

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

9.4MRIによるラット脳梗塞モデルの解析

研究分担者	横山 昌幸	東京慈恵会医科大学	ME研究部	准教授
研究協力者	王 作軍	東京慈恵会医科大学	ME研究部	研究員
研究協力者	白石 貢一	東京慈恵会医科大学	ME研究部	講師

研究要旨 経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の研究で、超音波照射の安全性を評価する場合にラットでナイロン糸を中大脳動脈に塞栓させるモデルを用いている。従来は塞栓後に麻痺症状を観察して、モデル作製の成否を判断していたが、塞栓の程度による脳梗塞症状の軽重が含まれることはある程度避け得ないことと考えられてきた。本研究では高磁場MRI装置による観察を行うことで、塞栓状態が分類でき、ばらつきの少ない脳梗塞モデルでの安全性評価が可能となった。

A. 研究目的

本研究の経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の開発では、超音波照射が安全に行えるかを評価することが大変重要な項目である。通常の健康なラットでの超音波照射実験も一定の意味はあるが、脳梗塞モデルラットを用いて虚血による様々な生体応答が惹起された状態で超音波照射によって脳出血が促進することの有無を知ることが適切と考えられる。この脳梗塞モデルとして比較的良く確立された方法は、ナイロン糸をラット中大脳動脈（MCA）に塞栓させるモデル（小泉モデル）である。ほぼ一定の長さの糸を術者の手の感覚により挿入するのであるが、塞栓の程度には差があると考えられる（MCA血流の完全・部分閉塞、他動脈の閉塞の有無など）が、閉塞後のラットの状態（脚の麻痺や、旋回挙動）で判断するのみであるのが常法である。特に塞栓時間が長い（例えば3時間）と、予後（生存や脳出血等）に大きく差が出やすいことを我々も経験している。

超音波照射によって出血が促進されずに安全であることを評価するには、ばらつきの少ない評価法であることが大変望ましい。

そこで、最新鋭の高磁場動物用MRI装置によって、塞栓状態の精密な観察を行

うと共に、ラットの予後との相関を求めることとした。高磁場MRI装置では、微細な生体情報が得られると共に、測定に要する時間が短縮されるために、従来は測定時間の長さ故に脳梗塞モデルでの超音波照射実験にMRI測定実施が不可能であった場合でも、測定が可能となることが考えられる。本研究が目的とする脳梗塞モデルラットでの超音波照射実験において、どのようなスケジュールならばMRI測定を繰り返すことが可能になるかの検討も行った。

B. 研究方法

Wistar雄ラット（体重254g～303g）を用い、ナイロン糸で中大脳動脈を閉塞する小泉法を基にし、抜糸による再開通操作を迅速に行うために、Memezawa法を改良した方法を用いた。すなわち、ポリエチレンチューブPE10で作ったシースとその内側に挿入された3-0ナイロン糸を血管にいれることで、内側のナイロン糸の抜糸をスムーズにする。再開通時には、再び手術面を開ける必要なく、体外に露出したシースを保持して内側のナイロン糸を引けば良い。

イソフルラン吸入麻酔下で、ラットを保温パッド上に仰臥位で固定後、頸部に正中切開を加え、右側の総頸動脈（CCA）

、外頸動脈(ECA)、内頸動脈(ICA)及び翼突口蓋動脈(PPA)を露出し、CCAをその分岐部より3mm近位処で結紮し、ECAとPPAをもそれぞれの根底部で結紮する。ICA末梢側に杉田クリップを掛け、CCA分岐部に4-0絹糸を緩く縛り、その直前1mmに穴を開いて、PE10で作ったシース(長さ50mm)とその中に挿入された3-0ナイロン糸(長さ68mm)と一緒にICA内へ入れてからCCA分岐部の絹糸を軽く縛り、ICA部のクリップを外し、シースをICA内6mmまで送り、CCAの結紮系で固定後、その中のナイロン糸をさらに13mmを進め、前大脳動脈内まで送ってから閉創する。こうすることで、ナイロン糸は中大脳動脈(MCA)の入口を塞ぎ、その支配領域への血流は遮断される。再開通時にはシース末端をピンセットで掴んで、ナイロン糸の末端をもう一つのピンセットで掴み、10mm位抜いて、MCAの再開通が開創なしに簡単にできる。

塞栓作業の直後に、高分子ミセル型のMRI造影剤(0.033 mmol Gd/kg)を尾静脈から投与してから、9.4TMRI装置(Bruker社製BioSpec 94/20USR型)にラット脳用のコイル(Model No.: 1P T10324V3)を装着してMRI撮像(Angiography、DWI、T1、T2、T2*)を行った。麻酔下で規定の時間(1~3時間)塞栓を続けた後に、ナイロン糸を抜糸して3時間MRI撮像を継続した後に、麻酔から覚醒させて、血管閉塞24時間後に状態観察を行った。

MRI Angiographyの撮像パラメーターは以下にまとめる通りである。

- TR/TE = 15.0/3.4ms
- FOV = 2.14cm x 3.30cm
- Slice thickness = 6 mm
- 解像度 = 0.01cm/pixel
- Time = 3.43 s
- 積算 = 1回

C. 研究成果

(1) MR Angiographyによる栓系による中大脳動脈塞栓状態の観察

ナイロン糸による塞栓手術の終了後20分~30分後に(手術後に、MRI用ベットに固定し、プローブチューニング等の撮像準備にこの程度の時間を要する)MR Angiographyで約4分間の撮像を行ったところ、塞栓の様子が明瞭に判別することができた。判別された類型を以下に記す。

まず、糸が深く入りすぎて前大脳動脈までの血流を遮断してしまった例を図1に示す。

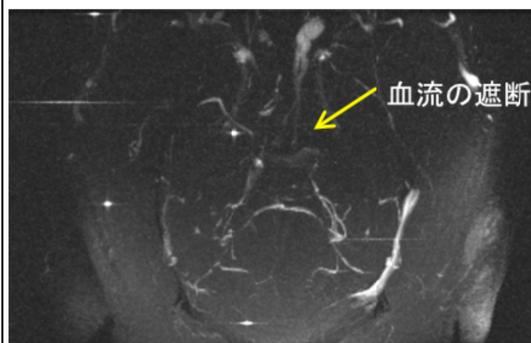
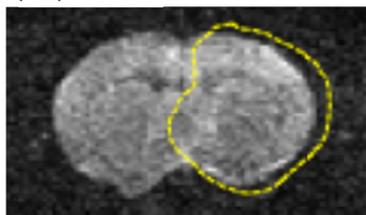


図1 糸が深く入りすぎてしまったMR Angiography像

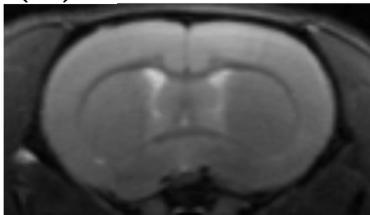
このナイロン栓子による脳梗塞モデルの手技では、挿入する糸の長さはある程度決まっているものの、手技を行う者が指に感じる抵抗感によって中大脳動脈の塞栓を推定する方法である。よって、ラットの個体毎に異なる血管形状によっては挿入の深さおよび挿入の方向(全く異なる血管系に入ってしまうこともある)、さらには脳動脈を穿刺してしまい脳出血に結びつくことが起き得る。同程度の体重のラットの場合には挿入長さは17.5mm~18.5mmであったのに対し、図1場合では19.5mmであり、この時だけ1cm長く挿入されたこととなった。(それだけ他のラットに比べて挿入に伴う抵抗感が少なかったことになる。)図1では、中大脳動脈のみではなく、前大脳動脈

まで閉塞していることが判明した。このラットは1日の観察期間が完了する前に手術後数時間で死亡した。このラットの他の撮像法での画像を図2に示す。

(A)



(B)



(C)

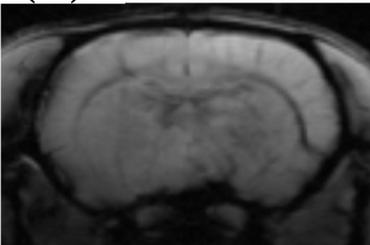


図2 糸が深く入りすぎてしまったラットのMR画像(A)Diffusion画像、(B)T2強調画像、T2*強調画像

最も早期から脳梗塞症状を診断可能なDiffusion像では、黄色点線で囲った梗塞半球に明確な拡散性の減少の様子がみられ、血管閉塞から30～40分という早期にもかかわらず、明確な脳梗塞症状が確認できる。脳梗塞後期の病状が画像化される(B)のT2強調画像においても、この時点では病状は観察されていない。一方、(C)のT2*強調画像では、手術によって脳出血が起きていないことを確認していて、このラットの死亡原因が脳出血ではなく、重篤な脳梗塞症状によることが、確認された。

以上のように、前大脳動脈の閉塞を伴って非常に重篤な脳梗塞となる場合を、このMRI撮像によって排除することができた。この格別に重症となった例の排除はMRI撮像なしにはなし得ない。また、閉塞早期でのT2*画像によって脳内出血が確認された例もあった。このような早期の出血は脳梗塞の影響によって生じたのではなく、ナイロン糸挿入によって物理的に穿刺されたものと考えられる。以上のように、前大脳動脈の閉塞や手術操作で生じた脳出血によって、評価対象から外す例は40例のうち4例であったが、精度の高い安全性評価実験には、これらが除外できることは大きな意義がある。

図3には中大脳動脈のみを完全に閉塞した成功例を示す。正常側の脳左半球では、黄色矢印に沿って中大脳動脈の血流がはっきりと観察されるが、梗塞側である脳右半球では、中大脳動脈の血流がなく、完全に閉塞していることがわかる。

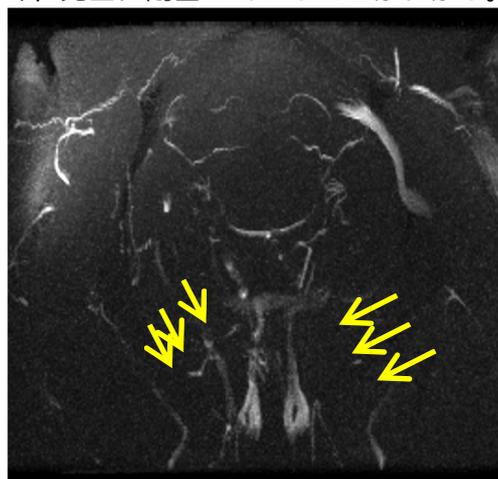
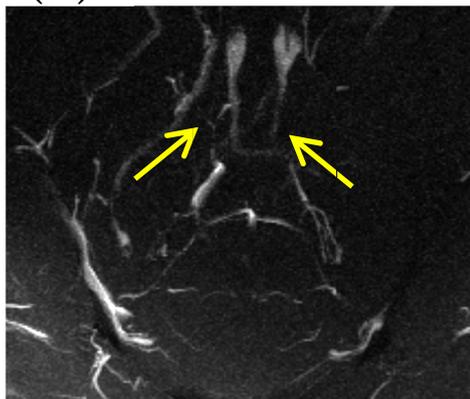


図3 中大脳動脈完全閉塞例のAngiography像(No. KS3623)

次に、不完全閉塞の例を図4に示す。いずれも正常の左半球側の血流よりは減少しているものの、血流が右半球側には観察されて、不完全閉塞と判定した。この不完全閉塞の3例にも違いがあり、(C)では、かなり正常に近い血流があるのに対し、(B)ではわずかに血流が確認できる程度である。

(A)



(B)

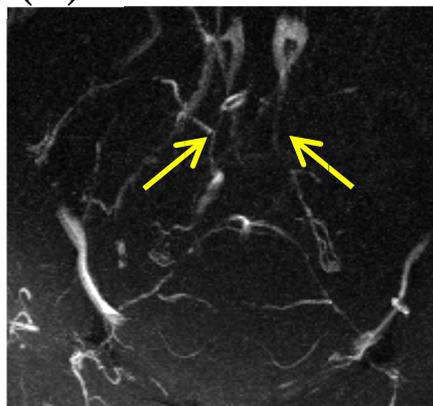


図4 中大脳動脈完全閉塞例の
Angiography像 A: KS3520, B:KS3527

次に、1時間から3時間までの閉塞時間での、MR Angiographyで測定した閉塞状態と24時間後の生存・死亡の結果を表1にまとめる。

この表の結果からは、血管の閉塞が完全であるか、不完全であるかによってラットの予後(24時間後の生存と死亡)が規定されていることがわかる。2時間以上完全に閉塞してから再開通すると、例外なく24時間以内に死亡しているのに対し、不完全閉塞の3例では2時間閉塞でも全例が生存していた。1時間の短い閉塞時間では、完全閉塞の場合でも2例が全例生存していた。

MRIで観察した脳梗塞症状の進行具合も完全閉塞と不完全閉塞では明確な差

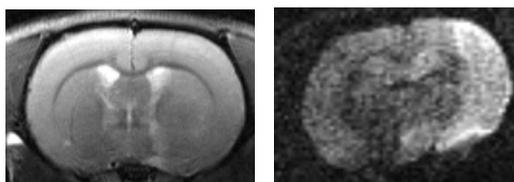
を示した。図5には2時間完全閉塞の場合

表1 ラット脳梗塞モデルにおける閉塞状態と予後の関係

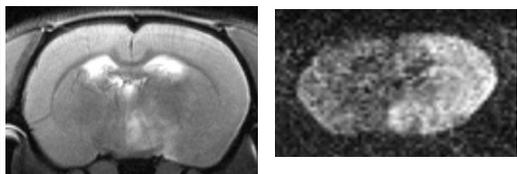
No.	体重 (g)	閉塞時間	閉塞状態	24時間後の状態*
KS3520	284	3 h	完全	X
KS3527	268	3 h	完全	X
KS3530	276	3h	完全	X
KS3604	277	2 h	完全	X
KS3614	278	2 h	完全	X
KS3616	278	2 h	完全	X
KS3532	298	2 h	不完全	○
KS3537	261	2 h	不完全	○
KS3539	283	2 h	不完全	○
KS3534	303	1 h	完全	○
KS3623	299	1h	完全	○
KS3610	254	1 h	不完全	○
KS3619	274	1 h	不完全	○

* x : 死亡、○ : 生存

(A)



(B)



(C)

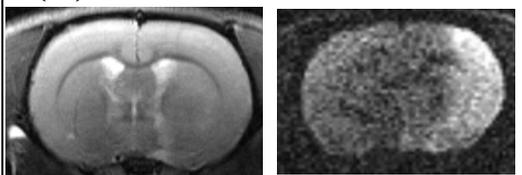


図5 2時間完全閉塞例 撮像は再開通後1時間 A:KS3616, B:KS3604, C:KS3614 各々左がT2強調、右がDiffusion画像

合のT2強調画像（左）とDiffusion画像（右）を示す。Diffusion画像では、この撮像法の性質から像が歪んでいるが、脳虚血による水分子の拡散低下が白い領域でコントラスト高く表現されている。一方、T2強調画像では、正常の左半球と著しい違いは、再開通後1時間では見られない。脳梗塞の早期では、Diffusion画像が脳虚血病態を最も良く表現するという従来知見を確認することとなった。よって、以後にはDiffusion画像のみを提示して比較する。図6には図5と同じく2時間完全閉塞の場合の時間経過をDiffusion画像で示している。2時間閉塞時においても、完全閉塞の場合にはすでに右半球には広範にわたって白い領域が観られる。その後の再開通後1時間には、白い領域がさらに線条体と皮質の両方に広がると共に、コントラストが高くなっていて、病態の進行が見て取れる。

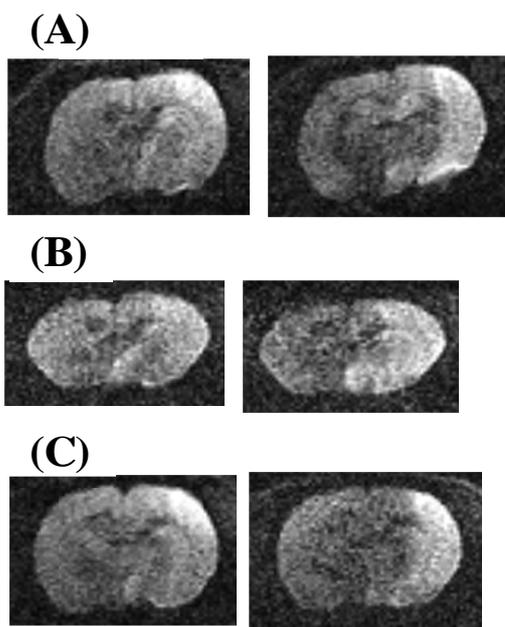


図6 2時間完全閉塞例のDiffusion画像
時間経過 A:KS3616, B:KS3604,
C:KS3614 各々左が2時間閉塞後（再開通直前）、右が再開通1時間後

次に、不完全閉塞の場合のMRI画像を図7に示す。完全閉塞の場合と異なり、病態の進行と広がりとは個体によって異なる。重症度はA>B>Cの順番になっていて最も重症度の高いAでは図6の完全閉塞の場合に近い画像であるのに対し、B,Cでは白い領域は狭く、そしてそのコントラストも低い。これらの3例の閉塞直後のAngiography像から血流の太さを推定すると以下のようなになった。尚、すべての場合で正常の左半球での中大脳動脈の太さは0.28mmであった。

A(KS3532):0.14 mm
B(KS3532):0.14 mm
C(KS3532):0.22 mm

この結果と図7の画像を比べてみると、血流が最も太く観察されたCの場合に脳梗塞症状が最も軽いものであった。よって不完全閉塞の場合でも、MR Angiographyによって脳梗塞症状の軽重を予想することができる。

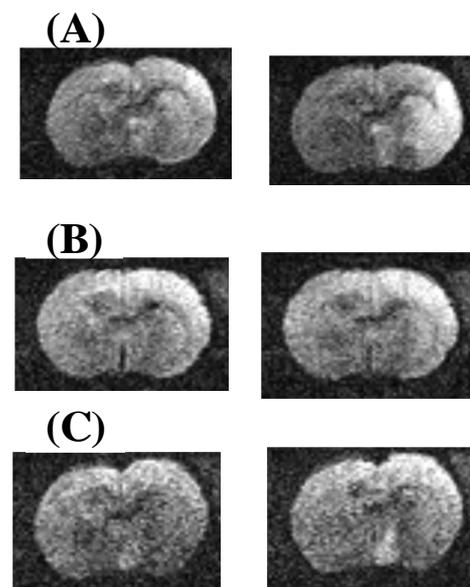


図7 2時間不完全閉塞例のDiffusion画像
時間経過 A:KS3532, B:KS3537,
C:KS3539 各々左が2時間閉塞後（再開通直前）、右が再開通1時間後

D. 考察

急性期脳梗塞の動物モデルとしてラット中大脳動脈をナイロン糸で塞栓する小泉モデルは広く使用されてきた。閉塞する時間と抜糸による血流開通の有無の条件設定によって、軽度から重篤にわたる様々な程度の脳梗塞モデルが作製できる。しかし、条件を一つに固定してもある程度の症状の軽重の幅があることは避けられなかった。また、症状の軽重に違いが生じる原因が、個体毎の虚血に対する抵抗性の違いであるのか、閉塞状態の違いによるものかは不明であった。また、このように症状の軽重に幅があると、様々な評価実験において有意差を得るためには、多数のラットを1群に使用する必要がある。そこで、同じ手技を施した動物でも、症状の軽重で分類できれば、実験の精度は高まり、用いる動物の数も少なくすることが可能である。

本研究のMRI観察によって明らかになったことは、

(1) 糸が深く入りすぎて前大脳動脈閉塞になる場合や、血管穿刺による脳出血など、頻度は高くないにしても正常ではない脳梗塞モデルとなった例の混入を避けられる。これは術者が中大脳動脈閉塞の技術に熟達しようとも避け得ない混入である。10匹に1匹程度としてもその混入を避けられることは精度の高い実験を行う上で大変有意義である。

(2) 中大脳動脈が成功裏に塞栓された例においても、血管が完全に塞栓された場合と部分閉塞に留まる場合があることが判明した。ラット中大脳動脈塞栓は4-0あるいはより太い3-0のナイロン糸で実施される。今回は太い方の3-0糸であっても、部分閉塞になる例がほぼ半分の例であったことが判明した。

閉塞が完全か不完全かによって脳梗塞症状の進行度合いと予後(24時間後の生死)が大きく異なっていた。従来は中大脳動脈閉塞の一群として扱ってきた完全閉塞と部分閉塞を、各々異なる群として分類することでさらに高精度の脳梗塞モデルを用いた実験が可能になると考えられる。

(3) 今回の2時間以上中大脳動脈完全閉塞となったラットは全例が再開通後24時間以内に死亡している。この事実はこれまでの小泉モデル脳梗塞ラットの報告と異なる。(3時間閉塞以下の再開通モデルではほとんど死亡例は出現しないとの報告)これは、今回の実験において閉塞開始から再開通後3時間まで連続に麻酔下に置いたことが原因と考えられる。通常の小泉モデルでは、閉塞手術完了後はすぐに覚醒させて症状(手足麻痺や、旋回歩行など)によってモデル作製の成否を確認し、再開通のための抜糸の直前に再麻酔を施す。本実験では、MRI画像による症状進行の過程を観察したために麻酔継続が必須であった。閉塞と再開通の2回の手術以外の時は小泉法では覚醒を維持することが、今回の実験と大きく異なっている。この閉塞時間の予後への影響の違いを踏まえた上で、小泉モデル作製の後に、MRI Angiography像でモデル作製の成否と完全・部分閉塞を診断することは大きな意義があると確信する。また、MRI測定を行うには、本実験のように麻酔を継続する場合と閉塞後にMRI撮像を行ってから覚醒させる場合が考えられる。後者の場合では、MRI測定のための準備と撮像に20分ほどの麻酔時間が余分に必要となるのみであるので、従来の小泉法と余り変化の無い条件(閉塞時間が症状と予後に及ぼす影響において)での検討が可能となる。

E. 結論

経頭蓋超音波血栓溶解促進療法で超音波照射の安全性評価を行うために、ラットを用いた中大脳動脈閉塞の小泉モデルは大変有用な実験方法である。従来は、ナイロン糸による中大脳動脈閉塞閉塞の成否は歩行障害の程度等の症状での判断のみによっていた。9.4T MRI装置を用いた撮像は、従来に混入することが避けられなかった、前大脳動脈閉塞や挿入系血管穿刺による脳出血を除外できるのみならず、従来はモデル作製成功の一群とした例も血管の完全と不完全閉塞に分類できることが示された。

以上より、中大脳動脈閉塞ラットモデルの実験には、高磁場MRIによる観察が極めて有用であることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞t-PA治療における出血リスクの定量的評価」第9回日本分子イメージング学会・学術総会 2014年5月大阪
- 2) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞再開通後のMRI造影剤を用いた血管透過性評価」第30回日本DDS学会 2014年7月東京
- 3) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞の診断・治療に向けたDDS製剤の開発」日本薬学会第135年会 2015年3月神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし