

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08843

研究課題名(和文)放射光位相差X線CT法による心構造疾患群の構造解析に関する研究

研究課題名(英文) Synchrotron radiation based phase X-ray tomography for mechanical analysis of structural heart disease

研究代表者

築部 卓郎 (Tsukube, Takuro)

神戸大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：50304100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：僧帽弁腱索断裂のメカニズムを解明する目的で位相差X線CT法並びに病理組織学的解析、Tenomodulin(Tnmd)による免疫染色を行い腱索内でのTnmdと位相差X線CT所見とを比較した。正常腱索の平均密度は $1.085 \pm 0.015 \text{g/cm}^3$ 、腱索断裂群では腱索断裂部分の密度は $1.029 \pm 0.004 \text{g/cm}^3$ であり正常と比べ有意に低下した($p < 0.0001$)。膠原線維占有率は正常部位61.1%、異常部位17.2%、Tnmd陽性細胞は正常腱索では内皮細胞層の下の間質組織に局在に対し、断裂腱索では異常結合組織の増加した領域にみられた。僧帽弁腱索の低密度は断裂腱索の脆弱性と関連していると判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

位相差X線CT法を利用し僧帽弁閉鎖不全症の異常構造を三次元・非破壊で解析し、僧帽弁腱索の異常構造をCT像として可視化しえた。その主な学術的意義として2022年にアメリカ胸部心臓外科学会の僧帽弁ワークショップで成果を講演、2023年に誌上発表した。位相差X線CT像と病理学的所見と一致した。腱索内の組織密度測定は、高周波心臓超音波検査法などで再現が可能であり、腱索断裂前の腱索異常を早期にとらえられる可能性を示唆している。さらに形成術中に温存する腱索の異常をとらえられる可能性があり再発予防に寄与しえる。社会的意義として僧帽弁弁下組織異常の早期検出は、多数の患者の治療・予防に直結すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The link between the structural property and the rupturing of chordae tendineae in the mitral valve complex is still unclear. Synchrotron radiation-based X-ray phase computed tomography (SR-XPCT) imaging has been employed, we measured the density of 6 ruptured mitral chordae tendineae, obtained during surgical repairs for mitral regurgitation, and 12 healthy chordae tendineae, obtained from autopsies. The specimens were subsequently analyzed pathologically. The mean densities were 1.0288 ± 0.0043 in the rupture group and $1.0848 \pm 0.0147 \text{g/cm}^3$ in the control group ($p < 0.0001$). Histological examination revealed a change in the components of the connective tissues in ruptured chordae tendineae, in accordance with the low density measured by SR-XPCT. SR-XPCT made it possible to measure tissue density in mitral chordae tendineae. Low density in mitral chordae tendineae is associated with a greater fragility in ruptured mitral chordae tendineae.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：僧帽弁腱索 位相差X線CT法 膠原線維 Tenomodulin 僧帽弁閉鎖不全症

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会である我が国において慢性心不全の増加は喫緊の課題であり、患者数は2030年に130万人に達すると推計される。原疾患として心構造疾患・心臓弁膜症の割合が増加しており、最適な治療法やタイミングの探求が重要となる。一方で近年、心臓弁膜症に対する外科治療では、標準的術式は人工弁による置換術から自己の心臓弁を温存する形成術に変遷している。その代表的疾患として僧帽弁閉鎖不全症に対する僧帽弁形成術の普及があげられる。さらに僧帽弁形成術の手技が確立され長期成績が良好であることが報告されて以来、僧帽弁閉鎖不全症に対する手術適応は拡大し、最新のガイドラインでは臨床的には無症状の症例でも僧帽弁逆流が高度であれば手術適応とされている。また僧帽弁形成修復術に際しては、僧帽弁組織は全く切除せずに腱索を再建する術式も注目されている。このように遠隔成績からみて自己弁を温存する術式が推奨されているが、年齢限界や温存された健常側の腱索の耐久性など不明な点が多い。腱索の構造は波型の膠原繊維束とその外側に散在する弾性繊維からなり、加齢に伴い波型の膠原繊維が直線化し伸展・延長するのではないかと推測されてはいるが、腱索の微細構造、張力や経年的変化および伸展や断裂のメカニズムについては全く明らかにされていない。そこで、張力や加齢による腱索構造を解明し、動脈硬化や加齢による構造変化の抑制機序を解明できれば、それを標的とした介入が可能となり、僧帽弁閉鎖不全症だけではなく心構造疾患の治療体系に技術的革新をもたらす可能性がある。僧帽弁腱索の伸展・延長や断裂が発生するのは、何故なのか？一般的に僧帽弁の前交連側の腱索に比べ後交連側の腱索は延長や断裂を来しやすく、さらに高齢者では腱索は脆弱とされている。I) 腱索の構造に差があるのか？II) 張力が腱索構造に及ぼす影響に差があるのか？が端緒の疑問となる。

2. 研究の目的

僧帽弁腱索断裂は僧帽弁閉鎖不全症の主な原因であり、腱索断裂に起因する僧帽弁閉鎖不全症の第一選択治療として僧帽弁形成術が選択される。しかし、心臓内部の僧帽弁複合体の解剖学的構造が確立されても、構造的性質や腱索断裂との関連は十分に検討されていない。したがって、従来の僧帽弁形成術後に僧帽弁閉鎖不全症が再発する可能性がある。放射光を用いたX線位相差CT(XPCT)は、従来のCTよりも高感度であり、生体軟部組織中の微小な密度差の可視化が可能である。高輝度光科学研究センター(SPring-8)で開発された回折格子干渉計を用いたXPCTが、いくつかの生体軟部組織に用いられている。位相シフトには減衰の約1,000倍の物理量が関与しているため、原理的にXPCTは軟組織に対して高感度である。わずかな密度差や構造の細部を可視化できるのは、高い空間分解能と密度分解能に起因する。このことは、僧帽弁腱索病変の密度データを得て、その形態学的変化を調べるのに有用であることを示唆している。本研究では、XPCTを用いた詳細な可視化と構造定量化により、RCTにおける腱索の構造変化を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

僧帽弁断裂腱索(n=6)は、僧帽弁閉鎖不全症に対して僧帽弁手術を受けた患者から得られた。切除された断裂腱索は10%ホルマリンで固定され、6ヶ月以内にXPCTを用いて3D

画像が得られた（断裂群）。僧帽弁腱索断裂は5本が僧帽弁後尖内側（P2）に、1本が僧帽弁前尖内側（A2）に存在した。さらに、心臓弁膜症のない献体の心臓から12本のホルマリン固定した正常な僧帽弁腱索が得られた（対照群）。断裂群の患者の平均年齢は 70.2 ± 3.0 歳（65-72歳）、対照群の患者の平均年齢は 67.2 ± 14.1 歳（38-83歳）であった。

（ $p=0.4927$ ）。SPRing-8の放射光施設で使用されているXPCTシステムは、シンクロトロンビームラインのX線タルボ回折格子干渉計をベースとしている。標本をアガロースゲルに包埋し、生理食塩水を満たした適当な大きさのプラスチックキャニスターに入れた。次に、回転ステージを用いて、キャニスター内で標本をゆっくりと回転させた。検査室の温度は一定に保たれた。位相格子と吸収格子からなるタルボ格子干渉計を標本の後方に設置し、干渉計で発生したモアレ縞をX線検出器で検出した。位相検索には、位相ステップ数を5としたフリンジスキャン法を用いた。位相検索は、ピエゾ駆動ステージで吸収格子をシフトさせる5段階の位相ステップを使用して達成された。データはハイスループット・システムで処理され、3D画像が作成された。ホルマリン固定した各サンプルについて、僧帽弁腱索の関心領域内の平均質量密度を推定することにより、形態学的差異を定量的に評価した。各関心領域は、断面積 $\times 100$ ボクセルを深さとした。対照群として正常な僧帽弁腱索の乳頭筋付着部付近の質量密度を測定した。断裂腱索では、乳頭筋付着部近傍の断裂部分と僧帽弁尖近傍の非断裂部分の2箇所密度を測定した。

XPCT撮影終了後、検体を10%ホルマリンで保存し、横断面方向に切片化した。その後、各標本の切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）およびシリウスレッド（SR）で染色した。SR染色は弾性線維と膠原線維の検出に用いられた。テノモジュリン（Tnmd）は抗Tnmd抗体による免疫染色で同定し、腱索の治癒過程を検出するために用いた組織学的検査では、炎症、膠原線維や弾性線維などの組織成分の異常を含む修復過程の同定に焦点を当てた。さらに、膠原線維が腱索の密度変化に寄与していることを評価するため、ImageJを用いて標本中の膠原線維の占有率を求めた。占有率は、選択された面積に対する膠原線維成分の占める面積の割合として定義された。形態学的差異を定量的に評価するため、各標本で腱索の質量密度を測定した。

4. 研究成果

対照群（ $n = 12$ ）では、腱索の平均密度は $1.085 \pm 0.015\text{g/cm}^3$ であり、腱索内では有意な変動はなかった。これらの所見は、同じ部位の組織学的所見と一致しており、中膜には均一な高密度の膠原線維が観察された。これらの所見は、腱索の密度が均一であり、腱索に安定した構造をもたらしていることを示しているかもしれない。断裂群では、腱索断裂部分の平均密度は $1.029 \pm 0.004\text{g/cm}^3$ であり、正常な僧帽弁腱索の質量密度より有意に低かった（ $p < 0.0001$ ）正常と断裂腱索の質量密度の違いは、関連する組織学的標本で観察された膠原線維の分布と一致していた。

正常および断裂腱索の組織学的検査において、正常腱索では、高密度の膠原線維がほぼすべての断面を占め、膠原線維束を構成していた。SR染色では、内皮下の小間質組織に見られる黒い病変は弾性線維を示した。SR染色を偏光すると、緑色に染色された膠原線維（III型）が、内皮層下の小さな間質組織領域とともに、膠原線維束の大部分を占めていることが示された。対照的に、HEで染色した断裂腱索では、膠原線維束を取り囲む間質組織の異常増殖が増加していた。断裂腱索のSR染色では、隣接する膠原線維と比較して弾性線維が多く、膠原線維が少ない異常間質組織の増加が認められた。得られたCT画像

は、正常および断裂腱索の構成弾性線維と膠原線維の違いを反映していた。正常腱索では、膠原線維束を示す均一な高信号を示したが、断裂腱索では、中核の膠原線維が、木の年輪のような異常な間質組織を反映する信号に囲まれていた。断裂腱索の矢状断面を HE で染色したところ、病理学的断面所見と一致する非縦長の異常間質組織層が観察された。異常間質組織と縦方向の膠原線維束を含む全層に炎症浸潤は認められなかった。SR 染色の偏光により、非縦走性異常結合組織層には弾性線維（黒色病変）と膠原線維（黄色病変；I 型膠原線維、緑色病変；III 型膠原線維）が含まれていることが明らかになった。膠原線維の分布の違いを定量化するために、異常結合組織が豊富な領域と正常な膠原線維束の領域を含む 2 つの選択された領域で膠原線維占有率を計算した。膠原線維占有率は、正常な膠原線維束のある部位で 61.1%、異常な結合組織が豊富な部位で 17.2%であった。さらに、索状腱膜の治癒過程を検出するために、抗 Tnmd 抗体による免疫染色を行った。正常腱索では、Tnmd 陽性細胞は極めてまれで、内皮細胞層の下の間質組織に局在していた。しかし、断裂腱索では、Tnmd 陽性の散在細胞が異常結合組織の増加した領域にしばしば見られた。

放射光を用いた XPCT により、僧帽弁腱膜の組織密度を測定することが可能になった。正常腱索の均一な密度は、膠原線維束中の高密度の膠原線維と一致しており、断裂腱索の断裂部分の局所的な低密度は、構造的変化をもたらした以前の腱索損傷に対する治癒過程が進行中であることを反映している可能性がある。したがって、僧帽弁腱索の低密度は、断裂腱索の脆弱性と関連している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koda Yojiro, Tsukube Takuro, Hoshino Masato, Yagi Naoto, Ishibashi-Ueda Hatsue, Okada Kenji	4. 巻 30
2. 論文標題 Structural properties in ruptured mitral chordae tendineae measured by synchrotron-based X-ray phase computed tomography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 995 ~ 1002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S1600577523005167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yojiro Koda, Takuro Tsukube, Masato Hoshino, Kentaro Uesugi Naoto Yagi, Hatsue Ueda, Kenji Okada
2. 発表標題 Structural Properties in Ruptured Mitral Chordae Tendineae Measured by Synchrotron-Based X-ray Phase Tomography
3. 学会等名 AATS Mitral Conclave2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	星野 真人 (Hoshino Masato) (30508461)	公益財団法人高輝度光科学研究センター・分光推進室・主幹 研究員 (84502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------