

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10287

研究課題名(和文) 易破裂大型脳動脈瘤の新規動物モデルとヒト臨床標本による破裂防止薬剤治療法の開拓

研究課題名(英文) Development of an anti-rupture drug treatment method using a novel animal model of easily rupturable large cerebral aneurysm and human clinical specimen

研究代表者

中山 若樹 (NAKAYAMA, Naoki)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：40421961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 脳動脈瘤の破裂機構を解明するために、まずは易破裂性大型脳動脈瘤動物モデルの確立を目指した。雄SDラットに両側腎動脈後枝の結紮と高塩分食による高血圧を誘導し、左総頸動脈結紮によって血行力学的な負荷を与え、ニトロ化合物を安定なフマル酸化合物として腹腔内投与を1週間毎に行う方法を行った。投与量を様々に変更し、1400mg/kgにて約8割の個体に動脈瘤が発現し、22%には大型瘤が誘導された。さらに大型瘤の誘導率を上げるべく、ヒト閉経後女性を模して雌ラットで卵巣を摘出し、加えて対側外頸動脈を結紮して血行力学的負荷を増強し、アスピリンやシロスタゾールによる薬剤投与実験を開始したところである。

研究成果の概要(英文)： In order to elucidate the rupture mechanism of the cerebral aneurysm, we first aimed to establish an animal model of easily rupturable large cerebral aneurysm. Hypertension was induced in male SD rats by ligation of the bilateral renal artery dorsal branch and high salinity, hemodynamic stress is given by left common carotid artery ligation, and the nitro compound was intraperitoneally administered as a stable fumaric acid compound every week. The dose of nitro compound was changed variously, aneurysm developed in about 80% of individuals at 1400 mg / kg, and large aneurysm was induced in 22%.

Furthermore, in order to raise the induction rate of large aneurysms, ovaries were removed in female rats simulating human postmenopausal women, in addition, the contralateral external carotid artery was ligated to enhance the hemodynamic stress. And we started experiments with medication by aspirin and cilostazol.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳動脈瘤 脳動脈瘤破裂 大型脳動脈瘤 動物モデル 抗血小板剤

1. 研究開始当初の背景

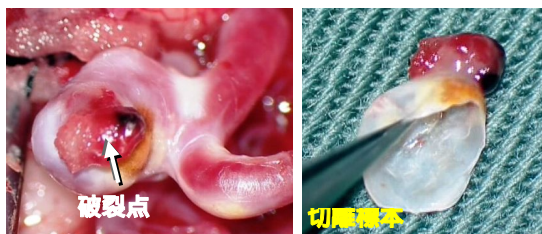
ヒト未破裂脳動脈瘤の外観として、瘤壁には非常に菲薄化して脆弱な部分もあれば、動脈硬化に類似した変化で厚くなっている部分も混在していることは一般的によく知られている。また、最も破裂につながりやすいと考えられている bleb (娘動脈瘤; 動脈瘤本体の上にさらに突出した部分) も、壁が厚く硬化したもものもあれば薄いものも存在する。これらの中で、どの部位が破裂するのか、またどのような経緯で破裂が発生するのかは、いまだ不明なままである。動脈瘤は、破裂さえ防止できればよいわけであり、そのメカニズムの解明が強く切望されている。

従来より、脳動脈瘤の動物モデルを用いた分子生物学的研究では、脳動脈瘤の形成と増大に血管壁の炎症反応が関わっていることが示されてきた (Moriwaki et al. Stroke 37: 900-5, 2006)。ところがこの脳動脈瘤モデルは、ごくわずかな膨隆を示す程度の小さいものが殆どで、破裂することは滅多に無く、臨床上治療の対象となる動脈瘤の実像とは程遠いものであり、この現存のモデルで破裂現象を解明することは不可能である。

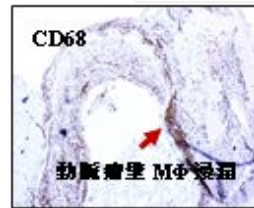
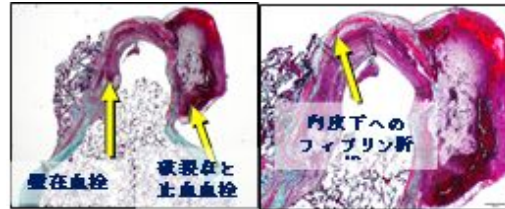
一方これまで、ヒト脳動脈瘤の術前検査画像を用いた流体力学的研究により、瘤壁には壁せん断応力の高い部分と低い部分とが混在していることが分かっており、bleb の新規形成によりその部位の壁せん断応力が低下することが指摘されている (Cebal et al. Proc of SPIE 6511: 65112C, 2007)。これは動脈瘤の増大が自身の力学的ストレスを減らすための自己保護的なホメオスタシスと捉えることもできる。そしてまた、破裂を起こしているのは壁せん断応力が低くなった部位であることも最近示唆されてきている。すなわち、破裂は瘤内の血流による「力負け」で破裂するのではなく、何らかの生物組織学的変化が連鎖して壁の自壊を起こすのだと推察される。ただし、具体的にどのような組織反応が起きているかは未だ証明されていないのが現状である。

しかし我々は、脳動脈瘤の破裂部位における破裂に至るまでの特異的組織変化に関する見解を徐々に得つつある。

我々はヒト破裂脳動脈瘤の手術において、脳動脈瘤 clip をかける前に破裂点のかさぶた (止血血栓) を付着させたままの状態を全貌を露出し、clipping 後に破裂部の構造を保った摘出標本を取得しており、これは他には類をみない独自性の非常に高い手法である。

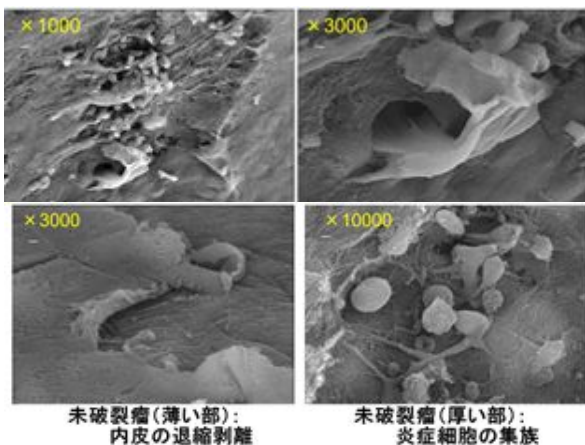


これを病理学的に解析した予備調査では、内皮下へのフィブリン析出や、陳旧性の壁内層状出血や壁在血栓、そしてそれらを貪食した激しい炎症の痕跡が見られた。この所見はリンパ球優位であることなどから破裂よりも以前に発生しているものだが、未破裂動脈瘤にはごく稀にだけ見られる所見であった。



一般に脳動脈瘤の内皮細胞は、本来の規則的な配列が乱れて変形・委縮し、所々で欠損して内皮下の結合組織が露出し、そこに血小板や白血球が付着しており (Hassler et al. Am J Pathol 68: 511-20, 1972) (Kataoka et al. Stroke 30: 1396-401, 1999)、更にその直下にある内弾性板の障害が発生し、筋層の退化と繊維化が惹起されると言われている (Kondo et al. Stroke 29: 181-189, 1998)。

一方、前述した摘出標本の内壁を走査電子顕微鏡で観察してみると、破裂点の近傍では、陳旧性の壁在血栓やフィブリン析出を思わせる堆積物とともに血小板の集集が見られた。未破裂瘤の標本では、壁の薄い部分では内皮の退縮と部分的剥離はあるものの血球成分はあまり見られず、厚い部分ではそこに炎症細胞の集集が見られるが、血小板はほとんど見られていない。



一般に、血管内皮の正常な機能形態の維持には一定以上の壁せん断応力が必要であることは古くから知られている。このことと前述の病理所見を考え合わせると、動脈瘤の破

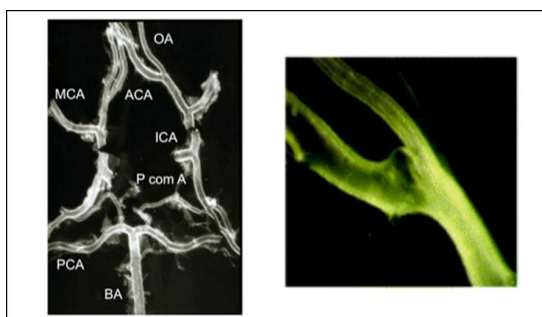
裂は、『動脈瘤の増大もしくは bleb 形成 壁せん断応力の低下 内皮の形態・敷石状配列の乱れ その間隙への壁在血栓形成とその凝固機転の連鎖 それらを貪食する激しい炎症反応 壁組織の崩壊、破裂』という一連のストーリーが仮定できる。かたや、未破裂瘤では、内皮障害部位に対する炎症反応で壁が肥厚・安定化することで非破裂化しているのだと想像される。またその炎症のさらなる増強で結局は壁在血栓が発生してやはり破裂することも想定される。

この仮定は、本研究における破裂部位を温存した動脈瘤標本の光顕的および電顕的病理評価と、各症例の術前画像による流体解析とを関連付けて解析することで、明らかにされることが大いに期待できる。

ただし、臨床の現場では破裂寸前の状態にある未破裂脳動脈瘤の症例に遭遇することはかなり稀有である。つまりヒト臨床例の組織標本だけでは破裂に至る過程を完全に証明することはできないので、そこを補完する方法として実験動物モデルを用いた解析が極めて重要になる。

2. 研究の目的

1978年に Hashimoto らが脳動脈瘤モデルラットを報告 9、10 して以来、動脈瘤の発生・増大に関する研究が行われてきた。モデル作成手術法は簡便であり 7 週齢の Sprague-Dawley strain (SD)ラットを用いて、全身麻酔下に左総頸動脈と片側腎動脈を結紮するのみである。頸動脈結紮により、血行動態を改変され右側の前方循環に血流負荷を加える。また、腎動脈の結紮により腎性高血圧が誘導される。術後から開始する給餌には、さらなる実験的高血圧を誘導するために高塩分 (8% NaCl) と、血管壁の結合組織を脆弱にする目的で 0.12% -AminoPropioNitril (BAPN)がそれぞれ含有されていた。4 週間飼育後に sacrifice し、脳から頭蓋内主幹動脈を剥離し光学顕微鏡にて観察すると、その約 60%の個体の anterior cerebral artery (ACA)と olfactory artery(OA) 分岐部に瘤が誘導されるといったモデルである。



Hashimoto モデルを用いて動脈瘤の病態を検討する上で limitation となりうる事項は

以下の 3 つと考えられた。1 つ目は誘導される瘤の多くは小型で増大の可能性がないこと、2 つ目は破裂例がみられないこと、そして 3 つ目は BAPN の副作用として lathyrism が生じ骨格変形による呼吸不全などが原因で長期生存が困難なことであった。

この limitation を克服するために、その後いくつかの改変 10、11 が加えられたが、全てを克服できないままである。しかし、他に有用なモデルが存在しないため広く使用されるモデルとなっている。

しかし、動脈瘤の実態はヒトに置き換えると脳動脈瘤の初期病変とも考えられる極小の瘤が主体であり、瘤の増大・破裂機構の研究に最適とは言えない。

以上より、現存の増大破裂機構を研究するための脳動脈瘤モデルラットは、小型の瘤が主体であり、かつ増大や破裂を期待できないモデルであるため、病態の解明に十分な情報を有しているとは言えない。

そこで、脳動脈瘤増大破裂機構を究明するため、増大破裂しうる大型脳動脈瘤モデルラットの作成を目指すのが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

誘導される瘤の病理がヒトのそれと類似しており、かつ手術手技の安全性が確立している Hashimoto モデルに修正を加えた。

Hashimoto モデルに使用されている BAPN は、可燃性・爆発性のため現在製造中止となっている。入手できる類似品は可燃性・爆発性のないフマル酸化物 BAPN-F (Sigma-Aldrich St. Louis MO)であり、これを使用する方針とした。

また、BAPN-F は薬理学的な特性上、血中濃度の測定が困難であった。15 食餌に混ぜ投与すると正確な摂取量が不明となるため、投与量を正確に把握するため腹腔内投与へと投与方法を変更する方針とした。ここで BAPN-F はニトロ化合物であり血管拡張作用や降圧作用を有しているため、高血圧や脳動脈瘤の誘導に影響を及ぼす可能性が考えられた。

BAPN-F による血圧に対する影響を確認しつつ、大型動脈瘤の誘導率を評価した。

モデルの作成方法は以下の通りである。

雄性 SD rat 7 週齢 (CLEA, Tokyo Japan)、体重 200-250g 前後を 1-2% isoflurane と笑気ガス N₂O を用いて全身麻酔をかける。手術用顕微鏡下に、仰臥位で左側頸部切開により左頸部総頸動脈を露出した後、迷走神経を障害しないように 10-0 ナイロン糸で 2 重結紮後にマイクロ尖刃で切断。

その後、体位を側臥位に変換し、両側側腹部切開により腎門部を露出させ、腎動脈後枝を 10-0 ナイロンで結紮。腎実質が変色し虚

血が完成したことを肉眼的に確認した後に閉創。

< BAPN-F 低容量投与群 >

術直後から BAPN-F(400mg/kg/week)の腹腔内投与を開始した。また、術後から 8%高塩分食餌で飼育を開始した。

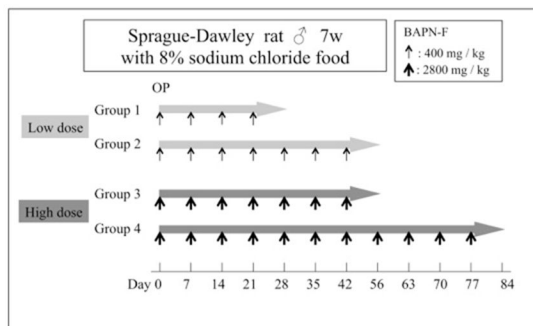
術前後、術後 28 日目は BAPN-F 投与前後、その他日程は 1 日 1 回、自動血圧計(Softron, Tokyo Japan)を用いて尾動脈で血圧を測定した。

Group 1: 術後 4 週間飼育群 (n=31) と Group 2: 術後 8 週間飼育群 (n=31) の 2 群にわけて、予定期間の飼育が終了した後、深麻酔をかけ生理食塩水で還流後に 10%パラホルムアルデヒドで還流固定し断頭。全脳を摘出し、30%スクロースで浸透圧を調整した後に頭蓋底から Willis 動脈輪を温存するように主幹動脈を摘出し、光学顕微鏡下に瘤形成の有無を評価した。

< BAPN-F 高容量投与群 >

術直後に BAPN-F(1400mg/kg)を腹腔内投与。術後から 8%高塩分食餌で飼育開始。翌日も BAPN-F(1400mg/kg)を腹腔内投与。その後は、1 週間ごとに 1400mg/kg を 2 連日にわたり投与を継続した。

Group 3: 術後 8 週間飼育、Group 4: 術後 12 週間飼育の 2 群を作製し、低容量群と同様に評価を実施した。



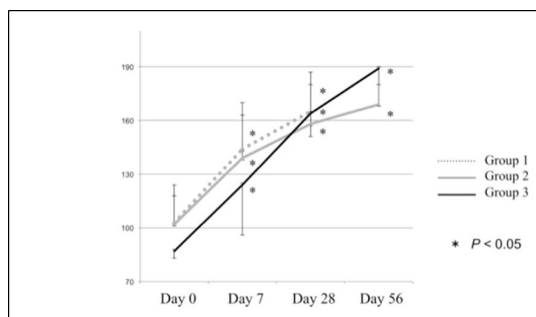
術直後から BAPN-F の腹腔内投与を開始し、Group 1 と 2 では週に 1 回 400mg/kg ずつ、Group 3 と 4 では 1 回 1400mg/kg を 2 連日かけて投与した。飼育期間は Group 1、2、3、4 で、それぞれ術後 4 週間、8 週間、8 週間、12 週間とした。

4. 研究成果

< 血圧変化 >

血圧は、飼育期間とともに上昇した。(図 20) 手術前の平均血圧は、Group 1、2、3 でそれぞれ 103 ± 15 mmHg、102 ± 22 mmHg and 87 ± 4 mmHg であった。術後 7 日目の平均血圧は、それぞれ 144 ± 19 mmHg、139 ± 31 mmHg and 124 ± 28 mmHg であり、術後 28

日目では 165 ± 22 mmHg、158 ± 22 mmHg and 164 ± 13 mmHg、術後 56 日目では Group 2 で 169 ± 21 mmHg Group 3 で 189 ± 9 mmHg であった。術後 7 日目以降で、すべての群において術前と比較して有意な血圧の上昇が認められた。



< 動脈瘤誘導率 >

Group 1 (n=31) では死亡率 12.9% (n=4)、瘤誘導率 19.4%、Group 2 (n=31) では死亡率 16.1% (n=5)、誘導率 29% であった。低死亡率のため目標期間まで飼育可能であったが、瘤の誘導率も低かった。両群ともに Hashimoto モデルに類似の小型瘤が ACA-OA 分岐部に観察され、いずれの群においても後方循環の瘤や large aneurysm は誘導されなかった。

low-dose BAPN-F						
Group	BAPN-F mg/kg/week	breeding period	no. of rats	mortality	cerebral aneurysm	
					induction rate	no. of lesions
1	400	4 weeks	31	12.9% (n=4)	19.4% (n=6)	6
2	400	8 weeks	31	16.1% (n=5)	29% (n=9)	9

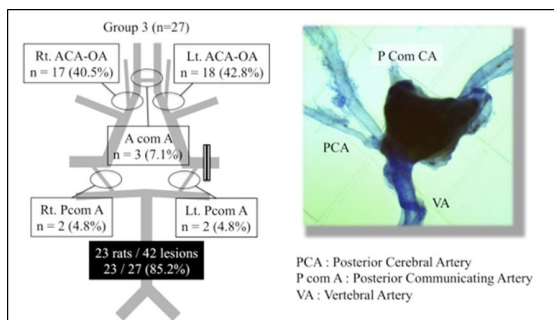
Group 3 (n=27) での動脈瘤誘導率は 85.2% (n=23)、Group 4 (n=13) では 84.6% (n=10) と低容量群と比べて非常に高かった。両群ともに前方循環・後方循環のいたるところに瘤が観察され large aneurysm が Group 3 の 22.2% (n=6)、Group 4 の 23.1% (n=3) に誘導され、全てが trunkal type であった。

high-dose BAPN-F						
Group	BAPN-F mg/kg/week	breeding period	no. of rats	mortality	cerebral aneurysm	
					induction rate	no. of lesions
3	2800	8 weeks	27	7.4% (n=2)	85.2% (n=23)	41
4	2800	12 weeks	13	30.1% (n=4)	84.6% (n=9)	22

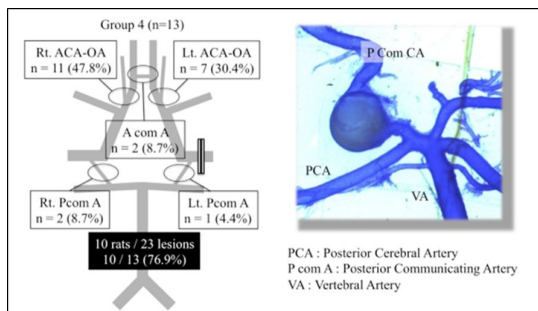
死亡率は低容量群よりは上昇したが、7 割の個体が長期生存可能であった。

瘤の誘導率が上昇し、複数の瘤が誘導された個体も多かった。加えて、約 20% で大型瘤が誘導され、location は前交通動脈と後交通動脈であった。

Group 3 代表例



Group 4 代表例



本実験により、有効に大型動脈瘤を誘導することができるようになった。これを用いて、破裂に直接かかわる機構を解明する薬剤投与試験などの実験が実現可能となった。

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 3件)

Masaaki Hokari, Naoki Nakayama, Yusuke Shimoda, Kiyohiro Houkin: Effect of headache on the pathological findings of unruptured cerebral saccular aneurysms. (査読有) World Neurosurg 103:431-441, 2017.

Masaaki Hokari, Naoki Nakayama, Ken Kazumata, Toshiya Osanai, Hideo Shichinohe, Takeo Abumiya, Kiyohiro Houkin: Surgical Outcome of Cerebral Aneurysm Clipping Treated with Immunosuppressants: Report of 11 Cases and Review of the Literature Original Articles. (査読有) Neurol Med Chir 57:122-127, 2017.

森脇拓也: 脳動脈瘤の基礎研究の現状. 脳神経外科速報(査読無) 26. 169-175, 2016

[学会発表](計 3件)

Yusuke SHIMODA, Takuya Moriwaki, Naoki Nakayama, Takeo Abumiya, Ken Kazumata, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin: A Novel Cerebral Aneurysm Model in Rat with Intraperitoneal BetaAminoPropioNitrilFumarate. International Stroke Conference 2016 (Los Angeles, USA), 2016, 02.

下田祐介, 森脇拓也, 中山若樹, 栗栖宏多, 穂刈正昭, 七戸秀夫, 鑑谷武雄, 長内俊也, 数又研, 寶金清博: 大型脳動脈瘤モデルラットの確立へむけて. 第74回日本脳神経外科学会学術総会, 2015.10.

Yusuke Shimoda, Naoki Nakayama, Takeo Abumiya, Masaaki Hokari, Kota Kurisu, Hideo Shichinohe, Ken Kazumata, Kiyohiro Houkin: Inside Intramural Thrombus Formation with Inflammatory Reactions is Relevant to the Rupture of Cerebral Aneurysms. 83rd AANS Annual Scientific Meeting (Washington, D.C, USA), 2015, 05.

[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]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 若樹 (NAKAYAMA, Naoki)
北海道大学・医学研究院・講師
研究者番号: 40421961

(2)研究分担者

森脇 拓也 (MORIWAKI, Takuya)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
客員研究員
研究者番号: 30597464

穂刈 正昭 (HOKARI, Masaaki)
北海道大学・医学研究院・客員研究員
研究者番号: 30622807

鐙谷 武雄 (ABUMIYA, Takeo)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 80270726

数又 研 (KAZUMATA, Ken)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号: 60634144

寶金 清博 (HOUKIN, Kiyohiro)
北海道大学・大学病院・教授
研究者番号: 90229146

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

下田 祐介 (SHIMODA, Yusuke)
北海道大学・医学研究院・客員研究員