

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02994

研究課題名（和文）ドナー肺の冷保存と体外肺灌流を組合わせた体外肺保存装置の開発と最適保存条件の検討

研究課題名（英文）Development of an ex-vivo lung preservation system combining cold preservation and ex-vivo lung perfusion for long-term lung preservation

研究代表者

小阪 亮 (Ryo, Kosaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：10415680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：肺移植は重症肺疾患患者に対する根源的な治療法として実施されているが、慢性的なドナー不足が世界的な問題である。そのため、ドナー肺の保存時間の延長と肺機能の評価を目的とした体外肺灌流（EVLP）が欧米を中心に臨床で実施されている。しかし、臨床でのEVLPは、肺の機能評価と長期保存の両面に課題が残っている。そこで、本研究では、冷保存とEVLPを組み合わせ、EVLPにおいて肺機能の評価しながら、肺の長期保存を実現することが可能な体外肺保存装置を開発した。そして、ブタを用いた動物実験において、ドナー肺の冷保存とEVLPを組み合わせることで、ドナー肺の長期保存が実現可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドナー肺の長期保存法については、未だ明確な保存法が確立されていない。臨床におけるヒト肺の冷保存時間は、6時間から8時間が限界である。そのため、本研究では、冷保存とEVLPを組合わせた肺の長期保存法が実現可能な体外肺保存装置を開発し、動物実験で長期間肺機能を保存されることを見出した。本研究成果により、冷保存とEVLPを組み合わせることでドナー肺の長時間保存が可能となる条件を見出す学術的意義を得ることができた。さらに、ドナー肺の保存時間の制限などで廃棄されていたドナー肺の移植活用率の向上、移植待機中の患者の救命症例の増加、肺移植件数の増加に繋がる社会的意義が高い研究成果になりえると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lung transplantation is the only established life-saving treatment for patients with end-stage respiratory diseases, although donor shortage is still a serious problem in all over the world. To expand the donor lung pool, ex vivo lung perfusion (EVLP) has been developed to assess pulmonary function of marginal donor lungs and preserve the donor lungs. However, current lung evaluation and preservation methods during EVLP are imperfect, occasionally resulting in poor outcomes. In this study, we developed an extracorporeal lung preservation system that combine cold preservation and EVLP to realize long-term lung preservation while evaluating lung function in EVLP. In animal experiments using pigs, we demonstrated that long-term preservation of donor lungs is feasible by combining cold preservation of donor lungs and EVLP.

研究分野：生体医工学

キーワード：肺移植 体外肺灌流 肺機能評価 肺機能保存 自動制御

1. 研究開始当初の背景

重症肺炎患者に対し、脳死患者や心停止後のドナー肺を移植する肺移植が実施されている。しかし、国内では2018年の肺移植数は58例と慢性的なドナー不足である。米国では2018年の肺移植は2,562例にもなるが、ドナー肺の冷保存時間の制限やICU管理中の肺機能不全により、臓器活用率は約20%に過ぎない。この状況を改善するため、移植前にドナー肺をレシピエントに移植した状態と同等となるように体外で保ちながら、ドナー肺の「保存」と「評価」を行う体外肺灌流（Ex Vivo Lung Perfusion: EVLP）が注目されている。EVLPは、ドナー肺を移植する前に体温、循環、呼吸などを、臓器移植を受けるレシピエントに移植した状態と同等に保ちながら、移植肺の保存と機能評価を行うことを目的としている（図1）。トロント大学のYeungらによると、肺の保存時間は、従来の冷保存の平均6.6時間からEVLPにより14.5時間に延長でき、移植後の成績は同様であったと報告されている（Lancet Respir Med 5:119-24, 2017）。また“機能にやや疑問が残る”マージナルドナー肺に対して、移植前にEVLPを用いて肺の機能評価を行うことで、臓器活用率の向上に繋がる。米国では2014年にFDA承認を得たXPS(XVIVO Perfusion社)が臨床で使われ、臓器活用率が改善している。しかし、臨床で使用されているEVLPは、肺の機能評価と長期保存の両面に課題が残っている。

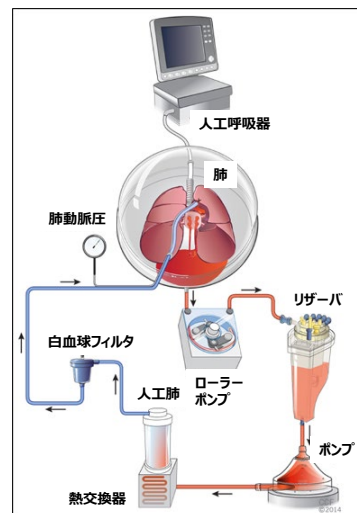


図1 体外肺灌流 (EVLP)

提案者らは、これまで産総研の内部予算とAMED「官民による若手研究者発掘支援事業」を通じて、ドナー肺の灌流と肺機能の評価が可能なEVLP装置を開発してきた（図2）。これまで本装置を用いて、1年間で20例のブタ肺を用いた動物実験を実施することで、肺に傷害のないシャム群と、心停止ドナーによる再灌流傷害群の実験モデルを確立した。また、本装置では肺機能の評価するため、灌流中の肺の循環パラメータ（肺動脈圧や灌流液流量、肺抵抗）と気道パラメータ（気道内圧や気速）、肺重量をリアルタイムで計測するシステムを開発した。さらに、肺設置底面に赤外光と可視光を透過する赤外線透過透明樹脂シートを採用することで、静水圧により局所的に肺動脈圧が高くなることで生じやすい、肺底面の肺水腫をサーモグラフィにより評価することを可能にした。

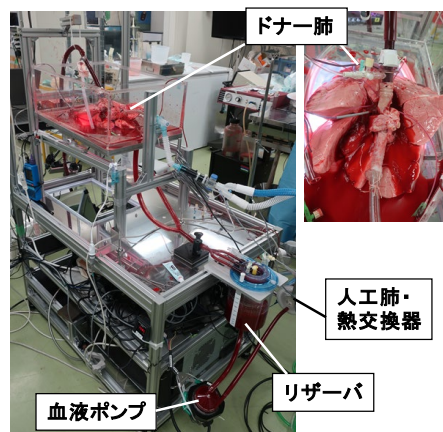


図2 研究用EVLP装置の試作機

肺の保存時間に関して、臨床におけるヒト肺の冷保存法の場合、6時間から8時間が限界である。そのため、臨床肺移植において、冷保存とEVLPを組み合わせた肺の長期保存法が試みられている（図3）。トロント大学によると、一度のEVLPを行った場合、EVLP前後の2度の冷保存時間と合わせて、肺採取から移植まで合計14.5時間の肺保存を安全に行うことが出来たと報告されている。しかし、冷保存とEVLPを組み合わせる場合、冷保存とEVLPが異なる装置で実施されているため、冷保存とEVLPの切り替えには、煩雑な作業と熟練した技術が必要である。

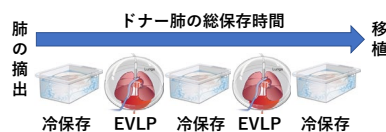


図3 冷保存とEVLPを組み合わせた肺の長期保存

2. 研究の目的

本提案ではドナー肺の冷保存とEVLPを組み合わせた体外肺保存装置を開発するとともに、ドナー肺の冷保存とEVLPを組み合わせることで、ドナー肺の長期保存のための検討を行った。具体的には、冷保存とEVLPを組み合わせた肺の長期保存と機能評価を1つのシステムで実施可能な体外肺保存装置の開発を実施した。そして、ブタを用いた動物実験において、冷保存とEVLPを組み合わせた肺の長期保存法について検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) 体外肺保存装置の開発

ドナー肺の冷保存とEVLPを組み合わせた体外肺保存装置のプロトタイプの開発を実施した。具体的には、体外肺保存装置のプロトタイプとして、これまで申請者が開発してきた研究用

EVLP 装置に追加する機能として、アクチュエータと 3D プリンタで製作した冷保存と EVLP の灌流回路の切り替え機構、ドナー肺の左房圧を目標値に調整する自動制御機構、ベンチレータの駆動条件の自動切り替え機構、EVLP 中の灌流条件（圧力、流量、温度、ポンプ回転数）の制御機構を開発した。灌流回路の切り替え機構について、灌流回路中に電磁弁を用いた切り替え機構を設けると、回路の小型化できるものの、基礎実験を実施した結果、回路抵抗が大きいことと弁の開閉時に急激な圧力変化が生じるうえに、回路の滅菌が困難となることがわかった。そのため、チューブ外周よりチューブを押しつぶすことで回路の開閉を制御する、アクチュエータと 3D プリンタで製作したピンチバルブを開発した。また、体外肺保存装置において、肺の冷保存を実現するため、恒温槽を用いて低温で循環させる肺保存液でオーガンチャンバに設置されたドナー肺の内部と外部を満たす機構を考案した。ドナー肺の左房圧を目標値に調整する自動制御機構として、左心房圧と目標圧の差から PID 制御で左房圧を目標値に制御する機構を開発した。ベンチレータの駆動条件の自動切り替え機構として、ベンチレータの呼吸回数や一回換気量などを外部の PC より制御可能なシステムを構築した。EVLP 中の灌流条件の制御機構として、LabView を用いて、血液ポンプの回転数を制御することで、自動的に設定した灌流条件を実現する制御システムを構築した。さらに、EVLP 中に灌流条件が異常状態となった場合にはアラームが鳴るとともに、自動的に異常状態から脱却する異常回避機構を開発した。

(2) Toronto 式 EVLP を実現する装置の開発

体外肺保存装置の有効性を評価するためには、ブタ肺を用いた長期の EVLP の動物実験が必要である。これまでの EVLP の試験では、臨床で使用されている EVLP のプロトコルのうち、主に肺機能の移植適合性の評価精度が高い、灌流液に赤血球を含む 2 時間の Lund 式 EVLP のプロトコルを実施して、開発した肺機能評価法の妥当性を評価してきた。しかし、肺の長期保存を実現するためには、灌流装置による赤血球破壊（溶血）の問題もあるため、灌流液に赤血球を含まない Toronto 式のプロトコルによる EVLP を実施することが必要となった。そこで、これまでの EVLP 装置を改良し、改良した Toronto 式 EVLP システムの有効性を確認するため、45kg のブタを用いた動物実験を実施した。動物実験では、臨床で実施されている Toronto 式のプロトコルと同様に、傷害を与えていない脳死ドナーモデルのブタによる 4 時間の EVLP 試験を実施した。Toronto 式 EVLP では、灌流開始後、灌流液を 37℃ に向けて恒温槽を用いて復温しつつ、10 分毎に灌流の流量を回路中の血液ポンプの回転数を増加させることで、徐々に増加させ、開始 50 分には、推定心拍出量の 40% まで流量を増加させた。そして、灌流中は、1 時間ごとに血ガス分析を実施するとともに、気道内圧、肺動脈圧などを連続計測した。4 時間の EVLP が終了した後、肺の重さや肺組織含水などの計測を実施し、最終的には、計測された生理パラメータを元に総合的に肺の移植適合性を評価した。

(3) 冷保存と EVLP を組み合わせた肺の長期保存法の開発

冷保存と EVLP を組み合わせた肺の長期保存を検討するため、ブタ肺に対して、冷保存と EVLP を 2 回組み合わせた肺の長期保存法の有効性を評価するための試験を実施した。肺の長期保存法の評価試験では、45kg のブタに対して、臨床と同様のプロトコルでブタの肺を摘出し、心停止後、冷保存を実施した。そして、灌流液に赤血球を含まない Toronto 式 EVLP を 24 時間実施した。Toronto 式 EVLP を実施した後、冷保存と EVLP の組み合わせを実施するため、1 時間の冷保存を組み合わせた後、血液ガス計測の精度の高い灌流液に赤血球を含んだ Lund 式 EVLP を 1 時間組み合わせて実施した。Lund 式 EVLP では、灌流液を 37℃ に向けて復温しつつ、灌流開始 10 分で回路内のシャントを閉鎖した。そして、肺のみに灌流液を流入させ、最終的な流量を推定心拍出量の 100% とした。灌流開始後、1 時間で血ガスによる肺機能評価を実施した。そして、1 時間の EVLP が終了した後、肺の重さや肺組織含水などの計測を実施し、最終的には、計測された生理パラメータを元に総合的に肺の移植適合性を評価した。

4. 研究成果

(1) 体外肺保存装置

体外肺保存装置のプロトタイプの評価するため、水を用いた基礎試験を実施した。まず、EVLP の回路の切り替え機能の有効性を検討した。血液ポンプを使用して回路を流れる流量を 3 L/min に制御したまま、回路切り替え機構を用いて、回路を開閉させた結果、約 0.7 秒で回路の開閉ができることが確かめられた。このとき、回路を閉じた状態で、流体の漏れが生じないことを確認した。ドナー肺の左房圧を目標値に調整する自動制御機構の評価試験を実施した結果、約 2 秒以内で、目標とした血圧 ± 0.5 mmHg を実現することを確認した。ベンチレータの駆動条件の自動切り替え機構については、ベンチレータの駆動条件のうち、吸入中の酸素濃度 (FiO₂: Fraction of Inspired Oxygen)、一回換気量、一分間の呼吸回数などを目標値に自動的に制御することが可能であった。さらに、EVLP 中の灌流条件（圧力、流量、温度、ポンプ回転数）を目標

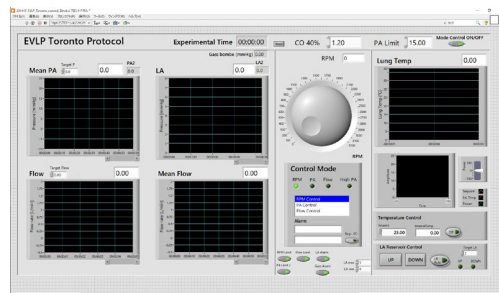


図 4 灌流条件制御パネル

値に自動的に制御することが可能であった。さらに、EVLP 中の灌流条件（圧力、流量、温度、ポンプ回転数）を目標

の灌流条件に向けて制御するため、LabView と DAQ を用いた制御システムを構築した (図 4)。本システムを用いて、灌流中の生理パラメータの計測値を観察しながら、灌流条件を設定すると、血液ポンプの回転数や恒温槽の設定温度を自動制御することで、目標とした灌流条件を実現できることがわかった。さらに、異常通知・異常回避機能として、灌流圧や流量が閾値よりも大きくなり、肺に障害を与える可能性がある場合、自動的に異常を検知し、アラームを表示しつつ、血液ポンプの回転数を減少させて異常を回避する機能も有効に動作することを確認した。

(2) Toronto 式 EVLP システムを用いた EVLP の試験結果

開発した Toronto 式 EVLP 装置を用いて、4 時間の Toronto 式 EVLP を実施した。その結果、EVLP 中に計測された P/F 比は、肺の移植適合性の目安となる 300 を超えており、灌流の流量も目標値である推定心拍出量の 40% に到達した。さらに、4 時間の灌流中の肺動脈圧も 12mmHg 程度、最高気道内圧も 15cmH₂O 以下であり、気管支鏡による検査においても、これまで実施してきたブタ肺の移植適合群と同等の問題ない結果であった。さらに、EVLP 試験後、EVLP 前後の肺重量の増加率を計測した結果、肺重量の増加率は 108% と少なく、肺水腫を反映する Wet/Dry 比も 5.2 と過去の移植適合群と同等の値であった。本結果から、EVLP において灌流したブタ肺は、移植可能な肺機能を有していることがわかった。そのため、開発した Toronto 式 EVLP システムでは、システム由来の肺の機械的損傷の問題が生じておらず、長期の灌流試験を実施するために適切な性能を有していることを確認することができた。

(3) 冷保存と EVLP を組み合わせた肺の長期保存法の試験結果

ドナー肺の冷保存と EVLP を組み合わせた長期保存法の検討を行うため、ブタ肺を用いた EVLP 試験を実施した (図 5)。その結果、初期の実験では、1 時間の冷保存時間の後、EVLP を実施した結果、肺の生理パラメータは 8-10 時間で悪化し、肺動脈圧を増加させたとしても、目標流量である推定心拍出量の 40% を維持することが困難となった。このとき、肺の EVLP 前後の肺重量の増加量から、重度の肺水腫を確認した。そのため、ブタの心停止後、冷保存の時間を延長し、Toronto 式 EVLP を 24 時間実施した後、さらに、冷保存と EVLP を組み合わせるため、冷保存を組み合わせる。最後に肺機能を評価するため、赤血球を含んだ Lund 式 EVLP を 1 時間組み合わせる。その結果、Lund 式の EVLP 中に得られた生理パラメータの 1 つである最高気道内圧はやや高めであったものの、他の生理パラメータ (肺動脈圧、灌流量、P/F 比、肺重量変化) の計測結果は問題ない範囲であった。本結果から、ドナー肺の移植適合性を計測された生理パラメータから総合的に評価すると、冷保存と EVLP を組み合わせることで、ドナー肺は移植可能な肺機能を有していると判断された。



図 5 肺の長期保存法の試験の様子

(4) まとめ

本研究では、ドナー肺の冷保存と EVLP を組み合わせた体外肺保存装置のプロトタイプを開発するとともに、ドナー肺の長期保存のための検討を行った。ブタを用いた体外肺灌流の動物実験を実施した結果、冷保存と EVLP を組み合わせることで肺機能の長期保存が実現できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Kosaka, Daisuke Sakota, Ichiro Sakanoue, Hiromichi Niikawa, Katsuhiro Ohuch, Hirokuni Arai, Kenneth R McCurry, Toshihiro Okamoto	4. 巻 107
2. 論文標題 Real-time Lung Weight Measurement During Cellular Ex Vivo Lung Perfusion: An Early Predictor of Transplant Suitability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 628 ~ 638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000004380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小阪 亮
2. 発表標題 肺機能イメージングを用いた体外肺灌流における移植適合性評価技術の開発
3. 学会等名 第34回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Kosaka, Daisuke Sakota, Hiromichi Niikawa, Katsuhiro Ohuch, Hirokuni Arai, Kenneth R McCurry, Toshihiro Okamoto
2. 発表標題 Lung Thermography as an Early Predictor of Pulmonary Function in Cellular Ex Vivo Lung Perfusion
3. 学会等名 42nd International Society for Heart and Lung Transplantation（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小阪 亮
2. 発表標題 体外肺灌流における新たな肺の機能評価技術の開発
3. 学会等名 第61回日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔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	新井川 弘道 (Hiromichi Niikawa) (80636027)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究 分担者	大内 克洋 (Katsuhiro Ohuchi) (20322084)	東京医科歯科大学・統合研究機構・特任准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Cleveland Clinic Foundation		