

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01810

研究課題名(和文)放射光微小冠動脈造影を用いた微小冠動脈の機能評価法確立および虚血性心疾患への応用

研究課題名(英文) Establishment of functional evaluation method of micro coronary artery using synchrotron radiation micro coronary angiography and application to ischemic heart disease

研究代表者

坂本 裕昭 (Sakamoto, Hiroaki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30611115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は糖尿病患者および慢性腎臓病患者の冠動脈の特徴を解明することである。交感神経緊張状態が糖尿病ラットや腎臓病ラットの冠動脈に及ぼす影響について、我々が開発した放射光微小冠動脈造影と画像解析プログラムを用いて評価した。外的ストレスである寒冷刺激を与えることで誘発された交感神経緊張状態は、正常ラットの冠動脈を拡張させ冠動脈血流速度を増加させた。一方、糖尿病ラットと腎臓病ラットでは冠動脈は収縮し、血流速度の増加は認めなかった。糖尿病ラットと腎臓病ラットの冠動脈の外的ストレスに対する生体応答機能低下と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病である糖尿病や新たな国民病ともいえる慢性腎臓病を合併した虚血性心疾患患者の増加が予想されている。今回の研究結果から糖尿病患者や慢性腎臓病患者の冠動脈は非合併患者のそれとは特徴が異なることが示唆された。そのような虚血性心疾患患者に対する治療は、その特徴に応じた統合的治療が必要であり、治療成績のさらなる向上の可能性のヒントが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the characteristics of coronary artery in patients with diabetes and chronic kidney disease. The effects of sympathetic nervous conditions on coronary arteries in diabetic rats and kidney disease rats were evaluated using synchrotron radiation micro coronary angiography and image analysis program developed by us. The sympathetic nerve stimulation induced by applying cold stress, which is an external stress, expanded the coronary arteries and increased the coronary blood flow velocity in normal rats. On the other hand, in diabetic rats and kidney disease rats, the coronary artery contracted and blood flow velocity did not increase. It was considered that the biological response to external stress in the coronary arteries of diabetic rats and kidney disease rats was impaired.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：放射光 糖尿病 慢性腎臓病 冠動脈 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 糖尿病と慢性腎臓病および虚血性心疾患

生活習慣病である糖尿病や新たな国民病ともいえる慢性腎臓病と虚血性心疾患の関連は周知の事実である。最近の我が国の糖尿病人口は 950 万人以上、慢性腎臓病人口は 1300 万人以上で今後も増加の一途を辿るといわれている。今後、これら糖尿病や慢性腎臓病を合併した虚血性心疾患患者の増加が予想されている。我々はそのような虚血性心疾患患者に対して積極的に冠動脈バイパス術や経皮的冠動脈形成術を行っているが、糖尿病患者や慢性腎臓病患者の冠動脈は非合併患者のそれとは特徴が異なるという印象を持っている。具体的には、糖尿病患者の冠動脈は瀰漫性に狭小化していることが多く、慢性腎臓病患者のそれは著明な石灰化病変であることが多い。このように異なる特徴を有するのであれば、それを考慮した治療戦略が必要である。

実際の冠動脈バイパス術後や経皮的冠動脈形成術を施行されて暫くの間、患者は交感神経緊張状態にあると推測される。そこで、交感神経緊張状態が冠動脈に及ぼす影響を *in vivo* ラットを用いて研究することを計画した。ちなみに、我々の予備研究では交感神経活動により正常ラットの冠動脈は拡張するが、糖尿病ラットのそれは収縮することが示されている。また交感神経緊張状態はラットに外的ストレスである寒冷刺激を与えることで引き起こすことを計画している。交感神経機能の評価は、過去に我々の研究室から報告した通常心電図から計測される heart rate variability を用いて行う。

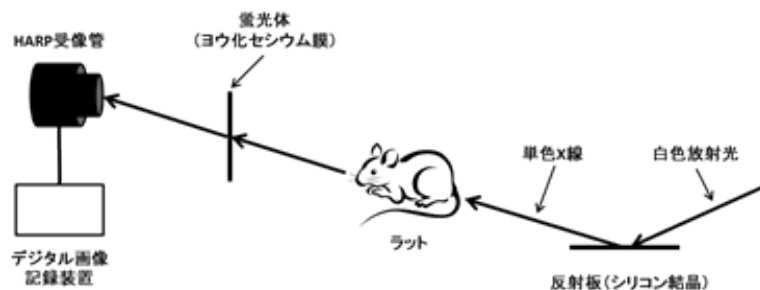
糖尿病ラットおよび慢性腎臓病ラットを用いて上記内容の実験を行い、各々についての比較を行う。

### (2) 放射光冠動脈造影

我々は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設(つくば市)にて放射光を用いた微小血管造影法の開発および研究を継続して行ってきた。放射光は 6.5GeV の高エネルギー電子シンクロトロンより偏向磁石を用いて分離される広帯域、高輝度、高指向性の特徴を有する電磁波であり分光器(シリコン結晶)に対し 13 度の角度で反射させることにより、光子エネルギー 33.3KeV の高輝度な単色 X 線に変換される。この単色 X 線を用いて *in vivo* ラットに放射光微小血管造影を行い、直径 45 $\mu$ m の微小冠動脈を造影することに成功した(Sakamoto, et al. Acta Radiol 2015)。また、日立製作所の協力で我々独自の画像解析プログラムを開発した。これを応用することで、冠動脈造影画像から任意の冠動脈における血流速度を相対評価することが可能となる。

我々は、放射光由来 X 線源と NHK 放送技術研究所の協力による High-Gain Avalanche Rushing Amorphous Photoconductor (HARP) 受像管を組み合わせた高感度放射光微小血管撮影法を研究開発しており、更に空間分解能と濃度分解能の非常に高い画像を得ることが出来る。

本研究では HRAP 受像管と画像解析プログラムを融合させることで、放射光冠動脈造影を用いた冠動脈機能評価法を確立することが可能であると考えた。このように、過去に報告のないラット微小冠動脈の機能評価という点が本研究の特色である。



## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病患者および慢性腎臓病患者の冠動脈の特徴の解明を目的とする。実際の冠動脈バイパス術後や経皮的冠動脈形成術を施行されて暫くの間、患者は交感神経緊張状態にあると推測される。従って、交感神経緊張状態が糖尿病や慢性腎臓病を合併した冠動脈微小血管流に及ぼす影響について、ラットを用いて *in vivo* で研究することが研究目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病モデルラット作成

雄 Wistar ラットに Streptozotocin (60mg/kg 1回)を腹腔内投与し糖尿病を作成。血糖 400mg/dl 以上のラットを糖尿病群とし、Streptozotocin 投与後 4 週経った糖尿病群と、同じ期間飼育のコントロール群とを比較した。

### (2) 慢性腎臓病モデルラット作成

雄 Wistar ラットを全身麻酔下に開腹し、両腎の 5/6 を切除する方法で慢性腎臓病を作成。腎切除後 8 週経った慢性腎臓病群と、同じ期間飼育のコントロール群とを比較した。

(2) プロトコル

三種混合麻酔薬による全身麻酔下で実験を行った。ラットの頸動脈に留置したカテーテルから造影剤を注入して放射光微小冠動脈造影を行った。

エンドセリン前駆体投与による糖尿病ラットと腎臓病ラットの冠動脈変化の評価

エンドセリン前駆体(0.5nmol)投与し、冠動脈収縮を促した。投与前後に放射光微小冠動脈造影を行った。画像解析プログラムを用いて、得られた冠動脈造影画像から冠動脈形態変化を解析した。

寒冷刺激による糖尿病ラットと腎臓病ラットの冠動脈変化の評価

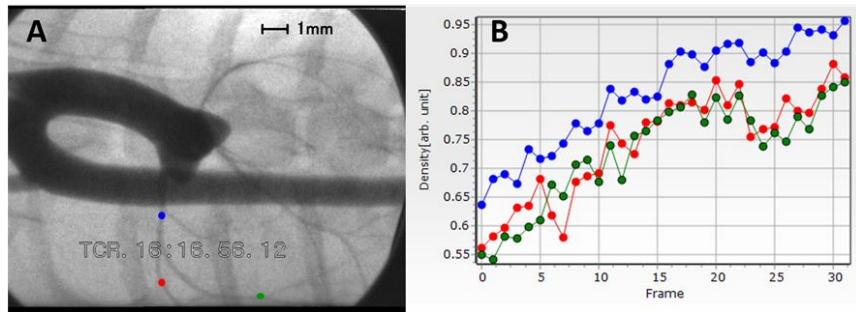
ラット下腿を除毛し、下腿から 10cm の距離で 10 秒間瞬間冷却スプレーを噴霧した。スプレー噴霧前後に放射光微小冠動脈造影を行った。画像解析プログラムを用いて、得られた冠動脈造影画像から冠動脈形態変化および血流速度変化を解析した。

4. 研究成果

我々の放射光微小冠動脈造影システムでは直径 50 μm 前後の冠動脈を描出可能である。強力な血管収縮作用を有するエンドセリンを投与することで、糖尿病ラット、腎臓病ラット共に冠動脈が収縮することが確認された。小動物であるラットの微小な冠動脈径の変化を我々のシステムは検出可能であることを確認した。

我々が開発した画像解析プログラムにより冠動脈造影像における任意の血管部位の経時的濃度変化を評価した (Fig.1)。Fig.1B のグラフはラット冠動脈の任意の 3 点における経時的濃度変化である。最初の 10frame(30msec/frame)のグラフの傾き(濃度変化)を求めることで、経時的濃度変化を相対評価することが可能となり、相対的血流速度と考えることができる。つまり濃度変化が早ければ血流が早いと解釈される。

Figure 1



次に、交感神経緊張状態が冠動脈に及ぼす影響を正常ラットと糖尿病ラットを用いて研究した。交感神経緊張状態はラットに外的ストレスである寒冷刺激を与えることで誘発した。その結果、寒冷刺激を与えると正常ラットでは冠動脈は拡張し (Fig.2A)、冠動脈血流速度は相対的に速くなった (Fig.3A)。一方、糖尿病ラットでは冠動脈は収縮し (Fig.2B)、血流速度の増加は認めなかった (Fig.3B)。同様の結果が腎臓病ラットにおいても得られた。

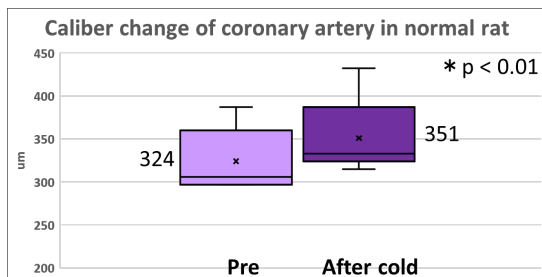


Figure 2A

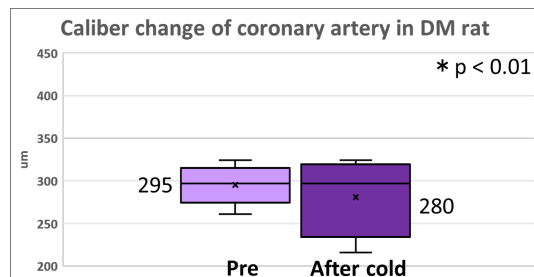


Figure 2B

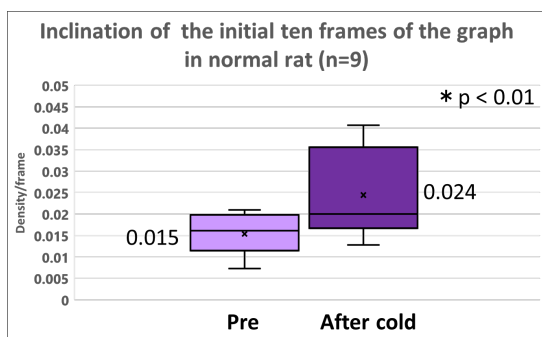


Figure 3A

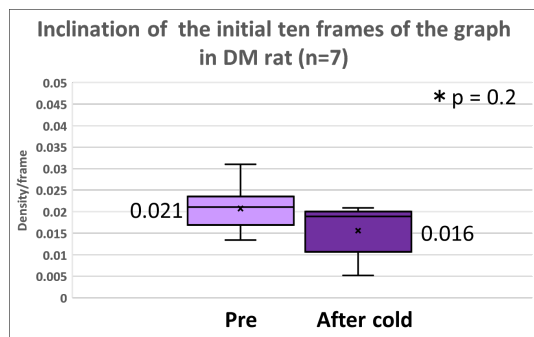


Figure 3B

糖尿病ラットと腎臓病ラットでは交感神経緊張状態での冠動脈の変化が正常ラットとは違うことを証明することができた。これは糖尿病ラットおよび腎臓病ラットの冠動脈の外的ストレスに対する生体応答機能低下と考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Tokunaga C, Matsushita S, Sakamoto H, Hyodo K, Kubota M, Tanioka K, Hitamatsu Y: A new method for visualizing pulmonary artery microvasculature using synchrotron radiation pulmonary microangiography: the measurement of pulmonary arterial blood flow velocity in the high pulmonary blood flow rat model. Acta Radiologica, DOI: 10.1177/0284185118770892, 2018, 査読あり

Miya K, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sakamoto H, Mizutani T, Hiramatsu Y: Renal contrast microangiography with synchrotron radiation: a novel method for visualizing structures within nephrons in vivo. Acta Radiologica, Vol. 58, 505-510, 2017, 査読あり

Fuji S, Matsushita S, Hyodo K, Osaka M, Sakamoto H, Tanioka K, Miyakawa K, Kubota M, Hiramatsu Y, Tokunaga C: Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension. General Thoracic and Cardiovascular Surgery, Vol. 64, 597-603, 2016, 査読あり

[学会発表](計 2 件)

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Hiramatsu Y: Synchrotron radiation microangiography with angio tracking program confirms coronary reaction by sympathetic stimulation in the in vivo rat. American Heart Association Scientific Sessions, 2018, November 10-12, Chicago, USA

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Hiramatsu Y: Synchrotron radiation coronary microangiography and micro-angio tracking program could confirm coronary vasodilatation by cold exposure in the in vivo rat. The 26th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, 2018, May 24-27, Moscow, Russia

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：徳永 千穂  
ローマ字氏名：(TOKUNAGA, chiho)  
所属研究機関名：筑波大学  
部局名：医学医療系  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：30451701

研究分担者氏名：松下 昌之助  
ローマ字氏名：(MATSUSHITA,shonosuke)  
所属研究機関名：筑波技術大学  
部局名：保健科学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：70359579

研究分担者氏名：兵藤 一行  
ローマ字氏名：(HYODO, kazuyuki)  
所属研究機関名：大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構  
部局名：物質構造科学研究所  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：60201729

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、研究者個人に帰属されます。