

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19944

研究課題名(和文) 経気管支マイクロサンプリング法を用いた移植肺モニタリングに関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study on the lung transplantation monitoring using a bronchoscopic microsampling

研究代表者

坂巻 寛之 (Sakamaki, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10749104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目標は、経気管支マイクロサンプリング法を用いて、豚の肺移植時における肺障害マーカーの動態を明らかにすることであった。しかし肺移植後レシピエントが急性期に死亡してしまうことが多かった。その原因は移植後の気管支縫合部の阻血であり左肺全摘後の気管支断端血流の動態を知ることが必要と考えた。気管分岐部から断端までの頭側と尾側の8点の組織内酸素分圧を測定した。外側遠位～内側近位への酸素分圧の上昇傾向がみられた。しかし気管支酸素分圧の測定困難であり大きく変動した。今後より正確に気管支酸素分圧を測定するためには、モニター電極の改良や手技の熟練が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore the mechanisms of the lung injury marker in pig lung transplantation using Bronchoscopic micro sampling. However, the recipient often died after lung transplantation in a few hours. We estimate that one of the cause of the failure is ischemia of the bronchial suture part. To test the hypothesis, we focus on the tissue oxygen concentration of the bronchial suture part. We measured the tissue oxygen concentration of eight points of a bronchial stump and remaining main bronchus. The results of the study show that tissue oxygen concentration of medial - proximal parts tended to be higher than that of lateral - distal parts. It is difficult to measure an accurate tissue oxygen concentration of the bronchial suture part. In the future, we need to improve the device and the accumulation of data of animal studies to get useful information for lung transplantation.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 気管支断端 酸素分圧

1. 研究開始当初の背景

肺移植は他に治療法のない進行性重症肺疾患に対する唯一の治療法として確立されているが、移植肺機能不全や拒絶反応、閉塞性細気管支炎、感染など、解決すべき問題がある。気道上皮被覆液 (Epithelial lining fluid: ELF) からは呼吸器系の病態を把握する上で有用な情報が得られる。一般に気管支肺胞洗浄 (broncho-alveolar lavage: BAL) が用いられるが、血液ガスの悪化など、患者への負担が大きく、生理食塩水の回収率が低いことなど、問題が多い。慶應義塾大学呼吸器グループが開発した経気管支マイクロサンプリング法 (bronchoscopic microsampling: BMS) は気管支鏡下に ELF を低侵襲で採取できる方法であり、これまでに急性呼吸促迫症候群 ARDS や種々の急性肺障害、癌の診断や病態変化の把握に用いられてきた (Ishizaka. *Crit Care Med.* 2001)。ヒトの場合は気管支鏡の操作孔からプローブを挿入し、ラットの場合は経口挿管したサーフローからプローブを挿入して末梢気道から ELF を採取する。また低侵襲であるため肺生検 TBLB や BAL では不可能な経時的に複数回の検体採取が可能である。

研究代表者らのグループは、経気管支鏡マイクロサンプリング法を臨床応用し、実験系においてもラット用マイクロサンプリングプローブを開発してきた。小動物において極微量の ELF を採取する事は困難であるが、ラット経気管支マイクロサンプリング法 (rat bronchial microsampling: rBMS) を用いてラットの ELF を採取し、複数のサイトカインを経時的に様々な方法で測定し得た。これはラットにエンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) を経気管投与し、肺損傷モデルでの ELF 中サイトカインを経時的に測定する事を可能としたものである。BMS で採取した ELF は希釈することなくプロテオーム解析することが可能であった

(Kamiyama. *Mol Immunol.* 2014.)。低侵襲性、経時的観察が可能であるという特徴は肺移植後の移植肺におけるモニタリングに最適であると考えた。

2. 研究の目的

ラット及びブタ肺移植モデルに経気管支マイクロサンプリング BMS を適応し、気道上皮被覆液 ELF を経時的に採取する。ELF の生化学的解析、分子生物学的解析、プロテオーム解析を行い、移植肺機能不全および拒絶反応の病態ごとに比較検討を行う。特に経時的な炎症性サイトカインの動向に注目し、臨床における肺移植術後のモニタリングに必要な基礎データを収集することが目的である。

3. 研究の方法

ラットおよびブタの肺移植虚血再灌流傷害モデル或いは拒絶反応モデルを作成する。ラットの虚血再灌流傷害モデルは雄性 Lewis ラット (約 200-300g) をドナーおよびレシピエントに用いる。ドナー肺保存時間を 12 時間として虚血再灌流傷害モデルを作成する。ドナー肺摘出直後、移植直後、再灌流後 2 時間、4 時間、12 時間、24 時間の時点で BMS を行い、ELF を採取する。その際はラット用マイクロサンプリングプローブを用いる。これはポリエチレン製の外套と、先端に直径 1.2mm、長さ 30mm のポリウレタン製の吸収可能部分を持つ内套で構成されている。ラットに経口挿管し、プローブを気管チューブから挿入し、採取場所で内套のみをゆっくり進め、約 10 秒後再び外套内に収め ELF を採取する。この操作により約 5~10 μ l の ELF が採取可能である。プローブは先端を切断し重量を測定する (湿重量)。吸収した ELF を 1ml の生理食塩水で抽出し、プローブを乾燥させ重量を測定する (乾燥重量)。湿重量と乾燥重量の差から採取できた検体の量を測定する。抽出した検体は 3000rpm で 15 分遠心し、上清を測定に使用する。

拒絶反応モデルについては、ラット主要組織

適合性複合体 (major histocompatibility: MHC) は RT1 である。RT1-incompatible なラット、Brown-Norway rat (BN, TR1n) から Lewis rat (LEW, RT1l) への同種異系肺移植を行って拒絶反応モデルを作成する。ブタのドナーは 30-40kg の SPF ブタにケタラル、ペントバルビタールを投与、仰臥位で 7.5mm 気管チューブを挿管。セボフルレンによる吸入麻酔とベクロニウムを用いて麻酔を維持。右総頸動脈より動脈ラインを確保。心電図、経皮的酸素飽和度、呼気二酸化炭素濃度、観血的動脈圧を持続測定する。胸骨正中切開にて左肺摘出を開始する。肺を摘出する前に、上大静脈、下大静脈を結紮し、上行大動脈をクランプし、冷却した還流液 (Perfadex: Vitrolife, Goteborg, Sweden) を 50ml/kg の量で還流させる。冷保存させる群で使用する場合には 4 の状態で保存する。レシピエントは、ドナーと同様に仰臥位で全身麻酔を施行する。血行動態の測定として、大腿動脈カテーテルを用い、中心静脈圧の測定の為に内頸静脈のカテーテルを用いてモニタリングする。加えて、酸素飽和度、心電図を記録する。胸骨正中切開でアプローチし、肺門部での操作の為に視野を確保する。左肺動脈を授動し、動脈管索より切離する。迷走神経、横隔神経に注意して心嚢を開き、肺静脈、左房を授動して、左肺を摘出、Donor 肺の移植を行う。左主気管支、肺動脈、肺静脈を吻合。再灌流を 4 時間行い、測定を行う。ブタ移植後の BMS の測定法はドナー肺摘出直後、移植直後、再灌流後 2 時間、4 時間の時点で BMS を行い、ELF を採取する。マイクロサンプリングプローブ BC-401C (Olympus, Tokyo, Japan) を用いる。これはポリエチレン製の外套と、先端に直径 1.2mm、長さ 30mm のポリウレタン製の吸収可能部分を持つ内套で構成されている。プローブを気管支鏡下に挿入し、採取場所内で内套のみをゆっくり進め、約 10 秒後再び外套内に収め ELF を採取する。この操作により約 5 ~

10 μ l の ELF が採取可能である。プローブは先端を切断し重量を測定する (湿重量)。吸収した ELF を 1ml の生理食塩水で抽出し、プローブを乾燥させ重量を測定する (乾燥重量)。湿重量と乾燥重量の差から採取できた検体の量を測定する。抽出した検体は 3000rpm で 15 分遠心し、上清を測定に使用する。ブタの虚血再灌流傷害モデルは拒絶反応を避けるため自家肺移植或いは同系移植を行い、肺保存時間を 12 時間として肺障害モデルを作成する。或いは心臓死ドナーを用いて肺障害を生じさせることで作成する。拒絶反応モデルは同種移植を行うことにより拒絶反応が生じることが期待できる。

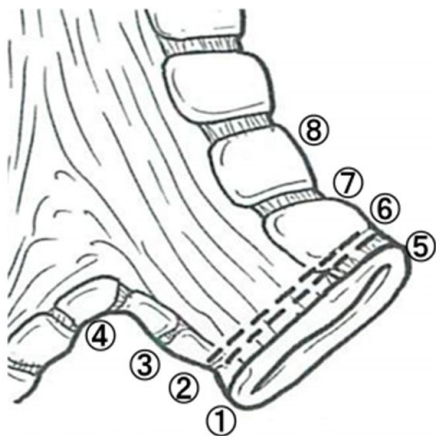
測定項目は経時的に気道上皮被覆液 ELF を採取し、同時に末梢肺の一部を採取し組織学的に肺損傷を評価する。気道上皮被覆液中の種々の炎症性サイトカイン (IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN alpha, IFN gamma, TNF-alpha), VEGF, KL-6 などの肺障害マーカーを測定し、動態を明らかにする。拒絶反応モデルでは長期に渡り、モニタリングを行う。ELF はプロテオーム解析し、新たなバイオマーカーの探索をおこなう。

4. 研究成果

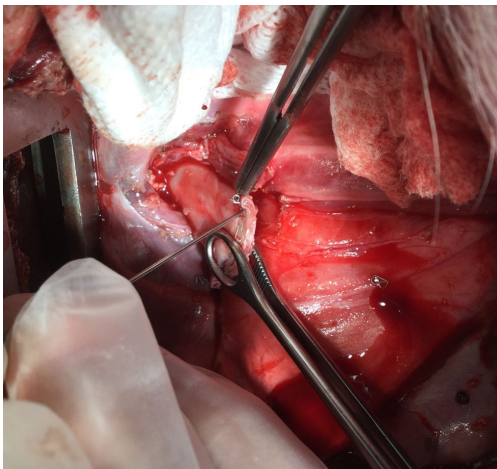
この研究の目標は、豚の肺を摘出し、レシピエントに移植し移植後再灌流を行い、移植前、移植後、再灌流後に経気管支マイクロサンプリング法を用い、経時的に気道上皮被覆液を採取し、種々のサイトカインを測定し、肺障害マーカーの動態を明らかにすることであった。しかし豚の肺移植実験をした後に豚レシピエントが急性期に死亡してしまい、測定ができなかった。その原因として移植後の気管支縫合部の阻血があると考え。気管支断端の血流の動態を知ることが必要と考えた。手術用ステーブルで豚の左肺全摘を行い、気管支断端の術中酸素分圧を酸素分圧/溶存酸素モニターを使用し評価をおこなった。気管分岐部から断端までの頭側と尾側の 8 点を測

定した。測定点は左肺主気管支断端外側ステープルライン遠位を、左肺主気管支断端外側ステープルライン近位を、気管分岐部をとし、との中央点をとした。内側も同様に、断端内側ステープルライン遠位を、断端外側ステープルライン近位を、左主気管支分岐内側をとし、との中央点をとした。の酸素分圧を1として相対的な酸素分圧を求めた。：3.2、：8.0、：22.0、：10.0、：12.0、：9.0、：26.0であった。外側遠位～内側近位への酸素分圧の上昇傾向がみられた。しかし気管支酸素分圧の測定手技は困難であり測定電極を気管支に当てる位置や角度や豚の呼吸状態で大きく変動した。今後、より正確に気管支酸素分圧を測定するにはモニター電極の改良が必要と考えられた。(図1.2)

気管支断端の部位別の評価



(図1)



(図2: 針電極による測定)

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂巻 寛之 (Sakamaki Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号: 10749104