

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学医学部内科学講座循環器内科学教室

職名・氏名 臨床助教 堀越 健生 ㊞

1 研究テーマ

心血管病に合併する末梢臓器障害の基礎的・臨床的機序解明に関する研究

2 研究の目的

本研究の目的は、主に光音響イメージング (PAI) と偏光顕微鏡を用いて、動脈硬化病変の評価とそれより飛散するコレステリン結晶を観察することで、心血管病と末梢循環不全による臓器障害の関連を明らかにすることにある。

3 研究の方法

本研究では、基礎研究で動脈硬化遺伝子改変ウサギと JW ウサギを対象に、PAI による大動脈プラークの視覚的な性状評価と偏光顕微鏡による血液・組織検体内のコレステリン塞栓の関連を明らかにする。具体的な研究方法を下記に示す。

【基礎実験】

・10 週齢の JW ウサギに 24 週間高脂肪食を負荷し、動脈硬化ウサギモデルを作製する。

①大動脈プラークの PAI 検査 (既存の検査法との比較)

動脈硬化ウサギ (n=4) を用い、腹部大動脈に形成された不安定プラークを全身麻酔下に PAI で観察し、不安定プラークに新生するプラーク内微小血管を画像評価する。また、同じプラークで造影エコー、血管内視鏡、光干渉断層法といった既存法による所見と PAI による所見とを比較検討する。同様の検査を遺伝子改変動脈硬化ウサギにも施行する。

②大動脈プラーク病理組織標本との対比

PAI でプラーク面積に占める微小血管シグナル領域の割合を算出し、不安定プラーク内に発生する微小血管の定量を行う。その後、灌流固定した血管から大動脈組織標本を作製し、IsolectinB4 (血管内皮細胞を染色) を用いた免疫染色を行う。組織学的に血管新生領域を同定し PAI での微小血管領域との比較検討を行う。

③末梢臓器の PAI (末梢微小循環の評価)

動脈硬化ウサギに PAI を用いて腎臓と足趾の微小循環評価を行う。組織における PAI シグナル強度を定量化し、高脂肪食負荷による末梢組織微小循環の経時的な変化を検討する。

④ウサギ腎・下肢組織におけるコレステリン結晶の観察

腎臓、下肢皮膚組織や末梢動脈の組織切片標本を作製し、偏光顕微鏡を用いてコレステリン結晶による塞栓症の有無を観察する。この結果と③の結果とを比較検討する。

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

【臨床実験】

⑤ヒト健常者における血管内皮機能検査と微小循環反応の関連についての検討

健常者における血管内皮機能検査である内皮依存性血管拡張反応（FMD 検査）と手指阻血前後での PAI を用いた末梢微小循環の反応の関連について検討する。

⑥ヒト動脈血内のコレステリン結晶の同定

心臓カテーテル検査時に末梢動脈より動脈血を採取、偏光顕微鏡を用いて血液内に含まれるコレステリン結晶を定性・定量化する。

⑦腎障害・末梢循環障害と⑥との関連

臨床的に得られた腎機能障害の指標や PAI で得られた下肢微小循環の結果と大動脈プラークの画像性状、コレステリン結晶との関連について検討を行う。

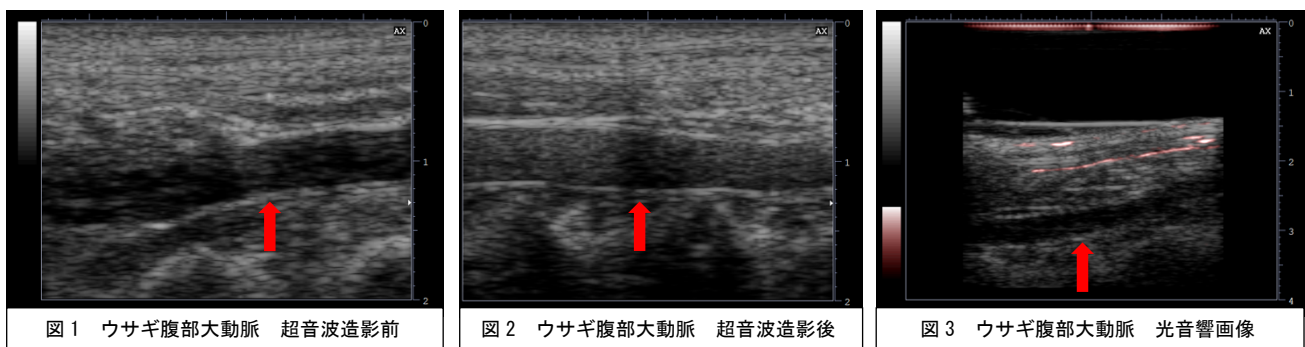
4 研究の成果

※半導体不足の影響で受注生産品である超音響イメージング装置の納入遅延が生じ、実験計画の大幅な遅滞が発生し、実験計画の修正を必要とした。

【基礎実験】

①大動脈プラークの PAI 検査（既存の検査法との比較）

JW ウサギ 4 羽を導入。高脂肪食負荷前の検査として、腹部大動脈を造影超音波および PAI で観察。動脈硬化病変が存在しないこと、動脈硬化内の微小血管が存在しないことを確認した(図 1-3)。今後、高脂肪食負荷を行い、定期的な（12 週ごと）動脈硬化の進展状況の確認と微小循環形成を評価していく予定である。また、遺伝子改変ウサギについても現在規定週数までの生育を待機している段階であり、納入され次第計画の実験を行う予定である。



【臨床実験】

⑤ヒト健常者における血管内皮機能検査と微小循環反応の関連についての検討

ヒト健常者（N = 5）を対象に内皮依存性血管拡張反応検査および手指阻血前と阻血解除後での PAI 信号シグナルの強度変化を検討した。得られた画像を 8bit 変換し、微小循環の存在部位に関心領域を設定し、平均輝度を光音響シグナルとして評価した。3 分間の阻血前後の光音響イメージングを下記に示す（図 4, 5 赤矢印：光音響シグナル、青矢印：

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

基点マーカ)。手指阻血前後で阻血部末梢の表在組織における光音響シグナルの有意な増強を認めた ($P = 0.04$)。(図 6)

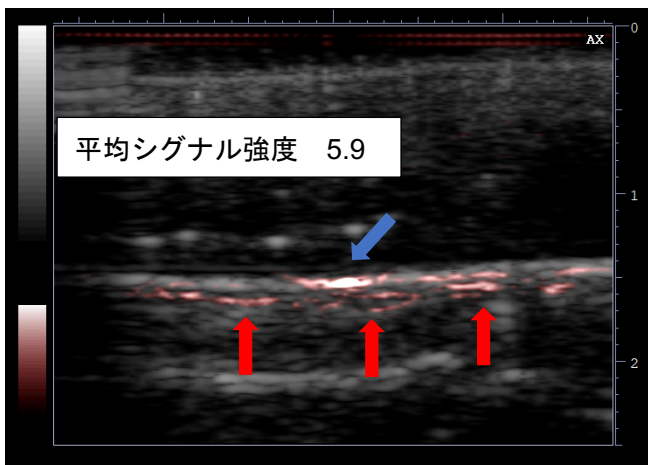


図 4 ヒト手指 光音響イメージング 阻血前

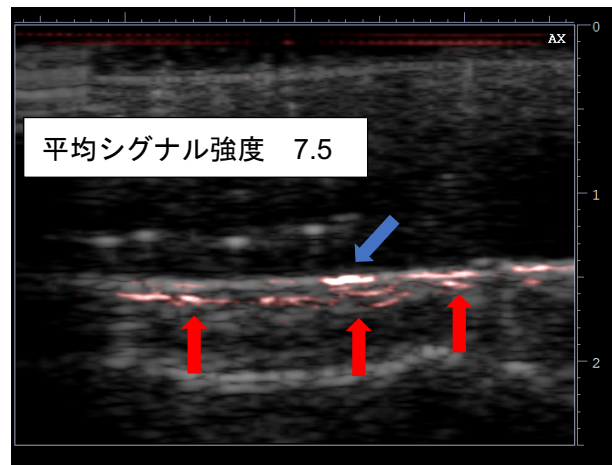
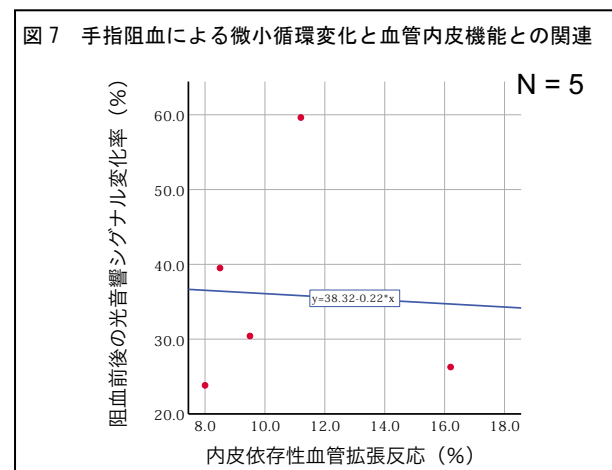
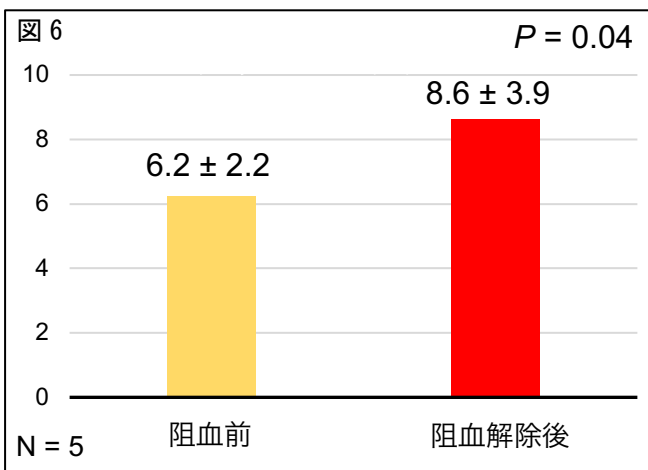


図 5 ヒト手指 光音響イメージング 阻血解除後



手指阻血による末梢微小循環の変化率 (%) と内皮依存性血管拡張反応 (%) との関連を図 7 に示す。被検者数が少ないため有意な関連を見出すには至らなかった。

5 今後の展望

今後、ウサギにおいて高脂肪食負荷による動脈硬化進展とともにプラーク内の微小血管の進出が期待される。既存の検査方法と比較し、圧倒的に非侵襲的である PAI で同等の検査成果が見いだされ、臨床応用に至ることが期待される。また、血管内皮機能との関連が見いだされれば、PAI が血管内皮機能としても有用である可能性が示唆される。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

本研究の結果は、アメリカ心臓協会学術総会/欧州心臓病学会学術総会での発表や査読付き英語論文への投稿を予定している。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。