

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32644  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2023  
課題番号：18K15859  
研究課題名（和文）脳梗塞に対する水素吸入療法の病巣到達経路解明及びヒト投与量シミュレーション解析  
研究課題名（英文）Elucidation of the path to the lesion and analysis of human dosage simulation for hydrogen inhalation therapy against cerebral infarction  
研究代表者  
後藤 信一（GOTO, Shinichi）  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：50770864  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラット・マウスにおいて脳内の水素のピーク濃度の対数と気相からの距離をプロットしたところ直線に並び、仮説（水素が単純拡散で組織に到達する）を支持する結果であった。脳梗塞モデルマウスで同様の実験を行ったところ、健康マウスに比べ、水素濃度の低下が観察された。本結果は仮説と矛盾する結果であったが、その後の検討で、脳梗塞の作成により、マウスの呼吸数が低下していることが判明した。水素濃度の低下が血流遮断によるものか、呼吸によるものかを切り分ける更なる研究が必要である。シミュレーションの結果は距離と濃度の対数が直線に並び仮説を支持する結果であったが、脳梗塞の有無による呼吸の影響は考慮できなかった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は日本人の死因第4位の疾患である。血栓溶解療法は適応が狭く、出血の副作用がある。脳出血には当然禁忌であり、治療開始前に必ず画像診断で出血を除外しなければならない。早期治療が重要な脳梗塞において治療を遅らせている大きな原因の一つとなっている。先行研究で水素投与は脳梗塞だけでなく頭蓋内出血においても予後改善効果が得られる可能性が示唆されている。臨床応用されれば、画像診断を不要にすることで救急車内治療を可能とし、治療開始までの時間を大幅に短縮することが期待される。水素は分子量が小さく拡散能力が高いため、真空などからの単純拡散で梗塞巣に到達する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：When the logarithm of the peak concentration and the distance from the gas phase were plotted, the results were in a straight line, supporting the initial hypothesis that hydrogen reaches the tissue through simple diffusion. To confirm that these results were not influenced by blood flow, similar experiments were conducted in a mouse model of cerebral infarction. We observed a decrease in hydrogen concentration compared to healthy mice. Although these results contradicted the hypothesis, subsequent investigations revealed that the respiratory rate of the mice had decreased with the infarction procedure. Further research is needed to determine whether the decrease in hydrogen concentration is due to blood flow obstruction or respiration. The simulation results also supported the hypothesis but the effects of respiration could not be considered. Further research considering the impact of respiration was also found to be necessary.

研究分野：医学

キーワード：水素 脳梗塞 シミュレーション 到達経路 吸入

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水素吸入療法はマウス脳梗塞モデルの梗塞巣を著明に縮小することが報告されている (Ohsawa et.al Nat Med 2007). 当研究室で施行した予備実験でもこの事実は確認された. 脳梗塞は日本人の死因第 4 位の疾患であるのみならず, 神経学的後遺症を残し寝たきりになるリスクもあるなど健康寿命を著しく害する疾患である (Shinohara et.al J Stroke Cerebrovasc Dis 2011). 脳梗塞の治療である血栓溶解療法は適応が狭く, 出血の副作用がある. 脳出血には当然禁忌であり, 治療開始前に必ず画像診断で出血を除外しなければならない. 近年カテーテルを用いた血栓吸引療法の有効性も示されているが, この治療も適応判断のため画像診断で解剖学的な部位を同定することが不可欠である. 画像診断には高次医療機関への到着が必須であるため, 早期治療が重要な脳梗塞において治療を遅らせている大きな原因の一つとなっている. 先行研究で水素投与は脳梗塞だけでなく脳出血 (Manaenko et.al Acta Neurochir Supple 2011) やくも膜下出血 (Zhan et.al Crit Care Med 2013) などの頭蓋内出血の動物モデルにおいても予後改善効果が得られる可能性が示唆されている. 臨床応用されれば, 画像診断を不要にすることで救急車内治療を可能とし, 治療開始までの時間を大幅に短縮することが期待される. 梗塞巣は血流が遮断されているため一般に薬剤が到達しない. しかし, 水素は分子量が小さく拡散能力が高いため, 鼻空などからの単純拡散で梗塞巣に到達する可能性がある. 先行研究で心筋梗塞モデルの心臓組織で水素濃度が上昇することが示されている (Hayashida et.al BBRC 2008). しかし, これまでに脳の梗塞巣に水素が到達することを示した研究はない.

### 2. 研究の目的

**目的 1: 水素が単純拡散で梗塞部位に到達するという仮説を検証する**

**目的 2: ヒトにおける至適投与量, 投与方法を推定する.**

現在水素の投与経路として吸入以外にも飽和水の静注 (Nagatani et.al MedGasRes 2013) や水素水の飲用 (Yoritaka A et.al BMC Neurol. 2016) などが検討されている. 水素の到達経路が気相からの単純拡散であれば, 最適な投与方法は吸入だと考えられる. また, ヒトに対する適切な水素投与量は分かっていない. 到達経路が明らかになれば, コンピュータシミュレーションと組み合わせることで, ヒトに対する適切な投与量を推定することが可能である. 従って, 早期の臨床応用を目指し臨床研究への橋渡しをするためには水素の梗塞巣への到達経路の解明が不可欠である. しかし, 現在までに水素が脳の梗塞巣に到達することや, 水素の脳梗塞巣への到達経路を示した研究はない. そのため水素の到達経路を明らかにするという本研究の目的は臨床応用の促進につながる.

### 3. 研究の方法

本研究では,

仮説 1: 距離-濃度プロットを用いて水素の到達経路が単純拡散であることを検証し,

仮説 2: ヒトにおいてマウスの梗塞巣と同様の濃度を達成するために必要な水素の投与量, 投与方法をコンピュータシミュレーションで推定する.

仮説 1: 梗塞巣内への水素の到達経路の解明

仮説: 水素は単純拡散にて梗塞巣内に到達する

現在水素の投与方法として、吸入以外に飽和水の点滴などが検討されているが、水素は水溶性が低い。また分子量が小さい。そこで申請者は水素が単純拡散にて梗塞巣に到達するという仮説を立てた。仮説を検証するため(実験1)気相からの距離が異なる複数の点において水素濃度を測定しグラフを作成(実験2)、梗塞巣内の水素濃度を健常、虚血、再灌流の3状態で評価する。

(実験1):頭蓋骨に穴を開けneedle型水素電極をマイクロマニピュレータで梗塞巣に挿入し、副鼻腔などの気相との距離が異なる複数の点において水素濃度を測定後グラフにプロットする。水素が単純拡散により到達するのであれば水素濃度のピーク値の対数と気相からの距離をプロットしたグラフは直線になるはずである。

(実験2):梗塞巣に電極を挿入し、正常、虚血、再灌流にて水素濃度の変化を記録する。水素の到達が単純拡散によるものであれば、水素濃度は血流の影響を受けないため、梗塞巣でも濃度が上昇し、かつ再灌流により濃度が変化しないはずである。

実験1で仮説を検証するためには気相からの距離を十分にとったデータポイントが必要である。このためある程度頭部の大きい動物を使用する必要がある。本研究では、まずラットを用いる。梗塞巣に水素が到達することはマウスで検証したため、ラットでは梗塞を作らずに脳内の様々な部位で水素濃度を測定する。ラットの頭蓋骨の3Dデータはすでに公開されている(M. Pohl, et.al 2013)。この3Dデータをもとに気相からの距離を入力として、コンピュータで正確な目標挿入部位を割り出し、マイクロマニピュレータを用いてプローブを挿入する。

## 仮説2: コンピュータシミュレーションを用いた投与量、投与方法の検討

気相から梗塞巣に至るまでのルートには少なくとも気相、骨、髄液、脳の異なる4つのコンポーネントがあり複雑な形状をしている。水素は非極性分子であるため溶解度は極性溶媒である水よりも非極性溶媒である脂質に対して格段に大きくなる(Ulises-Javier et al. Latin American applied research 2004)。従って脂質を多く含む脳、水を多く含む髄液、骨、気相では水素が異なる振る舞いをする事が予想される。このため、マウスで測定した水素濃度を達成するための投与量、投与経路は単純な大きさの比のみでは計算できずコンピュータシミュレーションが必要である。コンピュータシミュレーションを用いた研究は主に2つのステップで進める。第1に信頼のおけるシミュレーションモデルの作成、第2にヒトの頭部の3Dデータを用いた実際の投与量・投与方法の推定である。

### 2-1: 信頼のおけるシミュレーションモデルの作成

ラットの頭蓋骨の3Dモデルからメッシュを作成し、気相、骨、髄液、脳の4つの領域を定義する。Navier-Stokes方程式を基礎方程式とし、脳内の水素濃度の分布を有限要素法で計算する。骨は水素を通さないと仮定し、髄液は水と考える。これにより骨、髄液、気相における水素の拡散係数、動粘性係数は文献値を使用でき、計算可能になる。頭蓋骨には神経や血管を通すための穴が無数に空いており、水素はこのような穴を通して脳に到達していると考えられる。脳組織における水素の拡散係数は不明である。このため、脳内の水素の拡散を計算するためには、工夫が必要である。本研究では、気相からの距離が既知の点において、測定値とシミュレーションの値が一致するように拡散係数をフィッティングする。得られたモデルは気相からの距離を変化させた時の実測とシミュレーションの合致を確認し検証する。

### 2-2: ヒトにおける水素の最適投与方法・投与量の推定

上記の実験で得られたモデルをもとに、ヒトの CT 画像から作成された頭部の 3D モデルからメッシュを作成しシミュレーションを行う。口腔内の水素濃度を in-silico で変化させ、脳の各部位で目標水素濃度を達成するために必要な水素投与量を算出する。頭部 CT の画像から 3D 構造を構築する方法は一般に確立されている。申請者の所属機関には、頭部 CT 画像は蓄積されている。ヒトの頭蓋骨の構造はこの蓄積された CT 画像から得る。

#### 4. 研究成果

マウスおよびラットの脳に水素電極を挿入して、水素を吸入させながら継続的に組織中の水素濃度を測定した。ピーク濃度の対数と気相からの距離をプロットしたところ直線に並び、仮説(水素が単純拡散で組織に到達する)を支持する結果であった。さらに、マウス・ラットともに同様の結果が得られた。この結果が血流の影響を受けないことを確認するため、脳梗塞モデルマウスで同様の実験を行ったところ、健常マウスに比べ、水素濃度の低下が観察された。本結果は仮説と矛盾する結果であったが、その後の検討で、脳梗塞の作成により、マウスの呼吸数が低下していることが判明した。水素濃度の低下が血流遮断によるものか、呼吸によるものかを切り分ける更なる研究が必要である。シミュレーションの結果は距離と濃度の対数が直線に並ぶ仮説を支持する結果であったが、脳梗塞の有無による呼吸の影響は考慮できなかった。シミュレーション系では血流の有無により水素の濃度が影響を受けないことが明らかになった。血液に水素を運搬する物質がなければ、計測結果と合わせ、仮説を支持するものと考えられたが、こちら呼吸の影響を考慮したさらなる研究が必要であることが判明した。ヒトの頭部モデルでの検討では、局所の濃度は吸入する水素の濃度の影響を受けないことがわかったが、当該濃度を達成するまでにマウスよりも時間がかかることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤信一
2. 発表標題 Protective roles played by heme oxygenase-2 against transhemispheric diaschisis
3. 学会等名 第44回日本微小循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤信一
2. 発表標題 Protective roles played by heme oxygenase-2 against transhemispheric diaschisis
3. 学会等名 第44回日本微小循環学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------