

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591575

研究課題名（和文）ヘモグロビン小胞体を用いたドナー肺の機能改善及び評価、保存

研究課題名（英文）Application of hemoglobin vesicles for lung transplantation

研究代表者

河野 光智（KOHNO MITSUTOMO）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10276272

研究成果の概要（和文）：人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体を肺移植に応用すべく、マウス肺切除モデルでの小胞体輸液の効果の確認、マウス及びラット摘出肺灌流回路の作製、ブタ肺移植モデルでのデータの収集を行った。マウス肺切除モデルでは、肺切除という外科的侵襲下、低肺機能のマウス体内で有効に機能し、術後の回復に影響を与えないことが確認できた。外科手術でもヘモグロビン小胞体が安全に使用できることが明らかになった。摘出肺還流回路の作製ではマウス或いはラット摘出肺をヘモグロビン小胞体で還流する回路を作製した。肉眼的に肺外観に大きな変化を生じず、病理学的にも評価した。ブタ肺移植モデルでは全身麻酔下にドナー左肺を移植するモデルを作成しグラフト肺の機能を評価する手技を確立し、データ収集を行った。

研究成果の概要（英文）：On a mouse pneumonectomy model, the infusion of hemoglobin vesicles compensated for 40% of blood loss caused by pneumonectomy, without interfering with the recovery of mice from the operation. On a perfusion circuit with hemoglobin vesicles, donor lungs were not injured severely after long term perfusion. A swine lung transplant model was established and donor lungs were evaluated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：移植・再生医療、呼吸器外科

1. 研究開始当初の背景

1983 年の第 1 例目の肺移植の成功以来、全世界で 25,000 例以上の重症呼吸循環不全疾

患に対して肺移植が実施され、片肺移植、両側肺移植の術式も確立され、成績もほぼ安定している。本邦においては脳死と生体とを併

せて 140 例以上の肺移植が施行され、移植後の 5 年生存率は脳死肺移植で 53.4%、生体肺葉移植で 74.6%、全体で 67.0%と、海外の報告と比較して良好な成績を収めている。しかしドナー肺は極端に不足し、肺移植希望登録者の 40%にあたる 130 名が待機中に死亡している。脳死ドナー不足を解消すべく、「脳死は人の死」を前提に、本人の意思が不明な場合でも家族の承諾で 0 歳から臓器提供を可能にする改正臓器移植法が 2009 年 7 月に成立し、1 年後より施行される。これにより臓器提供者が増加して移植医療の進展と普及が期待される。また肺移植に関しては、他の臓器移植より生存率が低く、特に急性期の死亡率が高いこと、慢性拒絶としての閉塞性細気管支炎の発生率と死亡率が高いことが大きな問題として残っている。急性期の虚血再灌流障害の予防や治療に関する試みは、多くの研究者によって継続されており、呼吸器外科に所属する研究代表者も、これまでにラット肺移植モデルを用い、肺移植後の急性肺障害において遊離型 TNF α や E-cadherin がその発症のメカニズムに関与していることを論文発表してきた (Goto T. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, Goto T. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009)。

一方、人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを内包させたリポソームであり、期限切れの輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出、精製、ウィルス不活化を行ったのち、リポソームに内包、膜表面を PEG 修飾して粒径を 250nm、P50 は 32Torr に調製した粒子である。長期保存が可能で、血液型に関係なく使用でき、感染症の可能性もないので、臨床での実用化が期待されている。早稲田大学理工学術院土田英俊名誉教授や酒井宏水准教授のもとで開発され、研究者の所属する慶應大学呼吸

器外科においてマウスやラット、ビーグル犬を用いた動物実験で生体内での機能と安全性の評価が行われてきた (Sakai H, et al. *Artif Organs*, 2009)。

血液中で酸素運搬体として機能することは、ラットにおける交換輸血試験で確認され、90%の脱血交換試験でも生存が可能であった。交換輸血のみならず、出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られ、最も臨床応用に近いと考えられている。安全性試験としては白血球によるサイトカインの産生の変動、血小板に与える影響を始めとし、薬理動態、血清学的変化についての基礎検討、細網内皮系の活性化を含む代謝過程の解明が行われている。リポソームに包まれ血管収縮を起こすことがないため、修飾ヘモグロビンに認められるような血圧の上昇を生じないことも確認されている。臨床応用を視野に入れ、ビーグル犬を用いての交換輸血後の長期生存試験や、人工心肺のプライミング液として応用すべく研究が進行中である。

研究者らは待機手術における周術期出血での使用を想定し、マウスで肺切除を行い同時に術中出血させるモデルを作成し、術後侵襲からの全身状態の回復に対するヘモグロビン小胞体投与の安全性と効果とを検討した。

また、ヘモグロビン小胞体が、臓器の末梢血管で血流が低下する様々は病態で、酸素を末梢組織まで効果的に運搬し酸素代謝を改善することが確認されている。ラット脳梗塞モデルでは梗塞域の減少効果が得られ (Sakai H. *J Biomed Mater Res*, 2009)、皮膚筋弁モデルにおいても末梢の酸素分圧の上昇が確認されている。ラット人工心肺モデルによる検討ではヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果が確認されている。更にヘモグロビン小胞

体の投与により肺損傷モデルでは血中の酸素分圧が上昇する。これらの効果は粒子径が赤血球よりも小さいことにより、末梢血管にまでヘモグロビン小胞体が行き渡り、酸素化が改善するためと考えられている。ヘモグロビン小胞体により腫瘍組織の低酸素が改善され、放射線照射の効果が高まることも分かっている(Yamamoto M. J Surg Res, 2009)。

2. 研究の目的

肺移植においては虚血後再灌流障害により Pulmonary microvessel diameter(肺毛細血管径)の減少や Functional capillary density (機能的肺毛細血管密度)の減少が生じていることが知られている。細く収縮した毛細血管では、酸素交換が不良となり、血流シャントも生じ、移植肺グラフト不全を悪化させる一因になると考えられている。そこで研究者らは、このような病態に粒子径が赤血球よりも小さいヘモグロビン小胞体を投与することにより、肺移植後のグラフト不全を予防できるのではないかと考えた。

また、深刻なドナー肺不足を改善すべく、心臓死ドナーからの肺の使用が検討されているが、心臓死ドナー肺では機能が低下している可能性があり、移植前に臓器機能の評価することが必要である。またその間にドナー肺を可能な限り保護することも重要である。そこでヘモグロビン小胞体を添加した灌流液でドナー肺を *ex vivo* で還流し、ドナー肺を評価するシステムを確立すると同時に、酸素代謝改善による保護効果を検討することも今回の研究の目的とする。

ヘモグロビン小胞体の特性を肺移植に応用すべく、以下の目的を立てた。

(1) ラットおよびマウス虚血再灌流肺損傷モデルにおけるヘモグロビン小胞体輸液による酸素化能の改善効果および肺損傷の軽減効果を明らかにする。

(2) ラットで実際に肺移植を行い、ヘモグロビン小胞体輸液による酸素化能の改善効果および肺損傷の軽減効果を明らかにする。

(3) ラット心臓死ドナーからの摘出肺をヘモグロビン小胞体を添加した灌流液で *ex-vivo* 灌流し、肺機能評価法を確立し、肺保存保護効果を検討する

(4) 小動物での実験結果を基にして大型動物(ビーグル犬)を用いて、肺移植後虚血再灌流肺損傷と *ex-vivo* 肺灌流におけるヘモグロビン小胞体の効果、有用性を検討する。

3. 研究の方法

肺移植後のグラフト肺に生じる虚血再灌流肺損傷に対するヘモグロビン小胞体輸液の効果を検討するため、マウス及びラットで肺動静脈、気管支を一定時間クランプして作成する虚血再灌流肺損傷モデルにおいてヘモグロビン小胞体輸液を行い、酸素化能や肺損傷を評価する。その結果により輸液量等の至適条件を決定する。次に実際にラットにおいて肺移植を行い、ヘモグロビン小胞体投与を行いグラフト機能低下に対する効果を評価する。またラット心臓死ドナーからの摘出肺をヘモグロビン小胞体を用いて *ex-vivo* 灌流し、肺血管抵抗や気道内圧、組織学的検討、酸素化能を測定し、機能評価法を確立する。また、ヘモグロビン小胞体の添加量などに関して機能維持のための至適条件を決定するとともに、他の灌流液と保護効果を比較する。また *ex vivo* 灌流後の肺を実際にレシピエントに移植する。更には大型動物(ビーグル犬)を用いた肺移植後虚血再灌流肺損傷へのヘモグロビン小胞体投与の効果および長期観察を行う。

4. 研究成果

ヘモグロビン小胞体の特性を肺移植に応用す

るための以下のような研究成果が得られた。
 (1) マウス肺切除モデル：頸動脈にカニューレ
 ションし、循環血液量の40%交換輸液した
 後、左肺切除を行う。ヘモグロビン小胞体投
 与群、リンゲル液投与群、アルブミン投与群、
 保存血液投与群とで術後の生存率、回復過程
 を比較した。ヘモグロビン小胞体群とマウス
 保存血液群では100%のマウスが長期生存した
 が、リンゲル液群では全例が24時間以内に死
 亡し、アルブミン群では50%の生存率であっ
 た。体重変化、摂食量、自発運動量、血中炎症
 サイトカイン濃度はヘモグロビン小胞体群と
 保存血液群とで差を認めなかった（図1）。

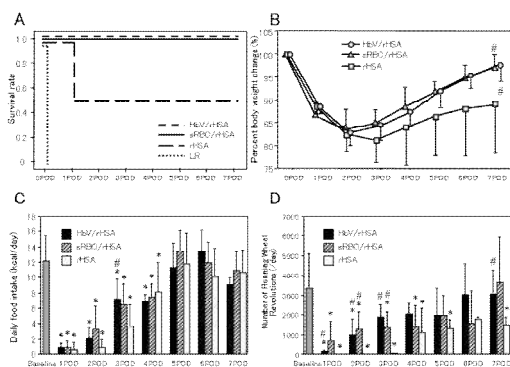


図1. ヘモグロビン小胞体投与群、リンゲル液投与群、アルブミン投与群、保存血液投与群での肺切除後7日目までの(A)生存率、(B)体重変化、(C)1日当たりの摂食量、(D)1日当たりの運動量の比較

またヘモグロビン小胞体が補足されるため、術後に脾腫を認めるが、14日目には改善した。アルブミン群では肝臓および腎臓で低酸素誘導因子HIF-1 α の発現を認めたが、ヘモグロビン小胞体とマウス保存血液群では発現が抑制されていた（図2）。肺切除という外科的侵襲下、低肺機能のマウス体内で有効に機能し、術後の回復に影響を与えないことが確認できた。この結果により肺移植を含む外科的手術に際してもヘモグロビン小胞体を安全に使用できることが示唆された。

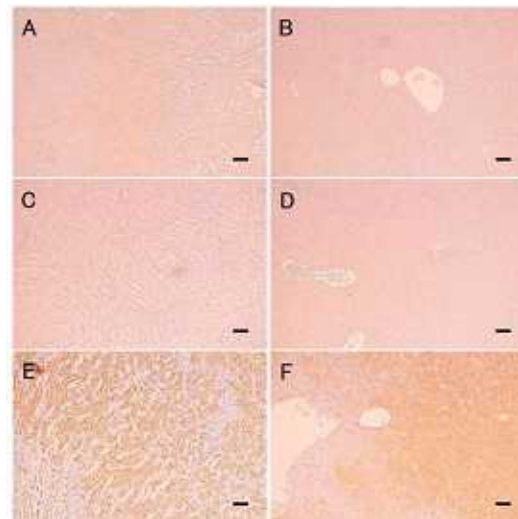


図2. ヘモグロビン小胞体投与群(A, B)、保存血液投与群(C, D)、アルブミン投与群(E, F)での肺切除後1日目の腎臓(A, C, E)と肝臓(B, D, F)でのHIF-1 α 免疫染色

(2) 摘出肺還流回路の作製：マウス或いはラット摘出肺をヘモグロビン小胞体で還流する回路を作製した。肺を摘出し、肺動脈にカニューレーションし、ヘモグロビン小胞体を低圧で持続注入する。同時に気管内挿管して人工呼吸器に接続して肺を換気する。肺静脈から灌流されたヘモグロビン小胞体が持続的に流出することを確認した。また肉眼的に肺外観に大きな変化を生じなかった。病理学的にも評価を行った。

(3) ブタ肺移植モデル：全身麻酔下にドナー左肺を移植するモデルを作成した。右大腿動脈カテーテル、Swan-Ganzカテーテル、左房カテーテルを挿入し、肺動脈圧、肺血管抵抗、動脈血酸素分圧等を測定し、グラフト肺の機能を評価する手技を確立し、リンゲル液投与群でのデータ収集を継続した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kohno M, Watanabe M, Izumi Y,
Tasaka S, Kitagawa Y, Maruyama I,
Kobayashi K. Mitigation of occult lung
injury by pneumonectomy via
minithoracotomy in mice. *The Thoracic
and cardiovascular surgeon*
2012;60:124-130. [査読あり]

Kohno M, Steinbruchel DA. Median
sternotomy for double lung
transplantation with cardiopulmonary
bypass in seven consecutive patients.
Surgery today 2012;42:406-409. [査読
あり]

Duyverman AM*, Kohno M* (*equal
contribution), Roberge S, Fukumura D,
Duda DG, Jain RK. An isolated tumor
perfusion model in mice. *Nature
protocols* 2012;7:749-755. [査読あり]

Duyverman AM*, Kohno M* (*equal
contribution), Duda DG, Jain RK,
Fukumura D. A transient parabiosis
skin transplantation model in mice.
Nature protocols 2012;7:763-770. [査読
あり]

〔学会発表〕(計1件)

河野光智、後藤太一郎、大塚崇、安樂真
樹、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、
小林紘一. 術中出血に対するヘモグロビ
ン小胞体投与の効果と安全性 - 肺切
除+40%交換輸血モデルでの検討 -. 第
64 回日本胸部外科学会定期学術集会.
2011年10月12日. 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 光智 (KOHNO MITSUTOMO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号:10276272

(2)研究分担者

堀之内 宏久 (HORINOUCHI HIROHISA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号:60173647
(H22年~H23年参画)

野守 裕明 (NOMORI HIROAKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号:90146613
(H22年~H23年参画)

泉 陽太郎 (IZUMI YOTARO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号:90245506
(H22年~H23年参画)

(3)連携研究者

酒井 宏水 (SAKAI HIROSHI)
早稲田大学・重点領域研究機構・教授
研究者番号:70318830
(H22年~H23年参画)