

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10983

研究課題名(和文)重症熱中症に対する水素を用いた新たな治療戦略

研究課題名(英文)Beneficial effects of Molecular hydrogen in rat model of heat stroke

研究代表者

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40397998

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)：分子状水素は抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有することが様々な疾患で報告されている。ラット熱中症モデルを用いて、分子状水素が熱中症により引き起こされる酸化ストレスや全身炎症反応を抑制し臓器保護効果を有するか検討した。水素ガス吸入および水素輸液は、熱中症による酸化ストレスおよび全身炎症反応を限定的ではあるが抑制し、肝臓保護効果を有することが明らかとなった。さらに、24時間後の生存率も上昇させた。今後、熱中症の新規治療薬としての分子状水素の臨床研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Molecular hydrogen exerts beneficial effects of the anti-oxidative stress, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects in various diseases. The purpose is to investigate whether molecular hydrogen suppress oxidative stress and systemic inflammation caused by heat stroke, and exert protective effects of liver using rat model of heat stroke. H<sub>2</sub> gas inhalation and intravenous administration of H<sub>2</sub> ringer solution suppressed oxidative stress and systemic inflammation caused by heat stroke, and exerted protective effect of liver. In addition, molecular hydrogen increases 24-hour survival rate. Molecular hydrogen may be an effective treatment for heat stroke and clinical research will be desired.

研究分野：救急医学

キーワード：熱中症 分子状水素 酸化ストレス 全身炎症反応

1. 研究開始当初の背景

熱中症は熱による細胞毒性、活性酸素産生による酸化ストレスの増大、炎症反応、虚血再灌流障害、凝固異常などから多臓器障害に至る症候群である。治療法はできるだけ早期に平温に戻し、不全臓器に対する支持療法を行うことのみで、他に有効な治療法は確立されていない。分子状水素(H<sub>2</sub>)は抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有することが様々な疾患で報告されている。今回、我々は熱中症の新規治療法として水素ガス吸入、水素輸液の効果を検討した。

2. 研究の目的

ラット熱中症モデルを用いて、H<sub>2</sub>が熱中症により引き起こされる酸化ストレスや全身炎症反応を抑制し臓器保護効果を有するか検討した。

3. 研究の方法

(1) ラット熱中症モデル

Figure 1 に実験方法を記す。Sprague-Dawley (SD)ラット(BW 350-450g)を用いて熱中症モデルを作成した。

麻酔下(ペントバルビタール 45 mg/kg 腹腔内投与)に人工呼吸管理とし、大腿動静脈にカニューレション(PE50)した。ラットの深部体温(直腸温)を白熱灯および加温パッドを用いて10分間に1℃の速度で40℃まで上昇させ、平均血圧が10mmHg低下した時点を超えて熱中症の発症とした。そして、40℃で1時間維持し、採血後に安楽死させ肝臓を灌流固定、あるいは復温後覚醒させ24時間生存させた。水素投与の有無でSham群、リンゲル液(Ringer solution: RS)群、水素ガス群(H<sub>2</sub>Gas+RS)、水素リンゲル液低用量群(H<sub>2</sub>RS Low dose)、水素リンゲル液高用量群(H<sub>2</sub>RS High dose)の5群に分けた。吸入群は熱中症発症後2%水素を吸入させた。リンゲル液は熱中症発症直後17mL/kgを静脈投与し、その後10mL/kgを10分毎に5回に分割投与した。水素リンゲル液(1.6ppm)は、熱中症発症直後17mL/kgを静脈投与し、その後低容量群は10mL/kgの水素水を10分毎に5回に分割投与、高容量群は20mL/kgの水素水を5分毎に10回に分割投与した。

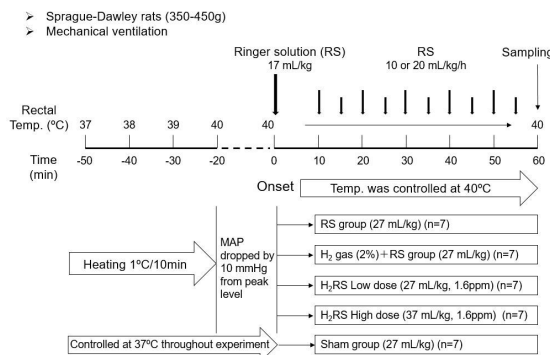


Figure 1. Experimental design

(2) 評価項目

発症1時間後のバイオマーカーおよび肝臓組織、24時間後の生存率を比較検討した。バイオマーカーは酸化ストレスマーカー(Malondialdehyde: MDA、Nitrotyrosine: N-Tyr、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG)、炎症マーカー(Soluble intercellular adhesion molecule-1: sICAM-1、High-mobility group box 1: HMGB1)、肝臓マーカー(Aspartate aminotransferase: AST、Alanine aminotransferase: ALT)を測定した。肝臓の組織学的評価は、10枚/匹の画像について6つのパラメーター(細胞質退色、空胞形成、核凝縮、核断片化、核消退、赤血球停滞)をスコアリングするLiver histology (injury) scoreを用いて定量的に行った(Heijnen BH, et al. Surgery 2003)。さらに、RS群およびH<sub>2</sub>RS低用量群について24時間後のラット生存率を比較検討した。

4. 研究成果

Table 1 に各群の特徴を示す。体重、準備時間、熱中症発症時間、加温時間、加温速度に有意差は認めなかった。投与されたH<sub>2</sub>実測値はH<sub>2</sub>Gas 1.84%、H<sub>2</sub>RS 1.1ppmであった。

Table1. Characteristics

	Sham	RS	H <sub>2</sub> gas + RS	H <sub>2</sub> RS Low dose	H <sub>2</sub> RS High dose
Body weight, g	396 ± 25	421 ± 29	421 ± 41	423 ± 43	416 ± 38
Preparation, min	34 ± 2	38 ± 6	38 ± 7	32 ± 3	32 ± 5
Onset time, min	-	18 ± 6	18 ± 4	19 ± 3	20 ± 4
Warming duration, min	-	34 ± 4	30 ± 6	31 ± 4	28 ± 2
Warming rate, min/°C	-	12 ± 2	11 ± 3	11 ± 2	9 ± 2
Hydrogen concentration, ppm	-	-	(1.84%)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1

Values are expressed as mean ± SD

Figure 2 に実験期間中の深部体温および平均動脈圧の推移を示す。Sham群は37℃に、熱中症群は40℃に維持された。平均動脈圧は120-130mmHgに維持された。

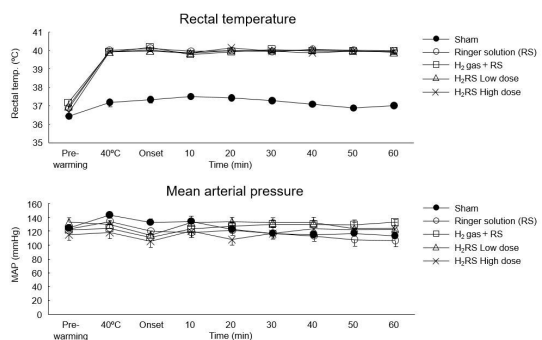


Figure 2. Physiological data  
Values are expressed as mean ± SD

Table 2 に血液ガス分析の結果を示す。熱中症発症1hr後、H<sub>2</sub>を投与していないRS群

では、pH および Base excess の低下、Lac の上昇を認め、代謝性アシドーシスを呈した。

Table 2. Blood gas analysis (FIO<sub>2</sub> 0.21)

		Pre-warming	Onset	60min
pH	Sham	7.45 ± 0.03	-	7.47 ± 0.03
	RS	7.47 ± 0.02	7.41 ± 0.04	7.34 ± 0.09
	H <sub>2</sub> gas + RS	7.43 ± 0.02	7.44 ± 0.02	7.43 ± 0.02
	H <sub>2</sub> RS Low dose	7.47 ± 0.04	7.46 ± 0.04	7.43 ± 0.04
	H <sub>2</sub> RS High dose	7.46 ± 0.01	7.46 ± 0.03	7.43 ± 0.03
PaO <sub>2</sub> , mmHg	Sham	83 ± 10	-	81 ± 7
	RS	81 ± 10	44 ± 8	45 ± 11
	H <sub>2</sub> gas + RS	76 ± 7	52 ± 9	55 ± 12
	H <sub>2</sub> RS Low dose	87 ± 12	49 ± 8	48 ± 11
	H <sub>2</sub> RS High dose	93 ± 7	54 ± 5	49 ± 13
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	Sham	41 ± 4	-	39 ± 3
	RS	39 ± 3	42 ± 3	40 ± 6
	H <sub>2</sub> gas + RS	42 ± 2	39 ± 1	36 ± 7
	H <sub>2</sub> RS Low dose	39 ± 3	40 ± 3	40 ± 4
	H <sub>2</sub> RS High dose	39 ± 2	38 ± 2	41 ± 3
Base Excess, mmol/L	Sham	4.8 ± 1.3	-	4.8 ± 1.1
	RS	4.2 ± 0.9	1.9 ± 1.8	-4.6 ± 9.2*
	H <sub>2</sub> gas + RS	2.9 ± 1.4	2.4 ± 1.5	0.6 ± 5.2
	H <sub>2</sub> RS Low dose	4.6 ± 1.4	3.8 ± 1.4	2.2 ± 1.9
	H <sub>2</sub> RS High dose	3.6 ± 1.1	3.3 ± 1.2	2.7 ± 0.4
Lactate, mmol/L	Sham	1.2 ± 0.4	-	1.0 ± 0.5
	RS	1.2 ± 0.1	1.9 ± 1.0	4.2 ± 3.5
	H <sub>2</sub> gas + RS	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.2 ± 0.3
	H <sub>2</sub> RS Low dose	1.6 ± 0.6	1.3 ± 0.6	1.6 ± 1.0
	H <sub>2</sub> RS High dose	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.2

Values are expressed as mean ± SD. \*P<0.05

酸化ストレスマーカーは RS 群と比較して H<sub>2</sub> 投与群ではいずれも低い傾向にあったが、有意差は認めなかった ( Figure 3-1 )。

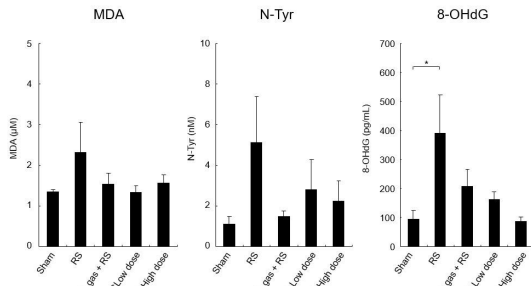


Figure 3-1. Biomarker (Oxidative stress)  
Values are expressed as mean ± SEM. \*P < 0.05

炎症マーカーにおいても同様に H<sub>2</sub> 投与群で低い傾向にあり、RS 群と比較して H<sub>2</sub>RS 低用量群では有意に低値であった ( Figure 3-2 )。

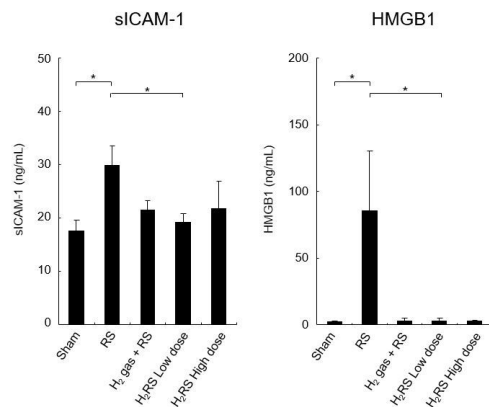


Figure 3-2. Biomarker (Inflammation)  
Values are expressed as mean ± SEM. \*P < 0.05

肝臓マーカーである AST および ALT においても同様に、RS 群と比較して H<sub>2</sub> 投与群で低い傾向にあったが、有意差は認めなかった ( Figure 3-3 )。

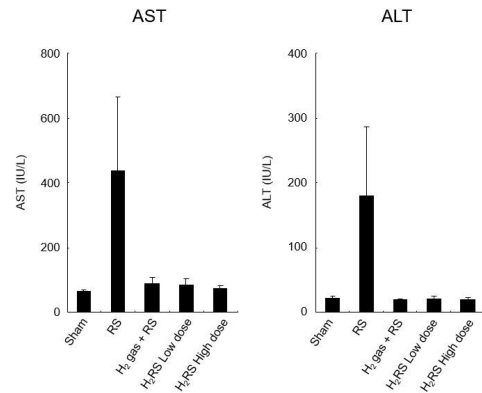


Figure 3-3. Biomarker (Liver)  
Values are expressed as mean ± SEM.

肝臓の組織学的評価に用いた Liver histology (injury) score について、H<sub>2</sub>RS 群はいずれも、RS 群および H<sub>2</sub>Gas 群と比較して有意に低値であった。H<sub>2</sub>RS 低用量および高用量群間に有意差は認めなかった。リンゲル液のみを投与した HR 群では、細胞質退色、空胞形成、核消退、赤血球停滞といった壊死に関連するパラメーターの異常が顕著であった ( Figure 4 )。

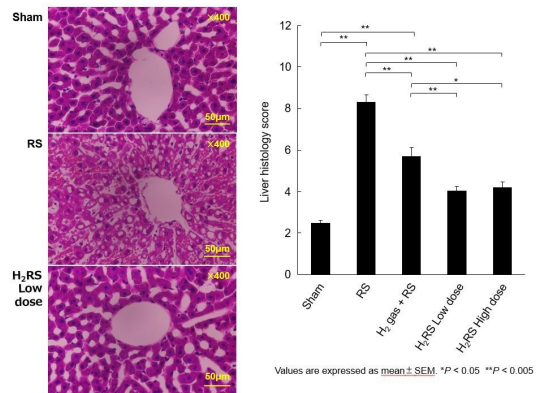


Figure 4. Histological evaluation

バイオマーカーおよび組織学的検討の結果から、水素リンゲル液低用量投与は水素ガス吸入や水素リンゲル液高用量投与と比較して遜色ない結果であったことから、生存率の比較は、RS 群および H<sub>2</sub>RS 低用量群の 2 群間で行った。

24 時間後の生存率は RS 群が 15 匹中 4 匹 ( 27% ) であったのに対して、H<sub>2</sub>RS 低用量群は 15 匹中 11 匹 ( 73% ) が生存しており有意差 ( P=0.011 ) を認めた。いずれの群においても、死亡するラットは平温に復温途中あるいは復温後 3 時間以内の早期に死亡した ( Figure 5 )。

	RS group	H <sub>2</sub> RS group	P value
24-hour survival	4/15 (27%)	11/15 (73%)	0.011 (0.015)

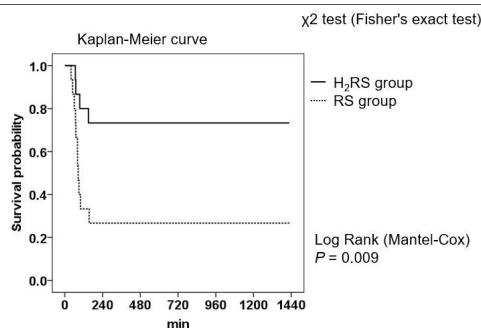


Figure 5. Outcome at 24 hours

以上の結果より、熱中症により引き起こされる急性期の高度な酸化ストレス障害、炎症反応、肝臓損傷が、水素輸液によって軽減されることにより生存率が上昇したと考えられた。

水素ガス吸入および水素輸液は、熱中症による酸化ストレスおよび全身炎症反応を限定的ではあるが抑制し、肝臓保護効果を有することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小田泰崇、ラット熱中症モデルを用いた分子状水素の効果の検討、第7回日本分子状水素医学生物学会、2017年

〔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：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：

取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)  
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：40397998

### (2) 研究分担者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)  
 山口大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：50380001

宮内 崇 (MIYAUCHI, Takashi)  
 山口大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：40380000

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし