

表 題 常温酸素化灌流装置による肝保存技術の有用性の検討

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 岡田 憲樹

担当指導教員氏名 水田 耕一 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学  
病態機能外科学  
移植外科学

2016 年 1 月 8 日申請の学位論文

## 目次

はじめに	p. 1
------	------

### I. 脳死ドナーブタモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植法

1. 緒言	p. 4
2. 方法	p. 5
3. 結果	p. 11
4. 小括	p. 16

### II. 常温酸素化灌流装置を用いた肝グラフト保存におけるアミノ酸消費の検討

1. 緒言	p. 18
2. 方法	p. 20
3. 結果	p. 23
4. 小括	p. 27

### III. 常温酸素化灌流装置を用いた肝グラフト保存における酸素運搬体の必要性

#### についての検討

1. 緒言	p. 28
2. 方法	p. 29
3. 結果	p. 30
4. 小括	p. 32

考察 p. 33

謝辭 p. 37

参考文献 p. 38

## 常温酸素化灌流装置による肝保存技術の有用性の検討

### はじめに

肝移植は臨床応用され、すでに 50 年が経過し(1)、本邦においても 30 年近くが経過しているが、提供臓器数はその需要に追いついておらず慢性的なドナーグラフト不足に陥っている(2-11)。そこで近年、世界的な臓器不足を背景に、グラフト保存技術の向上やマージナルグラフトの利用を目的とした常温酸素化灌流が注目されている(2-6, 12-17)。常温酸素化灌流によるグラフト保存技術によりこれまで使用できなかったマージナルグラフトの利用が可能となり、世界的な臓器不足を解消する一助となることが期待されており、欧米においてはすでに臨床でも用いられている(12, 13)。細胞の代謝活性は、温度が 10℃下がるごと 1/1.5-2 となることが報告されている(3, 18)。肝移植の黎明期には冷温灌流法による保存も用いられていたが(1)、効果的な保存液の開発以降臨床では 4℃の保存液に浸け保存する単純冷却保存が用いられてきた(18)。しかし、単純冷却保存では酸素や栄養の供給がないため、その保存の限界は 12 時間とされている。そこで常温酸素化灌流による保存では、酸素や栄養を持続的に供給しながら保存することによりその保存時間を延長したり、従来は使用できなかったマージナ

ルグラフトの利用を試みるものである。大動物を用いた実験では、心停止ブタモデルを用い常温体外酸素化灌流により 5 日間の生存実験においてその生存率の改善を認めたという報告もなされている(2)。また、欧米ではすでに実験的な段階であるが臨床応用もされており、常温酸素化灌流の有用性が報告されている(12, 13, 19)。しかし、本邦においては、肝グラフトにおける常温酸素化灌流装置は実験段階である(20, 21)。東京理科大学辻研究室ではラット肝を用いた実験を行っており、ラット肝保存における酸素運搬体の必要性についての検討などがされており、ラット肝においては常温酸素化灌流保存技術が確立されている(21)。また、国立成育医療研究センターにおいても常温酸素化灌流を用いて、復温障害を軽減する実験がブタ肝を用いて行われている(20)。

本邦においては、圧倒的な脳死ドナーグラフト不足からその約 90%は生体ドナーに頼っているのが現状である。しかし、親族からのグラフト提供が医学的あるいは社会的理由により困難な場合は脳死ドナーグラフトに頼るしかないが、その提供数は十分ではなく待機中に死亡する症例も少なくない。自治医大移植外科は小児肝移植を多く手掛けているが、小児肝移植においては生体ドナーのほとんどは両親である。小児肝移植において両親または親族が医学的あるいは社会的理由によりドナーとなれない場合は、成人での肝移植同様脳死ドナーグラフトに頼らざるを得ないが、わが国においては小児脳死ドナーからの臓器提

供は少なく、成人脳死ドナーからの分割肝移植が小児脳死肝移植のグラフト源となっている。脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植は、1 つの肝臓から 2 人が救命できる効果的な方法である(8, 10, 11, 22-24)。しかし、現在臨床で行われている単純冷却保存における肝分割手技はグラフトへのダメージと **primary non-function** のリスクからその適応条件は厳しく制限されている。

そこで、今後世界的に広まっていくことが予想される常温酸素化灌流のさらなる有用性の検討をテーマとして本研究を立案した。常温酸素化灌流は前述のように、心停止ドナーグラフトなどのマージナルグラフトの利用を進められているが、脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植への応用は報告されていない。我々は常温酸素化灌流はそのグラフト保存力の高さから、脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植にも応用できると考えた。そこでまず、実験Ⅰで脳死ドナーグラフトを用いた分割肝移植について常温酸素化灌流の有用性を検討した。次に、実験Ⅱでその常温酸素化灌流保存法におけるよりよい灌流条件の検討として灌流液へのアミノ酸の必要性を証明し、実験Ⅲでは常温酸素化灌流保存法における酸素運搬体の必要性について検討した。

# 実験Ⅰ．脳死ドナーブタモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植 法

## 1. 緒言

肝分割手技は、体内での分割と体外へ肝グラフトを摘出した後に分割する方法があるが、本邦においては、遺体をできるだけ早く遺族のもと返すという倫理的配慮から、体内ではなく体外での分割手技となっており、およそ 1.5-2 時間の冷阻血時間の延長を必要とする(25, 26)。体外冷阻血下での肝分割手技は、グラフトへのダメージと **primary non-function** のリスクから、その適応条件は制限されている(9)。また、本邦における脳死肝移植の検討でも、冷阻血時間 10 時間以上、**Model for End-stage Liver Disease (MELD) score 25** 以上、ドナー年齢 55 歳以上がレシピエントの死亡率を上昇させるリスク因子となっている(27)。

脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植は 1 つの肝グラフトから 2 人を救命できる効果的な方法であるが(8, 10, 11, 22-24)、分割手技によるグラフトへのダメージと冷阻血時間の延長が不可避である。さらに、臓器移植にけるグラフト冷阻血時間の延長は明らかに予後不良因子であり、冷阻血によるグラフト障害を改善させる臓器保存法の開発はわが国の臓器移植事情からも意義の大きい研究である。そこで、体外でのグラフト保存効果が高い常温酸素化灌流装置を用い

た体外肝分割を考案し、その有用性を検討した。

## 2. 方法

ドナーとしてマイクロミニブタ（Fuji Micra Inc., Shizuoka, Japan）を用い、レシピエントとして三元雑種ブタ（Fuji Micra Inc., Shizuoka, Japan）を用いて、脳死ドナーを想定し分割肝を用いた異所性肝移植実験を行った。ドナーブタは体重は平均 10.9kg（10.6-11.6kg）であり、レシピエントブタは体重は平均 29.8kg（28.7-31.4kg）であった。今回の実験では、肝移植後の生体内での変化を観察するために異所性肝移植を施行し、その肝グラフトの大きさと移植するスペースの点から、ドナーとしてマイクロミニブタを用い、レシピエントとして三元雑種ブタを用いた。ドナーブタおよびレシピエントブタを冷保存群（n=5）と、常温酸素化灌流群（n=5）の 2 群に分けた。すべてのレシピエントブタは脳死臓器摘出を想定し、脳死臓器摘出と同様の手順で肝グラフト摘出した。ただし、ドナーブタを実際に脳死に至らしめる必要はないと判断し、脳神経系への侵襲は加えていない。摘出した肝グラフトを 100 分間保存し、冷保存群では従来より臨床で行われている単純冷却法で保存し、常温酸素化灌流群では常温酸素化灌流装置を用いて保存した。また保存中 50 分が経過した時点で、肝分割を行った。保存後はレシピエントブタに異所性肝移植を施行し、生体内でのグラ

フトの変化について 12 時間観察した。

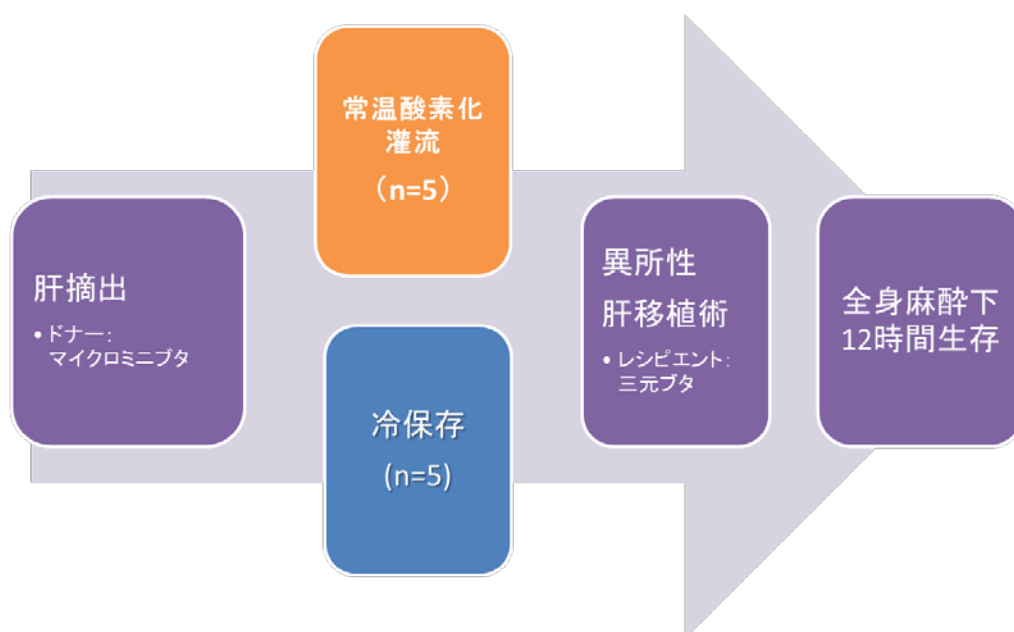


図 1：実験 I プロトコール

#### ドナー手順

全身麻酔をかけた後に、腹部正中切開で開腹した。まず、総胆管に 4Fr アトムチューブ (Atom Medical Corporation, Tokyo, Japan) を挿入し、腹部大動脈に 8-12Fr ネラトンカテーテル (TERUMO, Tokyo, Japan) を挿入した。ヘパリン 10,000 単位を全身投与した後、深麻酔後に脱血死した。心停止後、腹部大動脈を横隔膜直下でクランプし、腹部大動脈に挿入したネラトンカテーテルより 4℃ に冷却した 1L の乳酸リンゲル液と University of Wisconsin solution (UW 液) を腹腔内臓器へ灌流した。同時に腹腔内へ大量の氷を投与し、臓器の冷却を行った。臓器を冷却灌流した後に肝動脈、門脈、肝上部・下部下大静脈を受動し

肝グラフトを摘出した。摘出したグラフトは平均 171.7g (151-187g) であった。



図 2：摘出肝グラフト

バックテーブル

冷保存群

冷保存群では、摘出された肝グラフトの門脈より 4℃に冷却した UW 液 1L を灌流し、4℃に冷却した UW 液に浸けて 100 分間保存した。100 分の保存中、50 分が経過した時点で、肝分割を開始した。肝分割操作は、臨床でも行われているペアンクラッシュ法で行い左葉を減量した。



図 3：冷保存群

## 常温酸素化灌流群

常温酸素化灌流群では、摘出した肝グラフトの門脈および肝動脈より常温灌流を開始した。灌流装置は東京理科大学辻研究室と共同開発し、灌流液は酸素運搬体としてブタ全血を 10% 混注した肝細胞培養液を用いた。灌流液は酸素分圧 140-160mmHg へ酸素化し、門脈からは 5-10mmHg、肝動脈からは 20-30mmHg の圧で灌流した。灌流液は肝静脈から回収し、肝グラフトは 20℃ の生理食塩水に浮かべて保存した。冷保存群と同様の方法で、100 分の保存中、50 分が経過した時点で、肝分割を開始した。

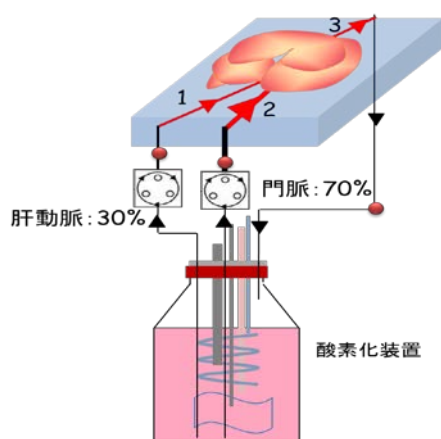
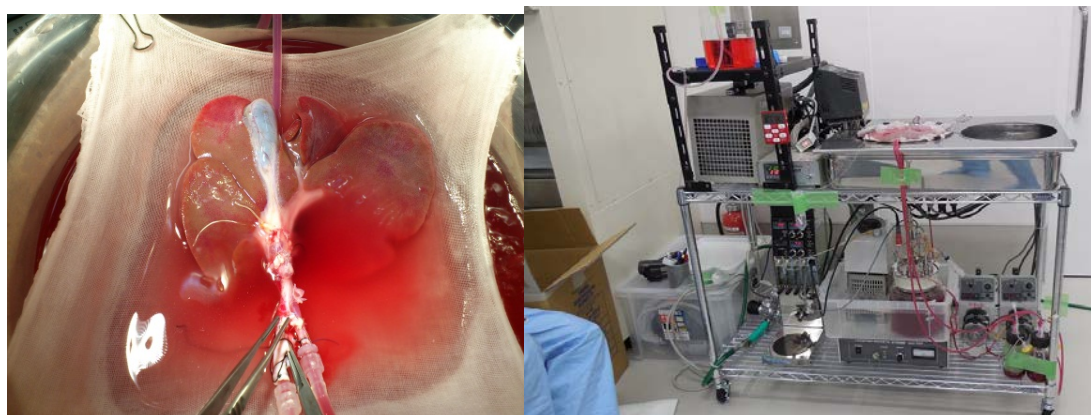


図 4：常温酸素化灌流群

## レシピエント手順

生体内へ移植後の肝グラフトの動態を観察するために、異所性肝移植を行った。

レシピエントは三元ブタを用いた。レシピエントブタは全身麻酔後、腹部正中切開で開腹し、右腎を摘出した。その後、100 分間保存した肝グラフトの肝下部下大静脈を右腎静脈へ、肝動脈を右腎動脈へ端端吻合し、肝グラフトの門脈はレシピエントブタの門脈へ端側吻合を行った。胆管はアトムチューブを挿入したまま、解放した。

その後全身麻酔を維持したまま 12 時間生存実験後、深麻酔下に犠牲死し、肝グラフトを摘出した。

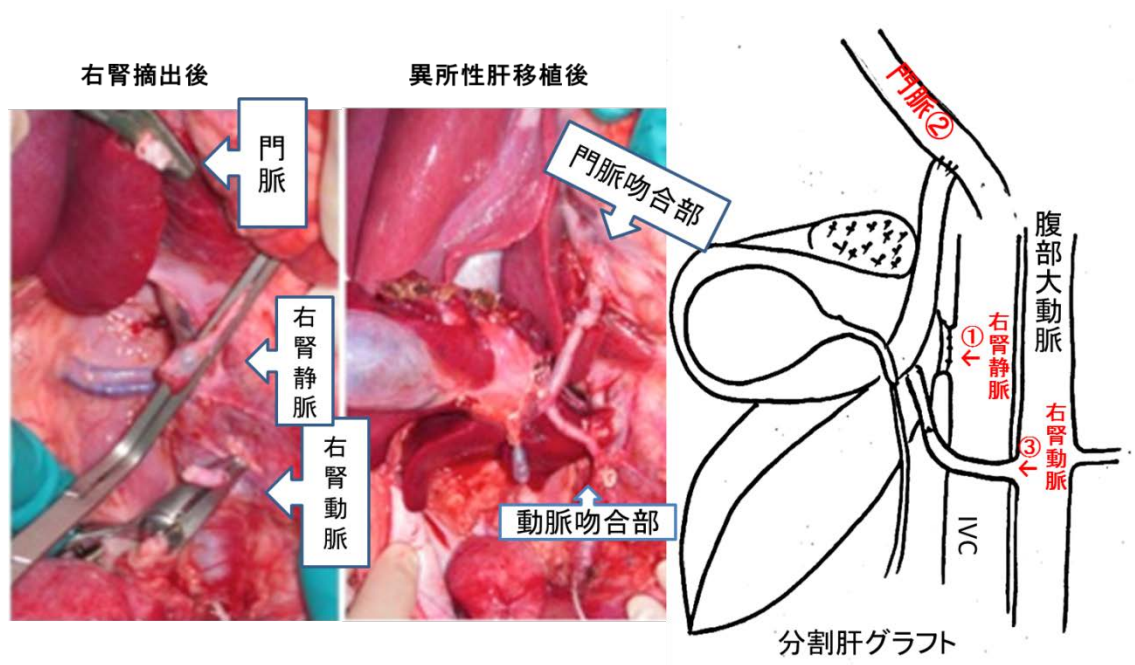


図 5：異所性肝移植法

評価

血液検査

異所性肝移植後 0、1、2、4、6、8、12 時間後の aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) を測定した。

病理学的評価

100 分保存後、および異所性肝移植 12 時間後の組織について病理学的評価を行った。採取された組織は 10%ホルムアルデヒドで固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (Hematoxylin-eosin 染色 : H-E 染色) および、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA; #sc-52250) と interleukin-6 (IL-6) (Rockland Inc., Pottstown, PA; #109-401-310) の免疫染色を行った。H-E 染色については、異所性肝移植 12 時間後の標本について、虚血再灌流障害の病理学的評価である Suzuki's score(28)を用いて評価した。

Suzuki's score は H-E 染色を用いて、鬱血・空胞化・壊死をそれぞれ 0-4 点に点数化し合算して評価した。また TNF  $\alpha$  と IL-6 の免疫染色についてはランダムに選んだ 100  $\mu$  m<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数を手動で測定した。

### 3.結果

血液検査所見

AST

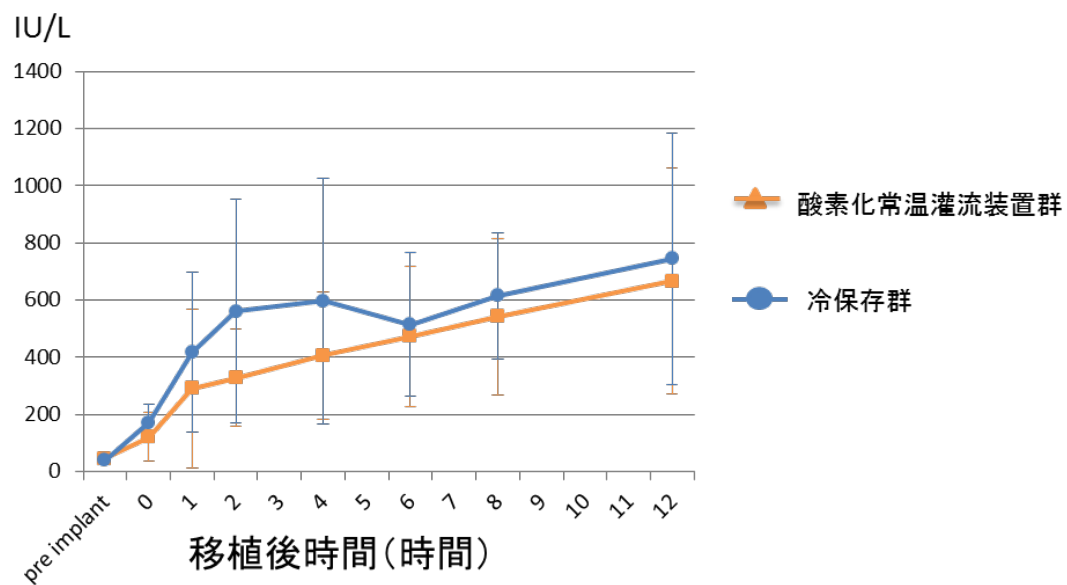


図 6 : 異所性移植後の AST の推移

わずかに冷保存群の方が上昇を認めるが、有意な差を認めない。

## ALT

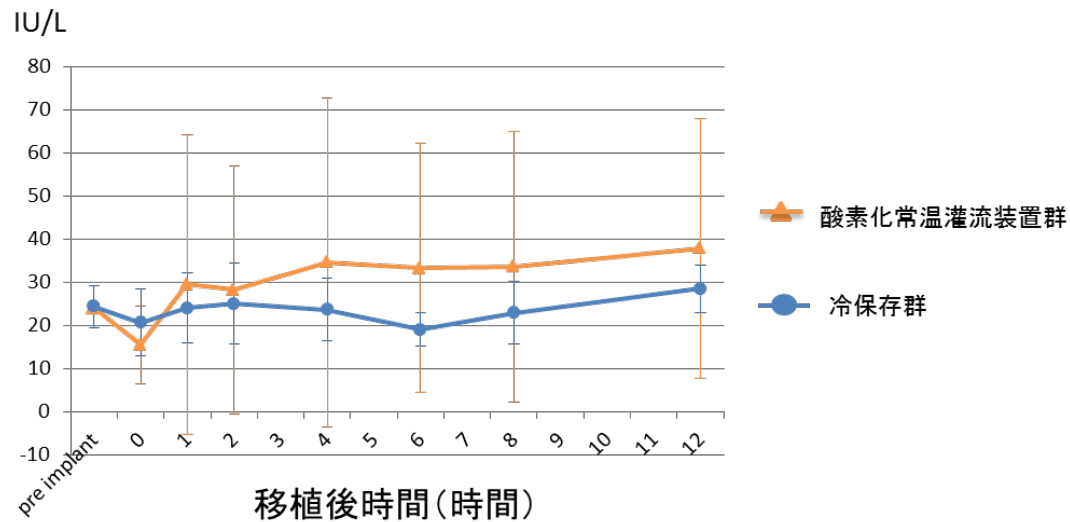


図 7：異所性肝移植後の ALT の推移

わずかに常温酸素化灌流群の方が上昇をみとめるが、有意な差を認めない。

## 病理学的評価 H-E 染色

100 分保存後では、冷保存群、常温酸素化灌流群のいずれも細胞壊死や脱落は認めず、類洞の拡張も差がなかった。しかし、異所性肝移植術後 12 時間後の評価では、常温酸素化灌流群においては、保存後と比較して大きな変化がなかったのに対し、冷保存群においては肝静脈周囲の肝細胞脱落と核の濃縮像が観察された。虚血再灌流障害の評価である Suzuki's score は異所性肝移植 12 時間後において、冷保存群は  $5.8 \pm 1.1$  に対して常温酸素化還流群においては  $3.6 \pm 1.5$  と有意に低い ( $p=0.03$ ) 結果であった。

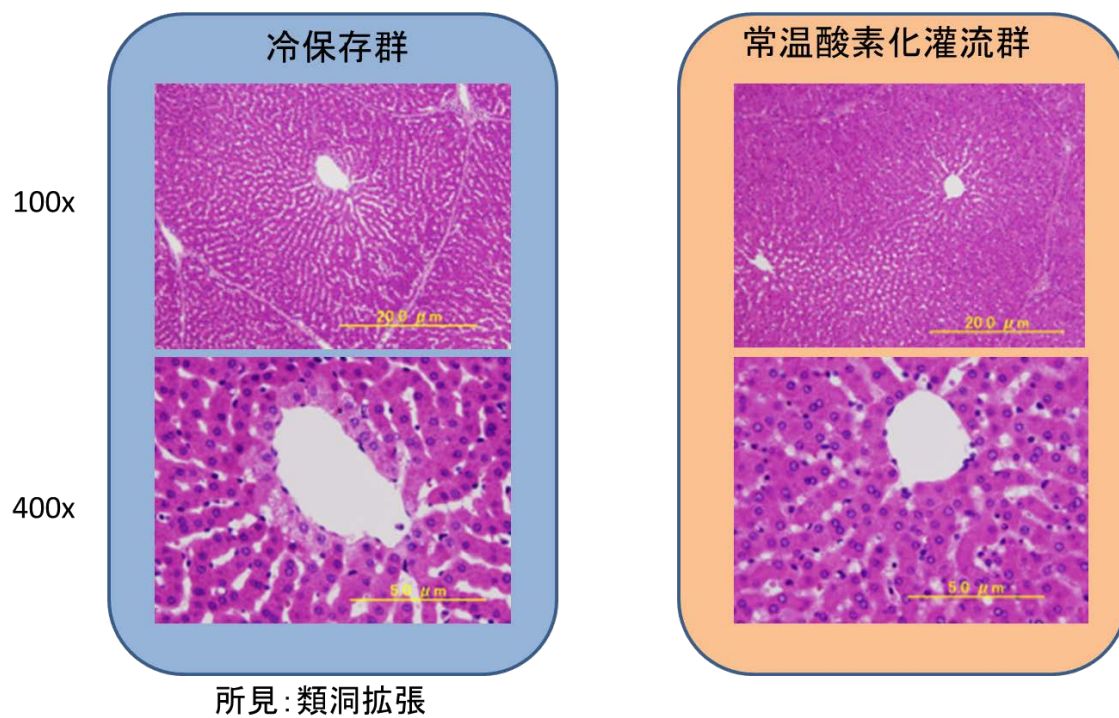


図 8 : 100 分保存後（異所性肝移植前） H-E 染色

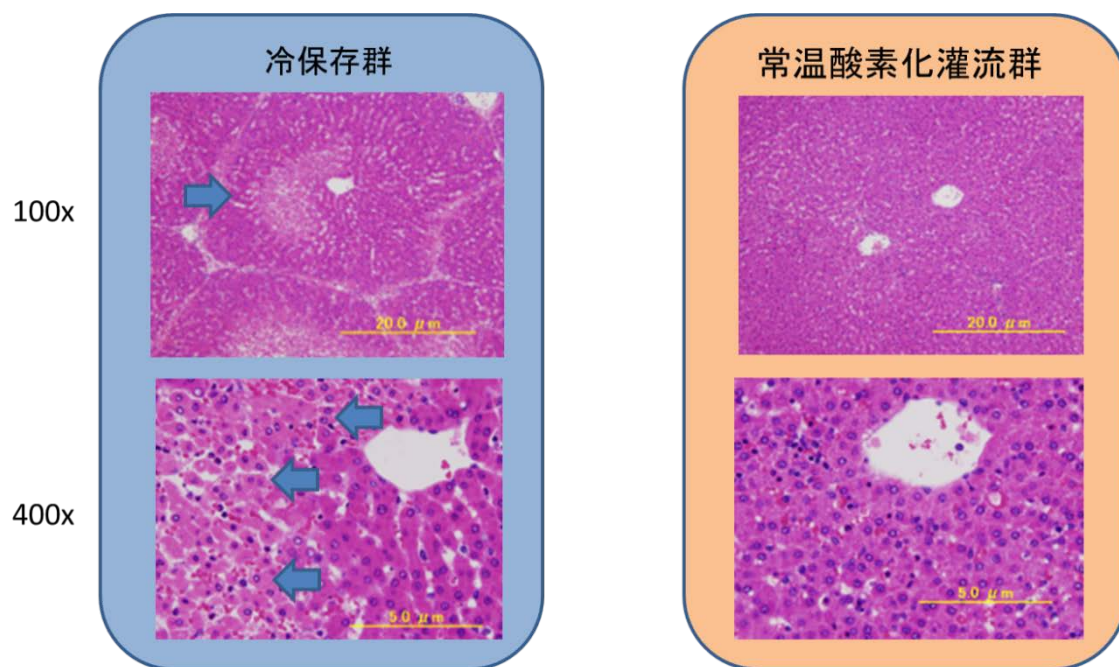


図 9 : 異所性肝移植 12 時間後 H-E 染色

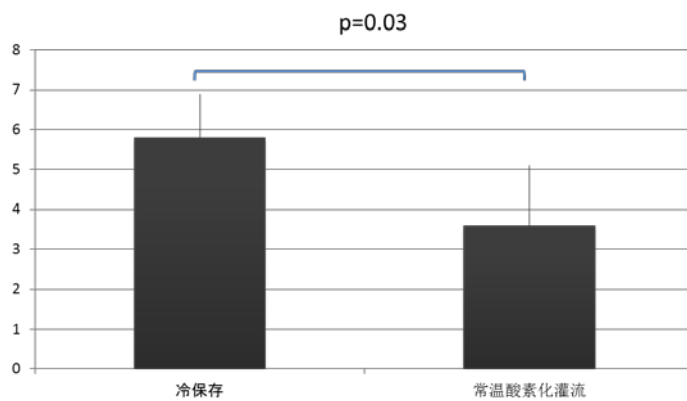


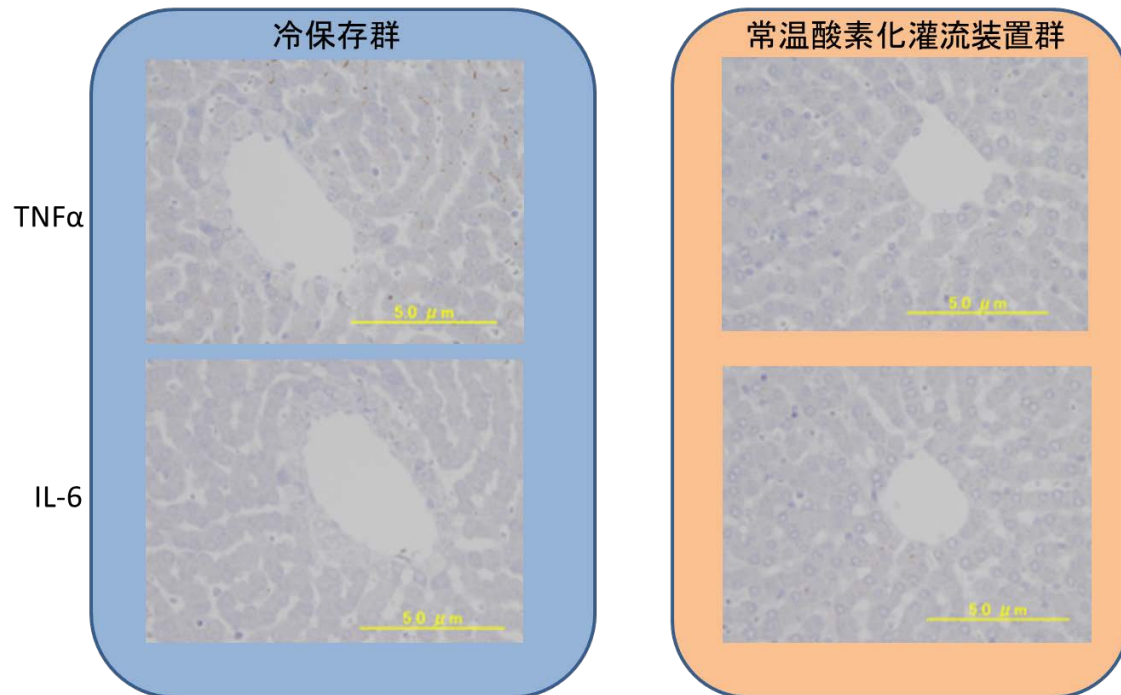
図 10 : Suzuki's score

#### 免疫染色

100 分間保存後の  $\text{TNF-}\alpha$  染色において、 $\text{TNF-}\alpha$  陽性細胞数は冷保存群において有意に多い結果であった。しかし、IL-6 染色においては冷保存群、常温酸素化灌流群において有意差はみとめなかった。

異所性肝移植 12 時間後においては、 $\text{TNF}$  染色、IL-6 染色とも有意な差は認めなかった。

## 異所性肝移植前(保存後)



## 免疫染色陽性細胞数

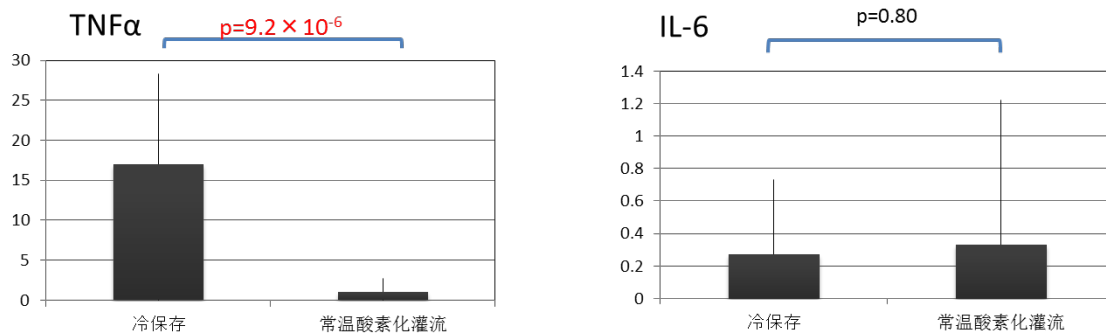
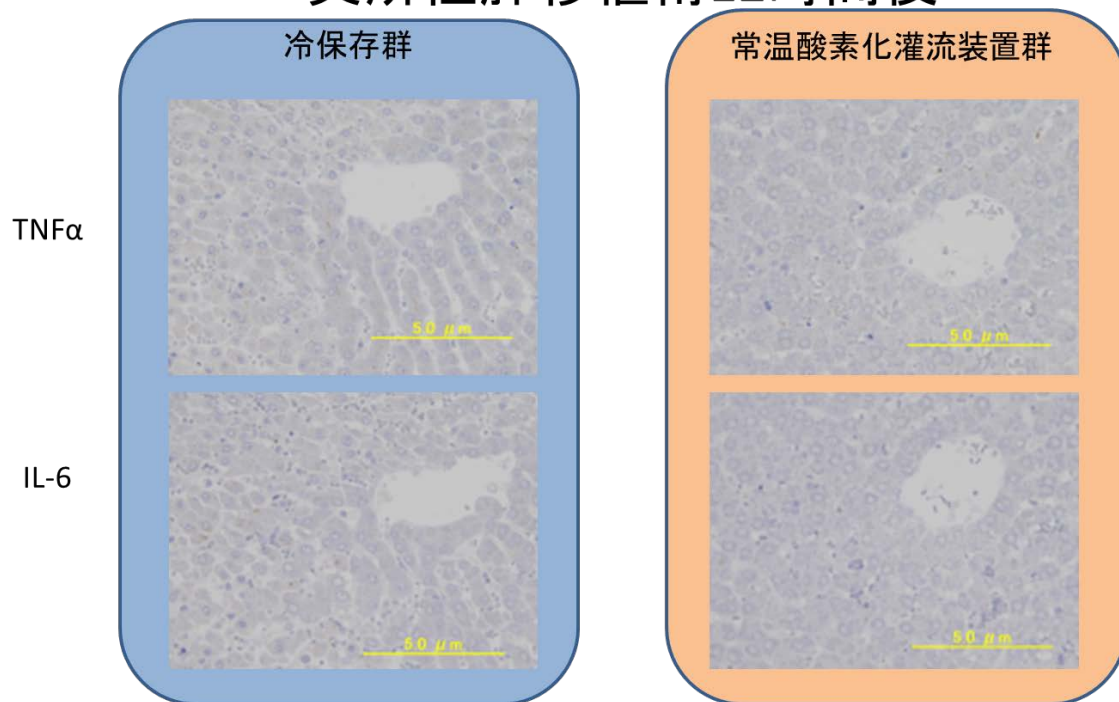


図 11：異所性肝移植前の免疫染色

## 異所性肝移植術12時間後



## 免疫染色陽性細胞数

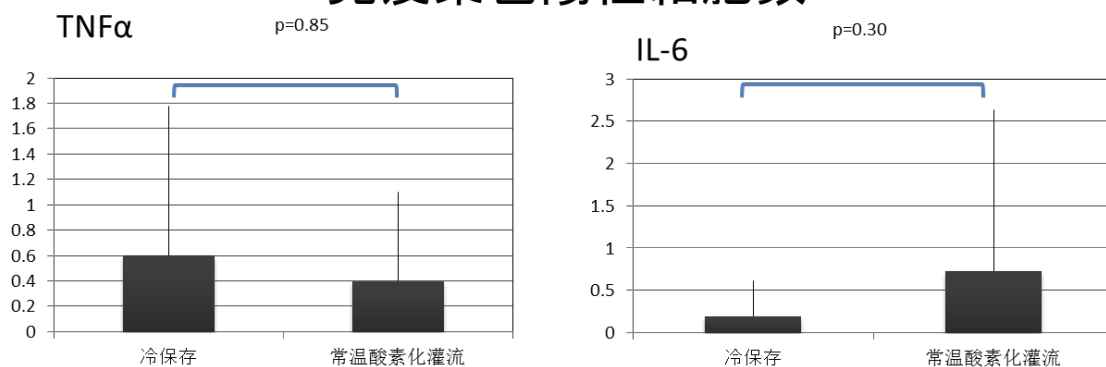


図 12：異所性肝移植後の免疫染色

### 4.小括

今回の実験結果では、生化学マーカーでは有意差を示すことはできなかったが、

100 分の保存後の冷保存群においてアポトーシスを誘導する  $\text{TNF}\alpha$  の有意な上

昇を認めた。また 12 時間の保存後の冷保存群において肝静脈周囲の肝細胞の脱落と核濃縮像を認め、Suzuki's score においても冷保存群で有意に障害をうけており、本実験において分割肝移植における常温酸素化灌流装置の有用性について、大動物を用いて示すことができた。また、肝分割手技において、冷保存群では血流がないため、肝内の脈管を同定しながら分割することが困難であり、異所性肝移植後グラフト離断面からの出血コントロールに難渋したが、常温酸素化灌流群においては出血点を同定しながら分割することが可能であり、異所性肝移植後グラフト離断面からの出血は少量であった。今回の実験で異所性肝移植実験を行ったのは、移植後の生体内での肝グラフトの動態を検討するためである。また 12 時間の保存実験としたのは、生化学マーカーが肝移植後 12 時間でピークとなるという報告に基づいている(2)。臨床に近い条件での検討として同所性肝移植による長期生存実験が必要であるが、その技術的難易度は高く手術手技により結果が左右されてしまうため、肝グラフトの生体内での変化を検討するため異所性肝移植を行った。

常温酸素化灌流を用いることにより脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植が増加し、肝移植により救命できる患者が増えることが期待される。

## Ⅱ．常温酸素化灌流装置を用いた肝グラフト保存におけるアミノ酸消費の検討

### 1.緒言

脳死ドナーブタモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植法において常温酸素化灌流装置の有用性を示すことができた。しかし、その臨床応用を目指すにあたっては灌流条件の検討が必要である。灌流条件は①灌流液、②灌流温、③灌流圧の検討があげられる。灌流液については、これまで冷保存において使用されてきた保存液は、細胞内液型の電解質組成に加えて細胞浮腫を防ぐために高浸透圧に調整されており、常温酸素化灌流に使用することはできず新たに開発する必要がある。そこで、本実験ではまず灌流液におけるアミノ酸の必要性を検討する方針とした。前実験においては、東京理科大学辻研究室で行ったラット肝を用いた実験で使用した肝細胞培養液（Leiovit's L-15 培地）に酸素運搬体としてブタ全血を 10%配合したものを用いたが、本実験では臨床応用を目標に市販のアミノ酸製剤を用いて灌流保存実験を行うこととした。そこで、東京理科大学辻研究室において、先にラットを用いた実験を行った。

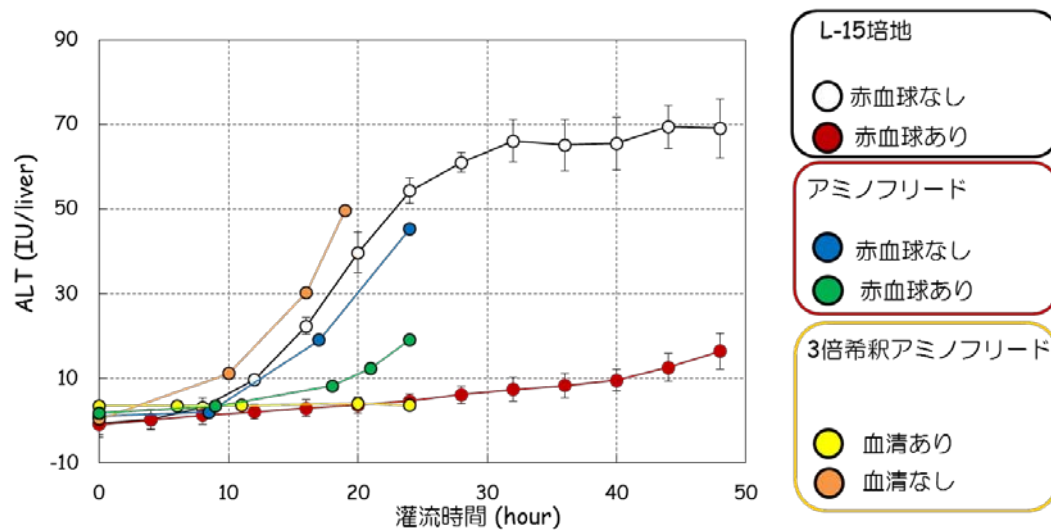


図 13：ラットにおける先行実験結果（personal communication）

この実験では灌流液として、①L-15 培地（前実験で使用）、②アミノフリード原液（大塚製薬工場）③アミノフリード 3 倍希釈を用い、それぞれにヒト赤血球液を 10% 混注した群としない群、計 6 群に分け、その灌流液中の ALT 値について検討している。アミノフリード 3 倍希釈については生理的食塩水を用いて希釈した。結果は前実験で使用した L-15 培地にヒト赤血球 10% を混注した群と、アミノフリード 3 倍希釈液にヒト赤血球 10% を混注した群が最も ALT の上昇を抑えることができた。

このラットの実験を踏まえ、ブタ肝常温酸素化灌流中の灌流液におけるアミノ酸濃度の変化を調べることによりアミノ酸の必要性について検討した。

## 2.方法

ドナーブタとして三元雑種ブタ（Fuji Micra Inc., Shizuoka, Japan）を用いて、摘出までは心停止させることなく全肝摘出を行った（n=4）。摘出した肝グラフトを前出の実験と同様の常温酸素化灌流装置上で 5 時間灌流し、その灌流液中のアミノ酸濃度を分析することにより、常温酸素化灌流におけるアミノ酸の必要性について検討した。

### ドナー手順

全身麻酔をかけた後に、右頸動脈にカニューレションし血液を 200ml 脱血した。腹部正中切開で開腹した。まず、総胆管に 4Fr アトムチューブ（Atom Medical Corporation, Tokyo, Japan）を挿入した。次に肝上部下大静脈、肝下部下大静脈、肝動脈、門脈をテーピングした。血管鉗子を用意し、肝上部下大静脈、肝下部下大静脈、肝動脈、門脈の順に素早くクランプ・切離し、肝グラフトを摘出した。肝グラフト摘出後は、速やかに塩化カリウム液を静注し心停止させた。

## 灌流液

灌流液はラットの実験を踏まえ、浸透圧、ブドウ糖濃度、電解質組成をヒト細胞外液に近い状態に調整し、アミノ酸を加えたものに、酸素運搬体としてドナーから採取した全血を 10-20% 混注した。具体的な内容は、アミノ酸製剤：アミノレバン（株式会社大塚製薬工場）と重炭酸リンゲル液：ビカネート（株式会社大塚製薬工場）および 50% ブドウ糖液を以下の割合で調整した。

ビカネート 8000ml

アミノレバン 360ml

50% ブドウ糖液 17.6ml

< 調製後の灌流液組成（ブタ全血混注前） >

・電解質；

・  $\text{Na}^+$  : 125 mEq/L

・  $\text{K}^+$  : 3.8 mEq/L

・  $\text{Cl}^-$  : 107 mEq/L

・  $\text{HCO}_3^-$  : 27 mEq/L

・  $\text{Citrate}^{3-}$  : 3.8 mEq/L

- ・糖質濃度；

- ・ブドウ糖：105mg/dL（約 0.1%）

- ・アミノ酸濃度；

- ・ 0.34%

- ・浸透圧

- ・ 290mOsm

#### 常温酸素化灌流

常温酸素化灌流装置については、前回の実験と同様のものを使用した。灌流時間は 5 時間とした。その他の条件は、前回実験と同様とし、灌流液の酸素分圧は 140-160mmHg、灌流圧については門脈からは 5-10mmHg、肝動脈からは 20-30mmHg とした。灌流液は肝静脈から回収し、肝グラフトは 20℃の生理食塩水に浮かべて保存した。

#### 評価

常温酸素化灌流前と、灌流 5 時間後の灌流液をサンプリングし、その肝逸脱酵素、尿素窒素およびアミノ酸濃度の変化を分析した。アミノ酸濃度については、株式会社 SRL へ依頼し、高速液体クロマトグラフィ法により 41 種類のアミノ

酸濃度を測定した。

### 3.結果

#### 肝逸脱酵素

AST は、灌流前は  $87 \pm 23.5 \text{ IU/L}$  から 5 時間後は  $249 \pm 144 \text{ IU/L}$  へ上昇する傾向がみられた ( $p=0.22$ )。一方 ALT は、灌流前  $25 \pm 9.3 \text{ IU/L}$  から灌流 5 時間後は  $28 \pm 8.6$  と有意な上昇は認めなかった( $p=0.77$ )。

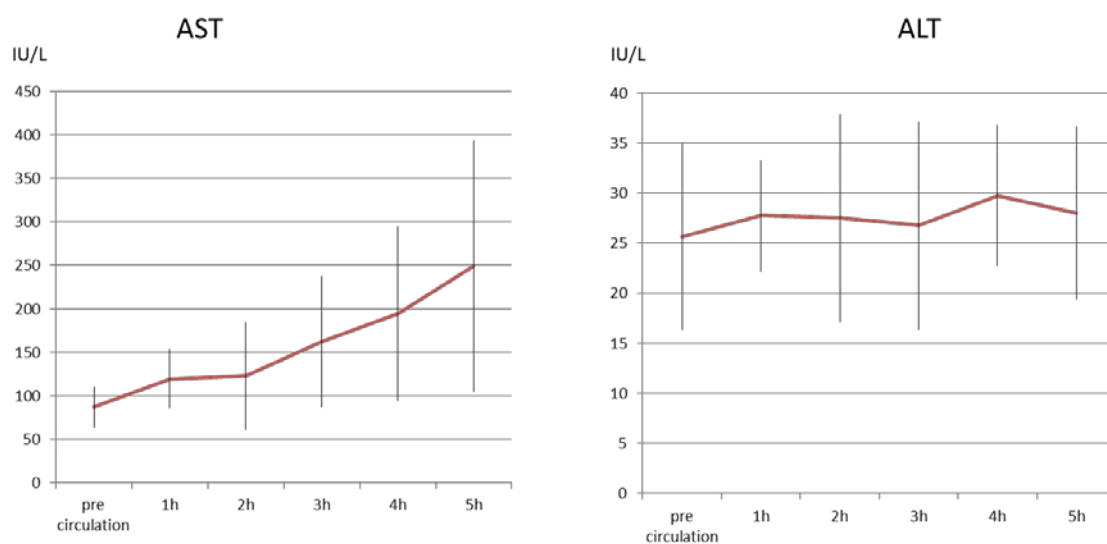


図 14：肝逸脱酵素の推移

## 尿素窒素

尿素窒素は、灌流前は検出されなかったが、徐々に上昇し、5 時間後では  $7.7 \pm 4.4 \text{mg/dl}$  と有意に上昇していた。

## 尿素窒素

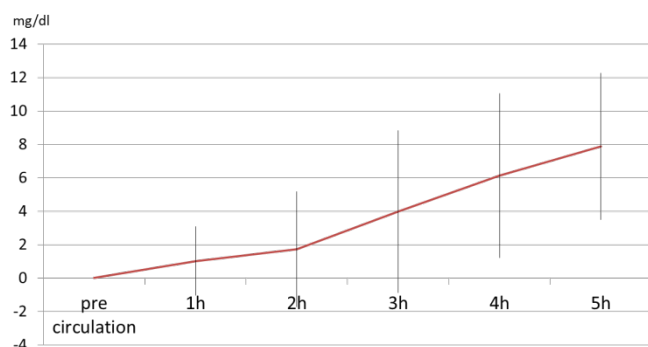


図 15：尿素窒素の推移

## アミノ酸分析

測定した 41 種類のアミノ酸のうち、有意に上昇したものが 6 種類、有意ではないが上昇したものが 11 種類、有意に低下したものが 15 種類、変化がなかったものが 9 種類であった。

必須アミノ酸のみに注目すると、8 種類すべての必須アミノ酸で有意な低下を認めた。また、尿素サイクルに関わる 5 種類のアミノ酸においては、尿素、オルニチンは有意に上昇したが、アルギニンは有意に低下していた。アスパラギン酸、シトルリンについては、有意ではないが上昇していた。

## アミノ酸（41 種類）

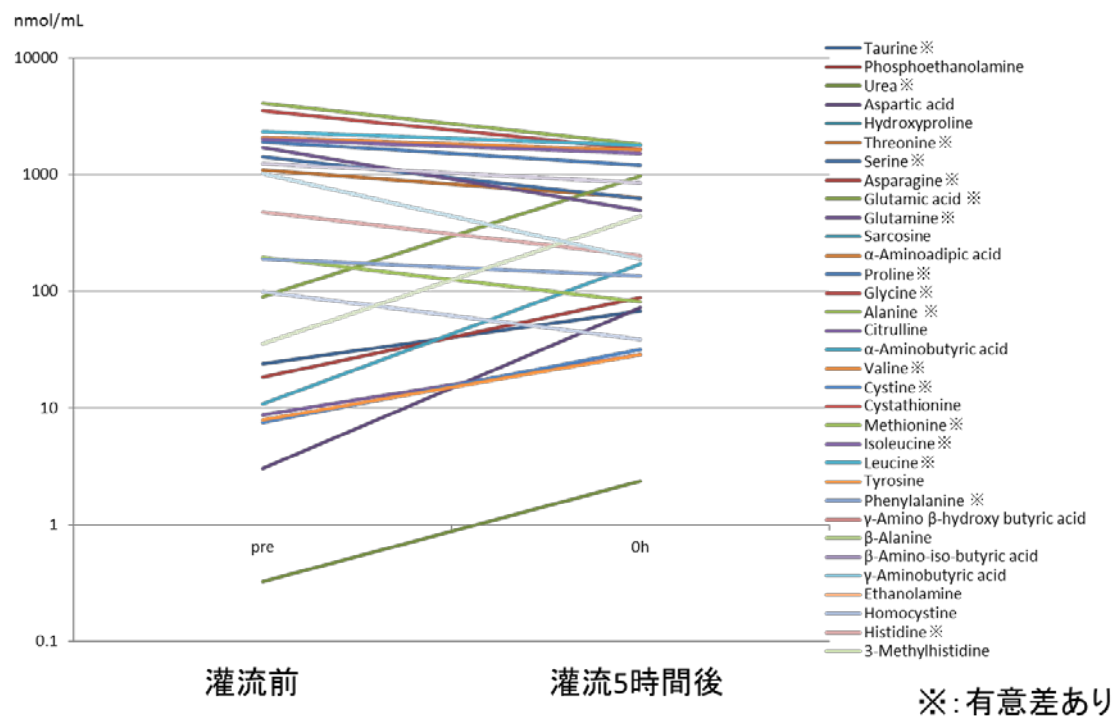


図 16 : アミノ酸分析（41 種類）の結果

## 必須アミノ酸

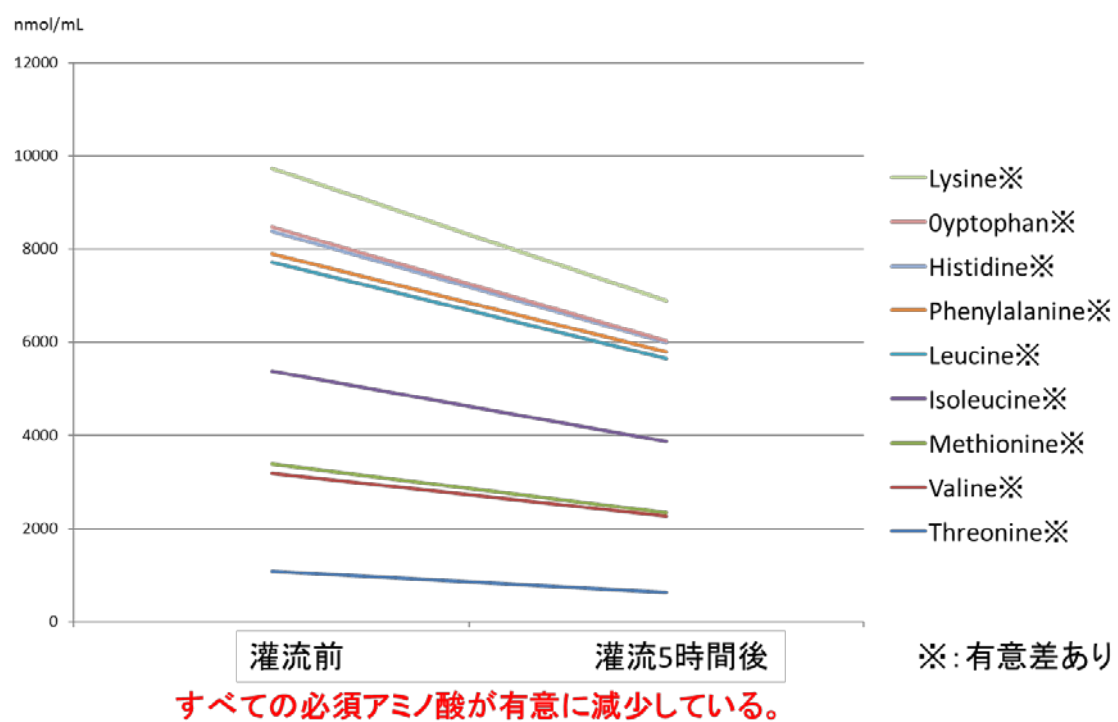
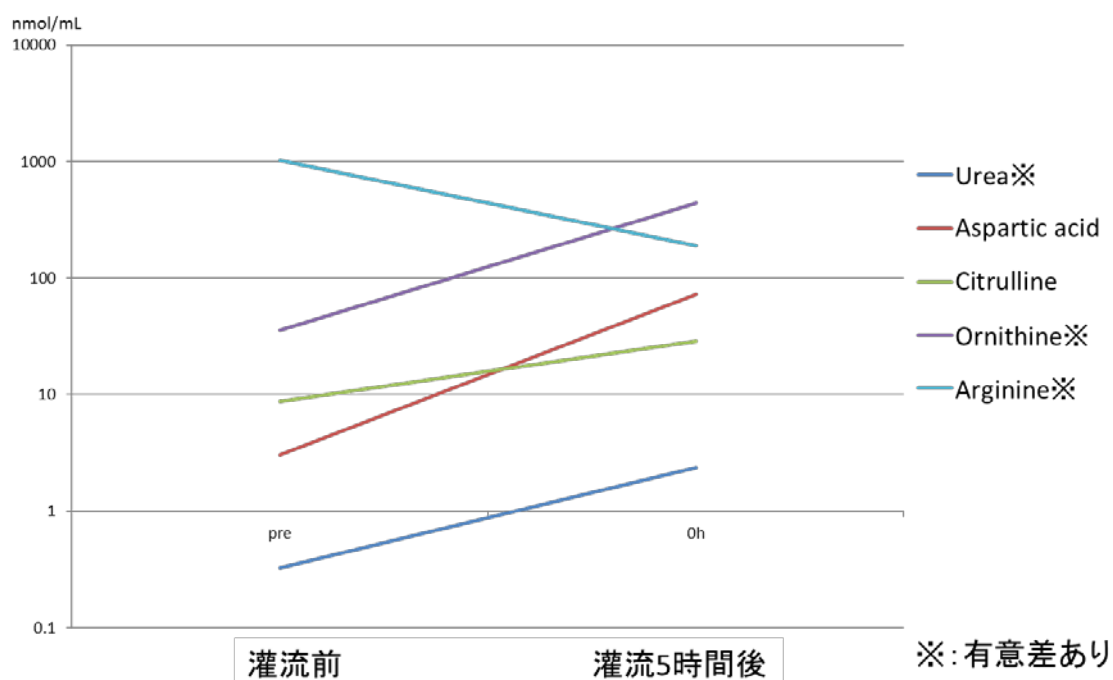


図 17 : アミノ酸分析（必須アミノ酸）の結果

## 尿素サイクルに関わるアミノ酸



尿素とオルニチンは有意に上昇・アルギニンは有意に低下している  
 →ミトコンドリア内での尿素サイクルが十分に機能していないことが示唆される

図 18 : 尿素サイクルに関わるアミノ酸分析の結果

## 4.小括

細胞の代謝活性は、温度が 10℃下がるごと 1/1.5-2 となることが報告されており、本実験における 20℃の環境においては細胞の代謝活性は 1/3-4 になっていると考えられる。しかし、完全に代謝が行われていないわけではない。本実験の結果では、必須アミノ酸が 5 時間の灌流により有意に低下しており、そのアミノ酸の代謝が行われたことを示唆する。さらに、尿素窒素も有意に上昇していることもこれを示唆している可能性がある。また、尿素サイクルに関わるア

ミノ酸では、尿素・オルニチンの上昇を認めた。これは、ミトコンドリア内での活性が低下している可能性がある。近年、灌流液中の尿素を測定することにより肝グラフトのバイアビリティを評価できると報告されているが(19)、灌流中のアミノ酸代謝はこれを裏付けるものである。常温酸素化灌流における本実験においては、酸素運搬体としての血液を 10・20%配合していたが、これらの配合量が少なく、十分な酸素を運搬できていなかった可能性がある。

本実験により、常温酸素化灌流保存において、肝グラフトはアミノ酸を代謝していることが示された。常温酸素化灌流においては、アミノ酸の供給が必要である。

### Ⅲ. 常温酸素化灌流装置を用いた肝グラフト保存における酸素運搬体の必要性についての検討

#### 1.緒言

実験Ⅱ 常温酸素化灌流装置を用いた肝グラフト保存におけるアミノ酸消費の検討において、ミトコンドリア内での活性低下を示唆する所見を認めたことを踏まえ、酸素運搬体の必要性について検討する。常温酸素化灌流における灌流液

については、灌流液の約 50%に赤血球液を用いる方法や、血液成分や酸素運搬体を全く配合しない方法などが報告されており、現時点では統一された方法はない。また、常温酸素化灌流において酸素運搬体の必要性について検討された報告もなく、これらのデータについては今後蓄積していく必要がある。そこで本実験では、前実験と同様の条件における常温酸素化灌流において、酸素運搬体の必要性について検討した。

## 2.方法

ドナーブタとして三元雑種ブタ（Fuji Micra Inc., Shizuoka, Japan）を用いて、摘出までは心停止させることなく全肝摘出を行った。摘出した肝グラフトを前出の実験と同様の常温酸素化灌流装置上で 12 時間灌流し、その灌流液中の肝逸脱酵素、胆汁産生量、肉眼的浮腫を分析することにより、常温酸素化灌流における酸素運搬体の必要性について検討した。

ドナー手順については、実験Ⅱと同様の方法で行った。

### 常温酸素化灌流

実験Ⅱで使用した灌流液を用い、酸素運搬体としてドナーブタ全血を 10%配合したモデル（n=1）と配合しないモデル（n=1）で検討した。

灌流圧、灌流温は実験Ⅰ、Ⅱと同様とし、灌流時間は 12 時間とした。

## 評価

評価は、臨床の現場を念頭におき、灌流液中の肝逸脱酵素（ALT）、胆汁排泄量、肉眼的浮腫、病理について行った。肉眼的浮腫については、灌流中のグラフトの画像を画像解析ソフト：Image J(Wayne Rasband, USA)を用いて投影面積比を計算し比較した。

## 3.結果

肝逸脱酵素（ALT）は灌流開始後 6 時間まではどちらのモデルもほとんど上昇無く経過していたが、灌流開始 7 時間後より、酸素運搬体を配合していないモデルでは上昇傾向を認めた。一方、酸素運搬体を配合したモデルにおいては、その後も上昇傾向は認めなかった。

### ALT

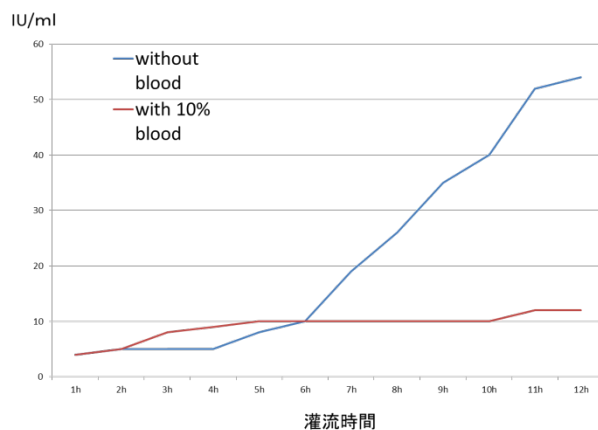


図 19：灌流中の ALT の推移

肉眼的浮腫については、酸素運搬体を配合したモデルにおいては投影面積比  
1.19 倍に膨化していたのに対し、酸素運搬体を配合しなかったモデルにおいて  
は 1.45 倍へ上昇していた。

## 肉眼的所見

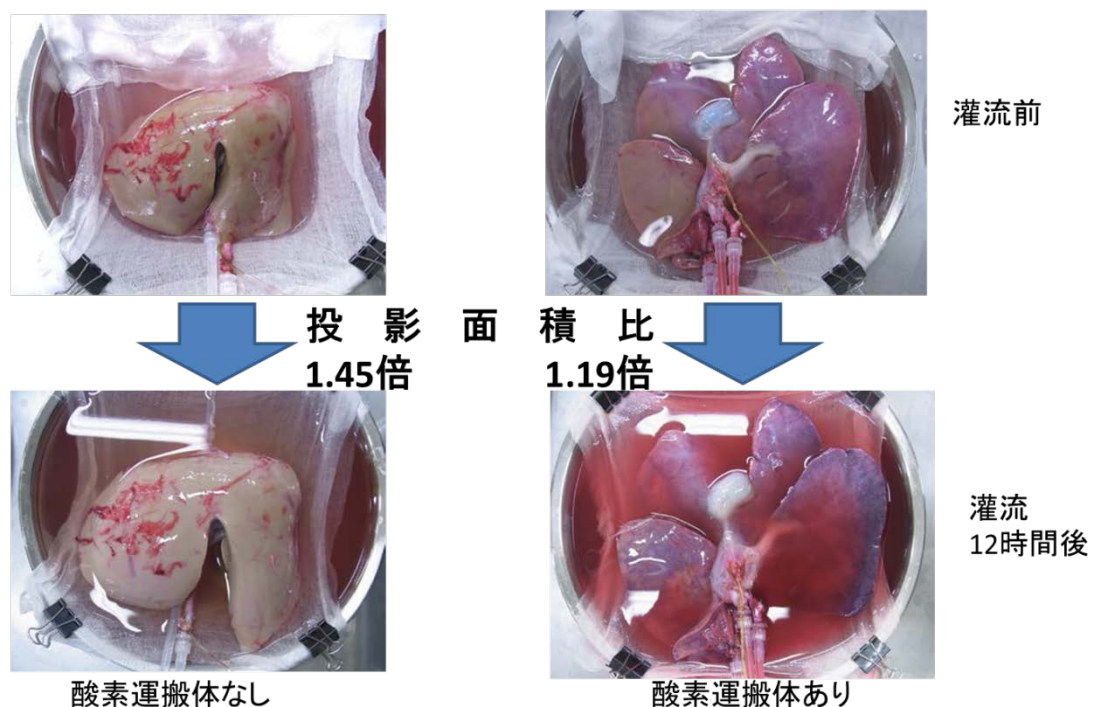


図 20：肉眼的所見

また、酸素運搬体を配合しなかったモデルは胆汁産生がみられなかったのに対し、酸素運搬体を配合したモデルにおいては 7ml/12 時間の胆汁産生を認めた。  
さらに、病理学的評価においては、酸素運搬体を配合しなかったモデルにおいては、肝細胞の核濃縮像を認めたのに対し、酸素運搬体を配合したモデルにお

いては、そのような所見は認めなかった。

## 灌流12時間後の組織所見と胆汁産生

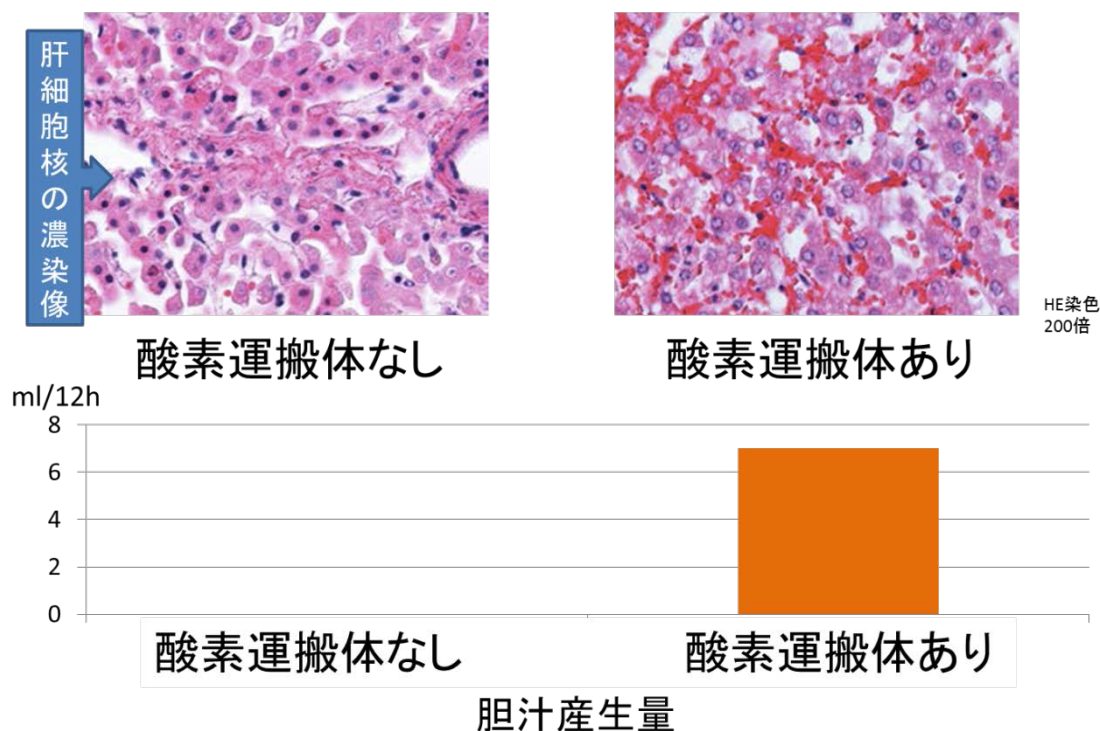


図 21：灌流 12 時間後の組織所見と胆汁産生量

### 4.小括

近年、常温酸素化灌流装置による肝グラフト保存の有用性が報告されているが、その灌流条件や灌流液は統一されておらず(12, 13)、今後はよりよい保存条件を検討していく必要がある。今回の実験では、その酸素運搬体の必要性について検討した。すでに臨床応用されているものでも、酸素運搬体として赤血球液を50%程度配合するものから(13)、酸素運搬体を全く配合しないものまで報告され

ている(12)。しかし、今回の実験においては、少なくとも 6 時間を超える常温酸素化灌流保存では酸素運搬体を配合した方がよいことが示唆された。本実験においては、1 例ずつの検討であるため、今後は実験数を増やし再現性を確認していく必要がある。また今回の実験では、酸素運搬体の必要性の検討であったため 10%の配合としたが、今後は適切な濃度を検討していく必要がある。

## 考察

本実験において、常温酸素化灌流の新たな有用性を検討することができた。実験 I. 脳死ドナーブタモデルを用いた常温酸素化灌流装置による分割肝移植法では、100 分保存後の冷保存群においてアポトーシスを誘導する  $\text{TNF}\alpha$  の有意な上昇を認め、異所性移植 12 時間後の冷保存群において肝静脈周囲の肝細胞の脱落と核濃縮像を認めた。これは、冷保存においては栄養や酸素の不足から肝細胞が徐々にアポトーシスが誘導されているが、冷保存により細胞内の酵素は働かないためその形態は変化せず、再灌流後に  $\text{TNF}\alpha$  より末梢のカスケードが活性化し、細胞死が誘導されていると考えられる。また、本実験において行っ

た肝分割操作は、いずれの群においても保存液あるいは灌流液に浸けたままでは操作できず、外科医の手により触りながらの操作が必要である。これらの操作は、冷保存群においてはその本来の厳密な冷保存は保つことができないが、常温酸素化灌流群においては手の温度と保存条件の温度が近いことから、冷保存群に比較して常温酸素化灌流装置を用いた肝分割操作の方が手の温度による障害を軽減できるものと考えられる。さらに、常温酸素灌流装置上での肝分割操作は離断面の出血点を同定しながら操作を行うことができることも有用である。

脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植は 1980 年代から行われており、1 つの肝グラフトから 2 人のレシピエントを救命できる有益な方法である(8, 10, 11, 22-24)。脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植は United Kingdom 基準(29)や Hamburg 基準(9)などに基づいて行われているが、primary non-function や過小グラフト症候群のリスクからその基準は厳しく、多くは施行されていない。さらに本邦においては、脳死肝グラフトの肝分割操作は、遺族へ遺体を可及的速やかに返すという倫理的配慮から体外で冷保存下での分割操作となっている。しかし、体外での肝分割操作は 1-2 時間の冷阻血時間の延長を必要とし、さらなるグラフトの質の低下の原因となる。本邦においては日本臓器移植ネットワークからの報告では 1997 年 10 月・2013 年 12 月までに施行した脳死分割肝移植

は 7.5% (15/199) と報告されている(30)。またヨーロッパにおいては European Liver Transplant Registry より 1988 年 1 月-2013 年 12 月までに行った分割肝移植は 6.0% (6246/104787) と報告されている(31)。そこで、今回の実験において検証した常温酸素化灌流装置を用いた肝分割を行えば、冷保存下での分割操作に比べてグラフトの質を低下させることなく分割でき、さらに肝内の血流を保っているため離断面における血管や胆管を同定しながら分割することができる。

また、常温酸素化灌流は近年急速に臨床応用の報告が増加しているが、その灌流条件については統一されていない。特に灌流液については、酸素運搬体として血液製剤を配合している報告(13, 32)や、一方で血液製剤を配合していない報告(12)などがあり、いまだ灌流中の肝グラフトの動態については未解明な部分が多く、今後よりよい灌流液の検討が必要となる。今回の実験においてその一部が解明され、20℃という条件においても肝グラフトではアミノ酸代謝が行われ、また酸素運搬体を配合することによりグラフト保存効果が高まったことが確認された。今後は、酸素運搬体の適切な濃度など検討していくことによりさらに保存効果の高い灌流条件を検討していく必要がある。

また、常温酸素化灌流保存を生体肝移植に用いれば、その保存力の高さからドナーの術中待機時間の解消などに応用できる可能性がある。常温酸素化灌流装

置は本邦においては基礎実験の段階であるが、今後臨床応用されれば脳死肝移植におけるマージナルドナーグラフトの利用や脳死分割肝移植、生体肝移植への応用など今後の展望が期待される。

### 結語

今回の実験では、大動物を用いて脳死ドナーグラフトを用いた分割肝移植における常温酸素化灌流装置の有用性を示すことができた。この方法により脳死ドナーグラフトにおける分割肝移植が増加し、肝移植により救命できる患者が増えることが期待される。また、この常温酸素化灌流中の肝グラフトはアミノ酸代謝を行っており、灌流液には酸素運搬体を配合した方がその肝グラフトの保存効果が高いことが示唆された。

## 謝辞

本論文を書き終えるにあたり、研究の推進に終始適切なご指導とご助言をいただきました先端医療開発部門 小林 英司 客員教授、東京理科大学基礎工学部 辻 孝 教授に深謝いたします。また実験の実施に際してご協力いただきました先端治療開発部門 菱川 修司 助教授、寺谷 工 講師、東京理科大学基礎工学部 大島 正充 助教、石川 潤 研究員に心より感謝申し上げます。

## 文献

1. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Moon JB, Fulginiti VA, Cotton EK, Porter KA.. Extended survival in 3 cases of orthotopic homotransplantation of the human liver. *Surgery* 1968; 63 (4): 549.
2. Fondevila C1, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Muñoz J, Taurá P, Calatayud D, Leuvenink H, Rimola A, Ploeg RJ, García-Valdecasas JC. Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg* 2011; 254 (6): 1000.
3. Vogel T, Brockmann JG, Coussios C, Friend PJ. The role of normothermic extracorporeal perfusion in minimizing ischemia reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2012; 26 (2): 156.
4. Perk S, Izamis ML, Tolboom H, Uygun B, Berthiaume F, Yarmush ML, Uygun K. A metabolic index of ischemic injury for perfusion-recovery of cadaveric rat livers. *PLoS One* 2011; 6 (12): e28518.
5. Xu H, Berendsen T, Kim K, Soto-Gutiérrez A, Bertheium F, Yarmush ML, Hertl M. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia. *J Surg Res* 2012; 173 (2): e83.
6. Tolboom H, Pouw RE, Izamis ML, Milwid JM, Sharma N, Soto-Gutierrez A, Nahmias Y, Uygun K, Berthiaume F, Yarmush ML. Recovery of warm ischemic rat liver grafts by normothermic extracorporeal perfusion. *Transplantation* 2009; 87 (2): 170.
7. Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Ruiz A, Mestres N, Calatayud D, Paredes D, Rodríguez C, Fuster J, Navasa M, Rimola A, Taurá P, García-Valdecasas JC. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12 (1): 162.
8. Malagó M, Rogiers X, Broelsch CE. Liver splitting and living donor techniques. *Br Med Bull* 1997; 53 (4): 860.
9. Wilms C, Walter J, Kaptein M, Mueller L, Lenk C, Sterneck M, Hillert C, Fischer L, Rogiers X, Broering DC. Long-term outcome of split liver transplantation using right extended grafts in adulthood: A matched pair analysis. *Ann Surg* 2006; 244 (6): 865.
10. Emre S, Umman V. Split liver transplantation: an overview. *Transplant Proc* 2011; 43 (3): 884.

11. Cescon M, Grazi GL, Ravaioli M, Ercolani G, Del Gaudio M, Vivarelli M, Cucchetti A, Zanello M, Vetrone G, Lauro A, Pinna AD. Conventional split liver transplantation for two adult recipients: a recent experience in a single European center. *Transplantation* 2009; 88 (9): 1117.
12. Karimian N, Matton AP, Westerkamp AC, Burlage LC, Op den Dries S, Leuvenink HG, Lisman T, Uygun K, Markmann JF, Porte RJ. Ex Situ Normothermic Machine Perfusion of Donor Livers. *J Vis Exp* 2015 (99): e52688.
13. Watson CJ, Kosmoliaptsis V, Randle LV, Russell NK, Griffiths WJ, Davies S, Mergental H, Butler AJ. Preimplant Normothermic Liver Perfusion of a Suboptimal Liver Donated After Circulatory Death. *Am J Transplant* 2015.
14. Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, McGuire J, Hughes D, Butler A, Rees M, Friend PJ. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation* 2002; 73 (5): 701.
15. Iwai S, Kikuchi T, Kasahara N, Teratani T, Yokoo T, Sakonju I, Okano S, Kobayashi E. Impact of normothermic preservation with extracellular type solution containing trehalose on rat kidney grafting from a cardiac death donor. *PLoS One* 2012; 7 (3): e33157.
16. Tolboom H, Izamis ML, Sharma N, Milwid JM, Uygun B, Berthiaume F, Uygun K, Yarmush ML. Subnormothermic machine perfusion at both 20°C and 30°C recovers ischemic rat livers for successful transplantation. *J Surg Res* 2012; 175 (1): 149.
17. Olschewski P, Gass P, Ariyakhagorn V, Jasse K, Hunold G, Menzel M, Schöning W, Schmitz V, Neuhaus P, Puhl G. The influence of storage temperature during machine perfusion on preservation quality of marginal donor livers. *Cryobiology* 2010; 60 (3): 337.
18. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53 (5): 957.
19. Reiling J, Lockwood DS, Simpson AH, Campbell CM, Bridle KR, Santrampurwala N, Britton LJ, Crawford DH, Dejong CH, Fawcett J. Urea production during normothermic machine perfusion: Price of success? *Liver Transpl* 2015; 21 (5): 700.

20. Shigeta T, Matsuno N, Obara H, Kanazawa H, Tanaka H, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Mizunuma H, Enosawa S. Impact of rewarming preservation by continuous machine perfusion: improved post-transplant recovery in pigs. *Transplant Proc* 2013; 45 (5): 1684.
21. Ishikawa J, Oshima M, Iwasaki F, Suzuki R, Park J, Nakao K, Matsuzawa-Adachi Y, Mizutsuki T, Kobayashi A, Abe Y, Kobayashi E, Tezuka K, Tsuji T. Hypothermic temperature effects on organ survival and restoration. *Sci Rep* 2015; 5: 9563.
22. Toso C, Ris F, Mentha G, Oberholzer J, Morel P, Majno P. Potential impact of in situ liver splitting on the number of available grafts. *Transplantation* 2002; 74 (2): 222.
23. Yersiz H, Renz JF, Farmer DG, Hisatake GM, McDiarmid SV, Busuttil RW. One hundred in situ split-liver transplantations: a single-center experience. *Ann Surg* 2003; 238 (4): 496.
24. Cescon M, Spada M, Colledan M, Torre G, Andorno E, Valente U, Rossi G, Reggiani P, Cillo U, Baccarani U, Grazi GL, Tisone G, Filipponi F, Rossi M, Ettorre GM, Salizzoni M, Cuomo O, De Feo T, Gridelli B. Feasibility and limits of split liver transplantation from pediatric donors: an italian multicenter experience. *Ann Surg* 2006; 244 (5): 805.
25. Abradelo M, Sanabria R, Caso O, Álvaro E, Moreno E, Jiménez C. Split liver transplantation: where? when? how? *Transplant Proc* 2012; 44 (6): 1513.
26. Busuttil RW, Goss JA. Split liver transplantation. *Ann Surg* 1999; 229 (3): 313.
27. Furukawa H, Taniguchi M, Fujiyoshi M, Oota M, Transplantation JSGL. Experience using extended criteria donors in first 100 cases of deceased donor liver transplantation in Japan. *Transplant Proc* 2012; 44 (2): 373.
28. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55 (6): 1265.
29. UK Transplant. Liver Organ Sharing Principles: Operating Principles for Liver Transplant Units in the United Kingdom and Republic of Ireland. 1999 (revised 2007).

30. Japan Organ Transplantation Network Homepage  
<https://www.jotnw.or.jp/index.html>

[accessed 3 Desember 2015].

31. European Liver Transplant Registry  
<http://www.eltr.org/>

[accessed 3 Desember 2015].

32. Perera M, Mergental H, Stephenson B, Roll GR, Cilliers H, Liang R, Angelico R, Hubscher S, Neil DA, Reynolds G, Isaac J, Adams DA, Afford S, Mirza DF, Muiesan P. First human liver transplantation using a marginal allograft resuscitated by normothermic machine perfusion. *Liver Transpl* 2015.