

二種の標識薬剤を用いた心筋機能評価法の開発
およびその心疾患への応用

【 課題番号 16590107 】

平成 16 年度 - 平成 17 年度 科学研究費補助金

基盤研究 (C) 研究成果報告書

新潟大学附属図書館



2060005705

平成 18 年 3 月
研究代表者 高橋俊博
(新潟大学 医歯学系 教授)

205
No.3
2024-05

はしがき

研究組織

- 研究代表者：高橋俊博（新潟大学 医歯学系 教授）
研究分担者：渡辺賢一（新潟薬科大学 臨床薬理学教室 教授）
研究分担者：内藤 眞（新潟大学 医歯学系 教授）
研究分担者：泉川卓司（新潟大学 アイソトープ総合センター 助教授）
- 研究協力者：太刀川仁（新潟大学 医歯学系）
研究協力者：小玉 誠（新潟大学 医歯学系）
研究協力者：相澤義房（新潟大学 医歯学系）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,000	0	2,000
平成 17 年度	1,000	0	1,000
総 計	3,000	0	3,000

研究発表

(1) 学会誌等 学術論文

1. Tachikawa H., Kodama M., Watanabe K, Takahashi T., Ma M, Kashimura T., Ito M., Hirono S, Okura Y., Kato K., Hanawa H. and Aizawa Y. Amiodarone improves cardiac sympathetic nerve function to hold norepinephrine in the heart, prevents left ventricular remodeling, and improves cardiac function in rat dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2005, 111, 894 - 899.
2. Mir Wahed, Watanabe K, Ma M., Yamaguchi K, Takahashi T., Tachikawa H., Kodama M. and Aizawa Y. Effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Pharmacology*, 2004, 73, 81 – 88.
3. Abe Y., Watanabe K, Sato S., Nagai Y., Kamal F. A., Wahed M. I., Wen J., Narasimman G., Ma M., Suresh P., Takahashi T., Tachikawa H, Kashimura T., Tanabe N., Kodama M., Aizawa Y., Yamaguchi K, Miyazaki M. and Kakemi M. Hemodynamic effects of carvedilol infusion and the contribution of the sympathetic nervous system in rats with heart failure. *Pharmacology*, 2004, 72, 213 – 219.
4. Mir Wahed, Watanabe K, Ma M., Nakazawa M., Takahashi T., Hasegawa G., Naito M., Yamamoto T., Kodama M. and Aizawa Y. Effects of pranidipine, a novel calcium channel antagonist, on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with heart failure. *Pharmacology*, 2004, 72, 26 – 32.
5. Watanabe K, Ma M., Wen J., Tachikawa H., Kodama M., Aizawa Y., Yamaguchi K. and Takahashi T. Comparative effects of Quinapril with Enalapril in rats with heart failure. *Pharmacology*, 2004, 71, 157 – 161.

(2) 学会・研究会への発表

【平成 17 年度】

1. 佐久間清美、高橋俊博、渡辺賢一、渡辺康夫、矢沢由美、千葉怜那、北川裕子、馬 梅薔、Palaniyandi Suresh、文 娟、Fadia Kamal、Paras Prakash、長井悠輔、瀬賀朋子、田沢周作 二種の標識薬剤を用いた心機能評価 — 心臓集積性と拡張度 —
日本薬学会 第 125 年会 2006 (Mar. 28 – 30)

【平成 16 年度】

2. 高橋俊博、山口 優、佐久間清美、渡辺賢一、Mir Wahed、馬 梅薔、Gurusamy Narasimman、Palaniyandi Suresh、文 娟、Fadia Kamal、白井 健、曾我真也子、長井悠輔、瀬賀朋子、田沢周作 標識脂肪酸を用いた不全心筋の評価 — 心筋集積性と肥大度 —
日本薬学会 第 125 年会 2005 (Mar. 29 – 31)

研究成果

1 当初の研究目標

心臓疾患においては、心筋局所のいくつかの機能に障害が起きていることが知られていて、その臨床診断では、心疾患の要因や心筋障害の程度を心筋血流量、エネルギー獲得機能、心筋交感神経機能等の複数の機能検査を行うことにより診断が行われている。しかしその基礎研究（動物実験）においては、これら複数の機能を単独に or 同時に評価する試みが種々検討されてきているが、それらの系統的な評価法は未だ確立していない。一方当センターでは「心筋におけるエネルギー獲得機能」に関連し「標識脂肪酸を用いた β 酸化能計測による心筋の機能評価」に関する研究が行なわれてきたが、この研究課題を展開させていく上で「心筋はエネルギー源として主に脂肪酸を用いているが、心筋に障害が起き、 β 酸化能が阻害されると脂肪酸の利用率が低下し、それに替わり糖がエネルギー源として利用される」の事項（脂肪酸代謝機能と糖代謝機能との関連）が次の大きな課題となっている。

本研究では心筋エネルギー獲得機能の評価する薬剤として放射性ヨード（I-125 or I-131）標識脂肪酸と [C-14]標識糖を、また心筋交感神経機能の評価する薬剤として [I-125]標識心筋交感神経分布診断薬を選択し、それらのうちの2種の標識薬剤を同時使用し、標識核種の物理的性質（半減期等）の違いを利用して心筋集積性経時変化実験や局所分布画像化等を行うことにより、同一心筋における異なる2種の機能（脂肪酸代謝機能と糖代謝機能 & 脂肪酸代謝機能と交感神経機能）を同時に評価する手法を確立すると共に、それを種々の心疾患に適用し、心疾患とエネルギー獲得機能（脂肪酸代謝機能、糖代謝機能）および交感神経機能との関連性を解明することを目的としている。また更に得られた結果を基礎データとして、臨床診断に応用することを最終目標としている。

本研究の特色は、2種の標識薬剤を同時に用いるため同一個体（心筋）から異なる2種の機能評価ができ、従来の標識薬剤を個々に用いた場合の動物個体差による実験データのばらつきを除去することができる点にある。

実験は上記標識薬剤のうち2種を用いて集積性の経時変化実験、代謝物分析実験、オートラジオグラフの作製および組織病理標本の作製等を行い、これらより得られる各標識薬剤の集積性、局所集積の画像および組織学的所見等より様々な状態にある心筋機能をエネルギー獲得系や交感神経系の点から総合的に評価して

いく。本研究では動物実験により障害を受けた心筋局所のエネルギー獲得機能と交感神経機能との関連性を同時に知ることができ、ここで得られる結果は心筋機能検査における基礎データとして有用である。

2 研究成果の概要

2-1 使用材料 (標識薬剤, 実験動物)

【2-1-1 標識薬剤】

脂肪酸代謝機能を評価する標識薬剤として [I-131]標識脂肪酸誘導体を, 糖代謝機能を評価する薬剤として [C-14]標識糖誘導体を, また 心臓交感神経機能を評価する薬剤として [I-125]標識グアニジン誘導体を用いた。

- 1) 標識脂肪酸誘導体 : 15-(p-[I-131]Iodophenyl)-9-methylpentadecanoic acid ([I-131]9MPA) を用いる。9MPA はβ酸化が評価できるように分子設計された心筋イメージング剤である。9MPA の心筋における代謝経路は 主に 2 つの経路 (貯蔵型代謝経路 & β酸化型代謝経路) がある。β酸化関連の代謝経路では, 心筋に取り込まれた9MPA は 3 回 β酸化を受け, 3-メチル脂肪酸(9-(p-[I-131]Iodophenyl)-3-methylnonanoic acid ; [I-131]3MNA) が生成する。3MNA は 更なるβ酸化を受けず, 別の代謝経路により炭素 1 個ユニットが離脱し, 2-メチル脂肪酸になる。生成した2-メチル脂肪酸は 再度 β酸化の基質となるため, 更に 3 回のβ酸化を受け 最終代謝物である フェニル酢酸 ((p-[I-131]Iodo phenyl)acetic acid ; [I-131]PIPA) となる。一方 貯蔵関連の代謝経路では, 9MPA は ほとんど トリグリセリド (TG) の形で 心筋内に貯蔵される。
- 2) 標識糖誘導体 : 2-Deoxy-D-(1-[C-14])glucose ([C-14]2DG) を用いる。2DG はグルコースの 2 位の水酸基から脱酸素化した化学構造を持ち, グルコースと同一機序で挙動するが, 途中の段階 (2-Deoxy-D-glucose-6-phosphate (2DG-6-P)) で代謝が停止し, それ以降の代謝が進行しないように分子設計された糖誘導体である。
- 3) 標識グアニジン誘導体 : meta-[I-125]Iodobenzyl)guanidine ([I-125]MIBG) を用いる。MIBG の [I-123]標識体は 心臓局所における交感神経機能を知る目的で, 核医学臨床診断に多用されている。

【2-1-2 実験動物】

実験には正常動物群 (正常群), 心不全作製動物群 (心不全群) および 心疾患治療薬投与動物群 (心不全群 + カルベジロール (治療薬) 投与 ; カルベジロール投与群) を用いた。

- 1) 正常群 (Lewis, 雄, 9 週齢) : 正常ラット群
- 2) 心不全群 (Lewis, 雄, 9 週齢) : 既知の方法 (Kodama M. et al., Circ Res, 75, 278 (1994)) に基づき ミオシン投与により, 投与後 6 週間の自己免疫性心筋炎を発症させたラット群
- 3) カルベジロール投与群 : 上記 心不全群に カルベジロール 2 mg/kg (体重) を 一ヶ月間投与して 治療を行ったラット群

2-2 2種の放射線の分離測定条件の検討

【2-2-1 [I-131] と [C-14] の放射線の分離測定条件の検討】

- ・ [I-131]: γ 線放出核種 (364 keV (82 %)), $T_{1/2}$ (半減期) = 8.0 d ; [C-14]: 軟 β 線放出核種 (156 keV (100 %)), $T_{1/2}$ = 5730 y
- ・ オートラジオグラフィ (Autoradiography: ARG) では、両核種から放出される放射線、放出エネルギー および 半減期 の違いを利用し、最初に 実験直後 (終了後1週間以内) のオートラジオグラフィ操作により、[I-131] の ARG 画像を得、次に [I-131] の十分な減衰を待って (約 6 ヶ月後) , [C-14] のみの ARG 画像を得た。

【2-2-2 [I-125] と [I-131] の放射線の分離測定条件の検討】

- ・ [I-125]: γ (X) 線放出核種 (35 keV γ (7 % emitted, 93 % internal converted), 27-32 keV X (140 % Te K X rays)), $T_{1/2}$ (半減期) = 59.4 d ; [I-131]: 2-2-1 参照
- ・ 分離計測では、両核種から放出される放射線のエネルギーの違いを利用し、両核種を異なるエネルギーレンジで計測することにより、[I-125] および [I-131] 各々の放射能を 同時分離計測を行った。

2-3 動物実験

【2-3-1 二種の標識薬剤 ([I-131]9MPA & [C-14]2DG) を用いた動物実験】

2-3-1-1 正常群における臓器集積性の経時変化実験

[I-131]9MPA: 9MPA は 投与直後には 心臓, 肝臓 に多く集積した。その後 肝臓からは緩やかに wash out されたが、心臓には 時間が経っても 比較的高い集積性を示した。一方 腎臓には 中程度の初期集積性があり、投与 10 分後までは わずかな集積性の上昇がみられたが、その後 時間経過とともに緩やかに減少した。また 血液に関して、初期集積性は 比較的低く 以後は 腎臓 と同様の集積パターンを示した。

[C-14]2DG: 2DG は 投与直後、心臓、脳に高い集積性、腎臓には 中程度の集積性、また 肝臓、血液には低い集積性を示した。その後 時間経過と共に 心臓、脳への集積性は増加したが、腎臓、肝臓、血液への集積性は急速に減少した。

2-3-1-2 心臓集積性の経時変化実験

[I-131]9MPA: 正常群では 9MPA は投与直後よりすみやかに心臓へ集積し、その後 時間経過と共に減少していった。心不全心臓における 投与直後の集積性は、正常心臓に比べて著しく低下しており、その後 時間経過と共に減少した。また これら 2 本 (正常群, 心不全群) の 経過時間-心臓集積性曲線は 両者 ほぼ平行に推移していることがわかった。一方 カルベジロール投与群の心臓集積性は、経時的に緩やかに減少し、その集積性は心不全群の心臓集積性を若干上回っていたが、その差はほとんど認められなかった。

[C-14]2DG : 正常心臓における 2DG の集積性は、経時的に緩やかに増加した。
一方 心不全心臓においてもその集積性は経時的に増加したが、その程度は正常心臓の増加の程度に比べて より大きいことがわかった。

総合評価 : 上記実験結果より 9MPA の正常群と心不全群の両経過時間-心臓集積性曲線が ほぼ平行に推移していることから、心不全心臓における β 酸化能は正常心臓とほぼ同等の能力を維持していることがわかった。

一方 カルベジロール投与群の 9MPA の心臓集積性は 心不全群の集積性と 差はほとんど認められなかったことから、カルベジロールは 脂肪酸代謝以外の心臓機能を改善するのに有効な薬剤であることがわかった。

更に 心不全心臓における集積性に関し、時間経過とともに 9MPA の集積性が減少、また 2DG の集積性が増加 の実験結果より “ 心臓に障害が起き β 酸化能が阻害されると 脂肪酸の利用率が低下し、それに替わり 糖がエネルギー源として利用されてくること (脂肪酸代謝 \rightarrow 糖代謝) “ が示唆された。

2-3-1-3 心筋における脂肪酸代謝物分析

代謝物分析 : [I-131]9MPA を用い、正常群 および 心不全群 の心臓における代謝物 (β 酸化型代謝物 & 貯蔵型代謝物) 分析を行なった。具体的には、心筋代謝物を
1) TLC (Thin-layer Chromatography) を用いて分離 \rightarrow 2) Rf 値の比較による各代謝物の同定 \rightarrow 3) 各々の [I-131]代謝物をフィルム黒化度より定量 の操作により、各々の代謝物の生成量を算出し、この結果より、心筋における脂肪酸代謝機能を評価した。

[I-131]9MPA : 正常心臓において、9MPA 投与 10 分、および 30 分後、どちらも主代謝物はトリグリセリド (TG) であるが、TG の貯蔵割合は時間経過とともに増加する (10 分 : 47% \rightarrow 30 分 : 60%) のに対し、 β 酸化に利用される脂肪酸 (3 MNA+PIPA) の割合は ほぼ一定であった (10 分 : 21% \rightarrow 30 分 : 22%)。一方 心不全心臓における貯蔵型代謝物量は 正常群に比べて 著しく減少していたが、 β 酸化型代謝物量は 同程度 or 増加傾向 であった。

評価 : 上記実験結果より 心不全心臓では 主に 脂肪酸貯蔵機能の著しい低下障害が起きていることがわかった。

2-3-1-4 オートラジオグラフィ (Autoradiography : ARG)

[I-131]9MPA (単独投与) : 正常群 および 心不全群に 9MPA 投与後、3 分、10 分、1 時間 における心臓 ARG 画像を作成した。9MPA の心不全心臓への取り込みは すべての時刻において 正常心臓に比べて低下していることが分かり、またその集積性は 正常群、心不全群 共に 経時的に (3 分 \rightarrow 10 分 \rightarrow 1 時間) 低下していた。これは、上記 心臓集積性の経時変化曲線と同じ傾向を示していた。
(2-3-1-2 参照)

[C-14]2DG (単独投与) : 正常群 および 心不全群に 2DG 投与後、3 分、10 分、1 時間、2 時間 における心臓 ARG 画像を作成した。2DG の心不全心臓への集積性は 正常心臓に比べて亢進していることがわかり、また その集積性は 時間経過 (3 分 \rightarrow 10 分 \rightarrow 1 時間 \rightarrow 2 時間) とともに増加した。

[I-131]9MPA + [C-14]2DG (同時投与) : 正常群 および 心不全群に 9MPA + 2DG 投

与後 10 分における 心臓 ARG 画像を、9MPA 寄与分 および 2DG 寄与分 個々に作成した。その結果 9MPA より得られる ARG 画像では（正常群の心臓集積性）>（心不全群の心臓集積性）であるのに対し、2DG より得られる ARG 画像では（正常群の心臓集積性）<（心不全群の心臓集積性）が確認された。

総合評価：9MPA および 2DG から得られる ARG 画像より、心不全心臓では“エネルギー獲得系の脂肪酸から糖への移行”が示唆された。

また 心不全群では 正常群に比べ 心臓が拡張していることが確認された。

【2-3-2 二種の標識薬剤（[I-131]9MPA & [I-125]MIBG）を用いた動物実験】

2-3-2-1 正常群における臓器集積性の経時変化実験

[I-125]MIBG：MIBG は 投与直後には 心臓、肺 および 腎臓 に多く集積した。その後 時間経過とともに 肺、腎臓 からは急速に wash out されたが、心臓には 時間が経っても 比較的高い集積性を示した。一方 肝臓、脳 および 血液 には投与直後から集積は少なく、経時的にもわずかな変動しか認められなかった。

2-3-2-2 心臓集積性の経時変化実験

[I-131]9MPA：2-3-1-2 参照

[I-125]MIBG：正常群、心不全群 および カルベジロール投与群 における MIBG の経時的に心臓集積性変化実験を行った。実験より得られる 3 本の 経過時間-心臓集積性曲線 の順番は 上（高集積側）から順に 正常群、カルベジロール投与群、心不全群 となった。また 心不全心臓における投与直後の集積性は 正常心臓に比べて低下しており、正常心臓と同様 その後は経時的に減少したが、この減少の程度は心不全心臓の方が 正常心臓に比べ 大きいことがわかった。これらの結果より 心不全心臓では 心臓交感神経機能が障害されているため MIBG の集積が低下し、また 経時的に集積が著明に低下するのは 心不全心臓において wash out が亢進するためであると考えられる。一方 カルベジロール投与群では 心不全群に比べ MIBG の集積は高くなり 上記曲線は正常群に近づいたことより、カルベジロールによる心臓交感神経機能の改善が示唆された。

総合評価：カルベジロール投与群において、9MPA の心臓集積性を検討した場合 心臓集積性の順は（正常群）>（カルベジロール投与群）=（心不全群）となり、また MIBG の場合（正常群）>（カルベジロール投与群）>（心不全群）となったことから、カルベジロールは“心臓交感神経機能の改善に有効な薬剤である”ことが確認できた。

2-3-2-3 心重量と心臓集積性との相関関係

[I-131]9MPA：9MPA 投与後 10 分 における 心臓集積性 と 心重量（心臓拡張） との相関関係を検討した。その結果 心重量が増加するほど 9MPA の心臓集積性が低下する傾向が見られ、更に 心重量と集積性（脂肪酸代謝機能）との間に 比較的良好な相関関係（負の相関）があることがわかった。この結果は ARG 実験においても確認された。（2-3-1-4 参照）

[I-125]MIBG：MIBG 投与後 10 分、30 分、4 時間 における 心臓集積性 と 心重量 との相関関係を検討した。その結果 上記 9MPA の場合と同様、心重量が増加する

ほど MIBG の心臓集積性が低下する傾向が見られ、また いずれの時刻においても 心重量と集積性 (交感神経機能) との間に 比較的良好な相関関係 (負の相関) があることがわかった。この結果は ARG 実験においても確認された (2-3-2-4 参照)。

総合評価 : 9MPA および MIBG どちらの薬剤を使用した場合も 心不全群で心重量が増加するほど 集積性が低下する傾向が見られ、更には 両薬剤の心臓集積性 (脂肪酸代謝機能 & 交感神経機能) と 心重量増加との間に 比較的良好な相関関係 (負の相関) があることがわかった。この実験結果より、心不全群における心臓障害の程度 (重症度) を、心重量 (心臓の拡張度) により評価できることがわかった。

2-3-2-4 オートラジオグラフィ ([I-125]MIBG 単独使用)

[I-125]MIBG: 正常群 および 心不全群に MIBG 投与後、3 分、10 分、30 分、4 時間における心臓 ARG 画像を作成した。MIBG の心不全群への取り込みはすべての時刻において 正常群に比べて低下していることがわかり、また その集積性は正常群、心不全群 共に 経時的に (3 分 → 10 分 → 30 分 → 4 時間) 減少した。これは、上記 心臓集積性の経時変化実験と同じ傾向を示した。(2-3-2-2 参照)

2-4 まとめ

(1) 2種の放射線の分離計測

集積性の経時変化実験では、2種の核種 ([I-131] と [C-14], [I-131] と [I-125]) の放射線 および 放出エネルギーの違いを利用して 同時分離計測することができた。また オートラジオグラフィでは、[I-131] と [C-14] の 2 核種を同時使用した場合 両核種の半減期の違い を利用して、個々の核種の ARG 画像 を得ることができた。

(2) 心臓集積性、治療薬の効果判定

9MPA および MIBG の心臓集積性実験より、心不全群の心臓では 脂肪酸代謝機能 および 心臓交感神経機能 共に 障害を受けていることがわかった。また 上記実験結果に加え 2DG による心臓集積性実験より、心不全群の心臓では、エネルギー獲得系が 脂肪酸から糖へ移行していることが確認された。更に カルベジロール投与群を用いた 9MPA および MIBG の心臓集積性実験より、カルベジロールの交感神経機能の改善効果が示され、治療薬の有効性の検定に 本法が有用であることが示された。

(3) 脂肪酸代謝機能

9MPA と 薄層クロマトグラフィ (TLC) の手法を用いた脂肪酸代謝物分析の結果、心不全群の心臓では 正常群の心臓と比べて β 酸化機能は同程度であったが、貯蔵機能において 著しい低下障害が起きていることがわかった。

(4) 心臓オートラジオグラフィ (心臓 ARG)

9MPA および 2DG より得られた 心臓 ARG 画像より、心不全の心臓では、エネルギー獲得系が 脂肪酸から糖へ移行していることが確認された。

また 上記実験中で得られた すべての ARG 画像において、心不全群における心臓の拡張が確認された。

(5) 心臓障害の程度（重症度）

9MPA および MIBG を用いた 心重量-心臓集積性実験より、両者の間に負の良好な相関関係があることからわかり、心不全心臓における脂肪酸代謝機能や交感神経機能の障害の程度（重症度）を 心重量（心臓の拡張度）により 評価できることがわかった。

3 研究評価

本研究において、正常心筋、心疾患（心不全）心筋 および 薬剤治療心疾患心筋 における エネルギー獲得機能（脂肪酸 / 糖 の利用）および 心臓交感神経機能に関する多くの研究成果を得た。

また 本研究では 動物実験により 障害を受けた / 治療薬により機能が改善された 心局所のエネルギー獲得機能と交感神経機能との関連性を 同時に知ることができ、ここで得られる結果は 核医学の心機能検査における基礎データとして有用である。