

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23281

研究課題名（和文）放射光微小血管イメージングを用いた脳血管内皮機能に対する運動効果の統合的解明

研究課題名（英文）Integrated elucidation of exercise effects on cerebral vascular endothelial function using synchrotron radiation microvascular imaging

研究代表者

前田 久 (Maeda, Hisashi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー

研究者番号：80883545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：定期的な日常的な身体運動は、脳卒中をはじめとした循環器病の発症を予防する事が知られている。本研究では、日常的な身体運動が脳血管拡張機能に与える影響について検討したものである。我々は、高血圧が完成する前の脳卒中易発性高血圧自然発症ラットに6週間の自発運動を実施させた後に、脳血管造影法、経頭蓋超音波エコー法を検討した。その結果、高血圧非依存的に自発運動が中大脳動脈拡張能を保持させる作用がある事を明らかにした。さらに放射光血管イメージングにより細かな脳血管像が得られる事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日常的な身体運動が脳血管拡張機能に与える影響について検討するために、高血圧が完成する前の脳卒中易発性高血圧自然発症ラットSHRSP（4週齢）に6週間の自発運動を実施させた。その結果、運動を実施したSHRSPは、運動未実施群のSHRSPと比較して、脳卒中が多発しやすい中大脳動脈において、常二酸化炭素時および高二酸化炭素血症時の血管径が有意に高い値を示した。また、経頭蓋超音波エコー法によって評価した血管抵抗の指標も運動群では有意に低値を示した。しかし、体血圧に有意差は認められなかった。本研究は、高血圧非依存的に、身体運動が脳卒中発症を予防する機序の一部を明らかにできたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Regular daily physical exercise is known to prevent the onset of cardiovascular diseases such as stroke. In this study, we investigated the effects of daily physical exercise on cerebrovascular diastolic function. We performed cerebral angiography, transcranial ultrasonography after 6 weeks of voluntary exercise in spontaneously hypertensive rats stroke-prone. As a result, it was suggested that voluntary exercise has the effect of maintaining the middle cerebral artery dilatation function independently of hypertension. Furthermore, it was confirmed that a detailed cerebral blood vessel image can be obtained by synchrotron radiation blood vessel imaging.

研究分野：健康科学

キーワード：脳卒中 身体運動 脳血管イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有酸素運動は脳卒中リスクを軽減する。その機序の一部として血管内皮機能障害 (血管拡張能低下)の予防が示唆されるが、脳卒中発生や病態と直接関わりが深いと考えられる脳微小血管の内皮機能障害に対する有酸素運動の効果については不明点が多い。

脳卒中は、脳主幹動脈や微小動脈に出血や梗塞が生じて、運動障害や高次機能障害が生じる疾患であり、本邦の寝たきりの原因の第一位である。脳卒中易発性高血圧自然発症ラットやヒト高血圧者では脳血管拡張障害が報告されており、これは将来発生する脳動脈硬化や脳卒中の前触れであると考えられている。血管内皮細胞は、種々の生理活性物質を分泌して血管収縮・拡張や血管壁リモデリングに関与しており、これらの脳血管拡張障害は血管内皮機能障害を示唆するものと考えられている。有酸素運動は、体血圧を下げ (J Hypertension 2006; 24: 215-233)、脳卒中リスクを減じるが (Circulation 2016; 133: 147-155)、その機序の一部として血管内皮機能障害 (血管拡張能低下)の予防が考えられている。しかし、脳卒中発生やその病態と直接関連すると考えられる脳微小血管内皮障害に対する有酸素運動の効果は十分に解明されていない。高血圧自然発症ラットを用いた先行研究においては、有酸素運動を実施しても高血圧の進行がほとんど抑制されないにも関わらず、脳卒中様症状の出現が抑制される事が報告されている (Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999; 26: 330-335; Brain Struct Funct. 2016; 221: 1653-1666)。今回、我々は有酸素運動が全身血圧を抑制するのとは異なる機序で脳卒中発症リスクを軽減する可能性を考えて、それを検証するべく本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP)を用いて、脳微小血管の血管拡張能および血管壁を評価し、脳卒中を発症する前の自発的な有酸素運動が脳微小血管拡張機能に与える影響を検討する事であった。

3. 研究の方法

脳卒中を発症するほど酷い高血圧を呈する動物モデルとして4週齢の SHRSP/1zm を用いた。また、正常血圧モデルとして同週齢の WKY/1zm を用いた。性別は全て雄を用いた。日常的な自発的な有酸素運動の効果を検討する慢性実験においては、SHRSP/1zm は通常ケージ内で飼育する Sedentary 群 (SED 群、n= 12)と回転車付きの特別ケージ内で (SWY-30、MELQUEST 社製、富山、日本)で飼育して自発運動を促す Exercise 群 (EX 群、n= 9)に分類した。WKY (n= 9)は通常ケージで飼育し、各動物群に対して11週齢に達するまで各種評価を施行した (以下、参照)。

さらに、急性実験として11週齢の SHRSP/1zm および Wistar/SLC を各3匹用いた。尚、全ての動物は、日本 SLC (静岡、日本)より購入した。

(慢性実験プロトコル)

体重、飼料と水分摂取、覚醒下血圧の計測: 慣れ化期間が終了する5週齢時点から最終的な評価週齢である11週齢に至るまで、毎週齢ごとに体重および脳卒中様症状の有無を評価した。さらに CODA 装置 (Kent Scientific 社製、米)を用いて tail-cuff 法により覚醒下血圧 (収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP)、平均血圧 (MBP))を記録した。実験動物には SHRSP/1zm の脳卒中発症率が100%になる SP 飼料 (船橋ファーム製、千葉、日本)を与え、さらに通常水を自由摂取させた。EX 群については、回し車の回転数を記録した。

経頭蓋超音波エコー法

小動物用に特化された超音波断層装置 Vevo3100 (FUJIFILM Visual Sonics 社製、カナダ)を用いた。計測に先立ってイソフルランを用いてラットを麻酔し (導入濃度4%、維持濃度1.5%)、後頭部の毛をバリカンおよび除毛クリームを用いて除去した。その後、超音波プローブを当てる部位に超音波用ジェルを塗布し、超音波が体内に浸透しやすくした。超音波画像の取得中は、ラット体温を保つために動物用保温パッド (BWT、BRC 社製、名古屋、日本)を使用した。取得した全ての超音波画像の解析は、Vevo3100 専用のソフトウェア (Vevo LAB 5.6.1, FUJIFILM Visual Sonics 社製、カナダ)を用いて解析した。

超音波プローブを後頭部に設置し、頭部画像を、前額面上で取得した。まずカラードプラー法を用いて両側の中大脳動脈 (MCA)の長軸像を同定した。その後、パルスウェーブドプラー法に切り替えて MCA の血流速度波形を取得し、収縮期最大血流速度 (PSV)、拡張期末末血流速度 (EDV)、平均血流速度 (MV)を算出した。これらの指標より以下の式で、測定部位より末梢の血管抵抗の指標である velocity pulsatile index (vPI)を算出した。測定は5、8、11週齢の時点で実施した。

$$MCA \ vPI = \frac{MCA \ PSV - MCA \ EDV}{MCA \ MV}$$

X線脳血管造影法

頭蓋骨内の MCA 内径を評価するために、11 週齢時点で X 線脳血管造影を実施した。イソフルラン麻酔下において、気管切開して気管カニューレを挿入し、人工呼吸を開始した (100cc/100gBW、80 回/分)。次に右大腿部を切開して大腿動脈を露出させ、動脈血圧測定と血圧調節実施のために、大腿動脈内に圧トランスデューサー (MLT0670、ADI Instruments 社製、ニュージーランド) と Power Lab システム (ADI Instruments 社製) に接続された PE-50 チューブを挿入した。その後、頸部切開して外頸動脈を露出し、総頸動脈側に向かって逆行性に PE-50 チューブを挿入した。チューブ内における血液凝固を防止するために、ヘパリン溶液 (50 単位) をチューブ内に満たした。その後、動物を X 線画像装置システム (MFX-80HK、HITEX、大阪、日本) 内に移動させ、非イオン性造影剤 Iomeron350 (エーザイ社製、東京、日本) を、マイクロインジェクターを用いて脳血管内に注入し (0.3 ml、30 ml/min)、脳血管造影画像を取得した (管電圧 70kv、管電流 30uA、fps 30)。測定は、常二酸化炭素条件および、脳血管拡張反応を評価するための高二酸化炭素条件とした。動脈血内の二酸化炭素濃度の設定は大気に二酸化炭素を加えたガスを動物に吸入させる事によって作出した (常二酸化炭素条件は 2.0-2.5%CO₂ in air、高二酸化炭素濃度条件は 7%CO₂ in air を吸入させた)。大腿動脈より動脈血を採取して、動脈血中の酸素濃度および二酸化炭素濃度を i-STAT®System (Abbott Laboratories 社製、米) を用いて評価した。

(急性実験プロトコル)

経頭蓋超音波エコー法

慢性実験によって体血圧と MCA vPI の関係を検討する必要が生じたため、急性実験を実施した。動物は 11 週齢の SHRSP/1zm および Wistar/SLC を用いた。イソフルラン麻酔下のラット大腿部を切開して大腿動脈を露出させた。動脈血圧の測定と目標血圧を設定するために、動脈内に圧トランスデューサー (MLT0670、ADI Instruments 社製、ニュージーランド) と Power Lab システム (ADI Instruments 社製) に接続された PE-50 チューブを挿入し、チューブ内はヘパリン溶液 (50 単位) を満たした。(1)と同様に MCA vPI を測定した。本急性実験では、超音波画像を取得しながら、大腿動脈内に挿入したチューブから瀉血し、動脈圧を (1) ベースライン MBP 条件、ベースライン時の (2) 80%MBP 条件、(3) 60%MBP 条件、(4) 40%MBP 条件(40%MBP 条件は SHRSP のみ) に設定し、血流速度波形を評価し、体血圧および脈拍と MCA vPI の関係を検討した。

4. 研究成果

(1) 体重変化と脳卒中様症状 (図 1)

SHRSP SED 群における 2 匹の体重は 10 週齢から 11 週齢にかけて減少した。体重が減少したラット 2 匹を含めて、合計 4 匹のラットに運動麻痺、痙攣等の脳卒中様症状が認められた。しかし、SHRSP EX 群や WKY 群においてはその様な兆候は認められなかった。

(2) SHRSP EX 群の運動量 (図 2)

SHRSP EX 群における全てのラットは、回し車を用いて運動を実施した事が確認できた。しかし、個体ごとにばらつきが認められた。

(3) 覚醒下における体血圧 (図 3)

SHRSP SED 群と EX 群間において有意差は認められなかった。自発運動によって SHRSP の血圧は抑制されない事が示唆された。

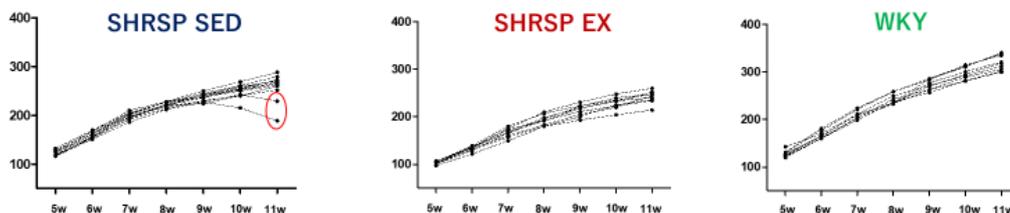


図 1 各群の体重推移 (g)

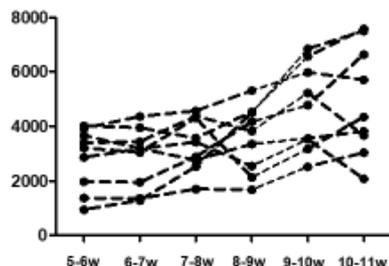


図 2 SHRSP EX 群の運動量推移 (m)

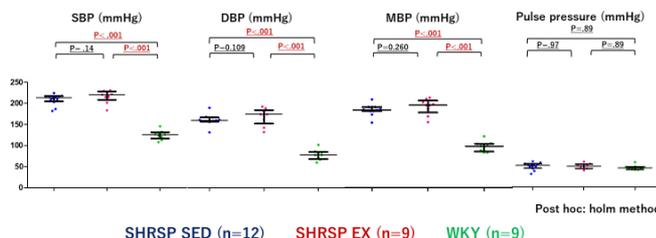


図 3 各群の 11 週齢時における覚醒下の血圧値

(4) 5、8、11 週齢時における vPI、adjusted vPI の比較 (図 4、5)

5、8 週齢において SHRSP SED と EX 群間で有意差は認められなかったが (P>.05)、11 週齢においては、SHRSP SED と EX 群の間で有意差が認められ、EX 群の方が有意に低値となった (P<.05)。EX 群は SED 群と比較して中大脳動脈測定部位より末梢の血管抵抗が低い事を示唆する。

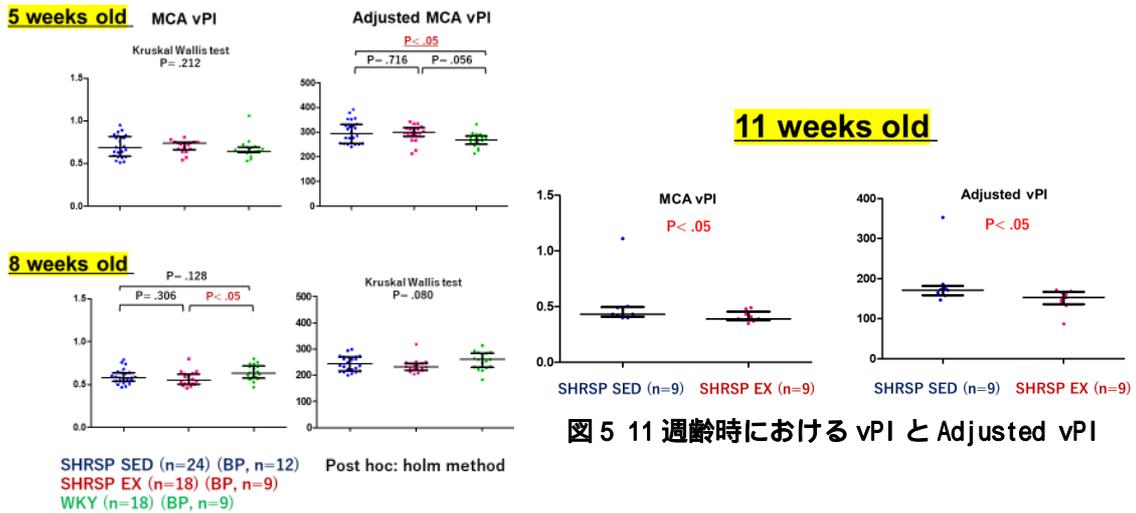


図 5 11 週齢時における vPI と Adjusted vPI

図 4 各群の 5、8 週齢時における vPI

(5) 11 週齢時における脳血管造影の比較 (図 6、7)

MCA 内径において、常二酸化炭素条件と高二酸化炭素血症条件ともに、EX 群は SED 群と比較して有意に高値を示した (P<.05)。ICA 内径は、両者で有意な差は認められなかった (P>.05)。自発運動が常二酸化炭素状態および二酸化炭素誘発性の脳血管拡張反応を促進する事が示唆された。

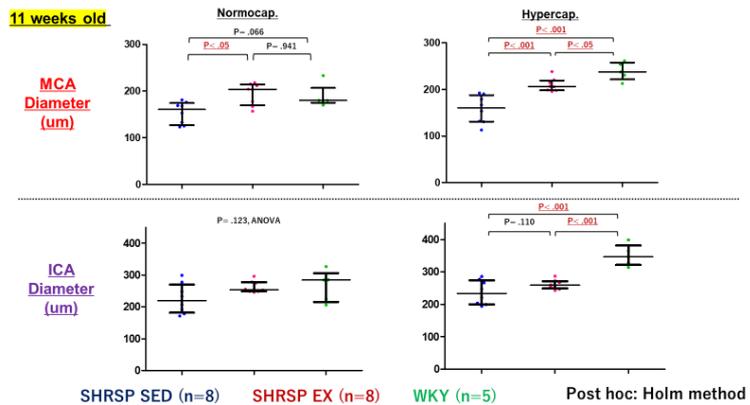
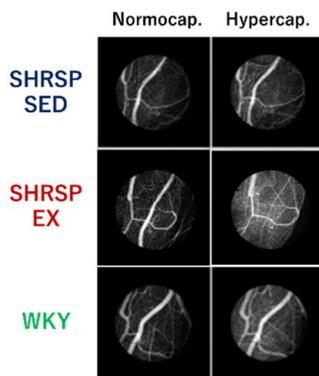


図 6 代表的な脳血管画像

図 7 MCA および ICA の実測値

表 1 常二酸化炭素条件および高二酸化炭素条件時の血中ガス

		pH	PCO2 mmHg	PO2 mmHg
SHRSP sed.	Normocap.	7.44 ± 0.02	37 ± 2	96 ± 6
	Hypercap.	7.31 ± 0.02	52 ± 3	101 ± 5
SHRSP ex.	Normocap.	7.42 ± 0.02	39 ± 3	85 ± 6
	Hypercap.	7.27 ± 0.05	60 ± 7	85 ± 16
WKY	Normocap.	7.41 ± 0.01	40 ± 2	81 ± 1
	Hypercap.	7.30 ± 0.02	52 ± 6	79 ± 3

(6) 11週齢時におけるvPIとAdjusted vPIとMCA内径の関係 (図8)

MCA vPI および adjusted vPI はいずれの指標においても、MCA 内径と有意な負の相関 ($p < .05$) を示した。これは、vPI および adjusted vPI の高値化は、MCA 狭小化を反映していると考えられる。

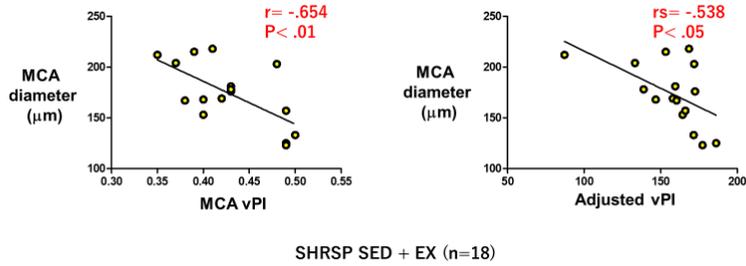


図8 11週齢時におけるvPIとAdjusted vPIとMCA内径の関係

(7) vPIとAdjusted vPIとMCA内径の関係 (図9, 10, 11)

慢性実験においてSHRSPにおいて脈拍は、MCA vPIと有意な負の相関を示した ($P < .01$)。その一方で、WKYにおいては有意な相関は認められなかった ($P > .05$) (図9)。また、覚醒下血圧とMCA vPIおよびadjusted vPIは両者とも、SHRSPにおいて有意な負の相関が認められた (図10)。この関係性を確かめるために、主に平均血圧を変動させた際のvPIの挙動変化を検討する急性実験を実施した (図11)。単相関および多変量解析の結果、vPIとadjusted vPIはともに、平均血圧および脈拍と有意な負の相関を示す事が明らかとなった。

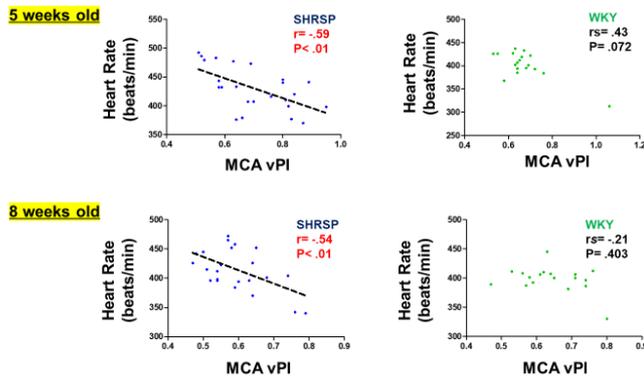


図9 脈拍 (HR)とMCA vPIの関係

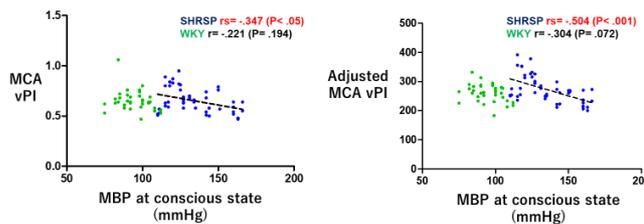


図10 覚醒下平均血圧とMCA vPIおよびAdjusted vPIの関係

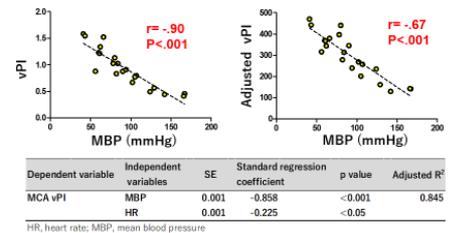
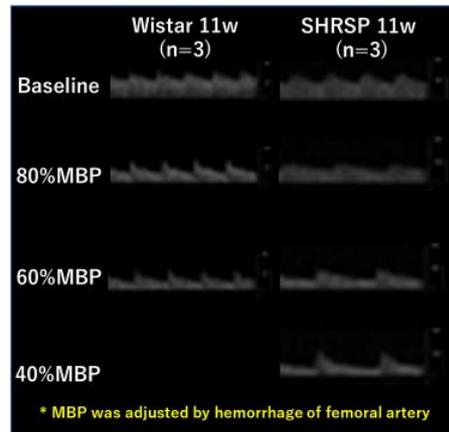


図11 平均血圧とMCA血流波形 (上)。平均血圧および脈拍がvPIに与える影響 (下)

本研究の結論

- 日常的な身体運動は、高血圧を抑制できない場合でも中大脳動脈の拡張機能を保つ作用がある事が示唆された。
- MCA vPI および adjusted vPI は高血圧によって、増加する可能性があるが、高血圧が極端に進行する事によって逆に低下する可能性がある。
- MCA vPI および adjusted vPI は血管抵抗を反映する指標であるが、計測時の脈拍や血圧に大きな影響を受けるため、その評価にはこれら指標を考慮する必要がある事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------