

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390333

研究課題名(和文)肺移植臨床応用をめざした心停止ドナー肺の体外循環装置による肺傷害修復

研究課題名(英文) Experimental study to repair non-heart beating donor lung using ex-vivo lung perfusion for clinical application

研究代表者

伊達 洋至 (Date, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心停止ドナー肺を使用した肺移植臨床応用をめざし、心停止にともなう温虚血によって障害を受けたドナー肺を体外肺還流(ex-vivo lung perfusion, EVLP)によって修復した後、レシピエントに移植するものである。平成23年度は、常温でのEVLPが冷保存法よりも有用であることをビーグル犬左片肺移植モデルで証明した。平成24年度は、低温EVLPが心臓死ドナーからの障害肺を回復させることを、ラット肺灌流モデルで証明した。平成25年度は、比較的短時間(2時間)の低温EVLPが心臓死ドナーからの障害肺を回復させることをビーグル犬左片肺移植モデルを用いて証明した。

研究成果の概要(英文)：One of the main obstacles in performing cadaveric lung transplantation from brain dead donor is shortage of available donor, especially in Japan. The purpose of this experimental animal study was to establish a clinically applicable method for lung transplantation utilizing non-heart-beating donors. The donor lungs obtained after cardiac arrest without heparinization were repaired by ex-vivo lung perfusion (EVLP) and were implanted to the recipient animal. Three experimental studies were conducted during 2011-13. 1) EVLP provided better lung preservation than cold static preservation using a canine left lung transplantation model in 2011. 2) Hypothermic EVLP repaired warm ischemic lung injury in a rat perfusion model in 2012. 3) Short term hypothermic EVLP repaired warm ischemic lung injury in a canine left lung transplantation model in 2013.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学・呼吸器外科学

キーワード：心停止ドナー肺 肺移植

## 1. 研究開始当初の背景

日本においては、2010年9月末現在、173例の肺移植が実施された。その内訳は、脳死ドナー不足から、生体肺移植96例が脳死肺移植77例を上回っている。研究代表者は、岡山大学および京都大学において75例の肺移植(日本全体の43%)を実施し、5年生存率86.3%を報告してきた(Date, *J Thorac Cardiovasc Surg* 128:933, 2004, *Front Biosci* 13:1433, 2008)。これは、国際心肺移植学会の報告する5年生存率約50%を大きく上回っている。一方で、同期間に約700名の肺移植相談を受けたが、生体ドナーのいない多くの患者は、肺移植を受けることなく死亡した。2010年7月に臓器移植法が改正され、脳死ドナー数は、それまでの約5倍に増加した。しかしながら、すでに140名以上が日本臓器移植ネットワークに登録して待機していることを考えると、脳死ドナー不足が当面続くことは明白である。このような状況の中で、心停止ドナーからの肺移植は、ドナー不足を根本的に解決する可能性があり注目されている。肺は、血流が停止した後も肺胞内の酸素を利用して好気性代謝を継続することができる(Date, *J Thorac Cardiovasc Surg* 105:49, 1993)。したがって肺は、心停止後も他の臓器よりも長い時間 viability を保つことができる可能性がある。

欧米では、2001年にスウェーデンのSteenらによって、初めての心停止ドナーからの臨床肺移植が成功した。最近数年間で、米国、カナダ、イギリス、スペイン、ブラジルなどの複数の施設から心停止後ドナーからの肺移植成功例の報告が相次いだ。そして、その成績は、脳死ドナーからの肺移植と遜色ないとされている。しかしながら、これらの報告の大半では、重度の不可逆性脳傷害を受けた患者の人工呼吸器を停止し、心停止を待つ方法がとられており、日本において実施することは極めて困難である。

心停止した個体の肺は、心停止直後より発生する温虚血に加え、血管内血栓形成による肺傷害にさらされる。また、脳死・生体ドナーとは異なり、その発生時期は予測困難であり、短時間内にレシピエントの移植準備をすることは不可能である。したがって、肺を摘出した後も長時間の保存が必要である。さらに、動脈血酸素分圧などの肺機能評価に不可欠な検査を心停止ドナーに行うことは不可能であり、移植に先立って摘出肺の質的評価が必要となる。このように、心停止ドナーからの肺移植を日本で実現させる上で解決しなければならない問題も多い。

研究代表者は、心停止後ドナーからの肺移植に関する研究を1992年から岡山

大学において開始した。温虚血の対策として、犬左片肺モデルを使用して、心臓死ドナーの肺に定流量の酸素を流して inflate する方法の有効性(Kayano, *Date, Acta Med Okayama*, 4:329, 1993)、移植後に一酸化窒素吸入することの有効性(Takashima, *Date, Ann Thorac Surg* 70:1679, 2000)を証明した。血栓形成の対策として、肺灌流液にウロキナーゼ(Umemori, *Date, Ann Thorac Surg*, 59:1513, 1995)を混ぜることによる血栓溶解の効果、肺静脈からの逆行性灌流による残存血栓の除去の有用性(Hayama, *Date, J Thorac Cardiovasc Surg* 125:901, 2003)を証明した。さらに心臓死後にヘパリン(Okazaki, *Date, J Heart Lung Transplant* 25:454, 2006)及びウロキナーゼ(Sugimoto, *Date, J Heart Lung Transplant* 25:1148, 2006)を投与し、心臓マッサージを行う方法の有効性を証明した。

一方研究分担者らは、京都大学において、心停止ドナーからの肺移植に関する研究を1980年代後半から開始した。温虚血時間と肺内エネルギーの状態およびミトコンドリアの機能とアポトーシスの関係について検討を行った。薬剤の投与経路として、気道の存在という肺の特殊性に着目し、吸入投与を選択した。ATP依存性カリウムチャンネル開口薬である isoflurane の温虚血中の吸入投与がミトコンドリア傷害を抑制し、虚血再灌流傷害を軽減することを証明した(Fujinaga, *Transplantation* 82:1168, 2006)。さらに、虚血再灌流傷害における最初のターゲットが、血管内皮細胞の細胞間接着の破綻であることと、細胞内のcAMPの維持が細胞膜の安定性の維持に重要であることから、長期作用型 $\beta$ 受容体作動薬 salmeterol を温虚血中に吸入投与することで、肺内のcAMPを保持し、虚血再灌流傷害を軽減することを証明した(Chen, *Ann Thorac Surg* 82:465, 2006)。また、主に血管内皮保護、活性酸素の抑制という観点から、それまで世界標準であったEuro-Collins液より長期保存可能な肺保存液ET-Kyoto液を開発してきた(Bando, *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:92, 1994. Chen, *Yonsei Med J*, 45:1107, 2004)。

研究代表者が2007年に京都大学に異動してからは、基盤研究B(課題番号20390367)の交付を受け、実験を継続した。心停止ドナーから摘出した肺に関して、体外循環装置を用いた肺還流(Ex-vivo lung perfusion = EVLP)を大動物(ミニブタ)(Okamoto, *Date, Transplant Proc* 42:1958, 2010)および小動物(ラット)モデルで確立し、吸入療法の有効性(Zhang, *Date, J Heart Lung Transplant* 89:1773, 2009)、京都大学で独自に開発したET-Kyoto液の還流液としての有用性(投稿中)、肺還流中にサイトカインを除去す

る効果(Kakishita, Ann Thorac Surg 89:1773, 2010)などの検討を行った。

EVLP は、摘出肺を評価するだけでなく、摘出時にすでに存在する傷害を修復する可能性を持っている。つまり、肺還流により、必要な酸素・栄養・エネルギーの供給、微小血栓の溶解、間質に貯留した水分の除去、無気肺の改善、などが可能と思われる。Steenらは、2007年に、通常肺移植に使用できないほどの傷害を受けた脳死ドナー肺をEVLPで修復した後に移植することに成功した。そこで、本研究は、上記のこれまでの研究成果を進展させ、EVLPで評価および修復した心停止ドナー肺を大動物で移植することにより、臨床応用をめざすものである。

## 2. 研究の目的

日本における脳死ドナー不足は、臓器移植法が改正された後も続いている。心停止ドナーからの肺移植が可能となれば、多くの患者の救命につながる。体外循環装置を用いた肺還流(Ex-vivo lung perfusion = EVLP)は、ドナー肺機能を移植前に評価できるだけでなく、摘出時にすでに存在する傷害を修復する可能性を持っている。つまり、EVLPにより、必要な酸素・栄養・エネルギーの供給、微小血栓の溶解、間質に貯留した水分の除去、無気肺の改善、などが可能と思われる。そこで、心停止ドナーから摘出した大動物(ミニブタ)肺を体外で還流し、温虚血による傷害を修復することにより、肺移植臨床応用をめざすことを目的に実験を計画した。

## 2. 研究の方法

### 平成23年度の実験群と実験方法

体外肺循環EVLPによってドナー肺の傷害を修復する方法と、現在広く臨床で使用されている冷保存法を比較するために以下の2群を設定し、比較検討した。当初ミニブタを使用する予定であったが、入手困難となったため、ビーグル犬を使用して実験を行った。

- EVLP(Ex-vivo肺修復)群(n=6)  
心停止4時間後に摘出したドナー肺をEVLP回路にて、3.5時間の還流を行った。
- 冷保存群(n=6)

心停止4時間後に摘出したドナー肺をET-Kyoto液にて、3.5時間の冷保存(4)を行った。

両群とも、保存後左肺を分離し、これを別に準備したレシピエントの左肺として移植した。移植後、右肺動脈を閉塞し、移植肺の機能を4時間計測した。

### 平成24年度の実験群と実験方法

腎移植、肝移植では、低温持続還流Hypothermic EVLPの有用性が証明され

ていることから低温EVLPと、現在広く臨床で使用されている冷保存法を比較するために、以下の3群を比較検討した。当初は、大動物を使用する予定であったが、まずラット肺でその効果を確かめることとした。つまり平成25年度に、ビーグル犬を使用して低温EVLPの有用性を検討する前段階の実験として位置づけた。

- コントロール群(n=6)

虚血のない群

- 低温EVLP群(n=6)

心停止90分後に摘出したドナー肺を低温EVLP回路にて60分間還流し、さらに120分冷保存を行う。

- 冷保存群(n=6)

心停止90分後に摘出したドナー肺を180分間例保存する。

4時間後に摘出したドナー肺をET-Kyoto液にて、3.5時間の冷保存(4)を行った。両群とも、保存後左肺を分離し、これを別に準備したレシピエントの左肺として移植した。移植後、右肺動脈を閉塞し、移植肺の機能を4時間計測した。

### 平成25年度の実験群と実験方法

ビーグル犬左肺移植モデルを用いて、比較的短時間の低温EVLPの効果を検討した。

- 冷保存群(n=5)

心停止4時間後にドナー肺を摘出し、冷保存14時間を行った。

- 短時間低温EVLP群(n=5)

心停止4時間後にドナー肺を摘出し、冷保存12時間後に2時間の低温EVLPを行った。保存後、左肺をレシピエント犬に移植し、再灌流4時間までの機能を測定した。

## 3. 研究成果

### 平成23年度の研究成果

EVLP群では、PaO<sub>2</sub>は437±68 mmHgから558±35 mmHgにEVLP中に有意に改善し、冷保存群よりも移植後のPaO<sub>2</sub>、肺コンプライアンス、肺湿乾燥重量比、肺組織ATPが有意に良好であった。また、組織学的評価では、EVLPによって、微小血栓が減少していることが示された。

### 平成24年度の研究成果

EVLP群では、PaO<sub>2</sub>は437±68 mmHgから558±35 mmHgにEVLP中に有意に改善し、冷保存群よりも移植後のPaO<sub>2</sub>、肺コンプライアンス、肺湿乾燥重量比、肺組織ATPが有意に良好であった。また、組織学的評価では、EVLPによって、微小血栓が減少していることが示された。

### 平成25年度の研究成果

比較的短時間(2時間)の低温EVLPが心臓死ドナーからの障害肺を回復させることをビーグル犬左片肺移植モデルを用いて証明した。

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 8 件)

1. Ohsumi A, Chen F, Sakamoto J, Nakajima D, Kobayashi M, Bando T, Date H. Protective effect of surfactant inhalation against warm ischemic injury in an isolated rat lung ventilation model. PLoS One 2013 Aug 29;8(8):e72574. doi: 10.1371/journal.pone.0072574. eCollection 2013.
2. Motoyama H, Chen F, Ohsumi A, Hijiya K, Okita K, Nakajima D, Sakamoto J, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Bando T, Date H. Protective effect of plasmin in marginal donor lungs in *an ex vivo* lung perfusion model. J Heart Lung Transplant 2013 May; 32(5): 505-10. doi: 10.1016/j.healun.2013.02.007. Epub 2013 Mar 15.
3. Nakajima D, Chen F, Okita K, Motoyama H, Hijiya K, Ohsumi A, Sakamoto J, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Bando T, Date H. Reconditioning lungs donated after cardiac death using short-term hypothermic machine perfusion. Transplantation 2012 Nov 27;94(10):999-1004. doi: 10.1097/TP.0b013e31826f632e
4. Ohsumi A, Chen F, Nakajima D, Sakamoto J, Yamada T, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Therapeutic Effect of Surfactant Inhalation during Warm Ischemia in an Isolated Rat Lung Perfusion Model. Transpl Int 2012 Oct;25(10):1096-105. doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01532.x. Epub 2012 Jul 21.
5. Sakamoto J, Chen F, Nakajima D, Yamada T, Ohsumi A, Zhao X, Sakai H, Bando T, Date H. The effect of beta-2 adrenoreceptor agonist inhalation on lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model. J Heart Lung Transplant. 2012 Jul;31(7):773-9. Epub 2012 Apr 24.
6. Nakajima D, Chen F, Yamada T, Sakamoto J, Ohsumi A, Bando T, Date H. Reconditioning of The Lungs from Non-Heart-Beating Donors with Normothermic Ex Vivo Lung Perfusion. J Heart Lung Transplant 2012 Feb;31(2):187-93.
7. Sakamoto J, Chen F, Yamada T, Nakajima D, Ohsumi A, Kikuchi R, Zhao X, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Effect of pre-procurement ventilation on lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model. Transplantation 2011 Oct 27; 92(8): 864-70.
8. Nakajima D, Chen F, Yamada T, Sakamoto J, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Hypothermic machine perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in rat lungs from non-heart-beating donors. Transplantation 2011 Oct 27; 92(8): 858-63.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Nakajima D, Chen F, Okita K, Motoyama H, Hijiya K, Ohsumi A, Sakamoto J, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Bando T, Date H. Reconditioning of lungs donated after cardiac death with short-term hypothermic machine perfusion.

- CO10.02 XXIV International Congress of The Transplantation Society Berlin, Germany Jul 16-19, 2012
2. Motoyama H, Chen F, Ohsumi A, Hijiya K, Okita K, Nakajima D, Sakamoto J, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Bando T, Date H. Protective effect of plasmin for the non-heparinized donor lungs after cardiac death. PO10.36 XXIV International Congress of The Transplantation Society Berlin, Germany Jul 16-19, 2012
  3. Ohsumi A, Chen F, Nakajima D, Sakamoto J, Kobayashi M, Yamada T, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H. Prophylactic Surfactant Inhalation Attenuates Warm Ischemic Injury in Rat Lungs from Donation after Cardiac Death Donors. CO33.08 XXIV International Congress of The Transplantation Society Berlin, Germany Jul 16-19, 2012
  4. Jin Sakamoto, Fengshi Chen, Daisuke Nakajima, Tetsu Yamada, Akihiro Ohsumi, Takuji Fujinaga, Tsuyoshi Shoji, Hiroaki Sakai, Toru Bando, Hiroshi Date. Beta2-ADRENORECEPTOR AGONIST INHALATION AMELIORATES ISCHEMIA REPERFUSION INJURY FOLLOWING LUNG TRANSPLANTATION FROM NON-HEART-BEATING DONORS IN A CANINE MODEL. PB 5-2. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2011 September 26-28. Seoul.
  5. Akihiro Ohsumi, Fengshi Chen, Daisuke Nakajima, Jin Sakamoto, Tetsu Yamada, Takuji Fujinaga, Tsuyoshi Shoji, Hiroaki Sakai, Toru Bando, Hiroshi Date. Prophylactic surfactant inhalation ameliorates ischemia-reperfusion injury in rat lungs from donation after cardiac death donors. OB 5-3. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2011 September 26-28. Seoul.
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ等
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
伊達洋至(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 60252962
- (2)研究分担者  
小池薫(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 10267164
- 板東徹(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 20293954
- 阪井宏彰(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 50362489
- 陳 豊史(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 00452334
- 佐藤寿彦(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 40388822