

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 越後 良介

クモ膜下出血後に見られる脳血管攣縮とは、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、脳虚血に伴って死亡や重篤な後遺症という転帰を辿る病態である。その発生機序にはクモ膜下腔に生じた血液が深く関わっており、ここから放出される因子が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。現在まで、脳血管攣縮に対しては様々な治療法が試みられてきたが、その効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ことが知られている。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。

したがって、脳血管がクモ膜下出血で生じた血液に曝される際に、そこにトレハロースが存在すれば脳血管表面を保護し、攣縮誘発因子や炎症誘発物質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、代表的な血管攣縮モデルの一つであるラット大腿動脈攣縮モデルを作製した。各液の曝露後7日目の大腿動脈について検討したところ、血液＋生理食塩水群では、対照血管と比較して顕著な内腔の狭小化と壁の肥厚が観察され、血管攣縮が誘発されたことが確認された。一方、血液＋トレハロース群ではそれらの変化はわずかであり、トレハロースの血管攣縮防止効果が認められた。また、経時的な血管の形態学的変化の検討から、トレハロースの攣縮防止効果は初期の段階から攣縮を防止する予防的効果を有する可能性が示唆された。

第2章では、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作製した。ウサギの大槽内に経皮的に自家血と生理食塩水あるいはトレハロース溶液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ったところ、血液＋生理食塩水群では、注入後の脳底動脈径が大きく減少したが、血液＋トレハロース群では軽度の減少にとどまり、トレハロースの攣縮抑制効果が確認された。

第3章では、マウス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培養細胞を用い、トレハロースの抗炎症効果を中心に解析を行った。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合してその反応を検討した。まずアラキドン酸カスケードについて検討するために、 $\text{PGE}_2$ とLT産生量を測定した。RAW264.7細胞に生理食塩水あるいはマルトースと混合した溶血液を加えたところ、大量の $\text{PGE}_2$ 、LT産生が見られたが、トレハロースと混合した溶血液を加えた細胞ではほとんど産生が認められなかった。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測定したところ、トレハロース群では、他の2群と比較して顕著に減少していた。以上の結果から、トレハロース群の細胞では、アラキドン酸カスケードの上流に位置するシクロオキシゲナーゼやリポオキシゲナーゼのレベルで活性が抑制されていると考えられた。また、 $\text{TNF}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ といった炎症性サイトカインの放出もトレハロースによって放出が抑制されたことから、トレハロースは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。またこの結果は、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養細胞を用いた実験でも同様であった。

第4章では、トレハロースの攣縮防止効果が主要な血管攣縮誘発過程である赤血球の溶血、フリーラジカルの産生、ならびに細胞膜脂質の過酸化のどの段階で生じるかを検討した。まずラット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、 $37^\circ\text{C}$ で静置したときの経時的な溶血率を算出したところ、トレハロースはマルトースより高い溶血防止効果を示したが生理食塩水には及ばない結果となった。次に、電子スピン共鳴法でトレハロースのフリーラジカル・スカベンジャーとしての効果を検討したところ、ヒドロキシルラジカルに対するスカベンジャー効果は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。細胞膜脂質の過酸化に関して培養細胞を用いた検討では、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、攣縮を示した血管においては特異的染色像が観察されたが、血液+トレハロース群ではその変化はわずかであった。以上の結果から、トレハロースはある程度のフリーラジカル・スカベンジャー効果と細胞膜脂質過酸化の抑制作用を介して攣縮を防止している可能性が示唆された。

本研究は、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、トレハロースが血液刺激から脳血管を保護することで防止効果を示すことを初めて証明したものである。このことは脳血管攣縮に対する新たな治療法の開発につながるものであり、臨床応用上の貢献は極めて高い。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。