

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591668

研究課題名 (和文) 薬剤吸入による心停止後移植肺グラフト保護に関する前臨床研究

研究課題名 (英文) Pre-clinical study on the protective effect of drug inhalation on the lung graft from donor after cardiac death

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：ビーグル犬左肺移植モデルにて、4 時間の温虚血を与えた肺を移植し、再灌流後の移植肺機能を評価した。温虚血中、最後の 1 時間のみに純酸素換気を行うことにより良好な肺機能を維持することが判明した。次に、温虚血時間を 5 時間に延長し、最後の 1 時間に換気を行った対照群と、この間に、 β 2-刺激剤のプロカテロール吸入を追加した群と比較した。再灌流後肺機能は吸入群が有意に優れており、心停止後移植肺グラフト保護におけるプロカテロール吸入と陽圧換気の有効性と安全性が確認された。

研究成果の概要 (英文)：We evaluated post-transplant pulmonary function of the lung graft that received 4-hour warm ischemia in a canine left lung transplantation model. One hour mechanical ventilation with 100% oxygen during the last hour of 4-hour warm ischemia provided significantly better lung function after reperfusion than no ventilation. In the next experiment where we extended the warm ischemic time to 5 hours, the last one-hour ventilation with inhalation of a beta2-adrenoreceptor agonist (Procatelol) significantly enhanced the posttransplant lung performance than the one-hour ventilation only. We demonstrated the efficacy and safety of the combined therapy with inhalation of a beta2-agonist and mechanical ventilation for the lungs from donor after cardiac death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：胸部外科・886

キーワード：外科、移植・再生医療、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、他に治療手段のない末期呼吸器疾患に対する治療法として確立してきた。本邦においても 1998 年 10 月以降、脳死お

よび生体肺移植が行われ、良好な術後成績が得られている。しかしながら、一方では、脳死ドナー不足のため肺移植候補者として登録されながら、数多くの患者が移植を受

けられずに亡くなっている。諸外国に比べて、脳死下の臓器提供が顕著に少ない本邦において、ドナー不足を軽減するには、心停止後のドナー（donor after cardiac death、DCD）からの肺移植を実現することが、一つの解決策と成りうる。

DCD からの肺移植では、循環停止から肺の冷却を行うまでの「温虚血」が不可避であり、この温虚血による肺の傷害は、冷却中の虚血に比べて遙かに大きい。このため移植後早期の主要な死因の一つである移植肺機能不全を生ずる危険が高く、DCD からの肺移植の成功には、この温虚血傷害の制御が鍵となる。しかしながら、DCD においては、この肺傷害を軽減する目的で心停止前に臓器提供を前提とした薬剤投与やドレーン留置などの侵襲的処置は倫理的に許容されない。また、循環停止後の経静脈的薬剤投与には安定した薬理効果が望めない。

そこで我々は、心停止後にご遺族からの臓器提供の承諾を得た後に、手術室で開胸し、肺血管フラッシュによる肺の冷却が実行できるまでの時間に、簡便で非侵襲的な処置による肺の温虚血傷害の軽減を目指して、肺が血流と関係なく、気道から薬剤の投与が可能であるという解剖学的特殊性に着目した。その結果、ラット肺温虚血モデルにおいて、ATP 依存性カリウムチャンネル開口作用のある吸入麻酔薬イソフルレン、およびβ受容体作動性気管支拡張薬サルメテロールの心停止後経気道投与が有意に肺の温虚血再灌流傷害を抑制することを明らかにした。これらの薬剤は、吸入麻酔薬ないし喘息治療用吸入薬として既に一般臨床で使用されている実績があり安全性が確立している。その後、さらにホスホジエステラーゼ阻害作用のある心不全治療薬として臨床使用されているミルリノンの経気道的投与にも肺温虚血傷害を軽減する効果があることを突き止めた。

経気道的薬剤投与法は、心停止後に行う処置として、簡便かつ低侵襲であり、一般病院で実行可能な実用性の高い方法と考え

られる。しかし、本方法の臨床化を実現するためには、前臨床試験として中動物を用いて、実際に心停止温虚血、冷虚血、移植・再灌流という臨床に即した形での有効性を確認することが必須である。

2. 研究の目的

イヌ肺移植モデルにおける心停止後薬剤吸入による肺グラフト保護作用を臨床肺移植に準じた前臨床試験として検討する。これにより、本法の有効性及び安全性を確認し、臨床応用化を目指す。

3. 研究の方法

(1) 心停止条件が保存肺に与える影響の検討：イヌ肺移植実験のプロトコール作成のための予備実験として、ラット肺を用いて、心停止法の違いによる保存肺の状態を検討した。実験は、心停止の方法の違いにより、ラットを(1)KCl 投与群、(2)心室細動群、(3)換気停止群の3群に分け、それぞれの方法で心停止を起こした後、60分間の温虚血を与え、虚血後の肺の状態の比較検討を行った。評価は虚血後肺の肺動脈から50mlのトリパンブルー色素を投与し、組織灌流状態を評価した。また、心室細動群と換気停止群では150分の温虚血後に肺を体外灌流回路に接続し、75分間の再灌流を行い、肺機能の評価を行った。また、再灌流後の肺組織を採取して、肺内エネルギー量（高エネルギーリン酸化合物濃度定量、HPLC法）を測定し、細胞機能を評価した。RT-PCR法にて各種mRNA発現を評価した。

(2) 人工換気による温虚血肺グラフト保護効果の検討：ビーグル犬に心停止を導入後、室温下に240分間放置した。人工換気群では、240分の温虚血中の最後の60分間に純酸素で人工換気を行った。対照群は240分間無換気で放置した。その後両群とも臨床肺移植に準じて、グラフト摘出・2時間の冷保存後に同種左肺移植を行い、再灌流後240分まで移植肺機能を評価した。また、温虚血後、移植前、再灌流後に肺組織検体を採取して、肺内エネルギー量（高エネルギーリン酸化合物濃度定量）を測定し、細胞機能を評価した。アポトーシスの有無（TUNEL法）を検討して細胞生存を評価した。また、虚血再灌流後の炎症性サイトカイン濃度を測定した。

(3) 薬剤吸入による温虚血肺グラフト保護効果の検討：ビーグル犬に心停止を導入後、室温下に300分間放置した。この300分のうち最後の60分間に人工換気を行った群を対照群として、この陽圧換気に加えて、市販のβ2-刺激剤であるプロカテロールの吸入を行った吸入群に分けて、比較検討した。300分の温虚血後にグラフト肺を摘出し、2時間の冷保存後に同種左肺移植を行い、再灌流

後 240 分まで移植肺機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 心停止条件の検討結果: KCl 投与群、換気停止群では、心室細動群に比べ、有意に肺の灌流が不均一であり、灌流時間も有意に延長し、微小循環の傷害が推測された。体外灌流回路による再灌流実験では、換気停止群では、心室細動群に比べて、有意に酸素化能の不良、一回換気量の低下、肺重量の増加が認められ、傷害が強いことが示された。また再灌流後の肺組織のエネルギー状態も心室細動群が有意に良好であった。RT-PCR では、心室細動群で換気停止群に比べて SP-C、SP-A mRNA 発現が高値であった。組織学的には、心室細動群で SP-C 染色が強い傾向が認められ、この傷害の原因として、肺サーファクタント機能の関与が示唆された。

(2) 人工換気の有効性の検討: 4 時間の温虚血の間、無換気のまま放置された対照群では、移植後に明らかな肺障害を示し、8 頭中 4 頭が高度の肺水腫のため再灌流を完遂できなかった。一方、温虚血 4 時間のうち、最後の 1 時間のみに人工呼吸器による純酸素換気を行った換気群では、6 頭とも再灌流を完遂した。換気群は対照群に比べて、再灌流後の酸素化能、肺湿乾重量比において有意に良好であった。また換気により肺組織内の高エネルギーリン酸化合物が保持され、アポトーシスの軽減が認められた。一方、対照群では組織学的に高度の出血や炎症所見を認め、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-8、IL-6) の高値を伴っており、温虚血中の陽圧換気による肺保護効果が示された。

(3) 薬剤吸入の有効性の検討: 換気のみを行った対照群では 5 頭中 1 頭が肺水腫のため脱落したのに対し、吸入群では 5 頭全てが 4 時間の再灌流を完遂した。再灌流後の酸素化能、肺コンプライアンスは吸入群が対照群に比べて有意に高値を示し、肺血管抵抗では、吸入群が対照群に比べて有意に低値であった。心停止後移植肺グラフト保護におけるプロテカロール吸入の有効性が示された。

(4) 以上の研究結果から、心停止後ドナーにおける人工陽圧換気と β 刺激剤の薬剤吸入は、十分に安全に実施可能であり、グラフト肺保護効果を有することが確認され、今後の臨床応用における実現可能性が示された。

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 7 件)

- ① 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: 1598-1601, 2010、査読有
- ② Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, Oku M, Okumi M, Nishihara H, Oriyanhan W, Tasaki M, Scalea J, Wada H, Bando T, Date H, Yamada K: Beneficial effects of perioperative low-dose inhaled carbon monoxide on pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine, Transplantation 90: 1336-1343, 2010、査読有
- ③ Zhang 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 28: 79-84, 2009、査読有
- ④ Aoyama A, Chen F, Fujinaga T, Sato A, Tsuruyama T, Zhang J, Shoji T, Sakai H, Nakamura T, Date H, Wada H, Bando T, Postischemic infusion of atrial natriuretic peptide attenuates warm ischemia-reperfusion injury in rat lungs, J Heart Lung Transplant 28: 628-634, 2009、査読有
- ⑤ Zhang J, Chen F, Nakamura T, Fujinaga T, Aoyama A, Hamakawa H, Sakai H, Hoshino Y, Yodoi J, Wada H, Bando T, Nakamura H, Protective effects of thioredoxin perfusion not inhalation in warm ischemic-reperfused rat lungs, Redox Rep 14: 75-81, 2009、査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 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, The 31st annual meeting and scientific sessions, The International Society for Heart and Lung Transplantation, 2011. 4. 14, San Diego, USA
- ② 阪本仁、陳豊史、中島大輔、菊地柳太郎、小島史嗣、大角明宏、高橋鮎子、里田直樹、藤永卓司、庄司剛、阪井宏彰、板東徹、伊達洋至、中動物肺移植モデルを用いた摘出前換気による心停止ドナー肺の保護効果、

第 63 回日本胸部外科学会定期学術集会、
2010.10.25、大阪

- ③ 阪本仁、山田徹、陳豊史、中島大輔、高橋
鮎子、里田直樹、藤永卓司、庄司剛、阪井
宏彰、板東徹、伊達洋至、イヌ心停止ドナ
ー肺移植モデルにおける臓器摘出前の換
気によるグラフト肺保護効果、第 46 回日
本移植学会総会、2010.10.22、京都
- ④ Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Nakajima
D, Satoda N, Takahashi A, Shoji T,
Fujinaga T, Sakai H, Bando T, Date H,
Injury of donor lungs from donation
after cardiac death in various settings,
The 30th annual meeting and scientific
sessions, The International Society for
Heart and Lung Transplantation,
2010.4.23, Chicago, USA
- ⑤ 山田徹、陳豊史、阪本仁、中島大輔、里田
直樹、高橋鮎子、岩切章太郎、園部誠、藤
永卓司、庄司剛、阪井宏彰、板東徹、伊達
洋至、心臓死ドナー肺における心停止導入
条件と肺障害、第 62 回日本胸部外科学会
学術集会、2009.10.12、横浜
- ⑥ 陳豊史、岡本俊宏、山田徹、張吉天、青山
晃博、藤永卓司、森川洋匡、高橋鮎子、里
田直樹、庄司剛、阪井宏彰、板東徹、伊達
洋至、マージナルドナー肺、心臓死ドナー
肺の新しい評価法と保護法、第 45 回日本
移植学会総会シンポジウム、2009.9.18、
東京
- ⑦ Yamada T, Chen F, Zhang J, Okamoto T,
Fujinaga T, Morikawa H, Matsumoto I,
Satoda N, Takahashi A, Shoji T, Sakai H,
Bando T, Date H, How the cause of death
affects the quality of DCD donor lungs?,
The 29th annual meeting and scientific
sessions, The International Society for
Heart and Lung Transplantation,
2009.4.23, Paris, France
- ⑧ 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、山田徹、森川洋匡、庄司剛、浜川博
司、阪井宏彰、松本いずみ、伊達洋至、わ
が国の DCD からの肺移植実現に向けての実
験的取り組み、第 44 回日本移植学会総会
シンポジウム、2008.9.20、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

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

(2) 研究分担者

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

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

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

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

(3) 連携研究者

なし