

頻度：2～10Hz、刺激強度：1～10V、パルス幅：210～450 μ s)を確認し、定期的に刺激の安定性を評価した。

B-3. 心筋梗塞後心不全モデルを用いた迷走神経刺激による心機能への影響の評価

迷走神経刺激による新しい心不全治療の可能性を検討するため、体重 20kg～25kg の HB 犬（北山ラベス社）を用いて実験を行った。まず、神経刺激群では心筋梗塞作成2週前に迷走神経刺激システムを B-2 に準じて植込んだ。一方、非刺激群では同様に心筋梗塞作成2週前に sham 手術を行った。植込み2週後に迷走神経刺激ができることを確認した後、B-1 に準じて心筋梗塞を作成した。なお、B-1 の結果より心筋梗塞は、LAD 領域とした。心筋梗塞作成前に、超音波断層法およびドプラ法にて左室機能の評価を行い、心臓カテテル検査にて左室拡張末期圧の測定を行った。心筋梗塞を作成した後、刺激群では心筋梗塞後2週を経過したのち右迷走神経刺激を開始した。その際、最適刺激強度は、チアミラールナトリウム鎮静下における心拍数が 10bpm 低下する強度とした。刺激パターンは、ラットにおける迷走神経刺激法と同様に、1 分間に 10 秒のみ刺激を行う間歇刺激とした。その後6ヶ月間、心エコー図や心臓カテテル検査等にて血行動態、心機能を経過観察した。

C. 研究結果

C-1. 心筋梗塞モデル

長期間にわたり迷走神経刺激実験を行う上で LAD と LCX のどちらを塞栓した方が適しているかを検討した。連続5例における検討では、LCX モデルの方が心筋梗塞巣を明らかに大きくすることができるが急性期死亡が3例中2例と高く、一方 LAD モデルでは、梗塞巣が LCX モデルに比し小さいものの、急性期

死亡が無く、安定して心筋梗塞モデルを作成できることがわかった（図 C-1）。これらの結果より、研究 B-3 においては、LAD 塞栓による心筋梗塞モデルを用いることとした。

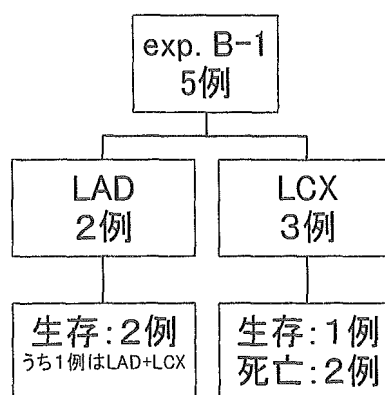


図 C-1. 心筋梗塞モデル

C-2. イヌ迷走神経刺激法

現在までに 17 例に迷走神経刺激システムを植込んだ。17 例中 9 例は、術後早期（2 週間から 1 ヶ月以内）に電極リードの断線もしくは刺激装置植込み部の感染により刺激を継続することができなくなり、刺激装置を除去した。特に、電極リードの断線は肩甲間部よりも頸部植込み例に多く発生した。また 1 例では電極自体によると思われる神経損傷（図 C-2）で早期から刺激ができなくなり、刺激装

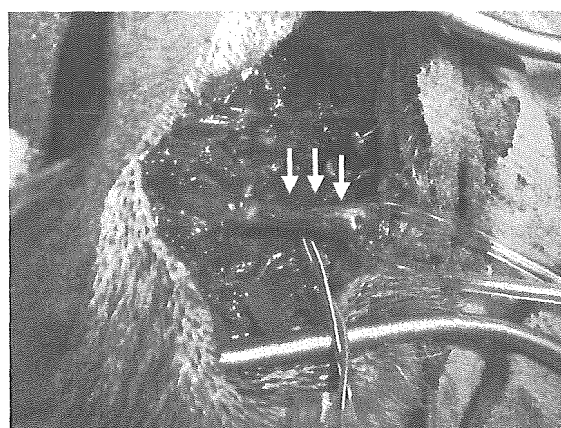
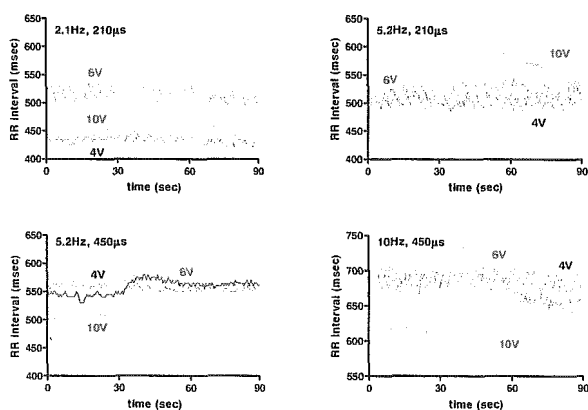


図 C-2. 神経損傷の一例
電極による神経損傷と考えられる迷走神経繊維の変色が認められる(矢印)

置を取り除いた。1例はほぼ6ヶ月にわたり、刺激が可能であったが、他病死した。

残り6例においては、図C-3に示すように植込み2週後に刺激強度の検討を行い、研究B-3に引き続き用いることとしたが、心筋梗塞作成後48時間以内(迷走神経刺激開始前)に4例が不整脈によるものと思われる突然死したため、実際には2例のみが研究B-3にエントリーされた。



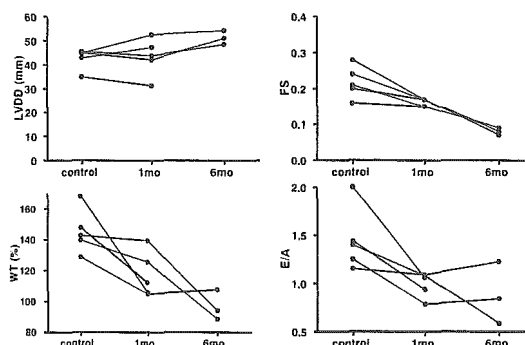
図C-3. 刺激強度設定の一例

C-3. 心筋梗塞後心不全モデルの心機能評価

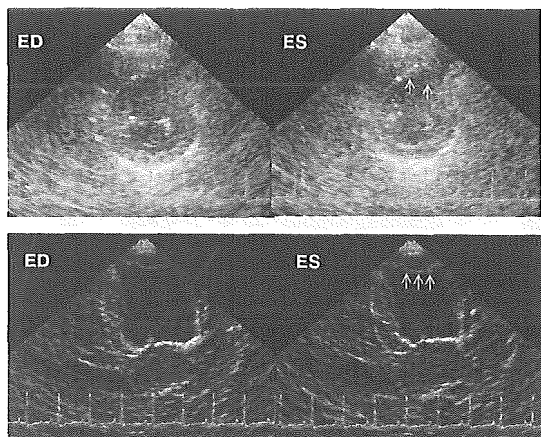
現在までに心機能を検討できた動物は、非刺激群の5例のみで、うち3例は6ヶ月経過後、2例は1ヶ月経過後の心エコー図検査と

心臓カテーテル検査を終了している。研究C-2から移行した迷走神経刺激群2例では、1例は迷走神経刺激を開始し1ヶ月後の検査待機中で、残る1例は迷走神経刺激の待機中である。

非刺激群の典型例を図C-4に示す。心エコー図上、心尖部領域を中心として無収縮領域を認め、心筋梗塞が作成できたことが確認できた。また、心エコー図検査からの心機能評価では、左室拡張末期径(LVDD)は増加傾向にあり、左室短縮率(FS)や前壁の収縮期壁厚増加率(WT)は低下し、また、ドプラー法による拡張期左室流入血流のE/A比の低下または偽正常化の心不全の所見が認められた(図C-5)。左室拡張末期圧は、 8.1 ± 3.3 mmHg、 15.5 ± 8.2 mmHg、 16.5 ± 3.2 mmHgと増加傾向にあった。



図C-5. 左室機能評価



図C-4. 心筋梗塞後6ヶ月の心エコー図
前壁から心尖部にかけての領域に無収縮領域を認める(矢印)。上段:短軸像、下段:心尖部二腔像、ED:拡張末期、ES:収縮末期

D. 考察

よりヒトに近い心筋梗塞による心不全モデルを作成するために、脳動脈瘤塞栓用プラチナコイルを用いて、イヌ心不全モデルの作成を試みた。本法では、低侵襲的にかつ選択的に心筋梗塞領域を作成することが可能であった。研究の第一段階では、LADモデルとLCXモデルの2種類の異なるモデルを検討した。本分担研究では、急性期死亡が比較的少なくかつ慢性期に左室リモデリングを検討できる程度の重症度の心筋梗塞モデルを作成す

る必要がある。イヌ冠動脈は、LCX 優位であるため、LCX モデルでは、心筋梗塞範囲は広範囲とすることができるが、一方不整脈によるものと思われる急性期死亡率が高いという結果であった。また、LAD モデルは、急性期死亡が少ないものの、LAD#6 から大きな右室枝がでており、純粋な左室心筋梗塞を作成するためにはこの枝より遠位部で塞栓する必要がある、結果として心筋梗塞の範囲が限局されたモデルとなってしまった。今後、慢性期に梗塞部位の同定及び梗塞量を病理組織学的に検討を行い、左室リモデリングの評価に適するかを更に詳しく検証する必要がある。

迷走神経刺激システムでは電極リード断線等のために、現在までに長期（6ヶ月）刺激可能だったのは1例のみである。刺激電極に関しては、径 0.1~0.2mm のプラチナワイヤを用いて、ループ型、フック型、ヘリカル型を試作しているが、図 C-2 に示すように、現段階ではまだ長期植込みによる神経損傷の問題を克服できていない。近年てんかん等の治療として迷走神経刺激療法が臨床的にも行われてきているが、ヘリカル型プラチナ電極が採用されており、本法でも参考にする必要がある。また、迷走神経刺激パターンについては、現在経過観察中の2例にて動物を鎮静した状態で至適刺激を再度検討する予定である。

心筋梗塞後心不全モデルの心機能評価では、非刺激群5例の結果からは、主に拡張機能不全を主体とする心機能の低下で、1例のみ収縮機能不全が発症していると考えられた。また、心エコー図による壁運動評価では、梗塞巣の大きさにばらつきがあることがわかった。今後安定したモデルを作成するために、先にも述べたように、右室枝分岐直後で塞栓するなど、更に工夫を加える必要がある。

現在、迷走神経刺激群は2例（うち1例は刺激待機中）で、迷走神経刺激が心機能へ与える影響については評価できていない。今後

これらのデータをまとめるとともに、継続して迷走神経刺激群の症例数を増やし、非刺激群との比較検討を行う予定である。さらに、心筋梗塞後6ヶ月以上経過した例に関しては、随時生理学的視点のみならず、病理組織学的に心臓への影響に関して検討していく予定である。

E. 結論

重症心不全の生命予後は、今なおきわめて不良であり、新たな治療法の開発が早急に必要である。その一つとして、我々はラット心不全モデルにおいて、迷走神経刺激療法という新しい心不全治療戦略を検討してきた。これらの結果を踏まえ、次世代 ICD に付加する新しい機能として迷走神経刺激療法が妥当であるか早急に検討する必要がある。現在までに、大型動物における心不全モデルの確立と迷走神経刺激システムについては、まだ課題はあるもののおおよその目途が立ってきたところである。今後、心不全例における迷走神経刺激療法の評価が喫緊の課題である。次年度は、慢性期心機能から見た有効性評価を早急に行うとともに、広範囲心筋梗塞モデルにおける急性期（発症後 6~12 時間）からの迷走神経刺激療法についても検討を加えたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Michikami D, Kamiya A, Kawada T, Inagaki M, Shishido T, Yamamoto K, Ariumi H, Iwase S, Sugenoja J, Sunagawa K, Sugimachi M. Short-term electroacupuncture at Zusanli resets the arterial baroreflex neural

- arc toward lower sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (In press) 2006
2. Uemura K, Kamiya A, Hidaka I, Kawada T, Shimizu S, Shishido T, Yoshizawa M, Sugimachi M, Sunagawa K. Automated drug delivery system to control systemic arterial pressure, cardiac output, and left heart filling pressure in acute decompensated heart failure. *J Appl Physiol.* (In press) 2006
 3. Kawada T, Yamamoto K, Kamiya A, Ariumi H, Michikami D, Shishido T, Sunagawa K, Sugimachi M. Dynamic characteristics of carotid sinus pressure-nerve activity transduction in rabbits. *Jpn J Physiol.* 55(3):157-63, 2005
 4. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Mori H, Sugimachi M. Myocardial interstitial choline and glutamate levels during acute myocardial ischaemia and local ouabain administration. *Acta Physiol Scand.* 184(3):187-93, 2005
 5. Traub M, Aochi T, Kawada T, Shishido T, Sunagawa K, Knaepfer MM. Contribution of baroreflex sensitivity and vascular reactivity to variable haemodynamic responses to cocaine in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32(11):911-8, 2005

G-2.学会発表

1. Hideto Ariumi, Toshiaki Shishido, Kenji Sunagawa, Masaru Sugimachi. Aortic depressor nerve stimulation markedly improves the survival rate after acute myocardial infarction in rats. 6th Asian-Pacific Conference on Biomedical Engineering(APCMBE), 2005
2. 立脇 禎二, 稲垣 正司, 宍戸 稔聡, 杉町 勝 血管内心臓副交感神経刺激は心筋梗塞急性期における致死性不整脈を抑制する 第44回日本生体医工学会大会(日本エム・イー学会)第43巻 Suppl.1 453, 2005
3. 川田 徹, 神谷 厚範, 宍戸 稔聡, 杉町 勝 Plasma norepinephrine of physiological concentration does not affect dynamic heart rate regulation by the cardiac sympathetic nerve. 生理的濃度の血漿中ノルエピネフリンは心臓交感神経による動的心拍数調節に影響を与えない 第82回日本生理学会大会 90, 2005
4. 山元 健太, 道上 大策, 宍戸 稔聡, 川田 徹, 神谷 厚範, 高木 洋, 砂川 賢二, 杉町 勝 交感神経調節における筋機械受容器反射と動脈圧受容器反射との静的相互作用のモデル化 第20回生体・生理工学シンポジウム論文集 103, 2005
5. 道上 大策, 川田 徹, 神谷 厚範, 宍戸 稔聡, 山元 健太, 有海 秀人, 砂川 賢二, 杉町 勝 鍼刺激の動脈圧反射の静特性および動特性に及ぼす影響 第20回生体・生理工学シンポジウム論文集 233, 2005
6. Tadayoshi Miyamoto, Toru Kawada, Toshiaki Shishido, Masashi Inagaki, Hiroshi Takaki, Masaru Sugimachi. Presynaptic α 2-adrenergic negative feedback shortens the time constant of sympathetic heart rate response. 第70回日本循環器学会総会・学術集会 Circulation Journal Supplement I, vol.70, 309, 2006
7. Toru Kawada, Toji Yamazaki, Tsuyoshi Akiyama, Kazunori Uemura, Toshiaki Shishido, Masaru Sugimachi. Vagal stimulation during ischemic period but not reperfusion period reduces myocardial myoglobin release in the ischemic region. 第70回日本循環器学会総会・学術集会

Circulation Journal Supplement I , vol.70,
400, 2006

G-3. 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

植込み型突然死防止装置の開発

心機能モニター（コンダクタンス法による心拍出量モニター）の開発（分担課題名）

分担研究者 上村 和紀（国立循環器病センター研究所循環動態機能部 研究室員）

研究要旨：ICD 埋め込み患者において心機能推移を把握するために、右心室コンダクタンス信号より心拍出量を推定するシステムの開発を目的とする。システムは ICD に統合可能で、追加の消費電力・システム容量を可能な限り小さくすることを目的とする。

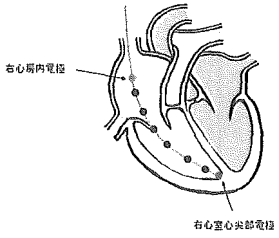
A.研究目的

植込み型突然死防止装置の開発において、心機能を長期連続してモニターすることは致死性不整脈の早期診断に必要であるのみならず、心不全慢性期の病態把握の点でも極めて重要である。本モニター装置では心機能推移を把握するために、右心室コンダクタンス法により心拍出量を推定することを考えている。このシステムに用いる電極は、ICD システムに統合可能で長期に留置でき、かつ動脈血栓症などの合併症のリスクを最小限に出来る部位に設定されなくてはならない。

B. 研究方法

実験には麻酔下成犬を用いた（図 1）。

実験方法(図1)	
動物	麻酔
犬(20~30kg)	吸入イソフルレン(0.5~1.0%)
操作	
コンダクタンスカテーテルは右頸静脈より逆行性に右心室内へ挿入。	
肺動脈に流量計を装着。	
心室内圧・心電図・コンダクタンス信号は200Hz	
・12bitでAD変換し保存	
後解析した。	



B-1. 右心室コンダクタンス心拍出量と実測心拍出量の相関

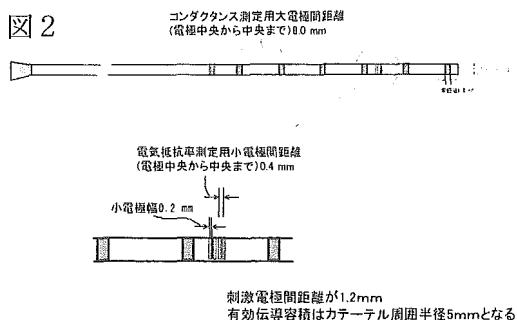
コンダクタンス刺激および測定電極を右心室・右心房・冠状静脈洞・左心室外膜・ICD ジェネレーターに様々に配置し、コンダクタンス信号と肺動脈流量計により実測された心拍出量が最も強く相関する電極配置を検討した。またその相関関係から、コンダクタンス信号より心拍出量を正確に推定する較正式を確立した。

B-2. カテーテル電極による血液電気抵抗率推定

コンダクタンス信号を心拍出量などの容積信号に変換するには血液電気抵抗率を計測しなければならない。B-1 の動物実験では採血により採取した血液を体外のキュベットに充填し電気抵抗率を実測した。しかしながら、ICD が埋め込まれた外来患者では不可能である。よってカテーテル上に留置した電極で電気抵抗率を推定する方法を開発した。

右心室横径内に血液電気抵抗率測定電流の伝導容積が包含されるように抵抗率測定用の刺激電極を配置する (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2906-13, 2004.)。先行研究 (*J*

Appl Physiol 96: 917-922, 2004)から犬右心室の拡張期横径は約3 cmである。刺激電極間距離を1.2mmとすると、有効伝導容積はカテーテル周囲半径5mm以内に収束することが理論解析で示された。これに基づき、図2に示すように、近接する4電極を血液電気抵抗率測定に用いるコンダクタンスカテーテルを試作した。



犬右心室内にこのカテーテルを留置し、血液電気抵抗率を計測した。また採血し体外のキュベットでも血液抵抗率を実測し、このカテーテルによる抵抗率推定精度を検証した。

B-3. 右心室コンダクタンス信号による心拍出量の推定

B-1 および B-2 の方法を統合し、図2のカテーテルを用い、心拍出量（1回拍出量）をカテーテルからの信号のみにて推定しうるか検討した。

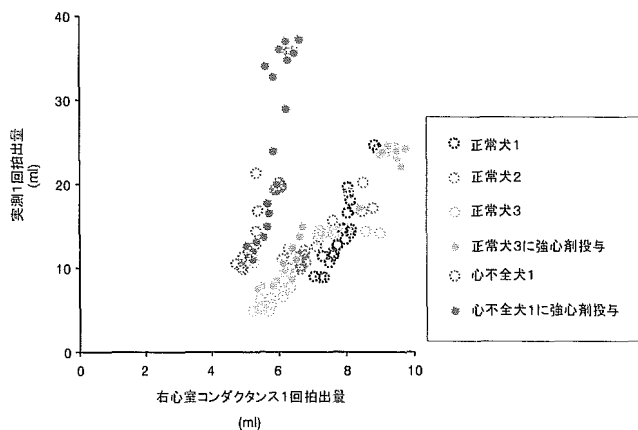
C. 研究結果

C-1. 右心室コンダクタンス心拍出量と実測心拍出量の相関

刺激電極として右心室心尖部と右心房内に電極を配置、測定電極として右心室内に3電極ないし4電極配置し2セグメントないし3セグメントのコンダクタンス信号を測定した

場合最も良好な相関が得られることを見出した。図3は4頭の犬における実測1回拍出量と右心室コンダクタンス1回拍出量の関係である。

図3



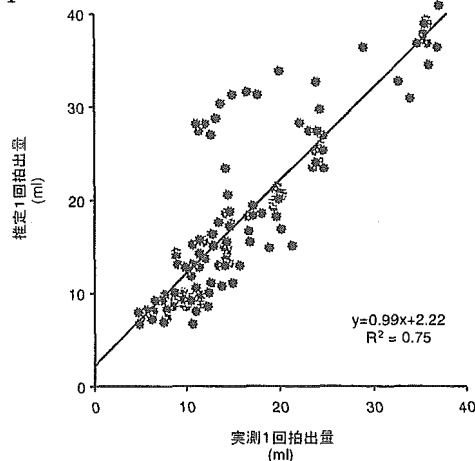
①心室容積-コンダクタンス関係は非線形関係にある②実測1回拍出量が0mlのときコンダクタンス1回拍出量は0mlとなる、この①および②を同時に満たす、実測およびコンダクタンス1回拍出量間の関係式として

$$\text{実測1回拍出量} = A \times (\text{EXP}(B \times \text{コンダクタンス1回拍出量}) - 1)$$
(式1)を規定した。

図3の実測およびコンダクタンス1回拍出量関係を式1へ最小二乗法を用いて近似した際のAとBの平均値を求めると、Aは1.1、Bは0.5となった。またAとBは

$$A = -4.9 \times B + 3.3 \quad R^2 = 0.6$$
と線形相関していた。

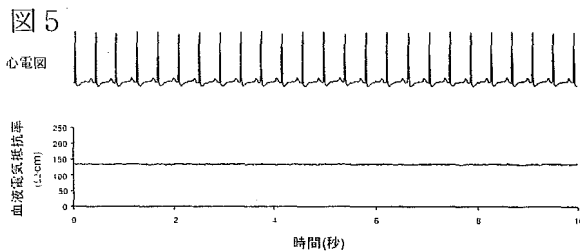
図4



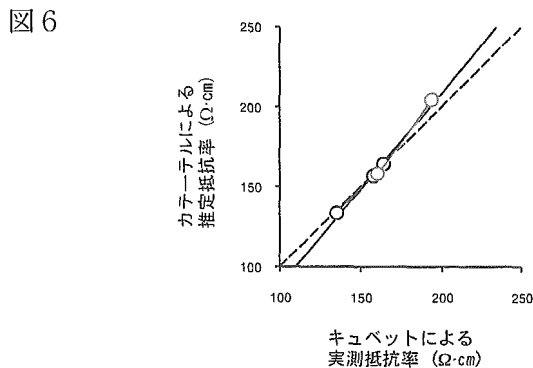
これより定常状態の実測1回心拍出量とコンダクタンス1回拍出量から個々の個体でAとBを求め、心拍出量をさまざまに変化させた際の実測1回心拍出量をコンダクタンス1回拍出量から推定した。図4に示すように多少のばらつきはあるものの推定可能であった。しかしながら推定精度には個体差があった。

C-2. カテーテル電極による血液電気抵抗率推定

図2のカテーテルを、図1のように右心室内へ留置し、血液抵抗率測定電極からの信号を採取した。図5に示すように、有効伝導容積は完全に右心室内血液にのみ包含されてしまっているので、信号は全心周期を通じて一定であった。

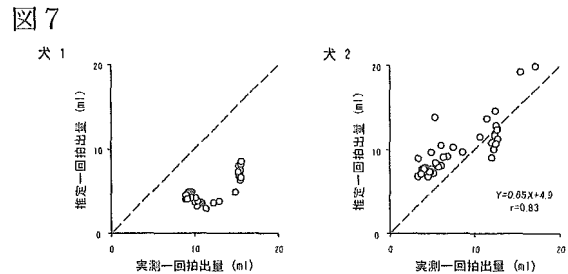


2頭の犬において、このようにしてカテーテル上の電極から得られた電気抵抗率の推定値は体外のキュベットにより実測された電気抵抗率と良好に一致していた(図6)。



C-3. カテーテルからの信号のみによる心拍出量の推定

C-1 および C-2 の結果に基づいて右心室に留置されたカテーテルの信号のみを用い1回拍出量を2頭の犬にて推定した。図7に示すように推定精度には個体差があった。



D. 考察

今回の研究結果は、右心室内カテーテルから得られるコンダクタンス信号を用い、心拍出量が推定可能なことを示唆している。少なくとも相対的变化はモニターしうる可能性がある。しかしながら推定精度(絶対値・相対的变化量いづれも)には個体差があり、推定法として個体ごとの補償法の確立が検討課題と考えられた。

E. 結論

右心室コンダクタンス信号を活用することで臨床上有用な心拍出量モニターとなりうると期待される。しかしながら、ICDに統合して臨床応用するには更なる検討・開発を要するといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. 上村和紀, 神谷厚範. コンピュータ制御による自動的な血行動態管理. 循環器科 58: 606-612, 2005
2. Uemura K, Kamiya A, Hidaka I, Kawada T, Shimizu S, Shishido T,

Yoshizawa M, Sugimachi M, Sunagawa K. Automated drug delivery system to control systemic arterial pressure, cardiac output, and left heart filling pressure in acute decompensated heart failure. *J Appl Physiol* 2005 Dec 22; [Epub ahead of print]

3. Kamiya A, Kawada T, Yamamoto K, Michikami D, Ariumi H, Miyamoto T, Shimizu S, Uemura K, Aiba T, Sunagawa K, Sugimachi M. Dynamic and static baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity (SNA) parallels that of renal and cardiac SNA during physiological change in pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(6):H2641-8. 2005
4. Kamiya A, Hayano J, Kawada T, Michikami D, Yamamoto K, Ariumi H, Shimizu S, Uemura K, Miyamoto T, Aiba T, Sunagawa K, Sugimachi M. Low-frequency oscillation of sympathetic nerve activity decreases during development of tilt-induced syncope preceding sympathetic withdrawal and bradycardia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(4):H1758-69. 2005
5. Kamiya A, Kawada T, Yamamoto K, Michikami D, Ariumi H, Uemura K, Zheng C, Shimizu S, Aiba T, Miyamoto T, Sugimachi M, Sunagawa K. Resetting of the arterial baroreflex increases orthostatic sympathetic activation and prevents postural hypotension in rabbits. *566(Pt 1):237-46*. 2005

G-2.学会発表

1. 上村 和紀、川田 徹、柏原 考爾、杉町勝、砂川 賢二 急性非代償性心不全の循環管理を支援する、血行動態自動制御システムの開発 第26回日本循環制御医学会総会 2005年5月13日・14日 長崎
2. 古澤 誠、稲垣 正司、上村 和紀、杉町勝、砂川 賢二 左心室容積信号を用いたICD用致死性不整脈検出アルゴリズムの開発 第44回日本生体医工学会大会(日

本工ム・イー学会) 第43巻 Suppl.1 460, 2005

3. Makoto Yoshizawa, Masashi Inagaki, KAZUNORI UEMURA, Masaru Sugimachi, Kenji Sunagawa. Development of Detection Algorithm of Fatal Arrhythmia for a New Implantable Cardioverter Defibrillator. 27th IEEE, IEEE Engineering in Medicine and Biology, 330, 2005
4. Toru Kawada, Toji Yamazaki, Tsuyoshi Akiyama, Kazunori Uemura, Toshiaki Shishido, Masaru Sugimachi. Vagal stimulation during ischemic period but not reperfusion period reduces myocardial myoglobin release in the ischemic region. 第70回日本循環器学会総会・学術集会 *Circulation Journal Supplement I*, vol.70, 400, 2006

G-3.新刊報道

無し

H.知的所有権の取得状況

無し

厚生省科学研究費補助金（身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業）

平成17年度分担研究報告書

植込み型突然死防止装置の開発

致死性不整脈例への ICD 植込みの適応に関する研究

分担研究者：鎌倉史郎（国立循環器病センター 心臓血管内科 部長）

研究要旨：日本人に多い突然死の原因として近年注目されている Brugada 症候群の病態、治療法と、ICD 植込み適応基準を文献的に考察した。Brugada 症候群は、特異な心電図波形を呈し、主として夜間に心室細動 (VF)を生じて突然死する疾患である。このうち VF/心蘇生既往のある群では予後が不良なため、ICD 植込みが必須と考えられた。一方、日本人の無症候・失神群は欧米人に比べて予後が良好であるため、電気生理学検査 (EPS) で VF が誘発される失神群と、無症候群のうち、自然の Type I 型 ST 上昇があり、かつ突然死の家族歴のある例には ICD 植込みが必要だが、それ以外の多くの例（無症候で saddleback 型 ST 上昇だけが認められる例を含む）では ICD 植込みが不要と考えられた。

A. 研究目的

植え込み型除細動器 (ICD) は 1970 年に Mirowski らによって考案され、心室頻拍、心室細動等の致死性不整脈の治療の切り札として 1980 年に初めて臨床応用された。当初の機器は大型で、開胸手術により体内に植え込まれ、除細動機能だけを有していたが、その後ペースメーカーと同様な胸壁植込みが可能になった。ICD は 1995 年以降に施行された種々の大規模臨床試験で他の治療法を凌ぐ生命予後延長作用が確認され、その適応症が漸次拡大しており、欧米諸国では本邦の 5 倍～数十倍もの植込みがなされている。昨年度の研究では QT 延長症候群 (LQTS)、カテコラミン誘発

性多形性心室頻拍 (CPVT) の ICD 植込み適応基準を考察したが、本年度は日本人の突然死の原因として注目されている Brugada 症候群の ICD 適応基準を検討した。

B. 研究方法

OVID/MEDLINE (1966～2006 年)、医学中央雑誌 (1983～2006 年) を用いて、Brugada 症候群の診断・治療と、ICD 植込みに関して記述した代表的な論文を抽出すると共に、Brugada 症候群に関する循環器病委託研究 13 指-1、および 16 公-3 の成績に基づいて、現時点で最も妥当と思われる適応基準を求めた。本研究は主として文献に基づく研究であるため、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

Brugada 症候群は心電図で右脚ブロック様波形と、V1~V3 誘導における coved 型または saddleback 型の ST 上昇を呈し、主として夜間に心室細動 (VF) で突然死する疾患である。本症候群は 1992 年、Brugada らによりその疾患の概要が報告されたが、その後の研究により、東南アジアにおける夜間突然死症候群や、日本における”ぽっくり病”の主たる原因疾患であると考えられている。本疾患は男性に多く、その有病率は 0.15%前後で、罹患率は約 0.014%と推定されている。Brugada 症候群には失神や VF 等の症状を伴う有症候群と、心電図異常を有するが症状のない無症候群があり、有症候群の予後は概ね不良だが、無症候群の予後は一部を除いて比較的良好とされている。これらには一般に器質的心疾患は認められないが、心筋の Na チャネルの α サブユニットをコードする SCN5A 遺伝子の変異が 15~25%で認められる。

1. Brugada 症候群の臨床所見

1) 臨床症状

本症候群は男性に多く、全症例の 75%~94%を男性が占める。罹患率は男性が女性の 9 倍で、男性は 20 才台から発症し、30 才台でピークとなるが、女性はやや遅れて発症し、かつ男性は女性に比べ、5.5 倍の突然死のリスクがあると報告されている。一方、45 才未満での突然死の家族歴は、全体の 22~55%の症例に認められ、特に無症候群では 50-70%を占めると報告されている。しかしながらこれら家族歴や性比率は登録の手法により大きく異なる。無症候群の多くを

有症候群の家系から抽出した欧米の研究でこれらの比率が高いのは当然であるが、主として弧発例が集積された本邦の登録調査 (循環器病委託研究) では女性の比率が 6%前後と少なく、突然死の家族歴を有する例も 16%前後にとどまっている。

VF 発作は安静時または夜間睡眠中に生じやすい。委託研究では夜間 (20 時から 8 時) 発症例が 66%を占め、その 51%で急性期に心室期外収縮が認められた。Brugada 症候群では VF の他に心房細動 (AF) も合併しやすい。委託研究では有症候群で 29%、無症候群で 12%に AF が認められ、そのほとんどが発作性 AF であった。また冠攣縮性狭心症や神経調節性失神も合併しやすいことが知られているが、委託研究では冠攣縮性狭心症が β -チルコリンまたはエルゴメトリンで 20%前後の症例に誘発されていた。

2) 心電図基準

Brugada 症候群は報告された当初、右脚ブロックを伴うとされていた。しかしながら完全右脚ブロックを呈する例は意外に少なく、正常 QRS 幅の症例も 1/3 程度存在することが判明したため、右脚ブロックは必須の所見とされなくなっている。ST は一般に saddleback 型 (馬鞍型)、または coved 型 (洞窟型、弓型) 上昇を示すが、明かな ST 上昇が認められなくとも、薬剤 (Na チャネル遮断薬等) 投与後に有意に ST が上昇する例も Brugada 症候群に含まれる。欧州 Heart Rhythm 学会は V1~V3 誘導の ST 異常を 3 つのタイプに分類し、いずれも J 点で 0.2mV 以上の上昇があるが、coved 型で T 波が陰転しているのを Type I、ST 部分が 0.1mV 以上上昇していて saddleback 型を呈し、T

波が陽性または2相性のものをType2、ST上昇が0.1mV未満でsaddleback型でT波が陽性のものをType3と定義している。このうちType1波形が自然の状態、または薬剤負荷後に認められる場合はBrugada型心電図としてもよいが、薬剤負荷後においてもType2やType3にとどまる場合はBrugada型とは断定できないとしている。しかしながらType2またはType3であっても1~2肋間上方でV1~V3誘導を記録すると、Type1心電図を示す場合がある。また1点で0.2mVに達さないST上昇例も少なからず認められる。これらは欧州Heart Rhythm学会の分類では分類不能となってしまうが、上方の肋間で記録すると典型的なType1~Type3を示し、Brugada症候群と診断できる場合がある。またType1ではT波の陰転が必須事項となっているが、現実にはT波の陰転のないcoved型が存在し、特にNaチャンネル遮断薬投与後には20%近くの症例でT波陰転を伴わないType1波形が認められる。

3) その他の心電図学的指標

QRS時間は有症候群や電気生理学的検査(EPS)でのVF誘発例で延長しており、V1誘導のS波幅も有症候群で延長している。P波幅、PR時間、QRS時間の延長はSCN5A変異の認められる症例で報告され、QT時間の延長もLQT3とのoverlap症例等で認められている。

前述のごとく、本症候群ではピルジカイニド、フレカイニド、アジマリン等のNaチャンネル遮断薬投与後に60~90%の例でSTが上昇し、一部の例では心室性不整脈や交代性T波が出現することが知られている。一方、運動負荷中やイソプロテレノール投与

中にはST上昇が改善(正常化)するが、負荷後や投与後には再上昇する。この他、Ca拮抗薬、β遮断薬、向精神薬、低K血症、発熱等でSTが上昇することが報告されている。また60~80%の症例で加算平均心電図が陽性となる。委託研究では薬剤負荷後Type1型ST上昇を呈したのは、有症候群53%、無症候群63%、運動負荷後にST再上昇が認められたのは、有症候群76%、無症候群74%、加算平均心電図で3指標のうち2指標以上を満たした陽性率は、有症候群70%、無症候群63%で、いずれも両群間に有意な差が認められなかった。

4) 電気生理学的指標

EPSでは2連発または3連発の心室早期期外束まで50~80%の例にVFや多形性VTが誘発され、その誘発率は無症候群よりも有症候群で有意に高いとされている。委託研究においても、VF誘発率は有症候群が無症候群に比べ有意に高かったが(71% vs 52%)、VF/多形性VTの誘発率には差が認められず(81% vs 62%)、VFは右室心尖部よりも右室流出路からの期外刺激で誘発されやすかった(27% vs 59%)。

2. Brugada症候群の診断

Brugada症候群を疑った時に行うべき非侵襲的検査として、加算平均心電図、運動負荷心電図、薬物負荷心電図等がある。Brugada症候群では加算平均心電図が陽性になる確率が高く、運動負荷検査において運動後にST上昇が顕性化したり、Ic群薬投与後(ピルジカイニド1-2mg/kgを10mg/分の速度で静注)にSTが上昇することが知られている。

電気生理学検査は失神群や、突然死の家
族歴を有する Type1 型の無症候群において、
よい適応となる。その意義に関しては未だ
明らかでなく、誘発法も3連発の心室期外
刺激まで行うのか、右室心尖部刺激だけ
でよいのか、最短連結期を200msecま
でに留めるのか等の合意が形成されて
ないが、容易にVFが誘発される例は
high risk群であるとする考え方が
一般的である。一方、VF/心蘇生群
ではEPSは必須検査でなく、突然
死の家族歴のない非Type1型の無
症候群も予後が良好なため、本検査
は不要と思われる。

3. Brugada 症候群の予後

欧米の大規模調査では、自然に、または
薬剤負荷後にType1となる(2mm以上の
coved型ST上昇を呈する)例だけを登録
対象としている。つまり、それ以外
のタイプのBrugada症候群(saddleback
例や12誘導心電図でST上昇が2mm
に達さない例など)の予後は未検討
であり、明らかにされていない。

これまでのBrugadaらの報告では有症
候群の予後は悪く、VF/心蘇生群では
17.4%/年、失神群では6.2%/年の頻
度で重篤な心事故を発症する。また
無症候群も3.7%/年の頻度で心事故
を発症するが、中でも自然のType1
型ST上昇を有する例の心事故発生
率は6.2%/年であるとしている。一
方、委託研究ではVF/心蘇生群の年
間心事故発生率は12.3%で、Bruga
daらの報告にほぼ合致したが、失
神群は1.9%、無症候群も0.5%と
有意に低値であった。また無症候
群のうち、自然にType1型心電図が
認められた例の年間心事故発生率
も0.9%で、Brugadaらの報告
より有意に低かった。最近Eckardt

らは欧州3カ国(独仏蘭)における調
査結果を報告しているが、それによ
るとVF/心蘇生群、失神群、無症
候群のいずれの予後も良好であった
としている。Eckardtらは、Bruga
daらの登録症例の予後が悪いのは、
突然死の家系から構成される重篤な
例がより多く集積されたためではな
いかと述べている。しかしながら
Eckardtらの研究では逆に、少数
の予後の良好なVF/心蘇生群の家
系から失神群、無症候群の多くが
抽出されたため、全体として良好な
経過を示したとも考えられる。い
ずれにしても突然死の家系例が多
く含まれる研究では、その発端者
グループの重症度に比例して全体
の結果が左右されかねない。すべ
ての群で発端者の占める割合が高
く、家系例が少ない委託研究は、
それらの偏りの少ない、より正確
なBrugada像を伝えているとも考
えられる。

有症候群にはcoved型が有意に多く
認められるため、saddleback型
よりもcoved型の予後が一般に不
良と考えられている。委託研究
では薬物負荷にても12誘導心電
図でType1型を呈さないBruga
da症候群例が35%近く存在する
ことが明らかにされている。これ
ら非Type1型の予後を検討したと
ころ、Type1型の予後とほぼ同様
であった。また上位肋間でのみ
Type1型ST上昇が認められる例
の予後も、通常誘導(V1-V3誘導)
におけるST上昇例とほぼ同様
であることが判明している。

4. 心事故の予測因子

これまでの検討では、自然にType1
型心電図が記録される例、男性、
EPSでのVF誘発例、突然死家
族歴などが心事故の有意な予測
因子として知られている。特にBruga

a らは、EPS で持続性 VT/VF が誘発される無症候群の心事故発生率は 5%/年と高く、自然の ST 上昇があれば 7%/年、さらに失神を伴えば 14%となると報告している。一方、P riori らは VF/多形性 VT 誘発は必ずしも有用な予後指標ではないとし、臨床症状と不整脈誘発性は無関係と報告している。

委託研究では VF/心蘇生群においては冠攣縮誘発例に有意に心事故が多かったが、自然の Type1 心電図、EPS での VF 誘発、AF 合併、加算平均心電図陽性、男性、突然死家族歴等は有意な予測因子ではなかった。一方、無症候・失神群では突然死の家族歴が心事故の有意な予測因子であった。しかしながら自然の Type1 心電図、EPS での VF 誘発、AF 合併、加算平均心電図陽性、男性等はいずれも有意な予測指標ではなかった。

一方、自然の Type1 型 ST 上昇がなく、薬剤ではじめて Type1 に移行する例の予後は良好であり、SCN5A 遺伝子の変異があっても薬剤負荷で Type1 に移行しない例は予後が良好と報告されている。

5. Brugada 症候群の薬物治療

VF 多発時の薬物治療としてはイソプロテレノールの持続点滴が有用である。VF の予防薬としては、アミオダロン、β 遮断薬は無効であるが、Ito 電流の遮断作用を有するキニジン、ペプリジル、Ca 電流を増加させるシロスタゾールが有効と報告されている。しかしながらこれらの薬剤も VF を完全に抑制するには至っておらず、今後の検討が必要と思われる。

D. 考察

米国および欧州 Heart Rhythm 学会は主と

して Brugada らの報告に基づいた、Brugada 症候群の治療指針を提唱している。これによると、VF/心蘇生群、VF による夜間の失神が疑われる群と、EPS で VF が誘発される無症候群には ICD 植込みを勧める方針であり、VF 由来でない失神が疑われる例、EPS で VF が誘発されない無症候群例と、薬剤ではじめて Type1 になる無症候群で、かつ突然死の家族歴がない例は経過観察が可能としている。しかしながらこの指針では Type1 以外の心電図を有する症例への対応が欠落しており、失神に関しても VF 性失神か否かを判断するのは困難のように思える。以上より、現時点では Type1、非 Type1 型に関係なく、VF/心蘇生の既往がある例（症状から VF 性失神であることが明らかな例を含む）、EPS で VF が誘発される失神例と、無症候群のうち、自然の Type1 型 ST 上昇があり、かつ突然死の家族歴のある例には ICD 植込みが必要だが、無症候で突然死の家族歴がない例、無症候で saddleback 型 ST 上昇だけが認められる例と、失神があり、かつ EPS で VF が誘発されない例は ICD 植込みを不要としてよいと考えられる。

E. 結論

VF/心蘇生の既往のある Brugada 症候群は予後が不良であるため ICD 植込みが必須であるが、日本人の無症候・失神群は欧米人に比べて予後が良好であるため、無症候群では突然死の家族歴がなければ、または失神群では EPS で VF が誘発されなければ、ICD 植込みは必要でないかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

鎌倉史郎：日本内科学会誌 96: 320-327, 2006

Satomi K, Kamakura S, et al: Heart Rhythm 2: 149-154, 2005

Noda T, Kamakura S, et al: JACC 46: 1288-1294, 2005

Shimizu W, Kamakura S, et al: Nat Clin Cardiovasc Med 2: 408-414, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

植込み型突然死防止装置の開発

虚血心における心臓リモデリングおよびその神経制御の検討

分担研究者 佐藤 隆幸（高知大学医学部循環制御学 教授）

研究要旨：

ACh（アセチルコリン）には、交感神経系と拮抗する既知の作用に加え、心筋に対しその作用時間経過に応じて、これまで不明であったさまざまな生物学的作用をもつことが以下のように明らかとなった。1) ACh は低酸素により抑制されるギャップ結合機能を、コネキシン蛋白を制御することで保つ（急性期作用）。2) ACh は心筋細胞の生存シグナルを活性化させ虚血耐性機構を亢進させる（急性期作用）。3) ACh は心筋細胞内での $\text{TNF}\alpha$ ・ $\text{HIF-1}\alpha$ といった細胞保護因子の産生を亢進させる（亜急性期からそれ以降）。4) ACh による生存シグナルは互いにクロストークしながら、最終的には血管新生に関わる各種因子（VEGF など）を心筋細胞から産生させる。これにより ACh が血管内皮細胞のチューブ形成を促進するなど、ACh は血管新生促進作用をもつ。以上から本研究では、ACh は短期的には心筋細胞レベルで電気的均一性を保ち心臓全体の電気的安定性を保つこと、さらに長期的には ACh は心臓での血管新生を促進させることで低酸素環境から保護するはたらきをもつことが示唆された。

A. 研究目的

左冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全ラットの非急性期生存率が、心筋梗塞後の迷走神経刺激によって改善され、さらに不全心リモデリングの進行も抑制されるという Liらの先行研究により、迷走神経刺激がどのような機序により上記の効果を発揮するのかを、分子または細胞レベルにおいて明らかにすることが本研究の目的である。

また、この迷走神経刺激の心不全進行抑制機序を解明することは、今後の植込み型除細動器 (ICD) の開発にあたり、その知見を応用し適用させることで、これまでの ICD にはない付加価値を提供する可能性につながるのではないかと考えられる。なぜならば、既存の

ICD は発生した致死的不整脈を停止させるためのものであるが予防作用は持っていない。しかし本研究のその後の展開により、迷走神経刺激には急性心筋梗塞後の致死性心室性不整脈発生抑制効果やさらには心筋細胞の虚血耐性獲得効果などが存在することが見出された。すなわち迷走神経に直接アプローチすることは、不整脈予防効果さらには心筋保護効果という新たな効果が加わることを示唆している。

以下に個体および細胞レベルにおいて本研究によって得られた結果について報告するが、迷走神経刺激という新たな治療法の効果および作用メカニズムを考察していく上での留意点は、その時間的要因を考慮に入れるこ

とである。すなわち、迷走神経終末から放出される神経伝達因子アセチルコリン (ACh) の効果は、分単位で起こる急性期の効果、それ以後の亜急性期、さらには十数時間後に現れる非急性期の効果というように分けて捉えられると考えられる。個体レベルで考えれば、迷走神経刺激直後に認められるような急性期効果、また迷走神経刺激を継続させた後にはじめて認められる非急性期の効果というように時間的側面を考慮にいたした捉え方である。

以上をふまえてもう一度迷走神経刺激の心筋梗塞後ラットの生存率改善効果について考察すると、生存率改善の要因は大別すると、1) 致死性不整脈抑制効果、2) 心筋細胞生存促進作用による細胞死の抑制効果、の二点の可能性が予想された。すでにわれわれのこれまでの研究によって、迷走神経刺激が心筋梗塞後の心室性不整脈を抑制することを明らかにしてきた。その後この研究を手がかりにし、細胞レベルの研究により迷走神経伝達物質である ACh には、既知の機能に加え多様な作用を持つことが明らかとなった。それぞれについて以下に、その時間的要素も考慮に入れて報告する。

B. 研究方法

B-1. ラット初代培養心筋細胞に対する ACh の細胞相互作用に関する研究

1) ラット心筋細胞初代培養

ラット新生児 (日齢 1-2 日) の心臓を取り出し心房を除いた後、37°C で震盪しながら酵素処理 (0.1% コラゲナーゼ) を行い、ゼラチンコーティングした培養皿上に細胞を播種し、20% 酸素濃度下 37°C で培養し 4 日目以降実験へ使用した。

2) 心筋細胞の低酸素暴露

20% 酸素濃度で培養中の心筋細胞に対して、窒素置換により酸素濃度を 1% まで低下させるか、または塩化コバルト 200 μM を用いて 12 時間の低酸素暴露実験を行った。

3) 色素細胞間移動法を用いた細胞間相互作用の評価

顕微鏡下で、Lucifer Yellow (LY) 色素を心筋細胞に直接ガラス電極を用いて注入し、蛍光顕微鏡下で注入された色素のギャップ結合を介した隣接した細胞への広がり具合を観察した。

通常酸素培養条件下ラット心筋細胞を塩化コバルト処理 (200 μM) 5 時間、ACh (500 μM) かつ塩化コバルト (200 μM) の両者処理した場合の色素の広がりへの影響を観察した。

B-2. 培養心筋細胞を用いた ACh の心筋細胞への直接作用として、心拍数に依存しない細胞生存シグナルおよび抗アポトーシス作用に関する研究

ACh の培養心筋細胞への作用を細胞生物学的に検討した報告はこれまでに少なかったことから、心拍数減少効果など既知の作用以外の他の ACh の心筋直接作用を調べるために、交感神経の関与を無視できる心筋細胞培養系を本研究では用いた。そこでラット初代培養心筋細胞を用いて、時間経過に応じて ACh の直接作用を検討した。

B-2.1. ACh の細胞生存シグナル

心筋細胞への ACh 直接作用で急性期の効果を調べるために PI3K/Akt というリン酸化酵素自身のリン酸化の時間経過を観察した。PI3K/Akt は、すでにシグナル情報伝達系の中でも特異な性質を持つことが知られている。一つはアポトーシス抑制作用で、アポトーシス実行因子のカスパーゼ機能を抑制し、一方でアポトーシス抑制作用をもつ Bcl-2 機能を維持する。さらに細胞増殖促進作用ももつ。これまで、ACh の低酸素暴露による心筋細胞障害保護作用についての報告はきわめて少なくこれを確かめるために以下の実験を行った。

1) ラット初代培養心筋細胞を通常酸素濃度下 (20%) で培養し、1 mM ACh 添加後の Akt

リン酸化の時間経過を分単位でウェスタンブロット法で検討した。また PI3K 特異的阻害剤 wortmannin (300 nM) による影響も検討した。さらにこの ACh の効果がムスカリン受容体を介するか否かを調べるために、アトロピン 1 mM の影響も検討した。

2) 低酸素誘導転写因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α は、低酸素暴露に適応するために必須な遺伝子発現制御に関与する重要な転写因子である。この転写因子の欠損は、低酸素環境への不適応やまた個体発生における

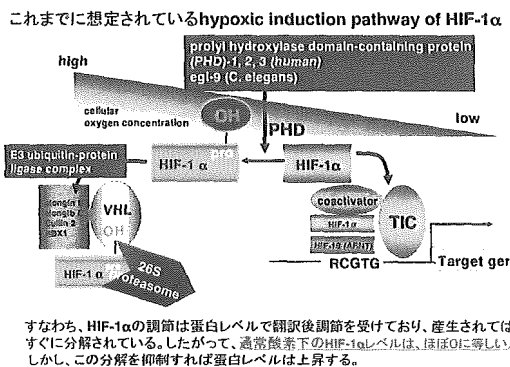


図1 HIF-1 α の調節機構

血管新生異常を起こし、胎生致死を引き起こすことが知られている。この転写因子の蛋白発現量は通常酸素濃度下ではプロテアソーム系により分解され、わずかである。一方低酸素下ではその分解系が抑制され時間単位で蛋白量が上昇することが知られている(図1)。

そこでこの HIF-1 α に着目し、通常酸素下(20%)において 1 mM ACh が HIF-1 α のタンパク発現およびその分解にどのような影響があるかを時間単位で、HIF-1 α に対する抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討した。

B-2.2. ACh の細胞保護作用についての in vitro での検討

細胞生存シグナルが ACh の心筋細胞に対する処理で入るか否かを検討することに加え、

実際に細胞がその外的環境ストレスから保護されるか否かを検討するために、次の実験を行った。

1) 低酸素(1%酸素濃度)ストレスまたは 1 mM 塩化コバルトでの低酸素刺激による細胞死が、ACh により抑制されるか否かを検討した。1mM ACh の心筋細胞前処理の有無で、その後 12 時間低酸素暴露させた場合の細胞死への影響を、ミトコンドリア膜電位感受性色素による膜電位変化、または電子伝達系コンプレックス II 活性を反映する MTT 活性の変化で検討した。

2) ACh による心筋細胞保護作用効果における HIF-1 α の関与および依存度を検討するために HEK293 細胞を用いて以下の実験を行った。DNA 結合能のみもち転写活性化能はもたない dominant negative HIF-1 α を作製し、これを HEK293 細胞に導入する。24 時間後 1mM ACh で細胞を処理し、その後 12 時間低酸素(1%酸素濃度)暴露させ細胞死抑制効果における HIF-1 α の関与を検討した。

B-3. ACh に対する心筋細胞の多様な反応性についての研究

すでに述べたように、分および時間単位で惹起される ACh の心筋細胞に対する効果には、コネキシン 43 のリン酸化や蛋白量の制御、Akt シグナルのリン酸化、さらには HIF-1 α の蛋白発現調節などの関与が示唆された。さらに時間単位で誘導される反応として、我々はサイトカインの一つである TNF- α が、ACh により心筋細胞から産生されるかどうかを検討した。

TNF- α はアポトーシス誘導を起こすサイトカインとして当初知られ、心臓への効果として心筋細胞でのアポトーシス誘導因子として考えられた。さらに心不全患者血液中 TNF- α 濃度は、心不全の進行によりその末期において著しく増加することも知られ、心不全の原因または悪化因子の一つとしての TNF- α の役

割が示唆されてきた。TNF- α は2つの受容体（p55またはタイプI（R1）、p75またはタイプII（R2））を介して作用するが、TNF- α の心筋細胞への作用を理解するうえで注意すべきことは、この2つの受容体が相反する情報伝達系を介して異なる表現型を呈することである。すなわちR1を介してアポトーシスを誘導し、一方ではR2を介してそれを抑制するものである。

B-3.1. AChによる心筋細胞でのTNF- α 産生の有無についての検討

AChにより心筋細胞からTNF- α が産生されるか否かを検討するために、ラット心筋細胞をAChで処理した後心筋由来TNF- α 産生をウェスタンブロット法および免疫染色法にて、時間単位で検討した。

B-3.2. AChにより誘導される心筋細胞由来TNF- α の生物学的作用についての検討

TNF- α の心筋細胞への作用が、アポトーシスを引き起こすか、その逆で抑制するかについて検討するために、ACh処理後の心筋細胞におけるTNF- α 受容体（R1, R2）の発現パターンを時間的経過で検討した。

B-3.3. AChによる心筋細胞でのNO産生についての検討

ACh情報伝達系にはさまざまな経路が知られているが、ACh刺激後にNO産生が心筋細胞で起こるか否かは不明であり、そこで産生されたNOを可視化するNOインジケータDAF-2/DAを用いて、新生児ラット培養心筋細胞への1mM ACh作用後、分単位でのNO産生を観察した。

またACh情報伝達系におけるNOの関与をさらに証明するため、非低酸素下でのAChによるPI3K/Akt/HIF-1 α 誘導能が、NOドナーS-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)でも同様に認められるかを検討した。そこで1

μ M SNAPを心筋細胞に添加し、分・時間単位でPI3K/Aktのリン酸化、HIF-1 α の蛋白発現をウェスタンブロット法にて検討した。

B-3.4. AChによる心筋細胞でのVEGF産生能の検討

AChの心筋細胞に対する作用効果にはその経過時間により（分および時間単位）さまざまなものが含まれる。この中でHIF-1 α 、TNF- α 、NOなどはそれぞれAChによって産生、誘導される因子である。互いに異なる因子ではあるが、これらが情報伝達系共有し共通の表現型を呈することも考えられる。

HIF-1 α によって制御される下流の遺伝子群には血管新生に重要なvascular endothelial cells growth factor (VEGF)が存在する（図2）。

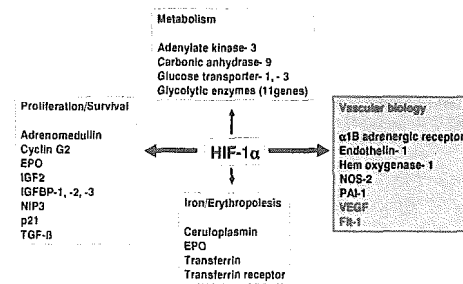


図2 HIF-1 α により制御される下流遺伝子

このVEGFは主に血管内皮細胞に作用し血管新生を促進させ、一方VEGF中和抗体は血管新生を抑制することが知られている。また先行研究では、一部の細胞でTNF- α はNOと同様にHIF-1 α を低酸素非存在下でその蛋白発現を誘導させることが報告されている。

一方で血管新生は血管内皮細胞単独でおこる現象ではなく、心臓においてはおそらく心筋細胞由来の因子も血管新生に関与することが予想されるが、詳細なメカニズムは明らかではない。しかしこれまでわれわれは、心筋細胞がAChによりHIF-1 α を誘導することを明らかにしており、心筋細胞由来のVEGFの心臓

内血管新生に参与することが予想される。以上より心筋細胞で VEGF 産生能の有無を検討し、これが血管新生につながるか否かをヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。

1) NO ドナー SNAP (1 μ M) による心筋細胞での VEGF 産生能の有無をウェスタンブロット法や免疫染色法で検討した。

2) 1 μ M SNAP 処理心筋細胞の培養上清をとり 50% 濃度になるように HUVEC の培地中 (DMEM, 20% FBS, 25 μ g/ml ECGS, 10U/ml ヘパリン) に添加し、96 ウェルプレートのマトリゲル上 (50 μ L) で培養した 1×10^4 個の HUVEC のチューブフォーメーションの形成過程を、SNAP 非存在下の培養上清と比較検討した。また VEGF 受容体の一つである Flk-1 のリン酸化の有無をウェスタンブロット法で検討した。

3) SNAP と同様に ACh (1 μ M-1 mM) によるチューブフォーメーションへの影響についても検討した。

C. 研究結果

C-1. ラット培養心筋細胞に対する ACh の細胞相互作用に関する研究

1) 低酸素によりギャップ結合は閉鎖し機能が抑制されるが、ACh はギャップ結合機能を温存させる。

図 3A のように、通常酸素濃度下での培養心筋細胞および 3E のように ACh 処理した心筋細胞いずれにおいても心筋細胞へ直接注入された LY 色素は、ギャップ結合を介して隣接した

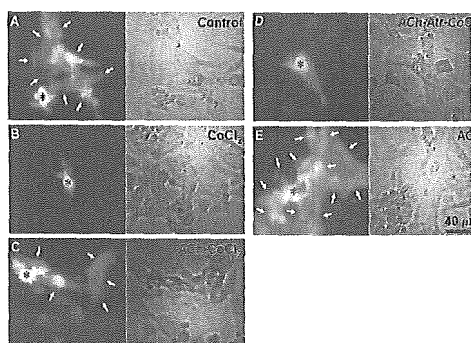


図 3 ACh による CoCl_2 のギャップ結合機能低下の抑制

細胞へと広がった (E では A よりも色素の広がる範囲が大きい傾向があった)。しかし塩化コバルト処理を行うと、色素の移動は認められなかった (3B)。10 分間 500 μ M ACh 前処理した心筋細胞では塩化コバルト存在下でも色素の移動は抑制されなかった (3C)。この効果はムスカリン受容体を介していた (3D)。以上から ACh は分単位という短時間で低酸素によるギャップ結合機能抑制を解除し、その機能を保たせることが示唆された。また膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS を用いた測定法でも、ACh 存在下では、低酸素による活動電位への影響が抑制された (図 4)。

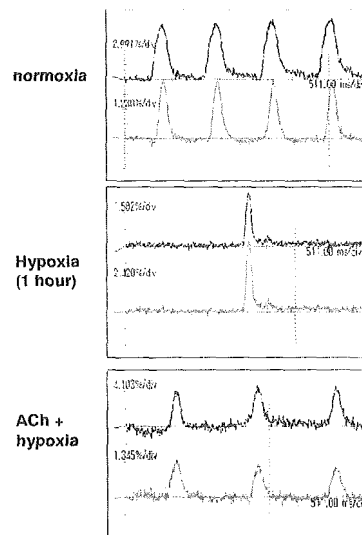


図 4 ACh による活動電位の低酸素による影響の抑制

C-2. ACh の心筋細胞への直接作用として、心拍数に依存しない細胞生存シグナルおよび抗アポトーシス作用に関する研究

想定する細胞生存シグナルをまとめると、その概念図 (図 5) は以下のとおりである。