

SPring-8 高輝度放射光画像による 小動物の心・血管機能の in vivo 解析



白井 幹康
Shirai Mikiyasu
(国立循環器病研究センター
研究所 心臓生理機能部)



八木 直人
Yagi Naoto
(高輝度光科学研究センター (SPring-8) JASRI)



梅谷 啓二
Umetani Keiji

1 はじめに

近年の分子生物学の発展により、生体を構築する種々の細胞の特性が、遺伝子・分子レベルで次々に明らかにされてきた。他方、このような要素的知識が蓄積するにつれ、これらを統合して生体を有機的にとらえる研究が益々重要となっている。

マウスなどの小動物は、遺伝子導入や欠損などの遺伝子操作技術が確立し、また、短期間での病態モデル作成が容易であることから、要素的知識を個体レベルに還元して検証する研究において重要な位置を占めている。しかし、小動物において、循環調節に直結する心筋機能や脳、心臓、肺、腎などの血管機能の in vivo 解析は決して容易とはいえない。

本稿では、筆者らが進めてきた SPring-8 高輝度放射光による麻酔下小動物での心・血管運動機能の解析法を紹介する。1つ目は、X線散乱を利用した心筋 X線回折法である。心臓収縮の力の源となる心筋収縮たんぱく質分子の動態が、心室の任意な心筋部位で評価できる。2つ目は、X線吸収を利用した高解像度微小血管造影法である。固定臓器の微小血管（内径 $\sim 30 \mu\text{m}$ ）はもちろん、高心拍数のマウス心臓の冠微小動脈（内径 $\sim 50 \mu\text{m}$ ）も観察可能である。

これらの方法の原理と応用例について概説する。

2 心筋 X線回折法の in vivo 心臓への応用

心ポンプ機能障害の基本病態は心筋収縮能、弛緩能の低下であるが、これまでの研究では、心筋収縮たんぱく質の機能がどのように障害され、さらにその障害が心室筋にどのように広がり不全心へと進展するののかというナノからマクロレベルへのダイナミックな知見は捉えることはできなかった。

筆者らは、放射光 X線回折法を麻酔下小動物の拍動心臓に応用することにより、アクチン・ミオシン相互作用と筋フィラメント格子間隔の変化を心室壁の多点で in vivo 解析することに初めて成功した^{1,2)}。

2.1 心筋収縮たんぱく質の六角格子構造から X線回折像が得られる

心筋細胞内ではミオシンフィラメントとアクチンフィラメントがそれぞれ重合して筋の機能的最小単位である筋節（長さ $1.7\sim 2.2 \mu\text{m}$ ）を構成し、筋節が鎖のように一列に並んで筋原線維を作る（図 1A）。筋節構造の A 帯部分の横断面は図 1B のような六角格子構造を形成し、収縮時にはミオシン頭部がアクチン側へ移動し

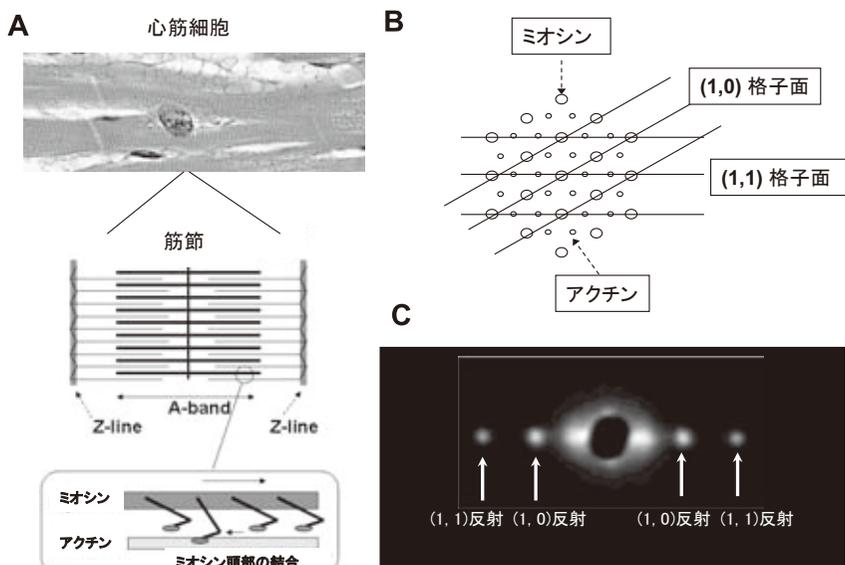


図1 心筋収縮たんぱく質分子の六角格子状配列とそのX線回折像

アクチンとの相互作用により強い結合（クロスブリッジ）を作ることによって力を発生する（図1A）。六角格子構造には幾つかのミオシンやアクチンを通る平行な直線を引くことができ、このような直線は筋原線維の中では面として表され、格子面と呼ばれる（図1B）。格子面にはミオシンだけが配列する(1,0)格子面とミオシンとアクチンが配列する(1,1)格子面がある（図1B）。格子間隔は40nm前後であるので、クロスブリッジ動態は光学顕微鏡（可視光の波長400~680nm）では到底観察できない。つまり、この格子間隔より短い波長の光（サブnmの波長を持つX線）を使う必要がある。

ラット右心室乳頭筋にその長軸に垂直なX線を照射すると、アクチン・ミオシンの規則的な構造によって、散乱X線は干渉し回折像を作る（図1C）。この回折像は心筋の長軸及びX線に垂直な方向に観察され、赤道反射と呼ばれる。赤道反射は内側と外側のスポットペアとして現れ、内側を(1,0)反射、外側を(1,1)反射と呼ぶ（図1C）。(1,0)反射は(1,0)格子面に、(1,1)反射は(1,1)格子面に由来する。

回折像の中心から(1,0)反射までの距離を用いてミオシンフィラメント格子間隔($d_{1,0}$)を求めると約36~40nmであり、この格子間隔は筋節長が伸ばされると短縮する²⁾。

筋収縮時、ミオシン頭部はアクチン側へ移動・結合する。この移動・結合は、図1Bで示したように、ミオシンだけで構成された(1,0)格子面からミオシンとアクチンで構成された(1,1)格子面への電子密度の移動を意味し、X線回折像では(1,0)反射の輝度($I_{1,0}$)の低下と(1,1)反射の輝度($I_{1,1}$)の増加として現れる（図2）。しかし、収縮に伴いX線が通過する心筋部位も変化し、X線が通過した筋量の変化によって反射の輝度も影響を受ける³⁾。これを補正するために、(1,0)反射と(1,1)反射の輝度の比、 $I_{1,0}/I_{1,1}$ を用いて規格化することで、ミオシン頭部の移動の評価が可能となる。 $I_{1,0}/I_{1,1}$ は、収縮時のミオシン頭部の移動により低下する。また、その移動数が多いほどより低値となる²⁾。

2.2 麻酔下ラット拍動心臓でのクロスブリッジ動態の解析

人工呼吸下に開胸して、左心室壁に準単色放

射光（波長 0.08 nm, ビーム直径 0.2 mm (horizontal) × 0.1 mm (vertical)) を直接照射した。また、左心室の圧-容積関係を同時に記録した。

高血圧自然発症ラット（生後 5 か月）の肥大した心臓で、左心室前壁と後壁の $I_{1,0}/I_{1,1}$ を約 10 心拍ほど連続記録した。左心室圧と左心室容積も同時に記録した（図 3）。後壁では、 $I_{1,0}/I_{1,1}$ は心収縮・拡張に一致して周期的に減少・増大した。しかし、前壁では、 $I_{1,0}/I_{1,1}$ の周期的な変化は完全に消失していた。この結果は、高血圧

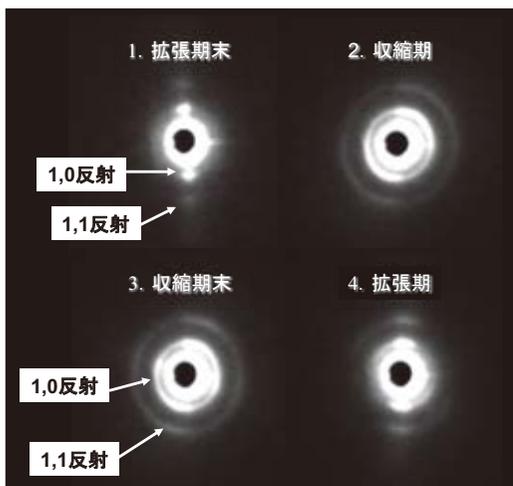


図 2 ラット心臓の左心室壁から得られた収縮・拡張期の X 線回折像

性心臓では、心筋肥大は心室全体にほぼ均一に進展するが、たんぱく質機能障害の進展強度は均一ではなく、心筋局所ごとに大きな差があることを示している。

Streptozotocin (STZ) の注射で作製した初期糖尿病モデルラット（注射 2 週間後）において、左心室前壁の心外膜下層、中層及び心内膜下層の $I_{1,0}/I_{1,1}$ を約 15 心拍ほど連続解析した⁴⁾（図 4）。正常ラットでは、これら 3 つの心筋層の $I_{1,0}/I_{1,1}$ の周期的変化に大きな差はなかった。しかし、STZ ラットでは、周期性に異常はなかったが、拡張期末の $I_{1,0}/I_{1,1}$ が正常と比べて高レベルを示し、そのレベルは心外膜から内膜側に進むにつれてより高値となった。これは、糖尿病心筋症の初期から、拡張期末でのミオシン頭部のアクチンへの結合数は減少しており、その減少は内膜側ほど顕著であることを示唆する。

以上のように本法を使えば、病的心室における収縮たんぱく質機能異常の程度が、心室壁の異なる部位間（前壁と後壁間や心基部と心尖部間など）のみならず、同部位でも異なる心筋層間（外、中、内層間）で比較でき、心室での心筋機能異常の詳細な分布を知ることができる。

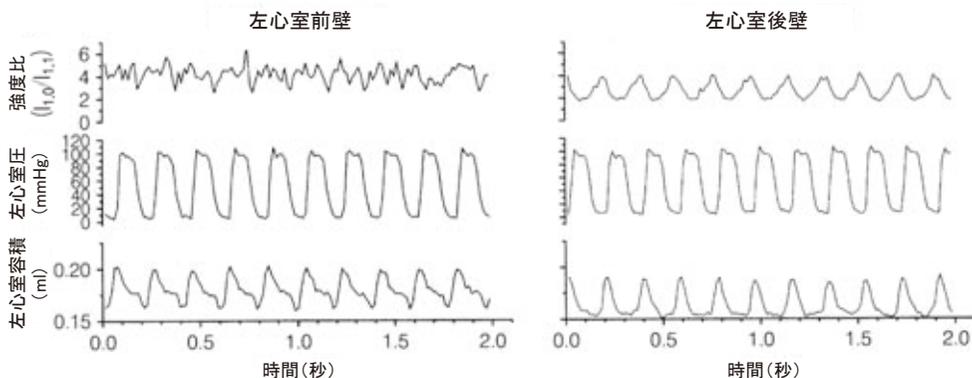


図 3 高血圧自然発症ラットの肥大心臓の左心室前壁（左図）と後壁（右図）間における $I_{1,0}/I_{1,1}$ 変動の差異
左心室圧と左心室容積を同時記録

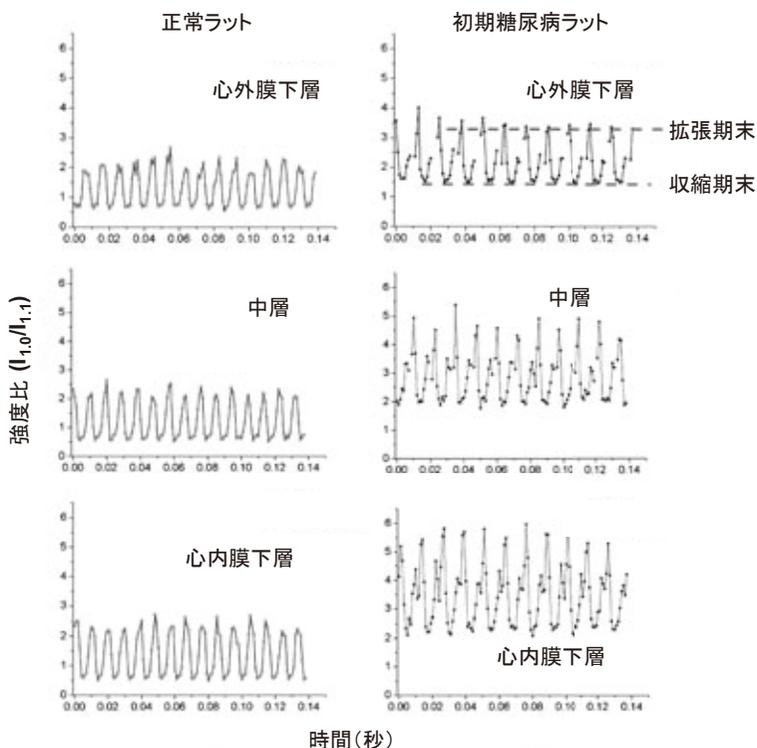


図4 STZ糖尿病ラット(右図)の左心室の異なる心筋層間における $I_{1,0}/I_{1,1}$ 変動の差異
正常ラット(左図)と比較

3 高解像度微小血管造影法の生体血管系への応用：血管ネットワークの形態・機能並びに血管新生を可視化

従来、小動物の臓器血管応答は、主に血圧-流量関係などから間接的に推定されてきた。直接的な計測法として生体顕微鏡システムや血管の切り出し標本があるが、脳、心臓、腎臓といった実質臓器の内部を走行する血管、特に抵抗血管である細動脈の応答を生理的に捉えることは極めて困難であった。

筆者らは、X線の優れた臓器透過性を活かした独自のX線テレビシステムを25年前に開発して以来、麻酔下動物の肺循環を中心に血管造影を行い、大血管から小血管(内径 $100\ \mu\text{m}$ <)までの収縮・拡張機構を研究してきた^{5,6)}。約10年前から、SPring-8放射光を用いた高解像度微小血管造影法の麻酔下動物への応用に取り

組み、最近、麻酔下マウスの種々の臓器での微小血管造影を可能とした。この方法の最大のメリットは、心臓、肺のように周期的に動く臓器の微小血管(内径 $\sim 50\ \mu\text{m}$)を、開胸することなく鮮明に撮影できることである^{2,7)}。デメリットは、撮像範囲が1cm四方以下で小さいということであるが、マウスなどの小動物を用いれば、脳や心臓の全血管樹を一視野に入れることが可能である。

3.1 放射光高解像度微小血管造影法の原理と特徴

SPring-8放射光の主な特徴は、1) 高輝度である、2) 指向性が良い、3) 波長選択性があることである。高解像度微小血管造影法はこの特徴を利用した高時間・空間分解能造影法である^{2,7)}(図5)。具体的には、優れた指向性は半陰影の最小化によって高空間分解能を可能とす

る。優れた波長選択性はヨード造影剤のX線吸収が特異的に高まるエネルギーへの単色化を可能とし、高濃度分解能を実現する。また、本法では、対象物の動きに伴う画像のブレを最小化するため、高速メカニカルシャッターによってビデオ信号に同期したパルスX線（パルス幅は0~7 msの範囲で設定可能）を発生させるが、このパルス化後も撮影に必要な光子数が確保できるのは高輝度という特性のおかげである^{2,7)}。

撮像デバイスは1インチX線直接変換型撮像管サチコンである。このカメラの標準モードではX線視野は9.5×9.5 mm, 1,024×1,024画素読み出しでX線画像での解像度は1画素サイズと同じ約10 μmである。ズームモードでは視野6.9×6.9 mmで、解像度は約7 μmである。撮影速度は30 frames/sである²⁾。

3.2 麻酔下小動物での微小血管撮影

動的臓器である心臓と肺の微小血管造影例を示す。造影剤注入用カテーテルは、冠動脈造影では、右総頸動脈から挿入し、その先端がバルサルバ洞に位置するように固定した。肺動脈造影では、右外頸静脈から右心室まで挿入し固定した。造影剤にはイオメロン350（エーザイ（株））を用いた。

内因性一酸化窒素（NO）の合成酵素阻害剤（L-NAME）の効果を、STZで作製した初期糖尿病ラットと正常ラットで比較した（図6）。正常ラット（上図）では、比較的太い血管を中心に、均一な弱い収縮が起こった。しかし、糖尿病ラット（下図）では、血管分岐部に限局した異常な強収縮が生じた（矢印）。この限局性強収縮は血管造影でしか捉えることができない重要所見で、糖尿病後期では限局性は

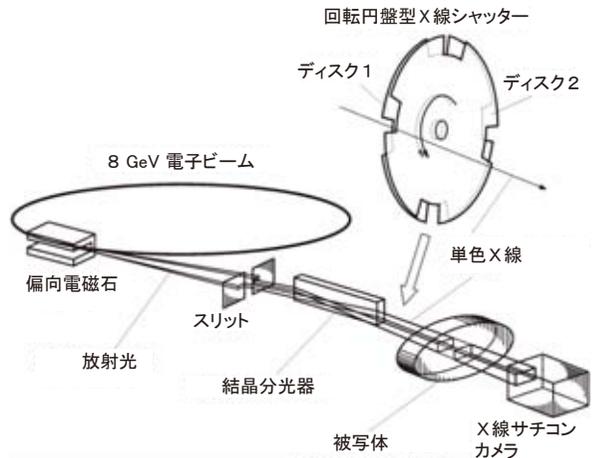


図5 放射光高解像度微小血管造影装置の概要

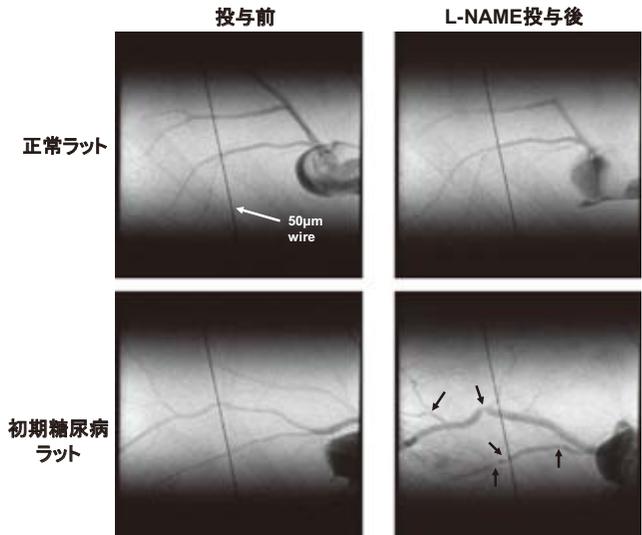


図6 初期糖尿病ラットでは冠動脈機能異常は不均一に進展する血管分岐部に限局した異常収縮を示す（矢印）

消失し、均一な広範囲血管の強収縮に転じた。この所見から、糖尿病時の血管機能障害は、まず血管分岐部から生じ、その後広範囲の血管セグメントに広がる可能性が示唆された⁸⁾。

アドレノメデュリン（AM）の虚血心臓での血管新生効果を評価した（図7）。虚血再灌流後、AMを3日間持続皮下注入したラット（下図）と無治療の対照ラット（上図）で、内皮依

存性血管拡張物質、アセチルコリン（ACh）投与前後の冠微小血管造影を行った。ACh投与

前の血管径と血管数は、対照よりAM注入ラットの方が大であった。AChに対して、対照では異常な血管収縮（米印）が起こったが、AM注入ラットでは正常な拡張応答（矢印）が起こった。この結果より、AMは冠血管新生を促進するだけでなく、大小冠動脈の内皮機能を改善することが判明した²⁾。

最近では、マウス冠微小動脈造影も可能となった²⁾。図8A、BはAChに対する応答例である。本管から細動脈（内径50 μ m）レベルまでの血管応答が鮮明に映し出されている。マウスの右心室・肺循環系の可視化にも成功した²⁾（図8C）。対象が小さい

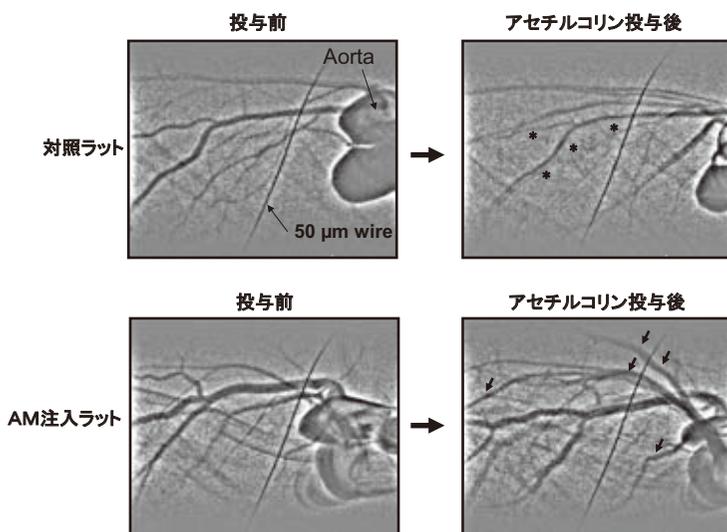


図7 アドレノメデュリン（AM）はラット心臓虚血再灌流後の冠動脈内皮機能を改善する

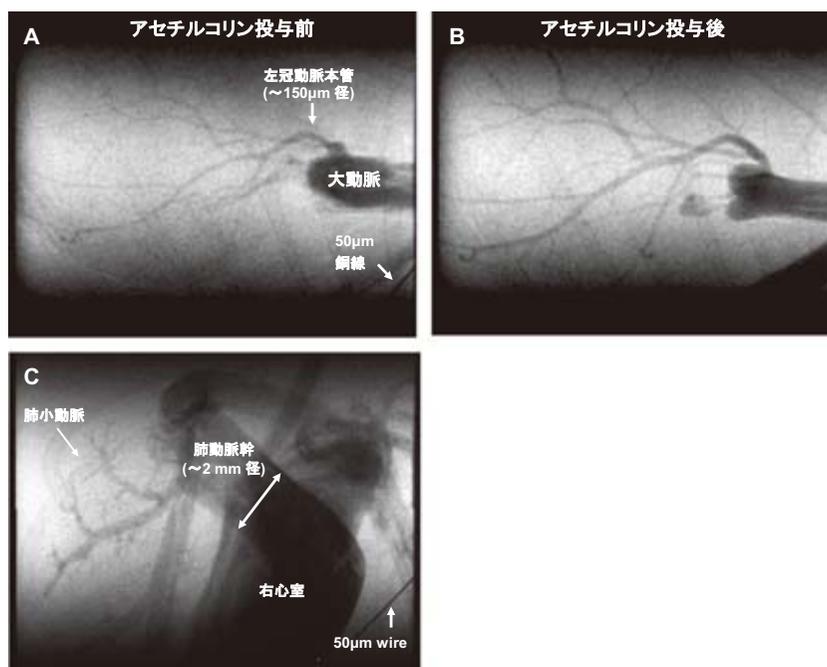


図8 麻酔下のマウス（心拍数 \sim 500拍/分）で可視化した冠動脈（A,B）と右心室から肺動脈（C）

ので、右心室から肺動脈幹、肺葉動脈、肺小動脈、肺静脈、左心房までの形態並びに造影剤移動時間が同一視野で観察できた。これらの造影技術の遺伝子改変マウスへの応用が期待される。

その他、本微小血管造影法を用いて、脳幹の心血管運動中枢の微小循環調節機構、腎臓循環調節機構及び下肢虚血における血管新生機構などの研究を進めている^{2,7)}。

4 おわりに

現在、心筋収縮たんぱく質の分子動態を丸ごと心臓から非侵襲的にリアルタイム計測できる手法は、放射光 X 線回折法以外にはない。この方法は、心室壁の心筋収縮たんぱく質機能のピンポイント (0.2×0.1 mm) 診断を可能にした。今後、iPS 細胞などによる再生心筋組織の局所的機能評価や、心筋の神経、液性調節分子の解析法とのカップリングによる心筋生理・病態の解明への応用が期待される。

X 線微小血管造影のメリットは、臓器を露出することなく、臓器表層から内層にわたるあるがままの臓器血管ネットワークにおいて、大・小血管の応答を同一画面で計測できることである。また、臓器内の血流分布や循環時間の情報も得ることができる。血管収縮・拡張機構は、臓器間のみならず、臓器内血管系でも大・小血管で異なり、これが血流分布や血圧調節にどのように関わるかは残された重要な研究テーマである。また、臓器障害の機序解明には、血管の構造的、機能的ネットワーク形成と臓器細胞機能との連関の究明が必要である。今後、血管、臓器細胞、更には自律神経、免疫系に関する発生学的情報を取り入れた血管ネットワーク研究がますます重要となるであろう。

SPring-8 放射光を利用したユニークな心臓・血管機能の解析法を紹介した。これらの方法の

小動物心血管病モデルや遺伝子改変マウスへの応用によって、循環器疾患の分子機序解明並びに治療法開発に新しい扉が開かれることを強く期待する。

参考文献

- 1) Pearson, J.T., Shirai, M., Ito, H., *et al.*, In situ measurements of crossbridge dynamics and lattice spacing in rat hearts by X-ray diffraction, *Circulation*, **109**, 2983–2986 (2004)
- 2) Shirai, M., Schwenke, D.O., Tsuchimochi, H., Umetani, K., Yagi, N. and Pearson, J.T., Synchrotron radiation imaging for advancing our understanding of cardiovascular function, *Circ Res*, **112**(1), 209–221 (2013)
- 3) Yagi, N., Shimizu, J., Mohri, S., *et al.*, X-ray diffraction from a left ventricular wall of rat heart, *Biophys J*, **86**, 2286–2294 (2004)
- 4) Jenkins, M.J., Pearson, J.T., Schwenke, D.O., Edgley, A.J., Sonobe, T., Fujii, Y., Ishibashi-Ueda, H., Kelly, D.J., Yagi, N. and Shirai, M., Myosin heads are displaced from actin filaments in the in situ beating rat heart in early diabetes, *Biophys J*, **104**(5), 1065–1072 (2013)
- 5) Shirai, M., Sada, K. and Ninomiya, I., Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats, *J Appl Physiol*, **61**, 440–448 (1986)
- 6) Shirai, M., Shimouchi, A., Pearson, J.T., *et al.*, Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries, *Brit J Pharmacol*, **139**, 899–910 (2003)
- 7) Shirai, M., Schwenke, D.O., Eppel, G.A., *et al.*, Synchrotron-based angiography for investigating regulation of vasomotor function in the microcirculation *in vivo*. (Frontiers in Research Review), *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **36**, 107–116 (2009)
- 8) Jenkins, M.J., Edgley, A.J., Sonobe, T., Umetani, K., Schwenke, D.O., Fujii, Y., Brown, R.D., Kelly, D.J., Shirai, M. and Pearson, J.T., Dynamic synchrotron imaging of diabetic rat coronary microcirculation *in vivo*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **32**(2), 370–377 (2012)