

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22506

研究課題名（和文）加圧装置組み込み型新規完全液体換気システムの構築：急性肺障害の治療に向けて

研究課題名（英文）Development of total liquid ventilation system with a pressure container: therapy for acute lung injury

研究代表者

垣内 健太（Kakiuchi, Kenta）

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：30875422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：完全液体換気（TLV）はガスの代わりに液体を用いた人工呼吸法であり、難治性肺疾患の治療法として確立が期待されている。しかし、これまで使用されてきた液体材料は、価格、温室効果係数、代謝性に課題があり、新しい材料を用いたTLVシステムの構築が求められている。今回、私は加圧装置により調製した酸素過飽和水を用いた新規TLVシステムを構築した。in vitro試験ではその有用性が示されたものの、in vivo試験では肺内部での液体の還流障害が確認され、目標の達成には至らなかった。しかし、本実験結果は、還流障害の課題を解決することで新しいTLVシステムを確立できる可能性を強く示唆するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLVは難治性肺疾患の治療法として注目されているが、液体材料の課題により研究の発展を妨げられている。今回、私は臨床で汎用されているリン酸緩衝生理食塩水を液体材料として用いることに挑戦し、独自のTLV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。動物実験にて本システムの有用性が示された場合、材料の安全性やコストの観点から迅速に大型動物への応用に展開できると期待される。また、治療対象としている急性肺障害はウイルス性肺炎や誤嚥性肺炎も原疾患となる疾患であり、世界的に深刻な医療課題を解決できる可能性を秘めている。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）：Total liquid ventilation (TLV) is a form of artificial respiration that uses liquid instead of gas and is expected to be a new treatment for intractable lung diseases (e.g., acute respiratory distress syndrome). However, the liquid materials that have been used so far have problems in terms of price, coefficient of greenhouse effect, and metabolism. Therefore, the development of a TLV system using new materials is required. In this study, I constructed a novel TLV system using oxygen-supersaturated water prepared by an original pressurized device. Although the usefulness of the device was confirmed in vitro, an issue of reflux inside the lungs was detected by in vivo testing; thus, failing to achieve the final goal. However, the results of the in vivo experiment strongly suggest the possibility of establishing a new TLV system by solving the problem of impaired reflux.

研究分野：医工学

キーワード：急性呼吸窮迫症候群 急性肺障害 液体換気 完全液体呼吸 肺洗浄 酸素過飽和水 酸素運搬体

1. 研究開始当初の背景

完全液体換気 (Total Liquid Ventilation, TLV) は、ガスの代わりに酸素溶解度の高い液体を用いてガス交換を行う人工呼吸法である。TLV は 1960 年代から研究されており、既に、動物実験にて呼吸の維持および急性肺障害への治療効果が報告されている¹⁾。先行研究では、酸素溶解度の高い液体として、人工有機化合物であるパーフルオロカーボン類 (Perfluorocarbons, PFCs) が用いられてきた。PFCs は化学的に安定な化合物であり、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、低表面張力という物理的性質から液体換気を実現できる唯一の物質とされてきた。しかし PFCs は、体内で代謝されず長期の安全性が保証されていないこと、温室効果係数が高く 1 部の種類が規制され始めていること、人工合成によって製造されているため高価であることから、PFCs を用いた TLV の実用化は困難であると考えられている。従って、TLV の実用化には新規液体材料を用いた TLV システムの開発が必要である。

我々の研究グループでは、PFCs の代替液として酸素ファインバブルと呼ばれる微小気泡をリン酸緩衝生理食塩水に分散させた酸素富化水 (酸素 FB 水) を用いた TLV システムを構築し、急性肺障害に対する予防的治療効果を実証した²⁾。これにより、安価かつ安全な PBS を用いた TLV の可能性を示唆することができた。しかし、酸素 FB 水では酸素供給量が十分ではなく、酸素供給量の観点において改善の必要があった。

2. 研究の目的

一般的に、加圧溶解させた溶存ガスは減圧と共に低下するが、気液界面に刺激 (振動や攪拌) を与えないことでその減少速度は大幅に低減することを見出した。この現象を利用して、加圧により調整した酸素過飽和水を TLV に応用することを考案した。本研究では、加圧溶解装置を組込んだ新規 TLV システムを構築し、その有用性を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 加圧装置を組込んだ新規 TLV システムの構築

特注の加圧装置を設計し、加圧装置を組込んだ新規 TLV システムを構築した (図 1)。初めに、1 MPa の加圧と 1000 rpm の激しい攪拌で加圧装置に入れた PBS に過飽和量の酸素を溶解させる。10 分後、攪拌を止め気液界面に刺激が無い条件下で、加圧装置内の圧力を 3 kPa まで減圧後させる。加圧装置内部を 3 kPa に維持した状態で、装置下部に設置されたバルブ (図 1:) を開放することで肺へ接続された流路内に酸素過飽和水が放出される。流路内にタイマー付きバルブ (図 1:) を設置することで液体の供給リズム (呼吸条件) を自動制御する。流路内の配管抵抗に伴う圧力損失が過飽和酸素の気泡化を促進し、肺への酸素供給量を低下させるため、排出口のバルブ (図 1:)、タイマー付きバルブ (図 1:)、挿管チューブとの接続コネクタ (図 1:) の 3 箇所で見られる圧力損失を最小にする条件を検討した。in vitro 実験では動物の代わりに自作のモデル肺を用いて実験を行い、評価項目としてモデル肺流入時の液中酸素含量 (mg/L) 及び液体運搬量 (mL/min) から算出した酸素供給量 (mg/min) を用いた (式 1)。ラットの 1 分間あたりの酸素消費量から算出した 7.2 mg/min を酸素供給量の目標値とした。

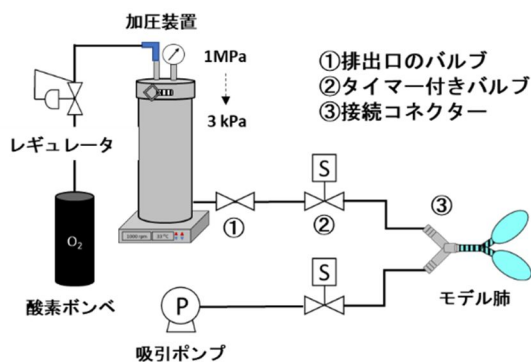


図 1 加圧装置を組込んだ TLV システム

排出口のバルブ (図 1:)、タイマー付きバルブ (図 1:)、挿管チューブとの接続コネクタ (図 1:) の 3 箇所で見られる圧力損失を最小にする条件を検討した。in vitro 実験では動物の代わりに自作のモデル肺を用いて実験を行い、評価項目としてモデル肺流入時の液中酸素含量 (mg/L) 及び液体運搬量 (mL/min) から算出した酸素供給量 (mg/min) を用いた (式 1)。ラットの 1 分間あたりの酸素消費量から算出した 7.2 mg/min を酸素供給量の目標値とした。

$$\text{酸素供給量(mg/min)} = \text{液中酸素含量(mg/L)} \times \text{液体運搬量(L/min)} \quad (1)$$

なお、液中酸素含量は既存の溶存酸素計では測定できない領域であるため、我々が開発した液中酸素含量測定方法を用いて測定した³⁾。

(2) ラットを用いた TLV 試験

最適化された新規 TLV システムは最後にラットを用いた動物実験にて有用性を評価した。ラットの気管に挿入した挿管チューブと TLV システムの接続コネクタ (図 1:) を接続することで、加圧装置で調製した酸素過飽和水をラットに直接運搬できるようになり、TLV を実施できる。TLV は 15 分間実施し、主要評価項目として TLV 前後の血液ガス分析、TLV 後の血中乳酸値、TLV 中の血行動態及び気道内圧を測定した。本研究では、血液の酸素化の維持を確認するため、TLV 後の酸素分圧: >80 mmHg、酸素飽和度: >96% を目標値とした。

4. 研究成果

(1) 加圧装置を組み込んだ新規 TLV システムの構築

加圧装置による酸素過飽和水の調製

1 MPa (100%酸素ガス) の加圧および **1000 rpm** の激しい攪拌により調製した酸素過飽和水中の酸素含量を、調製直後 (**0 分**) および、大気圧下で **15 分** 間静置した後 (**15 分**) で測定した。その結果、調製直後は **149 ± 3.47 mg/L** の酸素が含まれており、静置 **15 分** 後も **143 ± 0.41 mg/L** の酸素が保持されていることが分かった。この結果より、気液界面での刺激が無ければ過飽和と溶存酸素は高い割合で保持されることを実証できた。また、**149 mg/L** という酸素量は酸素飽和水 (**1 atm, 36**) の約 **5 倍** に相当することから、調製から **15 分** 以内に動物の肺へ酸素過飽和水を運搬することで完全液体換気を行える可能性が示唆された。

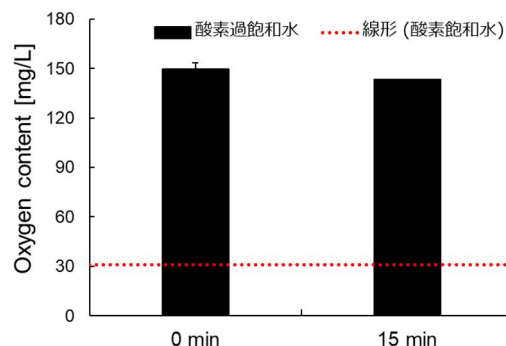


図2 酸素過飽和水中の酸素量 (36)

流路内抵抗 (圧力損失) の低減による酸素供給量の改善

加圧装置内で調製した酸素過飽和水 (図2) の気泡化を防ぎながら実験動物の肺へ運搬するため、流路の圧力損失を低減させる方法を検討した。初めに、流路内の **2 箇所** で使用されている、排出口のバルブ (図1:) およびタイマー付きバルブ (図1:) に関してパプルの種類と酸素供給量の関係性を評価した。*in vitro* 実験では、実験動物の代わりに自作のモデル肺を用いており、モデル肺到達時の液中酸素含量と液体運搬をそれぞれ測定し、酸素供給量を算出した (式1)。その結果、排出口のバルブは“ボールバルブ”、タイマー付きバルブでは“ピンチバルブ”を用いた組み合わせにおいて最も高い酸素供給量を示すことが分かった。また、液中酸素含量は、**129 ± 3.97 mg/L** であり、調製時の **86.6%** が保持されたまま肺に供給できることが分かった。

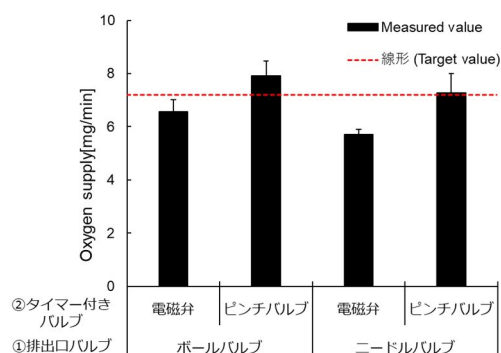


図3 バルブの種類と酸素供給量の関係

次に実験動物と TLV システムを接続するコネクタの形状に関して検討を行った。先行研究より、**T 字型**のコネクタよりも **Y 字型**のコネクタの方が、圧力損失が小さく、酸素供給量が増加することを確認している。この知見より、今回は **Y 字型**のコネクタと直線型のコネクタによる酸素供給量の違いを検証した。その結果、直線型のコネクタに変更することで酸素供給量が **114%** に増加し、**8.87 mg/min** の酸素を運搬できることが分かった。

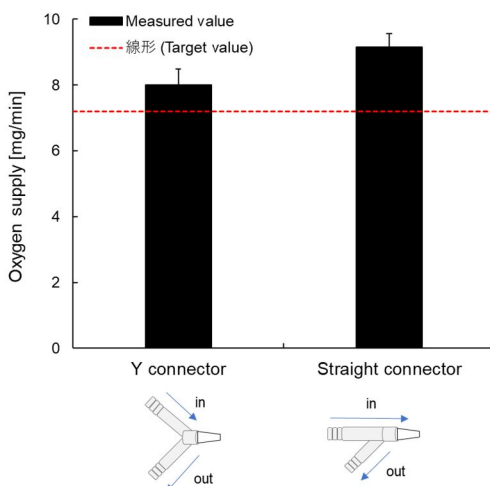


図4 挿管チューブと酸素供給量の関係

以上の結果より、TLV システムの流路内抵抗を低減させることで、ラットの酸素消費量から算出した目標値 (**7.2 mg/min**) を超える酸素量を供給できる可能性が示唆された。

(2) ラットを用いた TLV 試験

構築した新規 TLV システムの有用性を評価するため、ラットを用いた TLV 試験を実施した。*in vitro* 実験より、ラットの酸素消費量を十分に供給でき、TLV 直後の **PaO₂** は **80 mmHg** 以上を維持していると仮説を立てた。しかし、TLV 後の **PaO₂** は **41.0 ± 3.74 mmHg** であった。TLV 中、肺から出てくる液体には大量の気泡が含まれており、その一部はシステム外に排出されずに再び肺内部へ流入していく様子が確認された。また、肺内部で発生した気泡が合一化し、接続チューブに滞留していることも確認された。すなわち、酸素過飽和水が肺内部の分岐構造による圧力損失の影響を受け、その1部が気泡化したことにより換気障害を引き起こしたことが予想される。実際、酸素 FB 水を用いた TLV システムの実験結果 (先行システム) と比較して、**1 分間**あたりの換気量は **36%** 低下していた (**69.8 ± 3.40 vs. 44.9 ± 7.26 mL/min**)。しかし、液体の供給量が **36%** 低下していたのにも関わらず血ガス分析および血中乳酸値の結果はすべて先行システムよりも良好であったことから、**1mL** あたりの液体から供給される酸素量は大幅に改善したことが示唆された。

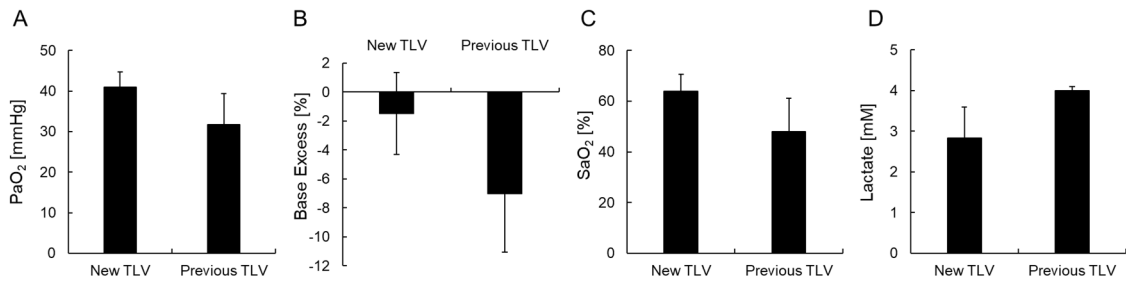


図5 先行システムと新規システムを用いたTLV試験後のラットの生理状態。(A) TLV直後の動脈血酸素分圧、(B) TLV直後のBase Excess (塩基過剰)、(C) TLV直後の動脈血酸素飽和度、(D) TLV直後の血中乳酸値

本研究課題では、急性肺障害の新規治療法として水系の液体を用いたTLVシステムの構築に挑戦した。*in vitro*試験では、ラットの酸素消費量から算出した目標値を超える酸素量を供給できるTLVシステムの構築に成功したが、*in vivo*試験では、肺内部での気泡化に伴う換気障害を引き起し、目標を達成することができなかった。しかし、液体運搬量が低下したのにも関わらず、先行研究で構築したTLVシステムよりも動物実験の成績は向上していた。従って、肺内部での気泡化という課題を解決することで、本研究の目的を達成できる可能性が示唆された。今後は、肺内部の構造を含めた流路をデジタルデータ化し、流体シミュレーションの観点からTLVシステムの最適化を図る。また、液体材料自体に関して、添加物を入れることで微細気泡の安定化を向上させ、気泡の合一化による流路の閉塞を防ぐことに挑戦する。

急性肺障害は、現在、世界的で蔓延している新型コロナウイルスによるウイルス性肺炎や高齢者で問題となっている誤嚥性肺炎などが原疾患となるため、世界的に深刻な医療課題の1つである。また、重症化した際の治療法は確立されておらず、致死率も27-45%と高い。本研究課題は、既存の治療法とは異なる新しい観点からのアプローチであり、酸素供給の課題を解決できた際には、大きなインパクトがあると考えている。

参考文献

- 1) ZHU Yao-bin, LIU Dong-hai, *et al.*, Total liquid ventilation reduces oleic acid-induced lung injury in piglets, *Chinese Medical Journal*, 126(22), 2013
- 2) Kenta Kakiuchi, Takehiro Miyasaka, *et al.*, total alveolar lavage with oxygen fine bubble dispersion directly improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome of rats, *Scientific Reports*, 10(16597), 2020
- 3) Kenta Kakiuchi, Takehiro Miyasaka, *et al.*, Development of quantitative and concise measurement method of oxygen in fine bubble dispersion, *PLoS ONE*, 17(2): e0264083, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kakiuchi Kenta, Miyasaka Takehiro, Harii Norikazu, Takeoka Shinji | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Development of quantitative and concise measurement method of oxygen in fine bubble dispersion | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0264083 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 垣内健太, 武岡真司, 針井則一 | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 短時間全肺胞洗浄によるARDSの治療 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Medical Science Digest | 6. 最初と最後の頁 743-744 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 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～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kenta Kakiuchi, Tomoki Kozuka, Nobuyuki Mase, Takehiro Miyasaka, Norikazu Harii, Shinji Takeoka |
| 2. 発表標題 Fundamental property of fine bubble dispersion as an oxygen carrier |
| 3. 学会等名 The 8th Asia biomaterials Federation (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年～2022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 |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 針井 則一 (Harii Norikazu) | | |
| 研究協力者 | 宮坂 武寛 (Miyasaka Takehiro) | | |
| 研究協力者 | 武岡 真司 (Takeoka Shinji) | | |

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 |
|---------|---------|