

生体内ガス分子の作用を応用した臓器保存法の確立

日本大学 医学部 生体構造医学分野

平井 宗一

1. 研究開始当初の背景

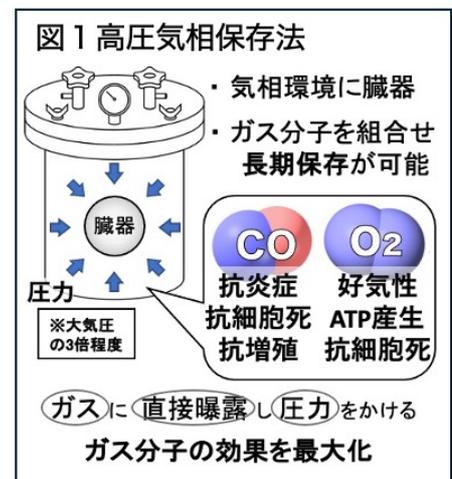
移植臓器(ドナー)不足は、世界的に深刻かつ喫緊の課題である。本邦では、2010年に臓器移植法が改正され臓器提供数は増加した。しかし、移植件数は約400件/年にとどまり、約15,000人いる移植希望患者は、その半数が移植を待ち詫びながら亡くなっている厳しい現状がある。また、移植の時機などが合わず摘出臓器の保存限界を超え、移植基準に満たず廃棄されてしまう臓器がある。移植の盛んな米国では、年間約600の移植のための摘出臓器が廃棄されている(United Network for Organ Sharing 2022より)。このような状況を解決する方法の一つに、摘出臓器を体外で生かし、長期に保存または蘇生できるような技術(臓器保存法)の開発が求められている。この技術により保存限界の緩和や、移植基準に満たない拡大適応ドナーの利用、将来的には臓器バンクを構築し、臓器の供給体制を改善することが期待されている。

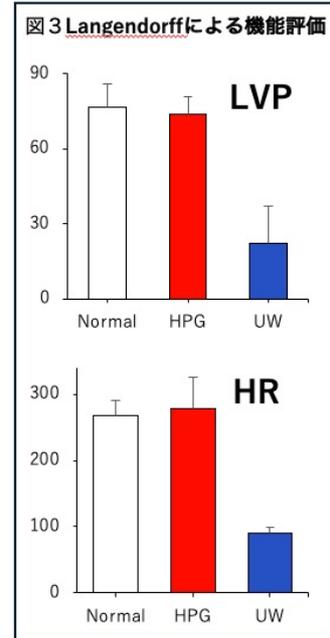
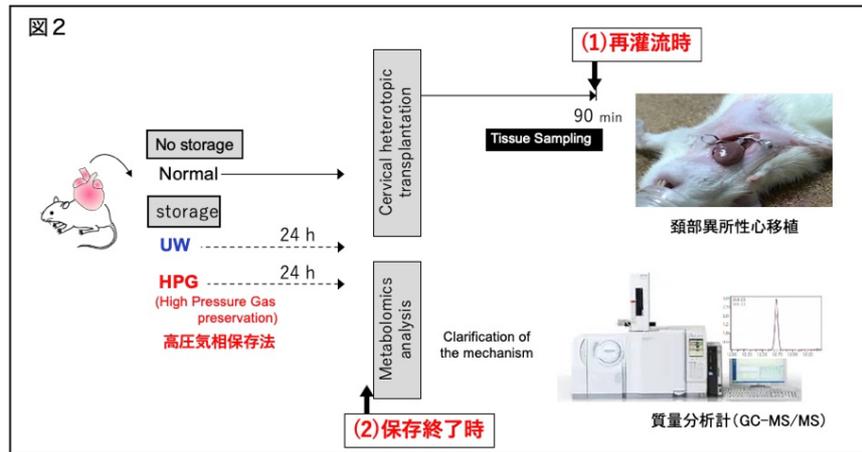
臓器移植において摘出臓器を保存する方法として、主に低温の保存液に浸漬する単純浸漬法が用いられている。近年では、保存液を持続的に還流する持続還流法の開発が盛んに行われてきた。持続還流法の発展に伴い、臓器保存中の酸素(Oxygen: O₂)供給についての検証が行われ、臓器保存中に酸素供給を行うことの有用性が報告がされている。酸素は、保存臓器の好気性代謝を誘導しATP産生を維持することで、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の開口を制御、膨化を 방지、カルシウムATPaseの機能を保ち、細胞死を防ぐ効果があると考えられる。代表者は、新たな移植用臓器保存方法として、ガスの効果について注目した高圧気相保存法を開発、研究を行ってきた。その過程で、酸素だけでなく、内因性生理活性ガスの一つである一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)が臓器保存に有用であることを立証している。一酸化炭素は、生体内で発生する生理活性ガスであり、ミトコンドリアに作用し細胞の代謝を抑制(ATP減少抑制・保護)し、MAPKやAktなどを介した抗細胞死・抗炎症・抗増殖作用を有し、虚血再灌流障害を軽減する効果があることを報告してきた。本研究では、「代謝解析により、ガスの効果を明らかにする(Mechanism)」「ガスを用いた保存法を臨床に応用する(Application)」の2つの項目について研究を行った。

2. 代謝解析により、ガスの効果を明らかにする (Mechanism)

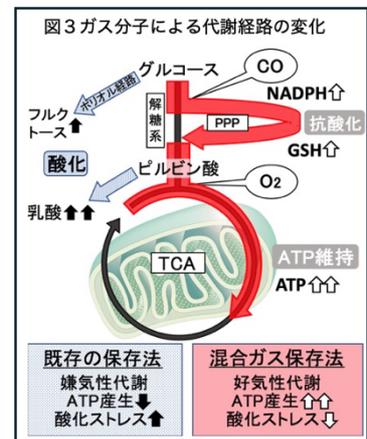
一般的に用いられている移植用臓器保存法である単純浸漬保存法では、酸素などのガス分子を摘出臓器に供給することが難しい。我々が開発した高圧気相保存法は、臓器を「気相」環境に保存することでガス分子の効果を最大限に引き出すことが可能となった。これまで酸素と一酸化炭素の混合ガスを用いることで、保存時間を2-6倍延長するなど、臓器の機能維持を飛躍的に改善している。また、摘出臓器保存中におけるガス分子の効果を最大化することで、作用についての解析が可能となった(図1)。

本研究では、既存の方法である単純浸漬法(CS群)および、高圧気相保存法(HPG群)にてラット心臓を24時間保存後、頸部異所性心移植を行い、90分後(図2(1)再灌流時)に、機能評価などの解析を行った(図3)。HPG群が有意に保存状態が良いこと確認の上、24時間保存時(図2(2)保存終了時)のラット心臓の代謝産物の変化について、質量分析装置(GC-MS/MS)を用いて解析を行った。





HPG 群では、CS 群より乳酸が有意に低く、クエン酸は有意に高かった。さらに、アデノシン三リン酸 (ATP) レベルが有意に高くなっていたことから、高圧気相保存法にて保存した臓器においては、TCA 回路が働き、ATP 産生が行われていることが示唆された。また、一部のペントースリン酸経路 (PPP) 代謝物である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) も HPG 群で有意に高く、酸化ストレスから細胞を保護する還元型グルタチオン (GSH) も HPG 群で CS 群より有意に高かった。このことから、高圧気相保存法にて保存した臓器では、PPP 経路が有意に行進したことで、酸化ストレスを軽減していることが示唆された (図 3)。さらに、脂肪酸測定においても、CS 群と HPG 群において、保存終了時の代謝産物に有意な差が見られるとの結果を得ている (Data not shown)。特定の酵素 A が重要な役割を果たしていると予測されており、現在、詳細な解析を行っている。



3. ガスを用いた保存法を臨床に応用する (Application)

今後の応用に向けて、ラットおよび、臓器サイズがヒトにより近いイヌの肺の保存において、一酸化炭素と酸素を用いた高圧気相保存法が、虚血再灌流障害の軽減に寄与するかを検証している。一酸化炭素 (CO; 1.5 atm) と酸素 (O₂; 2 atm) で充満した保存室に保存し、保存前に CO と O₂ の混合物 (CO/O₂ 群) または空気 (空気群) で換気した。ラット肺は異所性頸動脈移植を用いて、また、犬肺は同種移植を用いて再灌流後に評価した。その結果、CO/O₂ 群では肺泡出血が空気群よりも軽度であり、CO/O₂ 群では炎症関連遺伝子の発現が空気群よりも有意に低かった。肺移植片の酸素化は 2 群で同程度であったが、空気群では Lactate 値が高くなる傾向があった。以上より、イヌの肺のようなサイズの大きい臓器においても、ガス分子 (CO、O₂) の感作が可能であれば、IRI を抑制し、供給者肺を保存するのに有効であることを明らかにしている。一方で、肺は、内部と外部からガスに感作できるのに対し、サイズの大きい実質臓器では、外部からの感作だけでは、内部へガスの効果を送達することが出来ないことが予想されたため、ブタの心臓を用いて検証を行った。その結果、臓器表面に近い部分の保存状態と深い部分の保存状態に差があることが明らかとなり、ガスを送達することが一つの課題であることが課題であった。

本研究では、内因性生理活性ガスを UFB 化し、血管を介して、移植臓器全体の標的組織へガスを直接送達させる新たなガス運搬体として、気泡径が 1 μm 未満であり、水中安定性の特徴を有する、ウルトラファインバブル (UFB) に着目した。摘出臓器への投与する保存液であるため、無菌状態にて作成できること、かつ、空気塞栓をふせぐために、大きさの均一性が高いことが可能である閉鎖

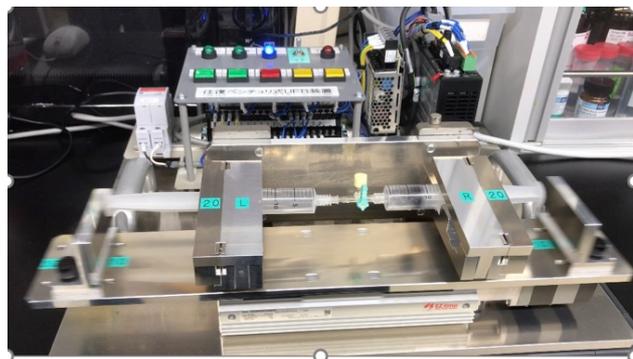
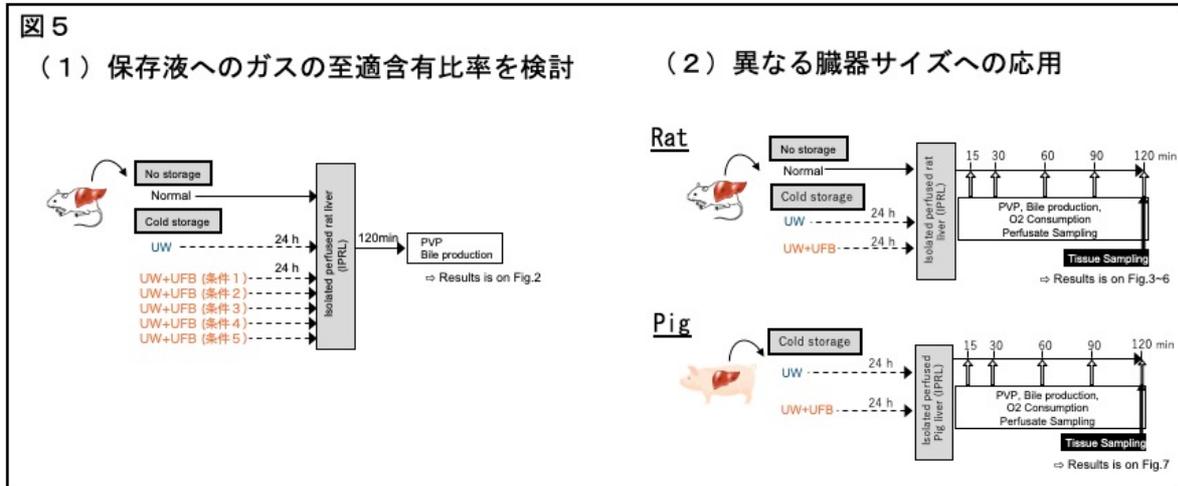


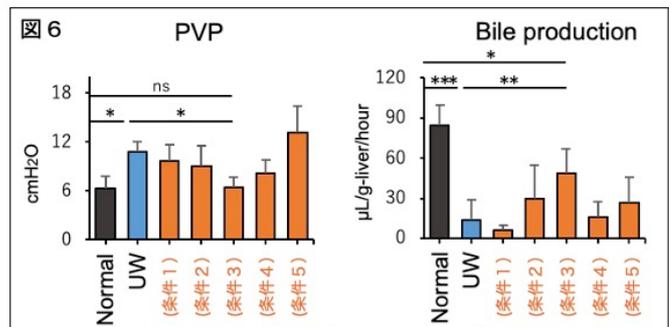
図 4 閉鎖系 UFB 発生装置

系のUFB発生装置を開発した(図4)。ベンチュリー効果を利用した、往復式UFB発生装置において、作成時間に伴って、UFB濃度が上昇し、ある一定時間からは、UFB濃度が増加しないことを確認した。さらに、UFBの電化など、その様々な性質を測定、検証した。さらに、細胞や臓器に与える効果、影響を検証中である(Data not shown)。



様々なガス分子の組み合わせのUFB(図5(1)、条件1-5)を作成し、単純浸漬法においてガス分子がUFBを介して摘出臓器に作用することが可能性について検証した。ラット肝臓を摘出後、各条件にて24時間保存後、Isolated perfused rat liver(IPRL)を行い、門脈圧(PVP)、胆汁産生量(Bile production)にて検証を行った。その結果、ある条件にて、PVPの上昇が見られず、既存の単純浸漬法(UW群)と比較して有意に胆汁産生が行われ、機能が維持されていることが明らかとなった(図6)。

さらに、臓器サイズがヒトにより近いブタの肝臓にて、同条件による24時間保存を行った(図5(2))。その結果、UFBを介するガス分子の感作は、有意に保存状態を改善することが明らかとなった(data not shown)。本研究にて、移植用臓器保存におけるガス分子の新たな活用方法としてUFBが有効であることが示された。



4. まとめ

本研究にて、移植用摘出臓器に対して、ガス分子を感作し、保存中の代謝を変化させることで、保存状態を向上させることを明らかにした。また、ガス分子の直接感作ではなく、UFBを介した感作することで、臓器の保存状態を向上させることを示した。これにより、ヒトのサイズの臓器にもガス分子の効果を供給できる可能性が示唆された。今後も、臓器保存方法に、「ガスを活用する」という概念を導入することで、ドナーから摘出された臓器が、より長期に、より良い状態で保存される技術確立し、ドナー不足の改善に貢献したい。