

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10794

研究課題名（和文）肺移植に対する超高密度窒素ナノバブルを使用した新たな臓器保存液の開発

研究課題名（英文）Development of a new organ preservation solution for lung transplantation using nanobubblized solution contained nitrogen

研究代表者

郡家 聖史（GUNGE, Kiyofumi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・研究協力員

研究者番号：00795867

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：窒素ナノバブル含有臓器保存液を用いて、ラット肺での臓器保存モデルを作成しました。ナノバブルを使用した群は、肺組織中の残存ATP量が多い傾向を示しており、細胞死マーカー（Capase-3）でもナノバブル群で細胞死が少ない傾向を示しており、ナノバブル群が良好ではないかと推測されました。現在さらにラット肺移植モデルを作成し追加評価検討している段階であります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療に用いるより良い臓器保存液の開発は、保存時間が延びることさらなる遠方に臓器が運ぶことができ多くの人に移植医療が受けられるだけでなく、より良い臓器保存液は臓器へのダメージが少なくなることで、日本のみならず、世界における移植医療の治療成績の改善に大きく寄与すると考えます。

研究成果の概要（英文）：Using an organ preservation solution containing nitrogen nanobubbles, we created an organ preservation model in rat lungs. The group using nanobubbles tends to have a large amount of residual ATP in lung tissue, and the cell death marker (Capase-3) also tends to cause less cell death in the nanobubble group. We guessed the nanobubble group is better than control group. We are currently in the process of creating a rat lung transplant model and conducting further evaluation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：高濃度窒素ナノバブル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺移植における保存液の開発は、細胞内液から細胞外液(低カリウム液)にて、保存時間の飛躍的向上が得られた。しかしながら、それ以降、肺移植は虚血時間が8時間にてこれまで行われてきた。実験的にはもう少し余裕があるとされるが、安全性を考慮するとその程度となる。しかしながら、脳死肺移植にて8時間以内に再灌流を開始することは難しく、特に日本のように、運搬に一般の交通機関を使用し、全国各地から臓器を運搬する場合は、かなりの時間を要しているのが実情である。したがって、より臓器をより少ないダメージで、より長い時間保存可能な技術の開発は、日本のみならず、世界における肺移植の治療成績の改善に大きく寄与する。

2. 研究の目的

今回、鮮魚の劣化を防ぐことができる超高密度窒素ナノバブル臓器保存液を用い、臓器中の細胞の酸化、壊死を防ぎ、術後の虚血再灌流障害を抑制する新たな臓器保存液の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EP-TU 保存液の超高密度窒素ナノバブル臓器保存液を作製し、保存液成分の変化を分析する。この溶液のナノバブル数および窒素濃度の経時的変化を見る。また、NOの産生、経時の変化を測定する。また、EP-TUの構成成分である、電解質、グルコース、デキストラン、浸透圧、pHの変化についても測定する。

(2) ラット肺に対して、超高密度窒素ナノバブル臓器保存液を用いて、臓器保存を行い、4、8、12、24、48時間後に臓器を評価する。Lewis ラットを用いて、高濃度窒素ナノバブル臓器保存液にて肺保存を行う。冷却保存後、4、8、12、24、48時間後に臓器の保存状態を評価する。評価項目としては、各タイムポイントにて、細胞(特に内皮細胞)のアポトーシス(Tunel 染色、アネキシン V/7AAD 法などを用いる)。組織 ATP 定量(低下量の比較)、電解質、酸化還元反応(d-ROM、BAP 測定)、組織学的所見(H&E 染色など)を用いて、臓器の状態を評価、比較する。

(3) ラットに保存後の肺を移植し、通常保存液と超高密度窒素ナノバブル臓器保存液にて、移植後再灌流障害、肺機能の評価を行う。Lewis ラットを用いる。上記のごとく、超高密度窒素ナノバブル EP-TU 液および通常の EP-TU 液を用いて保存したラット左肺を、別のラットへと移植する。移植にはカフ法を用いる。免疫反応はないと考えられるため、免疫抑制剤は用いない。移植後肺を4、8、12、24時間後に摘出し、虚血再灌流障害の評価を行う。各タイムポイントにて、細胞(特に内皮細胞)のアポトーシス(Tunel 染色、アネキシン V/7AAD 法など)を用いる。組織 ATP 定量(低下量の比較)、電解質、酸化還元反応(d-ROM、BAP 測定)、組織学的所見(H&E 染色など)、Wet/dry ratio、IL-6、TNF- α 測定、血液ガス測定、肺コンプライアンス測定などを用いて、臓器の状態、レシピエントの状態を評価、比較する。N=5 とする。

(4) ブタなど大動物で同様の実験を行う。最終年度には、ブタでの移植で効果を評価する。人への応用を目的として、大動物であるブタを用いて、前年と同様、摘出臓器の評価と、保存後肺移植の実験を行う。

<保存臓器の評価> 超高密度窒素ナノバブル臓器保存液にてブタ肺保存を行い、冷却保存後、8、24、48時間後に臓器の保存状態を評価する。評価項目としては、各タイムポイントにて、細胞(特に内皮細胞)のアポトーシス(Tunel 染色、アネキシン V/7AAD 法などを用いる)。組織 ATP 定量(低下量の比較)、電解質、酸化還元反応(d-ROM、BAP 測定)、組織学的所見(H&E 染色など)を用いて、臓器の状態を評価、比較する。N=3 とする。<移植後、再灌流障害の評価> 移植手術では、ブタを用いる。上記のごとく、超高密度窒素ナノバブル EP-TU 液および通常の EP-TU 液を用いて保存した(12時間、48時間)ブタ左肺を、別のブタへと移植する。免疫抑制シクロスポリン、ステロイドを用いる。移植後肺を4、12、24、48時間にモニタリングし、P/F ration、血液ガス、肺コンプライアンスなどを測定する。移植後4、48時間にて、肺を摘出し、摘出標本にて評価を行う。細胞(特に内皮細胞)のアポトーシス(Tunel 染色、アネキシン V/7AAD 法などを用いる)。組織 ATP 定量(低下量の比較)、電解質、酸化還元反応(d-ROM、BAP 測定)、組織学的所見(H&E 染色など)などを用いて、PGD(primary graft dysfunction) grade の評価、臓器の状態、レシピエントの状態を評価、比較する。N=3 とする

4 . 研究成果

窒素ナノバブル含有臓器保存液を用いて、ラット肺に対し臓器保存モデルを作成し行った。既存の肺 EpTU 保存液をコントロール群に、ナノバブル保存液でのラット肺保存群との比較検討でタイムポイントを 0 時間、4 時間、8 時間、16 時間、24 時間とおき保存臓器の状態を評価した。臓器保存肺の外観に大きな変化を認めず、また保存液溶液 pH は両群ともに酸化傾向を示しているが差を認めなかった。肺組織中の ATP 量を測定したところ、両群ともに経時的な減少は認められたが窒素ナノバブル群で残存 ATP 量が多い傾向を示していた。また細胞死のマーカーである TUNEL にて免疫組織学的染色を行ったが有意な所見は認めなかったが同様な細胞死のマーカーである Capase-3 などの追加検討を行ったところ窒素ナノバブル群で細胞死が少ない傾向を示しており、ATP の結果を踏まえてるとおおむねナノバブル群が良好ではないかと推測された結果であったと判断している。さらに炎症性サイトカインの推移なども検討している段階である。また同研究室ではナノバブル水の抗菌作用があることを研究しており、本実験モデルとの関連についても検討している。またラットでの肺移植のモデルの作成を並行して行っており、現在臓器保存状態で差が大きかったモデルの検討を追加評価検討している段階である。引き続き肺移植モデルまで検討する予定であり、継続研究している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 | 永安 武 (NAGAYASU Takeshi) (80284686) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301) | |
| 研究分担者 | 松本 桂太郎 (MATSUMOTO Keitaro) (80404268) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師 (17301) | |
| 研究分担者 | 馬場 雅之 (BABA Masayuki) (90771957) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員 (17301) | |