

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461166

研究課題名(和文)一酸化窒素・水素ガス吸入によるARDS軽減効果の解析

研究課題名(英文)Ameliorating effects of nitric oxide and/or hydrogen gas inhalation on ARDS

研究代表者

小林 弘祐 (KOBAYASHI, Hirosuke)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：70153632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、致死性ARDSモデルマウスに対する水素ガスと一酸化窒素ガスの吸入効果をそれぞれ単独および併用吸入で比較することを目的とした。

NO吸入により、肺への好中球の集積や血管透過性の亢進を抑制するなどの有益な効果が得られたが、炎症性サイトカインであるIL-6が増加してしまっており、生存時間を延長させることができなかった。一方、水素吸入は、好中球の浸潤は抑えていないものの、血管透過性の更新は抑制しており、サイトカイン濃度も増加させず、生存時間の延長が見られた。NOの効果も得ながら、その有害事象を減らすことができる併用吸入を行うことが望ましいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to clarify the effects of inhalation of either nitric oxide (NO) or hydrogen gas, or simultaneous inhalation of both gases for a mouse model of lethal septic shock due to severe lung injury.

NO gas inhalation provide beneficial effect such as inhibitions of neutrophil infiltration and vascular permeability increase, but adverse effect such as interleukin-6 (proinflammatory cytokine) increase, and resulted in the no change in the survival. On the other hand, hydrogen gas inhalation cannot inhibit neutrophil infiltration but inhibit vascular permeability increase and did not change interleukin-6 level, and resulted in the improved survival. Simultaneous inhalation of both gases will be a good strategy to reduce adverse effects of NO without eliminating the beneficial effects of NO.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：水素ガス 一酸化窒素ガス 吸入療法 ARDS

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促迫症候群 (ARDS) に対して、これまで多くの加療が試みられてきたが、有効性にエビデンスがあるのは肺の保護的換気のみであり、致死率の高い重篤な疾患である。ARDS は様々な原因で生じる。誤嚥性肺炎はその原因の一つで、比較的軽症の ARDS を発症し、人口の高齢化とともに臨床的に大きな問題となってきている。一方、敗血症により生じる ARDS は年齢に係わらず発症し、多臓器不全を来し、致死率が高い。

NO は、生体内に合成酵素がある生理活性物質で、低濃度 NO ガスの吸入 (5~80 ppm) は、細胞内のグアニル酸シクラーゼを活性化させ、肺血管を拡張して肺動脈圧を低下させ、血小板や白血球の活性化を抑制するなど、抗炎症作用もあることが知られている。研究責任者の小林は 1993 年からマサチューセッツ総合病院麻酔科の Warren Zapol 教授と協力し、NO 吸入療法の臨床応用に向けた海外共同研究を継続してきた。

しかし、NO は、細胞内外のスーパーオキシドアニオンと反応して、極めて組織障害性の高い活性窒素種を生成し、組織をニトロ化し機能障害を来すという問題があることも知られている。また、NO から生成される亜硝酸イオンが過酸化水素と遷移金属の存在下で活性窒素種を発生することも明らかになってきた。つまり、NO の吸入は生体に対して有害事象を生じる危険性も大きい。

一方、水素が反応性の高い活性酸素種や活性窒素種を除去することが示され (Ohsawa I *et al.* Nat Med. 2007; 13(6): 673-4)、水素ガスを吸入すると、血液を介して水素が全身に行き渡り、活性酸素や活性窒素に関連した病変を抑止することが期待できる。これまで、マウスの脳、肝臓、心臓の虚血・再灌流時の障害を水素吸入により低減できることが報告されている (Ohsawa I, *et al.*, Nature Medicine, 2007; 13: 688-4.; Hayashida K, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2008; 373: 30-5.)。しかし、水素自身は生理活性物質ではなく、NO とは異なり水素吸入のみでは好中球の浸潤や血小板の活性化などを、直接、抑制することはできない。

これまで研究責任者の小林は、誘導型 NO ノックアウトマウスを用いて、高濃度酸素障害マウスモデルで誘導型 NO 合成酵素による抗炎症効果を示し (Kobayashi H, *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 24:390-7)、NO ガス吸入が肺障害を低減させることを示したが、致死率を改善するまでには至らなかった。その他の ARDS や肺炎の動物モデルでも NO 吸入の効果はみられているが、臨床治験での有効性は確立できないでいる。

我々は、昨年、塩酸をマウスの左肺に注入し、誤嚥性肺炎による比較的軽い ARDS モデルを作成し、水素ガスの吸入を行わせたところ、肺障害の軽減効果がみられた。その成果を 2012 年 9 月の欧州呼吸器学会で発表

(Nishikawa *et al.* Hydrogen gas inhalation ameliorates direct lung injury and indirect contralateral lung injury in a murine aspiration pneumonia model) し、発表者の大学院生は ERS Young Scientist Sponsorship を受賞し、poster discussion で発表した。

その研究では麻酔下のマウスの左肺に 0.1N の塩酸を注入し、生食注入群を対照に、塩酸注入群と塩酸注入後 2% 水素吸入群との 3 群で湿乾重量比、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を、塩酸を注入した左肺、対側の右肺で比較検討した。その結果、塩酸を注入した左肺のみならず、右肺も湿乾重量比と MPO 活性が増加していたが、水素吸入により改善した。水素ガス吸入による肺損傷の軽減効果は組織標本でも確認できた。

現在までに知られている NO ガスと水素ガスの吸入効果をまとめると以下のようになる (: 効果あり ; × : 効果なし)。

効果	吸入ガス		
	NO	H ₂	NO+H ₂
血管拡張		×	
血小板抑制		×	
好中球血管内皮接着抑制		×	
好中球組織浸潤抑制		×	
活性酸素消去	×		
活性窒素消去	×		

以上の研究結果を総合すると、水素ガスと NO ガスを併用吸入すると、水素ガスが NO ガスの有害事象を抑え、単独ガス吸入よりも肺損傷を改善させる効果が期待できると考え、本研究を着想した。

NO 吸入療法はすでに一定の評価が定着しているが、当初考えられたほどの有益性には疑問の声もある。水素吸入療法は本邦の研究者によって着想された将来性のある治療法であるが、未だに基礎的検討が少なく、臨床応用への道りは長いと考えられる。本研究は両者の長所を組み合わせた点に特色があり、独創的である。また、水素吸入療法と NO 吸入療法および両者の併用療法の比較ができ、どの方法が有益であるか、今後、臨床応用する上での予想が立てられる。将来、新しい治療法が確立できると患者への多大な恩恵が期待でき、社会的意義も大きいと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、致死性 ARDS モデルマウスに対する水素ガスと一酸化窒素ガスの吸入効果をそれぞれ単独および併用吸入で比較することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究プロトコール

本研究は、北里大学医療衛生学部動物実験委員会にて、研究計画の承認を受け、実施した (承認番号: 研 13-32, 研 14-24, 研 15-22)。

(2) ガス吸入装置

ガス吸入容器の体積を流量に対して十分に小さくして、NO₂が生成しないことを確認した自作のガス吸入装置(図 3.1)を使用した。混合ガスは、流量計で混合比を調整後、加湿し、目標濃度になっていることを確認して使用した(表 3.1)。本実験は、吸入容器を経路1で並列に2つ、経路2で1つ、接続して行った。

表 3.1 目標ガス濃度

群	ガス濃度
Control群	O ₂ :21%
水素吸入群	O ₂ :21% H ₂ :1.3%
一酸化窒素吸入群	O ₂ :21% NO:80 ppm
水素・一酸化窒素併用吸入群	O ₂ :21% H ₂ :1.3% NO:80 ppm

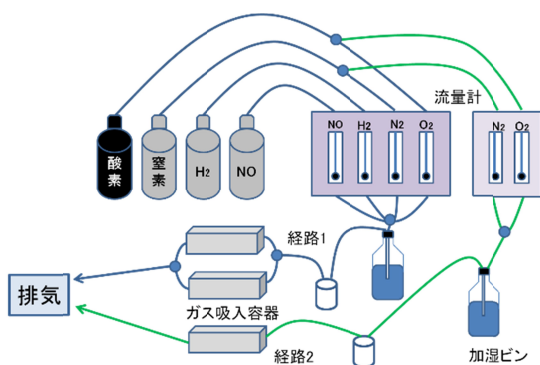


図 3.1 ガス吸入装置

(3) 致死性 ARDS モデルマウスの作製とガス吸入の効果の評価

ガス吸入による肺の保護効果を調べるために ARDS モデルマウスを作製した。ARDS マウスモデルとしては、Yokochi ら(Ito H, *et al.* Laboratory Investigation 2006, 86, 254-61; Yokochi T, *Innate Immunity*, 2011, 18, 364-70) が確立した、肺障害が強く現れる致死性敗血症モデルマウスを使用した。

マウスを固定し、尾静脈より、濃度を 20 µg/ml に調整した α-galactosylceramid 溶液を入れ、α-galactosylceramid を体重 1 g 当たり 5 µl 尾静脈に投与した。α-galactosylceramid 投与 6 時間後、濃度 50 µg/ml に調整した LPS 溶液を体重 1 g 当たり 10 µl 尾静脈に投与した。

投与後、直ちに各群(表 3.1)のガス吸入を行った。LPS を投与してから 9 時間後から 3 時間毎の生存確認を行った。また、LPS 投与 10 時間後に、肺の MPO (Myeloperoxidase) 活性値、肺血管外乾湿重量比、血漿中 IL (interleukin)-6 濃度を測定した。

(4) MPO (Myeloperoxidase) 活性値

LPS 投与から 10 時間後に右肺を摘出し、血液や余分な組織を取り除きシャーレに移して重量を測定した。右肺をハサミで細かく刻み、テフロンペストルに入れた。肺の 9 倍量の 50 µM リン酸緩衝生理食塩液 (PBS, pH:6.0) の半分量を加え、ホモジナイズした。そして 1.5 ml チューブへ移し、残りの PBS を加え、再度ホモジナイズした。これを 1.5 ml

チューブへ移し、遠心分離(6000 rpm, 15 min, 4 °C)にかけて、上清を 1.5 ml チューブに移してもう一度遠心分離にかけ、上清を取り出し、これを検体とした。

PBS を 200 µl、1.25 mg/ml ジメトキシベンジジン を 100 µl、Hanks BSS を 2 ml、検体を 5 µl、15 ml 遠心管に入れ、恒温槽で 37 °C、30 分間加温した。その後、過酸化水素水を 100 µl 加え、15 分間反応させた。その後、アジ化酸ナトリウムを 100 µl 加え、反応を停止させた。反応液の吸光度を 460 nm で測定した。

また、検体中のタンパク濃度を、マイクロ TP テストワコーを用いて測定した。MPO 活性値は、以下の式で表される、タンパク濃度で基準化した値とした。

$$\text{MPO 活性値} = [\text{吸光度} / \text{総蛋白濃度}]$$

(5) 肺血管外乾湿重量比

LPS 投与から 10 時間後に左肺を摘出し、血液や余分な組織を取り除きシャーレに移した。0.4 ml の蒸留水を加え、テフロンペストルを用いてホモジナイズした。そこから 0.15 ml を採取し、シャーレに移し、重量を測定した。また、同時に採決した 0.15 ml の血液も同様に重量を測定し、それぞれ、乾燥機で 60 °C、72 時間乾燥させ、乾燥後の重量も測定した。また、ホモジネートおよび血液中のヘモグロビン濃度を、ヘモグロビン B テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定し、血管外肺乾湿重量比を求めた

(6) IL(interleukin)-6 濃度

LPS 投与 10 時間経過後、心臓から採血を行った。血液は EDTA を加えた遠沈管に入れ、直ちに遠心分離(4 °C、15000 rpm、5 min)を行い、上清を取り出し、-20 °C で保存した。濃度測定は、すべての検体が揃ってから実施した。測定の 1 時間前に検体を氷上にて解凍し、IL-6 ELISA キット (IBL) にて IL-6 濃度を測定した。

(7) 統計処理

生存曲線では、すべてのガス吸入群に対して COX 比例ハザードモデルによる多変量解析を行い、また NO 吸入群と併用吸入群に対しては、log-rank 検定により比較を行った。

MPO 活性、血管外肺乾湿重量比、IL-6 については、2 元配置分散分析により NO 吸入と水素吸入で比較を行った。P>0.05 以上を統計的な有意な差があるとした。

4. 研究成果

各ガス吸入群で生存曲線(図 4.1)を比較した。COX 比例ハザードモデルを用いて検定したところ、水素を吸入することで、吸入しないことに比べリスクが 0.41 減少 (P=0.012, 有意差あり)。また一酸化窒素を吸入することで、吸入しないことに比べリスクが 1.33 増加 (P=0.384, 有意差なし)となった。一酸化

窒素吸入による影響は見られなかったが、水素吸入では生存時間の延長が見られた。

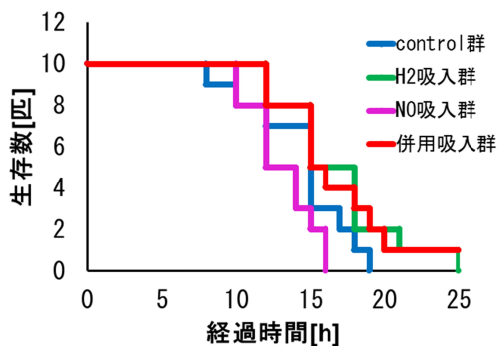


図 4.1 生存曲線(すべての群)

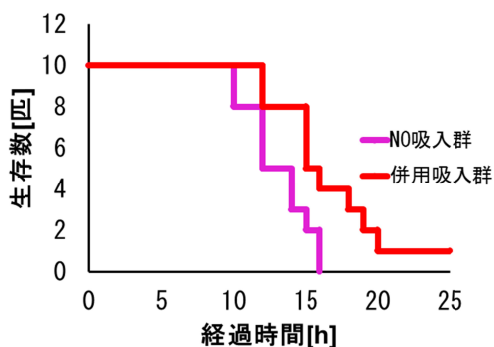


図 4.2 生存曲線(NO 吸入群、併用吸入群)

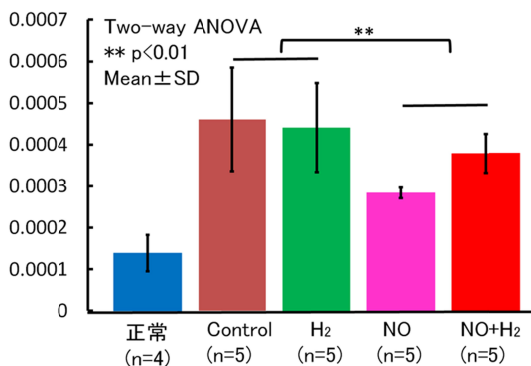


図 4.3 MPO 活性値

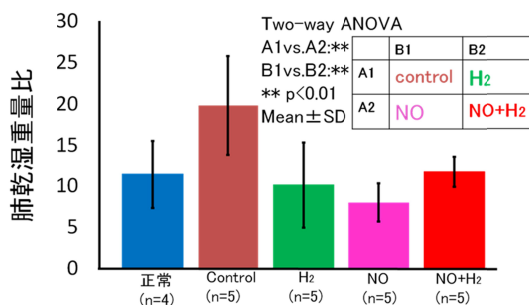


図 4.4 肺血管外乾湿重量比

さらに、水素ガスが NO ガスの有害事象を抑え、単独ガス吸入よりも効果があったかどうかを検討するために、一酸化窒素を吸入している 2 群(一酸化窒素吸入群、併用吸入群)間で生存曲線を log-rank 検定で比較した(図

4.2)。2 群間を比較したところ、併用吸入群の生存時間が有意に延長した。

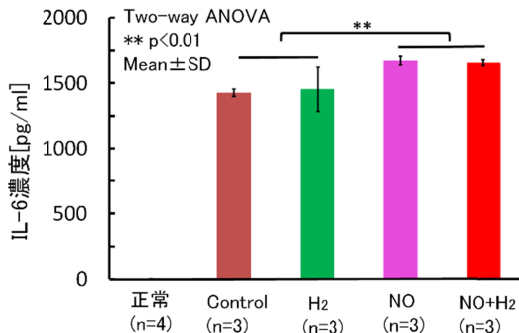


図 4.5 IL-6 濃度

MPO 活性値(図 4.3)では、一酸化窒素吸入している 2 群(一酸化窒素吸入群、併用吸入群)が、一酸化窒素吸入していない 2 群(Control 群、水素吸入群)と比べて、有意に低値を示した。

肺血管外乾湿重量比(図 4.4)では、水素吸入、NO 吸入のどちらも、肺血管外乾湿重量比を有意に低下させていた。

10 時間後の血漿中 IL-6 濃度では(図 4.5)、一酸化窒素吸入している 2 群(一酸化窒素吸入群、併用吸入群)が、一酸化窒素吸入していない 2 群(Control 群、水素吸入群)と比べて、IL-6 が有意に高値を示した。また、致死性 ARDS モデルマウスでは正常マウスに比べ、IL-6 濃度が非常に高くなっていった。

以上の結果から、NO 吸入は、肺への好中球の集積や血管透過性の亢進を抑制するなどの有益な効果が得られたが、炎症性サイトカインである IL-6 が増加してしまっており、生存時間を延長させることができなかったと考えられる。一方、水素吸入は、好中球の浸潤は抑えていないものの、血管透過性の亢進は抑制しており、サイトカイン濃度も増加させていないことから、生存時間の延長が見られたと考えられた。NO の効果も得ながら、その有害事象を減らすことができる一酸化窒素ガスと水素ガスの併用吸入を行うことが最も望ましいと考えられた。

本実験では、水素吸入により生存時間が延長することは確認されたが、死亡率の改善には至らなかった。そのため併用吸入だけでは治療として不十分と考えられた。特に吸入療法においては、サイトカインの増加を抑えることができている点が弱点になっている可能性が高いと考えられた。そこで、炎症性サイトカインの産生を抑制できるような既存の治療法、例えば血液浄化治療、薬物療法などの治療法と組み合わせて併用吸入を実施することによって、有効な治療効果が得られる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shinbo T, Kokubo K, Sato Y, Hagiri S,

Hataishi R, Hirose M, Kobayashi H. Breathing Nitric Oxide plus Hydrogen Gas Reduces Ischemia-Reperfusion Injury and Nitrotyrosine Production in Murine Heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 305: H542-H550, 2013 (査読・有)

[学会発表](計8件)

Ikeda R, Hoshi A, Shimoda J, Kobayashi K, Kokubo K, Kobayashi H. Effects of nitric oxide and hydrogen gas on mitochondrial respiration after anoxiareoxygenation. The 9th Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016.5.20-22, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

小久保謙一, 下田純平, 栗原佳孝, 小林こず恵, 小林弘祐. ミトコンドリアの酸素消費速度に及ぼす水素ガスの影響. 第5回分子状水素医学シンポジウム, 2015.3.21-22, 愛知県産業労働センター(ウインク愛知)(愛知県・名古屋)

Nishikawa Y, Kokubo K, Kobayashi K, Hataishi R, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Hydrogen gas inhalation ameliorates direct lung injury and indirect contralateral lung injury in a murine aspiration pneumonia model. The 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (APSR), 2014.11.13-16, Bali (Indonesia)

小久保謙一, 松代悠暉, 小林こず恵, 小林弘祐. ミトコンドリア呼吸に及ぼす水素ガスの影響. 第18回酸素ダイナミクス研究会, 2014.11.29, 京都大学医学部人間健康科学科・第5講義室(京都府・京都市)

小久保謙一, 青木実怜, 中村彩花, 小林こず恵, 下内章人, 小林弘祐. 水素水および難消化性糖類を摂取したときの呼気ガス中水素濃度の検討. 第23回バイオフィジオロジー研究会, 2014.2.20-21, ホテル京阪京都(京都府・京都市)

西川優希, 小久保謙一, 畑石隆治, 益田典幸, 小林弘祐. 誤嚥性肺炎マウスモデルにおける肺傷害の水素吸入による低減. 第4回分子状水素医学シンポジウム, 2014.2.1, きゅりあん小ホール(東京都・品川区)

昆夏美, 西川優希, 小久保謙一, 畑石隆治, 益田典幸, 小林弘祐. 誤嚥性肺炎マウスモデルにおける肺傷害の水素吸入による低減. 第17回酸素ダイナミクス研究会, 2013.8.3-4, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森県・弘前市)

佐藤友理, 新保年弘, 小久保謙一, 羽切慎太郎, 畑石隆治, 益田典幸, 小林弘祐. マウス心筋虚血-再灌流傷害モデルに対する水素・一酸化窒素同時吸入の保護効果. 第13回日本NO学会学術集会, 2013.6.28-29, 沖縄県医師会館(沖縄県・南風原町)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 弘祐 (KOBAYASHI, Hirotsuke)
北里大学・医療衛生部・教授
研究者番号: 70153632

(2)研究分担者

久保田 勝 (KUBOTA, Masaru)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号: 00234500

藤井 重元 (FUJII, Shigemoto)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00325333

赤池 孝章 (AKAIKE, Takaaki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20231798

小久保 謙一 (KOKUBO, Kenichi)
北里大学・医療衛生部・准教授
研究者番号: 20287965