

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10246

研究課題名(和文) ミニブタ大動脈弁二尖弁化による異常血流が胸部大動脈壁に及ぼす生体反応に関する検討

研究課題名(英文) Bicuspidalization of the native tricuspid aortic valve using a miniature pig

研究代表者

木村 直行 (KIMURA, Naoyuki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20382898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミニブタ9頭を使用し実験を行った。左肋間開胸・頸動静脈送脱血で人工心肺を確立した。大動脈弁尖を二尖弁化し、48時間後(n=8)と7日後(n=1)に安楽死させた。エコーによる二尖弁化評価を行った。computational fluid dynamics (CFD) 解析を行い、wall shear stress: WSS分布を計測した。二尖弁化は、左無冠尖(LN群)3例、右無冠尖(RN群)2例、sham群4例とした。手術死亡率0%・48時間死亡率11%(1/9)で、弁口面積縮小率は $44 \pm 3\%$ であった。CFD解析は、WSS分布はsham群で変化なく、LN型は大彎側でRN型は小彎側でWSS上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：We performed bicuspidalization experiments in miniature pigs and applied computational fluid dynamics (CFD) simulation to investigate the very early histologic changes caused by exposure to abnormal bicuspid flow.

Under general anesthesia, left thoracotomy was performed. Cardiopulmonary bypass was established with carotid artery cannulation and jugular vein and right atrium cannulation. After aortic clamping, bicuspidalization was conducted by running suture of left-non (n=3) or right-non (n=2) aortic cusps. Four sham operations were also performed. Postoperative mortality was 11% (1/9) and there was no operative death. Echo study showed that postoperative stenosis rate was 44%. CFD study showed increased wall shear stress (WSS) in the greater curvature after LN bicuspidalization and in the lesser curvature after RN bicuspidalization, respectively, H/E staining showed similar aortic wall histology between sham surgery and bicuspidalization surgery (high WSS area and low WSS area).

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈二尖弁 大動脈拡大 二尖弁化 ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈二尖弁は、頻度の高い先天性心疾患で（発生頻度 1-2%）、本邦でも大動脈二尖弁関連の心臓手術は増加傾向である。二尖弁症例の約半数は、胸部大動脈拡大も呈する。胸部大動脈拡大は、解離や破裂の原因になるため、二尖弁に合併する胸部大動脈拡大の機序解明は重要である。二尖弁の胸部大動脈拡大の要因は、Marfan 症候群に類似した大動脈壁の先天的脆弱性の他、二尖弁の異常血流による血行力学的影響も提唱されている。しかしながら、異常血流が大動脈壁に及ぼす影響を、分子細胞レベルで解析した研究は少なく、その発症機序は十分に解明されていない。

(2) 申請者らは、生理流体力学および計算力学に基づく循環器系血流解析が専門の埼玉大学中村博士と共同で、ヒト大動脈二尖弁症例の胸部大動脈拡大に関する共同研究を平成 26 年度から開始した。しかしながら、入手できるヒト検体は病的拡大を呈する症例のみで、異常血流が大動脈組織に及ぼす初期～中期の変化を解析することはできない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、埼玉大学理工学研究科機械工学科中村研究室と本学附属病院組織学教室と共同で、成獣化後も体重増加が少ないミニブタを使用し、正常大動脈三尖弁の二尖弁化によって、ヒトに類似したストレス動態を有する実験モデルを作製し、その後 MRI データをもとに数値流体力学計算を行い、異常血流が大動脈壁に及ぼす影響を分子細胞レベルで解析した。

(2) ミニブタにおける大動脈二尖弁の上行大動脈拡大に対する CFD 解析をヒトにも応用し、ヒト大動脈二尖弁症例の胸部大動脈拡大の病態解明を目指した血行力学研究を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、ミニブタ（体重45-50kg）を使用し、大動脈二尖弁化手術及びsham手術を行った（n=9）。さらに、手術未実施症例1例を組織学的解析のcontrolと使用した（n=1）。ミニブタは解剖学的にヒトと類似点が多いが、ヒトに対して通常行う胸骨正中切開アプローチの心臓手術では、ブタは手術後長期生存ができない。このため、左肋間開胸での手術（図1）を今回実施した。手術前1週間前に、術前状態の評価目的に造影CT検査とPC-MRI検査を実施した。手術当日は、全身麻酔下に全身麻酔下で左肋間開胸し、頸動脈送血・頸静脈/右房脱血で人工心肺を確立した。尚、人工心肺回路は、通常のヒト手術と同じ様式のもの

を使用し、周術期の貧血対策として、自己血回収装置（セルセーバー）を使用した。上行大動脈遮断後、心筋保護液を投与、上行



図1：左開胸ミニブタ二尖弁化手術

大動脈を横切開し、隣接する大動脈弁尖を6-0針で縫合し二尖弁化した。また、二尖弁化ブタのコントロールとして、上行大動脈切開のみで、二尖弁化は行わないsham手術も実施した。ミニブタは術後48時間後に安楽死させた。手術前後で、経胸壁心エコーによる二尖弁化の評価を行うとともに、手術48時間後に造影CTとPC-MRI検査を施行し、得られた大動脈形状データと流速データ（基部・弓部・下行大動脈で計測）を用いて、専用ソフトによるcomputational fluid dynamics (CFD) 解析を行い、壁剪断応力（wall shear stress: WSS）分布の変化を計測した（図2）。さらに、高/低WSS部位の組織学的変化をHE染色と電子顕微鏡で比較した。

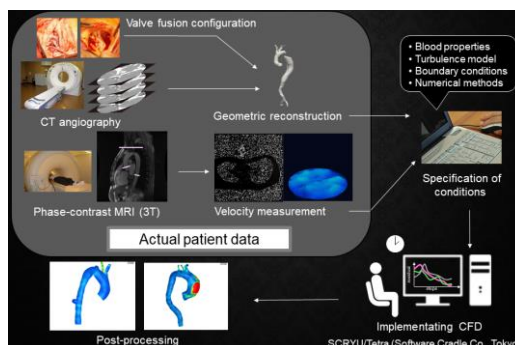


図2：3D-CTとPC-MRIデータに基づくCFDシステム

(2) 大動脈二尖弁による大動脈弁狭窄症（AS）症例12例と陰性コントロール群（大動脈弁疾患がなく、上行～弓部大動脈拡大を認めない下行大動脈瘤症例）3例の合計15症例において、3DCTデータとPC-MRI計測に基づくCFD血流解析を実施し、各症例で上行～弓部大動脈における血行力学因子の分布を解析した（図2）。

4. 研究成果

(1) ミニブタの大動脈二尖弁化

平成 27 年 4 月～平成 28 年 10 月までの期間で、ミニブタ計 8 頭で手術実験を行った。手術内容の内訳は、48 時間後モデル 8 頭（大動脈二尖弁化 5 頭・sham 手術 3 頭）であった。尚、二尖弁化の内訳は、左-無冠尖（LN 群）3 例、右-無冠尖（RN 群）2 例であった（図 3）。手術死亡症例はなく、全例手術後全覚醒麻痺

なしを確認した。手術 48 時間後の CT/MRI 検査時に 1 例呼吸不全で死亡したが、48 時間死亡率は 12.5% (1/8) であった。

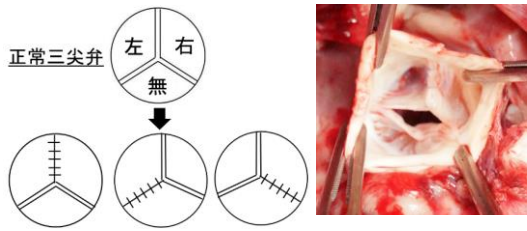


図3：大動脈二尖弁化の模式図

8 例の人工心肺時間：86±18 分、心筋虚血時間：45±14 分であり、二尖弁化 5 例は、術前大動脈弁口面積(AVA)：2.3±1.3cm²・術後 AVA：1.4±0.4 cm²で、平均 AVA 縮小率は 44±3% であった。CFD 解析は、死亡例を除く 7 例で実施し、二尖弁化症例の術前データを intact control として使用した。intact control 群と比較して、sham 群は WSS の上昇なく、LN 型では大彎側を中心に、RN 型では後壁～小彎側を中心に WSS の上昇を認めた (図 4)。

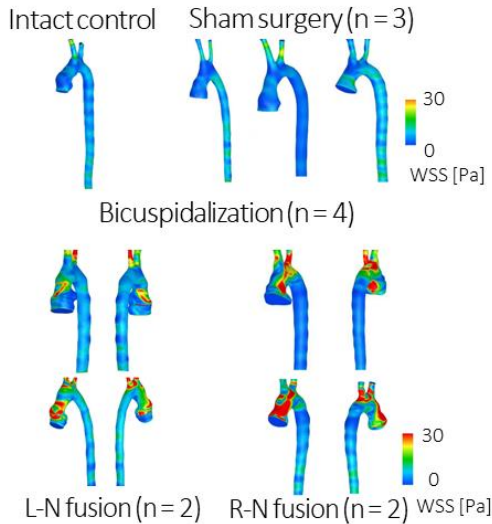


図 4：CFD 血流解析 (ミニブタ)。Intact control = 二尖弁化前の血流解析。Sham surgery (n=3), Bicuspidalization (n=4) を示す。

又、WSS 最大値及び WSS 値 5Pa 以上増加した上行大動脈の面積は、二尖弁化後で有意に上昇していた (図 5)。

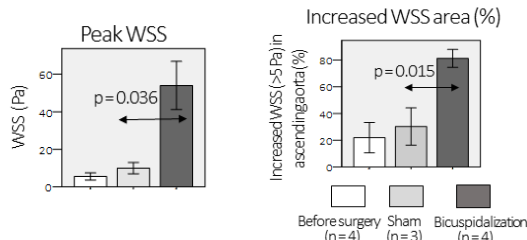


図 5：WSS 因子の比較

左：最大 WSS 値 右：WSS 値 5Pa 以上の面積

この結果を踏まえ、非手術例 (intact control) ・ sham 群・二尖弁化群の 3 群で、下行大動脈 / 上行大動脈大彎側 / 上行大動脈小彎側で組織学的な解析を行ったが、二尖弁化後の高

WSS と低 WSS 部位で、明らかな大動脈壁構造の変化は確認できなかった (図 6)。

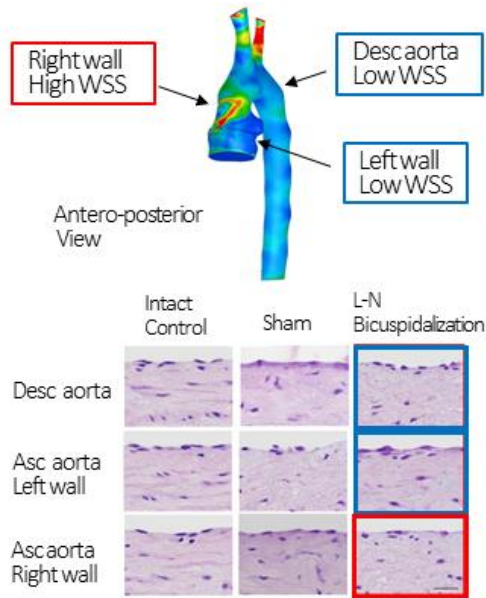


図 6：大動脈壁の組織像 (H/E 染色)

一方、sham 群を含めたほぼ全例で、術後 48 時間後には電子顕微鏡での組織解析では、内皮細胞の不正な細胞突起の出現、細胞の一部膨化、基底膜下の軽微な浮腫像、等の変化が上行～下行大動脈内に確認された。

WSS 上昇にも関わらず、血管内皮細胞を含めた大動脈組織の形態変化が確認できなかった点に関しては、二尖弁化後の異常血流暴露時間が 48 時間と短時間であった可能性が考えられた。このため、48 時間以上の長期生存モデルの可能性を検討するため、7 日モデルの手術実験を平成 28 年 7 月に 1 件施行した。人工心肺装置を使用し、心停止状態で手術操作を行うブタ心臓手術実験は、手術中安楽死させる terminal use 実験がほとんどである。今回、人工心肺装置を使用した左開胸 sham 手術を行い、感染症対策として連日の抗生剤投与を行った。実験ブタは 48 時間以降も生存したため、手術後 7 日目に安楽死させた。術後 7 日目モデルでは電子顕微鏡での変血管内皮細胞の組織変化は改善しており、人工心肺使用 (非拍動流) 時の血流変化が大動脈壁構造に影響を及ぼす可能性も示唆された。今後 7 日目モデルも視野に入れ、本大動脈実験モデルを継続して行う予定である。

(2) ヒト大動脈二尖弁症例

ミニブタ二尖弁化後の血流解析を同じ CFD 解析システムを使用し、ヒト大動脈二尖弁症例の異常血流が、上行大動脈壁に及ぼす影響を計算した。CFD による stream line 解析では、コントロール群の上行大動脈内では直線的な上行性血流が確認されたが、二尖弁群では特異的な螺旋型血流が認められ、ブタ二尖弁化症例と同様に上行～弓部大動脈の広い範囲で WSS の上昇が認められた。特に WSS 値は上行大動脈の大彎側で高い傾向があり、左室流出路に対して、上行大動脈大彎

側の屈曲が強いほど、上行大動脈近位側において高 WSS 部位を認めた (図 7)。

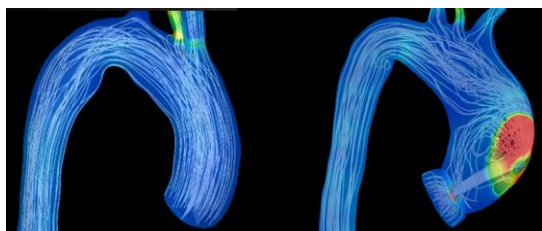


図 7: CFD 血流解析 (ヒト)
左: コントロール群 右: 大動脈二尖弁症群

三尖弁 AS に関しては、二尖弁 AS 症例で大動脈拡大のない 3 症例の大動脈形態情報を使用した CFD simulation を行い、①コントロール群 (n=3) ②三尖弁 AS (n=3) ③二尖弁 AS (n=15) で、上行大動脈内における最大 WSS 値と WSS 値 5Pa 以上の面積を 3 群間で比較した (図 8)。上行大動脈内での最大 WSS 値 (図 8A)、WSS 上昇領域 (図 8B) 双方とも、大動脈二尖弁症群が最も高く、コントロール群と比較して有意差を認めた。

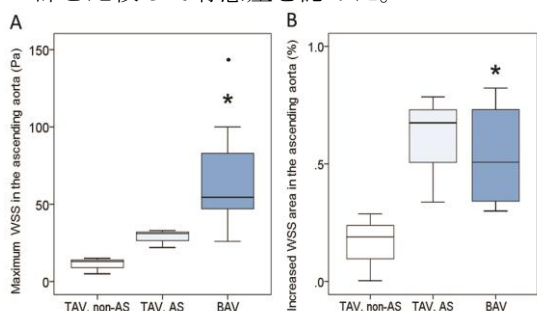


図 8: WSS 因子に関する比較. A: 最大 WSS 値 B: WSS 上昇 (5Pa 以上) 部分の比率. TAV: 大動脈三尖弁, AS: 大動脈弁狭窄症, BAV: 大動脈二尖弁

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Kimura N](#), [Nakamura M](#), Komiya K, Nishi S, [Yamaguchi A](#), Tanaka O, Misawa Y, Adachi H, [Kawahito K](#). Patient-specific assessment of hemodynamics by computational fluid dynamics in patients with bicuspid aortopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017;153;S52-S62.

[学会発表] (計 3 件)

- ① [木村直行](#), [川人宏次](#), [中村匡徳](#), [沼田尚己](#), [岡村誉](#), [伊藤智](#), [由利康一](#), [松本春信](#), [山口敦司](#), [安達秀雄](#). 弁形態分析に基づく大動脈二尖弁に伴う上行大動脈拡大の関連因子の検討. 第 43 回日本血管外科学会 2015 年 6 月 4 日 横浜
- ② [Kimura N](#), [Kawahito K](#), Komiya K, Numata N, [Yamaguchi A](#), Misawa Y, [Nakamura N](#), Adachi H. Patient-specific evaluation of hemodynamics in bicuspid aortopathy by

MRI-based computational fluid dynamics. AATS Aortic Symposium, New York, May 12, 2016

- ③ [吉崎隆道](#), [木村直行](#), [中村匡徳](#), [小宮賢士](#), [矢田部恵](#), [Tofrizal Alimuddin](#), [佐藤弘隆](#), [安達秀雄](#), [三澤吉雄](#), [屋代隆](#), [川人宏次](#). ミニブタを使用した大動脈二尖弁化モデルによる大動脈壁の血流解析. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会 2017 年 2 月 27 日東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

[木村 直行](#) (KIMURA, Naoyuki)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20382898

(2) 研究分担者

[中村 匡徳](#) (NAKAMURA, Masanori)
名古屋工業大学・機械工学科・教授
研究者番号: 20448046

[山口 敦司](#) (YAMAGUCHI, Atsushi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50265287

[川人 宏次](#) (KAWAHITO, Koji)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90281740

(3) 連携研究者

[中江 進](#) (NAKAE, Susumu)
東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター・准教授
研究者番号: 60450409

(4) 研究協力者

[松本 健治](#) (Matsumoto, Kenji)
国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー/感染研究部・部長

[吉崎 隆道](#) (YOSHIZAKI, Takamichi)
自治医科大学・医学部・臨床助教