

# 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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（WHHL 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。

## 【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。本報告までに施行した基礎領域の予備的実験と臨床領域の実験について詳細を報告する。

## 【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）

当科の既報では動脈硬化の不安定性が進行するとともにプラーク内の微小血管の増生が造影エコーで確認できることを報告している（図1, 2, Deyama J, et al. Circ J. 2013; 77(6) : 1499-507. 黄破線：プラーク、赤矢印：造影されたプラーク内微小血管）。

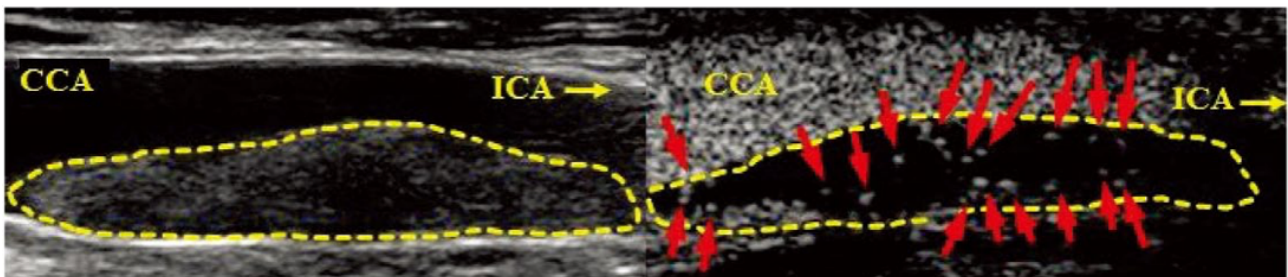


図1 ヒト頸動脈 超音波造影前

図2 ヒト頸動脈 超音波造影後

また、本研究で用いた超音響イメージング装置はパルス光の光源として、これまで用いられていたレーザーダイオードではなく、発光ダイオード（LED）光源を用いることで、組織に有害とされる温熱作用や網膜への安全性、装置の携帯性など様々な利点を有した装置である。850nmのLEDパルス光を組織に照射することで微小循環内に存在する赤血球に特異的に断熱膨張現象が生じる。これから発せられる弾性波を超音波プローブで画像化することで、既存の検査では描出困難であった血流のうっ滞した微小循環を鮮明に可視化できる。また、既存の造影剤超音波や造影CTなど、薬剤負荷を要する検査に代替することで、より低侵襲に検査を行うことが期待される装置である。（図3 PAIによる皮膚表面の微小循環）

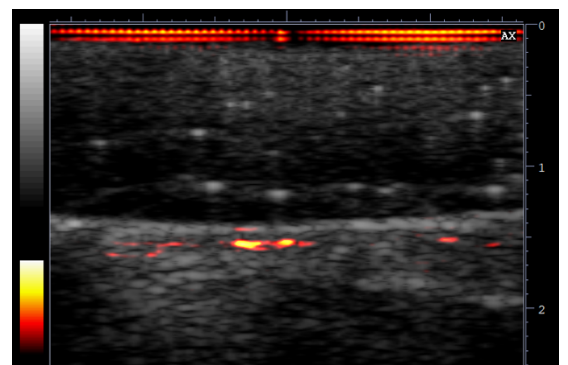


図3 ヒト皮膚 超音響イメージング

本研究では動脈硬化のない10週齢のJWウサギ4羽を導入した。高脂肪食負荷を行う前に、予備実験として腹部大動脈を造影超音波およびPAIで観察した。いずれの検査でも観察範囲内の腹部大動脈に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4-6、赤矢印：腹部大動脈)。

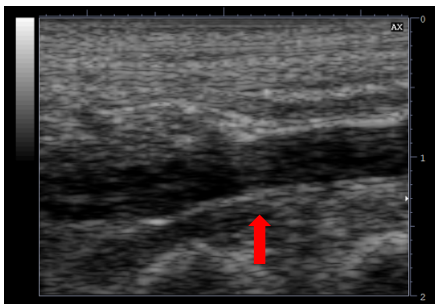


図4 ウサギ腹部大動脈 超音波造影前

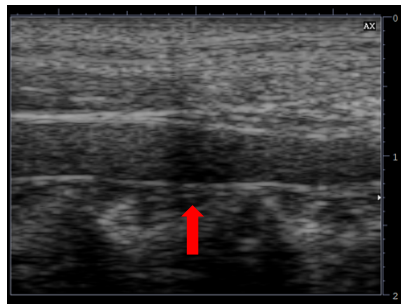


図5 ウサギ腹部大動脈 超音波造影後

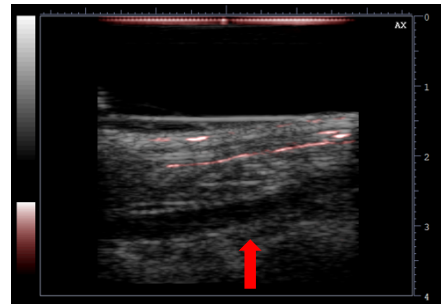


図6 ウサギ腹部大動脈 光音響画像

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、動脈硬化モデルである遺伝子改変ウサギ(WHHLウサギ)についても同様の実験を施行し、高脂肪食負荷により動脈硬化を認めたJWウサギと同様の所見が得られるか比較を行う。こちらのウサギについては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7,8 赤矢印：光音響シグナル、青矢印：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9)。この反応は内皮依存性血管拡張反応検査と同様に、阻血解除による血流で血管内皮表面にずり応力が生じ、血管内皮細胞から一酸化窒素(NO)の分泌が促進されることで血管拡張反応が生じていると推察される。

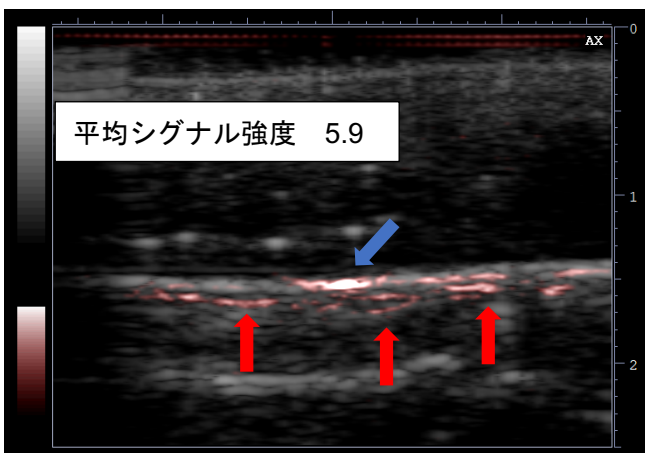


図7 ヒト手指 光音響イメージング 阻血前

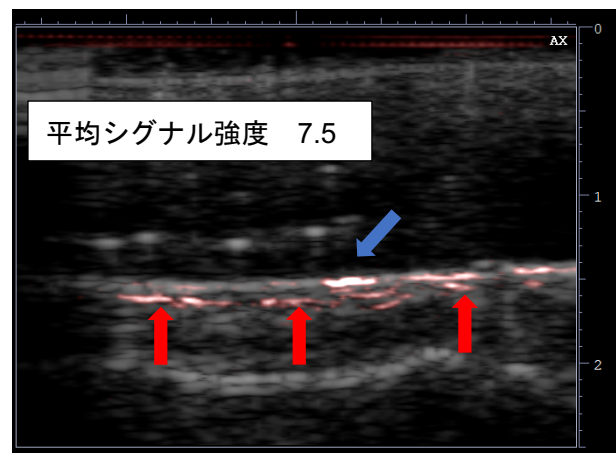
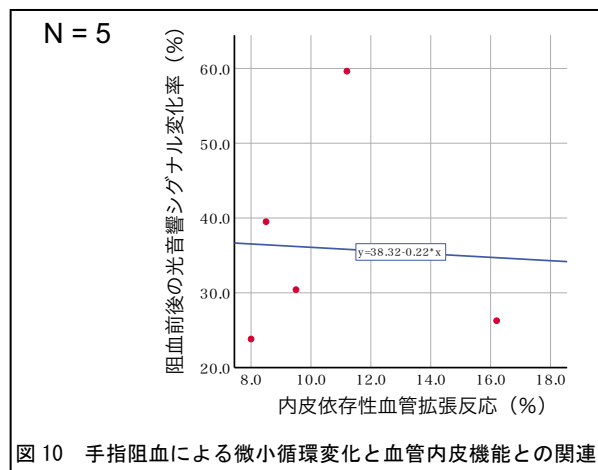
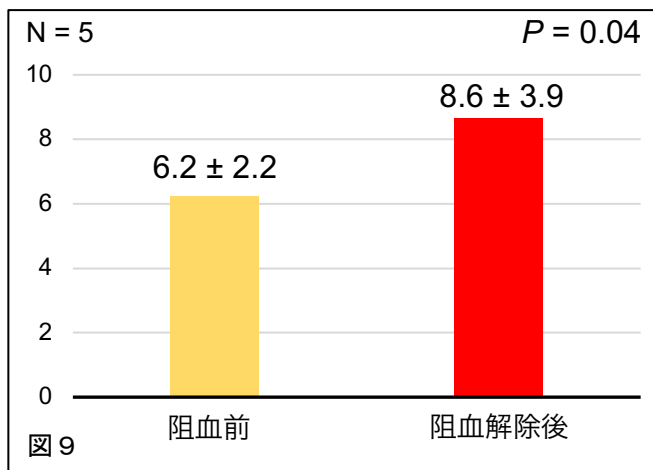


図8 ヒト手指 光音響イメージング 阻血解除後



一方で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 10 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。今後対象者を増やし検討を継続していく予定である。

### ⑥ヒト動脈血内のコレステリン結晶の同定

動脈硬化性疾患のため、山梨大学医学部附属病院循環器内科に入院した患者を対象にカテーテル検査時に末梢動脈から動脈血採血をした。採取した血液に蒸留水を塗布することで赤血球を溶血させた。その後、偏光顕微鏡を用いて血液を観察した。動脈硬化病変の末梢でコレステリン結晶が飛散していることを確認した（図 11）。



## 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。