



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15904
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92122
Type	doctoral thesis
File Information	TATEZAWA_Ryota.pdf



学 位 論 文

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)

2024 年 3 月

北海道大学

舘澤 諒大

学 位 論 文

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)

2024 年 3 月

北海道大学

舘澤 諒大

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第一章 抗酸化作用を付与した各種人工酸素運搬体制剤による脳虚血再灌流傷害への神経保護効果の比較検討	
緒言	8 頁
方法	9 頁
結果	16 頁
考察	18 頁
第二章 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の検討	
緒言	19 頁
方法	20 頁
結果	24 頁
考察	27 頁
第三章 脳虚血再灌流傷害早期における stroma-free hemoglobin nanoparticle の治療効果機序の検討	
緒言	29 頁
方法	29 頁
結果	32 頁
考察	36 頁
考察	37 頁
総括および結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 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した。

Ryota Tatezawa, Takeo Abumiya, Yasuhiro Ito, Masayuki Gekka,
Wataru Okamoto, Kohta Ishii, Natsumi Kohyama, Teruyuki Komatsu,
Miki Fujimura

論文名

“Neuroprotective effects of a hemoglobin-based oxygen carrier
(stroma-free hemoglobin nanoparticle) on ischemia reperfusion injury”

雑誌

Brain Research. Volume 1821, 15 December 2023, 148592

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ryota Tatezawa, Takeo Abumiya, Yasuhiro Ito, Masayuki Gekka,
Wataru Okamoto, Natsumi Kohyama, Teruyuki Komatsu, Miki
Fujimura

演題名：Neuroprotective effects of a newly developed hemoglobin-
based oxygen carrier (hemoglobin nanoparticle) on ischemia
reperfusion injury

学会名：Brain & Brain PET 2023, 12 - 15 June 2023, Brisbane,
Australia, The Brisbane Convention and Exhibition Centre

2. 舘澤諒大, 鏡谷武雄, 伊藤康裕, 月花正幸, 岡本航, 高山夏実, 小松晃之, 藤村
幹

演題名：新規人工酸素運搬体 stroma-free hemoglobin nanoparticle の脳虚
血再灌流傷害に対する神経保護効果

学会名：日本脳神経外科学会 第 82 回学術総会、2023 年 10 月 26 日、パシ
フィコ横浜・会議センター

要旨

【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265-320g)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種類で評価した(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)染色により脳梗塞/脳浮腫体積を計測した。

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 群間(各 n=10)で血圧や動脈血ガスデータの変化、神経症状、脳梗塞/脳浮腫体積、病学的評価(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、ペナングラ領域の 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 群で行い(各 n=5)、虚血前後、再灌流前後、2 時間後、6 時間後にそれぞれ CBF、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、脳浮腫体積において各群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 投与群で改善を認め(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 は高値を保持したが、PtO₂では Hb-HSA₃群は 6 時間後には低下したが(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の低下を来たした。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 は経静脈投与により、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。

略語表

BBB = blood-brain barrier
C-Act= Catalase albumin cluster
CBF= Cerebral blood flow
CCA= common carotid artery
DAB= 3,3' -diaminobenzidine
ECA= external carotid artery
HA = Hb-HSA₃
Hb= hemoglobin
HBOCs= Hemoglobin-based oxygen carriers
H₂O₂=hydrogen peroxide
HSA=human serum albumin
ICA= internal carotid artery
MCA= middle cerebral artery
MPO= myeloperoxidase
OA= occipital artery
PBS =phosphate-buffered saline
PEG-Hb=polyethyleneglycol Hemoglobin
PNPH = Polynitroxylated Pegylated Hemoglobin
PPA= pterygopalatine artery
PtNP = Platinum Nanoparticle
PtO₂ = tissue partial Oxygen pressure
RBC = red blood cell
rt-PA= recombinant tissue plasminogen activator
STA= superior thyroid artery
SFHbNP= Stroma-free Hemoglobin Nanoparticle
TTC= 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
tMCAO= transient middle cerebral artery occlusion
4HNE=4-hydroxy-2-nonenal

緒言

近年、急性期脳梗塞の治療は、rt-PA 静注療法だけでなく、特に血管内治療による機械的血栓回収療法の有効性が数多く示されている (Albers et al., 2018; Campbell et al., 2015; Goyal et al., 2015; Jovin et al., 2015)。また、多くの臨床研究から therapeutic time window の延長が期待できることが示され (Nogueira et al., 2018; Saver et al., 2015)、更には重篤な広範囲虚血例においても治療効果が示され、益々治療適応の拡大がなされてきている (Yoshimura et al., 2022)。しかしながら、急性期治療により早期に閉塞血管の再開通が得られたとしても、脳虚血再灌流傷害による著明な脳浮腫や出血を来し梗塞の増悪を認める機会も増えてきている (Zhou et al., 2023)。この脳虚血再灌流傷害の軽減目的にこれまで様々な研究がなされているが、臨床的に効果的な治療法はまだ確立されておらず、大きな課題である (Mizuma et al., 2018; Powers et al., 2019)。

これまで、脳虚血再灌流傷害に対して様々な脳保護療法が研究されてきているが、その一つに人工酸素運搬体による治療が挙げられる。人工酸素運搬体 (Hemoglobin based oxygen carriers: HBOCs) は赤血球に比べて粒径が小さく粘度の低い性質を持っており、微小血管内での良好な灌流ならびに酸素運搬が期待されている。虚血再灌流障害の病理学的機序の一つに no-reflow 現象と呼ばれる微小血管灌流障害がある。完全再開通後でも二次的な梗塞拡大を来すなど近年報告が増えてきている (Hu et al., 2023; Mujanovic et al., 2023)。この機序として、再灌流後早期の Astrocyte の end foot の膨化 (再灌流後 3-8 時間) (Ito et al., 2011)、pericyte の酸化ストレス依存性の収縮反応 (再灌流後 2 時間以内) (Korte et al., 2022; Zhou et al., 2022) により微小血管の狭小化を来し、赤血球の通過障害による微小循環不全を引き起こす事が想定されている。動物実験では、再灌流後 2 時間前後で生じる post-ischemic delayed hypoperfusion と呼ばれる脳血流低下現象としても報告されている (再灌流後 2 時間以内) (Karibe et al., 1994)。このような病態において、赤血球より粒径が小さい HBOC が良好な灌流ならびに酸素運搬をもたらす no-reflow 現象を抑制することが期待される。

我々はこれまで、中央大学理工学部応用化学科、小松研究室で開発された HBOC である、Hb 1 分子にヒト血清アルブミン 3 分子を架橋結合したヘモグロビン-アルブミン複合体である Hb-HSA₃ を使用し、虚血再灌流障害に対する神経保護効果を報告してきた (Gekka et al., 2018; Ito et al., 2020)。Hb-

HSA₃の動脈投与により、微小血管への灌流と酸素運搬、また共有結合しているアルブミンが持つ抗酸化作用により血管内皮障害や炎症反応の活性化を抑制し、脳梗塞による神経症状の改善と梗塞体積の縮小をもたらした(Gekka et al., 2018)。また、10°Cに冷却した Hb-HSA₃を経動脈的に投与することで、より強い脳梗塞縮小効果や抗浮腫効果を得ることも認めた(Ito et al., 2020)。

しかしながら HBOC 製剤が有する避けられない特性として、Hb-HSA₃は分子内の Hb が徐々に自動酸化し、その過程で生成されるスーパーオキシド、過酸化水素(H₂O₂)がさらに Hb を酸化し metHb 化してしまうことで、酸素運搬能が低下することが知られていた。(Hosaka et al., 2014)。そこで、HBOC に抗酸化能を付与することで自動酸化を防ぎ、酸素運搬能を維持することで治療効果の向上が期待されるのではないかと着想を得て、抗酸化能が強化された HBOC 製剤を用いて神経保護効果を検証する研究を行う事を計画した。また、これまでの研究では急性期血栓回収療法を想定し経動脈投与による治療効果の研究を行ってきたが、抗酸化作用を付与することで治療効果の向上が期待されるため、治療汎用性を拡大する目的に経静脈投与による脳虚血再灌流傷害への神経保護効果の検証を行う。

第一章では、抗酸化能を強化した各種 HBOC 製剤を用意し、脳虚血再灌流モデルラットに経静脈投与を行い、脳虚血再灌流傷害に対する治療効果の検証を行い、最も治療効果の高い製剤を選定する実験について報告している。第二章では、第一章の実験で選定された stroma-free hemoglobin nanoparticle (SFHbNP) を用いて、脳虚血再灌流傷害に対する治療効果の詳細な検証について報告をしている。第三章では、治療効果の作用機序について、再灌流後早期の微小循環における自己赤血球と SFHbNP の灌流状態や組織酸素分圧を比較することで SFHbNP の微小循環改善効果を検証し報告している。

第一章

抗酸化作用を付与した各種人工酸素運搬体製剤による

脳虚血再灌流傷害への神経保護効果の比較検討

【緒言】

我々はこれまで、中央大学工学部応用化学科、小松研究室で開発された HBOCs である、Hb 1 分子にヒト血清アルブミン 3 分子を架橋結合したヘモグロビン-アルブミン複合体である Hb-HSA₃ を使用し、脳虚血再灌流傷害ラットモデルに対する神経保護効果を報告してきた (Gekka et al., 2018; Ito et al., 2020)。Hb-HSA₃ は経動脈投与にて十分な脳梗塞縮小効果を示したが、HBOC 製剤が有する避けられない特性として、Hb の自己酸化による酸素運搬能の低下が問題とされてきた。この問題を解消するために、抗酸化作用を強化した各種 HBOC 製剤を用意し、自己酸化を防ぎ、酸素運搬能を維持することにより、治療効果の向上とそれによる経静脈投与での治療汎用性の拡大を目的とした。用意した各種 HBOC 製剤について、脳虚血再灌流傷害ラットモデルに対する神経保護効果を比較検討した。

白金ナノ粒子 (Platinum Nanoparticle: PtNP) は強い抗酸化作用を持ち、それに伴って神経保護効果を示すと報告されているが (Takamiya et al., 2012)、この PtNP を Hb-HSA₃ のアルブミンに結合させた PtNP-Hb-HSA₃ が中央大学小松研究室で既に開発されており (Hosaka et al., 2014)、第 1 の製剤の候補とした。

第 2 の製剤の候補として、抗酸化物質であるカタラーゼをアルブミン 4 分子と結合させた Catalase albumin cluster (C-Act) (中央大学小松研究室で開発) を活用することを考えた。この C-Act と Hb-HSA₃ を混合することで、Hb-HSA₃ 単独の場合より良い保護効果が得られるか検討することとした。

第 3 の製剤の候補として、実臨床で使用されているフリーラジカルスカベンジャーである Edaravone (EV) と Hb-HSA₃ を混合した製剤を用意した。EV の容量はこれまでの報告を参考に 3mg/kg とした (Yamashita et al., 2009)。

第 4 の製剤の候補として、中央大学小松研究室で新たに開発された HBOC 製剤である stroma-free hemoglobin nanoparticle を用いた。これは、赤血球から採取されたヒト Hb を球状に重合させたコア周囲に HSA を共有結合さ

せた直径 90nm のナノ粒子である。また、赤血球に元々存在する抗酸化物質のカタラーゼが Hb コア内部に内包されており、この HBOC 自体が抗酸化作用を持ち合わせている特性があり (Okamoto et al., 2022)、本製剤も検証することとした。

以上の 4 種類の抗酸化作用を付与した HBOC 製剤による脳虚血再灌流傷害への治療効果を検証した。本章では、tMCAO (transient middle cerebral artery occlusion) モデルラットに対し、各製剤を大腿静脈に留置したカテーテルから経静脈投与し、24 時間後の脳梗塞体積により評価を行った。

【方法】

1) 実験動物

以下すべての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受けている。動物の管理とケアについては、動物実験に関する施設ガイドラインに従って管理されている (室温 25 °C、湿度 50 %、明暗サイクル 12 時間)。体重 250g-320g の Sprague-Dawley (SD) ラット (日本クレア株式会社、東京、日本) を使用した。術後くも膜下出血、痙攣重積、虚血が不十分で神経症状が軽いもの、MCA 領域以外の広範囲な脳梗塞、手術関連死、これらの個体は除外して実験を行った。

2) tMCAO モデル

tMCAO モデルの作成は、過去に報告されている糸栓子を用いた方法 (intraluminal suture method) を基に行った (Gekka et al., 2018; Ito et al., 2020) (Figure 1)。麻酔導入は 4% isoflurane+N₂O:O₂ (70:30) の吸入麻酔で行い、術中維持麻酔は 1.5% isoflurane+ N₂O:O₂ (70:30) にて行った。呼吸抑制が著明な場合や痛み刺激による覚醒や体動が多い場合、適宜 isoflurane を調整し麻酔深度を調整した。術中は、ホットパッドでラットの体幹を保温し、直腸温を持続的に測定し 36.5~37.5°C で維持した。

手術は、仰臥位・頸部を軽度伸展させ、頸部正中から腹側に下顎下縁から胸骨上部まで正中切開を行い、筋層を鈍的に剥離し、ゴム付きの針で各筋層、皮膚を両外側へ牽引し、右外頸動脈

(external carotid artery, ECA)、右総頸動脈 (common carotid artery, CCA) を露出させた。その際に、迷走神経刺激による呼吸抑制や、物理的な圧迫・牽引による気道狭窄を生じること

があり、注意して行った。ECA 周囲を剥離し、後頭動脈 (occipital artery, OA)、上甲状腺動脈 (superior thyroid artery, STA) が確認できるまで遠位を確保し、ECA を 7-0 絹糸で結紮し凝固切断し手前に牽引した。次にその奥に確認できる ICA を剥離し、遠位側で Pterygopalatine artery (PPA) と頭蓋内に向かう ICA への分岐を確認し、PPA を結紮した。この際強い牽引で引き抜き損傷や解離を引き起こすため、周囲の剥離を十分行い作業スペースを確保して行った。ICA、CCA が確保できたところで、糸栓子を短く切り 20mm の位置で折り曲げ印をつけてスタンバイし、脳外科手術で使用するマイクロクリップにて ICA、CCA を一時クランプし、結紮切断した ECA に小切開を加え、糸栓子を頭蓋内に向けて約 20mm を目安に挿入した。糸栓子が中大脳動脈 (middle cerebral artery, MCA) の起始部に到達すると、微かな抵抗を感じるため、それを元に挿入位置を規定した。入れすぎることによって MCA などを穿通し、くも膜下出血をきたす。その場で呼吸停止することや、神経症状の想定以上の増悪など合併症となるため、慎重な操作が求められた。良い位置に到達した後、動かないように ICA とともに、7-0 絹糸で後に解除できるような形で固定し、マイクロクリップでも固定し、そのまま皮膚を 3-0 ナイロンで縫合し閉創した。

糸栓子は、ラットの体重毎の推奨サイズに合わせて 0.37 もしくは 0.39mm のシリコンコーティングされたナイロンフィラメントを使用した (Doccol

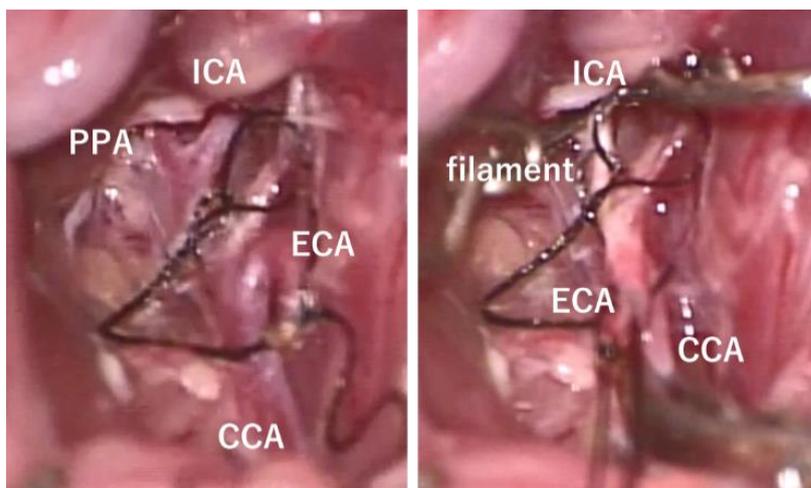


Figure 1. Intra-operative photograph of tMCAO model rat. (Left) The right CCA, ICA, ECA and PPA were exposed. The ECA was ligated. (Right) The ICA and CCA were temporarily clipped, and silicone coated monofilament was inserted toward the ICA via the ECA.

Corp., Redlands, CA, USA)。

このモデルにおいては、MCA の閉塞が不十分で脳血流低下が十分ではない場合や、糸栓子による MCA の貫通で生じたくも膜下出血など合併症のリスクがある。そのため tMCAO モデルラットは以下の inclusion criteria を設定した。tMCAO 手術前後に右 MCA が灌流する大脳半球皮質の微小血管の脳血流 (Cerebral blood flow, CBF) をレーザードプラー血流計 (OMEGAFLOW FLO-C1; OMEGAWAVE, Tokyo, Japan) にて計測し、術前後で CBF の 70% 以上の低下を認め、かつ神経症状が Bederson score (Bederson et al., 1986) にて grade 3 以上であるラットを tMCAO 成功例とし、その後の実験に使用した。

以上のようにモデルを作成した後、覚醒させ神経症状を確認し、2 時間経過時に再度全身麻酔を行い、糸栓子を抜去し ECA を凝固止血させた後に、ICA、CCA の遮断を解除し順行性の血流を再開し再灌流状態とさせ、再度創部を閉創した。

3) 経静脈的製剤投与方法

上述のように tMCAO モデル作成で再灌流時に麻酔をかけた際、右鼠径部を切開し、大腿静脈を剥離し、遮断下で小動物用カテーテル PE10 (brck LTD, Tokyo, Japan) を挿入し、7-0 絹糸で固定した。各薬剤をシリンジポンプ FP1000E (Melquest Ltd, Tokyo, Japan) を用いて、6.0ml/kg/5min の流速で持続静脈投与を行った。投与量は、これまでの研究結果を参考として、循環血液量の 10% を超えない量とし、6.0ml/kg とした (Gekka et al., 2018)。投与時に空気が混入しないようシリンジ、カテーテル内の脱気を十分に行った。

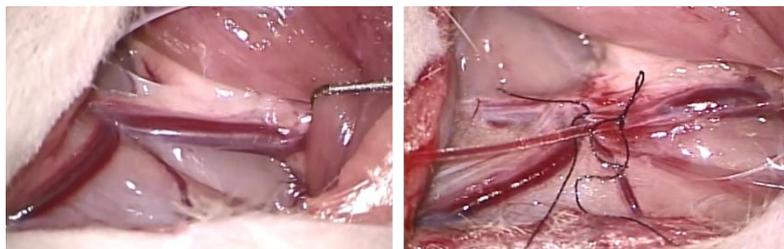


Figure 2. Intra-operative photograph of trans-venous infusion. (Left) The right femoral vein was exposed. (Right) A micro catheter was inserted into the femoral vein.

4) 薬剤

上述の抗酸化作用を付与した4種類のHBOC製剤とHb-HSA₃を比較して検討した (Figure 3.)

(1) Hb-HSA₃

Hb-HSA₃はHbコアとその周辺に共有結合したHSAで構成される非細胞型HBOCである(Tomita et al., 2013)。その粒子サイズは直径約15nmと微小で赤血球 (red blood cell, RBC) の1/500のサイズと小さく、微小循環不全を改善することをこれまでの研究で報告している(Gekka et al., 2018)。アルブミンコーティングされているため陰性荷電 (pI=5.1) しており、またRBC (P50=25 Torr) より酸素親和性が高くなっている (P50=9 Torr)。Hb-HSA₃は通常、PBS ([Hb] = 5.0 g/dL、pH 7.4) で調製されている。これまでの脳保護効果は経動脈投与による効果を示してきており(Gekka et al., 2018; Ito et al., 2020)、今回の静脈投与での治療効果は検証出来ていない。これまでの治療効果の比較対象も兼ねて選択した。投与量は6.0ml/kgとした。

(2) PtNP-Hb-HSA₃

強い抗酸化作用を有する白金ナノ粒子 (PtNP) をHb-HSA₃のアルブミンに結合する構造となっている。中央大学での報告では、Hb-HSA₃とPtNPを1:1で結合させた配合比で抗酸化作用が示されていた(Hosaka et al., 2014)。しかしTakamiyaらの報告にあるPtNPの投与量は4 μmol/kgであり、この量でHemoActと結合させると、Hb-HSA₃:PtNP-Hb-HSA₃=273:1という少ない量となり、HbのmetHb化を抑制する程の効果が認められなかった。そのため、今回はHb-HSA₃:PtNP-Hb-HSA₃=100:1となるまでPtNP量を増量し、実験を行うこととした。投与量はHb-HSA₃同様に6.0ml/kgとした。

(3) Hb-HSA₃+C-Act (1:1)、Hb-HSA₃+C-Act10 (1:10)

C-Actは抗酸化物質であるカタラーゼをアルブミン4分子と結合させて作成されている。カタラーゼの抗酸化作用は微量でも効果を発揮することが知られているが、至適投与量が不明のためHb-HSA₃とC-Actの混合比を(1)1:1、(2)1:10と設定し、投与実験を行うこととした。いずれも投与量はHb-HSA₃同様に6.0ml/kgとする。

(4) Hb-HSA₃ + Edaravone

Edaravone は実臨床で使用されているフリーラジカルスカベンジャーである。脳梗塞急性期 24 時間以内に使用され、活性酸素による二次的損傷を防ぐ目的で使用される。既に治療効果が報告された治療薬であり実臨床で使用されているため、今後の臨床応用が容易であり治療候補とした。Hb-HSA₃を事前に混合させたものを作成し、同時投与として行う。Edaravone の容量はこれまでの報告を参考に 3mg/kg とした(Yamashita et al., 2009)。投与量は Hb-HSA₃ 同様に 6.0ml/kg とする。

(5) SFHbNP

SFHbNP は stroma-free Hb を球状に重合させ、その表層を HSA で覆ったコアシェル構造の HBOC で、大きさは約 90nm である(Okamoto et al., 2022)。SFHbNP は天然の stroma-free Hb を使用しており、赤血球に含まれるカタラーゼを内包しているため抗酸化作用を有しており、Hb の自己酸化も抑制する効果がある。H₂O₂ 水溶液中でも非常に安定した O₂ 複合体を形成することがわかっている。P50 と T1/2 はそれぞれ 7 Torr と 20.7 時間であり、Hb-HSA₃ と同程度である(P50=9 Torr, T1/2=18.5 時間)。SFHbNP の投与量は過去論文と同様に 6.0ml/kg とする。

その他、vehicle 群として、PBS 群 (phosphate-buffered saline, PBS) を設けた。

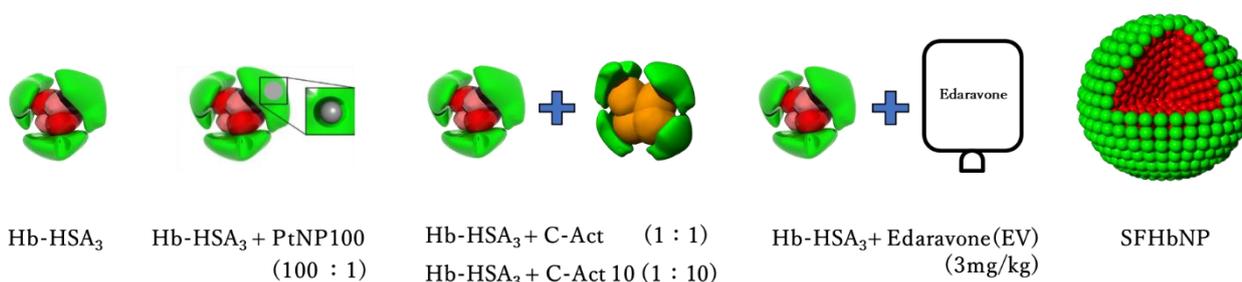


Figure 3. Structure of each formulation and mixing ratio or dose.

Structure of Hb-HSA₃ and PtNP: 論文より抜粋 (Hosaka et al., 2014). Structure of SFHbNP:論文より抜粋 (Okamoto et al., 2022)

7) 脳梗塞、脳浮腫体積評価

脳梗塞・脳浮腫体積評価は、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て6個のブロックを作成し、2% TTC溶液に37°C、20分間浸透させ染色した。染色した摘出脳は写真撮影し、Image J software (Image J 1.53e; NIH, Bethesda, MD, USA)を使用して解析した。脳梗塞体積および脳浮腫体積は以下の計算式に基づき算出した。

- ・ 梗塞体積 : Infarct volume (%) =
(contralateral hemispheric volume – ipsilateral non-infarct volume) /
contralateral hemispheric volume
- ・ 浮腫体積 : Edema volume (%) =
(ipsilateral hemispheric volume – contralateral hemispheric volume) /
contralateral hemispheric volume

8) CBF測定

前述したレーザードプラー血流計を用いて、右MCAが灌流する大脳半球皮質の微小血管のCBFを測定し、虚血時に虚血前から70%以上の低下がなされているか評価した。低下例をinclusionとした。血流計のプロローベは、bregmaより側方8mm、後方2mmの部位にて経頭蓋的に測定した。測定時は全身麻酔が行われた後、頭部に小切開を加え、側頭筋を軽度下方に剥離し、頭蓋骨を露出させ測定した。

9) 統計学的解析

データは、mean ± SEで示した。統計解析はR (version 4.0.3) with EZR ON R commander (version 1.54)を使用した。ウィルコクソンの順位和検定で評価し、p < 0.05を統計学的に有意とした。

【結果】

1) 神経症状所見の比較

18-point neurological scoring scale を用いた神経症状評価では、24 時間後の評価は、PBS 群(10 ± 1.0)、HA 群(8.3 ± 0.8)、HA+Pt100 群(10.0 ± 1.3)、HA+CA 群(10.5 ± 1.5)、HA+CA10 群(8.2 ± 0.4)、HA+EV 群(9.0 ± 0.4)、SFHbNP 群(11.2 ± 0.7)であった。各群に有意差を認められなかったが、HA+CA 群と SFHbNP 群のみ平均で改善を認めた。(Figure 5)

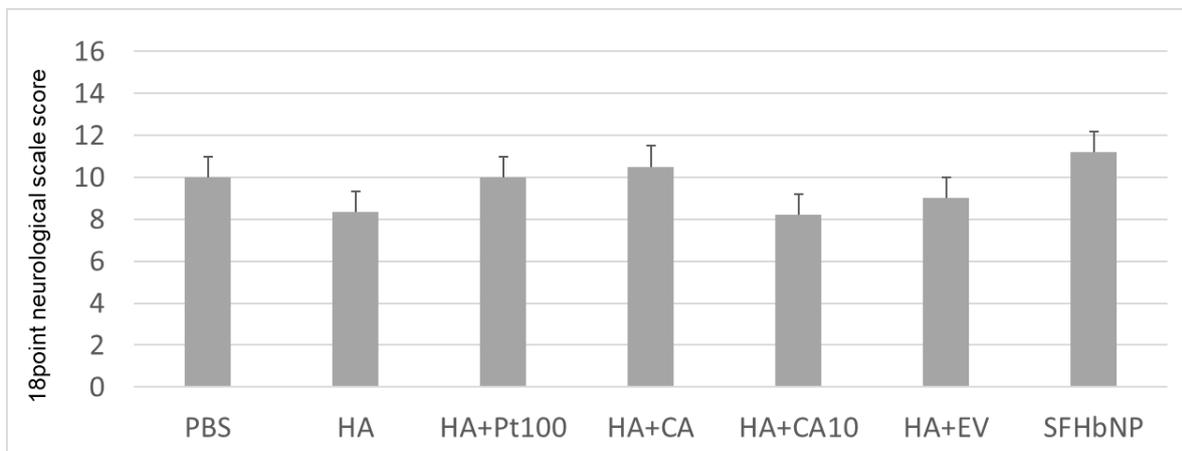


Figure 5. Neuroprotective effect of HBOCs with antioxidant effect on neurological findings. Neurological functions evaluated using the 18-point neurological scale score. PBS(n=5), HA(n=3), HA+Pt100(n=5), HA+CA(n=4), HA+CA10(n=5), HA+EV(n=4), SFHbNP(n=5)

2) 脳梗塞、脳浮腫体積の比較

再灌流後 24 時間後に灌流し摘出した脳のスライス切片を TTC 染色し撮影したデータで計測した。梗塞体積は、PBS 群($38.6 \pm 5.0\%$)、HA 群($33.8 \pm 7.4\%$)、HA+Pt100 群($28.6 \pm 7.1\%$)、HA+CA 群($32.3 \pm 7.8\%$)、HA+CA10 群($30.4 \pm 5.9\%$)、HA+EV 群($25.5 \pm 9.3\%$)、SFHbNP 群($21.2 \pm 2.8\%$)であり、PBS 群と比較し SFHbNP 群が有意に小さかった。一方、脳浮腫体積は、PBS 群($20.1 \pm 5.2\%$)、HA 群($14.1 \pm 7.1\%$)、HA+Pt100 群($14.9 \pm 4.2\%$)、HA+CA 群($16.0 \pm 5.1\%$)、HA+CA10 群($10.0 \pm 3.9\%$)、HA+EV 群($10.1 \pm 6.4\%$)、SFHbNP 群($15.7 \pm 5.2\%$)であり、統計学的な差は認めなかった。(Figure 6)

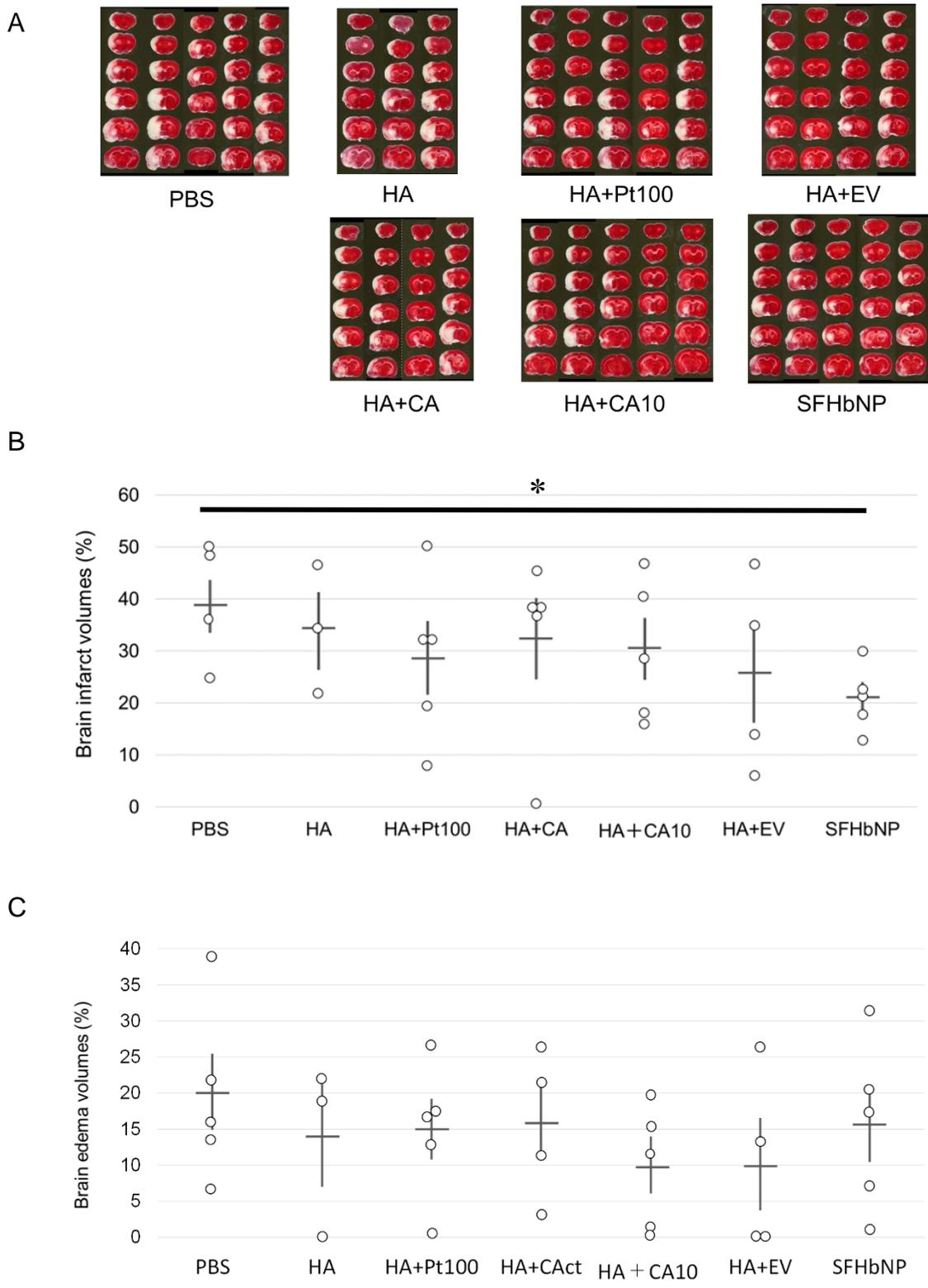


Figure 6. Neuroprotective effect of HBOCs with antioxidant effect on brain infarct and edema volumes. (A) Representative images of brain sections with 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride staining. Quantitative evaluation of (B) infarct volumes and (C) edema volumes. *P < 0.05.

【考察】

本章の実験では、脳虚血再灌流時に経静脈的に抗酸化作用を付与した HBOC 製剤を投与し神経保護効果の有無を検証した。

神経症状はばらつきが多数認められたが、平均的には HA + CA 群と SFHbNP 群で改善傾向にあることが伺えた。一方、脳梗塞体積では SFHbNP 群が PBS 群と比較して有意差を持って縮小が得られた。その他、脳浮腫体積においてはいずれもばらつきが多く評価としては困難な結果であったが、全体的に平均値では PBS 群よりも小さい結果となり、いずれの製剤も脳浮腫改善効果をもたらす可能性は示唆された。

以上から、脳梗塞の縮小効果が認められた SFHbNP を用いて脳虚血再灌流傷害に対する神経保護効果の研究を進めることとした。

第二章

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の検討

【緒言】

第一章では抗酸化作用を付与した複数の HBOC 製剤の脳虚血再灌流傷害への神経保護効果を検証し、stroma-free hemoglobin nanoparticle (SFHbNP) が最もその効果が期待される結果であった。以上より、SFHbNP を用いてその治療効果を検証していく。

SFHbNP は Hb を球状に重合させたコア Hb の周囲に HSA を共有結合させ、直径 90nm のナノ粒子として作成される。さらに、Hb コア内部には赤血球に元々存在する抗酸化酵素のカタラーゼが内包されており、この SFHbNP 自体が抗酸化作用を持ち合わせている。また、 H_2O_2 水溶液中でも metHb 化を強く抑制することが示され、Hb-HSA₃ よりも酸素運搬能が高いことがわかっており (Okamoto et al., 2022)、経静脈投与においても高い治療効果を示すことが期待される (Figure 7)。

本章では SFHbNP がより強い神経保護効果を発揮するかどうかを検証する。第一章と同様に 2 時間虚血の tMCAO モデルラットに対し、再灌流時に大腿静脈から製剤を投与し、その安全性と再灌流傷害への神経保護効果を検証する。本研究では、3 つの群：(1)PBS 群、(2)Hb-HSA₃ 群、(3)SFHbNP 群に分けて検証した。神経保護効果の評価として、神経機能、脳梗塞および脳浮腫体積、病理学的評価（酸化ストレス、白血球遊走、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の破綻）を再灌流 24 時間後に 3 群間で比較検討した。

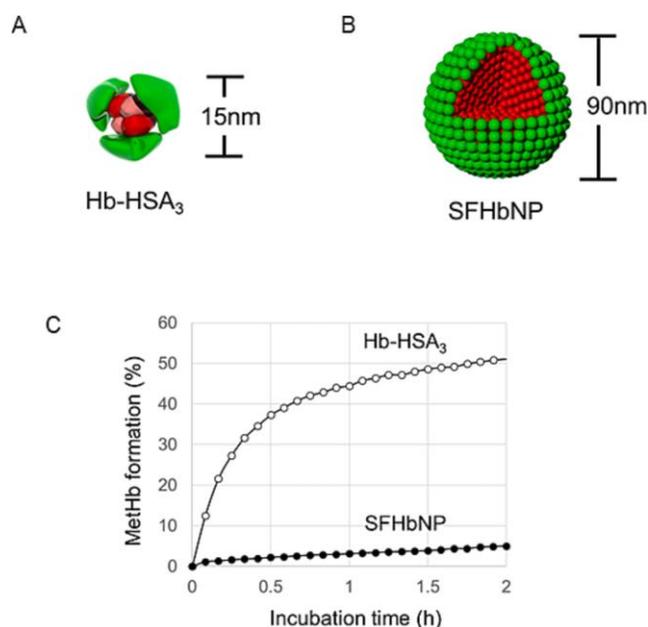


Figure 7. Structure and metHb formation rate of Hb-HSA₃ and SFHbNP.

Schema of (A) Hb-HSA₃ and (B) SFHbNP. (C) Time course of metHb formation (absorbance at 630 nm) of Hb-HSA₃ and SFHbNP ([Hb] = 10 μM) in 20 μM H₂O₂ solution at 25°C. (C) is adapted with permission from (Okamoto et al., 2022) Copyright 2022 American Chemical Society and adapted with permission from (Hosaka et al., 2014) Copyright 2016 PLOS.

【方法】

1) tMCAO モデルラット

以下すべての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受けている。実験動物は8週齢のSDラットの雄を使用し、体重は265–320gのものを使用した。tMCAOモデルの作成、製剤の静脈投与方法については第一章で述べた通りに行った。より慎重に糸栓子を挿入することで、くも膜下出血発症のリスクを減らす工夫を行った。またクリップでの固定を減らすことで創部内での糸栓子への刺激を減らし、糸栓子の安定化を図った。

2) 実験プロトコール

tMCAOモデルラットを次の3群に振り分けて実験を行った；(1)PBS群(n=10)、(2)Hb-HSA₃群(n=10)、および(3)SFHbNP群(n=10)。各製剤は37°Cに加熱し、6.0ml/kgを5分間持続で静脈投与を行った。Hb-HSA₃およ

び SFHbNP においてはラベルを blind にして行った。製剤の投与方法、安楽死、脳の摘出は第一章と同様に行っている (Figure 8)。虚血時 CBF が 70% 以上の低下であること、虚血時 Bederson score で 3 点以上のものを inclusion とし、くも膜下出血例、痙攣重積、MCA 領域外の広範囲梗塞例、手術関連死亡例は除外した。

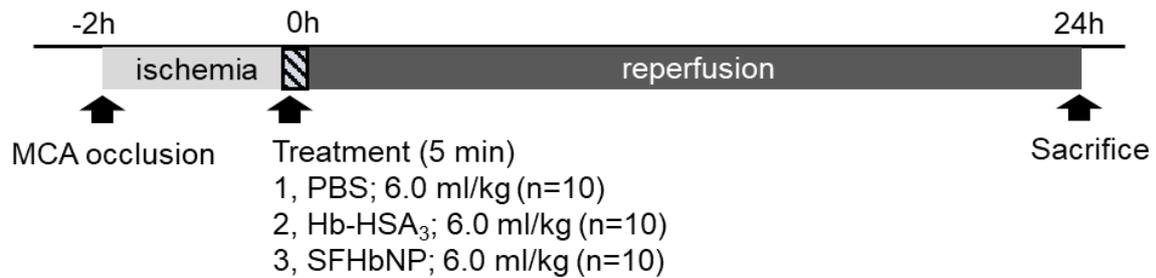


Figure 8. Scheme of the experimental protocol. Rats were divided into PBS group, Hb-HSA₃ group, SFHbNP group after the tMCAO surgery (each groups; n=10). After 24hrs of reperfusion injury, all rats were sacrificed for further evaluation.

3) 生理学的パラメータ

虚血の開始前後、再灌流の開始前後、再灌流後 30 分間まで 10 分毎、および再灌流 24 時間に、尾動脈により収縮期血圧を測定した。テールカフ装置 (BP-98A、Softron, Japan) を使用し、測定は全身麻酔下で、体温を安定させて測定した。また、動脈血液ガス測定を、虚血前と再灌流 24 時間後に行った。血液ガス分析装置 (GASTAT-navi、Techno Media, Japan) を用いて、血圧測定後、尾動脈より採血して測定を行った。

4) 神経学的所見

MCAO 作成後、再灌流後、再灌流 24 時間後 (安楽死時) に 18-point neurological scale score を用いて神経学的所見の評価を行った。3-18 点で評価され、18 点が正常な状態である。

5) 脳梗塞、脳浮腫体積評価

第一章と同様に行った。

6) CBF 測定

こちらも第一章と同様に測定した。

7) Western blotting (WB)

TTC 染色後の脳切片で、線条体を含むものの患側半球切片を -80°C で冷凍保存しておき WB を行った。酸化ストレスマーカーの一つである 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE)、炎症反応を反映した白血球遊走のマーカーとして myeloperoxidase (MPO)、BBB 破綻のマーカーとして Rat IgG をターゲットに各種抗体を使用して行った。

抽出した患側大脳を 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 $10\ \mu\text{g}$ を、泳動用ゲルである NuPage 8% 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 iBlot 2 Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用し、ニトロセルロース膜 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) に転写した。膜は 0.05 % PBS Tween-20 に ECLTM Prime blocking agent (Cytiva, Tokyo, Japan) を 2% で溶かし、室温 1 時間のブロッキングを行い、1 次抗体反応は 4°C overnight で行った。その後、peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000; Cytiva, #NA934 or NA931-100UL, Tokyo, Japan) と室温で 1 時間反応させ、標識タンパク質は化学発光 (ECL Advance Western Blotting Detection Kit: GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) による検出を行い、ChemiDoc Touch imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で撮影および定量化を行った。標準化は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて行った。使用した一次抗体、GAPDH の種類と濃度は以下の通りである。

- ・ anti-4HNE polyclonal antibody (1:2000; Bioss Antibodies, #bs-6313R, Woburn, MA, USA)
- ・ anti-MPO monoclonal antibody (1:1000; Abcam, #ab208670, Cambridge, MA, USA)
- ・ anti-rat IgG polyclonal antibody (1:5000; GeneTex, #GTX26703, Irvine, CA, USA)
- ・ anti-GAPDH polyclonal antibody (1:10000; GeneTex, #GTX100118, Irvine, CA, USA)

8) 免疫染色(Immunohistochemistry, IHC)

WB で行った 4 HNE、MPO、Rat IgG について組織学的評価を行うため、同様の抗体で免疫染色を行い解析した。

TTC 染色後の線条体を含む脳切片を 4% paraformaldehyde にて、1-2 日間の浸透固定を行い、パラフィン包埋し、4 μ m 厚のパラフィン切片を作成した。この切片をキシレンに 30 分間浸し、パラフィン除去を行い、pH6.0 クエン酸緩衝液を加熱沸騰させ、切片に 2 分間の加熱処置による抗原賦活を行った。3% H₂O₂ で内因性ペルオキシダーゼ活性を blocking 後、各種一次抗体を使用し、室温 1 時間で反応させた。2 次抗体反応は酵素結合ポリマー試薬 (Histofine Simple Stain MAX-PO, Nichirei Co., Tokyo, Japan) を室温 30 分で反応させ 3,3'-diaminobenzidine (DAB) による発色を 2-3 分で行い、ヘマトキシリン染色を行った。使用した一時抗体と濃度は以下に列挙する。

- ・ anti-4HNE polyclonal antibody (1:400; Bioss Antibodies, #bs-6313R, Woburn, MA, USA)
- ・ anti-MPO monoclonal antibody (1:100; Abcam, #ab208670, Cambridge, MA, USA)
- ・ anti-rat IgG polyclonal antibody (1:500; GeneTex, #GTX26703, Irvine, CA, USA)

9) 統計学的解析

データは、mean \pm SE で示した。統計解析は R (version 4.0.3) with EZR ON R commander (version 1.54) を使用した。3 群間の比較は、動脈血ガス分析、脳梗塞/脳浮腫体積においては one-way ANOVA で解析し、post-hoc

testに Bonferroni testを用いた。また、神経学的所見、WBの解析はKruskal-Wallis test を用い、post-hoc testにBonferroni testを用いた。p<0.05を統計学的に有意とした。

【結果】

1) 血圧及び動脈血液ガスパラメータにおけるSFHbNPの影響

いくつかのHBOCは、細胞外Hbの一酸化窒素への結合反応によって誘発される血管収縮により血圧を上昇させることが知られている(Cipolla et al., 2018; Taverne et al., 2017)。Hbの細胞外投与による血圧の上昇は非常に速く、10分以内に起こると報告されている(Haruki et al., 2015)。以上のHBOCsの副作用の出現がないか確認を行った。

血圧はいずれの時期においても3群ともに血圧の上昇を認めなかった(Figure 9)。3群間で血圧の有意な差は認めなかった。

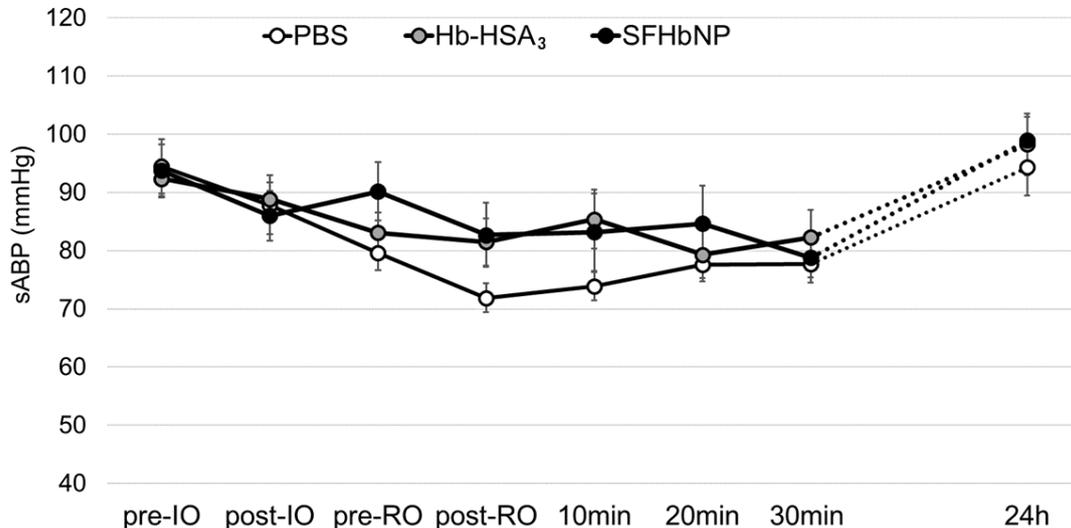


Figure 9. *Changes in systolic blood pressure in 2-hour ischemia/24-hour reperfusion.* No significant differences were observed in each groups. IO: ischemia onset. RO: reperfusion onset

また、動脈血液ガス分析は、手術開始時と再灌流後24時間での測定結果である。ガス分析はpH、pCO₂、pO₂、Ht、Hbを測定しているが、3群ともに有意差を認めなかった (Table 1)。

Table 1.

Blood gas data before ischemia and at 24-hour reperfusion

	PBS (n=10)	Hb-HSA ₃ (n=10)	SFHbNP (n=10)	
<i>Before MCAO</i>				
pH	7.49±0.02	7.47±0.03	7.49±0.03	n.s.
pCO ₂ (mmHg)	32.7±5.2	29.2±9.8	33.1±4.4	n.s.
pO ₂ (mmHg)	165.7±27.1	157.3±18.9	162.3±20.9	n.s.
Ht (%)	37.2±1.0	36.7±1.5	37.8±2.0	n.s.
Hb (mg/dl)	12.6±0.4	12.5±0.5	12.9±0.6	n.s.
<i>After 24hrs of reperfusion</i>				
pH	7.50±0.04	7.51±0.04	7.53±0.04	n.s.
pCO ₂ (mmHg)	32.8±6.5	34.9±5.4	32.2±5.6	n.s.
pO ₂ (mmHg)	188.9±19.3	162.7±19.8	156.4±45.8	n.s.
Ht (%)	41.8±1.0	42.8±2.7	42.1±1.8	n.s.
Hb (mg/dl)	14.2±0.4	14.6±0.9	14.3±0.6	n.s.

2) 2時間虚血/再灌流24時間での神経症状、脳梗塞/脳浮腫体積の比較

2時間虚血/再灌流24時間でのSFHbNPによる神経保護効果を、神経症状、脳梗塞体積、脳浮腫体積で3群比較した。神経学的所見は、虚血後、再灌流後、および再灌流24時間後で評価した。3群において虚血後および再灌流後に症状の悪化を認めscoreは減少したが、有意差は認めなかった。一方、再灌流24時間後では、PBS群よりもHb-HSA₃群およびSFHbNP群がより有意な改善を認めた(PBS群：7.0±0.13、Hb-HSA₃群：10.9±0.78、SFHbNP群：11.1±0.73) (p<0.01)。 (Figure 10A)

また、3群間の脳梗塞体積や、脳浮腫体積を比較すると、PBS群(梗塞：37.0±2.1%、浮腫：15.7±1.7%)、Hb-HSA₃群(梗塞体：26.6±5.84%、浮腫10.9±1.85%)およびSFHbNP群(脳梗塞：19.2±5.33%、脳浮腫：9.2±1.8%)の順に脳梗塞、脳浮腫ともに減少していた。PBS群とSFHbNP群の間では両方の体積に有意差が認められた。(p<0.05) (Figure 10B-D)

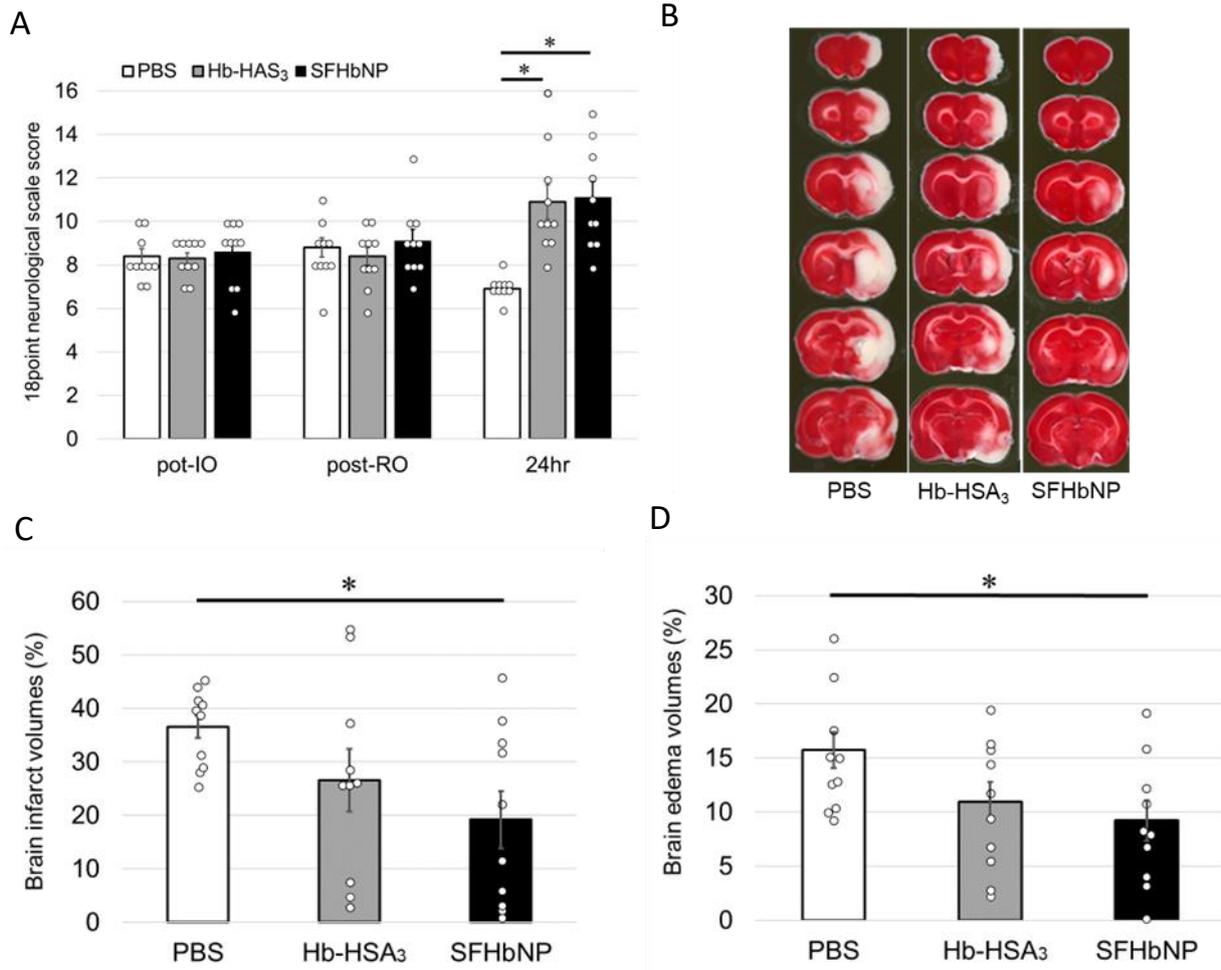


Figure 10. Neuroprotective effects of SFHbNP in 2-hour ischemia/24-hour reperfusion. (A) Neurological function evaluated using an 18-point neurological scale score at post-ischemia onset (post-IO), post-reperfusion onset (post-RO), and 24-hour reperfusion. * $P < 0.01$. (B) Representative images of brain sections with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. Quantitative evaluation of (C) infarct volumes and (D) edema volumes. * $P < 0.05$.

3) 2時間虚血/再灌流24時間における酸化ストレス、白血球遊走、BBB破綻の比較

脳虚血再灌流傷害に対するSFHbNPの効果について病理学的評価を行うため、酸化ストレス、白血球遊走、BBB破綻に焦点を当てて評価した。WBと免疫染色により、脂質酸化マーカーである4HNE、好中球リソソームタンパク質であるMPO、脳実質へ漏出する血清タンパク質であるIgGを用いて評価した。

WBでは、4HNE、MPO、IgGのタンパク発現量はPBS群、Hb-HSA₃群、SFHbNP群の順で減少していること明らかになった(Figure 11)。MPOおよびIgGに関しては、PBS群とSFHbNP群の間で有意差を認めた($p < 0.05$)。

免疫組織化学分析においては、虚血再灌流傷害を受けた脳領域で、4HNEは異形成を示す脳実質細胞、MPOは脳実質内に遊走した白血球、IgGは脳内に微小血管から漏出した(BBBの破綻)と思われる部位、でそれぞれ陽性になっていた。いずれの免疫染色ともPBS群、Hb-HSA₃群、およびSFHbNP群の順に染色の程度が軽減される傾向を認めた。

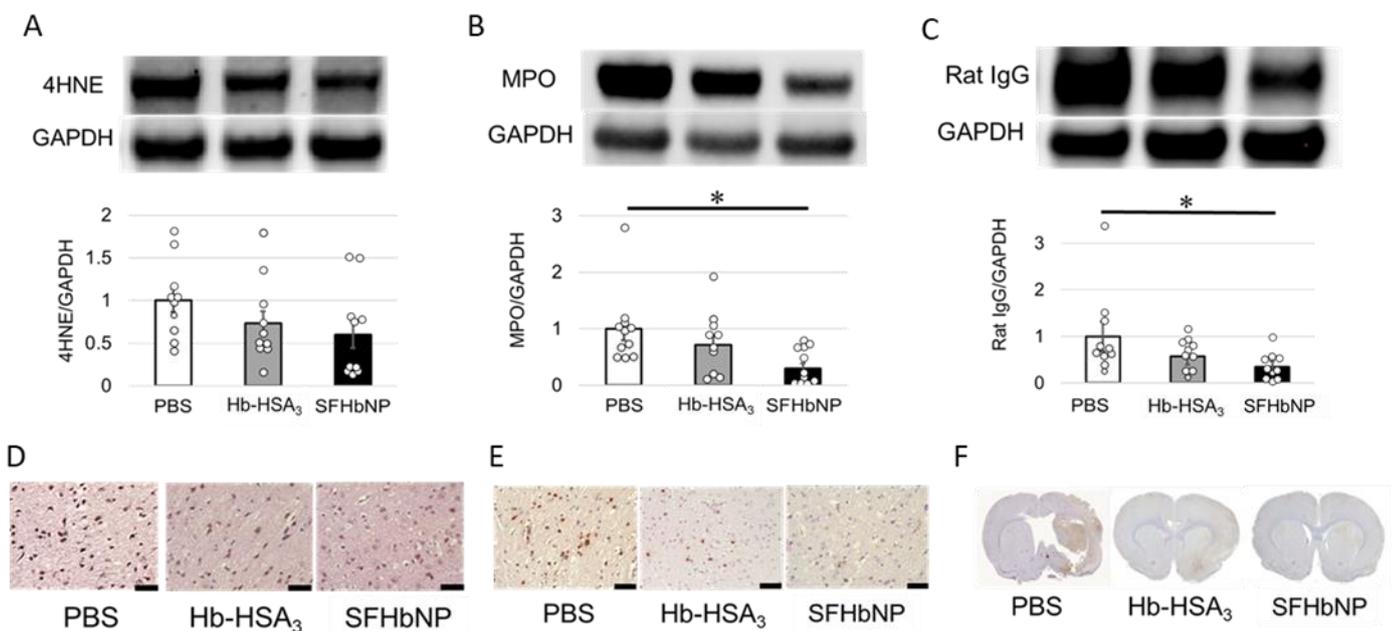


Figure 11. *Effects of SFHbNP on oxidative stress, leukocyte recruitment, and BBB disruption in 2-hour ischemia/24-hour reperfusion.* Representative images and quantitative evaluation of Western blotting of (A) 4HNE, (B) myeloperoxidase, and (C) IgG. * $P < 0.05$. Representative images of immunohistochemistry of (D) 4HNE, (E) myeloperoxidase, and (F) IgG.

【考察】

本章の2時間虚血/再灌流24時間でのtMCAOモデルラットにおいて、SFHbNPの静脈投与は、現在の投与条件(6ml/kg、Hb濃度 5g/DL)で血圧や血液ガス分析に有害事象を生じることなく、神経保護作用を示すことが明ら

かとなった。PBS群と比較し、SFHbNP群は神経症状、脳梗塞、脳浮腫において優れた効果を発揮し、酸化ストレス、白血球脳実質内遊走、BBB破綻の減少を認めた。Hb-HSA₃群においては神経症状では改善認めたが、その他の検討項目ではPBS群とSFHbNP群の中間の値を示していた。

以上より、SFHbNPの脳虚血再灌流傷害に対する脳保護効果が示された。この脳保護効果のメカニズムとして、再灌流後早期での微小循環不全の改善、酸素運搬能の改善が想起される。そこで次章では、再灌流早期でのSFHbNPの微小循環状態、酸素運搬能について解析を行った。

第三章

脳虚血再灌流傷害早期における stroma-free hemoglobin nanoparticle の治療効果機序の検討

【緒言】

第二章では、SFHbNPの静脈投与により2時間虚血/再灌流24時間における神経症状の改善や脳梗塞、脳浮腫体積の減少、酸化ストレスマーカーの低下や白血球遊走、BBB破綻の軽減効果など神経保護効果を示した。これらの治療機序のうち、再灌流後早期での微小血管狭小化による循環不全に対して、治療効果を来たしているのかを検証する。

虚血再灌流傷害の様々な機序のうち、再灌流後早期にAstrocyteのend footの膨化(3–8時間)(Ito et al., 2011)、pericyteの酸化ストレス依存性の収縮反応(再灌流後2時間以内)(Korte et al., 2022; Zhou et al., 2022)が生じ、微小血管の狭小化を来たし、赤血球の通過障害による微小循環不全が生じる。これにより酸素供給の低下を来たし、さらなる脳梗塞の増悪をもたらしていると考えられる。本章では、SFHbNPが急性期虚血再灌流後の微小循環不全に対する治療効果について検討を行う。

【方法】

1) 実験プロトコール

以下すべての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受けている。実験動物は8週のSDラットの雄を使用し、体重は265–320gのものを使用した。tMCAOモデルの作成、製剤の静脈投与方法については第二章で述べた通りに行った。

今回の実験において、再灌流後早期の評価を行うため再灌流後0時間、2時間、6時間でそれぞれ評価を行った。(Figure 12)

- (1) 脳虚血再灌流早期での微小血管内の赤血球及びHBOCの存在の検討
- (2) 脳虚血再灌流早期の脳血流 (CBF)、脳組織酸素分圧(PtO₂) の検討
- (3) 脳虚血再灌流早期でのHBOCの血管外漏出の評価

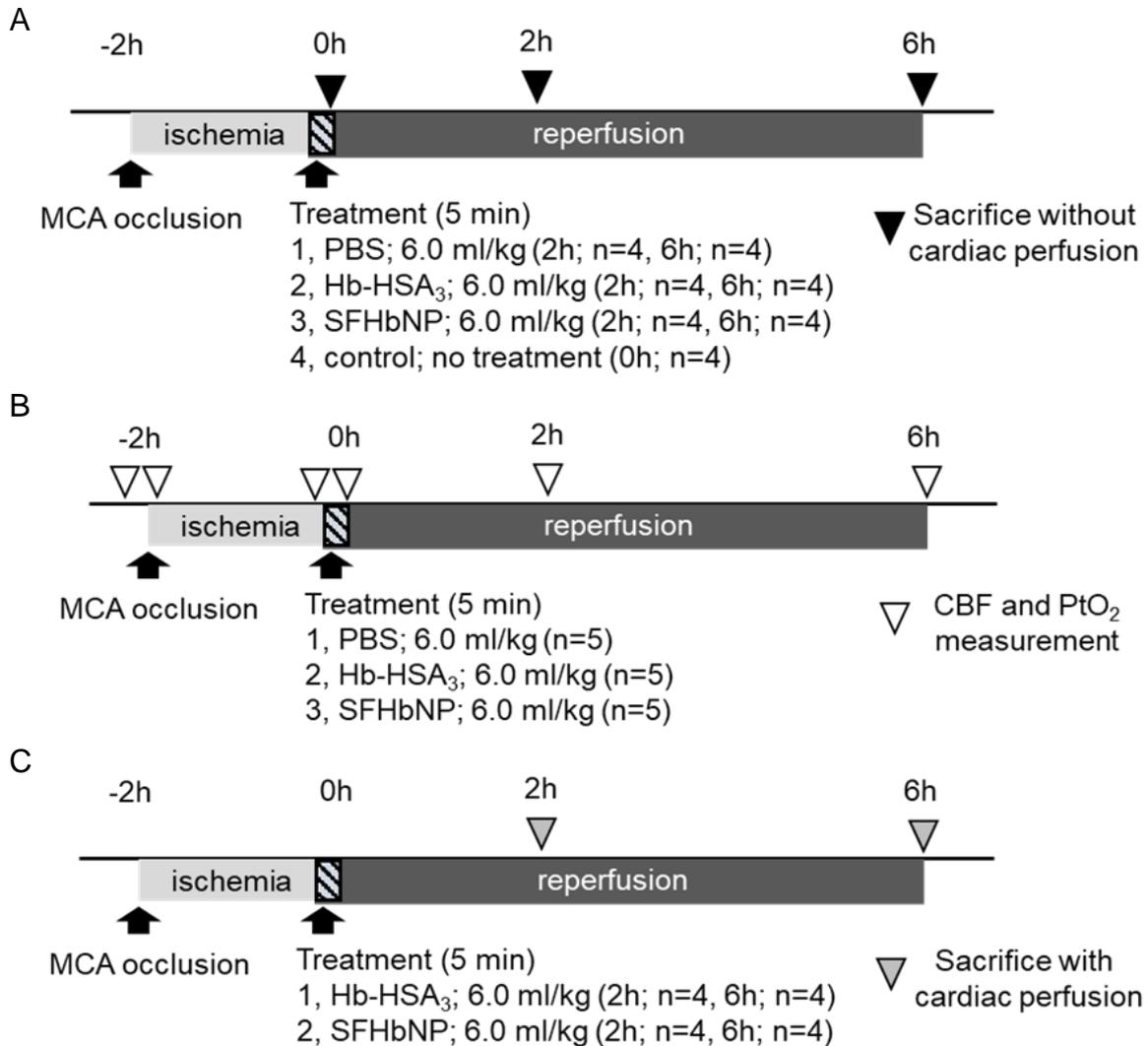


Figure 12. Scheme of the experimental protocol. (A) Experimental design diagram of microvascular perfusion states analysis in 2-hour ischemia/2- or 6-hour reperfusion. (each groups; n=4) (B) Experimental design diagram of CBF and PtO₂ analysis (each groups; n=5). (C) Experimental design diagram of extravasation analysis in 2-hour ischemia/2- or 6-hour reperfusion. (each groups; n=4)

実験(1)では微小血管内へのHbキャリア (PBS群では自己赤血球、Hb-HSA₃およびSFHbNP群ではHBOC) の灌流状況を検証するため、PBS群、Hb-HSA₃群およびSFHbNP群で、それぞれ2時間(n=4)、6時間(n=4)で屠殺し、その際血液の灌流状況を保つため、生理食塩水での灌流処置を行わずに脳サンプルを摘出し評価を行った。(Figure 12A)

実験(2)では各群n=5で行い、CBF測定とPtO₂測定をそれぞれ虚血前後、再灌流前後、2時間後、6時間後で経時的に測定を行った。(Figure 12B)

実験(3)はHb-HSA₃群およびSFHbNP群の2群で比較し、2時間(n=4)、6時間(n=4)で屠殺し、通常通り生理食塩水による灌流を行い、脳サンプルを摘出し評価した。(Figure 12C)

2) 脳血流と脳組織酸素分圧の測定

脳血流 (CBF) は、前述の通りレーザードップラー血流計を用い、MCA領域での血流を評価する。測定はこれまでと同様の部位で行った。

また組織酸素分圧(tissue partial Oxygen pressure, PtO₂)は、脳組織酸素分圧測定装置 (POG-203, Unique Medical, Tokyo, Japan) で酸素電極を用いて測定した。頭部を正中切開し頭蓋骨を露出させbregmaより側方3mm、後方2mmの部位に電動ドリルでburr holeを穿ち、最小限の硬膜切開を加え電極台をburr holeに設置し、レジンで固定した。酸素電極を電極台にセットし脳表から2mmの深さで組織酸素分圧を測定した。測定前には、酸素電極はエアポンプにてエアレーションされた水道水を用い、150mmHgにキャリブレーションして行った。これまでの報告で、5分間の安静により数値の安定が得られるとあり(Gekka et al., 2018)、プローブを挿入して5分ほど安静後のデータを採用とした。測定は、MCAO手術前後、再灌流直前後、再灌流2時間後、再灌流6時間後で測定を行った。

3) 免疫染色 (Immunohistochemistry, IHC)

第二章で提示したプロトコールと同様に2mm厚に冠状断した線条体を含む脳スライスを4% paraformaldehydeにて1-2日間の固定後、パラフィン包埋、4μm切片を作成し、DAB染色とヘマトキシリン染色で免疫染色を行い評価した。実験(1)ではPBS群は抗ラットHb抗体を用いてラットの赤血球を染色し、HBOC投与群は抗ヒトアルブミン抗体でHBOCを染色した。過去の報告とは別の抗体を使用したところ、交差反応により抗ヒトアルブミン抗体でPBS群が染

色される様子があり、過去の報告と同様の抗体で試すとnegative controlが取れるなど、予備検討により良好な染色条件を確立させた。実験(3)でも抗ヒトアルブミン抗体染色により血管外漏出したHBOC評価を行った。以下の抗体と濃度で評価を行うに至った。

・ anti-rat Hb polyclonal antibody (1:100; Cloud-Clone Corp., #PAB409Ra01, Katy, TX, USA)

・ anti-human albumin antibody (1:200; Abnova, #MAB3598, Taipei, Taiwan)

4) 再灌流後ペナンプラ領域における微小血管灌流評価

実験(1)で採取した脳切片のうち、線条体を含む切片で評価を行った。PBS群は抗ラットHb抗体でラットの自己赤血球を染色し、HBOC投与群は抗ヒトアルブミン抗体で染色を行った。

評価方法としては、患側のMCA灌流域における皮質梗塞周囲部（ペナンプラ領域）からランダムに5視野（×400）を抽出して観察し、視野内のすべての微小血管（<20 μm）で、ラットHb抗体陽性血管数またはヒトアルブミン抗体陽性血管数を測定し、平均値を算出して評価を行った。

5) 統計学的解析

データは、これまで同様に、mean±SEで示し、統計解析はR (version 4.0.3) with EZR ON R commander (version 1.54)を使用した。2群間比較にはMann-Whitney U testを使用し、3群間の比較は、Hbキャリア血管評価においてはone-way ANOVAで解析し、post-hoc testにBonferroni testを用いた。また、CBFやPtO₂解析には、paired t-testを用いて評価した。p<0.05を統計学的に有意とした。

【結果】

(1) 脳虚血再灌流早期での微小血管内の赤血球及びHBOCsの存在の検討

微小血管内の赤血球及びHBOCの灌流状態を示したIHCの結果はFigure

13A-Cの通りである。IHCで陽性となった微小血管の数による定量的検討では、PBS群で、再灌流後の時間経過で自己赤血球陽性血管数は減少しており、灌流が悪化していくことがわかった(0時間vs 6時間、 $p < 0.05$) (Figure 13D)。一方、Hb-HSA₃群およびSFHbNP群では、HBOC陽性微小血管数は投与後2時間、6時間ともPBS群の自己赤血球陽性血管数より有意に多い状態が維持されており、HBOCでは良好な灌流状態が保たれていることが分かった (Figure 13E-F)。

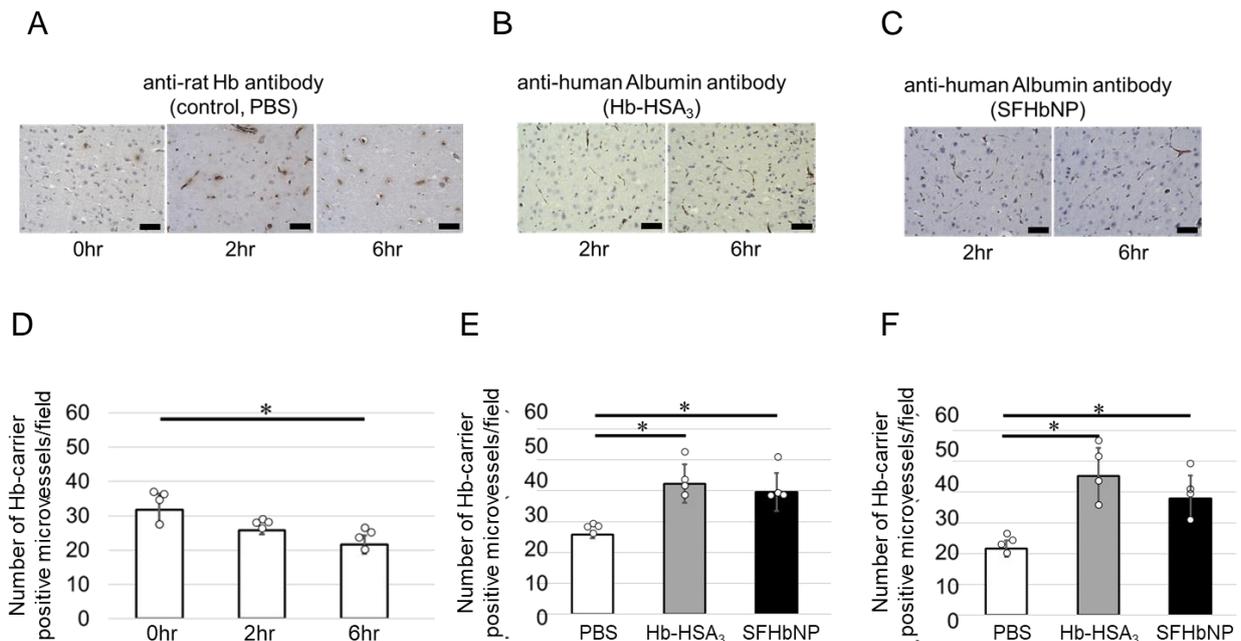


Figure 13. Effects of SFHbNP on microperfusion in 2-hour ischemia/2- or 6-hour reperfusion. Representative images of immunohistochemistry of (A) rat Hb (to detect autologous erythrocyte) in the control (0 h) and PBS groups (2 h and 6 h), (B) human albumin (to detect Hb-HSA₃) in the Hb-HSA₃ group, and (C) human albumin (to detect SFHbNP) in the SFHbNP group. (D) Quantitative evaluation of the number of Hb-carrier-positive microvessels in the control and PBS groups. Quantitative evaluation of the number of Hb-carrier positive microvessels in the 3 groups at (E) 2-hour reperfusion and (F) 6-hour reperfusion. * $P < 0.05$.

(2) 脳虚血再灌流早期の脳血流 (CBF)、脳組織酸素分圧 (PtO₂) の検討

CBFは、PBS群では時間経過と共に有意に減少した (-2時間 vs 6時間、

p<0.05) が、Hb-HSA₃群およびSFHbNP群では減少を認めなかった。
(Figure 14A)

PtO₂においても、PBS群では時間経過と共に有意に減少したが (-2時間 vs 6時間、p<0.05)、Hb-HSA₃群およびSFHbNP群では異なる挙動を示した。Hb-HSA₃群では再灌流後上昇を認めたPtO₂は再灌流6時間後には再び減少する結果となった (2時間 vs 6時間、p<0.01)。一方、SFHbNP群は再灌流後からPtO₂は術前比100%以上の高いレベルを維持した(Figure 14B)。

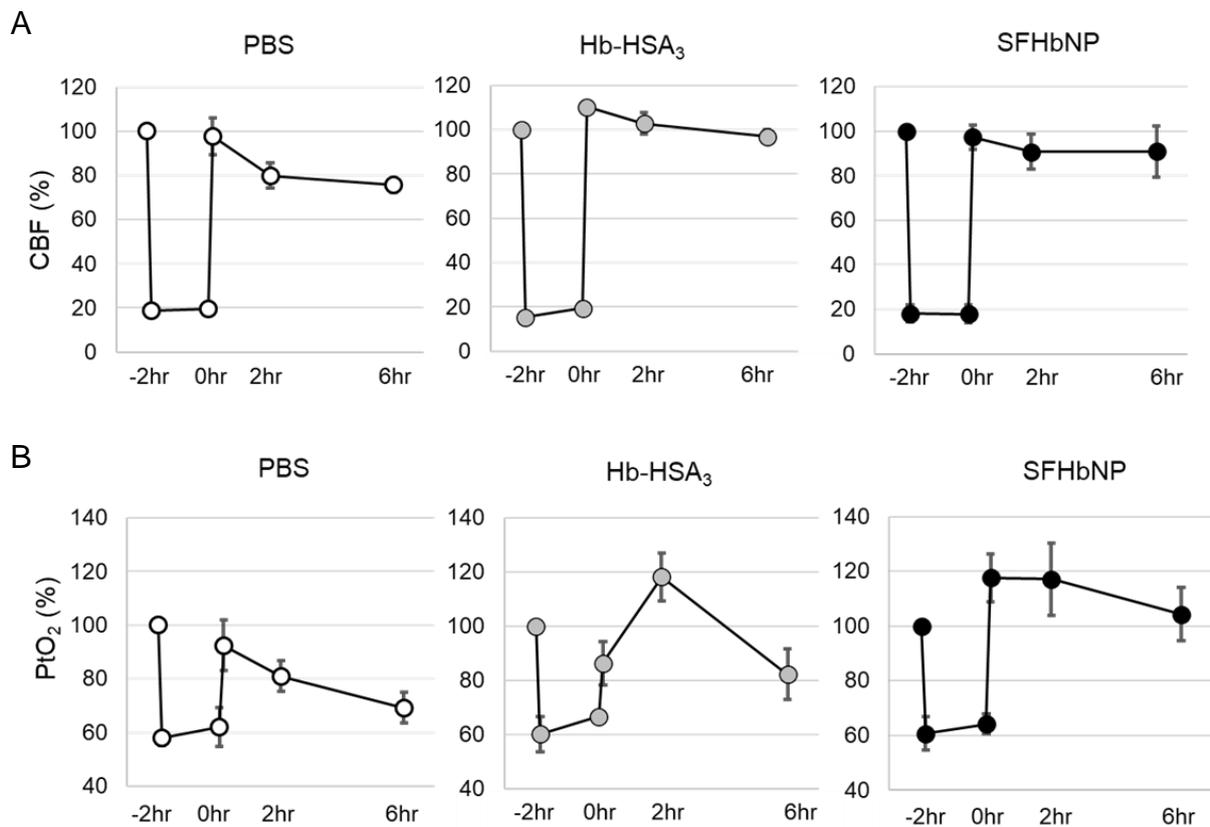


Figure 14. *Effects of SFHbNP on CBF and PtO₂ in 2-hour ischemia/2- or 6-hour reperfusion.* (A) Changes in CBF in the 3 groups. (B) Changes in PtO₂ in the 3 groups.

(3) 脳虚血再灌流早期のHBOCsの血管外漏出度の評価

BBB破綻により、血漿タンパク質と同程度のサイズであるHBOCは血管外に漏出する可能性があり、これにより灌流する粒子が減少する可能性がある。免

疫染色により、血管外漏出の程度を検討した。

Hb-HSA₃群およびSFHbNP群いずれにおいても血管外漏出を認めたが、SFHbNP群がいずれの時間においてもより血管外漏出が少ない結果であった (Figure 15A)。漏出面積を解析し、再灌流2時間 ($p < 0.05$)、6時間 ($p < 0.05$) いずれにおいてもSFHbNP群は有意にHb-HSA₃群より漏出が少ない結果であった (Figure 15B)。

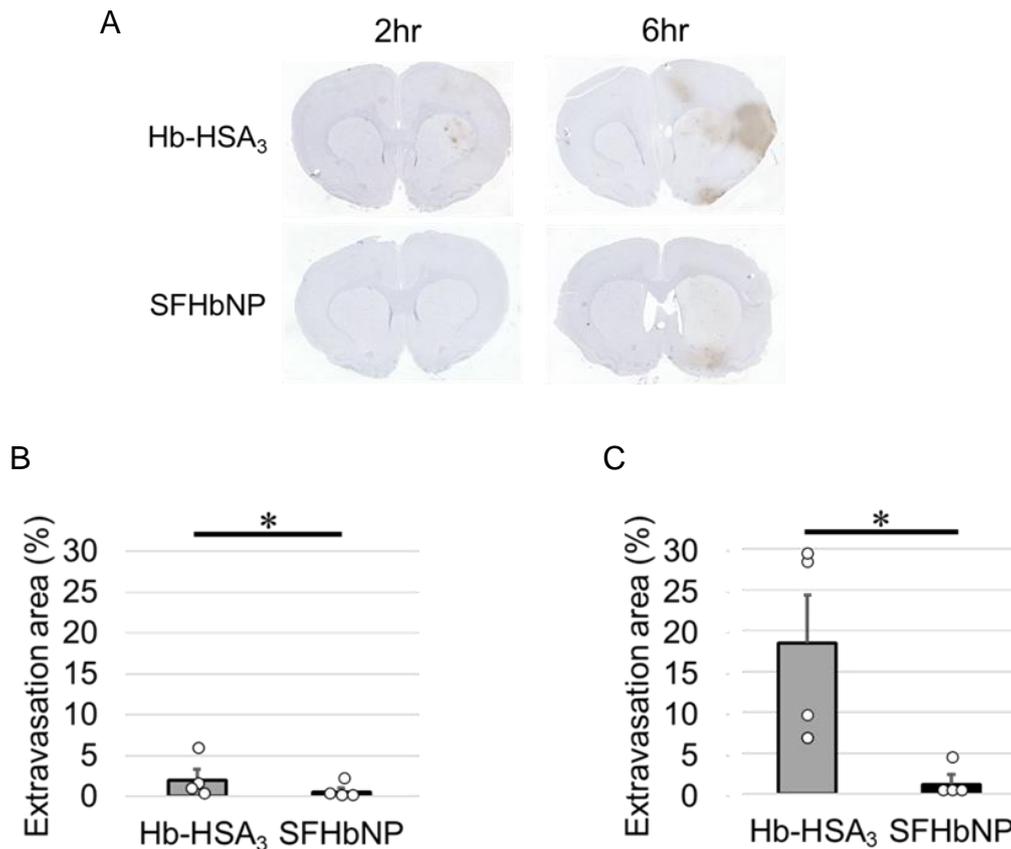


Figure 14. *Extravasation of HBOCs in 2-hour ischemia/2- or 6-hour reperfusion.* (A) Representative images of immunohistochemistry of human albumin (to detect HBOCs) in the Hb-HSA₃ and SFHbNP groups. Quantitative evaluation of the extravasation area in the Hb-HSA₃ and SFHbNP groups at (B) 2-hour reperfusion and (C) 6-hour reperfusion. * $P < 0.05$

【考察】

2時間虚血/再灌流2時間、または6時間での脳虚血再灌流傷害早期の病態について評価を行った結果、実験(1)、(2)より、Hb-HSA₃およびSFHbNP群では再灌流早期で微小血管へのHBOCによる灌流、およびCBFが高レベルに維持されることが明らかになった。しかしながら、PtO₂レベルには差異が観察され、Hb-HSA₃群では再灌流6時間後で有意に減少したが、SFHbNP群では高いまま維持されていた。さらに、実験(3)より、HBOCの血管外漏出の程度はSFHbNP群で有意に低かった。

酸素運搬能力を示すPtO₂レベルの違いは、虚血再灌流傷害に対するHb-HSA₃とSFHbNPの神経保護効果の違いに関連していると考えられる。前述の通り、酸化ストレスによりHb-HSA₃の酸素運搬能が低下してしまうことが報告されており(Okamoto et al., 2022)、それを反映して実験(2)の通りHb-HSA₃群のPtO₂は2時間という投与直後では酸素化が改善するも、酸化ストレスにより酸素運搬能を維持出来ず、6時間後で大きくPtO₂の低下を来たした可能性がある。一方、SFHbNPは内因性カタラーゼの抗酸化効果により長時間に渡りmetHb化を抑制し酸素運搬能を保持するため、6時間後でもPtO₂を高く維持し、no-reflow現象による虚血の進行を防ぎ、神経保護に繋がった可能性が示唆された。

また、BBB破綻による血管外漏出作用はHb-HSA₃群で著明に認められ、これもHb-HSA₃群の酸素運搬能の低下に関連している可能性がある。Hb-HSA₃(直径15nm)はIgG(直径14.5nm)と同様の大きさであり(Tan et al., 2008)、IgGと同様に脳実質内へ受動的に漏出したものと思われる。一方、SFHbNP(直径90nm)は粒子径が大きいことで漏出が少なく、灌流量が維持されたと考えられ、この特性もSFHbNPがより良い神経保護効果に参与した可能性がある。

考察

本研究により、脳虚血後再灌流時に SFHbNP を経静脈投与をすることで、神経症状の改善、脳梗塞および脳浮腫の軽減などの神経保護効果を示した。虚血再灌流後の病態評価で、酸化ストレス、白血球脳実質内遊走、BBB 破綻がいずれも抑制されていた。これらの作用機序の一つとして、再灌流後早期の脳微小血管灌流の改善と組織酸素化の高い改善がより良い効果を示したと考えられた。また、以前の研究でも使用された Hb-HSA₃ は微小なため血管外漏出が多く、SFHbNP は血管外漏出が少ない結果となり、作用機序の異なる一つと考えられた。

虚血再灌流傷害の重要な病理学的機序の一つに no-reflow 現象があるが、その根底にあるメカニズムや治療方法に関してははまだ完全には解明されておらず有効な治療法も確立されていない(Hu et al., 2023; Mujanovic et al., 2023)。No-reflow 現象の機序として、血液の流動性や血管の形態学的変化に関して報告がなされている。血液の流動性については、血管内皮への白血球の接着(Ritter et al., 2000)、血小板の凝集(Yang et al.)、さらにフィブリン形成(Chen et al., 2022)によって血流の減少または停滞が引き起こされる。また、血管の形態学的変化については、astrocyte の end foot の膨化(Ito et al., 2011; Kurisu et al., 2016)により再灌流後数時間(3-8時間)のうちに引き起こされることが電子顕微鏡等で報告されている(Ito et al., 2011)。その他、pericyte の酸化ストレス依存性による収縮反応も微小血管狭窄の原因として報告され、かつ再灌流後2時間以内に発生するとされており、発症早期からの治療介入の必要性が問題となる(Korte et al., 2022; Yemisci et al., 2009)。HBOC は赤血球よりも著明に小さく、no-reflow 現象による血流の停滞や微小血管狭窄という悪条件においても酸素輸送に適しており、この機序への治療方法として他の神経保護薬に比べて直接作用できる点でメリットが高いと考えられる。また静脈投与による治療効果を得られたことも、治療の簡便性と汎用性の向上に寄与したと考えられる。

HBOC による虚血性脳卒中への治療法はいくつか報告がある。我々の報告した Hb-HSA₃ や SFHbNP 以外に、tMCAO モデルラットまたはマウスに対して、重合 Hb (Mito et al., 2009; Nemoto et al., 2006)、ポリエチレングリコール化 Hb (polyethyleneglycol hemoglobin : PEG-Hb) (Cao et al., 2017; Zhang et al., 2012)、カプセル化 Hb (Kaneda et al., 2014; Shimbo

et al., 2017; Shimbo et al., 2014)などでの神経保護効果が報告されている。これらはある程度の治療効果を示しているが、これらの報告は虚血後 30 分で薬剤の投与を行っているモデルが多く、我々のプロトコールとはやや違う点である。この中で、ポリニトロキシル化 PEG-Hb(polynitroxylated PEGylated hemoglobin: PNPB)のみが、再灌流 2 時間後の投与であっても梗塞サイズを有意に減少させた報告であった(Cao et al., 2017)。この PNPB は superoxide dismutase かつカタラーゼ模倣活性を有するため抗酸化能力を持っている。この報告では若干の投与遅れでも効果がある可能性が示された。前述の通り、酸化ストレスにより metHb レベルが上昇することで HBOC の酸素運搬能力が低下する。よって、我々の使用した SFHbNP や PNPB のように強い抗酸化能力を持つ HBOC であれば虚血再灌流傷害により生じる酸化ストレス条件下でも高い酸素運搬能力を維持できる可能性がある。また、酸化ストレスは虚血再灌流傷害により影響を受けた脳組織へのアポトーシス、オートファジー、炎症反応の誘導などにも関与するため(HadjAbdallah et al., 2018)、強い抗酸化能力を持っている事はこれらの酸化ストレスによる有害事象を防ぐ可能性も備えているといえる。

本研究の Limitation としては、まず第 1 に、本研究では用量や投与時間を変化させての治療効果の検討がなされていないことが挙げられる。Hb-HSA₃ と SFHbNP を比較するため、Hb-HSA₃ を用いた以前の研究と同等の用量で行っている(Gekka et al., 2018)。SFHbNP の有効容量の特定をするため耐容量範囲研究をする必要がある。第 2 に、Hb-HSA₃ や SFHbNP の metHb 化に関するデータは H₂O₂ 溶液中での結果であり、脳虚血再灌流時の生体内での経過は不明である。第 3 に、今回の SFHbNP の作用機序が、優れた酸素運搬能による直接的な作用であったか、カタラーゼによる抗酸化作用による間接的な作用であったのかは分かっていない。また、第 4 にこの研究では薬物動態解析が出来ていない。薬理効果のメカニズムの解明だけでなく、投与の用量やタイミング、頻度の解明にも寄与するため解明が必要である。

総括および結論

本研究により、以下の新たな知見が得られた。

- 1) 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。
- 2) 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により、強い神経保護効果を来す可能性がある。

以上より、stroma-free hemoglobin nanoparticle は虚血性疾患や微小循環不全に対する治療薬として、新たな選択肢となる可能性がある。さらに詳細な作用機序の解明や最適投与方法など臨床応用に向けた基礎研究の蓄積が望まれる。

謝辞

稿を終えるに当たり、本研究の機会を下さりました北海道大学大学院医学研究院脳神経外科学分野 藤村幹教授に謝意を表します。併せて、本研究全般に渡り、直接のご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院脳神経外科学分野 客員研究員 鏡谷武雄先生に深く感謝申し上げます。

また、各種人工酸素運搬製剤のご提供と製品改良へのご助言、並びに論文記載に関するご助言を賜りました中央大学理工学部応用化学科小松晃之教授ならびに研究員の皆様に感謝申し上げます。

最後に、本研究実験の終始に渡りご協力賜りました長島里香 前実験助手、並びに各処ご助言賜りました脳神経外科教室員の皆様に心より厚く感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会基盤研究（C）19K09472 の助成を受けたものである。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Albers, G.W., Marks, M.P., Kemp, S., Christensen, S., Tsai, J.P., Ortega-Gutierrez, S., McTaggart, R.A., Torbey, M.T., Kim-Tenser, M., Leslie-Mazwi, T., *et al.* (2018). Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med* 378, 708-718.
- Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., and Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472-476.
- Campbell, B.C., Mitchell, P.J., Kleinig, T.J., Dewey, H.M., Churilov, L., Yassi, N., Yan, B., Dowling, R.J., Parsons, M.W., Oxley, T.J., *et al.* (2015). Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 372, 1009-1018.
- Cao, S., Zhang, J., Ma, L., Hsia, C.J.C., and Koehler, R.C. (2017). Transfusion of Polynitroxylated Pegylated Hemoglobin Stabilizes Pial Arterial Dilation and Decreases Infarct Volume After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Am Heart Assoc* 6.
- Chen, X., Wang, J., Ge, L., Lu, G., Wan, H., Jiang, Y., Yao, Z., Deng, G., and Zhang, X. (2022). A fibrin targeted molecular imaging evaluation of microvascular no-reflow in acute ischemic stroke. *Brain Behav* 12, e2474.
- Cipolla, M.J., Linfante, I., Abuchowski, A., Jubin, R., and Chan, S.L. (2018). Pharmacologically increasing collateral perfusion during acute stroke using a carboxyhemoglobin gas transfer agent (Sanguinate™) in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 755-766.
- Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., and Hu, X.J. (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26, 627-634; discussion 635.
- Gekka, M., Abumiya, T., Komatsu, T., Funaki, R., Kurisu, K., Shimbo, D., Kawabori, M., Osanai, T., Nakayama, N., Kazumata, K., *et al.* (2018). Novel Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Bound With Albumin Shows Neuroprotection With Possible Antioxidant Effects. *Stroke* 49, 1960-1968.
- Goyal, M., Demchuk, A.M., Menon, B.K., Eesa, M., Rempel, J.L., Thornton, J., Roy, D., Jovin, T.G., Willinsky, R.A., Sapkota, B.L., *et al.* (2015). Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 372,

1019-1030.

Hadj Abdallah, N., Baulies, A., Bouhlel, A., Bejaoui, M., Zaouali, M.A., Ben Mimouna, S., Messaoudi, I., Fernandez-Checa, J.C., García Ruiz, C., and Ben Abdennebi, H. (2018). Zinc mitigates renal ischemia-reperfusion injury in rats by modulating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *J Cell Physiol* *233*, 8677-8690.

Haruki, R., Kimura, T., Iwasaki, H., Yamada, K., Kamiyama, I., Kohno, M., Taguchi, K., Nagao, S., Maruyama, T., Otagiri, M., *et al.* (2015). Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster "HemoAct" as a Red Blood Cell Substitute. *Sci Rep* *5*, 12778.

Hosaka, H., Haruki, R., Yamada, K., Bottcher, C., and Komatsu, T. (2014). Hemoglobin-albumin cluster incorporating a Pt nanoparticle: artificial O₂ carrier with antioxidant activities. *PLoS One* *9*, e110541.

Hu, J., Nan, D., Lu, Y., Niu, Z., Ren, Y., Qu, X., Huang, Y., and Jin, H. (2023). Microcirculation No-Reflow Phenomenon after Acute Ischemic Stroke. *Eur Neurol* *86*, 85-94.

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

Ito, Y., Abumiya, T., Komatsu, T., Funaki, R., Gekka, M., Kurisu, K., Sugiyama, T., Kawabori, M., Osanai, T., Nakayama, N., *et al.* (2020). Neuroprotective effects of combination therapy of regional cold perfusion and hemoglobin-based oxygen carrier administration on rat transient cerebral ischemia. *Brain Res* *1746*, 147012.

Jovin, T.G., Chamorro, A., Cobo, E., de Miquel, M.A., Molina, C.A., Rovira, A., San Roman, L., Serena, J., Abilleira, S., Ribo, M., *et al.* (2015). Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* *372*, 2296-2306.

Kaneda, S., Ishizuka, T., Sekiguchi, A., Morimoto, K., and Kasukawa, H. (2014). Efficacy of liposome-encapsulated hemoglobin in a rat model of cerebral ischemia. *Artif Organs* *38*, 650-655.

Karibe, H., Zarow, G.J., Graham, S.H., and Weinstein, P.R. (1994). 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.

Korte, N., Ilkan, Z., Pearson, C.L., Pfeiffer, T., Singhal, P., Rock, J.R., Sethi, H., Gill, D., Attwell, D., and Tamarro, P. (2022). The Ca²⁺-gated channel TMEM16A amplifies capillary pericyte contraction and reduces cerebral blood flow after ischemia. *J Clin Invest* *132*.

Kurisu, K., Abumiya, T., Nakamura, H., Shimbo, D., Shichinohe, H., Nakayama, N., Kazumata, K., Shimizu, H., and Houkin, K. (2016). Transarterial Regional Brain Hypothermia Inhibits Acute Aquaporin-4 Surge and Sequential Microvascular Events in Ischemia/Reperfusion Injury. *Neurosurgery* *79*, 125-134.

Mito, T., Nemoto, M., Kwansa, H., Sampei, K., Habeeb, M., Murphy, S.J., Bucci, E., and Koehler, R.C. (2009). Decreased damage from transient focal cerebral ischemia by transfusion of zero-link hemoglobin polymers in mouse. *Stroke* *40*, 278-284.

Mizuma, A., You, J.S., and Yenari, M.A. (2018). Targeting Reperfusion Injury in the Age of Mechanical Thrombectomy. *Stroke* *49*, 1796-1802.

Mujanovic, A., Ng, F., Meinel, T.R., Dobrocky, T., Piechowiak, E.I., Kurmann, C.C., Seiffge, D.J., Wegener, S., Wiest, R., Meyer, L., *et al.* (2023). No-reflow phenomenon in stroke patients: A systematic literature review and meta-analysis of clinical data. *Int J Stroke*, 17474930231180434.

Nemoto, M., Mito, T., Brinigar, W.S., Fronticelli, C., and Koehler, R.C. (2006). Salvage of focal cerebral ischemic damage by transfusion of high O₂-affinity recombinant hemoglobin polymers in mouse. *J Appl Physiol* (1985) *100*, 1688-1691.

Nogueira, R.G., Jadhav, A.P., Haussen, D.C., Bonafe, A., Budzik, R.F., Bhuvu, P., Yavagal, D.R., Ribo, M., Cognard, C., Hanel, R.A., *et al.* (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med* *378*, 11-21.

Okamoto, W., Hasegawa, M., Kohyama, N., Kobayashi, T., Usui, T., Onozawa, H., Hashimoto, R., Iwazaki, M., Kohno, M., Georgieva, R., *et al.* (2022). Core-Shell Structured Hemoglobin Nanoparticles as Artificial O₂ Carriers. *ACS Appl Bio Mater* *5*, 5844-5853.

Powers, W.J., Rabinstein, A.A., Ackerson, T., Adeoye, O.M., Bambakidis, N.C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B.M., Hoh, B., *et al.* (2019). Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke:

2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50, e344-e418.

Ritter, L.S., Orozco, J.A., Coull, B.M., McDonagh, P.F., and Rosenblum, W.I. (2000). Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31, 1153-1161.

Saver, J.L., Goyal, M., Bonafe, A., Diener, H.C., Levy, E.I., Pereira, V.M., Albers, G.W., Cognard, C., Cohen, D.J., Hacke, W., *et al.* (2015). Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* 372, 2285-2295.

Shimbo, D., Abumiya, T., Kurisu, K., Osanai, T., Shichinohe, H., Nakayama, N., Kazumata, K., Nakamura, H., Shimuzu, H., and Houkin, K. (2017). Superior Microvascular Perfusion of Infused Liposome-Encapsulated Hemoglobin Prior to Reductions in Infarctions after Transient Focal Cerebral Ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26, 2994-3003.

Shimbo, D., Abumiya, T., Shichinohe, H., Nakayama, N., Kazumata, K., and Houkin, K. (2014). Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury. *Brain Res* 1554, 59-66.

Takamiya, M., Miyamoto, Y., Yamashita, T., Deguchi, K., Ohta, Y., and Abe, K. (2012). Strong neuroprotection with a novel platinum nanoparticle against ischemic stroke- and tissue plasminogen activator-related brain damages in mice. *Neuroscience* 221, 47-55.

Tan, Y.H., Liu, M., Nolting, B., Go, J.G., Gervay-Hague, J., and Liu, G.Y. (2008). A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization. *ACS Nano* 2, 2374-2384.

Taverne, Y.J., de Wijs-Meijler, D., Te Lintel Hekkert, M., Moon-Massat, P.F., Dubé, G.P., Duncker, D.J., and Merkus, D. (2017). Normalization of hemoglobin-based oxygen carrier-201 induced vasoconstriction: targeting nitric oxide and endothelin. *J Appl Physiol* (1985) 122, 1227-1237.

Tomita, D., Kimura, T., Hosaka, H., Daijima, Y., Haruki, R., Ludwig, K., Bottcher, C., and Komatsu, T. (2013). Covalent core-shell architecture of hemoglobin and human serum albumin as an artificial O₂ carrier. *Biomacromolecules* 14, 1816-1825.

Yamashita, T., Kamiya, T., Deguchi, K., Inaba, T., Zhang, H., Shang, J., Miyazaki,

K., Ohtsuka, A., Katayama, Y., and Abe, K. (2009). Dissociation and protection of the neurovascular unit after thrombolysis and reperfusion in ischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* *29*, 715-725.

Yang, L., Chen, X., Wang, S., Fei, Y., Wang, D., Li, Y., He, G., Wu, Q., Chu, S., and Fang, W.

Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., and Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* *15*, 1031-1037.

Yoshimura, S., Sakai, N., Yamagami, H., Uchida, K., Beppu, M., Toyoda, K., Matsumaru, Y., Matsumoto, Y., Kimura, K., Takeuchi, M., *et al.* (2022). Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region. *N Engl J Med* *386*, 1303-1313.

Zhang, J., Cao, S., Kwansa, H., Crafa, D., Kibler, K.K., and Koehler, R.C. (2012). Transfusion of hemoglobin-based oxygen carriers in the carboxy state is beneficial during transient focal cerebral ischemia. *J Appl Physiol* (1985) *113*, 1709-1717.

Zhou, S.Y., Guo, Z.N., Zhang, D.H., Qu, Y., and Jin, H. (2022). The Role of Pericytes in Ischemic Stroke: From Cellular Functions to Therapeutic Targets. *Front Mol Neurosci* *15*, 866700.

Zhou, Y., He, Y., Yan, S., Chen, L., Zhang, R., Xu, J., Hu, H., Liebeskind, D.S., and Lou, M. (2023). Reperfusion Injury Is Associated With Poor Outcome in Patients With Recanalization After Thrombectomy. *Stroke* *54*, 96-104.