

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592082

研究課題名(和文) 安全な脳梗塞治療法の開発：スタフィロキナーゼの応用

研究課題名(英文) Innovation of safety treatment method for cerebral infarction: Application of Staphylokinase

研究代表者

嶋村 則人(Shimamura, Norihito)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40312491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：「定量的自己血血栓を用いたラット脳塞栓モデル」を確立した。脳塞栓30分後にPBS、t-PA(600マイクロg/kg)またはSAK(200マイクロg/kg)を静脈投与し、24時間後に評価した。t-PA群2頭が呼吸器障害のために死亡した。出血性梗塞はPBS群2例、SAK群1例、t-PA群2例であった。大脳皮質梗塞体積はPBS群256mm<sup>3</sup>、SAK群132mm<sup>3</sup>、t-PA群112mm<sup>3</sup>で有意差を認めた。神経学的評価はPBS群9.2、SAK群7.7、t-PA群6.1で有意差を認めた。SAK治療は皮質梗塞体積軽減および神経機能温存について、PBSよりも有効で合併症も少なかった。

研究成果の概要(英文)：Ischemic rats were produced by inserting a blood clot into the internal carotid artery (ICA). We applied t-PA, SAK or PBS via an intravenous route 30 minutes after stroke. Neurological status was checked after 24 hours. The infarction volumes were measured using the TTC method. One rat in the PBS group died of infarction and two rats died due to respiratory difficulties in the t-PA group. Two t-PA treated rats, two PBS treated rats and one SAK treated rat revealed hemorrhagic infarction. Mean infarction volumes of the cortex were 112mm<sup>3</sup> in the t-PA group, 132mm<sup>3</sup> in the SAK group and 256mm<sup>3</sup> in the PBS group ( $p < 0.05$ ). Mean neurological scores were 6.1 in the t-PA group, 7.7 in the SAK group and 9.2 in the PBS group ( $p < 0.05$ ). SAK showed low risk of hemorrhagic infarction and respiratory difficulties. Its ability to improve neurological scores and reduce cortical infarctions was below that of t-PA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：スタフィロキナーゼ 心原性脳塞栓症 脳梗塞

### 1. 研究開始当初の背景

大量の組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) には、血液脳関門を破壊し、神経毒性を示し、出血リスクを上げるといった負の側面がある。2006年より本邦においても tPA が認可されたが、tPA 療法が施行された患者は全脳虚血症例の僅か 3~5% に過ぎない。これは tPA 投与が発症 3 時間以内に限定されていること、治療後の脳出血を避けるために重症例や CT または MRI の異常所見例では tPA 投与を控えているためである。そこで、1. 出血リスクが低い 2. 血液脳関門を保持する 3. 神経毒性が無い 4. 投与可能時間が長いといった利点を持つ薬剤を発見できるならば、脳梗塞治療において tPA に代わりうる。

Staphylokinase は黄色ブドウ球菌由来の成分で、プラスミノゲン活性化作用が発表され、血栓溶解剤としての効用が報告された。その後、生物学的半減期を延長させ抗体発生を予防した Polyethylene glycol staphylokinase (PEG-Sak) が開発され、冠動脈閉塞に対する臨床研究が成されている。

しかしながら、PEG-Sak の脳虚血症患に関する研究報告は渉猟しえた限りにおいて成されていない。

### 2. 研究の目的

脳虚血症実験および脳虚血症臨床においては PEG-Sak を用いた報告は、渉猟しえた限りにおいて無く、本研究が初めての研究となった。現在の tPA 静注療法が抱える三つの大きな問題点 (1. 投与可能時間が短い。2. 出血性合併症にて致命的となる。3. 神経毒性) に対する解決策と成り得ると予想している。特に、神経毒性については著明な改善が期待される。

究明する項目は、

(1) SAK の神経毒性についての解明: PEG-Sak 単独 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) または PEG-Sak および同剤による溶解血栓を内頸動脈へ投与する。24 時間後に血液脳関門の温存、神経細胞変性の有無について検討する。

(2) SAK による脳血管内血栓の溶解作用、至適投与量と至適投与方法の検討: 動脈血血栓を内頸動脈に注入し、PEG-Sak または tPA を投与する。投与経路は経大腿静脈、経内頸動脈の二法とし、投与量は 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  または 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とする。血栓溶解の程度、神経症状および脳梗塞の範囲を計測する。

(3) 脳虚血症発症後の SAK 投与可能時間についての検討: 脳虚血症後 2 時間から 5 時間の各時間において PEG-Sak を投与し、神経症状、脳梗塞領域、脳出血の有無について検討する。

(4) 多剤併用による neurovascular unit 温存についての検討: SAK および VEGF 阻害剤の併用により、血液脳関門が保たれ出血率が減少するか否かについて検討する。

### 3. 研究の方法

SD 雄ラットを使用。左大腿動脈から動脈血を 0.15ml 採取し、トロンビン 10 単位/50  $\mu\text{l}$  と混合し、凝固させる。30 分後に 2800rpm, 1 分間遠心し、上清を廃棄。血栓のみを 4Fr アトムチューブに吸引する。血栓を含んだ tube を長さ 30mm 切り取る。ラット頸部正中を切開し、左総頸動脈、左内頸動脈、左外頸動脈を剖出。Pterygopalatine a. を結紮、切断する。外頸動脈 Stump から止血弁付き 24 ゲージ留置針を挿入し、内頸動脈へ誘導する。血栓入り Tube を留置針に押し当て、ゼムクリップを用いて、プッシャーコイルの要領で挿入。体積 7.85  $\text{mm}^3$  の動脈血血栓が内頸動脈に挿入される。脳血流 (CBF) モニターを併用し、CBF が 80% 以上低下した例を脳塞栓症モデル作成成功とした。24 時間後に下記項目について検討をおこなった。

(1) 神経学的所見: J Neurosci Methods 2006; 156:161-5. において我々が示した定量的評価方法

(2) 脳梗塞体積評価: 大脳を 2mm 厚に切断し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate 染色を行う。健康域は赤色を呈するが、梗塞域は白色を呈する。

(3) 血液脳関門と脳浮腫評価: Evans Blue 脳内分布量、IgG 染色および乾燥法による脳内水分量計測

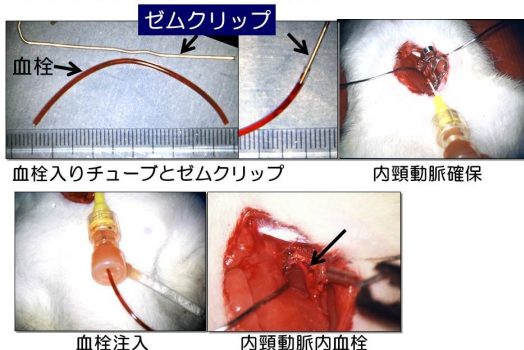
(4) 組織学的検討: Hematoxyline-Eosin 染色および Nissle 染色による細胞形態の評価

(5) 細胞内シグナル変化の究明: PKC, PKB, MAPK, Akt, NOS, Rho などの神経損傷に関わるシグナルの検討、及び VEGF, Occludin, Claudin などの血液脳関門保持に関する免疫染色および Western Blotting を行う。

### 4. 研究成果

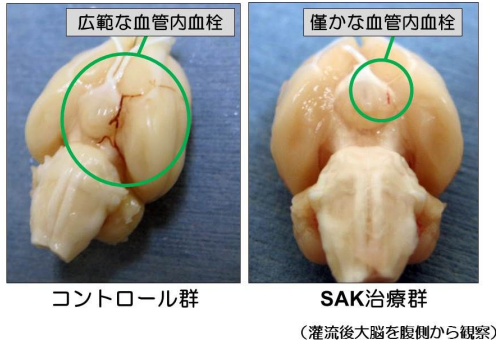
(1) 本研究にふさわしい動物モデルが無かったため、ヒト心原性脳塞栓症と同じ病態のラット脳塞栓症モデルを新規に確立させ、Translational Stroke Research 誌に掲載された。

#### 心原性脳塞栓モデル作成



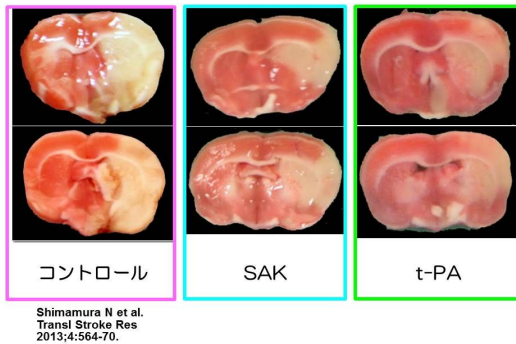
(Shimamura N, et al. Transl Stroke Res 2013; 4: 564 - 70)

結果：血管内血栓



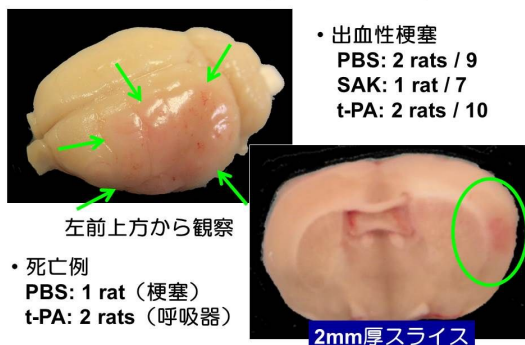
(2)ラットに対しては、PEG-SAK の神経毒性は認められない。  
 (3)PEG-SAK を用いた脳梗塞治療については、PEG-SAK はラットの体内で血栓溶解作用を示すが、その血栓溶解作用は t-PA と同程度ないしわずかに弱いようである。

脳梗塞領域 (TTC染色)



(4)脳浮腫は PEG-SAK、t-PA とともに同程度であったが、出血性梗塞は t-PA よりも PEG-SAK で少ない傾向であった。

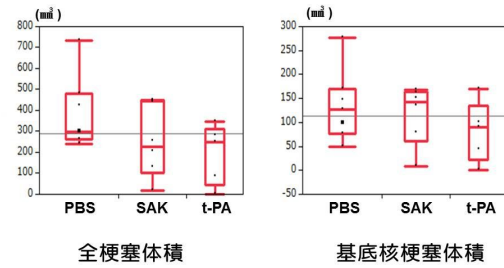
結果：出血性梗塞(t-PA治療群)



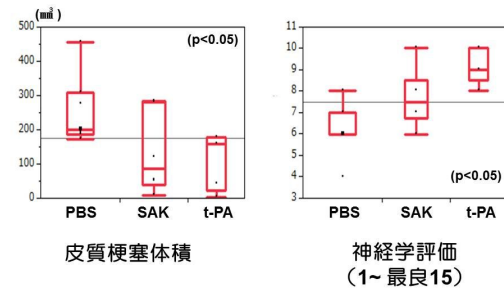
(5)24 時間後の評価では、t-PA 治療群と PEG-SAK 治療群では神経症状および脳梗塞範囲は有意差を認めなかった。

以上から、ラットを対象とした検討では、SAK は tPA に代わりうる薬剤である可能性が示された。

結果：三群間比較



結果：三群間比較 (Wilcoxon検定)



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)Norihito Shimamura、Masato Naraoka、Naoya Matsuda、Hiroki Ohkuma、Safety of preprocedural antiplatelet medication in coil embolization of ruptured cerebral aneurysms at the acute stage、Interventional Neuroradiology、査読有、2014. In print

(2)Norihito Shimamura、Hiroki Ohkuma、Phenotypic Transformation of Smooth Muscle in Vasospasm after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage、Transl Stroke Res、査読有、2014、5、357-364. DOI 10.1007/s12975-013-0310-1

(3)Norihito Shimamura、Naoya Matsuda、Kiyohide Kakuta、Akiko Narita、Hiroki Ohkuma、A Model of Rat Embolic Cerebral Infarction with a Quantifiable, Autologous Arterial Blood Clot、Transl Stroke Res、査読有、2013、4、564-570. DOI 10.1007/s12975-013-0262-5

〔学会発表〕(計 6 件)

(1)嶋村 則人、スタフィロキナーゼはラット脳塞栓モデルにおいて脳梗塞巣を軽減する、第 39 回日本脳卒中学会総会、2014 年 3 月 13 日~3 月 15 日、大阪

(2) Norihito Shimamura、Recombinant staphylokinase reduces the volume of cerebral infarction in a rat thromboembolic ischemia model、The 2nd International Conference on Heart & Brain、2014年2月27日～3月1日、フランス

(3) Norihito Shimamura、A model of rat embolic internal carotid artery occlusion with a quantifiable, autologous arterial blood clot、26th International Symposium of Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function、2013年5月20日～2013年5月23日、中国

(4) 嶋村 則人、定量的自家血栓によるラット心原性脳塞栓モデルの開発、第38回日本脳卒中学会総会、2013年3月21日～2013年3月23日、東京

(5) 嶋村 則人、血管内手技を応用した動物実験科学、第28回日本脳神経血管内治療学会、2012年11月15日～2012年11月17日、宮城県仙台市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
弘前大学大学院医学研究科脳神経外科ホームページ  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neuros/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 嶋村 則人  
(Shimamura Norihito)

研究機関：弘前大学

部局：医学研究科

職名：講師

研究者番号：40312491

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし