

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790880

研究課題名(和文)重粒子線を用いた致死性心室性不整脈の新規治療開発

研究課題名(英文)Development of new treatment for fatal ventricular tachyarrhythmias using heavy ion irradiation

研究代表者

網野 真理 (AMINO, Mari)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10407976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ心筋梗塞(MI)モデルを用いて心室遅延電位(LP)の経時的観察を行い、重粒子照射(THIR)が慢性期の不整脈基質に及ぼす効果を検討した。MI群では梗塞作成直後に出現したLPが、14日後には顕著となり1年続いた。THIR群では14日後からLPが軽減し始め、1年後には改善が進んだ。MI群で左室収縮能が低下したが、THIR群では14日後から収縮能が改善し、1年後には更に回復した。MI群で虚血境界領域におけるCx43の減少が認められたが、THIR群では発現亢進が認められた。MI群は全例VT/VF陽性であったが、THIR群では1例のみであった。THIRが不整脈基質を修復する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate longitudinal changes in electromechanical performance of myocardial infarction (MI) dog hearts by targeted heavy ion irradiation (THIR). Four dogs were treated with THIR (12C6r, 15Gy; RIKEN, Japan) 2W after MI. Signal-averaged ECGs and echocardiograms were obtained longitudinally over 1 yr. Inducibility of fatal ventricular tachyarrhythmias (VT/VF) and connexin 43 (Cx43) immunolabeling of the left ventricular tissues were studied 1 yr after MI. Immunolabeled Cx43 were significantly increased in dogs with THIR at non-ischemic zone and ischemic-border zone. Filtered-QRS increased 2W after MI and remained unchanged up to 1 yr in dogs without THIR, while returned toward baseline in dogs with THIR. RMS40 reduced 2W after MI, and then returned toward baseline only in dogs with THIR. VT/VFs were induced in 1/4 with THIR, whereas in 4/4 without THIR. LV systolic function inhibited 2W after MI, however 1 yr recovery was significantly enhanced by THIR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：コネキシン43 重粒子線照射 心室遅延電位

1. 研究開始当初の背景

(1) 筆者は従来の治療法とは根本的に異なる新しい抗不整脈治療が必要と考え、重粒子線治療の開発研究を進めてきた。最初の研究では、ウサギを用いて心筋梗塞 (MI) を作成し、2 週間後に心臓への重粒子線体外照射 (THIR) を行った。免疫染色, RT-PCR および Western blot 実験の結果から、コネキシン 43 (Cx43) の発現が梗塞周囲で大幅に増加する現象が観察された。In vivo の電気生理学実験では、低下した興奮伝導速度が改善するとともに、活動電位持続時間の空間的不均一性が減少し、VT/VF 誘発率が低下した。これは重粒子線が Cx43 GJ の発現亢進を介して心室筋細胞の電気結合を改善し、抗不整脈作用を発揮する可能性を示唆している。

(2) 続いて行った研究では、MI を作成しない正常ウサギを用いて、単回 THIR が Cx43 発現に及ぼす線量依存性効果と作用持続時間を検討した。照射線量 10 Gy 以上では線量依存性の有意な Cx43 発現亢進が生じ、15Gy では発現が照射後一年以上にわたって持続した。しかし病態心における慢性期の抗不整脈効果は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究ではイヌを用いて MI を作成し、THIR による Cx43 発現と心室内遅延電位 (LP) に及ぼす影響、慢性期の梗塞瘢痕に伴う不整脈抑制効果について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

体重 9-10Kg のビーグル成犬を用いて、ペントバルビタール静脈麻酔下(0.125-0.5mg/kg, i.v.) に経皮的カテーテルアプローチによる左冠動脈回旋枝へのマイクロスフェア ($5.0 \times 10^5/\text{mL}$, 2.5ml) 注入にて前側壁梗塞を作成した (n=8)。MI 作成 1 週間後、梗塞部位の確認と照射野を設定するため心臓磁気共鳴

映像法 (cardiac-MRI, フィリップス社製 intera master) を施行した。撮像にはペントバルビタール静脈麻酔下に β blocker (propranolol) div にて心拍数を 70 ~ 80 bpm にコントロールしつつ、呼吸非同期条件で心電図同期を行った。心臓の形態描出には Black blood technique、心機能描出には cine MRI、組織性状の描出には T2 強調画像およびガドリウム造影を施行した。造影剤はガドテル酸メグルミン (Gd-DTPA) (MAGNESCOPE[®]SYRINGE) (0.3cc/kg) を正肘皮静脈よりボラス投与し、投与 3 分後から 2 分間隔で撮像を繰り返した。

(2) 重粒子照射

MI モデルを重粒子線照射群 (MI+THIR, n=4) と非照射群 (MI, n=4) の 2 グループに分類した。THIR は MI 作成 2 週間後、理化学研究所 (埼玉県、和光市)においてペントバルビタール静脈麻酔下にエコーガイド下で 1 回のみ施行した。核種には理研サイクロトロン (RRC) で加速化された炭素イオン ($^{12}\text{C}^{6+}$) を使用し、照射エネルギー 135MeV/nucleon で 15Gy の単回照射とした。標的深度は皮膚表面から 2cm とし、SOBP を 2cm、照射範囲を 5cm 四方と設定した。照射野は健常心筋および冠動脈に対する放射線障害を最小限にするために、冠動脈腹側室間枝(LAD よりも中隔寄りの栄養血管) と回旋枝 (LCx) に囲まれる前側壁 ~ 心尖部の梗塞部位と周辺領域を目標とした。

(3) LP 計測と VT/VF 誘発試験

LP 計測はフクダ電子社製 12 誘導心電計 (FDX-6531) による加算平均心電図 (SAECG) を用い、ペントバルビタール静脈麻酔下に心拍数 80 ~ 100bpm 条件下で計測を行った。測定時期は、Baseline, MI 作成直後, MI 作成 2 週間後, THIR 2 週間後 (MI 作成 4 週間後), THIR 1 年後 (MI 作成 1 年後) とした。LP 解

析は QRS を 10 分ごとに 200 回自動加算平均し、ノイズレベル 0.8 μV 以下で the filtered QRS duration (FQRS), duration of the terminal low-amplitude signal less than 40 μV (LAS40), root mean square voltage of the terminal 40 ms of the FQRS (RMS40) の 3 指標を算出した。LP 計測後、フクダ電子社製汎用超音波画像診断装置 (Tellus UF-750XT) を用い、左室拡張終期容量 (LVEDV), 左室駆出率 (EF), フラクショナルシヨートニング (FS), early diastole/atrial filling velocity ratio (E/A), decelerating time in trans-mitral flow (DT) 計測を行った。

THIR 1 年後、ノルエピネフリン (0.1g/kg/min, i.v.) 注入下でプログラム刺激 (基本周期 300ms S1 \times 5-S2-S3-S4) を行い、VT/VF 誘発性を評価した。実験終了後、チアミラールナトリウム (10-15mg/kg) 静脈麻酔により安楽死させ、速やかに心臓を摘出し病理染色を行った。

(4) Cx43 発現

病理学的検討のため HE 染色, Azan 染色, および Cx43 免疫染色を施行した。Cx43 単染色には、一次抗体として抗 Cx43 マウスモノクローナル抗体 (Chemicon, 1:200)、二次抗体として ImmPRESS Reagent (低分子増感), 抗マウス IgG (host: horse) を使用した。Cx43 免疫陽性部位を定量化するために、免疫標識された切片を、デジタル顕微鏡 (COOLSCOPE、ニコン、日本) で観察した。2.2 \times 2.2mm 四方の領域を無作為に 10 カ所抽出し、心筋細胞一個あたりの Cx43 免疫染色陽性領域の平均値を求めた。

4 . 研究成果

(1) 心臓 MRI による梗塞部位の同定と病理学検討

MI 作成 1 週間後に施行した cardiac-MRI では、T2 強調画像およびガドリウム造影に

おいて前側壁に限局する高信号領域が認められた。造影剤投与後 3~5 分後で描出は最大となり、それ以降で灌流画像を得ることはなかったことから、同部位を梗塞巣と診断した。

梗塞作成 1 年後の病理学的検討では、心筋切片の Azan 染色と Cx43 免疫染色を施行した。左室横断面 (乳頭筋レベル) を、1) 健常部, 2) 梗塞部, 3) 虚血境界部 (IBZ) に分けて観察した。Azan 染色にて健常部 (梗塞部位対側領域) の中隔下部では心筋配列の整った健全組織が観察された。梗塞部 (前側壁領域) の心筋細胞の多くは線維組織に置換され、心筋構築が粗であった。梗塞巣と健常心筋の IBZ では、線維組織と残存組織が混在した。

Cx43 免疫染色では、MI モデルの健常部において介在板部分 (心筋細胞長軸に直交するものが多い) に限局して、統一性のある分布を示した。梗塞領域においては Cx43 発現の低下と消失が認められた。IBZ では介在板以外に細胞側面にも Cx43 発現が認められ、配列に乱れがあった。THIR モデルの健常部分では、心筋細胞長軸に直交する方向の介在板部分だけでなく、細胞側面にも Cx43 発現が観察された。梗塞領域においては Cx43 配列の乱れと欠損が認められた。THIR 施行後は、介在板および細胞側面とともに著しい Cx43 発現の亢進が見られた。全動物において、健常部で、THIR 群は MI 群に比較して 23.9 \pm 23.7% (p=0.04) の増加を呈した。梗塞部位では MI 群および THIR 群ともに Cx43 発現が低下しており、両群に有意差はなかった。IBZ では、THIR 群は MI 群に比較して 45.3 \pm 31.5% (p=0.03) の増加を呈した。

(2) 経時的な ECG 観察

代表的 MI モデルでは、14 日後の ECG にて I, aVL, II, aVF, V5, V6 誘導の T wave inversion が観察された。1 年後には同誘導部位の T wave が正常化していた。THIR モデ

ルでは、14日後の ECG にて I, aVL, II, aVF 誘導の T wave inversion が観察された。1年後には同誘導部位の T wave が正常化していた。MI 群および THIR 群における心電図の経時変化に違いは見られなかった。

(3) 経時的な LP 観察

SAECG を用いて LP を検討した。代表的 MI では Baseline に比べて 14 日後に FQRS と LAS40 μ V の増加, RMS40ms の減少が認められ、その結果 LP は悪化した。1年後のフォローでは、FQRS と LAS40 μ V は横ばい、RMS40ms の軽度増加が認められた。THIR 施行例では Baseline に比べて 14 日後に FQRS と LAS40 μ V の増加, RMS40ms の減少が認められ、その結果 LP は悪化した。1年後のフォローでは、FQRS と LAS40 μ V の減少、RMS40ms 増加が認められ、LP は改善した。

全 MI 群では Baseline に比較して MI 作成直後は LAS40 μ V の増加、RMS40ms の減少が有意であった。14 日後には FQRS も有意に増加し、LP を形成する 3 つの指標が悪化を示した。こうした LP 悪化の変化は、28 日後および 1 年後のフォロー時点まで持続した。いっぽう全 THIR 群では、照射前までは MI 群と同様の経時変化を示したが、照射 14 日後には FQRS と LAS40 μ V の減少、RMS40ms 増加が有意に認められ LP は改善した。こうした LP 改善の変化は、1 年後のフォロー時点まで持続した。

(4) UCG, general condition の評価と VT/VF 誘発試験

MI 群、THIR 群において UCG を用いた左室収縮・拡張能と、電気生理学検査による VT/VF 誘発率を評価した。代表的 MI モデルでは 14 日後に収縮能の指標である EF, FS の低下を呈し、1 年後も改善は認められなかった。拡張能の指標である E/A および DT は有意な経時変化は示さなかった。THIR モデ

ルでは MI 14 日後に EF は 16%, FS は 25% の低下が認められたが、1 年後の EF は 11%, FS は 10% 改善した。E/A および DT は有意な変化は示さなかった。

全 MI 群では Baseline に比較して MI 作成直後は EF, FS の低下が有意であった。14 日後には LVEDV も有意に増加し、左室収縮能低下と左室拡大は 1 年後まで継続した。いっぽう THIR 群は照射 14 日後には EF の改善傾向が認められた。1 年後には EF, FS が有意に改善し、LVEDV が減少した。E/A, DT については両群で有意な経時変化は生じなかった。晩期放射線障害に伴う心嚢液貯留、収縮性心膜炎、心臓悪性腫瘍、MI の新規発生は認められなかった。全身状態の観察では MI 群、THIR 群において接種量、体重に明らかな変化は認められなかったが、THIR 群では前胸部の照射領域に一致する脱毛所見が認められた。末梢血・生化学検査による汎血球減少症、肝臓障害、腎機能障害は認めなかった。全観察期間中死亡例は認められなかった。

電気生理学検査によるプログラム刺激 (S1-2-3-4) を用いた VT/VF 誘発検査では、打代表的 MI モデルで多形性心室頻拍に続いて VF が出現した。THIR モデルでは心室性期外収縮が 5 連発出現したのみで持続しなかった。全動物の結果として VT/VF 誘発率は MI 群で 100% (4/4) であるのに対して、THIR 群では 25% (1/4) であった。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Mari Amino. Heavy ion irradiation after myocardial infarction facilitates long-term recovery of electromechanical synchrony of canine hearts in association with Cx43 upregulation. 日本循環器学会学術集会. 2013 年 03 月 15 日 ~ 2013 年 03 月 17 日.
- (2) 網野真理, 重粒子線照射が梗塞後の不整脈基質に及ぼす長期効果: イヌ心筋梗塞モデ

ルを用いた検討. 日本心電学会学術集会.
2012年10月12日~2012年10月13日. ホテル
ルニューオータニ幕張

〔図書〕(計1件)

(1) 網野真理(分担著者), 不整脈学, 南江堂.
2012年

6. 研究組織

1) 研究代表者

網野 真理 (AMINO MARI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 10407976