

くも膜下出血による早期脳損傷に対する
グリベンクラミドの抑制効果

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

梶本隆太

修了年 2018 年

指導教員 大島秀規

目次

1. 概要	1
2. 略語表	3
3. 緒言	4
4. 材料と方法	
4-1 くも膜下出血モデル	6
4-2 血糖測定	7
4-3 くも膜下出血の血腫 grade 評価	7
4-4 脳水分含有量測定	7
4-5 PCR による炎症性変化の解析	7
4-6 免疫組織学的評価	7
4-7 統計解析	8
5. 動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮	9
6. 結果	
6-1 血糖値の変化	10
6-2 くも膜下出血の grade	10
6-3 脳水分含有量	10
6-4 炎症性サイトカイン	10
6-5 マイクログリアの免疫染色	11
7. 考察	
7-1 くも膜下出血後の早期脳損傷	12
7-2 本研究の限界	13
7-3 今後の展望	14
8. 結論	15
9. 謝辞	16
10. 図表	17
11. 引用文献	34
12. 研究業績	37

1 概要

くも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) は、死亡率が高い病態であり、救命されても重篤な後遺症を残すことがある。SAH 後 72 時間以内に生じる頭蓋内圧亢進を主体とした早期脳損傷 (early brain injury: EBI) は、予後規定因子である可能性とともに新たな治療ターゲットとしても注目されている。スルホニルウレア受容体 1 (sulfonylurea receptor 1: SUR1) は脳損傷の早期より神経細胞、グリア細胞および血管内皮細胞に発現を認めることが報告されている。SUR1 の発現はイオンチャンネルを介した Na イオンおよび Ca イオンの細胞内流入を促進させ、細胞の膨化、脱分極に引き続き細胞死を引き起こすことが知られている。また、詳細な機序は解明されていないものの SUR1 の過剰発現は炎症性反応を惹起することが報告されている。グリベンクラミドは世界各国で使用されている糖尿病治療薬であり、膵臓のβ細胞の SUR1 に作用することで強力な血糖降下作用を発現する。さらにグリベンクラミドは、middle cerebral artery occlusion (MCAO) モデルを用いた脳虚血の基礎研究において、脳浮腫の軽減と死亡率の低下が報告されている。しかし、SAH による EBI に対するグリベンクラミドの効果は十分に解明されていない。そこで本研究では、ラットの SAH モデルを用いて、グリベンクラミドによる EBI の抑制効果を検討した。

雄 Sprague-Dawley (SD) ラット 19 頭を用いて Sham 群 (n=3)、SAH-コントロール群 (n=8)、SAH-グリベンクラミド群 (n=8) を作製した。グリベンクラミドの溶解剤として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO) のみを投与した群を SAH-コントロール群とした。SAH 直後から皮下に埋め込み型浸透圧ポンプを留置し、薬剤の持続投与を行った。24 時間後に脳を摘出した。Dry-wet 法を用いて脳の水分含有量を測定した。また脳の冠状断切片を作製し、皮質、被殻および海馬の 3 つの部位に分け、炎症性サイトカインの発現を polymerase chain reaction (PCR) 法で評価した。また、SD ラット 9 頭を用いて同様の 3 群 (各々 n=3) を作製し、脳内の免疫細胞であるマイクログリアの評価を免疫組織学的に行った。

脳浮腫の指標である脳の水分含有量は、SAH-コントロール群と比較して SAH-グリベンクラミド群で有意に低下した。SAH により大脳皮質では interleukin-1beta (IL-1β)、tumor necrosis factor alpha (TNFα)、nuclear factor-kappa B (NF-κB) の有意な上昇を認めた。SAH-コントロール群と比較して、SAH-グリベンクラミド群では皮質における IL-1β と TNFα の有意な低下を認めた。また matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) と NF-κB も同様にグリベンクラミド投与により低下傾向を示したが、有意な差は認めなかった。SAH により脳に広範囲なマイクログリアの活性化が起こることが、免疫組織学的染色で確認された。SAH によるマイクログリアの活性化はグリベンクラミドの投与により抑制されていた。

SAH 後の EBI においては、大脳皮質で SUR1 の ATP and Ca²⁺ - sensitive nonselective cation (NC_{Ca-ATP}) チャンネルが過剰発現し、細胞内に Na と水分の過剰流入を引き起こすことで細胞毒性浮腫および血管原性浮腫が起こり、さらには細胞死を引き起こされる。本研究の SAH モデルにおいて、グリベンクラミドの投与は SAH に引き続く EBI の原因となる脳浮腫の抑制だけでなく、マイクログリアの活性化および炎症性サイトカインの分泌亢進を抑制

することが示された。本研究の発展により、グリベンクラミドによる SAH 後の EBI の抑制が治療法として確立されれば、機能予後の改善に大きく寄与できるものと期待される。

2 略語表

ATP: adenosine triphosphate
BA: basilar artery
BBB: blood-brain barrier
CBF: cerebral blood flow
CCA: common carotid artery
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
DMSO: dimethyl sulfoxide
EBI: early brain injury
ECA: external carotid artery
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ICA: internal carotid artery
ICP: intracranial pressure
IL-1 β : interleukin-1beta
MCA: middle cerebral artery
MCAO: middle cerebral artery occlusion
MMP-9: matrix metalloproteinase-9
mRNA: messenger ribonucleic acid
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
rt-PA: recombinant tissue plasminogen activator
SAH: subarachnoid hemorrhage
SUR1: sulfonylurea receptor 1
TNF α : tumor necrosis factor alpha
TTC: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

3 緒言

くも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) の発症率には地域差があり、全世界では人口 10 万対約 9 人/年とされているが、日本やフィンランドに多いとされ人口 10 万対約 20 人/年と推計されている^{1,2}。性差については世界的には一定の傾向がみられないという報告から女性に多いという報告があるが、わが国では女性に多い傾向にある³。SAH の発症原因の約 85% が脳動脈瘤の破裂であり、全脳卒中の 6-10% を占める⁴。SAH の死亡率は全脳卒中の中で最も高く、また生存しても大きな後遺症を残し、日常生活に介助が必要となる患者が多い。SAH 全体での死亡率は 10-67% と報告されており、要介助の転帰不良例は約 40% と考えられている^{4,5,6,7}。SAH の転帰を悪化させる因子としては再出血や遅発性脳血管攣縮があるが、特に急性期に多い再出血は高い死亡率と不良な転帰の原因となっている。そのため脳動脈瘤の再破裂を予防する目的で、急性期に開頭クリッピング術やコイル塞栓術などの治療が行われている。

脳動脈瘤の再破裂予防としての外科療法に引き続き、SAH 発症後に続発する合併症に対する治療が行われる。代表的な合併症に遅発性脳血管攣縮と水頭症がある。水頭症に対しては、シャント手術という標準治療が確立している。しかし脳血管攣縮に関しては確実な予防薬や治療法はなく、これまでに以下に記すような様々な研究がなされてきた。

SAH 後の脳血管攣縮には、動脈瘤破裂直後 (48 時間以内) に一過性に生じる早期攣縮と、SAH 発症から 5-7 日かけて生じ、長期間 (約 1-2 週間) 続く遅発性攣縮がある。早期攣縮は SAH 患者の約 10% に認められているが、予後への影響は明確となっていない。この早期攣縮は、3 ヶ月後の予後不良因子とされる報告もあるが、遅発性攣縮との関係はなく、予後との関係は不明との報告もある⁸。遅発性攣縮は、症状出現の有無にかかわらず脳血管撮影を行うと SAH 患者の約 30-70% に確認される⁹。このうち虚血症状を呈する頻度は 20-30% 程度とされ、約 15% の患者は予後不良の転帰をとる。現在日本国内で認可されている脳血管攣縮予防薬に、Rho キナーゼ阻害剤である塩酸フェスジル、トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害薬であるオザグレルナトリウムがある。さらに、現在も遅発性脳血管攣縮を治療対象とした様々な薬剤の有効性が、臨床治験によって検証されている。しかし多数の臨床研究の結果を統合したメタ解析の結果からは、治療薬によって脳血管撮影上の脳血管攣縮を減少することができたとしても、脳血管攣縮の改善だけでは予後を改善するまでには至らないことを示しており、近年では脳血管攣縮に代わる新たな治療の対象となる病態を検討する必要性が指摘されている¹⁰。そこで SAH による予後悪化の病態として「早期脳損傷 (early brain injury: EBI)」という概念が提唱されてきた¹¹。

近年の動物実験および臨床研究などの結果から、SAH 直後から脳損傷は始まっており、その損傷は約 72 時間かけて進行することが明らかとなってきた¹¹。この EBI と呼ばれる病態は、SAH 後の転帰不良と強く関係する因子と考えられており、SAH における新たな治療対象として注目されている。SAH 後の EBI の病態機序は以下のように考えられている。図 1 に示すように、脳動脈瘤の破裂による広範な脳血流低下、脳組織の物理的圧迫および頭蓋

内圧亢進などの SAH 特有の要因が複合し、炎症性反応、脳浮腫および神経細胞死などが引き起こされ、結果的に神経脱落症候の出現や死亡などの転帰不良となることが考えられる。現在 EBI を改善する様々な薬剤が基礎研究を中心に検証されている。

グリベンクラミドは糖尿病の治療薬として臨床で広く使用されており、スルホニルウレア受容体 1 (sulfonylurea receptor 1: SUR1) を介するインスリンの分泌促進による血糖降下作用を有している。SUR1 は図 2 に示すように、サブユニットを形成しており、ATP and Ca^{2+} -sensitive nonselective cation ($\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$) チャンネルと ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) チャンネルから構成されている。血液中のブドウ糖濃度が上昇すると膵臓 β 細胞上のグルコーストランスポーター 2 から細胞内に糖がとりこまれ、adenosine triphosphate (ATP) が産生されるため細胞内 ATP 濃度が上昇する。細胞内 ATP の上昇により、SUR1 サブユニットの K_{ATP} チャンネルが閉鎖し、細胞内外の K 濃度勾配が脱分極を誘発する。すると $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ チャンネルが活性化され、細胞内にカルシウムイオンが流入し、インスリン分泌顆粒に作用する事でインスリンが分泌される。グリベンクラミドは K_{ATP} チャンネルに作用し、このチャンネルを閉鎖することによりインスリン分泌を促進する。近年の研究では、この血糖降下作用以外にも虚血後の脳腫脹改善作用が示されている。虚血後には脳内の全てのタイプの細胞で SUR1 の発現が増強し、過剰に $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ チャンネルが機能することで細胞内への Na と水分の流入を引き起こし、細胞の膨化、さらには細胞死を引き起こすと考えられている。このように、虚血後の SUR1 の発現はその後にかかる細胞毒性浮腫に重要な働きをすることが *in vitro*、*in vivo* の両方の研究から証明されている¹²。グリベンクラミドは $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ チャンネルを選択的に拮抗し、虚血後に起こる脳細胞の脱分極や細胞膨化を抑制することが報告されており、Simard らによるラット脳梗塞モデルを用いた研究では、グリベンクラミドの投与により梗塞後の脳腫脹の軽減や死亡率の低下が示された¹³。

SAH モデルを用いた SUR1 発現に関する最初の研究結果が、Simard らにより 2009 年に報告された¹⁴。この報告では SUR1 とその encode mRNA である *Abcc8* の発現を大脳皮質と脳血管で観察している。この結果により、SAH 後の皮質領域における血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の透過性亢進に SUR1 が関与していると考えられている。ラットの SAH モデルにおける EBI は、虚血や低酸素といった単一要因だけでなく、BBB の透過性亢進や炎症性反応による SUR1 の発現が関与しているのではないかと考察している。

過去の研究では、グリベンクラミドの投与による SAH 後の EBI に対する有効性は検証されていない。そこで、本研究ではラットの SAH モデルを用いて、グリベンクラミド投与が EBI の主要因である脳浮腫や炎症性反応を軽減できるかどうか検討した。

4 材料と方法

4-1 くも膜下出血モデル

SAH モデルには 281-341 g の雄 Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。グリベンクラミド(G0639-5G: Sigma-Aldrich Japan, JAPAN)は dimethyl sulfoxide(DMSO) (043-07216: Wako, JAPAN) に溶解したため、対照薬としても DMSO を用いた。ラットは表 1 のごとく内頸動脈の結紮のみを行った Sham 群 (n=6) 、SAH 後に DMSO を投与した SAH-コントロール群 (n=11) 、SAH 後にグリベンクラミドを投与した SAH-グリベンクラミド群 (n=11) の 3 群に無作為に振り分けた。

SAH モデルについては、血管穿刺モデルとくも膜下腔自家血注入モデルの二つが主に用いられている^{15,16,17,18}。本研究で使用した血管穿刺モデルは、死亡率が高く、血腫量がコントロールできないために重症度にばらつきがあることが問題であるが、頭蓋内圧上昇や脳血流低下などの生理的変化が大きく、臨床の EBI をよく再現するモデルとされている。くも膜下腔自家血注入モデルは、血腫量のコントロールが可能のため重症度にばらつきが少ないという利点はあるが、頭蓋内圧上昇・脳血流低下などの変化が小さいため、EBI が軽度であり、本研究には不適と考えられた。

モデル作成にあたって、ラットの麻酔はイソフルレン 4%で導入し、2%で維持した。十分な麻酔深度が得られたのち、ラットを手術台に背臥位に固定した。体温測定プローブを直腸内に挿入し、体温調整パッドで術中の体温を 37 度に維持した。鎮痛のために切開部に 1%キシロカインを 0.5 mL 投与した。頸部正中皮膚切開を行い、鈍的に右総頸動脈を露出し近位部で結紮した。右外頸動脈、内頸動脈、後頭動脈を同定した。外頸動脈を近位部で結紮し、後頭動脈を結紮切離した。頸動脈分岐部を穿刺し、4-0 ナイロンを頭蓋内に 25 mm 挿入しすぐに引き抜いた(図 3)。モデル作成直後に、薬剤を充填した浸透圧ポンプ (Alzet 2001: Alzet, USA) を、ラットの腹部皮下に留置し、1.0 $\mu\text{L}/\text{h}$ で 24 時間持続投与した。投与濃度は先行研究を参考にして 3.3 mM の濃度で使用した。この濃度では 24 時間での総投与量は 39.52 μg となる。血糖値を 70 mg/dL 以下に低下させる量は 396 $\mu\text{g}/\text{day}$ と報告されているので、その 1/10 量に相当する¹⁹。皮膚を縫合した後、温室内でラットを覚醒させた。給餌に関しては不断給餌とし、実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。このモデルの成功率は 53.3%、死亡率は 16.7%であった。

まず、polymerase chain reaction (PCR) 用の脳と Dry-wet 法用の脳の検体は、24 時間後に致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し深麻酔した。次に、経心臓的に 200 mL の生理食塩水で脱血後に断頭して脳を摘出した。脳を摘出後 2 mm 間隔に薄切し、穿刺部対側の皮質、被殻、海馬の 3 部位に分けて、PCR 用として採取した。さらに、組織をメスで小さく破碎後に直接 RNALater (AM7024: Thermo Fisher Scientific, USA) 内に保存した。皮質の一部は Dry-wet 法用として採取した。組織染色用の検体採取には、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し深麻酔した。経心臓的に 200 mL の生理食塩水で脱血後、200 mL の 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後に脳を摘出した。同様の固定液で後固定を 24 時間し

た後、10%、20%、30%のショ糖加 phosphate buffered saline (PBS) 溶液内で各々24 時間ずつ段階的に漬けてクライオプロテクションを施した。その後液体窒素で瞬間凍結して組織を保存した。

4-2 血糖測定

手術施行直前と手術施行 24 時間後にラットの血液を採取し血糖値を測定した。血液は麻酔下に頸部皮下静脈叢より採取した。測定には全血を用い、解析には Glucose Pilot (GP-01: Iwai, JAPAN) を用いた。

4-3 くも膜下出血の grade 評価

脳摘出時に Sugawara らの SAH グレード評価スケールを用いて重症度を評価した²⁰。まず、摘出した脳の頭蓋底部を写真に撮影した。区域を 6ヶ所に分け、くも膜下腔の血腫量を 0-3 点で評価し、その合計点 (0-18 点) で grade 評価を行った (図 4)。0 点は SAH がない状態であり、18 点は最も重症の SAH である。

4-4 脳水分含有量測定

Dry-wet 法を用いて脳水分含有量を測定した^{21,22}。脳を摘出後、その湿重量を測定した。その後脳をオープンに入れ、80 度で 48 時間処理し、脳の乾燥重量を測定した。脳の水分含有量は、 $[(\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量}] \times 100 (\%)$ で算出した。

4-5 PCR による炎症性変化の解析

脳組織を RNALater からとりだした。そして messenger ribonucleic acid (mRNA) 精製には RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (74804: Quiagen, GERMANY) を使用した。RNA 濃度測定には分光光度計 (NanoDrop Lite: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。また、complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) 作成には SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (18090010: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。PCR は Platium Taq (10966-034: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、サーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler: Bio-Rad, USA) で行った。プライマーと PCR の条件は表 2 に記載した。プライマーは National Center for Biotechnology Information の Basic Local Alignment Search Tool を用いて設計した。泳動は Gel Red (41003: Biotium, USA) 添加 2%アガロースゲルで行った。検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) でバンドを検出した。DNA マーカーとして TrackIt 50 bp DNA Ladder (10488043: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。内部コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

4-6 免疫組織学的評価

パラホルムアルデヒドで灌流固定した標本を用いた。凍結脳をクライオスタットを用い

て 20 μm 厚に薄切し、500 μm 毎に切片を採取した。組織を PBS 溶液中に浮遊させた状態で免疫染色した。まず切片を 3%過酸化水素に浸し内因性ペルオキシダーゼを除去した。2%ウマ血清を用いてブロッキングしたのち、一次抗体 (anti-Iba-1 polyclonal antibody; 019-19741: Wako, JAPAN) 反応を 4 度で over night で行った。二次抗体反応からジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine: DAB) 発色までは VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (PK-6101, 6102: Vector Laboratories, USA) を用いた。アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹しカバースリップした。

4-7 統計解析

血糖値のデータ解析には二元配置分散分析を用いた。他のデータの解析には一元配置分散分析を用いた。分散が等しくないデータに対してはイプシロンで自由度を調整した。分散分析で要因に有意差が認められた場合のみ、その後の検定を行った。その後の検定には Tukey 法を用いた。すべて両側検定を行い、p 値 0.05 以下を有意とした。結果は、平均値 ± 標準偏差で表記した。統計解析には SPSS Statistics (version21: IBM, USA) を使用した。

5 動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮

本研究は日本大学動物実験委員会の審査を通過したのちに開始した。動物の取り扱いおよび実験は、日本大学動物実験マニュアルを順守して行われた。動物は気温 22-23 度、湿度 50-60%の室内で 12 時間ごとの明暗サイクルのもとで飼育した。飼料、水分は自由アクセスとした。過侵襲と判断された場合の人道的エンドポイントの設定を行ったうえで研究を行った。研究者は上記委員会が制定する年一回の講習会を受講している。

6 結果

6-1 血糖値の変化

術前の血糖値は、Sham 群で 159.3 ± 9.0 mg/dL、SAH-コントロール群で 170.3 ± 39.9 mg/dL、SAH-グリベンクラミド群で 167.8 ± 16.7 mg/dL であり、術後 24 時間の血糖値は、Sham 群で 161.3 ± 12.7 mg/dL、SAH-コントロール群で 150.3 ± 40.6 mg/dL、SAH-グリベンクラミド群で 131.4 ± 35.7 mg/dL であった。SAH-グリベンクラミド群では有意な低下を認めたが ($p=0.035$)、異常低値とはならなかった (図 5)。

6-2 くも膜下出血の grade

SAH の血腫 grade によって軽症 (SAH grade: 0-7) と重症 (SAH grade: 8-18) の 2 群に分類した^{20,21}。SAH-コントロール群は軽症が 6 頭 (SAH grade 平均値: 3.5)、重症が 2 頭 (SAH grade 8 及び 14) であり、SAH-グリベンクラミド群では軽症が 4 頭 (SAH grade 平均値: 4.25)、重症が 4 頭 (SAH grade 平均値: 14) であった。SAH-グリベンクラミド群でより重症が多い傾向にあったが、両群間に有意な差は認めなかった (表 3)。

6-3 脳水分含有量

脳浮腫の指標である脳水分含有量を図 6 に示した。Sham 群の脳水分含有量は $70 \pm 10\%$ であった。SAH-コントロール群では $90 \pm 19\%$ と増加したが ($p=0.014$)、SAH-グリベンクラミド群では $69 \pm 9\%$ と低下した。グリベンクラミド投与による有意な抑制効果が認められた ($p<0.001$)。

6-4 炎症性サイトカイン

炎症性サイトカインとして interleukin-1beta (IL-1 β) と tumor necrosis factor alpha (TNF α) を、また炎症の総合的な指標として nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を評価した。また組織損傷の指標として matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) を測定した。

大脳皮質において、Sham 群では IL-1 β 、TNF α 、NF- κ B とともに低値であった (図 7)。これらは SAH-コントロール群では大きく上昇したが、グリベンクラミド投与群ではコントロール群に比較して低下した。IL-1 β は SAH により有意に上昇し ($p=0.003$)、グリベンクラミドの投与により有意に減少した ($p=0.033$)。TNF α も同様に SAH-コントロール群では Sham 群と比較して有意に上昇した ($p<0.001$)。この TNF α の値はグリベンクラミドの投与により有意に抑制された ($p<0.001$)。NF- κ B は SAH により有意に上昇した ($p=0.016$)。グリベンクラミドの投与により NF- κ B は低下したが、統計学的に有意な差は認めなかった。MMP-9 は SAH により上昇を認めたが、統計学的に有意な変化ではなく、またグリベンクラミドの投与による有意な変化も認められなかった。

図 8 に示すように、被殻においても 4 つのサイトカインの変化は大脳皮質と同様の傾向を示したが、有意な差は認めなかった。

海馬においては、図 9 に示すように、IL-1 β がグリベンクラミドの投与群において有意に上昇していた (p=0.031)。他のサイトカイン、炎症性マーカーは SAH の影響も薬物の影響も認められなかった。

6-5 マイクログリアの免疫染色

Sham ラットの脳切片を抗 Iba-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、大脳皮質、被殻、海馬を含む脳全体に陽性細胞が確認された (図 10)。これらの陽性細胞は小さな胞体と多数の樹状突起を有しており、静止型の ramified 型のマイクログリアと考えられた。

次に SAH-コントロール群の抗 Iba-1 抗体染色切片を観察した (図 11)。大脳皮質、被殻、海馬を含む脳全体に Sham 群と同様に陽性細胞を認めた。弱拡大での観察では、Sham 群と比較して細胞数の増加がみられた。これらの陽性細胞を強拡大で観察すると、マイクログリアの胞体が肥大化しており、突起の乏しい、活性型の ameboid 型であった。

図 12 に示すように、SAH-グリベンクラミド群の脳切片を抗 Iba-1 抗体で免疫染色し観察した。脳全体にわたって陽性細胞が観察された。Iba-1 陽性細胞数は SAH-コントロール群のように増加しておらず、Sham 群の細胞数と近似していた。強拡大で観察すると、SAH-コントロール群と比較して SAH-グリベンクラミド群では、ameboid 型マイクログリアが少なく、ramified 型のマイクログリアが多く認められた。特に海馬では多くのマイクログリアが ramified 型を呈していた。

7 考察

7-1 くも膜下出血後の早期脳損傷

SAH 後の早期脳損傷により、神経細胞死と脳腫脹が起こり、最終的に機能予後に影響を与える。この神経細胞死と脳腫脹の生じる機序には、脳内の BBB の透過性亢進と炎症性反応が関与する^{11,23}。SAH 後早期に BBB の透過性亢進が生じ、それに伴い蛋白の血管外漏出がおきて血管原性浮腫が引き起こされることが知られている。また、蛋白の血管外漏出は浮腫だけでなく炎症性反応も惹起される。

過去の SAH と SUR1 の研究では、SAH 後に血管内皮細胞と神経細胞に SUR1 が発現していると報告されている。また、この研究では免疫染色で SUR1 の発現している細胞に一致して炎症性変化が生じ、BBB の破綻、その後におきる血管原性浮腫の発生に SUR1 の発現が関与していることが示唆された。血管原性浮腫は形態的な変化だけでなく機能的にも大きな変化をきたす。血漿や血漿の成分が脳内に流入することにより脳浮腫の悪化や、炎症性サイトカインが惹起され、核内 DNA の断片化、ネクロシスおよびアポトーシスが引き起こされ、マイクログリアや好中球浸潤の原因となることが知られている^{24,25}。本研究において、グリベンクラミド投与により SAH 後の脳水分含有量は有意に抑制された。SAH においては頭蓋内圧亢進による広範な脳血流量の低下により SUR1 が神経細胞、血管内皮細胞で upregulate されている¹⁴。SAH では、血管内皮細胞に SUR1 が発現することで BBB の透過性が亢進して血管原性浮腫が引き起こされたと考えられる。図 13 に示すように虚血や損傷により ATP の低下が起こり、これによる細胞の脱分極や細胞膨化を介して脳浮腫が出現する。SUR1 サブユニットの NC_{Ca}-ATP チャンネルがこの機序に関係しており、このチャンネルをグリベンクラミドが選択的に阻害することにより、BBB の透過性亢進の抑制に効果的に作用して、脳浮腫の改善をきたしたと考えられる。これまでの報告においても、ラット脳梗塞モデルを用いた基礎研究において、グリベンクラミドは梗塞後の脳腫脹や死亡率を低下させることが報告されている¹³。また臨床研究では、グリベンクラミドの投与により脳虚血後の虚血巣の体積を減少させ、死亡率の低下や神経学的な予後を改善させることが報告されている^{26,27}。また遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクチベータ (recombinant tissue plasminogen activator: rt-PA) 使用後の脳浮腫の改善の報告もなされている²⁸。本研究においても、SAH 後にグリベンクラミド投与による脳浮腫の改善が示された。SAH 後の EBI の抑制にグリベンクラミドが寄与していることを示唆している。

SAH 後の EBI における炎症性反応は、前述の BBB の透過性亢進と強い因果関係が知られている。SAH 後には脳内の様々な細胞で炎症性反応の誘導が惹起される。血管原性浮腫により、血液由来の物質が脳実質に蓄積され、マイクログリアやアストロサイトの活性化を引き起こし、炎症性サイトカイン分泌を誘導する。最終的に炎症性反応の増強により、さらに浮腫が増悪することが知られている^{24,25}。また、炎症性サイトカインの中でも特に TNF α に関しては、培養血管内皮細胞を TNF α に暴露することで SUR1 とその encode mRNA である Abcc8 を発現させることが報告されている¹⁴。これは Abcc8、SUR1 の発現と SAH の炎

症性反応の関連性を示唆する。本研究では、グリベンクラミド投与により SAH 後の大脳皮質における炎症性サイトカイン IL-1 β と TNF α の発現は有意に抑制された。NF- κ B と MMP-9 についても有意な差は認めなかったものの同様の傾向が認められた。被殻も同様に、有意な差は認めなかったが同様の傾向を認めた。過去の報告では SUR1 の発現には虚血や低酸素が大きく関与しているが、SAH モデルでの SUR1 の発現は虚血や低酸素といった単一の要因ではなく、その発現には炎症性変化が大きく関与しているのではないかと考えられている。グリベンクラミドによる SUR1 選択的阻害により、直接的抗炎症作用ではないが、炎症性サイトカインの上昇を抑制する結果を示すことができた。また、炎症性反応に関連するマイクログリアの活性化を抑制する効果もグリベンクラミドは有していることが示された。

7-2 本研究の限界

被殻や海馬においては、大脳皮質の様にグリベンクラミドによる炎症性サイトカインの有意な抑制効果は得られなかった。これには血管穿刺モデルの特性を考慮する必要がある。穿刺による虚血の影響に関しては過去の報告で、SAH の血管穿刺モデルでは大脳皮質に脳梗塞はきたさないと結論付けている²⁹。実際、血管穿刺モデルの脳を TTC 染色で確認したところ、図 14 に示すように、大脳皮質に脳梗塞の所見は認めなかった。そのため本研究で用いた血管穿刺モデルの大脳皮質は、SAH による EBI の影響を正確に調べる事が可能なモデルであると考えられる。さらに本研究では、従来よりもさらに穿刺による影響を少なくするために穿刺側と対側である左側の脳を検体として利用している。しかしながら血管穿刺モデルによる被殻や海馬への影響に関する報告はない。血管穿刺により脳梗塞を合併した場合は、純粋に SAH による影響のみの炎症性サイトカインを正確に評価できないことが推測された。また、ラットの痙攣重積モデルを使用した報告では、海馬における SUR1 は他の部位と比較してはるかに多く upregulate されていることが示されている³⁰。これが SAH モデルでも同様の変化が起こるのであれば、今回使用した low dose のグリベンクラミドでは、海馬の SUR1 の活性を十分に抑制できなかった可能性も示唆される。このように部位による SUR1 の upregulate の違いが、炎症性反応の抑制に影響を与えた可能性も考えられる。

血管穿刺モデルは、前述したように重症度にばらつきが出やすい欠点がある。SAH の重症度によって、脳浮腫の程度や炎症性サイトカインの発現に差が生じることが考えられ、本研究結果にも影響を与えている可能性が示唆される。本研究では、SAH-コントロール群と SAH-グリベンクラミド群の各々で軽症例と重症例を含んでいたが、その割合は統計学上で両群間に有意な差を認めなかった。このため、両群間の重症度のばらつきが本研究結果に与える影響は少ないと考えている。

本モデルでは神経学的評価が困難であり、グリベンクラミド投与による神経学的機能改善の有無が評価しにくいいため、EBI によって起こり得る神経脱落症状の抑制効果を判断することが難しい点が挙げられる。

7-3 今後の展望

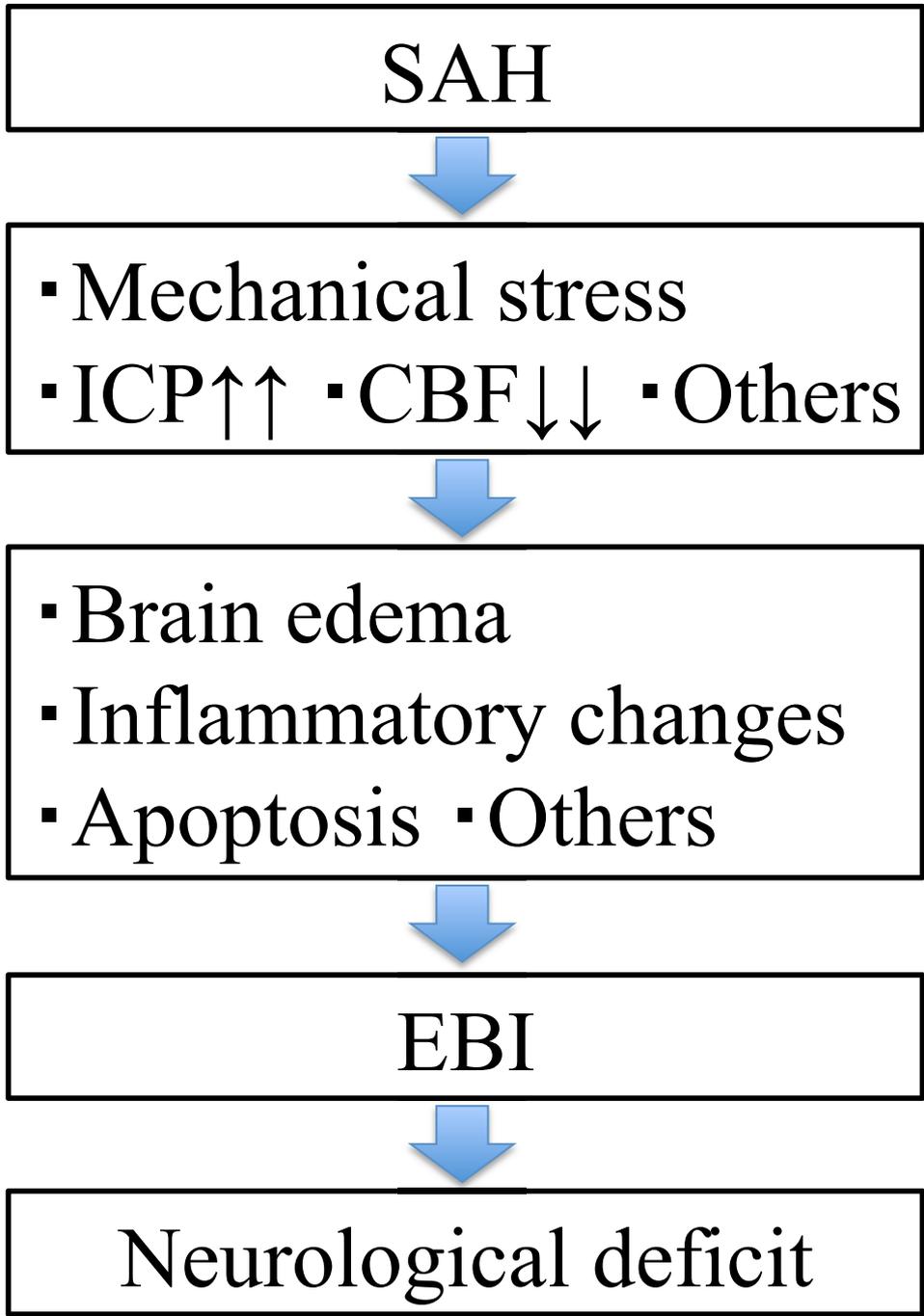
今回、グリベンクラミドを用いて SAH 後の EBI に対する抑制効果を炎症性反応の側面から検討してみた。しかしながら SAH 後の SUR1 の発現にはまだ明らかとなっていないことが多い。本研究においてもグリベンクラミド投与により炎症性サイトカインの抑制やマイクログリアの活性化を抑制できたが、SUR1 発現と炎症性反応の直接的な機序に関しては解明できていない。また、SAH 後の SUR1 発現の経時的変化や部位による差についても解明できていない。今後の研究課題として、1) SUR1 発現と炎症性反応の機序、2) SUR1 発現の部位による違いとグリベンクラミドの投与濃度による影響の解明がある。この機序の解明は、グリベンクラミドの EBI 抑制効果だけでなく、EBI 抑制を介した SAH 後の機能予後改善の可能性を提示しうるものと考えられる。

8 結論

SUR1 受容体の選択的拮抗薬であるグリベンクラミドの投与により、SAH 後の EBI に伴う脳浮腫を軽減した。また、マイクログリア活性化の抑制、サイトカインの分泌抑制といった炎症性反応の抑制が認められた。SUR1 の発現と脳浮腫に関しては明確な機序が解明されているが、SUR1 発現と炎症性反応の直接的な機序に関しては、未だ不明な点が多い。今後の更なる研究により、SAH 後の EBI と SUR1 発現の関連性を明確にする事で臨床においてグリベンクラミドが SAH 後の機能改善の一助になる事を期待する。

9 謝辞

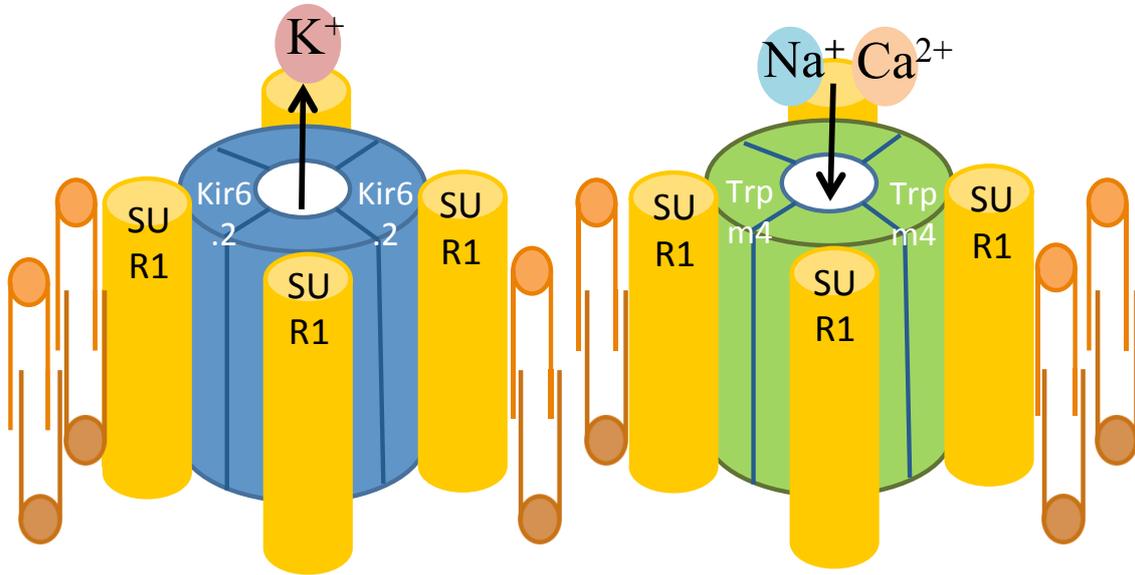
本研究の遂行におきまして、懇切なご指導を賜りました日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野の吉野篤緒教授、大島秀規准教授に深く感謝いたします。研究計画立案、および研究遂行協力を日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野の須磨健准教授、五十嵐崇浩助教に頂きましたことを感謝いたします。



я žřđŃ0 я а н Uó η vŠç0 ýĤĚŠaXSRU SAH α 'UqŠ; д ĥCe0 я В
řĪΩ τ шŭĪĪ A б Ющ_ħe<κAFAQP EBI TXΨD0 A б ю Δ τ β ħe<κA
F1

CBF: cerebral blood flow
ICP: intracranial pressure

§ 2Ä SUR1 U|oÍ¼



K_{ATP} channels

NC_{Ca-ATP} channels

SUR1 VzµÃ~|©hg.iD09c0

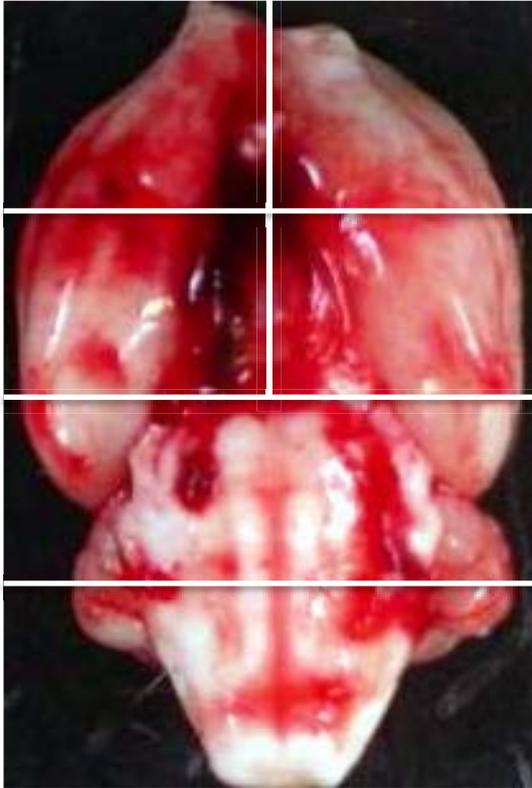
K_{ATP} ¥ÁÊ-ÇQ

NC_{Ca-ATP} ¥ÁÊ-Ç:bSd1

×T NC_{Ca-ATP} ¥ÁÊ-Ç

;℔žfũĩTŨ<= Ĩ ÓD06dQŵge06d1

§ 4A SAH 3r grade 3rI



0 3rSD

1 3rG: 3rhF^d

2 3r; 3rFd; × 0I 5 V 3FP<d

3 3r; 3rSD × 0I 5 ; 3FP<S6

0点

1点

2点

3点



Figure 5: Blood glucose levels

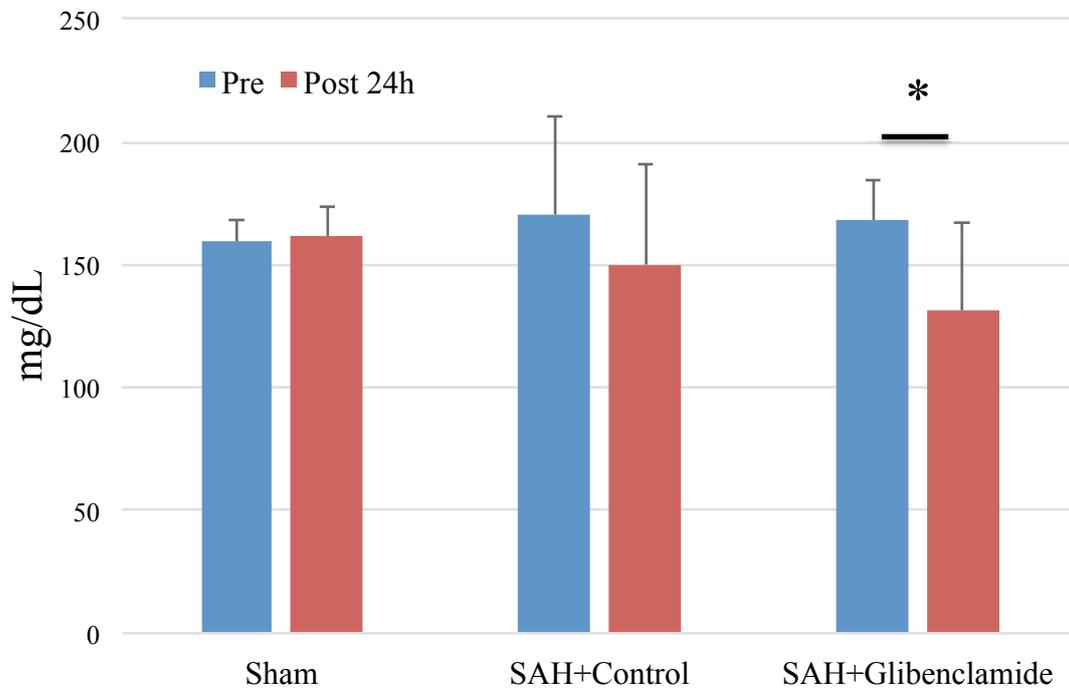
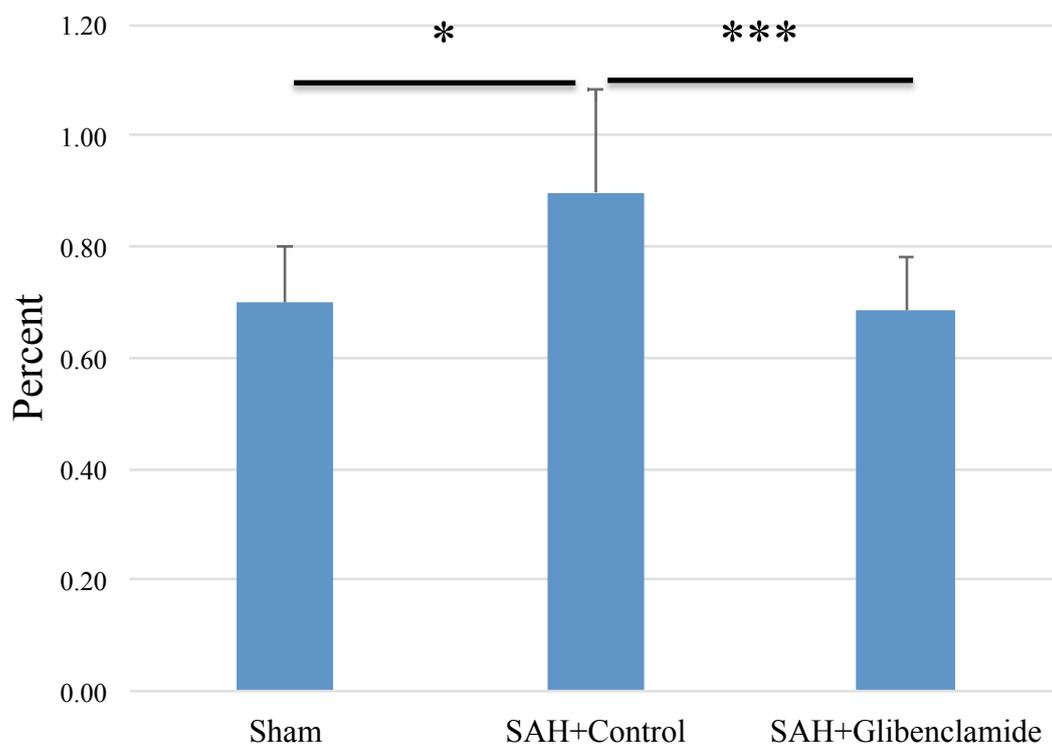


Figure 5: Blood glucose levels

Figure 5: Blood glucose levels

*p < 0.05

ê 6Ã ¼ UAËÕ·Ï

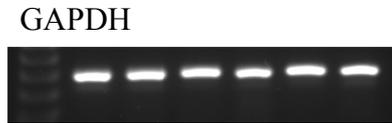
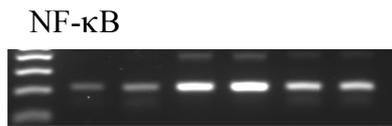
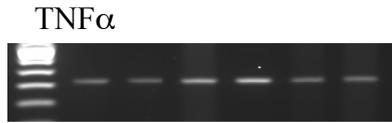
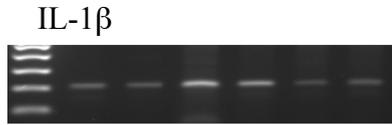


SAH Tãd ¼ B ñ; ùgFd; 0vÆ· ÊuÅ½^aTacIe; ·nTrÛCed1

*ã Pã 0.05

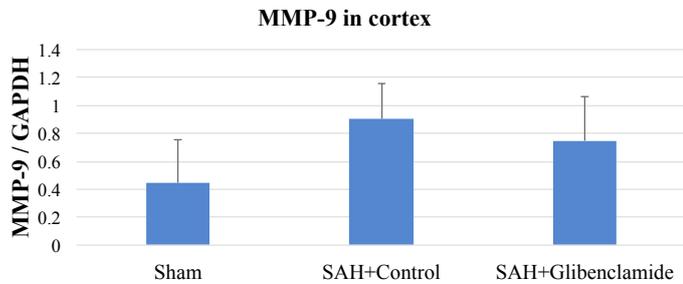
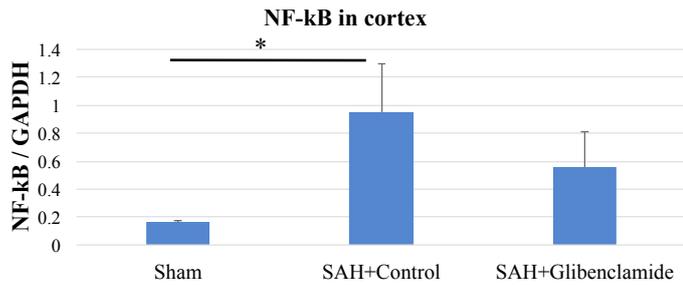
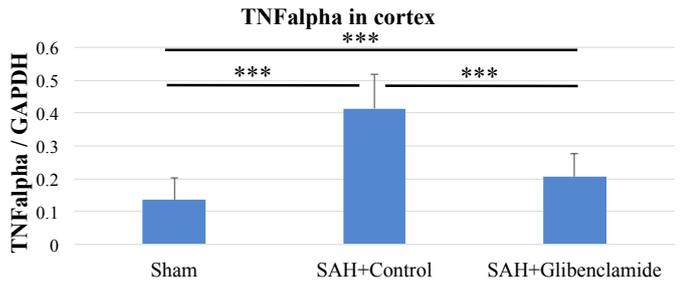
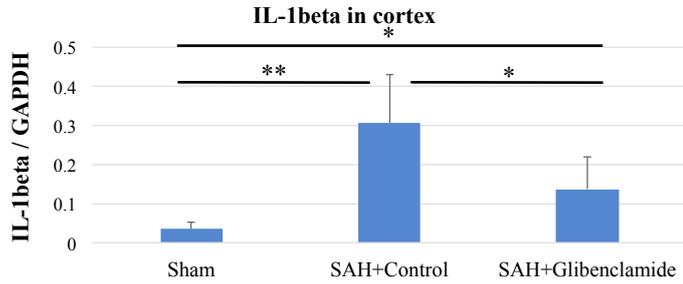
***ã Pã 0.001

ŝ 7Ā Ŵя óKT9?dΩ τ æŸŚzU



Ladder Sham DMSO Glibenclamide

PCR



SAH-yÊ©ÉÍÇ π V Sham π ac IL-1β0 TNFα9aX NF-κB U' nSũĨhf^ J1 [

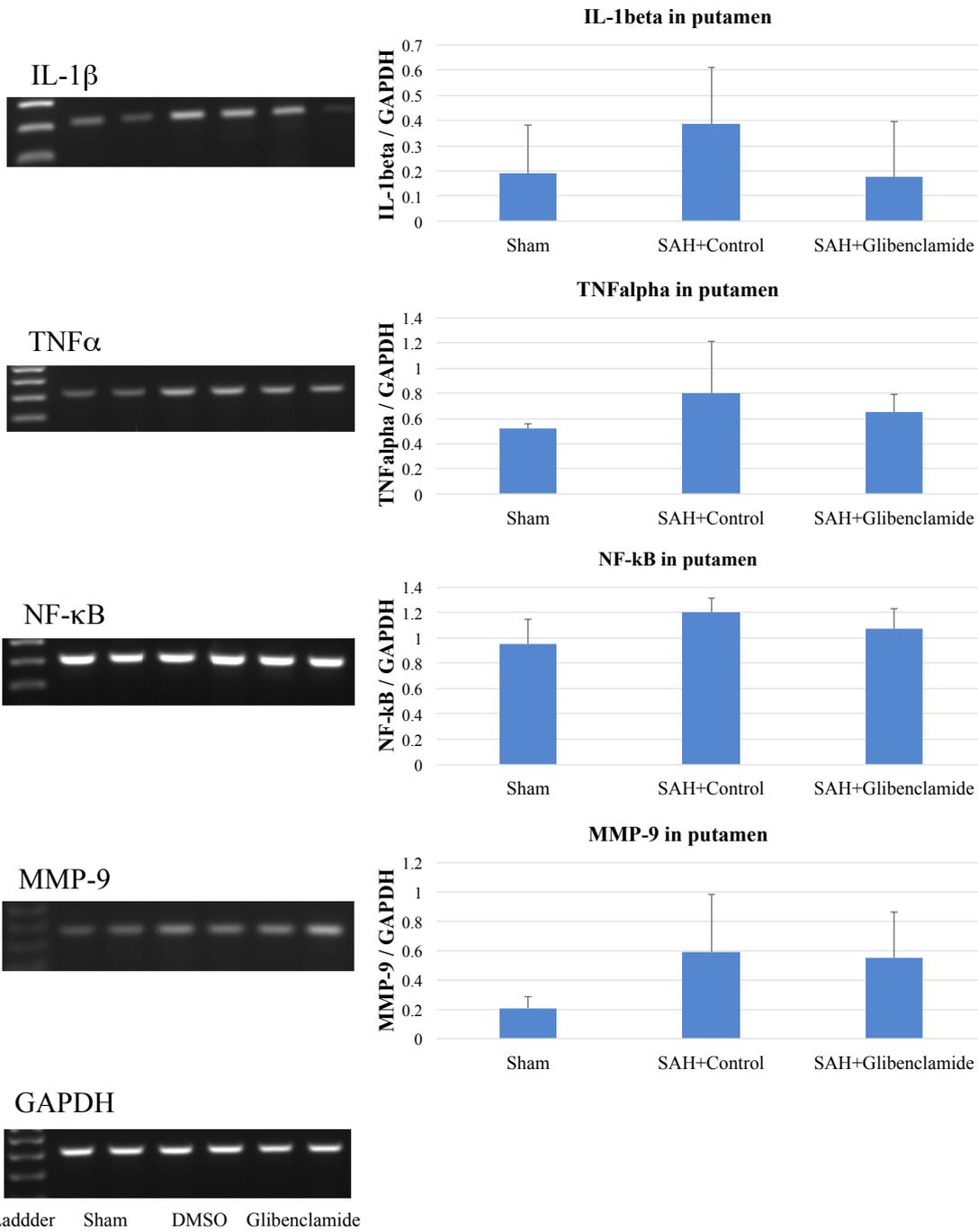
J SAH-vÆ· ÊuĀ½^a π V SAH-yÊ©ÉÍÇ π T^Z00 IL-1βQ TNFα; 'nTðÑ

DJ 1 MMP-9 Q NF-κB P_Ń..UćghKDJ;0' nSŌVF^ S: MJ1

*â Pá 0.05
 **â Pá 0.01
 ***â Pá 0.001

8 Å ø T9?dΩ τ æÿŚzU

PCR



SAH-yÊ©ÉÍÇ π V

Sham π acUĐOUzm©rmÊPũÏéphF^ J1

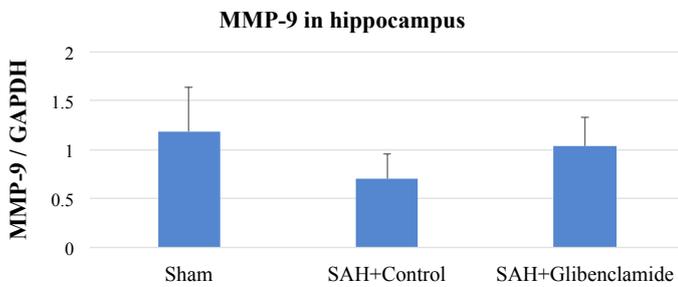
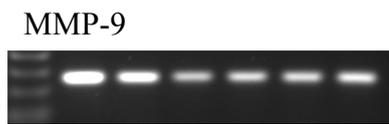
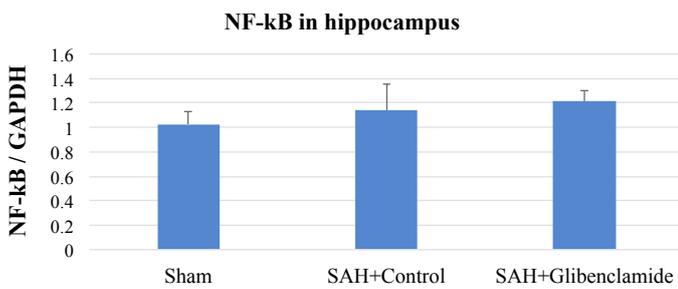
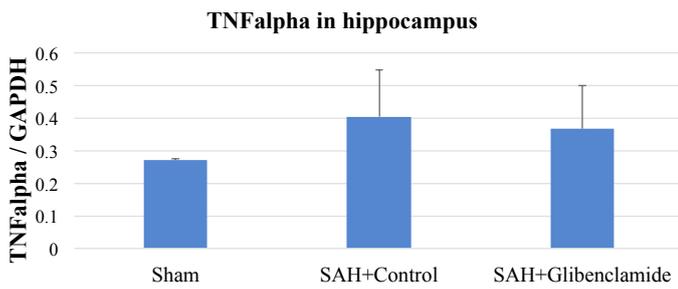
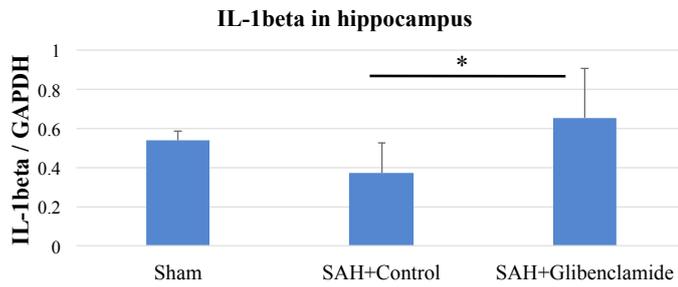
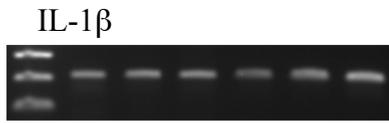
[J SAH-

vÆ· ÊuÅ½^a π V

SAH-yÊ©ÉÍÇ π T^Z0

ĐOUzm©rmÊPrĜéphF^

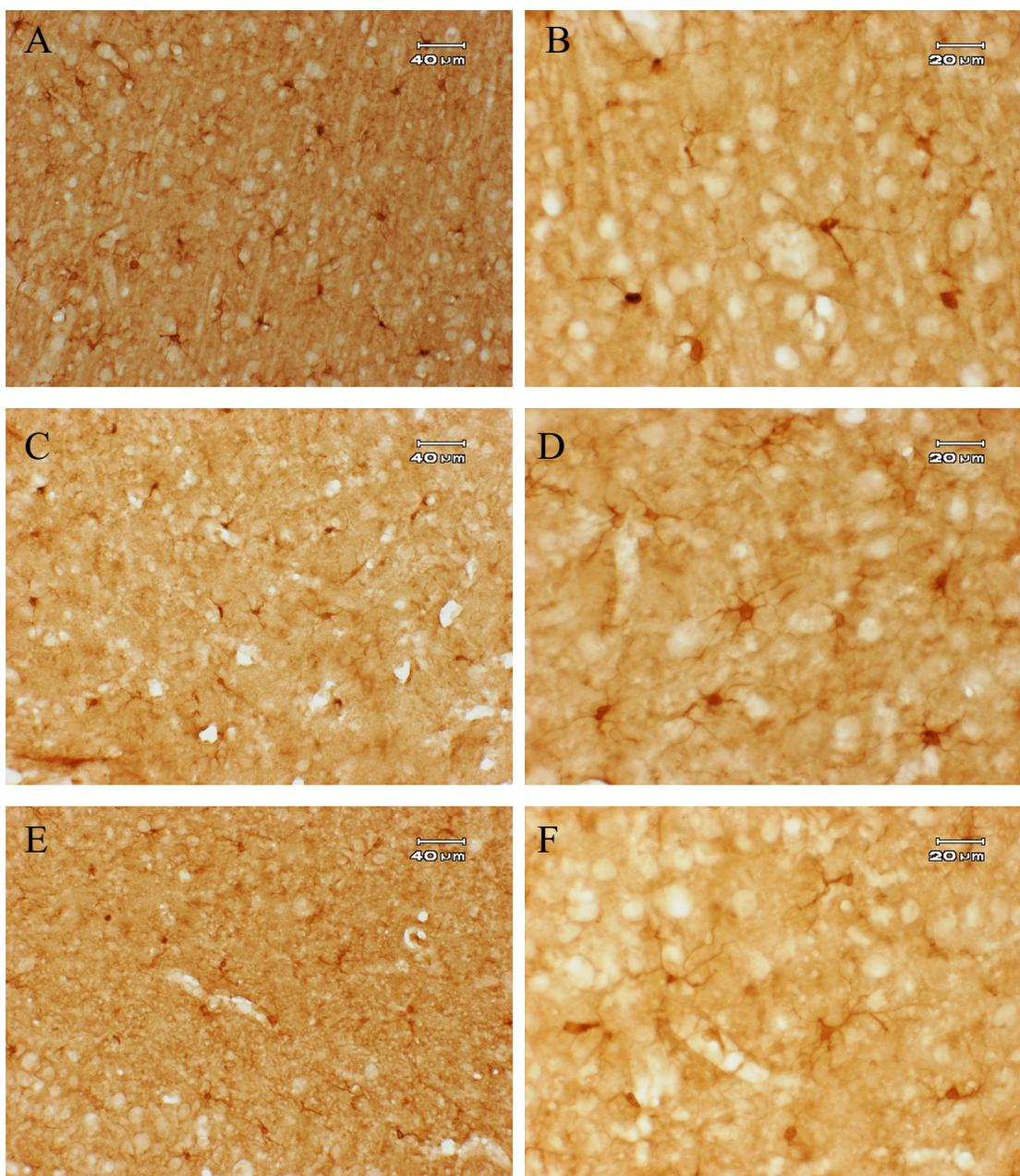
J 1



Ladder Sham DMSO Glibenclamide

TNFαV0 SAH-yÊ©ÉÍÇ Π ; Sham Π T´HD0ũĪćϥhFˆ0 SAH-vÆ· ÊuĀ½
 a Π ; SAH-yÊ©ÉÍÇ Π T´HD0 rĜćϥhFˆJ1
 çUzm◊rmÊTN60V0 SAH-vÆ· ÊuĀ½^a Π ; SAH-yÊ©ÉÍÇ Π T´HD0
 ũĪćϥhFˆ0ĪkuU5d B ˆQVSbS: MJ1
 *â Pá 0.05

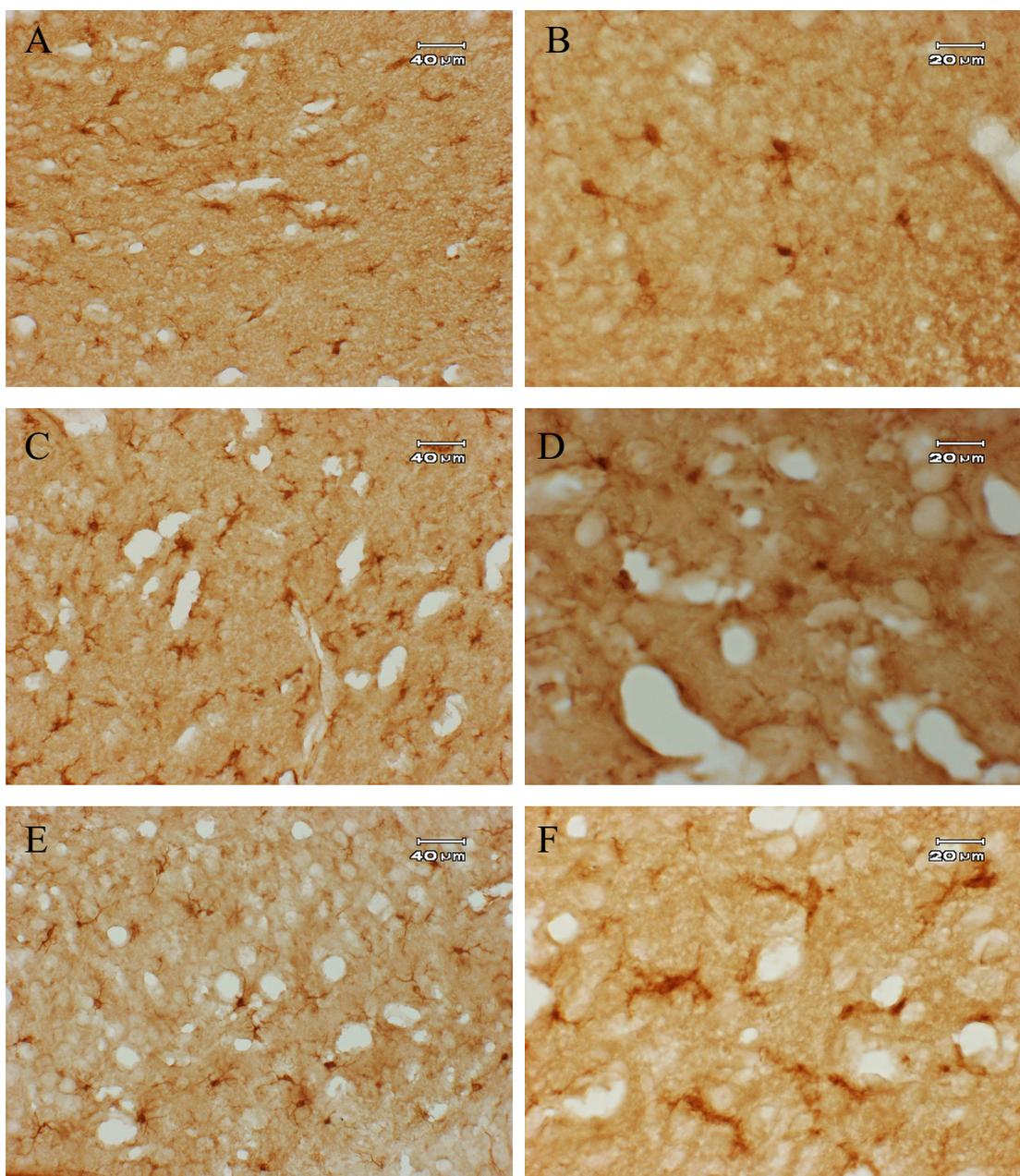
図 10 Sham 群の脳 Iba-1 染色



びまん性に Iba-1 陽性のマイクログリアを認める (A、C、E)。強拡大ではマイクログリアは長い突起を伸ばしており静止している ramified 型である (B、D、F)。

A : 皮質 150 倍、B : 皮質 300 倍、C : 被殻 150 倍、D : 被殻 300 倍、E : 海馬 150 倍、F : 海馬 300 倍

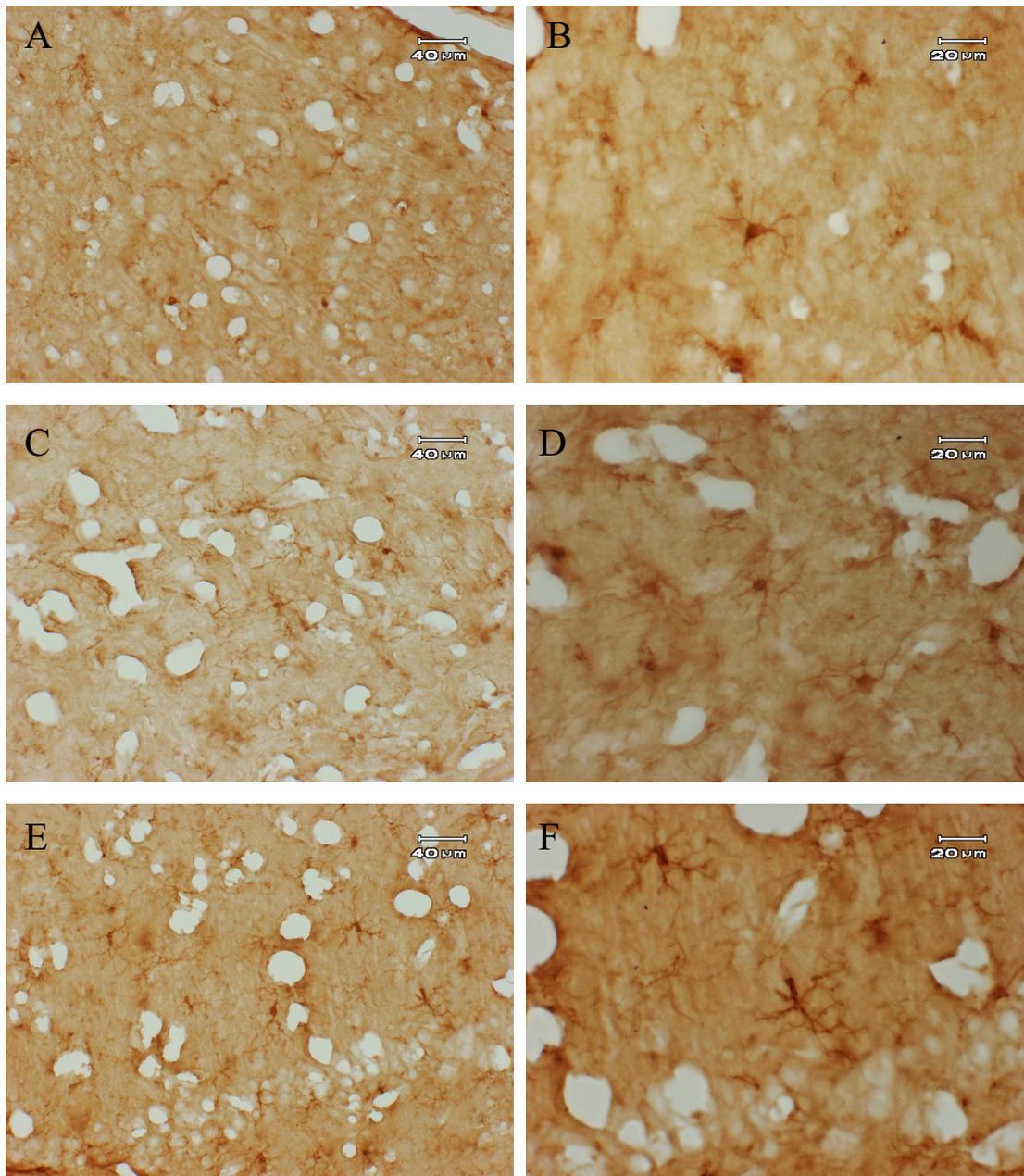
図 11 SAH-コントロール群の脳の Iba-1 染色



びまん性に Iba-1 陽性のマクログリアを認める (A、C、E)。強拡大ではマクログリアは突起を縮め胞体が肥大化した活性型の ameboid 型である (B、D、F)。

A : 皮質 150 倍、B : 皮質 300 倍、C : 被殻 150 倍、D : 被殻 300 倍、E : 海馬 150 倍、F : 海馬 300 倍

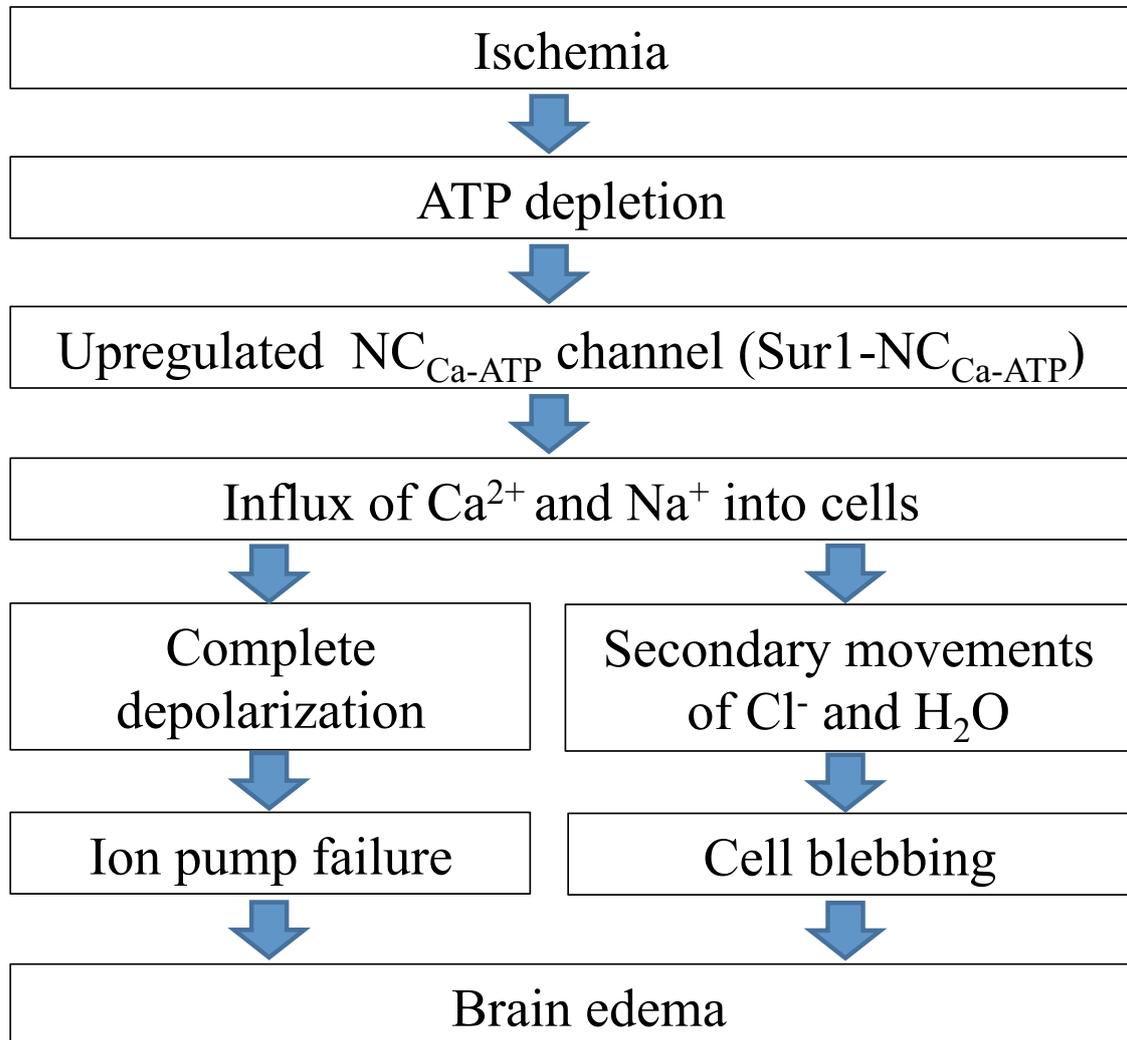
図 12 SAH-グリベンクラミド群の脳の Iba-1 染色



びまん性に Iba-1 陽性のマイクログリアを認める (A、C、E)。強拡大ではマイクログリアは活性型の ameboid 型より静止型の ramified 型を多く認める (B、D、F)。

A : 皮質 150 倍、B : 皮質 300 倍、C : 被殻 150 倍、D : 被殻 300 倍、E : 海馬 150 倍、F : 海馬 300 倍

図 13 脳浮腫の病態



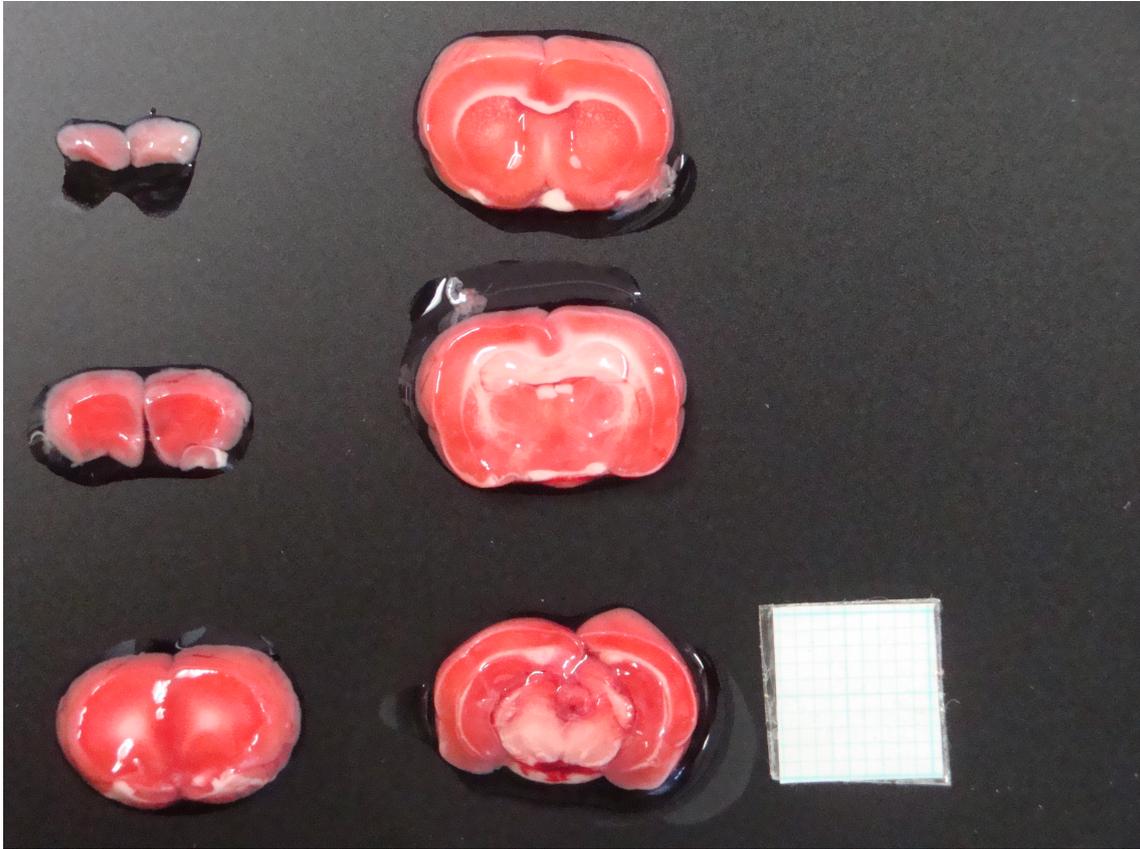
脳虚血により細胞内の ATP 減少が起こり、NC_{Ca-ATP} チャンネルが過剰に発現し、細胞内へのナトリウムと水分の流入を引き起こすことにより、細胞の膨化や脳浮腫を引き起こす。

ATP: adenosine triphosphate

NC_{Ca-ATP}: ATP and Ca²⁺-sensitive nonselective cation

SUR1: sulfonylurea receptor 1

図 14 血管穿刺モデルの脳冠状断切片の TTC 染色



大脳皮質に明らかな梗塞巣は認めない。脳底槽に SAH を認める。

TTC: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

表 1 本研究に使用した SAH モデルの内訳

組織染色	
Sham 群	n=3
SAH-コントロール群	n=3
SAH-グリベンクラミド群	n=3
PCR 用	
Sham 群	n=3
SAH-コントロール群	n=8
SAH-グリベンクラミド群	n=8

表2 本研究に使用したプライマーとその条件

	Forward	Reverse	AT	Cy
IL-1 β	GGATGATGACGACCTGC	CTTGTTGGCTTATGTTCTG	54	32
TNF α	CTTATCTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GAGACTCCTCCCAGGTACATGG	57	31
NF-kB	ACGATCTGTTTCCCCTCATC	TGCTTCTCTCCCCAGGAATA	55	31
MMP-9	GATCCCAGAGCGTTACTCG	GTTGTGGAAACTCACACGCC	63	31
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	63	23

AT : アニリング温度 Cy : サイクル数

表 3 SAH の血腫 grade

	軽症 (SAH grade: 0-7)	重症 (SAH grade: 8-18)
SAH-コントロール群	n=6, 平均値: 3.5	n=2, 値: 8 及び 14
SAH-グリベンクラミド群	n=4, 平均値: 4.25	n=4, 平均値: 14

両群間に有意な差を認めない。

11 引用文献

1. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(12):1365-72.
2. Backes D, Vergouwen MD, Tiel Groenestege AT, Bor AS, Velthuis BK, Greving JP, Algra A, Wermer MJ, van Walderveen MA, terBrugge KG, Agid R, Rinkel GJ. PHASES Score for Prediction of Intracranial Aneurysm Growth. *Stroke*. 2015;46(5):1221-6.
3. Inagawa T, Tokuda Y, Ohbayashi N, Takaya M, Moritake K. Study of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Izumo City, Japan. *Stroke*. 1995;26(5):761-6.
4. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain*. 2001;124(Pt 2):249-78.
5. Nieuwkamp DJ1, Setz LE, Algra A, Linn FH, de Rooij NK, Rinkel GJ. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2009;8(7):635-42.
6. Taylor B, Harries P, Bullock R. Factors affecting outcome after surgery for intracranial aneurysm in Glasgow. *Br J Neurosurg*. 1991;5(6):591-600.
7. Neil-Dwyer G, Lang D, Smith P, Iannotti F. Outcome after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: the use of a graphical model in the assessment of risk factors. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140(10):1019-27.
8. Baldwin ME, Macdonald RL, Huo D, Novakovic RL, Goldenberg FD, Frank JI, Rosengart AJ. Early vasospasm on admission angiography in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is a predictor for in-hospital complications and poor outcome. *Stroke*. 2004;35(11):2506-11.
9. Harrod CG, Bendok BR, Batjer HH. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review. *Neurosurgery*. 2005;56(4):633-54; discussion 633-54.
10. Laskowitz DT, Kolls BJ. Neuroprotection in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2010;41(10 Suppl):S79-84.
11. Sehba FA, Hou J, Pluta RM, Zhang JH. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*. 2012;97(1):14-37.
12. Chen M, Dong Y, Simard JM. Functional coupling between sulfonylurea receptor type 1 and a nonselective cation channel in reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci*. 2003;23(24):8568-77.
13. Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsybalyuk N, West GA, Gerzanich V. Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med*. 2006;12(4):433-40.

14. Simard JM, Geng Z, Woo SK, Ivanova S, Tosun C, Melnichenko L, Gerzanich V. Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(2):317-30.
15. Kojima J, Katayama Y, Moro N, Kawai H, Yoneko M, Mori T. Cerebral salt wasting in subarachnoid hemorrhage rats: model, mechanism, and tool. *Life Sci.* 2005;76(20):2361-70.
16. Lee JY, Sagher O, Keep R, Hua Y, Xi G. Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2009;65(2):331-43; discussion 343.
17. Park IS, Meno JR, Witt CE, Suttle TK, Chowdhary A, Nguyen TS, Ngai AC, Britz GW. Subarachnoid hemorrhage model in the rat: modification of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods.* 2008;172(2):195-200.
18. Veelken JA, Laing RJ, Jakubowski J. The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1995;26(7):1279-83; discussion 1284.
19. Johnston KC, Hall CE, Kissela BM, Bleck TP, Conaway MR; GRASP Investigators. Glucose Regulation in Acute Stroke Patients (GRASP) trial: a randomized pilot trial. *Stroke.* 2009;40(12):3804-9.
20. Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, Zhang JH. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model. *J Neurosci Methods.* 2008;167(2):327-34.
21. Hasegawa Y, Suzuki H, Altay O, Zhang JH. Preservation of tropomyosin-related kinase B (TrkB) signaling by sodium orthovanadate attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 2011;42(2):477-83.
22. Suzuki H, Ayer R, Sugawara T, Chen W, Sozen T, Hasegawa Y, Kanamaru K, Zhang JH. Protective effects of recombinant osteopontin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Crit Care Med.* 2010;38(2):612-8.
23. Schöller K, Trinkl A, Klotowski M, Thal SC, Plesnila N, Trabold R, Hamann GF, Schmid-Elsaesser R, Zausinger S. Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res.* 2007;1142:237-46.
24. Wagner KR, Dean C, Beiler S, Bryan DW, Packard BA, Smulian AG, Linke MJ, de Courten-Myers GM. Plasma infusions into porcine cerebral white matter induce early edema, oxidative stress, pro-inflammatory cytokine gene expression and DNA fragmentation: implications for white matter injury with increased blood– brain-barrier permeability. *Curr Neurovasc Res.* 2005;2:149–55.
25. Yoshida T, Tanaka M, Okamoto K. Immunoglobulin G induces microglial superoxide production. *Neurol Res.* 2002;24:361–4.
26. Simard JM, Yurovsky V, Tsymbalyuk N, Melnichenko L, Ivanova S, Gerzanich V. Protective

- effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke. *Stroke*. 2009;40:604–609.
27. Simard JM, Tsybalyuk N, Tsybalyuk O, Ivanova S, Yurovsky V, Gerzanich V. Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke. *Stroke*. 2010;41:531–537.
 28. Sheth KN, Kimberly WT, Elm JJ, Kent TA, Mandava P, Yoo AJ, Thomalla G, Campbell B, Donnan GA, Davis SM, Albers GW, Jacobson S, Simard JM, Stern BJ. Pilot study of intravenous glyburide in patients with a large ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45(1):281-3.
 29. Schwartz AY, Masago A, Sehba FA, Bederson JB. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods*. 2000;96:161-7.
 30. Jiang K, Yu Z, Shui Q. The pattern of ATP-sensitive K⁺ channel subunits, Kir6.2 and SUR1 mRNA expressions in DG region is different from those in CA1-3 regions of chronic epilepsy induced by picrotoxin in rats. *Neuropathology*. 2007 Dec;27(6):531-8.

12 研究業績

梶本隆太

I. 発表	①一般発表	12	(筆頭 4 / 共同 8)
	②特別発表	なし	(筆頭 0 / 共同 0)
II. 論文	①原著論文	1	(筆頭 1 / 共同 0)
	②症例報告	なし	
	③総説	なし	
III. 著書		なし	

以上

I. 発表

① 一般発表

1. 須磨健、梶本隆太、太田 隆、渋谷 肇、吉野篤緒、平山 晃康、片山容一、木下浩作：スーパー総合周産期センターにおける脳神経救急，第 20 回日本脳神経外科救急学会，東京，2015 年 1 月
2. 須磨健、梶本隆太、太田 隆、渋谷 肇、吉野篤緒、平山 晃康、片山容一、木下浩作：スーパー総合周産期センターにおける脳神経外科救急診療，第 74 回日本脳神経外科学会学術総会 艘橋幌，2015 年 10 月
3. 松崎 肅統、渋谷肇、梶本 隆太、田戸 雅宏、荻野 暁義、佐藤 祥史、平山 晃康、梅沢 武彦、須磨健、吉野 篤緒：経橈骨動脈アプローチによる脳血管撮影を行う際のシース内血栓検出に影響する因子の検討，第 31 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 岡山，2015 年 11 月
4. 梶本 隆太、渡辺充、太田隆、荻野 暁義、松崎 肅統、須磨健、渋谷肇、平山 晃康、吉野 篤緒、片山 容一：院内発症の脳梗塞に対する超急性期再開通療法の検討 艘橋 21 回日本脳神経外科救急学会総会，東京，2016 年 1 月
5. 加納 利和、梶本 隆太、下田 健太郎、古市 眞：急性期脳梗塞に対する血行再建術の成績，第 21 回日本脳神経外科救急学会総会，東京，2016 年 1 月
6. 梶本 隆太、下田 健太郎、加納 利和、古市 眞：脳動脈瘤クリッピング術後の再発瘤に対するコイル塞栓術，第 41 回日本脳卒中学会総会，北海道，2016 年 4 月
7. 梶本 隆太、影山 悠、栗原 淳、吉野 篤緒：乳児期に髄膜瘤と診断された脂肪脊髄髄膜瘤の 2 例，第 44 回日本小児神経外科学会，茨城，2016 年 6 月
8. 梶本 隆太、渡辺充、太田隆、荻野 暁義、松崎 肅統、須磨健、渋谷肇、平山 晃康、吉野 篤緒：院内発症の脳梗塞の対する急性期再開通療法の検討，第 75 回日本脳神経外科学会学術総会，福岡，2016 年 9 月
9. 須磨健、梶本 隆太、渡辺充、太田隆、荻野 暁義、松崎 肅統、渋谷肇、平山 晃康、吉野 篤緒：当院における脳虚血超急性期再開通療法-ステント型リトリーバー導入前後の比較，第 75 回日本脳神経外科学会学術総会，福岡，2016 年 9 月
10. 落合 祐之、梶本 隆太、神服 尚之、前島 貞裕、吉野 篤緒：レジストレーションマスクを使用した光学式ナビゲーション下脳室腹腔シャント術の有用性，第 75 回日本脳神経外科学会学術総会，福岡，2016 年 9 月
11. 須磨健、梶本 隆太、渡辺充、太田隆、荻野 暁義、松崎 肅統、渋谷肇、平山 晃康、吉野 篤緒：脳梗塞急性期再開通療法におけるステント型リトリーバー導入後の治療成績，第 32 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会，岡山，2016 年 11 月
12. 須磨健、梶本 隆太、渡辺充、荻野 暁義、渋谷肇、平山 晃康、吉野 篤緒：中大脳動脈 insula segment (M2) 閉塞に対する機械的血栓回収療法，第 14 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会関東地方会学術集会，東京，2017 年 6 月

Ⅱ. 論文

① 原著論文

1. 梶本 隆太、下田 健太郎、加納 利和、古市 眞：脳動脈瘤クリッピング術後の再発瘤に対するコイル塞栓術の有用性, 脳卒中 (in Press)。