

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591857

研究課題名（和文）マグネシウム溶液持続脳槽内投与を用いた常温冬眠療法による新しい脳保護法の開発

研究課題名（英文）Development of new neuro-protective and normo-thermic hibernation therapy using intra-cisternal infusion of magnesium sulfate solution

研究代表者

森 健太郎 (Mori Kentaro)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30200364

研究成果の概要（和文）：冬眠動物の脳内マグネシウムイオン(Mg²⁺)濃度が上昇することに注目し、硫酸マグネシウム溶液(MgSO₄)を脳槽内あるいは脳内に持続的に注入することによる新しい脳保護法を開発した。この方法が全脳虚血後の海馬神経細胞の遅延性神経細胞死を抑制しうることを証明するとともに、この脳保護作用が脳循環代謝の抑制を伴わないことを証明した。

研究成果の概要（英文）：During mammalian hibernation, magnesium ion (Mg²⁺) concentration in the brain increases. Based on this fact, we developed the new neuro-protective therapy using cisternal or intra-cerebral magnesium sulfate solution infusion. We demonstrated this therapy suppressed the delayed neuronal death in the hippocampal neurons after the global ischemia. We also showed this neuro-protective effect was not mediated by the suppression of the cerebral blood flow and metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学・脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：マグネシウム、脳保護法、遅延性脳神経細胞死、海馬、脳循環代謝

1. 研究開始当初の背景

脳虚血性疾患や脳損傷、あるいは脳神経外科手術における一時的な脳血管遮断などに

対する脳保護法には脳低温療法などがあるが臨床的には十分な効果が無いのが現状である。そのため、臨床サイドから新しい脳

保護法の必要性が求められているのが現状である。冬眠動物では冬眠中の脳や脳脊髄液のマグネシウムイオン濃度(Mg²⁺)が25~50%上昇することが知られており、中枢神経の Mg²⁺濃度を上昇させれば新たな脳保護法となりえるとの発想を得た。

2. 研究の目的

- (1) 脳槽あるいは脳内に硫酸マグネシウム溶液(MgSO₄)を持続的に注入することによる新しい脳保護療法の開発を目的とする。
- (2) この脳保護法が脳循環代謝の変化を介するものか否かを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 脳槽あるいは脳内に硫酸マグネシウム溶液(MgSO₄)を持続的に注入することによって脳保護作用が可能か否かを検討するため、Rat の全脳虚血による遅発性神経細胞死が抑制されるかについて検討した。Day 1にSD ratの背部に種々の注入溶液を入れた浸透圧ポンプを留置し、その注入カテーテルを脳槽(大槽)に留置した(脳槽注入群)。Day3に頸動脈および椎骨動脈の4本を10分間遮断する全脳虚血負荷を与える。脳槽注入群では30匹のratを4群に分けた。すなわち、Sham群(虚血負荷あり、N=6)、Ringer群(Ringer液を注入、N=8)、50 mmol/L MgSO₄群(50 mmol/LのMgSO₄溶液を注入、N=8)、100 mmol/L MgSO₄群(100 mmol/LのMgSO₄溶液を注入、N=8)である。浸透圧ポンプはalzet Model 2ML2で注入速度は5 μl/hrである。Day7にて、脳を還流固定して摘出し、海馬を中心に3 μmの冠状断切片を作成し、海馬CA1領域錐体細胞の生細胞数をhematoxylin-eosin (HE)染色にて定量的(生細胞数/mm)に測定するとともに、死細胞数はFluoro-Jade B (FJB)染色して定量的

(死細胞数/mm)を測定した。一方、Day1に同様に浸透圧ポンプを留置し、その注入カテーテルを一側(左)海馬CA1近傍に留置した(脳内注入群)。Day3に10分間の全脳虚血を負荷した。脳内注入群では32匹のratを4群に分けた。すなわち、Sham群(虚血負荷無し、N=6)、Ringer群(Ringer液を注入、N=6)、1 mmol/L MgSO₄群(1 mmol/LのMgSO₄溶液を注入、N=10)、10 mmol/L MgSO₄群(10 mmol/LのMgSO₄溶液を注入、N=10)である。浸透圧ポンプはalzet Model 2001で注入速度は1 μl/hrである同様にday7にて海馬CA1領域錐体細胞の生細胞数と死細胞数を定量的に測定した。

- (2) 脳槽あるいは脳内に硫酸マグネシウム溶液(MgSO₄)を持続的に注入することによる脳循環代謝への影響を調べるために、注入開始後Day5にて局所脳血流量(CBF)と局所脳グルコース代謝率(CMRglu)を定量測定した。CBFは¹⁴Ciodoantipyrineを用いて(Sakurada法)、CMRgluは¹⁴Cdeoxyglucoseを用いて(Sokoloff法)、それぞれ定量的autoradiogramを作成して測定した。脳槽注入群では3群に分け、それぞれCBFとCMRgluを測定した。すなわち、Sham群(N=5)、NS群(生理的食塩水を注入、N=5)、100 mmol/L MgSO₄群(100 mmol/L MgSO₄溶液注入群、N=5)である。一方、脳内注入群(左海馬CA1近傍)では10 mmol/L MgSO₄溶液を左海馬近傍に注入し、それぞれCBFとCMRgluを測定した。なお、脳内19か所にてそれぞれの局所CBFおよびCMRgluを測定した。

4. 研究成果

(1) 脳槽注入群での海馬 CA1 の生細胞数と死細胞数を図 1 に提示する。生細胞数は Ringer 群、50 mmol/L MgSO₄ 群、100 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 38±12、32±11、95±42 であり、100 mmol/L MgSO₄ 群が他の群に比べて有意に生細胞数が増加していた(p<0.01)。死細胞数は、Ringer 群、50 mmol/L MgSO₄ 群、100 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 181±31、181±33、95±37 であり、100 mmol/L MgSO₄ 群が他の群に比べて有意に死細胞数が減少していた(p<0.01)。脳内注入群での海馬 CA1 の生細胞数と死細胞数を図 2 に提示する。非注入側(右)における生細胞数は Ringer 群、1 mmol/L MgSO₄ 群、10 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 39±11、47±13、52±20 と差がなかった。注入側(左)における生細胞数は Ringer 群、1 mmol/L MgSO₄ 群、10 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 37±10、82±36、176±61 と、10 mmol/L MgSO₄ 群が他群に比べて有意に生細胞数が増加していた(p<0.01)。非注入側における死細胞数は、Ringer 群、1 mmol/L MgSO₄ 群、10 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 175±36、180±26、145±31 と 10 mmol/L MgSO₄ 群で有意に減少していた(p<0.05)。注入側での死細胞数は、Ringer 群、1 mmol/L MgSO₄ 群、10 mmol/L MgSO₄ 群で、それぞれ 158±32、126±39、21±33 と 10 mmol/L MgSO₄ 群では他群に比べて有意に死細胞数が減少していた(p<0.01)。以上より、脳槽注入群および脳内注入群の両法において、MgSO₄ 溶液の投与が遅延性細胞死を有意に減少させることが判明した。

図 1 脳槽注入群での海馬 CA1 の生細胞数と死細胞数

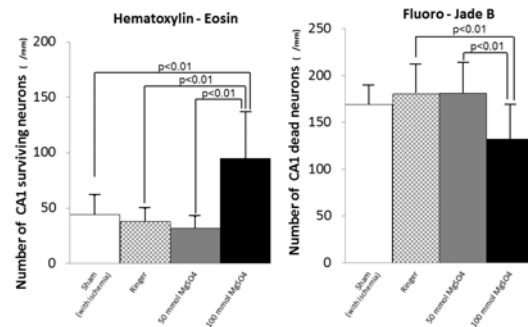
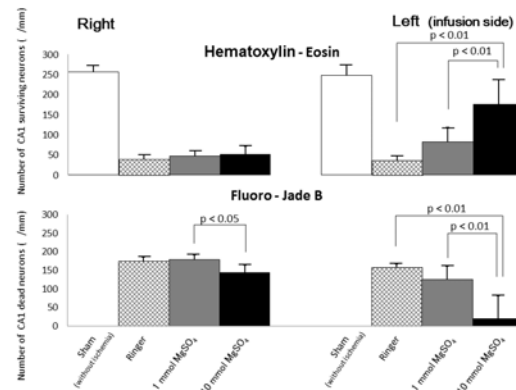


図 2 脳内注入群での海馬 CA1 の生細胞数と死細胞数



(2) Table 1 に脳槽内投与群と脳内投与群の海馬 CA1 および CA3 領域の CBF と CMRglu を提示する。両群とも海馬 CA1 領域における CBF および CMRglu の有意の差は認めなかった。以上より、MgSO₄ 溶液の脳槽内および脳内投与による海馬 CA1 領域による遅延性神経細胞死の抑制効果は、脳循環代謝の抑制を伴わない効果であることが判明した。

CBF (ml/g/min) in the cisternal infusion groups

Location	Sham	NS	Mg	P value
CA1	0.87±0.13	0.94±0.20	0.93±0.17	NS
CA3	0.87±0.13	0.84±0.13	0.82±0.12	NS

CMRglu (μ mol/g/min) in the cisternal infusion groups

Location	Sham	NS	Mg	P value
CA1	0.45 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02	0.42 \pm 0.05	NS
CA3	0.36 \pm 0.05	0.33 \pm 0.02	0.34 \pm 0.04	NS

CBF (ml/g/min) in the intra-cerebral infusion groups

Location	Right	Left	P value
CA1	0.86 \pm 0.13	0.72 \pm 0.14	NS
CA3	0.75 \pm 0.09	0.71 \pm 0.04	NS

CMRglu (μ mol/g/min) in the intra-cerebral infusion groups

Location	Right	Left	P value
CA1	0.56 \pm 0.06	0.50 \pm 0.05	NS
CA3	0.45 \pm 0.05	0.43 \pm 0.04	NS

Data are presented as mean \pm standard deviation.

NS: not significant, CBF: cerebral blood flow,

CMRglu: cerebral metabolic rate of glucose

Table 1 脳槽内投与群と脳内投与群の海馬の脳循環代謝

5. 主な発表論文等

雑誌論文(計 5 件)

- ① Mori K, Yamamoto T, Nakao Y, Osada H, Hara Y, Oyama K, Esaki T: Initial clinical experience of vasodilatory effect of intra-cisternal infusion of magnesium sulfate for the treatment of cerebral vasospasm after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 49, 2009, 139-144 査読有
- ② Mori K, Miyazaki M, Hara Y, Aiko Y, Yamamoto T, Nakao Y: Novel vasodilatory effect of intra-cisternal injection of magnesium sulfate solution on

spastic cerebral arteries in the canine two-hemorrhage model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 110, 2009, 73-78、2009 査読有

- ③ Mori K, Yamamoto T, Miyazaki M, Hara Y, Aiko Y, Koike N, Sakamoto S, Nakao Y, Esaki T: Optimal cerebrospinal fluid magnesium ion concentration for vasodilatory effect and duration after intracisternal injection of magnesium sulfate solution in the canine subarachnoid hemorrhage model. *J Neurosurg* 114, 2011, 1168-1175 査読有
- ④ Mori K, Miyazaki M, Hara Y, Aiko Y, Yamamoto T, Nakao Y, Esaki T: Temporal profile of the effects of intracisternal injection of magnesium sulfate solution on vasodilation of spastic cerebral arteries and CSF magnesium ion concentration in the canine SAH model. *Acta Neurochir Suppl* 110, 2011, 39-42 査読有
- ⑤ Mori K, Yamamoto T, Miyazaki M, Hara Y, Aiko Y, Koike N, Sakamoto S, Nakao Y, Esaki T: Effect of intrathecal magnesium sulfate solution injection via a microcatheter in the cisterna magna on cerebral vasospasm in the canine subarachnoid haemorrhage model. *Br J Neurosurg* 26, 2012, 64-68 査読有

学会発表(計10件)

- ① Kentaro Mori, Masahiro Miyazaki, Junko Iwata: Intra-cisternal infusion of magnesium solution reverses the reduced cerebral blood flow induced by experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. Brain '07&BrainPET' 07 平成19年5月23日(大阪)
- ② 森 健太郎、宮崎 正弘、原 保和、愛甲 泰久: 犬およびRatクモ膜下出血モデルを用いた脳槽内マグネシウム(Mg)投与による脳血管レン縮改善効果。第24回スパズムシンポジウム、平成20年3月20日(京都)
- ③ 森 健太郎、山本 拓史、中尾 保秋: 硫酸マグネシウム溶液の脳槽内持続注入による症候性脳血管レン縮の治療。第25回スパズム・シンポジウム(Stroke2009)。平成21年3月20日(島根)
- ④ Mori K: Temporal profile of the effects of intracisternal injection of magnesium sulfate solution on vasodilation of spastic cerebral arteries and CSF magnesium ion concentration in the canine SAH model. 10th international Conference on Cerebral Vasospasm. 平成21年10月9日、Chongqing, China
- ⑤ 森 健太郎、山本 拓史、中尾 保秋、江崎 孝徳: 硫酸マグネシウム(MgSO₄)溶液脳槽内投与によるコイル塞栓術後の脳血管攣縮治療法の開発。第26回スパズム・シンポジウム。平成22年4月15日(盛岡)
- ⑥ Mori K: Intracisternal infusion of magnesium sulfate after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: What is the

evidence? International STROKE Conference 2011, February 10, 2011 (Los Angeles), invited

- ⑦ Mori K, Yamamoto T, Hasegawa H, Nakao Y, Esaki T: Intracisternal magnesium injection therapy (Experimental data for its clinical application). 11th International Conference of Neurovascular Events after SAH (Vasospasm 2011) July 21, 2011 (Cincinnati)
- ⑧ 森 健太郎、山本 拓史、中尾 保秋、江崎 孝徳: 脳槽内硫酸マグネシウム溶液投与によるレン縮血管拡張作用の至適脳脊髄液Mg ion濃度と作用時間の定量的検討。第27回スパズム シンポジウム、平成23年7月29日(京都)
- ⑨ 森 健太郎: 脳脊髄液中のマグネシウムイオン濃度がくも膜下出血後の脳血管レン縮に及ぼす影響。第89回日本整理学会大会、(シンポジウム) 平成24年3月29日(松本)
- ⑩ 森 健太郎、山本 拓史、中尾 保秋、江崎 孝徳: 硫酸マグネシウム溶液の脳保護作用がSAH後のearly brain injuryによる脳虚血損傷を軽減する可能性について。第28回スパズムシンポジウム、平成24年4月26日(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健太郎 (MORI KENTARO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 30200364

(2) 研究分担者

山本 拓史(YAMAMOTO TAKUJI)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号: 50271276

中尾 保秋(NAKAO YASUAKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50255684