

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09108

研究課題名(和文) ガスメディエータ送達技術の拡大適応ドナー臓器への応用

研究課題名(英文) Application of gas mediator delivery system for the expanded criteria donor organs

研究代表者

畑山 直之 (Hatayama, Naoyuki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80534792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ウルトラファインバブル(UFB)化したガスメディエータを含む灌流保存液によって臓器を治癒・再生させることを目指す。灌流保存法におけるUFBの動態は、灌流時間・速度・圧によってUFBの数・サイズに大きな影響を与えないことが分かった。またマウス腎虚血再灌流モデルを用いた検討では、CO-UFBが虚血腎への保護効果を示し、機械灌流保存における灌流液へ応用できる可能性を示唆した。さらに大動物の腎臓を用いたUFBの効果を検証し、ブタやイヌの腎臓においてもCO-UFBは、腎臓に対して虚血再灌流障害を軽減させ保護効果を示し、組織学的にも糸球体や尿細管の構造を保つことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡大適応ドナー臓器の状態を改善させるには機械灌流(MP)が不可欠である。MPを使用する上で想定されうるUFBに与える影響を検証し、それらが影響を及ぼさないことを明らかにした。またマウスやブタ・イヌの虚血状態の腎臓に対して、CO-UFBが虚血再灌流障害を軽減し、保護効果を示すことがわかった。血管から投与したUFBは、臓器内部の組織に効果を発揮することを示しており、UFBはMPに使用可能であることが示唆された。本研究によって、臓器移植のMPにおいて、UFBがガスメディエータの運搬体となり、これまで利用が限られていたガスの使用方法の幅を広げ、医療応用への展開の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on ultra fine bubbles (UFB) and to regenerate organs with a perfusion preservation solution containing a gas mediator UFB. It was found that the UFB dynamics in the perfusion preservation method did not significantly affect the number and size of UFBs by the perfusion time, velocity, and pressure. In addition, it was indicated that CO-UFB, one of major gas mediators, has a protective effect on ischemic kidneys in a mice kidney ischemia-reperfusion model and may be applicable to perfusate in machine perfusion storage. We verified the effect of UFB using the kidneys of large animals. CO-UFB showed a protective effect on the kidneys by reducing ischemia-reperfusion and to maintain the structure of the glomerulus and renal tubules injury in the kidneys of pigs and dogs.

研究分野：ガスバイオロジー

キーワード：腎臓 ウルトラファインバブル 一酸化炭素 酸素 虚血再灌流障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植は、手術手技等の向上により、末期臓器不全患者に対する唯一最終の根治的治療として定着しているが、移植臓器(ドナー)不足は、世界的に非常に深刻かつ喫緊の課題である。ドナー提供数を増やす目的として欧米を中心に高齢ドナーや心停止ドナーなど、標準的ドナー条件を満たさない、これまで移植適応外とされてきた拡大適応ドナー(Expanded Criteria Donor: ECD)の活用が注目されている。しかし、虚血/再灌流障害に対して脆弱な ECD は、移植後の無機能や遷延性機能障害などの機能不全が高率に発生する。ECD 臓器の状態を改善させることを目的とした臓器保存法の開発が求められている。

(2) ウルトラファインバブル(UFB)は、気泡径が $1\mu\text{m}$ 未満の泡(バブル)であり、本邦が世界に先立ち開発した技術である。 $1\mu\text{m}$ 以上のバブルと異なり浮力が小さく、ブラウン運動により水中安定性を有し、ガス供与体を使用せず、ガスのみで供給できる。また、血球(赤血球 $7-8\mu\text{m}$ )より小さいため、末梢血管を介し、臓器の隅々まで拡散することが可能である。一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)、硫化水素( $\text{H}_2\text{S}$ )は、人体に有毒なガスとして知られている。一方で、これらのガスは、生体内で産生されるガスメディエータと定義され、生理作用として、血管調整、抗酸化、抗炎症、抗細胞死などの生体保護効果があり、治療薬剤として臨床応用が期待されている。本研究では、ガスメディエータを含有したUFBを作成し、灌流保存法における移植臓器に対するUFBの有効性を検証する。

### 2. 研究の目的

本研究では、直径 $1\mu\text{m}$ 以下の気泡であるウルトラファインバブル(UFB)に着目し、UFB化したガスメディエータを含む灌流保存液によって臓器を治療・再生させることを目指す。UFBがガス運搬体として機能することは立証されているが、国内外において、UFBを臓器移植に応用した報告は無い。申請者は、UFBを臓器内(血管内)に投与できる無菌的UFB作成装置を医療用に独自開発している。申請者がこれまで培ってきたガスメディエータの臓器保存における効果の知識と医療用UFBを開発してきた技術・経験をもとに、持続灌流保存法における臓器へのガス運搬体としてUFBを活用することを目的としている。また、UFBというガス送達技術によって、これまで利用が限られていたガスの使用方法の幅を広げ、医療応用への新たな展開を拓きたい。UFBの移植医療領域への応用方法を確立し、将来的にドナーが拡大されることで、移植医療への貢献を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の3つを目標に実験を行う。

(1) 灌流保存法でのUFB動態の検討:MPにおける循環時間・速度・圧力・フィルターの有無や、UFBを含有させる溶媒、UFBに使用するガスの種類など、様々な条件がUFBへ及ぼす影響を検証する。

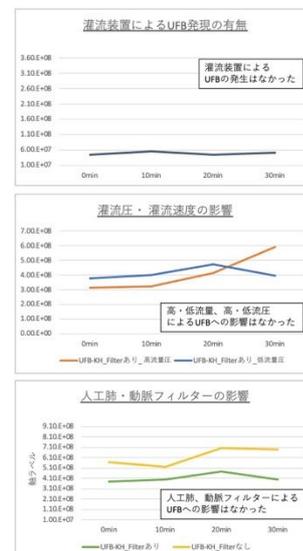
(2) マウス虚血再灌流モデルを用いたガス種の検討:マウス腎虚血再灌流障害モデルを用いてUFBの虚血再灌流障害への保護効果と最適なガス種を検討する

(3) 大動物の腎臓を用いたUFBの効果の検証:大動物の腎臓を一酸化炭素(CO)-UFBを含んだ保存液にて24時間保存し、保存効果を評価した。評価には、体外循環(IPPK or IPDK: isolated perfusion pig or dog kidney)を用いた機能評価と組織学的評価を行う。

### 4. 研究成果

(1) 灌流保存法でのUFB動態の検討

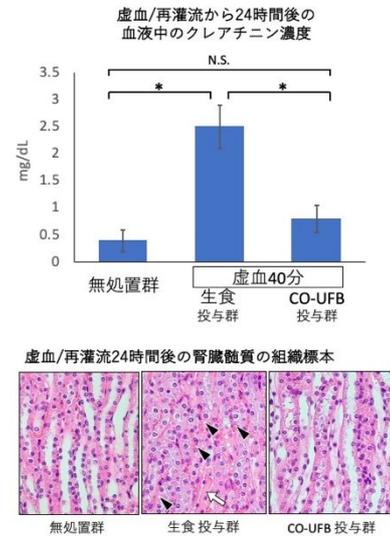
酸素およびガスメディエータを含有したUFBを作成し、機械灌流保存法(MP)における循環時間・温度・圧力や、UFBを含有させる溶媒、UFBに使用するガスの種類など、様々な条件がUFBへ及ぼす影響を検証した。灌流環境における条件(循環時間・速度・圧力・フィルターの有無)について、UFB測定装置ナノサイトにて検討したところ、灌流時間および灌流温度・圧の変化はUFBの数・サイズに大きな影響を与えないことが分かった。さらに溶媒の含有物とUFBの数の相関を明らかにするため、グルコースの濃度とUFBの数の関係を調べた。グルコースの濃度が上がるに伴って、UFBの数が増加した。この結果から、溶媒の含有物が、UFBの数に影響を及ぼすことが明らかとなった。ガス種による影響を明らかにするため、Air-UFBと一酸化炭素(CO)-UFBを比べたところ、数・サイズともに変化がないことが明らかとなった。拡大適応ドナー(ECD)臓器の状態を改善させるにはMPが不可欠である。MPを使用する上で想定されるUFBに与える影響(循環時間・温度・圧力、溶媒、ガス種)を検証し、それらが影響を及ぼさないことを明らかにした。



## (2) マウス虚血再灌流モデルを用いたガス種の検討

マウス腎虚血再灌流障害モデルを用いてUFBの虚血再灌流障害への保護効果を検証し、ガスメディエーター(H<sub>2</sub>S, NO, Xe)によるUFBの効果を検証した。

マウスを麻酔下にて開腹し、両側腎動脈を40分間クランプ後、再灌流させるマウス腎虚血再灌流障害モデルをUFBの虚血再灌流障害への効果の評価に用いた。クランプの1時間前にUFBを投与し、再灌流から24時間後に腎機能の評価し、生理食塩水を投与した群を対象群として比較したCO-UFB投与群は、生理食塩水投与群と比較して、腎機能が有意に保たれることが分かった。さらに、組織構造は何も処置していないNormal群と差がなく、組織構造がきれいに保たれていた。一方で、生理食塩水投与群では、組織間には出血が見られ尿細管にはタンパク円柱が確認された。また他のガスメディエーターとして、H<sub>2</sub>S, NO, Xeを含有させたUFBを作成し、同様の実験にてその効果を検証したが、虚血腎臓の保護に関して、大きな効果は見出せなかった。COを含んだUFBは虚血状態の腎臓に対して保護効果を示し、組織学的にもその糸球体や尿細管の構造を保ち、虚血再灌流障害を軽減することがわかった。主要なガスメディエーターにおいて、CO-UFBが虚血腎への保護効果が大きく、機械灌流保存における灌流液へ応用できる可能性を示唆した。マウス腎虚血再灌流障害モデルにて、実際に虚血状態の腎臓に対して一定の効果をもたらすことがわかった。つまり、UFBはMPに使用可能であることが示唆され、また血管から投与したUFBは、臓器内部の組織に効果を発揮することを示している。臓器移植のMPにおいて、UFBがガスメディエータの運搬体となりえる結果を得た。

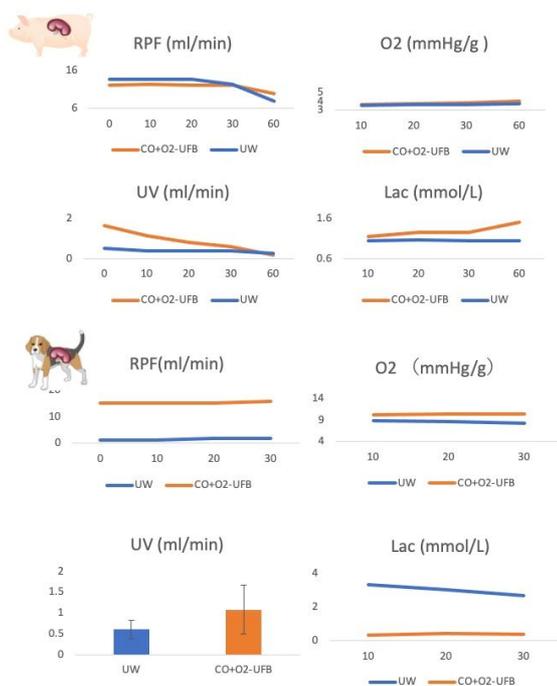


## (3) 大動物の腎臓を用いたUFBの効果の検証

大動物腎の体外循環評価モデルを確立し、ブタ腎臓やイヌ腎臓を用いて一酸化炭素(CO)-UFBを含んだ保存液にて24時間保存し、保存効果の評価した。評価には、確立した体外循環(IPPK or IPDK: isolated perfusion pig or dog kidney)による機能評価と組織学的評価を行った。

大動物腎臓体外循環評価モデルの条件を検討し、灌流評価をするための条件を確立した。ブタまたはイヌを麻酔下にて開腹し、両側の腎を脱血し、摘出後CO-UFBを含んだ保存液を灌流し、保存液に浸漬し、24時間後にIPPKまたはIPDKにて10分、20分、30分と経時的に腎管流量(RPF)を測定、灌流液を採取し、O<sub>2</sub>消費(O<sub>2</sub>)、乳酸(Lac)、尿量(UV)を測定することで、腎機能の評価・検討した。CO-UFBを含んだ保存液にて保存したイヌ腎臓は、IPDK中の腎灌流量、尿量において、UFBを含まない保存液で保存したものよりも高く維持されることが分かった。これらの結果から虚血による腎機能遅延が抑制されることが示唆された。また組織学的評価においても、糸球体、尿細管の構造を保たれているのが確認できた。

ブタ腎臓体外循環(IPPK)評価モデルの条件を確立したことで、前臨床試験として用いられるブタやイヌの腎臓を用いた実験を行うための基盤を形成できた。さらに、これまで得られたマウス腎における結果と同様に、ブタやイヌの腎臓においてもCOを含んだUFBは、腎臓に対して虚血再灌流障害を軽減させ保護効果を示し、組織学的にも糸球体や尿細管の構造を保つことが分かった。ヒトの臓器に近い大動物の腎臓で、CO-UFBの効果を示すことで、臨床応用への可能性が示唆された。今後、より詳細な解析を加え、UFBの医療への応用を開拓する。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki C, Hatayama N, Ogawa T, Nanizawa E, Otsuka S, Hata K, Seno H, Naito M, Hirai S.	4. 巻 21(22)
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 Int J Mol Sci	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 ~ 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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 ~ 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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑山 直之
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

〔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	小原 弘道 (Obara Hiromichi) (80305424)	東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授  (22604)	
研究分担者	伊藤 恭彦 (Ito Yasuhiko) (60402632)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
研究分担者	小林 孝彰 (Kobayashi Takaaki) (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
研究分担者	平井 宗一 (Hiai Shuichi) (70516054)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
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)	愛知医科大学・医学部・助教  (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
---------	---------