

博 士 論 文

リアルタイムイメージングを用いた  
脂肪乳剤投与後におけるフラッシング条件の検討

岡 村 直 耶

令和六年提出

# 目次

緒論 .....	1
第一章 インドシアニングリーンによる脂肪乳剤中の脂質エマルションの蛍光標識	8
第一 緒言 .....	8
第二節 方法 .....	10
第三節 結果 .....	12
第四節 考察 .....	16
第五節 小活 .....	19
第二章 完全皮下埋込み型中心静脈アクセスデバイスにおけるフラッシング後の 脂肪乳剤の残存評価 .....	20
第一節 緒言 .....	20
第二節 方法 .....	23
第三節 結果 .....	27
第四節 考察 .....	32
第五節 小活 .....	35
第三章 脂肪乳剤を側管投与した後のフラッシング方法の提案 .....	37
第一節 緒言 .....	37
第二節 方法 .....	39
第三節 結果 .....	43
第四節 考察 .....	47
第五節 小活 .....	50

第四章 中心静脈カテーテルまたは延長チューブ付き末梢静脈カテーテル内の 効果的なフラッシング条件および残渣が微生物増殖に及ぼす影響 ....	51
第一節 緒言 .....	51
第二節 方法 .....	52
第三節 結果 .....	55
第四節 考察 .....	61
第五節 小活 .....	65
総括 .....	67
参考文献 .....	69
発表論文 .....	77
謝辞 .....	78

## 略語一覽

BF	BFLUID <sup>®</sup> Injection
CRBSI	Catheter-Related Blood Stream Infection
CVC	Central Venous Catheter
EP	ELNEOPA-NF <sup>®</sup> No.2 Injection
FFA	Free Fatty Acid
HDL	High Density Lipoprotein
HPN	Home Parenteral Nutrition
ICG	Indocyanine green
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LE	Lipid Emulsion
PPN	Peripheral Parenteral Nutrition
QOL	Quality of Life
ROI	Region of Interest
TG	Triglyceride
TIVAD	Totally Implantable Venous Access Device
TPN	Total Parenteral Nutrition



## 緒論

ヒトは、そのエネルギーを三大栄養素である糖質・脂質・タンパク質から得ており、摂取経路としては経腸または経静脈に大別される。栄養療法は経腸栄養法と静脈栄養法に分類され、腸が機能している場合は経腸栄養法の選択が基本である<sup>1</sup>。経腸栄養剤は脂質を含む主要な栄養素がバランス良く含まれている一方で、静脈栄養剤では脂質を含む脂肪乳剤は少なく、本邦で静注用脂肪乳剤として製造販売されている製剤はイントラリポス輸液のみである。イントラリポス輸液は、主に脂質エマルションが分散している状態の輸液である。脂質エマルションの中心は大豆油由来のトリグリセリド(TG)で主に構成され、周りに卵黄レシチン由来のリン脂質が配列している(Figure 1)。TGはリン脂質によって乳化され、リン脂質の疎水基が内側に、親水基が外側に向いている状態で水溶液中に分散しており、表面はややマイナスに帯電するゼータ電位となっている<sup>2</sup>。人工脂肪粒子の大きさは100~700 nm (0.1-0.7 $\mu$ m)で、平均粒子径は200~400 nm (0.2-0.4  $\mu$ m)である。人工脂肪粒子の多くは0.2  $\mu$ m孔径の細菌、真菌、微粒子等の捕集を目的としたファイナルフィルターを通過しないため、1.2  $\mu$ m孔径の脂肪乳剤用フィルターが市販されている<sup>3</sup>。脂肪自体には浸透圧がないため、等張化剤として濃グリセリンが添加され、血漿浸透圧と等張となっている。pHは7.5程度で中性に近い白色懸濁液である。

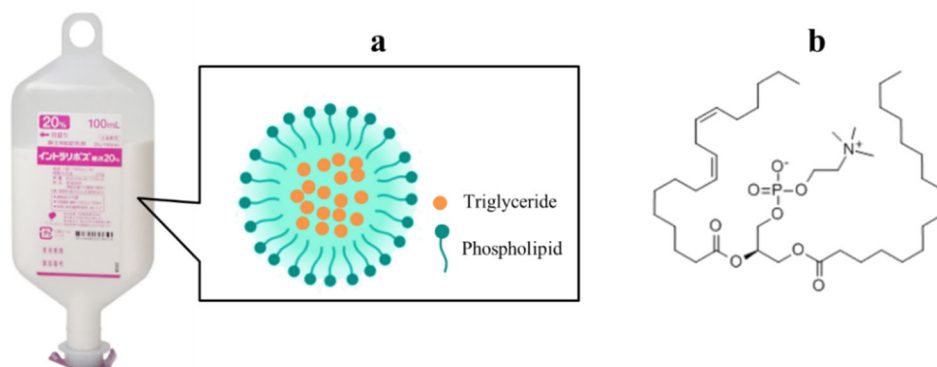
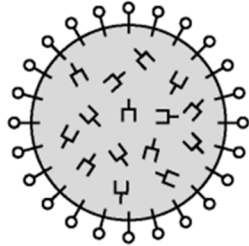


Figure 1 Structure of LE in Intralipos<sup>®</sup> Injection (a) and structural formula of phosphatidylcholine, a typical phospholipid in egg yolk lecithin (b).

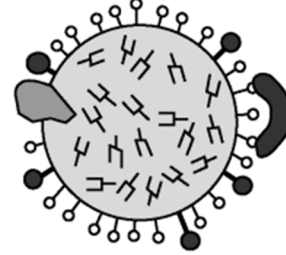
人工脂肪粒子の代謝経路を Figure 2 に示す。人工脂肪粒子は、体内で直ちにアポタンパク C-II, C-III および E が高比重リポタンパク(HDL)より転送され、カイロミクロンに類似した形態に変化する。そして、カイロミクロンと同様に、リポタンパクリパーゼ(LPL)により加水分解されて遊離脂肪酸(FFA)を供給している<sup>4</sup>。

●人工脂肪粒子の基本形態



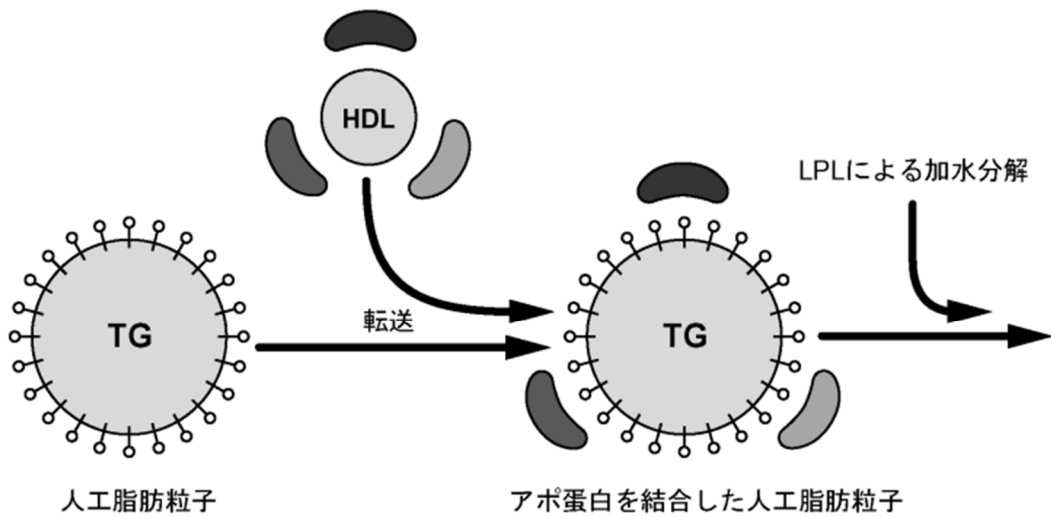
○ : リン脂質  
 □ : トリアシルグリセロール分子

●カイロミクロンの基本構造



○ : リン脂質  
 □ : トリアシルグリセロール分子  
 ● : フリーコレステロール  
 ○ : 構造アポ蛋白 (アポA, Bなど)  
 ◐ : 末梢アポ蛋白 (アポC, Eなど)

●人工脂肪粒子のリポ蛋白化



人工脂肪粒子

アポ蛋白を結合した人工脂肪粒子

TG : トリアシルグリセロール、HDL : 高比重リポ蛋白、LPL : リポ蛋白リパーゼ  
 ○ : アポリポ蛋白C-II、◐ : アポリポ蛋白C-III、◑ : アポリポ蛋白E

Figure 2 Lipid metabolism by lipoprotein conversion of LE.

静脈栄養法における脂肪乳剤の利点は以下のとおりである。

① 高いエネルギー効率

脂肪はエネルギー効率が 9 kcal/g と高く、糖質・アミノ酸の約 2.3 倍であるために少ない水分量で高いカロリー補給が可能となる。等浸透圧であることから、末梢から十分なエネルギー量を投与し、NPC/N 比を適正にして投与するためには有用である<sup>5</sup>。

② 必須脂肪酸の補給源

脂肪乳剤を投与しない静脈栄養管理下では、小児では約 2 週間、成人では約 4 週間で必須脂肪酸欠乏症が発生する<sup>2,6</sup>。欠乏症の予防には、1 日総エネルギー投与量の 1~4%をリノール酸として、0.2~0.5%を  $\alpha$  リノレン酸として投与すればよいとされている<sup>7-9</sup>。本邦で使用されているイントラリポス輸液は中性脂肪として大豆油が 100% 使用されており、大豆油は 50~57%がリノール酸、3~10%が  $\alpha$  リノレン酸で構成されている。そのため、イントラリポス輸液 20% 100~250 mL を週 2 回投与することで必須脂肪酸欠乏症を予防できる<sup>10,11</sup>。

③ 脂肪肝等の肝障害抑制

静脈栄養施行時に非タンパク質性カロリーを糖質のみにすると、糖質が過剰投与となり、脂肪肝や中心静脈栄養 (TPN) 関連肝障害の原因となる。したがって、必須脂肪酸欠乏症予防や投与エネルギーを補う目的だけではなく、静脈栄養時の脂肪肝や TPN 関連肝障害の発生予防のためにも脂肪乳剤を投与することは有用である<sup>12</sup>。

④ 低 CO<sub>2</sub> 産生

脂肪の呼吸商は 0.7 (糖質:1.0, タンパク質:約 0.8, 通常の食事:0.85 付近) であり、グルコース単独投与時に比べて、理論上は炭酸ガス自体の発生を抑制することができるため、高 CO<sub>2</sub> 血症に陥る呼吸不全等には有利である<sup>13</sup>。

⑤ 等浸透圧

浸透圧が高い糖電解質液やアミノ酸加糖電解質液と同時に投与すれば浸透圧を下げることができ、静脈炎の予防にも有用である<sup>14</sup>。

これらの数々のメリットから、2013 年に発刊された静脈経腸栄養ガイドライン第 3 版では静脈栄養施行中の脂肪乳剤の投与が推奨されている<sup>1</sup>。一方で、脂質は微生

物の増殖因子の一つであると特定されているため、輸液ラインやカテーテルなどの薬剤投与デバイス内に脂質エマルションが残存した場合は、カテーテル関連血流感染（CRBSI）の重大なリスクファクターとなりうる<sup>15,16</sup>。一般的な栄養輸液では、輸液容器または輸液ライン内で微生物が増殖すると内容液が白濁または着色するために、肉眼で微生物汚染の判断ができる。しかしながら、脂肪乳剤は白色懸濁液であるため、微生物汚染の判断が困難である。また、脂肪乳剤の影響で生じる凝集体、血栓形成、薬剤の沈殿により Figure 3 に示したような血管アクセスデバイスの閉塞を引き起こすことがあると報告されている<sup>17-19</sup>。脂肪乳剤の凝集や分離に影響を与える薬剤として、主に 2 価の陽イオン（特に  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ）、ヘパリンや血漿増量剤などが挙げられる<sup>18</sup>。

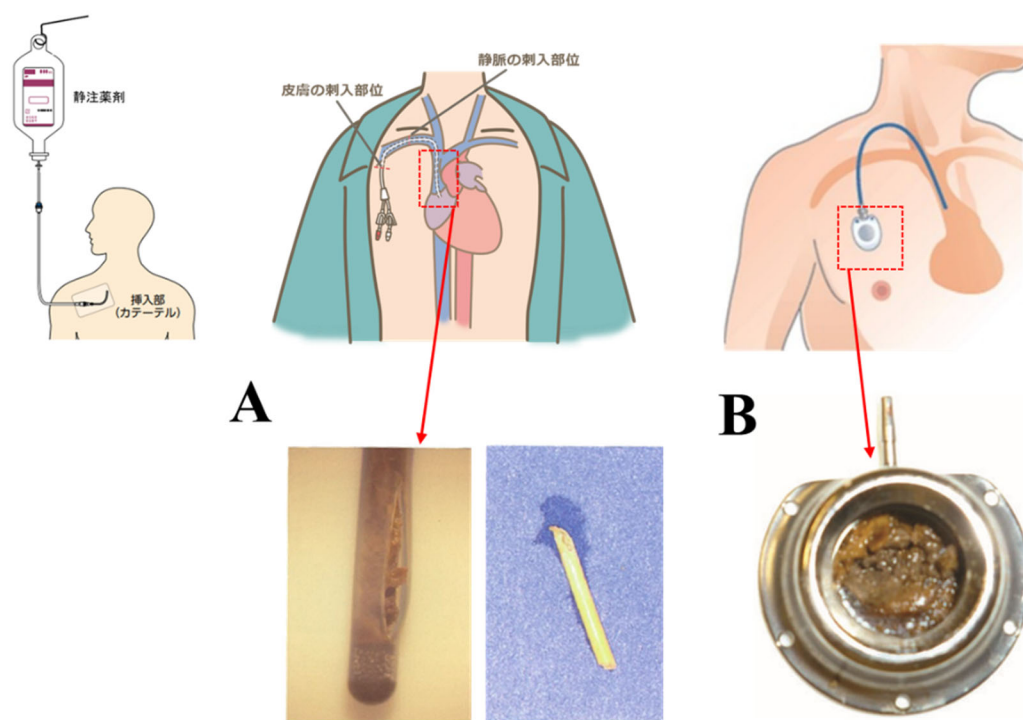


Figure 3 Obstruction containing lipid in central venous catheter (A) and totally implantable vascular access device (B).

したがって、脂肪乳剤投与後の輸液ラインや血管アクセスデバイス内の残渣低減は医療安全上の課題であり、対策方法としては、脂肪乳剤投与後 24 時間以内の輸液ライン交換や十分量の生理食塩液によるフラッシングが推奨されている<sup>1,20</sup>。しかし

ながら, Figure 4 に示した脂肪乳剤の側管投与では, 脂肪乳剤の投与に用いた輸液ラインのみを交換すればよいとされている<sup>1</sup>。そのため, 側管以降のメインラインやカテーテル内の脂肪乳剤は, フラッシングによる残渣低減が重要となる。

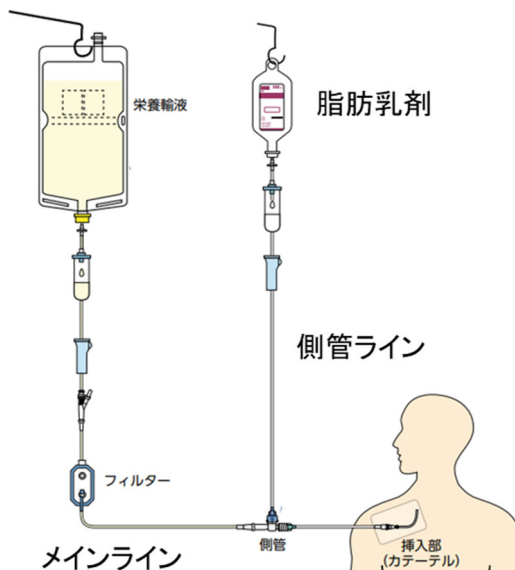


Figure 4 The image diagram of separate administration of LE from injection site.

臨床において, プレフィルドシリンジを用いたフラッシングはカテーテルの開存性を維持することに加え, CRBSI を予防することが報告されている<sup>21-23</sup>。フラッシングの手法としては, 一度の注入で連続的にフラッシングするボーラスフラッシュ, またはフラッシングの一部に停止操作を加えて拍動的にフラッシングするパルスングフラッシュが一般的である (Figure 5)。

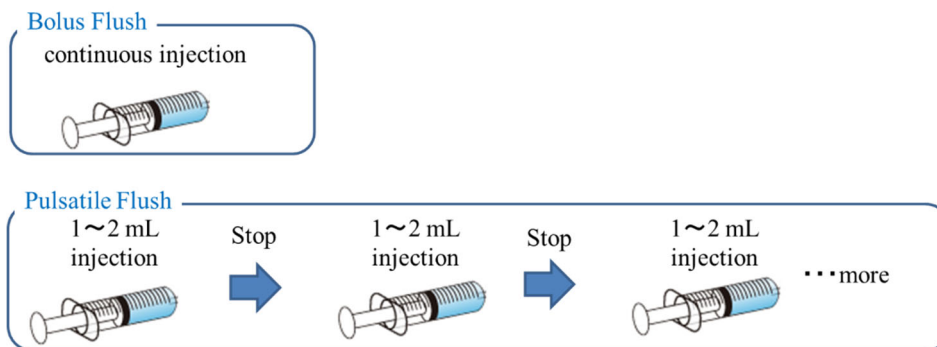


Figure 5 Typical flushing methods after injectable drug administration.

本邦において、生理食塩液のみが医療用器具の洗浄として適応となっていることから、フラッシングには生理食塩液を使用すべきである。使用するシリンジは、カテーテル損傷のリスクを避けるため、筒径の大きい 10 mL 容量以上のシリンジを用いることが望ましい<sup>24</sup>。また、フラッシングで用いる生理食塩液の量は、デバイス内容量の 2 倍以上や<sup>24</sup>、少なくとも 10 または 20 mL、栄養輸液などの粘度の高い液、血液や造影剤の通液後は 20 mL 以上が推奨されるなど様々である<sup>19</sup>。さらに、薬剤投与デバイスは一般的な輸液ラインから留置針まで多種多様で、内部形状や容量は様々である。脂肪乳剤は栄養輸液の一種であるため、いずれの投与デバイスでも使用される可能性があり、各デバイスに応じてフラッシング条件やフラッシング量を検証する必要があると考えた。

*in vitro* では、効果的なフラッシング条件を探索した先行研究が複数報告されている<sup>25-29</sup>。これらは、導電性の液体や造影剤、微生物、アルブミンなどのタンパク質を検出対象としており、脂肪乳剤のようにエマルジョンが分散した懸濁液を対象とした研究は報告されていない。また、先行研究では、フラッシング後の排出液やデバイス内容液を採取して残渣を測定し、洗浄効果を評価している。しかしながら、フラッシングのみではカテーテル内の残渣を 100% 排出することは困難であると報告されていることから<sup>25,27</sup>、詳細に残留機序を考察するためにも、残渣を非破壊的に検出して評価する手法が望ましいと考えた。そこで、本研究では、各投与デバイス内の脂肪乳剤の残渣をリアルタイムに可視化、定量する手法を提案し、各デバイスに応じた効果的なフラッシング条件を見出すことを目的とした。

第一章では、脂肪乳剤の有効成分である大豆油の脂質エマルジョンを標識する方法としてインドシアニンググリーン (ICG) による蛍光標識を試み、ICG と脂質エマルジョンの親和性や脂肪乳剤中での ICG 蛍光を評価した。第二章では、血管アクセスデバイスの中でも長期間の留置が想定される完全皮下埋め込み型血管アクセスデバイス (TIVAD) において、単独投与した脂肪乳剤に対する効果的なフラッシング条件を検討した。また、フラッシング直後の脂肪乳剤を非破壊的に可視化、定量する手法として、ICG を用いたリアルタイムイメージング法の有用性を評価した。第三章では、臨床において脂肪乳剤が側管投与されるケースが散見されることから<sup>30</sup>、側管投与され

た際の効果的なフラッシング方法を探索した。第四章では、脂肪乳剤を投与する経路として、TIVADよりも汎用される中心静脈カテーテル(CVC)または延長チューブ付きの末梢静脈カテーテルを用いた際の効果的なフラッシング条件を検討した。また、CVCや末梢静脈カテーテルにおいては、CRBSIが主な合併症の一つであるため<sup>31</sup>、フラッシング後の脂肪乳剤の残渣と微生物増殖の相関関係から、本研究で明らかにした効果的なフラッシング条件の臨床的意義を検証した。

以上の結果について、本論文では四章にわたって詳述する。

# 第一章 インドシアニンググリーンによる脂肪乳剤中の脂質エマルシヨンの蛍光標識

## 第一 緒言

薬剤投与デバイスのフラッシングに関する先行研究では、導電性の液体や造影剤、微生物、アルブミンなどのタンパク質を検出対象としており、脂肪乳剤のようにエマルシヨンが分散した懸濁液を対象とした研究は報告されていない<sup>25-29</sup>。また、先行研究は、フラッシング後の排出液や採取液中の残渣を測定し、洗浄効果を評価している。しかしながら、フラッシングのみではカテーテル内の残渣を100%排出することは困難とされていることから<sup>25,27</sup>、残渣が生じやすい箇所を特定して残留機序を考察するためにも、残渣を非破壊的に検出して評価することが望ましいと考えた。フラッシング後の脂質エマルシヨンの残渣を非破壊的に検出する手法として、放射性同位体による脂質の放射性標識などがある<sup>32</sup>。この手法は、既にイントラリポス輸液の薬物動態や排泄機序の解明に用いられている<sup>4</sup>。ただし、原料調製の段階から放射性同位体を脂肪酸に組み込む必要があり、安全面や健康面から好ましくなく、実機スケールで製造された製剤を対象とした標識には不向きである。そこで、蛍光イメージング技術の応用を検討した。蛍光イメージング技術は、特定のタンパク質、細胞、動物や抗体を蛍光物質で標識することで可視化し、連続的な空間情報を優れた分解能でアウトプットするため、同一サンプルを用いて非破壊的に評価することが可能である<sup>33</sup>。また、使用する蛍光物質は多種多様であり、人体に安全な化合物も多数存在するため、放射性標識の課題を解決しうる簡便な手法である。脂肪乳剤の有効成分である大豆油や乳化剤として用いられる卵黄レシチンは蛍光物質ではないため、脂質エマルシヨンを構成する物質と親和性を有する蛍光物質で標識する必要があった。



ICG はアメリカ食品医薬品局（FDA）で人体に使用が許可されている唯一の近赤外線蛍光色素で，人体にとって安全であり，構造式は Figure 6 に示すとおりである<sup>34</sup>。ICG は血漿タンパク質と速やかに結合して安定化することで強い蛍光を発生し，さらに生体深部を鮮明に可視化できることから，悪性黒色腫や乳がん等のセンチネルリンパ節同定用薬，血管および組織の血流評価を目的とした蛍光血管造影剤として用いられている<sup>35,36</sup>。ICG と血漿タンパク質との結合は特異的で，主にリポタンパク質中の特定のアポタンパク質と結合することや，リポタンパク質中のリン脂質と結合して強い蛍光を発生している可能性があることが報告されている<sup>37</sup>。脂肪乳剤の脂質エマルションは Figure 2 で示したようにリポタンパク質と似た構造である。また，リポソームに ICG を親和させた場合，ICG はリポソームの表面を形成しているリン脂質に作用して蛍光増大することが報告されている<sup>38</sup>。脂質エマルションも表面にリン脂質が並んでいるため，リポタンパク質やリポソームと同様に ICG で蛍光標識できると考えた。

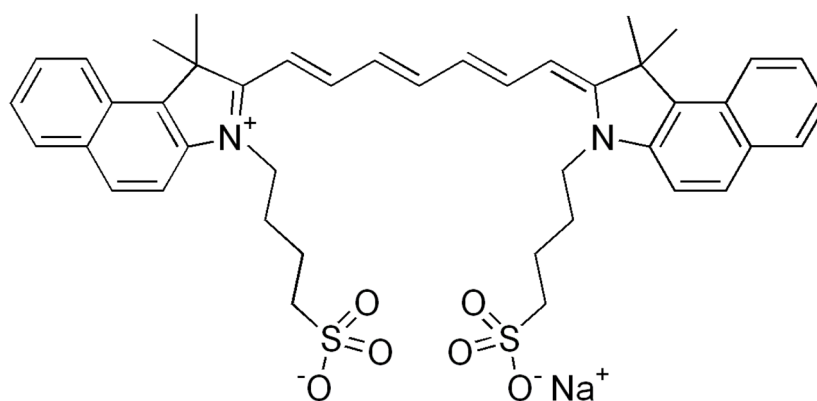


Figure 6 Structural formula of ICG

しかしながら，脂肪乳剤の脂質エマルションを ICG で蛍光標識し，評価した報告はない。そこで，本章では ICG による脂質エマルションの蛍光標識を蛍光顕微鏡で観察し，蛍光イメージング技術で脂肪乳剤中の ICG 蛍光分布を調査した。さらに，得られた ICG 蛍光の特性や安定性を評価した。

## 第二節 方法

### <実験材料>

脂肪乳剤は，大豆油の含有量が異なるイントラリポス®輸液 10%（株式会社大塚製薬工場），イントラリポス®輸液 20%（株式会社大塚製薬工場）を用いた。試薬および薬剤は，大豆油（富士フィルム和光純薬株式会社），ICG（ジアグノグリーン®注射用 25mg，第一三共株式会社）を用いた。水は，注射用水（大塚蒸留水，株式会社大塚製薬工場）を用いた。Table 1 示したように，ICG を 100 mL 中 25 mg の濃度となるように各液に混合後，容器をアルミホイルで覆って遮光し，10 分間室温で静置して検体 1~4 を調製した。検体 3 は水 80 mL に対して ICG が 25 mg となるように溶解した。

Table 1 Composition of samples used in experiments

Sample No.	Product name or test solution	Composition (g / 100 mL)			
		Soybean oil	egg-yolk lecithin	Glycerol	ICG
1	Intralipos® Injection 10% +ICG	10	1.2	2.2	0.025
2	Intralipos® Injection 20% +ICG	20	1.2	2.2	0.025
3	Soybean Oil/ Water + ICG	20	-	-	0.025
4	Water + ICG	-	-	-	0.025

### 一項 ICG による脂質エマルションの蛍光標識と評価

Table 1 で示した検体 2 に生理食塩液（大塚生食注，株式会社大塚製薬工場）を加えて正確に 200 倍希釈し，蛍光顕微鏡（BZ-X810，株式会社キーエンス）に ICG 用フィルター（励起波長 775 nm，蛍光波長 845 nm）を装着して観察した。次に，検

体 2 を 45,000 rpm, 5°C で 60 分遠心分離し, 脂質エマルション層, 水および余剰レシチン層に分画した。その後, 後述する蛍光イメージングで ICG 蛍光の分布を観察した。さらに, 脂質エマルションの主成分である大豆油と ICG との親和性を確認するため, 検体 3 を 10 分または 60 分間激しく振盪後, 5,000 rpm で 30 分間遠心分離し, 外観と蛍光イメージングによる ICG 蛍光の分布を観察した。

## 二項 脂肪乳剤における ICG 蛍光の安定性

Table 1 で示した検体 1, 2, 4 に生理食塩液を加えて正確に 2000 倍希釈し, 試料溶液とした。測定ポイントは, 各検体の保存開始時, 保存開始 1, 3, 6, 24, 72, 240 時間後とした。試料溶液から正確に 0.5 mL を採取して 96 well プレート(GDMP-96F, アズワン株式会社)に入れ, 96 well プレートのバックグラウンドを差し引いた蛍光強度を蛍光イメージングで測定した。

### < IVIS による蛍光イメージング >

ICG によって標識された成分の観察や蛍光強度の定量は IVIS<sup>®</sup> Spectrum live imaging system (株式会社パーキンエルマージャパン)を用い, 励起波長 745 nm, 発光波長 840 nm で測定した。

### 第三節 結果

#### 一項 ICG による脂質エマルションの蛍光標識と分布調査

イントラリポス輸液の平均粒子径は 200~400 nm で、蛍光顕微鏡で観察できる大きさであるため、脂肪乳剤に混合した ICG による乳化粒子の蛍光標識を観察した。Table 1 に示した検体 2 を希釈した溶液の蛍光顕微鏡像を Figure 7 に示す。全体的に粒子状の物体が ICG 蛍光を有していた(Figure 7 右図)。拡大すると、球形粒子は大小様々であるが、約 440 nm の球形粒子が強い ICG 蛍光を発していた(Figure 7 左図)。

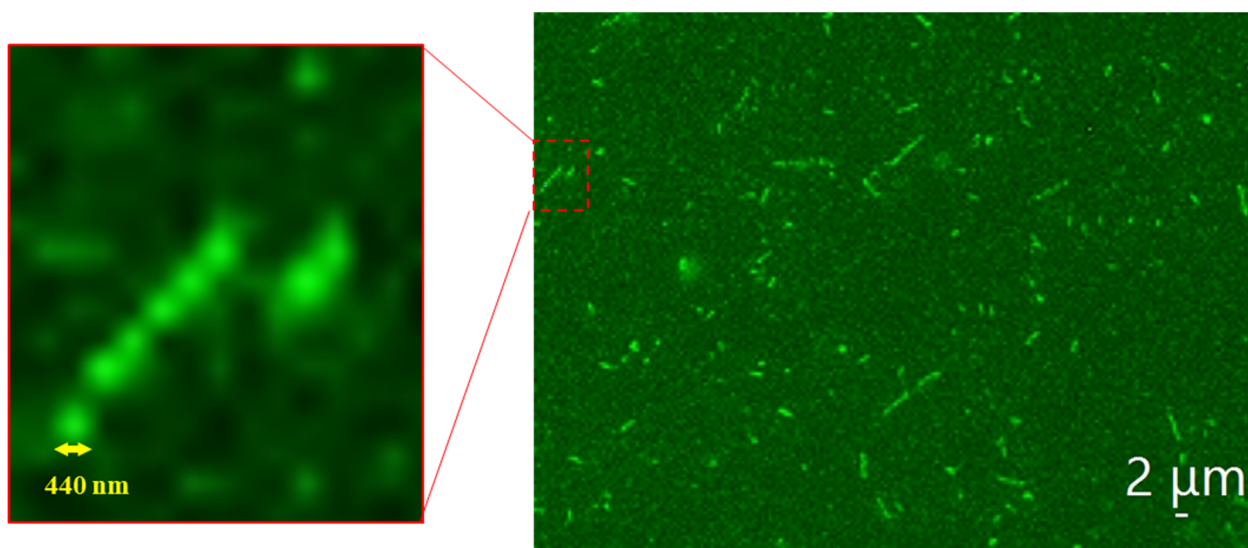


Figure 7 The representative fluorescence microscopy image of sample 2 diluted with saline.

Left: Magnified image, Right: Overall image

次に、検体 2 を脂質エマルション層、水および余剰レシチン層に分離し、ICG 蛍光の分布を調査した。検体 2 を遠心分離した後の外観と蛍光イメージング像を Figure 8 に示す。外観から、遠心分離によって上層の白濁層と下層の非白濁層に分離された。同様の組成である脂肪乳剤の Intralipid® 20% を遠心分離して構成物質を評価した先行研究では、白濁層は主に大豆油由来の TG、非白濁層はレシチン由来のリン脂質で主に構成されていると報告されていることから<sup>39</sup>、Figure 8 a における上層の白濁層は主に脂質エマルション層、下層の非白濁層は主に水および余剰レシチン層と考えられた。蛍光イメージング像から、脂質エマルション層で強い ICG 蛍光が確認された (Figure 8 b)。

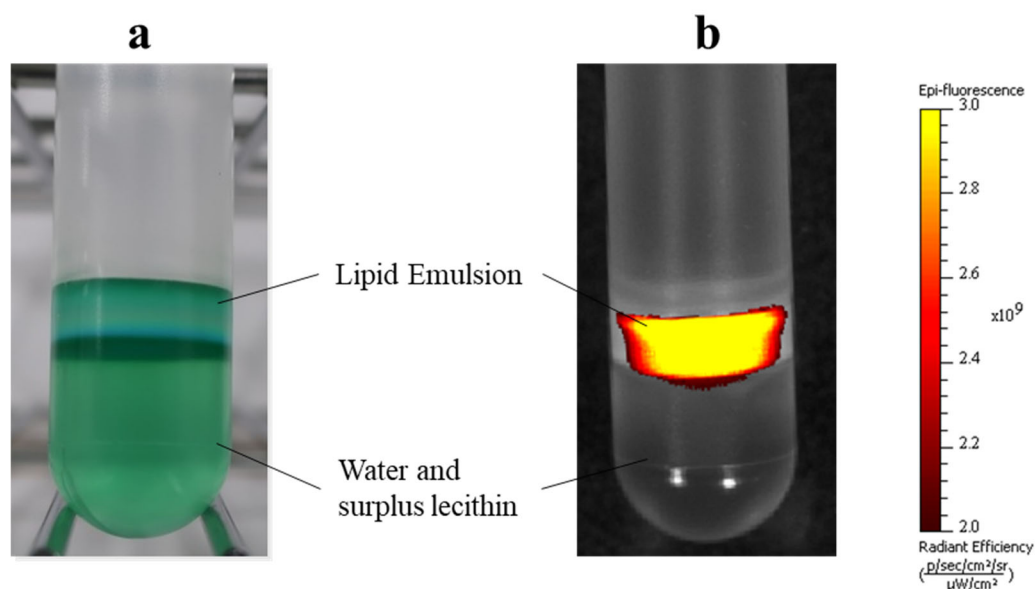


Figure 8 The appearance image (a) and fluorescence image (b) of sample 2 after ultracentrifugation under 45,000 rpm, 5°C, 1 h.

次に、脂質エマルションのリン脂質と ICG との親和を間接的に推測するため、ICG と脂質エマルションの主成分である大豆油との親和性を確認した。大豆油と ICG 水溶液からなる検体 3 を 10 分または 60 分振盪した後の外観および蛍光イメージング像を Figure 9 に示す。10 分間振盪した検体 (Figure 9 左図) では、ICG 蛍光は下部の水層部分でのみ検出され、上部の油層からは検出されなかった。60 分間振盪した検体 (Figure 9 右図) では、10 分間振盪した検体よりも水層の ICG 蛍光は減退し、ほとんど検出されなかった。また、油層と水層の境界も明瞭であったことから、ICG と大豆油の親和性は認められなかった。

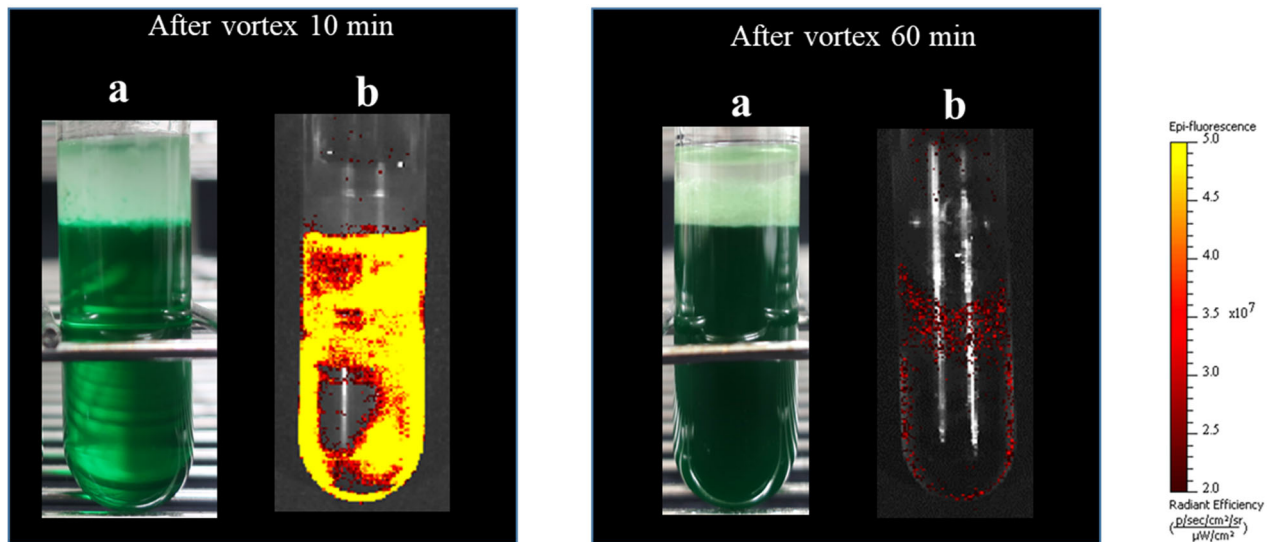


Figure 9 Appearance image (a) and fluorescence image (b) after vortexing sample 3 up to 60 min.

## 二項 脂肪乳剤における ICG 蛍光の安定性

ICG はリン脂質と結合することで蛍光強度が安定化するため<sup>38</sup>, イントラリポス輸液 20%に混合した ICG の蛍光安定性を評価した。その際, 脂質エマルションのリン脂質と ICG による蛍光の特異性を検証するために, イントラリポス輸液 20%とリン脂質の含有量が同じで大豆油の量が異なるイントラリポス輸液 10%でも同様に評価した。Table 1 に示した検体 1, 検体 2, 検体 4 における経時的な ICG 蛍光強度を Figure 10 に示す。開始時の ICG 蛍光強度は検体で異なり, 検体 4 < 検体 1 < 検体 2 の順に高値であった。ICG 水溶液である検体 4 の蛍光強度は経時的に低下し, 混合後 10 日目には消失していた。一方で, イントラリポス輸液に ICG を混合した検体 1 および 2 は 10 日目も混合直後と同等の蛍光強度を維持しており, 蛍光減退は認められなかった。また, 開始時は ICG を検体に混合して 10 分間静置した時点であることから, イントラリポス輸液に混合した ICG の蛍光強度は混合後 10 分で飽和に達していた。

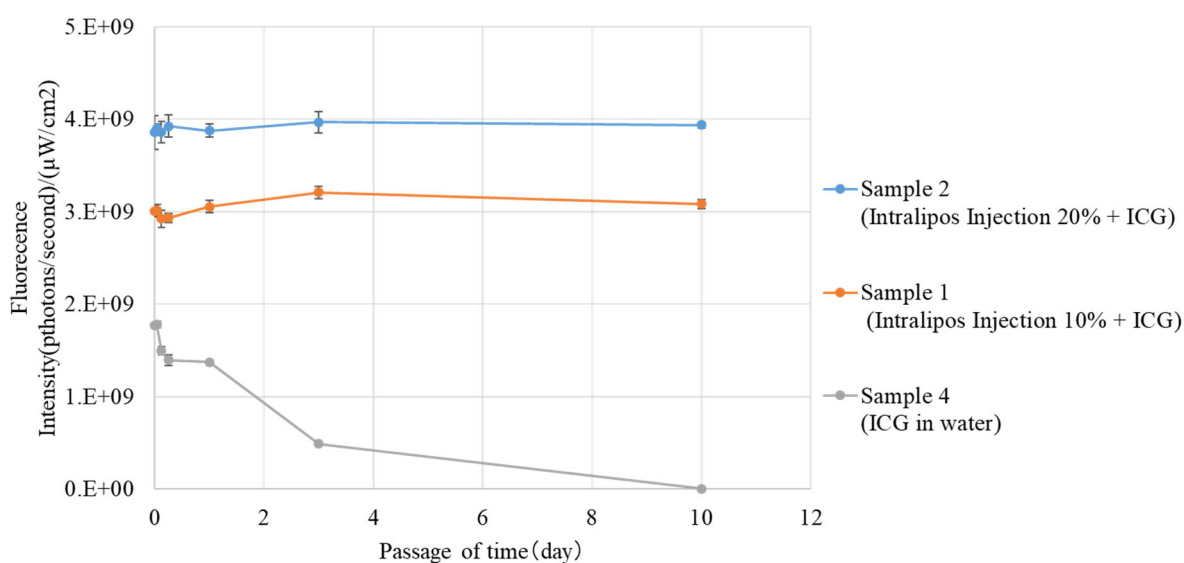


Figure 10 ICG Fluorescence intensity of sample 1, 2 and 4. Samples were stored in the dark at room temperature for up to 10 days. Each data point is the mean  $\pm$  SD of three repetitions.

#### 第四節 考察

イントラリポス輸液は、大豆油の主成分である TG および卵黄レシチン由来のリン脂質から構成される脂質エマルジョンと、脂質エマルジョンを安定化させるために余剰に加えられているレシチンから形成される球状ミセルやリポソーム等を含んでいる<sup>10</sup>。球状ミセルは主に単層のリン脂質で形成され、リポソームは主にリン脂質の疎水基が重なって二重層を形成している<sup>39</sup>(Figure 11)。イントラリポス輸液 20%は製剤中に含まれる卵黄レシチンが 1.2%である。20%の TG を平均 200 nm 程度の粒子径に乳化するために必要な卵黄レシチンの量は約 0.8%であり、余剰レシチンは単独でミセルやリポソームを形成している<sup>10</sup>。

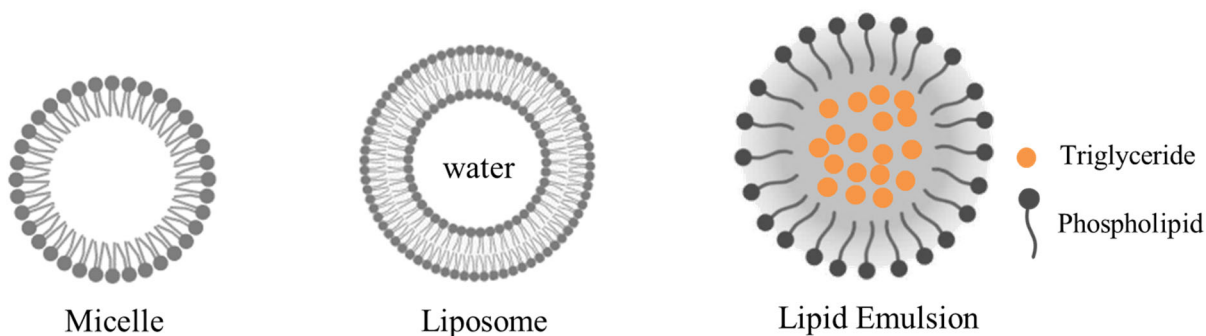


Figure 11 The image diagram of micelle, liposome and lipid emulsion.

ICG を混合したイントラリポス輸液 20% (検体 2) の蛍光顕微鏡像から、約 440 nm の球形粒子が強い ICG 蛍光を発していることが明らかとなった (Figure 7)。イントラリポス輸液の粒子径分布は 100~700 nm で、平均粒子径は 200~400 nm である<sup>3</sup>。同等の組成と平均粒子径である Intralipid<sup>®</sup> 20% では、脂質エマルジョンの粒子径は 250~500 nm である一方、球状ミセルやリポソームの粒子径は 80~100 nm であると報告されている<sup>39,40</sup>。したがって、本章で観察した ICG 蛍光を有する球形粒子は主に脂質エマルジョンであると推測できる。次に、検体 2 を脂質エマルジョンと水に遠心分離し、溶液全体における ICG 蛍光の分布を調査した。遠心分離した検体 2 の ICG 蛍光は主に脂質エマルジョン層に分布しており、水および余剰レシチン層よりも蛍光強度が強いことが確認された (Figure 8)。以上の結果から、イントラリポス輸液 20% に混合した ICG は脂質エマルジョンと何らかの結合を形成して親和し、蛍光強度が増



大していると考えられた。脂質エマルションは中心の TG にリン脂質の疎水基が結合した構造であり，ICG は親油性が高いとの報告があることから<sup>38</sup>，①TG 自体が ICG と親和している，または②リン脂質の疎水基と親和している可能性が考えられた。そこで，大豆油と ICG 水溶液の混合液(検体 3)を振盪することで，大豆油の主成分である TG と ICG の親和性を検証した。イントラリポス輸液 20% に混合した ICG は，混合後 10 分で脂質エマルションと親和して強く蛍光発光することを確認しているが，検体 3 を 10 分以上振盪しても大豆油層から ICG 蛍光は検出されなかった(Figure 9)。また，ICG は疎水基と親水基を有した構造であり，大豆油と親和性を有する場合は水との界面活性作用が期待されるが，検体 3 の油層と水層の界面が明瞭であったことから，ICG と TG との親和性は皆無であった。使用した ICG はスルホン酸基のナトリウム塩誘導体であり，ClogP は-3.411 と予測できることから，本知見に矛盾はないと考えられる。したがって，本試験で使用した ICG は，脂質エマルション中心部の TG に分布しておらず，表面層を形成するリン脂質との結合であると推測した(Figure 12)。

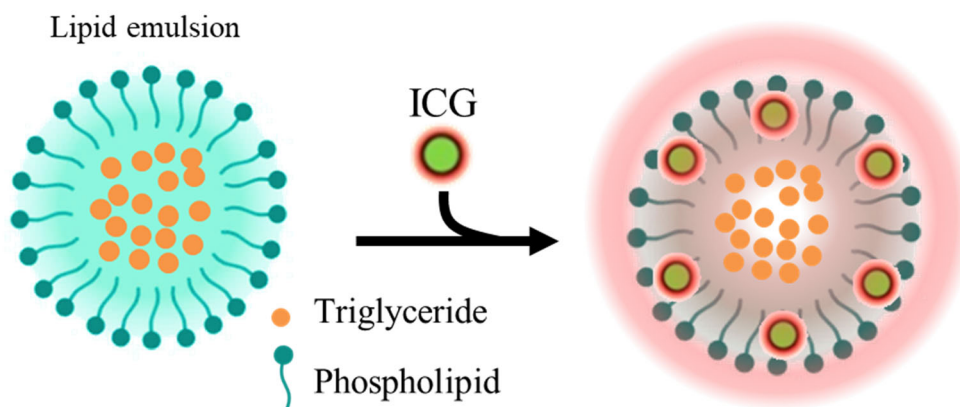


Figure 12 The image diagram of ICG fluorescence emission with lipid emulsion.

斎藤らは，リポタンパク質をリン脂質，遊離コレステロール，TG およびコレステロールエステルに分離して再懸濁し，ICG 蛍光の分布を観察した結果，ICG がリン脂質と特異的に結合して強い ICG 蛍光を発していたと報告している<sup>37</sup>。また，Kraft らは，リポソームに混合した ICG が表面層を形成しているリン脂質に作用して強い蛍光を発すると報告していることから，上記の仮説は矛盾していないと考えられる<sup>38</sup>。以上か

ら、ICG は脂質エマルションの主構成成分である大豆油を標識していない可能性が高く、脂質エマルション以外のリポソーム等にも親和している可能性が考えられた。そこで、リポソーム等の影響を排除するために脂質エマルションのみを蛍光標識する試みとして、親油性が高い蛍光物質であるナイルレッドで大豆油を直接標識する手法も検討した。しかしながら、ナイルレッドは血管アクセスデバイスや輸液投与デバイスを構成する樹脂との親和性が高く、収着することから、デバイス中の残渣評価を目的とした本研究には適さなかった (data not shown)。

ICG は共役系が長く、比較的疎水性であるため、水溶液中では二量体やポリマー等の凝集体を形成し、蛍光強度が減退する自己消失 (self-quenching) が確認されている<sup>41</sup>。本試験で設定した ICG 水溶液の濃度では 10 日以内に ICG 蛍光が消失した。一方で、同濃度で ICG を混合したイントラリポス輸液 10% および 20% では、ICG 水溶液でみられた経時的な蛍光減退は認められなかった (Figure 10)。Kraft らは、ICG がリポソームの液晶二重層に封入されることで ICG 同士の凝集が抑制され、高い ICG 蛍光強度を維持したまま長期間安定することを報告している<sup>38</sup>。したがって、イントラリポス輸液 10% および 20% に混合した ICG は、ICG の共役系がリン脂質の脂肪酸と結合したことで ICG 同士の凝集が妨げられ、蛍光強度の減退が抑制されたと推測できる。また、得られた ICG 蛍光強度はイントラリポス輸液 10% を用いた検体 1 よりもイントラリポス輸液 20% を用いた検体 2 の方が高値であった。一項の結果から、ICG は脂質エマルションと主に親和しているため、脂質エマルションが倍量含まれているイントラリポス輸液 20% の方が高い ICG 蛍光強度を示したと考えられる。一方で、イントラリポス輸液 10% でも ICG 蛍光強度の減退がみられなかったため、脂質エマルションに結合されなかった ICG は余剰レシチン由来のリン脂質にも親和していると考えられた。Table 1 に示したとおり、イントラリポス輸液 10% と 20% の卵黄レシチン含有量は同じであり、平均粒子径も同程度となるように制御されているため、イントラリポス輸液 10% は、余剰のレシチンからなる球状ミセルまたはリポソームが多く形成されている<sup>10</sup>。また、卵黄レシチンからはリポソームが形成されやすいと報告されている<sup>42</sup>。ICG が脂質エマルション、その他の余剰レシチン由来のリン脂質に一樣に結合していると

仮定すると、イントラリポス輸液10%と20%に同量の ICG を混合した場合は、いずれも同等の ICG 蛍光強度が得られると考えられる。しかしながら、二項の結果からこの仮説は支持されず、ICG は親和する物体によって蛍光強度が異なる特異性があると考えられた。リポソームの場合は内部構成物質がグリセリンなどの水溶性物質であるのに対して脂質エマルションは TG であることや、リポソームの方が脂質エマルションよりも粒子径が小さいことから、脂質エマルションに親和した ICG の方が凝集体を形成しにくく、より安定となっている可能性が考えられた。以上から、ICG は、脂質エマルションを蛍光標識して効果的なフラッシング方法を検証するという本論文の目的に合致した蛍光物質であった。

## 第五節 小活

ICG は、イントラリポス輸液20%に混合するだけで脂質エマルションを容易に蛍光標識し、10分後には蛍光強度が飽和に達して遮光下で長期間安定であることを見出した。イントラリポス輸液20%に混合した ICG は、脂質エマルションの表面層を形成するリン脂質とより安定で蛍光強度が高い結合を形成している可能性が示唆された。ICG は脂肪乳剤中のリン脂質と一様に結合しているのではなく、脂質エマルションのリン脂質と特異的に親和し、より安定化していると考えられた。以上から、ICG は、「脂肪乳剤の主構成物質である脂質エマルションを検出することで効果的なフラッシング条件を探索する」という本論文の目的に合致した蛍光物質であることを見出した。

脂肪乳剤中の各種乳化粒子と ICG の結合状態の解明には更なる検証が必要である一方で、脂質エマルションが形成されている状態で ICG によって蛍光標識する試みはない。本研究で得られた結果は、そのメカニズムやリポソームとの親和性の違いなどを検証する際の重要な知見と考える。

## 第二章 完全皮下埋込み型中心静脈アクセスデバイスにおけるフラッシング後の脂肪乳剤の残存評価

本章の内容については、European Journal of Clinical Nutrition, 2019, 73(7), 1084-87.に発表済みである。

### 第一節 緒言

TIVAD は、カテーテルとチャンバーから構成される完全皮下埋め込み型の血管アクセスデバイスであり、抗がん剤の連続投与や在宅医療等での長期静脈栄養療法において使用が増加している<sup>43</sup>。また、欧州臨床栄養代謝学会 (ESPEN) ガイドラインにおいて、長期静脈栄養療法で使用するカテーテルは、トンネル型中心静脈カテーテルもしくは TIVAD が推奨されている<sup>44</sup>。一方で、TIVAD の代表的な合併症である閉塞は、年単位での留置が期待される TIVAD の抜去に繋がるため<sup>45,46</sup>、治療を継続するためには閉塞につながる要因を低減することが医療安全上重要である。閉塞は、主に脂肪を含む凝集体、血栓形成、薬剤やカルシウム塩の沈殿によって引き起こされることが確認されている<sup>19</sup>。また、Flaatten らは、TIVAD を用いた *in vitro* システムにおいて、アミノ酸と脂肪乳剤を連続投与した後、グルコース単独または同時投与する処方 を 70 日間繰り返した後、チャンバーおよびカテーテルの両方に黄色い脂肪様の沈殿物が多数生じることを確認している<sup>47</sup>。さらに、TIVAD のフラッシングが不十分な場合は薬剤由来の沈殿物による堆積が生じることから<sup>48</sup>、TIVAD の開存性を維持するためには、脂肪乳剤の投与後に適切なフラッシングを実施する必要がある。フラッシング液の選択では、ヘパリンナトリウム液は脂肪の沈殿に影響する可能性があると報告されていることや<sup>49</sup>、閉塞予防効果が確認されていないことから<sup>50</sup>、生理食塩液が推奨される。また、本邦では、ヘパリンナトリウム液の適応に洗浄がないことも推奨できない理由の一つである。

TIVAD の外観と断面図を Figure 13 に示す。TIVAD は、円柱形の広いスペース (Chamber) があり、カテーテルのみから形成される CVC よりも内容積が大きいことから、残留物の除去には十分なフラッシング量が必要と考えられる。

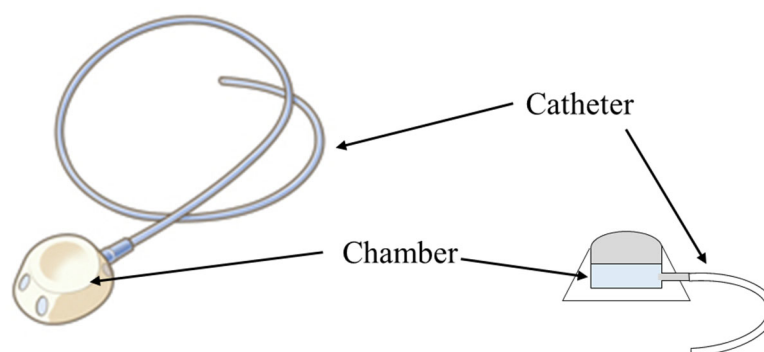


Figure 13 The image diagram of TIVAD.

Left: Overall view, Right: Cross-section

また、TIVAD をフラッシングする際の洗浄効果は、デバイス内部を流れるフラッシング液の流体挙動に依存すると考えられる。フラッシングには、連続的なポーラスフラッシュとフラッシング中に一定の停止時間を加えた脈動的なパルシングフラッシュの2つの手法がある。カテーテル内の流体挙動は両手法で異なると報告されている<sup>25-27</sup>。しかしながら、これらの先行研究では TIVAD と形状が異なる CVC で検証されており、TIVAD で両手法を比較検討した報告はない。さらに、TIVAD 内の脂肪乳剤に対する効果的なフラッシング条件を探索した報告はない。著者は、TIVAD におけるフラッシング液の流体挙動や脂肪乳剤の残渣が生じる機序を考察するためには、フラッシング後の残渣の挙動を明らかにする必要があると考えた。そこで、IVIS<sup>®</sup> Imaging System での評価を検討した。IVIS<sup>®</sup> Imaging System は、蛍光タンパク質を導入した細胞や微生物、蛍光物質などで標識した薬剤や抗体が発する蛍光を超高感度冷却 CCD カメラで捉え、リアルタイムに *in vivo* で可視化、定量できる装置である (Figure 14)。また、近赤外線蛍光色素である ICG は、透過性が高い励起・発光波長域であるために TIVAD チャンバーやカテーテルを透過して残渣を非破壊的に可視化、定量できると考えた。本章では、ICG で蛍光標識した脂肪乳剤を TIVAD チャ

ンバー内に充填し、異なるフラッシング手技、フラッシング速度、フラッシング量でフラッシングした後の残渣を IVIS<sup>®</sup> Imaging System を用いて可視化、定量することで効果的なフラッシング条件を探索した。

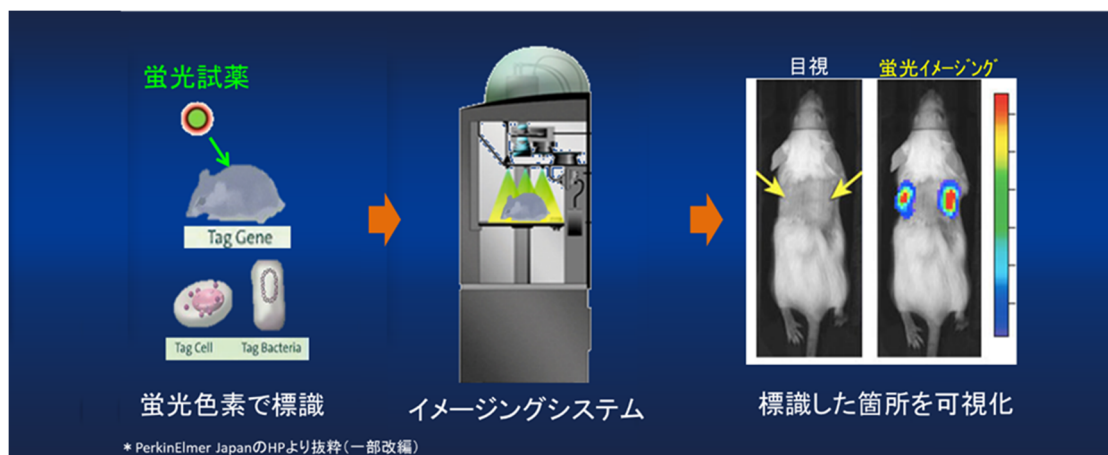


Figure 14 Overview of real time imaging method using IVIS<sup>®</sup> Imaging System.

## 第二節 方法

### < 実験材料 >

ICG (ジアグノグリーン®注射用 25 mg, 第一三共株式会社) を脂肪乳剤 (イントラリポス®輸液 20%, 株式会社大塚製薬工場) 100 mL 中 25 mg の濃度となるように混合後, 容器をアルミホイルで覆って遮光し, 10 分間室温で静置して試料溶液とした。フラッシング液には生理食塩液 (大塚生食注, 株式会社大塚製薬工場) を用いた。試料溶液の投与システムを Figure 15 に示す。閉鎖式コネクタ (ビオネクターS, 株式会社ビゴン・ジャポン) を接続した 22 ゲージのヒューバー針 (ヒューバープラス, 株式会社メディコン) を TIVAD (チャンバーの直径 13 mm, 内容量 0.6 mL; BARD X-ポート, 株式会社メディコン) のチャンバーセプタムの中央に, チャンバー排出口に対して 180°となるように穿刺した。チャンバー排出口には医療用シリコンチューブ (内径 1.0 mm, 長さ 50 cm, 株式会社カネカメディックス) を接続した。

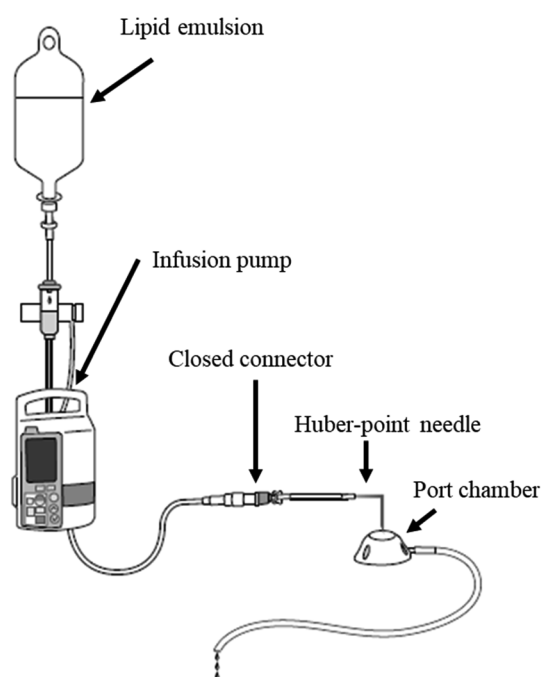


Figure 15 The system for pouring sample solution in a chamber in the present study.

## 一項 リアルタイムイメージングによるデバイス内残渣の検出および 定量性評価

ICG で脂質エマルジョンを蛍光標識し、薬剤投与デバイス内の残渣検出にイメージング技術を応用した研究はないため、初めにイメージング技術によるデバイス内残渣の検出および定量性を評価した。試料溶液を充填した TIVAD に機械式シリンジポンプ(YSP-301, 株式会社ワイエムシー)を接続し、5, 10, 20, 40, 70 mL のフラッシング液を 90 mL/min で 2.5 mL 毎に 5 秒の停止時間を加えてフラッシングした(Figure 16)。フラッシング後の ICG 蛍光分布を後述のリアルタイムイメージングで測定し、残渣の検出性を評価した。また、ICG 蛍光強度から残渣の定量性を評価した。チャンバー内の脂質エマルジョンの残存量は、後述する脂肪乳剤と ICG 蛍光強度の検量線を用いて絶対検量線法で算出した。ただし、チャンバー内に生理食塩液を満たした状態で測定した値をバックグラウンドとして測定値から差し引いた。検量線は、試料溶液の濃度が 100, 500, 1000, 2500 ppm となるように生理食塩液で希釈した液をチャンバーに充填し、得られた ICG 蛍光強度から作成した。イントラリポス輸液 20% における白濁はそのほとんどが脂質エマルジョンに由来しているため<sup>39</sup>、脂肪乳剤における濁度は脂質エマルジョンの量を測る指標となる。そこで、比較対象として TIVAD チャンバー内にイントラリポス輸液 20% を充填したモデルを作製し、前述の条件でフラッシングした後、チャンバー内容液の濁度を測定した。フラッシング後のチャンバー内容液は、エアフラッシングで石英セルに採取し、生理食塩液で希釈後、UV 分光光度計(V-650, 日本分光株式会社)を用いて濁度測定法(第十八改正日本薬局方一般試験法 2.61 濁度試験法 2.1. 透過光測定法)により測定した。チャンバー内の脂質エマルジョンの残存量は後述の検量線を用いて絶対検量線法によって算出した。検量線は、イントラリポス輸液 20% の濃度が 100, 500, 1000, 2500 ppm となるように生理食塩液で希釈した液の濁度から作成した。内容液の採取後は、チャンバー内にアセトンを充填し、アセトン溶液中の大豆油を高速液体クロマトグラフィーで測定した。排出しきれなかったチャンバー内の大豆油からイントラリポス輸液 20% の残渣は 50 ppm 以下と僅かであることを確認した。



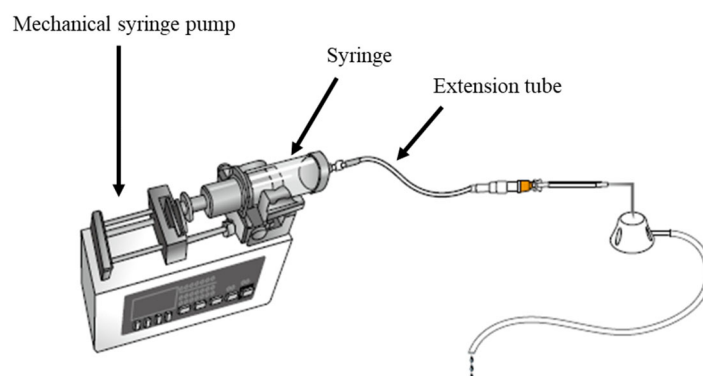


Figure 16 The system for flushing with normal saline via mechanical syringe pump.

## 二項 TIVAD におけるフラッシング条件の検討

試料溶液は、輸液ポンプ (TE-131, テルモ株式会社) を用いてチャンバー内に充填した。その後、効果的なフラッシング条件を探索するために、機械式高性能シリンジポンプを用いて以下の(1)~(3)の条件でフラッシュした後、脂肪乳剤の残渣を後述のリアルタイムイメージングで測定した。

### (1) フラッシング速度の条件設定

15, 30, 40, 50, 60 mL/min の各速度で 5, 10, 20, 40, 70 mL でボーラスフラッシュした。

### (2) パルシングフラッシュの条件設定

30 または 60 mL/min の各速度で 1 mL のフラッシングした後、1 または 3 秒の停止時間 (interval) を加えてパルシングフラッシュし、累計のフラッシング量が 5, 10, 20, 40, 70 mL となるまで繰り返した。

### (3) ヒューバー針の穿刺角度の条件設定

ヒューバー針の針孔とチャンバー排出孔の角度が  $180^\circ$ ,  $90^\circ$ , または  $0^\circ$  になるよう TIVAD チャンバーセプタムの中央にヒューバー針を穿刺した (Figure 17)。試料溶

液を充填した後、30 または 60 mL/min の速度で、5, 10, 20, 40, 70 mL でポーラスフラッシュした。

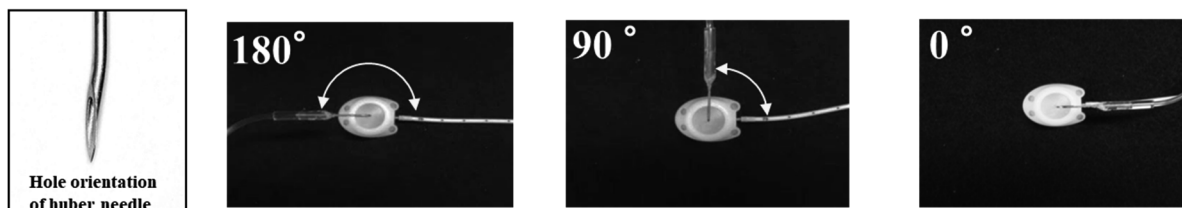


Figure 17 The puncture conditions to investigate the effect of puncture angle.

#### <IVIS によるリアルタイムイメージング>

フラッシング後の脂肪乳剤の残渣は IVIS<sup>®</sup> Spectrum live imaging system (株式会社パーキンエルマージャパン) を用い、励起波長 745 nm, 発光波長 840 nm で ICG 蛍光を検出した。

#### <統計方法>

すべての実験は 3 回繰り返した (N=3)。すべての値は平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。処理間の差は、反復測定分散分析 (repeated-measures ANOVA) を用いて分析し、必要に応じて Tukey の多重比較検定を行った。統計的有意水準は  $p < 0.05$  とした。すべての統計解析には、統計ソフト (エクセル統計 2015, SSRI 株式会社) を使用した。

### 第三節 結果

#### 一項 リアルタイムイメージングによるデバイス内残渣の検出および 定量性評価

試料溶液を充填し、フラッシングした後のチャンバーの明視野像と蛍光イメージング像を Figure 18 A および B に示す。フラッシング量が 5 mL を超える条件下では、試料溶液の残渣を目視で確認することは困難である一方で、蛍光イメージング像では、フラッシング量依存的に残渣が減少していることが明確に確認できた。

リアルタイムイメージングおよび濁度法の検量線を Figure 19 A および B に示す。いずれも低濃度まで直線性があり、リアルタイムイメージングで定量した場合の定量下限は、定量限界を  $10\sigma$  として算出した場合に約 150 ppm であった<sup>51</sup>。フラッシング後のチャンバー内の脂肪乳剤の残渣をリアルタイムイメージングと濁度法の両手法で算出した結果を Figure 19 C に示す。フラッシング後の残存量は両手法において差はなかった。

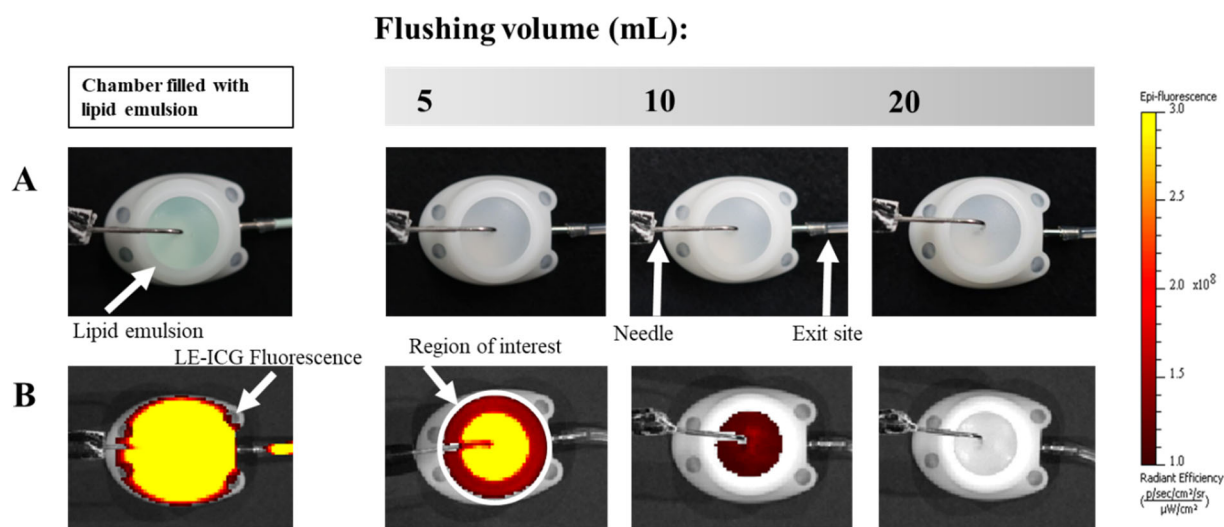


Figure 18 Representative example of bright field (A) and ICG fluorescence images (B) of sample solution and flushed until each flushing volume in chamber.

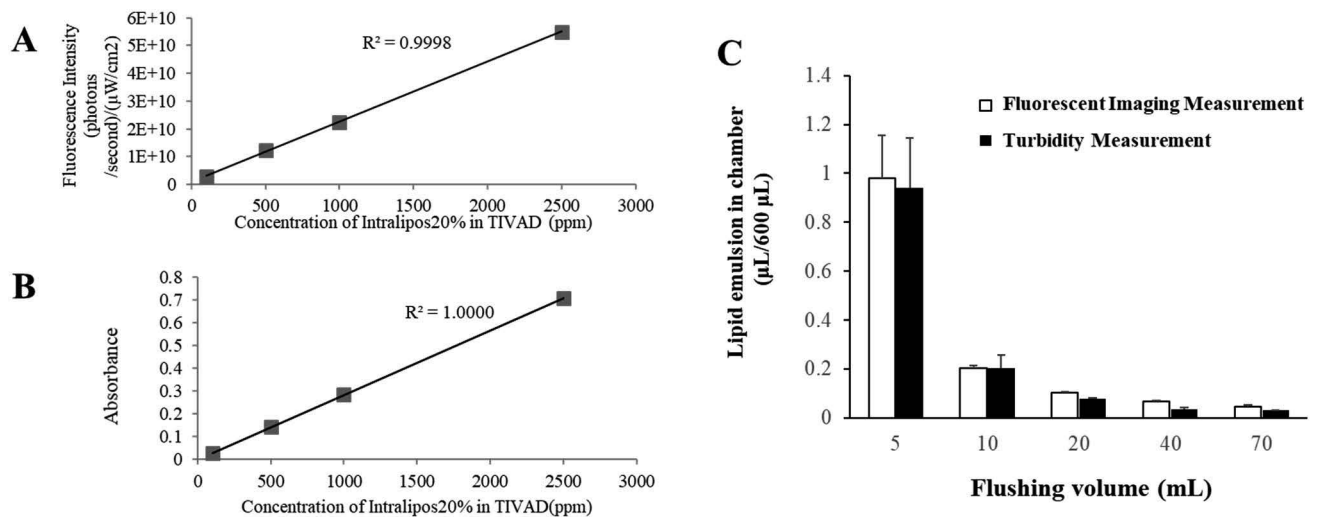


Figure 19 Standard curves and correlation coefficient for fluorescence intensities (A) or absorbance (B), and the residual amounts of LE after flushing calculated by fluorescence intensities produced from the chamber or turbidity of the recovered solution (C).

## 二項 フラッシング条件の検討：フラッシング速度の影響

先行研究から、フラッシング速度の影響が洗浄効果に影響すると考えられたため<sup>28</sup>、フラッシング速度の影響を検証した。各速度でボラスフラッシュした後のチャンバーの蛍光イメージング像を Figure 20 A に示す。15 mL/min のフラッシング速度で 20 mL フラッシングした場合や 30 mL/min で 10 mL フラッシングした場合は、ICG 蛍光強度の高い箇所が局在し、脂肪乳剤のプールが存在していた (Figure 20 A, a および b の緑矢印)。対照的に 40 mL/min 以上の速度では脂肪乳剤のプールは存在しなかった (Figure 20 A, c および d)。フラッシング後のチャンバー内の残渣の定量結果を Figure 20 B に示す。フラッシング速度が速いほど、脂肪乳剤の残存量は少なかった ( $p < 0.05$ )。また、脂肪乳剤の残存量は、フラッシング速度が 30 mL/min 以上の場合はフラッシング量が 10 mL 以上であっても有意に減少しなかった。

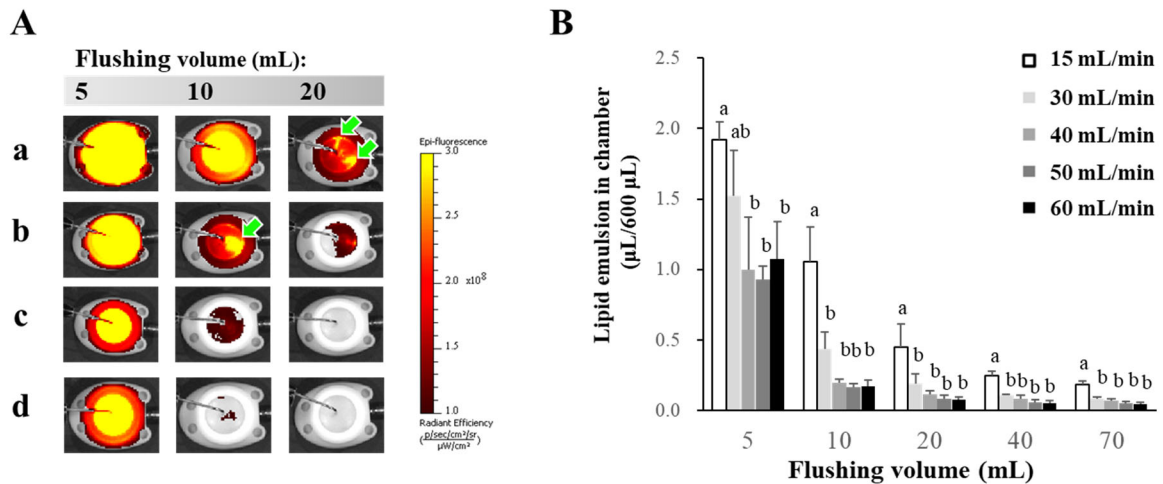


Figure 20 Representative fluorescence images of residual LE after bolus flush at 15 (a), 30 (b), 40 (c), 60 (d) mL/min until each flushing volume (A). The residual amounts at various flushing speeds until each flushing volume (B).

### 三項 フラッシング条件の検討：パルシングフラッシュの影響

30 mL/min のフラッシング速度でボラスまたはパルシングフラッシュした後のチャンバーの代表的な蛍光イメージング像を Figure 21 A に示す。10 mL や 20 mL フラッシングした後の蛍光イメージング像から、パルシングの停止時間が長くなるにつれ、ICG 蛍光強度の高い箇所 (Figure 21 A の緑矢印) が増大していた。30 mL/min または 60 mL/min の速度でフラッシュした後のチャンバー内の残渣の定量結果を Figure 21 B および C に示す。いずれの場合も、パルシングフラッシュではボラスフラッシュよりも残存量が少なくなることはなかった。また、60 mL/min の速度でパルシングフラッシュした場合において、停止時間が長くなるほど有意に残存量が多くなっていた。(Figure 21 C,  $p < 0.05$ ).

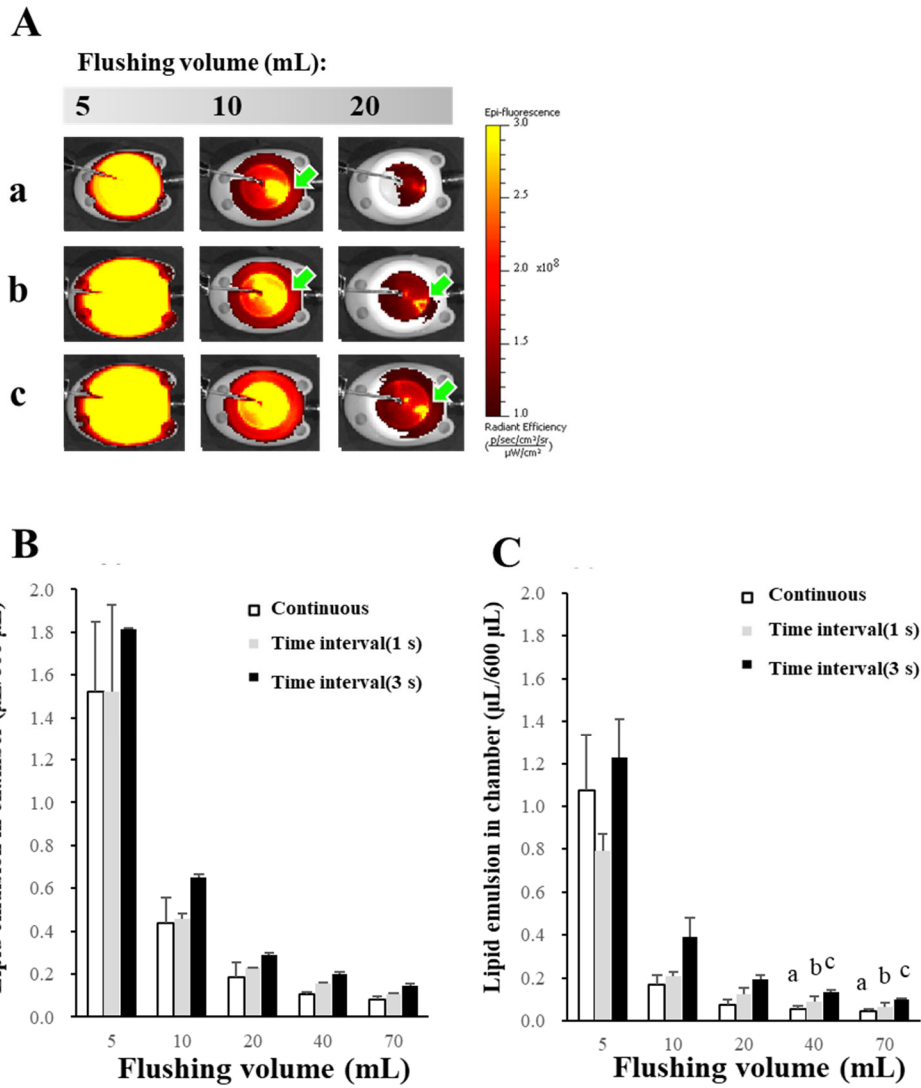


Figure 21 Representative fluorescence images of residual LE until each flushing volume without (a) or with time interval of 1 (b) or 3 sec (c) between boluses (A).

Comparison of residual amounts of LE between continuous flushing and pulsatile flush at various speeds 30 mL/min (B) and 60 mL/min (C) until each flushing volume. Different small letters indicate significant between groups ( $p < 0.05$ ).

#### 四項 フラッシング条件の検討：ヒューバー針の穿刺角度の影響

ヒューバー針はコアリング防止のために横向きに針孔が開いており、輸液がチャンバー内を二次元的に流れるため、穿刺角度によっては洗浄効果に差が生じると考えた。ヒューバー針の針孔の向きとチャンバー排出孔間の角度を変化させてボラスフラッシュした後のチャンバーの蛍光イメージング像を Figure 22 A に示す。フラッシング速度 30 mL/min では、洗浄されやすい領域が針孔の向きと一致していた (Figure 22 A, a)。一方で、60 mL/min では全体的に均一に分散していた (Figure 22 A, b)。30 mL/min または 60 mL/min のフラッシング速度でフラッシングした後のチャンバー内の残渣の定量結果を Figure 22 B および C に示す。30 mL/min において、針孔とチャンバー排出孔間の角度が 180°であった場合、他の角度で穿刺した場合よりも多くの脂肪乳剤が残存していた。60 mL/min でフラッシングした際は差異がなかった。

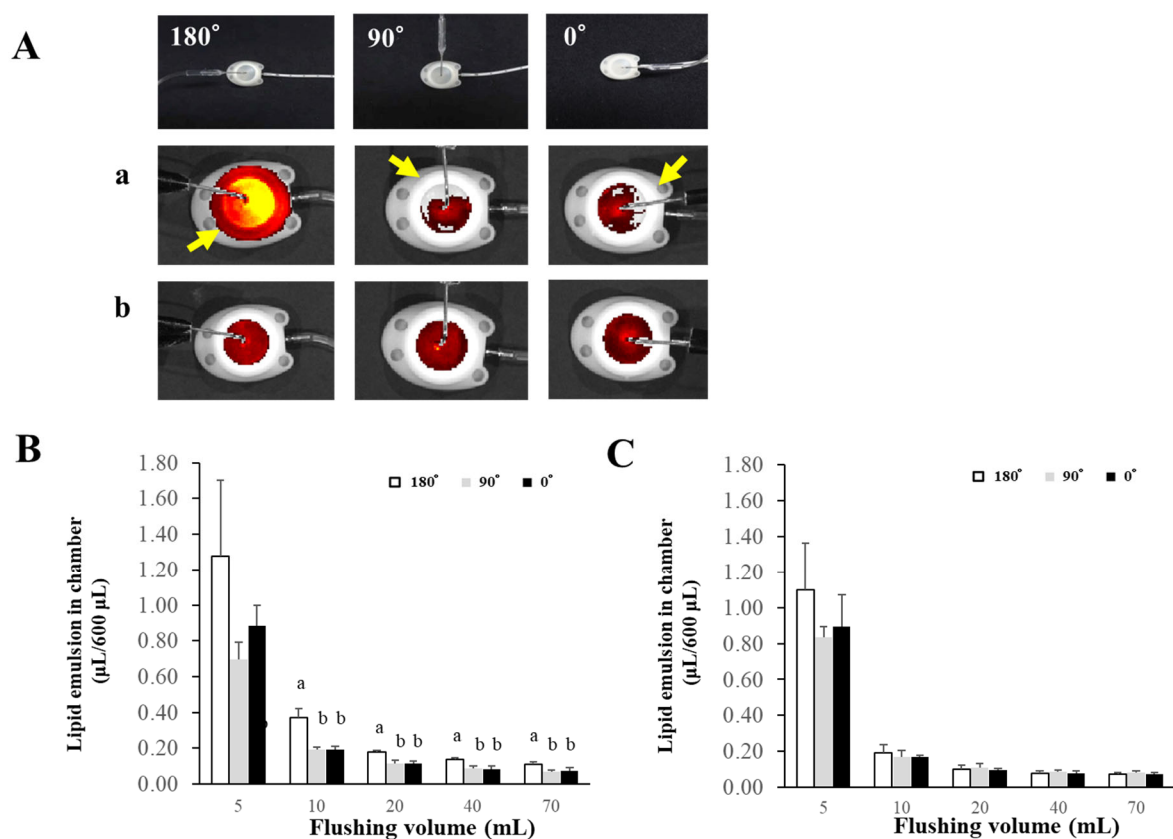


Figure 22 Representative bright-field and fluorescence images of chambers after bolus flush with 20 mL saline at 30 (a) or 60 (b) mL/min (A). Comparison of residual amounts of LE among various insertion angles after bolus flush at 30 (B) or 60 (C) mL/min until each flushing volume.

#### 第四節 考察

長期的な静脈栄養管理を計画する上で、脂質乳剤の投与は不可欠である。脂肪乳剤は他の栄養輸液を混合すると、相互作用により沈殿などが生じる可能性があることから<sup>18,19,47</sup>、栄養輸液と脂質乳剤が接触しないように間欠的に投与<sup>52</sup>、もしくは末梢ルートから単独で投与される<sup>17</sup>。しかしながら、いずれの場合も脂肪乳剤投与後のフラッシングが不十分な場合は血管アクセスデバイスが閉塞することがあり<sup>17-19</sup>、カテーテルの処置、抜去または交換が必要になることがある<sup>45,46</sup>。したがって、脂肪乳剤を投与する度にデバイスを清潔に保つことは非常に重要であるが、TIVAD 内の脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を検討した研究はなかった。

第一章では、イントラリポス輸液20%に ICG を混合することで、主に脂質エマルションが蛍光標識され、安定な ICG 蛍光が得られることを確認した。本章の目的は、TIVAD チャンバー中の脂質エマルションを様々な条件でフラッシングし、残渣をリアルタイムイメージングにより可視化および定量することで、より残渣が低減できる効果的なフラッシング条件を明らかにすることであった。初めに、TIVAD チャンバー内における脂質エマルションの可視化およびフラッシング後の残渣を定量する試験法として、リアルタイムイメージングの有用性を評価した。そのために、フラッシング直後の TIVAD チャンバー内の残渣をリアルタイムイメージングで非破壊的に測定した結果とデバイスから採取した内容液の濁度を測定する方法で、フラッシング後の残存量を比較した。ICG の励起・蛍光発光波長は近赤外線領域であり、透過性が高い。蛍光イメージングによるデバイス内残渣の透過性が不十分な場合や、ICG が投与デバイスの内壁に収着する場合には両試験法による残存量の比較結果に差が生じると考えられる。得られた結果から、フラッシング後の脂質エマルションの定量結果に差はなかったため、リアルタイムイメージングではチャンバー内の脂質エマルションの残渣を正確に定量できると考えられた。また、リアルタイムイメージングはチャンバー内に残存している約 150 ppm の極僅かな脂肪乳剤も検出することができる定量精度を有していた(Figure 19)。さらに特筆すべきは、高い濃度分解能を有する蛍光イメージング像から、フラッシング後の脂質エマルションの挙動を正確に可視化できることであり、デ



バイス内の脂質エマルジョンの残渣挙動を評価する手法として、ICG を用いたリアルタイムイメージングは有用であると考えている。

次に、TIVAD チャンバー内の脂肪乳剤に対して効果的なフラッシング条件を検討した。フラッシング条件は、*in vitro* でのタンパク質沈着物の除去または造影剤注入後の血管アクセスデバイスのフラッシングを評価した先行研究に基づいて計画し<sup>25,28</sup>、フラッシング速度は、一般的な女性でも実現可能な速度を事前試験で確認し、設定した (data not shown)。得られた定量結果から、TIVAD チャンバー内の脂質エマルジョンは、フラッシング速度が速いほど洗浄されやすいことが分かった。興味深いことに、フラッシング速度が遅い場合、TIVAD チャンバー内に脂質エマルジョンのプール (局在箇所) が存在する領域がある一方で、フラッシング速度が速い場合には認められないことがリアルタイムイメージングによって明らかとなった (Figure 20)。TIVAD チャンバー内の洗浄効率を考察する際は、フラッシング液の流体挙動を考慮する必要がある。フラッシング速度が遅い場合では、チャンバー内の脂質エマルジョンが均一に攪拌されず、結果としてチャンバー内に脂質エマルジョンのプールが生じたと考えられる。対照的に、フラッシング速度が速い場合では、チャンバー内に無秩序な流れである乱流が生じて脂質エマルジョンの十分な攪拌が可能となり、チャンバー内に脂質エマルジョンの局在によるプールが生じなかったと推測できる。

適切なフラッシング量としては、10~20 mL の生理食塩液によるフラッシングが推奨されている<sup>19</sup>。TIVAD 内の脂肪乳剤に対しては、10 mL 以上フラッシングしても脂質エマルジョンの残渣が有意に減少しないことから、前述の推奨を支持する結果が得られた。ただし、フラッシング速度が 30 mL/min 以下の場合には脂質エマルジョンのプールが生じていたことから、“フラッシング速度は 40 mL/min 以上”とする限定条件を追加することが望ましいと考えられる。しかしながら、脂質エマルジョンが 100% 排出されることはなかったため、上記の条件で脂肪乳剤の投与とフラッシングを繰り返した場合に閉塞の合併症を有意に低減できるかどうかは *in vivo* で長期反復試験を実施する必要がある。

次に、パルシングフラッシュが洗浄効率に及ぼす影響を検証したが、パルシングフラッシュはボーラスフラッシュに比べて脂肪乳剤の洗浄効率の向上に寄与しなかった。

寧ろ、パルシングの停止時間の間隔が長くなると脂質エマルションが残存しやすくなる傾向がみられ、フラッシング速度が速い場合においてより顕著であった (Figure 21)。フラッシング速度が低い場合は、前述したように乱流が生じにくい環境となっており、停止時間を設けることによってさらに平均速度が遅くなるために、脂質エマルションのプールが増大したと考えられる。フラッシング速度が速い場合には、停止時間を加えたことでポーラスフラッシュした際に比べてチャンバー内の乱流が維持されにくい、または乱流の強度が減弱したことで洗浄効率が低下したと推測する。Ball らの報告によると、細い孔から勢いよく液が噴出される場合、噴出直後に生じる渦が連続して重なり合うことで孔のすぐ後ろから乱流が生じるため、乱流が生じやすい環境となる。また、乱流の強度や範囲は噴出流体の速度や連続性にも依存すると報告されている<sup>53</sup>。ヒューバー針の針孔は内径が約 0.5 mm 以下と細いため、排出される液は乱流に遷移しやすいと考えられる (Figure 23)。

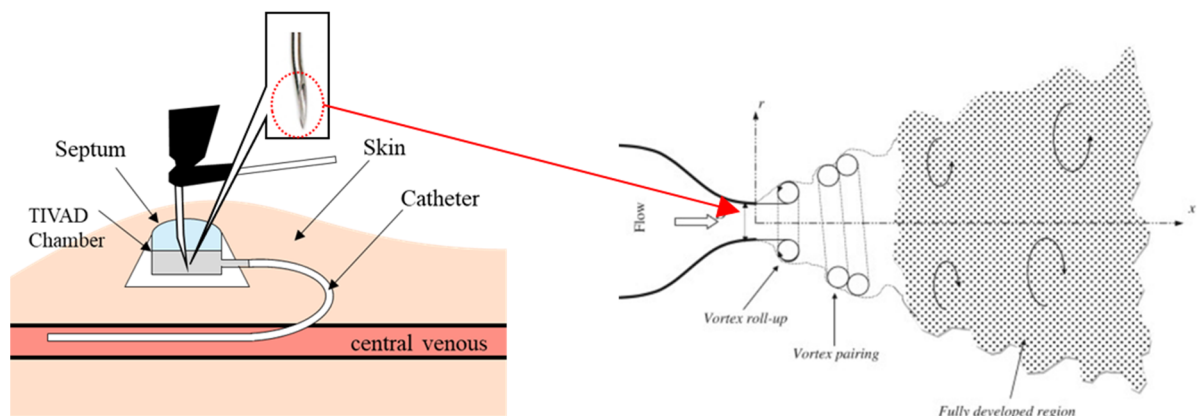


Figure 23 Turbulence generation near the needle hole in the TIVAD chamber (partly taken from Ref.53).

つまり、フラッシング速度が遅い場合でも、ヒューバー針から噴出した直後の液体は乱流が生じている可能性がある。しかし、乱流の強度が弱く、チャンバー内を攪拌する前に乱流が消失したために、針孔の背面側で脂質エマルションのプールが生じていたと考えられた。一方で、フラッシング速度が速い場合は、チャンバー内全体が均一に攪拌されるような強い乱流が生じていたと推測できる (Figure 20)。パルシングフラッシュにおいては、フラッシング速度の平均速度が遅くなるだけでなく、連続的にフ

ラッシング液の流れを遮断することで渦の連続性が得られないため、乱流が維持されにくくなると考えられる。本章の結果から、TIVAD チャンバー内の脂肪乳剤においてはパルシングフラッシュの有効性は認められなかった。パルシングフラッシュの有効性は、CVC 内の固形沈着物の洗浄<sup>25,27</sup> や微生物の洗浄<sup>26</sup> によって実証されている。これらはカテーテル内壁に付着した物体を洗浄対象としており、本研究ではデバイス内に分散した脂質エマルジョンを洗浄対象としている。また、本章で使用した TIVAD チャンバーは広い空間を有する構造であり、狭い内腔を有するチューブ状のカテーテルとは流体挙動が異なることも既報との齟齬が生じている要因と考えた。そのため、脂肪乳剤投与後のパルシングフラッシュの有効性を議論するには既報で用いられているカテーテルで比較検討する必要があるため、本論文では第四章で検討した。

最後に、ヒューバー針の針孔の穿刺角度による影響を検証し、フラッシング速度が遅い場合に一部の条件で脂肪乳剤が残りやすい領域が生じることが明らかとなった。一方で、フラッシング速度が速い場合はチャンバー内に乱流が生じて均一に攪拌されるため、針孔の向きによる影響がみられなかったと考えられる (Figure 22)。TIVAD は完全に皮下に留置されており、一部の製品ではチャンバー上部のセプタム表面に 3 点突起が設けられていることから皮膚上からでも TIVAD の留置状況を把握できる。このような製品では、チャンバー排出孔に対するヒューバー針の向きを意識して穿刺することが可能であるが、突起のない製品では困難である。また、留置される部位や向きも一定ではないことから、ヒューバー針の角度を考慮して穿刺することは困難であると推測された。そのため、ヒューバー針の針孔の方向による影響を排除するためにも 40 mL/min 以上のフラッシング速度でボースフラッシュすることが望ましいと考える。

## 第五節 小活

TIVAD 内の脂肪乳剤をフラッシングする条件として、40 mL/min 以上の速度でボースフラッシュをすることが望ましいことを明らかにした。パルシングフラッシュの有効性は認められなかった。フラッシング量は 10 mL 以上が効果的であることが確認できたが、脂質エマルジョンが 100% 排出されることはなかったため、上記の条件で脂肪乳

剤の投与とフラッシングを繰り返した場合に合併症を有意に低減できるかどうかは *in vivo* で長期反復試験を実施する必要がある。リアルタイムイメージングは、血管アクセスデバイス内における、フラッシング後の脂肪乳剤の分布を高解像度で示し、微量な残渣も定量できる精度を示す有用な評価手法であることを見出した。今後、類似するエマルション製剤のフラッシングを評価する際への応用も期待できる。

### 第三章 脂肪乳剤を側管投与した後のフラッシング方法の提案

本章の内容については、Clinical Nutrition ESPEN, 2021, 41, 287-92.に発表済みである。

#### 第一節 緒言

良性疾患または悪性疾患による慢性腸不全患者など、長期にわたる経静脈栄養投与が必要な患者は多く、長期 TPN および在宅中心静脈栄養法 (HPN) はそのような患者に対する重要な救命療法である<sup>2,8,17,54</sup>。6 ヶ月以上の長期 TPN や HPN を必要とする患者には、トンネル型中心静脈カテーテルまたは TIVAD などの長期留置が想定されている血管アクセスデバイスが望ましいとされる<sup>44,54</sup>。

脂肪乳剤は、脂質エマルションが他の薬剤やカルシウム塩によって凝集することがあり<sup>19</sup>、乳濁性注射剤であることから配合変化や菌類汚染が生じた際に視認することが困難であるために、他の輸液と混合せずに単独投与することが原則である。そのため、添付文書でも他剤と混合しない旨が注意喚起されている。一方で、脂肪乳剤は中心静脈ラインの側管から栄養輸液と同時投与可能である<sup>1</sup>。イントラリポス輸液では、中心静脈ラインの末端に TIVAD を接続して TPN 輸液や PPN 輸液と並行して投与しても脂質エマルションの粗大化が起こらないことが確認されている<sup>55</sup>。側管投与の概要図は Figure 24 に示すとおりである。側管投与は、患者の血管アクセスルートが少なく済み、栄養輸液の投与時間が短縮されるなど、患者の QOL 向上に寄与することから、米国や日本では散見される<sup>30,43</sup>。

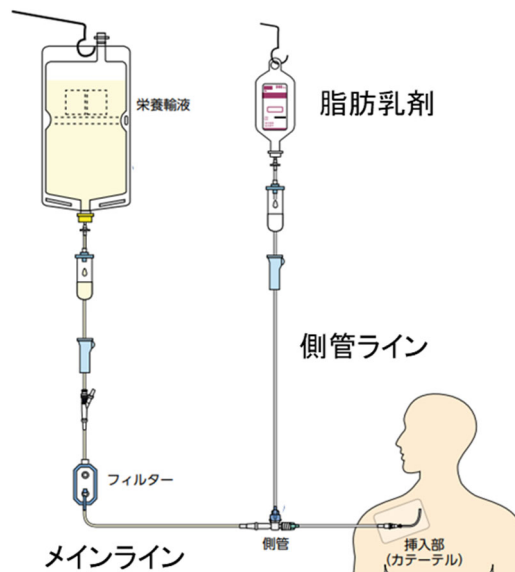


Figure 24 The image diagram of separate administration of LE from injection site.

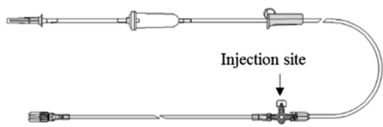
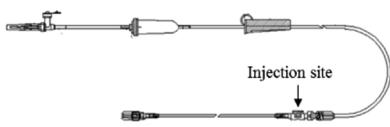
TIVAD を安全かつ長期的に使用するためには、脂肪乳剤による沈着物、器具の閉塞<sup>19,47</sup>、血流感染などの合併症<sup>15,16</sup>を予防することが重要である。そのため、HPNを含む長期 TPN を必要とする患者においては、脂肪乳剤投与後の適切なフラッシングによる管理が必要である<sup>56,57</sup>。第二章では刺入部である TIVAD のみを対象にフラッシング条件を検討した。しかしながら、側管投与では脂肪乳剤の投与に用いた輸液ラインのみを交換すればよいとされているため<sup>1</sup>、メインラインの側管以降に残存した脂肪乳剤を排出する必要がある。輸液ラインはチューブ内径が 2.5 mm 程度の製品が一般的であり、側管以降のチューブ長が 70 cm であった場合は内容量が約 3.5 mL となるため、TIVAD チャンバーの容量 0.6 mL を大きく上回る。そのため、側管投与時の脂肪乳剤のフラッシングは第二章で検討したフラッシング方法だけでは困難である可能性があった。そこで、第三章では、脂肪乳剤の側管投与後における、輸液ラインおよび TIVAD チャンバー内の適切なフラッシング方法を検討した。

## 第二節 方法

### ＜実験材料＞

栄養輸液には糖，電解質，アミノ酸，マルチビタミン，微量元素液を含む高カロリー輸液，EP(エルネオパ NF<sup>®</sup>2 号輸液，株式会社大塚製薬工場)を使用した。EPには界面活性剤が含まれているが，界面活性剤が含まれていない BF(ビーフリード<sup>®</sup>輸液，株式会社大塚製薬工場)も用意した。脂肪乳剤(イントラリポス<sup>®</sup>輸液 20%，株式会社大塚製薬工場)に 100 mL 中 25 mg となるように ICG(ジアグノグリーン<sup>®</sup>注射用 25 mg，第一三共株式会社)を溶解して試料溶液とした。フラッシング液には生理食塩液(大塚生食注，株式会社大塚製薬工場)を用いた。一次輸液ラインの形状と特徴を Table 2 に示す。閉鎖式コネクタ(ビオネクターS，株式会社ビゴン・ジャポン)を接続した 22 ゲージのヒューバー針(ヒューバープラス，株式会社メディコン)を TIVAD チャンバー(チャンバーの直径 13 mm，内容量 0.6 mL; BARD X-ポート，株式会社メディコン)のセプタム中央に穿刺し，医療用シリコンチューブ(内径 1.0 mm，長さ 50 cm，株式会社カネカメディックス)をチャンバーに接続した。一次輸液ラインの末端を閉鎖式コネクタに接続し，脂肪乳剤は一次輸液ラインの注入部位(側管)から二次輸液ライン(JY-ND223PL，株式会社ジェイ・エム・エス)を用いて側管投与した。

Table 2 The primary infusion line used for the examination.

Model Number (Manufacturer)	JY-NC323RFL (JMS Co. Ltd. Tokyo, Japan)	JY-NWP861F71 (JMS Co. Ltd. Tokyo, Japan)
Shape		
Feature	Three-way valve's volume: Dead Volume 0.05 mL Priming volume after the three-way valve: 3.4 mL Tube after the three-way valve: PVC-free, length 700 mm, inner diameter 2.5 mm	Injection site: Non Dead Volume Priming volume after the injection site: 0.5 mL Tube after the injection site: PVC-free, length 700 mm, inner diameter 1.0 mm

試験モデルを Figure 25 A に示す。栄養輸液と試料溶液は輸液ポンプ(TE-131，テルモ株式会社)を用いて 100 mL/1.2 h で同時に滴下を開始した。30 分後に滴下を終了し，以下の(1)～(3)を検証内容にしたがってフラッシュした。その後，後述のり

アルタイムイメージングでデバイス内の脂肪乳剤の残渣を評価した。一次輸液ラインの注入部位以降のチューブは直線形状となるように固定して試験した。

### (1) 側管投与直後のフラッシングの検証

注入部位以降のチューブの洗浄が困難な輸液ラインを想定し、注入部位にデッドボリュームを有する JY-NC323RFL を使用した (Table 2)。試料溶液の滴下終了と同時に二次輸液ラインを注入部位から取り外して EP の滴下を停止し、直ちに注入部位から 20, 40, 60 mL/min の速度で 10, 20, 40, 70 mL フラッシングした。(1)ではボーラスフラッシュまたはパルシングフラッシュで実施した。パルシングフラッシュは、60 mL/min の速度で 1 mL フラッシングした後、1 秒または 3 秒の停止時間を設けた。

### (2) メイン輸液による洗浄効果の検証

フラッシングプロセスを Figure 25 B に示した。一次輸液ラインとして JY-NC323RFL を使用した。Model A では、試料溶液の滴下終了後、二次輸液ラインを取り外して、EP は滴下し続けた。一方、Model B では、試料溶液の滴下終了と同時に、EP の滴下を一時停止し、EP 再開前に注入部位から 60 mL/min で 10 mL のボーラスフラッシュを加えた。その後、Model A と同じ条件で EP を再滴下した。どちらも、EP の滴下終了後に、60 mL/min の速度で 10, 20, 40, 70 mL フラッシングした。Model A では、メイン輸液の界面活性剤による影響を検証するため、BF でも同様に試験した。また、滴下速度の影響を検証するため、EP をさらに遅い速度(100 mL/2.4 h)で滴下した場合でも試験した。

### (3) 輸液ラインの内径の影響

(1)で用いた輸液ラインよりも内径およびプライミング量が小さい JY-NWP861F71 (内径 1.0 mm)を一次輸液ラインとして使用した (Table 2)。試料溶液の投与終了と同時に EP の滴下を停止し、直ちに注入部位から 20, 40, 60 mL/min の速



度で 10, 20, 40, 70 mL フラッシングした。(3)では(1)と同様にボーラスフラッシュまたはパルシングフラッシュで実施した。

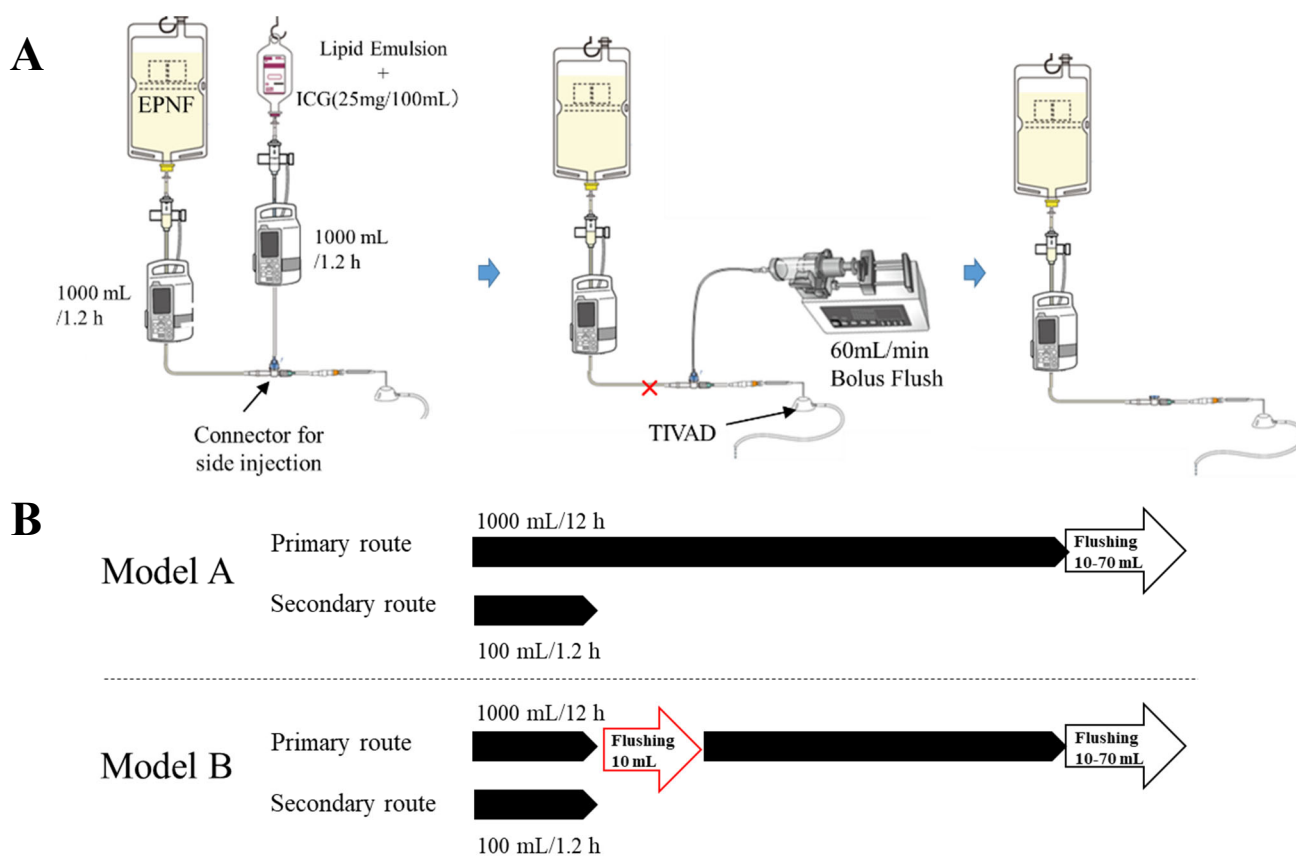


Figure 25 The system of sample solution administration and flushing (A). Model A: After administration of sample solution, the injection site was closed, and then EP flow is restarted. Finally, the residual LE is measured at each point after 80, 240, 420, 660, and 900 mL administration of EP. Model B: Flushing with 10 mL saline from the injection site is added before restarting EP (B).

#### <IVIS によるリアルタイムイメージング>

IVIS<sup>®</sup> Spectrum live imaging system(株式会社パーキンエルマージャパン)を用い、励起波長 745 nm, 発光波長 840 nm で、フラッシングした輸液ラインの注入部位以降から TIVAD チャンバーまでのチューブと TIVAD チャンバー内の ICG 蛍光の分布を可視化し、絶対検量線法を用いて脂肪乳剤の残渣を可視化し、定量した。

#### <統計方法>

すべての実験は 3 回繰り返した(N=3)。すべての値は平均値±標準偏差(SD)で示した。処理間の差は、反復測定分散分析(repeated-measures ANOVA)を用いて分析し、必要に応じて Tukey の多重比較検定を行った。統計的有意水準は  $p<0.05$  とした。すべての統計解析には、統計ソフト(エクセル統計 2015, SSRI 株式会社)を使用した。

### 第三節 結果

#### 一項 側管投与直後のフラッシングの検証

本項では、一般的な輸液ラインで脂肪乳剤を側管投与した場合を想定し、脂肪乳剤投与直後のフラッシングのみで脂肪乳剤が排出されるか検証した。フラッシング後の注入部位から TIVAD チャンバーまでのチューブ、または TIVAD チャンバー内の ICG 蛍光の分布を Figure 26 A に示す。ICG 蛍光は、20 mL でフラッシングした後も、チューブ内およびチャンバー内の両方で強く検出されており、70 mL フラッシングした後も検出されていた。フラッシング後の TIVAD チャンバー内の脂肪乳剤の残存濃度を Figure 26 B に示す。チャンバー内の脂肪乳剤の残存量は、フラッシング手技やフラッシング速度の違いによる差は認められなかった。

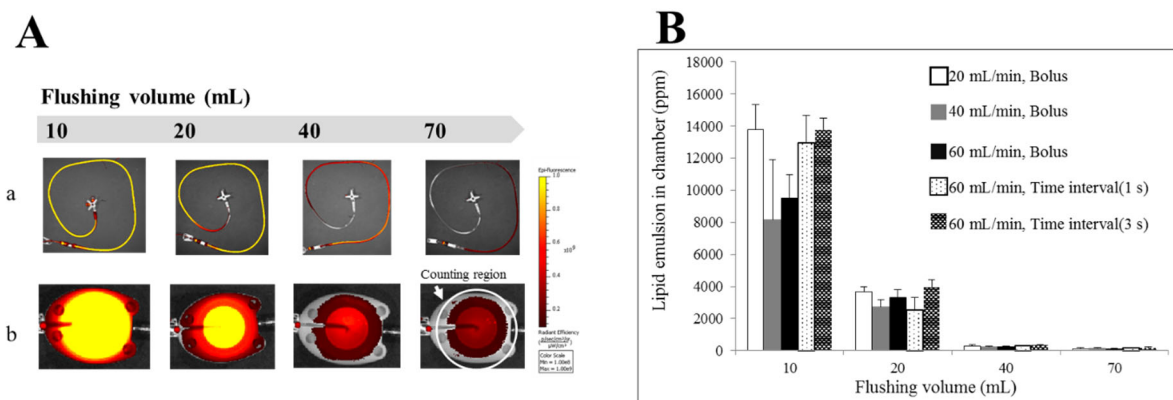


Figure 26 Representative fluorescence imaging images of tubes (a) and chamber (b) after a bolus flush at 60 mL/min after administration of sample solution (A). Residual amounts of LE in the chamber after flushing under various speeds and flushing patterns (B).

#### 二項 メイン輸液による洗浄効果検証

一項で側管投与後のフラッシュのみでは脂肪乳剤の排出が困難であったため、メイン輸液による洗浄の効果を検証した。Figure 25 で示した Model A および B でメイン輸液の EP を各量滴下した後のチューブおよびチャンバー内の ICG 蛍光の分布と脂肪乳剤の残存濃度を Figure 27 に示す。Model A では、試料溶液の滴下終了後

に 240 mL の EP を流した時点で、チューブ内の ICG 蛍光は検出されなかったが、チャンバー内の ICG 蛍光は依然として強く検出された (Figure 27 A)。また、注入部位のデッドスペース内に残存している脂肪乳剤は、EP を 900 mL 滴下した後も残存しており、EP 滴下終了後にフラッシングした際、TIVAD チャンバー内に流入したことで残存濃度は増加した。一方で、EP 再開前に 10 mL のフラッシングを追加した Model B では、EP 再開後、420 mL 滴下した時点で、チャンバー内の ICG 蛍光は検出限界以下となった。さらに、デッドスペースの脂肪乳剤は EP 再開前のフラッシングのみでほぼ洗い流され、EP 滴下終了後も残渣が検出されることはなかった (Figure 27 B)。

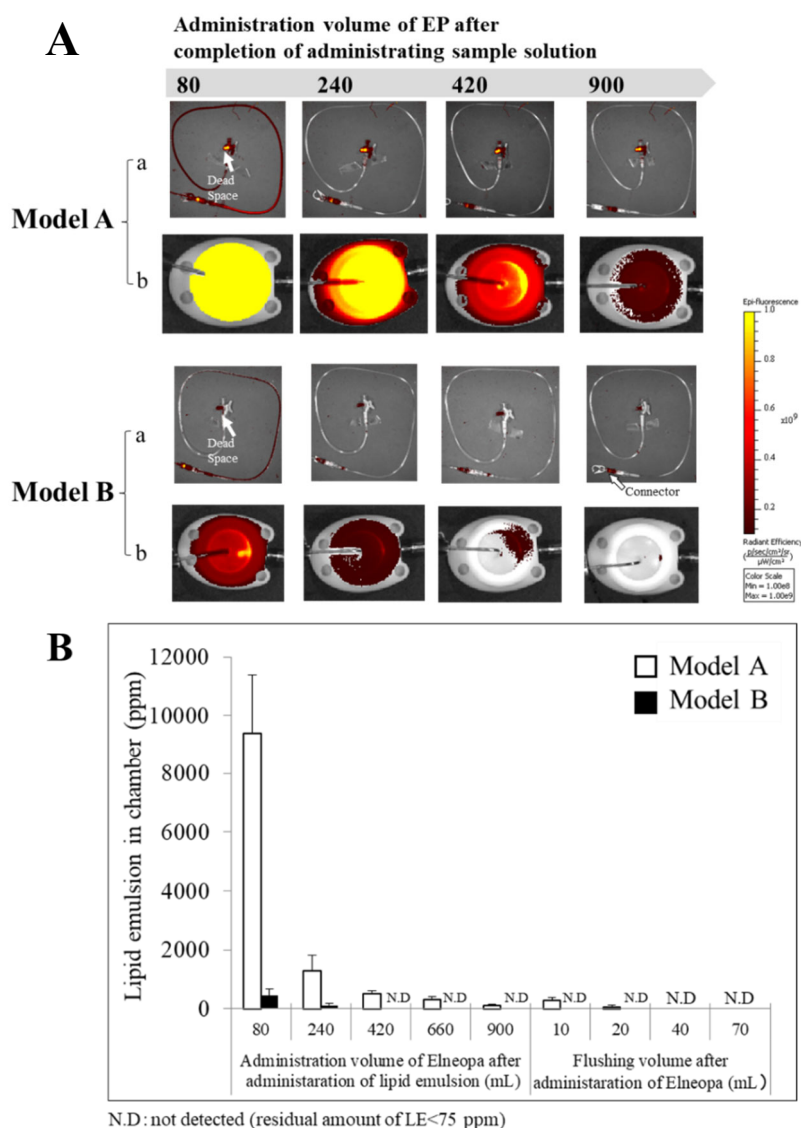


Figure 27 Representative fluorescence images of tubes (a) and chamber (b) of remaining sample solution after administration EP (A). Residual amounts of LE in the chamber after administration EP and flushing following each models (B).

次に Model A において、メイン輸液に EP または BF を滴下した後のチャンバー内の脂肪乳剤の残存濃度を Figure 28 A に示す。いずれの通液量においても両輸液を用いた場合で差は認められなかった。また、滴下速度の条件を変更して滴下した後のチャンバー内の脂肪乳剤の残存濃度を Figure 28 B に示す。いずれの通液量においても滴下速度による差は認められなかった。

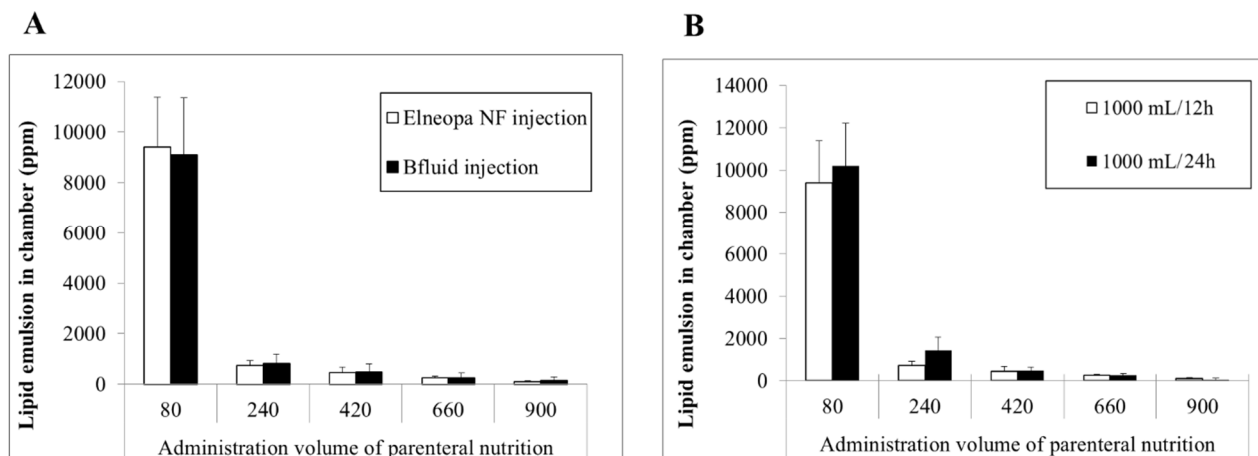


Figure 28 Residual amounts of LE in the chamber after administration EP containing surfactant or BF without surfactant (A) and residual amounts of LE in the chamber after administration EP following at different flow rates (B) following Model A.

### 三項 輸液ラインの内径の影響

一般的な輸液ラインよりも側注口以降の内径が細い一次輸液ラインでは、容易にフラッシングできると考えられるため、輸液ラインの内径の影響を検証した。細い一次輸液ラインを用いて試料溶液を側管投与後、直ちにフラッシングした後のチューブおよびチャンバー内の ICG 蛍光の分布と脂肪乳剤の残存濃度を Figure 29 に示す。チューブ内の ICG 蛍光は、20 mL でフラッシングした後は検出されなかったが、チャンバー内では僅かに検出された (Figure 29 A)。内径の細い輸液ラインの場合、チャンバー内の脂肪乳剤の残存量はフラッシング速度が速いほど少なくなっていた。一方で、パルスフラッシュの有意性は認められなかった (Figure 29 B)。フラッシング量を 20 mL 以上に増やしても、脂肪乳剤の残存量に有意差は認められなかった。

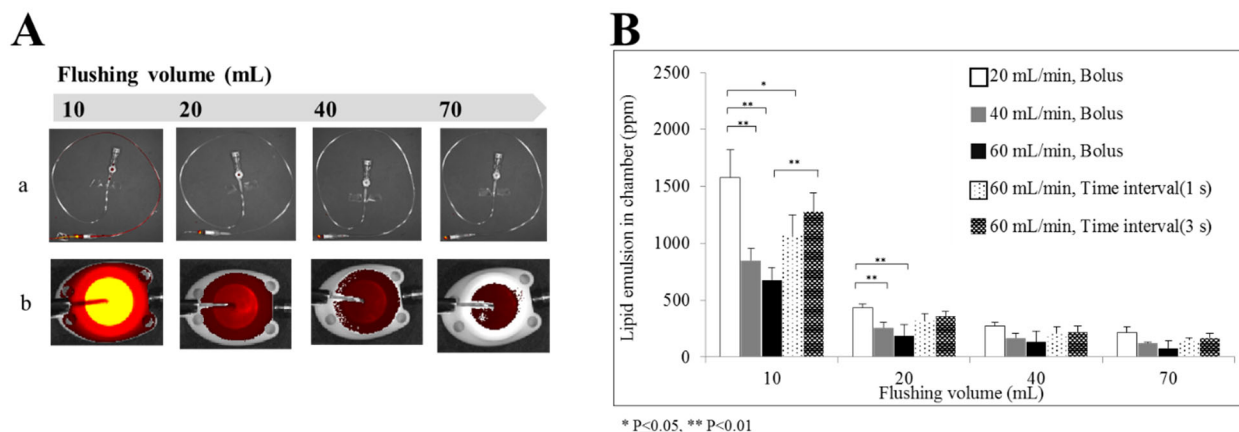


Figure 29 Representative fluorescence images of tubes (a) and chamber (b) after bolus flush following administration of sample solution using a small-diameter infusion line (A). Residual amounts of LE in the chamber after flushing under each condition using a small-diameter infusion line (B).

#### 第四節 考察

脂質は経腸、経静脈問わず栄養素として必要であり、経静脈栄養の場合は脂質が含まれる製剤が少ないため、必須脂肪酸や高密度エネルギーの補給源として脂肪乳剤は非常に有用である<sup>5,10,11,58</sup>。特に HPN を含む長期 TPN では脂肪乳剤の投与が好ましい。一方で、カテーテルの接続部やコネクターが CRBSI の感染源の 50% 以上を占めるとの報告もあることから<sup>59,60</sup>、一次輸液ラインの注入部位にアクセスする必要のある脂肪乳剤の側管投与では、輸液ラインと血管アクセスデバイスを清潔に保つこと、デバイス内の残渣を低減することが重要である。

本章では、脂肪乳剤を側管投与した後の輸液ラインと末端に接続した TIVAD チャンバーの適切なフラッシング方法を検討した。脂肪乳剤を側管投与した後の一次輸液ラインのフラッシングは配合変化や感染を予防するための基本的な操作である<sup>22,23</sup>。脂肪乳剤の側管投与は散見される手法でありながら<sup>30,43</sup>、側管投与後の輸液ラインおよび TIVAD 内の脂肪乳剤を適切に排出するための具体的な方法を検討した研究はなかった。一因として、投与デバイス内の脂肪乳剤の残渣を全体的に観察する簡便な方法がなかったことが挙げられる。リアルタイムイメージングは広範囲な残渣を検出し、フラッシング後の残渣の挙動を明らかにすることで上記の課題を解決することができる。

本章では、初めに一般的な内径(約 2.5 mm)の輸液ラインを用いて、脂肪乳剤を側管投与した後のフラッシングについて検証した。薬剤注入後のフラッシング量は、一般的に 10~20 mL<sup>19,57</sup> である。しかしながら、脂肪乳剤を側管投与した直後のフラッシングでは、20 mL の生理食塩液でフラッシングしても、輸液ラインと血管アクセスデバイスともに脂肪乳剤が多く残存することが明らかとなった。また、一般的な輸液ラインを用いた場合では、フラッシング速度やフラッシング手技などの条件を変化させても残存量は低減できないことが分かった(Figure 26)。チューブ内の洗浄効果は、フラッシング液のせん断力の強さに依存すると考えられる。せん断力の強さはレイノルズ係数(Re)で推測することができ、Re が大きいほど、せん断力の大きい乱流が生じやすいとされる。Re は、 $(\rho * V * D) / \eta$  を用いて算出できる。ρ は密度、V は流速、D は試験

に用いたチューブの内径,  $\eta$  は生理食塩液の粘度とし  $Re$  を算出した結果, 一般的な内径の輸液ラインを使用した場合, フラッシング速度が 60 mL/min であっても  $Re$  は 500 以下であった。したがって, どのような条件下でも乱流は発生せず<sup>25</sup>, 攪拌されにくいことから, フラッシング条件を変化させても残存量に差が生じなかったと推測された。

臨床では, 一次輸液ラインに接続された栄養輸液に並行して脂肪乳剤を側管投与することが可能であるが<sup>1</sup>, TPN 輸液と脂肪乳剤を同時に投与した場合, 脂肪乳剤の方が早く投与終了となることも十分考えられる。側管投与直後のフラッシングのみでは十分な洗浄が困難であったため, 脂肪乳剤の投与終了後, TPN 輸液の通液による輸液ラインの洗浄を検討した。その結果, 脂肪乳剤の側管投与後に一旦 10 mL の生理食塩液でフラッシングし, TPN 輸液を 420 mL 以上通液することができれば, 輸液ラインのチューブやチャンバー内の脂肪乳剤は検出限界以下まで排出されることを見出した (Figure 27)。また, 注入部位のデッドスペースでは, 滞留した薬剤が排出されないことが報告されている<sup>61</sup>。本試験でも, 側管投与後の 10 mL のフラッシングを行わなかった場合, 輸液ライン注入部位のデッドスペースに脂肪乳剤が長時間にわたって残存していたため, 脂肪乳剤の側管投与後は, 直ちに 10 mL の生理食塩液でフラッシングすることが望ましいと考えられる。さらに, TPN 輸液の投与終了後にもフラッシングを実施することで, TPN 輸液の残渣も最小限に抑え, 感染リスクの低減に繋がると考えられる<sup>62</sup>。TPN 輸液を滴下する際の滴下速度がチャンバー内の脂肪乳剤の洗浄効果に及ぼす影響を検証した結果, 滴下速度が 1000 mL/12~24 h の範囲内である場合は残渣に差異はなく, チャンバー内の残存量は TPN 輸液の通液量に依存していた。また, 脂肪乳剤は界面活性剤との親和性が高いため, メイン輸液における界面活性剤の有無が脂肪乳剤の洗浄効果に影響するかについても併せて検証した。脂溶性ビタミンを含む TPN 輸液には溶解剤として界面活性剤が含まれており, PPN 輸液には界面活性剤が含まれていない。得られた結果から, いずれの輸液を通液した場合でもチャンバー内の残渣に差異はなく, メイン輸液の界面活性剤の影響はないことが分かった (Figure 28)。したがって, TPN 輸液で洗浄する場合は, 用いる輸液や滴下速度の影響はなく, 通液量が主な因子と考えられる。これら



の新たな提案は脂肪乳剤の側管投与後にメイン輸液が残っている場合など、その後も滴下が継続される場合に有用である。

最後に、メイン輸液を継続して滴下できない場合を考慮して、細い内径(約 1 mm)の輸液ラインを用いた場合のフラッシングを検討した。内径が細いラインを使用した場合は、パルシングせずに勢いよくボールスフラッシュすることで、輸液ラインおよび TIVAD チャンバーから脂肪乳剤を効果的に排出できることが示された(Figure 29)。一般的な内径(約 2.5 mm)の輸液ラインを用いた場合と異なる結果が得られた理由として、輸液ラインの容量が少ないことに加え、細径のチューブであるためにフラッシング液の流速が高速となることが挙げられる。内径が 1 mm の輸液ラインをフラッシング速度 40 mL/min でフラッシングした場合、 $Re$  は 1000 近くなり、ルート内部の流体は乱流に遷移している可能性がある。また、TIVAD チャンバー内は第二章で検証したとおり、40 mL/min 以上の速度では均一に洗浄されることから 40 mL/min 以上が望ましい。一方で、40 mL/min 以上の速度でボールスフラッシュした場合には、20 mL 以上のフラッシング量でフラッシングしても残存量に変化がなかったことから、フラッシングの目安は 20 mL 程度と考えられた。10~20 mL の生理食塩液によるフラッシングが推奨されているが<sup>19,57</sup>、内径の細い一次輸液ラインを用いた場合は先行研究を支持する結果であった。

長期 TPN や HPN では脂肪乳剤が長期にわたって側管投与されていることが考えられるが、本試験は実験的に単回投与を想定して実施したものである。そのため、本章の結果は、必ずしも長期にわたる反復的な脂肪乳剤の投与後のフラッシングとして効果があるとは言えない。しかしながら、TIVAD の合併症を調査した研究では、TIVAD が閉塞にいたるまでの日数が中央値で 510 日であると報告していることから、閉塞は薬剤が長い期間をかけて蓄積された結果であると考えられる<sup>46</sup>。したがって、脂肪乳剤を投与する度にデバイス内の残渣を極力低減するフラッシング手技は長期的にみると沈着物の蓄積、閉塞、血流感染などのカテーテル関連合併症を減少させ、長期 TPN および HPN の安全性を向上する可能性は十分あると考える。

## 第五節 小活

脂肪乳剤を側管投与した際は、投与後直ちに 10 mL の生理食塩液でフラッシングし、その後 420 mL 以上のメイン輸液を滴下することで輸液ラインおよび血管アクセスデバイス内の脂肪乳剤の残存を最小限に低減することができる。脂肪乳剤の投与後にメイン輸液を継続して滴下できない場合は、側管以降の内径が細い輸液ラインを用いて脂肪乳剤を投与し、投与後は直ちに 20 mL 以上の生理食塩液で勢いよくボースフラッシュすることも効果的であると考えられた。

## 第四章 中心静脈カテーテルまたは延長チューブ付き末梢静脈カテーテル内の効果的なフラッシング条件および残渣が微生物増殖に及ぼす影響

本章の内容については，The Journal of Vascular Access, 2023, doi: 10.1177/11297298231173162, Epub ahead of print.に発表済みである。

### 第一節 緒言

静脈カテーテルは，使用目的や使用期間に応じて様々なものが市販されている。一般的な CVC は TIVAD と異なって，コネクタとチューブで構成されており，コネクタは皮膚上に露出した状態で固定される。そのため，完全皮下埋め込み型の TIVAD に比べて CRBSI 発生率が約 27 倍高いと報告されている<sup>31</sup>。また，末梢静脈カテーテルや留置針は長期留置によって微生物定着の発生率が上昇することから，留置後 96 時間までに交換することが推奨される<sup>63</sup>。末梢から投与される PPN 輸液は微生物増殖が速いことも一因である<sup>1</sup>。このように CVC や末梢静脈カテーテルの主な合併症には CRBSI が挙げられており，適切な管理方法で CRBSI を予防することは，関連する死亡率を低下させるために重要である<sup>64</sup>。脂肪乳剤は，高濃度のブドウ糖とアミノ酸のみを含む輸液製剤よりも各種微生物が増殖しやすい<sup>15,16</sup>。先行研究からもカテーテル内に残存した脂肪乳剤は CRBSI のリスク因子として特定されている<sup>65</sup>。したがって，脂肪乳剤投与後に生理食塩液のプレフィルド製剤を使用してカテーテルをフラッシングすることは，カテーテルの開存性を維持するだけでなく，CRBSI を予防するために重要な手技である<sup>21-23</sup>。一般的に実施されるフラッシングはボーラスフラッシュとパルシングフラッシュの 2 種類である。パルシングフラッシュは，カテーテル内に乱流を発生させ，より強力で効果的な洗浄効果をもたらすことが試験的に示されている<sup>24,25</sup>。しかしながら，第二章，第三章ではパルシングフラッシュの有意性が認

められなかったことに加え、米国輸液看護師協会 (INS) が発行する輸液療法の実践基準では、パルシングフラッシュの効果を検証する必要があると指摘されている<sup>66</sup>。臨床でのランダム化比較試験ではボーラスフラッシュとパルシングフラッシュによるアウトカムに差がなかったと報告されている<sup>67</sup>。一方で、*in vivo* の比較試験においては、パルシングフラッシュが血管内皮細胞の脱落や損傷を引き起こし、炎症細胞を増加させている可能性を指摘した報告もある<sup>68</sup>。そのため、パルシングフラッシュに関しては、より慎重な検討と更なる検証研究が必要である。そこで、第四章では CVC および末梢静脈留置針に脂肪乳剤を含む栄養輸液を充填し、ボーラスフラッシュとパルシングフラッシュで洗浄した後の残渣を比較して効果的なフラッシング条件を探索した。また、フラッシング後の脂肪乳剤の残渣が微生物増殖に及ぼす影響を検証した報告はない。そこで、検証した効果的なフラッシング条件の臨床的意義を明らかにするために、フラッシング後の残渣が、その後のカテーテル内の微生物増殖の程度に及ぼす影響についても検証した。

## 第二節 方法

### < 実験材料 >

脂肪乳剤 (イントラリポス<sup>®</sup>輸液 20%, 株式会社大塚製薬工場) に 100 mL 中 25 mg となるように ICG (ジアグノグリーン<sup>®</sup>注射用 25 mg, 第一三共株式会社) を溶解した。この液に、糖, 電解質, アミノ酸, マルチビタミン液を含む高カロリー輸液, NP (ネオパレン<sup>®</sup>2号輸液, 株式会社大塚製薬工場) を等量混合した液を試料溶液とした。混合比はそれぞれの輸液を添付文書に従って側管投与した場合と同様に設定した。フラッシング液には生理食塩液 (大塚生食注, 株式会社大塚製薬工場) を用いた。

### 一項 各モデルにおけるフラッシング条件の検討

CVC は X 線透視下での造影が可能な製品が多く、これらでは蛍光イメージングによるデバイス内残渣の検出に影響を与えることが想定されるため、CVC モデルとして、透明なポリブタジエン製チューブ (内径 1.0 mm, 長さ 160 mm) を用いた。寸法は、実

験的にパルシングフラッシュの有効性を検証した先行研究と同等のものを使用した<sup>26,27</sup>。なお、カテーテルの材質による影響を確認するため、内壁の微細な凹凸からCRBSIや血栓による閉塞の発生率が高いとされるポリウレタンを用いたカテーテルを別途用意し<sup>69,70</sup>、イントラリポス輸液20%を充填してフラッシングした。その後、濁度法で残渣を測定した結果、両カテーテルで脂肪乳剤の残渣に差がないことを事前に確認した(data not shown)。末梢静脈留置針は一般的に延長チューブが接続されるため、延長チューブ付き静脈留置針(18G留置針:外径1.3 mm 長さ32 mm, チューブ:内径1.7 mm 長さ110 mm, BD ネクシーバ, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を使用した。それぞれに閉鎖式コネクタ(ビオネクターS, 株式会社ビゴン・ジャパン)を接続してフラッシングモデルとした。試料溶液を両フラッシングモデルに充填後、フラッシング液を満たしたシリンジを接続した。そして、機械式高性能シリンジポンプ(YSP-301, 株式会社ワイエムシー)を用いて以下(1)~(3)の条件で試験を行い、後述の蛍光イメージングで脂肪乳剤の残渣を測定し、フラッシング速度の影響、フラッシング手技の影響、チューブ形状の影響を検証した。特に補足がない限り、フラッシングモデルはチューブが直線形状となるように固定して試験した。

#### (1) ボーラスフラッシュの条件設定

10 mL/4, 7, 10 秒の各速度でボーラスフラッシュした。フラッシング速度は、同様のカテーテルを用いてパルシングフラッシュの有効性を検討した先行研究を参考に設定した<sup>25</sup>。フラッシング量は10 mLとしたが、10 mL/4 秒のみ、20 または 30 mLでもフラッシングした。

#### (2) パルシングフラッシュの条件設定

10 mL/4, 7, 10 秒の各速度で1 mL注入後0.2, 0.4, 0.8 秒の停止時間(interval)を加え、総フラッシング量が10 mLとなるまで繰り返した。停止時間は、同様のカテーテルを用いてパルシングフラッシュの有効性を検討した先行研究を参考に設定した<sup>25</sup>。

#### (3) チューブ形状の設定

チューブに1回転のループを作り、10 mL/4 または 10 秒の各速度で、ボーラスフラ

ッシュまたは 0.8 秒の停止時間を加えたパルシングフラッシュを行った。

なお、CVC は皮下に留置されることからチューブ形状を制御できないため、(3)は延長チューブ付き静脈留置針のみで実施した。

## 二項 フラッシング後の残渣による微生物増殖

ICG を使用せずに調製した試料溶液を CVC モデルに充填した。陰性対照として生理食塩液のみを充填した CVC モデルを用意した。発光タンパク質(ルシフェラーゼ由来)の遺伝子が導入された微生物 (*P. aeruginosa* Xen 05, 住商ファーマインターナショナル株式会社)が  $5 \times 10^6$  CFU/mL となるようにフラッシング液に添加後、シリンジに充填し、閉鎖式コネクタに接続した。一項の条件(1)および条件(2)でフラッシングを行った後、カテーテル内容液がカテーテル先端から蒸発しないようにチューブの末端を鉗子で閉じた状態で、35°C に設定したインキュベーター内で 24 時間培養した。その後、後述の生物発光イメージングで測定した。

### <蛍光イメージングおよび生物発光イメージング>

脂肪乳剤の残渣は IVIS<sup>®</sup> Spectrum live imaging system (株式会社パーキンエルマージャパン)を用い、励起波長 745 nm, 発光波長 840 nm で、カテーテル内の ICG が発する蛍光の分布を可視化し、定量した。培養後の *P.aeruginosa* Xen 05 が発する生物発光の分布は IVIS の生物発光測定モードで可視化し、定量した。IVIS Imaging System では、Tissue Diffusion Model 理論<sup>71</sup>によって算出された物理量を用いることで、光源の強さを反映し、十分な定量性を保持している。

### <統計方法>

すべての実験は 5 回繰り返した(N=5)。すべての値は平均値±標準偏差(SD)で示した。統計解析は反復測定分散分析(repeated-measures ANOVA)を用いて分析した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。すべての統計解析には、統計ソフト(エクセル統計 2015, SSRI 株式会社)を使用した。

### 第三節 結果

#### 一項 CVC モデルのフラッシング条件の検証

CVC に充填した脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を検証した。CVC モデルをフラッシングした後の明視野画像と ICG 蛍光の分布および脂肪乳剤の残存濃度を Figure 30 に示す。興味深いことに、いずれのフラッシング条件においても ICG 蛍光はコネクタ付近で観察されたが、残渣の定量領域 (ROI) の範囲外であるカテーテルではほとんど検出されなかった (Figure 30 A)。フラッシング手技の主要な因子である停止時間 (interval) とフラッシング速度はフラッシング後の残存量に影響していた ( $P < 0.05$ )。いずれのフラッシングにおいてもフラッシング速度に応じて残渣は減少しやすい一方で、その度合いは停止時間によって異なっており、パルシングの停止時間が長いほど残渣の減少は緩やかであった (フラッシング速度  $\times$  停止時間の相互作用:  $p < 0.05$ )。

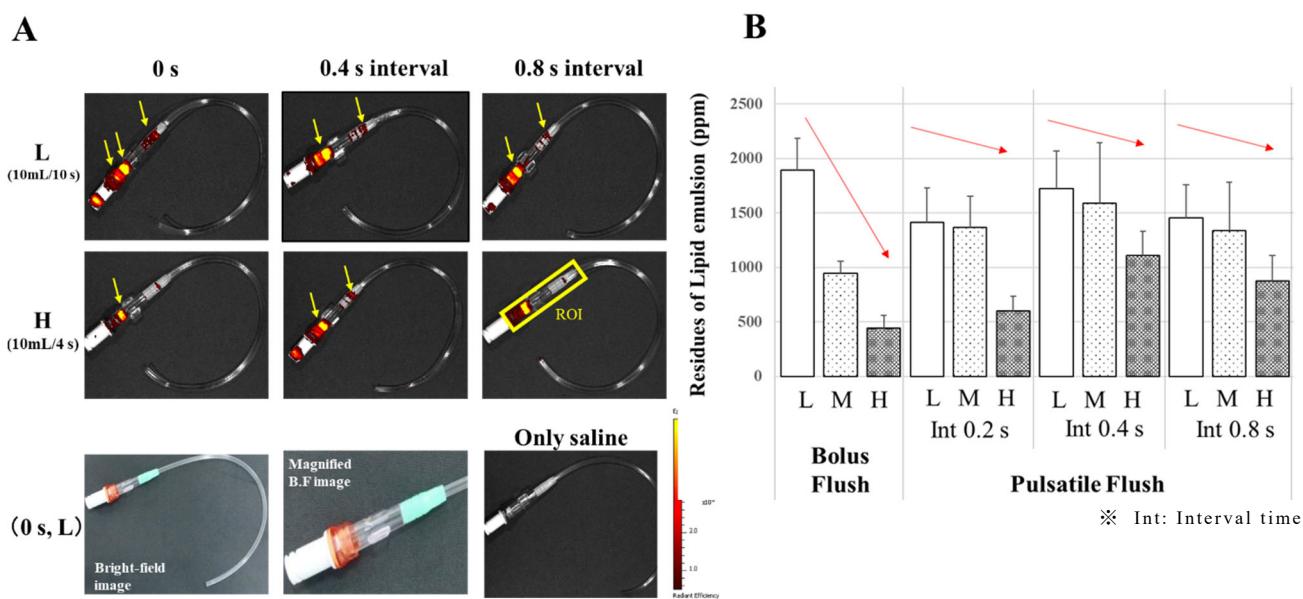


Figure 30 Representative fluorescence images of the CVC model after flushing. Residual LE (indicated by arrows) after flushing at various speeds with some intervals or without. Bright-field images of the CVC model after flushing at 10 mL/10 sec without interval and its magnified image (A). The residues of LE inside ROI at various speeds with some intervals or without (B).

次に、10 mL/4 秒でボラスフラッシュする最も効果的な条件において、10、20 または 30 mL でフラッシングした後の残存濃度を Figure 31 に示す。30 mL では定量限界以下となっており、10 mL と 20 mL でフラッシングした後の残存濃度に差はなかった。

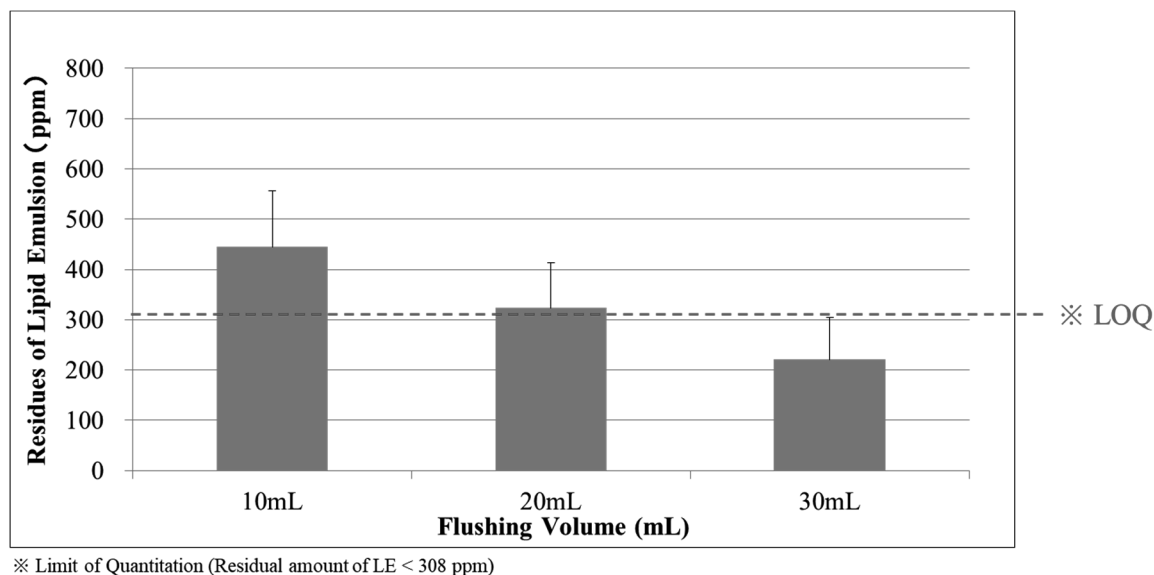


Figure 31 The residual of LE inside the catheter near connector after bolus flush at 10 mL/ 4 sec until each volume of saline.

## 二項 延長チューブ付き末梢静脈留置針のフラッシング条件の検討

延長チューブ付き末梢留置針に充填した脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を検証した。試料溶液をフラッシングした後の蛍光イメージング像と残存濃度を Figure 32 に示す。いずれの条件も、留置針近位の延長チューブ内に ICG 蛍光が検出された (Figure 32 A)。延長チューブのコネクター付近は、CVC モデルと異なってコネクター由来の蛍光が強く検出されたため、ICG 蛍光を観察することができなかった。主要なフラッシング要素である停止時間はフラッシング後の残存量に影響を及ぼす因子 ( $P < 0.05$ ) であり、フラッシング速度の影響も見られた ( $P = 0.07$ )。ボラスフラッシュにおいては、10 mL/7 秒以上の速度でフラッシングすることで残存量の減少はピークに達していた (Figure 32 B)。一方、パルスフラッシュではいずれの条件でもフラ



ッシング速度の増加による残渣の減少は観察されなかった(フラッシング速度×停止時間の相互作用:  $p < 0.05$ )。

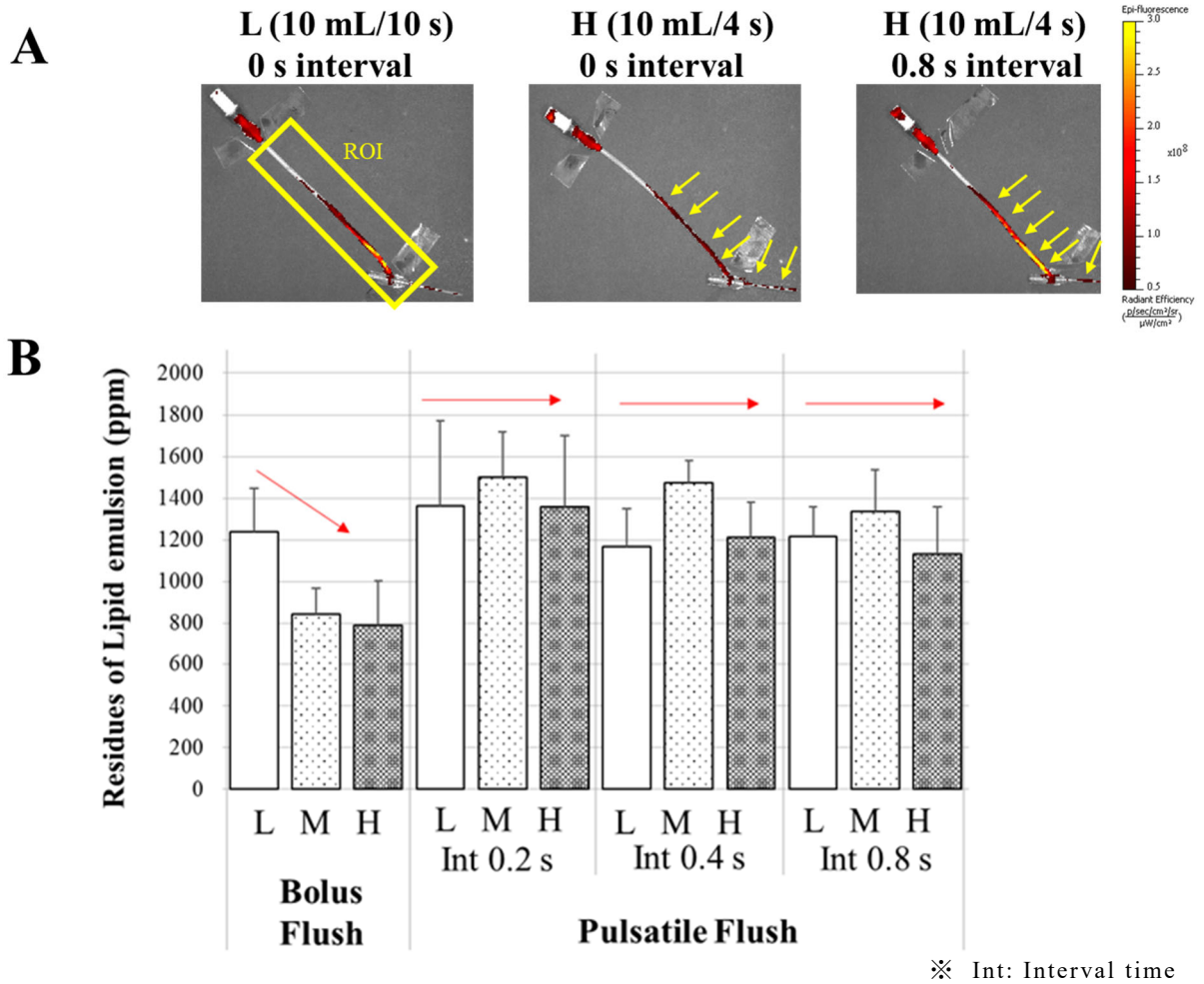


Figure 32 Representative fluorescence images of a flushed peripheral venous catheter.

Residual fluorescence (indicated by arrows) after flushing with various conditions (A). The residues of LE inside ROI at various speeds with some intervals or without (B).

次に、静脈留置針に接続される延長チューブは、チューブをループ状にして皮膚に固定されることがあるため、臨床に近い状態を想定して試験した。チューブを直線形状 (Straight) またはループ (Loop) 状に固定してフラッシングした後の蛍光イメージング像、並びに ROI 内の脂肪乳剤の残存濃度を Figure 33 に示す。チューブをループ状にしてフラッシングした場合、直線状の場合よりも明らかに残渣が減少した (Figure 33 B)。また、パルシングの有無やフラッシング速度による影響はみられなくなった (Figure 33 C)。

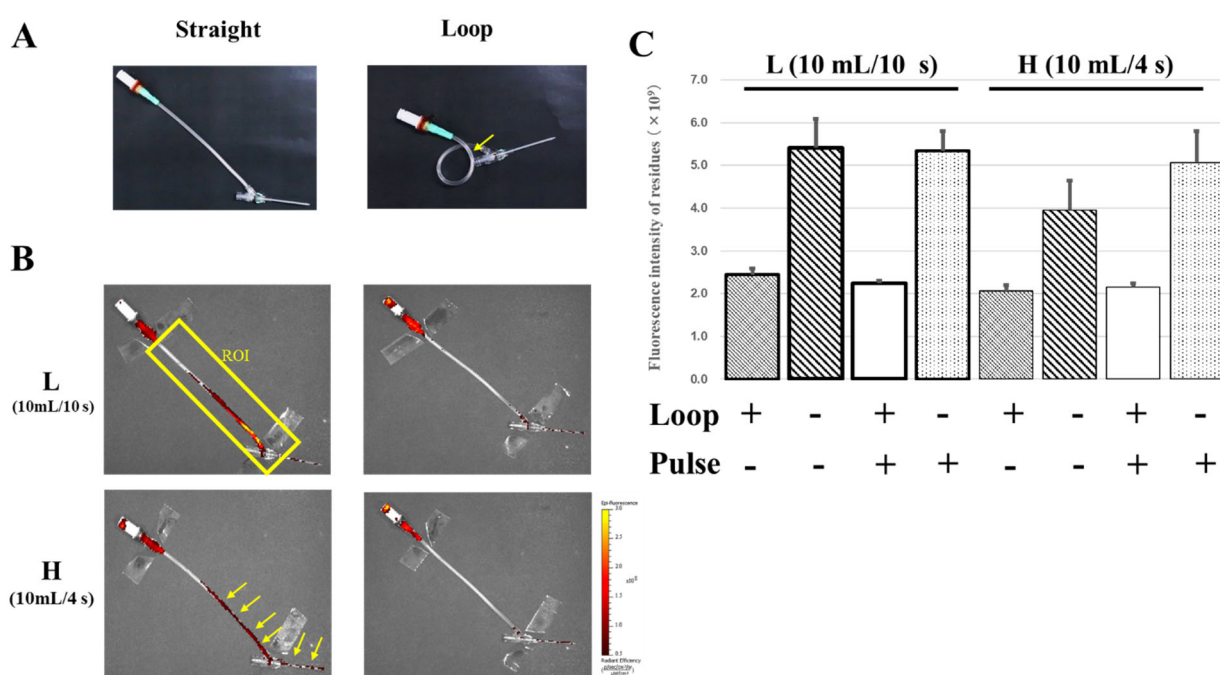


Figure 33 Bright-field images of peripheral venous catheter with or without a loop (A).

Residual fluorescence after bolus flush at various speeds with or without a loop (B). The residual fluorescence intensity inside ROI flushed with or without loop at various speeds with some intervals for pulse or without (C).

次に、ループを作成した状態かつ 10 mL/4 秒でボラスフラッシュする最も効果的な条件で、10、20 または 30 mL フラッシングした後の残存濃度を Figure 34 示す。いずれのフラッシング量でもフラッシング後の残存量に差はなかった。

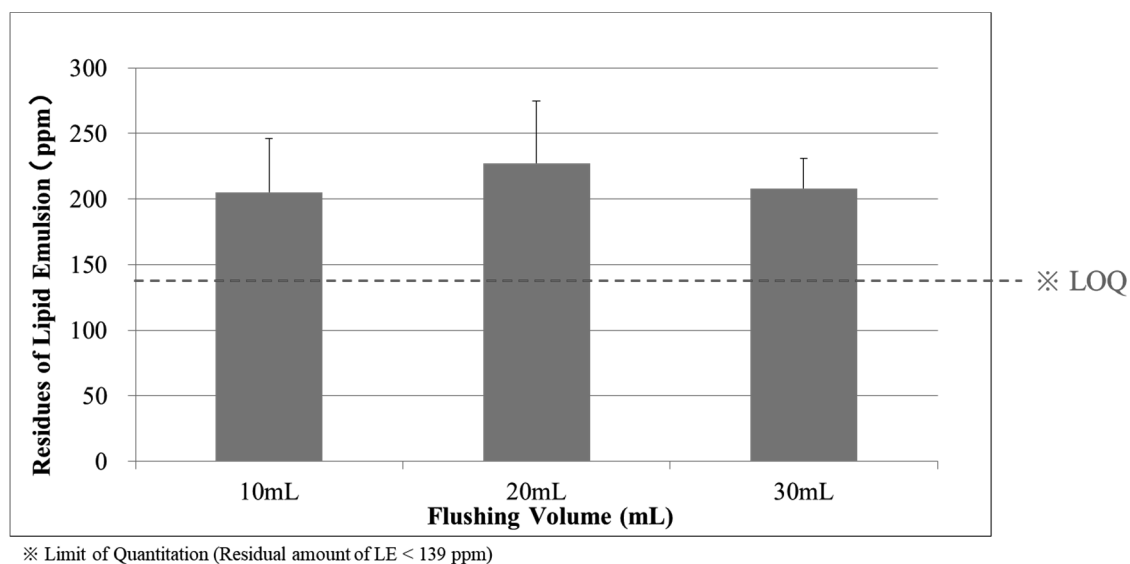


Figure 34 The residues of LE in the catheter after bolus flush at 10 mL/ 4 sec with a loop until each volume of saline.

### 三項 フラッシング後の残渣による微生物増殖

本章で検証した血管アクセスデバイスでは、微生物増殖による合併症が主である。そこで、一項で検証した効果的なフラッシングによる残渣の低減が微生物増殖の程度に及ぼす影響を検証した。フラッシング液に *P. aeruginosa* Xen 05 を分散してフラッシングし、24 時間培養後に測定した生物発光を Figure 35 に示す。脂肪乳剤が存在していない状態 (Only saline) では生物発光が観察されなかったが、脂肪乳剤をフラッシングしたカテーテルでは微生物増殖による生物発光が観察された。生物発光が検出される箇所は、フラッシング後に脂肪乳剤の残渣がみられる箇所と一致していた (Figure 35 A, 黄およびピンク矢印)。また、フラッシング後の脂肪乳剤の残存濃度とその後の微生物増殖による生物発光強度には正の相関がみられた (Figure 35 B)。

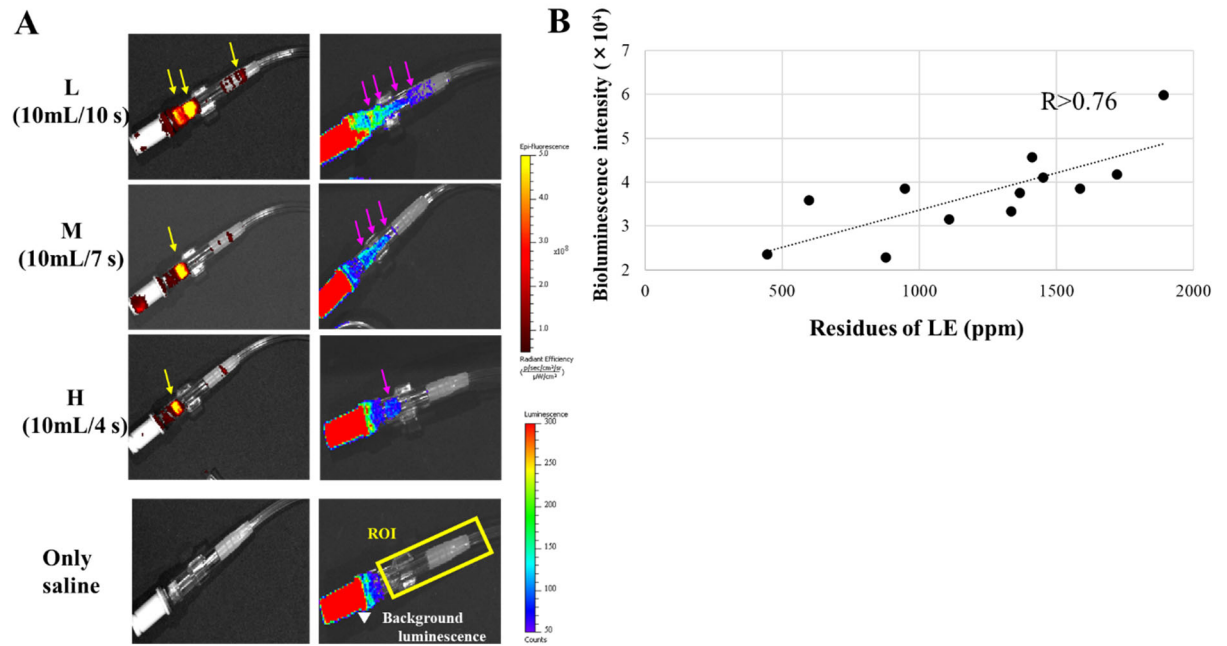


Figure 35 Representative fluorescence and bioluminescence images of CVC models after flushing. Left: Residual LE (indicated by yellow arrows) even after flushing at various speeds without intervals. Right: Bioluminescence images after flushing with *P. aeruginosa* Xen 05 (indicated by pink arrows) under the same flushing condition to left (A). Correlation between the average of fluorescence and bioluminescence intensities in the catheter after all respective flushing conditions in the present study (B).

#### 第四節 考察

本章では、CVC または延長チューブ付き末梢静脈カテーテルに満たした脂肪乳剤を対象に、効果的なフラッシング手技、フラッシング方法を検証した。CVC モデルにおいて、フラッシング後の脂肪乳剤の残渣は、チューブよりもコネクター部に分布していた。いずれのフラッシング手技も、フラッシング速度が早いほど残渣が減少しやすい傾向にあったが、この傾向はフラッシング中の停止時間が長くなるにつれて減少していた。そのため、パルシングフラッシュの有効性は認められなかった (Figure 30)。Royon らのグループは、血栓形成の原因となるフィブロネクチンやアルブミンを付着させたカテーテルの洗浄には、ボースフラッシュよりもパルシングフラッシュの方が効果的であると報告している<sup>27</sup>。Bode らの報告によると、パルシングフラッシュでは内壁表面の汚濁層の周囲でフラッシング液の流れが反転して大きなせん断力が生じ、汚濁層の除去が促進されるため、チューブ内壁の付着物に対して効果的であると述べている<sup>72</sup>。しかし、脂肪乳剤は脂質エマルジョンが均一に分散した製剤であり、カテーテル内壁とは異なって全体的に浮遊しているため、洗浄対象物によって効果的なフラッシング方法が異なる可能性が示唆された。

CVC モデルのチューブでは残渣がほとんど検出されなかったことから、本章で設定した最も遅いフラッシング速度 (10 mL/10 秒) でも、高い洗浄効果を発揮する乱流がチューブ内腔で発生したと考えられる。本章で用いたチューブの内径は、三章で用いた JY-NWP861F71 (内径 1.0mm) と同じ寸法であり、実施したフラッシング速度では乱流が生じていたと考えられることから、本試験結果に矛盾はなかった。一方で、コネクター部で残渣が検出された理由は、当該部位の特徴的な構造に起因する可能性がある。Figure 36 A に今回使用した CVC モデルおよび製造販売されている CVC のコネクター部の断面形状を示す。CVC モデルのコネクター部は、輸液ラインなどのデバイスの多様なオスコネクターに適合する汎用性が必要であるため、比較的広い内腔を有している。本章で用いた CVC モデル以外の製造販売されている CVC も同様の形状であった (Figure 36 A (1) 及び (2))。

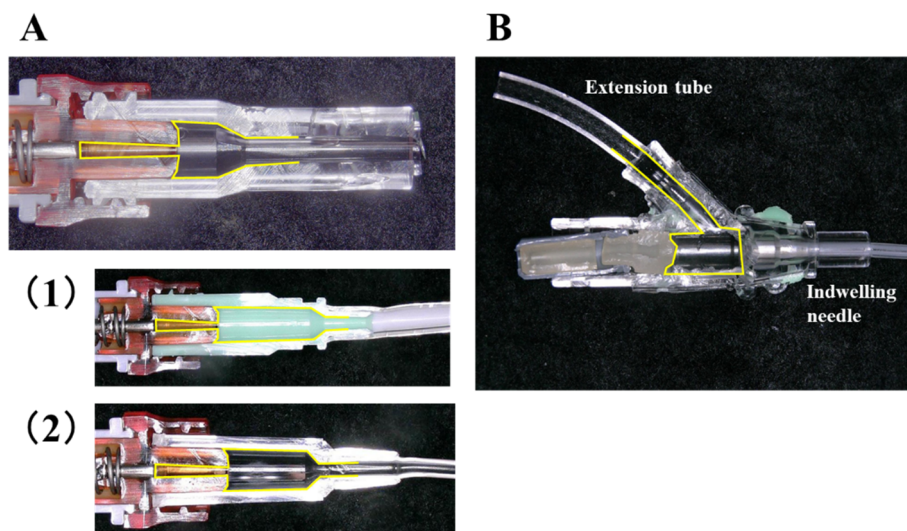


Figure 36 The cross-sectional shape where residual LE can be confirmed (area surrounded by yellow line) of CVC model after flushing (A). Shape of the connector part of a general CVC (1 and 2). The connection site between the extension line and peripheral venous catheter (B) used in the present study.

フラッシング液は閉鎖式コネクターの狭い管から CVC の広い空間に拡がるような流路となっているが、管内流路における急拡大 (sudden expansion) は流れの損失をもたらし、渦を形成して滞留することが既に示されている<sup>73</sup>。そのため、コネクタ部のデッドスペースに残渣が集中していたと推測される。また、このような管内流路における急拡大は第二章で検証したヒューバー針からチャンバーへ排出される機構と同様である。パルシングフラッシュは発生した乱流の連続性を阻害するため<sup>53</sup>、勢いよくボーラスフラッシュした方がパルシングフラッシュよりも脂肪乳剤の残渣を効果的に低減することができたと考えられる (Figure 37)。

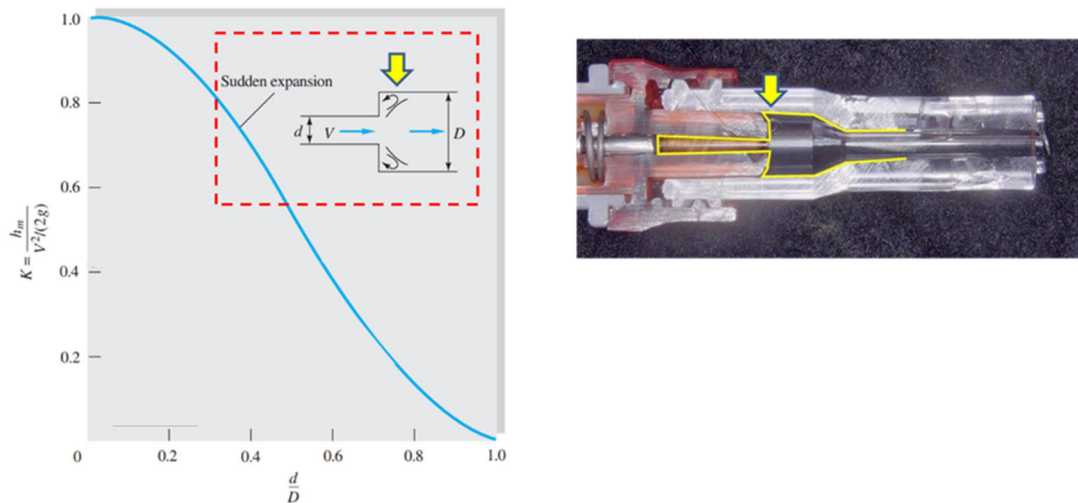


Figure 37 Sudden expansion near connector of CVCs causes losses. Left: Fluid behaviour in a circular tube with a difference in inner diameter (partly taken from Ref.73)  
Right: cross-section of CVC model.

本章で設定した 10 mL のフラッシング量は、臨床で一般的とされる量であるが、フラッシング量を 20 mL まで増やしても残存量に差はなく、コネクタ部の残渣を完全に除去することはできなかった (Figure 31)。つまり、CVC の構造によっては、どのようなフラッシングを行っても残渣が滞留するという限界を示唆しており、投与デバイスの設計要素 (コネクタやハブ閉鎖面の隙間、デッドスペースのあるセグメント化された流体経路など) は、感染のリスクを高める可能性があった<sup>74</sup>。したがって、カテーテルの残留物による合併症を低減するには、残渣が生じ難い設計の投与デバイスを使用することが望ましい。例えば TIVAD では、チャンバーが球形の場合に最も洗浄しやすいため<sup>29</sup>、投与デバイスに大きなデッドスペースがある場合でも、球形にすることで残渣が軽減されるはずである。これらの知見は、投与デバイス内の流路における急拡大のない、あるいは根本的にデッドスペースのない新しい投与デバイスの形状を検討する根拠となり得る。

延長チューブ付き末梢静脈針においては、フラッシング後の残渣が留置針近位の延長チューブ内に認められた。残渣の減少は、ボラスフラッシュで 10 mL/7 秒以上の速度でフラッシングすることでピークに達していた。一方、パルシングフラッシュではいずれの条件でもフラッシング速度の増加による残渣の低減はみられなかった。



Figure 36 B に、試験で用いたデバイスの留置針付近の断面形状を示した。延長チューブと留置針との接合部にはデッドスペースが存在する。このデッドスペースでは急激な膨張と急激な収縮の境界で圧力損失による渦（逆流）が発生し、抵抗となることがある<sup>75</sup>。このような状況下で、パルシング操作によりフラッシング液の注入が停止すると、逆流が延長チューブ側に拡散しやすくなることで、残渣が低減しにくくなると考えられる。また、カテーテル内の流体挙動が層流の場合に残渣が生じやすくなることから<sup>25</sup>、パルシング操作を加えることはフラッシング液が層流となる要因である可能性が高く、勢いよくボラスフラッシュすることが望ましいと考えられる。しかしながら、Piper らの報告によると、末梢静脈炎を誘発する血管壁の損傷を防ぐためには 10 mL/10 秒よりもゆっくりフラッシングすることが推奨されている<sup>76</sup>。したがって、本章で設定した 10 mL/4 秒または 10 mL/7 秒といったフラッシング速度を末梢静脈に留置されたカテーテルに適用する際には注意が必要であり、次に示すような手技を検討すべきである。末梢留置針に接続する延長チューブは、ドレッシングテープ等で体表に固定されており、そのままフラッシングするか、固定をほどいてフラッシングするかが選択される。本章の結果から、ループを形成した状態でフラッシングすることでゆっくりフラッシングした場合でも洗浄効率が向上し、さらにパルシングフラッシュのデメリットを解消できることを示している (Figure 33)。ループを有したチューブ内の流れは、ループによる遠心力と、ループ内側と外側の圧力分布の違いから発生する圧力勾配によって流れ方向とは異なるベクトルの 2 次的な力が流体に作用すると報告されている<sup>77</sup>。通常は流体とチューブ内壁との摩擦から、壁付近で流体の乱れが生じやすいが、ループ部分ではこの乱れがチューブ内の中心部に移行しやすく、チューブ内全体に強い乱れが生じやすい環境となる。つまり、延長チューブのループ部分では自然にフラッシング液が攪拌されやすい環境となっており、パルシングの有無やフラッシング速度にかかわらずチューブ内が均一に洗浄されやすくなっていると考えられる。延長チューブは、ループ状や S 字状で固定することがあるが、これらは一般的に静脈針の抜去防止を目的としており、フラッシングの洗浄効率向上を期待した手技ではない。そのため、本章で得られた結果は、ルート管理において、合併症のリスク低減が期待できる簡便で有益な情報である。



最後に、本章で検証した効果的なフラッシング条件の臨床的意義を確認するため、CRBSIの原因菌の一種で、脂肪乳剤中で容易に増殖する緑膿菌<sup>78,79</sup>をフラッシング後のカテーテル内に均一に分散し、培養後の微生物増殖を生物発光イメージングで測定した。その結果、フラッシング後の脂肪乳剤のわずかな残存量の違いが、その後の微生物増殖の程度に影響することが明らかとなった(Figure 35)。したがって、微生物汚染のリスク低減のためにも、効果的なフラッシングにより脂肪乳剤の残渣を可能な限り低減することが重要である。また、生物発光イメージングにより、フラッシング後の残渣がコネクター付近に残存して微生物の温床となることが示された(Figure 35)。カテーテルの接続に閉鎖式コネクターを用いた場合、CRBSIの発生率が低いことが報告されている<sup>80</sup>。しかし、一部では閉鎖式コネクターを使用した場合でもCRBSIの発生率が減少しないことも報告されており<sup>81</sup>、清潔操作不足に起因している可能性が指摘されている<sup>52</sup>。また、CVCにおいては、コネクターやハブなどの注入部位が原因となって感染が起こることが多いとも報告されている<sup>72</sup>。そのため、本章の結果は、コネクター周辺のデバイス表面の清潔操作を十分に行い、カテーテル注入部位からの微生物汚染に対する注意喚起を促す直接的な根拠になると考えられる。

## 第五節 小活

試験に用いたCVCおよび延長チューブ付き末梢留置針において、フラッシング後の脂肪乳剤の残渣は異なる位置で残存することが分かった。いずれのデバイスにおいても、勢いよくボラスフラッシュすることで残渣を効果的に低減できた。パルシングフラッシュの有効性は認められなかった。しかし、パルシングフラッシュは、カテーテル内壁の付着物を剥離する効果が高いと報告されていることから、必要に応じてパルシングフラッシュで付着物を剥離させた後、勢いよくボラスフラッシュする手順がカテーテル内の残留物を除去するために望ましい。ただし、末梢静脈では静脈炎のリスクからゆっくりフラッシングする必要がある。そこで、留置針に接続する延長チューブをループ状にすることで、ゆっくりフラッシュしても効果的に洗浄できることを見出した。

フラッシング後の脂肪乳剤の僅かな残存量の違いは微生物増殖の程度に影響するため、感染リスクの観点からも効果的なフラッシングをすることが望ましい。また、脂肪乳剤はコネクター部に残存しやすく、微生物の温床になることから、コネクター周辺の清潔操作が重要である。

## 総括

臨床における栄養管理は、疾患の治療効果の向上を図り、健康状態を維持するために、患者に応じた適切な栄養療法の選択が必要である。経静脈栄養において、脂質を含む脂肪乳剤は少なく、本邦で静注用脂肪乳剤として製造販売されている製剤はイントラリポス輸液のみである。しかしながら、脂肪乳剤は閉塞、菌類汚染や配合変化のリスクとなるため、投与後は適切にフラッシングするべきである。本研究では、臨床で脂肪乳剤が安全に使用されることを目的に、様々なデバイス、投与場面における効果的なフラッシング条件を検討し、各種研究を行うことで、有用な知見を得た。また、複数の先行研究から、フラッシングのみではカテーテル内の残渣を 100%排出することは困難であると報告されている。そこで著者は、フラッシング後の残渣を非破壊的に可視化し、残留機序を考察できる評価手法が望ましいと考え、新たに ICG を用いたリアルタイムイメージング法を提案した。

第一章では、ICG を混合した脂肪乳剤において、脂質エマルジョンに親和した ICG による蛍光発光を確認し、ICG 蛍光強度や安定性を評価した。その結果、イントラリポス輸液 20% に混合した ICG は、イントラリポス輸液の主成分である TG 自体を蛍光標識する特性は有していなかったが、脂質エマルジョンのリン脂質と素早く、かつ安定な結合を形成して蛍光標識していることが示唆された。したがって、ICG は、「脂肪乳剤の主構成物質である脂質エマルジョンを検出することで効果的なフラッシング条件を探索する」という本論文の目的に合致した蛍光物質であることを見出した。第二章では、TIVAD チャンバー内の脂肪乳剤の残渣評価法として、リアルタイムイメージングの有用性を検証した。その後、様々な条件でフラッシングした後の残渣を評価することで効果的なフラッシング条件や手技を探索した。リアルタイムイメージングは、TIVAD チャンバー内における、フラッシング後の脂肪乳剤の分布を高解像度で示し、微量な残渣も定量できる精度を示す有用な評価手法であることを見出した。TIVAD チャンバー内の脂肪乳剤は、パルシングフラッシュではなく、40 mL/min 以上の速度で勢いよくボラスフラッシュをすることが効果的であった。また、フラッシング量は 10 mL 以上が望ましかった。第三章では、臨床で多く実施されている脂肪乳剤の側管

投与時のフラッシング方法を探索した。結果として、脂肪乳剤を側管投与した際は、投与後直ちに 10 mL の生理食塩液でフラッシングし、その後 420 mL 以上のメイン輸液を滴下することで輸液ラインおよび血管アクセスデバイス内の脂肪乳剤の残存を最小限に低減できることが分かった。脂肪乳剤の投与後にメイン輸液を継続して滴下できない場合は、側注口以降の内径が細い輸液ラインを用いて脂肪乳剤を投与し、投与後直ちに 20 mL 以上の生理食塩液で勢いよくボースフラッシュすることが効果的であった。第四章では、第三章までで用いた TIVAD よりも一般的な血管アクセスデバイスである CVC および延長チューブ付き末梢留置針に脂肪乳剤を含む栄養輸液を充填し、様々な条件でボースフラッシュまたはパルシングフラッシュした後の残渣を比較した。さらに、フラッシング後の残渣がその後のカテーテル内の微生物増殖に及ぼす影響についても検証した。様々な条件でフラッシングした結果、いずれのカテーテルにおいても勢いよくボースフラッシュすることで脂肪乳剤の残渣を効果的に低減できることが明らかとなった。パルシングフラッシュの有効性は認められなかった。しかし、パルシングフラッシュは、カテーテル内壁の付着物を剥離する効果が高いことから、必要に応じてパルシングフラッシュで付着物を剥離させ、次に勢いよくボースフラッシュする手順がカテーテル内から残留物を除去するために望ましいと結論付けた。ただし、末梢静脈では静脈炎のリスクから勢いよくフラッシングすることは推奨できない。このような場合でも、留置針に接続する延長チューブをループ状にすることで、ゆっくりフラッシュしても効果的に洗浄できることを見出した。感染リスクを低減するためには、脂肪乳剤をより減らすフラッシング手技が望ましいだけでなく、コネクター部の残渣が微生物の温床となることから、コネクター周辺の清潔操作が重要であること明らかにした。さらに、デバイスの設計上の課題を示す知見が得られた。

以上、本研究によって得られた知見は、脂質エマルジョンの蛍光標識における極めて有用な情報であり、類似する研究の重要な基盤を提供した。また、様々なデバイスにおける脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を明確にすることで、より安全な脂肪乳剤の投与に貢献し、脂肪乳剤による治療効果の向上や患者の QOL 向上につながると思われる。

## 参考文献

- 1 日本静脈経腸栄養学会編集. 日本静脈経腸栄養ガイドライン第3版. 照林社, 東京. 2013: 2-137.
- 2 Mascioli EA, Lopes SM, Champagne C, Driscoll DF. Essential fatty acid deficiency and home total parenteral nutrition patients. *Nutrition*. 1996; 12: 245-9.
- 3 丸山 道生. 各種脂肪乳剤の特徴と代謝. 外科と代謝. 2017; 51(2): 63-72.
- 4 Carpentier YA, Dupont IE. Advances in intravenous lipid emulsions. *World J Surg*. 2000; 24(12): 1493-7.
- 5 小山 諭, 畠山 勝義. 静脈栄養管理の実際: PPN 製剤の使い方. ワンステップアップ静脈栄養. 医歯薬出版, 東京. 2010.
- 6 O'Neill J, Caldwell M, Meng H. Essential fatty acid deficiency in surgical patients. *Ann Surg*. 1977; 185: 535-42.
- 7 Holman RT, Johnson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*. 1982; 35(3):617-23.
- 8 Mascioli EA, Lopes SM, Champagne C, Driscoll DF. Essential fatty acid deficiency and home total parenteral nutrition patients. *Nutrition*. 1996; 12(4): 245-9.
- 9 Bjerve KS, Mostad IL, Thoresen L. Alpha-linolenic acid deficiency in patients on long-term gastric-tube feeding estimation of linolenic acid and long-chain unsaturated n-3 fatty acid requirement in man. *Am J Clin Nutr*. 1987; 45: 66-77.
- 10 瀧藤 克也. 脂肪乳剤の種類と現状. 日静脈経腸栄会誌. 2018; 33: 726-30.
- 11 塚本 哲也, 真島 吉也, 田代 重彦, ほか. 不飽和脂肪酸の臨床 静脈栄養におけるリノール酸最少投与量について. *JJPEN*. 1992; 14: 135-8.
- 12 入山 圭二. 中心静脈栄養施行時の脂肪乳剤投与の現状と問題点. 栄養-評価と治療. 2009; 26: 324-7.
- 13 小山 諭. 序論: 脂肪乳剤の特集について. 日本静脈経腸栄養学会雑誌. 2018; 33(2): 721-5.

- 14 Williams N, Wales S, Irving MH. Prolonged peripheral parenteral nutrition with an ultrafine cannula and low-osmolality feed. *Br J Surg*. 1996; 83(1): 114-6.
- 15 Kuwahara T, Kaneda S, Shimono K, Inoue Y. Effects of lipid emulsion and multivitamins on the growth of microorganisms in peripheral parenteral nutrition solutions. *Int J Med Sci*. 2013; 10: 1079-84.
- 16 Mershon J, Nogami W, Williams JM, Yoder C, Eitzen HE, Lemons JA. Bacterial/fungal growth in a combined parenteral nutrition solution. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1986; 10(5): 498-502.
- 17 Shiotani N, Numata K. Options available for the infusion of lipid emulsion in home parenteral nutrition (HPN): a questionnaire survey for hospitals in Japan where HPN is practice. *Nutrition*. 2006; 22: 361-6.
- 18 井上 善文. 脂肪乳剤ナビゲータ. フジメディカル出版, 東京. 2023.
- 19 Goossens GA. Flushing and Locking of Venous Catheters: Available Evidence and Evidence Deficit. *Nurs Res Pract*. 2015; 2015: 985686.
- 20 Gilbert M, Gallagher SC, Eads M, Elmore MF. Microbial growth patterns in a total parenteral nutrition formulation containing lipid emulsion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1986; 10(5): 494-7.
- 21 Bertoglio S, Rezzo R, Merlo FD, *et al*. Pre-filled normal saline syringes to reduce totally implantable venous access device-associated bloodstream infection: a single institution pilot study. *J Hosp Infect*. 2013; 84(1): 85-8.
- 22 Mathers D. Evidence-based practice: Improving outcomes for patients with a central venous access device. *JAVA*. 2011; 16(2): 64-72.
- 23 Keogh S, Flynn J, Marsh N, Higgins N, Davies K, Rickard CM. Nursing and midwifery practice for maintenance of vascular access device patency. A cross-sectional survey. *Int J Nurs Stud*. 2015; 52(11): 1678-85.
- 24 Infusion Nurses Society, Infusion nursing standards of practice, *J Infus Nurs*, 2011; 34(1): S1-S110.

- 25 Guiffant G, Durussel JJ, Merckx J, Flaud P, Vigier JP, Mousset P. Flushing of intravascular access devices (IVADs) - efficacy of pulsed and continuous infusions. *J Vasc Access*. 2012; 13(1): 75-8.
- 26 Ferroni A, Gaudin F, Guiffant G, *et al*. Pulsative flushing as a strategy to revert bacterial colonization of vascular access devices. *Med Devices (Auckl)*. 2014; 7: 379–83.
- 27 Royon L, Durussel JJ, Merckx J, Flaud P, Vigier JP, Guiffant G. The fouling and cleaning of venous catheters: a possible optimization of the process using intermittent flushing. *Chem Eng Res Des*. 2012; 90(6): 803–7.
- 28 Guiffant G, Durussel JJ, Flaud P, Royon L, Marcy PY, Merckx J. Power port contrast medium flushing and trapping: impact of temperature, an in vitro experimental study. *Med Devices (Auckl)*. 2013; 6: 133-40.
- 29 Dalton M, Pheil N, Lacy J, Dalton J. The port clearance test: why it is important to clinicians. *J Assoc Vasc Access*. 2014; 19(1): 42-6.
- 30 井上 善文, 増本 幸二, 栗山 とよ子, ほか. 脂肪乳剤の使用状況に関するアンケート調査結果, *Medical Nutritionist of PEN Leaders*, 2018, 2(2), 120-5.
- 31 Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 1159-71.
- 32 Belfrage P, Edgren B, Olivercrona T. The tissue distribution and metabolism in the rat of intravenously injected label fat emulsion. *Acta Physiol Scand*. 1964; 62: 344-56.
- 33 Li C, Tebo AG, Gautier A. Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7): 1473.
- 34 Food and Drug Administration (2013) Product Insert: Indocyanine Green (IC-Green™)  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2006/011525s0171b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/011525s0171b1.pdf)  
(accessed Jan 6, 2014).

- 35 Jiang K, Luo B, Hou Z, *et al.* Application of an indocyanine green surgical fluorescence imaging system in sentinel lymph node biopsy of acral malignant melanoma. *Ann Transl Med.* 2021; 9(18): 1456.
- 36 Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, *et al.* A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imaging.* 2012; 2012: 940585.
- 37 齊藤 民也, 小松 慶子, 森 茂, ほか. インドシアニングリーン色素と結合する血清蛋白分画の検討. 日眼会誌. 1996; 100 : 617-23.
- 38 Kraft JC, Ho RJ. Interactions of indocyanine green and lipid in enhancing near-infrared fluorescence properties: the basis for near-infrared imaging in vivo. *Biochemistry.* 2014; 53:1275-83.
- 39 Férézou J, Gulik A, Domingo N, *et al.* Intralipid 10%: physicochemical characterization. *Nutrition.* 2001; 17(11-12): 930-3.
- 40 Férézou J, Nguyen TL, Leray C, *et al.* Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1213(2): 149-58.
- 41 Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J Pharm Sci.* 2003; 92(10): 2090-7.
- 42 Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CP. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids.* 1986; 40(2-4): 127-44.
- 43 Pittiruti M, Hamilton H, Biffi R, MacFie J, Pertkiewicz M. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: central venous catheters (access, care, diagnosis and therapy of complications). *Clin Nutr.* 2009; 28: 365-77.
- 44 Staun M, Pironi L, Bozzetti F, *et al.* ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: home parenteral nutrition (HPN) in adult patients. *Clin Nutr.* 2009; 28: 467-79.
- 45 Walser EM. Venous access ports: indications, implantation technique, follow-up, and complications. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2012; 35(4): 751-64.
- 46 Royle TJ, Davies RE, Gannon MX. Totally implantable venous access devices - 20 years' experience of implantation in cystic fibrosis patients. *Ann R Coll Surg Engl.* 2008; 90(8): 679-84.



- 47 Flaatten H, Klem W. Catheter occlusion, in which way are lipid emulsions responsible? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1988; 12: 320-1.
- 48 Dalton M, Pheil N, Lacy J, Dalton J. Does sludge/debris exist in today's vascular access ports? *JAVA.* 2014; 19(1): 23–6.
- 49 Kerner JA Jr, Garcia-Careaga MG, Fisher AA, Poole RL. Treatment of catheter occlusion in pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006; 30: S73-81.
- 50 Wang R, Luo O, He L, Li JX, Zhang MG. Preservative-free 0.9% sodium chloride for flushing and locking peripheral intravenous access device: a prospective controlled trial. *J Evid Based Med.* 2012; 5(4): 205-8.
- 51 Currie LA. Limits for qualitative and quantitative determination—application to radiochemistry. *Anal Chem.* 1968; 40: 586–93
- 52 Messing B, Beliah M, Girard-Pipau F, Leleve D, Bernier JJ. Technical hazards of using nutritive mixtures in bags for cyclical intravenous nutrition: comparison with standard intravenous nutrition in 48 gastroenterological patients. *Gut.* 1982; 23(4): 297-303.
- 53 Ball CG, Fellouah H, Pollard A. The flow field in turbulent round free jets. *Prog Aerospace Sci.* 2012; 50: 1-26.
- 54 Pironi L, Boeykens K, Bozzetti F, *et al.* ESPEN guideline on home parenteral nutrition. *Clin Nutr.* 2020; 39(6): 1645-66.
- 55 岸 宗佑, 岡村 直耶, 野村 友祐, ほか. 脂肪乳剤を側管投与する場合に PICC 及び CV ポートが乳化粒子の粗大化に及ぼす影響の検討, 日本病院総合診療医学会雑誌. 2018; 14(5): 493-500.
- 56 Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Chauhan A, *et al.* Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(2):146-59.
- 57 Hadaway L. Technology of flushing vascular access devices. *J Infus Nurs.* 2006; 29(3): 137-45.

- 58 Adolph M, Heller AR, Koch T, *et al.* Working group for developing the guidelines for parenteral nutrition of The German Association for Nutritional Medicine. Lipid emulsions - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 6. *Ger Med Sci.* 2009; 18(7): Doc22.
- 59 Casey AL, Worthington T, Lambert PA, Quinn D, Faroqui MH, Elliott TSJ. *J Hosp Infect.* 2003; 54(4):288-93.
- 60 Casey AL, Worthington T, Lambert PA, Quinn D, Faroqui MH, Elliott TS. A randomized, prospective clinical trial to assess the potential infection risk associated with the PosiFlow needleless connector. *J Hosp Infect.* 2003; 54(4): 288-93.
- 61 Maragakis LL, Bradley KL, Song X, *et al.* Increased catheter-related bloodstream infection rates after the introduction of a new mechanical valve intravenous access port, *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 22:67-70.
- 62 Mitsuboshi S, Yamada H, Nagai K, Yamaguchi Y. Saline flush after administration of lipid emulsion reduces the risk of central line infections: A case-control study. *Canadian J Infect Control.* 2017; 32(1): 44-7.
- 63 Tager IB, Ginsberg MB, Ellis SE, *et al.* An epidemiologic study of the risks associated with peripheral intravenous catheters. *Am J Epidemiol.* 1983; 118(6): 839-51.
- 64 Taison B, Naomi P. Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections, *Infect Dis Clin North Am.* 2017; 31(3): 551-9.
- 65 Latia BC, Judit P, Patrick S, *et al.* Trends in the epidemiology of catheter-related bloodstream infections; towards a paradigm shift, Spain, 2007 to 2019. *Euro Surveill.* 2022; 27(19): 2100610.
- 66 Gorski LA, Hadaway L, Hagle ME, *et al.* Infusion therapy standards of practice 8th ed. *J Infus Nurs.* 2021; 44: S1–S224.

- 67 Hosseini SJ, Eidy F, Kianmehr M, *et al.* Comparing the Effects of Pulsatile and Continuous Flushing on Time and Type of Peripheral Intravenous Catheters Patency: A Randomized Clinical Trial. *J Caring Sci.* 2021; 10(2): 84-8.
- 68 Tong C, Peng X, Hu H, Wang Z, Zhou H. The effect of different flushing methods in a short peripheral catheter. *Acta Cir Bras.* 2019; 34(8): e201900804.
- 69 Wildgruber M, Lueg C, Borgmeyer S, *et al.* Polyurethane versus silicone catheters for central venous port devices implanted at the forearm. *Eur J Cancer.* 2016; 59: 113-24.
- 70 Thomsen HK, Kjeldsen K, Hansen JF. Thrombogenic properties of arterial catheters: a scanning electron microscopic examination of the surface structure. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1977; 3(4): 351-8.
- 71 Rice BW, Cable MD, Nelson MB. In vivo imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt.* 2001; 6(4): 432-40.
- 72 Bode K, Hooper RJ, Paterson WR, *et al.* Pulsed flow cleaning of whey protein fouling layers. *Heat Transfer Engineering.* 2007, 28 (3): 202-9.
- 73 White FM. Fluid mechanics. 8th ed. New York, NY:McGraw-Hill Science Engineering, 2015.
- 74 Moureau NL, Flynn J. Disinfection of Needleless Connector Hubs: Clinical Evidence Systematic Review. *Nurs Res Pract.* 2015; 2015: 796762.
- 75 Park JS, Jung HI. Multiorifice flow fractionation: continuous size-based separation of microspheres using a series of contraction/expansion microchannels. *Anal Chem.* 2009; 81(20): 8280-8.
- 76 Piper R, Carr PJ, Kelsey LJ, Bulmer AC, Keogh S, Doyle BJ. The mechanistic causes of peripheral intravenous catheter failure based on a parametric computational study. *Sci Rep.* 2018; 8: 3441.
- 77 須藤 浩三,高見 敏弘. 円形断面をした 180°ベンド内の乱流. ターボ機械. 1992; 20(12): 755-60.

- 78 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in U.S. hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 309–17.
- 79 Gilbert M, Gallagher SC, Eads M, Elmore MF. Microbial growth patterns in a total parenteral nutrition formulation containing lipid emulsion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1986; 10(5): 494-7.
- 80 Niël-Weise BS, Daha TJ, van den Broek PJ. Is there evidence for recommending needleless closed catheter access systems in guidelines? A systematic review of randomized controlled trials. *J Hosp Infect*. 2006; 62(4): 406-13.
- 81 Salgado CD, Chinnes L, Paczesny TH, Cantey JR. Increased rate of catheter-related bloodstream infection associated with use of a needleless mechanical valve device at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 28(6): 684-8.

## 発表論文

- 1 **Okamura N**, Yamato T, Yamaoka I. Evaluation of the amount of residual lipid emulsion in chambers of flushed totally implantable venous access devices using fluorescence imaging. *Eur J Clin Nutr.* 2019; 73(7): 1084-7.
- 2 **Okamura N**, Yamato T, Yamaoka I, Doi K, Koyama Y. How to perform appropriate flushing after lipid emulsion administration using totally implantable venous access devices in long-term total parenteral nutrition and home parenteral nutrition. *Clin Nutr ESPEN.* 2021; 41: 287-92.
- 3 **Okamura N**, Yamaoka I. A comparison of the effects of pulsatile and bolus flushing methods on lipid emulsion residues that lead to bacterial growth in intravenous catheters. *J Vasc Access.* 2023: Epub ahead of print.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究デザインの構築から論文執筆まで、当初から多くの御支援、御鞭撻を賜りました、株式会社大塚製薬工場 メディカルフーズ研究所 山岡一平 所長に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、研究を推進する機会を与えていただき、進展するよう多方面でお取り計らいいただいたうえ、研究の発展に繋がる多大な御助言を賜りました株式会社大塚製薬工場 OS-1事業部 岩切洋 取締役に深く感謝申し上げます。

学位論文審査において、貴重な御指導と御助言をいただきました、徳島文理大学薬学部 山本博文教授、同 四宮一昭教授、角大悟教授、そして徳島大学病院薬剤部長 石澤啓介教授に対して心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、臨床の立場からの的確な御助言を賜りました、新潟大学大学院保健学研究科 小山諭 教授に深く感謝申し上げます。

ディスカッションを通じて様々な知見を御教授いただくとともに、多忙な業務を抱える中で御理解いただきました、株式会社大塚製薬工場 輸液情報センター 松田憲治センター長、大和孝江 元センター長に深く感謝申し上げます。

本研究の基盤となる蛍光イメージング、生物発光イメージングの実験を御指導していただいた、株式会社大塚製薬工場 メディカルフーズ研究所 香川知博 博士に深く感謝申し上げます。

最後に、妻 茜音の理解と支援、息子 奏助の笑顔、両親・義父母等多くの方々の支えにより、拙論を成し遂げることができたことを申し添え、感謝の気持ちを述べたいと思います。