

ヒト由来人工赤血球を用いたブタ脂肪肝の保存方法の検討

金澤寛之, 松野直徒

旭川医科大学 移植医工学 治療開発講座

【研究の背景】

本邦では、現在年間約 70 例の脳死肝移植が行われている。一方で日本臓器移植ネットワークに脳死肝移植登録された患者は常時 300 名以上おり、待機期間中の死亡も多く臓器提供数は十分とはいえない。移植医療においてドナー臓器不足は深刻であり、心停止肝や脂肪肝などのマージナルな臓器への移植適用拡大に期待が集まっている。心停止ドナーから摘出された臓器の機能を良好に保存・維持し、更には機能回復・蘇生が可能な技術として臓器内に保存液を灌流する機械灌流保存が注目を集めている。欧米では、肝臓用持続灌流保存装置が実用化され、低温灌流保存の有用性 (Guarrera, et al. AJT, 2010) や、体温条件下での持続灌流保存の移植報告 (R. Ravikumar, et al. AJT, 2016) さらに、欧州では単純冷却保存と赤血球を用いた常温灌流保存の多施設共同による RCT による有効性の報告 (D Nasralla, et al. Nature 2018) がなされた。さらに、我々の研究室からは赤血球の代替となりうる人工赤血球を用いた preliminary study を行ってきた (Kanazawa H, et al. 日本移植学会総会 2018)。しかし、灌流保存条件については灌流液温度、灌流圧、灌流液組成、酸素運搬体の是非を含め、諸説あり混沌とした状況である。最適な手法は未だ確立されておらず精力的な研究が求められているのも事実である。

【目 的】

本研究では、酸素運搬体としての人工赤血球含有保存液を用いた機械灌流保存法による心停止ドナーモデルおよび脂肪肝モデルを用いた積極的機械灌流法により移植臓器の阻血再灌流傷害の克服を最終目的とする。脂肪肝モデルの確立と、人工赤血球含有保存液を用いた機械灌流保存により、酸素消費動態、流体力学的、組織学的評価、*ex-vivo* 再灌流モデルならびにブタを用いた同所性移植による検証と、臨床への展開を目指した技術を確立する。

【方 法】

(1) 心停止ドナー肝グラフトに対する灌流温度、灌流圧、酸素供給条件、酸素運搬体人工赤血球含有保存液での検討

灌流保存液は、UW (University of Wisconsin)-gluconate 液を基本とし、低温から常温へ復温させる温度変化に対応している。その際に最適な灌流液流量、酸素供給条件、圧力動態を解析し、灌流条件の網羅的探索を行い、酸素化灌流液による組織 ATP 濃度測定と保存後の組織学的評価を特に類洞内皮細胞の形態および微小循環障害を定量的に評価することで、至適灌流条件を決定する。

(2) 脂肪肝モデルの作成および *ex-vivo* 灌流保存実験による灌流条件の検討

Large-Yorkshire, Landrace, Duroc pigs による三元ブタ (大雪山麓社) にメチオニン・コリン無添加特殊飼料を用いて短中期間飼育後に、血液検査により肝障害の程度および肝生検により肝細胞への脂肪変性を確認する。得られた脂肪肝グラフトに対し *ex-vivo* 灌流保存がどのような影響を及ぼすかを評価する。

【結 果】

(1) 心停止ドナー肝の実験系を用いて至適灌流条件について一定の方針を得ることができた。低温あるいは室温それぞれにおいて酸素化灌流保存液を用いた機械還流保存によって組織 ATP 濃度は経時的に上昇することが確認され、単純冷却保存でみられる組織 ATP 濃度の減少および枯渇を回避することが可能であった。酸素運搬体を用いない灌流液の場合は灌流液温度が低温条件と室温条件では有意差を認めなかったことを今回報告するに至った (Kanazawa H, et al. J Surg Res. 2019 245:410-419)。先行研究により、酸素運搬体を用いた灌流保存においても、単純冷却保存と比較して、明らかな有害事象なく虚血再灌流傷害を軽減する可能性を示してきたが (Kanazawa H, et al 日本移植学会総会 2018 年) (Shonaka T, et al. PLoS One. 2019 14(12):e0226183)、組織 ATP 濃度が酸素運搬体を用いることで、どのように修飾されるか引き続き検証を行っていく。

(2) 離乳直後の体重 10 kg の三元ブタに対し、メチオニン・コリン無添加特殊飼料を用いて約 2 カ月間の飼育を行った。特殊飼料で 2 カ月間の飼育後、血液採取および肝生検を行い評価した。血中コレステロール値および ALP 値に異常を認めたが、病理学的には明らかな肝細胞の脂肪変性を確認することはできなかった。

【考 察】

本研究は、臨床医療への貢献が期待される大動物(ブタ)による実験であり医工学的な解析を複合的に行う国内外でも類をみない体制の研究である。欧米においても機械灌流保存は移植医療の高度化に大きく貢献すると期待され、さらにブタ脂肪肝モデル作成の報告は少なく、灌流保存で最も重要な因子である灌流液の酸素化とそれによる組織 ATP 濃度の維持と増加を効率的に達成すると予想される酸素運搬体としての人工赤血球を用いることは極めて独創的であり、心停止ドナー肝および脂肪肝の回復を企図した次世代型移植医療の礎として推進していくことが期待される。

心停止ドナー肝においては、酸素化灌流保存液によって組織 ATP 濃度は経時的に増加することが確認できた。次のステップであるブタ脂肪肝モデル作成においては、既報の Rodent model ではコリン無添加飼料により線維化を伴った脂肪肝を容易に誘導できることから、コリン・メチオニンを欠乏させた特殊飼料で短中期間飼育したが、組織学的に明らかな脂肪肝を誘導することはできなかった。しかし血液学的異常所見を得ることができたことから、今後は薬剤誘導を組み合わせることで、ブタ脂肪肝モデルの作成を試みたい。安定的なモデル作成レンピの探索が最優先課題である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

深刻なドナー不足の解決策の一つとして、機能劣化のリスクを有する心停止ドナーおよび脂肪肝ドナーへの適応拡大を可能とする技術の確立が急務である。欧米では臨床において肝臓の灌流保存装置の有用性が報告されつつあるが、本邦では臨床応用可能な灌流保存装置すらままならない状況である。心停止ドナーおよび脂肪肝をはじめとしたマージナルドナーの臓器が移植可能かの客観的な評価系や適切な保存技術のないまま移植に結び付かず破棄されている現状に対し、人工赤血球含有保存液を用いた灌流保存装置を確立することで、これらの問題を解決することを最終目標としていく。

【参考・引用文献】

1. Kanazawa H, Obara H, Yoshikawa R, Meng L, Hirano T, Okada Y, Nishikawa Y, Matsuno N. Impact of Machine Perfusion on Sinusoid Microcirculation of Liver Graft Donated After Cardiac Death. J Surg Res. 2019 Aug 19;245:410-419.
2. Obara H, Morito N, Matsuno N, Yoshikawa R, Nakajo T, Gochi M, Otani M, Shonaka T, Furukawa H, Hirano T, Enosawa S. Initial perfusate purification during subnormothermic machine perfusion for porcine liver donated after cardiac death. J Artif Organs. 2019 Aug 7.

3. Yoshikawa R, Matsuno N, Morito N, Gouchi M, Otani M, Takahashi H, Shonaka T, Nishikawa Y, Enosawa S, Hirano T, Furukawa H, Obara H. Evaluation Using an Isolated Reperfusion Model for Porcine Liver Donated After Cardiac Death Preserved with Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion. *Ann Transplant*. 2018 Nov 27;23:822-827.