



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Novel Large Cerebral Aneurysm Model Rat with Intraperitoneal Beta-AminoPropioNitril-Fumarate [an abstract of entire text]
Author(s)	下田, 祐介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2213 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12109号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61804
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Shimoda_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

Novel Large Cerebral Aneurysm Model Rat with Intraperitoneal

Beta-AminoPropioNitril-Fumarate

（ BAPN-F 腹腔内投与を用いた
大型脳動脈瘤モデルラットの開発 ）

2016 年 3 月

北海道大学

下田 祐介

学 位 論 文 の 要 約

Novel Large Cerebral Aneurysm Model Rat with Intraperitoneal

Beta-AminoPropioNitril-Fumarate

（ BAPN-F 腹腔内投与を用いた
大型脳動脈瘤モデルラットの開発 ）

2016 年 3 月

北海道大学

下田 祐介

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	26 頁
考察	35 頁
総括および結論	40 頁
謝辞	42 頁
引用文献	43 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yusuke SHIMODA, Takuya MORIWAKI, Naoki NAKAYAMA, Kota Kurisu, Masayuki Gekka, Masaaki HOKARI, Kiyohiro HOUKIN

**Novel Large Cerebral Aneurysm Model Rat with Intraperitoneal
Beta-AminoPropioNitril-Fumarate**

Journal of Neurosurgery (現在投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 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

日本脳神経外科学会 第74回学術総会, 2015年10月, 札幌

2. Yusuke SHIMODA, Takuya MORIWAKI, Naoki NAKAYAMA, Kota Kurisu, Masayuki Gekka, Masaaki HOKARI, Kiyohiro HOUKIN

**Novel Large Cerebral Aneurysm Model Rat with Intraperitoneal
Beta-AminoPropioNitril-Fumarate**

International Stroke Conference 2016, 2016年2月, Los Angeles

緒言

くも膜下出血は、現在の医療水準をもってしても、死亡率が 10 - 67%と高く要介助以下の転帰不良例が約 40%存在しており¹, その発症予防と治療は重要な問題である. 最新の脳卒中治療ガイドライン 2015 でも, くも膜下出血の危険因子として喫煙習慣, 高血圧の保有, 過度の飲酒があげられ, これらの危険因子を持ち合わせる場合には, その改善が勧められる.

くも膜下出血の最大の原因である未破裂脳動脈瘤に関してクリッピング術やコイル塞栓術など具体的な治療方法は確立されている一方で, 予防手段として確立したものはなく早期構築が望まれる.

近年, ヒト脳動脈瘤の増大破裂機構を摸索する研究として **Computational fluid dynamics (CFD)**を用いた流体力学的解析²や分子生物学的解析^{3,6}が注目されており, ずり応力 **wall shear stress**⁷や慢性炎症と瘤の増大との関係⁸が示唆されているが, いまだ解明されていない点が多い.

1978 年に Hashimoto らが脳動脈瘤モデルラットを報告⁹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が改変され右側の前方循環に血流負荷が加わり, 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% **β -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 モデルの **limitation** 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あること, 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。

Jamous らはヒトでの疫学研究から脳動脈瘤の有病率が閉経期女性に多いことに注目し、雌性 SD ラットを用いて卵巣摘出し estrogen 欠乏状態を誘導し、脳動脈瘤モデルの確率に成功した¹²。モデル作成手術法は Hashimoto モデルと類似するが、2 期的な手術を要するなどやや複雑となる。7 週齢の雌性 SD ラットを用いて、1 期目は全身麻酔下に左総頸動脈と両側腎動脈の結紮を行う。術後は、1%食塩水で給水させ、4 週間飼育する。その後 2 期目の手術として、両側卵巣を摘出し、8 週間飼育する。1 期目の手術から 12 週間で sacrifice すると、その約 60%の個体の ACA-OA 分岐部に瘤が誘導されるといったモデルである。やはり小型の瘤が主体である。

現時点で報告されている脳動脈瘤破裂モデルも、マウスの脳槽にエラストマーを注入することにより破裂を誘導したり¹³、ラットの頭蓋内血管をカテーテルで直接損傷させるもの¹⁴などであり、ヒトで生じる瘤形成・増大・破裂の病態を反映しているとは言いがたい。

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、病態の解明に十分な情報を有しているとは言えない。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。

実験方法の頁で詳しく述べるが、実験を進めていく中でパイロット実験から得られたデータより導き出された（組織障害 damage）×（時間経過 duration）の積として算出される「力積 impulse」がある閾値を越えると動脈瘤は誘導されるという仮説（impulse hypothesis）を検証するべく、従来のラット脳動脈瘤モデルに「高容量薬剤腹腔内投与」という改変を加えて検討した。

実験方法

以下の実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って specific pathogen-free barrier conditions 下で実施した。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 2 点の修正を加えた。具体的には、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。

まずは、この 2 点の変更を加えて、予備実験を行う方針とした。

【予備実験①】

BAPN-F への変更、腹腔内投与への変更でも有害事象は生じないか、実験的高血圧や脳動脈瘤は誘導されるかを検討した。

7 週齢の雄性 SD ラットを isoflurane と笑気ガス N₂O とで全身麻酔下に手術。左総頸動脈、両側腎動脈後枝を結紮。術直後から高塩分食餌（8%NaCl）と週に 1 回の BAPN-F 腹腔内投与と尾動脈で血圧測定を開始。BAPN-F 投与量に応じて 400mg/kg/week 投与群 (n=11)，800mg/kg/week 投与群 (n=11)，1600mg/kg/week 投与群 (n=6) の 3 群に分類した。術後 4 週間の短期飼育と死亡率と血圧の経時的変化を評価した。予定の飼育期間が終了した時点で、十分な麻酔をかけた後に sacrifice した。十分に生理食塩水で還流処置後に 10% パラホルムアルデヒドで環流固定し、断頭。摘出した脳を 30% sucrose に数日間浸潤させ、浸透圧を調整後に光学顕微鏡下に Willis の動脈輪を保つように主幹動脈を剥離し、瘤形成の有無を評価した。

死亡率はいずれの群も 30%前後であった。瘤の誘導率は BAPN-F の投与量が多くなるほど増加し、400mg/kg/week 投与群、800mg/kg/week 投与群、1600mg/kg/week 投与群で、それぞれ 27%、45%、66%であった。

一方、腹腔内投与に起因する有害事象は 1 例もみられなかった。収縮期血圧は術前、day7、day14、day21 で、それぞれ 132 ± 16 mmHg、 185 ± 12 mmHg、 194 ± 8 mmHg、 193 ± 11 mmHg であった。また、拡張期血圧は、それぞれ 98 ± 9 mmHg、 144 ± 8 mmHg、 152 ± 14 mmHg、 142 ± 10 mmHg であった。平均血圧は術前と比較して上昇していた。

誘導された瘤の多くは Hashimoto モデル類似の小型瘤であったが、特記すべきは 400mg/kg/week 投与群で大型瘤が 1 例観察されたことであった。

この結果を踏まえ、死亡率が最も低い 400mg/kg/week 投与群でさらに長期間（術後 8 週間）飼育をすると血圧変化や瘤誘導率がどのように変化するかを、また大型瘤は誘導されるのかを、本実験として検討する方針とした。

【本実験① BAPN-F 低容量投与群の作成】

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。術直後から BAPN-F(400mg/kg/week)の腹腔内投与し、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。

左頸部総頸動脈の結紮により右側前方循環に血流負荷を与え、腎動脈後枝を結紮することにより腎性高血圧を誘導した。また術直後より高塩分食でナトリウム負荷を与えさらなる高血圧を誘導し、BAPN-F により血管壁の内弾性板などの結合組織を脆弱にした。

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。

最好発部位であるACA-OA分岐部に関しては全例、その他の部位は瘤が形成されたと判断された部位を切断して Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (Sakura Finetech, Tokyo Japan) に包埋して-80℃の deep freezer で凍結させた後 Cryostat CM1510S (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany)を用いて 6 μ m 厚に薄切し内弾性板を評価するためElastica-Masson染色を実施した。異なる3名の評価者で評価を実施した。

結果の詳細は、結果の頁に記す。

【瘤の定義】

ACA-OA 分岐部に誘導された瘤は bifurcation type と、全交通動脈や後交通動脈に誘導された瘤は trunkal type として、それぞれ分類した。

瘤のサイズは、過去の報告にならい¹⁶ 瘤の orifice の長さを瘤の大きさとした。内弾性板の断片化のみで壁の膨隆がみとめられないものは wall deformity として、内弾性板の変化に加えて瘤のサイズが母血管径の半分以下の場合は immature aneurysm, 半分以上の場合は cerebral aneurysm, 母血管径と同等以上の場合は large aneurysm と定義した。

BAPN-F の腹腔内投与という改変を行っても瘤が誘導されることがわかった。過去の報告では高律に生じた BAPN の合併症はほとんど生じず、術後 8 週間飼育でも 80%以上の生存が得られモデル動物として十分な生存率と考えられた。さらなる大型の瘤の形成を目的とし、この段階で過去の実験から推察された BAPN-F 単回腹腔内投与における極量 (2800mg/kg/week) を、分割投与すると長期生存や瘤の大型化が得られるかもしれないと考え、予備実験②を組んだ。

【予備実験②】極量の半量を，2連日投与

2800mg/kg/week の半量 1400mg/kg を 2 連日投与することにより 2800mg/kg/week となる群を 1 匹作成した．術後 8 週間生存可能であり sacrifice すると従来のものと比較して大型の瘤が，前交通動脈瘤に誘導された．

ここで，2 連日投与群で従来よりも大型の動脈瘤が誘導されたことを鑑みて，大型瘤の誘導条件としては動脈瘤壁（内弾性板）への **damage** が長期間蓄積して（組織障害 **damage**）×（時間経過 **duration**）の積として算出される「力積 **impulse**」がある閾値を越えることではないかという仮説（**impulse hypothesis**）に到達した．ヒト未破裂脳動脈瘤におけるリスクファクターに高血圧の既往や喫煙歴が挙げられること，HIV や真菌感染の後比較的短期間で瘤が誘導されることなどを勘案すると，前者が低容量長期間暴露，後者が高容量短期間暴露となり，ヒト脳動脈瘤研究に関しては，前述の **impulse hypothesis** は **reasonable** と考えられた．

【本実験② BAPN-F 高容量投与群の作成】

手術手技は，本実験①と同様に，7 週齢の雄性 SD rat（体重 220g 前後）を全身麻酔下に手術．左頸部総頸動脈結紮，両側腎動脈後枝を結紮．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，本実験①と同様に評価を実施した．

結果の詳細は，結果の頁に記す．

【統計学的解析】

すべてのデータは（平均）±（標準偏差）で記載した．また，2 群間の検定には Student's t-test を，2 群間の比率の検定には Z-test を用いた．P 値が 0.05 を下まわっている場合にのみ有意とした．

実験結果

【血圧変化】

Group 1, 2, 3 で飼育期間中の平均血圧を測定した。飼育期間とともに平均血圧は上昇した。手術前の平均血圧は, Group 1, 2, 3 でそれぞれ 103 ± 15 mmHg, 102 ± 22 mmHg, 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, 124 ± 28 mmHg であり, 術後 28 日目では 165 ± 22 mmHg, 158 ± 22 mmHg, 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, Group 1, 2, 3 の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。

【BAPN-F 低容量投与群の作成】

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。

死因を解明するために剖検を実施。手技に習熟すると術中死は減少したが Group 1 の 6.5% (n=2) と Group 2 の 9.7% (n=3) が術中止もしくは手術ダメージによる死亡と考えられた。Group 1 の 6.5% (n=2) と Group 2 の 6.5% (n=2) で胸腔内出血が認められ, BAPN-F の副作用である結節性動脈周囲炎の破裂が関与しているものと考えられた。Hashimoto モデルの主たる死因であった胸郭変形⁹⁻¹¹の原因となりうる osteolathyrism は出現しなかった。くも膜下出血も認められなかった。

統計学的に Group 1 と Group 2 を比較すると, 死亡率 (12.9% vs 16.1% $p=0.719$) や誘導率 (19.4% vs 29% $p=0.374$) に有意差を認めなかった。

【本実験② BAPN-F 高容量投与群の作成】

この群も、目標飼育期間まで生存可能であった。動脈瘤誘導率は Group 3 (n=27) では 85.2% (n=23), Group 4 (n=13) では 76.9% (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。

前方のみならず、後方循環にも瘤が誘導された。また大型の瘤も誘導された。

死亡率は Group 3 で 7.4% (n=2), Group 4 では 30.1% (n=4) であった。剖検の結果いずれも胸腔内出血が認められ、低容量群同様に BAPN-F の副作用である結節性動脈周囲炎の破裂と考えられた。両群ともに脳動脈瘤の破裂はみられず、Hashimoto モデルの主たる死因である骨格の Lathyrism は出現しなかった。

Group 3 と Group 4 を統計学的に比較すると、死亡率 (7.4% vs 30.1% $p=0.053$) や誘導率 (85.2% vs 84.6% $p=0.871$) では有意差を認めなかったが、ACA-OA 分岐部瘤のサイズは ($116.37 \mu\text{m}$ vs $163.34 \mu\text{m}$ $p=0.0042$) で Group 4 に誘導される瘤が有意に大きいという結果であった。

ここで最好発部位である ACA-OA 分岐部瘤に注目した。誘導率は Group 1, 2, 3, 4 でそれぞれ 19.4% (n=6), 12.9% (n=4), 59.3% (n=16), 76.9% (n=10) であった。Group 2 と 3 を比較すると Group 3 で誘導率が有意に高く ($P=0.0002$) , 同一飼育期間の比較では BAPN-F が高容量の方が誘導率が高いという結果となった。また、ACA-OA 分岐部瘤のサイズは Group 1, 2, 3, 4 でそれぞれ $69 \pm 29.3 \mu\text{m}$, $64.3 \pm 11.5 \mu\text{m}$, $116.4 \pm 50.6 \mu\text{m}$, $163.3 \pm 51.6 \mu\text{m}$ であった。Group 1 と 2 を比較しても統計学的な有意差はみられなかったが、Group 2 と 3 との比較 ($P=0.0495$), Group 3 と 4 との比較 ($P=0.00424$) で有意差が認められた。このことから、同一飼育期間であれば BAPN-F の量が多い方が、同一高容量であれば飼育期間の長い方が、動脈瘤サイズが大きくなるという結果であった。

考察

1978年に京都大学から報告された Hashimoto モデル⁹は epoch-making なモデルであった。4月齢SDラットを用いて、右腎の摘出と左総頸動脈結紮を行い、術後から1%食塩水と0.12%BAPN含有餌を投与し4週間後にsacrificeして評価をするといったものであった。Lathyrismやperiarteritis nodosaの影響で5週間を超えて長期生存できない・誘導率低い(36%)・小さい瘤であるなど、問題点を孕んでいた。その翌年 Nagata ら¹¹により改変モデルが報告された。腎摘出は行わずに、腎動脈の後枝を結紮すること、BAPNは用いないことが主な変更点である。結果、誘導率は上昇(61%)したが、サイズは小さいままであった。しかしながら、その病理像がヒトのそれと類似していること、脳動脈瘤モデル動物はこのモデル以外に適切なものが存在しないことから、現在においてもこの Hashimoto モデルが脳動脈瘤実験には欠かせない存在となっている。

2005年に徳島大学から報告された Jamous らが作製したモデル¹²は、エストロゲンが血管内皮細胞に対して保護作用があることに注目し、卵巢摘出して擬似閉経状態とした雌性ラット使用し作製したモデルである。7週齢の雌性SDラットを用いて左総頸動脈結紮と両側腎動脈後枝の結紮を行い、術後は1%食塩水投与を開始。初回手術から4週間後に両側の卵巢摘出術を実施し、その8週間後にsacrificeして評価を行うといったモデルである。長期生存可能で誘導率も60%と高いものであったが、誘導される瘤は小さいサイズであった。

2011年にChaiらは血行動態の改変のみで瘤が誘導されるというモデルを報告した。¹⁷ このモデルは、左総頸動脈の結紮に加えて、右外頸動脈・右翼口蓋動脈の結紮を行い、右内頸動脈へかかる血流負荷を極端に増やすものであった。術後2ヵ月飼育群ではその20%に、3ヵ月飼育群ではその40%に瘤が誘導されるといった結果であるが、やはり瘤のサイズは小さいものであった。

いずれも瘤もサイズが小さく、増大や破裂が期待できないモデルであるため瘤の病態解析には適切なモデルとは言えない。我々は、増大破裂の可能性を秘めた新モデルを作製することを目標とした。過去の報告から、その病理像がヒト脳動脈瘤に最も類似している Hashimoto モデルをベースとして改変を加える方針とした。

Hashimoto モデルをベースとする上で BAPN を用いることは不可欠であった。論文で報告されたものと同一の BAPN は可燃性が強く現在流通していないため、そのフマル酸化合物である BAPN-F への変更を余儀なくされた。続いて、血管壁へダメージを変化させた群を作製するにあたり、BAPN-F の投与量を正確に把握する必要があった。薬理学的特性から血中濃度を正確に計ることが困難であり¹⁵、食餌に混ぜた場合に摂取量・血中濃度ともに不明となるため、腹腔内投与で投与量を把握する方針とした。予備実験では BAPN-F への変更、腹腔内投与への変更でも瘤が誘導されることが証明された。加えて、頻回の腹腔内投与でも、腹部合併症や感染症は生じなかった。

BAPN は自然界では sweet pea (*Lathyrus odoratus*) に含まれており、これらを餌として摂取すると骨格の変形をきたすことが知られている。BAPN はコラーゲンとエラスチンとの架橋構造を形成するために必要な lysyl oxidase を阻害する作用を有する。そのため、血管壁や骨に対して毒性があり、骨変形 osteolathyrism や結節性血管炎 polyarteritis nodosa の原因となりうる^{4,6,16}。Hashimoto モデルでは、胸郭の変形から呼吸不全に陥るため 5 週間を超えての生存が困難であった。しかし、我々の腹腔内投与モデルでは、主たる死因は結節性血管炎によって生じた大動脈瘤や冠血管瘤の破裂であり、致死的な骨変形は生じることがなかった。フマル酸化合物への変更、もしくは投与方法の変更のどちらかが関与しているものと思われたが、結論はでていない。この致死性の骨変形の減少が、過去の報告と比べて、生存率が上昇した理由の 1 つと考えられた。一方、BAPN-F はニトロ化合物であり、その薬理特性として血管拡張作用が知られている。それにもかかわらず、我々のモデルは実験的高血圧の誘導に成功した。これは、腎動脈の結紮による腎性高血圧と高塩分食餌の Na 負荷による高血圧が、BAPN-F の薬理作用を上回った結果と考えられた。Gilman らは BAPN は結合組織が形成される過程において影響を及ぼすため、immature な血管にのみ作用、すなわち成熟した結合組織を有する成体のラットより幼弱なラットにおいて作用すると報告している¹⁸。本実験では Group 2 と 3 の比較において術後 8 週までは BAPN-F の高容量投与群で誘導率が高く Group 3 と 4 の比較において術後 8 週を超えた群において誘導率に差はないが、サイズに有意な差が生じるといった結果であった。これは、術後 8 週（15 週齢）までは血管壁が immature なため誘導率に差が認められ、術後 8 週（15 週齢）を超過すると

immature な瘤化した部分にのみ BAPN-F が作用するため大型化するのではな
いかと考察された。Gilman らの報告と我々の ACA-OA 分岐部瘤が時間経過と
ともにサイズが増大したことを踏まえると、さらなる長期間飼育で瘤がより大
型化する可能性が考えられた。

このモデルにおいて 3 つの limitation が挙げられる。1 つ目は、BAPN-F の
薬理学的特性のため血中濃度が測定できない点である。¹⁵ 瘤の誘導率が上昇して
いることから、血中濃度が上昇しているものと推察されるが、本当に高容量腹
腔内投与で血中濃度が上昇しているのかは未知である。2 つ目は、血管壁への組
織学的なダメージの程度は Elastica-Masson 染色で検出された内弾性板の状態
を光学顕微鏡下で判定しているのみである。過去の報告では、免疫染色の手法
を用いて内弾性板や collagen の状態を評価している^{5,19} が、本研究では免疫組
織学的な確認はなされていない。3 つ目は、誘導された瘤が破裂し、くも膜下出
血を呈した例が存在しないことである。

しかし、さらに impulse を増大させたパイロットスタディで、瘤が破裂した
個体が観察された。具体的には、前述の高容量群の 1.75 倍にあたる 4200
mg/kg/week の BAPN-F を 2 分割で投与したところ、術後 28 日目に突然死亡
した。剖検で死因を確認したところ、くも膜下出血の所見にくわえて右後大脳
動脈に瘤をみとめ、この破裂と考えられた。この群の数を増やし観察・検討し
てからではないと結論は出せないが（組織障害 damage）×（時間経過 duration）
＝（力積 impulse）が 瘤を誘導するという impulse hypothesis は、力積
impulse が瘤を誘導・増大・破裂へと導くという仮説にまで発展できる可能性
を秘めている。

本研究で特記すべきは、BAPN-F への変更・腹腔内投与への変更という 2 点
の変更でも、実験的高血圧の誘導に成功・低死亡率、脳動脈瘤の高誘導率に成
功した点である。そのなかでも、impulse hypothesis に基づき致死量の半量を 2
連日投与するという手法で作製した群は、長期生存可能であり、高い動脈瘤の
誘導率を示した。誘導された瘤が時間経過とともに増大するという結果も他
には類を見ない特徴である。手技に伴う有害事象は出現せず、安全かつ簡便な手
術であるため、モデル動物としての条件を満たしていると考えられた。

impulse hypothesis に基づき作製されたモデルを HOKUDAI model (Hokkaido university de novo aneurysm investigation model)と名付けた. この HOKUDAI モデルの特徴は, 死亡率が低く, 誘導率が約 80%と高く, その 20% に大型瘤であることに加えて, さらに誘導された瘤は長期間の飼育でより大型化する可能性を秘めていることである.

【結論】

impulse hypothesis に法りHOKUDAI modelを作製した. BAPN-F 腹腔内投与で脳動脈瘤の誘導に成功し, 腹腔内投与は手技が簡便でありimpluseの調整も容易であるという利点を有している. 脳動脈瘤の誘導率が約80%と高く, その20%は大型瘤であった. 飼育期間とともにサイズは増大を示すため, さらに長期間飼育することで, 瘤はより大型化するものと考えられた.

【今後の展望・課題】

誘導された瘤を免疫組織学的検討する.

NF κ β , NOX1, NOX2, NOX4 の発現や ROS 産生を評価

SIRT-1 の発現

MMP-2 や MMP-9 の発現

走査電子顕微鏡を用いて形態学的に評価する.

Cilostazol や Statin, EPA などの血管内皮細胞に対して保護作用を有する薬剤を投与した場合に, 瘤の誘導や破裂率が抑えることができるか検討する.

謝辞

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 科研費の助成を受けたものです。
(JSPS KAKENHI Grant Number 15K10287)

本実験を遂行するにあたって多大なる技術的支援を賜りました北海道大学
大学院医学研究科脳神経外科の四戸由美子様，長島理香様に深謝します。

加えまして，動物を飼育して頂きました北海道大学大学院医学研究科附属動
物実験施設のスタッフの皆様，附属動物実験施設が改修工事になった際に飼育
室を提供頂きました北海道大学アイソトープ総合センターのスタッフの皆様にも，
深謝します。

最後になりますが，3年間の研究を通じて活発な議論にお付き合い頂き，終始
適切な助言を賜った脳神経外科の先生達にも併せて感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Dennis, J. N. *et al.* Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* **8**, 635-642 (2009).
- 2 Meng, H. *et al.* Complex hemodynamics at the apex of an arterial bifurcation induces vascular remodeling resembling cerebral aneurysm initiation. *Stroke* **38**, 1924-1931 (2007).
- 3 Aoki, T. *et al.* NF-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation* **116**, 2830-2840 (2007).
- 4 Aoki, T. & Nishimura, M. The development and the use of experimental animal models to study the underlying mechanisms of CA formation. *J Biomed Biotechnol.* **2011**, 535921 (2011).
- 5 Aoki, T. *et al.* Complementary inhibition of cerebral aneurysm formation by eNOS and nNOS. *Lab invest.* **91**, 619-626 (2011).
- 6 Moriwaki, T. *et al.* Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1beta-deficient mice. *Stroke* **37**, 900-905 (2006).
- 7 Miura, Y. *et al.* Low wall shear stress is independently associated with the rupture status of middle cerebral artery aneurysms. *Stroke* **44**, 519-521 (2013).
- 8 Frosen, J. *et al.* Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* **123**, 773-786 (2012).
- 9 Hashimoto, N., Handa, H. & Hazama, F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Surg Neurol.* **10**, 3-8 (1978).
- 10 Hashimoto, N., Handa, H. & Hazama, F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: part II. *Surg Neurol.* **11**, 243-246 (1979).
- 11 Nagata, I., Handa, H. & Hashimoto, N. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: part IV--cerebral angiography. *Surg Neurol.* **12**, 419-424 (1979).

- 12 Jamous, M. A. *et al.* Role of estrogen deficiency in the formation and progression of cerebral aneurysms. Part I: experimental study of the effect of oophorectomy in rats. *J Neurosurg.* **103**, 1046-1051 (2005).
- 13 Hosaka, K. *et al.* Modified murine intracranial aneurysm model: aneurysm formation and rupture by elastase and hypertension. *J Neurointerv Surg.* **6**, 474-479 (2014).
- 14 Delgado, T. J., Brismar, J., & Svendgaard, N. A. Subarachnoid haemorrhage in the rat angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke* **16**, 595-602 (1985).
- 15 Sevil, M. B. *et al.* Pharmacokinetic analysis of beta-aminopropionitrile in rabbits. *Vet Res.* **27**, 117-123 (1996).
- 16 Sadamasa, N., Nozaki, K. & Hashimoto, N. Disruption of gene for inducible nitric oxide synthase reduces progression of cerebral aneurysms. *Stroke* **34**, 2980-2984 (2003).
- 17 Cai, J. *et al.* A novel haemodynamic cerebral aneurysm model of rats with normal blood pressure. *J Clin Neurosci.* **19**, 135-138 (2012).
- 18 Gillman, T. & Hathoron, M. Rates of growth and of remodelling as factors in the genesis of vascular and osseous lesions of odoratism in rats. *J Embryol Exp Morphol.* **6**, 270-283 (1958).
- 19 Aoki, T. *et al.* Reduced collagen biosynthesis is the hallmark of cerebral aneurysm: contribution of interleukin-1beta and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **29**, 1080-1086 (2009).