

Graduate School of Advanced Science and Engineering  
Waseda University

# 博士論文概要

## Doctoral Thesis Synopsis

### 論文題目

#### Thesis Theme

Establishment of Total Liquid Ventilation System with Oxygen Fine  
Bubble Dispersion and Application to Acute Lung Injury Model Rats  
酸素ファインバブル分散液を用いた完全液体換気システムの  
構築および急性肺障害モデルラットへの応用

申請者  
(Applicant Name)

Kenta	KAKIUCHI
垣内	健太

Department of Life Science and Medical Bioscience  
Research on Biomolecular Assembly

May 2020

液体換気 (LV: liquid ventilation) は人工呼吸法の一つであり、液体を介してガス交換を行う。LV には液体で満たした肺に機械的ガス交換を行う部分液体換気 (PLV: partial LV) と液体を連続的に出し入れすることでガス交換を行う完全液体換気 (TLV: total LV) の 2 つの方法がある。肺を液体で満たすことで、1) 虚脱肺の再拡張、2) 低圧での肺拡張、3) 気道内分泌物の除去が可能となる。ガス換気と比較して圧損傷のリスクを低減でき、炎症原因物質を洗浄除去できることから肺障害を伴う肺疾患の治療法として研究されている。

Clark ら (Science, 1966) は、液体であるパーフルオロカーボン類 (PFCs) が高いガス溶解能 (酸素: 水の約 20 倍、二酸化炭素: 水の約 4 倍) を有することを見出し、液体換気材料として有用であることを報告した。この報告を契機に、PFCs を用いた液体換気研究は精力的に行われた。PLV においてはヒト臨床試験まで進んだ。乳児や小児の患者を対象とした臨床試験では、血液の酸素化や肺コンプライアンスの改善が確認され有効な治療法になりうると報告されたが、成人患者では従来の呼吸管理療法と比較して症状の改善は見られず、寧ろ呼吸性アシドーシスや徐脈といった副作用が確認された。一方、TLV に関しては、1) 高価な PFCs が大量に必要であること、2) 二酸化炭素の除去が困難であること、3) TLV 専用の人工呼吸装置が必要であることから、PLV と比較して発展が遅れていた。しかし、LV の特性である肺保護効果及び肺洗浄効果に関しては PLV よりも優れていることが期待され、実際に同一肺疾患モデルに PLV と TLV を実施して比較した文献では、TLV の方が高い治療効果を示した (Chinese Med. J., 2012 and 2013)。数例の研究報告ではあるが臨床試験に進んだ PLV よりも高い治療効果を示した TLV は、材料と装置の問題により研究が停滞しているのが現状である。

このような背景の下、申請者は酸素ファインバブル分散生理食塩水 (酸素 FB 分散液) を用いた新規 TLV 装置を構築した。FB は 100  $\mu\text{m}$  以下の微小気泡であり、小さなサイズに起因する高い滞留性と過飽和ガス溶解能を有することが知られている。申請者は修士課程在学中、安価で大量調製が可能な酸素 FB 分散液が PFCs の代替液として有用であるかを TLV 中のラットの生存時間で検証した。その結果、生理食塩水のみでは 7.5 分であった生存時間が酸素 FB 分散液を用いることで 40 分間まで延長されることを確認し、酸素 FB 分散液中の酸素は肺胞を介して血中に運搬されることを実証した。しかし、酸素供給量が不十分であるため TLV 開始から 40 分後には心機能はほとんど停止していた。一方、申請者は肺洗浄に着目すると 5 分間の TLV で十分な効果が得られると考えた。また、TLV 装置を用いた肺洗浄法は現在臨床で用いられ、片肺ずつ洗浄していく全肺洗浄法よりも効率がよく、操作が簡便であることから肺洗浄法としても従来の技術よりも優れていると推察した。そこで、TLV 装置を応用した短時間全肺胞洗浄の急性肺障害モデルラットにおける予防的治療効果の検証を本研究の目的とした。

本論文は、5 つの章から構成される。第 1 章は序論として本論文の背景と目的

を纏め、第2章は、酸素FB分散液の評価法として構築した新規酸素含量測定法と酸素運搬体としてのFBの物性評価を纏め、第3章では脂質コーティングFBを用いた短時間TLV試験とTLV装置の改良に関する実験について纏めた。第4章は本論文の主題であり、急性肺障害モデルラットに対するTLV装置を用いた短時間全肺胞洗浄試験について纏めた。終章である第5章は、本論文の結論及び将来展望について述べている。各章の概説は以下の通りである。

第1章では、肺洗浄及び液体換気に関する既往研究を包括的に纏めている。PFCsが開発される以前は生理食塩水を用いた肺洗浄及び液体換気に関する研究が報告されており、予備研究や症例報告が多いが本研究の概念には重要な先行研究である。一方、2000年代に日本で研究が始まったFBに関しては基本物性及び応用例を研究背景として纏めた。尚、本章では研究全体の背景に関して扱い、実験ごとに関する研究背景は各章の第1項に簡潔的に纏めている。

第2章では、既存の特殊酸素電極を応用することで、簡便且つ迅速に高濃度酸素を少量のサンプルで測定できる方法を提案した。初めに、純水中の酸素を測定し測定精度を評価した結果、測定誤差は5%以下、定量結果は既存の溶存酸素計の結果 $\pm 0.5$  mg/L以内であり、どちらも許容範囲内であった。また、酸素FB分散液の酸素含量を測定した結果、既存の溶存酸素計の測定範囲を超過した領域( $> 50$  mg/L)においても測定可能であり、ウインクラー法(滴定法)の測定値と比較して差がなかったことから酸素FB分散液中の酸素も精度よく測定できることが分かった。次に、FB濃度と酸素含量の関係を評価し、酸素運搬体としてのFBの物性評価を行った。その結果、ウルトラファインバブル(UFB、 $< 1$   $\mu\text{m}$ )は周辺酸素濃度、周辺温度、大気平衡の影響に関係なく安定であったが、脱酸素水で希釈した時にのみ消失することが分かった。一方、酸素含量は大気平衡に伴い経時的に減少し、その減少速度に温度依存性が確認されたことからUFB濃度の変化と異なる変化を示した。さらに、マイクロバブル(MB、 $20$ - $100$   $\mu\text{m}$ )の発生量とも酸素含量は相関しないことがわかった。本実験より、現状のFB発生濃度においては、FB濃度と液中酸素含量に相関性はなく、FBに内封された酸素は液中の酸素含量にほとんど寄与していないことがわかった。

第3章では、脂質膜でMBを安定化させ、既に高い酸素運搬能が報告(Sci. Transl. Med, 2012)されているガスリポソーム(GL)をFB分散液と併用し15分間のTLV試験を行った。GLは2倍希釈した状態でFB分散液の7倍の酸素含量を示したが、粘度が高く流動性に欠けていたため、TLV中の分時換気量は減少し、酸素供給量の改善には繋がらなかった。肺内部で最も細い肺胞管は直径 $100$   $\mu\text{m}$ 程度であるため、安定性を有したGLが衝突により合一化した場合、呼吸部を閉塞し換気量を低下させる可能性が示唆された。次に、分時換気量を増加させるためTLV装置の改良を行った。TLV装置を構成するチューブ及びコネクタに関して大きさ、材質、形状に着目して分時換気量に与える影響を評価した。その結果、コネクタ

一の形状が大きく影響することが分かり、流れ方向を変化させる際の圧力損失が小さい形状にすることで分時換気量が 18.4%改善した。

第 4 章では、TLV 装置を用いた 5 分間全肺胞洗浄の急性肺障害モデルに対する治療効果を検証した。肺障害を経気道的に投与したリポ多糖 (LPS) により惹起させ、LPS 投与量を 5 mg/kg 及び 10 mg/kg に分けることで重症肺障害モデル (実験 1) 及び致死性肺障害モデル (実験 2) を作製し、それぞれに対する効果を評価した。実験 1 では、対照群として LPS の代わりに PBS を投与した sham 群 (n = 5) 及び標準治療群として機械的ガス換気による呼吸管理療法を行ったガス治療群 (n = 5) を設定し、治療 2 日後の血液ガス、血行動態、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量 (左肺) を評価し、右肺は肺組織切片を作製し、後日顕微鏡観察による比較評価を行った。その結果、ガス治療群では 2 日後に酸素分圧 ( $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$ ) が 100 mmHg 以下を示し重度の低酸素血症を呈していた。また、同様の傾向は、気道内圧、平均動脈圧、炎症性サイトカインにも見られた。また、組織切片からは、肺胞出血及び好中球の集積が確認され、他群に比べて顕著な違いが確認された。一方、洗浄群 (n = 5) では、ほとんどの評価項目が sham 群と同程度の値を示し、組織切片及び炎症性サイトカイン量からはわずかな炎症のみが示唆された。実験 2 では、対照群としてガス治療群及び酸素飽和生理食塩水 (飽和水) による肺洗浄を行った群を設定し、観察期間を 7 日間にするこゝで 1 週間生存率を評価した。その結果、ガス治療群 (n = 5) では全例が 2 日以内に死亡したのに対して、FB 分散液洗浄群 (n = 5) では 80%が、飽和水洗浄群 (n = 3) では 100%のラットが生存し、洗浄群同士で有意な差はなかった。また、生存したラットの 7 日後の血液ガス、血行動態、気道内圧は正常であり、試験前の健常な状態に回復したと判断できた。これらの結果より、TLV 装置を用いた 5 分間の全肺胞洗浄は重度肺障害を抑制することができ、致死性の肺障害モデルに於いては、生存率を大幅に改善できる効果があることが分かった。また、興味深いことに、5 分間の肺洗浄後 3 時間の呼吸管理を行うことで肺サーファクタントを補填することなく自発呼吸に復帰でき、7 日後には健康な状態まで回復できることが実証された。

第 5 章では、本論文の総括として、研究結果の意義と将来展望を述べている。申請者は、TLV 装置を用いるこゝで効率よく肺胞洗浄を行えることを提案し、その有効性を重度肺障害モデルラットにおいて肺障害を抑制する効果を実証すること示した。今後は、酸素供給量の増加を企図した酸素 FB 分散液の改良及び肺胞洗浄治療の対象疾患の拡大を検証していく。本研究で提案した全肺胞洗浄は、安価且つ安全な材料を使用しており、さらに、簡便な装置で実施が可能であるため酸素供給の課題を解決できれば完全液体換気及び肺洗浄治療の発展に寄与できると期待される。



## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

(List of research achievements for application of doctorate (Dr. of Engineering), Waseda University)

種 類 別 By Type	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）(theme, journal name, date & year of publication, name of authors inc. yourself)
その他	<p>(論文)</p> <p>[1] Tomohisa Ichiba, <b>Kenta Kakiuchi</b>, Masahiro Suzuki, and Makoto Uchiyama. “Warm Steam Inhalation before Bedtime Improved Sleep Quality in Adult Men”, <i>Evid.-Based Complementary Altern. Med.</i>, Article ID 2453483, August 2019, 1-7.</p> <p>(コラム)</p> <p>[1] 武岡真司, <u>垣内健太</u> “TWIns -医学・理学・工学の融合拠点として-”, <i>人工臓器</i>, 49(1), June 2020, 66-67.</p> <p>(受賞レポート)</p> <p>[1] <u>垣内健太</u>, 青木順子, 松田兼一, 針井則一, 宗慶太郎, 武岡真司 “酸素マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液を用いた完全液体換気への応用”, <i>日本人工臓器</i>, 44(1), 27, June 2015.</p> <p>(受賞)</p> <p>[1] Young researcher abstract award, The 17th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, 2019.11.</p> <p>[2] 優秀賞, 2018 年度アーリーバードプログラム, 2019.3.</p> <p>[3] 優秀演題賞, 第 2 回稲門医学会, 2019.2.</p> <p>[4] 萌芽研究ポスター発表優秀賞, 第 52 回日本人工臓器学会大会, 2014.10.</p>