

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10284

研究課題名(和文)重症くも膜下出血の予後は炎症反応制御で改善するか？

研究課題名(英文)Can inflammation worsen the prognosis of severe subarachnoid hemorrhage

研究代表者

穂刈 正昭 (HOKARI, Masaaki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30622807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血急性期の炎症反応を制御し、神経損傷を軽減することが本研究の目的である。重症くも膜下出血モデルを作成し、それに対して低体温療法・ミノサイクリン投与を行うことによって、急性期炎症反応の制御および予後改善が可能であるか検討する。本研究を通じてくも膜下出血後の炎症反応に早期低体温療法は運動機能改善を伴う炎症反応の低下を認めたが、minocyclineは炎症反応の低下は認めるものの運動機能回復は認められないという結果であった。

研究成果の概要(英文)：Inflammation process following severe subarachnoid hemorrhage may exacerbate neuronal damage. Recent studies have revealed that microglia may play an important role in brain inflammation after cerebral damage, however the role of microglia after subarachnoid hemorrhage is not well understood. The authors have conducted a basic research to figure out whether hypothermia and minocycline which is the suppressive drug of microglia will work against inflammation after subarachnoid hemorrhage.

研究分野：脳卒中

キーワード：ミノサイクリン くも膜下出血 炎症 低体温

## 1. 研究開始当初の背景

重症くも膜下出血の死亡率および後遺症を残す確率は極めて高く、近年の治療技術の進歩にもかかわらず、著明な改善がない状況である。その大きな要因に、くも膜下出血急性期の脳損傷の病態と、それに対する有効な治療がなされていないことがあげられている。これらの患者の機能予後改善のためには、くも膜下出血による急性期脳損傷を治療ターゲットとしていく必要がある。

重症くも膜下出血発症時に強く惹起される炎症反応は神経損傷を増悪させる一因であり、最近これらの炎症反応においてミクログリアが重要な役割を果たしていることが示された。急性期炎症反応には様々な因子が影響しているが、ミクログリア活性化に続く炎症反応は数時間～数日を要するため、他の神経保護に関する治療ターゲットに比較すると、長い治療 time window を持ち、臨床的に治療ターゲットに適していると考えている。しかしこれらの炎症反応を制御することでくも膜下出血の予後を改善させようとする研究はまだ少ない。

低体温療法の脳保護作用機序の一つにミクログリア活性化の抑制が挙げられている。また、抗生物質のミノサイクリンもミクログリアの活性化を抑制する作用をもつ薬剤の一つである。ミノサイクリンは臨床で日常的にヒトへ使用される抗生物質であり、ヒト脳梗塞に対しての臨床研究もおこなわれており、低体温療法およびミノサイクリンでの効果が認められた場合には、臨床研究への波及効果が期待できると考えている。

## 2. 研究の目的

くも膜下出血急性期の炎症反応を制御し、神経損傷を軽減することが本研究の目的である。脳梗塞モデルにおいては、ミクログリアの活性化を制御する作用がミノサイクリンと低体温において示されており、重症くも膜下出血モデルを作成し、それに対して低体温療法・ミノサイクリン投与を行うことによって、主にミクログリアが介在する急性期炎症反応の制御が可能であるかを病理学的に検証し、また機能予後の改善が得られるかを検討する。

## 3. 研究の方法

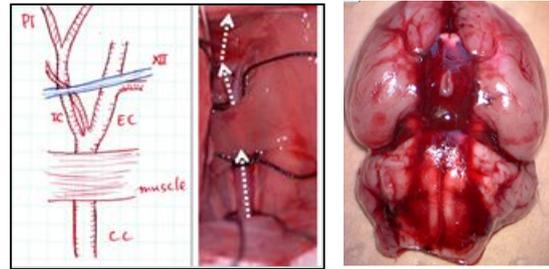
### 使用する動物：

#### 重症くも膜下出血モデルの作成：

くも膜下出血モデルには従来の脳槽内血液注入法と、脳血管穿孔法があるが、後者がより重症のくも膜下出血となるため、脳血管穿孔法による重症くも膜下出血モデルの作成を以下の方法にて行った。SD ラットの頸動脈を麻酔下に露出し、頸動脈から thread を 22

～28mm 誘導し、頭蓋内内頸動脈終末部で血管穿孔させる(図1)。

(図1)



成功すると直後に瞳孔散大を認め(図2)、麻酔覚醒遅延もみられる。それらの所見がないもの、直後の死亡(予備実験で約 10%)は研究から除外する。麻酔中に保温パットを用いないと、ラットの体温は室温にもよるが通常 30°C 前半に低下するため、周術期の体温管理は加温パットを用いて温度設定を行う。加温パットの設定温度を 36°C 設定で常温管理を手術中・術後 3-4 時間程度安定して行う。

(図2)



### 実験プロトコール

以下の4群に分けて運動機能評価および病理評価を行った(各群 20)。

- 1 Early hypothermia 群：術直後 33-35°C の軽度低体温麻酔(3時間) 1時間常温麻酔後に覚醒
- 2 Delayed hypothermia 群：術後 1時間常温麻酔 3時間低体温麻酔後に覚醒
- 3 Control 群：常温で 4時間麻酔管理後に麻酔覚醒
- 4 Minocycline 群：4時間常温麻酔 + ミノサイクリン投与(45mg/kg ip 1回, 22.5mg/kg ip 2回/day を 2日間)

\*ミノサイクリン投与量については、過去の脳梗塞モデルにおいてミクログリア活性を抑制させたとの報告がある投与量を参考として上記の投与量とした。

### 運動機能評価：

術直後、1日後、3日後、7日後に以下の運動機能評価を行う。

modified Bederson Score(mBS)を用いて運動機

能を評価すると共に、modified Neurological Severity Score (mNSS)も使用して運動機能を評価する。

組織切片の作成：

Day7 に sacrifice を行い、病理評価を行う。HE 染色および免疫染色(CD68,Iba1 など)を行い、残存神経細胞数およびアポトーシス、炎症細胞浸潤、活性化ミクログリアなどを評価する。ミクログリアは活性化すると樹状突起を有するラミフェイド型から、突起が退縮して大きな細胞質を持つ形態へと変化するため免疫染色による形態変化を評価する。

4 . 研究成果

死亡率および運動機能評価:

4 群において、術直後の死亡を除いた、7 日目までにそれぞれの死亡率は early hypothermia 群 35%(6/17)、delayed hypothermia 群 55%(10/18)、control 群 68%(13/19)、minocycline 群 58%(11/19)であった。統計学的にはearly hypothermia 群と control のみで有意差を認めた。

運動機能評価:

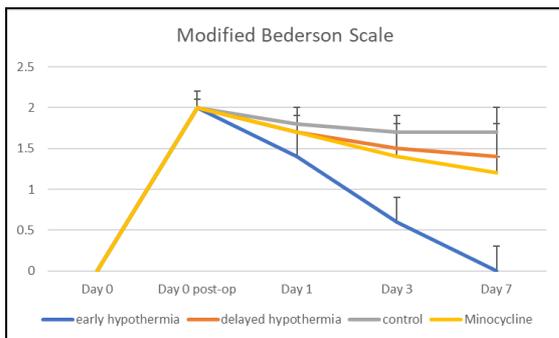
運動機能評価については、mBS(図 3)、mNSS(図 4) とともに、early hypothermia 群と control 群において Day3 以降において有意差を認めたが、他の群と control 群との間に差を認めなかった。

(図 3)

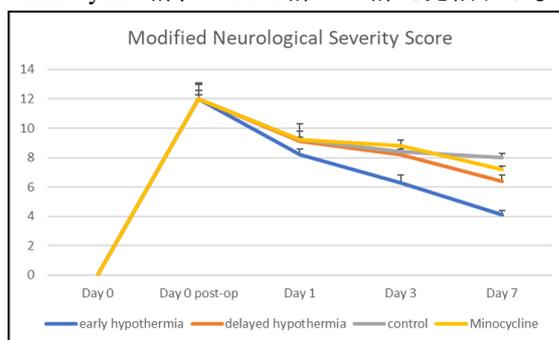
(図 4)

病理学的検討:

Delayed hypothermia 群の運動機能改善が control に比較し同程度であったことから病



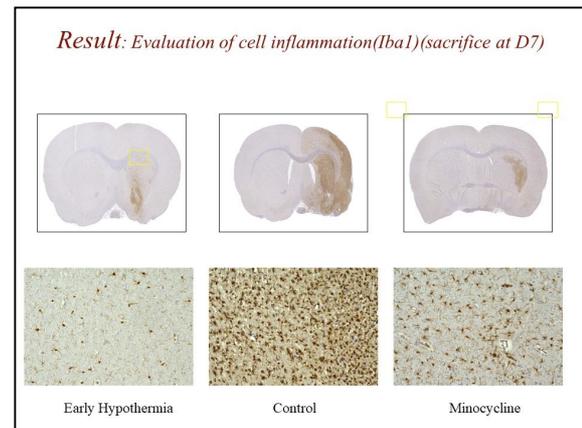
理学的検討には入れず、early hypothermia 群、minocycline 群、control 群の 3 群で比較する事



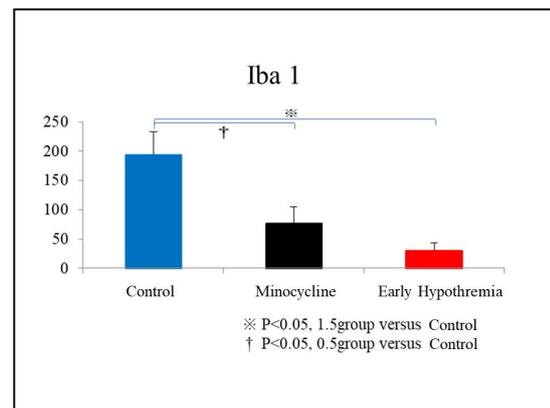
にした。これでは control に比較し、hypothermia, minocycline の両群において著明な炎症細胞系細胞である活性型ミクログリアの発現低下を認めた。

具体的には下の図 5,6 に示すように、control 群に比べて特に皮質における Iba1 陽性細胞が hypothermia 群と minocycline 群では減少しており(図 5)、半定量的な検討においても control 群に比べて hypothermia 群と minocycline 群では Iba1 陽性細胞が優位になかった(図 6)。

(図 5)



(図 6)



結果のまとめ

本研究を通じてくも膜下出血後の炎症反応に早期低体温療法は運動機能改善を伴う炎症反応の低下を認めたが、minocycline 投与群は炎症反応の低下は認めるものの運動機能回復は認められないという結果であった。Early hypothermia については、ヒトへの応用となると、くも膜下出血発症直後から低体温を行うことは現実的には難しく、delayed hypothermia での効果も期待されたが、こちらについては効果を示せなかった。臨床研究につなげる意味では、minocycline 投与群または delayed hypothermia 群での神経症状改善が確認できなかったことから、現時点で今回の研究から臨床研究につなげたいという当初の目的は達せられなかった。

以下、研究期間内に目的が達せられなかったことについての見解と今後の展望について記載させていただく。

ミノサイクリン投与の効果については、病理学的には有意な炎症反応の低下を示せたものの、同等の抑制効果を示した早期低体温療法とは異なり、神経症状の改善が示せなかったことからすると、神経症状改善についてはミクログリア活性の抑制効果以外の要素が影響していることが考えられる。低体温療法の作用点は多岐にわたりその全貌を確認することは難しいが、ミクログリア活性以外の別の要素を確認することができれば、くも膜下出血急性期の病態解明の手掛かりとなる可能性があると考えている。

重症くも膜下出血の病態ということに主眼をおいたため、穿孔モデルを行ったものの、10%程度の直後死亡を除いても7日目までの死亡率が35-68%と比較的高く、ヒトとは違いラットの神経症状評価となると、生存したラットの中では差が付きにくかった可能性がある。7日目以降の14-28日後まで神経症状の経過をみたら delayed hypothermia 群や minocycline 投与群で神経症状の改善がみられなかったか、特に minocycline 投与群では7日目の病理評価で control 群に比べて有意に炎症反応抑制を認めており、中～長期フォローする必要があったと考えている。またそれらの中～長期の神経機能評価においても delayed hypothermia 群と minocycline 群で神経症状の改善が確認できなかった場合は、脳槽内血腫注入法やもっと小さな穿孔モデルを作成して現在のモデルより死亡率が低い中等～重症のくも膜下出血モデルで同様の研究を行うことを検討したいと考えている。また、minocycline リン投与と delayed hypothermia を組み合わせる群を作り、それらの効果を確認することで、臨床応用に即した研究結果が得られる可能性もあると考えている。

本研究申請時には研究代表者が大学常勤であったが、その後客員研究員となり、現在は臨床現場でも仕事を行っているため、ヒト脳動脈瘤に関する研究や、実臨床におけるくも膜下出血患者の急性期炎症反応と予後に関わる研究も並行して行っている。今後はそれらの臨床研究を継続しつつ、本基礎研究を継続して完遂することで、新たな治療へつなげる臨床研究へと発展できると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計件)

Hokari M, Nakayama N, Nishihara H, Moriwaki T, Kuroda S, Houkin K. Pathological Findings of Cerebral Saccular Aneurysms - Impact of

Inflammation and subintimal fibrinoid deposition on Cerebral Aneurysm Rupture – Neurosurgical Review 38(3), p531-540, 2015

Hokari M, Kazumata K, Nakayama N, Ushikoshi S, Sugiyama T, Asaoka K, Uchida K, Shimbo D, Itamoto K, Yokoyama Y, Isobe M, Imai T, Osanai T, Houkin K. Treatment of Recurrent Intracranial Aneurysms After Clipping: A Report of 23 cases and a Review of the Literature. World Neurosurgery Aug 92, p434-444, 2016

Hokari M, Nakayama N, Shimoda Y, Houkin K. Effect of headache on the pathological findings of unruptured cerebral saccular aneurysms World Neurosurgery Jul 103, p431-441, 2017

Hokari M, Nakayama N, Kazumata K, Osanai T, Shichinohe H, Abumiya T, Houkin K. Surgical outcome of Cerebral Aneurysm Clipping Treated with Immunosuppressants: Report of 11 cases and Review of the literature. Neurologia medico-chirurgica (Tokyo), 57(3), 122-127, 2017

Hokari M, Shimbo D, Asaoka K, Uchida K, Itamoto K. Impact of Antiplatelets and Anticoagulants on the Prognosis of Intracerebral Hemorrhage. J Stroke Cerebrovasc Dis 27 (1), 53-60, 2018

[学会発表](計7件)

Yusuke Shimoda, Naoki Nakayama, Takeo Abumiya, Masaaki Hokari, Kota Kurisu, Hideo Shichinohe, Ken Kazumata, Kiyohiro Houkin. Inside Intramural Thrombus Formation with Inflammatory Reactions is Relevant to the Rupture of Cerebral Aneurysms 83rd AANS Annual Scientific Meeting, Washington, 2015

下田祐介 森脇拓也 中山若樹 栗栖宏多 穂刈正昭 七戸秀夫 鏡谷武雄 長内俊也 数又研 寶金清博. 大型脳動脈瘤モデルラットの確立へむけて. 第74回日本脳神経外科学会学術総会, 札幌, 2015

Yusuke Shimoda, Takuya Moriwaki, Naoki Nakayama, Takeo Abumiya, Ken Kazumata, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin. A Novel Cerebral Aneurysm Model in Rat with Intraperitoneal beta-AminoPropioNitril-Fumarate, International Stroke Conference, Los Angeles, 2016

穂刈正昭, 中山若樹, 数又研, 長内俊也, 七戸秀夫, 鏡谷武雄, 寶金清博. 免疫抑制剤使用患者のクリッピング術の治療成績: 11例の検討 第18回日本臨床脳神経外科学会, 神戸, 2015

穂刈正昭, 中山若樹, 下田祐介, 鏡谷武雄,

七戸秀夫, 長内俊也, 数又 研, 寶金清博: 病理学的に破裂兆候を認めた未破裂脳動脈瘤の臨床像 脳循環代謝学会, 富山, 2015

穂刈正昭, 新保大輔, 内田和希, 高宮宗一郎, 浅岡克行, 板本孝治: くも膜下出血急性期の炎症系および凝固・線溶系の異常と転帰予測 脳神経外科総会, 福岡, 2016

Hokari M, Shimbo D, Asaoka K, Uchida K, Itamoto K. Early coagulation, inflammation and acute brain injury after a subarachnoid hemorrhage. European Stroke Conference, Athene, 2018

〔図書〕(計2件)

穂刈正昭:: 脳血管障害、頭部外傷, 1 頁-66 頁, 135 頁-162 頁 (寺坂俊介編: 脳神経外科グリーンノート, 中外医学社, 東京), 2015

穂刈正昭, 寶金清博: 未破裂脳動脈瘤と医療倫理, 103 頁-109 頁 (井川房夫編: 未破裂脳動脈瘤 Japan standard, 中外医学社, 東京), 2015

〔産業財産権〕なし

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

穂刈 正昭 (HOKARI, Masaaki)  
北海道大学・医学研究院・客員研究員  
研究者番号: 30622807

### (2) 研究分担者

七戸 秀夫 (SHICHINOHE, Hideo)

北海道大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 80374479

中山 若樹 (NAKAYAMA, Naoki)  
北海道大学・医学研究院・講師  
研究者番号: 40421961

寶金 清博 (HOUKIN, Kiyohiro)  
北海道大学・大学病院・教授  
研究者番号: 90229146

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )