

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700467

研究課題名（和文） 血管組織構造から推定する大動脈瘤の破断強度予測法の開発

研究課題名（英文） Development of estimation method of rupture strength of aortic aneurysms from their structure of tissue

研究代表者

杉田 修啓 (SUGITA SHUKEI)

名古屋工業大学・工学研究科・助教

研究者番号：20532104

研究成果の概要（和文）：

大動脈瘤の組織構造から破裂を予測するため、引張強さが大きいコラーゲン成分の血管壁内構造と破断との関係を調べた。まず、血管壁内のコラーゲン成分の局所存在量と繊維走行方向を計測する方法を確立した。次に、コラーゲン成分構造を顕微鏡下で観察しつつ、血管壁に引張力を負荷すると、破断直前時の血管壁の変形はコラーゲン成分の局所的構造に大きく影響された。従って、コラーゲン成分の血管壁破壊への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To predict rupture of the aortic aneurysms from their microscopic structures, the relationship between rupture and structure of collagen in aortic wall was investigated. Firstly, a method to quantify local volume and direction of collagen fibers was established. Then, thin slices of the thoracic aortas were biaxially stretched during observation of collagen structure under a microscope. As a result, we found that local microscopic structures of collagen fibers strongly influenced its local strains, indicating that collagen structures may have important role on rupture of the aorta.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：生物・生体工学，生体材料，細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤患者の増加

厚生労働省の人口動態統計によれば、大動脈瘤の破裂・解離による死者は 2004 年で 10,679 名、2006 年 11,665 名、2008 年 13,440

名と急速な伸びを示しており、早急な対策が望まれている。大動脈瘤は一般に徐々に拡張し、破裂することがある。破裂確率は保有者の 1/4 程度である (Sterpetti AV ら, *Surg Gynecol Obstet* **173**(3), 175-158, 1991) が、破裂

時の 30 日生存率は 30%程度 (Katz DA ら, *JAMA* **269**(19), 2678-2686, 1992) と極めて低い。そのため、破裂前に外科的処方が行われる。材料力学的観点から考えると、大動脈瘤の直径が大きいと瘤壁への負荷応力が高いため、破裂しやすいと言える。実際、現状では 5cm 程度を基準とした手術が行われている。しかし、瘤径が小さくても破裂する場合もあり (Cambria RA ら, *Am J Surg* **170**(2), 213-217, 1995), 破裂する危険性が大きい大動脈瘤を特定する方法が求められている。

(2) 大動脈瘤壁の力学特性

生体内の大動脈瘤壁には血压による張力が負荷されているため、これまでに大動脈瘤壁の引張試験が行われている。その結果、正常組織 (2.01MPa) より大動脈瘤組織は (0.86MPa) 弱いことが分かっている (Raghavan ML ら, *Ann Biomed Eng* **24**(5), 573-582, 1996)。我々も生体内の力学環境を模した圧力負荷による破裂試験装置を開発し (Ohashi T, Sugita S ら, *JSME Int J Ser C* **46**(4), 1290-1296, 2003), 患者から摘出した大動脈瘤試料の破裂応力を調べたところ、試料差が非常に大きいことが判明した。

(3) 血管組織の内部構造と破壊

大動脈瘤試料の組織を観察すると、正常血管が比較的均質である一方、大動脈瘤では組織の構成成分が不均質に分布しており、この不均質性が破壊に結び付く可能性が考えられる。しかし、これまで大動脈瘤の強度構造について詳細に調べた研究はほとんどなく、どの成分や構造が血管壁のぜい弱化に寄与するのかはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、大動脈の壁内構造と血管壁の破壊の関係を見出すことを目的とする。具体的には、

- (1) 血管壁の引張強度の主成分と想定されるコラーゲン成分の組織内構造を詳細に調べる方法を確立する
- (2) 大動脈試料に力を加えた場合のコラーゲン線維構造を観察し、力に対する血管壁内の強度構造を検討する

ことを実施し、組織のマイクロ構造から血管壁の破壊メカニズムを明らかにすることを目指す。さらに将来的には、これを利用して組織の破断強度を推定する方法を構築することを目指す。

3. 研究の方法

- (1) コラーゲン成分の血管壁内構造の観察方法の確立

血管壁内では、コラーゲン線維の引張強さが他の成分より極めて高いことから、組織の

引張に対する強度はコラーゲン線維が主に担っていると考えられる。しかし、従来の組織観察法では、コラーゲン成分の分布は測定できるが、コラーゲン成分の局所存在量や繊維走行方向はわからない。ところで、コラーゲン線維には、線維の方向によって屈折率が異なる複屈折性がある。屈折率は物質中に対する真空中の光速比を示しているため、特定の方向しか振動していない偏光を複屈折物質に入射すると、速く物質を透過する方向 (進相軸) と遅く物質を透過する方向 (遅相軸) ができる。この両方向の偏光には位相差 (リターダンス) が生じ、またリターダンスは複屈折物質の量に比例するため、これを利用してコラーゲン量を計測することとした。さらに、偏光による遅相軸方向から主線維方向を計測することとした。しかし、血管にはコラーゲン以外にも主に平滑筋細胞とエラスチタンパク質が多く存在する。そこで、まず、これらコラーゲン以外の成分が血管壁のリターダンス値におよぼす影響について検討した。

① エラスチン成分による血管壁リターダンスへの影響の確認

エラスチン成分のリターダンス像への影響を調べるため、成分のほとんどがエラスチンであるウシ項靭帯を試料とした。さらに高温高圧 (118°C, 2 気圧) 下にこの試料を静置して、少量のコラーゲンや細胞を取り除いた。その試料を薄切し、複屈折イメージングシステム (Abrio-LS, CRi) を用いてリターダンス画像を得た。また、エラスチンは、紫外光を入射するとそれより波長が長い光を放射する性質 (自家蛍光) をもつため、この自家蛍光像を蛍光顕微鏡で取得した。

② 平滑筋細胞成分による血管壁リターダンスへの影響の確認

平滑筋細胞の血管壁リターダンスへの影響は、細胞の有無による血管壁のリターダンス画像を比較して検討した。ブタ胸部大動脈を薄切した後、一部の試料を脱細胞化処理をした。処理後、試料の平均リターダンスを計測した。

③ 従来コラーゲン成分観察法とリターダンス像の比較

コラーゲン線維画像とリターダンス画像の直接比較を行うため、コラーゲンの従来観察法であるピクロシリウスレッド染色を実施した。ブタ胸部大動脈を薄切した試料のリターダンス画像を取得した後、試料をピクリン酸溶液に浸した。試料を従来の偏光顕微鏡 (IX51-P, オリンパス) 下に移し、偏光画像を取得した。

(2) 2軸引張負荷した血管壁におけるコラーゲン成分の構造の観察

①試料の準備

血管壁に血圧が負荷された場合、血管壁の厚さ方向と垂直な面内（血管の層内方向）に主に力が負荷されると推定される。そこで、まず血管を厚さ方向と垂直な面に薄切した。その後、試料内の変形を観察するために、細胞核を染色して、変位マーカとした。

② 2軸引張負荷試験

①で用意した試料に対し、2軸等方引張負荷破壊試験（図1）を行った。この試験方法では、まず中央部に円孔を有する金属板を作成し、この円孔を覆うように試料を接着する。次に、金属製の円筒管を試料に押し込んで試料を破壊させる。同時に円筒内部を通して顕微鏡下で試料を観察する。観察は、変位計測のために細胞核染色の蛍光画像を撮影し、コラーゲン観察のためにリターダンス画像を取得した。円筒管を少しずつ試料に押し込むたびに画像を取得し、試料が破断するまでこれを繰り返した。

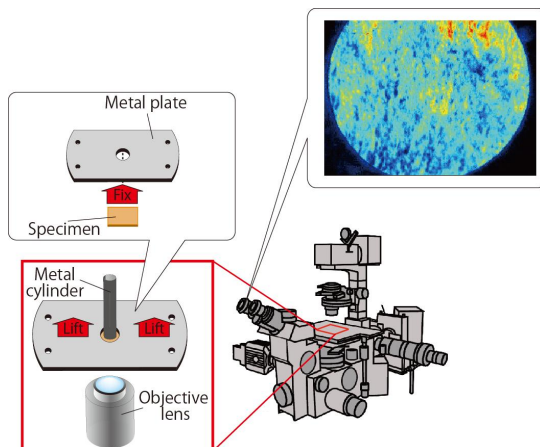


図1 顕微鏡下観察型の2軸等方引張負荷試験のイメージ

③ひずみ（変形割合）解析方法

力負荷時の試料内ひずみを計測するため、粒子画像流速測定用のソフトウェアを用いて、血管壁試料内の変位マーカである細胞核の動きを相互相関係数法で計測した。この方法は、変形前の変位マーカ画像の一定領域を切り取って基準パターンとし、変形後の画像中で最も基準パターンに近い場所を変位先として決定するものである。試料内の変位計測は、50 μm 間隔で格子状に計測した。次に、ある格子点と画像上のX、Y方向に隣接する格子点計3点の変位データより、局所領域のひずみを算出した。微小ひずみを仮定し、格子点3点から得られる面積ひずみを計算した。

4. 研究成果

(1) コラーゲン成分の血管壁内構造の観察方法の確立

エラスチン単体の従来法による画像とリターダンス像は、パターンが一致しなかった。また、平滑筋細胞による血管のリターダンスの影響は10%程度と小さかった。さらに、コラーゲンの従来観察像とリターダンス像は類似していた（図2）。従って、血管のリターダンスは主にコラーゲンによるものと考えられた。また、血管壁の厚さとリターダンスが比例したことからリターダンス計測による定量性も確認した。以上から、顕微鏡下で血管内コラーゲンを定量的に計測できる方法を確立した。

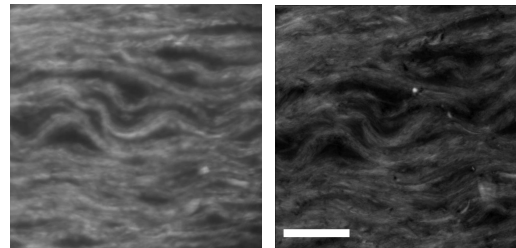
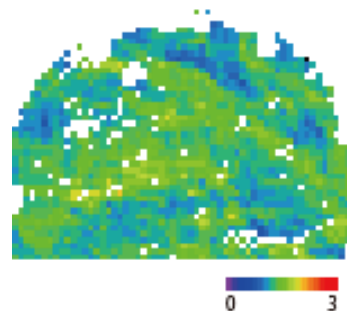


図2 コラーゲンの従来観察法であるピクロシリウスレッド染色像（左）とリターダンス像（右）

(2) 2軸引張負荷した血管壁におけるコラーゲン成分の構造の観察

図3に破壊直前のブタ胸部大動脈の局所面積ひずみ分布を示す。面積ひずみは、試料内で不均質になっており、ひずみが互いに3



倍以上異なる領域も存在した。また、無負荷時におけるコラーゲン分布量の指標を示すリターダンス値（図4A）と線維方向（図4B）も不均質に分布していた。線維の走行は、平均的には円周方向であった（図4B）が、血管軸方向へ少し傾いた線維領域が交互に繰り返されており、このような織物のような線維配向により、血管壁が強い構造をもつことが考えられた。

図3 破断直前時の面積ひずみの分布

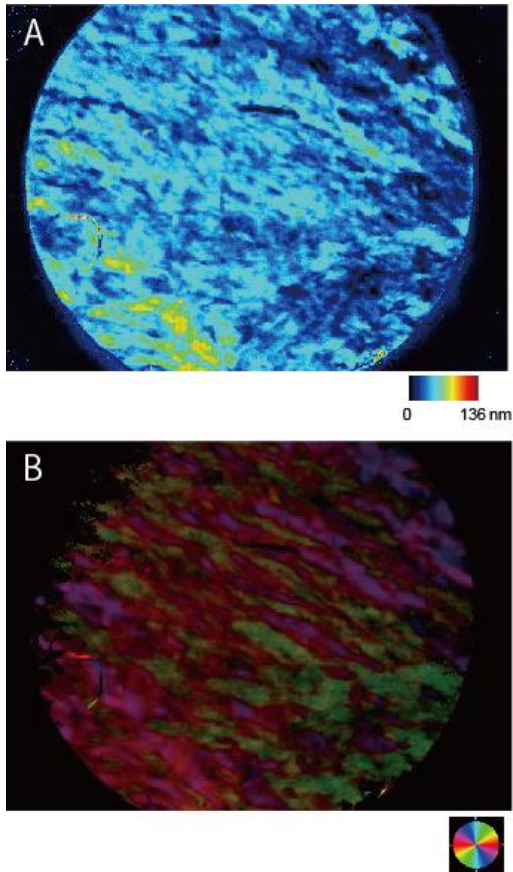


図4 無負荷時のリターダンス分布 (A) と主線維方向分布 (B)

血管壁内局所の面積ひずみと無負荷時のコラーゲン分布量の指標を示すリターダンス値を比較すると、両者に有意な負の相関が得られた (図5)。従って、破断直前時の局所のコラーゲン量が多いほど、局所領域のひずみが小さいことが示された。本研究により、破断時の血管組織の変形には、その内部コラーゲン組織の局所分布量が影響することが判明した。

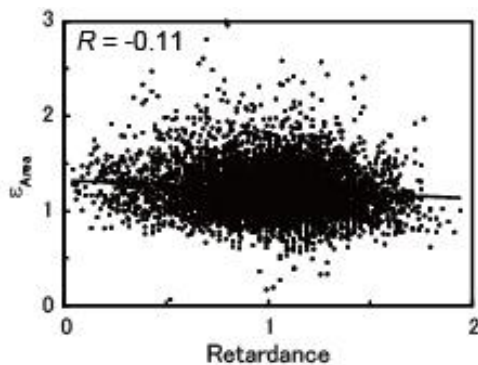


図5 面積ひずみ (ϵ_{Area}) とリターダンスの関係。試料毎にリターダンスレベルが異なったため、局所のリターダンスを試料内

の平均リターダンスで除した値で示した。

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1件)

S. Sugita, T. Matsumoto, T. Ohashi, K. Kumagai, H. Akimoto, K. Tabayashi, and M. Sato: Evaluation of rupture properties of thoracic aortic aneurysms in a pressure-imposed test for rupture risk estimation, *Cardiovascular Engineering and Technology* 3 (1), 41–51, 2012. (査読あり)

[学会発表] (計5件)

- ① S. Sugita and T. Matsumoto: Relationship between microscopic structure and intramural strain distribution in aortic tissues, 2nd Symposium on Life Science, Nagoya, 2012.3.7
- ② 杉田修啓, 松本健郎: 生体軟組織内微細構造と局所ひずみ分布の関連: 解析方法の確立と大動脈壁への応用, 日本機械学会 第24回バイオエンジニアリング講演会, 豊中, 2012.1.7-8.
- ③ S. Sugita and T. Matsumoto: Quantitative analysis of collagen distribution in the aorta using birefringence imaging, ASME 2011 Summer Bioengineering Conference, Farmington, PA, USA, 2011.6.22–25.
- ④ 杉田修啓, 松本健郎: 血管組織内コラーゲン量の計測方法の構築とその実例, 第50回日本生体医工学会大会, 東京, 2011.4.29–5.1.
- ⑤ 杉田修啓, 松本健郎: 偏光顕微鏡による血管組織内コラーゲン線維定量評価法, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, 熊本, 2011, 1.8–9.

[その他]

ホームページ等

<http://wakate.adm.nitech.ac.jp/node/118>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 修啓 (SUGITA SHUKEI)

名古屋工業大学・工学研究科・助教

研究者番号: 20532104