

学位論文題名

Evaluation of 18-hour lung preservation with oxygenated blood for optimal oxygen delivery.

（酸素化血液を用いた18時間肺保存の評価）

学位論文内容の要旨

【背景及び目的】肺移植は閉塞性肺疾患や末期呼吸不全患者に対する治療の一つとして確立され、特に片肺同種移植の1年生存率は70～90%にまで達している。しかし中心冷却（core cooling）や摘出時灌流（flush）を含む現肺保存法では、移植のための臨床的保存可能時間は6時間以内とされており、このためドナー肺の数は非常に限られている。肺は虚血・再灌流障害に対して弱く、適切な保存条件の確立と保存時間の延長を目的にこれまで多くの実験がなされてきた。肺保存液は、従来細胞内液型のEuro Collins液やUniversity of Wisconsin液が用いられてきたが、実験的には細胞外液型組成液の方がより優れていると幾つかの施設から報告されてきた。細胞内液型組成液はカリウム濃度が高く、flush時の高度な肺血管収縮作用による不均一な灌流、再灌流初期の高度な肺血管収縮などにより保存液としての効果が劣ると推察されている。また最近、肺保存中の好気性代謝の維持が、保存状態を良好に保つのに重要であるという報告がされている。伊達らの報告によると肺は保存中に好気性代謝を低レベルながら行っており、好気性代謝を維持することによりNa-Kポンプなどの基本的機能が維持され保存中の組織浮腫を軽減しているのではないかとされる。これは保存中の肺胞内の酸素消費と二酸化炭素濃度の増加、さらに100%酸素にてinflationした状態で保存した肺が100%窒素及び空気によるものより良好な保存後の機能を示したことにより確認された。本研究では細胞外液型組成であり、組織への酸素供給という点ではヘモグロビンがより高濃度の酸素を運搬できることを考慮し、保存及びflush液として酸素加同種血液を用い、その有効性をウサギ肺保存・再灌流モデルにて評価した。【材料と方法】肺及び血液のドナーとしてNew Zealand White Rabbits（2.5～3.7kg）を用い、使用した浸漬保存液及びflush液により3つのグループ、すなわち細胞内液型の液の代表として1）Euro-Collins液（EC）（n=6）、細胞外液型の液の代表として2）低カリウム低分子デキストラン液（LPD）（n=6）、それに3）酸素加血液（OB）（n=6）に分け保存後の肺機能を比較した。方法は、全麻人工呼吸（room air、一回換気量25ml、呼吸回数45回/分、呼気終末期圧0.5 cmH₂O）下に、右室流出路よりPGE1（10mg）を注入、その後肺動脈より各液200mlを30cmH₂Oの圧にてflush、左房よりドレナージした。その際flush時間を測定し肺血管抵抗を算出比較した。その後心肺を一塊に摘出、肺を空気でhalf inflationし、10℃、18時間、同液にて浸漬保存した。静脈血酸素加は別に数匹のRabbitsより採取した新鮮静脈血約400mLを小型膜型人工肺を用い酸素・二酸化炭素混合ガス（O₂ 95%, CO₂ 5%）にて行った。保存後再灌流はWangらの方法に従い18時間浸漬保存後、右肺門部で血

管および気管を一塊に結紮し、左肺のみを空気にて換気、同時に肺動脈より同種新鮮静脈血にて36℃、40mL/min で10分間再灌流した。灌流前、灌流開始1、5、10分後の左房肺静脈血を採取、肺の酸素化能を評価した。また、灌流中の肺動脈圧を持続的に測定し肺血管抵抗の指標とした。保存中の肺血管内皮障害の指標として、再灌流開始直後の肺静脈血を採取しthrombomodulin (TM), E-selectin, Endothelin を測定した。再灌流後、左肺上葉を用いwet/dry ratio (湿乾燥重量比) を測定、下葉を組織診断のためにホルマリン保存固定した。

【結果】摘出時灌流の肺動脈血管抵抗 (mmHg・min/mL) はLPD、OB、ECの順に低かった (2.6 ± 0.2 , $5.6 \pm 0.8^*$, $7.5 \pm 2.0^*$; vs LPD, $p < 0.05$)。開始10分後の左房より採取した肺静脈血平均酸素分圧はLPD、OB、EC (96.2 ± 10.9 mmHg, 76.9 ± 13.0 mmHg, 47.0 ± 2.8 mmHg) の順に有意に高く、全灌流時間を通しての平均肺動脈圧はOBおよびLPDがECに比較し有意に低かった (再灌流5分後、EC; 40.2 ± 3.9 mmHg, OB; 27 ± 3.6 mmHg, LPD; 20.0 ± 1.8 mmHg)。またTM及びEndothelinは各グループ間で差を認めなかったが、EセレクトインはOBで他の2グループに比較し有意に上昇していた (EC; 3.56 ± 0.54 ng/ml, OB; 5.04 ± 0.24 ng/ml, LPD; 2.92 ± 0.35 ng/ml)。再灌流後の肺の湿乾燥重量比の比較では、ECが他のグループに比較し有意に高値であった (EC; 7.94 ± 1.17 , OB; 5.53 ± 0.32 , LPD; 5.49 ± 0.09)。また再灌流後の肺組織病理標本では光顕上各グループ間で形態的な差は認められなかった。【考察】酸素運搬、供給能という点ではヘモグロビンは他の溶液成分よりも効果的と考えられる。以前の実験で静脈血を含んだ状態で単純に保存した場合の保存後の肺機能は非常に不良であったが、これは静脈血の酸素濃度が低いことがその一因と推察された。本実験では、静脈血に酸素を添加して肺保存中に酸素を供給することにより肺保存効果が修飾されるか否かを検討した。摘出時灌流の主目的の1つは肺のcore coolingだが、血管収縮が高度だと灌流が不均一となりcore coolingが効果的に行われな。細胞内液型組成のECでは K^+ 濃度が高いために血管収縮が起こり、血管抵抗が高くなり灌流が不均一であった事が推察された。OBはECに比較して血管抵抗は低かったが、LPDより高く、灌流がLPDより不均一であった可能性がある。肺保存の有用性を比較するパラメーターとして、保存後の酸素化能、肺血管抵抗 (平均肺動脈圧)、組織の湿乾燥重量比を比較したが、いずれもLPDが良好で、OBによる保存はECによるものより良好であるがLPDより不良であった。これはOBは酸素供給という点での利点があるとはいえ、恐らく保存中に白血球による内皮障害が起こっているためと推察される。そこで保存中の好中球の新生、浸潤による肺血管内皮細胞障害の有無を検討する目的で内皮活性化により内皮表面に発現する接着分子であるTMとEセレクトイン、内皮より産生される血管収縮性作動物質のエンドセリンを測定した。Boyleらによれば内皮の活性化は、刺激 (突然の血流遮断など) を受けて数秒から数分の短時間に起こる補体や酸化物質による活性化 (I型) と、反応過程に数時間を要する活性化 (II型)、すなわちサイトカインやその他の蛋白産生過程を要する物質や細胞性内皮障害による活性化に分類されている。今回、保存中の障害をよく反映すると考えられる灌流直後の左房よりの排出液を採取し測定した。その結果、II型のマーカーであるEセレクトインのみであったがOBを用いたグループで有意に高い値を示していた。この実験モデルではわずか10分間の再灌流による評価のために、再灌流障害によるII型の活性化のマーカーはそのような短時間では上昇しないと考えられる。したがって、Eセレクトインは再灌流後ではなく、保存中における内皮障害を反映していると考察できる。OBによる保存がLPDより及ばなかったのは、好中球のみならず他の血球成分、或いは血清に含まれる物質による内皮の障

害が起こっていたためと推察される。【結論】酸素加血液による肺保存は、ECより良好であった。これは保存液として、酸素を多く含み、保存中に有効に酸素を供給出来る可能性があること、及び細胞外液組成であることが主な理由と考察できた。しかし長時間浸漬保存中に血液に含まれる白血球による血管内皮細胞障害がおきるために、保存効果はLPDより劣ると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Evaluation of 18-hour lung preservation with oxygenated blood for optimal oxygen delivery.

(酸素化血液を用いた18時間肺保存の評価)

肺移植は末期呼吸不全の治療法の一つとして確立しているが、ドナー肺は慢性的に不足している。現在臨床では、Euro-Collins 液（以下EC）やUniversity of Wisconsin 液（以下UW）が肺保存に用いられているが、これら細胞内液型組成液を用いた肺保存可能時間は最長6時間にすぎず、ドナー不足の一因となっている。実験的には細胞外液型組成の有効性や、肺保存中の好気性代謝維持の重要性が最近報告されている。

本研究の目的は細胞外液型組成で、かつ至適酸素運搬の可能性がある酸素加血液による肺保存の有効性を検討することにある。Simple flush後のウサギ摘出肺を10℃、18時間浸漬保存する実験モデルを用い、使用保存液によりEC、低カリウムデキストラン(LPD)、酸素加血液(OB)の3群に分け検討した。保存肺再灌流後の酸素加能、肺血管抵抗および血管内皮細胞障害の指標としてトロンボモジュリン、エンドセリンおよびEセレクトインを測定した。また再灌流後保存肺のwet/dry ratioおよび組織病理学的所見も検討した。

得られた結果は以下のように要約される。1)再灌流10分後の灌流血液酸素分圧は、EC、OB、LPD群それぞれ 47.0 ± 2.8 、 76.9 ± 13.1 、 96.2 ± 10.9 (mmHg)で、保存後の酸素加能は $LPD > OB > EC$ であったこと、2) 再灌流時の肺血管抵抗は $EC > OB \approx LPD$ であったこと、3)再灌流時、トロンボモジュリンおよびエンドセリン値に差はないが、OB群でEセレクトイン値が有意に上昇していたこと（EC、OB、LPD群それぞれ 3.56 ± 0.54 、 5.04 ± 0.24 、 2.92 ± 0.35 (ng/mL)）、4) Wet/dry ratioの比較では、ECが有意に高値であったことである。

これまで静脈血による肺保存は有用でないことが報告されており、また静脈血液を20%の割合で保存液に加えても有益な結果は得られていなかった。保存液に含まれる酸素含有量の低さがその一因と考えられていたが、今回の結果より、保存後の肺機能をもっとも代表する保存肺の酸素加能についてみても、酸素加血液による保存は現在の臨床標

準液であるEC液より優れているが、LPD液に優る利点はないと考えられた。酸素加血液による保存でEセレクトイン値が上昇していた理由としては、1) 低酸素に伴う血管内皮細胞活性化、2) 白血球との相互作用による血管内皮細胞障害、のいずれかが考えられるが、前者の場合通常著明なエンドセリン値上昇を伴うこと、またEセレクトイン値が上昇するまで数時間を要することを考慮すると、本研究においては白血球－血管内皮細胞相互作用によるものの可能性が高く、しかも肺保存中より血管内皮障害が起きていると推察された。酸素加血液は細胞外液型組成のため、内液型組成で問題となる初回灌流時の血管収縮をきたさず、かつ保存中の有効な酸素供給の可能性があるという利点の一方で、白血球による保存中の肺血管内皮細胞障害を起こす欠点があり得るわけで、酸素加血液そのものが最良の肺保存液となる可能性は低いと結論される。

学位論文の公開発表に際して、副査の加藤教授からは全保存期間中の酸素加血液の経時変化（特に動脈血の酸素分圧低下の有無）、血液保存の至適温度設定、血液の単純浸漬による保存効果、全血を保存に用いた場合の各血液成分と肺の血管内皮細胞との相互作用について、副査の安田教授からは臓器による形態的特異性と保存法の違い、肺保存の特異性、持続灌流保存を肺に適用する可能性、摘出時灌流の意義、将来の血液保存の可能性と意義、主査の藤堂教授からは、本研究の最重要着目点、低温時のヘモグロビン酸素解離、保存時間18時間の設定の理由、再灌流時間の設定、この実験系におけるコントロールとしての無保存肺の機能評価、組織の検討において白血球の浸潤が認められたか、形態的な差を認めないのであればEセレクトインの値に差が出たのは何故か等の質問があった。いずれの質問に対しても申請者は実験結果に基づいて、また蓄積された学識で、誠実にかつ概ね適切に回答したが、主査の藤堂教授より今後の実験の進め方及び検討内容についてコメントがあった。本研究は、血液保存に際して肺保存中より内皮障害が起きる可能性を示したことに意味があり、肺移植領域でcontroversialであった血液保存の有効性に1つの結論を得たことで、今後の研究方向性を示したと考えられる。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて本研究が関連領域の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。