

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26709002

研究課題名(和文) 血管壁破壊現象と内部構造の同時・直接観察による破壊メカニズム解明の試み

研究課題名(英文) Elucidation of rupture mechanisms of aortas by observation of their microstructure at rupture site

研究代表者

杉田 修啓 (Sugita, Shukei)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20532104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈の一部が拡張する大動脈瘤は破裂時の致死率が高いため、壁の破壊メカニズムの解明が待たれている。本研究では、血管壁の破壊現象をミクロレベルで観察し、破壊箇所の組織構造を調べて、破壊機序の解明を目指した。ブタ胸大動脈を2軸引張試験下で破壊した結果、局所コラーゲン線維分布量が低い領域で破裂し、コラーゲン線維に沿って亀裂が走った。また、エラスチン分布量や、エラスチン線維とコラーゲン線維の結合は、破壊に影響しなかった。さらに、コラーゲンサブタイプの観察による定量化や、円筒管形状のまま破壊現象を観察する手法の基礎を構築した。

研究成果の概要(英文)：The mortality rate due to the rupture of the aortic aneurysm is still high. It is essential to investigate the rupture mechanism. In this study, simultaneous observation of the rupture phenomenon and microstructure of the aorta was performed to provide valuable insights into the rupture mechanisms. Porcine thoracic aortas were biaxially stretched under a microscope. The results showed that local density of collagen fibers was lower at the crack initiation sites. Local density of elastin and connection between elastin and collagen fibers were not related to the rupture sites. Basic researches to establish methods for quantification of sub-type of collagen fibers and observation of rupture of cylindrical shape of the aorta under a microscope were also performed.

研究分野：総合領域

キーワード：バイオメカニクス 細胞・組織 血管壁 破壊メカニズム コラーゲン エラスチン

1. 研究開始当初の背景

大動脈の一部が拡張する大動脈瘤は、破裂・解離による死者が年々増加しており(2006年から2年ごとに、11,665名、13,440名、15,209名、15,831名;厚生労働省の人口動態統計)、対策が望まれる。破裂時の死亡率が極めて高い点が問題であり、また材料力学的には瘤径増加は壁内応力(負荷)増加となるため、瘤径が約5cmになると外科的処方等が行われる。しかし、小さい瘤径でも破裂する(Cambria RA et al, Am J Surg 170(2), 213-217, 1995)ことから負荷が低くても破裂する、即ち瘤壁が脆弱化していることが考えられる。大動脈瘤になると瘤壁内の平滑筋細胞とタンパク質エラスチンの割合が極端に減少し、タンパク質コラーゲンの割合が増加(He CM and Roach MR, J Vasc Surg 20(1), 6-13, 1994)しており、組織の大きな変化が引張強さ変化の原因との考えもある。しかし、コラーゲンは血管壁内では引張に対して強い材料であり、一般的な組織内の成分量変化だけでは血管壁の脆弱化が説明できない。即ち、血管壁の破壊メカニズムは不明確である。

そこで、我々はまず血管壁の破壊箇所の特徴と破壊機序を明らかにするため、顕微鏡下で血管壁内構造を観察しながら血管壁を破壊させることを目指した。しかし、試料把持部の応力集中などにより、破壊現象を観察しながら試料を正常に破壊することは従来法では困難であった。そのため、「生体内の力学環境を模擬できる2軸引張負荷が可能」、「正常な破断が可能」、かつ「顕微鏡下で組織観察可能」な方法を新たに考案した(杉田ら、特願2012-280428)。この方法により顕微鏡下で観察しつつ、破壊を引き起こすことに成功した(Sugita S et al, Biomed. Eng. Online 12(1): 3, 2013)。次に、血管壁内のコラーゲン線維方向と分布量の指標であるリタレーション分布を観察したところ、コラーゲン線維方向にのみ局所的な変形が小さくなり、また局所コラーゲン分布量が多い領域で変形量が小さくなることなどを確認してきた(Sugita S et al, Biomed. Mat. Eng. 23(6), 447-461, 2013)。

2. 研究の目的

以上の背景とこれまでの研究経過より、本研究では、血管壁の破壊現象をよりミクロレベルで観察し、実際の破壊箇所の組織構造を詳細に特定して破壊機序を明らかにすることを目指した。

まず、コラーゲン線維量が評価できる指標としてきたリタレーションは線維方向一致度を含むパラメータであることを認識したため、より正確にコラーゲン分布量を計測できる手法を確立した上で、コラーゲン線維の局所分布量と破壊位置の関係を調べることとした。

次に、コラーゲン以外の物質であるエラスチンとコラーゲン線維の結合箇所分布を調

べ、この結合による血管壁破壊への影響を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

始めに、ブタ胸大動脈を2軸引張試験で血管壁を破壊させた際に、破壊開始位置の局所ひずみと局所成分分布量を調べた。コラーゲン線維を非染色で観察できる第2高調波光を用い、線維構造が認識できる高倍率の顕微鏡下でコラーゲン量の定量計測が可能なることを確認した。その後、顕微鏡下2軸引張試験装置で血管壁の破壊試験を行った。破壊開始位置は、ハイスピードカメラで撮影して特定した。細胞核を染色して得たひずみマーカーからひずみ分布を、エラスチンの自家蛍光像からエラスチン局所分布を、2光子顕微鏡の第2高調波光像からコラーゲン局所分布量を計測し、破壊開始領域とその他領域とで比較した。

次に、エラスチン線維とコラーゲン線維の結合箇所での破壊への影響を調べた。2光子顕微鏡下での単軸引張試験装置を作製し、血管壁引張時のエラスチン線維を自家蛍光像で、コラーゲン線維を第2高調波光で観察した。この画像より両線維の結合候補点を求めた。そして、この結合の有無による破壊開始位置の違いを有限要素解析により調べた。引張試験時の画像からエラスチン・コラーゲン線維によるネットワーク構造を計算機上に作製し、結合がある場合とない場合の引張応力を計算した。引張強さを超えた箇所を破壊開始位置として、結合有無による破壊開始位置の変化を調べた。なお、血管壁由来コラーゲン線維の引張強さの文献値がなかったため、単離コラーゲン線維の引張試験を行い、引張応力を求めた。

4. 研究成果

4.1 2軸引張試験時の破壊開始位置の特徴

始めに、2軸引張試験時の局所ひずみ分布と局所成分分布を求め、破壊開始位置とその他領域で比較した。その結果、ひずみ分布やエラスチン分布量に関しては、破壊開始領域とその他領域との間に有意差は認められなかった。一方、破壊開始領域のコラーゲン線維の局所分布量は、その他領域より有意に低値であった(図1)。さらに、破壊開始後の

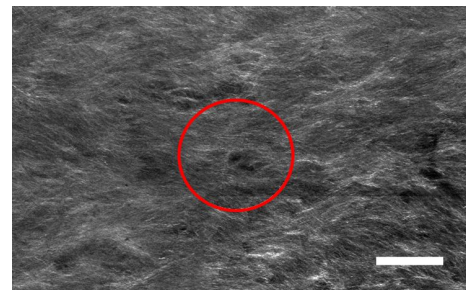


図1 ブタ胸大動脈のSHG光像の例。赤丸の中心が破壊開始位置。スケールバーは300 μm 。

亀裂伝播を見たところ、亀裂はコラーゲン線維に沿って走っていることが分かった。コラーゲン線維は、他の血管壁構成成分より引張強さが大きいとされるために、コラーゲン線維局所分布量が小さいところから破裂することが考えられた。なお、その他、動脈硬化や動脈瘤等で見られる合成型の平滑筋細胞のマーカータンパク質 α -SMA や血管壁を壊す作用を持つ酵素分布 MMP-2 と破壊開始位置との関係も調べたが、両領域間に有意差は認められなかった。

4.2 エラスチン・コラーゲン線維結合による破壊への影響

以上により、コラーゲン線維分布量が少ない箇所から破壊することが考えられたが、最低量の箇所から破壊した訳ではなく、破壊開始には他の要因の影響も考えられた。

そこで、次に、エラスチン線維とコラーゲン線維の結合による破壊の影響を調べた。2光子顕微鏡下で血管壁を引張した際、もし両線維が結合していれば、引張負荷しても結合箇所は同じ位置であると考え、引張試験中の両線維の交差点位置の変化を調べた。その結果、細胞1個当たり程度の体積において、数か所程度しか結合の可能性がある場所は存在しなかった。ただし、この交差点位置はあくまでも結合の必要条件であり、実際の結合箇所は、この数よりさらに少ない可能性もある。

そこで、次にこのコラーゲン線維とエラスチン線維の結合候補点の結合度が、血管壁の破壊にどの程度影響を与えるかを検証することとした。2光子顕微鏡で得た引張試験時のエラスチン・コラーゲン線維のネットワークモデルを計算機上で作製した。引張試験と同様に力を負荷し、エラスチン線維とコラーゲン線維の結合度を変化させて、線維の最大引張方向応力分布を調べた。

結果の1例を図2に示す。実際の結合可能数を考慮しても、エラスチン線維の応力は変化するものの破壊するレベルには無く、コラ

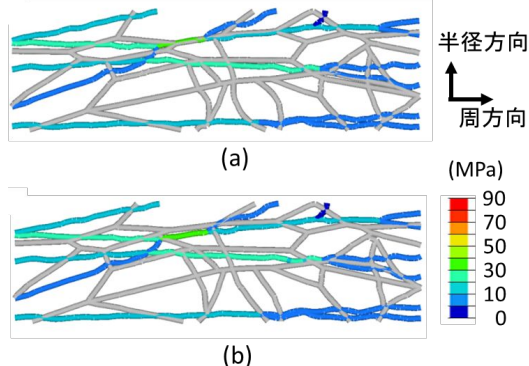


図2 周方向にひずみ53%負荷した時のコラーゲン線維の線維方向垂直応力分布。灰色はエラスチン線維を示す。コラーゲン線維とエラスチン線維を、(a) 結合させないモデルと (b) 結合候補点を全て結合させたモデルで差が見られなかった。

ーゲン線維の引張応力への影響は非常に小さかった。また、結合度を変化させても、血管壁破壊開始位置への影響はほぼなかった。従って、たとえエラスチン線維がコラーゲン線維結合していたとしても、血管壁の破壊への影響は低いことが示唆された。

なお、コラーゲン線維の力学特性文献値はあったものの、血管壁由来コラーゲン線維の力学特性値は見当たらなかった。そこで、血管壁内からコラーゲン線維を単離する手法を確立し、効率よく力学試験できる改良法により引張試験して、引張応力を取得した。なお、この際、外膜由来と中膜由来ではコラーゲン線維の力学特性が異なることが分かった結果を得ている。

4.3 コラーゲン線維の層ごとと蛇行度による破壊開始位置への影響

血管壁内のコラーゲン線維は、低圧では蛇行しているためあまり力を負担せず、高圧になるとまっすぐに伸び、力を負担するようになる。従って、蛇行度が大きいと早くから力を負担するため、より早く破壊することもあり得る。そこで、この蛇行度の壁破壊開始位置への影響を調べることにした。

顕微鏡下で再度2軸引張破壊試験を行い、第2高調波光観察によるコラーゲン線維の蛇行度を観察した。その結果、破壊開始点では、有意差は認められなかったものの、弾性板層ごとのコラーゲン線維蛇行度の差が大きい傾向があった。蛇行度が大きい層は良く伸びるが、蛇行度の小さい層は変形しにくくなると考えられる。よって、血管半径方向を含む面内せん断が大きい、即ち3次元的なひずみが大きいことが原因で破壊開始点となりやすい可能性もあることが考えられた。

4.4 コラーゲン線維サブタイプの影響

腱などの創傷治癒部位では、治癒の過程でコラーゲンサブタイプの変化が報告されている。また、コラーゲンのサブタイプの組成割合が力学特性に影響を及ぼすことも報告されている。そこで、コラーゲンサブタイプの局所分布が破壊開始位置に影響する可能性を考え、この変化を調べることを目指した。しかし、試料を細かく砕いてサブタイプ組成割合を調べる生化学的手法はあるが、顕微鏡下で力学試験しながらそのサブタイプ分布を調べる有効な方法がなかった。

そこで、顕微鏡下でコラーゲン線維のサブタイプの組成割合を計測する手法の確立を目指した。その結果、1本のコラーゲン線維であれば、type I と Type III コラーゲンを定量的に評価できたと考えられる結果が得られた。現在、引き続いて既法の生化学的手法と比較しており、従来法と同程度の値であることが検証できれば、簡便なコラーゲン線維成分分析法になることを期待している。

4.5 円筒管状試料を用いた、コラーゲン局所分布の破壊開始位置への影響

これまで、破壊まで可能な2軸引張試験を開発し、これを顕微鏡下に設置して、内部構造による破壊開始位置への影響を調べてきた。しかし、この試験法では試料を薄切する必要がある、薄切面の力学的影響は避けられなかった。

そこで、薄切不要な生理状態で十分に薄い大動脈を持つ小動物を利用し、円筒管状の血管に内圧を負荷し、壁内コラーゲン線維を観察しながら破壊試験することに取り組んだ。コラーゲン線維観察ができ、かつ4.4のサブタイプも観察できる2光子顕微鏡下で観察できるように、従来の内圧負荷試験装置を改良した。また、血管壁のどの位置から破壊してもよいように、軸方向周りに血管試料を回転できるように作製した。

この試験法をマウス胸大動脈に適用すると、同一試料の背腹両方のコラーゲン線維を高倍率で観察できた。これにより、これまで背中側と腹側で血管壁の剛性が異なるとされてきた原因の1つは、コラーゲン線維の蛇行度の差であることがわかった。また、正常血管でも血管壁内はこれまでに予想されていなかったような変形をしていることがわかった。残念ながら、大動脈瘤モデル動物から採取した血管壁が脆弱化しておらず、破壊開始時の構造撮影には至らなかったが、この点については、今後のプロジェクトで検討していきたい。

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2件)

S. Sugita and T. Matsumoto: Multiphoton microscopy observations of 3D elastin and collagen fiber microstructure changes during pressurization in aortic media, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **16**(3), 763-773, 2017, DOI: 10.1007/s10237-016-0851-9 (査読あり)

S. Sugita and T. Matsumoto: Local distribution of collagen fibers determines crack initiation site and its propagation direction during aortic rupture, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **17**(2), 577-587, 2018, DOI: 10.1007/s10237-017-0979-2 (査読あり)

[学会発表](計19件)

杉田修啓, 松本健郎: コラーゲン線維が2軸引張下の薄切大動脈試料の亀裂開始位置と亀裂伝播路に与える影響, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 新潟, 2015.1.9-10.

成田大興, 杉田修啓, 松本健郎: 大動脈中膜および外膜由来コラーゲン線維の引張試験に伴う内部微細線維の配向変化, 第24回ライフサポート学会 フロンティア講演会, 東京, 2015.3.5-6.

岡田成右, 杉田修啓, 松本健郎: 引張負荷時の大動脈中膜内エラスチン・コラーゲン線維の多光子顕微鏡による観察, 日本機械学会東海支部第46回学生員卒業研究発表講演会, 愛知工業大学, 2016.3.16.

山田麻加, 杉田修啓, 松本健郎: 多光子顕微鏡によるエラスチン線維の血管中膜内走行方向の基礎的解析, 日本機械学会東海支部第46回学生員卒業研究発表講演会, 愛知工業大学, 2016.3.16.

S. Sugita, T. Matsumoto: Morphological characterization of collagen fibers at the crack initiation sites in biaxially stretched porcine thoracic aortas toward clarification of aneurysm rupture mechanism, Summer Biomechanics, Bioengineering, and Biotransport Conference (SB³C2015), Snowbird Resort, Utah, USA, 2015.6.17-20.

S. Sugita, H. Narita, T. Matsumoto: Difference in mechanical properties of collagen fibers in the media and the adventitia of the porcine thoracic aorta, The 8th Asia Pacific Conference on Biomechanics, Sapporo, Japan, 2015.9.16-19.

S. Sugita, T. Matsumoto: Microscopic deformation of porcine thoracic aortas until failure during biaxial stretch as a model of aortic rupture, The International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2015 (ATEM'15), Toyohashi, Japan, 2015.10.4-8.

S. Sugita, T. Matsumoto: Observation of elastin and collagen fibers in the thoracic aorta under multiphoton microscope during pressurization, BIT7s 5th Annual Congress of Analytix-2017, Fukuoka, Japan, 2017.3.22-24.

杉田修啓, 松本健郎: 大動脈中膜内エラスチン・コラーゲン線維の加圧時の微細構造変化 - 弾性板層と平滑筋細胞層による差異 -, 日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋, 2017.1.19-20.

山田麻加, 杉田修啓, 松本健郎: 大動脈中膜内の応力状態とエラスチン線維走行方向との関連, 日本機械学会 第27回バイオフロンティア講演会, 札幌, 2016.10.22-23.

A. Yamada, S. Sugita, T. Matsumoto: Relation between Direction of Elastin Fibers and Principal Stress in the Aortic Media, The 1st ABiS Symposium - Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences -, Higashi-Okazaki, 2017.2.19-20.

鈴村拓也, 杉田修啓: コラーゲン線維の Type I-Type III 割合の定量化に関する基礎研究, 日本機械学会東海支部第47回学生

員卒業研究発表講演会 静岡大学(浜松),
2017.3.13.

上間大輝, 杉田修啓: 胸大動脈内の細胞外マトリックスの引張負荷変形に関する研究, 日本機械学会東海支部第 47 回学生員卒業研究発表講演会, 静岡大学(浜松), 2017.3.13.

S. Sugita, T. Matsumoto: Deformation of elastin and collagen fibers in the aortic media due to changes in pressure, XXVI Congress of the International Society of Biomechanics, Brisbane, Australia, 2017.7.23-27.

S. Sugita, Masaya Katoh, Masanori Nakamura, and T. Matsumoto: Microscopic deformation of the aorta during pressurization based on SHG and two-photon microscopy, The 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, 2018.7.8-12.

鈴村拓也, 杉田修啓: 第二次高調波発生光によるコラーゲン線維の Type I-Type III 割合の定量化, 日本機械学会 第 28 回バイオフロンティア講演会, 徳島, 2017.10.28-29.

岡田成右, 中村匡徳, 松本健郎, 杉田修啓: 血管壁破壊に対するエラスチン線維とコラーゲン線維の結合の影響, 日本機械学会 第 28 回バイオフロンティア講演会, 徳島, 2017.10.28-29.

加藤雅也, 杉田修啓: 血管の二光子顕微鏡下全周観察装置の開発と内圧負荷時のコラーゲン線維観察への適用, 日本機械学会 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 京都, 2017.12.14-15.

今岡健汰朗, 中村匡徳, 杉山由恵, 杉田修啓: コラーゲン線維の蛇行度を考慮した血管壁の構成法則 - 大動脈瘤破裂予測に向けて -, ライフサポート学会 第 27 回フロンティア講演会, 杏林大学, 2018.3.9-10

〔その他〕

ホームページ等

名古屋工業大学 医用生体工学研究室 研究紹介

<http://biomech.web.nitech.ac.jp/research/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 修啓 (SUGITA, Shukei)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 20532104