

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09324

研究課題名（和文）分子状水素吸入による人工心肺後の脳障害軽減・血管内皮グリコカリックス保護効果

研究課題名（英文）Molecular hydrogen inhalation reduces brain damage after cardiopulmonary bypass and protects vascular endothelial glycocalyx

研究代表者

加藤 孝澄（Kato, Takasumi）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80204478

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：人工心肺により心臓と肺では、血管内皮グリコカリックスの厚さは、有意に減少したが脳でほとんど変化しなかつたことにより、臓器によって障害の程度が異なることが明らかになった。分子状水素は人工心肺による全身炎症および肺障害を軽減し、グリコカリックスの保護効果が認められた。今回の結果は人工心肺による臓器の障害についての理解を深めることに繋がると考えられる。臨床麻酔に用いるためには、人工心肺に対する分子状水素の投与に関しては、投与方法や保護効果についてさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、人工心肺中に分子状水素を投与することにより、人工心肺による全身炎症および肺障害を軽減することが明確になった。心臓と肺では、血管内皮グリコカリックスの厚さは、有意に減少したが脳でほとんど変化しなかつたことにより、臓器によって障害の程度が異なることが明らかになり、初期に想定された脳障害の程度を抑制するとの仮説は、実証できなかったが、心臓や肺といった他の重要臓器の保護に、分子状水素を人工心肺に投与することの重要性が明確になり、人工心肺による障害を臨床でも改善できる可能性が示された。臨床麻酔に用いるための、有効な基礎的なデータが得られさらなる研究を進めていく重要性も確認された。

研究成果の概要（英文）：The thickness of the vascular endothelial glycocalyx was significantly reduced in the heart and lungs, but hardly changed in the brain, indicating that the degree of damage varied from organ to organ. Molecular hydrogen reduced systemic inflammation and lung injury induced by cardiopulmonary bypass and was protective of glycocalyx. These results may lead to a better understanding of organ damage caused by artificial cardiopulmonary bypass. Further verification of the administration method and protective effects of molecular hydrogen for use in clinical anesthesia is needed for the administration of molecular hydrogen to cardiopulmonary ventilation.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：分子状水素 血管内皮グリコカリックス 人工心肺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮グリコカリックスは血管内皮細胞上に存在するグリコサミノグリカンの層である。これまで観察が困難だったが、近年電子顕微鏡での観察が可能となったことから研究が進み、血管透過性の調整に関与していることが明らかとなった (Cardiovascular Research (2010) 87, 300-310)。

人工心肺 (Cardiopulmonary Bypass:CPB)は心臓・大血管手術において必須の手技であり、広く施行されている。しかし様々な副反応を引き起こすことも事実であり、副反応の抑制に努力が払われてきた。特に脳組織障害は微小であっても、機能障害は、時に患者さんにとっては深刻な問題となる。このような状況にも関わらず根本的な予防・治療法に乏しく、限界を感じてきた。CPB 後の微小塞栓による脳組織障害時には血管透過性が亢進し、血管内の液体が脳内に滲出すると考えられる。さらに脳の虚血再還流障害、腸管への灌流低下と腸粘膜のバリア機能低下による腸内エンドトキシンの体循環への流入などが増悪原因として挙げられている。

分子状水素の吸入は 2007 年に、脳虚血に対する治療効果が報告されてから (Nat Med 13:688, 2007)、水素による臓器保護作用が注目されている。これまでの国内外の分子状水素を使用した研究で水素が活性酸素による組織障害を抑え、抗酸化作用・抗炎症作用をもつことが示されている。しかし分子状水素吸入と血管内皮グリコカリックスの関連については、明らかではない。分子状水素は血管内皮グリコカリックス保護効果をもつかの検証が必要であると考えた。このため、グリコカリックスを損傷し脳障害を引き起こすラット CPB モデルにおいて分子状水素はグリコカリックス保護効果をもつか検証するとともに、CPB 後の神経後遺症に関与する脳障害において分子状水素吸入の効果を実証することとした。

2. 研究の目的

人工心肺(Cardiopulmonary Bypass : CPB)では、グリコカリックスが障害されることが知られている。しかし、臓器ごとのグリコカリックスの障害の程度の違いについてはよく分かっていない。分子状水素は活性酸素を選択的に除去し、抗酸化・抗炎症・抗アポトーシス作用をもち、グリコカリックスの保護作用も報告されている。本研究の目的は、CPB によって主要臓器である脳と心臓と肺におけるグリコカリックスの障害に臓器特異性があるかを、血管内皮グリコカリックスの厚さを計測することにより明らかにすることと、分子状水素に各臓器のグリコカリックス保護作用と肺障害の軽減作用があるかをラット CPB モデルを用いて検討することである。

3. 研究の方法

28 匹のラットを単純無作為化法に基づいて以下の 4 群に無作為に割り付けた (各群 n = 7): 偽薬群、対照群、2%水素群、4%水素群。偽手術は、静脈および動脈カニューレレーションとヘパリネーションからなり、CPB は行わなかった。動物は 5.0%イソフルラン (Mylan、東京、日本) で麻酔された。十分な麻酔が得られた後、ラットを 14 ゲージ静脈内カテーテル (B Braun, Melsungen, Germany) で挿管し、小動物用人工呼吸器 (信濃製作所、東京、日本) を用いて空気-酸素混合気 (吸入酸素分率 = 0.4) で機械的に換気した。手術中および CPB 中は、十分な麻酔深度を得るために 2%イソフルランで麻酔を維持した。すべての手術は標準的な無菌手技で行われた。直腸温は $37.0 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ にモニター・調節された。

実験プロトコル

外科的カニューレーションとヘパリン投与後、動物を CPB 回路に接続した。15 分間の安定化後、陰圧発生装置を作動させて静脈リザーバー内に陰圧を発生させ、体外循環を開始した。陰圧は徐々に増加させ、ローラーポンプの速度を 100mL/kg/分の流量まで増加させた。この流量に達したら、呼吸数を 20 回/分に減らし、吸入酸素分率を 1.0 に変更した。CPB は 90 分間行った。人工肺へのガスフローは 100%酸素、400mL/min、2%イソフルランであった。CPB 中に追加注入を受けたラットはいなかった。CPB 終了後、呼吸数を 60 回/分に増やし、ラットを CPB から離脱させた。CPB 回路から切り離す前に、リザーバー内の血液量を初期量と同じに調整した。その後、右外頸静脈および尾動脈カテーテルを抜去した。ラットは全身麻酔下でさらに 120 分間追跡された。水素投与群のラットには、CPB 開始から終了 1 時間後まで、選択した濃度の水素を投与した。水素は HGE-1A (島津製作所、京都、日本) から供給し、CPB 中は人工呼吸器と人工肺から、CPB 後は人工呼吸器から投与した。生成速度は、所望の水素濃度が得られるように、全新鮮ガス流量との関係で制御した。

サンプル採取

観察終了後、すべてのラットは麻酔下で開胸手術を受けた。右肺下葉を結紮し摘出した。その後、肺門をクランプして左肺を摘出した。右心房を切開後、心尖からリン酸緩衝生理食塩水 (MP-2000、東京理化学器械、東京、日本) を 8mL/分で 2 分間パーフュージョンし、全身の血液を洗浄した。その後、固定液 (2%グルタルアルデヒド、30mM HEPES 緩衝液、2%硝酸ランタン) を 8mL/分の速度で 5 分間灌流した。

灌流後、右肺、心臓、脳を摘出した。右肺上葉、左心室心筋、大脳皮質を切り出し、4、24 時間、固定/染色液に浸した。適切な組織処理の後、超薄切片を作成した。

糖鎖分解。糖鎖分解は、血清シンデカン-1 用の酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キット (Cloud-Clone Corp.) 血管内皮グリコカリックスの厚さ。心臓、肺、脳の血管内皮グリコカリックスを透過型電子顕微鏡で観察した

透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus; JEOL, 東京, 日本) で観察した。各臓器の灌流血管を無作為に 10 個選び、画像を撮影した。ランタン染色の面積と血管周囲長を測定し、これら 2 つの測定値の比を平均糖鎖厚と定義した。

炎症。血清および肺組織中のインターロイキン-1 (IL-1) および腫瘍壊死因子- (TNF) 濃度を ELISA (R&D Systems Inc.)

酸化ストレス。血清中のマロンジアルデヒド (MDA) を ELISA 法 (Cell Biolabs Inc.) MDA は、酸化ストレスによって引き起こされる脂質代謝の最終産物であり、MDA のレベルはフリーラジカルによる損傷と相関すると言われている。

肺組織学。左肺の上部をパラフィンに包埋し、3 μ m の切片に切り出し、抗ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) で染色した。スライドは NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) を用いてデジタル化した。切片中の全細胞に対する MPO 陽性細胞の比率を HALO (Indica Labs, Albuquerque, New Mexico, US) を用いて測定し、好中球活性化の指標とした。

肺湿潤乾燥重量比。肺水腫の指標として肺湿乾重量比を用いた。切除直後の右下葉の重量を測定し、75 のオープンで 72 時間乾燥させた後の乾燥重量を記録した。

4 . 研究成果

CPB 後の血管内皮グリコカリックス分解

4%水素投与群の血清シンデカン-1は、コントロール群および2%水素投与群よりも低く（各々 $P < 0.001$ ）、偽水素投与群との有意差は認められなかった

（ $P = 0.999$ ）。2%水素群とコントロール群との間に有意差はなく（ $P = 0.999$ ）、両群とも偽薬群よりもシンデカン-1濃度が高かった（それぞれ $P < 0.001$ ）。

CPB後の心臓、肺、脳における血管内皮グリコカリックスの厚さ。心臓血管内皮グリコカリックスは、4%水素投与群で対照群より厚かった

（ $P = 0.016$ ）、2%水素群と対照群（ $P = 0.843$ ）、2%水素群と偽薬群（ $P = 0.276$ ）、対照群と偽薬群（ $P = 0.060$ ）の間に有意差は認められなかった。

肺内皮糖衣は、4%水素群では対照群より厚く（ $P = 0.025$ ）、対照群では偽薬群より薄かった（ $P = 0.036$ ）、2%水素群と対照群との間に有意差は認められなかった（ $P = 0.577$ ）。

脳血管内皮グリコカリックスについては、4群間に有意差は認められなかった（ $P = 0.884$ ）。

血清炎症性サイトカインと酸化ストレス

血清 IL-1 は、4%水素群の7検体および偽薬群の3検体で測定可能範囲より低かった。ELISA（R&Dシステムズ社）による検出下限値を5.0 pg/mLとすると、血清 IL-1 は4%水素群で対照群および2%水素群より低く（それぞれ $P = 0.005$ ）、偽薬群との有意差は認められなかった（ $P = 0.133$ ）、2%水素群と対照群との間に有意差はなく（ $P = 0.697$ ）、両群とも IL-1 濃度は偽薬群より高かった（それぞれ $P = 0.011$ ）。

血清 TNF は、4%水素群の4検体で測定可能範囲を下回った。ELISA（R&D Systems Inc.）による検出可能な最小値5.0 pg/mLとすると、TNF は4%水素群の方が対照群、2%水素群、偽薬群よりも低かった（それぞれ $P = 0.010$ 、 $P = 0.010$ 、 $P = 0.015$ ）、血清 TNF は、対照群で偽薬群より高く（ $P = 0.036$ ）、2%水素群と有意差はなかった（ $P = 0.869$ ）。

血清 MDA は、4%水素群で対照群、2%水素群、偽薬群よりも低かった（それぞれ $P = 0.011$ ）。

血清 MDA は2%水素群で偽薬群より低く（ $P = 0.036$ ）、対照群とは有意差はなかった（ $P = 0.577$ ）。

対照群と偽薬群との間に有意差は認められなかった（ $P = 0.378$ ）。

肺組織の炎症

対照群の1頭において、肺組織が固定液で汚染されていたため、ELISAおよび病理学的評価が不正確であったため、この動物の肺組織評価は欠測データとした。

肺組織の炎症性サイトカイン発現。肺組織中の IL-1 は、4%水素投与群でコントロール群および2%水素投与群よりも低く（それぞれ $P = 0.017$ および $P = 0.011$ ）、偽水素投与群との有意差は観察されなかった

（ $P = 0.417$ ）。2%水素群と対照群との間に有意差はなく（ $P = 0.918$ ）、両群とも偽薬群と比較して IL-1 濃度が高いことが示された（それぞれ $P = 0.036$ および $P = 0.017$ ）。

肺組織中の TNF は、4%水素群ではコントロール群および2%水素群よりも低かったが（それぞれ $P < 0.001$ および $P = 0.011$ ）、偽薬群との比較では有意差は認められなかった（ $P = 0.883$ ）、2%水素群では対照群との有意差は認められず（ $P = 0.075$ ）、TNF は対照群で偽薬群より高かった（ $P < 0.001$ ）。

肺組織中の好中球。肺組織中の MPO 陽性細胞の比率は、4%水素投与群で対照群、2%水素投与群および偽薬投与群よりも低かった（ $P = 0.017$ 、

それぞれ $P = 0.011$ 、 $P = 0.017$ ）。対照群では偽薬群より高く（ $P = 0.017$ ）、2%水素群と対照群（ $P = 1.000$ ）、2%水素群と偽薬群（ $P = 0.051$ ）では有意差は認められなかった。

肺組織の湿乾比。肺組織湿潤乾燥重量比（ $P = 0.222$ ）は、4群間に有意差は認められなかった。

考察

部分的 CPB モデルラットにおいて、血管内皮グリコカリックスに対する水素の影響を検討した。4%水素投与群では対照群に比べ血清シンデカン-1 濃度が有意に低く、4%水素が血管内皮グリコカリックス障害を抑制したことが示された。また、4%水素投与群では、血清中の IL-1 、 TNF 、 MDA 濃度が対照群よりも有意に低かったことから、4%水素には抗炎症作用と抗酸化作用があることが示された。さらに、4%水素投与群では、肺組織の炎症性サイトカインおよび好中球濃度が対照群よりも有意に低かったことから、4%水素が肺組織の炎症を緩和したことが示唆された。

糖鎖は、IL-1 、 TNF 、 活性酸素によって活性化されるメタロプロテアーゼ、ヘパリナーゼ、ヒアルロニダーゼによって分解される。この研究では、4%水素投与群は対照群に比べ、血清中のシンデカン-1、IL-1 、 TNF 、 活性酸素濃度が有意に低かった。したがって、水素の糖鎖保護作用は、抗炎症作用と抗酸化作用による可能性が高い。さらに、4%水素投与群の肺内皮糖衣は対照群よりも厚く、4%水素投与群は対照群よりも肺組織における IL-1 、 TNF 、 好中球の発現が有意に低かった。したがって、4%水素投与群では、肺内皮の糖鎖が保たれることで、肺組織の炎症反応が緩和されたことが示唆された。一方、肺の湿潤重量と乾燥重量の比では、4 群間に有意差は認められなかった。肺の湿潤重量には、間質性滲出液、血管内滞留血、組織内出血、血管外蛋白漏出が含まれるため、重量測定には有意な誤差が含まれる可能性がある。さらに、4%水素投与群では、血清中の TNF および MDA 濃度が有意に低く、肺組織中の MPO 陽性細胞の比率が偽薬投与群よりも低かった。Huang らは、通常の潮容積で 5 時間の機械的換気を行うと、マウスに人工呼吸器誘発性肺障害が誘発されることを報告した。この実験は約 5 時間の機械的換気で行われた。したがって、人工呼吸器誘発性肺傷害は偽薬群でも生じたであろう。4%水素は CPB だけでなく、長時間の人工呼吸に伴う炎症を抑制することが示唆される。

結論

ラットの部分的 CPB 中、人工肺および自己肺を介した 4%水素の投与は、CPB による血管内皮グリコカリックス障害を抑制した。水素は、CPB に由来する炎症反応と酸化ストレスを抑制することで、血管内皮グリコカリックスを保護する新たな方法となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwata Hiroki, Katoh Takasumi, Truong Sang Kien, Sato Tsunehisa, Kawashima Shingo, Mimuro Soichiro, Nakajima Yoshiki	4. 巻 18
2. 論文標題 Hydrogen attenuates endothelial glycocalyx damage associated with partial cardiopulmonary bypass in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0295862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0295862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩田紘樹, 加藤孝澄
2. 発表標題 分子状水素は人工心肺に伴う血管内皮グリコカリックスの障害を軽減する
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第28回学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩田 紘樹 (Iwata Hiroki)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学・大学院生 (13802)	
研究協力者	キエン ツロング (Truong Sang Kien)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学	
研究協力者	佐藤 恒久 (Tsunehisa Sato)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学 (13802)	

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
研究協力者	川島 信吾 (Kawashima Shingo)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学・助教 (13802)	
研究協力者	御室 総一郎 (Mimuro Soichiro)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学・講師 (13802)	
研究協力者	中島 芳樹 (Nakajima Yoshiki)	浜松医科大学・麻酔・蘇生学・教授 (13802)	

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