

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592056

研究課題名(和文)改良型ET-K液による肺持続灌流保存の前臨床研究

研究課題名(英文)Pre-clinical study on pulmonary perfusion preservation using modified ET-Kyoto solutions

研究代表者

板東 徹(BANDO, TORU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20293954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：改良型ET-K液による肺持続灌流保存の臨床応用を目指して、温虚血後のラット肺・イヌ肺における持続灌流保存効果を体外灌流モデルを用いて検討した。その結果、血管収縮作用を軽減するためのK+を減量した改良型ET-K液、および液の粘稠度を下げるためにHESを添加しない改良型ET-K液も、十分な灌流保存効果を示さなかった。また、これらの欠点を補うために灌流液に洗浄赤血球を加えても、保存効果に有意な改善は認めなかった。以上の結果よりET-K液改良による肺持続灌流保存の実現には、さらなる検討・改良を要する。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of continuous perfusion on pulmonary preservation using a rat and a dog ex vivo perfusion models aiming at clinical application of modified ET-K solution as a perfusate. Neither a potassium-reduced ET-K nor an ET-K without HES demonstrated sufficient pulmonary preservation for reliable clinical practice. In addition, supplementation with red blood cells to the perfusion solution also failed to show any significant improvements of the preservation effect. A further extensive modification is needed for the clinical application.

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：呼吸器外科 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

臓器移植における臓器保存の目的は、虚血に陥った臓器の viability を維持することであり、その方法には単純冷却浸漬保存と持続灌流保存がある。単純冷却保存は、臓器を冷却することで組織の代謝を低く抑えて臓器傷害の軽減を図る方法であり、灌流保存は途絶した血流の代わりに灌流液を用いて臓器に必要な成分を補いながら、不要になった物質を取り除くことで傷害を抑える方法である。歴史的には 1960 年代に腎臓の灌流保存装置が開発されたが、当時の技術では装置が巨大で実用性に乏しく、手技・器具の簡便な単純冷却保存が臨床的に普及した。しかし、近年の周辺基盤技術の進歩により、充電式で小型のポータブル臓器灌流装置が開発され、すでに腎移植では臨床試験で有用性が報告されている。肺保存でも 2003 年にスウェーデンの Steen らが、肺の体外灌流装置を用いた持続灌流を報告し、2008 年にはカナダのトロント大学グループが、探索的医療として肺の灌流保存を報告した。持続灌流保存法は、今後、臓器の標準保存法となる可能性が期待されている。従来、こうした肺の持続灌流に用いられてきた灌流液は、Steen が開発した Steen 液が標準液として使用され、他の灌流液の検討はされていない。しかし、Steen 液は非常に高価であり、その成分も公表されていないため、今後の灌流保存の研究には適していない。

ET-K 液は、これまでラット、イヌの単純冷却肺保存実験で、他の臓器保存液よりも優れた肺保存効果を示した。また、2002 年以降は臨床肺移植における保存液としても使用され、有効性が確認されている。この ET-K 液の冷却保存における有効性に着目して、持続灌流保存における灌流液としての有効性を検討することを計画した。

## 2. 研究の目的

ラット・イヌ肺体外灌流モデルを用いて、ET-K 液の持続灌流保存効果の評価を行い、持続灌流保存に適した組成に改良を加え、将来の肺持続灌流保存の臨床応用化につなげる。

## 3. 研究の方法

(1) 持続灌流保存における灌流液至適 K<sup>+</sup>濃度の検討 : Lewis ラットを用いて、心停止を導入後、室温下に 90 分間放置した。90 分の温虚血後に両肺ブロックを摘出し、体外灌流回路に接続し、60 分間の低温持続灌流を行った。灌流液には ET-K 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 107/42 mEq/L) の K<sup>+</sup>濃度を減量した改変型 ET-K 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 149/5 mEq/L) を用いた。持続灌流中の換気抵抗、肺コンプライアンス、肺血管抵抗、肺重量を測定し、肺保存効果を評価した。

(2) 常温下持続灌流の灌流条件の検討 : Lewis ラットを用いて、心停止後に両肺ブ

ックを摘出し、体外灌流回路に接続し、安定した持続灌流を可能となるための条件を検討した。灌流液には従来型の ET-K 液を用いて評価した。

(3) 常温下持続灌流保存における灌流液至適 K<sup>+</sup>濃度の検討 : Lewis ラットを用いて、心停止を導入後、室温下に 90 分間放置した。90 分の温虚血後に両肺ブロックを摘出し、体外灌流回路に接続し、60 分間の常温持続灌流を行った。灌流液には改変型 ET-K 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 149/5 mEq/L) を用いた。持続灌流中の換気抵抗、肺コンプライアンス、肺血管抵抗、肺重量を測定し、肺保存効果を評価した。

(4) 持続灌流保存における灌流液中 HES の影響の検討 : Lewis ラットを用いて、心停止を導入後、室温下に 90 分間放置した。90 分の温虚血後に両肺ブロックを摘出し、体外灌流回路に接続し、60 分間の低温持続灌流を行った。灌流液には改変型 ET-K 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 149/5 mEq/L、3% HES 含有) と HES を加えない改変型 ET-K 液を用いた。持続灌流中の換気抵抗、肺コンプライアンス、肺血管抵抗、肺重量を測定し、肺保存効果を評価した。

(5) 持続灌流保存における灌流液中赤血球添加の効果の検討 : Lewis ラットを用いて、心停止を導入後、室温下に 90 分間放置した。90 分の温虚血後に両肺ブロックを摘出し、体外灌流回路に接続し、肺重量が 500 mg 増加するまで持続灌流を行った。灌流液には洗浄赤血球を添加した cellular 灌流液と赤血球を加えない acellular 灌流液を用いた。持続灌流中の肺コンプライアンス、肺血管抵抗、肺酸素化能、肺重量を測定し、肺保存効果を評価した。

(6) イヌ肺持続灌流保存における赤血球添加灌流液の検討 : ビーグル犬に心停止を導入し、室温下に 210 分間放置した。210 分の温虚血後に両肺ブロックを摘出し、体外循環回路に接続し、8 時間の持続灌流を行った。灌流液には洗浄赤血球を添加した cellular 灌流液と赤血球を加えない acellular 灌流液を用いた。持続灌流中の肺コンプライアンス、肺血管抵抗、肺酸素化能を測定し、肺保存効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 持続灌流液 K<sup>+</sup>濃度の検討結果 : K<sup>+</sup>濃度を減量した改変型 ET-K 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 149/5 mEq/L) を用いた持続灌流保存では、対照群の Steen 液 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = 138/6 mEq/L) と比較して同等の安定した換気抵抗、肺コンプライアンスを示し、肺血管抵抗は低値であったが、肺重量は増加し、肺水腫を認めた。ET-K 液では組成成分の 3% の HES を含有するため、特に低温下では液の粘稠度が高くなるのが肺水腫の原因と推測した。

(2) 常温持続灌流条件の検討結果 : 従来型 ET-K 液を用いた常温持続灌流にて、灌流条件 (10-11 ml/分) 換気条件 (60 回/分) が適切であることを確立した。

(3) 常温持続灌流における K<sup>+</sup>濃度の検討結果: K<sup>+</sup>濃度を減量した改変型 ET-K 液を用いた常温持続灌流保存では、対照群の Steen 液と比較して、有意に肺血管抵抗が高値を示し、また肺重量が増加し、肺水腫のため 60 分間の持続灌流を完遂できなかった。以上の結果から、ET-K 液の K<sup>+</sup>濃度を減量するだけでは、持続灌流保存効果は不十分であることが判明した。

(4) 灌流液中 HES の影響の検討結果: 低温下での灌流液の粘稠度を抑えるため HES を加えない改変型 ET-K 液を用いた持続灌流保存では、対照群の HES 含有液に比べて、有意に気道抵抗および肺血管抵抗の上昇を認め、高度の肺水腫を示した。以上の結果から HES は灌流液の粘稠度を増加させて、肺に悪影響を与える可能性がある一方、灌流液の膠質浸透圧を維持することで、灌流保存に有効であることが明らかになった。

(5) 持続灌流液中赤血球添加の効果の検討結果: 灌流液に赤血球を添加した cellular 群では、赤血球を含まない acellular 群と比較して、肺コンプライアンスの低下、肺水腫の進行において同等の結果を示し、肺血管抵抗では有意に高値を示した。一方では、acellular 群では、肺コンプライアンスが低下し、肺障害が生じているにもかかわらず、肺酸素化能は低下せず、肺機能の評価には不相当であることが判明した。以上の結果より、粘稠度を大きく増加させずに、膠質浸透圧を維持する目的で赤血球を添加しても、保存効果は不十分であることが推測された。

(6) イヌ肺持続灌流における赤血球添加液の検討結果: cellular 灌流液を用いた持続灌流保存では、酸素化能、肺血管抵抗は 8 時間の灌流中維持できたが、4 時間以降、肺コンプライアンスの有意な低下を認め、acellular 群と比べて、酸素化能、肺血管抵抗、肺コンプライアンスにおいて統計学的有意差を認めなかった。以上の結果より、改変型 cellular ET-K (K<sup>+</sup>濃度減量、HES 不添加、赤血球添加) による肺持続灌流保存効果は不十分であり、さらなる検討・改良を要すると思われた。

## 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 10 件)

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 8: e72574, 2013、査読有

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 32: 505-510, 2013、査読有

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 using short-term hypothermic machine perfusion, Transplantation 94: 999-1004, 2012、査読有

Ohsumi A, Chen F, Sakamoto J, Nakajima D, Hijiya K, Motoyama H, Okita K, Kikuchi R, Yamada T, Bando T, Date H, Protective effect of pre-recovery surfactant inhalation on lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model, J Heart Lung Transplant 31: 1136-1142, 2012、査読有

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, 25: 1096-1105, 2012、査読有

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 31: 773-779, 2012、査読有

Nakajima D, Chen F, Yamada T, Sakamoto J, Ohsumi A, Bando T, Date H, Reconditioning of lungs donated after circulatory death with normothermic ex vivo lung perfusion, J Heart Lung Transplant 31: 187-193, 2012、査読有

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 92: 858-863, 2011、査読有

Sakamoto J, Chen F, Yamada T, Nakajima D, Ohsumi A, Kikuchi R, Zhao X, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H, Effects of preprocurement ventilation on lungs donated after cardiac death in a canine lung transplantation model, Transplantation 92: 864-870, 2011、査読有

Okamoto T, Chen F, Zhang J, Choi H, Yamada T, Morikawa H, Nakayama E, Bando T, Date H, Comparison of ET-Kyoto solution and Perfadex as a preservation solution in a pig ex vivo lung perfusion model: impact of potassium level,

Transplant Proc 43: 1525-1528, 2011、査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

Kondo T, Chen F, Ohsumi A, Hijiya K, Motoyama H, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Bando T, Date H, Protective effect of beta-2 adrenoreceptor agonist inhalation during ex vivo lung perfusion, The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation, 2013.9.4. Kyoto, Japan

Motoyama H, Chen F, Ohsumi A, Hijiya K, Okita K, Kondo T, Nakajima D, Sakamoto J, Yamada T, Aoyama A, Sato M, Bando T, Date H, Protective effect of plasmin in marginal donor lungs in an ex vivo lung perfusion model, The 33rd Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, 2013.4.26, Montreal, Quebec, Canada

板東 徹、山田 徹、佐藤雅昭、青山晃博、陳 豊史、佐藤寿彦、園部 誠、大政 貢、松本いづみ、近藤 健、本山秀樹、土屋恭子、大角明宏、伊達洋至、我が国における肺移植の現状と課題、第 113 回日本外科学会定期学術集会、ワークショップ、2013.4.13、福岡

板東 徹、新たな臓器保存液開発への挑戦、ET-Kyoto 液、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、特別講演、2012.10.25、旭川

中島大輔、陳 豊史、尾北賢治、本山秀樹、土屋恭子、大角明宏、阪本 仁、山田 徹、佐藤雅昭、青山晃博、阪井宏彰、板東 徹、伊達洋至、肺移植における低温灌流保存法の確立、第 29 回日本呼吸器外科学会総会、2012.5.17、秋田

Nakajima D, Chen F, Okita K, Motoyama H, Hijiya K, Ohsumi A, Sakamoto J, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Sakai H, Bando T, Date H, Hypothermic machine perfusion for lung preservation: technical development in a canine model, The 32nd Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, 2012.4.18, Prague, Czech Republic

Sakamoto J, Chen F, Nakajima D, Yamada T, Ohsumi A, 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, The 32nd Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, 2012.4.18, Prague, Czech Republic

Nakajima D, Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H, Reconditioning of lungs from non-heart-beating donors with normothermic ex vivo lung perfusion, The 31st Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation,

2012.4.16, San Diego, USA

Nakajima D, Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Ohsumi A, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T, Date H, Hypothermic ex vivo perfusion prevents ischemia reperfusion injury in rat lungs from non-heart-beating donors, The 31st Annual Meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation, 2012.4.15, San Diego, USA

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 of the International Heart and Lung Transplantation, 2012.4.14, San Diego, USA

〔図書〕(計 1 件)

分担 板東 徹、臓器保存液の基礎。浅野武秀ら編集 移植のための臓器摘出と保存、p7-10、丸善出版、東京、2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 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

青山晃博 (AOYAMA AKIHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 60379047  
佐藤雅昭 ( SATO MASAOKI )  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 00623109

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：