

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08159

研究課題名(和文) 早産児肺障害に対する水素ガスを用いた新しい予防・治療法の開発

研究課題名(英文) The new therapy for preterm lung injury using hydrogen gas

研究代表者

近藤 園子 (Kondo, Sonoko)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70437680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生後24時間以内の新生仔豚10頭を用いて、低酸素虚血負荷と蘇生後、負荷+無治療群(HI, n=5)、負荷+水素ガス吸入群(HI-H2, 2.1-2.7%水素ガス6時間吸入、n=5)の2群に分け、負荷後6時間まで心臓超音波検査を行い、6時間後に肺病理組織評価を行った。HI-H2群が負荷後右心拍出量がHI群に比して有意に多く、肺動脈加速時間変化もHI-H2群がHI群に比して長い傾向にあった。肺好中球は、HI-H2群がHI群より有意に多かったが、右心拍出量と肺好中球は有意な正の相関を認め、右心拍出量当りの肺好中球数はHI-H2群がHI群より少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、低酸素虚血後の心臓や肺において、水素ガスは、右心機能を改善し、さらに肺における好中球も減少させる効果があることが明らかになったことにより、臨床におけるHIE児でも、脳保護効果だけではなく、心機能改善効果や肺における抗炎症効果も期待できることから、脳・心臓・肺における保護効果をもつ水素ガスは、HIE児の予後改善に寄与できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of hydrogen gas on the heart and lungs following ischemia-reperfusion after hypoxia-ischemia in a neonatal piglet. Ten neonatal piglets within 24 h of birth were subjected to a hypoxic-ischemic (HI) insult, and then divided into two groups: insult + no treatment group (HI, n=5), and insult + hydrogen gas inhalation group (HI-H2, 2.1-2.7% hydrogen gas for 6 h, n=5). RESULTS: The right cardiac output of the HI-H2 group was significantly higher than that of the HI group at 5 h after insult, and the pulmonary artery acceleration time change tended to be longer in the HI-H2 group than in the HI group. The HI-H2 group had significantly more pulmonary neutrophils than the HI group, but there was a significant positive correlation between 5h right CO and pulmonary neutrophils, and the HI-H2 group tended to have fewer pulmonary neutrophils per right cardiac output than the HI group.

研究分野：新生児

キーワード：水素ガス 低酸素虚血 新生仔豚 虚血再灌流肺障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦の在胎 28 週未満の早産児(超早産児)の救命率は、90%以上と世界でも高い水準を誇る。しかし、超早産児の重篤な合併症である慢性肺疾患(chronic lung disease; CLD)の発症率は、救命率向上と共に増加し、本邦における新規発症者数は年間約 2500 と推測される。特に、その約 13%は在宅酸素療法(HOT)を必要とする医療的ケア児であり、乳児期に気管支喘息や気道感染の重症化リスクが高いだけでなく、神経学的予後も不良であることが既に報告され、社会的な問題となっている。このため「早産児 CLD の発症予防・治療法の開発」は、少子化問題に直面する我が国において早急に取り組むべき最重要課題である。

低酸素状態の胎内から出生した新生児は、急激な酸素濃度の上昇に曝されるため、人生の中で最も酸化ストレスを受けやすい。特に早産児では、酸化ストレスへの耐性機序が十分ではなく、呼吸障害に対する高濃度酸素投与を受けることも多いため、未熟肺への影響は大きく、CLD 発症の最大の要因となる。また、CLD は、絨毛膜羊膜炎に代表される子宮内炎症との関連も報告され、羊水中の炎症性サイトカインや酸化ストレス物質が、胎児自身の呼吸様運動によって胎児の末梢気道まで到達し、CLD の発症が誘導される。このように CLD 発症には、酸化ストレス・炎症の曝露が関与しているため、「抗酸化・抗炎症作用」を持つ治療薬による発症予防・治療法が必要となる。現在、ステロイド投与が CLD に対する抗炎症効果が認められることから使用されているが、長期間の全身投与は神経学的予後への影響が懸念されている。ステロイドに代わる「抗酸化・抗炎症作用」を有する CLD に対する新規の治療薬が必要であるが、治療選択肢が無いのが現状である

分子状水素はヒドロキシラジカルスカベンジャーとして抗酸化作用を持ち、虚血再灌流障害でのアポトーシスが減少し、組織的な改善を認めることが既に報告された(Ohsawa et al., Nature 2007)。これまでに、我々も新生仔豚仮死モデルを用いて、低体温療法(TH)単独に比して、TH と水素ガス吸入( $H_2$ )併用(TH- $H_2$ )が、低酸素虚血(HI)負荷後 5 日目における大脳皮質灰白質の TUNEL 陽性細胞数の有意な減少を認め、運動機能改善効果(Htun Y, et al. Sci Rep. 2019)及び、脳循環酸素代謝変化への改善効果(Nakamura S, et al. Sci Rep. 2023)、痙攣軽減効果が高い事を報告した(Tsuchiya T, et al. Pediatr Res. 2024)。

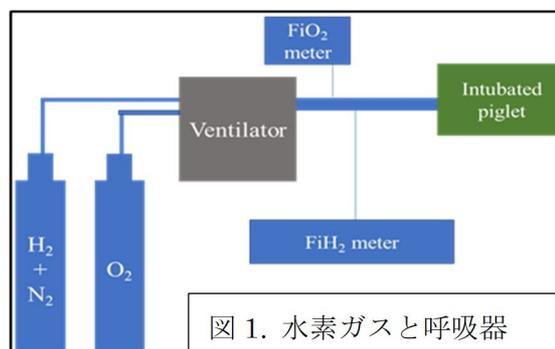
そこで早産動物モデルで検証する前に、本研究では、新生仔豚仮死モデルを用いて、低酸素虚血後の心臓と肺への水素ガス吸入の障害軽減効果を調べた。

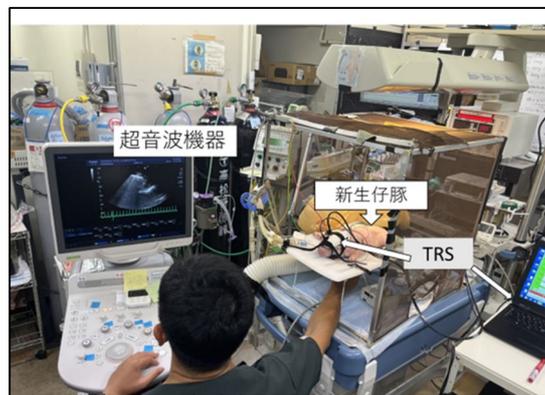
### 2. 研究の目的

新生仔豚仮死モデルにおける低酸素虚血(HI)負荷後の水素ガス吸入療法による心臓、肺障害の軽減効果を調べた。

### 3. 研究の方法

生後 24 時間以内の新生仔豚 12 頭を用いて、HI 負荷を約 40 分かけ、100%酸素で 10 分間蘇生した後、コントロール群(n=2)、負荷 + 無治療群(HI, n=5)、負荷 + 水素ガス吸入群(HI- $H_2$ , 2.1-2.7%水素ガス, n=5)(図 1)の 3 群に分け、負荷後 6 時間まで経時的に超音波にて左右心室拍出量(CO)、肺動脈最大流速加速時間(PAAT)の計測を行った(図 2)





また、6 時間後に還流後に肺を摘出し、その後、肺病理組織 ( HE 染色 )・免疫組織学的 ( 抗 PM 抗体 ) 評価を行った。

#### 4 . 研究成果

HI 負荷後の HR, MABP で HI 群と HI-H<sub>2</sub> 群では差はなかった。また左心拍出量に両群で差はなかったが、右心拍出量は HI 群では、負荷後 2 時間以降で低下し、増加は認めなかったのに対し、HI-H<sub>2</sub> 群は、HI 負荷後 2 時間より増加を認め、6 時間まで増加は持続した。また負荷後 5 時間値は有意に HI 群よりも高かった ( 図 3 )。肺動脈加速時間 ( PAAT ) 変化は、HI-H<sub>2</sub> 群は HI 群に比して長い傾向を認めた ( 図 4 )。

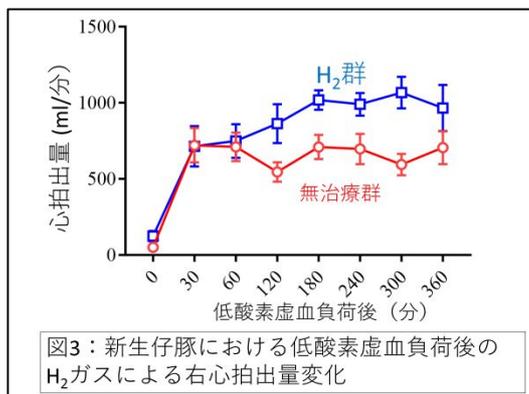


図3: 新生仔豚における低酸素虚血負荷後の H<sub>2</sub> ガスによる右心拍出量変化

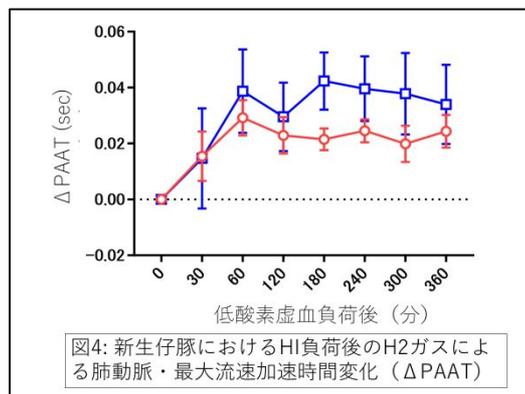
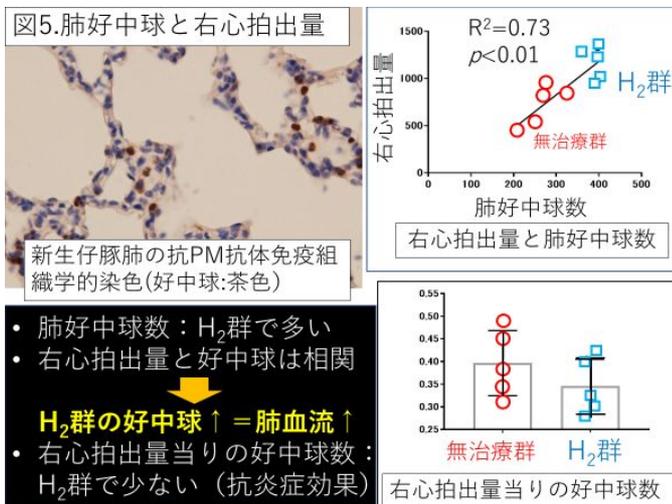


図4: 新生仔豚におけるHI負荷後のH<sub>2</sub>ガスによる肺動脈・最大流速加速時間変化 ( Δ PAAT )

次に、肺組織について肺好中球数を比較した。コントロールに比して、HI 群と HI-H<sub>2</sub> 群の肺好中球数は多く、更に HI-H<sub>2</sub> 群は HI 群より多かった。右心拍出量と肺好中球数は有意に正の相関関係を示した ( 図 5 )。このため、最大右心拍出量を認めた 5 時間値で肺好中球数を除した、右心拍出量当りの肺好中球数を、2 群間で比較したところ、HI-H<sub>2</sub> 群は HI 群に比して少ない傾向を認めた。

これらの結果から、HI 負荷後 6 時間の水素ガス吸入は、1 ) 右心拍出量を増加させる、2 ) 肺動脈最大加速時間変化を延長させる、2 ) 右心拍出量当たりの肺好中球数を低下させる、という効果を認めた。

水素ガス吸入による右心拍出量増加のメカニズムの 1 つには、“ 肺血管抵抗の軽減 ” が考えられる。一般的には、HI 後には肺血管抵抗は高くなることが知られている<sup>1,2</sup>。臨床でも、



新生仮死児では、しばしば肺高血圧症を合併する<sup>3</sup>。低酸素は、エンドセリンと NO の比率にエンドセリンに有利な不均衡を誘導し、内皮機能障害と NO 産生低下による血管収縮を引き起こす。また、低酸素状態が持続すると、NO 合成酵素のアップレギュレーションが阻害され、肺血管系の弛緩に必要な NO が不足する<sup>4</sup>。これらは、肺高血圧症に対して NO 吸入療法がなぜ非常に効果的であるかという理由である。本研究では、HI-H2 群の方が HI 群よりも PA の delta act が長い傾向が見られた。この結果は、H2 ガスによる肺動脈の血管抵抗の減少を反映していると考えられる。

なぜ H2 ガスが肺動脈の血管抵抗を減少させるのかは不明であるが、岸本らは、水素分子が、マクロファージの蓄積を抑制し、酸化ストレスを軽減し、転写-3 活性化因子および活性化 T 細胞核因子の軸を調節することにより、ラットモデルにおいて monocrotaline 誘発性肺動脈高血圧を低下させることを示した<sup>5</sup>。生体内で産生される活性酸素には、ヒドロキシルフリーラジカル、ONOO<sup>-</sup>、過酸化水素、スーパーオキシドアニオンなど様々な種類があるが、実際にどの活性酸素が PH の発症と進行に関与しているかは、まだ不明である。これまでの関連研究では、主に抗酸化物質の使用に焦点が当てられており、どの活性酸素が、あるいはいくつの活性酸素が役割を果たしているかに焦点を当てた研究はほとんどない。水素水の経口摂取は、その抗酸化能と肺炎症反応の軽減により肺高血圧症に対する保護効果を有するが、この現象の病態機序の時期には違いが見られる<sup>6</sup>。

水素の抗炎症作用については、これまでに多くの研究報告がある。成人または早産児肺障害ラットを用いた水素水投与による血中炎症性サイトカイン、酸化ストレス値の低下を認め、酸化ストレス軽減を伴う肺障害の軽減効果が報告されている<sup>7</sup>。特に、bleomycin 肺障害成獣マウスの研究では、水素ガスの吸入が炎症を抑制する NRF2 や炎症を促進する分子 NF- $\kappa$ B に作用し、IL-6 などの炎症物質産生を抑制し、呼吸機能が改善することが報告された<sup>8</sup>(Aokage S, et al. BMC Pulmonary Medicine. 2021)。本研究では、肺好中球は低酸素虚血負荷により増加したが、H2 ガス投与により更に見かけ上の肺好中球数は増加した。これらは、血管内・外どちらの好中球なのかは、本研究ではわからなかった。しかし、H<sub>2</sub> ガスにより肺血管抵抗が低下し、肺血流が増加した超音波結果を加味すると、この H<sub>2</sub> ガスによる肺好中球数増加は血管内好中球の増加、すなわち肺血流増加を示唆しているのではないかと考えた。

以上のことから、低酸素虚血負荷後水素ガス吸入を行った場合、肺血管抵抗軽減による右心拍出量の上昇を認め、肺好中球増加は肺血流増加を反映していることが推察され、実際には水素ガス吸入後の血管外の好中球は減少している可能性が高い。これらは、水素ガスによる抗酸化作用に伴う肺血管内皮の障害軽減、抗炎症作用に伴う好中球の減少を反映していることが考えられる。

水素ガス吸入は脳保護作用を持つだけでなく、心臓、肺においても保護作用を持っていることが考えられることから、新生児領域での利用は様々な臓器保護効果を期待できると考えられる。

## 引用文献

- 1 Lapointe, A. & Barrington, K. J. Pulmonary Hypertension and the Asphyxiated Newborn. *The Journal of pediatrics* **158**, e19-24 (2011).
- 2 Wojciak-Stothard, B. & Haworth, S. G. Perinatal Changes in Pulmonary Vascular Endothelial Function. *Pharmacology & therapeutics* **109**, 78-91 (2006).
- 3 Liu, X., Tooley, J., LØberg, E. M., Suleiman, M. S. & Thoresen, M. Immediate Hypothermia Reduces Cardiac Troponin I after Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in

- Newborn Pigs. *Pediatric research* **70**, 352-356 (2011).
- 4 Popescu, M. R. et al. Getting an Early Start in Understanding Perinatal Asphyxia Impact on the Cardiovascular System. *Frontiers in pediatrics* **8** (2020).
- 5 Kishimoto, Y. et al. Hydrogen Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats by Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **150**, 645-654.e643 (2015).
- 6 Bi, H. et al. Application and Comparison of Three Special Stains in the Postmortem Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Chinese Journal of Forensic Medicine* **28**, 330-332 (2013).
- 7 Muramatsu, Y., Ito, M., Oshima, T., Kojima, S. & Ohno, K. Hydrogen-Rich Water Ameliorates Bronchopulmonary Dysplasia (Bpd) in Newborn Rats. *Pediatric Pulmonology* **51**, 928-935 (2016).
- 8 Aokage, T. et al. The Effects of Inhaling Hydrogen Gas on Macrophage Polarization, Fibrosis, and Lung Function in Mice with Bleomycin-Induced Lung Injury. *BMC Pulmonary Medicine* **21**, 339 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakabayashi Takayuki, Nakamura Shinji, Nakao Yasuhiro, Yamato Satoshi, Htun Yinmon, Mitsue Tsutomu, Morimoto Aya, Arioka Makoto, Koyano Kosuke, Konishi Yukihiko, Miki Takanori, Ueno Masaki, Kusaka Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Hypothermia cannot ameliorate renal fibrosis after asphyxia in the newborn piglet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e14961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14961	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 -

1. 著者名 Tsuchiya Toui, Nakamura Shinji, Sugiyama Yuichiro, Nakao Yasuhiro, Mitsue Tsutomu, Inoue Kota, Inoue Eri, Htun Yinmon, Arioka Makoto, Ohta Kenichi, Morita Hirotsuke, Fuke Noriko, Kondo Sonoko, Koyano Kosuke, Miki Takanori, Ueno Masaki, Kusaka Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Hydrogen gas can ameliorate seizure burden during therapeutic hypothermia in asphyxiated newborn piglets	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-024-03041-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Shinji, Nakao Yasuhiro, Htun Yinmon, Mitsue Tsutomu, Koyano Kosuke, Morimoto Aya, Konishi Yukihiko, Arioka Makoto, Kondo Sonoko, Kato Ikuko, Ohta Ken-ichi, Yasuda Saneyuki, Miki Takanori, Ueno Masaki, Kusaka Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Impact of hydrogen gas inhalation during therapeutic hypothermia on cerebral hemodynamics and oxygenation in the asphyxiated piglet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28274-z	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土屋冬威, 中村信嗣, 杉山裕一郎, 中尾泰浩, Yinmon Htun, 光家努, 井上依里, 井上公太, 西岡克文, 福家典子, 阪本浩助, 小谷野耕佑, 近藤園子, 日下隆.
2. 発表標題 水素ガス吸入による新生児低酸素性虚血性脳症における痙攣軽減効果.
3. 学会等名 第12回日本分子状水素医学生物学会大会,
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kosuke Sakamoto, Yasuhiro Nakao, Toui Tsuchiya, Tsutomu Mitsuie, Shinji Nakamura, Takayuki Yokota, Taiko Horii, Takashi Kusaka
2. 発表標題 Impact on Cardiac Function of Hydrogen Gas Inhalation after Hypoxic-ischemic Insult in Asphyxiated Piglet
3. 学会等名 The 22nd Congress of the Federation of Asian and Oceania Perinatal Societies (FAOPS) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村信嗣
2. 発表標題 新生児領域における水素ガス吸入療法の可能性 水素ガスは本当に効くのか? .
3. 学会等名 第67回日本新生児成育医学会学術集会
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	荻原 享  (Ogihara Touru)  (00211128)	大阪医科薬科大学・医学部・功労教授    (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	安田 真之 (Yasuda Saneyuki)  (00380155)	香川大学・医学部附属病院・准教授  (16201)	
研究分担者	中村 信嗣 (Nakamura Shinji)  (30437686)	香川大学・医学部附属病院・助教  (16201)	
研究分担者	日下 隆 (Kusaka Takashi)  (50274288)	香川大学・医学部・教授  (16201)	
研究分担者	山岡 繁夫 (Yamaoka Shigeo)  (90434779)	大阪医科薬科大学・医学部・助教  (34401)	

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