

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670608

研究課題名(和文) 高圧気相による長期肺保存法の開発

研究課題名(英文) Development of high- pressure medical gas preservation of lung

研究代表者

横見瀬 裕保 (Yokomise, Hiroyasu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80231728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ肺移植モデルを確立した。PCO=4000hPa+PO2=3000hPaの高圧ガス内に肺を保存できるチャンバーを作成した。全身麻酔下にドナー肺をET-KYOTO液で灌流して摘出し、チャンバーにドナー肺をつり下げ、4、PCO=4000hPa+PO2=3000hPaの条件で20時間保存した。保存したドナー肺をレシピエント犬に移植し、機能することを確認した。臓器をガスに直接暴露して保存するというまったく新しい臓器保存法であり、安全確実に長期に肺を保存できるようにする可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We successfully established the canine lung transplantation model. We made the chamber which can preserve a lung in the high-pressure carbon monoxide(CO) and oxygen(O2)-mixed gas (PCO=4,000hPa+PO2=3,000hPa). Donor lungs were flushed with ET-KYOTO solution, then stored at 4 for 20 hours by the condition of PCO=4,000hPa+PO2=3,000hPa. The stored lungs were transplanted and confirmed to function. It's the completely new organ preservation method. There is a possibility to preserve a lung for long hours safely.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺保存 高圧ガス 肺移植

## 1. 研究開始当初の背景

肺の安全な保存限界は 8~10 時間とされており、腎臓、肝臓などと比較するとその安全限界は低い。肺は解剖学的特性として、ほかの固形臓器と異なり含気性臓器であるという特徴があり、肺泡毛細管において気相と液相という異なる 2 相が接するという点で特殊な臓器である。肺移植後の虚血再灌流障害は保存時間が長ければ長いほど強く出現する。遠隔地からの輸送、両肺移植を行った場合の対側移植肺の保存時間は極めて深刻な問題である。また、慢性的なドナー不足から条件の悪い肺、たとえば心停止後ドナーなど保存状態が悪いグラフトも移植の対象として検討される。本邦で行われた脳死肺移植 124 例中、27 例の死亡が報告されているが、そのうち 7 例において移植肺機能不全が原因であった。血流が再開されるまでの間、摘出臓器をいかに良好な保存状態に保つかということが重要である。

## 2. 研究の目的

一般的に臓器の保存は、摘出前あるいは摘出後に流入血管から低温の保存液を用いて血液成分を wash out したのち、低温の保存液に浸漬する方法(単純浸漬法)が用いられている。様々な保存液が開発されてきたが、臨床で安全な長期保存を達成することは依然困難である。近年、メディカルガスとして臓器や細胞を保護する効果のあるガスが多数報告され、臓器保存への応用が期待されている。共同研究者の内藤らは一酸化炭素(CO)と酸素(O<sub>2</sub>)の混合ガスを用いた高圧ガス保存法を新たに開発し、ラットの四肢を 1 週間保存して同系のラットに移植することに成功した。CO は、ヘモグロビンとの親和性が O<sub>2</sub> と比較して約 250 倍あり、ヘモグロビンと結合すると CO ヘモグロビンを形成し、組織への O<sub>2</sub> 運搬を妨げる毒性ガスとして有名である。一方、CO は Akt、

mitogen-activated protein kinase(p38)の活性化を通じて、抗炎症作用、抗アポトーシス作用が細胞に働くことが報告されている。また、CO はミトコンドリアに作用し、ブドウ糖からエネルギーを産出させるために生体にとって不可欠な酵素であるシトクロム酸化酵素の Fe<sup>2+</sup> と結びついて活性を低下させ、代謝を抑制する作用がある。また以前より、高圧酸素がフリーラジカルの発生を抑制することも分かっている。本研究の目的は高圧ガス保存法を応用して、肺を確実に長期保存する新しい方法を開発することである。

## 3. 研究の方法

(1) イヌ左肺同種肺移植モデルの確立: 全身麻酔下にドナー肺(左肺)を ET-KYOTO 液で灌流し、摘出する。ただちにレシピエント犬に左肺同種移植を行い、技術の精度を安定させる。

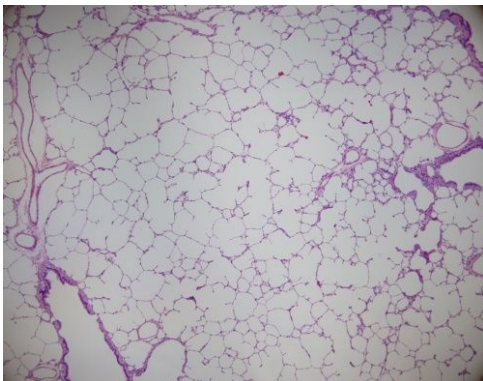
(2) ドナー肺の高圧ガスによる保存: 全身麻酔下にドナー肺を ET-KYOTO 液で灌流し、摘出する。作成したチャンバーにドナー肺をつり下げ、4、PCO=4000hPa+PO<sub>2</sub>=3000hPa の条件で 20 時間保存する。このドナー肺を同種移植し、移植肺の機能を評価する。

(3) 上記実験で機能の温存が確認されれば、実験群としての実験を開始する。高圧ガス法により 20 時間保存されたドナー肺と、対照群として ET-KYOTO 液で灌流し 20 時間単純浸漬保存を行ったドナー肺を用いて、それぞれビーグル犬 5 組で同様の評価を行う。

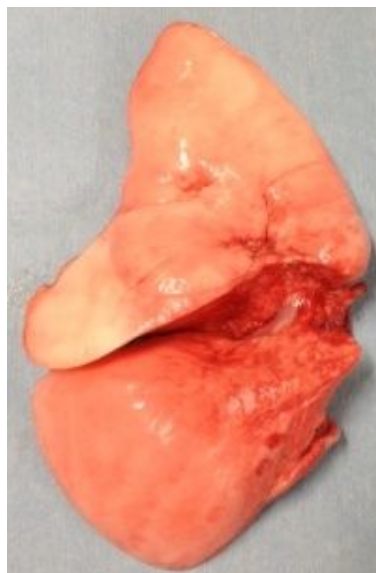
## 4. 研究成果

(1) イヌ左肺同種肺移植モデルの確立: 全身麻酔下に挿管(8.5Fr)し、人工呼吸器管理を行った(tidal volume: 20ml/kg, 15 breaths/min, PEEP: 5 cm H<sub>2</sub>O)。右外頸静脈に点滴ルートを確認した。左開胸し、左主肺動脈・左主気管支・左房をそれぞれ確保。

点滴よりヘパリン (250u/kg) を投与し、左主肺動脈よりプロスタグランジン E1 (25ug/kg) を投与。点滴より KCL を投与し、心停止を確認後、左主肺動脈をメスで切開して灌流用のカニューレを挿入した。直ちに左房を切開し、低温の ET-KYOTO 液 (80ml/kg) を左主肺動脈に挿入したカニューレを通して 50cm の高さよりフラッシュし、灌流を行った。灌流終了後、左肺を摘出した。レシピエント犬も同様に全身麻酔を施行し、左肺を摘出。ただちにドナー肺を移植した (主肺動脈と左房 : 5-0 prolene で縫合、主気管支 : 4-0 PDS で縫合)。上記手技を繰り返し施行し、技術の精度を安定させた。また、灌流後の肺を病理学的に評価し、問題なく灌流されていることを確認した。



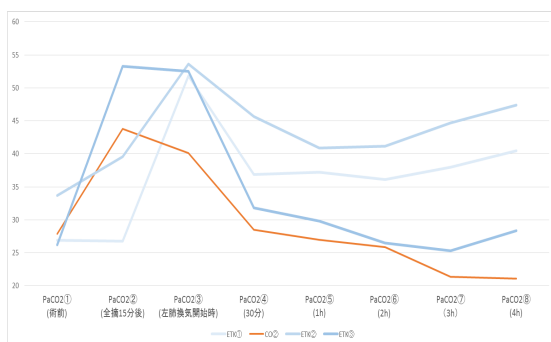
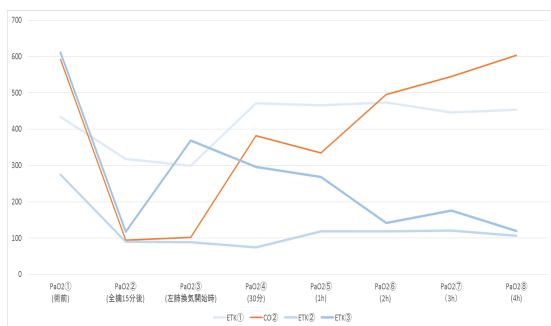
(2) ドナー肺の高圧ガスによる保存と機能評価 : 作成した肺保存用のチャンバーの写真を示す。全身麻酔下にドナー肺を ET-KYOTO 液で灌流して摘出し、チャンバーにドナー肺をつり下げ、4、 $PCO_2=4000\text{hPa}+PO_2=3000\text{hPa}$  の条件で 20 時間保存した。20 時間保存後の肺の肉眼的写真を示す。



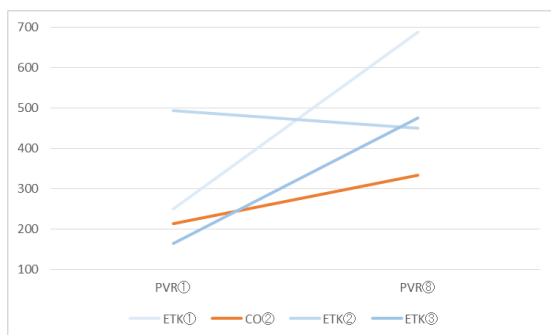
移植肺の機能評価には血液ガスデータと Swan-Ganz カテーテルを用いた各種血行動態モニタリングを使用することとした。レシピエント犬を全身麻酔下に挿管 (ダブルルーメンチューブ) 後、右大腿動脈より動脈ラインを確保した。さらに右外頸静脈から Swan-Ganz カテーテルを挿入して肺動脈圧 (PAP)、肺動脈楔入圧 (PCWP)、心拍出量 (CO) を測定し、肺血管抵抗 (PVR) を算出することとした。脈拍・血圧・酸素飽和度をモニタリングしながら手術を行い、左開胸で左肺摘出後、ドナー肺を移植した。移植肺の機能をより厳密に評価するため、移植再灌流開始後バイタルの安定を確認し、左片肺換気とした。血液ガス検査は術前、左肺全摘後、ドナー肺移植直後、30 分後、1 時間後、その

後 1 時間毎に移植後 4 時間まで行った。移植後 4 時間で再度 Swan-Ganz カテーテルから各種パラメーターを測定し、犠死とした。

(3) 対照群として ET-KYOTO 液で灌流し 20 時間単純浸漬保存を行ったドナー肺を移植し、同様の評価を行った。高圧ガス群と ET-KYOTO 群の PaO<sub>2</sub> と PaCO<sub>2</sub> の結果を示す。



Swan-Ganz カテーテルで測定した肺血管抵抗値を示す。



上記グラフの通り、ドナー肺の機能に注目すると高圧ガス保存群で非常に良好な結果が得られている。現在高圧ガス保存群と ET-KYOTO 保存群の比較試験をさらに進行中である。

高圧ガス保存法は、臓器をガスに直接暴露して保存するというまったく新しい臓器保

存法である。この方法で安全で確実な肺長期保存が可能となれば、移植後の致命的な合併症である移植肺機能不全を回避できる可能性がある。

## 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)

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横見瀬 裕保 (YOKOMISE HIROYASU)

香川大学医学部 教授

研究者番号: 80231728

### (2) 研究分担者

呉 哲彦 (GO TETSUHIKO)

香川大学 医学部附属病院 講師

研究者番号: 50313656

### (3) 研究分担者

奥田 昌也 (OKUDA MASAYA)

香川大学 医学部附属病院 助教

研究者番号: 60448355

### (4) 研究分担者

内藤 宗和 (NAITOU MUNEKAZU)

愛知医科大学 医学部 教授

研究者番号: 10384984