

氏 名	岡 田 憲 樹
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 502 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 八木澤 隆 (委 員) 教 授 花 園 豊 准教授 佐久間 康 成

論文内容の要旨

1 研究目的

近年、世界的な臓器不足を背景に、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。本邦でも脳死グラフトが不足しており、生体グラフト提供が困難な場合は、待機中に死亡する症例も少なくない。小児でも同様だが、本邦では小児脳死ドナーの臓器提供は少なく、成人脳死ドナー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。脳死分割肝移植は、1つの肝臓から2人を救命できる効果的な方法だが、現在臨床で行われている単純冷却保存下肝分割は **primary non-function** のリスクから、その適応条件は制限されている。

そこで、常温酸素化灌流の有用性の検討をテーマとして本研究を立案した。常温酸素化灌流の脳死分割肝移植への応用は報告されておらず、実験Ⅰでは脳死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で灌流液のアミノ酸の必要性を証明し、実験Ⅲでは酸素運搬体の必要性を検討した。

2 研究方法

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

ドナーとしてマイクロミニブタ、レシピエントとして三元雑種ブタを用いて、脳死ドナーを想定し肝摘出後、分割肝を用いた異所性肝移植実験を行った。冷保存群（**n=5**）と常温酸素化灌流群（**n=5**）に分け、肝グラフトを100分間保存し、保存中50分が経過した時点で肝分割を行った。保存後は異所性肝移植を施行し、12時間観察した。

常温酸素化灌流

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。灌流液は酸素化し、門脈から5-10mmHg、肝動脈から20-30mmHgで灌流した。肝グラフトは20℃の生理食塩水に浮かべて保存した。

レシピエント手順

レシピエントブタは、右腎を摘出し、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、門脈はレシピエントブタの門脈へ吻合した。その後全身麻酔を維持し、12時間生存実験とした。

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

ドナーブタとして三元雑種ブタを用いて、心停止させずに全肝摘出を行った（n=4）。摘出した肝グラフトを 5 時間常温酸素化灌流し、その他の灌流条件は実験Ⅰと同様とし、その灌流液中のアミノ酸濃度の変化を分析した。

灌流液は、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。

実験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

ドナーブタとして三元雑種ブタを用いて、心停止させずに肝グラフトを摘出した。灌流液に酸素運搬体としてブタ全血を 10%配合するモデル（n=1）と配合しないモデル（n=1）を用い、12 時間常温酸素化灌流した。灌流液は実験Ⅱで使用したものを、その他の条件は実験Ⅰ・Ⅱと同様とした。

3 研究成果

実験Ⅰ

血液検査：異所性肝移植後 12 時間の肝逸脱酵素は有意な差を認めなかった。

病理学的評価

H-E 染色

異所性肝移植術後 12 時間後において、常温酸素化灌流群では大きな変化がなかったが、冷保存群では肝静脈周囲の肝細胞脱落と核の濃縮像が観察された。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 ± 1.1 に対し常温酸素化還流群では 3.6 ± 1.5 と有意に低かった（ $p=0.03$ ）。

免疫染色

100 分間保存後の TNF α 陽性細胞数は冷保存群で有意に多かった。IL-6 染色は有意差は認めなかった。異所性肝移植 12 時間後は、いずれも有意差は認めなかった。

まとめ

今回の実験では、脳死分割肝移植における肝グラフトの保存について常温酸素化灌流の有用性を示した。また肝分割手技において、冷保存群では肝内の脈管を同定しながら分割することが困難であり肝移植後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肝移植後離断面からの出血は少量であった。

実験Ⅱ

測定したアミノ酸は、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。すべての必須アミノ酸は有意な低下を認めた。尿素サイクルに関わるアミノ酸では、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。尿素窒素は、灌流前は検出されなかったが、5 時間後では $7.7 \pm 4.4\text{mg/dl}$ と有意に上昇していた。

まとめ

本実験の結果では、特に必須アミノ酸が有意に低下し、また尿素窒素も有意に上昇しており、常温酸素化灌流において、肝グラフトはアミノ酸を代謝していることが示された。

実験Ⅲ

ALT は灌流開始後 6 時間まではどちらのモデルも上昇無く経過していたが、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ではその後も上昇傾向は認めなかった。

肉眼的浮腫については、酸素運搬体を配合しなかったモデルでは投影面積比 1.45 倍へ膨化したが、酸素運搬体を配合したモデルでは 1.19 倍であった。

また、酸素運搬体を配合しなかったモデルは胆汁産生を認めなかったのに対し、酸素運搬体を配合したモデルでは 7ml/12 時間の胆汁産生を認めた。

病理学的評価では、酸素運搬体を配合しなかったモデルは肝細胞の核濃縮像を認めたが、酸素運搬体を配合したモデルでは認めなかった。

まとめ

今回の実験においては、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。本実験では、1 例ずつの検討であるため、今後再現性を確認する必要がある。また酸素運搬体の適切な濃度を検討する必要がある。

4 考察

脳死分割肝移植は、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が、**primary non-function** のリスクからその適応基準は厳しい。本邦での施行数は 7.5% (15/199)、ヨーロッパでは 6.0% (6246/104787) と報告されている。常温酸素化灌流を用いれば、グラフトの質を低下させることなく分割でき、脳死分割肝移植の拡大を期待できる。

また、常温酸素化灌流保存を生体肝移植に用いれば、ドナーの術中待機時間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、脳死肝移植におけるマージナル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。

5 結論

今回の実験で、脳死分割肝移植における常温酸素化灌流の有用性を示すことができた。この方法により脳死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。

論文審査の結果の要旨

臓器移植において移植臓器の保存方法の開発は成績を左右するとともに適応を拡大するための重要なテーマといってよい。申請者は肝保存技術の一つとして常温酸素化灌流装置を作成し、これを用いた肝保存の有用性、また使用する灌流液の組成についてブタをモデルに検討している。

研究（実験）は大きく 3 つに分けてなされている。実験Ⅰではブタ（マイクロミニブタ、三元

雑種ブタ)を用いた分割肝保存、肝移植の実験である。対照として冷却保存群を設け、常温酸素化灌流保存群と比較している。常温酸素化灌流保存群では虚血性肝障害の評価指標の一つである Suzuki's score が移植後の病理所見で有意に低く、冷却保存と比較して障害が抑えられていることが判明した。また保存後の肝組織中の $\text{TNF}\alpha$ 陽性細胞数が常温酸素化灌流保存群で有意に少ないことを認めている。また常温酸素化灌流による分割保存においては出血点を確認しながらの分割が可能であり、これも本保存法の利点であった。

灌流保存では灌流液組成、灌流液温、灌流圧の設定が重要である。実験Ⅱにおいては常温酸素化灌流保存中の灌流液内アミノ酸濃度を測定し、とくに必須アミノ酸の減少が著しいことを認めている。これは灌流液内へのアミノ酸補給が必要なことを示唆する所見といえる。さらに実験Ⅲでは酸素運搬体である赤血球(全血 10%)を灌流液に配合し、この配合により灌流後の肉眼所見、病理所見が良好に保たれ、胆汁産生があることを認めている。

ブタを使用した大きな労力を要する肝保存研究(実験)のため、対象数が少ないという難点はあるものの、常温酸素化灌流保存法が肝保存、とくに分割肝保存に有用であり、また灌流液に酸素運搬体を配合することの意義を示唆した研究である。今後の展開は大いに期待でき、学位授与に相応しい内容と判定した。

なお、論文には一部の修正を要したが適確な修正がなされた。研究結果の一部は Transplantation Proceedings 誌に掲載されている。

最終試験の結果の要旨

申請者は肝移植の現況や課題、そして肝保存技術開発の重要性を述べた後、本研究の意義、方法、研究結果を明快に纏めた。常温酸素化灌流保存の方法、ブタにおけるドナー手術、レシピエント手術の手技、また灌流保存における保存条件などをわかりやすく解説し、灌流液組成に関する研究成果を発表した。そして常温酸素化灌流保存法が肝保存、とくに分割肝保存に有用であり、赤血球など酸素運搬体を灌流液に配合することにも意義あることが示された。

研究内容、論文内容について質疑応答がなされたが返答は適切であり、また今後の研究の発展や課題についても十分に理解できていた。最終試験(試問)においても審査委員は一致して合格と判定した。