

氏名	大枝基樹
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1106号
学位授与の日付	平成28年3月10日
学位論文題名	小動物での頸動脈狭窄モデルの作成および組織学的評価
指導教授	廣瀬雄一
論文審査委員	主査 教授 高木 靖 副査 教授 松浦 晃 洋 教授 外山 宏

論文内容の要旨

【緒言】

近年本邦では頸部内頸動脈狭窄症が原因となる脳梗塞患者が増加傾向である。頸部内頸動脈狭窄症の本態は粥状硬化性プラーク(atheromatous plaque)からの塞栓性梗塞、または高度狭窄による血行力学的な脳血流の減少によるものである。抗血小板剤や高脂血症剤などの薬物治療、内頸動脈内膜剥離術や経皮的頸動脈ステント留置術などの手術が主な治療法となるが、疾患モデル動物を用いて治療効果判定や血管内治療の新たなデバイスの評価を行うことは重要である。

【目的】

従来、小動物ではバルーンによる血管内皮損傷から狭窄を誘発するモデルが一般的であったが、安定して狭窄を作れないことや、狭窄に至るメカニズムが動脈硬化とは異なることが問題である。大動物ではブタの頸動脈の部分結紮による狭窄作成後高脂肪食を与えることにより組織学的に動脈硬化性プラークに類似した内膜肥厚ができることが報告されている。しかし、大動物ではコスト等の面で汎用し難い。したがって、同方法に準じて動脈硬化に近い頸動脈狭窄モデルを小動物で安定して作成することを今回の研究の目的とした。

【対象と方法】

実験動物として体重250g~300gの雄性ウィスターラットを用いた。合計24頭のウィスターラットを以下の6群に振り分けた。24頭を一側頸動脈の部分結紮後高脂肪食投与群と普通食投与群、各12頭に分け、それぞれの群で2週、4週、8週後に各4頭ずつ頸動脈を採取した。頸動脈狭窄作成方法はラット総頸動脈を露出し、径0.3mmのワイヤーを総頸動脈に沿わせ6-0ナイロン糸で結紮後、ワイヤーを引き抜く方法を用いた。これにより、ワイヤーの径に応じた残存腔を有する狭窄を作成、その後普通食又は高脂肪食を与えて内膜肥厚の発生について比較した。採取した標本はhematoxylin-eosin(HE)法、Elastica van Gieson stain(EV染色)に加え、Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)、VEGFの受容体であるFlt-1、マクロファージのマーカーであるCD68、 α -actinの免疫染色を行った。また、頸動脈採取時に血清コレステロール値の測定を行った。狭窄部前後の血行力学的変化を判

定するためにComputational Fluid Dynamics(CFD)解析をヒト内頸動脈狭窄モデルを用いて行った。

【結果】

明らかな内皮細胞増殖がみられたのは高脂肪食群の8週間後のラット3頭と、普通食群8週間後のラット1頭であった。これらの内皮細胞増殖はほぼ全周性にみられ、ヒトの動脈硬化性病変に形態的に類似していた。これらの内皮細胞増殖の最表層にVEGF陽性細胞、CD68陽性細胞がみられた。しかし、VEGF受容体であるFlt-1陽性細胞はいずれも認めなかった。また、高脂肪食投与による影響は血清コレステロール値の上昇が4週間までは普通食群と同等で8週間から高値傾向になることが分かった。CFD解析では、狭窄部近位部の壁面せん断応力(Wall Shear Stress: WSS)の低下と圧刺激の上昇が認められた。

【考察】

今回の結果から、手術的狭窄を総頸動脈に加えることで、内皮損傷モデルではなく血行力学的に血流のよどみを狭窄近位でうむことにより、血管内皮にマクロファージ遊走を惹起し、内皮細胞の肥厚がみられたとCFD解析から考えられた。また、高脂肪食投与はより内皮細胞増殖に寄与すると考えられた。しかし、2週間、4週間では内皮細胞増殖がごく軽度であり、狭窄モデル作成には最低でも8週間の飼育が必要であると考えられる。

【結語】

手術的な狭窄の作成に加えて高脂肪食を与えることで、小動物においても動脈硬化に類似した内膜肥厚を8週間以上の飼育で誘発できることが判明した。今回のモデルは、手技的に容易に作成でき汎用性が高いと考えられるが、内膜肥厚の程度を高める工夫、及び長期的な変化の観察が今後必要と考えられる。

論文審査結果の要旨

実験モデルの妥当性を考える上で、動物の個体差によって血管経がばらつく可能性が指摘されたが、これに対し使用したWister Ratの週齢を均一にすることで個体差を最小限にする努力を行ったことが述べられた。組織学的検討は狭窄作成近辺のみならず、複数の箇所を解析するとよいのではないかと指摘に対しては、まず実験操作の直接的な影響が及ぶ箇所の解析を中心に行う必要があることが述べられたが、将来の検討課題であろうとの議論がなされた。実臨床に合わせるために血管分岐部で実験的狭窄が作成できないかが議論されたが、ラットの血管解剖の問題などから現実験モデルが適当であるとの結論を得た。免疫組織化学でVEGF陽性細胞の由来は単球と考えられたが、病態解明の上で重要な検討課題であり、抗体を変えて解析を加えることも有用ではないかと議論された。また、CFDによる血流解析がヒトのデータであることと、ラットでの実験系の関連性に問題がないかについて討議されたが、血管径の小さいラットでは技術的な限界によりCFD解析が行えないことが述べられ、データの関連性については結果の解釈の上で特に支障のあるものではないとされた。本モデルでは、直接的な血管内皮障害を起こさずに内膜肥厚を惹起しており、短時間の高カロリー食負荷で実験的に血管狭窄病変が作成できることは重要であろうと指摘された。以上より、本論文は頸部内頸動脈狭窄症の新しいモデル作成に関する研究であり、学位論文に値すると評価された。