

人工酸素運搬体 HemoAct を用いた新規脳梗塞治療法の開発

鑑谷武雄¹⁾, 寶金清博¹⁾, 小松晃之²⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科 脳神経外科

2) 中央大学理工学部 応用化学科

【研究の背景】

人工酸素運搬体は、一般的に赤血球よりも粒径が小さいことで微小循環での灌流が良好であり、虚血性疾患の治療薬としての可能性が検討されてきた。我々はリポゾームカプセル型のヘモグロビン (Hb) 製剤である liposomal encapsulated hemoglobin (LEH) を用い、虚血再灌流傷害モデルにおいて、その脳保護効果を検討してきた¹⁻³⁾。しかし、開発企業側の問題で LEH の製造開発が中止となり、研究を継続できない状況となってしまった。その後、人工酸素運搬体として新規開発された HemoAct の供与を受けることが可能となり、今回の研究を開始する運びとなった。HemoAct はウシ Hb に 3 個のヒトアルブミンを共有結合した Hb 製剤であり、生体内では血漿蛋白質と認識され、赤血球よりも微小循環での酸素運搬能が高い。また、従来の分子型 Hb 製剤と異なり血管収縮作用がなく、臨床応用への可能性が期待されていた。

【目 的】

本研究は、脳梗塞動物モデルにおいて、人工酸素運搬体として開発された HemoAct の脳保護効果を検討して、新規の脳梗塞治療法を開発することを目的とする。

【方 法】

ラットを用いて一過性中大脳動脈閉塞 (transient middle cerebral artery occlusion: tMCAO) を作成し、脳虚血再灌流モデルとした。実際には、麻酔下の雄 SD ラット (7-8 週齢) に対し、右外頸動脈から内頸動脈側に向けて糸栓子 (ナイロン糸にシリコンラバーコートしたもの) を挿入・留置し、右中大脳動脈領域の血流を 2 時間遮断した。その後、挿入していた糸栓子を抜去することで再灌流状態を作成した。

HemoAct の脳保護効果を調べるために、以下の 4 群に分け治療処置を行った。①HemoAct 群: 2ml の HemoAct を血管内投与する群、②50%HemoAct 群: 溶媒である PBS にて 2 倍希釈した 2ml の 50%HemoAct を血管内投与する群、③Vehicle 群: 2ml の PBS のみを血管内投与する群、④Control 群: 再灌流のみの群、の 4 群である。再灌流 24 時間後に 18 point scale で神経症状を評価した後 sacrifice して、2 mm スライスの脳冠状断切片を作成し、TTC 染色で脳梗塞、脳浮腫の範囲を評価した。また患側脳から蛋白を抽出し、Western blotting にて患側脳における MMP-9 の発現、活性酸素の産生 (4-HNE) を検討した。

また、微小血管内における HemoAct の灌流状態とその灌流時の脳微小血管の形態変化を検討するために、HemoAct 群と Control 群の 2 群を用いて、さらに以下の実験を行った。再灌流後 0、2、6 時間の時点で sacrifice し、パラフィン切片を作成し、HemoAct の灌流状態の検討では、HemoAct 群ではヒトアルブミン抗体による免疫染色で HemoAct の灌流を評価し、Control 群ではラット Hb 抗体による免疫染色でラット自己赤血球の灌流を評価した。また、脳微小血管の形態変化の検討では、血管内皮細胞のマーカーである vWF 抗体での免疫染色を行い、血管周囲腔幅、血管幅を測定し、定量的な検討を行った。

【結 果】

24 時間後の神経障害は HemoAct 群、次いで 50%HemoAct 群で軽症であったが、HemoAct 群では他群と比較して統計的に有意に軽症であった。24 時間後の梗塞、浮腫体積は HemoAct 群と 50%HemoAct 群で他群と比較して有意に縮小していた。特に HemoAct 群はコントロール群と比較して 40%以下にまで梗塞体積が縮小していた。MMP-9、4-HNE の Western blotting では、HemoAct 群と 50%HemoAct 群で患側脳における発現低下をみたが、HemoAct 群では他群と比較して統計的に有意に低下していた。すなわち、HemoAct 投与により、脑梗塞の拡大が抑制され、その現象には蛋白分解酵素の産生低下、活性酸素産生低下が関連していることが分かった。

虚血再灌流領域の微小血管(15 μ m 以下)における HemoAct の灌流状態については、Control 群での自己赤血球の灌流血管数と比較して、HemoAct 群の HemoAct の灌流血管数の方が有意に多かった。脳微小血管の形態変化については、両群とも血管幅の狭小化があったが、HemoAct 群の方がコントロール群より血管幅が有意に大きかった。

【考 察】

今回の研究を通じて虚血再灌流傷害において、HemoAct の血管内投与による脳保護効果が明らかとなった。その脳保護効果については、MMP-9 の発現の低下、活性酸素の産生の低下が関与していた。また、組織の灌流状態の検討では、コントロール群の虚血再灌流領域において、微小血管の狭小化によって自己赤血球の灌流が悪化しているのに対し、HemoAct 群では同領域での微小血管の狭小化が軽減され、HemoAct の灌流状態はほとんど悪化していなかった。この微小循環での HemoAct の灌流状態の優位性が脳保護効果に大きく関わっているものと考えられた。

HemoAct は酸素をより多く組織に運搬すると考えられることより、再灌流領域の脳組織内において再酸素化による活性酸素の産生亢進が危惧される。しかし、今回の HemoAct 投与では、逆に活性酸素産生は抑えられており(Western blotting での 4HNE の発現抑制)、少なくとも問題となるよう過度の再酸素化・活性酸素産生亢進は生じていないと考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、急性期脳梗塞に対する血管内デバイスを用いた血栓除去治療において、複数のランダム化臨床研究(RCT)の結果として、治療介入により患者予後を改善するというエビデンスが示されている。早期の血管再開通が梗塞化をくい止めるのは間違いないが、再開通までの時間がかかると虚血再灌流傷害を引き起こす危険性がある。今回の HemoAct を用いた脳保護療法はこのような虚血再灌流傷害を予防する働きがあるものと考えられ、tPA 治療、血管内血栓除去治療と組み合わせることで患者予後をさらに改善させる可能性が考えられる。

【参考・引用文献】

1. 鑑谷武雄、新保大輔. 脳虚血再灌流傷害に対する Liposome-Encapsulated Hemoglobin の経動脈的投与による治療戦略. 人工血液 22 43-47, 2014
2. 鑑谷武雄、新保大輔. 人工酸素運搬体(liposome-encapsulated hemoglobin)を用いた虚血再灌流傷害の治療. 日本臨床 72(増刊 5)438-442, 2014
3. Shimbo D, Abumiya T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K. Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury. Brain Res. 1554 59-66, 2014