

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10834

研究課題名(和文) ラット脳出血モデルにおけるDFX治療の至適用法・容量の検討

研究課題名(英文) Effects of Deferoxamine on intracerebral hemorrhage-induced brain injury

研究代表者

岡内 正信 (Okachi, Masanobu)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50615036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳出血に対する2次的脳損傷に対するデフェロキサミン(DFX)の治療効果を検討した。SDラットの右基底核に100 $\mu$ lの自己動脈血を定位的に注入することで脳出血モデルを作成した。DFXの投与濃度、投与期間、投与するタイミングを検討した。評価は、DFX治療3日後の脳浮腫、56日後の脳萎縮およびその期間の神経症状にて行った。DFXはラット脳出血モデルにおいて脳浮腫を軽減させ、神経脱落症状を改善し、脳萎縮を抑制した。DFXの至適濃度は50mg/kg、治療期間は7日間、治療開始時期は脳浮腫に対しては12時間以内、神経症状および脳萎縮に対しては24時間以内であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳出血後の脳浮腫、脳萎縮および神経脱落症状は、患者の予後を左右する重大な因子である。鉄キレート剤であるDFXは脳出血後の脳損傷を改善できることが示唆された。本実験にてDFXの適切な濃度、投与期間、投与タイミングを示した。このデータは、今後脳出血に対するDFX治療が臨床応用されていく上で非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether Deferoxamine (DFX) is effective on brain injury after ICH in SD rats. Autologous whole blood (100  $\mu$ L) was injected into the right basal ganglia. We explored optimal DFX dose, potential therapeutic time windows, and optimal therapeutic durations. DFX can reduce ICH-induced brain injury in rats and that a dose 50mg/kg is the optimal dose of DFX. DFX administration, when begun within 12 hours after ICH, reduced brain edema. DFX treatment started 2 hours after ICH and administrated for 7 days attenuated ICH-induced brain atrophy and neurological deficits. DFX attenuated brain atrophy and neurological deficits when begun within 24 hours and administrated for 7 days.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳出血 デフェロキサミン 脳浮腫 脳萎縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳出血は脳卒中の中でも頻度が比較的高く、重篤な症状を呈する疾患である。脳出血による脳障害としては、血腫そのものによる物理的な脳損傷に加え、亜急性期に脳浮腫が生じ、それにより神経脱落症状が進行し、長期的には脳萎縮を来す。これらの脳出血後の2次的脳損傷には様々な因子が関与している。

鉄は正常な細胞機能に不可欠であり、酸化還元作用などの重要な生理作用を担っている。しかし脳内に過剰な鉄が存在すると、フリーラジカルの産生を介して酸化障害を引き起こす。脳出血後、脳内の血腫は赤血球融解を来してヘモグロビンが放出され、ヘモオキシゲナーゼを介して鉄が産生される。これにより脳内の鉄密度が異常高値となる。ラット脳出血モデルにおいて脳出血後には脳内の鉄濃度が約3倍に増加し、少なくとも数週間は高濃度に維持されると報告されている (Stroke 34: 2964-2969, 2003)。

Deferoxamine (DFX) は鉄キレート剤で、ヘモクロマトーシスや輸血後鉄過剰症などの治療薬として使用されている。DFXは投与後速やかに脳血液関門を通過して脳組織内へ到達するため、過剰鉄による脳損傷の抑制効果が期待される。

### 2. 研究の目的

脳出血後に生じる2次的脳損傷に対するDFXの治療効果を検討した。DFXの投与濃度、治療期間、治療開始時期についても検討を加えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳出血モデルの作成

SDラットにpentobarbital 45mg/kgを腹腔内注射して麻酔をかけた。右大腿動脈にカテーテルを挿入して動脈血を採取できるようにした。Stereotactic frameにラットの頭部を固定し、頭皮を切開して頭蓋骨を露出した。右基底核に血腫を注入すべく、coronal suture上で正中より3.5mm右方にドリルで1mmのburr holeを穿ち、26G針を挿入した。そこから大腿動脈より採取した100 $\mu$ Lの自己動脈血を、マイクロシリンジポンプを用いて10 $\mu$ L/minの速度で注入した。シャムモデルは26G針を挿入するだけとした。注入後に針を抜去し、burr holeはbone waxで埋めて頭皮を縫合した。

#### (2) 実験グループ

##### グループ1 (投与濃度の検討)

DFX (10、50、100mg/kg)を脳出血モデル作成2時間後、6時間後、それ以降は12時間毎に3日間投与した。DFXは大腿部の筋肉内注射にて投与した。無治療モデルとして、同僚の生理食塩水を同様の方法で投与した。シャムモデルはDFX 100mg/kg注入と生理食塩水注入の2群のみとした。1群にラットは3~9匹使用した。脳水分量の測定は3日後に行った。神経学的症状の評価は1、28、56日後に行い、脳萎縮の評価は56日後に行った。

##### グループ2 (治療期間の検討)

脳出血モデル作成2時間後よりDFX 50mg/kgを治療期間を変えて投与した(2、5、7、14日間)。神経学的症状の評価は1、28、56日後に行い、脳萎縮の評価は56日後に行った。

##### グループ3 (治療開始時期の検討)

脳出血作成2、4、18時間後よりDFX 50mg/kgにて3日間治療して脳浮腫を評価し、脳出血作成2、4、12、24、48時間後よりDFX 50mg/kgにて7日間治療して神経症状および脳萎縮を評価した。

#### (3) 脳浮腫の評価

脳出血モデル作成3日後に脳を摘出し、前頭極から4mmの部位より3mmの冠状切片とし、左右それぞれ皮質と基底核を分離した。小脳はコントロールとして使用した。これら5つのサンプルの重さを測りwet weight (WW)とした。その後、100 $^{\circ}$ Cで24時間サンプルを乾かして再度重量を測定しdry weight (DW)とした。 $(WW - DW)/WW \times 100 (\%)$ にて脳水分量を算出した。

#### (4) 神経学的症状の評価

行動学的テスト (forelimb placing test, corner turn test) を脳出血モデル作成1、28、56日後に行った。Forelimb placing testは、ラットの左前脚がフリーとなるように後方から保持して、テーブルの角に鼻の左触毛を素早く触れさせる。これを10回行って、左前脚をテーブルに乗せた回数をカウントする。Corner turn testは、板を2枚使って30度の角度に合わせてラットの正面から近づけ、ラットが左右のどちら側から体を回旋させたかを観察する。10回行ってラットが右に回旋した回数をカウントする。

#### (5) 脳萎縮の評価

脳出血モデル作成56日後に、心臓穿刺で4% paraformaldehydeにて脳を還流させて摘出して固定する。脳スライス18 $\mu$ mの冠状切片とし、脳穿刺部より1mm後方のスライスを用いた。へ

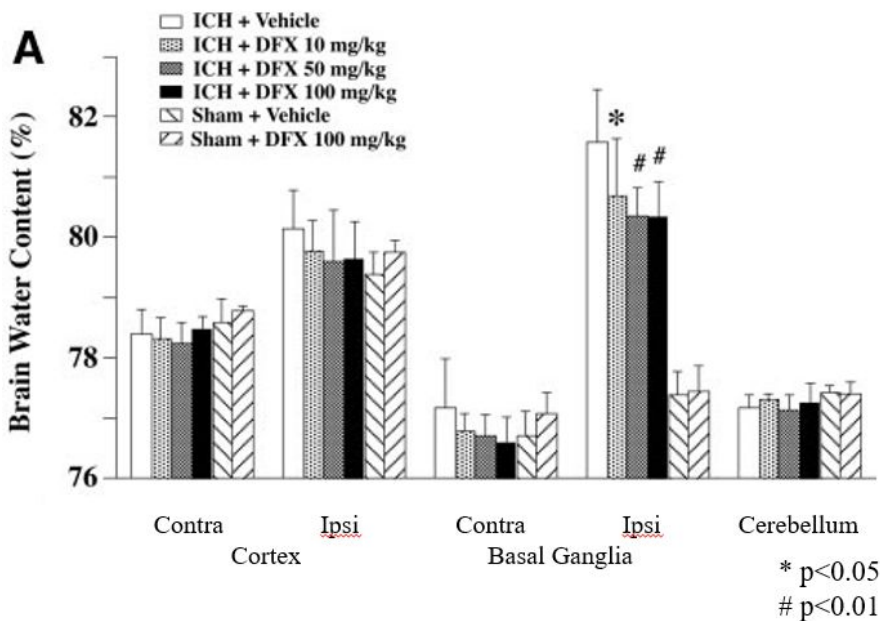
マトキシリン・エオジン染色を行い、両側の尾状核を測定して左右の比を算出した。

#### 4. 研究成果

##### グループ 1 (投与濃度の検討)

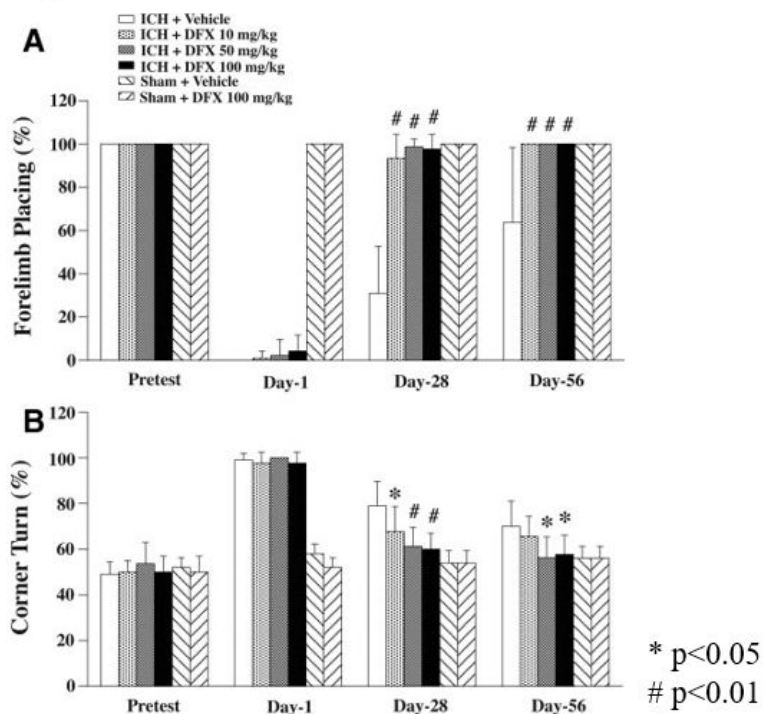
脳出血モデル作成 3 日後の脳水分量は、脳出血後 DFX 10、50、100mg/kg で治療した群で生食注入した群と比べて、同側基底核にて有意な脳水分量の低下を認めた。(Figure 1)

Figure 1



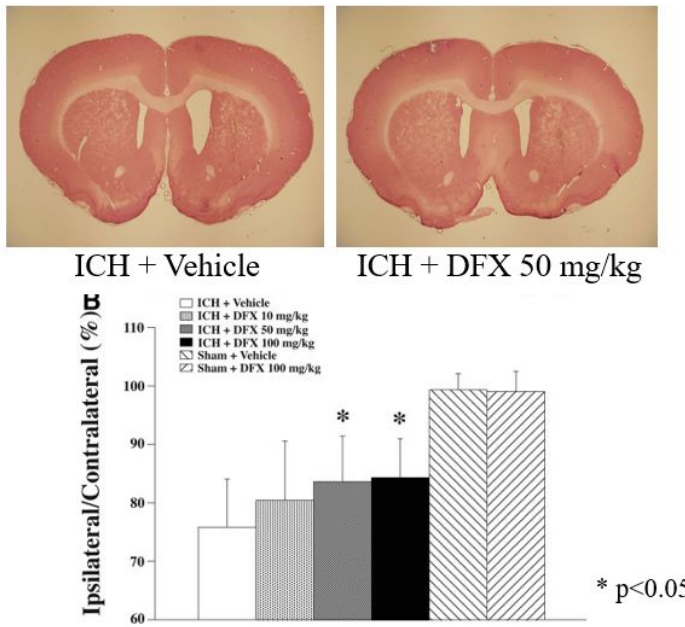
神経症状は、forelimb placing test では脳出血後 DFX 10、50、100mg/kg で治療した群で生食注入した群と比べて、28 日後および 56 日後において有意に改善していた。Corner turn test では 28 日後において脳出血後 DFX 10、50、100mg/kg で治療した群で生食注入した群と比べて有意な改善を認め、56 日後においては脳出血後 DFX 50、100mg/kg で治療した群で有意な改善を認めた。(Figure 2)

Figure 2



脳出血モデル作成 56 日後の尾状核サイズは、脳出血後 DFX 50、100mg/kg で治療した群で生食注入した群と比べて有意に萎縮が少なかった。(Figure 3)

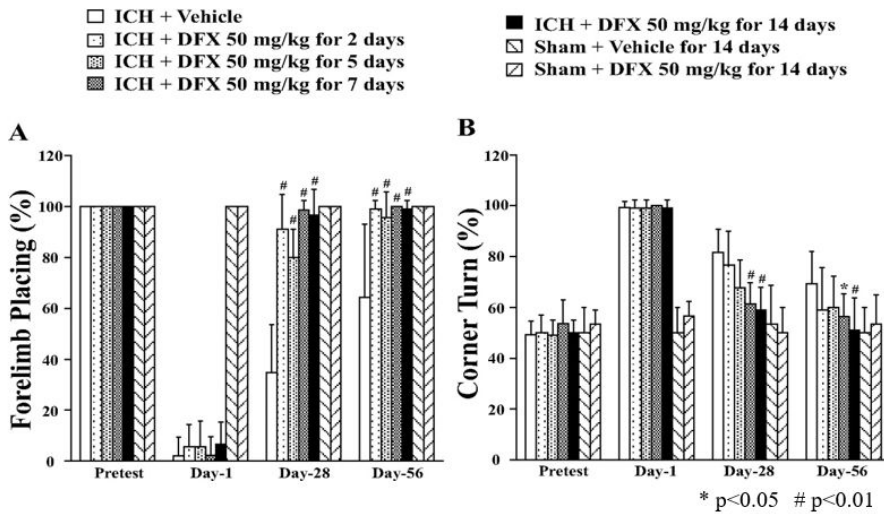
Figure 3



グループ 2 (治療期間の検討)

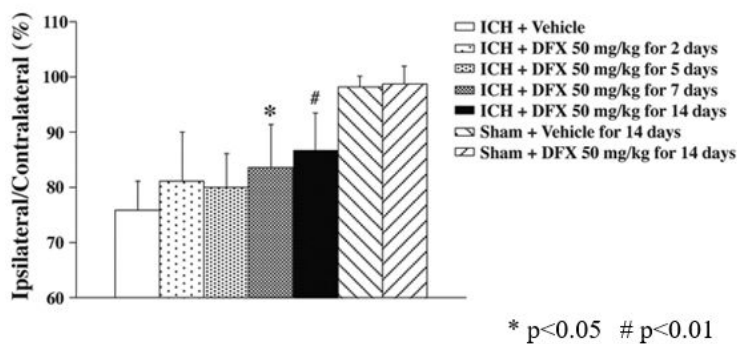
Forelimb placing test では、DFX 50mg/kg を 2、5、7、14 日間治療した群において生食注入した群と比べて 28 日後および 56 日後に有意な改善を認めた。Corner turn test では DFX 50mg/kg を 7、14 日間治療した群で 28 日後および 56 日後に有意な改善を認めた。(Figure 4)

Figure 4



脳出血モデル作成 56 日後の尾状核サイズは、DFX 50mg/kg を 7、14 日間治療した群で生食注入した群と比べて有意に萎縮が少なかった。(Figure 5)

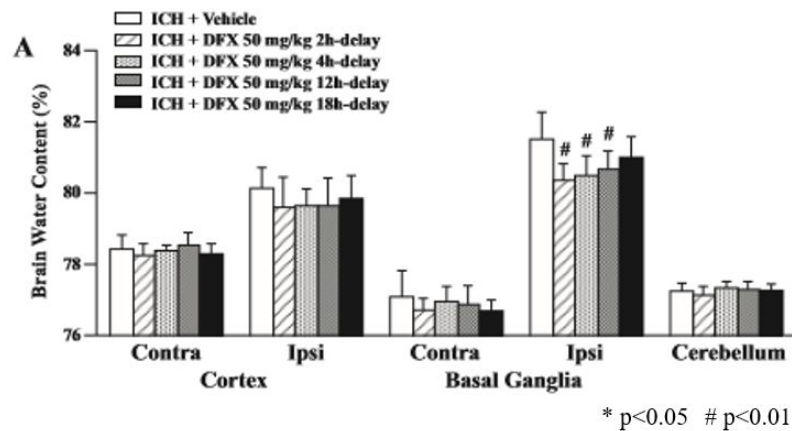
Figure 5



### グループ3 (治療開始時期の検討)

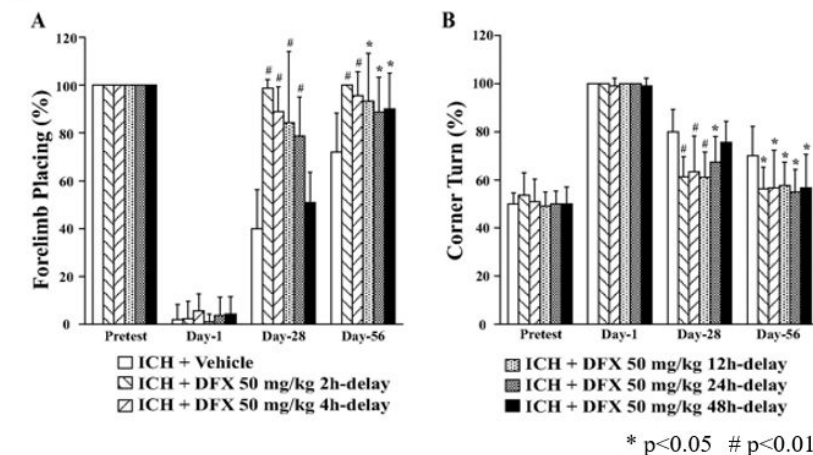
脳出血モデル作成3日後の脳水分量は、脳出血後 DFX 50mg/kg を2、4、12 時間後に治療開始した群で生食注入した群と比べて、同側基底核にて有意な脳水分量の低下を認めた。(Figure 6)

Figure 6



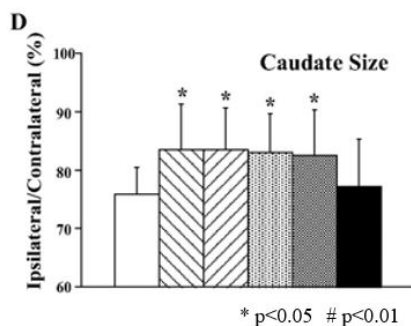
神経症状は、forelimb placing test では、28 日後に脳出血後 DFX 50mg/kg を2、4、12、24 時間後に治療開始した群で、56 日後は2、4、12、24、48 時間後に治療開始した群において生食注入した群と比べて有意な改善を認めた。Corner turn test においても同様の結果であった。(Figure 7)

Figure 7



脳出血モデル作成56日後の尾状核サイズは、脳出血後 DFX 50mg/kg を2、4、12、24 時間後に治療開始した群で生食注入した群と比べて有意に萎縮が少なかった。(Figure 8)

Figure 8



### 結果のまとめ

適切な DFX 治療によって、ラット脳出血モデルにおける脳出血後の脳浮腫、神経学的症状、脳萎縮は軽減された。至適投与濃度は50mg/kg、至適治療期間は7日間、至適治療開始時期は脳浮腫に対しては12時間以内、神経症状および脳萎縮に対しては24時間以内であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡内正信、Guohua Xi、Richard F. Keep、Ya Hua、宍戸 肇、小川大輔、中村丈洋、田宮 隆
2. 発表標題 ラット脳出血モデルにおけるdeferroxamineの治療効果
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡内正信、Guohua Xi、Richard F. Keep、Ya Hua、中村丈洋、河井信行、田宮 隆
2. 発表標題 ラットを用いた脳出血モデルにおけるdeferroxamineの治療効果
3. 学会等名 第45回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----