HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脳梗塞急性期治療としての経動脈的局所脳低温による神経保護作用の研究
Author(s)	栗栖, 宏多
Description	配架番号：2206
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12102号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12102
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66900
Type	doctoral thesis
File Information	Kota_Kurisu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

脳梗塞急性期治療としての
経動脈的局所脳低温による神経保護作用の研究

(Studies of neuroprotective effect of trans-arterial
regional hypothermia on ischemic stroke)

２０１６年　３月

北 海 道 大 学
栗 栖　宏 多

学　位　論　文

脳梗塞急性期治療としての
経動脈的局所脳低温による神経保護作用の研究

(Studies of neuroprotective effect of trans-arterial
regional hypothermia on ischemic stroke)

２０１６年　３月

北 海 道 大 学
栗 栖　宏 多

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　4 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6 頁

第一章　虚血再灌流傷害に対する経動脈的局所脳低温治療の神経保護作用・・　7 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　12 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16 頁

第二章　脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を当てた経動脈的局所脳低温治療の作用機序の解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　18 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　20 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　25 頁

第三章　経動脈的局所脳低温による異なる脳梗塞モデルに対する治療効果・・　27 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　31 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　37 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　38 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　40 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表予定である。

Kota Kurisu, Takeo Abumiya, Hideki Nakamura, Daisuke Shimbo, Hideo Shichinohe, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Hiroshi Shimizu, Kiyohiro Houkin.　Transarterial Regional Brain Hypothermia Inhibits Acute Aquaporin-4 Surge and Sequential Microvascular Events in Ischemia/Reperfusion Injury: *Neurosurgry. (Accepted; 2015 Oct 29[Epub ahead of print])*, journal 掲載年月・巻・号：未定

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 栗栖　宏多、鐙谷　武雄、新保　大輔、七戸　秀夫、数又　研、中山　若樹、宝金　清博
演題名；Rat における虚血再灌流障害に対する局所脳低温治療の有効性の検討
学会名；第 25 回日本脳循環代謝学会総会、2013 年 11 月 1 日、札幌

2. Kota Kurisu, Takeo Abumiya, Daisuke Shimbo, Ken Kazumata, Naoki Nakayama, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin.
演題名；Focal hypothermia induced by post-ischemic intra-arterial infusion has a neuroprotective effect on cerebral ischemia reperfusion injury.
学会名；International Stroke Conference 2014, Feb 12, 2014, San Diego, CA, USA

3. 栗栖　宏多、鐙谷　武雄、新保　大輔、七戸　秀夫、数又　研、中山　若樹、宝金　清博
演題名；ラット虚血再灌流障害モデルに対する経動脈的局所脳低温治療の有効性の検討
学会名；第 39 回日本脳卒中学会総会、2014 年 3 月 13 日、大阪

4. Kota Kurisu, Takeo Abumiya, Daisuke Shimbo, Ken Kazumata, Naoki Nakayama, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin.
演題名；Trans-arterial regional hypothermia therapy protects ischemic reperfusion injury through the supression of endothelial cell damage.
学会名； 82nd AANS Annual Scientific Meeting, Apr 5, 2014, San Francisco, CA, USA.

5. 栗栖　宏多、鐙谷　武雄、新保　大輔、七戸　秀夫、数又　研、中山　若樹、宝金　清博
演題名；経動脈的局所脳低温による虚血再灌流傷害に対する神経保護作用－微小血管での炎症反応抑制作用－
学会名；第 15 回日本分子脳神経外科学会、2014 年 9 月 25 日、山形

6. 栗栖　宏多、鐙谷　武雄、新保　大輔、七戸　秀夫、数又　研、中山　若樹、宝金　清博
演題名；経動脈的局所脳低温による虚血再灌流傷害に対する神経保護作用 －微小血管での炎症反応抑制作用－
学会名；第 73 回日本脳神経外科学会学術総会、2014 年 10 月 9 日、東京

7. Kota Kurisu, Takeo Abumiya, Hideki Nakamura, Daisuke Shimbo, Ken Kazumata, Naoki Nakayama, Hideo Shichinohe, Hiroshi Shimizu, Kiyohiro Houkin.
演題名；Post-ischemic trans-arterial regional hypothermia therapy attenuates microvascular narrowing due to astrocytic end-foot swelling and inhibits subsequent inflammatory reactions in ischemia reperfusion injury.
学会名；International Stroke Conference 2015, Feb 10, 2015, Nashville, TN, USA.

8. 栗栖　宏多、鐙谷　武雄、中村　秀樹、新保　大輔、七戸　秀夫、数又　研、中山　若樹、清水　宏、宝金　清博
演題名；虚血再灌流障害に対する経動脈的局所脳低温治療の脳保護効果の検討 -微小血管狭小化と AQP4 発現への影響-
学会名；第 40 回日本脳卒中学会総会、2015 年 3 月 26 日、広島

9. Kota Kurisu, Takeo Abumiya, Masaki Ito, Hideo Shichinohe, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Toshiya Osanai, Kiyohiro Houkin.
演題名 ; Trans-arterial regional hypothermia provides robust neuroprotection in rat permanent middle cerebral artery occlusion model.
学会名 ; International Stroke Conference 2016, Feb 17, 2016, Los Angeles, CA, USA. *(Accepted)*

緒　言

脳主幹動脈閉塞による脳梗塞は、重度の神経障害を引き起こし、致死的な経過を辿る可能性のある重篤な病態である。治療においては、発症後速やかに閉塞血管を再開通させ虚血脳への血液供給を回復せしめることが肝要であり、血栓溶解療法、血管内血栓除去療法が臨床で行われている[1-6]。しかし、この再開通療法の有効性は、発症から治療までの時間(therapeutic time window)に依存しており、再開通までに時間がかかると虚血再灌流傷害(Ischemia-reperfusion injury: I/R injury)のために予後不良となってしまうことが知られている。現在、本邦では I/R injury に対する脳保護療法薬としてフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが使用されているが、未だ I/R injury は完全には抑えきれてはいない現状がある。

従来より脳保護療法として様々な研究がなされてきたが、「低体温治療」は、その代表的なものである[7-9]。これは 1980 年代に脳温をわずかに 2℃下げたのみで著明な神経保護作用を示した報告[10]に端を発し、多くの基礎研究[7-10]で多様な中枢神経傷害（脳梗塞・脳出血・くも膜下出血・神経外傷など）において神経保護作用を有することが証明されてきた。これらを受け、低体温治療は蘇生後脳症[11,12]、重症頭部外傷[13,14]などに対してはすでに臨床応用され有効性も広く認知されている。しかし、その一方で脳梗塞に対しては、動物実験レベルでは著明な神経保護作用が報告されているが[7,8]、複数の大規模臨床試験でその有効性を示すことが出来ていない[15-17]。この原因としては、低体温が免疫抑制・心機能抑制など全身への作用も有し、高齢で基礎疾患を有するなどの背景を持つ脳梗塞患者においては重大な弊害となることが考えられている[17,18]。また、脳梗塞患者に低体温治療を行うには、shivering を防ぐための筋弛緩が必要であり、全身麻酔に準じた管理を要するなどの問題もある。

このような問題を克服するために、脳を局所的に冷却するという治療戦略が考えられ、現在注目を集めている[18-23]。経動脈的局所脳低温治療(trans-arterial regional hypothermia)[21-23]はこの代表的なもので、冷却灌流液を経動脈的に流入し、局所脳を選択的に低温化して脳保護効果を期待するものである。臨床応用を考慮した場合、血管内血栓除去療法において、血栓除去後に留置したカテーテルから再開通動脈に冷却生理食塩液を注入するのみで容易に実現可能であり、世界的にも期待されている[18,23]。本治療法を用いたラットの虚血再灌流モデルでは、I/R injury を著しく抑制することが報告されているが[21-26]、その作用機序については炎症反応の抑制が報告されている程度で未だ十分に解明されてい

ない。
今回我々はこの将来性の高い脳保護療法である経動脈的局所脳低温療法を研究主題とした。本研究では、まず、経動脈的局所脳低温療法の作用機序を明らかするために、脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を絞って検討を行った。ラットの一過性脳虚血モデルを用いて、脳微小血管の微細な形態変化を電子顕微鏡で観察し、また、分子発現などの機能的変化を分子生物学的・免疫組織学的な手法を用いて検討した。次いで、本治療法の有効性が、一過性脳虚血だけではなく永続性脳虚血でも期待できるのかを明らかにするために、ラットの partial reperfusion injury モデルを使用して、免疫組織学的検討を中心にその神経保護効果を検討した。

略語表

AQP4: aquaporin4
BBB: blood brain barrier
BSA: bovine serum albumin
CCA: common carotid artery
CC3: cleaved caspase 3
CS: cold saline
DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole
ECA: external carotid artery
FIHC: fluorescent immunohistochemistry
GFAP: glial fibrillary acidic protein
HRP: horse radish peroxidase
Iba1: ionized calcium binding adapter molecule 1
ICA: internal carotid artery
ICAM1: intercellular adhesion molecule 1
IHC: immunohistochemistry
IL-1 β : interleukin-1 beta
I/R injury: ischemia-reperfusion injury
MCA: middle cerebral artery
MCAO: middle cerebral artery occlusion
MMP9: matrix metalloproteinase9
MPO: myeloperoxidase
PPA: pterygopalatine artery
ROI: region of interest
TEM: transmission electron microscopy
tMCAO: transient middle cerebral artery occlusion
TNF- α : tumor necrotic factor-alpha
TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
vWF: von Willebrand factor
WB: western blotting
WS: warm saline

第　一　章

虚血再灌流傷害に対する経動脈的局所脳低温治療の神経保護作用

【緒言】

経動脈的局所脳低温治療は、脳保護療法として著明な神経保護作用をもたらし[18,21-27]、早期の実臨床への応用が期待される魅力的な治療法である[18]。しかし、目前に差し迫った臨床応用の前にまず動物実験レベルで治療有効性・安全性を検証することは重要である。本章では、まず経動脈的局所脳低温の I/R injury モデルラットに対する脳冷却効果や神経保護作用を確認することを目的とした。また、その過去にその神経保護作用には抗炎症作用が重要な役割を果たすという報告[24-26]が散見されたので、本章ではその抗炎症作用も検討することとした。

【実験方法】

1）Ischemia Reperfusion injury モデルラット

以下すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。
実験動物は 6-8 週齢の Sprague-Dawley (SD)ラットで、体重 240~310g のものを使用した。一過性中大脳動脈閉塞(transient middle cerebral artery occlusion、tMCAO)の方法は過去に報告[28]されている糸栓子を使用した方法(intra-luminal suture method)で行った。
ラットは 4.0%isoflurane＋N_2O/O_2(70:30)で麻酔導入を行い 2.0%isoflurane＋N_2O/O_2(70:30)で維持、術中直腸温を観察し、体温は 36.5~37.5℃に維持した。
手術(Figure 1)は、頚部腹側に正中切開を行い右総頚動脈(common carotid artery、CCA)、右外頚動脈(external carotid artery、ECA)、右 internal carotid artery

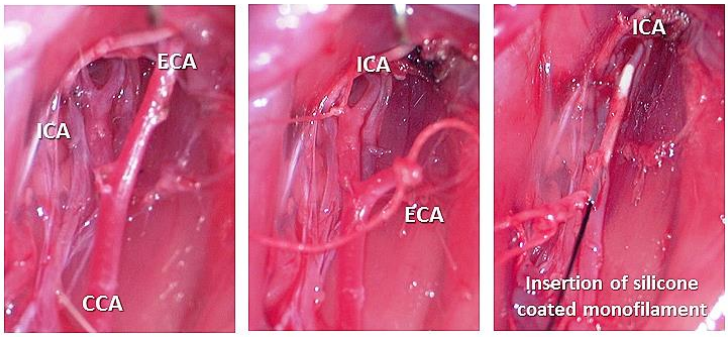


Figure 1. ***Intra-operative photograph of tMCAO model rats.*** (Left) The right CCA, ICA, and ECA were exposed. (Middle) The ECA was ligated and cut down. And PPA was also ligated. (Right) Silicone coated monofilament was inserted toward the ICA via the incised ECA.

(ICA)を露出した。ECA は十分遠位まで露出して結紮・凝固切断して ECA を下方外側へ剥離・翻転。次いで ICA を十分遠位まで剥離し Pterygopalatine artery(PPA)が ICA より起始しているのを確認し起始部で結紮した。その後、ICA と CCA を脳動脈瘤手術用のマイクロクリップでクランプし、翻転した ECA に小孔を設け、糸栓子を頭蓋内 ICA に向けて約 20mm 挿入していく。十分に挿入するとわずかな抵抗を感じ、糸栓子の先端が MCA 起始部を閉塞したのが確認できるので、この状態で糸栓子は ICA とともに 4-0 絹糸で固定した。糸栓子は、シリコンラバーで先端がコーティングされた直径 0.37mm のナイロン糸の MCAO suture (Doccol Corp., Redlands, CA, USA)を使用した。
tMCAO の虚血作成手技においては、時に糸栓子が十分に血流をブロックできていないケースや、糸栓子の先端が血管を貫通し想定外の部位に誘導されているケースも存在する。このため、実験の組み入れ基準として MCAO 手術前後に脳血流(Cerebral blood flow、CBF)を OMEGAFLOW FLO-C1(OMEGA WAVE, Tokyo, Japan)を用いて測定し、CBF の 70%以上の低下を呈し、かつ神経症状が Bederson score[29] grade3 以上であるラットをその後の実験に使用することとした。[22,29,30]
2 時間の脳虚血負荷を行った後に、ラットを再び全身麻酔下に置き糸栓子を抜去することで順行性の血流を再開させて再灌流状態を作成し、I/R injury を完成させた。

2) 経動脈的局所脳低温(trans-arterial regional hypothermia)

経動脈的局所脳低温は虚血側内頚動脈に冷却生理食塩液を灌流して実施した(Figure 2)。まず、糸栓子を抜去した直後に小動物用カテーテル PE 50 catheter (brck LTD, Tokyo, Japan)(矢頭)を ECA の小孔から挿入し、ICA まで誘導し、カテーテルを脳動脈瘤手術用のマイクロクリップで固定した。このカテーテルにシリンジとシリンジポンンプ FP1000E(Melquestt Ltd, Tokyo, Japan)を接続し、冷却生理食塩液を持続投与した。
投与量・投与速度・投与時間は過去の報告[21-23]を参考にして総量 20ml/kg の生理食塩液を 15 分間かけて持続投与することとした。治療による脳冷却効果を確認するために脳温・体温は治療直前から治療中（15 分間）、治療後(60 分間)の間、全身麻酔継続し観察した。
体温は直腸温を測定し、脳温は bregma の 3mm 後外側の点に burr-hole を作成

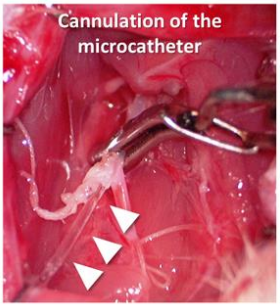


Figure 2. ***Intra-operative photograph of trans-arterial regional hypothermia.*** A micro catheter (arrow heads) was inserted into the ECA and advanced into the ICA.

し、針型温度計である BAT12 Microprobe Thermometer(Physitemp Instruments, Inc., NJ, USA)を刺入し、脳表(cortex)・線条体(striatum)の温度を観察・記録した。

3) 実験プロトコール(Figure 3)

2 時間の tMCAO に供したラットは以下の 3 群に振り分けた。
cold saline (CS)群:再灌流前に、ICA より 10℃に冷却した生理食塩液を 20ml/kg、15 分間かけて投与する。
warm saline (WS)群：CS 群と同様に 37℃に調整した生理食塩液を投与する。
control 群：通常の再灌流のみ。
I/R injury から 24 時間後（糸栓子抜去後 24 時間後）にラットは全身麻酔下に置き安楽死させ、生理食塩液による灌流処置後、脳を摘出し各種評価を実施した。

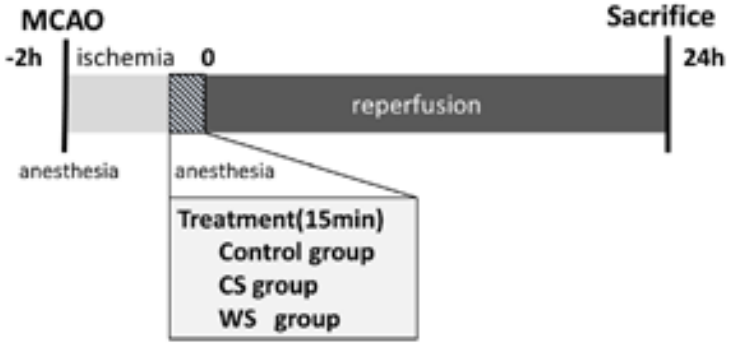


Figure 3. ***Scheme of the experimental protocol.*** Rats were devided into control group, Cold saline (CS) group, and Warm saline (WS) group after the tMCAO surgery. After 24hrs of reperfusion injury, all rats were sacrificed for further evaluation.

4) 神経症状

虚血後、I/R injury 直後、I/R injury24 時間後(屠殺時)に 18-point neurological scale score[31] を用いて神経症状評価を行った。

5) 脳梗塞、浮腫体積

脳梗塞・浮腫体積は 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich Chemice GmbH, Buchs, Switzerland)による染色で行った。摘出脳を 2mm の厚さで冠状にスライスし、2%TTC 溶液に 37℃、20 分間静置した。染色した摘

出脳は写真撮影し、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)を使用して解析した。梗塞体積・浮腫体積は以下の計算式にて算出した。

・梗塞体積：Infarct volume (%) = (measured infarct volume / edema volume)/contralateral hemispheric volume
・浮腫体積：Edema volume (%) = ipsilateral hemispheric volume/ contralateral hemispheric volume

6) 脳血液関門（Blood Brain Barrier、BBB）破綻の評価

BBB 破綻の程度については、Evans blue (EB)色素の脳内漏出を定量的に評価した。EB 色素(2%、4ml/kg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)を再灌流時に左大腿静脈より投与した。I/R injury 24 時間後に Sacrifice し摘出脳を-80℃下に冷凍保存を行った。
それぞれの摘出脳は 3ml の 50%の trichloroacetic acid でホモジナイズを行い、溶液を 12000 回転・30 分間遠心分離した。その上清と基準 EB 溶液の吸光度(620nm)を測定し、検体の EB 濃度を算出した。定量結果は脳 1g 当たりに含まれる EB の量(μg/g 組織)で示した[32]。

7) 免疫染色(Immunohistochemistry、IHC)

4%パラホルムアルデヒドで潅流固定後、2 日間の浸透固定を行った摘出脳サンプルをスライスし、2mm 厚の冠状切片とした。これをパラフィン包埋して線条体レベルで 4μm の薄切切片を作成した。各切片をキシレンに 30 分間浸し、パラフィン除去を行った。pH6.0 クエン酸緩衝液を加熱沸騰させ、切片を投じ 2 分間の加熱処置による抗原賦活を行った。10%正常ヤギ血清にて Blocking 後、各種一次抗体(下記参照)を使用し、室温 1 時間で反応させた。2 次抗体反応はエンビジョンポリマー試薬(Dako, Glostrup, Denmark)を室温 1 時間で反応させた。DAB による発色には Dako Real DAB+Chromogen(Dako, Glostrup, Denmark)にて行い、ヘマトキシリン染色を行った。
使用した一次抗体とその濃度、目的は以下の通りである。

・ Anti-myeloperoxidase (MPO) (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA)：脳内に浸潤した好中球の検出
・ Anti-intercellular adhesion molecule 1(ICAM1) (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA):血管内皮細胞障害時に発現する接着因子の検出

・Anti-matrix metalloproteinase 9 (MMP9) (1:50; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA): 細胞傷害性に作用するタンパク分解酵素の検出
・Anti-ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) (1:1500, Wako, Tokyo, Japan): 脳ミクログリア活性の評価

8) Western blotting (WB)

TTC 染色後に-80℃で冷凍保存していた脳を用いて WB を行った。患側大脳を RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を使用し homogenize し、遠心分離した上清を保存してタンパク質抽出を行った。抽出したタンパク質 10μg を、泳動用ゲル(NuPage 4-12% Bis－Tris Gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA))を使用して 200mV、35 分間の電気泳動を行なった。ゲルはニトロセルロース膜に転写した。膜は 5%bovine serum albumin (BSA)で室温 1 時間のブロッキングを行い、1 次抗体反応は 4℃ over night で行った。その後、Horse Radish Peroxidase (HRP)標識 2 次抗体(1:10000, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)と反応させた。標識されたタンパク質は化学反応(ECL detection kit; GE Healthcare, Piscataway, NJ)による検出を行い lumino image analyzer で撮影した。検出されたタンパク質のバンドは Image J soft ware を用いて定量化し、内在性コントロールタンパクβ-actin と比較した。使用した一次抗体とその濃度は以下の通りである。

・ Anti-MPO (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA)
・ Anti-ICAM1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, USA)
・ Anti-MMP9 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
・ Anti-β-actin (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

9) 統計学的解析

データは、mean±SD で表した。2 群間の比較には two-tailed Student's t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance と Bonferoni's test を用い、$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

【実験結果】

1）経動脈的局所低脳温による脳冷却効果

CS 群において、脳温（Cortex：36.9±1.0→34.8±0.6℃、Striatum：37.6±0.8→35.4±0.7℃）は、コントロール群と比較し速やかに、そして有意に低下した(Figure 4)。治療終了後、すなわち再灌流後、低下した脳温度は徐々に回復した。脳温の有意な低下効果は治療後 30 分間、すなわち治療開始から 45 分間持続した。測定期間中に直腸温の有意な変化は認めなかった。

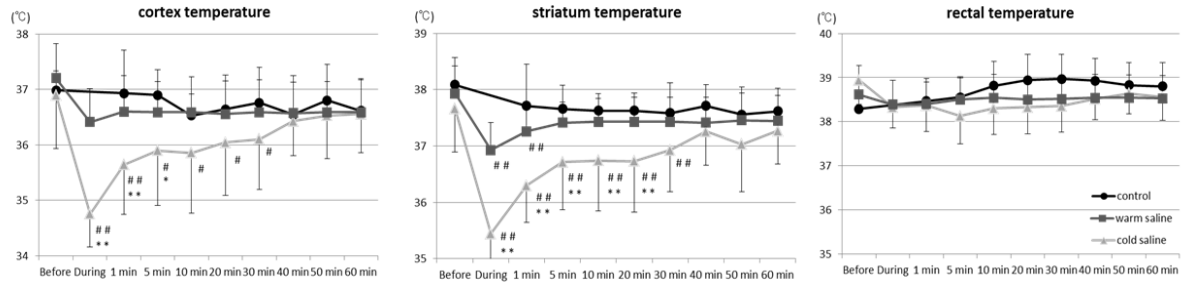


Figure 4. ***Effects of trans-arterial regional hypothermia on brain temperatures.*** Although the 15-minute 10°C saline infusion rapidly and significantly reduced brain temperatures in the cold saline group (stratum: from 37.6±0.8 to 35.4±0.7°C, cortex: from 36.9±1.0 to 34.8±0.6°C), this effect only lasted for 30 minutes after the end of the saline infusion (Figure 1A). No significant reductions were observed in rectal temperatures. (#p<0.05, ##p<0.01, significantly different from before, *p<0.05, **p<0.01 significantly different from the control group. #p<0.05, ##p<0.01, significantly different from before, *p<0.05, **p<0.01 significantly different from the control)group.

2）生理学的パラメーターに与える影響

生理学的パラメーターにおいて MCAO 前、I/R injury24 時間後ともに各群で有意な差は認めなかった。

Table 1. ***Physiological parameters.*** No significant reductions were observed in rectal temperatures. Furthermore, no significant differences were observed in physiological parameters or the percentage of cerebral blood flow (CBF) reductions between the three groups examined

	Control	Warm saline	Cold saline	
Pre MCAO				
BT(℃)	36.7±0.4	36.5±0.6	36.8±0.9	n.s.
mABP(mmHg)	87.1±17.1	98.4±21.2	92.6±11.3	n.s.
pH	7.49±0.03	7.46±0.03	7.47±0.06	n.s.
pCO2 (mmHg)	27.9±5.4	34.0±3.9	33.4±6.5	n.s.
pO2 (mmHg)	145.4±36.8	139.7±31.0	131.3±29.0	n.s.
Ht (%)	36.7±3.5	39.1±3.8	40.4±2.3	n.s.
Hb (mg/dl)	11.5±1.0	12.7±1.2	12.9±1.0	n.s.
Reduction of CBF(%)	22.1±3.6	21.9±7.6	19.7±7.9	n.s.
After 24hr reperfusion				
BT(℃)	36.1±0.6	36.2±1.6	36.9±1.0	n.s.
mABP(mmHg)	82.9±19.0	79.9±15.0	97.9±41.0	n.s.
pH	7.52±0.05	7.48±0.06	7.50±0.04	n.s.
pCO2 (mmHg)	34.3±7.3	38.1±9.0	33.4±4.7	n.s.
pO2 (mmHg)	210±63.3	161.3±46.4	146.1±58.0	n.s.
Ht (%)	42.1±2.5	44.7±2.2	43.7±1.4	n.s.
Hb (mg/dl)	13.7±0.8	14.6±0.7	14.2±0.5	n.s.

3）神経症状

18-point neurological scoring scale を用いた神経症状評価では、I/R injury 24hr 後において、CS 群(12.6±0.9)でコントロール群(9.6±0.5,p<0.01)・WS 群((10.0±1.1,p<0.01))比較し有意な神経症状の改善を認めた。(Figure 5)

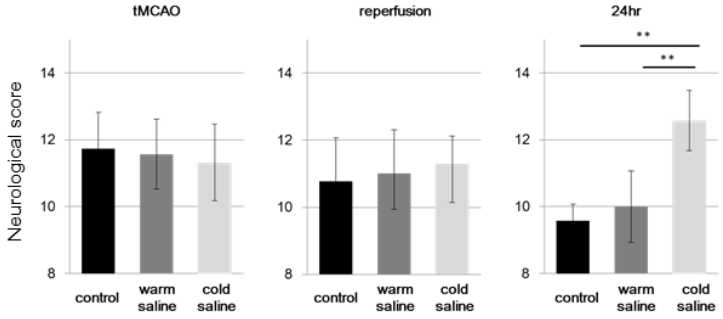


Figure 5. ***Neurological scores of the 18-point scale examined early after the onset of MCAO, early after the onset of reperfusion, and at 24 hours of reperfusion.*** Significant neurological improvements were observed in the cold saline group at 24 hours of reperfusion.(*p<0.05, **p<0.01)

4）脳梗塞、脳浮腫体積

I/R injury 24hr 後の TTC 染色の結果では、CS 群での脳梗塞体積は 15.1±13.7%で、コントロール群(53.9±8.9%, p<0.01)、WS 群(50.9±8.9%, p<0.01)と比較して有意に小さかった。また、脳浮腫体積も CS 群で有意な縮小を認めた(CS 群：10.0±9.9%、コントロール群：25.5±8.8%、WS 群：24.7±6.6%) (Figure 6)。

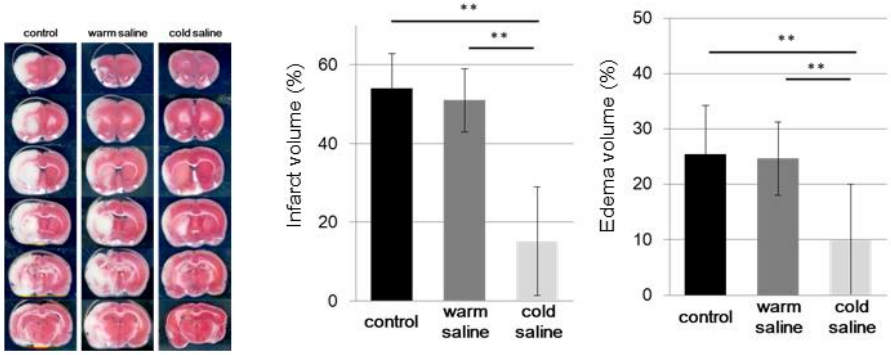


Figure 6. ***Coronal brain sections of TTC stain.*** A quantitative analysis of infarct volume and edema volume revealed a significant reduction in the cold saline group. (*p<0.05, **p<0.01)

5) BBB の破綻

CS 群ではコントロール群、WS 群と比較して EB の脳内への漏出量が少なく BBB の破綻は有意に抑制されていた(Fig 7)。

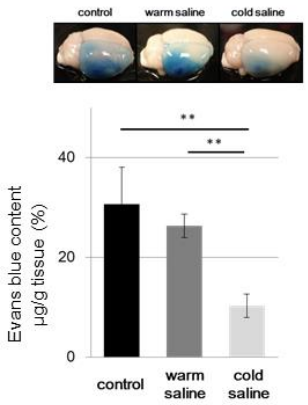


Figure 7. ***Evaluation of BBB disruption.*** A quantitative analysis of Evans blue content revealed a significant reduction in vascular leakage in the cold saline group
(*pD<0.05, **p<0.01)

6) 抗炎症作用

I/R injury 24 時間後、各炎症反応関連因子(MPO(A), ICAM1 (B), MMP9 (C), Iba-1 (D))の免疫染色、Western blotting による検討を行った(Fig. 8)。
MPO の IHC では脳内に浸潤している好中球(矢印)の発現は、CS 群で抑制されていた。WB による定量評価 CS 群はコントロール群、WS 群と比し有意($p<0.05$)な MPO 発現抑制作用を認めた(Fig. 8A)。
ICAM1 の IHC ではコントロール群、WS 群で血管内皮細胞に沿った ICAM1 発現(矢印)を認めるが、CS 群では発現抑制され、WB による解析では CS 群での有意($p<0.05$)な ICAM1 発現抑制効果を認めた(Fig. 8B)。
MMP9 の IHC ではコントロール群・WS 群では血管内皮細胞(矢印)や浸潤した好中球(矢頭)からの顕著な MMP9 産生を認めたが、CS 群では発現抑制され、WB でも有意($p<0.05$)な抑制効果を認めた。 (Fig. 8C)
Iba-1 の IHC では、コントロール群・WS 群では活性化されたミクログリア(amoeboid shape、矢印)が増殖していたが、CS 群では安定状態のミクログリア(ramified shape、矢頭)を認めるのみで、IHC による定量評価にて CS 群でのミクログリア活性化の有意な($p<0.05$)抑制効果を認めた。(Fig. 8D)

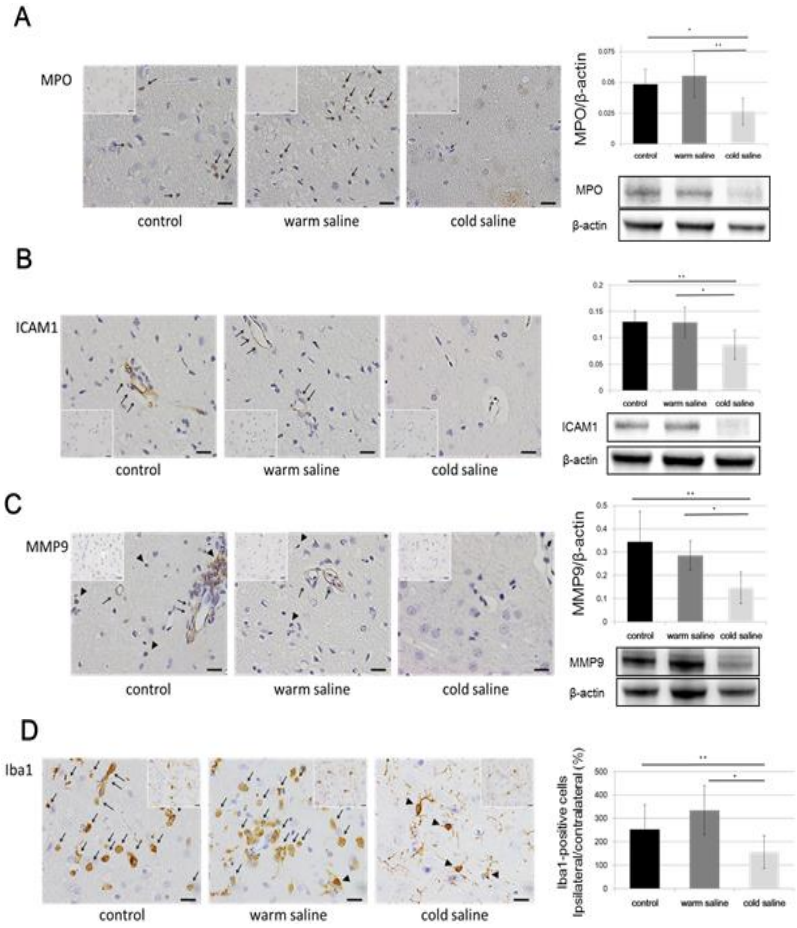


Figure 8. ***Trans-arterial regional hypothermia attenuated inflammatory reactions at 24 hours of reperfusion.*** (A) MPO immunohistochemistry showed that the parenchymal infiltration of MPO-positive neutrophils (arrows) was frequently observed in the control group and warm saline group, but not in the cold saline group. A quantitative analysis of immunoblots revealed the significant attenuation of MPO expression in the cold saline group. (B) ICAM1 immunohistochemistry showed that ICAM1 expression on the endothelium (arrows) was frequently observed in the control group and warm saline group, but not in the cold saline group. A quantitative analysis of immunoblots revealed the significant attenuation of ICAM1 expression in the cold saline group. (C) MMP9 immunohistochemistry showed that MMP9 expression on the endothelium (arrows) and perivascular cells (arrowheads) was frequently observed in the control group and warm saline group, but not in the cold saline group. A quantitative analysis of immunoblots revealed the significant attenuation of MMP9 expression in the cold saline group. (D) Iba1 immunohistochemistry showed that ramified Iba1-positive cells (arrowheads) were diffusely observed in the ipsilateral sides of the cold saline group and in the contralateral side of all three groups, whereas amoeboid Iba1-positive cells (arrows) were increasingly observed in the ipsilateral side of the control group and warm saline group. A quantitative analysis by the counting of positive cells showed the significant attenuation of Iba1 expression in the cold saline group. Inset figures show results obtained in the contralateral side. Scale bar=20μm. (*$p<0.05$, **$p<0.01$)

【考　察】

本章の実験では経動脈的局所脳低温治療の脳冷却効果と、それによる神経保護作用・抗炎症作用を検証した。15 分の冷却(10℃)生理食塩液の潅流によって、30 分から 45 分にわたるラット脳冷却効果(約 2℃)を認めた。この作用により、I/R injury 後に起こる神経症状の悪化、脳梗塞・脳浮腫形成は抑制されていた。この著明な神経保護効果は、過去に Ding ら[21,23]が初めて報告したものと相違ない結果であった。我々はこの神経保護作用の検討に加え、I/R injury 後の BBB の破綻や炎症反応への影響も追加して検討した。経動脈的局所脳低温は、I/R injury 後の BBB 破綻や炎症反応に対しても著明な抑制効果を認めた。

経動脈的局所低能温の作用機序に言及した過去の報告[24-26]では、その抗炎症作用が重要であると報告されてきている。これらの報告[24-26]で、経動脈的局所脳低温は interleukin-1 beta (IL-1β)、tumor necrotic factor-alpha (TNF-α)、ICAM1、MMP9 といった炎症関連因子を抑制することが、分子生物学的検討にて証明されている。同様に、我々の結果でも I/R injury 24 時間後に起こる ICAM1 の発現、好中球の脳内浸潤、ミクログリアの活性化、MMP9 産生は経動脈的局所脳低温で有意に抑制されており、本治療の抗炎症作用を確認した。

第二章

脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を当てた経動脈的局所脳低温治療の作用機序の解明

【緒言】

経動脈的局所脳低温の作用機序に関しては、まだ不明な点が多いのが現状である[18]。第一章で我々が明らかにした抗炎症作用以外の作用機序に迫った報告は無い。経動脈的局所脳低温が有する特徴として、我々の研究結果(第一章)や過去の報告[21,23]によると、治療による脳冷却効果が持続するのは長くとも 60 分間程度(治療時間は 15 分間)である。しかし、組織での I/R injury は、冷却効果が失われた後も長時間持続し進行する。限られた脳冷却時間にも関わらず、強固な神経保護作用をもたらす理由として、経動脈的局所脳低温は I/R injury 後生じる一連の反応の上流を抑制していることが想起された。そこで、経動脈的局所脳低温により最も早く冷却作用を受ける脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を当てて検討することとした。特に経時的な検討により、血管反応の動態を明らかにして、神経保護効果の機序解明につなげることを考えた。

本研究では、微小血管での形態変化を光顕レベルでの定量的検討と電子顕微鏡による微細構造観察で行うこととした。虚血再灌流における電子顕微鏡での検討については、Ito ら[33]の報告があり、微小血管周囲に裏打ちするように存在するアストロサイト終足の膨化と、それに伴う血管の物理的圧迫による微小血管内腔狭小化が生じるとされている。このアストロサイト終足の膨化は、中枢神経の様々な病態で起こることが報告[33-35]されている。今回我々は経動脈的局所脳低温治療が、このアストロサイト終足の膨化と微小血管内腔狭小化に与える影響を検討することとした。加えて、アストロサイト終足の膨化の原因として、細胞膜に存在する水分子トランスポーターのアクアポリン 4(aquaporin-4、AQP4)の関与を検討した。AQP4 は中枢神経でアストロサイト終足に集中して分布[36,37]し、細胞内外への水の移動を調節[38]しており、この分子の虚血再灌流傷害での作用は検討に値すると考えた。

【実験方法】

1）一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)と経動脈的局所脳低温

以下すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。
実験動物は 6-8 週齢の Sprague-Dawley (SD)ラットで、体重 240~310g のものを使用した。脳梗塞(tMCAO モデル)の作成、再灌流、経動脈的局所脳低温治療の方法は第一章で述べた通りに行った。
今回の実験では、ラットは 2 群に振り分けて行った。第一章で WS 群とコントロール群で神経保護作用や抗炎症作用に差異は認めなかったので CS 群とコントロール群のみ使用し比較した。
また、本実験では各検討項目の経時的な評価を必要としたため再灌流時(0 時間)、I/R injury 2 時間後、I/R injury 6 時間後、I/R injury 24 時間後の時点で屠殺を行い各評価項目(梗塞・浮腫体積、BBB 破綻、種炎症関連因子、微小血管の形態的変化､AQP4)の検討を行った。

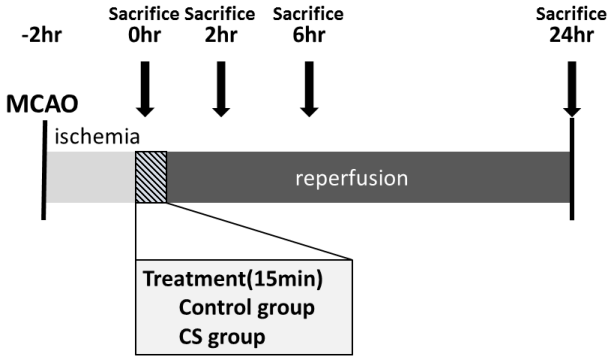


Figure 9. ***Scheme of the experimental protocol.*** For time course analysis, rats (Control and CS groups) were sacrificed at different designated time-points.

2） 脳梗塞、浮腫体積の経時的変化

I/R injury 0 時間、2 時間、6 時間、24 時間後に摘出した脳を使用し、前述の通り TTC 染色を行った。脳梗塞体積、浮腫体積も同様に算出した。

3） BBB 破綻の経時的変化

BBB 破綻の経時的変化は I/R injury 2 時間、6 時間、24 時間後の時相で評価した。
方法は前章と同様である。

4） 炎症反応の経時的変化

各炎症関連因子の検討も前章と同様に行った。MPO・ICAM1・MMP9 の発現は WB 法で、Iba1 の発現は IHC にて定量評価を行った。得られた結果は 0 時間 I/R injury の結果と比較した。

5) 微小血管の形態学的評価とその経時的変化

微小血管の形態学的評価は IHC にて行った。IHC は前述の如くであるが、1 次抗体として血管内皮細胞のマーカーである anti-von Willebrand factor (vWF) (1:200, Chemicon International Inc., Billerica, MA, USA)を使用した。微小血管の内腔、その周囲構造物(Astrocytic end-foot)の評価は Image J software を用いて行った。
患側皮質梗塞周囲部からランダムに 6 視野(×400)を抽出して観察した。染色された視野内の全ての微小血管(<20 μ m)で、血管内腔径(microvascular diameter)として横断の最短径(cross section width)を計測した。さらに、これらすべての微小血管で血管周囲間隙(perivascular halo)も計測し、cross section width との比率を算出した。
IHC 上の形態学的変化の実態追求のため、微小血管と周囲構造物を透過型電子顕微鏡(transmission electron microscopy、TEM)を用いて観察した。

6) TEM を用いた微小血管の観察

ラットは 2.5%グルタルアルデヒドと 0.1mol/L カコジル酸緩衝液で潅流固定し、さらに浸透固定も行った。固定された患側大脳半球線条体レベルの皮質より 2mm 大のブロックを切り出し、1%オスミウム酸で後固定した。その後 0.5%酢酸ウラニル+50%エタノールでブロック染色を行い、エタノールで段階的な脱水処理を進めた後、ブロックは Epon812 内に包埋した。60℃のオーブンで 3 日間重合させ完成させたブロックを 60nm に薄切し、切片を酢酸ウラニルで染色した。超微細構造の観察は TEM(JEM-1400; Joel, Tokyo, Japan)を使用して行った。

7) AQP4 発現の経時的変化

AQP4 の発現は IHC の手法を用いて検討した。AQP4 発現は水分子の細胞内移動亢進によるアストロサイト終足の膨化に関与可能性があると考えた。
IHC は前述の如くに行ったが、1 次抗体として anti-AQP4 (1:200; Abcam, Cambridge, MA, USA)を使用した。患側皮質の梗塞周囲部からランダムに 3 視野(×200)抽出して観察した。視野内で AQP4 が発現している微小血管の数を計測し定量的な評価を行った。

8) 統計学的解析

データは、mean±SD で表した。2 群間の比較には two-tailed Student’s t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance と Bonferoni’s test を用い、$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

【実験結果】

1) 梗塞・浮腫体積、BBB 破綻の経時的変化

I/R injury 0 時間、2 時間、6 時間、24 時間において脳梗塞体積と浮腫体積の経時的変化を観察した（Fig 10A)。持続する脳梗塞体積と浮腫体積の増加がコントロール群で認められたが、CS 群ではこの進行は抑制されていた。統計学的有意差は梗塞体積・浮腫体積ともに I/R injury 6 時間後の時点で認められていた。BBB 破綻も control 群では I/R injury 6 時間後の時点から顕著となり CS 群での有意な抑制効果を認めた(Fig 10B)。

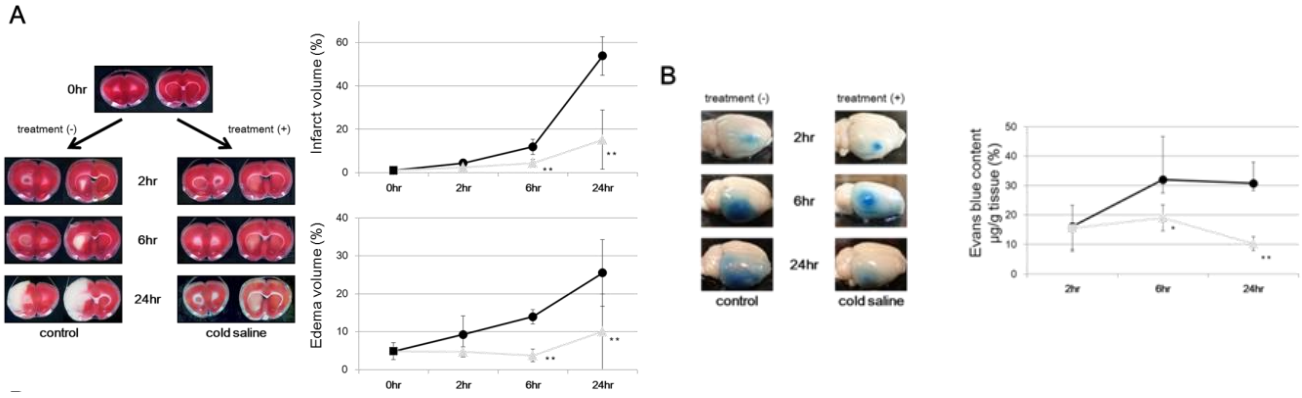


Figure 10. ***Trans-arterial regional hypothermia showed neuroprotective effects and attenuated vascular leakage from 6 hours of reperfusion.*** (A) Coronal brain sections were stained with TTC to evaluate infarct and edema volumes. A quantitative analysis of the infarct volume and edema volume showed that infarct and edema volumes were reduced by trans-arterial regional hypothermia at 6 and 24 hours of reperfusion. (B) Evans blue extravasation was examined to evaluate vascular leakage. A quantitative analysis of Evans blue content showed that BBB disruption was reduced by trans-arterial regional hypothermia at 6 and 24 hours of reperfusion. (*$p<0.05$, **$p<0.01$)

2) 炎症反応の経時的変化

ICAM1、MPO　、MMP9 、Iba1 の発現の経時的変化を観察した（Fig 11)。ICAM1 の発現は I/R injury 6 時間後(p<0.05)より有意に亢進し、24 時間後(p<0.05)まで亢進持続していたが、これは CS 群では有意に(p<0.05)抑制されていた。MPO と MMP9 の発現亢進は I/R injury 24 時間後になると出現し(p<0.05)、これも CS 群で有意に(p<0.05)抑制されていた。ミクログリアの活性化も 24 時間後に有意に(p<0.01)上昇していたが、CS 群ではこれも有意に(p<0.01)抑制していた。

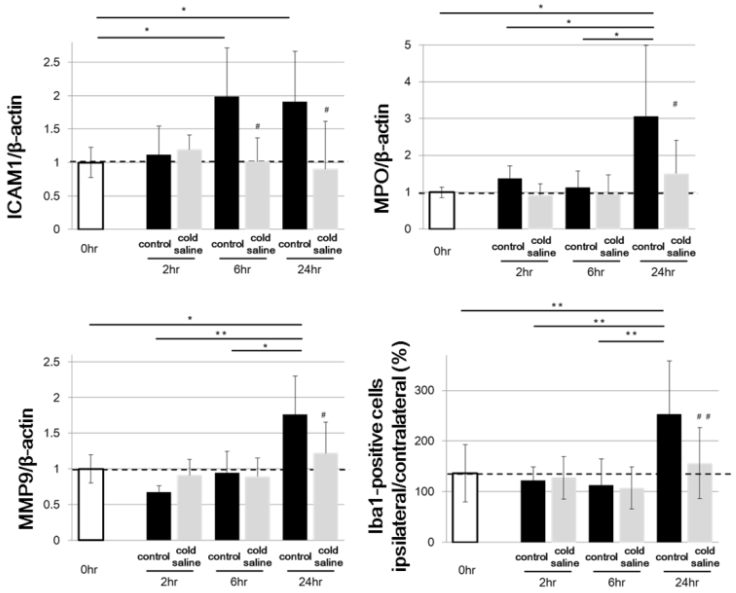


Figure 11. ***Temporal profiles of inflammatory reactions.*** A quantitative analysis of immunoblots showed that the significant up-regulation of ICAM1 from 6 hours of reperfusion was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. A quantitative analysis of immunoblots showed that the significant up-regulation of MPO and MMP9 at 24 hours of reperfusion was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. A quantitative analysis by the counting of Iba1-positive cells in immunohistochemistry showed that the significant activation of microglia at 24 hours of reperfusion was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. (*p<0.05, **p<0.01)

以上より、I/R injury による炎症反応の進行は、内皮細胞障害による ICAM1 発現が先んじて生じ、この接着因子発現を介して好中球の脳内浸潤、MMP9 産生、ミクログリア活性化など一連の炎症反応が惹起・進行するものと考えられた。また、局所脳低温はこれら炎症反応の惹起・進行を全て抑制していた。

3) 微小血管の形態学的な経時的変化

微小血管の形態学的な変化については、IHC で定量的な評価を行い、TEM で微細構造の観察を行った。IHC による観察(Fig 12A)では内腔狭小化した微小血管(矢印)がコントロール群では多数認められたものの、CS 群では認められなかった。

微小血管内腔径の定量的な評価(Fig 12B)を行うと、コントロール群では 0 時間(5.1±2.1μm)と比較して 2 時間 (4.5±2.3μm, $p<0.05$)、6 時間(3.2±1.8μm, $p<0.01$)と狭小化の有意な進行を認めた。CS 群ではこの変化は有意に抑制され、コントロール群と比較すると 2 時間、6 時間で微小血管内腔径は有意に保たれていた。また血管周囲構造の評価に関しては IHC にて、コントロール群では内腔狭小化した微小血管の周囲には拡大した perivascular halo(Fig 12A、矢頭)を伴っていた。この perivascular halo と血管内腔径の比率の定量評価(Fig12C)では、コントロール群では 2 時間から 24 時間に至るまで perivascular halo の有意($p<0.01$)な拡大を認めた。一方で、この現象はすべての時相(2~24 時間 I/R injury 後)で CS 群では有意($p<0.01$)に抑制されていた

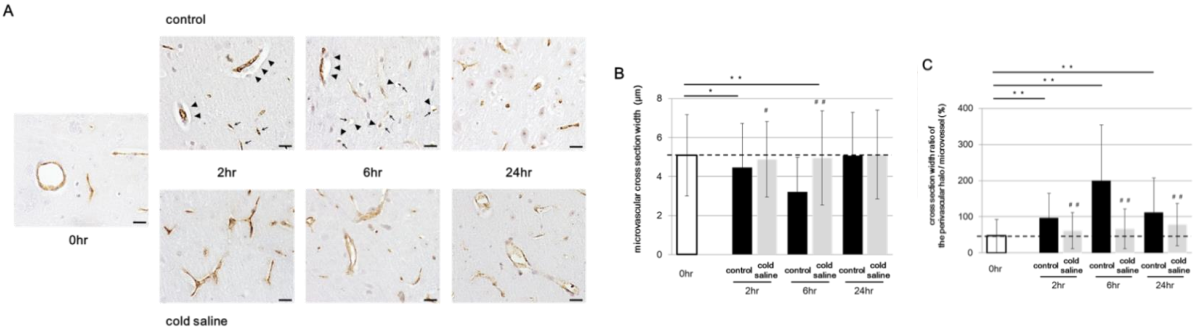


Figure 12. ***Temporal profile of microvascular morphological changes evaluated by von Willebrande factor (vWF) immunohistochemistry.*** (A) vWF immunohistochemistry showed that microvascular narrowing (arrowheads) with enlargement of the perivascular halo (arrows) was observed slightly at 2 hours of reperfusion and frequently at 6 hours of reperfusion in the control group, but not in the cold saline group. Scale bar=20μm (B) A quantitative analysis of the microvascular diameter showed that the significant decrease in diameter at 2 hours of reperfusion (4.5±2.3μm) and 6 hours of reperfusion (3.2±1.8μm) was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. (C) A quantitative analysis of the cross section width ratio of the perivascular halo showed that the significant increase in the ratio observed at all time points and enhanced at 6 hours of reperfusion was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. (*$p<0.05$, **$p<0.01$; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ significantly different from the control group.)

同部位の TEM による微細構造観察(Fig 13)においては、IHC で perivascular halo と認識されていた部位には、膜構造や細胞質内顆粒と思われる構造物が存在しており、これは微小血管を取り囲んで存在しているアストロサイト終足が局所的に膨化したものと確認できた。経時的な変化を観察すると、IHC での所見と同様にアストロサイト終足の膨化は I/R injury 後 2 時間~24 時間の間認められ、6 時間でピークとなっていた。この時相では、物理的な圧迫による顕著な微小血管内腔狭小化も確認可能であった。

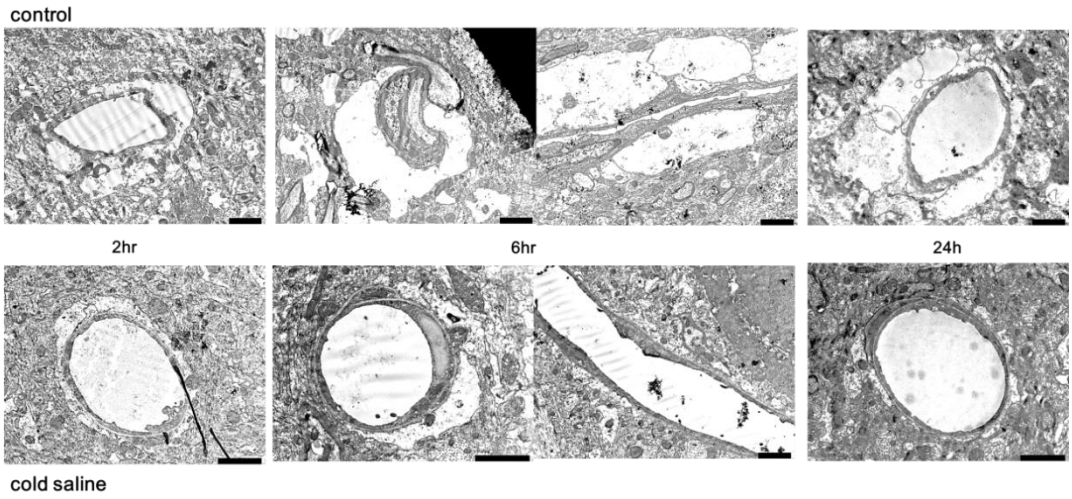


Figure 13. ***Temporal profile of microvascular morphological changes evaluated by TEM.*** Trans-arterial regional hypothermia attenuated microvascular narrowing due to astrocytic end-foot swelling enhanced at 6 hours of reperfusion. Swollen astrocytic end-feet containing membrane structures and organelles were perivascularly observed at all time points in the control group. Marked swollen astrocytic end-feet compressed and narrowed microvessels, which was frequently observed at 6 hours of reperfusion. This was rarely observed in the cold saline group. Scale bar=2μm

4) AQP4 発現の経時的変化

AQP4 の発現解析は IHC(Fig 14)の手法で行った。AQP4 は血管内皮細胞上に恒常的に発現(矢印)していたが、I/R injury 2 時間後の時点ではコントロール群で AQP4 発現さらなる亢進を認めた。CS 群ではこの反応は認められず、定量的な評価でもコントロール群では I/R injury 2 時間後の有意な($p<0.05$)発現亢進は CS では抑制されていた($p<0.05$)。

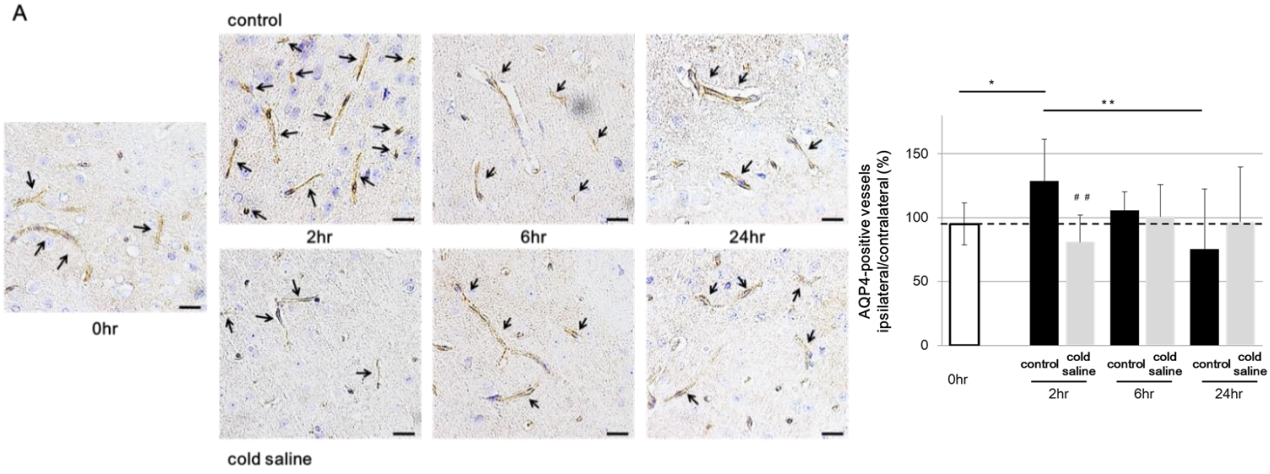


Figure 14. ***Temporal profile of Aquaporin 4 (AQP-4) expression evaluated by immunohistochemistry.*** AQP4 immunohistochemistry showed that constant AQP4 expression (arrows) was observed on the rim of microvessels. Its expression was enhanced at 2 hours of reperfusion in the control group, but not in the cold saline group. Scale bar=20μm. A quantitative analysis by the counting of AQP4-positive microvessels in immunohistochemistry showed that the significant increase in AQP4-positive microvessels at 2 hours of reperfusion was attenuated by trans-arterial regional hypothermia. (*$p<0.05$, **$p<0.01$; ## $p<0.01$ significantly different from the control group)

【考察】

今回、我々は経動脈的局所脳低温による分子生物学的な作用機序を解明するため、様々な側面から I/R injury 後に起きる反応の経時的変化を観察し多くの有益な情報を得た。

I/R injury 後に各時相において観察された反応は以下の通りであった(Fig 15)。
・2 時間：AQP4 発現亢進
・2 時間-6 時間：アストロサイト終足の膨化、微小血管内腔狭小化
・6 時間-24 時間：脳梗塞・浮腫の形成、BBB 破綻、ICAM1 発現
・24 時間：炎症反応（好中球の浸潤、マイクログリア活性化、MMP9 産生）

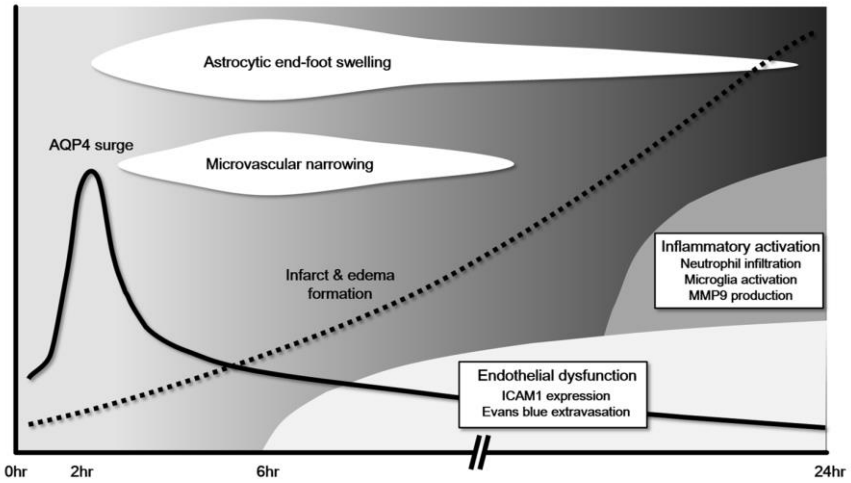


Figure 15. ***Scheme of the time course analysis of events in I/R injury.***

今回の実験結果では好中球の脳内浸潤、ミクログリアの活性化、MMP9 産生に代表される炎症反応亢進は I/R injury 24 時間後の時点で賦活化されていた。しかし、脳梗塞・浮腫の出現・進行、血管内皮細胞傷害(ICAM1 の発現、BBB 破綻)は I/R injury 6 時間後から出現してきていた。また、経動脈的局所脳低温は I/R injury 6 時間後の時点においてもすでにこれらに対する有意な治療効果をもたらしていた。この結果から、I/R injury 後の脳梗塞出現・進行には炎症反応以外の機序が存在し、この機序に対しても経動脈的局所脳低温は効果を発揮していることが示唆された。

I/R injury 後早期に起こる事象として、アストロサイト終足の膨化とそれによる微小血管内腔狭小化を I/R injury 6 時間後に認めた。過去の研究では、この興味

深いイベントは I/R injury 3〜8 時間後に生じることが報告[33]されており、我々の観察結果を支持するものであった。この微小血管内腔狭小化は再灌流後の 2 次性脳血流減少を引き起こし、脳傷害を助長している可能性がある。この 2 次性脳血流減少は、過去においては tMCAO モデルでの虚血後低灌流状態(post-ischemic hypoperfusion)[39]や再灌流後症状悪化(secondary deterioration of I/R injury)[40]と関連しているものと考えられた。

今回の結果では AQP4 の I/R injury 2 時間後の発現亢進(acute AQP4 surge)を認めた。この超急性期の AQP4 発現亢進がアストロサイト終足の膨化に先んじて起きていたことに加えて、AQP4 の役割（水分子の細胞な取り込み促進）[41,42]とその特徴的な分布(アストロサイト終足に主に存在)[36,37]から、超急性期の AQP4 発現亢進が I/R injury 後の一連の反応の上流にあるものの可能性があり、経動脈的局所脳低温は、この超急性期の AQP4 発現亢進を抑制し著明な神経保護効果をもたらしているものと考えられた。本結果によって、経動脈的局所脳低温の新たな分子生物学的な作用機序を提唱することができた。

第三章

経動脈的局所脳低温による異なる脳梗塞モデルに対する治療効果

【緒言】

経動脈的局所脳低温が I/R injury に著明な神経保護作用を示すのは過去の報告[21-26]や、これまでも述べた如くである。しかし経動脈的局所脳低温に関する過去に行われてきた基礎実験[21-26]は、すべて一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルラットを使用したもので、異なる脳梗塞モデルに対するその治療効果を検討した報告はない。
実臨床では、当然のことながら脳梗塞の病態は患者毎に異なる。病因や臨床症状、虚血深度や範囲、再灌流の程度など、多様な病態を呈する。経動脈的局所脳低温の臨床応用に向けて、様々な病態を想定した基礎研究を行うことは重要である。本章では、これまでと異なる永続性脳虚血をも伴うモデルとして partial reperfusion injury モデルラットを使用して経動脈的局所脳低温の有効性を検討することとした。
加えて、分子生物学的作用機序検討として新たに脳虚血性傷害後に生じる神経細胞死(neuronal apoptosis)と反応性神経膠症(reactive gliosis)への経動脈的局所脳低温の作用も検討した。

【実験方法】

1) partial reperfusion injury (Craniotomy MCAO) モデルラット

以下すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。
実験動物は 6-8 週齢の Sprague-Dawley (SD)ラットで、体重 210~280g のものを使用した。
Rat は 4.0%isoflurane＋N_2O/O_2(70:30)で麻酔導入を行い 2.0%isoflurane＋N_2O/O_2(70:30)で維持し、術中体温は 36.5~37.5℃に維持した。
まず頚部腹側に正中切開を行い、両側 CCA を露出した。右半球に対してはカテーテル挿入し経動脈的局所脳低温を行うために CCA から ECA・ICA・PPA まで操作可能なように、十分高位まで露出した。第一章と同様に右 ECA は結紮切断し翻転、カテーテル挿入用の小孔を設けた。

続いて、右眼及び右耳の中間に垂直に 1.5cm 程の皮膚切開を行い、側頭筋を側頭骨より剥離しデンタルドリルを使用して約 5×5mm の側頭開頭(Fig 16,right)を行った。開頭後、硬膜上から MCA を透見し視認した。硬膜上から 10-0nylon 糸で MCA 本幹を結紮し切断し MCA の永久閉塞(Fig 16, left)を完成させた。その後、閉創し、マイクロクリップで両側頚動脈遮断を 1 時間行った。本モデルは、MCA の血流途絶を視認でき、第一章で使用した tMCAO モデルと比較して、再現性の高いモデルであった[43]。術後 Bederson score[29] grade 3 以上の神経症状を呈したラットを使用した[44,45]。



Figure 16. ***Intra-operative photograph of caraniotomy MCAO model rats.*** After the 5×5-mm temporal craniotomy the right MCA was ligated using 10-0 nylon thread and cut off through the dura mater.

2) 経動脈的局所脳低温と実験プロトコール

これまでの如く経動脈的局所脳低温は ECA から ICA に向けて誘導留置したカテーテルから冷却生理食塩液(4℃、20ml/kg、15 分間)を灌流し実行した。
本実験では治療開始の遅滞がその神経保護効果に影響するのかも検討するため、虚血直後に治療を行う群と虚血より遅れて治療を行う群も作成しそれぞれ比較した。

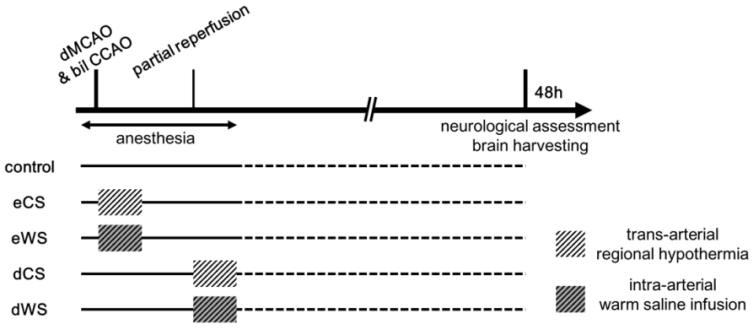


Figure 17. ***Scheme of experimental protocol.*** Rats sub jected to MCAO were divided into the following groups: early cold saline (eCS), early warm saline (eWS), delayed cold saline (dCS), delayed warm saline (dWS), and control group. All rats were sacrificed at 48hrs after the MCAO surgery for further evaluation.

実験に使用した群は以下 5 群となる。

コントロール群：治療介入を行わない。
early cold saline (eCS)群：MCAO 直後から経動脈的局所脳低温を行う。
early warm saline (eWS)群：eCS 群と同様に 37℃の生理食塩液を投与する。
delayed cold saline(dCS)群：MCAO1hr 後から経動脈的局所脳低温を行う。
delayed warm saline(dWS)群：eCS 群と同様に 37℃の生理食塩液を投与する。

MCAO から 48 時間後にラットは全身麻酔下に置き安楽死させ、大脳を摘出し各種評価を実施した。
脳冷却効果は、eCS 群・eWS 群・コントロール群で前章と同様に温度測定を行い、生理学的パラメーターも MCAO 前・MCAO48 時間後にて測定した。

3) 神経症状

MCAO48 時間後(屠殺時)に神経症状の評価を行った。評価は Bederson score grade[29] と 18-point neurological scale score[31] の両方を用いて実施した。

4) 脳梗塞・浮腫体積

脳梗塞・浮腫体積は前述の TTC 染色で行った。
梗塞体積・浮腫体積は以下の計算式を用いて算出した。
・梗塞体積 : Infarct volume (%) = (left hemisphere volume – right non-infarct volume)/left hemispheric volume
・浮腫体積 : Edema volume (%) = (right hemisphere volume – left hemisphere volume)/left hemispheric volume

5) 蛍光免疫染色(Fluorescent Immunohistochemistry、FIHC)

4%パラホルムアルデヒドで潅流固定後、2 日間の浸透固定を行った摘出脳サンプルをスライスし、2mm 厚の coronal 切片とした。これをパラフィン包埋して線条体レベルで 4μm の薄切切片を作成し FIHC を行った。
各切片をキシレンに 30 分間浸し、パラフィン除去を行った。pH6.0 クエン酸緩衝液を加熱沸騰させ、切片を投じ 2 分間の加熱処置による抗原賦活を行った。
切片は 10%正常ヤギ血清にて Blocking した。
神経細胞死の評価のため、アポトーシスのマーカーである Cleaved caspase 3(CC3)と神経細胞のマーカーである NeuN の二重染色を行った。切片は抗 CC3 抗体(1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)＋抗 NeuN 抗体(1:100, Millipore, Billerica, MA, USA)にて室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, life technologies, Carlsbad, CA, USA) および Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, life technologies)を室温で 1 時間反応させた。
また反応性神経膠症の評価には、アストロサイトのマーカーである GFAP(glial fibrillary acidic protein)染色とミクログリアのマーカーである Iba1 染色をそれ

ぞれ行った。1 次抗体には抗 GFAP 抗体(mouse monoclonal, 1:500, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) または、 Iba1 (rabbit polyclonal, 1:1000, Wako, Tokyo, Japan)を使用し、二次抗体として GFAP 染色には Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, life technologies) 、Iba1 染色には Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, life technologies) を用いた。
これらの後、すべての切片は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)による核染色を行い封入した。
切片は蛍光顕微鏡下に観察し、付属のデジタルカメラで記録した。定量的評価は Fig 18 のように指定した region of interest(ROI)で Image J software を用い細胞数や細胞面積の測定を自動で行った。ROI は Fig18 のように、皮質梗塞内(ischemic core)と梗塞辺縁(penumbra)にそれぞれ 2、4 か所設定した。

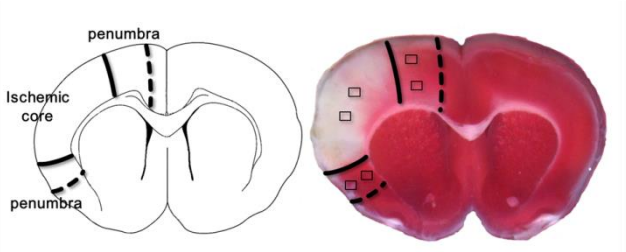


Figure 18. ***ROIs for IHC analysis.*** ROIs of 'infarct core' and 'penumbra' were set for 2 and 4 spots as shown.

6) 統計学的解析

データは、mean±SD で表した。2 群間の比較には two-tailed Student's t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance と Bonferoni's test を用い、$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

【実験結果】

1）脳冷却効果

eCS 群において、治療後速やかな脳温低下(Cortex：34.1±1.2℃→32.5±0.9℃、Striatum：36.4±0.8℃→34.3±1.0℃)を認めた。治療の間、この有意な(p ＜0.01)脳温低下効果は持続され、治療終了後には速やかに復温した。Rectal temperature の有意な変化は認めなかった。

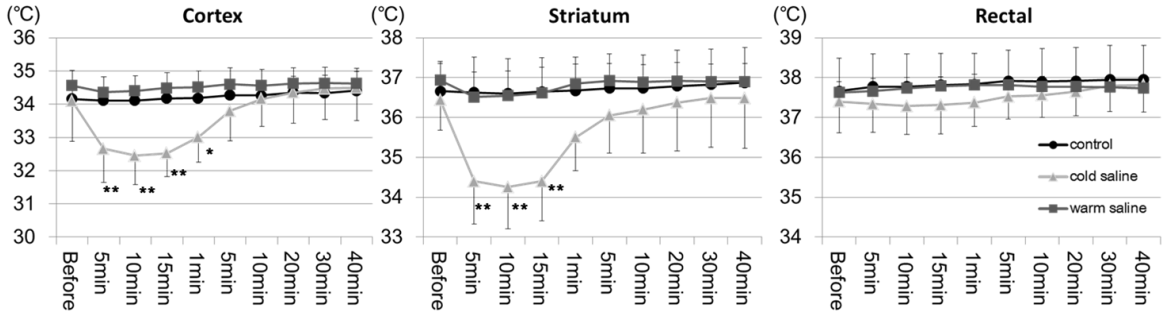


Figure 19. ***Effects of trans-arterial regional hypothermia on brain temperatures.*** In eCS group, brain temperature was rapidly and significantly lowered by the cold saline infusion in both cortex (from 34.1±1.2℃ to 32.5±0.9℃) and striatum (from 36.4±0.8℃ to 34.3±1.0℃). The lowered temperature in both striatum and cortex were maintained as statistically significant (striatum: $p<0.01$; cortex; $p<0.01$) throughout the treatment. Rectal temperature did not show any change during the observational period, in all groups. (*$p<0.05$, **$p<0.01$ significantly different from the before temperature)

2）生理学的パラメーター

生理学的パラメーターにおいて MCAO 前、MCAO48 時間後ともに各群間に有意な差は認めなかった。

	Control	eWS	eCS	dWS	dCS	
Pre MCAO						
Body weight (g)	253.0±18.5	245.5±14.6	227.6±12.0	252.3±28.4	256.2±23.3	n.s.
Body temperature (℃)	36.4±1.1	36.8±1.0	36.9±1.0	35.9±1.1	36.5±1.4	n.s.
Mean Arterial Blood Pressure (mmHg)	102±13.2	99.9±19.1	87.3±20.5	98.1±26.8	90.0±14.1	n.s.
Blood gas assessment						
pH	7.48±0.05	7.44±0.05	7.47±0.04	7.45±0.08	7.47±0.04	n.s.
pCO2 (mmHg)	34.4±5.0	39.3±4.3	33.4±3.8	39.4±9.0	34.0±6.6	n.s.
pO2 (mmHg)	148.0±9.0	160.4±13.6	150.6±19.3	153.0±35.1	165.5±20.8	n.s.
Ht (%)	40.3±1.9	40.0±1.0	39.5±2.7	40.0±2.4	36.3±3.9	n.s.
Hb (mg/dl)	13.1±0.6	13.0±0.3	12.8±0.9	13.1±0.8	11.8±1.4	n.s.
HCO_3^- (mEq/L)	25.0±1.3	26.4±1.7	23.6±2.2	26.1±1.7	24.3±2.7	n.s.
48hr after MCAO						
Body temperature (℃)	35.9±0.6	35.3±0.6	35.8±0.7	35.3±0.6	34.9±0.5	n.s.
Mean Arterial Blood Pressure (mmHg)	94.8±14.0	94.0±20.1	87.5±19.1	90.0±19.8	81.0±14.9	n.s.
Blood gas assessment						
pH	7.52±0.05	7.49±0.08	7.46±0.07	7.46±0.10	7.49±0.05	n.s.
pCO2 (mmHg)	35.9±6.6	41.1±12.7	42.3±12.9	43.0±16.4	38.0±6.0	n.s.
pO2 (mmHg)	156.4±26.1	135.1±38.1	136.4±31.3	180.1±13.0	168±13.7	n.s.
Ht (%)	42.9±4.9	44.6±2.3	43.5±3.8	44.6±2.2	43.8±2.4	n.s.
Hb (mg/dl)	14.0±1.6	14.6±0.8	14.2±1.2	14.6±0.7	14.3±0.8	n.s.
HCO3- (mEq/L)	28.5±2.2	28.4±2.5	28.9±4.6	28.9±3.3	28.5±2.0	n.s.

Table 2. ***Physiological parameters.*** No significant differences were observed in physiological parameters between all of five groups.

3) 神経症状

Bederson grade score[29] を用いた神経症状評価では、コントロール群(3.1±0.3)と比して eCS 群(2.5±0.5, p<0.01)では有意な神経症状の改善を認めたが、dCS 群(2.9±0.3)では有意な改善は認めなかった。
18-point neurological scoring scale[31] を用いた評価では、コントロール群(9.4±0.9)や WS 群と比した有意な神経症状の改善は、eCS 群(12.5±0.5, p<0.01)・dCS 群(12.3±0.8, p<0.01)の両群で認められた。

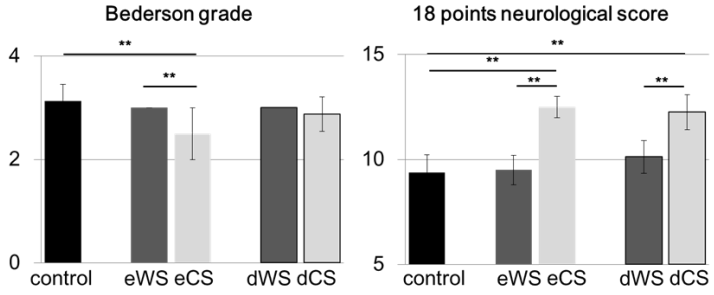


Figure 20 ***Neurological scores of the Bederson grade and 18-point scale.*** In Bederson scoring test, neurological deficits scores were significantly reduced only in the eCS groupbut not in the dCS group compared with the control group. In 18-point scale scoring system, neurological scores were significantly improved not only in the eCS groupbut also in the dCS groupcompared with the control group. There were also significant difference between the eCS group and the eWS group, as well as the dCS group and the dWS group.

4) 脳梗塞、脳浮腫体積

TTC 染色による脳梗塞・脳浮腫体積の評価を行った(Fig 21)。
梗塞体積は eCS 群(8.1±4.7%)でコントロール群(35.1±8.9%)、eWS 群(35.8±5.6%)と比して有意な(p<0.01)梗塞体積縮小を認めた。dCS 群(15.7±5.9%)でもコントロール群(35.1±8.9%)、dWS 群(34.0±3.6%)と比較して有意な梗塞体積縮小を認めた。eCS 群と dCS 群での比較では eCS 群の方が有意に(p<0.05)梗塞体積は縮小され、より早期に治療した方が有意に(p<0.05)梗塞体積縮小効果が強いことが示唆された。

脳浮腫体積は eCS 群(p<0.05)、dCS 群(p<0.05)ともにコントロール群、WS 群と比較して有意な脳浮腫形成抑制作用を認めた。

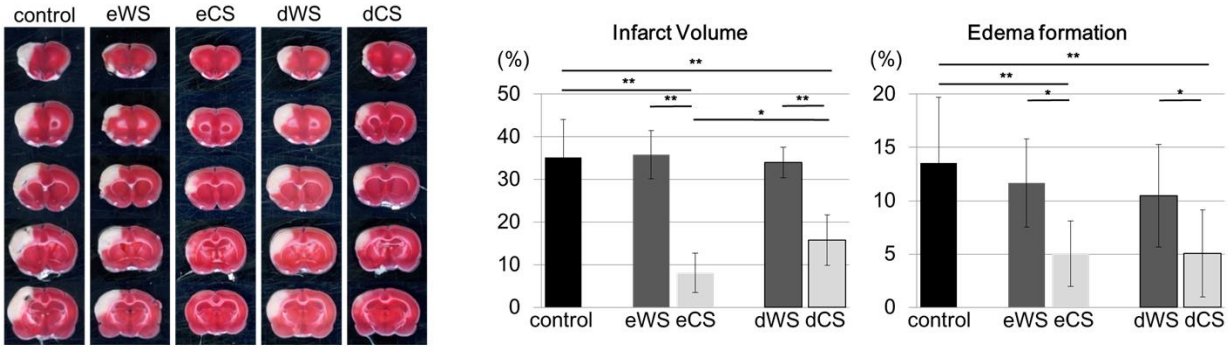


Figure 21. ***Coronal brain sections of TTC stain and the analysis of infarct volume and brain edema.*** In rats of the eCS group and the dCS group, infarct volumes was significantly decreased. Furthermore, infarct volume in the dCS group was significantly greater than that of eCS group.
In a quantitative analysis of edema formation, the edema volume was significantly decreased not only in the eCS group but also in the dCS groupcompared with the control group. There were also significant difference between the eCS group and the eWS group, as well as the dCS group and the dWS group. (*p<0.05, **p<0.01)

5) Neuronal Apoptosis

MCAO 後の神経細胞死の評価を CC3+NeuN の二重免疫組織染色にて行った。CC3 の発現は cell apoptosis を示唆し、NeuN の発現は viable な神経細胞そのものを示唆する。
ischemic core 領域では CC3・NeuN 発現に各群間の明らかな差は認めなかった。penumbra 領域(Fig 22)ではコントロール、eWS 群では CC3 陽性細胞の発現増加を認め、それに伴い NeuN 陽性細胞は減少していた。逆に、eCS 群では CC3 陽性細胞は減少し、NeuN 陽性細胞は増加していた。この所見は eCS 群における神経細胞死抑制を示唆した。
定量的な評価においても penumbra 領域では eCS 群で有意な CC3 陽性細胞の減少(p<0.01)と、NeuN 陽性細胞の増加(p<0.01)を認めた。
eCS 群と dCS 群の比較では、CC3 陽性細胞発現抑制、Neu N 陽性細胞発現維持の作用は eCS 群の方が有意(p<0.01)に強固であり、より早期の治療介入にて神経細胞死をより強固に抑制できると考えられた。

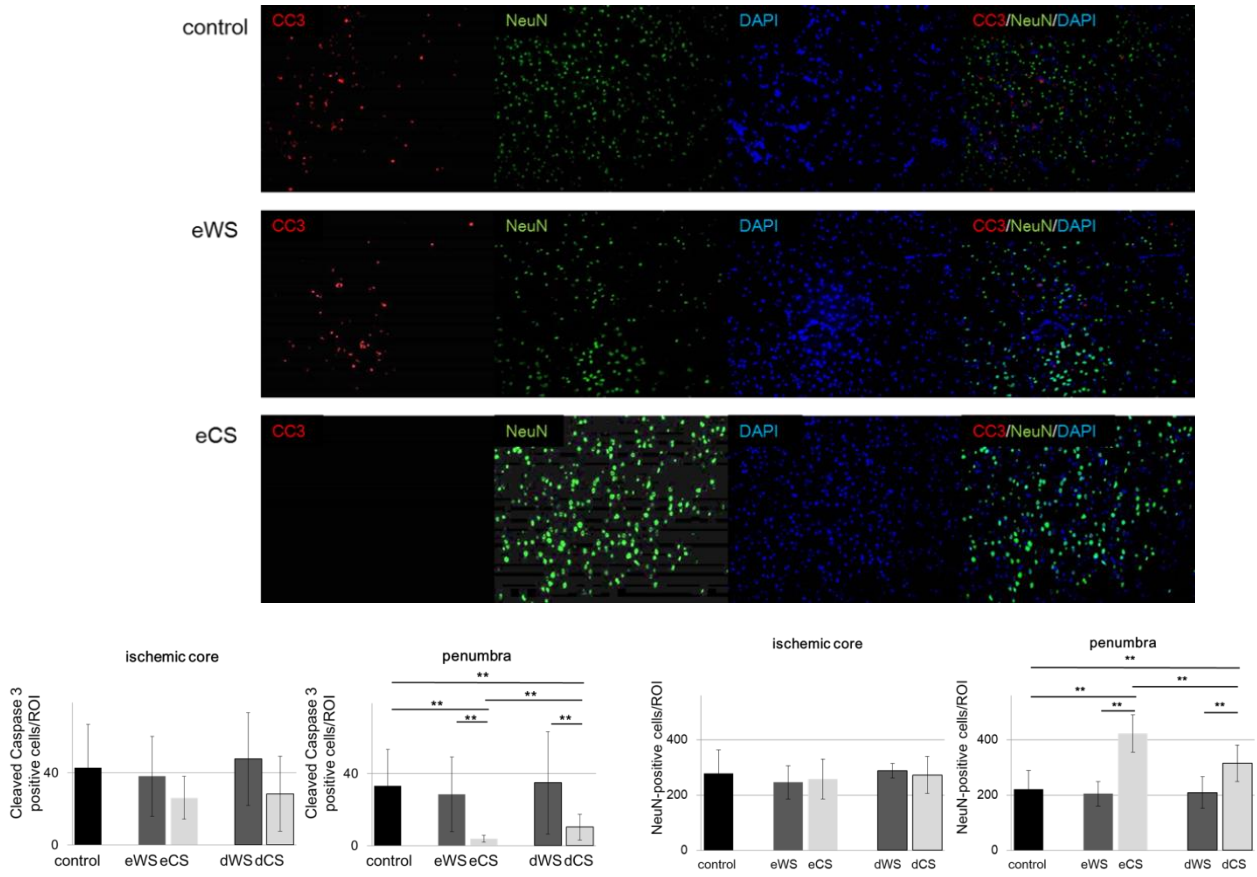


Figure 22. ***FIHC analysis for neuronal apoptosis.*** In both the control and the eWS group, CC3 was frequently expressed accompanied with the reduction of viable neuronal cell (Neu N positive cell). On the other hand, CC3 expression was strongly suppressed with preserved viable neuronal cells, in the eCS group. A quantitative analysis for the number of CC3-positive cells revealed that the apoptotic cell number was significantly lower in the eCS group than that in the control group and the eWS group, in the area of 'penumbra'. Furthermore, the number of viable neuronal cells was significantly retained in the eCS group compared to the control and the eWS group. Although the similar significant difference was observed between the control group, dWS group, and dCS group, the treatment effects on both suppression of cell apoptosis and preservation of viable neuronal cells were stronger in eCS group than that of dCS group. (*p<0.05, **p<0.01)

6) Reactive gliosis

MCAO 後の反応性神経膠症は、アストロサイト活性化(GFAP-FIHC)とミクログリアの活性化(Iba1-FIHC)の検討を行った。
GFAP 染色(Fig 23)は penumbra 領域での発現亢進がコントロール群、eWS 群では著明に認められたものの、eCS 群ではこの反応は抑制されていた。定量的評価でも、penumbra 領域においては、eCS 群で有意な(p<0.01)GFAP 陽性面積

の亢進抑制作用を認めた。これは dCS 群でも同様に(p<0.01)認められた。経動脈的局所脳低温は penumbra 領域でのアストロサイト活性化を抑制していた。また、Iba1 染色(Fig24)でも penumbra 領域においてコントロール群、eWS 群の著明な発現亢進を認めたが、これは eCS 群では抑制されていた。定量的評価でも、penumbra 領域では、eCS 群の有意な(p<0.01)Iba1 陽性細胞の発現抑制を認めた。dCS 群でも同様な作用(p<0.05)を認めたが、その作用は eCS 群の方が dCS 群より強固である傾向があった。

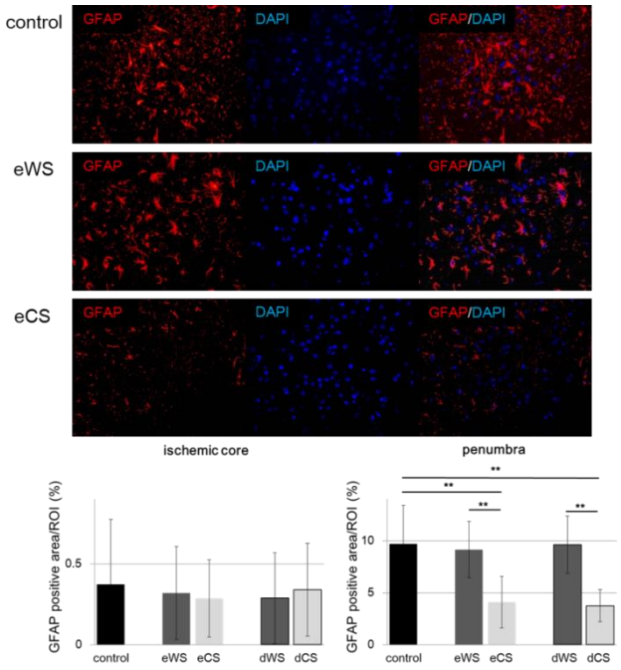


Figure 23. ***FlIHC analysis for astrocyte activation.*** In both the control and the eWS group, GFAP was remarkably expressed reflecting activated astrocyte. On the other hand, the astrocyte activation was strongly suppressed in eCS group. A quantitative analysis for activated astrocyte demonstrated that significant reduction in the eCS group compared to that in the control group and eWS group in the area of 'penumbra'. Likewise, GFAP-positive area was significantly reduced in dCS group than that in the control group and dWS group. There was no significant difference between the eCS group and the dCS group (*p<0.05, **p<0.01)

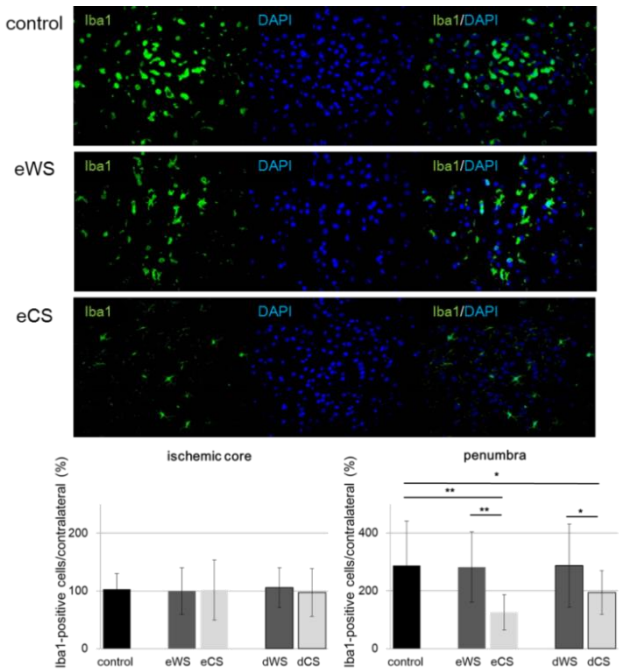


Figure 24. ***FIHC analysis for microglial activation.*** In both the control and the eWS group, Iba1-positive microglia, especially amoeboid shape, was remarkably increased. On the other hand, in eCS group, decreased number of Iba-1 positive cells was observed, and most of these cells were the ramified shape. The quantitative analysis demonstrated the significant suppression of microglial activation in the eCS group compared with that in the control group and in the eWS group. The similar statistically significant difference was observed among the control group, the dWS group, and the dCS group. (*p<0.05, **p<0.01)

【考察】

脳梗塞超急性期治療の治療として tPA 静注療法[6,15]や経動脈的血栓回収療法[2,3]は有効な治療として広く普及しており、適切な治療によってその虚血性脳損傷を軽減することが可能となる。しかし、閉塞血管再開通に成功したとしても虚血再灌流傷害(I/R injury)は残された重要な克服すべき課題である。経動脈的局所脳低温治療が I/R injury に対して強い神経保護作用を有すること[18,21-26]や、本治療が血管内治療のアプローチから実施可能であることから、本治療は閉塞血管再開通治療を行った後の追加治療としての臨床応用が現実的であると考えられている[18]。

そこでこれまでの基礎研究では tMCAO model を用いてその神経保護作用が検証されてきた。tMCAO model は I/R injury を模す代表的な脳梗塞モデル[28,43]であり、虚血脳組織への完全な再開通[43,46,47]を再現できる。しかし、実臨床では閉塞血管再開通を目指した適切な治療を行ったとしても、本モデルのように虚血領域の完全なる再灌流を得られるケースばかりではない。最近発表された、最新のデバイスや技術を駆使した血管内治療による大規模な報告[2,3]ですら完全な再開通状態を得られる例は 25-30%とされている。大半の患者は部分再開通状態(partial reperfusion)で治療を終える。

今回、我々が使用した craniotomy MCAO model も代表的な脳梗塞モデル[43,44]であるが、これは MCA 遠位部の永久閉塞(permanent MCAO, pMCAO)と CCA の一時閉塞を組み合わせたもので partial reperfusion injury model[43,46,48]とも呼ばれ、実臨床をよく反映したモデルと言える。本研究では経動脈的局所脳低温が partial reperfusion injury モデルに対しても、強固な神経保護作用を有することを示した。この結果は、本治療の臨床的な広い汎用性を示唆し臨床応用に向けた期待がさらに高まるものである。

また本研究結果にでは、eCS 群と dCS 群の治療効果には有意な差があり、脳虚血後より早期の経動脈的局所脳低温の実施がより良好な治療効果をもたらすことを示した。過去にも同様の報告[27]があり、経動脈的局所脳低温は可能な限り速やかに導入することが望ましいと考えられた。

ま今回神経細胞死と反応性神経膠症を脳虚血後の神経機能障害の評価のために検討したが、これらは重要な治療ターゲットとしても検討[8,49]されている。現在のところ、前章で認めた AQP4 抑制作用や抗炎症作用との関連の詳細は不明であるが、この神経細胞死抑制や反応性神経膠症抑制も経動脈的局所脳低温の脳保護作用の重要な現象であると考えられた。

考　察

本研究では、経動脈的局所脳低温による I/R injury に対する強い神経保護作用を証明し、その作用機序として超急性期 AQP4 発現亢進の関与と、それに伴うアストロサイト終足の膨化、微小血管狭小化の関与を示した。加えて、この治療が部分再灌流傷害に対しても有効であることも証明した。

本治療は、血管内治療によるアプローチで実施可能で、冷却した生理食塩液を使用するのみで治療できるため、比較的容易に臨床応用にトランスレーション出来る可能性は高いと考えられる。過去の基礎実験[18,21-26]や我々の今回の検討においてその神経保護作用は確実で強固なものであることが示され、脳梗塞治療の新たなブレークスルーとなり得るものと考えている。

この強い神経保護作用を考察した場合、全身低体温治療とはまた異なる作用が考察される。全身低体温治療によって強い神経保護作用を得るためには十分な時間(duration)と深度(depth)の全身冷却を要する[7]。しかし、本治療はわずか 15 分の治療時間、30 分から 1 時間程度の脳冷却効果のみで、著明な神経保護作用をもたらしている。脳温もわずかに約 2℃程低下させるのみである。この、全身低体温治療と比較してより短時間で緩やかな脳冷却のみで強い神経保護作用をもたらすことは、経動脈的局所脳低温の特徴でありメリットの一つである。この全身低体温とは異なる点を説明するには、その異なる冷却システムが考察される。経動脈的局所脳低温はまず脳微小血管から冷却効果を脳実質へと波及させる。治療によって、まず血管内皮細胞やその周囲構造物が冷却される。この血管内皮細胞を中心とした、直接的かつ集中的で速やかな冷却が強固な神経保護作用をもたらす要因の一つであると考えられた。しかし、この詳細なメカニズムの解明には更なる研究が必要である。

本研究はラットを使用した実験でありこの結果がそのままヒトに反映されるかはまだ検討されていない。動物種によって虚血性中枢神経傷害は異なる反応を示すことが知られている。臨床応用においては、冷却生理食塩水の投与時間、投与量などを最適にするための検討が必要になると考える。また、臨床における血管再開通は実験のように一気に完全再開通する場合ばかりではなく、段階的に再開通することも有り得る。このような状況では、異なる治療アプローチが必要になる可能性もあり、人工酸素運搬体の使用[30]などが一つの候補になるかもしれない。

総括および結論

本研究によって以下の新たな知見が得られた。

1) 経動脈的局所脳低温は速やかで効果的な局所脳冷却を実現し、I/R injury に対して強固な神経保護作用（神経症状改善、脳梗塞・浮腫縮小、BBB 破綻の軽減など） をもたらす。

2) 本治療の重要な作用機序として、抗炎症作用だけでなく、微小血管での AQP4 発現抑制効果や引き続いて起こるアストロサイト終足の膨化、微小血管内腔狭小化抑制効果を認める。

3) また、本治療は閉塞血管再開通治療後の部分再開通状態を模す脳梗塞モデル(craniotomy MCAO model)に対しても神経細胞死抑制や反応性神経膠症抑制を介した強い神経保護作用を有する。

以上の知見から、経動脈的局所脳低温は実現可能性・治療有効性ともに高い治療であり今後の急性期脳梗塞の新たな選択肢になり得ると考えられた。上記知見を踏まえてさらに詳細な新規作用機序の解明や、臨床応用に向けたデータ収集のための基礎研究の蓄積が望まれる。
また、現状では本治療をヒトに臨床応用した際に、ラットでの動物実験と同等の効果をもたらすのかは不明である。ヒトに近い動物種での基礎実験が望まれる。さらに、本治療の臨床応用を考慮した場合、その適切な方法（冷却生理食塩液の温度、投与経路、投与時間など）を詳細に検討した研究はまだ無い。今後は、この点に着目しての研究の発展が必要であろう。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会をくださいました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野　寶金清博教授に謝意を表します。併せて本研究全般にわたり、直接ご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野　鐙谷武雄助教に深く感謝いたします。
また、電子顕微鏡による解析にご協力をいただいた北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野　清水宏教授、北海道大学大学院医学研究科医歯学総合研究棟中央研究部門　中村秀樹助手に深く感謝いたします。
最後に、本研究にご協力いただきました四戸由美子実験助手、長島里香実験助手、その他の脳神経外科教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1 Berkhemer, O. A. *et al.* A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 372, 11-20 (2015).

2 Campbell, B. C. *et al.* Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N. Engl. J. Med.* 372, 1009-1018 (2015).

3 Goyal, M. *et al.* Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 372, 1019-1030 (2015).

4 Nakagawara, J. *et al.* Thrombolysis with 0.6 mg/kg intravenous alteplase for acute ischemic stroke in routine clinical practice: the Japan post-Marketing Alteplase Registration Study (J-MARS). *Stroke* 41, 1984-1989 (2010).

5 Minematsu, K. *et al.* Guidelines for the intravenous application of recombinant tissue-type plasminogen activator (alteplase), the second edition, October 2012: a guideline from the Japan Stroke Society. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 22, 571-600 (2013).

6 Prabhakaran, S., Ruff, I. & Bernstein, R. A. Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA.* 313, 1451-1462 (2015).

7 van der Worp, H. B. *et al.* Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain* 130, 3063-3074 (2007).

8 Yenari, M. A. & Han, H. S. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 267-278 (2012).

9 Maier, C. M. *et al.* Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 29, 2171-2180 (1998).

10 Busto, R., Dietrich, W. D., Globus, M. Y. & Ginsberg, M. D. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke* 20, 1113-1114 (1989).

11 Hypothermia after Cardiac Arrest Study, G. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* 346, 549-556 (2002).

12 Bernard, S. A. *et al.* Treatment of comatose survivors of out-of-hospital

cardiac arrest with induced hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 346, 557-563 (2002).

13 McIntyre, L. A. *et al.* Prolonged therapeutic hypothermia after traumatic brain injury in adults: a systematic review. *JAMA.* 289, 2992-2999 (2003).

14 Clifton, G. L. *et al.* Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N. Engl. J. Med.* 344, 556-563 (2001).

15 Hemmen, T. M. *et al.* Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke* 41, 2265-2270 (2010).

16 Lyden, P. D. *et al.* Endovascular therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ICTuS 2/3 protocol. *Int. J. Stroke* 9, 117-125 (2014).

17 van der Worp, H. B., Macleod, M. R., Kollmar, R. & European Stroke Research Network for, H. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1079-1093 (2010).

18 Esposito, E., Ebner, M., Ziemann, U. & Poli, S. In cold blood: intraarteral cold infusions for selective brain cooling in stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 743-752 (2014).

19 Oku, T. *et al.* The influence of focal brain cooling on neurophysiopathology: validation for clinical application. *J. Neurosurg.* 110, 1209-1217 (2009).

20 Clark, D. L. & Colbourne, F. A simple method to induce focal brain hypothermia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 115-122 (2007).

21 Ding, Y. *et al.* Prereperfusion flushing of ischemic territory: a therapeutic study in which histological and behavioral assessments were used to measure ischemia-reperfusion injury in rats with stroke. *J. Neurosurg.* 96, 310-319 (2002).

22 Ding, Y. *et al.* Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 33, 2492-2498 (2002).

23 Ding, Y. *et al.* Local saline infusion into ischemic territory induces regional brain cooling and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosurgery* 54, 956-964; discussion 964-955 (2004).

24 Ding, Y. *et al.* Reduced inflammatory mediator expression by

pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rats: a real-time polymerase chain reaction analysis. *Neurosci. Lett.* 353, 173-176 (2003).

25 Ding, Y. H., Li, J., Rafols, J. A. & Ding, Y. Reduced brain edema and matrix metalloproteinase (MMP) expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rat. *Neurosci. Lett.* 372, 35-39 (2004).

26 Luan, X. *et al.* Regional brain cooling induced by vascular saline infusion into ischemic territory reduces brain inflammation in stroke. *Acta Neuropathol.* 107, 227-234 (2004).

27 Zhao, W. H. *et al.* Local mild hypothermia induced by intra-arterial cold saline infusion prolongs the time window of onset of reperfusion injury after transient focal ischemia in rats. *Neurol. Res.* 31, 43-51 (2009).

28 Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S. & Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84-91 (1989).

29 Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472-476 (1986).

30 Shimbo, D. *et al.* Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury. *Brain Res.* 1554, 59-66 (2014).

31 Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. & Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26, 627-634; discussion 635 (1995).

32 Wang, Z. *et al.* Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 52-57 (2011).

33 Ito, U., Hakamata, Y., Kawakami, E. & Oyanagi, K. Temporary cerebral ischemia results in swollen astrocytic end-feet that compress microvessels and lead to delayed focal cortical infarction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 328-338 (2011).

34 Ostergaard, L. *et al.* The role of the microcirculation in delayed cerebral ischemia and chronic degenerative changes after

subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1825-1837 (2013).

35 Castejon, O. J. Morphological astrocytic changes in complicated human brain trauma. A light and electron microscopic study. *Brain Inj.* 12, 409-427; discussion 407 (1998).

36 Nielsen, S. *et al.* Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 171-180 (1997).

37 Friedman, B. *et al.* Acute vascular disruption and aquaporin 4 loss after stroke. *Stroke* 40, 2182-2190 (2009).

38 Agre, P. *et al.* Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542, 3-16 (2002).

39 Karibe, H., Zarow, G. J., Graham, S. H. & Weinstein, P. R. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 620-627 (1994).

40 Olah, L., Wecker, S. & Hoehn, M. Secondary deterioration of apparent diffusion coefficient after 1-hour transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1474-1482 (2000).

41 Katada, R. *et al.* Greatly improved survival and neuroprotection in aquaporin-4-knockout mice following global cerebral ischemia. *FASEB. J.* 28, 705-714 (2014).

42 Igarashi, H., Huber, V. J., Tsujita, M. & Nakada, T. Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic cerebral edema. *Neurol. Sci.* 32, 113-116 (2011).

43 Fluri, F., Schuhmann, M. K. & Kleinschnitz, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug. Des. Devel. Ther.* 9, 3445-3454 (2015).

44 Sugiyama, T. *et al.* Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. *Neurosurgery* 68, 1036-1047; discussion 1047 (2011).

45 Saito, H. *et al.* 123I-iomazenil single photon emission computed tomography visualizes recovery of neuronal integrity by bone marrow stromal cell therapy in rat infarct brain. *Stroke* 44, 2869-2874 (2013).

46 Zhao, H. & Steinberg, G. Limited Therapeutic Time Windows of Mild-to-Moderate Hypothermia in a Focal Ischemia Model in Rat. *Stroke. Res. Treat.* 2011, 131834 (2011).

47 Tang, Z. *et al.* Protective effects of erythropoietin on astrocytic swelling after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation: mediation through AQP4 expression and MAPK pathway. *Neuropharmacology* 67, 8-15 (2013).

48 Takahashi, T., Steinberg, G. K. & Zhao, H. Lithium treatment reduces brain injury induced by focal ischemia with partial reperfusion and the protective mechanisms dispute the importance of akt activity. *Aging Dis.* 3, 226-233 (2012).

49 Gao, Z. *et al.* Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.* 48, 690-701 (2013).