

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890103

研究課題名（和文）血栓溶解療法時における低体温療法併用の有用性

研究課題名（英文）Combination therapy of hypothermia and thrombolysis in acute ischemic stroke

研究代表者

矢田 健一郎 (YATA KENICHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・産学官連携研究員

研究者番号：40467361

研究成果の概要（和文）：血栓溶解療法は、その狭い time window や重篤な side effects の為その使用が限られる。今回の研究では、血栓溶解療法時に低体温療法を併用することの有用性を確かめた。低体温療法は、leukocyte の rolling と adhesion を著明に抑制し、血液脳関門の保護効果が期待された。

研究成果の概要（英文）：Thrombolysis therapy is essentially limited by the short therapeutic window and its potential side effects. The present study investigates whether thrombolysis alone or in combination with hypothermia has beneficial effects after experimental acute ischemic stroke. Hypothermia reduces leukocyte rolling and adhesion, and protects the blood brain barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	720,000	216,000	936,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,620,000	486,000	2,106,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：血栓溶解療法、血液・脳関門、内皮細胞、t-PA、低体温療法

1. 研究開始当初の背景

近年、脳梗塞急性期治療法として血栓溶解療法 (Tissue Plasminogen Activator: t-PA) が臨床応用可能となった。しかし、t-PA による血栓溶解療法は、その Time Window は非常に狭く、現在のところ発症 3 時間以内の症

例のみにしか適応とならない。また使用に際しての、一番の問題点は、致死的な出血性梗塞を来すことである。その致死的副作用である出血性変化を防ぎ、少しでも Time Window を広げることができれば、t-PA 治療法の可

能性をさらに高めることができる。近年の研究結果からは、t-PA には、血栓溶解作用以外にもさまざまな生体内作用があることが報告されており、Blood Brain Barrier (BBB) に対しては障害性に働き、出血性梗塞、脳浮腫を助長することが示されている。

2. 研究の目的

t-PA 使用時における出血性梗塞・脳浮腫の抑制などの観点から考えると、1 つの可能性として、低体温療法の併用療法が挙げられる。今回の研究では、脳梗塞モデルを用いて、t-PA 投与に伴う出血性梗塞や脳浮腫の増悪を低体温療法を併用することにより軽減できないかどうかを確認することにある。低体温療法自体はすでに臨床応用されている手技であり、血栓溶解療法と低体温療法の併用療法の有用性を示すことができれば、臨床応用は比較的容易であると考えられる。

3. 研究の方法

今回の実験では、急性脳虚血発作時における t-PA 投与における内皮細胞・血液脳関門障害の評価し、その障害が低体温療法を併用することにより保護効果があるかどうかを評価した。

脳虚血モデル作成

ラットとマウスを用いて脳虚血モデルを作成した。ラット脳虚血モデルは、suture occlusion model を用いて transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model を作成した。Rectal temperature を指標にして体温コントロールを行った。正常体温群では、37 度にコントロールし、低体温群に関しては、34 度にコントロールした。正常体温群、低体温群をそれぞれに、shame、saline 投与、t-PA 投与の 3 グループに分け、

脳浮腫の程度を評価した。脳浮腫の評価方法としては、脳水分含有量の測定を行った。脳実質重量と脳乾燥重量を測定することにより、脳内の水分含有量を測定した。

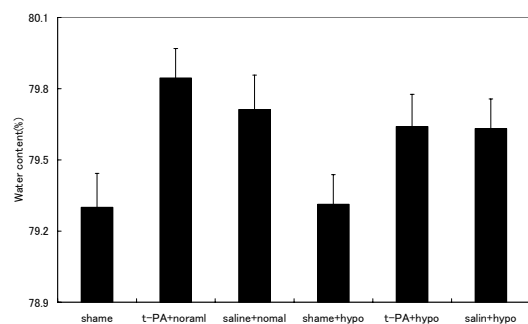
マウス脳虚血モデルでは、二光子顕微鏡下で血液脳関門、内皮細胞障害を real time で観察した。その為 actin promoter 領域に GFP を transgenic した Green mouse を用いて観察を行った。虚血の方法としては、左総頸動脈を絹糸にて occlusion した。Sham 群、t-PA 投与群、生食投与群をそれぞれ、37 度の正常体温、34 度の低体温群に分け、観察を行った。Green mouse では leukocyte は GFP 陽性として観察であった。leukocyte の rolling や adhesion は、内皮細胞障害や血液脳関門障害の起点となっていると考えられ、今回は二光子顕微鏡を用いて real time に評価を行った。また、Tex Red 標識 Dextran plasma labeling を行うことにより、赤血球の移動度から、血管閉塞前後の velocity を測定し血流変化の指標とした、また、この Tex Red 標識 dextran の血管外漏出の程度から、脳血液関門の障害の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) 脳水分含有

tMCAO における脳浮腫の評価

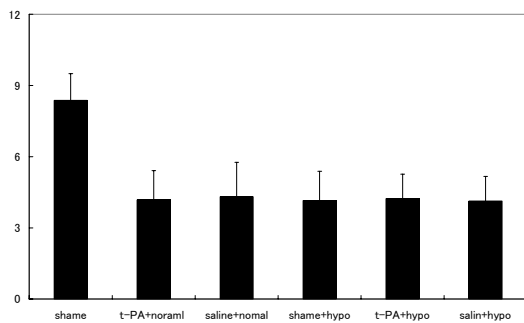
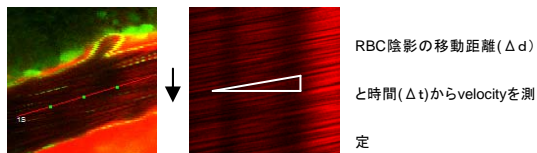
Shame 群、t-PA 群、Saline 群に分け、それぞれを正常体温群、低体温群に分けて脳水分量の測定を行い脳浮腫の程度を評価した。



t-PA 投与群では、saline 投与群と比較して脳浮腫の増悪が認められた。低体温療法を併用することにより、脳浮腫の程度が改善することが認められた。Saline 投与群においても、低体温療法を併用することにより、脳浮腫の程度が改善することが認められた。

(2) velocity 測定

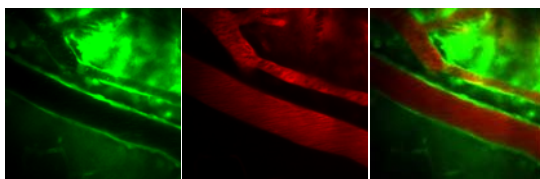
左総頸動脈閉塞に伴う Velocity の低下 Shame 群、t-PA 群、Saline 群それぞれを正常体温群、低体温群に分けて 2 光子顕微鏡下で Velocity の測定を行った。



左総頸動脈閉塞に伴い Velocity は正常の 50% 以下まで低下した。t-PA 投与に伴う velocity の変化や低体温療法に伴う Velocity の変化は認められなかった。

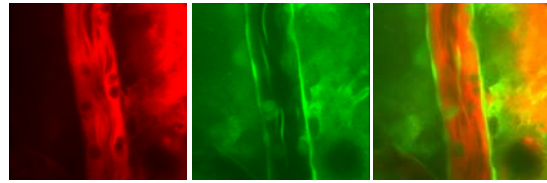
(3) Rolling と Adhesion

左総頸動脈閉塞時における rolling と adhesion の頻度を二光子顕微鏡を用いて観察した。

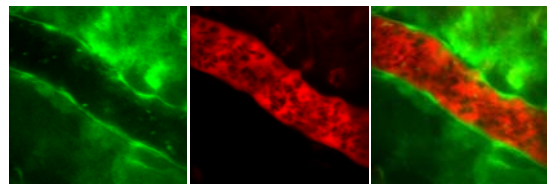


総頸動脈閉塞+正常体温例の Arteriole: 血流低下に伴う rolling や adhesion は散見され

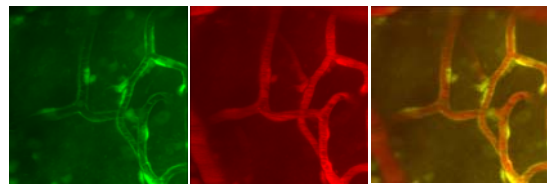
る程度で shame 群と比較して大きくことなるところはなかった。



総頸動脈閉塞+正常体温例での Venule: 総頸動脈閉塞後 30 分程度で、leukocyte の rolling や adhesion が出現 (leukocyte は GFP 陽性の細胞として確認)。時間とともにその頻度は増加した。

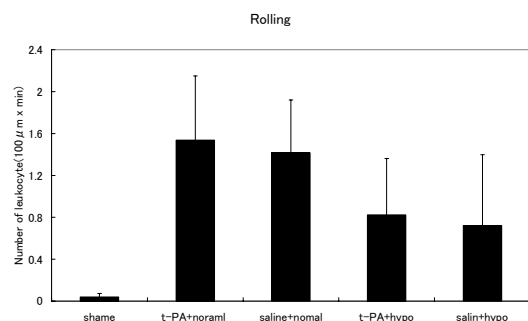


総頸動脈閉塞+低体温療法例での Venule : leukocyte の rolling や adhesion が著明に抑制されている。



Capillary Artery には明らかな変化は認められなかった。

Rolling 定量

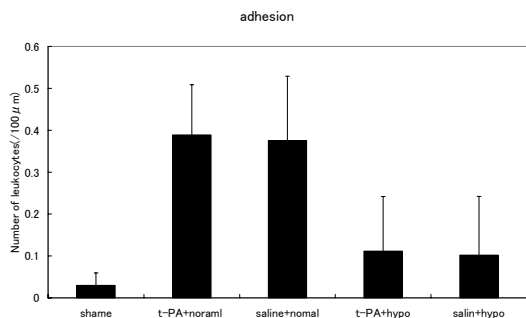


Venule における rolling の評価

総頸動脈閉塞後 30 分の時点では、venule を中心に leukocyte の rolling が多数認められた。t-PA 投与群、saline 投与群には rolling の程度に差は認められなかった。低体温療法

を併用することにより、t-PA 投与群、saline 投与群ともに rolling の頻度が低下した。Arteriole に関しては、rolling は散見される程度で、頻度としては shame 群と比較してわずかに多い程度であった。

Adhesion 定量

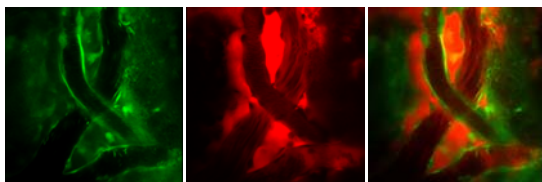


Venule における adhesion の評価

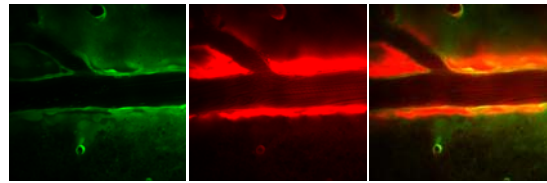
総頸動脈閉塞後 30 分の時点では、venule を中心に leukocyte の adhesion が多数確認された。t-PA 投与群、saline 投与群には adhesion の程度に差は認められなかった。低体温療法を併用することにより、t-PA 投与群、saline 投与群ともに adhesion の頻度が低下した。Arteriole に関しては、adhesion は散見される程度で、その頻度は Shame 群と比較してわずかに多い程度であった。

(4) 血液脳関門

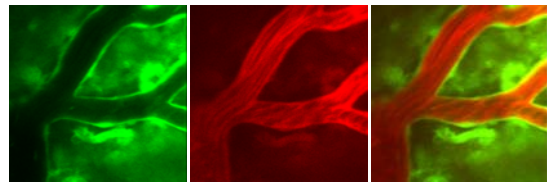
Tex Red 標識 Dextran を静脈内投与し、この dextran の血管外漏出の程度から、血液脳関門の障害の程度を評価した。



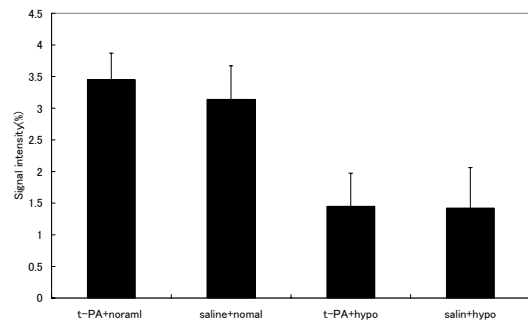
Tex Red 標識 Dextran 静脈内投与後 2 時間の Arteriole と Venule。TexRed が血管外に漏出しているのが確認された。この漏出部位に関しては、動脈からも漏出があることが疑われた。



Arteriole における血管外漏出。Rolling や Adhesion が認められない Arteriole においても、TexRed 標識 Dextran の血管外漏出が認められた。



低体温療法併用群の二時間後の TexRed 標識 Dextran 漏出像。低体温療法を併用することにより、著明に血管外漏出が抑制されているのが確認された。



Velune 周囲に ROI を設定し TexRed の intensity を測定した。t-PA 投与群、saline 投与群とも低体温療法を併用することにより著明に TexRed 標識 Dextran の血管外漏出が抑制された。

今回の実験結果からは、急性脳虚血において、低体温療法が Rolling と Adhesion を著明に抑制することが認められた。Rolling や Adhesion は Secondary brain damage において重要な役割を果たしていると考えられ、この点からは、低体温療法の脳保護効果が十分に期待される結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 木田博隆、矢田健一郎、富本秀和、脳の老化・認知症の病理学的背景からアンチエイジングを探る、Angiotensin research vol.6 no.2 2009 31-37(査読なし)
- ② 矢田健一郎、金丸憲二、荒木朋浩、松浦啓太、木田博、富本秀和、類もやもや病と脳動静脈奇形を合併した遺伝子出血性毛細血管拡張症の一例、分子脳血管病 vol8 no3 105-109 (2009) (査読なし)
- ③ 矢田健一郎、木田博隆、荒木明浩、松浦啓太、川北文博、金丸憲二 stroke care unit とstroke unit, 総合リハビリテーション 36 巻 12 号・1153-1157 (2008) (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

- (1)矢田健一郎、溝口明、新堂晃大、富本秀和 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス慢性脳低灌流状態における血行動態の評価、第35回日本脳卒中学会総会 2010年4月16日 盛岡

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢田 健一郎 (YATA KENICHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科
産学官連携研究員

研究者番号：40467361

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：