

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790628

研究課題名（和文） ラット脳卒中モデルにおける水素ガスを用いた効果の検討

研究課題名（英文） Relationship between administration of molecular hydrogen and stroke

研究代表者

西山 康裕 (NISHIYAMA YASUHIRO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20350077

研究成果の概要（和文）：水素ガスを吸入させることにより脳梗塞体積が縮小するというこれまでの知見を基に、まず水素ガスを溶解させた水素水を経口投与することにより脳卒中自然発症ラット（SHRSP）の死亡率に変化が見られるかを検討した。水素ガスは4気圧を2時間かけ、蒸留水に溶解させた。初期濃度として水素水の電位が-300～-500mVの範囲であることを確認し、水素水および蒸留水は連日交換した。水素水群(n=18)、蒸留水群(n=18)で比較検討を行った。結果として、両群間で死亡率に有意な差を認めず(Log-rank 検定 p=0.25)、水素水が生命予後に及ぼす影響については確認できなかった。一方で蒸留水に水素ガスを溶解し、経静脈投与を行う実験を行った。ラットは Male SD rats 8wks を用い、intraluminal suture MCAO 90分間再開通モデルで行った。水素水投与は bolus 投与とし、水素水 A 群は再開通5分前から bolus 投与(5ml/kg)、B 群は再開通60分後に bolus 投与(5ml/kg)とし、対照群と比較した（各群 n=5）。24時間後に TTC 染色を行い、脳梗塞体積を比較した。結果として、3群間で梗塞体積に有意な変化を認めなかった。水素水投与については経静脈的持続投与を検討したが、持続投与中に溶解液中の水素濃度を保つ事が困難であった。脳梗塞に対して水素ガスを投与することは脳保護効果を有し、脳梗塞治療に有効な方法であると期待されているが、本検討ではいずれも有意な結果を得ることができなかった。今後は水素投与のタイミングおよび量、とくに経路について、効率的な方法を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Clinical evidence as well as experimental results strongly suggests the major contribution of oxidative stress to stroke. The recent study reported that molecular hydrogen (H₂) reduces oxidative stress and limits infarct volume of the brain. Moreover, the other study showed that the consumption of water with dissolved H₂ to a saturated level prevents stress nigrostriatal degeneration. A variety of H₂ delivery systems are used for effective administration. I investigate whether this simple method to deliver H₂ into body or organs has the potential to prevent stroke. I tried two

preliminary experiments. First, a separate population of 8-week-old SHRSPs was divided into two groups of 18 animals each and one group administered H₂ water, which is replaced each day. Mean survival day did not differ significantly between two groups (DW group 107.5 ± 38.6 days vs H₂ group 105.85 ± 39.5 days). This study suggested that giving hydrogen water to SHRSP rats did not influence the survival time. Second, rats were subjected to transient focal ischemia for 90 min by the intraluminal suture technique. Rats received intravenous injections of 5.0 mg/kg of hydrogen dissolved in saline water or saline. Hydrogen water degassed by gentle stirring was used for control animals. Rats were randomly divided into three groups of 5 animals each: (I) 5 min before reperfusion group; (II) 60 min after reperfusion group, (III) saline group (control). But there is no significant difference in the infarction volume among three groups. This study suggested that injection of hydrogen dissolved in saline may have the potential effect on ischemic stroke, but further study is required to investigate how the timing or the route of administration of H₂ is appropriate.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳卒中、水素水

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害、特に脳梗塞においては虚血再灌流や炎症によって誘導される急性の酸化ストレスは組織に重篤な傷害を引き起こし、また酸化ストレスの持続は、癌などの多くの一般的な疾患の一因と考えられている。我々の教室では、2007年、共同研究にて水素(H₂)が抗酸化剤として脳梗塞の治療方法となる可能性があることを報告した (ohsawa I *et al*, *Nature*

Med,13,688-694, 2007)。すなわち、水素ガスが細胞傷害性のきわめて高い活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS)であるヒドロキシラジカルを選択的に保護することを見いだした。このことから、局所虚血と再灌流によって脳内で酸化ストレスによる損傷が誘導されるラット脳虚血モデルを使用し、水素ガスを吸入させたところ、酸化ストレスの影響の緩和により脳損傷が著しく抑制された。この理由として水素ガ

スが拡散によって膜を迅速に通過でき、細胞傷害性 ROS の存在箇所到達して反応を起こし、酸化的損傷を防ぐためと考えられた。これらの効果はマウスにおいて、肝障害に対しても確認された(Fukuda K *et al*, *Biochem.Biophys.Res.Commun*,361,670-674,2007)。こうした結果をふまえ、我々は、脳卒中に対する水素ガスの治療への応用に着目した。

2. 研究の目的

脳卒中に対する水素ガスの効果を検討した際、投与方法による効果の相違が考えられる。すなわち、1. 吸入による方法、2. 静脈注射による方法、3. 飲水による方法、である。これらのうち、実際の臨床治療に近い投与方法と考えられる2および3のテーマで研究を行う。水素ガスは4気圧、180分で1〜2ℓの水(浄水)に溶解することから、水素ガスを溶解させた水あるいは生理食塩水を用いてラットに投与する。これにより水素ガス吸入と同様の効果、すなわち脳梗塞体積の縮小および神経症状の改善を認めるか否かを検討し、効果を認めるなら病理学的、免疫学的手法を用いてその作用機序の解明を行うことで、実際の臨床応用に結びつく可能性がある。

3. 研究の方法

(1)経口水素水投与実験

- ① 8週齢の雄性脳卒中自然発症ラット(SHRSP)を用い、2群にわけ、第1群は蒸留水を、第2群は水素水を飲水させる。各群 n=18 とする。
- ②SHRSP用の飼料(塩分負荷)を与える。水素水、蒸留水は毎日交換する。
- ③水素水群と蒸留水群では飲水量に違いが見られないことを確認する。

④水素水は交換前、交換時に酸化還元電極にて測定し、どの程度電位に変化が出るかを検討する。

⑤水素水群、蒸留水群で、死亡率に差が出るか調べる。

(2)経静脈的水素水投与実験

① 8週齢の雄性SDラット(250-300g/body)を用い、ラット中大脳動脈閉塞モデル(Intraluminal suture model)として中大脳動脈を90分間閉塞後、再開通を行う(Figure 1)。さらに以下の3群(各群 n=5)に分ける。A群として生理食塩水に水素を溶解させた水(水素水)を再開通5分前からbolus投与(5ml/kg)、B群として再開通60分後にbolus投与(5ml/kg)とする。一方で、対照群(C群)は水素水を攪拌し、脱水素を行った生理食塩水を使用し、bolus投与とする。

② 24時間後にTTC染色を行い、脳梗塞体積を比較検討する。

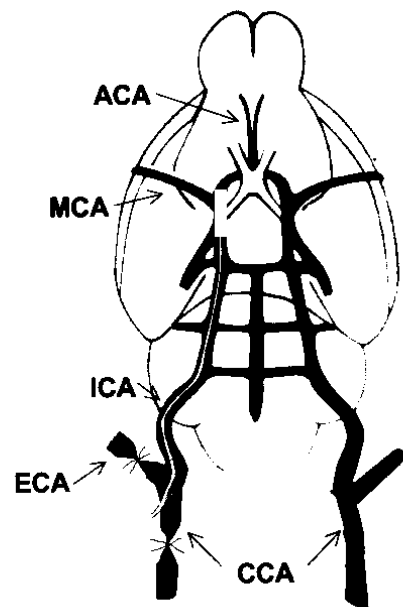


Figure 1. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture
CCA; common carotid artery, ECA; external

carotid artery, ICA; internal carotid artery, MCA; middle cerebral artery, ACA; anterior cerebral artery

4. 研究成果

経口水素水投与実験；平均生存日数は蒸留水投与群で 108.78 日、水素水投与群は 103.9 日であり、両群間で死亡率に有意な差を認めず(Log-rank 検定 $p=0.48$)、水素水が生命予後に及ぼす影響については確認できなかった。

経静脈の水素水投与実験；A-C 群間で脳梗塞体積に有意差を認めなかった(Figure 2)。

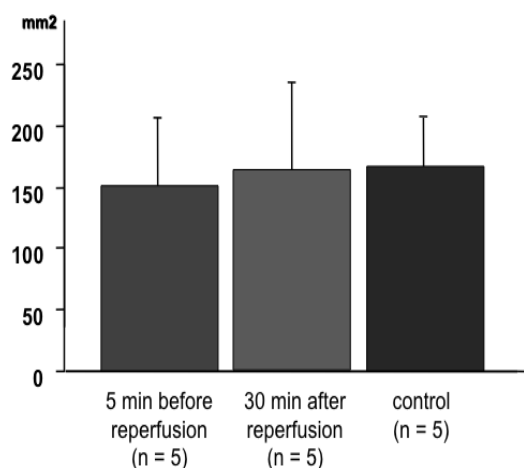


Figure 2. Effect of brain infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats.

今回の我々の結果からは水素水投与による有意な生存期間の延長や脳梗塞体積への有意な影響は得られなかった。しかしながら、潜在的には水素水投与は脳梗塞に有効と考えられる。我々の結果は preliminary な実験結果であり、実験条件の検討も十分ではないため、今後は水素水が直接的に脳へ到達し、持続的に投与可能な方法を検討し、より効率的な方法を再考したい。

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 0 件)

[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

西山 康裕 (NISHIYAMA YASUHIRO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20350077

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：