



Title	脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素運搬体HemoAct併用の脳保護効果に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	伊藤, 康裕
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14040号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/77954">http://hdl.handle.net/2115/77954</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2502
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Yasuhiro_Ito_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文  
(要約)

脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素  
運搬体 HemoAct 併用の脳保護効果に関する研究

**(Studies on neuroprotective effect of combination therapy of  
regional cold perfusion and hemoglobin-based oxygen carrier  
HemoAct for ischemic-reperfusion injury)**

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

伊藤康裕



学 位 論 文  
(要約)

脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素  
運搬体 HemoAct 併用の脳保護効果に関する研究

**(Studies on neuroprotective effect of combination therapy of  
regional cold perfusion and hemoglobin-based oxygen carrier  
HemoAct for ischemic-reperfusion injury)**

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

伊藤康裕

## 【緒言】

今日、急性脳主幹動脈閉塞の治療は、血管内治療による機械的血栓除去療法の発展により高い確率で再開通が得られる時代となった(Goyal M et al., 2015; Campbell BC et al., 2015; Saver JL et al., 2015; Jovin TG et al.,2015)。最近では機械的血栓回収療法に関して、発症から早期でない症例においても、側副血行路の発達程度によっては従来よりも Therapeutic time window がより長く期待できると報告されている(Albers et al.,2018; Ngeura et al.,2018; Sharma et al.,2018)。一方で有効な再開通が得られても虚血再灌流障害により強い後遺障害や致命的な障害に繋がることも少なくなく、この虚血再灌流障害を防ぐ事は今後の脳梗塞治療にとって重要な課題である(Kim et al.,2018;Savitz et al.,2017)。

虚血再灌流障害の病態として、血管透過性が亢進して脳浮腫を惹起したり、血漿・血球成分の血管外漏出により最終的には出血性変化に陥ることが臨床的によく知られている。一方で動物実験では微小血管の灌流障害により引き起こされる”2 次的な虚血”として post-ischemic hypoperfusion の存在が示されている。

これは霊長類の梗塞モデルにおいて白血球の接着、血小板の蓄積、フィブリンの形成により微小血管が閉塞する”no-reflow phenomenon”として報告されてきた。しかし最近では電子顕微鏡での研究によりこの hypoperfusion について上記の”no-reflow phenomenon”と異なる病態メカニズムの存在が示唆されている。

これは再灌流の早期に微小血管周囲を取り囲んでいるアストロサイトの end-foot の膨化が生じ、その結果として、微小血管の狭小化が引き起こされ、一時的に微小血管内での赤血球の通過が滞り、微小血管血流不全が起これば虚血が進行すると報告されている(Kurisu et al.,2016; Ito et al.,2011)。

我々は以前よりこの虚血再灌流障害に対して異なる 2 つのアプローチから有効な治療方法を動物実験レベルで証明し発表してきた。一つは局所冷却灌流療法で、再開通した中大脳動脈領域に冷却した生理食塩水を灌流することで脳梗塞の範囲と脳浮腫の改善を証明した(Kurisu et al.,2016)。この治療方法は、虚血再灌流傷害で見られる以下の一連の経時的血管反応(AQP4 サージ⇒アストロサイトの end-foot の膨化と微小血管の狭小化⇒血管内皮障害⇒炎症反応活性化)を抑制し、梗塞範囲を縮小した。もう一方は人工酸素運搬体(HBOCs)である HemoAct(Tomita et al.,2013;Haruki et al.,2015)を用いた治療である。HemoAct は 1 つのヘモグロビンに対し 3 つのアルブミンが共有結合した新規の HBOCs で、中央大学の理工学部小松研究室で開発された。この HemoAct を虚血領域へ投与す

る事により梗塞範囲の縮小と脳浮腫の軽減に成功した(Gekka et al.,2018)。

HemoAct 投与による脳保護作用については粒径 15nm という大きさの酸素運搬体が、赤血球の通過障害を来たすような狭小化した微小血管内へ効率的に酸素を供給し続ける事、また共有結合しているアルブミンの持つ抗酸化作用が発揮される事で、血管内皮障害や炎症反応活性化を抑えて、梗塞の拡大を防ぐと考えられる。

当該研究では上述の微小血管の狭小化を抑制する局所冷却灌流療法と微小血管の狭小化が起こっていても虚血範囲に酸素を供給し続けることが可能な HemoAct による治療を併用することで、両治療法の相加もしくは相乗効果を期待し、より高い治療効果が得られるか否かを検討する。今回の研究では2時間の虚血モデルラットを用いて再開通直前に治療を行い24時間後の評価をまず行い、1週間の亜急性期までの治療効果の確認、さらに治療効果が期待できる虚血時間の上限、すなわち therapeutic time window ついても検討を行う。

## 【方法】

すべての実験においてオスのSDラット(体重290-330g)を使用した。一過性中大脳動脈閉塞モデルはこれまでの報告と同様に右内頸動脈に糸栓子を挿入し再開通させることで作成した。薬液投与は再開通時にPE10のチューブを右内頸動脈より挿入してシンリンジポンプを用いて6ml/kgを5分かけて投与した。

### 1)併用療法の脳保護効果の検討

併用療法は10度に冷却した人工酸素運搬体 HemoAct をラット一過性中大脳動脈閉塞モデルの再開通時に経動脈的に投与し、二つの単独療法(10度生理食塩水投与、37度 HemoAct 投与)、未治療コントロールと比較検討した(各々n=7)。検討項目は神経障害度、脳梗塞、脳浮腫の体積(%)、脳血流の経時的变化、血液脳関門破綻の程度である。神経障害度はBedersonの18point scaleを使用し、脳梗塞体積、脳浮腫体積の検討には2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色を用いた。また血液脳関門(BBB)の破綻の程度は線条体を含む摘出脳の4μmの薄切切片をrat-IgGの免疫染色を行うことで検討した。

### 2)併用療法の脳保護効果の持続性の検討

100分虚血/7日再開通における併用療法群(n=8)の効果持続性を未治療コントロール群(n=8)と比較検討した。検討項目は日々の神経障害度と再開通7日目の時点での脳梗塞体積である。脳梗塞の体積はNissl's染色で行った。

### 3)併用療法の Therapeutic time window の検討

虚血時間を4時間、5時間、6時間と延長しそれぞれ併用療法群(n=8)と未治療コントロール群(n=8)における神経障害度の評価と再開通24時間の時点での出血性変化の程度を比較検討した。神経障害度は死亡が概念として含まれる6-point scaleを用い、出血性変化は摘出脳の線条体を含む冠状の4 $\mu$ mの薄切切片をHE染色し評価した。観察された出血点の長径によって1点から3点に分類し、各々の出血点の個数を掛け合わせ合計スコアを算出した。

#### 【結果】

#### 1) 併用療法の脳保護効果の検討

2時間虚血/24時間再灌流での検討では、神経障害度スコアは3つの治療群ともコントロール群に対して優位に改善したが、3治療群間で差が無かった。梗塞体積は未治療コントロール群で44.7 $\pm$ 6.9%であったのに対し、10 $^{\circ}$ C生食単独療法群20.7 $\pm$ 10.2%、37 $^{\circ}$ C HemoAct単独療法群24.9 $\pm$ 3.9%、10 $^{\circ}$ C HemoAct併用療法群12.3 $\pm$ 11.9%と全ての群で有意な脳梗塞縮小効果があった。また単独療法群と併用療法群間では10 $^{\circ}$ C HemoAct併用療法群と37 $^{\circ}$ C HemoAct単独療法群の間のみで有意差が見られたが、併用療法群は各単独療法群と比して約1/2の梗塞縮小効果を確認した。また脳浮腫の体積についても同様の結果であったが、統計学的な差は未治療コントロール群と10 $^{\circ}$ C HemoAct併用療法群の間のみ見られた。BBBの破綻の程度においては併用療法で最も抑制されていた。

#### 2)併用療法の脳保護効果の持続性

Day 0からDay 7までの神経障害度はすべての日で併用療法群が有意に良好な結果となっており、またNissl's染色でのDay 7における梗塞の体積も未治療コントロール群の平均49%に対し、併用療法群は21%と有意に梗塞の縮小効果を認めた。

#### 3)Therapeutic time window の検討

虚血時間を延長した4、5、6時間虚血/24時間再灌流モデルの検討では、4、5時間虚血においては神経障害度の有意な改善を認めた。出血性変化については4時間虚血、5時間虚血における未治療コントロール群の平均出血スコアは各々21.1、36.5であったが10 $^{\circ}$ C HemoAct併用療法群では4、5時間虚血での出血のスコアは10.6、19.4と有意に出血性変化を抑制した。このことから併用療法は5時間のtherapeutic time windowが期待でき、虚血再灌流傷害の有効な治療法になりうる可能性を示した。

### 【考察】

本研究により、脳局所冷却灌流療法と HemoAct の併用療法は強力な神経保護効果を示した。その背景には2つの異なる作用機序を持ち各々治療法が相加的に作用したためと考えている。脳局所冷却灌流療法は、虚血再灌流障害における微小血管の狭小化、血液脳関門の破綻、炎症反応を防ぎ、HemoAct は 15 $\mu$ m という小ささからたとえ狭小化した微小血管でも通過することができ効率的な酸素運搬と抗酸化作用もたらし不可逆的な低酸素を防ぐことができると考えた。また本治療法の Therapeutic time window は5時間となった。この結果は過去の同様の報告の中で最長の結果である。虚血時間が長くなれば長くなるほど死亡率は高くなり、本研究でも未治療の場合は4時間以上の虚血で半数以上が死亡したことを考慮すると、冷却 10°C HemoAct 併用療法は、実臨床において側副血行に乏しい非動脈硬化性の脳主幹動脈閉塞の重症例にも応用可能であることが期待される。

### 【結論】

10°C HemoAct 併用療法は急性期脳梗塞における新たな治療の選択肢となり得ると考えられた。特に虚血時間の長い症例に対する神経症状悪化の軽減や、死亡率の軽減に有用であることが示唆された。実臨床での応用へ向けてさらなる基礎データの蓄積やラット以外の動物種での治療効果の検討も望まれる。また臨床応用へ向けて、冷却 HemoAct の投与方法の最適化も必要であり、温度の設定、投与量、投与速度などを変化させた研究が今後必要と考える。