

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04295

研究課題名(和文) 水素水の拡散能を利用した心停止ドナー肺障害の修復と肺移植実現を目指した大動物実験

研究課題名(英文) Large animal experimental study on lung repair by hydrogen diffusion for lung transplantation from donation after cardiac death

研究代表者

伊達 洋至 (Date, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60252962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本での脳死ドナー不足は深刻であり、心停止ドナーや障害のあるマージナルドナーからの肺移植が可能となれば、多くの患者の救命につながる。我々は、抗酸化作用と拡散能を有する「水素」に着眼し、小動物であるラット移植モデルにおいて、水素水の胸腔内灌流により、水素が胸膜を透して心停止ドナー肺に拡散し、温虚血障害を改善することを突き止めた。そこで、より臨床に近い大動物(ビーグル犬)を用いて、23時間の冷保存実験を行った。その結果、水素水を肺還流に使用する肺保存液および保存肺を浸漬する浸漬液に使用することにより、移植肺機能が有意に改善されることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素ガス吸入法は、肺保存実験において報告されてきたが、取り扱いが難しく、爆発性があるなどの欠点があった。爆発性のない水素水が肺保存に有用であることを、小動物(ラット)の胸膜還流モデルを使って報告してきた。しかし、大動物では胸膜を通じての肺内への水素の拡散に限界があった。そこで本研究では、臨床肺移植に近い条件の大動物(ビーグル犬)を使用して、水素水を保存液と浸漬液に使用することの有用性を示し、23時間の冷保存を可能とした。

8-10時間が限界とされてきた安全保存時間を延長させる可能性を示した学術的意義は大きく、臓器移植数を増加させる可能性があることは、ドナー不足の日本において社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Molecular hydrogen (H₂) has protective effects against ischemia-reperfusion (I/R) injury in various organs. They are easier to transport and safer to use than inhaled H₂. In this study, we examined the protective effects of an H₂-rich solution for lung preservation in a canine left lung transplantation (LTx) model. Ten beagles underwent orthotopic left LTx after 23 h of cold ischemia followed by reperfusion for 4 h. The beagles were divided into two groups: control (CON group, n=5) and hydrogen (H₂ group, n=5). Significantly higher partial pressure of arterial oxygen and significantly lower partial pressure of carbon dioxide were observed in the H₂ group than in the CON group. The W/D ratio was significantly lower in the H₂ group. Moreover, in histological examination, less lung injury and fewer apoptotic cells were observed in the H₂ group. Our results indicated that the H₂-rich preservation solution attenuated I/R injury in a canine left LTx model.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：水素水 肺移植 虚血再灌流障害 冷保存

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

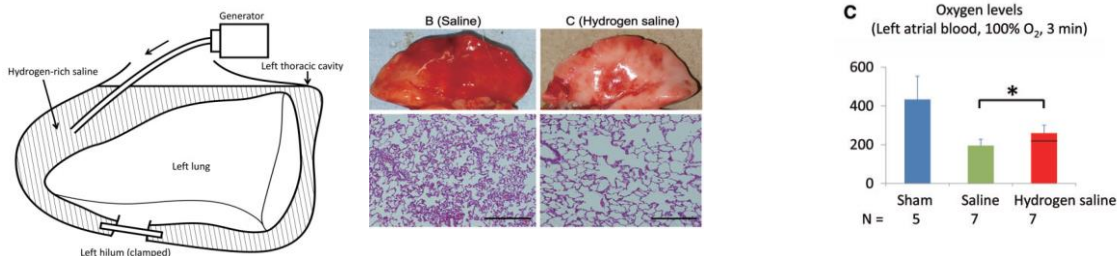
日本においては、2016年10月現在、517例の肺移植（生体肺移植195例、脳死肺移植322例）が実施された。研究代表者は、これまでに206例の肺移植（日本全体の40%）を実施し、5年生存率75%を報告してきた(Date, *J Thorac Cardiovasc Surg* 128:933, 2004, *Curr Opin Organ Transplant* 16:453, 2011, *Eur J Cardiovasc Surg* 47:967, 2015)。これは、国際心肺移植学会の報告する5年生存率約50%を大きく上回っている。一方で、同期間に約1,500名の肺移植相談を受けたが、生体ドナーのいない多くの患者は、肺移植を受けることなく死亡した。2010年7月に臓器移植法が改正され、脳死ドナー数は、それまでの約5倍に増加したが、すでに300名以上が日本臓器移植ネットワークに登録して待機していることを考えると、脳死ドナー不足が今後も続くことは明白である。このような状況の中で、心停止ドナーからの肺移植は、ドナー不足を根本的に解決する可能性があり注目されている。欧米では、最近、カナダ、米国、ベルギー、イギリス、スペインなどの複数の施設から心停止後ドナーからの肺移植成功例の報告が相次いだ。しかしながら、これらの報告のほとんどは、重度の不可逆性脳障害を受けた患者の人工呼吸器を停止し心停止を待つ方法がとられており、日本において実施することは極めて困難である。心停止した個体の肺は、心停止直後より発生する温虚血にさらされる。また、脳死・生体ドナーとは異なり、その発生時期は予測困難であり、短時間内にレシピエントの移植準備をすることは不可能である。したがって、肺を摘出した後も長時間の保存が必要である。さらに、動脈血酸素分圧などの肺機能評価に不可欠な検査を心停止ドナーに行うことは不可能であり、移植に先立って摘出肺の質的評価が必要となる。このように、心停止ドナーからの肺移植を日本で実現させる上で解決しなければならない問題も多い。

研究代表者は、心停止後ドナーからの肺移植に関する研究を1992年から開始した。前任地の岡山大学において犬左片肺モデルを使用して、定流量の酸素を流して inflate する方法の有効性(Kayano, Date, *Acta Med Okayama*, 4:329, 1993)、移植後に一酸化窒素吸入することの有効性(Takashima, Date, *Ann Thorac Surg* 70:1679, 2000)を証明した。血栓形成の対策として、肺灌流液にウロキナーゼ(Umemori, Date, *Ann Thorac Surg*, 59:1513, 1995)を混ぜることによる血栓溶解の効果、肺静脈からの逆行性灌流による残存血栓の除去の有用性(Hayama, Date, *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:901, 2003)を証明した。さらに心臓死後にヘパリン(Okazaki, Date, *J Heart Lung Transplant* 25:454, 2006)及びウロキナーゼ(Sugimoto, Date, *J Heart Lung Transplant* 25:1148, 2006)を投与し、心臓マッサージを行う方法の有効性を証明した。

研究代表者が2007年に京都大学に異動してからは、基盤研究B(平成20年課題番号20390367、平成23年課題番号23390333、平成26年課題番号26293315)の交付を受け、心停止ドナー実験を継続した。そして、体外循環装置を用いた肺還流(Ex-vivo lung perfusion = EVLP)を大動物(ブタ、ビーグル犬)モデルで確立した(Okamoto, Date, *Transplant Proc* 42:1958, 2010)。これによって、移植に先立って摘出肺の質的評価が可能となった。この大動物EVLPの実験系を使って、広く用いられてきた冷保存法よりも常温でのEVLPによる保存法の方が肺機能を良好に維持できること(Nakajima, Date, *J Heart Lung Transplant* 31:187, 2012)、サーファクタント吸入の有効性(Ohsumi, Date, *J Heart Lung Transplant* 31:1136, 2012)、 β -2 adrenoreceptor agonist 吸入の有効性(Kondo, Date, *Ann Thorac Surg* 100:480, 2015)を示した。また、同時に、大動物(ビーグル犬)を用いた左片肺移植を確立した。心停止ドナー肺の換気の有効性(Sakamoto, Date, *Transplantation* 92:864, 2011)、 β -2 adrenoreceptor agonist 吸入の有効性(Sakamoto, Date, *J Heart Lung Transplant* 31:773-9, 2012)、を証明した。

このように、大動物による、EVLPおよび左片肺移植モデルが確立しており、この二つを組み合わせると、臨床肺移植により近い実験が可能となった。

希少ガスの中でも水素(H₂)は、広い拡散能力や抗酸化作用から注目され(Ohsawa, *Nature Med* 2006)、様々な臓器の虚血再灌流障害に効果があることが証明された。肺移植においても水素ガス吸入が虚血再灌流障害に有用である(Kawamura, *Surgery* 150:240, 2011)とする報告がみられる。しかしながら、水素ガスは4%以上の濃度で、爆発や火災の危険性があり、水素吸入療法の臨床応用の妨げとなっている。一方で、その溶解液である水素水においても、広い拡散能力や抗酸化作用の性質が維持されることが、角膜、腸管、心臓などの実験で報告されている。そこで、われわれは爆発性のない水素水に注目し、水素水の開発を行っているMiZ社(神奈川)と共同して研究を行ってきた。これまでに、ラットを用いた水素水の胸腔内灌流モデルを確立し、水素水を用いた肺温虚血障害にたいする効果を検討した。小動物であるラット移植モデルにおいて、水素水の胸腔内灌流により、水素が胸膜を透して心停止ドナー肺に拡散し、温虚血障害を改善することを突き止めた(Takahashi, Date, *Eur J Cardiovasc Surg* 2016 in press)。



小動物の肺は小さく、胸膜を透して肺全体に水素が拡散しやすいことは予測される。そこで、より臨床に近い大動物（ビーグル犬）を用いて、胸腔ドレーンから水素水を胸腔内に灌流することにより心停止ドナーからの肺移植を可能にすることを目的に実験を計画した。先に挙げた EVLP モデルで水素水の効果を確認し、左片肺移植モデルで肺移植の実現性を確認したいと考えている。

2. 研究の目的

日本での脳死ドナー不足は深刻であり、心停止ドナーからの肺移植が可能となれば、多くの患者の救命につながる。心停止ドナー肺の利用には、温虚血障害の克服が重要課題である。我々は、抗酸化作用と拡散能を有する「水素」に着眼し、小動物であるラット移植モデルにおいて、水素水の胸腔内灌流により、水素が胸膜を透して心停止ドナー肺に拡散し、温虚血障害を改善することを突き止めた。そこで、より臨床に近い大動物（ビーグル犬）を用いて、胸腔ドレーンから水素水を胸腔内に灌流することにより心停止ドナーからの肺移植を可能にすることを目的に実験を計画した。

3. 研究の方法

平成 29 年度から、ビーグル犬を使った実験を開始した。温虚血モデルとしてラットでの先行研究と同様に、左肺門部クランプモデルにて、水素水の胸腔内灌流による効果を検討した。温虚血時間は 3 時間とし、温虚血中に胸腔内に水素水を灌流させ、再灌流後右肺動脈をクランプして左肺の評価を行った。対照群には生理食塩水を胸腔内に灌流させた。結果は肺機能・酸素化能を含む生理学データおよび肺組織学的検査で対照群並びに水素群において有意な差は認めなかった。原因としては胸腔内に灌流させる水素水の量が少ないこと、ビーグル犬の肺が大きいこと、胸膜を透して、十分に水素が肺中心部まで拡散しないことが考えられた。水素水の胸腔内灌流量を増加し、再度実験を行うも 2 群間に差は認めなかった。

そこで、平成 30 年度から冷虚血モデルとして、ビーグル犬の左片肺移植モデルを用いて、水素含有臓器保存液による肺のフラッシングおよび浸漬による肺保存の効果を検証する実験を開始した。冷虚血時間は検討を重ねて、23 時間に設定した。水素濃度を維持するためにアルミバックに肺を入れて保存した。肺のフラッシングに関しては、ドナー犬の手術の際に順行性、逆行性に還流させ、23 時間後の移植の直前に再度順行性、逆行性に還流して、移植を行った。移植後は、グラフトが再灌流してから 45 分後に対側の肺動脈を結紮して、グラフト肺の機能評価を 4 時間行った。

以下の二群を比較検討した

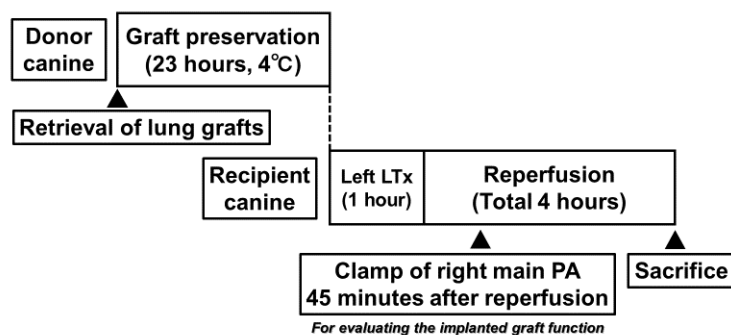


Figure 1

➤ コントロール群 (n = 5)

ドナービーグル犬は胸骨正中切開で開胸し、肺動脈から 4 度の ET-Kyoto 液でフラッシングを行う。両肺を摘出して、4 度の ET-Kyoto 液に浸して 23 時間保存する。23 時間後に、別のレシピエントビーグル犬に左片肺移植を行った。

➤ 水素水灌流群 (n = 5)

コントロール群と同じ実験を行った。ただし、水素水作成器具 (MiZ 社) を用いて、水素濃度 1.0 ppm の ET-Kyoto 液を作成する。フラッシングおよび保存液として使用する ET-Kyoto 液は、水素水を含有したものを用いた。

レシピエントは、移植後右肺動脈クランプ下に左移植肺の機能（肺動脈圧、左房圧、気道内圧、動脈血ガス分析）を 4 時間にわたって計測する。肺血管抵抗、肺内シャント率、肺のコンプライアンス、レジスタンス、コンダクタンスを算出する。さらに、犠牲死後は、病理検査と、湿乾燥重量比測定した。その他の測定項目として、生化学的評価（肺内および気管支・肺洗浄液の ELISA 法による炎症性サイトカイン測定、IL-1 β 、IL-6）、メカニズム評価（ウェスタンブロット法による障害肺内のタンパク質発現、HMGB1、 β -actin 評価）を行った。

4. 研究成果

H2 群は、コントロール群に比べて、移植後の PaO₂ は有意に高く (p=0.045)、PaCO₂ は有意に低値 (p<0.001) であった。移植肺の肺湿乾燥重量比 (W/D ratio) は、H2 群が有意に低値であった (p=0.032)。さらに、病理学的所見では、H2 群で、肺胞障害が少なく (p<0.001)、アポトーシスが少なかった (p<0.001)。

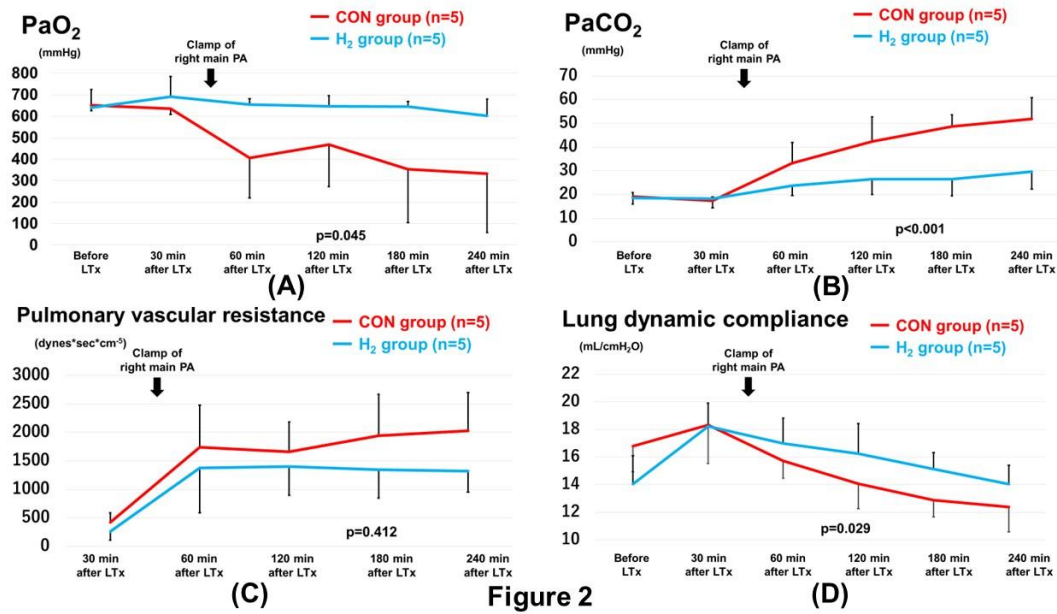


Figure 2

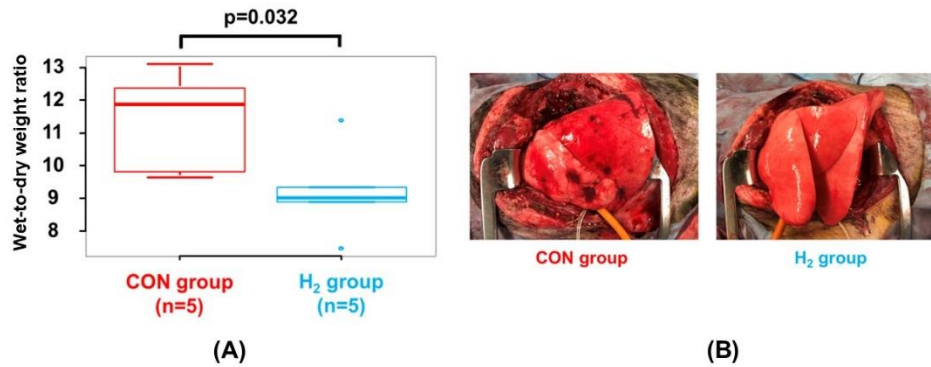


Figure 3

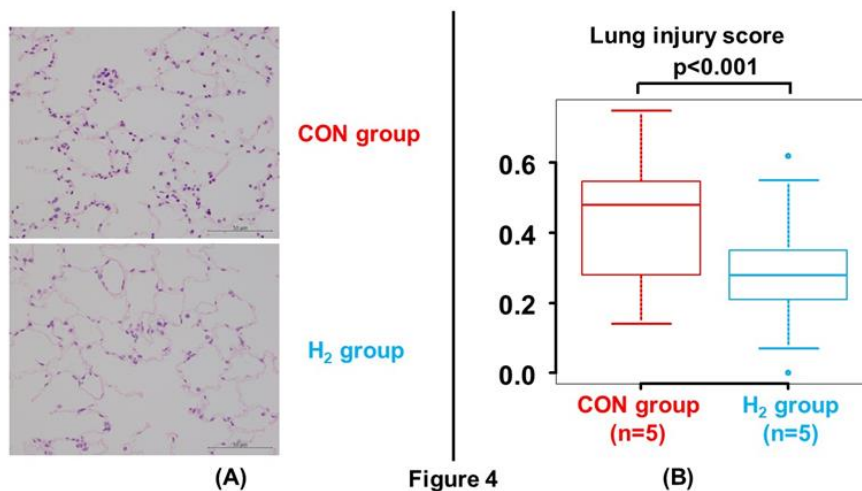


Figure 4

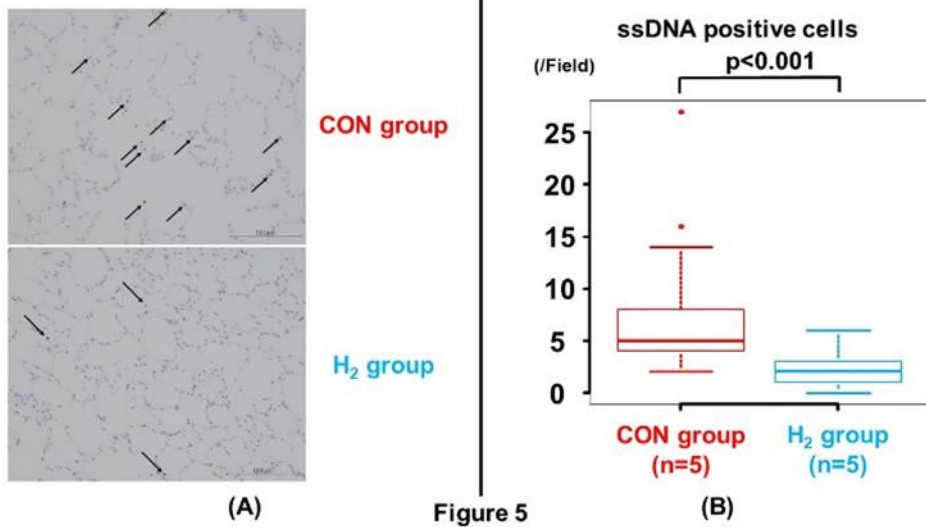


Figure 5

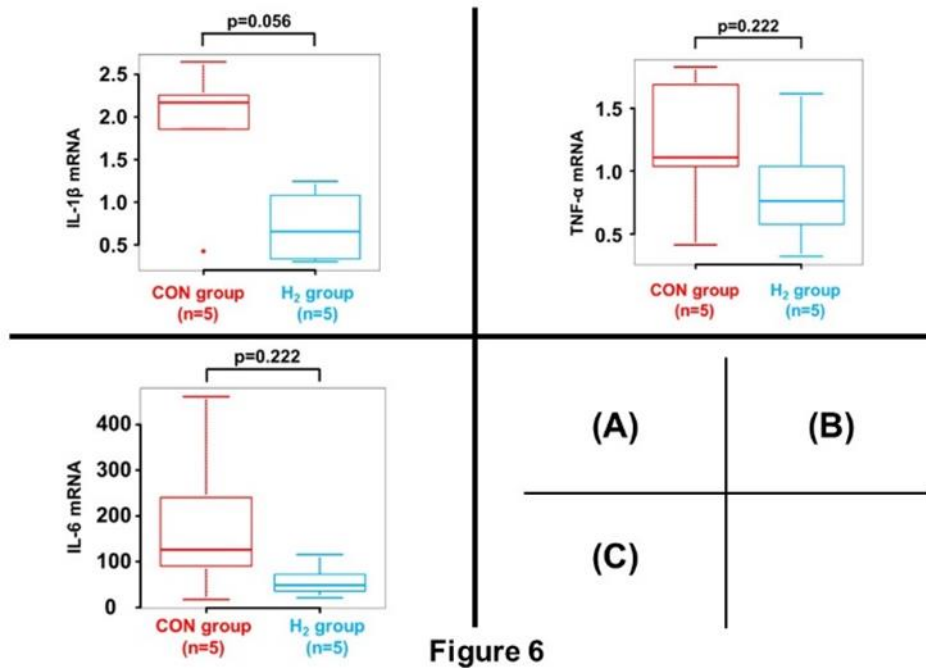


Figure 6

以上の実験結果より、水素水を肺還流に使用する肺保存液および保存肺を浸漬する浸漬液に使用することにより、23 時間保存した移植肺機能が有意に改善されることを証明した。8-10 時間が限界とされてきた安全保存時間を延長させる可能性を示した学術的意義は大きく、臓器移植数を増加させる可能性があることは、ドナー不足の日本において社会的意義も大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Saito M, Chen-Yoshikawa TF, Takahashi M, Kayawake H, Yokoyama Y, Kurokawa R, Hirano SI, Date H	4. 巻 159-5
2. 論文標題 Protective effects of a hydrogen-rich solution during cold ischemia in rat lung transplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 2110-2118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kayawake H, Chen-Yoshikawa TF, Hamaji M, Nakajima D, Ohsumi A, Aoyama A, Date H.	4. 巻 158-6
2. 論文標題 Acquired recipient pulmonary function is better than lost donor pulmonary function in living-donor lobar lung transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 171-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Date H, Aoyama A, Hijiya K, Motoyama H, Handa T, Kinoshita H, Baba S, Mizota T, Minakata K, Chen-Yoshikawa TF.	4. 巻 153
2. 論文標題 Outcomes of various transplant procedures (single, sparing, inverted) in living-donor lobar lung transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 479-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kayawake H, Chen-Yoshikawa TF, Aoyama A, Motoyama H, Hijiya K, Menju T, Sato T, Sonobe M, Date H.	4. 巻 51(2)
2. 論文標題 Excellent outcome of donor lobectomy with various surgical techniques for the interlobar artery.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 279-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto E, Motoyama H, Sato M, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Yoshizawa A, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Date H.	4. 巻 101(5)
2. 論文標題 Association of local intrapulmonary production of antibodies specific to donor major histocompatibility complex class I with the progression of chronic rejection of lung allografts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 e156-e165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada T, Chen-Yoshikawa TF, Oh S, Ito-Taniguchi R, Gochi F, Sato M, Aoyama A, Date H.	4. 巻 103(3)
2. 論文標題 Living-donor lung transplantation after bone marrow transplantation for Chediak-Higashi syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 :e281-e283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goda Y, Chen-Yoshikawa TF, Kusunose M, Hamaji M, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Date H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Late-onset chest wall abscess due to a biogradable rib pin infection after lung transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gen Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kayawake H, Chen-Yoshikawa TF, Motoyama H, Date H.	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Pulmonary venoplasty with a pericardical conduit in living-donor lobar lung retransplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Interact Cardiovasc Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 830-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi R, Chen-Yoshikawa TF, Takahagi A, Oshima Y, Hjiya K, Motoyama H, Aoyama A, Date H.	4. 巻 104(5)
2. 論文標題 Pulmonary function and exercise capacity in patients with flat chests after lung transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 1695-1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Date H.	4. 巻 9(9)
2. 論文標題 Living-related lung transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 3362-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kayawake H, Chen-Yoshikawa TF, Motoyama H, Hamaji M, Hijiya K, Aoyama A, Goda Y, Oda H, Ueda S, Date H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Inverted lobes have satisfactory functions compared with noninverted lobes in lung transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 栢分秀直、芳川豊史 (陳)、齊藤正男、平野伸一、黒川亮介、山岸弘哉、岡部亮、合地史明、徳野純子、上田聡司、横山雄平、池田政樹、尾田博美、山田義人、豊洋次郎、中島大輔、大角明宏、濱路政嗣、伊達洋至
2. 発表標題 Hydrogen-Rich Preservation Solution Attenuates Lung Ischemia-Reperfusion Injury after Prolonged Cold Ischemia in a Canine Left Lung Transplant Model
3. 学会等名 39TH ANNUAL MEETING of International Society for Heart and Lung Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Date
2. 発表標題 Living-donor lobar lung transplantation
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Date
2. 発表標題 Surgery for N2 lung cancer
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Date
2. 発表標題 New techstratgies in living-donor lobar lung transplantation Comparison of diseased donor and living donor lung transplantation Current concepts in lung preservation
3. 学会等名 The 15th Congress of the Asian Society of Transplantation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学呼吸器外科
<https://www.thoracic-kyoto-u.gr.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	陳 豊史 (Chen Fengshi) (00452334)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	濱路 政嗣 (Hamaji Masatsugu) (70782142)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	本山 秀樹 (Motoyama Hideki) (20762264)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	青山 晃博 (Aoyama Akihiro) (60379047)	京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他 (14301)	