

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月2日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18371

研究課題名(和文) 頭蓋内血腫除去術後の再灌流障害に対する新規治療戦略の開発—水素治療効果の検討—

研究課題名(英文) Hydrogen therapy for re-perfusion injury after removal of intracranial hematoma

研究代表者

竹内 誠 (Satoru, Takeuchi)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・脳神経外科学・助教)

研究者番号：30794127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、頭蓋内血腫除去術後の再灌流障害に対する水素投与の効果調べた。まず、急性硬膜下血腫除去モデルを用い、水素投与群、非投与群、sham群に分けた。6時間後及び24時間後の組織学的検討において、水素投与群では、脳皮質における8-OHdG陽性細胞数の減少、TUNEL陽性細胞の減少、Water contentの減少を認めた。また、水素投与群では、24時間後の脳損傷体積の減少、神経学的所見の改善を認めた。次に、脳出血除去モデルを用いて検討したが、水素の効果は確認できなかった。本研究により、少なくとも急性硬膜下血腫術後における水素投与は新たな治療戦略の1つとなり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性硬膜下血腫は、依然、重篤な外傷である。重症である場合、減圧開頭を含む開頭血腫除去などの手術が選択されるが、血腫除去術に脳腫脹が進行し、難治性の頭蓋内圧亢進状態となる場合があり、再灌流障害は病態の1つとして注目されている。また、活性酸素腫が再灌流障害の病態に深く関与していることが示されており、我々は、強い抗酸化作用を示す水素が治療手段の1つとなり得ると考え、本研究を施行した。本研究により、急性硬膜下血腫術後における水素投与は、再灌流障害を抑制することにより機能予後改善につながることを示唆され、新たな治療戦略の1つとなり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of hydrogen against re-perfusion injury after removal of intracranial hematoma. We examined that effect using rat subdural hematoma evacuation model (experiment 1) and rat intracerebral hematoma evacuation model (experiment 2). Experiment 1. Rats were randomly divided into three groups: sham, non-hydrogen group (vehicle), hydrogen group. The evaluations of histological and functional outcome were done at 6 and 24 hours after the insult. Hydrogen group exhibited a significantly lower number of 8-OHdG and TUNEL positive cells in the brain cortex at 6 and 24 hours after the insult. At 24 hours, hydrogen reduced brain injury volume and improved functional outcome. Experiment 2. Rats were randomly divided into three groups: sham, non-hydrogen group (vehicle), hydrogen group. The evaluations of histological and functional outcome were done at 6 and 24 hours after the insult, however the results showed no beneficial effect of hydrogen.

研究分野：脳神経外科

キーワード：急性硬膜下血腫 脳出血 再灌流障害 酸化ストレス 水素

## 1. 研究開始当初の背景

急性硬膜下血腫や脳出血などの頭蓋内血腫は、いずれも予後不良例が約 30%存在する重症な疾患群である。いずれの頭蓋内血腫も血腫量が多く、神経学的異常を認める場合には血腫除去術の適応となり得る。しかし、血腫除去術に脳腫脹が進行し、難治性の頭蓋内圧亢進状態となる症例をしばしば経験する。反跳性の頭蓋内圧亢進の機序の1つとして、「血腫圧迫時の周囲脳への低灌流」が手術により解除されたことによる「再灌流」が関与していることが報告されている(再灌流障害)再灌流障害の機序は多因子的であると考えられているが、活性酸素種の増加が2次性脳損傷を助長することが重要視されている。一方、2007年、初めて水素が抗酸化物質として有効であり活性酸素種由来の傷害から細胞を保護すると報告された(Ohsawa et al. Nature Medicine 2007)。この報告以降、抗酸化物質としての水素に注目が集まり、水素ガス吸入や水素ガス含有水の投与によって、脳梗塞、虚血性肺障害、虚血性心疾患、虚血性肝障害や敗血症など各種疾患モデルにおいて臓器保護効果が認められている。我々も、脳梗塞、くも膜下出血などにおいて、水素投与効果について基礎・臨床の両面から研究し、報告を続けてきた(Nagatani et al. Shock 2012; Takeuchi et al. Intern Med 2012; Takeuchi et al. BMC Neurol 2014; Takeuchi et al. BMC Neurosci 2015)。さらに、近年では、重症頭部外傷モデルや脳出血モデルでの水素の効果を示す報告も相次ぎ、新たな治療ターゲットとして注目されている。しかし、頭蓋内血腫除去後の水素投与効果を検討した研究は存在しなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、頭蓋内血腫除去術後の再灌流障害に対する水素投与の効果を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1)急性硬膜下血腫除去モデル

Yokoboriらのモデルを応用した(Yokobori et al. J Neurosurg 2013)。イソフルランによる全身麻酔及び気管挿管・人工呼吸管理下のラット(Sprague Dawley rat、雄、9-11週)の頭頂部を皮膚切開し、プレグマから2mm右、3mm後方の位置に骨窓を設けた。顕微鏡下に硬膜を切開し、先端を鈍に形成したJ型の23ゲージ針を硬膜下に挿入した。尾動脈から採取した自己血を硬膜下に持続注入(350  $\mu$ l、7分間)した。注入後、1時間において15 $\times$ 6mmの開頭を行い血腫を除去した。手技中は持続的なバイタルサインのモニタリングを行うとともに、10分毎にを用いて、血液ガス分析を行い、pO<sub>2</sub>、pCO<sub>2</sub>、pHを一定に保った。また、持続的頭蓋内圧モニターを行い、レーザードップラー血流&表面温度モニター及び聴診器型プローブで血腫除去前後の脳血流を測定した。本モデルを水素水静脈投与群、非投与群、sham群に分けたうえで6、24時間後の脳組織検出、行動評価を行った。組織学的評価として、Brain water content、TTC染色(損傷量の評価)、Albumin染色(脳血液関門破綻の評価)、Nissl & TUNEL染色(apoptosis評価)、8-OHdG染色(核酸化ストレス評価)を行った。また、それぞれWestern blotにて定量を行った。

### (2)脳出血除去モデル

申請者が過去に報告したモデルを応用した(Takeuchi et al. Turk Neurosurg 2016)。全身麻酔及び気管挿管・人工呼吸管理下のラット(Sprague Dawley rat、雄、9-11週)の頭頂部の皮膚切開し、プレグマから1mm前、4mm右に骨窓を設けた。27ゲージ針を右基底核に挿入し(骨表面から5mm腹側)、尾動脈から採取した自己血を持続注入(50  $\mu$ l、5分間)した。注入後、1時間において、血腫腔内に recombinant tPA (12  $\mu$ l) を注入し、血腫を吸引除去した。その他、全身管理、評価項目に関しては上記急性硬膜下血腫除去モデルと同様とした。

## 4. 研究成果

### (1)急性硬膜下血腫除去モデル

6時間後及び24時間後の組織学的検出において、水素投与群では、脳皮質における8-OHdG陽性細胞数の減少、TUNEL陽性細胞の減少、Water contentの減少を認めた(P<0.05 vs 非投与群)。また、水素投与群では、24時間後の脳損傷体積の減少、神経学的所見の改善を認めた(P<0.05 vs 非投与群)。つまり、急性硬膜下血腫除去モデルにおいて、水素投与は酸化ストレスを抑制し、機能改善効果を示すことを見出した(現在論文作成のため、本報告では結果の図示は行わない)。

### (2)脳出血除去モデル

6時間後及び24時間後の病理学的検出のみならず神経機能上も水素の効果は確認できなかった。本モデルにおいては、個体により脳損傷の程度に差があることを確認したため、negative resultとなった可能性があると考えている。

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

本研究により、少なくとも急性硬膜下血腫術後における水素投与は新たな治療戦略の1つとなり得ることが示唆された。今後、本モデルを用い、水素投与がBBB破綻抑制効果等を有するかを検討する予定である。

<引用文献>

Ohsawa et al, Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals, Nat Med, 2007, 13(6):688-694

Takeuchi S et al, Hydrogen may inhibit collagen-induced platelet aggregation: an ex vivo and in vivo study, Intern Med, 2012, 51(11):1309-1313

Takeuchi S et al, Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats, BMC Neurosci, 2015, 20;16:22

Takeuchi S et al, Effects of intravenous infusion of hydrogen-rich fluid combined with intra-cisternal infusion of magnesium sulfate in severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: study protocol for a randomized controlled trial, BMC Neurol, 2014, 14:176.

Nagatani K, Wada K, Takeuchi S et al, Effect of hydrogen gas on the survival rate of mice following global cerebral ischemia, Shock, 2012, 37(6):645-652

Yokobori S et al, Neuroprotective effect of preoperatively induced mild hypothermia as determined by biomarkers and histopathological estimation in a rat subdural hematoma decompression model, J Neurosurg, 2013, 118(2):370-380

Takeuchi S et al, Hydrogen does not Exert Neuroprotective Effects or Improve Functional Outcomes in Rats After Intracerebral Hemorrhage, Turk Neurosurg, 2016, 26(6):854-859

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

竹内誠 他、重症くも膜下出血患者に対する水素点滴投与及び脳槽内マグネシウム投与の有用性に関するランダム化比較試験 - 中間報告 -、第34回スパズムシンポジウム、2018

竹内誠 他、頭部銃創 - 基本事項及び最新の知見、第41回日本脳神経外傷学会、2018

竹内誠 他、頭部銃創 - 適切な診断・治療の point、第23回日本脳神経外科救急学会、2018

〔図書〕(計 1件)

竹内誠 他、Medical View、老年脳神経外科診療マニュアル、2018、218-224

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

6. 研究組織

(1)研究分担者 研究分担者氏名  
なし

(2)研究協力者 研究協力者氏名  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。