

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

くま がい こう すけ
熊 谷 光 祐

(神経病学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

目次

第1章 緒言

1-1. くも膜下出血 (SAH) とは	1
1-2. 早期脳損傷 (EBI)	1
1-2-1. EBI の病態	1
1-2-2. 反応性グリオシス (reactive astrogliosis)	2
1-2-3. 活性酸素種と活性窒素種 (ROS / RNS)	3
1-3. 遅発性脳血管攣縮 (CV)	3
1-4. 動物モデルを用いた SAH 研究の課題	4
1-5. 水素の薬理作用と SAH に対する効果	5
1-6. 研究の目的	6

第2章 実験1: 軽症 SAH ラットに脳低灌流負荷を加えた動物についての検討

2-1. 軽症 SAH ラットに脳低灌流負荷を加えたモデルの作成	7
2-2. 実験1 方法	7
2-2-1. 実験動物	7
2-2-2. 軽症 SAH ラットの作成	8
2-2-3. 一側総頸動脈結紮 (UCCA/O)	9
2-2-4. 生理学的パラメーター	10
2-2-5. 死亡率	10
2-2-6. 体重減少率と神経機能評価	10
2-2-7. 脳水分含有量測定	10
2-2-8. ウェスタンブロット法	11

2-2-9. 免疫組織染色	12
2-2-9-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) の評価	12
2-2-9-2. 損傷神経細胞の評価	12
2-2-9-3. reactive astrogliosis の評価	13
2-2-10. 統計学的解析	13
2-3. 実験 1 結果	13
2-3-1. 血液ガス分析	13
2-3-2. SAH 発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移	13
2-3-3. 死亡率	14
2-3-4. 体重減少率と神経機能評価	14
2-3-5. 脳水分含有量に対する脳低灌流負荷による影響	14
2-3-6. ウェスタンブロット法を用いた発現量・リン酸化量の評価	14
2-3-6-1. S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する脳低灌流負荷による影響	14
2-3-6-2. reactive astrogliosis に対する脳低灌流負荷による影響	15
2-3-7. 組織観察	15
2-3-7-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) に対する脳低灌流負荷による影響	15
2-3-7-2. 損傷神経細胞の割合に対する脳低灌流負荷による影響	15
第 3 章 実験 2: SAH + UCCAO モデルを用いた水素ガス吸入効果の検討	
3-1. 実験 2 方法	17
3-1-1. SAH + UCCAO モデルの作成	17
3-1-2. 水素ガス	18
3-1-3. 生理学的パラメーター	18

3-1-4. 死亡率	18
3-1-5. 体重減少率と神経機能評価	18
3-1-6. 脳水分含有量測定	18
3-1-7. ウェスタンブロット法	18
3-1-8. 免疫組織染色	18
3-1-9. 統計学的解析	19
3-2. 実験 2 結果	19
3-2-1. 血液ガス分析	19
3-2-2. SAH 発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移	19
3-2-3. 死亡率	19
3-2-4. 体重減少率と神経機能評価	20
3-2-5. 脳水分含有量に対する水素ガス吸入効果	20
3-2-6. ウェスタンブロット法を用いた発現量・リン酸化量の評価	20
3-2-6-1. S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する水素ガス吸入効果	20
3-2-6-2. reactive astrogliosis に対する水素ガス吸入効果	20
3-2-7. 組織観察	21
3-2-7-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) に対する水素ガス吸入効果	21
3-2-7-2. 損傷神経細胞の割合に対する水素ガス吸入効果	21
第 4 章 考察	
4-1. 実験 1 の考察	22
4-1-1. 軽症 SAH モデル	22
4-1-2. SAH + UCCAO モデル	22

4-2. 実験 2 の考察	24
4-2-1. SAH+UCCAO モデルにおける水素ガス吸入効果	24
4-2-2. 水素の可能性	26
4-3. 今後の課題と展望	26
第 5 章 結論	28
謝辞	29
引用文献	30
図表	42

論文の要旨

研究論文題目

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

申請者 熊谷光祐

1. 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。

2. 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

(熊谷光祐)

(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。これらのことより、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。

3. 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 % 窒素環境下で軽症 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 % 窒素環境下で軽症 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の程度に関係なくDBIおよび予後が改善した。本研究において、H₂ガス治療をSAH発症前から行ったが、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。

4. 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。

第1章

1-1. くも膜下出血 (SAH) とは

本邦において、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) は 10 万人に対し年間 20~25 人の割合で発症するとされている。重症 SAH の場合、治療を行っても 20~30% の患者が死亡する (1)。また、生存した患者においても約半数は予後不良である (2-4)。依然として、SAH に対する有効な治療手段は確立されておらず、予後改善には至っていない。予後不良の最大要因は、再破裂の他、SAH 発症数日~2 週間後に生じる遅発性脳障害 (delayed brain injury, DBI) である (5)。DBI は、遅発性脳血管攣縮期に生じる脳損傷と定義され、虚血の有無は問わない。従来、DBI 発生の主たる原因は、SAH 発症 4 日から 7 日目に生じ 1、2 週間続く遅発性脳血管攣縮 (cerebral vasospasm, CV) とされてきた。しかしながら、最近の研究結果より、DBI 発生には CV 以外に、後述の SAH 発症後 72 時間以内に発生する早期脳損傷 (early brain injury, EBI)、局所微小循環障害や血栓形成、大脳皮質拡張性抑制 (cortical spreading depression, CSD) などが複合的に関与していることが明らかになってきた (5-9) (図 1)。また、SAH 発症後 72 時間以内の脳低灌流が DBI 悪化の危険因子であるとする臨床報告もあり、SAH 後早期の脳低灌流も DBI の増悪因子の一つと考えられている (10, 11)。このように、様々な要因が DBI 発生に関与していることから、DBI に対する治療の方向性を複雑化し不明瞭なものにしている。

1-2. 早期脳損傷 (EBI)

1-2-1. EBI の病態

EBI は SAH 発症数分以内から 72 時間以内に生じ、SAH 患者の予後を規定する重大な因子の一つとして近年注目されている (6, 12)。SAH 発症後、頭蓋内圧 (intracranial pressure: ICP) の急激な上昇が起こり、全脳虚血の状態を惹起し、脳浮腫、脳内炎症反応、血液脳関門の破壊が引き起こされる (13, 14)。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 の病態として、脳虚血による細胞毒性浮腫 (cytotoxic edema)、血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) の破綻に伴う血管原性浮腫 (vasogenic edema)、さらに、酸

化ストレスや炎症性サイトカインによるアポトーシスなどが挙げられる (15-17)。最近では、EBI を抑制することで DBI を改善したとの報告もある (18)。

EBI において、酸化ストレスや S100B、phosphorylated C-Jun N-terminal kinase (p-JNK) などが重要な役割を担うものとして挙げられる (15, 19)。S100B は、アストロサイトに特異的に発現するカルシウムイオン (Ca^{2+}) 結合タンパクで、後述の reactive astrogliosis や BBB 障害のマーカーと考えられている (20, 21)。神経活動の上昇に伴って、S100B はアストロサイト内で産生され、アストロサイト外へ分泌される。細胞外 S100B が高濃度の場合、S100B はアストロサイト、神経細胞およびミクログリアにそれぞれ作用し、脳浮腫の増悪や神経機能障害を引き起こす (22-24)。アストロサイトでは、S100B の産生・分泌がさらに亢進し、突起が伸長しかつ細胞体が肥大した反応性アストロサイト (reactive astrocyte) へと変化する (25, 26)。神経細胞では、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) と活性窒素種 (reactive nitrogen species, RNS) が増加することで、mitogen-activated protein kinases (MAPK) の一つである JNK のリン酸化が亢進する。リン酸化した活性型 JNK (p-JNK) は、神経細胞のアポトーシスを誘導する (15, 19, 27, 28)。ミクログリアでは、JNK などの MAPK 系が活性化することで、炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β) や TNF- α の発現が亢進し、ミクログリアの活性化が起こる (29, 30)。

1-2-2. 反応性グリオシス (reactive astrogliosis)

アストロサイトは、脳の機能的構造維持、BBB の機能維持、シナプスにおける伝達物質の調整など、脳機能を制御する重要な役割を担っている (31)。脳損傷後、前述のように S100B 発現や JNK リン酸化が亢進し、アストロサイトは reactive astrocyte となり reactive astrogliosis を起こす。Reactive astrocyte では、特異的に存在する中間径フィラメントタンパク質の一つである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現が増強する。Reactive astrocyte は、神経細胞やミクログリアに作用し、脳損傷後の病態を悪化させる (7, 32)。さらに、reactive astrocyte における透過性亢進因子の産生・分泌亢進により、BBB が破綻し脳浮腫が悪化する (33)。SAH の重症度と reactive astrogliosis の増悪とは相関し、実際、SAH 後の血中及び髄液中の S100B と GFAP の濃度は脳障害の程度や神経

学的悪化に關与することが示されている (34–37)。脳梗塞モデルにおいて、アストロサイトにおける S100B の産生を抑制することで、reactive astrogliosis を抑制し、梗塞巣拡大を抑制し神経症状を改善させたとの報告がある (38)。また、ラット未熟脳の白質損傷モデルにおいて、JNK リン酸化を抑制することで、reactive astrogliosis を抑制し BBB 障害が改善したとの報告もある (39)。EBI は DBI を規定する重大な因子の一つであるため、reactive astrogliosis を抑制することで、EBI のみならず DBI をも改善させる可能性がある。

1-2-3. 活性酸素種と活性窒素種 (ROS / RNS)

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、 $\cdot O_2^-$ (スーパーオキシド) 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。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ごとに $\cdot O_2^-$ や H_2O_2 、 $\cdot OH$ (ヒドロキシラジカル)、 H_2O となる。また、 $\cdot O_2^-$ は NO と反応して、傷害性の強い RNS である ONOO \cdot (ペルオキシナイトライト) を生成する (40)。特に、 $\cdot OH$ と ONOO \cdot は ROS / RNS の中でも反応性が高く、細胞傷害性が最も強いと言われている。

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、過剰な ROS / RNS が生体内の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酸化ストレスと呼ばれる (41) (図 3)。ROS / RNS は、MMP-9 や Caspase-3、NF- κ B などの血管内皮細胞のアポトーシス誘導物質を活性化し、BBB の破綻を引き起こす。ROS / RNS を抑制することで SAH 後の予後が改善したとの報告もあり (42, 43)、ROS / RNS による酸化ストレスは、EBI の重大な危険因子として近年注目されている (44, 45)。

1-3. 遅発性脳血管攣縮 (CV)

CVは、SAH 4～14日後に発生する脳主幹動脈の可逆的狭窄である。脳血管撮影にて血管狭窄が実際に認められる頻度は約40～60%とされ、そのうち神経症状の悪化を来す頻度は20～55%と報告されている(46, 47)。CVの主な要因には、血管平滑筋内のカルシウムイオン(Ca^{2+})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挙げられる(48)。血管平滑筋の収縮は、細胞内 Ca^{2+} とカルモジュリンの結合体がmyosin light chain kinaseを活性化することで、myosin light chainがリン酸化しactinに働きかけることで起こる。SAHでは、血管平滑筋内の Ca^{2+} 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^{2+} 濃度の上昇は、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細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入により生じる。また、くも膜下腔に存在するオキシヘモグロビンによってROS/RNSが産生され、PKCが活性化されることで血管収縮が生じ、一酸化窒素(NO)が阻害されることで血管拡張能が阻害される(49)。その他、アラキドン酸カスケードの促進、endothelin (ET)産生亢進、血管平滑筋のカリウムイオンチャネルの障害なども血管平滑筋が収縮をきたす原因として挙げられる(50–52)。

従来、CVによる脳血流量の低下がDBIの主原因と考えられ、脳主幹動脈のCV抑制に主眼を置いた多くの基礎および臨床研究が行われてきた。しかし、CVの程度や頻度が改善したにもかかわらず、SAHの予後は改善しなかったとの報告もある(53–55)。そのため、近年はDBIを引き起こすCV以外のEBIやCSDに注目した研究が進められている。

1-4. 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endovascular perforation (EVP)モデルとblood injectionモデルがある(56, 57)。EVPモデルは、ナイロン糸等を用いて頭蓋内内頸動脈分岐部を穿破することでSAHを発症させる。よりヒトのSAHに近い病態を再現できる反面、血腫量を調整できず重症化しやすいために生存率・生存期間が極めて低いといった欠点がある(57, 58)。死亡率が高いためDBIの観察は容易ではないが、実臨床に近

い EBI の病態を再現できるという特徴を活かして、CV および DBI よりむしろ EBI の研究に用いられている。

一方、blood injection モデルでは、脳槽内等に自己血を注入することで SAH と類似した環境を作成する (59, 60)。血腫量を調整でき重症度も調整することができるが、脳損傷の程度が比較的軽微であり実際の EBI の病態との差異が指摘されている。そのため、EBI よりむしろ CV および DBI の研究に用いられている (61)。

以上のように、両モデルにはそれぞれ長所・短所があるが、EVP モデルの方が blood injection モデルと比較して、よりヒト SAH に近い病態を再現できる。そのため、EVP モデルを改良することで DBI が観察することができれば、よりヒト SAH の病態を知ることができる。

SAH 後の時間的経過は、ヒトとラット EVP モデルでは異なることが知られている。EVP モデルの場合、EBI は 24 時間以内に起こり、神経機能は SAH 後 7 日目までにはベースラインに回復するとされている (19, 62)。CV は、通常 SAH 後 24 時間以内に始まり、2~3 日後に血管収縮のピークを迎えるとされている (57, 63)。これらのことより、ラット EVP モデルを用いて DBI を評価する場合、最低 SAH 後 7 日以上経った後に評価する必要がある。しかし、EVP モデルの死亡率は高いため、そのような報告例は少ない (18, 64, 65)。この問題を克服するため、tangsten wire を用いた中等症 SAH モデルなどの改良モデルが報告されているが、依然死亡率は高いままである (66)。SAH 後の病態解明のためには、ヒトの SAH に近い病態を再現できる EVP モデルを用いながらも、死亡率の低い新規モデルの作成が必要と考えられた。

1-5. 水素の薬理作用と SAH に対する効果

2007 年に Ohsawa らがラット脳虚血再灌流障害に対する 2% 水素 (H_2) ガス吸入の効果を経験して以降、 H_2 の治療効果や予防効果に関して数多く報告されている (67-70)。 H_2 は、強い抗酸化作用と速い組織移行性を有し、生体における安全性が高いことが証明されている (71-73)。また、多様な方法で体内に送り込むことができるという長所も兼ね備えている。

H₂の強力な抗酸化作用は、ROS/RNSの中でも傷害性の強い・OHとONOO⁻の酸化作用を選択的に阻害することで発揮される。さらに、H₂が酸化ストレスに対して細胞防御機能を有することや、生体に不利となるようなROS/RNSの消去や炎症反応の抑制をしないことも証明されている(67)。

H₂は密度が小さいため、生体内で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。吸入、経静脈投与や経口投与といった投与方法の違いに関わらず、H₂の脳組織への高い移行性が報告されている(74)。

SAHに対するH₂の効果に関しては、酸化ストレスを軽減させることでEBIやCVに対して効果を示したとする報告が多数ある(75-77)。しかし、DBIに対する効果の報告は未だない。

1-6. 研究の目的

目的1: ラットEVPモデルを用い、DBIの病態解明に適したモデルを作成する(実験1、2章)。

目的2: 実験1で得られたモデルを用いて、EBI及びDBIに対するH₂ガス吸入効果についての検討を行う(実験2、3章)。

第2章 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

2-1. 低死亡率SAHラットに脳低灌流負荷を加えたモデルの作成

SAH発症直後のICP値とSAHの重症度は相関するとの報告がある(78, 79)。通常のラットEVPモデルにおいて、動脈穿破のため3-0もしくは4-0ナイロン糸が用いられるが、死亡率が非常に高いという難点がある。そこで、まず始めに6-0プロリール®糸(エチコン、米国)を用いてSAH発症時のICP値を抑えた低死亡率SAHラットを作成した。また、SAH後の急性期脳低灌流はDBIを悪化させることは既に知られており(10, 11)、SAH発症24時間後にラット一側総頸動脈結紮(unilateral common carotid artery occlusion, UCCAO)を行うことで脳低灌流負荷を行った。そして、このSAH+UCCAOモデルがDBIを評価するのに適したモデルであるかを検討した。

2-2. 実験1 方法

2-2-1. 実験動物

本実験は、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18066)。本研究では、雄性Sprague-Dawleyラット、8~11週齢、300~400g(日本エスエルシー、静岡)を使用した。Sham群、UCCAO群、SAH-UCCAO群、SAH+UCCAO群の各群が25匹ずつになるようにし、合計109匹のラットを使用した。まずSAHの有無に従い以下の2群に振り分けた。この際、SAH群のうち3匹は、SAH作成時に血管穿破が成功しなかったと考えられたため除外した。

(1) no SAH群 (n=50)

(2) SAH群 (n=59)

次に、24時間後の第1病日にそれぞれを無作為に振り分け、以下の4群とした。この際、SAH群において、24時間以内に死亡した3匹と24時間後の神経学的スコアが3点以上14点以下の3匹は除外した後、無作為に振り分けた。

(1) sham群 (n=25) : no SAH群でUCCAOを行わなかった群

- (2) UCCAO 群 (n=25) : no SAH 群で UCCAO を行った群
- (3) SAH – UCCAO 群 (n=25) : SAH 群で UCCAO を行わなかった群
- (4) SAH + UCCAO 群 (n=25) : SAH 群で UCCAO を行った群

体重測定を SAH 発症日 (第 0 病日) から第 7 病日までの連日行った。また、第 1、2、3 及び 7 病日にそれぞれ神経学的評価を行った。第 2、3 及び 7 病日においては、神経学的評価を行った後、5 % イソフルランを 5 分間吸入させた後、経心臓的に灌流固定を行った。その後、脳を摘出し組織サンプルを採取した。一方、第 2 及び 3 病日における脳浮腫の評価及びウエスタンブロットのための組織サンプルは、同様の麻酔を行った後、灌流固定を行わず脳を摘出して採取した。ウエスタンブロット法による評価は、第 2 病日に S100B の発現量及び JNK のリン酸化量、第 3 及び 7 病日に GFAP の発現量を、それぞれ各群 5 匹ずつ用いて行った。組織学的評価は、第 3 病日は各群 5 匹ずつを用いて HE 染色及び GFAP 染色、第 7 病日は各群 5 匹ずつ用いて HE 染色、Nissl 染色及び GFAP 染色を用いて行った (表 1, 図 4)。

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後に実験を行い、実験後の飼育も同様の環境下で行った。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. 低死亡率 SAH ラットの作成

過去の文献を参考に SAH モデルを以下の如く作成した (58)。ブプレノルフィン 0.01 mg / kg 腹腔内投与後、30 % 酸素及び 70 % 窒素環境下で 3 % イソフルラン 5 分間吸入による導入麻酔を行った。その後、気管内挿管を行い、全身麻酔管理を SAH 発症 30 分後まで継続した。尾動脈よりカニューレ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。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 1.5 ~ 2 % 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、ヒートパッドを用いて 37°C 前後になるよう管理した。

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 SAH 発症 30 分後まで継続した。センサーを留置後ラットの体位を仰臥位に変換し、以下の手順で低死亡率 SAH ラットを作成した。

頸部を正中切開し、左胸鎖乳突筋前縁を鈍的剥離し頸動脈三角を露出した。左総頸動脈を剥離・露出し、左内・外頸動脈も剥離し外頸動脈は遠位部で焼灼後切離した。内頸動脈遠位部では翼口蓋動脈を結紮切離した。外頸動脈近位部に 6-0 プロリーン®糸(ジョンソン・エンド・ジョンソン、東京) をループ状にした状態で留置し、クリップを用いて総頸動脈の血流を遮断した。外頸動脈を一部切開して 6-0 プロリーン®糸を頭蓋内内頸動脈に向けて進入させ、左前大脳動脈・中大脳動脈分岐部を穿破させ SAH を発症させた。次に、プロリーン®糸を抜去した後、外頸動脈をループ状にしたプロリーン®糸で結紮し、総頸動脈を開放した。総・内頸動脈に 2 本の 4-0 絹糸を結紮せずに留置した後、閉創した。no SAH 群に対する偽手術としては、プロリーン®糸を頭蓋内内頸動脈まで誘導するも内頸動脈を穿破させずに糸を抜去した (図 5)。術後、自然覚醒を待ち十分な自発呼吸を確認して抜管を行った。抜管後、飼育ケージに戻して飼育した。

2-2-3. 一側総頸動脈結紮 (UCCAO)

SAH 発症 24 時間後 (第 1 病日) に、以下の手順で UCCAO を行った。

3% イソフルラン 5 分間吸入による導入麻酔を行った後に、フェイスマスクによる吸入麻酔を、血圧をモニタリングしながらイソフルラン吸入濃度を 1.5~2% で調整して行った。尾動脈近位部より再度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。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パッドを用いて 37 °C 前後になるよう管理した。

ラットを仰臥位にし、頸部を正中切開後、前日に留置した 4-0 絹糸を 2 本確認した。左総・内頸動脈及び既に結紮処理されている外頸動脈を十分に露出し

た。UCCAO 群及び SAH + UCCAO 群では、前日に留置した 2 本の絹糸で左総・内頸動脈をそれぞれ結紮しその間を切離した。血圧モニタリングは UCCAO 3 分後まで行った後、閉創した。Sham 群及び SAH - UCCAO 群では、結紮をせずに 2 本の絹糸を抜去した。術後、自然覚醒を確認した後、飼育ケージに戻して飼育した。

2-2-4. 生理学的パラメーター

尾動脈にカテーテルを挿入し、動脈血圧モニタリングと血液ガス分析のためのサンプル採取を行った。第 0 病日は SAH 発症前、第 1 病日は UCCAO 施行前にそれぞれ pH、PaCO₂、PaO₂ を測定した。

2-2-5. 死亡率

SAH 発症 24 時間後 (sham 群はナイロン糸抜去 24 時間後) 及び第 7 病日までのラットの生存、死亡を集計して算出した。

2-2-6. 体重減少率と神経機能評価

全ての生存動物に対して、体重測定を SAH 発症日 (第 0 病日) から第 7 病日までの連日行い、第 0 病日を基準にした減少率を算出した。また、第 1、2、3 及び 7 病日にそれぞれ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 (80) (3 ~ 18 点、表 2)。

2-2-7. 脳水分含有量

脳浮腫の評価を行うため、第 2 病日に wet / dry 法を用いた脳水分含有量を測定した (81)。全群より 5 匹ずつ、計 20 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。摘出脳の左側前大脳半球の重量を測定し湿潤重量とした。その後、105 °C で 72 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。

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

2-2-8. ウェスタンブロット法

第2病日に S100B 及び p-JNK、第3及び7病日に GFAP を測定するため、各群それぞれ5匹ずつ計60匹の摘出脳から採取したサンプルを用いて、以下の抗体にてウェスタンブロットを行なった(82)。摘出脳の Bregma から4 mm 尾側の位置で、穿破側大脳皮質嗅周野 (Perirhinal cortex, PRh 領域) の一部をサンプルとした。

サンプルを、等張緩衝液 (0.5 M Tris-HCl [pH 6.8]、10 % グリセロール、2 % ドデシル硫酸ナトリウム) で懸濁後に超音波処理にて破碎し、ウェスタンブロットでの解析用のサンプルライゼートとした。等量 (20 µg) のサンプルライゼートに含まれる蛋白質を、SDS-PAGE (15 % ゲル) でゲル上に分離した後に PVDF 膜に転写した。転写を行った PVDF 膜は、5 % スキムミルク含有の TBS-T 溶液で室温で1時間ブロッキングを行い、一次抗体で一晩反応させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で3回洗浄した後、HRP 標識二次抗体で室温で1時間反応させ、再度 TBS-T で3回洗浄した。ECL Plus (Thermo) で HRP 標識を受けた各蛋白質のバンドを発光させたのち、Amersham Imager 600 (Amersham) にて発光した各蛋白質のバンドをイメージ化した。イメージ化したバンド、すなわち各蛋白質の発現量もしくはリン酸化量は、ImageJ ソフトウェアを用いて定量化した。それぞれの蛋白質の発現量もしくはリン酸化量を GAPDH の発現量で標準化し、各群間で比較した。使用した一次抗体とその濃度は以下の通りである。

- anti-S100B (GeneTex, #GTX129573; 1:1000)
- anti-p-JNK (Cell Signaling, #4668; 1:1000)
- anti-GFAP (Cell Signaling Technology, #3670; 1:1000)
- anti-GAPDH (Cell Signaling, #8884; 1:1000)

2-2-9. 免疫組織染色

第3及び7病日に、各群それぞれ5匹ずつ計40匹を用いて組織切片を作成した。経心臓的に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。その後、摘出した脳を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った。以下の評価を行うため、後述する各位置で8µm厚の冠状断切片を作成した後、各々の組織染色を行った。

2-2-9-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) の評価

CV評価のためHematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。遠位部前大脳動脈 (anterior cerebral artery: ACA) と脳底動脈 (basilar artery: BA) の断面を用いて、過去の文献を参考に評価した (83, 84)。遠位部 ACA の断面は Bregma の位置で、BA の断面は Bregma から 8 mm 尾側の位置で、それぞれ冠状断切片を作成した。一体型蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス株式会社、大阪) で写真撮影し、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箇所測定し平均値を算出した。この測定・算出は2人の観察者によって行い、それらの平均値をもって血管の直径 / 血管壁厚を算出した。この比率の低下をもって CV が悪化したと評価した。

2-2-9-2. 損傷神経細胞の評価

損傷神経細胞評価のため、0.2% クレシルバイオレットを用いた Nissl 染色を行った (70)。摘出脳の Bregma から 4 mm 尾側の位置で冠状断切片を作成し、穿破側大脳皮質嗅周野 (PRh 領域) および歯状回 (DG) を BZ-X700 で写真撮影した。核凝縮や形態変化を認める神経細胞を損傷神経細胞とした。

関連領域の錐体細胞層の観察では、500×500µm 範囲内における非損傷神経細胞数及び損傷神経細胞数をそれぞれ測定した。一方、DG の顆粒細胞層の観察では、200×200µm 範囲内における非損傷神経細胞数及び損傷神経細胞数をそれぞれ測定した。2人の観察者によって測定した細胞数の平均値をもって全細胞数に占める損傷細胞の割合をそれぞれ算出した。

2-2-9-3. reactive astrogliosis の評価

Reactive astrogliosis 評価のため GFAP 染色を行った (85)。摘出脳の Bregma から 4 mm 尾側の位置で冠状断切片を作成し、抗 GFAP マウスモノクローナル抗体 (Cell Signaling, #3670; 1:50) を用いて切片を 4°C で一晩反応させた。その後、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) を二次抗体として使用し、DAB (武藤化学, 東京, 日本) を用いて発色を行った。Nissl 染色と同様に、PRh 領域の錐体細胞層を BZ-X700 で写真撮影した。

2-2-10. 統計学的解析

全ての統計学的解析は Graphpad Prism 8 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) を用いて行った。各群の死亡率の比較は Fisher's exact test を用いて行った。正規分布に従うデータの多群間比較は one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、事後の多重比較は Tukey's honestly significant difference test (HSD) 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。数値は平均値 ± 標準誤差で表記した。

2-3. 実験 1 結果

2-3-1. 血液ガス分析

第 0 及び 1 病日における血液ガス分析 (pH、PaCO₂、PaO₂) において、各群間で有意差を認めず、かつ生理的範囲内であった (表 3)。

2-3-2. SAH 発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移

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 10 分以内に最高値まで到達した後には下降、30 分かけて安定した。30 分後の ICP は、SAH - UCCAO 及び SAH + UCCAO 群で sham 及び UCCAO 群と比較して有意に高かった (全て $P < 0.0001$)。MABP は、ICP の上昇に伴い下降し、その後上昇して 30 分かけて安

定した。CPP は、ICP の上昇に伴い 10 分以内に最低値に達した後下降し、その後上昇して 30 分かけて安定した。一方、sham 群及び UCCAO 群においては ICP、MABP とともにプロリン®糸留置前後で変化は認めなかった (図 6)。

2-3-3. 死亡率

24 時間以内の死亡率は、no SAH 群 0 % (0 / 50)、SAH 群 5.7 % (3 / 53) で、両群間に有意差は認めなかった。また、sham、UCCAO、SAH-UCCAO、SAH + UCCAO 群において、第 2 から 7 病日までの死亡率は全ての群で 0 % であった。

2-3-4. 体重減少率と神経機能評価

体重減少率に関して、第 1 から 7 病日にかけて、SAH - UCCAO 及び SAH + UCCAO 群は sham 群と比較して有意に体重減少率が高かった (全て $p < 0.001$)。さらに、第 3 から 7 病日にかけて、SAH + UCCAO 群は SAH - UCCAO 群と比較して有意に体重減少率が高かった (全て $p < 0.05$) (図 7)。神経機能は、第 2、3 及び 7 病日において、SAH + UCCAO 群では SAH - UCCAO 群と比較して有意な悪化を認めた (それぞれ $p < 0.05$, < 0.05 , < 0.01) (図 8)。

2-3-5. 脳水分含有量に対する脳低灌流負荷による影響

脳水分含有量は、SAH - UCCAO 群 79.8 ± 0.1 % は sham 群 78.8 ± 0.1 % と比較して有意に増加していた ($p < 0.001$)。また、SAH + UCCAO 群 81.0 ± 0.2 % は、SAH - UCCAO 群 79.8 ± 0.1 % と比較して有意に増加していた ($p < 0.0001$) (図 9)。このことは、低死亡率 SAH に脳低灌流負荷を加えることで、脳浮腫が有意に増悪したことを示した。

2-3-6. ウェスタンブロット法を用いた発現量・リン酸化量の評価

2-3-6-1. S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する脳低灌流負荷による影響

S100B の発現量 (S100B / GAPDH) は、SAH + UCCAO 群 (1.632) では SAH - UCCAO 群 (0.651) と比較して有意に増加していた ($p < 0.0001$)。JNK のリン酸化量 (p-JNK / GAPDH) は、SAH + UCCAO 群 (5.323) では SAH - UCCAO 群 (2.226) と比較して有意に増加していた ($p < 0.001$) (図 10)。このことは、低死亡率 SAH に脳低灌流負荷を加えることで、S100B の発現及び JNK のリン酸化が有意に増悪したことを示した。

2-3-6-2. reactive astrogliosis に対する脳低灌流負荷による影響

第 3 病日における GFAP の発現量 (GFAP / GAPDH) は、SAH + UCCAO 群 (1.421) では SAH - UCCAO 群 (1.027) と比較して有意に増加していた ($p < 0.01$)。このことは、低死亡率 SAH に脳低灌流負荷を加えることで reactive astrogliosis が有意に増加したことを示した。一方、第 7 病日における GFAP の発現量は、群間における有意差は認めなかった ($p = 0.2107$) (図 11 A, B)。図 11 C は代表例の GFAP 染色画像。

2-3-7. 組織観察

2-3-7-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) に対する脳低灌流負荷による影響

遠位部 ACA に関して、第 3 病日において、SAH + UCCAO 群 8 (9、7) では、SAH - UCCAO 群 24 (23、25) と比較して有意に血管の直径 / 血管壁厚の低下、すなわち CV の増悪を認めた ($p < 0.05$)。第 7 病日には、全群間における有意差は認めなかった ($p = 0.8597$) (図 12 A, B)。一方、BA に関しては、第 3 及び 7 病日の両日ともに全群間における有意差は認めなかった ($p = 0.9372, 0.5153$) (図 12 C)。

2-3-7-2. 損傷神経細胞の割合に対する脳低灌流負荷による影響

第 7 病日において、穿破側 PRh 領域における全神経細胞における損傷神経細胞の割合は、sham 群 12 (9.2、13.6) %、UCCAO 群 20 (21.0、19.9) %、SAH - UCCAO 群 34 (34.3、33.0) %、SAH + UCCAO 群 65.4 (62.3、68.4) % であった。

SAH + UCCAO 群は、SAH – UCCAO 群と比較して損傷神経細胞の割合が有意に増加していた ($p < 0.01$) (図 13 A, C)。一方、DG における損傷神経細胞の割合は、sham 群 3.5 (3.2, 3.8) %、UCCAO 群 8.4 (8.7, 8.2) %、SAH – UCCAO 群 9.1 (8.9, 9.3) %、SAH + UCCAO 群 34.2 (34.9, 33.6) % であった。SAH + UCCAO 群は、SAH – UCCAO 群と比較して非損傷神経細胞の割合が有意に増加していた ($p < 0.01$) (図 13 B, D)。これらのことは、低死亡率 SAH に脳低灌流負荷を加えることで、穿破側 PRh 領域及び DG における損傷神経細胞の割合が有意に増加したことを示した。

第3章 実験2: SAH + UCCAO モデルを用いた H₂ ガス吸入効果の検討

実験1の結果から、SAH + UCCAO モデルに対する H₂ ガス吸入効果の検討を行った。

3-1. 実験2 方法

3-1-1. SAH + UCCAO 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; 2-2-2、2-2-3 と同様に行った。実験は、sham 群、control 群、H₂ 群の3群に分けて行い、各群が28匹ずつになるようにした。合計92匹のラットを使用した。SAH 作成中に control 群及び H₂ 群で、それぞれ1匹ずつ穿破に成功しなかったため各群から除外した。

- (1) 偽手術を行う群 (sham 群、n=28)
- (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、n=33)
- (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、n=31)

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。第2、3及び7病日においては、神経学的評価を行った後、5% イソフルランを5分間吸入させ経心臓的に灌流固定を行った。その後、脳を摘出し組織サンプルを採取した。一方、第2及び3病日における脳浮腫の評価及びウエスタンブロットのための組織サンプルは、灌流固定を行わず脳を摘出した後に採取した。第2、3及び7病日に神経学的評価を行った後、直ちに断頭による安楽死を行い、脳浮腫の評価もしくは組織サンプルの採取を行った。ウエスタンブロット法による評価は、第2病日に S100B の発現量及び JNK のリン酸化量、第3及び7病日に GFAP の発現量を、それぞれ各群5匹ずつ用いて定量化した。組織学的評価は、第3病日は各群6匹ずつを用いて HE 染色及び GFAP 染色、第7病日は各群7匹ずつ用いて HE 染色、Nissl 染色及び GFAP 染色を用いて行った (図14)。

3-1-2. 水素ガス

市販されている 1.3 % 水素 + 30 % 酸素 + 68.7 % 窒素 (H₂ガス; ジャパンファインプロダクツ, 川崎) のものを使用した。第 0 病日の SAH 作成時、麻酔導入から H₂ガス投与を開始し計 2 時間投与を行った。第 1 病日の UCCAO 処置時は、麻酔導入から H₂ガス投与を開始し計 30 分間投与を行った。両日ともに、H₂ガスの流量は 1 L/分とした。

3-1-3. 生理学的パラメーター

実験 1 と同様の方法で測定した。

3-1-4. 死亡率

実験 1 と同様の方法で測定した。

3-1-5. 体重減少率と神経機能評価

実験 1 と同様の方法で測定した。

3-1-6. 脳水分含有量測定

実験 1 と同様の方法で測定した。

3-1-7. ウェスタンブロット法

実験 1 と同様の方法で測定した。

3-1-8. 免疫組織染色

CV、非損傷神経細胞の割合、reactive astrogliosis を評価するため、実験 1 と同様の方法で、それぞれ HE 染色、Nissl 染色、GFAP 染色を行った。実験 1 の

結果から、BAにおけるCVに有意差を認めなかったため、遠位部ACAの評価のみを行った。

3-1-9. 統計学的解析

実験1と同様の方法で解析を行った。

3-2. 実験2 結果

3-2-1. 血液ガス分析

第0及び1病日における血液ガス分析 (pH、PaCO₂、PaO₂) において、各群間で有意差を認めず、かつ生理的範囲内であった (表4)。

3-2-2. SAH発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移

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。Control群及びH₂群の両群において、SAH発症後ICPは速やかに上昇し10分以内に最高値まで到達した後に下降、30分かけて安定した。両群間に有意差は認めなかった。30分後のICPはsham群と比較して、control群及びH₂群の両群で有意に高かった (ともに $P < 0.05$)。MABPはICPの上昇に伴い下降し、その後上昇して30分かけて安定した。CPPは、ICPの上昇に伴い10分以内に最低値に達した後下降し、その後上昇して30分かけて安定した。一方、sham群においてはICP、MABPともにプロリン®糸留置前後で変化は認めなかった (図15)。

3-2-3. 死亡率

24時間以内の死亡率は、sham群0% (0/28)、control群6.3% (2/32)、H₂群3.3% (1/30) で、control群とH₂群の間に有意差は認めなかった。Control群において、第1病日の神経機能スコアが3点以上14点以下のラットは2匹であり、そのうちの1匹は第2病日までに死亡し、残り1匹は第7病日まで生存した。また、H₂群において、第1病日の神経機能スコアが3点以上14点以下の

ラットは1匹であり、その1匹は第7病日まで生存した。Control群及びH₂群において、UCCAO処置後の第7病日までの死亡率はともに0%であったため、第7病日までの死亡率は、sham群0%(0/28)、control群9.4%(3/32)、H₂群3.3%(1/30)で、control群とH₂群の間に有意差は認めなかった。

3-2-4. 体重減少率と神経機能評価

体重減少率に関して、第1、2、3及び7病日において、control及びH₂群ではsham群と比較して有意に体重減少率は高かった(全て $p < 0.05$)。さらに、第3及び7病日において、H₂群はcontrol群と比較して有意に体重減少率は低かった($p < 0.01, < 0.001$)(図16)。神経機能スコアは、第3及び7病日において、H₂群はcontrol群と比較して有意な改善を認めた($p < 0.01, < 0.01$)(図17)。

3-2-5. 脳水分含有量に対する水素ガス吸入効果

脳水分含有量は、H₂群 $79.7 \pm 0.1\%$ ではcontrol群 $81.4 \pm 0.3\%$ と比較して有意に減少していた($p < 0.0001$)。すなわち、H₂群ではcontrol群と比較して有意に脳浮腫の改善を認めた。(図18)。

3-2-6. ウェスタンブロット法を用いた発現量・リン酸化量の評価

3-2-6-1. S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する水素ガス吸入効果

S100Bの発現量(S100B/GAPDH)は、H₂群(0.325)ではcontrol群(1.318)と比較して有意に抑制されていた($p < 0.01$)。JNKのリン酸化量(p-JNK/GAPDH)は、H₂群(2.733)ではcontrol群(6.258)と比較して有意に抑制されていた($p < 0.001$)(図19)。このことは、H₂ガス吸入によりS100Bの発現及びJNKのリン酸化が有意に抑制されたことを示した。

3-2-6-2. reactive astrogliosis に対する水素ガス吸入効果

第3病日におけるGFAPの発現量(GFAP/GAPDH)は、H₂群(0.692)ではcontrol群(1.437)と比較して有意に抑制されていた($p < 0.01$)。このことは、

H₂ガス吸入により reactive astrogliosis が有意に改善したことを示した。一方で、第7病日における GFAP の発現量は、群間における有意差は認めなかった ($p = 0.0594$) (図 20 A, B)。図 20 C は代表例の GFAP 染色画像。

3-2-7. 組織観察

3-2-7-1. 遅発性脳血管攣縮 (CV) に対する水素ガス吸入効果

第3病日において、control 群 9 (8、9) と H₂群 8 (9、7) の両群ともに sham 群 32 (33、31) と比較して有意に遠位部 ACA の 血管の直径 / 血管壁厚の低下、すなわち CV の増悪を認めた ($p < 0.0001, < 0.0001$)。Control 群と H₂群の間には有意差は認めなかった ($p = 0.9715$)。第7病日には、全群間における有意差は認めなかった (図 21)。

3-2-7-2. 損傷神経細胞の割合に対する水素ガス吸入効果

第7病日において、穿破側 PRh 領域における全神経細胞における損傷神経細胞の割合は、sham 群 10.3 (8.2、11.6) %、control 群 57.2 (51.2、59.3) %、H₂群 29.6 (24.9、30.9) % であった。H₂群は、control 群と比較して損傷神経細胞の割合が有意に低下していた ($p < 0.001$) (図 22 A, C)。DG における損傷神経細胞の割合は、sham 群 4.1 (3.5、4.7) %、control 群 30.7 (31.0、30.5) %、H₂群 10.3 (10.4、10.3) % であった。H₂群は、control 群と比較して損傷神経細胞の割合が有意に低下していた ($p < 0.05$) (図 22 B, D)。これらのことは、H₂ガス吸入により、穿破側 PRh 領域及び DG における損傷神経細胞の割合が有意に減少したことを示した。

第4章 考察

4-1. 実験1の考察

4-1-1. 低死亡率 SAH モデル

SAH 発症後の ICP ピーク値が、その重症度と死亡率に相関することは既に知られている (78, 79)。既存の SAH モデルは死亡率が高いため、DBI の病態解明や治療方法の研究には適していない。そのため、今回、死亡率の低い SAH モデルを作製する必要がある。まず、6-0 プロリーン®糸を使用して ICP ピーク値の低い低死亡率 SAH モデルを作製した。このモデルにおける ICP ピーク値は 33 ± 15 mmHg であった。Hollig らの報告によると、3-0 ポリプロピレン糸を使用した場合の ICP ピーク値は 94 ± 23 mmHg、tangsten wire モデルの場合は 68 ± 19 mmHg であった (66)。また、3-0 ポリプロピレン糸を使用した場合の死亡率は SAH 発症後 24 時間以内で約 50%、7 日までで 50% 以上であるとされている (57, 66)。中等症 SAH モデルである tangsten wire モデルでさえ、SAH 発症後 24 時間以内の死亡率は 19% と報告されている。一方、我々が作成した低死亡率 SAH モデルの場合、SAH 発症後 24 時間以内の死亡率は 5.4% (3/56 ラット) と低値であった。

4-1-2. SAH + UCCAO モデル

近年 SAH に伴う頭蓋内圧亢進とそれに引き続く SAH 後急性期脳低灌流が EBI の病態悪化の一因であることが報告されており、この時期の脳低灌流は CV および DBI の増悪因子でもある (10, 11)。ラットに UCCAO を加えると、致命的とはならない軽度の同側脳低灌流が起こることは既に知られている (86, 87)。そこで、SAH 後急性期脳低灌流を再現するため、SAH 24 時間後に UCCAO を穿破側に加えた SAH + UCCAO モデルを作製することとした。この際、吸入麻酔下での追加処置を行うにあたり、麻酔による呼吸などへの影響を鑑み神経機能スコアが 14 点以下の中等症および重症 SAH ラットは除外した。SAH + UCCAO モデルの第 7 病日までの死亡率は 0% と低値であった。

近年、SAH 発症 72 時間以内に起こる EBI が、SAH 後の予後に大きく関与する DBI の増悪因子の一つとして注目されている (6, 12)。EBI の主病態は脳浮腫

であり、SAH 後に S100B、活性型 JNK (p-JNK)、reactive astrogliosis が増加・亢進することで脳浮腫の増悪をきたすことが知られている (15, 19, 33)。また、SAH 後早期の脳低灌流が DBI 及び CV を増悪させることも知られている (10, 11)。SAH + UCCAO モデルにおいても同様の結果を示した。すなわち、SAH 後早期に脳低灌流負荷が加わることで、穿破側大脳皮質の S100B 発現量及び JNK リン酸化量がより亢進し、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 (図 23)。

SAH 後の体重減少率と神経学的スコアが相関することは既に報告されており (62)、本実験においても同様の結果を示した。このことから、SAH + UCCAO モデルが低死亡率 SAH モデルより神経学的に重症度の高いモデルであることが示唆された。

今回の結果は、reactive astrogliosis に伴う GFAP の発現量は脳損傷後第 3 病日にピークに達し、第 7 病日までにベースラインまで改善するという過去の報告と矛盾しなかった (37, 64)。さらに、穿破側 PRh 領域および DG における神経細胞死は、SAH の重症度に相関することが知られており、本研究においても同様の結果を得た (64, 66, 88)。大脳皮質 PRh 領域と DG はともに記憶に関与しているため、同部位の障害は SAH 後の認知機能障害に関連している可能性があり、今後検討に値すると考える (88–90)。

遠位部 ACA における CV に関して、第 3 病日に SAH + UCCAO モデルで有意に悪化し、第 7 病日には有意差は認めなかった。一方、BA の CV は、第 3 及び 7 病日で有意差は認めなかった。BA に有意な CV を認めなかった理由として、既に報告されているように SAH 発症後の血腫の局在と血腫量によると考えられた (57)。また、EVP モデルにおいて、7 日目までに CV が改善することを報告した研究は狩猟し得た範囲では一件のみであり、CV の病態解明に有用なモデルである可能性がある (57)。

以上のことより、SAH + UCCAO モデルは、blood injection モデルと比較してヒト SAH に近い病態を再現することのできる EVP モデルを用いており、ヒト SAH の病態に酷似したモデルと考える。さらに、通常の EVP モデルは、死亡

率が高いため DBI の観察が容易ではないが、SAH + UCCAO モデルでは、低い死亡率で EBI、CV 及び DBI を観察することが可能である。

4-2. 実験 2 の考察

4-2-1. SAH + UCCAO モデルにおける水素ガス吸入効果

本実験は、先の実験 1 で作成した SAH + UCCAO モデルを用いて、H₂ ガス吸入効果について検討した。

H₂ ガス吸入群では、第 2 病日以降の神経機能が改善し、第 2 病日の脳浮腫の改善、第 7 病日の非損傷神経細胞の割合の増加を認めたことから、H₂ ガス吸入により EBI 及び DBI がともに改善したことが示された (図 24)。

EBI において、ROS / RNS や S100B、活性型 JNK (p-JNK) などが重要な役割を担っており、脳浮腫の増悪に関与していることが知られている (15, 19, 33)。脳損傷後、アストロサイトから S100B 分泌が亢進することで、アストロサイト、ミクログリア、神経細胞内の ROS / RNS が増加する。増加した ROS / RNS により、神経細胞内の JNK リン酸化亢進が惹起され、アポトーシスが誘導される。一方、アストロサイトは S100B の産生亢進により reactive astrocyte へ、ミクログリアは JNK リン酸化亢進により活動性ミクログリアへと変化する (22–24)。ROS / RNS を抑制することで、SAH 後の転帰が改善することは多くの研究で示されている (76, 77)。このため、EBI の評価に S100B、JNK 及び reactive astrogliosis を用い、H₂ ガス投与によりそれら全てが抑制されていた。

H₂ は、強い抗酸化作用と速い組織移行性を有し、生体における安全性が高いことも証明されている (59–61)。H₂ の強力な抗酸化作用は、ROS / RNS の中でも傷害性の強い・OH と ONOO⁻ の酸化作用を選択的に阻害することで発揮される (67, 91)。ラットを用いた脊髄損傷モデルや心肺蘇生モデル、アルツハイマーモデルなどにおいて、H₂ が ROS / RNS の産生を抑えることで、S100B の発現、JNK リン酸化、reactive astrogliosis を抑制し、神経細胞損傷を改善させたとの報告がある (92–94)。2012 年に Zhan らは、EVP モデルにおいて H₂ ガス吸入が ROS / RNS を抑制することにより EBI を抑制することを初めて報告した (77)。しかし、その機序は不明であった。本研究では、H₂ ガス吸入によって、

S100B 発現、JNK リン酸化、さらには reactive astrogliosis が抑制されることによって EBI が改善した (図 24)。さらに、EBI が抑制されたことで、CV の改善効果を介することなく、DBI 及び予後が改善した (図 25)。この結果は、EVP モデルにおける H₂ ガス吸入効果の機序を示した初めての報告である。

本研究において、神経機能は H₂ ガス吸入により第 2 病日以降に有意に改善した。一方、Zhan らの報告では、H₂ ガス吸入により、神経機能は第 1 病日には有意に改善したものの、第 3 病日では有意な改善は認めなかった。これら 2 研究間の結果の相違の主な原因として、実験モデルと H₂ ガス投与時期の違いが挙げられる。本研究では、EBI 及び DBI の観察に適した SAH + UCCAO モデルを使用した。一方、Zhan らの研究では、一般的な死亡率の高い EVP モデルを使用しており、DBI の観察には適していなかった可能性がある。次に、H₂ ガス投与時期について、Zhan らの研究では SAH 発症 1 時間後 2 時間のみであるのに対し、本研究では第 0 病日の SAH 発症前から 2 時間のみならず第 2 病日にも 30 分間行った。投与回数及び投与時期による影が大きいと考える。特に、SAH 発症前投与による影響も否定はできない。実際、H₂ の疾患発症前投与の有効性については、脳虚血再灌流障害や横紋筋融解症誘発性急性腎障害のラットモデルにおいて既に報告されている (95–97)。実臨床において、本研究のごとく SAH 発症前から H₂ ガス吸入を行うことは難しいものの、特殊な治療例、例えば未破裂脳動脈瘤に対する手術の際に、術前および術中に H₂ ガス投与を行い、仮に SAH が起きたとしても、それに伴う脳損傷を抑えることができる可能性は、本研究を通して示唆された。H₂ ガス治療を臨床応用するためには、SAH 発症後 H₂ ガス投与開始の time window を検索していく必要があり、今後の課題としたい。

以上のことより、本研究を通して、H₂ ガスの EBI 抑制効果により、DBI を改善することが示された。さらに、H₂ ガスが CV を改善することなしに DBI を改善することが示されたことで、EBI が SAH 後の予後を規定する重大な因子であることが確かめられた。

4-2-2. 水素の可能性

臨床の場合において、EBI 及び DBI を軽減させる治療薬は未だ存在しない。本研究結果より、H₂ による治療効果は期待できると考える。さらに、H₂ 自体は生体に対して無害であり投与方法も様々であるため、臨床応用しやすいと考える。

また、H₂ の作用として ROS / RNS を消去する化学的な作用だけでなく、酸化傷害による細胞死を抑制することが報告されている (98)。そのため、SAH 発症後 72 時間以内と言われる EBI の出現時期や ROS / RNS の生成期を過ぎても、長期的な H₂ の投与が良好な効果を発揮する可能性もある。

さらに、本研究において H₂ ガス吸入による CV の有意な改善は認めなかった。これは、SAH 後血管外に漏出したヘモグロビンは ROS / RNS を持続的に生成しているにもかかわらず、H₂ ガス投与が CV 発生時には既に終了していることに起因する可能性がある (74, 99)。JNK リン酸化軽減により CV が改善することが報告されており (100)、SAH 後に H₂ ガスを長期間使用すれば CV が軽減する可能性がある。今後、CV 抑制効果も含めた H₂ ガス投与時期の更なる検討が必要と思われる。

4-3. 今後の課題と展望

本研究では、ウェスタンブロットでの各サンプル毎の phospho-JNK のバンドの定量結果を正確なものとするため、同ブロットで用いた PVDF メンブレンに対する抗 GAPDH 抗体でのリプローブで得られたバンドの定量値にて補正を行った。しかし、理想的には抗 total JNK 抗体でのリプローブで得られたバンドの定量値で補正を行うべきであったと考える。

Reactive astrogliosis は、傷害的作用のみならず炎症の限局化や組織修復などの神経保護に働く作用も有しているため、SAH 後の reactive astrogliosis に関して、さらなる解明が必要と考える (37, 101)。Reactive astrogliosis の程度が、単に SAH の重症度を反映しているだけなのか、もしくは SAH 後の予後に直接影響を及ぼすのかは未だ明らかになっておらず、更なる検討が必要である。また、H₂ が直接 reactive astrogliosis を抑制したのか、それとも間接的に reactive

astrogliosis が抑制されたのかは不明であるため、H₂ の作用機序の解明も必要と考える。

H₂ ガス治療に関して、治療の至適な開始時期や継続期間について今後も検討する必要がある。特に、本研究においては H₂ ガス治療を SAH 発症前から行ったが、実臨床への応用を考え、SAH 発症後からの投与による効果を今後検討したい。

第5章 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、DBI 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ことが再確認された
- 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。

謝辞

本研究にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました総合東京病院脳神経外科 森健太郎先生、防衛医科大学校抗加齢血管内科学講座教授 池脇克則先生、ならびに防衛医科大学校脳神経外科学講座臨床教育教授 和田孝次郎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(5):761-6.
2. Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*. 2006 Jan 26;354(4):387-96.
3. Broessner G, Lackner P, Hoefler C, Beer R, Helbok R, Grabmer C, et al. Influence of red blood cell transfusion on mortality and long-term functional outcome in 292 patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*. 2009 Jun;37(6):1886-92.
4. Shirao S, Yoneda H, Kunitsugu I, Ishihara H, Koizumi H, Suehiro E, et al. Preoperative prediction of outcome in 283 poor-grade patients with subarachnoid hemorrhage: a project of the Chugoku-Shikoku Division of the Japan Neurosurgical Society. *Cerebrovascular Diseases*. 2010;30(2):105-13.
5. Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdevicks EF, Muizelaar JP, et al. 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(10):2391-5.
6. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol*. 2011 Feb;43(1):27-40.
7. Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke*. 2008 Jul;39(7):2114-21.
8. Ohkuma H, Itoh K, Shibata S, Suzuki S. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery*. 1997;41(1):230-6.
9. Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, Fiss I, Sandow N, Major S, et al. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after

- subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012;32(2):203-12.
10. Malinova V, Dolatowski K, Schramm P, Moerer O, Rohde V, Mielke D. Early whole-brain CT perfusion for detection of patients at risk for delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. 2016;125(1):128.
 11. Sanelli PC, Jou A, Gold R, Reichman M, Greenberg E, John M, et al. Using CT perfusion during the early baseline period in aneurysmal subarachnoid hemorrhage to assess for development of vasospasm. *Neuroradiology*. 2011;53(6):425-34.
 12. Sherchan P, Lekic T, Suzuki H, Hasegawa Y, Rolland W, Duris K, et al. Minocycline improves functional outcomes, memory deficits, and histopathology after endovascular perforation-induced subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurotrauma*. 2011 Dec;28(12):2503-12.
 13. Ostrowski RP, Colohan A, Zhang JH. Molecular Mechanisms for Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Acute Ischemic Injury and Repair in the Nervous System*. 2007:235-53.
 14. Cahill WJ, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2006;26(11):1341-53.
 15. 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 May 15;85(7):1436-48.
 16. Satoh M, Date I, Ohmoto T, Perkins E, Parent A. The expression and activation of matrix metalloproteinase-1 after subarachnoid haemorrhage in rats. *Acta neurochirurgica*. 2005;147(2):187-93.
 17. 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(12):1993-2000.

18. Sherchan P, Lekic T, Suzuki H, Hasegawa Y, Rolland W, Duris K, et al. Minocycline improves functional outcomes, memory deficits, and histopathology after endovascular perforation-induced subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of neurotrauma*. 2011;28(12):2503-12.
19. Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Aug;24(8):916-25.
20. Cocchia D. Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res*. 1981;214(3):529-40.
21. Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D, et al. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res*. 2002;940(1-2):102-4.
22. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. 2009;6(22):7.
23. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative neurology and neuroscience*. 2003;21(3, 4):97-108.
24. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, et al. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci*. 2008;28(43):10928-36.
25. Villarreal A, Seoane R, González Torres A, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, et al. S100B protein activates a RAGE - dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *Journal of neurochemistry*. 2014;131(2):190-205.
26. Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184(1-2):214-22.

27. Fulle S, Pietrangelo T, Mariggio MA, Lorenzon P, Racanicchi L, Mozrzymas J, et al. Calcium and fos involvement in brain-derived Ca²⁺-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Experimental physiology*. 2000;85(3):243-53.
28. Kawamura Y, Yamada K, Masago A, Katano H, Matsumoto T, Mase M. Hypothermia modulates induction of hsp70 and c-jun mRNA in the rat brain after subarachnoid hemorrhage. *J Neurotrauma*. 2000 Mar;17(3):243-50.
29. Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 β production. *Neurobiology of aging*. 2004;25(4):431-9.
30. Liu L, Li Y, Van Eldik LJ, Griffin WST, Barger SW. S100B - induced microglial and neuronal IL - 1 expression is mediated by cell type - specific transcription factors. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(3):546-53.
31. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(8):626.
32. Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci*. 2008 Mar 5;28(10):2394-408.
33. Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):494-506.
34. Nylén K, Csajbok LZ, Ost M, Rashid A, Blennow K, Nellgård B, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2007;38(5):1489-94.
35. Petzold A, Keir G, Lim D, Smith M, Thompson E. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: release and wash-out pattern. *Brain research bulletin*. 2003;61(3):281-5.
36. Sanchez-Peña P, Pereira A-R, Sourour N-A, Biondi A, Lejean L, Colonne C, et al. S100B as an additional prognostic marker in subarachnoid aneurysmal hemorrhage. *Critical care medicine*. 2008;36(8):2267-73.

37. Murakami K, Koide M, Dumont TM, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Subarachnoid Hemorrhage Induces Gliosis and Increased Expression of the Pro-inflammatory Cytokine High Mobility Group Box 1 Protein. *Transl Stroke Res*. 2011 Mar 1;2(1):72-9.
38. Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y, Tateishi N. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*. 2005 Apr 1;4(2):127-42.
39. Wang L-W, Tu Y-F, Huang C-C, Ho C-J. JNK signaling is the shared pathway linking neuroinflammation, blood–brain barrier disruption, and oligodendroglial apoptosis in the white matter injury of the immature brain. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9(1):175.
40. Setsukinai K-i, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):3170-5.
41. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1865-79.
42. Cheng G, Wei L, Zhi-dan S, Shi-guang Z, Xiang-zhen L. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway. *BMC neuroscience*. 2009;10(1):7.
43. Yang S, Chen X, Li S, Sun B, Hang C. Melatonin Treatment Regulates SIRT3 Expression in Early Brain Injury (EBI) Due to Reactive Oxygen Species (ROS) in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage (SAH). *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:3804.
44. Gaetani P, Lombardi D. Brain damage following subarachnoid hemorrhage: the imbalance between anti-oxidant systems and lipid peroxidative processes. *Journal of neurosurgical sciences*. 1992;36(1):1-10.

45. Marzatico F, Gaetani P, Cafe' C, Spanu G, Baena RR. Antioxidant enzymatic activities after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta neurologica scandinavica*. 1993;87(1):62-6.
46. Wilkins RH. Attempted prevention or treatment of intracranial arterial spasm: a survey. *Neurosurgery*. 1980;6(2):198-210.
47. Weir B, Grace M, Hansen J, Rothberg C. Time course of vasospasm in man. *Journal of neurosurgery*. 1978;48(2):173-8.
48. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological reviews*. 1996;76(4):967-1003.
49. Matsui T, Asano T. Protein kinase C and vasospasm. *Journal of neurosurgery*. 1996;85(6):1197-8.
50. Fuwa I, Mayberg M, Gadjusek C, Harada T, Luo Z. Enhanced secretion of endothelin by endothelial cells in response to hemoglobin. *Neurologia medico-chirurgica*. 1993;33(11):739-43.
51. Ishiguro M, Morielli AD, Zvarova K, Tranmer BI, Penar PL, Wellman GC. Oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent K⁺ channels in cerebral arteries by enhanced tyrosine kinase activity. *Circulation research*. 2006;99(11):1252-60.
52. Rubanyi GM. Endothelium - derived relaxing and contracting factors. *Journal of cellular biochemistry*. 1991;46(1):27-36.
53. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, et al. 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(11):3015-21.
54. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, et al. 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). *The Lancet Neurology*. 2011;10(7):618-25.

55. 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. *Neurocritical care*. 2012;16(3):368-75.
56. Dudhani RV, Kyle M, Dedeo C, Riordan M, Deshaies EM. A low mortality rat model to assess delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(71):e4157-e.
57. 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 Dec;283(6):H2551-9.
58. 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 Jun;26(6):1086-91; discussion 91-2.
59. Solomon 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(1):58-64.
60. Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, Dettmann E, Zimmermann M, Raabe A, et al. 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(6):1190-7.
61. Lee JY, Sagher O, Keep R, Hua Y, Xi G. Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009 Aug;65(2):331-43; discussion 43.
62. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Shang X, Chen G, et al. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci*. 2009 Aug 25;10:103.
63. Cahill J, Calvert JW, Solaroglu I, Zhang JH. Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2006 Jul;37(7):1868-74.

64. 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(6):1046-54.
65. Kooijman E, Nijboer CH, van Velthoven CT, Mol W, Dijkhuizen RM, Kesecioglu J, Heijnen CJ. Long-term functional consequences and ongoing cerebral inflammation after subarachnoid hemorrhage in the rat. *PloS one.* 2014 Mar 6;9(3):e90584.
66. Hollig A, Weinandy A, Nolte K, Clusmann H, Rossaint R, Coburn M. Experimental subarachnoid hemorrhage in rats: comparison of two endovascular perforation techniques with respect to success rate, confounding pathologies and early hippocampal tissue lesion pattern. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123398.
67. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature medicine.* 2007;13(6):688.
68. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia–reperfusion injury. *Biochemical and biophysical research communications.* 2008;373(1):30-5.
69. Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Maekawa Y, et al. H₂ gas improves functional outcome after cardiac arrest to an extent comparable to therapeutic hypothermia in a rat model. *Journal of the American Heart Association.* 2012;1(5):e003459.
70. Nagatani K, Wada K, Takeuchi S, Kobayashi H, Uozumi Y, Otani N, et al. Effect of hydrogen gas on the survival rate of mice following global cerebral ischemia. *Shock.* 2012;37(6):645-52.
71. Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Sakamoto M, Kudo Y, Nakazawa J, et al. Hydrogen (H₂) treatment for acute erythematous skin diseases. A report of 4 patients with safety data and a non-controlled feasibility study with H₂ concentration measurement on two volunteers. *Medical gas research.* 2012;2(1):14.

72. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;377(4):1195-8.
73. 戸村哲, 藤井和也, 上野英明, 富山新太, 大谷直樹, 長田秀夫, et al. 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. *防衛医科大学校雑誌*. 2014;39(2):96-102.
74. Liu C, Kurokawa R, Fujino M, Hirano S, Sato B, Li X-K. Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes. *Scientific reports*. 2014;4:5485.
75. Shao A, Wu H, Hong Y, Tu S, Sun X, Wu Q, et al. 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. *Molecular neurobiology*. 2016;53(5):3462-76.
76. Hong Y, Shao A, Wang J, Chen S, Wu H, McBride DW, et al. 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;9(4):e96212.
77. 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. *Critical care medicine*. 2012;40(4):1291.
78. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL, 3rd, et al. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42(2):352-60.
79. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K. Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurosurg*. 2009;110(5):996-1002.

80. 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 Apr;26(4):627-34; discussion 35.
81. Topkoru BC, Altay O, Duris K, Krafft PR, Yan J, Zhang JH. Nasal administration of recombinant osteopontin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(11):3189-94.
82. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, et al. Flotillin-1 Regulates Oncogenic Signaling in Neuroblastoma Cells by Regulating ALK Membrane Association 2014.
83. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Macdonald R. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Neuroscience*. 2010;169(4):1805-14.
84. Kamii H, Tominaga T. Filament perforation subarachnoid hemorrhage: Mouse model. *Animal Models of Acute Neurological Injuries*: Springer; 2009. p. 279-86.
85. Xu H, Tan G, Zhang S, Zhu H, Liu F, Huang C, et al. Minocycline reduces reactive gliosis in the rat model of hydrocephalus. *BMC Neuroscience*. [journal article]. 2012 December 05;13(1):148.
86. Thong-asa W, Thornmart K, Srimongkol C, Somredngan S, Lisanguanngam H, Tilokskulchai K. Early Onset Effects of Mild Chronic Cerebral Hypoperfusion on The Dorsal Hippocampus and White Matter Areas: The Use of Male Sprague-Dawley Rats as a UCO Model 2015.
87. De Ley G, Nshimyumuremyi JB, Leusen I. Hemispheric blood flow in the rat after unilateral common carotid occlusion: evolution with time. *Stroke*. 1985 Jan-Feb;16(1):69-73.
88. Wada K, Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Fukasawa M, Araki Y, et al. Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at Ser1412 in the dentate gyrus of the rat brain. *Nitric Oxide*. 2018 2018/12/01/;81:67-74.
89. Witter MP. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007;163:43-61.

90. Lima RH, Rossato JI, Furini CR, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;91(4):466-72.
91. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2004 Jan;58(1):39-46.
92. Liu FT, Xu SM, Xiang ZH, Li XN, Li J, Yuan HB, et al. Molecular hydrogen suppresses reactive astrogliosis related to oxidative injury during spinal cord injury in rats. *CNS Neurosci Ther.* 2014 Aug;20(8):778-86.
93. Huo TT, Zeng Y, Liu XN, Sun L, Han HZ, Chen HG, et al. Hydrogen-rich saline improves survival and neurological outcome after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats. *Anesth Analg.* 2014 Aug;119(2):368-80.
94. Wang C, Li J, Liu Q, Yang R, Zhang JH, Cao YP, et al. Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-kappaB activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2011 Mar 17;491(2):127-32.
95. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007 Jun;13(6):688-94.
96. Gu H, Yang M, Zhao X, Zhao B, Sun X, Gao X. Pretreatment with hydrogen-rich saline reduces the damage caused by glycerol-induced rhabdomyolysis and acute kidney injury in rats. *J Surg Res.* 2014 May 1;188(1):243-9.
97. Kawasaki H, Guan J, Tamama K. Hydrogen gas treatment prolongs replicative lifespan of bone marrow multipotential stromal cells in vitro while preserving differentiation and paracrine potentials. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010;397(3):608-13.
98. Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, et al. Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain

reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Scientific reports*. 2016;6:18971.

99. Macdonald RL, Weir BK. Cerebral vasospasm and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(5):633-43.
100. Yatsushige H, Yamaguchi M, Zhou C, Calvert JW, Zhang JH. Role of c-Jun N-terminal kinase in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2005;36(7):1538-43.
101. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005 Jun;50(4):427-34.

	第0病日	第1病日	第2病日	第3病日	第4病日	第5病日	第6病日	第7病日	
体重測定	○	○	○	○	○	○	○	○	-
神経学的評価	-	○	○	○	-	-	-	○	-
Brain water content	-	-	○	-	-	-	-	-	EBI
S100B発現量 JNKリン酸化量	-	-	○	-	-	-	-	-	
GFAP発現量	-	-		○	-	-	-	○	
GFAP染色	-	-	-	○	-	-	-	○	
HE染色	-	-	-	○	-	-	-	○	CV
Nissl染色	-	-	-	-	-	-	-	○	DBI

表 1: 評価項目

体重測定を連日行った。Early brain injury (EBI) の程度は、第 2 病日における神経機能、脳浮腫の程度、穿破側大脳皮質における S100B の発現量及び 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。Cerebral vasospasm (CV) の程度は、第 3 及び 7 病日における遠位部 anterior cerebral artery (ACA) 及び basilar artery (BA) を用いて組織学的に評価した。Delayed brain injury (DBI) の程度は、第 7 病日における神経機能評価、穿破側 PRh 領域及び歯状回 (DG) における損傷神経細胞の割合を用いて評価した。

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 (80)

6 項目について評価し、点数の合計を神経機能スコアとした (3 ~ 18 点)。

	Sham 群 (n=25)	UCCAO 群 (n=25)	SAH - UCCAO 群 (n=25)	SAH + UCCAO 群 (n=25)
第 0 病日				
Body weight, g	350.5 ± 24.1	353.8 ± 28.6	351.7 ± 30.5	359.2 ± 24.9
Arterial blood gas				
pH	7.431 ± 0.003	7.436 ± 0.004	7.437 ± 0.006	7.428 ± 0.005
PaCO ₂ , mmHg	36.2 ± 0.3	35.7 ± 0.4	35.6 ± 0.4	36.1 ± 0.3
PaO ₂ , mmHg	150 ± 1.2	151 ± 1.4	153 ± 1.6	151 ± 1.4
MABP, mmHg				
Baseline	113 ± 2.0	113 ± 2.1	116 ± 1.5	113 ± 1.8
30 min	100 ± 2.4	98 ± 1.9	96 ± 3.0	99 ± 3.1
第 1 病日				
Arterial blood gas				
pH	7.412 ± 0.005	7.423 ± 0.005	7.416 ± 0.005	7.406 ± 0.004
PaCO ₂ , mmHg	41.0 ± 0.5	40.4 ± 0.6	40.2 ± 0.7	41.5 ± 0.5
PaO ₂ , mmHg	138 ± 1.4	141 ± 1.8	138 ± 1.8	144 ± 1.3
MABP, mmHg				
Baseline	107 ± 2.0	108 ± 1.7	106 ± 1.9	109 ± 1.6
3 min	101 ± 1.9	107 ± 1.7	102 ± 1.8	106 ± 1.8

表 3: 実験 1 の生理学的パラメーター

SAH 発症前 (第 0 病日) および一側総頸動脈結紮 (unilateral common carotid artery occlusion, UCCAO) 前 (第 1 病日) における各パラメーターは、各群間でそれぞれ有意差を認めなかった。データは平均値 ± 標準誤差で表示。

	Sham 群	Control 群	H ₂ 群
第 0 病日			
Body weight, g	354.5 ± 4.8	347.1 ± 5.3	350.0 ± 4.4
Arterial blood gas			
pH	7.434 ± 0.003	7.416 ± 0.00	7.430 ± 0.004
PaCO ₂ , mmHg	36.0 ± 0.3	37.1 ± 0.2	36.6 ± 0.3
PaO ₂ , mmHg	149 ± 1.2	150 ± 1.2	148 ± 1.1
MABP, mmHg			
0 min	113 ± 1.6	111 ± 1.6	115 ± 1.6
30 min	99 ± 1.9	96 ± 2.6	97 ± 1.8
第 1 病日			
Arterial blood gas			
pH	7.416 ± 0.005	7.412 ± 0.006	7.427 ± 0.003
PaCO ₂ , mmHg	41.6 ± 0.5	41.7 ± 0.5	39.9 ± 0.4
PaO ₂ , mmHg	138 ± 1.7	142 ± 1.4	140 ± 1.4
MABP, mmHg			
0 min	106 ± 1.8	107 ± 2.1	108 ± 2.6
3 min	101 ± 1.7	108 ± 1.9	104 ± 2.4

表 4: 実験 2 の生理学的パラメーター

SAH 発症前 (第 0 病日) および一側総頸動脈結紮 (unilateral common carotid artery occlusion, UCCAO) 前 (第 1 病日) における各パラメーターは、各群間でそれぞれ有意差を認めなかった。データは平均値 ± 標準誤差で表示。データは平均値 ± 標準誤差で表示。第 0 病日は sham: n = 27、control: n = 32、H₂: n = 30。第 1 病日は各群 n = 28。

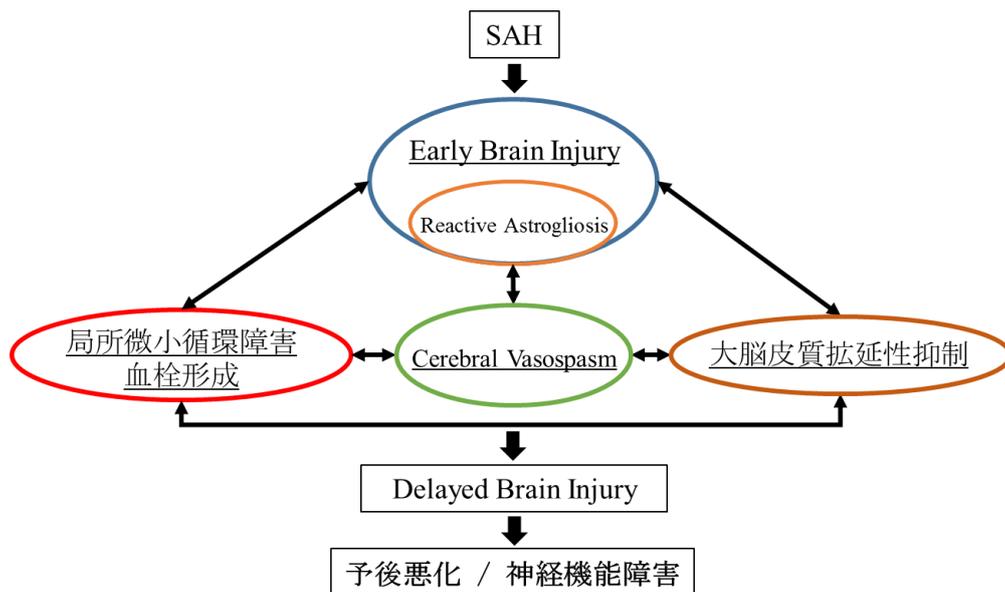


図 1: SAH 後の病態

SAH 発症後 72 時間以内に early brain injury (EBI)、発症数日～2 週間後に delayed brain injury (DBI) が起こり、DBI が SAH の予後に重大な影響を与えると考えられている。また、DBI の発生には、EBI、局所微小循環障害や血栓形成、大脳皮質拡張性抑制、遅発性脳血管攣縮などが複合的に関与していると考えられている。特に、EBI は DBI の増悪因子として近年最も注目を集めている。

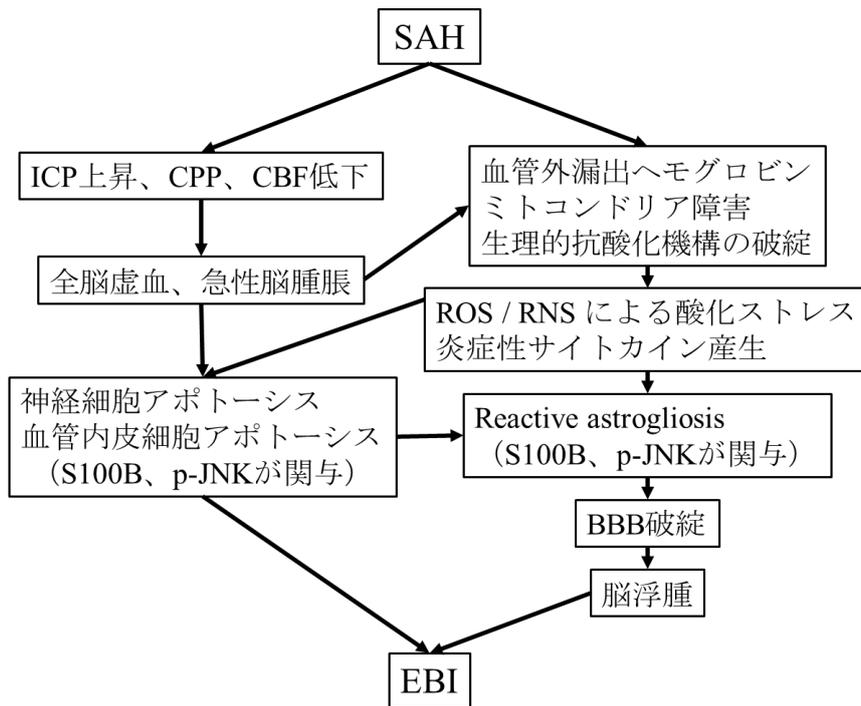


図 2: early brain injury (EBI) の病態

SAH 発症直後に、intracranial pressure (ICP) 上昇、cerebral perfusion pressure (CPP) および cerebral blood flow (CBF) 低下により一過性全脳虚血、急性脳腫脹が引き起こされる。さらに、各種炎症性サイトカインや活性酸素種と活性窒素種 (ROS / RNS) による酸化ストレス傷害により、神経細胞アポトーシスや blood brain barrier (BBB) 破綻、脳浮腫がもたらされる。

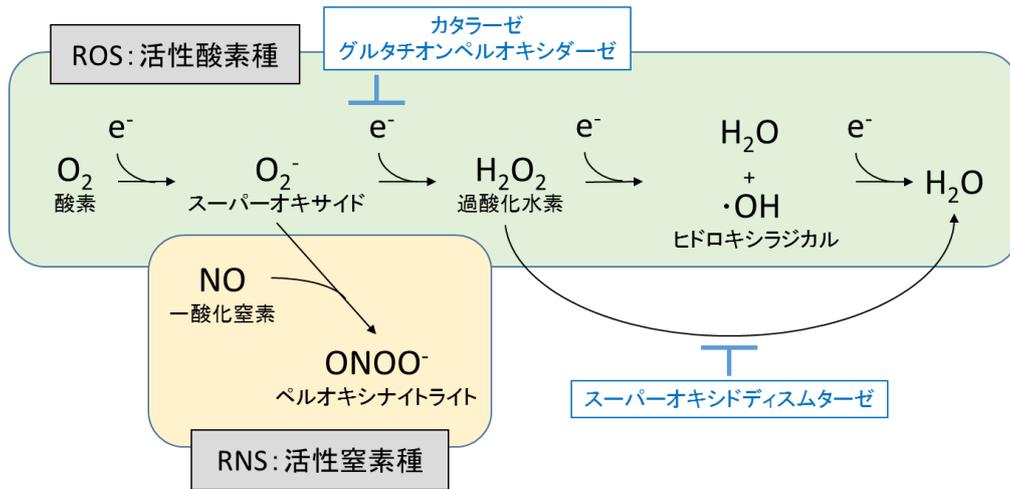


図 3: 活性酸素種および活性窒素種

酸素は計 4 つの電子を受け取り水分子となる。その過程で、 $\cdot O_2^-$ (スーパーオキサイド)、過酸化水素 (H_2O_2)、 $\cdot OH$ (ヒドロキシラジカル)、 $ONOO^-$ (ペルオキシナイトライト) などの活性酸素種および活性窒素種 (ROS / RNS) が生成される。ROS / RNS の中でも、特に $\cdot OH$ と $ONOO^-$ は細胞傷害性が強い。

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、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。

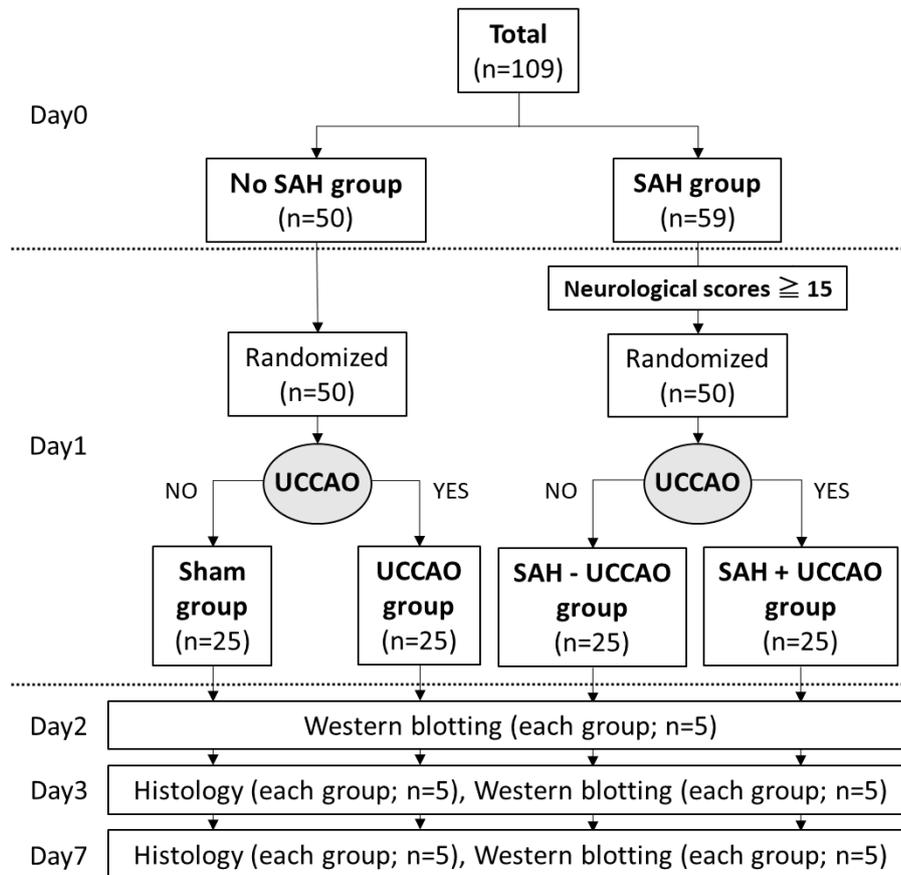


図 4: 実験動物の振り分けと評価項目

109 匹のラットを no SAH 群 (n=50)、SAH 群 (n=59) の 2 群に無作為に振り分けた。第 1 病日に、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 群に無作為に振り分け、sham 群 (n=25)、UCCAO 群 (n=25)、SAH - UCCAO 群 (n=25)、SAH + UCCAO 群 (n=25) の 4 群とした。

体重測定を第 0 ~ 7 病日の間連日行い、第 1、2、3 及び 7 病日にそれぞれ神経学的評価を行った。さらに、第 2、3 及び 7 病日に神経学的評価を行った後、直ちに断頭による安楽死を行い、脳浮腫の評価もしくは組織サンプルの採取を行った。第 2、3 及び 7 病日のウエスタンブロット法による評価、第 3 及び 7 病日の組織学的評価を、それぞれ各群 5 匹ずつ用いて行った。

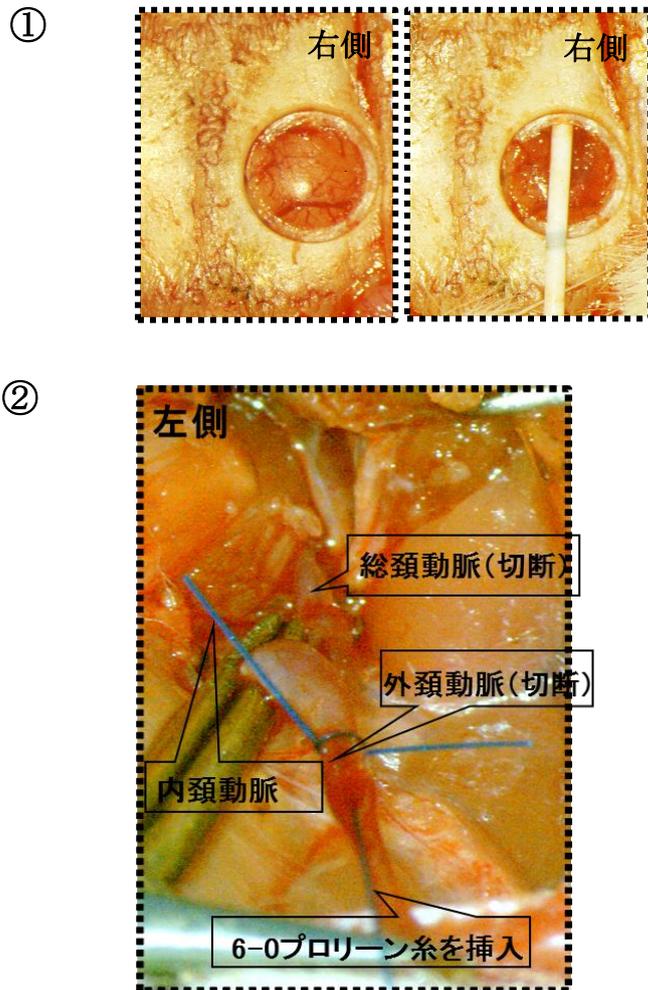


図 5: endovascular perforation (EVP) モデルの作成方法

- ① 右頭頂骨に骨窓を開け、ICP センサーを硬膜外に留置した。
- ② 外頸動脈の断端より 6-0 プロリン[®]糸を挿入し、頭蓋内内頸動脈先端部を穿破した。SAH 発症後プロリン[®]糸は抜去し外頸動脈を結紮した。その後、総頸動脈の遮断を解除し血流を再開させた。

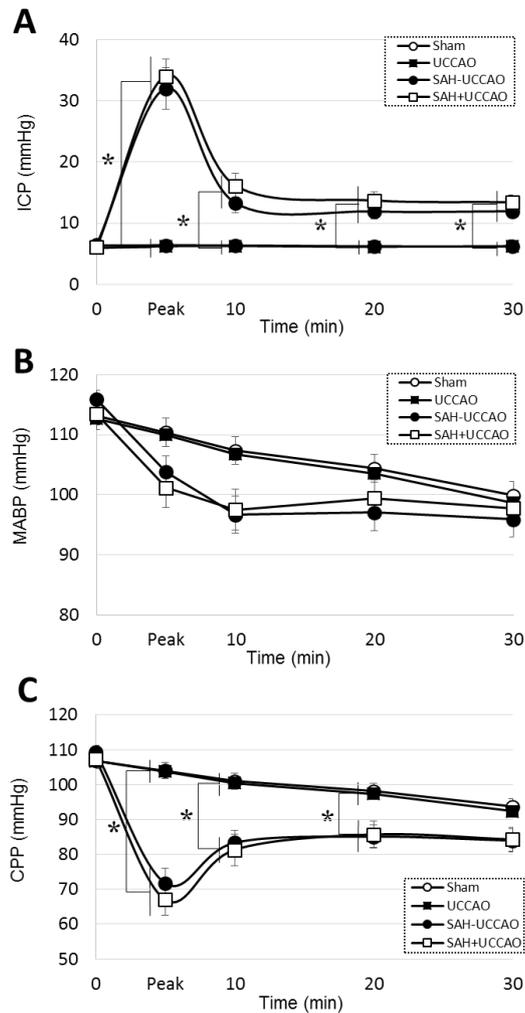


図 6: SAH 発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移

A. SAH 発症後、intracranial pressure (ICP) は速やかに上昇し、10 分以内に最高値に達した後下降、30 分かけて安定した。SAH 発症後 ICP 最高値から 30 分後までの間、ICP は sham 群と比較して SAH - UCCAO 及び SAH + UCCAO 群で有意差を認めた ($P < 0.05$)。

B. SAH - UCCAO 及び SAH + UCCAO 群において、平均血圧 (mean arterial blood pressure: MABP) は ICP の上昇に伴い下降し、その後上昇して 30 分かけて安定した。

C. 脳灌流圧 (cerebral perfusion pressure: CPP) は、ICP の上昇に伴い 10 分以内に最低値に達した後下降し、その後上昇して 30 分かけて安定した。

データは平均 \pm 標準誤差で表示。* $p < 0.05$ 。

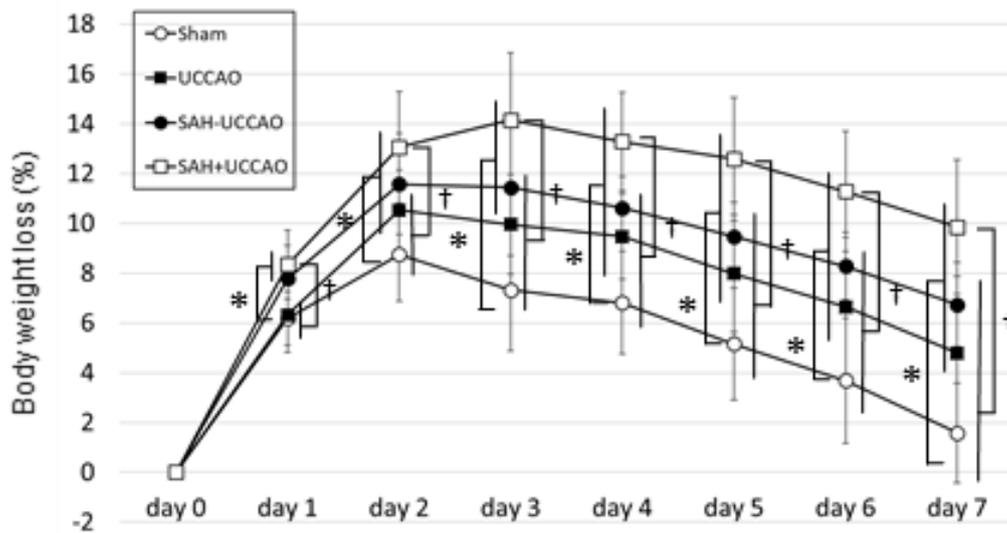


図 7: 体重減少率の推移

第 1 から 7 病日にかけて、SAH - UCCAO 及び SAH + UCCAO 群は sham 群と比較して有意に体重減少率は高かった。さらに、第 3 から 7 病日にかけて、SAH + UCCAO 群は SAH - UCCAO 群と比較して有意に体重減少率は高かった。* $p < 0.05$; sham 群との比較、† $p < 0.05$; SAH + UCCAO 群との比較。

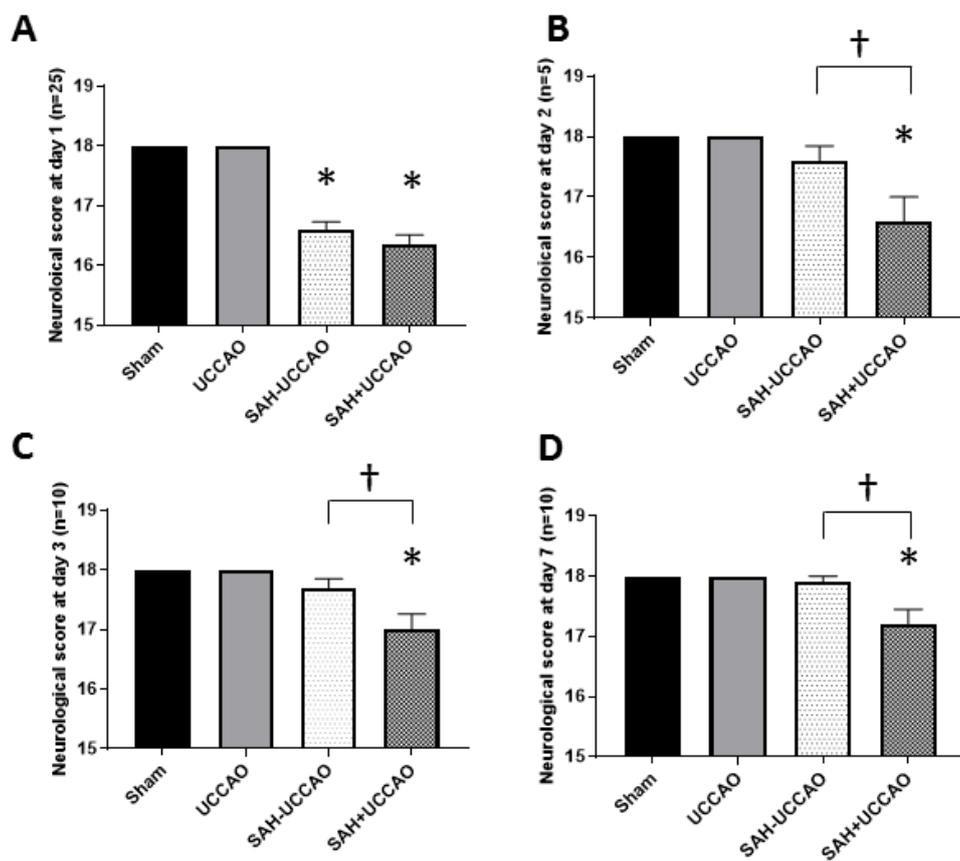


図 8: 神経機能評価

第 2、3 及び 7 病日において、SAH + UCCAO 群は SAH - UCCAO 群と比較して、神経機能の有意な悪化を認めた。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。

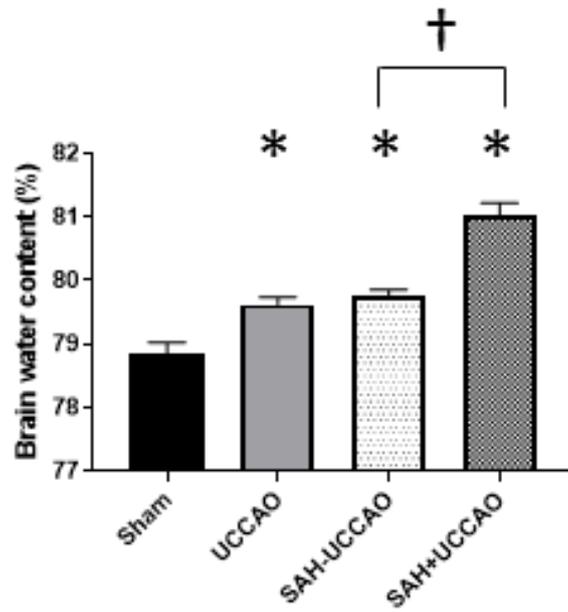


図 9: 脳水分含有量に対する脳低灌流負荷による影響

脳水分含有量を測定することで脳浮腫の程度について評価した。SAH + UCCAO 群では SAH - UCCAO 群と比較して有意に脳浮腫が増悪していた。

* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。

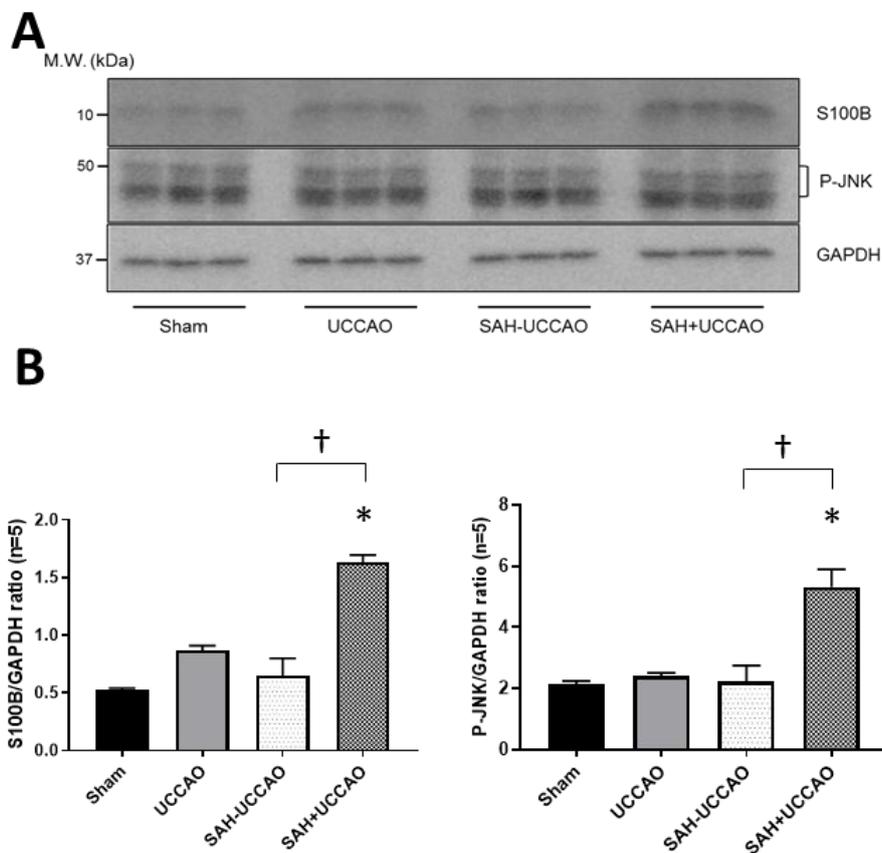


図 10: 穿破側大脳皮質における S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する脳低灌流負荷による影響

S100B、p-JNK 及び GAPDH のウェスタンブロットの代表例 (A)とその定量結果 (B)。SAH + UCCAO 群では、SAH - UCCAO 群と比較して有意に S100B の発現、JNK のリン酸化が増大していた。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。

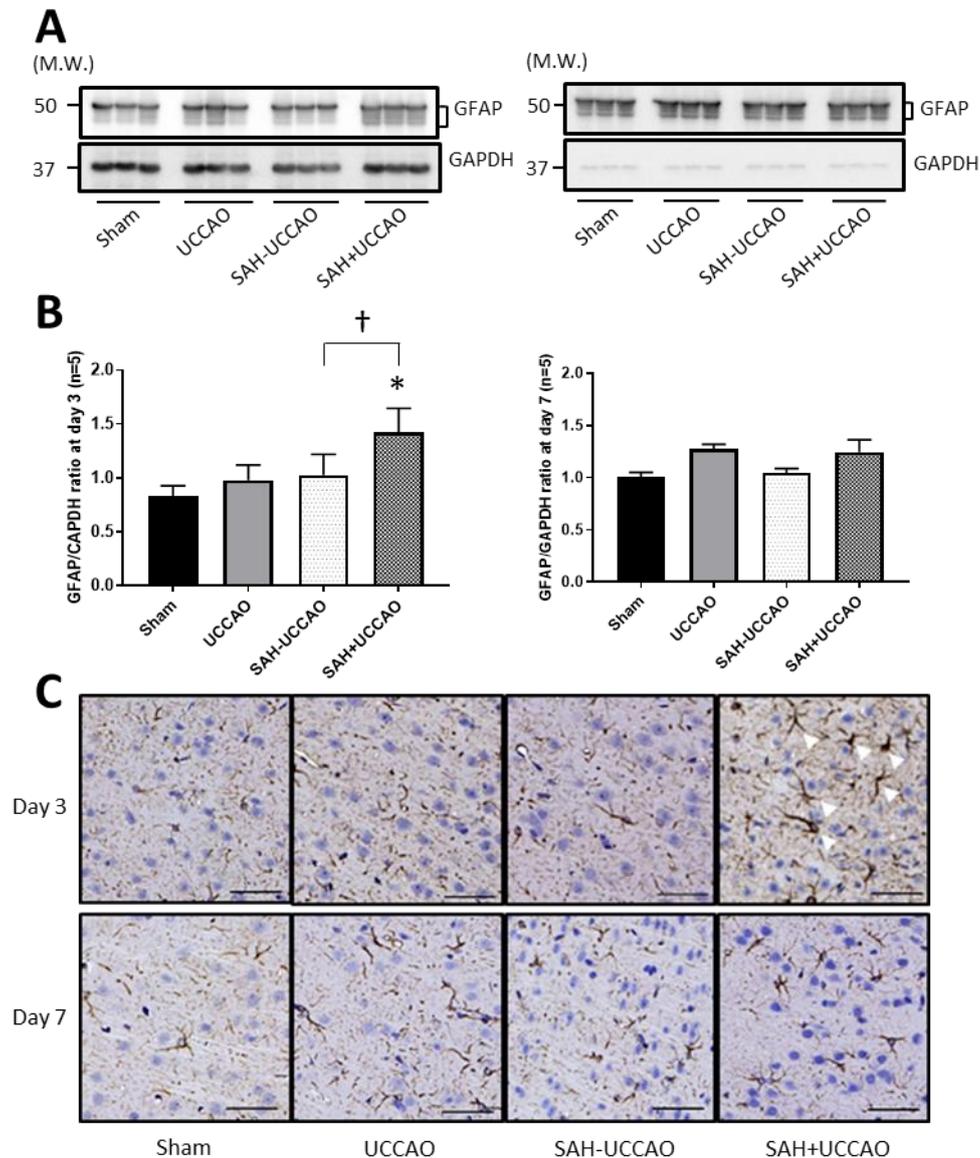


図 11: 穿破側大脳皮質における reactive astrogliosis に対する脳低灌流負荷による影響

第 3 及び 7 病日における、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び GAPDH のウエスタンブロットの代表例 (A)、定量結果 (B)、および GFAP 染色代表例 (C)。SAH + UCCAO 群では、SAH - UCCAO 群と比較して第 3 病日における GFAP 発現量の有意な増加を認めた。白矢頭は、突起が伸長しかつ細胞体が肥大した反応性アストロサイト(reactive astrocyte)を示す。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。スケールバー = 50 μm。

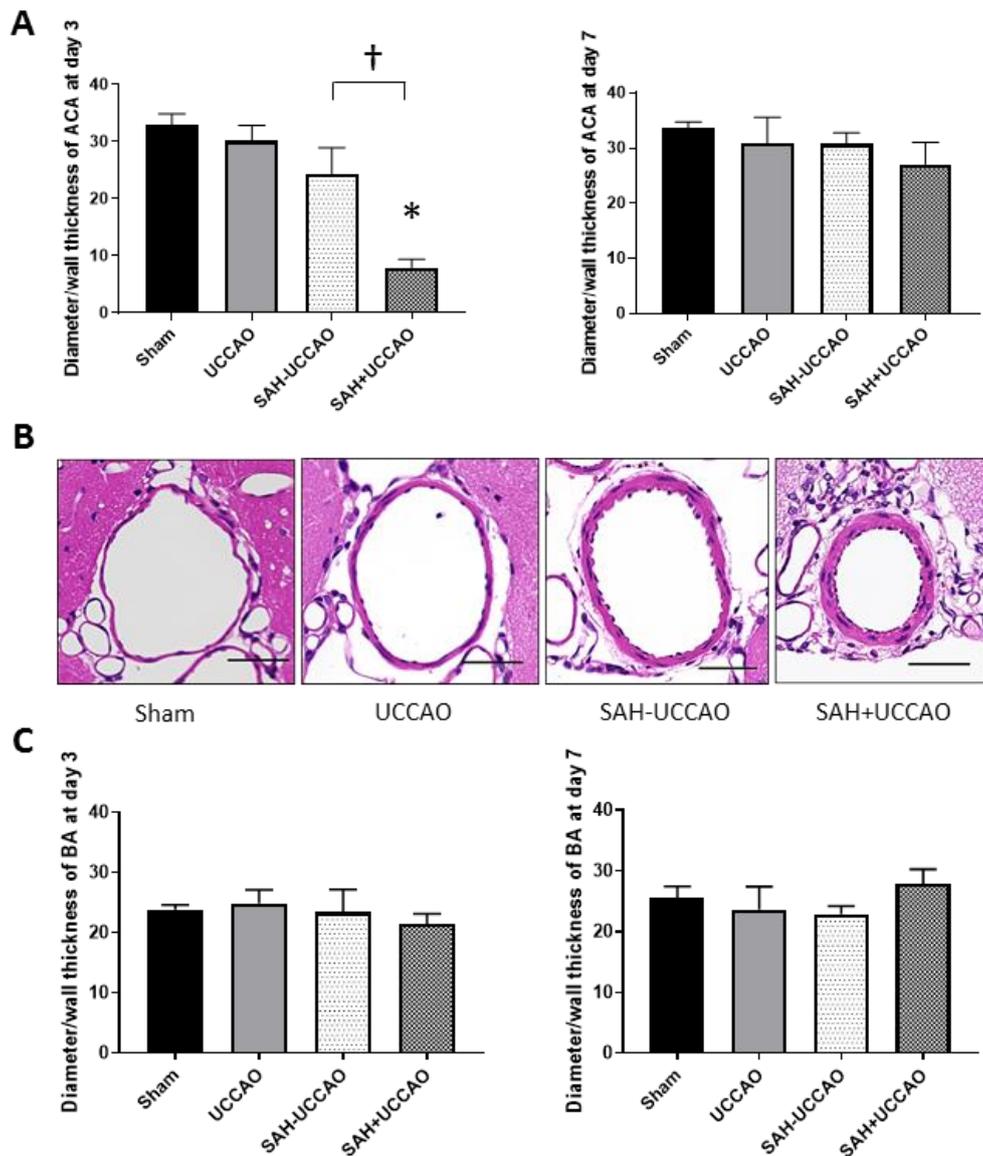


図 12: 遠位部前大脳動脈と脳底動脈における血管攣縮に対する脳低灌流負荷による影響

第3及び7病日における遠位部前大脳動脈 (ACA) (A) と脳底動脈 (BA) (C) の血管の直径と血管壁厚から算出した血管攣縮の程度と遠位部 ACA の各群代表例 (B)。遠位部 ACA において、第3病日 SAH + UCCAO 群では SAH - UCCAO 群と比較して有意に脳血管攣縮の増悪を認めた。第7病日には、全群間における有意差は認めなかった。一方、BA に関しては、第3及び7病日の両日ともに全群間における有意差は認めなかった。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。スケールバー = 50 μm 。

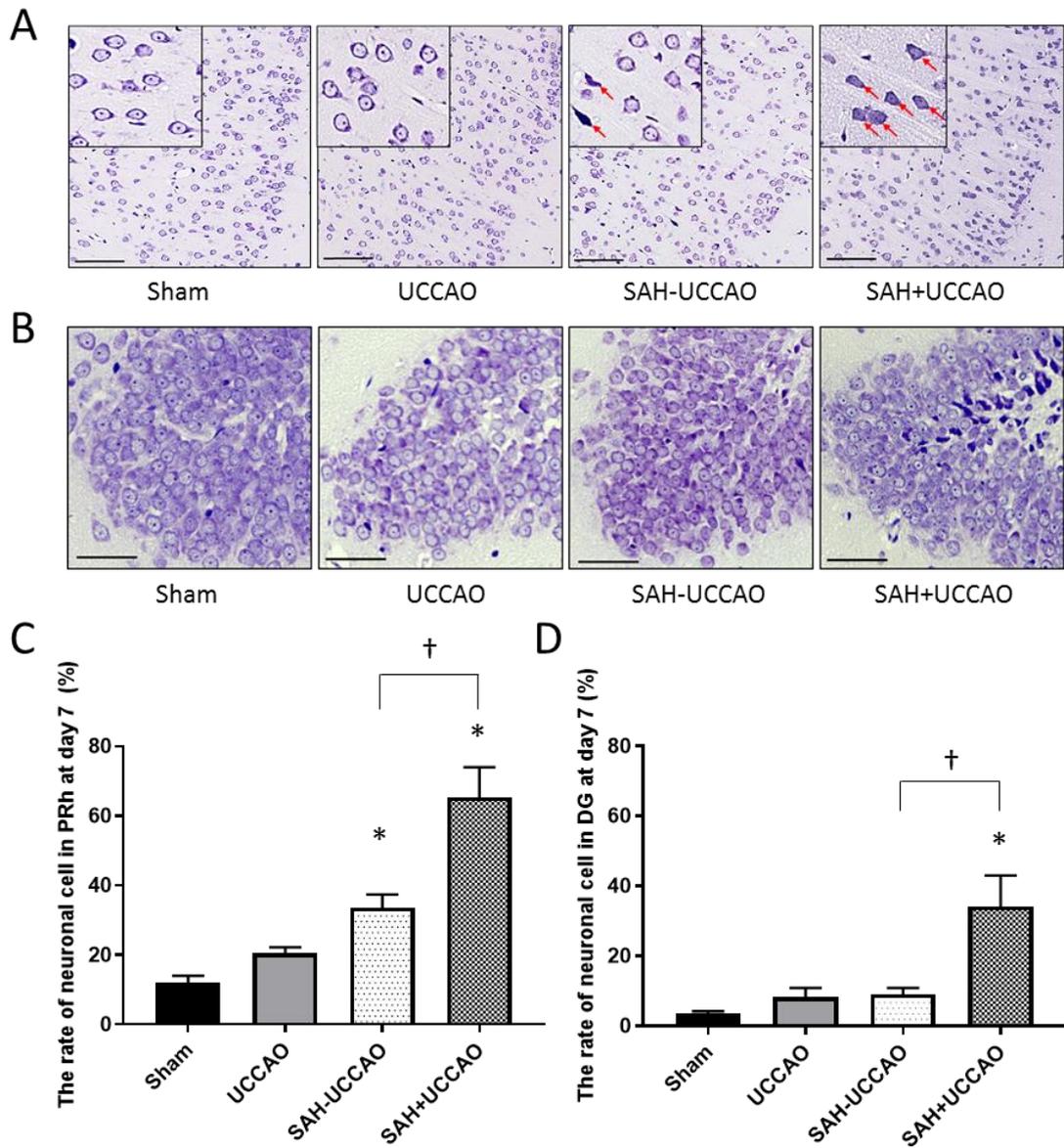


図 13: 損傷神経細胞の割合に対する脳低灌流負荷による影響

第 7 病日における、穿破側大脳皮質嗅周野 (PRh) と歯状回 (DG) の Nissl 染色代表例 (A と B) と損傷神経細胞の割合 (C と D)。PRh 領域及び DG において、SAH + UCCAO 群では SAH - UCCAO 群と比較して、損傷神経細胞の割合が有意に増加していた。赤矢印は、核凝縮や形態変化を伴う損傷神経細胞を示す。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. SAH - UCCAO group。スケールバー = 50 μm 。

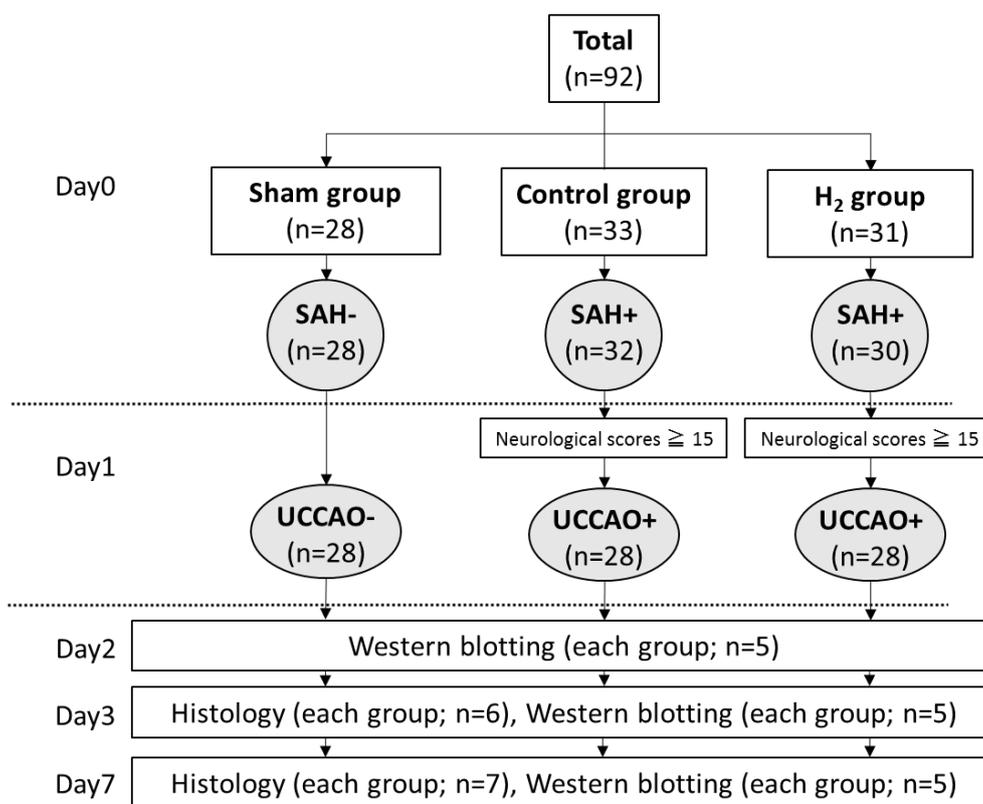


図 14: 実験動物の振り分けと評価項目

92 匹のラットを sham 群 (n=28)、control 群 (n=33)、H₂ 群(n=31) の 3 群に振り分けた。Control 群及び H₂ 群において、24 時間後の神経学的スコアが 15 点以上のラットのみ unilateral carotid artery occlusion (UCCAO) 処置を行った。Sham 群 28 匹、control 群 28 匹、H₂ 群 28 匹を用いてそれぞれ評価を行った。

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。第 2、3 及び 7 病日に神経学的評価を行った後、直ちに断頭による安楽死を行い、脳浮腫の評価もしくは組織サンプルの採取を行った。第 2、3 及び 7 病日の western blot による評価を各群 5 匹ずつ用いて行った。組織学的評価は、第 3 病日は各群 6 匹ずつ、第 7 病日は各群 7 匹ずつ用いて行った。

Control 群では、30 % 酸素 + 70 % 窒素の混合ガス、H₂ 群では 1.3 % 水素 + 30 % 酸素 + 68.7 % 窒素の混合ガスを使用した。第 0 病日の SAH 作成時、麻酔導入から H₂ ガス投与を開始し計 2 時間投与を行った。第 1 病日の UCCAO 処置時は、麻酔導入から H₂ ガス投与を開始し計 30 分間投与を行った。

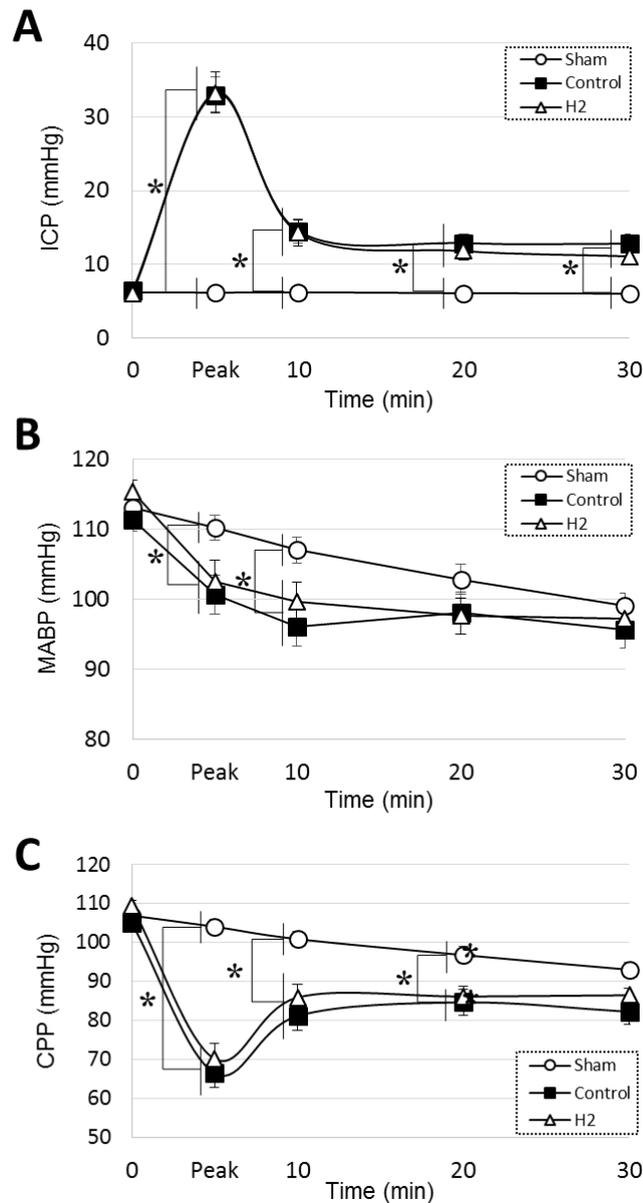


図 15: SAH 発症後の頭蓋内圧、平均血圧、脳灌流圧の推移

A. SAH 発症後、intracranial pressure (ICP) は速やかに上昇し、10 分以内に最高値に達した後下降、30 分かけて安定した。SAH 発症後 ICP 最高値から 30 分後までの間、ICP は sham 群と比較して control 群及び H₂ 群で有意差を認めた。

B. Control 群及び H₂ 群において、平均血圧 (mean arterial blood pressure: MABP) は ICP の上昇に伴い下降し、その後上昇して 30 分かけて安定した。

C. 脳灌流圧 (cerebral perfusion pressure: CPP) は、ICP の上昇に伴い 10 分以内に最低値に達した後下降し、その後上昇して 30 分かけて安定した。

データは平均 ± 標準誤差で表示。* p < 0.05。

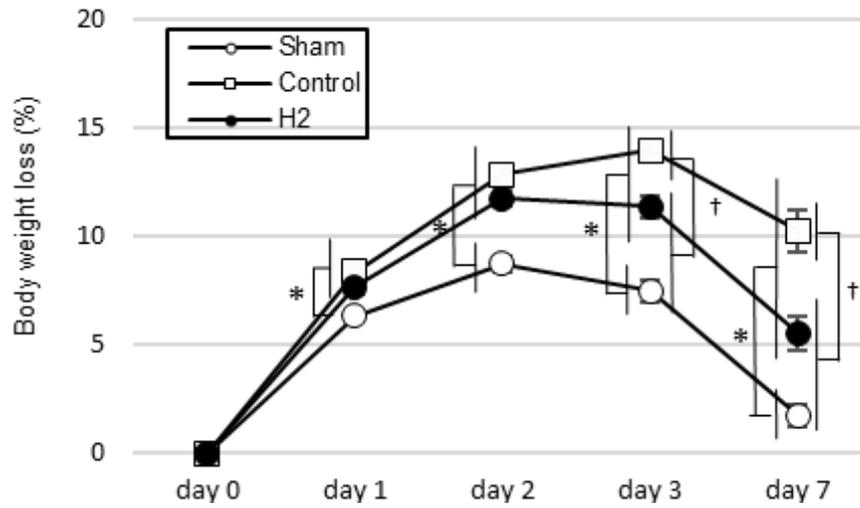


図 16: 体重減少率の推移

第 1 から 7 病日にかけて、control 及び H₂ 群は sham 群と比較して有意に体重減少率は高かった。さらに、第 3 から 7 病日にかけて、H₂ 群は control 群と比較して有意に体重減少率は低かった。* p < 0.05 : vs. sham group, † p < 0.05: vs. control group。

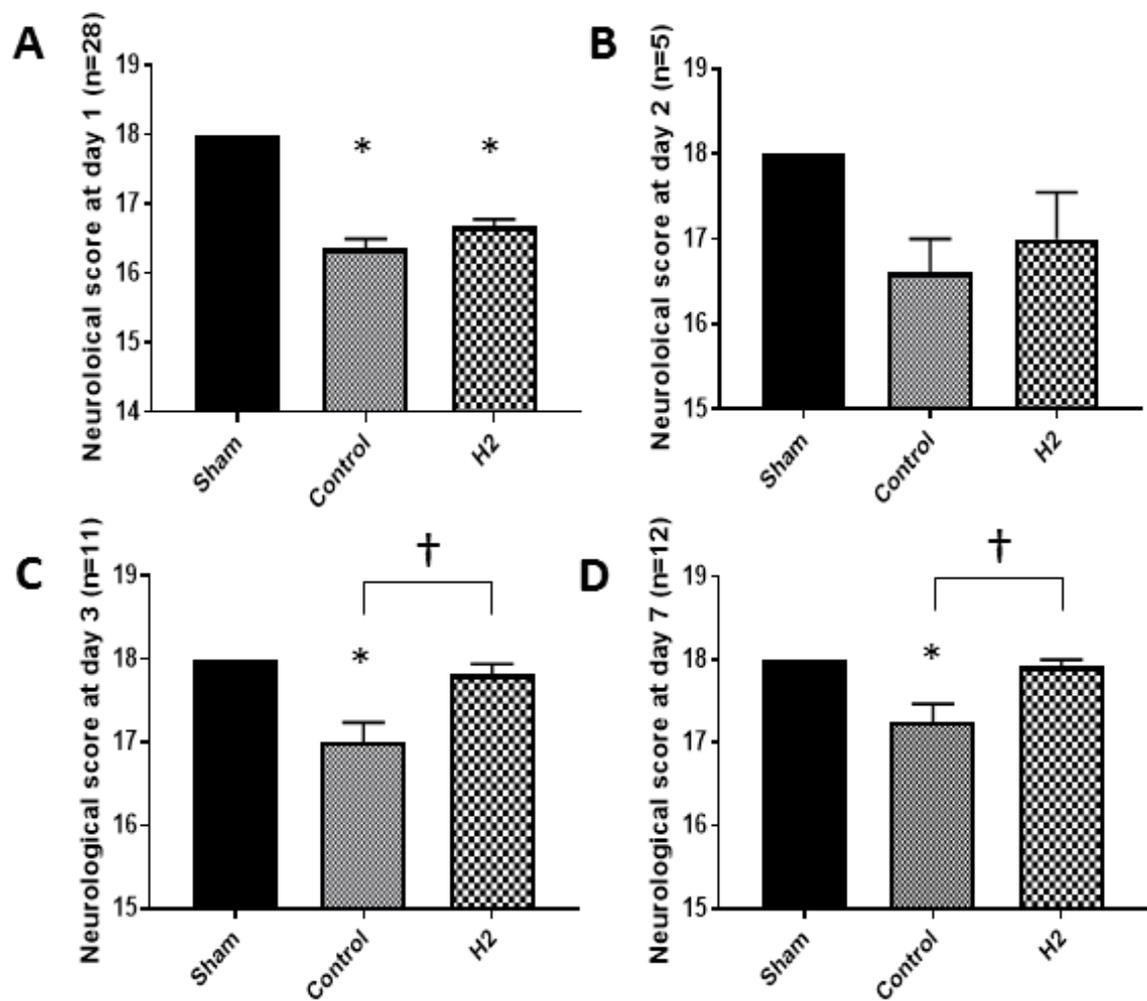


図 17: 神経機能評価

第3及び7病日において、H₂群はcontrol群と比較して神経機能の有意な改善を認めた。* p < 0.05 : vs. sham group, † p < 0.05: vs. control group。

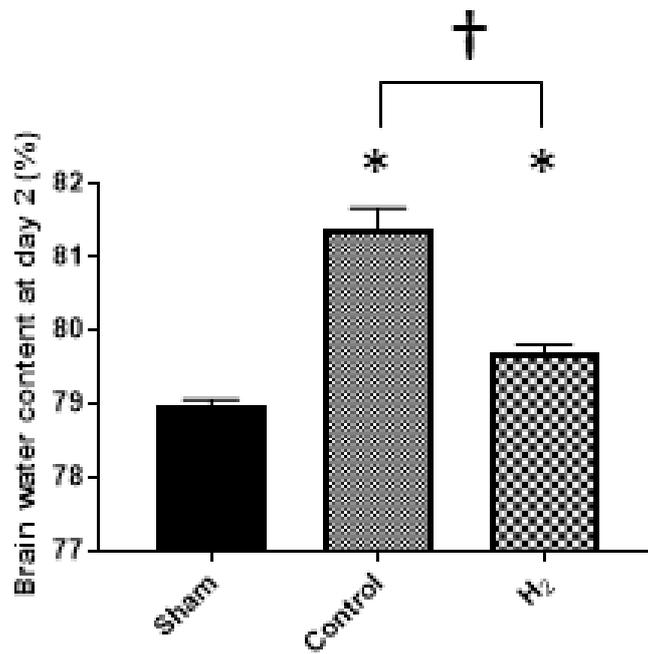


図 18: 脳水分含有量に対する水素ガス吸入効果
 脳水分含有量を測定することで脳浮腫の程度について評価した。H₂群では control 群と比較して有意に脳浮腫の改善を認めた。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs. control group。

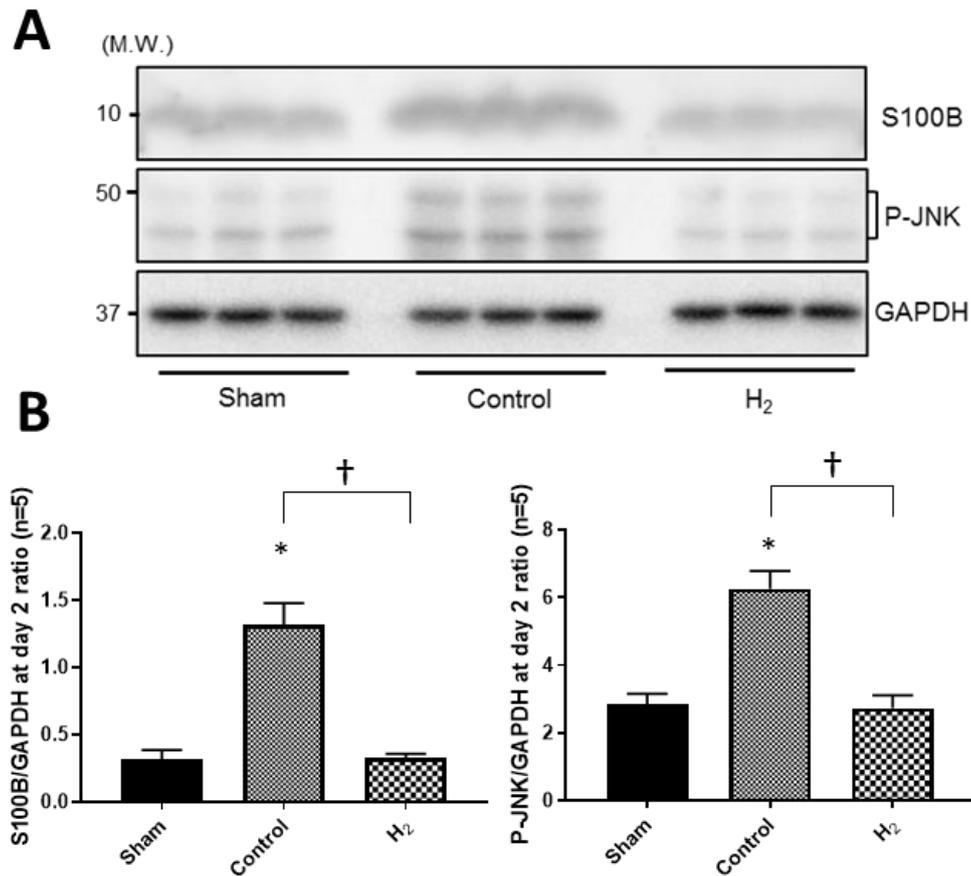


図 19: 穿破側大脳皮質における S100B 発現量及び JNK リン酸化量に対する水素ガス吸入効果

S100B、p-JNK 及び GAPDH のウェスタンブロットの代表例 (A)とその定量結果 (B)。H₂群では、control 群と比較して S100B 及び p-JNK の発現量が有意に低下していた。* p < 0.05 : vs. sham group, † p < 0.05: vs. control group。

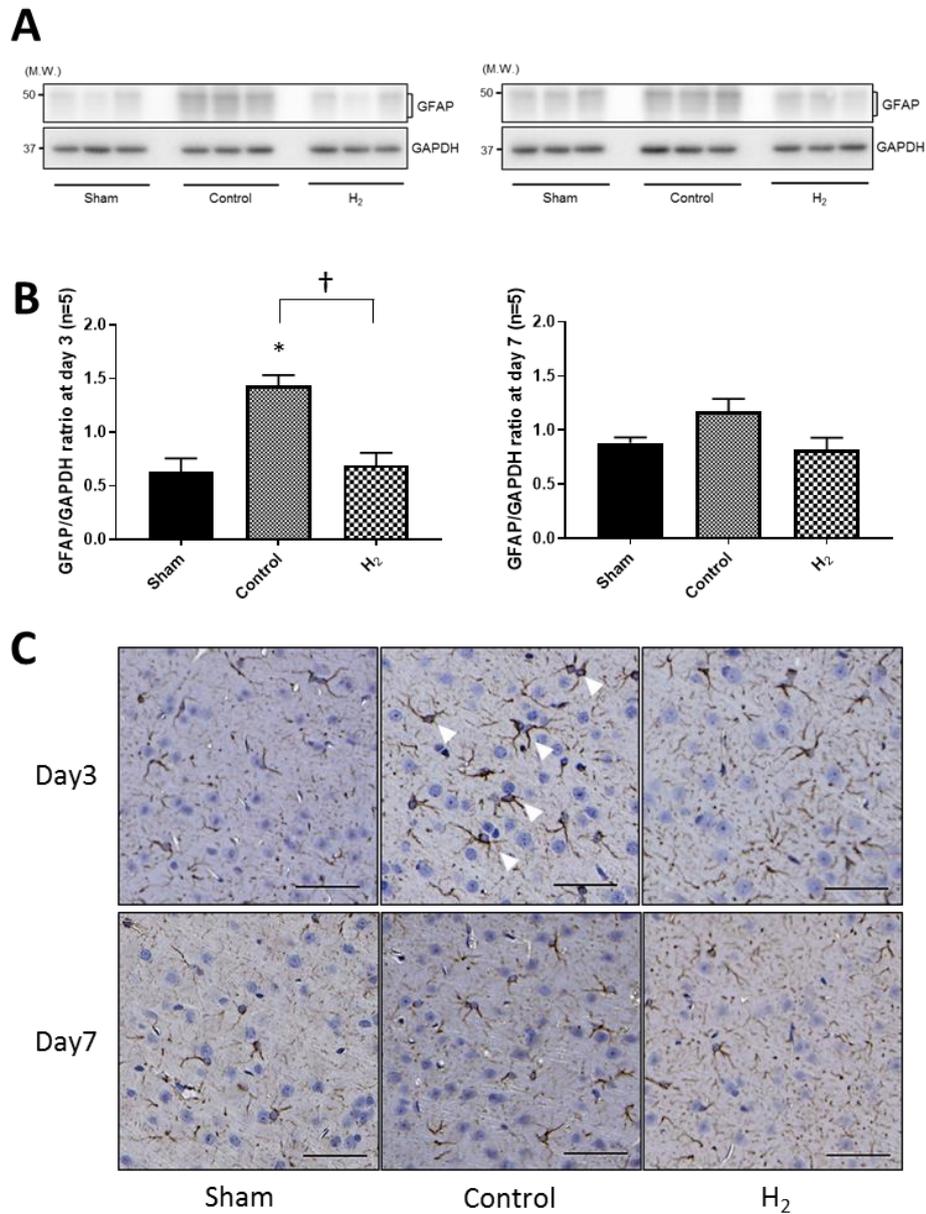


図 20: 穿破側大脳皮質における reactive astrogliosis に対する水素ガス吸入効果
 第 3 及び 7 病日における、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び GAPDH のウ
 エスタンブロットの代表例 (A)、定量結果 (B)、および GFAP 染色代表例
 (C)。H₂ 群では、control 群と比較して第 3 病日における GFAP 発現量の有意な
 減少を認めた。白矢頭は、突起が伸長しかつ細胞体が肥大した反応性アストロ
 サイト(reactive astrocyte) を示す。* $p < 0.05$: vs. sham group, † $p < 0.05$: vs.
 control group。スケールバー = 50 μm 。

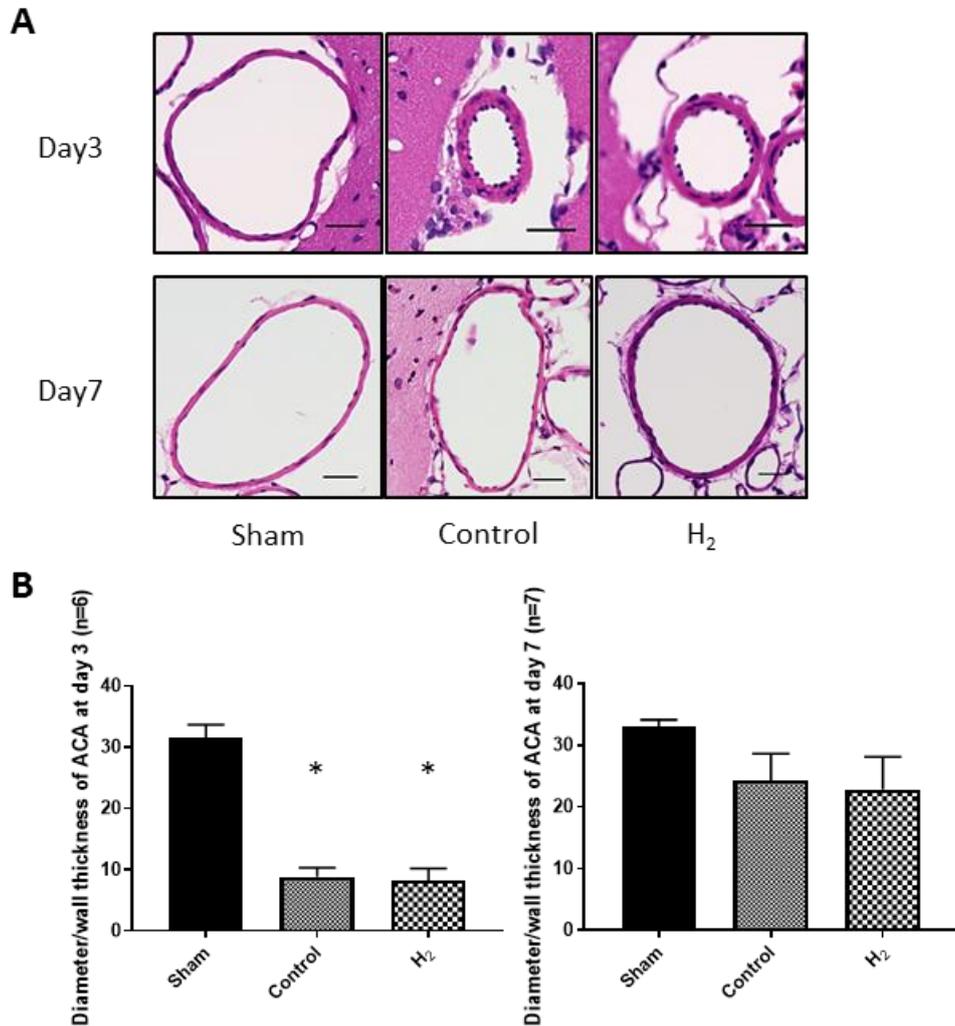


図 21: 遠位部前大脳動脈の血管攣縮に対する水素ガス吸入効果

第 3 及び 7 病日における遠位部前大脳動脈 (ACA) の各群代表例 (A) と血管の直径と血管壁厚から算出した血管攣縮の程度 (B)。第 3 病日において、control 群及び H₂ 群は sham 群と比較して有意に血管攣縮の増悪を認めた。第 7 病日には、全群間における有意差は認めなかった。両日ともに、H₂ 群は control 群と比較して血管攣縮の改善は認めなかった。スケールバー = 30 μ m。* $p < 0.05$ 。

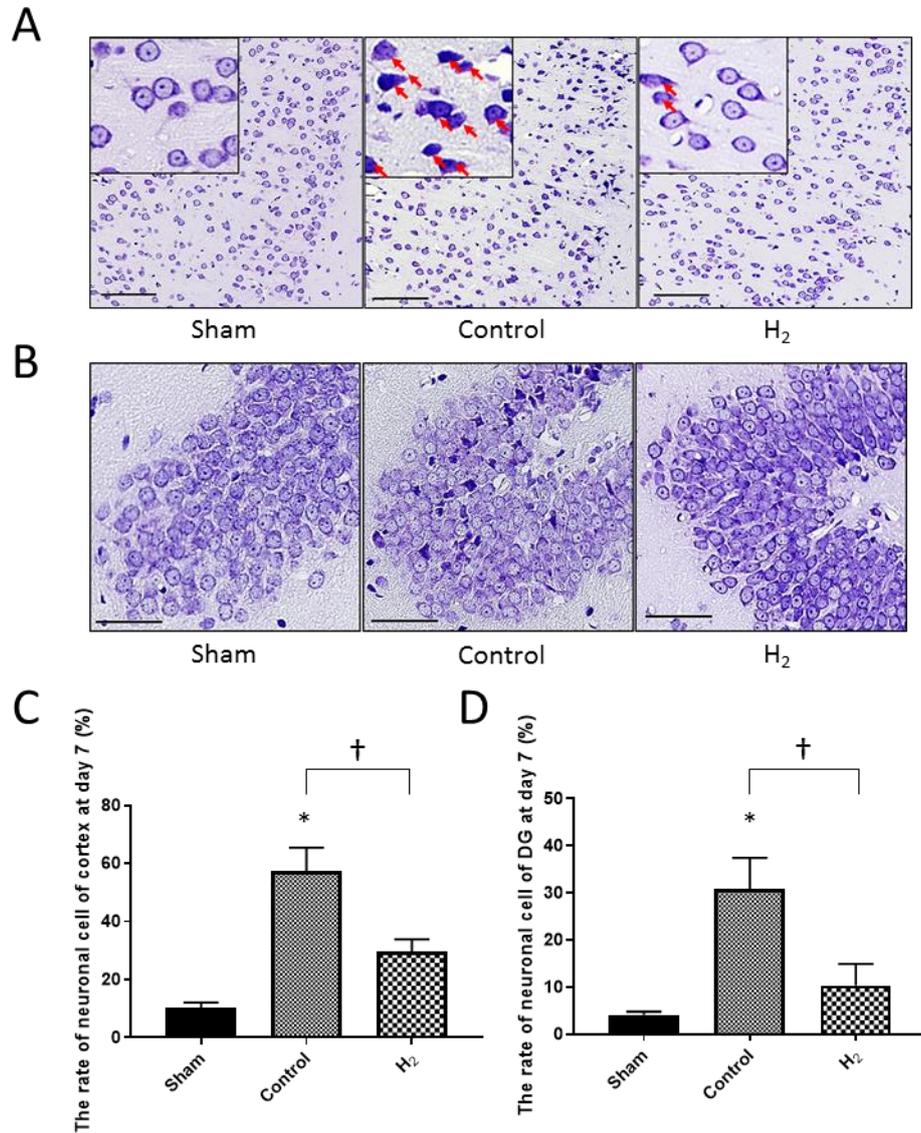


図 22: 損傷神経細胞の割合に対する水素ガス吸入効果

第7病日における、穿破側大脳皮質嗅周野 (PRh) と歯状回 (DG) の Nissl 染色代表例 (A と B) と損傷神経細胞の割合 (C と D)。PRh 及び DG おいて、H₂ 群は control 群と比較して、損傷神経細胞の割合が有意に低下していた。赤矢印は、核凝縮や形態変化を伴う損傷神経細胞を示す。スケールバー = 50 μm。

* p < 0.05 : vs. sham group, † p < 0.05: vs. control group。

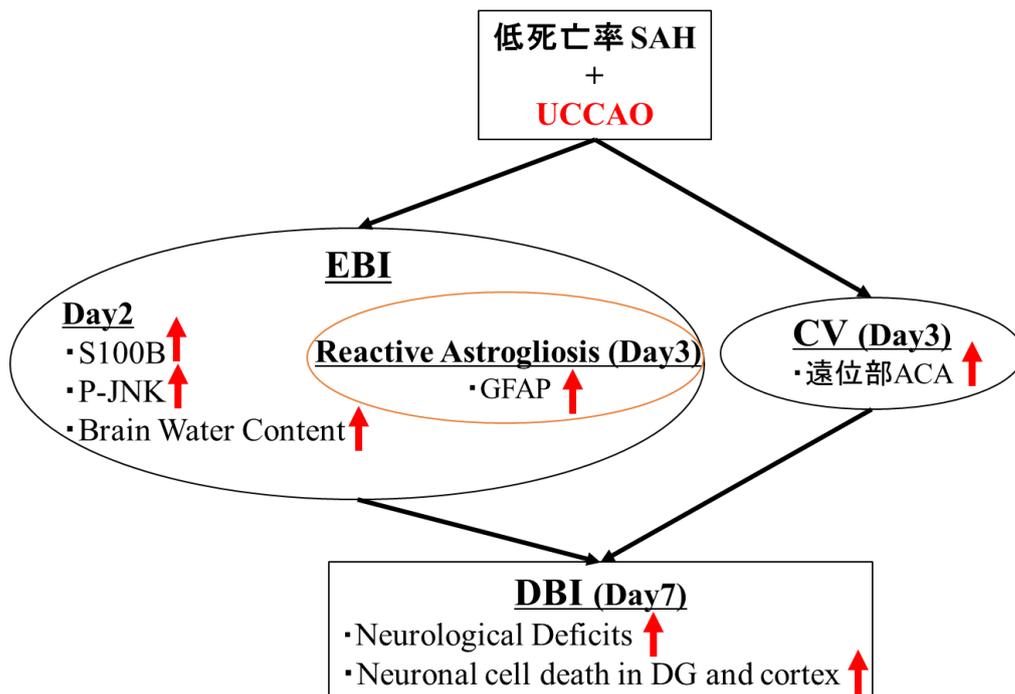


図 23: SAH + UCCAO モデルにおける病態変化

Early brain injury (EBI) の時期に unilateral common carotid artery occlusion (UCCAO) を加えることで、EBI 及び CV (cerebral vasospasm) 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 delayed brain injury (DBI) が発生した。

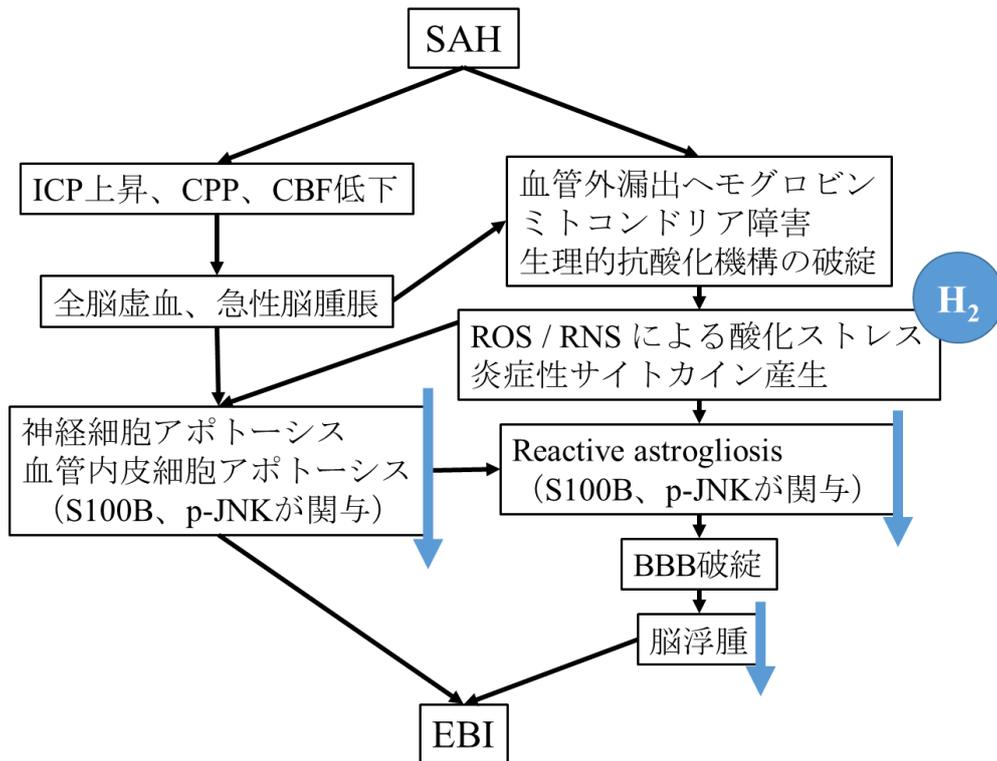


図 24: SAH + UCCAO モデルにおける early brain injury (EBI) に対する水素ガス吸入効果

H₂ ガスが S100B 発現及び JNK リン酸化を抑制することで、reactive astrogliosis 及び脳浮腫が軽減し、EBI が改善した。

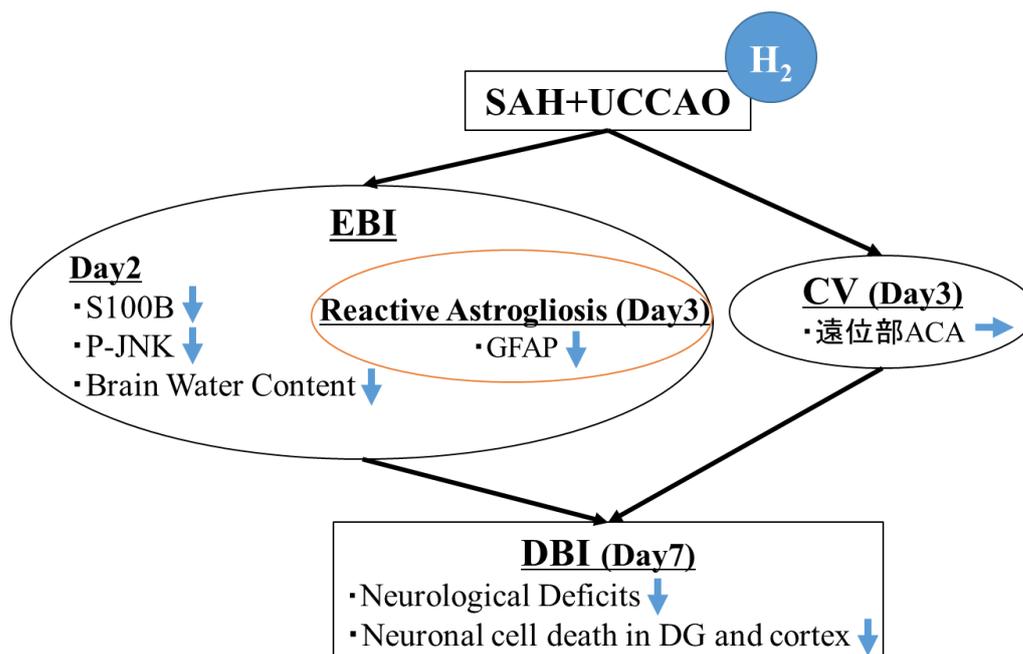


図 25: SAH + UCCAO モデルにおける水素ガス吸入効果

H₂ ガス吸入により early brain injury (EBI) が抑制されたことで、CV (cerebral vasospasm) の改善効果を介することなく、delayed brain injury (DBI) 及び予後が改善した。