

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590848

研究課題名（和文） リアルタイム一酸化窒素計測カテーテルによる高感度冠血管内皮機能評価法の確立

研究課題名（英文） The evaluation of coronary endothelial function using a real time nitric oxide catheter

研究代表者

川元 隆弘（KAWAMOTO TAKAHIRO）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30368667

研究成果の概要（和文）：

高脂肪食負荷によるイヌのメタボリック症候群モデルでは、体重増加に伴ってインスリン抵抗性が強くなるとともに、冠動脈内皮依存性 NO 産生能は低下していくことを明らかにした。同モデルでは薬剤誘発性最大冠拡張は維持されており、冠微小循環においては NO の生体利用能が低下した場合にはアデノシン、プロスタグランジンなどにより冠拡張反応を維持している可能性が示唆された。またヒトでの上腕動脈血流依存性血管拡張反応測定における駆血圧、駆血時間につき正常例での検討を行ない、駆血圧：安静時血圧+30mmHg、駆血時間：5 分が至適条件であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the endothelial dependent nitric oxide production in a canine model of metabolic syndrome induced by high fat diets and we demonstrated that the endothelium-dependent nitric oxide production was diminished according to the deterioration of insulin resistance. However, drug induced maximal hyperemia of coronary microcirculation was maintained in a same model, so it was possible that in case of the elimination of nitric oxide bioavailability, coronary vasodilatation was maintained by other vasoactive factors, such as adenosine or prostaglandin. We also evaluated the optimal value of the cuff pressure and the ischemic time at measurement of the flow mediated vasodilatation response of human forearm and demonstrated that resting blood pressure plus 30 mmHg and 5 minutes were optimal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：一酸化窒素、血管内皮機能、メタボリック症候群、心血管イベント、動物実験

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 冠血管内皮機能障害により血管拡張反応は低下し、易血栓性となる。こうした内皮細

胞障害部に血液中の単球が接着、遊走し動脈硬化巣が形成され、最終的に急性心筋梗塞等

の心血管イベントが発症する。したがって冠血管内皮機能障害の段階で介入すれば心血管イベントの発症を予防できると期待される。

(2) 冠血管内皮機能評価法として冠血管内皮細胞で産生される一酸化窒素(NO)の生理活性を直接リアルタイムに計測できる方法論が望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究代表者(川元隆弘)の研究グループは以前よりNO濃度をnM単位で直接計測可能なカテーテル型NOセンサーを開発している。このNO計測システムを発展させ臨床応用することにより、冠血管内皮機能障害の早期診断を可能にすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 健常成犬を用いてカテーテル型高感度NOセンサーによる冠血管内皮機能評価法を確立する。

### 動物実験準備

イヌを吸入麻酔下に人工呼吸管理とする。右内頸静脈より冠動脈形成術用7Fカテーテルを冠静脈洞に留置し、NOセンサーを挿入する。右大腿動脈より冠動脈造影用5Fカテーテルを左冠動脈入口部に留置し、薬剤の冠動脈内投与、冠血流速度計測用ドプラガイドワイヤーの挿入を行う。心電図、カテーテル先端圧、冠血流速度はポリグラフに常時表示し記録する。

### NOセンサー準備

使用直前に蒸留水中で較正を行う。較正值の確認後、生体内へ挿入する。生体内でセンサーの安定化が得られる約30分後より後述する実験プロトコルを開始する。

### 実験プロトコル

(a) 血管内皮依存性冠血管拡張薬投与による冠循環NO濃度/冠血流速度の計測

アセチルコリン(0.1, 0.4  $\mu$ g/kg/min)・ブラジキニン(1, 2  $\mu$ g/min)・ニコランジル(0.2, 0.4mg/min)を冠動脈内投与し、リアルタイムで冠静脈洞内NO濃度と冠血流速度を計測する。また比較のために内皮非依存性冠血管拡張薬(硝酸イソソルビド、ニトログリセリン)でも同様に検討する。

(b) 薬剤による血管内皮機能障害下の冠循環NO濃度/冠血流速度の計測

NO合成酵素阻害剤(L-NAME, 10  $\mu$ g/kg/min, 20min)投与後に、(a)と同様の計測を行う。

### NOセンサー較正

NOセンサーは非常に高感度であり、誤差を極力少なくするために計測前後で毎回較正作業(NO飽和水溶液使用)を行う。較正によ

りセンサー感度の適正を判定し、実験計測値の信頼性を確認する。またセンサーの耐久性に関しても検証していく。

(2) 高脂肪食投与により作成した内皮障害動物モデルを用いてNOセンサーによる冠血管内皮機能の評価し、薬剤(ARBとスタチン)による冠血管内皮機能改善効果を検証する。成犬に高脂肪・高カロリー食を長期間摂食させメタボリックシンドロームモデルを作成する。4週間毎に体重、空腹時の血糖値、脂質、インスリン値の計測を行ない体重の20%以上の増加、高脂血症、インスリン抵抗性増大を確認したのちに健常成犬と同様のプロトコルで内皮機能評価をおこなう。評価時期は①高脂肪・高カロリー摂食開始前、②摂取後、さらに③ARB/スタチン投与後とし、経時的に同一個体での冠血管内皮機能評価を行なう。

(3) ヒトでの内皮機能評価の臨床応用の可能性について検証する。NOセンサーは生体内での安全性についての検証が十分ではないために本研究では非侵襲的に内皮機能評価が可能である前腕での血流依存性血管拡張反応について検討した。主として健常例での検討により、測定そのものの信頼性と至適な測定条件について検討を行なった。

## 4. 研究成果

### 平成20年度

健常成犬での冠循環リアルタイムNO濃度測定法を確立し、引き続きメタボリック症候群のモデル犬を用いて検討を行なった。成犬に高脂肪、高カロリー食(120kcal/kg・day)を長期間(8ヵ月)摂食させて20%以上の体重増加を確認した。また4週毎に耐糖能、脂質等の血清学的検査を施行した。健常成犬と比べて空腹時血糖値は差がなかったが、血清インスリン値は有意に高値であり、インスリン抵抗性が増大したと考えられた。冠動脈内皮機能に関してはドプラガイドワイヤーにて計測した冠動脈血流速度予備能はベースラインと比較して変化していなかったが、内皮依存性NO産生能は有意にその反応性が低下していた。以上よりメタボリック症候群モデルにおいては体重増加がはじまる早期の段階で冠微小循環における冠充血反応は保たれている時期からNO産生能が徐々に低下しはじめることが示唆された。また興味深いことにNO産生能の低下はインスリン抵抗性の増大の程度と相関していた。

平成 21 年度

メタボリック症候群モデルの解析によりインスリン抵抗性の増大とともに内皮依存性NO産生能は低下し始めることが示された一方でアデノシン三リン酸静脈内投与による冠充血反応は維持されており、冠微小循環においてはNOの生体利用能が低下してくるとアデノシン、プロスタグランジンなどの系により冠充血反応が維持されている可能性が予想された。そこで実際にヒトのメタボリック症候群では内皮機能がどのように変化するかを前腕駆血後の血流依存性血管拡張反応の計測により評価し、インスリン抵抗性ととの関係を検討することを目標とした。まず正常例で血流依存性血管拡張反応を計測し、測定結果の再現性、個体間でのばらつきを解析した。再現性については同一検者による3回計測のばらつきをみたところ標準偏差は12.5%であった。しかしながら計測手技への習熟により最終的には5.3%と改善し、計測法として信頼できる再現性を持つと考えられた。次に駆血時間、駆血圧といった測定方法の条件が結果に影響するかを検討することとし、各3とおらず設定してその傾向について分析を行なった。

平成 22 年度

前年度より引き続き上腕動脈血流依存性血管拡張反応測定における正常例での至適条件について分析することとし、正常例で駆血圧、駆血時間につき検討を行なった。

健常例8例（男性5名、女性3名、年齢 $29 \pm 5$ 歳）にて検討を行なった。測定には超音波診断装置ユネクスイーエフを用いた。測定は室温を $22 \sim 25^{\circ}\text{C}$ に調節した静かな部屋にておこない、測定前2時間から食事摂取、お茶やコーヒー等のカフェイン摂取、飲酒、喫煙、過度の運動といった内皮機能に影響を与えるものを禁止した。測定は安静、仰臥位にて2度施行し、その平均値を採用した。上腕動脈血流依存性血管拡張反応測定は右上腕動脈にて①安静時血管径を計測し、②収縮期血圧+30もしくは50mmHgで3分もしくは5分駆血する、③駆血解放後に安静時と同じ部位にて最大拡張血管径を計測、といった手順でおこない、最大拡張血管径から安静時血管径を差し引いてそれを安静時血管径で除したものをパーセントにて算出した。結果は+30mmHg/3分駆血で $5 \pm 2\%$ 、+30mmHg/5分駆血で $11 \pm 6\%$ 、+50mmHg/3分駆血で $4 \pm 3\%$ 、+50mmHg/5分駆血で $11 \pm 4\%$ であった。駆血圧により有意差は認めなかったが、どちらの圧でも駆血時間は5分の方が有意に上腕動脈血流依存性血管拡張反応は大であった。以上より、上腕動脈血流依存性血管拡張

反応測定では安静時血圧+30mmHg/5分駆血が至適条件と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Miyamoto Y, Okura H, Kume T, Kawamoto T, Neishi Y, Hayashida A, Yamada R, Imai K, Obase K, Yoshida K: Coronary microvascular endothelial function deteriorates late (12 months) after sirolimus-eluting stent implantation. J Cardiol 56(2):229-235,2010 (査読有)

② Imai K, Okura H, Kume T, Yamada R, Miyamoto Y, Kawamoto T, Neishi Y, Watanabe N, Toyota E, Yoshida K: C-reactive protein predicts non-target lesion revascularization and cardiac events following percutaneous coronary intervention in patients with angina pectoris. J Cardiol 53(3):388-395,2009 (査読有)

③ Kume T, Kawamoto T, Okura H, Neishi Y, Hashimoto K, Hayashida A, Watanabe N, Kanda Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K: Evaluation of coronary endothelial function by catheter-type NO sensor in high-fat-diet-induced obese dogs. Circ J 73(3):562-567,2009 (査読有)

[学会発表] (計3件)

① 玉田 (前濱) 智子、「上腕動脈反応性充血反応の駆血時間と駆血圧に関する検討」、第21回心エコー図学会、2010年5月15日、札幌

② 根石 陽二、「腎動脈狭窄症に対する経皮的腎動脈形成術後の Renal Flow Reserve による慢性期腎機能の予測」、第57回日本心臓病学会学術集会、2009年9月20日、札幌

③ Kawamoto, Takahiro, “Coronary Stenting to Plaque with Necrotic Core Induces Microvascular Injury and Results in the Late Phase Left Ventricular Remodeling: A Virtual Histology Intravascular Ultrasound Study”, AHA 2008, 2008.11.11, NewOrleans

[図書] (計1件)

大倉 宏之、「チャートでわかる 実践 IVUS、OCT&FFR」、南江堂、全156頁、2009年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川元 隆弘 (KAWAMOTO TAKAHIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30368667

### (2) 研究分担者

大倉 宏之 (OKURA HIROYUKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30425136

根石 陽二 (NEISHI YOJI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80319946

土谷 哲生 (TSUCHIYA TETSUO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80388959

### (3) 研究協力者

鼠尾 晋太郎 (NEZUO SHINTARO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10412173

前濱 智子 (MAEHAMA TOMOKO)

川崎医科大学・大学院生