

心臓血管系ノックアウトマウス (hesr) における  
心機能評価と心不全発症機構の解明

(課題番号 15591498)

平成15, 16年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書



平成17年3月

研究代表者 村崎 かがり

(東京女子医科大学循環器内科学講座 助手)



心臓血管系ノックアウトマウス (hesr) における  
心機能評価と心不全発症機構の解明

(課題番号 15591498)

平成15, 16年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 村崎 かがり

(東京女子医科大学循環器内科学講座 助手)

## 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 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. 心血管疾患に伴う急性肺血栓塞栓症の臨床的凝血学的検討.....	3 3
2. 冠動脈硬化の促進因子 喫煙が冠疾患に及ぼす影響.....	4 3
3. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation .....	4 7
4. Optimal therapeutic range for oral anticoagulants in Japanese patients with prosthetic heart valves: a preliminary report from a single institution using conversion from thrombotest to PT-INR .....	5 7
5. 末梢血白血球,血小板活性化指標より不安定プラークの安定化を 評価しえた不安定狭心症.....	6 3
6. 急性冠症候群における炎症の関与.....	6 7
7. 急性冠症候群と再狭窄病変における炎症細胞の重要性.....	7 1
8. Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass grafting .....	7 9
9. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes .....	8 7
10. Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis .....	9 5
11. 人工血管-この1年の進歩.....	1 0 3

## はしがき

東京女子医科大学循環器内科 村崎 かがり

最近、がん、急性心筋梗塞、脳卒中を含む3大成人病に関する基礎的および臨床研究が盛んである。心臓血管領域の研究には長い歴史があるが、発生工学的手法を用いて単一因子の影響を*in vivo*で解析することを可能にしたノックアウトマウスの利用は強力な解析手法として、研究を新しい方向へと進めることが期待されている。

この研究を開始するにあたり、我々が日常使用している検査方法である心電図、心エコーでさえ動物のサイズおよび心拍数の速さ、装置の性能の問題により評価に適さないことに気がついた。デジタル心電計では300 beat/min以上は数えられず"\*\*\*"になってしまい、生後5日のbabyマウスは心エコーのためのゼリーの重さが障害になった。しかし、種々の工夫を行い、研究を進めることができた。

この報告書は過去2年間に及ぶ我々の研究成果である。今後この成果が他の基礎研究に、また臨床に応用できるように弛まらずに研究を続けていきたい。

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)における心機能評価と心不全発症機構の  
解明

研究課題番号 15591498

【研究組織】

研究代表者 村崎 かがり (東京女子医科大学循環器内科助手)  
研究者分担 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 14 年度	2,200 千円
平成 15 年度	1,300 千円
計	3,500 千円

【研究発表】

学会発表

1. Ohmori H, Murasaki K, Honda A, Kakizawa Y, Terajima Y, Tanoue K, Kasanuki H. Systemic inflammation and glycemic control as the amplifying factors for aspirin-resistant thromboxane biosynthesis in patients with coronary artery disease. *Circulation* 110(17) III-310, 2004
2. Kajimoto H, Murasaki K, Takahashi K, Tanoue K, Kasanuki H, Nakazawa M. Significance of enhanced p-selectin expression on platelets and decreased thrombomodulin in patients with cyanotic congenital heart disease. *Circulation* 110(17) III-620, 2004
3. Murasaki K, Kawana M, Murasaki S, Ueno A, Tanoue K, Kasanuki H. Clonally expanded T cells from coronary artery thrombus in patients with acute coronary syndrome. *Circulation J* 68 Suppl.I 14, 2004
4. 重城健太郎, 青鹿佳和, 山田雄一郎, 村崎かがり, 谷本京美, 石塚尚子, 萩原誠久, 川名正敏, 笠貫宏: 保存的内科治療により改善を認めた原発生乳心膜症の1例, 第190回日本循環器学会関東甲信越地方会 2003.12 *Circ J* 68(Suppl. II):783, 2004
5. 梶本英美, 村崎かがり, 高橋一浩, 田上憲次郎, 笠貫宏, 中澤誠: Fontan 術後の患者における血小板活性化の検討 第40回日本小児循環器学会 2004.6~7 日本小児循環器学会雑誌 20:316, 2004
6. Higashitani M, Murasaki K, Tatsumi F, Ueno A, Murasaki S, Haruto S, Kawana M, Tanoue K, Kasanuki H: The Functional Profiles of Circulating T Lymphocytes Distinguish Patients with Stable and Unstable Angina, 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2003.3 *Circ J* 67(Suppl.I):279, 2003
7. Ueno A, Murasaki K, Kawana M, Murasaki S, Tanoue K: C-Reactive protein upregulates TLR-4 expression through NF- $\kappa$ B activation in vascular endothelial cells, Scientific Session 2003, American Heart Association, 2003.11 *Circ.* 108( Suppl ) 41, 2003
8. 村崎かがり, 上野敦子, 村崎理史, 石井康宏, 高木厚, 鶴見由起夫, 川名正敏, 笠貫宏: Leucocytes activation is systemically detectable in patients with unstable angina, 第17回日本冠疾患学会 2003.12 日冠疾患会誌 9:198, 2003

## 学術雑誌、他

1. 村崎かがり、笠貫宏: 本邦における抗凝固、抗血小板療法の実状と将来の展望, ICUとCCU 28(11) 891-896, 2004
2. 村崎かがり:心房細動における血栓塞栓症一わが国における新しいガイドラインの提案する血栓塞栓症予防, 医学のあゆみ 211(13)1117-1120, 2004
3. 笠貫宏、青崎正彦、池田康夫、石丸新、井上博、内山真一郎、小川久雄、川副浩平、米田正始、住吉徹哉、高野照夫、中澤誠、中谷武嗣、野々木宏、堀正二、山口武典、浅野竜太、岩出和徳、上塚芳郎、坂本知浩、佐藤直樹、田上健次郎、恒吉祐史、中居賢司、花谷彰久、八坂正弘、村崎かがり:循環器疾患における抗凝固、抗血小板療法に関するガイドライン Circulation J 68, Suppl. IV,1153-1219, 2004
4. Kimura F, Satoh H, Sakai F, Nishii N, Tohda, J, Fujimura M, Haruta S, Yamazaki K, Endo M, Sakomura Y, Kurosama H, Kasanuki H: Computed tomographic findings of syphilitic aortitis. Cardiovasc Intervent Radiol 2004; 27:179-81.
5. 小林豊, 川合明彦, 盆子原幸宏, 斉藤博之, 石田徹, 青見茂之, 西田博, 遠藤真弘, 黒澤博身:僧帽弁前尖に punched out lesion のみを呈した感染性心内膜炎の1例. 胸部外科. 57; 2004:223-225.
6. 遠藤真弘, 黒澤博身.虚血性心疾患 心室自由壁破裂. 胸部外科. 57; 2004:690-697.
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. Goya N, Ishikawa N, Ito F, Kobayashi C, Tomizawa Y, and Toma H: Transurethral ethanol injection therapy for prostatic hyperplasia: 3-year results. J Urol, 172, 1017-1020, 2004.
13. Tomizawa Y, Aomi S: Deterioration of Suture Materials at Prosthetic-Host Anastomoses, J Artifi Organs, in press
14. Tomizawa Y: Endothelialization and Functional Neointima on Vascular Grafts in Human, Ann Thorac Surg, in press
15. Suzuki H, Murasaki K, Kodama K, Takayama H. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. Br J Haematol 2003; 121:904-12.
16. 東谷迪昭, 村崎かがり, 川名正敏, 上野敦子, 巽藤緒, 高木厚, 春田昭二, 田上憲次郎, 笠貫宏:末梢血白血球,血小板活性化指標より不安定プラークの安定化を評価しえた不安定狭心症, 治療学 37:199-201, 2003



17. 中島雅人, 青見茂之, 野々山真樹, 富岡秀行, 盆子原幸宏, 斉藤博之, 遠藤真弘, 黒澤博身: 胸腹部大動脈瘤人工血管置換術における超低体温循環停止法と常温下手術との比較検討. 胸部外科. 56; 2003:175-182.
18. 富澤康子, 遠藤真弘, 木原信一郎, 斉藤聡, 石戸谷浩, 山寄健二, 青見茂之, 西田博, 黒澤博身, 再手術症例における OPCAB 再冠状動脈再建術 on-pump と off-pump の比較・検討. 胸部外科. 56; 2003:688-693.
19. 原田研介, 加藤裕久, 赤木禎治, 唐澤賢祐, 北村惣一郎, 佐地勉, 鈴木淳子, 馬場清, 藤原久義, 鮎沢衛, 岡田知雄, 小川俊一, 荻野廣太郎, 西垣和彦, 遠藤真弘, 尾内善四郎, 中澤誠, 山口徹, 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(2001-2002 年度合同研究班報告) 川崎病心臓血管後遺症の診断と治療に関するガイドライン. Circulation Journal. 67; Suppl. IV, 2003:1111-1173.
20. 吉田聡美, 青見茂之, 小澤英樹, 前田朋大, 川合明彦, 西田博, 遠藤真弘, 小柳仁, Kommerell 憩室, 左鎖骨下動脈起始異常を合併した右側大動脈弓に対して大動脈弓部全置換術を施行した 1 例. 胸部外科. 56; 2003:403-405.
21. 山崎暁, 青見茂之, 野々山真樹, 富岡秀行, 山寄健二, 川合明彦, 西田博, 遠藤真弘, 黒澤博身, 両側内頸動脈狭窄を伴った遠位弓部大動脈瘤に対し上行及び弓部大動脈置換術を施行した 1 例. 日本心臓血管外科学会雑誌. 32; 2003:307-310
22. 西田博, 富澤康子, 遠藤真弘, 黒澤博身, 吉田悦子, 大橋靖雄, 【21 世紀初頭の循環器医療を取り巻く社会的諸問題 専門医制度 義務化研修を控えて】 心臓血管外科 心臓血管外科の医療経済. Cardiovascular Med-Surg. 5; 2003:317-330.
23. 西田博, 遠藤真弘, 黒澤博身: 補助循環. Mebio. 20; 2003:92-101.
24. 西田博, 黒澤博身, 遠藤真弘. 心筋梗塞の臨床 急性心筋梗塞 緊急冠状動脈バイパス術の適応とその実際. 日本臨床. 61 増刊; 2003:569-575.
25. 西田博, 黒澤博身, 遠藤真弘. 心筋梗塞の臨床 急性心筋梗塞 重篤合併症と治療法の進歩 急性心筋梗塞の重篤合併症の緊急外科手術. 日本臨床. 61 増刊; 2003:511-519.
26. 西田博, 黒澤博身, 遠藤真弘, et al. Coronary intervention の進歩 冠動脈バイパス術 緊急 CABG の適応. 日本臨床. 61 増刊; 2003:612-617.
27. 西田博, 黒澤博身, 遠藤真弘. Coronary intervention の進歩 冠動脈形成術 レーザー心筋血行再建術. 日本臨床. 61 増刊; 2003:549-557.
28. 許俊鋭, 安倍十三夫, 上田裕一, 遠藤真弘, 黒澤博身, 末田泰二郎, 高本眞一, 田林暁一, 松田暉, 安井久喬, 秋元弘治, 今中和人, 渡橋和政, 小松幹志, 小山勇, 澤芳樹, 高木靖, 西田博, 野村実, 益田宗孝, 宮田哲郎, 森田紀代造, 師田哲郎, 今関隆雄, 川副浩平, 北島顕, 畔政和, 森下靖雄, 山本文雄, 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(2001-2002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; 2003:1175-1259.
29. 遠藤真弘. 「左冠動脈閉鎖症の 1 例」江口太助氏らの論文に対するコメント. 心臓. 35; 2003:830-831.
30. 遠藤真弘, 富澤康子. CABG の新しいスタンダード. 医学のあゆみ. 205; 2003:678-682.
31. 遠藤真弘, 富澤康子, 西田博. 血管新生・再建療法 血管新生療法(レーザー心筋血行再建術). 日本臨床. 61 増刊; 2003:704-706.
32. 遠藤真弘, 富澤康子, 西田博, et al. 狭心症の臨床 冠血行再建術:適応,術式の選択,遠隔成績. 日本臨床. 61 増刊; 2003:105-117.

33. 遠藤真弘, 増刊. Coronary intervention の進歩 冠動脈バイパス術 CABG 世界の動向と我が国の現状. 日本臨床. 61 増刊; 2003:558-566.
34. 遠藤真弘. Coronary intervention の進歩 冠動脈形成術 直視下経管的冠動脈形成術. 日本臨床. 61 増刊; 2003:534-539.
35. 遠藤真弘, 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 【OPCAB 2003 年】 OPCAB の手術戦略 冠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; 2003:619-625.
36. 関口守衛, 遠藤真弘, 蘇欣, 矢崎善一, 阿部一彦, 長尾博明. 慢性虚血心筋細胞は再生できるのか? 心筋梗塞後心室瘤心筋の半定量的ないし定量的電顕的観察から. Therapeutic Research. 24; 2003:210-216.
37. 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, 心臓血管外科(5), Cardiovascular Med-Surg 5:317-330, 2003
38. 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
39. Tomizawa Y. Vascular grafts: basic research and clinical applications. In: Tura A, ed. Vascular grafts: Experiment and modelling. in . 34. International Series on Advances in fluid mechanics. Southampton: WIT press, 2003:1-39.
40. 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
41. 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
42. 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, 2003; 125: 570-7
43. 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.
44. 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.
45. Uchikawa S, Aomi S, Kawai A, et al. Left ventricular mass index reduction early after an isolated aortic valve replacement with St. Jude Medical 19A-HP. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 51:361-7.
46. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes. Circulation 2003; 108:1343-9.
47. 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
48. 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
49. 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
50. 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



## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学循環器内科 村崎 かがり

### 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局限しており、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の評価したが、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。以上から明らかのように、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命的でないため、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、体重が増加せずに死亡する。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 年度の 2 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が伊能が向上。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として、循環器内科領域にて重要なテーマである血栓症、抗凝固療法、喫煙等の影響を主にとりあげ、『心血管疾患に伴う急性肺血栓塞栓症の臨床的凝血学的検討』、『喫煙が冠疾患に及ぼす影響』を示した。ヒト血小板のグリコプロテイン IV について『Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation』、日本人の

人工弁症例における抗凝固療法について 多く、さらに研究を進めていきたい。

『Optimal therapeutic range for oral anticoagulants in Japanese patients with prosthetic heart valves: a preliminary report from a single institution using conversion from thrombotest to PT-INR』を示した。

急性冠症候群でプラーク安定化の治療効果の判定について末梢白血球、血小板活性化指標が有用な指標となった症例を『末梢白血球,血小板活性化指標より不安定プラークの安定化を評価しえた不安定狭心症』で示し、不安定狭心症において血小板と好中球の活性がC反応タンパク(CRP)に比べてより鋭敏な指標となり得ることを、『急性冠症候群における炎症の関与』で示した。また、プラーク内炎症性病変が慢性狭窄に与える影響について『採取された冠動脈組織からみた細胞動態-急性冠症候群と再狭窄病変における炎症細胞の重要性-』に示した。

さらに、共同研究者が心臓血管外科医であることから本邦においての動脈グラフトを使用した冠動脈バイパス術の成績を『Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass graftingSuperiority of bilateral internal thoracic artery grafting』にて示した。また糖尿病症例における冠動脈バイパス術の成績を『Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes』しめした。大動脈炎症候群は本邦に多くみられるが、冠動脈病変を合併した症例の病変形態および部位を検討し『Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis』に示した。

人工臓器領域の中から人工血管を選択し、最近の動きについて『人工血管-この1年の進歩』にて示した。

## まとめ

この度は『心臓血管系ノックアウトマウス(hesr)における心機能評価と心不全発症機構解明』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

### **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 is 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 the 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



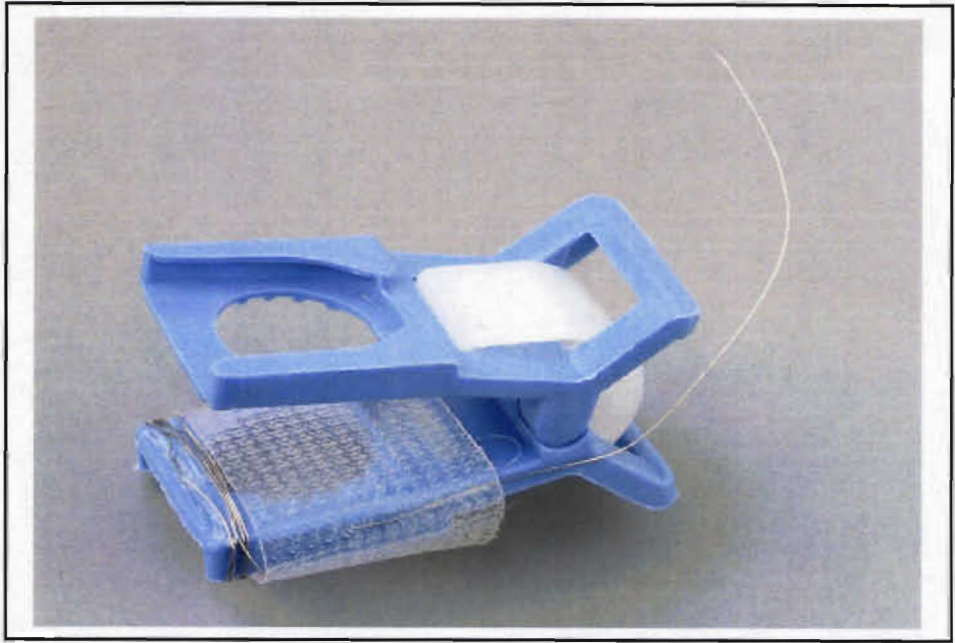


図3 脳波用耳クリップにタングステンワイヤーを巻いた電極

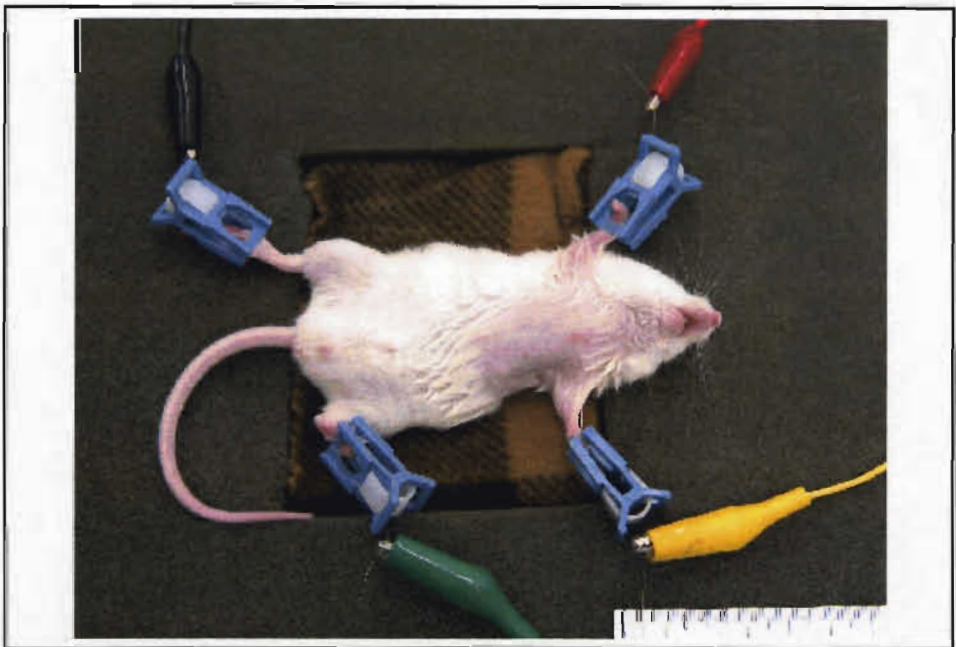


図4 Adultマウスの心電図をとっているところ



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

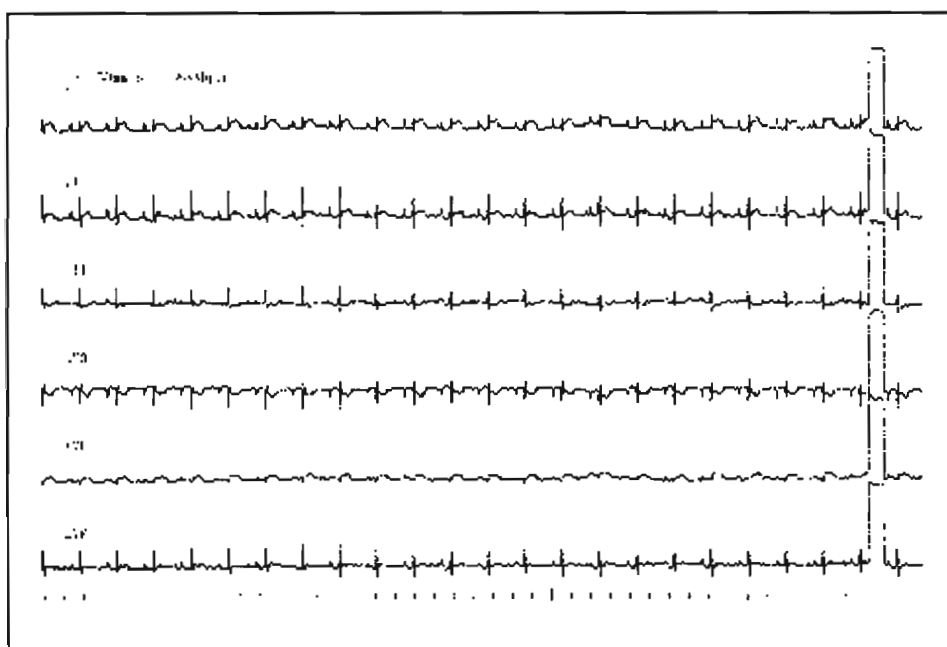


図6 Baby マウスの心電図 (50 mm/sec)

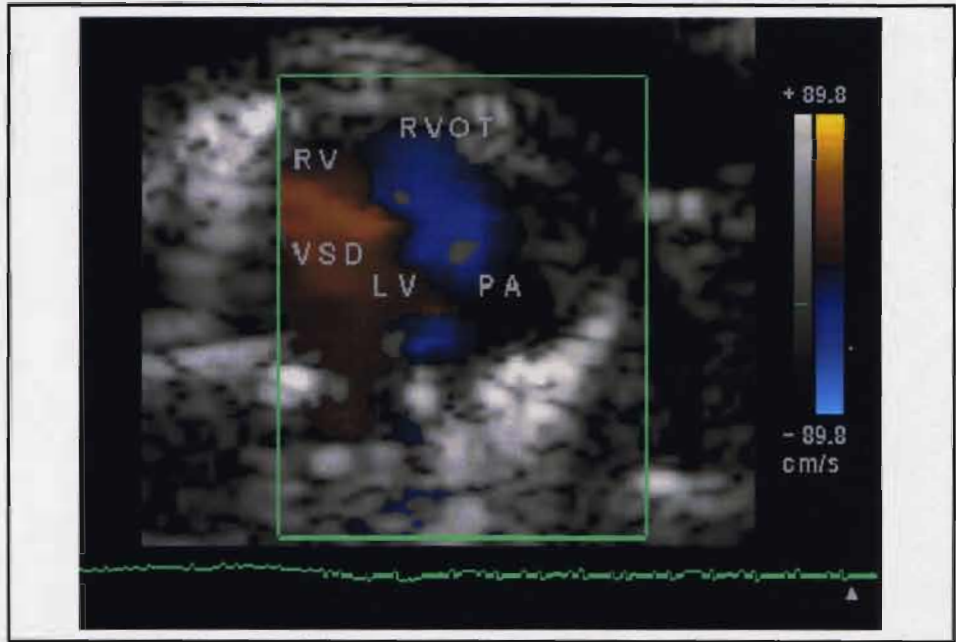


図7 生後5日目のhesr2ノックアウトホモマウスにてVSDが診断された

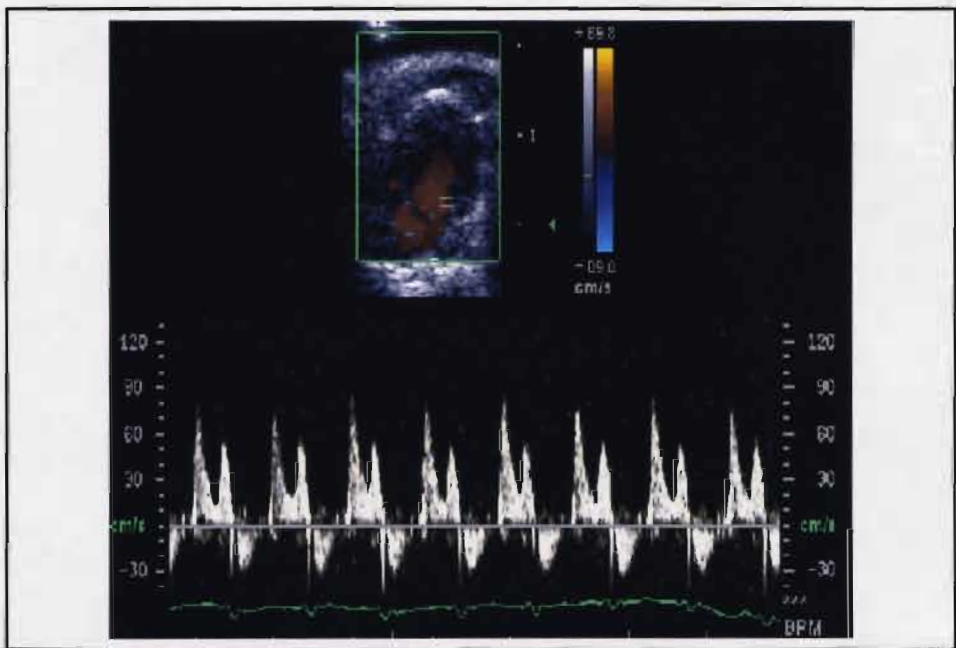


図8 Adultのhesr2ノックアウトホモマウスでの左室流入血流

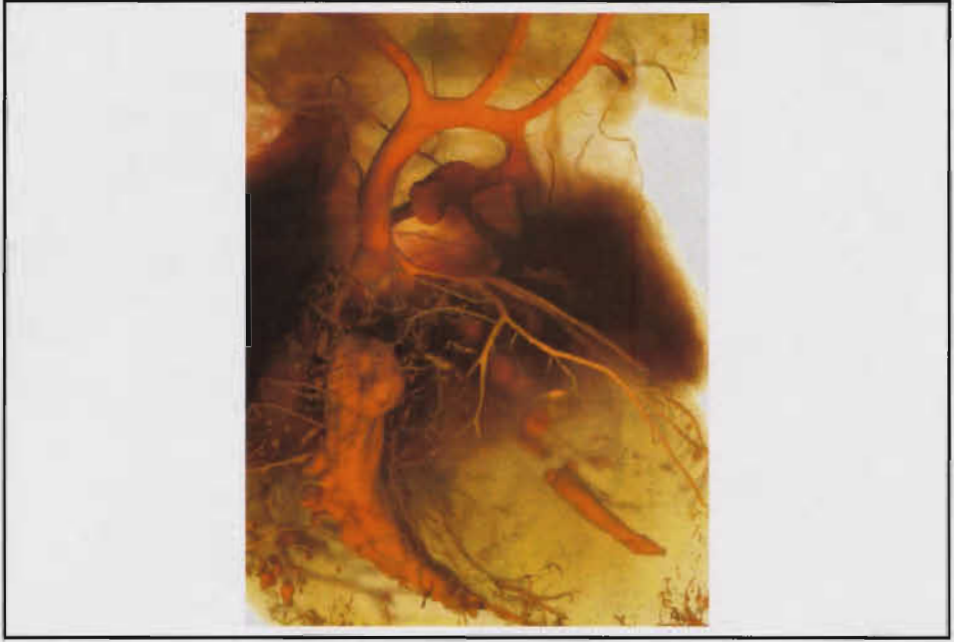


図9 マイクロフィルを注入した大血管と心臓 PDAが大動脈側から収縮しているのがわかる

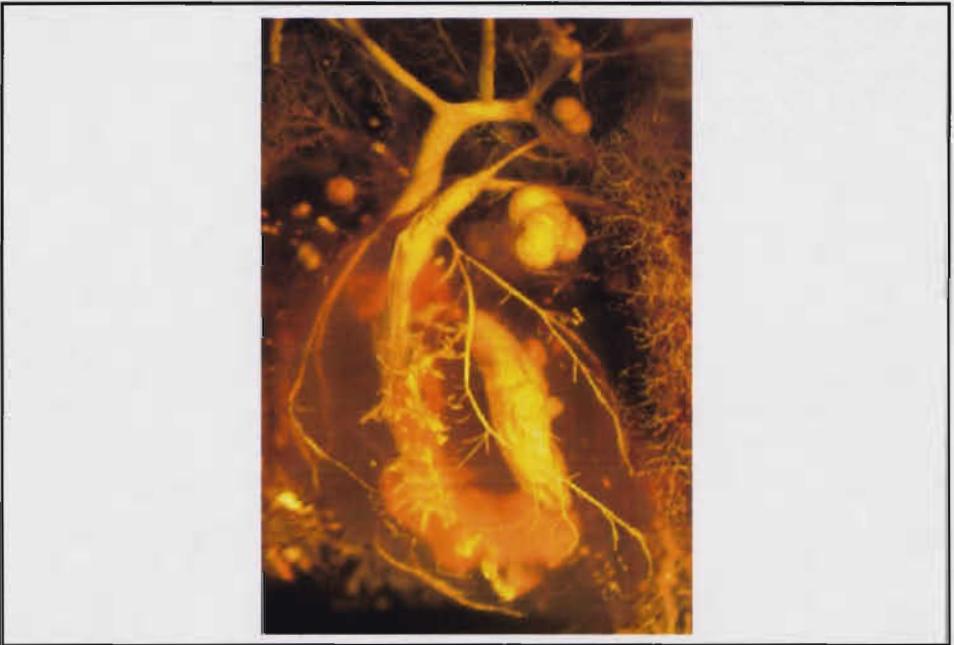


図10 マイクロフィルを注入した大血管と心臓 PDAが収縮傾向にあるのがわかる

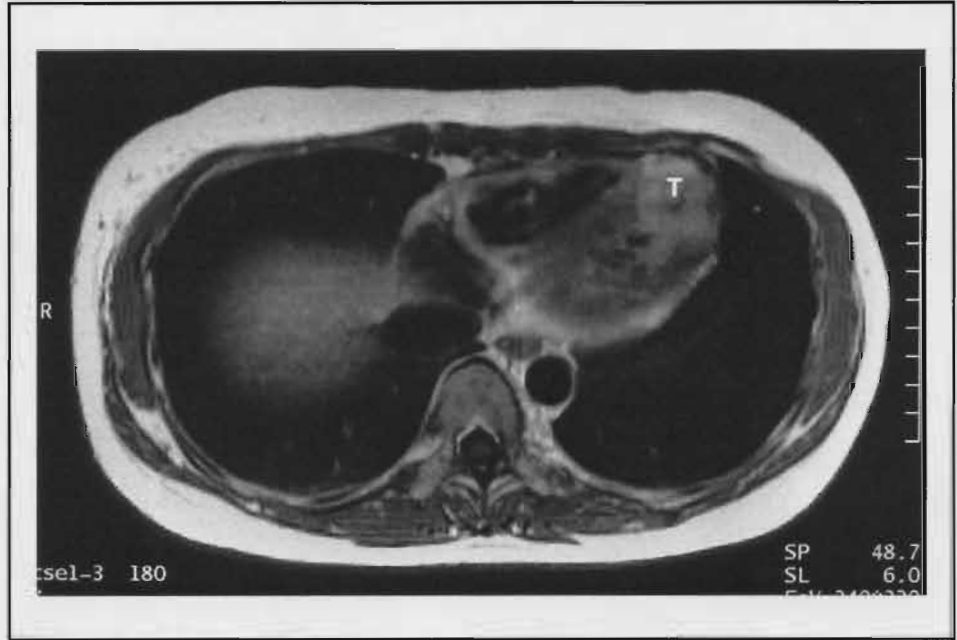


図1 CT所見  
心尖に腫瘍(T)が観察される。

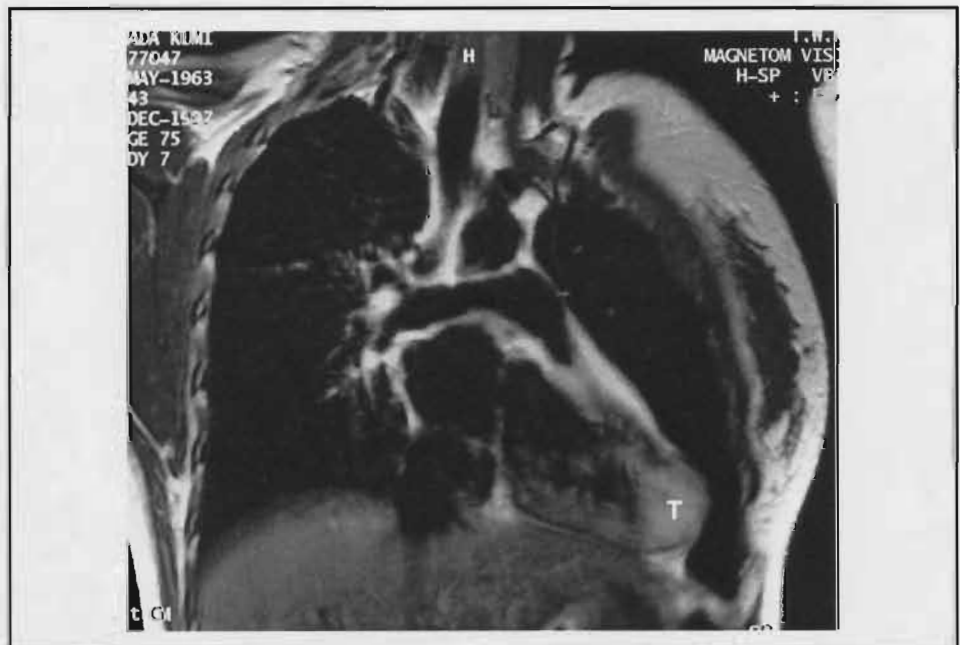


図2 MRI所見  
心尖に腫瘍(T)が観察される。



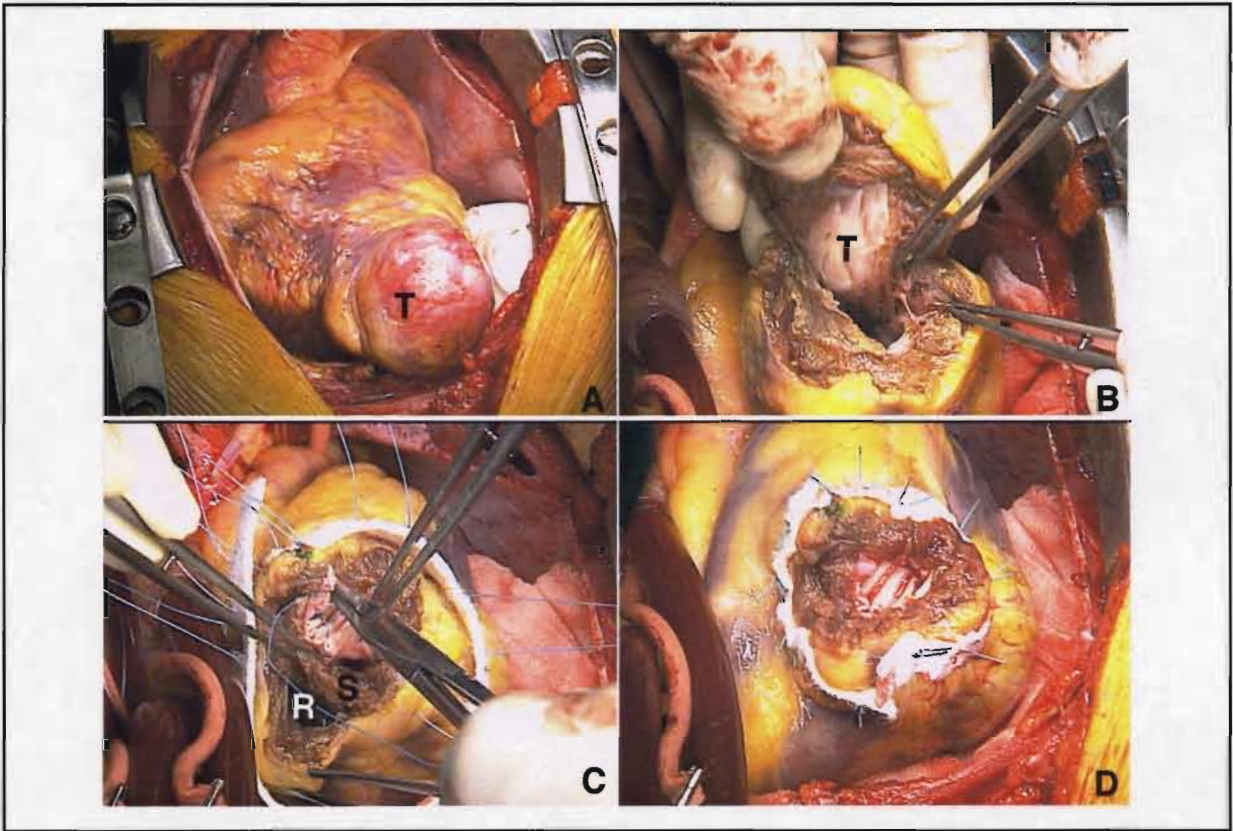


図3 術中写真 (論文中のFig. 1)

- A. 心尖にあるある腫瘍(T)
- B. 左室腔(L)側の腫瘍(T)は白色
- C. 短冊状のフェルトを持ちいた。パッチから中隔(S)へ針をとおす。右室腔(R)が見える
- D. 完成した心尖



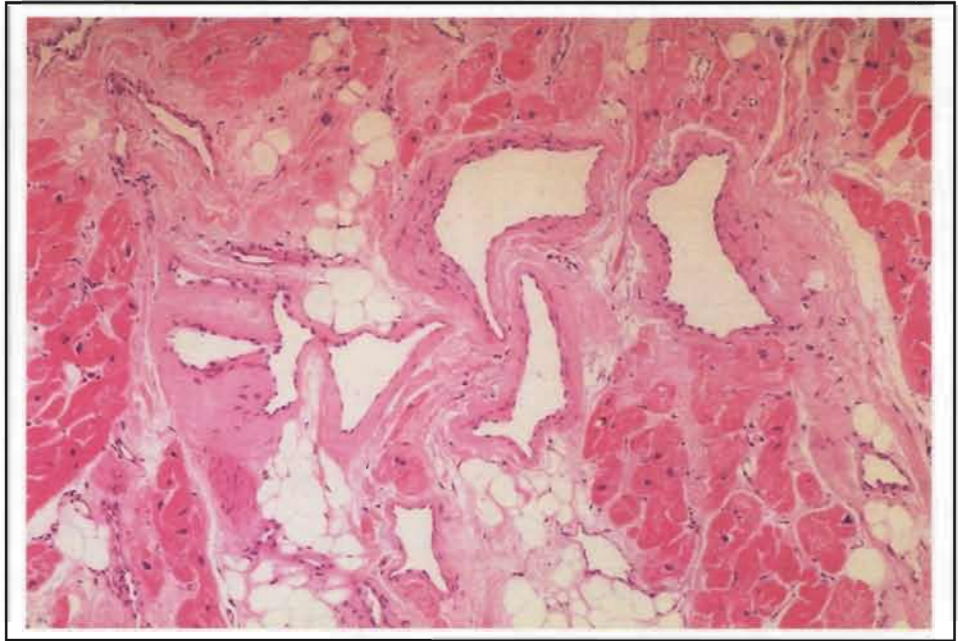


図4 血管腫の組織学的検討  
血管腔が著しい。  
(ハマトキシリン-エオシン染色)

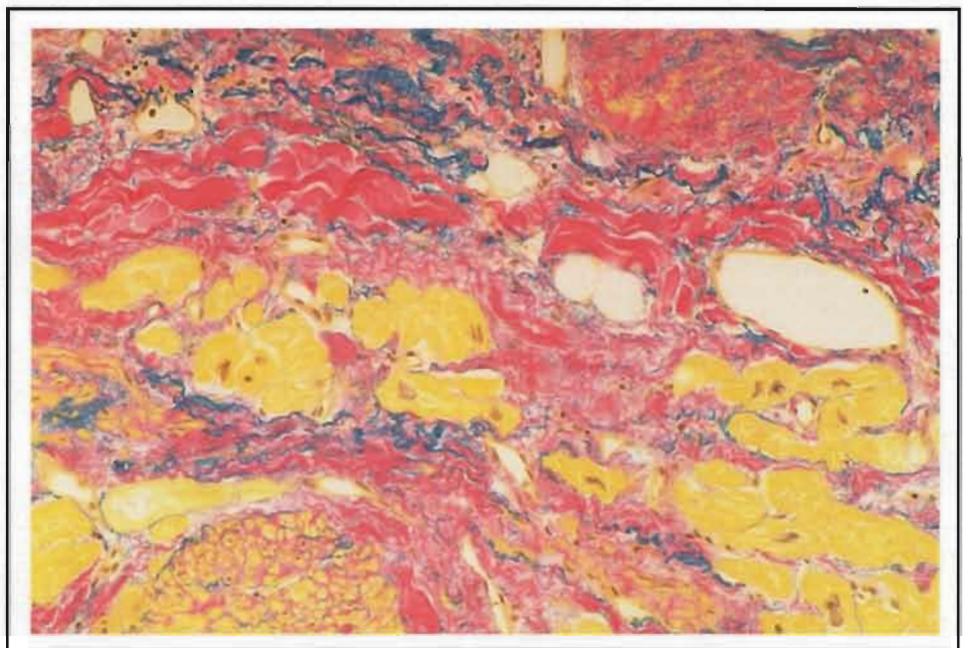


図5 摘出血管腫の組織学的検討  
筋線維、脂肪、血管、弾性線維等が観察される。  
(ビクトリア-ブルー染色)