

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462840

研究課題名(和文) ラット出血性ショック蘇生後肺障害モデルにおける水素吸入療法の効果

研究課題名(英文) Hydrogen Inhalation Protects Against Acute Lung Injury Induced by Hemorrhagic Shock and Resuscitation

研究代表者

中尾 篤典 (Nakao, Atsunori)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40648169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット出血性ショック作成後、1.3%水素21%酸素77.7%窒素の混合ガスを吸引させた水素群と、21%酸素79%窒素の混合ガスを吸引させたコントロール群を作成した。水素群では、動脈血液ガス解析では $PO_2$ 、Lactate、肺の組織染色では肺胞壁の肥厚、好中球集積、酸化ストレス、mRNAによる解析では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1、iNOS、CCL2がコントロール群に比べ有意に減少していた。さらに、水素群ではNF- $\kappa$ B p65の核内発現が抑制されていた。以上より、水素は肺での炎症を抑制し、水素吸入療法は出血性ショック後の肺障害に有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hemorrhagic shock followed by fluid resuscitation (HS/R) leads acute lung injury (ALI). Hydrogen, a therapeutic gas, has potent cytoprotective, antiinflammatory, and antioxidant effects. Rats were subjected to hemorrhagic shock by withdrawing blood to lower blood pressure followed by resuscitation with shed blood and saline to restore blood pressure. After HS/R, the rats were maintained in a control gas of similar composition to room air or exposed to 1.3% hydrogen. HS/R induced ALI, as demonstrated by significantly impaired gas exchange, congestion, edema, cellular infiltration, and hemorrhage in the lungs. Exposure to 1.3% hydrogen significantly attenuated the upregulation of neutrophil accumulation, alveolar cell wall thickness, oxidative stress, the mRNAs for several proinflammatory mediators induced by HS/R. Hydrogen, administered through inhalation, may exert potent therapeutic effects against ALI induced by HS/R and attenuate the activation of inflammatory cascades.

研究分野：救急・災害医学

キーワード：水素 出血性ショック 肺障害

### 1. 研究開始当初の背景

出血性ショック蘇生後肺障害の病態は多岐にわたるが、基本的には侵襲により産生された炎症性サイトカインに起因する肺泡領域の非特異的炎症による肺障害である。酸素化障害とコンプライアンスの低下による呼吸不全をきたし、救急領域では非常に重要な病態であるが、いまだに確立した治療法に乏しい。外傷や内因性疾患での出血性ショックは、たとえ蘇生しえても後に臓器不全が多発し、治療に難渋することをしばしば経験し、現行の治療の限界を感じてきた。

2007年に日本医科大学のグループにより、水素分子が脳虚血に対し治療効果があることが報告され、水素がもつ抗酸化作用が注目されるようになった(Nat Med13:688, 2007)。それ以来、フリーラジカル産生に伴う様々な病態に対し水素吸入が有効であったとする報告が行われるようになり、水素はNO, CO, H<sub>2</sub>S に続く第4のシグナルガスと提唱されている。我々は、水素ガスに注目し、肺移植後の虚血再灌流障害や人工呼吸誘発性肺障害に水素吸入が効果的であることをすでに報告している(Critical Care 14: R234, 2010、Transplantation 90:1344-51, 2010)。水素は起爆性があり、水素を治療に用いることは一見非現実的なように思えるが、4%以下の濃度であれば空気中でも、また酸素と混合しても安全であることが証明されている。吸入ガス治療は、心不全などで輸液量を制限したい場合や、血管ルートがとりにくい場合でも容易に行うことができ、新規医療として期待される。また、水素濃度を感知するモニターも安価で市販されているため、その管理も比較的容易である。

これまでの国内外の水素を使った実験結果を総括すると、水素が酸化ストレスを減少させる結果が共通にみられ、水素の直接的あるいは間接的な抗酸化作用、抗炎症作用は疑う余地はない。本研究により水素を用いた吸入ガス治療のメカニズムが明らかになれば、臨床試験のための準備も整備されていくと考える。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットを用いて、水素吸入療法が出血性ショック蘇生後肺障害に効果を示すかどうか、もし効果を示すのであれば、そのメカニズムは何か、を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 出血性ショック+蘇生モデル(HS/R)の作成

雄性SDラットに気管内挿管し、イソフルランで全身麻酔を行い、脱血により平均血圧が30±5 mmHgになるように60分間維持したあと、返血、蘇生する。このモデルは、研究

代表者がすでに確立しており、再現性の高い実験モデルである(J Trauma 69: 185-194, 2010)。また、sham 群として出血性ショックを行わない群も作成した。

#### 2) 水素ガスの吸引

蘇生後、専用のガス吸入チャンバーで

H<sub>2</sub>群:1.3%水素、21%酸素、77.7%窒素

N<sub>2</sub>群:21%酸素、79%窒素

の混合ガスを吸引させ、1、3、6時間で動物を犠死せしめた。

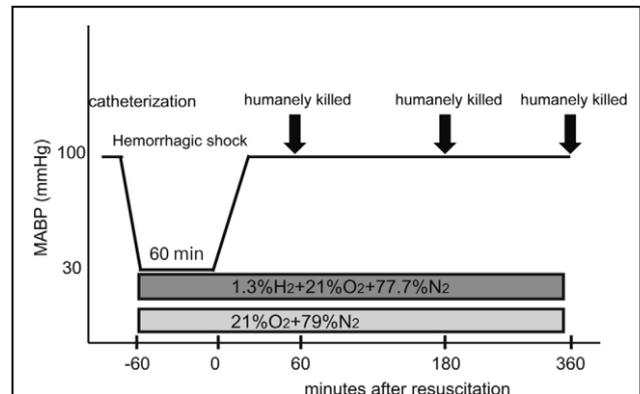


図1. 出血性ショック作成と水素投与方法

#### 3) 検体の採取と測定

動脈血は100%酸素で5分換気後採取した。また、肺組織の mRNA(TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, ICAM-1, iNOS, CCL2)は 定量リアルタイム RT-PCR で評価し内部標準には gapdh を用いた。脂質の過酸化を示すマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)は測定キットを用いて測定した(BIOXYTECH MDA Assay Kit、ペルシビオバイオサイエンス)。さらに、パラフィン包埋にて薄切切片を作成し、HE染色で肺障害スコア(acute lung injury (ALI) score)を、ナフトール AS-D クロロアセテートエラストーゼ染色を用いて肺の好中球数を、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 染色を用いて酸化ストレスを、確認した。ALIスコアは①肺胞壁の厚さ、②air space、肺胞または基底膜への好中球の浸潤、③うっ血の程度を各 0-3 点で評価し、点数の高いほど状態が悪いと定義した。最終的な点数は①-③を合計した 0-9 点で評価した。ALIスコア、好中球数、酸化ストレスの評価にはいずれも 400倍視野を 1 検体 10 視野評価し、その平均値をグラフ化した。NF-kB は western blot 法により細胞質内、核内の p65 を検出し、核内の内部標準としてはラミニンを、細胞質の内部標準としては $\beta$ アクトチンを用いた。NF-kB の DNA 結合能はゲルシフトアッセイにて測定した。

#### 4) 統計解析

結果はいずれも平均値±標準誤差で示した。JMP version 8 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて解析を行った。多重比較検定には

正規性のある場合は Tukey-Kramer 法を用い、正規性の無い場合には Bonferroni 法を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

##### 1) 水素は肺の酸素化を改善した

出血性ショック蘇生後 3 時間において、出血性ショックを実施していない Sham 群に比べ、コントロールである  $N_2$  群でラットの肺機能は低下した。 $H_2$  群は  $N_2$  群に比べ酸素分圧を有意に増加させ (図 2A)、乳酸濃度を有意に減少させた (図 2C)。二酸化炭素分圧には変化は認められなかった (図 2B)。また、pH や BE などには有意な変化はなかった。

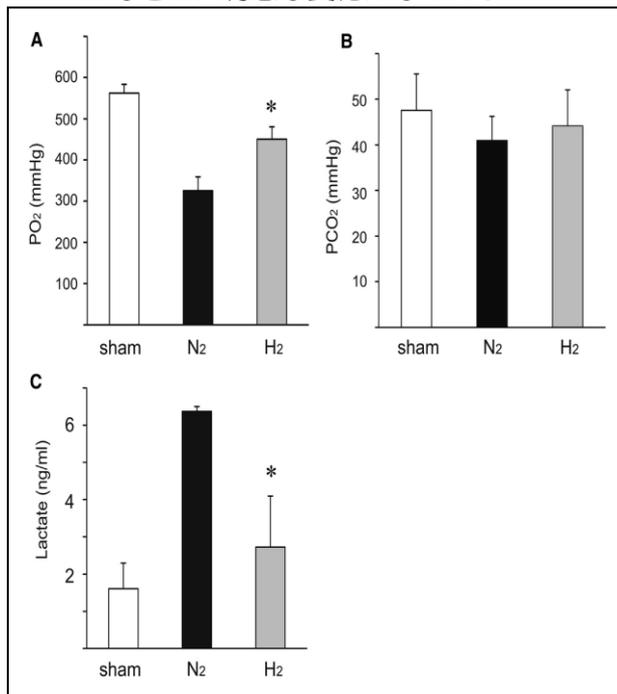


図 2. 出血性ショック蘇生後 3 時間での動脈血の A. 酸素分圧、B. 二酸化炭素分圧、C. 乳酸濃度 \*: $p < 0.05$  対  $N_2$  群

##### 2) 水素は肺障害を軽減した

出血性ショック後、肺には細胞浸潤や浮腫が見られ、肺胞壁が肥厚していた。sham 群では 2 点以下であった肺の ALI スコアは  $N_2$  群で 4.5 点まで増加した (図 3A,B,G)。好中球数も sham 群では 40 個程度であったが、 $N_2$  群では 100 個以上に増加した (図 3D,E,H)。 $H_2$  群はそれらを有意に改善し、ALI スコアは 3.3 点 (図 3C,G)、好中球数は 50 個程度にまで減少させた (図 3F,H)。

MDA は脂質の酸化により生じる有害な代謝産物であるが、出血性ショック後には増加が確認され、sham 群の 200 mg/protein 程度の濃度に比べて  $N_2$  群では 400 mg/protein 程度まで増加した (図 4A)。この時、ROS などの活性酸素によって DNA が酸化されることで生じる 8-OHdG も  $N_2$  群で増加した (図 4B,C)。 $H_2$  群はそれらを有意に改善し、MDA は 300 mg/protein 程度まで減少し (図 4A)、

8-OHdG 陽性細胞も見られなくなった (図 4D)

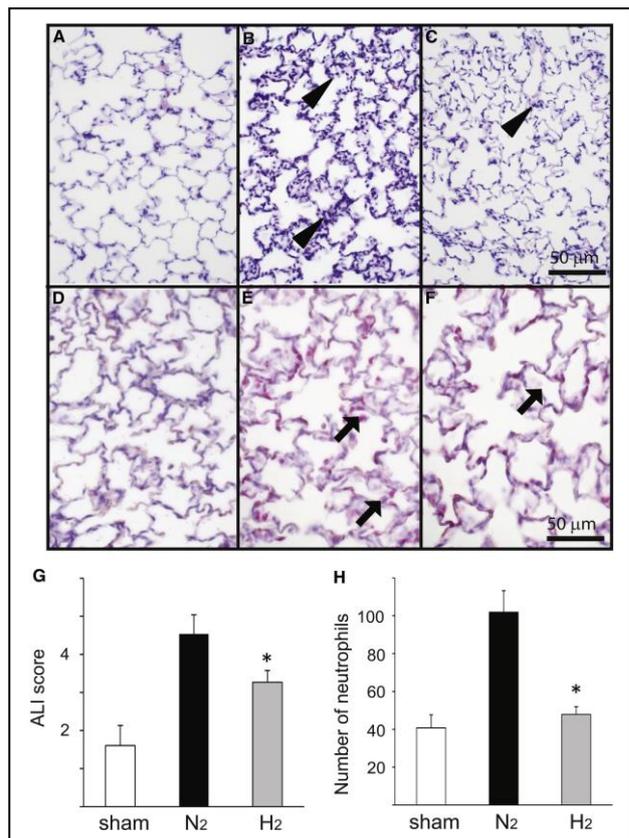


図 3. 出血性ショック 3 時間後での肺組織の HE 染色 (A. sham 群、B.  $N_2$  群、C.  $H_2$  群) と G. ALI スコア、及びナフトール AS-D クロロアセテートエラスターゼ染色 (D. sham 群、E.  $N_2$  群、F.  $H_2$  群) と H. 浸潤好中球数 \*: $p < 0.05$  対  $N_2$  群

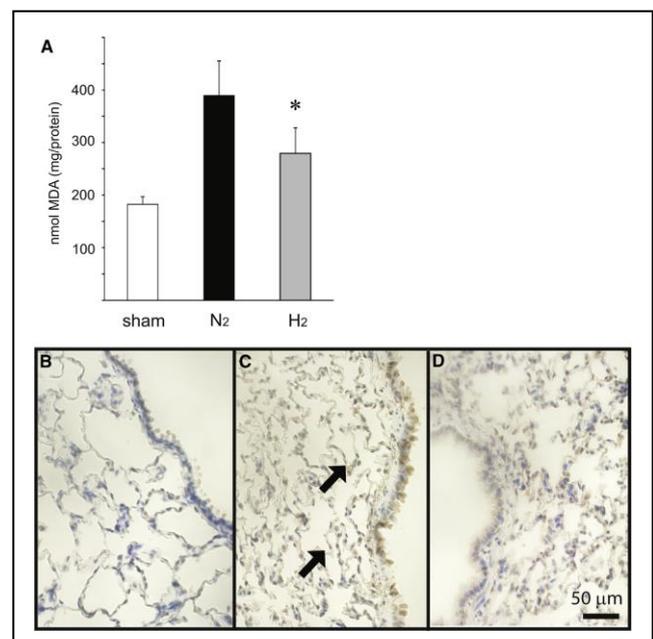


図 4. 出血性ショック 3 時間後での肺組織の A. MDA 濃度と 8-OHdG 染色 (B. sham 群、C.  $N_2$  群、D.  $H_2$  群)

### 3) 水素は炎症性因子を抑制した

1) 2) より、出血性ショック蘇生後 3 時間において水素は肺への好中球の浸潤を抑制し、肺障害を抑制したと考えられたため、蘇生後 1 時間、及び 3 時間後の肺組織の mRNA を用いて炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )、誘導型一酸化炭素合成酵素 (iNOS)、接着・走化因子 (ICAM-1, CCL2) の発現量を測定した。結果、出血性ショックにより、いずれの mRNA も有意に増加したが、H2 群は N2 群に比べ出血性ショック蘇生後 1 時間で TNF- $\alpha$  を有意に抑制し、蘇生後 3 時間で IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS, ICAM-1, CCL2 を有意に抑制することが明らかとなった (図 5)。

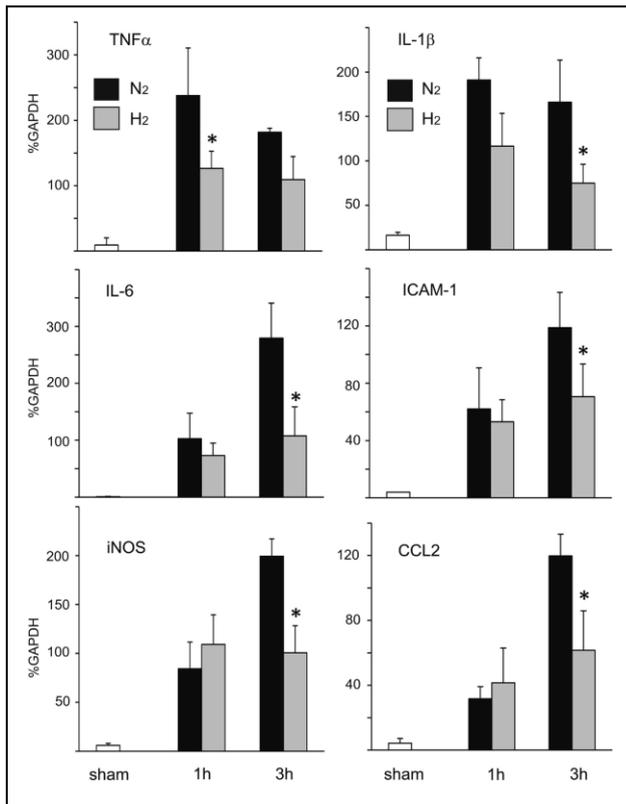


図 5. 出血性ショック蘇生後 1 時間及び 3 時間での肺組織の mRNA 発現

### 4) 水素による抗炎症効果は NF-kB 経路により制御されている可能性がある

Sham 群にくらべて H2 群では NF-kB p65 の核内での発現が増加したため (図 6A,B)、出血性ショックにより、NF-kB p65 の核内移行が増加し、炎症性物質の転写活性が上昇したと考えられた。また、DNA との結合についても N2 群では増加していた (図 6C,D)。しかし、H2 群では p65 の核内発現 (図 6A,B) 及び DNA 結合能 (図 6C,D) が有意に減少していた。従って、H2 群では NF-kB の p65 の核内移行が抑制され、炎症物質の転写活性が抑制されることで炎症性物質の発現が低下し、炎症を抑えることが出来たのではないかと考えられた。

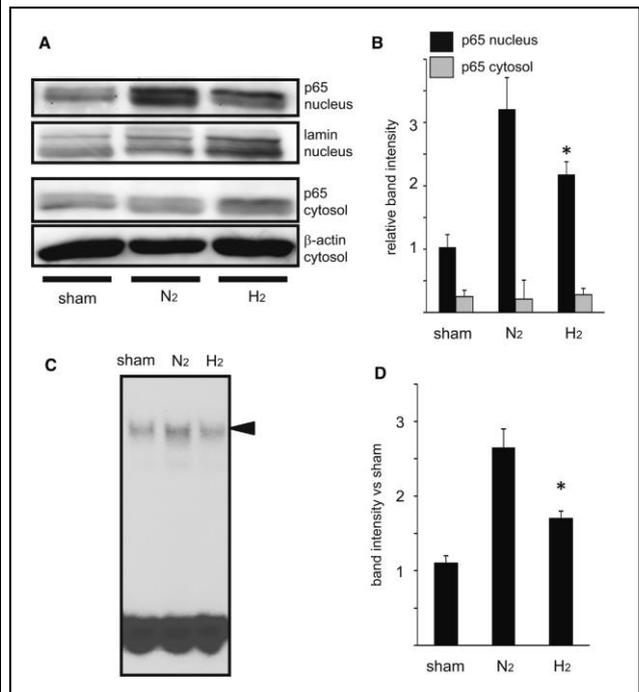


図 6. 出血性ショック 6 時間後における肺組織の NF-kB p65 の細胞内、核内発現 (A. western blot による蛋白発現、B. sham 群の核内発現を 1 としたときの相対比グラフ) と DNA 結合能 (C. ゲルシフトアッセイによる発現、D. sham 群を 1 としたときの相対比グラフ)

上記 1) - 4) の結果より、ラット出血性ショックモデルにおいて、水素ガス吸入は肺における炎症カスケードの過活性を阻害し、肺障害を軽減することが明らかとなった。

本研究結果は、気管挿管患者など、ガス吸入治療が容易な患者において、水素ガスが肺障害を抑制する新しいツールとなり得ることを証明したものであり、今後の臨床応用が十分に期待できる。

### 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 1 件)

Kohama K, Yamashita H, Aoyama-Ishikawa M, Takahashi T, Billiar TR, Nishimura T, Kotani J, Nakao A. Hydrogen inhalation protects against acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation. *Surgery* 152(2), 2015, 399-407. DOI; 10.1016/j.surg.2015.03.038. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. Keisuke Kohama, Hayato Yamashita, Michiko Aoyama-Ishikawa, Takeshi Nishimura, Noritomo Fujisaki, Joji Kotani, Atsunori Nakao. Hydrogen Inhalation Protects Against Acute Lung Injury

Induced by Hemorrhagic Shock and Resuciation. 10<sup>th</sup> Annual Academic Surgical Congress. Las Vegas (Nevada, USA), Feb.3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup>, 2015.

2. 山下勇人、小濱佳祐、石川倫子、西村健、藤崎宣友、宇佐美眞、小谷穰治、中尾篤典 1.3%水素吸入は出血性ショック蘇生後急性肺障害を軽減する 第30回日本 shock 学会総会 京王プラザホテル八王子(東京都八王子市)、2015年5月22日-5月23日

3.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

中尾 篤典 (NAKAO, Atsunori)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40648169

(2) 研究分担者

石川 倫子 (ISHIKAWA, Michiko)

神戸大学大学院・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号: 40566121

(3) 連携研究者

小谷 穰治 (KOTANI, joji)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80360270