

平成30年 5月30日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10021

研究課題名(和文) 微弱磁場環境下・不凍物質添加低温保存肺の移植に関する研究

研究課題名(英文) Subzero lung preservation in a variable magnetic field using anti-freeze protein

研究代表者

松本 勲 (Matsumoto, Isao)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80361989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植における、微弱磁場環境下と不凍物質添加による過冷却および冷凍保存法の有用性を研究した。ラットを用い、24時間保存後同種移植を行い、移植肺でのエネルギー代謝や再灌流障害の程度を比較した。【過冷却】微弱磁場下、 $-2^{\circ}\text{C}$  保存の移植肺は、 $4^{\circ}\text{C}$  単純冷却保存と比べエネルギー代謝や再灌流障害が抑制され、肺摘出直後移植の移植肺と比べほぼ同等であった。微弱磁場環境下で、保存液にAFPを添加しても有意な乗せ効果はなかった。 $4^{\circ}\text{C}$  単純冷却肺保存では不凍タンパク、特にAFGPは肺保存状態を改善する可能性があることが示された。【冷凍】 $-10^{\circ}\text{C}$  での冷凍肺保存におけるCAS、不凍タンパク添加の有意な効果はなかった。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of subzero lung preservation in a variable magnetic field using CAS with anti-freeze protein was examined.

We prepared a lung allograft model in rats. After reperfusion for 2 hours following 24-hour preservation, we evaluated the energy charge and reperfusion injury values of the transplanted lung in four groups. Group A: without preservation, Group B: at  $4^{\circ}\text{C}$  in a normal refrigerator, Group C: at  $-2^{\circ}\text{C}$  in a CAS, Group D: 60 mg/ml of AFP to the preservation solution used for Group C. The outcome of Group C was better than that of Group B and equivalent to that of Group A and Group D. CAS was effective and adding AFP resulted in only a small added effectiveness. In addition, the effectiveness of anti-freeze proteins (AFP and AFGP) was examined in the same model as Group B. Anti-freeze proteins, in particular AFGP, are relatively effective. Furthermore, a separate experiment demonstrated that CAS with AFP was not significantly effective for  $-10^{\circ}\text{C}$  lung cryopreservation.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺保存 不凍物質 微弱地場 サブゼロ

## 1. 研究開始当初の背景

### 【肺移植における肺保存法】

本邦の肺移植において、ドナー肺不足はいまだに深刻な問題であり、少ないドナー肺の、より長時間の保存が望まれる。現在肺移植では、4~8 で6-8時間の肺保存が限界である。これまでわれわれは臓器保存の温度に着目し研究を行ってきた。低温保存を行えば移植臓器の代謝率が低下しエネルギー需要が減少するうえ、虚血障害を抑制しうる。しかし、単純な零下保存は氷結による物理的細胞損傷、脱水作用などを来し、細胞障害が起きるため臓器保存には逆効果である。

このため、移植臓器の氷結を抑制しつつ、低温(氷温)保存を行うことができれば、保存時間を延長しうる。また、真に長期間の臓器保存を行うには冷凍保存を行う必要がある。そのためには、次の二つの問題を解決することが必要である。

(1) 細胞内氷結を抑制しつつ、細胞を安定化したまま保存温度を低くし、低温・虚血障害に曝される細胞膜および細胞内酵素を保護すること。

(2) いったん冷却または冷凍した保存臓器を常温に戻す際、実際の臨床では、移植臓器の温度上昇が不均一となりやすく、細胞内再氷結が発生し細胞破壊を来す。この再氷結を抑制すること。

この二点、特に再氷結抑制に着目した肺の氷温保存の研究はこれまで行われていない。

### 【細胞内氷結を抑制する微弱磁場環境下臓器保存】

これまでわれわれは、微弱磁場付加により、低温下でも水の氷結晶化を抑え、過冷却状態を維持しうる冷蔵庫(CAS®、株式会社アビー)を用いて臓器保存法を研究してきた。

通常保存では、不均一に冷却・氷結され、細胞内部の脱水と細胞破壊を起こし細胞破壊を引き起こす。一方、微弱磁場下保存では、微弱磁場付加により細胞内の水分子を振動させ、氷結晶化を抑制しつつ過冷却状態を維持し、内部まで均一に冷却することによって脱水と細胞破壊を抑制する。われわれは既に、心臓保存において微弱磁場環境下の氷結しないサブゼロ保存が有用であることを、科学研究費を得て研究し、論文発表報告を行ってきた[1][2]。

### 【細胞膜保護と再氷結抑制のための不凍物質】

われわれは、科学研究費で、*Bacillus thuringiensis* 由来の不凍物質をEuro-Collins液に添加し、-1、24時間保存を行った場合、肺組織内ATP量および肺構造の維持に効果があるが、不凍物質添加単独ではトレハロース添加の効果には劣ることを報告した[3]。しかし、近年、魚(カレイ)由来の不凍タンパクが低温において強い細胞保護機能を有することが証明された[4]。また、保存液に不凍物質を添加することによって、保存臓器を常温に戻す際、細胞内の再氷

結が発生しにくく、細胞破壊を抑制しうると考えられる。

[1] 代表：山口聖次郎、平成21-22年度科学研究費補助金、若手研究(B)、平成23年報告「Cell Alive System(CAS)を併用した心臓移植術の基礎的研究」

[2] Kato H, et. Al.; Subzero 24-hr nonfreezing rat heart preservation: a novel preservation method in a variable magnetic field. *Transplantation*. 2012; 94(5): 473-7.

[3] 代表：松本勲、平成16-17年度科学研究費補助金、基盤研究(C)、平成18年報告

「抗氷核活性物質、不凍蛋白質を用いた移植肺の低(氷)温保存に関する基礎的研究」

[4] Kamijima T, et.al.; Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. *PLoS ONE* 2013; 8(9), e73643.

## 2. 研究の目的

肺移植において、移植肺の長時間保存の実現はドナー肺不足解消の一助となる。長時間保存には低温保存の有用性が期待される。微弱磁場は低温下での組織破壊を防ぎ、不凍物質は低温での細胞保護と再氷結抑制効果を持つ。今回、「微弱磁場」保存と「微弱磁場+不凍タンパク添加」保存の肺保存効果を比較し、低温保存における不凍タンパクの有用性を動物実験によって検討した。さらに、肺の凍結保存を行い「微弱磁場+不凍タンパク添加」凍結保存の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### 実験1

【方法】ラットを用いて肺にPerfadexを灌流したのちに左肺を摘出した。コントロール群(摘出後に保存せず移植)、通常保存群(摘出後通常冷蔵庫にて4、24時間保存後移植)、CAS保存群(摘出後CAS systemにて-2、24時間保存後移植)の3群に分け、各々6組ずつ実験を行った。保存した左肺を別のラットに移植し、2時間の再灌流を行った後に摘出し、移植肺組織中ATP、W/D Ratio、肺動脈PaO<sub>2</sub>、病理を評価した。

### 実験2

微弱磁場環境下で、保存液に不凍タンパク(AFP)を添加した効果を実験1と同様に評価した。

【方法】CAS+AFP群：6組。実験1のCAS保存群の保存液に30 mg/mlのAFPを添加した。

### 実験3

実験1、実験2の結果から、保存液へ不凍タンパクを添加すること自体の効果を検証することとした。不凍タンパクであるAFP、AFGP添加の肺保存への効果を検討した。

【方法】保存液として ET-KYOTO を使用し、4、24 時間保存。以下の 3 群（各 6 組）を作成。control 群：ET-KYOTO のみ、AFP 群：ET-KYOTO に AFP10mg/ml 添加、AFGP 群：ET-KYOTO に AFGP10mg/ml 添加。ラットで左肺同種移植モデルを作成した。再灌流 2 時間後、動脈血 PaO<sub>2</sub>、移植肺 ATP、W/D ratio、病理を評価した。

#### 実験 4

実験 3 で AFP より AFGP の方が保存に有効であると判明し、冷凍肺保存への CAS + AFGP の効果を検証した。

【方法】Perfadex を使用し、-10、24 時間保存。以下の 3 群（各 6 組）を作成。control 群：通常冷凍、CAS 群：CAS 下冷凍、CAS+AFGP 群：CAS 下、保存液に AFGP (500µg/ml) を添加し冷凍。移植肺 ATP、W/D ratio、病理を評価した。

### 4. 研究成果

#### 実験 1

【結果】ATP 量(µmol/g) は、コントロール群 33.8±6.8、通常保存群 21.3±1.5、CAS 保存群 31.8±2.5 で、コントロール群、CAS 保存群に対し、通常保存群は有意に ATP 量が低下していた (P<0.05)。W/D Ratio は、コントロール群 0.204±0.028、CAS 保存群 0.220±0.038、通常保存群 0.205±0.045 で、3 群間で有意差はなかった。肺動脈 PaO<sub>2</sub> はコントロール群 178±20、通常保存群 180±28、CAS 保存群 172±41 で、3 群間で有意差はなかった。病理学的検討 (H-E 染色): 間質の浮腫、血管外顆粒球浸潤、肺胞内出血、無気肺は各群においてみられたが、その程度に差はなかった。肺胞破壊平均スコアは、コントロール群 1.0、CAS 保存群 1.2 に対し、通常保存群は 2.0 であり、有意に破壊が進んでいた (P<0.05)。

#### 【結論】

微弱磁場環境下でのサブゼロ肺保存は、4 の単純冷却保存と比較して代謝を抑え、肺組織構造を温存し得た。肺摘出直後に肺移植を行った移植肺とほぼ同等な状態を保つと考えられる。

#### 実験 2

【結果】ATP 量は 32.0±4.8µmol/g、W/D ratio は 0.210±0.045、動脈血 PaO<sub>2</sub> は 178±45mmHg であり、CAS 群、コントロール群に比べて有意差はなかった。病理学的検討で CAS 保存群と同等であった。

【結論】肺保存において微弱磁場環境下に AFP 添加の上乗せ効果は十分ではない。

#### 実験 3

【結果】値は control 群、AFP 群、AFGP 群の順。PaO<sub>2</sub>(mmHg) は 476.0±69.8、458.2±78.8、512.0±131.5。W/D は 6.1±1.2、5.1±0.6、5.2±0.4。ATP(µmol/g) は 1.86±0.70、1.38±0.47、1.86±0.24。W/D は control 群に比べ、AFP 群、AFGP 群で有意に低く (P<0.05) AFP 群より AFGP 群

が低い傾向にあった。病理は、control 群よりも AFP 群、AFGP 群で間質の浮腫が少ない傾向にあった。

【結論】不凍タンパク、特に AFGP は肺保存を改善する可能性がある。

#### 実験 4

【結果】値は control 群、CAS 群、CAS+AFGP 群の順。ATP は 0.18±0.08、0.17±0.06、0.16±0.09。W/D は 5.4±0.6、5.3±0.3、4.8±0.3。ATP、W/D、病理ともに各群に差なし。

【結論】冷凍肺保存における CAS、不凍タンパク添加の効果は少ない。

以上から、微弱磁場環境下でのサブゼロ保存は、肺保存に有用である。肺保存において、不凍タンパク、特に AFGP は肺保存を改善する可能性がある。冷凍肺保存における CAS、不凍タンパク添加の効果は少ない。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：<http://kanazawa-surg1.jp/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

松本 勲 (Matsumoto Isao)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：80361989

(2)研究分担者

田村 昌也 (Tamura Masaya)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：10397185

(3)研究分担者

高田 宗尚 (Takata Munehisa)  
金沢大学・附属病院・協力研究員  
研究者番号：20459514

(4)研究分担者

加藤 寛城 (Kato Hiroki)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：20733843