

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09694

研究課題名（和文）水素ガス吸入による網膜動脈閉塞症治療への展開

研究課題名（英文）Development of hydrogen gas inhalation to treat retinal artery occlusion

研究代表者

林 篤志（Hayashi, Atsushi）

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：20283773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：SDラットを用いて網膜虚血再灌流障害を90分作成し、再灌流後3日後、7日後の網膜内層厚は、それぞれ $85.9 \pm 6.3 \mu\text{m}$ 、 $60.8 \pm 6.7 \mu\text{m}$ とコントロールの $109.2 \pm 10.7 \mu\text{m}$ と比較して菲薄化がみられた。一方で90分の虚血作成時に同時に2%の水素ガス吸入を行った群では、3日後、7日後の網膜内層厚はコントロールと有意差はなく、水素ガス吸入により網膜保護作用があることが示された。これらを英語論文として発表した。Otsuka M, Arai K, Yoshida T, Hayashi A. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2024;262:823-833

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞、心筋梗塞の虚血再灌流障害に対する動物実験での水素ガス吸入の効果はすでに報告されている。眼科領域では水素ガスを飽和させた点眼液の効果をラットの虚血再灌流障害で報告したものがあるが、臨床で実施困難である。本研究は、すでに高度先進医療として心停止後症候群に対して実臨床で実施されたのと同じ方法で、網膜の虚血再灌流障害に対する軽減効果を検討するものであり、過去に報告はない。本研究で2%水素ガス吸入により、網膜の虚血再灌流障害を抑制できることが明らかになったことから、今後の臨床応用に道を開き、臨床的意義、学術的意義、社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：Retinal ischemia reperfusion injury was created in SD rats for 90 minutes, and the thickness of the inner layer of the rat retina at 3 and 7 days after reperfusion was measured as $85.9 \pm 6.3 \mu\text{m}$ and $60.8 \pm 6.7 \mu\text{m}$, respectively. Thinning of the inner retina was observed compared to the control $109.2 \pm 10.7 \mu\text{m}$. On the other hand, in the group in which 2% hydrogen gas was inhaled for 90 minutes during ischemia reperfusion injury, the thickness of the inner layer after 3 and 7 days was $102.3 \pm 23.6 \mu\text{m}$ and $107.2 \pm 16.0 \mu\text{m}$, respectively. The hydrogen gas inhalation was shown to have a protective effect on the retina after ischemia reperfusion injury. We published as an English paper, Otsuka M, Arai K, Yoshida T, Hayashi A. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2024; 262:823-833.

研究分野：眼科

キーワード：虚血再灌流 網膜 水素ガス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜虚血再灌流障害を抑制する臨床応用可能な治療の選択肢として2%水素ガス吸入療法を行うために動物モデルを用いて水素ガス吸入による網膜虚血再灌流障害の抑制効果を検討する。検討項目として網膜虚血再灌流後、1日後、3日後、7日後について組織学的に網膜厚の測定、網膜内活性酸素の可視化、虚血で誘導される核内因子やサイトカインなどの免疫染色を行う。水素ガスは人体に無害であることが証明されており、本研究で網膜障害の抑制効果を認めれば、網膜虚血再灌流障害に対する初めての治療となり、臨床応用への基礎データを提供できる。

2. 研究の目的

水素ガス吸入によりラット脳の虚血再灌流が抑制できることが2007年に報告された。水素ガスは活性酸素のなかでも強力な細胞障害を来すヒドロキシラジカルを選択的に除去する作用があり、分子量が小さいため体内の組織移行性が優れている。眼科領域でも水素ガス吸入が網膜静脈分子閉塞症モデルラットのVEGF発現を減少させたとの報告や、水素の吸入が虚血再灌流モデルラットの網膜神経節細胞を保護したとの報告がある。水素ガス吸入療法は心停止後症候群に対して先進医療として国内で実施され、その結果が報告されている。(Tamura T et al.; HYBRID II Study Group. *EClinicalMedicine*. 2023 Mar 17;58:101907.) 本研究では網膜虚血再灌流の動物モデルを用いて組織学的に2%水素ガスの吸入の効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

ラット網膜虚血再灌流障害モデルの作成:SDラットの眼球にトロピカミドとフェニレフリンを点眼し散瞳させる。腹腔内注射で全身麻酔を行ったうえで局所麻酔点眼を行う。腹腔内注射に用いる麻酔はドミツール、ミダゾラム、ベトルファールの混合麻酔を用いる。顕微鏡下で右眼の前房内に27G針を刺入し、27G針を生理食塩水のボトルに接続し、眼圧をラットの収縮期圧140mmHg以上になるように維持する。この時体温の管理も行う。網膜の虚血状態は網膜血流および脈絡膜血流が停止していることで検眼鏡的に判断する。またトノラボ眼圧計で眼圧測定もする。虚血時間は90分で作成する。2%の水素吸入の開始は虚血作成の開始と同時にいき、虚血終了時まで行う。網膜虚血後の再灌流の確認は検眼鏡的に行う。コントロール群では同じ網膜再灌流障害を作成し、水素ガスではなく、通常空気を吸引させる。ラットは水素吸入群で30匹、コントロール群で30匹使用する。ラットなどの動物の取り扱いに関しては、富山大学動物実験取扱規則に基づいて行う。

網膜虚血再灌流障害の組織学的検討:網膜厚および免疫染色による検討では、網膜虚血再灌流障害を作成後、1日後、3日後、7日後にラットを安楽死させ、眼球を摘出する。SUPER FIXで固定しパラフィン切片、あるいは凍結切片を作成する。既報に従い、パラフィン切片は視神経を通る断面で作成したものをHE染色し、乳頭縁から同じ距離での網膜全層と内層の厚みを評価する。網膜神経節細胞数を測定して、再灌流障害の程度を評価するとともに、網膜内のマイクログリア、アストロサイトについてはIba-1抗体、GFAP抗体を用いて染色する。ヒドロキシラジカルの検討では、酸化ストレスマーカーである8-hydroxy-2-deoxyguanosin(8-OHdG)のウエスタンブロットを行う。サイトカインの変化に関する検討では、虚血後1日の網膜を採取し、メンブレンブロットを行い、虚血に伴って上昇するサイトカインである血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン6、MCP-1などを検討する。

4. 研究成果

網膜虚血再灌流障害を抑制する臨床応用可能な治療の選択肢として2%水素ガス吸入療法を行うために動物モデルを用いて水素ガスの再灌流障害の抑制効果を検討した。ラットを用いて網膜虚血再灌流後、3日後、7日後について組織学的に網膜厚の測定し、虚血で誘導される核内因子やサイトカインなどのタンパクレベルでの網羅的解析を行った。再灌流後3日後、7日後のラット網膜内層(内境界膜から外網状層まで)の厚みの測定結果では、それぞれ $85.9 \pm 6.3 \mu\text{m}$, $60.8 \pm 6.7 \mu\text{m}$ とコントロールの $109.2 \pm 10.7 \mu\text{m}$ と比較して菲薄化がみられた。一方で90分の虚血作成時に同時に2%の水素ガス吸入を行った群では、3日後、7日後のラット網膜内層の厚みはそれぞれ $102.3 \pm 23.6 \mu\text{m}$, $107.2 \pm 16.0 \mu\text{m}$ とコントロールと比較して差はみ

られず、水素ガス吸入により網膜保護作用があることが示された。免疫染色、メンブレインプロットの結果をまとめ、英文雑誌に報告した。(Otsuka M, Arai K, Yoshida T, Hayashi A. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2024 Mar;262(3):823-833)

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 Mitsuya Otsuka, Kenichi Arai, Toshiko Yoshida, Atsushi Hayashi	4. 巻 262(3)
2. 論文標題 Inhibition of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by inhalation of low-concentration hydrogen gas	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 823-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-023-06262-3	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 篤志
2. 発表標題 網膜虚血再灌流障害に対する水素吸引の効果
3. 学会等名 硝子体手術フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大塚光哉
2. 発表標題 ラットを用いた低濃度水素ガス吸入による網膜虚血再灌流障害抑制効果
3. 学会等名 第128回日本眼科学会総会
4. 発表年 2024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	吉田 淑子 (Yoshida Toshiko) (00171421)	富山大学・医学部・客員教授 (13201)	

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	荒井 健一 (Arai Kenichi) (40752960)	富山大学・医学部・客員助教 (13201)	
研究分担者	大塚 光哉 (Otsuka Mitsuya) (60868298)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	

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