

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04274

研究課題名（和文）高圧メディカルガスを用いた新しい臓器保存法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new organ preservation method using high-pressure medical gas

研究代表者

内藤 宗和（Naito, Munekazu）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：10384984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々は高圧メディカルガス(酸素(O₂)1.5atmと一酸化炭素(CO)2atm)を用いた新しい器保存法を開発し、ラットの心臓を24時間保存し、摘出直後と同等の機能を保つことに成功した。また、この保存法がイヌの肺保存でも有効であることを明らかにした。さらに、この保存法は細胞のATP供給に重要な影響を及ぼし、酸化ストレスを減少させることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の移植医療の発展に伴い、様々な臓器保存法が次々に開発され、現在も更なる技術開発が進んでいる。また、メディカルガスとして臓器や細胞を保護する効果があるガスが多数報告され、臓器保存への応用が期待されている。我々が開発した高圧メディカルガス保存法(酸素(O₂)1.5atmと一酸化炭素(CO)2atm)は、保存された臓器の質を維持し、臨床現場においても実用的であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：With the development of transplantation medicine in recent years, various organ preservation methods have been developed one after another, and further technological development is still in progress. Applicants have developed a new vessel preservation method using high-pressure medical gas (oxygen (O₂) 1.5 atm and carbon monoxide (CO) 2 atm) to preserve the rat heart for 24 hours and perform the same function as immediately after excision. It was also clarified that this preservation method is also effective for lung preservation in dogs. In addition, this preservation method has been shown to have a significant effect on the ATP supply of cells and reduce oxidative stress.

研究分野：臓器保存

キーワード：臓器保存 メディカルガス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

一般的に臓器の保存は、摘出前あるいは摘出後に流入血管から低温(0-4℃)の保存液を用いて血液成分を washout した後、低温の保存液に浸漬する方法(単純浸漬法)が用いられている。20世紀末までに、University of Wisconsin (UW) 液、histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) 液、Celsior 液、ET-Kyoto 液などの保存液が次々と開発され、臓器保存の技術が進んできた。最近では、機械で持続的に保存液を灌流する方法(持続灌流法)の試みなど、更なる技術開発が継続されている。

メディカルガスとは、O₂ や笑気 (N₂O) のように患者の麻酔や治療に用いられるガスの総称である。最近、メディカルガスの臓器保存への応用が期待され、CO、水素(H₂)、硫化水素(H₂S)、一酸化窒素(NO)、オゾン(O₃)などのガスが注目されている。我々は、長期に臓器の機能を維持する方法として、高压メディカルガス(酸素(O₂)3000hPa と一酸化炭素(CO)4000hPa)を用いた新しい臓器保存法を開発した(図1)。この保存法によって24時間保存されたラット心臓(CO24h)は、心筋虚血領域の同定、細胞死の定量、PETによる糖代謝機能の評価にて、摘出後すぐに移植した群(Control)と同等の機能を保つことができる。

この結果は既存の UW 液による単純浸漬法よりも極めて優れていることが明らかになった(図2)。しかし、この臓器保存法におけるメディカルガスの至適条件は未だ解明できておらず、その詳細な作用機序も不明であった。

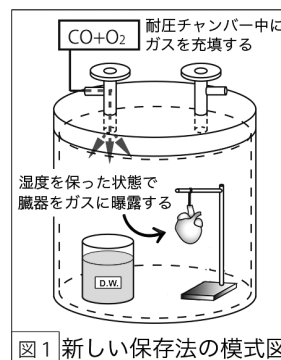


図1 新しい保存法の模式図

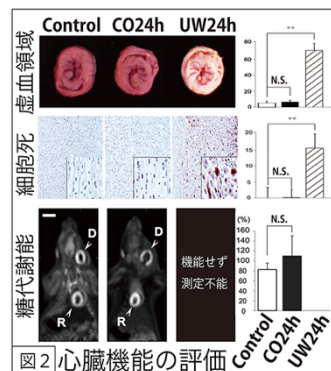


図2 心臓機能の評価

2. 研究の目的

現在、様々なメディカルガスが、臓器や細胞を保護する効果を有することが報告され、そのメカニズムも明らかになっている。例えばCOはミトコンドリアに作用し、代謝を抑制するだけでなく、Aktおよびmitogen-activated protein kinase(p38)を活性化させ、抗炎症および抗アポトーシスに作用することが明らかになっている。また最近、毒性が極めて低い希ガスであるアルゴン(Ar)とキセノン(Xe)にも細胞を保護する効果があることが分かってきた。実際、申請者は、XeとO₂を用いてラット心臓で予備実験を行なった。その結果、ラットの心臓を48時間保存して蘇生することに成功した。そこで申請者はCOだけではなく、安全性の高いArとXeを用いて、この臓器保存法における最適条件を明らかにしたい。本研究計画では、培養細胞を用いたin vitroで条件検討を行い、解析にはメタボローム解析を用いる予定である。メタボローム解析とは、生命活動によって生じる特異的な内因性代謝物を網羅的に解析するオミクス解析の一つであり、ここ10年で注目され始めた比較的新しい分野である。内因性代謝物は遺伝子発現やタンパク質発現に比べ、生体内の表現系に直結することから、メタボローム解析は高压メディカルガスの作用機序に関わる分子を探索するために有用である。また、本研究では、開発した臓器保存法の有効性および安全性の検証を行う為、大動物実験を計画している。これらの結果を学術的基盤とし、将来的に高压メディカルガスを用いた臓器保存法を臨床応用へと展開することである。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞・臓器を用いた至適条件の検討

ヒト培養細胞(血管内皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、肝細胞)およびラット心臓を使用し、保存後に各種評価を行う。

①それぞれに適した培地(内皮細胞用培地、心筋細胞用培地、平滑筋用培地、肝細胞用培地)にて培養する。

②細胞・臓器を高压チャンバー内にシャーレごとに入れ、CO、O₂、Ar、Xeを充填させ、4℃に保存する。※分圧条件はそれぞれ、1000hPaごとに振り分ける。

例：CO(1000hPa)+O₂(6000hPa)、CO(2000hPa)+O₂(5000hPa)、CO(3000hPa)+O₂(4000hPa)等

③24時間保存後、細胞数、死細胞数、ミトコンドリア膜電位、細胞内カルシウムレベル、アポトーシス、糖の取り込み、細胞内ATP濃度を測定し、評価する。Controlには通常培養した細胞を用いて比較検討する。

(2) 大動物を用いた有効性および安全性の検証

培養細胞を用いた研究の結果を受けて、イヌ肺および小腸、ブタ肝臓を用いて有効性および安全性の検証を行う。臓器の保存および移植は、それぞれの専門家と共に遂行する。Controlには、現在、臨床で用いられている保存液「肺：ET-Kyoto液、小腸および肝臓：UW液」にて浸漬保存

した臓器を用いる。動物間の適合度は、ABO 式血液型の一致（ブタ血液型は 2 種類 A 型 O 型、イヌ血液型は 13 種類 DEA1.1 型等）および、MHC の適合度を条件として移植を行う。血液型の一致は交差適合試験で、MHC の一致は real-time PCR で行う。

(3) メタボローム解析による高圧メディカルガス作用機序の解明

保存後の培養細胞・臓器をメタボローム解析にて、変動する代謝経路を解析する。

- ① 培養細胞・臓器を解析用に前処理した後、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)にかける。
- ② 細胞・臓器から得られた分子情報をパスイエ解析、多変量解析を用い、代謝変動に関わる経路、それに関連するタンパク、遺伝子を特定する。
- ③ 対象の代謝経路に関連するタンパク質の発現を Western blotting 法、遺伝子を Real-Time RT-PCR によって、Control と比較する。

4. 研究成果

(1) 培養細胞・臓器を用いた (in vitro の系による) 至適条件の検討

培養細胞には、HUVEC を用いて 高圧チャンバー内にシャーレごと入れ、CO₂ を充填させ、4°C に保存した。分圧条件はそれぞれ、CO (1000hPa) O₂ (2000hPa)、CO (2000hPa) O₂ (7000hPa)、CO (3000hPa) O₂ (4000hPa)、CO (4000hPa) O₂ (3000hPa)、CO (5000hPa) O₂ (2000hPa)、CO (6000hPa) O₂ (1000hPa) に振り分けて、生存細数、死細数、ミトコンドリア電位、細胞内カルシウムレベル、MTT アッセイで評価した。培養条件を 15 回以上変更して実を繰り返したが、コントロール群と高圧ガス保存群で明らかな差がないことが分かった。次に、BIONIX 低酸素培養キットを用いて、培養細胞を低酸素状態にした後に、同様の条件で高圧チャンバー内にシャーレごと入れて評価を行なった。コントロール群と比べて、CO (4000hPa) O₂ (3000hPa) で保存した群は、細胞活性がない傾向があった。

(2) 臓器を用いた (in vivo の系による) 至適条件の検討

ラットから心臓を摘出し UW 液で灌流した後、CO;1500hPa+O₂;2000hPa および CO;2000hPa+O₂;1500hPa 満たされた高圧チャンバー内に 24 時間保存した。in vivo 評価として異所性顕心臓移植をレシピエントラットに行い、ex vivo 評価としてランゲンドルフ灌流システムを使用した。移植した心臓の生存率は、術後 7 日目の CO;1500hPa+O₂;2000hPa 群では 100% であったが、CO;2000hPa+O₂;1500hPa 群ではわずかであった。対応する生存率は、すべての UW 液浸群において低値であった。ランゲンドルフ灌流システムと病理組織学的分析により CO;1500hPa+O₂;2000hPa 群の心臓の左室圧は CO;2000hPa+O₂;1500hPa よりも優れていた。この結果は、高圧メディカルガス保存法において CO および O₂ の分圧が極めて重要であることを示唆している。

Group	Preservation method	Humidity in the chamber (%)	n	Heart weight			Revival rate (%)	Survival rate	
				before preservation (g)	after preservation (g)	rate of change (%)		at 1 hour (%)	on day 7 (%)
CO 7 -moist	Fig. 1a	96.3±1.06 ^a	12	1.52±0.27	1.31±0.22 ^b	-13.40±1.77 ^c	12/12 (100)	12/12 (100)	9/12 (75)
CO 1 -moist	Fig. 1b	96.3±1.51	6	1.48±0.24	1.28±0.22	-13.85±1.63	5/6 (83)	2/6 (33)	0/6 (0)
Air 7 -moist	Fig. 1c	96.4±1.14	5	1.49±0.25	1.30±0.21	-13.20±1.51	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)
Air 1 -moist	Fig. 1d	96.1±1.33	5	1.51±0.24	1.33±0.23	-11.87±2.25	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
CO 7 -dry	Fig. 1e	61.0±1.00 ^d	5	1.49±0.31	1.19±0.19 ^e	-19.20±5.43 ^f	4/5 (80)	2/5 (40)	0/5 (0)
UW	Fig. 1f	-	5	1.42±0.41	1.20±0.35 ^g	-15.12±2.11 ^h	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
UW-CO7	Fig. 1g	96.2±1.10	6	1.44±0.30	1.22±0.25	-15.33±2.06	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
UW-CO	Fig. 1h	-	5	1.45±0.21	1.23±0.16	-15.12±2.77	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
Control							8/8 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)

Table 1. Humidity in the chamber, change of heart weight before and after 48 h of preservation, and revival and survival rates of post-transplanted hearts using different preservation methods. Values are expressed as the mean SD. P < 0.05: a vs d, b vs e, g, c vs f, h. P-values were calculated by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparison analysis.

Group	Partial pressure CO-O ₂ (atm)	n	Revival rate (%)	Survival rate on day 7 (%)
CO 7 -moist	7:0	5	0/5 (0)	0/5 (0)
	4:3	12	12/12 (100)	9/12 (75)
	3.5: 3.5	6	2/6 (33)	0/6 (0)
	3:4	9	6/9 (67)	3/9 (33)
	0:7	5	0/5 (0)	0/5 (0)
CO 3.5 -moist	3.5: 0	5	0/5 (0)	0/5 (0)
	2.0: 1.5	9	6/9 (67)	3/9 (33)
	1.75: 1.75	8	4/8 (50)	2/8 (25)
	1.5: 2.0	12	12/12 (100)	12/12 (100)
	0: 3.5	5	0/5 (0)	0/5 (0)
CO 1 -moist	1:0	5	0/5 (0)	0/5 (0)
	0.6: 0.4	8	1/8 (13)	0/8 (0)
	0.5: 0.5	8	1/8 (13)	0/8 (0)
	0.4: 0.6	8	2/8 (25)	0/8 (0)
	0: 1	5	0/5 (0)	0/5 (0)

Table 2. Revival and survival rates of transplanted hearts after 48 h of preservation using different partial pressures of CO and O₂.

(3) 大動物を用いた有効性および安全性の検証

イヌの肺を用いて臓器保存実験を行った。ドナーのイヌから肺を摘出し、保存液 ET-KYOTO で灌流した後、CO;1500hPa+O₂;2000hP で満たされた高圧チャンバー内に保存した。その後、保存した肺をレシピエントに同種移植した。その結果、圧メディカルガスで保存した群は、コントロールに比べて出血が優位に少なかった。また、炎症性メディエーター IL-6、IL- β は、高圧メディカルガスで保存した群は、コントロールに比べて優位に低かった。さらに、高圧メディカルガスで保存した群は、血中酸素濃度を保つことができ、移植後の血中の乳酸値が低下する傾向があった。この方法において、の内を空気で満たした場合、COとO₂で満たす群よりもの状態が良いことが明らかになった。このため、高圧メディカルガス保存法は、小動物の臓器だけでなく、大動物の臓器にも応用可能であることが示唆された。また、を保存する肺には、外部から圧力かけるだけでなく、内部にもガスが入るようにする必要があることを明らかにした。

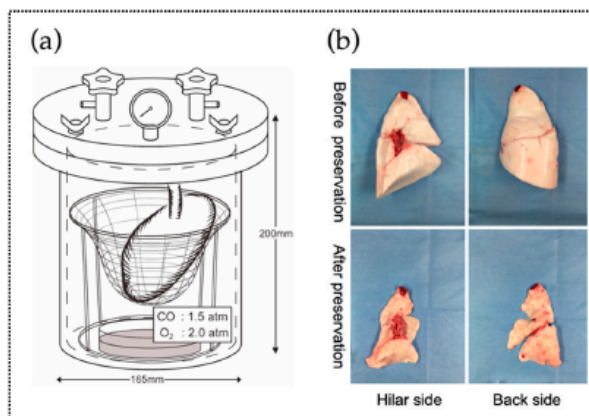


Figure 4. Schematic representation of the preservation method used in this study (Experiment 2). (a) The chamber was filled with a mixture of CO and O₂ [PCO (partial carbon monoxide pressure), 1.5 atm; PO₂ (partial oxygen pressure), 2 atm], and a flask with 50 mL distilled water was placed inside to maintain humidity for 20 h. The lung was gently placed on the net placed in the container. Before preservation, each lung was ventilated five times either with a mixture of CO and O₂ at a ratio of 3:4 (CO/O₂ group) or air (air group). (b) In the chamber, the trachea was kept open. After preservation, the lung shrunk due to high pressure.

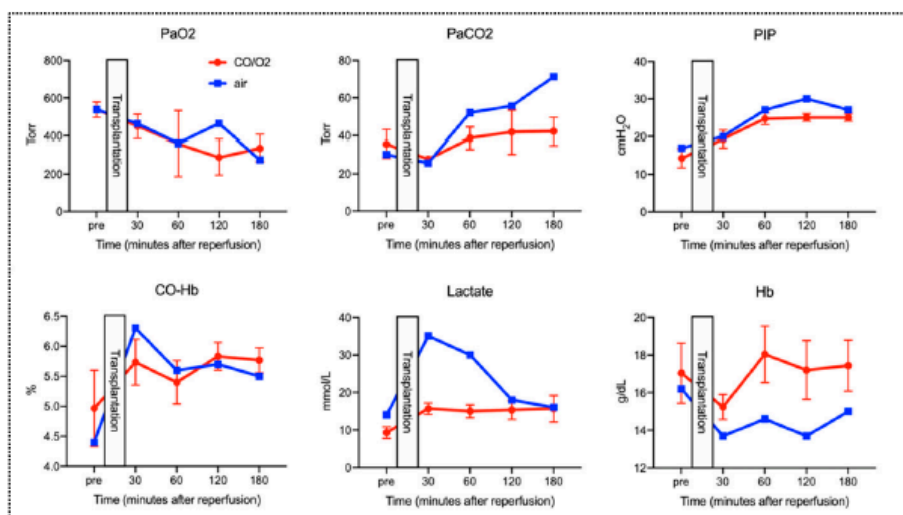


Figure 6. Assessment of chronological changes in parameters of arterial blood gases (ABG). The red line shows parameters in the CO/O₂ group, and the blue line shows parameters in the air group. Each data of red lines are expressed as the means \pm standard deviations.

(4) メタボローム解析による高圧メディカルガス作用機序の解明

ラットから採取した直後の心臓 (コントロール群)、UW 液に 24 時間浸漬保存した群 (単純冷保存群)、高圧メディカルガス保存群のメタボローム解析を行った。その結果、高圧メディカルガス保存群は、単純冷保存群よりも乳酸は有意に低く、クエン酸が有意に高かった。さらに、アデノシン三リン酸 (ATP)、一部のペントースリン酸経路の代謝物、および還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) は、単純冷保存群よりも高圧メディカルガス保存群で有意に高かった。細胞を酸化ストレスから保護する還元型グルタチオン (GSH) も、単純冷保存群よりも高圧メディカルガス保存群で有意に高かった。これらの結果は、CO および O₂ が嫌気性代謝から好気性代謝へのシフトを誘発するため、臓器のエネルギーが維持され、また、グルコース利用を解糖からペントースリン酸経路にシフトし、酸化ストレスを低減することを示した。

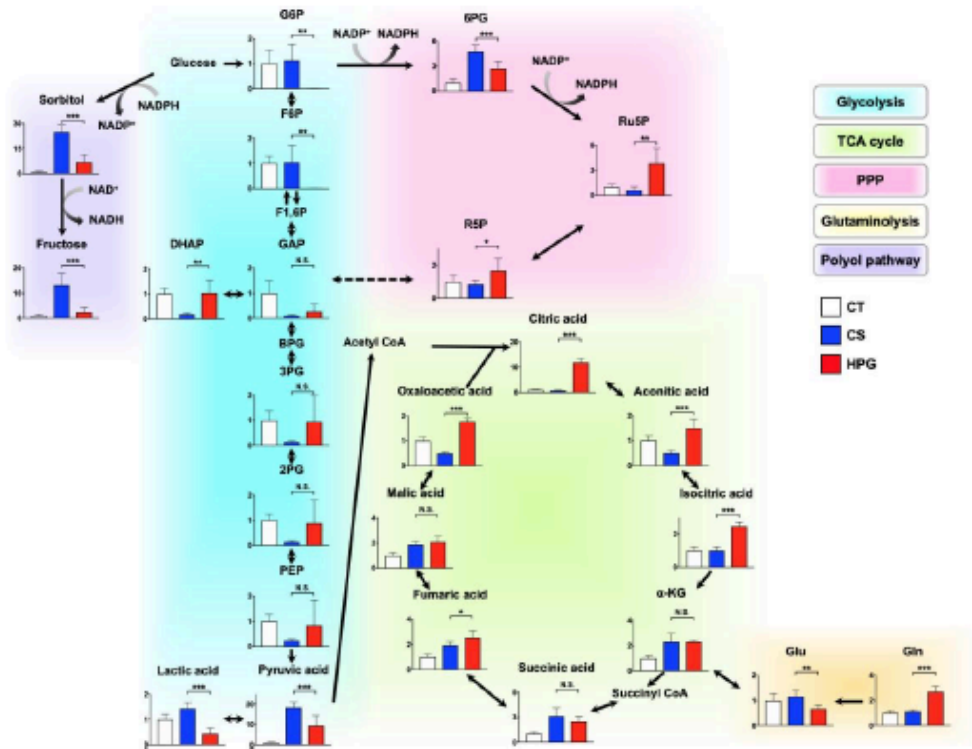


Figure 4. Metabolome data map after 24-h heart preservation in glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, pentose phosphate pathway (PPP), glutaminolysis, and polyol pathway. Bar graphs indicate fold changes relative to the control (CT) group. The lack of a bar graph representation for a given metabolite means that the metabolite was not detected. Data in each bar are presented as mean \pm standard error of the mean. N.S., not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CS, cold storage; HPG, high-pressure gas; G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; F1,6P, fructose 1,6-bisphosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; BPG, bisphosphoglycerate; 3-PG, 3-phosphoglycerate; 2-PG, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; α -KG, α -ketoglutarate; 6PG, 6-phosphogluconate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; Glu, glutamic acid; Gln, glutamine.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujiwara Atsushi, Hatayama Naoyuki, Matsuura Natsumi, Yokota Naoya, Fukushige Kaori, Yakura Tomiko, Tarumi Shintaro, Go Tetsuhiko, Hirai Shuichi, Naito Munekazu, Yokomise Hiroyasu	4. 巻 20
2. 論文標題 High-Pressure Carbon Monoxide and Oxygen Mixture is Effective for Lung Preservation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2719～2719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hatayama Naoyuki, Hirai Shuichi, Fukushige Kaori, Yokota Hiroki, Itoh Masahiro, Naito Munekazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Different effects of partial pressure in a high-pressure gaseous mixture of carbon monoxide and oxygen for rat heart preservation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43905-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hatayama Naoyuki, Hirai Shuichi, Naito Munekazu, Terayama Hayato, Araki Jun, Yokota Hiroki, Matsushita Masayuki, Li Xiao-Kang, Itoh Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Preservation of rat limbs by hyperbaric carbon monoxide and oxygen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25070-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chiharu Suzuki, Naoyuki Hatayama, Tadashi Ogawa, Eri Nanizawa, Shun Otsuka, Koichiro Hata, Hiroshi Seno, Munekazu Naito, Shuichi Hirai	4. 巻 21
2. 論文標題 Cardioprotection via Metabolism for Rat Heart Preservation Using the High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21228858.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hatayama N, Hirai S, Fukushige K, Yokota H, Nakano T, Naito N
2. 発表標題 Effective partial pressure for rat heat preservation in a high-pressure gaseous mixture of carbon monoxide and oxygen
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichi Hirai, Naoyuki Hatayama, Kaori Fukushige, Hiroki Yokota, Tomiko Yakura, Atsushi Fujiwara, Masaya Yasui, Chiharu Suzuki, Munekazu Naito, Takashi Nakano
2. 発表標題 The hemoglobin affinity of carbon monoxide in the ultra-fine bubble .
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福重香, 平井宗一, 畑山直之, 横田紘季, 中野隆, 内藤宗和
2. 発表標題 医療応用を目指したウルトラファインバブル(UFB)の有効性評価 - 酸素および空気UFBが培養細胞の生存に与える効果と影響 -
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑山直之, 平井宗一, 横田紘季, 矢倉富子, 福重香, 中野隆, 内藤宗和
2. 発表標題 高压ガスを用いた新たな移植臓器の保存方法
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平井 宗一 (Hirai Shuichi) (70516054)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	畑山 直之 (Hatayama Naoyuki) (80534792)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	藤原 敦史 (Fujiwara Atsushi) (00748642)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	削除：2019年12月20日
研究分担者	矢倉 富子 (Yakura Tomiko) (20722581)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	西澤 祐吏 (Nishizawa Yuji) (50545001)	国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員 (82606)	
研究分担者	横見瀬 裕保 (Yokomise Hiroyasu) (80231728)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	秦 浩一郎 (Hata Koichiro) (90523118)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	奥村 正直 (Okumura Masanao) (90450858)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関