

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10972

研究課題名(和文)急性呼吸窮迫症候群モデルラットにおける短時間完全液体呼吸の有用性

研究課題名(英文)The possibility of therapeutic application of temporary total liquid ventilation in rat acute respiratory distress syndrome model.

研究代表者

針井 則一 (HARII, Norikazu)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80377522

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)：急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome, ARDS)に対する人工呼吸器療法は、あくまでも支持療法であり、ARDSによる肺胞の傷害を直接除去する治療は未だ確立されていない。我々は、マイクロ/ナノバブル分散酸素富化水(MNB液)による完全液体換気システムを応用した肺胞洗浄法を構築した。今回、ARDSの病態である肺胞の傷害を直接的に除去することで、炎症を鎮静化、救命率を向上させうる治療法を確立するために、1)液体換気条件の最適化、2)液体換気からガス換気への復帰試験、3)ARDSモデルラットの作製を実施した。

研究成果の概要(英文)：Mechanical ventilation in acute respiratory distress syndrome is simply used to assist or replace spontaneous breathing and does not directly improve lung damage. We previously reported that the oxygen micro/nano-bubbles containing a sufficient amount of oxygen are useful in producing oxygen-rich liquid suitable for liquid ventilation, and a total liquid ventilation system was established using saline-based oxygen micro/nano-bubble dispersions in rats. In this study, we investigated whether lung damage can be improved by removing pathogens by temporary total liquid ventilation in rat acute respiratory distress syndrome model. We conducted experiments about 1) optimization of liquid ventilation condition, 2) evaluation of returning to general gas ventilation from liquid ventilation, 3) preparation of ARDS model rats.

研究分野：集中治療医学

キーワード：完全液体呼吸 急性呼吸窮迫症候群

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は、敗血症・肺炎・熱傷・外傷などの全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) の発症を契機とし、肺胞領域の非特異的な炎症から広範囲の肺損傷より重篤な低酸素血症を呈する疾患である。その病態には体内で過剰に産生された炎症性サイトカインなどの炎症物質により活性化された肺胞マクロファージや好中球が関与している。現行の ARDS の治療としては、原疾患である SIRS の沈静化と人工呼吸器管理などの支持療法が挙げられるが、ARDS による肺胞の傷害を直接除去する治療は未だ確立されていない。

液体呼吸 (liquid ventilation, LV) は、空気もしくは酸素ガスの代わりに酸素を含む液体で換気する非生理的な呼吸法である。液体呼吸は特殊環境下における呼吸療法の代替療法として 1960 年代から研究されている。生体において最大の構成成分である水は、酸素溶解度が低いため、LV の溶媒としては不適である。炭素フッ素化合物のパーフルオロカーボン (perfluorocarbon: PFC) は、酸素溶解度が水の 20 倍であり、これまでの研究で溶媒として用いられてきたが、温室効果ガスであること、生体では代謝されず長期の安全性が保証できないこと、高粘性・高比重による循環抑制の懸念が明らかになり、LV の溶媒としての臨床応用は困難である。

マイクロ・ナノバブル (Micro Nano Bubble, MNB) は直径が 50 μm 以下の気泡であり、自己加圧効果 (気泡内圧が気泡半径に反比例して大きくなる性質; Young-Laplace の式) による高いガス溶解能と、気泡の上昇速度が直径の 2 乗に比例する性質 (Stokes の式) に起因する液中での高い滞留性を有することが知られている。

本研究開始時までに我々は、水と MNB の特性を組み合わせた MNB 分散液が、PFCs に代わる新たな TLV 材料になり得ると考え、MNB 分散液を用いた TLV 試験を実施した結果、水中に含まれる酸素含量に比例して TLV モデルラットの生存時間が延長し、水と泡のみで最大 45 分間生存できることを実証した。MNB を含まない水の場合、生存時間は 7 分間であったことから、生命維持に必要な酸素を MNB で供給することに初めて成功した。また、流入直前の液体 (632 \pm 31 mmHg) と排出直後の液体 (177 \pm 62 mmHg) の酸素分圧の差から、MNB 分散液の酸素が肺で消費されていることも確認した。

2. 研究の目的

マイクロ・ナノバブル分散酸素富化水 (酸素 MNB 液) による完全液体換気 (total liquid ventilation, TLV) を行うことで、生体に必要な呼吸を維持したまま、炎症に起因する物質を肺胞内から除去しようとの仮説について、加圧溶解法によるマイクロ・ナノバブル

発生装置を採用した TLV と ARDS モデルラットを用いて検討する。

(1) MNB 分散液の最適化

我々は、生理食塩水に酸素 MNB を分散させた液体の酸素供給能について検討してきた。一方で、TLV 中の二酸化炭素の蓄積が新たな課題として示されたため、pH 緩衝作用をもつ DPBS および透析液を MNB 分散液として検討した。

(2) 呼吸条件の最適化

既往研究では、呼吸条件の最適化は分時換気量にのみ着目して決定された。今回、生存時間を評価項目とすることで生理学的根拠を元に呼吸条件の再検討を行った。

(3) 液体呼吸からガス呼吸への復帰試験

TLV モデルラットの生存時間から MNB 液の酸素供給能力を示したため、次に、水で洗浄された肺が機械的ガス換気 (MGV) に復帰し、正常に機能するかを評価した。

(4) ARDS モデルラットの作製検討

酸素 MNB 液による肺洗浄効果を検討するため、塩酸を気管内投与することで誘発させた ARDS モデルラットの作製を検討した。なお、研究計画段階ではエンドトキシンを用いた実験を考えていたが、短時間で ARDS モデルを作製できるという点を考慮し、塩酸投与による ARDS モデルラットを先行して評価した。

3. 研究の方法

ラットは Sprague Dawley 系の雄、12-14 週齢、体重 340g-440g を用いた。固定装置に固定し、ケタミンの筋肉内注射による全身麻酔を行った後、尾静脈よりプロポフォールを投与し麻酔を維持する (V-line)。気管切開し MGV で呼吸管理を行う。総頸動脈をカニューレーションし観血的動脈圧測定および採血ルートを確認し、TLV モデルラットを作成する (A-line) (図 1)。

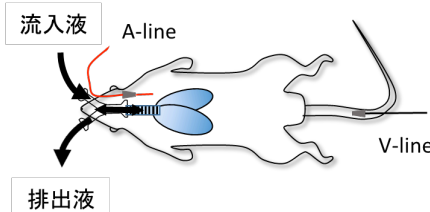


図 1 TLV モデルラット

本研究に用いた TLV システムを図 2 に示す。ラットの頭上に用意した容器内に、MNB 発生装置を用いて酸素 MNB 液を調製する。酸素 MNB 液はオーバーフローシステムにより水位を一定に保つりザーバに貯められ、重力差を用いて肺へ送り込まれる。肺から液体を排出する際は、固定装置の下部まで延長した流路による重力差を用いて排水する。また、ラットの肺の前後に用意した電磁弁の開閉時間を制御することで呼吸条件を制御する。

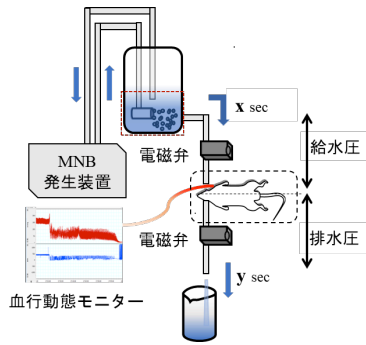


図2 TLV システム

(1) MNB 分散液の最適化

医療現場で汎用されており、緩衝作用を有する DPBS および透析液を MNB 分散液として用いて、TLV 試験を行った。本実験では、既往研究の TLV 条件を採用し、給水圧および肺水圧は 30cmH₂O、流入時間（吸気時間）は 4 秒、排出時間（呼気時間）は 5 秒とした。血液ガス分析および生存時間を評価項目とした。

(2) 呼吸条件の最適化

酸素 MNB 液を効率よく肺から出し入れできる操作条件を検討する。具体的には、リザーバの高さを 30cm から 70cm に変化させることで給水圧を、電磁弁の開閉時間を変化させることで呼吸時間を制御した。肺の過拡張を防ぐため液体の流入量は 7mL 前後になるように設定し、流入時間は 1.8 秒に固定した。流入時間 1.8 秒に対して、異なる排水時間（3.6, 4.5, 5.4, 6.3, 7.2, 8 秒）の TLV を実施し、TLV モデルラットの生存時間を評価した。

(3) 液体呼吸から通常呼吸への復帰試験

短時間 TLV 実施後、機械的ガス換気条件下で肺が正常に機能することを確認した。

10 分間の液体換気を実施後、機械的ガス換気 (mechanical gas ventilation, MG) に切り替え、2 時間経過観察を行う。血液ガス分析および術後の肺組織切片を評価項目とした。

(4) ARDS モデルラットの作製検討

ラットを手術台に固定し、頭部を 45° 上げる。手術台を左右に 90° 傾け左右の肺に塩酸 (0.1M, 1.5mL/kg) を経気道的に投与した。塩酸投与後、塩酸を肺全体に行き渡らすため 30 秒間マッサージを行い、その後、仰向けに戻し 240 分経過観察した。血液ガス分析および術後摘出肺の観察を評価項目とした。

4. 研究成果

(1) MNB 分散液の最適化

DPBS と透析液を用いて TLV 手術の検討をした。TLV 手術中の血液ガス分析の結果を比較すると、生理食塩水に対して pCO₂ の蓄積が改善傾向にあった。pCO₂ の上昇が抑えられることより、pH の減少が穏やかになる傾向にあった。さらに重炭酸バッファーである透析液により、TLV 後期段階で HCO₃⁻、BE の減少が抑えられている傾向にあった。しかし、酸素 MNB

液の酸素含量は同程度であったため、pO₂ の改善はみられなかった。

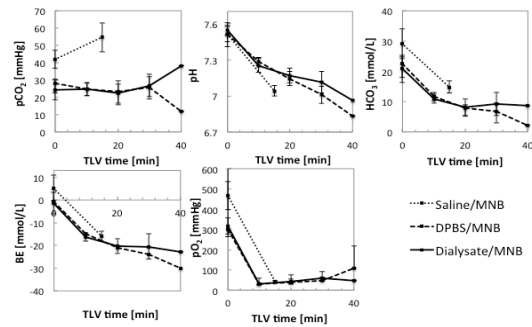


図3 MNB 分散液ごとの血液ガス分析の結果

本実験で TLV 試験を行った TLV モデルラットに対して、カプランマイヤー法を用いて酸素 MNB 液の溶媒別に生存曲線を作製した

(DPBS-MNB: n=16、透析液-MNB: n=18、生理食塩水のみ: n=3)。DPBS と透析液での TLV 手術結果を比較したところ、生存時間に大きな変化はなかった。また、生理食塩水-MNB を用いた既往研究と比較しても生存時間は延長しなかったことから、生存時間は二酸化炭素の蓄積でなく酸素供給量に寄与することが示唆された。

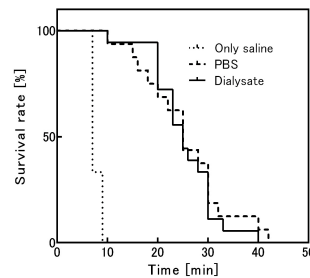


図4 MNB 分散液ごとの生存曲線

(2) 呼吸条件の最適化

排水時間が長いほど 1 分間換気量が小さくなったが（酸素供給量が小さい）、生存時間は排水時間 6.3 秒で極大値となった。排水時間が長いほど、肺に流入する液体による循環系への圧迫の影響が小さくなるものの、1 分間換気量も同時に小さくなる。そのため、生存時間と呼気時間の関係に極大値が存在したと考えられる。

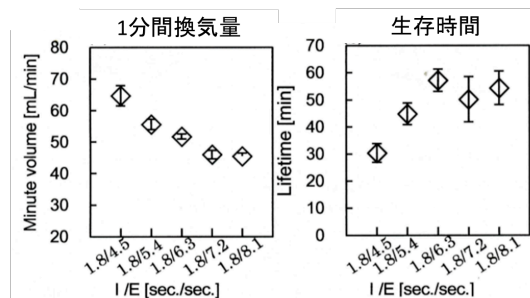


図5 呼吸条件と分時換気量および生存時間の関係

TLV モデルラットの生存時間に影響する条件を 1 分間換気量 (minute volume, MV) と 1 回換気量に対する呼気時間 (Expiratory time/Tidal volume, ET/TV) に着目して解析

した。その結果、ET/TV の大きさと TLV モデルラットの生存時間と 1 分間換気量の関係を分類した際に、各群で生存時間が 1 分間換気量に比例することが認められた。

ET/TV の値が大きいほど TLV モデルラットの脈圧が高く維持されたことから、ET/TV が大きいほど肺内の液体による圧迫が小さかったことが生存時間の延長に寄与したと考えられる。

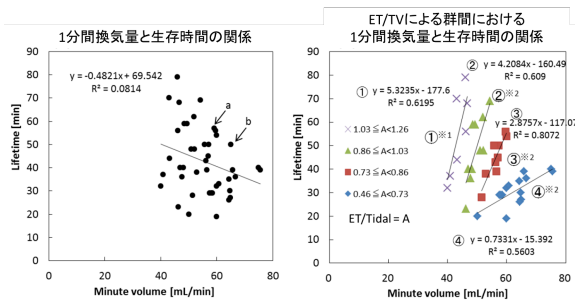


図 6 分時換気量と生存時間の関係

(3) 液体呼吸から通常呼吸への復帰試験

ラットの血液ガス分析の結果を図 7 に示す。

TLV の実施 10 分後に pH および pO_2 の低下、 pCO_2 の若干の増加が認められたが、気体換気復帰 20 分後にはすべての項目が TLV 実施前とほぼ同じ値まで回復した。この結果から、TLV から MGV に復帰することで、血液ガスに関する生理状態は 20 分以内に回復することが示された。

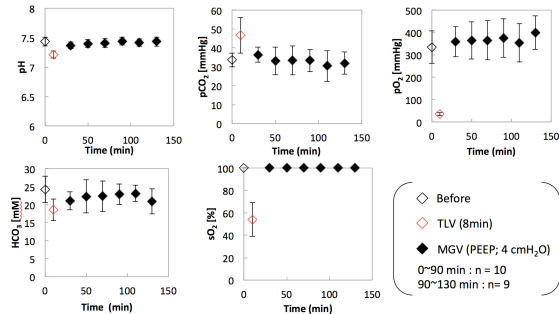


図 7 復帰試験時の血液ガス分析の結果

また、TLV 未実施および復帰試験を実施したラットの肺の組織切片画像を図 8 に示す。復帰試験後の個体と、MGV のみ実施した個体の間に違いは認められなかった。

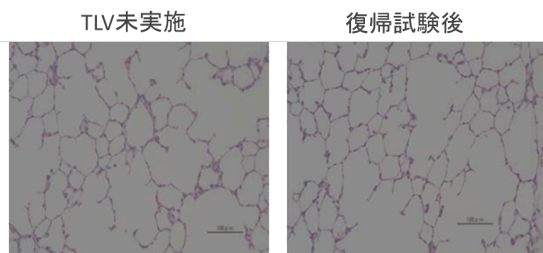


図 8 復帰試験後の組織学的検討

(4) ARDS モデルラットの作製検討

塩酸投与 30 分後に ARDS による低酸素状態が確認された ($PaO_2/FiO_2 < 300$)。一時的に PaO_2/FiO_2 が回復する個体をみられたが、240 後には PaO_2/FiO_2 は 50 以下まで低下し、重度の ARDS モデルとなった ($PaO_2/FiO_2 < 100$)。摘出した肺を観察すると、均一な炎症が肺全体に惹起されていることが確認できた (図 9)。

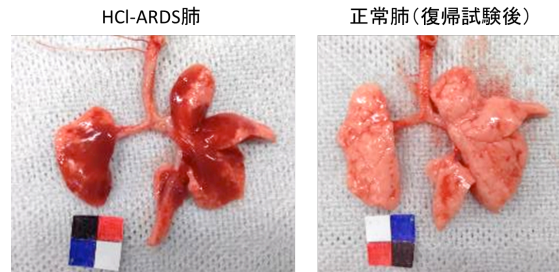


図 9 塩酸投与後の ARDS 肺 (左) と正常肺 (右)

ARDS は依然として治療の難しい肺の炎症性疾患のひとつである。本研究では、マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液を介して肺胞-血管間でのガス交換を達成できること、短時間の完全液体換気後に機械的人工換気に復帰できることを確認した。マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液には肺胞内の炎症の原因、炎症メディエータを物理的に除去する物性があり、本研究で示した短時間の完全液体換気により肺胞構造の破壊を軽減することが可能であれば、ARDS そのものの独創的な治療になりうる。また、有機化合物である PFC に代わり水を用いることで、水溶性物質を肺胞部まで運搬することができ、ドラッグデリバリーシステムなど従来の液体呼吸とは異なる新しい応用の展開が期待される。

また、マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液が通常の生理食塩水よりも酸素含有量、洗浄能力に優れており、これまで原因の究明に有用であっても実施することが困難であった重篤な呼吸不全を呈する患者への気管支肺胞洗浄検査に応用することが可能である点も意義があると考えられる。

今後、本研究で確立した塩酸気管内投与・ARDS モデルラットを用いて、実際に炎症を鎮静化し、救命率を上げる治療法になることを証明したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kakiuchi K, Matsuda K, Harii N, Sou K, Aoki J, Takeoka S. Establishment of a total liquid ventilation system using saline-based oxygen micro/nano-bubble dispersions in rats. J Artif Organs. 18: 220-227, 2015.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 佐藤 啓斗, 針井 則一, 宮坂 武寛, 松田 兼一, 武岡 真司, 酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気から気体換気への復帰 第 24 回日本血液代替物学会（2017 年 12 月, 東京/日本）
- ② Hiroto Sato, Takehiro Miyasaka, Norikazu Harii, Kenichi Matsuda, Shinji Takeoka, Application of micro/nano bubble dispersion for total liquid ventilation. (44th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs, Sep. 2017, Vienna, Austria)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

針井 則一 (HARII, Norikazu)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号：80377522

(2) 研究分担者

松田 兼一 (MATSUDA, Kenichi)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：60282480

森口 武史 (MORIGUCHI, Takeshi)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号：60422680

後藤 順子 (GOTO, Junko)
山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員
研究者番号：60530102

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：20222094

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし