

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861121

研究課題名(和文) Ex vivo lung perfusionを用いた新しい臓器保存法の確立

研究課題名(英文) New organ preservation method using modified Ex vivo lung perfusion

研究代表者

田中 雄悟 (Tanaka, Yugo)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20403256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植における臓器保存は冷保存が一般的であるが、近年Ex vivo lung perfusion (EVLP) が臨床応用されている。我々は、これまでEVLPで重要視されていなかった気管支動脈にも還流液を流すシステム (Dual EVLPシステム) を考案し、その効果を検証した。その結果、Airway Hypoxia の克服、肺組織のmetabolism の改善により我々の方法が従来よりも良好な臓器保存法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the feasibility of dual-perfusion techniques with the bronchial artery circulation and pulmonary artery circulation synchronously perfused using ex vivo lung perfusion (EVLP) and evaluate the effects of dual perfusion on posttransplant lung graft function. Our results demonstrated that dual-EVLP yields better posttransplant graft function through increased microvasculature and better perfusion of the lung grafts after transplantation.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 臓器保存 Ex vivo lung perfusion

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、2011年より2013年までピッツバーグ大学胸部移植外科の研究グループに属していた際に肺移植におけるドナー肺保存の研究に従事していた。細胞治療、医療ガス、還流装置を用い臓器保存の質を上げる研究を行っていたが、ドナー肺を還流装置に装着し臓器保存を行う方法(Ex-vivo Lung Perfusion; EVLP)に特に注目していた。EVLPシステムはこれまでの臓器保存方法(冷保存)に比べ優れた保存法であることは、これまでに報告があるが、EVLPをさらに改良したシステムが考案できるとの着想のもと研究を開始した。

2. 研究の目的

肺移植において、臓器保存の向上は我々が早急に取り組むべき課題である。近年、EVLPシステムを用いた臓器保存法が登場し、その可能性が注目されているが、我々はEVLPのさらなる研究が本システムのさらなる臨床応用につながると確信している。今回、我々は、ドナー肺保存中の(1) Airway Hypoxiaの克服、(2) 肺組織の metabolism の改善に着目し、新たなEVLPシステムを考案し、その有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

EVLPモデルはこれまで肺動脈からのみグラフト肺に還流液を流していた。しかし、肺への血流は気管支動脈もある。気管支動脈の血流は肺動脈の血流と比較し少ないが、重要だと考え、EVLP中に肺動脈と気管支動脈の2つの循環系を還流するDual EVLPシステムを作成することとした。

(1) ラット Standard EVLP モデル及び Dual EVLP モデルの作成

Lewis ラットを用い、Standard EVLP 及び Dual EVLP モデルを作成する。

Lewis ラットの主肺動脈から、20ml の low potassium dextran を還流させ、心肺ブロックを摘出する。1時間の冷保存中に肺動脈と左房内にカニュラを、気管に気管チューブを装着する。

Dual EVLP モデルでは、上記操作に加え下行大動脈にもカニュラを装着する。大動脈弓からの分枝も結紮し、還流液の漏出を防止する。

心肺ブロックをEVLPシステムに装着し、Steen solution を用い、還流を開始する。開始から1時間をwarming up時間とし、還流速度を徐々に上げていく。開始から20分で人工呼吸換気を始め。

4時間還流を行う。1時間ごとに還流液中の酸素分圧、糖、乳酸値を血液ガス分析装置を用い測定する。

還流中の肺動脈圧、気道内圧、換気量については、還流開始から終了まで継続的に計測する。また、解析ソフト(Lab Chart)を用

い、血管抵抗、肺コンプライアンスを解析する。

還流後の肺のサンプルを凍結及びホルマリンで保存する。

(2) 還流中のグラフト機能評価

還流中のグラフト肺の酸素化、肺コンプライアンスについて評価を行う。

肺の血管抵抗については新たに standard EVLP と Dual EVLP を比較する。

(3) 還流中のグラフト肺の代謝評価

下記のアプローチを行い、Dual EVLP が Standard EVLP と比較し、還流中の好気性代謝にどの程度の貢献ができていたか検討を行う。

還流中の還流液内の糖消費と乳酸産生について測定及び評価する。

還流液内のピルビン酸を測定し、乳酸・ピルビン酸比を評価する。

還流後の凍結保存された肺組織を用い、肺内のATP量を測定する。

還流後の凍結保存された肺組織を用い、グラフト肺からRNAを抽出し、real time RT-PCR法を用い、Hif-1a と Glut1 の mRNA レベルを測定する。

還流後、ホルマリン固定された肺組織を用い、Hif-1a 抗体の免疫染色を行う。肺組織中のどの部分(肺実質、血管周囲、気管支周囲など)にhypoxiaが存在するかも評価する。

(4) EVLP 後のグラフト肺を用いた同所性肺移植モデルの作成

EVLPシステムにて還流後にカフ法を用いた左片側肺同所移植を行う。移植後再灌流2時間後におけるグラフト機能を評価する。

還流後の肺をEVLPシステムから取り外し、1時間冷保存する。

1時間の冷保存中に左肺動静脈、気管支にカフを装着する。

レシピエントラット(Lewis)にグラフト肺を移植する。

移植後再灌流2時間後におけるグラフト機能を評価する。グラフト肺のガス交換能は、右肺(健側肺)をクランプし、5分間100%酸素下で評価した。

還流後の肺のサンプルを凍結及びホルマリンで保存する。

(5) 移植後肺の評価

移植後再灌流2時間後におけるガス交換能をグラフト機能として評価する。グラフト肺のガス交換能は、右肺(健側肺)をクランプし、5分間100%酸素下でグラフト肺静脈より血液採取する。血液ガス分析装置を用い測定する。

グラフト肺からRNAを抽出し、real time RT-PCR法を用い、TNF-a, IL-1b, IL6, ICAMといった炎症性サイトカインのmRNAレベルを測定し、虚血再灌流障害を評価する。

ホルマリン固定された肺を H-E 染色、Hif1a 免疫染色を行い、肺の組織障害スコア、hypoxia の箇所を評価する。

移植後 2 時間のレシピエントに造影剤を注入し、マイクロ CT 撮影を行う。

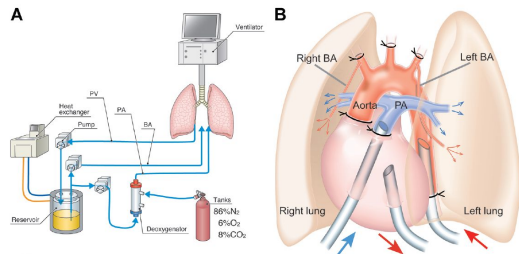
Dual EVLP 及び、Standard EVLP にて保存されたグラフト肺内の移植後の血流分布を評価することにより、Dual EVLP がどのようにグラフト肺に影響しているのかを Standard EVLP で保存された肺及び、冷保存された肺と比較し考察する。

さらに顕微鏡的にもグラフト内の血流量と血流分布に差がないか確認するために蛍光免疫染色法を行い、それぞれの血流量、分布について評価する。

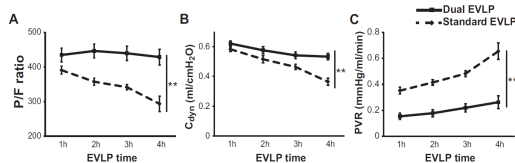
4. 研究成果

(1) まず、ラットを standard EVLP モデルおよび Dual EVLP モデル (図 1) を作成した。それぞれが、4 時間臓器保存可能であることを確認した。

(図 1)

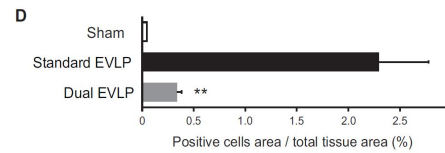
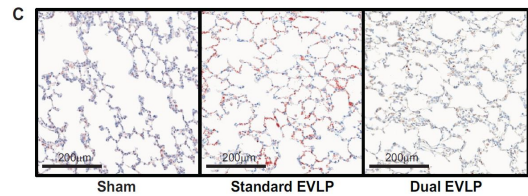
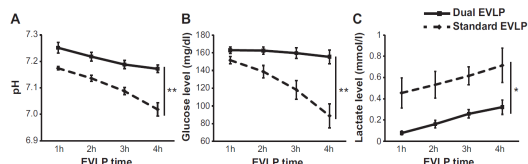


(2) 還流中のグラフト肺の酸素化、肺コンプライアンス肺の血管抵抗を standard EVLP システムと Dual EVLP システムで比較を行った結果、Dual EVLP システムではいずれの項目についても有意に良好な結果 (酸素化・コンプライアンス改善、血管抵抗減少) を得た。(図 2)

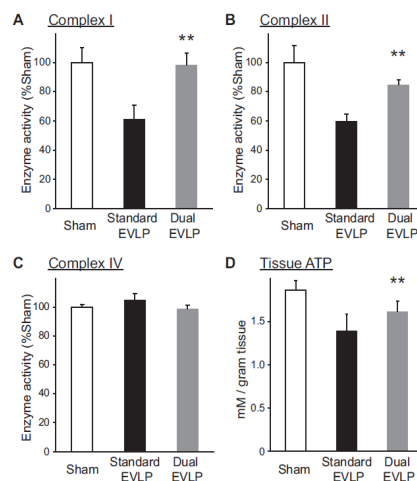


(3) 還流中のグラフト肺の代謝評価を評価した。還流液内の糖消費と乳酸産生は共に Dual EVLP で低く、嫌気性代謝の回避が示唆された。また、Hif1、Glut1 は Dual EVLP で発現が抑制されていたため、ドナー肺の低酸素が Dual EVLP で改善されていたことが示唆された。

(図 3)

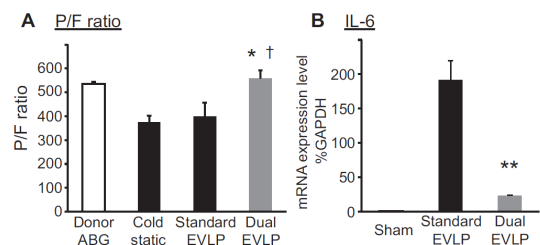


(4) さらに、還流後のグラフト肺の ATP 合成能およびグラフト肺内の ATP 量を測定したところ、Dual EVLP で保存されたグラフト肺で高値となった。(図 4)



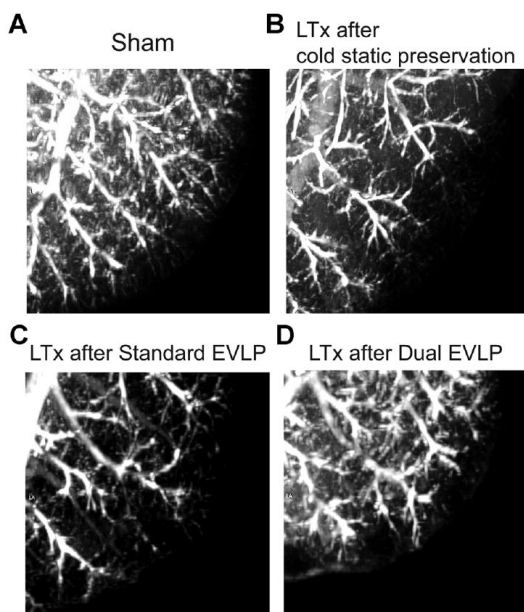
(5) 上記のように保存されたグラフト肺を片側肺同所移植行うモデルを作成した。比較モデルは次の 3 群とした。従来の保存法 (4 時間冷保存) Dual および standard EVLP (1 時間冷保存、2 時間 EVLP、1 時間冷保存) 評価は移植後 2 時間とした。

(6) 移植後 2 時間のグラフト肺のガス交換能を比較したところ、Dual EVLP で保存された肺が最も高く、その後 standard EVLP、冷保存が続いた。また、炎症性サイトカイン (TNF-a, IL-1b, IL6) の減少も Dual EVLP で最も顕著に認められた。(図 5)

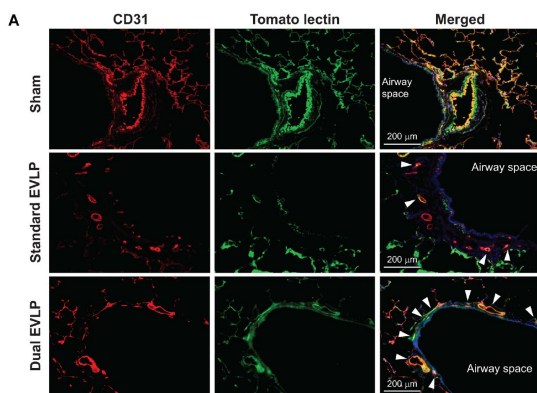


(7) 上記の結果よりグラフト肺への灌流液の増加および移植後のグラフト肺への血流増

加が臓器保存へ良好な影響を与えたのではないかと想定し、それぞれの保存法でのグラフト肺について保存中の血流に着目し解析を行った。マイクロCTを用いDual EVLP、standard EVLP、冷保存で保存された肺の移植後のグラフト肺に造影剤を注入しCT撮影を行ったところ、Dual EVLPでは移植後もグラフト肺への血流が他の2つの方法と比較し有意に増大していることが示された。臓器保存中に気道へも還流液を流していたため、末梢肺動脈の開存を確保できたと考えられた。(図6)



また、顕微鏡的にもグラフト肺内の末梢血管拡張が確保されているかどうかを確認するために蛍光免疫染色法を用いそれぞれの保存法を解析した。Standard EVLPでは肺動脈領域に移植後の血流が確認されたのに対し、Dual EVLPでは肺動脈領域だけでなく気管支動脈領域にも血流が分布されていることが確認できた。(図7)



上記よりDual EVLPはこれまで肺移植で重要視されていなかった気管支動脈にも還流液を流すことにより、Airway Hypoxiaの克服、肺組織のmetabolismの改善により良

好な臓器保存法になる可能性が今回の結果より示唆された。

また、今回の我々の成果は、現在の肺移植における新しい臓器保存法として普及されているEVLPシステムを改良した方法で、他の施設がこれまで試みていない独創的なものである。肺移植の国際的な学会(ISHLT)でも口演にて発表し一定の評価を受けた。また、今回の結果をまとめた論文も移植分野では世界的に評価の高い雑誌(American journal of Transplantation)に掲載された。今回の成果は小動物での実験を基にしているが、今後の臨床応用が期待できるインパクトのある研究成果であったと思われる。

しかし、これまでの実験結果はラットでの結果である。ラットとヒトの解剖および生物学的特徴は大きく異なるため、ブタやヒツジといった大動物でのモデル作成が必要である。今後の展望としては、まず大動物でのDual EVLPモデルを作成し、実際に臓器が有効に保存されるか確認することである。それが、今回と同様の結果が得られれば、臨床応用に大きく近づくと思われる。

また、今回はstandard EVLPに気管支動脈の還流を付け加えこのような良好な成果が得られたが、まだこの他にもstandard EVLPの改善点があると思われる。還流液の速度や還流の向き、還流液の酸素濃度の変更などの条件設定の変更や、還流中の肺に細胞治療を行ったり投薬を行ったりと様々なコンディションが考慮されるため、できる限り様々な条件設定を検討していく予定である。

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 1 件)

Tanaka Y, Noda K, Isse K, Tobita K, Maniwa Y, Bhama JK, D'Cunha J, Bermudez CA, Luketich JD, Shigemura N. A novel dual ex vivo lung perfusion technique improves immediate outcomes in an experimental model of lung transplantation. 査読あり Am J Transplant. 2015;15:1219-30.

〔学会発表〕(計 1 件)

Y. Tanaka, N. Shigemura, K. Noda, Y. Saito, Y. Maniwa, J.K. Bhama, J. D' Cunha, C.A. Bermudez. Dual Ex Vivo Lung Perfusion Techniques Ameliorate Airway Hypoxia in Lung Grafts in Rats. International Society for Heart and Lung Transplantation 34th Annual Meeting. 2014.4.11 サンディエゴ (米国)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雄悟 (YUGO TANAKA)
神戸大学大学院医学研究科外科学講座低
侵襲外科学分野・特命准教授
研究者番号：20403256

(2) 研究協力者

重村 周文 (NORIHISA SHIGEMURA)
ピッツバーグ大学 胸部移植外科
准教授

(3) 研究協力者

田根 慎也 (SHINYA TANE)
ピッツバーグ大学 胸部移植外科
研究員