

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16420

研究課題名(和文)ブタ肺脂肪塞栓症モデルを用いた逆行性温還流法による脂肪塞栓除去効果の検討

研究課題名(英文)Examination of fat embolism removal by warm retrograde perfusion from lung grafts with fat embolism in a porcine model

研究代表者

黒崎 毅史(Kurosaki, Takeshi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：20756051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：実験1では、ブタ肺脂肪塞栓症モデルを用いて、逆行性温還流で脂肪塞栓の除去率に変化があるかを検討した。通常の逆行性還流法(Cold群)では、脂肪の回収率は投与量のわずか8%であったのに対し、新還流法(Warm群)では25%の回収率で有意差があった。虚血再還流障害については両群とも大差なかった。これらの結果を誌上発表した。

実験2では、まずは肺移植技術を安定させるために健常ブタによる肺移植を行った。特に、肺静脈吻合が最も難しかったが、技術が安定したところでコントロール群(脂肪塞栓Cold群)の肺移植を開始した。時間の制約により実験を完遂できたものは2例のみの実施となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪塞栓を伴った肺を移植した場合、肺移植後急性期に移植肺機能不全を起こす場合がある。本研究では逆行性温還流を行った方がより多くの脂肪塞栓を除去することが可能であり、移植肺機能不全を来す可能性を軽減できるのではないかとと思われる。また、脂肪塞栓肺で基準外の肺の適切な管理方法がわかることで、ドナー肺の使用率向上に寄与できる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In Experiment 1, using lung grafts with fat embolism in a porcine donor model, it was examined whether there is a change in the removal rate of fat embolism by retrograde warm perfusion. In the conventional retrograde perfusion (Cold group), the removal rate of fat was only 8% of the dose, whereas in this perfusion (Warm group), the removal rate was 25%, which was significantly different. There was no significant difference in the pulmonary function and hemodynamics during the 3-h period after reperfusion. These results were published in the General Thoracic Cardiovascular Surgery.

In Experiment 2, first, lung transplantation was carried out by healthy pigs in order to stabilize the lung transplantation technique. In particular, pulmonary vein anastomosis was the most difficult, but when the technique was stable, lung transplantation of the control group (fat embolus Cold group) was started. Due to time constraints, only two cases were able to complete the experiment.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 脂肪塞栓 臓器管理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺移植は、あらゆる内科的・外科的治療によっても回復する見込みのない重度の呼吸器疾患、肺循環疾患に対して行われる治療法である。しかしながら、本邦では他の先進国と比較し、極端に脳死肺提供数が少ないのが現状である(0.76人/ppm)。一方、ドナー発生数の多い海外においても肺移植需要の高まりにより相対的にドナー肺不足は深刻であり、また、ドナー肺の使用率は約40%程度であるためドナーソースの拡大が至上命題である。ドナーソースを拡大するためには、安全性が担保されたマージナルドナー肺の利用率を向上させるとともに、脳死肺移植の成績を向上させる必要がある。

### 2. 研究の目的

マージナルドナー肺(特に塞栓症例)の使用限界点は定かではないため、使用における安全性を上昇させるために本研究を行うこととした。臨床では肺塞栓(血栓塞栓および脂肪塞栓)を伴う可能性のある外傷症例が比較的多いものの、肺塞栓ドナーを使用した肺移植に関する臨床報告並びに基礎実験報告は少ない。さらに、脂肪塞栓の除去方法に言及した研究はいままでに報告がなく、独自性のある研究と考えた。

### 3. 研究の方法

#### 研究1: ブタ肺脂肪塞栓症モデルを用いた逆行性温還流法による脂肪塞栓除去効果の検討

肺脂肪塞栓があることで虚血再灌流障害がより強く惹起されると考えられた。逆行性還流時に温還流液を使用することで、塞栓した脂肪が融解し脂肪の除去率に変化があるかを検討した。また、その除去率の違いにより再灌流後の肺機能に変化があるかを検討した。

方法: ブタの皮下脂肪を切除・抽出し、0.08 ml/kgを開胸後の左肺動脈に選択的に注入し肺脂肪塞栓症を起こしブタ肺脂肪塞栓症モデルを作成した。投与から二時間後に、肺動脈、肺静脈にカニューレーションを行い、ターニケットにより左肺の血流を遮断した。その後4℃の冷還流液で順行性肺還流を行った。還流量は通常量(1L)で行った。その後37℃に温めた還流液(500 ml)で逆行性肺還流を行い、使用した順行性・逆行性還流液はすべて回収した。フィルターに吸着させて除去された脂肪を回収・測定しその除去率を検討した。対照群として通常4℃に冷やした還流液で逆行性肺還流を行うブタを準備した。逆行性還流が終了したら肺動脈、肺静脈のカニューレーションを直ちに抜去し、血液による再灌流を再開した。血液の再灌流後は一定時間ごとに体血圧、左房圧、肺動脈圧、心拍出量、心係数、動脈血液ガス分析を行った後に、再灌流後3時間で犠牲死させて肺を摘出した。摘出肺の一部はホルマリン固定標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色や免疫染色で組織学的に虚血再灌流障害の程度を評価した。

#### 研究2: ブタ肺脂肪塞栓症肺移植モデルを用いた、肺移植術式の検討

我々の先行研究では、重力と血流量の関係から脂肪塞栓は下葉有意に引き起こされることが判明している。さらに、研究1により逆行性温還流が冷還流よりも有意に脂肪塞栓を除去可能であった。本研究では逆行性温還流を行ったブタ肺脂肪塞栓肺移植モデルを使用し、左全肺移植、左上葉移植で術後の肺機能に変化があるかを検討した。

方法: ブタ肺脂肪塞栓モデルの作成は研究1と同様の手順で行った。脂肪塞栓から2時間経過後に肺動脈にカニューレーションを行い、通常冷還流液によるフラッシングを行った。さらに2時間の冷保存を行い、温還流逆行性還流を行った後に肺移植を施行した。ドナー肺摘出から肺移植終了までの全虚血時間を約4時間に設定した。術式は逆行性温還流を行った左全肺移植と左上葉移植を行ったものの2群とコントロールとして通常逆行性冷還流を行った左全肺移植の計3群で比較検討する。移植後は一定時間毎に肺動脈圧、左房内圧、心係数、血ガス、採血などを行い移植後6時間まで継続した。6時間経過後は犠牲死させ、移植肺の病理所見を各群で比較検討した。

### 4. 研究成果

平成30年度は、ブタ肺脂肪塞栓症モデルを用いて、肺保存液還流法を改良すること(逆行性温還流)で脂肪塞栓の除去率に変化があるかどうかを検討した。脂肪塞栓モデルはすでに確立していたため容易に実験に入ることが可能であった。しかしながら、還流後の脂肪回収方法の確立についてやや時間を要した。最も困難であったのはブタの左房から肺静脈に適切な部位・位置に出血させることなくカニューレーションを行うことであった。カニューレーション技術習得後は比較的順調に実験を遂行できた。通常逆行性還流法(Cold群)では、脂肪の回収率は投与量のわずか8%( $\pm 1.4\%$ )であったのに対し、新還流法(Warm群)では25%( $\pm 3.2\%$ )の回収率であった。また、オイルレッドO染色による摘出病理標本においては、Warm群で脂肪の残存が少なく( $0.12 \pm 0.01\%$  vs  $0.38 \pm 0.07\%$ ,  $p = 0.01$ ) Warm群において顕微鏡的にも脂肪の除去が多くされていることが確認された。一方で、Warm群においても投与した脂肪の約75%は肺内に残存していることがわかった。また、Cold/Warm逆行性還流後に再還流を行い虚血再灌流障害についても検討した。Cold/Warm群いずれにおいても、組

織学的検討では肺水腫、壊死、毛細血管周囲の変化など明らかな虚血再還流障害を疑う所見は認められなかった。原因としては、脂肪除去率(8 vs 25%)では臨床的な効果が限定的である可能性や、短時間(3時間)での評価のため、パラメーターに表れてきていない可能性が考えられ、より長期間の観察が必要である可能性が示唆された。

平成30年度後半は以上の結果をまとめ、論文作成を行い、General Thoracic and Cardiovascular Surgeryに投稿し受理された(2020, volume 68, pages363-369)

また、平成30年後半からは研究2を行う準備として健常ブタを使用した肺移植手術を開始した。

まずは肺移植技術を安定させることを優先し健常ブタによる肺移植を行っていたが、ブタ肺移植技術の習得に時間を要した。特に、肺静脈吻合が最も難しく、肺静脈周囲の剥離範囲や吻合部 cuff の長さなどに留意しながら経験を蓄積した。その後平成31年度中旬からコントロール群(脂肪塞栓 Cold 群)の肺移植を開始したが、時間の制約により実験を完遂できたものは2例のみの実施となった。肺移植後の6時間の血液ガス分析の推移では、健常ブタの肺移植データと比較して酸素化の低下はほとんど認められず、良好な結果を得られた。肺移植技術が安定していることを示唆するが、一方で、脂肪塞栓を伴っているにもかかわらず健常ブタと同等の酸素化であることから、コントロール症例(群)として適切かどうか評価が難しいと思われた。観察期間ないでの酸素化に変化を認めないのは、塞栓による血管抵抗の増加によって、自己肺(右肺)への血流のシフトで酸素化が代償されている可能性が考えられた。そのため、今後の実験では肺移植前後に左右の血流量などを超音波で測定することを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Irie Masahiro, Otani Shinji, Kurosaki Takeshi, Tanaka Shin, Ohki Takashi, Miyoshi Kentaroh, Sugimoto Seiichiro, Yamane Masaomi, Oto Takahiro, Toyooka Shinichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Warm retrograde perfusion can remove more fat from lung grafts with fat embolism in a porcine model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 363 ~ 369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-019-01245-w	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----