

題名：水素含有生理食塩水による腹腔内洗浄は、急性腹膜炎において、効果的かつ実用的な治療法になり得る。

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学

佐田 春樹

序論：

急性腹膜炎は未だ致死性疾患であり、死因の多くは敗血症が引き起こす多臓器不全である。その機序には様々な因子が関与するが、その中でも活性酸素が引き起こす酸化ストレスが治療標的として注目されている。2007 年に大澤らが、水素分子が生体内で障害性の高い活性酸素種を選択的に還元すると報告して以降、水素ガスの吸入、水素含有生理食塩水の飲水や腹腔内注入の効果報告され、敗血症に対しても有望な治療法と考えられている。一方で、水素の投与方法には課題を要している。腹膜炎の治療には手術を要することが多く、その際には腹腔内洗浄を行うことが多い。そこで、我々は、水素療法をより導入しやすい方法として、水素含有生理食塩水で腹腔内洗浄を行うことが有効であり、かつ安全であるかを検討した。

方法：

① 短時間で高濃度の水素含生理食塩水の精製器の作製。

② 急性腹膜炎に対する水素含有生理食塩水腹腔内洗浄の、ラットを用いた有効性とミニブタを用いた安全性と実用性の検証。

A) F344/Fisher ラット(9 週齢)：盲腸結紮穿孔モデルにて腹膜炎を誘発し、通常の生理食塩水腹腔内洗浄グループ(NS 群)と水素含有生理食塩水腹腔内洗浄グループ(HRS 群)に分け、比較する。盲腸結紮穿孔は盲腸壁を 18 ゲージの針で 4 回穿孔することで重症敗血症とする。閉腹後 6 時間で、壊死盲腸を切除し、腹腔内洗浄を 40 mL の温かい NS または HRS で行い、腹腔内に 10 ml の NS または HRS を満たした後、閉腹した。

評価項目

1) 生存期間

2) 閉腹後 3 時間における

a) 肝腎機能障害：AST、ALT、BUN、Cre および病理学的所見

b) 抗酸化効果：体重あたりの尿中 8-OHdG

c) 抗炎症効果：WBC、PLT、TNF- α 、IL-6

d) 抗アポトーシス効果：組織における Bcl-2 (腎・肝) および Bax (腎) の発現

B) ミニブタ：2 頭使用し、盲腸穿孔モデルにて腹膜炎を誘発する。開腹し、回盲弁の下の盲腸壁に 5cm の切開を行う。腹腔内に戻し、圧迫して糞便物質を腹腔内に押し出した後、閉腹する。1 時間後、再開腹し、穿孔した盲腸を除去する。腹腔内洗浄を 4L の NS と HRS を行った後に、1L の NS または HRS を腹腔内に残し閉腹し、6 時間循環動態をモニターする。

評価項目

- 1) 循環動態：心電図、動脈圧、酸素飽和度、尿量、および心拍数
- 2) 動脈血ガス測定：1時間ごとの pH および PaO₂、PaCO₂ (Abbott Point of Care Inc., Princeton, NJ)
- 3) 抗酸化効果：体重あたりの尿中 8OHdG

統計分析：データは平均±標準偏差とし、すべての統計分析は、JMP を使用した。

結果：

① 水素含有生理食塩水の準備

水素ガスを高圧 (0.15 Pa) の水に過飽和レベルまで溶解させて、2時間で水素含有生理食塩水 5L を生成する装置を開発し、その水素濃度の平均は 0.93ppm であった。

② ラット：

生存期間：HRS 群で腹膜炎後の生存期間が有意に延長した (HRS vs NS; median survival: HRS 30h vs NS 9h ; p = 0.012)。

肝腎機能障害：HRS 群で有意に肝腎機能障害を抑制した (HRS vs NS; AST 429.75 ± 84.49 U/L vs 707.25 ± 186.41 U/L, p < 0.048、BUN 32.38 ± 16.12 mg/dL vs 65.75 ± 23.68 mg/dL, p=0.048、Cre 0.30 ± 0.05 mg/dL vs 0.49 ± 0.13 mg/dL, p = 0.030)。

組織病理学的分析：NS 群では空胞化を伴う肝細胞変性や、急性尿細管壊死として近位尿細管に

高好酸球性物質を認めた。一方で、HRS 群ではその様な所見を認めなかった。

抗酸化効果： HRS 群の体重あたりの尿中-8OHdG は NS 群よりも有意に低かった (HRS vs NS; 4.8 ± 2.5 vs 10.3 ± 3.9 pg/kg/h, $p = 0.023$)。

抗炎症効果： HRS 群で TNF- α で有意な減少が見られた (HRS vs NS; 44.6 ± 4.1 vs 66.1 ± 5.8 pg/mL, $p = 0.027$)。一方で、IL-6 (HRS vs NS; 2750.8 ± 198.2 vs 3407.8 ± 280.2 pg/mL, $p = 0.085$) , WBC, PLT においては有意な差を認めなかった。

抗アポトーシス効果： HRS 群は腎にて Bcl-2 の発現が上昇し、腎および肝における Bax の発現を減少させた。(HRS vs NS ; 中等度以上の発現比率 Bcl 2 : 腎 $27.6 \pm 8.0\%$ vs $14.4 \pm 6.4\%$, $p = 0.009$, Bax : 腎 : $16.0 \pm 2.8 \%$ vs $25.6 \pm 9.0\%$, $p = 0.009$, 肝臓 : $2.3 \pm 0.9 \%$ vs $8.0 \pm 3.7\%$, $p = 0.009$)。

ミニブタ： NS と HRS のミニブタともに、同様の血圧値と pH、PaO₂、PaCO₂ の推移を示した。尿中-8OHdG は HRS 投与のミニブタにて投与早期(洗浄後 1 時間)において NS 投与ミニブタより低い値であったが、洗浄後 3 時間では 2 つのミニブタにおける尿中-8OHdG はほぼ同じ値を示した。

考察：

HRS による腹腔内洗浄は、生存率の向上、肝不全および腎不全に対する保護効果、抗酸化作用、抗炎症作用、および抗アポトーシス作用を認めた。さらに、大型動物 (ミニブタ) モデルで実行可能で循環動態に影響を与えないことを確認した。

敗血症が引き起こす多臓器不全には、臓器におけるミトコンドリア障害が関与していると報告されている。これは活性酸素により障害されるが、水素がこれを選択的に除去すると報告されており、新たな抗酸化療法が敗血症治療として注目されている。

我々は腹腔内洗浄を水素含有生理食塩水で行うことで、臓器障害を抑制することをラットにおいて示した。機序の一つとしては、2016年に Jie Li らが報告した活性酸素が引き起こす細胞のアポトーシスを、水素が抑制することが我々の臓器の免疫染色から考えられた。一方で、我々の実験は動物実験数が少ないこと、詳細なメカニズムに言及できていないこと、パラメーターが少ないことなど、いくつかの課題を要している。

我々の研究の目標は、腹膜炎症例に対する新たな水素療法の臨床応用である。水素は腹膜透析および血液透析、飲用、静脈内およびガス吸入によるヒト臨床研究が近年行われている。今後、我々は腹膜炎に対する HRS による腹腔内洗浄が、ヒトに応用できるか、さらなる臨床試験が必要と思われる。