

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10295

研究課題名(和文)多孔質足場を用いた動脈瘤開口部の新生血管壁構造の誘導実験

研究課題名(英文) Regeneration of vessel walls using a porous scaffold in an external carotid artery aneurysm model in rats

研究代表者

内山 尚之(Uchiyama, Naoyuki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：80293364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脳動脈瘤内に多孔質足場(セルロースポーラスビーズ, cellulose porous bead: CPB)を留置することにより, 動脈瘤開口部に新生内膜構造が誘導され, 動脈瘤内への血流が永続的に遮断されるか否かを確認した。動脈瘤開口部にはCPB留置後2週間目で, 血管平滑筋細胞が一層形成された。この層は6週目まで徐々に肥厚し, 以後その厚さを維持した。また血管平滑筋細胞の内側には血管内皮細胞が2週目より出現し, 6週目までに開口部を完全に覆っていた。CPBは動脈瘤開口部に新生内膜を誘導する有用な足場となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of the vessel wall structure at the aneurysmal neck orifice is important but does not readily occur with coil embolization, which is commonly used to treat cerebral aneurysms. To promote vessel wall regeneration, a scaffold of cellulose porous bead (CPB) was used as a material for aneurysm embolization. A rat external carotid artery (ECA) aneurysm model was created, and a single CPB with a diameter similar to the diameter of the ECA was placed in the aneurysm. The layer of regenerating SMA-positive spindle cells at the aneurysm neck orifice was recognized as early as 2 weeks after implantation of the CPB, and maintained its thickness by 6 months. A monolayer of factor VIII-positive cells appeared at the neck at 2 weeks, and covered the entire neck by 6 months. CPBs might be appropriate as an embolization material for inducing vessel wall regeneration at the neck of an aneurysm.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：aneurysm embolization neck orifice porous scaffold

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤に対するコイルリング術は開頭が不要であり、脳実質に触れることなく治療が行える点でクリッピング術より優れている。一方、コイルリング術の最大の欠点は、根治性においてクリッピング術に劣る点である。これまでの報告でも、コイルリング後の再治療率は15-20%と高い。クリッピング術の場合、動脈脈瘤頸部を外側からクリップで挟み込むと、開口部はとじて正常内膜が連続する形態をとり、最終的には血管内皮が覆い動脈瘤への血流が再発することはほとんどない。一方、コイルリング術の場合は、瘤内にプラチナ製のコイルを留置するが、留置直後は開口部にコイルが露出しており、そこに膜構造が形成されるかどうかは開口部の広さ等に依存する。開口部が小さい場合は瘤内への血流は遮断され、最終的には新生内膜が形成されて瘤内の血栓は器質化し治癒に至る。しかし開口部が広いと、母血管からの血流が絶えずコイル体あたり内膜形成は起こりづらく、その結果として瘤内への血流が再発することになる。これまでの動脈瘤に対する血管内治療では、瘤内にコイルを可及的に密に充填し、内部への血流が物理的に入らなくすることを優先してきた。十分な充填ができれば最終的には内膜形成がおこり瘤の再発はなくなるが、必ずしもそれが可能とは限らない。

そこで見方を変えて、動脈瘤開口部を血管壁の欠損部と考える。その血管壁欠損部に新生血管壁が誘導されれば動脈瘤は再発しなくなる。瘤内部にプラチナ製コイルの代わりに新生内膜を誘導しやすい物質を留置した場合、母動脈側から開口部を覆うように新たに内膜形成がおこれば、最終的には瘤内の血流は途絶し動脈瘤治療は完成する。本研究では、血管壁再生の足場としてCPB (セルロースポーラスビーズ, cellulose porous bead) という多数の孔を有する物質を用いて、血管壁欠損部に新たな血管壁が再構築されるか否かを確認する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット脳動脈瘤内に多孔質足場(を留置することにより、動脈瘤開口部に新たな血管壁構造が誘導され、動脈瘤内への血流が永続的に遮断されるか否かを明らかにすることである。

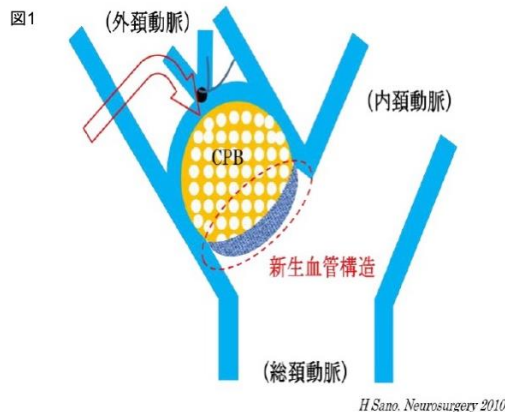
### 3. 研究の方法

ラット動脈瘤モデルに、CPBを留置する。留置後、2週目、6週目、12週目、6カ月目、1年目で動脈瘤を採取し、瘤の開口部に新たな膜構造が構築されているかを確認し組織学的検討を行う。

#### (1) 動脈瘤モデル

オスのWistar ratを使用する。ラット頸部を正中切開し、左側の頸動脈分岐を露出同定する。外頸動脈(ECA)を分岐部から2mmのところまで、10-0絹糸にて結さつする。続いて

総頸動脈(CCA)と内頸動脈(ICA)をクリップではさみ一時的に血流を遮断する。ECAの分岐部をつまみながら小切開を加え、そこからCPBをECA内に挿入する。

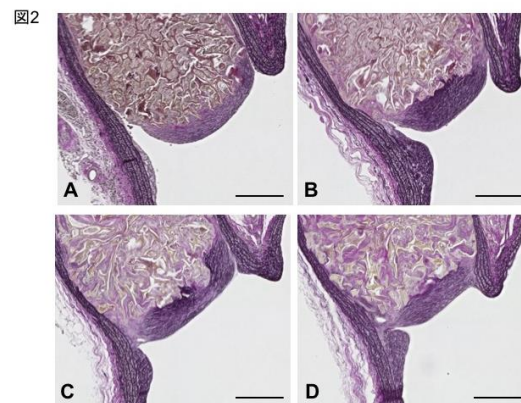


#### (2) 組織学的検討

術後、2週、6週、12週、6カ月で動脈瘤を採取する。10%ホルマリンによる固定後CCA、ICA、ECAが同一平面に入るように矢状断に切開しパラフィンに包埋し4μで切片を形成する。得られた切片は、HE染色、Elastic van Gieson染色を行う。さらに血管内皮細胞をみるためにFactor VIIIを、血管平滑筋細胞をみるためにαSMAによる免疫染色を行う。

### 4. 研究成果

- (1) 動脈瘤モデルへのCPBの移植  
CPBは2週間後、6週間後、12週間後、および6ヶ月後に瘤内に安定して存在した。
- (2) 動脈瘤開口部での新生組織の増殖

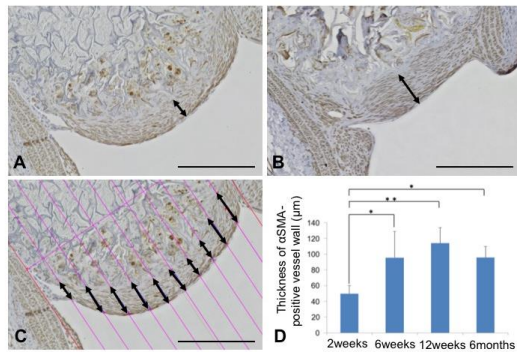


動脈瘤を2から6週目に採取した。新生組織の増殖は2週間目に明らかであり(図2A)、経時的に横方向に広がった(図2B、C、D)。しかしながら、過度の組織増殖による親動脈の狭窄所見は全期間にわたって認められなかった。さらに、CPBに隣接する親動脈では、内弾性板および開口部を形成する動脈内膜平滑筋のリモデリングまたは裂傷はなく、炎症細胞浸潤などもなかった。

#### (3) 動脈瘤開口部における新生内膜組織の増殖

新生組織が内膜組織であるかどうかを調べるために、αSMA抗体による免疫組織化学を行った。動脈瘤ネック部分全体にわたるαSMA陽性細胞の再生は、第2週に明らかであった(図3A)。αSMA陽性細胞の層は、6ヶ月で

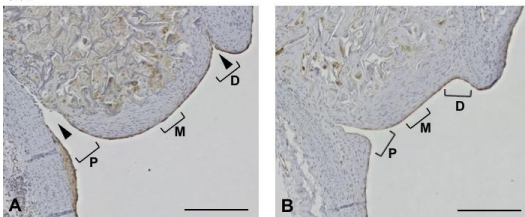
図3



組織内の開口部を完全に覆った (図 3B). 図 3C に示すように,  $\alpha$  SMA 陽性細胞層の厚さを等間隔で平均して 10 点測定した. 各組織採取時期における厚さの平均値は, 2 週間で  $95.52 \pm 33.30 \mu\text{m}$ , 6 週間で  $49.60 \pm 10.66 \mu\text{m}$ , 12 週間で  $113.92 \pm 19.96 \mu\text{m}$ , 6 ヶ月で  $95.87 \pm 13.94 \mu\text{m}$  であった. 2 週間の厚さと他のすべての時間との間に統計学的有意差が見られたが, 6 週, 12 週, および 6 ヶ月で組織間の組織の厚さに有意差はなかった (図 3D).

(4) 増殖組織表面の内皮化  
 新生組織の最外層の内皮細胞の存在を調べるために, 第 VIII 因子抗体による免疫組織化学を行った. 動脈瘤開口部における第 VIII 因子

図4



陽性細胞の単層の再生は 2 週間目に明らかであったが, この時期では CPB 上の第 VIII 因子陽性細胞層は, 親動脈の第 VIII 因子陽性細胞層とは連続していなかった (図 4A). しかし, 6 ヶ月後には第 VIII 因子陽性細胞層は, すべての組織において親動脈の第 VIII 因子陽性細胞層と連続していた (図 4B).

#### (5) 結論

以上の結果から, CPB は動脈瘤開口部における新生内膜形成の誘導を促す有用な塞栓物質となる可能性がある.

### 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 6 件)

- ① Mohri M, Ichinose T, Uchiyama N, Misaki K, et al. Hyperperfusion syndrome after trapping with high-flow bypass for a giant paraclinoid internal carotid artery aneurysm. *World Neurosurg.* 2018 30800-3. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.081.
- ② Nambu I, Misaki K, Uchiyama N, et al. High Pressure in Virtual Postcoiling Model is a Predictor of Internal Carotid Artery Aneurysm Recurrence After Coiling. *Neurosurgery.* 2018

doi: 10.1093/neuros/nyy073. [Epub ahead of print]

- ③ Misaki K, Uchiyama N, Inaki A, et al. Objective evaluation of cerebrovascular reactivity for acetazolamide predicts cerebral hyperperfusion after carotid artery stenting: Comparison with region of interest methods. *J Neuroradiol.* 2018 30361-9. doi: 10.1016/j.neurad.2018.02.008.
- ④ Nambu I, Uchiyama N, Misaki K, et al. Concurrent cervical dural and multiple perimedullary arteriovenous fistulas presenting with subarachnoid hemorrhage: The source of bleeding was invisible at initial angiography. *Surg Neurol Int.* 2017 Jan 19;8:2. doi: 10.4103/2152-7806.198729.
- ⑤ Uchiyama N. Anomalies of the Middle Cerebral Artery. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2017 57(6):261-266. doi: 10.2176/nmc.ra.2017-0043.
- ⑥ Uchiyama N, Misaki K, et al. Treatment Result in the Initial Stage of Kanazawa Mobile Embolectomy Team for Acute Ischemic Stroke. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016 56(12):737-744. doi:10.2176/nmc.oa.2016-0101

[学会発表] (計 6 件)

- ① 内山尚之, 毛利正直, 見崎孝一, ほか: 移動式血栓除去チームによる急性期再開通治療の適応範囲と治療成績 日本脳神経外科学会第 76 回学術総会 平成 29 年
- ② Naoyuki Uchiyama, Masanao Mohri, Kouichi Misaki, et al: Treatment Result of Kanazawa Mobile Embolectomy Team for Acute Ischemic Stroke (Symposium). 13th International Conference on Cerebrovascular Surgerv. 2017
- ③ 内山尚之, 毛利正直, 見崎孝一, ほか: 脳表静脈への逆流を伴った dural AVF のシャント血流出パターンと脳循環動態および神経症状との関係 (シンポジウム) 第 33 回日本脳神経血管内治療学会学術集会 平成 29 年
- ④ 内山尚之: NBCA による経動脈的塞栓術で硬膜動静脈瘻を完全消失するための技術的要因について第 45 回日本脳卒中の外科学会学術集会 平成 28 年
- ⑤ 内山尚之, 毛利正直, 見崎孝一, ほか: 移動式血栓除去チームによる急性期再開通治療の治療成績 -Kanazawa mobile embolectomy team の取り組み- 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会 平成 28 年

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 尚之 (UCHIYAMA, Naoyuki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 80293364

(2)研究分担者

見崎 孝一 (MISAKI, Kouichi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20507082