

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592110

研究課題名(和文)急性期脳虚血に対する経脳室および経動脈冷却灌流による複合的局所脳低温療法の開発

研究課題名(英文)Development of regional brain hypothermia by trans-ventricular and trans-arterial cold infusion in acute cerebral ischemia

研究代表者

鐙谷 武雄 (Abumiya, Takeo)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80270726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、虚血再灌流モデルにおいて、経動脈的冷却灌流を行い、梗塞体積が1/3に縮小することを明らかにした。次いで、このモデルにおいて経時的な検討を行い、AQP4での一過性発現亢進(2時間)、アストロサイト終足の膨化と微小血管の圧迫狭窄(2～6時間)、ICAM-1発現亢進(6～24時間)、血管透過性亢進(6～24時間)、梗塞の拡大(6～24時間)、好中球浸潤、MMP9発現亢進、ミクログリアの増加(24時間)を認めた。治療群では、これらの現象がすべて抑制されており、冷却灌流による再灌流早期の低温化のインパクトが治療効果を発揮する上で重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study initially confirmed that trans-arterial regional hypothermia possessed strong neuroprotective effects on ischemia-reperfusion (I/R) injury, and then demonstrated that the treatment sequentially inhibited the acute aquaporin4 (AQP4) surge, microvascular narrowing due to astrocytic end-foot swelling, endothelial dysfunction, and activation of inflammatory reactions. More direct and intensive cooling of the endothelium and its surroundings, including astrocytic end-feet, may contribute to these therapeutic effects. This therapeutic strategy is convenient and feasible for clinical applications by an endovascular approach; therefore, it represents a promising candidate to attenuate I/R injury after tissue plasminogen activator thrombolysis and/or endovascular thrombectomy.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳梗塞 虚血再灌流 脳低温治療

1. 研究開始当初の背景

近年の脳梗塞治療では、tPA 投与、または血管内手技により急性期の血行再建が可能となっているが、虚血の深度・時間が一定以上になると不可逆的变化を生じて、再開通が得られても虚血再灌流傷害が生じてしまう。このような状況下での脳保護の目的で、臨床では既にフリーラジカルスカベンジャーが投与されて一定の効果を上げている。しかし、再開通を得る前には投与された薬剤は虚血中心に到達できていないと考えられ、虚血中心での保護作用は低いものと考えられる。低体温(脳低温)療法がその意味で再開通前の虚血下でも脳保護作用を発揮すると考えられ、動物実験による基礎的なデータも数多く蓄積されている。しかし、全身冷却の低体温療法では麻酔管理に近い全身管理が必要であり、そのため臨床的には広く普及しない原因となっている。また、脳を外部より冷却する限り、急性期に短時間で目的の脳低温状態を作ることは容易ではない。このような脳低温療法の問題点を克服するために、我々は、脳組織をより早期に効果的に局所脳を低温化するための新たな治療戦略を想起し、今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

今回我々は、局所的に冷却灌流をすることにより早期に効果的に虚血脳を低温化するための新たな治療戦略を想起した。一つは経脳室的に冷却した人工髄液を灌流する方法であり、もう一つは内頸動脈から経動脈的に冷却した電解質輸液を灌流する方法で、両者を複合して施行することにより、十分な脳低温化を達成したいと考えている。まず、実験モデルの確立と脳低温達成度の評価を行い、ついで脳虚血再灌流傷害への治療効果を評価し、臨床応用を前提としてのデータ集積をしたいと考えている。また治療効果のメカニズムを解明する目的で、微小血管における形態変化、炎症関連分子等の発現の変化を経時的に検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験モデルの確立と脳低温達成度の評価

虚血再灌流モデルの確立

実験モデルとしては、糸栓子を用いたラットの虚血再灌流モデルを用いる。シリコンをコートした 4 - 0 ナイロン手術糸を糸栓子として、頸部で外頸動脈より内頸動脈に上行性に挿入して中大脳動脈起始部を閉塞し、同血管支配領域の虚血をまず形成する。2 時間虚血の後、糸栓子を除去し、再灌流状態を形成し、その後の組織傷害の出現の程度を検討する。このモデルにおいて下記の脳冷却灌流により脳低温化を達成し、脳保護効果を検討する。

経動脈冷却灌流による脳冷却法の確立

内頸動脈に挿入した糸栓子を除去することにより再灌流状態が作成されるが、糸栓子を除去した血管内にチューブを挿入し、10 に冷却した生理食塩水を微量輸液ポンプにて流入し、脳の低温化を図る。

経脳室冷却灌流による脳冷却法の確立

脳室内にチューブを留置して冷却した人工髄液(アートセレブ)をマイクロシリンジで注入し、冷却人工髄液の脳室内灌流により虚血側の脳を中心として低温化を図る。

脳低温達成度の評価

ニードル型の温度センサーを用いて、脳表と線条体での脳温を測定し、脳低温の達成度を評価する。また、冷却処置中の体温、血圧、血液ガスなどをモニタリングして、さらに全身機能に及ぼす影響についても検討する。

(2) 脳虚血再灌流傷害への治療効果の判定

脳虚血再灌流傷害に対する治療効果を脳低温療法施行群と未施行群で比較検討する。再灌流 24 時間後に、の神経症状の評価の後、ラット脳を摘出し、組織標本を用いて、～ の項目について検討を加える。

神経症状の評価

18point neurological scale を用いて評価する。

脳梗塞の範囲の同定

TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色法を用い、大脳の coronal 切片を染色して梗塞の範囲を同定する。Image J を用いて梗塞巣を定量化する。

透過性亢進の検討

エバンスブルーを静脈内に投与し、脳組織内に漏出によるエバンスブルーの量によって透過性亢進の程度を検討する。大脳の coronal 切片で漏出の範囲、程度を確認した後、溶媒内で脳をホモジナイズして溶媒中に溶出したエバンスブルーの量をスペクトロフォトメーターで検出し定量化する。

各種炎症関連分子等の発現の検討

ICAM-1(白血球接着分子)、MPO(好中球抗原)、MMP-9(タンパク分解酵素)、Iba-1(ミクログリア抗原)、APQ4(水分子移動チャネル)の発現について、発現の局在は免疫染色で、また定量的評価はウエスタンブロッティングで検討する。

微小血管の形態変化に関する検討

vWF による内皮細胞の免疫染色、電子顕微鏡による微細構造観察により、微小血管の形態変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 実験モデルの確立と脳低温達成度の評価

虚血再灌流モデルの確立

糸栓子を用いたラットの虚血再灌流のモデルを確立した。Doccol 社製の 0.37mm 径シリコンコートナイロンモノフィラメントを外頸動脈より挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞して虚血を作成した。2時間虚血の後に糸栓子を除去し、24時間再灌流での脳傷害を評価した。本方法にて、梗塞体積が体側半球の $40 \pm 10\%$ 程度の比較的安定した梗塞を得た(TTC 染色での評価)。

経動脈冷却灌流による脳冷却法の確立

糸栓子除去後に内頸動脈内にチューブを挿入し、冷却灌流液を注入して虚血脳を冷却する方法である。今回の初回実験では、10 の冷却生理食塩水 6ml を 15 分間で注入した。この cold saline 群の他に、冷却灌流の効果を検証するた

めに、37 生理食塩水を投与する warm saline 群を設け、さらに、再灌流のみの control 群を設けた。

経脳室冷却灌流による脳冷却法の確立

Ventricular infusion device を用いて冷却した人工髄液を注入した。脳室内に注入することは可能であったが、ラットの脳室が小さいためか注入しても有意な脳温の低下を認めず、注入量を上げると脇漏れしてしまい、有効な方法となりえなかった。このため、以下の検討は経動脈的冷却灌流のみで行った。

脳低温達成度の評価

cold saline 群において、脳温が 37 から 34.7 まで下がり、注入 30 分後までは、他の warm saline 群、control 群より有意に低下していた(図 1)。

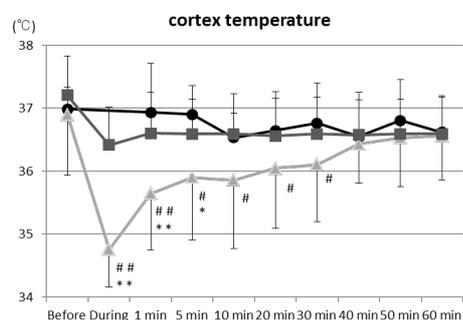


図 1 脳皮質での温度の変化

(2) 脳虚血再灌流傷害への治療効果の判定

神経症状の評価(18 ポイントスコア)

再灌流 24 時間後において、cold saline 群は warm saline 群、control 群に比べて神経症状が有意に軽かった(図 2)。

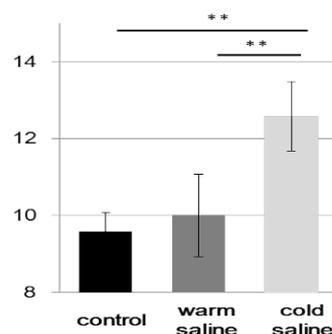


図 2 24 時間での neurological scale

脳梗塞の範囲の同定

再灌流 24 時間後において、cold saline 群は warm saline 群、control 群に比べて梗塞体積が 1/3 となり、有意に小さかった(図 3)。

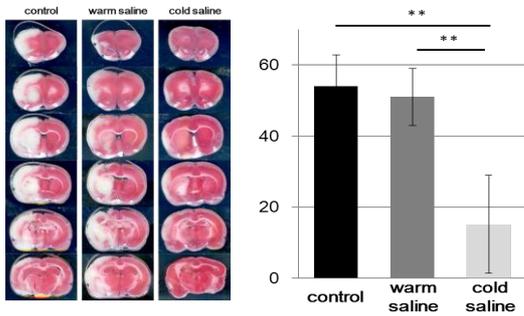


図3 24時間での梗塞体積

透過性亢進の検討

再灌流24時間後において、cold saline 群は warm saline 群、control 群に比べて透過性亢進が有意に抑制された(図4)。

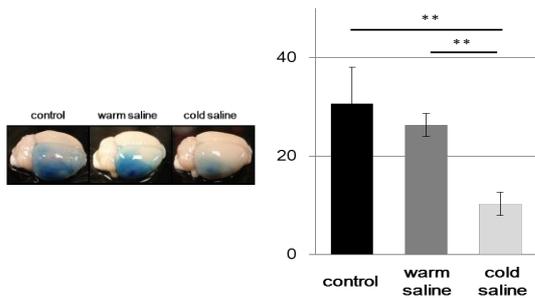


図4 24時間での透過性亢進

微小血管での炎症関連分子等の発現

control 群では、AQP4 は2時間で発現が一過性に亢進し、ICAM-1 は6~24時間で発現が亢進し、MPO、MMP-9、Iba-1 は24時間で発現が亢進していた。これらの亢進は、cold saline 群で有意に抑制されていた(図5、6)。

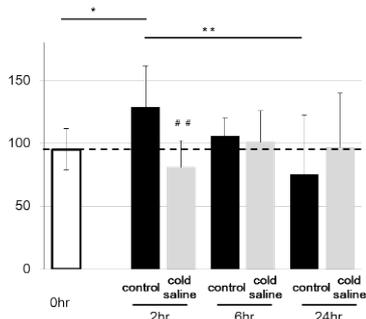


図5 AQP4 発現の経時的変化

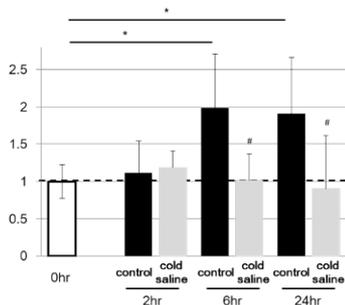


図6 ICAM-1 発現の経時的変化

微小血管の形態変化に関する検討

control 群では、アストロサイト終足の膨化が2時間に生じ、それが6時間で最も強くなり、微小血管を圧迫狭窄させていた。cold saline 群ではその変化が抑制されていた(図7)。

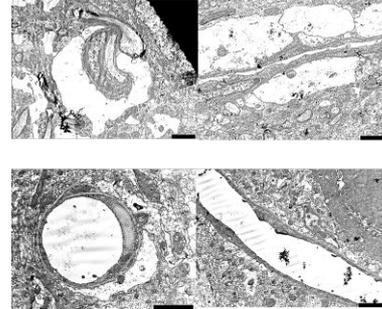


図7 6時間での微小血管の形態変化
(上段:control 群、下段:cold saline 群)

研究成果のまとめ

今回の検討では、まず、経動脈的冷却灌流による局所脳低温療法により、再灌流24時間後に梗塞体積が1/3にまで縮小することを確認した。

虚血再灌流傷害の時間経過として、AQP4の発現亢進(2時間)、アストロサイト終足の膨化と微小血管の圧迫狭窄(2~6時間)、ICAM-1発現亢進、血管透過性亢進、梗塞の拡大(6~24時間)、炎症反応の活性化(24時間)を認めた。一方、治療群においては、これらの現象がすべて抑制されることが分かった。

冷却灌流による再灌流早期の低温化のインパクトが、AQP4の発現亢進を抑え、さらに引き続いて生じる微小血管の反応を抑制することにより、治療効果が発揮されているものと考えられた。

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0件)

現在投稿中

(学会発表)(計6件)

栗栖宏多、鏡谷武雄、他、Rat における虚血再灌流障害に対する局所低脳温治療の有効性の検討。日本脳循環代謝学会総会、2013 年 11 月 1-2 日、京王プラザホテル(札幌市)

Kurusu. K., Abumiya T et al. Focal hypothermia induced by post-ischemic intra-arterial infusion has a neuroprotective effect on cerebral ischemia reperfusion injury. International Stroke Conference 2014, 2014.2.12-14, San Diego Convention Center, (San Diego, USA)

栗栖宏多、鏡谷武雄、他、ラット虚血再灌流障害モデルに対する経動脈的局所低脳温治療の有効性の検討、日本脳卒中学会総会、2014 年 3 月 13-15 日、大阪国際会議場(大阪府)

Kurusu. K., Abumiya T et al. Trans-arterial regional hypothermia therapy protects ischemic reperfusion injury through the suppression of endothelial cell damage. AANS Annual Scientific Meeting, 2014.4.5-9, Moscone Center, (San Francisco, USA)

Kurusu. K., Abumiya T et al. Post-ischemic trans-arterial regional hypothermia therapy attenuates microvascular narrowing due to astrocyte end-feet swelling and inhibits subsequent inflammatory reactions in ischemia reperfusion injury. International Stroke Conference 2015, 2015.2.10-12, Music City Center, (Nashville, USA)

栗栖宏多、鏡谷武雄、他 虚血再灌流傷害に対する経動脈的局所低脳温治療の脳保護効果の検討 微小血管狭小化と AQP4 発現への影響 日本脳卒中学会総会、2015 年 3 月 26 日 -29 日、リーガロイヤルホテル広島(広島市)

(図書)(計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 はなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鏡谷武雄 (ABUMIYA TAKEO)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号:80270726

(2)研究分担者

宝金清博 (HOUKIN KIYOHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:90229146
中山若樹 (NAKAYAMA NAOKI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 40421961

(3)連携研究者

なし