課　題　名「微小血管造影による脳虚血後の新生血管とＶＥＧＦの効果の観察」
所属、氏名　川崎医科大学　救急医学　宮崎修平（0015524）　大学院１年
課 題 番 号　2005A0571-NL3-np　　利用ビームライン　BL28B2

【目的・背景】

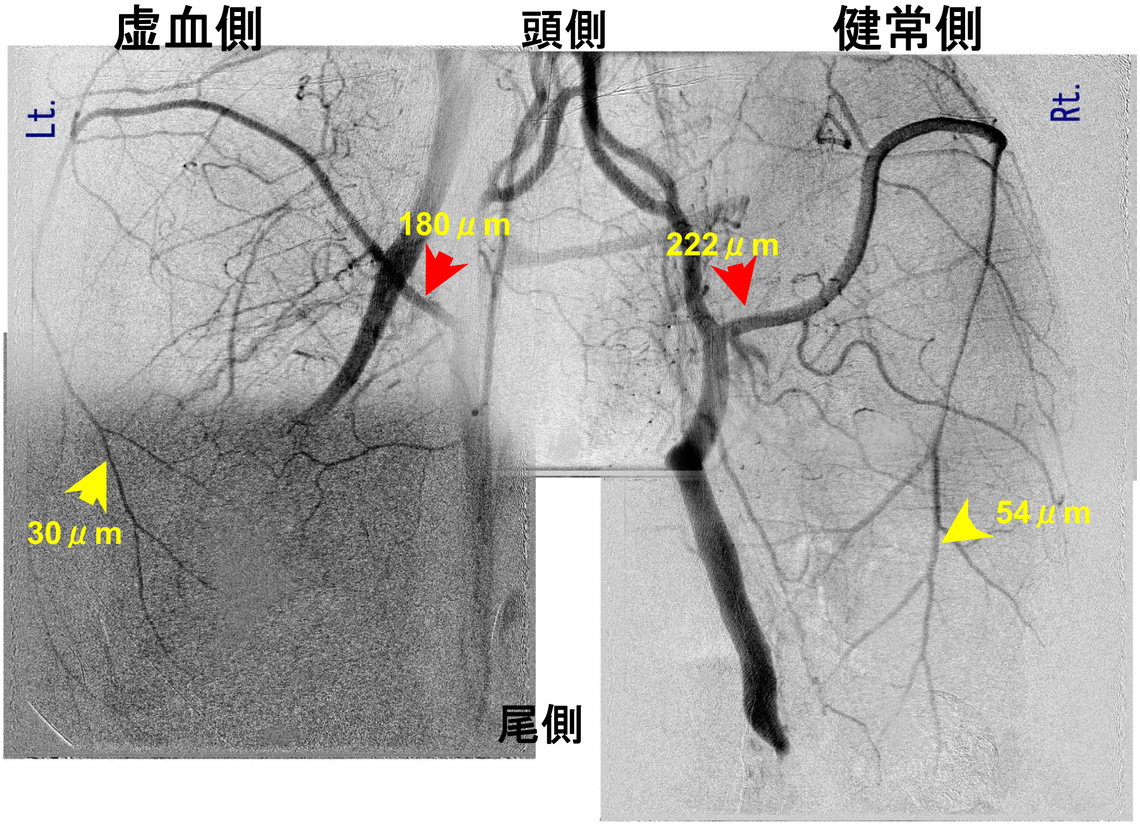
脳虚血によって引き起こされる血管の損傷および血管新生は、急性期から亜急性期、慢性期にかけて経時的に進行する。
虚血後の神経細胞損傷と神経再生はこれらの血管損傷および血管新生により引き起こされており、虚血後脳血管の経時的変化をとらえることは急性期脳梗塞の治療や神経再生医療に大きな意義を持つと考える。
これまでも血管損傷および血管新生のメカニズムについては組織学的検索や免疫染色等、数々の研究にて解明されつつあるが、生体下で実際の血管観察を行った報告は少ない。
また、血管反応を生体下で直接観察する手段として Laser scanning confocal microscopy (LSCM)等により、新生血管を可視化する方法等がある。しかし従来の方法では表在する血管しか観察できなかった。
我々は今までラット脳塞栓モデルを用いて虚血後の血管変化について Spring-8 放射光を用いて観察し、生体下における主幹動脈および 20μm までの微小血管においての、虚血後の血管変化について報告してきた。
このモデルを用い、虚血後新生血管の発生を可視化する事を目的とし SPring-8 放射光を用い、微小血管造影を行い、ＶＥＧＦの免疫染色をあわせて評価を行った。

【方法】

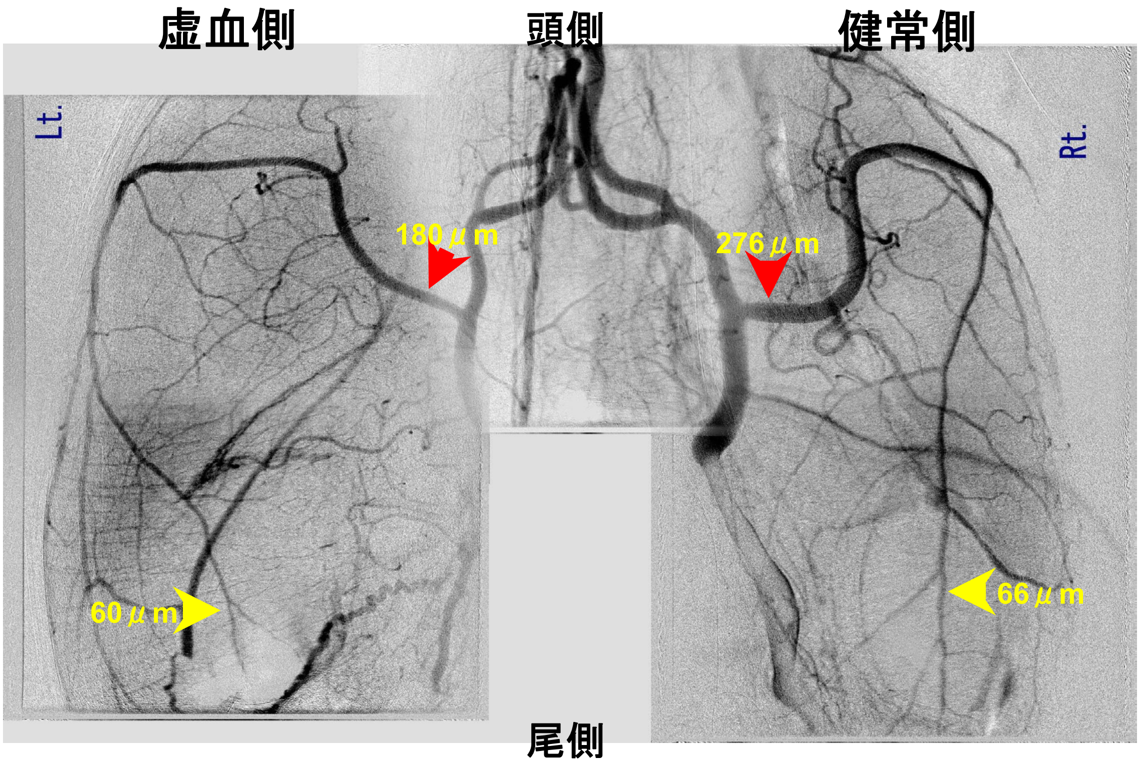
一過性脳虚血モデル；雄の WISTAR ラット（250~300g）にて、ハロタンによる全身麻酔下にて頚部正中切開を加え、左総頚動脈を露出、結紮。次いで外頚動脈を結紮した後、内頚動脈分岐部より４－０モノフィラメントナイロン糸を１２．６mm 挿入し留置した。１２０分後にナイロン糸を抜去し、創を閉鎖、虚血モデルを作成した。
虚血の確認は、接触型超音波ドップラー血流計を用い血流の低下を確認した。
再還流後３日・９日後に Spring-8 にて、ペントバルビタールで全身麻酔後、頚部正中切開から気管切開を加え人工呼吸管理下に右外頚動脈を結紮した後、右総頚動脈より造影用カテーテルを留置。左大腿動脈よりＡ－ｌｉｎｅを留置し持続的に血圧管理を行いながら、右総頚動脈に留置したカテーテルより非ヨード系造影剤を用い左右の脳血管造影を行った。
微小血管造影の条件として、単色Ｘ線に対して被写体、画像検出器の順で配置した実験系を用いる。放射光をシリコン〈111〉面の一結晶分光器で単色化し、ヨウ素造影剤に対応した 33.2KeV のＸ線を作り出し、スリットで 7mm 角のビーム断面サイズに設定する。検出器であるＸ線サチコンカメラの視野をズーミングモードで 7mm 角とすると、I 画素のサイズは 1024×1024 画素モードで 7μm となる。これにより内径 20μm 以下の血管の画像化

を行った。
撮影後、画像のサブトラクション処理を行い、健常側および患側の中大脳動脈分岐部および軟膜動脈について血管径を測定し、同一個体にて左右の血管径を比較した。
また、造影後ラットを素早く断頭した後、脳を取り出しホルマリンにて固定、パラフィン包埋し切片を作成。ＨＥ染色およびＶＥＧＦの免疫染色を行い、組織学的な考察を加えた。

【結果】
再還流後 3 日では患側脳血管が健常側に比べ健側の中大脳動脈、軟膜動脈に比し患側はともに細い状態であった。9 日後では軟膜動脈には大きな差は認められなかったが、中大脳動脈では患側が健常側に比し細くなっていることが確認された。また、9 日後では健側に比べ静脈相が早期に観察された。(Fig1,Fig2)（表１）
また、２０μｍ までの血管径は十分に計測し得たが、毛細血管または新生血管についてはは観察不可能であった。



（Fig1）虚血３日後の脳微小血管造影
中大脳動脈および軟膜動脈の両部位にて明らかな左右差を認めた。



（Fig2）虚血９日後脳微小血管造影
軟膜動脈では明らかな左右差は認められなかったが、中大脳動脈では虚血側に狭窄が認められた。

	３日目	９日目
健常側中大脳動脈	222μm	276μm
虚血側中大脳動脈	180μm	180μm
健常側軟膜動脈	54μm	66μm
虚血側軟膜動脈	30μm	60μm

（表１）

摘出した脳組織をＨＥ染色にて脳梗塞の部位を確認した後、ＶＥＧＦ免疫染色を行った。
組織学的には、虚血後３日目ではアストロサイトの膨化を認め９日後では神経細胞の脱落を認めた。
また、ＶＥＧＦ免疫染色にて梗塞周囲にＶＥＧＦの増加を認めており、３日目に強く９日後まで認められた。（Fig3）

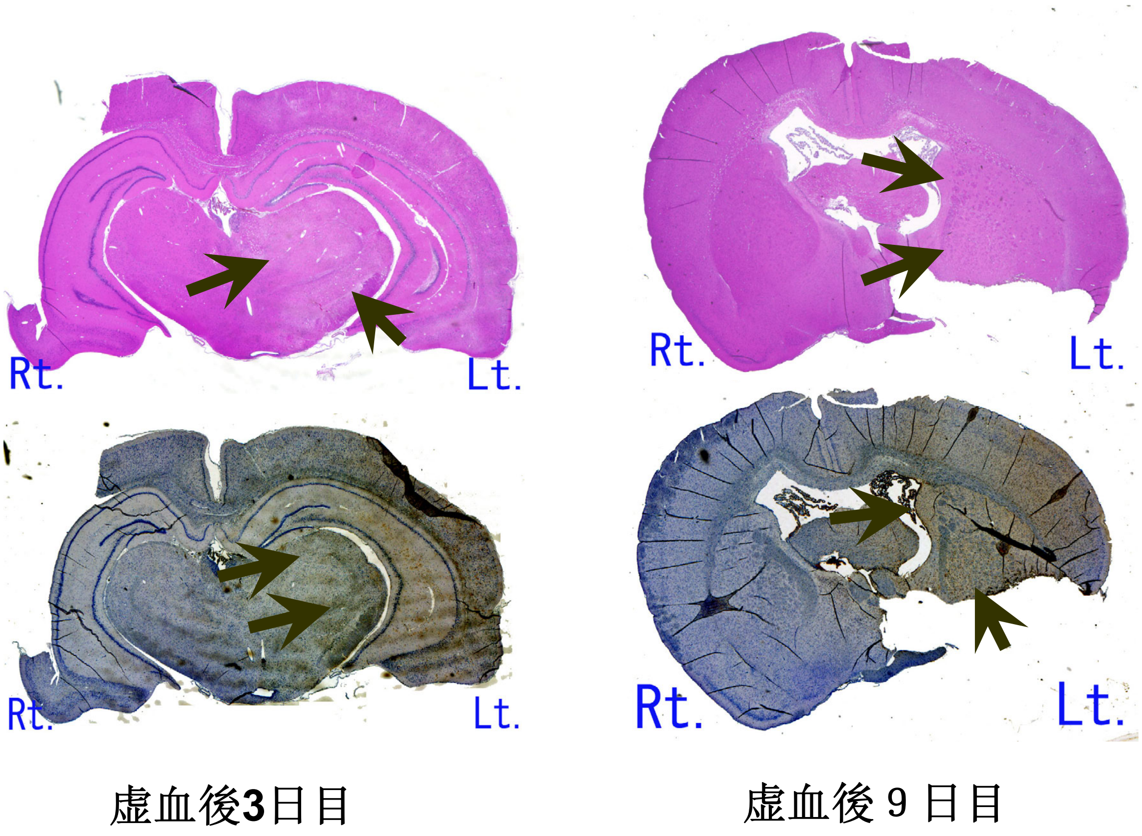


Fig3　上段ＨＥ染色、下段ＶＥＧＦ免疫染色
梗塞の範囲（矢印）の位置に一致してＶＥＧＦの増加を認める。

【考察】

虚血再還流後の脳血管の形態学的変化を経時的に観察した。亜急性期には脳浮腫や free radical の著しい増加 等の影響により健側に比べ患側の主幹動脈および軟膜動脈の狭小化が急性期に引き続き残存しており、従来提唱されている脳虚血後に引き続き起こる no reflow phenomenon もしくは delayed neuronal death の裏付けになりうる血管変化が観察されたと考える。また１０日後では虚血後慢性期の artherosclerosis や血管の apotosis による脳循環の変化が起こっており、それにより血流維持のため、末梢微小循環が代償的に開く事が考えられる。

これらの結果より、この実験形により脳虚血再還流後慢性期における生体での血管の反応性を観察することが出来、今後脳保護薬、血栓溶解療法後の血管反応性を観察し臨床に還元できると考える。