

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08899

研究課題名(和文) 造影剤投与による急性腎障害の機序解明および医薬応用

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of acute kidney injury by administration of contrast media and pharmaceutical application

研究代表者

佐々木 淳一 (Sasaki, Junichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90235250

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)：本研究は造影剤による急性腎障害の進行を抑制する新しい方法を提案することを目的とし、私たちが以前に報告した水素分子に着目した。最初に、水素ガスをラットに吸入させ、組織内溶存水素濃度を高感度水素モニターにて複数臓器で測定した。その結果、水素は拡散単独によって分布しているのではなく血流により強く依存していることが示唆された。その結果を踏まえて、水素含有造影剤を作成し、造影剤腎症モデル動物に対する腎臓保護効果を検討した結果、水素を含まない造影剤を投与した群と比較して腎臓保護作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者(CKD)は増加の一途を辿っており、私たちの生活を脅かす新たな国民病と言われている。CKD患者の増加に伴い、血液透析患者は30万人を超え医療経済を圧迫している。CKD患者に対して病気の診断や治療のために造影剤を使用する場面が多く、この造影剤投与により腎臓寿命が短縮することがある。本研究の成果である水素含有造影剤の腎臓保護効果は改善が必要であるものの、造影剤投与による腎臓寿命短縮を抑制する新しい方法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Here, we propose a novel method for suppressing the progression of contrast-induced acute kidney injury through the use of hydrogen-containing contrast medium, as we have described previously. Rats were exposed to hydrogen gas by inhalation. A high-sensitivity hydrogen sensor was used to determine the concentration of dissolved hydrogen in multiple organs. Results showed that the distribution of hydrogen was more blood flow-dependent rather than diffusion-dependent. Based on this finding, we prepared a hydrogen-containing contrast medium. A contrast-induced nephropathy animal model was utilized to examine the renoprotective effects of the special medium. The results revealed renoprotective effects on the group treated with hydrogen-containing contrast medium compared to those treated with hydrogen-deficient contrast medium.

研究分野：救急医学

キーワード：急性腎障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は現在国内で1,330万人(20歳以上の成人の8人に1人)いると考えられ、私たちの生活をおびやかす新たな国民病といわれている。今後も高齢者の増加に伴い、増加の一途をたどることが容易に予想される。この慢性腎臓病が進行すると、血液透析などの腎代替療法が必要となるが、血液透析患者は30万人を超え、全医療費の約4%にもなり医療経済を圧迫している。このように慢性腎臓病が増加しているなかで、病気の診断や治療のために造影剤を使用する頻度は増加しているが、慢性腎臓病患者では造影剤投与による急性腎障害(造影剤腎症)を発症するリスクが高く、腎臓寿命がさらに短縮するが、造影剤腎症予防ガイドラインでは半日以上前から生理食塩水を補液することしか推奨されていない。急性心筋梗塞、大動脈解離、肺塞栓症や急性腹症などといった致死的な疾患を診断する際に造影剤を使用する検査は必須であるが、緊急性が高く、十分に補液を行う時間的余裕がなく、造影剤腎症に対しては何も対策を行うことができないジレンマがある。

2. 研究の目的

十分な検討がされていない分子状水素の体内分布や動態を明らかにし、分子状水素含有造影剤を開発、その腎臓保護効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 分子状水素の体内分布、動態の検討

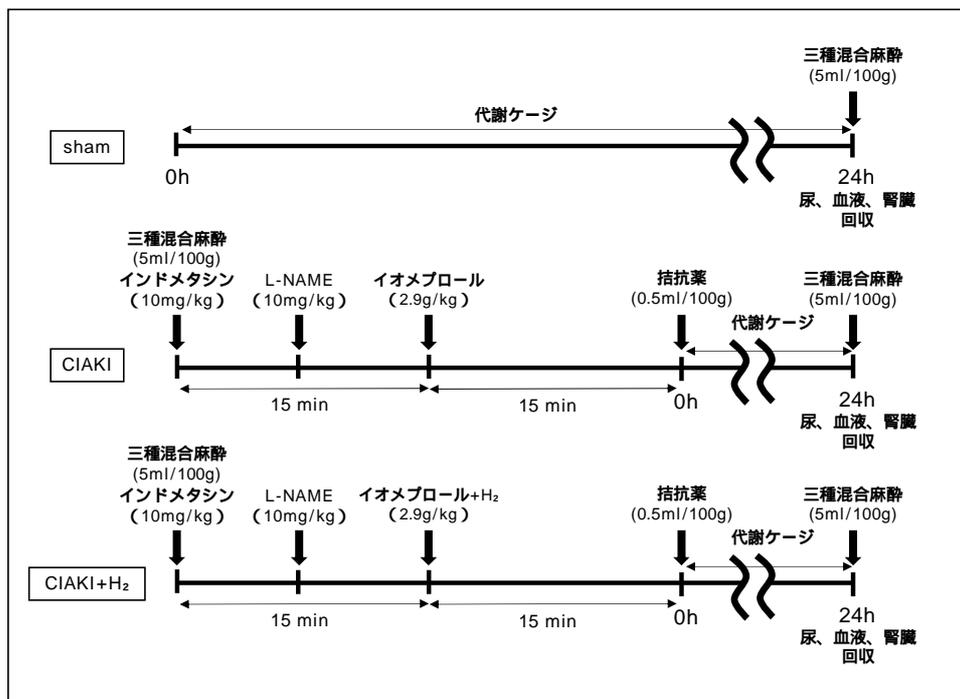
分子状水素(H_2)の供給後の組織分布と動態を明らかにするため、SDラットに3% H_2 ガスを連続吸入し、臓器と組織中の H_2 濃度の経時変化を検討した。 H_2 濃度は、*in vivo*での測定に適した高感度ガラスマイクロセンサを用いたリアルタイムモニタリングにより、脳(n=8)、肝臓(n=6)、腎臓(n=5)、腸間膜脂肪(n=4)、大腿筋(n=5)で測定した。各臓器での H_2 の濃度曲線から最大濃度(C_{max})、飽和までの時間(T_{sat})および分布の動力学を表す測定値を得た。これら結果を異なる臓器間で比較した。

(2) 分子状水素含有造影剤の開発

イオメプロール(造影剤)に高圧状態(0.4MPa)で H_2 を充填し、30秒間バブリングし溶解させた。

(3) 分子状水素含有造影剤の腎臓保護効果についての検討

ラットに三種混合麻酔を腹腔内投与した後、シリンジポンプを使用し大腿静脈より等速で、インドメタシン、L-NAMEの順に15分かけて投与し、続けてコントロール群では造影剤、水素投与群では水素充填造影剤を15分かけて投与した(下図)。水素充填造影剤は、使用直前に調製した。薬剤投与終了後、拮抗薬を腹腔内投与し覚醒を確認し、代謝ケージにて24時間飼育した。術後24時間後に、尿、血液、腎臓サンプルを回収した。



生化学パラメーターの測定

生化学自動分析装置を使用して尿中クレアチニン、血中クレアチニン (SCr)、血清尿素窒素 (BUN) を測定した。

組織評価

腎臓の細胞構造を確認するため、パラフィン切片 (4 μm) を作成し、HE 染色を行った。

組織損傷度のスコアリングは、第三者が無作為化した組織画像を任意のスケールを使用し、タンパク質性円柱及び尿管壊死に関して評価した。以下のようにスコア分けされた。

- 0 : 障害なし
- 1 : 斑状の孤立した障害
- 2 : 障害は 25% 未満
- 3 : 障害は 25% 以上 50% 未満
- 4 : 障害は 50% 以上

統計解析

データは、平均値 \pm 標準偏差で示した。Sham 群、CIAKI 群、CIAKI+H₂ 群の腎機能及び組織損傷度の多重比較では、クラスカル・ワリス検定に続き、Tukey-Kramer 法を用いて解析した。 $p < 0.05$ であるとき、統計学的に有意であると評価した。

4. 研究成果

(1) 分子状水素の体内分布、動態の検討

筋肉の T_{sat} は、他の器官よりも有意に長かった (20.2 分対 6.3-9.4 分、全例で $P = 0.004$)。 C_{max} は肝臓で最も高く、腎臓で最も低かった (29.0 ± 2.6 対 $18.0 \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$ 、全例で $P = 0.03$)。 C_{max} は臓器によって有意なばらつきがあった ($P = 0.03$)。

本研究では、ラットに 3% H₂ ガスを連続吸入し、各臓器における分子状水素 (H₂) 濃度の分布とリアルタイム変化をモニターしたところ、標的臓器間で、分布と動態が有意に異なっていた。特に、 C_{max} と T_{sat} は、互いに相関しなかった。本研究は、濃度曲線を比較することで得た動物組織間の H₂ 分布の差を報告した最初の研究である。

分子状 H₂ は、電気的に中性であり、低分子のために細胞膜を容易に透過できるので、H₂ ガスは供給直後に臓器に拡散できるとする報告が多数ある。ラットに超高濃度 H₂ 含有食塩水を経口または腹腔内投与した 5 分後と静脈内注射した 1 分後に各臓器の H₂ 濃度が、最大レベルに達したとの報告がある。またラットに H₂ を吸入した 5 分後に、動脈血と心筋中の H₂ 濃度が最大に達したとの報告もある。一方、ラット大腿筋では、H₂ 飽和がより遅いとの報告があり、H₂ の分布は気体拡散に完全には依存しないことも示唆されている。本研究での大腿筋の T_{sat} は他臓器よりも有意に長かったという結果は、ラットの筋肉の血流が他の器官の血流よりも低く、特に麻酔下ではさらに低いという事実を示唆するものである。

臓器により C_{max} に差があることの分子・細胞生理学的な理由は不明であるが、H₂ は、グリコーゲンのような多糖類または細胞脂質相に蓄積することが報告されている。本試験で観察された肝臓中の C_{max} ($29.0 \pm 2.6 \mu\text{mol/L}$) は、投与濃度 ($22.1 \mu\text{mol/L}$) よりも高く、肝臓で H₂ が貯蔵されることを示唆した。

結論として、連続 H₂ ガス吸入されたラットの各臓器での H₂ 濃度と分布について報告した。大腿筋は他の臓器よりも長い T_{sat} を必要としたが、肝臓は最も高い C_{max} を有し、臓器間でかなり C_{max} の変動がみられた。これらの結果は、哺乳動物系における H₂ の有益な治療効果の根底にあるメカニズムを解明するために不可欠である。今後の H₂ ガス吸入を用いる研究は、実験を設計する際と結果を解釈する際に、臓器間の H₂ 分布の有意差を考慮すべきである。

(2) 分子状水素含有造影剤の開発

従来法である非破壊的水素含有法では、溶存水素濃度が 0.4ppm であったが、本法では溶存水素濃度が 3ppm に達した。(図 1)

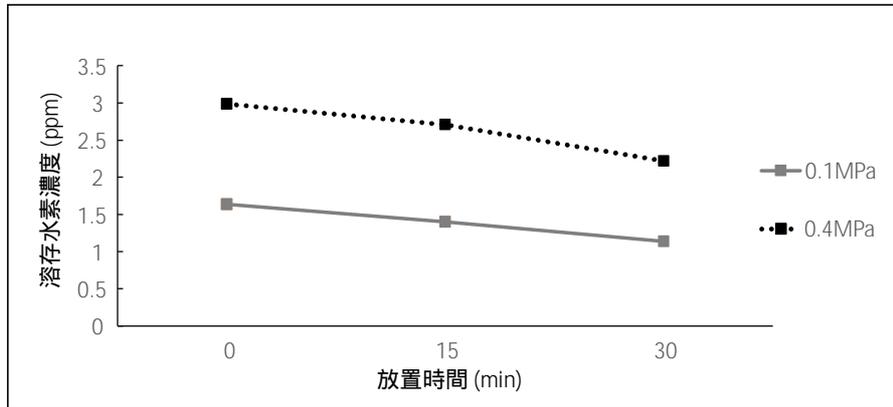


図1 イオメプロールの溶存水素濃度

ガスクロマトグラフィー（トライライザーmBA-3000）を使用し、15分刻みで30分までの計3回測定された。サンプル測定の所要時間は4分50秒、水素のピークRTは約60秒である。n=3（3）分子状水素含有造影剤の腎臓保護効果についての検討

腎障害マーカーによる評価

主要な腎障害マーカーである血清クレアチニン（SCr）、血清尿素窒素（BUN）、クレアチニンクリアランス（CCr）をsham群、Ct群、H₂群において測定した結果を以下に示す。（図2）

BUNは、Sham群と比較しCIAKI群で有意に上昇し（BUN;CIAKI=114.20±22.1,CIAKI+H₂=80.93±44.33）（図2b）、CCrはSham群と比較しCIAKI群で有意に減少した（CCr; CIAKI=0.61±0.5,CIAKI+H₂=2.31±1.88）（図2c）。一方SCrは、Sham群と比較しCIAKI群で上昇したものの、有意差は付かなかった。（SCr;CIAKI=1.01±0.7,CIAKI+H₂=0.64±0.6）（図2a）

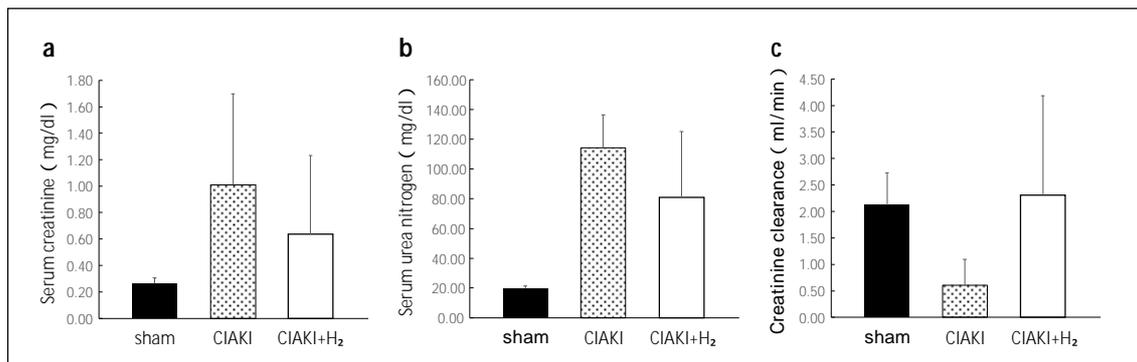


図2 水素充填造影剤の腎保護作用の腎機能評価

CIAKIモデルラットは、インドメタシン、L-NAME、イオメプロール（Ct）または水素充填イオメプロール（H₂）を大腿静脈より30分間で投与することに作製した。血清クレアチニン（a）、血清尿素窒素（b）はイオメプロール投与終了後24時間後の血清を測定した。クレアチニンクリアランス（c）は、イオメプロール投与終了後24時間後の血清及び尿サンプルより算出した。

n=3~5, mean±S.D., * p<0.05 vs Sham, ** p<0.01 vs Sham

組織評価

CIAKIの組織学的特徴である、タンパク質性キャストの形成及び尿細管壊死をHE染色画像をもとに評価した結果を以下に示す（図3,図4）。組織損傷度スコアリングの結果、尿細管におけるタンパク質性キャストは、CIAKI群と比較してCIAKI+H₂群において有意に減少した（cast; CIAKI=3.00±1.19, CIAKI+H₂=1.90±1.78）（necrosis; CIAKI=2.29±0.91, CIAKI+H₂=1.85±1.21）（図3）。一方、尿細管壊死は、CIAKI群と比較してCIAKI+H₂群において有意な減少は確認できなかった（necrosis; CIAKI=2.29±0.91, CIAKI+H₂=1.85±1.21）（図4）。

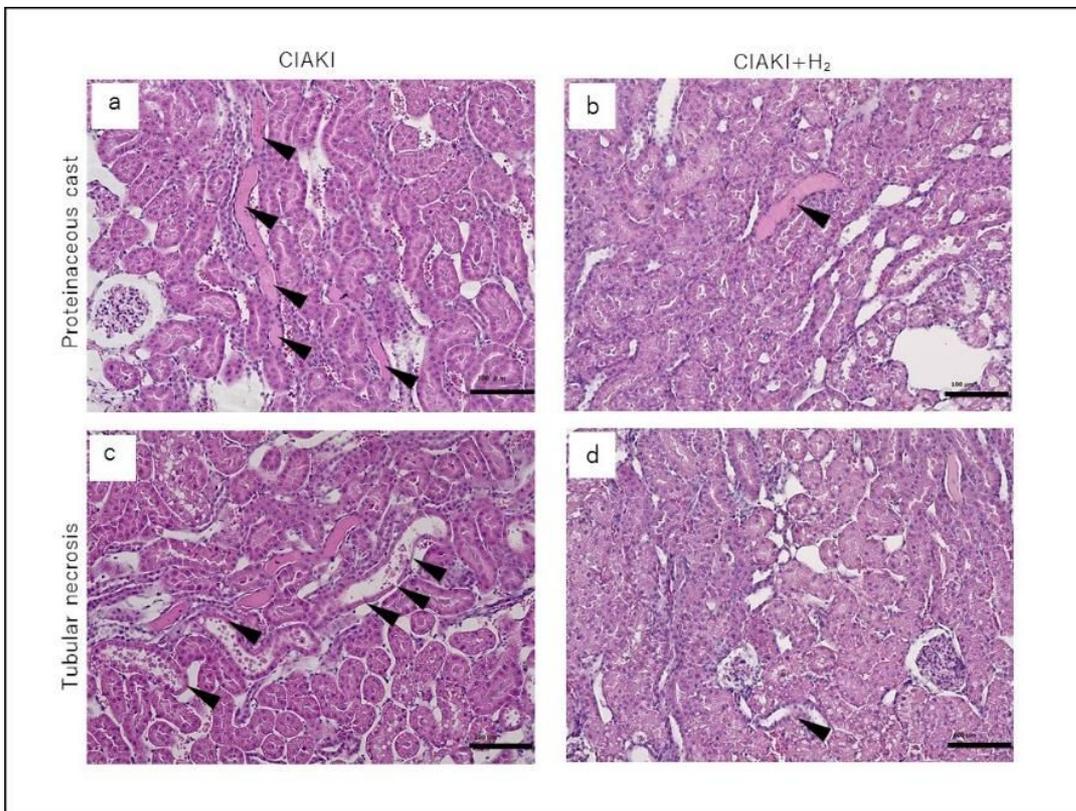


図3 水素充填造影剤投与時の腎臓組織のHE染色

CIACKI 群 (a,c)は、インドメタシン、L-NAME、イオメプロールを大腿静脈より30分間で投与することで作製した。CIACKI+H₂群 (b,d)は、投与直前に水素を充填したイオメプロールを投与した。組織画像 (a-d)はすべて200倍で撮影した。CIACKI 群及びCIACKI+H₂群のタンパク質性キャスト(a,b)、CIACKI 群及びCIACKI+H₂群の尿細管壊死(c,d)を示す ()。

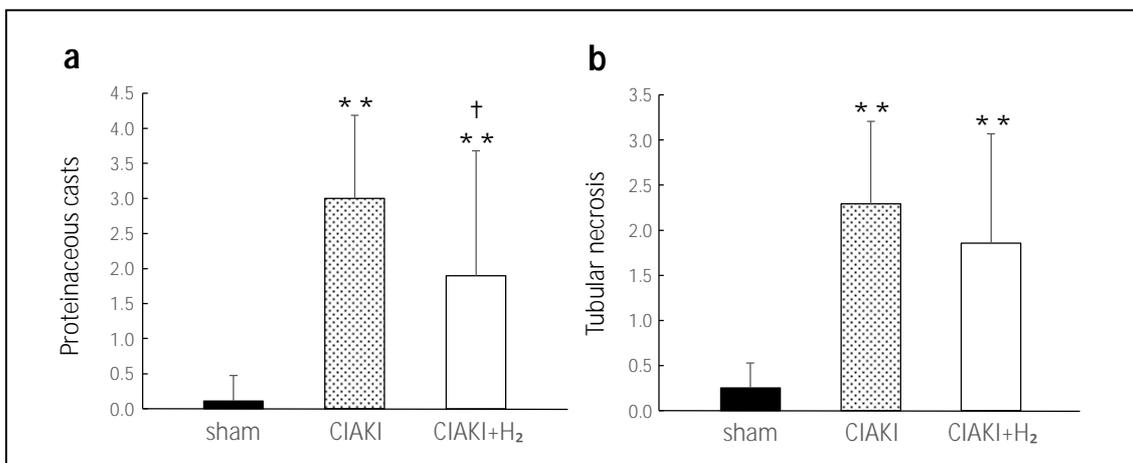


図4 水素充填造影剤投与時の腎組織損傷度スコアリング評価

sham 群、CIACKI 群及び CIACKI + H₂群のタンパク質性キャスト (a)、尿細管壊死 (b)の組織損傷度スコアリングを示す。n=3~5, mean ± S.D., ** p<0.01 vs Sham, † p<0.05 vs CIACKI

以上より、分子状水素の体内分布、動態を明らかにし、水素分子含有造影剤の腎臓保護効果の可能性を示すことができた。今後は、より実臨床に近い動物モデルを使用し、水素含有生理食塩水投与との併用効果の検討などを行う所存である。

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 Yamamoto Ryo, Homma Koichiro, Suzuki Sayuri, Sano Motoaki, Sasaki Junichi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Hydrogen gas distribution in organs after inhalation: Real-time monitoring of tissue hydrogen concentration in rat | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1255 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38180-4 | 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 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 本間 康一郎 (Homma Koichiro) (10383762) | 慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612) | |

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 |
|---------|---------|
| | |