

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591002

研究課題名（和文） 高濃度酸素による肺障害に対する水素吸入の効果

研究課題名（英文） The effects of hydrogen gas breathing on the lung injury induced by hyperoxia

研究代表者

小林 弘祐 (KOBAYASHI HIROSUKE)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：70153632

研究成果の概要（和文）：マウスは高濃度酸素下で水素吸入により生存率が延長し、好中球の肺内浸潤も軽減していた。培養ヒト肺胞上皮細胞で、アンチマイシン A による酸化ストレスに対して水素は細胞保護効果が見られた。ミトコンドリアから発生するスーパーオキシドも、水素付加群ではコントロール群に比べて有意に低く、また、アンチマイシン A を添加した後の産生量の増加も小さくなっていた。水素は高濃度酸素による肺障害に対して保護効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：Survival time of mice exposed to hyperoxia became longer when the mice breathed hydrogen gas, and the leukocytes accumulation in the lungs was reduced. Hydrogen gas protected cultured human alveolar epithelial cells against antimycin A-induced oxidative stress. The level of superoxide produced by mitochondria was significantly low, and the increase in superoxide produced by antimycin A was also lower in the presence of hydrogen gas. Hydrogen gas protected lungs against hyperoxic lung injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症、その他・酸素障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 活性酸素種の中でも反応性が高く組織障害性が高い水酸化ラジカルが水素によって消去されることが示され、水素ガスを吸入投与すると血液を介して水素は全身に行き渡り、活性酸素に関連した病変を抑えることが出来ることが、報告されている。

(2) 呼吸器疾患領域においても高濃度酸素吸入による肺障害を予防できると期待した。

2. 研究の目的

(1) *in vivo* のマウスを用いた実験では、1年目に高濃度酸素暴露での肺障害による生存曲線を調べ、さらに吸入水素ガスの濃度による違いを調べる

(2) ヒト肺胞上皮細胞 (A549) に酸化ストレスを与え、水素付加有無による細胞数および

細胞内活性酸素種(ROS)量を比較検討する。

(3) ミトコンドリアに酸化負荷を加え、水素の効果調べる。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J 雄性マウスを使用し、control (O₂ 21%)、高濃度酸素 (O₂ 80%)、水素 (O₂ 80%, H₂ 2%)、NO (O₂ 80%, NO 80 ppm)、NO+水素 (O₂ 80%, NO 80 ppm, H₂ 2%) の 5 吸入群 (いずれも N₂ Balance) にて実験を行い、生存時間解析を行った。肺障害の程度を肺乾湿重量比と MPO (myeloperoxidase) 活性で 6 日目に調べた。

(2) 水素付加群と水素非付加群の 2 群に分け、常酸素 (21%) 下で 12 時間前培養した。その後水素付加群を、酸素 21%、二酸化炭素 5%、窒素 72%、水素濃度が 2% になるよう調整したチャンバー内で培養した。水素非付加群は常酸素下で培養を続けた。酸化剤として、スーパーオキシドを生成させるメナジオン、アンチマイシン、細胞内で HO ラジカルを生成させるフェントン反応を起こす硫酸銅 (II) + アスコルビン酸を使用した。24 時間後に WST-8 を用いて生細胞数を測定し、一方、ミトコンドリアのスーパーオキシドを検出する蛍光試薬である MitoSOX および HO ラジカル、[•]OCl、ONOO⁻ などの強いラジカルを検出する蛍光試薬である APF (aminophenyl fluorescein) をあらかじめ細胞に取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) マウス肝からミトコンドリアを単離し、タンパク量で基準化し、MitoSOX の蛍光強度でスーパーオキシド発生量を測定し、水素付加群と水素非負荷群とで比較した。基質であるコハク酸を投与し、200 秒後にミトコンドリア複合体 III を阻害してスーパーオキシドを生成させるアンチマイシン A を投与し、30 秒ごとに蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) H₂ 吸入群、NO 吸入群および NO+H₂ 吸入群では、高濃度酸素吸入群に比べ累積生存率が有意に延長した (下図)。

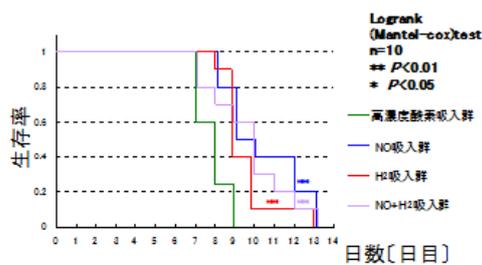
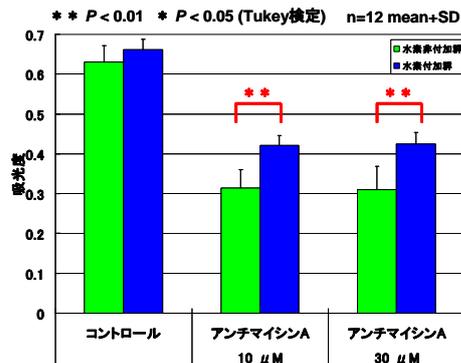


図1 マウス生存曲線

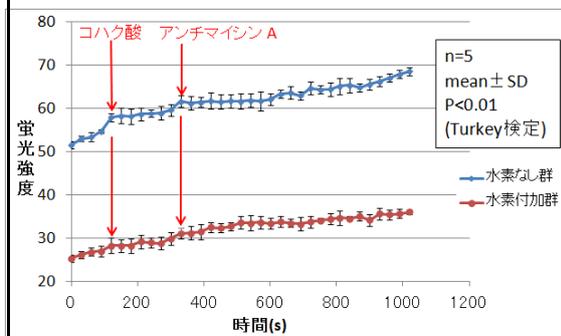
高濃度酸素吸入では control 群に比べ肺乾

湿重量比が有意に高値を示し、このことから高濃度酸素により血管透過性を亢進し肺傷害を起こしていることがわかった。H₂ 吸入群、NO 吸入群、NO+H₂ 吸入群では高濃度酸素吸入群と比較すると、乾湿重量比の増加が有意に抑制された。このことから H₂、NO 共に血管透過性を低下させたことがわかった。control 群と高濃度酸素群を比較すると、MPO 活性値が有意に上昇し (P<0.01)、高濃度酸素群と水素群を比較すると MPO 活性値が有意に低下した (P<0.01)。つまり、水素の吸入が好中球集積を抑制していた。

(2) 水素存在下の細胞の生存率は、メナジオンでは減少し、アンチマイシン A では増加し (下図 WST-8 による生細胞数)、フェントン反応では変化なかった。水素はメナジオンのような HO ラジカルを生成させる酸化ストレスに対しては、細胞保護効果が見られなかったが、アンチマイシン A のようなスーパーオキシドを生成させる酸化ストレスに対しては、生成を抑制させ、細胞を保護する効果があると考えられた。



(3) 単離したミトコンドリアに水素を付加して、産生されるスーパーオキシドに対して水素付加群と水素なし群の影響を比較検討したところ、ベースラインの測定において、ミトコンドリアから出ているスーパーオキシドは、水素付加群ではコントロール群に比べて有意に低く、また、アンチマイシン A を添加した後の産生量の増加も小さくなっていった (下図)。



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 11 件) すべて査読あり。

- ① Eshima E, Chiba S, Suzuki H, Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, Iwabuchia K, Shinohara N. Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4⁺Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunology Letters* 144:7- 15, 2012
- ② Takakura A, Kurita A, Asahara T, Yokoba M, Yamamoto M, Ryuge S, Igawa S, Yasuzawa Y, Sasaki J, Kobayashi H, Masuda N. Rapid deconjugation of SN-38 glucuronide and adsorption of released free SN-38 by intestinal microorganisms in rat. *Oncology letters* 3:520-524, 2011
- ③ Fukui T, Mitsufuji H, Kubota M, Inaoka H, Hirose M, Iwabuchi K, Masuda N, Kobayashi H. Prevalence of topoisomerase I genetic mutations and UGT1A1 polymorphisms associated with irinotecan in individuals of Asian descent. *Oncology letters* 2:923-928, 2011
- ④ Hirose M, Tachikawa K, Ozaki M, Umezawa N, Shinbo T, Kokubo K, Kobayashi H. X-ray radiation causes electromagnetic interference in implantable cardiac pacemakers. *Pacing Clin Electrophysiol* 33, 1174-1181, 2010
- ⑤ Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Kokubo K, Kobayashi H, Kim M S, Sidransky D, Watanabe M. Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. *Oncogene* 29, 3263-3275, 2010
- ⑥ Kokubo K, Futatsugi K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Removal of an endotoxin fragment (Lipid A) by an endotoxin-retentive filter. *Desalination and Water Treatment* 17: 25-30, 2010
- ⑦ Kokubo K, Soeda S, Shinbo T, Hirose M, Fuku N, Nishigaki Y, Tanaka M, Kobayashi H. Macrophages that survive hyperoxia exposure have higher superoxide dismutase activities in their mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 662, 63-69, 2010
- ⑧ Shimane M, Tomita Y, Shinbo T, Kokubo K, Hirose M, Hataishi R, Kubota M, Masuda N, Kobayashi H. Respiratory Rhythms in Healthy Subjects and Patients. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 662:133-40, 2010
- ⑨ Arai S, Mitsufuji H, Nishii Y, Onda S,

Ryuge S, Wada M, Katono K, Iwasaki M, Takakura A, Otani S, Yamamoto M, Yanaihara T, Yokoba M, Kubota M, Katagiri M, Fukui T, Kobayashi H. Yanase N, Hataishi R, Masuda N, Effect of gefitinib on warfarin antithrombotic activity. *Int J Clin Oncol* 14:332-336, 2009

⑩ Ogata S, Ogihara Y, Nomoto K, Akiyama K, Nakahata Y, Sato K, Minoura K, Kokubo K, Kobayashi H, Ishii M. Clinical score and transcript abundance patterns identify Kawasaki disease patients who may benefit from addition of methylprednisolone. *Pediatric Research* 66:577-584, 2009

⑪ Kubota M, Shirai G, Nakamori T, Kokubo K, Masuda N, Kobayashi H. Low frequency oscillometry parameters in COPD patients are less variable during inspiration than during expiration. *Respir Physiol Neurobiol*.166; 73-79, 2009

[学会発表] (計 14 件)

- ① Kobayashi H. Possible applications of hydrogen gas and nitric oxide for the therapy of critical illness. Invited lecture in the Symposium III: Applications of the Medical Gases NO, CO, H₂S and H₂ in Critical Illness. (Shock Society 24th annual conference, 2011.6.14, Norfolk, USA)
- ② Kurihara Y, Kokubo K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Increased surface coverage area of polyvinylpyrrolidone on polysulfone hemofilter membrane improves biocompatibility by suppressing cell adhesion during continuous hemofiltration (16th International Conference on Continuous Renal Replacement Therapies CRRT2001, 2011.2.22-25, San Diego, USA)
- ③ Harashima T, Otani Y, Kokubo K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Sakai K, Kobayashi H. Urea concentrating ability of artificial renal tubule based on countercurrent multiplier system using electro dialysis, dialysis and filtration (World Conference on portable-wearable and miniaturized systems for dialysis and ultrafiltration and 3rd Annual Congress of the International Society for hemodialysis, 2010.9.30-10.2, Vicenza, Italy)
- ④ Noda K, Kokubo K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Dialysate-based perfusate of low viscosity is suitable for normothermic ex vivo lung perfusion. (ERS Annual Congress 2010, 2010.9.18-19, Barcelona,

Spain)

⑤Sato Y, Shinbo T, Hataishi R, Kokubo K, Hirose M, Kobayashi H. Inhaled hydrogen during mechanical ventilation and hydrogen generated by enterobacterial flora reduce infarct size in the mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury. (European Respiratory Society Annual Congress 2010, 2010.9.18-19, Barcelona, Spain) ERS Young Scientist Sponsorship award

⑥ Kokubo K, Yamashita K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Hydrogen protects alveolar epithelial cells (A549) against injury induced by reactive oxygen species in vitro. (European Respiratory Society Annual Congress 2010, 2010.9.18-19, Barcelona, Spain)

⑦ Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Nebuya S, Fukuoka Y, Kokubo K, Kobayashi H, Noshiro M, Temporal changes in gene expressions and cytokine productions caused by stretching of normal human pulmonary artery endothelial cells. (European Respiratory Society Annual Congress 2010, 2010.9.18-19, Barcelona, Spain)

⑧Maruyama N, Nishikubo Y, Kokubo K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi M, Sakuragawa N, Kobayashi H. Differentiation of side population cells isolated from human amniotic mesenchymal cell into vascular endothelial cells under hypoxic condition. (Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 Asia Pacific meeting, TERMIS-AP 2010 Annual Conference 2010.9.15-17, Sydney, Australia)

⑨Nishikubo Y, Maruyama N, Kokubo K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi M, Sakuragawa N, Kobayashi H. Differentiation into neural cells from human amniotic mesenchymal cell in serum free medium. (Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 Asia Pacific meeting, TERMIS-AP 2010 Annual Conference 2010.9.15-17, Sydney, Australia)

⑩Sakurai K, Saito T, Kokubo K, Asahi D, Yamauchi F, Hosoya H, Maruyama N, Kobayashi H. Comparison of the effects of the dilution mode on inflammation and lymphocyte function between predilution and postdilution hemodiafiltration, (47th ERA-EDTA Congress, 2010.6.25-28, Munich)

⑪Urabe S, Kokubo K, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Suppression of platelet Activation on the surface of dialysis membrane releasing nitric oxide from the dialysate. (47th ERA-EDTA Congress, 2010.6.25-28, Munich)

⑫ Tsukao H, Kokubo K, Nagasato M, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Activation of platelets in contact with oxidized vitamin E-coated surface. (47th ERA-EDTA Congress, 2010.6.25-28, Munich)

⑬Shinbo T, Sato Y, Hataishi R, Kokubo K, Hirose M, Kobayashi H. Simultaneous inhalation of nitric oxide and hydrogen reduces infarct size in the mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury. (6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide June 14-18, 2010, Kyoto) [Nitric Oxide 22 suppl. S28]

⑭Kokubo K, Urabe S, Tsukao H, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H. Dialysis membrane releasing nitric oxide from dialysate side increases cyclic guanosine monophosphate in platelets and suppresses the activation of platelets on the surface. (6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide June 14-18, 2010, Kyoto)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：虚血再灌流障害軽減用治療剤および治療装置

発明者：小林弘祐, 小久保謙一, 新保年弘

権利者：学校法人 北里研究所

種類：特許

番号：特願 2010-053405 特開 2011-184398

出願年月日：2010年03月10日

国内外の別：国内および国外国際特許公開

PCT/JP/2011/054747 各国特許移行中

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弘祐 (KOBAYASHI HIROSUKE)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：70153632

(2) 研究分担者

廣瀬 稔 (HIROSE MINORU)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：50286382
小久保 謙一 (KOKUBO KENICHI)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号：20287965
新保 年弘 (SHINBO TOSHIHIRO)
北里大学・医療衛生学部・助教
(現 東京工科大学・助教)
研究者番号：10406910
久保田 勝 (KUBOTA MASARU)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：00234500
畑石 隆治 (HATAISHI RYUJI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：20276124

(3) 連携研究者

()

研究者番号：