

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462156

研究課題名(和文) くも膜下出血後の脳血管攣縮に対する予防薬・治療薬の可能性

研究課題名(英文) Possibility of a prevention or therapeutic drug for the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

諸 真人(MORO, Makoto)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90648651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： α -アドレナリン受容体アゴニストによる摘出ウサギ脳底動脈に対する弛緩作用を検討した。その結果、KClで収縮させた脳底動脈に対し、リトドリン塩酸塩を含む α -アドレナリン受容体アゴニストは用量依存的に血管を弛緩させた。ウサギ、イヌ及びヒトの脳底動脈における α -アドレナリン受容体mRNAの発現について検討したところ、 α_1 及び α_2 -アドレナリン受容体mRNAの発現を認めた。そこで、イヌを用いてくも膜下出血後の脳血管攣縮モデルを作製し、リトドリン塩酸塩の治療効果の検討を行った。しかしながら、リトドリン塩酸塩の脳血管攣縮改善効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relaxant effects of α -adrenoceptor agonist on isolated rabbit basilar artery. As a result, α -adrenoceptor agonists including ritodrine hydrochloride dose-dependently relaxed on KCl-induced contraction of rabbit basilar artery. Thereafter, we examined the messenger RNAs (mRNAs) expression of α -adrenoceptor on rabbit, dog and human basilar artery. The mRNA of α_1 and α_2 -adrenoceptor were detected on these basilar arteries. The in vivo pharmacological properties were tested, the effect of ritodrine hydrochloride on subarachnoid hemorrhage - induced cerebral vasospasm dog model. However, ritodrine hydrochloride did not improve this vasospasm.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 α -アドレナリン受容体 血管弛緩

1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血発症後にウィリス動脈輪を中心とした脳底部主幹動脈に生じる遅発性かつ可逆的狭窄であり、通常、くも膜下出血後4日目から14日目頃にかけて発生し、2週間から4週間持続した後に徐々に回復する。いったん脳血管攣縮が生じると、それにより遅発性の神経学的虚血症状を呈し、たとえ血管径がもとに復しても、脳梗塞に移行することも少なくない。脳血管攣縮は、血管造影上約70%の患者に認められ、脳虚血症状の出現頻度は20~30%と言われている。脳血管攣縮は、重篤な神経障害や死をもたらす場合があり、急性期を脱したくも膜下出血患者の機能予後および生命予後を決定する重要な合併症といわれている。

脳血管攣縮は、くも膜下出血発症後一定の時期を経て、遅発性に生じるため、予防的治療、早期診断、発症後の迅速な治療などの対応が可能な病態である。そのため、治療法の開発をめざして、多くの基礎研究および臨床研究が活発に行われてきた。現在、いくつかの薬剤や治療法が臨床で用いられ、一定の効果が得られているが、未だ、脳血管攣縮発症の完全予防には至っておらず、現在なお、くも膜下出血の急性期を脱した患者の約15%に脳血管攣縮による脳梗塞が発現するといわれている。さらに、脳梗塞が永続的な後遺症として残る場合、あるいは致死的となる場合があり、新たな予防薬及び治療薬の開発が望まれている。

各種血管に対するβ-アドレナリン受容体アゴニストの影響に関しては幾つかの報告が見られ、いずれの報告も血管を弛緩させるというものである。しかしながら、ヒトの脳血管におけるβ-アドレナリン受容体の発現に関する報告やβ-アドレナリン受容体アゴニストによる脳血管攣縮に対する検討については報告されていない。

2. 研究の目的

くも膜下出血後の脳血管攣縮に対しては、血管拡張作用のある薬剤での有用性が推察される。切迫流・早産治療薬として医療現場で使用されているβ-アドレナリン受容体アゴニストのリトドリン塩酸塩は子宮平滑筋を、気管支ぜんそく治療薬として使用されているクレンブテロール塩酸塩は、気管支平滑筋を各々弛緩させることが知られているが、いずれも血管に対する作用は確認されていない。そこで、本研究では脳血管におけるβ-アドレナリン受容体遺伝子(mRNA)の発現の有無、摘出脳血管に対する各種β-アドレナリン受容体アゴニストの作用及びくも膜下出血脳血管攣縮モデルを用いたβ-アドレナリン受容体アゴニストの効果を評価し、くも膜下出血後の脳血管攣縮に対するβ-アドレナリン受容体アゴニストの予防・治療薬としての可能性について考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳底動脈における各種β-アドレナリン受容体 mRNA の発現量の検討

雄性 NZW ウサギ (体重 2.4~3.5 kg) 及び体重 10kg 前後の雄性ビーグル犬を麻酔下にて頸動脈にカニューレを挿入し、脱血により安楽死させた後、脳底動脈、総頸動脈及び腹部大動脈を摘出した。摘出した動脈及び Tissue Solutions 社から購入したヒト脳底動脈組織から、total RNA を回収した。回収した total RNA から、逆転写反応により cDNA を合成した。Real-time PCR を用いて、合成した各々の cDNA から各種β-アドレナリン受容体 mRNA の発現量を評価した。

(2) 摘出ウサギ脳底動脈に対するβ-アドレナリン受容体アゴニストの検討

雄性 NZW ウサギ (体重 2.4~4.0 kg) を麻酔下にて頸動脈にカニューレを挿入し、脱血により安楽死させた後、脳底動脈、総頸動脈及び腹部大動脈を摘出した。摘出した各動脈は、Krebs-Henseleit 液中で結合組織等を取り除いたのち、脳底動脈は3mmのリング標本、総頸動脈及び腹部大動脈は幅2mm、長さ20mmの螺旋標本を作製した。標本は、95% O₂、5% CO₂ 混合ガスを十分に通期した Krebs-Henseleit 液 (37°C) を満たした容積 10mL の organ bath 内に懸垂し、20分毎に Krebs-Henseleit 液を交換しながら、60分間平衡化した。その後、脳底動脈には0.5g、総頸動脈及び腹部大動脈には1.0gの負荷を掛け、20分毎に Krebs-Henseleit 液を交換しながら、さらに60分間平衡化した。平衡化の後、organ bath 内に60mMのKClを30分間隔で2回添加し、標本が収縮することを確認したのち、120mMのKClを添加し収縮が安定したところで、各被検物を累積的に添加し、弛緩反応を評価した。なお、各実験の終了時に papaverine 塩酸塩 30mM を添加し惹起した弛緩を100%として、各被検物の作用を評価した。

(3) イヌくも膜下出血後脳血管攣縮モデルに対するβ-アドレナリン受容体アゴニストの検討

雄性ビーグル犬 (体重 9.9~11.6 kg) をチオペンタールナトリウム (25 mg/kg, i. v.) にて導入麻酔後、N₂O : O₂ = 1 : 1 の混合ガス + 0.5~1.5%セボフルランの条件下で麻酔を維持した。動物を横臥位にし、C1-C2 領域から 20G の留置針を用いて背側大槽内穿刺を行い、髄液を確認後、X 線透視下で大槽内まで留置針を進め髄液 4mL を抜いた後、大腿静脈、あるいは橈側皮静脈から自家血 4mL を採血し、大槽内に約 2mL/min で注入した。注入後 30 分間頭部を 30° 下垂させて姿勢を保持し、その後、動物を覚醒させた。1 回目の自家血注入 2 日後に再び同様の方法で自家血を注入した。1 回目の自家血注入前及び 2 回目の自家血注入 4 日後に、麻酔下にて大腿動脈から椎骨動脈まで挿入したカテーテルから造影剤 (イオ

パミドール) を 5 mL 注入して脳血管造影を行った。血管造影上、遅発性脳血管攣縮が発現していることを確認した後に薬物の評価を実施した。 β -アドレナリン受容体アゴニストのリトドリン塩酸塩を大腿静脈に挿入したカテーテルより、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で 60 分間持続投与した。投与開始前、投与開始後 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分に脳底動脈を X 線造影し、血管攣縮に対するリトドリン塩酸塩の作用を評価した

4. 研究成果

(1) 脳底動脈における各種 β -アドレナリン受容体 mRNA の発現量の検討

ウサギ、イヌ及びヒト脳底動脈には、 β -アドレナリン受容体 mRNA が発現していることが確認された。各 mRNA の発現量は、ウサギ及びヒトの脳底動脈では、 β_2 -アドレナリン受容体 $>$ β_1 -アドレナリン受容体であり、イヌでは β_1 及び β_2 -アドレナリン受容体 mRNA はほぼ同量であった。なお、ウサギ、イヌ及びヒトの脳底動脈には β_3 -アドレナリン受容体 mRNA の発現はほとんど見られなかった (図 1)。

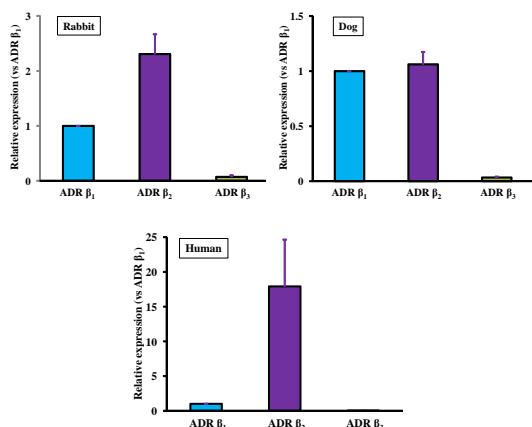


図 1. ウサギ、イヌ及びヒト脳底動脈における各種 β -アドレナリン受容体 mRNA 発現量の検討

また、ウサギ及びイヌの総頸動脈、腹部大動脈も脳底動脈同様に β_1 及び β_2 -アドレナリン受容体 mRNA の発現が認められたが、 β_3 -アドレナリン受容体 mRNA の発現はほとんど見られなかった。

(2) 摘出ウサギ脳底動脈に対する β -アドレナリン受容体アゴニストの検討

β -アドレナリン受容体アゴニストのリトドリン塩酸塩及びクレンブテロール塩酸塩は、KCl により収縮した脳底動脈を用量依存的に弛緩させた (図 2)。また、各種 β -アドレナリン受容体選択的アゴニストの影響を検討したところ、選択的 β_1 -受容体アゴニストであるドブタミン塩酸塩では、用量依的に脳底動脈を弛緩させたのに対し、選択的 β_2 -受容体アゴニストのプロカテロール塩酸塩及び選択的 β_3 -アドレナリン受容体アゴニストの CL 316, 234 は、KCl により収縮した脳底

動脈に対し、弛緩作用はほとんど認められなかった (図 3)。

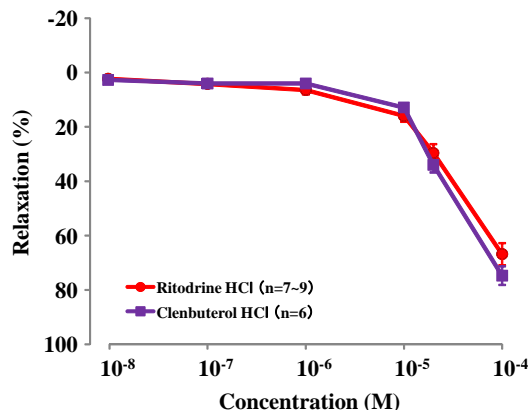


図 2. ウサギ脳底動脈に対する β -アドレナリン受容体アゴニストの検討

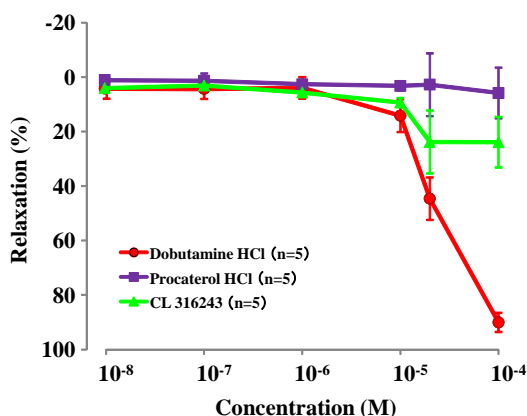


図 3. ウサギ脳底動脈に対する選択的 β -アドレナリン受容体アゴニストの検討

一方、総頸動脈及び腹部大動脈に対してリトドリン塩酸塩、クレンブテロール塩酸塩及びドブタミン塩酸塩は弛緩作用を示したが、その作用は脳底動脈に比し非常に弱かった。また、プロカテロール塩酸塩及び CL 316, 234 による弛緩作用は認められなかった。

(3) イヌくも膜下出血後脳血管攣縮モデルに対する β -アドレナリン受容体アゴニストの検討

2 回目の自家血注入 4 日後に、脳底動脈の有意な収縮 ($P=0.016$) が認められた (図 4, 図 5)。

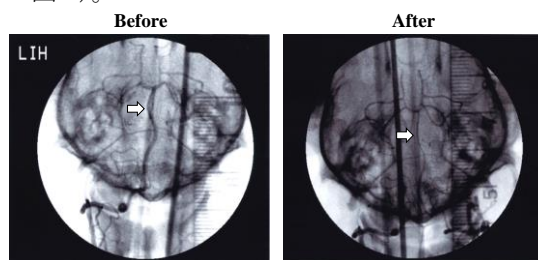


図 4. 自家血注入前及び注入後の脳底動脈

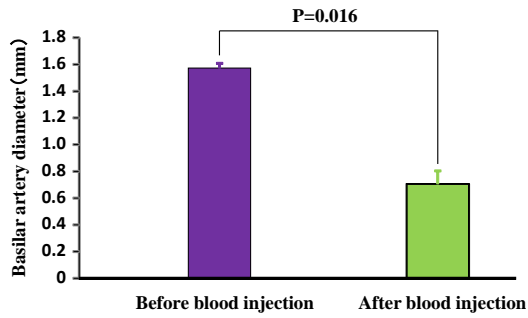


図5. 脳底動脈径に対する自家血注入の影響

作製された3匹の遅発性脳血管攣縮モデルにリトドリン塩酸塩を60分間持続投与したが、脳底動脈の攣縮に対するリトドリン塩酸塩の改善効果は認められなかった(図6)。

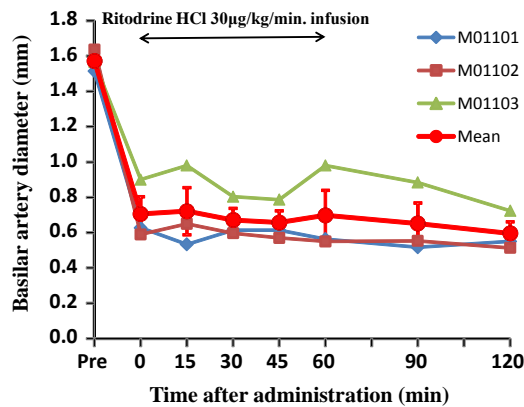


図6. 脳底動脈径に対する自家血注入の影響

本研究において、ヒト及びウサギ脳底動脈には β_1 及び β_2 -アドレナリン受容体 mRNA が発現しており、両種とも β_2 -アドレナリン受容体 mRNA の発現がドミナントであることを初めて明らかにした。さらに、これまで検討されていなかった、摘出ウサギ脳底動脈において、リトドリン塩酸塩及びクレンブテロール塩酸塩がくも膜下出血後の脳血管攣縮の改善につながる血管平滑筋の弛緩作用を示すことを確認した。また、 β_2 及び β_3 -アドレナリン受容体選択的アゴニストでは、弛緩作用は認められず、 β_1 -アドレナリン受容体の選択的アゴニストでのみ弛緩作用が認められた。一方、イヌくも膜下出血後脳血管攣縮モデルにおいては、リトドリン塩酸塩による血管攣縮改善効果が認められなかった。これらの結果から、ウサギにおいては β_1 -アドレナリン受容体が脳底動脈の弛緩に関与している可能性が示された一方、イヌ脳底動脈においては、 β -アドレナリン受容体を介した機能が弱い可能性が考えられた。このように、種差により脳底動脈の弛緩に関わる受容体、または、そのサブタイプの特異性がある可能性が示唆された。今後、ヒト脳血管攣縮の適切な予防薬・治療薬を開発するためには、さらなるヒト脳底動脈の解析により適切な動

物モデルを選定し、評価することが必要である。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸 真人 (MORO, Makoto)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90648651

(2) 研究分担者

村田 貴弘 (MURATA, Takahiro)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80533322