

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659788

研究課題名（和文）液体への浸漬により虚血組織・臓器の酸素化をはかる実験的研究

研究課題名（英文）Experimental studies to achieve the oxygenation of ischemic tissue and organs by immersing into oxygenated liquid.

研究代表者

堂後 京子（佐々木京子）（Dogo (Sasaki), Kyoko）

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：00622292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：高い酸素溶存能を有する有機フッ化合物であるパーフルオロケミカル（PFC）を高濃度酸素化し、虚血組織・臓器を直接浸漬する方法で組織を酸素化できる事を実験的に証明し、血流を介さない新しいアプローチによる局所酸素療法の開発を目的とした。PFCを5気圧で酸素加圧し高濃度酸素化PFCを作成した。この液体は常温大気圧下でも長時間高い酸素分圧が維持され、ラット組織を直接浸漬する方法で潰瘍面を酸素化できる事を確認した。高濃度酸素化PFCに浸漬保存したラット皮膚組織の移植では臓器保存液UW液と同等の組織保存能と生着率向上、治癒促進効果が示された。移植後6ヶ月以上の経過観察で潰瘍や新生物の発生は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to achieve the oxygenation of ischemic tissue and organs by immersing into hyperbaric oxygenated Perfluorochemicals (PFC) which are organic fluorine compound having a high oxygen dissolved capacity, and development of local oxygen therapy with a new approach that does not pass through the blood flow.

We prepared hyperbaric oxygenated PFC under 5 atm pressures of oxygen. This liquid maintained a high partial pressure of oxygen under the normal temperature atmospheric pressure for a long time. Ulcer surface of the rat lower limb was oxygenated by immersing directly into this liquid. When rat skin graft after preservation in hyperbaric oxygenated PFC was transplanted, improvement of tissue preservation ability and engraftment rate, and the promotion of wound healing has been shown equivalent to the UW solution. There was no occurrence of ulcer and neoplasm by follow-up in more than 6 months after transplantation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：パーフルオロケミカル 組織酸素化 局所酸素療法 創傷治癒 臓器保存 再生医療

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒、虚血性疾患、難治性潰瘍・褥瘡、組織・臓器移植および保存、再生医療などに関する広い分野において必要不可欠な要素は血流、すなわち組織酸素化である。これまで臨床では血流改善を目的とする血行再建術、血管拡張剤・抗凝固剤の使用、局所陰圧吸引療法、高圧酸素療法等が行われてきたが、微小循環不全をきたしている部位には酸素が十分に供給されない点が問題であった。これに対しては酸素を局所に直接投与し酸素化させるアプローチが期待できる。

生体組織における酸素化の役割を担っているのは血液中のヘモグロビンであるが、その代替物質として古くから注目されてきたのがパーフルオロケミカル (Perfluorochemical: PFC) である。PFC は有機フッ素化合物で無色透明無臭の液体であるが、高い酸素溶存能を有し化学的に不活性で安定であることから、人工血液や液体呼吸技術として研究されている。これを応用し、虚血状態にある組織を高濃度酸素化した PFC に直接浸漬させる方法により酸素化をはかる事を着想した。

2. 研究の目的

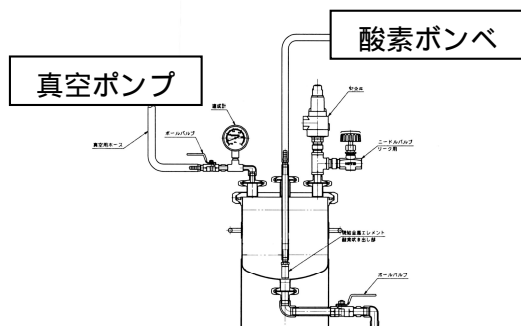
本研究では、高濃度酸素化した PFC に虚血状態にある組織を直接浸漬する方法により組織酸素化が可能である事を実験的に証明し、移植組織の生着率を向上させる新しい保存・移植法および血流を介さない新たなアプローチによる局所酸素療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1. 高濃度酸素化 PFC 作成と組織浸漬させる至適条件の確立

酸素加圧タンク (図 1) に PFC を封入し、真空ポンプでタンク内の空気を脱気した後、酸素ボンベから酸素を PFC 液内に通気バブリングさせた。圧条件 (1~5 気圧)、温度条件 (4、24、37) を変えて PFC の酸素分圧を測定した。続いて、酸素化 PFC の大気圧 (1 気圧) 下での脱酸素の状況を経時的に測定して、安定性の検討を行った。

これらの結果をもとに、安定で組織の浸漬に至適な条件の高濃度酸素化 PFC を作成し使用した。



< 図 1: 酸素加圧タンク >

2. 浸漬による組織酸素分圧に及ぼす効果の検討

実験動物 (ラット) の組織酸素分圧はニードル式酸素濃度計 (MicroxTX3) を用いて測定した。

組織条件は ①除毛のみ行った下腿皮下 (Skin) ②皮膚剥脱した下腿皮膚欠損創皮下 (Ulcer) ③下腿剥脱皮膚組織内 (Graft) 測定条件は (1) 未治療大気下 (Air) (2) 生食浸漬 (NS) (3) 高濃度酸素化 PFC 浸漬 (PFC) とした。

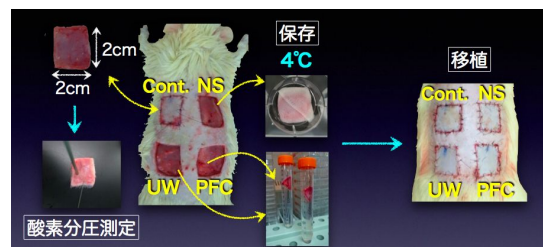


3. 組織の浸漬保存・移植における効果の検討

ラット背部から皮膚組織採取し、保存後に戻し移植するラット皮膚移植モデルを作成した。

ラットの背部 4 カ所から 2×2cm 大の皮膚組織を皮筋層下で採取し、まずコントロールとして直後に戻し移植 (Cont.)。他 3 カ所においては、組織を生食ガーゼ包み (NS) 臓器保存液 UW 液 (University of Wisconsin solution) 浸漬 (UW) 高濃度酸素化 PFC 浸漬 (PFC) にて、4、6、24 時間で 1 時間、6 時間、24 時間保存した後に戻し移植した。

評価は、移植時の組織片の酸素分圧および組織像を確認し、臨床的には 2 週間後の生着状態と 4 週間後の創治癒状態を観察した。



4. 有害性についての検討

PFC あるいは高濃度酸素 (活性酸素) による組織障害性、蓄積性、悪性腫瘍誘発などの有害事象の発生について、モデル作成後 1 カ月、さらに長期の臨床的経過観察および組織採取により検討した。

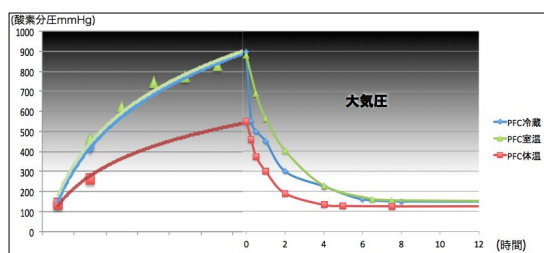
4. 研究成果

1. 高濃度酸素化 PFC 作成

PFC の酸素分圧は、加圧により上昇し、5 気圧で 900mmHg に達した。

作成時の温度条件による酸素分圧は、37（体温相当）でやや低下したが、4（冷蔵相当）24（常温相当）では同等であった。

作成後、温度条件を維持したまま大気圧下で放置すると、酸素分圧は低下するものの数時間は 200mmHg 以上を維持し、密閉容器（ねじ口瓶）に入れて保存した場合では常温で一週間以上経過しても 450mmHg の酸素分圧が維持された。



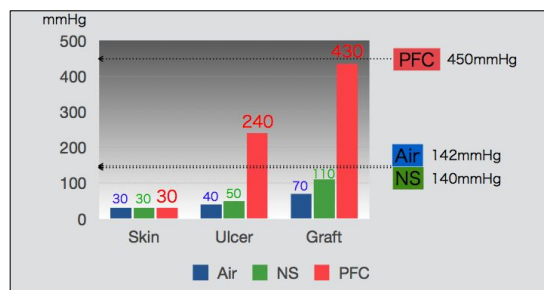
< 圧力と温度による PFC の酸素分圧の変化 >

この結果から、以降の実験では常温で 5 気圧まで酸素加圧して作成した高濃度酸素化 PFC（以降：O₂PFC）をねじ口瓶中で常温保存したものを使用することとした。

2. 浸漬が組織酸素分圧に及ぼす影響

組織酸素分圧は気体と液体が接している部分での酸素拡散の原理によって説明できる。通常の動脈血酸素分圧 100mmHg に対して、末梢組織間質の酸素分圧は 20～40mmHg である。

測定のために除毛のみ行ったラットの下腿皮下（Skin）の組織酸素分圧は大気（Air：酸素分圧 142mmHg）下で 30mmHg であったが、生理食塩水（NS：140mmHg）や O₂PFC（450mmHg）に浸漬させても変化しなかった。皮膚が酸素拡散の機会を遮断していることが確認された。皮膚を除去した潰瘍部（Ulcer）の場合 Air 40mmHg、NS 50mmHg、O₂PFC 240mmHg に数分で上昇した。さらに、剥脱皮膚組織（Graft）では Air 70mmHg、NS 110mmHg、O₂PFC 430mmHg と上昇し、酸素拡散の影響を強く受ける事が解った。

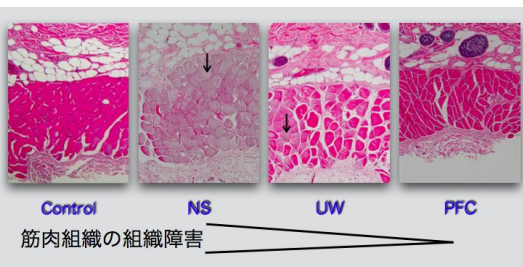


< 組織酸素分圧の変化 >

組織を O₂PFC に直接浸漬させる方法で、酸素拡散による局所の組織酸素化が可能である事が確認された。

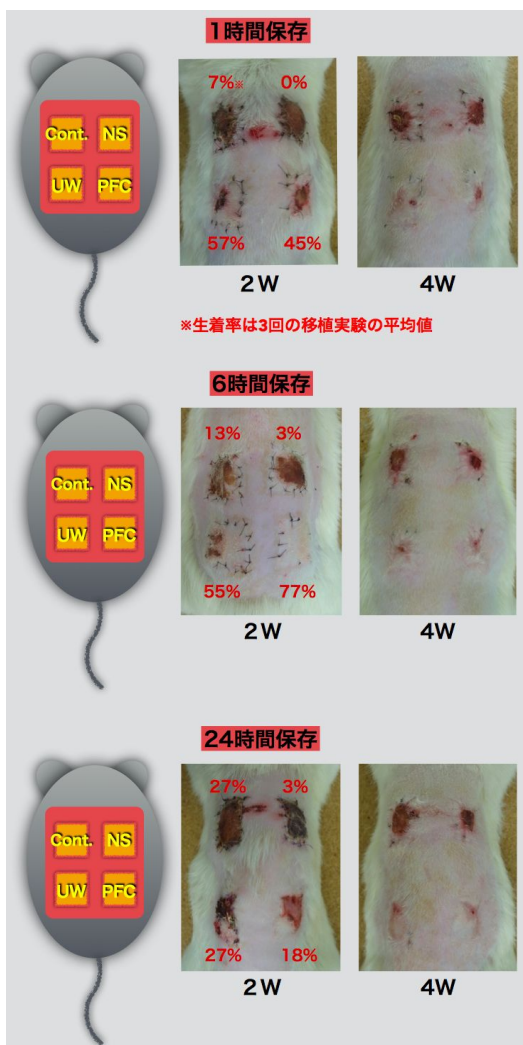
3. 組織の浸漬保存・移植における効果

ラット皮膚移植モデルにおいて、移植組織片採取直後および各条件で保存後の組織酸素分圧は O₂PFC 保存組織のみ 98mmHg と高くなっていた。同様に移植組織片の組織像を比較すると、特に 24 時間保存後の横紋筋で組織障害の程度の違いが顕著にみられた。組織壊死を示す組織障害の像は生理食塩水保存（NS）で非常に強く、O₂PFC 保存では軽度で組織形態が比較的保たれていた。UW 保存はその中間の所見であった。



< 移植組織片の組織像（HE 染色 ×100） >

保存組織の戻し移植後 2 週間の生着状態を比較すると、コントロール（Cont.：採取直後戻し移植）と NS 群ではほとんどが壊死し、UW と O₂PFC 群は同等に生着率が向上した。4 週間後の創治癒状態も同様の傾向であった。



< 組織移植後の生着率と創治癒状態 >

本実験で採取移植した組織は皮筋を含むいわゆる皮弁に相当する厚さと考えられ、通常の移植ではほぼ全壊死する。しかし UW 液あるいは O_2 PFC 浸漬により生着率が向上する事が示された。UW 液による臓器保存の原理は電解質バランス、膠質浸透圧、その他の添加成分により代謝を抑制し細胞を保護するものがある。一方、PFC は水との親和性がなく、ガスの拡散効果により細胞に酸素を供給し好気性代謝が良好に維持されることで細胞障害を防いでいると考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

4. 有害性についての確認

移植後 6 ヶ月以上の経過観察を行い、全ての個体において潰瘍や新生物の発生は臨床的にも組織学的にも認めなかった。

まとめ

PFC を酸素加圧する方法により高濃度酸素化 PFC を作成し、常温大気圧下で長時間高い酸素分圧が維持された。ラットの組織をこの高濃度酸素化 PFC に直接浸漬させる方法で、局所の酸素化が可能である事を確認した。また、高濃度酸素化 PFC に浸漬保存したラット皮膚組織を移植し、臓器保存液である UW 液と同等の組織保存能と生着率の向上、治癒促進効果が示された。なお、移植後 6 ヶ月以上の経過観察を行い、潰瘍や新生物の発生は認めなかった。

虚血状態にある組織の酸素化法として、本法は、薬剤の生体内への穿刺注入といった操作の必要がなく非侵襲的であること、血流の無い部位へのアプローチが可能であること、繰り返し治療が行える一方で有害事象発生時は直ちに治療を中止できること、常温での使用、保存が可能であることは、医療現場で使用する上での大きな利点である。創傷治癒、虚血性疾患、難治性潰瘍、組織・臓器移植、保存などに関連する広い分野で有用な、新たな治療手段になると期待される。

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)

[学会発表](計 3 件)

堂後京子: 高濃度酸素化パーフルオロケミカル浸漬による組織・臓器の保存および局所組織酸素化療法の開発. 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会, 2015.10. 岩手県盛岡市

堂後京子: 高濃度酸素化した液体への浸漬により虚血組織の保存および局所酸素化療法の開発. 第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会, 2015.4. 京都府京都市

堂後京子: 高濃度酸素化液体浸漬による虚血組織・臓器の酸素化をはかる実験的研究. 第 41 回日本マイクロサージャリー学会学術集会, 2014.12. 京都府京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂後(佐々木)京子 (Dogo Sasaki, Kyoko)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00622292