

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04493

研究課題名(和文) 新たな内因性生理活性ガス送達システムの構築と移植医療への応用

研究課題名(英文) Endogenous Physiological Gas Delivery System and Its Application to Transplantation Medicine

研究代表者

平井 宗一 (HIRAI, Shuichi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70516054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素と酸素の混合ガスを用いた臓器保存においては、割合(分圧)が最適化する必要があることを示した。また、混合ガスの効果として、無酸素代謝から有酸素代謝への転換が引き起こされ、保存された臓器のエネルギーを維持すると同時に、グルコースの利用が解糖系の回路からペントースリン酸回路(PPP)へのシフトにより、酸化ストレスを減少させることを示した。さらに、臓器の内部から混合ガスを感作させる方法として、1 $\mu$ m未満の気泡径と水中安定性の特徴をもつウルトラファインバブル(UFB)に注目し、臓器保存に適したUFB作成方法やその特性、効果について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植用摘出臓器の保存において、酸素の重要性は認知されていた。一方で、酸素濃度やその他のガスの有効性については理解が遅れていた。本研究は、酸素と内因性生理活性ガスである一酸化炭素を適切な割合での組み合わせることにより、摘出臓器が良い状態にて保存されることを示した。これにより、移植用臓器保存法に、ガスの効果という新たな概念を提示した。さらに、保存臓器の内部からガスを送達する新たな方法として、ウルトラファインバブルを利用する可能性について検証した。

研究成果の概要(英文)：A mixed gas of carbon monoxide and oxygen with an optimized ratio (partial pressure) was shown to be beneficial in maintaining the function of the isolated organ. In addition, the effect of gas mixtures is to induce a switch from anaerobic to aerobic metabolism to maintain conserved organ energy and at the same time shift glucose utilization from the glycolytic cycle to the pentose phosphate cycle (PPP). These metabolic changes induced the reduction of oxidative stress. As a method of sensitizing mixed gases even in large-sized organs, we focused on ultra-fine bubbles (UFB), which have a bubble diameter of less than 1  $\mu$ m and are stable in water, and investigated its characteristics and effects.

研究分野：移植医療

キーワード：移植用臓器保存法 内因性生理活性ガス 移植医療

## 1. 研究開始当初の背景

移植臓器(ドナー)不足は、世界的に深刻かつ喫緊の課題である。本邦では、2010年に臓器移植法が改正され臓器提供数は増加した。しかし、移植件数は約400件/年にとどまり、約15,000人いる移植希望患者は、その半数が移植を待ち詫びながら亡くなっている厳しい現状がある。また、移植の時機などが合わず摘出臓器の保存限界を超え、移植基準に満たず廃棄されてしまう臓器がある。移植の盛んな米国では、年間約600の移植のための摘出臓器が廃棄されている(United Network for Organ Sharing 2022より)。このような状況を解決する方法の一つに、摘出臓器を体外で生かし、長期に保存または蘇生できるような技術(臓器保存法)の開発が求められている。この技術により保存限界の緩和や、移植基準に満たない拡大適応ドナーの利用、将来的には臓器バンクを構築し、臓器の供給体制を改善することが期待されている。

臓器移植において摘出臓器を保存する方法として、主に低温の保存液に浸漬する単純浸漬法が用いられているが、近年、保存液を持続的に還流する持続還流法の開発が盛んに行われている。持続還流法の発展に伴い、臓器保存中の酸素(Oxygen: O<sub>2</sub>)供給についての検証が行われ、臓器保存中に酸素供給を行うことの有用性が報告がされている。代表者は、新たな移植用臓器保存方法として、ガスの効果について注目した高圧気相保存法を開発、研究を行ってきた。その過程で、酸素だけでなく、内因性生理活性ガスの一つである一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)が臓器保存に有用であることを報告している。

## 2. 研究の目的

本研究は、保存時間の延長および移植後再還流障害の軽減を目的に、酸素と一酸化炭素の混合ガスを外部から感作させる高圧気相保存法にて、摘出臓器に対するガスの効果を評価し、その効果を検証することを目的とした。また、臓器の外部からガスを供給する方法である高圧気相保存法のデメリットを補うため、臓器内部からガスを供給することを可能とする送達方法としてウルトラファインバブル(UFB)について注目し、その作成方法および性質、効果について検討を行った。

## 3. 研究の方法

酸素及び一酸化炭素の混合ガスにおける摘出臓器への作用を検証するため、3種類の実験を行った(1). 酸素と内因性生理活性ガスである一酸化炭素の割合に応じた臓器保存効果の違い、(2). 内因性生理活性ガスを用いた保存臓器の代謝変化、(3). 臓器サイズにおける内因性生理活性ガスの効果)。また、内部からガスを送達するための方法として、ウルトラファインバブルに着目し、その作成、特性、および細胞や摘出臓器への効果について検証した(4). 内因性生理活性ガス送達システムとしてのウルトラファインバブルの可能性)。

## 4. 研究成果

(1). 酸素と内因性生理活性ガスである一酸化炭素の割合に応じた臓器保存効果の違い一酸化炭素と酸素の高圧混合気体中で24-48時間保存した抽出ラット心臓の機能を維持することに成功した。そこで、ラット心臓を、高圧気相保存法(High pressure gas preservation method:HPG)を用いた保存において、異なる分圧のCOとO<sub>2</sub>の効果を比較、検討した。保存された心臓は、異所性頸動脈心移植により評価を行った。CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub>=2.0:1.5 atm)で保存された移植後の心臓の拍動再開率は67%(6/9)、CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 1.75:1.75 atm)では50%(4/8)、CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 1.5:2.0 atm)では100%(12/12)でした。CO (PCO = 3.5 atm)またはO<sub>2</sub> (P0<sub>2</sub> = 3.5 atm)で保存された移植後の心臓は拍動再開しなかった。移植後7日目の機能維持率は、CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 2.0:1.5 atm)で保存された心臓では33%(3/9)、CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 1.75:1.75 atm)では25%(2/8)でしたが、CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 1.5:2.0 atm)では100%(12/12)でした。CO + O<sub>2</sub> (PCO:P0<sub>2</sub> = 0.6:0.4 atm)で保存された移植後の心臓の復活率は13%(1/8)、CO + O<sub>2</sub>

(PCO:P02 = 0.5:0.5 atm) では13% (1/8)、CO + O2 (PCO:P02 = 0.4:0.6 atm) では25% (2/8)であった。CO (PCO = 1 atm) またはO2 (P02 = 1 atm) で保存された移植後の心臓は機能が著しく低下していた。さらに、CO + O2 (PCO : P02 = 1.5 : 2.0 atm) 群および「、CO + O2 (PCO : P02 = 2.0 : 1.5 atm) 群の詳細な比較を Langendorff system と組織病理学的解析により行ったところ、CO + O2 (PCO : P02 = 1.5 : 2.0 atm) 群の保存された心臓の左心室圧がCO + O2 (PCO : P02 = 2.0 : 1.5 atm) 群よりも良好であることが明らかになった(図1)。ラットの心臓を高压気相保存法を用いてCO とO2 の環境下にて保存することで、UW 液を用いた浸漬法よりも良い状態を維持して、摘出臓器を保存することが立証されたと同時に、臓器に感作するCO とO2 の割合(部分圧)は保存に重要であることが示された。(引用文献1)

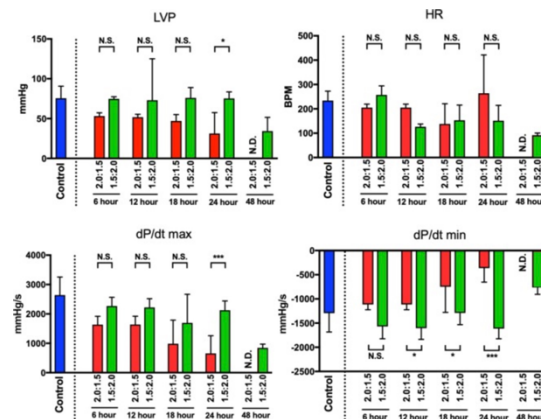


図1 Cardiac function after 6, 12, 18, 24, and 48 h of preservation under conditions of CO + O2 (PCO:P02 = 2.0:1.5 atm) and CO + O2 (PCO:P02 = 1.5:2.0 atm) using the Langendorff system. N.D., not detected; N.S., not significant, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001. P-values were calculated by two-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparison analysis. Int J Mol Sci. 2019 Jun 3;20(11):2719. High-Pressure Carbon Monoxide and Oxygen Mixture is Effective for Lung Preservation. より引用

### (2) 内因性生理活性ガスを用いた保存臓器の代謝変化

一酸化炭素と酸素の混合物を用いた高压気相保存法(HPG)は、保存されたラットの心機能を維持する。24時間の保存中、ストック液に浸して冷蔵保存(CS)法と比較して、高压気相保存法で保存されたラットの心臓の代謝物を評価し、CO とO2 の効果を確認した。

高压気相保存法で保存された臓器(HPG群)では、単純浸漬法にて保存された臓器(CS群)より乳酸が有意に低く、クエン酸は有意に高かった。さらに、アデノシン三リン酸(ATP)レベルが有意に高くなっていったことから、高压気相保存法にて保存した臓器においては、TCA回路が働き、ATP産生が行われていることが示唆された。また、一部のペントースリン酸経路(PPP)代謝物である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)もHPG群で有意に高く、酸化ストレスから細胞を保護する還元型グルタチオン(GSH)もHPG群でCS群より有意に高かった。このことから、高压気相保存法にて保存した臓器では、PPP経路が有意に行進したことで、酸化ストレスを軽減していることが示唆された。

本研究にて、CO とO2 を用いた高压気相保存法は、無酸素代謝から有酸素代謝への転換を引き起こし、保存された臓器のエネルギーを維持した。さらに、グルコース利用を解糖系の回路からPPP回路へのシフトが occur することで、酸化ストレスを減少させることが示された。保存中の摘出臓器では、酸素および内因性生理活性ガスである一酸化炭素に感作することで、代謝経路の変化が起こることが、保存臓器の状態維持に寄与することが示された。(引用文献2)

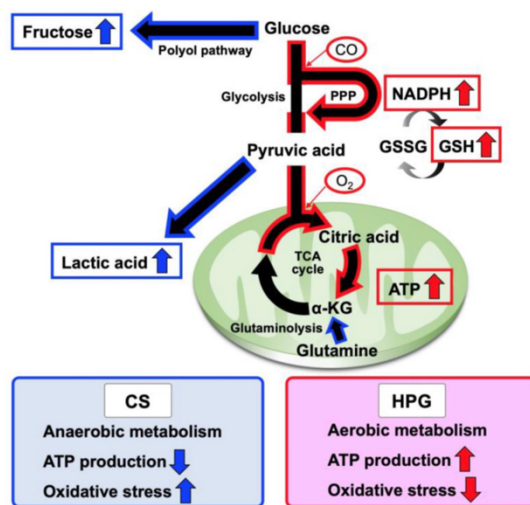


図2 Schematic representation of proposed metabolic pathways for the preservation in comparison between the cold storage (CS) method and high-pressure gas (HPG) method. ATP: adenosine triphosphate. PPP: pentose phosphate pathway. NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. GSH: glutathione. Int J Mol Sci. 2020 Nov 23;21(22):8858. Cardioprotection via Metabolism for Rat Heart Preservation Using the High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen. より引用

### (3) 臓器サイズにおける内因性生理活性ガスの効果

ラットおよび、臓器サイズがヒトにより近い犬の肺の保存において、一酸化炭素と酸素を用いた高压気相保存法が、虚血再灌流障害(IRI)の軽減に寄与するかを検証した。一酸化炭素(CO;1.5 atm)と酸素(O2;2 atm)で充満した保存室に保存し、保存前にCO とO2 の混合物(CO/O2群)または空気(空気群)で換気した。ラット肺は異所性頸動脈移植を用いて、また、犬肺は同種移植を用いて再灌流後に評価した。その結果、CO/O2群では肺胞出血が空

気群よりも軽度であり、HO-1 の mRNA 発現量は両群とも変化しなかったが、CO/O<sub>2</sub> 群では炎症関連遺伝子の発現が空気群よりも有意に低かった。肺移植片の酸素化は2群で同程度であったが、空気群では Lactate 値が高くなる傾向があった。以上より、サイズの大きい臓器においても高圧気相保存法における CO と O<sub>2</sub> を用いた高圧気相保存法は IRI を抑制し、供給者肺を保存するのに有効であると結論づけられた。一方で、肺は、内部と外部からガスに感作できるのに対し、サイズの大きい実質臓器では、外部からの感作だけでは、内部へガスの効果を送達することが出来ないことが予想された。そこで、ブタの心臓を用いて検証を行ったところ、臓器表面に近い部分の保存状態と深い部分の保存状態に差があり、ガスを送達することが一つの課題であることが示唆された。(引用文献3)

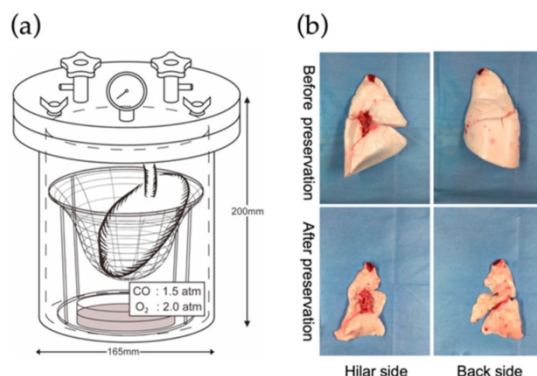


図3 Schematic representation of the preservation method. (a) The chamber was filled with a mixture of CO and O<sub>2</sub> for 20 h. Before preservation, each lung was ventilated five times either with a mixture of CO and O<sub>2</sub> at a ratio of 3:4 (CO/O<sub>2</sub> group) or air (air group). (b) In the chamber, the trachea was kept open. After preservation, the lung shrunk due to high pressure. Int J Mol Sci. 2019 Jun 3;20(11):2719. High-Pressure Carbon Monoxide and Oxygen Mixture is Effective for Lung Preservation. より引用

(4) 内因性生理活性ガス送達システムとしてのウルトラファインバブルの可能性  
内因性生理活性ガスをUFB化し、血管を介して、移植臓器全体の標的組織へガスを直接送達させる新たなガス運搬体として、気泡径が1 $\mu$ m未満であり、水中安定性の特徴を有する、ウルトラファインバブル(UFB)に着目した。摘出臓器への投与する保存液であるため、無菌状態にて作成できること、かつ、空気塞栓をふせぐために、大きさの均一性が高いことが可能である閉鎖系のUFB発生装置を開発した(図4)。

ベンチュリー効果を利用した、往復式UFB発生装置において、作成時間に伴って、UFB濃度が上昇し、ある一定時間からは、UFB濃度が増加しないことを確認した。さらに、UFBの電化など、その様々な性質を測定、検証した。さらに、細胞や臓器に与える効果、影響を検証中である(特許等のためデータ未記載)。

今後、臓器保存に利用可能なガス運搬体としてのUFB作成法を確立することは、内因性生理活性ガスの移植医療への利用を検討していく。

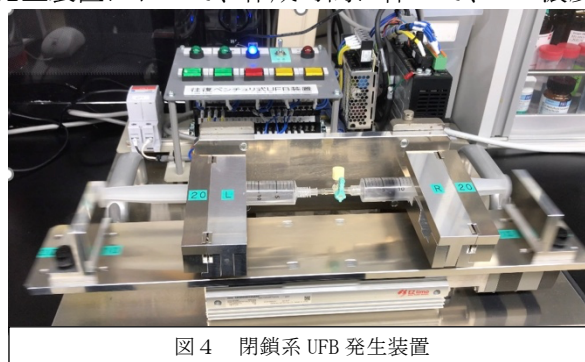


図4 閉鎖系UFB発生装置

#### <引用文献>

1. Different effects of partial pressure in a high-pressure gaseous mixture of carbon monoxide and oxygen for rat heart preservation.  
Hatayama N, Hirai S, Fukushige K, Yokota H, Itoh M, Naito M.  
Sci Rep. 2019 May 16;9(1):7480. doi: 10.1038/s41598-019-43905-0.
2. Cardioprotection via Metabolism for Rat Heart Preservation Using the High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen.  
Suzuki C, Hatayama N, Ogawa T, Nanizawa E, Otsuka S, Hata K, Seno H, Naito M, Hirai S.  
Int J Mol Sci. 2020 Nov 23;21(22):8858. doi: 10.3390/ijms21228858.
3. High-Pressure Carbon Monoxide and Oxygen Mixture is Effective for Lung Preservation.  
Fujiwara A, Hatayama N, Matsuura N, Yokota N, Fukushige K, Yakura T, Tarumi S, Go T, Hirai S, Naito M, Yokomise H.  
Int J Mol Sci. 2019 Jun 3;20(11):2719. doi: 10.3390/ijms20112719.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Chiharu, Hatayama Naoyuki, Ogawa Tadashi, Nanizawa Eri, Otsuka Shun, Hata Koichiro, Seno Hiroshi, Naito Munekazu, Hirai Shuichi	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 -

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 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
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 -

〔学会発表〕 計3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 heart 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

〔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	内藤 宗和  (NAITO Munekazu)  (10384984)	愛知医科大学・医学部・教授   (33920)	
研究分担者	福重 香  (FUKUSHIGE Kaori)  (30805023)	愛知医科大学・医学部・助教   (33920)	
研究分担者	横田 紘季  (YOKOTA Hiroki)  (50815876)	名城大学・理工学部・助教   (33919)	



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	畑山 直之  (HATAYAMA Naoyuki)  (80534792)	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