



Title	脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素運搬体HemoAct併用の脳保護効果に関する研究
Author(s)	伊藤, 康裕
Description	配架番号 : 2502
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14040号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14040
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94725
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhiro_Ito.pdf



学 位 論 文

脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素

運搬体 HemoAct 併用の脳保護効果に関する研究

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

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

伊藤康裕

学 位 論 文

脳虚血再灌流障害に対する局所脳冷却灌流療法と人工酸素

運搬体 HemoAct 併用の脳保護効果に関する研究

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

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

伊藤康裕

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
要旨	2 項
略語表	5 項
緒言	6 項
第一章 虚血再灌流障害に対する冷却 HemoAct の神経保護効果の検討	
緒言	8 項
方法	8 項
結果	14 項
考察	19 項
第二章 虚血再灌流障害に対する冷却 HemoAct の治療効果の持続性の検討	
緒言	20 項
方法	20 項
結果	22 項
考察	24 項
第三章 虚血再灌流障害に対する冷却 HemoAct の治療可能虚血時間の検討	
緒言	25 項
方法	25 項
結果	28 項
考察	30 項
考察	31 項
結論	33 項
謝辞	34 項
利益相反	35 項
引用文献	36 項

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部をまとめた論文は以下の雑誌に投稿中である。

論文名 Neuroprotective effects of combination therapy of regional cold perfusion and hemoglobin-based oxygen carrier administration on rat transient cerebral ischemia

雑誌 Journal of Cerebral Blood flow and Metabolism

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 伊藤康裕、鎧谷武雄、小松晃之、船木亮佑、月花正幸、栗栖宏太、寶金清博
演題名; ラットを用いた脳虚血再灌流障害に対する人工酸素運搬体 HemoAct
投与+局所脳冷却灌流の併用療法の脳保護効果の検討

学会名;第 77 回日本脳神経外科学会学術総会、2018 年 10 月 11 日、仙台国際
センター

2. Yasuhiro Ito, Takeo Abumiya, Masayuki Gekka, Kota Kurisu, Kiyohiro Houkin

演題名; Combinatio therapy of regional cold perfusion and hemoglobin-based oxygen
carrier in transient ischemic model

学会名;Brain and Brain PET, Jul, 7,2019, Pacifico Yokohama

3. 伊藤康裕、鎧谷武雄、月花正幸、栗栖宏太、寶金清博

演題名; ラットを用いた脳虚血再灌流障害に対する人工酸素運搬体 HemoAct 投
与+局所脳冷却灌流の併用療法の脳保護効果の検討

学会名;第 78 回日本脳神経外科学会学術総会、2019 年 10 月 9 日、大阪国際会
議場

要旨

【背景と目的】

我々はこれまで局所冷却灌流と人工酸素運搬体(HemoAct)投与の各々の治療法が虚血再灌流傷害に対し神経保護効果を持つことを示してきた。今回はこの2つの治療法の併用がより強い神経保護効果を示すか否かを、一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討することを目的とした。

【方法】

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

1)併用療法の脳保護効果の検討

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

2)併用療法の脳保護効果の持続性の検討

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

3)併用療法のTherapeutic time windowの検討

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

【結果】

1) 併用療法の脳保護効果の検討

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

2) 併用療法の脳保護効果の持続性

Day 0 から Day7 までの神経障害度はすべての日で併用療法群が有意に良好な結果となっており、また Nissl's 染色での Day7 における梗塞の体積も未治療コントロール群の平均 49% に対し、併用療法群は 21% と有意に梗塞の縮小効果を認めた。

3) Therapeutic time window の検討

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

【考察】

本研究により、脳局所冷却灌流療法と HemoAct の併用療法は強力な神経保護効果を示した。その背景には 2 つの異なる作用機序を持ち各々治療法が相加的に作用したためと考えている。脳局所冷却灌流療法は、虚血再灌流障害における微小血管の狭小化、血液脳関門の破綻、炎症反応を防ぎ、HemoAct は $15\mu\text{m}$ という小ささからたとえ狭小化した微小血管でも通過することができ効率的な酸素運搬と抗酸化作用もたらし不可逆的な低酸素を防ぐことができると考えた。ま

た本治療法の Therapeutic time window は 5 時間となった。この結果は過去の同様の報告の中で最長の結果である。虚血時間が長くなれば長くなるほど死亡率は高くなり、本研究でも未治療の場合は 4 時間以上の虚血で半数以上が死亡したことを考慮すると、冷却 10°C HemoAct 併用療法は、実臨床において側副血行に乏しい非動脈硬化性の脳主幹動脈閉塞の重症例にも応用可能であることが期待される。

【結論】

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

略語表

AQP4=aquaporin 4

BBB=blood-brain barrier

CCA= common carotid artery

CBF= cerebral blood flow

ECA=external carotid artery

Hb=hemoglobin

HBOC=hemoglobin-based oxygen carrier

4HNE=4 hydroxynonenal

ICA= internal carotid artery

LEH=liposome-encapsulated hemoglobin

MMP=matrix metalloproteinase

MPO= myeloperoxidase

OA =occipital artery

PPA=pterygopalatine artery

rt-PA= recombinant tissue plasminogen activator

STA= superior thyroid artery

TTC=2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

tMCAO= transient middle cerebral artery occlusion

緒言

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

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

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

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

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

央大学の理工学部小松研究室で開発された。この HemoAct を虚血領域へ投与する事により梗塞範囲の縮小と脳浮腫の軽減に成功した(Gekka et al.,2018)。

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

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

第 1 章

虚血再灌流障害に対する冷却 HemoAct の神経 保護効果の検討

【緒言】

我々は以前、虚血再灌流に対し、37°Cの HemoAct を経動脈的に投与し脳保護効果を報告してきたが(Gekka et al.,2018)、今回はその HemoAct による酸素供給に加えて、異なる機序で脳保護効果のある局所冷却灌流療法(Kurisu et al.,2006)を併用することでより高い治療効果が得られるか否かを検討する。

本章においてはラットの tMCAO (transient Middle Cerebral Artery Occlusion) モデルを用いて 1)未治療コントロール群(n=7)、2)冷却灌流単独療法 (10°C生食投与) 群 (n=7) 3) HemoAct 単独療法 (37°C HemoAct 投与) 群(n=7)、冷却 HemoAct 併用療法 (10°C HemoAct 投与) 群 (n=7) を設定した。この 4 群において再開通 24 時間の時点で冷却 HemoAct 併用療法により強い脳保護作用があるかを調べることを目的とした。脳保護の効果の検討として脳梗塞体積、脳浮腫体積、臨床症状、rCBF 変化、血漿蛋白の血管外漏出を検討した。

【実験方法】

1) transient MCAO 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、体重 290g-330g の Sprague-Dawley(SD)ラットを使用した。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 (Figure 1)。4%イソフルレン+1 N2O/O2(70:30)1 で導入し術中は 2%イソフルレン+N2O/O2(70:30)で維持した。個体の麻酔深度により維持は適宜調整し直腸温を 36.5~37.5° C に維持した。

ラットを手術台に仰臥位に寝かせ、顔面はシリンジ内に留置して維持麻酔を行い、最初に足底部を鑷子でつまみ、体動がなければ麻酔深度は十分と判断した。

皮膚切開は胸骨上端から下顎へ向かう正中切開を行い、四方にフックをかけて固定した。皮膚切開をすると直下に左右のリンパ節と顎下腺が確認できる。まず、左右の間を剥離し、胸鎖乳突筋を確認し術野上方の顎二腹筋を外側上方へ牽引すると、総頸動脈が露出できる。総頸動脈には迷走神経が伴走し数本の分枝を出しているが、この分枝や総頸動脈の分枝は中枢側においてカットしても特に症状は出ないので基本的にカットした。総頸動脈と外頸動脈を確認したのちに重要なのはまず外頸動脈が総頸動脈から分岐した直後に外側へ出る枝をしっかりと電気焼灼しカットすることで、これを怠り止血不能な出血を招いたこともしばしばあった。ここまでの過程が終了したら、舌骨をフックで牽引して外頸動脈を可能な限り長く剥離し 7-0 絹糸で結紮切断した。この際、使用する絹糸は長い糸を用いて、後に内頸動脈を剥離する際に持針器などでこの糸を把持することで retractor として使用することができる。この絹糸を利用して外頸動脈を時計 4 時方向へ牽引し翼口蓋動脈 (PPA) と内頸動脈が確保したのちに PPA を 7-0 の絹糸で結紮した。糸栓子は先端から 2 cm のところで折っておき糸栓子が入りすぎて SAH を起こすリスクを軽減した。また挿入した糸栓子を固定するためにあらかじめ内頸動脈の下に糸を通しておいた。総頸動脈を 7-0 絹糸で遮断し、(その際には後に再開通することが可能なように縛り方を工夫した)。次いでクリップを用いて内頸動脈を遮断し、外頸動脈を切開した。

その部位から糸子をゆっくり挿入した (PPA との分岐では PPA 側へ先端が入ってしまうことがあるのでうまく誘導した)。糸栓子の先端がクリップに当たったら、クリップをはずしさらに末梢へゆっくり挿入しあらかじめ折り曲げておいた 2cm のところまで挿入して、糸栓子の先端が MCA と ACA の分岐部まで到達すると軽い抵抗を感じるのでそれ以上は挿入せずに内頸動脈の糸を総頸動脈同様に解けるように縛り固定し終了とした。

MCAO 手術前後に脳血流 (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、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 MCAO 成功とし、その後の実験に使用した。

MCAO ラットモデルを作成し、覚醒下に 2 時間の脳虚血負荷を行った後に、再び吸入麻酔下に置き留置している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、tMCAO ラットモデルを完成させた。

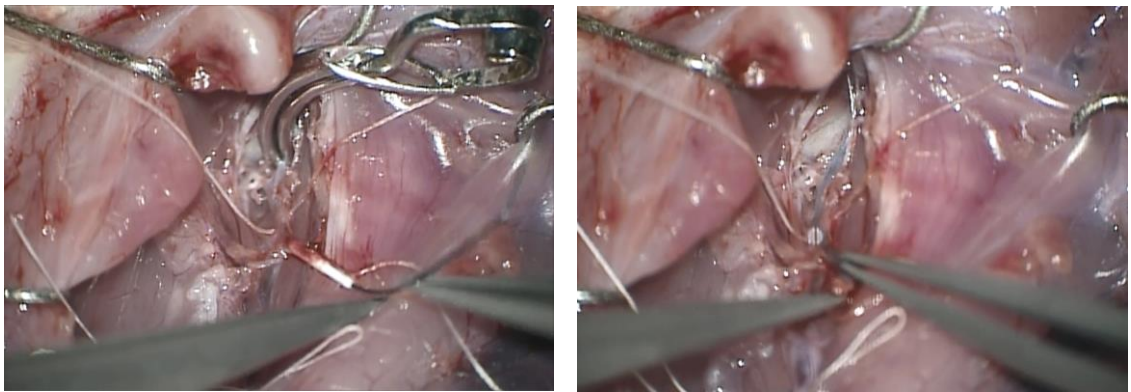


Figure 1 糸栓子を用いた tMCAO モデルの作成

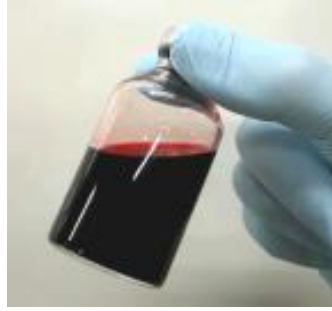
糸栓子は外頸動脈より内頸動脈へ向けてゆっくり挿入する。先端が内頸動脈先端部に達すると軽い抵抗と糸栓子のたわみを感じるのでそれ以上は挿入せずに固定する。

2) 経動脈的局所灌流療法

前述の如く、2時間の脳虚血負荷後に全身麻酔下に糸栓子を抜去した際に、右 ICA より患側脳に局所灌流療法を施行した。ICA に巻いた糸栓子の固定のための結紮糸を解除し、糸栓子を抜去したのちに小動物用カテーテル PE 10 catheter (brck LTD, Tokyo, Japan)を ECA の既存の小孔から挿入し、ICA まで進め、カテーテルを ICA と共に 7-0 の絹糸で固定した。カテーテルにシリンジ及びシリンジポンプを接続し、総量 6ml/kg を 5 分で投与した。

3) HemoAct

HemoAct (Figure2)は中央大学理工学部応用化学科小松研究室にて、開発された新規の HBOCs であり、ヘモグロビン 1 分子をコアとしアルブミン 3 分子が周囲に共有結合したタンパク複合体である。アルブミンが表層を覆う形となり、陰性荷電 (pI=5.1) していることで血管内皮細胞と電荷的に反発することで血管外漏出が生じにくく、また大きさが 15nm とヒト赤血球の 1/500 で粒径が著しく小さいという特徴を有している。HemoAct 溶液は、以前の報告にあるように Hb=5g/dl, 総蛋白濃度=20g/dL の濃度となるように小松研にて製造調製され、当研究室に発送されたものを使用した。



4) 実験プロトコール(Figure3)

(a) 未治療コントロール (Cont) 群：通常の再灌流のみ。

(c) 37°C HemoAct “単独療法” (37H) 群：37°C HemoAct を上記と同様に投与。

(d) 10°C HemoAct “併用療法” (10H) 群: 10°C HemoAct を上記と同様に投与。

Experimental timeline diagram showing the sequence of events:

- 2 h:** MCA occlusion (indicated by an upward arrow).
- Ischemia:** Period from -2 h to 0 h, represented by a light gray bar.
- 0 h:** Treatment (5 min) (indicated by a hatched bar).
- Reperfusion:** Period from 0 h to 24 h, represented by a dark gray bar.
- 24 h:** Sacrifice (indicated by an upward arrow).

Below the diagram, the treatment groups are listed:

- 1, Control (n=7); no treatment
- 2, 10S (n=7); 10°C saline (6.0 ml/kg)
- 3, 37H (n=7); 37°C HemoAct (1.2 g/6.0 ml/kg)
- 4, 10H (n=7); 10°C HemoAct (1.2 g/6.0 ml/kg)

11

5) CBF 測定

レーザードプラー血流計 (OMEGAFLOW FLO-C1; OMEGAWAVE, Tokyo, Japan) を用いて、右 MCA が灌流する大脳半球皮質の微小血管の CBF を測定した。血流計のプロローベは、麻酔下の状態で動脈処置開始前に伏臥位で側頭筋を剥がし側頭線より約 4mm 下の部位にて経頭蓋的に測定した。頭蓋骨にプロローベを当て、脳梗塞前の段階で約 30-45ml/min 部分で安定した数値が得る部位を測定部位とし、その後の測定も同じ部位で行うこととした。脳梗塞前の CBF の値を base line 100% とし、以降の測定値はこの base line に対する % 表示で表現することとした。測定は梗塞前、虚血作成直後、再開通前、再開通直後、再開通 24 時間後に測定し全て全身麻酔下に測定している。全て条件は同じであるが麻酔そのものによる CBF への影響もある。

6) 神経学的所見

MCAO 作成後、再灌流直後、再灌流 24 時間後にこれまで報告と同様に Bederson の 18-point neurological scale score (Bederson et al., 1986) を用いて神経学的所見の評価を行った。スコアが高ければ高いほど神経学的所見が軽く、低いほど重症となる。評価は、盲検的になるように各ラットの振り分けを知らない検者が行うようにした。

7) 脳梗塞、脳浮腫体積

脳梗塞・脳浮腫体積は、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 6 切片を作成し、2% TTC 溶液に 37°C、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。解析は、盲検的になるように各ラットの振り分けを分らない検者が行うようにした。

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 (%) =
$$(\text{contralateral hemispheric volume} - \text{ipsilateral non-infarct volume}) / \text{contralateral hemispheric volume}$$
- ・浮腫体積 : Edema volume (%) =

$(\text{ipsilateral hemispheric volume} - \text{contralateral hemispheric volume}) / \text{contralateral hemispheric volume}$

8) 免疫染色

血液脳関門の破綻に伴う血漿蛋白成分の血管外漏出の程度を評価する目的で前述の TTC 染色で使用した脳切片を TTC 染色での脳梗塞体積評価後に 4%パラホルムアルデヒドで浸透固定を行なった。線条体が含まれる切片を 4 μ m の薄切切片にし rat-IgG の免疫染色と HemoAct そのものの血管外漏出を評価する目的でヒトアルブミンの免疫染色を行なった。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 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 1 時間で反応させた。発現シグナルを得るために 3,3-ジアジノベンジン(DAB)を 2-3 分反応させた。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-rat IgG (1:400, Genetex, Inc, USA) : 血漿成分の血管外漏出
- Anti-Human Alb (1:200, Abnova, Taipei, Taiwan) : HemoAct の血管外漏出

染色後、評価は染まった部分の面積と体側の脳の面積から%として評価し比較検討した。

9) 脳温の測定

ラット中大脳動脈領域に穿頭し、脳皮質から約 3 mm の部位に針温度計を穿刺して、局所灌流療法中に 1 時間に渡り、脳温の持続測定を行った。この実験は脳の損傷を伴い、以降の実験にラットが使用できないことから 10°C生食単独療法群、10°C HemoAct 併用療法群 1 匹ずつの測定とした。

10) 統計学的解析

データは、mean $\pm$ SD で表した。4 群間の比較には 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) CBF に与える影響

レーザードプラー血流装置を用いた CBF の変化については脳梗塞作成前、直後、再開通直後、再開通 24 時間後で測定した。全ての群において再開通直後は一過性の過灌流状態となったが、再開通 24 時間後には CBF は低下し、base line の値に対し各群以下の通りとなった。

Cont: $43\% \pm 11\%$ 、10S: $59 \pm 13\%$ 、37H: $76 \pm 21\%$ 、10H: $90 \pm 32\%$ (Figure 1)。37°C HemoAct 単独療法群と 10°C HemoAct 併用療法群は未治療コントロール群に比べ有意に CBF の低下が抑制された結果となった。一方、単独療法群と併用療法群の間では統計的な有意差は無かったが、併用療法投与群の方が CBF の低下が少ない傾向にあった。

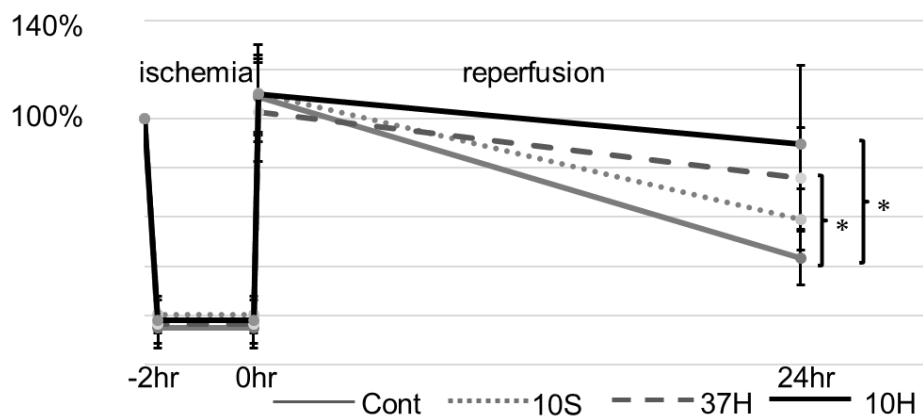


Figure4 CBF の経時的変化

Cont:未治療コントロール群、10S:局所脳冷却灌流療法群、37H:37°C HemoAct 単独療法群、10H:10°C HemoAct 併用療法群

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

2) 臨床症状に対する影響

18-point neurological scoring scale を用いた神経症状評価では、MCAO 作成直後・局所灌流療法後（再灌流直後）では4群間に差は認められなかった。再灌流 24 時間後では、未治療コントロール群（ 8.1 ± 0.6 ）、 10°C 生食単独療法群（ 11 ± 0.8 ）、 37°C HemoAct 単独療法群（ 11 ± 1.7 ）、 10°C HemoAct 併用療法群（ 12 ± 1.4 ）となり、治療を行なった3群は全て未治療コントロールに比して有意に症状の改善を示した。各々の治療群間には差が無かった。

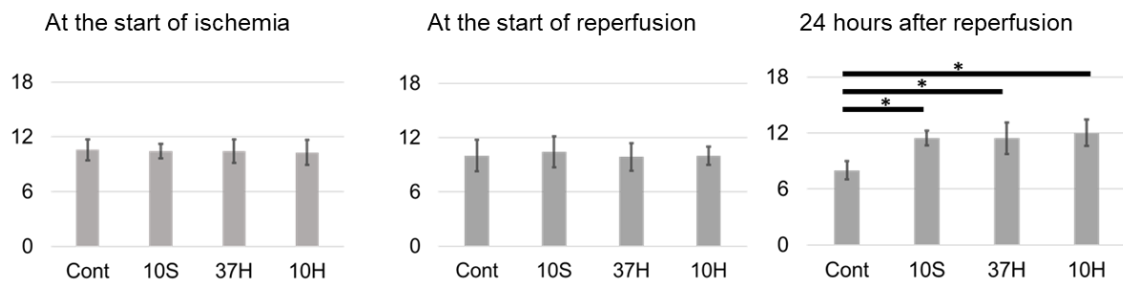


Figure 5 各群の神経障害度の変化

各群の神経障害度は 18 point scale を用いて虚血直後、再開通時、再開通 24 時間の時点で測定した。* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

3) 再開通 24 時間後の梗塞体積、脳浮腫体積に対する影響

再灌流 24 時間後の摘出脳切片に TTC 染色を行なった結果は未治療コントロール群での脳梗塞体積は $44.7 \pm 6.9\%$ であった。これに対し、 10°C 生食単独療法群 $20.7 \pm 10.2\%$ 、 37°C HemoAct 単独療法群 $24.9 \pm 3.9\%$ 、 10°C HemoAct 併用療法群 $12.3 \pm 11.9\%$ と全ての治療群で有意な脳梗塞縮小効果があった。また単独療法群と併用療法群間では 10°C HemoAct 併用療法群と 37°C HemoAct 単独療法群の間のみで有意差が見られたが、併用療法群は各単独療法群と比して約 1/2 の梗塞縮小効果を確認した。また脳浮腫の体積についても同様の結果であったが、統計学的な差は未治療コントロール群と 10°C HemoAct 併用療法群の間のみ見られた。

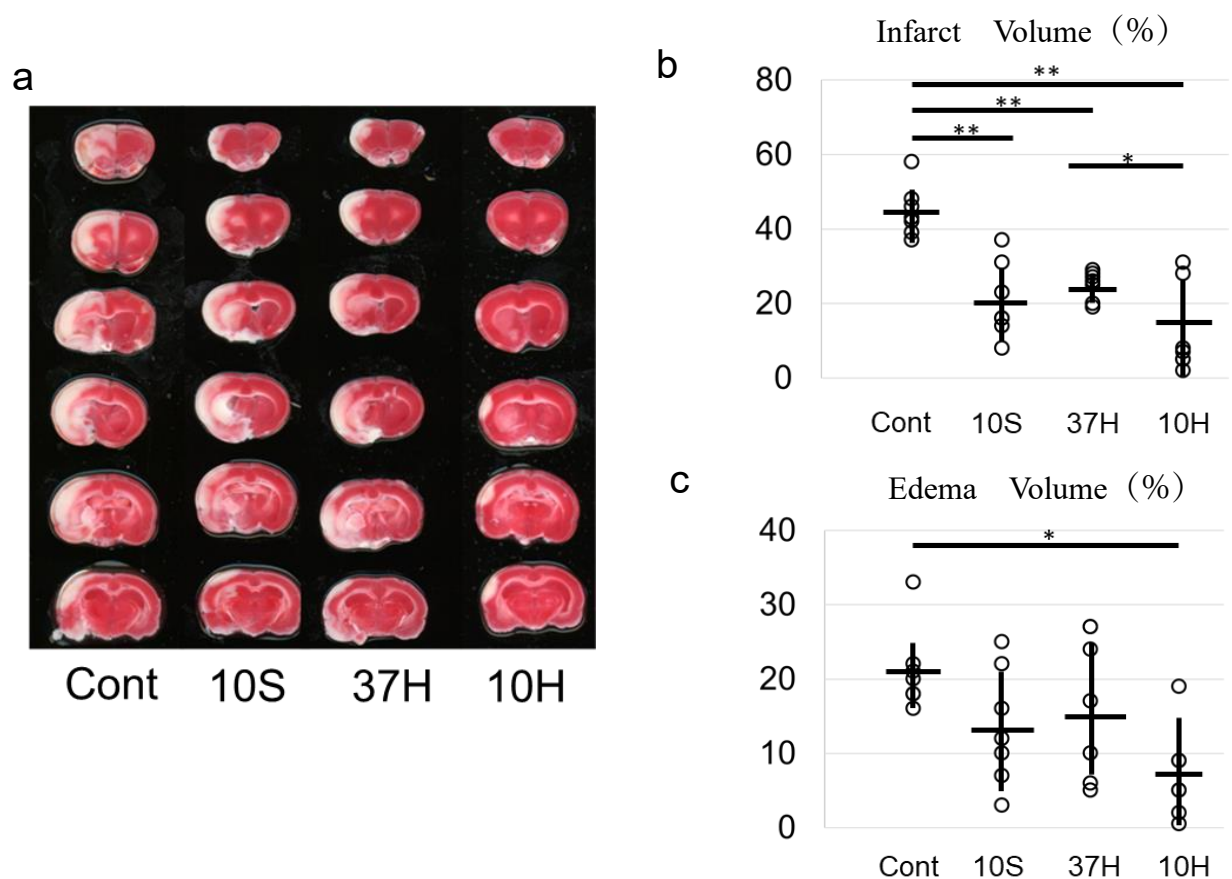


Figure 6 10°C HemoAct 併用療法の脳梗塞、脳浮腫体積に対する影響

a, TTC 染色による各群の代表症例 **b**, 各群の脳梗塞体積 (%) **c**, 各群の脳浮腫体積 (%) . Cont: 未治療コントロール群、10S: 局所脳冷却灌流療法群、37H: 37°C HemoAct 単独療法群、10H : 10°C HemoAct 併用療法群

*P< 0.05 and **P< 0.01.

4) BBB 破綻による血漿蛋白の血管外漏出への影響

上述の方法で rat-IgG の免疫染色で BBB 破綻の程度を評価した結果、未治療コントロール群は $55 \pm 14\%$ 、 10°C 生食単独療法群は $45 \pm 18\%$ 、 37°C HemoAct 併用療法群は $39 \pm 22\%$ 、 10°C HemoAct 併用療法群は $23 \pm 8\%$ であった。いずれの治療においても未治療コントロール群よりも BBB の破綻の程度は小さい傾向であったが、 10°C HemoAct 併用療法群のみ統計学的に有意であった。また、Human Alb の免疫染色によって HemoAct そのものの血管外漏出を解析した結果、併用療法群の方が小さい傾向ではあったが統計学的に有意では無かった($p=0.11$)。

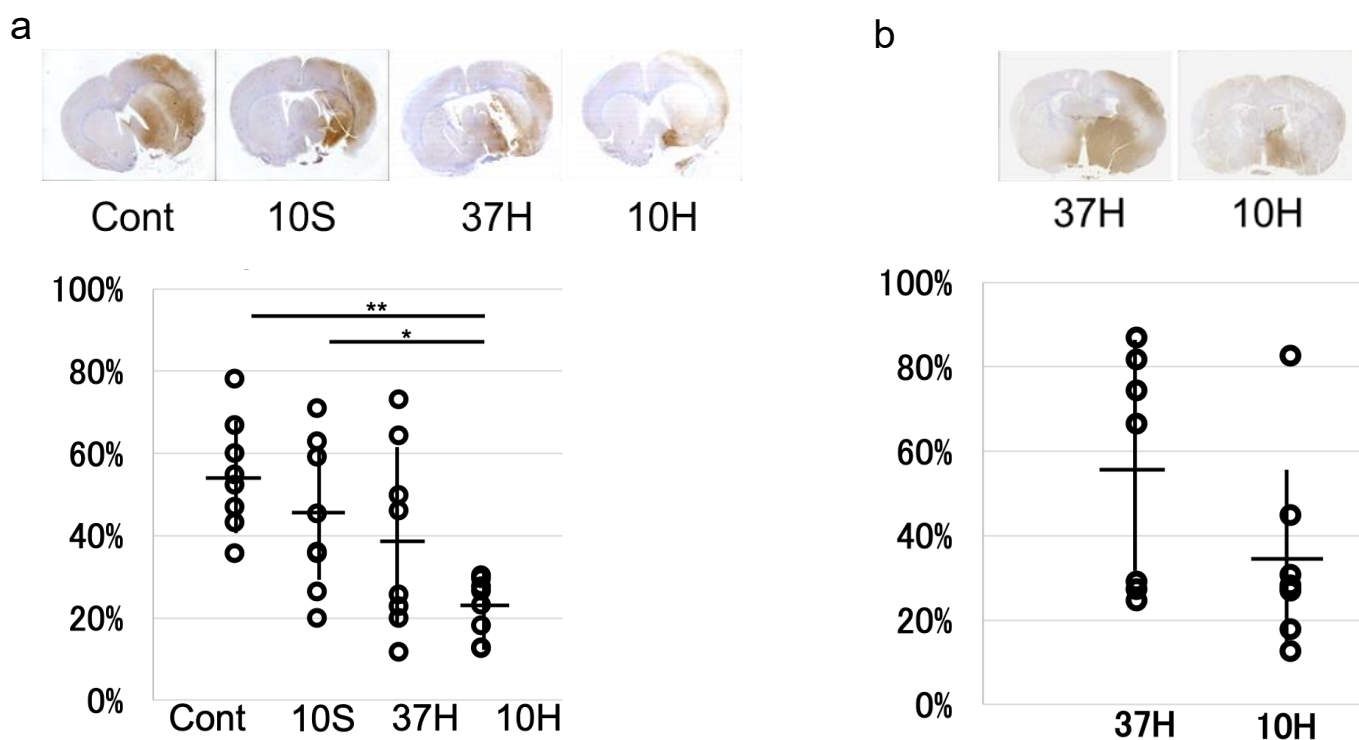


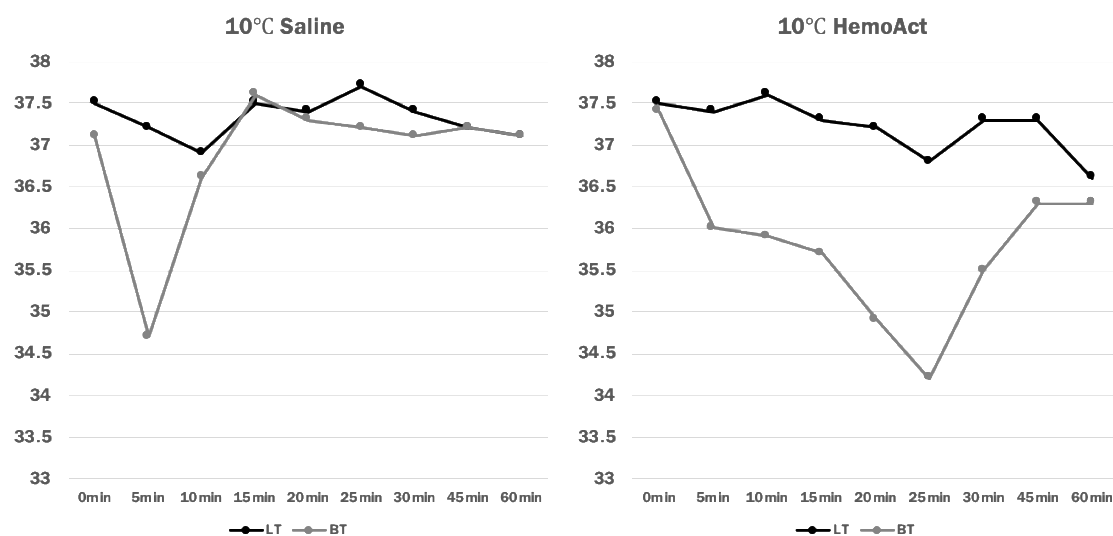
Figure 7 各群の BBB 破綻の程度の比較

a, rat-IgG 免疫染色による各群の代表例と免疫陽性領域の比較

b, Human-Alb 免疫染色による 37H と 10H 群の代表例と免疫陽性領域の比較 Cont: 未治療コントロール群、10S:局所脳冷却灌流療法群、37H: 37°C HemoAct 単独療法群、10H : 10°C HemoAct 併用療法群 *P< 0.05 and **P< 0.01.

4) 脳温に対する影響

10°C生食単独療法群、10°C HemoAct 併用療法群共に治療開始時には直腸温とほぼ同じ温度であった。局所灌流療法後、10°C生食の場合は脳温が急峻に下がり、速やかに復温した。一方 10°C HemoAct は生食と同程度の温度変化を見せたが、その下がり方は緩やかで、かつ低温状態が長く継続する特徴を示した。(Figure 8)



LT:Rectal temperature(直腸温) BT:Brain temperature(脳温)

Figure 8 10°C生食、10°C HemoAct 投与中の脳温の変化

10°C HemoAct の方が脳温の低下は緩やかで、持続時間が長かった。これは生食に比べて HemoAct の方が粘性の高い液体であるため起こった現象であると考えている。

【考察】

本章の実験では先行の研究ですでに虚血再灌流障害に対し効果が示された“局所脳冷却灌流療法”と“人工酸素運搬体 HemoAct”の 2 つの異なる治療を併せた併用療法として 10°C HemoAct 経動脈投与による治療効果を検討した。結果、本治療法は、未治療コントロールと各々の単独療法に比べ虚血再灌流後の CBF の維持、梗塞体積縮小効果、脳浮腫の縮小効果を示した。各々の単独療法の結果は先行の研究と比して梗塞体積縮小効果が弱く出ているが、先行の実験では局所脳冷却灌流療法では生食 20ml/kg の投与に対し本実験では 6ml/kg、37°C HemoAct 単独療法も先行の研究では 7ml/kg に対し本実験では 6ml/kg 投与と投与量が少ないことが一つ原因としてあげられる。これは、今後の臨床応用などを考えた場合に投与による循環動態の破綻を避けるべく、投与量が循環血液量の 1/10 相当となる 6ml/kg 投与が適切であると考えたためである。

血漿蛋白の漏出については BBB の破綻をみていることになるが、IgG と HemoAct の漏出している範囲を比較すると、同等か HemoAct の方がやや広い印象にあった。HemoAct は重さ 264 kDa、長径 8.7nm の分子である一方で IgG は 150kDa、14nm であり、IgG も HemoAct も分子の大きさ（分子量より長径の方）に依存して受動的に漏出したとすると、HemoAct の方が幾分漏出しやすい状況にあるのかもしれない。

本章では虚血再灌流 24 時間における治療効果を検討したが、この 10°C HemoAct 併用療法の治療効果が亜急性期から慢性期まで持続するか否かを次実験で検討した。

第 2 章

虚血再灌流障害に対する冷却ヘモアクトの治療 効果の持続性の検討

【緒言】

第 1 章では 10°C HemoAct 併用療法の 2 時間虚血/24 時間再開通における神経保護効果を示した。そこで本実験は、本治療方法の治療効果が亜急性期から慢性期まで持続するものか否かを検討する目的で行なった。本章においては第 1 章と同様ラットの tMCAO モデルを用いて 1) 未治療コントロール群 (n=8)、10°C HemoAct 併用療法群 (n=8) を設定した。この 2 群において再開通 7 日までの観察期間を設け臨床症状、7 日の時点での脳梗塞体積を検討した。

【実験方法】

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、体重 290g-330g の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。tMCAO ラットの作成方法と、局所灌流療法の方法は第 1 章で述べた通りである。今回は 10°C HemoAct 併用療法群 (n=8) と未治療コントロール群 (n=8) の 2 群設けた。

虚血時間は第 1 章の 2 時間に対し、長時間の生存を必要としたため 100 分虚血とした。再開通後 7 日間観察を行い、日々の 18 point scale と 7 日目の時点での脳梗塞体積を検討した (Fig9)。脳梗塞の体積は本実験では Nissl's 染色で解析した。理由は再灌流 7 日になると虚血巣にマクロファージなどの炎症細胞が遊走する結果、ミトコンドリアを染色する TTC 染色では偽陽性が生じてしまうからである (Fig10)。

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。解析は、盲検的になるように各ラットの振り分けを分からない検者が行うようにした。

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 (%) =
(contralateral hemispheric volume – ipsilateral non-infarct volume) / contralateral hemispheric volume

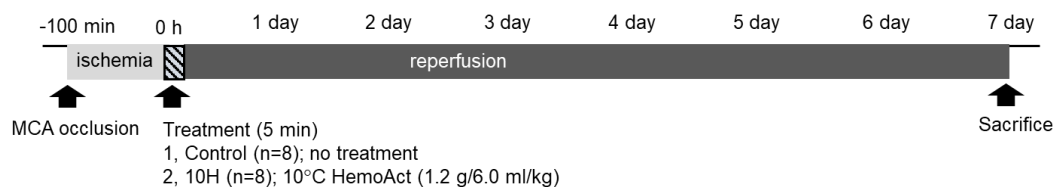


Figure 9 実験プロトコール

Nissl's 染色

TTC 染色

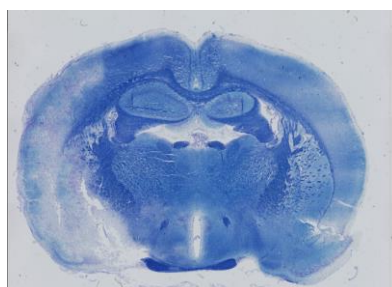


Figure 10 Nissl's 染色と TTC 染色の違い

TTC 染色 (右)は炎症細胞の遊走により梗塞体積を測定する際には偽陽性を生じてしまうため本章の再開通7日での評価には適さないと判断し Nissl's 染色(左)を使用した。

【実験結果】

1) 神経所見に与える影響

18-point neurological scoring scale を用いた神経症状評価では、MCAO 作成直後・局所灌流療法後（再灌流直後）では両群間に差は認められなかった。そして両群とも継時的に症状は改善傾向にあった。Day1 から Day7 全てにおいて 10°C HemoAct 併用療法群の症状が未治療コントロール群に比べ有意に良好な結果であった。

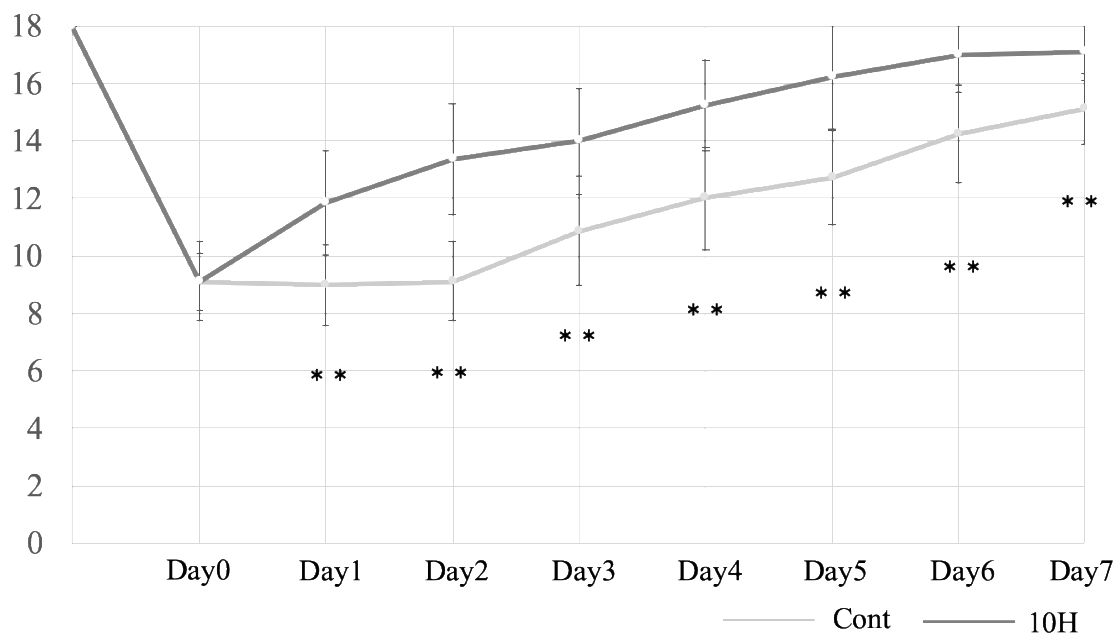


Figure 11 併用療法の神経障害度に対する治療効果の持続性

神経所見は第1章同様に 18 point scale を使用した。Cont:未治療コントロール群、10H:10°C HemoAct 併用療法群

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

2) 脳梗塞体積に対する影響

Nissl's 染色を用いた脳梗塞体積の結果はコントロール群が平均 $49 \pm 15\%$ であったに対し 10°CHemoAct 併用療法群では $21 \pm 15\%$ と有意に梗塞の縮小効果を確認した。

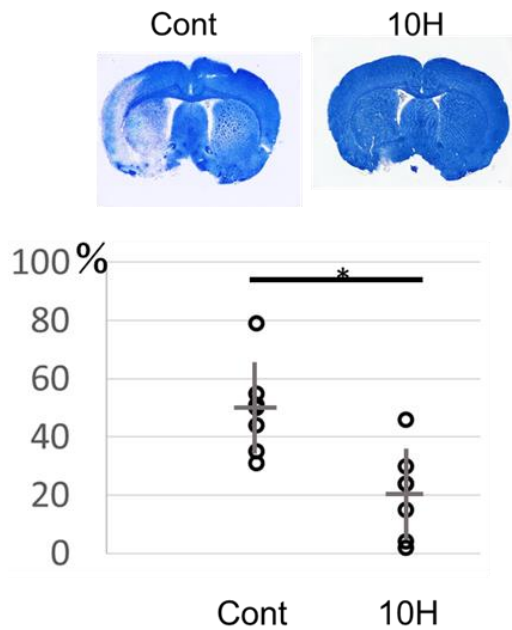


Figure 12 脳梗塞体積に対する影響

各群の Nissl's 染色の代表例と梗塞体積の比較。Cont:未治療コントロール群、10H: 10°CHemoAct 併用療法群 * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

【考察】

今回の実験では第 1 章で示された 10°C HemoAct 併用療法の治療効果の持続期間を検討した。結果からまずわかったことは、未治療であっても、経時的に神経障害度は改善を呈することである。この挙動は、実臨床においても見られる傾向である。梗塞直後の症状は MRI などの画像上の改善がない場合でもリハビリなどを経て改善を呈する点で今回のラットのモデルの結果からヒトへの応用において参考となりうることが示唆された。再開通 7 日の亜急性期において症状、梗塞体積が治療群において良好であったのは再開通直後に投与し梗塞の体積が減少した結果がそのまま持続したためと考える。

しかし、実際の臨床では発症してから治療（再開通）までの時間は当然症例により様々であり臨床応用に向けてはどの程度の虚血に対して効果があるのかを検討する必要がある次章での目的とした。

第 3 章

虚血再灌流障害に対する冷却 HemoAct の治療 可能虚血時間の検討

【緒言】

第 1 章では冷却 HemoAct 併用療法の 2 時間虚血/24 時間再開通における神経保護効果を示し、第 2 章ではその効果の再開通 7 日までの効果持続性を確認した。しかし実臨床においては、発症から 2 時間で再開通が得られる症例は多くなく、病院への搬送、検査を経て治療を行うため、より長い虚血時間に有効であることが望まれる。そこで今回は、本治療方法の治療可能な虚血時間を検討することとした。本章においては第 1 章と同様ラットの tMCAO モデルを用いて 1) 未治療コントロール群(n=8)、10°C HemoAct 併用療法群 (n=8) を設定した。この 2 群において虚血時間を 4 時間から 6 時間まで延長し再開通 24 時間の時点での神経障害度と、摘出脳を用いて出血性変化の程度を検討した。

【実験方法】

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、体重 290g-330g の Sprague-Dawley(SD)ラットを使用した。tMCAO ラットの作成方法と、局所灌流療法の方法は第 1 章で述べた通りである。虚血時間は 4 時間、5 時間、6 時間とした。各々の虚血時間において未治療コントロール群 (n=8)、10°C HemoAct 併用療法群 (n=8) で、虚血直後、再開通 24 時間後の神経障害度と再開通 24 時間後における出血性変化の程度を検討した (Figure 13)。

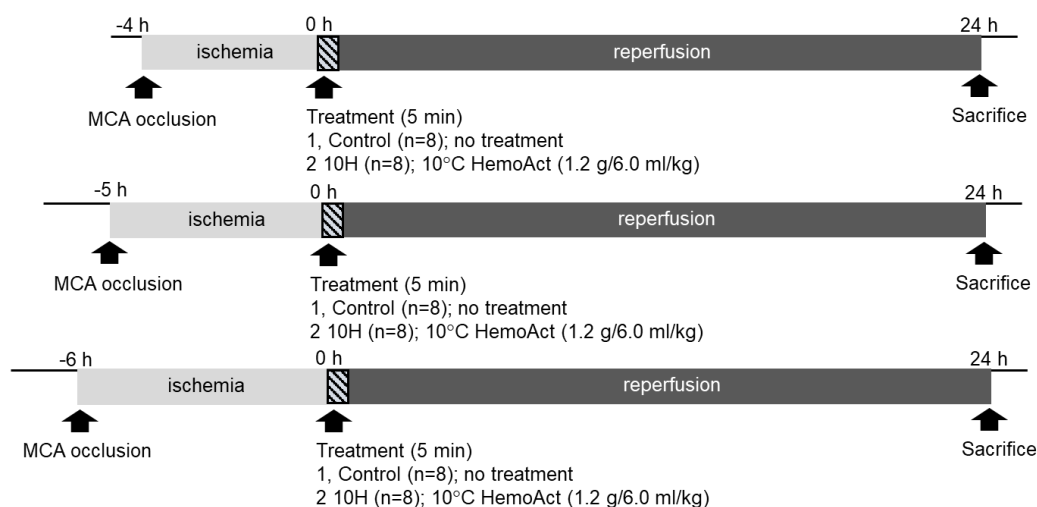


Figure 13 実験プロトコール

1) 神経障害度の測定

第1章と第2章においては、Bedersonの18point scaleを神経障害度の測定に使用した。

しかし本章においては6-point scaleを使用している(Tibo et al., 2004)。理由は本章の実験のように長い虚血時間においてラットがしばしば死亡するため、死亡という項目も含めたscaleでなければ比較検討することができないためである。本scaleは0から6で表記され(0=症状なし, 1=前足の伸展が不完全, 2=たまにcirclingする, 3=絶えずcirclingする, 4=麻痺側へ転倒する, 5=自発の歩行なし, 6=死亡)数字が大きいほど重症となる。

2) 出血性変化の評価 (Figure14)

本章の実験の特徴として、長い虚血時間のため梗塞拡大が著しくなって、再灌流24時間以前に死亡してしまうラットが多く出てくることがあった。生きた状態で脳組織が取り出せない場合に死後変化で梗塞範囲の正確な同定ができないため、脳の障害の程度は虚血再灌流後の出血性変化を指標とした。再開通24時間後にラットが生存している場合は4%パラホルムアルデヒドで灌流固定、死亡したラットについては浸透固定を施行したのち、厚さ2mmの冠状スライスを作成した。そこで線条体が含まれるスライスを第1章と同様に4μmの薄切片にしてHE染色を行ない評価した。出血の程度を定量化するために、観察された出血点の長径によって1点から3点に分類し、各々の出血点の個数を掛け合わ

せ合計スコアを算出した。50 μ m 以下を small(1 点)、50 から 150 μ m を medium(2 点)、150 μ m 以上を large(3 点)とした。

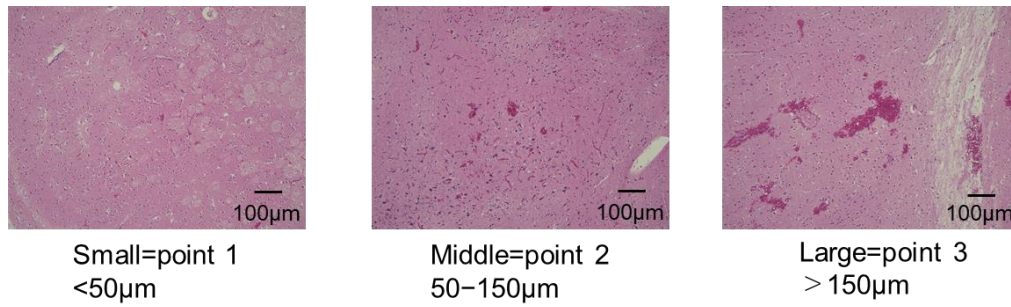


Figure 14 出血スコアの定義

出血の程度は HE 染色で評価した。出血点の大きさと個数の総和を各ラットの出血スコアとして定量的な解析を行った。出血点は 1 点から 3 点まで大きさにより定義した。

【実験結果】

1) 神経障害度に与える影響

すべての虚血時間において、虚血直後、再灌流直後の神経障害度は両群間に差は認めなかった。一方、4時間虚血、5時間虚血において再開通24時間後の10°C HemoAct 併用療法群の神経障害度は各々 2.4 ± 0.7 、 3.6 ± 2.2 であったのに対し、未治療コントロール群は 5.1 ± 0.1 、 5.5 ± 0.5 といずれも10°C HemoAct 併用療法群が有意に良好であった。6時間虚血においては両群ともすべてのラットが再開通24時間後には死亡しており差は無かった。

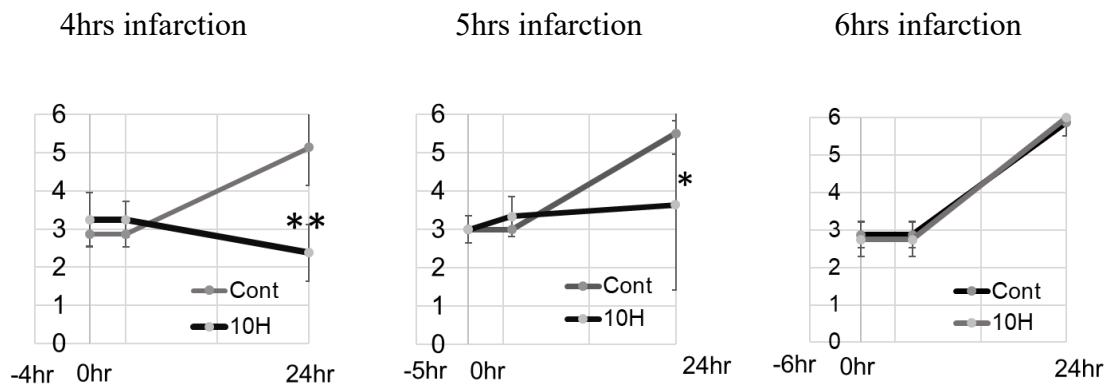


Figure 15 各群の4から6時間虚血における神経障害度の変化

本章では6-point scaleを使用した。(0=症状なし, 1=前足の伸展が不完全, 2=たまにcirclingする, 3=絶えずcirclingする, 4=麻痺側へ転倒する, 5=自発の歩行なし, 6=死亡) 数字が大きいほど重症となる。

* $P < 0.05$. Cont:未治療コントロール群、10H:10°C HemoAct 併用療法群

2) 出血性変化に対する影響

出血のスコアは前述の如く、患側スライスの中の出血点の大きさと個数から総和で算出し比較検討した。4時間虚血、5時間虚血における未治療コントロール群の平均は各々 21.1 ± 11.2 、 36.5 ± 18.3 であった。

これに対し、 10°C HemoAct 併用療法群では4、5時間虚血での出血のスコアは 10.6 ± 8.2 、 19.4 ± 5.2 と有意に出血性変化を抑制した。6時間虚血については未治療コントロール群で 47.8 ± 31 、冷却 HemoAct 群で 21 ± 22 と冷却 HemoAct 群のほうが低い傾向にあったが、有意差は認めなかった ($p=0.160$)。

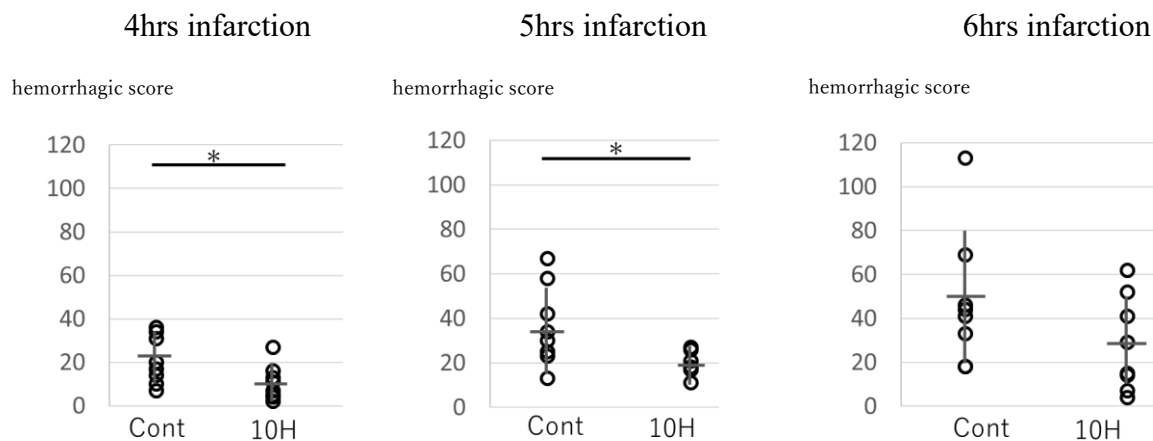


Figure 16 各群の出血スコアの虚血時間毎の比較

Cont:未治療コントロール群、10H: 10°C HemoAct 併用療法群

* $P < 0.05$

【考察】

本章の結果から 5 時間までの虚血時間では、神経障害度並びに出血性変化共に 10°C HemoAct 併用療法の治療効果が確認された。脳そのものの障害度の尺度として脳梗塞体積ではなく出血性変化を検討したのは、前述のように死後でも評価が可能と考えた結果である。実際、虚血時間が長くなれば出血のサイズ、出血点の数共に増えており結果出血のスコアが大きくなっていることから脳の障害を適切に反映していると考えられた。また興味深いのは虚血時間 4 時間の場合、両群共に出血していたのは主に線条体の領域に留まっていたのに対し、虚血時間の延長と共に出血点が観察された範囲は皮質下へと拡大する傾向にあったことも実臨床で観察される出血性梗塞を反映していると考ええる。本章の結果から 10°C HemoAct 併用療法の Therapeutic time window は 5 時間となった。

考察

本研究により冷却 HemoAct 併用療法は強力な神経保護効果を示した。2 時間虚血、再開通 24 時間の実験においては梗塞体積の減少率は未治療の梗塞体積と比較して冷却 HemoAct 併用療法で 27.5%であったのに対し、局所脳冷却灌流単独療法、37°C HemoAct 単独療法が各々 46.3%、55.7%であった。各々の単独療法は先行の研究ではより高い梗塞減少率を示したが、本研究との違いは投与量に依存したと考える。本研究ではいずれも 6ml/kg の投与で、先行研究では局所脳冷却灌流療法は 20ml/kg、37°C HemoAct 単独療法は 7.0kg/ml の投与であった。6ml/kg という量は循環血液量の 1/10 以下であり、循環動態の破綻を起こす危険性が少ないことから、今後の臨床応用に参考となる実験結果であったと考えている。

今回の強力な神経保護効果の背景には 2 つの異なる治療法が相加的に作用したためと考えている。脳局所冷却灌流療法は、虚血再灌流障害における AQP 4 の上昇を抑えることで、アストロサイトの end-foot の膨化を抑制し、微小血管の狭小化、血液脳関門の破綻、炎症反応を防ぐことで、神経保護効果をもたらした。一方 HemoAct は効率的な酸素運搬と抗酸化作用が神経保護効果をもたらした (Kurusu et al., 2016)。HemoAct は 15 μ m と自家赤血球の 1/500 という大きさの特徴から、虚血再灌流障害時に、たとえ狭小化した微小血管でも内腔を通り、虚血領域へ酸素を運搬し不可逆的な低酸素を防ぐことができる (Gekka et al., 2018)。

本研究の結果で最も重要なことは Therapeutic time window の延長であった。10°C HemoAct 併用療法は 5 時間の Therapeutic time window を示した。文献を調べ得た限りでは、我々同様に中大脳動脈閉塞モデルを用いた 3 時間以上の虚血に対する Therapeutic time window に関する論文は 3 つあった。エダラボンと t-PA の併用療法 (Zhang W et al., 2004) では、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて 3 時間虚血まで生存期間を延長したが、4.5 時間は延長しなかった。20°C の生理食塩水を利用した中程度の低体温療法 (Zhao et al., 2009) では 2.5 時間 Therapeutic time window と報告されている。また、内因性の虚血耐性を誘導する post conditioning は同様にラットに対し、2、3、4、4.5、6 時間の虚血時間を設けて検討されているが、Therapeutic time window は 4 時間と報告されている (Wang Y et al., 2014)。すなわち、過去の報告からは最大 4 時間の Therapeutic time window までであり、今回の我々の治療法が 5 時間までと最も長い結果となった。虚血時

間が長くなれば長くなるほど死亡率は高くなり、本研究でも未治療の場合は4時間以上の虚血で半数以上が死亡したことを考慮すると、10°C HemoAct 併用療法は、実臨床において側副血行に乏しい非動脈硬化性の脳主幹動脈閉塞の重症例にも応用可能であることが期待される。

本研究の limitation は以下のとおりである。今回示した脳保護効果は神経障害度や脳梗塞体積などの治療の結果であり、その過程にあるメカニズムに迫る結果を示せていない。MMP-9 や 4HNE などの炎症反応や酸化ストレスの程度をウェスタンブロッティングで定量的に測定し比較することが必要であると考え。また 7 日までの治療の持続性は評価したがそれ以上の長期の評価をできていないため、今後は月単位での評価も必要となる。また、本研究で使用したラットがすべて約 8-9 週齢のオスに限定しているため、より高齢であったりメスのラットでの評価も必要となる。

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) 本治療法は2時間虚血24時間再開通において他の単独療法より梗塞縮小効果、脳浮腫縮小効果、BBBの破綻を軽減し最も強い脳保護効果を示した。
- 2) 本治療法は7日間の亜急性期まで脳梗塞体積の軽減、神経症状の改善がありその効果の持続性が確認された。
- 3) 本治療法は神経症状の改善と出血性変化の軽減を認め、Therapeutic time windowを5時間まで延長した。

以上の知見から、10°C HemoAct 併用療法は急性期脳梗塞における新たな治療の選択肢となり得ると考えられた。中でも Therapeutic time window を延長したことから虚血時間の長い症例に対する神経症状悪化の軽減や、死亡率の軽減に有用であることが示唆された。この効果の背景にあるメカニズムは先行の2つの研究 (Kurisu et al., 2016; Gekka et al., 2018) で確認されているが、本研究においてもウェスタンブロッティングによる MMP-9 や 4HNE などのタンパク定量で示すべきと考える。

今後実臨床での応用へ向けてさらなる基礎データの蓄積やラット以外の動物種での治療効果の検討も望まれる。具体的に本研究は全て閉塞血管の再開通を前提としたプロトコルを設定したが、実臨床においては再開通し得ない症例も多い。そこで側副血行路に富んだ動脈硬化性病変の永久虚血に対しては本治療法の効果が期待できると考えており、今後は永久虚血に対する効果の検討も行いたい。また実臨床への応用へ向けて HemoAct の投与経路についても最適化を図りたい。経皮的血栓回収術を行う場合にはカテーテルより本研究と同様の経動脈投与が可能であるが、実臨床においては自然再開通する症例も多い。

そこで HemoAct 単独療法の経静脈投与でも効果が確認されれば、前述の自然再開通の場合にも対応できる。

また経皮的血栓回収を行う際にも局所冷却灌流療法を再開通時に生理食塩水で行うこととし、患者接触時に経静脈的 HemoAct 投与を開始して、投与しながら経皮的血栓回収術を試みるのが可能になるであろう。

さらに温度の設定、投与量、投与速度などを変化させた研究が今後必要と考える。

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 實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、直接御指導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 鎧谷武雄助教に深く感謝致します。

また、HemoAct の提供及び HemoAct に関する論文上の記載に関する助言などご協力いただいた中央大学理工学部応用化学科 小松晃之教授に感謝申し上げます。

また、本研究は JSPS KAKENHI Grant Number 16K10708 の助成を得て行っており、重ねて御礼申し上げます。

最後に、本研究に御協力いただきました長島里香実験助手、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。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない

引用文献

Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, McTaggart RA, Torbey MT, 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 JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 17(3),472–6.

Campbell BC1, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, et al. (2015) Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 372,1009-1018.

del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 22,1276-1283

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 AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, et al. (2015) Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 372,1019-1030

Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. (2004) Complications and Pitfalls in Rat Stroke Models for Middle Cerebral Artery Occlusion A Comparison Between the Suture and the Macrosphere Model Using

Magnetic Resonance Angiography. *Stroke*. 35,2372-2377.

Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, Yamada K, Kamiyama I, Kohno M, Taguchi K, Nagao S, Maruyama T, Otagiri M, Komatsu T.(2015) Safety evaluation of hemoglobin-albumin cluster "hemoact" as a red blood cell substitute. *Sci Rep*.5,12778

Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, 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

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

Kim BM, Baek JH, Heo JH, Nam HS, Kim YD, Yoo J, Kim DJ, Jeon P, Baik SK, Suh SH, et al.(2018) Collateral status affects the onset-to-reperfusion time window for good outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.89,903-909

Krueger M, Bechmann I, Immig K, Reichenbach A, Härtig W, Michalski D.(2015) Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 35,292-303

Kurusu K, Abumiya T, Nakamura H, Shimbo D, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Shimizu H, Houkin K. (2016) Transarterial regional brain hypothermia inhibits acute aquaporin-4 surge and sequential microvascular events in ischemia/reperfusion injury. *Neurosurgery*. 79,125-134

Kurusu K, Abumiya T, Ito M, Gekka M, Osanai T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K. (2016) Transarterial regional hypothermia provides robust neuroprotection in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion with transient collateral hypoperfusion. *Brain Res*. 1651,95-103

Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA, et al. (2018) Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct. *N Engl J Med.*78,11-21

Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, et al.(2015) Stent-retriever throm- bectomy after intravenous t-PA vs t-PA alone in stroke. *N Engl J Med.*372, 2285-2295.

Sharma R, Llinas RH, Urrutia V, Marsh EB. (2018) Collaterals predict outcome regardless of time last known normal. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*27,971-977

Savitz SI, Baron JC, Yenari MA, Sanossian N, Fisher M. (2017)Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era. *Stroke.* 48,3413-3419

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

Shimbo D, Abumiya T, Kurisu K, Osanai T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Nakamura H, Shimuzu H, 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

Tomita D, Kimura T, Hosaka H, Daijima Y, Haruki R, Ludwig K, Böttcher C, KomatsuT.(2013) Covalent core-shell architecture of hemoglobin and human serum albumin as an artificial o₂ carrier. *Biomacromolecules.* 14,1816-1825

Wang Y, Ge P, Yang L, Wu C, Zha H, Luo T, Zhu Y1. (2014) Protection of ischemic post conditioning against transient focal ischemia-induced brain damage is associated with inhibition of neuroinflammation via modulation of TLR2 and TLR4 pathways. *J*

Neuroinflammation. 24,11:15.

Zhang W, Sato K, Hayashi T, Omori N, Nagano I, Kato S, Horiuchi S, Abe K.(2004) Extension of ischemic therapeutic time window by a free radical scavenger, Edaravone, reperused with tPA in rat brain. *Neurol Res*. 26(3),342-8.

Zhao WH, Ji XM, Ling F, Ding YC, Xing CH, Wu H, Guo M, Xuan Y, Guan B, Jiang LL.(2009) 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(1),43-51.