

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11055

研究課題名（和文）膜型人工肺を用いた水素投与による新規治療法の開発

研究課題名（英文）The novel hydrogen therapy with a membrane oxygenator

研究代表者

古賀 寛教（Koga, Hironori）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50468013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではラット体外循環モデルを用いたが、当初のモデルでは出血性合併症の頻度が高く、モデルとして確立するために厳密な抗凝固薬の用量調整を要した。また、血行動態が不安定であるため、モデルそのものの修正を行い、脱血ルートと送血ルートを変更し、ポンプ流量を一定にすることでより効果的に膜型人工肺を組み込むことが可能となった。体外循環における膜型人工肺を用いた水素療法の可能性が示唆された検討であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、モデルの確立に難渋し、水素投与効果の十分な検討には至らなかったが、根本的な体外循環モデルの修正を行った。具体的には動脈脱血、静脈返血を静脈脱血、動脈返血のより臨床に近いモデルとし、血行動態の管理も厳密にすることでより確実に水素投与検討が出来るようになった。また、体内組織の水素濃度の測定系を確立したことで、今後水素投与法の違いによる体内動態、臓器特異性などを検討することが可能となった。今後、水素療法の益々の研究促進、導入が見込まれる中、水素の体内動態を知ることが不可欠であり、本研究成果はその礎となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used the rat extracorporeal circulation model. We often had difficulty controlling bleeding at first, but we established the suited model for evaluating the hydrogen therapy by fine-adjusting the dosage of the anticoagulant agent. In addition, we changed the blood removal route and blood supply route, this trial lead to the of hemodynamic stability and setting the membrane oxygenator in the circuit appropriately. This study suggested we can apply the mambrane oxygenator as the hydrogen therapy in the extracorporeal circulaiton.

研究分野：集中治療

キーワード：水素 体外循環 膜型人工肺

1. 研究開始当初の背景

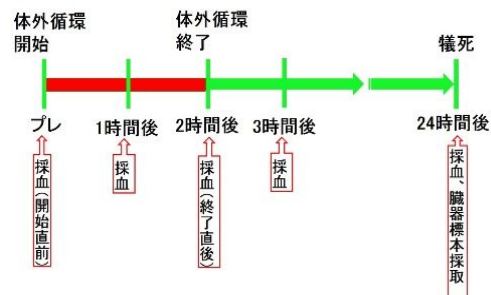
-水素分子の抗酸化作用、細胞保護効果-

水素分子 (H_2) は、強力な活性酸素種であるヒドロキシルラジカルを消去することで、抗酸化作用を呈すると報告されて以来、酸化ストレス反応が主体となる虚血再灌流障害モデルにおける水素の改善効果について検討が多くなされてきている。さらに近年、これまで報告されている血中有効濃度よりもはるかに低濃度の水素で細胞保護効果を示す研究が紹介され、すみやかに体内に吸収され細胞内に移行後、直接遺伝子に作用し、細胞内シグナルの制御を行っているのではないかという新しい知見が報告されている。水素の新規治療法としての可能性が広がっている今、動物実験のみならず、臨床においても各種病態に対する治療効果が検討されるに至っている。

-体外循環モデルにおける水素療法の可能性-

体外循環は、臨床現場において開心術、補助循環、血液浄化等、幅広く使用されており、生命維持に必要な人工心肺としての役割や、各種病態改善を目的とした治療法として確立している。しかし、体外循環そのものが、高度な酸化ストレス、炎症を惹起する侵襲の大きな医療行為であり、時には有用性を上回るデメリットをもたらすことに留意しなければならない。

現在報告されている水素投与法は、水素ガス吸入、水素含有水の静脈内投与、経口投与の3つのみである。そこで本研究によって、膜型人工肺による投与法が確立し、適応できる投与法の選択肢が広がれば、病態や環境によってより有効な水素投与法の使い分けが可能となる。本研究で検討する膜型人工肺における拡散によるガス交換法は、確実に血中に水素を溶存させることができ、濃度調整もその都度設定可能である。例えば、開心手術中、呼吸を停止させ肺循環を中断している際にも、確実に水素を体内に吸収させることができ、ガス吸入法では適応できない例であろう。また、水素含有水に関しては、水素溶存濃度の安定性も現時点では確実とはいえず、早々に大部分が消失してしまう欠点がある。長時間、安定して体内の水素濃度を保つことができるのも、体外循環を用いた投与法のメリットであると考えられる。



現在報告されている水素投与法は、水素ガス吸入、水素含有水の静脈内投与、経口投与の3つのみである。そこで本研究によって、膜型人工肺による投与法が確立し、適応できる投与法の選択肢が広がれば、病態や環境によってより有効な水素投与法の使い分けが可能となる。本研究で検討する膜型人工肺における拡散によるガス交換法は、確実に血中に水素を溶存させることができ、濃度調整もその都度設定可能である。例えば、開心手術中、呼吸を停止させ肺循環を中断している際にも、確実に水素を体内に吸収させることができ、ガス吸入法では適応できない例であろう。また、水素含有水に関しては、水素溶存濃度の安定性も現時点では確実とはいえず、早々に大部分が消失してしまう欠点がある。長時間、安定して体内の水素濃度を保つことができるのも、体外循環を用いた投与法のメリットであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この体外循環モデルに膜型人工肺を組み込み新たな水素投与系を確立すること、また、各種病態の改善と、体外循環そのものがもたらす炎症や、酸化ストレスを抑制するかどうかを検討することである。

3. 研究の方法

-ラット体外循環モデルの基本プロトコール-

これまで我々の研究で用いてきたモデルを踏襲する。セボフルレン吸入で麻酔導入、維持した Sprague-Dawley (SD) 雄性ラット (400-450g) の外頸静脈を露出し、中心静脈カテーテルを挿入し、投薬、採血、脱血用ルートとして確保する。また、大腿動脈に送血用カテーテルを挿入し、対側大腿動脈には動脈圧持続的モニター、採血用カテーテルを挿入する。次に筋弛緩薬を静脈内投与し、気管挿管後、人工呼吸器で調節換気を開始する。適宜ヘパリン投与し、ACT を一定レベルに保つ。血行動態の安定化を確認後、60ml/kg/min の流量で体外循環を開始、2時間維持する (体外循環時間は設定を変えながら、適宜侵襲の程度を把握し最終決定する)。この基本操作をもとに、回路に組み込んだ膜型人工肺 (膜面積 0.039m²) を介して水素添加を行う。はじめは、水素投与の条件決定を目的とし、以下の条件で体外循環が維持できるようにトータル流量 (ポンプ V/Q 比の検討)、水素濃度 (酸素及び窒素との混合比率) などの条件設定を決定し、体外循環モデル膜型人工肺 (充填量 4.0 ± 0.5ml) のプライミングは、ヘパリン生食で試みるが、貧血の進行、血管内ボリューム不足により、体外循環維持が困難となる場合は、同種輸血によるプライミングを考慮する。

【血中溶存水素濃度測定】ニードルタイプ水素センサー (Unisense 社) を用いて経時的に測定

(1) 他の投与法との効果比較

体外循環モデルに対し、人工呼吸器を用いた水素吸入 (吸入水素濃度 1%、2%、4%) を行い、膜型人工肺による水素投与法との比較を行う

体外循環モデルに対し、水素含有生理食塩水 (当研究グループで確立したバブリング法を用いて作成した飽和水素水、含有水素濃度は水素センサーで測定) の経口投与 (体外循環のプレ投

与、ポスト投与) 及び静脈内持続投与(体外循環時施行時)を行い、膜型人工肺による水素投与法との比較を行う。

(2) 新たな病態を追加し治療効果を検討(膜型人工肺を用いた水素投与法)

低体温モデル:体外循環に加え、ブランケットを用いた低体温条件(直腸温 34、32、30)での治療効果を検討する。

敗血症モデル:CLPによる敗血症モデルに、体外循環による水素投与の効果検討を行う。

LPS投与モデル:LPS投与を行い、ショックモデルを作成。体外循環による水素投与の効果検討を行う。

一方で、体外循環だけでも侵襲が大きいモデルであるため、体外循環の実験中の vital の維持が困難となり、実験遂行に影響を及ぼす可能性もある。このような場合には、体外循環時間を短くするなど基本設定を調整し、検討可能な範囲内で条件を変更して対処する。それでも追加侵襲モデルでの実験遂行が不可能な場合には、これまで体外循環という侵襲に対する水素投与の検討は、吸入法、水素水静脈内投与・経口投与のいずれも報告がないため、体外循環モデルに対する水素療法の検討(上記)をより詳細に行うこととする。具体的には、吸入法、水素水静脈内投与・経口投与について、投与時間設定の検討項目を増やし、より厳密に最適な治療法を決定する。

4. 研究成果

(1) 膜型人工肺の回路への組み込みによる合併症増加

膜型人工肺を組み込んだ体外循環モデルの確立するにあたり、これまで確立していた体外循環モデルの回路中にラット用人工肺を組み込む試みを行った。しかし、血行動態が不安定となるケースが多く、人工肺内回路分のポリウムロスの影響が考えられ、輸液等の増量で対応した。また、さらなる血行動態安定化を目指し、同種血輸血によるポリウム負荷も行ったが、やはり死亡例が多いため、後に示す出血合併症への対処とともに、根本的に回路中のプライミングポリウムを減らす試みが必要であった。そこで、ポンプ回路によるポリウムロスを回避するために、大腿動脈脱血、外頸静脈送血とし、血流は圧任せとした。

(2) 出血性合併症の対応

抗凝固に関して当初予定の ACT 目標値 200-250s は達成できるものの、体外循環後にカテーテル抜去部位から出血をきたし、死亡する症例が多く、血栓形成を生じないレベルでのヘパリン投与量の再検討を行った。また、2時間の体外循環時間を1時間に短縮し検討可能な範囲で侵襲を軽減する対策を行った。ヘパリン投与量を推奨される ACT 目標値 200-250s よりやや下げ、150-200s に維持することで体外循環の以前よりは安定した継続が可能となった。また、その後の出血性合併症も少なくさせることで、死亡症例を減じることができた。一方で、体外循環時間を2時間から1時間に短縮し、観察期間早期に死亡する症例は減ったものの、病態改善効果を検討するだけの長時間の生存は依然として厳しく、30分まで短縮せざるを得ない状況であった。血行動態を適切に維持し、炎症や酸化ストレス惹起の平均化を達成するためにプロトコルの修正が必要であった。

(3) 体外循環経路の修正

そこで新たな対策として、体外循環時間の変更、送血、脱血経路の変更を検討した。これまで体外循環は30分程度は問題ないが惹起される炎症度合いが一定しないため、1時間程度の体外循環がやはり不可欠と判断。また、水素を付加する膜型人工肺中の血流が一定しておらず(血圧が個体によって一定しないため)、付加効果が検証できなかった。そこで、これまで動脈脱血、静脈送血で血流を生体の圧任せとしていた経路を外頸静脈脱血、大腿動脈送血に再度戻し、輸血によって十分量のポリウムを確保し、血流はポンプによる灌流に変更(当初の速度より減速)した。また、その間血圧をやや低めに維持する(内頸動脈で測定)ことで血行動態のばらつきをおさえる試みによって、1時間の体外循環後の生存が可能となった。体外循環中は、平均血圧を50mmHg前後に保つように脱血を行いながら、1時間後に体外循環の終了と同時に返血した。このように血行動態や循環経路を臨床の体外循環に近い条件を設定した結果、灌流速度がポンプ使用によって一定となり、膜型人工中を流れる血流も均一化したため、今後検討モデルとして確立出来たのではないかと判断している。

(4) 今後の展望

現在、同時進行として、投与した水素の体内動態を計測する実験系の確立を模索した。血液中、

組織中の水素濃度を直接測定する系であり、投与した水素がどの組織に分布し、その局所における酸化ストレスや炎症をどう抑制しているのか検討に入っている。水素添加のための膜型人工肺を機能させつつ、体外循環モデルとして確立するまでに当初の予定よりはるかに遅延したが、本研究を通じ、今後の水素療法検討の一助となると考えている。今後は本研究をもとに、各組織における投与された水素の体内動態を明らかにし、標的臓器と水素療法が効果的な病態を詳しく検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----