

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 10日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700444

研究課題名（和文） 霊長類を用いた非接触磁気計測手法に基づく心臓興奮・伝導異常病態の解明

研究課題名（英文） Electrophysiological cardiac evaluation by magnetocardiography in nonhuman primates

研究代表者

揚山 直英（アゲヤマ ナオヒデ）

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・主任研究員

研究者番号：50399458

研究成果の概要（和文）：本研究は非侵襲的で高感受性の心臓の検査方法である非接触磁気計測手法をヒトに最も近縁な霊長類に適応し、心臓の電気生理学的評価を行い心臓伝導異常のメカニズム解明に繋がったものである。その過程で得られた新規評価システムや不整脈疾患モデルは新たな心疾患の診断法として有用であるのみならず、心疾患の電気生理学的なメカニズム解明にも役立つものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, electrophysiological cardiac evaluation systems based on noninvasive and highly sensitive magnetocardiography techniques that can evaluate nonhuman primate cardiovascular disease will lead to novel models of safety assessment. Moreover, systems based on MCG that can evaluate non-human primate models of arrhythmias will lead to novel diagnoses of human conditions and elucidate the electrophysiological mechanisms in cardiology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：心臓興奮・伝導異常

1. 研究開始当初の背景

心臓の興奮は心筋細胞内外のイオン交換による電気生理学的活動によって発生する。超伝導量子干渉素子による非接触磁気計測手法はその電気生理学的活動に伴い心臓・脳などから発生する微弱な磁界を心磁図として記録し可視化できることが知られている。すなわち、心磁図は心電図などでは検出不可

であった微弱な電気生理学的現象を画像化する事により、心臓の伝導異常に対する高度で容易な解析能力を発揮する。本手法に用いる設備は既に本研究の研究協力者らにより市販装置として樹立されている（Kandori et al. 2002. Med. Biol. Eng. Comput.）。また、世界的には本手法を用いて不整脈疾患の診断、心臓移植の拒絶判定、急性心筋梗塞の虚

血判定や認知症早期診断などの報告が一部あり(Yamada et al. 2005. Inter. Med.)、さらには心筋症の両室ペーシングの位置決め、心房細動の治療法選択、鬱病の病態診断など、多くの可能性が示唆されている。しかしながら、そのいずれも疾患モデル動物などを用いての具体的なエビデンス検証は行われておらず、そのポテンシャルを発揮させるには至っていない。

近年、実験用霊長類を用いた医科学研究は注目を集めており、その事実はサルへの輸入量が増加の一途を辿っているという事実からも一目瞭然である。その一方で、これまで霊長類を用いた循環器疾患の体系的な研究というものは行われておらず、霊長類循環器疾患モデルとしての報告もほとんど無い。既に申請者らはこれまでに霊長類繁殖コロニー内より得られた心室中隔欠損、右室二腔症、心筋症、弁膜症などの疾患を抽出し、世界に例のない自然発症循環器疾患モデルとしての樹立の可能性を示唆している(Koie et al. 2005. Contemp Top Lab Anim Sci.)。さらに、世界的にも霊長類の心疾患モデルを用いた研究は、申請者らを中心に行われた心筋梗塞作出モデルに対する再生医療研究が報告されている程度であり(Yoshioka et al. 2005. Stem Cells.)、不整脈疾患モデルを用いた報告は皆無に等しい。本研究実施機関はこうした循環器疾患を抽出・作出する事が可能な1500頭規模からなる実験用霊長類の自家繁殖コロニー有しており、それらを体系的に利用出来る技術と設備を持った施設は国内・外においても類を見ない。

さらに、心疾患は死亡原因の上位を占め、世界各国で大きな問題となっている。しかしながら、それら疾患の病態機序の多くは未だ解明されていない点が多い。そうした疾患をターゲットにした前臨床研究、また、疾患の本態解明を目指す上では、基礎研究と臨床応用の架け橋となるヒトに最も近縁な霊長類を用いて疾患モデルの樹立・評価を行うことが急務となってきている。特に、日米EU医薬品規制調和国際会議においても、ヒト用医薬品を臨床承認する際に最も重篤な副作用である突然死を引き起こすQT間隔延長の潜在的可能性に関して、非臨床的評価としてはラットやマウスのイオン機序動態はヒトや大型動物のそれと異なるため不向きであり、適切な動物種とin vivoの試験系を選択すべきであると述べている(ICHS7B Guideline, 2005)。さらにはFDA等で提唱されているマイクロドージング試験等に代表されるような微細な電気生理学的変化を霊長類においてin vivoで評価できるシステムの開発が急がれている。よって、心電図では捕らえることが難しい微細な電気生理学的変化を、ヒト胎児の心臓ですら評価する事が可

能な非接触磁気計測手法を霊長類モデルと組み合わせる本研究は応用研究としても必須であると考えられる。

2. 研究の目的

当研究は非接触磁気計測手法をヒトに最も近縁な霊長類モデルに適応し、心臓の電気生理学的評価をすることで、その手法自体のエビデンスを確認しながら、評価システムの構築・不整脈疾患モデルの樹立を試み、心臓伝導異常のメカニズム解明を目指すものである。さらに、その過程で得られる評価システム・モデルを利用し、病態の解明を行うことで、不整脈疾患などに対する新たな前臨床評価、新規診断基準の樹立へとつなげることも可能となる。

3. 研究の方法

まず霊長類における非接触磁気計測手法の技術確立を行い、体系的な計測を開始し、霊長類の評価基準を作成する。次いで心筋梗塞モデルなどの疾患モデルを作成、もしくは新たにスクリーニングで得られた心臓興奮・伝導異常疾患を対象に実際の病態に対する評価を行い、そのエビデンスを確認する。さらにブロック、QT延長症候群、WPW症候群、Brugadaなどの新たな不整脈疾患モデルの抽出や作出を試み、評価基準と照らす事で病態の解明を目指す。最終的にはそれら得られた評価基準、疾患モデルの解析結果などを合わせ、霊長類を用いた心臓興奮・伝導異常評価システムとしての樹立やヒト新規診断領域の拡大につなげる。

具体的な方法としては以下の通りである。

(1). 霊長類における非接触磁気計測手法および評価基準の樹立

- ① まず、霊長類医科学研究センター内に非接触磁気計測装置およびシールドルームを設置し、霊長類に特化した非接触磁気計測設備・手法の構築を行う。
- ② 1500頭規模からなるカニクイザル繁殖コロニー、さらに同施設内で維持されている老齢ザル群の測定も対象として非接触磁気計測を体系的に計画し、実際の心磁図測定を開始する。同時に心エコー、心電図、心臓ペプチドホルモンなどの測定による心疾患のスクリーニング、さらには後天性の心筋梗塞モデルの作成も開始する。
- ③ 非接触磁気計測手法より得られた心磁図データの集積および解析を行い、心エコーや心電図から得られるデータとの比較、さらにヒトの心磁図と照合することによりその手法のエビデンスを確認しながら、霊長類における心臓の電気生理学的特性を理解し、評価基準の作成を目指す。

(2). 非接触磁気計測手法を用いた心臓興奮・伝導異常病態の抽出および評価

- ① これまでに得られた心磁図の計測手法、評価基準を利用し、電気生理学的に特徴のある霊長類を抽出する。老齡ザルについてはヒトの加齢性変化のモデルとしての可能性も模索しながら計測を進める。特に先天性不整脈疾患の抽出を期待する。
- ② 霊長類における体系的な非接触磁気計測を引き続き継続しつつ、これまで得られた心筋症個体や心筋梗塞モデルに関しても適応を開始し、その他の循環機能検査の結果と比較を行い不整脈疾患以外における本手法の早期診断も含めたエビデンスを確立する。得られた電気生理学的に異常の認められる個体については心エコー、心電図、MRIなどの循環器機能検査を併せて行い確定診断を試みる。
- ③ 得られた心疾患の心磁図より電気生理学的な特徴の詳細な解析を行い、病態の把握に努めると同時に、心疾患モデルとしての付加価値の可能性を探る。特に得られた先天性疾患などについてはヒトの遺伝子異常部位等との比較を行うことを目指し、相同領域のシーケンス検索用にプライマー設計などを検討する。

(3). 非接触磁気計測手法を用いた霊長類心疾患モデルの評価および霊長類を用いた新たな安全性・毒性評価システムの樹立

- ① 引き続き体系的な霊長類の心磁計測を行い心筋梗塞・不整脈疾患等モデルの作出、抽出を継続し、データの拡充を進めると共に他の循環器機能検査を併用した確定診断を行い比較を可能とする事で評価基準や解析結果の信頼性向上を図る。
- ② 構築された心筋梗塞モデルにおいて、心エコー所見、CPK-MB、BNP、ANPなどの心疾患マーカーの経時的変動や安楽殺後の病理組織学的検索、リモデリングの進行などと心磁計による所見を照らし合わせ、病態の進行機序の解明、新たな早期診断基準の検討を行う。さらに、これまでに得られた不整脈疾患については病態を明らかにして、心磁計による診断レベルの検証を行う。特に先天性不整脈疾患については繁殖コロニーの利点を生かし、家系性や遺伝的バックグラウンドなどの調査を行い、ヒト病態を反映する疾患モデルとしての樹立を目指す。
- ③ 最終的にはこれまで樹立された霊長類の評価基準、疾患モデルの解析結果などを照らし合わせ、微細な電気生理学的変

化の検出を可能とする事で、新たな霊長類を用いた安全性・毒性評価システム系としての樹立を目指す。また、各種疾患モデルの解析を通し、非接触磁気計測手法に基づく新規電気生理学評価の新たな診断基準の樹立や病態メカニズムの解明も目指す。

4. 研究成果

(1). 霊長類における非接触磁気計測手法および評価基準の樹立

- ① 非接触磁気計測装置、シールドルーム、モニター装置や同期用心電図などを組み合わせ、霊長類に特化した計測設備・手法の構築を行い、ヒト新生児相当の大きさのカニクイザルにおいて心臓磁場を計測する事に成功した。
- ② 1500 頭規模からなるカニクイザル繁殖コロニーおよび施設内で維持されている老齡ザル群を対象に非接触磁気計測を順次開始し、これまでに約 50 頭の心臓磁場データを取得した。
- ③ 霊長類心筋梗塞モデルの作成も開始し、心エコー、心電図、生化学マーカーなどの測定を経時的に行う事で、ヒト病態を忠実に反映した慢性化モデルである事を明らかにした。
- ④ 非接触磁気計測手法により得られたデータの集積および解析を行ったところ、霊長類の心臓磁場強度はヒト成人の半分程度であり、体重の相同するヒト胎児とほぼ同等である事が明らかとなった。さらに、イメージングとして得られるアローマップや加算平均波形はヒトとほぼ相同する正常な画像を得る事に成功した。これらの結果より時間幅や磁場強度など、カニクイザルの各種正常値を得る事に成功し、非接触磁気計測における診断基準が確立された。

(2). 樹立した計測手法を用いて霊長類における心臓伝導異常病態の抽出および評価を行い下記の成果をあげた。

- ① 得られた評価基準を利用し、電気生理学的に特徴のある霊長類の抽出を試みた結果、左脚ブロック、WPW 症候群、Burugada 症候群、QT 延長症候群などの先天性不整脈疾患の特徴を有する心磁図の描写に成功した。特に、QT 延長症候群においては T 波時相における異常電流、WPW 症候群では副伝導路の早期興奮をアローマップとしてイメージングする事が出来、本手法が詳細な電気生理学的変化を描写可能である事を明らかとした。

- ② これまでに得られた心筋症や心筋梗塞モデルに関しても計測を行ったところ、心筋症個体から得られた電流アローマップにおいては脱分極、再分極時の異常電流を認め、これらの所見がMRIや心エコー検査所見、病理組織学的検索における左室心筋のびまん性線維化所見と一致する事を見出した。
- ③ 得られた心疾患の病態把握に努めると同時に、心疾患モデルとしての付加価値の可能性を探る目的で疾患関連遺伝子の特定を行うため、ヒトで報告のある心筋発現蛋白質 Phospholamban、 δ -sarcoglycan の mutation 部位を参照に primer を設計し、検索を行った。その結果、心筋症個体ではヒトと全く同一の変異は認められなかったが δ -sarcoglycan の R97Q 別領域に発症個体特異的な SNPs の存在が示唆された。

(3). 霊長類心疾患モデルの評価および霊長類を用いた新たな安全性・毒性評価システムの樹立を行い、下記の成果をあげた。

- ① 体系的な霊長類の心磁計測を行う事によりさらなるデータの拡充を図った。その結果得られた電流アローマップより最大ベクトル(MCV)と総和ベクトル(TCV)を求め、角度と強度を算出し、経時の変化を定量可能な新たな解析方法を適応する事で新たな評価基準を樹立し、解析結果の信頼性を向上させた。
- ② 心筋梗塞では中長期的なモデルにおいて心疾患マーカーの経時的変動を解析したところ、CPK、トロポニン T、BNP は急性期に一過性の上昇を示し、ヒトの病態を長期にわたり反映している事が明らかとなった。一方心磁計では同モデルにおいて脱分極、再分極時の電流を経時的に定量化したTCV、MCVで梗塞直後から長期的に異常値を検出可能である事が明らかとなり、心筋梗塞の急性から慢性期まで有用な新たな診断方法であることが示唆された。
- ③ ここまで得られた左脚ブロック、WPW症候群、Brugada症候群、QT延長症候群、心筋症などの疾患が疑われる個体についてはその家系を追跡し、一部に血縁関係があるものを見出した。現在遺伝子解析や子孫の調査を開始しており、引き続き疾患モデルとしての樹立を目指す。

(4). まとめ

これまでに得られた評価基準や疾患解析の結果、本手法は霊長類において微細な電気生理学的変化を検出可能である事が明らかとなった。すなわち将来の創薬探索や心臓興奮・伝導異常の新規診断にも有用な非接触磁

気計測手法と霊長類を組み合わせた新たな安全性・毒性評価システム系を樹立する事が出来た。さらには霊長類で初となる不整脈疾患など心疾患モデルのシーズを発掘する事にも成功し、ヒト心疾患病態解明にも大いに役立つ成果を上げることが出来た。

今後は本研究の成果をその他の施設から得るヒト等のデータと比較する事により、新たなエビデンスを得た上で新規前臨床評価・診断基準の樹立に現実的に繋げることを目標とする予定である。また、得られた様々な疾患モデルの候補に関しては現在遺伝子の解析および家系の調査を継続している。霊長類の寿命は他の動物に比べても長い為、長期的な視野に立った調査、解析が必要となるが、引き続き、心疾患の病態解明や新規治療・診断法開発研究に有用な疾患モデルとしての樹立を目指す。

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1件)

揚山直英. 霊長類の循環器疾患とモデル動物開発. 関西実験動物研究会会報. 2011; 33号:14-21 査読無

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/kansai/kansai_web_new/Contents%20of%20Proceedings_1.htm

[学会発表] (計17件)

① Hiroshi Koie, Takashi Ikegawa, Sachi Okabayashi, Kiichi Kanayama, Tadashi Sankai, Yasuhiro Yasutomi, Naohide Ageyama. Rare Cardiac Disease Cases in Four Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis). 62nd American Association for Laboratory Animal Science National Meeting. 2011年10月3日. San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

② Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Miyoko Kato, Yasuhiro Yasutomi. Assessment of QTc reference values in cynomolgus monkeys with arrhythmia. 62nd American Association for Laboratory Animal Science National Meeting. 2011年10月3日. San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

③ 大藤圭子、片貝 祐子、加藤美代子、藤本浩二、揚山直英. カニクイザルにおけるクレアチンキナーゼ検査系の検討. 第38

回日本トキシコロジー学会. 2011年7月11日. パシフィコ横浜(神奈川県)

- ④加藤美代子、関悠介、神鳥明彦、塚田啓二、寺尾恵治、保富康宏、揚山直英. 心磁計を用いたカニクイザルにおける電気生理学的評価システムの検討. 第38回日本トキシコロジー学会. 2011年7月11日. パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑤川嶋 晴子、鯉江洋、岡林佐知、金山喜一、山海直、保富康宏、揚山直英. 心拍変動解析を用いたカニクイザルにおける加齢性変化の検討. 第38回日本トキシコロジー学会. 2011年7月11日. パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑥川嶋 晴子、鯉江洋、岡林佐知、金山喜一、山海直、保富康宏、揚山直英. ホルター心電計を用いたカニクイザルにおける加齢性変化の解析. 第20回サル疾病ワークショップ. 2011年7月2日. 麻布大学(神奈川県)
- ⑦池川隆、鯉江洋、岡林佐、金山喜一、山海直、保富康宏、揚山直英. カニクイザルに認められた先天性心疾患4例における臨床経過. 第58回日本実験動物学会総会. 2011年5月25日. タワーホール船堀(東京).
- ⑧西川智也、鯉江洋、金山喜一、山海直、保富康宏、揚山直英. カニクイザルにおける椎骨心臓スケールと心胸郭比の有用性. 第58回日本実験動物学会総会. 2011年5月25日. タワーホール船堀(東京).
- ⑨Naohide Ageyama. Magnetocardiography in Non-human Primate. The 3rd Asian Symposium on Magnetocardiography. 2010年12月9日. つくば国際会議場(茨城県)
- ⑩揚山直英. 霊長類の循環器疾患とモデル動物開発. 関西実験動物研究会第107回研究会(招待講演). 2010年9月11日. 滋賀医大(滋賀県)
- ⑪加藤美代子、鯉江洋、保富康宏、揚山直英. カニクイザルにおけるQTc基準に関する検討. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月13日. 京都テルサ(京都府).
- ⑫Naohide Ageyama, Yusuke Seki, Akihiko Kandori, Miyoko Kato, Keiji Tsukada, Keiji Terao, Yasuhiro Yasutomi. Development of nonhuman primate

arrhythmia model by magnetocardiography. International Conference on Biomagnetism 2010. 2010年4月1日. Rixos Libertas (Dubrovnik, Croatia).

- ⑬Naohide Ageyama, Yusuke Seki, Akihiko Kandori, Miyoko Kato, Keiji Tsukada, Yasuhiro Yasutomi, Keiji Terao. Electrophysiological cardiac evaluation by magnetocardiography in nonhuman primates. 60th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting. 2009年11月9日. Colorado Convention Center (Denver, CO, USA).
- ⑭関悠介、神鳥明彦、揚山直英. 霊長類の心磁図評価手法の確立. 第24回日本不整脈学会学術大会/第26回日本心電学会学術集会 合同学術集会. 2009年7月2日. 国立京都国際会館(京都府).
- ⑮揚山直英、関悠介、加藤美代子、神鳥明彦. 霊長類心疾患モデルにおける心磁図評価. 第24回日本不整脈学会学術大会/第26回日本心電学会学術集会 合同学術集会. 2009年7月2日. 国立京都国際会館(京都府).
- ⑯加藤美代子、関悠介、田原秀哲、神鳥明彦、塚田啓二、寺尾恵治、保富康宏、揚山直英. カニクイザルにおける心磁図と心電図の比較. 第56回日本実験動物学会総会. 2009年5月14日. 大宮ソニックホール(埼玉県).
- ⑰揚山直英、関悠介、田原秀哲、加藤美代子、片貝祐子、神鳥明彦、塚田啓二、保富康宏、寺尾恵治. カニクイザル心筋梗塞モデルにおける心磁計を用いた電気生理学的評価. 第56回日本実験動物学会総会. 2009年5月14日. 大宮ソニックホール(埼玉県).

[その他]
ホームページ等
<http://tprc.nibio.go.jp/ageyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

揚山 直英 (AGEYAMA NAOHIDE)
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター・主任研究員
研究者番号: 50399458