

令和元年6月14日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10708

研究課題名(和文) 冷却人工酸素運搬体の経動脈選択的投与による脳保護療法の開発

研究課題名(英文) Development of neuroprotective therapy with selective intra-arterial infusion of cold artificial oxygen carrier

研究代表者

鏡谷 武雄 (Abumiya, Takeo)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80270726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：2時間脳虚血後に10 に冷却した人工酸素運搬体HemoActを再開通動脈から投与した。この人工酸素運搬体投与+冷却灌流のcombination therapy群を、10 生理食塩水の同量投与、37 HemoActの同量投与の二つmonotherapy群と、未治療コントロール群と比較して検討した。その結果、combination therapyの方が梗塞体積を縮小し、脳血流量低下を抑制する傾向にあった。この治療効果は、少なくとも治療7日後まで継続した。また、therapeutic time windowの延長効果の検討では、虚血時間が5時間までは治療効果があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主幹動脈閉塞を伴う急性期重症脳梗塞においては血管内血栓除去治療が積極的に行われている。しかし、再開通が得られても虚血再灌流傷害によって著明な脳浮腫、出血性梗塞を来し、予後不良となるケースは少なくない。このため、虚血再灌流傷害を防ぐための脳保護療法の開発は重要な課題といえる。今回、我々が行った冷却した人工酸素運搬体HemoActの投与は虚血時間5時間後の投与においても脳保護効果を発揮したことより、今後の脳梗塞治療においてtherapeutic time windowを拡大する有効な治療法となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：A combination therapy of regional cold perfusion and HBOC administration was performed with a core-shell structured hemoglobin-albumin cluster "HemoAct" in rat transient middle cerebral artery occlusion model. The combination therapy was evaluated in comparison with a monotherapy of regional cold perfusion or HemoAct administration and an untreated control. In analysis of rats with 2-hour ischemia/24-hour reperfusion, combination therapy tended to be less in rCBF reduction and infarct volume. Durability of therapeutic effects of the combination therapy was confirmed till 7days after the treatment. Furthermore, the combination therapy ameliorated neurological disabilities and hemorrhagic transformation in rats with 4-hour and 5-hour ischemia/24-hour reperfusion. Because the therapeutic effects can be expected until 5 hours of ischemia and reperfusion, this therapy is a promising neuroprotective strategy in treatment of acute ischemic stroke.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳保護療法 人工酸素運搬体 冷却灌流 脳梗塞 虚血再灌流障害

### 1. 研究開始当初の背景

近年、主幹動脈閉塞を伴う重症脳虚血症例において、血管再開通を目的として tPA 静注療法、もしくは血管内血栓除去治療が積極的に行われている。しかし、再開通が得られても虚血再灌流傷害によって著明な脳浮腫、出血性梗塞を来し、予後不良となるケースは少なくない(図1)。このため、虚血再灌流傷害を防ぐための脳保護療法の開発は重要な課題といえる。

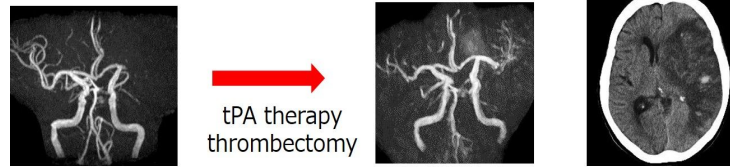


図1 血管内血栓除去治療後の脳浮腫と出血性梗塞

我々は以前より新規脳保護療法の開発研究を行ってきたが、その一つが経動脈選択的に冷却灌流する局所脳冷却灌流であり、もう一つが、経動脈選択的に人工酸素運搬体を投与する酸素化療法である。これら二つの治療法は微小血管に対して異なる作用(局所脳冷却灌流:血管の狭小化を防ぐ、人工酸素運搬体投与:狭小化した血管でも酸素を効果的に運搬する)を持ち、脳保護効果を発揮すると考えられた。このため、両者を融合することでより強い脳保護効果を得ることが出来る可能性があり、今回の研究計画を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

我々はラット虚血再灌流モデルにおいて、冷却輸液による局所脳低温療法、人工酸素運搬体による酸素化療法が、それぞれ脳虚血再灌流傷害で生じる微小血管狭小化に有効に働き、脳保護効果を示すことを明らかにしてきた。今回、両者を融合した“冷却人工酸素運搬体”の投与でどれだけの脳保護効果が得られるかを明らかにし、さらに therapeutic time window の延長効果を検討して、臨床応用に向けたデータ集積をしたい。

### 3. 研究の方法

平成28年度は、非脳低温下で今回初めて用いる人工酸素運搬体である HemoAct (図2) の脳保護効果についての基礎的データ取得のための実験を行う。ラット虚血再灌流モデルを用い、過去に我々が用いた人工酸素運搬体である liposome-encapsulated hemoglobin の投与実験とほぼ同等の条件で、37 の HemoAct を投与して、脳保護効果を評価する。この一連の実験により、HemoAct の脳保護能力の基礎的データを先ず揃える。

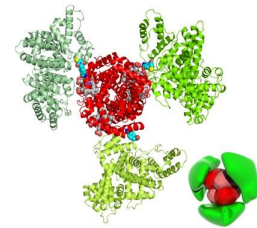


図2 HemoAct の構造

平成29年度以降は、10 に冷却した HemoAct の投与による局所脳低温 + 酸素化療法の脳保護効果を、まず2時間虚血/24時間再灌流のモデルを用いて検討する。次いで、より長い期間での治療効果を2時間虚血/7日間再灌流のモデルを用いて検討する。さらに therapeutic time window の延長が図れるかをみるために、4時間、5時間、6時間と虚血時間を延長し、その後24時間の再灌流をさせて脳保護効果が発揮されるかを検討する。

### 4. 研究成果

非低温条件下、すなわち、37 HemoAct 投与での脳保護効果についての検討では、梗塞は36%まで縮小していた(図3)。この治療効果のメカニズムについては、再灌流早期の時間帯(再灌流6時間以内)において、HemoAct が自己赤血球に比べて微小血管での灌流が良好あることが関連していると考えられた(図4)。また、脳微小血管内皮細胞を用いた培養実験の結果からは、HemoAct には抗酸化作用があり、これは、HemoAct 中のアルブミンの抗酸化作用による可能性が考えられた(図5)。我々が過去に行ってきた別の人工酸素運搬体である LEH の投与実験と比較してみると、HemoAct の方がより強い脳保護効果があったが、これについては前述の HemoAct の抗酸化作用が関連していると考えられた。実験結果が出そろったので論文を作成し、これを海外誌 Stroke に掲載することができた。

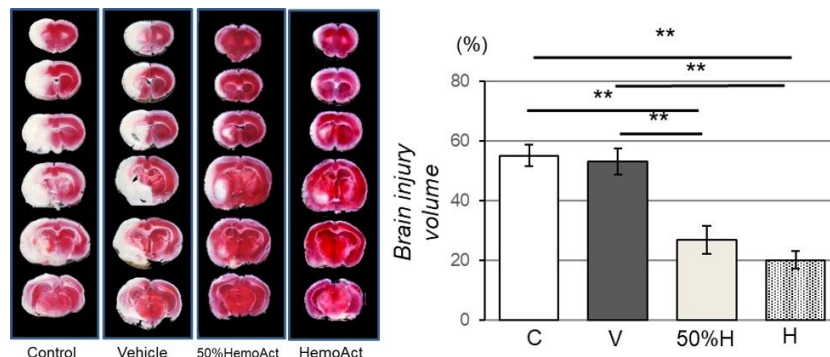


図3 37 HemoAct 投与による梗塞縮小効果

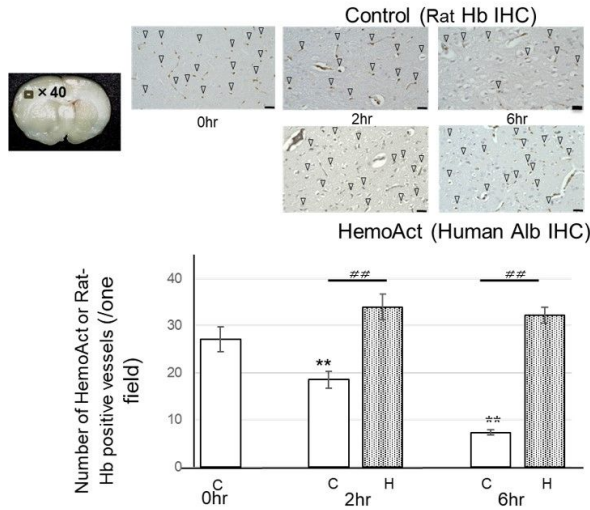


図4 HemoAct と自己赤血球の灌流状態の比較

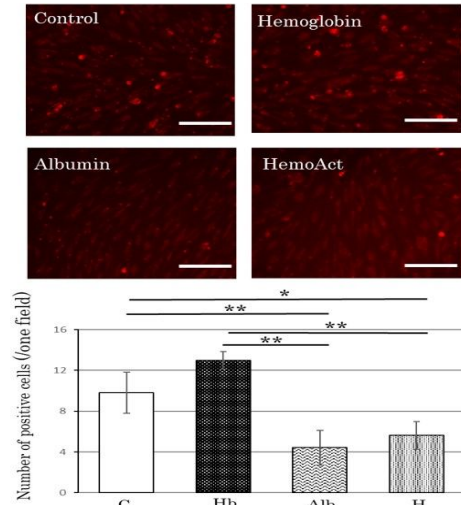


図5 培養実験での HemoAct の抗酸化作用

次いで、冷却 HemoAct の投与による脳保護効果の検討を中心に行った。実際の方法としては、系栓子による中大脳動脈の2時間虚血後の再灌流の時点で、10 に冷却した HemoAct を再開通動脈から 6ml/kg で投与した。この人工酸素運搬体投与 + 冷却灌流の combination therapy 群を、10 生理食塩水の同量投与、37 HemoAct の同量投与の二つ monotherapy 群と、未治療コントロール群と比較して、どれだけの治療効果が得られるかを検討した。その結果、combination therapy、すなわち、10 HemoAct 投与の方が梗塞体積の縮小、脳血流量低下の抑制により働く傾向にあることが分かった (図6)。さらに、この combination therapy の治療効果がどれくらい続くかを検討し、少なくとも7日目までは神経障害度の改善、梗塞体積の縮小に働くことが分かった (図7)。また、therapeutic time window の延長効果の検討では、虚血時間が4時間、5時間までは治療効果としての神経障害度の軽減があることが分かった (6時間では効果消失) (図8)。現在、この実験結果をまとめて英語論文を作成中である。

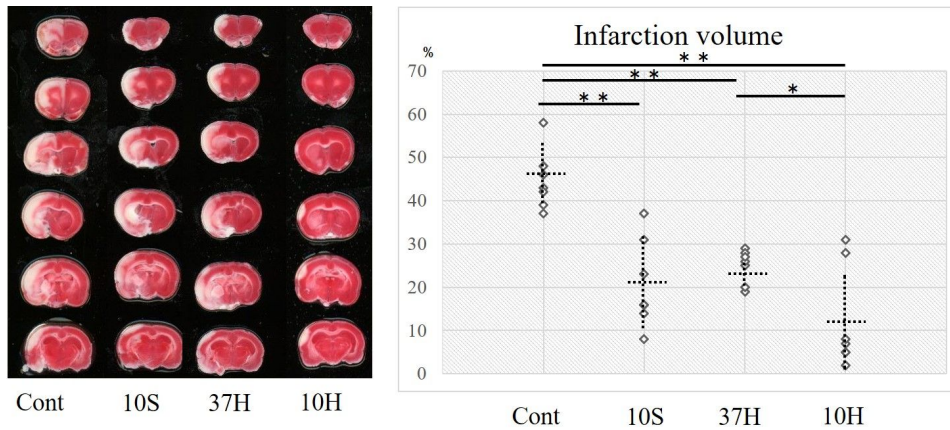


図6 10 HemoAct 投与による梗塞縮小効果

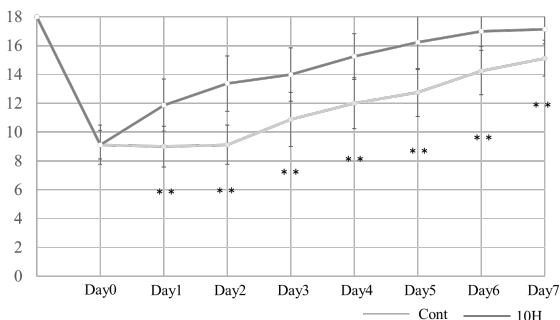


図7 10 HemoAct 投与での7日間の神経障害度の改善度

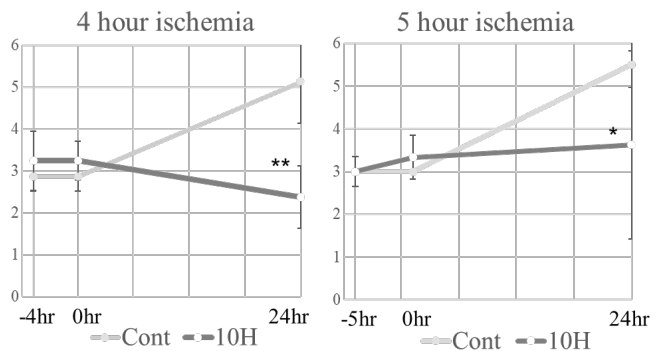


図8 10 HemoAct 投与による therapeutic time window の延長効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Gekka M, Abumiya T, Komatsu T, Funaki R, Kurisu K, Shimbo D, et al. Novel hemoglobin-based oxygen carrier bound with albumin shows neuroprotection with possible antioxidant effects. Stroke. 49;1960-1968,2018 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 月花 正幸、鏡谷 武雄、他 8 名、脳虚血再灌流傷害急性期微小循環障害に対するヘモグロビン アルブミン複合型人工酸素運搬体 HemoAct の効果の検討、第 44 回日本脳卒中学会学術集会、2019 年

2. 鏡谷 武雄、月花 正幸、他 6 名、脳虚血再灌流傷害に対するアルブミン結合型人工酸素運搬体 HemoAct の脳保護効果の作用機序 微小循環・酸素運搬能改善と抗酸化作用、日本脳神経外科学会第 77 回学術総会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：虚血性疾患の治療剤

発明者：小松 晃之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-134478

出願年：2016 年

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学脳神経外科ホームページ 基礎研究

<https://neurosurgery-hokudai.jp/research/basic/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小松 晃之

ローマ字氏名：Teruyuki Komatsu

所属研究機関名：中央大学

部局名：理工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30298187

研究分担者氏名：中山 若樹

ローマ字氏名：Naoki Nakayama

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁): 4 0 4 2 1 9 6 1

研究分担者氏名：数又 研

ローマ字氏名：Ken Kazumata

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 6 0 6 3 4 1 4 4

研究分担者氏名：七戸 秀夫

ローマ字氏名：Hideo Shichinohe

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 8 0 3 7 4 4 7 9

研究分担者氏名：竈金 清博

ローマ字氏名：Kiyohiro Houkin

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号(8桁): 9 0 2 2 9 1 4 6

研究分担者氏名：長内 俊也

ローマ字氏名：Toshiya Osanai

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁): 9 0 6 2 2 7 8 8

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。