

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト大動脈壁膠原線維立体構造の部位特異性
及び加齢性変化についての検討
－腹部大動脈瘤形成との関連－

指導教員 名川弘一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 浦部 豪

【背景・目的】

腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm: AAA) は 60 歳以上の男性の 4-8%、女性の 0.5-1.5% に認められるとの報告があるが、一旦破裂すると救命率の低い疾患である。しかしながらその治療方針は、AAA の最大径が基準を超えたものを手術適応として、それに満たないものは経過観察をすることを原則とし、治療法は従来からの開腹人工血管置換術や近年急速に広まっているステントグラフト内挿術などのインターベンションによるものが唯一の方法であり、他に薬物療法による臨床試験でも動脈瘤増大が抑制されるとの報告あるが臨床応用には至っていない。これら新たな治療法の確立には AAA 形成機序の解明が不可欠

である。

AAA の成因についてはこれまで様々な視点からの報告があるが未だに全容は解明されていない。現在の AAA 形成機序に関する研究の枠組みは①蛋白分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) による大動脈壁の分解、②炎症及び免疫反応、③力学的ストレス、④遺伝の主に以下の 4 つに分類される。

動脈瘤形成に際しては様々な要因により動脈壁の力学的強度の低下を来して動脈径が拡大すると考えられる。動脈壁を構成する成分のうち力学的強度を規定する主なものに collagen と elastin があるが、前者は主に強度・後者は主に弾力度を規定しており、慢性的に動脈径が拡大する動脈瘤形成には collagen の力学的強度の低下が必須と考えた。しかし動脈瘤壁では collagen が増加することが報告されており、これは動脈瘤壁においては力学的強度を規定する collagen が増加しているにもかかわらず強度が低下していることになる。collagen は常に破壊・再構築を繰り返していることから、AAA においては collagen の再構築 (remodeling) に変化が生じたために collagen の質の変化を生じているという仮説を立てた。

動脈瘤壁で起きている collagen の remodeling の変化を解析する方法として、collagen を特異的に観察可能であり、動脈の層別に解析することも可能である構造解析を視覚的に行うこととし、動脈壁の強度を保つ中膜及び外膜の collagen の構造解析を行うこととした。

一般に AAA 形成には加齢変化が強く関与するとされ、またその発生部位が腎動脈分岐部の末梢に頻発するなど部位による特異性があることも知られている。

従って本研究では、

I. 正常大動脈の collagen は部位特異性および加齢性に構造変化を来す

II. AAA は動脈壁 collagen の構造変化により形成される

という2つの仮説を立て、これらについて視覚的に解析し検証することとした。

【研究対象・方法】

正常動脈検体 (normal aorta : 以下、NA 群) は剖検症例の中から非血管疾患による男性死亡例 15 例で年齢構成は 40 歳未満 (NA 若年群) が 5 例、40 歳以上 60 歳未満 (NA 中年群) が 5 例、60 歳以上 (NA 高齢群) が 5 例 (27-73 歳 : 平均 49.5 歳)。各症例より、上行大動脈 1 か所 (①大動脈弁より 5cm 末梢 : 以下、上行大動脈)・腹部大動脈 3 か所 (②上腸間膜動脈分岐レベル・③腎動脈分岐部より 2cm 末梢・④下腸間膜動脈分岐レベル : 以下、それぞれ SMA レベル・Inf RA レベル・IMA レベル) を半周性に約 1cm 幅で採取した。

動脈瘤検体 (以下、AAA 群) は東京大学医学部附属病院血管外科にて腎動脈下腹部大動脈瘤に対する待機的開腹人工血管置換術を施行した症例より大動脈瘤の最大径部 (n=11) および可能な症例では瘤頸部 (腎動脈分岐部やや末梢) (n=5) より動脈壁を採取した。採取した標本は 10%パラホルムアルデヒド溶液に 24 時間含浸した。

全ての標本につき Hematoxylyn Eosin (HE) 染色及び collagen・elastin を特異的に染める Elastica van Gieson (EVG) 染色、collagen を染める Picrosirius red (PSR) 染色を行った。

動脈壁 collagen の立体構造解析にあたり、以下の 5 種類の解析を行った。

①走査型電子顕微鏡による膠原線維立体構造の解析

本研究では IMA レベルに限定して NA 若年群及び NA 高齢群（各 n=3）と AAA 群（n=4）について動脈壁 collagen 立体構造の全体像及び微細線維構造を把握し、正常動脈の加齢性変化と AAA の構造を比較することを目的として走査型電子顕微鏡による観察を行った。各層別に拡大倍率を調整して collagen を構成する要素である collagen bundle、collagen fiber 及び collagen fibril の立体構造を観察した。

②フーリエ解析による膠原線維束構造の定量解析

コンピュータ解析による 2 次元高速フーリエ変換 (2-Dimension Fast Fourier Transform: 2D-FFT) は理工学分野では広く用いられており、様々な事象を周期性を持つ関数の集合に見立ててその周波成分の連続スペクトルに分解するという理論であるが、生体組織の画像解析に応用可能であり、皮膚 collagen bundle に関する構造解析の技術を有する株式会社ポーラファルマに共同研究を依頼して動脈壁 collagen bundle の構造解析にこの技術を応用して「方向性」及び「太さ」の 2 つの観点から定量評価することとした。

対象は NA 群全例（n=15）の各 4 部位と AAA 群の最大径部（n=11）と瘤頸部（n=5）の中膜および外膜とする。これにより正常動脈 collagen bundle の「方向性」と「太さ」の加齢性変化及び部位特異性を検討し、さらに AAA の構造と比較して AAA 形成との関連を検討した。

各標本の PSR 染色スライドを偏光顕微鏡下に中膜及び外膜の collagen bundle をそれぞれ 5 か所ずつ無作為にデジタルカメラで写真撮影し、コンピュータで 2

次元 Fourier 変換するとパワースペクトル像が作成される。これを元にして collagen bundle の方向性の指標として Orientation Variation と Orientation Ratio の二つを求め、太さの指標として Bundle Cycle を求めた。

③外膜膠原線維束の波状構造の定性解析

大動脈外膜の collagen bundle の波状構造に加齢性変化・部位特異性がみられるかを検討するため正常動脈全例 (n=15) ・各 4 部位について定性的に 3 段階に評価した。

偏光顕微鏡下に PSR 染色の各標本にて外膜 collagen bundle 構造を確認し、その波状構造の程度を 3 段階に分類した。その結果を各年齢群別に分類して大動脈の部位別にプロットした。

④光路差測定による外膜膠原線維構造の定量解析

collagen bundle よりもさらに小さな collagen の分子レベルでの構造変化を定量化する方法として、偏光顕微鏡を用いた光路差 (retardation) の測定がある。これは collagen fiber を透過する直線偏光が複屈折を起こして位相のずれた 2 つの直線偏光に変わる際に生じる光路差が、collagen 構造の成熟度 (整然性) に比例するという性質を利用して collagen 構造を定量化するものである。対象は NA 群全例 (n=15) ・各 4 部位と AAA 群の拡大部 (n=11) とし、retardation 値を用いて動脈壁外膜 collagen 分子レベル構造の加齢性変化、部位特異性及び動脈瘤形成との関連につき検討した。

⑤免疫染色による Collagen subtype の局在変化の解析

動脈壁における線維性 collagen の大勢を占める collagen type I 及び collagen type III が動脈壁の力学的強度や伸展性を規定する。このためこれらの二つの collagen subtypes の局在変化を免疫染色にて検討した。対象は NA 群全例 (n=15) ・各 4 部位と AAA 群の拡大部 (n=10)、瘤頸部 (n=4) とし、正常大動脈の部位特異性・加齢性変化の有無を確認して AAA 形成との関連を検討することとした。

染色したスライドは光学顕微鏡を用いてデジタルカメラにて撮影した画像をコンピュータで画像解析ソフトを用いて、染色画像を二値化して染色部分の面積比(%)を算出し、各 collagen の占有率とした。

【結果】

①走査型電子顕微鏡による膠原線維立体構造の解析

大動脈 IMA レベルにおいて、中膜及び外膜いずれにおいても collagen fibril の単位では走査型電顕で観察可能な範囲で加齢性変化や動脈瘤での病的変化は明らかでないが、fibril が集束した collagen fiber や bundle の単位では①密度が疎になる、②bundle が平坦化するという加齢性変化があり、AAA ではさらにそれらが顕著になっていた。

②フーリエ解析による膠原線維束構造の定量解析

NA 群の上行大動脈及び IMA レベル大動脈の中膜においては加齢により collagen bundle の方向性は強くなるが、IMA レベル大動脈の AAA 群では逆に方向性は失われていた。また中膜及び外膜の collagen bundle の太さは NA 群に

比べて AAA 群では有意に太くなっていた。

③外膜膠原線維束波状構造の定性評価

IMA レベルでは他部位と異なり若年では波状構造が強いが、加齢によりやや平坦化する傾向がみられた。

④光路差測定による外膜膠原線維束構造の定量解析

外膜 collagen の分子レベルの構造変化として、NA 群における retardation 値は IMA レベルでは他部位よりも有意に低値であり、AAA 群ではさらに低値であった。つまり大動脈 IMA レベルでは元来外膜の collagen 分子構造が他部位に比べて未熟（整然性が崩れている）であり、AAA の好発部位であることの説明がつく。

⑤免疫染色による中膜 collagen subtype 局在変化の解析

NA 群ではいずれのレベルでも加齢により type I 占有率は増加するが type III では有意差はない。正常に比べて AAA では type I 占有率が低下するため相対的に type III 比率は高くなっていた。collagen type I が動脈壁の力学的強度を規定することから、中膜における強度が AAA では低下していることが推測される。

【結論】

正常大動脈の IMA レベルでは外膜の collagen 分子構造が未熟で加齢により波状構造が平坦化し、中膜の collagen bundle の方向性が加齢により強くなるということより、正常大動脈の collagen は部位特異性及び加齢性に構造変化を来すという仮説 I が正しいことが示された。

さらに同時に、正常大動脈の IMA レベルでの外膜の collagen 分子構造の未熟性、加齢による波状構造の平坦化及び collagen fibril 密度の低下は AAA でさらに顕著となっていることから、AAA は動脈壁 collagen の構造変化により形成されるという仮説 II も正しいことが推測された。

しかし一方で、中膜 collagen bundle は加齢により方向性が強くなるのに対して AAA では方向性が失われており、また collagen type I 占有率は加齢により上昇するのに対して AAA では占有率が低下していることなどより、AAA 形成及び増大には部位特異性や加齢性変化とは異なる要因も関与していることが示唆された。

今後これらの立体構造変化の原因となるメカニズムをさらに明らかにすることにより腹部大動脈瘤の破裂リスクの詳細な評価および非侵襲的治療法が実現することが期待される。