

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09442

研究課題名(和文)水素ガス吸入による網膜虚血再灌流障害抑制効果の検討

研究課題名(英文) Investigation of the effect of hydrogen gas inhalation on retinal ischemia-reperfusion injury

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスで本研究を開始したが、モデル作成が困難であったため、ラットを用いて実施した。ラットで網膜中心動脈閉塞症のモデル動物を用いて、90分の網膜の虚血後に再灌流を行い、3日後、7日後に眼球の組織切片を作成し、HE染色後に網膜内層の厚みを測定した。H2(-)群では、網膜厚の減少がみられ、90分の虚血作成時に同時に1.8%の水素ガス吸入を行った水素ガス吸入群(H2(+))群では、水素による網膜の保護作用があることが示された。網膜内のグリア細胞に対してIba-1抗体およびGFAP抗体を用いて、免疫組織染色を行い、H2(-)群ではグリア細胞が増加し、H2(+))群ではそれらが少なかった。

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1.8%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の臨床的意義、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)：We began this study with mice, but because mice have small eyes and it was difficult to create a model, we conducted this study with rats.

In the H2(-) group, there was a decrease in retinal thickness, and in the hydrogen gas inhalation group (H2(+)) group, in which 1.8% hydrogen gas was simultaneously inhaled during the 90-minute ischemia, there was no difference from the control group, indicating that hydrogen gas inhalation has a protective effect on the retina. The H2(+)) group showed no difference from the control group, indicating that hydrogen gas inhalation had a protective effect on the retina. Immunohistochemical staining was performed using Iba-1 antibody against microglia and GFAP antibody against astrocytes in the retina. Astrocytes and microglia were increased in the H2(-) group and were decreased in the H2(+)) group.

研究分野：眼科

キーワード：虚血再灌流 網膜 水素ガス

### 1. 研究開始当初の背景

網膜中心動脈閉塞症は、内頸動脈の不安定プラークや心疾患に伴う血栓などにより網膜中心動脈が閉塞して発症する。その発症は突然で片側、無痛性、急激な視力低下を伴う。現在行われている治療は保存的治療であり、眼球マッサージ、眼圧下降、血管拡張薬投与程度しかなく、有意な視力改善は通常10%未満の症例でしか得られない。この網膜中心動脈閉塞症の予後を改善させるため、過去に血栓溶解剤の静脈内、動脈内投与も試みられたが、脳出血などの重篤な有害事象の頻度が高まることが示され、現在は行われていない。同じく、動脈閉塞による臓器障害として心筋梗塞がある。冠動脈の閉塞後に再灌流すると虚血再灌流障害が生じ、梗塞巣がさらに拡がることわかっている。しかし、この虚血再灌流障害を軽減させる有効な治療法はなかった。水素ガス吸入療法が心筋梗塞後の虚血再灌流障害に対して有効であるとの報告が、動物実験でも臨床研究でも明らかとなり、先進医療Bとして臨床の場で心停止後症候群に対して実施され、有効性が示された。網膜中心動脈閉塞症においても一時的な動脈閉塞後再灌流が生じるため、同じく水素吸入療法が有効である可能性が高い。以上をもとに本研究では網膜中心動脈閉塞症の動物実験を行い、水素吸入療法の効果を検討する。

### 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障害が抑制できることが2007年に報告された(Ohsawa et al., Nature Med 2007)。水素ガスは、活性酸素腫の中でも強力な細胞傷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に体内での組織移行が優れていることが理由である。その後、ラットの急性心筋梗塞モデルでも水素ガス吸入により梗塞範囲を減少させることが報告された(Hayashida et al. Biochem Biophys Res Commun 2008)。水素ガス吸入療法は比較的安全な治療であり、先進医療Bで、その有効性が示された。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水素ガス吸入の効果を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウスからラット網膜虚血再灌流障害モデルの作成

研究開始当初は、マウスを使用したが、眼球が小さく、モデル作成が困難であったため、ラットに変更し、SDラットで研究を実施した。トロピカミドとフェニレフリンを点眼し散瞳させる。筋肉内注射と腹腔内注射で全身麻酔を行ったうえで、局所麻酔薬の点眼を行う。顕微鏡下で右眼の前房内に30ゲージ針と刺入し、30ゲージ針を生理食塩水のボトルに接続し、眼圧を収縮期血圧以上の110mmHgになるように維持する。このとき、体温の管理も同時に行う。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できる。虚血時間は90分で作成し、再灌流後3日および7日で眼球摘出を行う。1.8%水素吸入の開始は、眼球の虚血開始後すぐに開始した。網膜虚血後の再灌流の確認は検眼鏡で行う。水素ガス吸入は1.8%水素 + Air のガスを用意して吸入させた。また1.8%水素ガスは非可燃性の濃度である。

コントロール群では、同じ網膜虚血再灌流障害を作成し、通常のルームエアーを吸入させる。いずれの群でも片眼のみ虚血再灌流障害を作成する。水素吸入群で20匹、コントロール群で20匹使用する予定である。

動物実験の取り扱いに関しては、富山大学動物実験指針に基づいて研究許可を得て行う。

#### 2) 組織学的検討

##### 1. 網膜厚および免疫染色による検討

網膜虚血再灌流障害を作成中に90分間の1.8%水素ガス吸入を行った後、3日後、7日後にマウスを安楽死させ、眼球を摘出する。4%パラホルムアルデヒドで固定し、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各層の厚みと網膜の層

構造の維持、網膜神経細胞数を評価する。

これらの切片を使用して、免疫染色では、網膜内のグリア細胞に対して GFAP 抗体を用いて染色し、マイクログリアに対しては Iba-1 抗体を用いて染色する。

## 2. ウェスタンブロットによる検討

ウェスタンブロットでは、HSP70 (heat shock protein)、および GFAP について、虚血再灌流後 3 日目および 7 日目の網膜からタンパク質を抽出し、水素吸入群とコントロール群でタンパク量を比較する。

## 4. 研究成果

マウスで本研究を開始したが、マウスでは眼球が小さく、モデル作成が困難であったため、ラットを用いて本研究を実施した。また、コロナ禍のため、動物実験施設等の使用が十分にできず、2 年間研究機関を延長せざるをえなかった。そのため、動物モデルの作成に大きく時間を要した。

ラットで網膜中心動脈閉塞症のモデル動物作成を用いて、90 分の網膜の虚血後に再灌流を行い、3 日後、7 日後に眼球摘出し、ラット眼球の組織切片を作成し、HE 染色後に網膜内層（内境界膜から外網状層まで）の厚みを測定した。再灌流後 3 日、7 日の H2(-)群では、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  $109.2 \pm 10.7 \mu\text{m}$  と比較して減少がみられた。一方で 90 分の虚血作成時に同時に 1.8%の水素ガス吸入を行った水素ガス吸入群（H2(+)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  $102.3 \pm 23.6 \mu\text{m}$ ,  $107.2 \pm 16.0 \mu\text{m}$  とコントロールの  $112.0 \pm 10.9 \mu\text{m}$  と比較して差はみられず、水素ガス吸入が網膜の保護作用があることが示された。

さらに免疫組織染色を行った。網膜内のマイクログリアについては Ionized calcium binding adapter molecule 1(Iba-1)抗体、アストロサイトについては Glial fibrillary acidic protein(GFAP)抗体を用いた。虚血再灌流 3、7 日後の H2(-)群では無処置群にみられる網膜表層のアストロサイトの網膜内層に伸長する突起が消失し、無処置群に比べアストロサイトが増加していた。一方で 3、7 日後の H2(+)群では網膜表層のアストロサイトは、網膜内層に突起を伸長し、無処置群に比較してアストロサイトの突起は増加していた(3日 > 7日)。7 日後の H2(+)群では 7 日後の H2(-)群と比較してアストロサイトが少なかった。

3 日後の H2(-)群の Iba1 の免疫染色像では網膜下へ多数のマイクログリアが浸潤する像が観察された。しかし、H2(+)群では網膜下へマイクログリアが浸潤する程度は軽度であった。7 日後の H2(-)群では網膜の菲薄化がみられたが、マイクログリアの浸潤はほとんど観察されなかった。

ウェスタンブロットでは、HSP70 のタンパク質発現量を測定し、水素吸入による神経保護作用因子への影響を検討した。1 日、3 日後に HSP70 を測定したが、経時的にも群間においても差は見られなかった。GFAP のタンパク質発現は 3 日後の H2(+)群で無処置群と比較して有意に亢進していた。

水素吸入による抗酸化作用因子への影響を検討するため NRF2 のタンパク質発現量を測定し、3 日後の H2(+)群で無処置群と比較して有意に亢進していた。

現在、論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0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
4. 発表年 2023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	柚木 達也 (Yunoki Tatduya)  (30401805)	富山大学・学術研究部医学系・講師  (13201)	
研究分担者	宮腰 晃央 (Miyakoshi Akio)  (10624926)	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
---------	---------