

1) Original Article

2) Transient middle cerebral artery occlusion model in the *Macaca fuscata* using a novel intravascular technique

3) ^{1, 2, 3}Okuma Yu, M.D., ³Liu Keyue, M.D., ²Hishikawa Tomohito, M.D., ¹Hirotsune Nobuyuki, M.D., ²

Sugiu Kenji, M.D., ¹Nishino Shigeki, M.D., ³Nishibori Masahiro, M.D., and ²Date Isao, M.D.

4) ①Department of Neurological Surgery, Hiroshima City Hiroshima Citizens Hospital, Hiroshima, Japan.

②Department of Neurological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan.

③Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan.

5) Corresponding author: Yu Okuma, MD, Ph.D.

Department of Neurological Surgery, Hiroshima City Hiroshima Citizens Hospital, Hiroshima, Japan

7-33 Moto-machi, Naka-ku, Hiroshima, Hiroshima, Japan 730-8518

Tel., E-mail: y8u2bear4@hotmail.com

6) middle cerebral artery occlusion model, *Macaca fuscata*, Bovine arch, Azygos anterior cerebral artery

7) All authors pledge that this manuscript does not contain previously published material and is not under
consideration for publication elsewhere.

【和文要旨】

【目的】これまでサルを用いての一過性脳梗塞モデルは、侵襲性が高い上、脳梗塞領域を一定化するのが困難であった。そこで、今回我々はヒトにおける脳神経血管内治療のテクニックの応用を試みた。【方法】ニホンザルを用い、全身麻酔下に右大腿動脈に5Frシースを留置、5FrカテーテルをBovine archを經由し右Internal Carotid Artery(ICA)に、同軸上に4FrカテーテルをPosterior Communicating Artery (Pcom A)分岐部以遠に留置し、triple co-axialに、遠位塞栓防止用に従来用いるballoon付カテーテルを中大脳動脈M1起始部に誘導した。ヘパリン化にて血栓予防した上で、balloonにて2時間閉塞した上で、解除した後、48時間後に神経学的評価と組織評価を行った。【結果】術後左片麻痺を認めると共に、閉塞血管領域のborder zoneにあたる尾状核頭部周辺に脳虚血病巣が生じていることが病理組織学的に確認された。【結論】血管内アプローチを用いた一過性脳梗塞モデルは、今後低侵襲でかつ、再現性の高いモデルとなりうる。

【緒言】

虚血性脳損傷の研究において、より人間に近い霊長類であるサルで一過性脳梗塞モデルを作成する際、従来は transorbital Middle Cerebral Artery occlusion (MCAo) model や transient global ischemic model といったモデルが使用されてきた。これらは、侵襲性が高い上、閉塞後再開通をさせても、血栓形成に伴う副次的な梗塞が生じ、脳梗塞領域の一定化が困難とされてきた。そこで、本稿では我々は血管内アプローチで遠位塞栓防止用 balloon 付カテーテルを用い、より低侵襲に transient MCAo model をサルで作成できる方法について、サル特有の解剖学的特徴も交えて報告する。

【対象と方法】

本実験は、当施設の動物実験委員会のガイドラインに従って施行された。プロトコールは動物実験倫理委員会によって承認された。

(# OKU- 2011166)

1、体重 5-7kg のオスのニホンザルを用いた。この際、これ以上に小型だと、下記鼠径部の穿刺に苦慮する。

2、ケタラール 10mg/kg を im 投与し、睡眠導入する。その後、アトロピン 0.2mg/kg/iv、ペンタゾジン 1mg/kg/iv 投与し、サルを手術台に仰臥位で固定し、酸素 49%、笑気 50%、イソフルレン 1%にて、吸入麻酔で維持し、手術を行う。

3、右鼠径部の剃毛後、2cm の皮膚切開を加え、大腿動脈を露出させた後、大腿動脈へカニューレションし、ヒト血管造影用の 5F

シースを挿入する。

4、移動型外科用 digital subtraction angiography (DSA) 装置 ; BV-29 を用いて、腹部大動脈から大動脈弓を経由し、サル特有の Bovine arch (Figure 1) から分岐する右 ICA へ 5Fr Envoy (Codman, Raynham, MA, USA) (Figure 2) を、カテーテルの安定性を高めるために同軸上に 4Fr Optiflash (Terumo, Tokyo, Japan) を、Pcom A 分岐部より遠位部 (Figure 3) に留置する。

5、同部より冠動脈用 Percusurge (Medtronic, Minneapolis, MN, USA) を、MCA M1 まで進めた上で、バルーンを 3mm に拡張し、2 時間遮断する。遮断中、ヘパリンにより Activated Clotting Time を 250 秒以上に延長させ、血栓形成の予防を行う。

6、血流再開の時間がきたら、バルーンを収縮させ、血流の再開を確認する。カテーテルを抜去し、用手圧迫した上で皮膚を縫合し、体温 (37°C) を保って覚醒させる。

7、再灌流後 48 時間後、ペントバルビタール 100mg/kg の静注で安楽死させ、脳を取り出し、病理組織学的評価を行う。

【結果】

術後、十分な覚醒が得られ、安楽死させるまでは神経学的所見として左片麻痺を確認できた。

剖検において、血管評価では、大動脈弓部に Bovine arch (Figure 1) を認めた。また、前方循環 (ICA-MCA-Anterior Cerebral Artery (ACA)) に比し、後方循環 (Vertebral Artery (VA)-Basilar artery (BA)-Posterior Cerebral Artery (PCA)-Pcom A) の血管

の発達が目立ち、ACAはAzygos ACAの形態をとっていた (Figure 4)。脳の組織学的評価としては、マクロでは head of the caudate nucleus に梗塞所見 (Figure 5) を認めた。ミクロでの組織を評価すると右 MCA の支配領域の脳組織では pyknotic cell を認め (Figure 6)、transient MCAo に伴う脳梗塞が出来たと考えた。

【考察】

虚血性脳損傷は、世界中の死亡および障害の主要な原因であり、そのメカニズム解明並びに効果的な治療法開発については、現在も多くの研究がなされている (1, 2)。

動物実験では、多くがげっ歯類を用いているが、げっ歯類で素晴らしい結果を得られた薬剤が、ヒトにおける臨床試験においては有意な効果を得られなかったという例が多くを占める。そこで近年、よりヒトに近いとされる霊長類であるサルを用いての動物実験での結果が重要視されるようになってきた (3, 4)。

サルにおいて、従来の一過性脳梗塞モデルである transorbital MCAo model や transient global ischemic model はその手技上、侵襲性が高い。また、ヘパリン化が難しく永続的な閉塞となりやすい (5, 6)。更に、近年出てきた、開頭動脈瘤クリッピング術と同様の手順で M1 を遮断する、transsylvian MCAo model であっても、大気と脳が触れる環境という、本来の脳梗塞では考えにくい状態を呈している。一過性で再現性の高い MCAo model 作成には、高い水準の技術が必要であった (7)。

そこで、今回ヒトでの脳神経血管内治療のテクニックを応用し、

低侵襲で容易かつ簡便に、再現性の高いモデル作成を試みた。今回のモデル作成において、血管解剖の理解は不可欠であり、サルとヒトとの違いをよく理解しておかなければならない。まず、腕頭動脈と左総頸動脈が共通幹をなす Bovine arch となっていることを理解する必要がある。ヒトでの場合ではあるが、このパターンの血管分岐において、大腿動脈経路で左総頸動脈にアプローチすることは困難な場合がしばしばあり、頸動脈ステント留置時に合併症が多いことが報告されていることから (8)、今回は右側での transient MCAo model 作成とした。ヒトと比べると、前方循環 (ICA-MCA-ACA) に比し、後方循環 (VA-BA-PCA-Pcom A) の血管の発達が目立ち、また、ACA は Azygos ACA の形態をとる。そのため、ACA へは比較的カテーテルが迷入しにくい一方、Pcom A への迷入は注意が必要である。そこで、ガイディングカテーテルを Pcom A 分岐部以遠まで誘導することで、Percusurge の迷入を防いだ (6, 9)。

サルの一過性 MCAo モデルでは、deep border zone に該当する head of the caudate nucleus 周辺で比較的明確な梗塞所見を認めやすい (5, 13)。また、組織学的に pyknosis 変化は、脳梗塞を示唆する所見に合致する (10)。

今回我々は Percusurge を用いたが、Percusurge は low profile である上、操作性も比較的良好く、サイズ調整も容易であり、長時間にわたっても、比較的確実な閉塞が得られることから、脳神経血管内治療において、頸動脈ステント留置術でのバルーン型 Embolic Protection Device として用いられる。これまでも、

サルでの一過性脳梗塞モデルに対してヒトでの脳神経血管内治療のテクニックを応用する報告はいくつかあり、マイクロカテを wedge させる報告や、コイルを使用する報告を認める。しかしながら、サイズ調整が容易な上、長時間の確実な閉塞や、しっかりした再開通を考えた場合、Percusurge を用いるとともに、閉塞中しっかりとしたヘパリン化を行い、副次的な血栓形成を予防することが肝要と考える(11, 12, 14, 15)。

今回は、3mm でも安全かつ確実に閉塞可能とされる冠動脈用の Percusurge を用いたが、こちらの製品は現在販売中止となっており、今後は頸動脈用の Percusurge Guardwire Plus を使う必要がある。ただし、こちらは添付文書上 5mm 以上が推奨であり、小径でも大丈夫とされるが、可否を何度か試す必要があると考えられる(11, 12)。

サルを用いる実験の費用、規模、煩雑さもあり、神経学的所見や梗塞領域等を、統計学的に解析できるまでの数は作成できていない。そのため、サルの一過性脳梗塞モデルにおける虚血部位の個体差については、作成経験をさらに重ねながら解析していく必要がある。今後、上記を解析するとともに、神経保護効果があると考えられる薬剤投与など、虚血性脳損傷の治療法の開発に着手したい。

【結語】

血管内アプローチの上、遠位塞栓防止用 balloon 付カテーテルを用い、長時間一定かつ血管に傷害を与えない程度の閉塞圧で作成

しえた transient MCAo model は、今後低侵襲で再現性の高い model となる可能性を秘めており、作成経験をさらに重ねたい。

【利益相反開示】

無し。

【文献】

- 1, Liu K, Mori S, Takahashi HK, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. FASEB J 2007; 21: 3904-16.
- 2, Zhang J, Takahashi HK, Liu K, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. Stroke 2011; 42: 1420-8.
- 3, Cook DJ, Teves L, Tymianski M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. Nature 2012; 483: 213-7.
- 4, Courtine G1, Bunge MB, Fawcett JW, et al. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? Nat Med 2007; 13: 561-6.
- 5, Crowell RM, Olsson Y, Klatzo I, et al. Temporary occlusion of the middle cerebral artery in the monkey: clinical and pathological observations. Stroke 1970; 1: 439-48.

- 6, Hara K, Yasuhara T, Maki M, et al. Anomaly in aortic arch alters pathological outcome of transient global ischemia in Rhesus macaques. *Brain Res* 2009; 1286: 185-91.
- 7, Sasaki M, Honmou O, Radtke C, et al. Development of a middlecerebralarteryocclusionmodel in the nonhumanprimate and a safetystudy of i.v. infusion of humanmesenchymalstemcells. *PLoS One* 2011; 6: e26577.
- 8, Faggioli GL, Ferri M, Freyrie A, et al. Aortic arch anomalies are associated with increased risk of neurological events in carotid stent procedures. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33: 436-41.
- 9, Kapoor K1, Kak VK, Singh B. Morphology and comparative anatomy of circulus arteriosus cerebri in mammals. *Anat Histol Embryol* 2003; 32: 347-55.
- 10, Garcia JH, Liu KF, Ho KL. Neuronal Necrosis After Middle Cerebral Artery Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex. *Stroke* 1995; 26: 636-42.
- 11, Percusurge Occlusion Balloon Catheter [package insert]. Medtronic, Minneapolis, MN, USA; 2010.
- 12, Guardwire Protection System [package insert]. Medtronic, Minneapolis, MN, USA; 2010.
- 13, Gao H, Liu Y, Lu S, et al. A Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion Model Using Intraluminal Balloon Technique

in Monkeys. J Stroke Cerebrovasc Dis 2006; 15: 202-8.

14, de Crespigny AJ, D'Arceuil HE, Maynard KI, et al. Acute studies of a new primate model of reversible middle cerebral artery occlusion. J Stroke Cerebrovasc Dis 2005; 14: 80-7.

15, Zhao B, Shang G, Chen J, et al. A more consistent intraluminal rhesus monkey model of ischemic stroke. Neural Regen Res. 2014 ; 9: 2087-94.

【 図表の説明 】

Figure 1

剖検での摘出した Aortic arch。Bovine arch を認める。

Figure 2

ICA, External Carotid Artery 分岐部の血管撮影像。

Figure 3

Percusurge (PS) を triple co-axial に誘導している様子。5 Fr カテーテル、4 Fr カテーテルの先端は矢印が示す通り。

Figure 4

剖検脳の血管。後方循環の血管径が相対的に太い。また、ACA が Azygos ACA の形態となっている。

Figure 5

剖検脳の肉眼的断面。右大脳半球皮質の淡い虚血性変化と、head of the caudate nucleus (黄色矢印) の強い虚血性変化を認める。

Figure 6

剖検脳の組織像。gliosis と、pyknotic cell を認める。scale bars = 10 μ m。

Fig.1

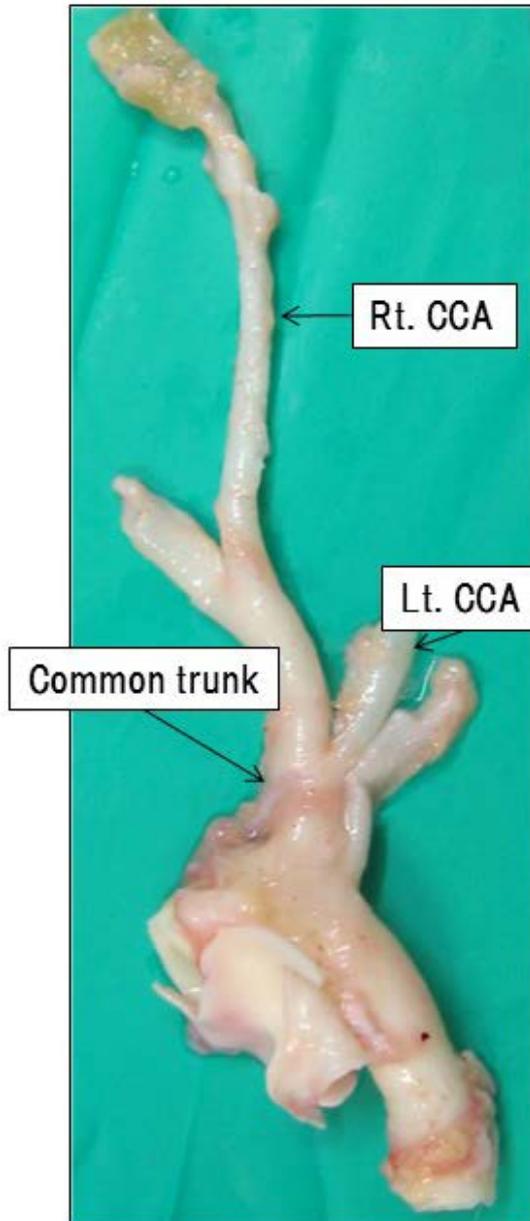


Fig.2

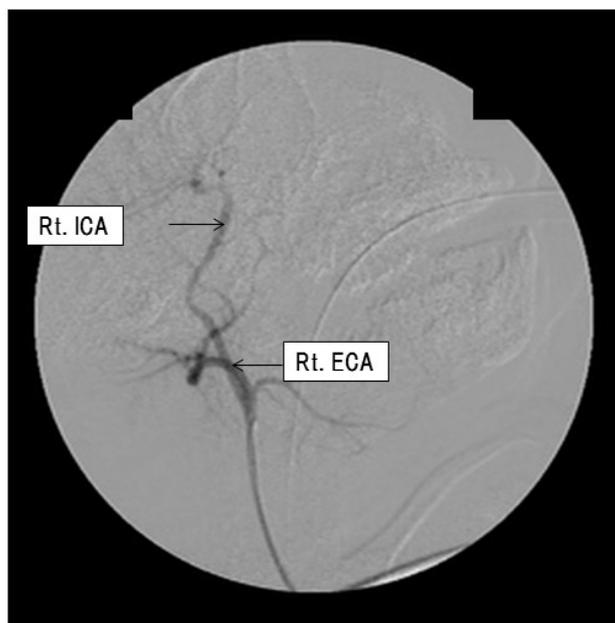


Fig.3

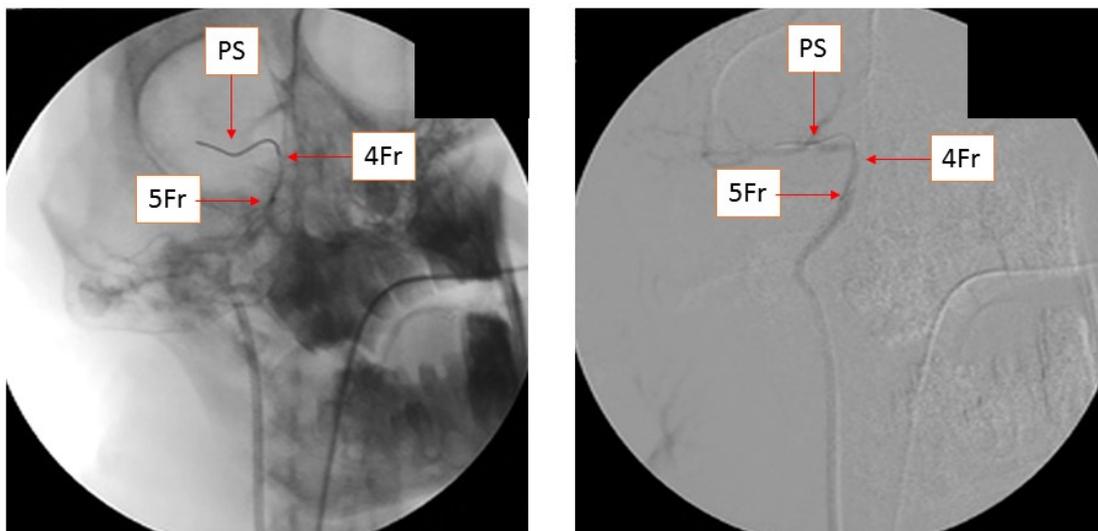


Fig.4

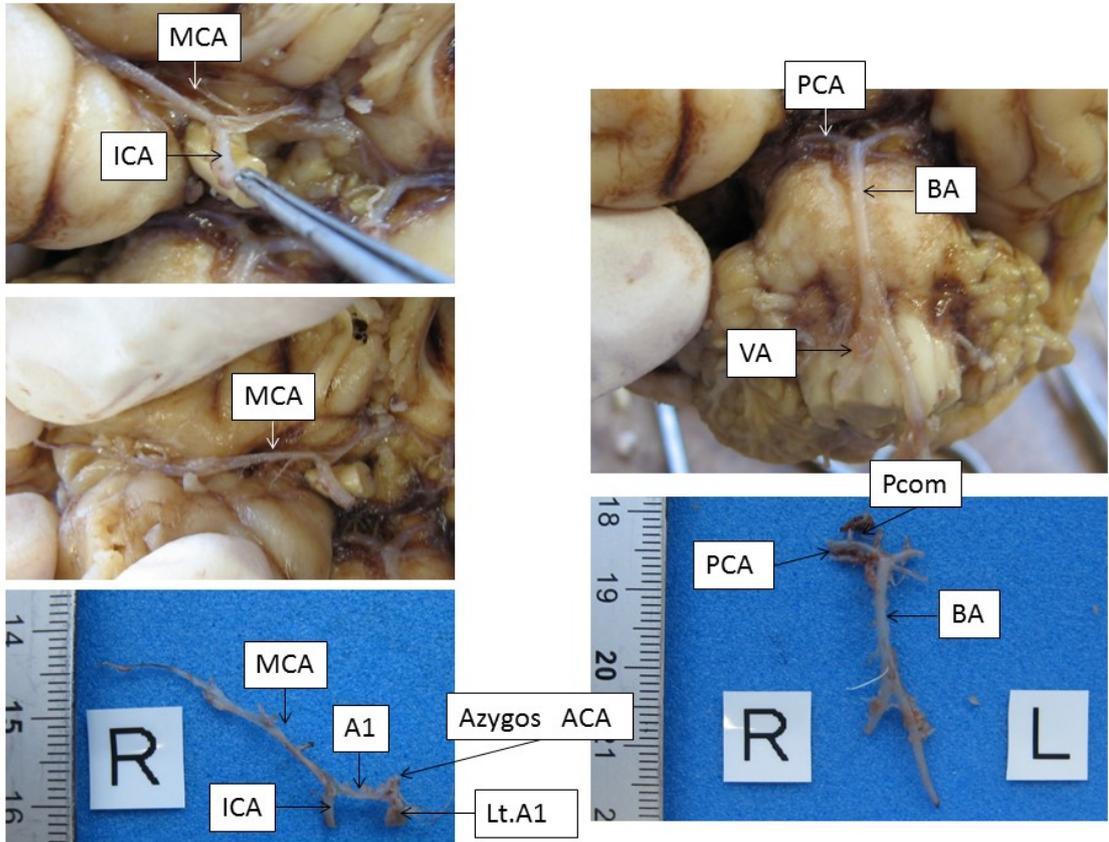


Fig.5

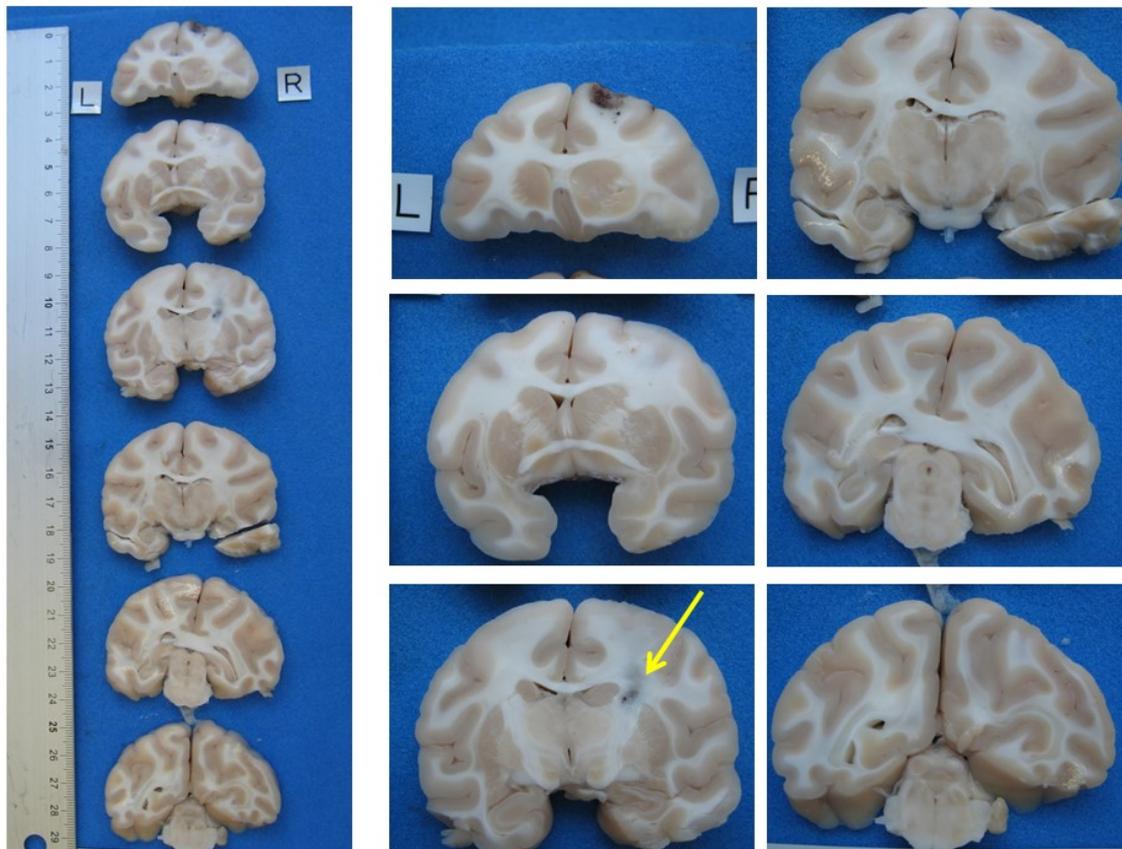


Fig.6

