

微小血管造影法を利用した各種循環器疾患における 微小循環動態の評価

1. ラット肺高血圧モデルにおける肺動脈微小血管構造の評価
2. マウス下肢微小血管の薬剤に対する反応性の評価

高谷具史(1)・梅谷啓二(2)・佐々木直人(1)・篠原正和(1)・山下智也(1)・川嶋成乃亮(1)
横山光宏(1)

(1)神戸大学大学院医学系研究科 循環呼吸器病態学講座

(2)高輝度光科学研究センター

1. ラット肺高血圧モデルにおける肺動脈微小血管構造の評価

この実験は 2005A0456-NL3-np 課題にて当教室の篠原正和が萌芽的研究支援
報告書を作成しており、内容が重複するため今回の報告書では省略とする。

2005A0456 並びに 2005B0642 で行った実験の結果をまとめて

2005A0456-NL3-np 課題報告書となっている。

2. マウス下肢血管の薬剤に対する反応性の評価

背景

血管内皮機能障害は動脈硬化性疾患の発症・進展に関与し、心血管イベントの予測因子となりうる。従って血管内皮機能障害の評価は動脈硬化性疾患における治療戦略決定に重要である。臨床においてはエコー検査を用いて前腕動脈の拡張・収縮を観察することが可能であり、薬剤や血流量の変化に対する血管反応性を観察することで血管内皮機能障害を定量的に評価できる^{1,2}。近年、小動物、中でもマウスを用いた循環器疾患の研究が進められており、マウスにおいても血管内皮機能障害を評価する必要性が高まっている。

これまで、マウスにおいては胸部大動脈を摘出し、organ chamber を用いた生

体外実験(ex vivo)で血管反応性が評価されていた³。この実験系での評価はあくまでも生体外実験であるということ、また少なくとも胸部～腹部大動脈程度の大きさの血管で無ければ技術的に実験が困難であることが問題点となっていた。

生体内において血管反応性を評価するためには造影剤を用いた血管造影を行い、血管径の変化を画像として評価することで可能となる。マウスでは血管径が 0.5-1.0mm 前後と細いため、その血管径の変化をとらえるためには高い空間分解能と時間分解能を必要とする。放射光を線源とし、ヨード造影剤に特異性の高いエネルギーの単色放射光を用いることで、生体内における血管反応性を評価することが可能になると考えた。

目的

単色放射光を用いた微小血管造影システムによりマウス生体内における血管反応性を評価することを目的とする。

実験方法

1. 動物の処置

マウスをペントバルビタール腹腔内注射により麻酔をおこない、顕微鏡下に右大腿動脈へ外径 0.5mm のポリエチレンチューブ(夏目製作所 SP-8)を挿入し、腹部動脈分岐部に先端を留置した。ポリエチレンチューブは外径 1.0mm のチューブに接続し(夏目製作所 SP-31)、これを 24G の注射針に連結して造影剤の入ったシリンジに接続した。造影剤としてヨード系造影剤オムニパーク 300 を使用した。

2. 微小血管造影実験

実験は BL28B2 にて、33.2KeV の放射光を用いた。BL28B2 では回転式スリットを用いたシャッターが設定されており、今回の実験ではシャッター速度を 2msec に設定した。

薬剤投与前の血管径計測のため 0.1ml/sec の速度で 1 秒間造影剤を注入し血管造影を行った。その後 10 分間待った後に血管内皮依存性弛緩反応を生じるアセチルコリン(Ach)を 2 μ g/kg 動脈内に投与し、1 分間待った後に 0.1ml/sec の速度で

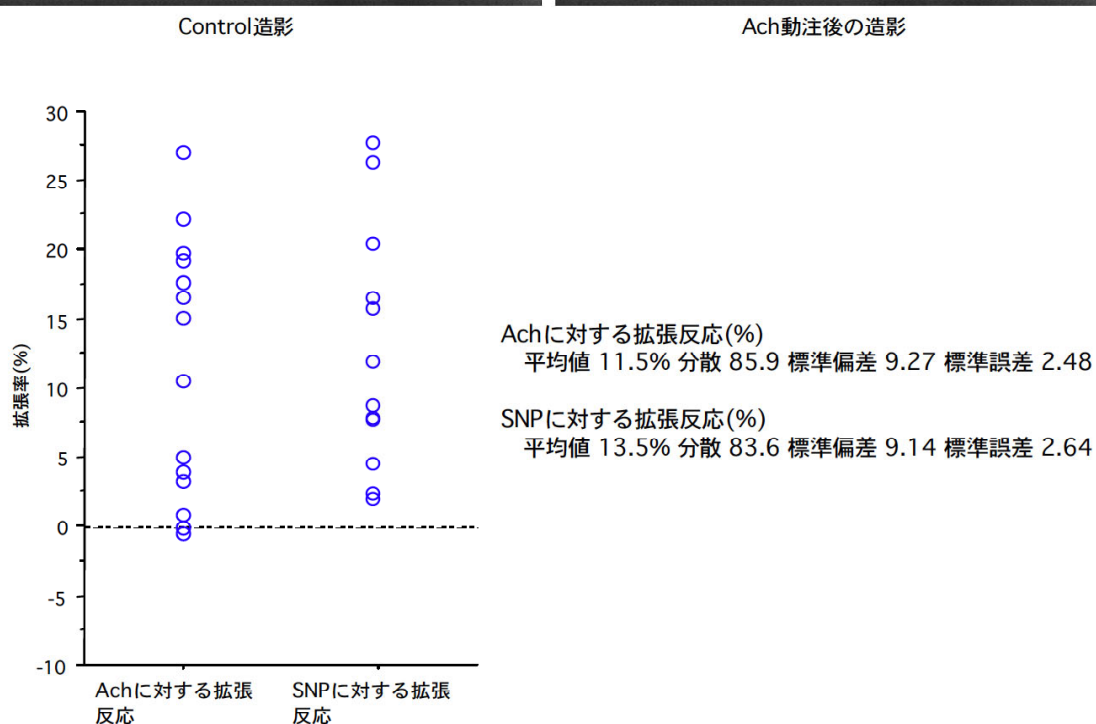
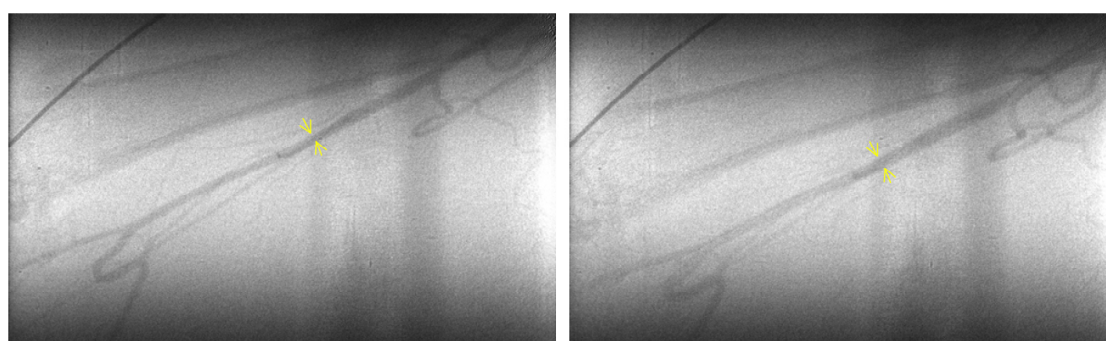
1 秒間造影剤を注入し血管造影を行った。さらに 10 分間待った後に血管内皮非依存性弛緩反応を生じるソディウムニトロプルシド(SNP)を 20 $\mu\text{g/kg}$ 動脈内に投与し、1 分間待った後に同様の血管造影を行った。

3.血管径変化の定量的評価

薬剤投与前の血管径とアセチルコリン・ソディウムニトロプルシド投与後の血管径を同一の部位で計測し、その拡張率を計算した。

結果

造影剤注入後、同フレーム時相の画像を用いて同一部位の血管径を計測し、control 造影とアセチルコリン・SNP 動注後の造影を比較した。



図に示すようにアセチルコリンに対する拡張反応は平均 11.5%、また SNP に対する拡張反応は平均 13.5%観察された。

考察

今回の実験では「再現性の低さ」が大きな問題となった。まず 1 つめの「再現性の低さ」として血管造影手技自体の不安定性を挙げなくてはならない。造影剤を注入しても造影が薄いために血管径の測定が困難となる個体や、全く造影されない個体も多く見られた。

実験手技として、右側の大腿動脈より上行性に造影カテーテルを腹部大動脈分岐部まで上げ、造影剤の注入を行った。この操作により対側の大腿動脈に十分な造影剤が流れ込み、再現性に富む血管造影が可能であろうと予想していた。カテーテル先端の位置確認は造影剤注入前に透視像を確認することで可能であったが、実際に造影を行うと約半数は評価可能な血管造影像を得ることが出来なかった。その原因としては、造影カテーテルが腹部大動脈分岐部を超えて大動脈へ楔入するように挿入されてしまい、大腿動脈へ造影剤が注入されなかったこと、またマウスでは尾動脈に流れる血流量が多いため、腹部動脈分岐部より注入した造影剤が尾動脈へ逃げてしまったことなどが可能性として考えられた。

次に 2 つめの「再現性の低さ」としては、様々な薬剤濃度に対する血管拡張反応の相関を取ることが難しい点である。注入したアセチルコリン・SNP は血流で直ちに希釈されるため、血管造影で観察している部位にどのような濃度で作用しているかが分からない。このため organ chamber を用いた ex vivo 生体外実験で通常行われているように、累加的に薬剤を投与しながら血管反応を評価することができず、ある one-point の薬剤に対する血管反応を観察することしかできない。そのため薬剤注入時のばらつきの影響を大きく受ける可能性が高い実験系と言える。

BL28B2 にて構築されている微小血管造影システムは、10 μ m 前後の空間解像力を持ちながら生体内にて血管反応性を定量的に評価することが可能なシステムである。マウスの大腿動脈を観察対象とした場合、以上のような「再現性」の問題を解決しなくてはならないが、高脂血症・糖尿病・動脈硬化モデルマウスといった種々の病態モデルマウス（遺伝子改変マウスも含む）における血管

内皮障害を生体内で評価し、それら病態モデルマウスに対する治療の血管内皮機能に与える影響を評価するといった展開を今後検討していきたい。

参考文献

1. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-265.
2. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-1115.
3. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1998;102:2061-2071.