

平成 21 年 3 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007-2008

課題番号：19890110

研究課題名（和文） 心臓死肺移植における、ドナー肺の評価とその保護に関する研究

研究課題名（英文） Evaluation of donor lungs and their protection in the lung transplantation from donors after cardiac death.

研究代表者 陳 豊史（Chen Fengshi）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00452334

研究成果の概要：

「ドナー不足」に対する打開策として、心臓死ドナー（donation after cardiac death, DCD）肺を用いた肺移植がある。DCD では心停止後の温虚血による臓器傷害が甚大であるが、吸入による薬物投与などの手法を開発することで、傷害肺の有効利用が可能になる。これに基づき、申請者は、以下一連の研究を行った。（1）rat 肺 ex vivo 灌流モデルを用いて、さらに優れた肺保護作用を有する薬剤の検索（2）新しい DDS を用いた薬剤の吸入効率改善についての検討（3）大動物 ex vivo 肺灌流モデルの確立。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,330,000	0	1,330,000
20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺移植・心臓死・移植・マージナルドナー・臓器保護・吸入・体外回路

1. 研究開始当初の背景

現在の移植医療における最大の問題のひとつに、慢性的なドナー不足を打開する手段として、マージナルドナー肺の使用、心臓死ドナー（donors after cardiac death, DCD）肺の使用、異種移植などが考えられる。この中で、DCD 肺を用いた肺移植が、最も現実的な代替手段として、近年、着目されている。DCD 肺移植においては、循環停止中の温虚

血をいかにコントロールするかが重要である。この観点から、研究代表者（陳 豊史）は、rat の ex vivo 肺灌流モデルを用いて温虚血に伴う肺傷害モデルを作成し、これに肺保護薬剤を投与することで肺虚血再灌流傷害を軽減すべく検討を行ってきた。薬剤の投与経路として、心停止（=循環停止）状態において経血管的投与は有効な投与経路になりがたいが、気道の存在という肺の特殊性に着眼し、吸入投与を選択した。

2. 研究の目的

温虚血による肺傷害を軽減する手法等を開発することで、マージナルドナーを含めた傷害肺の有効利用が可能になる。こうした研究は、DCD ドナー肺の利用のみならず、不足する脳死ドナーの拡大にもつながり、非常に魅力的であるが、系統的にはほとんど行われていないのが現状である。

3. 研究の方法

肺移植における translational research として臨床に還元することを目標に掲げ、次の如き一連の研究を行う。(1) 虚血再灌流傷害を軽減する新規有用薬剤を既存の rat ex vivo 肺灌流モデルを用いて検索。(2) 薬剤をナノパーティクルである cholesterol pullulane (CHP) に内包して投与することによる吸入効率改善についての検討。(3) 大動物 ex vivo 肺灌流モデルを用いて移植前に肺機能評価するモデルの確立。(4) 肺温虚血再灌流傷害を軽減する薬剤について、小動物でのわれわれの実験結果を大動物で確認。以下、各項を詳述する。

- (1) これまでに研究代表者が中心となって確立した rat 肺 ex vivo 灌流モデルを用いて、さらに優れた肺保護作用を有する薬剤を検索する。
- (2) CHP はリポソームよりも粒子径が小さく、気道での高い吸入効率が見込まれる新規ナノパーティクルである。まず、CHP 吸入による肺内での薬剤の到達範囲や効率について検討する。さらに、単独吸入では体内に取り込まれない、または、極めて吸入効率が低い物質について、CHP を運搬体とした吸入を行い、その効果を検討する。
- (3) 大動物 ex vivo 肺灌流モデルを十分に理解したうえで、類似モデルの作成を行う。ミニブタを用い、心停止後ある一定時間の温虚血時間を設定するなど、臨床に近い状況を模したプロトコルを作成し、肺機能評価の大動物モデルを確立する。
- (4) これまでに、rat の ex vivo 灌流モデルで保護効果を認めた薬剤の有効性を大動物でも確認する。両薬剤を同時もしくは別々に温虚血中に一定時間吸入させ、その肺保護効果を (3) で確立した ex vivo モデルを用いた評価法で確認する。

4. 研究成果

DCD 移植の実現は、脳死ドナーが極端に不足している本邦における肺移植を、1) レシピエントの手術成績向上、2) 生体ドナーへの負担の回避、3) 手術成績向上、すなわち合併症の回避による医療経済への好影響、など、さまざまな観点から急務である。本研究は、薬剤の吸入投与という、肺に特異的な方法で現実的な解決策を模索すべく、実現可能なステップを重ねるものであった。以下、各項目ごとに結果を詳述する。

- (1) 細胞内の cAMP, cGMP を維持するために、PDE 阻害剤である Milrinone や hANP に着目した。また、radical scavenger の観点から thioredoxin の吸入についても検討を行った。Milrinone や hANP の吸入投与が、温虚血再灌流傷害を抑制することを上記モデルを用いて明確に示した。これらの成果については、国際学会で複数回の発表を行い、聴衆の興味を引き、非常に多くの質問を得た。なお、thioredoxin の吸入については、温虚血再灌流傷害が逆に悪化することを認めた。
- (2) 新規ナノパーティクルである CHP を用いて、麻酔下の rat において、種々の薬剤や蛍光物質である Quantum dot を内包した CHP およびその誘導体の吸入を行った。種々の薬剤や蛍光物質の血中濃度や肺組織中の分布状況などについて、蛍光顕微鏡を用いて測定した。CHP やその誘導体を用いることで、明らかに肺実質内への取り込みが増加する傾向を示した。種々の薬剤の吸入効果も検討したが、heparin を内包した CHP については、血中への有意な移行を認めなかった。なお、これらの研究については、追加実験を行い、今後とも、詳細な検討を続けていく予定である。DDS, ナノパーティクルという観点からのアプローチは、今後とも重要な位置づけが行われるであろう。
- (3) 人工心肺装置および回路・人工呼吸器などを整備し、京都大学における大動物 ex vivo lung perfusion model を確立した。屠殺場からのブタ (115kg 程度) を用いた大動物 ex vivo 肺灌流モデルについて検討を行い、その有効性を示した。

論文投稿中であり、reviewer から興味深い意見を得ている。また、その後、肺保存液の違いによる、肺の保存効果について実験を行いその結果について検討・論文作成中である。さらに、今後、還流後の肺移植実験を継続して行い、実際の DCD 肺移植臨床につなげる translational research を計画中であり、当該分野における中心的研究として、位置づけられるであろう。

(4) (3) のモデル確立のための条件設定などに予想以上に時間がかかったため、今後の課題として、随時、研究を進めていきたい。

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 6 件)
(すべて査読あり)

①Zhang J, Chen F, Nakamura T, Fujinaga T, Aoyama A, Hamakawa H, Sakai H, Hoshino Y, Yodoi J, Wada H, Bando T, Nakamura H. Protective effect of thioredoxin perfusion but not inhalation in warm ischemic-reperfused rat lungs. Redox Report accepted.

②Zhang J, Chen F, Zhao X, Aoyama A, Okamoto T, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Cui Y, Bando T, Date H. Nebulized phosphodiesterase III inhibitor during warm ischemia attenuates pulmonary ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant 2009 Jan; 28(1): 79-84.

③Satoda N, Shoji T, Wu Y, Fujinaga T, Chen F, Aoyama A, Zhang JT, Takahashi A, Okamoto T, Matsumoto I, Sakai H, Li Y, Zhao X, Manabe T, Kobayashi E, Sakaguchi S, Wada H, Ohe H, Uemoto S, Tottori J, Bando T, Date H, Koshihara T. Value of FOXP3 expression in peripheral blood as rejection marker after miniature swine lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2008 Dec; 27(12): 1293-301.

④ Okamoto T, Nakamura T, Zhang J, Aoyama A, Chen F, Fujinaga T, Shoji T, Hamakawa H, Sakai H, Manabe T, Wada H, Date H, Bando T. Successful Subzero Nonfreezing Preservation of Rat Lungs at -2°C with a New Supercooling Technology.

J Heart Lung Transplant 2008 Oct;27(10):1150-7.

⑤Chen F, Zhang J, Aoyama A, Okamoto T, Fujinaga T, Bando T. Potential for Pulmonary Protection by Nebulized Milrinone during Warm Ischemia. Transplant Proc 2008 Dec; 40(10): 3335-8.

⑥Chen F, Kondo N, Sonobe M, Fujinaga T, Wada H, Bando T. Expression of endothelial specific adhesion molecules after cardiac arrest. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2008 7(3): 437-40.

[学会発表] (計 14 件)

①T. Okamoto, T. Nakamura, X. Zhao, J. Zhang, A. Aoyama, N. Satoda, A. Takahashi, F. Chen, T. Fujinaga, H. Hamakawa, T. Shoji, H. Sakai, T. Bando, and H Date. Novel superiority of subzero non-freezing preservation of rat lung with supercooling technology. 38th Annual Congress of the Korean Society for Transplantation and 7th Korea-Japan Transplantation Forum Oct 10, 2008 Seoul, Korea.

②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、山田徹、森川洋匡、庄司 剛、阪井宏彰、松本いずみ、板東徹、伊達洋至。わが国の DCD からの肺移植実験に向けての実験的取り組み。第 44 回日本移植学会総会 2008.9.21, 大阪市

③板東徹、陳 豊史、藤永卓司、張吉天、青山晃博、岡本俊宏、趙向東、高橋鮎子、里田直樹、庄司剛、阪井宏彰、伊達洋至。心臓死ドナーからの肺移植に向けた、ドナー肺の評価とその保護の研究。第 44 回日本移植学会総会 2008.9.21, 大阪市

④Okamoto T, Zhao X, Nakamura T, Zhang J, Aoyama A, Satoda N, Takahashi A, Chen F, Fujinaga T, Hamakawa H, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Novel superiority of subzero non-freezing preservation of rat lung with supercooling technology in ex vivo model and lung transplantation model. 8th International Congress on Lung Transplantation, Paris, September, 2008.

⑤Okamoto T, Chen F, Zhang J, Zhao X, Satoda N, Takahashi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Ex vivo evaluation of non-heart-beating donor lungs in larger-size pigs.

8th International Congress on Lung Transplantation, Paris, September, 2008.

⑥ Yamada T, Chen F, Zhang J, Okamoto T, Fujinaga T, Morikawa H, Satoda N, Takahashi A, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Experimental donor lungs from donation after cardiac death in various settings. 8th International Congress on Lung Transplantation, Paris, September, 2008.

⑦ Sato K, Chen F, Aoyama A, Akiyoshi K, Date H. Nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of anticancer drug. EACR 20 - 20th Meeting of the European Association for Cancer Research, 5-8 July 2008, Lyon, France.

⑧ 陳 豊史、藤永卓司、張吉天、青山晃博、岡本俊宏、趙向東、高橋鮎子、里田直樹、庄司剛、阪井宏彰、板東徹。心臓死ドナーからの肺移植に向けた、ドナー肺の評価とその保護の研究。第108回日本外科学会定期学術集会 WS7-2 2008.5.16, 長崎市

⑨ Okamoto T, Nakamura T, Zhang J, Aoyama A, Satoda N, Takahashi A, Zhao X, Chen F, Fujinaga T, Hamakawa H, Shoji T, Sakai H, Wada H, Bando T. Successful subzero non-freezing preservation of rat lungs with supercooling technology. Abstract#446, 28th Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Boston, April 9 - 12, 2008.

⑩ Chen F, Zhang J, Zhao X, Aoyama A, Okamoto T, Fujinaga T, Takahashi A, Satoda N, Shoji T, Sakai H, Bando T. Protective effect of nebulized milrinone in pulmonary warm ischemia-reperfusion injury. Abstract#142, 28th Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Boston, April 9 - 12, 2008.

⑪ 陳 豊史、張吉天、青山晃博、岡本俊宏、藤永卓司、里田直樹、高橋鮎子、庄司剛、阪井宏彰、趙向東、松本泉、板東徹。肺温虚血再灌流傷害におけるミルリノン吸入の検討。#216 第43回日本移植学会総会 2007.11.24, 仙台市

⑫ 板東徹、陳 豊史、藤永卓司、張吉天、趙向東、高橋鮎子、岡本俊宏、青山晃博、里田直樹、浜川博司、庄司剛、阪井宏彰、松本いずみ、和田洋巳。肺移植ドナープール拡大の試み。第34回日本臓器保存生物医学会総会。2007.11.16, 札幌市

⑬ 張吉天、陳 豊史、趙向東、青山晃博、

岡本俊宏、高橋鮎子、里田直樹、庄司剛、阪井宏彰、藤永卓司、板東徹。肺温虚血再灌流傷害におけるホスホジエステラーゼ阻害剤の吸入効果。第34回日本臓器保存生物医学会総会。2007.11.16, 札幌市

⑭ Aoyama A, Chen F, Nakamura T, Fujinaga T, Zhang JT, Okamoto T, Wada H, Bando T. Human atrial natriuretic peptide ameliorates warm ischemia-reperfusion injury of the lung. Abstract, Abstract #, 27th Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, San Francisco, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陳 豊史 (Chen Fengshi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00452334

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし