

筑 波 大 学

博 士 （医学） 学 位 論 文

ナノ粒子化活性酸素消去剤（RNP）による  
脳虚血再灌流障害に対する Neurovascular Unit  
保護効果の検証

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

細尾 久幸

## 目次

第1章 序論	4
1-1 脳主幹動脈閉塞症および急性期再開通療法	
1-2 虚血再灌流後の活性酸素種の発生と活性酸素消去剤について	
1-3 ナノ粒子化活性酸素消去剤 (Radical containing nanoparticles ; RNP)	
1-4 RNP を用いた虚血再灌流障害に対する治療	
第2章 研究の目的	10
第3章 実験方法	11
3-1 マウス一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルの作製	
3-2 ナノ粒子化活性酸素消去剤 RNP (Radical containing nanoparticle)の作製と 経頸動脈投与方法	
3-3 血液脳関門(BBB)損傷の評価	
3-4 中大脳動脈一過性脳虚血後の神経症状および脳梗塞体積の評価	
3-5 蛍光免疫染色による Rh 添加 RNP の脳虚血巣内への分布の検討	
3-6 蛍光免疫染色による虚血巣でのスーパーオキシド産生の測定	
3-7 蛍光免疫染色によるアポトーシス細胞の測定	
3-8 蛍光免疫染色法による血管内皮・オクルディン損傷、DSA 酸化損傷検討	
3-9 電子スピン共鳴法 (EPR ; Electron paramagnetic resonance) を用いた虚血脳	

の活性酸素種消去活性の測定

### 3-10 統計学的手法

## 第4章 結果 . . . . . 21

- 4-1 RNP は虚血半球における BBB 損傷を抑制した
- 4-2 RNP は tMCAO モデルにおいて神経症状軽減、脳梗塞体積を縮小させた
- 4-3 虚血脳における Rh-RNP の分布
- 4-4 RNP はスーパーオキシドアニオンの生成および酸化 DNA 損傷を抑制した
- 4-5 RNP は虚血脳におけるアポトーシスを抑制した
- 4-6 RNP 脳微小血管およびタイトジャンクション障害を抑制した
- 4-7 RNP は複数種の活性酸素消去能を改善した

## 第5章 考察 . . . . . 27

- 5-1 RNP の動脈投与量について
- 5-2 RNP の特性
- 5-3 虚血脳への RNP の分布
- 5-4 RNP による Neurovascular Unit 保護効果と活性酸素種消去能について
- 5-5 本研究の limitation と今後の課題

## 第6章 結論 . . . . . 33

## 第7章 謝辞 . . . . . 34

第 8 章 表	35
第 9 章 図の説明	36
第 10 章 図	40
第 11 章 参考文献	51

## 第 1 章 序章

### 1-1 脳主幹動脈閉塞症および急性期再開通療法

脳主幹動脈閉塞は、主要な死因の一つであり、また救命されても ADL が自立できないほどの重大な神経障害を残す疾病である。

脳主幹動脈閉塞に対する急性期治療のターゲットは、低灌流ではあるものの、再灌流により回復可能な領域、いわゆる「ペナンプラ」である。これまで、脳主幹動脈閉塞に対する急性期再開通治療として、まず tPA (プラスミノゲンアクチベーター) の静脈投与による血栓溶解療法の有効性が示され、早期の再開通により、生命・機能予後が改善することが、複数の RCT により示された<sup>1-3</sup>。欧米で行われた RCT では、tPA0.9mg/kg 静脈投与により、3 ヶ月後の予後良好群が有意に高かった。本邦においても、日本人における tPA0.6mg/kg 投与の、有効性および安全性が報告され、2005 年に発症 3 時間以内の tPA 静注療法が承認された<sup>4</sup>。有効な治療手立てのなかった本疾病に対して、エビデンスの確立した新たな時代の幕開けとなった。一方、発症 3 時間以内というのは、therapeutic time window として短く、ごく一部の患者しか、その恩恵にあずかれない状況であった。啓蒙活動により徐々に、脳卒中の症状とそれに対する対応が一般市民にも認知され、さらには発症 3-4.5 時間での tPA 静注療法の有効性<sup>5</sup>も示され、適応が発症 4.5 時間に延長されたことで、施行症例が増加した。しかしながら、tPA 静注療法による再開通率は、内頸動脈で 11%、脳底動脈

で 29.7%、中大脳動脈では 37.8%であり、特に近位大血管においては、再開通が得られるものは限られており、十分な再開通率といえない状況であった<sup>6</sup>。2015 年 tPA 静注療法と比較した前方循環のカテーテル血栓回収術併用療法の有効性が、相次いで 5 つの RCT で証明され<sup>7-13</sup>、tPA 静注療法に加え、カテーテルによる血栓回収術が標準的な治療となり、その再開通率は飛躍的に向上し、生命および機能的予後の改善が得られる症例が増加してきた。

## 1-2 虚血再灌流後の活性酸素種の発生と活性酸素消去剤について

全体的な予後が改善してきたことは事実であるが、症例の中には、早期に再灌流が得られても、再灌流障害による二次的な脳損傷のため、出血性脳梗塞や脳浮腫の原因となり、予後が悪化するものが多々ある。二次的な脳損傷の原因の一つとして、再灌流後に生じる活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)があるということはよく知られている。虚血脳において、第一に組織障害の最初のメカニズムとして、興奮毒性がある<sup>14</sup>。興奮毒性とは、エネルギー欠乏の結果として、グルタミン酸の急激な放出と、その再取り込みが障害されることである。グルタミン酸の集積により、カルシウム流入を含むシグナル伝達系が過剰に活性化され、細胞内カルシウム濃度の上昇につながる。この興奮毒性に引き続いて、虚血組織では、COX (Cyclooxygenase) や NO 合成に関与するシグナル伝達系の活性化により、活性酸素種発生が生じる<sup>15</sup>。

この活性酸素種の発生は、血管閉塞時のみならず、再灌流時により多く産生され、再灌流後の二次的な脳損傷を引き起こし、機能・生命予後の悪化に関与する。実際、機械的血栓回収術により早期再灌流が得られても、機能的に生活が自立できる程度まで回復するケースは 30-70%と報告されており、まだまだ十分とは言えない。また、再灌流療法に伴う出血性合併症も 10%程度あり、無視できない頻度である<sup>1-7</sup>。

虚血脳は、酸素消費が多いうえ、鉄や不飽和脂肪酸の含有が多く、さらには内因性の抗酸化作用が低いため、きわめて酸化損傷のダメージを受けやすい。再灌流後に生じる酸化ストレスを抑制することは、二次的な脳損傷を軽減し、さらなる予後改善に寄与することが期待される。

エダラボンは、活性酸素捕捉剤として開発されたフェノール化合物であり<sup>16,17</sup> 本邦では臨床現場で使用されている。エダラボンは、ヒドロキシラジカルの発生を抑制し、ヒドロキシラジカル依存、非依存いずれの脂質過酸化反応を抑制しうる<sup>18,19</sup>。

血管内皮障害を抑制し、脳保護効果を有し、日本における RCT では、72 時間以内のエダラボン投与での脳梗塞体積の減少と 12 ヶ月後の機能予後の改善が示され、2001 年保険償還されている<sup>20</sup>。以後、脳梗塞急性期患者に対して、日本では広く使用されている。急性期再開通療法と関連することとして、tPA 静注療法と同時にエダラボンを投与することで、再開通率が向上し、出血性合併症および予後改善を期待できるということが、後ろ向きおよび前向き研究により報告された<sup>21-23</sup> ことを受けて、



RCT が行われたが、RCT ではエダラボン併用の有効性を示すには至らなかった<sup>24</sup>。

その効果には限界がある可能性も示唆される。

エダラボンとは異なる活性酸素消去剤の一つとして、脳保護効果が期待される物質に TEMPOL(4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)がある。TEMPOL は、それ自体安定したニトロキシラジカル (Nitroxide (NO) radicals) であり、フリーラジカル消去により、モデル動物においてこれまでその神経保護効果が示されている<sup>25-27</sup>。

TEMPOL は、スーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase ; SOD)と類似の作用があり、活性酸素種および脂質酸化反応を抑制する<sup>26</sup>。それ自身の酸化還元反応により効率よく活性酸素種を消去することができる。しかしながら、TEMPOL のような低分子ニトロキシラジカルは、いくつかの問題点があった。生体内においては、非特異的に正常組織に拡散し、速やかに腎代謝され、またカタラーゼやグルタチオンといった生体抗酸化機構により急速に還元されてしまうため、半減期が短いというのがその問題点の一つである。また、TEMPOL は、内皮細胞において NO を誘導することにより低血圧作用もある<sup>28</sup>。低血圧状態は、特に虚血性疾患においては好ましくない状態である。低分子抗酸化物質は、正常細胞のミトコンドリアに吸収されて、正常な酸化還元反応を障害し、このような副反応を引き起こすといわれており、臨床応用には至っていない。

### 1-3 ナノ粒子化活性酸素消去剤 (Radical containing nanoparticles ; RNP)

TEMPOL の種々の問題点を克服するため、TEMPOL を含有するナノ粒子を開発した(Radical containing nanoparticles ; RNP)。本薬剤は、親水性のポリエチレングリコール部分と、4-amino TEMPO を側鎖に有する疎水性のポリスチレン部分の繰り返し構造からなるブロック共重合体である (NO radical (4-amino-TEMPO)-containing polymer (PEG-b-poly [4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) aminomethylstyrene] [PEG-b-PMNT])). このポリマーは、水溶液中で自己集積化して、RNP が形成される<sup>29, 30</sup>。ラジカルである TEMPOL が、ナノ粒子内にステルス化されることにより、細網内皮系の貪食が抑制される。それに伴い、RNP の生体内での半減期は TEMPOL の半減期よりも 60 倍(15 分)に延長し、その毒性も TEMPOL より軽減された。さらに、RNP は pH 応答性を有するという特徴もある。虚血という酸化環境下において、RNP コアのアミノ基がプロトン化されることにより RNP が分解、TEMPOL が露出し、フリーラジカル消去能を発揮する。

### 1-4 RNP を用いた虚血再灌流障害に対する治療

これまで、我々のグループではこの RNP を用いた虚血再灌流障害に対する治療効果、および活性酸素による二次的な臓器損傷に対するその抑制効果を、いくつかの動物モデルにおいて、報告してきた<sup>31-33</sup>。マウス腎虚血再灌流障害に対する腎保

護効果<sup>32</sup>、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルに対する脳保護効果<sup>31</sup>、ラット脳出血モデルに対する脳保護効果<sup>33</sup>といったものである。

脳虚血に関しては、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルに対する再灌流障害の抑制効果について以前検討している。90mg/kg の RNP の静脈投与により治療した群において、PBS 投与群、TEMPOL 投与群、ミセル投与群と比較検討し、RNP 投与により有意に神経症状の改善、脳梗塞体積の縮小効果が得られた<sup>31</sup>。さらに、RNP は低分子 TEMPOL で治療した群と比べて、その血圧降下作用は有意に少なかった。

## 第2章 研究の目的

前研究では、RNP は静脈投与で治療していたが、近年の脳主幹動脈閉塞に対する急性期カテーテル血栓回収療法が標準的に施行されるようになり、再灌流後にカテーテルから薬剤を直接動脈投与することが容易となった。再灌流直後より活性酸素種は発生が増加するため<sup>27</sup>、虚血脳に直接動脈投与ということは、静脈投与と比べ、よりリーズナブルで、より有効性の高い効果が得られる可能性があると考えた。

本研究においては、マウス一過性脳虚血モデルに対して、RNP を経頸動脈的に投与したときの、虚血再灌流後の脳保護効果、血液脳関門保護効果を検討することを目的とした。RNP による Neurovascular unit 保護のメカニズムを検証するため、脳組織、血液脳関門を組織学的に評価するとともに、RNP の虚血巣における分布、活性酸素種消去能についても評価し、将来 RNP 動脈投与による脳虚血再灌流障害に対する治療への発展性について検討したい。

## 第3章 研究の方法

### 3-1 マウス一過性中大脳動脈閉塞モデル(tMCAO モデル)の作製

動物実験計画は、筑波大学生命科学動物資源センターから承認を得て実施した（承認番号：#15-156）。またすべての実験は、「実験動物の管理と使用に関する指針」にしたがって実施した。

C57BL/6J マウス（♂、6–7 週齢、体重 20–25 g）を使用した（Charles River, Japan より購入）。マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルは、これまでに報告されている方法を参照して作成した<sup>34,35</sup>。以下、そのプロトコールを簡潔に記述する。まずマウスに、ケタミン（70 mg/kg）およびキシラジン（16 mg/kg）の混合溶液を腹腔投与して全身麻酔をかける。血液脳関門障害および虚血細胞死を助長、確実なものとするため、50% glucose 5mL/kg を全身麻酔導入後に腹腔投与し、高血糖状態とした<sup>45</sup>。顕微鏡下に頸部正中切開し、甲状腺、前頸筋群を剥離し、右総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を剥離、露出した。外頸動脈および総頸動脈近位部を結紮。総頸動脈に小切開を加え、先端がシリコンコーティングされた 6-0 ナイロン糸(6021 PK5Re; Doccoll Corporation)を、内頸動脈を通して抵抗を感じるころまで挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞させた。中大脳動脈閉塞 60 分後に、塞栓糸を抜去し、再灌流を起こさせる。手技および麻酔回復時は、ヒートパッド上で行い、体温を 37°C に維持した。

### 3-2 RNP (Radical containing nanoparticle)の作製と経頸動脈投与

pH 応答性の有する RNP は、ブロック共重合体 PEG-b-PMNT(poly(ethylene glycol)-b-poly(methylstyrene) (PEG-b-PMS) block copolymer, covalently conjugated to 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (amino-TEMPO))より作成した。PEG-b-PMNT は水溶液中で、透析膜を用いた手法で自己集積しコアシェルミセルを形成する<sup>29,30</sup>。RNP の平均粒子径およびゼータ電位を、Zetasizer Nano (Malvern Instruments)を用いて測定した。平均粒子径は  $33 \pm 6$  nm であった。またゼータ電位は  $-0.15$  mV であり、PMNT のアミノ基部分が PEG シェル内に含有されていることが確認できた。

RNP (9 mg/kg, 1 mg/mL 溶液)を、再灌流 20 分後、総頸動脈切開部より、PE10 ポリエチレンチューブを用いて、ゆっくりと 1 分以上かけて動脈投与を行った。コントロールとして、同量の PBS(phosphate-buffered saline)を投与した群を用意した。

本実験に先立って、動脈投与における適切な RNP 投与量の検討を行った。投与量を 27、18、9、0.9mg/kg と 5 群に振り分けた（それぞれの投与量において、投与する RNP の濃度は 10、3、2、1、0.1mg/mL とした）。それぞれの群における再灌流後 24 時間時点での、神経症状を評価し、sacrifice して、脳梗塞体積を測定した（神経症状評価方法、および脳梗塞評価方法の詳細については 3-4 参照）。それぞれの群における、神経所見および脳梗塞体積の結果は図 1 に示す。図 1 に示すように、9 mg/kg (1 mg/mL) 投与群において、もっとも脳保護効果が得られることが分かったため、本研

究において、RNP の至適動脈投与量として 9mg/kg(1mg/mL 溶液)に決定した。

マウスを、RNP 投与群および PBS 投与群にランダムに振り分け、2 群での比較検討を行った。塞栓系の穿通に伴いくも膜下出血をきたしたものは除外して解析した。

### 3-3 血液脳関門 (BBB) 損傷の評価

Evans blue (EB)の虚血脳への漏出量を測定する手法を用いて、tMCAO モデルにおける血液脳関門損傷について評価した。方法は、以前に報告されている方法を参照して実験を行った<sup>36,37</sup>。以下、簡潔に方法を述べる。PBS で溶解した 2% EB 溶液を 4 mL/kg を薬剤の動脈投与 30 分後に腹腔投与した (PBS 投与群, n=9; RNP 投与群, n=9)。EB 投与 24 時間後にペントバルビタール 40mg/kg を腹腔投与して sacrifice したのち、血中に残存する EB を wash out する目的で、PBS を経左心に全身灌流した。その後、右側虚血脳を摘出した。虚血脳の重量を計測し、1mL50% トリクロロ酢酸を添加して、ホモジナイズした。遠心分離したのち、その上清の 620nm 吸光度を吸光光度計 (Mithras LB 940, BERTHOLD technologies GmbH & Co. KG) を用いて測定し、標準曲線に従って、EB 血管外への漏出量を定量評価した。結果は、半球全体における EB 漏出量として、 $\mu\text{g/g}$  と記載した。

### 3-4 中大脳動脈一過性脳虚血後の神経症状および脳梗塞体積の評価

tMCAO モデルを、PBS 投与群 (n=13)、RNP 投与群(n=10)の 2 群に分けて、再灌流 24 時間後に神経所見を評価したのち sacrifice した。PBS で経左心灌流したのち、脳を摘出、イソペンタンで急速凍結させ、標本作成までの間は、-80℃のフリーザーで保存した。脳標本は、Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek Japan)で包埋し、冠状断 10μm 厚でクリオスタットを用いて凍結切片を作成した。凍結切片は、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、クレシルバイオレット染色した。脳梗塞体積は、過去の報告にならい、Bregma を挟んで前後 2mm、1mm ごとのスライス、計 5 切片において、対側半球面積の総和に対する脳梗塞面積の総和の比率 (%Infarction volume)を算出した<sup>38</sup>。脳浮腫の影響を除去する目的で、対側半球を分母に用いた。

なお、用いた神経所見のスケールは以下の通りである。

0=神経脱落所見なし

1=一貫しない対側へ回旋運動；尾を持ち上げたとき対側へねじる動き 50%未満

2=一貫した対側へ回旋運動；尾を持ち上げたとき対側へねじる動き 50%以上

3=一貫して迅速な回旋運動；尾を持ち上げたとき対側へねじる状態 1-2 秒維持

4=重度の回旋 歩行不能

5=昏睡

6=死亡



### 3-5 蛍光免疫染色による Rh 添加 RNP(Rh-RNP)の脳虚血巣内への分布の検討

TEMPO を含有した RNP を動脈投与したあと、虚血脳においてどのように分布しているかを検討するため、Rh(rhodamine)添加 RNP(Rh-RNP)を用いて実験を行った。Rh-RNP は、自己集積化させる前のブロック共重合体に rhodamine-NHS を添加して、作成した。得られた Rh-RNP を tMCAO モデルおよび sham サンプル(同様の手順でモデルを作成、塞栓糸を挿入しなかったサンプル)に経頸動脈投与し、再灌流 3 時間後に sacrifice し、脳を摘出した。Bregma のスライスにおいて冠状断の凍結切片で、蛍光免疫染色を行った。4%PFA で固定し、2 回 PBS で洗浄、1%ウシ血清アルブミンを含む PBS 中に混和した 1 次抗体で、4℃一晩 incubation した。用いた一次抗体は以下のとおりである。ラットポリクローナル抗 CD31 抗体 (1:100; #550274; BD Bioscience)、マウスモノクローナル抗 rhodamine 抗体(1:500; ab9093; Abcam)、ウサギモノクローナル抗 NeuN 抗体(1:500; ab9093; Abcam)である。一次抗体で incubation 後、PBS で洗浄し、適切な Alexa Fluor 二次抗体(1:400; Invitrogen) で 60 分室温にて incubation した。DAPI 含有水性封入材(mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (#SCR-38448, Dianova GmbH))を用いて、カバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡 (Biozero, BS8000, Keyence Inc.)を用いて観察した。ネガティブコントロールとして、PBS 投与した tMCAO モデルも同様のプロトコールで、凍結切片を作成し、染色した。右中大脳動脈領域皮質領域を観察した。

### 3-6 蛍光免疫染色による虚血巣でのスーパーオキシド産生の測定

tMCAO モデル、再灌流 24 時間後、PBS 投与群( n=7)、RNP 投与群( n=7)の 2 群のサンプルを用いた。PBS 全身灌流し、脳を摘出した。スーパーオキシド産生を評価する目的で、凍結切片を 10 $\mu$ mol/L ジヒドロエチジウム(#D1168, Thermo Fisher Scientific)で、30 分 37℃にて、染色した。ジヒドロエチジウムの incubation ののち、抗 NeuN 抗体 (1:200; MAB377, MILLIPORE) で incubation し、その後、適切な二次抗体(Alexa Fluor 488; Invitrogen)で incubation した。ジヒドロエチジウムが酸化されると、エチジウムブロマイドとなり、540nm で励起すると、605nm の赤い蛍光を発し、観察できる。Bregma を含む冠状断切片における中大脳動脈領域において、400 倍視野で観察し、脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)および中心領域(Ischemic core)それぞれにおいて、ランダムに 5 視野ずつ抽出し、蛍光強度の合計を算出、2 群で比較した。

### 3-7 蛍光免疫染色によるアポトーシス細胞の測定

再灌流後 24 時間サンプル、前述と同様の方法で凍結切作成した。PBS 投与群(n=7)、RNP 投与群(n=7)の 2 群のサンプルを用いた。アポトーシス細胞の検出のため、TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling)染色を行った。in situ cell death detection kit (POD, #1 684 847, Roche Life

Science)を用いた。PFA で固定したのち、0.3% Triton X100 で pre-permeabilization し、TUNEL 反応溶液で 37℃、60 分 incubation した。その後、マウス抗 NeuN 抗体(1:200; MAB377, MILLIPORE)を 1%ウシ血清アルブミン含有 PBS 中で 4℃一晩 incubation した。一次抗体の incubation 後、適切な二次抗体 (Alexa Fluor 555; Invitrogen)で incubation し、蛍光顕微鏡で観察した。TUNEL 陽性細胞は、488nm で励起し、507nm の緑色蛍光として観察される。TUNEL 陽性細胞および、TUNEL-NeuN 陽性細胞(TUNEL 陽性神経細胞)を 400 倍視野で観察し、脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)および中心領域(Ischemic core area)で、それぞれ 5 視野ずつ抽出し、陽性細胞をカウント、その合計数を比較した。結果は、陽性細胞数/mm<sup>2</sup> と記載した。

### 3-8 蛍光免疫染色法による血管内皮・オクルディン損傷、DNA 酸化損傷の検討

凍結切片を、微小血管マーカーとして CD31、血液脳関門マーカーの一つとしてオクルディンの免疫染色を行った。また DNA 酸化損傷の評価として、8-OHdG の免疫染色を行った。固定およびブロッキングを行った後、切片を以下の一次抗体で 4℃一晩 incubation した。ラットポリクローナル抗 CD31 抗体 (1:100; #550274; BD Bioscience)、マウス抗オクルディン抗体 (1:100; #33-1500; Thermo Scientific)、マウスモノクローナル抗 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体(1:100; #MOG-020P, Japan Institute for the Control of Aging)である。一次抗体の incubation 後、適切な Alexa

Fluor 二次抗体(1:400; Invitrogen)で incubation し、DAPI 含有封入剤を用いて封入した。

CD31 により検出される血管面積、オクルディンおよび 8-OHdG の蛍光強度を測定した。いずれも、これまでと同様に、脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)および中心領域(Ischemic core area)で 400 倍視野、それぞれ 5 領域を抽出して解析した。結果は、血管領域の合計 ( $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ )および蛍光強度の合計値として記載した。

### 3-9 電子スピン共鳴法 (EPR ; Electron paramagnetic resonance) を用いた虚血脳活性酸素種消去活性の測定

電子スピン共鳴法(EPR ; Electron paramagnetic resonance)による、MULTIS 法(Multiple free radical scavenging capacities)を用い、虚血脳活性酸素主消去活性を計測した<sup>39,40</sup>。計測した活性酸素種は、スーパーオキシド (superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ))、ヒドロキシラジカル(hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ))、脂質アルコキシラジカル(alkoxyl radical ( $\text{RO}\cdot$ ))、および脂質ペルオキシラジカル(alkyl peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ ))の 4 種類である。

PBS 投与群(n=7)、RNP 投与群(n=7)の 2 群の tMCAO モデルを、再灌流 24 時間後に sacrifice した。PBS で経左心灌流を行った後、右虚血脳全体を摘出し、サンプルとした。脳サンプルは、700 $\mu\text{L}$  PBS を添加してホモジナイズし、遠心分離した。上清を回収し、計測までは-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザで凍結保存した。

それぞれの活性酸素種は、前駆物質に可視光もしくは紫外線を照射することで、

実験室で合成した（照射は RUVF-203SR UV illuminator; Radical Research Inc, Tokyo, Japan を使用）。EPR スピントラップ剤として CYPMPO（5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide ; Shidai system, Saitama, Japan）を用いた。それぞれのフリーラジカルの生成に際して、用いた前駆物質・感受物質、照射条件は表 1 に示すとおりである。リン酸バッファー（PB ; Phosphate buffer）もしくは蒸留水中を溶媒としたフローインジェクション系にて施行した。表 1 に示している通り、反応溶液に添加した脳ホモジネートサンプルの上清は反応溶液中の 1.7-3.4% である。EPR 装置は、RRX-1X EPR 装置(Radical Research Inc.)を用い、WIN-RAD operation software を用いて解析した。活性酸素種消去活性は、それぞれの活性酸素種に対応する標準ラジカル消去物質を用いて、標準曲線を作成し、算出した。それぞれ用いた標準物質は、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) に対してはグルタチオン(GSH ; glutathione)、スーパーオキシドアニオン( $\text{O}_2^-$ ) に対しては SOD、アルコキシラジカル( $\text{RO}\cdot$ )に対しては TROLOX(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、ペルオキシラジカル( $\text{ROO}\cdot$ )に対しては  $\alpha$  リポ酸である。

### 3-10 統計学的手法

すべての数値は、平均±標準偏差で記載した。統計解析は、SPSS（IBM Japan）を用いて行った。連続変数に関しては Student's t-test を、ノンパラメトリックデータに関しては Mann-Whitney U test を用いた。P 値が 0.05 未満で、統計学的有意差ありとした。

## 第4章 結果

### 4-1 RNP は虚血半球における BBB 損傷を抑制した

血液脳関門(BBB)損傷を、虚血脳における EB の血管外漏出量を計測することで検討した。RNP 動脈投与した tMCAO モデルは、PBS 群と比較して、中大脳動脈閉塞に起因して生じる EB の血管外漏出量が有意に少なかった (図 2A-B)。虚血半球あたりの EB 漏出量( $\mu\text{g/g}$ )は、PBS 群で  $18.17 \pm 5.20 \mu\text{g/g}$ 、RNP 群で  $7.89 \pm 2.83 \mu\text{g/g}$  であった( $p < 0.001$ )。

### 4-2 RNP 動脈投与により tMCAO モデルにおいて神経症状軽減および脳梗塞体積を縮小させた

再灌流後 24 時間の時点で、PBS 群では 4 匹、RNP 群では 1 匹のマウスが死亡した。死亡率には 2 群間で有意な差は認めなかった。また、2 群間の心拍数、呼吸数、血糖値といった、生理学的パラメータや採血データは、tMCAO 作成前、および再灌流 3 時間後のいずれのポイントにおいても有意な差は認めなかった(表 2)。なお、今回の研究では、血圧は測定していない。以前の研究で、ラット tMCAO モデルに対し、RNP を静脈投与した実験において、有意な血圧低下は見られなかったことを報告しているものの<sup>31</sup>、RNP 動脈投与において、血圧低下がみられないかどうかを検討することは、今後必要と考える。

神経所見は、同様に RNP 投与群において、PBS 投与群と比較して有意に軽症であった ( $p<0.01$ , 図 2C)。また、クレシルバイオレットを用いた Nissle 染色で、%Infarction volume を算出し、2 群で比較したところ、RNP 投与群において、PBS 投与群と比較して、有意に脳梗塞領域が小さかった (図 2D)。%Infarction volume は、PBS 投与群で  $75.56\pm13.96\%$ 、RNP 投与群で  $52.80\pm9.37\%$  であった。 ( $p<0.01$ , 図 2D-2)。

#### 4-3 再灌流 3 時間後における Rh-RNP の分布

蛍光免疫染色法により、虚血脳における Rh-RNP の分布を評価した。図 3A および 3B は、Bregma のスライスにおける、中大脳動脈皮質枝領域の蛍光顕微鏡像である (400 倍視野、図 3A; 1000 倍視野、図 3B)。青、赤、緑の蛍光は、それぞれ CD31、NeuN、(抗)Rhodamine を示している。脳組織における RNP の脳組織への分布を検証、最初は直接 Rh-RNP を検出することを試みた。しかしながら、Rhodamine はわずかに皮質枝の一部に検出されるのみで、毛細血管レベルや血管外脳実質においては検出することが困難であった。蛍光強度が非常に弱いということが要因と考えられた。そこで、Rhodamine の検出能を上げるため、抗 Rhodamine 抗体を用いると、Rh-RNP を検出できた。(抗)Rhodamine は脳内微小血管内および神経細胞を含む周囲の細胞のまわりに分布していることが、観察された (図 3A-2, 4、図 3B-2, 4)。一方、



(抗)Rhodamine は Sham サンプルの右中大脳動脈領域(図 3C)および、PBS コントロールサンプル(図 3D)においては、検出されなかった。(抗)Rhodamine の蛍光強度を算出した。Rh-RNP を投与した tMCAO モデルのサンプル、Rh-RNP を投与した Sham サンプル、PBS コントロールサンプルそれぞれにおける Rhodamine の蛍光強度は、それぞれ 10、0.98、0.05 (arbitrary units)であった (微小血管内ではそれぞれ 4.11、0.49、0.03 / 血管外においては 5.89、0.49、0.02)。これらの結果から、RNP が虚血脳において、BBB を通過して、血管外領域へ集積していることを示していると考えられた。

#### 4-4 RNP はスーパーオキシドアニオンの生成および酸化 DNA 損傷を抑制した

ジヒドロエチジウム染色を用いて、虚血脳におけるスーパーオキシドアニオンの生成レベルについて評価した。図 4A は蛍光顕微鏡像であり、赤がエチジウムブロマイド、緑が NeuN を示している。スーパーオキシドアニオンは、主に PBS 投与群の神経細胞において生成されており、RNP 投与群においてはそれが抑制されていた。エチジウムブロマイドの蛍光強度は RNP 投与群で有意に弱く、RNP 動脈投与により、脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)および中心領域(Ischemic core area)いずれにおいても低かった(脳梗塞周辺領域  $p<0.05$ 、中心領域  $p<0.01$ ; 図 4B)。また、8-OHdG 染色により DNA 酸化損傷についても評価した。ジヒドロエチジウム染色と同様に、赤い 8-OHdG の蛍光強度は、RNP 投与群において有意に低かった(図 4C-D)。これら

の結果をまとめると、RNP 動脈投与により、スーパーオキシドアニオンの生成および DNA 酸化損傷が抑制されると考えられた。

#### 4-5 RNP は虚血脳におけるアポトーシスを抑制した

虚血脳におけるアポトーシスの評価のため、TUNEL 染色を行った。緑色の TUNEL 陽性細胞はアポトーシス細胞を示しており、TUNEL 陽性神経細胞（神経細胞は赤い蛍光で示される）はアポトーシスしている神経細胞を示しており、どちらの数もカウントした。脳梗塞周辺領域(Peri-oinfarction area)、アポトーシス細胞およびアポトーシス神経細胞はいずれも、RNP 投与群で有意に少なかった(TUNEL 陽性細胞;  $p<0.01$ ; PBS 投与群  $355.51\pm124.11$  cells/mm<sup>2</sup> ・RNP 投与群  $149.95\pm60.04$  cells/mm<sup>2</sup> 図 5A-B; TUNEL 陽性神経細胞、 $p<0.01$ ; PBS 投与群  $218.70\pm38.40$  cells/mm<sup>2</sup> RNP 投与群  $67.13\pm25.03$  cells/mm<sup>2</sup> 図 5C-D)。また、脳梗塞中心領域においては、RNP 投与群においてアポトーシス細胞は有意に少なかったが、アポトーシス神経細胞は 2 群間で有意差はなかった(TUNEL 陽性細胞,  $p<0.05$ , PBS 投与群  $344.99\pm120.72$  cells/mm<sup>2</sup> RNP 投与群  $214.25\pm92.36$  cells/mm<sup>2</sup> 図 5A-B; TUNEL 陽性神経細胞  $p=0.057$ , PBS 投与群  $188.42\pm59.13$  cells/mm<sup>2</sup> RNP 投与群  $113.68\pm82.76$  cells/mm<sup>2</sup> 図 5C-D)。これらの結果から、RNP 動脈投与により、特に脳梗塞周辺領域において神経細胞のアポトーシスを抑制すると考えられた。

#### 4-6 RNP 脳微小血管およびタイトジャンクション障害を抑制した

RNP による脳微小血管保護および血液脳関門の保護効果を評価するため、CD31(内皮細胞マーカー)およびオクルディン(タイトジャンクション)を、蛍光免疫染色により検討した。図 6A は蛍光顕微鏡像であり、赤いオクルディンの蛍光が PBS 群で明らかに弱いことがわかる。対して、RNP 投与群においては、オクルディンの蛍光が、CD31(緑)と一致して、明瞭に認識することができる。このことは、RNP 投与群において、虚血脳の内皮細胞のタイトジャンクションが保護され、残存していることを示している。

CD31 染色により認識できる血管領域を計測した( $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ )。血管領域は脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)においても、中心領域(Ischemic core area)においても、RNP 投与群において、有意に残存していた (Peri-infarction area,  $p<0.001$ 、Ischemic core area,  $p<0.01$ 、図 6B)。また、オクルディンの発現も同様に、脳梗塞周辺領域(Peri-infarction area)および中心領域(Ischemic core area)で、RNP 投与群において、有意に残存していた (いずれも  $p<0.01$  ; 図 6C)。これらの結果から、RNP 動脈投与により、虚血脳において、血管内皮細胞損傷およびタイトジャンクション損傷を抑制していると考えられた。

#### 4-7 RNP は複数種の活性酸素消去能を改善した

脳ホモジネートサンプルの、活性酸素消去活性を、MULTIS 法を用いて評価した。

2 群の活性酸素消去活性を図 7 に示す。図が示すように、RNP 投与群において、ヒドロキシラジカル( $\text{OH}\cdot$ )、脂質ペルオキシラジカル( $\text{ROO}\cdot$ )およびスーパーオキシドアニオン( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )に対する消去活性が有意に高く、一方脂質アルコキシラジカル( $\text{RO}\cdot$ )に対する消去活性は、2 群間で有意差がなかった。活性酸素消去活性は標準物質により測定された標準曲線に従って算出した。ヒドロキシラジカルは、PBS 投与群で  $4.90 \pm 2.31 \text{ mM-GSHeq}$ 、RNP 投与群で  $9.80 \pm 3.46 \text{ mM-GSHeq}$  ( $p < 0.05$ )。脂質アルコキシラジカルは、PBS 投与群で  $25.62 \pm 8.47 \text{ mM-TROLOXeq}$ 、RNP 投与群で  $26.49 \pm 6.08 \text{ mM-TROLOXeq}$  ( $p = 0.83$ )。脂質ペルオキシラジカルは、PBS 投与群で  $422.84 \pm 395.91 \mu\text{M-}\alpha\text{-LAeq}$ 、RNP 投与群で  $1005.45 \pm 339.47 \mu\text{M-}\alpha\text{-LAeq}$  ( $p < 0.05$ )。スーパーオキシドアニオンでは、PBS 投与群で  $1.61 \pm 0.65 \text{ U/ml-SODEq}$  RNP 投与群で  $4.11 \pm 1.84 \text{ U/ml-SODEq}$  ( $p < 0.05$ )であった。

## 第5章 考察

### 5-1 RNPの動脈投与量について

脳主幹動脈閉塞に対する急性期カテーテル血栓回収術は、予後改善につながる有効な治療選択肢の一つである<sup>7-13</sup>。しかしながら、再灌流後に増加する活性酸素種は、脳梗塞サイズの増大、脳浮腫、出血性脳梗塞と関連する。そのため、再灌流後の活性酸素消去剤投与により、さらなる予後改善につながる治療として期待される。活性酸素種の生成は、主幹動脈閉塞および再灌流後に増加するが、特に再灌流後早期の段階で、その生成が増加することが報告されている<sup>27</sup>。

今回の研究では、新規活性酸素消去剤である、ナノ粒子化活性酸素消去剤RNPの、神経保護効果について評価した。以前われわれのグループでは、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルの再灌流障害に対して、RNP 90mg/kgの静脈投与による神経保護効果を報告している<sup>31</sup>。なお、この90mg/kgという投与量はLD<sub>50</sub> (600–1200mg/kg)の約10分の1の投与量として設定された。今回、RNPの初回通過効果を回避するため、RNP動脈投与による治療効果を検証した。それに際して、まず動脈投与における適切な投与濃度の検索を行い、9mg/kgが十分な神経保護効果を得られる可能性があると見出した。9mg/kgという投与量は、本研究における動脈投与量として設定した。これはLD<sub>50</sub>の約100分の1の量である。RNPを動脈投与することで、再灌流直後に、直接RNPを標的臓器へ届かせることを可能となるため、より少ない投与量

でも十分な効果が得られるものと考えられた。その効果は、ラットでの RNP 静脈投与実験<sup>31</sup>の 24 時間後の神経症状を参照してみると、もちいた神経所見のスケールも動物種も異なるため、直接的に比較できるものではないが、今回のマウスでの動脈投与実験の 24 時間後の症状は、同等かより軽症である可能性があると考えている。ただし、今後、静脈投与との効果の比較を行う必要がある。神経保護薬剤や幹細胞の動脈投与に関しては、その有効性および安全性に関する報告はこれまでもされている<sup>41-43</sup>。本研究においては、RNP 動脈投与治療の、再灌流障害からの神経細胞保護および血液脳関門保護作用を明らかにした。

## 5-2 RNP の特性

ポリエチレングリコール(PEG)により表面修飾されたナノ粒子は、細網内皮系を介した処理が軽減されるため、血液循環においてより安定して維持することができる<sup>44,45</sup>。PEG 化ナノ粒子は、生体適合性が高く、血液循環で安定して維持されるため、脳血管への到達やより容易となり、効率よく脳組織への集積させることが可能となる<sup>46</sup>。また、ナノ粒子の表面電荷もそのクリアランスに影響を与える。多くの細胞表面は、負の電荷を有するため、陽荷電ナノ粒子は組織表面に吸着しやすくなり、血管内で循環しにくくなる。一方陰荷電ナノ粒子は、スカベンジャー受容体により取り込まれるため、やはり血管内での循環が制限されてしまう<sup>47</sup>。RNP は PEG 化

された非荷電ナノ粒子であり、TEMPOL のようなこれまでの低分子抗酸化剤に比べて、生体内での半減期を延長させることができた(15 分)<sup>30</sup>。こういった特性により、再灌流後の虚血脳への RNP のデリバリーが向上すると考えられる。粒子のサイズもまた重要な因子であり、血液脳関門を通過して虚血脳組織へ分布させられるかどうかということに影響を与える<sup>48-50</sup>。Cabral らは浸透性の乏しい腫瘍に対しても、50nm よりも小さい粒子は腫瘍内へデリバリーが可能であることを報告している<sup>49,50</sup>。RNP の平均粒子径は 30nm であり、これまで脳虚血再灌流障害に対する治療効果を検証されている他のナノ粒子と比べてもより小さい粒子径である<sup>51,52</sup>。

### 5-3 虚血脳への RNP の分布

再灌流直後は、血液脳関門の透過性が亢進する<sup>53</sup>。そのため、血中半減期が長く粒子径の小さいナノ粒子は、血液脳関門を超えて、虚血脳実質へ到達できる可能性が高まると考えられる。そこで、RNP が虚血脳において、どのように分布するか調べるため、Rh-RNP を投与し、蛍光免疫染色法で評価した。抗 rhodamine 抗体を用いて評価したところ、RNP は内皮細胞上のみならず、神経細胞周囲にも分布していることが分かった。一方 RNP は、sham モデルにおける正常脳においては検出されず、正常な血液脳関門は通過せず分布していなかった。これらの結果から、一過性脳虚血後に、血液脳関門の透過性が亢進していることで、RNP が血液脳関門を通過する

ことができると考えられる。再灌流直後に小粒子径で半減期の長い RNP を動脈投与することで、ダイレクトにターゲットである脳へデリバリーされ、かつ血液脳関門を通過し、虚血脳にとどまって、活性酸素種を捕捉、効果的に Neurovascular unit 保護効果を発揮すると考えられた。

#### 5-4 RNP による Neurovascular Unit 保護効果と活性酸素種消去能について

RNP の動脈投与治療により、RNP は血液脳関門を通過、脳実質へ分布し、虚血脳における活性酸素種の発生および DNA 酸化損傷を軽減させた。また、RNP は虚血脳において、活性酸素種を消去し、アポトーシス、血管内皮損傷を抑制した。虚血再灌流障害から Neurovascular Unit の保護効果により、脳梗塞サイズの縮小、神経症状の軽減につながると考えられた。こういった Neurovascular Unit 保護効果は、脳梗塞周辺領域でより顕著であった。本研究では、高血糖状態の虚血再灌流モデルを用いたが、高血糖状態では、酸化ストレスおよび微小血管循環が増悪される<sup>54,55</sup>。にもかかわらず、RNP が脳梗塞周辺領域でより神経血管保護効果が得られた理由として、長時間循環でき、生体適合性の高い RNP が、虚血脳全体へ分布しうるからではないかと考えている。

本研究では、MULTIS 法を用いて、複数の活性酸素種の消去活性についても評価した。再灌流後の RNP 治療により、ヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )、スーパーオキシド



アニオン( $O_2^-$ )、脂質ペルオキシラジカル( $ROO\cdot$ )に対する、消去活性が改善していた。

虚血再灌流後は、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、ヒドロゲンペルオキシドが貪食細胞、内皮細胞、グリア細胞から産生される<sup>38,39</sup>。さらに、ペルオキシナイトライト( $ONOO^-$ )が、スーパーオキシドアニオンと一酸化窒素( $NO$ )との反応により産生され、これにより脂質過酸化反応、ミトコンドリア膜や DNA 損傷、複数のシグナル経路の活性化や抑制、血液脳関門の障害が惹起される<sup>56,58,59</sup>。

RNP 治療により、スーパーオキシドアニオンの産生のみならず、スーパーオキシドアニオンから始まるヒドロキシラジカルの生成や、脂質過酸化といった連鎖反応も抑制させていると考えられた。脳組織においては、脂質は特に重要な構成要素であるため、脂質ペルオキシラジカルを抑制させることは、RNP の神経保護効果のメカニズムを考える上で、重要な役割を果たしているであろう。

## 5-5 本研究の limitation と今後の課題

本研究にはいくつかの limitation がある。一つには、24 時間時点での評価であるということである。そのため、本研究からは、RNP の亜急性期の治療効果や、毒性に関しては、言及することはできない。24 時間を sacrifice のタイミングとして選択した理由は、以前我々のグループで、24 時間での RNP の静脈投与の治療効果について検証しており、その抗酸化効果および脳梗塞縮小効果を報告していたため<sup>31</sup>、今回

動脈投与を検証するに際しても、まず 24 時間を選択した。しかしながら、虚血再灌流後 24 から 72 時間といったタイミングで生ずる炎症反応が、血液脳関門損傷や血管原性浮腫に関与するといわれている<sup>60</sup>。亜急性期における治療効果については、今後の研究課題と考えている。二つ目に、60 分という therapeutic time window でのみの検証であったことである。実際の臨床現場においては、様々な状況が想定されるため、より長い therapeutic time window での効果についても検討する必要がある。三つめに、本研究においては、RNP が虚血能にどのように分布しているかを検証したが、この分布した RNP が時間の経過でどのように変化していくかということについてはわかっていない。また、今回は再灌流後 20 分後に、RNP の動脈投与を行ったが、動脈投与のタイミングを変えた場合（より早いタイミングなど）、虚血脳への浸透性や、その効果に違いがあるかどうかというのも検討課題と考える。加えて、再灌流前、閉塞の状態での動脈投与もしくは静脈全身投与というのも、実際の臨床現場では治療方法として考えられる。この場合、順行性の灌流は閉塞しているが、側副血行を介して、虚血脳へ RNP が到達するチャンスがあり、治療効果として期待できる可能性がある。さらに今後、臨床応用へ発展させるためには、RNP 全身投与した時の薬物動態、および代謝経路、また RNP を構成するポリマーの臓器毒性の有無、程度などについても検討する必要がある。

## 第 6 章 結論

本研究の結果から、RNP が虚血再灌流障害に対して、有効な治療となりうる可能性が示唆された。RNP の動脈投与により、血管保護、血液脳関門の保護効果を示し、脳神経症状改善および脳梗塞縮小効果を認めた。複数種に対する活性酸素種消去能を改善させ、Neurovascular Unit 保護効果を示した。

## 第7章 謝辞

今回、このような貴重な研究の機会をいただき、ご指導・ご鞭撻いただきました、筑波大学医学医療系脳神経外科、松村明教授に感謝申し上げます。また、研究手法および論文作成など直接的かつ具体的にご指導をいただきました、筑波大学医学医療系脳神経外科、丸島愛樹先生に感謝申し上げます。

RNP の作製、無償でご提供いただき、研究手法および論文作成のご指導いただきました、筑波大学数理物質科学研究科、長崎幸夫教授に感謝申し上げます。

電子スピン共鳴法（EPR）の解析、評価法、論文のご指導をいただきました、筑波技術大学東西医学統合医療センター、平山暁教授に感謝申し上げます。

検体の解析等において、ご指導、ご協力いただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科(脳神経外科)技官の塚田喜子さん、宮川牧子さんに感謝申し上げます。蛍光免疫染色にご協力いただきました筑波大学医療科学類、庭野亜美さんに感謝申し上げます。

## 第 8 章 表

表 1

UV; ultra violet (300-400nm) VL; visual light (500-600nm)

AAPH; 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride,

tBHP; tert-butyl hydroperoxide

CYPMPO; 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide

Free radial	Spin trap	Precursor/Sensitizer	UV/VL	Irradiation time	Proportion of sample
$\cdot\text{OH}$	CYPMPO	$\text{H}_2\text{O}_2$ 10mM	UV	5s	1.7%
$\text{O}_2^{\cdot-}$	CYPMPO	Riboflavin 20 $\mu\text{M}$	VL	60s	3.4%
$\text{RO}\cdot$	CYPMPO	AAPH 10mM	UV	5s	3.4%
$\text{ROO}\cdot$	CYPMPO	tBHP 10mM	UV	10s	1.7%

表 2

		PBS	RNP	
Heart rate (bpm)	pre-surgery	356.3±32.2	344.6±23.2	N.S.
	3h after reperfusion	378.8±21.5	374.6±36.0	N.S.
Respiratory rate (/min)	pre-surgery	191.8±26.3	192.8±19.5	N.S.
	3h after reperfusion	199.5±29.1	200.7±24.7	N.S.
Blood sugar (mg/dl)	pre-surgery	122.5±6.9	127.3±7.4	N.S.
	3h after reperfusion	287.3±57.2	291.3±35.6	N.S.

## 第9章 図の説明

### 図1 RNP 動脈投与量における治療効果の違い

(A) 各投与量における神経症状 (B) 各投与量における% infarction volume

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 図2 RNP 動脈投与により血液脳関門障害、神経症状の軽減、脳梗塞体積を縮小させた

(A) 再灌流 24 時間後の虚血脳への EB 漏出 (B) EB の血管外漏出量の定量評価。

EB 漏出量は  $\mu\text{g/g}$ (半球)で記載 各群;  $n=9$  (C) PBS 群および RNP 群における Nissle

染色写真 (D-1) 再灌流 24 時間後の神経症状 PBS 群 ;  $n=13$ 、RNP 群 ;  $n=10$

(D-2) % infarction volume 各群 ;  $n=9$  \*\* $p < 0.01$

### 図3 Rh-RNP は虚血脳に分布し、微小血管および血管外領域へ分布した

中大脳動脈皮質領域の Rh-RNP 分布を免疫蛍光染色により評価 (青, CD31; 赤, NeuN; 緑, rhodamine; ピンク, DAPI). (A,B) Rh-RNP 投与 t MCAO モデルの虚血側中大脳動脈領域 倍率: A, 400 倍; B, 1000 倍 (C) Rh-RNP を投与した Sham モデルの右中大脳動脈領域 (D) PBS を投与した tMCAO モデルの虚血側中大脳動脈領域 1, CD31; 2, NeuN; 3, (抗) rhodamine; 4, Merge 像 Bar=50  $\mu\text{m}$

#### 図4 RNP はスーパーオキシドアニオン生成および DSA 酸化損傷を抑制した

スーパーオキシドアニオン生成は、ジヒドロエチジウム染色により評価した。DNA 酸化損傷は、8-OHdG 染色により評価した。(A) 蛍光顕微鏡像 エチジウムブロマイド (赤)、NeuN (緑) 1・2; PBS 群 3・4; RNP 群 (1, 3: 脳梗塞周辺領域 peri-infarction area; 2, 4: 脳梗塞中心領域 ischemic core) (B) 脳梗塞周辺領域および中心領域の赤色蛍光強度 (C) 蛍光顕微鏡像 8-OHdG (赤). 1・2 ; PBS 群 3・4; RNP 群 (1, 3: 脳梗塞周辺領域 2, 4: 脳梗塞中心領域). (D) 脳梗塞周辺領域および中心領域の赤色蛍光強度 Bar=50 $\mu$ m 各群 n=7 DHE, dihydroethidium \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### 図5 RNP は虚血脳におけるアポトーシスを抑制した

脳梗塞領域におけるアポトーシス細胞の評価を TUNEL 染色により行った。(A) 緑色蛍光は TUNEL 陽性細胞を示す 1・2; PBS 群、3・4; RNP 群 (1 3: 脳梗塞周辺領域 peri-infarction area; 2, 4: 脳梗塞中心領域 ischemic core) (B) 脳梗塞周辺領域および中心領域の TUNEL 陽性細胞陽性細胞数 (D) TUNEL-NeuN 2 重染色 赤色蛍光が神経細胞を示す(NeuN)。アポトーシス神経細胞は、NeuN および TUNEL いずれも陽性の細胞である 1・2; PBS 群、3・4; RNP 群 (1 3: 脳梗塞周辺領域 peri-infarction area; 2, 4: 脳梗塞中心領域 ischemic core) (D) 脳梗塞周辺領域および中心領域の TUNEL-NeuN 陽性細胞の数 Bar=50  $\mu$ m. 各群 n=7



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; n.s., not significant.

## 図 6 RNP による微小血管およびオクルディン発現の保護

(A) CD31 (1, 4: 緑)と occludin (2, 5: 赤) の蛍光顕微鏡像 3・6 Merged 像

(B) 脳梗塞周辺領域および中心領域の CD31 染色により示される血管領域

(C) 脳梗塞周辺領域および中心領域の赤色の蛍光強度 (occludin 発現)

Bar=50  $\mu$ m. 各群 n=7 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 図 7 RNP は虚血脳の複数種に対する活性酸素種捕捉能を改善した

再灌流 24 時間後の虚血脳の活性酸素種捕捉能を MULTIS 法により評価した

(A) ヒドロキシラジカル消去活性 単位; mM GSH equivalent. (B) 脂質アルコキシ

ラジカル消去活性 単位; mM Trolox equivalent. (C) 脂質ペルオキシラジカル消去

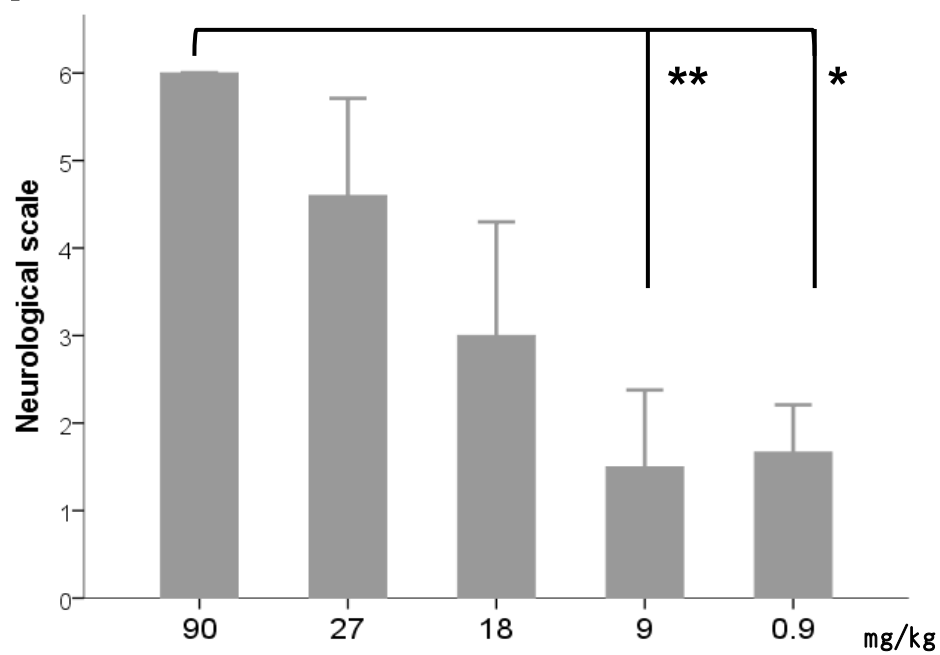
活性 単位;  $\mu$ M  $\alpha$ -lipoic acid equivalence. (D) スーパーオキシドアニオン消去活性

単位 U/mL SOD equivalent. 各群 n=7 \* $p < 0.05$ ; n.s., not significant.

## 第 10 章 図

図 1

**A**



**B**

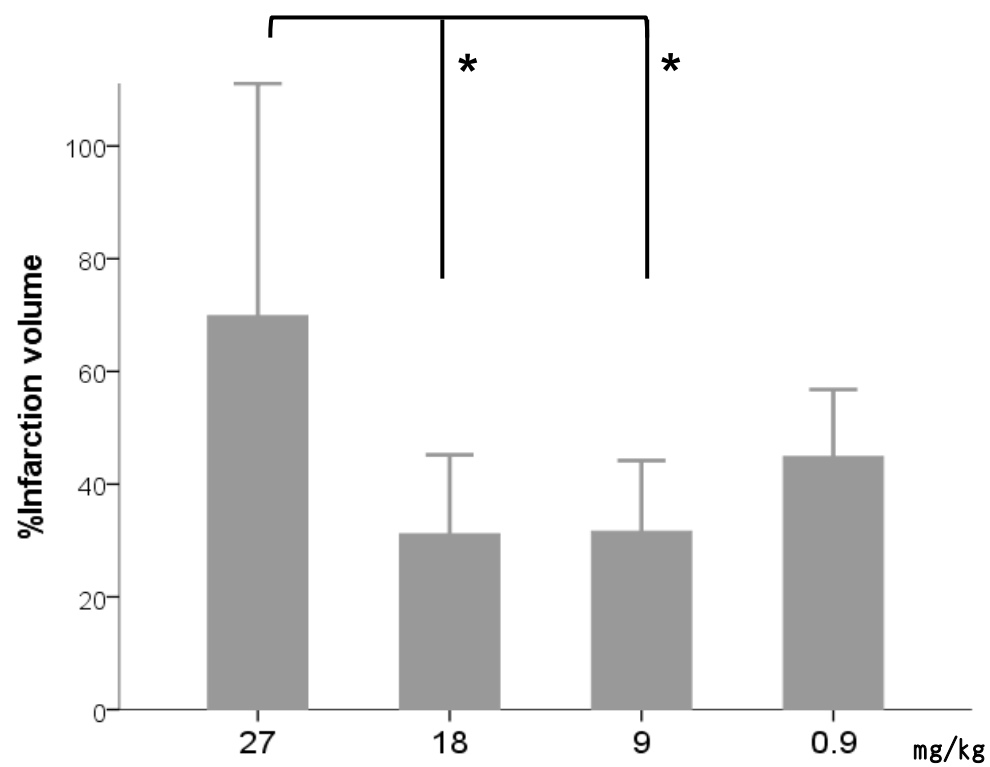
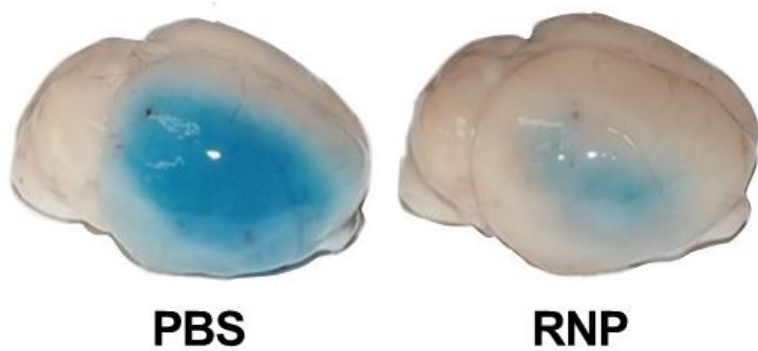
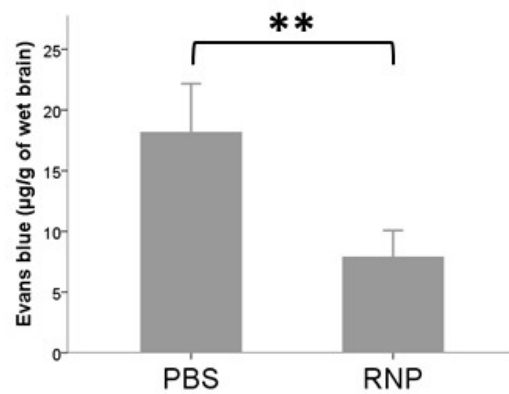


Figure 2

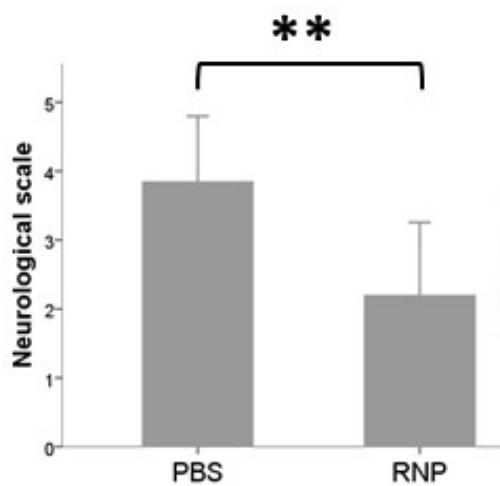
**A**



**B**

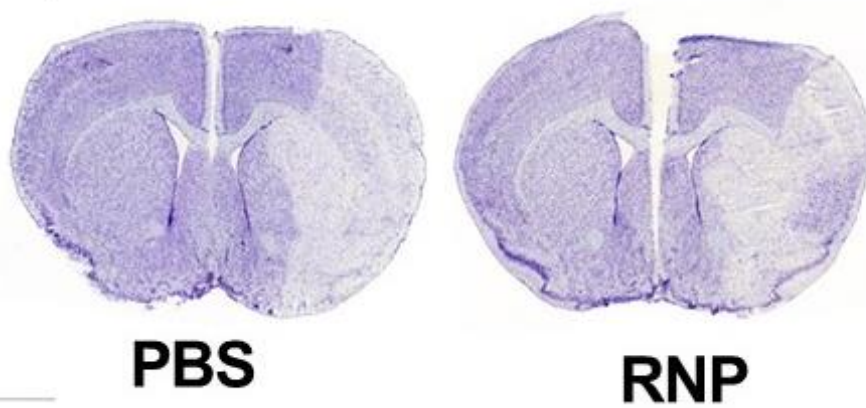


**C**



**D**

**1**



**2**

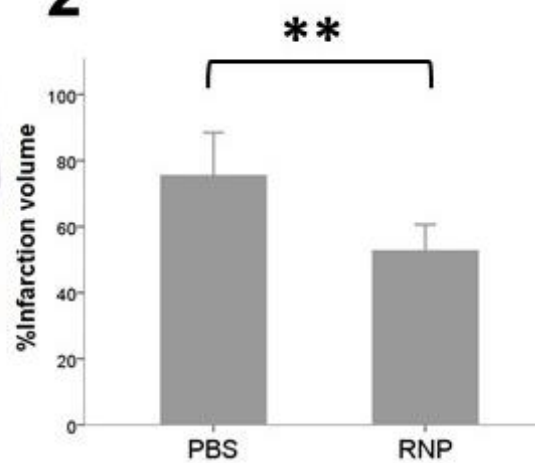
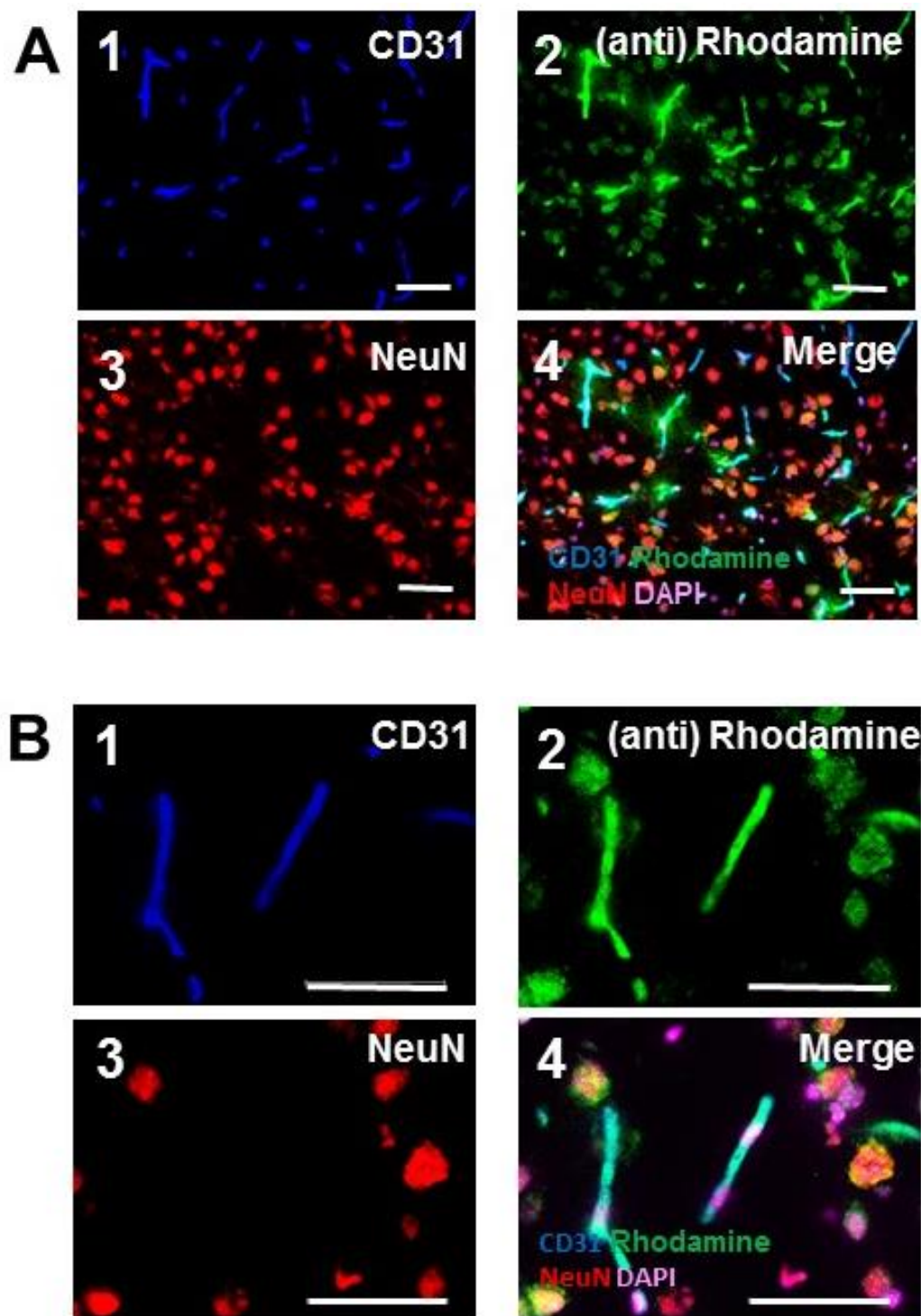


图 3



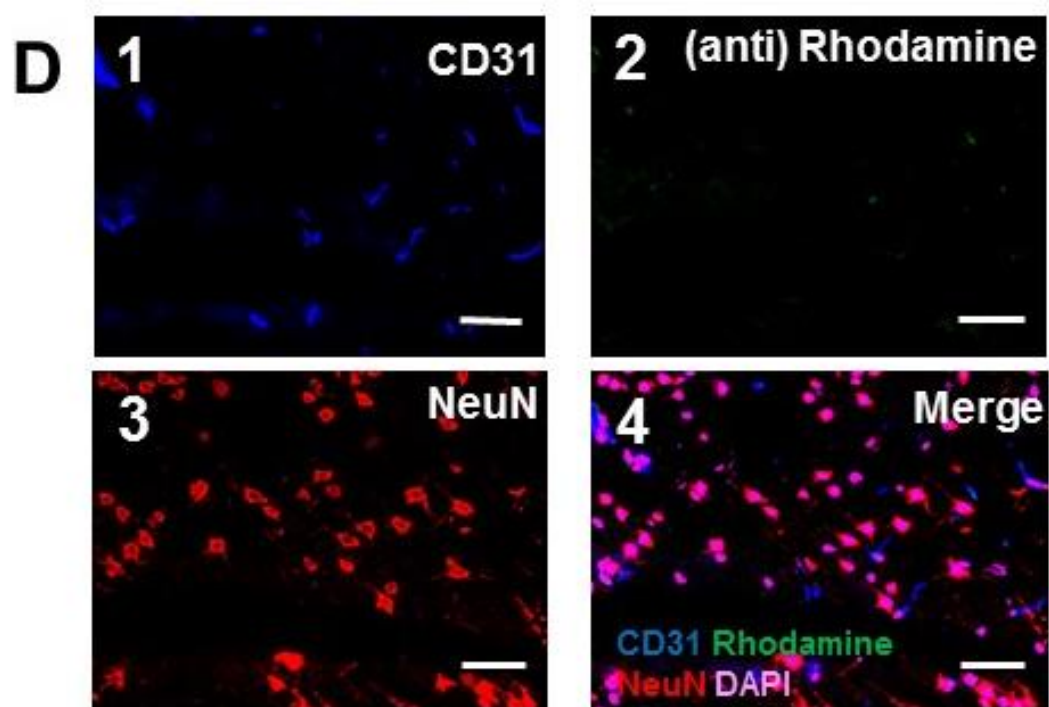
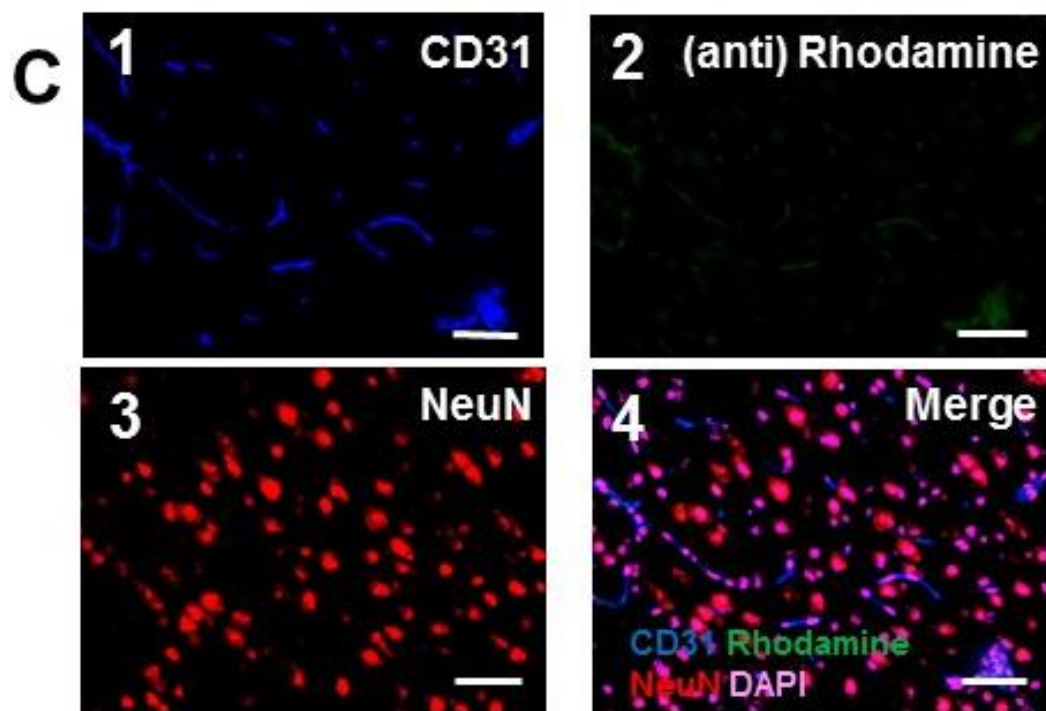
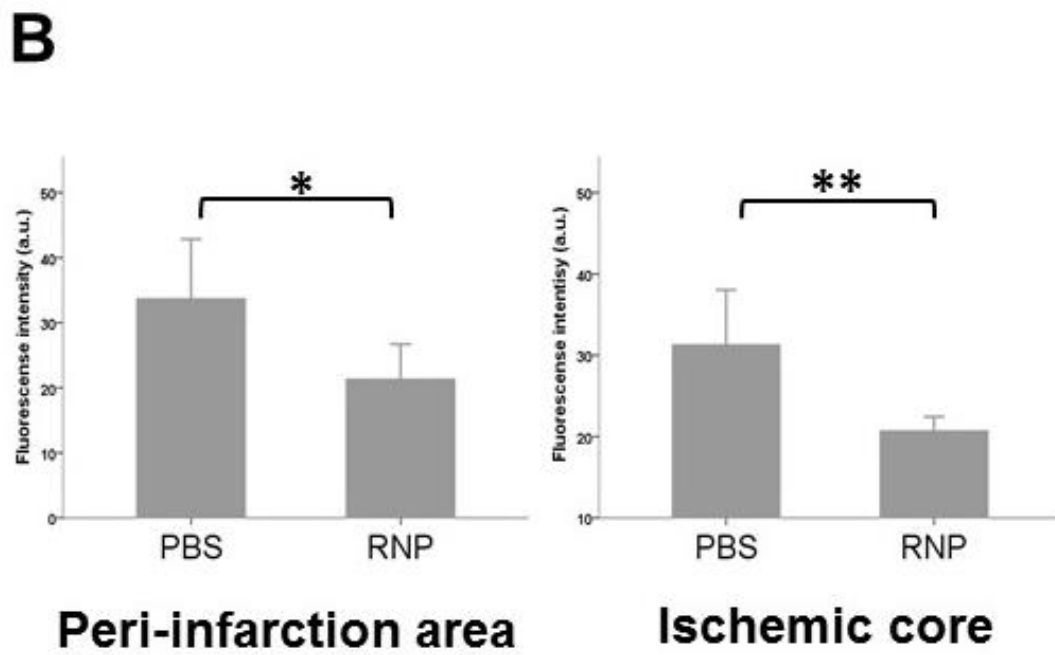
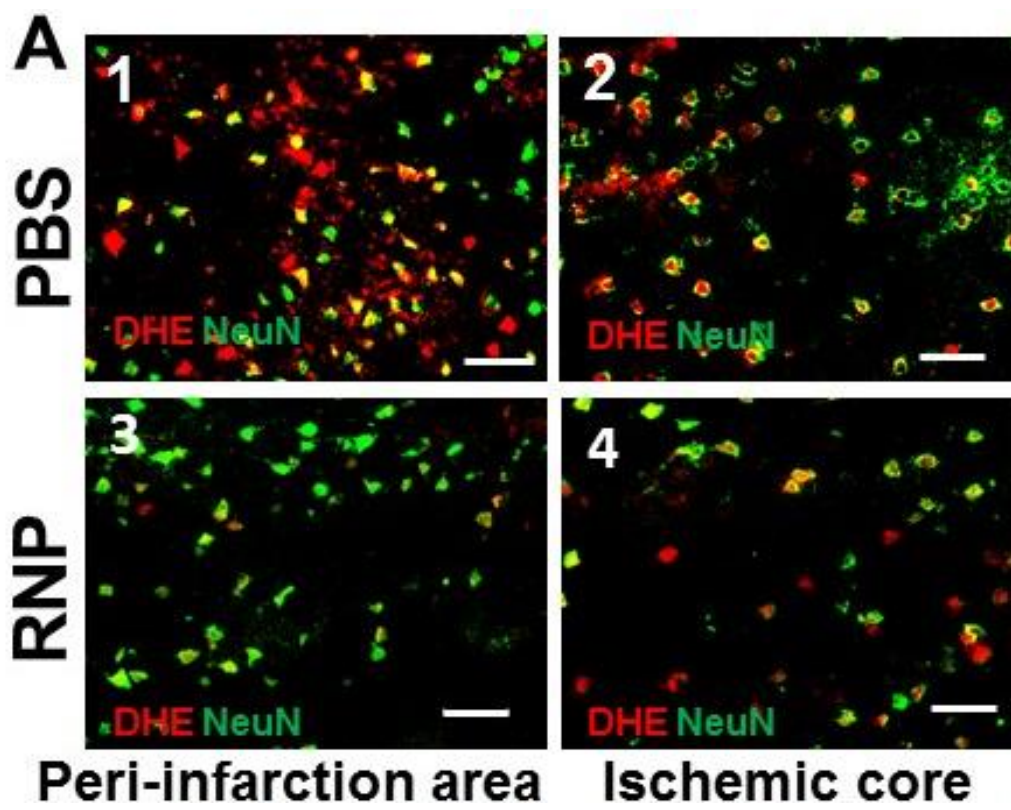


Figure 4





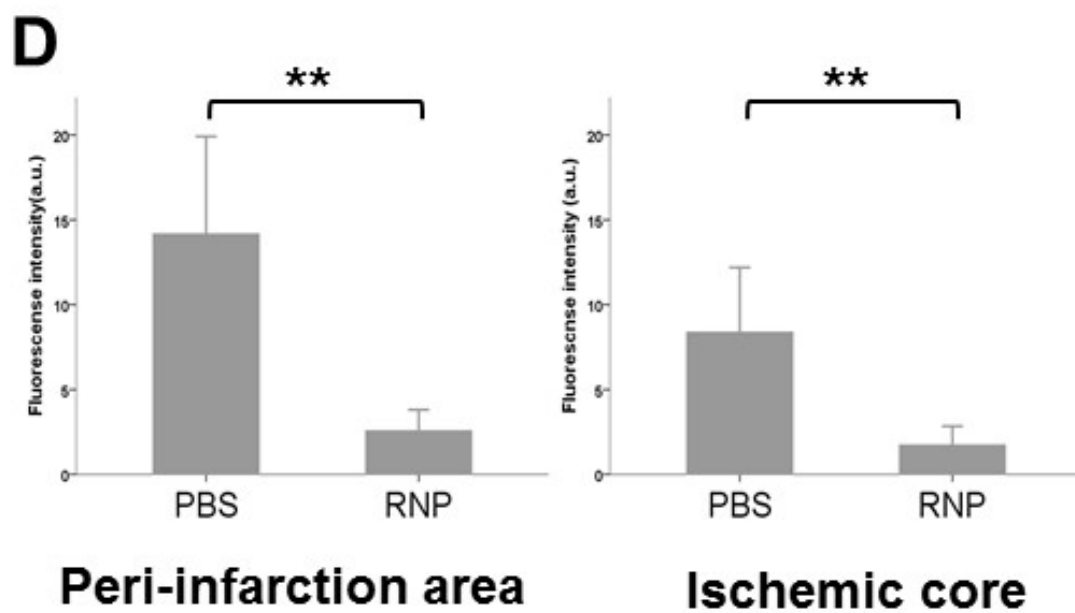
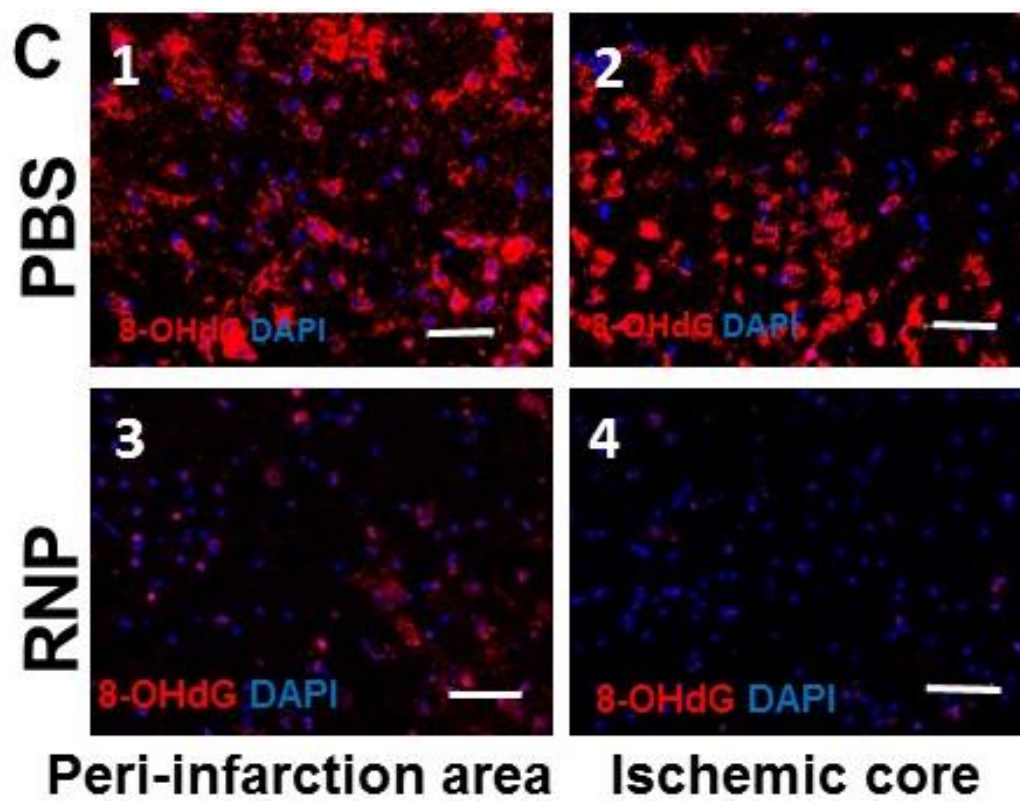
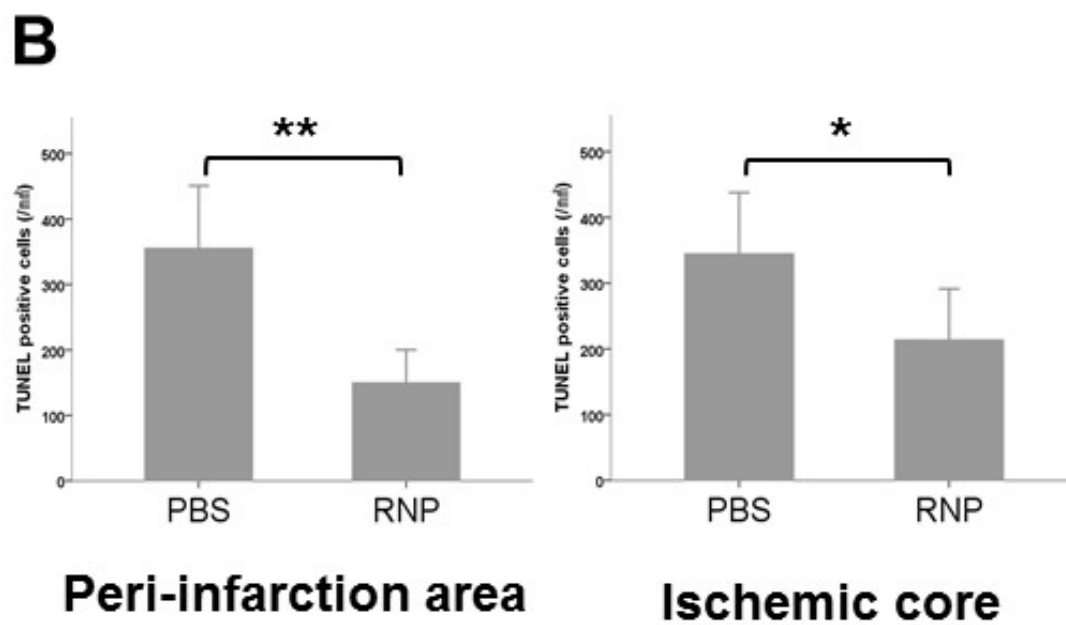
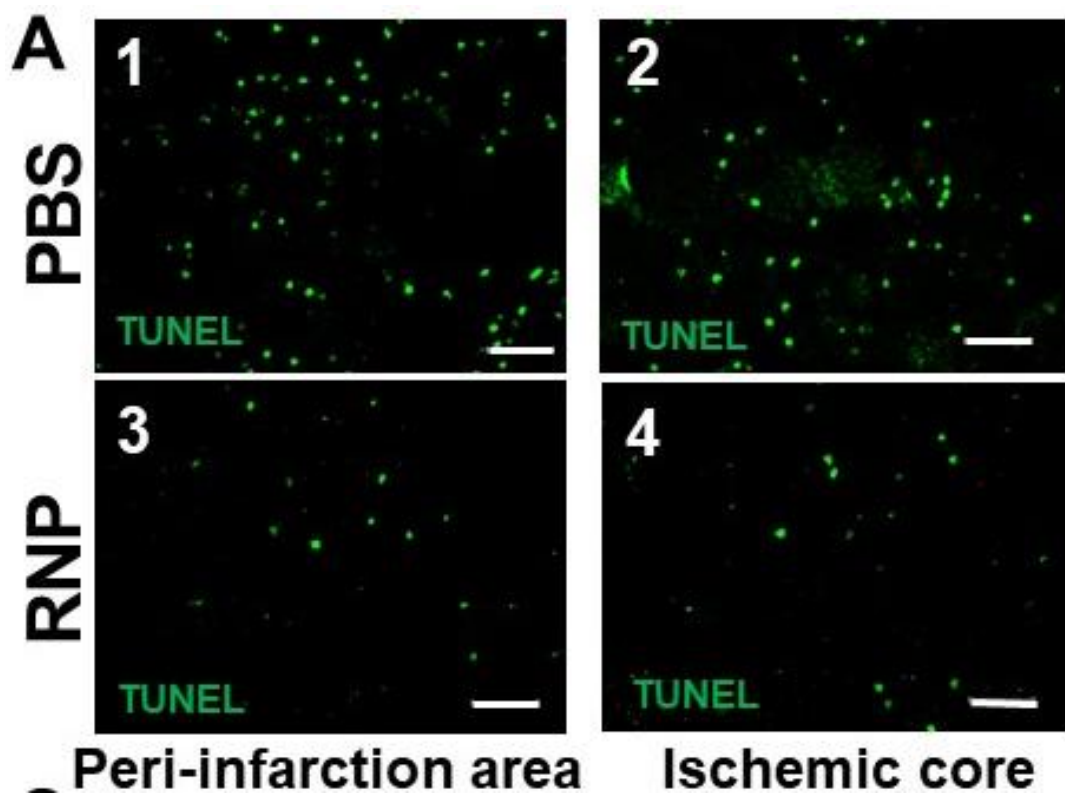
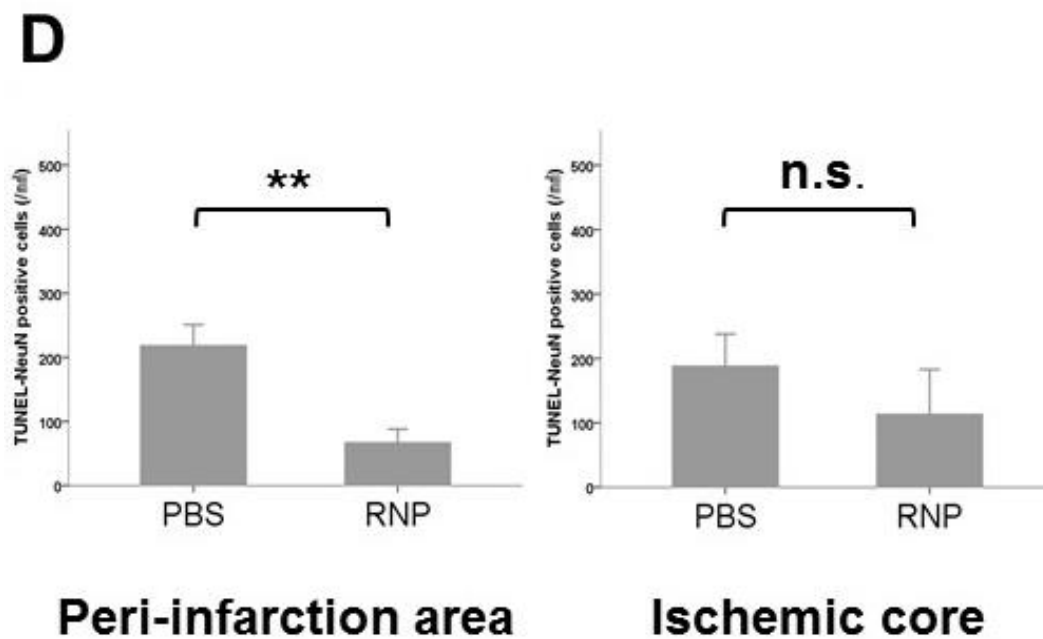
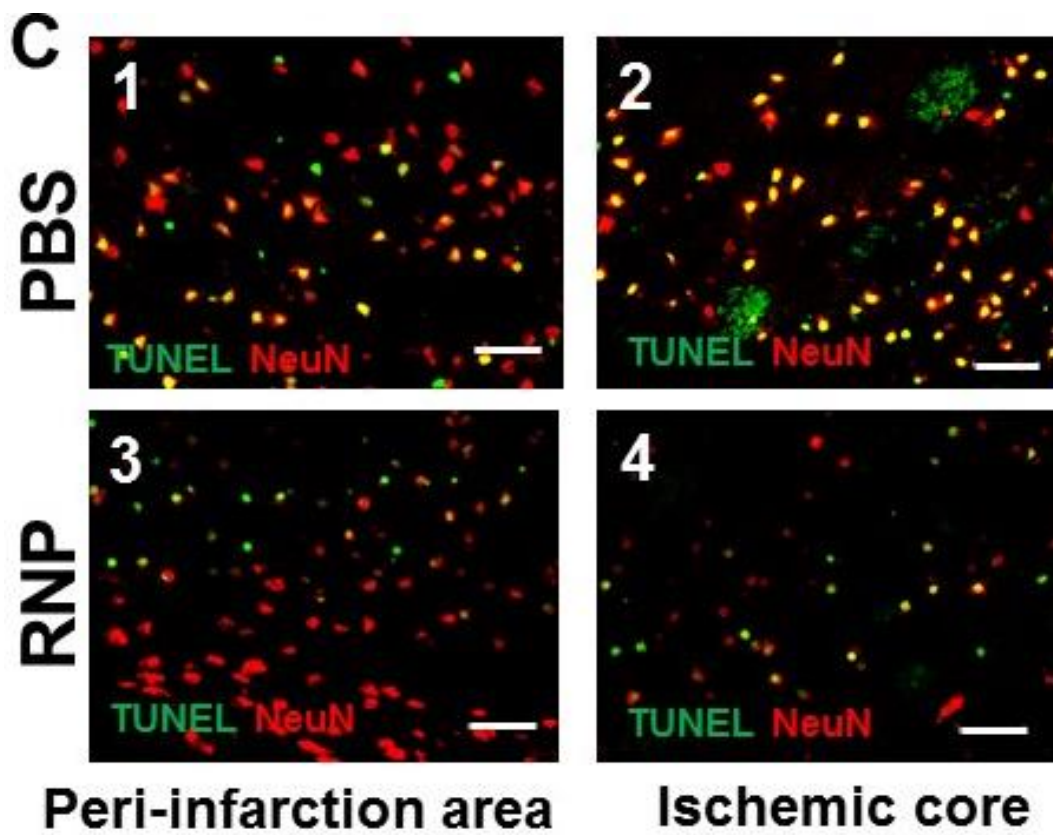
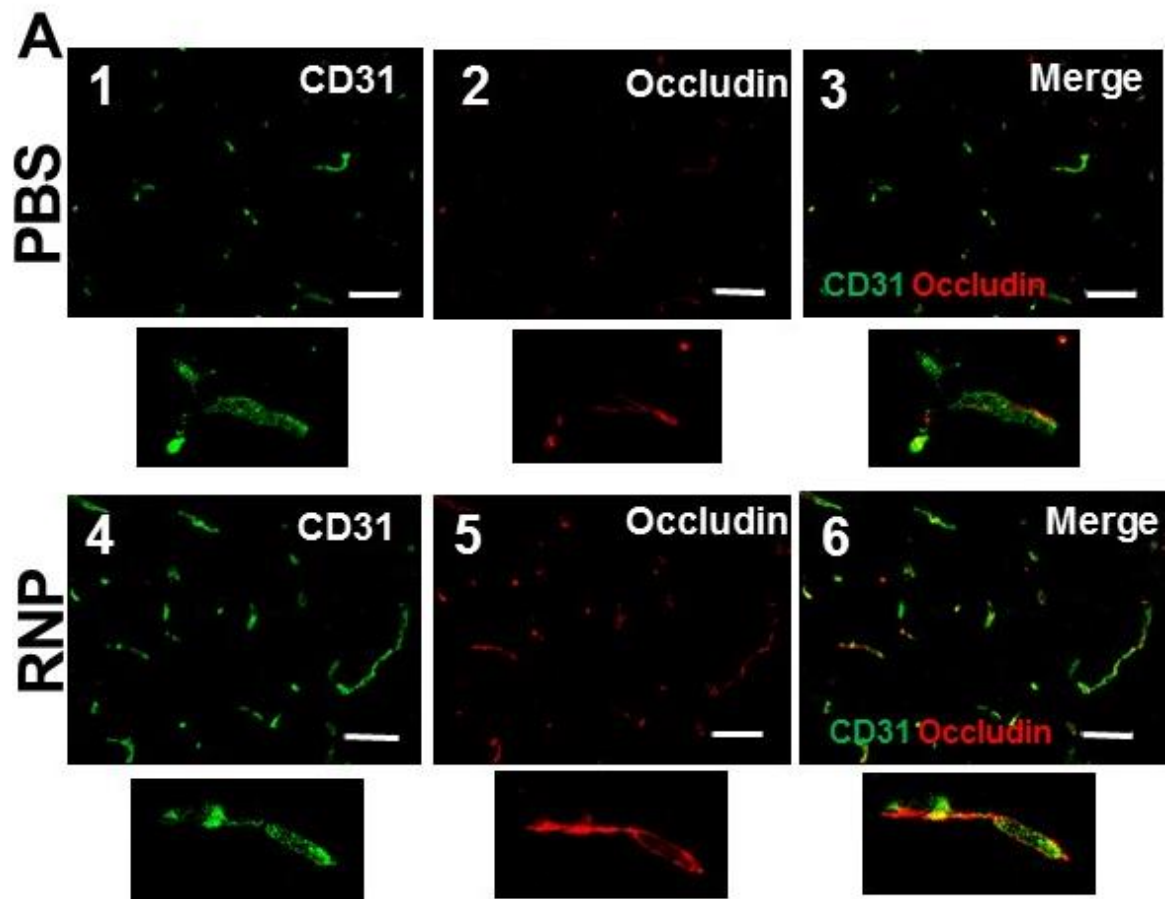


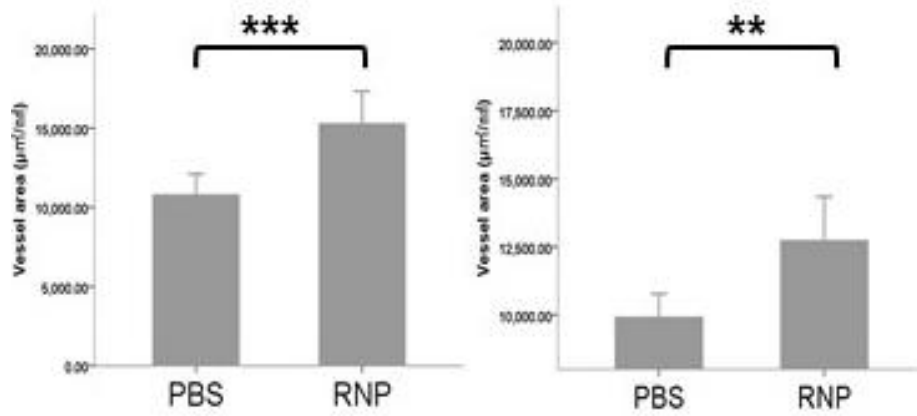
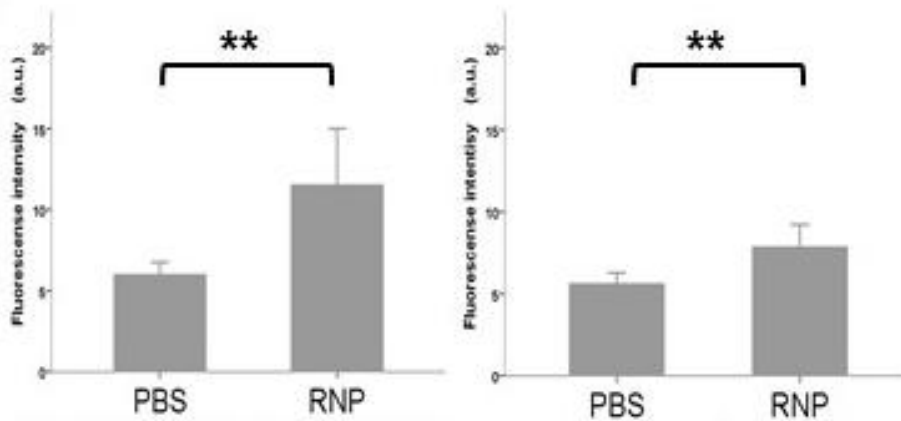
Figure 5

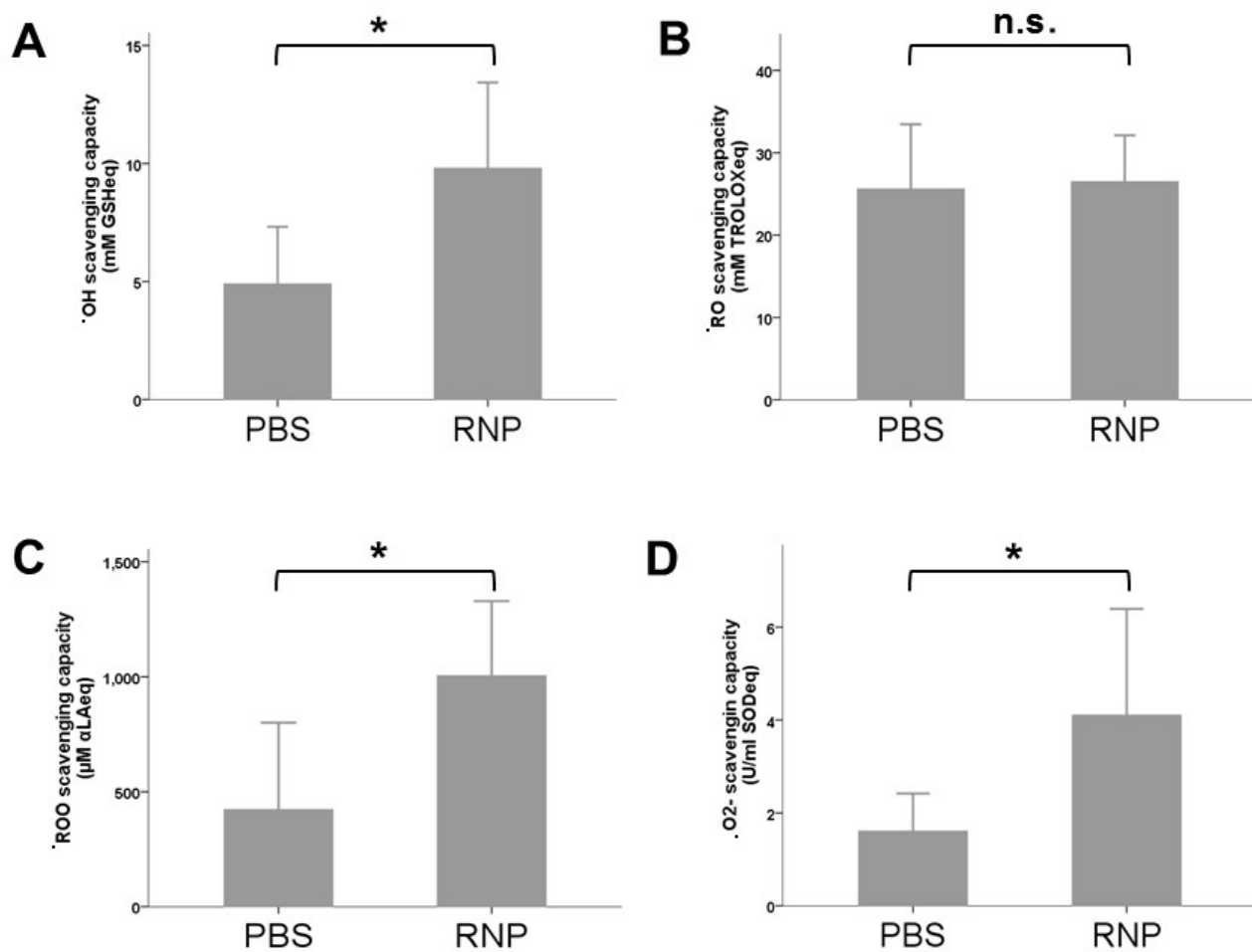








**B****Peri-infarction area****Ischemic core****CD31****C****Peri-infarction area****Ischemic core****Occludin**



## 第 11 章 参考文献

1. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-1587
2. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The european cooperative acute stroke study (ecass). *Jama.* 1995;274:1017-1025
3. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ecass ii). Second european-australasian acute stroke study investigators. *Lancet (London, England).* 1998;352:1245-1251
4. Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, Hashi K, Saito I, et al. Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan alteplase clinical trial (j-act). *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2006;37:1810-1815
5. Bluhmki E, Chamorro A, Davalos A, Machnig T, Sauce C, Wahlgren N, et al. Stroke treatment with alteplase given 3.0-4.5 h after onset of acute ischaemic

- stroke (ecass iii): Additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology*. 2009;8:1095-1102
6. Egashira Y, Yoshimura S, Sakai N, Kuwayama N. Efficacy of endovascular revascularization in elderly patients with acute large vessel occlusion: Analysis from the rescue-japan retrospective nationwide survey. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22:627-632
  7. Broderick JP, Berkhemer OA, Palesch YY, Dippel DW, Foster LD, Roos YB, et al. Endovascular therapy is effective and safe for patients with severe ischemic stroke: Pooled analysis of interventional management of stroke iii and multicenter randomized clinical trial of endovascular therapy for acute ischemic stroke in the netherlands data. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2015;46:3416-3422
  8. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 2015;372:1009-1018
  9. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372:1019-1030
  10. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever

- thrombectomy after intravenous t-pa vs. T-pa alone in stroke. *N Engl J Med.* 2015;372:2285-2295
11. Campbell BC, Hill MD, Rubiera M, Menon BK, Demchuk A, Donnan GA, et al. Safety and efficacy of solitaire stent thrombectomy: Individual patient data meta-analysis of randomized trials. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2016;47:798-806
  12. Ribo M, Molina CA, Cobo E, Cerda N, Tomasello A, Quesada H, et al. Association between time to reperfusion and outcome is primarily driven by the time from imaging to reperfusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2016;47:999-1004
  13. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet (London, England).* 2016;387:1723-1731
  14. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol.* 1986;19:105-111
  15. Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y, Nakazawa H. Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab.*

1998;18:123-129

16. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *The Journal of nutrition*. 2003;133:3275s-3284s
17. Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: A hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:409-422
18. Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. Protective effects of mci-186 on cerebral ischemia: Possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1994;268:1597-1604
19. Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res*. 1997;762:240-242
20. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (mci-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis*. 2003;15:222-229
21. Kimura K, Aoki J, Sakamoto Y, Kobayashi K, Sakai K, Inoue T, et al. Administration of edaravone, a free radical scavenger, during t-pa infusion can enhance early recanalization in acute stroke patients--a preliminary study.



- Journal of the neurological sciences.* 2012;313:132-136
22. Kono S, Deguchi K, Morimoto N, Kurata T, Yamashita T, Ikeda Y, et al. Intravenous thrombolysis with neuroprotective therapy by edaravone for ischemic stroke patients older than 80 years of age. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013;22:1175-1183
23. Wada T, Yasunaga H, Inokuchi R, Horiguchi H, Fushimi K, Matsubara T, et al. Effects of edaravone on early outcomes in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator. *Journal of the neurological sciences.* 2014;345:106-111
24. Aoki J, Kimura K, Morita N, Harada M, Metoki N, Tateishi Y, et al. Yamato study (tissue-type plasminogen activator and edaravone combination therapy). *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2017
25. Rak R, Chao DL, Pluta RM, Mitchell JB, Oldfield EH, Watson JC. Neuroprotection by the stable nitroxide tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia. *J Neurosurg.* 2000;92:646-651
26. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1632-1650

27. Kato N, Yanaka K, Hyodo K, Homma K, Nagase S, Nose T. Stable nitroxide tempol ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Brain Research*. 2003;979:188-193
28. Hahn SM, Sullivan FJ, DeLuca AM, Bacher JD, Liebmann J, Krishna MC, et al. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:529-535
29. Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. Ph-sensitive radical-containing-nanoparticle (rnp) for the l-band-epr imaging of low ph circumstances. *Bioconjug Chem*. 2009;20:1792-1798
30. Yoshitomi T, Miyamoto D, Nagasaki Y. Design of core--shell-type nanoparticles carrying stable radicals in the core. *Biomacromolecules*. 2009;10:596-601
31. Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Toh K, Tsurushima H, et al. Newly synthesized radical-containing nanoparticles enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurosurgery*. 2011;68:1418-1425; discussion 1425-1416
32. Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y. The ROS scavenging and renal protective effects of ph-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:8021-8028

33. Chonpathompikunlert P, Fan CH, Ozaki Y, Yoshitomi T, Yeh CK, Nagasaki Y. Redox nanoparticle treatment protects against neurological deficit in focused ultrasound-induced intracerebral hemorrhage. *Nanomedicine (London, England)*. 2012;7:1029-1043
34. Ansari S, Azari H, McConnell DJ, Afzal A, Mocco J. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (mcao) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *J Vis Exp*. 2011;51:e2879
35. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal mcao: Cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp*. 2012;59:e4038
36. Chen F, Hori T, Ohashi N, Baine AM, Eckman CB, Nguyen JH. Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure. *Hepatology*. 2011;53:1294-1305
37. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison evans blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*. 2011;195:206-210
38. Nakamura K, Tsurushima H, Marushima A, Nagano M, Yamashita T, Suzuki K, et al. A subpopulation of endothelial progenitor cells with low aldehyde dehydrogenase activity attenuates acute ischemic brain injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun*.

2012;418:87-92

39. Oowada S, Endo N, Kameya H, Shimmei M, Kotake Y. Multiple free-radical scavenging capacity in serum. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;51:117-121
40. Hirayama A, Okamoto T, Kimura S, Nagano Y, Matsui H, Tomita T, et al. Kangenkaryu raises surface body temperature through oxidative stress modification. *J Clin Biochem Nutr.* 2016;58:167-173
41. Dang S, Liu X, Fu P, Gong W, Yan F, Han P, et al. Neuroprotection by local intra-arterial infusion of erythropoietin after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res.* 2011;33:520-528
42. Khan IS, Odom M, Ehtesham M, Colvin D, Quarles CC, McLaughlin B, et al. Intraarterial administration of norcantharidin attenuates ischemic stroke damage in rodents when given at the time of reperfusion: Novel uses of endovascular capabilities. *J Neurosurg.* 2016;125:152-159
43. Kasahara Y, Yamahara K, Soma T, Stern DM, Nakagomi T, Matsuyama T, et al. Transplantation of hematopoietic stem cells: Intra-arterial versus intravenous administration impacts stroke outcomes in a murine model. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 2016;176:69-80
44. Lee SY, Ferrari M, Decuzzi P. Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular

- interaction in laminar flows. *Nanotechnology*. 2009;20:495101
45. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134:2139-2147
  46. Kolate A, Baradia D, Patil S, Vhora I, Kore G, Misra A. Peg - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;192:67-81
  47. Furumoto K, Nagayama S, Ogawara K, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, et al. Hepatic uptake of negatively charged particles in rats: Possible involvement of serum proteins in recognition by scavenger receptor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2004;97:133-141
  48. Nance EA, Woodworth GF, Sailor KA, Shih TY, Xu Q, Swaminathan G, et al. A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Science translational medicine*. 2012;4:149ra119
  49. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature nanotechnology*. 2011;6:815-823
  50. Cabral H, Makino J, Matsumoto Y, Mi P, Wu H, Nomoto T, et al. Systemic targeting

- of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers. *ACS nano*. 2015;9:4957-4967
51. Karatas H, Aktas Y, Gursoy-Ozdemir Y, Bodur E, Yemisci M, Caban S, et al. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29:13761-13769
  52. Liu X, Ye M, An C, Pan L, Ji L. The effect of cationic albumin-conjugated pegylated tanshinone iia nanoparticles on neuronal signal pathways and neuroprotection in cerebral ischemia. *Biomaterials*. 2013;34:6893-6905
  53. Kulik T, Kusano Y, Aronhime S, Sandler AL, Winn HR. Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain. *Neuropharmacology*. 2008;55:281-288
  54. Fan X, Qiu J, Yu Z, Dai H, Singhal AB, Lo EH, et al. A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012;43:567-570
  55. Okamura K, Tsubokawa T, Johshita H, Miyazaki H, Shiokawa Y. Edaravone, a free radical scavenger, attenuates cerebral infarction and hemorrhagic infarction in rats with hyperglycemia. *Neurol Res*. 2014;36:65-69
  56. Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y, Nakazawa H.

- Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:123-129
57. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews.* 2007;87:315-424
58. Fabian RH, DeWitt DS, Kent TA. In vivo detection of superoxide anion production by the brain using a cytochrome c electrode. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:242-247
59. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical research in toxicology.* 1996;9:836-844
60. Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2011;42:3323-3328