

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390367

研究課題名（和文）

心停止ドナーからの肺移植臨床応用をめざした大動物実験

研究課題名（英文）

A large animal experimental study to establish a clinically applicable method for lung transplantation utilizing non-heart beating donors

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

研究成果の概要（和文）：

本研究は、京都大学（呼吸器外科および救急医学分野）と岡山大学（呼吸器外科）の共同研究により、心停止ドナーからの肺移植臨床応用をめざすものである。体外肺還流（ex-vivo lung perfusion, EVLP）の実験系を用いて、両大学で大動物実験を継続した。京都大学では、EVLP 還流液としての ET-Kyoto 液の有用性と EVLP による肺水腫を来したグラフト肺修復の可能性を報告した。一方、岡山大学では、EVLP 中に吸着膜を使用して炎症性サイトカイン（TNF $\alpha$  と IL-8）を除去する効果を検討し、サイトカイン以外の因子がグラフト肺の傷害に関与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to establish a clinically applicable method for lung transplantation utilizing non-heart-beating donors under the collaboration between Kyoto University and Okayama University groups. Using a large animal ex-vivo perfusion (EVLP) model, both groups performed the experimental studies. At Kyoto University, we demonstrated the usefulness of ET-Kyoto solution as perfusion solution of EVLP and the effect of EVLP in repairing edematous lung graft. At Okayama University, the effect of removing cytokines (TNF $\alpha$  and IL-8) by absorbable membrane was investigated. We suggested that factors other than these cytokines might play a rule for the graft injury during EVLP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：胸部外科・886

キーワード：心停止ドナー・肺移植・Ex-vivo evaluation・温虚血・再灌流

### 1. 研究開始当初の背景

日本の肺移植は1998年10月の岡山大学グループによる生体肺移植の成功で始まった。これまでに、京都大学、岡山大学をはじめ全国5施設にて102例(脳死肺移植38例、生体肺移植64例)が実施されてきた。このうち本研究グループは、3分の2に相当する67例の肺移植を行ってきた。脳死ドナーが極端に少ない日本においては生体肺移植数が多くなっているが、健康な二人のドナーが必要な生体肺移植を受けることのできる患者数は限られている。一方で脳死肺移植の待機患者は年々増加し、140名を超えた。平均待機期間が3年あまりの状況の中で、多くの患者が待機中に死亡しているのが現状である。そこで、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。肺は、血流が停止した後も肺胞内の酸素を利用して好気性代謝を継続することができる(Date, *J Thorac Cardiovasc Surg* 105:49,1993)。したがって肺は、他の臓器よりも長い時間 *viability* を保つことができる。

欧米では、心停止ドナーからの肺移植が臨床応用されるようになり、多くの注目を集めている。2001年にスウェーデンのSteenらは、心筋梗塞で院内死した心停止ドナーからの右片肺移植に成功した。さらに、スペインのグループは、院外で死亡し、救急部に搬送されたドナーからの肺移植に成功したことを報告した。これら欧米での心停止ドナーからの臨床肺移植の成功は、本邦での本移植術実現の可能性を示唆するものである。

京都大学では、心停止ドナーからの肺移

植に関する研究を1980年代後半から開始した。温虚血時間と肺内エネルギーの状態およびミトコンドリアの機能とアポトーシスの関係について検討を行った。薬剤の投与経路として、気道の存在という肺の特殊性に着目し、吸入投与を選択した。ATP依存性カリウムチャンネル開口薬である *isoflurane* の温虚血中の吸入投与がミトコンドリア傷害を抑制し、虚血再灌流傷害を軽減することを証明した(Fujinaga, *Transplantation* 82:1168, 2006)。さらに、虚血再灌流傷害における最初のターゲットが、血管内皮細胞の細胞間接着の破綻であることと、細胞内の *cAMP* の維持が細胞膜の安定性の維持に重要であることから、長期作用型  $\beta$  受容体作動薬 *salmeterol* を温虚血中に吸入投与することで、肺内の *cAMP* を保持し、虚血再灌流傷害を軽減することを証明した(Chen, *Ann Thorac Surg* 82:465, 2006)。また、主に血管内皮保護、活性酸素の抑制という観点から、それまで世界標準であったEuro-Collins液より長期保存可能な肺保存液ET-Kyoto液を開発してきた(Bando, *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 92, 1994. Chen, *Yonsei Med J*, 45: 1107, 2004)。

一方、岡山大学においても、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。まず、温虚血の対策として、犬左片肺モデルを使用して、心臓死ドナーの肺に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。

このように、両大学は心停止後ドナーからの肺移植に関する長年の実験研究において様々な知見を報告してきた。そこで、本研究では、両大学が協力し、これまでに得られた有用な知見を総合して、さらに救急医学分野のアドバイスを得て、臨床応用を目的とした大動物実験を行う計画である。

## 2. 研究の目的

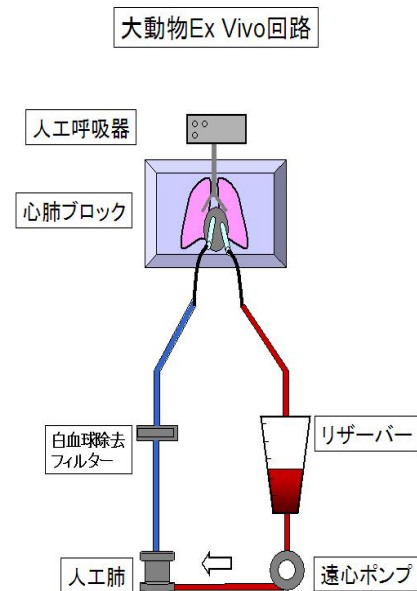
本研究では、大動物を使用して、心停止後2時間の温虚血時間と12時間以上の冷保存時間を経たドナー肺からの肺移植が可能であることを証明したい。これは、近畿地方にて心停止ドナーが発生し、京都大学により臓器摘出、岡山大学に搬送され移植するといった状況を設定したものである。その際 Ex-vivo evaluation を確立して、移植前に心停止ドナー肺の移植後機能を予測することも証明したい。

## 3. 研究の方法

実験動物としてブタあるいは犬を使用する。ドナーは potassium chloride の静脈注射で犠牲死させ、室温下に放置する。温虚血後開胸し保存液 2L にて肺動脈より順

行性に、さらに 1L にて肺静脈より逆行性にフラッシングし両肺を摘出する。

摘出した肺は体外肺還流 (ex-vivo lung perfusion, EVLP) 回路でのドナー肺評価を行う。



さらに、EVLP 評価後、左肺を分離し、レシピエントに左肺移植を行う。移植後は、レシピエントの右肺動脈を遮断することによって、移植肺機能を評価した。

京都大学では、保存液として ET-Kyoto 液と Perfadex 液を比較検討することとした。また、レシピエントに急速輸液することによる肺水腫モデルを作成し、EVLP による肺水腫回復が可能かどうかを検討した。

岡山大学では、EVLP 中に吸着膜を使用して炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  と IL-8) を除去することによる、肺障害の軽減が可能かどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

京都大学では、20-21 年度にかけて、平均体重 115 Kg のブタからの心肺ブロックを使用し、20 分間の温虚血の後、保存液を使用してフラッシングし、さらに 6 時間冷保存した。保存液として、Perfadex 液 (n = 5) と ET-Kyoto (n = 5) 液を使用した。同時に提供されたブタ血液と Steen 溶液を使用して、Ex-vivo evaluation モデルによる 2 時間の肺機能評価を行った。ET-Kyoto 液群では、カリウム濃度を軽減するため、Ex-vivo evaluation の最初の 200 ml の排出液を捨て去る操作が必要であった。その結果、いずれの群も肺水腫を生じることなく、2 時間後の肺動脈圧はそれぞれ、 $13.6 \pm 1.9$  mmHg,  $14.6 \pm 1.5$  mmHg、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> は  $474 \pm 11$ ,  $443 \pm 21$  と極めて良好であり、有意差はなかった。このことから、心停止後 20 分の温虚血に 6 時間の冷虚血を加えても、両液による肺保存によって肺移植に使用できるグラフトであることが示唆された。

京都大学では、21-22 年度にかけて EVLP によって、肺水腫を来したドナー肺を評価および修復することが可能かを検討する実験を行った。平均体重 13 Kg のビーグル犬からの心肺ブロックを使用し、ET-Kyoto 液でフラッシングし、2 時間の冷虚血後、Steen 液を使って EVLP を 8 時間行った。5%糖液 100 ml/kg を急速輸液した肺水腫群 (n = 5) とコントロール群 (n = 5) を比較検討した。肺水腫群では、EVLP 開始直後の肺血管抵抗が  $3800$  dyne $\cdot$ sec $^{-1}\cdot$ cm $^{-5}$  まで上昇していたが、90 分後には、 $890$  dyne $\cdot$ sec $^{-1}\cdot$ cm $^{-5}$  まで低下し、コントロール群と有意差がなくなった。EVLP によって、肺水腫を来したドナー肺の修復が可能であることが示され

た。

岡山大学では、20-21 年度にかけて、ブタ Ex-vivo evaluation 自体が、移植肺に与える影響を評価するために、Ex-vivo evaluation 後に、左肺移植を行った (n = 5)。Ex-vivo evaluation を用いずに左肺移植を行ったコントロール群 (n = 5) と比較検討した。その結果、移植後 3 時間までは、PaO<sub>2</sub> が低下したが、6 時間の時点で回復した。したがって、Ex-vivo evaluation の安全性が確認された。

岡山大学では、21-22 年度にかけてブタ EVLP モデルを使用し、EVLP 中に吸着膜を使用して炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  と IL-8) を除去する効果を検討した。その結果、吸着膜により一定期間のサイトカイン除去に成功したが、肺機能には有意な改善が得られなかった。吸着膜を使用したことで、肺機能維持に有用と思われる物質 (炎症性サイトカイン IL-10 やアルブミン) まで除去された可能性がある。今回の実験では期待した効果は得られなかったが、サイトカイン以外の因子がグラフト肺の傷害に関与している可能性を示した。

#### 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 5 件)

1. Miyoshi K, Oto T, Otani T, Tanaka S, Harada M, Kakishita T, Hori S, Waki N, Yamane M, Miyoshi S. Effect of donor pre-mortem hypoxia and hypotension on graft function and

- start of warm ischemia in donation after cardiac death lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 30(4):445-51, 2011
2. Okamoto T, Chen F, Zhang J, Choi H, Yamada T, Morikawa H, Nakayama E, Bando T, Date H. Comparison of extracellular-type-kyoto solution and perfadex as a preservation solution in a pig ex vivo lung perfusion model: impact of potassium level. *Transplant Proc* 43(5):1525-8, 2011
  3. Otani S, Oto T, Kakishita T, Miyoshi K, Hori S, Yamane M, Toyooka S, Miyoshi S. Early effects of the ex vivo evaluation system on graft function after swine lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011 (Epub ahead of print)
  4. Okamoto T, Chen F, Zhang J, Yamada T, Nakayama E, Morikawa H, Bando T, Date H. Establishment of an ex vivo lung perfusion model using non-heart-beating large pigs. *Transplant Proc* 42(5):1598-601, 2010
  5. Kakishita T, Oto T, Hori S, Miyoshi K, Otani S, Yamamoto S, Waki N, Yoshida O, Okazaki M, Yamane M, Toyooka S, Sano Y, Miyoshi S. Suppression of inflammatory cytokines during ex vivo lung perfusion with an absorbent membrane. *Ann Thorac Surg* 89(6):1773-9, 2010
- [学会発表] (計 7 件)
- ① Nakajima D, Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Reconditioning of lungs from non-heart-beating donors with normothermic ex-vivo lung perfusion. 31<sup>st</sup> Annual Meeting and Scientific Sessions of International Society for Heart Lung Transplantation Society:2011 年 4 月 13-16 日サンディエゴ
  - ② Nakajima D, Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Hypothermic ex-vivo perfusion prevents ischemia reperfusion injury in rat lungs from non-heart-beating donors. 31<sup>st</sup> Annual Meeting and Scientific Sessions of International Society for Heart Lung Transplantation Society:2011 年 4 月 13-16 日サンディエゴ
  - ③ Sakamoto J, Yamada T, Chen F, Nakajima D, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Protective effect of ventilation before organ procurement on graft lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model. 31<sup>st</sup> Annual Meeting and Scientific Sessions of International Society for Heart Lung Transplantation Society:2011 年 4 月 13-16 日サンディエゴ
  - ④ Yamada T, Nakajima D, Sakamoto J, Chen F, Okamoto T, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Reconditioning of lungs with pulmonary edema in ex-vivo lung perfusion circuit. 31<sup>st</sup> Annual Meeting and Scientific Sessions of International Society for Heart Lung Transplantation Society:2011 年 4 月 13-16 日サンディエゴ
  - ⑤ Otani S, Oto T, Kakishita T, Harada M, Yamamoto S, Miyoshi K, Okazaki M, Waki N, Hori S, Sugimoto S, Soh J, Yamane M, Toyooka S, Miyoshi S. Effects of ex-vivo lung evaluation system on post-transplant graft function in swine donation after cardiac death (DCD) lung transplantation. The 6<sup>th</sup> Lung Transplant Conference:2010 年 5 月 13

日仙台

- ⑥ Otani S, Oto T, Kakishita T, Harada M, Yamamoto S, Miyoshi K, Okazaki M, Waki N, Hori S, Sugimoto S, Soh J, Yamane M, Toyoka S, Miyoshi S. Does the ex-vivo lung evaluation system affect post-transplant graft dysfunction in swine donation after cardiac death (DCD) lung transplantation? 30<sup>th</sup> Annual Meeting and Scientific Sessions of International Society for Heart Lung Transplantation Society:2010年4月21-24日シカゴ
- ⑦ 岡本俊宏、陳豊史、藤永卓司、張吉天、青山晃博、趙向東、高橋鮎子、里田直樹、庄司剛、阪井宏彰、板東徹、伊達洋至. 肺Ex vivo回路を用いたドナー肺保護と機能評価の研究. 第44回日本移植学会総会:2008年9月19-21日大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.thoracic-kyoto-u.gr.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊達 洋至 (DATE HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60252962

### (2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10267164

板東 徹 (BANDO TORU)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20293954

庄司 剛 (SHOJI TSUYOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80402840

陳 豊史 (CHEN FENGSHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00452334

藤永 卓司 (FUJINAGA TAKUJI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00444456

岡本俊宏 (OKAMOTO TOSHIHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・COE リサーチアシスタント

研究者番号：90467465

佐野由文 (SANO YOSHIFUMI)

岡山大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号：60322228

大藤剛宏 (OTO TAKAHIRO)

岡山大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号：40452578

山根正修 (YAMANE MASAOMI)

岡山大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号：20432643