

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20338

研究課題名(和文)線溶系の制御による脳動脈瘤発生および破裂予防法の検討

研究課題名(英文)The influence on intracranial aneurysm rupture by the fibrinolytic system control

研究代表者

木村 哲朗(Kimura, Tetsuro)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脳動脈瘤モデルを用いて、以下の項目の研究を行った。1．プラスミノゲン遺伝子改変マウスのバッククロス交配を行う必要が生じたため、抗線溶薬であるトラネキサム酸投与による検討を先行した。線溶系遺伝子改変マウスを用いた研究は現在実施中である。2．3テスラ-MRI装置と小型サドルコイルを用いて、MRAで脳動脈瘤を、T2強調画像でも膜下出血を非侵襲的に抽出することに成功した。3．脳動脈瘤破裂の詳細な評価モニタリングのため、iPad上で動作するビデオトラッピングアプリケーションを新たに開発した。4．脳動脈瘤破裂後の麻酔必要時の安全性向上を目的として、イソフルラン至適必要濃度を検討した。

研究成果の概要(英文)：We studied the influence on intracranial aneurysm rupture by the fibrinolytic system control using the intracranial aneurysm mouse model, and also proceeded the evaluation of mouse aneurysm development and rupture.

1. We carried out the study by administration of tranexamic acid as an antifibrinolytic agent in advance. Currently, we are conducting the research using fibrinolytic genetically mice. 2. For mouse cerebral vessel imaging, we used 3-T magnetic resonance imaging (MRI) and saddle coil. We were able to detect the aneurysm formation using nonenhanced magnetic resonance angiography (MRA) and subarachnoid hemorrhage using T2-weighted imaging. 3. For detailed monitoring of aneurysm rupture, we developed a new video trapping application which could operate on the iPad. 4. In order to improve the safety of anesthesia after subarachnoid hemorrhage, we measured the minimal alveolar concentration of isoflurane of mice.

研究分野：脳循環

キーワード：脳動脈瘤 動物モデル 画像解析 行動解析

1. 研究開始当初の背景

画像診断の進歩により未破裂脳動脈瘤の発見が近年増加している。脳動脈瘤の破裂は死亡率5割、社会復帰率約3割という悲惨な結末を招くため、脳動脈瘤の病態解明を推進することは重要な課題である。脳動脈瘤においては、炎症細胞の浸潤および細胞外マトリックス (ECM) の分解亢進がその進行に關与している事が近年の研究により明らかになっている。プラスミノゲン プラスミンを主体とする線溶系は血管内血栓溶解のみならず、炎症や癌の浸潤・転移、動脈硬化など血管外においても重要な役割を示すことが知られており、特に血管リモデリングへの關与が近年明らかとなってきた。線溶系を抑制することで、ECM の劣化の程度が減少し、マクロファージや平滑筋細胞の脳動脈瘤への浸潤を減らす事ができると考えられ、脳動脈瘤の発生及び破裂の予防につながる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) プラスミノゲン遺伝子改変マウス、抗線溶薬を用い、線溶系の制御による血管リモデリングの抑制が脳動脈瘤破裂に及ぼす影響を検証し、脳動脈瘤の発生及び破裂予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) プラスミノゲン欠損マウスおよびプラスミノゲン活性化マウスを用いての検討を計画していたが、バッククロス交配を行う必要が生じたため、抗線溶薬であるトラネキサム酸 (TXA) 投与による検討を先行して行った。脳動脈瘤モデルは、片腎を摘出した C57BL/6 マウスの皮下にデオキシコルチコステロンを埋め込み、1%食塩水を飲料水として与えることで高血圧を発症させ、脳基底槽内へ豚膀胱エラストーゼを一回注入する事により作成した。

バッククロスを待つ間、上記研究と並行して、以下の研究を行った

(2) MRI でのマウス脳血管の可視化
3T-MRI 装置と小型サドルコイルを用いて、マウス脳血管および脳動脈瘤の破裂を描出し、最適な撮像パラメータを決定した

(3) マウス行動量を 24 時間観察できる装置の作成

マウスの脳動脈瘤破裂のタイミングは、従来の方法では 飲水・接触不良の結果として体重減少の測定、脳虚血が発生した場合に生じる神経症状の観察を連日行うことで行っていたが、1日単位での発症診断となる。マウスの活動状況を常時モニタリングすることで発症時間の特定や、より細かな行動変化の発見と早期診断につながる可能性がある。既存の赤外線などを用いて測定する市販装置は高価であるなどの問題点がある。

そこで iPad 上で動作するビデオトラッキングアプリケーションを新たに開発した。性能を評価するために、既存のマウス脳梗塞モデルを用い、脳梗塞発症前後および回復期のマウス行動量の変化、マウス体重の変化、MRI T2 撮影による脳梗塞領域の変化を比較した。

(4) くも膜下出血前後の麻酔至適濃度の検証

脳動脈瘤破裂後のマウスに処置を行う場合に麻酔が必要となるが、極端に衰弱しているために、麻酔中の不測の死亡例も経験する。麻酔の安全性向上のために、くも膜下出血前後におけるマウスのイソフルラン至適濃度を検討した

4. 研究成果

(1) 線溶系の制御による脳動脈瘤の発生および破裂予防の検討

TXA 投与の有無により 2 群に分けた。TXA 群では 600mg/kg/日 を腹腔内投与したが、投与直後に 8 割のマウスが痙攣を伴い死亡した。TXA の神経毒性による可能性を考え、300mg/kg/日に減量したが、結果は同様であった。投与量および投与経路の安全性を確認するために、100mg/kg 腹腔内投与、15mg/1mouse 皮下投与を行ったが、いずれも TXA 投与直後からの死亡率が高かった。

経口摂取による方法を検討し、TXA 50mg/ml の経口投与を試みたが、飲水摂取量が少なく 3 日以内に衰弱死する個体が多かった。

マウス脳動脈瘤モデルに対して添付文書や過去の報告を参照し TXA 投与量、投与方法を慎重に検討したが、死亡率が高く、脳動脈瘤発生および破裂予防の検討には至らなかった。モデルの特性上、脳に対する外科処置後に TXA を投与しており、TXA による神経毒性閾値が低下していることが原因として推察された。

遺伝子改変動物を 7 世代バッククロスするのに時間を要したが、2017年4月1日現在、実験進行中である。

(2) MRI でのマウス脳血管の可視化
ファントム実験により最適な撮像パラメータを決定し、脳動脈瘤モデルマウスを対象に T2 強調画像および MRA の撮像を行った。

T2 強調画像は脳実質において脳動脈瘤破裂による出血や周囲の脳梗塞領域を評価するのに十分な画質が得られた (図 1)。

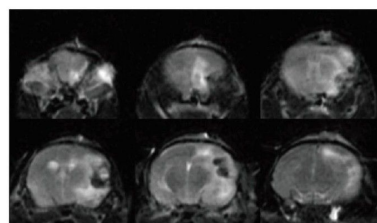


図1 脳動脈瘤破裂マウスのT2強調画像

MRA では主な脳動脈および脳動脈瘤を描出することができた(図2)。

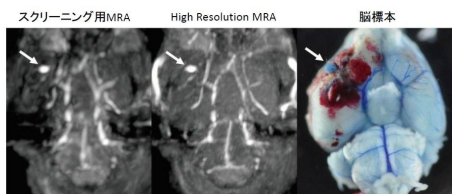


図2 脳動脈瘤マウスのMRA

本研究で構築したイメージング環境では新たに小動物用 MRI 装置を導入することなく、マウス脳イメージングを行うことが可能であった。画像収集時間は短時間で、動物への負担も軽度であった。侵襲的な処置や造影剤を必要とせず、麻酔およびMRI撮影に関連した死亡例はなかった。

(3) 脳動脈瘤破裂の詳細な評価のためのモニタリング方法の構築

iPad 上で動作する行動解析アプリケーションを開発した。(図3)

実験的に脳梗塞を発症させることでマウスの行動距離は大幅に低下した。マウスの状態が回復するとともに行動量は増加し、脳梗塞から7日後の行動距離はほぼ脳梗塞発症前のものと同等であった。(図3、4)

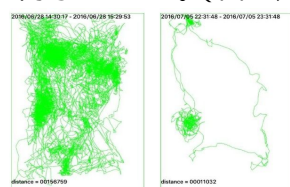


図3 行動解析アプリケーションによるマウス移動の軌跡
左: 活発に活動 右: 脳梗塞導入後の低活動

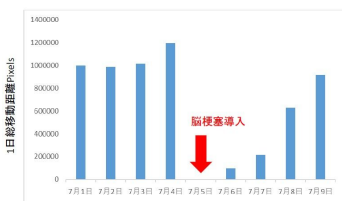


図4 脳梗塞前後および回復期のマウス移動量

マウス体重の変化、MRI による脳梗塞領域の変化も、行動距離と同様に経過した。

今回開発したアプリケーションは、市販の iPad で動作するものであり、従来の市販機器と比べて安価である。また、マーカーの移動距離を測定するため、動物種を選ばない点、同時に複数の動物の測定が可能である点、ウォーターメイズなどの他装置への応用が可能である点などの有用性が挙げられ、汎用への可能性が考えられる。

現在、本アプリケーションを用いての脳動脈瘤破裂マウスにおける行動量、パターン計測を行っている。

(4) くも膜下出血前後の麻酔至適濃度の検証

破裂脳動脈瘤、未破裂脳動脈瘤および脳動脈

瘤なしの個体は、それぞれ 50%、12.5%、37.5% であり、過去の報告と一致していた。

以下のイソフルランの最小肺胞濃度 (MAC) が得られた(図5)

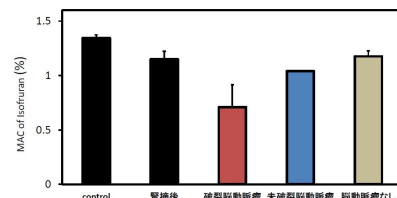


図5 脳動脈瘤マウスのイソフルラン最小肺胞濃度 (MAC)

腎摘前 (control) 1.35 ± 0.02 %; 腎摘後 1.15 ± 0.07 %; 破裂脳動脈瘤 0.75 ± 0.28 %; 未破裂脳動脈瘤 1.04 %; 脳動脈瘤なし 1.18 ± 0.05 %

くも膜下出血を発症したと思われるマウスに対して麻酔を行う場合には、イソフルランの濃度を約半分に減らすことが安全管理につながる。

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2件)

Successful serial imaging of the mouse cerebral arteries using conventional 3-T magnetic resonance imaging

H Makino, K Hokamura, T Natsume, T Kimura, Y Kamio, Y Magata, H Namba, T Katoh, S Sato, T Hashimoto, K Umemura

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 35: 9; p1523-7, 2015

DOI: 10.1038/jcbfm.2015.78

査読あり

臨床用 3T-MRI を用いたマウス脳イメージング環境の構築

夏目貴弘、外村和也、牧野洋、木村哲朗、梅村和夫

脳循環代謝、27 巻 2 号、p235-241、2016 年

http://doi.org/10.16977/cbfm.27.2_235

査読あり

[学会発表](計5件)

外村和也、梅村和夫、牧野洋、木村哲朗、加藤孝澄、神尾佳宣、難波宏樹

臨床用 3 テスラ MRI を用いたマウス脳動脈瘤可視化の試み

第 8 回静岡県血栓と血管フォーラム

2015 年 4 月 4 日、浜松市

木村哲朗、牧野洋、加藤孝澄、佐藤重仁

マウス脳動脈瘤モデルにおいてくも膜下出血の発症はイソフルランの最小肺胞濃度を減少させる

第 62 回日本麻酔科学会学術集会

2015 年 5 月 29 日、神戸市

K Hokamura, H Makino, T Natsume, T Kimura,
Y Kamio, Y Magata, H Namba, T Katoh, S Sato,
T Hashimoto, K Umemura
Visualizing cerebral aneurysm in mice by
a conventional three tesla MRI
BRAIN & BRAIN PET
2015.6.27, Vancouver

外村和也、牧野洋、加藤孝澄、木村哲朗、
夏目貴弘、鈴木智、難波宏樹、中島芳樹、梅
村和夫
マウス脳梗塞モデルにおける運動量測定ア
プリケーションの評価
第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会
2016 年 11 月 11 日、徳島市

牧野洋、加藤孝澄、木村哲朗、外村和也、
鈴木智、岩城孝之、中島芳樹、難波宏樹、梅
村和夫
動物行動解析 iPad アプリケーションの開発
第 22 回浜松医科学シンポジウム
2017 年 3 月 10 日、浜松市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村哲朗 (KIMURA Tetsuro)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00467250

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

牧野洋 (MAKINO Hiroshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10397408

岩城孝之 (IWAKI Takayuki)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70509463

橋本友紀 (HASHIMOTO Tomoki)
UCSF, Department of Anesthesia, 米国