

題目

ラットくも膜下出血モデルに対するマグネシウム脳槽内投与
および飽和水素水経静脈投与の治療効果に関する検討

藤 井 和 也

(神経病学専攻)

防衛医科大学校

平成29年度

目次

1 章 研究背景と目的	
1-1. くも膜下出血 (SAH) の臨床経過と治療成績	1 頁
1-2. 脳血管攣縮	1 頁
1-3. 遅発性脳虚血 (DCI) と脳血管攣縮	2 頁
1-4. 遅発性脳血管攣縮に対する治療の現状	3 頁
1-5. マグネシウムによる脳血管攣縮の抑制と問題点	3 頁
1-6. EBI の概念と酸化ストレス	4 頁
1-7. フリーラジカルと ROS、酸化ストレス	4 頁
1-8. 水素の薬理作用と EBI 抑制への期待	5 頁
1-9. SAH 動物モデルの課題	6 頁
1-10. 研究の目的	7 頁
2 章 実験 1: 重症 SAH モデルの作成法についての検討	
2-1. SAH モデルの作成方法と頭蓋内圧に着目した重症度の選別方法	8 頁
2-2. 実験 1 方法	8 頁
2-2-1. 実験動物	8 頁
2-2-2. ラット SAH モデルの作成	8 頁
2-2-3. 24 時間後死亡率および神経機能評価	9 頁
2-2-4. 血腫量に基づく SAH grade の評価	10 頁
2-2-5. 組織学的評価	10 頁
2-2-5-1. Nissl 染色	10 頁
2-2-5-2. 8-OHdG 染色	11 頁
2-2-5-3. TUNEL 染色	11 頁
2-2-6. 脳浮腫の評価	12 頁
2-2-7. 統計学的解析	12 頁
2-3. 実験 1 結果	12 頁
2-3-1. SAH 発症前後の血液ガス分析	12 頁
2-3-2. SAH 発症前後の ICP の推移	13 頁
2-3-3. 24 時間後死亡率	13 頁
2-3-4. ICP と神経機能予後の相関性	13 頁
2-3-5. ICP と SAH grade の相関性	13 頁

2-3-6. SAH 後の脳の組織学的変化	14 頁
2-3-6-1. Nissl 染色	14 頁
2-3-6.2. 8-OHdG 染色	14 頁
2-3-6-3. TUNEL 染色	14 頁
2-3-7. 脳浮腫の比較検討	15 頁
2-4. 実験 1 の結果から：重症 SAH モデルに適した ICP grade	15 頁
3 章 実験 2: ラット SAH モデルを用いた治療効果の検討	
3-1. 実験 2 方法	16 頁
3-1-1. ラット SAH モデルの作成	16 頁
3-1-2. Mg 脳槽内投与方法、および飽和水素水の作成と経静脈投与方法	17 頁
3-1-3. 死亡率および神経機能評価	17 頁
3-1-4. 血腫量に基づく SAH grade の評価	17 頁
3-1-5. 組織学的評価と脳血管攣縮の評価	18 頁
3-1-5-1. 組織学的評価	18 頁
3-1-5-2. 脳血管攣縮の評価	18 頁
3-1-6. 酸化的傷害の定量的評価	18 頁
3-1-7. BBB 破綻の程度の評価	19 頁
3-1-8. 脳浮腫の評価	20 頁
3-1-9. 統計学的解析	20 頁
3-2. 実験 2 結果	20 頁
3-2-1. SAH 発症前後の血液ガス分析	20 頁
3-2-2. SAH 発症前後の ICP の推移	20 頁
3-2-3. 24 時間後死亡率	21 頁
3-2-4. 神経学的評価	21 頁
3-2-5. SAH 血腫 grade	21 頁
3-2-6. 脳の組織学的変化	22 頁
3-2-6-1. 8-OHdG 染色	22 頁
3-2-6-2. TUNEL 染色	22 頁
3-2-7. ELISA 法を用いた 8-OHdG の定量測定	23 頁
3-2-8. BBB 破綻の程度の評価	23 頁
3-2-9. 脳浮腫の評価	23 頁

3-2-10. 脳血管攣縮の程度	24 頁
3-2-10-1. BA の脳血管攣縮	24 頁
3-2-10-2. ACA の脳血管攣縮	24 頁
3-2-10-3. MCA の脳血管攣縮	25 頁
3-3. 実験 2 の結果から : Mg 脳槽内投与および飽和水素水経静脈投与の効果	25 頁
4 章 考察	
4-1. 実験 1 の考察	
4-1-1. SAH 動物モデルにおける重症度分類の重要性	26 頁
4-1-2. ヒトの SAH との類似性: ICP の急上昇と死亡率	27 頁
4-1-3. monofilament perforation model における EBI の再現性	27 頁
4-2. 実験 2 の考察	28 頁
4-2-1. Mg 脳槽内投与による治療効果	28 頁
4-2-2. 水素水の経静脈投与治療効果	29 頁
4-2-3. 水素の作用の可能性	30 頁
4-2-4. 本研究の課題、および臨床研究について	30 頁
5 章 結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁
図表	46 頁

1 章 研究背景と目的

1-1. くも膜下出血 (SAH) の臨床経過と治療成績

破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) は本邦では 10 万人に対し 20 ~ 25 人の割合で発症すると推測される。また、そのうち 8% は治療前に、また無治療の場合、39% の患者は発症 1 ヶ月以内に死亡すると推測される¹⁾。SAH 患者の予後を予測する重要な因子として発症時の意識障害があり、国際脳神経外科学会連合 (World Federation of Neurosurgical Societies: WFNS) は意識レベルに基づいた重症度分類を提唱し、多くの施設で治療適応の指針となっている²⁾(表 1)。この重症度分類において、特に Grade IV および V は重症とされ、治療に関わらず 20 ~ 30% の患者が死亡し、生存した患者も約半数が不良な転帰を辿る^{3,4)}。重症 SAH の適切な治療戦略は確立されておらず、外科的手技の進歩にも関わらず、治療成績は改善していないのが現状である⁵⁻⁹⁾。

1-2. 脳血管攣縮

SAH の生命および機能予後に関連する重要な合併症として再出血、脳血管攣縮、水頭症が広く知られており、そのうち再出血の予防や水頭症への対処は外科的治療の進歩により改善している。一方で、脳血管攣縮に関しては治療の進歩に伴い、以前と比較し発生頻度は減少傾向にあるものの、治療成績は大きくは改善していない¹⁰⁻¹²⁾。

脳血管攣縮は、出血後 24 時間以内に出現する早期攣縮と、第 4 ~ 14 病日に発生頻度がピークを迎える遅発性脳血管攣縮に大別され、特に後者が患者の生命、機能予後にとって重要となる。脳血管撮影の所見として血管の狭窄が認められる angiographic vasospasm の発生頻度は約 40 ~ 60% とされ、そのうち神経症状の悪化を来す症候性脳血管攣縮 (symptomatic vasospasm) が 20 ~ 55% の頻度で出現すると報告されている^{13,14)}。symptomatic vasospasm は一度発生すると、病態の改善は困難であり、かつ永続的な後遺症が残存してしまうため、くも膜下出血の術後管理において脳血管攣縮の予防は非常に重要であることが知られている¹³⁾。

脳血管攣縮の主な要因には、血管平滑筋内のカルシウムイオン (Ca) 濃度の上昇、protein kinase C (PKC) を介するミオシン脱リン酸化酵素の阻害、および血管拡張能の阻害などが関わりとされる¹⁵⁾。血管平滑筋の収縮は細胞内 Ca と

calmodulin の結合体が myosin light chain kinase を活性化し、その結果リン酸化した myosin light chain が actin に働きかけることで起こる。SAH では血管平滑筋内の Ca 濃度が上昇することで持続的な収縮が発生する。この細胞内 Ca 濃度の上昇には、内因性の血管収縮物質や血管外に漏出したオキシヘモグロビンの刺激による、Ca イオンチャネルを介した細胞外 Ca の流入が関わる。オキシヘモグロビンはまた、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生し、酸化傷害を介して diacylglycerol を活性化する。この結果 PKC は持続的に活性化し、myosin phosphatase を阻害するため、myosin のリン酸化は継続し、血管のさらなる収縮をもたらす^{18, 19)}。さらにオキシヘモグロビンは、PKC の調節能を有する一酸化窒素 (NO) を阻害し、血管拡張能を阻害する (図 1)。

1-3. 遅発性脳虚血 (DCI) と脳血管攣縮

動脈瘤の処置等、SAH の初期治療後遅発性に、かつ虚血に由来する神経脱落症状が出現することがあり、遅発性脳虚血 (delayed cerebral ischemia: DCI) と呼ばれる^{20, 21)}。長年に渡って、脳血管攣縮による脳血流量の低下こそが DCI の原因と考えられ、脳主幹動脈の血管攣縮抑制に主眼を置いた研究がなされてきた。その結果遅発性脳血管攣縮の頻度は減少したものの、後述するように SAH の予後改善には至っていない^{11, 12, 20, 21)}。また、血管撮影上は攣縮が認められない脳血管の支配領域に、虚血症状や脳梗塞が出現することが知られており、近年は DCI を引き起こす脳血管攣縮以外の病態に注視した研究が進められている。

脳主幹動脈の血管攣縮以外で DCI を引き起こす病態として、後述する early brain injury (EBI) の他、遅発性脳血管攣縮と同時期に出現する微小血管の狭小化による局所の微小循環障害の可能性が示唆されている^{22, 23)}。また、炎症反応の結果、微小血管の血管透過性亢進や血栓が形成されることも報告されている²⁴⁾。その他、SAH 発症第 10 病日頃まで観察されることの多い、大脳皮質の神経細胞が過剰興奮した後の電氣的抑制状態が同側の大脳皮質を拡散してゆく cortical spreading depression と呼ばれる現象に引き続き、局所の脳血流が低下する cortical spreading ischemia と呼ばれる特異的な病態が、DCI の発症と同時期に頻回に観察されたことも報告され、近年注目を集めている^{25, 26)}。

1-4. 遅発性脳血管攣縮に対する治療の現状

遅発性脳血管攣縮が SAH の重大な合併症として知られ、DCI の主要原因とされてきたが、現在は、脳血管攣縮の改善が必ずしも患者の機能予後の改善にはつなげる訳ではないことが知られている。endothelin 受容体拮抗薬である clazosentan の静注療法、Ca 受容体拮抗薬である nifedipine の脳槽内灌流、phosphodiesterase 阻害薬である milrinone の髄注投与などが試みられたが、いずれにおいても、脳血管攣縮の抑制はし得たものの予後の改善は認めなかった、と結論づけられている²⁷⁻³⁰⁾。nifedipine と同様の Ca 受容体拮抗薬である nimodipine の経口投与には脳血管攣縮の予防効果はないものの、脳梗塞の発症頻度の減少と予後不良例の減少が認められた。しかし、nimodipine は本邦では現在も未承認である³¹⁾。このように、本邦における脳血管攣縮および DCI に対する標準的な治療はいまだ確立していない^{32,33)}。

1-5. マグネシウムによる脳血管攣縮の抑制と問題点

マグネシウム (Mg) は Ca 受容体の拮抗的作用による血管拡張作用と、NMDA 受容体の活性阻害による興奮性アミノ酸の放出抑制、細胞内 ATP 貯蓄増加作用を介した神経保護作用を有するため、SAH の治療薬として期待された薬剤である^{35,36)}。

SAH 患者の半数以上で低 Mg 血症が発生しており、予後不良の因子になるとの報告以降、SAH に対する Mg 投与の研究が開始された³⁴⁾。しかし、2010 年に実施された Mg の静注療法を用いた大規模試験 IMASH (Intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage) では、患者の機能予後の改善を示せず、むしろ体循環への悪影響の可能性が示唆された³⁷⁾。同じく Mg の静注療法を用いた MASH-2 (Magnesium for aneurysmal subarachnoid hemorrhage) 、および他の臨床試験を含めたメタ解析結果からも、Mg 静注療法には DCI の抑制や予後の改善効果はない、と結論づけられた^{38,39)}。この原因として、Mg は血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を通過し難いため、静脈投与では髄液中の Mg 濃度が有効域に到達せず、Mg の血中濃度が上昇したことによる血圧低下や不整脈等の副作用が出現した可能性が示唆された。

そこで 2016 年に Yamamoto らにより Mg の脳槽内投与を用いた脳血管攣縮の

予防効果に関する臨床試験が行われた⁴⁰⁾。Mg を脳槽内投与することにより、血中 Mg 濃度は大きく上昇することなく、髄液中 Mg は有効濃度まで上昇し、脳血管攣縮は抑制された。しかし患者の転帰は有意に改善せず、Mg による脳血管攣縮の抑制のみでは、DCI の抑制や予後の改善には不十分であると考えられた。

1-6. EBI の概念と酸化ストレス

EBI は SAH 発症後 72 時間以内に出現する病態であり、DCI を引き起こす遅発性脳血管攣縮以外の要因として、近年注目されている。

SAH 発症後、最も早期に起こり得る変化は頭蓋内圧 (intracranial pressure: ICP) の急激な上昇であり、その結果、一過性の全脳虚血や急性脳腫脹が引き起こされる⁴¹⁾。ICP は急激に上昇した後に下降するものの、依然として SAH 発症前より高いまま推移する⁴²⁻⁴⁵⁾。この頭蓋内環境の変化により発生する、様々な脳損傷を総じて EBI と呼ぶ (図 2)。EBI の機序として、脳虚血が原因となって細胞毒性浮腫 (cytotoxic edema) が引き起こされる他、血管内皮細胞のアポトーシスやタイトジャンクションの分解の結果、BBB が破綻し、血管原性浮腫 (vasogenic edema) が引き起こされることが考えられている⁴⁶⁾。この際、ROS や炎症性サイトカインの産生が起こり、相互作用しつつ、最終的には主にアポトーシスの機序を介して神経細胞死がもたらされるのが EBI の主病態とされている⁴⁷⁻⁵⁶⁾。血管内皮細胞のアポトーシス誘導物質として MMP-9、Caspase-3 や、NF κ B が報告されている^{50,56,70)}。ROS はこれらアポトーシス誘導物質の活性化や、酸化ストレスによる神経細胞の傷害に関わっていることが示唆され、EBI における酸化ストレスの重要性が近年注目されている。

1-7. フリーラジカルと ROS、酸化ストレス

フリーラジカルとは分子の最外殻電子が単独の電子 (不対電子) となっている独立した種である。単純なものとして水素原子 (H \cdot) がある他、活性酸素種であるスーパーオキシド (O $_2\cdot^-$) やヒドロキシラジカル (\cdot OH) 、また NO もフリーラジカルとして生体内に存在している。

ROS とは酸素フリーラジカルを含む酸素分子 (O $_2$) 由来の分子種で、生体内

では $O_2^{\cdot-}$ や過酸化水素 (H_2O_2) が、食細胞による殺菌の際に使われる。NO は ROS や酸素と反応して様々な化合物を生成し、ROS に対して NO やその派生物を活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS) と呼ぶ^{57,58)}。

生体内において ROS は、ミトコンドリア内での電子伝達等の代謝系の副産物として生成される。1 つの O_2 は計 4 つの電子を受け取り、水 (H_2O) となるが、その過程で電子を一つ受け取る (還元される) ごとに $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、そして H_2O となる。この中で $\cdot OH$ は反応性が高く、細胞傷害性が非常に強い。また $O_2^{\cdot-}$ は NO と反応して、傷害性の強いペルオキシナイトライト ($ONOO^{\cdot}$) を生成する⁵⁹⁾。生体内にはスーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼといった抗酸化酵素が備わっているが、ROS の酸化力が抗酸化力を上回ると、細胞傷害性や癌化の原因物質となり得る。ROS が酸化作用によって生体を傷害する刺激を酸化ストレスと呼ぶ⁵⁸⁾。

SAH においては、全脳虚血の際にミトコンドリア破綻によって $O_2^{\cdot-}$ が発生する。また髄液中に漏出したヘモグロビンが自動酸化する際に、 $O_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 が生成され、 H_2O_2 は鉄 (Fe) や銅 (Cu) イオンと反応し、 $\cdot OH$ となる^{60,61)}。

ROS は脂質過酸化による細胞膜破壊、細胞内タンパクの変性、核やミトコンドリア内の DNA 損傷などの酸化的傷害を引き起こす。また、caspase-3 の活性化による血管内皮細胞のアポトーシス誘導や、MMP-9 の活性化によるタイトジャンクションの分解を誘導し、BBB の破綻を引き起こす。このため ROS による酸化的傷害は EBI の重大な因子として注目されている^{62,63)} (図 3)。

1-8. 水素の薬理作用と EBI 抑制への期待

水素は強力な抗酸化作用を有しており、2007 年に Ohsawa らはラット脳虚血モデルの虚血再灌流障害を軽減することを報告した⁶⁴⁾。水素の特徴の一つは、傷害性が強い $\cdot OH$ と $ONOO^{\cdot}$ の酸化作用を特異的に除去することである。一方で、 $O_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 、NO といった、傷害性が弱い ROS や RNS に対する作用は弱く、免疫能や血圧、微小循環の観点から有利であるとされる^{64,65)}。

また水素は、細胞膜に対する酸化ストレスの結果生じる、遺伝子変化の発現を制御することが報告されている⁶⁶⁾。水素による遺伝子発現の制御は、主に NFAT

と呼ばれる転写因子の活性低下によってもたらされると報告されているが、この効果はフリーラジカル連鎖反応が亢進している時に発揮されるため、水素は過度な ROS の消去や炎症反応の抑制をしないことが示唆されている。

水素のほかの重要な特徴として、密度が小さいため拡散速度が非常に速い点が挙げられる。生体内では水溶性、脂溶性を問わずに素早く拡散し、あらゆる組織内に容易に、かつ速やかに到達する。脳に対しても例外ではなく、経静脈投与や経口投与、吸入といった投与方法の違いに関わらず、水素分子の脳組織への高い移行性が報告されている⁶⁷⁾。

水素の持つ、強い抗酸化作用と速い組織移行性は、SAH 発症直後から出現する EBI や、脳血管攣縮の抑制に効果的であるとする基礎実験の報告もある⁶⁸⁻⁷³⁾。

1-9. 動物モデルを用いた SAH 研究の課題

動物を用いた SAH の研究において、代表的な SAH モデルの作成方法として **monofilament perforation model** や **blood injection model** がある。**blood injection model** は、脳槽内に自己血を注入することで SAH と類似した環境を動物に引き起こさせる⁷⁴⁻⁷⁸⁾。しかしこのモデルの問題点として、脳損傷や血管攣縮の程度が比較的軽微であることが挙げられ、原因として脳血管を直接損傷していないことが示唆されている。一方の **monofilament perforation model** は重症化しやすく、よりヒトの SAH に近い病態を再現することが知られている⁷⁹⁻⁸⁵⁾。ただし、重症度が高い故に生存率・生存期間が極めて低く、大型や高価な動物には適さないという欠点もある。

また、SAH 動物モデルは作成方法に関わらず、動物ごとの重症度にばらつきが生じやすいことが知られている。そのため、血腫量の評価を統一化し、ばらつきを修正するのが一般的である。特に **monofilament perforation model** を用いた研究では、血腫量を他覚的に評価する **grading system** が Sugawara らによって提唱され、広く用いられている⁸⁶⁾。しかし脳の摘出後に評価を行う点や、断頭前の灌流処置による血腫量の増減の可能性といった欠点も危惧される。このため、EBI 等の重症 SAH における病態を研究するためには、断頭前に予め重症度を分類できる手段の重要性が示唆された。

1-10. 研究の目的

本研究は Mg 脳槽内投与による遅発性脳血管攣縮の抑制効果に、水素投与による EBI の抑制効果を加えることで DCI を抑制し、SAH、特に重症例の予後を改善し得るかについて、動物実験モデルを用いて検討したものである。前述のように、SAH 動物モデルは重症度のばらつきが生じやすい欠点があるが、本研究は治療効果の検討を主眼のひとつとしているため、病態の把握や効果の比較を正確に行う必要があった。

そのため、実験を以下のように2段階に分けて行った。

実験 1: ラットを用いて重症 SAH の研究に適したモデルの作成方法と重症度の評価方法、また EBI の程度についての検討を行った (2 章)。

実験 2: 上記の実験で得られた結果を元に、最適と考える SAH モデルを用いて Mg と水素の治療効果についての検討を行った (3 章)。

2 章 実験 1: 重症 SAH モデルの作成法についての検討

2-1. SAH モデルの作成方法と頭蓋内圧に着目した重症度の選別方法

先述のように、SAH 動物モデルは作成方法に関わらず、重症度の個体差が大きいため、病態の把握や治療効果の検討を正確に行うためには、EBI の病態を十分に再現する重症 SAH モデルの作成方法につき検討する必要がある。

そこで SAH 発症直後の ICP の上昇に着目し、SAH 発症時の ICP と生命・機能予後、および EBI の病態に関する検討を行った。SAH の作成には、より重症化する頻度が高いとされる *monofilament perforation model* を選択し、また生存率や脳の組織所見を検討項目とするため、動物種としてラットを用いることとした。

ラットを用いた *monofilament perforation model* においては、24 ~ 48 時間後に神経細胞死やアポトーシス誘導物質等の EBI に関する所見を認めることが多く、24 時間後に各種の比較や組織学的評価を行うこととした⁶⁸⁻⁷¹⁾。

2-2. 実験 1 方法

2-2-1. 実験動物

実験 1、および実験 2 において、すべての動物実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て同じ動物種を用いて行った (承認番号 14006)。

対象動物は雄性 Sprague - Dawley ラット、8 ~ 11 週齢、280 ~ 350 g (日本エスエルシー、静岡) を合計 105 匹使用した。動物は 20 ~ 25 °C の室温下に 12 時間毎の明暗サイクル下で食餌および水が自由に摂取できる環境下で予備飼育したのちに実験を行った。実験の全行程において、動物の苦痛と不快を最大限取り除くべく細心の注意を払った。

2-2-2. ラット SAH モデルの作成

過去の文献を参考に SAH モデルを以下の如く作成した^{79,86)}。

ブプレノルフィン 0.01 mg/kg 腹腔内投与、および 3% イソフルラン 5 分間吸入による基礎麻酔の後に気管挿管し、全身麻酔管理を SAH 発症 60 分後まで継続した。尾動脈よりカニューレーションし動脈血圧モニタリング、および血液ガス

分析の採取経路とした。血液ガス分析はくも膜下出血発症直前および発症後 30 分の時点で行った。持続麻酔は血圧モニタリングを行いながらイソフルラン吸入濃度を 0.5 ~ 3 % で調整した。術中、および術後自発運動が見られるまでは直腸内プローブで体温をモニタリングしながらヒートランプを用いて 36.5 ~ 37.5°C に管理した。

ICP モニタリングのため、ラットを小動物用脳定位固定装置に腹臥位で固定し、頭頂部を正中切開しハンドドリルにて右頭頂骨に骨窓を開け、硬膜外に ICP センサー (コッドマンマイクロセンサー、ジョンソン・エンド・ジョンソン、東京) を留置した。ICP モニタリングは術後ラットの自発運動が出現するまで 継続した。センサーを留置後ラットの体位を仰臥位に変換し、以下の手順で monofilament perforation model を作成した。

頸部を正中切開し、胸鎖乳突筋前縁を鈍的剥離し頸動脈三角を露出させた。総頸動脈を剥離・露出し、内・外頸動脈も剥離し外頸動脈は遠位部で結紮切離した。内頸動脈遠位部では pterygopalatine artery を結紮切離した。外頸動脈を一部切開して 4-0 ナイロン糸を頭蓋内内頸動脈に向けて刺入し、前大脳動脈・中大脳動脈分岐部を貫通させ SAH を発症させた。その後ナイロン糸を抜去し、外頸動脈断端を焼灼凝固し、総・内頸動脈を再開通させ、閉創した。sham 群に対する偽手術としては、ナイロン糸を頭蓋内内頸動脈まで誘導し、内頸動脈貫通させずに糸を抜去した (図 4)。

SAH 発症時の ICP の最高値に応じて重症度 (ICP grade) を mild 群 (50mmHg 未満、n = 27)、moderate 群 (50 ~ 149mmHg、n = 35)、severe 群 (150mmHg 以上、n = 23)、および sham 群 (正常 ICP、n = 20) に分類し、その後の比較検討を行った (図 5)。ICP が安定した後に再度急上昇した場合は、再出血したと判断し除外した。

2-2-3. 24 時間後死亡率および神経機能評価

SAH 発症 24 時間後 (sham 群はナイロン糸抜去 24 時間後) にラットの生存、死亡を集計し、全ての生存動物に対して神経機能評価を行った。神経機能は Garcia らの報告にある神経機能スコアリングを用いて評価した^{86,87)} (3 ~ 18 点、表 2)。その後、以下の評価を行った。severe 群は 24 時間後の生存数が 6 匹であ

り後述の脳浮腫の評価を行った。

2-2-4. 血腫量に基づく SAH grade の評価

mild 群 10 匹、moderate 群 15 匹を用いて SAH 血腫 grade の評価を行った。grade の評価には、Sugawara らの報告にある grading 法を用いた⁸⁶⁾。

ラットに 5% イソフルランを 5 分間吸入させた後、経心臓的に 4°C 150mL の生理的食塩水で灌流し、さらに 150mL の 4% パラホルムアルデヒドで灌流した後、断頭し脳を摘出した。摘出脳の底面部を実態顕微鏡内蔵カメラ (M320 F12、Leica microsystems GmbH、Wetzlar、ドイツ) で写真撮影した。Willis 動脈輪および脳底動脈の位置で 6 箇所分割し、それぞれの箇所で血腫量の評価し、合計して SAH 血腫 grade とした (0 ~ 18 点、図 6)。その後、脳を 4% パラホルムアルデヒドで一晩固定し、パラフィン包埋処置を行い病理組織学的検討の材料とした。

2-2-5. 組織学的評価

mild 群、moderate 群、および sham 群より 6 匹ずつ、計 18 匹の摘出脳を用いて以下の免疫組織化学的染色を行ない比較検討した。摘出脳の Bregma から 3.8mm 尾側の位置で 8 μ m 厚の冠状切片を作成し、各切片に Nissl 染色、8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) 染色、および transferase-Mediated deoxyuridine triphosphate Nick end-labeling (TUNEL) 染色を行った。

2-2-5-1. Nissl 染色

神経錐体細胞の損傷評価のため Nissl 染色を行った⁸⁸⁾。染色には 0.2% クレシルバイオレットを用いた。各切片の右側 (非動脈貫通側) の頭頂葉皮質、および海馬を一体型蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス、大阪) にて写真撮影した。

頭頂葉皮質においては parietal cortex area 1 (PA1) 領域の外錐体層を 400 倍視野で観察し、362 × 272 μ m 範囲内における非損傷錐体細胞数を計測した。海馬においては、cornu ammonis 1 (CA1) 領域の錐体細胞層に平行に 350 μ m 計測し、

その幅の中で全層における非損傷細胞数を測定した。各々連続する 3 箇所を測定し、平均値をその切片における非損傷細胞数とした。

2-2-5-2. 8-OHdG 染色

酸化ストレスによる DNA 損傷の評価のため 8-OHdG 染色を行った⁸⁹⁾。抗 8-OHdG マウスモノクローナル抗体 (1:100、日本老化制御研究所、袋井、静岡) を用いて切片を 4°C で一晩反応させた。その後ビオチン標識二次抗体で反応させ、VECTASTAIN ABC キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて発色を行った。Nissl 染色と同様に、右頭頂葉皮質 PA1 領域の外錐体層および海馬 CA 1 領域を写真撮影し、頭頂葉皮質においては 400 倍視野で観察した 362 × 272 μm 範囲内の、また海馬においては錐体細胞層に平行に 350 μm 計測した幅の中で全層における 8-OHdG 陽性細胞数を測定し、連続 3 箇所を測定した平均値を算出した。

2-2-5-3. TUNEL 染色

アポトーシスの評価のため TUNEL 染色を行った⁸¹⁾。Apoptosis in situ Detection Kit (和光純薬工業、東京) を用いて免疫組織化学染色を行った。アポトーシス発生細胞の断片化 DNA 遊離 3'-OH 末端をフルオレセイン- dUTP で標識した後、POD 標識抗フルオレセイン抗体を反応させ、POD-DAB 反応により検出した。核染色はマイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬工業、東京) を用いて行った。上記同様に、右頭頂葉皮質 PA1 領域の外錐体層および海馬 CA 1 領域を写真撮影し、頭頂葉皮質においては 400 倍視野で観察した 362 × 272 μm 範囲内の、また海馬においては錐体細胞層に平行に 350 μm 計測した幅の中で全層における TUNEL 陽性細胞数を測定し、連続 3 箇所を測定した平均値を算出した。

2-2-6. 脳浮腫の評価

脳浮腫の程度につき評価するため、wet / dry 法を用いた brain water content を測定した⁹⁰⁾。全群より 6 匹ずつ、計 24 匹を用いて比較検討した。ラットに 5% イソフルランを 5 分間吸入させた後、断頭し脳を摘出した。摘出脳の両側大脳半球 (硬膜を除く) の重量を測定し湿潤重量とした。その後 95°C で、24 時間熱乾燥処理し再度重量を測定し乾燥重量とした。以下の式より水分含有量を算出した。

$$\text{水分含有量 (\%)} = (\text{湿潤重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿潤重量} \times 100$$

2-2-7. 統計学的解析

全ての統計学的解析は統計解析ソフト (IBM SPSS Statics 22.0、日本アイ・ビー・エム、東京) を用いて行った。ICP と SAH 血腫量、神経学的評価の相関関係は Spearman の順位相関係数を用いて解析し、その後回帰分析を行った。各群の死亡率の比較は χ^2 検定を用いて行った。多群間比較はあらかじめ Shapiro-Wilk 検定で各値の正規性について検定し、正規分布に従うデータの群間比較は one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、事後の多重比較は Tukey's honestly significant difference test (HSD) もしくは Games-Howell の方法を用いて行った。正規分布に従わないデータの群間比較は Kruskal-Wallis 検定を用い、事後の多重比較は Steel-Dwass の方法を用いて行った。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意差ありとした。数値は中央値 (四分位範囲の 25%、75%点)、もしくは平均値 \pm 標準偏差で表記した。多群間比較のグラフは箱ひげ図で描画し、中央値を中央線に、四分位範囲の 25%および 75%点を上下辺として表示した。

2-3. 実験 1 結果

2-3-1. SAH 発症前後の血液ガス分析

sham 群および SAH 発症群の前後の血液ガス分析 (pH、PaCO₂、PaO₂、HCO₃⁻、BE、Lactate) は各群間、および SAH 発症前後で有意差を認めず、かつ生理的範囲内であった (表 3)。

2-3-2. SAH 発症前後の ICP の推移

sham 群および SAH 発症前の ICP、平均血圧 (MABP)、脳灌流圧 (CPP) は各群間で有意差を認めなかった。SAH 発症後、ICP は速やかに上昇し 5 分以内に最高値まで到達した後に下降、30 - 60 分かけて安定した (perforation 前よりも高値で持続)。60 分後の ICP は moderate 群および severe 群において、mild 群よりも有意に高かった。血圧は ICP の上昇に伴い上昇し、ICP の下降とともに下降した。ICP の最高値が高いほど、血圧の上昇も高かった (図 7)。一方 sham 群においては ICP、MABP とともにナイロン糸留置前後で大きな変化は認めなかった。

2-3-3. 24 時間後死亡率

死亡率は SAH 発症群全体で 38.8% (33 / 85) であった。ICP grade 別では mild 群 11.1% (3 / 27)、moderate 群 37.1% (13 / 35)、severe 群 73.9% (17 / 23) であった。群間比較では sham - mild 群間以外の全群間で有意差を認めた ($P < 0.001$)。

sham 群では 24 時間後の死亡は認めなかった。また、severe 群の死亡例のほとんどは 1 時間以内の死亡であった (表 4)。

2-3-4. ICP と神経機能予後の相関性

SAH 発症例において、ICP 最高値と神経機能スコアにかなり強い負の相関関係を認めた ($r = -0.859, P < 0.001$)。

ICP grade 別では sham 群 18 (18、18) 点、mild 群 16 (15、17) 点、moderate 群 13 (10、14) 点、severe 群 10 (7、11) 点であった。sham - mild 群間と moderate - severe 群間以外の群間でスコアに有意差を認めた (図 8)。

2-3-5. ICP と SAH 血腫 grade の相関性

SAH 発症例において、ICP 最高値と SAH 血腫 grade にかなり強い相関関係を認めた ($r = 0.859, P < 0.001$) (図 9)。

2-3-6. SAH 後の脳の組織学的変化

2-3-6-1. Nissl 染色

Nissl 染色では sham 群において、明らかな神経細胞損傷はほとんど認めなかった。mild 群にでは錐体細胞の減少や核濃縮を伴う神経細胞の損傷が認められた。moderate 群では損傷錐体細胞はさらに増加していた (図 10)。

頭頂葉皮質における非損傷錐体細胞数は sham 群 152 (145、167) 個、mild 群 105 (93、134) 個、moderate 群 27 (25、27) 個であった。moderate 群は sham 群と比較して非損傷錐体細胞数が有意に減少していた。

海馬における非損傷錐体細胞数は sham 群 102 (100、107) 個、mild 群 81 (77、83) 個、moderate 群 52 (42、56) 個であった。mild 群は sham 群と比較して非損傷錐体細胞数が有意に減少していた。また moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して非損傷錐体細胞数が有意に減少していた。

2-3-6.2. 8-OHdG 染色

8-OHdG 染色では moderate 群において皮質、海馬に多数の陽性細胞を認めた。mild 群では少数の陽性細胞を認め、sham 群ではごく少数の陽性細胞を認めるのみであった (図 11)。

頭頂葉皮質における 8-OHdG 陽性細胞数は、sham 群 15 (12、18) 個、mild 群 25 (20、28) 個、moderate 群 111 (95、125) 個であった。moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に増加していた。

海馬における 8-OHdG 陽性細胞数は、sham 群 12 (10、15) 個、mild 群 15 (13、18) 個、moderate 群 82 (76、85) 個であった。moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に増加していた。

2-3-6-3. TUNEL 染色

TUNEL 染色では moderate 群において皮質、海馬に多数の陽性細胞を認めた。mild 群では少数の陽性細胞を認め、sham 群では陽性細胞はほとんど認められなかった (図 12)。

頭頂葉皮質における TUNEL 陽性細胞数は、sham 群 2 (1、2) 個、mild 群 3 (2、4) 個、moderate 群 62 (45、65) 個であった。moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。

海馬における TUNEL 陽性細胞数は、sham 群 1 (1、1) 個、mild 群 3 (2、3) 個、moderate 群 29 (26、32) 個であった。moderate 群は sham 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。

2-3-7. 脳浮腫の比較検討

brain water content は sham 群 78.94 (78.32、79.22) %、mild 群 79.27 (79.19、79.38) %、moderate 群 80.03 (79.99、80.68) %、severe 群 82.39 (82.30、82.53) % と、ICP grade が上がるほど脳浮腫が強くなる傾向を認めた。severe 群は、sham 群および mild 群と比較して brain water content が有意に増加していた (図 13)。

2-4. 実験 1 の結果から：重症 SAH モデルに適した ICP grade

本実験ではラットを用いて monofilament perforation model を作成し、SAH 発症後の ICP の最高値と急性期の予後について検討した。SAH 発症時の ICP が高いほど、SAH 血腫 grade は増加し、神経機能スコアは低下する傾向があり、有意な相関関係を認めた。ICP の最高値に基づいて 50mmHg、および 150mmHg を cut off 値とした grade で分類すると、24 時間後の生存率や神経機能スコア、脳浮腫の程度に有意な群間差を認めた。また組織学的には頭頂葉皮質 PA1 領域、および海馬 CA1 領域の広範囲に渡って、酸化ストレスおよび神経細胞のアポトーシスを認めた。この所見は moderate 群で顕著であった。

今回の実験結果から SAH 急性期、特に EBI の病態について研究する際には ICP が 50 ~ 149mmHg に達する動物 (ICP grade: moderate 群) を選別するのが適していると考えた。酸化ストレスやアポトーシスといった、early brain injury の病態をあまり再現しない比較的軽症例や、急死の可能性が非常に高い重症例を除外することで、より正確かつ効率的に病態や治療効果についての検証できると考えた。また、ICP の持続モニタリングによって SAH を確実に引き起こすことが可能になり、無用な実験動物数の増加を抑制できることも示唆された。

3 章 実験 2: ラット SAH モデルを用いた治療効果の検討

実験 1 の結果から、ラットを用いて monofilament perforation model を作成し、ICP が 50 ~ 149mmHg に達する動物 (ICP grade: moderate 群) を選別して治療効果の検討を行った。治療の比較検討は Mg 脳槽内投与、水素水経静脈投与、および併用療法を用いて行った。水素水は飽和水素水 (1.6ppm、大気圧において水素が水に溶解する飽和濃度) を作成し経静脈的に投与した。なお、ラットに対する各治療の単独および併用の安全性については事前の実験で確認している⁹³⁾。

3-1. 実験 2 方法

3-1-1. ラット SAH モデルの作成

モデルに用いる実験動物および SAH の作成方法は実験 1; 2-2-1、2-2-2 と同様に行った。ICP をモニタリングし、moderate 群に選別された動物を用いた。ICP が安定した後に再度急上昇した場合は、再出血したと判断し除外した。

実験は合計 160 匹のラットを以下の 5 群に分けて行った。各治療は、ICP を始めとした頭蓋内の環境が安定する SAH 発症 30 分後より開始し、30 分間かけて行った (表 5)。

SAH に対照薬の脳槽内投与と経静脈投与を行う群 (control 群、n= 35)、Mg 脳槽内投与と対照薬経静脈投与を行う群 (Mg 群、n= 35)、対照薬の脳槽内投与と飽和水素水経静脈投与を行う群 (H 群、n= 35)、Mg 脳槽内投与と飽和水素水経静脈投与を併用する群 (H + Mg 群、n= 35)、偽手術を行い対照薬の脳槽内投与と経静脈投与を行う群 (sham 群、n=30)。

SAH 発症 24 時間後にラットの生存、死亡を集計し、生存動物の神経機能評価を行った。また摘出脳を用いて組織学的評価、組織の酸化的傷害の定量的評価、脳浮腫の評価、および BBB 破綻の程度の評価を行った。さらに組織標本を用いて脳血管攣縮の程度についても評価した (図 14)。

3-1-2. Mg 脳槽内投与方法、および飽和水素水の作成と経静脈投与方法

Mg 脳槽内投与には硫酸マグネシウム (マグネゾール 3.1mL; 東亜薬品、富山)、および炭酸水素ナトリウム (メイロン静注 8.4% 3mL; 大塚製薬工場、徳島) を添加した乳酸リンゲル液 (ラクテック; 大塚製薬工場、徳島) を用いてマグネシウム濃度を 5mEq/L、pH は約 7.3 に調整した (前述の Yamamoto らの臨床試験では 10mEq/L の Mg 溶液を用いており、呼吸抑制の副作用が報告されたため、半分の濃度を用いることとした)。ICP センサーを留置する際に大後頭槽にシリコンチューブ (シリコーンマイクロチューブ; アラム、大阪) を留置し、薬剤の投与経路とした (図 15)。薬剤はマイクロシリンジポンプ (EP-60、Eicom、京都) を用いて 45 μ L を 30 分間かけて投与した⁹³⁾。

飽和水素水は非破壊的水素含有器 (Miz 株式会社、神奈川) を用いて作成した。乳酸リンゲル液 (ラクテック; 大塚製薬工場、徳島) を電解槽に漬けこみ、バッグ内を水素飽和状態とした。バッグ内の水素濃度が 1.6ppm 以上であることを溶存水素濃度判定試薬 (メチレンブルー; Miz 株式会社) を用いて確認し、投与を開始した^{93,94)}。薬剤はシリンジポンプ (CFV-3200、日本光電、東京) を用いて大腿静脈より、2mL を 30 分間かけて投与した。

3-1-3. 死亡率および神経機能評価

SAH 発症 24 時間後 (sham 群はナイロン糸抜去 24 時間後) にラットの生存、死亡を集計し、全ての生存動物に対して神経機能評価を行った。評価は実験 1; 2-2-3 と同様に Garcia らの報告にある神経機能スコアリングを用いて評価した^{86,87)} (3~18 点、表 2)。その後、以下の評価を行った。

3-1-4. 血腫量に基づく SAH grade の評価

control 群 9 匹、Mg 群 14 匹、H 群 16 匹、Mg+H 群 18 匹を用いて、SAH 血腫 grade を評価した。脳の摘出は実験 1; 2-2-4 と同様に行い、SAH 血腫 grade も同様に Sugawara らの報告にある grading 法を用いて評価した⁸⁶⁾ (0~18 点、図 6)。摘出脳は 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後にパラフィン包埋処置を行い、病理組織学的検討の材料とした。

3-1-5. 組織学的評価と脳血管攣縮の評価

3-1-5-1. 組織学的評価

各 SAH 群および sham 群より 6 匹ずつ、計 30 匹の摘出脳を用いて免疫組織化学染色を行ない比較検討した。摘出脳の Bregma から 3.8mm 尾側の位置で 8 μ m 厚の冠状切片を作成し、8-OHdG 染色、および TUNEL 染色を行い、それぞれ酸化ストレスによる DNA 損傷、およびアポトーシスの程度を評価した。

染色は実験 1;2-2-5 と同様に行い、各切片の右頭頂葉皮質、および海馬を写真撮影した。頭頂葉皮質においては PA1 領域の外錐体層を 400 倍視野で観察した 362 × 272 μ m 範囲内の、海馬においては CA1 領域の錐体細胞層に平行に 350 μ m 計測し、その幅の中で全層における陽性細胞数を測定した。各々連続する 3 箇所を測定し、平均値をその切片における 8-OHdG および TUNEL 陽性細胞数とした。

3-1-5-2. 脳血管攣縮の評価

右側 (非穿刺側) の近位部前大脳動脈 (anterior cerebral artery: ACA) と中大脳動脈 (middle cerebral artery: MCA)、および脳底動脈 (basilar artery: BA) の断面を用いて脳血管攣縮の程度について過去の文献を参考に評価した。monofilament perforation model において、脳血管攣縮は SAH 発症 24~72 時間後に出現し、その組織学的所見はヒトにおける遅発性脳血管攣縮と類似するとされる^{81,95,96}。

近位部 ACA および MCA の断面は視交叉前端部を走行する位置で 8 μ m 厚の冠状切片を作成し、BA の断面は前下小脳動脈を分岐する位置の 0.2mm 頭側で作成した。一体型蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス株式会社、大阪) にて写真撮影し、付属ソフトを用いて血管の直径および血管壁の厚さを測定した。血管の直径は長径と短径の平均値で算出した。血管壁厚は内膜表面から中膜外側端までの距離を 4 箇所を測定し平均値を算出した (図 16)。

3-1-6. 酸化的傷害の定量的評価

脳組織 DNA 中の 8-OHdG を ELISA 法で定量測定し、酸化的傷害の程度につ

いて定量的に評価した⁹⁷⁾。各 SAH 群および sham 群より 6 匹ずつ、計 30 匹の摘出脳を用いて測定を行った。ラットに 5%イソフルランを 5 分間吸入させた後、経心臓的に 4°C 150mL の生理的食塩水で灌流した後、断頭し脳を摘出した。摘出した脳を前頭極より 7~12mm の冠状面で切断し、その後大脳半球間裂で切断した。視床を除去し右側の脳皮質、海馬、および歯状回を含む領域を測定材料とし、直ちに -80°C で凍結保存した。凍結サンプルに組織溶解液 1.4mL を加え、ビーズクラッシャー (μT-01、タイテック社、埼玉) を用いて 4600rpm × 30 秒破碎しホモジネートを得た。DNA Extractor TIS Kit (和光純薬工業、大阪) を用いてホモジネート 1mL から DNA を抽出した。抽出した DNA を蒸留水 150μL に溶解し、4°C で一晩静置した。精製 DNA に 8-OHdG assay preparation reagent set (和光純薬工業、大阪) を用いて NucleaseP1 による加水分解処理を行った後、限外濾過フィルター (分子量 10kDa、Nanosep 10K、日本ポール、東京) で処理した。処理したサンプルに含まれる 8-OHdG を高感度 8-OHdG Check ELISA (日研ザイル、東京) を用いて測定した。濃度測定結果から DNA 単位重量当たりの 8-OHdG 量 (ng/mg DNA) を算出した。

3-1-7. BBB 破綻の程度の評価

BBB からの Evans Blue (EB) 漏出量を測定し、BBB の破綻について比較検討した^{98,99)}。各 SAH 群および sham 群より 6 匹ずつ、計 30 匹の摘出脳を用いて評価を行った。EB 溶液はリン酸緩衝生理食塩水を用いて 2%に濃度調整した。各群の治療の終了 30 分後に、EB 溶液を 4mL/kg 静脈内投与した。手術 24 時間後、ラットに 5%イソフルランを 5 分間吸入させた後、経心臓的に 4°C 150mL の生理的食塩水で灌流し、断頭して脳を摘出した。摘出した脳を前頭極より 7~12mm の冠状面で切断し、その後大脳半球間裂で切断した。視床を除去し、右側の脳皮質、海馬、および歯状回を含む領域をサンプルとして使用した。サンプルの重量を測定した後、50%トリクロロ酢酸 3mL を加えホモジナイズした。溶液を 12000rpm × 20 分で遠心分離し、上清を採取した。検査サンプルの上清とスタンダード EB 溶液 (20、15、10、7.5、5、2、1、0.5、0.25μg/mL を作成) の吸光度をマイクロプレートリーダー (iMark、BIO RAD、CA、USA) を用いて、620nm で測定した。スタンダード溶液の濃度と吸光度から作成した検量線から、サンプルに含まれる EB 濃度を測定し、脳 1g あたりの EB 漏出量を算出

した ($\mu\text{g/g}$)。

3-1-8. 脳浮腫の評価

脳浮腫の程度を比較するため、wet / dry 法を用いた brain water content で評価を行った⁹⁰⁾。上記の 3-1-6 および 3-1-7 で用いた摘出脳の右側大脳前部 (前頭極から 7mm まで) をサンプルとして使用し、各 SAH 群および sham 群より 12 匹ずつ、計 60 匹について比較検討した。実験 1; 2-2-6 同様にサンプルの湿潤重量と乾燥重量を測定し、以下の式より水分含有量を算出した。

$$\text{水分含有量 (\%)} = (\text{湿潤重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿潤重量} \times 100$$

3-1-9. 統計学的解析

全ての統計学的解析は統計解析ソフト (IBM SPSS Statics 22.0、日本アイ・ビー・エム、東京) を用いて行った。各群の死亡率の比較は χ^2 検定を用いて行った。多群間比較はあらかじめ Shapiro-Wilk 検定で各値の正規性について検定し、正規分布に従うデータの群間比較は ANOVA を用い、事後の多重比較は Tukey's HSD もしくは Games-Howell の方法を用いて行った。正規分布に従わないデータの群間比較は Kruskal-Wallis 検定を用い、事後の多重比較は Steel-Dwass の方法を用いて行った。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意差ありとした。数値は中央値 (四分位範囲の 25%、75%点)、もしくは平均値 \pm 標準偏差で表記した。多群間比較のグラフは箱ひげ図で描画し、中央値を中央線に、四分位範囲の 25%および 75%点を上下辺として表示した。

3-2. 実験 2 結果

3-2-1. SAH 発症前後の血液ガス分析

sham 群および SAH 発症群の前後の血液ガス分析 (pH、PaCO₂、PaO₂、HCO₃⁻、BE) は各群間で有意差を認めず、また生理的範囲内であった (表 6)。

3-2-2. SAH 発症前後の ICP の推移

sham 群および SAH 発症前の ICP、MABP、CPP は各群間で有意差を認めなかった。実験 1; 2-3-2 で得られた結果と同様に SAH 発症後、ICP は速やかに上昇し 5 分以内に最高値まで到達した後に下降、30 ~ 60 分かけて安定した (perforation 前よりも高値で持続)。血圧は ICP の上昇に伴い上昇し、ICP の下降とともに下降した。脳槽内灌流による ICP の上昇は Mg 溶液、対照薬いずれにおいても認められなかった。SAH 発症群の ICP 最高値は各群間で有意差を認めなかった。また sham 群においては ICP、MABP とともにナイロン糸留置前後で大きな変化はなかった (表 7)。

3-2-3. 24 時間後死亡率

死亡率は SAH 発症群全体で 25.0% (35 / 140) であった。治療群別では control 群 40.0% (14 / 35)、Mg 群 25.7% (9 / 35)、H 群 20.0% (7 / 35)、H + Mg 群で 14.3% (5 / 35) であった。

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して死亡率が有意に低下していた。sham 群では動物の死亡は認めなかった (表 7)。

3-2-4. 神経学的評価

神経機能スコアは control 群 11 (9、13) 点、Mg 群 14 (12、14) 点、H 群 14 (13、15) 点、H + Mg 群 15 (14、16) 点、sham 群 16 (15、16) 点であった。

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して有意にスコアが高かった。また H + Mg 群は Mg 群と比較して有意にスコアが高く、有意差はないものの H 群と比較してスコアが高い傾向を認めた ($P = 0.054$)。sham 群は他の群と比較してスコアが有意に高かった (図 17)。

3-2-5. SAH 血腫 grade

SAH 発症群 (control 群、Mg 群、H 群、H + Mg 群) において、SAH 血腫 grade は各群間での有意差を認めなかった (表 7)。また sham 群では SAH は認めなか

った。

3-2-6. 脳の組織学的変化

control 群では実験 1; 2-3-6 と同様に、頭頂葉皮質 PA1 領域の外錐体層と海馬 CA1 領域の広範囲に、8-OHdG、および TUNEL 陽性細胞を多数認めた。

3-2-6-1. 8-OHdG 染色

頭頂葉皮質における 8-OHdG 陽性細胞数は、sham 群 14 (10、19) 個、control 群 133 (121、140) 個、Mg 群 84 (73、94) 個、H 群 36 (33、38) 個、H + Mg 群 29 (27、30) 個であった。Mg 群、H 群、および H + Mg 群は、control 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に減少していた。また、H 群および H + Mg 群は、Mg 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に減少していた。control 群、Mg 群、および H 群は、sham 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に増加していた (図 18)。

海馬における 8-OHdG 陽性細胞数は sham 群 11 (8、15) 個、control 群 67 (62、74) 個、Mg 群 42 (27、56) 個、H 群 18 (16、20) 個、H + Mg 群 16 (15、19) 個であった。H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に減少していた。control 群および Mg 群は、sham 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に増加していた (図 19)。

3-2-6-2. TUNEL 染色

頭頂葉皮質における TUNEL 陽性細胞数は、sham 群 2 (2、3) 個、control 群 96 (81、106) 個、Mg 群 57 (44、64) 個、H 群 25 (23、29) 個、H + Mg 群 30 (26、32) 個であった。Mg 群、H 群、および H + Mg 群は、control 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。また、H 群および H + Mg 群は、Mg 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。sham 群と比較して他の群は TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた (図 20)。

海馬における TUNEL 陽性細胞数は sham 群 1 (1、1) 個、control 群 38 (36、41) 個、Mg 群 34 (31、37) 個、H 群 16 (15、18) 個、

H+Mg 群 16 (14、18) 個であった。H 群および H+Mg 群は、control 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。また H 群および H + Mg 群は、Mg 群と比較しても TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。sham 群と比較して他の群は TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた (図 21)。

3-2-7. ELISA 法を用いた 8-OHdG の定量測定

定量測定における脳組織の DNA 1mg あたりの 8-OHdG 量は、sham 群 0.36 (0.34、0.37) ng、control 群 0.71 (0.56、0.79) ng、Mg 群 0.53 (0.52、0.62) ng、H 群 0.44 (0.43、0.46) ng、H+Mg 群 0.41 (0.39、0.44) ng であった。

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して 8-OHdG が有意に減少していた。control 群および Mg 群は、sham 群と比較し 8-OHdG が有意に増加していた (図 22)。

3-2-8. BBB 破綻の程度の評価

脳 1g あたりの EB 漏出量は、sham 群 0.66 (0.54、0.75) μg 、control 群 3.80 (2.20、4.47) μg 、Mg 群 2.19 (1.94、2.29) μg 、H 群 0.63 (0.52、1.07) μg 、H + Mg 群 0.74 (0.46、1.38) μg であった。

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較し EB 漏出量が有意に低下していた。control 群は sham 群と比較して漏出量が有意に増加していた (図 23)。

3-2-9. 脳浮腫の評価

Wet / dry 法で算出した brain water content は sham 群 78.79 (78.52、79.11) %、control 群 80.00 (79.36、80.47) %、Mg 群 79.14 (78.72、79.37) %、H 群 78.95 (78.80、79.06) %、H + Mg 群 78.95 (78.74、79.23) % であった。

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して脳浮腫が有意に軽減していた。また Mg 群は、有意差はないものの control 群と比較して脳浮腫が軽減する傾向を認めた ($P=0.061$)。control 群は sham 群と比較して脳浮腫が有意に増大して

いた (図 24)。

3-2-10. 脳血管攣縮の程度

BA、ACA、MCA いずれの動脈の断面においても、Mg 群および H + Mg 群は control 群よりも血管径が拡張し、血管壁の肥厚が抑制される傾向を認めた。各動脈の血管径、および血管壁厚は以下の通りであった。

3-2-10-1. BA の脳血管攣縮

BA の血管径は sham 群 352 (340、368) μm 、control 群 167 (150、178) μm 、Mg 群 270 (253、312) μm 、H 群 186 (169、200) μm 、H + Mg 群 312 (300、331) μm であった。Mg 群および H + Mg 群は、control 群と比較して血管径が有意に拡張していた。また Mg 群および H + Mg 群は、H 群と比較しても血管径が有意に拡張していた。control 群、Mg 群、および H 群は、sham 群と比較して血管径が有意に狭窄していた。

血管壁厚は sham 群 15 (13、16) μm 、control 群 32 (26、34) μm 、Mg 群 19 (18、22) μm 、H 群 23 (19、27) μm 、H + Mg 群 19 (17、20) μm であった。Mg 群、H 群、および H + Mg 群は、control 群と比較して血管壁の肥厚が有意に抑制されていた。control 群および H 群は、sham 群と比較しての血管壁が有意に肥厚していた (図 25)。

3-2-10-2. ACA の脳血管攣縮

ACA の血管径は sham 群 263 (250、303) μm 、control 群 182 (168、185) μm 、Mg 群 229 (217、273) μm 、H 群 180 (170、196) μm 、H + Mg 群 260 (225、274) μm であった。Mg 群および H + Mg 群は、control 群と比較して血管径が有意に拡張していた。また Mg 群および H + Mg 群は、H 群と比較しても血管径が有意に拡張していた。control 群および H 群は、sham 群と比較して血管径が有意に狭窄していた。

血管壁厚は sham 群 17 (15、20) μm 、control 群 27 (25、33) μm 、

Mg 群 24 (21、25) μm 、H 群 22 (21、23) μm 、H+Mg 群 20 (17、24) μm であった。control 群は sham 群と比較して血管壁が有意に肥厚していた (図 26)。

3-2-10-3. MCA の脳血管攣縮

MCA の血管径は sham 群 274 (240、305) μm 、control 群 175 (155、197) μm 、Mg 群 250 (223、283) μm 、H 群 191 (188、194) μm 、H+Mg 群 235 (211、259) μm であった。Mg 群および H+Mg 群は、control 群と比較して血管径が有意に拡張していた。control 群および H 群、sham 群と比較しての血管径が有意に狭窄していた。

血管壁厚は sham 群 16 (15、17) μm 、control 群 31 (30、31) μm 、Mg 群 18 (18、19) μm 、H 群 24 (23、29) μm 、H+Mg 群 17 (15、18) μm であった。Mg 群および H+Mg 群は、control 群と比較して血管壁の肥厚が有意に抑制されていた。また Mg 群および H+Mg 群、は H 群と比較しても血管壁の肥厚が有意に抑制されていた。control 群および H 群は、sham 群と比較して血管壁が有意に肥厚していた (図 27)。

3-3. 実験 2 の結果から : Mg 脳槽内投与および飽和水素水経静脈投与の効果

本実験は先の実験 1 における moderate 群を用いて治療の比較検討を行ったが、control 群の 24 時間後死亡率は 40% であり (実験 1 では 37%)、脳の組織所見や脳浮腫の程度を見ても先の実験と矛盾しない結果となっていた。SAH 急性期に引き起こされる EBI に焦点を当てた評価時期や項目になっているが、研究当初の仮説通り予後の改善のためには、脳血管攣縮の抑制のみでは不十分であり、少なくとも EBI を抑制する必要もあることが明らかとなった。また EBI における酸化ストレスの重要性、および水素が強力な抗酸化作用を持つことが確認された。

4 章 考察

4-1. 実験 1 の考察

4-1-1. SAH 動物モデルにおける重症度分類の重要性

本実験ではラットを用いて重症の SAH、かつ EBI の研究に適した動物の選別方法について検討した。今回用いた **monofilament perforation model** は主に SAH 急性期の研究に用いられ、モデルの特徴として以下のことが知られている⁸⁵⁾。

1. 頭蓋内血管を直接損傷するため、より (動脈瘤破裂による) SAH に近い病態を再現する。
2. ICP が速やかに上昇し、急性全脳虚血が引き起こされる。

このためモデルが重症化しやすいことが知られているが、同時に軽症例も存在し、病態の研究や治療効果の比較検討を困難にしている。SAH の血腫量に基づいた **grading scale** を提唱した Sugawara らも、重症度のばらつきについて検討する必要性を訴えている⁸⁶⁾。

実験 1 において、SAH 発症時に ICP が 50mmHg 未満 (ICP grade : mild) の動物が 85 匹中 27 匹 (32%)存在し、この mild 群は死亡率、神経機能スコアにおいて、sham 群と有意差を認めなかった。また mild 群のラットは脳の組織学的所見においても、酸化的傷害、神経細胞のアポトーシスといった EBI の病態の再現性は低かった。SAH 発症群全体では死亡率が約 40%と高く、動物モデルとしてヒトの SAH における重症の病態を反映してはいるが、軽症例の混入率は無視できるものではなく、解析結果を狂わせる一因になり得る。

ICP の測定は簡便に、脳を損傷することなく、SAH 発症早期に重症度を予測できる利点があり、目的とする病態に応じた ICP grade を設定し、動物を選別した上で研究を行うことの重要性が示唆された。一方、SAH 発症時の ICP を人為的に調整することは困難で、穿刺に用いる **monofilament** の太さや先端部の形状を工夫することで、ある程度ばらつきは抑えられるものの、確実性は低く、やはり ICP を測定することの重要性が確認された。

4-1-2. ヒトの SAH との類似性: ICP の急上昇と死亡率

先述のように SAH 発症時の意識状態は予後を予測する重要な因子であり、重度の意識障害を呈する WFNS Grade IVやVでは、患者の 20~30% が死亡すると報告されている^{3,4)}。ヒトの重症 SAH 急性期における意識障害や突然死の原因は、ICP の急上昇、CPP の低下による全脳虚血や脳腫脹にあるとされる^{42-44,47)}。今回の実験においても CPP は moderate 群で 31mmHg、severe 群では 13mmHg と明らかに生理的範囲を逸脱する値まで低下した。また、特に死亡率の高かった severe 群では有意に脳浮腫が亢進していた。ラットはヒトより虚血耐性が強いとされ、単純な比較はできないが、動物モデルにおいても、ICP の急上昇による一過性の全脳虚血や脳腫脹が急性期の死亡原因となることが示唆された。

4-1-3. monofilament perforation model における EBI の再現性

EBI は一過性の全脳虚血と持続する ICP の亢進が引き金となって神経細胞のアポトーシスや BBB の破綻を介し、さらなる ICP 亢進状態の持続と神経細胞死につながる病態とされる⁴⁷⁾。虚血によって破綻したミトコンドリアや、漏出したヘモグロビンから ROS が産生され、ROS による酸化ストレスによって、血管内皮細胞や神経細胞の傷害が引き起こされる⁶⁰⁻⁶³⁾。また、ROS は血管内皮細胞のアポトーシスやタイトジャンクションの分解を誘導し、BBB の破綻をもたらす。

今回の実験では SAH 発症後 24 時間の時点で、大脳皮質および海馬 CA1 領域における正常神経錐体細胞の減少を認めた。この領域では酸化ストレスによる DNA 損傷を伴う神経細胞のアポトーシスが多数認められ、この所見は特に moderate 群で顕著であり、SAH 発症時の ICP が高いほど EBI に伴う脳損傷が強いことが示唆された。

4-2. 実験 2 の考察

4-2-1. Mg 脳槽内投与による治療効果

SAH ラットモデルにおいて、Mg 脳槽内投与は明らかに脳血管攣縮を抑制したものの、Mg 投与単独によっては死亡率や神経機能の有意な改善は認められなかった。この実験結果は、先述の Mg 脳槽内投与を用いた臨床試験の結果と類似する⁴⁰⁾。ただし、実験における評価は SAH 発症 24 時間後に行っており、この時点で組織学的所見として認められる脳血管攣縮がラットの脳に及ぼす影響は不明である。したがって今回の実験結果をもって、Mg 脳槽内投与に DCI の抑制や予後を改善する効果がないとは結論できない。SAH 患者において遅発性に出現し得る symptomatic vasospasm は重大な予後低下因子であり、脳血管攣縮の予防や抑制は不可欠な治療と言える。Mg に限らず血管拡張作用を有する薬剤は、通常の用法 (静脈内投与や経口投与) では全身の血管に作用するため、血圧低下を来すという難点が知られている^{32,33,39)}。全身の循環動態には影響を及ぼさずに、脳血管攣縮のみを効率的に抑制することは治療の理想形であり、Mg 脳槽内投与もこれに当てはまるものである。

実験 2 における Mg 群の摘出後脳組織では、頭頂葉皮質において酸化ストレスを軽減し、アポトーシスを抑制する所見が認められた。また有意差は認めないものの脳浮腫を軽減する傾向も認めた。一過性虚血後の神経細胞では、NMDA 受容体からグルタミン酸が遊離し、Ca チャネルが活性化することによって Ca の細胞内流入が起こり、プロテアーゼ活性化を介してアポトーシスが引き起こされる¹⁰⁰⁾。Mg には NMDA 受容体の活性阻害作用があり、今回の実験では Mg の髄液中濃度が上昇することにより、アポトーシスを抑制した可能性も示唆された。ただし、ヒトの脳においては、白質の割合がラット等のげっ歯類よりも多く、白質には NMDA 受容体を含むグルタミン酸受容体の関与が少ないため、Mg 脳槽内投与が本実験と同じくアポトーシス抑制効果を発揮し得るかは疑問である。

先述の Mg 脳槽内投与を用いた臨床試験では、Mg による循環器系の副作用は認めないものの、鎮静作用による呼吸抑制の出現が報告された (頻度の記載はなし)⁴⁰⁾。今回の動物実験においては、SAH 発症後に麻酔からの覚醒が得られた動物に呼吸抑制は認めなかった。動物モデルの髄液中 Mg 濃度の測定は不可能であったが、臨床試験で使用した溶液の Mg 濃度 (10mEq/L) は、実験で用いた溶

液 (5mEq/L) の倍であることから、中枢神経系の副作用である呼吸抑制は髄液中 Mg 濃度依存性に出現することが示唆され、また髄液中 Mg 濃度の測定によって、より安全に Mg 脳槽内投与を行えることが示唆された。

4-2-2. 水素水の経静脈投与治療効果

ROS による酸化ストレスは EBI の重要な因子であり、神経細胞および血管内皮細胞のアポトーシスや、BBB の破綻を引き起こす⁶⁰⁻⁶³。特に SAH では一過性虚血によるミトコンドリアの破綻にともなう ROS の放出だけでなく、血管外漏出したヘモグロビンの自動酸化過程で O_2^{\cdot} を産生するとともに、生体内の抗酸化酵素の活性低下が加わり、非常に強い酸化的傷害が発生する。一方、水素は細胞傷害性の強い $\cdot OH$ と $ONOO^{\cdot}$ の作用を選択に軽減し、また脂質フリーラジカル連鎖反応に介入することで抗酸化作用を発揮することが報告されてきたが、今回の実験でもその強い抗酸化作用が確認された^{64,66-73}。

組織学的には頭頂葉皮質と海馬の両方において、酸化ストレスの抑制を認めた。酸化ストレスを抑制することで、神経細胞のアポトーシス、BBB の破綻、脳浮腫が抑制されることも確認された。この結果 EBI は抑制され、生存率の改善につながった可能性が示唆された。また、Mg 脳槽内投与との併用を行った群においては、死亡率が最も低く神経機能スコアは最も高かったものの、有意差は得られなかった。

一方、水素投与単独では脳血管攣縮の抑制効果は認められなかった。水素が有する血管内皮アポトーシスの抑制作用や、炎症性サイトカインの制御作用により、脳血管攣縮が抑制されるとも考えられるが、今回の組織所見では有意な脳血管攣縮抑制効果は認められなかった⁷⁰。水素水が脳血管攣縮を改善したとする基礎実験報告もあるが、この報告ではラットを用いた blood injection model に対する水素水の腹腔内投与が行われた⁷²。blood injection model は主に脳血管攣縮のモデルとして広く用いられているが、monofilament perforation model との脳血管攣縮の発生機序の相違点等は不明であり、今回の実験結果との相違の原因については究明できなかった。

4-2-3. 水素の作用の可能性

今回の実験で、飽和水素水の経静脈投与が酸化ストレスを軽減し、EBIを抑制することが確認された。水素の特徴として、 $\cdot\text{OH}$ と ONOO^- による酸化ストレスを特異的に軽減すること、脂質フリーラジカル連鎖反応の亢進時に効果を発揮すること、あらゆる組織内に速やかに到達することが挙げられる。また水素は様々な経路で投与可能であり、経静脈投与や経口投与、吸入といった投与方法の違いに関わらず、脳組織へ速やかに移行することが報告されている^{65,67)}。

水素水の作成方法は様々であり、今回の実験で用いた 1.6ppm 以上の濃度の水素水も作成可能である。水素自体は生体に対して無害であり、濃度の上昇や投与方法の変更による治療効果の向上等、今後さらに期待が持たれる課題もある。

また実験では SAH 発症 30 分後に治療を開始しているが、投与開始までのタイムリミットは未だ不明である。水素の作用は、ROS を消去する化学的な作用だけでなく、酸化傷害を受けている細胞に働きかけることが報告されている⁶⁶⁾。このため、SAH 発症後 72 時間以内と言われる、EBI の出現期や ROS の生成期を過ぎても、水素が良好な効果を発揮する可能性もあり、治療の至適な開始時期や継続期間についての検討も今後の課題となる。

4-2-4. 本研究の課題、および臨床研究について

本研究の仮説であった「脳血管攣縮の抑制のみでは DCI および予後の改善には不十分である」ことは確認された。また、「水素投与による EBI の抑制効果と予後の改善」も確認された。しかし、DCI の原因は脳血管攣縮と EBI 以外には存在しないのか、また脳血管攣縮はどの程度 DCI に関与しているのか、という疑問点が残る。

DCI を引き起こす病態としては、微小循環障害や微小血管内の血栓、cortical spreading ischemia 等の病態が報告されている²²⁻²⁶⁾。いずれの病態も脳虚血をもたらす原因として存在し、相互に作用しつつ DCI に至ると考えられ、ひとつの病態への対処のみでは予後の改善は得られないと予想される。

本研究で脳血管攣縮が SAH の予後に及ぼす影響が明らかにならなかった原因として、動物モデルにおける脳血管攣縮の再現性の問題が挙げられる。組織学的

所見上は遅発性脳血管攣縮と類似する動物実験報告が多数あるものの、出現時期や軽快までの過程の早さ、脳梗塞にまで至るほどの symptomatic vasospasm の少なさ等、ヒトとの相違点も少なくない¹³⁾。

本研究で用いた monofilament perforation model は侵襲が強く生存率や生存期間が短いため、ヒトにおける遅発性脳血管攣縮との比較検討には限界があった。ヒトにおける遅発性脳血管攣縮や DCI を、より正確に再現するモデルの確立と、脳血管攣縮所見を鋭敏に検出し得る方法についての検討も今後の課題となる。

なお我々の施設では、倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 1126)、重症くも膜下出血患者に対するマグネシウム脳槽内投与および飽和水素水の点滴投与によるランダム化比較試験を開始し、治療効果に関する研究を行っている。

5 章 結論

1. ラットくも膜下出血モデルの作成において、
 - ・くも膜下出血発症時の頭蓋内圧は予後を規定する重要な因子であった。
 - ・研究目的に適した重症度の選別するため、また確実にくも膜下出血を発症させるためには、モデル作成時の頭蓋内圧の計測は非常に有用である。

2. ラットくも膜下出血モデルに対するマグネシウム脳槽内投与および飽和水素水経静脈投与は、
 - ・①水素による酸化ストレスの軽減、②マグネシウム脳槽内投与による脳血管攣縮の抑制によって生命、機能予後を改善させた。また、併用による相互作用や有害事象は特に認めなかった。
 - ・これらの併用療法が、重症くも膜下出血の治療成績を向上させる新たな治療手段となる可能性はあるが、さらなる検討も必要である。

謝辞

本研究にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました防衛医科大学校脳神経外科学講座教授 森健太郎先生、同臨床教授 和田孝次郎先生、ならびに同防衛医学研究センター外傷研究部門准教授 戸村哲先生に深謝いたします。また、本研究を遂行するにあたって、多義に渡りご支援ご尽力いただきました防衛医科大学校脳神経外科教室の皆様、ならびに共同利用研究施設の皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Inagawa T, Tokuda Y, Ohbayashi N, Takaya M, Moritake K. Study of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Izumo City, Japan. *Stroke*. 1995;26:761-6.
2. Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale. *J Neurosurg* 1988 ; 68 : 985-986.
3. Shirao S, Yoneda H, Kunitsugu I, Ishihara H, Koizumi H, Suehiro E, Nomura S, Kato S, Fujisawa H, Suzuki M. Preoperative prediction of outcome in 283 poor-grade patients with subarachnoid hemorrhage: a project of the Chugoku-Shikoku Division of the Japan Neurosurgical Society. *Cerebrovasc Dis*. 2010;30:105-13.
4. 後藤修, 田村晃, 二瓶博史, 間中信也, 桐野高明, 佐野圭司. 破裂脳動脈瘤早期手術後の血管攣縮と6ヶ月転帰 -Glasgow Coma Scale による術前重症度との関連-. *No Shinkei Geka*. 1993;21:221-6.
5. Bailes JE, Spetzler RF, Hadley MN, Baldwin HZ. Management morbidity and mortality of poor-grade aneurysm patients. *J Neurosurg*. 1990;72:559-66.
6. Le Roux PD, Elliott JP, Newell DW, Grady MS, Winn HR. Predicting outcome in poor-grade patients with subarachnoid hemorrhage: a retrospective review of 159 aggressively managed cases. *J Neurosurg*. 1996;85:39-49.
7. Takagi K, Tamura A, Nakagomi T, Nakayama H, Gotoh O, Kawai K, Taneda M, Yasui N, Hadeishi H, Sano K. How should a subarachnoid hemorrhage grading scale be determined? A combinatorial approach based solely on the Glasgow Coma Scale. *J Neurosurg*. 1999;90:680-7
8. Inagawa T. Trends in surgical and management outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Izumo city, Japan, between 1980-1989 and 1990-1998. *Cerebrovasc Dis*. 2005;19:39-48.
9. Phillips LH 2nd, Whisnant JP, O'Fallon WM, Sundt TM Jr. The unchanging pattern of subarachnoid hemorrhage in a community. *Neurology*. 1980;30:1034-40.
10. Bulsara KR, Günel M, Amin-Hanjani S, Chen PR, Connolly ES, Friedlander RM. Results of a national cerebrovascular neurosurgery survey on the management of cerebral vasospasm/delayed cerebral ischemia. *J Neurointerv Surg*. 2015;7:408-11.

11. Etminan N, Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL. Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:1443-51
12. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H, et al. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurosurg.* 1992;76:571-7.
13. Wilkins RH. Attempted prevention or treatment of intracranial arterial spasm: A survey. *Neurosurg.* 1980;6:198-210.
14. Weir B, Grace M, Hansen J, Rothberg C. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg.* 1978;48:173-8.
15. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 1996;76:967-1003.
16. Nishizawa S, Peterson JW, Shimoyama I, Uemura K. Relation between protein kinase C and calmodulin systems in cerebrovascular contraction: investigation of the pathogenesis of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1992;31:711-6.
17. Nishizawa S, Nezu N, Uemura K. Direct evidence for a key role of protein kinase C in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1992;76:635-9.
18. Matsui T, Asano T. Protein kinase C and vasospasm. *J Neurosurg.* 1996;85:1197-8.
19. Sakaki T, Tanigake T, Kyoji K, Utumi S, Murata Y, Hiasa Y, Kikuchi H. Pathological study of late arterial spasm. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1979;19:1085-93.
20. Rowland MJ, Hadjipavlou G, Kelly M, Westbrook J, Pattinson KT. Delayed cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: looking beyond vasospasm. *Br J Anaesth.* 2012;109:315-29.
21. Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdicks EF, Muizelaar JP, Mendelow AD, Juvela S, Yonas H, Terbrugge KG, Macdonald RL, Diringner MN,

- Broderick JP, Dreier JP, Roos YB. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke*. 2010 ;41:2391-5.
22. Dhar R, Diringner MN. Relationship between angiographic vasospasm, cerebral blood flow, and cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2015;120:161-5.
 23. Ohkuma H, Itoh K, Shibata S, Suzuki S. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery*. 1997;41:230-5
 24. Ishikawa M, Kajimura M, Morikawa T, Tsukada K, Tsuji T, Kusaka G, Tanaka Y, Suematsu M. Leukocyte plugging and cortical capillary flow after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016;158:1057-67
 25. Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhupl KM, Victorov I, Dirnagl U. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg*. 2000;93:658-66.
 26. Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, Fiss I, Sandow N, Major S, Winkler M, Dahlem YA, Manville J, Diepers M, Muench E, Kasuya H, Schmiedek P, Vajkoczy P; COSBID study group. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:203-12.
 27. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, Frey A, Roux S, Pasqualin A. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke*. 2008;39:3015-21.
 28. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy

- P, Wanke I, Bach D, Frey A, Marr A, Roux S, Kassell N. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol.* 2011;10:618-25.
29. Lu N, Jackson D, Luke S, Festic E, Hanel RA, Freeman WD. Intraventricular nicardipine for aneurysmal subarachnoid hemorrhage related vasospasm: assessment of 90 days outcome. *Neurocrit Care.* 2012;16:368-75.
 30. Koyanagi M, Fukuda H, Lo B, Uezato M, Kurosaki Y, Sadamasa N, Handa A, Chin M, Yamagata S. Effect of intrathecal milrinone injection via lumbar catheter on delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2017 Mar 3:1-6.
 31. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, Shaw MD, Teasdale GM, Foy PM, Humphrey PR, Lang DA, Nelson R, Richards P, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ.* 1989;298:636-42.
 32. Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007. p. CD000277.
 33. Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Neurology.* 1998;50:876-83.
 34. van den Bergh WM, Algra A, van der Sprenkel JW, Tulleken CA, Rinkel GJ. Hypomagnesemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2003 ;52:276-81.
 35. van den Bergh WM, Dijkhuizen RM, Rinkel GJ. Potentials of magnesium treatment in subarachnoid haemorrhage. *Magnes Res.* 2004;17:301-13.
 36. Mori K, Yamamoto T, Nakao Y, Miyazaki M, Iwata J, Tamura M, Shiroishi T. Novel neuroprotective effect of cisternal and intra-cerebral magnesium sulfate solution infusion on delayed cerebral death in rat hippocampal neurons after transient global

ischemia. *Brain Res.* 2012;1480:72-80.

37. Wong GK, Poon WS, Chan MT, Boet R, Gin T, Ng SC, Zee BC; IMASH Investigators. Intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage (IMASH): a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter phase III trial. *Stroke.* 2010;41:921-6.
38. Dorhout Mees SM1, Algra A, Vandertop WP, van Kooten F, Kuijsten HA, Boiten J, van Oostenbrugge RJ, Al-Shahi Salman R, Lavados PM, Rinkel GJ, van den Bergh WM; MASH-2 Study Group. Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2012;380:44-49.
39. Wong GK, Boet R, Poon WS, Chan MT, Gin T, Ng SC, Zee BC. Intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an updated systemic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2011;15:R52.
40. Yamamoto T, Mori K, Esaki T, Nakao Y, Tokugawa J, Watanabe M. Preventive effect of continuous cisternal irrigation with magnesium sulfate solution on angiographic cerebral vasospasms associated with aneurysmal subarachnoid hemorrhages: a randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 2016;124:18-26.
41. Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 2006;28:399-414.
42. Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1988;22:654-61.
43. Nornes H. The role of intracranial pressure in the arrest of hemorrhage in patients with ruptured intracranial aneurysm. *J Neurosurg.* 1973;39:226-34.
44. Nornes H. Cerebral arterial flow dynamics during aneurysm haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).* 1978;41:39-48.
45. Mokri B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology.* 2001;56:1746-8.
46. Keep RF, Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Shakui P, Ennis SR. Ischemia-induced endothelial cell dysfunction. *Acta Neurochir Suppl.* 2005;95:399-402.

47. Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1341-53.
48. Horstmann S, Su Y, Koziol J, Meyding-Lamadé U, Nagel S, Wagner S. MMP-2 and MMP-9 levels in peripheral blood after subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci.* 2006;251:82-6.
49. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem.* 2003;252:305-29.
50. Satoh M, Date I, Ohmoto T, Perkins E, Parent AD. The expression and activation of matrix metalloproteinase-1 after subarachnoid haemorrhage in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 2005;147:187-92
51. Kubota T, Handa Y, Tsuchida A, Kaneko M, Kobayashi H, Kubota T. The kinetics of lymphocyte subsets and macrophages in subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1993;24:1993-2000.
52. Oruckaptan HH, Caner HH, Kilinc K, Ozgen T. No apparent role for neutrophils and neutrophil-derived myeloperoxidase in experimental subarachnoid haemorrhage and vasospasm: a preliminary study. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142:83-90.
53. Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K, Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg.* 2005 Jun;102:1046-54.
54. Rabinstein AA, Weigand S, Atkinson JL, Wijdicks EF. Patterns of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2005;36:992-7.
55. Kreiter KT, Copeland D, Bernardini GL, Bates JE, Peery S, Claassen J, Du YE, Stern Y, Connolly ES, Mayer SA. Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2002;33:200-8.
56. Yatsushige H, Ostrowski RP, Tsubokawa T, Colohan A, Zhang JH. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res.* 2007;85:1436-48.
57. Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:119-45.

58. 安西和紀. 活性酸素・フリーラジカル酸化ストレス. 紀吉川敏一, 内藤裕二, 豊國信哉. 酸化ストレスの医学. 診断と治療社 第2版 2014. p2 - 9
59. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 2003;278:3170-5.
60. Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma.* 2000;17:871-90.
61. 四釜慶治, 菅原芳明. ミオグロビンやヘモグロビンも錆びる: ヘム鉄の酸化とグロビン部分の役割. *生物と化学.* 1999;37:260-5.
62. Gaetani P, Lombardi D. Brain damage following subarachnoid hemorrhage: the imbalance between anti-oxidant systems and lipid peroxidative processes. *J Neurosurg Sci.* 1992;36:1-10.
63. Marzatico F, Gaetani P, Cafè C, Spanu G, Rodriguez y Baena R. Antioxidant enzymatic activities after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurol Scand.* 1993;87:62-6.
64. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007;13:688-94.
65. 大澤郁朗. 水素分子医学の現状と展望. *基礎老化研究.* 2011;35:1-7
66. Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci Rep.* 2016;doi:10.1038/srep18971
67. Liu C, Kurokawa R, Fujino M, Hirano S, Sato B, Li XK. Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes. *Sci Rep.* 2014;doi:10.1038/srep05485.
68. Li T, Liu H, Xue H, Zhang J, Han X, Yan S, Bo S, Liu S, Yuan L, Deng L, Li G, Wang Z. Neuroprotective Effects of Hydrogen Sulfide Against Early Brain Injury and Secondary Cognitive Deficits Following Subarachnoid Hemorrhage. *Brain Pathol.*

2017;27:51-63.

69. Cui Y, Duan X, Li H, Dang B, Yin J, Wang Y, Gao A, Yu Z, Chen G. Hydrogen Sulfide Ameliorates Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Mol Neurobiol.* 2016;53:3646-3657.
70. Shao A, Wu H, Hong Y, Tu S, Sun X, Wu Q, Zhao Q, Zhang J, Sheng J. Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome. *Mol Neurobiol.* 2016;53:3462-3476.
71. Hong Y, Shao A, Wang J, Chen S, Wu H, McBride DW, Wu Q, Sun X, Zhang J. Neuroprotective effect of hydrogen-rich saline against neurologic damage and apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible role of the Akt/GSK3 β signaling pathway. *PLoS One.* 2014;doi:10.1371/journal.pone.0096212.
72. Hong Y, Guo S, Chen S, Sun C, Zhang J, Sun X. Beneficial effect of hydrogen-rich saline on cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurosci Res.* 2012;90:1670-80.
73. Zhan Y, Chen C, Suzuki H, Hu Q, Zhi X, Zhang JH. Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Crit Care Med.* 2012;40:1291-6
74. Olomon RA, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke.* 1985;16:58-64.
75. Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, Dettmann E, Zimmermann M, Raabe A, Preibisch C, Zanella FE, Seifert V. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. *Neurosurgery.* 2006;58:1190-7.
76. Delgado TJ, Brismar J, Svendgaard NA. Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke.* 1985;16:595-602.

77. Jackowski A, Crockard A, Burnstock G, Russell RR, Kristek F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:835-49.
78. Delgado TJ, Arbab MA, Diemer NH, Svendgaard NA. Subarachnoid hemorrhage in the rat: cerebral blood flow and glucose metabolism during the late phase of cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986;6:590-9.
79. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke.* 1995;26:1086-91.
80. Park IS, Meno JR, Witt CE, Suttle TK, Chowdhary A, Nguyen TS, Ngai AC, Britz GW. Subarachnoid hemorrhage model in the rat: modification of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods.* 2008;172:195-200.
81. Lee JY, Sagher O, Keep R, Hua Y, Xi G. Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2009;65:331-43
82. Sehba FA. Rat endovascular perforation model. *Transl Stroke Res.* 2014;5:660-8
83. Sehba FA, Pluta RM. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage models: do they need a fix? *Stroke Res Treat.* 2013;2013:-13
84. Prunell GF, Mathiesen T, Svendgaard NA: Experimental subarachnoid hemorrhage: cerebral blood flow and brain metabolism during the acute phase in three different models in the rat. *Neurosurgery.* 2004;54:426-36.
85. Cahill J, Zhang JH. Monofilament perforation subarachnoid hemorrhage rat model: Animal models of Acute neurological Injuries. Humana Press; 2009.
86. Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, Zhang JH. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model. *J Neurosci Methods.* 2008;167:327-34.
87. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995;26:627-34.

88. Nagatani K, Wada K, Takeuchi S, Kobayashi H, Uozumi Y, Otani N, Fujita M, Tachibana S, Nawashiro H. Effect of hydrogen gas on the survival rate of mice following global cerebral ischemia. *Shock*. 2012;37:645-52.
89. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Shang X, Chen G, Macdonald RL. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci*. 2009;doi:10.1186/1471-2202-10-103.
90. Tomura S, Nawashiro H, Otani N, Uozumi Y, Toyooka T, Ohsumi A, Shima K. Effect of decompressive craniectomy on aquaporin-4 expression after lateral fluid percussion injury in rats. *J Neurotrauma*. 2011;28:237-43.
91. Ayer R, Zhang J. Connecting the early brain injury of aneurysmal subarachnoid hemorrhage to clinical practice. *Turk Neurosurg*. 2010;20:159-66.
92. Schmidt JM, Rincon F, Fernandez A, Resor C, Kowalski RG, Claassen J, Connolly ES, Fitzsimmons BF, Mayer SA. Cerebral infarction associated with acute subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2007;7:10-7.
93. 戸村哲, 藤井和也, 上野英明, 富山新太, 大谷直樹, 長田秀夫, 和田孝次郎, 森健太郎. マグネシウム溶液脳槽内投与および水素水静脈内投与の併用療法がラットの生理的パラメーターに及ぼす影響について. *防医大誌*. 2014;39:96-102.
94. Ryosuke Kurokawa, Tomoki Seo, Bunpei Sato. Shin-ichi Hirano, Fumitake Sato. A convenient method for determining the concentration of hydrogen in water: use of methylene blue with colloidal platinum. *Med Gas Res*. 2012;doi:10.1186/2045-9912-2-1.
95. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Macdonald RL. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Neuroscience*. 2010;169:1805-14.
96. Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A, Zhang JH. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2551-9.
97. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991;10:211-6.
98. Nakamura T, Saito R, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T. Local

convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model. *Cancer Lett.* 2011;310:77-83.

99. Chan PH, Yang GY, Chen SF, Carlson E, Epstein CJ. Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Ann Neurol.* 1991;29:482-6.
100. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002 ;5:405-14

Grade	GCS score	主要な局所神経症状 (失語あるいは片麻痺)
I	15	なし
II	14-13	なし
III	14-13	あり
IV	12-7	不問
V	6-3	不問

表 1: WFNS 分類 ²⁾

患者の意識レベル (Glasgow coma scale: GCS) および局所神経症状の有無により SAH の重症度を分類している。特に高度の意識障害を伴う GradeIV以上は重症 SAH として知られている ²⁾。

項目	点数			
	0	1	2	3
自発的な運動 (5分間観察)	無動作	少し位置を 時々変える	動きはあるが檻の 2面以内の移動範囲	檻の3面以上に渡 って移動する
四肢の動き	不動	最小の動き	四肢の動きが遅い	病前と同じ動き
尾を保持時の 前足の動き	不動	最小の動き	SAH発症前より動き が遅い	病前と同じ動き
金網の昇降		登れない	弱々しく登る	普通に登れる
胴体刺激時の 反応		無反応	反応が弱い	正常の反応
ヒゲ刺激時の 反応		無反応	反応が弱い	正常の反応

表2 神経機能評価法^{86,87)}

6個の項目につき評価し、点数の合計を神経機能スコアとした(3~18点)。

	pre	SAH 30 分後
sham 群		
pH (units)	7.39 ± 0.04	7.40 ± 0.03
PaCO2 (mmHg)	37.7 ± 4.2	37.4 ± 3.8
PaO2 (mmHg)	132.1 ± 15.9	138.5 ± 14.3
HCO3 (mmol / L)	22.8 ± 2.4	22.8 ± 2.3
Base excess (mmol / L)	- 1.2 ± 1.9	- 1.7 ± 1.8
Lactate (mmol / L)	1.5 ± 0.7	1.5 ± 0.7
mild 群		
pH (units)	7.39 ± 0.04	7.39 ± 0.03
PaCO2 (mmHg)	37.3 ± 4.3	38.1 ± 3.6
PaO2 (mmHg)	131.6 ± 12.9	136.9 ± 11.7
HCO3 (mmol / L)	23.6 ± 2.2	23.3 ± 2.1
Base excess (mmol / L)	- 1.0 ± 1.8	- 0.9 ± 2.3
Lactate (mmol / L)	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5
moderate 群		
pH (units)	7.41 ± 0.04	7.39 ± 0.04
PaCO2 (mmHg)	36.3 ± 3.9	36.3 ± 4.0
PaO2 (mmHg)	138.2 ± 13.9	136.6 ± 16.2
HCO3 (mmol / L)	22.9 ± 2.1	21.9 ± 4.2
Base excess (mmol / L)	- 1.6 ± 1.8	- 1.9 ± 1.8
Lactate (mmol / L)	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.6
severe 群		
pH (units)	7.38 ± 0.05	7.40 ± 0.04
PaCO2 (mmHg)	35.3 ± 4.0	34.6 ± 3.0
PaO2 (mmHg)	127.0 ± 12.7	139.2 ± 12.3
HCO3 (mmol / L)	22.5 ± 3.0	22.4 ± 2.2
Base excess (mmol / L)	- 1.7 ± 1.9	- 1.6 ± 1.3
Lactate (mmol / L)	1.4 ± 0.5	2.5 ± 2.8

表 3: SAH 発症前、および発症 30 分後の血液ガス分析

各群間で有意差を認めなかった。

データは平均値 ± 標準偏差で表示

	mild (n=27)	moderate (n=35)	severe (n=23)	sham (n=20)
ICP 最高値 (mmHg)	35.2 ± 11.3	103.3 ± 26.7	174.4 ± 14.7	9.3 ± 3.0
CPP 最低値 (mmHg)	82.5 ± 17.2	30.2 ± 19.5	11.6 ± 6.7	98.2 ± 8.8
死亡率 (%)	11.1 (3 / 27)	37.1 (13 / 35)	73.9 (17 / 23)	0
神経機能スコア	16.3 ± 1.2	11.6 ± 3.0	9 ± 1.9	17.8 ± 0.4
SAH 血腫 grade	6.5 ± 2.2	11.0 ± 2.5	評価なし	0

表 4. SAH 発症時の ICP 最高値と CPP 最低値、および 24 時間後の死亡率、
神経機能スコア、SAH grade

死亡率は sham - mild 群間以外の全群間で有意差を認めた ($P < 0.001$)。

神経機能スコアについては図 8 に別示

データは平均 ± 標準偏差で表示

	脳槽内投与 (45 μ L / 30min)	経静脈投与 (2mL / 30min)
対照薬 (control) 群	乳酸リンゲル	乳酸リンゲル
Mg脳槽内投与 (Mg) 群	Mg溶液 (5mEq / L)	乳酸リンゲル
飽和水素水経静脈投与 (H) 群	乳酸リンゲル	飽和水素水 (1.6ppm)
併用療法 (H + Mg) 群	Mg溶液 (5mEq / L)	飽和水素水 (1.6ppm)
偽手術 (sham) 群	乳酸リンゲル	乳酸リンゲル

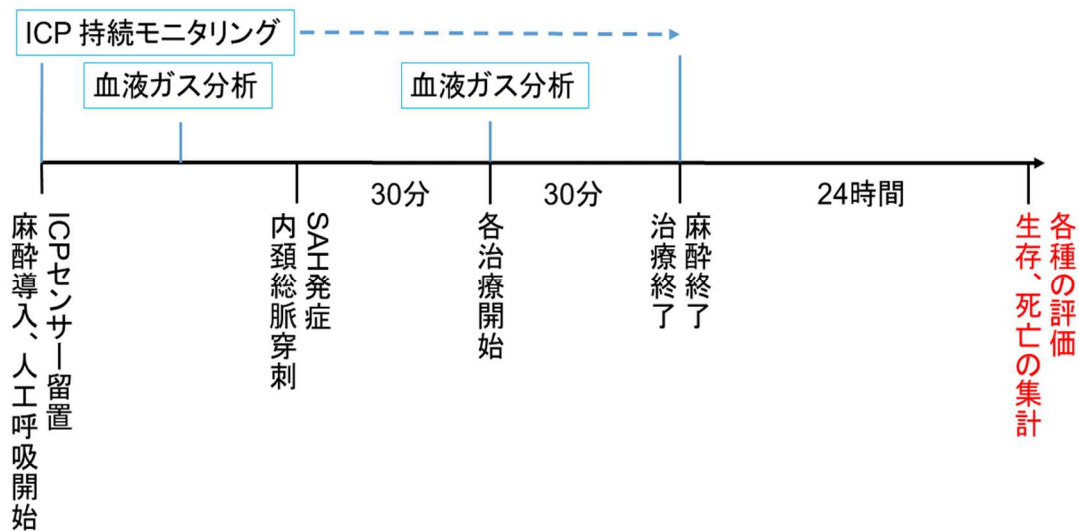


表 5. 各群の投与薬物、実験の時間経過

Mg 溶液、および飽和水素水はともに乳酸リンゲル (ラクテック; 大塚製薬工場、徳島) を用いて作成した。SAH 発症 30 分後から 30 分かけて行った。

治療終了後に麻酔を終了し、動物を覚醒させた。24 時間後の生存、死亡の集計の後、各種評価を行った。

	pH (units)	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)	HCO ₃ (mmol / L)	Base excess (mmol / L)
sham 群					
pre	7.39 ± 0.04	36.1 ± 4.3	133.2 ± 19.1	22.5 ± 2.6	-1.4 ± 1.8
30 分後	7.41 ± 0.03	35.3 ± 3.1	139.3 ± 12.0	22.2 ± 2.4	-1.6 ± 1.5
control 群					
pre	7.39 ± 0.04	37.1 ± 4.2	133.4 ± 13.0	23.4 ± 2.3	-1.1 ± 1.8
30 分後	7.39 ± 0.03	37.5 ± 3.9	134.3 ± 10.5	23.1 ± 2.1	-1.2 ± 2.2
Mg 群					
pre	7.39 ± 0.04	36.7 ± 4.0	132.4 ± 13.5	23.3 ± 2.2	-1.1 ± 1.7
30 分後	7.39 ± 0.05	37.4 ± 3.9	134.0 ± 12.3	23.2 ± 2.1	-1.1 ± 2.1
H 群					
pre	7.39 ± 0.05	37.4 ± 4.1	131.7 ± 16.4	23.3 ± 2.3	-0.9 ± 1.9
30 分後	7.41 ± 0.03	36.4 ± 3.6	137.1 ± 14.7	22.7 ± 2.1	-1.5 ± 1.6
H + Mg 群					
pre	7.40 ± 0.04	36.3 ± 3.8	136.3 ± 13.3	23.1 ± 1.9	-1.3 ± 1.7
30 分後	7.39 ± 0.04	35.9 ± 3.9	138.9 ± 15.7	21.7 ± 4.0	-1.9 ± 1.7

表 6: SAH 発症前、および発症 30 分後の血液ガス分析

各群間で有意差を認めなかった。

データは平均値 ± 標準偏差で表示

	control 群 (n=35)	Mg 群 (n=35)	H 群 (n=35)	H + Mg 群 (n=35)
ICP 最高値 (mmHg)	93.1 ± 25.9	89.5 ± 29.0	95.7 ± 21.9	95.7 ± 23.1
SAH 血腫 grade	9.1 ± 1.4	11.2 ± 2.7	11.4 ± 2.1	11.7 ± 2.6
死亡率 (%)	40.0 (14 / 35)	25.7 (9 / 35)	20 (7 / 35)	14.3 (7 / 35)

表 7: SAH 発症群の ICP 最高値と 24 時間後生存率、SAH grade

ICP 最高値と SAH grade は SAH 発症群の群間で有意差を認めなかった。
水素投与群 (H 群および H+Mg 群) は control 群と比較して死亡率が有意に低下
していた ($P < 0.001$)。sham 群の死亡例はなかった。

データは平均 ± 標準偏差で表示

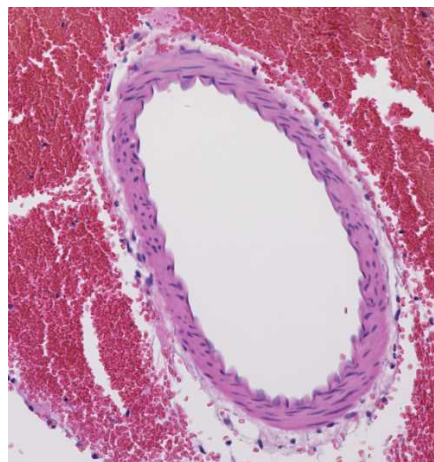
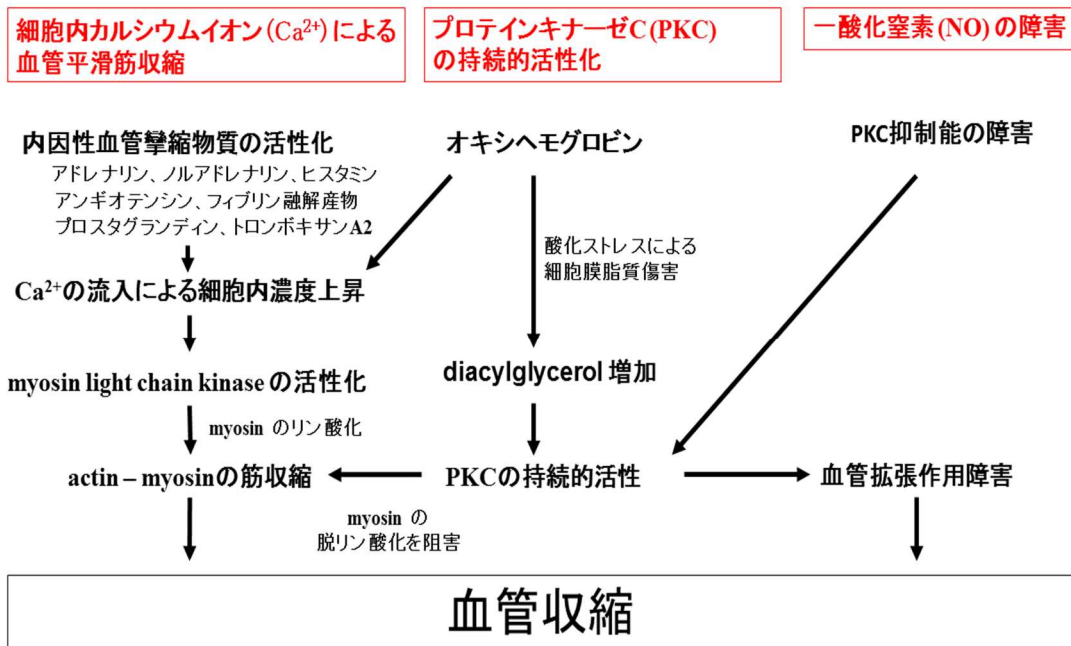


図 1: 脳血管攣縮の機序

早期攣縮は血管平滑筋の収縮であるが、遅発性脳血管攣縮は異常収縮が持続する。特にオキシヘモグロビンによる Ca チャネルの活性や、自動酸化の過程で発生する活性酸素の酸化ストレスによる PKC の持続活性が重要な因子であると考えられている。

組織学的には中膜の肥厚、内弾性版の corrugation (屈曲蛇行)、外膜の浮腫状変化や、リンパ球やヘモジデリンの沈着が見られ、血管内腔は狭小化する。

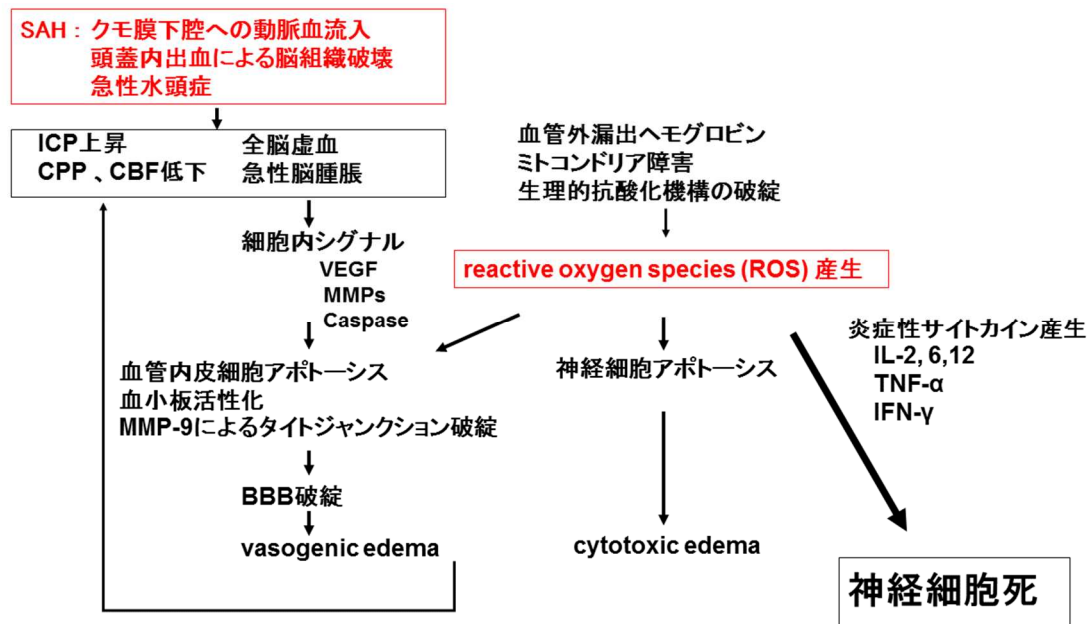


図 2: early brain injury

SAH 発症直後に ICP は上昇、CPP および CBF は低下し一過性全脳虚血、急性脳腫脹が出現する。各種炎症性サイトカインやメディエーターが関与し、神経細胞アポトーシスや BBB 破綻をもたらす。特に ROS による酸化ストレス傷害は重要な因子として注目されている。

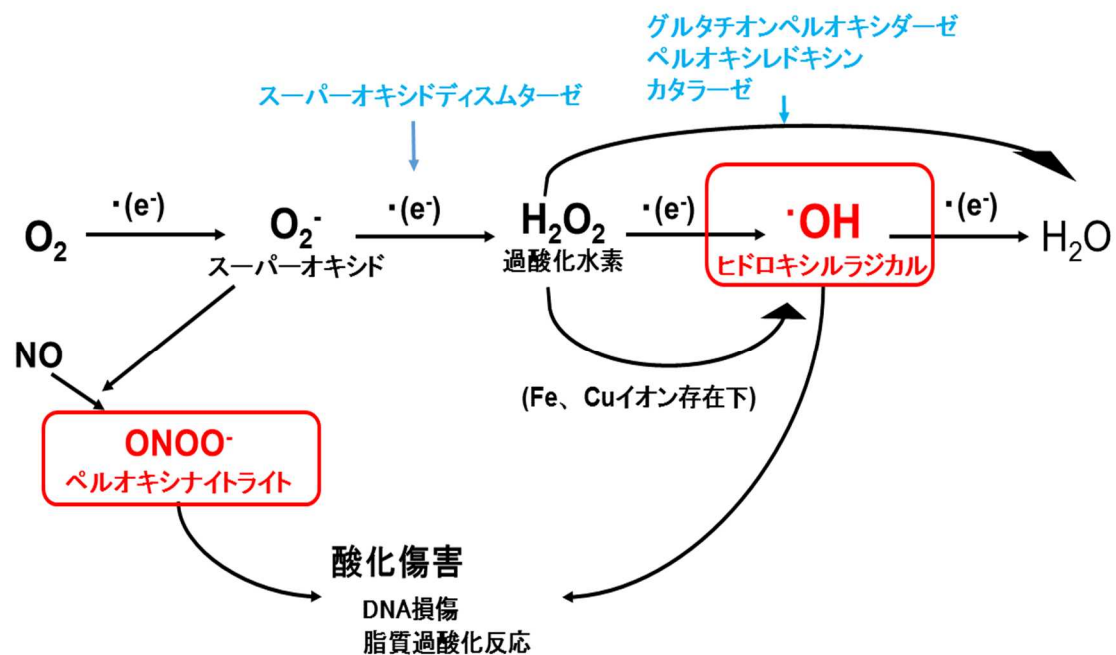


図 3: 活性酸素種および窒素種

酸素は計 4 つの電子を受け取り水分子となる。この過程で発生するヒドロキシルラジカル、および NO とスーパーオキシドが反応し生成されるペルオキシナイトライトは細胞傷害性が高い。

生体内にはスーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ペルオキシレドキシシン、カタラーゼといった抗酸化酵素が備わっているが、SAH においてはこれらの活性が低下する。

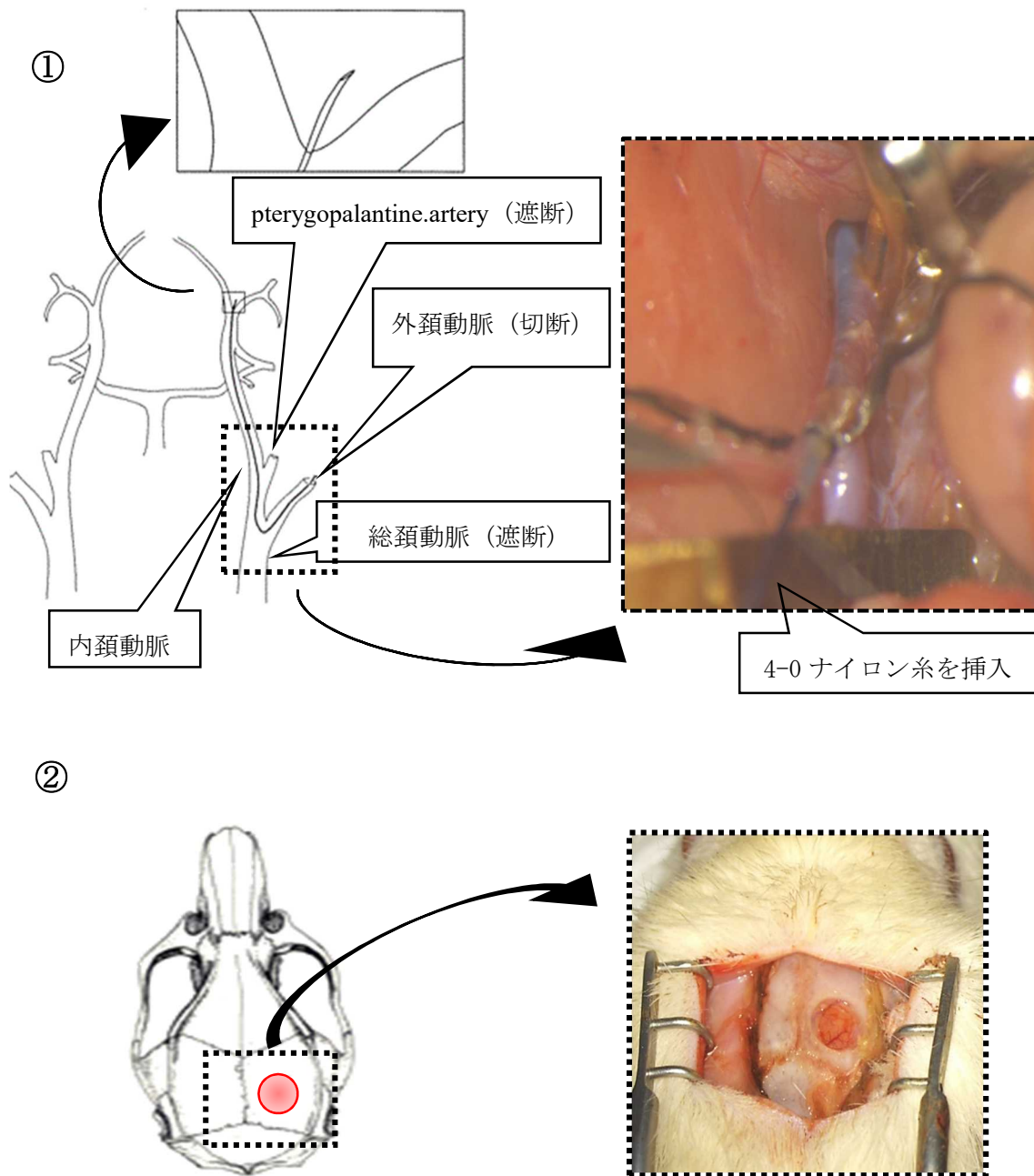


図 4: monofilament perforation model の作成方法 ⁷⁹⁾

- ① 外頸動脈の断端より 4-0 ナイロン糸を挿入し、頭蓋内内頸動脈先端部を穿刺した。SAH 発症後ナイロン糸は抜去し外頸動脈を焼灼した。その後、総頸動脈、内頸動脈、pterygopalantine artery の遮断を解除し、血流を再開させた。
- ② ICP センサーは右頭頂骨に骨窓を開け硬膜外に留置した。

SAH発症時のICP

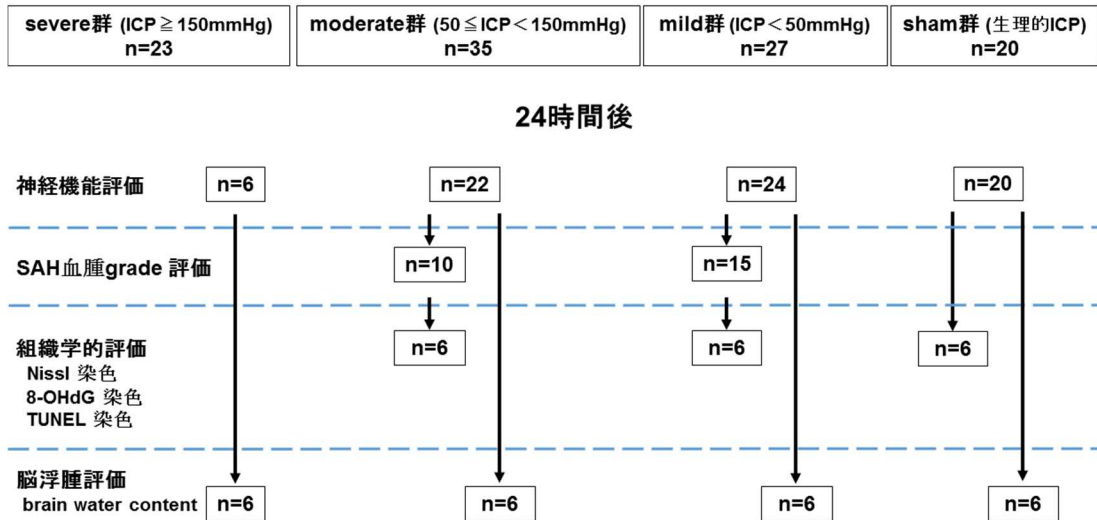
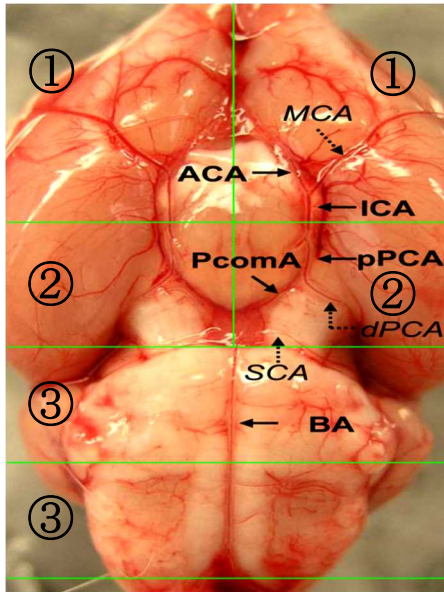


図 5: 実験動物の振り分けと評価項目

SAH 発症時の ICP 最高値によって severe 群、moderate 群、mild 群に分けた。また偽手術を行った sham 群と併せて 4 群で比較検討を行った。

24 時間後に生存している動物全ての神経学的評価を行った。その後、moderate 群 10 匹、mild 群 15 匹を用いて SAH 血腫 grade の評価を行った。このうち 6 匹ずつと sham 群の 6 匹を用いて摘出脳の組織学的評価を行った。また、全群から 6 匹ずつを用いて脳浮腫の評価を行った。



ACA : 前大脳動脈
 MCA : 中大脳動脈
 ICA : 内頸動脈
 pPCA : 近位部後大脳動脈
 dPCA : 遠位部後大脳動脈
 PcomA : 後交通動脈
 SCA : 上小脳動脈
 BA : 脳底動脈

図 6: SAH grade の評価方法 ⁸⁶⁾

1. 脳底面から見た脳槽を 6 箇所領域に分割しそれぞれ評価する。
 - ①左右の ACA、ICA 領域
 - ②左右の pPCA、PcomA 領域
 - ③頭頂側、および尾側の BA 領域

2. 各領域の血腫を 0~3 点で評価し、6 つの領域の点数の合計を SAH 血腫 grade とする (0~18 点)。点数は以下の通り。
 - 0 点: SAH なし
 - 1 点: わずかな SAH
 - 2 点: 動脈の輪郭を同定できる程度の SAH
 - 3 点: 動脈の輪郭が同定できない量の SAH

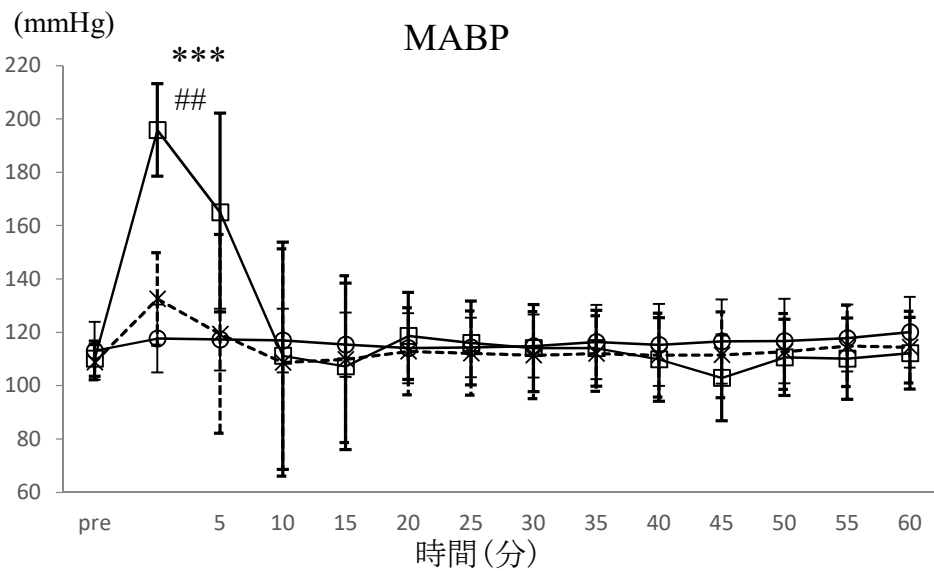
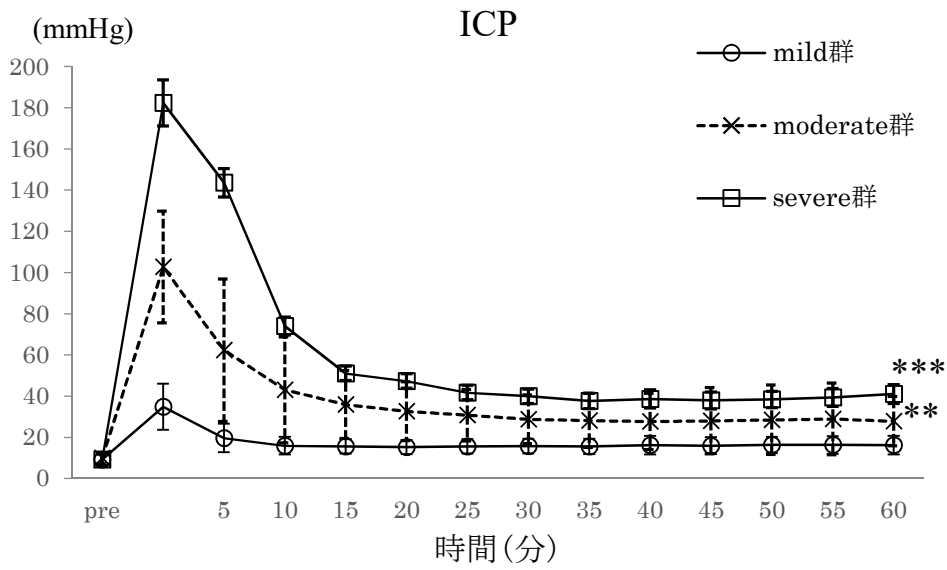


図 7 - 1: SAH 発症群の ICP と平均血圧の推移

SAH 発症後 60 分間の各群の ICP、平均血圧 (mean arterial blood pressure: MABP)

** P < 0.01; *** P < 0.001 vs. mild 群、## P < 0.001 vs. moderate 群

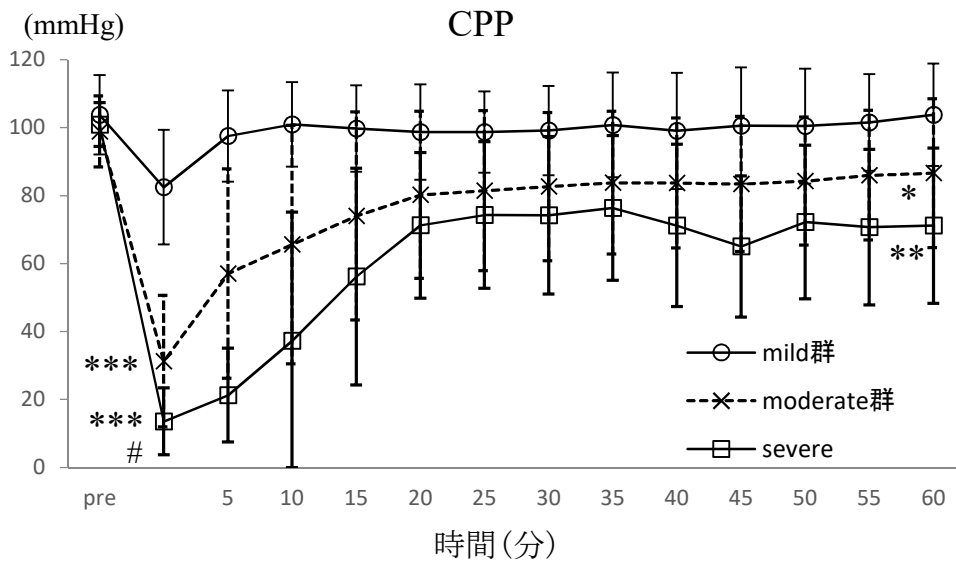


図 7 - 2: SAH 発症群の脳灌流圧の推移

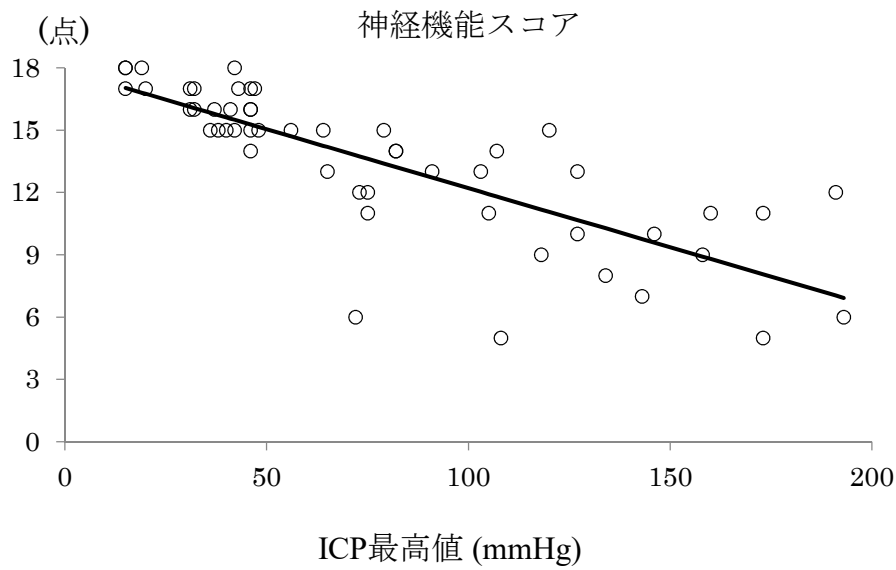
SAH 発症後 60 分間の各群の脳灌流圧 (cerebral perfusion pressure: CPP)

SAH 発症後 ICP は速やかに上昇、5 分以内に最高値まで到達した後に下降、30~60 分かけて安定した。SAH 発症 60 分後の moderate 群および severe 群の ICP は mild 群よりも有意に高かった。MABP は ICP の上昇、下降に伴い同様に上昇、下降した。CPP (MABP - ICP で算出) は ICP がピークを迎えた時に大幅に減少した。

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs. mild 群、# P < 0.01; ## P < 0.001 vs. moderate 群

データは平均 ± 標準偏差で表示

A



B

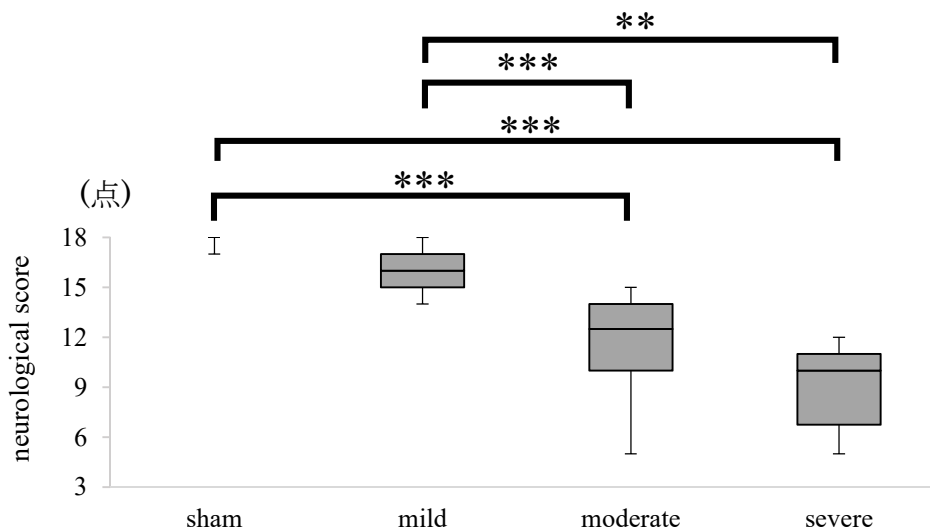


図 8: ICP と神経機能スコア

A: ICP 最高値と神経機能スコアの散布図と回帰直線

SAH 発症時の ICP と 24 時間後の神経機能スコアには強い負の相関関係を認めた ($|r|=0.859, P<0.01$)。グラフは回帰分析の結果を表示しており決定係数は $R^2=0.628$ と高く、 $P<0.001$ で有意であった。(sham 群は除外して集計)

B: 各群の神経機能スコアの比較

sham - mild 群間と moderate - severe 群間以外の群間に有意差を認めた。

** $P<0.01$; *** $P<0.001$

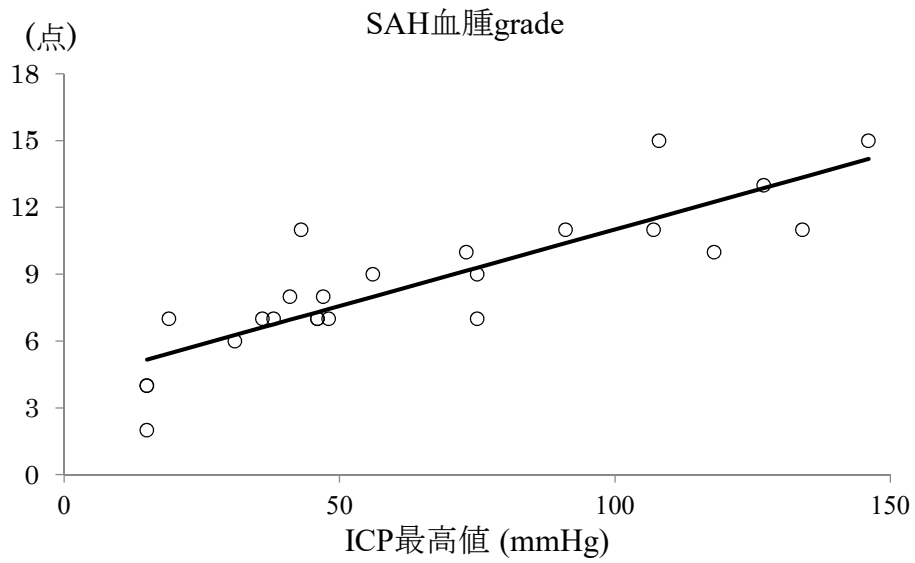
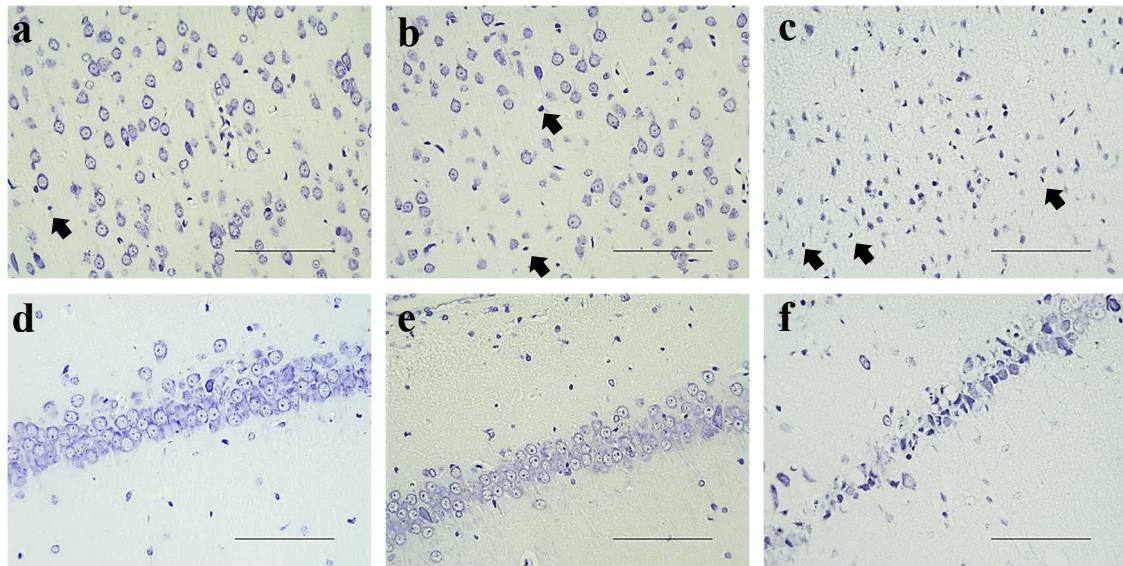


図 9: ICP 最高値と血腫量に基づく SAH の grade

SAH 発症時の ICP と 24 時間後の SAH 血腫 grade には強い正の相関関係を認めた ($|r| = 0.859$, $P < 0.01$)。

グラフは回帰分析の結果を表示しており、決定係数は $R^2 = 0.736$ と高く、 $P < 0.001$ で有意であった。(sham 群は除外して集計)

A



B

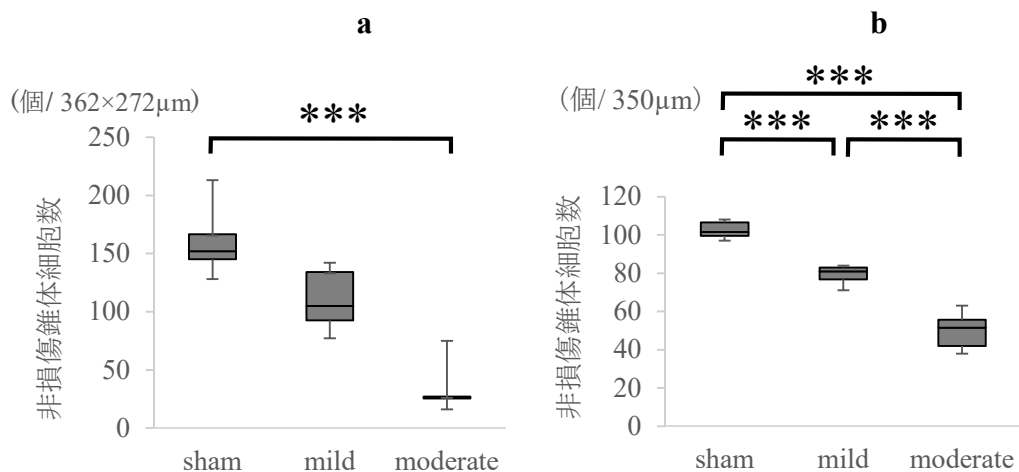


図 10: SAH 後の神経細胞損傷

A: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a~c) と海馬 CA1 領域 (e~f) の Nissl 染色

sham 群では明らかな神経錐体細胞損傷を少数認めた (a と d)。mild 群でも錐体細胞損傷を少数認めた (b と e)。moderate 群では細胞数の減少とともに皮質と海馬の広範囲に核濃縮や形態変化を伴う錐体細胞損傷を多数認めた (c と f)。

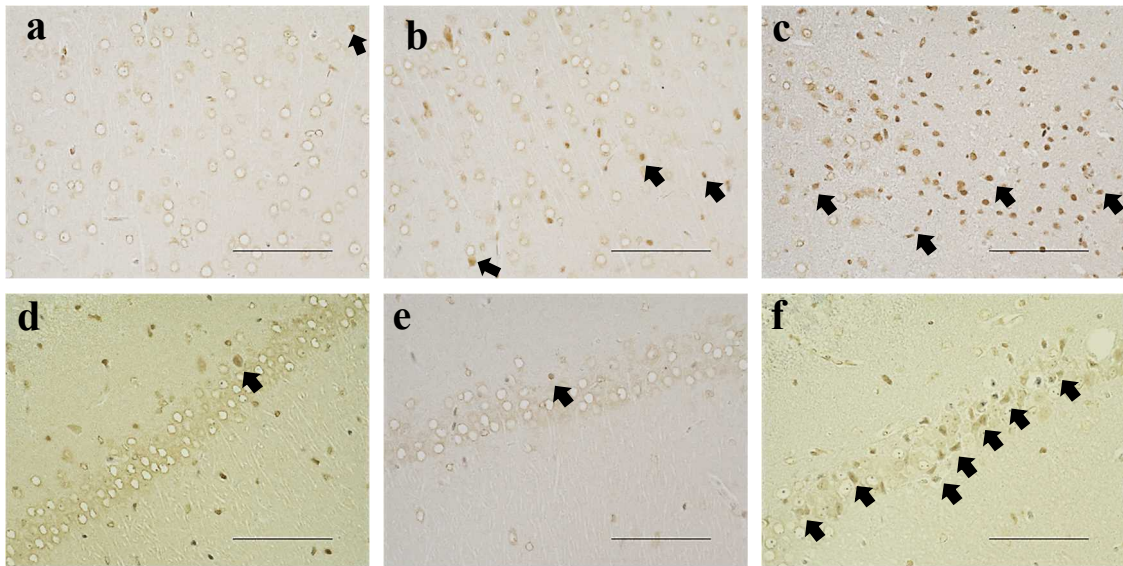
スケールバー = 100 μm

B: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a) と海馬 CA1 領域 (b) の非損傷錐体細胞数の比較

頭頂葉皮質において moderate 群は、sham 群と比較して非損傷錐体細胞数が有意に減少していた。海馬において mild 群および moderate 群は、sham 群と比較して非損傷細胞数が有意に減少していた。また moderate 群は、mild 群と比較しても非損傷細胞は有意に減少していた。

*** P < 0.001

A



B

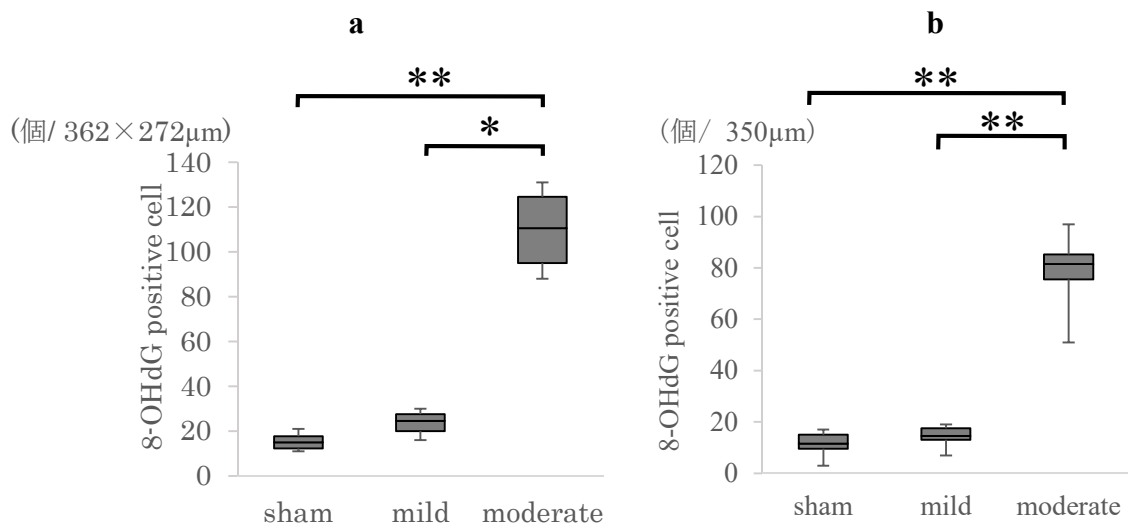


図 11: SAH 後の酸化ストレス

A: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a~c) と海馬 CA1 領域 (e~f) の 8-OHdG 染色

sham 群では脳皮質と海馬にごく少数の 8-OHdG 陽性細胞を認めた (a と d)。mild 群では陽性細胞は、より頻回に認められた (b と e)。moderate 群では皮質と海馬の広範囲に 8-OHdG 陽性細胞を多数認めた (c と f)。

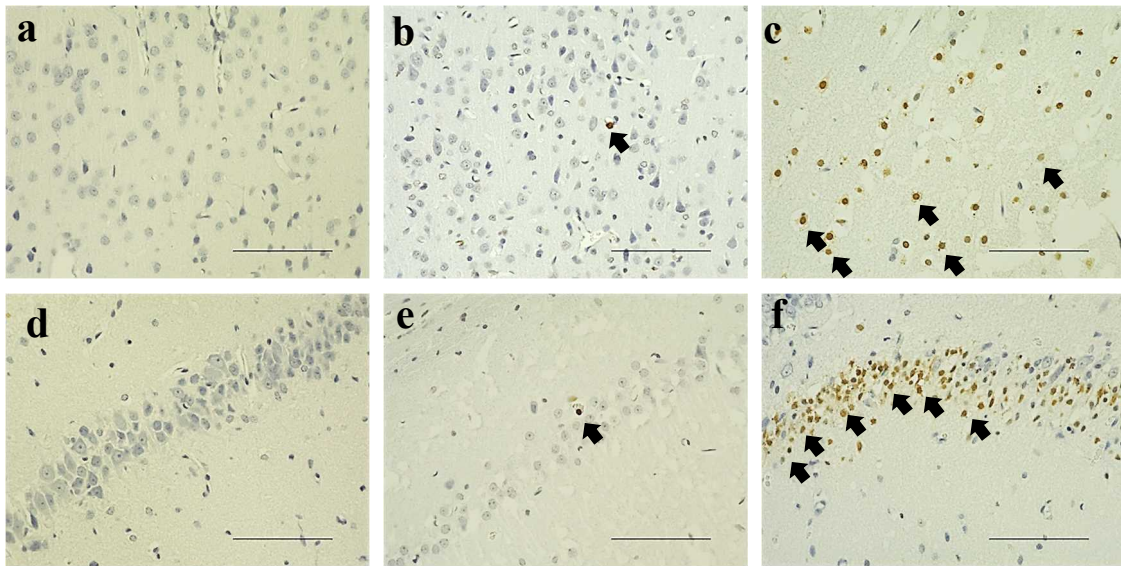
スケールバー = 100 μ m

B: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a) と海馬 CA1 領域 (b) の 8-OHdG 陽性細胞数の定量比較

頭頂葉皮質、海馬両方において moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して 8-OHdH 陽性細胞数が有意に増加していた。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

A



B

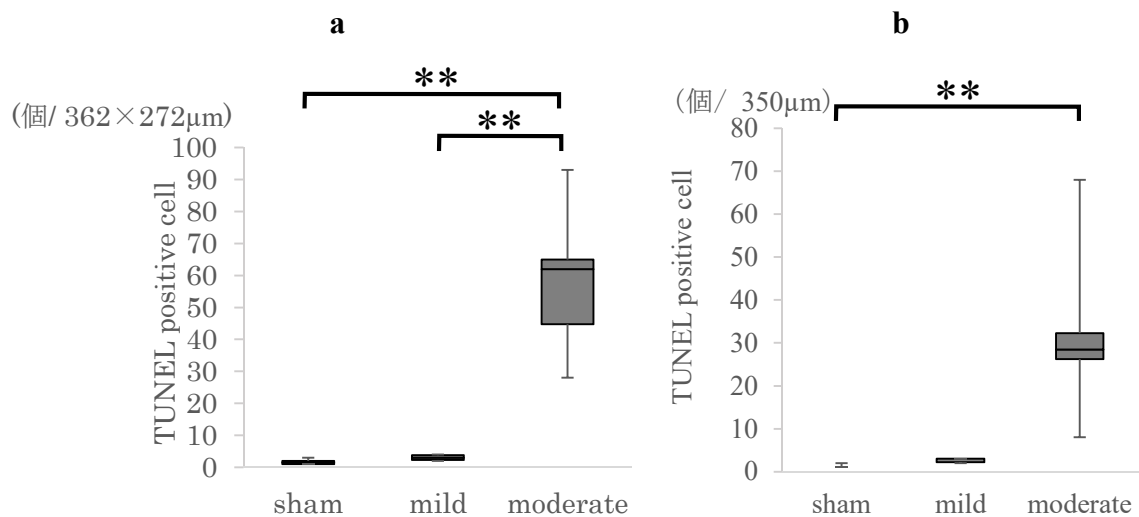


図 12: SAH 後のアポトーシス

A: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a~c) と海馬 CA1 領域 (e~f) の TUNEL 染色

sham 群では明らかなアポトーシスはほとんど認めなかった (a と d)。mild 群ではごく少数の TUNEL 陽性細胞を認めた (b と e)。moderate 群では皮質と海馬の広範囲に神経細胞のアポトーシスを多数認めた (c と f)。

スケールバー = 100 μm

B: 頭頂葉皮質 PA1 領域 (a) と海馬 CA1 領域 (b) の TUNEL 陽性細胞数の定量比較

頭頂葉皮質において moderate 群は、sham 群および mild 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。海馬において moderate 群は、sham 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に増加していた。

**P < 0.01

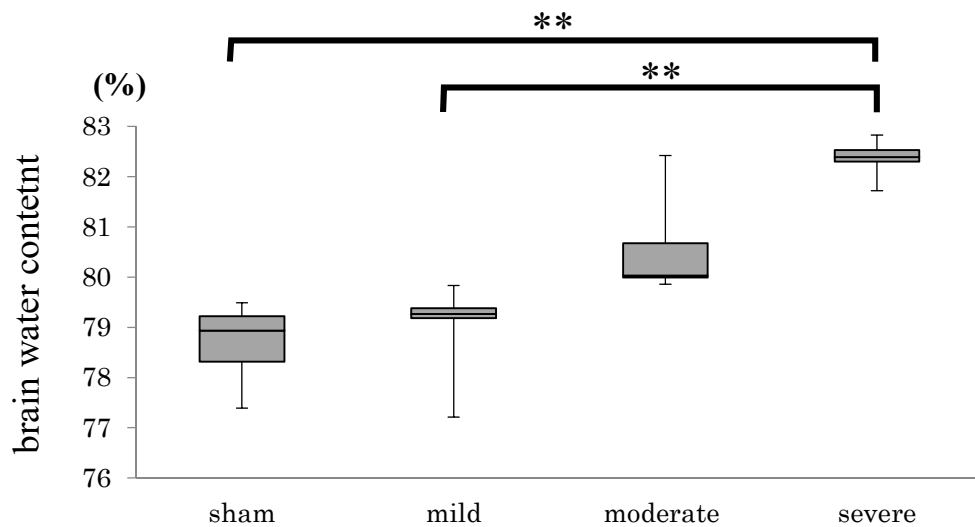


図 13: SAH 後の脳浮腫

brain water content で脳浮腫の程度につき比較した。ICP が高い群ほど脳浮腫は増加する傾向を認めた。severe 群は、sham 群および mild 群と比較して有意に脳浮腫が増大していた。

**P < 0.01

SAH発症時のICPが50～149mmHgまで上昇した個体を選別

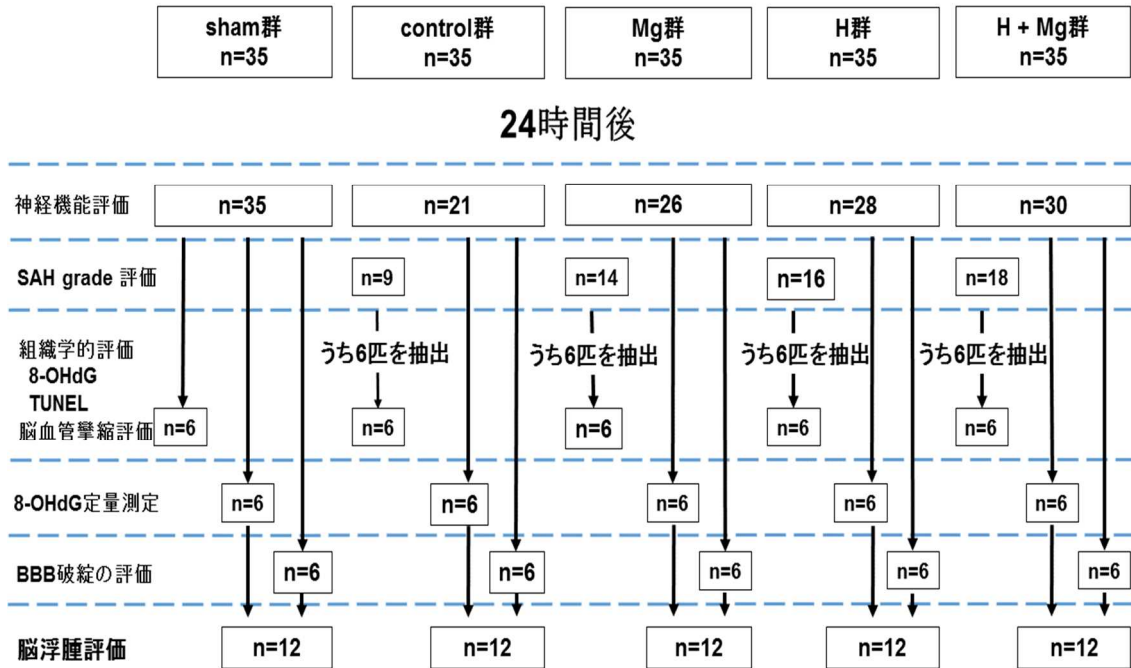


図 14: 実験動物の振り分けと評価項目

SAH 発症時の ICP が基準に達したラットを使用して各群に振り分けた。24 時間後の生存動物の神経機能評価を行った。control 群 9 匹、Mg 群 14 匹、H 群 16 匹、H + Mg 群 18 匹を用いて SAH grade の評価を行った。その後、組織学的評価や脳血管攣縮評価、8-OHdG 定量測定、エバンスブルーを用いた BBB 破綻の評価を各群 6 匹ずつ用いて行った。また脳浮腫の評価を各群 12 匹ずつ用いて行った。

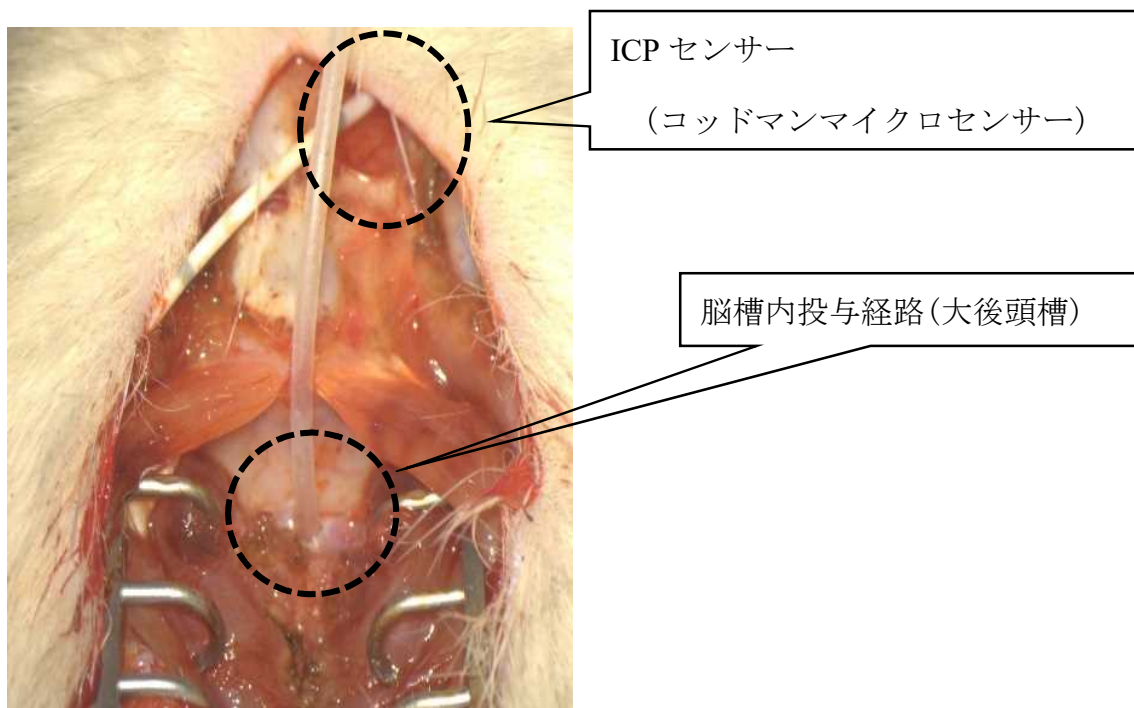


図 15: 脳槽内投与の経路

大後頭槽にシリコンチューブを留置し、脳槽内投与経路とした。治療後チューブは結紮し、髄液の硬膜内外の交通を遮断した。

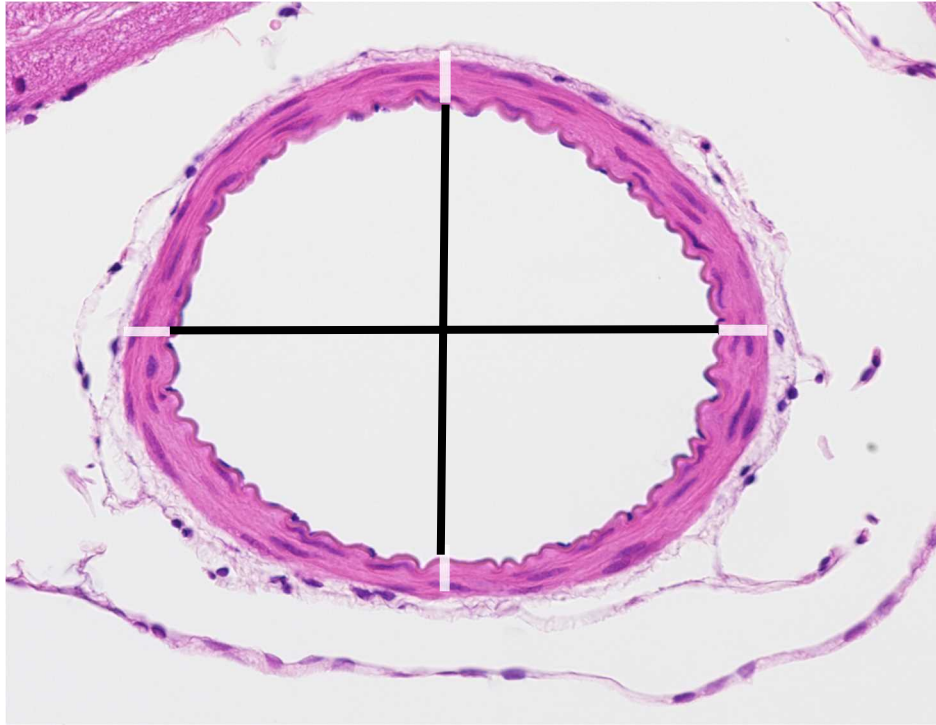


図 16: 脳血管攣縮の評価方法、BA の切片 (control 群)

血管内腔の直径 (楕円形の場合は長軸と短軸の平均)、および血管内皮 ~ 中膜外側間の距離 (白線) の 4 箇所を測定した平均値を算出し壁厚として評価した。

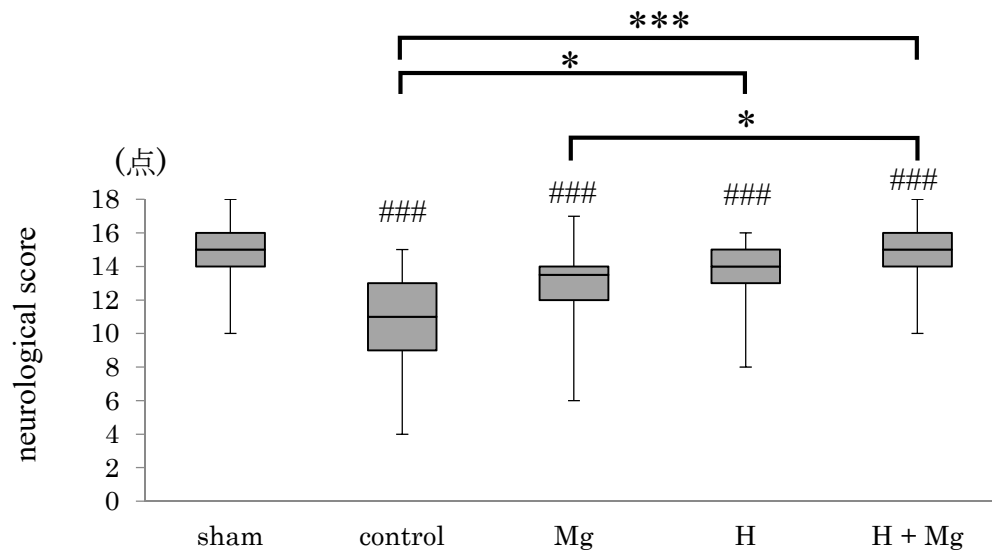
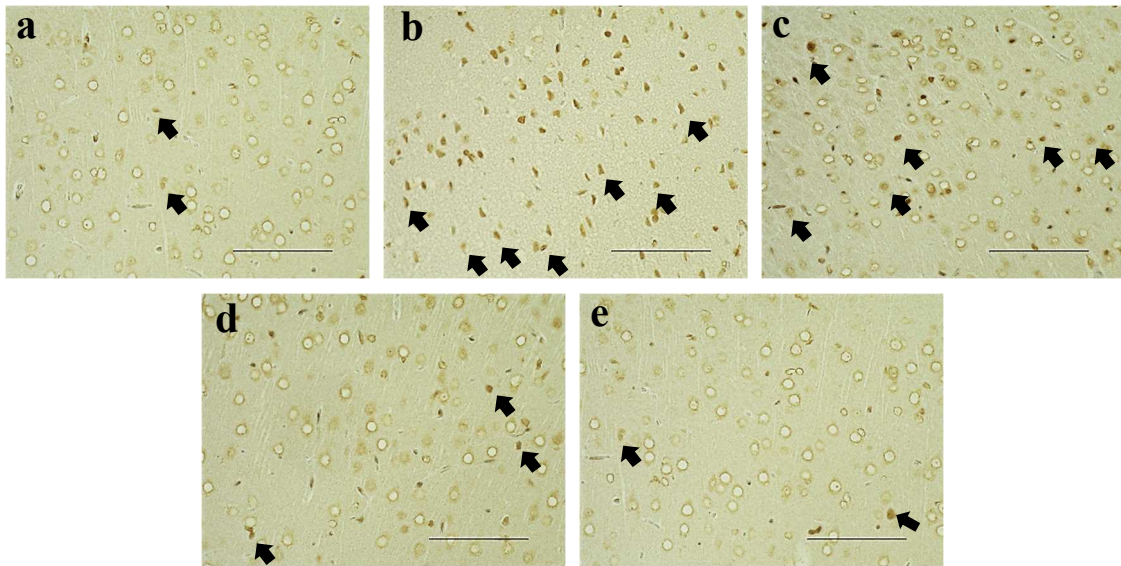


図 17: 各群の神経機能スコア

H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して神経機能スコアが有意に高かった。特に H + Mg 群は Mg 群よりも有意にスコアが高く、また有意差はつかないものの、H 群よりもスコアが高い傾向を認めた (P=0.054)。

* P < 0.05; *** P < 0.001、### P < 0.001 vs. sham 群

A



B

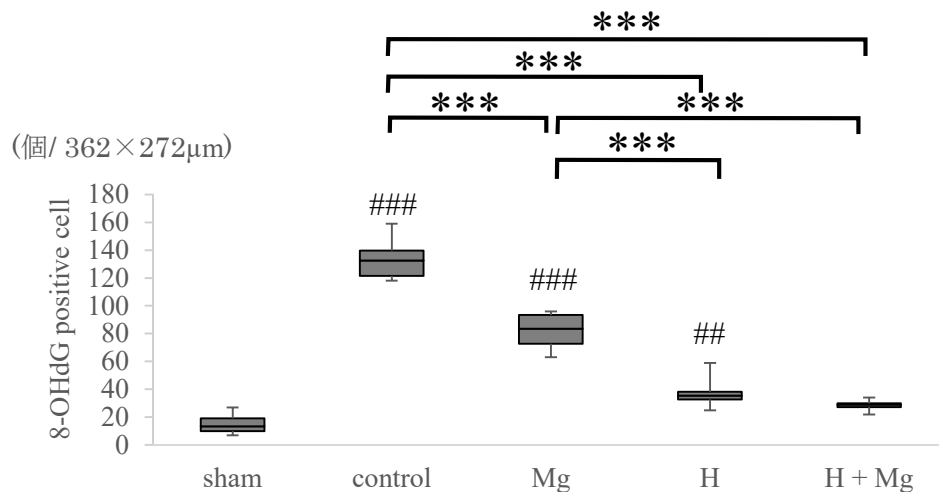


図 18: 頭頂葉皮質 PA1 領域の酸化ストレス損傷の評価

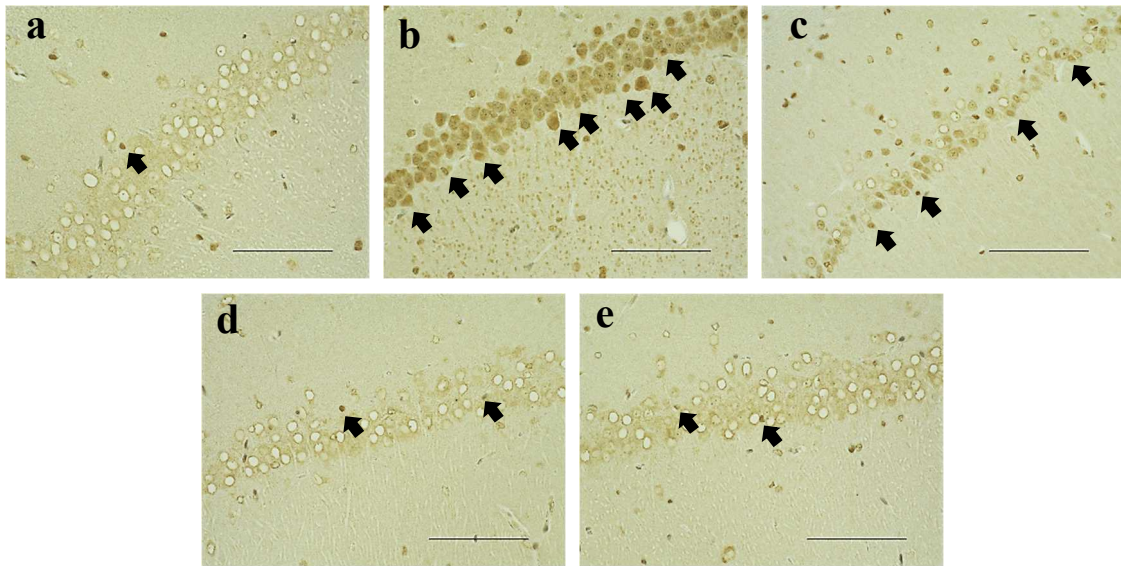
A: sham 群 (a)、control 群 (b)、Mg 群 (c)、H 群 (d)、H + Mg 群 (e) の 8-OHdG 染色
 sham 群では陽性細胞はごく少数であった。control 群と Mg 群では多数の陽性細胞を認めた。H 群および H + Mg 群では陽性細胞が著明に減少していた。
 スケールバー = 100 μm

B: 8-OHdG 陽性細胞数の定量的比較

H 群および H + Mg 群は、control 群および Mg 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に減少していた。また Mg 群は control 群と比較して陽性細胞数が有意に減少していた。

*** P < 0.001、##P<0.01; ###P<0.001 vs. sham 群

A



B

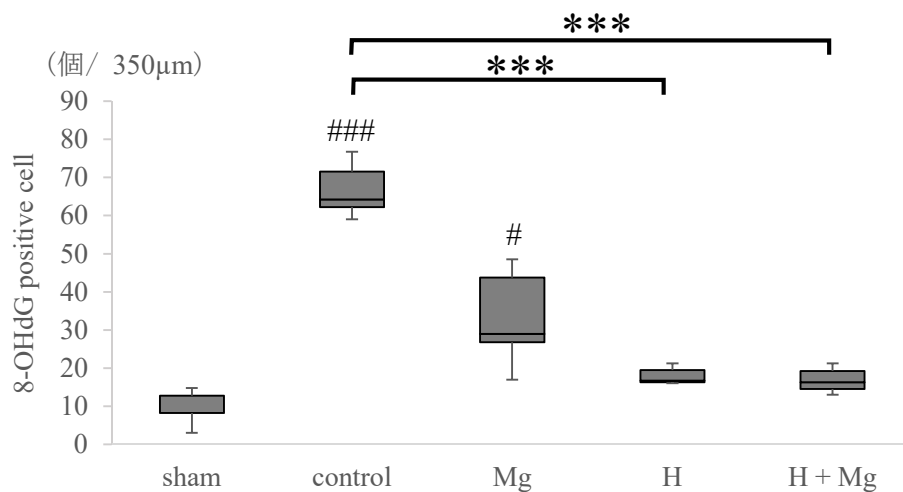


図 19: 海馬 CA1 領域の酸化ストレス損傷の評価

A: sham 群 (a)、control 群 (b)、Mg 群 (c)、H 群 (d)、H+Mg 群 (e) の 8-OHdG 染色

sham 群では 8-OHdG 陽性細胞はごく少数であった。control 群と Mg 群では多数の陽性細胞を海馬全体に認め、特に control 群で顕著であった。H 群および H+Mg 群では陽性細胞が著明に減少していた。

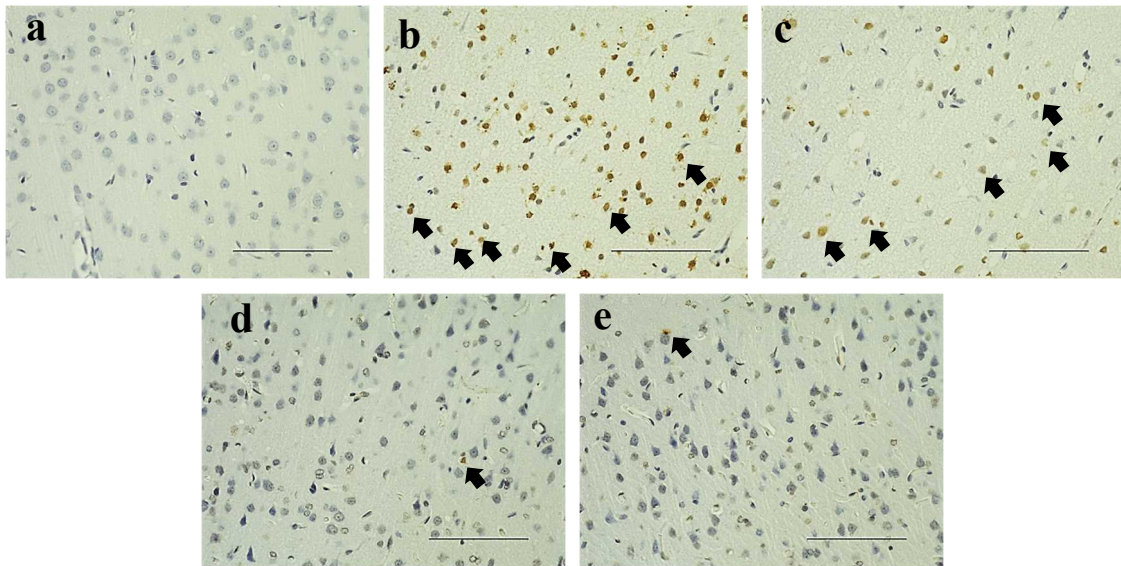
スケールバー = 100 μ m

B: 8-OHdG 陽性細胞数 (350 μ m あたり) の定量的比較

H 群および H+Mg 群は、control 群と比較して 8-OHdG 陽性細胞数が有意に減少していた。

*** $P < 0.001$ 、# $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ vs. sham 群

A



B

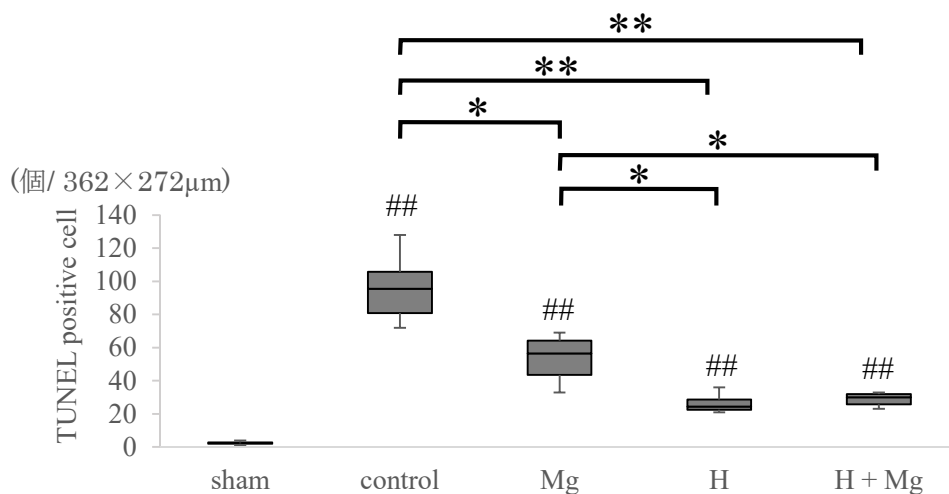


図 20: 頭頂葉皮質 PA1 領域のアポトーシス

A: sham 群 (a)、control 群 (b)、Mg 群 (c)、H 群 (d)、H+Mg 群 (e) の TUNEL 染色

sham 群では TUNEL 陽性細胞はほぼ認めなかった。control 群と Mg 群では多数の陽性細胞を認めた。H 群および H+Mg 群では陽性細胞は認めるものの control 群、Mg 群より少数であった。

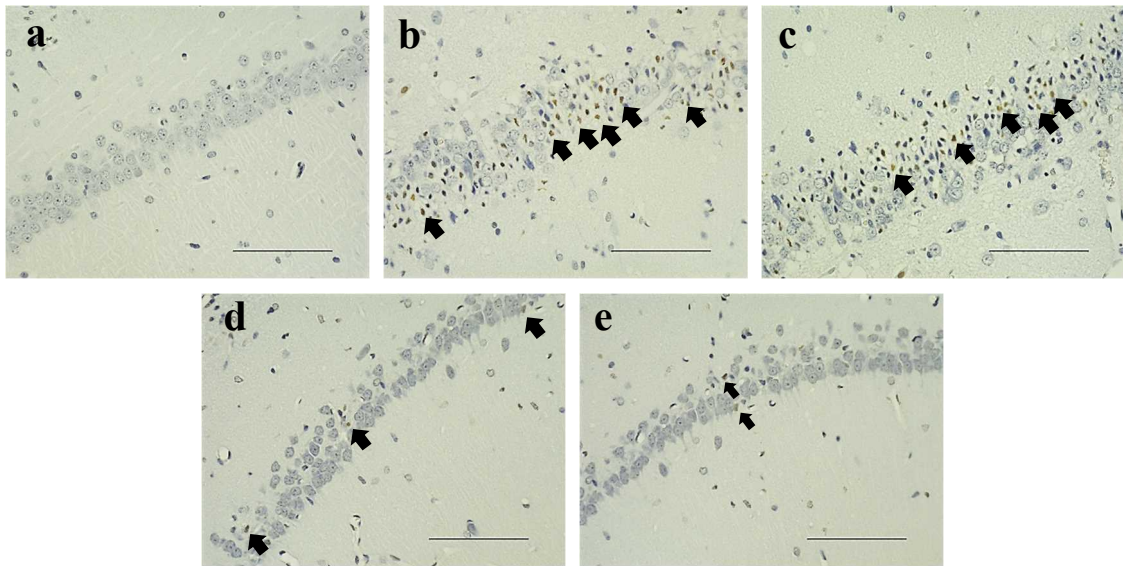
スケールバー = 100 μm

B: TUNEL 陽性細胞数の定量的比較

H 群および H+Mg 群は、control 群および Mg 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。また Mg 群は control 群と比較して陽性細胞数が有意に減少していた。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 、## $P < 0.01$ vs. sham 群

A



B

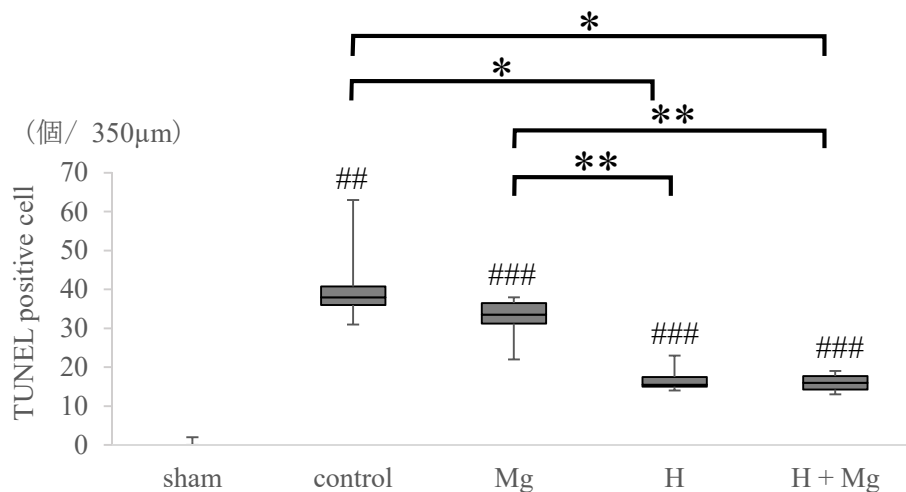


図 21: 海馬 CA1 領域のアポトーシス

A: sham 群 (a)、control 群 (b)、Mg 群 (c)、H 群 (d)、H+Mg 群 (e) の TUNEL 染色

sham 群では TUNEL 陽性細胞はほぼ見られなかった。control 群と Mg 群では陽性細胞を多数認めた。H 群および H+Mg 群ではアポトーシスは散発的に観察された。

スケールバー = 100 µm

B: TUNEL 陽性細胞数 (350µm あたり) の定量的比較

H 群および H+Mg 群は、control 群および Mg 群と比較して TUNEL 陽性細胞数が有意に減少していた。

* P < 0.05; ** P < 0.01、## P < 0.01; ### P < 0.001 vs. sham 群

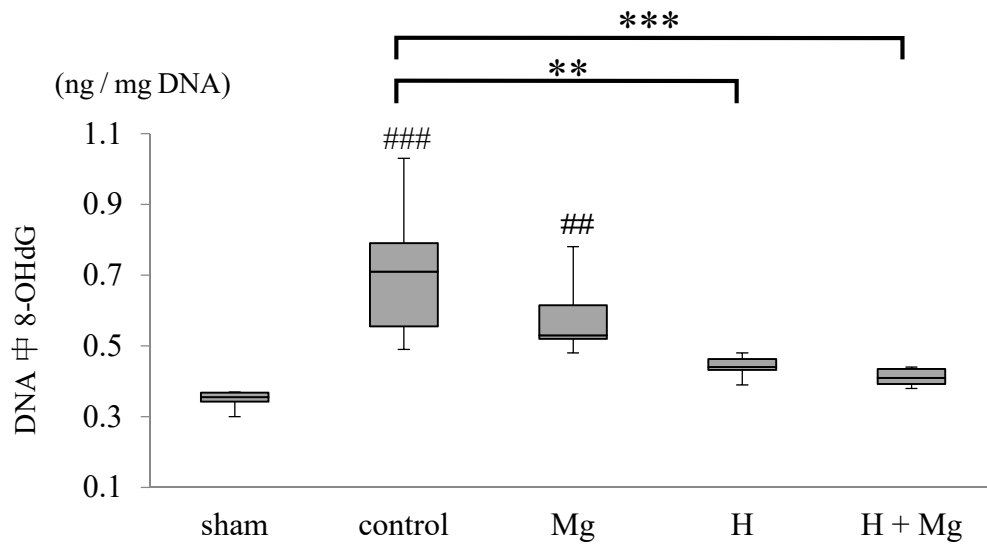


図 22: 脳組織内の 8-OHdG 定量測定

ELISA 法を用いて 8-OHdG を定量的に測定した。H 群および H + Mg 群は、control 群と比較して DNA 1mg あたりの 8-OHdG 量が有意に減少していた。また control 群、Mg 群は、sham 群と比較して 8-OHdG 量が増加していた。

** P < 0.01; *** P < 0.001、## P < 0.01; ### P < 0.001 vs. sham 群

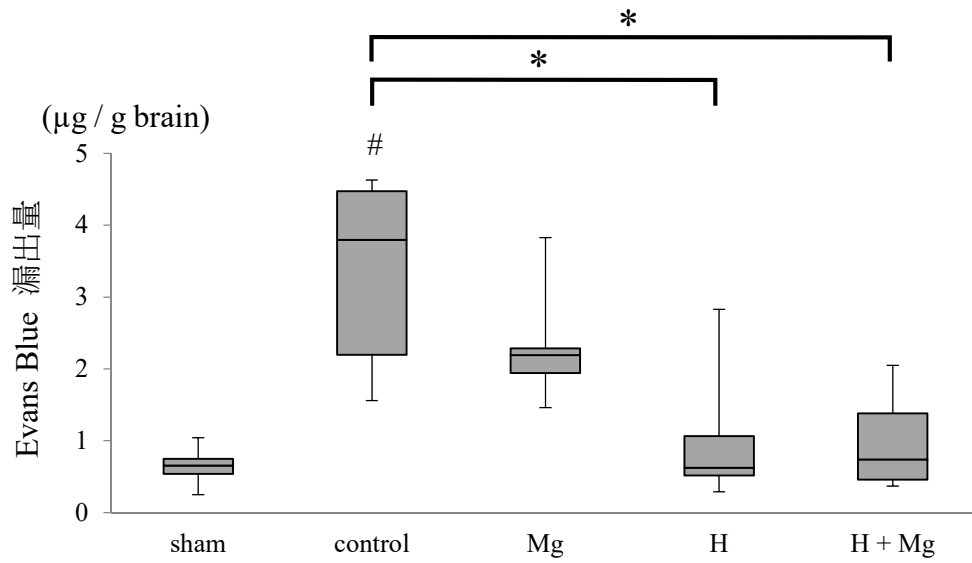


図 23: BBB 破綻の評価

Evans Blue 漏出量を測定し、脳 1g あたりの漏出量を算出した。H 群、H + Mg 群および sham 群は control 群と比較して有意に漏出量が減少していた。

* $P < 0.05$ 、# $P < 0.05$ vs. sham 群

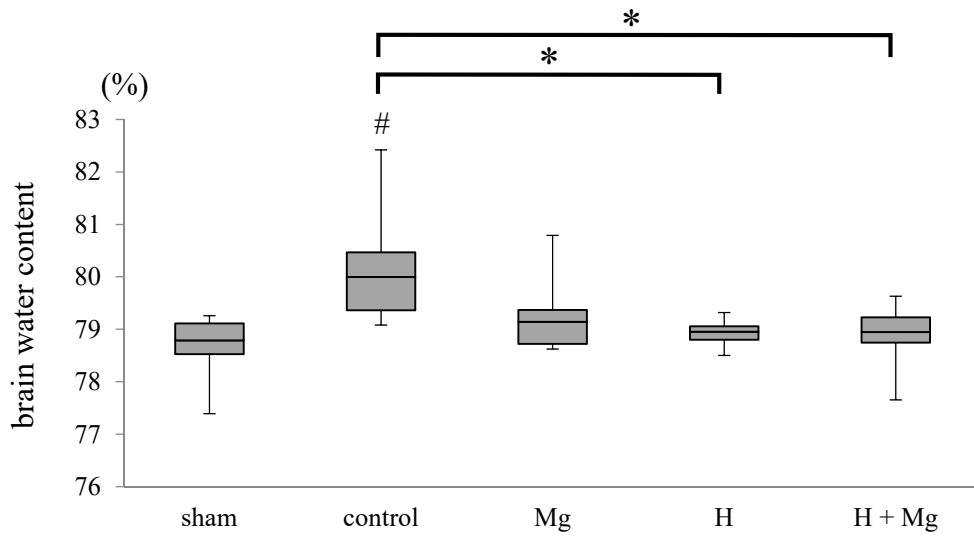


図 24: 脳浮腫の評価

brain water content で脳浮腫の程度を比較した。H 群、H+Mg 群および sham 群は、control 群と比較して脳浮腫が有意に軽減していた。また Mg 群は、有意差はつかないものの control 群よりも脳浮腫が軽減する傾向を認めた (P=0.061)。

* P < 0.05、# P < 0.05 vs. sham 群

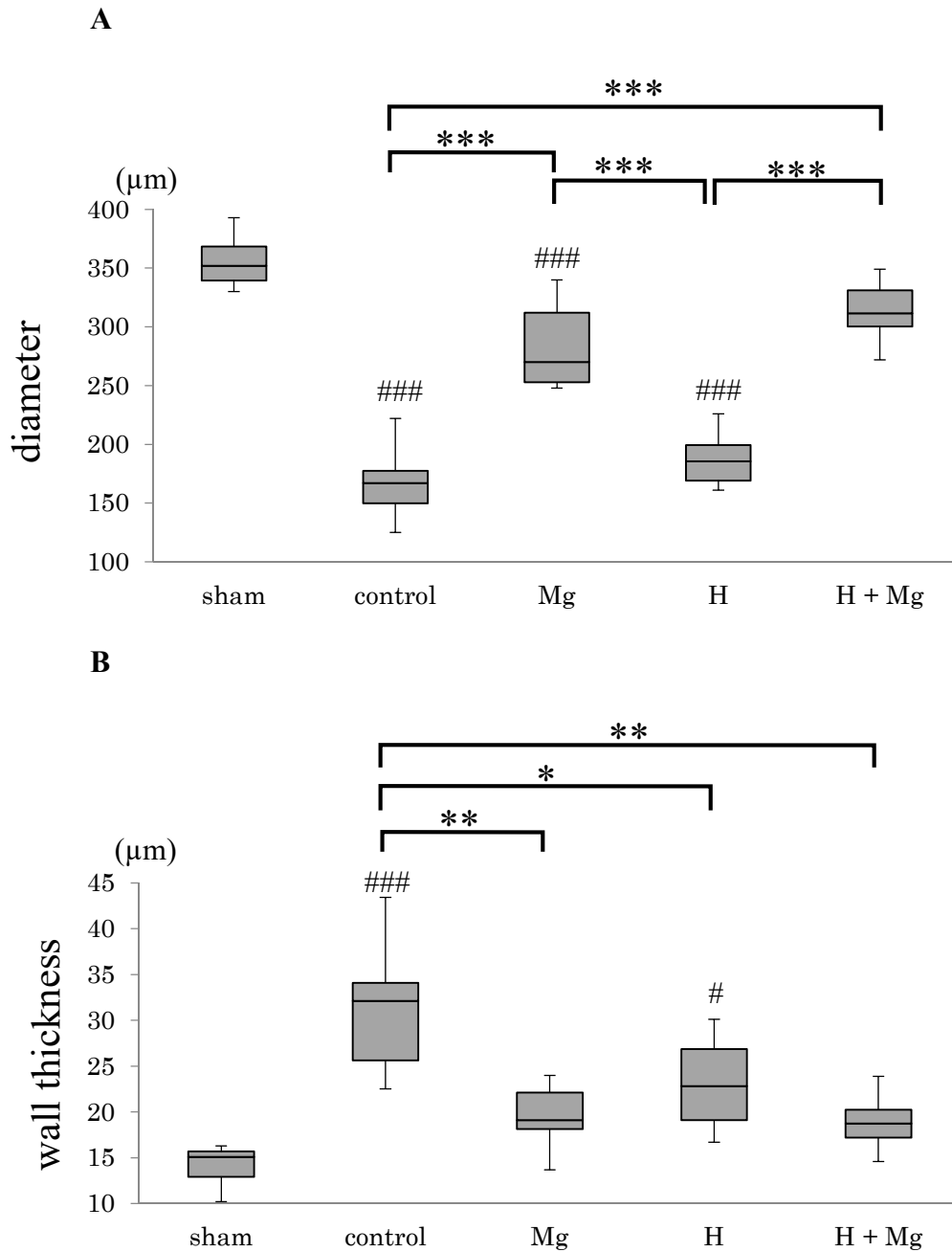


図 25: BA の血管攣縮評価

BA の直径 (A) および壁厚 (B)

Mg 群および H + Mg 群は、control 群と比較して有意に血管径が拡張し、血管壁の肥厚化が抑制されていた。また H 群と比較して血管径が有意に拡張していた。control 群および H 群は、sham 群と比較して有意に血管径が狭窄し、血管壁が肥厚化していた。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 、# $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ vs. sham 群

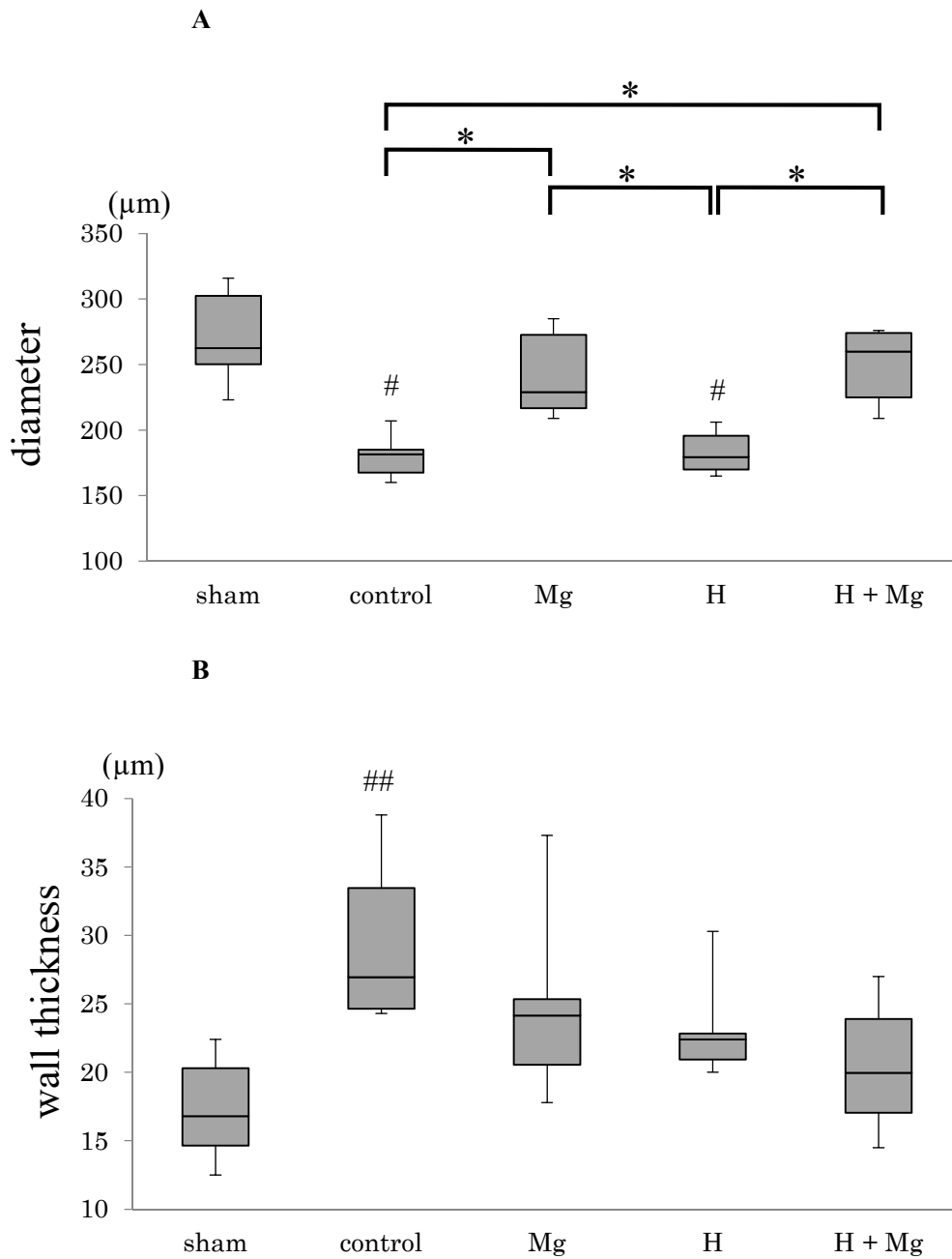


図 26: ACA の血管攣縮の評価

ACA の直径 (A) および壁厚 (B)

Mg 群および H+Mg 群は、control 群および H 群と比較して血管径が有意に拡張していた。血管壁の肥厚に関しては、sham 群と control 群の間に有意差を認めた。

* $P < 0.05$ 、# $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ vs. sham 群

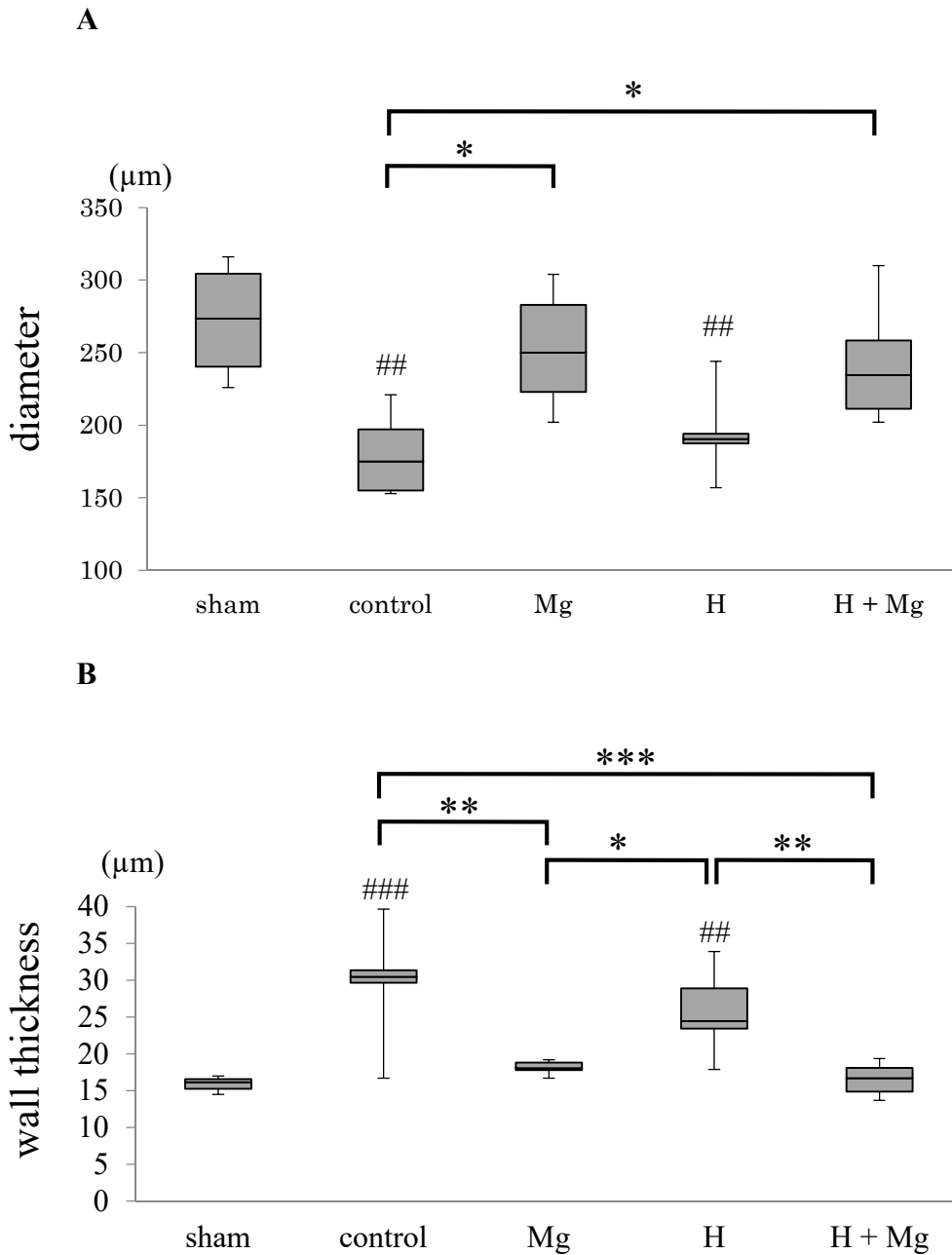


図 27: MCA の血管攣縮の評価

MCA の直径 (A) および壁厚 (B)

Mg 群および H + Mg 群は、control 群と比較して有意に血管径が拡張し、血管壁の肥厚化が抑制されていた。また H 群と比較して血管壁の肥厚化が有意に抑制されていた。control 群および H 群は、sham 群と比較して有意に血管径が狭窄し、血管壁が肥厚化していた。

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001、##P<0.01; ### P<0.001 vs. sham 群