

学 位 論 文 題 名

Effects of transient coronary occlusion on the capillary network in the left ventricle of the rat

(ラット左冠動脈の一過性虚血・再灌流の左室壁内層毛細血管網に対する効果)

学位論文内容の要旨

緒言

冠動脈の一過性虚血は側副血行路を速やかに開通させその後の虚血障害を軽減させプレコンディショニングとして広く研究されている。しかし、冠循環の毛細血管内皮細胞は増殖性が強いことから、一過性虚血の作用は側副血行路の開通だけではなく、毛細血管網にも何らかの作用を及ぼすと想定される。実際先に行った血管収縮により虚血を起こすバソプレッショ静注実験では数分間の心電図異常の後、30日経過した時点で心筋毛細血管の強い増加が認められた。そこで本研究では、ラットの冠動脈を絹糸にて一過性に結紮した後、再灌流し30日間飼育し、左室心筋壁特に内層の毛細血管網の構築を形態学的に検討した。

材料と方法

8週齢18頭の雄性ウイスターラットを偽手術群、1回虚血群、3回虚血群に分け、エーテル麻酔下に気管挿管し、1.2ml/min/100g, 65strokes/min の人工呼吸を行った。第4肋骨で開胸、囲心腔切開して心臓を露出し、左心耳を引き上げて周囲の小量の心筋とともに左冠動脈に糸付きエルブ針を掛けた。偽手術群での手技はここまでとし糸を切断、留置したまま閉胸した。虚血群ではこの糸を一重結びして冠動脈を結紮した。この糸には一重結びの前に予め二本の引き糸を掛けて置いた。一重結びを緊迫し冠動脈を結紮すると、直ちに左室前壁が虚血状態となり、暗色に変じた前壁の拍動は顕著に減弱した。3分後引き糸を左右に引いて一重結びを開放し再灌流した。ついで閉胸し30日間飼育して1回虚血群 (I-R1群) とした。3回虚血群では3分間の結紮と3分間の再灌流を3回反復した後 (I-R3群)、閉胸して30日間飼育した。手術30日後、急速断頭して犠牲死させ心臓を採取し、O.C.T. compound に浸け、液体窒素で凍結した。各心臓について最大外径の高さで厚さ16 μ mの横断薄片を80 μ mおきに4枚づつクライオトームにより切り出した。細動脈性毛細血管をアルカリフォスファターゼ (AP) の活性に対して、細静脈性毛細血管をディペプチドイルペプチダーゼ I V (DPPIV) 活性に対して二重染色した。左室壁内膜下層の毛細血管網を顕微鏡下に全毛細血管密度、細動脈性、中間性、細静脈性毛細血管密度、各々の毛細血管が全毛細血管に占める比率、全毛細血管数と心筋細胞数の比率 (C:M ratio)、心筋細胞面積、一本の毛細血管が心筋に酸素と栄養を供給している支配面積 (CDA) を計測した。心筋細胞面積と CDA は、毛細血管、心筋細胞の輪郭を描画管を介して紙面に描き NIH image program によって求めた。視野面積は0.0615 μ m²であり、一視野に100から150本の毛細血管が分布していたので、一心臓について400本以上の毛細血管を観察したことになる。

文中の測定値はすべて平均値 $\pm$ S.D.を記した。ANOVA, Kruskal-Wallis Mann-Whitney U-test によって検定し、 $P<0.05$ の時有意差があると判定した。

別に5頭のラットにて3分間の1回結紮を行い、再灌流120分後に凍結切片を作り、毛細血管新生に関わるといわれている増殖因子、basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) についてほぼ定法により免疫組織染色して、これらの増殖因子蛋白の発現を検討した。

ラットのbFGFと交差反応するといわれている anti-bovine basic FGF (Upstate Biotechnology, USA)を4℃にて24時間反応させビオチン化 anti-mouse IgG aminoethylcalbasol (AEC substrate kit, Nitirei, Tokyo) によって可視化した。VEGFについては anti-VEGF, A-20 (Santa Cruz Biotech, CA, USA) を同様に反応させて可視化した。この免疫染色は術後30日の試料のついても施行し、また予備実験として術後60分の試料についても施行した。

結果

30日後、体重、心重量、左室重量について偽手術群と二つの一過性虚血群との間に差はなかった。心筋細胞断面積ならびに心筋細胞密度にも差は見られなかった。しかし、C:M ratioについては一過性虚血群で有意に上昇していた。すなわち、偽手術群の 1.07 ± 0.75 に対し、I-R1群では 1.62 ± 0.15 と大きな値に達していた。I-R3群では 1.31 ± 0.12 と増加していたが、I-R1群よりは小さかった。

CDAの値は毛細血管の部位毎に異なっており、3実験群すべてにおいて、細動脈>中間性>細静脈の順であった。毛細血管のなかで酸素分圧の高い血液の流れている部位では支配面積が大きく、酸素分圧の低い部位では小さいことが共通して認められた。さらに、CDAの値を群間で比較すると、二つの一過性虚血群とも対応する毛細血管部位毎に縮小が著しかった。とくに、I-R1群のCDA値は、I-R3群のCDA値よりもさらに小さく、両者の間にも有意差が認められた。Kroghの組織円筒の半径は、毛細血管の各々の部位において、I-R1群で著明に縮小していた。I-R3群では中程度に縮小した。

全毛細血管密度は偽手術群の $1888 \pm 140/\text{mm}^2$ に対し、I-R1群では $2885 \pm 231/\text{mm}^2$ と強く増加していた。I-R3群では $2385 \pm 170/\text{mm}^2$ と中程度に増加していた。また一過性冠動脈虚血の両群で細静脈性毛細血管が有意に増加しており、全毛細血管密度増加主因は細静脈性毛細血管であることが判った。すなわち細静脈毛細血管密度は偽手術群の $1643 \pm 209/\text{mm}^2$ に対して、I-R1群の $2589 \pm 187/\text{mm}^2$ へ有意に増加していた。I-R3群でも $2136 \pm 234/\text{mm}^2$ とかなり増加していた。

3分間の一過性虚血を施し120分再灌流した群では主として心筋細胞の細胞質内にbFGF蛋白が認められた。またVEGF蛋白が多く毛細血管の周囲に認められた。30日後の組織においても若干の毛細血管の周囲にbFGF、VEGF蛋白の鮮明な染色が得られた。なお偽手術群の心組織においては細胞間隙に局限してごく弱いbFGFの染色が得られるのみでVEGFの染色像は得られなかった。

考察

狭心症の発作においては2から10分間の一過性虚血の発生することが多い。このような一過性虚血のモデルとして、申請者らは先にバソプレッシンの静注に伴う心筋毛細血管網の変化を検討した。本剤の静注により3から10分間つづく心電図上の虚血性変化が認められ、その30日後には毛細血管密度が上昇することを確認した。そこで今回は冠動脈を直接3分間だけ一過性に結紮した後解除再灌流して、30日後の毛細血管網の変化を検討したのである。その結果として両虚血再灌流群において得られた、左室重量と心筋細胞断面積は変わることなくC:M比が増大するという成績は、3分という短時間の虚血によって長期にわたり毛細血管の新生が促進されたことを示している。しかもこの全毛細血管密度の上昇は主として細静脈毛細血管の増加によって支えられていた。これは毛細血管の新生が細静脈側からの出芽によって進行するという腫瘍組織でいわれている知見と符合するものであった。このような変化につれて、毛細血管の支配面積CDA毛細血管の全流域に互って縮小し、Kroghの組織円柱の半径も縮小した。すなわち酸素分圧の低い細静脈性毛細血管では酸素分圧の高い細動脈性毛細血管よりも小さいという条件は維持されていた。これらの結果は短時間の一過性虚血の後、毛細血管網の酸素供給能が全域にわたって改善されたことを示している。

毛細血管網改善の機序として、本研究では血管新生を促進する増殖因子といわれるbFGFやVEGF蛋白が一過性虚血後2時間にて著明に発現し、30日後にも一部の毛細血管周囲に分布することを免疫組織学的に観察することができた。虚血あるいは低酸素暴露により筋組織にbFGFやVEGFのmRNAが速やかに発現し、増殖因子蛋白の免疫染色も報告されており、今回の結果も概ねその範疇にはいる。しかし3分間の虚血、2時間後の蛋白の発現、さらに30日後にも蛋白の分布が認められたことは新しい結果である。このような

毛細血管網の改善は I-R1 群の方が I-R3 群よりも顕著であった。この現象は反復虚血が、切りだし灌流ラット心筋の VEGFmRNA 発現を減弱させるという報告と一致する。おそらく過剰の虚血負荷が心筋細胞や血管内皮細胞に障害を与え血管新生能を低下させるものと考ええる。

結論

ラット冠動脈の 3 分間一過性虚血とその後の再灌流により、左室筋組織の増殖因子が発現し、毛細血管網は緻密になり、心筋組織への酸素供給能は改善される。しかし過剰な虚血は毛細血管網改善の反応を減弱させる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 北 畠 顯

副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

Effects of transient coronary occlusion on the capillary network in the left ventricle of the rat

(ラット左冠動脈の一過性虚血・再灌流の左室壁内層毛細血管網に対する効果)

心臓の毛細血管内皮細胞は、強い増殖性を示す。一方、冠動脈の一過性虚血は、その後の虚血障害を軽減させるために、側副血行路を速やかに開通させる。しかし、この際、毛細血管の増殖があるかどうかは不明である。そこで、本研究は、冠動脈一過性虚血により心臓壁の毛細血管が増殖するかどうか、および毛細血管の増殖部位、および増殖因子を組織学的に調べた。

実験動物にはラットを用い、左冠動脈の根元を結紮し、3分後にこの結紮を解くことで血流を再開通させて、左室壁の一過性虚血を作成した。偽手術は、冠動脈に糸をかけたのみとした。一定時間後に、体重を測定、心臓を取り出し、心臓重量、左心室重量を測定、液体窒素で凍結・切片として、左室心筋層において、内皮細胞を増殖させる basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) と Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、心筋線維の断面積、毛細血管密度、1心筋細胞あたりの毛細血管の数を組織化学的、免疫組織化学的に検索した。毛細血管は、組織化学2重染色により、alkaline phosphatase をもつ動脈側と dipeptidyl peptidase IV をもつ静脈側とを動脈性毛細血管と静脈性毛細血管として区別した。両者の酵素をもつ反応を示したものは中間性毛細血管とした。また、各毛細血管を中心とする毛細血管支配領域の面積、および毛細血管支配領域の面積を断面円とする組織円筒半径を求めた。

手術1ヵ月後の体重、心臓重量、左室重量は変化を示さなかった。増殖因子は、2時間後に発現がみられ、1ヵ月後でも毛細血管内皮細胞に発現が持続していた。また、毛細血管は、偽手術群でみると、動脈性が7%、中間性が7%、静脈性が86%を占めていた。手術1ヵ月後では、心筋線維の断面積は変化していなかったが、毛細血管の密度と1心筋あたりの数は有意に増加していた。部位別では、とくに静脈性毛細血管が増加していた。毛細血管支配領域の面積と組織円筒半径は、動脈性、中間性、静脈性ともに有意に減少

していた。つぎに、左冠動脈の3分間結紮・3分間血流再開通を3回くりかえす3回虚血実験を行なうと、1ヵ月後には1回虚血群と同様の変化を示したが、変化の程度は偽手術群と1回虚血群との中間であった。以上から、心臓壁の3分間という短い虚血・低酸素は、内皮細胞に増殖因子を発現させ、これにより心筋層の毛細血管とくに静脈側の毛細血管を増殖・新生させ、虚血による血流を代償性に改善させる変化を惹起することを知った。また、また、この変化は頻回虚血では抑制されることを知った。

口頭発表にあたり、北畠教授から毛細血管増殖に対するトリガーとしての虚血、bFGFとVEGF以外の増殖因子、毛細血管増殖時の血流について、本間教授から組織化学的に区別された毛細血管の機能、3回虚血による細胞破壊の有無、高地におけるような慢性酸素欠乏の効果について、主査からは毛細血管の組織化学による色付け、染色範囲についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、心臓心筋層の3分間の虚血により、毛細血管、とくに静脈側毛細血管が増殖することを初めて明らかにしたものである。また、このような効果は、心臓の細胞に傷害を与えるような頻回の虚血、あるいは長時間の虚血では抑制されることを明らかにした。

審査員一同は、この論文が、狭心症におけるような一過性虚血によって心臓壁に起こる微小循環の変化、心臓保護作用を考えるための重要な現象を提供するものであることを高く評価し、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。