

氏名(本籍)	砂原 央 (鹿児島県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 139 号
学位授与年月日	平成 26 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	犬の肺動脈狭窄症に対する非侵襲的治療法の確立
論文審査委員	(主査) 藤 井 洋 子 (副査) 代 田 欣 二 土 屋 亮

論文内容の要旨

第一章 諸言

肺動脈狭窄症(以下 PS)は、重度の場合生存期間短縮を引き起こすとされている。重度 PS 罹患犬の治療法には、カテーテルによるバルーン弁口拡大術(以下 BV)や外科手術が挙げられるが、前者が治療の第一選択とされている。BV は術後に肺動脈弁逆流(以下 PI)、三尖弁逆流(以下 TR)、再狭窄などが合併症として挙げられている。獣医学領域においても BV 後の再狭窄は報告されているものの情報は限られており、その原因は不明であり、したがって対策がなされていないのが現状である。本研究の目的は、BV の合併症を把握し、対策および治療を提案することである。本研究ではまず臨床例の疫学的調査を実施し、BV の治療効果と合併症、中でも再狭窄率に注目し、再狭窄に関連する因子を探索することとした。さらに再狭窄弁を病理組織学的に検索し、正常弁や非再狭窄弁、BV 未実施狭窄弁と比較検討することで再狭窄の発生機序について仮説を立てることとした。病理組織学的検索結果に基づき、犬の肺動脈弁内細胞を培養し薬物添加によって再狭窄の病態を再現することを試みた。薬物添加による培養細胞の再狭窄モデルに投薬を行うことで、再狭窄を抑制可能であるかを検討することとした。

第二章 重度弁性肺動脈狭窄症症例に対するバルーン弁口拡大術の成績と合併症

[目的] 本研究の目的は、犬の臨床例における BV の成功率、合併症の種類と発生数および発生時期、再狭窄に関連するとされる因子の探索である。

[実験材料と方法] 本学に 2006 年 9 月から 2014 年 5 月までに来院し、重度 PS と診断され、BV を実施した 41 例の犬を対象とした。術後の肺動脈右室圧較差(以下 PG)の減少および合併症、再狭窄発生率を調査した。また手術時月齢、体重、術前 PG、術後短期 PG、BV 回数、BV に使用したバルーン径・肺動脈径比、BV 前 β 遮断薬および BV 前カンデサルタン投与の有無と再狭窄との関連を後方視的

調査を行った。

[結果] BV 後短期成功率は 95.1% (39/41) であった。成功と判断され長期間の追跡が可能であったのは 22 例であり、そのうち再狭窄が認められたのは 6 例であった。再狭窄の発覚時期は 5.5 ヶ月 (1.5-68.2 ヶ月) であった。成功例と再狭窄例における各因子を比較したところ、どの因子においても有意差は認められなかった。短期経過時に TR、PI が認められたのは 12 例と 4 例であったが、長期経過時には 2 例と 3 例に減少した。TR、PI の悪化が認められた症例で右心不全を呈した症例は認められなかった。

[小括] 過去の報告同様に BV は成功率が高く効果的な治療法であった。再狭窄発生率は 22 例中 6 例で、再狭窄を呈するまでの経過は広範囲であった。再狭窄に関連する因子は、今回の検討では検出できなかった。BV 実施後の TR や PI の悪化によって右心不全を呈した症例は認められなかった。過去の報告においても重症化は少ないことから重度 PS に対する治療法として BV は合併症の少ないより安全な方法であると考えられた。

第三章 バルーン弁口拡大術実施後再狭窄が認められた犬の病理学的調査

[目的] これまで BV 後の再狭窄の原因及びその発生機序の報告はなく、不明である。そこで本章では、BV 後再狭窄と診断された 1 例について肺動脈弁の病理学的調査を実施することで、再狭窄の原因を探索することを目的とした。

[実験材料と方法] BV 実施後約 1 年半で再狭窄と診断され、再手術中に死亡した犬 1 頭の肺動脈弁と正常実験ビーグル犬 3 頭の肺動脈弁を採材し、特殊染色および免疫染色を用いた病理組織学的検査を実施した。

[結果] 再狭窄弁は正常弁と比較して肉眼上での肥厚が認められた。再狭窄弁では正常弁と比較して酸性ムコ多糖類および膠原線維の蓄積、筋線維芽細胞の増加が認められた。

[小括] 再狭窄弁では酸性ムコ多糖類および膠原線維が多く蓄積していたことから、これらにより肺動脈弁口部が狭小化していたことが明らかとなった。再狭窄弁では筋線維芽細胞の増加が認められた。筋線維芽細胞は細胞外基質 (以下 ECM) である酸性ムコ多糖類と膠原線維を産生することから再狭窄には筋線維芽細胞の増加が関連している可能性が考えられた。

第四章 バルーン弁口拡大術実施後短期および長期経過における肺動脈弁の病理学的変化の比較検討

[目的] 本章では BV 実施後短期および長期における肺動脈弁の病理学的変化を検討することで、肺動脈弁に対する経時的な BV の影響および再狭窄の原因を病理組織学的に検索することを目的とした。

[実験材料と方法] 自然発症 PS に罹患した実験ビーグル犬 2 例に BV を実施し、短期および長期経過時に肺動脈弁を採材し、第三章同様に病理組織学的検査を実施した。BV を実施していない PS 罹患犬 1 例を陽性コントロール、第三章で用いた正常犬を陰性コントロールとした。

[結果] BV 実施 2 例では再狭窄は認められなかった。BV 実施 2 例短期経過時および陽性コントロール

では肉眼上で弁の肥厚が認められ、特殊染色検査では酸性ムコ多糖類、膠原線維の増加が認められた。長期経過では短期経過と比較して酸性ムコ多糖類のさらなる増加が認められた。膠原線維は短期と長期で比較して大きな差は認められなかった。短期で多く認められていた筋線維芽細胞は長期では減少していた

[小括]本実験で用いた2例はBV実施後、長期経過時に肺動脈弁の肥厚は認められたものの、再狭窄を呈していないためBV成功例のモデルと考えられた。BV成功例は実施後、中長期的に細胞外基質による弁の肥厚を生じるが、筋線維芽細胞が不活化し、第三章で認められているような肺動脈弁口部を狭小化するほどのECMの過剰産生が停止していると考えられた。

第五章 培養細胞を用いた再狭窄モデルの確立

[目的] 前章より再狭窄は筋線維芽細胞によるECM過剰産生による肺動脈弁口部の狭小化によって起きるのではないかと考えられた。本実験では肺動脈弁内に存在する筋線維芽細胞を培養し、TGF β -1を添加し細胞外基質の産生を促進させ、肺動脈再狭窄モデルを作製できると仮説を立てた。培養筋線維芽細胞にAng II変換酵素阻害薬（以下ACEI）やARBを添加することでAT1受容体を介したTGF β -1産生を抑制するかを検証することとした。

[実験材料と方法] 実験ビーグル4頭から肺動脈弁を採材し、細胞を培養した。培養9日目に筋線維芽細胞を活性化するためにTGF β -1（20ng/ml）を添加し、12日目に細胞数計測および培養液の採取を行った。培養液はヒアルロン酸（以下HA）およびアンジオテンシンII（以下Ang II）の定量を実施した。定性は抗Vimentin抗体および抗 α -smooth muscle actin（以下SMA）抗体を用い、蛍光免疫染色を行った。

[結果] 培養細胞は全て筋線維芽細胞であった。TGF β -1未添加群と添加群において細胞数およびHA濃度に有意差は認められなかった（ $P=1.00$ 、 $P=0.56$ ）。TGF β -1添加群の4頭中3頭でHA濃度が多かった。Ang II濃度はTGF β -1未添加群で有意に高値を示していた（ $P=0.04$ ）。TGF β -1添加群とACEIおよびARB添加群において細胞数、Ang II濃度およびHA濃度ではいずれの群でも有意差は認められなかった。

[小括] TGF β -1添加では細胞数において有意差が認められなかったがこれは過去の報告と一致していた。TGF β -1添加群はHA産生において有意差は認められなかった。Ang IIはTGF β -1未添加群で有意に上昇していたことからTGF β -1添加によって筋線維芽細胞からのAng II産生が抑制されるのではないかと考えられた。筋線維芽細胞はAng IIの作用を受けてTGF β -1を産生することからACEIとARBの投与が有効ではないかと考えられたが、本実験ではAng IIとHA産生の抑制は認められなかった。

第六章 総括

第二章の結果からBVの短期および長期成功率から示されているように今までの報告同様に重度PSに対して有効であることが再度示された。再狭窄はBV実施後中長期間で認められた。また医学領域

においても再狭窄は BV 実施後の長期経過中に多く認められていることから犬においても再狭窄率は BV 後時間経過とともに上昇していくことが予想された。BV 実施後の TR および PI の発生は他の論文でも報告されているが、いずれにおいても重症化をするのは珍しいとされていることから今回の結果と一致しており、今回の BV の結果は良好であったと考えられた。第三章において再狭窄は ECM の産生過剰亢進による肺動脈弁口部の狭小化が原因と考えられた。再狭窄弁での筋線維芽細胞の増加が ECM を過剰産生していることが考えられた。しかしながら第四章において BV 実施後長期経過した非再狭窄弁では ECM の増加が認められているにもかかわらず、筋線維芽細胞は減少していた。これらのことから BV 実施後に筋線維芽細胞の活性化停止の有無が再狭窄発生と関連していると考えられた。第五章の結果では TGF β -1 添加群と ACEI や ARB 添加群では HA と Ang II の産生を抑制できなかったが、過去の報告では ECM の抑制が報告されていることから今回使用した添加濃度が低い可能性がある。そのため今後 TGF β -1 と ACEI、ARB の添加量は再検討する必要があると考えられた。これらの結果から BV 実施の再狭窄はメカニカルストレスと筋線維芽細胞による細胞外基質の蓄積によって発生していると考えられた。再狭窄を予防するために細胞外基質産生を抑制する薬剤の検討が望まれる。

論文審査の結果の要旨

肺動脈狭窄症 (PS) は犬でよく認められる先天性心疾患のひとつで、日本で飼育率の高い小型犬種を中心に好発する。重度の狭窄では、臨床徴候が認められなくても突然死を引き起こしたり、あるいは失神、運動不耐性、右心不全といった臨床徴候を生じたりすることから、根治的な治療が推奨される。根治治療には、獣医領域ではバルーン弁口拡大術 (BV) や開心術による弁切開・流出路拡大術が実施されており、前者は侵襲性が低く効果的で、かつ低コストであることから第一選択とされている。しかし BV の術後合併症として、再狭窄、肺動脈弁逆流、三尖弁逆流の発生あるいは悪化が問題視されている。再狭窄が生じた場合、医学領域では再度 BV の実施や弁置換術で対応しているが、獣医学領域ではそれらは過去に報告がなく困難とされている。前述のように医学領域では十分な治療的対応が確立していることから、再狭窄の原因や病態の追求に関する検討はなされておらず、したがってそれに対する予防的な治療介入もなされていないのが現状である。本研究の目的は、犬における BV の合併症の現状を把握し、合併症の病態の解明、さらには治療介入について検討することであり、最終的な目標は BV 実施の術後成績を向上させることである。合併症の中でも特に再狭窄に注目し、再狭窄関連因子の検討、病理学的検索、培養細胞を用いた実験を行い、これまで見いだされなかった病態について新たな知見を加え、治療介入の可能性を示唆した。

獣医学領域において、これまで BV の成績に関する研究はいくつかあるものの、長期的なフォローアップを行い、再狭窄をはじめ合併症に注目した研究はこれまで見受けられない。そこで研究 1 では、PS の犬の臨床例に対する BV の成績および合併症の現状を把握する目的で、麻布大学附属動物病院に来院し、重度 PS と診断されかつ BV を実施した臨床例の犬を後方視的に調査した。その結果、BV は 95.1%と高い短期成功率を示したものの、長期フォローアップ中に 27.3%の症例で再狭窄を認め、重要

な合併症であることが示唆された。再狭窄発覚時期の中央値は 5.5 ヶ月（範囲 1.5～68.2 ヶ月）であった。再狭窄の関連因子として、手術時月齢、体重、術前 PG、術後短期 PG、バルーン膨張回数、バルーン径・肺動脈径比、BV 前 β 遮断薬投与、BV 前カンデサルタン投与の各因子について検討したが、統計的に有意に関連している因子は認められなかった。しかしながら、BV 前 β 遮断薬投与は再狭窄に関連する傾向があると考えられ、今後さらに例数を重ねて検討する必要があると思われた。三尖弁逆流、肺動脈弁逆流は一定の症例で認められたものの、心不全徴候まで至った症例はおらず、予後を左右する重大な合併症とは思われなかった。

上記のように、再狭窄は重大な合併症であるにもかかわらず、その病態発生に関する研究は医学領域を含めてもなされていない。そこで研究 2 では再狭窄弁を病理学的に探索することで、再狭窄の病態を推測することを目的とした。再狭窄症例 1 例および正常肺動脈弁 3 例について各種染色および免疫染色を行い、組織学的に比較したところ、再狭窄弁では酸性ムコ多糖類および膠原線維の顕著な蓄積、筋線維芽細胞の増加が認められた。このことから、これらの弁への沈着が生じたことで、肺動脈弁口部が狭小化し、再狭窄を生じたことが明らかとなった。狭窄弁では筋線維芽細胞が増加していたが、これは細胞外基質である酸性ムコ多糖類や膠原線維を産生することから、筋線維芽細胞の増加と活性化が再狭窄に関連している可能性が示唆された。

研究 1 において、再狭窄の発生時期はまちまちであることが示された。再狭窄が生じるのは BV による短期的な影響が強いのかそれとも長期的な影響なのかは不明である。そこで BV の経時的な影響を評価することを目的に、研究 3 を実施した。本研究では、PS を自然発症した実験ビーグル 2 例に BV を実施し、短期サンプルとして 1 週間後に、長期サンプルとして約 1 年後に肺動脈弁を採材し、研究 2 と同様の病理学的な検索を行った。陽性コントロールとして BV を実施していない PS 犬の肺動脈弁、陰性コントロールとして研究 2 で使用した正常肺動脈弁を比較対象とした。BV 実施 2 例では、術後再狭窄は認められなかった。BV 実施 2 例の短期サンプルおよび陽性コントロールでは、肉眼状弁の肥厚が認められ、酸性ムコ多糖類、膠原線維の増加が認められた。長期サンプルでは、短期と比較してさらに酸性ムコ多糖類の増加が認められたが、膠原線維に変化は認められなかった。短期サンプルで多く認められた筋線維芽細胞は、長期サンプルでは減少していた。このことから、BV 成功例では、BV 後ある程度の弁肥厚は生じるものの、筋線維芽細胞が不活化し、細胞外基質の過剰産生は停止したと考えられた。

これまでの研究から、再狭窄は筋線維芽細胞の細胞外基質過剰産生による弁口部の狭小化が原因であると示唆された。そこで研究 4 では、培養細胞による再狭窄モデルを作成した上で治療薬の可能性を模索することを目的とした。これまで肺動脈弁細胞の培養自体の報告が過去にないことから、本研究では培養方法の確立から試み、さらに TGF β -1 にて筋線維芽細胞を活性化し再狭窄弁モデルの作成を試みた。肺動脈弁から培養した細胞は、Vimentin 抗体および α SMA 抗体による蛍光免疫染色から、筋線維芽細胞であることが確認された。しかし、TGF β -1 により培養液のアンジオテンシン II (Ang II) は減少し、細胞外基質であるヒアルロン酸の有意な増大は得られなかった。また、アンジオテンシン

変換酵素阻害薬（ACEI）とアンジオテンシン II 受容体ブロッカー（ARB）の投与は再狭窄の抑制に対して有効性があると仮説を立て、2種類の薬剤をそれぞれ投与したが、その結果 Ang II とヒアルロン酸産生の抑制は得られなかった。この研究については今後継続検討が必要であり、再狭窄モデルの更なる確立をした上で他の薬剤についての検討の余地がある。

以上、研究 2 および研究 3 より、筋線維芽細胞の活性化から細胞外基質の増大を生じ、それが再狭窄を引き起こしていることが示唆されたが、筋線維芽細胞はメカニカルストレスによって増加、活性化することが知られていることから BV および遺残高速血流のようなメカニカルストレスが筋線維芽細胞の増加及び活性化に関係しているのではないかと推察された。培養細胞を用いて再狭窄の内科的介入の可能性を検討したところ、ACEI あるいは ARB による有効な反応は得られなかったが、研究 1 からは β 遮断薬の可能性も示唆されることから、有効な治療法の候補として本薬剤について今後さらなる検討する必要があると思われた。以上、今後の継続研究が望まれるものの、本研究の成果はこれまで医学領域を含めて検討されてこなかった分野を開拓し、獣医心臓病学に大きく貢献するものである。このことから、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。

以上。