

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659624

研究課題名(和文)脳死肺移植における新規ドナー肺モニタリングシステムの開発

研究課題名(英文)Development of lung monitoring system for brain death donor

研究代表者

野田 雅史(NODA, MASAFUMI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70400356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植後の急性拒絶反応は致死的である。これを未然に防ぐためには、肺移植後にドナー肺を経時的にモニタリングし、早急に急性拒絶反応を察知することが重要である。われわれは動物肺移植モデルを用いて肺胞上皮機能のモニタリングおよび肺胞上皮機能評価をおこなった。肺胞上皮の機能評価は、肺胞上皮が保持する電解質(ナトリウム)の輸送能および水分輸送能を観察した。その結果非拒絶反応モデルでは、移植後数日間は肺胞上皮機能が維持されたが、急性拒絶反応モデルでは、急性拒絶反応が顕在化する数日前に肺胞上皮機能が低下した。肺胞上皮機能をモニタリングすることで、早期に急性拒絶反応を予測し、治療することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Acute rejection after lung transplantation is lethal. We discovered a significant decrease in alveolar fluid clearance at 72hrs after animal lung transplantation by acute rejection models. On the other hand discovered a no significant change in alveolar fluid clearance at 72hrs after animal lung transplantation by non-acute rejection models. Monitoring of alveolar epithelial function after lung transplantation is useful for detection by acute rejection.

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 ドナー 脳死 肺胞上皮 ナトリウムチャンネル 急性拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

脳死下肺移植における術後急性期死亡率は10%超と非常に高く、その最大要因が primary graft failure (以下 PGF) であることが明らかにされている。PGF はドナー肺 viability 低下による移植肺機能不全であり、十分な肺 viability を有していると思われるドナー肺が移植後に十分機能しないだけでなく、むしろその機能が低下していき、最終的に不可逆性の呼吸不全に至る病態である。従って、ドナー肺そのものの viability 評価は移植前後を通じ、継続的且つ詳細に行われるべきである。現実の臨床現場において、このドナー肺 viability 評価は、臓器摘出手術前の画像所見、肺酸素化能を指標とした定性評価に基づき行われるが、一旦臓器摘出手術が開始されると、臓器搬送中の虚血時間も含め、移植が終了するまで、経時的に肺 viability を評価する方法は存在しない。以上よりこれらの問題を打開し、継続的且つ経時的にドナー肺 viability を評価する手法が必要であると考え。移植肺機能不全の最大の要因には急性拒絶反応、虚血再灌流障害などがあり、事実、急性拒絶反応モデル ; Brown Norway (BN) ラットをドナー、Lewis (LEW) ラットをレシピエントとする主要組織適合性抗原完全不適合の組み合わせで、同種性左片肺移植を行うと移植後3日目頃からリンパ球浸潤が始まり、移植後1週間で急性拒絶反応が完成する。我々は以前より肺 viability 評価法として、肺外血管水分量に極めて影響のある肺胞 II 型上皮機能、詳細には Na⁺ channel、Na⁺ K⁺ -ATPase に依存した肺胞上皮を介した能動的な水分輸送能 (肺胞水分クリアランス) に着目し、これらの定量化を試み、この肺胞水分クリアランスの維持が、移植成績に重要な影響を及ぼすことを報告してきた。そして、この肺胞 II 型上皮細胞の viability がステロイドホルモンにより up-regulation されることを mRNA レベルで証明してきた。翌年の NEJM の review にて、脳死ドナー臓器ケアに関し、肺移植においては肺胞上皮を介した肺胞水分クリアランスの重要性が報告され近年では Brimingham らのグループにより、ドナー肺胞上皮機能温存の観点からステロイド有無による臨床的ランダム化比較試験 (RCT) を行い、ドナー肺へのステロイド投与の有効性を、肺胞上皮を介した水分輸送の観点から報告している。しかしこのような現状のなか、実際の肺移植において肺胞上皮を介した能動的な水分輸送能を経時的にモニタリングした報告は未だ存在しない。

2. 研究の目的

脳死肺移植前後を通じ、簡便で定量的且つ

経時的にドナー肺 viability 評価するため、肺胞上皮を介した能動的な水分吸収能の経時的モニタリングシステムを確立し、肺移植急性期死亡の最大要因である PGF の早期解明に重要な知見を得ることを目的とする。これまで我々が動物実験で用いたラット fluid filled lung model は、実際のヒト臨床応用に関し、気道内液注入に伴う血液ガスの一時的悪化など臨床応用に懸念される点もあることから、臨床で既に用いられている経気管支鏡下マイクロサンプリング法を応用し、肺胞上皮を介した水分輸送能の定量評価法を試みると共に、ドナー肺の経時的機能評価を行うことを目的とする。肺移植急性拒絶反応における肺胞上皮を介した水分輸送能の推移を観察する。さらに不可逆性変化に陥る前段階でイオントランスポーターの遺伝子制御により PGF を制御することが可能か否かについて追及する。

3. 研究の方法

動物 (ラット及びブタ) を用い、急性拒絶反応モデル及び非拒絶反応モデルを作成した後全身麻酔導入し、人工呼吸器に装着、酸素濃度、気道内圧等換気条件を一定にして、状態を安定させた。続いて特殊に作成したマイクロサンプリングプローブにて、任意の気管支に wedge し気道上皮被覆液を採取した (control 群)。続いて、気道内より微量 (0.5ml/kg 以下) の肺胞被覆液 (150mM Na⁺, 5.5mM K⁺, 1.9mM Ca²⁺, 28mM lactate⁻, 5.5mM glucose, 5g/dl Albumin, 315mOsm/L, PH6.8) を含むマイクロサンプリングプローブを同部位の選択した気管支末梢を接触させ、30分後、1時間後、マイクロサンプリングプローブを用いて気道上皮被覆液 (ELF) 回収した。プローブ先端のファイバーロッドを切断、収納後検体を -80 ° に凍結保存した。続いて湿重量 (WW) 測定後、任意の生理食塩水に浸し、ELF を抽出した。プローブ乾燥後、ELF を含まない乾燥重量 (DW) を測定し、WW と DW の差から ELF の重量を求め、生理食塩水の量と ELF の量から希釈倍率を算出した (3ヶ所の平均値)。アルブミン濃度と電解質濃度を、自動解析装置 (TBA-80FR: 東芝) を用いて測定する。単位時間あたりに肺胞から吸収される水分吸収量を以下の式に従って算出する。

肺胞水分量 = $(V_i \times F_{wi} - V_f \times F_{wf}) / t$ を算出する。

V_i : 注入液の容積 F_w : 水分量の分画 t : 時間
 $V_f = (V_i \times P_i) / P_f$ P : アルブミン濃度

上記アプローチにて肺胞水分吸収能が Na⁺ channel を介した機能への影響を検討する

ため、肺胞被覆液に Na⁺channel 阻害剤アミロライド (10⁻⁴M) を添加した実験、アゴニストによる肺胞水分吸収の効果を確認するため刺激剤テルブタリン (10⁻³M) を添加した実験、ステロイドホルモンによる移植肺に対する肺胞水分吸収の効果を検討するためデキサメタゾン (0.2mg/kg) を添加し AFC を測定した。

4 . 研究成果

まず非拒絶反応モデルにおける肺移植が及ぼす影響 (虚血再灌流モデル) をみるためラットの基礎実験を行った。Brown Norway (BN) ラットをドナー、同系の BN ラットをレシピエントとする組み合わせで、同種性左片肺移植を行うと、非拒絶反応モデル肺移植による肺胞上皮を介した水分輸送能を検討すると、移植後 1 日目、2 日目、3 日目に肺胞水分吸収率 (%Alveolar Fluid Clearance) は非拒絶モデル 1 日目で 7.6±11.6%、2 日目で 15.0±8.1%、3 日目で 26.4±13.8% と時間が経過するにつれ経時的に増大した。一方で、急性拒絶反応が水分輸送に及ぼす影響をみるため Brown Norway (BN) ラットをドナー、Lewis (LEW) ラットをレシピエントとする主要組織適合性抗原完全不適合の組み合わせで、同種性左片肺移植を行い、拒絶反応モデル肺移植による肺胞上皮を介した水分輸送能を検討すると、移植後 1 日目、2 日目、3 日目の肺胞水分吸収率 (%Alveolar Fluid Clearance) は拒絶反応モデル 1 日目で 26.6±12.3%、2 日目で 21.1±12.0%、3 日目で 10.8±14.6% と経時的に低下した。以上より肺移植急性拒絶反応により肺胞上皮を介した水分輸送能の低下がもたらされる可能性がある。この輸送能の低下はステロイド及び刺激剤投与により機能が保持され、更に免疫組織学的検討よりこの原因が肺胞型細胞に存在する sodium channel の機能低下が関与することが示唆された。同様の実験をブタ拒絶反応肺移植モデルを作成し、in vivo で肺胞上皮を介した水分輸送能を検討すると、ラット肺移植モデルと類似した結果が得られた。肺移植後に肺胞上皮を介した水分輸送を本アプローチを用いて経時的にモニタリングすることで、早期に肺移植後急性拒絶反応を検出し得る可能性が示唆された。

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 9 件)

Contralateral pulmonary artery banding after single lobar lung transplantation.

Watanabe T, Okada Y, Adachi O, Sado T, Toyama H, Noda M, Hoshikawa Y, Oishi H, Sasahara Y, Saiki Y, Kondo T.

Ann Thorac Surg. 2014 Apr;97(4):1429-31. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.07.030.

査読あり

p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells.

Notsuda H, Sakurada A, Endo C, Okada Y, Horii A, Shima H, Kondo T.

Int J Oncol. 2013 Nov;43(5):1569-77. doi: 10.3892/ijo.2013.2096.

査読あり

Awake video-thoracoscopic surgery for intractable pneumothorax in pregnancy by using a single portal plus puncture.

Onodera K, Noda M, Okada Y, Kondo T.

Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 Aug;17(2):438-40. doi:

10.1093/icvts/ivt205.

査読あり

Reconstruction of pulmonary artery with donor aorta and autopericardium in lung transplantation.

Noda M, Okada Y, Saiki Y, Sado T, Hoshikawa Y, Endo C, Sakurada A, Maeda S, Oishi H, Kondo T.

Ann Thorac Surg. 2013 Jul;96(1):e17-9.

doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.01.029.

査読あり

Registry of the Japanese society of lung and heart-lung transplantation: the

official Japanese lung transplantation report 2012.

Oto T, Okada Y, Bando T, Minami M, Shiraishi T, Nagayasu T, Chida M, Okumura M, Date H, Miyoshi S, Kondo T; Japanese Society of Lung and Heart-Lung Transplantation.

Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Apr;61(4):208-11. doi: 10.1007/s11748-013-0215-7. Epub 2013 Feb 26.

査読あり

Presented at the 64th Annual Scientific Meeting of the Japanese Association for thoracic surgery: wet-lab training for thoracic surgery at the laboratory animal facilities.

Noda M, Mizuma M, Maeda S, Sakurada A, Hoshikawa Y, Endo C, Okada Y, Unno M, Kasai N, Kondo T.

Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Nov;60(11):756-9. doi: 10.1007/s11748-012-0134-z. Epub 2012 Aug 12.

査読あり

Successful management of intractable chylothorax in Gorham-Stout disease by awake thoracoscopic surgery.

Noda M, Endo C, Hoshikawa Y, Ishibashi N, Suzuki T, Okada Y, Kondo T.

Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Jun;61(6):356-8. doi: 10.1007/s11748-012-0130-3.

査読あり

1port & 1puncture 法による胸腔鏡下ブラ切除の経験

小野寺賢 野田雅史 三友英紀 前田寿美子 岡田克典 近藤丘 日本呼吸器外科学会雑誌 2012 27 巻 2号 187-190

査読あり

難治性気胸に対する再手術

野田雅史 近藤丘

胸部外科 2013 66 715-720_

査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

野田雅史 難治性呼吸器疾患の治療アプローチ-外科治療とインターベンション 第 53 回 日本呼吸器病学会 2013 年 4 月 20 日 東京

新井川弘道 脳死肺移植における CMV 感染のマネージメント 第 29 回日本肺及び心肺移植研究会 2013 年 1 月 26 日 千葉

佐渡哲 脳死肺移植後の再手術の状況 第 29 回日本肺及び心肺移植研究会 2013 年 1 月 26 日 千葉

石橋直也 間葉系幹細胞投与による肺移植後急性拒絶反応抑制に関する実験的検討 第 29 回日本肺及び心肺移植研究会 2013 年 1 月 26 日 千葉

岡田克典 肺リンパ脈管筋腫症に対する脳死肺移植の成績と問題点 第 48 回日本移植学会総会 2012 年 9 月 21 日

佐渡哲 肺移植術後管理における持続的血液濾過透析導入に関する検討 第 48 回 日本移植学会総会 2012 年 9 月 21 日

〔図書〕(計 1 件)

Annual Review 呼吸器 中外医学社
LAM における脳死肺移植の現状 野田雅史 岡田克典 近藤丘 294 (236-241) 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 雅史 (NODA, MASAFUMI)

東北大学・大学病院・講師
研究者番号：70400356

(2)研究分担者

佐渡 哲 (SADO, TETSU)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：20396485

岡田 克典 (OKADA, YOSHINORI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号：90323104

近藤 丘 (KONDO, TAKASHI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：10195901