

脳内出血に対する臨床検査としての新しいバイオマーカーの可能性

中村 丈洋^{1)*}, 大星 航¹⁾, 林 恵輔²⁾, 行正 信康¹⁾, Richard F. Keep³⁾

¹⁾香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科

²⁾香川県立保健医療大学大学院保健医療学研究科

³⁾Department of Neurosurgery, University of Michigan

New Biomarkers for Intracerebral Hemorrhage

Takehiro Nakamura^{1)*}, Wataru Oboshi¹⁾, Keisuke Hayashi²⁾,
Nobuyasu Yukimasa¹⁾, Richard F. Keep³⁾

¹⁾Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

²⁾Graduate School of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

³⁾Department of Neurosurgery, University of Michigan

要旨

脳内出血は、ガイドライン上においても未だ決定的治療法がないのが現状である。虚血性の脳卒中と異なる点として、血腫が病態に関与することが挙げられる。基礎的研究により、血腫が凝固、溶解そして吸収の過程における病態が解明されつつある。その中でも、血腫に含まれる鉄が酸化傷害を引き起こすことが報告されている。本稿では、これまであきらかになっている病態から臨床検査としての新しいバイオマーカーの可能性を概説する。

Abstract

The present article reviews the current and possibility of new biomarkers for intracerebral hemorrhage (ICH) models. Recent evidence suggests that some ICH-induced brain injury results from the products of hemoglobin degradation, especially iron. Iron-induced brain damage might result from oxidation. Oxidative brain damage plays an important role in ICH. Clinical benefits in new biomarker should require more basic studies before definitive management for acute ICH.

Key Words: 脳内出血 (intracerebral hemorrhage), バイオマーカー (biomarker), 酸化ストレス (oxidative stress)

*連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281番地1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 中村 丈洋

*Correspondence to: Takehiro Nakamura, Department of Medical Technology, Faculty of Health Science, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1, Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan

E-mail: nakamura@chs.pref.kagawa.jp

はじめに

わが国の脳卒中の特徴として、欧米と比較し脳内出血の割合が2～3倍高いことが挙げられる¹⁾。高血圧治療の普及により、脳内出血の発症は減少傾向であるが、発症30日までの死亡率は30～50%に及び、また生存者の多くが後遺障害を有し、発症6ヶ月後では日常生活が自立できている症例が全体の約20%とされている²⁾。脳内出血の初期治療は、症例により外科的治療および保存的治療が行われている。外科的治療としては、症例によって開頭術、定位脳手術、内視鏡手術などが行われてきているが、未だ大規模研究での手術による改善の有意性が認められていない。脳卒中治療ガイドライン2015³⁾における保存的治療では、グレードAとして強く推奨する治療法はない。グレードBとして推奨しているのは、頭蓋内圧亢進を伴う大きな脳内出血に高張液グリセロール静脈内投与のみである。以上のように脳内出血の臨床では、決め手となる治療法がないのが現状である。近年、基礎的研究において、様々な脳内出血モデルを用いた、病態解析やの研究が報告されている^{4, 5)}。これら病態に対するモニタリングおよび重症度を反映するバイオマーカーが必要とされる⁶⁾。

出血性脳卒中は、虚血性脳卒中と異なり、血腫の存在が病態に大きく影響する。血腫は形成、溶解そして吸収の過程を経るが、各過程において病態が異なる。血腫形成の過程において凝固作用の関与、血腫溶解の過程では溶解に伴い放出される鉄が主に関与している。本稿では、脳内出血後の血腫による二次的損傷の病態に関してモデルを用いた基礎研究を中心に最新の知見を概説し、新しいバイオマーカーの可能性について考察する。

脳内出血モデル

脳内出血モデルは、一般にラットやマウスなどのげっ歯類を使用し、基底核灰白質に自家血を注入する血腫注入モデル^{7, 8)}、もしくはコラゲナーゼを注入する自然発症モデル⁹⁾などが大半を占める。両者ともに基底核に血腫が形成され、多少の違いはみられるが¹⁰⁾、数日後より血腫溶解が確認され¹¹⁾、1ヶ月後までに血腫は、吸収されマクロ的に消失する⁴⁾。血腫周囲の脳組織の短期的変化として、浮腫が数日後をピークにみられ、その後、徐々に軽減していくことが、乾燥重量法などで確認されている¹²⁾。長期的変化としては、およそ1ヶ月後に脳室の拡大を伴った萎縮が確認されている^{8, 13)}。症状の評価としては、一般に実験モデルは神経行動学的検査で評価される。脳内出血モデルでは、半身麻痺を評価するCorner Turn Test, Forelimb Placing TestやAsymmetry Testなどが用いられ、モデル作成直後より神経行動学的に患側と反対側の半身麻痺が遷延性にみられ1ヶ月後も継続することが報告されている^{8, 12)}。

以上のように、基礎的研究で使用される脳内出血モデルも、我々が日常臨床で経験する脳内出血の経時的変化に近いものであると言える。

脳におけるヒトとげっ歯類の相違

基礎的研究を行う際に、ヒトと主な実験の対象であるげっ歯類での相違を把握しておく必要がある。ヒトの脳と比較し、げっ歯類の脳は大脳皮質灰白質と基底核灰白質で占められており白質が極端に少ない特徴があげられる。灰白質は神経細胞やグリアが主となるが、白質は主に軸索、ミエリン、オリゴデンドロサイトで構成される。脳疾患モデルで得られた結果は、ヒトへの応用を考える場合には、灰白質のみでなく白質も考慮しなくてはならない。

血腫周辺組織における二次的損傷の病態

臨床で脳内出血後、血腫による直接的な脳組織の破壊である一次的損傷に加え、出血が止まった後も脳損傷が進行する二次的損傷が進行することが知られている。

急性期の血腫周辺組織での二次的損傷の原因として、血腫による周辺組織の圧迫が局所的脳循環障害を引き起こし、結果として脳虚血による二次的損傷と考えられてきた¹⁴⁾。しかし、その後の基礎的研究により、血腫周辺組織での血流低下は、脳内出血発症後一時的なものであり、その程度も強い脳虚血を生じるものでないことが明らかとなった¹⁵⁾。さらに、臨床研究においても血腫周囲の血流低下は脳浮腫とは関連していないことも報告されている¹⁶⁾。

これまでの基礎的研究により、脳内出血後の血腫周囲での二次的損傷の機序として、急性期に起こる血腫形成に伴う一連の血液凝固反応活性化とそれに伴うトロンビ

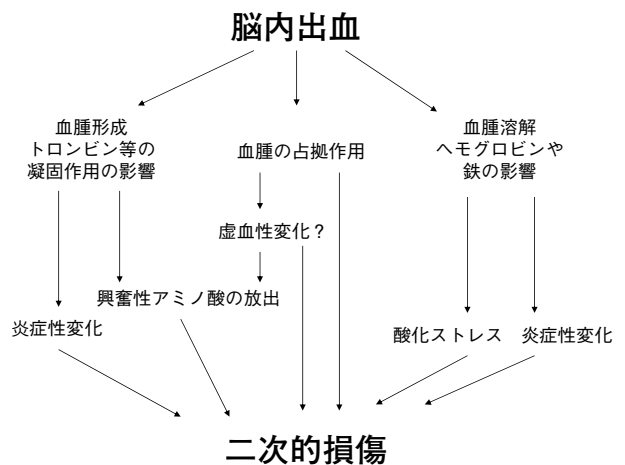


図1 脳内出血後の血腫による二次的脳損傷の病態

脳内出血後、これまでに考えられている主に灰白質での二次的脳損傷に至る過程を模式図で示した。本来、病態は多岐にわたり複雑である。ここでは、近年病態解析が発展している血腫形成および溶解による影響を中心に、以前より研究が行われている血腫による占拠作用を含め、代表的な過程を記載した。

ンの産生, 亜急性期以降での血腫溶解により放出された鉄の影響などが明らかとなってきた^{4, 5)}. これらは炎症や酸化ストレスを引き起こし二次的損傷に関係していることも明らかになっている(図1). 本稿では, これら病態の中で特に酸化ストレスに焦点を当てる.

血腫溶解後の酸化ストレスの病態

出血後, 凝固作用と同時に血球成分の崩壊も始まり, 数日後にみられる赤血球の溶壊時に最も浮腫が強くなる事が確認されている¹¹⁾. 我々は赤血球溶壊時に放出される物質として鉄に注目し, 鉄が基底核灰白質に及ぼす二次的損傷について酸化ストレスを中心に研究を行ってきた¹⁵⁻¹⁸⁾. 鉄染色を行ったところ, 72時間後を中心に血腫周囲の脳組織で鉄染色陽性細胞を多数確認した(表1). 血腫溶解の時期と一致し, 血腫より放出された鉄を周辺脳組織が取り込んだものと考えられる. なお, 脳梁白質部では鉄陽性細胞が僅かにみられる程度であった.

鉄による増悪因子のメカニズムとしては, 鉄は活性酸素を産出させるFenton反応($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$)を有することから, 酸化ストレスを惹起すると考えられる. 我々は, 酸化ストレスのタンパクレベルでのマーカーDNP (dinitrophenyl)¹⁹⁾, DNAレベルでのマーカー8-OHdG (8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine)あるいはAP-sites (apurinic/aprimidinic sites)²⁰⁾などで検討したところ, 各パラメータともに鉄の取り込みと同様に72時間後をピークに発現がみられた(表1). これを裏付けるデータとしてDNA修復酵素(APE/Ref-1: apurinic/aprimidinic endonuclease/redox effector factor-1)が72時間後に消費によると考えられる有意な減少を認めた^{19, 20)}. さらに, 脳内出血モデルに鉄キレート剤^{20, 21)}や抗ラジカル剤²²⁾を投与すると, これら酸化ストレスによる傷害は有意に抑制される. 以上から, 灰白質出血後における二次的損傷の機序の一つとして鉄による酸化ストレスを示唆するものである.

次に白質における二次的損傷に関して, 考察していく. 先述のようにラット基底核灰白質出血モデルでは, 脳梁白質に血腫由来の鉄による鉄染色陽性細胞をあまり認めないことから, 灰白質とは異なった機序が考えられる. 我々は, このモデルを用いて脳梁白質を検討したところ, 浮腫と脂質酸化のマーカーである4-HNE (4-hydroxyl-2-nonenal)の発現を認めた(表1). このことは, 白質でも酸化ストレスの影響があることを示唆している. 白質は灰白質と異なり, 軸索, ミエリンそしてオリゴデンドロサイトで構成される. 特に, 脂肪を多く含んだミエリンが白質のおよそ半分を占めることから, 白質の脂肪含有量は灰白質の倍近くに及ぶ. またオリゴデンドロサイトは, ミエリン産生以外に鉄結合タンパクであるトランスフェリンも産生する. よって白質は灰白質と比べ鉄含有量も多いことから, 酸化ストレスを受けやすいと言

える. 脳内出血後, 灰白質では血腫由来の鉄による酸化ストレスで, 白質では脂肪と元来存在する鉄による酸化ストレスが原因と考えられる.

表1 ラット脳内出血モデルにおける72時間後の各種パラメータ

	大脳基底核灰白質	脳梁白質
浮腫	+++	+++
鉄染色	+++	(±)
8-OHdG	++	+
AP-sites	+++	+
DNP	+++	++
4-HNE	+	+++
APE/Ref-1	---	-
NG2	(±)	+
TUNEL染色	(±)	(±)
PANT染色	+++	+

浮腫は乾燥重量法にて測定. 鉄染色は, 血腫周囲の脳組織での鉄の取り込みを反映する. 8-OHdGとAP-sitesは酸化的DNA障害, そしてDNPは, タンパクレベル, 4-HNEは脂質の酸化ストレスのマーカーである. APE/Ref-1は, DNA修復酵素でありDNA損傷時に消費され減少する. NG2はオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー. TUNEL染色はDNA二重鎖障害, PANT染色はDNA単鎖障害を反映する. +: 弱陽性, ++: 中等度陽性, +++: 強陽性, -: 軽度減少, --: 中等度減少, ---: 大幅減少, (±): ごく僅かな発現.

酸化ストレスを反映するバイオマーカー

我々の脳内出血に対して鉄キレート剤を用いた基礎的研究の報告が基になり²⁰⁾, 鉄キレート剤の臨床研究第I相が実施され, 現在, 第II相が行われている²³⁾. 将来, 実際の治療薬として応用される場合, 治療適応や治療効果の判定を行うため, 病態を反映するバイオマーカーが必要不可欠である. 脳内出血における酸化ストレスの病態を反映するバイオマーカーを表2に挙げた. DNAの酸化ストレスマーカーである8-OHdGとAP-sites, そして脂質の酸化ストレスマーカーである4-HNEが候補になる. 手術適応の重症脳内出血で, 手術で除去した損傷脳は良いサンプルになりえる. AP-sitesは損傷したDNAで検出されることから, 摘出した損傷脳のみがサンプルとなり得る. 8-OHdGはDNA修復時に, 除去され代謝を受けずに尿中に排泄されるため, 血清や尿がサンプルとなり得る. 4-HNEも血清がサンプルとなり得るので臨床への応用が可能と考えられる.

表2 酸化ストレスの病態を反映するバイオマーカー

8-OHdG	血清, 尿, 組織
AP-sites	組織
4-HNE	血清, 組織

8-OHdGとAP-sitesは酸化的DNA傷害, 4-HNEは脂質の酸化ストレスのマーカーである.

おわりに

本稿では、脳内出血における二次的損傷の最近の知見を紹介した。血腫が脳組織内に存在することで、機序も多岐にわたり非常に複雑な病態となっていることが理解いただけたかと思う。今後、これらを反映した脳内出血の新しいバイオマーカーが期待される。

文 献

- 1) 鈴木一夫. 日本の脳卒中の特徴. 老年病予防 1 : 16-22, 2002.
- 2) 金谷春之. 高血圧性脳出血の治療の現状—全国調査の成績より. 脳卒中12 : 509-524, 1990.
- 3) 日本脳卒中学会 脳卒中ガイドライン委員会. 脳卒中治療ガイドライン2015. 協和企画, 東京, 2015.
- 4) Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Lancet Neurol* 5(1) : 53-63, 2006.
- 5) 中村文洋, 田宮隆. 新たな視点からみた脳出血 急性期管理(2) 新たな薬物療法の可能性. 分子脳血管病 12(3) : 256-261, 2013.
- 6) 田中耕太郎. 脳虚血モデルの変換と問題点. 分子脳血管病 1 (1) : 97-103, 2002.
- 7) Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg* 81 (1) : 93-102, 1994.
- 8) Nakamura T, Xi G, Hua Y, Schallert T, et al. Intracerebral hemorrhage in mice: model characterization and application for genetically modified mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24(5) : 487-495, 2004.
- 9) Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 21 (5) : 801-807, 1990.
- 10) MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(3) : 516-525, 2008.
- 11) Xi G, Keep RF, Hoff JT. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg* 89(6) : 991-996, 1998.
- 12) Hua Y, Schallert T, Keep RF, Wu J, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 33(10) : 2478-2484, 2002.
- 13) Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, et al. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: The “black hole” model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol* 51(4) : 517-524, 2002.
- 14) Mendelow AD, Bullock R, Teasdale GM, Graham DI, et al. Intracranial hemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 2: Short term changes in local cerebral blood flow measured by autoradiography. *Neuro Res* 6(4) : 189-193, 1984.
- 15) Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg* 81 (1) : 93-102, 1994.
- 16) Butcher KS, Baird T, MacGregor L, Desmond P, et al. Perihematomal edema in primary intracerebral hemorrhage is plasma derived. *Stroke* 35(8) : 1879-1885, 2004.
- 17) Wagner KR, Xi G, Hua Y, Kleinholz M, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: Rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke* 27(3) : 490-497, 1996.
- 18) Xi G, Wagner KR, Keep RF, Hua Y, et al. The role of blood clot formation on early edema development following experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 29(12) : 2580-2586, 1998.
- 19) Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Hoff JT, et al. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 1039(1-2) : 30-36, 2005
- 20) Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Schallert T, et al. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 100(4) : 672-678, 2004.
- 21) Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Nagao S, et al. Iron-induced oxidative brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* : 96 : 194-198, 2006.
- 22) Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S, Zhang X, et al. Edaravone attenuates brain edema and neurologic deficits in a rat model of acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* 39(2) : 463-469, 2008.
- 23) Selim M, Yeatts S, Goldstein JN, Gomes J, et al. Safety and tolerability of deferoxamine mesylate in patients with acute intracerebral haemorrhage. *Stroke* 42(11) : 3067-3074, 2011.

受付日 2016年 9月30日

受理日 2016年12月22日