

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11430

研究課題名(和文)水素豊富生理食塩水の腹腔内投与による術後イレウスの予防

研究課題名(英文)Prevention of surgical ileus with intraperitoneal administration of hydrogen-rich saline

研究代表者

中尾 篤典 (NAKAO, ATSUNORI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40648169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：雄性C57BL/6を使用し、腸管全体を綿棒で軽くこする操作(SM)を行い、術後腸管麻痺モデルを作成し水素水をSM直後に1.0mLを腹腔内投与し閉腹した。SMにより腸管輸送能は低下し、筋層への好中球浸潤及びNO産生は増加した。マクロファージの腹腔への遊走も増加した。また、6時間後に測定したRT-PCRでは炎症性サイトカインの発現率は上昇を示した。一方、SM直後に水素水を腹腔内投与することにより、これらの反応は有意に改善を示した。水素水投与を行うと優位に増加していた好中球浸潤及び腹腔内へのマクロファージの遊走は抑制される。そのためNO産生は抑制され、消化管運動低下を予防すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後イレウスは重要な術後合併症であり、入院期間の延長と医療費の増加につながり、臨床上的大きな問題である。術後イレウスの患者は、経管栄養がすすまず、また嘔吐に続発する誤嚥性肺炎の合併など治療に難渋することをしばしば経験し、現行の治療の限界を感じてきた。水素を水溶液として用いることで、水素の起爆性の問題がクリアでき医療の現場では受け入れられやすい。また、開腹手術では生理食塩水で腹腔内を洗浄する操作も日常的に行われるため、開腹手術のストラテジーを大きく変える必要がなく、臨床応用が容易である。本方法の有効性が実証されれば、医療経済的観点からも意義が大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Ileus was induced via surgical manipulation (SM) of male C57BL/6 mice. After SM, the peritoneal cavity was filled with 1.0 mL of either physiological saline or hydrogen-saturated physiological saline. SM resulted in a marked delay in intestinal transit associated with proinflammatory cytokine expression compared with sham controls. Bowel dysmotility induced by SM was attenuated by intraabdominal administration of hydrogen-saturated saline. Hydrogen-saline significantly reduced the upregulation of mRNAs of inflammatory markers. SM was associated with extensive leukocyte infiltration 24 hrs after SM when treated with saline; however, this extravasation was significantly decreased when hydrogen-saline was i.p. administered. While NO production increased after SM, hydrogen significantly reduced NO levels in organ culture six hours after SM.

A single i.p. dose of hydrogen-saturated physiological saline ameliorates postoperative ileus by inhibiting the inflammatory response and NO production.

研究分野：臓器移植、救命救急医学

キーワード：水素 イレウス 腹腔内投与

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜炎などの開腹手術後には、術後イレウス(postoperative ileus: POI)と称される腸管麻痺がおり、経腸栄養の開始の遅れや、腸管での細菌叢の乱れからくる敗血症を併発することがある。POIの原因は全身麻酔に用いる薬剤の影響、手術侵襲による全身の炎症、腸管の空気への暴露、手術操作による腸管の機械的刺激(腸管の牽引、圧迫、切断、縫合)など様々な因子があるが、主に腸管運動に関係する腸管壁の神経組織を障害と考えられている。POIは重要な術後合併症であり、入院期間の延長と医療費の増加につながり、臨床上的大きな問題である。POIの予防や治療は様々報告されてきたが、いまのところ確立した有効な治療法、予防法はない。2007年に日本医科大学のグループにより、水素分子が脳虚血再灌流障害に対し治療効果があることが報告され、水素がもつ抗酸化作用が注目されるようになった(Nat Med 13:688, 2007)。我々の研究グループは、平成25年度の基盤研究Cで申請した「水素吸入による出血性ショックに伴う肺障害の抑制」をはじめ、フリーラジカル産生に伴う様々な病態に対し水素吸入が有効であったとする報告を行ってきた(Surgery 158: 399, 2015)。同様に、水素が豊富に溶けた溶液を用いての研究も、基礎・臨床の両面で行っており、国際的にも認識され継続して一貫した水素医学に関する研究を行ってきた。水素ガスは4%以下であれば可燃性がなく、気体として安全に吸入させることができる。一方、水素の起爆性は、いくら厳重に管理するとはいえ、電気メスの火花が散る可能性がある手術室では躊躇される。敗血症やショックの重症患者では、カテコールアミンなどの循環作動薬や、鎮静剤・鎮痛剤の影響もあり、腸管運動障害がおきやすい環境にある。腸管運動不全の患者は、経管栄養が進まず、また嘔吐に続発する誤嚥性肺炎の合併など治療に難渋することをしばしば経験し、現行の治療の限界を感じてきた。これらの患者はほとんどが気管内挿管、人工呼吸管理を行われており、水素吸入治療は比較的臨床応用がしやすいであろうが、水素を水溶液として用いるほうが水素の起爆性の問題がクリアでき医療の現場では受け入れられやすい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、治療的医学ガスである水素を溶解させた生理食塩水(水素豊富生理食塩水: Hydrogen-rich saline、以下 HRS)を腹腔内投与により、術後イレウスが予防できるか、もし効果を示すのであればそのメカニズムは何かを、小動物を用いて解明することである。

### 3. 研究の方法

#### <マウス POI モデル>

雄性 C57BL/6 マウスまたは SD ラットを用い、実験を行った。マウスにイソフルレン吸入麻酔を行い、開腹し綿棒で腸管全域を傷がつかないように腸を擦る操作(surgical manipulation; 以下 SM)を施行し、術後腸管麻痺モデルとした。Sham コントロールは、SMを行わず開腹のみとした。SMのあと閉腹前に HRS または水素を含まない生理食塩水を 1.5ML 腹腔内投与した。実験群は以下の4群とした。Group1: Sham+生理食塩水(ShamH<sub>2</sub>(-))、Group2: Sham+HRS(Sham H<sub>2</sub>(+))、Group3: SM+生理食塩水(SM H<sub>2</sub>(-))、Group4: SM+HRS(SM H<sub>2</sub>(+))

#### <HRS 腹腔内投与の水素濃度の確認>

HRSの有効水素濃度を確認した。HRSは市販の水素水7.0(エコモインターナショナル)を使い作成した。一方弁付きの試験管内に水素発生剤を入れ、生理食塩水の入った耐圧式容器内に入れ、攪拌することにより水素水を作成した。作成直後から24時間後まで経時的に水素濃度を測定した。

#### <効果判定>

腸管輸送能の評価、筋層浸潤好中球の評価、炎症に関係する mRNA の解析、および筋層の NO 産生定量で行った。腸管輸送能は各群に SM 施行 22.5 時間後に蛍光デキストランをゾンデで胃内に投与し、投与後 90 分後に安楽死させた。胃から大腸までを取り出し 14 の区域(胃、小腸は等間隔で 10 分割、結腸 3 分割)にわけ、それぞれを 1 mL の精製水に浮遊させ、遠心分離にて腸管内容物を沈殿させ、上清に含まれる蛍光色素の吸光度を計測した。筋層浸潤好中球の評価は、各群 SM 施行後 24 時間において安楽死せしめ、腸管を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、顕微鏡下にて筋層を剥離し、Hunker-Yeats 試薬を用いてミエロペルオキシダーゼ染色を行い、好中球数浸潤を確認した。mRNA の定量 SM 施行後 6 時間における筋層の mRNA を用い、炎症性サイトカインとして IL-6、抗炎症性サイトカインとして IL-10、NO 発現に関与する iNOS、好中球接着に関与する ICAM-1 を測定した。筋層の NO 産生は剥離した筋層の NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 量を ELISA により定量した。

<統計学的解析> 各群 n=3 のデータについては ANOVA による検定で有意差があったものについて Fisher least significant difference test を行い、p<0.05 を有意とした。

### 4. 研究成果

#### <HRS 最適濃度についての検討>

作成直後から経時的に水素濃度を測定した結果、作成直後では 7 ppm 程度の濃度が 60 min で約 3 ppm 程度となり、200 min 前後で 1.0-2.0 ppm となった。24 時間後にも 1.0-2.0 ppm 程度の

水準を保っていた。通常大気中の水素飽和度は 1.57 ppm であり、本方法で作成した HRS はほぼ飽和の状態 で 24 時間維持されていることが確認できた。従って、腹腔内投与から 24 時間はほぼ飽和状態の水素濃度である 1.0-2.0 ppm を維持し、効果を発揮したと考えた。

< 経口胃内投与後のデキストランの腸内分布 >

SM 施行後 22.5 時間で投与したデキストランが、その 90 分後 (SM 施行後 24 時間後) の時点でどれだけ腸管に分布しているかを検討した (図 1)。Sham H<sub>2</sub>(-)群および Sham H<sub>2</sub>(+)群ではデキストランは盲腸がピークとなっており、HRS の投与のみでは腸管運動に変化は認められなかった。しかし、SM H<sub>2</sub>(-)群ではピークが空腸中央部であり、腸管運動が不全となっていることが確認できた。しかし、HRS を投与した SM H<sub>2</sub>(+)群においてはピークが盲腸に戻っており、SM により不全となった腸管運動を HRS 投与が明らかに改善していた。また、ラットを用いたモデルにおいても同様の結果が得られ、ラットにおいても HRS 投与は SM による腸管運動不全を改善していることを確認した。

< 筋層内の炎症性メディエーター mRNA 発現 >

図 1 の結果より、SM により腸管筋層は炎症刺激を受け、HRS はその炎症刺激を抑制していると考えた。そこで、SM 刺激 6 時間後の筋層の炎症関連因子の mRNA を測定した (図 2) と、炎症性サイトカインである IL-6、誘導性 NO 産生酵素である iNOS、好中球接着因子である ICAM-1 は SM 刺激により SM H<sub>2</sub>(-)群で有意に上昇し、その上昇は HRS 投与により SM H<sub>2</sub>(+)群で有意に減少した。また、抗炎症性サイトカインである IL-10 は有意差は認められなかったが、SM により上昇した IL-10 を HRS は減少させる傾向がみとめられ、これは HRS 投与により炎症が抑制されたため、抗炎症性サイトカインの放出が抑えられている可能性があると考えた。また、ラットにおいても IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、好中球遊走に関連する CCL2 について mRNA を解析したが、いずれの項目においても SM H<sub>2</sub>(-)群で有意に上昇し、その上昇は HRS 投与により SM H<sub>2</sub>(+)群で有意に減少し、ラットにおいても HRS 投与で炎症刺激を抑制していることが示唆された。

< 筋層内の NO 産生 >

また、mRNA の結果より、NO の産生が HRS 投与により抑制されていると考え、実際の筋層の NO 産生量を定量した (図 3)。筋層の剥離はマウスではサイズが小さいため、ラットを用いて行った。Sham 群では H<sub>2</sub>(-)、H<sub>2</sub>(+)に差は認められなかったが、SM H<sub>2</sub>(+)群では NO 産生の亢進が確認でき、さらにその亢進は HRS 投与により

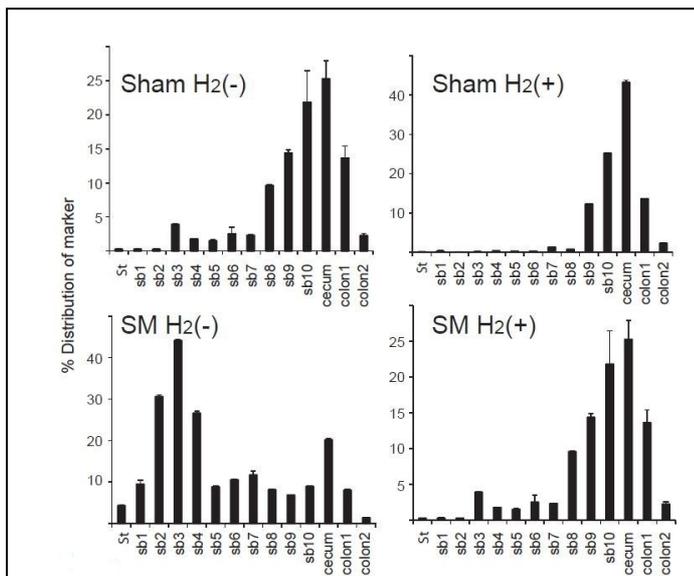


図 1 . デキストランの腸内分布

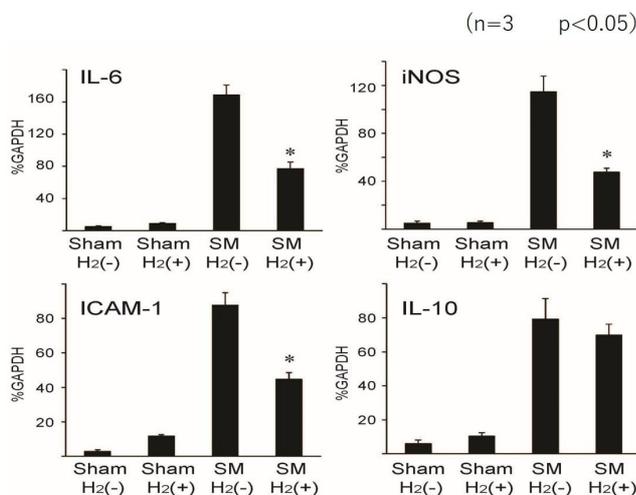


図 2. 炎症関連因子の mRNA 発現

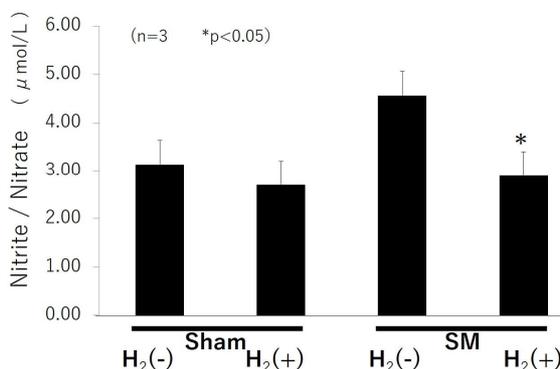
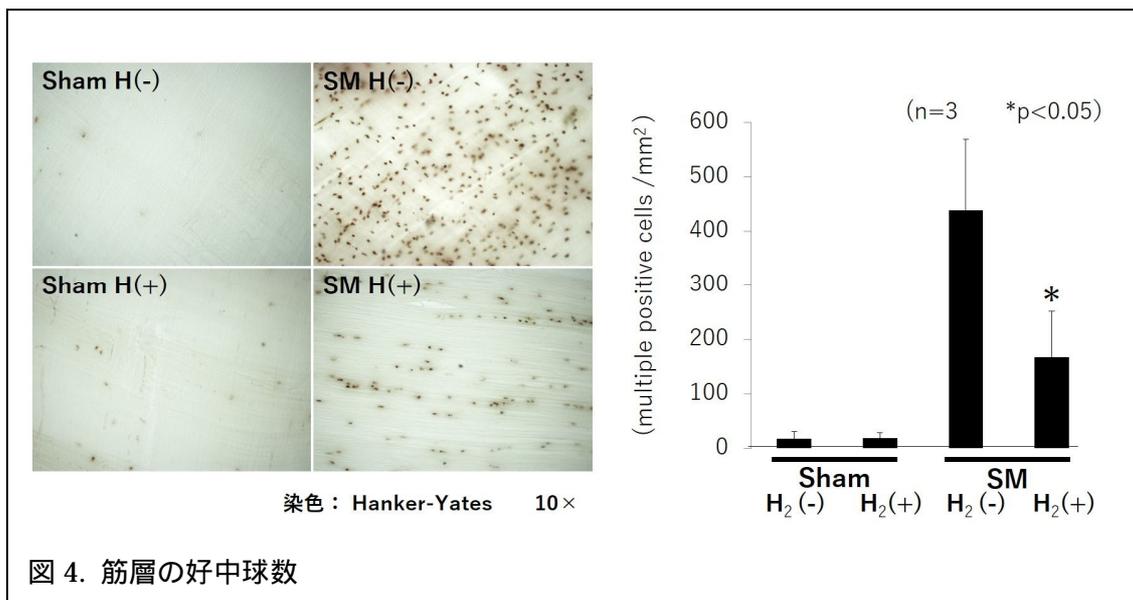


図 3. 筋層の NO 産生

SM H<sub>2</sub>(+)群で有意な減少を認めた。

<筋層に浸潤した好中球数>

mRNA の解析により、好中球接着に関わる ICAM-1 が HRS で減少していたため、実際の好中球浸潤が抑制されているかを確認した(図4)。筋層の剥離はマウスではサイズが小さいため、ラットを用いて行った。結果、Sham,群では H<sub>2</sub>(-)、H<sub>2</sub>(+)ともほとんど好中球の浸潤は認められなかったが、SM 刺激により SM H<sub>2</sub>(-)群では好中球浸潤が認められ、HRS 投与により SM H<sub>2</sub>(+)群で減少を認めた。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Okamoto A, Kohama K, Aoyama-Ishikawa M, Yamashita H, Fujisaki N, Yamada T, Yumoto T, Nosaka N, Naito H, Tsukahara K, Iida A, Sato K, Kotani J, Nakao A. Intraperitoneally administered, hydrogen-rich physiologic solution protects against postoperative ileus and is associated with reduced nitric oxide production. *Surgery*. 2016 160(3):623-631. doi: 10.1016/j.surg.2016.05.026. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yamamoto H, Yamada T, Yumoto T, Osako T, Naito H, Nakao A. Pneumoperitoneum with hydrogen-containing carbon dioxide ameliorates bowel inflammation. *International Conference on Emergency Medicine*, 2018 年  
中尾 篤典, 岡本 彩那, 山下 勇人, 石川 倫子, 小濱 圭祐, 西村 健, 藤崎 宣友, 小谷 穰治 水素水の腹腔内注射によるマウス術後腸管麻痺の改善効果；第 43 回日本集中治療医学会学術集会、2016 年 (査読あり)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：石川 倫子

ローマ字氏名：ISHIKAWA Michiko

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部救急・災害医学講座

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁): 40566121

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。