

単色放射光を用いた微小血管造影による肺高血圧モデルラットでの微小肺動脈構造の解析

篠原正和(1)・高谷具史(1)・梅谷啓二(2)・佐々木直人(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

背景

肺高血圧症は前毛細血管性肺高血圧と後毛細血管性肺高血圧に大別される。前者は肺動脈系の血管抵抗の増大に起因する肺高血圧症であり、その原因疾患として原発性肺高血圧症・肺塞栓症・シャント性先天性心疾患等があげられる。後者は肺静脈圧の上昇が肺高血圧の原因となるもので、左心不全が大きな原因としてあげられるものである。前毛細血管性肺高血圧は病態の進行と共に肺動脈微小血管において血管病変が進行してくるものと考えられる。しかし現在、肺動脈微小血管病変は病理組織においてでしか直接的には確認できず、病態の評価となる指標は心エコー検査・心臓カテーテル検査による右心系の圧データしか得られない。

組織の灌流抵抗は直径約 100 μm 以下の抵抗血管が規定している。前毛細血管性肺高血圧においては、末梢の微小血管において平滑筋の増生を認めその過収縮が生じていたり、中膜・内膜の繊維性肥厚による内腔の狭窄が出現したりすることにより肺循環灌流抵抗が増大していると考えられる。これらの病変は出現部位が微小血管領域であるがため、従来の X 線を用いた血管造影においては描出が困難であった。肺動脈の微小血管病変を画像的に評価することが可能となれば、前毛細血管性肺高血圧の病態を正確に把握したり、薬物治療に対する反応性を予測したりできる可能性があると考えられる。

我々はこれまで SPring-8 によって得られる単色放射光を用いた微小血管造影システムを用いて小動物での生体内微小血管造影実験を行ってきた。マウス生体内における微小血管の血管作動性物質への反応性の評価¹、マウス・ラット生

体内における冠動脈造影²、動脈硬化モデルマウスにおける動脈硬化病変の生体内微小血管造影における画像評価³などを行い、報告を行ってきた。

これまで研究を行ってきた微小血管造影システムを発展させ、今回我々は肺高血圧モデル動物において、肺動脈微小血管造影を用いた肺動脈微小血管構造の評価を試みた。肺高血圧モデルとして、モノクロタリン投与による肺高血圧モデルラットを用いた。正常ラット、モノクロタリン肺高血圧モデルラットに加え、臨床的意義を念頭におき肺高血圧に対する治療群の設定も行った。肺高血圧に対する治療群としてさまざまな薬剤が候補として研究されているが、今回我々の実験では Rho キナーゼ阻害薬のファスジルを用いた。1990年代に低分子量 G 蛋白質 Rho の下流にある Rho キナーゼが同定され^{4,6}、血管平滑筋の収縮・細胞の接着と運動・炎症性遺伝子/サイトカインの発現などの様々な細胞機能に関係していることが報告された。九州大学の阿部らの研究により Rho キナーゼ阻害薬はモノクロタリン肺高血圧モデルラットに著明な効果を示すことが報告されており⁷、ファスジル投与量・投与期間も阿部らの実験条件を採用した。

目的

単色放射光を用いた微小血管造影により肺高血圧モデルラットでの肺動脈微小構造の評価を行う。また Rho キナーゼ阻害薬ファスジルによる治療効果を微小血管造影による形態的評価で評価可能であるか検討を行う。

実験・解析方法

1. モノクロタリン肺高血圧モデルラットの作成

動物群として(1)コントロール群(2)モノクロタリン肺高血圧群(3)ファスジル治療を行ったモノクロタリン肺高血圧群 の 3 群を設定した。いずれも 250g-300g のオス SD ラットを用いた。(1)コントロール群に対しては生理食塩水の腹腔内注射を行った。(2)モノクロタリン肺高血圧群に対しては、60mg/Kg のモノクロタリンを生理食塩水に溶解して単回腹腔内注射を行った。過去の検討にて投与後 3 週間で高度の肺高血圧を発症することが報告されている⁸。(3)ファスジル治療群では、モノクロタリン注射後より 100mg/Kg/day のファスジルを飲水に溶解して 3 週間投与した。

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。視野角は 9.5mm 四方とした。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。生理食塩水/モノクロタリン注射後 3 週後のラットを SPring-8 に持ち込み、ビームラインに設置した動物処置室にて処置を行った。ペントバルビタール腹腔内注射によって麻酔を行い、右内頸静脈へ 22G サーフローを顕微鏡下で挿入し全長 (25mm) が挿入されるように角度を調節し、造影剤注入装置に接続した。造影剤としてはヨード系造影剤 (オムニパーク 300) を用いた。予備実験にて 22G サーフローの全長が入ることで右房にサーフローがアプローチされることを確認した。次に気管切開を行い、切開部に 20G のチューブを挿入し人工呼吸器によって一回換気量 2.5ml、呼吸回数 150-180 回/分の過換気状態とした。実験ハッチ内にラットを垂直に固定し、人工呼吸器を一時停止すると 5-10sec 前後の呼吸停止が得られる。呼吸停止の間に造影剤を 3.0ml/sec の速度にて 1 秒間注入を行った。

得られた血管造影画像より半定量的な微小血管密度の計測を行った。

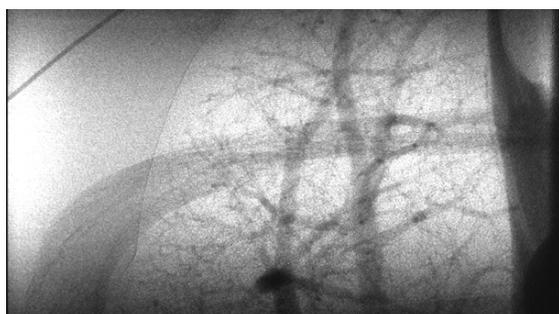


Figure 1A

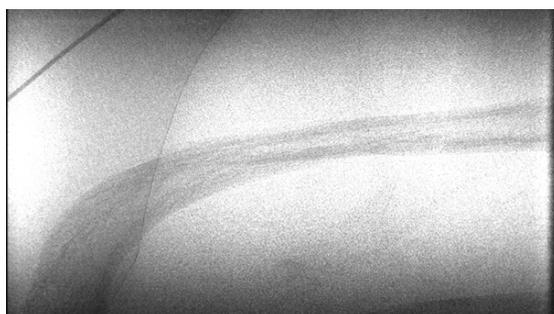


Figure 1B

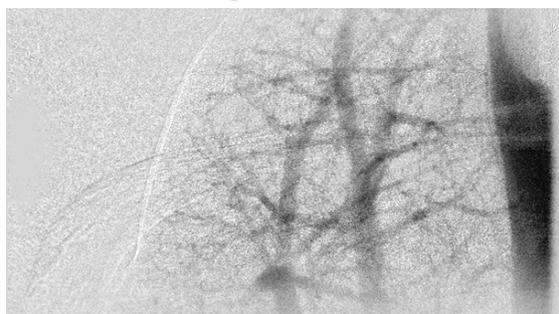


Figure 1C

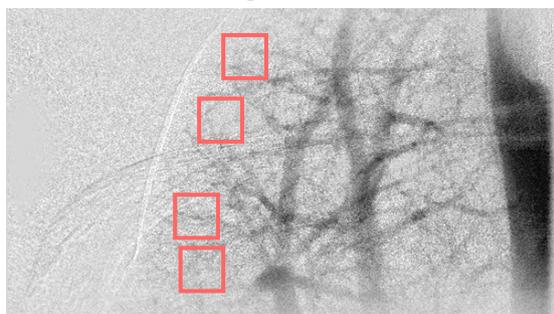


Figure 1D

得られた画像(Figure1A)は垂直方向に背景輝度の差があるため、造影前の画像(Figure 1B)を引き算処理してサブトラクション画像を得た(Figure 1C)。サブトラ

クシヨン画像の上で、直径 100 μ m 以下の微小血管が存在する領域に 1mm 四方の ROI を設定し、ROI 内の平均密度を求めた。

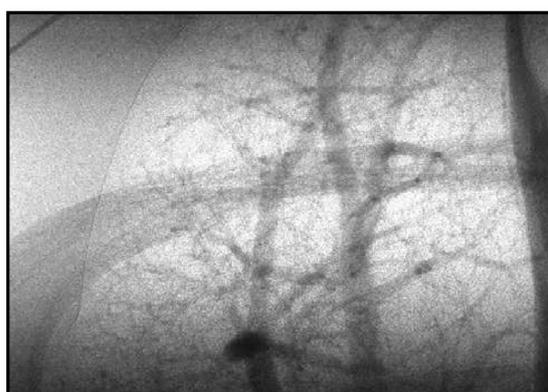
3. 心内圧測定実験

3 群のラットをペントバルビタール腹腔内注射によって麻酔を行い、経横隔膜的に右心室を穿刺し、圧トランスデューサーシステム (MacLabo system) により右心内圧を測定した。右心内圧の収縮期圧を肺動脈収縮期圧として解析に用いた。

4. 右室肥大の評価

3 群のラットを安楽死後、心臓を取りだし右室質量・左室質量の計測を行った。右室肥大の指標として(1)右室質量(2)右室質量/左室質量比を算出した。

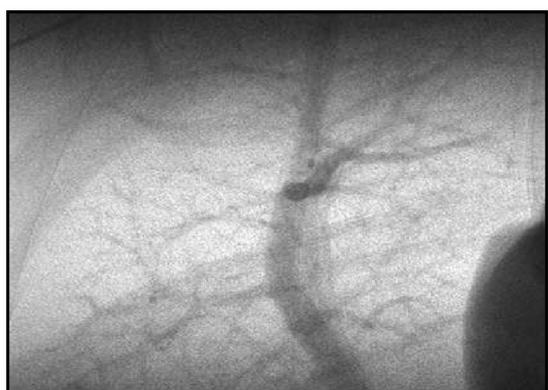
結果



Normal rat



MCT-induced PH rat



Fasudil treated MCT-induced PH rat

Figure 2

代表的な肺動脈血管造影の結果を Figure 2 に示す。コントロール群(Figure 2. Normal rat)では生体内での肺動脈が直径 50 μ m 程度の微小血管まで明瞭に描出された。モノクロタリン肺高血圧群では(Figure 2. MCT-induced PH rat)肺血管床の減少が明らかであった。特に直径 70-80 μ m 以下の微小血管において、その血管径の狭小化と血管の数の減少が著明であった。ファスジル治療群においては(Figure 2. Fasudil treated MCT-induced PH rat)これらの肺血管構造異常が改善している所見が得られた。

直径 100 μ m 以下の微小血管の血管密度が肺循環の組織灌流抵抗を規定していると考え、微小血管密度を半定量的に計測した。Figure 3 に示すように、モノクロタリン肺高血圧群ではコントロール群の微小血管密度に比較して 58.4 \pm 2.8% の密度低下を示した(P<0.05)。またファスジル治療群においてはコントロール群の 85.4 \pm 8.4%まで微小血管密度の改善が認められた。

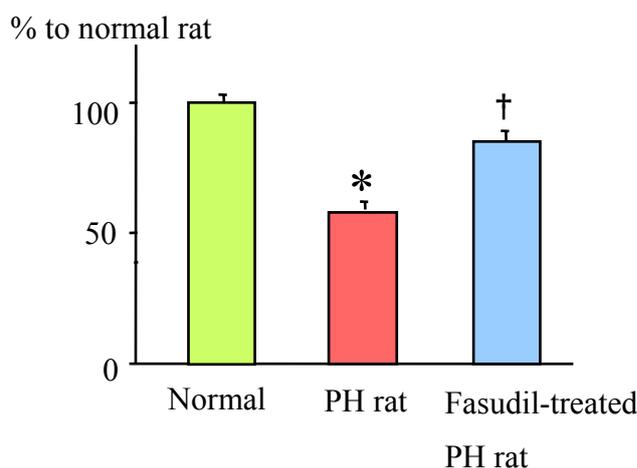


Figure 3

* P<0.05 vs. Normal rat † p<0.05 vs. PH rat

また収縮期肺動脈圧、右室質量・右室質量/左室質量比は以下の通りであり、モノクロタリン肺高血圧に対するファスジル治療の有効性がこれらの指標でも示された。

	コントロール群	モノクロタリン肺高血圧群	ファスジル治療群
収縮期肺動脈圧(mmHg)	22.1 \pm 3.5	51.0 \pm 2.7*	30.0 \pm 4.4†
右室質量(mg)	214 \pm 16	351 \pm 13*	234 \pm 17†
右室質量/左室質量比	0.308 \pm 0.026	0.61 \pm 0.039*	0.431 \pm 0.027†

*p<0.05 vs. コントロール群

†p<0.05 vs. 肺高血圧群

考察

阿部らが報告している通り⁷、モノクロタリン肺高血圧に対するファスジル治療の有効性は今回の実験の肺動脈微小血管造影・心内圧測定・右室肥大いずれの指標からも認められた。これまでに報告されているモノクロタリン肺高血圧モデルラットを用いた実験では、肺高血圧発症の機序として組織学的に肺動脈微小血管の中膜平滑筋の増加・中膜平滑筋の増殖等の微小血管リモデリング、また肺動脈の収縮性の亢進と拡張能の低下などが挙げられている。今回我々の微小血管造影が示したような微小血管密度の減少に関する報告⁹は少ない。組織学的な検討では肺全体の一部のスライスしか捉えることができないという技術的な問題から微小血管の密度という指標で解析することが困難である。今回の実験では、組織灌流抵抗を規定する微小血管の密度が、コントロール群に比較してモノクロタリン肺高血圧群で減少し、ファスジル治療群で増加していることが半定量的ではあるが評価可能であった。微小血管造影システムを用いなくては得ることのできない重要な所見であると考ええる。

今回の実験ではモノクロタリン注射3週間後のラットを実験に用いた。3週間後の時点では肺高血圧モデルラットは肺動脈血管病変が既に完成しており、病態としては末期の状態であり（注射後3週間を過ぎるとラットの死亡率も急速に増加する）、一般的な右心系圧データでもその病態は類推できる。したがって臨床的な意義を考えれば、より早期で、右心系圧データにも有意な増悪所見が出現していない段階において、肺動脈微小血管の密度が既に変化しているのかどうか、今後検討していく必要がある。また本実験は血管造影実験であるため血管内腔の情報しか得られず、病態の原因となる微小血管リモデリングそのものは捉えられていない。肺灌流抵抗を規定する微小血管のリモデリング自体が何らかの画像評価で捉えることが可能となれば、さらに肺高血圧症の本態に迫ることが可能になると考える。

参考文献

1. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Satomi-Kobayashi S, Seno T, Matsuda Y, Inoue N, Hirata K, Akita H, Umetani K, Tanaka E, Mori H, Yokoyama M. Role of endogenous nitric oxide generation in the regulation of

- vascular tone and reactivity in small vessels as investigated in transgenic mice using synchrotron radiation microangiography. *Nitric Oxide*. 2001;5:494-503.
2. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Hirase T, Inoue N, Hirata K, Umetani K, Sugimura K, Yokoyama M. Images in cardiovascular medicine. Mouse coronary angiograph using synchrotron radiation microangiography. *Circulation*. 2002;105:E3-4.
 3. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, Namiki M, Shinohara M, Inoue N, Hirata K, Umetani K, Yokoyama M. In vivo angiographic detection of vascular lesions in apolipoprotein E-knockout mice using a synchrotron radiation microangiography system. *Circ J*. 2002;66:1057-1059.
 4. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*. 1995;270:29051-29054.
 5. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*. 1996;15:1885-1893.
 6. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 1997;275:1308-1311.
 7. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*. 2004;94:385-393.
 8. Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med*. 2000;6:698-702.
 9. Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol*. 1976;57:542-554.