

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18324

研究課題名（和文）水素吸入は補助的治療手段になりうるか？ショックモデルを用いた検討

研究課題名（英文）Can hydrogen inhalation be an adjunctive therapy for hemorrhagic shock?

研究代表者

藤崎 宣友（FUJISAKI, NORITOMO）

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：90732644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：出血性ショックに続発する肺傷害において、水素吸入による酸化ストレス軽減と臓器保護効果をラットで検討した。吸入酸素濃度を21%から98.7%とした群を作成し水素1.3%をそれぞれに添加、残りは窒素とした。ショック蘇生後3時間において、肺組織では98.7%酸素吸入が惹起した酸化ストレスを水素吸入が軽減し、肺組織障害の軽減が示された。かつ水素吸入による抗炎症作用の有益性が示唆された。臨床試験では出血性ショック患者の血中酸化ストレス値と病態との関連性は乏しく、酸化ストレスの評価方法は今後の課題となる。水素吸入は特に高濃度酸素投与時の組織障害軽減に有効と考えられ、水素吸入療法の臨床応用への一助となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場でショック患者に頻用されている高濃度酸素吸入は、続発する肺傷害を惹起する可能性が高く、水素吸入がその傷害を低減することが示唆された。出血性ショック患者において肺組織での直接的な抗酸化作用や抗炎症作用により臓器保護的に作用する可能性があり、さらなる詳細なメカニズムが確立すれば、水素吸入療法は慣用的に行われている酸素投与療法に併用できる新たな治療法となりうる。これまで吸入酸素濃度に勾配をつけ水素吸入効果を評価したものはなく、重症患者への新たな介入手段として社会的にも有意義なものになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated whether hydrogen inhalation reduces oxidative stress and protects organs in lung injury secondary to hemorrhagic shock in rats. Inhalation concentrations ranged from 21% to 98.7% oxygen, with 1.3% hydrogen added to each group and the remainder adjusted with nitrogen. At 3 hours after shock resuscitation, hydrogen inhalation reduced oxidative stress in the lung tissue by 98.7% oxygen inhalation, indicating that hydrogen reduces lung tissue damage. Anti-inflammatory effects of hydrogen inhalation were also suggested to be beneficial regardless of oxygen concentration. In clinical trials, blood oxidative stress levels in hemorrhagic shock patients were measured as a severity index, but the relationship between oxidative stress and pathological conditions is poor, and methods for evaluating oxidative stress are a future challenge. This study provides a scientific basis for the clinical application of hydrogen inhalation therapy in patients with hemorrhagic shock.

研究分野：救急、集中治療医学

キーワード：水素 出血性ショック 酸化ストレス 抗酸化作用

## 1. 研究開始当初の背景

救急現場で遭遇する頻度が高く、かつ致死的状态である“ショック”では、後に急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) が進行し、危機的状态に陥ることが多い。出血性ショックは急激な組織低灌流と酸素需給バランスの変化、大量輸液や大量輸血に伴う虚血再灌流により酸化ストレスが惹起される。酸素 (O<sub>2</sub>) にはフリーラジカルによる直接的組織障害という有害性があるにもかかわらず、重症病態であるほど救命目的に高濃度 O<sub>2</sub> 投与を行う慣習が臨床現場には存在する。高濃度 O<sub>2</sub> がショック患者の臓器障害をさらに助長するのではとの疑問から、抗酸化作用、抗炎症作用、臓器保護作用を示す報告がされている水素 (H<sub>2</sub>) を吸入することで、ショック患者に有益な治療となる可能性が示唆されていたが、具体的な O<sub>2</sub> 濃度と H<sub>2</sub> 吸入の効果についての検討は少ない。H<sub>2</sub> 吸入は今後の実臨床で有益となる対象疾患が多く、かつ副作用が少ない新たな補助的治療手段として普及していく可能性が高いと思われ、吸入 O<sub>2</sub> 濃度との関連を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では O<sub>2</sub> 吸入という日常的になされる診療行為に対し、「H<sub>2</sub> 吸入」が O<sub>2</sub> による酸化ストレスを軽減するののかについて、ラット出血性ショックへのガス吸入モデルを用いて様々な O<sub>2</sub> 濃度に H<sub>2</sub> を添加し、H<sub>2</sub> の有用性と O<sub>2</sub> 濃度と肺障害の関係を明らかにすることを試みた。さらに臨床におけるショック患者の血中酸化ストレス度、抗酸化力を測定し、病態と酸化ストレスの関連性を検討した。これらは救急の臨床現場での測定はなされておらず、今後の H<sub>2</sub> 吸入療法を見据えた基礎的な臨床検査データの構築となる。

## 3. 研究の方法

### 3-1) 動物実験

8 週齢雄性 SD ラット (260-280g) を使用。ラットは室温 22°C、12 時間毎の明暗条件下で自由に摂食させ飼育した。イソフルランで麻酔導入、ラット用喉頭鏡で経口気管挿管、人工呼吸管理を開始した。右内頸動脈に 22G サーフローカテーテルを挿入し観血的血圧測定を行いながら、同時に脱血を行い、出血性ショック状態 (MAP: 平均動脈圧 30±2 mmHg) を厳密に 1 時間維持した。15 分かけ自己血の一部を緩やかに返血し蘇生、3 時間 MAP > 65mmHg を維持したのち検体採取を行なった。治療ガス吸入はショック導入直後から開始し、犠死させるまで続した (図 1)。

実験は O<sub>2</sub> 濃度を 21% から 100% まで 4 段階に振り、各 O<sub>2</sub> 濃度の気体に 1.3% の H<sub>2</sub> 投与の有無で 8 群とした (Air (21% O<sub>2</sub>) 群、Air+1.3% H<sub>2</sub> 群、50% O<sub>2</sub> 群、50% O<sub>2</sub>+1.3% H<sub>2</sub> 群、75% O<sub>2</sub> 群、75%+1.3% H<sub>2</sub> 群、100% O<sub>2</sub> 群、98.7% O<sub>2</sub>+1.3% H<sub>2</sub> 群)。効果判定はショックから蘇生、その 3 時間後に犠死せしめ、血液、肺組織を採取。血漿で d-ROMs test、BAP test (WISMERLL, 東京) を行い、酸化ストレスマーカー (血漿 8-OHdG) の検出を ELISA 法にて行なった。

分子生物学的検討では採取した肺から mRNA を抽出、炎症性メディエーター (IL-6、TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、iNOS、CXCL1、CXCR2)、抗炎症性メディエーター (IL-10)、血管内皮関連因子 (VEGF- $\alpha$ 、ET-1) の発現をそれぞれ realtime RT-PCR で解析し、発現蛋白 (NARF2、KEAP1、NQO1、IKK  $\gamma$ 、NF-kBp65) をウエスタンブロットで分析した。

病理学的には、蘇生後 3 時間後の肺左葉を切り出し、4% パラホルムアルデヒド液に浸漬、固定後、3  $\mu$  m の切片を作成。ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、8-OHdG 免疫染色を行い、1 検体あたり 5 視野、400 倍視野 (High Power Field: HPF) で観察、平均値を算出し評価した。

3-2) 臨床研究  
岡山大学医療系部局生命倫理審査委員会、臨床研究審査専門委員会で承認された後 (研究番号: 2007-021)、岡山大学病院高度救命救急センターに出血性ショック、敗血症性ショックで搬送された成人を対象に、前向き研究を施行した。初療時、入院 24 時間後、48 時間後に動脈血を 1ml、ヘパリン管に採取し、その血漿を用い血中酸化ストレス度 (d-ROMs test)、抗酸化力 (BAP test) を測定、病態との関連、経時的变化を確認した。目標症例数は 20 症例とした。

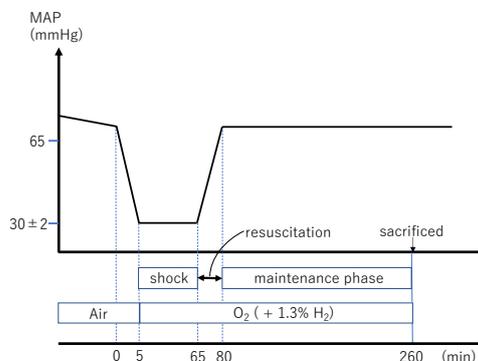


図 1 実験の流れ

#### 4. 研究成果

##### <動物実験結果>

##### (1) 血漿酸化ストレス値 (dROMs test)

血中の dROM 値は 50%O<sub>2</sub> で増加し、他の O<sub>2</sub> 濃度よりも有意に高かった。H<sub>2</sub> 投与では 75% O<sub>2</sub> 投与時の H<sub>2</sub> 投与群は他の O<sub>2</sub> 濃度における H<sub>2</sub> 投与よりも有意に低かった。しかし、各 O<sub>2</sub> 濃度で H<sub>2</sub> による改善は認められなかった (図 2)。

全体的に dROM 値は正常値上限程度であり、1時間間の出血性ショックモデルでは血中酸化ストレスを有意に変動する侵襲度は得られなかった可能性がある。一方、H<sub>2</sub> 投与は血中酸化ストレスを増悪させるものでないと考えられた。

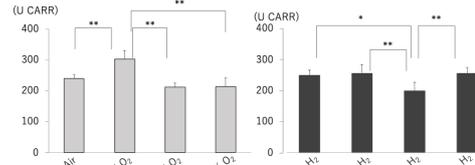


図 2 各群の dROM 値

##### (2) 抗酸化力測定 (BAP test)

血中 BAP 値は、100% O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> 投与で有意に増加、H<sub>2</sub> 吸入により O<sub>2</sub> 濃度が高くなるほど有意に BAP 値が高くなる傾向を認めた (図 3)。

すなわち、H<sub>2</sub> は 100% O<sub>2</sub> 投与時に抗酸化作用を特に強く発現し、濃度依存的に抗酸化作用の効果発現が強くなる可能性が考えられた。

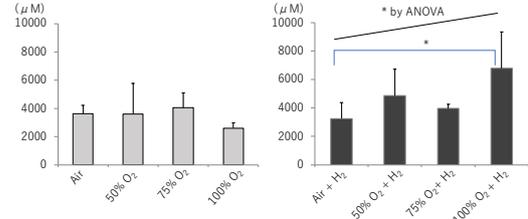


図 3 各群の BAP 値

##### (3) 血漿 8-OHdG 測定

血漿中 8-OHdG はいずれも有意差は認めなかった (図 4)。本検討に用いたショック時間では H<sub>2</sub> 投与による核の酸化ストレス変化を血漿中で感知するような条件ではなかったと考えられる。

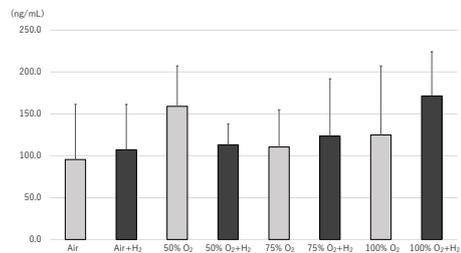


図 4 ELISA による血漿 8-OHdG 測定値

##### (4) realtime RT-PCR

*TNF-α* の発現量は 50%O<sub>2</sub> 投与により増加するも H<sub>2</sub> 投与により有意に減少した。濃度依存的変化や、H<sub>2</sub> 吸入による抑制は認められなかったが、Air 群にでは H<sub>2</sub> 投与で *TNF-α* を抑制する傾向がみられた (図 5-1)。*ET-1* は有意な所見は認めなかった。

ケモカインである *CXCL1* は差が認めなかったが、ケモカイン受容体の *CXCR2* は O<sub>2</sub> 投与群で 75%までは濃度依存的に発現が減少し、100% O<sub>2</sub> で有意に増加することが示された。100% O<sub>2</sub> 投与で *CXCR2* 発現を H<sub>2</sub> は有意に減少させており、過剰な好中球の遊走を抑制する可能性が示唆された (図 5-1)。

NF-κB 経路である *IKBKKG* は、O<sub>2</sub> 投与では 75%までは発現が減少し、炎症抑制を示唆する。一方、100% O<sub>2</sub> では発現が有意に増加しており、炎症を促進していると考えられた。しかし 100% O<sub>2</sub> による *IKBKKG* 増加は、H<sub>2</sub> により有意に抑制された (図 5-1)。

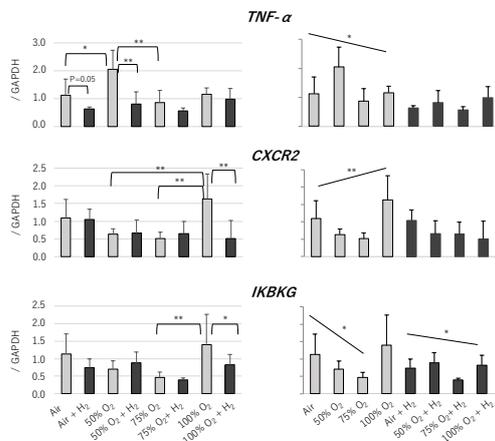


図 5-1 出血性ショック蘇生 3 時間後の肺組織の mRNA 発現

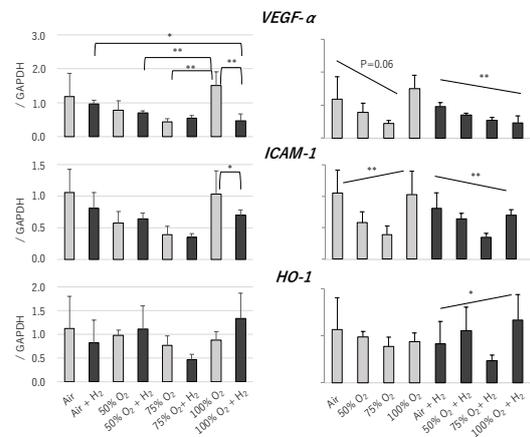


図 5-2 出血性ショック蘇生 3 時間後の肺組織の mRNA 発現

VEGF- $\alpha$ の発現量は、O<sub>2</sub>濃度75%までは濃度依存的に下げる傾向がみられるが、100% O<sub>2</sub>では有意に増加した。H<sub>2</sub>投与下においても、O<sub>2</sub>濃度依存的に有意に VEGF- $\alpha$ 発現が抑制され、特に100% O<sub>2</sub>投与下においては H<sub>2</sub>により VEGF- $\alpha$ 発現が著減した(図5-2)。血管透過性を亢進させる作用のある VEGF- $\alpha$ は、H<sub>2</sub>が出血性ショックによる血管透過性亢進を抑制している可能性が考えられた。

接着因子である ICAM-1は、75% O<sub>2</sub>投与までは発現が有意に減少したが、100% O<sub>2</sub>では増加した。H<sub>2</sub>投与下でも同様の傾向を示し、特に100% O<sub>2</sub>投与下では H<sub>2</sub>により発現が有意に抑制された(図5-2)。これらから、100% O<sub>2</sub>投与時の過剰な好中球接着が H<sub>2</sub>により抑制されることが示唆された。

HO-1は O<sub>2</sub>投与群では各群に有意差は認めなかった。H<sub>2</sub>投与群では、概ね O<sub>2</sub>濃度依存的に発現量が増加する傾向が見られ、特に100% O<sub>2</sub>投与下で HO-1を増加させる結果を得たが、有意差を検出するには至らなかった(図5-2)。

mRNAについては、概ね75%までの O<sub>2</sub>濃度では出血性ショックにおける生体に有利であろうと考えられたが、100% O<sub>2</sub>は生体にとっては不利と考えられるデータが得られた。しかし、そこに H<sub>2</sub> 1.3%を加えるだけで100% O<sub>2</sub>による影響を緩和することが明らかとなった。

## (5) Western blot

細胞質内での NF- $\kappa$ B 経路の制御について、IKK  $\gamma$  (NEMO: NF- $\kappa$ B essential modulator)の蛋白発現量を測定した。明らかな有意差はないものの、O<sub>2</sub>濃度が高くなると発現が抑制される傾向があり、H<sub>2</sub>は各濃度において蛋白発現量をやや抑制する傾向が見られた。蛋白レベルでは100% O<sub>2</sub>が IKK  $\gamma$ を増加させることはなかった(図6)。

また出血性ショックにより惹起された炎症は、H<sub>2</sub>吸入により NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制して炎症を抑制する可能性があることから、NF- $\kappa$ B p65 の核内移行を確認した。Air 群においては H<sub>2</sub>が抑制していることが確認されたが(図7)、他の O<sub>2</sub>濃度では明らかな傾向は同定出来なかった。

その他、酸化ストレス抑制に関連する蛋白を誘導し、炎症抑制系に働く転写因子である Nrf2 を肺の細胞質と核内で発現量を測定したが、H<sub>2</sub>による影響を検出出来なかった。また、Nrf2 抑制機構を司る Keap1 や酸化ストレス蛋白である NQO1 の発現量でも有意な所見を得られなかった(図8)。

蛋白レベルの検討では Air 群における H<sub>2</sub>の抗炎症効果には NF- $\kappa$ B p65 の核内移行が関与することが明らかとなったが、その他の蛋白では H<sub>2</sub>による効果として有意な差を得ることはできなかった。したがって、100% O<sub>2</sub>下における H<sub>2</sub>の効果としては、IKK  $\gamma$  や NF- $\kappa$ B、および Nrf2、Keap1、NQO1 の経路とは異なる部分で働きかけている可能性がある。具体的な経路は本研究では明らかにできなかったが、リアルタイム PCR のデータを鑑み、他の経路については今後の研究課題としたい。

## (6) 肺組織 8OHdG 免疫染色

肺における核の酸化ストレスを反映する、8OHdG 陽性細胞数を確認した(図9-1)。75% O<sub>2</sub>吸入までは濃度依存的に 8OHdG 陽性細胞数が減少傾向を示すが、100% O<sub>2</sub>吸入では陽性細胞数が有意に増加した。特に100% O<sub>2</sub>吸入に H<sub>2</sub>を含有させた場合、有意に陽性細胞を減少させた(図9-2)。

これらの動物実験結果より、出血性ショックでは、生体の O<sub>2</sub>需要が高まっているのに対し O<sub>2</sub>供給量が足りない状態である。75%程度の高濃度 O<sub>2</sub>吸入は組織障害も少なく許容される可能性があるが、100% O<sub>2</sub>投与は酸化ストレスを増悪することが推察される。H<sub>2</sub>は100% O<sub>2</sub>投与による酸化ストレスを軽減できる可能性があると考えられた。

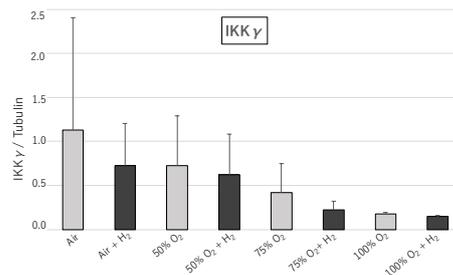


図6 出血性ショック蘇生3時間後の肺組織、IKK  $\gamma$  の細胞質内発現

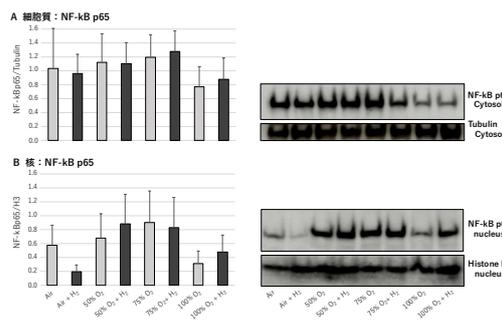


図7 出血性ショック蘇生3時間後の肺組織 NF- $\kappa$ B p65 の western blot による蛋白発現 (A. 細胞質の蛋白発現、B.核内の蛋白発現)

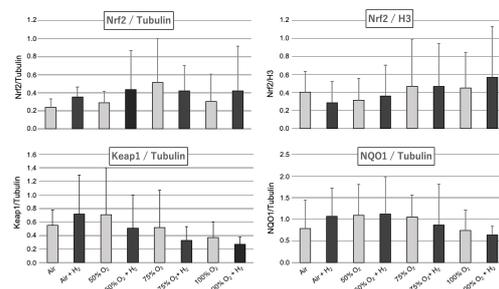


図8 出血性ショック蘇生3時間後の肺組織、酸化ストレス抑制に関連する蛋白発現量

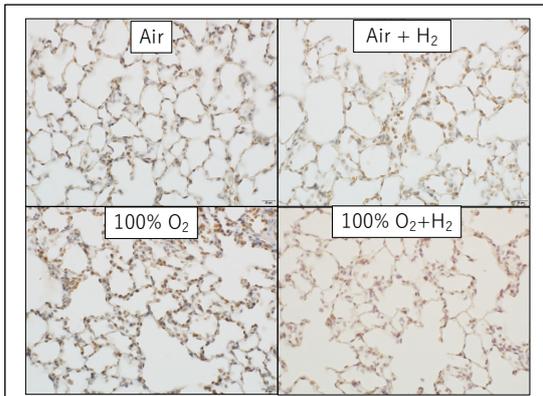


図 9-1 肺組織の 8OHdG 免疫染色

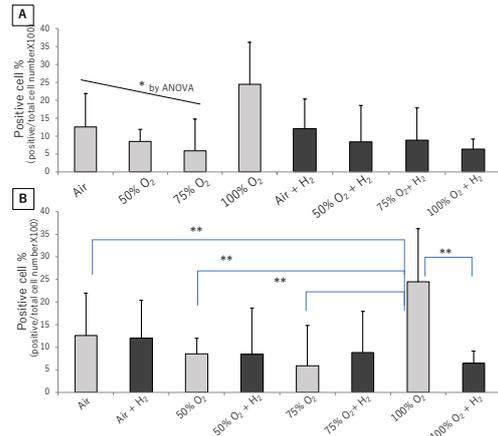


図 9-2 肺組織の 8OHdG 陽性細胞数

産科出血を除外し、赤血球製剤(RBC)を 10 単位以上輸血した症例(輸血症例)のみ 5 例抽出し解析すると、48 時間後までは有意に dROM 値の上昇を認めた。一方、BAP 値には経時的変化は同定されなかった(図 10)。

10 単位以上の赤血球輸血が必要な症例では、48 時間、またはそれ以上に酸化ストレスの上昇が持続していると考えられる。抗酸化力は酸化ストレスに対応した反応は無く、今後抗酸化物質投与は大量輸血時の酸化ストレス制御に寄与する可能性があると考えられた。

<まとめ>

動物実験により、出血性ショックの早期には 75%までの O<sub>2</sub> 吸入は許容されるが、100%O<sub>2</sub> 吸入が酸化ストレスを惹起し、生体肺には明らかに有害であることが示唆された。また、1.3%の H<sub>2</sub> 吸入がそれを減弱する可能性が示された。蘇生後3時間という超急性期だけの検討であるため、今後 H<sub>2</sub> 吸入濃度を上げる、吸入時間を伸ばすなど、指摘濃度や指摘時間を検討していくことが課題となる。また、H<sub>2</sub> の効果機序はまだ不明な点が多いため、引き続き検討すべきである。

臨床研究からは酸化ストレス値と病態の関連性は乏しいと思われたが、重症病態では経時的に変化している可能性もあり、抗酸化物質投与の関連性などにさらに詳細に検討する必要があると考えられた。今回用いたものが最適な評価方法であるかも含め、臨床検体における酸化ストレスの検知については今後の検討課題となる。

<臨床研究結果>

最終的に同意が得られた症例は 17 例、蘇生後、外傷で入院翌日に死亡した 2 症例は検体採取が完了せず除外した。内訳は出血性ショック 10 例(外傷 9 例、産後出血 1 例)、敗血症性ショック 5 例であった(表 1)。

	出血性ショック (N=10)	敗血症性ショック (N=5)
年齢 (中央値)	64.5歳	74歳
男性 / 女性 (人)	4 / 6	5 / 0
APACHE II	24.7 ± 7.1	26.8 ± 4.5
ISS	18.3 ± 3.4	
Ps	0.791 ± 0.084	

表 1. 患者背景

(APACHE II; Acute Physiology and Chronic health evaluation II, ISS; Injury Severity Score, Ps; Probability of survival)

それぞれの群で、初診時、24 時間後、48 時間後に経時的に測定した結果は、dROM 値、BAP 値とも有意な結果は得られなかった(表 2、3)。

dROM	初診時	24時間後	48時間後
出血性ショック (n=9)	290 ± 80.4	305.2 ± 73.2	336.2 ± 63.3
敗血症性ショック (n=5)	317.4 ± 106.2	285 ± 61.6	382.6 ± 75

表 2. dROM 値の結果(単位:U.CARR)

BAP	初診時	24時間後	48時間後
出血性ショック (n=9)	2805.9 ± 1233.8	2259.7 ± 605.3	2035.2 ± 1190.6
敗血症性ショック (n=5)	1936.7 ± 817.6	2058.1 ± 451.7	1906.6 ± 586.5

表 3. BAP 値の結果(単位;umol/L)

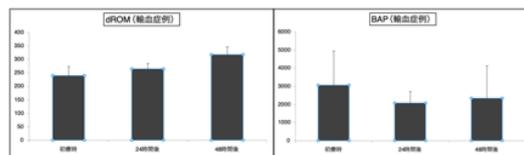


図 10 輸血症例の dROM 値、BAP 値の推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 藤崎宣友、石川倫子
2. 発表標題 ラット出血性ショック時の吸入酸素濃度の違いによる肺傷害と水素吸入の有効性
3. 学会等名 第44回日本呼吸療法医学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------