

# <sup>99m</sup>Tc-Annexin Vによる虚血再灌流心筋における アポトーシスイメージング

滝 淳一\* 樋口 隆弘\* 川島 篤弘\*\*  
中嶋 憲一\*\* 松成 一朗\*\*\* 村守 朗\*  
河野 匡哉\* 利波 紀久\*

アポトーシスは種々の心疾患の病態に関与しているとされるが、心筋虚血再灌流においてはアポトーシスが重要な役割を担っていると考えられている。アポトーシスが惹起されるとその比較的早い時期に細胞膜内側に能動的に局限していた phosphatidylserine が細胞膜表面に露出する。この phosphatidylserine に対して Annexin が高い結合性を有しており、Annexin を <sup>99m</sup>Tc にて標識することにより細胞膜表面の phosphatidylserine の検出すなわちアポトーシスの画像評価が可能となる。

近年 <sup>99m</sup>Tc-Annexin V (TcA) が開発されその有効性が示されている。そこで TcA を用いてラット心筋虚血再灌流モデルにおけるアポトーシスイメージングの可能性と、再灌流後の経時的变化を検討した。

## 【方法】

41匹のウイスターラットにおいて左冠動脈を近位で20分間閉塞し再灌流した。再灌流30分 (n=6), 90分 (n=7), 6時間 (n=7), 1日 (n=8), 3日 (n=8), 2週間 (n=5) にて TcA (80-150MBq) を投与し、1時間後に左冠動脈を再結紮し <sup>201</sup>Tl (0.74MBq) を投与し1分後に屠殺した (図1)。ただちに心臓を取り出し冷凍し、オートラジオグラフィのための心筋の短軸標本を20ミクロンの厚さで連続的に作製した。これをイメージングプレートにて約20分間 exposure し TcA の分布を画像化した (BAS-5000, Fuji Film)。<sup>99m</sup>Tc が減衰しほぼ消失した3日後 (12半減期) に同様に <sup>201</sup>Tl のオートラジオグラフィ (虚血領域像) を24時間の exposure にて行った (図2)。

解析は <sup>201</sup>Tl での虚血領域に一致する関心領域 (ROI) を TcA 像に適応し、そのカウント濃度の正常灌流領域のカウント濃度に対する比を求めた。

## 【結果】

TcA の集積は極めて不均一であり、TcA の虚血部正常部集積比は30分から90分で最も高くそれぞれ  $4.8 \pm 2.3$ ,  $4.4 \pm 1.6$  であり、その後低下し1日、3日、14日後でそれぞれ  $2.6 \pm 0.54$ ,  $1.6 \pm 0.39$ ,  $1.3 \pm 0.31$  であった (図3)。TcA 集積分布からはアポトーシスが心筋中央部から始まり、再灌流6時間後には心外膜、内膜側に拡大し、その後3日にわたり徐々に終息に向かうことが示された。TcA 集

積部は TUNEL 染色陽性部とほぼ一致した。TUNEL 染色では30分モデルで染色陽性がみられ、1日モデルで特に陽性細胞が多く、3日モデルではごく一部に染色陽性細胞を認めるのみであった (図4)。

## 【考案】

今回の結果からアポトーシスは再灌流直後より始まり、しかもその程度は直後が最も強く、約3日の間で徐々にアポトーシスのアクティビティが減少し終息していくものと考えられた。TUNEL 染色は24時間後が最も陽性率が高かったが、TcA 集積との時間的差異に関しては、phosphatidylserine の細胞膜表面への分布がアポトーシス初期にみられる現象に対して、DNA の断片化はアポトーシスの最終段階でみられる現象であることより説明可能であると考えられた。

## 【結論】

TcA イメージングはアポトーシス画像診断法として有用であり、虚血再灌流の早期心筋細胞障害の検出に有用と考えられた。

図の説明

### 図1

実験プロトコル。左冠動脈を近位で20分間閉塞し、図の如く種々の時間後に再灌流した TcA (80-150MBq) を投与した。1時間後に左冠動脈を再結紮し <sup>201</sup>Tl (0.74MBq) を投与し1分後に屠殺した。

### 図2

デュアルオートラジオグラフィ。屠殺後直ちに心筋凍結切片を作成し20分間イメージングプレートにて exposure し、TcA の分布画像を得た。TcA が減衰した3日後に24時間の exposure にて <sup>201</sup>Tl の area at risk 画像を得た。

### 図3

虚血再灌流後の TcAV の正常灌流部分に対する虚血部の TcA の集積比を示した。右方に実際のオートラジオグラフィの画像を示した。上段が TcA の下段が <sup>201</sup>Tl の画像である。<sup>201</sup>Tl での集積がない area at risk 部に局限して TcA の集積が見られ、アポトーシスの分布を示しているものと考えられる。

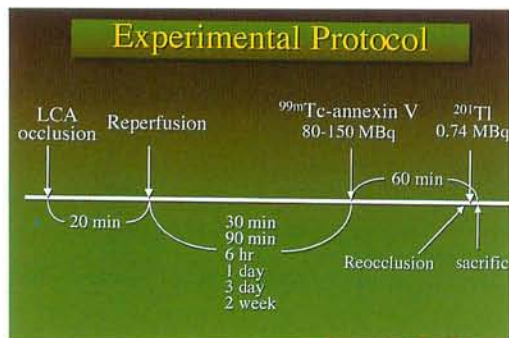
### 図4

TUNEL 染色の結果を示す。核が褐色に染まった陽性所見は再灌流30分モデルよりみられ、24時間後が最も陽性率が高かった。3日後ではごくわずかの陽性所見をみるのみである。

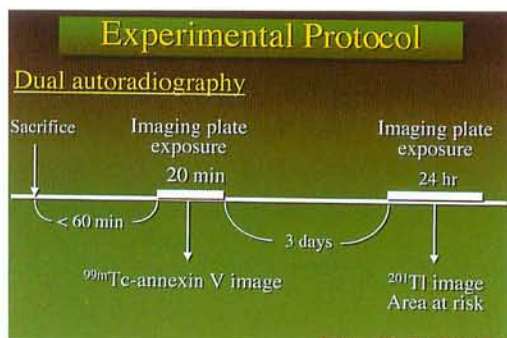
\* 金沢大学大学院医学系研究科 バイオトレーサ診療学

\*\* 分子細胞病理学

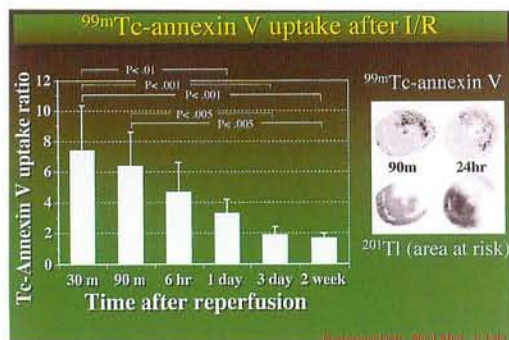
\*\*\* 先端医学薬学センター



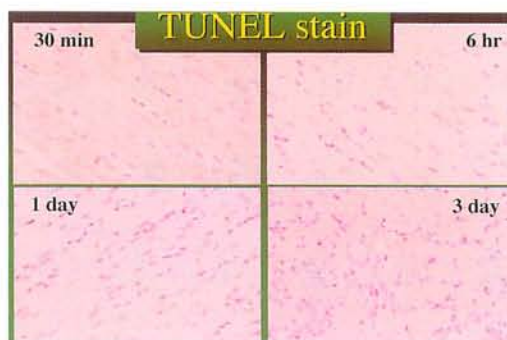
▲ 図1



▲ 図2



▲ 図3



▲ 図4