

氏名(本籍)	いまづる とも ひろ 今水流 智 浩 (鹿児島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第5838号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	血管新生の可視化をめざした放射光微小冠動脈造影に関する研究

主査	筑波大学教授	医学博士	青沼和隆
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	長谷川雄一
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	鶴岡秀一
副査	筑波大学講師	博士(医学)	鶴嶋英夫

論文の内容の要旨

(目的)

ラット冠動脈における血管新生の angiogenesis、arteriogenesis の可視化をめざし、高解像度、高コントラストを特徴とする放射光を用いた冠動脈微小血管造影法を構築する。さらに、組織学的血管新生評価とほぼ同等の価値を見いだせるかどうか検討することを目的とした。

(対象と方法)

放射光

血管造影法の光源として、放射光を選択した。放射光は、高輝度・高コントラスト性、高い指向性があり、本冠動脈微小血管造影の目的に合うと判断した。

撮像システムの構築

撮像システムは、光源、反射板、生体試料、蛍光板、受像管、記録装置で構成される。放射光光源は、Silicone 反射板で13度に回折され、単色 X 線に転換され、蛍光板で可視光に変換される。可視光は受像管に感知され、AD 変換後デジタル保存される。単色 X 線の電子エネルギーは 33.3 KeV であり、ヨード吸収端の直上に相当する。そのため、組織とヨード造影剤の X 線吸収差が最大となる。撮像には高感度 CCD カメラを使用した。

動物モデル

動物は、Wister 雄性ラット (5 週令、体重 250 ~ 300g) を用いた。

血管造影法

35% 非イオン性ヨード造影剤を用いた。ラット心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に大動脈から逆行性に 1 ml を 1 秒間注入した。高 K 加灌流液で一時的に心停止下に、撮像をした。

虚血モデルの作成

冠動脈結紮の手技を簡便にするため、臨床の心拍動下冠動脈バイパス術を参考にして、新しい術式を考案した。左開胸後、先端を特殊加工した陰圧吸引器により心尖部を吸着しつつ、すみやかに左前下行枝を結紮し閉胸した。

Erythropoietin (Epo) の使用

血管新生因子として Epo を選択した。Epo は毛細血管の血管新生因子であり、赤血球増多に由来する shear stress の増加から arteriogenesis の促進効果を合わせ持つとされている。

評価法

血管として認識可能な細動脈は、格子法を用いてその数を数えた。一方、解像度の有効性を下回って直接評価不能であった毛細血管レベルの評価は、densitometry 法を用いた。

(結果)

撮像システムの評価

①空間分解能：放射光照射装置と撮像システムの組み合わせにより、

1 pixel=13 μm の高い空間分解能が確認できた。

②観察視野：単色 X 線から変換した可視光線を光学レンズで 1/2 に縮小することで、26.6 mm × 26.6 mm の広い視野を確保でき、ラット全冠動脈領域を 1 視野の中に撮像することが可能であった。

放射光血管造影法

心停止下で、撮像された最小冠動脈血管径は 50 μm であった。ランゲンドルフ灌流装置により拍動と心停止は任意に繰り返すことができ、これにより同一心臓で複数回の冠動脈血管造影も可能であった。

実験動物の作成

当初、結紮モデル作成数 105 例のうち、当初、術後早期死亡が 32 例 (30.5%)、術後後期死亡が 18 例 (17.1%) で、4 週間後の実験日までの生存していた動物は 55 例 (52.4%) と成功率は低かったが、手法の習熟により、最終的には 4 週生存率は 70% に上げることができ結紮成功率も 90% を認め、本法の妥当性を確認できた。

本法による冠動脈血管新生像の特徴

冠動脈結紮後の血管造影像では、非虚血部導管冠動脈より分枝形成の少ない副側血管が多数、虚血領域 (avascular area) に向かうのが認められた。この場合の撮像最小血管径は 50 μm であった。

Epo の使用による新生血管の画像評価と組織像との対応

冠動脈結紮後のラットを、虚血のみと虚血直後 Epo 投与群の 2 群に分け、結紮 4 週後に放射光冠動脈造影と組織標本による血管密度を調べた。心筋梗塞の非梗塞虚血領域を検討の対象とした。Arteriogenesis の対象血管径は 50 ~ 400 μm であるが、angiogenesis との重複をさけるため、100 μm 以上の細動脈数を arteriogenesis の指標とし、50 μm 未満の血管径の血管密度を angiogenesis の指標とした。組織では、それぞれ angiogenesis で、Epo (+) 群：142 ± 32/hpf、Epo (-) 群：95 ± 19/hpf (p<0.005)、arteriogenesis で Epo (+) 群：11.8 ± 0.6/1 視野 (× 100)、Epo (-) 群：4.3 ± 0.21 視野 (× 100) (p<0.00001) であった。放射光血管造影では、arteriogenesis の指標である、50 μm 以上の血管の格子交差数は、それぞれ Epo (+) 群：5.4 ± 1.7 / 4 mm² vs. Epo (-) 群：3.8 ± 0.4 / 4 mm² (p<0.05) であり、densitometry で示される毛細血管密度の評価はそれぞれ Epo (+) 群：15012 ± 4311square (pixel × 256 shades of gray)、Epo (-) 群：11805 ± 4746 square (p : NS) であった。放射光画像と組織学的評価の比較では、arteriogenesis ではよく対応し、毛細血管密度を示すと考えた放射光冠動脈造影による densitometry 法の結果では有意な相関は得られなかった。

(考察)

放射光冠動脈造影では、血管径 50 μm の側副血行が撮像された。また 50 μm 以上の arteriogenesis において、組織像と放射光画像は同様の傾向を示した。このことは、放射光冠動脈造影によって、虚血-血管新生の具体的な血管構築 (arteriogenesis) を、病理学的手段を用いることなく評価できることを意味する。Densitometry による毛細血管密度の評価は、arteriogenesis に比べやや感度が落ちる結果であった。Angiogenesis の評価には、本法になお技術的な改良の余地があると判断した。

(結論)

ラット摘出心を対象に放射光冠動脈造影を行い、血管径 50 μ m の新生血管まで撮像することが可能であった。

心筋梗塞病態モデルでは、arteriogenesis を形成する側副血行全体を描出することが可能であり、血管新生療法の血管密度検査役立つものと判断した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

当研究論文は、ラットにおける心筋梗塞モデル作成において、独自に開発した吸引方法を用い効率よい虚血モデルの作成法を確立した。また、放射光冠動脈造影法について、その方法を確立し従来では描出困難であった新生血管の画像化を可能にした。このことは、独創的かつ十分に検討されており、博士学位論文として十分な内容である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。