

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659678

研究課題名（和文） ヒト破裂脳動脈瘤の瘤壁性状に応じた流体解析と免疫組織解析による破裂機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the rupture mechanism By immunohistological analysis and computed fluid dynamics analysis according to the aneurysmal wall properties in human ruptured cerebral aneurysm.

研究代表者

中山 若樹（NAKAYAMA NAOKI）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：40421961

研究成果の概要（和文）：

これまで、臨床例における脳動脈瘤クリッピング術後の動脈瘤組織標本を計 54 個（破裂例 40 個、未破裂例 14 個）が取得できた。破裂瘤に特徴的な病理組織学的所見として、〈1〉内皮下のフィブリン析出、〈2〉内膜内へのリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤、〈3〉内壁表面の層状血栓形成などが見られた。

一方で、免疫染色や走査電子顕微鏡による評価では、瘤壁にも機能は低下しながらも内皮細胞は存在しているようだが、破裂部近傍では形態や配列が乱れが顕著であったり、損失していたりすることが示唆された。

これらの所見から鑑みると、動脈瘤は、壁せん断応力低下などの力学的要素に影響を受けた内皮障害に端を発し、その修復過程としての内壁の血栓形成あるいは壁内出血そしてそれに対する急激な炎症反応が、やがては壁の崩壊をきたすことで破裂すると推察される。

研究成果の概要（英文）：

Aneurysmal specimens in human clinical cases totaled 54 (ruptured 40, non-ruptured 14), which were obtained after clipping surgery, were acquired till now. As findings to be characteristic of ruptured cerebral aneurysm, <1> fibrin deposition under aneurysm endothelium, <2> infiltration of inflammatory cell to intima, <3> layered thrombus formation in inside wall surface were found.

On the other hand, by immunohistological study and scanning electron microscopic study, endothelial cell seems to be still present in an aneurysm inside wall while a function falls. But, especially in ruptured aneurysm, it is speculated that its configuration and alignment was distracted, or it had been lost. When it considers from these findings, aneurysm may rupture because wall disintegration gets up by thrombus formation in intima and intramural bleeding and drastic inflammatory reaction following the endothelium disorder that was influenced by mechanical stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学、脳動脈瘤、破裂、内皮、炎症、免疫染色、computed flow dynamics

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脳動脈瘤の増大・破裂の機構解明を目標にした流体力学的あるいは免疫組織学的な研究が盛んに行われてきており、壁せん断応力や壁の炎症反応などが着目されているが、それらが瘤の安定化/増大/破裂といった様々な機転にどう関与しているか、未だその全容解明には至っていない。

これまで、ヒト脳動脈瘤の術前検査画像やファントムなどを用いた流体力学的研究により、血管分岐部にかかる壁せん断応力が血管内皮の障害を介して動脈瘤形成の引き金になっていることが示されている (Ujiie *et al. Heart Vessels* 23: 60-6, 2008)。そして形成された動脈瘤内には、壁せん断応力の高い部分と低い部分とが混在していることも分っている。しかし、破裂につながるのが壁せん断応力の高い部なのか低い部なのかは意見の分かれるところである。一方、bleb の新規形成によりその部位の壁せん断応力が低下することが指摘されているが (Cebal *et al. Proc of SPIE* 6511: 65112C, 2007)、これは動脈瘤の増大が自身の力学的ストレスを減らすための自己保護的なホメオスタシスと捉えることもでき、興味深い知見である。

脳動脈瘤の動物モデルを中心に繰り返らされている分子生物学的研究では、脳動脈瘤の形成増大に血管壁の炎症反応が関わっていることが示されてきた (Moriwaki *et al. Stroke* 37: 900-5, 2006) (Aoki *et al. Stroke* 38: 162-9, 2007)。この炎症反応は壁せん断応力の高い部で活性化されて動脈瘤形成に関わると考えられており、NF- $\kappa$ B・MCP-1・iNOS などの炎症関連因子が動脈瘤増大にも密接に関わっていることが指摘されている。

しかし、前述のごとく動脈瘤増大が力学的ストレス低減のための形態変化とも考えられることと同様に、この炎症反応も、壁を肥厚させることで壁を安定化させ保護するための反応であるとも考えられる。こう考えると、動脈瘤増大や炎症反応は動脈瘤の破裂を惹起する因子ではなくて、増大や炎症をもってしても動脈瘤のストレスを保護しきれなかったものが破裂に至るのかもしれない。様々な分子生物学的現象は明らかにされてきているが、それが破裂に対して善なのか悪なのかは未解決であり、破裂メカニズムを解明するためには動脈瘤の生涯を包括的に明らかにする必要がある。

一方、瘤壁には厚い部分と薄い部分が混在していることはかねてよりよく知られた事

実である。

ヒト未破裂脳動脈瘤の開頭手術で観察される所見として、動脈瘤の瘤壁には非常に菲薄化して脆弱な部分があれば、動脈硬化に類似した変化で厚くなっている部分も混在していることは一般的によく知られている。また、動脈瘤本体の上にさらに突出した娘動脈瘤 (bleb) は最も破裂につながりやすい部分と考えられがちだが、この bleb も壁が厚く硬化したものもあれば薄いものも存在する。しかもこうした壁の厚みの違いや bleb の局在位置は、動脈瘤の基部や先端部などまちまちで一定していない。

一般に、ヒト破裂瘤の手術においてはその全貌を視認することは困難とされている。しかし我々はそれを正確に観察できる手術方法を行っており、破裂点をも温存した病理標本を取得することができる。これを用いることによって、これを題材として用いることで、真の破裂機構の解明に大きく近づくことができると期待される。

## 2. 研究の目的

ヒト破裂脳動脈瘤手術例における、破裂点を温存して取得した病理標本を題材に、異なる壁性状ごとの流体解析および免疫組織学的解析を行うことで、これまで動物実験モデルを中心に示されてきた数多くの断片的知見を統合させ、ヒト脳動脈瘤における増大破裂機構全容の真実を紐解こうとするのが本研究の目的である。

瘤壁の破裂点近傍・破裂点から離れた部・ネック部 (基部)・bleb などの位置ごとに、壁が薄いか厚いかの術中所見に応じて、摘出標本による免疫組織学的解析と、術前3次元画像による流体解析とを行う。更には同様の解析を未破裂脳動脈瘤においても行って破裂瘤の場合と比較検討することで、動脈瘤の経時的形態変化に伴う壁性状変化の破裂に対する意義を見出すことを目指す。最終的には、破裂に至る真の要因は何であるかを解明することを目指す。

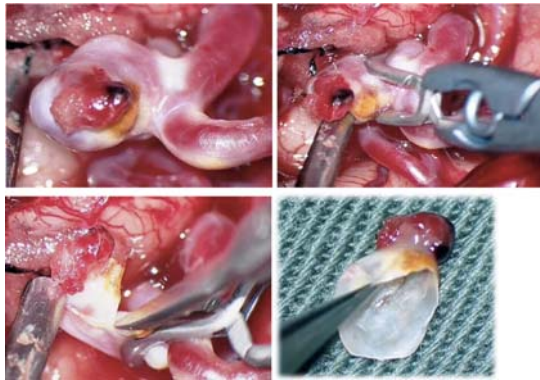
## 3. 研究の方法

### (1) 対象と標本の採取

くも膜下出血を発症した破裂脳動脈瘤に対して開頭クリッピング術を行ったヒト臨床例で、(i) 3次元回転DSA (3D-DSA) または3次元CT血管造影 (3D-CTA) による術前画像 DICOM データ、(ii) 手術中の動脈瘤外

観全貌をくまなく十分に観察できた記録映像、(iii) クリッピング処置後に動脈瘤を切り取った病理標本、の3つが揃った症例が対象となる。

破裂脳動脈瘤クリッピング術において、クリップをかける前に、破裂点を止血しているフィブリン血栓が付着したままの状態ですべて完全に剥離露出し、術中ビデオ録画下に動脈瘤の全周に渡る全貌をよく視認評価した。次いでネック・クリッピングを行ったあと、動脈瘤閉鎖が完全であることを確認した上で、クリップの外側にある瘤壁をそのまま切離採取して、10%ホルマリン液で固定した。



### (2) 組織学的・免疫組織学的評価

基本的な組織学的評価として、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) とエラスティカ・マッソン染色 (EM 染色) を行なった。また標本中のフィブリン要素を評価するために、リンタングステン酸・ヘマトキシリン染色 (PTAH 染色) を行なった。これらを光学顕微鏡 (Olympus BX50) にて観察し、内弾性板 (internal elastic lamina) の欠損・筋内膜過形成 (myointimal hyperplasia) ・壁の菲薄化・新生血管形成・そしてフィブリン析出について評価した。

免疫組織学的評価としては、慢性炎症細胞浸潤の評価としてマクロファージのマーカーである CD68 を使用した。

### (3) 流体力学的評価

動脈瘤壁の異なる性状外観を示す部位ごとに流体力学的評価を行うべく、手術前の 3D-CTA (3 次元 CT 血管造影) もしくは 3D-DSA (3 次元デジタルサブトラクション血管造影) の 2 次元元画像 axial section を DICOM フォーマットで取得した。

## 4. 研究成果

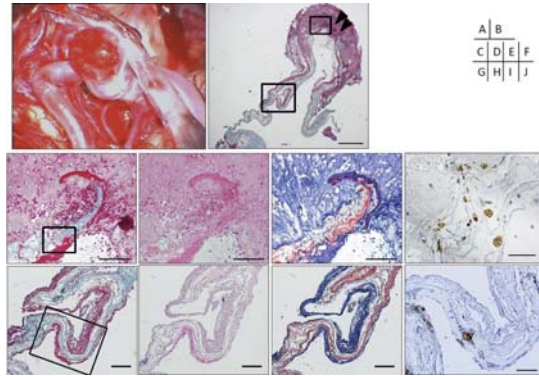
破裂脳動脈瘤 28 個、未破裂脳動脈瘤 12 個の、計 40 個の動脈瘤を解析した。平均年齢

は  $63.1 \pm 9.5$  歳、男女比は 17 : 23 で、動脈瘤の平均サイズ (最大径) は  $6.9 \pm 3.8$  mm だった。

破裂群と未破裂群の双方間において、年齢・性・サイズ・部位・多発・単発・高血圧・喫煙の特徴に差はなかった。

### (1) 代表的な病理組織学的所見

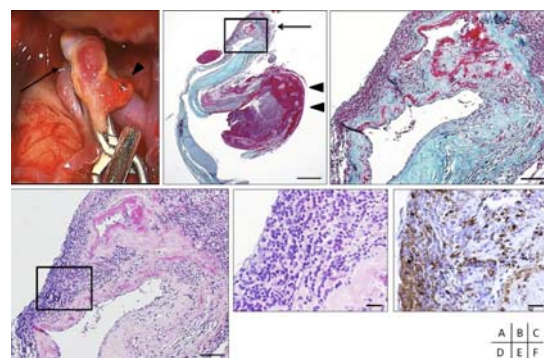
#### ① 症例 1



動脈瘤壁は破裂点 (図 B の矢頭) で断裂しており、その近傍にはヒアリン様の線状構造物が内皮下に存在しているのが EM 染色 (図 C) および HE 染色 (図 D) で認められた。この線状構造物は PTAH 染色で非常に濃い青で染色され、すなわちフィブリンが析出した状態であることが判明した (図 E)。この層には赤血球は存在していない一方で、CD68 陽性細胞の存在が確認された (図 F)。

このような内皮下フィブリン析出と CD68 陽性細胞の浸潤は、破裂点から離れた部位にも認められた。

#### ② 症例 2

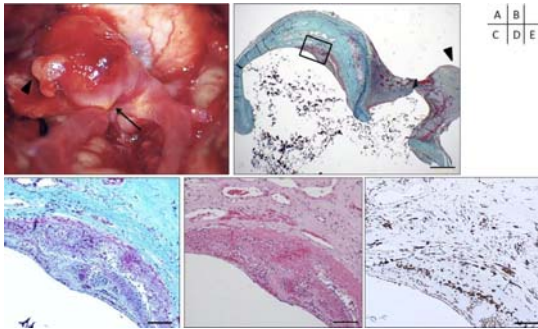


破裂点 (図 B 矢頭) およびそれとはやや離れた部位 (図 B 矢印) において、フィブリン析出と顕著な炎症細胞浸潤が認められるのは、破裂瘤に共通して見られる所見である。さらに、その炎症細胞は、円形核を持つ CD68 陽性細胞すなわちリンパ球および大食細胞であり、このことは動脈瘤の破裂よりも先立って、およそ数日以内に発生した比較的急な



炎症であることを意味する (図 C, D, E)。

### ③ 症例 3



破裂点 (図 A および B の矢頭) からは離れた隣接部位 (図 A における矢印) において、内皮上および内皮下に、層状の血栓形成と新生血管形成が認められた (図 C, D, E)。

### (2) 破裂に関連する因子の解析

内弾性板の欠損、myointimal hyperplasia、壁の菲薄化は、破裂動脈瘤と未破裂動脈瘤の双方に共通して見られる所見であった。

一方、層状の血栓形成は、有意差こそ得られなかったものの、破裂瘤で多く見られる所見であった。また、内皮下のフィブリン析出、壁内出血、壁内新生血管形成、単球浸潤も、破裂瘤で多く見られる所見であり、 $\chi^2$  検定による単変量解析で有意差が得られた。内皮下フィブリン析出は、多変量解析でも破裂瘤と関連性が深いことが示唆された ( $p=0.042$ )。

	Total	Ruptured	Unruptured	univariate P(<0.1)	multivariate P
Number of patients	40	28	12		
Age mean in y:SD	63.1±9.5	63.2±9.6	63.0±8.7	0.96	
Male:Female	17:23	10:18	7:5	0.18	
Size mean in mm:SD	6.7±3.8	6.9±3.7	6.3±3.8	0.63	
Location (ICA-MCA-ACA)	10-12-18	7-9-12	3-3-6	0.98	
Multiple aneurysms	8 (20%)	4 (14.3%)	4 (33.3%)	0.17	
History of hypertension	22 (55%)	16 (57.1%)	6 (50.0%)	0.68	
Smoking	12 (30%)	9 (32.1%)	3 (25%)	0.65	
Hyperlipidemia	16 (40%)	13 (46.4%)	3 (25%)	0.21	
stenosis	6 (15%)	5 (17.9%)	1 (8.3%)	0.44	
Fragmented internal elastic lamina	39 (97.5%)	28 (100%)	11 (91.7%)	0.12	
Myointimal hyperplasia	28 (70%)	18 (64.3%)	10 (83.3%)	0.23	
Thinning of wall	39 (97.5%)	28 (100%)	11 (91.7%)	0.12	
Subintimal fibrin deposition	28 (70.0%)	26 (92.9%)	2 (16.7%)	<0.001	* 0.042 *
Organized lamina thrombosis	9 (22.5%)	8 (28.6%)	1 (8.3%)	0.16	
Organized intamural hemorrhage	22 (55.0%)	19 (67.9%)	3 (25%)	0.013	* 0.4082
Neovascularization in the wall	21 (52.5%)	19 (67.9%)	2 (16.7%)	0.003	* 0.5200
Chronic inflammation	28 (70.0%)	28 (100%)	4 (33.3%)	<0.001	* 0.8441

### (3) 流体力学的解析

動脈瘤壁の性状の異なる各部位 (薄い部分、厚い部分、bleb、破裂部、非破裂部など) ごとの血行力学的特性として、壁せん断応力や局所流速を評価すべく、computed flow dynamics (CFD) 解析を行うことにした。

術前の 3D-CTA、3D-DSA、MRA などの画像 DICOM データを、画像再構成ソフトウェアである Real Intage® に取り込んで、動脈瘤部を中心とした 3次元の rendering 画像を作成し、これをメッシュ加工処理ソフトウェアである 3-Matics® に移して細部の修正と流体

解析用のフォーマットに変換させ、最後に流体解析ソフトウェアである ANSYS CFX® に移して流体解析を行う、一連のシステムを整備した。

現在、目下それぞれの症例の画像データ解析を順次進めているところである。従来より、bleb が形成された部位では壁せん断応力が低下しており、また壁せん断応力が低下した部位で破裂していることが多いことは指摘されているが、これを病理組織所見と対比させていく予定である。

### (4) 得られた成果と今後の展望

ある時期まで未破裂の状態であった動脈瘤の或る特定の部位が、破裂に至る真の機転を特定することは非常に難しいことではあるが、今回の研究によってその概要が徐々に見えつつある。

そもそも動脈瘤壁では内皮は欠損していたり機能を失ったりしているはずだが、特に壁せん断応力が低下したところでは内皮の配列と形状が乱れて間隙が生じているはずである。ここからフィブリンが内皮下に析出したり、層状の血栓が形成され、また新生血管の形成と壁内出血なども生じたりすることが、動脈瘤破裂と密接に関係がありそうなが判明してきた。

このような変化が生じた壁において、急激な激しい炎症と食食が起きて、とうとう壁が自壊して破裂に至るという一連のカスケードが推測される。

今後はこの推測の確証を得るべく、動脈瘤壁の各部位および破裂点近傍において、CFD 解析による壁せん断応力の低下・走査電子顕微鏡による内皮配列の状況およびその間隙への血栓付着・病理組織学的評価の摺り合わせを行っていく。また易破裂性大型動脈瘤の実験動物モデルを確立して、それを用いて成熟した動脈瘤が破裂に至るまでの各段階を捕捉して経時的な病理組織学的変化を把握し、血栓形成を抑制する薬剤や炎症を抑える薬剤による効果を試験することで、真の破裂機構解明を目指す。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 穂刈正明、中山若樹、西原広史、寶金清博。  
囊状脳動脈瘤の病理像 — 動脈瘤壁の炎症

と血管内皮細胞下のフィブリン析出が脳動脈瘤破裂に与える影響について、

日本脳神経外科学会総会、  
2012年10月17日、大阪国際会議場(大阪)

- ② 穂刈正明、中山若樹、西原広史、寶金清博.  
嚢状脳動脈瘤の病理像 —動脈瘤壁の炎症  
と血管内皮細胞下のフィブリン析出が脳  
動脈瘤破裂に与える影響について、

北海道脳卒中研究会、  
2012年7月7日、札幌医科大学(札幌)

- ③ 穂刈正明、中山若樹、西原広史、寶金清博.  
嚢状脳動脈瘤の病理像 —動脈瘤壁の炎症  
と血管内皮細胞下のフィブリン析出が脳  
動脈瘤破裂に与える影響について、

日本脳卒中の外科学会総会、  
2012年4月26日、福岡国際会議場(福岡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 若樹 (NAKAYAMA NAOKI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：40421961

### (2) 研究分担者

森脇 拓也 (MORIWAKI TAKUYA)  
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講  
師  
研究者番号：30597464

寶金 清博 (HOUKIN KIYOHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90229146

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

穂刈 正昭 (HOKARI MASAOKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教