

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462263

研究課題名(和文) 高血圧ラットを用いた特発性正常圧水頭症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Verification of ventricular enlargement mechanism in idiopathic normal pressure hydrocephalus using with hypertensive rat

研究代表者

野村 貞宏 (NOMURA, Sadahiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20343296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：水頭症でくも膜下腔が拡大せず、脳室だけが拡大する理由として、「脳室内の動脈の拍動が脳室を拡大させる」という仮説を証明した。自然発症高血圧ラット(SHR)(n=10)と正常血圧ラット(Wistar rat)(n=10)、雄、生後10週を用いた。25%カオリンを大槽に注入し、2週間後に脳冠状断面の脳室幅を測定した。SHRの脳室幅は脳幅の $48 \pm 12\%$ で、これはWistar ratの $39 \pm 12\%$ より有意に大きかった($p = 0.04$)。高血圧ラットは正常血圧ラットに比し有意な脳室拡大を認めた。脳室内動脈の強い拍動が脳室を拡大させる原因の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Objective: In hydrocephalus state, cerebrospinal fluid (CSF) does not enlarge subarachnoid space but cerebral ventricles. In the present study, the hypothesis that pulsation of intraventricular arteries expands the ventricles was investigated. Methods: Spontaneous hypertensive rat (SHR) and normotensive Wistar rat were subjected for the study. Kaolin was injected into the basal cisterns to develop hydrocephalus. The ventricular size was measured two weeks later. Results: Ventricle width / brain width of SHR is $48 \pm 12\%$, which was significantly larger than $39 \pm 12\%$ of the Wistar rat ($p = 0.04$). Conclusion: Hypertensive rat indicated ventricular enlargement in larger extent than normotensive rat. Hypertension could be one of the reason to enlarge ventricular size.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：hydrocephalus risk factor hypertension rat

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液は脈絡叢で産生され、脳室からくも膜下腔に流れ、くも膜顆粒で吸収されるという Baskin flow 説が信じられてきた(1)。近年有力な説は、脳実質で脳脊髄液が産生かつ吸収され、篩板、神経根等からも流出するというものである。いずれにしても脳脊髄液の通過障害または流出障害があり、液が頭蓋内に貯留すると、脳室が拡大する。この疾患を水頭症といい、くも膜下出血、脳腫瘍、脳奇形等がその原因である。水頭症でくも膜下腔ではなく脳室が拡大する理由は不明である。Greitzら(2)は、「脈絡叢動脈の拍動が脳室を拡大させる」という仮説を提唱した。この説が正しいならば、血圧が高い人、または脈圧が高い人ほど、水頭症の際に脳室が高度に拡大すると推測される。

米国で45歳から64歳の成人4000人を対象に、1987年から10年をかけて行われたAtherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC study) (3)という前向き研究では、高血圧と糖尿病は脳室拡大のリスクファクターであることが示された。ただしこの研究では水頭症と同じく脳室の拡大を示す脳萎縮との鑑別が十分に検討されていなかったため、高血圧と水頭症の直接の関係は見出されなかった。

高血圧の研究用に開発された、自然発症高血圧ラット(spontaneous hypertension rat, SHR)の中に、加齢とともに脳室が拡大する個体がある(4)。この脳室拡大はSHRに降圧剤を使っても変わらなかった(4)。そのためGonzález-Marreroら(5)は脳室拡大の原因を、血圧自体ではなく、髄液中の蛋白(protein B)であると推測した。同研究で見られた脳室拡大は自然に発症した水頭症(特発性正常圧水頭症)であり、臨床の場で発症頻度の高い二次性水頭症については調べられていない。

2. 研究の目的

SHRと正常血圧のラットであるWistar rat

の両者に意図的に水頭症を作成し、水頭症の程度の差と、それによる神経症状の差を検討した。前者の水頭症が、後者の水頭症よりも重症であれば、水頭症の形成に高血圧が関与していると考えられる。

3. 研究の方法

実験動物

SHR、雄、実験開始時10週齢、体重250~350g、およびWistar rat、雄、実験開始時10週齢、体重250~350gを使用した。

ラットの使用に当たっては、動物の保獲及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)その他の法令を遵守し、動物の苦痛除去及び安全の確保に努めた。山口大学生命科学実験施設の使用承認手続きを得て、指導を遵守した。

血圧測定

非観血血圧測定装置(BP98-E)を用いた。ラットの尻尾根元にセンサーをセットし測定を行った。測定は非観血血圧測定装置に付属のポケット内にラットをいれて、落ち着いた状態に保ち、ヒートパッドで保温しつつ行った。1匹につき連続して6回ほど、収縮期、拡張期血圧及び心拍数を記録し平均値をとった。血圧測定は水頭症手術後3日目に行った。

水頭症の作成

Liら(6-12)の方法に従って行った。ラットをペントバルビタールによる麻酔下に腹臥位とし定位手術装置に固定した。後頭部から頸部に正中切開を行い、後頭骨と第一頸椎を露出。後頭骨と第一頸椎の間に27ゲージ針を挿入し、25%カオリン懸濁液を50 μ l注入した。針を抜去してスポンゼルでカオリン・脳脊髄液の流出を止め、皮膚を縫合した。手術終了後は覚醒するまで体温のモニタリングを行いながら、ヒートパッドを用い体温の保

持に努めた。

病理組織学的検討

カオリン注入から 14 日後、ペントバルビタールでラットを麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。脳を取り出し、パラフィン包埋後、bregma 上の冠状断面を作成した。Hematoxylin-Eosin 染色を行った。

脳室の最大幅(ventricular width, VW) / 脳の最大幅(brain width, BW)、および脳室の最大高さ(ventricular height, VH) / 脳の最大高さ(brain height, BH) を測定した。VW/BW を ventricular width index (VWI)、VH/BH を ventricular height index (VHI) とし、両群の平均 VWI, VHI を比較した。

脳室壁および脳実質の病理学的変化を Hematoxylin-Eosin 染色標本にて観察した。

行動テスト

運動能力を調べるため、ロータロッド試験 (rorarod test) (13)を、水頭症作成前と手術後 11 日目に計 2 回行った。回転するシリンダーにラットを載せ、シリンダーから転落するまでの時間を測定する。能力に優れたラット程、長時間シリンダー内に滞在することが可能となる。また回を進める毎にその時間が変化していき、その推移から運動の能力及び学習能力を測定することができる。ロータロッドの設定は 4-40rpm、最大時間 300 秒として 10 回連続して行い、後半 5 回の平均タイムをその個体の成績とした。

記銘力を調べるため、受動的回避学習試験 (passive-avoidance task, PA task) (14, 15)を水頭症作成前と手術後 12 日目に計 2 回行った。ラットを明室に置き、暗室に入った時に、明室と暗室の境にある扉を閉めると共に電気刺激を与える。また、ラットの尻尾の付け根が暗室へ入った時点を暗室への侵入と定義する。これをもう一度繰り返し、明

室に留まり続けた時間を最長 600 秒として測定する。ラットには暗室を好む習性があるが、暗室への進入と痛みの恐怖の関連付けを記憶できたラットでは、明室に長く留まろうとする。二度目の試験で明室に留まり続けた時間をその個体の成績とした。受動的回避学習試験の前にロータロッド試験を行ったが、スコアに影響を及ぼさないように試験の間を 24 時間以上おいて受動的回避学習試験を実施した。

統計解析

SHR と wistar rat 両群の、VWI、VHI、ロータロッド滞在時間、明室滞在時間を、対応のない t 検定で比較し、 $p < 0.05$ の時を有意差と判定した。また、行動テストの結果においては両群間の変化率の差も同様に比較した。

4. 研究成果

脳室サイズ測定

VWI では Wistar rat が $39 \pm 12\%$ となり、SHR で $48 \pm 12\%$ となった。 $P=0.04$ となり VWI に有意な差が見られた。VHI では Wistar rat が $26 \pm 11\%$ となり、SHR で $35 \pm 10\%$ となった。 $P=0.08$ となり有意な差は見られなかった。

病理組織学的検討

Wistar rat、SHR とともに脳室上衣細胞の菲薄化と部分的崩壊、絨毛の減少、脳室近傍白質の軸索と髄鞘の損傷が見られた。上衣下の反応性グリオシスは観察することが出来なかった。

ロータロッド試験結果

後半 5 回の平均タイム : wistar rat : 水頭症作成前 $150.6 \pm 50.0\text{sec}$ 水頭症作成後 $110.5 \pm 40.1\text{sec}$ 。SHR : 水頭症作成前 $116.5 \pm 36.0\text{sec}$ 水頭症作成後 $95.0 \pm 58.0\text{sec}$ となった。水頭症作成前後での差は wistar rat

で $P=0.025$ となり有意に悪化していた。SHR では $P=0.29$ となり有意な差は見られなかった。また、平均悪化率は wistar rat で $25.4 \pm 20.8\%$ 、SHR で $14.3\% \pm 61.6\%$ となった。両群間の平均悪化率での比較は $P=0.63$ となり有位な差は見られなかった。

受動的回避学習試験

Wistar rat : 水頭症作成前 $414.5 \pm 80.9\text{sec}$
水頭症作成後 $435.2 \pm 105.0\text{sec}$ 。SHR : 水頭症作成前 $307.5 \pm 42.7\text{sec}$ 水頭症作成後 $327.7 \pm 80.1\text{sec}$ となった。Wistar rat、SHR ともに水頭症作成後の記憶力低下は観察できなかった。変化率には wistar rat と SHR 間に有位な差は見られなかった。

考察

頭蓋内の髄液は脳室とくも膜下腔にあるにもかかわらず、水頭症の際には必ず脳室のみに髄液が貯留するのは奇異である。貯留した髄液が脳室壁を圧迫することによって脳室が拡大することは自明であるが、この圧力は、静止した髄液よりも拍動する髄液の方が10万倍強いといわれている(2, 16)。髄液の拍動は脳動脈壁の拍動によって生じる。脳室内には脈絡叢動脈があり、これが脳室の髄液の拍動を形成すると考えられる。脳内の動脈には外弾性板がないことも、拍動が髄液に伝わりやすい要因かもしれない。ただしくも膜下腔にも動脈があり、これがくも膜下腔の拡大に寄与しないのは不思議である。一節によれば、脳表面とくも膜下腔の結合は密であり、圧力をかけても容易には拡大しないのだと言われている。いずれにせよ動脈拍動が強い、すなわち血圧が高い程、脳室内髄液拍動が強くと、脳室が拡大しやすいと想像される。本研究では収縮期血圧、拡張期血圧のいずれもが Wistar rat よりも約1.5倍高かったSHRにおいて有意に大きな脳室拡大が観察され、高血圧が脳室拡大に影響することが証明された。た

だし、水頭症自体はカオリンの注入によって形成されたので、高血圧が水頭症の原因であるとはできない。水頭症は頻度の低い疾患なので、高血圧以外の誘引を与えず水頭症の発生率を比較するには多数の実験動物を必要とする。

更なる問題点は高血圧群と正常血圧群のラットの種が異なっていることである。SHRと Wistar ratは、血圧以外にも水頭症になりやすさ、なりにくさの差があるのかもしれない(4, 5, 17)。この異議を否定するためには、Wistar ratに食餌など後天的な要因で高血圧を作成し、同様に高度の水頭症が形成されることを証明する、またはSHRに降圧剤を与えて血圧を下げ、水頭症の程度が軽くなることを証明する、という方法がある。また本研究の仮説から、髄液拍動を高めるものは、平均血圧ではなく脈圧である。SHRは収縮期血圧も拡張期血圧も上がるが、Wistar ratは加齢、または食餌誘発によって収縮期血圧だけが上がり、脈圧が大きくなる(18)。従ってSHRよりも二次的に高血圧にしたWistar ratの方が本研究には適していると考えられる。

本研究では脳室拡大の差は示せたが、脳室拡大の差が神経症状の差にはならなかった。両群の病理組織学的変化は過去に報告された通り(19, 20)であり、脳室がかなり拡大した個体でも大脳皮質神経細胞は保たれ、神経線維も比較的残っていた。これが麻痺や意識障害のような強い障害を呈した個体がいずれの群にも少なかった理由である。Rotarod test は、脳虚血など四肢に麻痺を来したモデルの評価として有効な手段である(13)。ヒトの水頭症でみられる四肢の症状は動作緩慢、不安定、小刻み歩行、広基性歩行などであり、麻痺よりは軽い症状である。Rat も同様で、高度の水頭症でも rotarod test はクリアーでき、有意差がなかったものと考えられる。高次機能障害の指標として用いた IA は、不快感や恐怖を記憶する能力を調べるも

のであり、大脳辺縁系の機能テストである(14, 15)。水頭症における高次機能障害は作業記憶、注意・集中力等の大脳半球の機能は評価されにくかった可能性がある。

結語

SHRにカオリンの髄腔内投与を行って水頭症を作成した。SHRは対照として用いたWistar ratよりも有意に血圧が高く、脳室拡大が高度だった。高血圧が脳室拡大のリスク因子の一つであると考えられた。

<引用文献>

1. Dandy W. Am J Dis Child. 1914;8:406-82.
2. Greitz D. ChNS 2007 May;23(5):487-9.
3. Knopman DS. Neurology. 2011 May 31;76(22):1879-85.
4. Ritter S. Brain research. 1988 May 31;450(1-2):354-9.
5. Gonzalez-Marrero I, Carmona-Calero EM, Fernandez-Rodriguez P. Histology and histopathology. 2007 Dec;22(12):1371-8.
6. Li J. Experimental neurology. 2008 Jun;211(2):351-61.
7. Del Bigio MR. Neurosurgery clinics of North America. 2001 Oct;12(4):639-49.
8. Del Bigio MR. Annals of neurology. 2003 Mar;53(3):337-46.
9. Nagra G. Cerebrospinal fluid research. 2010;7(1):4.
10. Tashiro Y. Journal of neurosurgery. 1997 Feb;86(2):263-71.
11. Tashiro Y. Journal of neurosurgery. 1998 Apr;88(4):709-17.
12. Tashiro Y. Brain research. 1997 Oct 3;770(1-2):45-52.
13. Lekic T. Journal of neurosurgery. 2013 Feb;118(2):465-77.
14. Gattu M. Brain research. 1997 Oct 10;771(1):89-103.
15. Gattu M. Brain research. 1997 Oct 10;771(1):104-14.
16. ReKate HL. ChNS. 2007 Nov;23(11):1227-8.
17. Ritter S. Brain research. 1986 Apr 9;370(2):327-32.
18. Safar ME. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2003 Oct;285(4):H1363-9.
19. Lopes L. Experimental neurology. 2009 Sep;219(1):187-96.
20. Khan OH. Experimental neurology. 2006 Aug;200(2):311-20.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

野村貞宏、鈴木倫保. Dandy-Walker complex の分類と Blake ' s pouch cyst に対する脳室穿破術. 日本医事新報. 査読無. 4782, 2015, 54
Shirao S, Yoneda H, Shinoyama M, Sugimoto K, Koizumi H, Ishihara H, Oka F, Sadahiro H, Nomura S, Fujii M, Tamechika M, Kagawa Y, Owada Y, Suzuki M. A novel trigger for cholesterol-dependent smooth muscle contraction mediated by the SPC-Rho-kinase pathway in the rat basilar artery. J CBF Metab. 査読有.35(5), 2015, 835-42. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.260.
野村貞宏、石原秀行、小泉博靖、末廣栄一、白尾敏之、五島久陽、奥高行、貞廣浩和、鈴木倫保. くも膜下出血後の外水頭症の特徴. 第15回日本正常圧水頭症学会記録集. 査読無.15, 2014, 15
Nomura S, Inoue T, Ishihara H, Koizumi H, Suehiro E, Oka F, Suzuki M. Reliability of laser speckle flow imaging for intraoperative monitoring of CBF during cerebrovascular surgery. World Neurosurg. 査読有 82(6), 2014, e753-7. DOI:10.1016/j.wneu.2013.09.012
野村貞宏、丸田雄一、稲村彰紀、五島久陽、鈴木倫保. 特発性正常圧水頭症におけるシャント術後の脳血液量増加. 第16回日本正常圧水頭症学会記録集. 査読無 14, 2013, 41

Nomura S, Ideguchi M, Sadahiro H, Goto H, Suzuki M. Analysis of persistent hydrocephalus cases after endoscopic third ventriculostomy. J Hydrocephalus 査読無 5(1)2013,26-30

〔学会発表〕(計 10 件)

野村貞宏、秋村龍夫、西本拓真、鈴木倫保. 局所麻酔下の脳室腹腔シャント延長術. 第 43 回日本こども病院神経外科医会. 2015 年 11 月 28-29 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

野村貞宏、末廣栄一、井本浩哉、五島久陽、篠山瑞也、國次一郎、鈴木倫保. RI 脳槽造影による髄液鼻漏・耳漏の判定 第 8 回日本水頭症髄液学会 2015 年 11 月 22 日、順天堂大学講堂(東京都文京区)

野村貞宏、末廣栄一、井本浩哉、五島久陽、篠山瑞也、國次一郎、鈴木倫保. RI 脳槽造影による髄液鼻漏の判定. 第 74 回日本脳神経外科学会学術総会、2015 年 10 月 14-16 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

野村貞宏、田中信宏、篠山瑞也、稲村彰紀、山根亜希子、鈴木倫保. 特発性正常圧水頭症症例におけるシャント術効果予測因子の検討. 第 16 回日本正常圧水頭症学会 2015 年 2 月 28 日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

野村貞宏、出口誠、貞廣浩和、五島久陽、稲村彰紀、鈴木倫保. 第三脳室底開窓術後の早期閉塞例の検討. 第 21 回日本神経内視鏡学会. 2014 年 11 月 28-29 日、浅草ビューホテル(東京都台東区)

野村貞宏、出口誠、貞廣浩和、五島久陽、稲村彰紀、鈴木倫保. 第三脳室底開窓術後の閉塞と再手術に関する検討. 第 7 回日本水頭症髄液学会 2014 年 10 月 26 日、東京医科大学臨床講堂(東京都)

野村貞宏、稲村彰紀、杉本至健、藤山雄一、山根亜希子、鈴木倫保. シャント手術における整容. 第 6 回日本水頭症髄液学会 2013 年 12 月 1 日、東京医科大学臨床講堂(東京都文京区)

野村貞宏、出口誠、貞廣浩和、五島久陽、鈴木倫保. 第三脳室底開窓術不成功例の検討. 第 20 回日本神経内視鏡学会. 2013 年 11 月 7-8 日、甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)

野村貞宏. くも膜下出血後の髄液循環障害と水頭症 20131. 2013 年 10 月 26 日、JJ 福岡営業所会議室(福岡県・福岡市)

Nomura S, Koizumi H, Suehiro E, Suzuki M, Kiya H. Chronological and Topographical Expression of the Benzodiazepine Receptor in the Developing Brain. The 15th WFNS World Congress of Neurosurgery Sep. 8-13, 2013, Seoul, Korea

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 貞宏(NOMURA, Sadahiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20343296

(2) 研究分担者

白尾 敏之(SHIRAO, Satoshi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70448281