

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16404

研究課題名（和文）新規重症下肢虚血モデル確立とMRスペクトロスコピーによる診断及び災害医療への応用

研究課題名（英文）Establishment of novel critical limb ischemia model and application of MR spectroscopy to disaster medical diagnosis

研究代表者

太田 裕貴 (Ohta, Hiroki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70408376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では小動物用血管造影法を開発し、低侵襲で再現性の高い下肢虚血モデルを確立した。さらに脳梗塞や腎不全などの疾患モデルにも適用可能であることを示した。さらに透視下で視認可能なマイクロファイバーの開発により、血流遮断の精度も向上させた。MRスペクトロスコピー法（MRS）を用いた非侵襲的診断法では、コンパートメント症候群の経時的変化を関連代謝パラメーターを用いて詳細に解析した。MRSを組織代謝活性の評価に応用することで、コンパートメント症候群の早期診断と適切な治療計画の策定が可能となる。本研究成果は、MRSによる診断法の開発が災害医療において重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で成功した小動物用血管造影法の開発は、低侵襲で再現性が高く、脳梗塞や腎不全などの疾患モデルにも応用できることが示された。これにより、さまざまな疾患の研究や治療法の開発に寄与する可能性がある。また、透視下で視認可能なマイクロファイバーの開発により血流遮断の精度が向上しました。この技術は動物実験の信頼性を高めるだけでなく、臨床的な応用にもつながる可能性がある。またMRスペクトロスコピー法（MRS）を用いた非侵襲的診断法により、コンパートメント症候群の経時的変化を詳細に解析でき、早期診断と適切な治療計画の策定が可能となり、災害医療の現場での診療の向上に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an angiographic method specifically for small animals and established a minimally invasive and highly reproducible model of lower limb ischemia. Furthermore, we demonstrated the applicability of this technique to disease models such as cerebral infarction and renal failure. Non-invasive diagnosis using MR spectroscopy (MRS) allowed for a detailed analysis of temporal changes in compartment syndrome, employing relevant metabolic parameters. The application of MRS in evaluating tissue metabolic activity will enable early diagnosis of compartment syndrome and the formulation of appropriate treatment plans. The results of this study highlight the importance of developing diagnostic methods using MRS in the field of disaster medicine.

研究分野：再生医学

キーワード：災害医療 コンパートメント症候群 下肢虚血 MRスペクトロスコピー 虚血再灌流障害 血管造影 低侵襲 マーモセット

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、65歳以上人口の総人口に対する割合が27.3%となり世界でも類を見ない超高齢社会を邁進している。食生活の欧米化も相まって動脈硬化に起因する血管病が増加している。頸動脈の動脈硬化の終末像が脳梗塞であり、冠動脈の動脈硬化の終末像が心筋梗塞であるのと同様、下肢動脈の動脈硬化が進行すると下肢虚血に陥り、重症下肢虚血となると5年生存率50%を下回り、胃がんや大腸がん、悪性リンパ腫など多くの癌より予後不良である。さらには下肢切断を余儀なくされる症例も散見され、患者のクオリティ・オブ・ライフが著しく損なわれるばかりでなく、家族を含めた周囲の医療支援が必要となり医療資源の浪費に繋がる。このような社会的背景もあり、血管病に対する治療は様々な低侵襲治療が開発されている一方、下肢虚血の診断法は未だ改善の余地がある。客観的診断方法としてABI (ankle brachial pressure index) /TBI (toe brachial pressure index) や tcPO<sub>2</sub> (transcutaneous partial pressure)、SPP (skin perfusion pressure)、サーモグラフィなどが用いられているがいずれも確実な診断法とは言い難く、動脈触知や痛みの訴え、色調、匂いなど主観的な診断手法に依存しているため明確な診断手法の確立は依然として困難であるのが現状である。また、血管造影や造影CTなどの画像診断は、下肢の血流は評価できるものの下肢の筋組織自体の評価は不可能である。

一方、画像診断技術の進歩に伴い、MRIは高磁場装置の開発が進み、小型実験動物においても高解像度の画像を撮像することが可能になった。さらに、MRIの特性により、画像再構築のみならず、高磁場MRI装置を使用してMRスペクトロスコピー法(MRS)が可能となり、低ノイズの情報が得られ、データの再現性が向上した。MRSとは代謝物の構造や環境により原子核の共鳴周波数が異なることを利用して、代謝物の磁気共鳴信号を周波数ごとに分類し、代謝物の種類や濃度、緩和時間などの情報を得る手法である。これにより生体の生化学的代謝を無侵襲且つリアルタイムに描出することが可能となる。

そこで、今回我々は9.4テスラMRIを用いた<sup>31</sup>P-MRSにより、ATP(アデノシン三リン酸)系の代謝動態を定量的に評価することで、下肢の骨格筋組織の虚血変化を評価する新たな診断手法を開発することを目指す。この手法により、下肢の筋組織自体の虚血性変化を画像ベースで客観的に評価する新たな診断方法を開発する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、下肢筋組織の可塑性をMRSで評価することにより、下肢虚血による筋肉組織の虚血の程度を客観的に評価し的確に診断する新しいツールを開発することである。この新規診断ツールが確立された後には、薬剤や細胞投与による治療介入を行い下肢虚血に対する治療法開発の研究に繋げる。更に、血行障害による下肢筋組織のダメージを評価できるメリットを応用し、災害医療におけるコンパートメント症候群後の再灌流障害のリスクヘッジにも展開する。

## 3. 研究の方法

まず、ラットを用いて下肢虚血モデルを作製した。一般的には鼠径部を切開し、大腿動脈を結紮する方法が用いられるが、このモデルでは直ぐに虚血が改善され、自然回復してしまうため、治療効果を検証する研究において良いモデルとは言えない。一方、下肢を長く切開し、淺大腿動脈を全長に渡り露出し、その枝を全て結紮する方法もあるが、この方法は侵襲が高く、伴走する神経や静脈も損傷させる可能性も高い。そこで、今回我々は新たな低侵襲下肢虚血モデルを作製

した。

作製した下肢虚血モデルにおいて、本学の実験動物専用のデジタルサブトラクション血管造影装置（Seamens 社、Artis Zee、ドイツ）を用いて血管造影を行い、下肢虚血の程度や側副血行路の形成を評価した。また、無侵襲に行える行動評価としてフリームービング下のラットをビデオ撮影し活動量や歩容を解析した。さらに、9.4 テスラ動物実験用 MRI 装置（Bluker 社、Biospec 9.4T、ドイツ）を使用し MR スペクトロスコピー法を用いて下肢筋組織のダメージを評価した。

さらに、下肢の虚血状態のバリエーションを考慮し、ラットで急性コンパートメント症候群（Acute Compartment Syndrome: ACS）モデルを作製した。このモデルは一過性の下肢の完全虚血及び虚血再灌流を再現したモデルで、このモデルを用いて下肢筋組織におけるエネルギー代謝のダイナミックな変化を MRS で評価する方法を開発した。本法を検証するにあたり、従来の ACS の一般的評価法である血液検査も施行した。具体的には尾動脈に留置したシースから経時的に採血を行い、pH 値を動脈血液ガス分析装置（Abbot 社、iSTAT、米国）で、CPK 値を富士ドライケムスライド（フジフィルム社、富士ドライケム 3500v、日本）で MRS 撮像と同時に測定し比較検討した。

#### 4. 研究成果



経皮的尾動脈アプローチ“Ohta method”

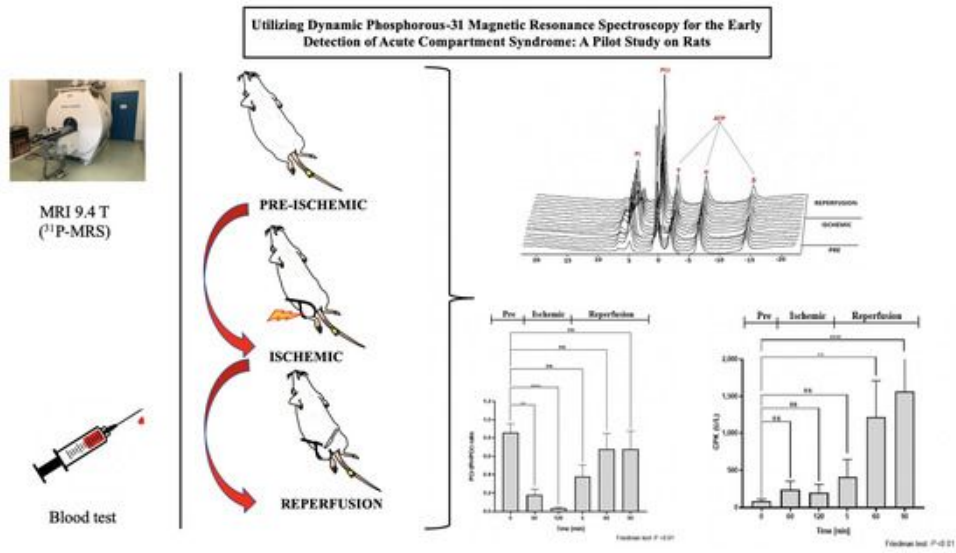
本研究では小型実験動物のラット（齧歯類）及びマーモセット（霊長類）に対し、尾動脈の穿刺のみでほぼ全身の臓器に血管内からアプローチできる低侵襲手技を “Ohta Method” として確立した。この手技は修練が必要なものの、成功率はほぼ 100% と安定した手法であり、再現性が高く確実性の高い技術として他の疾患モデルにも応用されている。我々はこの技術を用いて脳梗塞モデルや腎不全モデル作出にも成功した。さらに、本手法を活用した新たな細胞治療戦略を国際学会で発表した。このように本技術は経カテーテル的に血管造影を行えるばかりでなく、新たなドラッグデリバリーシステム（DDS）研究にも応用できることから今後、多くの展開が期待できるものとなった。この方法を用いて、本研究の疾患モデルである下肢虚血モデルの作出を行った。虚血の程度を視覚化し客観的に評価する為

に、モデル作製前後に血管造影を行った。当初は塞栓物質として汎用されているシアノアクリレート系薬剤などにより塞栓させたが、下肢血管を完全に閉塞させるため、下肢の虚血が極めて重度となり、壊死に陥る例が散見された。この結果から、重症虚血肢モデルとしては適しているが、壊死部からの感染による敗血症など、純粋に虚血を評価することは困難であることが判明した。そこで、塞栓物質及び塞栓領域を再考し、最終的に浅大腿動脈全域の血管閉塞がモデルとして最適であるという結果を得た。

また塞栓物質としては、慶応義塾大学理工学部との共同研究により X 線視認性の高い細胞封入可能なハイドロゲルファイバーを開発し特許出願した。このハイドロゲルファイバーは、放射線不透過な材料で作られているため高い X 線視認性を持つことが特長である。X 線のみでファイバーの所在を非侵襲的に正確にモニタリングできることから、前述の血管造影と併せて使用することにより、より詳細な血流情報を取得することが可能となった。行動評価においては、自由行動下のビデオ撮影により歩行状態を観察した。その結果、ケージの底面温度の違いによりラットの活動量が変化することを見出し、この変化を利用することでリハビリテーション機器に応用可能なシステムの技術開発も行ない特許申請した。

さらに、下肢虚血状態を呈する急性コンパートメント症候群（ACS）モデルは一過性の完全血流遮断と虚血再灌流の病態を再現できるモデルであり、従来の ACS モデルの弱点を克服した安定したモデルの作製に成功した。本モデルに対し 9.4 テスラ MRI を用いた MRS による下肢筋肉組織の ATP 代謝系を評価することにより、筋組織自体の可塑性を経時的に観察した。連続 31P-MRS スキャンを行い、ホスホクレアチン（PCr）、無機リン酸塩（Pi）およびアデノシン三リン酸（ATP）のレベルに代表される骨格筋代謝を評価すると共に、尾動脈に留置したカテーテルから経動脈的に採血を行い、MRS による虚血性変化と血液データの変化を比較したところ、MRS により計測された PCr/(Pi+PCr) 値は下肢虚血を誘発した直後から漸減し、再灌流後急速に回復したのに対し、採血により得られた pH 値や CPK 値は虚血（駆血）中はあまり変化せず、再灌流後から徐々に増加していった。この結果から従来の血液検査では捉えられない超早期の生体反応を MRS により非侵襲的に客観的に評価できることが明らかとなり、このアルゴリズムを特許申請した。

これらの技術開発と本研究で得られた知見は非常に興味深く、当初の計画以上に価値のある結果を生み出し、慢性動脈疾患のみならず、災害におけるACSの病態とも関連し、下肢虚血および虚血再灌流における病態解明や機能解析、さらには人命救助に貢献することができる新規技術開発となった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohta Hiroki, Komatsu Teppei, Muta Kanako, Koizumi Makoto, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 16
2. 論文標題 Marmoset angiography just by percutaneous puncture of the caudal ventral artery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Teppei, Ohta Hiroki, Motegi Haruhiko, Hata Junichi, Terawaki Koshiro, Koizumi Makoto, Muta Kanako, Okano Hiroataka James, Iguchi Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel model of ischemia in rats with middle cerebral artery occlusion using a microcatheter and zirconia ball under fluoroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92321-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohta Hiroki, Vo Nhat-Minh Van, Hata Junichi, Terawaki Koshiro, Shirakawa Takako, Okano Hiroataka James	4. 巻 11
2. 論文標題 Utilizing Dynamic Phosphorous-31 Magnetic Resonance Spectroscopy for the Early Detection of Acute Compartment Syndrome: A Pilot Study on Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 586 ~ 586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11040586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohta Hiroki, Komatsu Teppei, Muta Kanako, Koizumi Makoto, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 16
2. 論文標題 Marmoset angiography just by percutaneous puncture of the caudal ventral artery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Hiroki, Takakura Naoki, Komatsu Teppei, Kurashina Yuta, Hiroka Yuya, Okano Hirotaka J., Onoe Hiroaki	4. 巻 219
2. 論文標題 Vascular embolization of radiopaque hydrogel microfiber using ultra-minimally invasive technique for stage-adjustable renal failure model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials & Design	6. 最初と最後の頁 110802 ~ 110802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matdes.2022.110802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Tomoko, Hata Junichi, Shintaku Yuta, Ohta Hiroki, Sogabe Kazumi, Mori Susumu, Miyabe-Nishiwaki Takako, Okano Hirotaka James, Hamada Yuzuru, Hirabayashi Toshiyuki, Minamimoto Takafumi, Sadato Norihiro, Okano Hideyuki, Oishi Kenichi	4. 巻 273
2. 論文標題 The Japan Monkey Centre Primates Brain Imaging Repository of high-resolution postmortem magnetic resonance imaging: The second phase of the archive of digital records	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 120096 ~ 120096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroimage.2023.120096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 太田裕貴, 小松鉄平, 小泉誠, 牟田佳那子, 岡野ジェイムス洋尚
2. 発表標題 Development of Ultra-Minimally Invasive Disease Model and novel therapeutic intervention strategies friendly to common marmosets using "Ohta Method"
3. 学会等名 第11回 日本マーマセット研究会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Takakura, Hiroki Ohta, Teppei Komatsu, Yuta Kurashina, Hirotaka J Okano, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 CATHETER DELIVERY OF RADIOPAQUE CELL-ENCAPSULATED HYDROGEL MICROFIBERS FOR CELL THERAPY
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (uTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松鉄平, 太田裕貴, 高倉直輝, 北川友通, 畑純一, 寺脇幸四郎, 小泉誠, 牟田佳那子, 倉科佑太, 尾上弘晃, 岡野ジェイムス洋尚, 井口保之
2. 発表標題 幹細胞を含有可能な放射線視認性ハイドロゲルマイクロファイバーを用いた新規ラット脳梗塞モデルの開発.
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takakura N, Ohta H, Komatsu T, Kurashina Y, Okano HJ, Onoe H.
2. 発表標題 Radiopaque Hydrogel Microfiber for Arterial Embolization.
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minh Van Nhat Vo, Ohta H, Hata J, Terawaki K, Okano HJ, Shirakawa T.
2. 発表標題 Acute Compartment Syndrome Model in Rats: An Early Evaluation with In Vivo Dynamic 31P-MR Spectroscopy at 9.4 T.
3. 学会等名 The 5th ISMRM-JPC Annual Scientific Meeting (ISMRM JPC 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高倉直樹, 太田裕貴, 小松鉄平, 倉科佑太, 岡野ジェイムス洋尚, 尾上弘晃
2. 発表標題 X線イメージング可能な細胞含有ハイドロゲルマイクロファイバ
3. 学会等名 第10回日本機械学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 X線不透過マイクロゲルファイバ	発明者 太田裕貴ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/42381	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 歩行障害検出装置	発明者 太田裕貴，岡野ジェ イムス洋尚，大木隆 生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-196397	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 挫滅症候群の診断補助方法およびそれに使用されるプログラム	発明者 太田裕貴ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-200769	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 X線不透過マイクロゲルファイバ	発明者 太田裕貴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-206618	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------