

心臓血管系ノックアウトマウス(hesr)における  
心疾患発症機構の解明と心機能評価

(課題番号 15390385)

平成15, 16, 17年度科学研究費補助金 (基盤研究B)  
研究成果報告書



平成18年3月

研究代表者 西田 博

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 講師)





心臓血管系ノックアウトマウス(hesr)における  
心疾患発症機構の解明と心機能評価

(課題番号 15390385)

平成15, 16, 17年度科学研究費補助金 (基盤研究B)  
研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 西田 博

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 講師)

## 目次

はしがき	1
1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表	3
2. 研究成果	
1. この度の研究計画及び成果の概要	7
2. Evaluation of Cardiac Function and Anatomy of a Knockout Mouse with Cardiac Failure	1 1
3. 冠動脈の発生と発達に関する最近の知見	2 3
4. マウスの心電図計測方法-生後5日目のbabyからadultまで	2 9
3. 参考論文	
1. 人工血管-この1年の動き	3 3
2. ペースメーカー-最近の進歩	5 1
3. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: A review	5 5
4. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes	7 1
5. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting	7 9
6. Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis	8 5
7. Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozingtype free wall rupture	9 3
8. 外科のあるべき診療報酬体系 企画に当たって	9 7
9. 包括医療(DPC)からみた術式の選択-疾患別IVR vs. 手術の比較- ケース2：冠動脈疾患の治療	9 9
10. 循環器診療機関の配置は適正か(2)心臓血管外科	1 0 5
11. 政策誘導非迎合派からの提言	1 1 9

2005年に人口減少が始まったわが国においては、ますます“科学技術立国”の重要性が叫ばれている。小泉内閣は経済界などの錢勘定に起因した日中あるいは日韓関係の悪化への懸念にもかかわらず、毅然とした態度で靖国参拝の非のなさを主張している。私はこの“流されぬ”“迎合せぬ”姿勢が科学にとっても極めて重要と考える。靖国参拝を批判し、これが一事が万事のように振る舞い、日本の科学レベルに追いつき追い越せの中国、韓国両国はいまどうなっているか？中国は未曾有の経済成長を遂げつつあるが、高度成長時代の日本が独自技術と独自商品で世界をわかせてきたのと全く異なり、模倣と膨大な人口に支えられた労働集約的大量生産、さらには旬を過ぎた欧米のお荷物企業の買収などで、一時の繁栄を享受しているにすぎない。韓国はどうであろうか？初の自然科学系ノーベル賞を目指し莫大な国家予算をある捏造科学者につぎ込んでどうしようもない国辱を抱え込む事態に陥っている。私の大学時代の友人の樋野興夫氏(順天堂大学病理学教授)はこう語っている。“理念を失い、断片化した知識が、あらゆる分野に横行する現代、いわゆる「科学する心」は、地滑りのように流行はするであろう。しかし、思慮深く、一步踏み込む胆力を持って、気概のある「批判する心」を持った「プロ」は、そこからは生じないであろう。「プロ」は、ルールが有名無実となり、マニュアルが通用しない時代でも、我慢強く、丁寧に仕上げ、最後には立派に完成するものである。「風激しくて勁草を知る」故事は、時代を超えて、今に生きる。事実を直視し、リアリズムに徹することが要求される。リアリズムに徹するとは、「Grasp of thing」である。研ぎ澄まされた感性を持って、「Sense of proportion」の心で、大小を的確に判断して物事に対処することである。冷静に真偽をかき分ける目を養いたいものである。「根源的な議論」は避けて通れぬ「目下の急務」である。”感性と理念を失った研究に魅力も未来もないのである。

さて、本研究のような基礎科学研究においては人間の医療への応用を忘れてはならないことも事実である。人間の医療とは“自然科学”でもあり、同時に“社会科学”でもある。つまり、科学的技術的イノベーションに加え、社会的イノベーションへの取り組みも必要不可欠であることをわれわれは忘れてはならない。社会的イノベーションとは社会的インフラのイノベーションである。今日のわが国における医療への社会的インフラのイノベーションの二大テーマは“医療経済”と“医療の安全と質”のインフラ整備である。特に“医療の安全と質”のインフラ整備は欧米に比較して著しく遅れており、その整備は急務である。もちろん“医療経済”は科学的イノベーションにも社会的イノベーションにも密接に関係してくる大問題であるが、財政当局の論理のみが先行し“医療費は何が何でも抑制すべし”とする政策にも毅然として立ち向かう必要がある、と考えたのが、本研究成果報告書の参考文献にこれらのテーマに関連した論文があげられている所以でもある。



1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

心臓血管系ノックアウトマウス(hesr)における心疾患発症機構の解明と心機能評価  
研究課題番号 15390385

【研究組織】

研究代表者 西田 博 (東京女子医科大学心臓血管外科講師)  
研究分担者 遠藤真弘 (東京女子医科大学心臓血管外科教授)  
研究分担者 富澤康子 (東京女子医科大学心臓血管外科助手)

【研究経費】

平成 15 年度	12,300 千円
平成 16 年度	1,400 千円
平成 17 年度	1,400 千円
計	15,100 千円

【研究発表】

学会誌・本

1. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H, Aomi S, Nakazawa M, Tsurumi Y, Kawana M, Kasanuki H: Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis, *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:, 2003.
2. 安井久喬 安井久喬、黒澤博身、竹内靖夫、許 俊鋭、西田 博: 胸部外科医の処遇に関する調査 2002 年度 日本胸部外科学会 『胸部外科医の処遇に関する調査』 集計結果報告, 日本胸部外科学会雑誌 51(2) 付録 1-12, 2003.
3. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H, Aomi S, Nakazawa M, Tsurumi Y, Kawana M, Kasanuki H: Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis, *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (3):570-577, 2003.
4. 遠藤真弘、富澤康子、西田 博: 血管新生療法(レーザー心筋血行再建術) 冠動脈の臨床 (下) -21 世紀の診断治療体系- VI. Coronary intervention の進歩, 日本臨床 61 (増刊号 4):704-706, 2003.
5. 遠藤真弘、富澤康子、西田 博、黒澤博身: 冠血行再建術: 適応、術式の選択、遠隔成績冠動脈の臨床 (下) -21 世紀の診断治療体系-VIII. 狭心症の臨床, 日本臨床 61 (増刊号 4):704-706, 2003.
6. 許 俊鋭、西田 博、安井久喬、黒澤博身、竹内靖夫: 胸部外科医の処遇 *Cardiovascular Med-Surg* 5 (3):309-316, 2003.
7. Ishida T, Kurosawa H, Nishida H, Aomi S, Endo M: Sequential bypass using the right gastroepiploic artery for coronary artery bypass grafting, *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 51 (7):277-281, 2003.
8. 遠藤真弘、真弘、青見茂之、富澤康子、内川 伸、木原信一郎、山寄健二、西田博、黒澤博身: 冠状動脈疾患を有する腹部大動脈瘤の手術戦略 -一期的か二期的か、off-pump か on-pump かの選択, 胸部外科 56 (8):619-625, 2003.
9. 許 俊鋭、西田 博、安井久喬、黒澤博身、竹内靖夫: 胸部外科医の処遇 *Cardiovascular Med-Surg* 5 (3):309-316, 2003.
10. Uchikawa S, Aomi S, Kawai A, Yamazaki K, Tomizawa Y, Nishida H, Endo M, Kurosawa H: Left ventricular mass index reduction early after an isolated aortic valve replacement with St. Jude Medical 19A-HP: *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 51 (8):361-367, 2003.
11. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H: Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes, *Circulation* 108:1343-1349, 2003.
12. 西田 博、遠藤真弘、黒澤博身: 循環器 難治性心不全治療の最前線補助循環, *Mebio* 20 (4):92-101, 2003.

13. 西田 博: 冠疾患侵襲的治療における診療報酬制度の問題点ー外科医の視点からー 日本心血管カテーテル治療学会誌 3(1):51-57, 2003.
14. 西田 博、黒澤博身、遠藤真弘: 冠動脈形成術 レーザー心筋血行再建術 冠動脈の臨床 (上) -21 世紀の診断治療体系- IV. Coronary intervention の進歩, 日本臨床 61 (増刊号 4):549-557, 2003.
15. 西田 博、黒澤博身、遠藤真弘: 冠動脈バイパス術 緊急 CABG の適応 冠動脈の臨床 (上) -21 世紀の診断治療体系- IV. Coronary intervention の進歩, 日本臨床 61 (増刊号 4):612-617, 2003.
16. 西田 博、黒澤博身、遠藤真弘: 冠動脈形成術 急性心筋梗塞の重篤合併症の緊急外科手術 冠動脈の臨床 (下) -21 世紀の診断治療体系- X. 急性心筋梗塞 重篤合併症と治療法の進歩, 日本臨床 61 (増刊号 5):511-519, 2003.
17. 西田 博、黒澤博身、遠藤真弘: 冠動脈バイパス術 緊急冠動脈バイパス術の適応と実際 冠動脈の臨床 (下) -21 世紀の診断治療体系- X. 急性心筋梗塞 重篤合併症と治療法の進歩, 日本臨床 61 (増刊号 5):569-575, 2003.
18. 西田 博: 学会の“内”と“外”ー縦割り体質に対峙する横断的民活組織としての存在価値をもっと前面に!ー, 人工臓器 32 (1):168, 2003.
19. 西田 博、富澤康子、遠藤真弘、黒澤博身、吉田悦子、大橋靖雄: 心臓血管外科の医療経済, Cardiovascular Med-Surg 5 (3):317-330, 2003.
20. 西田 博: 本邦における虚血性心疾患手術に関する学会調査の紹介, 日本冠疾患学会雑誌 9(3):173-178, 2003.
21. 西田 博: 今月号のハイライト Orphan drug を正しい形で世に出し、広めるのは集中治療医の重要な役割であるー心臓外科医の経験からー, 日本集中治療医学会雑誌 10 (4):325-327, 2003.
22. 西田 博: 循環・呼吸系代行装置 人工心肺装置(ロータリーポンプ) 人工心肺装置(遠心ポンプ) 冷温水槽 心筋保護液供給装置, 医療機器事典 IV. 代行機器. pp 292 - pp 298, 2003 年 医療機器事典編集事務局 編. (株)産業調査会 事典出版センター
23. 西田 博: 人工心肺装置 体外循環と補助循環, 日本人工臓器学会 第 19 回 教育セミナーテキスト、2003 年. 四津良平編集
24. 西田 博: 虚血性心疾患 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(2001ー2002 年度合同研究班報告) 非心臓手術における合併心疾患の評価と管理に関するガイドライン, Circulation Journal 67 (suppl IV): 1195-1200, 2003.
25. Tomizawa Y. Vascular grafts: basic research and clinical applications. In: Tura A, ed. Vascular grafts: Experiment and modelling. in Vol. 34. International Series on Advances in fluid mechanics. Southampton: WIT press, 2003:1-39.
26. 富澤康子、小森万希子、高田勝美、西田博、遠藤真弘、黒澤博身: コラーゲン製止血材の生体顕微鏡による評価; 組織親和性及び吸収性、日心血外会誌、32:17-22, 2003
27. 富澤康子、遠藤真弘、西田博、小柳仁: 左室瘤の外科治療後の遠隔成績、胸部外科、56:528-531, 2003
28. 鈴木豊、富澤康子、小森万希子、高田勝美: 血管新生過程の観察、-ND フィルターの利用による観察域の拡大-、呼と循、51:507-510, 2003
29. Takada K, Komori M, Notoya A, Tomizawa Y, Ozaki M. Effect of ulinastatin on microcirculation during excessive hemorrhage using fluid therapy. In Vivo 2003; 17:129-35.
30. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Ozaki M. Urinary trypsin inhibitor improves peripheral microcirculation and bronchospasm associated with systemic anaphylaxis in rabbits in vivo. Shock 2003; 20:189-94.
31. Uchikawa S, Aomi S, Kawai A, Yamazaki K, Tomizawa Y, Nishida H, Endo M, Koyanagi H: Left ventricular mass index reduction early after an isolated aortic valve replacement with St. Jude Medical 19A-HP. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 51:361-367., 2003
32. 富澤康子: 麻酔科医に役に立つ人工血管の知識、臨床麻酔、27(5):807-812, 2003
33. 遠藤真弘、富澤康子: CABG のスタンダード、先端外科医療の最前線、医学のあゆ

- み、205:678-682、2003
34. 富澤康子、遠藤真弘、木原信一郎、斎藤聡、石戸谷浩、山崎健二、青見茂之、西田博、黒澤博身：再冠状動脈再建術-on-pump と off-pump の比較・検討、胸部外科、56:221-226, 2003
  35. 富澤康子：最近話題の人工血管、心臓血管麻酔学会雑誌、7:3-6, 2003
  36. 富澤康子：2.心電図 [85歳の心電図]、岩手県85歳追跡調査、p.82-87, 2003年、財団法人8020推進財団、社団法人岩手県歯科医師会、岩手県、岩手医科大学、8020報告書、2003
  37. 富澤康子：人工血管、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性、新材料・新素材シリーズ、土屋利江編集、シーエムシー出版、2003、p.118-122
  38. 西田 博：特集 21世紀初頭の循環器医療を取り巻く社会的諸問題 その3：循環器領域を若手にとって魅力的なものにするために 施設基準and人物基準 (1) 外科 Cardiovascular Med-Surg 6(1):26-36, 2004.
  39. 黒澤博身、西田 博：心臓血管外科の医療経済における問題点、日本外科学会雑誌 105 (9):534-536, 2004.
  40. 田中啓治、西田 博：難治性虚血性心疾患と血管再生療法、医工学治療 16(2):80-81, 2004.
  41. 西田 博：Drug Eluting Stent の影響予測に関するアンケート結果報告、日本冠疾患学会雑誌 10 (1):5-9, 2004.
  42. 西田 博：冠動脈バイパス術 冠動脈疾患、循環器疾患最新の治療 2004-2005. pp 120 - pp 125, 2004年 山口 徹・堀 正二編集 南江堂
  43. 西田 博：収縮性心膜炎 VII. 他の重要な疾患の手術適応と至適時期 新・心臓病診療プラクティス, 2. 心疾患の手術適応と至適時期. pp 393 - pp 396, 2004年 赤阪隆史・吉川純一編集 文光堂
  44. 西田 博：循環器分野 特集 臨床家の望むバイオマテリアル こんな材料がほしい!, バイオマテリアル 22(3):189-192, 2004.
  45. 人工臓器 第20回教育セミナー 編者：富澤康子 発行：日本人工臓器学会、2004年7月
  46. 富澤康子、小森万希子、高田勝美、西田博、遠藤真弘、黒澤博身：局所止血材の細胞毒性と組織親和性の *in vitro* および *in vivo* 評価、日心血外会誌、33:382-386, 2004
  47. 宮川-富田幸子、今中-吉田恭子、杉村洋子、富澤康子、中澤誠：冠動脈の発生と発達に関する最近の知見、冠疾患学会雑誌、10:55-60、2004
  48. 富澤康子：糖尿病合併症例における冠血行再建術、循環器専門医、12:295-300, 2004
  49. 岩崎淳一、宮川-富田幸子、森善樹、富松宏文、中澤誠、富澤康子、遠藤真弘、小久保博樹：マウスの心電図計測方法-生後5日目のbabyからadultまで、呼吸と循環、52:203-206, 2004
  50. Goya N, Ishikawa N, Ito F, Kobayashi C, Tomizawa Y, Toma H. Transurethral Ethanol Injection Therapy for Prostatic Hyperplasia: 3-Year Results. J Urol 2004; 172:1017-1020.
  51. Tomizawa Y, Aomi S. Deterioration of suture materials at prosthetic-host anastomoses. J Artif Organs 2004; 7:207-209.
  52. 富澤康子：人工血管-この1年の動き、人工臓器、33:191-7, 2004
  53. Sato M, Endo M, Tomizawa Y, Nishida H: Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozing type free wall rupture., Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 53 (3):147-149, 2005.
  54. Hirasawa Y, Kawai A, Ninami H, Aomi S, Nishida H, Endo M, Koyanagi H, Tanimoto K, Ishizuka N: Characteristics of hypertrophic obstructive cardiomyopathy refractory to medical treatment and selection of surgical methods., J Card Surg 20(1):8-15, 2005.
  55. 西田 博：外科医の技術料について考える “外科医のあるべき診療報酬体系” 企画にあたって、日本外科学会雑誌 106 (1):38-39, 2005.
  56. 西田 博、黒澤博身、遠藤真弘、富澤康子：包括医療(DPC)から見た術式の選択 -



- 疾患別 IVR vs.手術の比較－ ケース 2：冠動脈疾患の治療，インナービジョン 20 (2):19-23, 2005.
57. 西田 博: 特集 循環器診療の質を問い直す III. 循環器診療の質の向上とそれを阻害するもの 循環器診療機関の配置は適正か (2) 心臓血管外科, Cardiovascular Med-Surg 7 (2):49-62, 2005.
  58. 西田 博: 総論：ハイテク低侵襲手術・治療機器, Medica Science Digest 31 (6):200-201, 2005.
  59. 西田 博: 人工臓器－最近の進歩 ペースメーカ, 人工臓器 33 (3):187-190, 2005.
  60. 西田 博: 特集 心臓領域でのインフォームド・コンセントを考える インフォームド・コンセントに関するさまざまなトピック, ハートナーシング 18 (7):726-733, 2005.
  61. 西田 博、吉田悦子: 特集 冠動脈病変：DES 時代の心臓血管外科の役割 施設基準、Second Wave は来るのか (1)政策誘導非迎合派からの提言, Cardiovascular Med-Surg 7(3):417-429, 2005.
  62. 西田 博: 特集 部位から理解する心臓血管手術 冠動脈に対する手術, ハートナーシング 18(10) : 73-80, 2005.
  63. 西田 博: 冠動脈疾患の治療の進歩－早期及び遠隔成績から－ 虚血性心筋症, 第33回 循環器教育セッション 循環器専門医 12 (suppl):86-93, 2005. 山口 徹 日本循環器学会
  64. 西田 博: IX. 再手術の Knack & Pitfalls 手術適応 X. その他の心筋虚血改善法 レーザーによる心筋虚血の改善 ワンポイントアドバイス 止血材料の使い方 Is BITA better than SITA?, pp 252 – pp 256 pp 264 – pp 269 pp 122 – pp 123 pp 218 – pp 219 2005 年 冠動脈外科の要点と盲点 高本真一 監修 竹内靖夫 編集 文光堂
  65. 西田 博、黒澤博身: 心疾患における至適医療モデル 心臓病のベストプラクティス－外科を中心に－, 疾患別至適医療モデル・資料集(疾患別ビジネスモデル) Pp 97 – pp 118 2005 年 株)コンタクス
  66. 西田 博: レーザー心筋血行再建術 新・心臓病プラクティス 冠動脈疾患を診る II I 冠動脈疾患を治療する, 6. 新しい治療法 Pp149 - pp152 2005 年 木村一雄・土師一夫 編集 文光堂
  67. 人工臓器 第21回教育セミナー 編者：富澤康子 発行：日本人工臓器学会、2005年7月
  68. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. J Artif Organs 2005; 8:137-42.
  69. 富澤康子: 医師と技士の教育と連携はどうあるべきか、特集「体外循環」、人工臓器、34:xxx-xxx, 2005
  70. 富澤康子. 人工血管開発の課題と展望. In: 許俊鋭, 斉藤明, 赤池敏宏, eds. 人工臓器・再生医療の最先端. 先端医療シリーズ 37. 東京: 先端医療技術研究所; 2005:122-125.
  71. Komori M, Tomizawa Y, Takada K, Ozaki M. A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber. Anesth Analg 2005; 100:830-4.
  72. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Nishiyama K, Ozaki M. Effects of Colloid Resuscitation on Peripheral Microcirculation, Hemodynamics, and Colloidal Osmotic Pressure During Acute Severe Hemorrhage in Rabbits. Shock 2005; 23:377-382.
  73. Tomizawa Y. Endothelialization and functional neointima on vascular grafts in humans. Ann Thorac Surg 2005; 79:1465.
  74. 富澤康子 : A well-known aortic surgeon-Scholarly achievements D. Craig Miller, 高本真一 監修 心臓外科 Knack & Pitfalls 大動脈外科の要点と盲点、文光堂 東京 2005年3月
  75. 高田勝美、小森万希子、能登谷敦子、尾崎真、富澤康子 : Effects of Ulinastatin on Microcirculation during excessive hemorrhage using fluid therapy, Surgical Trauma & Immunological Responses, 14: 84, 2005

## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学心臓血管外科 西田 博

### はじめに

ここでは本研究の全貌の大まかな理解のために、この研究を始めるにあたっての背景および位置づけについて明らかにし、研究計画および成果のエッセンスを簡単に説明する。そうすることによって、この研究の意義および成果の意味を浮き彫りにすることができ、また、この研究により導かれた論文、さらに我々の参考論文を読むに際して、一層深い理解が得られると思われる。

### 研究の背景および目的

血管の形成されない動物は生存できない。そのため心臓血管領域におけるノックアウトマウスの大多数は致死性であり、成体まで生き延びるものは珍しい。Notch シグナル伝達系は、細胞間相互作用の重要な因子群として、細胞膜貫通型のシグナル受容体であり、Jagged / Serrate および Delta という二種類の ligand との相互作用により、Notch 細胞内ドメイン が放出され核内へ移行し、suppressor of hairless などの遺伝子産物と共同で hairy and Enhancer of split といった標的遺伝子の発現を活性化し、細胞の運命決定を行うとされる。重複した機能を有するファミリー遺伝子において double mutant は致死であっても、single mutant では比較的軽い表現系を示すことがある。

最近、point mutation での各遺伝子座における hypermorphic な allele の利用、時期および特異的に遺伝子をノックアウトできるシステムを利用して遺伝子機能を一部欠いたまま誕生させ、adult 成体での遺伝子機能を解析する機会が増加している。ノックアウトマウスは発生工学的手法を用いて単一因子の影響を *in vivo* で解析できるようにしたものだが、これまでの古典的方法による研究を補っているばかりでなく、新しい研究

資源として多くの可能性を秘めている。心臓血管系に心奇形を発現する Notch シグナル系を介したノックアウトマウスの (*hesr*) の心疾患発症機構の解明は発生機序の理解を大きく進め、また心機能の解析に非常に有用であることが期待できると考えた。

### 当該研究の学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義

①心臓形成過程では *hesr1* は心房に、*hesr2* は心室に発現し、特に *hesr2* が重要な役割を占めている。② *hesr* ノックアウトマウスにおける心奇形は右心系に限局しており、右心系の発生過程の解明が可能である。③心臓血管領域のノックアウトマウスは大多数が致死性であるが、本マウスは生存・生殖可能で成体になることがあり、今まで行えなかった経時的な心機能評価が可能である。④ *hesr2* ノックアウトマウスは高率に右心不全を起こす。⑤ *hesr1* は血管が豊富な組織で高いレベルで感知され endothelial cell tube formation を制御し心臓に多く発現する。

ノックアウトマウスが遺伝子疾患モデルとなり、成体におけるある遺伝子機能の欠損が生体内で導かれる影響を明らかにできることは、疾病に至る作用機序の理解にとどまらず、製薬や治療への応用を可能にすることが確信されており、多大な社会的貢献が期待できると考えた。

### 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

ショウジョウバエでの Notch シグナル系を介した側方抑制モデルが提唱されたが、最近、神経系以外にも体節形成、器官形成に Notch シグナル伝達系が重要な役割を果たすことが示された。心臓形成では Notch の ligand である Jagged 1 遺伝子が Alagille

syndrome の原因遺伝子として同定された (Loomes, Underkoffler et al. 1999)。その後、Notch1/4 およびもう一種の Notch の ligand である delta4 が心臓血管系の形成に必須であることが示された (Krebs, Xue et al. 2000)。hesr 遺伝子群は、Notch シグナル伝達系の標的遺伝子であり転写因子である hairy and E(spl) 遺伝子群のサブファミリーであるが、世界で5カ所同時期にクローニングが報告され、現在、国内外で盛んに研究されている (Nakagawa, et al. 1999, Leimeister, 1999, Sun, 2001)。しかし、hesr ノックアウトマウスと心奇形発症機構の解明、および心エコー検査を含む心機能評価を経時的に行った報告はほとんどなかった。

### 本研究の着想に至った経緯

生直後の乳幼仔マウスの心臓は長軸 5mm と小さく、しかも心拍数が約 300-400/分と速い。そのため、読み込み画像を処理する速度および分解像度が機械の限界を越え対応できていなかったため、エコー診断装置を用いての心機能評価は極めて困難であることが指摘されてきた。我々は心機能の評価を目的に日本で入手可能な数種類のエコー診断装置の機能を評価したが、満足な描出が得られなかった。市販の機種では唯一 HITACHI/PMS 社製エコー診断装置 HDI-5000 Sono CT XRES に小型高性能プローブ CL15-7 high frequency linear probe を用いたところ、生後5日目の乳幼仔マウスにおいて描出可能であった。しかし、対象の乳幼仔マウスが小さく①心電図波形を同時に描出するためのリードの装着、②プローブの角が動物を固定している台にあたるため、検査用台と検査時の体位、③体温が下がらないようにゼリーの加温、動物の保温、④ゼリーで窒息しない配慮等を工夫することにより心エコー検査が可能になった。以上から明らかなように、心臓形成過程に重要な役割を果たしている hesr ノックアウトマウスを用いて本研究を準備するに至った。

### 本研究の準備状況等について

心臓血管系の形成過程をノックアウトした本マウスは致死的でないため、生きて生まれる。しかし、生後5日目の正常の心臓でさえ長軸 5mm と小さく、卓越した発生学的知識、繊細な解剖技術、循環動態の理解があり初めて剖検においてのみ心奇形の確定診断をつけることが可能となり、生存中の心奇形の診断は不可能に近い。hesr2 は重複した機能を有するファミリー遺伝子 hesr1 との double KO mutant で初めて致死となり、hesr2 単独ホモマウスでは比較的軽い表現系を示すのみである。hesr2 ノックアウトホモマウスは生後 2 -10 日の間に、体重が増加せず死亡する。本マウスの死因は、心機能不全による体循環還流量の不充分による多臓器不全によることが考えられているが、心筋形成不全の可能性も否定できなかった。剖検では常に心臓の拡大が著しいが、確定診断をつけることが困難であった。心筋形成の異常が存在するのであれば、経時的な心機能の評価は重要性である。また、過去において、ノックアウトマウスの心機能の経時的変化はほとんど評価されておらず、本研究において興味深い知見が得られることが期待された。

**Preliminary study** として本ノックアウトマウスの心エコー検査を試みた。まだ、心奇形の確定診断をエコー検査ではつけることはできなかった。左室流入路および左室流出路から大動脈を心電図と同一画面に描出することは可能であった。検査施行後に心臓の標本を採取し、マクロ観察および連続切片による組織学的観察を行った。心臓の形態は、三尖弁形成不全の他には、小さい右心室、心室中隔欠損及び心房中隔2次孔欠損等の右心系の奇形が観察されることがあったが、各心奇形の出現頻度は不明であった。長軸方向の連続切片による組織学的評価では小さい心室中隔欠損も診断可能であった。



## 研究計画

平成 15, 16, 17 年度の 3 年間で研究することを計画した。

1. 血行動態評価：実験中の血圧、心拍、ECG、体温、血中酸素飽和度を連続して測定することとした。レーザー血流計 (ALF21N, Flow・Mass・Velocity, Advance co. Ltd.) を用いると非接触性に組織血流を測定可能である。実験動物の体温、脈拍の変化に特に気をつけた。

2. 心エコー検査での心機能評価において役に立つ機能の利用

① Broadband digital beam-forming と extended signal processing [超音波パルス幅、周波数、振幅をコントロールし周波数帯の全域を画像化。浅部から深部まで], Broadband flow imaging [距離分解能の向上。血流信号画像で高分解能], Tissue harmonic imaging [高調波成分の画像化、アーチファクトの低減], Power motion imaging [心筋での doppler シフトの画像化], Tissue doppler imaging (TDI) [心筋からの高振幅壁運動信号のみを表示。TDI 中に心筋速度の M モードを行うと時間分か伊能が向上。TDI は心臓の拡張/収縮機能の局所 LV 壁運動速度の定量評価を可能に], Digital video streaming (DVS) [超音波画像データをデジタル信号のままリアルタイムで記録するオンザフライ圧縮]。

② 2D contrast harmonic imaging [超音波造影剤のエネルギーを検出し画像化する], Pulse inversion harmonics (PIH) [広い帯域を用いるため距離およびコントラスト分解能が向上], Power contrast harmonic imaging (PHI) [aliasing の影響を受けずに低速の血流に対する感度]

3. 運動負荷：トレッドミル、水泳、車輪等で至適運動量を得られる方法を考えた。自発的運動と強制運動では負荷程度が異なることが知られている。心電図他を連続してモニターするために telemetry が多用されているが、植え込みのストレスが強く、1/3 以上の動物を失うという報告もあり、機種を選び慎重に行いたいと思った。血中酸素

飽和度をモニターすることとした。

4. ドブタミン負荷：マウスが成体の時には麻酔の必要性を考慮する。心不全がある場合にはイソプロテレノールでは不整脈が誘発されたり、低酸素になることが指摘されているため注意を要する。

5. 解剖学的評価：立体顕微鏡下に摘出した剖検心における両心房の大きさ、冠動脈の発達、房室弁の三次元的形状、中隔の状態、心室筋の形態等の観察を試みた。本ノックアウトマウスでは三尖弁の形成不全が多発している。

6. 組織学的評価：マクロ解剖では心室中隔の存在が診断しにくいことがあるため、摘出心臓全体を包埋し、長軸方向に連続切片とし観察することとした。心室筋の異常を免疫組織学的、あるいは in situ hybridization 手法を用いて評価することとした。

7. 経時的エコー心機能評価：ノックアウトマウスを成体まで飼育して、心エコー検査を施行し、心機能、心不全と心室筋の関係を評価する。

## 研究成果と参考論文

この報告書の研究成果としてまとめた『Evaluation of cardiac function and anatomy of a knockout mouse with cardiac failure』には本研究で得られた心電図の測定方法、エコー検査結果、解剖学的な所見を示した。冠動脈の発生と発達の理解のために『冠動脈の発生と発達に関する最近の知見』を示した。本研究では心機能を評価するためにエコー検査を多用したが、そのためにノイズの少ない心電図の測定法が必要となり『マウスの心電図計測方法-生後 5 日目の baby から adult まで』を示した。

この報告書の参考論文には心臓血管外科および人工臓器に関係した論文を載せた。

人工臓器の中でも人工血管は再生医療の研究に影響を与え、また影響を受けており、最近の研究の基礎になる過去の研究に注目し、また最近の研究からも学び『人工血管-この 1 年の動き』をまとめた。最近のペースメーカーでの一番の話題は、bradycardia ではないにもかかわらず、ペースメーカーを用

いて治療する cardiac resynchronization therapy (CRT)である。さらにほかの話題を含め『ペースメーカー：最近の進歩』をまとめた。再生医療の足場としてコラーゲン製材料が用いられることが多い。しかし、全てのコラーゲン製剤の細胞親和性が良い訳ではない。そこで臨床に使用されている市販の止血材料の利点および欠点に注目し、基礎研究を含め総説とし『Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: A review』にまとめた。

冠動脈バイパス術において内胸動脈の使用が遠隔成績を改善し、しかも1本よりも2本の方が良いが、これを糖尿病合併症例において示し『Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes.』にした。さらに In situ で動脈グラフトを利用することに利益が得られることを『Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting』でしめした。

大動脈炎症候群（高安病）において血管病変が大血管に起こることは良く知られているが、冠動脈に起こることはあまり知られていない。冠動脈病変の合併例で、造影から狭窄、拡大などの病変が観察されたのを『Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis』としてまとめた。今後、本研究を更に進めたいと思っている。広範囲心筋梗塞による Oozing type 出血/心破裂を乗り切るための手術術式を「フィブリン糊オキシセル固定法」(1990年)として報告した。同じ症例が遠隔期に再手術となり、この大変貴重な症例報告を『Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozing type free wall rupture』としてまとめた。

最近では、診療報酬体系が大変注目されており、外科医も包括医療を無視できなくなっている。そこで、『外科のあるべき診療報酬体系 企画に当たって』および、『包括医療(DPC)からみた術式の選択-疾患別

IVR vs. 手術の比較- ケース2：冠動脈疾患の治療』を載せた。

また、最近話題になっていることから『「循環器診療機関の配置は適正か(2)心臓血管外科』と『政策誘導非迎合派からの提言』を参考文献に加えた。

## まとめ

この度は『心臓血管系ノックアウトマウス(hesr)における心疾患発症機構の解明と心機能評価』という題で研究を開始したが、未だ解明されていない部分が多く、さらに研究を進めていきたい。

### **Evaluation of Cardiac Function and Anatomy of a Knockout Mouse with Cardiac Failure**

The majority of knockout mouse models with failure in cardiovascular system are fatal, since it is difficult for these mice to survive. And, animals without blood vessels cannot live. In the knockout mouse model that we used, malformation of the heart was localized and limited to the right side, therefore the animals were able to survive and reproduce.

The heart was evaluated serially by the noninvasive method of echo (Figure 1 & 2) and less invasive method of catheter. Experimental animals were monitored on an electrocardiogram, for that purpose, a non-invasive electrode was developed using a tungsten wire on an EEG ear clip (Figure 3 & 4). A tungsten wire was used for a 5-day-old mouse (Figure 5) and ECG was recorded successfully without noise (Figure 6). Observation of the mice from day 5 after birth to adulthood was performed using an echo diagnostic system HDI-5000 Sono CT XRES manufactured by PMS Company, using a high frequency linear probe CL15-7. It was possible using echo to detect and visualize ventricular septal defect (VSD) flow in a 5-day-old mouse weighing 1.7 g (Figure 7) and flow at left ventricular outflow in an adult mouse (Figure 8).

Prominent hypertrophy in the right atrium and right ventricular was observed in one mouse that died of heart failure. A heart specimen was obtained and a good penetrating resin was injected into the coronary arteries through the aorta, then the surrounding tissue was dehydrated and made transparent. The physical relationship of the blood vessels and the ventricles was evaluated three-dimensionally. Also, the right and left coronary arteries were observed to arise from the aorta (Figure 9 & 10). To explore cardiac anatomy and physiological function of a knockout mouse is helpful to demonstrate the intrinsic function of the gene, to identify the new function of the gene from the unexpected phenotype, and to examine the role of the gene in the phenotype by a relation between the genetic background and the genealogical standpoint.



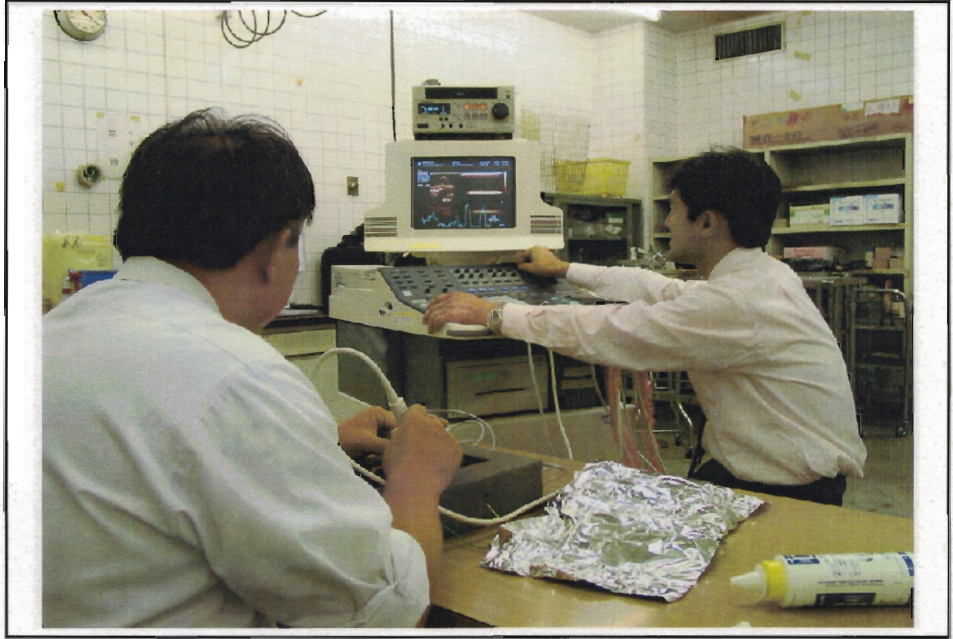


図1 実験風景：画面をみながら操作し、プローベを持つ

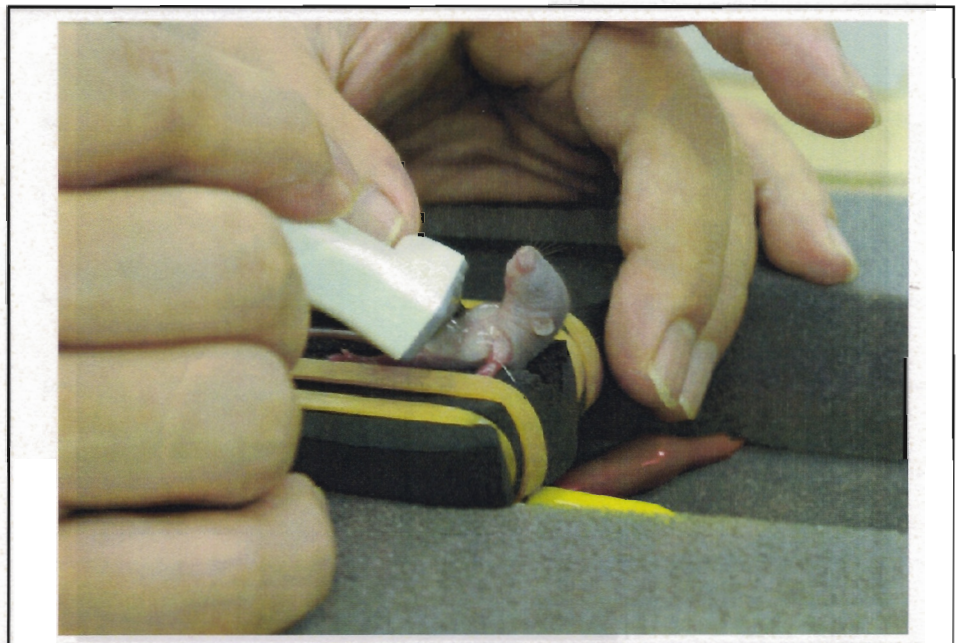


図2 Baby マウスにプローベをあてる

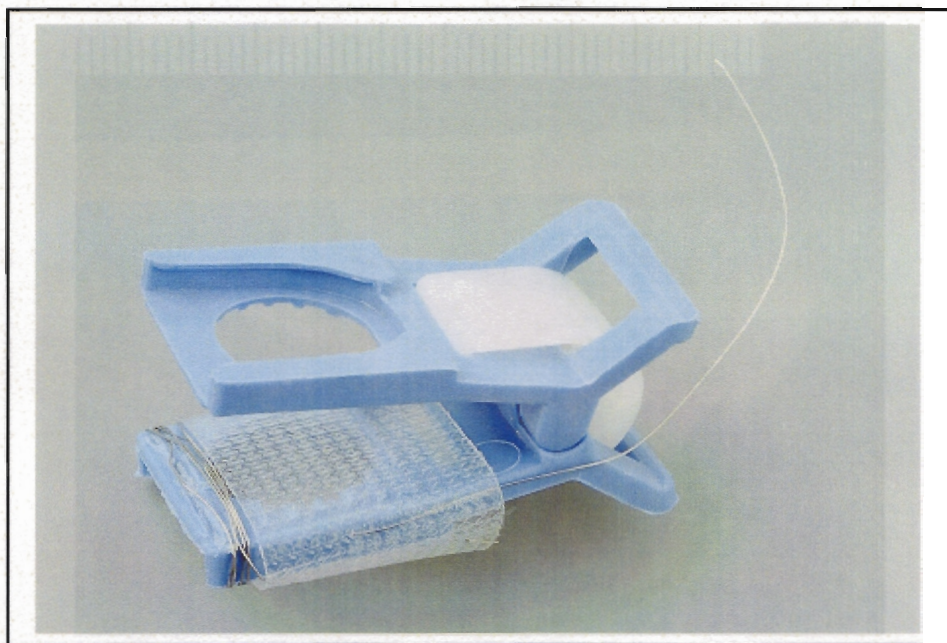


図3 脳波用耳クリップにタングステンワイヤーを巻いた電極

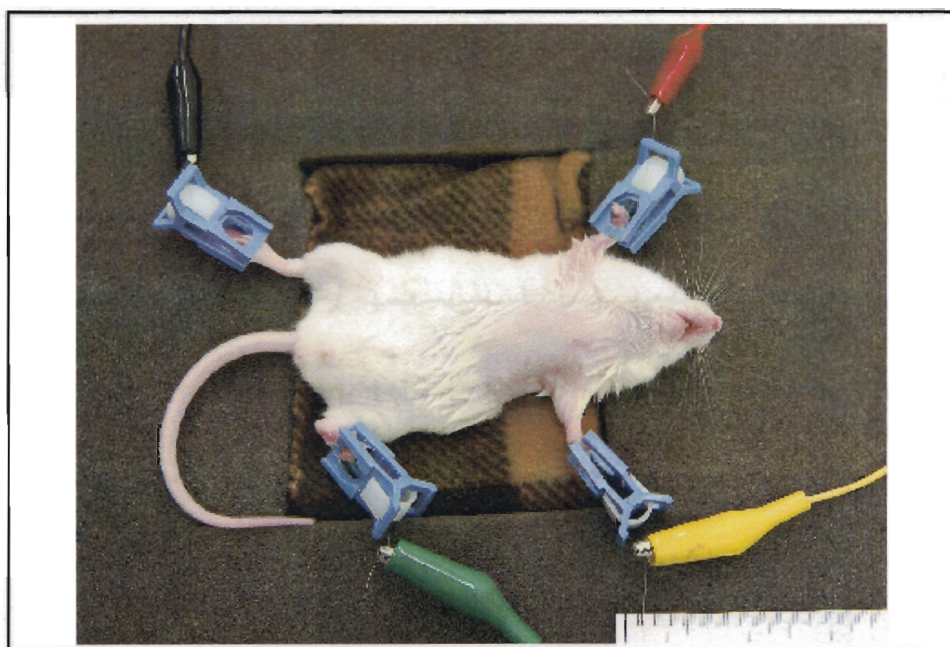


図4 Adultマウスの心電図をとっているところ



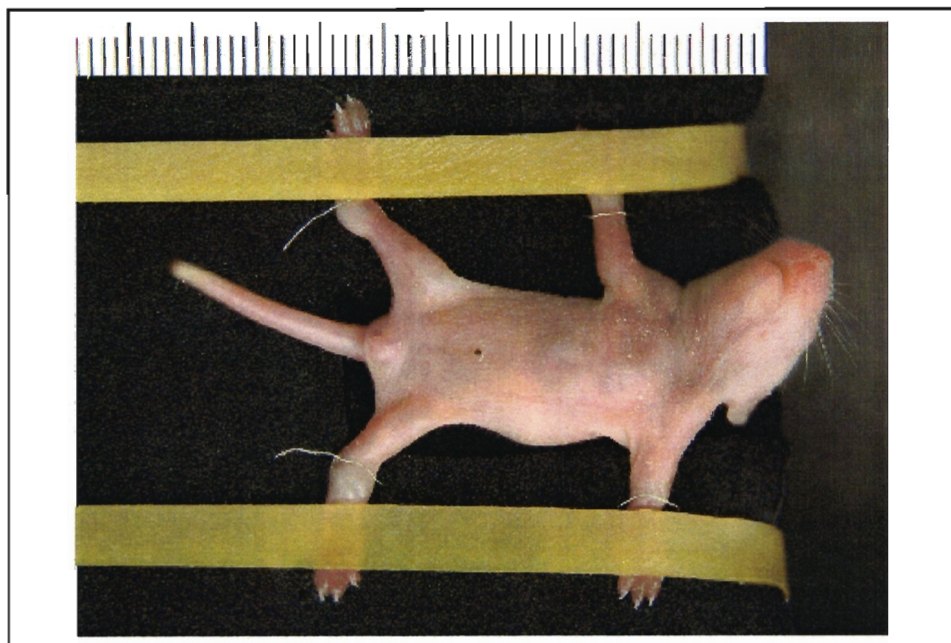


図5 Babyマウスは体毛が無い  
ため、タングステンワイヤー1  
本で心電図は記録可能である

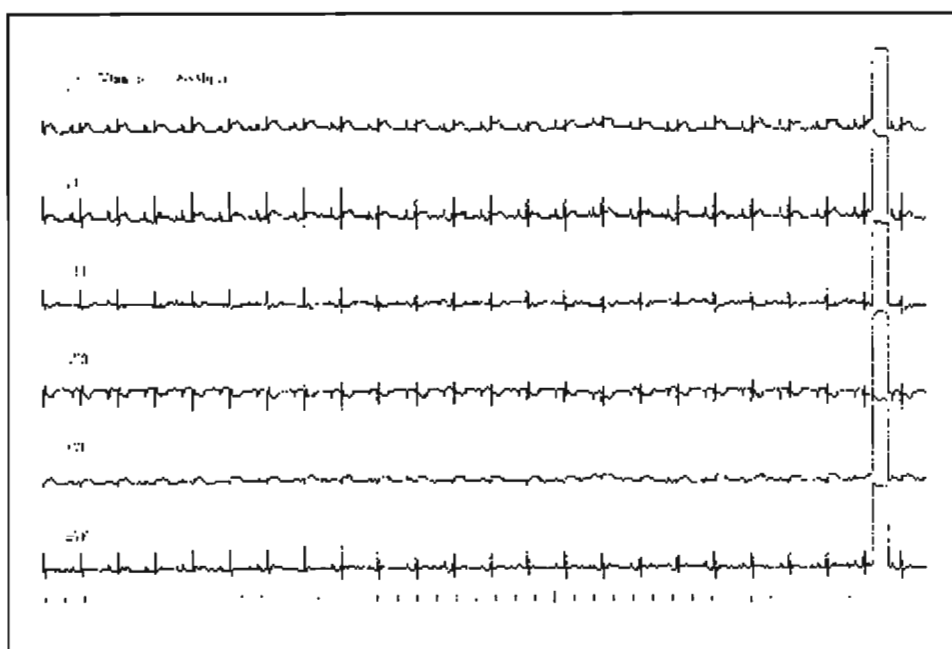


図6 Baby マウスの心電図 (50 mm/sec)



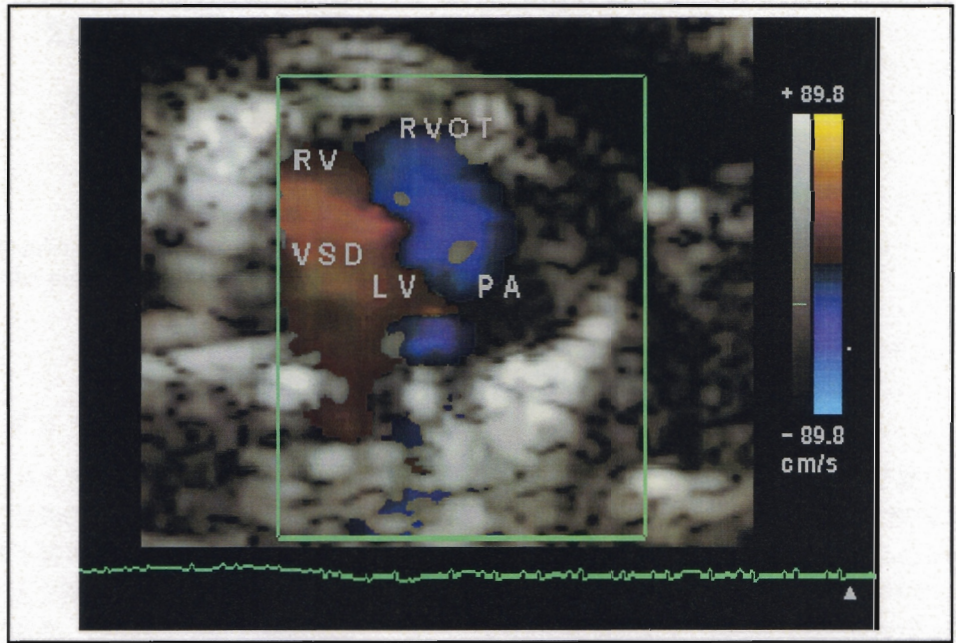


図7 生後5日目のhesr2ノックアウトホモマウスにてVSDが診断された

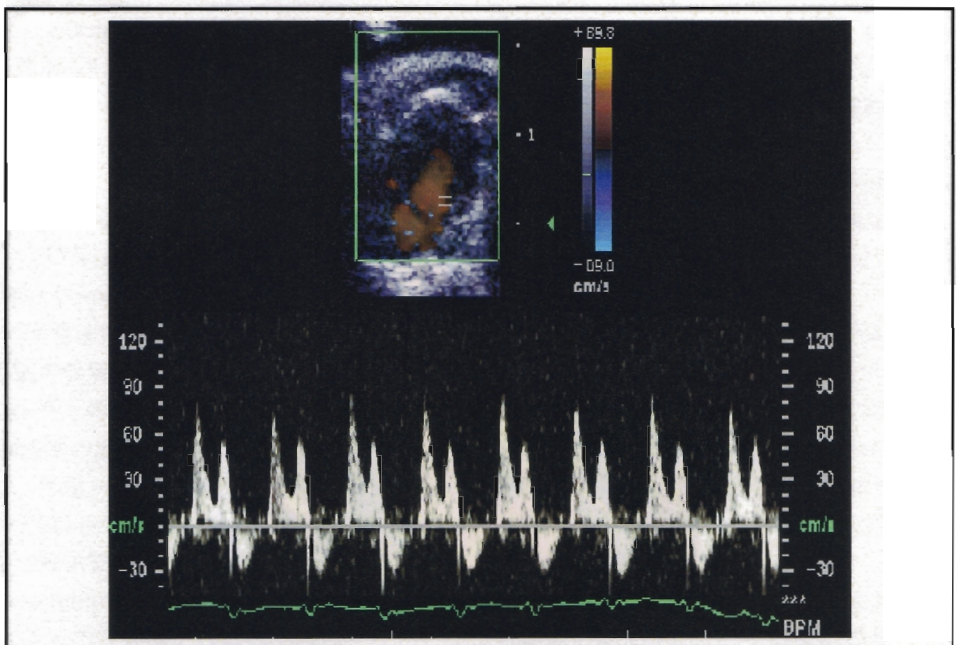


図80 Adultのhesr2ノックアウトホモマウスでの左室流入血流



図9 マイクロフィルを注入した大血管と心臓 PDAが大動脈側から収縮しているのがわかる

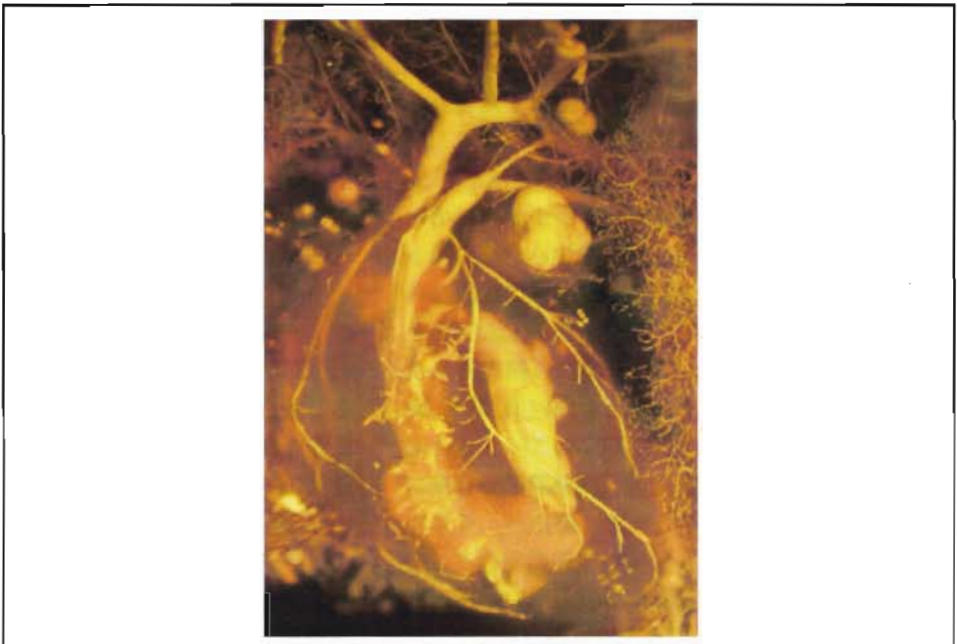


図10 マイクロフィルを注入した大血管と心臓 PDAが収縮傾向にあるのがわかる