

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2023

課題番号：16K11411

研究課題名(和文) 硫化水素の中樞神経系中毒機序と脳保護作用の解明

研究課題名(英文) Synaptic intoxicant and neuroprotective effects of hydrogen sulfide

研究代表者

成松 英智 (Narimatsu, Eichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70295343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では1次性(虚血性)および2次性(グルタミン酸)脳損傷モデルに対する硫化物イオンの保護効果を検証した。細胞外電位同時多点記録法(MEA)を用いて、海馬スライスCA1のfEPSP(樹状突起上EPSPを反映)とpopulation spike(神経細胞体上活動電位を反映)を同時記録し、シナプス伝達の指標とした。本研究は、1) Na₂Sの可逆的シナプス伝達抑制作用は高濃度では不可逆的となること、2) 両脳損傷モデルのシナプス伝達障害に対し可逆的濃度のNa₂Sは保護効果を持つこと、3) この効果は前投与および後投与では有効だが、同時投与では逆に障害を増悪させること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、硫化物イオンが1次性および2次性中枢神経系障害に対し限定的条件下においてそれぞれ保護的あるいは増悪的に影響するという成果を得た。この保護的影響は障害前からの予防投与および障害後投与時に限定的であり、同時投与では逆に障害を増悪させた。この硫化物イオンによる中枢神経系保護の投与時期依存性の明確化は、硫化物イオンを用いた薬理的脳保護の研究および臨床応用を進めるにあたり重要な情報であり、学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated neuroprotective effects of hydrogen sulfide on ischemic- or excessive glutamate-induced depressions of central (hippocampal) excitatory synaptic transmissions in vitro. From the CA1 in rat hippocampal slices, orthodromically elicited population spikes (PSs) and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) at 0.1 Hz were simultaneously recorded. Hydrogen sulfide-induced synaptic depression was reversible, however, being irreversible at higher concentration. Preceding and following applications of hydrogen sulfide at lower (reversible) concentrations protects ischemic or excessive glutamate-induced synaptic depressions, however, simultaneous application of hydrogen sulfide rather deteriorates these depressions. These results indicate that hydrogen sulfide has both protective and deteriorating effects on the primary and secondary brain damages, which depend on phase of the application of hydrogen sulfide.

研究分野：救急医学 集中治療学 神経科学

キーワード：hippocampus synaptic transmission electrophysiology EPSP hydrogen sulfide neuroprotectio
n

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

硫化水素の中樞神経系中毒機序と脳保護作用の解明

基盤研究(C)(一般), 16K11141

研究代表者 札幌医科大学医学部 救急医学講座 成松 英智
研究分担者 札幌医科大学医学部 救急医学講座 沢本 圭悟
札幌医科大学医学部 神経科学講座 石黒 雅敬
札幌医科大学医学部 麻酔科学講座 高橋 和伸
札幌医科大学医学部 麻酔科学講座 高田 幸昌

1. 研究開始当初の背景

硫化水素は意識障害や呼吸・循環抑制を始めとした広範な臓器機能不全を引き起こす中毒物質であり、産業事故、自然災害、自殺企図、等の面で社会問題化している。一方で硫化水素投与による個体、臓器、組織レベルの保護的影響、すなわちミトコンドリア保護+

9, 等を機序とする臓器・組織保護作用および虚血再灌流障害抑制作用¹⁻³も報告され、一部臨床試験も実施されているが⁴、未だ広い臨床応用には至っていない。

硫化水素はミトコンドリアのチトクローム c オキシダーゼ抑制により、ATP 産生の抑制抑制とともに細胞障害性活性酸素産生も抑制する⁵。このため、生理学的濃度以上の硫化水素はほぼ全ての臓器・組織の生理機能に影響するが、特に中枢神経系における硫化水素投与時の神経中毒機序および神経保護作用の詳細には未解明な点が多かった。またその背景にある硫化水素によるシナプス伝達抑制の機序にも未解明点が多いが、それを直接評価した電気生理学的研究は未だ少数である⁶。

硫化水素は低濃度域(生理的濃度)では NMDA 受容体活性化、細胞外 ATP 濃度上昇、等の機序によりシナプス伝達を増強・修飾するセカンドメッセンジャーである⁷⁻⁸。一方、高濃度域(中毒濃度)では硫化水素はシナプス伝達を抑制するが、その機序や可逆性の詳細は未解明である。これらのシナプス機序が明確化すれば硫化水素の臨床応用や硫化水素中毒の病態解明が進み、治療法・解毒薬の開発や予後予測にも資する情報となると考えた。

2. 研究の目的

本研究の主目的は硫化水素の中樞神経系毒性と脳保護作用の明確化である。本研究の作業仮説は、「硫化水素(溶解後に生成される硫化物イオン)は、神経伝達抑制作用を持つと同時に中枢神経系障害に対する保護作用を持つ」である。我々は、硫化物イオンが正常シナプス伝達および 1 次性(虚血)脳損傷および 2 次性(グルタミン酸)脳損傷に及ぼす影響を、海馬スライス標本を用いた電気生理学的技法で検証した。

3. 研究の方法

イソフルラン麻酔下ラットから迅速摘出した脳組織から海馬スライスを作製し、人工髄液(30)を持続灌流した記録用液槽内にスライスに移した。MEA (multi electrode alley) system を用いて海馬スライス CA3-Schaffer collateral 電気刺激により誘発した CA1 細胞外電位(field EPSP, 以下 fEPSP および population spike, 以下 PS)を同時記録した。CA1 の fEPSP および population spike は、それぞれ樹状突起上 EPSP および神経細胞体上活動電位を反映する。記録電位の波形解析にはコンピュータ波形解析プログラム(LabChart)を用いた。統計には分散分析を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

実験モデルは、各試薬を灌流人工髄液に溶解して投与することで再現した。

- ・1 次性脳損傷(虚血)モデル:無酸素人工髄液 10 分間灌流。
- ・2 次性脳損傷(グルタミン酸脳損傷)モデル:グルタミン酸(10mM)溶解人工髄液を 10 分間灌流。

・硫化水素投与:硫化ナトリウム(Na_2S)溶解人工髄液を灌流(個体レベルの吸入時を再現)。

4. 研究の成果

(1) Na_2S 単独作用

fEPSP および PS は $100 \mu\text{M}$ では無変化であったが, $300 \mu\text{M}$ および $1000 \mu\text{M}$ では強力に抑制された。その後の washout により $300 \mu\text{M}$ では fEPSP および PS は完全回復を示したが, $1000 \mu\text{M}$ での回復は小さかった。

(2) 1 次性脳損傷(虚血モデル)

虚血介入によりほぼ完全に抑制された fEPSP および PS は, それに続く 40 分間の washout により部分回復した。

(3) 2 次性脳損傷(グルタミン酸脳損傷モデル)

グルタミン酸投与介入により完全抑制された fEPSP および PS は, それに続く 40 分間の washout により部分回復した。

(4) Na_2S 前投与群

Na_2S ($100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$) を 1・2 次性脳損傷モデル介入前 10 分間と介入中にも 10 分間投与した。 Na_2S はモデル介入の抑制的影響を変化させなかったが, それに続く washout による部分回復を改善させた。

(5) Na_2S 同時投与群

Na_2S ($100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$) を 1・2 次性脳損傷モデル介入中に 10 分間同時投与した。 Na_2S はモデル介入の抑制的影響を変化させず, それに続く washout による部分回復を逆に増悪させた。

(6) Na_2S 後投与群

Na_2S ($100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$) を 1・2 次性脳損傷モデル介入直後から 10 分間投与した。 Na_2S はモデル介入の抑制的影響を変化させなかったが, それに続く washout による部分回復を改善させた。

(7) これら全ての成績において, fEPSP および PS は並行して変化し, これらの乖離は見られなかった。

以上, 本研究は, 低濃度では可逆的であった Na_2S のシナプス伝達抑制作用は高濃度では不可逆的となること, 虚血(1 次性)およびグルタミン酸(2 次性)脳損傷モデルのシナプス伝達障害に対し, 単独では無作用濃度 ($100 \mu\text{M}$) および可逆的抑制濃度 ($300 \mu\text{M}$) の Na_2S は保護効果を持つこと, この保護効果は Na_2S 前投与および後投与では有効だが, 同時投与では逆に障害を増悪させること, を明らかにした。

Na_2S 単独によるシナプス伝達抑制は低濃度では可逆性だったが高濃度では不可逆性であった。この濃度依存性から, 重症硫化水素中毒における遷延性(不可逆的)意識障害の病態⁹⁾を説明できる可能性がある。

Na_2S は虚血(1 次性)およびグルタミン酸(2 次性)脳損傷によるシナプス伝達障害に対して保護効果を示した。ただしその効果はシナプス伝達障害の時相から見て前 + 同時投与および後投与の場合に限定的であり, 同時投与では逆にシナプス伝達障害を増悪させた。病態進行期の Na_2S 投与は, 活性酸素産生抑制よりも ATP 産生抑制の影響が大きく発現して病態を悪化させている可能性がある。

この中枢神経系保護作用の投与時期依存性の明確化は, 今後の硫化物イオンを用いた薬理的脳保護の研究および臨床応用を更に進めるにあたり重要な情報である。本研究の成績は脳保護目的の Na_2S 投与時期は中枢神経系障害病態の進行期を避ける必要があることを示唆するが, 実際の脳障害時の個体内の病態進行度は脳内局所により同一ではなく混在状態であるため, Na_2S 投与開始の判断には困難が伴う可能性がある。病態を事前想定した Na_2S の予防投与については, 安全性と有効性の両者が期待できると考える。また無作用濃度や可逆的抑制濃度の Na_2S による脳保護効果は, 比較的安全性の高い低濃度で治療濃度が得られる可能性を示すものである。

近年, 硫化水素による薬理的臓器保護に関する研究については, 中枢神経系に関するものよりも心臓や腎臓に関する報告が多い傾向にある。しかしながら本研究で得られた成果は, 硫化水素中毒の神経学的機序の解明と治療への応用, および硫化物イオンを用いた薬理的脳保護の研究および臨床応用を更に進めるにあたり重要

な情報であり、今後の学術的・社会的意義は大きいものと考えらる。

参考文献

- 1) Whiteman M, Jeffrey S, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? J. Neurochem. 2004;90:765-768.
- 2) Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. FASEB J. 2004;18:1165-1167.
- 3) Sodha NR, Clements RT, Jeng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Sellke FW. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. Eur. J. Cardio-thoracic Surg. 2008;33:906-913.
- 4) Zhang JY, Ding YP, Wang Z, Kong Y, Gao R, Chen G. Hydrogen sulfide therapy in brain diseases: from bench to bedside. Med Gas Res. 2017. 30;7:113-119.
- 5) Yang G, An SS, Ji Y, Zhang W, Pei Y. Hydrogen sulfide signaling in oxidative stress and aging development. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:357824.
- 6) Jabe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J. Neurosci. 1996;16:1066-1071
- 7) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-376.
- 8) Yang Q, Yim APC, He GW. The significance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human circulation. Curr. Vasc. Pharmacol. 2007;5:85-92.
- 9) Haouzi P, Tsonobe T, Judenherc-Haouzi A. Hydrogen sulfide intoxication induced brain injury and methylene blue. Neurobiol Dis. 2020;133:104474.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura K, Narimatsu E, Oke Y, Oku Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 The lesion site of organophosphorus-induced central apnea and the effects of antidotes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-47745-x.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kakizaki R, Narimatsu E, Kasai T, Nomura K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Sepsis-induced modulation of long-term potentiation induced by theta burst stimulation in the rat hippocampus.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1296391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1296391.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 井上 弘行, 原田 敬介, 成松 英智	4. 巻 37
2. 論文標題 低体温による腓傷害のメカニズム解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 193-197
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 有
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 -

1. 著者名 井上 弘行, 上村 修二, 宮田 圭, 葛西 毅彦, 武山 佳洋, 成松 英智	4. 巻 28
2. 論文標題 長期的な高圧酸素療法が社会復帰に奏効したと思われる間歇型一酸化炭素中毒の1例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本救急医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 327-332
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 有
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 -

1. 著者名 Bunya N, Ohnishi H, Kasai T, Katayama Y, Kakizaki R, Nara S, Ijuin S, Inoue A, Hifumi T, Sakamoto T, Kuroda Y, Narimatsu E;	4. 巻 52(4)
2. 論文標題 Prognostic Significance of Signs of Life in Out-of-Hospital Cardiac Arrest Patients Undergoing Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Crit Care Med.	6. 最初と最後の頁 542-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.00000000000006116.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Narimatsu E, Kakizaki R, Nomura K, Sawamoto K, Takahashi K, Uemura S, Ishiguro M.	4. 巻 1789
2. 論文標題 Dexmedetomidine improves excessive extracellular glutamate-induced synaptic depression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 147949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2022.147949.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Okamoto N, Bunya N, Kakizaki R, Nishikawa R, Nagano N, Kokubu N, Narimatsu E, Nara S.	4. 巻 60
2. 論文標題 Cases of prolonged cardiac arrest with preserved gasping successfully resuscitated with ECPR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am. J. Emerg. Med.	6. 最初と最後の頁 227.e1-227.e3.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajem.2022.07.019.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kazuhito Nomura, Eichi Narimatsu, Hiroyuki Inoue, Ryoko Kyan, Keigo Sawamoto, Shuji Uemura, Ryuichiro Kakizaki, Keisuke Harada	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Mechanism of central hypopnea induced by organic phosphorus poisoning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73003-5.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hiroyuki Inoue, Keisuke Harada, Eichi Narimatsu, Shuji Uemura, Wakiko Aisaka, Naofumi Bunya, Kazuhito Nomura, Yoichi Katayama	4. 巻 50(2)
2. 論文標題 Pathophysiologic Mechanisms of Hypothermia-Induced Pancreatic Injury in a Rat Model of Body Surface Cooling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 235-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001738.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Inoue H, Uemura S, Harada K, Mizuno H, Bunya N, Nomura K, Kakizaki R, Narimatsu E.	4. 巻 37
2. 論文標題 Risk factors for acute pancreatitis in patients with accidental hypothermia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Emerg Med	6. 最初と最後の頁 189-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajem.2018.05.008	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村和史, 成松英智, 尾家慶彦, 越久仁敬
2. 発表標題 有機リン系毒物による中枢性呼吸停止の機序について
3. 学会等名 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村和史, 尾家慶彦, 越久仁敬, 成松英智
2. 発表標題 有機リン系毒物による中枢性呼吸停止に対する解毒薬の効果について
3. 学会等名 日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村 和史, 成松 英智, 井上 弘行, 上村 修司, 宮田 圭, 原田 敬介
2. 発表標題 二次性脳幹損傷モデルの新規開発およびグルタミン酸受容体拮抗薬の効果について
3. 学会等名 日本救急医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田 圭, 成松 英智
2. 発表標題 心原性心停止後患者における急性期脳波モニタリング所見と神経学的転帰との関連
3. 学会等名 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村 和史, 成松 英智, 沢本 圭吾, 喜屋武 玲子, 井上 弘行, 上村 修二, 原田 敬介
2. 発表標題 有機リン系アセチルコリンエステラーゼ阻害薬による中枢性呼吸抑制および解毒薬の効果について
3. 学会等名 日本救急医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村 和史, 上村 修二, 成松 英智
2. 発表標題 有機リン系コリンエステラーゼ阻害薬による中枢性呼吸抑制の病態解明
3. 学会等名 日本集中治療医学会雑誌
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 弘行, 原田 敬介, 文屋 尚史, 上村 修二, 成松 英智
2. 発表標題 体表冷却ラットモデルを用いた低体温に起因する腓傷害発現の病態解明
3. 学会等名 日本救急医学会雑誌
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成松 英智
2. 発表標題 救急医の新たなアカデミックキャリア 救急医のキャリアとしての実験研究者
3. 学会等名 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 弘行
2. 発表標題 体表冷却ラットモデルを用いた低体温に起因する腓傷害発現の病態解明
3. 学会等名 日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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	沢本 圭悟 (Sawamoto Keigo) (10597529)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石黒 雅敬 (Ishiguro Masanori) (30404586)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	高橋 和伸 (Takahasi Kazunobu) (40530605)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	削除：20237年3月10日
研究分担者	高田 幸昌 (Takada Yukimasa) (70530608)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	削除：2017年3月21日

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