

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 新保大輔

学位論文題名

人工酸素運搬体：liposome encapsulated hemoglobin を用いた虚血再灌流障害の治療戦略の検討 (Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury)

【背景と目的】脳梗塞の急性期治療として、遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator、rt-PA) の静注治療や血管内治療での機械的血栓除去術による閉塞血管の再開通療法は、機能予後の改善のために最も重要な治療である。しかし、閉塞血管の再開通が得られても、脳浮腫の増大や出血性梗塞の発生のような虚血再灌流障害が問題となることがある。本邦での rt-PA 市販後調査では、rt-PA 静注後の症候性頭蓋内出血は 4.4%であり、無視できるものではない。虚血再灌流障害のメカニズムの1つとして、好中球を中心とする炎症反応がある。好中球は、障害された血管内皮細胞に発現した白血球接着分子 (intercellular adhesion molecule-1、ICAM-1) に接着し、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) を産生、MMP-9 によって脳血液関門 (blood-brain barrier、BBB) が破綻し、浮腫や出血性変化が生じるとされている。過去には、好中球や MMP-9 を inhibitor や抗体等で抑制し動物実験レベルでは良好な結果が報告されている。しかし、好中球を抑制することによる感染症の問題などにより臨床応用には至っていない。そこで虚血領域局所での好中球の作用を抑制するという目的で我々は、人工酸素運搬体 Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH)に着目した。LEH は好中球を含まない、径が赤血球の 1/40 であるためより末梢の組織まで酸素を運搬するという 2 つの特徴を持つ。本研究ではこの特徴に注目し、ラットを用いた一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO モデル) において再灌流動脈から LEH を虚血領域に向けて局所灌流することで、好中球や産生される MMP-9 の作用を抑制して虚血再灌流障害の軽減化が得られるかを検討、また、LEH が脳保護効果を示した場合のメカニズムについて検討することを目的とした。

【対象と方法】実験動物は雄の Sprague-Dawley ラットを使用し、糸栓子による tMCAO モデルを作成した。2 時間の虚血後、糸栓子抜去後の内頸動脈から動物用カテーテルを挿入し、LEH を経動脈的、局所的に灌流させたのちに通常の血流を再開させた。Vehicle 群として LEH の溶媒である生理食塩水を灌流させ、Control 群では通常の再灌流のみを行った。LEH の灌流時間についてはまず 2 時間投与とし、その結果をふまえて 15 分投与モデルの実験を行った。再灌流 24 時間後に脳を摘出して各種評価を行った。Bederson score、18 point scale で神経症状、摘出脳の冠状切片を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で染色して脳梗塞と脳浮腫の面積を評価した。Western blotting では、患側脳を homogenize

してタンパク質を抽出し、Myeloperoxidase (MPO) の発現 (好中球の脳内浸潤の程度)、MMP-9 の発現、脂質の酸化代謝産物である 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の発現 (活性酸素)、ICAM-1 の発現 (血管内皮細胞の障害) を検討した。また zymography で MMP-9 の活性を評価した。BBB の破綻は、再灌流後に静脈内投与した Evans Blue 色素の脳実質への漏出量を定量化した。免疫染色では抗 MPO 抗体を用いて脳内の好中球を評価した。最後に LEH の灌流域を調べるために、LEH の構成要素であるヒト Hb の免疫染色を行い、MCA 領域でのヒト Hb (LEH) とラット Hb (ラット赤血球) の灌流範囲について検討した。

【結果】2 時間投与モデル: LEH 群では Vehicle 群、Control 群と比較し、神経症状の改善、脳梗塞、浮腫面積の有意な減少を認めた。また、western blotting の結果では、MPO の発現、MMP-9 の発現と活性、4-HNE の発現は、いずれも LEH 群において Vehicle 群、Control 群と比べ有意に抑制された。15 分投与モデル: 2 時間投与モデルと同様に、LEH 群において神経症状の改善、脳梗塞と浮腫面積の減少、MPO の発現、MMP-9 の発現と活性の抑制が認められた。また、ICAM-1 の発現も LEH 群で抑制されていた BBB の脳内への漏出量は LEH 群で低く、BBB の破綻が抑制されていると考えられた。MPO の免疫染色では Vehicle 群、Control 群では微小血管周囲、脳内に好中球が多数確認されたが、LEH 群では少なかった。Hb の免疫染色において、MCA 末梢領域の Hb を含有する微小血管数を count したが、LEH 群 (ヒト Hb) では Vehicle 群 (ラット Hb)、Control 群 (ラット Hb) よりも有意に数が多かった。

【考察】経動脈的な LEH の 2 時間投与は、好中球の虚血領域への流入を物理的に抑制し、MMP-9 や活性酸素の産生を抑制することで、脳梗塞や浮腫が減少、神経症状の改善につながったと考えられた。しかし、2 時間の麻酔、呼吸管理の難しさや臨床応用を考えた場合にはより短い投与時間が望ましいと考えられた。また、LEH の投与時間は 24 時間の再灌流の最初の 2 時間だけであり、LEH の治療効果は、好中球の虚血脳への流入抑制だけでは説明できないと考えた。LEH の治療効果のメカニズムも検討するために、次に LEH の 15 分投与を行った。結果は 2 時間投与と同様の治療効果を示した。さらに ICMA-1 の発現も抑制されたことから、LEH は血管内皮細胞の障害を抑える効果があることが予想された。Hb の免疫染色の結果からは、LEH はラット赤血球よりも末梢の微小血管まで灌流していることが示された。以上の結果から LEH の脳保護効果のメカニズムとして、末梢微小循環を改善して効果的に酸素を運搬、低酸素による血管内皮細胞の障害を抑制、ICAM-1 の発現が抑制されることで好中球の脳内浸潤を抑え、MMP-9 による BBB の破綻を抑制していると予想された。

【結論】虚血再灌流障害時に LEH を経動脈的に虚血領域へ灌流することで、末梢組織へ効率的に酸素を供給して脳保護効果が示された。臨床において、閉塞血管の再開通後に選択的に虚血巣に LEH を灌流させることによって虚血再灌流障害を軽減化するという、新たな治療戦略の可能性が示された。