

研究テーマ 心筋形成FESシステム

研究者 田林 暁一 東北大学大学院医学系研究科

委託研究員

フェーズ

平成10年度

(1) 研究の概要

心筋形成術に用いた成犬の広背筋にVEGF（血管内皮増殖因子）産生遺伝子を導入し、新生血管の造成を促した後、電気刺激を加えて収縮力の変化、収縮特性（筋タイプ変換）の変化等を電気生理、免疫組織学、遺伝子工学的手法などを用いて、特にVEGF産生遺伝子を導入しない広背筋と比較検討する。

(2) 研究の目標

成犬を用いた、広背筋形成術の手術手技の確立と、筋組織への遺伝子導入手技の確立。

(3) 実施内容

遺伝子の導入を行っていない雑種成犬を用いた急性実験で、左側広背筋を剥離し、心筋形成術を行った。また、遺伝子導入手技の修得と確立のために、大阪大学医学部、分子病態・栄養制御学講座を訪ね、協力を得た。さらに、成犬のVEGF遺伝子の導入に先立ち、家兎に-galactosidase産生遺伝子を導入し、その手技について検討中である。

(4) 結果

雑種成犬を用いた急性実験では心筋形成術施行については、手技的には問題のないことが確認された。また、大阪大学医学部、分子病態・栄養制御学講座で行っている、マウスに対する遺伝子導入手技は修得し得たが、成犬、家兎などの中型の動物に対しては遺伝子の量や、導入手技の工夫について今後も検討が必要であることが確認された。そこで、まず家兎と発現を確認しやすい-galactosidase産生遺伝子を用いて実験を行い、現在導入を行った細胞に免疫染色をほどこして、効果を確認する作業を進めている。

平成11年度

(1) 研究の概要

Cardiomyoplasty (CMP)は心臓に骨格筋（広背筋）を巻き付けこれを心臓の拍動に同期させ刺激することにより心補助を行う末期的心不全に対する外科治療である。本治療の問題点として骨格筋の疲労によりその補助力が手術後数カ月で減弱することにある。その原因の一つとして、骨格筋の運動量および酸素消費量が増大することによる相対的虚血により骨格筋の繊維化がすることが示唆されている。

一方近年、血管新生因子としての生理的因子としてbasic growth factor (bGF)が注目されている。実験的にもbGFの投与により虚血下肢骨格筋の血流改善効果が報告され(Circula

tion 1996)、また閉塞性動脈硬化症患者への臨床応用も開始された(Lancet 1999)。しかし、bGF投与の問題点は、一回の筋肉内投与ではbGFが血管内に吸収される速度が速いため効果時間が短く、繰り返し静脈内投与するには局所到達量が少ないため投与量が大量となる。そのため我々はdrug delivery system (DDS)の担体としてのゼラチンに注目した。ゼラチンにbGFを浸漬させ、これを除放することにより局所において高濃度のbGF濃度を維持することが可能となる。

(2) 研究目標

本研究では、CMPにおいて広背筋にbasic growth factor (bGF)をゼラチンシートを用いて除放することにより長期間に渡り広背筋の血管新生を促進し、相対的虚血を改善することによりその繊維化を抑制することにある。

(3) 実施内容

CMPに用いた骨格筋の径時的繊維化を検討するために無処置の広背筋を心臓に巻き付け支配神経を刺激するモデルを作成した(無処置群)。具体的には体重10kgのビーグル犬を用い、全身麻酔科に左広背筋を剥離し有茎(血管神経は温存)にて胸腔内に誘導し心室に巻き付け固定した。広背筋茎部にペースメーカーリードを逢着し電気刺激にて広背筋が収縮することを確認しペースメーカージェネレーターを接続し背部皮下に埋め込んだ。手術後2週間後から1分間60回(5ワット)で刺激を開始し、その2週間後から1分間80回で刺激した。

またbGF群を作成した。すなわち実験1時間前にゼラチンシートにbGFを浸漬させCMP作成時に広背筋の心臓と接触する側にシートを逢着した。他の操作は無処置群と同様に行った。

(4) 結果

現在無処置群3頭(作成後4ヶ月2頭、1ヶ月1頭)およびbGF群1頭(作成後1ヶ月)を飼育中である。飼育中の体調不良および死亡は認めていない。

平成12年度

(1) 研究の概要

重症心不全に対する最終的な治療法としては、現在のところ、心臓移植か人工心臓という選択になるが、移植はドナーの存在が前提となり、その数は絶対的に不足している。また、人工心臓の発展はめざましいが、血栓形成や感染症の問題が完全にはクリアされていない。そこで、近年自己骨格筋を用いた循環補助(cardiomyoplasty)が実験的臨床的に試みられるようになった。大きな問題であった骨格筋疲労に関しても、Salmonらにより、低頻度電気刺激が骨格筋繊維を、type2からType1へのtransformationを引き起こすことにより、軽減されることが分かっている。しかしながら、実際に広背筋を用いてcardiomyoplastyを行うと、筋皮弁の端から虚血により繊維化していくことがTangらにより報告されている。さらに、彼等はこの虚血はvasospasmによるものではないことも、証明している。これらを踏まえて、本研究ではcardiomyoplastyによっておこる広背筋フラップの虚血を改善し、繊維化を防止することを目的とする。

(2) 研究目標

広背筋の繊維化が始まる時期を同定し、実験モデルを作成する。

bFGF 投与方法を検討するとともに、微小循環の状態、繊維化阻止の程度、筋肉の収縮力への効果などを検討する。

(3) 実施内容

cardiomyoplasty に用いた広背筋の経時的繊維化を検討するために、無処置の広背筋を心臓に巻き付け、支配神経を刺激するモデルを作成する。体重 10kg のビーグル犬を用いて、全身麻酔下に左広背筋を剥離し、有茎にて胸腔内に誘導し、心室に巻き付ける。広背筋茎部にペースメーカーリードを縫着し、電気刺激にて広背筋が収縮することを確認したのち、ペースメーカージェネレーターを接続し、皮下に埋め込む。手術後 2 週間の vascular delay period の後、1 分間 60 回（5 ワット）で刺激を開始、その 2 週間後から 1 分間 80 回で刺激する。刺激期間 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月のコントロールを完成させ、繊維化の状態について、組織学的に検索し、繊維化の前段階の脂肪変性の始まる時期を確認する。（H-E 染色）。

次に、cardiomyoplasty のみの群、cardiomyoplasty+bFGF のみ投与群、cardiomyoplasty+bFGF+ゼラチン投与群を作成する。bFGF のみ投与群は cardiomyoplasty 時に 100 μ g を 10ml の生食に溶解して、広背筋の辺縁 10 箇所筋に筋肉注射する。bFGF+ゼラチン投与群は、同じく cardiomyoplasty 時に、bFGF（100 μ g）を含有させたゼラチン粒子を広背筋に筋肉注射する。全体として、cardiomyoplasty のみ 5 頭、cardiomyoplasty+bFGF のみ投与群 5 頭、cardiomyoplasty+bFGF+ゼラチン群 5 頭を作成する。各々、前述の脂肪変性の起こる時期に屠殺し、対側をコントロールと、以下の検討を行う。

イ H-E 染色にて脂肪変性を調べる。

ロ 加速度センサーを用いて広背筋の収縮力を測定する。

ハ レーザードップラー血流計を用いて、微小循環を検出する。

(4) 結果

刺激開始から 2 ヶ月で脂肪変性が始まり、4 ヶ月で繊維化が始まり、6 ヶ月で繊維化がほぼ完成することを H-E 染色で確認した。これにより、屠殺時期を刺激開始後 2 ヶ月と決定した。

処置した広背筋の収縮加速度及び末梢循環血液量の、対側をコントロールとしたときの割合（平均）

	Cardiomyoplasty のみ	Cardiomyoplasty+bFGF	Cardiomyoplasty+bFGF+ゼラチン
加速度	82.3%	90.5%	84.6%
末梢血液循環量	13.1%	56.2%	100%

以上より、bFGFはゼラチン粒子から徐放させたほうが、直接筋肉に投与するよりも、末梢循環血液量を増加させると結論付ける事ができるが、加速度に関しては、3群で有意差はでなかった。

2 フェーズ以降

今回は脂肪変性する時点で犠牲死させ測定したが、広背筋の収縮力が落ちる時点で測定すれば、加速度も有意差が出る可能性がある。したがって、次回は完全に繊維化する6ヶ月の時点で測定することとする。また、bFGFで血管新生がおきることは既に証明されているが、その程度の評価は難しく、また繊維化についても評価基準が定まっていない。そこで新たに、定量RT-PCRによる評価法を導入し、mRNAレベルでの評価を試みる。これにより、血管新生と繊維化、及び筋肉の収縮力の関係を定量的に明らかにし、同時にゼラチン粒子によるbFGFの徐放の有用性を証明する。