

## 学位論文題名

Study on the Functional and Morphological Alterations  
of Vascular Endothelium After Irradiation

(放射線照射による血管内皮細胞の変化に関する基礎的研究)

## 学位論文内容の要旨

## 研究目的

悪性腫瘍の治療では、放射線治療を行うことが多く、放射線照射による血管損傷および創傷治癒遷延の可能性が高い。近年、血管内皮依存性弛緩反応の発見以来、種々の内皮由来弛緩因子と収縮因子が報告されている。これまで、動脈硬化、高血圧、低酸素血症、糖尿病などの血管病変を惹起し、創傷治癒に変化を与える病態における血管の収縮・弛緩反応の変化については報告されているが、放射線照射後の血管収縮・弛緩反応の変化に関する詳細な報告はみられていない。本研究は放射線照射後の血管収縮反応、内皮依存性と非依存性弛緩反応ならびに内皮細胞の形態学的変化について検討を加えた。

## 実験方法

Part 1: 麻酔下にウサギ耳介に<sup>60</sup>Co 10Gy, 20Gy, 45Gy をそれぞれ一回照射した。10Gy と 20Gy は照射後 1 週目、45 Gy は照射直後、1 週、4 週、6 週及び 10 週目の群に分けた。

血管張力測定：耳介中央動脈を幅4mmの輪状標本とし、トランスデュサーにて発生張力を等尺性に記録した。norepinephrine (NE)により惹起された収縮反応および内皮依存性であるacetylcholine (ACh), calcium ionophore A23187 (A23187), 内皮非依存性であるsodium nitroprusside (SNP)を投与し、惹起した血管弛緩反応を各群で比較した。また、45Gy照射後1週目にL-arginine, indomethacin, superoxide dismutase (SOD)およびcatalaseを投与し、血管弛緩反応への影響を調べた。

Western blot 分析：蛋白を抽出し、抗eNOSモノクローナル抗体を用い、eNOS蛋白を測定した。

Part 2: ウサギの耳介に<sup>60</sup>Co 45Gyを一回照射し、照射直後、1週、4週、6週、10週目の群および非照射群に分け、耳介中央動脈の肉眼、光顕 (HE 染色) および走査電顕での観察を行った。

Part 3: 悪性腫瘍における頸部頸清術中に採取した10の頸部動脈を用い、非照射群と術前照射群に分けて、以下の解析・検討を行った。

血管張力測定：NEによる収縮反応、ACh, A23187, SNPによる血管弛緩反応を各群で比較検討した。また、N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), indomethacin, および30mM K<sup>+</sup>を投与し、血管弛緩反応への影響について検討した。

組織学的検査：動脈標本を光顕 (HE, Weigert 弾性繊維染色) および走査電顕による観察を行った。

免疫染色：抗eNOSモノクローナル抗体を用い、DAB発色し、免疫染色を行った。

尚、有意差検定には一次元分散分析およびt-testを用いた。

## 結 果

Part 1: 収縮反応：照射後、NEによる血管の収縮反応は各群間で有意差を認めなかった。

内皮依存性弛緩反応：非照射群においてAChによる血管弛緩反応は、L-NNA投与によりほぼ完全に抑制された。AChによる血管弛緩反応は照射線量の増加に伴い有意に漸減し、45Gy照射群では、照射後1週目から経時的に低下した。A23187によるM型受容体非依存性弛緩反応は45Gy照射後1週目から経時的に有意な低下を示した。

45Gy照射後1週目に、L-arginine, indomethacin, SODおよびcatalase投与前後における、AChによる血管弛緩率には有意な変化は認められなかった。

内皮非依存性弛緩反応：SNPによる内皮非依存性弛緩反応では、45Gy照射照射後6週目まで有意差を認めなかったが、10週目では有意に減弱した。

Western blot分析：eNOS蛋白質は非照射群と比べ、45Gy照射後1週目および4週目に有意に低下した。

Part 2: 照射後顕微鏡所見では、内膜増生を認めず、中膜では平滑筋細胞の配列が不整となり、外膜に強い繊維化、炎症細胞浸潤などが認められた。走査電顕所見では、照射後4週目まで内皮細胞の変化は認められず、6週目以降で、内皮細胞が収縮し、基底膜から脱落した。基底膜が一部断裂し、結合組織が露出していた。露出部にフィブリン、赤血球、血小板などが付着していた。

Part 3: 血管張力測定：NEによる血管収縮反応では有意差を認めなかった。AChおよびA23187による内皮依存性弛緩反応は照射群では有意に低下していた。SNPによる受容体非依存性弛緩反応には有意な変化が認められなかった。

AChによる弛緩反応は、非照射群では、L-NNAおよびindomethacin投与により有意に減弱し、L-NNA, indomethacinおよび30mM K<sup>+</sup>の同時投与により完全に抑制された。一方、照射群においては30mM K<sup>+</sup>単独投与により弛緩反応はほぼ完全に抑制された。

組織学的検査：照射群では内膜肥厚、中膜の弾性繊維の増加が非照射群に比べ強く認められた。走査電顕では両群ともほぼ同様の所見であり、内皮細胞が剥離していない部位では正常の組織像を示した。

免疫染色：非照射群では内皮細胞が染色され、照射群では内皮細胞が染色されなかった。

## 考 察

血管内皮依存性弛緩反応には、内皮由来NO、PGI<sub>2</sub>および内皮由来過極化因子(EDHF)の産生・放出が関与するが、動物の種類と血管の部位により、これらの内皮由来物質の作用する割合が異なる。本実験の結果より、ウサギの耳介中央動脈において、AChによる内皮依存性弛緩反応にはNOが大きく関与し、ヒトの頸部動脈においてはNO、PGI<sub>2</sub>およびEDHF全てが関与していることが示唆された。

ウサギにおける放射線照射後の血管収縮反応は変化せず、内皮依存性弛緩反応は選択的に減弱し、また、この変化には線量依存性と照射後の経過時間依存性の両者の関与が明らかになった。SNPによる内皮非依存性弛緩反応は照射後に有意な変化が認められなかったことより、平滑筋細胞は照射後も弛緩機能を十分に維持していることが示された。

形態学的変化では、照射後4週目まで内皮細胞表面に大きな変化が認められず、照射後早期における内皮細胞の機能障害は形態学的変化を伴わないと考えられた。

NOはNOS酵素によりL-arginineから産生され、グアニジルと結合し、その活性を失う。ウサギの実験における、NOの前駆物質であるL-arginine、グアニジルの清掃物質であるSODとcatalaseの添加後、AChによる弛緩反応は有意な変化を示さなかった。この結果より、放射線照射後にNOの作用が抑制される原因は、主にeNOS酵素の活性低下であることが推測される。この推定はWestern blot分析に照射後eNOS活性が減弱することより確認された。

ヒトの頸部動脈を用い、照射群にEDHFの抑制剤である30mM K<sup>+</sup>を投与すると、AChによる弛緩反応はほぼ全体的に抑制され、また、免疫染色においてもeNOS活性が減弱することより、ヒトの頸部動脈では、放射線治療後EDHF産生機構が温存され、NOとPGI<sub>2</sub>産生が障害されると考えられる。

## 結 論

放射線照射後、血管収縮反応が変化せず、eNOS酵素の活性が低下し、内皮依存性弛緩反応は選択的に低下した。照射後早期における内皮細胞の機能障害は形態学的変化を伴わなかった。今後、放射線照射後におけるeNOS酵素の変化について、mRNAレベルでの検討を行うことが重要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男  
副 査 教 授 菅 野 盛 夫  
副 査 教 授 阿 部 和 厚  
副 査 教 授 杉 原 平 樹

学 位 論 文 題 名

## Study on the Functional and Morphological Alterations of Vascular Endothelium After Irradiation

(放射線照射による血管内皮細胞の変化に関する基礎的研究)

悪性腫瘍の治療では、放射線治療を行うことが多く、放射線照射による血管損傷および創傷治癒遷延の可能性が高い。近年、種々の内皮由来弛緩因子と収縮因子が報告され、動脈硬化、高血圧、低酸素血症、糖尿病などの血管病変を惹起し、創傷治癒に変化を与える病態における血管の収縮・弛緩反応の変化について報告されている。本研究は放射線照射後の血管収縮反応、内皮依存性と非依存性弛緩反応ならびに内皮細胞の形態学的変化について検討し、3つの部分に分けて報告した。

Part 1: ヲギ耳介に<sup>60</sup>Co 10Gy, 20Gy, 45Gy をそれぞれ一回照射した。10Gy と 20Gy は照射後1週目、45 Gy は照射直後、1週、4週、6週及び10週目の群に分けた。耳介中央動脈を輪状標本とし、発生張力を等尺性に記録した。norepinephrine (NE)により惹起された収縮反応および内皮依存性である acetylcholine (ACh), calcium ionophore A23187 (A23187), 内皮非依存性である sodium nitroprusside (SNP) を投与し、惹起した血管弛緩反応を各群で比較した。45Gy 照射後1週目に L-arginine, indomethacin, superoxide dismutase (SOD) および catalase を投与し、血管弛緩反応への影響を調べた。また、抗 eNOS $\alpha$ / $\beta$ 抗体を用い、eNOS 蛋白を測定した。

照射後、NE による血管の収縮反応は各群間で有意差を認めなかった。非照射群において ACh による血管弛緩反応は、L-NNA 投与によりほぼ完全に抑制された。ACh による血管弛緩反応は照射線量の増加に伴い有意に漸減し、45Gy 照射群では、照射後1週目から経時的に低下した。A23187 による M 型受容体非依存性弛緩反応は 45Gy 照射後1週目から経時的に有意な低下を示した。

45Gy 照射後1週目に、L-arginine, indomethacin, SOD および catalase 投与前後における、ACh による血管弛緩率には有意な変化は認められなかった。

SNP による内皮非依存性弛緩反応では、45Gy 照射照射後6週目まで有意差を認めなかったが、10週目では有意に減弱した。

eNOS 蛋白質は非照射群と比べ、45Gy 照射後1週目および4週目に有意に低下した。

Part 2: ヲギの耳介に<sup>60</sup>Co 45Gy を一回照射し、照射直後、1週、4週、6週、10週目の

群および非照射群に分け、耳介中央動脈の肉眼、光顕および走査電顕での観察を行った。

照射後光顕所見では、内膜増生を認めず、中膜では平滑筋細胞の配列が不整となり、外膜の強い繊維化と炎症細胞浸潤などが認められた。走査電顕所見では、照射後4週目まで内皮細胞の変化は認められず、6週目以降で、内皮細胞が収縮し、基底膜から脱落した。基底膜が一部断裂し、結合組織が露出していた。露出部にフィブリン、赤血球、血小板などが付着していた。

Part 3: 悪性腫瘍における頸部障害術中に採取した1本の頸部動脈を用い、非照射群と術前照射群に分けて、NEによる収縮反応、ACh、A23187、SNPによる血管弛緩反応を各群で比較検討した。また、N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA)、indomethacin、および30mM K<sup>+</sup>を投与し、血管弛緩反応への影響について検討した。また、動脈標本を光顕および走査電顕により観察を行った。抗eNOS抗体を用い、免疫染色を行った。

NEによる血管収縮反応では有意差を認めなかった。AChおよびA23187による内皮依存性弛緩反応は照射群では有意に低下していた。SNPによる受容体非依存性弛緩反応には有意な変化が認められなかった。

AChによる弛緩反応は、非照射群では、L-NNAおよびindomethacin投与により有意に減弱し、L-NNA、indomethacinおよび30mM K<sup>+</sup>の同時投与により完全に抑制された。一方、照射群においては30mM K<sup>+</sup>単独投与により弛緩反応はほぼ完全に抑制された。

照射群では内膜肥厚、中膜の弾性繊維の増加が非照射群に比べ強く認められた。走査電顕では両群ともほぼ同様の所見であり、内皮細胞が剥離していない部位では正常の組織像を示した。非照射群では内皮細胞のeNOSが染色され、照射群では内皮細胞にeNOSは染色されなかった。

公開発表に際し、副査の菅野教授より、1) 加齢による弛緩反応の変化に関する詳細、2) 頸部動脈以外の血管での内皮由来弛緩因子に関する知見、3) 放射線照射後eNOS酵素が低下する機序に関する知見について質問があった。次いで、副査の阿部(和)教授より、1) 血管の組織的変化と機能的変化並びに経時的変化の差異に関する詳細、2) 炎症細胞が機能に与える影響について質問があった。副査の杉原教授より、1) 放射線照射後EDHFのみ残存した詳細と検出方法に関する知見、2) 放射線が静脈に及ぼす影響について質問があった。主査の宮坂より、1) 放射線照射後血管内腔の血栓形成に関する知見、2) 照射後内皮細胞の損傷と創傷治癒の関係について質問があった。申請者は最新の情報をまじえ概ね適切な解答をなし得た。以上の研究は、血管の放射線損傷メカニズムの解明に関する貴重な研究であり、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や修得単位などと併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。