

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 2 月 8 日現在

機関番号：11101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26861137
研究課題名(和文) Early Brain Injuryに対するスタチン・エダラボンの効果

研究課題名(英文) Effect of statin Edaravone for Early Brain Injury

研究代表者

奈良岡 征都 (Naraoka, Masato)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10455751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット内頸動脈穿通によるくも膜下出血モデル作成を行った。手技に先立って左頭部穿頭を行い、左前頭葉へ脳圧センサー先端を挿入、留置してくも膜下出血作成前から持続的に脳圧をモニタリングしている。作成したラットくも膜下出血モデルに対して治療群を作成、24時間後に安楽死を行い検討を行った。アポトーシスの検出としてTUNEL染色およびカスパーゼ3、さらに抗ラジカル染色を追加した。血管脳関門の破綻についてはMMP-9をELISAにて測定、エダラボンにて有意差を持って治療効果が得られた。脳底動脈血管面積測定にて評価を行ったところ、エダラボン治療群にて有意に攣縮治療効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Rat SAH model by endovascular perforation from the internal carotid artery was performed. Prior to the procedure, the left head is drilled, the tip of the brain pressure sensor is inserted into the left frontal lobe, and the intracerebral pressure(ICP) is continuously monitored from before SAH. A treatment group was prepared for the rat subarachnoid hemorrhage model which was prepared, and euthanasia was conducted 24 hours later and examination was conducted. TUNEL staining and caspase 3(ELISA) as well as anti-radical staining were added as detection of apoptosis. Regarding the breakdown of the blood vessel brain barrier(BBB), MMP - 9 was measured by ELISA, and treatment effect was obtained with significant difference in edaravone. As a result of evaluation on basal artery blood vessel area measurement, the effect of treating cerebral vasospasm was significantly recognized in the Edaravone treatment group.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 早期脳損傷 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

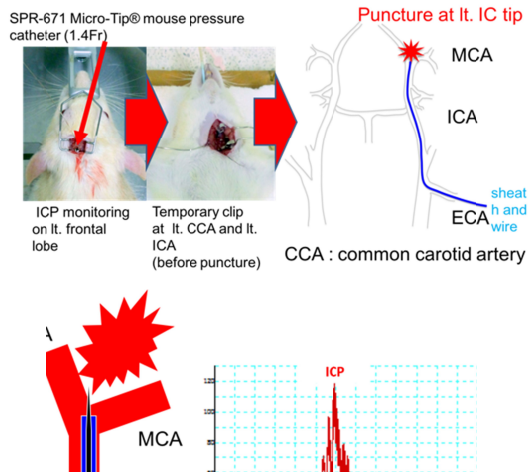
くも膜下出血後には頭蓋内圧亢進による脳虚血に基づく脳損傷 (necrosis と cytotoxic edema) が生じることが古くから指摘されてきた。最近ではくも膜下出血に由来する様々な反応や物質により、apoptosis による神経細胞死、内皮細胞 apoptosis や血液脳関門破綻による vasogenic edema が生じ、病態が進展することが示されている。くも膜下出血後には oxyhemoglobin の生成と引き続く hydroxyl radical などの活性酸素の産生により酸化ストレスが増大する。最近、こうした酸化ストレスが、apoptosis による神経細胞死、内皮細胞 apoptosis や血液脳関門破綻による脳浮腫を引き起こし得ることが指摘されている。

2. 研究の目的

脳動脈瘤性くも膜下出血の超急性期に生じる脳障害は、頭蓋内圧亢進とともにくも膜下血腫由来の様々な物質、反応により引き起こされることが示されている。こうした病態は、最近、Early Brain Injury と称され、超急性期の重症度を左右するとともに、遅発性の脳血管攣縮発生や予後に多大なる影響を与えることで注目されている。従って、Early Brain Injury を最小限に抑えることで、予後の向上が期待される。酸化ストレスが Early Brain Injury を引き起こす一大要素であることが示されているために、酸化ストレスを抑制することで、Early Brain Injury を予防できるかどうかを解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ラット内頸動脈穿通によるくも膜下出血モデルを用いてエダラボン投与を行い、Early Brain Injury に対する効果について検討した。

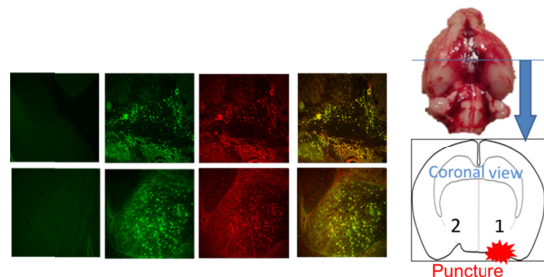


アポトーシスの検出として TUNEL 染色およびカスパーゼ 3、さらに抗ラジカル染色を追加した。血管脳関門の破綻については MMP-9 を ELISA にて測定、エダラボンにて有意差を持って治療効果が得られた。脳底動脈血管面積測定にて脳血管攣縮評価を行った。

4. 研究成果

アポトーシスの検出として TUNEL 染色およびカスパーゼ 3 を ELISA にて測定し、さらに抗ラジカル染色を追加した。

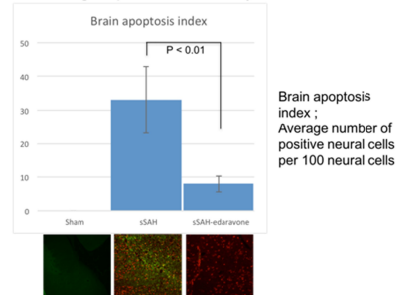
脳圧亢進に比例してアポトーシスが増加し、Early brain injury の発生が確認できた。



ICP	41	43	52	55	68	70	79	84	86	88	92	110	120
Area 1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Area 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

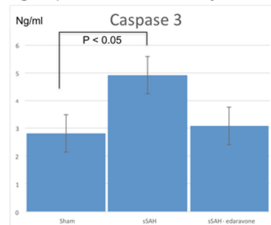
Apoptosis appeared significantly in the rats that over 90mmHg of ICPmax after puncture.

• Apoptosis of sSAH-edaravone group appeared a tendency to decrease than sSAH group with statistically difference.



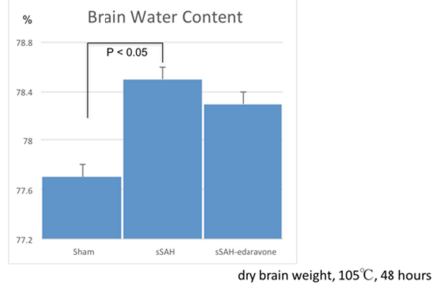
一方、いずれの項目においてもエダラボン治療群において改善傾向は認められたものの、有意差は得られなかった。

• Caspase 3 was suppressed in the sSAH-edaravone group compared to the sSAH group without statistically difference.



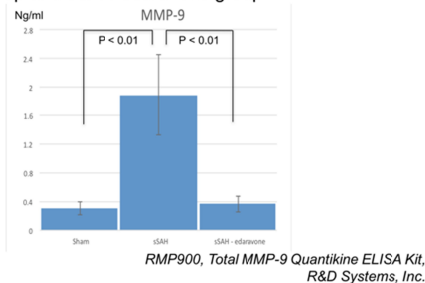
CSB-E08857R, Caspase 3 ELISA Kit, Cusabio Biotech Co., Ltd.

- Brain edema improved in the sSAH-edaravone group compared to the sSAH group without statistically difference.



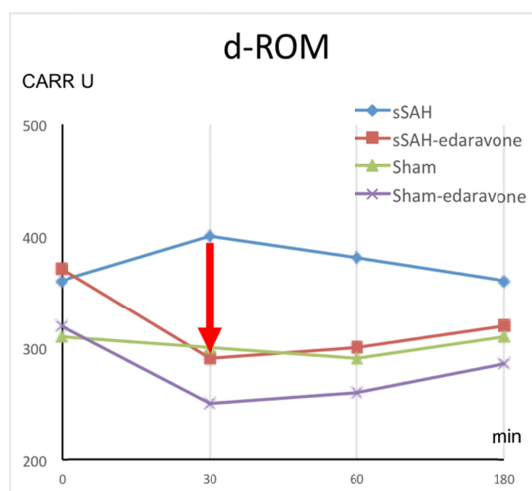
脳浮腫については脳乾燥法による重量測定を行ったが、エダラボンによる治療効果は明らかにはできなかった。血管脳関門の破綻についてはMMP-9をELISAにて測定、エダラボンにて有意差を持って治療効果が得られた。

- MMP-9 had been prevented statistically difference between sSAH group and sSAH-edaravone group.



なお、計画ではEvans blueの漏れも試みたが、脳圧センサー部位から人為的な漏れが見られ、評価の対象外となった。

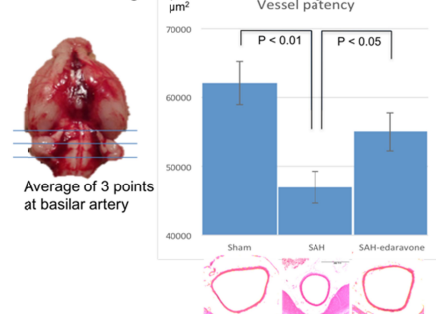
酸化ストレスの測定をd-ROMを末梢血から測定したところ、くも膜下出血作成後30分においてエダラボンによる治療効果が確認できた。



Normal range : 200-300 CARR U
1 CARR U is equivalent to 0.08 mg H₂O₂/dL

最後に、Early brain injuryに伴う脳血管攣縮とその治療効果につき脳底動脈血管面積測定にて評価を行ったところ、エダラボン治療群にて有意に攣縮治療効果が認められた。

- Vasospasm improved in the sSAH-edaravone group compared to the sSAH group with statistically difference.



以上の結果の総括から、くも膜下出血後のEarly brain injuryは脳圧亢進に相関すること、エダラボンの治療効果は、とくに血管脳関門破綻抑制によって効果が認められたこと、機序は不明であるが、脳血管攣縮の治療効果も得られたこと、が挙げられる。

	Effect of Edaravone	Statistically difference
Oxidative stress	d-ROM : tendency to improve significantly improved at 30min	+
Apoptosis	TUNEL : tendency to improve Caspase3 : improved?	+ -
Brain edema	Brain Water Content : a little improved or no change	-
Disruption of BBB	MMP-9 : significantly improved	+
Vasospasm	Vessel patency : improved	+

くも膜下出血直後からのエダラボン投与の有効性が示唆された。エダラボンすなわちfree radical scavengerがどのような機序でこれらの治療効果を発揮しているかが今後の課題である。

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4件)

以下、全て査読有り。

Naraoka Masato, Matsuda Naoya, Shimamura Norihito, Asano Kenichiro, Akasaka Kenichi, Takemura Atushito, Hasegawa Seiko, Ohkuma Hiroki. Long-acting statin for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Cereb Blood Flow Metab. 1:271678X17724682. doi:10.1177/0271678X17724682. [Epub ahead of print] (2017)

Akira Munakata, Masato Naraoka, Takeshi Katagai, Norihito Shimamura, Hiroki Ohkuma. Role of Cyclooxygenase-2 in Relation to Nitric Oxide and Endothelin-1 on Pathogenesis of Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage in Rabbit. Transl. Stroke Res. 27:443-61 (2016)

Naoya Matsuda, Masato Naraoka, Hiroki Ohkuma, Norihito Shimamura, Katsuhiko Ito, Kenichiro Asano, Seiko Hasegawa, Atsuhito Takemura. Effect of Cilostazol on Cerebral Vasospasm and Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Cerebrovasc Dis. 42:97-105 (2016)

Naraoka, Masato, Matsuda, Naoya, Shimamura, Norihito, Asano, Kenichiro, Ohkuma, Hiroki. The role of arterioles and the microcirculation in the development of vasospasm after aneurysmal SAH. BioMed Research International 25:3746 (2014)

〔学会発表〕(計3件)

Masato Naraoka, Toshio Fumoto, Liang Wang, Naoya Matsuda, Norihito Shimamura, Hiroki Ohkuma. Efficacy of edaravone, a free radical scavenger, on early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. Early brain injury (EBI). The 84th AANS Annual Scientific Meeting at McCormick Place West in Chicago (USA), Illinois April 30th- May 4th 2016.

Masato Naraoka, Toshio Fumoto, Liang Wang, Naoya Matsuda, Norihito Shimamura, Hiroki Ohkuma. Efficacy of edaravone, a free radical scavenger, on early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. 13th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage. Karuizawa Prince Hotel West (Karuizawa, Nagano), September 17th-19th 2015.

奈良岡征都、松田尚也、嶋村則人、大熊洋揮 脳血管攣縮時の脳虚血に対し脳主幹動脈狭小化はどの程度関与しているか

第31回スパズムシンポジウム リーガロイヤルホテル広島(広島県、広島市)
2015.3.26

〔その他〕
ホームページ：
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neuros/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
奈良岡征都(Naraoka, Masato) 弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10455751

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()