

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15515

研究課題名(和文) Perfluorocarbonを用いた移植臓器保護方法の開発

研究課題名(英文) Effects of Perfluorocarbon on the re-perfusion injury of the donor lungs

研究代表者

中島 淳(Nakajima, Jun)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90188954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植の際の臓器保存液には、ETK液(大塚製薬)が用いられることが多いが、今実験では、ETKを溶質として、超音波ホモジナイザーなどを使用して、perfluorocarbon(PFC)を混合して使用した。PFC溶液を臓器灌流液に用いると、先行研究でも報告はあったが、炎症の惹起が見られるのみで、低酸素状態の改善は見られなかった。この原因としては、肺動脈内の酸素含有量が少ないのが原因とかがえられるために、今後はex vivo lung perfusion中での使用を想定している。

研究成果の概要(英文)：Perfluorocarbon(PFC) has been studied in the field of transplantation but has never been used to reduce re-perfusion injury of the implanted lungs. Therefore, we investigated whether PFC can ameliorate the injury after lung transplantation using our rat transplant model. It seemed that PFC could cause tissue inflammation represented by increase of mRNA expression of CXCL-1, but no significant protective effects to hypoxic tissue injuries measured by hypoxia-induced factor 1-alpha and 2-alpha. We are going to examine its effects on anti-tissue damage in the setting of ex-vivo perfusion of the grafts.

研究分野：肺移植

キーワード：温虚血 移植 ドナーグラフト 虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

ドナー臓器保護は、ドナーとなられた方の臓器機能維持から始まり、臓器摘出、適切な臓器灌流、冷保存、温虚血時間帯の障害予防、そして移植後の虚血再灌流障害の軽減まで、それぞれの機序の解明、また機序に即した障害軽減が必要とされる。

温虚血時間帯は吻合操作に要する 1 - 2 時間程度だが、この間の組織温度上昇・低酸素状態による組織障害は、数時間の冷虚血と同等かそれを上回る可能性がある。今回我々が臓器保存に使用する perfluorocarbon(PFC) は、その高い酸素溶解度、化学的に不活性・安定、低い表面張力(14-18 dyn/cm)、高比重(1.7-1.9 mg/ml)等の特徴から、液体呼吸(liquid ventilation)の換液として開発されてきた(Leach CL, et al. N Engl J Med.1996;335:761-7)。すでに完全液体呼吸、部分液体呼吸、もしくはエアロゾル化した PFC による換気が acute respiratory distress syndrome(ARDS)の患者に臨床試験の形で使用されてきた(Galvin IM, et al. Cochrane Database Syst Rev. 2013;23;7)。PFC はすでに経気道的に臨床使用されており、また経静脈的投与でも凝固系に影響を与えないことが確認されている(Leese PT, et al. Anesth Analg. 2000;91:804-11)。さらに近年の研究では PFC のケモカインや Nuclear Factor- κ B 活性化阻害による抗炎症効果が知られてきた(Haerberle HA, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:1433-8)。

臨床経験上、また虚血時間と移植後肺機能の関連の検討報告から、臓器全虚血時間(血流のない状態)は概ね 8 時間以内に収まるよう予定され、肺移植は施行されている。そのうち温虚血時間は短くて数十分、長くて 2 時間程度である。しかし組織代謝がほぼ停止している冷却状態に比較すると、温虚血状態では低酸素・組織温上昇による代謝障害が進行すると考えられる。一方臨床的には、移植吻合時は組織温上昇に対して局所クーリ

ングのみで対処しているのが現状である。この時間帯の組織・代謝障害軽減に絞った研究は斬新であり、効果的な保護法の臨床導入が期待される。

2. 研究の目的

肺移植においてドナー肺摘出後の虚血時間が、移植後の肺機能障害・予後に関連することが知られている。ドナー肺摘出後の虚血・低酸素状態による組織障害をいかに軽減できるかは、移植後の肺機能・患者予後を考える上で重要である。本研究では従来の臓器保存液に加え、高い酸素溶解度を持つ perfluorocarbon(PFC)を併用することで、虚血・低酸素による組織障害、特に温虚血時間帯の障害を軽減する新たな臓器保護方法の検討を目的とする。

3. 研究の方法

小動物(ラット)を用いて、本研究のコンセプトが実施可能かを確認する。すなわち摘出したラット肺に、PFC を経気道的、もしくは経血管的に灌流の上浸漬し、組織保護効果について検討する。さらに同方法で保存された肺を移植して、移植後の肺機能を検討する。臨床応用を念頭に、PFC の酸素含量、適切な投与量、投与方法、安全性等について、臓器保護効果と投与効率性を検討する。

4. 研究成果

ドナー肺の受ける組織障害は時相別で大きく 4 つに分けられる。すなわち 臓器摘出前、肺摘出・体外保存中(いわゆる冷虚血状態)、肺移植手術中(いわゆる温虚血状態)、血液再灌流後、である。これら 4 時相のうち、
、
のドナー肺摘出後の虚血・低酸素状態における組織障害について、虚血後再灌流障害ラットモデルを用いて実験を行った。

実験モデルの詳細

肺移植の際の臓器保存液には、ETK 液(大塚製薬)が用いられることが多いが、今実験では、ETK を溶質として、超音波ホモジナイ

ザーなどを使用して、perfluorocarbon(PFC)を混合して使用した。PFCはperfluorodecalinを使用し、作成した溶液を分光光度計で粒子径を測定したところ、生理食塩水を使用時と遜色のないばらつきの少ない粒子径の分布であり、使用に耐えうると判断した。用意した溶液は当日中に使用することとした。移植実験の前段階として、グラフトの評価を行う方針として：

臨床経験上、また虚血時間と移植後肺機能の関連の検討報告から、臓器全虚血時間（血流のない状態）は概ね8時間以内に収まるよう予定され、肺移植は施行されている。そのうち温虚血時間は短くて数十分、長くて2時間程度である。しかし組織代謝がほぼ停止している冷却状態に比較すると、温虚血状態では低酸素・組織温上昇による代謝障害が進行すると考えられる。一方臨床的には、移植吻合時は組織温上昇に対して局所クーリングのみで対処しているのが現状である。よって温虚血の時間は2時間に設定して今回の実験を行った。

PFC溶液で灌流した肺グラフトを、肺門一括クランプで膨張した状態で、酸素を飽和させたPFC溶液中で37℃2時間保存した。対照は、ETKのみで灌流したグラフトを、ETK内で37℃2時間保存した。グラフトの状態をRT-PCRで評価した。

PFC溶液で灌流したグラフトを、片肺は肺門一括クランプで膨張した状態で、もう片肺は肺動脈・肺静脈のみをクランプし、気管支は開放し虚脱した状態で、乾燥を防ぐために、生理食塩水に浸したガーゼで保護し、37℃2時間保存した。グラフトの状態はRT-PCRで評価した。

実験結果

各々n=4で評価をした。GAPDHの発現量をhouse-keeping geneとして、CXCL1、TNF、HIF-1 α 、HIF-2 α 、SOD1の発現を検討したところ、低酸素のマーカとなる

HIF-1 α /HIF-2 α の発現には有意差を認めなかったが、PFC群で有意にCXCL1の発現を多く認めた。これは、膨張状態での肺胞気管支内に存在している酸素の量が、肺動脈内の溶液内の酸素の量よりも多い計算になり、PFCの炎症を惹起する作用が大きくてた結果と考えられた。

上記実験での気管支内の酸素の有無を排除するために、検討した。各々n=4で評価を行い、対照はETKで灌流し、肺門一括クランプで肺を膨張した状態で保存した物とした。「PFCで灌流、膨張」「PFCで灌流、虚脱」「ETKで灌流、虚脱」の3群に関して、GAPDHの発現量をhouse-keeping geneとして、CXCL1、TNF、HIF-1 α 、HIF-2 α 、SOD1の発現を検討したが、いずれも有意差は認められなかった。

ドナー臓器保護は、臓器機能維持から始まり、臓器摘出、適切な臓器灌流、冷保存、温虚血時間帯の障害予防、そして移植後の虚血再灌流障害の軽減まで、それぞれの機序の解明、また機序に即した障害軽減が必要とされる。

温虚血時間帯は吻合操作に要する1-2時間程度だが、この間の組織温度上昇・低酸素状態による組織障害は、数時間の冷虚血と同等かそれを上回る可能性がある。本研究により温虚血の組織障害の程度と、その軽減に関する知見を今回の一連の実験で深め得たことは従来の臓器保護に新しい視点を加えたといえる。

しかし今回の実験系ではPFC溶液を臓器灌流液に用いると、炎症の惹起が主体として観察され、低酸素状態の改善は（少なくとも検索した低酸素関連マーカーの遺伝子発現の提言という形としては）見られなかった。

原因としては、肺動脈内の酸素含有量が少ないのが原因と考えられた。また実験系の設定（虚血再灌流時間、PFC溶液濃度、グラフ

トの温虚血時間などの設定)についても、今後見直す余地を残した。

さらに、摘出した臓器を体外で還流して臓器組織障害の軽減を図るために欧米を中心に近年導入され始めている ex vivo lung perfusion での使用を想定している。

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 1 件)

肺移植後の長期成績 Long-term outcome after lung transplantation: An update

安樂真樹、中島淳

医学のあゆみ、査読なし、255 巻 8 号 833-836, 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

Masaki Anraku and Shaf Keshavjee

McGraw-Hill Education

Care of Multi-Organ Donor

Principle of Critical Care 4th Ed.

2015,1317(1108-1115)

〔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〕

ホームページ等

<http://cts.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 淳(NAKAJIMA, Jun)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 90188954

(2)研究分担者

安樂 真樹 (ANRAKU, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 70598557

長山 和弘 (NAGAYAMA, Kazuhiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00647935

似鳥 純一(NITADORI, Jun-ichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40424486

村川 知弘(MURAKAWA, Tomohiro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号: 50359626

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()