

主任研究者

神谷 厚範
国立循環器病センター研究所
循環動態機能部 室員

分担研究者

杉町 勝
国立循環器病センター研究所
循環動態機能部 部長

川田 徹
国立循環器病センター研究所
循環動態機能部 室長

A. 研究目的

わが国は約100万人の慢性心不全患者を有し、各種薬物療法の進歩にも関わらず死亡率は依然として高い（5年生存率50%）。慢性心不全では自律神経異常（交感神経増加・迷走神経低下）が病態の発症と増悪に深く関与し、これを是正する自律神経治療が生存率を格段に改善する（動物実験, Circulation 2004）。しかしながら現行の薬物医療は十分でなく、全身の循環系自律神経を適切に制御する方法の開発がヒト心不全を抑制する鍵を握る。

そこで研究チームはまず、圧反射のシステム神経循環生理研究（世界トップ）を礎に、頸動脈洞（圧反射求心路）へ介入して全身（心臓・腎臓・血管）の自律神経を制御する方法を開発し、心筋梗塞性心不全を発症抑制するのに成功した（Circulation 2005）。これを土台として本研究は、真に臨床実用化を目指したマイクロマシン神経医療による心不全治療システムの開発を目的とする。（長期安定に低侵襲刺激）

研究期間内に、産学官の連携下にマイクロ

マシン神経医療の動物装置を開発し、心不全モデル動物の治療実験を行う。まず、神経を神経線維毎にモニターや刺激できる神経マイクロマシン（超小型電極アレイ、長期耐用保護チューブ等、特許出願済）を開発する。これを用いて、頸動脈洞や神経中枢を刺激して、脳に血压ダミー信号（実圧より高い仮想圧信号）を送り、圧反射性に全身の循環系自律神経を自動制御（交感神経の抑制・迷走神経の刺激）して、心不全の発症や重症化を抑制する。実用化には、患者個人特性や病態変化、電極ズレ等への適応が必要のため、生体信号計測（診断）-治療の閉ループ型生体制御（特許出願済）を利用して、神経刺激治療に対する心拍血圧や自律神経の応答を神経マイクロマシン等で計測し、これを刺激条件（電流・周波数）に負帰還して刺激を連続的に最適化し、自律神経を自動制御する。

圧反射神経求心路の治療応用は、圧反射システムの複雑性や、頸動脈洞を長期安定低侵襲に刺激する神経機械インターフェイスの未開発の故に、国内研究は皆無であり欧米でも実現していない。本研究は、数理工学、圧反射システム生理研究、超微細MEMS技術による頸動脈洞長期安定刺激マイクロマシン、患者個人への適応制御、閉ループインテリジェント自動医療によって、上記課題を克服し実用化を目指すものであり、国内外に類似研究のない独創的融合研究である。

本研究は神経機能異常を機械で代替するバイオニック医療であり、生体機能異常を人類がテクノロジーで克服する新時代の幕開けとなる。研究終了後の心不全治療臨床実用の期待が高い。また本装置は将来的には、自律神経治療のみでなく、末梢神経障害、痒み、慢性疼痛等の難治

性疾患治療にも応用できる可能性を秘める。

B. 研究方法

研究全体の計画の概要（3年間）は以下の通りである。

- ①刺激部の試作：身体低侵襲で耐用性の高い神経刺激治療マイクロマシン
- ②計測部の試作：治療効果を定量化するための心拍血圧モニター、自律神経モニター
- ③制御部の試作：計測生体信号を受けて神経刺激治療（電流・周波数）を自動調節する回路
- ④刺激部－計測部－制御部よりシステム神経医療を構築・試作・改良し、動物体内（頸動脈洞等・自律神経等）に植込み、システム作動を検討する。
- ⑤試作装置により急性心不全モデル動物の治療実験を行い、治療効果と安全性を検討する。
- ⑥試作装置を用いて、慢性心不全モデル動物の治療実験を行い、装置改良（長期耐用性含む）、治療効果と安全性を検討する。

平成21年度計画

平成21年度計画

上記全体計画の①②③を行う。

- ①研究チームは現在までに、MEMS(micro electronics machine system)技術を専門とする企業（(株)メムスコア等）と連携して超小型MEMS神経装置を開発した。本研究ではこの神経装置や産学管連携実績を土台として、頸動脈洞神経を長期安定に刺激するのに特化した神経マイクロマシン（超小型刺激電極・保護固定チューブ等）を開発する。
- ②治療効果を定量化する計測部については、試

作済みの心拍（血圧）モニター、マイクロマシンによる自律神経モニターを改良し、また取得生体信号を高速演算処理する回路を開発する（A D621等）。

- ③システム神経生理学を用いて、頸動脈洞刺激（電流・周波数等）に対する生体応答（心拍血圧と自律神経）を動物実験で実測しシステム同定する。刺激治療と生体応答の全体をコンピューター上に再現し、独自開発済みの閉ループ型生体信号制御技術を応用して、頸動脈洞刺激（電流・周波数等）を自動調節して脳に最適な血圧ダミー信号（実圧より高い仮想圧信号）を送り、圧反射性に全身の循環系自律神経を設定値に制御（交感神経抑制・迷走神経心臓枝刺激）するための制御部を設計する。この制御部は、患者個々の特性や病態変化、電極ズレにも適応する安心安全なインテリジェント医療を目指す。また長期の頸動脈洞刺激やその効果、装置装着等による線維化抑制等を細胞移植や生化学分子生物学的方法等によって検討しシステム開発を加速する。

平成22年度計画

上記全体計画の④と⑤を行う。

- ④刺激部－計測部－制御部を統合して、診断治療論理を内部搭載したインテリジェント神経医療システムを試作する。急性動物実験（ウサギ・イヌ等）で、簡単な手術によって、試作装置を動物（ウサギ・ラット等）の体内（頸動脈洞・自律神経等）に植込み、頸動脈洞刺激によって自律神経を設定値に自動制御できるか等、システム作動を検討する。
- ⑤急性心不全モデル動物（冠動脈結紮による心筋梗塞・doxorubicin投与による心筋症様等）を

対象に治療実験を行い、治療効果（自律神経活動・循環動態・ポンプ機能・心臓リモデリング・生化学等）を検証して、心不全の抑制効果を確認する。治療結果を受けて装置を改良すると共に、組織解析等で神経障害の有無を検討して装置の低侵襲性や安全性を確認する。

平成23年度計画

上記全体計画の⑥を行う

⑥慢性心不全モデル動物（同上）を対象に長期治療実験を行い、急性実験と同様に治療効果を検証して、心不全の発症や重症化を抑制する効果を確認する。長期使用の耐用性や作動安定性等を含め、治療結果を受けて装置を改良する。また組織解析等によって、長期使用の低侵襲性安全性を確認する。さらにシステム頸動脈神経医療の実用化を目指して、制御部の回路構成（増幅器・演算器）等を工夫して可能な限り装置の小型化に取り組む。

C. 研究結果（神経装置の開発）

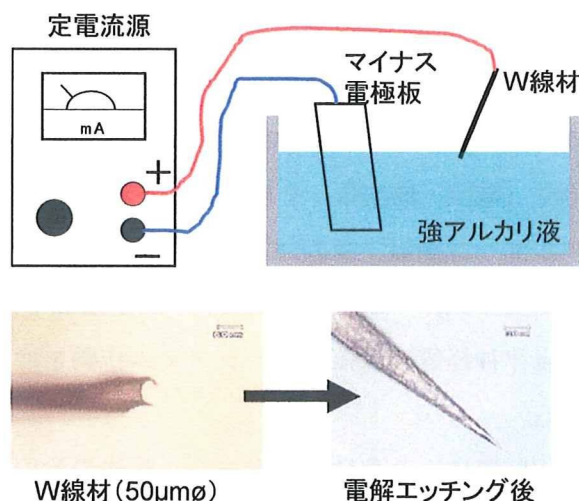
<針材の決定と先鋭化>

平成21年度（初年度）は、（株）メムス・コアと共に本装置を試作開発した。装置開発には、神経膜をソフトに貫き且つ十分な機械的強度を持つ微小針電極の開発が重要である。有限要素法応力シミュレーション等によって針材を検討し、MEMS加工性（針状構造形成・導通配線）に優れるシリコン（Si）は機械的強度が弱く（針基部へ応力集中）神経内で破損する危険があり、一方、タングステン（W）はSiの10倍以上に機械的強度に優れ（針全体に応力分散）、高い耐剪断応力性のため自由な針長の微細電極アレ

イを製作可能であると判明した。

そこで針材をタングステンに決定し、安全生体材料（パリレン）を薄膜コート（ $2\mu\text{m}$ ）し、電解エッチングで先端ナノ先鋭化処理した（下図）。

タングステン鍼の先鋭化の原理 （電解エッチング法）



電解エッチングにおいては、KOH水溶液(40wt%)を用いた。電極板は導通が取れてアルカリに強い金属であれば良い。今回はCrめっきされた薄い鉄板を使用した。W線に定電流源のプラス極からリード線をワニ口クリップなどで接続し、マイナス電極板のついたKOH水溶液に先端2mm程度を投入し通電する。WはKOH水溶液中にWイオンとして溶解し、先端から細くなり、最終的に図1右下の写真のように先鋭化される。反応中は泡が発生する。水溶液から取り出す目安は先端が尖ってくると電圧表示が急に高くなるのでその時点で取り出すとほぼ同じ形状の針が得られた。

これをウサギ腓骨・脛骨神経への刺入するテストによって、神経膜貫通性や強度の点から針シャフト径を50 μm と決定した。

<有機コーティング (パリレンコート) >

W針に絶縁膜を形成する。絶縁膜は、撥水性、耐薬品性にも優れて安定な有機膜として医療器具分野、電子回路分野などに広く使われているポリパラキシレン(パリレン)樹脂を使用した。これはCVD(Chemical Vapor Deposition)によるので、分子レベルでのコンフォーマルな膜付けが可能である。プロセスはまず、原料ダルマー(粉末・パラキシリレン2量体)を気化室に入れて加熱する。次に加熱蒸発したダルマーは、高温の熱分解室に導かれて、ここで反応性の高いラジカルなモノマー(パラキシリレン)になる。さらに、ラジカル化した蒸気が蒸着室内で物体に接し、そこで重合して高分子膜(パリレン樹脂膜)を生成する。

針シャフト径50 μm のW鍼に、5 μm 厚でCVDしたパリレン膜を針先端のみ被覆除去した状態の写真を示す(下図)。

<タングステン鍼電極>



<鍼電極アレイの台座>

W針を電極間隔100 μm に2列10-20ピン集積化し、世界最小レベル電極アレイを開発した。ヒト自律神経モニターに用いる神経は直径0.5-1.5 cm であり、この仕様で50-150本の針電極を1本の神経に挿入できるため、この電極アレイは、実用に十分な空間分解能(神経線維選択能)であると考えられる。

針を立てて固定するための台座は、Si半導体微細加工技術(MEMSプロセス技術)を用いて開発した。次ページ表1に製作工程(プロセスフロー)を示す。

表1 針電極アレイのSi製台座の製作プロセス

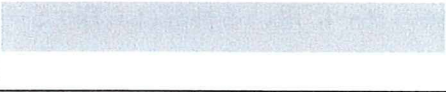

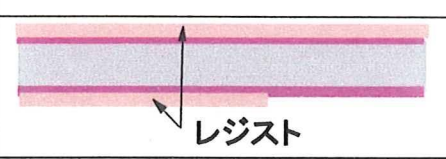
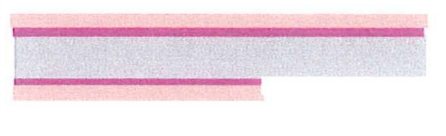
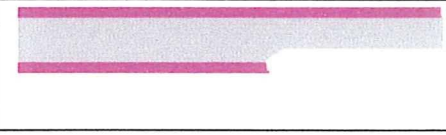
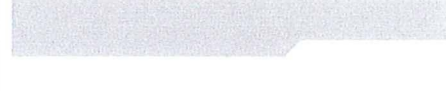
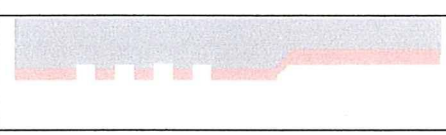

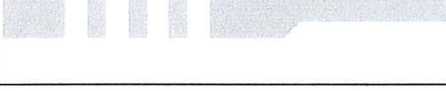
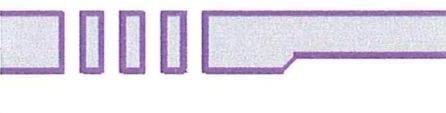
| | 鉅固定・配線取り出し基板の加工 | 大工程 | プロセス 概要 |
|-----|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 |  | Siウエハ | (100)単結晶ウエハ |
| 1-1 |  | 熱酸化膜(SiO ₂)形成、 100nm程度 | O ₂ 雰囲気下 1100°C Siを焼く。 |
| 1-2 |  | 酸化膜(SiO ₂)パターニング レジソ | フォトリソ |
| 1-3 |  | 酸化膜パターニング | BHFで酸化膜をエッチング |
| 1-4 |  | Siウエハエッチング | TMAHというアルカリ液でSiをエッチング。(酸化膜マスク) |
| 2 |  | 配線シート接続段差形成 | 酸化膜をBHFで落とす。 |
| 2-1 |  | 貫通加工用フォトリソ | 貫通部のレジストを使ったリソ |
| 2-2 |  | DRIE (Deep Reactive Ion Etching) | ドライエッチングSi加工 |
| 3 |  | 鉅穴貫通加工 | レジスト除去 |
| 4 |  | 絶縁膜形成 | 再度熱酸化膜を形成(1 μm厚程度) |

表1の補足説明

プロセスNo.1-1 表面をSiO₂にすることで、Siをアルカリ液で深くエッチングするためのマスクを形成する工程。

プロセスNo.1-2. Siをエッチング加工したいところだけ、SiO₂を取り除くためにSiO₂の上に感光性の樹脂（レジスト）を塗って、エッチングパターンを転写・現像し、レジストにパターンを形成する工程。

プロセスNo.1-3. SiO₂の露出している部分がBHFというフッ酸剤で溶けてSiが露出する。

プロセスNo.1-4. レジストをアセトンなどの有機溶剤で溶かして除去し、SiO₂をマスクとしてTMAHという強アルカリ液でSiをエッチングし、段差を形成する工程。

プロセスNo.2. SiO₂は必要なくなったので、BHFで洗い落としSiのみの状態にするための工程。

プロセスNo.2-1. 針を通す穴を形成するために、プロセスNo.1-2.と同じようにリソによって貫通穴のレジストパターンをSi表面に作る工程。

プロセスNo.2-2. このレジストをマスクとして、SF₆というSiのエッチングガスをプラズマで活性化することでSiと反応させてSi₃F₄という物質にしてSi表面から取り去る反応性のエッチングを行う。この方法は、ドライエッチングといい、特にこの方法の場合をDRIE(深くエッチングできる反応性イオンエッチング法)という。

プロセスNo.3. レジストをアセトンなどの有機溶剤で溶かして除去する工程。

プロセスNo.4. Siは抵抗体なので、このまま針デバイスを通すとショートしてしまうため、再度酸化膜して、SiO₂絶縁膜で表面を覆う工程。

<鍼デバイス（電極アレイと配線）>

鍼デバイスは、Si台座の中央部にパリレンコートW鍼(W線50μmφ, パリレン5μm厚)を挿入固定した鍼部と、同じくSi台座にウレタンコートAu線(Au線60μmφ, ウレタン7.5μm厚)を導通接続した導線部(約15cm)と電極端子(差動アンプとの接続端子)を主な構成部材としている。下図に完成したデバイスの写真を示す。

<針デバイス>




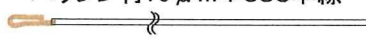

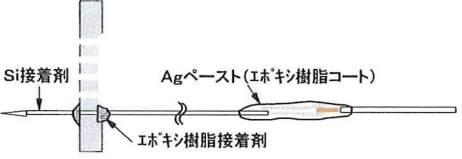
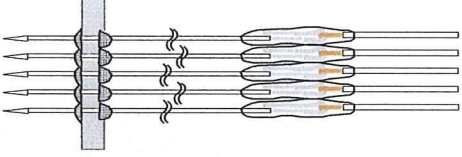
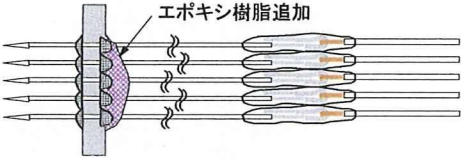
以下に、針デバイスの組立て手順を説明する。
組立手順①W鍼のSiベースへの取り付けとSUS配線の接続(表2)

W鍼は、Si台座表面から、0.5mm突き出るように長さを調整した状態で、シリコン接着剤と

エポキシ接着剤を併用して固定した。パリレン付W針は、全長30~40mmあり、針先端と反対側のリード線接続部のみパリレン被覆を除去してSi台座（ベース）に挿入・接着固定し

た。更に70 μ m ϕ のパリレンコートSUS単線をつなぐために、W線とSUS線を絡めてAgペースト固着し、更にエポキシ接着剤をコートして補強・絶縁処理を施した。

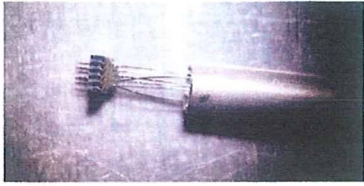
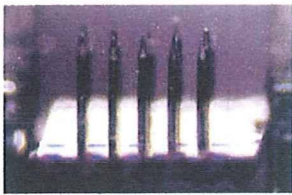

表2 W針電極のSi台座への取り付け

| | 大工程 | 組み立て図 | プロセス説明 |
|---|--------------|---|---|
| 1 | W針と接続配線材の前準備 | <p>パリレン付50μmϕWはり</p>  <p>パリレン付70μmϕSUS単線</p>  | <p>W針は、長さ約35mm、先端部(先鋭部)の最先端と末端部3mm程度のパリレンを除去し、被服解除した末端は完全に折り曲げておく。接続するSUS線(約70μmϕパリレンコート品)も先端3mm程度被服解除し折り曲げる。SUS線は150mm程度の長さとした。</p> |
| 2 | Si台座の準備 |  | <p>表-1に示したSi加工チップを用いる。このデバイスの場合には特に電極パターンを必要としない。</p> |
| 3 | 台座と針の組み立て-1 |  | <p>まず針の末端とSUS単線の折り曲げ箇所を使って引っ掛け、この部分にAgペーストを塗布して乾燥・固化し、電氣的に導通がとれる状態を確保。更にSi台座の針穴へ通し、針高さが600μmのところまで接着剤で固定する。</p> |
| 4 | 台座と針の組み立て-2 |  | <p>必要本数を台座に挿入固定する。</p> |
| 5 | 台座と針の組み立て-3 |  | <p>台座背面部にエポキシ接着剤を追加してしっかり固着させる。</p> |

組立手順②SUSパイプの挿入固定 (表3)

外形1. 8 ϕ ×内径1. 63 ϕ ×25mm長のSUSパイプに配線をすべて通し、Si台座側とエポキシ接着剤を使って接着させた。表3に針部とSUSパイプを挿入した状態の写真を示す。

表3 SUSパイプの挿入固定

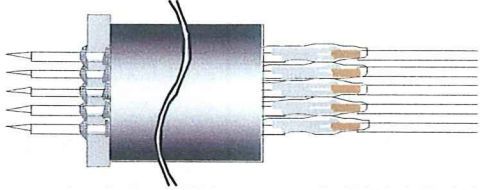
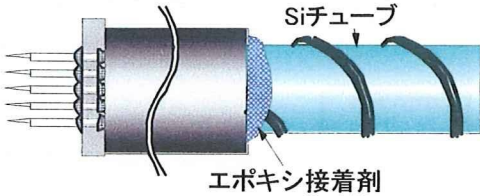
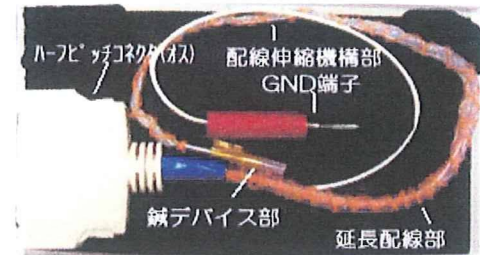
| | 大工程 | 組み立て図 | プロセス説明 |
|---|--------------|--|---|
| 6 | SUSパイプ取り付け-1 |  <div data-bbox="475 611 863 678" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>外1.8mmΦ×内1.63mmΦ×長さ25mmSUS管を通す。</p> </div> |  <p data-bbox="1286 412 1342 443">針部</p>  |

組立手順③配線 (表4)

SUSパイプの末端部に外形1.0mm程度のSiチューブを挿入し、やはりエポキシ接着剤で固定する。しっかり固まったらSiチューブを引っ張った状態で固定し、配線を束にしてこ

のチューブに螺旋状に巻いていく。巻き終わったらSi接着剤を上掛け被覆して配線を固定する。表3-3.に配線処理を図解して示す。その後はコネクターへの接続へ続く。

表4 配線-Siチューブへの巻きつけ・固定・延長処理

| | 大工程 | 組み立て図 | プロセス説明 |
|---|--------------|--|---|
| 7 | SUSパイプ取り付け-2 |  | SUSパイプとSi台座をエポキシ接着剤で固着させる。 |
| 8 | 配線処理 -1 |  | Siチューブ(0.5mm φ)をSUSチューブへ挿入してエポキシ接着剤で固着する。Siチューブを伸ばした状態でSUS線を巻きつけ、Si接着剤を塗布して、乾燥させる。 |
| 9 | 配線処理 -2 |  | 更に被服Cu単線をハンダづけして配線を延長する。次にGND配線をSiチューブへ巻きつけ、先端の鍼デバイスから折り返して戻り、より太いコードとつないでから差込み用のGND端子を取り付ける。さらにピンの配線はハーピッチコネクタのオスとハンダ接続して完成。 |

C-2. 鍼デバイス用中間コネクタの開発

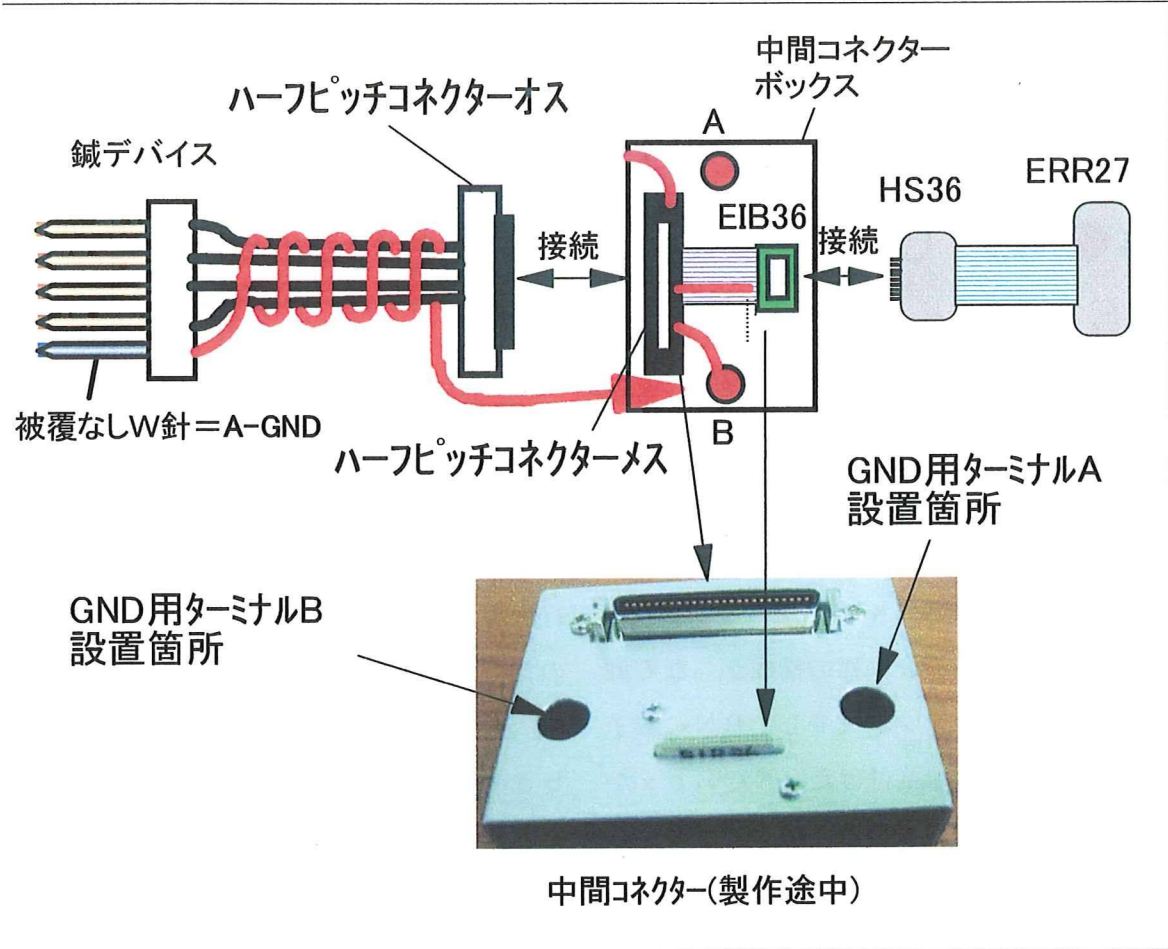
<脳幹神経活動記録用中間コネクタ>

鍼デバイスの配線端末は、コネクタ類を経由し、更にアンプユニット付コネクタを経由して生体アンプ(記録・刺激)装置へ接続される。

鍼デバイスの針1本をGND(グラウンド)に使うためにパリレン膜を全被覆除去した針からの接続配線のみ、中間コネクタまでの配線をノイズシールドする役割をもたせる構成となっ

ており、このシールドGNDと中間コネクタとその取り付け筐体(A1シャーシ)とそして次に接続されるアンプユニットのGND経路へも接続される。記録装置の構成の概要を下図に示す。また、ハーピッチコネクタとEIB36の配線のチャンネルの対応関係をその下の模式図に示す。

<神経活動記録装置の構成概要>

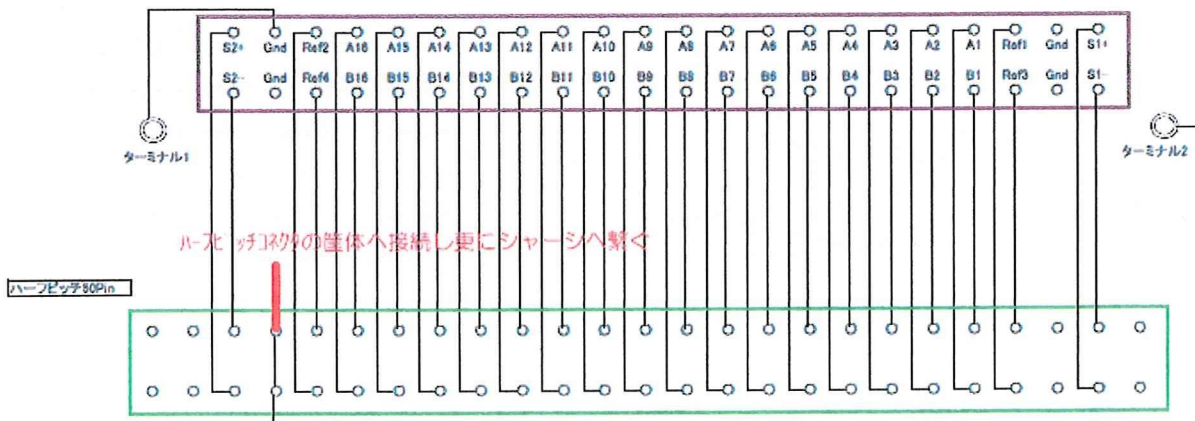


<ハーフピッチコネクタからEIB36への接続>

裏面からの配線

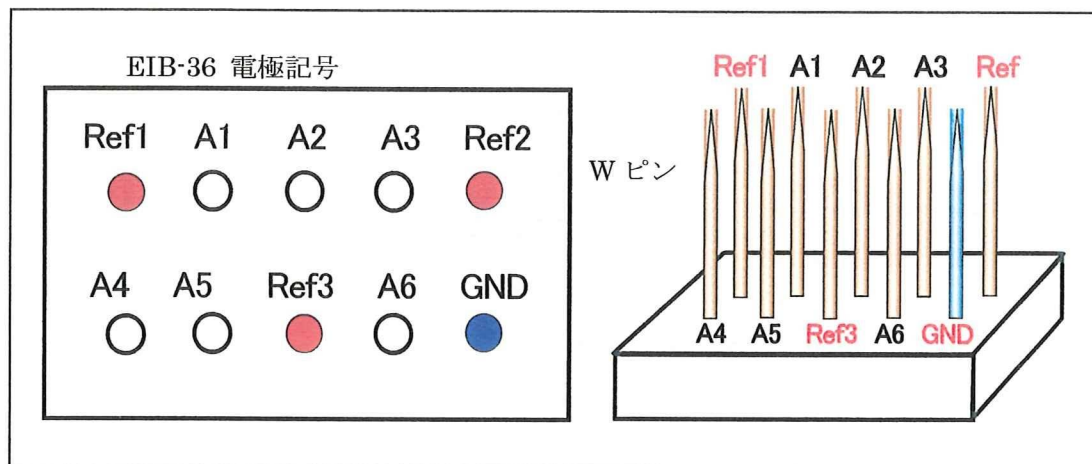
2010.1.14
Technofine

EIB-36



また、鍼が10本ピンの場合のピンとEIB-36の接続関係を下図に示す。

<針電極アレイとEIB36の接続>

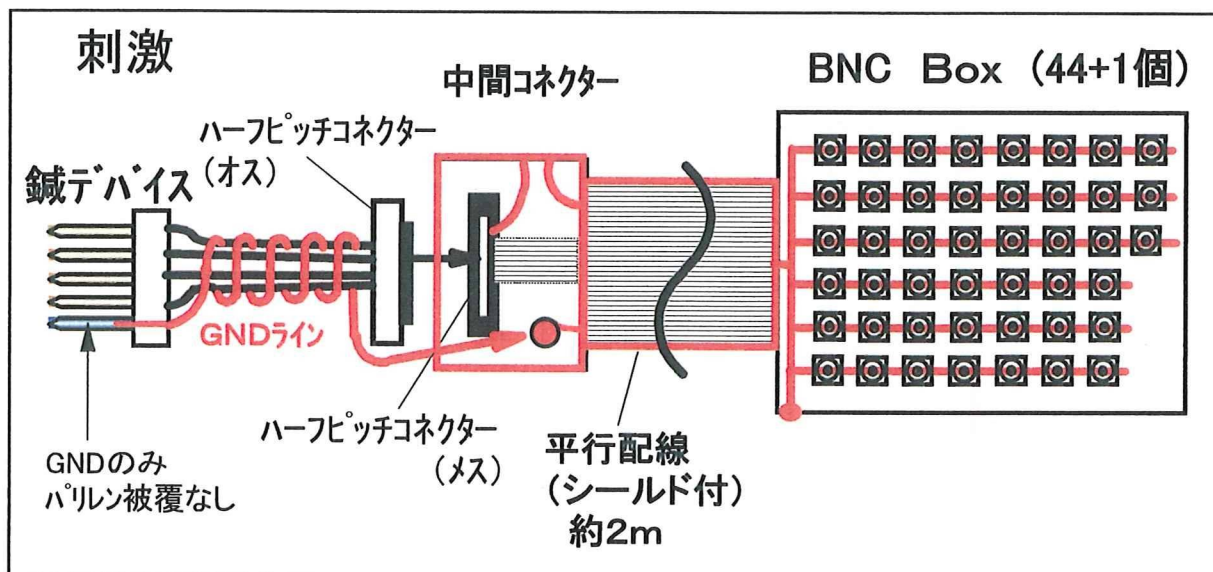


<脳幹神経刺激用中間コネクタ>

刺激装置は、記録装置と同様の構成からなる鍼デバイス部、中間コネクタそしてBNC端子を44個(+予備1個)取り付けられたBNC Boxから成る。この構成のGNDは、鍼デバイスからハーフピッチコネクタまでは記録装置と同じ接続構成で中間コネクタBoxへ繋がり、平

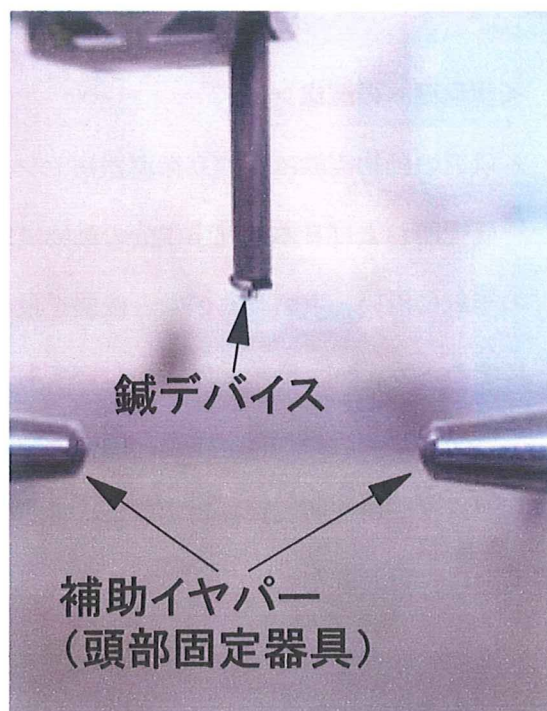
行配線を覆っているGNDシールドへ続く。このシールドラインはBNC Boxシャーシ(筐体)へ接続され、BNC自体のGNDシールドもBoxへ落ちている。鍼デバイスとハーフピッチコネクタ(オス)の組み合わせは、記録装置及び刺激装置に共通して使われる。刺激装置の構成の概要を下図に示す。

<神経刺激装置の構成概要>



C-3. 脳定位固定装置への取付部の開発

鉈デバイスはこの固定装置の鉈固定治具のV溝へ挿入され、ねじで締め付けて固定される。この治具は角度可変軸上に構成された上下・前後へ正確に移動させることのできるマニピュレーターと一体となっている。小動物（ラットなど）頭部は、補助イヤパーなどの頭蓋骨固定器具及び口金具などによってしっかり固定される。その上で、動物脳神経の3次元的（空間的）な目的場所へ、正確に鉈を固定させることができる構成とした。下図に、装置固定の様子を示す。



<倫理面への配慮>

本研究の動物実験は、国立循環器病センター研究所および日本生理学学会の動物実験の指針に沿い、実験動物の数と侵襲を最小にするよう、また、動物愛護上においても、十分配慮して行われた。また、国立循環器病センター研究所実験動物委員会に承認のもとに、行われた。

D. 健康危険情報

健康危険情報は特にない。

E. 研究発表

1. 論文

14. Sugimachi M, Sunagawa K, Uemura K, Kamiya A, Shimizu S, Inagaki M, Shishido T. Macroscopic two-pump two-vasculature cardiovascular model to support treatment of acute heart failure. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;1:2365-8.
15. Sugimachi M, Uemura K, Kamiya A, Shimizu S, Inagaki M, Shishido T. Feedback control of multiple hemodynamic variables with multiple cardiovascular drugs. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;1:2030-2.
16. Okazaki Y, Zheng C, Li M, Sugimachi M. Effect of the cholinesterase inhibitor donepezil on cardiac remodeling and autonomic balance in rats with heart failure. J Physiol Sci. 2009 Dec 1.
17. Akiyama T, Yamazaki T, Kawada T, Shimizu S, Sugimachi M, Shirai M. Role of Ca(2+)-activated K(+) channels in catecholamine release from in vivo rat adrenal medulla. Neurochem Int. 2009 Nov 6.
18. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Mizuno M, Kamiya A, Yamazaki T, Sano S, Sugimachi M. In vivo direct monitoring of interstitial norepinephrine levels

- at the sinoatrial node. *Auton Neurosci.* 2009 Sep 18.
19. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Li M, Shirai M, Sugimachi M. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. *Life Sci.* 2009 Oct 7;85(15-16):597-601.
 20. Kawada T, Kamiya A, Li M, Shimizu S, Uemura K, Yamamoto H, Sugimachi M. High levels of circulating angiotensin II shift the open-loop baroreflex control of splanchnic sympathetic nerve activity, heart rate and arterial pressure in anesthetized rats. *J Physiol Sci.* 2009 Nov;59(6):447-55.
 21. Sugimachi M, Kawada T. Coronary artery volume noninvasively measured with multislice computed tomography. Definition, accuracy and implication. *Circ J.* 2009 Aug;73(8):1395-6.
 22. Kamiya A, Kawada T, Shimizu S, Iwase S, Sugimachi M, Mano T. Slow head-up tilt causes lower activation of muscle sympathetic nerve activity: loading speed dependence of orthostatic sympathetic activation in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jul;297(1):H53-8.
 23. Kawada T, Sugimachi M. Artificial neural interfaces for bionic cardiovascular treatments. *J Artif Organs.* 2009;12(1): 17-22.
 24. Kawada T, Shimizu S, Yamamoto H, Shishido T, Kamiya A, Miyamoto T, Sunagawa K, Sugimachi M. Servo-controlled hind-limb electrical stimulation for short-term arterial pressure control. *Circ J.* 2009 May;73(5):851-9.
 25. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Yamazaki T, Kamiya A,

26. Kawada T, Mizuno M, Shimizu S, Uemura K, Kamiya A, Sugimachi M. Angiotensin II disproportionately attenuates dynamic vagal and sympathetic heart rate controls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May;296(5):H1666-74.
2. 学会発表
13. アンジオテンシンⅡが動脈圧反射系の開ループ静特性に及ぼす影響. 川田 徹、清水 秀二、水野 正樹、宍戸 稔聡、杉町 勝. 第48回日本生体医工学会大会.
14. 心臓マイクロダイアリシス法による洞房結節における交感・副交感神経活動の定量化. 清水 秀二、秋山 剛、川田 徹、宍戸 稔聡、神谷 厚範、杉町 勝. 第48回日本生体医工学会大会.
15. 心筋梗塞後心不全ラットにおける開ループ動脈圧反射特性. 川田 徹、李 梅花、上村 和紀、宍戸 稔聡、杉町 勝. 第30回日本循環制御医学会総会.
16. 上村 和紀、鄭 燦、李 梅花、川田 徹、杉町 勝. 迷走神経を、冠虚血再灌流後の3日間電気刺激するだけで心筋梗塞後左心室リモデリングを劇的に改善することができる. 第30回日本循環制御医学会総会.
17. アセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ドネペジル)投与による心筋梗塞後重症心不全治療における $\alpha 7$ -ニコチン性アセチルコリン受容体($\alpha 7$ nAChR)の関与. 李 梅花、川田 徹、上村 和紀、宍戸 稔聡、杉町 勝. 第30回日本循環制御医学会総会.
18. Effects of angiotensin II on open-loop carotid sinus baroreflex function. Kawada T, Shimizu S, Uemura K, Shishido T, Sugimachi

19. 重症心不全に対する迷走神経刺激療法. 宍戸 稔聡、李 梅花、鄭 燦、上村 和紀、川田 徹、杉町 勝. 第 24 回生体・生理工学シンポジウム.
20. ロサルタンとドネペジルの併用投与による心筋梗塞後重症心不全ラットの新生機能・心臓リモデリングの改善作用. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣 正司、杉町 勝. 第 7 回交感神経とアンジオテンシンⅡ研究会.
21. ストレスを軽減する鎮静剤 $\alpha 2$ アゴニストは薬理的にも副交感神経を賦活化するか? 清水 秀二、秋山 剛、川田 徹、宍戸 稔聡、神谷 厚範、稲垣 正司、杉町 勝. 第 10 回 Neurocardiology Workshop.
22. 静水圧要因による中心循環動態の変化は呼吸化学調節負帰還システムの静特性を変化させる. 宮本 忠吉、三木屋 良輔、中原 英博、川田 徹、杉町 勝. 第 10 回 Neurocardiology Workshop.
23. ラットにおける頸動脈洞圧反射の定常応答の推定に必要とされるステップ状入力時間の検討. 川田 徹、神谷 厚範. 第 55 回日本航空宇宙環境医学会大会.
24. システム生理学によって、自律神経系および循環器系の動態を予測する試み. 神谷 厚範、川田 徹、杉町 勝. 第 55 回日本航空宇宙環境医学会大会.
3. マスコミなどへの発表
なし。
- F. 知的財産権の出願・登録状況
4. 特許取得
なし。
5. 実用新案登録
なし。
6. その他
なし

医療機器開発推進研究事業（ナノメディシン研究）

H21 年度 研究終了報告書（分担）

心不全ラットの頸動脈洞圧反射の静的および動的システム解析に関する研究

分担研究者 川田 徹

国立循環器病センター研究所先進医工学センター循環動態機能部冠循環研究室長

研究要旨

頸動脈洞圧反射は自律神経系を介して循環系を調節する主要な反射系であるが、心不全等の病態において頸動脈洞圧反射のシステム特性がどのように変化するかは十分に調べられていない。頸動脈洞圧反射のシステム特性は大きく静特性と動特性の面から記述できる。本研究では頸動脈洞マイクロマシンの開発に資するために、冠動脈閉塞による心筋梗塞後ラット慢性心不全モデルを作成し、心筋梗塞作成後 100～200 日の心不全慢性期のラットを用いて、麻酔下に頸動脈洞圧反射のシステム特性を同定した。その結果、圧反射システムの静特性については、圧反射中枢弓における交感神経活動の応答範囲が小さくなり、圧反射末梢弓における交感神経活動の変化に対する血圧応答のゲインが低下した。圧反射システムの動特性については、圧反射中枢弓の特徴である微分特性は維持され、圧反射末梢弓における血圧応答の応答速度と定常応答が低下した。心不全においても圧反射中枢弓を介する交感神経活動の制御が維持されていることから、頸動脈洞圧反射に介入して自律神経活動を定量的に制御することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

心不全においては自律神経系のバランスが崩れ、交感神経活動の亢進と迷走神経の活動低下が生じる。本プロジェクトでは頸動脈洞マイクロマシンを用いて圧反射性に交感神経抑制と迷走神経の賦活化を生じさせることで、心不全を治療することを目指している。

頸動脈洞圧反射は自律神経性に血圧を調節する上で大きな役割を果たしており、その調節機構をシステム解析の手法を用いて解き明かすことは、圧反射を利用した治療方法の開発に不可欠である。これまでに私たちは正常動物を用いて圧反射の静特性と

動特性を定量化してきた。

本年度は心筋梗塞後のラット慢性心不全モデルを作成して、頸動脈洞圧反射の静的および動的システム解析を行い、正常ラットとの比較を行うことを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 慢性心不全ラットの作成

8 週令の雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、ハロセン吸入麻酔下に経口挿管を行い、人工呼吸を実施した。清潔手術操作下に左第 4 肋間を切開して心臓に到達し、左冠動脈を 5-0 プロリン糸で結紮した。冠動脈閉塞後 1 時間にわたって心電図をモニタ

一し、心室細動が生じたときは直ちに綿棒で心臓マッサージを行って除細動した。その後、胸腔内を脱気して閉胸し、麻酔から回復させた。手術後は自由摂食、自由飲水、自由行動下に飼育し、心筋梗塞作成後 100~200 日 (156±18 日) の時点で、次に述べる急性実験を行った。

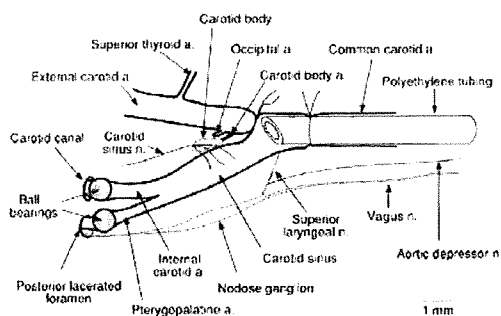
B-2. 急性実験の手術手技

慢性心不全ラットと正常対照ラットを用いて急性実験を行った。ウレタン (250 mg/ml) + αクロラロース (40 mg/ml) の混合液を腹腔内投与 (2 ml/kg) して麻酔を施した。気管切開を行い、挿管して人工呼吸を実施した。右大腿動脈および大腿静脈にカテーテルを挿入し、血圧と心拍数の測定と、麻酔薬の持続投与を行った (0.1 ml/kg/h)。左大腿静脈より別のカテーテルを挿入し、下大静脈まで進行させ、大気圧との差分から中心静脈圧を測定した。

左側腹部切開を行い、後腹膜的に内臓交感神経に到達した。腹腔神経節よりも遠位側にある内臓交感神経の枝に双極神経電極を装着し、二液混合シリコンで絶縁固定した。神経活動は 150~1000 Hz の帯域フィルターで前置増幅した後、全波整流し、遮断周波数 30 Hz のローパスフィルターを用いて測定した。実験終了後に神経節遮断薬ヘキサメソニウム 60 mg/kg を静脈内投与し、神経活動の信号が消失するのを確認して、そのノイズレベルを記録した。

頸部切開を行い、総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を剖出した。7-0 プロリン糸を用いて、内頸動脈との分岐直後を外頸動脈を結紮した。次に、総頸動脈側から直径 0.8 mm のステンレスボールを流し込んで内頸動脈

を閉塞させ、最後に、総頸動脈にカニューレーションすることで頸動脈洞を体循環から完全に分離した (Sato et al., *Am J Physiol* 276: H326-H332, 1999)。



図B-2-1. 頸動脈洞圧受容器の分離手術

B-3. 頸動脈洞圧反射の静特性の推定

実験データは 200 Hz で A/D 変換してコンピュータに記録した。サーボポンプを用いて頸動脈洞内圧を制御し、まず、60 mmHg まで頸動脈洞内圧を低下させ、血圧が新たな定常値に達するまで 4~6 分間待機した。次に、頸動脈洞内圧を 20 mmHg ずつ階段状に 180 mmHg まで上昇させ、交感神経活動と血圧の応答を記録した。階段状入力 of 1 ステップは 1 分間とした。各入力圧において、最後の 10 秒間のデータを平均して、その入力圧に対する交感神経活動と血圧の値とした。

得られたデータを元に、頸動脈洞内圧と交感神経活動の関係を求め、動脈圧反射の中樞弓の静特性としてプロットした。中樞弓はシグモイド状の非線形入出力関係を示したことから、次に示す 4 係数ロジスティック曲線に近似して、非線形最小二乗法でパラメータを推定した。

$$y = \frac{P_1}{1 + \exp[P_2(x - P_3)]} + P_4$$

P_1 は出力の応答範囲、 P_2 は傾きの係数、 P_3 は入力を中心点、 P_4 は出力の最小値を示す。

一方、交感神経活動と体血圧の関係を求め、動脈圧反射の末梢弓の静特性としてプロットした。末梢弓はほぼ直線的な入出力関係を示したことから、直線回帰して傾きと y 切片を推定した。

最後に、横軸に交感神経活動、縦軸に頸動脈洞内圧または体血圧をとって同一平面上に中枢弓と末梢弓の静特性をプロットし、動脈圧反射の平衡線図を得た。平衡線図上、中枢弓と末梢弓が交差する点は、動脈圧反射系を閉ループにしたときの動作点に一致する。また、動作点における中枢弓の傾きと末梢弓の傾きの積から、動作点における動脈圧反射の開ループゲインを推定することができる。

B-4. 頸動脈洞圧反射の動特性の推定

頸動脈洞圧反射の動特性を推定するために、サーボポンプを用いて頸動脈洞に平均 120 mmHg、標準偏差 20 mmHg のガウス白色雑音を入力した。入力値の切り替え時間を 500 ms とすることで、最高 1 Hz の圧入力に対するシステムの応答を記録した。

得られたデータを元に、次の手順でシステムの動特性を示す伝達関数を計算した。動脈圧反射全体の動特性を求めるときは頸動脈洞内圧を入力、体血圧を出力として伝達関数を推定した。動脈圧反射の中枢弓の動特性を求めるときは、頸動脈洞内圧を入力、交感神経活動を出力として伝達関数を推定した。動脈圧反射の末梢弓の動特性を推定するときには、交感神経活動を入力、体血圧を出力として伝達関数を計算した。

まず、入力信号と出力信号を 10 Hz にリ

サンプリングし、1024 点ずつのセグメントに分割した。各セグメントは 512 点ずつオーバーラップさせた。各セグメントから直線トレンドを除去した後、入力信号と出力信号をフーリエ変換し、12 セグメントの平均値から入力のパワースペクトル $S_{XX}(f)$ 、出力のパワースペクトル $S_{YY}(f)$ 、入出力のクロススペクトル $S_{YX}(f)$ を推定した。これを元に、入出力間の伝達関数 $H(f)$ を次の式で計算した。

$$H(f) = \frac{S_{YX}(f)}{S_{XX}(f)}$$

伝達関数は複素数値であるので、その実数部 $H_R(f)$ と虚数部 $H_I(f)$ から絶対値 $gain(f)$ と位相 $phase(f)$ を求めてボード線図に表示した。

$$gain(f) = \sqrt{H_R(f)^2 + H_I(f)^2}$$

$$phase(f) = \arctan \frac{H_I(f)}{H_R(f)}$$

また、入出力間のコヒーレンス $Coh(f)$ を次の式で計算した。

$$Coh(f) = \frac{|S_{YX}(f)|^2}{S_{XX}(f)S_{YY}(f)}$$

コヒーレンスは 0 から 1 の値をとる。コヒーレンスが 1 のとき、入力と出力は完全に線形相関しており、出力変動はすべて入力変動で説明できる。コヒーレンスが 0 のとき入力と出力は無相関である。

伝達関数は周波数軸における入出力関係の記述であり、直感的に入出力関係を把握しにくい欠点がある。そこで、伝達関数を逆フーリエ変換して時間軸におけるインパルス応答を求めた後、それを時間積分することでシステムのステップ応答を推定し、伝達関数とともに記述した。

(倫理面への配慮)

冠動脈閉塞手術は麻酔下に実施し、手術回復後は自由摂食、自由飲水、自由行動下に飼育した。急性実験はすべて麻酔下で実施し、実験終了後は直ちに大量の麻酔薬(ペントバルビタール)の静脈投与によって安楽死させた。

実験は国立循環器病センターの実験動物委員会の審査と承認を受けた上で、日本生理学会の示す動物実験指針にしたがって実施した。

C. 研究結果

C-1. 心重量および中心静脈圧の変化

表C-1-1に急性実験時の週令、体重、心重量を示す。週令および体重に有意差はなかったが、心不全群では週令に比して体重が小さい傾向がみられた。両室心重量は心筋梗塞後心不全による心臓リモデリングを反映して、絶対重量および体重当たり重量のいずれも心不全群で増加した。実験時中心静脈圧はポンプ失調を反映して、心不全群において有意に高かった。

表C-1-1. 体重および心重量

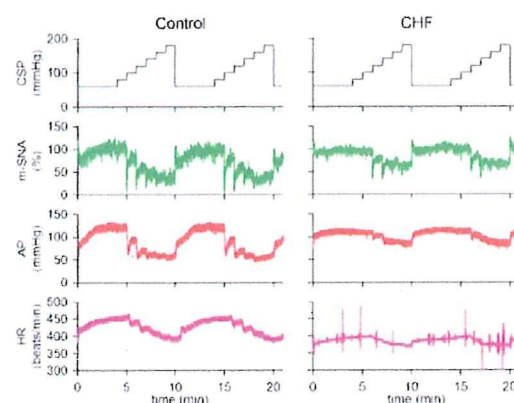
| | 対照群 (n=12) | 心不全群 (n=7) |
|-----------------|---------------|---------------|
| 実験時週令 | 24±3 | 30±3 |
| 体重(g) | 565±28 | 538±19 |
| 両室心重量(g) | 1.16±0.04 | 1.45±0.08* |
| 両室心重量(g/kg) | 2.05±0.06 | 2.71±0.13* |
| 中心静脈圧 (mmHg) | 2.0±0.2 | 5.4±0.9* |

数値は平均±SE. *P<0.01

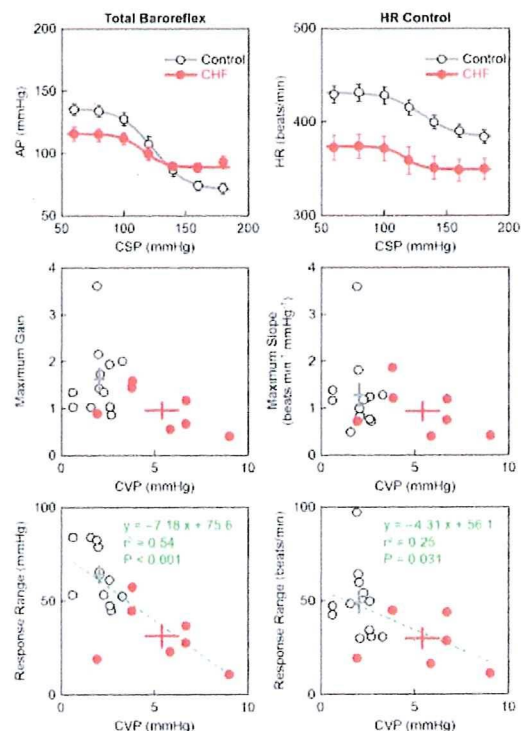
C-2. 心不全ラットにおける頸動脈洞圧反射の静特性

図C-2-1に実験例を示す。頸動脈洞内圧を階段状に上昇させると、圧反射性に

交感神経活動が抑制され、血圧、心拍数も低下する。心不全ラットでは対照ラットに比べて、同じ入力圧の変化に対して交感神経活動の変化幅、血圧の変化幅、心拍数の変化幅が小さい。また、心拍数データが示すように、心不全ラットでは不整脈が観察される例がみられた。



図C-2-1. 静特性を求める実験例。CSP: 頸動脈洞内圧, m-SNA: 平均交感神経活動, AP: 体血圧, HR: 心拍数。Control: 対照ラット, CHF: 心不全ラット。



図C-2-2. 圧反射全体(Total Baroreflex)と心拍数制御(HR Control)の静的な入出力関係。CSP: 頸動脈洞内圧, AP: 体血圧, HR: 心拍数, CVP: 中心静脈圧, Control: 対照群, CHF: 心不全群。