

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791082

研究課題名（和文） 心筋虚血再灌流障害における水素ガスの抗酸化効果の検討

研究課題名（英文） The protective effect of hydrogen on myocardial ischemia-reperfusion injury

研究代表者

古賀 寛教（KOGA HIRONORI）

大分大学・医学部・医員

研究者番号：50468013

研究成果の概要（和文）：近年、水素ガスにフリーラジカル消去作用があると報告されており、その抗酸化作用を期待して様々な薬理作用が研究されている。本研究では、水素ガスを、安全かつ確実に体内に供与するシステムを構築し、さらに、心臓での検討に先立って行ったラットの腎虚血再灌流モデルにおいて、水素水投与による腎機能の改善効果を発見した。この研究により、低用量においても水素が抗酸化作用を発揮していることが推測され、今後、各種病態に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Recently, some researchers have reported that hydrogen gas has free radical scavenging effect, and they have been trying to apply hydrogen in a clinical setting as an antioxidant. In the present study, we have established methods of administering hydrogen to the body safely and appropriately, moreover, we have found that hydrogen ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. These results have indicated that even low dose of hydrogen can produce an antioxidant effect, which has shown great potential for clinical use of hydrogen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学、心筋虚血再灌流障害、水素

## 1. 研究開始当初の背景

近年、水素ガスにフリーラジカル消去作用があることが報告されていた。その報告によると、脳の局所虚血再灌流モデルにおいて、再灌流時に水素ガス吸入を行うと梗塞巣の

減少が認められ、神経学的予後にも改善をもたらすという。水素は、細胞内への拡散能力に優れており、強烈的な細胞障害性をもつヒドロキシラジカルを選択的に消去することで、虚血再灌流傷害に伴う酸化ストレスを緩和していることが確認されている。申請者は、

この水素の抗酸化作用をさらに解明することで、酸化ストレスとそれによって引き起こされる疾病に対し、水素の予防かつ治療薬としての可能性を見出したいと考えた。心筋をはじめ、各種臓器における虚血再灌流障害にともなう組織障害の主因として、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドをはじめ、様々な活性酸素種が過酸化脂質生成に関わり、細胞のミトコンドリア障害を引き起こすことが挙げられる。従って、ラジカルスカベンジ作用のある水素を投与し、これらの酸化ストレスを軽減することで、臓器障害を抑え、機能悪化を改善する可能性が高いと考えられる。しかし、現在のところ、水素ガス投与が各種臓器のラジカル動態にどう影響するかについてはまだ報告がない。そこで、本研究では、水素ガスの抗酸化作用が、どれだけ虚血再灌流障害を抑制することが出来るかを検証し、さらに、その機序についての検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、心筋や各種臓器の虚血再灌流モデルを用いて、水素がどれだけラジカルを抑制して機能改善をもたらすかを検討し、臨床における予防かつ治療的水素投与の可能性を探ることを目的とした。また、安全で確実な水素投与法の確立が不可欠であり、生体内に水素を投与する方法を多角的に検証し、より実現性の高いものを開発する。さらに、水素の持つラジカル消去作用を検証し、生体内での抗酸化作用を発揮する機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1)水素投与法の確立

予防、及び治療法としての水素の投与効果を検討するにあたり、まずは爆発性のある水素ガスを、安全に供給できる水素投与系の確立が不可欠である。そこで、以下の2方法で、水素投与系を検討した。

①吸気法：報告で用いられている水素投与法（吸入により4%水素を投与）を確立するため、ダクト内で混合気（酸素、窒素、水素）を調整し、呼吸器に接続できる回路を通し、吸気中の水素濃度を測定。最も精度の高い混合法、そして経時的なモニタリング法を開発する。

②溶解法：経静脈的に投与するための方法を確立するため、ダクト内で生理食塩水に水素をバブリングし、水素水を作成。高濃度水素水の作成法、その溶解度の変化を解明する。

### (2)水素のラジカル消去能の測定

電子スピン共鳴（ESR）装置を用い、人工的に発生させたヒドロキシルラジカル（最も細胞障害性が高い活性酸素種）を水素がどれだけ消去するかを検証する。そのために、ラジカル発生法の確立を行う。発生系にまったく重金属が関与しない、紫外線を照射して発生させる改良型 ESR 装置を作成し、より安定した発生系および測定系を構築する。

### (3)動物モデルでの検証

確立した水素投与系を用い、動物モデルに実際に投与する。心筋での検討には、より高度な手技が求められるため、手技の習熟と並行し、先立って腎における虚血再灌流障害について検討した。

ラットを用い、全身麻酔下、右腎摘出後、左腎門部を1時間クランプする。その後、デクランプし再灌流とし、24時間後の組織、腎機能、酸化ストレスマーカーを測定する。また、アスコルビン酸ラジカルやヒドロキシルラジカルの動態を ESR 装置を用いて検出を試みる。さらに、新しいスピントラップ剤である CYPMPPO を用い、ラジカルの定量法を確立し、各物質のラジカル消去能の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)水素投与法の確立

論文等で発表されていた、吸入法では、有効治療域とされ、爆発下限濃度でもある 4% を確実に投与する（水素の比重が非常に小さく、当初は、均一なミキシング、安定した濃度での供給に難渋した）ための、混合比、回路構成、また、経時的に回路供給水素濃度をモニタリングできるシステム（サイドストリーム方式で吸引し、濃度測定器で測定）を構築し、安全な人工呼吸器での投与を可能にした。そのシステムは特許出願中である。

一方、水素溶存溶液に関しては、生理食塩水、細胞外液の水素バブリングによる溶存を行い、ガスクロマトグラフィーを用いほぼ飽和に近い水素溶存を確認したが、一方で、濃度低下もきたし易く、多くの場合、約 12 時間でほぼ消失しており、水素を飽和状態で溶存させておくための何らかの機構が必要であることが判明した。生成してすぐに臨床でも用いられるシリンジと投与ルートで投与するこれまでの方法には、再検討の余地があると考えられる。

### (2)水素のラジカル消去能の測定

ESR 装置に紫外線照射装置を取り付け、キャビティー内に直接照射でき、すぐさまラジカル測定がおいて出来るシステムを構築できた。紫外線照射による物理的な発生系の確

立を行い、重金属を含まない、よりクリアな条件でのラジカル消去能の分析を可能にした。従来の、フェントン反応を利用する系よりも、ラジカルスペクトル強度のばらつきが格段に少なく、ほぼ一定の値を示すため、ラジカル消去能の測定に適したものであった。

この系を用い、水素投与による消去能を測定したところ、ラジカルスペクトルの減弱を認め、ヒドロキシルラジカルの消去を示唆する傾向にあったが、濃度依存性の傾向まではつかめなかった。水素の消去能に対し、ラジカル発生量が膨大であるためではないかと推測している。

### (3) 動物モデルでの検証

本研究期間においては、より安全で確実な溶解法を用いた水素投与法を動物実験に用いた。(1)で確立した、水素水の作成を行い、ラット腎虚血再灌流モデルにおいて、水素水の持続投与を行った。その結果を、以下に示す。

水素水投与によって腎の組織障害が抑制され、(AB:正常、CD:コントロール、EF:水素水HRSS)腎機能の悪化も改善した。また、酸化ストレスマーカーである8-OHdGも抑制されており、腎機能障害の軽減効果は、水素の持つ抗酸化作用による可能性が強く示唆された。

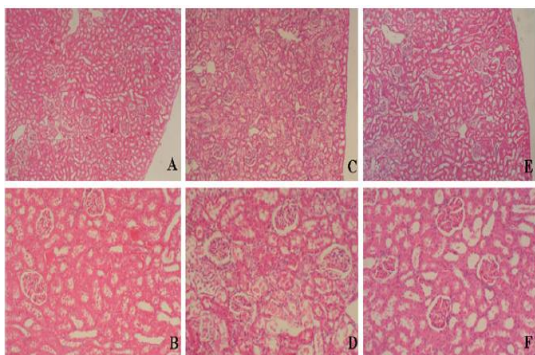


Table 1 Effect of hydrogen-rich saline solution treatment on I/R-induced renal dysfunction

	Control group	I/R group	HRSS-I/R group
Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.1*	4.1 ± 1.0	2.3 ± 0.7*
BUN (mg/dl)	15.0 ± 2.0*	164.0 ± 20.4	119.3 ± 29.5*

Kidney function was measured 24 h after renal I/R injury in rats (n = 6 per group). Evaluated markers for renal function included blood urea nitrogen (BUN) and creatinine. Data are expressed as mean ± SD

\* Significant difference (p < 0.05) relative to the I/R group

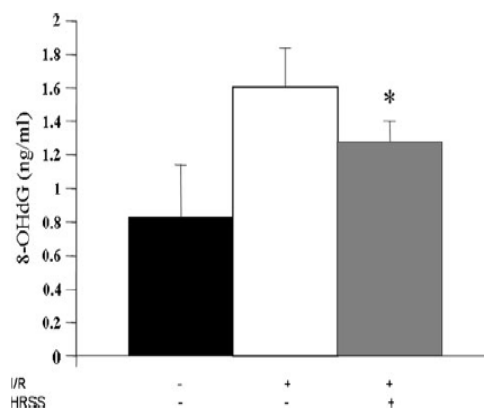


Fig. 3 Effect of renal ischemia-reperfusion on serum 8-OHdG levels. Serum 8-OHdG levels were measured 24 h following renal I/R-induced injury. Control group (black bar); ischemia-reperfusion (I/R) group (white bar); and I/R group treated with hydrogen-rich saline solution (HRSS-I/R group; gray bar). Data are expressed as mean ± SD (n = 6 per group). \*Denotes a significant difference (p < 0.05) relative to the I/R group

一方、ESR 装置を用い、血清中のラジカル測定を行ったが、ラジカルスペクトルの検出は出来なかった。スピントラップ剤として、DMPO だけでなく、より感度の高いとされるCYOMPO を用いた結果も、同様であり、生体内のラジカルを検出するには、感度の向上、測定タイミングの検討など、さらなる研究が必要とされる。

一方で、濃度低下が著しい水素水にあって、投与する水素の量がたとえ微量であっても、虚血再灌流障害が軽減されたという我々の研究結果を踏まえると、逆に水素の持つ抗酸化作用の強さ、組織移行性の大きさを裏付けるものであり、どの濃度までが効果を発揮するのか今後の検討課題として重要だと考えられる。さらに、他の臓器においても検討することで臓器特異性など、作用の違いが生じる可能性もある。臨床応用にむけて、さらなる研究を重ね、投与法の検討、機序解明を目指していきたい。

### 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 1 件)

C. Shingu, H. Koga, S. Hagiwa, S. Matsumoto, K. Goto, I. Yokoi, T. Noguchi. Hydrogen-Rich Saline Solution Attenuates Renal Ischemia-reperfusion Injury. Journal of Anesthesia, 2010, 24(4) 569-74

[学会発表] (計 1 件)

Hironori Koga 他 5 名、Hydrogen-Rich Saline Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury in a Rodent Model  
Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (2010.10.17San Diego, California)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：水素投与装置

発明者：野口隆之、萩原 聡、古賀 寛教

権利者：大分大学

種類：特許

番号：特願 2009-141875

出願年月日：H21 年 6 月 15 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀 寛教 (KOGA HIRONORI)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：50468013