



Title	新規人工酸素運搬体HemoActを用いた脳虚血再灌流障害治療開発に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	月花, 正幸
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12999号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/70399">http://hdl.handle.net/2115/70399</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2378
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Masayuki_Gekka_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 月花 正幸

## 学位論文題名

新規人工酸素運搬体 HemoAct を用いた脳虚血再灌流障害治療開発に関する研究  
(Studies on neuroprotective therapy for cerebral ischemic-reperfusion injury by HemoAct)

### 【背景】

近年、主幹動脈閉塞を伴う重症脳虚血症例に対して、tPA 静注療法・血管内血栓除去療法が積極的に行われており非常に高い閉塞血管再開通率を獲得している。しかし、再開通が得られても虚血再灌流障害によって著名な脳浮腫、出血性梗塞を来し予後不良となる症例は少なくない。この軽減目的で脳保護療法薬としてエダラボンが臨床の現場において使用されているが、脳虚血再灌流障害を抑えきれない現状がある。我々は以前より、人工酸素運搬体が脳虚血再灌流障害に有効であることを報告している。ヘモグロビンを基剤とする人工酸素運搬体のうち、ヘモグロビンを赤血球の 1/40 の大きさの liposome 内に封入した liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) は、酸素運搬能の高さにより、脳虚血動物モデルにおいて静脈投与により脳保護効果があることが報告されている。我々はラット脳虚血再灌流モデルを用い、閉塞血管再開通後の内頸動脈にカニューレションをして再灌流領域にこの LEH を選択的に投与することにより、酸素投与の目的のみならず、炎症反応を惹起する白血球の物理的流入を抑制して虚血再灌流傷害を改善することを検討した。その結果、LEH の経動脈的投与は、白血球の再灌流領域への流入を抑制し、径がより小さい微小血管 ( $5\mu\text{m}$  以下) へも効果的に酸素を運搬し、脳保護効果を示すことがわかった。当該研究では、従来、我々の研究で使用してきた LEH ではなく、新たな人工酸素運搬体としてヘモグロビン-アルブミン複合体の HemoAct™を用いて研究を行った。HemoAct は、ヘモグロビン 1 分子とヒトアルブミン 3 分子がクラスター構造となった人工酸素運搬体であり、動物投与実験で生体内動態、半減期、安全性についての検討はされているが、虚血疾患モデル動物に対しての治療研究はなく今回が初めての検討となる。HemoAct は粒径 10nm と赤血球の 1/800 と小さく、微細粒子であることでの良好な微小循環酸素運搬能が期待できる。またアルブミンによる循環血漿量増加作用や抗酸化作用が期待され、内径の小さい微小血管においても良好な灌流状態を維持する能力や再酸素化による過酸素状態の参加ストレスを軽減することが期待される。特に微小循環障害が本態である脳虚血再灌流障害において、より強い脳保護効果を発揮するものと期待される。

### 【目的】

脳虚血再灌流ラットモデルにおいて、再灌流時に HemoAct を再開通動脈に灌流し、I/R injury に対する脳保護効果を検討した。次いで再灌流急性期に微小血管灌流における HemoAct の局在・酸素運搬能・微小血管の形態変化を検討し、脳虚血再灌流障害急性期の病態解明と HemoAct を用いた新規治療法を開発することを目的とする。また、ラット脳微小血管内皮細胞 (Rat brain microvascular endothelial cells, RBMECs) を低酸素再酸素化処理し、細胞レベル虚血再灌流モデルに対して HemoAct を投与することにより、その活性酸素産生量を評価し In Vitro での HemoAct の効果を検討した。

### 【対象・方法】

In Vivo の実験として、雄 SD ラット(7-8 週齢)で糸栓子による一過性中大脳動脈閉塞モデル (tMCAO) を作成した。右総頸動脈・内頸動脈・外頸動脈を露出し外頸動脈から内頸動脈側に向

けて糸栓子 (4-0 ナイロン糸にシリコンコートしたもの) を挿入・留置し、中大脳動脈領域の血流を 2 時間遮断した。2 時間遮断後、以下の 4 群に分類してそれぞれの検討項目につき比較検討を行った。①HemoAct 群 (n=7) : 再灌流後内頸動脈より選択的に HemoAct(37°C, 2ml/5min) を投与する群、②50%HemoAct 群(n=7) : PBS にて 2 倍希釈した HemoAct (37°C, 2ml/5min) を投与する群、③Vehicle 群(n=7) : PBS (37°C, 2ml/5min)、④Control 群(n=8) : 再灌流のみの群である。再灌流 24 時間後に 18 point scale で神経症状を評価、sacrifice して TTC 染色で脳梗塞、脳浮腫の範囲を評価、Western blotting にて MMP-9 の発現、活性酸素の産生(4-HNE)を検討し微小血管に関わる炎症変化の免疫組織学的定量及び活性酸素産生量測定をした。また、再灌流後 0、2、6 時間の時点で sacrifice し、微小血管の継時的変化 (vWF の免疫染色と電子顕微鏡による評価)、微小血管内における HemoAct の局在 (ヒトアルブミン抗体による免疫染色による評価)、脳組織酸素分圧の継時的変化 (酸素電極刺入型の組織酸素分圧測定装置による評価) を検討した。

In Vitro の実験として、RBMECs を低酸素ワークステーション内 (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> at 37°C) で 2 時間低酸素負荷した後に、再酸素化した際に HemoAct を投与群、Hb 投与群、20%アルブミン投与群、何も投与しない群の 4 群に振り分け、再酸素化 6 時間後に DHE 産生量を比較した。

### 【結果】

In vivo 実験 : 再灌流 24 時間後の検討では、神経症状は HemoAct 群で他の 3 群に対して有意に良好であった ( $p < 0.05$ )。脳梗塞/脳浮腫の範囲は、Control 群 : 55.2%/26.4%・Vehicle 群 : 53.2%/27.1%・50%HemoAct 群 : 27.1%/15.2%・HemoAct 群 : 20.2%/14.1%で、脳梗塞 ( $P < 0.01$ ) 脳浮腫 ( $P < 0.05$ ) とともに HemoAct 群で Control 群に対して有意に小さかった。MMP-9 の発現・活性酸素の産生 ( $P < 0.05$ ) も HemoAct 群で有意に抑制された。虚血再灌流急性期 (2 時間後、6 時間後) の検討では、虚血再灌流域の脳皮質の CBF 及び脳組織分圧では、Control 群は、再灌流 2 時間後から徐々に CBF・PtO<sub>2</sub> の低下を来し、再灌流 6 時間後には大幅に CBF・PtO<sub>2</sub> の低下を来した。HemoAct 群では、再灌流 2 時間後・6 時間後と、CBF・PtO<sub>2</sub> が維持されていた。また、HemoAct 群では Control 群に対して、再灌流 6 時間の時点で見られるはずの微小血管狭小化が抑制 ( $P < 0.05$ ) され、5 $\mu$ m 以下の微小血管で HemoAct がより多く灌流しているのが確認された。HemoAct 2 時間後及び 6 時間後の微小血管内での HemoAct の局在が確認でき、虚血再灌流域の微小血管灌流において有効な灌流を来していることがわかった。

In vitro 実験 : RBMECs 2 時間低酸素化モデルに対し再酸素化時にそれぞれ薬液を投与し 4 群に振り分け、その 6 時間後における DHE 産生量の比較を行った。20%アルブミン群の DHE 産生量が最も低く、次いで HemoAct 群が DHE 産生量の抑制を認めた。20%アルブミン群と HemoAct 群に有意な差は認められないが、20%アルブミン群・HemoAct 群は Control 群・Hb 群に比較して有意に DHE 産生量の抑制を認めた。Hb 群が最も DHE 産生量が高く、低酸素再酸素化細胞モデルにおいて、Hb 毒性が示唆された。

【考察・結論】 HemoAct の頸動脈選択的投与は、I/R injury に対し神経所見の改善、梗塞体積・脳浮腫縮小効果、MMP-9 産生抑制及び活性酸素抑制効果を認めた。I/R injury における微小血管障害に対して微小血管狭小化の抑制及び 5 $\mu$ m 以下の微小血管における HemoAct の有効な灌流も認め、微小血管レベルでの HemoAct の効果が証明された。HemoAct は、再灌流後の微小循環において良好な灌流状態を作り出し、I/R injury に対し非常に強い脳保護効果を発揮した。更に HemoAct は、アルブミンと同様に低酸素再酸素化処理した培養 RBMEC において抗酸化能を示した。脳卒中治療の臨床応用において、再開通治療後の脳保護療法としての可能性が期待される。臨床において tPA 治療、血管内血栓除去治療との組み合わせにより脳梗塞治療に様々な可能性を見出した。