博士（医　学）　高　　明

学位論文題名

細動・静脈性毛細血管の分布からみたラット心筋毛細血管網の運動訓練にともなう適応変化

学位論文内容の要旨

緒言

運動にともなう心筋の酸素消費量増大を維持するために心臓の負担が増加すると想定され，これが心筋毛細血管網に対して何らかの適応変化を起こすことが期待される。しかし，現在まで細動性，静脈性毛細血管を弁別して検討した報告はない。本研究では弁別染色法の有効性を確認したのち，若いラットに運動訓練を負荷して左心室心筋毛細血管網に発生する形態学的な変化を検討した。免疫組織化学染色法を用い運動訓練した若いラット左室心筋に対して血管増殖因子の発現について検討した。

材料・方法

毛細血管内皮細胞の酵素発現と細動脈性，細静脈性毛細血管の弁別法を確認するため，７週令の雄性ウイスターラットを麻酔下に開腹し，腹部大動脈からポリエチレン管を挿入し，直径１０μｍの着色微粒子を逆行性に注入した後，心臓を切りだし，厚さ１６μｍの凍結切片とした。毛細血管内皮細胞に分布するalkaline phosphotase（ＡＰ）を青く染色させ，Dipeptidylpeptidase Ⅳ（ＤＰＰⅣ）を赤く染色した。生後３週間，雄性ウイスターラットを６頭づつ運動と安静対照群に分けた。運動群は毎週６日，１時間／日，トレッドミル訓練を行なった。４３日後にラットを犠牲死させ，左心室を液体窒素で凍結した。左心室の中間部で厚さ１６μｍの横断切片を切りだし，以下の検討を行った。

横断面切片をＡＰとＤＰＰⅣとの二重組織学染色を行い，光学顕微鏡下に呈色の違いにより細動脈性，中間性，細静脈性毛細血管を弁別して，心筋細胞の輪郭と共に白紙上に描いた。次に毛細血管の密度，心筋細胞面積，毛細血管対心筋細胞の数の比（Ｃ：Ｍ比）と一本の毛細血管が担当する心筋組織面積（Capillary Domain Area, ＣＤＡ）を算出した。さらに長軸断面切片をつくり顕微鏡下に細動脈性毛細血管の起始部から細静脈性毛細血管の集合部まで，分岐合流を含めて描画し，各区間の長さ，分岐から分岐までの長さ（分節間隔），各毛細血管区間内の分節数，屈曲した毛細血管の全長を求めた。

血管内皮増殖因子の検討には血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）とアルカリ性繊維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）の抗体を用いて心筋切片を定法に従って免疫組織染色した。

結果

１．微粒子を注入した心筋の二重染色

微粒子は常に青く染まった毛細血管内にトラップされており，赤く染まった部位には認められなかった。従って，ＡＰを発現して青く染まる毛細血管は細動脈により近い部位であり，ＤＰＰⅣが赤く染まる毛細血管は細静脈側に位置し，両者の中間にＡＰとＤＰＰⅣの両酵素を発現して紫色に見える中間区域があると解釈した。

２．毛細血管網に関する測定

左心室重量の体重比とＣ：Ｍ比は有意に上昇した。心筋細胞断面積と心筋細胞の密度は有意な変化を示さなかった。対照群で細静脈性毛細血管が５０％に達していた。毛細血管各区域の数は細静脈性＞中間性＞細動脈性の順で有意差があった。運動群では細動脈性毛細血管が強く増加し，その数は細動脈性＞中間性＞細静脈性の順となった。全毛細血管密度も上昇した。

ＣＤＡは毛細血管区域によって有意差があったが，両群とも細動脈性＞中間性

＞細静脈性の順で大きかった。両群間を較べると運動群で有意に小さくなっていた。Kroghの組織円筒半径はＣＤＡと同じ変化を示した。

長軸断面切片では運動により毛細血管の全長は短縮した。細静脈性区間の長さが短縮し，細動脈性区間は延長した。分節間隔はそれぞれの区間で短縮した。区間内分節数は細動脈性区間で増加し，細静脈性区間で減少した。

3．増殖因子の分布

ＶＥＧＦに対する免疫組織染色では運動群の微小血管とそれを囲む心筋細胞がかなり赤く染色された。対照群では染色斑が認められなかった。ｂＦＧＦも対照群ではほとんど染色されなかったが，運動群ラット心筋では強くまた広範に染色された。多くの細胞の細胞質や，血管内腔が赤く染まった。

考察

1．細動脈性・細静脈性毛細血管の弁別

二重染色した長軸面切片上にて毛細血管の走行に沿って呈色を調べると青，紫，赤の三つの区間が連続していることが判る。この中で，彩色微粒子は心筋毛細血管のＡＰを発現している青く染まった区域に留まり，赤く染まった血管に見いだされることはなかった。この結果から青く染まる区間は，細動脈側に位置し，赤く染まる区間は細静脈に近い部位を占め，その中間に紫色に呈色する区間があると言うことができる。

2．毛細血管網に関する測定

運動訓練によって横断切片上の全毛細血管密度とＣ：Ｍ比が増大し，一方，心筋断面積は変化しなかったので毛細血管の支配面積ＣＤＡが全区間で有意に縮小した。これらの結果は運動訓練期間中に毛細血管の増加したことを示唆する。同時に細動脈性毛細血管の有意な増加と細静脈性毛細血管の減少が見いだされた。この結果から多くの毛細血管が細動脈化し，毛細血管の細動脈性区間も延長したと考えられる。実際長軸切片上で細動脈性区間が倍以上に延長していた。しかも分節間隔も短縮したので運動期間中に発生した毛細血管も細動脈性化したとみられるのである。

3．増殖因子

対照群では全く染色されないVEGFが，運動群でかなりの毛細血管とその周囲に染色された。ＶＥＧＦは運動訓練によって心筋にも発現し，毛細血管密度を上げ，運動時に発生する低酸素を解消する方向へ毛細血管網を再構築させると思われる。心筋内に広範に染色斑が認められたｂＦＧＦはペプチドの疎水性配列を持たないので，主に細胞の損傷によって細胞外に出て内皮細胞等の増殖を促すと言われる。今回の知見は運動負荷により心筋細胞に微細な損傷の起きる可能性を示唆している。ｂＦＧＦは血管内皮のみならず，血管平滑筋の増殖も促す。血管平滑筋細胞は細動脈につながる毛細血管上へ増殖していくことが知られており，本研究でみられた細動脈性毛細血管の増加機序の一つとみられる。

4．酸素の拡散

毛細血管から酸素の組織への拡散については，組織の毛細血管に近接する部位とKroghの組織円筒辺縁Ｒでの酸素分圧をP_0，P_Rとすると，酸素分圧の較差は近似的に$P_0 - P_R = A \cdot R^2 \cdot K / D$（但しＡは酸素消費量，Ｋは溶解度，Ｄは拡散係数）で与えられる。血管密度の上昇により，Ｒは減少し，分圧の較差は運動訓練によって２０％も減少したことになる。従って，毛細血管網による酸素の供給能は大幅に上昇したはずである。更にP_0は内部を流れる血液の酸素分圧が高ければ高くなり，それだけP_Rは高いことになる。即ち毛細血管が細動脈性化すれば酸素の供給能率は上昇する筈である。かくて運動により毛細血管密度上昇および細動脈性化という二面から酸素供給能が高まると推論される。同時に見出された毛細血管全長の短縮も細静脈性区間の血中酸素分圧を比較的高く維持するはずであるから，組織への酸素供給に有利である。

結語

トレッドミルによって運動訓練させた若いラットでは左室心筋の毛細血管密度が増すと共に細動脈性毛細血管が大幅に増加した。これは心筋への酸素供給能を高める適応変化と考えられる。この様な毛細血管網の変化には血管内皮増殖因子や繊維芽細胞増殖因子が関与していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査　教授　小山富康
副査　教授　阿部和厚
副査　教授　本間研一

学位論文題名

細動・静脈性毛細血管の分布からみたラット心筋毛細血管網の運動訓練にともなう適応変化

哺乳動物の心筋毛細血管網は生後間もなく増殖が止まり，その後の新生は困難であると言われている。従って，心臓への負荷が増加し，酸素消費量の増大するような条件に曝されたとき，心臓へ酸素を供給する毛細血管網の増加という適応変化はかなり困難とみられている。そこで，申請者は毛細血管密度の上昇だけではなく，何らかの対応が行われているであろうと想定した。この想定の当否を調べるため，毛細血管網の動脈性化という観点から検討した。

毛細血管は細動脈と細静脈のあいだを連絡する細い血管であるから全長が一様な性質を示すものではない。従来，細動脈に近い区域にはアルカリ・フオスフアターゼ（ＡＰ）が，細静脈に近い区域にはジペプチジルプチターゼⅣ（ＤＰＰⅣ）が分布するので，両酵素について二重染色することにより，区別することができるという説があった。しかしその明確な実験的証拠は呈示されていなかった。申請者はまず，この二重染色法の信頼性を検討した。すなわちラット冠動脈に直径１０μｍの微小球を注入し，これが毛細血管のＡＰが分布する区域に止まること，ＤＰＰⅣの分布する区域には入らないことを確かめ，ＡＰとＤＰＰⅣの二重染色により，動脈性と静脈性毛細血管を区別できることを明確に示した。この方法により，心臓に負担のかかる運動訓練によって発生する心筋毛細血管網の適応変化を調べた。３週令のウィスタラットをトレッドミル上で週６日，夕刻１時間／日づつ走行訓練を６週間行った。トレッドミルははじめ水平に設置し，１０ｍ／分の速度で訓練を開始し，段階的に速度をあげ，４週間で２５ｍ／分の速度に高めた。また，３週以後は７°の傾斜をつけた。このような運動訓練ののち，心筋切片を作り二重染色した。顕微鏡下に描画管を通して，心内膜下筋層について，青く染まった細動脈性，赤く染まった細静脈性，また両者の混合して紫色に染まった中間性毛細血管を弁別描画し計数した。まず，心外径の最も大きい付近の横断面をみると運動訓練により単位面積内の全毛細血管数は有意に増加し，心筋細胞数との比も著明に上昇した。毛細血管の性質毎にみると，細動脈性毛細血管は増

加，中間性は有意差無く，細静脈性の有意な減少が認められた。次に縦断面の心内膜下筋層をみると，毛細血管の細動脈性区間が延長し，区間内の分岐数も増加した。一方細静脈性区間は短縮することが認められた。このことは横断切片上での細動脈性毛細血管の増加という所見を裏付けるものである。この現象の成立機序を明らかにするために，これらの心筋切片を血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）および塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）にたいする免疫抗体染色すると，運動群においてのみかなりの数の毛細血管内壁と周囲に染色がみられ，両因子の発現していることが明かとなった。ＶＥＧＦは低酸素によって強く発現するので，細静脈性毛細血管側によく発現し，血管を新生させるとみられる。一方，ｂＦＧＦは毛細血管内皮細胞の増殖を刺激するとともに血管平滑筋も増殖させる。細動脈から毛細血管へ向かって，平滑筋細胞や血管周細胞を増殖させ，細動脈性毛細血管を増加させると推察される。この結果今回の6週間の運動訓練により血管新生とともに動脈性化が強く進行したと考えられる。血中酸素分圧の高い細動脈性毛細血管では酸素供給能が高いので，心筋にたいする支配面積は細動脈性毛細血管が最も大きく，細静脈性は小さかった。すなわち動脈性区間ではより遠い心筋細胞へも酸素を供することができるのである。したがって，全毛細血管密度の増大とともに細動脈性化の進行することは，心筋への酸素供給力が大幅に上昇することを意味している。すなわち，酸素需要の上昇をまかなうための毛細血管網の適応に，毛細血管数の増加と細動脈性化の二つの途があることを結論した。

この発表に対し，副査の阿部和厚教授より，運動訓練によって，心筋の肥大は起こらないか，左心室の毛細血管網計測部位，細動脈と，動脈性毛細血管の判別，運動開始や終了に供ない血液量，酸素分圧の変化に応じて動脈性，静脈性毛細血管の長さのかわることはないのか，本間研一教授より弁別の手掛かりとしたＡＰ，ＤＰＰⅣの両酵素の存在部位，運動に伴い静脈側から新生する毛細血管の延びが悪いために静脈性区間の短縮，分岐数の減少が起こるのではないか，また参加者の第一生理学教室本間さと助教授から，毛細血管の中でどの部位が最もガス交換に有効と考えられるかとの質問が出された。

これらの質問に対して，申請者は日本語に若干の問題はあったが，豊富な知識に基づいて，概ね良好に回答した。

この二重染色法により種々な内的，外的条件にたいする適応変化を組織の毛細血管網の二重の応答方式の観点から解明することができると期待される。審査員一同はこれらの研究成果を高く評価し，申請者が博士（医学）の学位を受けるに充分な資格を有するものと判定した。