

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/195852

発行日 平成30年7月26日 (2018. 7. 26)

(43) 国際公開日 平成29年11月16日 (2017. 11. 16)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/00	(2006. 01)	C 1 2 N	5/00	Z N M	4 B 0 2 9	
C 1 2 M	1/00	(2006. 01)	C 1 2 M	1/00	Z	4 B 0 6 5	
A 6 1 K	33/00	(2006. 01)	A 6 1 K	33/00		4 C 0 7 6	
A 6 1 P	35/00	(2006. 01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 6	
A 6 1 K	9/08	(2006. 01)	A 6 1 K	9/08			

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

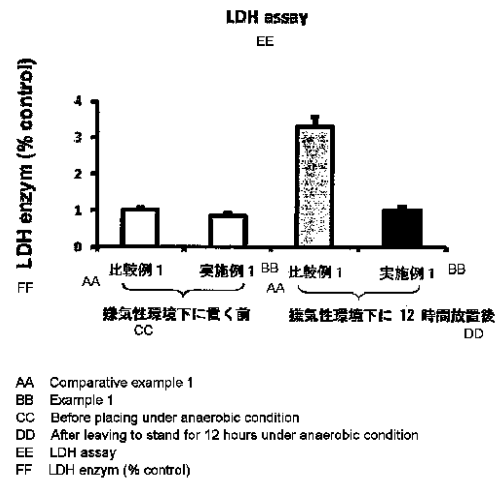
出願番号	特願2018-517070 (P2018-517070)	(71) 出願人	304041976 シグマテクノロジー株式会社 茨城県ひたちなか市中根5147-10
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/017779	(71) 出願人	516143259 山之内 大 アメリカ合衆国 53593 ウィスコン シン州、ペローナ、ホリブッ シュレーン 8816
(22) 国際出願日	平成29年5月11日 (2017. 5. 11)	(74) 代理人	100176164 弁理士 江口 州志
(31) 優先権主張番号	特願2016-96775 (P2016-96775)	(72) 発明者	山之内 大 アメリカ合衆国 53593 ウィスコン シン州、ペローナ、ホリブッ シュレーン 8816
(32) 優先日	平成28年5月13日 (2016. 5. 13)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体投与可能な水溶液及びその製造方法

(57) 【要約】

末梢細胞に酸素を十分に供給する機能を有し、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果が十分に高く、安定的な効果が持続して得られる生体投与可能な水溶液及びその製造方法を提供する。本発明の生体投与可能な水溶液は、酸素ナノバブルを含み、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの前記酸素のナノバブルの平均粒径及び密度がそれぞれ30nm以下及び1mlあたり 10^{16} 個以上、好ましくは1~10nm及び1mlあたり 10^{17} 個以上である。本発明の生体投与可能な水溶液は、溶存酸素を含む水溶液を、2以上の貫通小穴を周方向に有する筒の外部から該貫通小穴を通して大気圧以上の圧力で噴射させ、前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で前記筒の中心に水撃が集中するように衝突させて発生させた酸素ナノバブルを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸素ナノバブルを含む生体投与可能な水溶液であって、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの前記酸素ナノバブルの平均粒径及び密度がそれぞれ 30 nm 以下及び 1 ml あたり 10^{16} 個以上であることを特徴とする生体投与可能な水溶液。

【請求項 2】

氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの前記酸素ナノバブルの平均粒径及び密度がそれぞれ 1 ~ 10 nm 及び 1 ml あたり 10^{17} 個以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の生体投与可能な水溶液。

【請求項 3】

前記生体投与可能な水溶液が、前記生体投与可能な水溶液の 100 質量部に対して、塩化ナトリウムを 0.85 ~ 0.95 質量% で含む生理食塩水であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の生体投与可能な水溶液。

【請求項 4】

前記生体投与可能な水溶液が、5% ブドウ糖液を添加した低張複合電解質液、リンゲル液、高カロリー液及びヘパリンを含む生食液の群から選択されるいずれかの輸液であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液。

【請求項 5】

前記生体投与可能な水溶液が、細胞培養液であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液。

【請求項 6】

前記生体投与可能な水溶液が、癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止するために生体内への投与又は経口摂取によって使用する水溶液であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液。

【請求項 7】

溶存酸素を含む水溶液を、2 以上の貫通小穴を周方向に有する筒の外部から該貫通小穴を通して大気圧以上の圧力で噴射させるときに、前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように配置された前記 2 以上の貫通小穴のそれぞれの開口部から噴射した溶存液を前記筒の中心に水撃が集中するように衝突させることによって発生させた酸素ナノバブルを含有し、該酸素ナノバブルは、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの平均粒径及び密度がそれぞれ 30 nm 以下及び 1 ml あたり 10^{16} 個以上であることを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 8】

前記酸素ナノバブルにおいて、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの平均粒径及び密度がそれぞれ 1 ~ 10 nm 及び 1 ml あたり 10^{17} 個以上であることを特徴とする請求項 7 に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 9】

気体及び液体をそれぞれ吸引する手段と、前記気体及び前記液体を同時に加圧して搬送する手段と、該搬送された気体を含む前記液体を新たな酸素と混合させることによって溶存酸素を富化させるための気液混合槽と、該気液混合槽において気液混合の状態にある溶存液を用いてナノバブルを発生させるために、空洞の筒、該筒の周方向に 2 以上の貫通小穴のそれぞれの開口部が前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように配置された前記 2 以上の貫通小穴、及び前記筒の少なくとも片端部にナノバブル吐出口を有し、前記貫通小穴は該貫通小穴の断面中心部を通る延長線のすべてが前記筒の中心で交差するように配置される噴射ノズルと、を備えるナノバブル発生手段によって前記酸素ナノバブルを発生させることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 10】

前記貫通小穴は、前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように、前記筒の周方向等間隔に 4 個以上 8 個以内で設けられ、前記筒の空洞に通じる部分の孔径が 0.1

10

20

30

40

50

～ 0.5 mmであることを特徴とする請求項 7～9 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 11】

前記生体投与可能な水溶液が、前記生体投与可能な水溶液の 100 質量部に対して、塩化ナトリウムを 0.85～0.95 質量%で含む生理食塩水であることを特徴とする請求項 7～10 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法において、前記溶存酸素を含む水溶液として塩化ナトリウムを 0.85～0.95 質量%で含有する水溶液を使用することにより生理食塩水を製造することを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法。

10

【請求項 13】

請求項 11 に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法において、前記溶存酸素を含む水溶液として塩化ナトリウムを含まない水溶液を使用し、前記酸素ナノバブルを含む水溶液を製造した後、前記酸素ナノバブルを含む水溶液に塩化ナトリウムを前記生理食塩水の 100 質量部に対して 0.85～0.95 質量%で配合することにより生理食塩水を製造することを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 14】

前記生体投与可能な水溶液が、カリウム及びカルシウムの少なくとも 1 種の元素、5%ブドウ糖液、アミノ酸並びにヘパリンの群からなる選択される少なくともいずれかの添加剤を含有して製造される輸液であることを特徴とする請求項 7～13 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

20

【請求項 15】

前記生体投与可能な水溶液が、細胞を培養するために使用する細胞培養液として製造されることを特徴とする請求項 7～14 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【請求項 16】

前記生体投与可能な水溶液が、癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止するために生体内への投与又は経口摂取によって使用する水溶液であることを特徴とする請求項 7～14 のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果の高い生体投与可能な水溶液及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

マイクロ・ナノバブルは、非特許文献 1 に記載されているように、(a) 気泡径が小さいこと、(b) 上昇速度が遅いこと、(c) 摩擦抵抗を低減すること、(d) 気泡内圧力が高いこと、(e) 気液界面が大きいこと、(f) ガスの溶解量が大きいこと、(g) 溶解、収縮を伴うことと、及び(h) 気泡表面が負に帯電していること、等の様々な特徴を有する。特に、ナノバブルは粒径が 1 μm 未満と非常に小さく、ナノバブルを含む液体では目視確認ができず無色透明になること、粒子径が小さくなるほど浮力が粘性力に比べて非常に小さくなるため、上面に浮上しないで液体中に超微細バブルのままで長期間存在できること、等が知られている。ナノバブルは、これらの特徴を利用して医療分野への応用が期待されている。

40

【0003】

例えば、特許文献 1 には、気泡径が 1～1000 nm、好ましくは 50～500 nm の酸素ナノバブルを含んでなる、輸液が提案されている。前記特許文献 1 に記載の発明は、赤血球と接合している「接合型酸素」と、赤血球に溶解している「溶解型酸素」において、末梢細胞に酸素を供給することができる「溶解型酸素」の割合が非常に小さく、その不

50

足分を補うために酸素含量の高い輸液を提供するものである。この輸液は、「脳低温療法」、「脳の無血手術」又は「末梢循環不全症への治療」への使用を目的としており、ラットを用いた脳の選択的冷却法に適用するとき、酸素ナノバブルを含有しない輸液（リンゲル液）に比べて高い酸素分圧を得ることができる。そして、前記特許文献1の実施例1には、酸素ナノバブル含有生理食塩水を、特許文献2に記載の方法によって製造することができることが記載されている。

【0004】

また、特許文献3には、動的光散乱法で求められる個数平均径が300nm以下の気泡を含むナノバブル水を有効成分とするNK（ナチュラルキラー）活性増強剤の存在下で培養して調整されるNK活性増強リンパ球、NK活性増強単核球、又は細胞免疫製剤を含有する輸液製剤が提案されている。前記特許文献3に記載の発明は、動的散乱法において個数平均径が300nm以下の微細気泡を含むナノバブル水に、NK活性を増強させる作用があることを見出してなされたものであり、実際に体積平均粒径が0.3734 μ m（373.4nm）、個数平均径が0.2995 μ m（299.5nm）の酸素ナノバブルを使用してNK活性の増強が確認されている。

10

【0005】

さらに、特許文献4には、心血管疾患又は状態の治療用薬剤の調整のために使用する界面動電的に改変された水性流体として、平均直径が約100nm未満である酸素含有ナノバブルがイオン水性流中で安定的に形成され、帯電安定化した酸素含有ナノ構造のイオン水溶液を含む水性流体が開示されている。そして、前記イオン水溶液には食塩水を含むことが記載されている。

20

【0006】

一方、ナノバブルを含む輸液や生理食塩水は、上記のような治療目的だけでなく、癌の治療又は予防のための薬剤としての検討も行われている。例えば、特許文献5には実施例1において、オゾンナノバブル水及び酸素ナノバブル水とオゾンナノバブル水とを混合した塩分濃度が0.3質量%であるナノバブル水を癌の治療又は予防に適用することが提案されている。このときに使用するナノバブル水は、前記特許文献2に記載の方法によって製造することが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0007】

【特許文献1】特開2011-1271号公報

【特許文献2】特開2005-246294号公報

【特許文献3】特開2010-75180号公報

【特許文献4】特表2013-538803号公報

【特許文献5】特開2009-84258号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】柘植 秀樹、「マイクロバブル・ナノバブルの基礎」、Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn., 2010年、第64巻、p4-10

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

酸素ナノバブルを含む水溶液は、従来から生理食塩水、輸液又は細胞培養液等の生体投与可能な水溶液に適用することが検討されており、酸素供給能の向上や各種の治療に対してある程度の効果がみられている。しかしながら、その効果は期待されたものより小さく、また、効果のバラツキがみられ安定的に持続しないことから、医療効率及び安全性と安心の確保等の点から具体的な適用が進んでいないのが実情である。酸素ナノバブルを含む水溶液を生理食塩水、輸液又は細胞培養液に適用するためには、効果が明確に現れ、且つ、その効果が安定的に持続して得られることが必要不可欠な条件となる。

50

【0010】

前記の生体投与可能な水溶液において、生理食塩水は、輸液、各種添加剤を含む輸血又は注射用薬剤の溶媒として使用されることから特に有用である。そのため、末梢細胞に酸素を十分に供給する機能を有し、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果を高めることができる生理食塩水のニーズは極めて高い。

【0011】

前記特許文献1に記載されている輸液は、酸素ナノバブルの気泡径が1～1000nmと規定されているものの、輸液を製造するために実際に検討された生理食塩水に含まれる酸素ナノバブルの気泡径は50～500nmである。前記特許文献1には、酸素ナノバブルを含有しない輸液（リンゲル液）に比べて高い酸素分圧が観測されることが記載されているが、その効果は定量的に検証されたものではなく、実際に低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果を十分に有するのかが否かが不明である。本発明者等の検討によると、生理食塩水等の生体投与可能な水溶液に含まれる酸素ナノバブルの気泡径が50nm以上であると、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果がほとんど得られず、酸素ナノバブルを含まない生理食塩水と比べて優位差がほとんど無いことが確認された。また、前記特許文献1に記載の発明と同じ方法で製造される前記特許文献2に記載の酸素ナノバブル水においても、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果が十分に得られないことが分かった。

10

【0012】

前記特許文献3に記載の輸液製剤は、動的光散乱法で求められる個数平均径が300nm以下の酸素気泡を有するが、実際に実施例として検討された酸素ナノバブルの気泡径は個数平均径が299.5nmである。そのため、前記特許文献1及び2と同じように、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果を十分に有するのかが不明である。気泡径が50nm以上である酸素ナノバブルを有する生理食塩水を用いて本発明者らが行った上記の検討結果を鑑みると、前記特許文献3に記載の発明も、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果を得ることが難しい。

20

【0013】

また、前記特許文献4に記載の水性流体は、平均直径が約100nm未満である酸素含有ナノバブルがイオン水性流中で安定的に形成されるものであるが、酸素含有ナノバブルの平均直径については実際に測定が行われておらず、0.22及び0.1ミクロンフィルターを通過したときの溶解酸素測定結果から、酸素含有ナノバブルの平均直径を100nm未満と推定しているに過ぎない。加えて、前記特許文献4には水性流体に含まれる酸素含有ナノバブルの密度が記載されておらず、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果を十分に奏する水性流体であるのかが不明である。

30

【0014】

さらに、前記特許文献5に開示されているように、ナノバブル水は癌の治療又は予防に効果があると期待されているものの、安定的に持続して顕著な効能が得られていないためナノバブル水の効能に対しては疑問視されており、具体的な治療への適用が進んでいないのが現状である。これは、従来から使用されているナノバブル水は気泡径が最小でも50nmであるため、温度や保管状態等の使用環境によってはナノバブルが急速に消失しやすく、且つ、生体内の細胞や血管への吸収性又は浸透性の点でも十分に機能していないためであると本発明等は考えた。前記特許文献5の発明においても、使用するナノバブル水は前記特許文献2に記載の方法で作製されており、その気泡径は50nm以上である。

40

【0015】

本発明は、上記した従来の問題点に鑑みてなされたものであって、生理食塩水等の生体投与可能な水溶液に含まれる酸素ナノバブルの平均粒径が従来技術よりも小さく、且つ、その密度が高い場合に、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果が十分に得られるという検証に基づき、生体投与可能な水溶液に含まれる酸素ナノバブルの平均粒径をより小さくするだけでなく、酸素ナノバブルの密度についても高くする方向で最適

50

化することによって、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果、及び嫌気性環境下で起きやすい癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果を高くするとともに、それらの効果が安定的に持続して得られる生体投与可能な水溶液及びその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、生理食塩水等の生体投与可能な水溶液に含まれる酸素ナノバブルの平均粒径を50 μ m未満に小さくし、且つ、酸素ナノバブルの密度を高くする方向で規定するとともに、そのような性状と特性を有する酸素ナノバブルの形成方法を生体投与可能な水溶液の製造方法として適用することによって上記の課題を解決できることを見出して本発明に

10

【0017】

すなわち、本発明の構成は以下の通りである。

[1]本発明は、酸素ナノバブルを含む生体投与可能な水溶液であって、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの前記酸素ナノバブルの平均粒径及び密度がそれぞれ30nm以下及び1mlあたり 10^{16} 個以上であることを特徴とする生体投与可能な水溶液を提供する。

[2]本発明は、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの前記酸素ナノバブルの平均粒径及び密度がそれぞれ1~10nm及び1mlあたり 10^{17} 個以上であることを特徴とする前記[1]に記載の生体投与可能な水溶液を提供する。

20

[3]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、前記生体投与可能な水溶液の100質量部に対して、塩化ナトリウムを0.85~0.95質量%で含む生理食塩水であることを特徴とする前記[1]又は[2]に記載の生体投与可能な水溶液を提供する。

[4]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、5%ブドウ糖液を添加した低張複合電解質液、リンゲル液、高カロリー液及びヘパリンを含む生食液の群から選択されるいずれかの輸液であることを特徴とする前記[1]~[3]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液を提供する。

[5]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、細胞培養液であることを特徴とする前記[1]~[4]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液を提供する。

[6]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止するために生体内への投与又は経口摂取によって使用する水溶液であることを特徴とする前記[1]~[4]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液を提供する。

30

[7]本発明は、溶存酸素を含む水溶液を、2以上の貫通小穴を周方向に有する筒の外部から該貫通小穴を通して大気圧以上の圧力で噴射させるときに、前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように配置された前記2以上の貫通小穴のそれぞれの開口部から噴射した溶存液を前記筒の中心に水撃が集中するように衝突させることによって発生させた酸素ナノバブルを含有し、該酸素ナノバブルは、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの平均粒径及び密度がそれぞれ30nm以下及び1mlあたり 10^{16} 個以上であることを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[8]本発明は、前記酸素ナノバブルにおいて、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの平均粒径及び密度がそれぞれ1~10nm及び1mlあたり 10^{17} 個以上であることを特徴とする前記[7]に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供

40

する。

[9]本発明は、気体及び液体をそれぞれ吸引する手段と、前記気体及び前記液体を同時に加圧して搬送する手段と、該搬送された気体を含む前記液体を新たな酸素と混合させることによって溶存酸素を富化させるための気液混合槽と、該気液混合槽において気液混合の状態にある溶存液を用いてナノバブルを発生させるために、空洞の筒、該筒の周方向に2以上の貫通小穴のそれぞれの開口部が前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように配置された前記2以上の貫通小穴、及び前記筒の少なくとも片端部にナノバブル吐出口を有し、前記貫通小穴は該貫通小穴の断面中心部を通る延長線のすべてが前記筒の中

50

心で交差するように配置される噴射ノズルと、を備えるナノバブル発生手段によって前記酸素のナノバブルを発生させることを特徴とする前記[7]又は[8]に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[10]本発明は、前記貫通小穴が、前記筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように、前記筒の周方向等間隔に4個以上8個以内で設けられ、前記筒の空洞に通じる部分の孔径が0.1~0.5mmであることを特徴とする前記[7]~[9]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[11]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、前記生体投与可能な水溶液の100質量部に対して、塩化ナトリウムを0.85~0.95質量%で含む生理食塩水であることを特徴とする前記[7]~[10]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

10

[12]本発明は、前記[11]に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法において、前記溶存酸素を含む水溶液として塩化ナトリウムを0.85~0.95質量%で含有する水溶液を使用することにより生理食塩水を製造することを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[13]本発明は、前記[11]に記載の生体投与可能な水溶液の製造方法において、前記溶存酸素を含む水溶液として塩化ナトリウムを含まない水溶液を使用し、前記酸素ナノバブルを含む水溶液を製造した後、前記酸素ナノバブルを含む水溶液に塩化ナトリウムを前記生理食塩水の100質量部に対して0.85~0.95質量%で配合することにより生理食塩水を製造することを特徴とする生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

20

[14]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、カリウム及びカルシウムの少なくとも1種の元素、5%ブドウ糖液、アミノ酸並びにヘパリンの群から選択される少なくともいずれかの添加剤を含有して製造される輸液であることを特徴とする前記[7]~[13]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[15]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、細胞を培養するために使用する細胞培養液として製造されることを特徴とする前記[7]~[14]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

[16]本発明は、前記生体投与可能な水溶液が、癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止するために生体内への投与又は経口摂取によって使用する水溶液であることを特徴とする前記[7]~[14]のいずれかに記載の生体投与可能な水溶液の製造方法を提供する。

30

【発明の効果】

【0018】

本発明の生体投与可能な水溶液は、従来よりも小さな平均粒径を有する酸素ナノバブルが大量に含まれることにより、末梢細胞に酸素を十分に供給する機能を有し、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果を高めることができる。さらに、細胞を保護する効果が長期間に亘って安定して得られるだけでなく、その効果のバラツキを大幅に低減することができる。

【0019】

さらに、本発明の生体投与可能な水溶液は気泡径が30nm以下であり、好ましくは1~10nmと従来よりも小さいため、ナノバブルの寿命が温度や保管状態等の使用環境によって影響を受けることが小さく、且つ、生体内の細胞や血管等へのナノバブル水の吸収性又は浸透性が優れる。そのため、嫌気性環境下で起きやすい癌細胞の増殖及び肥大化を抑制する効果を安定的に継続して得ることができる。

40

【0020】

また、本発明による生体投与可能な水溶液の製造方法は、従来のナノバブル発生装置と比べて、30nm以下の平均粒径を有する酸素ナノバブルを大量に、且つ、安定的に発生することができるため、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護するという効果、及び嫌気性環境下で起きやすい癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果を長期に亘って安定的に得ることができる生体投与可能な水溶液を容易に製造することができる。そのような効果を有する生体投与可能な水溶液は、従来

50

技術では製造することが困難であり、本発明の製造方法によって初めて得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明の生体投与可能な水溶液を製造するための酸素ナノバブル発生装置を示す正面図及び斜視図である。

【図2】図1に示す酸素ナノバブル発生装置において、酸素ナノバブルを発生させるノズル形状及び処理液を噴射するノズルヘッダーの例をそれぞれ示す図である。

【図3】図2に示す液衝突ノズル12の1個の形状を示す図である。

【図4】参考例1の空気ナノバブル水及びナノバブルを含まない水について、それらアモルファス氷の電子顕微鏡像の写真及びナノバブルの粒度分布を示す図である。

【図5】本発明の実施例1の酸素ナノバブル水について、アモルファス氷の電子顕微鏡像の写真を示す図である。

【図6】動的光散乱法で測定した実施例1の酸素ナノバブル水のバブル粒径を個数分布で示す図である。

【図7】本発明の実施例1及び比較例1において、嫌気性環境下に置く前と放置後での細胞の形態変化を示す写真撮影図である。

【図8】本発明の実施例1及び比較例1において、細胞障害時に漏れ出る酵素(LDH)の量を嫌気性環境下に置く前と放置後でそれぞれ測定した結果を示す図である。

【図9】本発明の実施例1及び比較例1において、細胞発育力(cell viability)を嫌気性環境下に置く前と放置後でそれぞれ測定した結果を示す図である。

【図10】本発明の実施例1と比較例2において、嫌気性環境下に放置後で撮影した細胞の形態変化を示す写真撮影図である。

【図11】本発明の実施例1と比較例2において、嫌気性環境下に放置後で測定した細胞生存率を示す図である。

【図12】本発明の実施例3と比較例3において、癌細胞の培養を行ったときに使用した市販の低酸素培養キットを示す図である。

【図13】本発明の実施例3と比較例3において、O₂濃度が約1%である低酸素雰囲気中で6時間及び24時間留置した後のHIF-1 α 及びHSC70の各タンパク質の誘導結果を示す図である。

【図14】図12の(a)において黒く写っている部分の面積を画像処理によって数値化するときの手順を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

気体のマイクロナノバブル発生させる技術としては、前記非特許文献1に記載されているように、旋回液流式、スタティックミキサー式、ベンチュリー式、加圧溶解式、細孔式等の様々な方法が従来から提案されている。また、前記特許文献1及び2に記載されているように、水溶液中に含まれる酸素を含有する微小気泡に物理的的刺激、例えば、水中放電による衝撃波等を加えることにより、より微細な酸素ナノバブル(気泡径50~500nm)を発生させる方法も提案されている。しかしながら、これら従来のナノバブル発生方法で得られる気泡径は、最も小さいものでも50nm位が限度である。加えて、100nm以下の気体ナノバブルは可視光及び紫外光の波長よりも小さい直径を有する非常に微細な粒子であるため、粒径を精密に測定できる測定技術が確立されておらず、気体のナノバブルを含む水溶液として一般的に呼ばれるものは、数十nm以下の粒子径を有するナノバブルの存在を明確に証明することが困難であった。

【0023】

本発明者等は、従来のマイクロナノバブル発生方法で得られる最も小さな気泡径として50nmを有する酸素ナノバブルを含む生理食塩水を用いて、低酸素性又は嫌気性の刺激下で細胞を保護する効果を検証した。検証は、酸素ナノバブルを含む生理食塩水を細胞培養液に50%混合した状態で、嫌気性(低酸素)刺激下で細胞形態の変化及び細胞損傷の

10

20

30

40

50

程度を定性的及び定量的に測定し、実際に細胞の保護がどの程度行えるかを調べることに
よって行った。その結果、細胞の損傷程度は、酸素ナノバブルを含まない生理食塩水と比
べて効果の優位差がほとんど無く、50nm以上の気泡径を有する酸素ナノバブルを含む
生理食塩水では細胞の大きな細胞損傷が見られ、細胞障害が大きいことが分かった。した
がって、細胞を保護する効果に対しては、生理食塩水に含まれる酸素ナノバブルの粒径と
して一般的に1000nm未満、500nm未満、300nm未満又は100nm未満と
規定するだけでは十分でないことが明らかとなった。

【0024】

本発明は、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の保護効果を検証する上記の結果
から、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護する効果が、生理食塩水に含ま
れる酸素ナノバブルの平均粒径を従来方法よりもさらに小さく、且つ、その密度を高くす
ることによって十分に得られるではないかとの思想に基づいて、そのような性状及び特性を
有する酸素ナノバブルを含む生理食塩水を製造できる方法について試行錯誤で検討を行い
、実現可能な方法を見出すことによってなされたものである。そして、実際にその方法に
よって製造される生理食塩水を細胞培養液として使用することにより、低酸素性又は嫌気
性の刺激下で細胞を保護する効果が確認された。なお、検証結果については、後述の実施
例において詳細に説明する。

10

【0025】

本発明において使用する生理食塩水に含まれる酸素ナノバブルの大きさは、平均粒径で
規定することができる。平均粒径が小さいものほど、ナノレベルで含まれるバブルの量が
多く、それよりも大きな粒径を有するバブルの量が少なくなる傾向にある。マイクロ・ナ
ノバブルの大きさは、粒度分布（粒径の標準偏差）によっても影響を受けるが、その影響
は小さく、生理食塩水に含まれるナノバブルは、平均粒径が50nm未満のオーダーであ
り、できるだけ小さい平均粒径を有することが必要である。

20

【0026】

本発明において、酸素ナノバブルは、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測
定したときの平均粒径が30nm以下であり、好ましくは1nm以上で10nm以下であ
る。酸素ナノバブルの平均粒径が30nm以下であるときに、低酸素性又は嫌気性の刺激
下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果が高い状態で安定的に持続
して得られる。さらに、10nm以下であれば、著しく大きな効果を得ることができる。
他方、細胞を保護する効果は、酸素ナノバブルの平均粒径が1nm未満であっても飽和す
る傾向にあり、酸素ナノバブル発生装置を製造するときの技術的なハードルの高さを考慮
すると経済性及びメンテナンス容易性の観点から、平均粒径は1nm以上で規定するのが
好ましい。

30

【0027】

本発明においては、酸素ナノバブルの平均粒径だけでなく、さらに、生理食塩水等の生
体付与可能な水溶液1ml中に含まれる個数、すなわち、酸素ナノバブルの密度を高い値
に規定することが必要である。これは、酸素ナノバブルの平均粒径を30nm以下と非常
に小さくすることによりバブルの保存安定性及び粒径維持性の向上を図る一方で、低酸素
性又は嫌気性の刺激下で細胞を保護する機能を十分に発揮できるように、生理食塩水等の
生体付与可能な水溶液1ml中に含まれる酸素の総量を高くする必要があるためである。

40

【0028】

本発明で使用する生理食塩水等の生体付与可能な水溶液に含まれる酸素ナノバブルの密
度は、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定したときの密度が生理食塩水等
の生体付与可能な水溶液1mlあたり 10^{16} 個以上であることが必要であり、好ましく
は 10^{17} 個/ml以上である。本発明で利用する酸素ナノバブルは、そもそも平均粒径
が非常に小さいため、その密度が 10^{16} 個未満であると、単位体積当たりの生体付与可
能な水溶液に含まれる酸素濃度が薄くなるため、低酸素性又は嫌気性の刺激下で細胞を保
護する効果を十分に得ることができない。低酸素性又は嫌気性の刺激下で細胞を保護す
る効果は、酸素濃度が高いほど大きくなる。さらに、酸素ナノバブルの平均粒径が1~10

50

nmの場合は、生体付与可能な水溶液に含まれる酸素の濃度を十分に確保するため、酸素ナノバブルの密度が 10^{17} 個/ml以上であるのが好ましい。

【0029】

マイクロ・ナノバブルの粒径の測定方法としては、従来から様々な方法が知られている。それらの中で、ナノバブルの計測法は、光学的な観察が困難であるため、例えば、ミー散乱光を利用する光散乱法、レーザ回折・散乱法、液中のバブル粒子のブラウン運動を観測するナノ粒子トラッキング解析法、細孔電気抵抗法（コール・カウンター法）、動的光散乱法、MEMS（Micro Electro-Mechanical Systems）の梁を利用する共振式質量測定法等が提案されている。これらの方法以外にも、ゼータ電位測定によるナノバブルの粒子径を求める方法やスピントラップ剤を用いて電子スポン共鳴法（ESR）によるナノバブルの存在を確認する方法が提案されている。

10

【0030】

本発明等は、上記以外のマイクロ・ナノバブル計測法として、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法を提案している（特願2014-230407号を参照）。この方法は、液体を非晶質の固相状態にし、前記非晶質の固相状態にある液体に含まれる超微細バブルを透過型電子顕微鏡を用いて観察することによって、液中に含まれる超微細バブル及びその分布状態を直接的に画像として観測し解析できる。そのため、10nm未満の粒径を有する超微細バブルを高精度に測定することができる。また、この方法は、酸素ナノバブルの平均粒径の他にも、粒径分布及び密度を求めることができるため、本発明において規定する酸素ナノバブルの平均粒径及び密度は、この方法で測定して求めたものである。

20

【0031】

氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法は、マイクログリッド又はマイクロメッシュに保持した液体を試料として用い、エネルギーが10～300キロエレクトロンボルト（keV）の透過型電子顕微鏡によって、観察のときに用いる電子線の数を $1 \sim 10^5$ 電子/ cm^2 に設定して測定が行われる。

【0032】

なお、本発明で使用する酸素ナノバブル水のバブル粒径は、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法以外にも、例えば、動的光散乱法（光子相関法）によって測定することが可能である。例えば、大塚電子製の粒径・分子量測定システム（型番：ELS Z-2000S）又はゼータ電位・粒径・分子量測定システム（型番：ELS Z-2000ZS）等の測定装置を用いて、特殊なデータ処理を行うことによって10nm以下のバブル径の測定が可能になる。ここで、特殊なデータ処理とは、例えば、測定の積算回数を増やし、測定時に不確定乱反射するデータだけを削除することによって安定的に存在する粒子だけを抽出し、その粒径を測定する方法である。

30

【0033】

本発明者等が検討を行った結果、動的光散乱法による測定方法でも、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法と同じような粒径測定結果が得られることが確認できた。両者の測定方法の対比については、後述の実施例1において具体的なデータを示しながら説明する。しかしながら、動的光散乱法は測定粒子が内実であるのか、又は中空であるのかを明確に区別することが極めて難しい。さらに、酸素ナノバブルの密度についても高精度測定を行うことが技術的な制約を受け、困難である。それに対して、本発明のように氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法は、電子顕微鏡によって測定粒子が内実か中空であるかを明確に区別して観測することができるだけでなく、酸素ナノバブルの密度も高精度で測定することが可能である。したがって、本発明においては、酸素ナノバブル径の測定方法として、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定する方法を採用する。

40

【0034】

本発明の生体投与可能な水溶液は、通常の生理食塩水と同じように、浸透圧が血液又は体液に合致するように基本的に0.9質量%の塩化ナトリウムを含むことにより生理食塩

50

水として使用することができる。本発明の生理食塩水において、塩化ナトリウムの含有量は、ある程度のバラツキがあっても許容されている。しかしながら、塩化ナトリウムの含有量が0.9質量%から極端に離れる場合は使用が大きく制限される。したがって、本発明の生体投与可能な水溶液を生理食塩水として使用する場合は、塩化ナトリウムを生理食塩水の100質量部に対して0.85~0.95質量%の範囲で含むことが好ましい。

【0035】

本発明の生理食塩水は、人体の臓器又は生体内反応の酸化還元電位に合わせるために、酸化還元電位を調整する場合には、水素ナノバブルや他の電解質溶液を少量混入させてもよい。また、生理食塩水のpHを調整するため、電解質等からなるpH調整剤を添加してもよい。

10

【0036】

また、本発明の生体投与可能な水溶液は、次のような各種の添加剤を含む輸液として使用することができる。例えば、本発明の生理食塩水に、5%ブドウ糖液を所定の量で添加した低張複合電解質液、カリウムやカルシウムを加えたリンゲル液、ブドウ糖やアミノ酸を添加した高カロリー液、ヘパリンを添加した生食液である。本発明の輸液を製造する場合は、通常、本発明で得られる生理食塩水を溶媒として使用するが、必ずしも塩化ナトリウムを0.85~0.95質量%の範囲で含む生理食塩水を使用することに限定されるものではない。本発明の輸液を生体に投与するとき、輸液の浸透圧を血液又は体液に厳密に合わせる必要が必ずしも無い場合には、塩化ナトリウムの含有量を低減したり、若しくは塩化ナトリウムを全く含まない水溶液、又は塩化ナトリウムの含有量を増やした水溶液を用いて、前記の各種添加剤を含有させたものを輸液として使用してもよい。

20

【0037】

本発明の生理食塩水又は輸液は、血管平滑筋細胞等の各種細胞を培養するための水溶液として使用することができる。例えば、運動中や運動後の低血糖状態や低酸素状態における細胞障害の低減を図り、心筋梗塞、脳梗塞及びその他の循環血流障害による細胞障害に対する保護を高めたいときに大きな効果を得ることができる。

【0038】

また、本発明の生体投与可能な水溶液は、低酸素濃度の嫌気性雰囲気下で起こる癌の増殖及び肥大化を抑制又は防止するために生体に投与又は経口摂取する水溶液として使用することができる。従来から癌細胞は嫌気性雰囲気下で増殖しやすいことが知られており、癌細胞の周りを酸素濃度の高い好気性にするにより、その増殖及び肥大化が抑えられるのではないかと考えられていた。そのため、例えば、前記特許文献5に開示されているように、気泡径が50nm~500nmのナノバブル水を癌治療用として使用することが提案された。しかしながら、生体内の正常な細胞や血管の表面に存在する孔径は30nm以下、具体的には数nm~十数nmの範囲であるため、酸素又はオゾンのナノバブル水内に存在する気泡径が50nm以上では、生体内の細胞又は血管の内部への吸収性又は浸透性が必ずしも十分であるとは言えなかった。さらに、生体は通常35~37℃とやや高温に維持されているため、ナノバブルの気泡径が大きくなるほど、バブルの大径化が加速されバブル消失が促進されることから、癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果が十分に得られなかった。仮に、その効果があったとしても安定的に持続するものではなかった。

30

40

【0039】

それに対して、本発明の生体投与可能な水溶液に含まれるナノバブルは、気泡の平均粒径が30nm以下、好ましくは1~10nmであり、加えてバブルの密度が非常に高いため、生体内細胞内への吸収性又は浸透性が優れるとともに、その気泡径で存在するナノバブルの寿命が相対的に長くなる。それにより、従来のオゾンナノバブル水又はオゾンと酸素のナノバブル水を併用した場合に比べて、本発明のように酸素ナノバブルだけを含む水溶液であっても癌細胞の周辺環境を酸素濃度の高い好気性に長期間維持することが可能になり、癌の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果が高くなる。さらに、その効果を相対的に長い期間にわたって持続することが可能になる。このように、本発明の生体投与可能

50

な水溶液は、癌の増殖及び肥大化を抑制又は防止するための薬剤としての機能を有しており、そのような癌治療等の医療分野において好適な水溶液である。

【0040】

次に、本発明の生理食塩水を製造するための酸素ナノバブル発生装置について図面を用いて説明する。

【0041】

図1は本発明で使用する酸素ナノバブル発生装置の一例を示す図であり、基本的な構成は特許第5555892号公報に記載されている装置と同じである。図1において(a)及び(b)は、それぞれ酸素ナノバブル発生装置の正面図と斜視図である。図1に示す酸素ナノバブル発生装置1において、2がペローズシリンダポンプ、3が気液混合槽、4がポンプコントローラ、5が圧力センサ、6がマイクロ・ナノバブル発生用ノズル取付部、7が液吸引管、8が気体吸引口、9が気体吸引調整バルブである。

10

【0042】

これらは、図1の(b)に示す斜視図のように配置する。接液部をフッ素樹脂で作成したペローズシリンダポンプ2で7の液吸引管、9の気体吸引調整バルブを使用して気体量を調整してポンプ内部に液と気体を混ぜた状態で吸い込んでペローズ内部で攪拌、溶存させて、圧縮液の中に酸素を溶存させる。本発明においては、ペローズシリンダポンプ2はメタルフリーであれば良く、フッ素樹脂以外のプラスチック、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリエチレンテレフタレート等の汎用プラスチック、ポリアセタール、ポリアミド、ポリカーボネート及び変性ポリフェニレンエーテル等のエンジニアリングプラスチック、ポリエーテルサルホン、ポリフェニレンスルフィド、ポリエーテルエーテルケトン及び液晶ポリマー等のスーパーエンジニアリング等の少なくとも1種を使用しても良い。その場合、ポンプだけでなく、液設部にもフッ素樹脂を始め、前記の各種プラスチックを用いることによって、信頼性の高い清浄な酸素ナノバブル発生装置とすることができる。また、本発明において、厳密なメタルフリー化による洗浄や殺菌が要求されない場合には、上記のプラスチックだけでなく、金属やセラミックスを使用しても良い。

20

【0043】

次に、気液混合槽3に気体と液をポンプ2で攪拌して圧送する。ポンプ2は、主に圧縮空気起動式ペローズシリンダポンプを使用するが、電動式のものであっても良い。気液混合槽3の気体と液とは、ポンプ2からの圧力を受けており、気体が溶存しやすくなる。つまり気体と液体とをポンプ2から圧送する圧力を5の圧力センサでチェックしている。この方法によって溶存気体の量を多くしてナノバブルの発生量を増やす準備を行う。本発明の酸素ナノバブル発生システムはポンプ2としてペローズシリンダポンプを用いるのが実用的であるが、用途に応じて、従来から送液ポンプとして公知のピストンポンプ、プランジャーポンプ又はダイヤフラム等の往復動ポンプや、ギヤーポンプ、偏心ポンプ又はネジポンプ、カスケードポンプ、ベーンポンプ等の回転ポンプ等を適用することができる。

30

【0044】

圧送されて気液混合槽3に入った液は酸素と混合して、酸素を液の内部に溶存させてからナノバブル発生用ノズル取り付け部6に送る。ナノバブル発生用ノズル取り付け部6は、溶存した酸素を直径が30nm以下、好ましくは1nm~10nmの大きさの酸素ナノバブルを大量に作成するノズルと接続する部分である。

40

【0045】

このとき、5の圧力センサでノズル6と気液混合槽3との間の液圧力の変動をみて気液の溶存状態を監視する。こうすることで安定したナノバブル用発生ノズルに必要な一定した圧力状態を実現する。

【0046】

図1の(a)及び(b)に示す本発明で使用する酸素ナノバブル発生装置を用いて実施する工程は次の通りである。液吸引管7、気体(酸素)吸引口8及び気体吸引調整バルブ9を用いて行うのが気体・液体吸引工程である。圧力は、圧力センサ5で調整する。次に、ペローズシリンダポンプ2を用いて酸素を含有する気体を含む液体を加圧する工程が気

50

体・液体加圧工程である。引き続き、加圧された前記の気体を含む液体を新たな酸素と混合させるために、ポンプコントローラ 4 及び気液混合槽 3 を用いて行う工程が溶存気体富化工程である。その後、後述する本発明の発生ノズルを酸素ナノバブル発生用ノズル取付部 6 に接続してから酸素ナノバブルを発生させる。この工程を溶存気体微細化工程と呼ぶが、酸素ナノバブルは、2 以上の貫通小穴を有する筒の外部から該貫通小穴を通して大気圧以上の圧力で噴射し、前記筒の内部の一点で衝突させることによって発生させることができる。

【0047】

本発明で使用する酸素ナノバブル発生装置においては、空気が含まれる通常の液体を真空下で脱気処理することにより液体中に含まれる空気をできるだけ除いた状態にした液体を使用してよい。脱気処理後の液体は、気体吸入口 8 から吸引した酸素及び/又は溶存気体富化工程において新たな酸素とそれぞれ混合された後、本発明で使用するバブル発生ノズルを用いて酸素ナノバブルの発生を行うことにより、酸素ナノバブルを含む液体として使用される。この方法は、酸素を混合する前に液体を脱気することにより、後で行う酸素の混合及び溶存の工程で液体中の酸素濃度をより高める効果が得られることから本発明の製造方法において好適に採用される。

10

【0048】

図 2 に 図 1 の洗浄装置において、酸素ナノバブルを発生させるノズル形状及び処理液を噴射するノズルヘッダーの例をそれぞれ示す。図 2 において、(a) 及び (b) は、それぞれノズルヘッダー 10 の断面図及び上面図である。図 2 の (a) は、(b) の D - D 断面を示している。

20

【0049】

図 2 の (a) 及び (b) に示すように、ノズルヘッダー 10 は、処理液を噴射するための噴射ノズル 11 及び酸素ナノバブルを吐出させるための液衝突ノズル 12 と台 13 とから構成されており、液衝突ノズル 12 の 1 個又は 2 個以上を 13 の台上に取り付け配置する。ここで、液衝突ノズル 12 が、酸素ナノバブルを発生させるノズル形状の例である。

【0050】

図 3 は、図 2 の (a) に示すノズルヘッダー 10 の液衝突ノズル 12 を配置した部分の拡大図である。図 3 に示すように、12 の液衝突ノズルの 1 個の形状において、12 a の小さな穴は 12 の中心に向かって空いている。この小さな穴 12 a を通り、高圧で入った液を液衝突ノズル 12 の中心部分で衝突させてナノバブルを発生させ、矢印 Q で示す方向に噴射する。実験の結果、液の速度 V をコントロールすれば、発生したナノバブルの量が多く、かつバブルの寿命が長くなることがわかった。速度 V の目安として、2.5 m/秒を超える速度になると安定したナノバブル発生ノズルになる。

30

【0051】

図 2 及び図 3 において液衝突ノズル 12 から噴射した水溶液 (Q) は、例えば、酸素ナノバブルを含む生理食塩水を製造するときに、次の 2 つの方法に従って調整する。第 1 の方法は、図 1 に示す液吸引管 7 によって吸引する液として、塩化ナトリウムを 0.85 ~ 0.95 質量% で含有する水溶液を使用し、該水溶液に酸素を溶存させた後に噴射ノズル 11 から噴射して得られる気液混合液をそのまま生理食塩水とする方法である。また、第 2 の方法においては、図 1 に示す液吸引管 7 によって吸引する液として塩化ナトリウムを含まない水溶液 (純水を含む) を使用し、酸素ナノバブルを含む水溶液を製造した後、前記酸素ナノバブルを含む水溶液に、塩化ナトリウムを前記生理食塩水の 100 質量部に対して 0.85 ~ 0.95 質量% で配合することにより生理食塩水として用いる。

40

【0052】

また、前記水溶液 (Q) を輸液として調整する場合も、図 1 に示す液吸引管 7 によって吸引する液として、カリウム及びカルシウムの少なくとも 1 種の元素、5% ブドウ糖液、アミノ酸並びにヘパリンの群から選択される少なくともいずれかの添加剤をあらかじめ含有する水溶液を使用し、該水溶液に酸素を溶存させた後に噴射ノズル 11 から噴射して得られる気液混合液をそのまま輸液として使用することができる。このとき、必要に応じて

50

塩化ナトリウムを同時に含有させてもよい。この方法以外にも、図1に示す液吸引管7によって吸引する液として前記添加剤を含まない水溶液を使用し、酸素ナノバブルを含む水溶液を製造した後、前記酸素ナノバブルを含む水溶液に、前記添加剤を所定の含有量で配合することにより輸液として使用する。このとき、前記添加剤を含まない水溶液としては、純水だけではなく、塩化ナトリウムを含む生理食塩水を使用してもよい。

【0053】

液噴射ノズル11からの水流を用いて酸素ナノバブルを作成する方法について説明する。高速ジェット液噴射ノズル11から出たペローズシリンダポンプ2からなる高圧ポンプの吐出圧力(大気圧以上)状態から圧力を急激に解放するので、酸素が溶存する液が互いに激突し、その水撃力で炸裂する力で気体を溶存した液を砕いて酸素ナノバブルを大量に含む状態にする。ただし解放する方法によっては、酸素ナノバブルの発生量が少なくなってしまう場合があるが、本発明による方法と装置によって酸素ナノバブルを大量に発生させることができる。

10

【0054】

本発明の生理食塩水に含まれる酸素ナノバブルは、例えば、図2及び図3に示すような構造を有する液衝突ノズル12を使用することによって、気液混合の状態にある溶存液を噴射するときの圧力が大気圧(約0.1MPa)以上であれば、酸素ナノバブルの発生量を従来と同等以上にすることができる。さらに、この圧力を0.2MPa以上に設定することによって、十分な量で発生させた酸素ナノバブルを含む生理食塩水を製造することができる。このように、本発明においては溶存液の噴射圧力の下限値を0.2MPaと従来よりも低くできるため、金属コンタミの影響を無くすために好適なポンプ、例えば、フッ素樹脂で作製した圧縮空気駆動式又は電動式のペローズシリンダポンプ2を使用することが可能となる。酸素溶存液の噴射圧力の上限値は特に規定されないが、噴射圧力の増大に伴う酸素ナノバブル発生装置1の負荷を低減したい場合には1.0MPa以下に設定することが好ましい。

20

【0055】

本発明の生理食塩水を製造するときに使用する酸素ナノバブル発生装置のノズルは、大気圧以上、好ましくは0.2MPa以上という従来よりも低い圧力でも溶存液のジェット流を噴射できるように設計する。気体溶存液のジェット流の噴射及び衝突によって得られる水撃力をFとする。水撃力Fは、液の密度を ρ 、小さい穴の大きさをS、液の速度をVとすると、 $F = \rho SV^2$ の関係が成り立つ。Fを最適値にするためには、穴の大きさSと速度Vの関係を考慮した最適設計が必要になる。

30

【0056】

本発明で使用する酸素ナノバブル発生装置においては、図2及び図3の12で示す液衝突ノズルが有する貫通孔の径S、すなわち小さな穴12aの径が0.1~0.5mmであることが好ましく、さらに0.2~0.4mmであることがより好ましい。ここで、液衝突ノズル12の穴12aの径が0.1mm未満であると、粒径が小さな微細酸素バブルの生成量は増える傾向にあるものの、1nm以上の粒径を有するバブルの生成量が急激に少なくなるため、酸素ナノバブルの発生量が低下して、酸素ナノバブルの密度低下が顕著になる。また、液衝突ノズル12の穴12aの径が0.5mmを超えると、1nm以上の粒径を有するバブルの総生成量は増えるものの、逆に、10nm以下の小粒径バブルの生成量が急激に減少するため、平均粒径の増大に伴って酸素ナノバブルの安定性が急激に低下し、本発明の効果を十分に奏することができない。したがって、本発明においては、酸素ナノバブルの平均粒径を30nm以下と小さくし、酸素ナノバブルの密度を生理食塩水1mlあたり 10^{16} 個以上と大量にするために、液衝突ノズル16の貫通小孔径は0.1~0.5mmの範囲で設けることがより好ましい。さらに、液衝突ノズル16の貫通小孔径を0.2~0.4mmの範囲で設けることにより、酸素ナノバブルの平均粒径及び密度をそれぞれ1~10nm及び生理食塩水1mlあたり 10^{17} 個以上とすることができる。

40

【0057】

50

同じ効果は、四方から中心に向けて発射してセンターに水撃を集中させることで速度をより高めることができ、平均粒径がより小さな酸素ナノバブルを大量に発生させることができる。そのため、四方からの水撃を行う場合には、水噴射の速さが同じある場合、貫通孔の穴の個数に応じてより大きな効果を得ることができる。例えば、 $F = SV^2$ なので貫通小孔が4穴あり、それらが中心に集中する場合は、中心に集まる力 $F = 4 SV^2$ になり、貫通孔の穴の個数が2の場合と比べて2倍の水撃力が得られる。このように液が衝突して中心に水撃を集中させるのにノズルの小さい穴の個数を多くすると、流量が多くなるため液の衝突するエネルギーが高くなる。酸素ナノバブルの発生量は液の衝突するエネルギーが大きくなれば、より小さな平均粒径を有する酸素ナノバブルを大量に発生させることができる。

10

【0058】

本発明においては、液衝突ノズル12の貫通小孔径を0.1~0.5mmと規定することにより、酸素溶存液の速度Vが上昇し、発生する酸素ナノバブルの平均粒径を小さくできる効果が得られる。加えて酸素ナノバブルの密度も同時に高くする必要があるため、液衝突ノズル12の貫通小孔の個数は、液衝突ノズル12の筒の周方向等間隔に4個以上8個以内で設けることが好ましい。液衝突ノズル12の貫通小孔の個数が3個以下であると、酸素ナノバブルの密度の低下が顕著になる。また、貫通小孔の個数が9個以上である場合は、酸素ナノバブルの密度向上の効果が飽和するだけでなく、液衝突ノズル12の貫通小孔の位置合せを行うときに高精度が要求されるため、液衝突ノズル12の製造が非常に困難になる。

20

【0059】

また、本発明で使用する酸素ナノバブル発生装置においては、液衝突ノズル12の形状は、12aの小穴を4~8個で周方向に等間隔に設けるだけでなく、例えば、液衝突ノズル12の長手方向に2段以上で並行して貫通小孔の穴をあけ、液の水撃の発生する場所を2ヵ所以上にしてもよい。それによりナノバブルを大量に発生させることが可能になるので、ノズルの小型化と効率化には有効な方法である。さらに、4個以上の小穴から液を同時に吐出させることで水撃の強度を増加させることができるため、液の速度Vを上げなくとも30nm以下の平均粒径を有する酸素ナノバブルを大量に発生できる。そのため、高圧で液を吐出させるポンプが必要でなくなり、負担が少なくて済むため、工業的には、非常に有益な技術で、エネルギー効率の良いノズルの開発ができる。

30

【実施例】**【0060】**

以下において、本発明に基づく実施例を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

【0061】

<参考例1>

特許第5555892号公報に開示された方法に従ってナノバブル水作製装置 PM-5 (ペローズポンプ式) (シグマテクノロジー有限会社製)により空気ナノバブル水を作製し、純水によって100倍に希釈して測定用試料として用いた。液噴射ノズルとして、図2に示す液衝突ノズル12を有するものを使用した。液衝突ノズル12に設ける貫通小孔の穴は、液衝突ノズル12を構成する筒の径方向断面と平行な同一平面上で対向するように、前記筒の周方向等間隔に6個で設けられており、前記筒の空洞に通じる部分の孔径が0.3mmである。また、参考用試料としてナノバブル作製前の純水を用いた。ナノバブル作製前の純水は、ナノバブルを含まない水に相当する。

40

【0062】

試料急速凍結装置Vitrobot Mark IV (FEI社製)により作製直後の前記空気ナノバブル水を急速凍結してナノバブルをアモルファス氷中に包埋した試料を作製し、観察用試料とした。試料厚さは200nmである。一方、ナノバブルを含まない水(純水)についても同じ試料急速凍結装置により急速凍結して参考用試料とした。試料厚さは200nmである。300keVの電子エネルギーを有するクライオ透過型電子顕微鏡Titan Krios (FEI社

50

製)を用いて、試料温度約80Kにおいてアモルファス氷中に包埋されたナノバブルを直接観察した。観察に用いる電子線は、Low dose技術によって20電子/ μm^2 程度であり、撮影中の試料温度の上昇はほとんどなかった。

【0063】

図4に、空気ナノバブルを含む純水を凍結したアモルファス氷及び純水(ナノバブルを含まない水)を凍結したアモルファス氷について電子顕微鏡像の写真を示す。また、空気ナノバブル水については、電子顕微鏡写真の下にバブルの粒度分布(サイズ分散を示すヒストグラム)を示す。

【0064】

図4の左側に示す電子顕微鏡像の写真は、PM-5によって作製後、ただちに観察された空気ナノバブルであり、写真中に観察される円形のコントラストがナノバブルである。画像処理の結果、平均粒径は7nmである。ヒストグラムの測定に用いたアモルファス氷の体積は 3.2×10^{-14} cc(400nm \times 400nm \times 200nm厚さ)であり、その中にバブルは約60個含まれている。100倍に希釈したナノバブル水を観察していることから、このナノバブル水の空気ナノバブルの濃度は、 8.1×10^{17} 個/cc(ml)(81京個/cc(ml))であると評価される。それに対して、図4の右側に示す電子顕微鏡像の写真はアモルファス氷でありコントラストの変化はなく、バブルが含まれない水であることが確認できる。このように、本発明による測定方法及び測定装置によって、水に含まれるナノバブルの存在を直接的に画像として確認することができるだけでなく、ナノバブルの粒子径、個数、粒度分布及び形態に関する情報を取得することができる。

10

20

【0065】

<実施例1>

空気に代えて酸素を用いる以外は、前記参考例1と同様の装置と方法によって酸素ナノバブルを含む水溶液を製造した。本実施例による酸素ナノバブル水は、クライオ透過型電子顕微鏡Titan Krios(FEI社製)を用いて、参考例1と同じ条件と方法によって平均粒径及び密度を測定した。図5に、酸素ナノバブルを含む純水を凍結したアモルファス氷について電子顕微鏡像の写真を示す。

【0066】

図5において、写真の中央部付近に実線の円で囲った領域には平均粒径は3nmの暗いコントラストが認められる。また、写真の下部付近に点線の円で囲った領域には暗いコントラストが連続的につながって配列し、線のように観察される部分が存在しているが、これも酸素ナノバブルである。この結果から、3nmの平均粒径を有する酸素ナノバブルは、孤立して存在するのではなく、一部凝集した配列をとることが明らかになった。このアモルファス氷の体積 1.8×10^{-14} cc(300nm \times 300nm \times 200nm厚さ)中には酸素ナノバブルが360個含まれていることが分かり、酸素ナノバブル水を100倍に希釈した水を用いて観察していることから、このナノバブル水の酸素ナノバブルの密度は、 2×10^{18} 個/cc(ml)(200京個/cc(ml))であると評価される。

30

【0067】

図6には、参考までに大塚電子製の粒径・分子量測定システム(ELS Z-2000S)を用いて動的光散乱法で測定した本実施例の酸素ナノバブル水のバブル粒径を個数分布で示す。図6に示す個数分布は、前記で述べたように特殊なデータ処理を行った後の測定結果である。図6に示すように、本実施例の酸素ナノバブルは、粒径が1~10nmの狭い範囲で分布しており、図5に示す結果とほぼ同じような粒度分布が得られている。また、平均粒径として3 μm に近い値を有することが容易に見て取れる。このように、氷包埋法によってクライオ透過型電子顕微鏡で測定を行う本発明の測定方法は、酸素ナノバブル水のバブル粒径を正確に測定できることが動的光散乱法との対比からも確認できた。

40

【0068】

このようにして製造された酸素ナノバブルを含む水に、塩化ナトリウムの含有量が生理食水100質量部に対して0.9質量%となるように配合することにより本実施例の生理

50

食塩水を製造した。この生理食塩水を実施例 1 とする。

【0069】

< 比較例 1 >

前記参考例 1 で検討した酸素ナノバブルを発生させる前の純水に、塩化ナトリウムを前記生理食塩水の 100 質量部に対して 0.9 質量%で配合することにより比較例 1 の生理食塩水を製造した。

【0070】

以上のようにして製造された酸素ナノバブルを含む細胞培養液（実施例 1）及び酸素ナノバブルを含まない細胞培養液（比較例 1）を用いて、嫌気性（低酸素）の刺激下で細胞形態の変化及び細胞損傷の程度を定性的及び定量的に測定し、細胞の保護がどの程度行えるかを検証した。検証は、以下の方法で行った。

10

【0071】

実施例 1 及び比較例 1 の生理食塩水を用いて細胞培養液を作成し、12 時間嫌気性環境下で血管平滑筋細胞の培養を行い、嫌気性環境下に置く前と放置後での細胞の形態変化を写真撮影して比較した。また、細胞が障害を受ける場合は細胞障害時に漏れ出る酵素（LDH）の量が多くなるため、嫌気性環境下に置く前と放置後での LDH の量を測定した。LDH は、この量が高いほど細胞障害が高いことを意味する。さらに、ミトコンドリアの機能（MTT Assay）の比較を行うため、嫌気性環境下に置く前と放置後での細胞発育力（cell viability）を測定した。cell viability は、この値が低いほど細胞障害が高いことを意味する。

20

【0072】

実施例 1 及び比較例 1 の各生理食塩水について細胞の形態変化を写真撮影した結果、LDH の量の測定結果、及び cell viability の測定結果を、それぞれ図 7、図 8 及び図 9 に示す。図 7 において、「検証前」は通常の細胞培養液中に見られる血管平滑筋細胞の形態を示し、「比較例 1（前）」及び「実施例 1（前）」は嫌気性環境下に置く前を、「比較例 1（後）」及び「実施例 1（後）」は 12 時間嫌気性環境下に放置後を、それぞれ意味する。

【0073】

図 7 に示すように、実施例 1 は嫌気性環境下 12 時間放置後でも細胞形態が保持されるのに対して、比較例 1 では細胞が小さくなり死にかけているのが分かる。また、図 8 に示す LDH 量の測定結果から分かるように、実施例 1 は比較例 1 と比べて、嫌気性環境下 12 時間放置後において LDH の流出が優位に少なくなっている。図 9 に示す cell viability の値についても、実施例 1 は比較例 1 と比べて、嫌気性環境下に置く前と 12 時間放置後との差が小さく、ミトコンドリアの機能が保持されていることを示している。

30

【0074】

以上の結果から、血管平滑筋細胞においては実施例 1（酸素ナノバブルを含む細胞培養液）が嫌気性（低酸素性）の刺激から細胞及びミトコンドリアを保護する機能が非常に高いことが確認された。本検証では例として血管平滑筋細胞を用いたが、血管平滑筋細胞に限らず、すべての細胞について同じ結果が得られるものと推察できる。例えば、本発明の酸素ナノバブルを含む生理食塩水は低血糖状態における細胞障害が低減できるため、運動中又は運動後における低血糖状態での細胞障害低減効果が期待できる。また、本発明の酸素ナノバブルを含む生理食塩水は低酸素状態における細胞障害が低減できるため、心筋梗塞、脳梗塞及びその他の循環血流障害による細胞障害に対する保護効果も期待される。

40

【0075】

< 比較例 2 >

前記特許文献 2 に開示された方法に従って、気泡径 50 ~ 500 nm を有する酸素気ナノバブルを含む水溶液を製造し、この水溶液を用いて細胞培養液を作製した。この細胞培養液を比較例 2 とする。比較例 2 の細胞培養液について細胞毒性を確認するため、まず通常環境下で一晩血管平滑筋を培養した。比較として通常の細胞培養液、及び前記実施例 1

50

で製造した酸素ナノバブルを含有する細胞培養液を用いた。細胞傷害の指標として、細胞形態の変化及び細胞損傷の程度を定性的及び定量的に測定し、細胞の保護がどの程度行えるかを検証し、細胞の保護の程度を前記実施例1の生理食塩水と比較した。検証は、実施例1と同じ方法で行い、嫌気性環境下に放置後での細胞の形態変化の観察とともに、ミトコンドリアの機能を測る試験(MTT assay)として、嫌気性環境下に放置後の細胞生存率を測定した。

【0076】

実施例1及び比較例2の各細胞培養液について細胞の形態変化を写真撮影した結果及びMTT assayによる細胞生存率の測定結果を、それぞれ図10及び図11に示す。図10において、上段の左側に示す「通常の細胞培養液」の写真図は、酸素ナノバブルを含まない細胞培養液であり、嫌気性環境下に置く前の状態のものである。また、図10において上段中央及び上段右側は、嫌気性環境下で一晩放置後の細胞の形態変化を示す写真図である。他方、図10において下段中央及び下段右側は、細胞を含まない培養液のみを使用し、嫌気性環境下で一晩放置後の培養液の変化を撮影したときの写真図である。

10

【0077】

図10の上段に示す写真から分かるように、実施例1は嫌気性環境下で一晩放置後も細胞形態が保持されており、培養液細胞毒性が認められなかった。それに対して、比較例2(気泡径50~500nmを有する酸素気ナノバブルを含む水溶液を含有する細胞培養液)は非常に強い細胞毒性を示し、一晩放置後にはほぼ全ての細胞が死滅した。また、図10の下段に示す培養液のみの写真において、実施例1は沈殿物がないのに対して、比較例2では培養液中に沈殿物が多く存在していることが観測された。このように、比較例2では培養液中のタンパク等が凝集する作用が働き、細胞毒性が認められる結果になったものと考えている。この結果は、図11に示す細胞生存率の測定結果からも容易に読み取ることができる。すなわち、実施例1は、嫌気性環境下で一晩放置後において細胞生存率が放置前と比べて変化がないのに対して、比較例2は、細胞生存率の大きな低下がみられた。以上の結果から、平均粒径が30nm以下、好ましくは1~10nmの酸素ナノバブルを、 1×10^{16} 以上、好ましくは 1×10^{17} 以上の密度で大量に含む本発明の生理食塩水を使用することにより、細胞毒性が抑制され、初めて生体に安全に投与できることが確認された。

20

【0078】

30

<実施例2>

水溶液として、塩化ナトリウムを0.85~0.95質量%で含有する水溶液を使用する以外は、実施例1と同じ装置を用いて同じ方法及び条件で酸素ナノバブルを含む生理食塩水を製造した。この生理食塩水は、酸素ナノバブルを発生させた後に塩化ナトリウムを添加しないで、そのまま生理食塩水として使用した。本実施例による酸素ナノバブルを含む生理食塩水は、クライオ透過型電子顕微鏡Titan Krios (FEI社製)を用いて、上記と同じ条件と方法によって酸素ナノバブルの平均粒径及び密度を測定した結果、酸素ナノバブルの平均粒径及び密度は、それぞれ3nm及び 2×10^{18} 個/cc(ml)であることが確認された。本実施例の生理食塩水を実施例2とする。

【0079】

40

このようにして得られた実施例2の生理食塩水を用いて作成した細胞培養液で、嫌気性(低酸素)の刺激下で細胞形態の変化及び細胞損傷の程度を定性的及び定量的に測定し、細胞の保護がどの程度行えるかを検証し、細胞の保護の程度を前記実施例1の生理食塩水と比較した。検証は、実施例1と同じ方法で行い、嫌気性環境下に置く前と放置後での細胞の形態変化の観察とともに、細胞障害時に漏れ出る酵素(LDH)の量及び細胞発育力(cell viability)の値をそれぞれ測定した。

【0080】

検証の結果、実施例2の細胞培養液は、実施例1と同じようなデータが得られ、細胞毒性が認められなかった。このように、本発明の生理食塩水を用いて作製した細胞培養液は、塩化ナトリウムの添加が酸素ナノバブルを発生させる工程の前後によって影響されない

50

ことが分かり、嫌気性（低酸素性）の刺激下において細胞を保護するという効果は両者とも同じように得られることを確認した。

【0081】

<実施例3>

本実施例において、本発明の生体投与可能な水溶液を用いて癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果について検証を行った。具体的には、実施例1と同じ方法で製造された平均粒径が3nmの酸素ナノバブルを含む水溶液を用いて血清と培地とを有する細胞培養液を作製し、この細胞培養液を注入したガラス製の細胞培養用ウエルプレート中に、癌細胞として肺扁平上皮細胞株EBC-1の肺がん細胞を入れた後、低酸素状態で所定時間留置するときに前記肺がん細胞によって誘導されるタンパク（HIF-1 α ）の発現の程度を調べた。

10

【0082】

図12に、癌細胞の培養を行ったときに使用した市販の低酸素培養キットを示す。図12に示すように、この低酸素培養キットはラインA及びラインBの各線に沿ってクリップ14、15が設けられており、ガスバリア性パウチ袋16の内部を2つの空間に区分けすることにより、それぞれの空間をクリップ14、15によって密閉状態に保つことができる。ラインAの奥の方にはO₂センサ17が配置され、該O₂センサ17のすぐ横には培養液を満した細胞培養用ウエルプレート18を載置し、ラインAとラインBとの間には、ガス濃度調整剤19を入れる。ガス濃度調整剤19は使用時にアルミ袋から開封して取り出し、ラインAより入口近くに置き、ラインBに設けたクリップ14を用いて密封する。それにより、ガスバリア性パウチ袋16の内部のO₂が短時間で吸収され、低酸素環境が創り出される。ガスバリア性パウチ袋16の内部のO₂濃度は、O₂センサ17の目盛を監視し、希望するO₂濃度に近づいた時点で細胞培養用ウエルプレート18の内部の空気をガスバリア性パウチ袋16の内部の空気と入れ替える。そして、O₂濃度が希望する値よりやや低くなった時点で、ラインAに設けるクリップ15によって封鎖してO₂の吸収を停止させる。ラインAとラインBとの間の空間内のO₂濃度は、ラインAに設けるクリップ15を用いて調整することができる。本実施例においては、ラインAとラインBとの間の空間内のO₂濃度が約1%となるように調整した。

20

【0083】

低酸素雰囲気中で留置するときに前記肺がん細胞によって誘導されるタンパク（HIF-1 α ）の発現の程度はウエスタンブロッティング（Western Blotting）法により測定した。ウエスタンブロッティング法とは、電気泳動の優れた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせ、タンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する手法であり、タンパク質の検出や解析に利用される公知の測定方法である。本実施例では、前記肺がん細胞によって誘導されるタンパク（HIF-1 α ）に加えて、細胞培養用ウエルプレート中の試料に確実にタンパク質が含まれていること、及びウエスタンブロッティング法で使用される総タンパク量が一定であることを確認する目的で、タンパク発現のコントロール（基準）として前記肺扁平上皮細胞株EBC-1に含まれるHSC70のタンパク質についても測定を行った。

30

【0084】

<比較例3>

実施例3において、酸素ナノバブルを含む水溶液に代えて、酸素ナノバブルを全く含まない水溶液を用いたこと以外には、実施例3と同じ方法で、前記肺がん細胞によって誘導されるタンパク（HIF-1 α ）の発現を検証した。前記肺がん細胞によって誘導されるタンパク（HIF-1 α ）の発現の測定方法は、実施例3と同じウエスタンブロッティング法で行った。この検証例を比較例3とする。

40

【0085】

図13に、O₂濃度が約1%である低酸素雰囲気中で6時間及び24時間留置した後の実施例3及び比較例3について、HIF-1 α 及びHSC70の各タンパク質の誘導結果を示す。図13に示す[Normoxia]、[Hypoxia 6h]及び[Hypox

50

i a 24 h] は、それぞれ低酸素雰囲気中に留置する前の状態、低酸素雰囲気中で6時間及び24時間留置した状態を意味する。また、図中において[Medium]で表示した「O₂」及び「DW」はそれぞれ実施例3及び比較例3を意味し、「O₂」及び「DW」で表示した縦の各欄に、それぞれの検証例で測定したタンパク質の発現結果を示している。

【0086】

図13の(a)はウエスタンブロッティング法による測定結果であり、黒く写っている部分がHIF-1a及びHSC70の各タンパク質の発現を示す部分である。図中の黒い部分が濃いほど、タンパク質の発現が強いことを示している。また、図13の(b)は、(a)に示す図において黒く写っている部分の面積を算出し、コントロールであるHSC70に対するHIF-1aの面積比を求めたデータである。図13の(a)において黒く写っている部分の面積は、図14に示すように画像処理によって数値化することができる。図14において、例えば、低酸素雰囲気中で載置する前の状態(Normoxia)に着目すると、HIF-1aの発現はほとんど観測されず、面積が平均(Mean)として32.21とカウントされているのに対して、HSC70の発現は面積(Mean)が226.902とカウントされており、HSC70に対するHIF-1aの面積比(Ratio)は0.14であることは分かる。ここで、HSC70の発現は低酸素雰囲気中の載置前後で大きな変化がなく、ほぼ一定であることが分かる。さらに、低酸素雰囲気中で6時間及び24時間留置した後の実施例3(O₂)及び比較例3(DW)についても同様の処理を行って、HSC70に対するHIF-1aの面積比(Ratio)を算出し、Normoxiaの場合を1として規格化(Normalize)することによりHSC70に対するHIF-1aの面積比を求めたのが図13の(b)に示す結果である。

10

20

【0087】

図13の(b)に示すように、Normoxiaの場合を1として規格化した場合、低酸素雰囲気中で6時間(Hypoxia 6h)においては実施例3(O₂)と比較例3(DW)の間でHIF-1aの発現に大きな差がみられなかった。それに対して、24時間(Hypoxia 24h)と低酸素雰囲気中で長時間留置することによりHIF-1aの発現に対する抑制効果には大きな差異がみられ、実施例3は比較例3に比べてHIF-1aの発現が顕著に抑制されることが分かる。これは、低酸素雰囲気中の6時間留置は留置時間が短いため酸素ナノバブルの効果が実質的に観測されない過渡的な現象を示しているに過ぎないと考えられるが、Hypoxia 24hの結果から留置時間の経過とともに酸素ナノバブルの効果が強まってくることを示している。図13には示していないが、低酸素雰囲気中で48時間留置したときでも同じような方法で検証を行った。その結果、24時間留置した場合と同等か、それ以上の抑制効果が得られることを確認した。したがって、酸素ナノバブルを含む水溶液は、癌細胞の増殖を抑える効果を十分に有するものと推察できる。

30

【0088】

以上のように、本発明の生体投与可能な水溶液は、末梢細胞に酸素を十分に供給する機能を有し、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞の損傷又は障害が少なく、細胞を保護する効果、及び嫌気性環境下で起きやすい癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果を高めることができる。さらに、細胞を保護する効果が長期間に亘って安定して得られるだけでなく、その効果のバラツキを大幅に低減することができる。したがって、生体への投与又は経口摂取を安全に行うことができる。

40

【0089】

また、本発明による生体投与可能な水溶液の製造方法は、従来のナノバブル発生装置と比べて、より小さな粒径を有する酸素ナノバブルを大量に、且つ、安定的に発生することができ、低酸素性又は嫌気性の刺激下において細胞を保護するという効果、及び嫌気性環境下で起きやすい癌細胞の増殖及び肥大化を抑制又は防止する効果を長期に亘って安定的に得ることができる生体投与可能な水溶液を容易に製造することができる。そのような効果を有する生体投与可能な水溶液は、従来技術では製造することが困難であり、本発明の製造方法によって初めて得られたものである。

50

【産業上の利用可能性】

【0090】

したがって、本発明の生体投与可能な水溶液は、生理食塩水又は輸液として生体への投与又は経口摂取を行ったり、細胞培養液として使用することにより、低酸素性又は嫌気性の刺激下における細胞の保護並びにそれらの雰囲気下で起きやすい癌の増殖及び肥大化を抑制又は防止することができるため、様々な医療の分野においてその有用性は極めて高い。

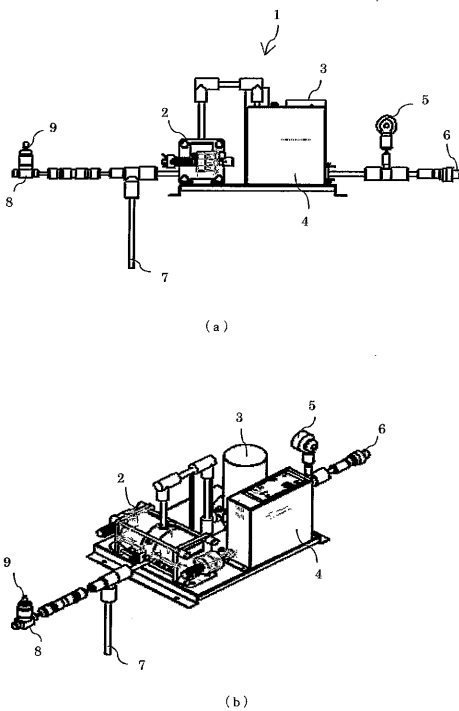
【符号の説明】

【0091】

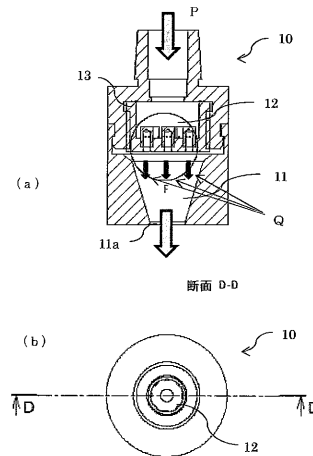
1・・・酸素ナノバブル発生装置、2・・・ペローズシリンダポンプ、3・・・気液混合槽、4・・・ポンプコントローラ、5・・・圧力センサ、6・・・マイクロ・ナノバブル用ノズル取付部、7・・・液吸引缶、8・・・気体吸引口、9・・・気体吸引調整バルブ、10・・・ノズルヘッダー、11・・・噴射ノズル、12・・・液衝突ノズル、13・・・台。14・・・クリップ、15・・・クリップ、16・・・ガスバリア性パウチ袋、17・・・O₂センサ、18・・・細胞培養用ウエルプレート、19・・・ガス濃度調整剤。

10

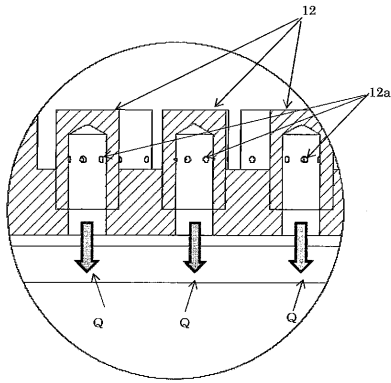
【図1】



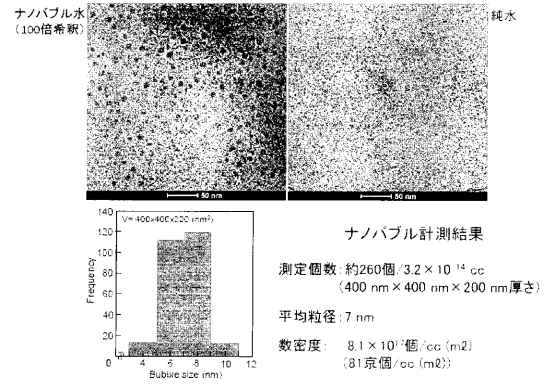
【図2】



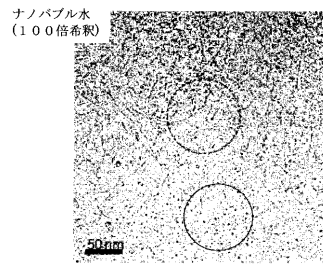
【 図 3 】



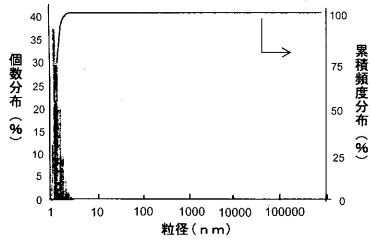
【 図 4 】



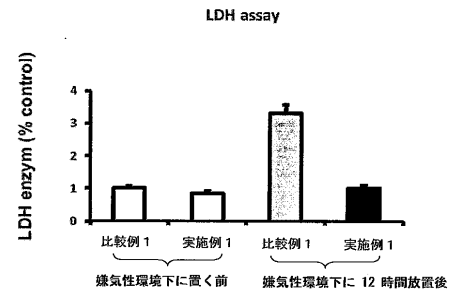
【 図 5 】



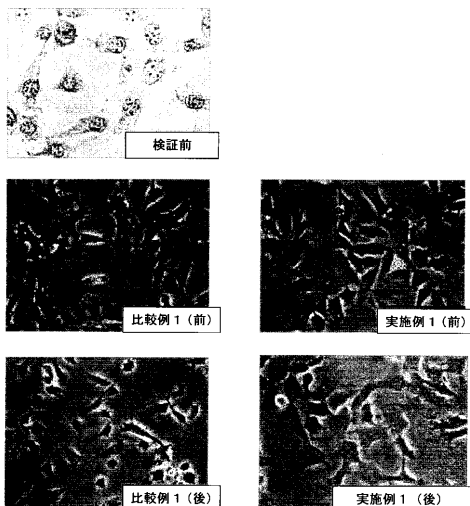
【 図 6 】



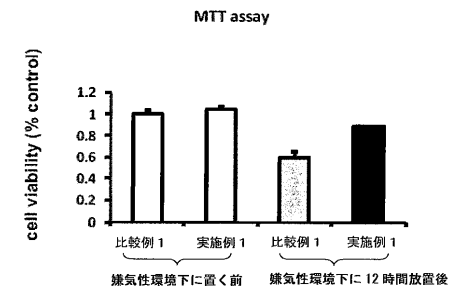
【 図 8 】



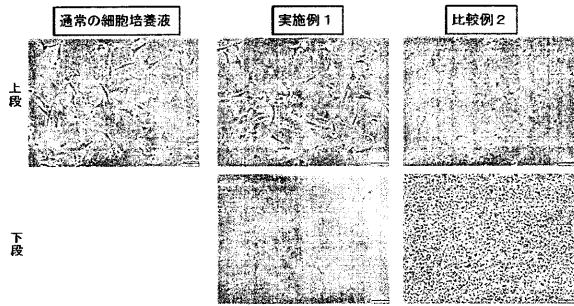
【 図 7 】



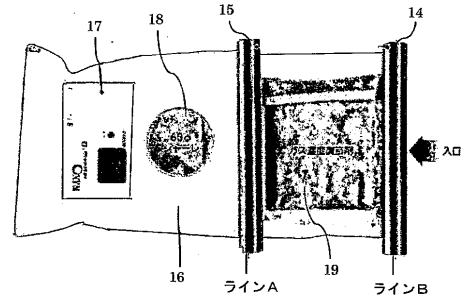
【 図 9 】



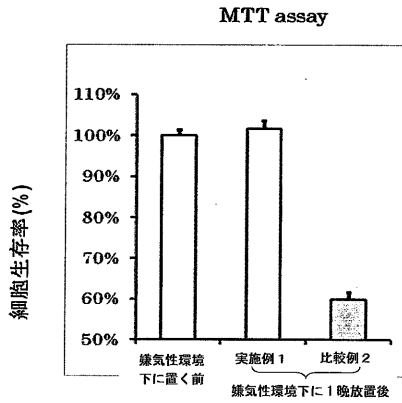
【図10】



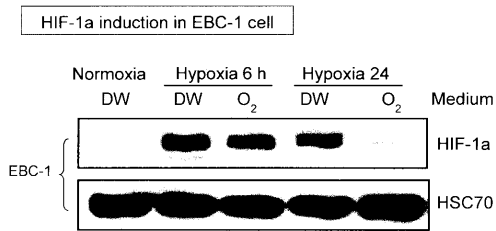
【図12】



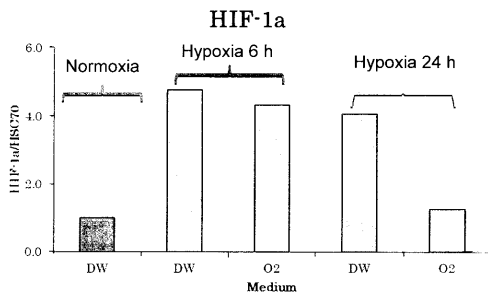
【図11】



【図13】

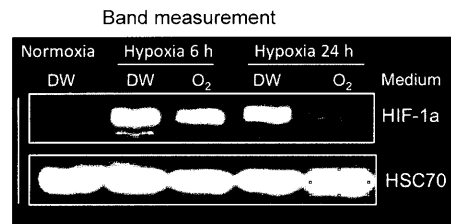


(a)



(b)

【図14】



20170419	Condition	Medium	Mean	Ratio	Normalize
HIF-1a	Normoxia	DW	32.21	0.14	1.0
		O ₂	154.464	0.68	4.8
	Hypoxia 6 h	DW	133.807	0.61	4.3
		O ₂	125.37	0.58	4.1
Hypoxia 24 h	DW	42.927	0.18	1.3	
	O ₂	226.902			
HSC70	Normoxia	DW	228.115		
		O ₂	217.607		
	Hypoxia 6 h	DW	217.724		
		O ₂	240.763		

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/017779
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/00(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K9/10(2006.01)i, A61K33/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/00-5/28, A61K9/08, A61K9/10, A61K33/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masami NAGATA et al., "Nano Bubble Suichu no Nano Bubble no Kaiseki", NanotechJapan Bulletin, 2015, vol.8, no.4, pages 1 to 6 (figures)	1-16
Y	Hidehiro YASUDA et al., "Kuki Nano Bubble-sui no Kansatsu to Size Keisoku", Shiken Hokokusho, 2014, page 1 (figures)	1-16
Y	JP 2015-509725 A (Konkuk University Industrial Cooperation Corp.), 02 April 2015 (02.04.2015), claims & US 2015/0099301 A1 claims & WO 2013/129885 A1	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 August 2017 (03.08.17)		Date of mailing of the international search report 15 August 2017 (15.08.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017779

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-1271 A (Tomio OTA), 06 January 2011 (06.01.2011), claims (Family: none)	1-16
Y	JP 2009-84258 A (Tokyo Medical and Dental University), 23 April 2009 (23.04.2009), claims (Family: none)	1-16
A	WO 2014/199525 A1 (Sigma Technology Inc.), 18 December 2014 (18.12.2014), claims; figures & US 2015/0273408 A1 claims; figures & EP 3009184 A1	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 7 7 7 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K9/10(2006.01)i, A61K33/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/00-5/28, A61K9/08, A61K9/10, A61K33/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	永田正己 外, ナノバブル水中のナノバブルの解析. NanotechJapan Bulletin, 2015, vol.8, no.4, pp.1-6 (図)	1-16	
Y	保田英洋 外, 空気ナノバブル水の観察とサイズ計測. 試験報告書, 2014, p.1 (図)	1-16	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 03.08.2017		国際調査報告の発送日 15.08.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 戸来 幸男	4B 3964 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 7 7 7 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-509725 A (コングク・ユニバーシティ・インダストリアル・ コーポレーション・コーポレーション) 2015.04.02 (請求項) & US 2015/0099301 A1 (Claims) & WO 2013/129885 A1	1-16
Y	JP 2011-1271 A (太田 富雄) 2011.01.06 (請求項) (ファミリーなし)	1-16
Y	JP 2009-84258 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2009.04.23 (請 求項) (ファミリーなし)	1-16
A	WO 2014/199525 A1 (シグマテクノロジー有限会社) 2014.12.18 (請 求項、図) & US 2015/0273408 A1 (Claims, FIG.) & EP 3009184 A1	1-16

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 橋 良昭
茨城県ひたちなか市中根 5 1 4 7 - 1 0 シグマテクノロジー有限会社内

(72) 発明者 橋 甲輔
茨城県ひたちなか市中根 5 1 4 7 - 1 0 シグマテクノロジー有限会社内

Fターム(参考) 4B029 AA27 BB11 DG10
4B065 AA90X BB03 BB15 BB21 BB40 BD50 CA44 CA60
4C076 AA12 BB01 BB11 CC27 DD23D DD67D FF70 GG50
4C086 AA01 AA02 HA08 MA02 MA06 MA52 MA55 NA05 ZB26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。