

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591599

研究課題名(和文) トロンボモジュリンによる重症新生児仮死治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Neuroprotective treatment of thrombomodulin for severe neonatal asphyxia in rats

研究代表者

高橋 幸博 (TAKAHASHI, YUKIHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60142379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トロンボモジュリンの神経保護作用をナイロン縫合系を用いた中大脳動脈結紮による脳傷害ラットモデルで検証実験を行った。方法は、成熟ラットを用い、中大脳動脈内にナイロン縫合系を挿入し永久結紮を行い、6時間後に脳組織TTC染色で観察した。傷害部位の評価はTTC染色で傷害を受けた非染色部位面積を計測し、総面積、体積変換した解析法と、Image Jで皮質領域部位とStriatum等の部位に分けて解析した。その結果は、トロンボモジュリン非投与群と比較し、投与群では有意に脳皮質領域での傷害域が減少した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the neuroprotective effects of thrombomodulin during middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rat stroke model. Sprague Dawley (SD) rats (N=10) were randomly divided into two groups: control (N=5), and treatment (N=5) groups. The intraluminal monofilament was inserted right middle cerebral artery by the surgical procedure, and it was occluded permanently. The treatment group received intravenous thrombomodulin injections, and the control group received normal saline injections. After six hours, the infarct of brain slice generated by MCAO was stained in 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). The size and extent of the infarcted area was determined using NIH Image J/Fiji 1.46. Neuroprotective effect was observed significantly in the cortex area but not in the striate area. The data indicate that thrombomodulin has the neuroprotective effects on MCAO rat stroke model, which needs further studies for confirmation.

研究分野：新生児の止血機構

キーワード：新生児仮死 低酸素性虚血性脳症 トロンボモジュリン 神経保護作用

### 1. 研究開始当初の背景

重症新生児仮死は低酸素性虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy; HIE) や播種性血管内凝固 (DIC) 合併し、HIE は新生児の脳性麻痺の主たる原因疾患である。我々は重度新生児仮死に合併した DIC に、新規 DIC 治療薬のリコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) を用い治療した際、DIC の改善効果に加え、顕著な神経予後改善効果が得られることを観察した。そこで、rTM の中枢神経保護作用を検討するために、後方視的に rTM 使用前の重症新生児仮死および新生児低酸素症で新生児 DIC を合併した症例と rTM 使用後の同様な症例で matched case-control study を行い、rTM 使用後の症例では rTM 使用前の症例と比較し臨床予後および MR 画像で有意な改善効果がみられたことから、rTM には神経保護作用が期待できると考えた。しかし、臨床例の比較は DIC 発症に至るまでの病歴や治療開始までの時間が、必ずしも同一条件でなく、rTM の神経保護作用を検証するには動物実験が必要と考えた。

### 2. 研究の目的

rTM の中枢神経保護作用を、新生児仮死動物実験モデルで検証する。

### 3. 研究の方法

当初、新生児仮死実験モデルとして既報の Rice らの方法に準拠して Day 7 の幼弱ラットの総頸動脈結紮および低酸素負荷で実験を重ね、また rTM 投与実験も行ったが、同モデルは脳傷害の重症度や再現性で安定した成績が得られず、また中枢神経傷害部位の同定や病変の広がりが明瞭でなく、rTM 薬剤が高価であることも考慮し、再現性が高い成熟ラットの中大脳動脈永久結紮モデルで、中枢神経傷害部位を 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) 染色法を用いて検証した。

#### 成熟ラット MCA モデル実験動物とその作成方法:

実験動物: 奈良県立医科大学の動物実験倫理委員会および日精バイリス滋賀研究所の動物実験倫理委員会の承認 (それぞれの倫理委員会承認番号: 学外-3 および 1408-06、試験番号 8658) を得て、日本チャールス・リバー株式会社より 7 週齢の Crl-CD ラットを 12 匹購入し、日精バイリス研究所で、ラット飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) で、自由摂食で 7 日間飼育し、実験環境に適応後に 8 週齢 (体重 307.2~338.2g) で試験に供した。

#### MCA 結紮術:

Koizumi J らの方法<sup>2)</sup>に準じ MCA 結紮ラットモデルを作成した。まず、37 °C の保温マット上で、room air でベースガスに 4~

5% の動物用吸入麻酔剤イソフルレン (Isoflurane、マイラン株式会社) ガスを混合したチエンバー内で麻酔導入した後、1~3% のイソフルレン麻酔で維持した。麻酔中は体温 36.5~38 °C に維持し、呼吸心拍をモニターしつつ、右頸部を消毒後、約 2 cm 皮膚切開し、右総頸動脈、右外頸動脈起始部、右内頸動脈起始部を表出し、右外頸動脈と総頸動脈を絹糸で結紮し、右外頸動脈に小切開を入れ、シリコンコーティングした 4-0 ナイロン糸 (シリコン接着剤; MED-1511、ニューシルシリコンテクノロジー社製) を挿入し、右総頸動脈脈との分岐部で内頸動脈に反転させ、先端を約 18~20mm 挿入させナイロン糸を中大動脈の起始部で永久結紮した。その後、皮膚切開部を縫合し、結紮術を終了した。麻酔から覚醒後に、Petullo ら D の方法 (添付)<sup>3)</sup> の評価法で、neuromuscular 運動麻痺を確認後、結紮効果の見られた 10 匹を、5 匹ずつ rTM 投与群と被検対照群 (vehicle) の 2 群に分け、rTM 投与群には 3mg/kg の rTM (生理食塩水で溶解) を、対照 vehicle 群には生理食塩水を、おのおの 1ml/kg で、MCA 閉塞手術後約 30 分で、bolus で尾静脈から静脈内単回投与を行った。rTM 投与量は同薬剤の DIC 治療薬安全性試験において実施された投与量として算出した。

虚血操作終了後、6 時間後に倫理委員会で報告した方法で無麻酔科に弾頭後、開頭し、MCA 起始部を起点に、物側 4 および 2mm、MCA 起始部直上、尾側 2, 4, 6mm の 6 切片を、ラット用プレインスライサー (室町機械株式会社) でスライス幅 1mm 切片を作成した後に、1% の TTC (Sigma-Aldrich Co. LLC T8877-saline 液で染色 (液温室温、時間 30 分間) し、52mm x 76mm のスライド上で、標本を写真撮影し、画像解析装置 (汎用画像処理 “WinROOF Version 5.7、三谷商事株式会社) を介して、冠状断面面積 (左右大脳)、右脳面積 (梗塞側)、梗塞面積 (皮質および髄質部分) を測定した。また、一部、画像解析に Image J (NIH, Windows) を用いた。得られた梗塞面積から、次に示す計算式を用いて梗塞体積を求めた。

#### TTC 染色:

TTC は水素で還元されて、水に溶けない赤色をした TPF (1,3,5-triphenylformazan) となる。神経細胞内のミトコンドリアの電子伝達系酵素群の脱水素酵素反応により遊離した水素で TTC が還元され、赤色の TPF となる。したがって、脱水素酵素の存在するミトコンドリアが存在する部位では染色される。赤く染色される部位では生物活性の存在し、生物活性のない部位は白色に描出される。

## 梗塞面積（体積）の評価

### 梗塞面積【大脳皮質（cerebral cortex）や線条体（striatum）を含む白色部】

a：MCA 起始部吻側 4mm 断面上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

b：MCA 起始部吻側 2mm 断面上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

c：MCA 起始部直上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

d：MCA 起始部尾側 2mm 断面上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

e：MCA 起始部尾側 4mm 断面上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

f：MCA 起始部尾側 6mm 断面上の梗塞巣面積（mm<sup>2</sup>）

### 梗塞体積の計算式:



$$V = \frac{1}{3} \times h \times (S_1 + S_2 + \sqrt{S_1 \times S_2})$$

上記の公式から 2mm 厚の切片として  
 $V = 2(a+b+ab)/3 + 2(b+c+bc)/3 + 2(c+d+cd)/3 + 2(d+e+de)/3 + 2(e+f+ef)/3$

すなわち

$$V = 2(a+f+ab+bc+cd+de+ef) / 3 + 4(b+c+d+e) / 4$$

### 梗塞面積率:

各 segment 領域での梗塞面積/右脳面積 x100 から算出した。

### 皮質部位領域と線条体部位領域との比較:

TTC 染色標本図と Paxinos and Watson's The Rat Brain in stereotaxic coordinates (7th Ed) (ELSEVIER Inc. Oxford, UK) およびマウス脳の免疫染色図 <http://mouse.brain-map.org/welcome.do> を参考とした。

### 統計解析:

The SAS System Release 8.2 (TS2M0) for Windows (SAS Institute Inc.)を用いた。梗塞面積（体積）及び体温について対応のない t-検定を行った。皮質部位領域と線条体部位領域との比較での統計解析はエクセル統計解析ツールを用い、対応のない t-検定を行った。なお、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 4. 研究成果

### 1. rTM 群と vehicle 群の梗塞面積および体積の比較:

rTM 群と vehicle 群との間で梗塞面積では segment c はそれぞれ  $29.999 \pm 5.780 \text{ mm}^2$  ( $M \pm SE$ )、 $29.409 \pm 6.313 \text{ mm}^2$  で両群間では  $p = 0.95$  と差異はなく、segment a, b では rTM で  $1.370 \pm 1.370 \text{ mm}^2$ 、 $19.620 \pm 5.570 \text{ mm}^2$ 、vehicle 群で  $4.735 \pm 3.204 \text{ mm}^2$  ( $p = 0.36$ )、 $25.478 \pm 6.413 \text{ mm}^2$  ( $p = 0.51$ )、segment d, e, f では rTM で  $21.990 \pm 8.550 \text{ mm}^2$ 、 $2.220$

$\pm 2.220 \text{ mm}^2$ 、 $0.000 \pm 0.000 \text{ mm}^2$ 、vehicle 群で  $24,432 \pm 10.297 \text{ mm}^2$ 、 $13.036 \pm 6.857 \text{ mm}^2$  ( $p = 0.17$ )、 $2.245 \pm 2.245 \text{ mm}^2$  ( $p = 0.35$ ) で、各 segment で有意差はないが減少していた。梗塞体積では  $125,31 \pm 32,96 \text{ mm}^3$ 、 $180.87 \pm 55.17 \text{ mm}^3$  で両群間では  $p = 0.55$  と d 同様に体積が少ないが有意差はなかった。

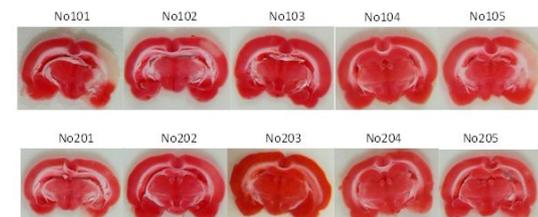
### 2. rTM 群と vehicle 群の梗塞面積率比較:

rTM 群と vehicle 群との間で梗塞面積では segment c はそれぞれ  $44.808 \pm 8.520 \%$  ( $M \pm SE$ )、 $48.371 \pm 9.958 \%$  で両群間では  $p = 0.95$  と差異はなく、segment a, b では rTM で  $3.462 \pm 3.462 \%$ 、 $35.087 \pm 10.278 \%$ 、vehicle 群で  $12.664 \pm 7.721 \%$  ( $p = 0.31$ )、 $41.364 \pm 8.017 \%$  ( $p = 0.64$ )、segment d, e, f では rTM で  $29.505 \pm 11.479 \%$ 、 $2.845 \pm 2.845 \%$ 、 $0.000 \pm 0.000 \%$ 、vehicle 群で  $32.973 \pm 14.192 \%$  ( $p = 0.85$ )、 $17.656 \pm 9.371 \%$  ( $p = 0.17$ )、 $3.613 \pm 3.613 \%$  ( $P = 0.35$ ) で、各 segment で有意差はないが減少していた。また、平均でも  $19.285 \pm 4.909 \%$ 、 $26.107 \pm 6.894 \%$  で両群間では  $p = 0.44$  と面積率でも有意差はないが少なかった。

### 3. 皮質部位領域と線条体部位領域との比較:

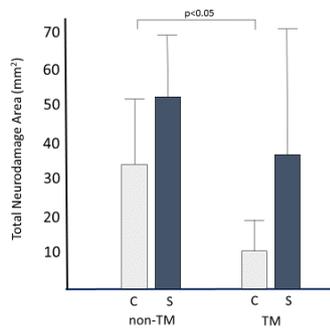
TTC の病理切片を用い、各切片での皮質部位領域（帯状皮質領域と背側膝皮質領域、前頭前皮質、眼窩前頭皮質、一次および二次運動野（M1, M2）、一次および二次体性感覚野、梨状皮質）と線条体部位領域（尾状核被殻；線条体）、淡蒼球、海馬、扁桃核、視床、視床下部）とに区分し、rTM 群と vehicle 群とで梗塞部を比較した。線条体部位領域では、rTM 群と vehicle 群との間で傷害領域に有意な差異が見られなかったが、皮質部位領域、とりわけ segment 「e」で、rTM 群で vehicle 群との間で傷害領域に有意な差異をみられた（図 1, 2）。また、皮質部位領域において梗塞部位の浮腫がみられた。そのため、梗塞面積の比較に同側領域並びに対側領域でも検討したが同一結果であった。

図1. Segment「e」での皮質領域での比較



MCA 結紮後 6 時間の segment[e]の TTC 染色像：上段は対照 vehicle 群 101-105、下段は rTM 投与群 201-205)。白色部位が壊死部、

図2



C:皮質部位領域、S:線条体部位領域

### 結果からの考察：

重症新生児仮死の急性期は基底核や視床、海馬、皮質錐体路に、慢性期は大脳白質部に病変を認める。中枢神経傷害はアトーゼ麻痺や知能障害を伴った痙性四肢麻痺に加え、てんかんや嚥下障害を合併する。治療は脳低温療法のほか、中枢神経保護を目的とした薬物治療には中枢神経保護薬剤として抗てんかん薬やラジカルスカベンジャー（エダラボン；ラジカット®注や N-Acetylcysteine）、キセノン(Xenon)ガス、赤血球造血刺激因子(エリスロポエチン)などのほか、硫酸マグネシウム療法、抗HMGB1抗体、臍帯血輸血などが臨床的あるいは基礎的研究が行われ、新生児領域では脳低温療法の他に硫酸マグネシウム療法が有用とされ、さらにはラジカルスカベンジャー、エリスロポエチン療法、臍帯血輸血などが検討されている。我々の施設でも重症新生児仮死に対して、脳低温療法や硫酸マグネシウム療法を施行してきた。しかし、長期予後は満足できるものではなかった。一方、重症新生児仮死は新生児DICを合併する。DIC治療は新鮮凍結血漿による補充療法やアンチトロンビン(AT)製剤、合成蛋白分解酵素阻害薬(FOYやFuthan)を使用してきた。しかし、遺伝子組み換え製剤のrTMがDIC治療薬として適応承認されたことから、新生児DICでもrTM製剤を投与してきた。その結果、DICの改善効果に加え、臨床的に中枢神経予後の改善効果が期待できたことから、rTMに中枢神経予後改善効果があるとの仮説をもとにラットを用いrTMの神経保護作用を検証した。rTMの神経保護作用の機序として、rTMの神経障害を惹起するトロンビンへの直接的な不活化作用とトロンビンの凝固活性化能や血小板活性化能を中和する抗血栓作用、プロテインCを活性化することから、活性化プロテインC(APC)による中枢神経保護作用、虚血低酸素傷害で細胞傷害から放出される炎症惹起物質のHMGB1中和作用が想定される。すなわち、トロンビン中和作用はトロンビンのPAR1,3,4受容体を介する細胞傷害作用を直接的に抑制すると考えら、APC製剤は出血助長作用からその使用は慎重さが求められているが、APCの中枢神経保護作用に関する報告は多数存在する。また、HMGB1中和作用は、既に抗HMGB1抗体単独でも中

枢神経保護作用があることは動物実験で示されている。今回、ラットMCA完全閉塞6時間後では、閉塞脳半球と対側脳半球間との間に、rTM投与群は梗塞巣の縮小はみられるが、有意な改善効果は得られなかったが、皮質部位領域と線条体部位領域とに区分し、各領域での梗塞巣を解析したところ、線条体部位領域で梗塞部位に差異はなかったが、皮質部位領域で有意な減少効果が得られた。同結果は、既にDIC合併重症新生児仮死児へのrTM療法で観察した結果を支持するもので、rTMには神経予後改善効果を期待できると思われた。今回の成績を踏まえ、現在、追加試験とともに、幼弱ラットでの検証試験、病理面ではTTC染色で得られる情報に加え他の免疫染色でのApoptosisの検証、さらに、rTM投与量や投与時期についても検証の準備を進めている。rTMに神経保護作用が確認されれば、重症新生児仮死児のDIC治療に加え中枢神経予後の改善につながる事が期待できる。

なお、本研究に際し、旭化成ファーマからrTMの提供を受けた。

### 文献

1. Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 9(2):131-41,1981
2. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 8:1-8,1986.
3. Petullo D, Masonic K, Lincoln C, Wibberley L, Teliska M, Yao DL. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 64(13):1099-1108, 1999.
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4件)  
Takahashi D, Takahashi Y, Itoh S, Nishiguchi T, Matsuda Y, Shirahata A Late vitamin K deficiency bleeding in an infant born at a maternity hospital. *Pediatr Int.* 査読有 2014 Jun;56(3):436. doi: 10.1111/ped.12346.

Miyakawa Y, Kashiwagi H, Takafuta T, Fujimura K, Kurata Y, Kobayashi T, Kimura T, Adachi T, Watanabe

T, Imaizumi M, Takahashi Y, Matsubara K, Terui K, Kuwana M, Kanagawa T, Murata M, Tomiyama Y; Committee for clinical practice guide of primary immune thrombocytopenia in pregnancy.

Consensus report for the management of pregnancy with primary immune thrombocytopenia

Rinsho Ketsueki. 査読有 2014 Aug;55(8):934-47

〔学会発表〕(計3件)

高橋幸博、新居育世、伊藤昭人、左近上博司、加治木正洋。中大脳動脈永久結紮ラットモデルを用いたリコモジュリンの神経保護作用に関する検討  
第77回日本血液学会、2015. 金沢市

新居育世、高橋幸博、西久保敏也、金廣裕道 新生児 DIC へのリコンビナント・トロンボモジュリン療法 5年間の使用経験

第36回 日本血栓止血学会、2014、大阪市

高橋幸博 西久保敏也、瀧 正志、長江千愛、横山知佳、他

新生児 DIC の診断基準(案)の新規作成  
第36回 日本血栓止血学会、2014、大阪市

〔図書〕(計5件)

高橋幸博 金原出版 NICU マニュアル B. 主要症候に対する診断学的アプローチ

8. 吐血・下血 p99-104, 2015

D. ハイリスク児の基本的管理

9. 血液・凝固系の管理 p207-213

IV章 ベッドサイドの検査

16 凝固系の検査 p449-453

高橋幸博 西村書店 止血・血栓ハンドブック: 新生児児の出血傾向(新生児メレナを含む) 2015 p

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

なし

(1) 研究代表者

高橋 幸博 (TAKAHASHI, Yukihiro)

奈良県立医科大学医学部・医学科

教授 研究者番号: 60142379

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

新居 育世 (ARAI, Ikuyo)

奈良県立医科大学 研究生

伊藤昭人 (ITOU Akito)

日精バイリス株式会社 滋賀研究所

左近上博司 (SAKONJOU Hiroshi)

日精バイリス株式会社 滋賀研究所

加治木正洋 (KAJIKI Masahiro)

旭化成ファーマ株式会社