

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09202

研究課題名(和文) 出血性ショックに対する水素含有輸液の治療効果 -グリコカリックス保護の観点から-

研究課題名(英文) The beneficial effects of hydrogen-rich saline on glycocalyx degeneration after hemorrhagic shock in a rat model

研究代表者

森 隆 (Mori, Takashi)

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00336786

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)：出血性ショックモデルラットを用いて、水素含有輸液のグリコカリックス(GCX)保護効果について検討を行った。全身麻酔下のラットをsham群、出血性ショック群、生理食塩水群、膠質液群、水素含有生理食塩水(H2-NS)群に分別した。GCXに関しては、GlycoCheckを用いて赤血球灌流領域(PBR)により評価を行った。H2-NS群の生存率は、他の輸液群と比較し有意に改善した。H2-NS群では他の輸液群と比較しPBRの上昇は抑制され、水素含有生理食塩水のGCX保護効果が示された。本研究により、出血性ショック時の水素含有輸液投与は生存率を改善し、その機序としてGCX保持効果の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環管理を含めた周術期管理の質は向上しているにも関わらず、危機的大量出血は周術期心停止の最大の要因である。現在使用されている晶質液、膠質液は共に、過剰投与により合併症を引き起こす可能性があり、その使用が制限される。また大量出血を治療する際には、循環不全改善後の再灌流障害を軽減させることが非常に重要であり、これらの点からより効果的な輸液製剤の登場が求められている。本研究により、出血性ショックにおける水素含有輸液のグリコカリックス保護効果、生存率改善などの有効性が示された。今後は大動物を用いた基礎研究や臨床研究において水素含有輸液の有効性をさらに検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed the effect of hydrogen-rich saline to reduce shedding of the endothelial glycocalyx (GCX) during hemorrhagic shock using a rat model. Rats under general anesthesia were divided into 5 groups: sham (sham), hemorrhagic shock (shock), saline (NS), colloid solution (HES) and hydrogen-rich saline (H2-NS) groups. GCX thickness was assessed by the perfusion region of red blood cells (Perfusion Boundary Region: PBR) using GlycoCheck system. The survival rate of the H2-NS group was significantly improved compared to the shock, NS, and HES groups ($p<0.05$). The PBR increase in mesentery and quadriceps was significantly suppressed in the H2-NS group compared to the shock, NS, and HES groups ($p<0.001$), indicating the protective effect of hydrogen-rich saline on the GCX. This study suggests that intravenous administration of hydrogen-rich saline in hemorrhagic shock improves the survival rate compared to conventional fluid resuscitation by the retention of GCX thickness.

研究分野：麻酔科学

キーワード：グリコカリックス 出血性ショック 水素 輸液

1 . 研究開始当初の背景

循環管理を含めた周術期管理の質は向上しているにも関わらず、危機的大量出血は周術期心停止の最大の要因である。出血の際の循環血液量の減少に対して最初に行う対処法は輸液投与である。HES 製剤をはじめとした膠質液はその膠質浸透圧により、出血に対して投与した際に晶質液より大きな血漿増量効果を発揮するとされるが、特に HES 製剤は腎機能障害や凝固系障害を引き起こす可能性があり、その使用が制限される。出血による臓器障害は、低酸素、低灌流、ATP 供給の減少による細胞死が原因とされ、循環不全改善後の血液再灌流は酸素化の改善と同時に活性酸素種 (ROS) を大量発生させ、カルシウム過負荷をもたらし、細胞アポトーシスが誘導される。このために大量出血を治療する際には、単純に輸液投与を行うだけではなく、循環不全改善後の再灌流障害を軽減させることが非常に重要となってくる。これらの点からより効果的な輸液製剤の登場が求められている。

2 . 研究の目的

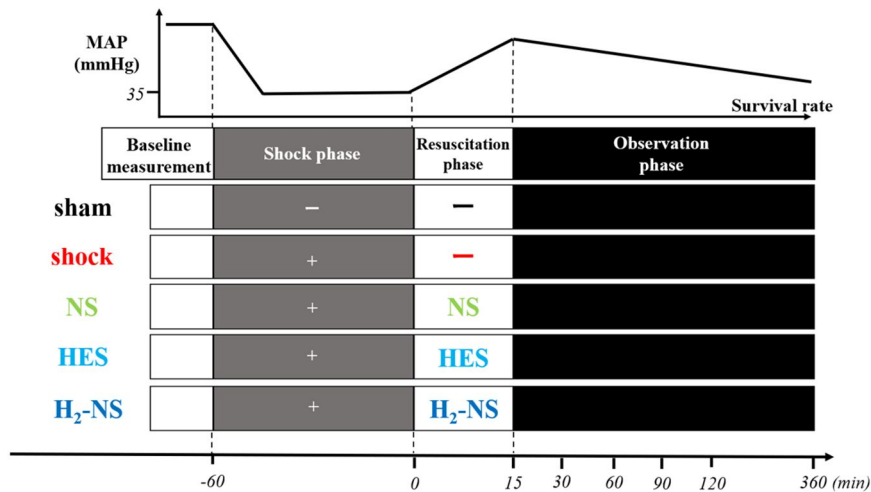
本研究の目的は、出血性ショックモデルラットを用いて水素含有輸液を投与する事による血行動態改善効果、グリコカリックス保護効果を検討する事である。過去の報告では、水素含有輸液を用いて出血性ショックモデル動物の血行動態改善効果を検討している報告はない。特に本研究では、出血性ショックにおける水素含有輸液のグリコカリックス保護効果に注目した。グリコカリックスは血管内皮表面に存在する構造物であり、水やタンパク質などの高分子物質が毛細血管壁を透過する際の最初のバリアーとなる。虚血再灌流障害、酸化ストレスなどによってグリコカリックスが菲薄化すると、水分やたんぱく質の漏出が起こり、間質浮腫につながるとされる。過去の報告では敗血症性ショックモデルや出血性ショックモデル動物におけるグリコカリックスについて、晶質液や HES 製剤投与によるグリコカリックス保護効果が検討されているが、これまで水素投与によるグリコカリックス保護効果を検討したものはない。またこれまで出血性ショックの病態における水素投与による予後改善効果の機序は解明されておらず、本研究は微小循環の非侵襲的なモニタリングシステムである Sidestream Dark Field (SDF) 撮影法によりグリコカリックス層の厚さを計測することで、水素含有輸液投与によるグリコカリックス保護効果、臓器保護効果の機序解明に寄与する事が期待される。

3 . 研究の方法

(1) 出血性ショックモデルの作成

10-12 週齢の体重 450g 前後の SD 系雄ラットを用いた。全ラットを 5 群 [sham、出血性ショック (shock) 群 (出血性ショックのみ)、生理食塩水 (NS) 群 (出血性ショック後生理食塩水投与)、HES 群 (出血性ショック後ボルペン®投与)、水素含生理食塩水 (H₂-NS) 群 (出血性ショック後水素含有生理食塩水投与)、各群 n = 6] に分別しペントバルビタール (40mg/kg) の腹腔内投与後、セボフルラン吸入 (3%) にて全身麻酔を行った。麻酔導入後、気管切開を行い ID2.0 の気管チューブを挿入し人工呼吸器に接続後、両側大腿動脈より動脈圧測定用・脱血用カテーテル、右内頸動脈より心室内圧測定用カテーテル (Model SPR-320; Millar Instruments, Houston, TX) を挿入した。出血性ショックモデルは脱血用カテーテルから血液を吸引し、平均動脈圧 30-35mmHg を 60 分間維持した。その後、NS 群、HES 群、H₂-NS 群においては各輸液製剤を平均動脈圧が 80mmHg になるまで 15 分かけて投与した。輸液蘇生開始 6 時間後まで血行動態指標 (血圧、心拍数、左室拡張末期圧、dp/dt) の計測

を行った。また脱血前、輸液蘇生開始 30 分後、1 時間後、2 時間後に血液ガス測定および活性酸素種の測定を行った。



(2) 水素含有生理食塩水の作成

非破壊的水素含有器 (MiZ 株式会社 : <http://www.e-miz.co.jp/technology.html>) により水素含有輸液の作成を行った。アルミバッグ内に水素発生剤と点滴バッグを入れ真空処理をすることにより、ポリエチレン製のバッグを通過して水素が点滴バッグ内に無菌的に溶解される。この方法により輸液製剤内の水素濃度が 1.2ppm に長期間維持される。

(3) グリコカリックスの評価

微小循環の非侵襲的なモニタリングシステムである Sidestream Dark Field (SDF) 撮影法を利用した GlycoCheck (フィンガルリンク社) によりグリコカリックスの厚さの評価を行った。GlycoCheck は毛細血管において、グリコカリックスの変化を赤血球の灌流境界領域 (PBR) により評価することができ、グリコカリックスが菲薄化すると PBR が増加する。腸間膜、大腿四頭筋の毛細血管において、脱血前、輸液蘇生開始前、蘇生後にグリコカリックスの評価を行った。

(4) 肺の組織学的評価

実験後、肺を摘出し生理食塩水、4%中性緩衝ホルマリンで灌流し固定しパラフィンブロックを作成し、HE 染色を用いて組織を染色した。組織標本を肺障害 (ALI) スコアを用いて各群の肺障害の評価を行った。

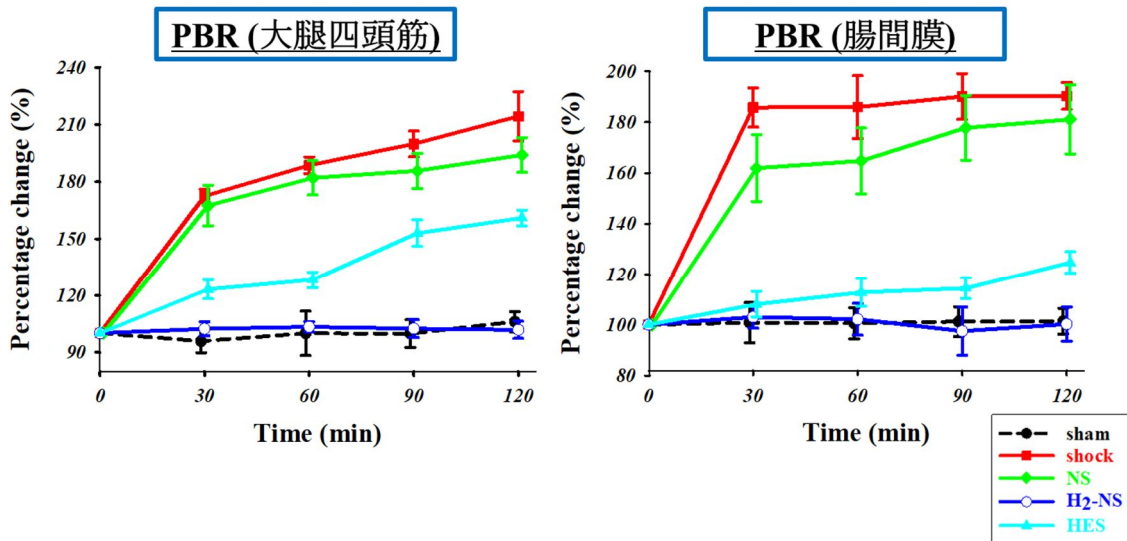
(5) 生存率の評価

各群の実験プロトコール施行後、輸液蘇生開始から 6 時間後の生存率を評価した。

4. 研究成果

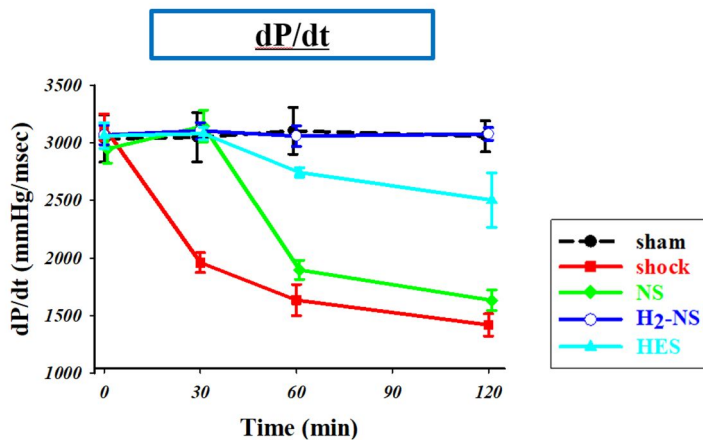
(1) 腸間膜・大腿四頭筋膜のグリコカリックス

shock 群で出血性ショック後 PBR の有意な上昇すなわちグリコカリックスの有意な菲薄化がみられたが、H₂-NS 群ではこの上昇は有意に抑制され、水素含有生理食塩水のグリコカリックス保護効果が示された。また NS 群と H₂-NS 群を比較した場合にも H₂-NS 群の方が有意にグリコカリックスが保護されていることが分かった。



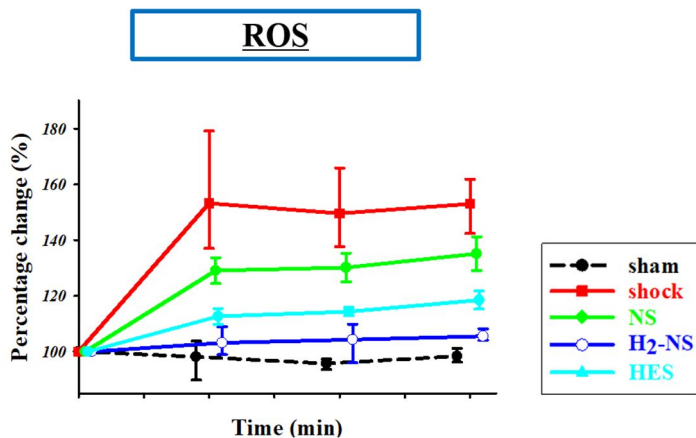
(2) dP/dt

shock 群で出血性ショック後有意な dP/dt の低下がみられたが、H₂-NS 群ではこの低下は有意に抑制された。また NS 群と比較しても H₂-NS 群は dP/dt の低下が有意に抑制された。



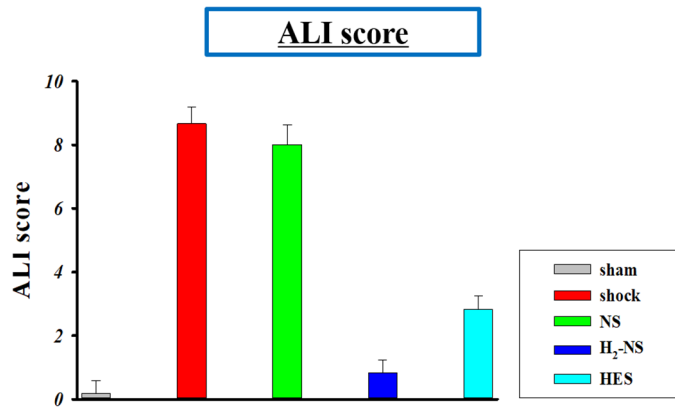
(3) 活性酸素種

shock 群では出血性ショック後活性酸素種は有意に増加したが、shock 群と比較し H₂-NS 群は活性酸素種の上昇が有意に抑制された。



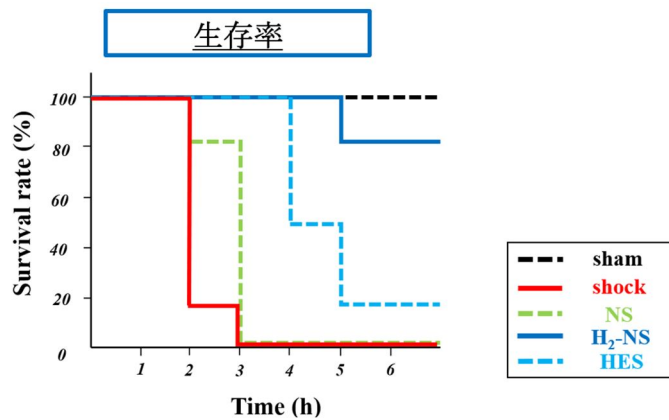
(4) 肺障害

shock 群と比較し H₂-NS 群では出血性ショック後の肺障害が有意に抑制された。NS 群と比較しても H₂-NS 群の肺障害は有意に抑制された。



(5) 生存率

shock 群では出血性ショック後の生存率は有意に低下したが、H₂-NS 群は shock 群と比較して生存率の有意な改善が認められた。また NS 群と比較しても H₂-NS 群の生存率は有意に高かった。



本研究結果より水素含有生理食塩水は血管内皮グリコカリックスを保護し、心収縮力を維持し、肺障害を改善し生存率を改善することが示された。またその作用機序として水素含有生理食塩水による出血性ショック後の活性酸素種増加の抑制が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura Aya, Suehiro Koichi, Mukai Akira, Fujimoto Yohei, Funao Tomoharu, Yamada Tokuhiko, Mori Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	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） 10.1016/j.jtcvs.2021.04.077	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 Mukai Akira, Suehiro Koichi, Kimura Aya, Fujimoto Yohei, Funao Tomoharu, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 163
2. 論文標題 Protective effects of remote ischemic preconditioning against spinal cord ischemia?reperfusion injury in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 e137 ~ e156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtcvs.2020.03.094	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 Juri Takashi, Fujimoto Yohei, Suehiro Koichi, Nishikawa Kiyonobu, Mori Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Participation of the descending noradrenergic inhibitory system in the anti-hyperalgesic effect of acetaminophen in a rat model of inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	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） 10.1016/j.lfs.2021.120030	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 Mukai Akira, Suehiro Koichi, Kimura Aya, Fujimoto Yohei, Funao Tomoharu, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective effects of remote ischemic preconditioning against spinal cord ischemia?reperfusion injury in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	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） 10.1016/j.jtcvs.2020.03.094	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 Inada Yosuke, Funai Yusuke, Yamasaki Hiroyuki, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of sevoflurane and desflurane on the nociceptive responses of substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord dorsal horn: An in vivo patch-clamp analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806920903149	査読の有無 無
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 Hino Hideki, Matsuura Tadashi, Kuno Miyuki, Hori Kotaro, Tsujikawa Shogo, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 133
2. 論文標題 Left Ventricular Hypertrophy Increases Susceptibility to Bupivacaine-induced Cardiotoxicity through Overexpression of Transient Receptor Potential Canonical Channels in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1077~1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000003554	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 森隆, 木村文, 末廣浩一
2. 発表標題 脊髄虚血に対する水素の保護効果
3. 学会等名 日本分子状水素医学生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Kimura, Koichi Suehiro, Takashi Mori
2. 発表標題 Protective Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury: A Microdialysis Study in the Spinal Ventral Horn
3. 学会等名 International Anesthesia Research Society 2021 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 文、末廣 浩一、森 隆
2. 発表標題 出血性ショックに対する水素含有輸液の有効性 -グリコカリックス保護の観点から
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Kimura, Koichi Suehiro, Takashi Mori
2. 発表標題 The beneficial effects of hydrogen-rich saline on glycolyx degeneration after hemorrhagic shock in a rat model.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 出血性ショックの予後の改善および/または症状の悪化を抑制するための組成物および方法	発明者 木村文、末廣浩一、平野伸一、佐藤文平、佐藤文武	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-41906	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------