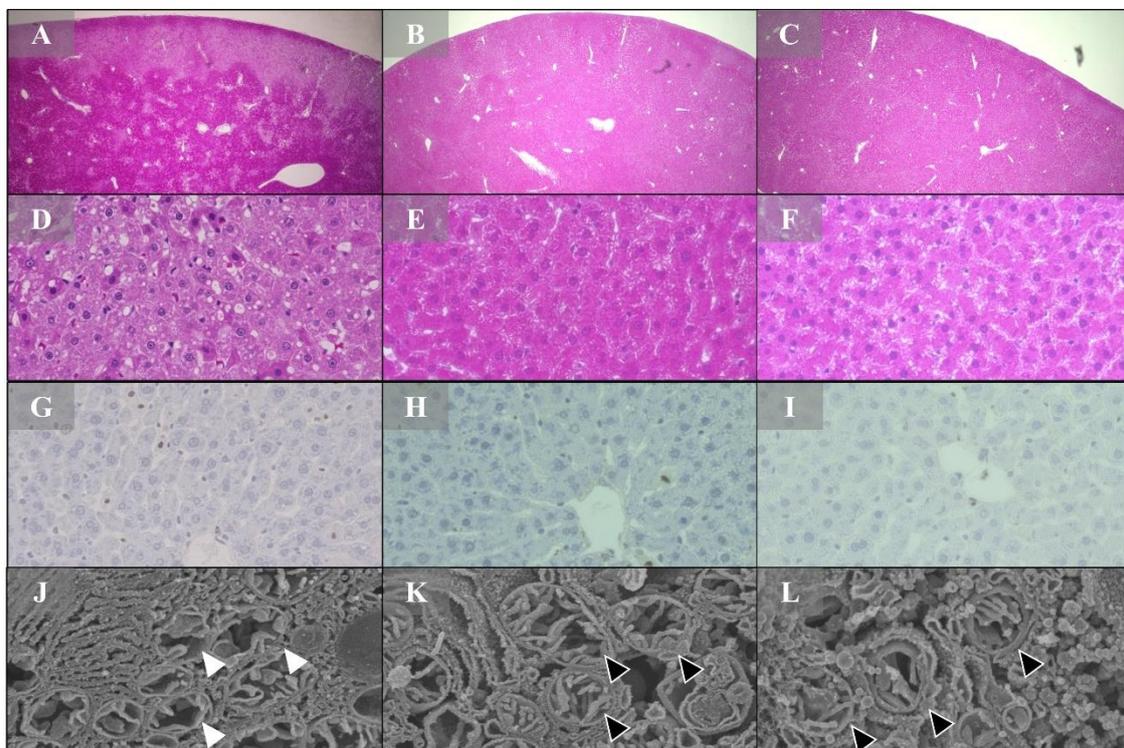


図 20 新液 FJH を用いた心停止肝モデルにおける HMP による再灌流後の病理所見と電子顕微鏡所見。

A : MP 群、B : MP-pH 7.8 群、C : MP-FJH 群の HE 染色弱拡大像。MP 群では細胞質の不均一な染色不良を認めたのに対し、MP-pH 7.8 群と MP-FJH 群では染色不良域は認めなかった。D : MP 群、E : MP-pH 7.8 群、F : MP-FJH 群の HE 染色強拡大像。MP 群の HE 染色において多数の vacuolization と核の凝縮・膨潤、染色の不均一性が認められたが、MP-pH 7.8 群および MP-FJH 群ではこれらの所見は減少していた。G : MP 群、H : MP-pH 7.8 群、I : MP-FJH 群の TUNEL 染色強拡大像。MP 群では多数の TUNEL 陽性細胞を認めた。MP-pH 7.8 群と MP-FJH 群では TUNEL 陽性細胞の減少を認め、MP 群と比較して MP-FJH 群では有意に Apoptotic index が減少した。J : MP 群、K : MP-pH 7.8 群、L : MP-FJH 群の再灌流 90 分後の電子顕微鏡所見。MP 群のミトコンドリアは扁平な構造を持ち、棍棒状構造は少なく、クリステの密度は疎であった (Δ)。MP-pH 7.8 群や MP-FJH 群では棍棒状の構造と高密度のクリステが保たれた所見が多く確認され (\blacktriangle)、疎な内腔のミトコンドリアは減少していた。

・電子伝達系物質

第三章と同様にすべての群で FMN は経時的に増加傾向を示し、HMP 終了時に最高値となった。180 分時点の FMN は MP 群で 3.59 ± 1.79 mmol/L、pH 7.8 群で 2.64 ± 1.31 mmol/L、FJH 群で 1.49 ± 0.65 mmol/L であり、MP 群と FJH 群で有意差を認めた。第三章と同様に FAD と RF では各群に有意差を求めなかった (図 21)。

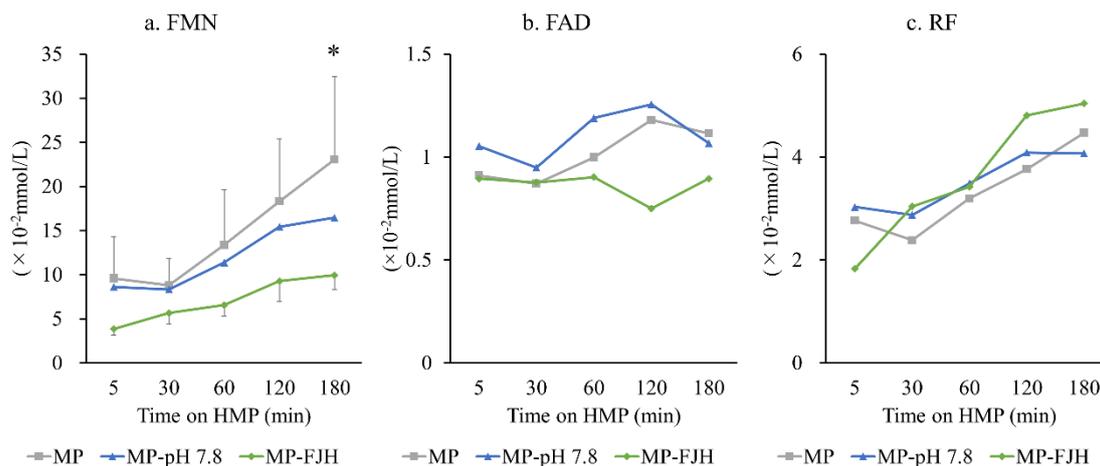


図 21 新液 FJH を用いた心停止肝モデルにおける HMP 時の FMN、FAD および RF の比較

HMP 灌流液中の FMN、FAD、RF を HPLC を用いて測定した。すべての群で FMN は経時的に増加傾向を示した。180 分時点の MP 群の FMN が最も高値となった。HMP 終了時の MP-FJH 群の灌流液の FMN は、MP 群と比較して有意に低値となった。MP-pH 7.8 群は他群と有意差はなかった。FAD と RF の推移は有意な変化を示さなかった。Tukey-Kramer の HSD 検定で $p < 0.05$ の場合を有意とした。*: MP 群と MP-FJH 群を比較して $p < 0.05$ 。

・オートファジーや炎症シグナル

第三章と同様に細胞質タンパクにおける AMPK- α 、SQSTM-1、ATG5、ミトコンドリアタンパクにおける PRKN、および PINK-1 をウェスタンブロッティングで測定し、マクロおよびミクロオートファジーを評価した。AMPK- α および SQSTM-1 は、活性化シグナルの比率を示す phospho/pan で示した。ATG5、PRKN、PINK-1 は標準化したバンドシグナルを示す。いずれのシグナルにも群間差は認められなかった。細胞質およびミトコンドリアタンパクにおける MKK4-JNK 経路をウェスタンブロッティングで測定して炎症シグナルについて評価した。JNK は前述のように

phospho/pan で示した。細胞質およびミトコンドリアの JNK の各群間に有意差はなかった (図 22)。

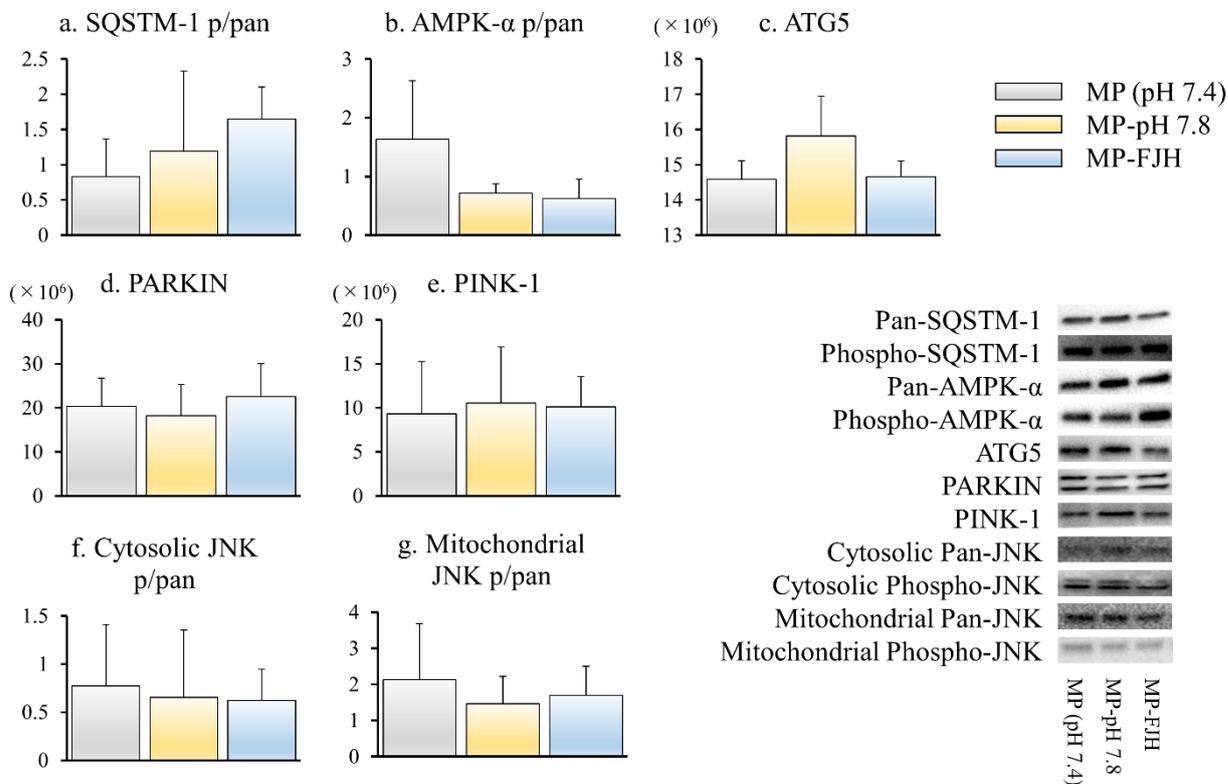


図 22 新液 FJH を用いた心停止肝モデルにおける HMP による再灌流後のオートファジーや炎症シグナルの比較

細胞質タンパクにおける AMPK-α、SQSTM-1、ATG5、ミトコンドリアタンパクにおける PRKN、および PINK-1 をウェスタンブロッティングで測定した。AMPK-α および SQSTM-1 は、活性化シグナルの比率を示す phospho/pan で示した。ATG5、PRKN、PINK-1 は標準化したバンドシグナルを示す。いずれのシグナルにも群間差は認められなかった。細胞質およびミトコンドリアタンパクにおける MKK4-JNK 経路をウェスタンブロッティングで測定した。JNK は前述のように phospho/pan で示した。各群間に有意差はなかった。

考 察

実験 1 では HMP の虚血再灌流傷害に対する抑制効果をラットの DCD 肝、IPRL を用いて確認した。その結果、HMP を行うと、CS と比較して再灌流時の肝逸脱酵素活性が低下し、胆汁産生量が増加した。しかし、門脈抵抗は低下せず、酸素消費率は上昇せず、病理学的所見では肝細胞傷害を疑う染色不良域が多く残存しており、アポトーシスが低減されなかった。電子顕微鏡所見でも温阻血によるミトコンドリア傷害の残存が示唆された。HMP は DCD 肝に対して一定の効果はあるものの、移植に耐えうる虚血再灌流傷害の顕著な抑制は得られなかった。DCD 肝に対する HMP は CS と比較して虚血再灌流傷害低減に一定の有効性が確認された。しかし、その効果は限定的であり、特に病理所見で肝細胞傷害を疑う染色不良域が多く残存しており、UW-MP 液を用いた低温機械灌流では低温による門脈抵抗増大などから循環不全の可能性を考えた。門脈拡張作用や抗酸化作用をもつ H₂ の HMP における有効性を検討した。

実験 2 では UW-MP を用いた HMP に H₂ を加えることで、apoptosis が抑制されていることが確認された。しかし H₂ を加えても、肝逸脱酵素活性や胆汁産生量、門脈抵抗値、酸素消費率などの臓器機能の改善は認められなかった。H₂ は抗酸化作用を有し、虚血再灌流時に用いることで門脈抵抗値を低減させて虚血再灌流障害を低減することが報告されている (Ishikawa et al., 2018) が、本実験では HMP 中の門脈抵抗値の軽度低下が確認されたものの、再灌流時の門脈抵抗値は低下しなかった。病理所見から H₂ は循環不良を改善させ apoptosis を減少させている可能性は示唆されたが、HMP の明らかな効果増幅は認められなかった。肝における HMP はミトコンドリア機能の改善や、ATP の蓄積により再灌流障害を低減すると考えられているが、その効果を増幅させる効果は H₂ にはないと考えられた。

次に実験 3 として 7-10°C において UW-MP 液を pH 7.4 (原液)、pH 7.6、pH 7.8、pH 8.0 に調節した HMP を行い、IPRL による虚血再灌流傷害を評価して比較検討を行った。HMP 時の灌流液を pH 7.8 に調整することで再灌流時の AST の低下が認められ、虚血再灌流による肝細胞傷害の低下が示された。pH 7.8 の HMP では胆汁産生量も多い傾向であり肝の合成能が最も保持されている可能性が示唆された。また、HMP 中の灌流液における FMN は、pH 7.4 の HMP では時間経過とともに上昇傾向を認めているが、pH 7.8 に調整することで上昇の抑制が確認された。評価した pH 値の中では、pH 7.8 の HMP が最適な選択肢であった。これらの結果から、HMP 中に酸塩基平衡を pH 7.8 前後の許容範囲内に維持することが、DCD 肝にお

ける再灌流後の傷害の改善につながったことが示唆される。

本研究では特に pH 7.4、7~10°Cでの HMP の修復効果は不十分であると考えた。この結果は低温において pH 7.4 は細胞外液として acidosis であり臓器修復における至適条件ではないと考える。生体のホメオスタシスから 37°Cにおける細胞内環境と細胞外環境の至適 pH をそれぞれ 7.200 と 7.400 と仮定して pH が Rosenthal 因子 (-0.0147)に従って変化すると、7°Cにおける細胞内液と細胞外液の pH 値はそれぞれ 7.641 と 7.841 になる。この細胞外液における pH は本実験の最も成績が良かった pH と一致しており、細胞外環境における至適 pH は 7.8 前後であることを裏付ける。低体温における pH の変化を十分に理解し、pH を適切にコントロールすることで、HMP は再灌流障害をさらに抑制し、その修復効果を十分に発揮することができる。

pH を調節した HMP では、pH を調節しなかった HMP に比べて FMN の増加が抑制された。特に pH 7.8 で顕著な抑制が観察され、HMP のミトコンドリアの ETC における Complex I に対する保護効果は、7°Cでのアシドーシスを回避することで増強されることが示唆された。これまでの研究で、HMP における FMN 放出は虚血再灌流傷害と関連しており、ミトコンドリア傷害のマーカーであることが報告されている (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2021)。しかし、これまでの報告では、ビタミン B2 種である FAD、FMN、RF を分離せずに蛍光強度が測定されていた。本研究では、FAD と RF は pH が調節された HMP と調節されていない HMP の間で差を示さなかったが、FMN は有意な差を示した。これらの結果は、FMN のみが HMP 中のミトコンドリア傷害のマーカーであることを示唆している。

SEM 所見では、ミトコンドリアの大きさとミトコンドリア内膜構造であるクリステの違いが観察された。ミトコンドリア内膜の形態は、ATP 合成のための内膜を横切るプロトン勾配の形成に重要であり、ミトコンドリア内膜の密度増加はミトコンドリアの ATP 産生能を変化させる (Heine et al., 2022; Plecítá-Hlavatá and Ježek, 2016)。温度などの外的要因もミトコンドリアのサイズや内外のミトコンドリア膜の面積比を変化させ (Malatesta et al., 2009)、脂質組成や不飽和度などの内的要因はエネルギー生産能力を変化させる (Gallardo-Montejano et al., 2021)。これらの様々な内的・外的因子の変化は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の場であるクリステを含むミトコンドリアの構造と機能を動的に制御する。酸素を高速で輸送する不飽和度の高い脂肪酸のミトコンドリア膜構成、脂肪滴組成、

シトクロム酸化酵素の発現量などが動的に調節されている (Thorniley et al., 1995)。今回のオスミウム浸漬 SEM による観察結果は、これらの報告と一致していた。また、低温保存および低温灌流による心停止臓器障害モデルにおいて、クリステの長さ、ミトコンドリアの大きさ、ミトコンドリア - 小胞体接触面積、ミトコンドリア - 脂質滴接触面積を評価する評定法を確立することで、このモデルで述べられているミトコンドリア機能障害のメカニズムを解明し、新たな治療標的を同定することができ、今後の課題である。

SEM 所見に基づき、再灌流障害を抑制するメカニズムとしてミトコンドリアの修復あるいはマイトファジーを探索した。損傷または機能不全のミトコンドリアでは、PINK-1 がミトコンドリア外膜に蓄積した後、細胞質内の PRKN がミトコンドリア外膜に移動して活性化され、マイトファジーを誘導する (Galluzzi and Green, 2019; Ma et al., 2020; Wauer et al., 2015)。本研究では、WB においてミトコンドリアの PRKN または PINK-1 に全群間で有意差が認められず、至適 pH の HMP によるマイトファジーの亢進は確認できなかった。AMPK- α 、SQSTM-1、および ATG5 は、マイトファジーに加えて、マクロおよびミクロオートファジーに関与するタンパク質である (Garcia and Shaw, 2017; Hong et al., 2016; Lamark et al., 2017; You et al., 2013)。本研究でこれらのタンパク発現において、各群間で有意差は観察されず、HMP による修復とオートファジーとの関連は証明できなかった。同様に、JNK 経路の傷害抑制との関連も観察されなかった (King et al., 2009; Uehara et al., 2005)。

実験 3 で 7~10°C の HMP では pH 7.8 に調整することで臓器修復効果が高まる可能性が示唆されたため、実験 4 で新規灌流液 FJH を用いて実験を行った。実際に FJH を用いた HMP は各パラメータが有意に改善していた。HMP に FJH を用いることで、門脈抵抗値が低下して肝逸脱酵素活性は減少し、酸素消費率が上昇する。実験 3 と同様に作用機序としてミトコンドリアの形態保護や ETC の傷害の抑制による虚血再灌流傷害の減少が考えられた。HMP における H⁺ の増加は機械灌流の効果を減弱させる可能性があり、HEPES や MOPS といった安定したバッファーを用いて至適 pH を維持することで HMP のミトコンドリア保護作用を十分に発揮でき、虚血再灌流傷害を抑制するものと考えられる。虚血再灌流傷害抑制の機序は基本的に実験 3 での考察と同様と考えるが、虚血再灌流傷害の抑制効果が向上したのは実験 3 と比較して至適 pH から変動することがなかった可能性を考える。実験 3 では pH を測定しながら間欠的に NaOH で調整しており、

一過性に pH が増減して至適域を逸脱していた可能性がある。pH の変動を抑制するバッファーを用いて至適環境を維持することが、効果的な HMP を行う上で重要であると考ええる。

この実験の limitation は、再灌流の評価方法が IPRL であり、血液成分を含まない再灌流を 90 分間行ったことである。Western blot によるタンパク発現の解析で有意差が得られなかったのは再灌流時間が短かった可能性がある。今後の課題として、小動物や大動物の肝移植において評価する必要がある。また、FJH は pH の管理を首座に置いて作成した新規灌流液であるが、その他は UW-MP 液と HTK 液の有効成分を配合して作成している。pH 管理以外の何らかの配合や組成が有効であった可能性は否定できず、さらなる検討が必要である。

結 論

1. 本研究における新知見

・ UW-MP を用いた DCD 肝に対する HMP は、IPRL を用いた本実験でも虚血再灌流傷害を抑制することを確認した。しかし UW-MP による HMP では虚血再灌流傷害による細胞傷害は残存しており、この効果向上のためには詳細の条件検討が必要である。

・ UW-MP を用いた DCD 肝に対する HMP に H₂ を加えることでアポトーシスが抑制される可能性がある。

・ DCD 肝に対する 7-10°C の HMP は、灌流液を pH 7.8 にすることで虚血再灌流傷害の抑制効果が向上する。その機序として、HMP 中のアシドーシスを回避することで、ミトコンドリア微細構造の保護やミトコンドリア ETC の Complex I が維持され、虚血再灌流傷害の抑制効果が増大する。

・ HMP の至適 pH を安定して維持する新規灌流液 FJH は HMP の臓器修復効果を増強して虚血再灌流傷害を抑制する。この新規灌流液による HMP はより高いミトコンドリア保護効果を認め、既存の灌流液より虚血再灌流傷害の抑制効果は高い。

2. 新知見の意義

本研究結果から、HMP においてより効果的な条件がわずかながら判明した。HMP を用いた臨床研究が進展する中で、本研究は既存の灌流液の使用など、不十分な条件検討に一石を投じるものであると考察される。本研究が提供する知見を通じて、HMP の効果を向上させるための適切な条件の探索が行われ、その結果、非標準的な臓器である DCD 肝などの利用が拡大し、肝移植待機患者へのグラフト提供が増加することが期待される。

3. 今後の研究、課題

HMP は DCD 肝などの非標準的臓器に対する修復機構として有効だが、その至適環境に関する研究はまだ不十分である。特に本研究でも指摘するように、灌流液についての検討が不十分である。FJH は低温に限らず、血液と類似の温度-pH 変化をするため、HMP 以外の温度での MP でも有効である可能性がある。また、HMP の臓器修復効果は灌流時間にも影響を受けると考えられるが、その最適な灌流時間についての検討が不足している。機序の解明についても検討が必要であり、低温における至適 pH による変化を細胞実験で行い、より詳細な修復機序の検討が必要である。また、動物実験による肝移植での有効性の検討も必要である。

謝 辞

大学院博士課程を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始御指導御鞭撻を賜り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武富紹信教授ならびに深井原特任講師に深く感謝いたします。また熟練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

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

引用文献

Abdul Aziz, K.A.; Meduoye, A. Is PH-Stat or Alpha-Stat the Best Technique to Follow in Patients Undergoing Deep Hypo-thermic Circulatory Arrest? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2010, 10, 271–282.

Ahmed, I.; Attia, M.S.; Corps, C.L.; Potts, D.J.; Lodge, J.P.A. Comparison of Two Preservation Solutions in the Protection of the PH Regulation Mechanism of Perfused Rat Livers after 24 Hours of Cold Storage. *Transplant. Proc.* 2001, 33, 886–888.

Álvarez-Mercado, A.I.; Gulfo, J.; Romero Gómez, M.; Jiménez-Castro, M.B.; Gracia-Sancho, J.; Peralta, C. Use of Steatotic Grafts in Liver Transplantation: Current Status. *Liver Transplant.* 2019, 25, 771–786.

Baicu, S.C.; Taylor, M.J. Acid-Base Buffering in Organ Preservation Solutions as a Function of Temperature: New Parameters for Comparing Buffer Capacity and Efficiency. *Cryobiology* 2002, 45, 33–48.

Baicu, S.C.; Taylor, M.J.; Brockbank, K.G.M. The Role of Preservation Solution on Acid-Base Regulation during Machine Perfusion of Kidneys. *Clin. Transplant.* 2006, 20, 113–121.

Bessemers, M.; 'T Hart, N.A.; Tolba, R.; Doorschodt, B.M.; Leuvenink, H.G.D.; Ploeg, R.J.; Minor, T.; van Gulik, T.M. The Isolated Perfused Rat Liver: Standardization of a Time-Honoured Model. *Lab. Anim.* 2006, 40, 236–246.

Bochimoto, H.; Matsuno, N.; Ishihara, Y.; Shonaka, T.; Koga, D.; Hira, Y.; Nishikawa, Y.; Furukawa, H.; Watanabe, T. The Ultrastructural Characteristics of Porcine Hepatocytes Donated after Cardiac Death and Preserved with Warm Machine Perfusion Preservation. *PLoS ONE* 2017, 12, e0186352.

Burra, P.; Samuel, D.; Sundaram, V.; Duvoux, C.; Petrowsky, H.; Terrault,

N.; Jalan, R. Limitations of Current Liver Donor Allocation Systems and the Impact of Newer Indications for Liver Transplantation. *J. Hepatol.* 2021, 75, S178–S190.

Chouchani, E.T.; Pell, V.R.; Gaude, E.; Aksentijević, D.; Sundier, S.Y.; Robb, E.L.; Logan, A.; Nadtochiy, S.M.; Ord, E.N.J.; Smith, A.C.; et al. Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS. *Nature* 2014, 515, 431–435.

de Goeij, F.H.C.; Schlegel, A.; Muiesan, P.; Guarrera, J. V.; Dutkowski, P. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Protects from Cholangiopathy in Donation after Circulatory Death Liver Transplantation. *Hepatology* 2021, 0, 1–4.

de Vries, Y.; Berendsen, T.A.; Fujiyoshi, M.; van den Berg, A.P.; Blokzijl, H.; de Boer, M.T.; van der Heide, F.; de Kleine, R.H.J.; van Leeuwen, O.B.; Matton, A.P.M.; et al. Transplantation of High-Risk Donor Livers after Resuscitation and Viability Assessment Using a Combined Protocol of Oxygenated Hypothermic, Rewarming and Normothermic Machine Perfusion: Study Protocol for a Prospective, Single-Arm Study (DHOPE-COR-NMP Tri. *BMJ Open* 2019, 9, e028596.

Dogan, S.; Aslan, M. Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Therapeutic Strategies to Alleviate Cellular Damage. *Hepatol. Res.* 2011, 41, 103–117.

Dubbeld, J.; Hoekstra, H.; Farid, W.; Ringers, J.; Porte, R.J.; Metselaar, H.J.; Baranski, A.G.; Kazemier, G.; van den Berg, A.P.; van Hoek, B. Similar Liver Transplantation Survival with Selected Cardiac Death Donors and Brain Death Donors. *Br. J. Surg.* 2010, 97, 744–753.

Dutkowski, P.; Furrer, K.; Tian, Y.; Graf, R.; Clavien, P.A. Novel Short-Term Hypothermic Oxygenated Perfusion (HOPE) System Prevents Injury in Rat Liver Graft from Non-Heart Beating Donor. *Ann. Surg.* 2006, 244, 968–976.

Dutkowski, P.; Schlegel, A.; de Oliveira, M.; Müllhaupt, B.; Neff, F.; Clavien,

P.A. HOPE for Human Liver Grafts Obtained from Donors after Cardiac Death. *J. Hepatol.* 2014, 60, 765–772.

Dutkowski, P.; Polak, W.G.; Muiesan, P.; Schlegel, A.; Verhoeven, C.J.; Scalera, I.; Deoliveira, M.L.; Kron, P.; Clavien, P.A. First Comparison of Hypothermic Oxygenated Perfusion versus Static Cold Storage of Human Donation after Cardiac Death Liver Transplants. *Ann. Surg.* 2015, 262, 764–771.

Eltzschig, H.K.; Eckle, T. Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation. *Nat. Med.* 2011, 17, 1391–1401.

Gallardo-Montejano, V.I.; Yang, C.; Hahner, L.; McAfee, J.L.; Johnson, J.A.; Holland, W.L.; Fernandez-Valdivia, R.; Bickel, P.E. Perilipin 5 Links Mitochondrial Uncoupled Respiration in Brown Fat to Healthy White Fat Remodeling and Systemic Glucose. Tolerance. *Nat. Commun.* 2021, 12, 3320.

Galluzzi, L.; Green, D.R. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell* 2019, 177, 1682–1699.

Garcia, D.; Shaw, R.J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell* 2017, 66, 789–800.

Goldaracena, N.; Cullen, J.M.; Kim, D.S.; Ekser, B.; Halazun, K.J. Expanding the Donor Pool for Liver Transplantation with Marginal Donors. *Int. J. Surg.* 2020, 82, 30–35.

Heine, K.B.; Parry, H.A.; Hood, W.R. How Does Density of the Inner Mitochondrial Membrane Influence Mitochondrial Performance? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2023, 324, R242–R248.

Helbling, B.; Renner, E.L. Hepatocellular Defense against Acidosis Is Preserved after Cold Storage. *Eur J Clin Invest* 1998, 28, 456–465.

Henry, S.D.; Nachber, E.; Tulipan, J.; Stone, J.; Bae, C.; Reznik, L.; Kato,

T.; Samstein, B.; Emond, J.C.; Guarrera, J. V. Hypothermic Machine Preservation Reduces Molecular Markers of Ischemia/Reperfusion Injury in Human Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2012, 12, 2477–2486

Hoedemaekers, C.; Van Der Hoeven, J.G. Is α -Stat or PH-Stat the Best Strategy during Hypothermia after Cardiac Arrest? *Crit Care Med* 2014, 42, 1950–1951

Hong, J.M.; Kim, S.J.; Lee, S.M. Role of Necroptosis in Autophagy Signaling during Hepatic Ischemia and Reperfusion. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016, 308, 1–10.

Hu, X.; Wang, W.; Zeng, C.; He, W.; Zhong, Z.; Liu, Z.; Wang, Y.; Ye, Q. Appropriate Timing for Hypothermic Machine Perfusion to Preserve Livers Donated after Circulatory Death. *Mol Med Rep* 2020, 22, 2003–2011.

Ishikawa, T.; Shimada, S.; Fukai, M.; Kimura, T.; Umemoto, K.; Shibata, K.; Fujiyoshi, M.; Fujiyoshi, S.; Hayasaka, T.; Kawamura, N.; et al. Post-Reperfusion Hydrogen Gas Treatment Ameliorates Ischemia Reperfusion Injury in Rat Livers from Donors after Cardiac Death: A Preliminary Study. *Surg. Today* 2018, 48, 1081–1088.

Jaeschke, H.; Woolbright, B.L. Current Strategies to Minimize Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting Reactive Oxygen Species. *Transplant Rev* 2012, 26, 103–114

Karangwa, S.; Panayotova, G.; Dutkowski, P.; Porte, R.J.; Guarrera, J.V.; Schlegel, A. Hypothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation. *Int. J. Surg.* 2020, 82, 44–51.

King, L.A.; Toledo, A.H.; Rivera-Chavez, F.A.; Toledo-Pereyra, L.H. Role of P38 and JNK in Liver Ischemia and Reperfusion. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2009, 16, 763–770.

Lamark, T.; Svenning, S.; Johansen, T. Regulation of Selective Autophagy: The P62/SQSTM1 Paradigm. *Essays Biochem.* 2017, 61, 609–624.

Lin, L.T.; Chen, J.T.; Tai, M.C.; Chen, Y.H.; Chen, C.L.; Pao, S.I.; Hsu, C.R.; Liang, C.M. Protective Effects of Hypercapnic Acidosis on Ischemia-Reperfusion-Induced Retinal Injury. *PLoS One* 2019, 14, 1–17.

Ma, X.; McKeen, T.; Zhang, J.; Ding, W.X. Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases. *Cells* 2020, 9.

Martins, P.N.; Schlegel, A.; Ghinolfi, D. Cold or Not So Cold-Static Organ Preservation at 10 °C May Prolong Organ Preservation and Facilitate Transplant Logistics. *Transplantation* 2022, 106, 427–429.

Mergental, H.; Laing, R.W.; Hodson, J.; Boteon, Y.L.; Attard, J.A.; Wallace, L.L.; Neil, D.A.H.; Barton, D.; Schlegel, A.; Muiesan, P.; et al. Introduction of the Concept of Diagnostic Sensitivity and Specificity of Normothermic Perfusion Protocols to Assess High-Risk Donor Livers. *Liver Transplantation* 2021.

Michelotto, J.; Gassner, J.M.G.V.; Moosburner, S.; Muth, V.; Patel, M.S.; Selzner, M.; Pratschke, J.; Sauer, I.M.; Raschzok, N. Ex Vivo Machine Perfusion: Current Applications and Future Directions in Liver Transplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2021, 406, 39–54.

Mihaylov, P.; Mangus, R.; Ekser, B.; Cabrales, A.; Timsina, L.; Fridell, J.; Lacerda, M.; Ghabril, M.; Nephew, L.; Chalasani, N.; Kubal, C. A., Expanding the Donor Pool with the Use of Extended Criteria Donation After Circulatory Death Livers. *Liver transplantation*, 2019, 25, 1198–1208.

Monbaliu, D.; Pirenne, J.; Talbot, D. Liver Transplantation Using Donation after Cardiac Death Donors. *J. Hepatol.* 2012, 56, 474–485.

Muller, X.; Schlegel, A.; Kron, P.; Eshmuminov, D.; Würdinger, M.; Meierhofer, D.; Clavien, P.A.; Dutkowski, P. Novel Real-Time Prediction of

Liver Graft Function During Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Before Liver Transplantation. *Ann Surg* 2019, 270, 783–790.

Nasralla, D.; Coussios, C.C.; Mergental, H.; Akhtar, M.Z.; Butler, A.J.; Ceresa, C.D.L.; Chiocchia, V.; Dutton, S.J.; García-Valdecasas, J.C.; Heaton, N.; et al. A Randomized Trial of Normothermic Preservation in Liver Transplantation. *Nature* 2018, 557, 50–56.

Nasralla, D. Incremental Improvements in Machine Perfusion. *Transplantation* 2021, 106(6), 1105–1106.

Panayotova, G.G.; Rosado, J.; Paterno, F.; Deo, D.; Dikdan, G.; McCarty, M.A.; Arrington, B.; Giudice, A.; Fano, A.; Dhaduk, N.; et al. Novel Oxygenation Technique for Hypothermic Machine Perfusion of Liver Grafts: Validation in Porcine Donation after Cardiac Death (DCD) Liver Model. *Am J Surg* 2020, 220, 1270–1277.

Plecitá-Hlavatá, L.; Ježek, P. Integration of Superoxide Formation and Cristae Morphology for Mitochondrial Redox Signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016, 80, 31–50.

Quillin, R.C.; Guarrera, J. V. Hypothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 2018, 24, 276–281.

Rosenthal, T.B. The Effect of Temperature on the PH of Blood and Plasma in Vitro. *J. Biol. Chem.* 1948, 173, 25–30.

Schlegel, A.; Graf, R.; Clavien, P.A.; Dutkowski, P. Hypothermic Oxygenated Perfusion (HOPE) Protects from Biliary Injury in a Rodent Model of DCD Liver Transplantation. *J. Hepatol.* 2013, 59, 984–991.

Schlegel, A.; Kron, P.; Dutkowski, P. Hypothermic Oxygenated Liver Perfusion: Basic Mechanisms and Clinical Application. *Curr Transplant Rep* 2015, 2, 52–62.

Schlegel, A.; Kalisvaart, M.; Muiesan, P. Machine Perfusion in Liver Transplantation: An Essential Treatment or Just an Expensive Toy? *Minerva Anesthesiol* 2018, 84, 236–245.

Schlegel, A.; Kalisvaart, M.; Scalera, I.; Laing, R.W.; Mergental, H.; Mirza, D.F.; Perera, T.; Isaac, J.; Dutkowsky, P.; Muiesan, P. The UK DCD Risk Score: A New Proposal to Define Futility in Donation-after-Circulatory-Death Liver Transplantation. *J Hepatol* 2018, 68, 456–464.

Schlegel, A.; Muller, X.; Kalisvaart, M.; Muellhaupt, B.; Perera, M.T.P.R.; Isaac, J.R.; Clavien, P.A.; Muiesan, P.; Dutkowsky, P. Outcomes of DCD Liver Transplantation Using Organs Treated by Hypothermic Oxygenated Perfusion before Implantation. *J. Hepatol.* 2019, 70, 50–57.

Schlegel, A.; Muller, X.; Dutkowsky, P. Machine Perfusion Strategies in Liver Transplantation. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2019, 8, 490–501.

Schlegel, A.; Muller, X.; Mueller, M.; Stepanova, A.; Kron, P.; de Rougemont, O.; Muiesan, P.; Clavien, P.A.; Galkin, A.; Meierhofer, D.; et al. Hypothermic Oxygenated Perfusion Protects from Mitochondrial Injury before Liver Transplantation. *eBioMedicine* 2020, 60, 103014.

Seifter, J.L.; Chang, H.-Y. Disorders of Acid-Base Balance: New Perspectives. *Kidney Diseases* 2016, 2, 170–186, doi:10.1159/000453028.

Tejchman, K.; Sierocka, A.; Kotowski, M.; Zair, L.; Pilichowska, E.; Ostrowski, M.; Sieńko, J. Acid-Base Balance Disorders During Kidney Preservation in Cold Ischemia. *Transplant Proc* 2020, 52, 2036–2042.

Shimada, S.; Fukai, M.; Wakayama, K.; Ishikawa, T.; Kobayashi, N.; Kimura, T.; Yamashita, K.; Kamiyama, T.; Shimamura, T.; Taketomi, A.; et al. Hydrogen Sulfide Augments Survival Signals in Warm Ischemia and Reperfusion of the Mouse Liver. *Surg Today* 2015, 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.

Hydrogen Gas Ameliorates Hepatic Reperfusion Injury After Prolonged Cold Preservation in Isolated Perfused Rat Liver. *Artif Organs* 2016, 40, 1128–1136.

Shimada, S.; Fukai, M.; Shibata, K.; Sakamoto, S.; Wakayama, K.; Ishikawa, T.; Kawamura, N.; Fujiyoshi, M.; Shimamura, T.; Taketomi, A. Heavy Water (D₂O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1818.

Stacpoole, P.W. Lactic Acidosis and Other Mitochondrial Disorders. *Metabolism* 1997, 46, 306–321.

Stepien, K.M.; Heaton, R.; Rankin, S.; Murphy, A.; Bentley, J.; Sexton, D.; Hargreaves, I.P. Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders. *J Clin Med* 2017, 6.

Swan, H. The Importance of Acid-Base Management for Cardiac and Cerebral Preservation during Open Heart Operations. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1984, 158, 391–414.

Tamaki, I.; Hata, K.; Okamura, Y.; Nigmat, Y.; Hirao, H.; Kubota, T.; Inamoto, O.; Kusakabe, J.; Goto, T.; Tajima, T.; et al. Hydrogen Flush After Cold Storage as a New End-Ischemic Ex Vivo Treatment for Liver Grafts Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Liver Transplantation* 2018, 24, 1589–1602.

Thorniley, M.S.; Simpkin, S.; Fuller, B.; Jenabzadeh, M.Z.; Green, C.J. Monitoring of Surface Mitochondrial NADH Levels as an Indication of Ischemia during Liver Isograft Transplantation. *Hepatology* 1995, 21, 1602–1609.

Truchot, J.P. Temperature and Acid-Base Regulation in the Shore Crab *Carcinus maenas* (L.). *Respir. Physiol.* 1973, 17, 11–20.

Uehara, T.; Bennett, B.; Sakata, S.T.; Satoh, Y.; Bilter, G.K.; Westwick, J.K.; Brenner, D.A. JNK Mediates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury. *J. Hepatol.* 2005, 42, 850–859.

van Beekum, C.J.; Vilz, T.O.; Glowka, T.R.; von Websky, M.W.; Kalff, J.C.; Manekeller, S. Normothermic Machine Perfusion (NMP) of the Liver - Current Status and Future Perspectives. *Ann Transplant* 2021, 26, 1–8.

van Leeuwen, O.B.; de Vries, Y.; de Meijer, V.E.; Porte, R.J. Hypothermic Machine Perfusion before Viability Testing of Previously Discarded Human Livers. *Nat Commun* 2021, 12, 1–2.

van Rijn, R.; van Leeuwen, O.B.; Matton, A.P.M.; Burlage, L.C.; Wiersema-Buist, J.; van den Heuvel, M.C.; de Kleine, R.H.J.; de Boer, M.T.; Gouw, A.S.H.; Porte, R.J. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Reduces Bile Duct Reperfusion Injury after Transplantation of Donation after Circulatory Death Livers. *Liver Transplantation* 2018, 24, 655–664.

van Rijn, R.; Schurink, I.J.; de Vries, Y.; van den Berg, A.P.; Cortes Cerisuelo, M.; Darwish Murad, S.; Erdmann, J.I.; Gilbo, N.; de Haas, R.J.; Heaton, N.; et al. Hypothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation - A Randomized Trial. *New England Journal of Medicine* 2021, 384, 1391-1401.

Wang, L.; Thompson, E.; Bates, L.; Pither, T.L.; Hosgood, S.A.; Nicholson, M.L.; Watson, C.J.E.; Wilson, C.; Fisher, A.J.; Ali, S.; et al. Flavin Mononucleotide as a Biomarker of Organ Quality—A Pilot Study. *Transplant. Direct.* 2020, 6, e600.

Watson, C.J.E.; Hunt, F.; Messer, S.; Currie, I.; Large, S.; Sutherland, A.; Crick, K.; Wigmore, S.J.; Fear, C.; Cornateanu, S.; et al. In Situ Normothermic Perfusion of Livers in Controlled Circulatory Death Donation May Prevent Ischemic Cholangiopathy and Improve Graft Survival. *American Journal of Transplantation* 2019, 19, 1745–1758.

Wauer, T.; Simicek, M.; Schubert, A.; Komander, D. Mechanism of Phospho-Ubiquitin-Induced PARKIN Activation. *Nature* 2015, 524, 370–374.

Weissenbacher, A.; Vrakas, G.; Nasralla, D.; Ceresa, C.D.L. The Future of Organ Perfusion and Re-Conditioning. *Transplant International* 2019, 32, 586–597.

You, Y.-H.; Andreyev, A.; Xu, M.; Ly, S.; Miyamoto, S.; Fogo, A.; DeCleves, A.-E.; Le, T.P.; Ali, S.S.; Diamond-Stanic, M.; et al. AMPK Dysregulation Promotes Diabetes-Related Reduction of Superoxide and Mitochondrial Function. *Journal of Clinical Investigation* 2013, 123, 4888–4899.

Zha, X.M.; Xiong, Z.G.; Simon, R.P. PH and Proton-Sensitive Receptors in Brain Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2022.

Zhang, H.; Yan, Q.; Wang, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Du, J.; Chen, L. The Role of Mitochondria in Liver Ischemia-Reperfusion Injury: From Aspects of Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial Fission, Mitochondrial Membrane Permeable Transport Pore Formation, Mitophagy, and Mitochondria-Related Protective Measures. *Oxid Med Cell Longev*, 2021.

Zhang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Ma, Z.; Wu, S.; Tarantino, G. Hypothermic Machine Perfusion Reduces the Incidences of Early Allograft Dysfunction and Biliary Complications and Improves 1-Year Graft Survival after Human Liver Transplantation: A Meta-Analysis. *Medicine (United States)* 2019, 98.