

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350879

研究課題名(和文)放射光微小血管造影を用いた糖尿病心臓における微小冠動脈血流の解析

研究課題名(英文) Analysis of coronary artery blood flow in diabetic rat using synchrotron radiation coronary microangiography

研究代表者

坂本 裕昭 (SAKAMOTO, HIROAKI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30611115

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)：本研究の目的は糖尿病患者の冠動脈の特徴を解明することである。我々が開発した放射光微小血管造影法を冠動脈造影に応用し、in vivoラットの直径50umの冠動脈造影を可能とした。この放射光微小冠動脈造影を用いることで、エンドセリン投与前後での僅か25umの血管収縮を検出可能とした。また外的ストレスである寒冷刺激をラットの後脚に与えると、正常ラットでは刺激後に冠動脈径は約9%拡張するが、糖尿病ラットでは刺激後に径が約10%収縮した。この結果から、糖尿病ラットの冠動脈は外的ストレスに対する生体応答機能が低下している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to elucidate the feature of coronary artery in diabetic patients. First of all, we developed a system of synchrotron radiation coronary microangiography (SRCA) in the in vivo rat. SRCA can visualize vessels as small as 50 um in diameter, thus enabling us to evaluate the coronary artery reaction in the in vivo rat. After that, SRCA could confirm the microvascular constriction of the coronary arteries in the in vivo rat after endothelin administration and detect 25 um caliber change of coronary artery. And also, SRCA could confirm that sympathetic nerve stimulation by cold exposure induced coronary vasoconstriction in the in vivo diabetic rat. Average diameter of all measured coronary arteries after cold exposure was increased by 9% in the normal rat and decreased by 10% in the DM rats. This result suggests that the biological response function of coronary artery against external stress is low in the in vivo diabetic rats.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：放射光 糖尿病 冠動脈 ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病と虚血性心疾患

生活習慣病である糖尿病と虚血性心疾患の関連は周知の事実であり、更に、最近の世界の糖尿病人口は2億8000万人以上で、今後も増加の一途を辿るといわれている。そのため糖尿病を合併した虚血性心疾患患者の増加も予想されている。我々はそのような患者に対して積極的に冠動脈バイパス術や経皮的冠動脈形成術を行っているが、糖尿病合併患者と非合併患者の冠動脈は同じものとして扱ってよいのかという疑問がある。何故なら、糖尿病合併患者の冠動脈が全長にわたって細く狭小化していることに実際の臨床で多く遭遇するからである。異なる性質を有するのであれば、それを考慮した治療戦略が必要である。

(2) 交感神経活動が冠動脈に及ぼす影響

虚血性心疾患患者が冠動脈バイパス術や経皮的冠動脈形成術を施行された暫くの間、患者は交感神経緊張状態にあると推測される。

過去の研究では交感神経活動により糖尿病の冠動脈微小血管は収縮することがPETなどにより推測されているが、直接的に血管造影検査で確認された報告はない。

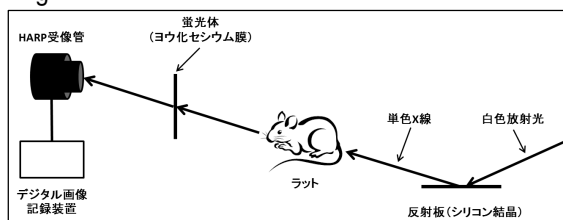
交感神経緊張状態はラットに外的ストレスである寒冷刺激を与えることで引き起こすことができる。我々は過去に、通常心電図から計測される heart rate variability を用いた交感神経機能の評価方法を報告している。

(3) 放射光微小血管造影

代表者らは、高エネルギー加速器研究機構放射光施設(つくば市)にて放射光を用いた微小血管造影法の開発および研究を継続して行ってきた。放射光は6.5GeVの高エネルギー電子シンクロトロンより偏向磁石を用いて分離される広帯域、高輝度、高指向性の特徴を有する電磁波であり分光器(シリコン結晶)に対し13度の角度で反射させることにより、光子エネルギー33.3KeVの高輝度な単色X線に変換される。この単色X線を用いて放射光微小血管造影を行うと、直径50 $\mu$ mの微小血管を判別することが可能である。

放射光微小血管造影を用いたラット糖尿病モデルのin vivoでの冠動脈微小血管造影(Fig. 1)は現在までに報告が無く、本研究は新たな評価法を用いた研究である。

Fig. 1



2. 研究の目的

本研究では、糖尿病患者の冠動脈の特徴の解明を目的とする。実際の冠動脈バイパス術後や経皮的冠動脈形成術を施行されて暫くの間、患者は交感神経緊張状態にあると推測される。従って、交感神経緊張状態が糖尿病を合併した冠動脈微小血流に及ぼす影響について、ラットを用いてin vivoで研究することが研究目的である。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルラット作成

雄 Wistar ラットに Streptozotocin (60mg/kg 1回)を腹腔内投与し糖尿病を作成する。血糖300mg/dl以上のラットを糖尿病群とし、Streptozotocin投与後4週経った糖尿病群と、同じ期間飼育のコントロール群とを比較した。

(2) プロトコール

Pentobarbital (50mg/kg) 及び Atropine (0.01mg/kg)の腹腔内投与による全身麻酔下で実験を行った。ラットの頸動脈に留置したカテーテルから造影剤を注入して放射光微小冠動脈造影を行った。

エンドセリン前駆体投与による糖尿病ラットの冠動脈変化

エンドセリン前駆体(0.5nmol)投与し、冠動脈収縮を促した。投与前後に放射光微小冠動脈造影を行った。画像解析プログラムを用いて、得られた冠動脈造影画像から冠動脈形態変化を解析した。

寒冷刺激による糖尿病ラットの冠動脈の変化を放射光血管造影で評価

ラット下腿を除毛し、下腿から10cmの距離で10秒間瞬間冷却スプレーを噴霧した。スプレー噴霧前後に放射光微小冠動脈造影を行った。画像解析プログラムを用いて、得られた冠動脈造影画像から冠動脈形態変化を解析した。

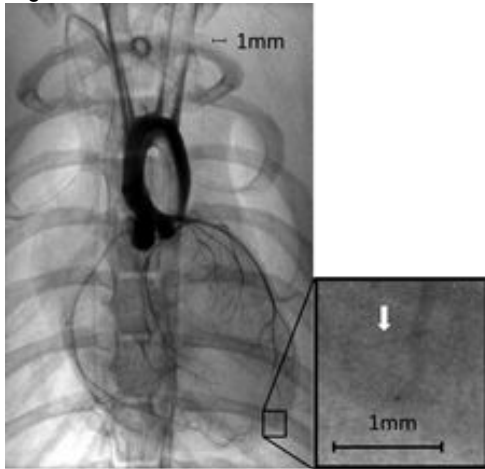
4. 研究成果

本研究の目的は糖尿病患者の冠動脈の特徴を解明することである。

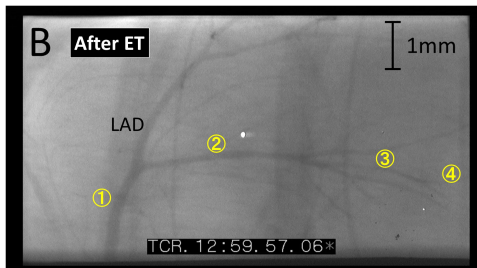
その第一段階として、放射光由来X線源とNHK放送技術研究所の協力によるHigh-Gain Avalanche Rusing Amorphous Photoconductor (HARP)受像管を組み合わせた高感度放射光微小血管撮影法を用いて、in vivoラットにおける微小冠動脈造影法を確立することに成功した(Fig. 2)。

この方法を使用することで、通常の心拍数が300回/分以上であるラットなどの小動物を用いたin vivo実験で、空間分解能と濃度分解能が非常に高い微小冠動脈造影画像を得ることが出来た。現時点ではin vivoラットの直径50 $\mu$ m前後の微小冠動脈を描出することが可能である。

Fig. 2



次に、in vivo ラットに強力な血管収縮作用を有するエンドセリンを投与することによって起こる微小冠動脈の直接的な変化を、前述の放射光微小冠動脈造影法でどこまで捉えられるかを検証した。その結果、冠動脈の極わずかな収縮変化を描出可能であった。実例として、直径 85  $\mu\text{m}$ の冠動脈がエンドセリン投与後は 60  $\mu\text{m}$ に収縮。この 25  $\mu\text{m}$ の変化を捉えることが出来た(Fig. 3)。



	①	②	③	④
Baseline	340	210	125	85
After ET	225	170	100	60

( $\mu\text{m}$ )

Fig. 3

また、外的ストレスによる交感神経活動が糖尿病の冠動脈に与える変化に関して、in vivo 糖尿病ラットで検証した。外的ストレスとして冷却スプレーによる寒冷刺激をラットの後脚に与えると、正常ラットでは刺激後に冠動脈径は約 9% 拡張するが、糖尿病ラットでは刺激後に径が約 10% 収縮した。この結果から、糖尿病ラットの冠動脈は外的ストレスに対する生体応答機能が低下している可能性が示唆された(Fig. 4)。

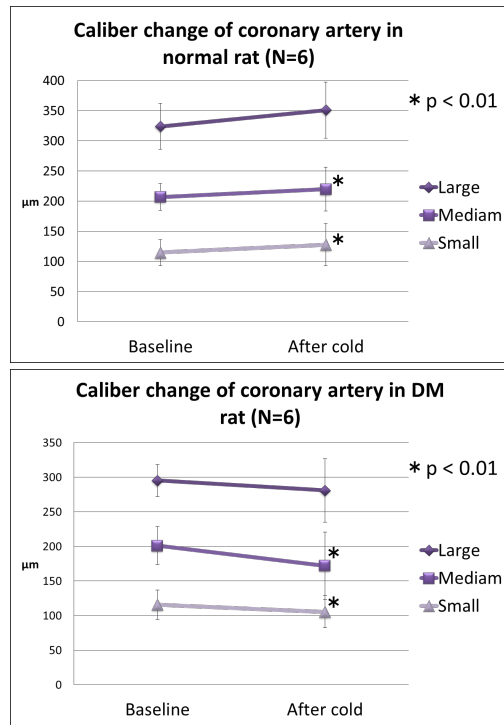


Fig. 4

## 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2件)

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sato F, Hiramatsu Y: A new technique of in vivo synchrotron radiation coronary microangiography in the rat. Acta Radiol, 査読あり, Vol. 56, 2015, 1105-1107

DOI: 10.1177/0284185114549570

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sato F, Hiramatsu Y: A newly developed technique of synchrotron radiation coronary micro-angiography in an in-vivo rat. Photon Factory Activity Report 2014, 査読なし, Vol. 32, 2015, Part B 299  
[http://pfwww.kek.jp/acr/2014pdf/part\\_b/pf14b0299.pdf](http://pfwww.kek.jp/acr/2014pdf/part_b/pf14b0299.pdf)

[学会発表](計4件)

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sato F, Hiramatsu Y: Synchrotron radiation coronary microangiography could confirm induction of coronary vasoconstriction by cold exposure in the diabetic rat. American Heart Association Scientific Sessions 2015, Nov 7-11, 2015, Orlando, USA

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sato F, Hiramatsu Y:

Synchrotron radiation coronary microangiography for evaluating changes in the caliber of the in vivo rat coronary artery after endothelin administration, American Heart Association Scientific Sessions 2014, Nov 15-19, 2014, Chicago, USA

Sakamoto H, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sato F, Kubota M, Tanioka K, Hiramatsu Y, Sakakibara Y: A newly developed technique of synchrotron radiation coronary micro-angiography in an in-vivo rat. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Nov 16-20, Dallas, USA

坂本裕昭、松下昌之助、徳永千穂、佐藤藤夫、平松祐司、榊原 謙: In vivo ラットにおける放射光微小血管造影法を用いた超精細な冠動脈造影、第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会、2013 年 10 月 19 日、仙台国際センター（仙台）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 裕昭 (SAKAMOTO, Hiroaki)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：30611115

### (2) 研究分担者

佐藤 藤夫 (SATO Fujio)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：20375497

徳永 千穂 (TOKUNAGA Chiho)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：30451701

兵藤 一行 (HYODO Kazuyuki)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授  
研究者番号：60201729

松下 昌之助 (MATSUSHITA Shonosuke)  
筑波技術大学・保健科学部・教授  
研究者番号：70359579