

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09013

研究課題名（和文）ARDSモデルラットにおける短時間液体呼吸と新規薬物伝達システムの治療効果の検証

研究課題名（英文）Evaluation of therapeutic effects of short-time liquid ventilation and novel drug delivery systems in a rat ARDS model.

研究代表者

針井 則一（Harii, Norikazu）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：80377522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000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、未だ肺障害への直接的な治療は確立されていない。我々は、100 μm以下の酸素の微小気泡を分散させた酸素富化水（ファインバブル液）による液体呼吸技術（肺洗浄技術）の開発に取り組んでいる。本研究から、ヒトのARDSに近いARDSモデルラットを作製するためには、1）長期的なLPSの暴露、2）オレイン酸投与による血管透過性の亢進、3）補液管理による血行動態の維持が重要であることがわかった。また、高い酸素量を正確に測定できる方法を開発し、ファインバブル液中の高酸素は気泡内部の酸素より過飽和状態の溶存酸素の寄与が大きいことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の対象疾患としているARDSは、周期的にパンデミックを引き起こすウイルス性肺炎も原疾患となりうる症候群であり、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い世界的な医療課題である。液体呼吸技術は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ARDSの研究を進めていく上で重要なARDSモデルラットに関する重要な知見を取得した。また、新しい液体材料として注目している酸素ファインバブル液の物性評価技術の開発および基本物性の一部を明らかにした。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) poses a significant threat to patients, with a high mortality rate and no definitive therapy. Our research focuses on a novel approach to ARDS treatment through total liquid ventilation utilizing oxygen micro/nano bubble dispersion. In this time, we have identified crucial factors in establishing a rat ARDS model: 1) sustained lipopolysaccharide (LPS) administration, 2) oleic acid-induced vascular permeability, and 3) fluid replacement for hemodynamic stability. Furthermore, we have established an oxygen measurement system tailored to oxygen micro/nano bubble dispersion and revealed that the high oxygen content in the dispersion arises predominantly from super-saturated dissolved oxygen rather than the oxygen encapsulated within the bubbles. These findings represent a contribution to both ARDS research in intensive care medicine and the micro/nano bubble research in material science.

研究分野：集中治療医学

キーワード：急性呼吸窮迫症候群 完全液体換気 敗血症 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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、肺泡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り、重篤な低酸素血症を呈する疾患である。新型コロナウイルス肺炎 (COVID-19) のパンデミックにより、ARDS の治療は救急・集中治療領域において世界的に重要な課題のひとつとなった。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をはじめとした炎症物質による肺泡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おり、その炎症の持続にはリポ多糖 (LPS) など外来微生物に由来する共通の構成成分である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) やダメージを受けた細胞や細胞外基質から放出される成分 (damage-associated molecular patterns: DAMPs) の存在が重要である。

(2) これまで、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、生存率の改善が証明された治療法はない。すなわち、現時点では ARDS 治療の成否はその根本原因の除去による SIRS の鎮静化、原疾患の改善に依存しており、如何に迅速に人工呼吸器から離脱し、肺構造の荒廃を回避できるかが重要であると考えられる。

(3) TLV はガスの代わりに液体を介してガス交換を行う非生理的な人工呼吸法であるが、TLV 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、急性肺障害モデルにおいて 1) 全肺泡洗浄、2) 虚脱した肺泡の再拡張、3) 圧損傷リスクの低減を実現することができると考えられている。先行研究の TLV では、水の約 20 倍の高い酸素溶解度を有し、化学的に安定な有機化合物であるパーフルオロカーボン類 (PFCs) が液体材料として使用されてきた。しかし、PFCs は液体換気に適した物性を示す一方、高価格 (>¥150 万/L) および高比重 (1.78~1.92 g/mL) に伴う心臓の圧迫の課題がある。さらに、PFCs の一部は温室効果係数が高く使用規制が強まっている。以上の背景より、TLV の研究では PFCs に代わる新しい液体を用いた新規 TLV システムの開発が望まれている。

(4) 我々はファインバブル (FB) と定義される酸素の微小気泡を分散させたリン酸緩衝生理食塩水 (FB 液) を用いた TLV システムを開発した。さらに、direct-ARDS モデルラットにおいて、5 分間の TLV が肺泡内の炎症性サイトカインおよびマクロファージを直接的に除去することで、致死性の ARDS を回避し、生存率を 80%改善させることを確認した。しかし、indirect-ARDS モデルに対する治療効果は検証していない。

### 2. 研究の目的

#### 実験 I: Indirect-ARDS モデルの作製

敗血症を契機とする indirect-ARDS モデルラットに対して FB 液を用いた TLV 治療が有効であるかを検証する。なお、COVID-19 の影響により TLV の介入まで実験を進めることができなかったため、Indirect-ARDS モデルの作製および *in vitro* 実験として FB 液の評価を実施した (実験 II)。

#### 実験 II: FB の基礎物性評価

TLV の新規材料として用いている FB 液の酸素運搬体としての基礎物性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 実験 I: Indirect-ARDS モデルの作製

静注 (i.v.)、腹腔 (i.p.)、皮下 (s.c.) からエンドトキシン (LPS) あるいはオレイン酸 (OA) を投与することで敗血症由来の ARDS モデルの作製を試みた。セボフルラン麻酔下のラットに対して LPS and/or OA を投与し一定時間経過観察を行った後、気切-挿管を実施して人工呼吸器 (Vt: 7 [mL/kg], PEEP: 3-5 [cmH<sub>2</sub>O], RR: 80-90 [/min], FiO<sub>2</sub>: 0.2 or 1.0, I:E = 1:1) にて呼吸管理を行った。呼吸管理下において 15 分間血行動態をモニタリングし、血ガスを測定した。術後評価として、肺を摘出し、左肺で BAL、右肺・上葉を組織切片評価、右肺・中葉および後葉を wet/dry ratio の評価に用いた (図 1)。

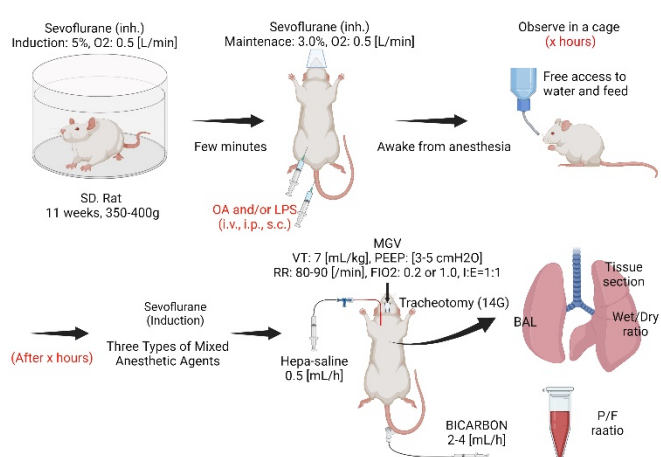


図 1 Indirect-ARDS モデル作製プロトコール

敗血症由来の ARDS モデルは多くの文献で報告されているが、そのほとんどが肺組織切片や炎症性サイトカインの変化のみで評価しており、ARDS の診断基準を十分に満たしているとは言えない。また、ラットは LPS に対する耐性が高いため、一時的に ARDS の症状が現れても 1-2 日で回復するため ARDS の症状を残した病態モデルを作製するのは極めて困難である。

## 実験 II: FB の基礎物性評価

液体換気を実現するためには、酸素含有量の高い液体材料を用いる必要がある。そこで、FB 液の酸素運搬体としての物性を評価するため、1) 高酸素領域 (>50 mg/L) の酸素量を測定できる液中酸素測定システムの開発、2) FB の酸素運搬体としての物性評価を実施した。

### 1) FB 液中の酸素含量測定方法の開発

特殊な形状の酸素計 (図2A, OXY G1-PLUS; Hansatech Instruments Ltd) を用いて、酸素 FB 分散水を脱酸素水で希釈することで FB 液中の酸素量を測定する方法を考案した (図2B)。本酸素計を用いることで、①電極部への FB の付着および②大気からの酸素の混入を防ぐことができ、定量的な測定が可能となった。開発した方法の測定精度はプローブ型の溶存酸素系および化学滴定法 (ウィンクラー法) によって得られた結果との比較により評価した。

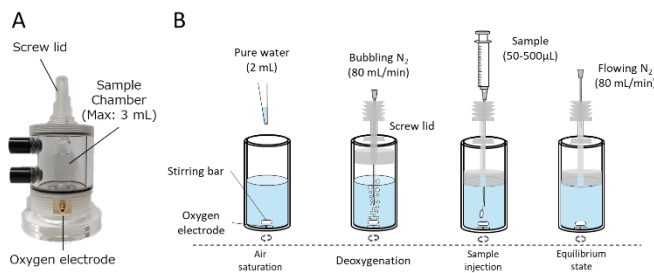


図2 液中酸素測定方法

### 2) FB の酸素運搬体としての物性評価

酸素 UFB が酸素運搬体として機能する場合、脱気水で希釈した際に UFB 濃度および粒子径が減少すると仮説を立て、脱気水による希釈前後の UFB 濃度および酸素含量を評価した。次に、酸素 UFB に内包された酸素が分散水の過飽和度に関与している場合、FB 濃度と過飽和酸素量に相関関係があると仮説を立て、両因子の相関関係を評価した。具体的には、FB 液を20℃、30℃、40℃の環境で保存し、酸素含量および UFB 濃度の経時変化とその関係性を評価した。最後に、卓上ファインバブル発生装置 (FBG-OS Type1, (株) PMT) を用いて FB 発生装置稼働中の UFB 濃度、MB 濃度、酸素含量の経時変化を同時に計測し、各因子の相関関係を評価した。

## 4. 研究成果

### 実験 I: Indirect-ARDS モデルの作製

#### 1) OA および LPS の単回投与 (i.v.)

OA は 175 μL/kg、LPS は 5 mg/kg が単回投与量の限界であった。一方、限界投与量以下では一時的に活動量の低下や下痢などの症状が確認されたが、1-2 日後に改善したため、単回投与では敗血症由来の ARDS モデルを作製することは困難であった。また、OA は血管透過性を増加させ肺水腫を進行させることが分かった。

#### 2) OA (i.v.) および LPS の同時投与 (i.v., i.p.)

血管透過性を向上させた上で、炎症性サイトカインの増加を惹起するため OA と LPS の同時投与を検証した。しかし、OA: 100 μL/kg、LPS: 1 mg/kg においても同時投与では 24 時間以内に全例が死亡したため、i.v.からの同時投与は死亡リスクが高く目的のモデルを作製することは困難であった。また、ラットの場合、活動量および摂食量の低下に伴い体重が 1 日で 5%以上低下し、血行動態が悪化する。心原性肺水腫を否定するためには補液による血行動態の管理が重要であることが示唆された。

#### 3) OA (i.v.) および LPS の同時投与 (s.c.) + 補液

LPS による炎症を軽微かつ長期的に制御するため経皮投与に変更し、OA の静注投与と併用するプロトコルを検証した。また、定期的な補液管理 (10-14mL/400g) も追加した。その結果、組織切片、P/F ratio、W/D ratio より1-2 日後においても ARDS の症状を確認できるモデルが作製できた。しかし、改善はみられたものの血圧の低下 (MAP: 75 mmHg 前後) および心拍数の低下 (250 rpm 前後) は依然として残っていた。

以上の結果より、Indirect-ARDS モデルラットを作製するためには、1) 長期的な LPS の暴露、2) OA による血管透過性の亢進、3) 補液管理による血液循環量の維持が重要であることが分かった。

## 実験 II: FB の基礎物性評価

### 1) FB 分散水中の酸素含量測定方法の開発

純水をサンプルとして開発した測定法の測定精度をプローブ型溶存酸素計と比較した。その結果、既存の溶存酸素計と同程度の精度で測定できることが分かった。また、FB 分散液中の酸素含量をウィンクラー法により測定した結果と比較をした結果、両群に有意差はなく定量的に FB 分散液中の酸素含量を測定できることがわかった (図3)。さらに、本測定法はウィンクラー法と比較して①簡便性 (4 steps)、②迅速性 (<8 min)、③サンプル量 (50-500 μL) おいて優位性があった。

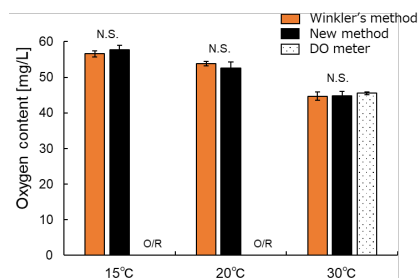


図3 測定精度評価

## 2) FBの酸素運搬体としての物性評価

調製したUFB分散水を脱気水で希釈してもUFB濃度および粒子径の減少は確認されなかった。すなわち、UFBから脱気水への酸素の拡散移動は生じないことが分かった。また、UFB分散水調製直後におけるUFB濃度と過飽和酸素量に相関性はなく(図4A,  $R^2 = 0.0157$ )、両因子の経時変化にも関連性は確認されなかった(図4B, C)。さらに、FB発生装置稼働中の、FB濃度の変化量と液中酸素含量の変化量には大きな乖離があり、FBに内包された酸素量で過飽和酸素量を説明することはできなかった。一方で、FB分散水の酸素量低下速度は、FBを発生させずに調製した過飽和溶存酸素水の低下速度と類似していたことから、FB分散水中の過飽和酸素は、FBに内包された酸素ではなく過飽和溶存酸素であることが示唆された。

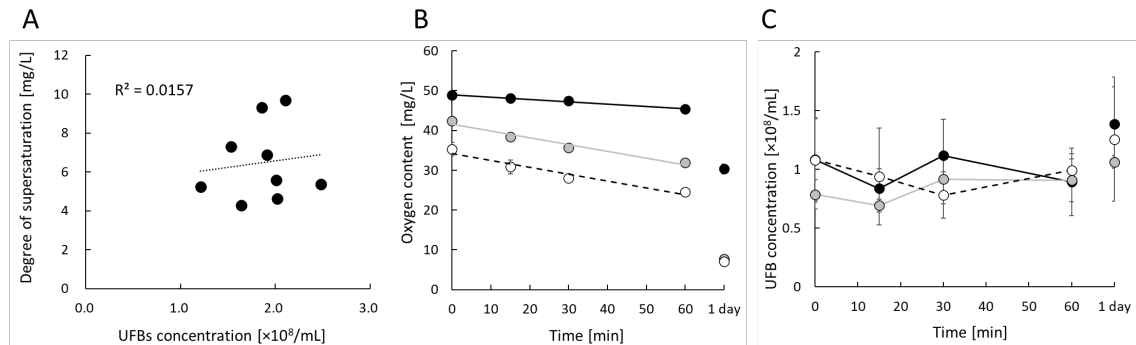


図4 液中酸素測定方法

## 5. 主な発表論文等

### <論文>

[1] 垣内健太, 武岡真司, 針井則一. “短時間全肺胞洗浄によるARDSの治療”, *Medical Science Digest*, 48(1), January 2022, 743-744 (査読なし・執筆依頼)

[2] Kenta Kakiuchi, Takehiro Miyasaka, Norikazu Harii, Shinji Takeoka. “Development of quantitative and concise measurement method of oxygen in fine bubble dispersion”, *PLoS ONE*, 17(2): e0264083, February 2022, 1-13 (査読あり) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264083>

[3] Kenta Kakiuchi, Tomoki Kozuka, Nobuyuki Mase, Takehiro Miyasaka, Norikazu Harii, Shinji Takeoka. “Do Ultrafine Bubbles Work as Oxygen Carriers?”, *Langmuir*, 39(4), January 2023, 1354-1363 (査読あり) <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01209>

### <学会>

[1] Kenta Kakiuchi, Tomoki Kozuka, Nobuyuki Mase, Takehiro Miyasaka, Norikazu Harii, Shinji Takeoka. “Fundamental property of fine bubble dispersion as an oxygen carrier” (English), *The 8th Asia biomaterials Federation, Aichi*, 2021.11. (国際、口頭)

[2] 垣内健太, 小塚智貴, 間瀬暢之, 宮坂武寛, 針井則一, 武岡真司 “酸素ファインバブルの酸素運搬体としての物性評価”, 第29回日本血液代替物学会年次大会, 東京, 2022.12 (国内、口頭)

[3] 垣内健太, 小塚智貴, 間瀬暢之, 宮坂武寛, 針井則一, 武岡真司 “酸素ファインバブルは酸素運搬体として機能するのか?”, 化学工学会第88年会, 東京, 2023.3 (国内、口頭)

[4] 垣内健太, 針井則一, 宮坂武寛, 松田兼一, 武岡真司 “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と肺洗浄治療効果”, 医工学治療学会第38回学術大会, 愛媛, 2022.5. (査読あり) (国内、ポスター)

[5] 垣内健太, 小塚智貴, 間瀬暢之, 宮坂武寛, 針井則一, 武岡真司 “酸素ファインバブル分散水中の酸素含量測定方法の確立および酸素運搬体としての物性評価”, 日本化学会第103春季年会, 東京, 2023.3 (国内、ポスター)

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, Kozuka Tomoki, Mase Nobuyuki, Miyasaka Takehiro, Harii Norikazu, Takeoka Shinji	4. 巻 39
2. 論文標題 Do Ultrafine Bubbles Work as Oxygen Carriers?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c01209	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(1)
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5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, 松田兼一, 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と肺洗浄治療効果
3. 学会等名 医工学治療学会第38回学術大会, 愛媛, 2022.5
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内健太、小塚智貴、間瀬暢之、宮坂武寛、針井則一、武岡真司
2. 発表標題 酸素ファインバブルの酸素運搬体としての物性評価
3. 学会等名 第29回日本血液代替物学会年次大会，東京，2022.12
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内健太、小塚智貴、間瀬暢之、宮坂武寛、針井則一、武岡真司
2. 発表標題 酸素ファインバブルは酸素運搬体として機能するのか？
3. 学会等名 化学工学会第88年会，東京，2023.3
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 垣内健太、小塚智貴、間瀬暢之、宮坂武寛、針井則一、武岡真司
2. 発表標題 酸素ファインバブル分散水中の酸素含量測定方法の確立および酸素運搬体としての物性評価
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会，東京，2023.3
4. 発表年 2023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, Aichi, 2021.11. (国際学会)
4. 発表年 2021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	垣内 健太 (Kakiuchi Kenta)  (30875422)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員  (82626)	
研究分担者	宮坂 武寛 (Miyasaka Takehiro)  (60308195)	湘南工科大学・工学部・教授  (32706)	
研究分担者	森口 武史 (Moriguchi Takeshi)  (60422680)	山梨大学・大学院総合研究部・教授  (13501)	
研究分担者	後藤 順子 (Goto Junko)  (60530102)	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
---------	---------