ラットにおける冠動脈LAD結紮モデルの作成と 放射光血管撮影による評価法

今水流智浩¹ 松下昌之助¹ 兵藤 一行² 秋島 信二¹ 佐藤 藤夫¹ 野間 美緒¹ 平松 祐司¹ 重田 治¹ 榊原 謙¹

要 旨:人工呼吸器を用いない簡便化ラット冠動脈結紮モデルを開発した。また,放射光由来の高 分解能X線を用いたラット冠動脈造影を確立した。評価可能な最小血管径は,50μmであった。冠動 脈結紮により左室菲薄化と線維化を伴う左室リモデリングが出現した。冠動脈造影では結紮部遠位 に無血管領域が出現し,そこに向かう側副血行が確認された。本法により小動物血管新生研究にお ける動脈形成の画像上の評価が可能であると考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 49–53)

Key words: angiogenesis, arteriogenesis, coronary ligation, coronary angiography, synchrotron radiation

緒言

近年,血行再建術が不可能な重症心筋虚血に対し, 血管新生因子を用いた血管新生療法が試みられるよう になった。血管新生の評価法の1つである血管造影法 は,従来のX線源では,冠動脈造影において血管径 300~500μmの撮像が限界であるとされている。ところ が,心筋虚血による側副血行や血管新生は,細動脈の 拡張や毛細血管のネットワークの増生と考えられてお り,300μm以下の血管にみられる現象である。

今回,従来のX線に比し10⁵倍のphoton数を有する放 射光由来の高輝度X線を用い,ラット心臓における微 小新生血管の描出を試みた。

目 的

人工呼吸器を用いない簡便な方法によりラットの冠 動脈結紮モデルを作成し,放射光冠動脈造影を用いて 血管新生の評価を行う。

方 法

(1) 無挿管下での心筋梗塞ラットの作成5~6 週敏(体重約200g)の雄性Wistar系ラットを用い

1国立大学法人筑波大学臨床医学系外科

²大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構(KEK)

THE JOURNAL of JAPANESE COLLEGE of ANGIOLOGY Vol. 46 Nos. 1-2

た。ジエチルエーテルによる吸入麻酔後,仰臥位に固 定した。胸骨下端から左上方へ皮膚切開し,胸郭筋を 露出し,外斜筋と内斜筋を鈍的に分け,肋間筋を露出 した。心窩部より2肋間頭側で開胸し,心臓の位置を 確認。心膜を切開し,吸引器により陰圧(-30mmHg)を かけ心尖部を吸着し引き上げ,体外に心臓を脱出さ せた(Fig.1)。左心耳を指標として,左前下行枝(left anterior descending artery: LAD)を同定し,5-0 TiCron糸 を用いて結紮した。結紮直後に心臓を還納し,胸腔内 脱気後2-0 絹糸を用いた皮膚縫合により閉胸した。必 要に応じて,酸素・アトロピン投与,加温を行った。

なお,本実験は筑波大学動物資源センター倫理委員 会の承認を得て実施された。

(2) 放射光を用いたラット冠動脈造影法 1) 放射光

放射光冠動脈造影は,高エネルギー加速器研究機構 (つくば市)放射光施設(PF-AR)で行われた。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る¹⁾。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

2005年 5 月11日受付 2005年11月25日受理 Published online before print March 20, 2006



Figure 1 LAD ligation in the rat heart without endotracheal intubation. The heart was held by aspiration tube (arrow).

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線を用いて冠動脈造影を行った。心臓を透過し た単色X線は,セシウム蛍光板により可視光線とな り,90度反射の後,高感度CCDカメラ(Model C4880, 浜松ホトニクス)に結像した。解像度は,1 pixel = 13μ m,16 line pairs/mmであり,光学レンズにより1 pixel = 26μ m,1,024×1,024 pixe(約26×26mm)の撮像視野とな る。露光時間は150msecであり,1秒間に3回撮像した。

2) ランゲンドルフ灌流と冠動脈造影

心筋虚血心作成後,25.4 ± 1.2日に心臓を摘出しラン ゲンドルフ灌流を行った。灌流液はmodified Krebs-Henseleit液(KH液)を用い,大動脈直上のコネクタを 造影剤の注入部位とした。高カリウム加KH液(K=25 mM/L)灌流液に変更し,心停止を得た後に造影剤を 注入し撮像を行った。造影剤は非イオン性ヨード剤 (35%)を用い,1ml/minの注入速度で1秒間,インジェ クタを用いて注入した。

結 果

(1)冠動脈LAD結紮による心筋梗塞モデル作成

結紮モデル作成数105例のうち,術後早期(12時間以内)死亡は32例(30.5%),術後後期死亡(術後12時間以降3週間目まで)は18例(17.1%),3週間後の実験日までの生存数は55例(52.4%)であった。早期死亡例は,術中死亡(出血等)6例(5.7%),術後死亡(心不全・肺水腫と推定)18例(17.1%)であった。生存55例は全て冠動

脈造影が行われ,そのうちLAD結紮は30例 54.5%), 対角枝結紮は2例(3.6%)で,LADに対する有効結紮率 は55%であった。手技の習達により,実験後期のLAD 結紮率は,85%まで上昇した。

(2)冠動脈造影

ラットの冠動脈の走行は,ヒトとほぼ類似し,左右 に入口部を有し, 左主幹部から前下降枝と回旋枝を分 枝する。回旋枝の走行は、ヒトに比し右冠動脈側に偏 位する傾向を認めた(Fig.2)。また,画像で判別できる 最小血管径は50µmであった。計測には,画像ソフト NIH Image(Windows版, Ver. 1.63)を用いた。256階調 でX,Yプロットし,階調の変曲点を血管の両端とし, 血管径を確定した。LAD結紮後の冠動脈造影の1例を 示す(Fig.3)。LADは,造影上途中で途絶し,末梢側の 心筋には無血管領域(avascular area)を形成した。この 領域に向かって右冠動脈(right coronary artery: RCA)近 位部から副側血行(arteriogenesis)が確認できた。側副血 行路の確認率は,結紮が行われた32例中28例(87.5%) であった。側副血行路の形状は, Rentropスコアを用い るとすべてgrade1であった²⁾。同結紮部位の病理画像 を示す(Fig.4)。LADを結紮糸が有効に絞扼し,LAD周 囲に線維化組織を認め,虚血性変化と考えられた。同 一心臓のマクロ画像(Fig.5)では,結紮部位以下の左室 心筋の菲薄化と線維化(左室リモデリング)を認め, LAD結紮による心筋梗塞巣が形成されているのが確認 された。

今水流智浩 ほか8名



Figure 2 Rat coronary arteries. Artery diameters were identified down to 50 µm using synchrotron radiation coronary angiography. RCA: right coronary artery, Cx: circumflex artery, LAD: left anterior descending coronary artery





考 察

ラット冠動脈結紮による実験的心筋梗塞作成は,臨 床での心筋梗塞との共通性があることが報告されてい る³⁾。ラットの冠動脈結紮法は,近年開胸操作時に人 工呼吸器と挿管を用いた機械的換気を用いたものが多 く,操作が煩雑になり,時間を要することが多かっ た。今回,われわれは心拍動下冠動脈バイパスグラフ

ト術(coronary artery bypass grafting: CABG)の吸引法に ヒントを得て,吸引心臓脱出法を開発した。心筋梗塞 モデル作成に際し,1匹あたり約5分の手術操作で完 了することが可能となった。人工呼吸器を使用せず気 管内挿管も必要ないことから,麻酔時間が短縮し,侵 襲が少なくなり, ラットの術後状態が改善されたと考 えられる。また,手術操作も簡便で汎用性が高い。 放射光を用いた冠動脈造影の利点として, 高輝度



Figure 4 Histological findings of ligated LAD and surrounding tissues (HE stain).



Figure 5 Thinning of infarcted left ventricular wall due to LAD ligation (left ventricular remodeling).

であること[従来の10⁵倍のphoton数を有するため,より 高輝度画像(辺縁が鮮明)を得ることができる], 広 視野であること(26×26mmの像を得ることができ, ラットの心臓を全体像で捉えることができる), 高 解像度であること(心停止下で50µmまでの解像度が得 られる。血管径の特徴により,angiogenesisは確認で きないが,arteriogenesisの走行を観察でき,collateral formationを確認できる), ランゲンドルフ摘出心灌 流であるため,周囲の組織による吸収(blunting)がない という点,が挙げられる。

ラットの冠動脈結紮モデルでは,結紮後48時間か ら小動脈の増生が始まり,17日目までピークを続け, 21日後にも線維化組織において拡張した血管がみられ ると報告されている⁴。われわれは,冠動脈結紮3週間 後に冠動脈造影を行った。したがって,虚血部位に対 する血管の拡張・増生が冠動脈造影に反映されること が期待された。実際,LADが完全に遮断された例で は,周辺の動脈(RCA遠位,Cx遠位部)から血管増生が avascular areaに向かっているのが確認され,その形態 は臨床でみられるcollateral formationと類似性がみられ た。しかし,現時点では血管新生因子投与を比較群と して行う研究まで至っていないため,ラットモデルで の血管新生効果を正確に確認できている訳ではない。

本法を用いた実験法の将来の展望として, G-CSF や血管新生促進因子(遺伝子・血管内皮前駆細胞)を用 いた血管新生療法の評価が考えられる。本法では, 50µmまでの血管描出が可能であり,arteriogenesisは任 意の心筋部位で評価可能である。 ランゲンドルフ拍 動心を用いて, arteriogenesisの生理的血管作動性の確認 に用いることができる。 また, in vivoでの放射光血 管造影による遺伝子改変マウス⁵⁾での血管新生の評価 を目指すことなどが挙げられる。

結 論

無挿管下,短時間での簡便な冠動脈結紮によるラット虚血心筋モデルの作成を行い,放射光を用いた摘出 心での冠動脈造影法を確立した。従来の冠動脈造影法 の撮像限界を超える血管径50µmまでの描出が可能であ り,虚血部位に対するblood supplyが微小血管レベルで 画像化された。

文 献

- 1)Arfelli F: Synchrotron light and imaging systems for medical radiology. Nucl Instr and Meth, 2000, **454**: 11–25.
- 2)Rentrop KP, Cohen M, Blanke H et al: Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. J Am Coll Cardiol, 1985, 5: 587–592.
- 3 Goldman S, Raya TE: Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. J Card Fail, 1995, 1: 169–177.
- 4)Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR: Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. Am J Pathol, 1978, 90: 57–70.
- Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M et al: Images in cardiovascular medicine. Mouse coronary angiograph using synchrotron radiation microangiography. Circulation, 2002, 105: E3–4.

Synchrotron Radiation Coronary Angiography in Infarcted Rat Heart Utilizing Simple Ligation Technique

Tomohiro Imazuru,¹ Shonosuke Matsushita,¹ Kazuyuki Hyodo,² Shinji Akishima,¹ Fujio Sato,¹ Mio Noma,¹ Yuji Hiramatsu,¹ Osamu Shigeta,¹ and Yuzuru Sakakibara¹

¹Department of Cardiovascular Surgery, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan ²High Energy Accelerator Research Organization: KEK, Ibaraki, Japan

Key words: angiogenesis, arteriogenesis, coronary ligation, coronary angiography, synchrotron radiation

Since the diameters of vasculature in arteriogenesis and angiogenesis are less than 200 μ m, conventional coronary angiography cannot visualize these vessels. High quality X-rays derived from synchrotron radiation are capable of providing extensively high resolution in comparison to conventional X-rays. We exercised a simple method of LAD ligation without tracheal intubation to visualize the changes of vasculature at infarcted heart in rat. The heart was extracted using a negatively pressured tube, then LAD was ligated under inhalation of diethylether and simple thoracotomy. The process was performed within 5 minutes. Effective LAD ligation was obtained in 85% cases finally. Coronary angiography using synchrotron radiation could visualize the arteries down to 50 μ m in diameter, which is comparable to the minimum diameters of arteriogenesis. The avascular area in coronary angiography corresponded to the infarcted area in the rat heart. Many small arteries down to 50 μ m in diameter extended from RCA and Cx towards the center of avascular area. On the basis of findings in this study, it appears to be arteriogenesis, rather than angiogenesis, that is more capable of direct visualization and evaluation when combined with synchrotron radiation coronary angiography.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 49–53)