



Title	新規人工酸素運搬体 stroma-free hemoglobin nanoparticle による脳虚血再灌流傷害に対する神経保護効果に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	館澤, 諒大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15904号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92120
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TATEZAWA_Ryota_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 舘澤 諒大

学 位 論 文 題 名

新規人工酸素運搬体 stroma-free hemoglobin nanoparticle による

脳虚血再灌流傷害に対する神経保護効果に関する研究

(Studies on neuroprotective effects of a hemoglobin-based oxygen carrier

(stroma-free hemoglobin nanoparticle) for ischemia reperfusion injury)

【背景と目的】近年、急性期脳梗塞治療は早期の閉塞血管の再開通を目指し、rt-PA 静注療法や血栓回収療法が多く行われ、血栓回収療法の適応例や適応時間が大きく拡大してきている(Nogueira et al., 2018)。しかし、再開通後の著明な脳浮腫や出血による症状の増悪を認める脳虚血再灌流傷害が生じることがあり(Zhou et al., 2023)、未だ効果的な治療法はまだ確立していない(Mizuma et al., 2018)。これまで我々は再灌流後早期に生じる脳微小血管の狭小化による循環不全に着目し(Ito et al., 2011)、赤血球より微小な酸素運搬体である Hemoglobin (Hb) を基盤とした人工酸素運搬体 Hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC)による神経保護効果を研究してきた。1つの Hb と3つのヒト血清アルブミン Human serum albumin(HSA)のクラスターである Hb-HSA₃の経動脈投与による神経保護効果を報告してきたが(Gekka et al., 2018; Ito et al., 2020)、Hb の自動酸化による metHb 化により酸素運搬能が低下することが課題であった(Hosaka et al., 2014)。そこで、抗酸化能を付与した HBOC 製剤を使用することで更なる治療効果の増強を図り、治療汎用化のため経静脈投与での実験を行った。

【方法】全ての実験で8週のSDラットの雄（体重265-320）に対し、糸栓子を用いた一過性中大脳動脈閉塞モデルを用い、2時間虚血後、再灌流時に製剤を6ml/kg、5分間で静脈投与し、その後評価を行った。第一章では、抗酸化能を強化した各種 HBOC 製剤による治療効果を再灌流後24時間で検証し、最も治療効果の高い製剤を選定した。(1)白金ナノ粒子 Platinum nanoparticle (PtNP)+Hb-HSA₃、(2)カタラーゼとアルブミンを結合させた Catalase albumin cluster (C-Act)+Hb-HSA₃、(3)フリーラジカルスカベンジャーである Edaravone + Hb-HSA₃、(4)カタラーゼが内包された新規 HBOC である Stroma-free hemoglobin nanoparticle (SFHbNP) の以上4種類の抗酸化能を付与した HBOC 製剤を使用した（各 n=3-5）。評価は神経症状（18-point neurological scale score）、脳切片の2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色から計測した脳梗塞、脳浮腫体積を用いた。第二章では、選定された新規 HBOC である SFHbNP を用い、2時間虚血/再灌流後24時間の評価で、神経保護効果を検証した。(1)Phosphate-buffered saline (PBS) 群、(2)Hb-HSA₃群、(3)SFHbNP 群の3群（各 n=10）で血圧や動脈血ガスの変化、神経症状、脳梗塞/脳浮腫体積、病理学的評価（脂質酸化ストレス: 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE)、白血球遊走: Myeloperoxidase (MPO)、血液脳関門 (BBB) の破綻: Rat IgG) として Western blotting (WB)、組織免疫染色で評価した。第三章では、再灌流早期での微小循環不全に対する治療効果を検証するため、実験(1)微小血管内の赤血球及び HBOCs の存在の検討、実験(2)再灌流早期の脳血流 (CBF)、脳組織酸素分圧 (PtO₂) の検討、実験(3)再灌流早期での HBOCs の血管外漏出について評価を行った。実験(1)では第二章同様の3群比較で再灌流直後、2時間後、6時間後（各 n=4）に屠殺し、無灌流の脳切片を PBS 群は抗ラット Hb 抗体、HBOC 群は抗ヒトアルブミン抗体で免疫染色を行い、ペナンプラ領域の5視野を無作為抽出し、微小血管（< 20 μm）で染色陽性血管数を比較した。実験(2)は同様の3群で（各 n=5）、虚血前後、再灌流前後、2時間後、6時間後に脳血流 (CBF)、組織酸素分圧 (PtO₂) を測定し比較した。実験(3)は Hb-HSA₃

群、SFHbNP 群を用い（各 n=4）、再灌流 2 時間後、6 時間後で屠殺し、灌流固定した脳切片を抗ヒトアルブミン抗体で免疫染色し、血管外漏出した HBOC の面積を比較した。

【結果】第一章は、神経症状、脳浮腫体積で有意差を認めなかったが、梗塞体積で SFHbNP 群が PBS 群と比較して縮小を認めたため ($P<0.05$)、今後の研究は SFHbNP を用いて行うこととした。第二章では、HBOCs 投与による血圧、動脈血ガスの変動は認めず、神経症状は HBOCs 群で改善を認め ($P<0.01$)、脳梗塞/脳浮腫体積では SFHbNP 群が PBS 群と比較し縮小を認めた ($P<0.05$)。WB では、4 HNE、MPO、Rat IgG は PBS 群、Hb-HSA₃ 群、SFHbNP 群の順に発現低下を認め、MPO、Rat IgG では PBS 群と SFHbNP 群で有意差を認めた ($P<0.05$)。免疫染色も同様の傾向にあった。第三章は、実験(1)において PBS 群は再灌流後 Hb 陽性血管が減少したが ($P<0.05$)、Hb-HSA₃ 群、SFHbNP 群は再灌流 2 時間後、6 時間後で PBS 群より HBOC 陽性血管数が多かった ($P<0.05$)。実験(2)において PBS 群は CBF、PtO₂ 共に再灌流後低下した (-2 時間 vs 6 時間、 $p<0.05$)。Hb-HSA₃ 群、SFHbNP 群の CBF は高値を保ったが、PtO₂ では Hb-HSA₃ 群は 6 時間後には低下し (2 時間 vs 6 時間、 $p<0.01$)、SFHbNP 群は再灌流後から高い状態が維持された。実験(3)において、SFHbNP 群は Hb-HSA₃ 群と比較し再灌流 2 時間後、6 時間後ともに血管外漏出が少ない結果であった ($P<0.05$)。

【考察】SFHbNP は脳虚血後再灌流時に静脈投与することで有力な神経保護効果を示した。その要因を探るため、再灌流後早期の微小循環不全での検討を試みると、Hb-HSA₃ 群、SFHbNP 群いずれも微小循環を改善させたが、Hb-HSA₃ は 6 時間後の PtO₂ の低下を来した。一方、SFHbNP は 6 時間後も PtO₂ が維持されており、この高い酸素運搬能が効果的な神経保護に繋がった可能性が示唆された。SFHbNP の高い酸素運搬能については、粒子内に存在するカタラーゼの抗酸化能が metHb 化を抑制していることが関与しているものと考えられた。また、BBB 破綻による血管外漏出は、Hb-HSA₃(直径 15nm)より SFHbNP(直径 90nm)の粒子径が大きいため漏出が少なく、灌流量が維持されたことも神経保護効果に関与した可能性がある。

【結論】SFHbNP の経静脈投与により、脳虚血再灌流傷害に対し、酸化ストレスや白血球遊走、BBB 破壊の減少をもたらすことで、神経症状の改善や脳梗塞/脳浮腫の軽減といった有用な神経保護効果を示した。また、SFHbNP は虚血後再灌流早期における脳微小循環不全を改善し、高い酸素運搬能により早期から組織酸素レベルを高く維持し、かつ低い血管外漏出作用により、強い神経保護効果を来す可能性がある。