

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10673

研究課題名(和文)酸化ストレスマーカーはドナー肺常温生体外還流中の肺機能評価マーカーとなり得るか

研究課題名(英文)Change in marker of oxidative stress during acellular normothermic ex vivo lung perfusion

研究代表者

小池 輝元 (Koike, Terumoto)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：90635723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミニブタの心肺ブロックを摘出、直後の肺をコントロール、4で18時間保存した肺を障害肺とし、安定維持還流条件でそれぞれ4時間生体外肺還流を行った。いずれの肺も還流液中の酸素分圧は高値を維持し、障害肺の肺機能低下は酸素化能低下としては検出されなかった。続いて、コントロール肺、障害肺、それぞれ還流中各時間の還流液サンプル中のd-ROM値をフリーラジカル測定装置を用いて測定した。いずれの肺でもd-ROM値はこれまでの報告による生体内の値と比較し著名に低値で、経時的な変化や、肺の間での比較は困難であった。生体外肺還流における酸化ストレスマーカーによる肺障害、肺機能評価は困難であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植ドナー肺の生体外肺還流中の、フリーラジカル測定装置を用いた還流液中の酸化ストレスマーカー測定は簡便で、短時間で行える方法ではあるが、現行の条件下ではこれまでの報告における生体内の濃度と比較し著名に低値であり、還流中のドナー肺の肺障害や肺機能低下を評価するのは困難と考えられた。今後は、還流条件や還流液の量を変更することにより、同測定法による生体外肺還流中の肺機能や肺障害評価の可能性は残されていると考える。

研究成果の概要(英文)：During acellular normothermic ex vivo lung perfusion, we examined the levels of oxidative stress in the perfusate. In an experimental pig model, uninjured control lungs and lungs after 18 hours of cold ischemia were perfused ex vivo for 4 hours by using the acellular perfusate, and the perfusate samples were collected every hour. The levels of oxidative stress in the perfusate were determined through a spectrophotometric procedure (d-ROMs test). During 4 hours of perfusion, ex vivo PO₂ remained stable in both the uninjured control and injured lungs, and decreased lung function in the injured lungs was not reflected as decreased ex vivo PO₂. The levels of oxidative stress in the perfusate were extremely lower than those serum levels of oxidative stress in the previous reports, and there was no difference between the uninjured control and injured lungs. It was concluded that it is difficult to evaluate lung injury using the perfusate levels of oxidative stress in ex vivo lung perfusion.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：生体外肺還流

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床肺移植は重篤な呼吸不全を呈する末期肺疾患の最終的な治療として欧米を中心に広く行われ、その有効性が報告されている。本邦でもその手技、周術期管理などの技術が習熟し年々肺移植患者数は増加しているが、全世界的に肺移植を必要とする患者に比し提供ドナー肺は大きく不足している。それに伴い、肺移植待機患者の長期に至る待機期間や、その間の原病の悪化による死亡などは可能な限り早期に解決すべき課題と考えられている。そのドナー肺不足の大きな理由として、脳死ドナーにおける肺障害などに起因する肺機能低下により脳死ドナー肺が実際には肺移植に使用できないことが挙げられている。つまり、脳死ドナーの長期 ICU 管理などに伴う肺水腫、肺炎などに起因する肺障害により移植ドナー肺として使用できない廃棄肺の増加、それによる脳死ドナーにおける肺の低い臨床肺移植での使用率である。

(2) これまでの脳死ドナー肺における臨床肺移植への利用を増加するために、障害を伴う肺、肺機能を改善し、肺移植ドナーとして使用できる肺に改善するたくさんの試みが行われているが、そのひとつが近年開発された生体外肺還流(Ex Vivo Lung Perfusion, EVLP)である。EVLP ではドナーから摘出した肺を生体外で専用の還流液で常温還流し、還流中に経時的に肺機能を評価、また、肺水腫を改善するなどの効果により、摘出した時点では障害により移植に使用できなかったドナー肺機能、肺障害を改善し、肺移植に使用できるように改善する効果が期待されている。現在では実臨床でも EVLP が使用され、その障害肺での肺機能改善効果とそれに伴う臨床ドナー肺使用増加に関連した有用性が報告されている。

(3) しかし、EVLP 中のドナー肺機能評価についてはまだまだ検討の余地がある。現在のところ EVLP 中のドナー肺評価は、生体内における肺機能評価と同様に還流液中の酸素分圧、肺血管抵抗などの生理学的な評価項目を用いて行われている。しかし、血液成分を含まない無細胞還流液を用い、ドナー肺保護のための低還流量の維持還流条件下においては、還流液の酸素化が容易であり、また、選択的に換気条件がよい部位を還流する可能性があることなどにより、障害肺であっても酸素化能が維持され肺機能低下が生理学的パラメータに反映されないことも多い。また、EVLP の臨床使用においては、数時間の還流中の短時間でドナー肺を評価する必要があるが、現行の臨床 EVLP においては、簡便に還流液などを用い、かつ短時間の還流中に結果を得て肺機能評価に使用できる新しいバイオマーカーの開発が切望されている。

(4) 以前より、移植後再還流障害などの肺障害において、活性酸素などの酸化ストレスマーカーと肺障害の関連が示唆されている。また近年では、生体内において間質性肺炎の重症度、急性増悪のリスクと、血清中の酸化ストレスマーカーである d-ROMs(Diacron-Reactive Oxygen Metabolites)濃度との関連が報告されている。したがって、これらの、専用のフリーラジカル測定装置を用いて短時間で簡便に測定できる酸化ストレスマーカーである d-ROMs が、EVLP 中のドナー肺機能評価に応用できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、専用のフリーラジカル測定装置を用いて短時間で簡便に測定できる酸化ストレスマーカーである d-ROMs を EVLP 中の還流液で経時的に測定し、その値が EVLP で還流中のドナー肺障害や肺機能低下を反映するかどうかを研究する。ブタ肺を用いた実験モデルにおいてコントロールとしての正常肺、長時間冷虚血保存後の障害肺をいずれも数時間還流し、還流液中の d-ROMs の値や経時変化を、コントロール肺と冷虚血保存障害肺においてと比較、検討する。

3. 研究の方法

ブタ肺を用いたコントロール肺と障害肺の EVLP による還流実験

(1) ミニブタに気管切開による気管内挿管、全身麻酔導入後に、胸骨正中切開経路で開胸し、上大静脈、下大静脈、上行大動脈、肺動脈をそれぞれ剥離、露出し、テーピングを行う。肺動脈に巾着縫合を置き、全身はヘパリン下後に肺動脈にカニューレを挿入し、その後、上、下大静脈をそれぞれ結紮、上行大動脈をクランプし心停止を確立する。肺動脈よりプロスタグランディンを含む還流液を注入し肺をフラッシュ、その後、左心房を切離、開放とする。還流液を十分量注入後、心肺ブロックを摘出する。摘出直後の正常肺をコントロール肺、4 で 18 時間保存した肺の冷虚血保存障害肺を作成する。

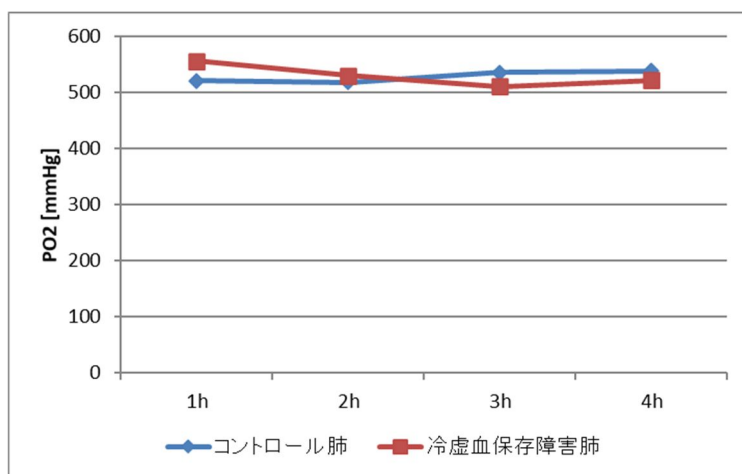
(2) 摘出したミニブタ心肺ブロックの肺動脈、左房にそれぞれ生体外肺還流専用のカニューレを縫合、装着する。リザーバー、遠心ポンプ、人工肺、熱交換器、白血球除去フィルターからな

る回路を作成し，専用の細胞成分を含まない還流液で肺を常温で還流する．コントロール肺，冷虚血保存障害肺，いずれも安定維持還流条件の低還流量で還流，維持還流を4時間行う．EVLP中は経時的に各種生理学的肺機能評価パラメータを測定，肺機能評価を行う．具体的には，還流液サンプルを採取，血液ガス分析にて還流液中の酸素分圧，二酸化炭素分圧，pH等を測定，記録する．また，併せて気道内圧，肺コンプライアンス，肺血管抵抗などの因子も測定，記録する．

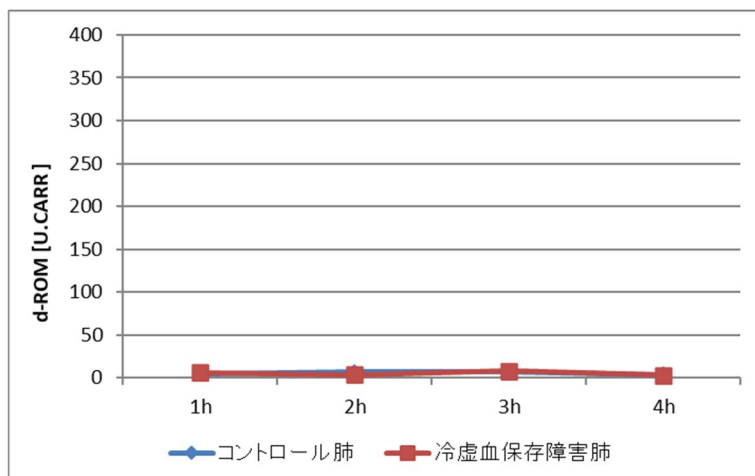
(3) 還流中は経時的に還流液サンプルを採取する．還流液サンプルを用いて，フリーラジカル測定装置(FREE Carrio Duo, Wismerll Co. Ltd., Tokyo, Japan)を使用し，還流液中のd-ROMs濃度を測定，記録する．還流液サンプル中のd-ROMs濃度，経時的变化を観察し，冷虚血保存障害肺において酸化ストレスマーカーである還流液中のd-ROMs濃度が肺障害を反映し，コントロール肺と比し増加しているか否かを検討する．

4. 研究成果

(1) コントロール肺，冷虚血保存障害肺をそれぞれ生体外肺還流回路に接続し還流を開始，1時間をかけて徐々に還流量を増加，還流液温度を上昇，人工呼吸器による換気を開始し，予測心拍出量の40%の維持安定還流を確立した．その後，3時間維持安定還流を行ったが，その維持還流中，コントロール肺，冷虚血保存障害肺いずれも還流液中の酸素分圧は高値を維持した．これまでのEVLP関連の報告，当方での実験結果の傾向と同様に，冷虚血保存障害肺における肺障害や肺機能低下は，同安定維持還流条件下ではドナー肺の酸素化能の低下としては検出されなかった．



(2) コントロール肺，冷虚血保存障害肺それぞれの安定維持還流4時間の各時間の還流液サンプル中のd-ROM濃度をフリーラジカル測定装置を用いて測定し，経時的变化を検討した．いずれの肺においても還流液中のd-ROM濃度は，これまでの報告による生体内の濃度と比較し著名に低値であり，経時的变化や，コントロール肺と冷虚血保存障害肺間での比較は困難であった．今回の条件下においては，酸化ストレスマーカーであるd-ROMの還流液サンプル中の濃度測定による肺障害，肺機能評価は困難であると考えられた．



<引用文献>

Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*. 2011 Apr 14;364(15):1431-40.

Yeung JC, Cypel M, Machuca TN, Koike T, Cook DJ, Bonato R, Chen M, Sato M, Waddell TK, Liu M, Slutsky AS, Keshavjee S. Physiologic assessment of the ex vivo donor lung for transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Oct;31(10):1120-6

Matsuzawa Y, Kawashima T, Kuwabara R, Hayakawa S, Irie T, Yoshida T, Rikitake H, Wakabayashi T, Okada N, Kawashima K, Suzuki Y, Shirai K. Change in Serum Marker of Oxidative Stress in the Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015 Jun;32:1-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	土田 正則 (Tsuchida Masanori) (60293221)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	佐藤 征二郎 (Sato Seijiro) (40646931)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	