

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

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

Kenta	KAKIUCHI
垣内	健太

Department of Life Science and Medical Bioscience  
Research on Biomolecular Assembly

2021年2月

完全液体換気（TLV）は空気・酸素の代わりに液体を用いた非生理的人工呼吸法であり、肺内部に液体を出し入れすることでガス交換を行う。液体を用いることで、1) 肺胞洗浄、2) 圧損傷リスクの低減、3) 虚脱した肺胞の再拡張を実現でき、通常ガス換気では治療が困難な急性肺疾患の治療法として期待されている。しかし、先行研究で使用されている高濃度の酸素を溶解する液体であるパーフルオロカーボン類（PFCs）はコスト、代謝性、環境問題に課題があり TLV 研究の進展を遅らせている一因となっている。そこで、申請者はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に酸素ファインバブル（FB）を分散させた液体（FB 分散液）に着目した。FB 分散液は短時間で大量に調製することが可能である。申請者は、これまでに FB 分散液を用いた TLV によりラットが 40 分間以上生存できることを報告している。しかし、FB 分散液を用いた TLV の応用に対する多角的な検討が求められている。本研究では、酸素 FB 分散液の酸素含量の定量法を確立すると共に酸素 FB 分散液の特徴を明らかにし、酸素 FB 分散液を用いた短時間の TLV が炎症原因物質および炎症性サイトカインを洗浄除去することによって急性肺傷害を抑制できることを検証した内容をまとめている。

本論文は、5 章から構成されている。第 1 章は序論として研究背景を纏め本論文の目的を述べている。第 2 章には、酸素 FB 分散液中の酸素含量測定方法を新規に提案し、FB 量と液中の酸素含量の相関を評価した。その結果、FB 量と酸素含量には相関は認められず、FB 自体は液中の酸素含量にほとんど寄与していないことを明らかにした。簡便で正確な酸素含量の測定により、FB 自体が酸素運搬体ではなく、酸素 FB 分散液に酸素が過飽和状態で溶存していることを明らかにしたのは高く評価できる。第 3 章では、酸素 FB 分散液による短時間の TLV がラットの生理状態に与える影響および酸素供給量の増加を企図した TLV 実験について記述している。現行の装置では 5 分間の TLV でラットが低酸素状態に陥っており、酸素供給量の増加が必要であることを確認した。ところが、5 分間の TLV であれば通常ガス換気に復帰できる可能性も示すことができた。更に、TLV 装置を圧力損失の観点から最適化したところ、TLV 中の液体供給量を 19%改善することに成功した。第 4 章は本論文の主題であり、エンドトキシン（LPS）誘発急性肺傷害モデルラットに対する酸素 FB 分散液を用いた TLV の有効性について纏めている。LPS の投与量を変化させることで重症度の異なる肺傷害モデルを 2 種類作製し、酸素 FB 分散液を用いた 5 分間 TLV を行い、全肺胞洗浄を実施した。その結果、5 分間の TLV が LPS や炎症性サイトカインを洗浄除去することで炎症の重症化を防ぐことが分かった。また、致死性の肺傷害モデルでは、生存率を 0% から 80%まで改善させることも確認できた。肺洗浄効果に関しては酸素飽和 PBS でも生存率を改善する結果が得られ、TLV 中の心拍数が有意に高く、TLV 中の酸素供給という点で酸素 FB 分散液の方が優れていることが示唆された。第 5 章は、終章として、本論文の結論及び将来展望について述べている。

次に、公聴会における質疑討論の概要を示す。

1. 肺循環系に異常がある ARDS 患者に対しても TLV による治療は効果的であるかと問われ、申請者は、肺循環障害が原因で血液の酸素化に異常がある患者にも効果があるかは懐疑的であると回答した。

2. 添加物を加えることで分散媒の粘度が変化し FB 生成に影響を与えるかと問われ、申請者は、粘度と FB の関係は検討していないと回答した。その上で、界面活性剤を添加することで FB の発生量が増加したが、肺内部で泡の膜を生成し換気障害を誘引した事例を紹介した。塩濃度や pH が FB の安定性に与える影響は既に報告されているため、それらの事例を第 1 章に追加で纏めることとした。

3. 水に FB を分散させることによって pH は変化するのか。また、PBS から調製した FB 分散液と生理食塩水から調製した FB 分散液ではどちらの方が TLV に適しているのかを問われた。申請者は、第一の質問に対して直接測定はしていないが、FB 表面は負に帯電しており水素イオンの吸着が生じるため、分散液の pH が変化する可能性はあると回答した。第二の質問に対しては、分散液中の緩衝作用が TLV 中の血中二酸化炭素分圧の上昇を抑制すること確認しており、FB の安定性とは別の理由から PBS の方が適していると回答した。FB が分散媒の pH へ与える影響に関して追加実験の結果および先行研究の内容を第 1 章に追加することとした。

4. 肺サーファクタントを産生する II 型肺胞上皮細胞は気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に含まれていたかと問われ、申請者は、予備検討で行った評価では BALF 中に I 型・II 型肺胞上皮細胞は存在していなかった。BALF 中の細胞診に関しては今後の評価項目にしたいと回答した。

5. 酸素供給の観点から酸素飽和水よりも酸素 FB 分散液の方が優れているとの評価であったが、活性酸素 (ROS) の産生およびそれに伴う傷害の観点からはどのように考察できるかと問われ、申請者は、肺胞内は低酸素環境であること、FB 分散液は TLV 後に体外へ排出されることから ROS による傷害の可能性は低いと回答した。また、ROS の産生については BALF 中の ROS 量を測定キットで定量評価する方法が考えられ、肺胞への傷害は組織切片から評価できると回答した。

6. ウルトラファインバブル (UFB) が消失するときは徐々に内封ガスが抜けていくのか、それとも弾けるような現象が生じて消失するのかと問われ、申請者は、UFB は観察できないため実際の形態変化を確認することはできていないが、気体の飽和度が低い環境下において UFB の内封ガスが徐々に放出され収縮することで消失すると考えていると回答した。

7. 酸素分子の移動には塩濃度や温度も関係するのかと問われ、申請者は、塩濃度は溶存酸素量に関係する因子であるため酸素分子の移動に関係するが、温度や酸素濃度勾配の方が移動速度には大きく影響すると考えられると回答した。

8. 新規酸素含量の測定方法に関して、既存の溶存酸素計を用いても同じ測定ができるのではないかと問われ、申請者は、先行研究の実施例を紹介し既存の溶存酸素計を用いても同様の測定が可能であるものの大気の影響を除くのが困難であるため定量測定ができない、その課題を解決し定量測定を可能にした今回の方法の方が優れていると回答した。第2章の目的と結論において定量測定の長所をより強調した文章に修正することとした。

9. 今回の報告ではモデル動物としてラットを用いているが、TLVを行う上でラットの肺とヒトの肺で異なる点を問われ、申請者は、ラットとヒトでは肺葉の構造が異なるため液体の流れ方が大きく異なる、動物種を変更する際はシミュレーションなどによってあらかじめ呼吸条件などを推測できるようにしたいと回答した。

最後に、主査から第2章と第4章で酸素FB分散液中の酸素の状態について異なる解釈を招く記述をしていると指摘があった。学位論文全体で矛盾がないように、全体に亘って確認と修正を行うよう指示があった。

最終的に学位論文において、すべての加筆修正箇所は適切になされていることを確認すると共に、剽窃や研究不正は一切なされていないことを確認した。

以上より、本学位論文は酸素FB分散液の酸素含量を測定する方法を新規に提案し酸素運搬体としての酸素過飽和状態の酸素FB分散液の物性を纏めた成果および酸素FB分散液を用いたTLVが急性肺傷害の予防的治療法として有用であることを世界で初めて示した成果が記述されている。申請者は材料・デバイス工学・医工学における高い専門性と優れた独創性を有することが認められ、申請者は博士(工学)の学位を受けるに相応しいと判断された。

2021年1月

審査員

主査 武岡真司 早稲田大学教授 工学博士 早稲田大学 \_\_\_\_\_

副査 合田亘人 早稲田大学教授 博士(医学) 慶應義塾大学 \_\_\_\_\_

副査 竹山春子 早稲田大学教授 博士(工学) 東京農工大学 \_\_\_\_\_