

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17728

研究課題名（和文）下肢虚血再灌流障害における水素の効果のライブイメージングを用いたメカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of hydrogen-effect in ischemia-reperfusion injury model of lower extremities using live imaging

研究代表者

鳥崎 友紀子 (TORIZAKI, Yukiko)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30867487

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）：下肢虚血再灌流モデルマウスに対して、両親媒性ポリマーを用いて可溶性化したAPFを経皮的に投与し、リアルタイムイメージングシステムを用いて下肢筋組織内でのROSの発生をリアルタイムで撮像する実験系を作成した。イメージングシステムにて測定されたAPFの輝度は、虚血開始後に経時的に低下したが、再灌流後に上昇傾向を認めた。また、下肢虚血再灌流モデルに対して水素ガスの吸入投与を行い、虚血再灌流障害に伴う炎症反応が水素吸入群で有意に抑制された。虚血再灌流障害におけるROSの経時的な動態の観察を可能とし、また水素の吸入投与によって虚血再灌流に伴う組織障害が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性動脈閉塞後の虚血再灌流障害は、発症すると致死的となることも多い病態だが、依然として虚血再灌流障害に対する確立された治療法や予防法は示されていない。また、過去に水素がROSに対する選択的な抗酸化作用を有していることが報告されてきたが、生体内におけるROSと水素の動態の検証はなされていない。本研究は下肢虚血再灌流モデルマウスにおけるROSの動態を可視化することを可能とした初めての研究である。また、マウスモデルにおける水素の虚血再灌流障害抑制効果が示唆され、急性動脈閉塞に伴う下肢虚血に対する実臨床での治療の発展への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The experimental system was created in which APF solubilized with an amphiphilic polymer was administered transcutaneously to lower limb ischemia-reperfusion mouse models, and a real-time imaging system was used to image ROS development in the lower limb muscle in real time. The luminance of APF decreased over time after the start of ischemia, but showed an increasing trend after reperfusion. In addition, hydrogen gas inhalation was administered to the lower limb ischemia-reperfusion model, and the inflammatory response associated with ischemia-reperfusion injury was significantly suppressed in the hydrogen inhalation group. The results suggest that the temporal dynamics of ROS in ischemia-reperfusion injury can be observed and that the tissue damage associated with ischemia-reperfusion injury may be suppressed by hydrogen inhalation.

研究分野：末梢血管

キーワード：虚血再灌流 水素 マウスモデル 末梢血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性動脈閉塞後の虚血再灌流障害(Ischemic reperfusion syndrome: IRS)は、発症すると致死的となることも多く、重大な合併症の一つである。下肢における急性動脈閉塞症とそれに伴う下肢虚血においては、下肢切断と虚血再灌流障害による全身障害を回避することが治療の最大目標だが、依然として虚血再灌流障害に対する確立された治療法や予防法はないのが現状である。虚血再灌流障害による組織障害には活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)の発生が関与しているとされており、水素が ROS に対する選択的な抗酸化作用を有していることが報告されて以来、種々の酸化ストレス反応に対する研究が報告されてきた。しかし、そのメカニズムの解明については、無細胞系と細胞培養系を用いた実験での提唱はあるものの、生体内における検証は充分になされていない。

2. 研究の目的

本研究では、われわれの研究グループにおいて確立した下肢虚血再灌流モデルマウスを用いて、虚血再灌流における下肢組織内の ROS の動態と、吸入投与後の水素分子の効果のメカニズムを in vivo ライブイメージングによって経時的に観察し、水素分子が ROS に対して示す効果を検証する。また、生体における虚血再灌流障害を抑制するために有効な水素濃度やその投与時間についても明らかにし、急性動脈閉塞に伴う下肢虚血に対する実臨床での治療方法の開発を検討する。



図1 虚血再灌流障害における ROS の発生と水素の抑制効果に関する仮説

3. 研究の方法

(1) 下肢虚血再灌流モデルマウスに対するライブイメージングシステムでの観察

下肢虚血再灌流モデルマウスに対して経口挿管を行い、人工呼吸器および吸入麻醉管理を行う。

(2) 下肢虚血再灌流モデルマウスにおける ROS の発生の経時的な観察

下肢虚血再灌流モデルマウスの下肢組織に対して、両親媒性ポリマーを用いて可溶化した APF(アミノフェニルフルオレセイン)を経皮的に投与し、ライブイメージングシステム(FUSION SYSTEM, Vi Iber-Lourmat 社)を用いて虚血時および虚血再灌流時の下肢筋組織内における ROS の発生を経時的に観察・撮影した。

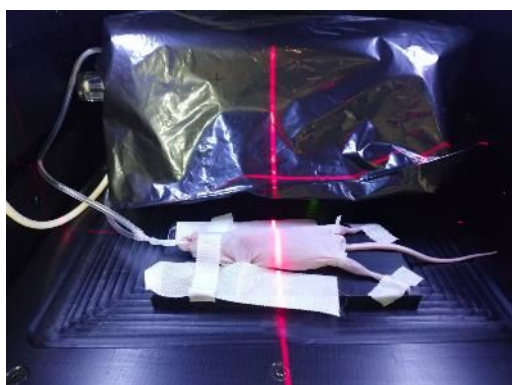


図2 ライブイメージングシステムにおける下肢虚血再灌流モデルマウスの観察



図3 下肢虚血再灌流モデルマウスに対する APF の経皮的投与

4. 研究成果

(1) ライブイメージングシステムを用いた ROS の視覚的観察

下肢虚血再灌流モデルマウスの下肢に、両親媒性ポリマーを用いて可溶化した APF(PMB ポリマー1%、APF 0.35%、NaCl 0.9%)を 100 μ l 皮下投与し、APF 投与直後から経時的にライブイメージングシステムでの撮像を行った。撮像によって得られた画像データから、下肢の虚血および再灌流によって APF の蛍光強度が変化することが示された。

(2) 虚血再灌流障害による ROS の発生の経時的变化

ライブイメージングシステムによって得られた画像データでの AFP の蛍光強度を経時的に測定・解析したところ、AFP 投与直後からの下肢虚血状態においては AFP の蛍光強度は低下傾向を示した後、再灌流によって AFP の蛍光強度は再上昇傾向を示した。これにより、虚血再灌流を生じた下肢筋組織内において ROS の発生が促進される可能性が示唆され、生体内での虚血再灌流による ROS の経時的な変化を視覚的に観察することができたという点で意義深い結果を得た。

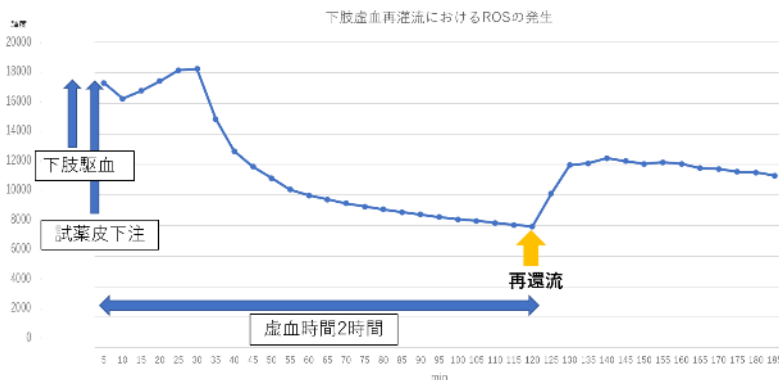


図4 下肢虚血再灌流モデルマウスにおける ROS の発生の経時的变化

(3) 下肢虚血再灌流モデルマウスに対する水素吸入と水素による下肢虚血再灌流障害の抑制効果の証明

今後、下肢虚血再灌流モデルマウスに対して人工呼吸器および吸入麻酔管理を行う実験系を用いて、ライブイメージングシステムでの水素吸入下における AFP の経時的観察を行い、水素吸入が ROS の発生に及ぼす影響を同様に検証する。水素吸入による ROS の発生抑制効果が示されれば、実臨床において手術室や救急車内といった診療現場における治療方法への応用に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥崎 友紀子
2. 発表標題 下肢虚血再灌流モデルマウスに対する水素ガスの効果の検証とライブイメージングシステムを用いた活性酸素の観察
3. 学会等名 第62回 日本脈管学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------