

重症外傷の初期診療における生理学的指標と解剖学的評価

柳川 洋一（順天堂大学医学部救急・災害科）

急性期の重症外傷で問題となるのは、心破裂、大血管損傷や脳幹損傷等による救命不可能な即死以外に、顔面や気道損傷による気道閉塞から生じる低酸素血症、広範囲な肺挫傷、気管損傷や血気胸に伴う呼吸器損傷に伴う低酸素血症の他、臓器損傷に伴う内外出血による出血性ショック、頭蓋内損傷に伴う脳ヘルニアによる脳死が臨床的に問題となる。亜急性期は消化管穿孔等から感染症の悪化に伴う敗血症やショック・低酸素血症遷延による多臓器不全が死亡原因となる。即死以外の重症外傷に対する診療には、解剖学的異常をきたした外傷の把握とそれに基づく生理学的指標の異常への対応、例えば低酸素血症、出血性ショック等、かつ、引き続きもしくは同時に行われる解剖学的異常をきたした外傷に対する外科的修復が必要となる。Japan Advanced Trauma Evaluation and Care (JATEC) は日本外傷学会と日本救急医学会が主体となって重症外傷症例の標準化診療プログラムを作成している。標準化診療プログラムでは、primary survey と secondary survey approach を推奨している。Primary survey では生命に関わる臓器の身体診察並びに画像診断（ポータブルレントゲンと超音波）と同時に生理学的評価を実施し、その病態を明らかにして応急処置（蘇生）を行うことにより生命徴候の異常を安定化させる。Secondary survey では身体診察と各種画像診断を用いて、解剖学的な評価を詳細に行う。

外傷初期診療における生理学的評価方法としては、生命の危機的状況に対して交感神経緊張症状が伴うため、患者の生命徴候（血圧、脈拍、皮膚所見、呼吸数、呼吸様式、呼吸音、酸素飽和度、意識水準、瞳孔径等）を用いている。出血性ショックの場合は輸液に対する生命徴候の反応も生理学的評価の重症度判断に加える。一方、解剖学的評価は、五感を用いた身体診察所見以外に、胸部・骨盤部レントゲンと超音波検査により身体診察のみでは評価困難な胸腔、腹腔、後腹膜腔内への内出血の評価を行っていく。重症外傷では初診時に生命徴候が安定していても解剖学的に重症度が高い症例は経時的に状態が悪化していくため、生理学的評価と解剖学的評価の両者をもって外傷症例は診療していく必要がある [1]。生理学的評価に関わる因子（血圧、脈拍、呼吸数、酸素飽和度、体温）は 1970 年代に酸素飽和度の測定が加わった以外、最近目立った新たな有用な指標の出現は臨床現場で見られていない。また、高齢者社会を迎えて外傷症例の高齢化が進み、高齢者は生命の危機的状況における早期検出に有用な交感神経反射が低下していることから、生理学的異常が重症外傷でも出現しにくい傾向にある。従って生理学的評価による生命徴候の悪化に気づく以前にいかに解剖学的重症度を画像的に評価できるかが現在の研究の主流となっている。超音波においては、気胸を早期発見し、緊張性気胸への移行を防止、下大静脈径測定による循環血液量の間接的評価がなされている（図 1）[2, 3]。海外では救急救命士に超音波を用いた診断を病院前に行わせる取り組み

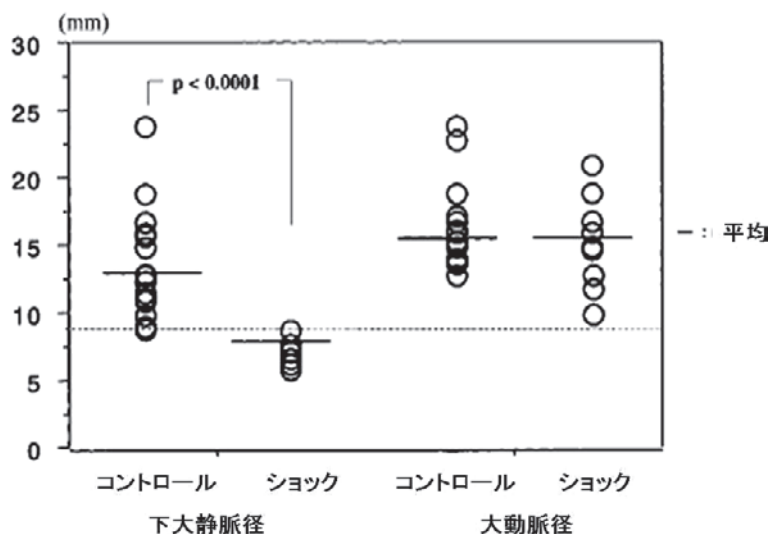


図 1. ショックにおけるエコー検査の下大静脈直径と大動脈直径の比較。

下大静脈径は出血性ショック症例では虚脱している。

みが始まっている。JATECでは循環動態が安定しない外傷症例に対してCT撮影を死のトンネルとして戒めているが、Lancetで発表された後ろ向き検討では、重症外傷に対するwhole body CT撮影は予後改善に寄与するとの報告がなされている[4]。これを受けて、初期診療室にCT撮影機を設置し、重症外傷に対して生理学的な評価と対応を行いつつ、解剖学評価もwhole body CTを用いて一気に行い、重症外傷の予後改善を試みる前向き検討が本邦で始まっている。

利益相反状態：無

1. Brown CV et al: Hemodynamically “stable” patients with peritonitis after penetrating abdominal trauma: identifying those who are bleeding. Arch Surg **140**: 767-772, 2005
2. Yanagawa Y et al: Hypovolemic shock evaluated by sonographic measurement of the inferior vena cava during resuscitation in trauma patients. J Trauma **63**: 1245-1248, 2007
3. Yanagawa Y et al: Early diagnosis of hypovolemic shock by sonographic measurement of inferior vena cava in trauma patients. J Trauma **58**: 825-829, 2005
4. Huber-Wagner S et al: Effect of whole-body CT during trauma resuscitation on survival: a retrospective, multicentre study. Lancet **373**: 1455-1461, 2009

人工血小板を用いた重症外傷での止血制御

萩沢康介¹, 木下 学¹, 西川可穂子¹, 柳川練平¹, 土井麻実², 武岡真司², 西田育弘¹, 関 修司¹, 斎藤大蔵¹ (¹防衛医科大学校, ²早稲田大学大学院先進理工学研究科)

【はじめに】

重症外傷では時に大量出血を合併することがある。これに対する初期治療としては、まず細胞外液量を補充して体循環を安定させることを目的に、晶質液やコロイド含有液を投与する。さらに出血量に応じて、濃厚赤血球輸血を適宜追加することが多い。このような病態では出血部位局所で止血凝固系が活性化・消費されると共に、全身的には大量輸液・輸血（赤血球輸血）により凝固因子や血小板が相対的に希釈されるため、凝固障害が生じ易出血性となる。救急領域においては、外傷から続発する凝固障害を防止すべく、大量出血患者には、赤血球輸血とともに、血小板輸血や血漿輸液を当初から行うことで急性期予後の改善が図られている。

我々は完全人工物である血小板代替物 H12 (ADP) リボゾーム (平均径 210nm) を開発してきた。H12 (ADP) リボゾームは膜表面にフィブリノゲン γ 鎖カルボキシル末端にある HHLGGAKQAGDV 配列の 12 個のペプチド (H12) を組み込むとともに、リボゾーム膜の内部に ADP を含有させている。すなわち、殻としての H12 が血小板凝集を増強するとともに、リボゾーム膜に内包された ADP は、出血部位局所でこれを放出させることで、その近傍に存在する血小板を活性化し凝集効果をさらに促進させる [1]。

今回、急性大量出血に対する大量輸液・輸血を施した後の急性血小板減少病態による易出血モデルを家兎で作製し、H12 (ADP) リボゾームが血小板輸血を代替して臓器出血などを予防出来るか、さらには止血救命効果が得られるかについて以下の検討を行った。

【方法】

体重 2 kg 前後の家兎で一方の大腿動脈にカニューレを施し、脱血用と動脈圧測定用とした。対側の大腿静脈にも同様のカニューレを行い、輸液および輸血、薬物投与用とした。まず大腿動脈より 12.5 mL/kg の脱血を行い、対側の大腿静脈より等量の Lactated Ringer を投与した。脱血した動脈血を遠心分離し PRP を採取、さらに残りの検体を遠心分離し PPP を採取した。残った血球成分を生理食塩水で洗浄し洗浄赤血球とした。続いて 12.5 mL/kg の脱血を大腿動脈より同様にを行い、これと同時に先程の洗浄赤血球を Lactated Ringer (5% albumin) で 12.5 mL/kg に調整した後に対側大腿静脈より輸血（返血）した。

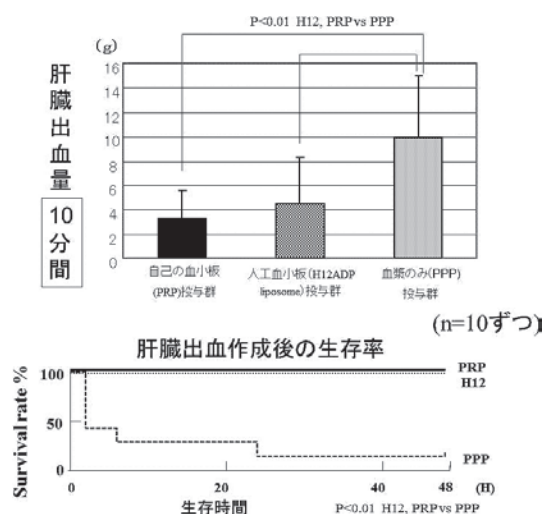


図 1

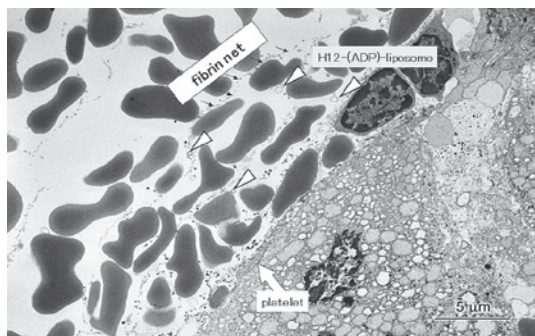


図2. Electron micrography on the liver injured site

以後、この脱血と輸血を繰り返し、最後は8回目の脱血血液から作製した洗浄赤血球の輸血のみを行った。血小板数が $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下になったことを確認して、H12 (ADP) リポゾーム 20 mg/kg をPPPで15 mL/kgに溶解し、これを静脈内投与した (H12 (ADP) リポゾーム群)。陽性対照群としてPRPを15 mL/kg (PRP群)、陰性対照群としてPPPを15 mL/kg投与した (PPP群)。その後、開腹し肝臓に直径5mmのDerma punchを用いて組織損傷を作製し、急性期の生命予後と出血量への影響を比較するとともに、肝損傷部位でのH12 (ADP) リポゾームの集積、止血凝固効果を透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果】

脱血・輸血により血小板減少 ($< 5 \times 10^4/\mu\text{L}$) と耳介出血時間の顕著な延長 ($> 10\text{min}$) を認めたが、図1のようにH12 (ADP) リポゾーム投与で、PRP投与に匹敵する肝臓からの臓器出血量の減少を認めた。PPP群では肝損傷後の止血制御が不能で10例中9例が出血死したが、PRPとH12 (ADP) リポゾーム群は10例全例の止血に成功し救命し得た。

電子顕微鏡による観察 (図2) では、H12 (ADP) リポゾームが損傷臓器表面の凝血部にフィブリン網と接続して集積し、血小板機能を代替していることを確認した。

【まとめ】

H12 (ADP) リポゾームが外傷性大量出血時の輸血に伴う血小板減少病態において、出血部位に集積して血小板機能を代替し、止血制御に直接貢献していることを確認した [2]。また、急性期に他臓器に血栓症を認めず、1か月後の慢性期でも肝臓等で炎症反応は生じていなかった。今後はFibrinogen等の凝固因子製剤との組み合わせや、至適投与方法などの、臨床応用に向けての検討を

進めていく必要がある。

利益相反はありません。

1. Okamura Y et al: Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* **7**: 470-477, 2009
2. Nishikawa K et al: Fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J Thromb Haemost* **10**: 2137-2148, 2012

アナフィラキシーショック

芝本利重 (金沢医科大学生理学第二講座)

アナフィラキシーショックは致死的となるが、その頻度は高くない。しかし、 β アドレナリン受容体 (β -AR) 遮断薬の服用患者がアナフィラキシーショックに罹患すると重篤となり、本シンポジウムのテーマの対象となる。 β_1 -ARと β_2 -ARの関与についてZhangら[1]は無麻酔ラットのアナフィラキシー低血圧で β_1 -AR阻害より β_2 -AR阻害が生存率を低下させることを報告した。しかし、その増悪機序は不明であった。一方、アナフィラキシーの血圧低下は肥満細胞と好塩基球から放出されるヒスタミンや血小板活性化因子などの化学伝達物質により①細動脈拡張、②肝門脈収縮、③肺血管収縮、④心機能低下、⑤血管透過性亢進が惹起されて生じる[2]。今回、これらに基づいて β_2 -AR阻害のアナフィラキシー低血圧の増悪機序をラットのアナフィラキシーショックモデルで解明した知見を紹介する。

卵白アルブミンで感作したSDラットを麻酔開胸人工呼吸下に体血圧、肺動脈圧、左心房圧、中心静脈圧、門脈圧を測定した[3]。また、超音波血流計により上行大動脈で心拍出血量を測定し、肺血管抵抗と総末梢血管抵抗を求めた。実験は選択的 β_1 -AR拮抗薬 (atenolol) 群、選択的 β_2 -AR拮抗薬 (ICI118, 551) 群、副腎摘除群、感作対照群などにおいて行った。アナフィラキシーは抗原の静脈内投与により惹起した。

①細動脈拡張：細動脈拡張は総末梢血管抵抗の低下としてとらえられる。総末梢血管抵抗は感作対照群では抗原投与後1分に一過性に78%に低下した[3]。アナフィラキシーショックの病態として動脈拡張が知られているが、ラットでは初期に、しかも一過性にしか生じないことが明らかとなった。しかし、この総末梢血管抵抗の低下に β -AR拮抗薬の影響を認めず、 β_2 -AR阻害はアナフィラ

キシーによる細動脈拡張を増悪しなかった[3].

②肝門脈収縮：肝門脈収縮により門脈圧が上昇し、腹腔血管床がうっ血して静脈還流量が減少する。さらに、腹腔血管床の毛細管圧上昇により血管外への体液漏出が増大し、循環血液量が減少し、これも静脈還流量を減少させる[2]。しかし、感作したすべての群で同程度の門脈圧上昇がみられた[3]。また、覚醒ラットでも同じ成績を得ている[1]。したがって、アナフィラキシー肝血管収縮は β_2 -ARの阻害により増悪されなかった。

③肺血管収縮：イス、サル、ヒツジ、ウサギなどの実験動物ではアナフィラキシー時には肺血管収縮による肺動脈圧上昇があり、右室後負荷が増大して、静脈還流量が減少し、血圧低下に関与する[2]。しかし、感作対照群では肺動脈圧は増加せず、心拍出量の低下とともに低下した。一方、 β_2 -AR拮抗薬群、副腎摘除群では肺動脈圧と肺血管抵抗は増加した[3]。また、血中アドレナリン濃度は感作対照群と β_2 -AR拮抗薬群では増加したが、副腎摘除群では検出されなかった。これらの成績から、 β_2 -AR拮抗薬はマスクされていた肺血管収縮を顕在化させることによりアナフィラキシー低血圧増悪への関与が明らかとなった。さらに、副腎摘除群の成績からラットアナフィラキシーショック時には副腎から分泌されるアドレナリンにより肺動脈平滑筋の β_2 -ARが活性化され、肺動脈収縮が減弱されていることが推察された。

④心機能低下：ラットアナフィラキシー低血圧では前負荷の減少が著しく *in vivo*での心機能評価は困難であり、感作ラットからの血液交差灌流心標本で検討した。未感作ラットの動脈血で冠動脈を定圧灌流し、左室留置バルーンで左室圧を130 mmHgに維持して、抗原の冠動脈内投与により心アナフィラキシーを惹起した。心収縮性はdP/dtmaxで評価した。抗原投与後、一過性に冠血流量減少とともに心収縮性が低下した。ラット心アナフィラキシーにおける心収縮性低下にはアナフィラキシー冠血管収縮による冠血流量低下が主要な役割を果たすことが示されている[4]。今回の検討では β_2 -AR阻害は冠血管収縮を増強して心機能低下を増大して、心アナフィラキシーを増悪させた。

⑤血管透過性亢進：今回は評価を行っていない。しかし、 β_2 -ARは正常時の血管透過性の維持に重要であり、今後の検討課題である。

以上、 β_2 -AR阻害によるラットアナフィラキシー低血圧の増悪機序には肺血管収縮と心機能抑制が増大されることによるが、細動脈拡張と肝血管収縮の関与はみられない。

利益相反：なし。

1. Zhang W et al: Eur J Pharmacol **650**: 303-308, 2011
2. 芝本利重：アナフィラキシーショックの病態：生理。アナフィラキシーショック。光畑裕正編，克誠堂出版，pp 21-38, 2008
3. Zhang W et al: Anesthesiology **114**: 614-623, 2011
4. Kuda Y et al: Cardiol J 2013 (in press)

重度外傷や熱傷に続発する複合免疫不全とその対策

木下 学，関 修司（防衛医科大学校免疫微生物学講座）

【はじめに】

重度外科侵襲により、生体は細胞性免疫や液性免疫、好中球機能など種々の感染防御機構が同時に傷害される複合免疫不全の病態に陥ることが知られている[1]。Interleukin-18 (IL-18)は本邦で発見された多彩な免疫賦活化作用を有するサイトカインで、細菌感染時の生体防御へ果たす役割も多彩である。著者らは重度外科侵襲のモデルとしてマウスに熱傷を作製し、これにIL-18を投与することで、複合免疫不全に陥ったマウスの不良な感染予後を改善し得たので紹介する[1]。

【熱傷後大腸菌感染時の細胞性免疫不全とIL-18投与による活性化】

マウスに20% III度熱傷を作製し1週間後に大腸菌を接種したところ、菌投与後の血中IFN- γ の上昇が抑制され、24時間後の肝単核球、中でもNK細胞のIFN- γ 産生が極端に低下し、肝臓での菌クリアランスも増悪、感染予後が不良となった。IL-18のIFN- γ 産生誘導作用に着目して recombinant IL-18 (5 μ g/kg)を熱傷後より隔日腹腔内投与すると、血中のIFN- γ 値や肝単核球のIFN- γ 産生が回復し、さらにこれがクッパー細胞の貪食能を改善して肝での菌クリアランスも改善させたことで感染予後が向上した。これは、熱傷後にIL-18を頻回投与することで肝での細胞性免疫能が回復し感染抵抗性が増強したためと考えられた[2]。

【熱傷後緑膿菌感染時の液性免疫不全とIL-18投与による活性化】

緑膿菌はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と共に、熱傷後感染で最も頻度が高い起因菌とされる。大腸菌感染時と同様な熱傷をマウスに作製し1週間後に緑膿菌を接種したところ、感染予後が増悪した。しかし血中IFN- γ の上昇抑制は認められず、IFN- γ が関与する細胞性免疫は維持されていたと考えられた。緑膿菌感染では大

腸菌感染とは違い、熱傷マウスで内因性の IL-18 が菌投与後に血中で有意に上昇しており、これを中和抗体で阻害すると IFN- γ 上昇は消失したことから、緑膿菌感染刺激で誘導された内因性 IL-18 が IFN- γ 産生を賦活化したと考えられた[3]。一方、細菌感染時に重要な液性免疫である IgM は熱傷後血中で減少を続けた。菌接種直前に正常マウスから採取した IgM（抗原非特異的な natural IgM）を投与すると緑膿菌の感染予後が顕著に改善したことから、液性免疫不全が熱傷後緑膿菌感染の予後増悪に深く関与することが示唆された。熱傷後に IL-18 を頻回投与すると血中 IgM の低下が改善され、緑膿菌接種後も血中 IgM が高く推移し、緑膿菌感染の予後も natural IgM 投与時と同様に改善した。IgM を産生する B 細胞が多く含まれる脾臓、骨髄、肝臓などの臓器での IgM 産生を見ると、IL-18 頻回投与により肝臓で特に顕著な IgM 産生亢進が認められていた。このように熱傷後に IL-18 を頻回投与すると肝での液性免疫能も賦活化され緑膿菌への感染抵抗性が増強したと考えられた[3]。

【熱傷後 MRSA 感染時の好中球機能不全と IL-18 投与による活性化】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）も熱傷後に感染頻度の高い細菌であるが、熱傷により感染予後は極めて不良となる。MRSA 接種後には血中 IFN- γ の上昇が認められないことから、菌排除への細胞性免疫の強い関与はあまり考えられない。また、菌接種直前に IgM を投与しても熱傷後 MRSA 感染の予後には改善効果がないことから液性免疫の関与も強くないと考えられた[4]。しかし熱傷後の IL-18 頻回投与で MRSA 感染の予後は劇的に改善した。一方、好中球を抗体で除去したマウスでは MRSA への感染抵抗性が完全に消失するため、MRSA の排除には好中球の強い関与が考えられた[4]。熱傷マウスでは MRSA 感染 2～3 日後に認められる好中球数の著明な増加が消失するが、熱傷後に IL-18 を頻回投与したマウスではこれが回復する。MRSA 感染後、好中球の貪食能は減弱するが、熱傷後に IL-18 を頻回投与したマウスでは貪食能が回復していた。熱傷マウスでは好中球の MRSA に対する殺菌活性が減弱化して

いたが IL-18 頻回投与で殺菌活性は回復した。IL-18 投与による好中球の機能的活性化は *in vitro* での IL-18 刺激によっても認められたことから、IL-18 は好中球を直接的もしくは間接的に活性化し MRSA 殺菌活性を増強することで熱傷後の MRSA 感染の予後を改善することが示唆された[4]。検証のため好中球移入実験を行った。Donor である熱傷マウス、非熱傷マウス、熱傷後に IL-18 を頻回投与したマウスに各々 MRSA を接種し、2 日後に好中球を採取して recipient である熱傷後 MRSA 感染を施したマウスに移入した。熱傷マウスから採取した好中球を移入した場合、予後改善効果はなかったが、熱傷後 IL-18 投与マウスの好中球を移入すると、非熱傷マウスの好中球を移入した時と同様に顕著な予後改善効果が認められ、IL-18 頻回投与による好中球の機能的活性化、すなわち殺菌能の回復が熱傷後 MRSA 感染の予後を改善させたことが示唆された[4]。

【まとめ】

熱傷後の IL-18 療法は細胞性液性両免疫の賦活だけでなく好中球機能も活性化し、感染防御への有用性が示唆された[1]。

利益相反はありません。

1. Kinoshita M et al: Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol* **93**: 689-698, 2013
2. Kinoshita M et al: Paradoxical effect of IL-18 therapy on the severe and mild *Escherichia coli* infections in burn-injured mice. *Ann Surg* **240**: 313-320, 2004
3. Kinoshita M et al: Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **177**: 4627-4635, 2006
4. Kinoshita M et al: Enhancement of neutrophil function by interleukin-18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **79**: 2670-2680, 2011

障害脳における生体シナプス再編

鍋倉淳一（生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部）

神経科学分野における非侵襲的生体イメージング法としては、機能的核磁気共鳴法 (fMRI) や近赤外線分光法 (NIRS)、ポジトロン断層法 (PET) などがある。しかしこれらは局所脳血流の変化や糖代謝などを指標に間接的に神経活動を類推する手法であり、また時間・空間分解能の限界のため、細胞・シナプス等の微細構造を描出することは困難である。一方、細胞イメージング分野で汎用されている共焦点顕微鏡法では高い解像度を得られる深度が組織表面から数十 μm 程度に限られると共に、励起光エネルギーによる組織・細胞に対する侵襲性や蛍光の褪色などが問題である。これらの問題点を克服する手法として、近年、多光子励起法による生体内微細構造イメージングが神経科学分野を中心に進み、現在では、癌・免疫やその他の生命科学研究分野に飛躍的な広がりを見せている。今回、2光子励起法を用いた生体脳内微細構造の観察例を紹介する。

脳内免疫細胞であるミクログリア細胞は細胞外環境によって容易にその形態・機能が変化するため、培養系などの *in vitro* 標本を用いた多くの報告があるものの、生体内における動態や他の細胞・臓器との連関に関しては推測の域を脱しなかった。今回、ミクログリアと神経回路との動的連関を生体内で観察するため、Iba-1 eGFP マウス（ミクログリアに GFP 発現）と Thy-1 GFP マウス（大脳皮質錐体細胞に GFP 発現）を交配したマウスに、2光子励起顕微鏡を適用した。正常脳においてはミクログリアは個々の突起をダイナミックに伸縮させるとともに、シナプス前構造（ブートン）や後構造（スパイン）に選択的に接触した。接触のリアルタイム観察の結果、正常脳においては約1時間毎に5分間接触していた。また、脳梗塞周囲領域（ペナンプラ）では、接触時間の大幅な延長（～1時間）がみられ、しばしば接触後にはシナプス構造の消失が観察された。ミクログリアは、正常時においてシナプスを定期的に監視し、障害回路においてはシナプスの除去など神経回路の可塑的变化に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

生体イメージングの利点として、動物が生きているため同じ生体内微細構造の長期間（数ヶ月以上）の繰り返し観察が可能である。例として、後肢末梢感覚神経の損傷による慢性疼痛モデルマウスにおいて、大脳皮質シナプスの変化を長期間観察した。Thy1-YFP マウスの末梢下肢を機械的に

刺激し、内因性シグナルを指標として応答する大脳皮質感覚野後肢領域を同定し、同部位内の錐体神経細胞 (YFP を発現) の同一樹状突起上のシナプス（スパイン）形態の経時的変化を損傷前後で観察した。大脳皮質錐体細胞のシナプスは正常成熟マウスでも観察毎に5—10%程度変化していた。新生スパイン及び除去されたスパインの比率（ターンオーバー率）は、末梢感覚神経損傷後に亢進した。このターンオーバー率は痛覚過敏が次第に増強しつつある時期に特異的に亢進した。しかし、その後、痛覚過敏はその後数週間以上持続するものの、末梢感覚神経損傷前の正常値まで低下した。また、過剰入力発生（末梢神経損傷）以前に存在したスパインが多く除去されることが判明した。一方、シナプス密度は観察期間を通して大きな変化が見られなかった。この結果から、シナプス密度の変化がないため、慢性疼痛において重要視されていなかった大脳皮質感覚野においても、慢性疼痛増悪期に限定してシナプス再編が亢進していることが、2光子励起顕微鏡を用いた同一神経回路の長期繰り返し観察を用いて初めて明らかになった。

神経回路の形態変化に加えて、大脳皮質錐体神経細胞の応答性の変化を Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いて検討した。興奮性神経細胞（錐体細胞）、抑制性神経細胞およびアストロサイトを弁別するために、GABA 作動性神経細胞に蛍光 Venus 蛋白が発現している遺伝子改変マウス (VGAT-Venus マウス) に Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1, カルシウム指示薬) と SR-101 (アストロサイトを選択的に染色する蛍光指示薬) を同時に添加した。Venus と SR-101 との染色の有無により、Venus (-)・SR101 (-)・OGB-1 (+) である錐体神経細胞の同定が可能となる。神経細胞の応答とその強度を Ca^{2+} 蛍光色素強度の変化として測定を行うと、末梢感覚刺激に対して応答を示す錐体神経細胞数や末梢刺激に対する反応確率、反応の大きさは、正常群と比較し慢性疼痛モデル群では統計学的に有意な増加が認められた。

このように、2光子励起顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングの実験では、*in vivo* 標本を用いて生理的刺激に対する反応性の評価を画像的に行うことが可能となった。

同一個体における同一微細構造や活動の長期間の繰り返しイメージング法やリアルタイムイメージングを用いると、これまで技術的な制約によって観察出来なかった細胞やシナプスの形態・機能の微細な変化を抽出することが可能となった。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益

相反関係にある企業等はない。

オプトジェネティクスを用いた神経活動操作と本能行動制御

山中章弘（名古屋大学環境医学研究所）

オレキシンはオーファンGタンパク質共役型受容体（内因性リガンドが不明のGPCR）に対する内因性リガンドとして同定された神経ペプチドである。オレキシンを産生する神経、すなわちオレキシン神経は、本能行動や恒常性機能の中核として知られる視床下部のみに存在し、少数のオレキシン神経が散在する分布様式をとる。マウスの脳では約4,000個のオレキシン神経が両側の視床下部外側野に前後約1ミリ、左右約1ミリの領域に疎らに分布する。オレキシン神経はそこから脳のほとんどの領域に軸索を投射している。プレプロオレキシン遺伝子欠損マウスの行動解析から、オレキシンが睡眠覚醒調節に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。プレプロオレキシン遺伝子、オレキシン神経を欠損した動物、およびオレキシン2受容体を欠損した動物がいずれも睡眠覚醒を頻繁に繰り返し、突然脱力して動けなくなる発作を起こした。これらの症状は、睡眠障害として知られる「ナルコレプシー」において認められる症状に酷似していた。実際にナルコレプシー患者の脳では脳脊髄液中のオレキシン濃度が検出限界以下にまで低下しており、死後脳の解析からもオレキシン神経だけが無くなっていることが明らかになった。これらのことから、オレキシン神経が睡眠覚醒調節において重要な役割を担っていることが明らかとなった。しかし、睡眠覚醒は全ての神経回路が保たれた個体でのみ生じる現象で有り、オレキシン神経活動がどのように睡眠覚醒調節に関与しているのかについては、個体を用いた解析を行う必要があった。光遺伝学はインビボにおいて特定の神経の活動を制御出来ることから、オレキシン神経活動を光で操作した時に生じる個体レベルの睡眠覚醒状態変化を解析することで、その調節のメカニズムを明らかにすることが出来ると考えた。そのために、オレキシン神経特異的にチャネルロドプシン2 (ChR2)、ハロロドプシン (HaloR)、アーキオロドプシン (ArchR) などの光活性化膜電位変換タンパク分子を発現する遺伝子改変マウスの作製を試みた。オレキシン神経細胞の活動を光で抑制するために、オレキシンプロモーターを用いて HaloR、もしくは ArchR をオレキシン神経細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス (orexin-HaloR マウス, orexin-Arch マウス) を作製した。HaloR は橙色の光によって活性

化されるクロライドイオンポンプであり、細胞外から細胞内へクロライドイオンを汲み入れるために細胞膜電位を過分極させる。一方、ArchR は緑色光によって活性化されるプロトンポンプで、細胞内から細胞外へプロトン汲み出すために同じく細胞膜電位を過分極させる。過分極によって、活動電位の発生を抑制するため、これらの分子を発現する神経細胞の活動は抑制される。Orexin-HaloR マウス, orexin-Arch マウスのいずれの遺伝子改変マウスにおいてもオレキシン神経特異的に発現が認められる系統を免疫組織化学的解析によって樹立した。次にこれらのマウスの脳スライス標本を作成し、オレキシン神経細胞にホールセルパッチクランプして、橙色光もしくは、緑色光を照射した。HaloR もしくは ArchR を発現するオレキシン神経では光照射によって過分極応答が観察された。

電気生理学的解析の結果を基に、意識下において自由行動するマウスの脳に光を照射してオレキシン神経活動を抑制した。視床下部は脳の深い領域に存在するため、光ファイバーを視床下部の約1mm 上方まで両側に刺入し、オレキシン神経に光照射を行った。覚醒下において毛繕いをしているマウスの脳内に橙色光 (orexin-HaloR マウス) もしくは、緑色光 (orexin-ArchR マウス) 照射を行い、オレキシン神経活動を急性的に強制停止させた。オレキシン神経活動が抑制されてもマウスは数秒間毛繕いを続けたが、急に寝る準備をはじめて眠りについた。このときの脳波筋電図記録からマウスがノンレム睡眠に移行していることが分かった。光照射を止めて、オレキシン神経活動を再び元の状態に戻すと、マウスは直ちに覚醒し、先ほどと同様の毛繕いを再開した。Orexin-HaloR マウス, orexin-Arch マウスの両方で同じ実験を行い、同じ結果を得たことから、オレキシン神経活動を抑制することによって、マウスにノンレム睡眠を誘導出来ることが明らかとなった。また、オレキシン神経抑制によって誘導されるノンレム睡眠時に触刺激を与えると直ちにノンレム睡眠から覚醒に移行した。このことは、誘導されたノンレム睡眠が生理的な睡眠であることを示している。以上の結果から、オレキシン神経活動は覚醒中枢を活性化して睡眠覚醒調節を安定化させており、オレキシン神経活動を抑制することによって覚醒中枢の活動レベルが低下し、睡眠が誘導されることが明らかとなった。

光遺伝学を様々な神経に適用することによって、これまで不可能であった丸ごと個体を用いて、特定の神経活動だけを任意のタイミングで操作出

来る実験が可能となり、睡眠覚醒を含めた多くの生理現象を調節するメカニズムが解明されることが期待される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

イメージングによる心臓・血管発生メカニズムの解明

望月直樹, 福原茂朋 (独立行政法人国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部)

インビボサイエンスに迫るためには、インビボでの生体の可視化によるサイエンスの解明が基本と考えた本研究を行った。循環器系(心臓と血管)は生体の初期発生で最初に形成される臓器であり、この確立なくして臓器への酸素・栄養の供給は成立しない。このため心臓形成と血管形成が如何なるメカニズムで制御されているかを調べた。心筋細胞特異的あるいは血管内皮細胞特異的プロモーターの下流で、蛍光蛋白質あるいは、情報伝達可視化プローブを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ(Tg)を作製し、発生時の形態と情報伝達を調べた。

心筋特異的発現にはcardiac myosin light chain 2 (cmlc2)あるいはNkx2.5プロモーター、血管内皮細胞特異的発現にはFlk1 (VEGFR2)プロモーターを用いた。Nkx2.5プロモーター下流にtandemEOS蛍光蛋白質を発現するTg(Nkx2.5:tEOS)を作製した。心筋細胞の細胞周期を検出可能なFluorescent Ubiquitin-based Cell Cycle Indicator (Fucci) cDNAを理研宮脇・沢野両博士より提供していただきS/G2/M期にmVenusをG0/G1期にはmCherry蛍光蛋白質を発現するTg(cmlc2:Fucci)を作製した。

まずNkx2.5(+)tEOS陽性細胞群が両側の中胚葉領域に16 hours post fertilization (hpf)に出現し中央に向かって移動し、原始心筒を形成する部位に心臓原器細胞が集まることを明らかにした。Tg(cmlc2:Fucci)を用いた心筋細胞の細胞周期特異的な蛍光蛋白質の発現を検討したところ、36 hpfでは心筋細胞がほとんどS/G2/Mの増殖期であり、これが48 hpfではG0/G1にほとんど変わることが分かった。さらに、3 days post fertilization (dpf)から、再度分裂を開始するためにmVenus陽性細胞が増加してくることもわかった。この分裂心筋は30 dpfの心臓でも検出されることから、ゼブラフィッシュでは哺乳類心臓とは異なり生後でも心筋細胞増殖が生じていることが明らかとなった。

ゼブラフィッシュの血管は、初期にvascular

cordが生じ、体幹部では背側大動脈(DA)と後主静脈(PCV)がephrinB2, EphB4の反跳作用により分離する。さらにDAから節間血管(ISV)が背側に伸張して最背側でDLAVを形成する。またPCVからも二次分枝が生じてそのうちの約半数がDA由来のISVに結合することで、静脈ISVとなる。二次分枝に結合しなかったISVが動脈ISVとなり、50 hpfには体幹の動脈・静脈が形成され赤血球がこの中を流れることになる。尾側での静脈は背側に向かった二次出芽だけではなく、尾側静脈叢—尾側静脈を形成するように腹側に向かって出芽することがわかった。

この尾側の静脈の出芽と維持に重要なシグナルとしβ-Cateninのシグナルの転写レポーターを可視化できるTg(flk1:Tcf/Gal4DBD):Tg(14xUAS:egfp)を作製して調べた。このTgは血管内皮細胞特異的にGal4とTcfの融合蛋白質を発現しβ-Cateninが核内に移行すると14xUASと結合することでレポーターとしてのEGFPを発現するようになる。尾側静脈叢の腹側のみでEGFPの蛍光を観察できることから、β-Cateninの転写が機能していることがわかった。さらに尾側静脈叢の形成にはBMPシグナルが必須であるとの報告があったために、これを検討したところ、BMP依存性にβ-Cateninの転写が調節されていることもわかった。

以上本研究では、成体蛍光イメージングにより心筋分裂の時間的解析と、新たな血管新生のメカニズムを解明することができた。

開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

脳機能画像による脳腸相関の分析

福土 審 (東北大学大学院医学系研究科行動医学分野)

脳機能画像法の陽電子断層撮影法(PET)、機能的磁気共鳴画像(fMRI)あるいは内臓知覚大脳誘発電位ならびに経頭蓋磁気刺激法(rTMS)、消化管パロスタット法を組み合わせることにより、ヒトにおける脳腸相関の生体機能イメージングを可能にした。パロスタットはヒト消化管に圧力を随意に認知バイアスなく負荷できる手法であり、かつ、消化管神経叢機能と平滑筋toneをリアルタイムで計測できる検査法である。更に画像解析を領域間結合の詳細を調べるdynamic causal modeling(DCM)に発展させることにより、局所脳が活性化されるネットワークの生理と病理を明らかにできるようになっている。また、脳腸相関のdiffuse tensor imaging(DTI), arterial spin labeling(ASL), voxel-based morphometry(VBM),

magnetic resonance spectroscopy (MRS) が鋭意進行中である。

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome ; IBS) と情動の関係は際立って重要である。IBS とは、腹痛と便通異常が関連し合いながら慢性に持続するが、通常の臨床検査では愁訴の原因となる器質的疾患を認めないという概念の症候群である。健常者と IBS 患者を対象としたインビボサイエンスにより、その脳内プロセッシングと神経伝達 が明らかになりつつある。

内臓感覚の脳内 processing であるが、消化管の伸展刺激などの侵害刺激信号は、交感神経の中を上行する脊髄神経の細径感覚 neuron が受容し、脊髄後根から脊髄後角のラミナ I ニューロンに信号を伝える。その軸索は脊髄視床路、脊髄網様体路を視床まで上行する。ここから、島後部、次いで島前部で信号処理がなされるが、交感神経の刺激は右島前部と右眼窩前頭皮質が優位に反応する。一方、消化管の接触刺激、化学刺激などの信号は、迷走神経の中を上行する細径感覚 neuron が受容し、孤束核を経て視床で処理され、島後部、次いで島前部で信号処理がなされるが、副交感神経の刺激は左島前部が優位に反応する。

内臓知覚信号はさらに前帯状回、前頭前野に投射される。また、ラミナ I から傍小脳脚核、さらには、扁桃体・視床下部を賦活化する経路の優位性が画像により得られる。こうして、内臓への刺激強度が高い場合か、感覚閾値が低ければ消化器症状と不安感や抑うつ感を起こす。これらの中樞の賦活は中心灰白質の下行性痛覚抑制系を賦活し、内因性 opioid, noradrenaline neuron, serotonin neuron を介して内臓知覚を抑制する。実際に、大腸を伸展刺激しながら PET の脳画像を撮像すると島の活性化を描出できる。遠心性交感神経興奮の指標である心拍数、心拍変動の low frequency (LF)/high frequency (HF) 比、血漿 adrenaline を測定するとこれらはいずれも大腸伸展刺激によ

り増加し、かつ、右島前部における局所脳血流量増加と相関する。ブザー音と皮膚電気刺激を組み合わせた恐怖条件づけパラダイムでは、大腸収縮が誘導されるが、同時に撮像した PET により、島、前帯状回、前頭前野の局所脳血流量増加が見出された。すなわち、内臓に対する刺激と恐怖条件づけ時の脳の賦活パターンは共通している。

健常者と IBS 患者に対して、認知柔軟性を計測する Wisconsin Card Sorting Test を行くと、IBS 患者のほうがエラーが多いことが判明した。この時、IBS 患者の blood oxygenation level-dependent (BOLD) signal は、右背外側前頭前野と右海馬の増加が健常者よりも少なく、左島後部が多かった。IBS では内臓由来信号過剰なために左島後部の BOLD が高く、BOLD の変動幅が小さく、状況に即応して行動選択をするよりも内的感覚への依存性が高い。

このようにヒトにおけるインビボサイエンスにより、内臓知覚のメカニズムのみならず、刺激下の脳機能 module、対応する脳部位、神経伝達物質、情報処理パターンを明らかにできる。IBS に対する向精神薬や心理療法による病態の改善は、神経科学的な過程に根差した変化である。脳機能画像で得られた所見から、反復経頭蓋磁気刺激法により、右背外側前頭前野を刺激すると、低周波数刺激では内臓刺激下の不安が抑制され、高周波数刺激では、内臓刺激後の大腸壁微細運動が惹起される。IBS の中枢側の病態生理の結果としての情動形成、その出力としての消化管運動の変化、これらを支配する遺伝子と環境の影響、以上の全てを解決できれば、広く科学的に重要な知識を提供できる。ヒトにおけるインビボサイエンスにより、脳腸相関の実態が健常と病態の両面で明らかにされつつあり、その動向が今後ますます注目される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

血圧変動性：その規定因子と臨床的意義

菊尾七臣（自治医科大学内科学講座循環器内科学）

高血圧は循環器疾患の最大のリスク因子の1つであり、さらに近年、一刻一刻変化する血圧変動性の増大が臓器障害の進展や循環器疾患の発症リスクとなることが示されつつある。交感神経系が高血圧の成因と血圧変動性の規定因子として重要な役割を持つことは言うまでもない。

脳卒中や心筋梗塞、突然死など大半の循環器疾患の発症には明確なサーカディアンリズムがあり、早朝に好発する。夜間から早朝にかけては交感神経活動が亢進し、血圧はモーニングサージと呼ぶ上昇を示す。我々は初めて24時間血圧測定を用いて血圧モーニングサージを定義して、その増大が脳卒中の独立したリスク因子となることを示した[1]。その後、多くの研究が血圧モーニングサージの増大が大小血管のリモデリングと悪循環を形成し、臓器障害を進展させ心血管イベントの発症リスクを増加させることを示している[2]。

また、サーカディアンリズムが破綻し、正常の夜間血圧下降が消失した non-dipper や、逆に夜間血圧が上昇する riser では、脳卒中、冠動脈疾患、心不全、腎障害の発症や死亡リスクが増加している[3, 4]。体内時計を規定する時計遺伝子に関する動物実験は急速に進んでいるが、ヒトでの血圧のサーカディアンリズムの破綻が生じる機序と循環器疾患を引き起こす機序の詳細は分かっていない。その中で、機序が最も明確な病態が睡眠時無呼吸症候群（SAS）である。SAS は“neurogenic hypertension”モデルといわれ、主に交感神経の亢進を介し、夜間血圧が著明に変動する riser を示す。我々は無呼吸発作時の低酸素血症をトリガー信号とし、SAS の血圧変動を特異的に測定する夜間トリガー家庭血圧計を開発した[5]。本血圧計を用いて検出した重症 SAS 患者の血圧“スリープサージ”は、100mmHg 程度にも達することがある。このスリープサージが血圧サーカディアンリズムを修飾し、SAS 患者で好発する夜間発症の循環器イベントのトリガーになるとの仮説を証明するため、多施設 Sleep Pressure and disordered breathing in REsistant Hypertension And Cardiovascular Disease (SPREAD) Registry を開始している。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

Sources of Funding: This research was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (21390247) from The Ministry of Education,

Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan, to K.K., and by MEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2011-2015.

1. Kario K et al: Morning surge in blood pressure as a predictor of silent and clinical cerebrovascular disease in elderly hypertensives: a prospective study. *Circulation* **107**: 1401-1406, 2003
2. Kario K et al: Nocturnal fall of blood pressure and silent cerebrovascular damage in elderly hypertensive patients: advanced silent cerebrovascular damage in extreme dippers. *Hypertension* **27**: 130-135, 1996
3. Kario K et al: Stroke prognosis and abnormal nocturnal blood pressure falls in older hypertensives. *Hypertension* **38**: 852-857, 2001
4. Kario K. Morning Surge in Blood Pressure and Cardiovascular Risk -Evidence and Perspectives-. *Hypertension* **56**: 765-773, 2010
5. Kario K. Proposal of a new strategy for ambulatory blood pressure profile-based management of resistant hypertension in the era of renal denervation. *Hypertens Res* 2013 Mar 21. doi:

脳内 neuron-astrocyte uncoupling による交感神経調節異常

岸 拓弥（九州大学大学院医学研究院先端心血管治療学講座）

高齢人口の増加に伴い、循環器疾患が爆発的に増加する中で、最終型である慢性心不全が激増・重症化しており、様々な内服薬やデバイスが登場してきているにも関わらず依然5年生存率が50%前後であり、抜本的な新規治療法の開発は急務である。重症慢性心不全の発症進展においては、過剰かつ不適切な交感神経活動活性化が極めて重要であり、予後との相関も強く、β遮断薬の登場が劇的に長期予後を改善したことからもその重要性は明らかである。交感神経活動は「脳」の出力であることから、「脳」内異常は心不全の原因であり重要な治療対象であるはずであるが、慢性重症心不全の治療は心臓・血管・腎臓を標的とした治療に留まっている。

このような背景のなかで、我々は脳内酸化ストレスやアポトーシスによる交感神経活動活性化について研究してきた。交感神経活動を規定するのは、延髄にある頭側延髄腹外側野（RVLM）である。RVLM は、動脈圧受容器反射に関与する

様々な神経核から入力があって、最終的にRVLMの神経細胞が脊髄へと投射されており、RVLMの神経活動が直接交感神経活動となっている。RVLMにおいて、一酸化窒素が抑制性アミノ酸である γ アミノ酪酸 (GABA) の放出を介して交感神経活動を抑制する[1, 2] 一方で、交感神経活動が亢進している高血圧モデルラットのRVLMでは活性酸素種が増加しており、酸化ストレス消去酵素をRVLMへ遺伝子導入を行い活性酸素種を抑制すると大幅に交感神経活動が抑制されることから、RVLM内での交感神経活動を活性化させる最大の要因は活性酸素種であることを明らかにした[3]。RVLM内での活性酸素種を産生するのはアンジオテンシンIIタイプ1受容体(AT1R)およびNAD(P)Hオキシダーゼである。脳内にAT1R拮抗薬(ARB)を投与すると、脳内活性酸素種低下を介して交感神経活動が抑制される。

さらに、産生された活性酸素種によって引き起こされるアポトーシスが神経活動を亢進させていることも明らかにした[4]。アポトーシスが神経核でおこると、その領域の神経活動が減弱するため、RVLM内のアポトーシスはむしろ交感神経活動を抑制するはずであるが、実際には逆である。そのメカニズムとして、我々は神経細胞を保持するグリア細胞であるアストロサイトに着目した。脳を構成する大部分は神経細胞ではなくアストロサイトであり、近年その機能的な重要性、特にアストロサイトによる神経細胞保護作用が注目されている。

我々は、交感神経活動活性化型高血圧モデルとして、脳卒中易発症自然発症高血圧ラット(SHRSP)の14-18週齢を使用した。心不全モデルには、coronary ligationにより作成した心筋梗塞後心不全ラットを使用した。RVLM組織はパンチアウト法で採取し、神経細胞やアストロサイトは免疫染色で確認した。交感神経活動は尿中カテコールアミン排泄量で、RVLMでの酸化ストレスはTBARS法で測定を行った。ラットの脳室下部から採取した組織から分離した神経幹細胞を、2種類のサイトカインBMP2とLIFを添加して培養することによりアストロサイトに選択的に分化誘導させた。SHRSPおよび心不全ラットのRVLMに、自家アストロサイトの注入移植を行い、生存率を観察した。

その結果、SHRSPのRVLMにおいて、神経細胞の数は変わらない一方でアストロサイトが減っていた。また、RVLMでのアストロサイト減少が抑制された。ヒドララジン内服群ではこのような結果は得られなかった。SHRSPのRVLMにアス

トロサイトを自家移植すると、1週間後には有意な収縮期血圧・心拍数の低下、交感神経活動の低下を認めた。移植していないSHRSPは食塩負荷により血圧上昇が続き20週齢で全例死亡したが、アストロサイト自家移植群では22週齢まで全例で生存かつ血圧上昇が認められなかった。さらに、心不全モデルでも、心筋梗塞作成後の予後が有意に改善した。

これらの結果から、神経細胞の活動に対しアストロサイトが抑制的に働いており、AT1Rを介して産生される活性酸素種によって引き起こされるアポトーシスはアストロサイトで起こっていて、アストロサイトが減少することで神経細胞の脱抑制が起こって、過剰な交感神経活動が出力されていることになる。さらに、自家神経幹細胞から分化誘導させた免疫反応のないアストロサイトの脳内移植により著明な交感神経活動抑制作用が長期間持続し、心不全ラットの生命予後を劇的に改善させることを確認した。

β 遮断薬内服のみという十分な治療が行えていない交感神経活動活性化に対し、その根源である脳に対して介入をするというのは、重症心不全治療を抜本的に変革する可能性を秘めている。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kishi T et al: Hypertension **38**: 896-901, 2001
2. Kishi T et al: Hypertension **39**: 264-268, 2002
3. Kishi T et al: Circulation **109**: 2357-2362, 2004
4. Kishi T et al: Hypertension **55**: 291-297, 2010

非線形心拍ダイナミクスの解析による交感神経活動亢進の評価

早野順一郎(名古屋市立大学大学院医学研究科医学・医療教育学分野)

急性心筋梗塞後突然死の動物モデルは、迷走神経の拮抗機能障害下で、一過性心筋虚血時に交感神経活動亢進が起こることによって、心室細動閾値が低下することを示している[1]。急性心筋梗塞後死亡率の予測指標として様々な心拍変動指標が提唱されているが、交感神経活動亢進を捉える指標は知られていない。例えば、心拍変動の低周波数(LF, 0.04-0.15 Hz)成分と高周波数(HF, 0.15-0.45 Hz)成分の比であるLF/HFは交感神経活動の相対的優位性を示すとする報告もあるが、急性心筋梗塞後ではLF/HFの低い者の方が高い死亡率を示すという事実と矛盾する[2-4]。著者ら[5, 6]は、心拍数とそのトレンドから突発的に大きく逸脱する確率を示す指標として、心拍変動の非ガウス性(λ)を開発し、 λ の増加がうっ血性心不全

における死亡率の増加を予測することを見出した。そこで、 λ が急性心筋梗塞後の死亡率を予測するか否かを検討した。急性心筋梗塞後の 670 例で、24 時間ホルター心電図を記録し、 λ の他に、予後予測指標として SDNN, LVF, スケーリング指数 α_1 , deceleration capacity, heart rate turbulence (HRT) を計算した。 λ は他の予測指標と実質的な相関を示さず ($|r| < 0.4$)、 β ブロッカーの服用者で低下していた ($P = 0.04$)。中央値 25 か月の追跡期間中に、45 名 (6.7%) が死亡 (心臓死 32 例, 非心臓死 13 例) し、39 例が非致死性急性心筋梗塞を再発した。 λ 以外の他の予測指標は心臓死ばかりでなく非心臓死のリスクとも関連したが、 λ の増加は心臓死のリスクとのみ関連した (1SD の増加あたりの相対ハザード [95%CI], 1.6 [1.3-2.0], $P < 0.0001$)。 λ の予後予測力は、年齢、糖尿病、左室駆出率、腎機能、過去の急性心筋梗塞、脳卒中の既往、Killip クラス、投薬内容の影響を調整しても有意であった (1.4 [1.1-2.0], $P = 0.01$)。 λ の予後予測力は他の予測指標とも独立で、 λ の増加と異常な HRT との組み合わせによって心臓死リスクの最良の予測モデルが得られた。 λ も他の予測指標も非致死性急性心筋梗塞の再発リスクとは有意な関連を示さなかった。急性心筋梗塞後の患者において、 λ の増加は、心臓死のリスクとのみ関連し、その予後予測力はこれまで知られている心拍変動の予後予測指標とは独立である。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Hull SS Jr et al: Do increases in markers of vagal activity imply protection from sudden death? The case of scopolamine. *Circulation* **91**: 2516-2519, 1995
2. Tsuji H et al: Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort: The framingham heart study. *Circulation* **90**: 878-883, 1994
3. Huikuri HV et al: Fractal correlation properties of r-r interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* **101**: 47-53, 2000
4. La Rovere MT et al: Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. *Circulation* **107**: 565-570, 2003
5. Kiyono K et al: Non-gaussian heart rate as an independent predictor of mortality in patients

with chronic heart failure. *Heart Rhythm* **5**: 261-268, 2008

6. Hayano J et al: Increased non-gaussianity of heart rate variability predicts cardiac mortality after an acute myocardial infarction. *Front Physiol* **2**: 65, 2011

神経疾患における交感神経機能評価とその意義

朝比奈正人 (千葉大学医学研究院神経内科学)

本発表では、神経内科領域の主要疾患である脳卒中中、神経変性疾患であるパーキンソン病 (PD) および認知症疾患であるレビー小体型認知症 (DLB) を中心に、その自律神経障害と意義について述べる。

日本の 3 大死亡原因は悪性腫瘍、心疾患、脳卒中であり、脳卒中は神経内科領域にとどまらず、重要な疾患である。脳卒中は直接の死因となるだけでなく、突然死の危険因子であることがよく知られている。その理由として、①虚血性心疾患の危険因子が脳卒中の危険因子でもある、②冠動脈疾患および心房細動が虚血性脳卒中の主要な危険因子である、③中枢病変が心自律神経活動に影響を与える、などが挙げられる。実際、脳卒中の急性期には心停止、不整脈、たこつぼ心筋症などがしばしば観察される。自律神経活動に影響を与える脳内の部位は central autonomic network と呼ばれ、前部帯状回、島皮質、扁桃核、視床下部、脳幹網様体などから構成される。脳卒中患者における突然死に関連する部位に関して、Oppenheimer の仮説が注目されている。Oppenheimer は、てんかん患者の側頭葉切除術の術中に大脳皮質を電気刺激し、血圧と脈拍が右刺激で増加し、左刺激で低下すると報告し、右島皮質が交感神経中枢、左島皮質が副交感神経中枢であると推察した。その後、Oppenheimer の仮説を支持する研究が複数報告される一方で、支持しない報告も散見され、今後のさらなる検討が必要である。しかし、脳卒中後の突然死と心拍変動との低下には関連があることが報告されるなど、脳卒中後の自律神経活動の変化が突然死に関与している可能性は高い。自律神経活動は network で調節されており、特定の病変部位と突然死を単純に結びつけるだけでは説明できないのかもしれない。

神経領域で重要な疾患である PD や多系統萎縮症などの神経変性疾患は自律神経障害を高頻度に伴う。自律神経障害は神経疾患の生命予後予測因子として重要であるとともに、診断バイオマーカーとしても期待されている。特に関心が高いのはレビー小体型病のひとつである PD である。レ

ビー小体は神経細胞の内部に見られる異常な球状の構造物であり、PD ではレビー小体の中脳黒質を中心に認められる。神経疾患の進展様式に関する Braak 仮説によれば、PD のレビー小体病理は嗅神経と末梢自律神経から始まるとされ、実際に嗅覚低下や便秘は PD の発症前から出現することが報告されている。自律神経障害のスクリーニングが PD の初期診断あるいは発病前診断に役立つ可能性があり、注目が集まっている。交感神経節後神経を評価できる MIBG 心筋シンチグラフィによる検討では、PD では病初期から心交感神経節後神経が障害されることが明らかとなっており、既に一般臨床で利用されている。また、胃壁神経叢や迷走神経背側運動核も病初期に障害されることが指摘されており、交感神経節後神経障害に加え、消化管自律神経機能障害や心副交感神経機能障害の特定が PD の診断バイオマーカーとなると期待されている。PD においては、レビー小体を形成する蛋白である α シヌクレインが神経変性に関与していると考えられ、根本的治療となる α シヌクレインに対するモノクローナル抗体による治療が最近試みられた。根本的治療を行う場合は、運動機能障害が顕著になってからでは遅すぎる。神経の変性が軽微な病初期あるいは運動機能障害出現前に治療を開始することが望ましい。そのためには病初期あるいは運動障害出現前に PD を診断する必要がある。自律神経機能検査はその際の有用なツールになる可能性がある。

本邦の認知症患者は、2012 年には 300 万人を超えた。認知症は神経領域において重要な疾患であるだけでなく、高齢化する日本において大きな社会問題であり、適切な診断と介入が求められる。DLB はレビー小体を大脳皮質に広範に認める認知症疾患で、アルツハイマー病 (AD) に次いで多い神経変性認知症疾患である。早期治療は認知症の予後を改善することが知られており、早期診断が重要であるが、認知症疾患の鑑別はしばしば困難である。最近、DLB の診断において自律神経検査の有用性に関心が持たれている。DLB は PD と同じレビー小体病のひとつであり、臨床的および病理学的にも PD と共通性を持ち、PD と同様に嗅神経および末梢自律神経系から病変が始まる可能性がある。実際、DLB では PD と同様あるいはそれよりも顕著に病初期から自律神経障害が認められることが多く、MIBG の心筋集積低下がみられることも報告されている。一方、DLB と鑑別が問題となる AD では自律神経機能は保たれていることが多く、MIBG の心筋集積は正常である。自律神経機能検査や MIBG 心筋シンチグラフィは DLB と AD の鑑別に有用であると考えられる。

今後、神経疾患の予後予測や診断において自律神経機能検査はさらに重要性・必要性が高まると予想される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

遺伝性拡張型心筋症における無症候期、突然死危険期、心機能破綻期と、これらを左右する因子

呉林なごみ（順天堂大学・医・薬理）

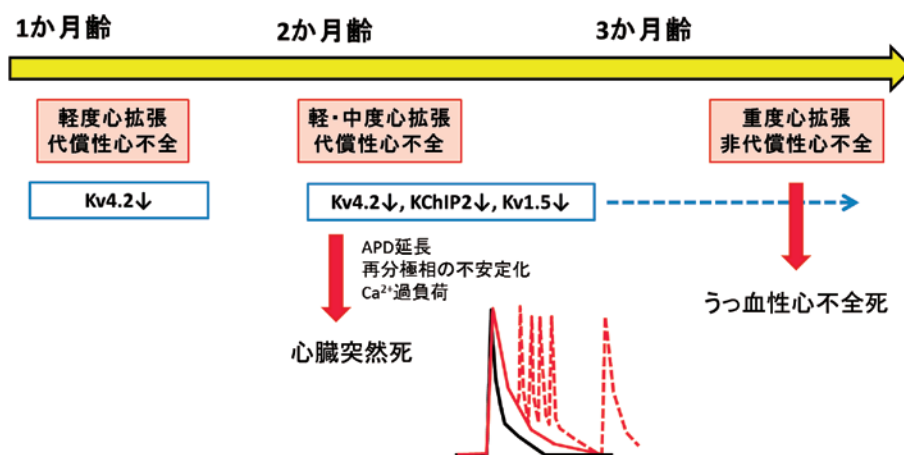
家族性拡張型心筋症（DCM）は心拡張と収縮不全を特徴とする進行性疾患であり、死因の約50%は心不全の悪化（非代償性心不全）、約40%は予期せぬ突然死である。現在多くの原因遺伝子が報告されており、一般的に収縮力を低下させる変異がDCMを惹起すると考えられている。しかし同一変異であっても発症時期は若年から高齢まで様々で、死因も心不全悪化と突然死の両方があり、その理由はまだよく分かっていない。ヒトにおける遺伝子疾患の系統的な研究は困難な為、遺伝的・環境的な背景が均一な動物実験が重要となる。本報告では九州大学の森本幸生博士がヒトDCM変異に基づいて作出したTNNT2（トロポニンT） Δ K210ノックインマウス[1]を用いたDCM心室筋の電気的リモデリングと心不全の経時変化について紹介する。

DCMマウスの病態進行の経過：TNNT2 Δ K210ホモ接合体マウス（C57BL/6J strain）（以下DCMマウス）は、心筋筋原線維のCa²⁺感受性低下を示し出生時から既に心拡大がある。生後1か月半以前の死亡率は非常に低いが、以降、急激に増加し半減期は70~90日である。DCMマウスは外見上元気で、いつから非代償性心不全がおこるのか、死因が心不全か突然死かを知るの難しい問題である。心不全の判定には心臓超音波検査が良く用いられるが、突然死の危険性が高いマウスは麻酔や保定操作によりしばしば死亡し実験が中断される。心不全の進行過程を調べるため、回し車を用いた自発運動量とsacrifice後の肺重量/体重比（肺

うっ血の尺度）および心重量/体重比（心拡張の尺度）を測定した[2]。DCMマウスの自発運動量低下は肺うっ血と非常によく対応したので、その経時変化測定はうっ血性心不全の進行判定の良い手段となることが分かった。2か月齢前後で死亡したDCMマウスの大部分は直前まで野生型と同様の高い運動性を保っていた。一方、3か月以降まで生きた個体の多くでは運動性が10~20日前後かけて徐々に低下し重度心拡張とうっ血性心不全を呈してから死亡した。どちらの場合もテレメトリ心電図では低頻度であるが心室性不整脈が記録され、死亡時にはすべて心室性不整脈を示した。以上より、このDCMマウスではある確率で心室性不整脈が発生し一部は突然死し、生き残った個体はうっ血性心不全が重症化して死亡すると考えられた(図)。

DCMマウスの病態進行に伴う電気的リモデリング：DCMマウスの不整脈発生に関与する因子を調べるためにイオンチャネルの発現解析を行った。出生直後からKv4.2（I_{to}チャネル）の減少、Cav3.1（T型Ca²⁺チャネル）の増加がみられた。加えて2か月齢前後からはKv1.5（I_{Kur}チャネル）、KChIP2（Kv4.2修飾因子）の減少が始まり、これに対応して心電図QT間隔や心筋活動電位持続時間（APD）の延長も顕著となった。またAPDの心基部・心尖部間の差も増大していた。以上の結果からDCMマウスの心室性不整脈/突然死には複数種類のK⁺電流の減少とその部位差の増大が寄与しているものと考えられた[3]。さらに、心不全非代償期には心筋細胞の構造変化や線維化が重篤になると考えられた。

病態進行に影響する因子：森本らは、いくつか



図

薬物が DCM マウスの心不全の進行を改善することを報告している。我々はアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の電気的リモデリングに対する効果を検討した。ARB は生存率を著しく改善すると共に、心拡大の抑制および上述 K^+ チャネルの有意な減少を示した (Odagiri et al., 投稿中)。

結語 本 DCM モデルマウスはヒト DCM の病態を再現する良いモデルと言える。このモデルを用いた実験において、心拡張および寿命が多くの薬物や因子によって影響されたことから、今後の治療法の開発により家族性 DCM の大幅な予後改善が見込まれる。

なお本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Du CK et al: *Circ Res* **101**: 185, 2007
2. Sugihara M et al: *PLoS One* **8**: e55514, 2013
3. Suzuki T et al: *PLoS One* **7**: e35353, 2012

GTP-binding protein α_q 強発現による心不全と頻脈性不整脈発生の機序について

弘瀬雅教, 竹石恭知 (岩手医科大学・薬・分子細胞薬理学)

GTP-binding protein coupled receptor (GPCR)-ホスホリパーゼ C (PLC) 系の活性化は心肥大や心不全の進展に重要であり、心房細動や心室頻拍の発生にも関与している。この GPCR-PLC 系の活性化は、inositol-tri phosphate (IP3) と diacylglycerol (DAG) を産生するが、これらの内どちらが心不全の進展と不整脈発生成に重要であるかについてはよくわかっていない。最近、活性化型の G protein α_q を一過性に強発現した心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス ($G\alpha_q$ TG) が、心不全と心房細動、心室性期外収縮や心室頻拍を誘発することを解明した。そこで、この $G\alpha_q$ TG マウスと DAG kinase ζ を強発現したマウスを交配して、心不全と不整脈発生における DAG の役割を検討したところ、 $G\alpha_q$ TG マウスで引き起こされた心不全および不整脈は、DAG kinase ζ を発現した共発現した $G\alpha_q$ TG マウスでは、ほぼ完全に抑制されることがわかった。この結果は、GPCR-PLC 系の活性化による心不全の進展や不整脈の発生に、DAG の関与が重要であることを示唆している。

次に、GPCR-PLC 系の活性化が、diacylglycerol (DAG) を介して種々の TRPC チャネルを活性化する事、TRPC チャネルのサブタイプである TRPC3 と TRPC6 の活性化は、陽イオンの細胞内流入を起こし、膜電位を脱分極させ心筋肥大を引き起こすことが報告されていることを受け、この

TRPC チャネル活性化の不整脈トリガー発生に対する関与について検討した。心不全を引き起こして心室性不整脈を発生している $G\alpha_q$ TG マウスに TRPC チャネル阻害薬である SK&F96365 を投与して検討した結果、この $G\alpha_q$ TG マウスで誘発された心室性期外収縮の数と心室頻拍は有意に抑制された。また DAG 類似物である 1-oleoyl-2-acyl-sn-glycerol (OAG) は、正常 (WT) マウスと比較して $G\alpha_q$ TG マウスにおいて、心室性期外収縮の数を有意に増加させ、また心室頻拍を誘発させた。この OAG の効果は、SK&F96365 の投与により抑制された。さらに、単一心筋のパッチクランプ実験において $G\alpha_q$ TG マウスの心室筋は、早期後脱分極および遅延後脱分極による triggered activity を誘発した。この triggered activity の誘発は、SK&F96365 の投与により抑制された。この結果は、心不全に伴う心室頻拍発生のトリガーに、TRPC チャネルが関与していることを示唆している。本研究で用いた $G\alpha_q$ TG マウスは活性化型の G protein α_q を一過性 (生後 4 週まで) にのみ強発現しているにもかかわらず、16 週齢では発生しない不整脈が 32 週齢で認められる。一方、Renin-angiotensin-aldosterone 系は心肥大や心不全の進展に重要で、心房細動や心室頻拍の発生にも関与していることが知られている。そこで、Angiotensin II type 1 受容体の阻害薬であるオルメサルタンを 6 週齢より 32 週齢まで慢性投与して $G\alpha_q$ TG マウスにおける心不全と不整脈発生について検討した。オルメサルタンの慢性投与は、32 週齢の $G\alpha_q$ TG マウスにおいて心不全を改善し、心室性期外収縮の発生頻度も有意に減少させた。また心室筋の TRPC6 蛋白の発現量増加を改善させた。加えて心筋の angiotensin converting enzyme (ACE) 1 および 2 の遺伝子発現量の検討では、 $G\alpha_q$ TG マウスにおいて WT マウスと比較してその発現量が有意に増加していることがわかった。今回の結果から、GPCR-PLC 系の活性化により発症してくる心不全や不整脈においては、DAG 経路が重要な役割を果しており、DAG の活性化による TRPC チャネルの活性化が不整脈発生の引き金となっていることが示唆される。加えて、初期の GPCR-PLC 系の活性化がどのような系で引き起こされるかに関わらず、心不全の進展や不整脈発生には renin-angiotensin 系が大変重要な役割を担っている可能性も示唆された。

なお本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

心不全・突然死モデルマウスを用いた心不全の病態解明と新規治療標的の同定

桑原宏一郎（京都大学大学院・医・内分泌代謝内科）

心血管病の最終病態としての慢性心不全は未だ予後不良の症候群であり、その病態解明に基づく新規治療標的の同定が望まれる。そのためには、有用なモデル動物の開発とその詳細かつ的確な解析が不可欠である。慢性心不全の死因の約50%を占める突然死は、主に頻脈性の心室不整脈によるものと考えられるが、慢性心不全に伴うこれら致死性不整脈発症機序の分子メカニズム解明は未だ十分とは言えず、有効な薬物療法も乏しい。慢性心不全に伴う突然死の有効な動物モデルの解析に基づく、新規治療標的の同定が必要である。

我々は心臓ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチドおよび脳性ナトリウム利尿ペプチド（ANP, BNP）の遺伝子発現の制御機構を研究する過程において neuron-restrictive silencer factor (NRSF) として知られる転写抑制因子の意義を見出した。転写抑制因子である NRSF はその結合配列である NRSE を介して ANP および BNP の遺伝子発現を負に制御しており、その抑制の解除が病的状態における ANP, BNP 遺伝子発現亢進の一部に関与することを我々は明らかにした。ANP, BNP 遺伝子は一般に胎児期の心筋には強く発現し、生後、心筋の成熟と共にその発現が低下することから、心筋胎児型遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子群に属すると考えられている。我々は NRSE が ANP, BNP 遺伝子のみならずその他の心筋胎児型遺伝子と呼ばれる遺伝子にも存在することを見出した。このことは、NRSF が広く心筋胎児型遺伝子の発現調節に関わることを示唆するものと考えられた。そこで NRSF の機能を心筋細胞でのみ阻害するマウス（優性抑制変異 NRSF 心筋特異的過剰発現マウス；dnNRSF-Tg）を作製したところ、予想通り ANP, BNP の発現が亢進していたが、それに加え、このマウスは生後加齢に伴って徐々に心収縮能低下をきたし、最終的には頻脈性心室性不整脈により突然死することが明らかとなった。このマウスでは前述の ANP, BNP 始め、複数の心筋胎児型遺伝子の発現が亢進していた。これら心筋胎児型遺伝子は種々の心臓病態で発現亢進することが種を超えて報告されていること、実際、ANP, BNP 血中濃度はヒトの心不全の予後とよく相関することから、我々はこの dnNRSF-Tg モデルをヒト慢性心不全・突然死のよい動物モデルの一つと捉えて、現在その解析を行っている。

こうした研究の中で、まず我々は胎児期の心室筋には多く発現するが、生後の成熟した心室筋では発現が低下し、病的心では心室での発現が再度亢進することが報告されているイオンチャンネルである、T 型カルシウムチャンネルおよび HCN チャンネルといった心筋胎児型イオンチャンネルに注目した。これらイオンチャンネルの遺伝子上には NRSE が存在しており、実際 dnNRSF-Tg の心室筋においてこれらイオンチャンネルの発現が亢進していた。そこで、これらイオンチャンネルの発現亢進の、dnNRSF-Tg の突然死における意義を検討するために、それぞれのイオンチャンネルの阻害作用を有する薬物を dnNRSF-Tg に投与した。その結果、いずれの阻害薬も対照群に比し、心室性不整脈発生を抑制し、dnNRSF-Tg の生存率を改善させた。T 型カルシウムチャンネルの阻害薬では dnNRSF-Tg の心室筋における静止膜電位の上昇が改善するとともに、dnNRSF-Tg でおそらく心機能の低下により二次的に引き起こされと考えられる、自律神経バランスの異常（交感神経活性亢進と副交感神経活性低下）も改善されていた。一方 HCN チャンネル阻害薬では、dnNRSF-Tg 心室筋細胞における異常自動能の亢進が明らかに抑制されていた。これらの結果より、これらイオンチャンネルの発現亢進は、それぞれ異なる機序を介して dnNRSF-Tg の致死性不整脈発症に関与することが示され、これらイオンチャンネルの阻害薬が、慢性心不全における悪性不整脈発症の予防に有効である可能性が示唆された。また、dnNRSF-Tg では、上記に述べた自律神経バランスの異常に加え、レニン-アンジオテンシン系の活性化も認めており、これらのおそらく心機能の低下により dnNRSF-Tg で二次的に活性化されと考えられる因子もまた、dnNRSF-Tg の突然死発症に関与することも我々は明らかにしつつある。このように、一次的に心室筋で起こる遺伝子発現変化に加え、二次的に引き起こされる神経体液性因子の活性化が、相互に作用しつつ慢性心不全における致死性不整脈発症に関与していることが、我々の研究で示されつつある。さらなる研究が新しい慢性心不全、致死性不整脈に対する治療法の開発につながることを期待したい。

なお本シンポジウム発表で報告した内容は、Institut de Recherches Internationales Servier よりの研究費を使用して行った研究の結果である。

慢性的で過剰な β_1 アドレナリン受容体刺激が心室筋の興奮収縮連関を修飾する分子機序について

柏原俊英 (信州大学・医・分子薬理学講座)

心不全では、低下した心収縮力を代償するため交感神経やレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が活性化される。これらの反応は、一時的には血行動態を改善するが、やがて心室筋細胞の興奮収縮連関をリモデリングして、心収縮力をさらに低下させる。心不全の病態生理の本質のひとつは、この悪循環にある。

心室筋細胞では、活動電位に伴い開口した L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) を介して流入した Ca^{2+} が、筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体 (RyR) からの Ca^{2+} 遊離を生じ、収縮を引き起こす (Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR))。活動電位が終了すると、細胞内 Ca^{2+} の約 70% は SR の Ca^{2+} ポンプである SERCA2 により SR に回収され次の収縮に再利用され、残りの約 30% は表面細胞膜の Na^+ , Ca^{2+} 交換機構 (NCX) により細胞外へ排出される。心不全では、SERCA2 の活性が低下し、NCX の活性が上昇するために、拡張期に SR に回収される Ca^{2+} が減少する。さらに心不全では、拡張期に RyR を介して SR の Ca^{2+} が細胞質にリークする。これらの興奮収縮連関のリモデリングにより、心不全では SR の Ca^{2+} 含量が低下し、CICR により SR から遊離される Ca^{2+} が減少して収縮力が低下する。

一方、これまでの研究では、心不全で CICR を引き起こす LTCC の活性は大きく変化しないとされてきた。しかし、心室筋細胞の LTCC は T 管と表面細胞膜に存在しており、興奮収縮連関で主要な役割を果たすのは T 管の LTCC である。にもかかわらず、これまで心不全の研究は、T 管と表面細胞膜の LTCC を区別して解析してこなかった。そこで我々は、単離心室筋細胞の T 管を急性に閉塞させる方法 (detubulation) を用いて、心不全による T 管と表面細胞膜の LTCC の変化を区別して評価した。

心不全のモデル動物としては、 β アドレナリン受容体 (β AR) 作用薬のイソプロテレノール (ISO) を 21 日間連続投与して作成したマウス (ISO マウス) を用いた。このマウスは、慢性で顕性の心不全を呈し、その心不全は β_1 AR 選択的阻害薬のメトプロロールの同時投与で完全に抑制された。したがって ISO マウスの心不全は、過剰な β_1 AR 心室筋刺激が心室筋の興奮収縮連関をリモデリングすることにより生じていると考えられた。

Detubulation は、CONT マウスの心室筋細胞の LTCC 電流を約 60% 減少したが、ISO マウスの LTCC 電流を約 30% しか減少しなかった。このことは、ISO マウスの心室筋細胞では T 管の LTCC 電流が減少していることを示唆している。実際に、detubulation をした細胞としていない細胞の LTCC 電流量と細胞膜電気容量から計算した T 管の LTCC 活性は、ISO マウスでは正常マウスの約半分に減少していた。この現象は、ISO マウスの心機能の低下に寄与していると考えられた。一方、表面細胞膜の LTCC 活性は ISO マウスの心室筋細胞で有意に増加していた。さらに種々の薬理学的解析から、ISO マウスの心室筋細胞の T 管では蛋白質脱リン酸化酵素 (PP) 2A の機能亢進により LTCC 活性が減少し、表面細胞膜では PP1 の機能低下により LTCC 活性が増加していることが判明した。

ところで、心筋細胞では三量体 G 蛋白質 $G_{i/o}$ が PP2A を活性化し、 G_o が PP1 を抑制することが知られている。そこで、ISO と同時に G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と $G_{i/o}$ の共役を特異的に阻害する百日咳毒素 (PTX) を投与したマウスを作成して解析した。その結果、PTX は ISO マウスの心室筋細胞の LTCC の異常をほぼ完全に改善し、心機能有意に増加した。これより心不全では何らかの GPCR が $G_{i/o}$ の活性化を介して LTCC 活性の異常を惹起することが示唆された。

心室筋細胞で $G_{i/o}$ と共役する GPCR としては、 β_2 AR, M_2 ムスカリン性受容体 (M_2 R), A_1 アデノシン受容体 (A_1 R) 等が知られている。そこでこれらの受容体の逆アゴニストを ISO と同時に投与したマウスを作成して解析した結果、 β_2 AR と M_2 R の逆アゴニストは ISO による LTCC 活性の異常と心機能の低下を著明に改善した。一方、 A_1 R の逆アゴニストを投与したマウスは ISO マウスと差がなかった。

以上の結果より、心不全では慢性的で過剰な β_1 AR 刺激が何らかの機序で間接的に β_2 AR 或いは M_2 R を活性化し、 G_i を介して PP2A を活性化して T 管の LTCC 活性を半減することで心機能を抑制することが示唆された。したがって、これらの受容体の逆アゴニストは、新たな心不全治療薬になる可能性があると考えられた。

なお本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。