

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	庄中 達也
学位論文題目			
Impact of human-derived hemoglobin based oxygen vesicles as a machine perfusion solution for liver donation after cardiac death in a pig model (人工赤血球含有灌流液を用いた肝臓の機械灌流保存の有効性)			
共著者名			
松野直徒、小原弘道、吉川遼、西川祐司、石原洋、暮地本宙己、合地美香子、大谷将秀、金澤寛之、東寛、酒井宏水、古川博之			
PLoS One. 2019 Dec 11;14(12):e0226183. doi: 10.1371/journal.pone.0226183. eCollection 2019. に掲載			
研究目的			
本研究の目的は、心停止ドナーの肝移植に機械灌流を用いる際、人工赤血球を用いた灌流液の有効性についてブタの実験モデルで検討することである。			
材料・方法			
ブタは雑種ブタ(約 25kg)を使用した。KCL を用いて 60 分の心停止の後、ブタより肝臓を摘出、4 群に分け 4 時間の肝臓の保存を行ったのち、灌流装置(Fig.1)を用いた再灌流を 2 時間行った。保存方法としては①CS (Cold storage)群 ②HMP(hypothermic machine perfusion)群 ③SNMP(subnormothermic machine perfusion)群 ④SNMP+HbV(hemoglobin vesicles)群に分けた(Fig.2)。評価方法としては血行動態(肝動脈圧、門脈圧、酸素消費量)、生化学的データ(AST,LDH)、血液ガス分析(pH, Lactate)、病理、走査電子顕微鏡結果を用いた。			
本実験は灌流保存の後に 2 時間の再灌流モデルを用い評価した。この評価方法については Yoshikawa らが報告している 1)。			

成 績

1, 灌流中の肝動脈圧・酸素消費量(Fig.3,4)

灌流中の肝動脈圧は SNMP+HbV 群で最も低値となった。SNMP 群と比較して SNMP+HbV 群の肝動脈圧は低値となったが 2 群間に有意差はなかった(Fig.3)。酸素消費量は HMP 群で最も低値であり、次いで SNMP 群、SNMP+HbV 群で高い値となったが、この 2 群間では有意差はなかった (Fig.4)。

2, 灌流中の灌流液内の AST,LDH 値(Fig.5,6)

灌流中の AST 値は SNMP+HbV 群が最も低い値であった。SNMP 群と HMP 群の灌流中の AST 値はほぼ同様の推移を示した(Fig.5)。灌流中の LDH 値は SNMP+HbV 群が SNMP 群や LDH 群と比較しても最も低い値であった。しかし 3 群間で有意差はなかった (Fig.6)。

3, 再灌流時の門脈圧・肝動脈圧の変化(Fig.7,8)

「門脈圧の変化」は以下の式で示される: (再灌流 60 分の門脈圧-再灌流 0 分の門脈圧)/再灌流 0 分の門脈圧。

門脈圧の変化は SNMP+HbV 群で最も少なく、次いで SNMP 群、HMP 群、CS 群の順で門脈圧に変化がみられた(Fig.7)。

「肝動脈圧の変化」は以下の式で示される: (再灌流 60 分の肝動脈圧-再灌流 0 分の肝動脈圧)/再灌流 0 分の肝動脈圧

肝動脈圧の変化は HMP 群で最も高かった。HMP 群と比較して SNMP 群では門脈圧の差は少なかったが有意差はなかった。しかし HMP 群と比較して SNMP+HbV 群の肝動脈圧の差は優位に少なかった(Fig.8)。

4, 再灌流後の灌流液内の AST および LDH 値(Fig.9,10)

再灌流中の AST 値は CS 群が他の 3 群と比較して優位に高く、灌流保存で灌流液内の AST が低下することが示された。また SNMP+HbV 群の AST 値は HMP 群および SNMP 群と比較しても優位に低かった。(Fig.9)

再灌流中の LDH 値も同様で CS 群が他の 3 群と比較して優位に高く、灌流保存で灌流液内の LDH が低下することが示された。また SNMP+HbV 群の LDH 値は HMP 群と比較して優位に低かった。(Fig.10)

5, 再灌流時の pH および Lactate の差 (Fig.11,12)

再灌流 0 分と 120 分の灌流液中の pH 値の差を比較した。pH 値の差は CS 群で最も大きく SNMP+HbV 群で最も少なかった。SNMP+HbV 群は CS 群および HMP 群と比較して優位に pH 値の差が少なかった。(Fig.11)

再灌流 0 分と 120 分の灌流液中の Lactate 値の差を比較した。Lactate 値の差は CS 群で最も大きく SNMP+HbV 群で最も少なかった。SNMP+HbV 群は CS 群および HMP 群と比較して優位に Lactate 値の差が少なかった。(Fig.12)

6, HE 所見 (Fig.13 a)-l))

心停止 60 分後の肝検体を「control」として、再灌流終了時の肝組織を比較検討した。

「control」では、4 群ともに肝細胞への脂肪滴の沈着が見られここに違いはなかった。再灌流終了時の SNMP+HbV 群の中心静脈周囲の変化は SNMP+HbV 群で少なかった。浮腫は CS 群で最も強く見られた。人工赤血

球は肝臓内に遺残していなかった。(Fig.13 a)-l))

7. 走査電子顕微鏡所見(Fig.14 a)および b))

HMP 群と SNMP+HbV 群での走査電子顕微鏡を検討した。HMP 群ではミトコンドリアの膨化が見られたが、SNMP+HbV 群ではミトコンドリアの膨化が抑えられていた。(Fig.14 a)および b))

考 案

機械灌流保存は冷却保存に比べ有効であることはヒトにおいて報告されている 2)。

酸素化を伴う機械灌流保存は、ドナー肝の生存率を改善し、我々のグループでは、SNMP(22°C前後の灌流保存)の灌流液中の肝逸脱酵素の値が HMP(8-10°Cの灌流保存)よりも低いことを実証している。この結果は温度の上昇に伴い、肝障害が軽減できることを証明している。しかし、われわれのグループでは灌流保存中の酸素消費量は温度に比例することを過去に報告しており 3)、温度上昇に伴い増える酸素消費量に対しどのように酸素供給を行うかが問題であった。このため、現在行われている NMP(37°Cでの機械灌流保存)の臨床試験では血液を灌流液中に含有し使用している 2)。

ピッツバーグ大学の Fontane らのグループはブタの実験モデルで、Hemopure[®]と呼ばれる人工血液を用い、SNMP 後に肝移植を実施した 3)。この結果酸素運搬能力が 8 倍向上したこと、効率的に酸素供給と二酸化炭素除去が行われたことを証明した。Hemopure は長い保存期間が得られること、感染リスクが下がることも利点として挙げられた。

本研究では人工赤血球として奈良医大の酒井先生らが開発した hemoglobin vesicles (HbV)を使用した。これは期限切れの赤血球を用いた酸素運搬体で我々のグループで長期の保存(18ヶ月)での安定性と生体適合性をブタの実験モデルで証明している 5)。

本研究で HbV を含む灌流液は、低 Ht 条件下でも酸素を輸送可能なことが証明された。図 7 および 8 に示すように、SNMP+HbV グループの HA 圧力と PV 圧力の変化は、HMP および SNMP グループよりも低いレベルで維持された。また、灌流中および再灌流時の肝逸脱酵素の濃度は、HMP および SNMP グループのものよりも低く肝障害から保護されていることがわかった。SNMP で灌流を行うと肝組織への酸素供給が増加し、臓器保護につながり、肝臓酵素レベルの低下に寄与すると考えた。

また、この研究は、図 11 および 12 に示すように、再灌流後の pH および乳酸レベルが SNMP+HbV グループで低いままであることを実証し、酸素供給量減少に伴う肝細胞障害を軽減できる可能性を示唆した。

墓地本らは、走査電子顕微鏡による 1 時間の温虚血後の肝細胞における異常な液胞の出現とミトコンドリアの異常について検討している 6)。我々の検討では HMP と比較して、SNMP+HbV 群でミトコンドリアの膨化が抑えられていることがわかった。

本検討では limitation がある。それは実際の肝移植を行っていないため、移植の影響を評価できていないことや免疫系に与える影響も評価していないことである。

結 論

ブタの実験モデルで心停止ドナーの肝移植に機械灌流を用いる際、人工赤血球を用いた灌流液を用いることで肝細胞の障害を軽減できる。

肝臓移植時での灌流保存の際に灌流液中に人工赤血球を使用すること有効である可能性がある。

引用文献

(重要な引用文献3編以内を掲載すること。)

- 2) Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT et al. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *Am J Transplant.* 2016; 16: 1779-1787. <https://doi.org/10.1111/ajt.13708> PMID: 26752191
- 3) Morito N, Obara H, Matsuno N, Enosawa S, Furukawa H. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death. *J Artif Organs.* 2018; 21: 450-457. <https://doi.org/10.1007/s10047-018-1063-0> PMID: 30046934
- 4) Fontes P, Lopez R, van der Plaats A, Vodovotz Y, Minervini M, Scott V, et al. Liver preservation with machine perfusion and a newly developed cell-free oxygen carrier solution under subnormothermic conditions. *Am J Transplant.* 2015; 15: 381-394. <https://doi.org/10.1111/ajt.12991> PMID: 25612645

参考論文

(参考論文5編以内を掲載すること。)

- 1) Yoshikawa R, Obara H, Matsuno N, Morito N, Gouchi M, Otani M, et al. Ex Vivo Reperfusion Model to Evaluate Utility of Machine Preservation for Porcine Liver Donated After Cardiac Death. *Transplant Proc.* 2018; 50: 2826-2829. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.04.020> PMID: 30401405
- 5) Shonaka T, Matsuno N, Obara H, Yoshikawa R, Nishikawa Y, Gouchi M, et al. Application of Perfusate With Human-Derived Oxygen Carrier Solution Under Subnormothermic Machine Perfusion for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs. *Transplant Proc.* 2018; 50: 2821-2825. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.184> PMID: 30401404
- 6) Bochimoto H, Matsuno N, Ishihara Y, Shonaka T, Koga D, Hira Y, et al. The ultrastructural characteristics of porcine hepatocytes donated after cardiac death and preserved with warm machine perfusion preservation. *PLoS One.* 2017 Oct 12; 12(10):e0186352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186352> PMID: 29023512