

博士論文

心停止ドナー肝移植における  
プロスタグランジン E1 含有冷保存前灌流の効果に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻  
外科病態学講座先進外科学分野  
米田 海

## 目次

1. 要約.....	2
2. 研究背景.....	4
3. 研究目的.....	8
4. 研究方法.....	9
実験 1（生存実験） .....	9
実験 2（移植後 1 時間の検体採取） .....	14
5. 研究結果.....	19
6. 考察.....	23
7. 結論.....	32
8. 文献.....	33
9. 図.....	38

## 1. 要約

【目的】 ex vivo の灌流実験において、常温酸素化バッファーによる 30 分間の冷保存前灌流（short oxygenated warm perfusion: SOWP）が、心停止下摘出肝グラフトのエネルギーステータスを改善し、温阻血再灌流障害を軽減することが報告されている。しかし、SOWP のみでは心拍動下摘出肝グラフトと同程度までの胆汁産生能の回復や細胞障害軽減は得られていないため、ビリベルジン・エダラボン・プロスタグランジン E1（PGE1）などを灌流液中に添加して検討したところ、PGE1 添加 SOWP が最も組織・細胞障害を改善した。これらの結果を踏まえ、本研究では、ラット肝移植を行い、SOWP および PGE1 添加 SOWP の温阻血再灌流障害軽減効果を検証した。

【方法】 同系ラット肝移植実験を、肝グラフトを心拍動下に摘出し冷保存した心拍動（heart-beating donor; HBD）群、温阻血後に摘出し冷保存した温阻血後無処置（Non-treatment; NT）群・温阻血後冷保存前灌流（SOWP）群・温阻血後 PGE1 添加冷保存前灌流（SOWP+PG）群に分けて行なった。温阻血群（NT・SOWP・SOWP+PG 群）では死戦期を経て 30 分の温阻血後に肝グラフトを摘出し、6 時間の冷保存後に移植した。SOWP 群では温阻血肝摘出後に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流し冷保存した。SOWP+PG 群では SOWP 群と同様に肝グラフトを摘出し PGE1（10ng/ml）を添加した灌流液で SOWP を行った。

実験 1 では、移植後 1 週間の生存率を比較検討し、実験 2 では、移植後 1 時間後のグラフト肝機能、肝細胞障害、血清中サイトカイン濃度等について比較検討した。

【結果】実験1では、HBD群、NT群、SOWP群、SOWP+PG群の1週間生存率はそれぞれ、100%、0%、83%、100%であり、SOWP群・SOWP+PG群でNT群に比較して有意に生存率の向上を認めた。実験2では、胆汁産生量・血清中肝逸脱酵素・血清中好中球接着因子が、SOWP・SOWP+PG両群で改善を示した。とくにSOWP+PG群では、グラフトの総体的機能の指標である胆汁産生量が、HBD群と同レベルまで増加していた。また、SOWP群では上昇を抑えられなかった再灌流障害増悪をもたらすHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1) 血中濃度がSOWP+PG群では抑えられた。酸化ストレスの指標である malondialdehyde (MDA) の肝組織中濃度もSOWP+PG群で抑えられた。病理組織学的検討では、SOWP群・SOWP+PG群でネクロシス面積比率とアポトーシス細胞数の有意な減少を認め、特にアポトーシスはSOWP+PG群で強く抑制される傾向を認めた。

【結論】SOWP 及び PGE1 添加 SOWP が実際のラット肝移植において生存率を向上させることが示された。PGE1 添加 SOWP はとくにグラフト機能を改善したが、その背景には、細胞障害・細胞死の抑制が寄与し、肝細胞のエネルギーステータスのさらなる改善や微小循環の改善がその機序であると考えられた。PGE1 添加 SOWP は、心停止下摘出肝グラフトを用いた肝移植において有効な一手段となることが示唆された。

## 2. 研究背景

肝移植が末期肝疾患や急性肝不全などに対する確立された治療法となるに従い、移植適応の拡大と希望患者数の増加により世界的なドナー不足と移植待機中の死亡数の増加が問題となっている。これらの問題解決の選択肢の一つとして、欧米では心停止ドナー（non-heart-beating donor : NHBD）からの肝移植の施行数が増加してきている<sup>(1,2)</sup>。

NHBD は Maastricht 分類により、病院到着時に死亡状態であったもの (category 1)、心肺蘇生が成功しなかったもの (category 2)、生命維持処置の中断 (category 3)、脳死状態下での心停止 (category 4) に分類されており<sup>(3)</sup>、category 1・2 が uncontrolled NHBD (UNHBD)、category 3・4 が controlled NHBD (CNHBD) とされている。CNHBD からの肝グラフトは摘出までに時間的余裕があるため、グラフトの温阻血時間を短縮することが可能である<sup>(4)</sup>。しかし、心拍動下ドナー (heart-beating donor : HBD) からの移植と比べて primary non-function (PNF : 移植後早期機能不全) や胆管合併症、再移植の頻度が高いとされている<sup>(5,6)</sup>。また、温阻血時間が長期化した場合など、摘出しても移植に適さず破棄処分となる率も高い<sup>(7)</sup>。一方、UNHBD は最も多くのドナー数の増加が期待できるドナープールであると考えられているが、移植後合併症が CNHBD より高率に起こることから実際に肝移植を行った報告は CNHBD よりも更に少ないのが現状である<sup>(8,9,10)</sup>。

心停止下摘出肝グラフトの第一の問題点は、心停止後から冷保存液による灌流まで

の間の温阻血障害である。温阻血後の低酸素状態のため細胞内の ATP が枯渇し、ATPase 依存性ポンプが機能不全に陥り、肝細胞の膨化や類洞内皮の脱落から類洞の狭小化を来し、再灌流後の微小循環障害を引き起こす原因となる<sup>(4,11)</sup>。第二の問題点は、移植後の血流再開時に起こる再灌流障害として、クッパー細胞の活性化に伴い放出される活性酸素種・サイトカインや、好中球・リンパ球・血小板の活性化などにより引き起こされる細胞障害である<sup>(12,13,14)</sup>。心停止下摘出肝グラフトの移植では、これら微小循環障害と再灌流障害の相乗作用が重度の機能低下をもたらす要因と考えられている。

今日まで、心停止ドナーからの移植成績向上を目指し、温阻血再灌流障害を克服しようとする様々な試みが検討されている。心停止前のドナーへの処置として、薬剤投与によるクッパー細胞活性化抑制<sup>(15)</sup>、クッパー細胞除去<sup>(16)</sup>、選択的 IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$  産生阻害剤の投与<sup>(17)</sup>、フリーラジカルスカベンジャーの投与<sup>(18)</sup>など、心停止後の処置としては cardio-pulmonary bypass による re-circulation<sup>(8,19,20)</sup>や冷保存中や冷保存後の machine perfusion<sup>(21,22,23)</sup>などの有効性が報告されている。しかしながら、UNHBDからの移植の場合、病院到着時死亡例や蘇生失敗例から移植臓器摘出を行うため、心停止前にドナーへの薬剤投与をはじめとする処置を行うことは、薬理効果を発揮するまでの時間的制約と、蘇生を行いながら臓器を取り出すための準備を行うという点で倫理的問題がある。また、灌流保存に関しては技術的問題や臓器搬送における煩雑さもあり臨床応用には課題が残る。

これら臨床的問題、技術的問題・制約を克服しつつ温阻血障害を改善する方法として、冷保存前に 30 分間常温酸素化バッファーで灌流（前灌流）する方法（short oxygenated warm perfusion: SOWP）が考案され、その有効性が検討されてきた<sup>(24,25,26)</sup>。

移植後のグラフトの viability とエネルギーステータスは相関するため<sup>(27,28)</sup>、冷保存前にグラフトを酸素化させエネルギーステータスを回復させてより良好なグラフト状態で冷保存できれば、温阻血再灌流障害を克服できるのではないかという考えに基づいたものである。検討の結果、無処置の温阻血を被った肝グラフトに比べ、SOWPにより肝組織中のエネルギーステータスが改善し、再灌流時の胆汁産生能の改善、組織障害の軽減やアポトーシスの減少、細胞障害時に活性化される MAPKs 活性の抑制を認めた。しかしながら SOWP のみでは、組織・細胞障害における改善効果は十分でなかったため、Iwane ら<sup>(25)</sup>は内因性の抗酸化物質であるビリベルジンを、Kobayashi ら<sup>(24)</sup>はフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを灌流液へ添加した。どちらも SOWP 単独に比べ改善する点はあるが、ビリベルジン添加では胆汁産生量やアポトーシス細胞数において、エダラボン添加では門脈流量や炎症性サイトカインにおいて、心拍動下摘出肝グラフトでの測定値を下回っていた。そこで、血管拡張作用、抗血小板凝集作用、抗炎症性サイトカイン作用、細胞膜の安定化などにより様々な肝保護作用をもたらすとされるプロスタグランジン E1 (PGE1) が注目された。PGE1 は、細胞膜上の EP2・EP4 受容体に結合し、細胞内の cyclic AMP を上昇させ、血管平滑筋を弛緩することで血管拡張作用をもたらす<sup>(29)</sup>。又、細胞内のカルシウム濃度上昇を抑

え、細胞膜の安定化やミトコンドリアの保護作用をもたらす事も知られている<sup>(30,31,32)</sup>。

肝虚血再灌流障害の研究においても、Izuishi らは 24 時間冷保存後の *ex vivo* の灌流実験において、PGE1 の冷保存液・灌流液内投与が 5ng/ml 以上で門脈流量や胆汁産生量の増加が認められたと報告している<sup>(33)</sup>。また、Hara ら<sup>(26)</sup>は死戦期をおいた 30 分間温阻血ラットモデルの *ex vivo* の灌流実験において、30 分間の前灌流 (SOWP) 中に PGE1 を 10ng/ml の濃度で添加したところ、ミトコンドリア機能が改善し、肝組織・細胞障害が心拍動下摘出肝グラフトと同程度まで有意に改善されたと報告した。ただし、これらは *ex vivo* 灌流モデルを用いた実験結果であり、再灌流液中に血液成分が含まれておらず再灌流障害早期のグラフト因子のみの検討に限られていた。従ってレシピエント側の血液成分によりもたらされる影響や、実際のグラフト生着率を検証するため肝移植実験が必要であると考えた。そこで本研究では、温阻血を被った肝グラフトに対する、SOWP および PGE1 添加 SOWP の *in vivo* での効果を評価するため、ラット肝移植モデルを用いた検討を行った。



### 3. 研究目的

本研究の目的は、常温酸素化バッファーによる 30 分間の冷保存前灌流 (SOWP) および PGE1 添加 SOWP の、心停止下摘出肝グラフトに対する温阻血再灌流障害軽減効果を、ラット肝移植モデルにおいて検討することである。

#### 4. 研究方法

肝移植後 1 週間の生存をみた生存実験（**実験 1**）と、移植・再灌流後 1 時間の検体を採取して生存率改善因子を検討する実験（**実験 2**）をそれぞれ行った。

##### **実験 1**（生存実験）

###### （1）実験動物

ドナー及びレシピエントとして体重 250～350g の雄性 Wistar ラット (Japan SLC Inc, Shizuoka, Japan) を用いて同所性肝移植実験を行った。動物実験施設搬入後 1 週間以上の順応期間をもうけた後に移植実験を行い、実験直前まで水分・食餌摂取の制限は行わなかった。本動物実験は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会により承認を受け、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に則って施行した。

###### （2）ラット移植実験プロトコール（**図 1**）

以下の 4 群において、各群 6 例ずつの移植実験を行った。いずれの群でもグラフィット肝は 6 時間の冷保存の後に同所性に移植した。

- 1) 心拍動群 (Heart-beating donor 群 : HBD 群) : 心拍動下に摘出した肝臓を移植する群。
- 2) 温阻血群 (Non-heart-beating donor 群 : NHBD 群) : 温阻血を加えた肝臓を移植する群。これは下記の 3 群を含む。
  - a) 無処置群 (Non-treatment 群 : NT 群) : 温阻血後摘出しそのまま冷保存した肝

臓を移植する群

- b) 冷保存前灌流群 (Short oxygenated warm perfusion 群 : SOWP 群) : 温阻血後摘出した肝臓を、30 分間の SOWP を施行した後に冷保存する群。
- c) PGE1 添加前灌流群 (SOWP+PG 群) : 温阻血後摘出し、灌流液に PGE1 を添加して灌流した後に冷保存する群。

### (3) 肝摘出手技

同系同所性肝移植を鎌田らのカフ法<sup>(34)</sup>に準じて行った。ドナーラットは、ペントバルビタール 50mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔後、上腹部横切開により開腹した。総胆管を離断し 22G サーフロー針外套 (フッ素樹脂製 ; TERUMO Co, Tokyo, Japan) を 5mm にカットして作成したステントを挿入した。右腎静脈・副腎静脈を肝下部の下大静脈 (IVC) から結紮切離し、脾静脈・胃十二指腸静脈は門脈から切離した。肝動脈は結紮切離した。HBD 群では、心拍動下で門脈に 14G サーフロー針外套を挿入した後、肝上下部 IVC を切開し 20ml の 4°C University of Wisconsin solution (UW 液 ; DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) で経門脈的に血液をウォッシュアウトし、4°C UW 液中で 6 時間冷保存した。NHBD 群 (NT 群・SOWP 群・SOWP+PG 群) では HBD 群と同様に血管・胆管処理をした後、左右横隔膜を切開して両側気胸を作成することによって低酸素による心停止を誘導した。横隔膜切開から心室の拍動停止を視認するまでを死戦期とし、平均 10 分 6 秒±20 秒であり群間で有意差を

認めなかった。心停止後 30 分間の温阻血を加えた。温阻血の間、体温低下を防ぐためホットカーペット及び白熱灯で加温し、臓器の乾燥防止のため開腹部位をラップで被覆した。NT 群では、その後 HBD 群と同様に門脈カニューレーション及び UW 液によるウォッシュアウトを行い冷保存した。SOWP 群・SOWP+PG 群では、温阻血 30 分経過後に 20ml の生理食塩水で経門脈的にウォッシュアウトを行った後に肝臓を摘出、体外灌流装置で 30 分間の SOWP を行い、UW 液を経門脈的に注入して冷保存した。全ての群において肝摘出手技の間、ヘパリンなど抗凝固剤の投与は行わなかった。

#### (4) 体外灌流装置 (図 2)

SOWP 群・SOWP+PG 群における灌流液は酸素化 (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 飽和) した 37°C の Krebs-Henseleit 液 (Krebs-Henseleit solution : KH 液) を用いた。灌流液酸素分圧は 450~500mmHg であった。KH 液は、ラット体外灌流モデルにおいて広く使用されている、外液を模した晶質緩衝液であり、組成は 121.0mM NaCl、1.3mM CaCl<sub>2</sub>、1.0mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、13.5mM KCl、1.2mM MgCl<sub>2</sub>、1.2mM NaHCl<sub>2</sub> 及び 10.0mM Glucose である。非循環型灌流装置として Perfusion System (PS-1; HUGO SACHS ELEKTRONIK-HARVARD APPARATUS GmbH, Germany) を用いた。摘出した肝臓を 37°C の moist chamber 内の KH 液中に浸水させ、門脈に回路を接続し定圧灌流した。門脈圧は Pressure Transducer (Research Grade Blood Pressure Transducer, 110 VAG/ 60 Hz; HUGO SACHS

ELEKTRONIK-HARVARD APPARATUS GmbH, Germany)を用いて 7mmHg を保

つように灌流流量を調節した。グラフト冷保存前に 30 分間灌流した。

SOWP+PG 群では PGE1 を 10ng/ml の濃度で灌流液中に溶解させた。

#### (5) バックテーブル手技

冷保存中に冷 UW 液内でグラフトの血管の形成、カフ装着を行った。肝上部 IVC 周囲の横隔膜は切除し、左下横隔膜静脈は IVC への流入部で結紮切離した。門脈に、14G サーフロー針外套 (TERUMO Co, Tokyo, Japan) を 5mm の長さにカットして作成したカフを、肝下部 IVC には内径 2.0mm のテフロンチューブを 5mm の長さにカットして作成したカフを装着した。

#### (6) 肝移植手技

全ての群で 6 時間の冷保存を置いた後、鎌田らのカフ法<sup>(34)</sup>に準じて共通の移植手技を施行した。麻酔は、小動物用麻酔器 MK-A110 (MUROMACHI KIKAI, Co, Ltd, Japan) を使用し、セボフルラン 1.5~3%によるマスク麻酔とした。上腹部横切開で開腹し、肝臓を周囲組織より剥離、左下横隔膜静脈を結紮し、右副腎静脈を切離した。総胆管は左右肝管に分岐するところで結紮切離した。肝臓の剥離・各血管分離後に陰茎背静脈よりヘパリンをラット体重 g 当たり 0.1 単位と、フロモキシセフナトリウム (フルマリン® ; Shionogi & Co., Ltd, Osaka, Japan) を 6mg 含んだ生食 2.5ml を投与した。その 2 分後、肝下部 IVC、門脈・肝動脈の順にクランプし、肝上部 IVC を周囲横隔膜ごとクランプした後に各血管を切離し、レシピ

エント肝を摘出した。肝グラフトを腹腔内に Put-in し、まず肝上部 IVC を、7-0 プロリンを用いて二点支持で連続手縫い吻合した。次にグラフト門脈カフをレシピエント門脈内に挿入し絹糸で結紮固定し、門脈吻合とした。ここで肝上部 IVC、門脈の順にデクランプし再灌流し、腹腔内を温生食で洗浄し復温した。さらに肝下部 IVC も門脈同様カフを挿入し結紮固定することにより吻合した。胆管吻合はレシピエント胆管にグラフト胆管側のステントを挿入し結紮固定することにより行った。腹壁を 2 層で縫合閉鎖し手術を終了し、覚醒後白熱灯下で 1 時間復温し、飼育室に戻し水・飼料は自由摂取とした。手術時間は HBD 群で  $60.8 \pm 4.2$  分、NT 群で  $68.3 \pm 4.0$  分、SOWP 群で  $65.8 \pm 3.7$  分、SOWP+PG 群で  $60.0 \pm 0.0$  分であり、群間で有意差を認めなかった。

#### (7) 検討項目

##### 1) 生存率

手術後 1 週間の生存を観察し、評価した。

#### (8) 統計学的処理

Kaplan-Meier 曲線を作成し、全ての 2 群間の組み合わせで log-rank 検定を行った。P<0.05 を有意差ありとした。統計処理はすべて JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

## 実験 2 (移植後 1 時間の検体採取)

実験 1 と同じ群分け、手技で移植した。それぞれの群で 5 例の肝移植を行った。ただし、門脈吻合後、麻酔下で 1 時間の再灌流を経てから検体を採取し、安楽死させた。すなわち、腹部大動脈より可及的に血液吸引し失血死させ、移植した肝臓を摘出した。肝下部 IVC 吻合後から検体採取までの間は、腹壁は縫合せずラップで保護・保温しセボフルラン 2%麻酔下で管理した。胆管は吻合せず外瘻とし、1 時間の胆汁産生量を計測した。肝摘出後、病理組織検体用に各肝葉より 5mm の厚さで計 3 片の組織を採取し、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定した。その残りの肝組織はフリーズクランプし、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。手術時間(開腹から肝下部 IVC 吻合終了までの時間)は HBD 群で  $34.0 \pm 2.4$  分、NT 群で  $41.0 \pm 2.4$  分、SOWP 群で  $41.0 \pm 4.6$  分、SOWP+PG 群で  $46.0 \pm 1.0$  分であり、HBD・SOWP+PG 群間のみで有意差 ( $p=0.009$ ) を認めた。

### (1) 検討項目

#### 1) 胆汁産生量

1 時間の再灌流中に総胆管から排出した胆汁量を測定し、ラット肝重量当たりの胆汁産生量を算出した。

#### 2) エネルギーステイタス

Seya らの方法に準じてアデニンヌクレオチドを測定した。凍結保存肝組織を 0.5N 過塩素酸中でホモジナイズし、1500rpm×5 分冷却遠心し、上清を回収。水酸化カリウムを用いて pH を 6.0~7.6 に滴定しアデニンヌク

レオシドを抽出した後、さらに 3000rpm×10 分冷却遠心し、上清 1ml を回収。孔径 0.45 $\mu$ m のセルロースアセテート膜フィルター (03CP045AS; Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan) を通して遠心タイプセルロース膜限外濾過カートリッジ (ULTRACENT30; TOSOH, Tokyo, Japan) に注入、3000rpm×30 分冷却遠心し濾過されたものを-20°Cで保存し、測定時に解凍した。4°Cで 60mM リン酸緩衝液 (pH5.0) を溶出液とし、1.0ml/min の流量で Wakosil-II5C18HG カラムを使用して、high-performance liquid chromatography (HPLC) 法によって検体中の ATP・ADP・AMP 量を測定した (Jusco HPLC analyzer system Gilliver900 series, UV970; Jusco, Tokyo, Japan)。Adenosine 5'-triphosphate sodium salt、Adenosine 5-diphosphate sodium salt、Adenosine 5'-monophosphate sodium salt (Sigma-Aldrich corporation, St. Louis, Missouri, USA) を 10 $\mu$ mol/l に調整したものをスタンダードとし、検体 20 $\mu$ l 中の ATP・ADP・AMP 量(スタンダードは 200pmol) を測定し、肝組織 1g 当たりの mol 数 ( $\mu$ mol/g) を算出した。

### 3) 血清中肝逸脱酵素

大動脈から採血した全血は血清を分離し、-80°Cで保存した。血清中の aspartate aminotransferase (AST)・alanine aminotransferase (ALT)・lactate dehydrogenase (LDH) 濃度を、市販キットを用いた酵素比色法で測定した。

(AST, ALT : Kainos TA-LN Kit ; KAINOS Laboratories, Inc, Japan、LDH : エス



パ・LDH リキッド ; NIPRO, Osaka, Japan)

4) 血清中サイトカイン

血清中の tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) を市販 ELISA キット (enzyme-linked immunosorbent assay kit; Invitrogen Corporation, CA, USA) を用いて測定した。

また、侵襲時に放出されそれ自体にも組織障害性を有するメディエーター (アラミン) の 1 種である、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) 濃度を、市販キット (HMGB1 ELISA Kit II; Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

また、強力な血管収縮作用を持つ、血管内皮細胞由来のペプチドであるエンドセリン-1 の血中濃度を市販キット (Quantikine ELISA Kit; R&D systems, MN, USA) を用いて測定した。

5) 血清中アラキドン酸代謝物

血清中の thromboxane B2 (TXB2)、6-keto-prostaglandin F1 $\alpha$  (6-keto-PGF1 $\alpha$ ) を市販 ELISA キット (EIA Kit; Cayman Chemical Company, MI, USA) を用いて測定した。

6) 血清中細胞接着因子

血中可溶性 intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)、E-セ렉チン、P-セ렉チンを市販 ELISA キット (sICAM-1: Quantikine ELISA Kit; R&D

systems, MN, USA、E-セレクトイン、P-セレクトイン: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit; Uscn Life Science Inc, Hubei, China) を用いて測定した。

7) 肝組織中 malondialdehyde (MDA) 量

過酸化脂質の副産物であり、酸化ストレスの指標と考えられる MDA を測定した。冷凍保存肝組織を 5 倍量の 5mM ブチルヒドロキシトルエン含有 20mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4) でホモジナイズし、3000g、10 分間、4 °C で遠心した上清をサンプルとした。市販キット (BIOXYTECH® MDA-586 : Oxis International Inc., CA, USA) を用いて濃度を測定し、単位蛋白量当たりの MDA 量 ( $\mu\text{mol/g protein}$ ) を算出した。蛋白濃度の測定は、市販のキット (BCA Protein Assay Reagent Kit : Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いてビシコニン酸法で行った。

8) 組織学的検討

各ラットにつき異なる肝葉から 1 片ずつ計 3 片の肝組織を採取し、4%PFA で固定し、エタノールで脱水した後、パラフィン包埋した。3 $\mu\text{m}$  厚の切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で組織学的検討を行った。

ネクロシス及び高度変性病変の面積比率 (%) の算出のため、全自動顕微鏡 (KEYENCE BIOREVO BZ-9000 ; KEYENCE Co, Osaka, Japan) を

用いて 100 倍拡大で切片全体を取り込み、付属の Image-joint soft を用いて画像を結合させた。ネクロシス及び高度変性範囲を組織学的基準（空胞変性、索状構造の破壊、細胞の膨化、核の融解・脱落）に従いマッピングし、ネクロシス及び高度変性範囲の面積／切片全体の面積×100(%)を算出した。

アポトーシス検出のため市販のキット（Apop Tag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Chemicon International Inc., CA, USA）を用いて TUNEL（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling）染色を行った。光学顕微鏡下 200 倍拡大で各切片につき無作為に 10 視野×3 切片の計 30 視野抽出し、その陽性細胞数を計測し、1mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数を算出した。

画像処理はすべて NIH Image J ソフトウェアを用いて行った。

## （2）統計学的処理

結果は平均値±標準誤差（SEM）で表記した。多群間比較を Kruskal-Wallis 検定で行い、2 群間比較を Wilcoxon の順位和検定で行った。いずれも P<0.05 を有意差ありとした。統計処理はすべて JMP Pro ソフトウェア（SAS Institute, Cary, NC, USA）を用いて行った。

## 5. 研究結果

### 実験 1

#### 1) 生存率 (図 3)

HBD 群、NT 群、SOWP 群、SOWP+PG 群の 1 週間の生存率はそれぞれ、100%、0%、83%、100%であった。NT 群では術後 5~12 時間以内に全例死亡しており、SOWP 群 ( $P<0.001$ )、SOWP+PG 群 ( $P<0.001$ ) で有意に生存率の改善がみられた。

SOWP 群では術後 2 日目に死亡例が 1 例あり、死後の解剖では吻合部に異常はなかったが、著明な腹水を認めた。

### 実験 2

#### 1) 胆汁産生量 (図 4)

再灌流時の胆汁産生量 ( $\mu\text{l/g liver}$ ) は、HBD 群に比べ NT 群で有意に低値であった ( $56.44 \pm 21.98$  vs.  $13.50 \pm 7.02$ ,  $p=0.012$ )。SOWP 群 ( $45.94 \pm 22.09$ ) は、NT 群に対し胆汁の増加傾向を認め、SOWP+PG 群 ( $76.83 \pm 7.57$ ) では HBD 群と同程度まで増加した。SOWP+PG 群は NT 群・SOWP 群に対し有意差を認めた ( $p=0.012$ )。

#### 2) エネルギーステータス

##### (ア) 肝組織中 ATP 量 (図 5)

ATP 量 ( $\mu\text{mol/g}$ ) は、NT 群に比べ、SOWP+PG 群において有意に高値であり ( $0.0443 \pm 0.0022$  vs.  $0.0649 \pm 0.0037$ ,  $p=0.012$ )、HBD 群 ( $0.05110 \pm 0.0020$ ) に比べても有意に高値を示した ( $p=0.012$ )。

(イ)ATP/ADP 比

ATP/ADP 比は、SOWP+PG 群において、HBD 群に比べ有意に高値であった。(0.450 ±0.041 vs. 0.338 ±0.051, p=0.022)

3) 血清中肝逸脱酵素 (図 6)

NT 群では AST 値 (U/l) は HBD 群に比べ有意に高値であった (977.09 ±132.74 vs. 183.48 ±78.71, p=0.012) が、SOWP 群および SOWP+PG 群では NT 群に比べ有意に低値であった (順に 374.17 ±107.59, p=0.022、210.71 ±29.56, p=0.012)。ALT、LDH に関しても同様の結果であった。

4) 血清中サイトカイン (図 7)

再灌流液中の TNF- $\alpha$  濃度 (pg/ml) は、HBD 群に比べ NT 群および SOWP 群で有意に高値であった。SOWP+PG 群では、NT 群 (217.154 ±40.207) に対しては差を認めなかったが、SOWP 群に対し、有意ではないものの上昇が抑えられる傾向があった (218.64 ±44.67 vs. 381.69 ±52.44, p=0.095)。

再灌流液中の IL-1 $\beta$  濃度は、HBD 群では検出限界以下であったが、NT 群で有意に上昇しており、SOWP 群、SOWP+PG 群でも上昇は抑えられず、むしろ SOWP+PG 群で他のすべての群に対し有意に高値であった。

HMGB1 濃度 (ng/ml) (図 8) は、HBD 群と比べ NT 群で有意に上昇した (24.33 ±4.73 vs. 243.77 ±22.78, p=0.012)。SOWP 群 (198.78 ±129.93) では上昇が抑制されなかったが、SOWP+PG 群 (56.93 ±19.26) では NT 群と比べ有意に HMGB1 濃度

が低値となった ( $p=0.012$ )。

血清中エンドセリン-1 濃度 (pg/ml) (図 9) は HBD 群、SOWP+PG 群において NT 群より有意に高値であった。(266.12  $\pm$ 23.74, 285.96  $\pm$ 25.92 vs. 161.53  $\pm$ 7.59,  $p=0.012$ )

#### 5) 血清中アラキドン酸代謝産物 (図 10)

血清中の TXB 濃度 (ng/ml) は、有意差はないものの、NT 群・SOWP 群で高く、HBD 群・SOWP+PG 群で低い傾向であった。

6-keto-PGF1 $\alpha$  濃度 (pg/ml) は、TXB2 と同様の結果であったが、NT 群では HBD 群に比し有意に高かった (9369.78  $\pm$ 2997.2 vs. 2237.40  $\pm$ 557.7,  $p=0.037$ )。SOWP+PG 群で NT 群・SOWP 群に比べ低い傾向であった。6-keto-PGF1 $\alpha$ /TXB2 比は各群間で有意差を認めなかった。

#### 6) 血清中細胞接着因子 (図 11、12)

sICAM-1 濃度 ( $\mu$ g/ml) は SOWP 群・SOWP+PG 群で、NT 群に対し、有意に低値 (60.98  $\pm$ 9.90, 60.97  $\pm$ 2.58 vs. 120.47  $\pm$ 19.74,  $p=0.012$ ) で HBD 群 (50.46  $\pm$ 10.29) と同程度であった。E-セレクトリン (ng/ml) は SOWP 群では HBD 群に比べ有意に高値 ( $p=0.022$ ) で、SOWP+PG 群では HBD 群・NT 群に比べ有意に高値 ( $p=0.012$ ) であった。P-セレクトリン (ng/ml) はいずれの群でも有意差を認めなかったが、NT 群で高い傾向であった。

#### 7) 肝組織中 MDA 量 (図 13)

肝組織中のタンパク 1g あたりの MDA 量 (nmol/g) は HBD 群、SOWP+PG 群において NT 群より有意に低値であった ( $24.28 \pm 1.17$ ,  $23.07 \pm 0.70$  vs.  $36.57 \pm 3.57$ ,  $p=0.012$ )。SOWP 群では  $28.30 \pm 1.98$  で、NT 群より低い傾向だったが有意差はなかった ( $p=0.144$ )。

## 8) 組織学的検討

### (ア) ネクロシス及び高度変性面積比率 (図 14)

1 時間の再灌流後、NT 群で肝細胞の空胞変性や索状構造の破壊などの虚血性変化が著明であり、巣状にネクロシスに陥っている部位が多数認められた。SOWP 群・SOWP+PG 群では、心停止群に比べこれらの変化は軽度であった。ネクロシスおよび高度変性範囲の面積比率 (%) の定量化では、SOWP 群・SOWP+PG 群では NT 群に比べて有意に減少し ( $1.45 \pm 0.62$ ,  $2.16 \pm 0.61$  vs.  $10.00 \pm 2.95$ ;  $p=0.022$ ,  $p=0.012$ )、HBD 群 ( $1.12 \pm 0.24$ ) と同程度だった。

### (イ) TUNEL 染色 (図 15)

TUNEL 陽性細胞数 (個/mm<sup>2</sup>) は NT 群で著明に増加しており、SOWP 群では NT 群の約 2 分の 1 に抑えられていた ( $75.89 \pm 4.07$  vs.  $30.08 \pm 11.30$ ,  $p=0.022$ )。さらに、SOWP+PG 群では、約 4 分の 1 に抑えられていた ( $17.28 \pm 2.89$ ,  $p=0.012$ ) が、SOWP 群と SOWP+PG 群の間で有意差は認めなかった。

## 6. 考察

本研究では、心停止下摘出肝グラフトに対する常温酸素化バッファーによる 30 分間の冷保存前灌流 (SOWP) および PGE1 添加 SOWP の、ラット肝移植における効果について検討を行った。モデルとしては、臨床現場で発生頻度が高い uncontrolled NHBD からの肝移植を想定し、死戦期を経て心停止を誘導するモデルを選択した。ラット肝移植モデルにおいて移植後にグラフトが十分に機能する温阻血時間の限界は、死戦期を経ない場合では 30~60 分で<sup>(35,36)</sup>、死戦期を経た後に 30 分間の温阻血を加えたグラフトを移植した場合には、24 時間生存例はないと報告されており<sup>(37)</sup>、本研究では死戦期約 10 分後の温阻血時間を 30 分間に設定した。また、ラットのグラフトの保存に関連した肝移植実験において、術後一週間の生存が得られれば長期に生存することが予想される<sup>(38,39)</sup>ため生存率観察期間を一週間に設定した。

実験 1 において移植後一週間の生存率を観察した結果、無処置の温阻血肝グラフトを移植した場合には 12 時間以内に全例死亡する本モデルにおいて、SOWP および PGE1 添加 SOWP は、一週間後の生存期間をそれぞれ 83%及び 100%に著明に向上させた。SOWP 群で術後 2 日目に死亡したラットは死後に解剖したところ、吻合部に異常はなかったが著明な腹水を認め、肝不全により死亡した可能性が高いと考えられた。SOWP および PGE1 添加 SOWP の有効性は ex vivo 灌流実験において示唆されていたが、本研究によりレシピエント側の血球、血漿成分によってもたらされる再灌流障害に対しても有効性を示したと言える。

Tolboom ら<sup>(38)</sup>が、ラット温阻血肝の移植実験で Normothermic extracorporeal liver



perfusion (NELP) という灌流方法が、移植後 4 週間後の生存率を 0% から 93% に改善したと報告している。NELP は、冷保存の代わりに、血液を混合した灌流液を、透析装置を接続した循環系回路により持続灌流 (5 時間) するという方法である。また、Berendsen ら<sup>(39)</sup>は、subnormothermic machine perfusion (SNMP) が、移植後 4 週間後の生存率を 0% から 93% に改善したと報告している。SNMP も冷保存のかわりに持続灌流を行うもので、20°C の酸素化した Williams E 液体培地による灌流 (180 分間) である。本研究での簡素化された方法 (冷保存前の短時間の灌流、単純な灌流液) によりそれらの方法と遜色のない結果が得られた。

SOWP は冷保存前に灌流を行う方法であるが、冷保存後の再灌流直前に 60 分間灌流を行う方法があり、hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) として報告されており<sup>(21)</sup>、ブタ心停止ドナーを用いた移植実験で生存率、胆汁産生量、肝組織 ATP 量などの改善効果が認められている。この方法は、臓器提供施設から移植施設に臓器を搬送した後に灌流できるため、灌流装置の準備の面でメリットがある。本研究の SOWP においても冷保存後に施行でも効果は見込まれるが、冷保存前に冷保存期間を耐えうる肝構成細胞を増加させ、グラフトの状態を改善させることにより、冷保存中にも進行するグラフトの虚血障害を前もって軽減することを目的として、冷保存前の灌流を選択した。また、摘出後直ちに灌流を行うことのメリットとして、灌流液を分析することでグラフトの viability を診断し移植の可否の基準とする可能性も考えており、今後の検討課題である。

生存率向上の背景について実験 2 で検討した。SOWP 単独によって、グラフト再灌流後の血清中肝逸脱酵素・ネクロシス比率・アポトーシス細胞数は有意に減少しており、肝細胞障害が軽減されたことが示された。胆汁産生は NT 群より増加傾向であるものの有意差を認めなかった。また、血清中の炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の抑制効果も見られず、組織障害の指標かつ炎症メディエーターである HMGB1 に対する抑制作用も確認されなかった。これらは、これまでの ex vivo での SOWP の効果を検証した諸実験と相反しない結果であり、Kobayashi らが ex vivo の実験において報告したように、SOWP により 1) エネルギーステイタス維持によるネクロシスの抑制、2) ミトコンドリア機能改善による JNK・p38MAPK 活性を介したネクロシス・アポトーシスの抑制が起こった結果、グラフト障害が軽減されたと考えられる<sup>(24)</sup>。

1 時間再灌流後の肝組織中 ATP 量に関しては、本研究で SOWP 単独による改善は認めなかったが、Iwane ら<sup>(25)</sup>が、SOWP により冷保存前および 6 時間の冷保存後に心停止群に比し有意に ATP 量が高値となることを報告していることを考慮すると、ATP 量は再灌流前には SOWP によって改善されるものの、再灌流時の酸素化による ATP 産生亢進により各群で差がなくなると考えられる。

また、再灌流障害はクッパー細胞を中心として好中球・CD4 陽性リンパ球・血小板などが関与し、クッパー細胞による TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の放出が再灌流障害の起点となるとされている<sup>(40)</sup>。本研究では SOWP 群の血清中 TNF $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ 、および HMGB1 は減少せず、TNF $\alpha$  濃度に至っては、NT 群に比べて上昇傾向であり、SOWP 単独ではクッ

パー細胞をはじめとする免疫系への抑制効果はないか、むしろ活性化作用があると考えられた。

ICAM-1 は、血管内皮細胞・肝細胞に発現を認め、好中球との接着分子として、再灌流障害の進行に強い関わりを持ち、低酸素・細胞障害により直接、さらに IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$ ・インターフェロン  $\gamma$  等の炎症性サイトカインにより間接的に発現が増強される<sup>(41,42,43)</sup>。本研究では SOWP により、血清中の可溶性 ICAM-1 が有意に減少したが、内皮細胞・肝細胞そのものの再灌流障害に伴う ICAM-1 発現を SOWP が抑制したためか、あるいは、SOWP で血清中 TNF $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  濃度上昇が抑制されないことから、クーパー細胞に関わらない ICAM-1 発現誘導経路（例えば CD4 陽性 T 細胞によるインターフェロン  $\gamma$  を介した経路）を SOWP が抑制した可能性がある。SOWP により ICAM-1 を制御することにより、好中球の活性化・遊走・接着からつながる再灌流障害の悪循環を抑制できる可能性がある。

PGE1 の添加により、総体的肝機能の評価項目としての胆汁産生は SOWP 単独に比べても有意に増加しており、HBD 群と同程度に改善した。血清中肝逸脱酵素・アポトーシス細胞数は SOWP 単独よりも減少傾向で、NT 群と比し有意な減少を示した。ネクロトーシスに関しては SOWP+PG 群で NT 群に比べ有意に抑制されていたが、SOWP 単独と有意差はなかった。肝組織中 ATP 量は NT 群と比べ有意に高値であり、ATP/ADP 比は SOWP+PG 群で最も高値であった。PGE1 添加により、SOWP 単独よりもエネルギーステータスが改善され、それに伴う胆汁産生能、組織・細胞障害軽減を認め

たとえられる。Hara らの報告によると、PGE1 の血管拡張作用や細胞保護作用により、1) 微小循環の血流改善によるグラフト障害軽減の好循環、2) ミトコンドリアプロトン ATPase 活性の増加、3) ミトコンドリア外膜上での Bcl-2 発現の保持、外膜への Bax 移行の抑制等によるアポトーシスの抑制が起こる可能性が示唆されており<sup>(26)</sup>、本研究においても同様の機序が働いたと考えられる。

PGE1 はマクロファージの細胞質内のカルシウム濃度を抑えることで炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ・IL-1) の産生を抑制する<sup>(44)</sup>。また、PGE1 の経門脈投与が TNF $\alpha$ 、細胞接着因子を減少させ、肝虚血再灌流障害を改善させると報告されている。本研究で TNF $\alpha$  は SOWP 群では他の 3 群に比して有意に高値であり、PGE1 群においても、SOWP 群よりは低値の傾向であるものの、NT 群に対して有意差を認めなかった。IL-1 $\beta$  に関しては、SOWP 群は NT 群と差がなく、PGE1 添加によりむしろ有意に高値であり、Hara らの報告とは異なる結果となっている。イヌの *in vivo* の肝虚血再灌流実験において、PGE1 の経門脈投与により IL-1 $\beta$  が再灌流後に上昇したことが報告されており<sup>(31)</sup>、PGE1 は *in vivo* の虚血再灌流においては IL-1 $\beta$  を抑制しない場合もあると考えられた。灌流時間のみ PGE1 投与では効果が十分でない可能性がある。また IL-1 $\beta$  の細胞外への放出は、インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体により前駆型の proIL-1 $\beta$  が活性型に変換されることによる。TNF $\alpha$  放出とは異なる細胞内シグナル経路を介するため、PGE1 が何らかの形でインフラマソームの活性化を引き起こす可能性もある。インフラマソームを活性化させる物質としては、細胞外 ATP・核 DNA、

酸化ミトコンドリア DNA、活性酸素種、細胞内カリウム低下など複数報告されており<sup>(45)</sup>、本研究においては、*ex vivo* の実験では考慮されないレシピエント由来の因子が TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  高値の原因の一端を担っている可能性もある。

また、HMGB1 は虚血再灌流障害の早期メディエーターの一つとして近年注目されており<sup>(46)</sup>、活性酸素種産生のシグナルになると報告されている<sup>(47)</sup>。HMGB1 濃度は SOWP 群では NT 群と有意差がなかったが、SOWP+PG 群では有意に減少していた。

HMGB1 は DNA 結合蛋白の一つであるが、重篤な細胞障害の信号やネクロシスの結果として細胞外に放出され、Toll-like receptors (TLRs) や、receptor for advanced glycation end products (RAGEs) のようなレセプターと結合し、局所の細胞に炎症反応を伝播し<sup>(48,49,50)</sup>、免疫細胞を刺激して TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  のような炎症性サイトカインの産生を促進し、炎症反応の拡大を導く。本研究では PGE1 により血清中 HMGB1 濃度は有意に減少しており、これは細胞障害が抑制された結果であり、かつ、再灌流障害の悪循環を軽減させグラフト機能を HBD 群と同等まで改善した理由の一つとも考えられる。また、HMGB1 が制御されているにもかかわらず、SOWP 及び PGE1 添加で TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が抑制されていない一因として、血液中のサイトカイン変動と肝組織内のサイトカイン変動の相違が考えられる。NT 群では微小循環障害が強いため肝からのサイトカインが体循環に放出されず、血中サイトカイン濃度が低値となっている可能性があるため、肝組織中のサイトカイン濃度に関し、今後検討を加える必要がある。

血管内皮から産生される強力な血管収縮因子であるエンドセリン-1 は再灌流ごく早期から上昇し微小循環を傷害する再灌流障害悪化因子として知られており、内皮細胞の虚血や TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインにより産生が亢進する<sup>(51)</sup>ため、本研究においてエンドセリン-1 血清中濃度が、血清中 IL-1 $\beta$  高値の SOWP+PG 群において NT 群より有意に高値となったことは矛盾しない結果であった。しかし、HBD 群でもエンドセリン-1 が高値となったことは既知のメカニズムでは説明のつかない結果であった。

sICAM-1 に関しては、PGE1 による発現抑制の報告<sup>(52)</sup>もあるため、抑制効果の増強を期待していたが、NT 群に対して有意に低値ではあるものの、SOWP 単独と差のない結果であった。ICAM-1 は TNF $\alpha$  だけでなく、IL-1 $\beta$  によっても誘導されるため、TNF $\alpha$  抑制の効果が IL-1 $\beta$  増加によって打ち消された可能性がある。

アラキドン酸代謝産物である TXB2・6-keto-PGF1 $\alpha$  は、SOWP+PG 群において NT 群・SOWP 群に比べて減少傾向で、有意差はないものの HBD グラフト移植群とほぼ同程度の値であった。TXB2 は血小板凝集作用を持つ thromboxane A2 (TXA2) の代謝産物である。肝虚血再灌流により TXA2・PGI2 合成酵素の一つである COX2 が発現増加されることが報告されている<sup>(17)</sup>。それに対し、PGE1 はアラキドン酸からのエイコサノイド合成を抑制すると報告されており<sup>(53)</sup>、本研究でも PGE1 添加により TXB2 濃度が低値となる傾向であった。また、6-keto-PGF1 $\alpha$  は、プロスタグランジン I2 (PGI2) の代謝産物であり、TXB2 と同様に PGE1 により PGI2 合成も抑えられたと考えられる。

PGE1 はアラキドン酸からのトロンボキサンの生成を抑えることにより、血小板の活性化を抑制し、微小循環の改善に寄与する可能性がある。

SOWP による酸素付加により、虚血再灌流障害の一因である活性酸素を生じる可能性が憂慮されたが、本研究において、酸化ストレスの指標である肝組織中 MDA 量は SOWP では増加せず、SOWP+PG 群では NT 群に比し有意に低値であった。これにより活性酸素は SOWP により増加せず、PGE1 添加により HBD 群と同程度に抑制されることが示唆された。ミトコンドリアの機能改善によるものと考えられる。

その一方で SOWP では赤血球等の酸素キャリアが灌流液中に含まれていないため、肝組織末端への酸素化が不十分になることが憂慮されたが、SOWP 群では中心静脈領域の弱い空胞変性が認められたものの強い変性ではなく、低酸素の影響は少ないと考えられた。また、SOWP では ATP が効果的に産生される温度として灌流温度を 37°C に設定したが、37°C では肝代謝の亢進や免疫担当細胞の活性化も進むと考えられ、酸素キャリアを含んでいないことも併せ、本法による長時間の前灌流は不適當である可能性が高いと考えられた。SOWP の灌流時間は 30 分のみの検討だが、至適時間設定のためにさらに短いもしくは長い時間で効果を検討する必要がある。

本研究は肝臓のみの検討だが、マージナルドナーからの臓器に対し酸素化常温灌流をする方法は、腎臓ではすでに臨床での使用が報告されており<sup>(54)</sup>、肺移植の領域でも動物実験が行われている<sup>(55)</sup>が、いずれも酸素キャリアを含む灌流液による長時間の灌流方法である。SOWP が腎臓や肺でも効果を示すかは今後の検討課題である。さ

らに今後は大動物での実験を経て臨床ケースで適用していく必要があるが、動脈の灌流方法や、大量の灌流液の用意もしくは濾過再循環装置の導入といった課題がある。

本研究において PGE1 添加 SOWP の、胆汁産生や ATP 産生の改善について SOWP に対する優位性が確認されたが、PGE1 自体の貢献度を検証するためには、“PGE1 のみをグラフトへ投与する群”の効果をみる必要があると考えられる。肝移植、肺移植において、臨床的にグラフト保護のため再灌流後のレシピエントへの PGE1 投与は広く施行され効果が認められている<sup>(56,57)</sup>が、ブタ肺移植においてドナーに PGE1 を投与する研究<sup>(58)</sup>では、グラフト機能の改善効果は認められなかった。また、Miyagi ら<sup>(37)</sup>は、心停止ドナーラットからの同種肝移植における 1 週間生存が、無処置群の 9 例中 0 例に対して、プロスタグランジン I2 (PGI2) の心停止前投与群で 9 例中 1 例だったと報告しており、PGI2 のグラフト投与のみでは効果不十分であると思われ、PGI2 はプロスタグランジンレセプターへの親和性において PGE1 と類似していることから、PGE1 のみを肝グラフトへ投与した場合も同様に効果が限定的であることが予想される。PGE1 の灌流液中添加に、更にレシピエントへの PGE1 投与を追加することによってグラフト保護効果の強化が期待される。

<まとめ>

一週間生存率は SOWP 単独により 83.3%に、PGE1 添加により 100%になった。両者の生存率の差は有意ではなかったが、胆汁産生や ATP 産生における検討においては、



PGE1 添加により心拍動下グラフト移植と同程度までグラフト機能及びグラフト障害は著明に改善された。そのメカニズムの検討を行ったが、本研究において SOWP・NT 群間に有意差がなく、SOWP+PG・NT 群間に有意差が確認された項目は、胆汁量・肝組織 ATP 量・血中 HMGB1 濃度・肝組織中 MDA 濃度であった。直接的炎症起因性因子である TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が抑制されなかった結果をふまえると、PGE1 の作用のメインは肝グラフト組織の微小循環改善によるエネルギーステータスの改善であり、さらに、そういった微小循環障害改善効果は SOWP のみでかなり達成できたと考えられる。したがって、少なくとも温阻血再灌流障害モデルの短期経過においては、微小循環の改善が極めて有用であり、PGE1 の添加は血小板の凝集や活性化を制御することでこの微小循環の改善に貢献していると思われ、さらに HMGB-1 の制御を介し、より後期の炎症性再灌流障害の改善に寄与する可能性を秘めているが、この点に関しては今後のさらなる検証が必要である。

## 7. 結論

心停止下摘出肝グラフトに対する PGE1 添加冷保存前灌流は、微小循環の改善により、ネクロシスやアポトーシスといった細胞死を軽減することでグラフト障害を軽減し、心拍動下摘出肝グラフトと同程度の状態にまで改善することがラット肝移植において示された。

## 8. 文献

1. Organ Procurement and Transplantation Network. 2011 Annual Data Report. [Online]. [cited 2013 9 21. Available from: [http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual\\_reports/2011/](http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2011/).
2. NHS Blood and Transplant. Organ Donation and Transplantation -. [Online]. [cited 2013 9 21. Available from: [http://www.organdonation.nhs.uk/statistics/downloads/annual\\_stats.pdf](http://www.organdonation.nhs.uk/statistics/downloads/annual_stats.pdf).
3. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1995; 27(5): p. 2893-4.
4. Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, et al. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl.* 2004; 10(10): p. 1223-32.
5. de Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, et al. Liver transplantation using donation after cardiac death donors: long-term follow-up from a single center. de Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, Campos S, Morris W, Demetris AJ, Fontes P, Marsh JW. 2009; 9(4): p. 773-81.
6. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, et al. Biliary complications after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of risk factors and long-term outcomes from a single center. *Ann Surg.* 2011; 253(4).
7. Muiesan P, Girlanda R, Jassem W, et al. Single-center experience with liver transplantation from controlled non-heartbeating donors: a viable source of grafts. *Ann Surg.* 2005; 242(5): p. 732-8.
8. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl.* 2009; 15(9): p. 1110-8.
9. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant.* 2007; 7(7): p. 1849-55.
10. Quintela J, Gala B, Baamonde I, et al. Long-term results for liver transplantation from non-heart-beating donors maintained with chest and abdominal compression-decompression. *Transplant Proc.* 2005; 37(9): p. 3857-8.
11. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, et al. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int.* 2007; 27(1): p. 6-16.
12. Dogan S, Aslan M. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatol Res.* 2011; 41(2): p. 103-17.
13. Bahde R, Spiegel HU. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg.* 2010; 97(10): p. 1461-75.
14. H. Jaeschke. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 284(1): p. G15-26.

15. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology*. 1997; 25(2): p. 356-60.
16. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart-beating donors. *Transplantation*. 1999; 67(11): p. 1396-403.
17. Miyagi S, Ohkohchi N, Oikawa K, et al. Effects of anti-inflammatory cytokine agent (FR167653) and serine protease inhibitor on warm ischemia-reperfusion injury of the liver graft. *Transplantation*. 2004; 77(10): p. 1487-93.
18. Nakamura A, Akamatsu Y, Miyagi S, et al. A free radical scavenger, edaravone, prevents ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2008; 40(7): p. 2171-4.
19. Jiménez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl*. 2009; 15(9): p. 1110-8.
20. Otero A, Gomez-Gutierrez M, Suarez F, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation*. 2003; 76(7): p. 1068-73.
21. de Rougemont O, Breitenstein S, Leskosek B, et al. One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allografts donated after cardiac death. *Ann Surg*. 2009; 250(5): p. 674-83.
22. Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA. Machine perfusion for 'marginal' liver grafts. *Am J Transplant*. 2008; 8(5): p. 917-24.
23. Dutkowski P, Furrer K, Tian Y, et al. Novel short-term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg*. 2006; 244(6): p. 968-76; discussion 76-7.
24. Kobayashi Y, Akamatsu Y, Iwane T, et al. Signaling pathway on the effect of oxygenated warm perfusion prior to cold preservation of the liver grafts from non-heart-beating donors, and the additive effect of edaravone. *Transplant Proc*. 2009; 41(1): p. 49-51.
25. Iwane T, Akamatsu Y, Narita T, et al. The effect of perfusion prior to cold preservation and addition of biliverdin on the liver graft from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2006; 38(10): p. 3358-61.
26. Hara Y, Akamatsu Y, Maida K, et al. A new liver graft preparation method for uncontrolled non-heart-beating donors, combining short oxygenated warm perfusion and prostaglandin E1. *J Surg Res*. 2013; 184(2): p. 1134-42.
27. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, et al. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation*. 1988; 45(1): p. 138-43.

28. Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, et al. Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation*. 1985; 39(1): p. 50-5.
29. Le M, Krilov L, Meng J, et al. Bile acids stimulate PKC $\alpha$  autophosphorylation and activation: role in the attenuation of prostaglandin E1-induced cAMP production in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 291(2): p. G275-87.
30. Ishibe A, Togo S, Kumamoto T, et al. Prostaglandin E1 prevents liver failure after excessive hepatectomy in the rat by up-regulating Cyclin C, Cyclin D1, and Bclxl. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(1): p. 62-70.
31. Hafez T, Moussa M, Nesim I, et al. The effect of intraportal prostaglandin E1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and histology in canine hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2007; 138(1): p. 88-99.
32. Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, et al. The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain- $\mu$  activation. *transplantation*. 2000; 69(11): p. 2314-9.
33. Izuishi K, Fujiwara M, Hossain MA, et al. Protective effect of intraportal prostaglandin E1 on prolonged cold preserved rat liver. *Transplant Proc*. 2003; 35(1): p. 130-1.
34. Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery*. 1983; 93(1Pt1): p. 64-9.
35. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T, et al. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation*. 2005; 79(9): p. 1226-30.
36. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation*. 1997; 63(3): p. 369-73.
37. Miyagi S, Okada A, Kawagishi N, et al. The new strategy of liver transplantation from marginal donors using serine protease inhibitor. *Transplant Proc*. 2009; 41(1): p. 36-9.
38. Tolboom H, Pouw RE, Izamis ML, et al. Recovery of warm ischemic rat liver grafts by normothermic extracorporeal perfusion. *Transplantation*. 2009 Jan; 27;87(2):170-7.
39. Berendsen TA, Bruinsma BG, Lee J, et al. A simplified subnormothermic machine perfusion system restores ischemically damaged liver grafts in a rat model of orthotopic liver transplantation. *Transplant Res*. 2012 May; 9;1(1):6.
40. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000; 2: p. 169-73.
41. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. ; 61(6): p. 647-53.
42. Jaeschke. H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell

- injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290(6): p. G1083-8.
43. Mickelson JK, Kukielka G, Bravenec JS, et al. Differential expression and release of CD54 induced by cytokines. *Hepatology*. 1996; 22(3): p. 866-75.
  44. Sakuma F, Miyata M, Kasukawa R. Suppressive effect of prostaglandin E1 on pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *Lung*. 1999; 177(2): p. 77-88.
  45. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. 2013; 59(3): p. 583-94.
  46. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med*. 2005; 201(7): p. 1135-43.
  47. Tsung A, Klune JR, Zhang X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med*. 2007; 204(12): p. 2913-23.
  48. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418(6894): p. 191-5.
  49. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285(5425): p. 248-51.
  50. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28: p. :367-88.
  51. Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, et al. Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. Reperfusion injury and its hemodynamic effect. *Transplantation*. 1995 Mar; 15:59(5):679-84.
  52. Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, et al. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation*. 1997; 64(11): p. 1514-20.
  53. Dolegowska B, Piłkuła E, Safranow K, et al. Metabolism of eicosanoids and their action on renal function during ischaemia and reperfusion: the effect of alprostadil. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 75(6): p. :403-11.
  54. SA, Hosgood. Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *Am J Transplant*. 2013 May; 13(5): p. 1246-52.
  55. Yeung JC, Cypel M, Machuca TN, et al. Physiologic assessment of the ex vivo donor lung for transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Oct; 31(10): p. 1120-6.
  56. Henley KS, Lucey MR, Normolle DP, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of prostaglandin E1 in liver transplantation. *Hepatology*. 1995 Feb; 21(2): p. 366-72.
  57. Aoe M, Trachiotis GD, Okabayashi K, et al. Administration of prostaglandin E1 after lung transplantation improves early graft function. *Ann Thorac Surg*. 1994 Sep; 58(3): p.

655–661.

58. Vainikka T, Heikkilä L, Kukkonen S, et al. Donor lung pretreatment with prostaglandin E(1) does not improve lung graft preservation. *Eur Surg Res.* 1999; 31(5): p. 429-36.

9. 図

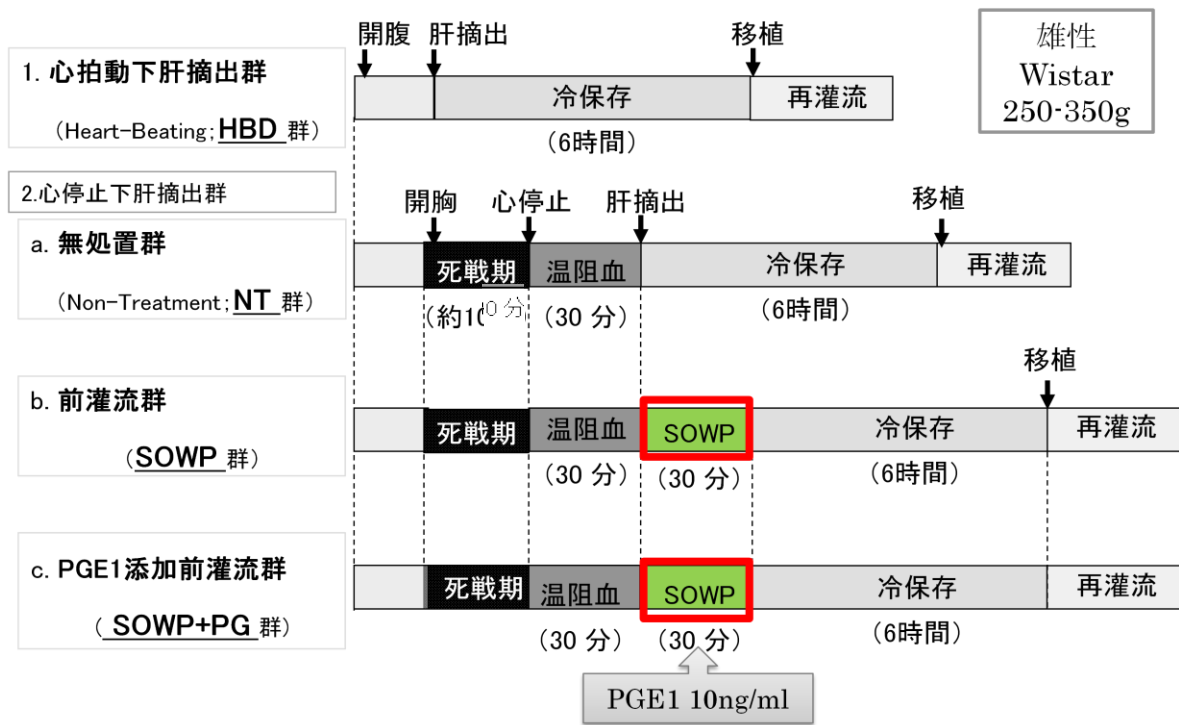


図 1 プロトコール

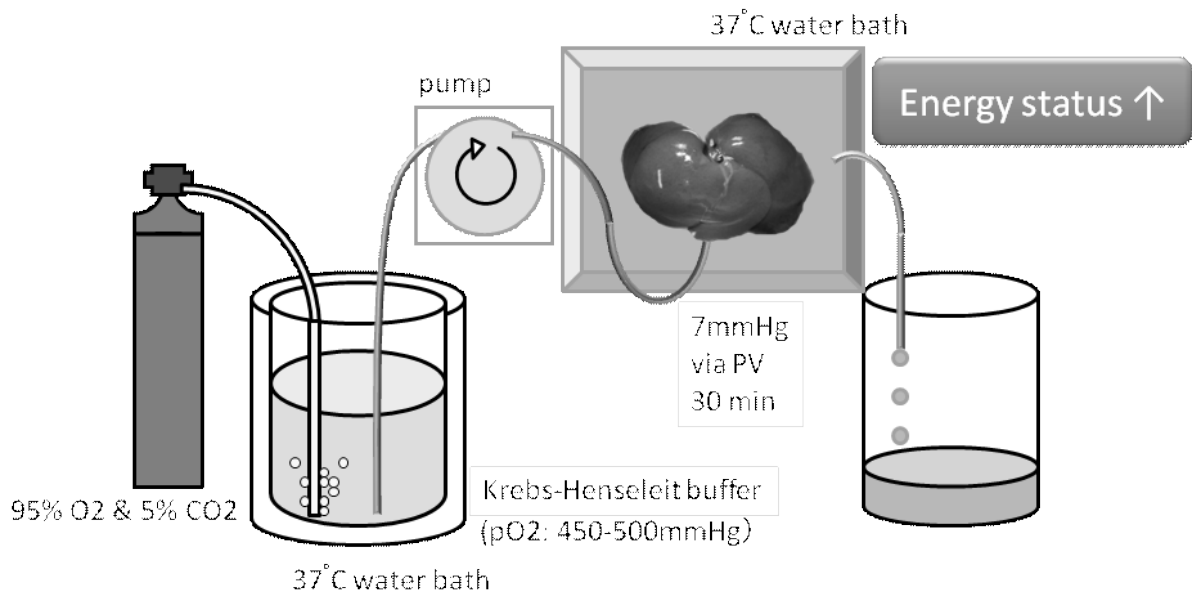


図 2 SOWP シェーマ

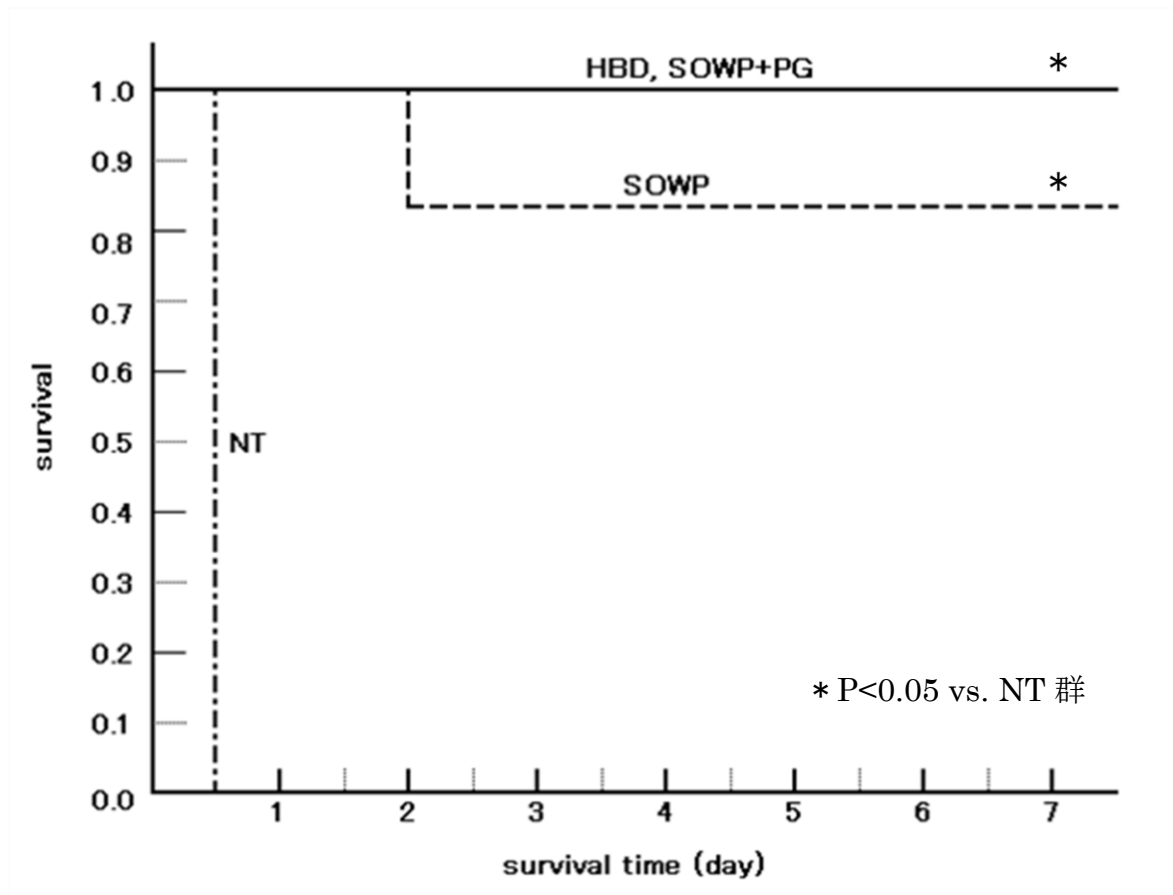


図 3

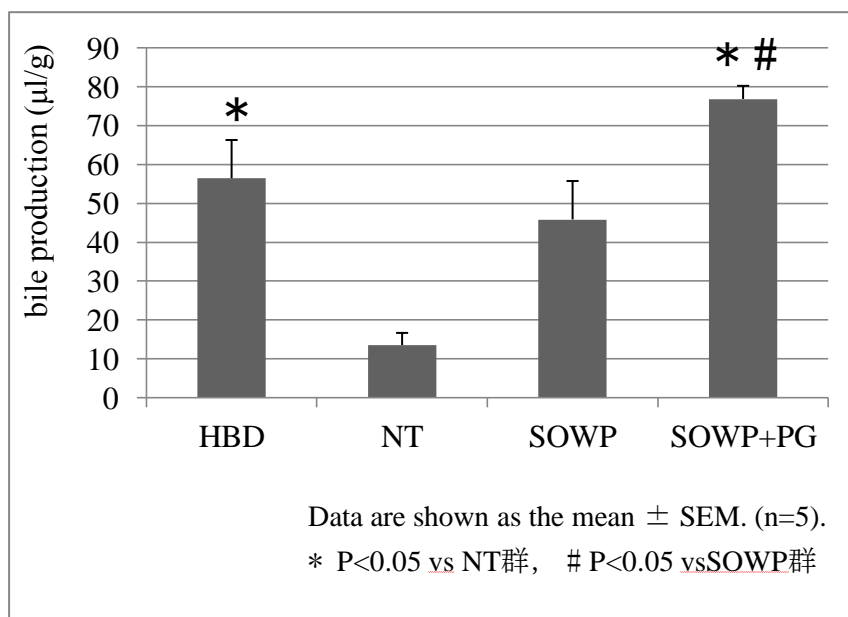


図 4 再灌流後 1 時間の肝 1g あたりの胆汁産生量



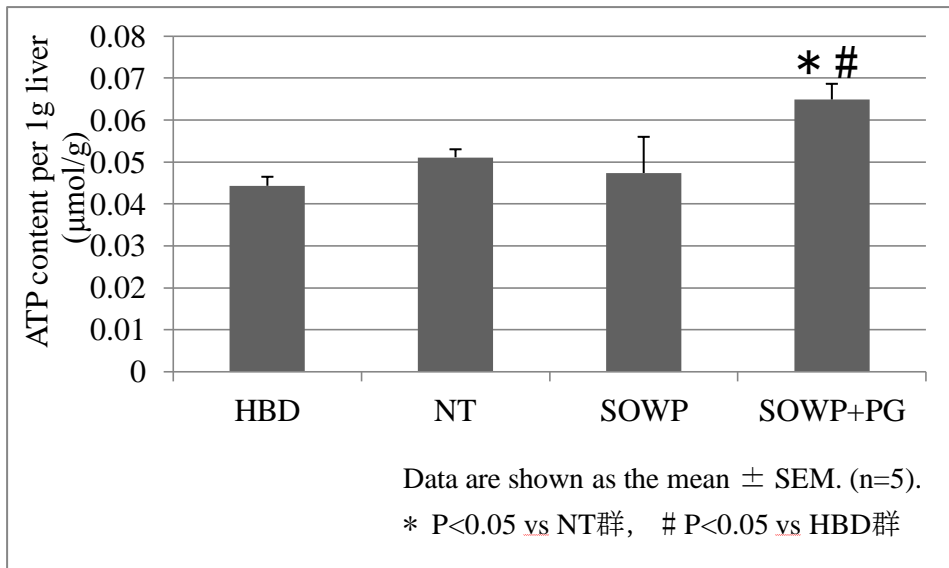


図 5 肝組織 1gあたりの ATP 量

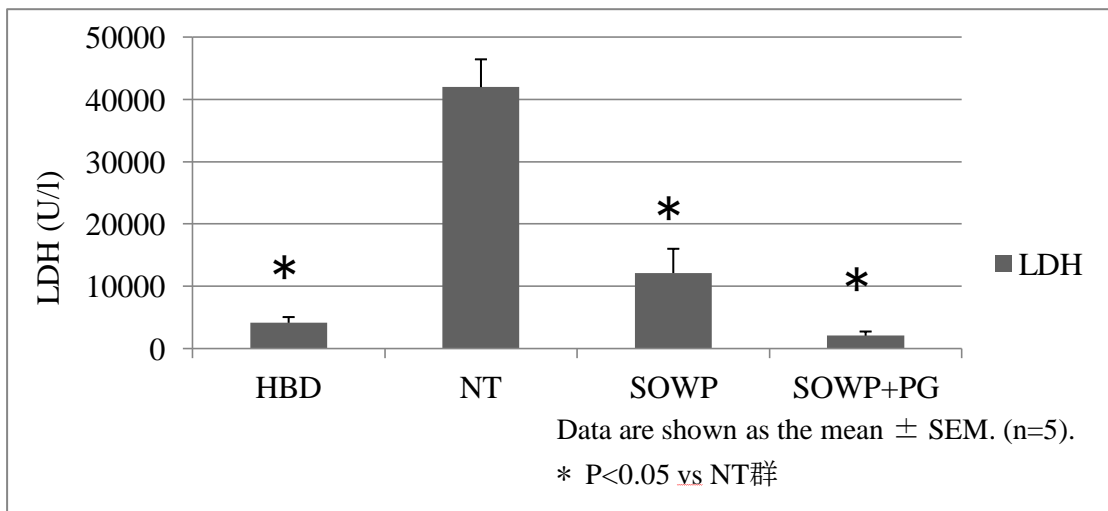
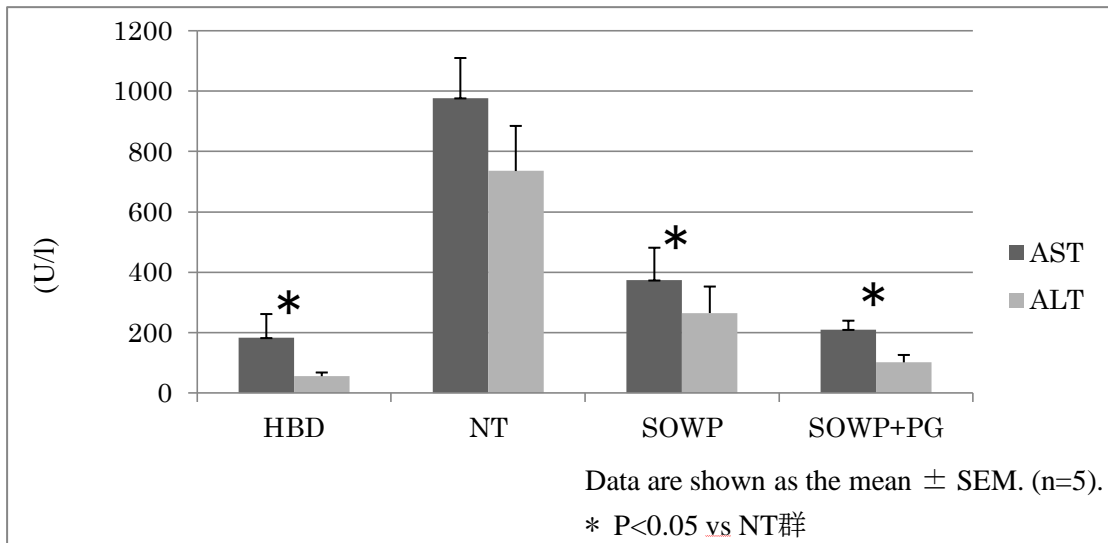


図 6 血清中肝逸脱酵素

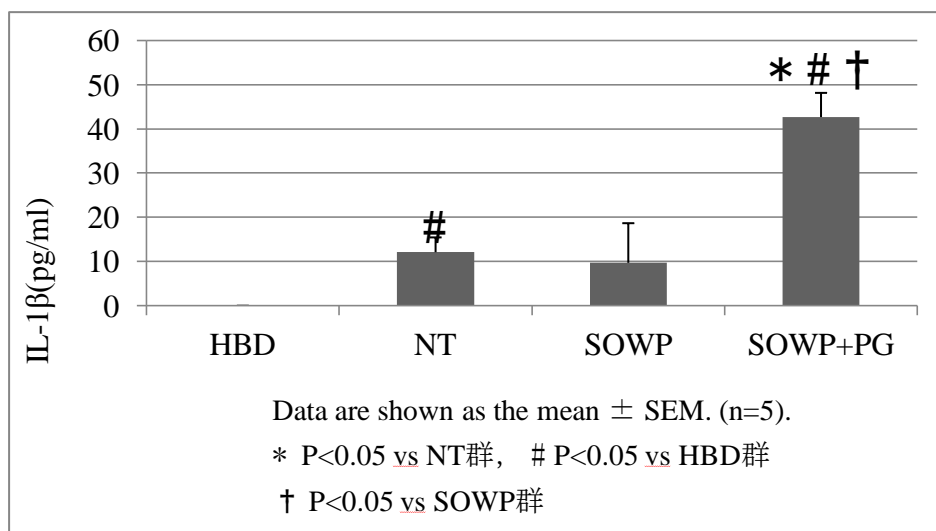
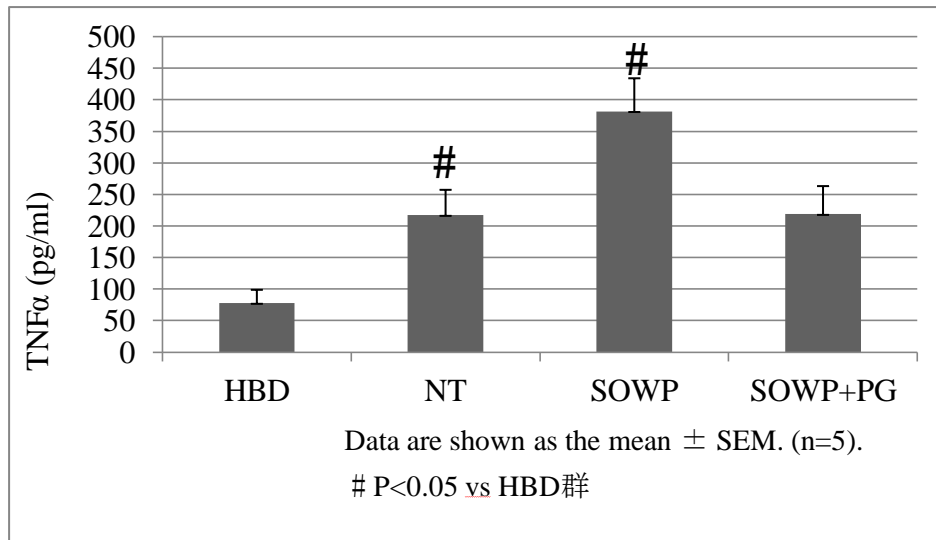


図 7 血清中 TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$

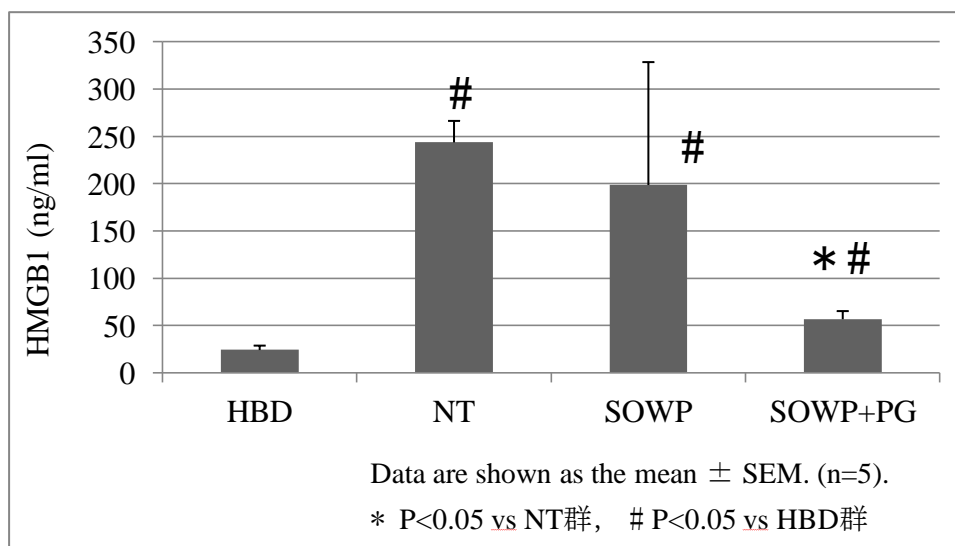


図 8 血清中 HMGB1

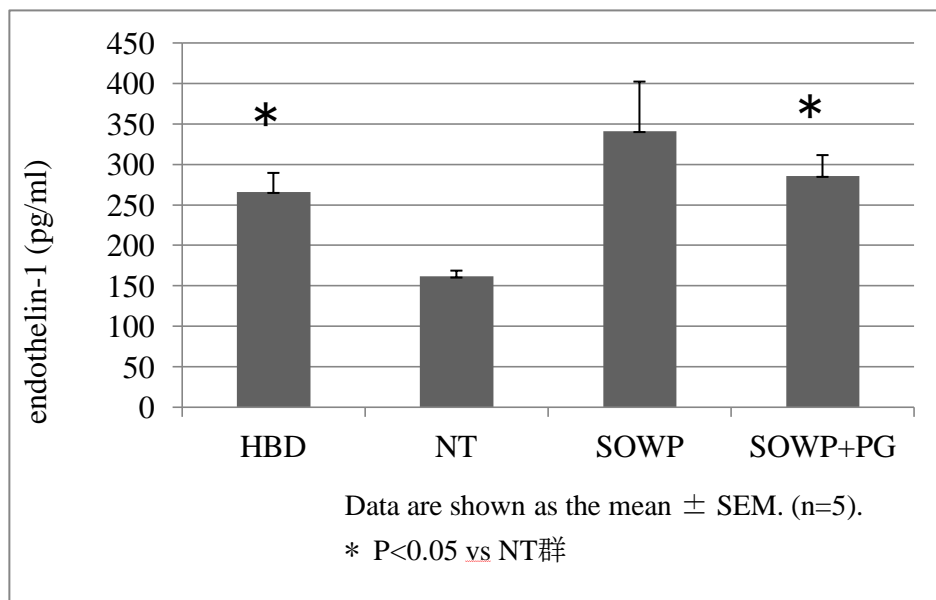


図 9 血清中エンドセリン-1

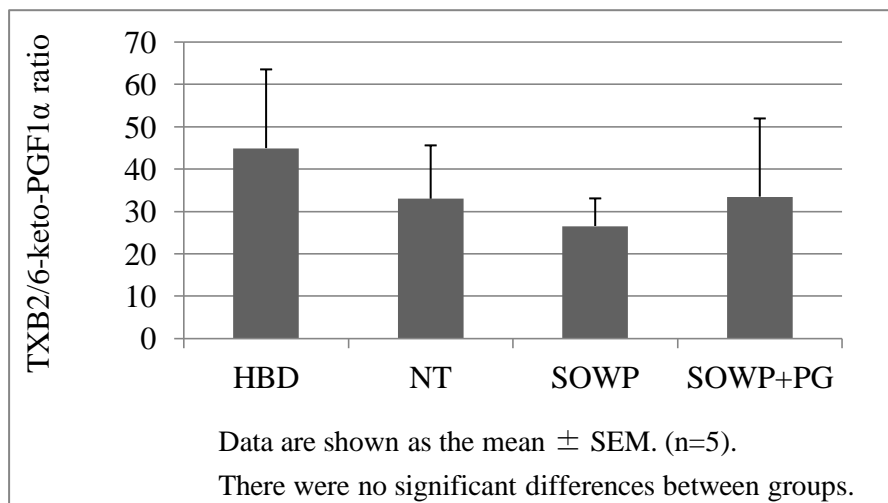
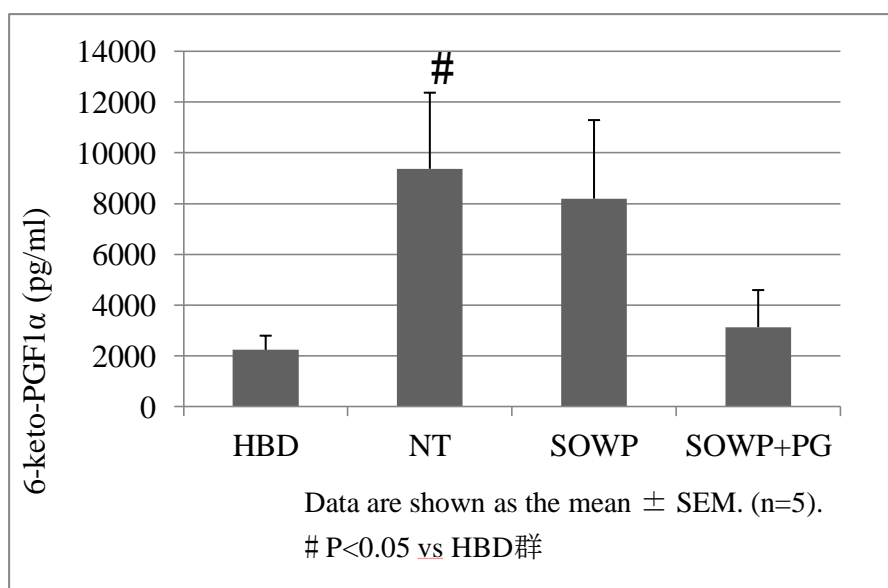
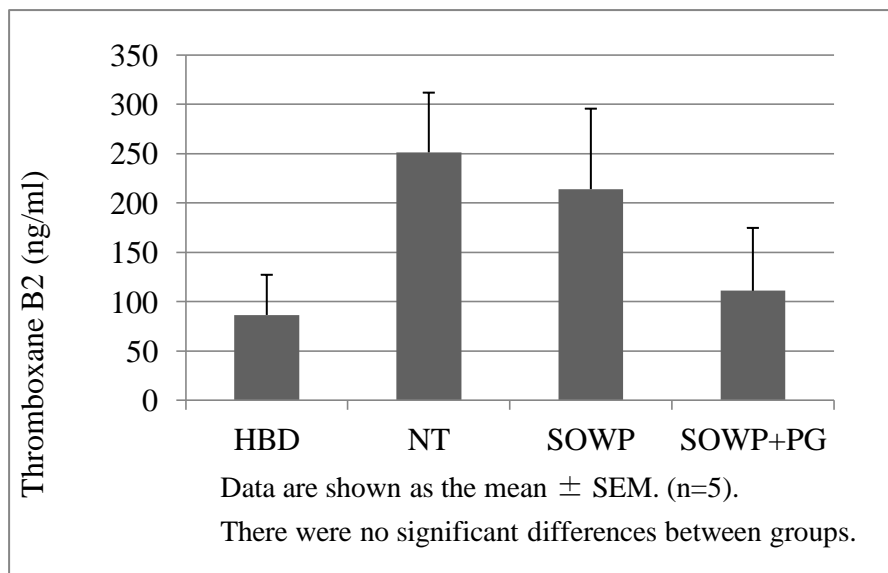


図 10 血清中 thromboxane B2、6-keto-PGF1 $\alpha$ 、及びその比率

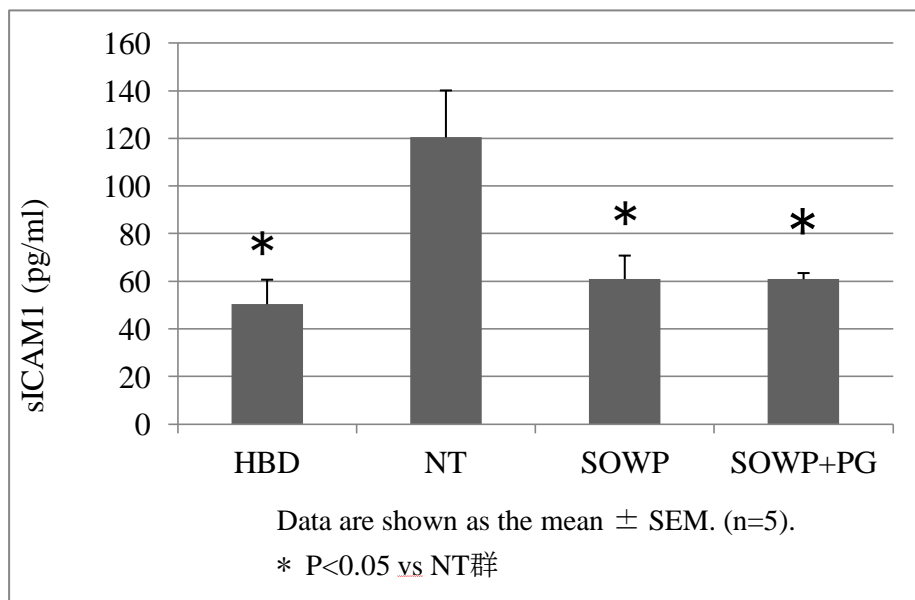


图 11 血清中 sICAM1

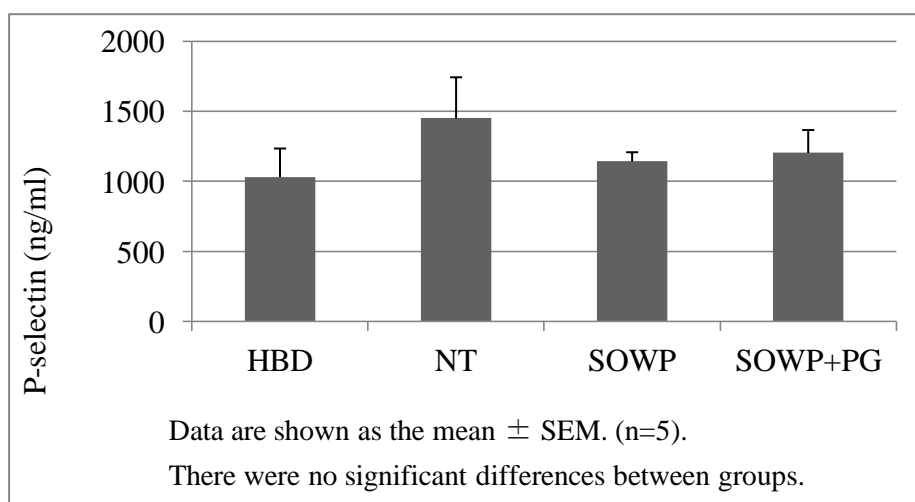
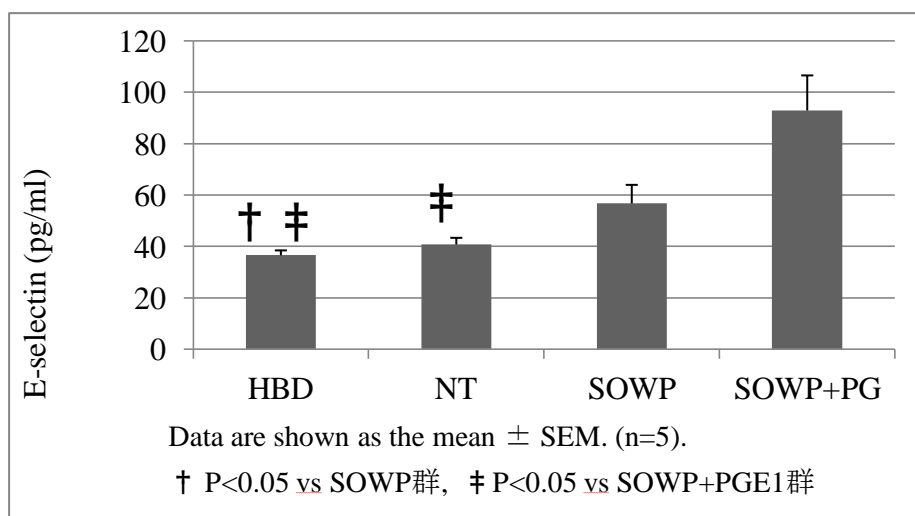


图 12 血清中 E-selectin、P-selectin

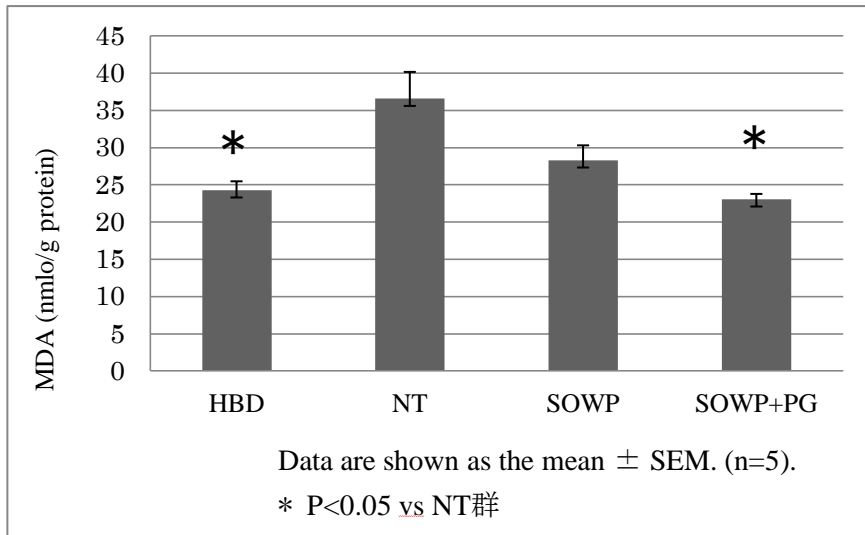


图 13 肝組織中 MDA 量

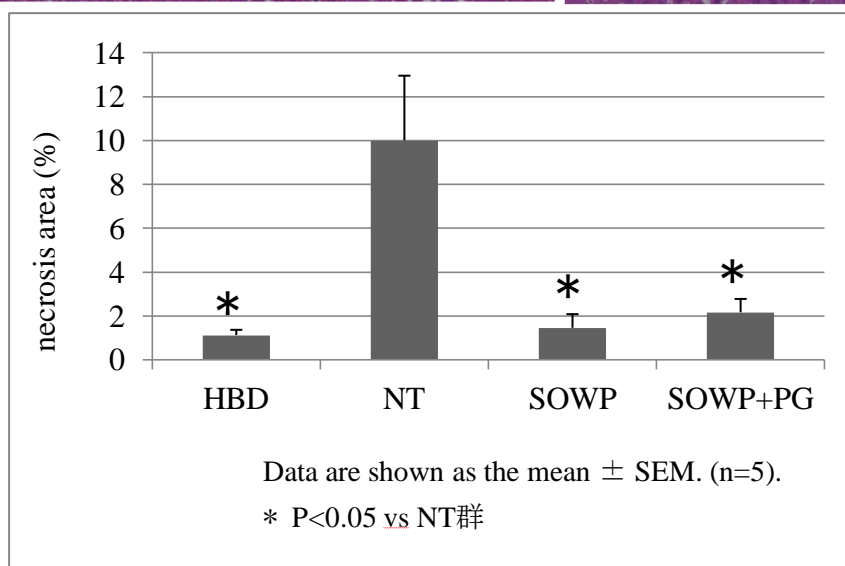
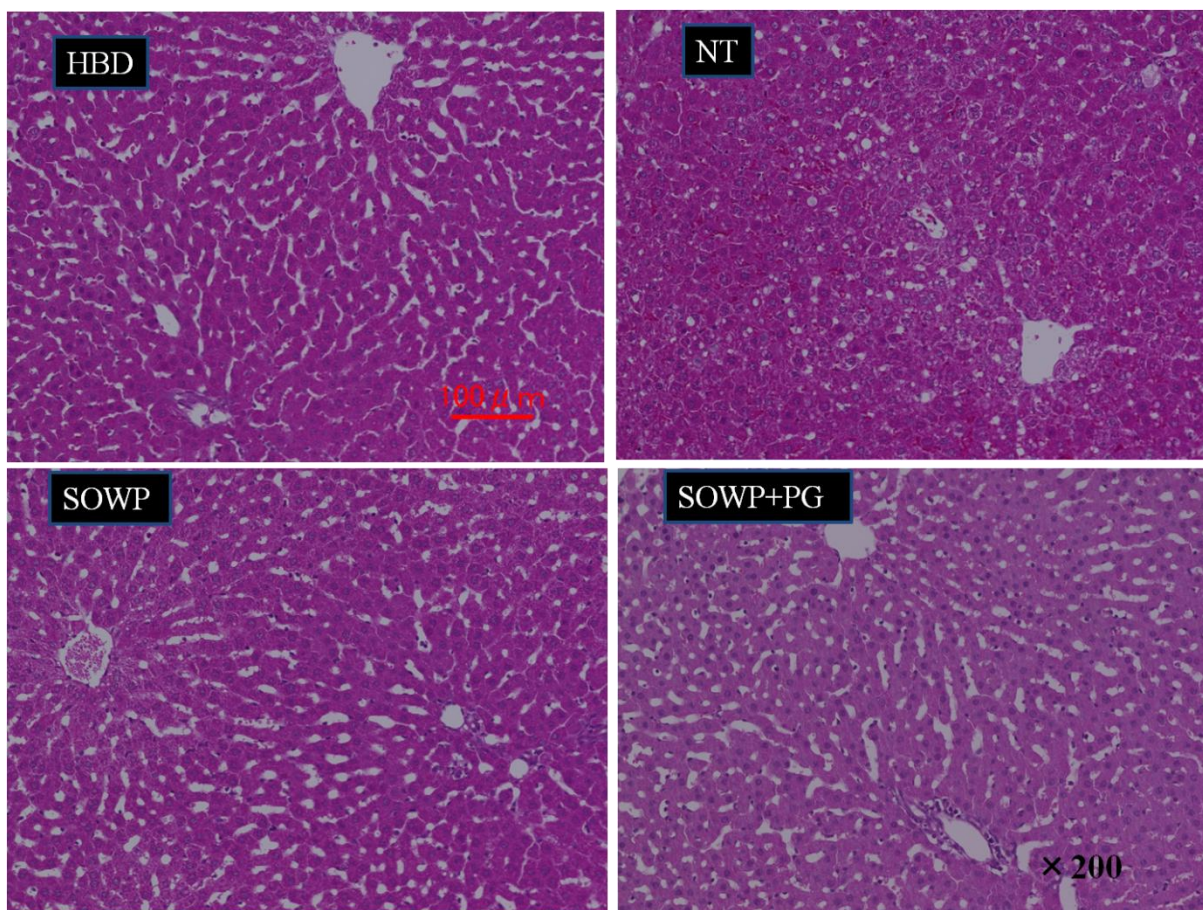


図 14 HE 染色・ネクロシス面積比率

NT 群で肝細胞の空胞変性や索状構造の破壊などの虚血性変化が著明であり、巣状にネクロシスに陥っている部位が多数認められた。SOWP 群、SOWP+PG 群とも、HBD 群と同程度まで、NT 群に比べて有意にネクロシスが抑制された。

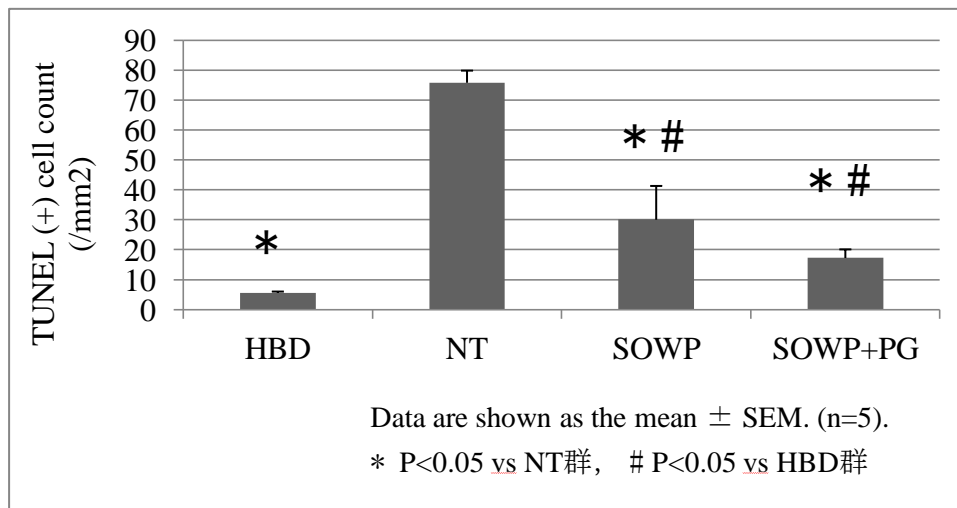
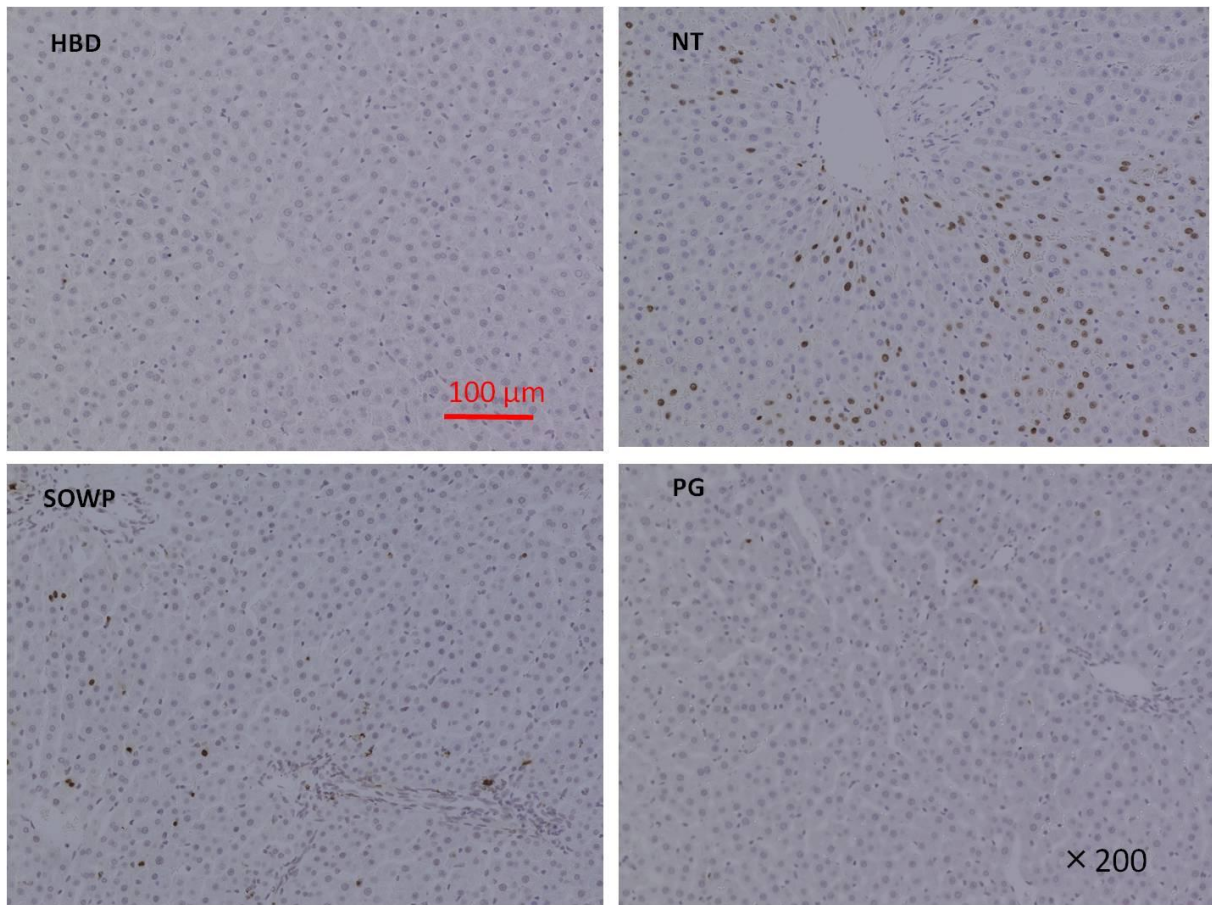


図 15 TUNEL 染色・TUNEL 陽性細胞数

TUNEL 陽性細胞数は NT 群に比べ、SOWP 群ではその約半数に抑えられ、SOWP+PG 群では、4 分の 1 に抑えられていた。