

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17896

研究課題名（和文）水素の抗炎症作用に着目したVV-ECMO中の新規抗凝固療法の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic Research on Novel Anticoagulant Therapy during VV-ECMO Focusing on Anti-inflammatory Effects of Hydrogen

研究代表者

野島 剛（Nojima, Tsuyoshi）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：60869717

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）：本研究の目的は、水素の抗炎症作用に着目したLPSラットを用いたVV-ECMO中の水素を用いた新規抗凝固療法の開発であった。今回の研究では、水素がECMO中の抗凝固作用を強化できるかを検討した。水素は、炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1 のmRNA発現を低下させたが、HO-1は水素群でも有意差を認めなかった。さらに、抗凝固作用に関するPAI-1のmRNA発現は、水素群でPAI-1発現は低下するも有意差は認めなかった。E-セレクトインやCCL2といったケモカインでも、有意差を認めなかった。本研究からは、水素は抗凝固作用を有する可能性はあるも有意差は明確にならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VV-ECMOでは、治療中の出血が問題となる。VV-ECMOでは回路内での血液凝固を防ぐために抗凝固薬を使用するが、さらに出血リスクが高くなってしまふ。また、感染症では炎症により出血の危険性がさらに高くなるため、出血傾向を防ぐことが死亡率軽減につながると考えられた。そのため、VV-ECMO中に抗炎症作用を有する水素を用いることで抗凝固薬の減量が可能であるかを検討した。今回の検討では、水素を用いることによる抗炎症作用は有意差を持って確認できたが、抗凝固作用に関しては、その作用を有するものの、有意差を持って確認はできなかった。今後も研究を続けていく必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a novel anticoagulant therapy using hydrogen in VV-ECMO using LPS rats, focusing on the anti-inflammatory effects of hydrogen. In this study, we investigated whether hydrogen can enhance anticoagulant effects in ECMO. Hydrogen decreased mRNA expression of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1, but HO-1 was not significantly different in the hydrogen group. Furthermore, PAI-1 mRNA expression related to anticoagulation was not significantly different in the hydrogen group, although PAI-1 expression was decreased in the hydrogen group, and chemokines such as E-selectin and CCL2 were not significantly different. From this study, it is possible that hydrogen may have anticoagulant effects, but significant differences were not clarified.

研究分野：救命救急

キーワード：水素 VV-ECMO 抗凝固療法

1. 研究開始当初の背景

静脈静脈-体外式膜型人工肺療法(VV-ECMO)は重症呼吸不全に対する生命維持法であり、近年使用例は増加している。VV-ECMOの適応患者の半数は感染症に起因しており、ほとんどが重症敗血症の基準を満たしている。高度の炎症による凝固異常から、回路内血栓や播種性血管内凝固症候群(DIC)、出血の合併は稀ではない。出血合併症の予防はECMO管理の最重要課題であるものの、いまだに最適な抗凝固療法を見出せずにいる。

水素は、強い抗酸化作用・抗炎症作用を有することが知られており、敗血症や急性肺障害、急性間質性肺炎など、急性炎症モデルにおいて共通してサイトカイン発現抑制を認めた。そのため、水素の抗炎症作用がVV-ECMO中の凝固安定化に寄与するのではと考えられた。人工肺への水素投与は、送気ガスへ加えるだけで簡便である。既存のECMO装置を大きく変更することなく臨床応用可能であり、本研究で効果が証明できれば、臨床研究を開始できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水素の抗炎症作用に着目したVV-ECMO中の新規抗凝固療法の開発であった。ラットモデルを用いて、水素が出血リスクを増加させることなくECMO中の抗凝固作用を強化できるか否かを検証する。下記に示すように3段階の実験計画を設定した。

健常ラットを用いて最適な抗凝固療法を含めたVV-ECMOモデルを確立し、水素の安全性を確認する

リポ多糖(LPS)肺炎モデルを用いて、水素投与によるVV-ECMO中の凝固因子の消耗と回路内血栓の抑制効果を検証する

で効果が認められれば、水素の抗凝固作用のメカニズムを探求する。

3. 研究の方法

実験 : 健常ラットを用いて最適な抗凝固療法を含めたVV-ECMOモデルを確立し、水素の安全性を確認する

SDラット12週齢雄(400-450g)をイソフルランで麻酔後、気管切開にて人工呼吸管理を開始した。右頸静脈と右大腿静脈にそれぞれ16Gと20Gの留置針の外筒を挿入し、脱血・送血カテーテルとした。ローラーポンプとラット用人工肺を取り付けた回路(プライミング量8ml)を装着。ヘパリン開始後、血液流量150ml/kg/minとし、送気ガス流量2L/minでVV-ECMOを開始した。効果を認める最小限のヘパリン投与速度を見出すため、ヘパリン投与速度は50単位/kg/hrで開始し、血栓が認められれば最大200単位/kg/hrまで増量する予定であった。次に、送気ガスに2%水素を添加し、バイタル変動、アシドーシスの進行、回路内の気泡形成などの有無を確認し、水素投与の安全性を確認した。

VV-ECMO開始から6時間後に屠殺し、血液・組織サンプルを採取した。血液検査では、凝固・線溶マーカー(D-dimer, TATなど)および凝固の消耗(PLT, Fibrinogenなどの低下)を評価することとした。

実験 : LPS肺炎モデルを用いて、水素投与によるECMO中の凝固因子の消耗と回路内血栓の抑制効果を検証する

肺炎モデルは先行研究で水素の効果が認められているLPSモデルを用いた。LPS肺炎は、気管内にLPS2.5mg/kgを投与し作成した。投与10分後より、実験で得られたヘパリン投与速度にて投与開始した。その後、VV-ECMOを開始し、水素投与群は人工肺に2%水素ガス(2%水素+98%

酸素)を2L/minにて投与した。コントロール群は2%窒素+98%酸素とした。実験と同様に6時間後に屠殺し、血液・組織サンプルを採取した。

コントロール群ではLPSによる炎症のため凝固因子は消耗し、水素はそれらの変化を抑制する、と予測した。効果を認めた場合は、ヘパリン投与量や水素濃度をさらに少量にして凝固因子の消耗と回路内血栓の抑制効果を検証することとした。

実験：(実験で効果を認めた場合)水素による抗凝固作用のメカニズムを探求する

重要な作用点と考えている単球・マクロファージ内のHO-1とサイトカイン(IL-1bとTNFなど)の発現を確認するためmRNA、蛋白分析を行い、さらに免疫染色にて局在を確認した。また水素の血管内皮への効果も注目し、PAI-1、P-セレクチン、ケモカイン(IL-6, CCL2)などの凝固関連因子を網羅的に検索した。

4. 研究成果

実験

健常ラットを用いたVV-ECMOの確立に成功した。各種血液、臓器のサンプル採取も行った。同時にヘパリン投与速度も50単位/kg/hrで確立した。

実験

LPS肺炎モデルを作成しVV-ECMOを行うことに成功した。コントロール群と水素投与群の2群に分けて検討を行った。ヘパリン投与量に関しては、水素投与群・コントロール群ともに同じ量であり、ヘパリン投与量を減量することはできなかった。

各種血液、臓器サンプルの採取を行った。

実験

LPS肺炎モデルに関して、水素投与群とコントロール群で検討を行った。単球・マクロファージ内のHO-1と炎症性サイトカインに関してmRNAの分析を行った。水素群に関しては、炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1のmRNAは抑制されたが、HO-1に関してはコントロール群と比較して変化は認めなかった。血管内皮に対する効果としてPAI-1のmRNAも確認すると、水素群で発現低下を認めるも、統計学的な有意差は認めなかった。ケモカインに関しても確認を行なったが、水素群とコントロール群の間で有意差は認めなかった。

以上より、水素はPAI-1など血管内皮障害に対して作用する可能性はあると考えられるが、これが抗凝固作用を示すかに関しては、更なる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------