

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461965

研究課題名(和文)ミニブタ脳死ドナー/臓器への一酸化炭素投与の移植臓器生着延長効果と臓器間の相違

研究課題名(英文)Effects of carbon monoxide inhalation on allograft survival of the lung or kidney from brain death donors in miniature swine.

研究代表者

平方 敦史 (HIRAKARA, Atsushi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40468765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素COの細胞保護効果が知られるなか、有毒ガスCOの臨床応用には大動物による検討が必須であると考え、CO吸入による肺IRI抑制効果や、移植肺生着延長効果を大動物で初めて報告した。今回、臨床移植医療での応用性が高い手法を開発する前臨床大動物実験として、1)脳死ドナーに対するCO投与効果、2)ドナー灌流保存中のCO投与効果を検討した。実験の結果、脳死ドナー投与のみで肺移植モデルでは有意な生着延長効果が得られ、またドナー灌流保存時のCO投与によるIRI抑制効果を示した。一方、腎臓では肺と同様の効果は得られず、臓器間での有効なCO投与法や量が異なる可能性など、今後の検討課題が明確となった。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that perioperative carbon monoxide (CO) inhalation to both donor and recipient prolongs lung graft survival in MHC-inbred CLAWN swine. The systemic physiologic changes during and after brain death (BD) would affect the suitability of organs for transplantation; therefore, donor treatment might be an approach to improve the quality of the graft. In this study, we examined whether donor BD affects lung or kidney allograft survival and CO inhalation improves functions and survival of lung grafts from BD donors using large animal. CO inhalation after confirmation of brain death exerts cytoprotective effects on inflammatory graft damage, which led to improve not only early function but survival of only the lung graft.

研究分野：外科学一般

キーワード：移植・再生医療 肺移植 腎移植 マージナルドナー 臓器保護 前臨床実験 ミニブタ 一酸化炭素

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ドナー臓器保護戦略の重要性

2010年7月の臓器移植法改正後に脳死ドナーは増加傾向を示し、2011年には約200件の脳死下移植が行われたが、米国の移植約3万件に比べドナー不足は依然深刻である。対策として、より条件の悪い拡大適応ドナー (extended-criteria donor: ECD) や心停止ドナー (donation after cardiac death: DCD) からの移植が進められているが、脳死に付随する炎症の活性化、凝固障害、不安定な循環・内分泌代謝などによる臓器傷害が通常より強いECDドナーや、温虚血時間が不可避のDCDドナーへの適応拡大は、虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury: IRI) による急性臓器不全や、更には免疫学的因子の活性化による急性・慢性拒絶増加が懸念される。従って、ドナー臓器を適切なコンディションに保つことは、臓器利用率増加によるドナー拡大のみならず、移植医療の成績向上に直結する。

### (2) 一酸化炭素 CO によるドナー臓器保護戦略に基づくこれまでの成果と腹部臓器移植への展開

有毒ガス CO が生体内情報伝達物質として働き、また抗炎症や抗アポシスなどの細胞保護作用を持つことが報告され移植医療への応用が期待されている。鹿児島大学大動物移植実験チーム (研究分担者) は前臨床ミニブタ肺移植実験から、CO 吸入が IRI 抑制・移植肺の生着延長効果を有し (Sahara H. *J Thorac Cardiovasc Surg & Transplantation* 2010)、更にドナー個体への CO 吸入が効果の鍵を握ることを示した (Sahara H. *Organ Biology* 2012)。申請者はこれまでの大動物移植実験から、CO 効果は腹部臓器移植分野への展開が可能であると考え、CO 吸入の多臓器移植モデルでの効果を検討し、急性期障害に加え長期成績にまで効果を及ぼす、ドナー臓器保護作用に基づく新たな治療法の確立をはかる計画を立案した。

## 2. 研究の目的

【本研究で明らかにする点：ドナーあるいはドナー臓器への一酸化炭素 CO 投与は、多臓器で虚血再灌流傷害 IRI 抑制ならびに移植後臓器生着の延長効果を有するか？】

これまでの申請者の研究チームが示した MHC 完全不適合ミニブタ肺移植時の CO 吸入による移植肺生着延長効果は、CO が移植医療への高い応用性を有することを示唆され、脳死ドナーへの CO 投与は、新しい臓器保護法として極めて有力な臨床応用性をもつことが期待されるが、臨床応用を考えるに際しては、有効性ととも、多臓器において CO 投与がむしろ臓器生着を損ねる因子とならないかを慎重に評価する必要がある。そこで、これまで検討されていない脳死ミニブタへの CO 投与による IRI 抑制ならびに移植臓器生着延長効果を腹部・胸部臓器移植で評価する (目

的 1)。脳死ドナーへの CO 投与の臨床応用性は高いと考えられるものの、ドナー臓器摘出後に CO を投与することによっても同様の効果が得られれば、臨床応用性は更に高まることが期待される。そこで、近年着目をあびるドナー臓器の体外灌流保存中に CO 投与を行った後に腎臓・肺移植を行い、目的 1 と同様の治療効果が得られるかについて明らかにする (目的 2)。

## 3. 研究の方法

### 目的 1：脳死ミニブタへの CO 投与による IRI 抑制・移植臓器生着延長効果の多臓器移植での評価

脳死確立3時間後に CO 吸入を3時間行い、脳死後の炎症反応亢進や循環動態変動による臓器組織傷害惹起後の CO 投与で、(1) 吸入 CO の多臓器 (肺・腎・肝臓等) への分布、(2) CO 吸入臓器を用いた臓器移植による急性期 IRI や、長期臓器生着に対する効果を評価する。

\*当初は脳死 18 時間後から 6 時間の CO 投与を行う予定であったが、準備実験で、脳死 3 時間後には肺内での炎症性サイトカイン上昇を認めること、これまでの実験で 3 時間のドナーへの CO 吸入で効果が得られたことから計画を変更した。

### 【目的 2：脳死ドナー臓器の体外灌流保存中の CO 投与による治療効果の検討】

近年新たな臓器保存方法として、臨床移植領域での体外循環回路を用いた常温臓器保存法が注目されるが、この方法の大きな特徴として、ドナー臓器に対する移植前の preconditioning として臓器保護作用を持つ補助治療を追加することが可能になる点 (臓器修復) があげられる。目的 1 ではドナー個体への CO 投与効果を検討したが、臓器への直接 CO 投与によっても同様の治療効果が得られるのであれば、臨床応用性は飛躍的に高まるものと期待される。そこで、目的 1 に準じ、脳死 3 時間を経た動物から臓器を摘出し、既に確立した手法で 3 時間の灌流保存を行った後に CO 投与を行い、非投与症例との間で腎・肺移植後成績の比較を行う (各群 n=3)。腎体外循環保存：摘出腎臓の腎動脈、静脈、尿管にカニューレーションを行い、平均動脈圧 80-85mmHg で灌流を行う。95%酸素で酸素化した自己赤血球を 0.5L/分で灌流する。肺体外循環保存：肺動脈、肺静脈にカニューレを逢着し、体外循環回路に接続し血液灌流を開始する。段階的に灌流量を増やし、30 に復温後、一回換気量 10ml/kg、換気回数 20 回/分、PEEP5cmH2O で換気を開始する。灌流液は市販の Steen 液に自己赤血球を混ぜ Ht15-20%とする。

移植動物・移植手技・移植臓器機能評価：MHC 完全不適合クラウンミニブタ C1 をドナー、C2 をレシピエントとし、既に申請者の研究室で確立した腎移植・肺移植を行う。脳死誘

導・確認 18 時間後、360 分間 CO 吸入あるいは CO 無治療後に臓器を摘出し移植を行う。12 日間の持続タクロリムス投与(血中濃度: 35-45 ng/ml)を唯一の免疫抑制療法として用い、移植臓器生存を画像、血液機能(Cre)、グラフト肺静脈血ガス分析、定期的な生検を評価する。

脳死誘導: 硬膜外バルーン拡張により脳死を誘導する。本手法で誘導した脳死 3 時間後には血清炎症性サイトカイン(IL-1/IL-6)・組織内 mRNA の発現増加を準備実験で確認している。

CO 吸入: 気道内に 250 ppm で吸入し、血中 COHb 濃度を定期モニターする。これまでの実験で、250 ppm では COHb は 15 %前後\*に維持され、390 分間の吸入でも副作用が生じないことを確認している。(\*効果が不十分の際は、高濃度 CO 投与による炎症制御効果増強という小動物実験結果(Otterbein LE. Nat Med 2000)から、濃度を 500 ppm とし、追加評価する)。

移植臓器の画像的評価・生検による病理学的評価: 移植後 2 時間、2、7、14、28 日、以後 4 週毎にグラフト生検を行い、病理学的評価を行う。腎移植は腹部超音波検査、肺移植は胸部 X 線を併用する。

移植臓器・血液の細胞学的・免疫学的解析および炎症性変化評価。

#### 4. 研究成果

脳死ミニプタへの CO 投与による IRI 抑制・移植臓器生着延長効果の多臓器移植での評価を目的とした実験として、7 頭のクラウンミニプタに対し、12 日間持続タクロリムス投与下に MHC 完全不適合肺移植を行った。硬膜外バルーン拡張による脳死誘導 3 時間後からドナーに対し 250ppm の CO 吸入を 3 時間行った BD+CO 群 (n=4) と、CO 吸入を行わない脳死誘導 6 時間後のドナー肺を用いた BD 群 (n=3) に分類し、移植肺生着および術後早期の機能を評価した\*。まず BD 群では、これまでの自験例である非脳死ドナーからの肺移植に比べ、有意に拒絶反応が促進することを確認した。一方、BD+CO 群では生着期間は BD 群に対し有意に延長した。更に、脳死 3 時間までに上昇を始めたグラフト内炎症性サイトカイン発現は CO 投与により著明に抑制されること、BD+CO 群では移植肺静脈 PO2 は BD 群より有意に良好であること、組織学的にも再灌流 2 時間および 2 日目の肺生検で、IRI の抑制を認めた。このように、脳死ドナーに対する CO 吸入がもたらす臓器保護作用が早期移植肺機能改善のみならず長期生着延長に寄与することが大動物モデルで明らかとなった(目的 1)。

また脳死 3 時間を経た動物から肺を摘出し、3 時間体外灌流保存を行い、その間に 3 時間の CO 吸入を行った後に肺移植を行ったところ、術後 IRI の軽減効果が得られた(目的 2)。

一方、腎臓での効果検証実験として、脳死

後 6 時間を経た腎臓を用いて MHC 完全不適合間腎移植を行うモデルを用い、脳死後 3 時間を経たドナーに対し 3 時間 CO 吸入(血中 COHb 濃度は 15-20%に維持)を行った。CO 吸入を行わない移植症例と比べ、3 時間の CO 吸入は術後早期のクレアチニン値の比較において明らかな改善を認めなかった。上述のように、肺移植実験では、この CO 投与方法により有意な移植肺生着延長効果が見られたことと相反する結果であった。臓器間での効果の相違という結果から、肺移植に比べ腎移植では脳死後 6 時間での臓器内炎症性サイトカイン発現が低値であり CO による有効な抗炎症効果が働かなかった可能性、腎臓と肺での抗原提示細胞数の違い、臓器間での有効な CO 投与方法や投与量が異なる可能性など、本モデルでは有効な効果が得られなかったことに対する考察点が挙げられ、更なる研究進展への道筋を得た。さらに PCPS 装置を用い、至適灌流液、血液含有量、流量を中心とした腎臓持続体外灌流保存法の確立を、既報の論文に準ずる方法により確立していることから、腎臓における CO 吸入効果が確認された後、灌流装置中に CO を付加することによって、脳死ドナー腎移植モデルでの CO 投与効果を明らかにする方針である。

#### 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 3 件)

山田和彦, 佐原寿史. 大動物を用いた前臨床虚血再灌流障害モデルの作製とマージナルドナー活用戦略. Organ Biology. 2013;20(2): 42-50

Miura K, Sahara H, Sekijima M, Kawai A, Waki S, Nishimura H, Setoyama K, Clayman ES, Shimizu A, Yamada K. Protective effect of neutralization of the extracellular high-mobility group box-1 on renal ischemia-reperfusion injury in miniature swine. Transplantation. 2014. Nov 15;98(9):937-43.

佐原寿史, 関島光裕, 山田和彦. 特集「毒ガス?いいえ治療薬です」.【新たな治療薬としての一酸化炭素への期待】. 臨床麻酔. 2015;39(6):855-864.

[学会発表](計 7 件)

Sahara H, Miura K, Waki S, Kawai A, Shimizu A, Yamada K. Establishment of clinically applicable strategy of CO therapy - Beneficial effects of inhaled carbon monoxide to brain-dead donors on prolonging pulmonary allograft survival in MHC-inbred

CLAWN miniature swine. World Transplant Congress 2014. 2014.7.28-31 (29). San Francisco, CA, US

Miura K, Sahara H, Waki S, Kawai A, Shimizu A, Yamada K. Beneficial effects of inhaled carbon monoxide (CO) to brain-dead (BD) donors on prolonging pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013.9.3-6 (4). Kyoto, Japan

佐原寿史. MHC 確立クラウンミニブタによる新規治療・医療機器開発を目指す前臨床試験. BIO tech 2014 アカデミーフォーラム. 2014.5.14-16 (16). 東京(東京ビッグサイト)

佐原寿史, 山田和彦. シンポジウム「医用ミニブタを用いた前臨床研究」. クラウンミニブタを用いた移植モデルと Medical Gas. 第3回公開シンポジウム 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト. 2015.3.25. 鹿児島市(鹿児島大学農・獣医共通教育棟1階101講義室)

山田和彦. シンポジウム2「実験用ブタ施設の現状と今後の動向」高度前臨床移植実験: 医用ミニブタを用いた大動物実験として果たすべき役割と課題. 第3回日本先進医工学ブタ研究会. 2015.10.16-17 (16). 東京(日大会館)

佐原寿史, 関島光裕, 岩永健裕, 市成ゆりか, 山田和彦. シンポジウム5「実験用ブタを用いた各種応用研究」Medical Gas を用いた新たな移植医療: 硫化水素の有用性. 第3回日本先進医工学ブタ研究会. 2015.10.16-17 (17). 東京(日大会館)

Sahara H, Iwanaga T, Sekijima M, Waki S, Ichinari Y, Shimizu A, Yamada K. MHC-inbred CLAWN miniature swine as preclinical large animal model for transplantation. The 14th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2015.8.23-26 (26). Singapore, Singapore

〔図書〕(計0件)

〔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  
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xeno tx/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平方 敦史 (HIRAKATA, Atsushi)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40468765

### (2) 研究分担者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・教授  
研究者番号: 40241103

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター・准教授  
研究者番号: 90452333

### (3) 連携研究者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00256942