

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 熊谷光祐

2 論文題目

くも膜下出血後の遅発性脳障害に対する水素ガス吸入効果：新規ラットくも膜下出血モデルによる検討

3 目的

くも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) は死亡率が高く予後不良の疾患である。SAH 発症時に死亡しなかった場合、SAH 発症数日 ~ 2 週間に出現する遅発性脳障害 (delayed brain injury, DBI) が、SAH の予後に重大な影響を与えるとされている。長年、遅発性脳血管攣縮 (cerebral vasospasm, CV) が DBI の主要因と考えられていたが、CV の抑制だけでは DBI 及び予後の改善は得られなかった。

近年、SAH 発症 72 時間以内に起こる早期脳損傷 (early brain injury, EBI) を抑制することで、DBI 及び予後が改善したとの報告があり、EBI は DBI 及び予後の増悪因子の一つとして注目されている。

水素 (H_2) は、強力な抗酸化作用と高い組織移行性を兼ね備えており、様々な疾患に対する効果が報告されている。特に、活性酸素種と活性窒素種の中でも傷害性の強い $\cdot OH$ と $ONOO^-$ を選択的に還元することで、 H_2 の強力な抗酸化作用は発揮される。SAH においても、 H_2 ガス吸入による EBI 抑制効果については既に報告されているが、DBI 抑制効果については未だ示されていない。そこで、本研究は、SAH 動物モデルを用いて H_2 ガス吸入による DBI 抑制効果について検討することを目的とした。

研究を始めるにあたり、ヒトの SAH に近い病態を再現でき、かつ DBI を観察するのに適したモデルを作成する必要がある。Endovascular puncture (EVP) モデルは、ヒトの SAH に近い病態を再現できるラット SAH モデルの一つとして広く用いられているものの、血腫量を調整することができず生存率・生存期間が極めて低いため、DBI を観察するには適していないとされている。そこで、まず、EVP モデルを改良して SAH 発症後の頭蓋内圧 (intracranial pressure, ICP) 最高値を抑えた、死亡率の低い SAH モデルを作成した。次に、SAH 後急性期脳低灌流が EBI の病態の一つであり、DBI の増悪因子でもあることに注目し、SAH 発症 24 時間後に一側総頸動脈結紮 (unilateral common carotid artery occlusion, UCCAO) による脳低灌流負荷を軽症 SAH ラットに加える SAH + UCCAO モデルを作成した。

実験 1 では、この SAH + UCCAO モデルが DBI の病態解明に適したモデルであるかを検討した。次に、実験 2 では、SAH + UCCAO モデルを用いて、EBI 及び DBI に対する H_2 ガス吸入効果について検討した。

4 実験 1: 低死亡率 SAH ラットに脳低灌流負荷を加えた動物についての検討

(方法)

109 匹の雄性 SD ラットを SAH の有無に従い、no SAH 群と SAH 群の 2 群に振り分けた。24 時間後、脳低灌流負荷の有無により、no SAH 群は sham 群及び UCCAO 群に、SAH 群は 24 時間後の神経学的スコアが 15 点以上のラットのみを SAH - UCCAO 群及び SAH + UCCAO 群にそれぞれ振り分け、sham、UCCAO、SAH - UCCAO、SAH + UCCAO 群の 4 群とした。SAH 発症日から第 7 病日まで連日体重測定を行った。EBI の程度は、第 2 病日における神経機能、脳浮腫の程度、大脳皮質における S100B 発現量及び C-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化量、reactive astrogliosis の程度を用いて評価した。Reactive astrogliosis の程度は、第 3 及び 7 病日の GFAP の発現量で評価した。CV の程度は、第 3 及び 7 病日における遠位部 ACA 及び BA を用いて組織学的に評価した。DCI の程度は、第 7 病日における神経機能評価、穿破側 PRh 領域及び DG における損傷神経細胞の割合を用いて評価した。

(結果)

SAH 群において、ICP 最高値は 33 ± 15 mmHg、24 時間以内の死亡率は 5.4 % と低値であった。Sham、UCCAO、SAH - UCCAO、SAH + UCCAO 群における第 7 病日までの死亡率は各群とも 0 % であった。第 2、3 及び 7 病日における体重減少率および神経機能は、SAH - UCCAO 群と比較して SAH + UCCAO 群において有意に悪化した。SAH + UCCAO 群において、SAH - UCCAO 群と比較して EBI、reactive astrogliosis、遠位部前大脳動脈における CV、及び DBI の有意な悪化を認めた。

(考察)

SAH + UCCAO モデルにおいて、SAH 後早期に脳低灌流負荷が加わることで、脳皮質の S100B 発現量及び JNK リン酸化量が亢進し、reactive astrogliosis が増悪した。このことで、脳浮腫と神経機能の悪化を来し、EBI が増悪した。さらに、増悪した EBI とともに CV は悪化し、第 7 病日における神経細胞死と神経機能の悪化を伴う DBI が生じた。これらのことから、SAH + UCCAO モデルは、低い死亡率で EBI、CV 及び DBI を観察するのに適したモデルと考えられた。

5 実験 2: SAH + UCCAO モデルにおける水素ガス吸入効果

(方法)

92 匹の雄性 SD ラットを (1) 偽手術を行う群 (sham 群)、(2) 30 % 酸素 + 70 % 窒素環境下で低死亡率 SAH ラットを作成後、同環境下で UCCAO を負荷する群 (control 群)、(3) 1.3 % 水素 + 30 % 酸素 + 68.7 % 窒素環境下で低死亡率 SAH ラットを作成後、同環境下で UCCAO を負荷する群 (H₂ 群) の 3 群に振り分けた。第 1、2、3 及び 7 病日に体重測定及び神経学的評価を行った。EBI、reactive astrogliosis、DBI の評価は実験 1 と同様に行った。CV の評価は、遠位部前大脳動脈を用いて行った。

(結果)

24時間以内及び第7病日までの死亡率は、それぞれ control 群 6.3%、9.4%、H₂ 群 3.3%、3.3% であり有意差は認めなかった。H₂ 群は control 群と比較して、第3及び7病日における体重減少率および神経機能が有意に改善した。H₂ 群では、control 群と比較して EBI 及び DBI の有意な改善を認めたが、CV に関しては有意差を認めなかった。

(考察)

H₂ ガス吸入によって EBI が改善した。さらに、EBI が改善したことで、CV の程度行っただが、実臨床への応用を考えると SAH 発症後からの投与による効果を検討する必要があると考えられた。

6 結論

1. SAH + UCCAO モデルについて

- SAH 発症早期に脳低灌流負荷を加えることで、EBI 及び CV が悪化し、その結果として神経細胞死と神経機能の悪化を伴う DBI が発生した。
- SAH + UCCAO モデルは、死亡率が低い上に、EBI、reactive astrogliosis、CV、DCI の全てを観察することができた。SAH 後の病態解明、治療薬の効果を検討するのに有用なモデルである。

2. SAH + UCCAO モデルに対する水素ガス吸入効果

- H₂ ガス吸入による EBI 抑制効果は、CV の程度に関係なく DBI および予後を改善した。また、H₂ ガスによる明らかな有害事象は認めなかった。
- EBI が、SAH 後の予後を規定する重大な因子である。
- H₂ ガス吸入療法が SAH の治療成績を向上させる新たな治療手段となる可能性がある。