

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293315

研究課題名(和文)心停止ドナーからの肺移植実現をめざした体外循環装置中吸入療法による肺傷害修復実験

研究課題名(英文)Lung repair by inhalation therapy during ex-vivo lung perfusion for lung transplantation from donation after circulatory death

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) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本での脳死ドナー不足は深刻であり、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、肺傷害を修復できる可能性を持っている。そこで、心停止ドナーから摘出したビーグル犬肺を体外で還流し、吸入療法を付加し温虚血による傷害を修復する実験を行った。EVLP中にプロカテロール(β -2 adrenoceptor agonist)あるいは、サーファクタント吸入を行うことにより、温虚血傷害が優位に抑制されることが証明された。この結果は、心停止ドナーからの肺移植の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Severe shortage of brain dead donor is unsolved problem in Japan. Lung transplantation from donation after circulatory arrest (DCD) may increase the donor pool. Ex-vivo lung perfusion (EVLP) is a potential modality to repair lung injury caused by warm ischemic change. Beagle lungs were harvested 150 minutes after circulatory arrest and perfused by EVLP for 4 hours and these lungs were implanted to the recipient animal. Inhalation with β -2 adrenoceptor agonist and surfactant during EVLP significantly improved lung function after transplantation. These results suggested that lung transplantation for DCD donor is possible.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：lung transplantation ex-vivo lung perfusion inhalation therapy circulatory death surfactant

1. 研究開始当初の背景

日本においては、2013年9月末現在、324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141例が脳死肺移植183例に肉薄している。研究代表者は、岡山大学および京都大学において131例の肺移植(日本全体の40%)を実施し、5年生存率81.7%を報告してきた(Date, J Thorac Cardiovasc Surg 128:933, 2004, Front Biosci 13:1433, 2008, Curr Opin Organ Transplant 16:453, 2011)。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1,000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倍に増加したが、すでに210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、脳死ドナー不足が今後も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。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、カナダ、米国、ベルギー、イギリス、スペイン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よりもむしろ良好であった。しかしながら、これらの報告のほとんどは、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。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(平成20年課題番号20390367、平成23年課題番号23390333)の交付を受け、心停止ドナー実験を継続した。そして、体外循環装置を用いた肺還流(Ex-vivo lung perfusion = EVLP)を大動物(ブタ、ビーグル犬)モデルで確立した(Okamoto, Date, Transplant Proc 42:1958, 2010)。これによって、移植に先立って摘出肺の質的評価が可能となった。

この大動物EVLPの実験系を使って、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(Okamoto, Date, Transplant Proc 43:1525, 2011)を示した。さらに、広く用いられてきた冷保存法よりも常温でのEVLPによる保存法の方が肺機能を良好に維持できることを示した(Nakajima, Date, J Heart Lung Transplant 31:187, 2012)。この実験(ビーグル犬モデル)では、EVLPによって肺組織中のATPが回復すること、毛細血管内に形成されていた微小血栓が減少することも示した。つまり、EVLPによって摘出肺の質的評価が可能であること、エネルギーの供給ができること、微小血栓が除去できることが証明された。

また、同時に、大動物(ビーグル犬)を用いた左片肺移植を確立した。心停止ドナー肺の換気の有効性(Sakamoto, Date, Transplantation 92:864, 2011)、 α -2 adrenoreceptor agonist吸入の有効性(Sakamoto, Date, J Heart Lung Transplant 31:773-9, 2012)、サーファクタント吸入の有効性(Ohsumi, Date, J Heart Lung Transplant 31:1136, 2012)を証明した。吸入療法は、肺特有の薬物投与経路である気道を利用したものであり、全身への影響が少ないという特徴を有している。

このように、大動物による、EVLPおよび左片肺移植モデルが確立しており、この二つを組み合わせると、臨床肺移植により近い実験が可能となる。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。また、EVLP中に吸入療法を行えば、ドナー及びレシピエントの肺以外の臓器への影響がない。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

日本での脳死ドナー不足は深刻であり、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、摘出時にすでに存在する肺傷害を修復でき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。また、肺特有の薬物投与ルートである気道を利用した吸入療法の有用性を我々は報告してきた。そこで、心停止ドナーから摘出した大動物(ビーグル犬)肺を体外で還流し、吸入療法を付加し温虚血による傷害を修復することにより心停止ドナーからの肺移植を可能にすることを目的に実験を計画した。

3. 研究の方法

平成 26-27 年にかけて以下の実験を行った
【方法】 イヌ肺に 150 分温虚血を作成後、EVLP 120 分施行し、EVLP 中のネブライザーによる経気道的介入により 2 群(各 n=5)を作成した。control 群: control 溶媒を経気道投与。beta 群: プロカテロール 1400 µg を経気道投与。EVLP 終了後左肺を移植し、再灌流後 240 分において評価した。EVLP 中と移植後の生理学的データを検討した。【結果】 EVLP 中の生理学的指標の変化量は、beta 群が有意に compliance 低下の程度が少なく ($p < 0.001$)、肺血管抵抗上昇の程度が少なかった ($p < 0.001$)。移植 240 分後は全例生存していたが beta 群が有意に酸素化能良好 ($p < 0.001$)、compliance 高値 ($p < 0.001$)、肺血管抵抗低値 ($p < 0.001$)、乾湿重量比低値 ($p < 0.001$) と良好な結果であり、副作用としての頻脈は認めず、むしろ control 群で有意に脈拍数が多かった ($p < 0.001$)。

平成 27-28 年にかけて以下の実験を行った
【方法】ビーグル犬に対して KCl を用いて心停止を導入し、室温で安置した。ビーグル犬を生理食塩水の吸入を行う生食群 ($n=7$) とサーファクタント群 ($n=5$) の 2 群に無作為に分け、4 時間後の換気再開と同時に吸入を施行した。5 時間冷保存の後、左肺全摘・片肺移植を行い、ドナー肺を再灌流した。再灌流 45 分後に右肺動脈を遮断し、再灌流 240 分後までの移植肺の評価を行った。【結果】温虚血中の吸入後、生食群の動肺コンプライアンスは変化しなかったが、サーファクタント群では有意に上昇した。再灌流後、生食群 2 例が 75 分後に重篤な肺水腫により死亡したが、サーファクタント群は 4 時間後まで全例生存した。再灌流 4 時間後の動肺コンプラ

イアンス、肺酸素化能、A-aDO₂、肺内シャント率、肺組織湿乾重量比はいずれもサーファクタント群で有意に改善した。肺組織中の ATP 含量はサーファクタント群で有意に高値であった。気管支肺胞洗浄液中の IL-8、TNF- α およびタンパク量は共にサーファクタント群で有意に低値であった。MPO 活性はサーファクタント群で有意に低値であった。組織学的に、サーファクタント群は生食群に比して、間質の浮腫・出血、好中球浸潤は軽度であった。

4. 研究成果

EVLP 中にプロカテロール (β_2 adrenoreceptor agonist) あるいは、サーファクタント吸入を行うことにより、温虚血傷害が優位に抑制されることが証明された。この結果は、心停止ドナーからの肺移植の可能性を示唆するものである。

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 5 件)

1. Motoyama H, **Chen F**, Hijiya K, Kondo T, Ohsumi A, Yamada T, Sato M, **Aoyama A**, Bando T, **Date H**. Plasmin administration during ex vivo lung perfusion ameliorates lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 33(10):1093-9, 2014
2. **Date H**, Sato M, **Aoyama A**, Yamada T, Mizota T, Kinoshita H, Handa T, Tanizawa K, Chin K, Minakata K, **Chen F**. Living-donor lobar lung transplantation provides similar survival to cadaveric lung transplantation even for very ill patients. *Eur J Cardiovasc Surg* 47(6):967-73, 2015
3. Motoyama H, Chen F, Hijiya K, Kondo T, Ohata K, Takahashi M, Yamada T, Sato M, Aoyama A, **Date H**. Novel thermographic detection of regional malperfusion caused by a thrombosis during ex vivo lung perfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 20(2):242-7, 2015
4. **Yamada T**, **Chen F**, Sakamoto J, Nakajima D, Ohsumi A, Bando T, **Date H**. Impact of the cardiac arrest mode on cardiac death donor lungs. *J Surg Res* 195(2):596-603, 2015
5. **Date H**. Current status and problems of lung transplantation in Japan. *J Thorac D* 8(Suppl 8):S631-6,

2016

〔学会発表〕(計 5 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊達洋至 (DATE Hiroshi)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・教授
研究者番号：6 0 2 5 2 9 6 2

(2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE Kaoru)
京都大学大学院医学研究科救急医療・教授
研究者番号：1 0 2 6 7 1 6 4

陳 豊史 (CHIN Toyofumi)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・講師
研究者番号：0 0 4 5 2 3 3 4
青山晃博 (AOYAMA Akihiro)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・講師
研究者番号：6 0 3 7 9 0 4 7

佐藤寿彦 (SATO Toshihiko)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・助教
研究者番号：4 0 3 8 8 8 2 2

佐藤雅昭 (SATO Masaaki)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・助教
研究者番号：0 0 6 2 3 1 0 9

山田 徹 (SAMADA Tetsu)
京都大学大学院医学研究科呼吸器外科・助教
研究者番号：9 0 5 3 4 3 4 7

(3) 連携研究者
なし
(4) 研究協力者
なし

()