

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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590499

研究課題名（和文）臨床薬理学的ツールとしての新規血管内皮機能評価法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel evaluation methods to measure endothelial functions as a clinical pharmacological tool

研究代表者 竹内 和彦（TAKEUCHI KAZUHIKO）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00419425

研究成果の概要（和文）：反応性充血を利用した血管内皮機能評価法は、動脈硬化性早期変化の検出に有用である。慢性閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性変化は上肢より下肢に圧倒的に多くみられるにもかかわらず臨床現場での血管内皮機能評価法は技術的理由から上肢のみである。我々は、近赤外時間分解分光法の応用によって下肢の反応性充血を測定することに成功した。上肢の反応性充血は 20 歳代群、50 歳代群、70 歳代群において群間の差は見られなかったが、下肢反応性充血は 20 歳代群と比較し 50 歳代群、70 歳代群で低下していた。近赤外時間分解分光法による下肢反応性充血測定は、既存の上肢反応性充血測定法よりも早期に加齢による血管機能変化を検出でき、その変化に対する薬物治療効果判定のバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The evaluation method using reactive hyperemia (RHE) to measure endothelial function is useful for detecting the early phase of atherosclerotic changes. Atherosclerotic changes like peripheral arterial disease are found much more in legs than in arms, however, the current methods for evaluating endothelial function with ultrasound graph (FMD) or peripheral tonometry (EndoPAT) are limited to 'arm' RHE due to technical difficulties in measuring 'leg' RHE. The present study established a novel method to measure 'leg' RHE by using a near-infrared time-resolved spectroscopy (NIRTRS). In arm RHE measured by NIRTRS, there was no difference of RHE patterns among 20s, 50s and 70s men groups, however the leg RHE patterns of 50s and 70s men groups were lower than that of 20s men group. Thus, the leg RHE measured by NIRTRS could be a biomarker for detecting the early phase of aging changes in vascular function and evaluating drug effects on the vascular functional changes.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2011 年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 2012 年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：血管内皮機能・反応性充血・近赤外線時間分解分光法

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化における初期の変化は、血管の質的変化に先行して血管内皮障害による血管

の機能的低下がみられる。血管内皮は、一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI₂)といった内皮由来血管拡張因子の産生により、

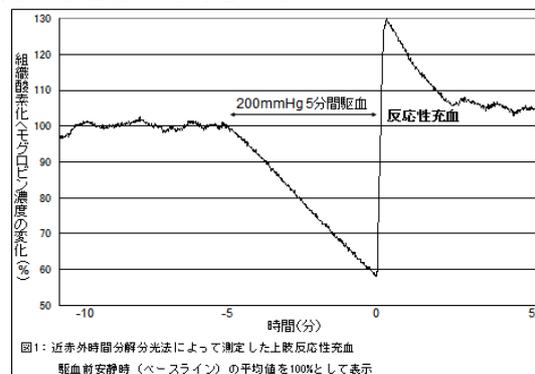
血管トーンスの調節だけでなく白血球接着抑制、血小板凝集抑制などの血管恒常性の維持に重要な役割を果たしている。つまり、血管内皮障害とは主に内皮由来血管拡張因子の産生障害であると考えられている。

ヒトにおける内皮由来血管拡張因子産生を刺激する方法には、アセチルコリン動注法やずり応力刺激法があるが、薬効評価のためにベットサイドで内皮由来血管拡張因子産生を刺激しようとする場合、マンシエツト(200mmHgで駆血・解除)を用いたずり応力刺激法の方が非侵襲的で実用性と汎用性において優れている。ずり応力刺激法によって誘発される充血(反応性充血)は、現在、血管エコーによる血管拡張測定やプレチスモグラフによる前腕容積測定によって評価されているが、これら既存の評価法は、測定値にアーチファクトが入りやすいことや測定技術に熟練を要するなどの問題が指摘され、感度や精度の面で信頼性が低い。

既存の血管内皮機能評価法は上肢のみに限定されているが、動脈硬化における初期の変化の検出力や虚血性心疾患などの動脈硬化関連疾患罹患率との相関性は、上肢よりも下肢における血管内皮機能評価の方が優れているのではないかと考えている。その根拠は、動脈硬化病変は閉塞性動脈硬化症に見られるように上肢動脈より下肢動脈が圧倒的に多いこと、閉塞性動脈硬化症患者の虚血性心疾患(24%)および脳血管疾患(54%)の合併率が際立って高いことなどである(J Vasc Surg. 2007; 45: S5-67)。このような事実があるにもかかわらず、下肢血管内皮機能を評価した報告は今日まで全く見受けられない。これまで下肢血管内皮機能評価がなされなかった背景には、下肢(大腿部もしくは足首)の駆血(200mmHg)には耐え難い疼痛を伴うことが主な要因とされている。現在、上肢血管内皮機能測定で用いられているマンシエツトによる駆血(200mmHg5分間駆血)を利用したずり応力刺激法を基に大腿部と足首への駆血を実施してみたが、マンシエツトによる疼痛は1分間すら耐えることができない想像以上のものであった。たとえ駆血時間を短縮しても、駆血による疼痛が下肢筋の収縮を誘引したり、自律神経系を刺激して血行動態を変化させたりしたため反応性充血測定に大きく影響してしまうことが予想された。我々は、疼痛を伴わない下肢駆血法について試行錯誤し、ついに膝窩部にウレタン製の枕子を置きマンシエツトを枕子ごと膝部に巻きつける方法(膝窩部圧迫法)により、200mmHgで5分間以上の駆血をしても強い疼痛を伴わないことを発見した。しかしながら、血管内皮機能評価法として現在最も普及している血管エコーを用いた評価法(flow-mediated dilatation: FMD)では、膝窩

動脈以外の下肢動脈の評価は困難であるため、測定と駆血が同一部位となる膝窩部圧迫法をFMD測定に採用することは不可能であった。また、マンシエツトによる上肢反応性充血を利用したプレチスモグラフによる評価法もNO阻害薬によって有意に減弱されず血管内皮機能法としての信頼度が低いことが報告されていることから(Br J Clin Pharmacol. 1999; 48(3): 457-9)、マンシエツトを使用した下肢血管内皮機能評価に既存の測定法を採用できないと判断し、新規血管内皮機能評価法の開発が必要であるとの考えに至った。

新規血管内皮機能評価法における測定の必要条件として、動脈血流の変化に対する感度と測定時間分解能が高いことを挙げ、近赤外時間分解分光法(near-infrared time-resolved spectroscopy)が最も適した手法であると判断した。近赤外時間分解分光法は、3波長(760nm、800nm、830nm)の半導体パルス光源を用いて、生体深部組織内の酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン、全ヘモグロビン濃度を定量的に評価することが可能であり、酸素化ヘモグロビン濃度の変化を測定することにより組織内動脈血流の変化を連続的に計測することができる。我々はこのプロジェクトに先立ち近赤外時間分解分光法を用いてマンシエツトによる上肢反応性充血を捉えることに成功していた(図1)。以上の見地より、新規下肢反応性充血測定法は、血管内皮機能障害や動脈硬化疾患の検出力において既存の血管内皮機能評価法を凌駕することが期待される。



2. 研究の目的

本研究は、動脈血流の変化計測における感度と時間分解能に優れた近赤外時間分解分光法を用い、上肢血管に比し動脈硬化病変をきたしやすい下肢血管を対象とした下肢反応性充血測定法を確立し、血管内皮機能に対する薬効評価に耐えうる感度と精度を兼ね備えた新規血管内皮機能評価法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1. 反応性充血測定に先立ち血圧脈波検査装置 (VaSera VS-1000、フクダ電子製) にて動脈硬化指数とされる ABI (Ankle Brachial Pressure Index、足関節上腕血圧比) と CAVI (Cardio Ankle Vascular Index、心臓足首血管指数) を測定し ABI が 1.0 を下回った場合は下肢血行障害ありとして、本研究対象から除外する。ABI 値と CAVI 値は、データ集積後、反応性充血測定結果の考察の際に使用される。

2. 上肢反応性充血測定法: 右上腕にマンシエットを巻きつけ、近赤外時間分解分光法測定装置 TRS-10 システム (浜松ホトニクス製) の光プローブを照射-検出間距離 3cm で検出部を末梢側にして右腓腹筋外側に装着し、積算時間 1 秒にて連続的に組織酸素化ヘモグロビン濃度の測定を開始する。5 分間の安静後、Rapid cuff inflator (Hokanson 製) を使用して 200mmHg で 5 分間駆血した後、駆血を解除し反応性充血を誘発させる。組織酸素化ヘモグロビン濃度の変化は、安静時 5 分間、駆血時 5 分間、反応性充血時 5 分間の計 15 分間を連続記録する。

3. 下肢反応性充血測定法: 右膝窩部にウレタン製の枕子を置きマンシエットを枕子ごと巻きつける (膝窩部圧迫法)。

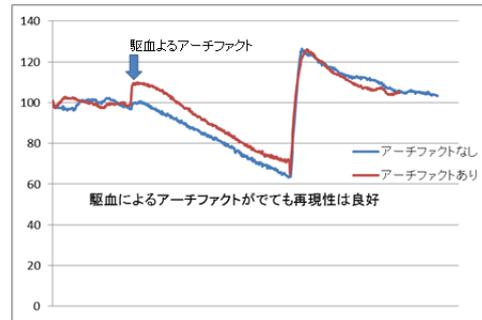
近赤外時間分解分光法測定装置 TRS-10 システム (浜松ホトニクス製) の光プローブを照射-検出間距離 3cm で検出部を末梢側にして右腓腹筋外側に装着し、積算時間 1 秒にて連続的に組織酸素化ヘモグロビン濃度の測定を開始する。5 分間の安静後、Rapid cuff inflator (Hokanson 製) を使用して 200mmHg で 5 分間駆血した後、駆血を解除し反応性充血を誘発する。組織酸素化ヘモグロビン濃度の変化は、安静時 5 分間、駆血時 5 分間、反応性充血時 5 分間の計 15 分間を連続記録する。

4. 研究成果

初年度からの約 2 年間は新規反応性充血測定法の安定性・再現性に重点を置いた検討に重点を置いた。上肢に比較し下肢反応性充血測定は安定を欠いたため、駆血位置、測定プローブ位置、下肢駆血時に膝窩部に置くウレタン製の枕子の形状の検討に非常に多くの時間を費やし、安定した再現性のある測定方法が決定するまでに約 2 年を要した。図 2 のように駆血時に急峻にベースラインが上昇する現象がみられることがあったが (図 2 矢印)、このような場合、ベースライン (100%) を駆血前値と駆血直後値のどちらにするべきかを検討した結果、通常通り駆血前値をベースラインとして駆血直後に急峻な上昇があっても解放後の反応性充血に影響しないことが確認された (図 2)。また、測定時刻、室内温度と明るさを一定にした条件下での

上肢および下肢の反応性充血測定値の再現性は良好であった。

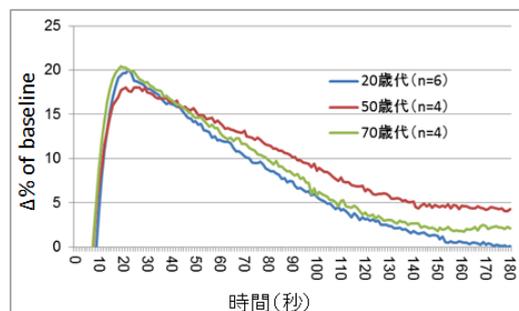
駆血によるアーチファクト出現時 (赤) の反応性充血 (図 2)



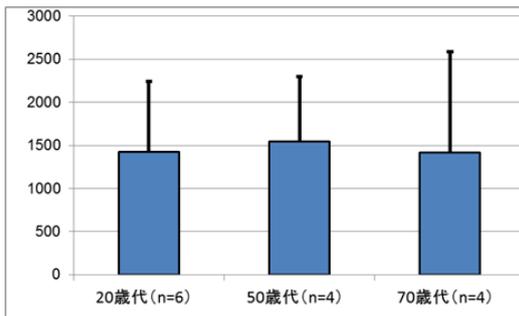
平成 23 年度は細部に渡る測定条件やデータ処理法がほぼ決まり、年齢別におけるデータの収集に取り掛かりかかった。血圧脈波検査装置にて ABI (Ankle Brachial Pressure Index、足関節上腕血圧比) が 1.0 以上の男性を対象として、近赤外線時間分解分光法による上肢および下肢の反応性充血測定を行った。

図 3-1 は、20 歳代群 (n=6)、50 歳代群 (n=4)、70 歳代群 (n=4) の上肢反応性充血曲線 (駆血前の動脈血量をベースラインとしたときの増加率 (%)) である。上肢反応性充血は、駆血解放後急峻に増加しピーク値からなだらかに減少していった。図 3-2 は 3 群の反応性充血曲線の曲線下面積 (AUC) を示すが (mean ± SD)、3 群間の AUC に差は見られなかった。他方、下肢反応性充血は、上肢と比べ駆血解放後の立ち上がりやピークが緩やかとなる傾向がみられた (図 4-1)。下肢反応性充血の 3 群間比較では、統計学的有意差を得るには至らなかったが、50 歳代群と 70 歳代群の下肢反応性充血は、20 歳代群より低い傾向がみられた (図 4-1, 2)。現時点での結果では、下肢反応性充血は、上肢反応性充血よりも加齢による血管機能低下を早期に検出できる可能性が示された。この血管機能変化がいつ頃からみられるようになるのかを検討するため、今後 30 歳代、40 歳代についてデータの集積を行う予定である。

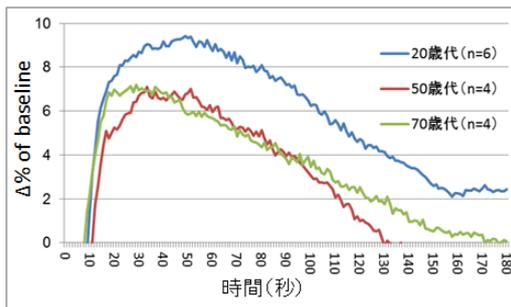
20歳代、50歳代、70歳代における上肢反応性充血 (図3-1)



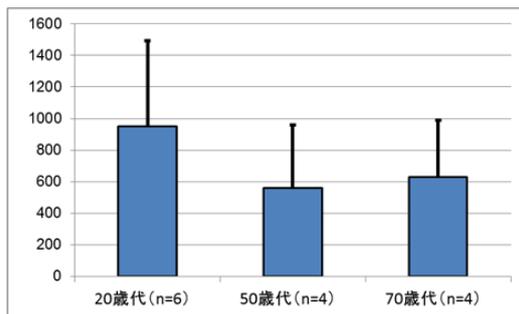
20歳代、50歳代、70歳代における上肢反応性充血
AUC(Area under the curve) (図3-2)



20歳代、50歳代、70歳代における下肢反応性充血
(図4-1)



20歳代、50歳代、70歳代における下肢反応性充血
AUC(Area under the curve) (図4-2)



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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. Takeuchi K, Watanabe H: Biomarkers for Endothelial Function. 第 33 回日本臨床薬理学会学術総会 BPS/JSCPT Joint Symposium, 那覇, 2012 年 11 月 29 日
2. Wei J, Takeuchi K, Inui N, Watanabe H: Inhibitory effects of Omega-6 polyunsaturated fatty acids on endothelial function, The 5th China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, Urumqi, China, 2011 年 8 月 8 日
3. 竹内和彦, Wei Jiazhang, 渡邊裕司: 血管

皮細胞機能に対する遊離脂肪酸の影響,
第 4 回静岡県血栓と血管フォーラム, 静岡.
2011 年 4 月 2 日

4. Wei J, Takeuchi K, Watanabe H: Omega-6 PUFA- induced endothelial dysfunction. 第 75 日本循環器学会学術年会, 横浜. 2011 年 3 月 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/wlb/cpharm/clinpharm.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 和彦 (TAKEUCHI KAZUHIKO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00419425

(2) 研究分担者

渡邊 裕司 (WATANABE HIROSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50262803

乾 直輝 (INUI NAOKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80402254

(3) 連携研究者