

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08913

研究課題名(和文)急性呼吸窮迫症候群ラットにおける短時間完全液体呼吸による炎症制御と肺障害の軽減

研究課題名(英文) Total liquid ventilation with oxygen micro/nano bubble dispersion ameliorates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rats.

研究代表者

針井 則一 (HARII, Norikazu)

山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授

研究者番号：80377522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は致死率の高い疾患であるにも関わらず、未だ原因療法が確立されていない。我々は、マイクロ・ナノバブル分散酸素富化水による完全液体換気(肺洗浄法)がARDSの予防的治療法として有用であることを実証した。今回の結果は、発症前の介入であり発症後の治療効果を検証する必要があるが、肺傷害の原因物質を直接的に除去することが、炎症の鎮静化、救命率を向上に重要であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

完全液体換気はARDSの治療法として注目されてきたが、液体材料の課題により学術的および臨床的發展を妨げられてきた。今回、我々は酸素マイクロ・ナノバブル分散液を新規材料として応用し、独自のシステムを構築することでその可能性を示すことができた。ARDSは医療技術が発展した現代においても根本的な治療法がなく世界的な医療課題であり、現在世界中で蔓延しているウイルス性肺炎の原疾患となりうる症候群である。以上の点から、本研究成果は学術的および社会的意義の高いものであるといえる。

研究成果の概要(英文)：Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a respiratory disease with a high mortality rate; however, no causative therapy has yet been established. We have demonstrated that total alveolar lavage with total liquid ventilation system using micro/nano bubble dispersion is useful as a preventive treatment for ARDS. Although we have to examine if this treatment is effective after the onset of ARDS, the present results showed that a direct removal of causative substances of acute lung injury is important for alleviating inflammation and improving survival rate.

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 肺洗浄 マイクロ・ナノバブル ファインバブル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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に至ることによって、重篤な低酸素血症を呈する疾患である。その病態には、過剰に産生された炎症性サイトカインをはじめとした炎症物質による肺胞マクロファージの活性化と動員された好中球が関与している。

(2) ARDS の発症により傷害を受けた肺を直接的に改善させる様々な試みが行われたが、ヒトにおいては人工呼吸器の装着期間や ICU 滞在日数に生存率の改善が証明されたものはない。現時点では、人工呼吸器および体外式膜型人工肺による支持療法により、根本原因である SIRS の鎮静化、原疾患の改善を待つ。すなわち、如何に迅速に原疾患を制御し、人工呼吸器から早期離脱し、肺構造の荒廃を回避することが重要であると考えられている。

(3) 完全液体呼吸 (Total Liquid Ventilation, TLV) は、空気もしくは酸素ガスの代わりに酸素溶解度の高い液体を介してガス交換を行う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として 1960 年代から研究されており、既に、小型動物を用いた急性肺障害モデルにおいてその有効性が示されている。先行研究では、酸素溶解度の高い液体として、炭素フッ化合物であるパーフルオロカーボン (Perfluorocarbon, PFC) が用いられてきた。PFC は化学的に安定な有機化合物であり、酸素溶解度が水の約 20 倍、二酸化炭素溶解度が水の約 3 倍であり、低表面張力という物理的性質から液体換気に適している。一方で、高比重であることから心臓への圧迫による循環抑制が懸念されること、生体では代謝されず長期の安全性が保証できないなどの欠点を有している。さらに、PFC 類の一部は温室効果ガスに制定されており、人工合成によって製造するために高価であることから、実用化は困難であると考えられている。そのため、液体換気の実用化のためにはマテリアルの問題を解決しなければならないといえる。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は PFC の代替液として酸素マイクロ・ナノバブル分散酸素富化水 (MNB 分散液) に注目し、MNB 分散液を用いた TLV システムを構築した。PFC と比較して酸素供給量は不足しているものの、本 TLV システムは肺洗浄法としても有用であることに着目し、MNB 分散液を用いた短時間 TLV が ARDS 治療に有効であると仮説を立てた。よって、本研究は、新規 TLV システムが ARDS モデルラットの炎症制御と肺胞障害の軽減に有用であることの証明を目的とする。具体的には、酸素供給量改善を企図した(1) 脂質コーティング MNB 分散液の調製、および(2) ARDS モデルラットに対する新規 TLV の有効性検討を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂質コーティングマイクロ・ナノバブル分散酸素富化水の調製

リン脂質を主要の成分とし、バブルの安定化に寄与することが報告されているポリエチレングリコールを 9:1 (モル比) でリン酸緩衝液に分散させ、脂質分散液 (脂質濃度: 5 mg/mL) を調製した。三口フラスコに脂質分散液を 50 mL 入れ、ホモジェナイザーミキサー (25000 rpm, 15 min, 4°C) にて 100% 酸素ガスと激しく混合させることで、脂質コーティング MNB 分散液を調製した。10 mL シリンジに分注し、遠心分離 (300 × G, 10 min, 4°C) により MNB 層と水相に分け、水相のみを取り除くことで濃縮を行った。物性評価として顕微鏡観察および分散液中の酸素含量測定

を実施した。

(2) ARDS モデルラットに対する TLV の酸素化、炎症の軽減効果の検討

2015年に構築した新規 TLV システム<sup>1</sup>を水温管理および液体供給量の観点から改良した(図1)。本システムは水頭圧を動力とした TLV 装置であり、流路途中に設置した電磁弁の開閉時間および水頭圧を調整することで呼吸リズムを制御する。本実験では、供給圧 35 cmH<sub>2</sub>O、排水圧 -20 cmH<sub>2</sub>O、供給時間 3 秒、排水時間 6 秒の条件で 5 分間の TLV を実施した。1 回の呼吸時間が 9 秒間であるため、5 分間で 33.3 回の肺洗浄を実施することができる。

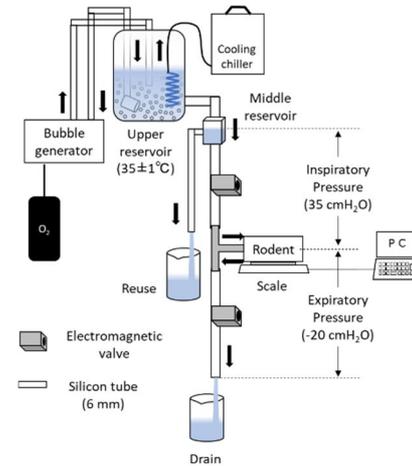


図1: TLV システム (文献2を改編して引用)

重度 ARDS モデルに対する予防的治療効果

MNB 分散液を用いた TLV の有効性を評価するため、ARDS モデルラットに対する予防的治療効果の評価した。ARDS モデルラットとしてエンドトキシン (Lipopolysaccharides, LPS)

気管投与モデルを用いた。LPS (5 mg/kg) を経気道的に投与し 20 分後、5 分間の TLV を実施した。TLV 後、3 時間の呼吸管理、人工呼吸器の離脱、抜管を順に行いケージにてラットを 2 日間飼育観察した (TLV 治療群)。2 日後、血行動態、血液ガス、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン (Interleukins-6, IL-6 and Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1, CINC-1) 濃度を評価した。また、犠牲死後のラットから摘出した肺から組織切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色後、顕微鏡にて肺胞構造を観察した。TLV を行わず 3 時間の呼吸管理のみを実施した群を MGV 治療群 (Mechanical Gas Ventilation, MGV)、LPS の代わりに PBS を投与した非炎症群を Sham 群として比較評価を行った。

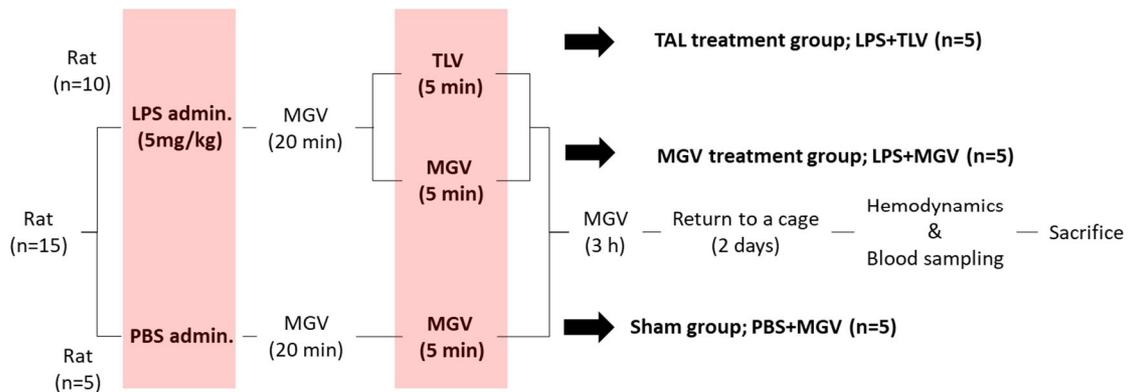


図2: 実験プロトコール

致死性 ARDS モデルに対する予防的治療効果

実験における、LPS 濃度を 10 mg/kg に増加させ致死性 ARDS モデルラットを作製した。実験と同様の治療を行い、1 週間生存率を主要評価項目として MGV 治療群との比較評価を行った。

4. 研究成果

(1) 脂質コーティングマイクロバブル分散酸素富化水の調製

濃縮後に得られた脂質コーティング MNB は粘度の高いムース状の物質であった。MNB の形状および粒子径を評価するため、5 倍希釈した分散液を顕微鏡にて観察した結果、2-5 μm の多分散粒子が観察された。また、分散媒 (リン酸緩衝生理食塩水) を食紅で着色することでバブル

内部は水相ではなくガス相であることも確認した(図 3a)。次に、2 倍希釈したバブル分散液の酸素含量を測定したところ、340 mg/L の酸素が含まれており、これは空気飽和水の約 42 倍、マイクロ・ナノ分散液の約 7.8 倍であった(図 3b)。ラットの酸素消費量から算出した目標値が 150 mg/L であったことから MNB 分散液と併用することで TLV 中の酸素供給量改善が期待されたが、

脂質 MNB が肺内部を閉塞し換気量が減少すること、数日間保存すると polyethylene glycols 40 stearate (PEG40S) が MNB から脱離し界面活性に伴う細胞傷害を引き起こすことが確認され(図 3c)、TLV には応用できないことがわかった。

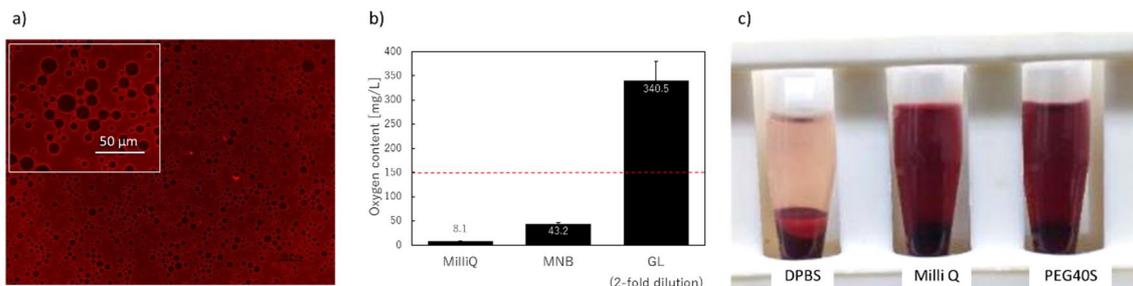


図3 (a) 脂質コーティングマイクロバブルの顕微鏡画像(赤:水相、黒:バブル内部)、(b) 脂質コーティングマイクロバブル分散液中の酸素含量、(c) ラット血液を用いた溶血試験

## (2) ARDS モデルラットに対する TLV の酸素化、炎症の軽減効果の検討

### 重度 ARDS モデルに対する予防的治療効果

TLV 治療群、MGV 治療群、Sham 群における施術 2 日後のラットの状態を比較評価した。血行動態では、平均心拍数に有意差はなかったが、MGV 群の平均血圧は TLV 治療群よりも有意に低く(MGV 群:  $120 \pm 37$  mmHg、TLV 群:  $179 \pm 10$  mmHg、Sham 群:  $173 \pm 12$  mmHg)、TLV 治療により心機能の低下を抑制できることが示唆された。血液ガス分析の結果では、MGV 治療群はすべてのラットが 2 日後に重篤な低酸素状態( $pO_2/FiO_2 < 100$  mmHg,  $SaO_2: 90.2 \pm 6.6\%$ )に陥っていたが、TLV 治療群では  $pO_2/FiO_2 > 300$  mmHg,  $SaO_2: 100\%$ を維持しえた。一方で、 $pCO_2$  および pH に大きな違いは見られなかった。肺内部の炎症性サイトカイン量の結果では、好中球の浸潤を引き起こす CINC-1 において MGV 治療群と比較して TLV 治療群は有意差に低かった( $p < 0.05$ )。炎症性マーカーである IL-6 量では、有意差は確認されなかったが TLV 治療によって分泌が抑制されていた。いずれの炎症性マーカーにおいても、Sham 群と比較して MGV 治療群は優位に高く、Sham 群と TLV 治療群間に有意差がなかったことから TLV 治療により炎症は軽減されたことが確認できた。これらの違いは、摘出肺および組織切片の観察ではっきりと識別することができ、MGV 治療群では炎症に伴ううっ血および好中球の浸潤が確認された一方で、TLV 治療群ではその程度が軽微であった(図 4)。TLV 群および MGV 群の治療効果は、他にも体重減少率( $12 \pm 2.0\%$  vs.  $7.1 \pm 1.6\%$ )、気道内圧変化( $+3.4 \pm 3.0$  mmHg vs.  $-2.2 \pm 1.2$  mmHg)にも確認された。

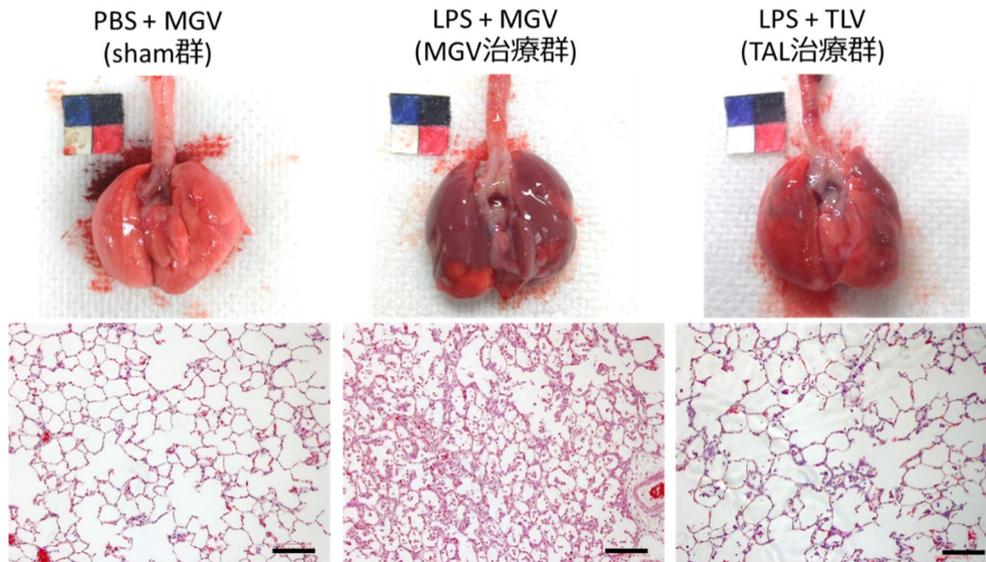


図4 治療2日後の摘出肺（上段、スケール1cm<sup>2</sup>）および組織切片（下段、スケール100µm）  
（文献2を改編して引用）

#### 致死性 ARDS モデルに対する予防的治療効果

LPS 投与量を2倍増やした致死性のARDSモデルにおけるTLV治療効果を評価した。その結果、MGV治療群では全例が2日以内に死亡したが、TLV治療群の1週間生存率は80%であり明らかな差が確認された（図5、 $p=0.0079$ ）。

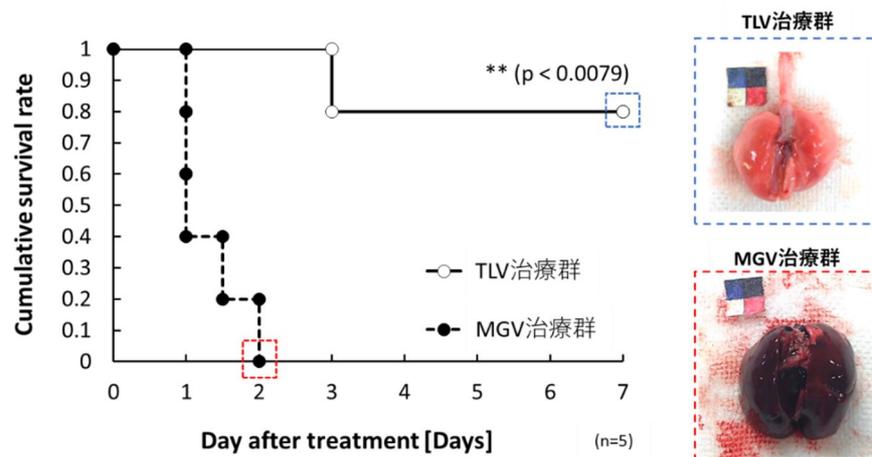


図5 TLV治療およびMGV治療を受けたARDSモデルラットの生存曲線  
（文献2を改編して引用）

実験の結果より、MNB分散液を用いたTLVを5分間実施することで、炎症原因物質(LPS)を洗浄除去することができ、重篤な肺疾患を回避できることを実証した。本研究成果は早期に肺洗浄を行うことの重要性を示したものである。今後、炎症が進行したモデルに対する効果を検証し、TLVを応用した肺洗浄治療の確立を目指したい。

#### <引用文献>

1. K. Kakiuchi, K. Matsuda, N. Harii, K. Sou, J. Aoki, S. Takeoka. Establishment of a total liquid ventilation system using saline-based oxygen micro/nano-bubble dispersions in rats, Journal of Artificial Organs, 18(3), 2015
2. K. Kakiuchi, T. Miyasaka, S. Takeoka, K. Matsuda, N. Harii. Total alveolar lavage with oxygen fine bubble dispersion directly improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome of rats, Scientific Reports, 10, 16597, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakiuchi Kenta, Miyasaka Takehiro, Takeoka Shinji, Matsuda Kenichi, Harii Norikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Total alveolar lavage with oxygen fine bubble dispersion directly improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome of rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73768-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kenta Kakiuchi, Norikazu Harii, Takehiro Miyasaka, Shinji Takeoka, Kenichi Matsuda
2. 発表標題 Total liquid ventilation with oxygen fine bubbles for acute lung injury,
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Nara, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Kakiuchi, Norikazu Harii, Takehiro Miyasaka, Shinji Takeoka, Kenichi Matsuda
2. 発表標題 Total Liquid Ventilation with Oxygen Fine Bubble Dispersion Prevents from Acute Lung Injury in Rats
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs, Osaka, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Kakiuchi, Shinji Takeoka, Norikazu Harii, Takehiro Miyasaka, Kenichi Matsuda
2. 発表標題 TOTAL LIQUID VENTILATION WITH OXYGEN MICRO/NANO BUBBLE DISPERSED SALINE PREVENTS FROM LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN RATS
3. 学会等名 The 46th European Society for Artificial Organs, Germany (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 垣内健太, 松田兼一, 針井則一, 宮坂武寛, 武岡真司
2. 発表標題 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的确立
3. 学会等名 第2回 稲門医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 垣内健太, 針井則一, 宮坂武寛, 武岡真司
2. 発表標題 酸素ファインバブル分散液を用いた完全液体換気技術の開発
3. 学会等名 第24回 酸素ダイナミクス研究会
4. 発表年 2020年

〔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	武岡 真司  (TAKEOKA Shinji)  (20222094)	早稲田大学・理工学術院・教授   (32689)	
研究分担者	松田 兼一  (MATSUDA Kenichi)  (60282480)	山梨大学・大学院総合研究部・教授   (13501)	
研究分担者	宮坂 武寛  (MIYASAKA Takehiro)  (60308195)	湘南工科大学・工学部・教授   (32706)	

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	森口 武史  (MORIGUCHI Takeshi)  (60422680)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	
研究分担者	菅原 久徳  (SUGAWARA Hisanori)  (70746776)	山梨大学・大学院総合研究部・助教    (13501)	
研究分担者	高三野 淳一  (TAKAMINO Junichi)  (70769281)	山梨大学・大学院総合研究部・助教    (13501)	

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