

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏名 越後 良介

指導教員名 佐々木 伸雄

論文題目 トレハロースによるクモ膜下出血後の脳血管攣縮防止効果に関する研究

生活習慣病の一つである脳血管障害は、日本人の死亡率では悪性腫瘍、心臓疾患に次ぐ3位に位置している。中でもクモ膜下出血の発生数は増加傾向にあり、医学の発展にも関わらずその死亡率には十分な改善が見られない。その原因の一つが、重大な合併症の脳血管攣縮である。

脳血管攣縮とは、血管平滑筋の持続的な収縮によって血管内腔が狭小化し、その支配領域が脳虚血を呈して様々な神経学的異常を示す病態である。その発生機序にはクモ膜下腔に生じた血液、特にヘモグロビンが深く関わっており、ここから放出される因子が血管周囲の炎症を誘発し、血管攣縮のきっかけとなると考えられているが、その詳細は解明されていない。治療として、血圧上昇や全身循環量の増加などを目的とした Triple-H 療法、クモ膜下腔の血液を洗い流すための脳槽灌流、平滑筋細胞内で攣縮を促進する因子である Rho キナーゼを阻害する塩酸ファスジルの投与などが行われているが、その成果はまだ十分とは言えない。

一方、トレハロースは天然に広く存在する二糖類であり、植物や昆虫などを乾燥、凍結などの厳しい環境から保護する作用のあることが知られている。現在では、その多様な機能から食品、化粧品など非常に幅広い分野で応用されている。このようなトレハロース

の生体防御に関わる作用は、結合水置換、ガラス化、不飽和脂肪酸の過酸化抑制など、特に生体膜やタンパク質の保護機能によるものとされている。

以上の背景から、クモ膜下出血で生じた血液が脳血管に曝される際に、そこにトレハロースが存在すれば脳血管表面を保護し、血液から放出される炎症性物質や攣縮誘発因子を防御する可能性が考えられた。そこで本研究では、トレハロースの脳血管攣縮の防止効果、ならびにその作用機序を検討するために以下の実験を行った。

第1章では、クモ膜下出血モデルとして広く用いられているラット大腿動脈攣縮モデルを作製し、血管の組織形態学的な解析を行った。ラットの左右大腿動脈の周囲をカテーテルで覆い、動脈外膜とカテーテルの間隙に生理食塩水あるいは3段階の濃度のトレハロース溶液を混合した自家血を曝露した。曝露後7日目に左右大腿動脈を採材し、断面像から血管内腔断面積と中膜厚を測定した。生理食塩水を血液に混じた群においては、対照血管と比較して顕著な内腔の狭窄(対照血管の断面積の14%)と壁の肥厚(対照血管の中膜厚の200%)が観察された。一方、トレハロースの最終濃度を3.8%とした群では、内腔の狭窄(対照血管の断面積の86%)と壁の肥厚(対照血管の中膜厚の93%)がともに抑制された。トレハロースの最終濃度を1.9%、7.5%とした群では3.8%ほどの強い攣縮抑制効果は見られなかった。以上から、トレハロースと血液との混合液投与は大腿動脈の攣縮を抑制し、至適トレハロース濃度が3.8%程度である可能性が示唆された。次に同じモデルを用いて、経時的な血管の形態学的変化を検討した。生理食塩水と血液を混合した群においては、処置後1日目から内腔の狭窄と壁の肥厚が始まり7日目にピークを迎え、その後徐々に元の状態に回復していくことが確認された。一方、トレハロースと血液を混合した群では、内腔の狭窄と壁の肥厚ともに実験期間全体(1~20日)でほぼ一定の値を示した。本実験の結果から、トレハロースの攣縮防止効果は、一旦攣縮が進んだ後で回復させるという治療的効果ではなく、初期の段階から攣縮を防止する予防的効果である可能性の高いことが示唆された。

続いて第2章では、脳脊髄液に血液を混じて脳血管の攣縮を誘発するという点で、実際の臨床的病態により近いウサギクモ膜下出血モデルを用いて解析を行った。ウサギの大槽内に経皮的に自家血1.5mlと生理食塩水あるいはトレハロース0.5mlの混合液を注入した。注入前と注入48時間後に脳血管造影を行い、攣縮が最も顕著に観察される脳底動脈の外径を測定して評価を行った。その結果、生理食塩水と血液を注入した群では、注入前と比較して48時間後の脳底動脈径が66%まで減少したが、トレハロースと血液を注入した群では、85%と軽度の減少にとどまった。この結果から、ウサギクモ膜下出血モ

デルにおいてもトレハロースの攣縮抑制効果が確認された。

以上の *in vivo* の結果をもとに、トレハロースによる攣縮抑制機序の解明を試みた。血管攣縮の発生と増悪には、凝血塊による血管周囲の炎症が様々な形で関わっており、トレハロースはこの炎症反応の抑制によって血管攣縮の防止効果を発現した可能性がある。そこで第 3 章では、培養細胞を用いた *in vitro* の系でトレハロースの抗炎症効果を中心に解析を行った。用いた細胞はラットマクロファージ由来の RAW264.7 細胞および正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) である。炎症誘発物質として赤血球溶血液を用い、これに生理食塩水、トレハロース液、トレハロースの構造異性体であるマルトース液を混じてその反応の違いを検討した。まずアラキドン酸カスケードについて検討するために、酵素免疫測定法 (EIA) によって PG (プロスタグランジン) E₂ 産生量を測定した。その結果 RAW264.7 細胞に生理食塩水あるいはマルトースで処理した溶血液を加えたところ、大量の PGE₂ 産生が見られた。しかし、トレハロース処理した溶血液を加えた細胞では PGE₂ 産生はほとんど認められず、他の 2 群と比較して有意に低下していた。同じ方法で LT (ロイコトリエン) についても測定を行ったところ、PGE₂ の結果と同じようにトレハロース処理群でのみ産生量の低下が認められた。次に RAW264.7 細胞にトリチウムラベルしたアラキドン酸を取り込ませ、その代謝物の放出量を液体シンチレーションで測定した。その結果、トレハロース処理をした細胞群では、他の 2 群と比較してアラキドン酸代謝産物の放出量が顕著に減少していた。以上の結果から、トレハロース処理をした細胞では、PG や LT といったエイコサノイドだけでなく、アラキドン酸カスケードにおいてその上流に位置する cPLA₂ のレベルで活性が抑制されていることが明らかとなった。また、TNF- α や IL-1 α といった炎症性サイトカインについても EIA で測定したが、トレハロース処理をした細胞からのこれらの因子の放出は抑制されていた。したがって、トレハロースはアラキドン酸カスケードのみならず、より広範な炎症反応を抑制している可能性が示唆された。一方、HUVEC を用いた EIA では PGE₂ についてのみ検討を行ったが、RAW264.7 細胞のときと全く同様にトレハロース群でのみ産生量が低下していた。この結果から、トレハロースの抗炎症効果はより多種類の細胞で発現する可能性が高いことが示唆された。

第 4 章では血管攣縮の実際の病態において、トレハロースがどの段階において攣縮の誘発を防止するか検討した。凝血塊によって血管攣縮を引き起こす過程として、赤血球の溶血、フリーラジカルの産生、ならびに細胞膜脂質の過酸化が生じると考えられ、この 3 段階について以下の実験を行った。まず赤血球の溶血については、ラットの赤血球を生理食塩水、トレハロース液、マルトース液の各液に懸濁し、37°C で静置したときの経時的な溶

血率を算出することで検討した。その結果、溶血率は高い順にマルトース、トレハロース、生理食塩水となった。すなわち、トレハロースはマルトースよりは溶血防止効果を示したが生理食塩水には及ばないことが判明した。次に、フリーラジカル・スカベンジャーとしての効果を電子スピン共鳴法で検討したところ、トレハロースのヒドロキシルラジカルに対するスカベンジャー効果がある程度認められたものの、その程度はマルトースと同等であったため特異的とは考えられなかった。最後に細胞膜脂質の過酸化に関しては、2種類の検討を行った。培養細胞を用いた検討では、溶血液を生理食塩水、トレハロース液、マルトース液で処理したものを RAW264.7 細胞に加え、一定時間後の過酸化脂質を定量した。その結果、統計学的有意差は認められなかったもののトレハロース群においてのみ過酸化脂質の産生が抑制される傾向が見られた。さらに第1章のラット大腿動脈を用いた過酸化脂質の免疫染色では、血液によって顕著な攣縮を示した組織においては外膜や中膜に特異的染色像が観察されたが、血液とトレハロース液の混合液を曝露した動脈の組織では過酸化脂質の発現は外弾性板周囲に少量認められる程度であった。以上の結果からトレハロースの効果をまとめると、赤血球溶血を防ぐ効果は低いこと、フリーラジカル・スカベンジャーとしての効果は部分的に認められること、そして細胞膜脂質過酸化については抑制している可能性が高いことが判明した。

以上本研究では、クモ膜下出血の重大な合併症である脳血管攣縮に対して、細胞や分子の保護作用を有する天然二糖類のトレハロースが、主として血液による炎症反応を抑制することでその防止効果を発現することが明らかとなった。トレハロースが脳血管攣縮防止効果を示すことに関する研究は本研究が初めてであり、まだ多くの点で研究の余地を残している。しかし、トレハロースによる攣縮防止は、血管内治療や外科的治療などの従来の治療法とは全く異なる観点からの治療につながる可能性があり、最終的には実際の臨床の場で他の治療と組み合わせることによって、脳血管攣縮の治療や予防の一助となることが期待される。