

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590182
 研究課題名（和文） 冠細動静脈の三次元構築自動分離イメージング法による冠循環アポトーシスの研究
 研究課題名（英文） Investigation of coronary apoptosis by three dimensional imaging by automatic separation method for coronary arterioles and venules.
 研究代表者
 根石 陽二 (NEISHI YOJI)
 川崎医科大学・医学部・講師
 研究者番号:80319946

研究成果の概要：

本研究では心筋虚血再灌流障害慢性期の冠血管アポトーシスの発症する病期において、冠微小血管の三次元構築が損壊されていく様相、血管構築の三次元空間的トポロジー、とりわけ冠細動脈と冠細静脈の三次元的相互的位置関係についての研究を行った。正常ラット心においてそのイメージングを行うことができたが、心筋虚血再灌流障害のラットモデルの慢性期心臓のサンプルを用いては同等のクオリティのイメージングを行うことは困難であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,500,000	750,000	3,250,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：冠微小循環、アポトーシス、心筋虚血、リモデリング

1. 研究開始当初の背景

心筋が虚血再灌流に曝されると冠循環微小血管はアポトーシスに陥りその血管構築を失う。今日まで虚血再灌流障害性冠循環アポトーシスに関する研究は1)冠毛細血管を観察対象にした2)組織観察(免疫染色を含む)がほとんどであった。最近我々の研究グループは、虚血再灌流障害急性期に冠毛細血管が特有の構築異常(全体がコルクスクリュー状に萎縮)を生じることを三次元的観察によって始めて明らかとし(Watanabe N, Toyota E et al. *Circ J*.2004;68(9):868)それが微小循環血液レオロジーを破綻させる事を報告して

きた。しかし、虚血再灌流障害による慢性期において毛細血管のみならず冠細動脈や冠細静脈の三次元構築が破壊されていく様相の詳細は不明である。1)冠細動脈と冠毛細血管網は相互的に局所血流を制御しており(Kuo et al. *Circulation* 1995;92(3):518)、また2)冠毛細血管からのドレナージュを行う冠細静脈は、虚血再灌流障害の初期段階から血流阻害機転(白血球/血小板の癒着・凝集・血管閉塞)をきたす標的領域である事(Ritter et al. *Am J Physiol* 1997;273(3):H1154)から、虚血再灌流障害では冠細動脈・細静脈においても血流制御破綻に関わる病態の一因とし

て、何らかの三次元構築異常を生じている可能性が高い。しかしこの事は不明である。国内外で毛細血管と動静脈系とのリンケージは研究されてきた。例えば、毛細血管を動脈系と静脈系に染色分類する手法や (Koyama, T et al. *Jpn J Physiol* 1998;48(4):229)、動脈・静脈系各々への分化関連蛋白:エフェリン (Wang et al. *Cell* 1998;93(5):741) などの研究がある。ジオメトリックな検討としては、組織切片中で細動脈は α アクチンの組織免疫染色法によって識別されているが、この方法論では観察範囲の制約 (例えば共焦点レーザー顕微鏡観察では数百 μm オーダー、免疫組織染色観察では数 μm オーダーのみ) から、その様相を十分な広がりを持つ立体空間の中で観察評価することが困難であった。すなわち細動脈や細静脈にどのような立体構造異常が生じているのか、それが心筋アポトーシス領域を超えてどの範囲まで波及しているかなど、心臓全体にわたって三次元広範囲で観察しなければ不明な点が多い。

2. 研究の目的

心臓全体をサンプルサイズとして冠微小循環全体の三次元構造を空間座標上にデジタル変換して定量解析できるイメージング技術とそれによる基礎研究は稀少である。このためには十分な空間分解能を有する三次元撮像系を利用した特異な方法論が要求される。このニーズに答えた方法論が、我々が独自開発した microCT を用いた撮像法 (Toyota E et al. *Circulation* 2002;105(5):621) であった。本申請研究ではこのオリジナルの方法論をさらに発展させて、冠細動脈・冠細静脈・心筋各々の構築要素を選択的に分離・抽出して三次元再構築する革新的な方法論を確立するものである。得られる画像の CT 値で規定してそれらをクリアに分けるために、造影剤の再調整と多重造影を工夫することが本研究のユニークなポイントであった。本研究によって各々の血管構成要素を識別したアポトーシスの (三次元的) トポロジーの研究のブレイクスルーとなることが期待された。

今日まで冠微小血管アポトーシスの研究はモレキュラーシーケンスが中心的であったが、冠微小血管構築破綻の実際の様相は情報が不足している。本申請研究で得られる結果の三次元画像は世界初となる。新たな冠細動脈の空間形態的パラメータを導き、アポトーシスにおける重要性を明確にできれば、そのパラメータを用いた治療戦略の検討など、医学・医療への貢献も大きいと考えた。虚血性心筋症患者に対する再生医療の分野の研究においても有効に応用される方法論となることが期待された。

3. 研究の方法

健常雄ウイスターラットを麻酔下 (ケタミン・キシラジン) に心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流心筋保護下に、最大血管拡張 (アデノシン) と心筋収縮阻止 (酸素化・リドカイン) を行った。以下の加温造影剤を冠循環に定圧注入し凝固させ、冷ホルマリン内で血管形状を維持したまま固定した。

完全充填写用造影剤 (Toyota E, *Circulation* 2002;105(5):621) の再調整を行った。主に 1) 硫酸バリウム (現在特注) の粒子径として中央値 $0.7\mu\text{m}$ と $15\mu\text{m}$ を用意し、2) 硫酸バリウムの濃度調整として 0.1% から 60% まで各段階ごとに用意し、これらを冠循環に充填する順列組み合わせにより多重造影を行った。高 CT 値分画の細動脈と、血管サイズ依存性の低 CT 値分画 (細静脈は鮮明であるが低 CT 値画像、毛細血管は低い S/N 値分画) による微小血管の分離・抽出を行った。最適なカットオフ値 (ミニマムクロストークとなる閾値)、最適な分離 CT ピーク値が得られる条件設定を検出した。これを microCT で撮像した。撮像条件を冠細動脈・冠細静脈・心筋など各血管構成要素の CT ウィンドウを各々イメージングしうる撮像条件の最適化を行った。

病的な心臓のサンプル作製は、麻酔科開胸下に冠動脈閉塞用バルーンを植え込む慢性モデルを作成した。この独自の的方法論により、意識下で冠動脈を閉塞後に開放することが可能な虚血再灌流心筋障害モデルを作成することが可能であった。心エコー図法を用いて、心不全が発症していることを確認した後、その心臓を摘出して造影剤を冠循環に充填固定する同様の的方法論を用いた。

4. 研究成果

正常心のラットにおいて、血管構成要素を選択的に分離抽出、さらにオーバーレイする三次元再構築イメージングが実現した。すなわち、静脈系と動脈系を一つの心臓で同時に撮像する事が可能となった。静脈系は $0.7\mu\text{m}$ の粒子をもつ造影剤によって充填されており、動脈系は $15\mu\text{m}$ の粒子径をもつ別濃度の造影剤で充填されたことにより、各々個別の CT 値を有するために、同時に撮像し、個々の、あるいは overlay してイメージングする事が可能であった。

一方、従来の目的であるアポトーシスをおこす虚血心モデルにおいて、同様の充填で増化をこころみるも、分離することが困難であった。濃度の変化をつけたり、さまざまな工夫を試みたが、十分な分離画像を得ることが困難であった。

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2件)

- 1) Toyota E, Neishi Y, et.al. Novel rat model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive myocardial ischemia/reperfusion injury while conscious. Circulation Journal;71 (5), 2007; 788-795
- 2) Sukmawan R, Toyota E, Neishi Y et. al. Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function after ischemia/reperfusion on the beating canine heart in vivo. J Pharmacol Sci;104(4), 2007; 341-348
- 3) Kume T, Toyota E, Neishi Y et.al. Assessment of the histological characteristics of coronary arterial plaque with severe calcification. Circulation Journal;71 (5), 2007; 643-647
- 4) Toyota E, Neishi Y et al. Development of Cardiac Dysfunction Induced By Repetitive Transient Myocardial Ischemia Is Inhibited By Edaravone in Conscious Rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009 Mar 26.

[学会発表] (計5件)

根石陽二

- 1) 演題名 : VH-IVUS Analysis of Renal Artery Lesions with Atherosclerotic Renal Artery Stenosis 日本循環器病学会総会 平成20年03月22日 福岡
- 2) 演題名 : Relation between Renal Artery Plaque composition and the Distance from the ostium in Patients with Atherosclerotic Renal Artery Stenosis Using Vitreal Histology IVUS Transcatheter Cardiovascular Therapeutics 平成20年10月15日 Washington D.C.

3) 演題名 : Renal Flow Reserve after Successful Percutaneous Renal Angioplasty predicts renal functional recovery American Heart Association 平成20年11月13日 New Orleans

4) 演題名 : 経皮的腎動脈形成術前後での Renal Flow Reserve の変化と治療効果との関連 心血管画像動態学会 平成21年01月17日 和歌山

5) 演題名 : Renal Flow Reserve and Renal Resistance Index after Successful Percutaneous Renal Angioplasty for Renal Artery Stenosis Predict Renal Functional Recovery 日本循環器病学会総会 平成21年03月22日 大阪

豊田英嗣

6) 演題名 : 三次元で観る冠微小循環の構築と血流動態 モレキュラーイメージングセミナー平成19年02月19日 北海道

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

産業財産権の名称 : Micro-pneumatic snare

発明者 : Eiji Toyota, William Chilian

権利者 : LSU(USA)

産業財産権の種類、番号 : 7344548

取得年月日 : 平成20年03月18日

国外 : 米国

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根石 陽二 (NEISHI YOJI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号:80319946

(2) 研究分担者

豊田 英嗣 (TOYOTA EIJI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号:30248215

(3) 研究協力者

前濱 智子 (MAEHAMA TOMOKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号:90435016