

学 位 論 文 題 名

# 心筋症モデルハムスターにおける心筋組織コラーゲンの検討

## 学位論文内容の要旨

### I 研究目的

心筋症では心筋組織の線維化が顕著に認められる。本研究では心筋症の進行の過程に伴う心筋細胞外マトリックスの変化を、その主要な成分であるコラーゲンに注目し心筋症の発症・進展にどのようにコラーゲンが関与するかを検討した。

### II 方 法

1) 実験動物：BIO53.58系ハムスター（5, 11, 22週齢）を拡張型心筋症のモデルとして、また肥大型心筋症のモデルとして BIO14.6系ハムスター（20, 30週齢）を用いた。対照動物には F1b を用いた。

2) コラーゲンの抽出：ハムスターの体重・左右両心室重量を測定後、心室筋に0.45M, NaClを加え心筋をホモジェナイズした。その一部を総コラーゲン量の定量に用いた。残りの試料を2日間塩抽出を行なった。沈渣に0.5M酢酸抽出を行ない上清の一部を酸可溶性コラーゲンの定量に用いた。沈渣にペプシン消化を3日間行い消化されたコラーゲン相を沈渣として回収した。コラーゲン量・型分析には、各群の5匹の心室筋をそれぞれ分析した。還元性架橋分析には BIO53.58, F1B 5匹分の心室筋の塩不溶性コラーゲン相を用いた。

3) コラーゲンの定量：Woessnerの方法に従い、各試料中のヒドロキシプロリン量を比色定量しコラーゲン量を求めた。

4) コラーゲンの型分析：Sykesらの方法により、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。泳動後染色しデンシトメーターを用いてI・III・V型コラーゲン量を比較した。

5) コラーゲンの還元性架橋分析：塩不溶性コラーゲン相を $[^3\text{H}] - \text{NaBH}_4$ 試薬で還元した。試料を6N塩酸で水解した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて各還元性架橋を分離し分析した。

6) 組織学的検討：各心筋組織を10%ホルマリン水溶液にて約1週間浸漬固定した。そして脱水

しパラフィン包埋した後、心筋組織の断面が心臓の短軸面となるように200  $\mu$ m ごとに8  $\mu$ m の厚さに薄切し心臓全体の準連続切片を作成した。得られた切片は脱パラフィン後、アルデヒド・フクシン、マッソン・トリクローム重染色を施し、各組織の膠原線維・弾性線維、筋線維等を区別し比較検討した。

7) 統計処理：それぞれの実験結果の有意検定にはt-testを用いた。

### Ⅲ 結 果

1) 体重・心室筋重量の変化：心室筋湿性重量の体重に対する割合は BIO53.58は22週齢のみ F1b に比し有意に大きかった。BIO14.6は20週、30週とも F1b に比し大きく有意差を認めた。

2) コラーゲン量の変化：BIO53.58では、心室筋湿性重量に対するコラーゲン量は、11週ですでに F1b より有意に高値を呈し、22週ではさらに著しく増加していた。BIO14.6は20週では F1b と差を認めなかったが30週で増加していた。コラーゲンの増加の程度は BIO53.58が BIO14.6 より大であった。総コラーゲン量に対する酸可溶性コラーゲンの割合は BIO53.58は心筋症が進行するにつれ顕著に減少していたが、BIO14.6は20週では F1b と差がないが30週では有意に低下した。

3) コラーゲンの型変化：BIO53.58は11週でⅠ型とⅢ型コラーゲンの合計に対するⅢ型コラーゲンの比率(Ⅲ/Ⅰ+Ⅲ)が増加していた。しかし22週ではⅢ/Ⅰ+Ⅲは差がなかった。また BIO53.58のⅤ型コラーゲンのⅠ型コラーゲンに対する比率(Ⅴ/Ⅰ)は F1b に比し大きい傾向はあったが有意差はなかった。BIO14.6は20週の肥大型でⅢ/Ⅰ+Ⅲが有意に大きかったが30週齢では差がなかった。Ⅴ/Ⅰは20週では差がなかったが30週齢で F1b に比し有意に減少していた。

4) コラーゲンの還元性架橋変化：BIO53.58において行った還元性架橋分析では、dihydroxylysino-norleucine・hydroxylysino-norleucine・histidinohydroxymerodesmosine のいずれも心筋症の進行につれ減少傾向が認められた。

5) 心筋症ハムスターの形態学的所見：BIO53.58の10週齢ではおもに心室壁に出血を伴った心筋細胞の壊死巣を慢性に認めた。壊死巣には組織球やリンパ球などの円形細胞が多数浸潤している領域と円形細胞をほとんど伴わずに膠原線維が区域を作るようになっている領域と区別できた。BIO53.58の20週齢では円形細胞の浸潤は消失していき、線維芽細胞とその間を埋める膠原線維で構成される領域を認めた。膠原線維で区域された領域では各区域をつくる膠原線維の壁がさらに厚くなっていた。この区域内にはカルシウム様沈着物が認められた。BIO14.6の20週齢で

は円形細胞の浸潤とそれにひき続く線維化によってできたと思われる膠原線維の増殖が心室壁に慢性に認められた。しかし膠原線維が壊死巣を囲み区域を作るような変化はわずかしき見られなかった。BIO14.6の30週齢では円形細胞の浸潤とそれにひき続く線維化によってできたと思われる膠原線維の増殖が心室壁に慢性に認める一方、膠原線維が壊死巣を囲み区域を作るような変化を左心室壁に巣状に認めた。F1b では膠原線維は心内膜・心外膜と血管周囲にわずかに存在するのみであった。

#### IV 考 察

BIO53.58の方がBIO14.6よりコラーゲンの増加の程度が大きかったことより拡張型心筋症ハムスターの方が肥大型心筋症ハムスターより線維化の進行が顕著であり、BIO14.6に認められるような心肥大にはコラーゲンの増加の関与は少ないがBIO53.58に認められるような心拡大にはコラーゲンの増加が大きく関与していると考えられる。

コラーゲンの型分析からBIO14.6の20週齢・BIO53.58の11週齢にⅢ型コラーゲンが増加していた。心筋組織が線維化する場合の主要なコラーゲンはⅠ型コラーゲンであり、その過程でⅢ型コラーゲンは一時的に増加すると考えられた。組織学的に太いコラーゲン線維が増えていたことと生化学的にⅠ型コラーゲンが増加していたことは一致した変化と考えられる。Ⅴ型コラーゲンは線維化の進行の際に重要な役割を果たしていると考えられる。

コラーゲンの可溶性には架橋形成が大きく関与している。酸可溶性コラーゲンがBIO14.6、BIO53.58ともに病期の進行に従い減少し、その減少の程度がBIO53.58において大きいのは、心拡大および心不全期に架橋の形成がいっそう活発になることを意味している。

BIO53.58で線維化が進行するにつれ還元性架橋が減少していたことは、架橋が非還元性の成熟架橋に変化すると考えられる。こうした架橋の変化はコラーゲン分子内・分子間の結合を密にし、コラーゲン細線維をいっそう強固なものに変化させていると考えられる。

#### V 結 語

心筋症の進行の初期においてはⅢ型コラーゲンの多い幼弱な組織であるが、進行した時期においては硬組織に近い組織（Ⅰ型コラーゲンが多く、可溶性が減少し、非還元性の成熟架橋が多い組織）へと変わることが考えられる。強固な結合をした太いコラーゲン線維が心筋組織内に慢性に増えることは心筋細胞が変性・壊死することと共に心臓の収縮能・拡張能を障害していると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 近 藤喜与太郎

心筋症では心筋組織の線維化が顕著に認められる。本研究では心筋症の進行の過程に伴う心筋細胞外マトリックスの変化を、その主要な成分であるコラーゲンに注目し検討した。

実験動物として、BIO53.58系ハムスターを拡張型心筋症のモデルとして、BIO14.6系ハムスターを肥大型心筋症のモデルとして、また F1b を対照動物として用いた。ハムスターの体重・心室筋重量を測定後、0.45M, NaCl による塩抽出を2日間行なった後、0.5M酢酸抽出を1日行ない、さらにペプシン消化を3日間行ないコラーゲンを抽出した。コラーゲンの定量は Woessner の方法に従い行なった。コラーゲンの型分析は Sykes らの方法による SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より求めた。高速液体クロマトグラフィーを用いて還元性架橋を分析した。また各心筋組織切片にアルデヒド・フクシン、マッソン・トリクローム重染色を施し形態学的に比較検討した。

心室筋湿性重量の体重に対する割合は BIO53.58は22週のみ F1b に比し有意に大きかった。BIO14.6は20週、30週とも F1b に比し大きく有意差を認めた。心筋湿性重量に対するコラーゲン量は、BIO53.58では11週ですでに F1b より有意に高値を呈し、22週ではさらに著しく増加していた。BIO14.6は20週には F1b と差を認めなかったが30週で増加していた。総コラーゲン量に対する酸可溶性コラーゲンの割合は BIO53.58は心筋症が進行するにつれ顕著に減少していた。BIO14.6は20週では F1b と差がないが30週では有意に低下した。BIO53.58は11週でⅠ型とⅢ型コラーゲンの合計に対するⅢ型コラーゲンの比率（Ⅲ）が増加していた。しかし22週ではⅢは差がなかった。BIO53.58のⅤ型コラーゲンのⅠ型コラーゲンに対する比率（Ⅴ）は F1b に比し大きい傾向はあったが有意差はなかった。BIO14.6は20週でⅢが有意に大きかったが、30週では差がなかった。Ⅴは20週では差がなかったが30週齢で F1b に比し有意に減少していた。BIO53.58において行なった還元性架橋分析では還元性架橋は心筋症の進行につれ減少傾向が認められた。形態学的に BIO53.58の10週はおもに心室壁に出血を伴った心筋細胞の壊死巣を慢性に認めた。壊死巣には組織球やリンパ球などの円形細胞が多数浸潤している領域と円形細胞をほとんど伴わずに膠原線維が区域を作るようになっている領域と区別できた。20週では円形細胞の浸

潤は消失していき、線維芽細胞とその間を埋める膠原線維で構成される領域を認めた。膠原線維で区域された領域では各区域をつくる膠原線維の壁がさらに厚くなっていた。この区域内にはカルシウム様沈着物が認められた。BIO14.6は20週では円形細胞の浸潤とそれに引き続く線維化によってできたと思われる膠原線維の増殖が心室壁に慢性性に認められた。30週では20週の所見に加え、膠原線維が壊死巣を囲み区域を作るような変化を左心室壁に巣状に認めた。

心筋症の進行の初期においてはⅢ型コラーゲンの多い幼弱な組織であるが、進行した時期においては硬組織に近い組織（Ⅰ型コラーゲンが多く、可溶性が減少し、非還元性の成熟架橋が多い組織）へと変わることが考えられる。強固な結合をした太いコラーゲン線維が心筋組織内に慢性に増えることは心筋細胞が変性・壊死することと共に心臓の収縮能・拡張能を障害していると考えられた。

口頭発表の審査会において、長嶋教授より心筋症モデルハムスターと心筋梗塞の線維化との違いについて、また心筋症モデルハムスターに心筋炎の所見は認められないか、さらにコラーゲンの増加は心機能を保つためではないかという質問がなされた。近藤教授より心機能に対するコラーゲンの関わりは2次的なものではないか、また今回心筋症モデルハムスターに認められたコラーゲンの変化は心筋に線維化を起こす病態において一般的な変化なのかについて質問がなされた。阿部教授より形態学的学的変化の過程で心筋細胞の壊死巣に出血・細胞浸潤・線維化を認めるがこれらの変化が心筋症の本態に迫るものではないか、また細胞浸潤を伴い線維化する領域とカルシウム沈着を伴い線維化する領域の出来方の違い、さらに線維化している領域の分布について質問がなされた。牧田教授より、非還元性架橋について検討したかについて質問がなされた。古舘教授より肥大型心筋症モデルハムスターの肥大の部位に偏りがあるか、コラーゲンの分布に偏りがあるか、さらに心筋症の左心機能の低下をコラーゲン量で説明ができるかについて質問がなされた。これらの質問に対し申請者は概ね妥当な回答を行なった。その後行なわれた長嶋、近藤審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は心筋症の発症・進展にどの様にコラーゲンが関与するかを明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ学位授与に値する。