

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461091

研究課題名(和文)ウサギ除神経モデルにおけるMIBGを用いた交感神経増生の検討

研究課題名(英文) Normal 123I-MIBG uptake areas may be associated with hyperinnervation and arrhythmia risk in phenol model rabbit hearts

研究代表者

網野 真理 (AMINO, Mari)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10407976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：健常なNew Zealand White rabbitを用い、フェノール塗布による除神経モデルを作成し鏡面心筋病理切片を用いたオートラジオグラフィおよび免疫染色(GAP43, TH)を用いて定量し、電気生理学的研究を行った。除神経が存在する心筋では、MIBGとりこみ正常領域においても過増生が存在した。すなわち異質な神経リモデリングがMIBGで一見正常な非除神経領域まで広がり、電気的不安定性に寄与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Iodine-123 metaiodobenzylguanidine (123I-MIBG) is useful for detecting sympathetic innervation in the heart, and has been closely associated with fatal arrhythmias. However, such imaging is typically calibrated to the area of highest uptake and thus is unable to identify areas of hyperinnervation. We hypothesized that normal 123I-MIBG uptake regions in the denervated heart would demonstrate nerve sprouting and correlate with the potential for arrhythmogenesis. Twenty New Zealand white rabbits treated with phenol or sham were prepared under anesthesia. Sympathetic innervation was quantified using autoradiography and immunostaining 4 weeks after phenol application, and electrophysiological study was performed. The presence of hyperinnervation in the non-denervated regions of denervated rabbit hearts suggests that heterogeneous neural remodeling occurs in regions with seemingly normal 123I-MIBG uptake and contributes to electrical instability.

研究分野：循環器内科

キーワード：MIBG 交感神経過増生 除神経モデル うさぎ

## 1. 研究開始当初の背景

心臓交感神経の分布異常は心室頻拍および心室細動 (VT/VF) の発生と関連している。交感神経の障害は神経発芽に伴う再生を招き、除神経後数週間で神経過増生につながる可能性がある。除神経と過増生の混在は、除神経過敏 (denervation hypersensitivity) に応じて、交感神経刺激による再分極時間の過度な延長あるいは短縮をもたらす、左室における不応期のばらつきを増大させる。

ヨウ素 123 メタ・ヨードベンジルグアニジン (123I-MIBG) はノルエピネフリン (NE) 類似物質がシナプス前交感神経終末にて選択的に取り込まれる性質を利用した交感神経支配異常のイメージング様式の 1 つである。左心室機能不全患者の心室不整脈誘発性は 123I-MIBG SPECT における後期の欠損スコアと関連し、この欠損スコアは、適切な埋め込み型電気除細動器 (ICD) 療法の独立した予測因子として確立された。プラナーイメージにおける縦隔縦隔 (H/M) 比は、ICD 移植を受けた心不全患者のうち、不整脈事象を経験した患者で不整脈事象を経験していない患者よりも有意に低下していた。

## 2. 研究の目的

神経発芽を判定するための MIBG とりこみ量の定量化は、生理学的変動、アーチファクトの混入、全体的に低い取り込み率、施設の設定の違ひなどのために技術的に困難である。Clements らは MIBG の包括的定量を評価するための調整に H/M 比を使用した。しかしこの手法は心内膜と心外膜の MIBG 取り込みの差を考慮していないため、不整脈基質となりうる電気生理学的特性を過小評価する可能性がある。

したがって本研究の目的は、除神経心における MIBG uptake 正常領域は神経再生を含み、不整脈形成の可能性と相関するか否かを検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 除神経モデルの作成

健常な New Zealand White rabbit を用い (n=20, 雄)、フェノール塗布による除神経モデルを作成した。対照は生理的食塩水塗布によるシャムオペモデルとした。

### (2) MIBG

MIBG には <sup>123</sup>I-MIBG (half period 13.1hours) をもちいた。術後 4 週の時点で シャム・フェノールモデルにおいて鏡面心筋病理切片を用いたオートラジオグラフィを用いて定量評価を行った。摘出心を用いた ARG 解析にはスキャナータイプ画像解析装置 (Typhoon FLA 7000, GE ヘルスケア) によるデンシトメトリーを用いてアイソトープの分布量を計測し、循環器専門医 2 名による視覚的評価を施行した。解析ソフトには Multi Gauge V3.1 (FUJIFILM) を用い、心筋短軸切

片の左室前壁から時計方向に 12 カ所 (ROI No 1-12) の矩形関心領域 (region of interest: ROI) を設定し、左室の最大 ROI を 100% とした場合の MIBG 集積率を対左心最大比 (%) と定めた。集積率により MIBG uptake の割合を正常 ( $\geq 64\%$ ), 軽度低下 (36-63%), 中等度低下 (13-35%), 高度低下 ( $\leq 12\%$ ) の 4 段階に分類した。

### (3) 免疫染色

免疫染色用に作成した厚さ 10 $\mu$ m の凍結切片を用いて 2 種の交感神経線維の標識: anti-growth associated phosphoprotein 43 抗体 (GAP43), anti-tyrosine hydroxylase 抗体 (チロシン水酸化酵素 TH) を施行した。解析手法は過去の研究手法にもとづき、免疫標識された交感神経密度を蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000 KEYENCE) で観察し、コンピュータによる自動識別解析を施行した (BZII 解析アプリケーション, KEYENCE)。

### (4) 電気生理学検査

モデル作成から 4 週間後、静脈麻酔下に、仰臥位にて胸骨正中切開による開胸実験を施行した。頸部正中切開により左右両側の内頸部動脈および総頸動脈から迷走神経を剥離し、心臓迷走神経支配を遮断する目的で切断した。右総頸動脈に動脈圧計測用のカテーテルを留置し、左室収縮末期圧 (left ventricular end systolic pressure: LVESP) をモニターリングした (Fukuda Denshi Co. Japan)。頸部交感神経節を結合組織から剥離し、左星状神経節にシルバーコーティングされた双極電極を装着した。左星状神経節刺激では、2ms 幅、2-10Hz、6-12V の電気刺激を定常的に与えた (Model SEN-3201; Nihon Kohden Co. Japan)。左室心表面における不応期測定のために、7 $\times$ 7mm 四方に 8 $\times$ 8 本の単極電極を備えた電極板 (64 電極マップ) を左室心表面に設置した。

## 4. 研究成果

### (1) 123I - MIBG 画像解析

シャムオペモデル (n=4) フェノールモデル (n=4) における ARG 画像を ROI に一致する 12 領域を時計回りにナンバーリングする。シャムオペモデルでは 123I-MIBG の集積低下は認められず、左室集積率は対左心最大比で  $91\pm 4.4\%$  であった。フェノールモデルでは、左室前壁～側壁領域心筋中層の集積低下が認められ、対左心最大比は  $61\pm 33.0\%$  と低下していた。左室 12-ROI 領域における lacking MIBG uptake の割合を色別に分類した棒グラフを示す。シャムオペモデルでは各 ROI-1～ROI-12 における集積率は全領域で 90% 以上と正常集積であった。いっぽうフェノールモデルでは ROI-1～7 のうちの 4 領域で中等度低下 (yellow-green)、3 領域で軽度低下 (yellow) に分類された。MIBG 画像における局所の MIBG uptake の不均一性を明らかにす

るため、隣接する ROI 間の差分を求めた。シャムオペモデルとフェノールモデルを比較すると ROI-12/1, ROI-1/2, ROI-6/7 の 3 領域間において有意に大であった。とりこみの局所ばらつきが最大となるのは取り込みが低下する中心部分ではなく、取り込み低下領域と非低下領域の境界域であった。これらの結果は、局所領域間の取り込みのばらつきが、MIBG とりこみの最も低い領域内ではなく、MIBG とりこみが低下している領域と正常な領域の境界部で増加したことを示唆した。

### (2) 組織学検討

GAP43 および TH 免疫染色をコンピュータにより自動シグナル化した。GA43 免疫染色はシャムオペモデルの左室でびまん性シグナルが確認され、明らかな偏在は認めなかった。フェノールモデルではフェノール塗布領域の左室前側壁(#2-6)に一致するシグナル減衰が認められ、その他の部位では豊富な発現が認められた。拡大像においては、シャムモデルの #5 領域では GAP43 の比較的均一な線状の発現が見られるが、フェノールモデルの #5, #6 領域では GAP43 が不均一かつ網状に過剰発現していた。GAP43 の定量をシャムオペモデル(n=4)とフェノールモデル (n=4)でおこなうと、シャムオペモデルでは各領域で 2.6%~3.6%と均一な分布を示した。フェノールモデルではフェノールを塗布した左室前側壁でシグナルが低下し、いっぽう塗布していない中隔~下壁領域においてはシグナルが亢進し、1.1%~5.9%とばらつきがあった。統計学的にシャムと比較して、フェノールでは ROI-3 および ROI-4 における有意な減少 ( $p < 0.01$ ) および ROI-10 および ROI-11 における有意な増加 ( $p = 0.04$ ) が観察された。これらの結果は、フェノール塗布領域では GAP-43 の発現の減少が認められたのに対して、フェノールが塗布されていない領域で GAP-43 の過剰発現が認められたことを示した。

TH 免疫染色はシャムオペモデルで GAP に比較してシグナル強度が弱かったが、均一な発現が確認された。フェノールモデルの TH 免疫染色においてもシグナル強度が弱いものの、しかしながらフェノール塗布領域では発現の低下は見られなかった。定量結果において、シャムオペモデル (n=4) は各領域で 0.8%~1.2% と均一な分布を示し、フェノールモデル (n=4) では 0.9%~2.1% と発現量のばらつきが大きくなった。統計学的にシャムと比較して、フェノールモデルにおける ROI-8 ( $p < 0.01$ ) および ROI-9 ( $p = 0.04$ ) の有意な増加が観察された。この結果は、フェノール塗布部位で TH の減少は見られなかったが、塗布していない下壁領域で増加がみられることを意味した。

### (3) 電気生理学検査

シャムオペモデル (n=6)・フェノールモデ

ル (n=6) に対してノルエピネフリンを投与した。ノルエピネフリンは、サイナスサイクルレンクスを変えずに  $338 \pm 27$  対  $326 \pm 29$ ms、 $p = \text{ns}$ 、平均血圧を上昇させた ( $74 \pm 11$  対  $92 \pm 16$ mmHg、 $p < 0.01$ )。

シャムオペモデルでは、NE 注入前後の平均 ARI 値は、前側壁 (生理食塩水塗布) と中隔 - 下壁 (対照) 領域で差はなかった。また両領域における NE 注入後の ARI ばらつきの変化はほとんどなかった。投与された NE を十分に wash out した後、星状神経節刺激を行った。左星状刺激の前後における、前側壁および中隔 - 下壁の平均 ARI 値に差はなかった。いずれの LV 領域においても ARI のばらつきは変化しなかった。

フェノールモデルにおけるベースライン (NE 注入前) の平均 ARI は、中隔 - 下壁領域 (対照) よりも前側壁領域 (フェノール塗布) においてより長かった ( $136 \pm 3.2$  および  $132 \pm 2.8$ ms、 $p = 0.04$ )。NE 注入中の平均 ARI は、中隔 - 下壁領域より前側壁領域においてより短かった ( $123 \pm 8.3$  および  $133 \pm 6.3$ ms、 $p = 0.02$ )。NE 注入後の ARI のばらつきは、前側壁領域 ( $12 \pm 4.1$  および  $24 \pm 6.0$ ms、 $p < 0.01$ ) のベースラインより有意な増加を示した。しかし、中隔 - 下壁領域では有意な増加は観察されなかった ( $13 \pm 3.0$  および  $18 \pm 5.6$  ms、 $p = \text{n.s.}$ )。ベースライン時 (星状刺激前) の平均 ARI は、中隔 - 下壁領域より前側壁領域においてより長かった ( $135 \pm 3.8$  および  $132 \pm 2.6$ ms、 $p = 0.04$ )。しかし、星状刺激後、前側壁領域と中隔 - 下壁領域 ( $123 \pm 13.0$  および  $133 \pm 4.4$ ms、 $p = \text{n.s.}$ ) との間に有意差はなかった。したがって、ARI のばらつきは、前側壁領域 ( $14 \pm 3.6$  および  $28 \pm 5.9$ ms、 $p < 0.01$ )、中隔 - 下壁領域 ( $13 \pm 2.9$  および  $20 \pm 2.6$ ms、 $p < 0.01$ ) においても、星状刺激後に有意に増加した。

VT/VF 誘発性は、NE 投与中のプログラム刺激または NE を wash out したうえでの星状刺激によって試験した。非持続性 VT は、3 つ以上の連続した心室期外収縮 ( $\geq 100$  ビート/分) で 30 秒以内に自発的に終了するものと定義された。これより長い持続を示すものは持続性 VT として記載された。VT/VF の発生率は、シャムモデルで 0%、フェノールモデルで 83%であった (0/6 対 5/6;  $p < 0.02$ )。より大きい ARI のばらつきを示すフェノールモデルにおいて、より高い心室性不整脈の誘発性が観察された。自発発生的な不整脈事象は観察されなかった。

結語) 除神経が存在する心筋では、MIBG とりこみ正常領域においても過増生が存在した。すなわち異質な神経リモデリングが MIBG で一見正常な非除神経領域まで広がり、電気的不安定性に寄与する可能性を示唆した。

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 1件)

1. Amino M, Yoshioka K, Tanaka S, Kawabe N, Kurosawa H, Uchida K, Oshikiri S, Hashida T, Kanda S, Inokuchi S, Ikari Y. Normal 123I-MIBG uptake areas may be associated with hyperinnervation and arrhythmia risk in phenol model rabbit hearts. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2017;40(10):1103-1112 (査読有).

〔学会発表〕(計 2件)

1. Amino M, Yoshioka K, Tanaka S, Kawabe N, Kurosawa H, Uchida K, Oshikiri S, Hashida T, Kanda S, Inokuchi S, Ikari Y. Normal 123I-MIBG uptake areas may be associated with hyperinnervation and arrhythmia risk in phenol model rabbit hearts. The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRs 2017) and the 64th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society (JHRS2017) (2017.9 yokohama)

2. Amino M, Yoshioka K, Sakurai K, Kurosawa H, Uchida K, Oshikiri S, Tanabe T, Ikari Y. Meta-iodobenzylguanidine Scintigraphy is Useful to Determine the Hyperinnervation in Denervated Rabbit Heart. The 79th Anniversary Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (2015.4)

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

網野 真理 (AMINO, Mari)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：10407976

(2)研究分担者

吉岡 公一郎 (YOSHIOKA, Koichiro)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：30246087

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者 該当なし