

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09166

研究課題名（和文）ナノバブルを用いた新たな臓器保存液の臨床応用に向けた有効性の確立とシステム開発

研究課題名（英文）Establishing the Efficacy and System Development for Clinical Application of a Novel Organ Preservation Solution Using Nanobubbles

研究代表者

原 亮介（Hara, Ryosuke）

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：80866286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：臓器保存液であるEP-TU液と、それを窒素ナノバブル化したナノバブルEP-TU液を用いてラット肺の臓器保存効果を比較する実験を行った。F344ラットの左肺を摘出後、それぞれの保存液で灌流・保存し、4時間から48時間後に評価を実施。結果、窒素ナノバブル化した保存液が肺組織の虚血性障害を抑制する可能性が示唆された。大動物であるブタの肺を用いた実験では、一部でラットと同等の効果が得られなかったため、再度ラット肺での実験を追加。今後はラット及びブタでの移植実験を予定し、炎症性サイトカインの測定を行う計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、臓器移植の成功率を向上させるための新しい保存方法を検討するものである。窒素ナノバブルEP-TU液の使用により、臓器保存中の虚血性障害が抑制される可能性が示唆された。これにより、移植臓器の品質が向上し、移植待機患者の生存率が上がることが期待される。また、保存技術の進歩は医療コストの削減にも寄与し、広く社会全体に利益をもたらす重要な成果である。さらなる研究により、他の臓器や異なる保存期間においても同様の効果が確認されれば、臓器移植の現場における標準的な保存方法として普及する可能性がある。これにより、移植手術の成功率がさらに向上し、多くの患者にとって救命の手段となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted an experiment comparing the effectiveness of organ preservation solutions, EP-TU solution, and its nitrogen nanobubble version, on preserving rat lungs. After excising the left lung of F344 rats, each lung was perfused and preserved using the respective solutions, and evaluated at intervals from 4 to 48 hours. The results suggested that the nitrogen nanobubble EP-TU solution could potentially mitigate ischemic injury in lung tissue. A similar experiment using lungs excised from pigs, a large animal model, showed that the nitrogen nanobubble solution did not achieve the same level of effectiveness as observed in rats. Consequently, additional experiments using rat lungs were conducted to verify the effects. Future plans include transplantation experiments using both rats and pigs, followed by the measurement of inflammatory cytokines such as TNF- and IL-6 through blood tests to further assess the preservation effectiveness.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：ナノバブル 臓器保存 肺移植 臓器保存液 臓器移植

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植において、現在の臓器保存液では臓器別に保存可能時間がおおよそ定められており、心臓は4時間、肺は8時間、肝臓は12時間である。ドナー臓器の摘出後運搬において、特に日本では心臓以外の臓器では一般の交通機関を使用する必要があるため、虚血時間が長くなる傾向にある。特に肺移植においては、虚血時間が8時間を超えることも稀ではなく、保存状態の改善が術後の虚血再灌流障害に關与するため、保存技術の向上が求められている。また、臓器をより少ないダメージで、より長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し、輸送費、術後管理の医療費などのコスト面においても大きく貢献すると考えられる。

一方で、組織腐敗は、主に血液や油脂分の酸化と腐敗(細菌の増殖)によって進行するため、酸素が少なく、また抗菌作用のある液体の中で臓器保存できれば、酸化や好気性細菌の増殖を抑制することが可能で、従来よりも長い期間、鮮度保持できることが期待できる。ナノバブルは気泡直径が1000nm(=1μm)より小さな気泡で、精製後約3か月後も8割残存しており、気体を高密度に、長く留めることで、その効果を高く持続できることが証明されている。(図1、表1) そのため、各施設に精製器を設置する必要がなく、価格の主体が溶液と気体の費用となるため、安価で提供できる。近年、様々な分野でナノバブルの有用性が実証されているものの、医療分野への応用は少ない。

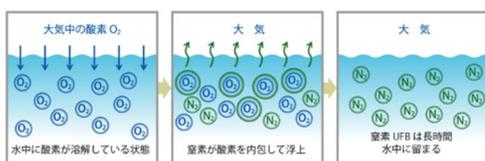


図1 窒素置換による脱酸素のメカニズム

水中に窒素を微細化混合分散させることにより、窒素が水中に溶存している酸素を内包し大気へ放散させる

項目	生成時	32日後	63日後	92日後
NB密度 (E8/ml)	9.22	7.29	7.12	7.19
NB Mode径 (nm)	113	110	122	143
NB D50%径 (nm)	123	134	137	151

表1 NB(ナノバブル)の経時的変化

NBの密度(数)は  $9.22 \times 10^8$  個/ml から  $7.19 \times 10^8$  個/ml と約3ヶ月経過後、約8割は残存している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、窒素ナノバブル EP-TU 液を用いて臓器保存中の虚血性障害を抑制する効果を検証し、新たな臓器保存液の臨床応用を目指すことである。

### 3. 研究の方法

我々が所有しているナノバブル精製器を用いて高濃度窒素ナノバブル水を作製するが、このナノバブル精製器は、特許を取得した方法で1000ml/hrの大量のナノバブル水を作製することが可能である。(特許取得済み：第4456176号)(図2) 既存の臓器保存液であるEP-TU液を用いることで、窒素ナノバブル化したEP-TU液を作製し、通常のEP-TU液との比較を行う。



図2 ナノバブル精製器

#### (1)ラット肺における保存液効果の比較検討

F344 ラットの左肺を摘出し、通常のEP-TU液と窒素ナノバブル化したEP-TU液の2つの保存液を用いて灌流・保存を行った。保存時間は4時間、8時間、16時間、24時間、48時間とし、各時間点で以下の指標を評価する。

肺組織のATPレベル：エネルギー代謝の指標としてATPの経時的変化を測定。

免疫染色による caspase-3 陽性細胞数：アポトーシスの指標として caspase-3 陽性細胞数を測定。

## (2)大動物としてのブタ肺における保存液効果の比較検討

### 4. 研究成果

#### (1)ラット肺における保存液効果の比較検討

肺組織の ATP レベル :

臓器保存液として通常の EP-TU 液を使用した場合、ATP レベルは保存時間 8 時間をピークとして、以降急速な低下を認めた。これは 8 時間以降の保存時間の延長に伴い臓器へのダメージが大きくなり、臓器保存能が急速に低下したことを意味しており、先述した肺の推奨保存時間に一致する。

一方で、窒素ナノバブル化した EP-TU 液を使用した場合、24 時間までは ATP レベルは緩やかな低下に留まる結果となった。結果として、通常の EP-TU 液を使用した場合と比較して、窒素ナノバブル化した EP-TU 液を使用した場合、4 時間・8 時間の ATP レベルに有意差はなかったが、16 時間・24 時間では有意に ATP レベルが高値であった。(図 3)

窒素ナノバブル化した EP-TU 液が、通常の EP-TU 液と比較して、臓器のダメージを軽減し、細胞のエネルギー代謝を長時間維持することが可能であることが示唆される結果であった。

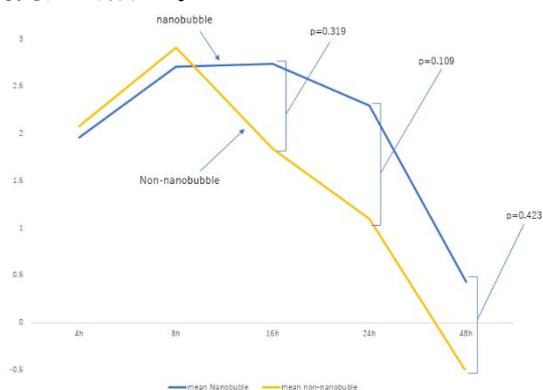


図 3 臓器保存における肺組織の ATP

免疫染色による caspase-3 陽性細胞数 :

細気管支レベルや肺胞レベルでの免疫染色による評価を行った。通常の EP-TU 液を使用した場合、窒素ナノバブル化した EP-TU 液を使用した場合ともに、保存時間の延長に伴いアポトーシス細胞が増加する傾向であり、同じ保存時間で両者を比較すると、窒素ナノバブル化した EP-TU 液を使用した場合のほうが、アポトーシス細胞の数が少なく、細胞死の抑制効果が認められた。(図 4、5)

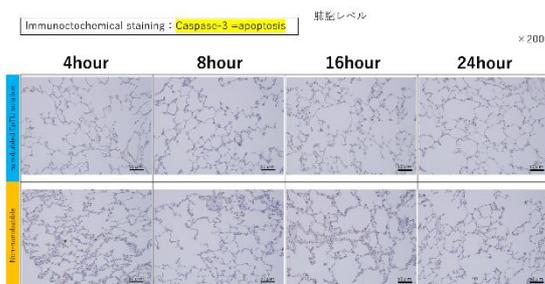


図 4 肺胞レベルでの免疫染色(caspase-3)

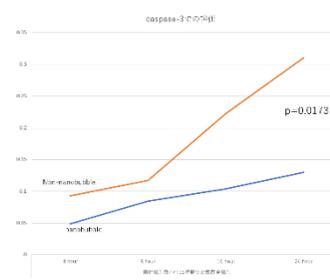


図 5 肺組織における caspase-3 陽性細胞率

以上のことから、ラットにおける肺臓器保存において、通常の EP-TU 液と比較して窒素ナノバブル化した EP-TU 液を使用することで、保存時間の延長と臓器劣化の軽減が可能であることが示唆された。この結果をうけて、大動物への有効性を検証することとした。

## (2)大動物としてのブタ肺における保存液効果の比較検討

ブタ肺においても、ラット肺と同じ方法で比較検討を行った。しかし、窒素ナノバブル化した EP-TU 液の効果にはばらつきがみられ、一部ラットと同等の効果が得られないことがあった。種間差や臓器サイズの影響の可能性も考えられた。臓器サイズに関して、ラット肺と比較してブタ肺の保存液使用量は多量となる。そのため、窒素ナノバブル化した EP-TU 液の作成においても精度にばらつきがあることが考えられた。そこで、精製容器のサイズによってナノバブル数が異なるか検討を行った。1L 容器と 3L 容器で比較したところ、1L 容器を使用した場合の方がナノバブル数は多く 30 分で最大となったのに対し、3L 容器を使用した場合では 60 分でもまだ最大には到達せずナノバブル数も 1L 容器と比較して顕著に少なかった。(図 6) 今後は、ナノバブルの温度、振動・振盪などによる外的要因、圧環境、保存環境などの外部環境による影響についても検証する。

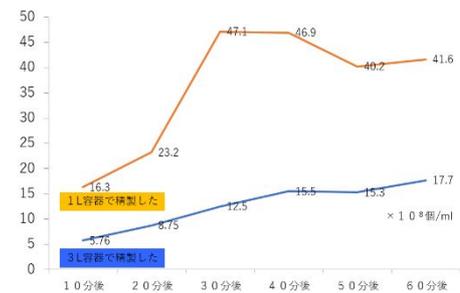


図 6 容器別ナノバブル精製数の比較

ラット肺における研究とは異なり、ブタ肺の研究にはより多くの人員や時間を要するため、研究の回数を重ねることは容易ではなく、また種間差以外にも上記を含む研究によって多少条件が異なる要素が複数考えられたため、これらの検証も行いつつ研究をすすめている段階で、研究に遅れが生じている。大動物としてのブタ肺における保存液効果の比較検討の結果報告には、もうしばらくの時間を要する。

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	松本 桂太郎  (Matsumoto Keitaro)  (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授   (17301)	
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	土谷 智史  (Tsuchiya Tomoshi)  (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員教授   (17301)	
研究分担者	高木 克典  (Takagi Katsunori)  (90635856)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員   (17301)	
研究分担者	畑地 豪  (Hatachi Go)  (80437889)	長崎大学・病院(医学系)・助教   (17301)	
研究分担者	土肥 良一郎  (Doi Ryoichiro)  (00817786)	長崎大学・病院(医学系)・助教   (17301)	

## 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	渡邊 洋之助 (Watanabe Hironosuke) (30457551)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	
研究分担者	谷口 大輔 (Taniguchi Daisuke) (20773758)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	
研究分担者	町野 隆介 (Machino Ryusuke) (90728081)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	
研究分担者	小山 正三郎 (Oyama Shozaburo) (20815972)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	

## 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