

学 位 論 文 題 名

高血圧性肥大心における心筋細胞微小管に関する研究

—自然発症高血圧ラット（SHR）における組織学的検討—

学位論文内容の要旨

緒 言

心臓に負荷が加わると心筋は肥大して心機能を保持するように代償機構が働く。サミュエルらは、大動脈に狭窄を作り、急性に肥大心を作製した場合、一過性に微小管が増加する細胞があることを組織学的手法で指摘し、微小管が筋新生に關与する可能性を報告した。しかし、臨床的に最も多く見られる本態性高血圧症は、漸増的な血圧の上昇であり、彼らの結果を本態性高血圧症の際の微小管動態にあてはめることはできない。そこで本研究では、漸増的な血圧上昇による心肥大形成過程における微小管の変化を明らかにし、その役割を検討することを目的として、本態性高血圧の動物モデルとなる自然発症高血圧ラット（SHR）を用い経時的に微小管を観察し、併せて急性圧負荷モデルを作成し、微小管動態を比較検討した。

方 法

1. 実験動物 1) SHR : 4, 6, 10, 16週令のSHR各5例ずつ計20例を用い、対照は同週令のWistar-Kyotoラット（WKY）各週令5例ずつ計20例を用いた。2) 急性圧負荷モデル : 6週令のWKYの腎動脈より中枢側の腹部大動脈に内腔が23G針の太さの狭窄を作成し、1週間の急性圧負荷を加えた4例を用いた。またSham-Operationを行った3例を対照とした。3) コルヒチン前処置例 : WKY10週令の灌流固定3時間前に、微小管脱重合剤であるコルヒチン2.4mg/kgと8mg/kgを腹腔内投与した各1例を用い、1) で使用したWKY10週令を対照とした。

2. 組織学的観察 ラットの血圧を尾カフ法で測定し、体重測定後、左心室よりPLP固定液で灌流固定した。引続き、左室重量を測定し、左心室心基部心筋の水平断面を全周性に採取し、同固定液で浸漬固定した。続いて4%パラホルムアルデヒド固定液で浸漬固定し、厚さ2 μ mの凍結切片を作成した。切片は、抗 β -チューブリンマウスモノクローン抗体と反応後、フルオレセ

イン結合抗マウス IgG と反応させ、次にローダミン-ファロイジンと反応させた。その後、落射蛍光顕微鏡あるいは、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。共焦点レーザー走査顕微鏡の光学的断層面は、約700nm とした。2) 定量法：核を含む筋細胞横断面で、点状に見える微小管の相対的総量を求め、また各周囲の微小管をのぞいた細胞質中の微小管の総量を細胞質の面積(細胞横断面と核の面積の差)で除し密度を求めた。

3. エポン切片の光学顕微鏡と透過電子顕微鏡による観察 PLP 固定液で灌流固定後、3.5% グルタルアルデヒド-2%パラホルムアルデヒド混合液で浸漬し、続いて1%オスミウム酸で浸漬し、型通りエタノール系列で脱水し、エポン包埋した。その後試料より厚さ2 μ m の準超薄切片を作りトルイジンブルー染色し光学顕微鏡で観察を行った。さらに超薄切片を作り、クエン酸訛とウラニル酢酸で二重染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 統計学的処理 得られた測定数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。有意差検定には、Student's t-test を用い、5%未満の危険率を有意と判定した。

結 果

1. 血圧 収縮期血圧は、WKY 4週令で 55 ± 5 mmHg に対して SHR 4週令で 68 ± 5 mmHg と軽度上昇していたが有意差は認められなかった。SHR 6週令では、 147 ± 9 mmHg であり、4週令から6週令にかけて SHR では血圧の上昇が見られ、WKY (104 ± 4 mmHg) と比べて有意 ($p < 0.01$) であった。WKY では10週令で血圧の平衡状態に達したが、SHR では10週令から16週令にかけてさらに上昇した。

2. 左室重量/体重(左室重量比) は、4週令では WKY 2.9 ± 0.2 mg/g, SHR 3.0 ± 0.1 mg/g と有意差は認められなかったが、6週令ではそれぞれ 2.7 ± 0.1 mg/g, 3.0 ± 0.1 mg/g となり SHR で有意に大きかった。($p < 0.05$)。また腹部大動脈狭窄群の左室重量比は 3.9 ± 0.5 mg/g で、非狭窄群 2.7 ± 0.1 mg/g に比べ有意に大きかった ($p < 0.05$)。

3. 心筋細胞横断面積 心筋細胞横断面積は、4週令では WKY 242 ± 10 μ m², SHR 245 ± 10 μ m² と両群に差は認められなかったが、6週令では WKY 293 ± 20 μ m² であるのに対し SHR 320 ± 13 μ m² と有意に大きかった。($p < 0.01$)。一方核の面積は両群内でも各週令間でも有意差は見られなかった。また大動脈狭窄群の心筋細胞横断面積は 440 ± 18 μ m² で非狭窄群 276 ± 20 μ m² と比べ有意に大きかった。($p < 0.01$)。

4. 準超薄切片の光学顕微鏡での観察 心筋細胞の中央部に楕円形の核が存在し、細胞質内には豊富な筋原線維とミトコンドリアが、整然と配列していた。SHR 16週令では、対照と比べ細

胞横断面積が大きく、筋原線維束も肥厚していた。また SHR16週令では WKY と異なり、ミトコンドリアが細胞膜直下に大量に集積している細胞が認められた。

5. 透過型電子顕微鏡での観察 SHR16週令ではミトコンドリア分布の不均一像がより明らかに観察でき、さらにミトコンドリアには大小不同が認められた。心筋細胞横断切片では、微小管は各周囲部、筋原線維間、細胞膜直下、ミトコンドリア近傍などに外径25nmの管状構造として認められた。

6. 蛍光抗体法による微小管の観察 1) 落射蛍光顕微鏡による観察：微小管は、心筋細胞内で細胞質中を主に縦走し、核の周囲では特に密な走行を示した。また長楕円形を示す核の両極の細胞質内に集積する傾向があった。なお、急に方向を変え横走する微小管もわずかに見られた。横断面を低倍率で観察すると同一心筋では微小管の分布は比較的均一であった。2) 共焦点レーザー走査顕微鏡による観察：アクチンと微小管の二重染色を画像処理で重ね合わせることによって、微小管は細胞質中で筋原線維間を走行し、アクチンの中央近傍つまりZ線の近傍で横方向に向きをかえることが明らかになった。またコルヒチン2.4mg/kg前投与では、束状の微小管は減少し8mg/kgの前投与では、さらに減少することが確認された。しかし、完全には消失せず、比較的安定な微小管も存在した。

7. 微小管の相対的総量、密度、分布：微小管の相対的総量には SHR と WKY の両群間で、有意差は見られなかった。細胞質内の微小管の密度は WKY と比べ SHR では各週令で有意に少なかった。しかし各群内で週令に伴う密度の変化は認められず、漸増する血圧の上昇に伴う微小管密度の大きな変化は見られなかった。また、微小管分布にも大きな変化は認められなかった。一方、腹部大動脈狭窄による急性圧負荷群では、一見して明らかに微小管の量が増加している細胞が約16%に見られた。

考 案

1. 共焦点レーザー走査顕微鏡の有用性 共焦点レーザー走査顕微鏡では、レーザー光を光源とするので、光束は非常に小さなスポットに収束し、このスポット内の蛍光物質のみ、光を射出する。さらに、この蛍光は共焦点面に焦点を結ぶので共焦点面にピンホールを置き迷光を排除し、高解像度、高コントラストで光軸の方向の分解能を高めた像が得られる。このため本研究では、微小管が密に走行している部分の観察が従来より正確に行うことができた。

2. 肥大心における微細構造の変化 SHR の肥大心では、心筋細胞の再構築として筋原線維の肥厚が認められた。また、ミトコンドリアの分布および形態の変化が認められたが、その意

義付けは不明であった。

3. 心筋細胞微小管とコルヒチン： コルヒチン前投与により、微小管を脱重合させた場合、対照と比べて蛍光標識された束状の微小管は激減しており、遊離 β -チューブリンの状態では可視化できないことが確認され、本法では正しく微小管が観察されていることが証明された。本研究のコルヒチンを用いた実験は微小管の重合、脱重合の周期が比較的早いこと、しかし中には安定な微小管もあることをも確認した。

4. 肥大心における微小管 一般に血圧の上昇に伴い心筋細胞にかかる張力は増えるので、形態維持のために細胞骨格である微小管は、その密度の増加を伴うことが考えられた。また肥大形成時には、蛋白合成亢進があるため、細胞内の物質輸送を担当する微小管はその密度を増加させるとも予想された。本研究の急性圧負荷モデルでは16%の細胞に微小管の増加が見られ、急性圧負荷に対する微小管の代償的役割が示された。しかし、SHRを用いた慢性圧負荷モデルでは、微小管の密度は、血圧の上昇過程や心肥大の形成過程でも大きな変化は見られず、微小管の相対的総量はWKYと有意差がなかった。すなわち、本研究の慢性圧負荷モデルにおける微小管の動態および分布は安定であり漸増的な圧負荷は微小管動態を変える刺激とはなりえなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 小 山 富 康

心臓に負荷が加わると心筋は肥大して心機能を保持するように代償機構が働く。サミュエルらは、大動脈に狭窄を作り、急性に肥大心を作製した場合、一過性に微小管が増加する細胞があることを組織学的手法で指摘し、微小管が筋新生に関与する可能性を報告した。しかし、臨床的に最も多く見られる本態性高血圧症は、漸増的な血圧の上昇であり、彼らの結果を本態性高血圧症の際の微小管動態にあてはめることはできない。そこで本研究では、漸増的な血圧上昇による心肥大形成過程における微小管の変化を明らかにし、その役割を検討することを目的として、本態性高血圧の動物モデルとなる自然発症高血圧ラット（SHR）を用い経時的に微小管を観察し、併せて急性圧負荷モデルを作成し、微小管動態を比較検討した。

方法は、4、6、10、16週令の SHR 各5例と、同週令の Wistar-Kyoto ラット (WKY) 各週令5例、2) 6週令の WKY の腎動脈より中枢側の大動脈に狭窄を作成し、1週間の急性圧負荷を加えた4例と Sham-Operation を行った3例、3) WKY 10週令の灌流固定3時間前に、微小管脱重合剤であるコルヒチン 2.4mg/kg と 8mg/kg を腹腔内投与した各1例を用い、まず、ラットの血圧を尾カフ法で測定し、体重測定後、左心室より灌流固定した。その後、左重量を測定し、左心室心基部心筋の水平断面を全周性に採取し、浸漬固定し、凍結切片を作成した。切片は、抗 β -チューブリンマウスモノクローン抗体と反応後、フルオレセイン結合抗マウス IgG と反応させ、次にローダミン-ファロイジンと反応させた。その後共焦点レーザー走査顕微鏡で観察し、核を含む心筋細胞横断面で、点状に見える微小管の相対的総量を求め、また核周囲の微小管をのぞいた細胞質中の微小管の総量を細胞質の面積(細胞横断面積と核の面積の差)で除し密度を求めた。また、SHR と WKY は固定後エポン処理し、準超薄切片を作り光学顕微鏡で観察した。さらに超薄切片を作り、透過電子顕微鏡で観察した。

その結果、収縮期血圧、左室重量/体重(左室重量比)は、4週令で両群間に有意差は認められなかったが6週令では SHR で有意に高値であった。また、腹部大動脈狭窄群の左室重量比は非狭窄群に比べ有意に高値を示した。光学顕微鏡での観察で SHR16週令では、対照と比べ細胞横断面積が大きく、筋原線維束も肥厚しており、また対照には見られないミトコンドリアが細胞膜直下に大量に集積している細胞が認められた。透過電子顕微鏡での観察で SHR16週令ではミトコンドリア分布の不均一像がより明らかに観察でき、さらにミトコンドリアには大小不同が認められた。

共焦点レーザー走査顕微鏡による観察では、アクチンと微小管の二重染色を画像処理で重ね合わせることによって、微小管は細胞室中で筋原線維間を走行し、アクチンの中央近傍つまり Z 線の近傍で横方向に向きをかえることが明らかになった。またコルヒチン 2.4mg/kg 前投与では、束状の微小管は減少し、 8mg/kg の前投与では、さらに減少することが確認された。しかし、完全には消失せず、比較的安定な微小管も存在した。

微小管の相対的総量は SHR と WKY の両群間で、有意差は見られなかった。細胞質の微小管の密度は WKY と比べ SHR では各週令で有意に低値を示した。しかし各群内で週令に伴う密度の変化は認められず、漸増する血圧の上昇に伴う微小管密度の大きな変化は見られなかった。また、微小管分布にも大きな変化は認められなかった。一方、腹部大動脈狭窄による急性圧負荷群では、一見して明らかに微小管の量が増加している細胞が16%に見られた。すなわち、本研究における漸増的な圧負荷は微小管動態を変える刺激とは成り得なかった。

口頭発表の審査会において、第3解剖阿部教授より、凍結切片の厚さについて、微小管の分布から予想される機能について、特に急性圧負荷モデルで横に走行する微小管が増えている意味について、筋原線維の中を走行する微小管の有無について、筋原線維と比べたときの微小管の細胞の骨組みという役割の重要度について、急性圧負荷モデルで微小管のもっと早い時期の反応の有無についての質問がなされた。また、小山教授より、SHR16週令でミトコンドリアの不均一な集積が起こる意義について、また使用した顕微鏡など方法について、急性圧負荷モデルでのミトコンドリアについての質問がなされた。川上教授より心臓で微小管を調べる意義についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後行われた阿部、小山両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。

本研究は慢性圧負荷と急性圧負荷による心肥大の際の微小管動態の違いを明らかにし、その役割を考察したものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。