

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791078
 研究課題名 (和文) 新しい脳水分測定法の開発と基礎的応用—水チャネルに着目した新脳浮腫治療法の開発—
 研究課題名 (英文) Development of a new procedure for measurement of brain water content -aquaporin as a target of a new therapy for brain edema-
 研究代表者
 平手 博之 (HIRATE HIROYUKI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：20363939

研究成果の概要 (和文)：

麻酔・集中治療領域において脳浮腫は生命予後を左右する重大な病態であり、脳浮腫の抑制は治療戦略上重要である。脳浮腫は水分の脳への異常集積であり、研究上水分量の測定は不可欠である。古典的な方法では、脳全体の水分含有量しか測定できず、脳の部位による詳細な水分含有量測定は困難である。本研究では、カールフイッシャー法を用いて、局所の脳水分含有量を測定することができるようになった。本法は、古典的な方法とも相関性があり、損傷を起こした脳において、損傷の程度に応じた水分含有量を測定することができた。その精度の高さから、今後の研究への応用が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：

Brain edema leading to an expansion of brain volume has a crucial impact on morbidity and mortality following brain damages. It is necessary to develop a new procedure for measurement of brain water content for experiments. Here, I have developed a new method of measurement of focal brain water content by Karl-Fischer titration. The method will be useful for studies of brain edema.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 570,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，麻酔・蘇生学

キーワード：蛋白質、脳・神経、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

麻酔・集中治療領域において脳浮腫は生命予後を左右する重大な病態であり、脳浮腫の抑制は治療戦略上重要である。現在、

薬物療法、脳低温療法、開頭減圧術などが臨床における脳浮腫治療の選択肢であるが、これら種々の治療によっても脳浮腫の制御が困難な場面に遭遇することも少なくない。

このように、臨床においては重要な病態であるにもかかわらず、その発生機序は十分には解明されていない。近年、水チャネルであるアキアポリン4 (AQP4)の関与を示唆する報告がなされており、発生機序の解明に期待が寄せられている。AQP は、赤血球において水を特異的に通過させるチャネルとして1990年初期に発見された。現在までに、ほ乳類ではAQP0からAQP12の13種類が発見されており、様々な臓器に発現して、水移動の調節、細胞容積の調節、ホルモン分泌などに関与している。脳においては、AQP4は水の移動や脳脊髄液の産生・吸収に関与していることがわかってきた (Sobue K et al.: Biochim Biophys Acta, 2000)。申請者のグループは、以前からAQP4の発現調節機構や脳浮腫の病態に果たすAQP4の機能について研究をすすめてきており、細胞内情報伝達系 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase)を介したAQP4の発現調節 (Arima H et al.: J Biol Chem, 2003)、NF- κ Bを介したAQP4の発現調節 (Ito H et al.: J Neurochem, 2006)、AQP4を介したマニトールの作用発現機序 (未発表、平成16-18年度科研費若手B、代表 平手博之) など基礎的知見を蓄積してきている。これらAQP4の発現調節機構や脳浮腫の機序を解明することにより、AQPの機能を調節することによる新しい脳浮腫治療法の発見につながるものと期待している。

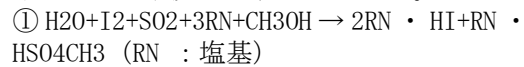
しかしながら、研究を進めいくにつれ、実験動物においてAQP4を介した水の移動を検討するためには脳水分量測定が重要であると考えに至った。今後、新しい治療法の脳浮腫抑制作用を検討するためにも、高精度の脳水分量測定は必要不可欠である。現在、一般的に使用されている脳水分量測定法は、脳全体を乾燥し、(乾燥前重量)から(乾燥後重量)を差し引くことで水分量を決定している。この方法の欠点は、組織の乾燥に非常に長時間を要すること、脳全体が検体となること、精度が不十分なこと、局所の水分量変化は測定できないことなどであり、長年にわたりこの方法に取って代わる新たな方法は普及していない。近年、MRIによる測定も可能であるが、機器が高価であるため普及には至っていない。以上のことから、安価で、簡便かつ迅速で、精度が高く、少ない検体量で脳水分量が測定できれば、当該分野の研究は進歩すると考える。

2. 研究の目的

そこで、当該研究では、新しい脳水分量測定法を開発することを主眼とし、さらには実験動物への応用が可能であることを確認す

る。具体的には、植物の水分量測定などにはすでに応用されているカールフィッシャー法を改良し、脳水分量の新しい測定法の確立を目指す。

カールフィッシャー法の基本的原理は以下の式に示す反応を利用している。



水が塩基とアルコールの存在下で、よう素、二酸化硫黄と定量的に反応することを測定原理として利用し、水の存在下では式①のような反応がおこるが、水が滴定されると、水と反応できなくなったよう素がイオン化し電位差が低下する。その電位差が低下するまでに要した試薬(塩基、よう素、二酸化硫黄含有)量から、反応したアルコール中の水分量を求め、全体の重量から水分含有量を求める測定法である。植物の種子などの水分量測定は約5分で測定が可能であり、その精度も十分に保障された測定法である (Larsson et al.: Anal Chem, 2003)。本法を脳に適用できれば、簡便迅速な水分測定を可能にし、脳室の水分などを含むことなく純粋な脳組織の水分測定ができる。また、より小さな局所脳組織の水分を測定することが可能になる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) カールフィッシャー法による脳水分量測定法の確立

カールフィッシャー法による水分測定には、メトラート社製水分量測定器(名古屋市立大学既存)を使用する。ラットを開頭し、スパーテルにてごく少量の脳を採取してアルミ箔の小片に乗せ、精密秤(名古屋市立大学既存)で重量を迅速に測定後、水分量測定器測定器に挿入・測定する。予備実験では、約20mgの脳で測定が可能であり、約80%の水分含有率を認めた。適切な検体量を決定するため、検体量を10mgから徐々に増量し、安定して測定できる検体量を決定する。

(2) 古典的脳水分量測定法との比較

新規測定法による計測結果が、古典的方法で計測した測定値と近似した数値であることを確認する。

古典的方法とは、ラットの全脳を摘出し、精密秤(名古屋市立大学既存)で重量を測定後、乾燥器(名古屋市立大学既存)にて数日間乾燥し、乾燥脳の重量を測定する。乾燥前後の重量差が含有水分量であり、乾燥前重量で除すれば水分含有率が計算できる。

(3) ラット腹腔内マニトール投与モデルにおける脳水分量測定

(1)で確立した新規脳水分量測定法をラット腹腔内マニトール投与モデルに応用し、脳水分含有量の減少を捉えることができることを確認する。

モデルの作成は、麻酔したラットの腹腔内にマニトールを投与することで行う。当該モデルは、申請者の研究室ですでに確立できており(Arima H *et al.*: J Biol Chem, 2003)、実験は円滑に実施できる。このモデルにおいて、古典的方法と新規方法により測定した脳水分含有量が近似値をとることを確認する。

(4) 脳凍結損傷モデルにおける部位別脳水分量測定

(1)で確立した新規脳水分量測定法をラット脳凍結損傷モデルに応用し、脳浮腫による水分含有量の増加を捉えることができることを確認する。

ラット脳凍結損傷モデルは、麻酔したラットに対し液体窒素を浸潤した綿棒を頭蓋骨上から押し当てることにより作成する。損傷作成12時間後に再度麻酔を施行し、脳を露出し、①浮腫部、②浮腫周囲、③損傷対側脳、以上3箇所から少量の検体を摘出し、新規測定法により部位別水分含有量を測定する。③損傷対側脳<②浮腫周囲<①浮腫部の順に水分含有量が増加する結果を得られれば、新規測定法の精度が確認できる。

4. 研究成果

(1) カールフィッシャー法による脳水分量測定法

ラットを開頭し、スパーテルにてごく少量の脳を採取してアルミ箔の小片に乗せ、精密秤(名古屋市立大学既存)で重量を迅速に測定後、水分量測定器測定器に挿入・測定する。20mgの脳で安定した測定が可能であり、約80%の水分含有率を認めた。よって、後の実験は脳組織20mgで測定を行うようにした。

(2) 古典的脳水分量測定法との比較

新規測定法による計測結果が、古典的方法で計測した測定値と近似した数値であることを確認した。ただし、脳の部位による水分含有量は、生理的状态では差がないとの仮定で行った実験である。

(3) ラット腹腔内マニトール投与モデルにおける脳水分量測定

(1)で確立した新規脳水分量測定法をラット腹腔内マニトール投与モデルに応用し、脳水分含有量の減少を捉えることができることを確認した。経時的な脳水分量の低下を認めた。このモデルにおい

て、古典的方法と新規方法により測定した脳水分含有量が近似値をとることを確認した。

(4) 脳凍結損傷モデルにおける部位別脳水分量測定

(1)で確立した新規脳水分量測定法をラット脳凍結損傷モデルに応用し、脳浮腫による水分含有量の増加を捉えることができることを確認した。①浮腫部、②浮腫周囲、③損傷対側脳、以上3箇所から少量の検体を摘出し、新規測定法により部位別水分含有量を測定する。③損傷対側脳<②浮腫周囲<①浮腫部の順に水分含有量が増加する結果を得ることができ、新規測定法の部位による水分量の違いをとらえることができることがわかった。今後の研究への応用が期待できる。

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2件)

- ① Morisima M, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate Hiroyuki, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K: Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neuroscience Research* 61(1) 18-26, 2008. 査読あり
- ② 祖父江和哉、平手博之、飯田裕子、高柳猛彦: 脳浮腫の発症機序と水チャンネル「アクアポリン」の機能. *Anesthesia 21Century* 10: 1835-1839, 2008. 査読あり

[学会発表](計2件)

- ① 高柳猛彦、平手博之、藤田義人、松本麗、祖父江和哉、浅井清文: ラット敗血症モデルの副腎におけるアクアポリン(AQP)の発現. 日本麻酔科学会第56回学術集会 2009.8.17 神戸.
- ② 平手博之、有馬一、高柳猛彦、飯田裕子、伊藤弘晃、成松紀子、藤田義人、薊隆文、浅井清文、祖父江和哉: マニトールによる水チャンネル aquaporin4 を介した脳水分量調節機構. 36 回日本集中治療医学会学術集会 2009.2.26 大阪.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科麻酔・危機
管理医学分野ホームページ URL
<http://www.ncu-masui.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平手 博之 (HIRATE HIROYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20363939

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし