



Ultrastructural studies of the mouse aorta and its endothelial pinocytosis in diet-induced arteriosclerosis

藤野, 基博

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1982-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0374

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000374>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	藤野基博	(大阪府)
学位の種類	医学博士	
学位記番号	医博い第357号	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の日付	昭和57年12月8日	
学位論文題目	Ultrastructural studies of the mouse aorta and its endothelial pinocytosis in diet-induced arteriosclerosis 食餌性動脈硬化症におけるマウス大動脈及び内皮細胞 吸引能の超微形態学的研究	

審査委員　主査 教授 福崎恒
教授 浦野順文 教授 木村修治

論文内容の要旨

序論

動脈硬化症は、内膜肥厚とそれへの脂肪沈着によって特徴づけられる。しかしながら動脈硬化症の初期変化は依然不明な点が多い。最近、平滑筋細胞（以下 SMC と略す）の増殖を促す因子、そして内膜への脂肪輸送の機構に対する関心が強く、*in vivo* で標識蛋白を用いての大きな動脈壁の透過性に關し種々の報告がなされている。しかし、血中物質の移送に關連する内皮細胞の吸飮能（pinocytotic activity）については余り知られていない。本研究では、内皮細胞吸飮能及び内膜の実験条件下での超微形態学的変化をマウス大動脈を用いて検索した。

対象及び方法

- 動物は 6 週令の BALB/C マウスを用いた。
- ① 実験群：30匹のマウスを 1.5% コレステロール添加食にて 4 ～ 8 ヶ月間飼育し実験に供した。内 4 匹を下記のごとく腎摘した。
 - ② 対照群：50匹以上のマウスを普通食で 4 ～ 8 ヶ月間飼育し、内 24 匹を対照群とし、3 匹を下記のごとく腎摘した。
 - ③ 腎摘群：実験群のうち 4 匹、対照群のうち 3 匹を片側腎摘し 4 ヶ月間 DOCA (20mg/kg) を週 2 回注射し、1% NaCl を飲料水とした。血圧は毎週 tail plethysmographic method にて測定した。血漿コレステロール値の測定は Zorkowski の方法によった。
 - ④ 組織学的検索：動物を灌流固定後、大動脈を 2 分し一方をグルタールアルデヒド・オスニウム酸にて 2 重固定し型通り脱水・包埋後切片を作製した。メチレンブルーにて染色し光学顕微鏡で

又超薄切片はウラン・鉛染色後日立 HS-9 透過型電子顕微鏡にて検鏡した。他方は脱水・臨界点乾燥後金蒸着し日立 S-700走査型電子顕微鏡にて観察した。その際定量的評価のため1,000ないし2,000倍の写真を撮影し最低275（平均358±125.1 SD）の内皮細胞を検索し個々の細胞をその表面に存する microvilli の特徴的配列により 2 分し、その比率を求めた。

- ② *in vitro* での内皮細胞吸飮能の検索：動物を屠殺後胸部大動脈を直ちに細切し、1 mg/ml の horseradish peroxidase (以下 HRP と略す) 加培養液中にて 4 °C あるいは 37 °C にて 10, 60, 120 分間培養した。又 37 °C にて HRP なしの培養液での培養を 10, 60, 120 分間行った。培養終了後直ちに HBSS にて数回洗い、グルタルアルデヒドで固定、再び水洗後 Graham-Karnovsky medium にてベンチジン反応を行った。反応産物は透過型電子顕微鏡にて観察した。その際 10,000倍の写真を撮影し HRP 陽性 vesicle を最低 200 (平均 287±82.5 SD) 個数え、それら反応産物の形態的特徴により分類し定量的検索に供した。統計学的解析は Four-fold table を用いて student t 検定にて行った。

成 績

血漿コレステロール値は、4, 8 ヶ月で実験群は各々 130±21, 94±19 mg/100 ml で対照群のそれら (104±15, 76±19 mg/100 ml) に比し有意 ($P < 0.005, 0.05$) に高値を示した。肉眼的及び光顕での観察では特に両群に差異を認めず又部位による差も認め難かった。

- ① 透過型電顕による観察：対照群では大動脈の内膜は表面を一層の扁平な内皮細胞でおおわれ内皮下腔は狭く、弾性板により境された数層の SMC よりなる中膜へ続く。外膜は少数の神経終末、血管およびリンパ管を有する。8 ヶ月では内皮下腔の拡大と中膜での膠原線維・弾性組織および基質の増加が目立ったが他の点に関しては 4 ヶ月との間に大きな差は認められなかった。一方実験群では、4 ヶ月では内膜全体の構造は保たれているが、内皮細胞は胞体内に多数の cytoplasmic microfilament 及び無数の microvesicle を含み、時には最内層の弾性板の断裂融解を認め細胞外基質の増加も著明であった。又中膜では SMC の基底膜の重層化が目立った。8 ヶ月になると上記変化に加えるに細胞外成分 (主に膠原線維と弾性組織) の増加を伴って modified SMC が増殖し内膜は肥厚を示した。弾性板は断裂・融解が著明でこれらと関連して granulo-vesicular body を認めた。

- ② 走査型電顕による観察：対照群・実験群共に大動脈内腔面は一層の比較的扁平な血流方向に長い多角形の内皮細胞におおわれ、個々の細胞は細胞間橋で区分され中央部には核に対応した盛り上りを見せ、細胞表面をおおう microvilli が特徴的であった。個々の細胞によりこの microvilli の配列は異り、対照群では多くは細胞の表面の 2/3 をおおうが、ときには核の部分に多く、かえって辺縁部では少い傾向を見せた。また逆に中央部では少く細胞辺縁部に集簇する傾向も認めた。これら対照群に比し実験群では、microvilli の配列は特徴的でこれらは血流方向に細長い細胞の遠位端に集簇する傾向を見せ、残りの細胞表面は microvilli を欠くことが多かった。さらに直径 0.2~0.4 μ の浅い陥凹が細胞間橋の近傍に偏位・集簇した microvilli に特に関連して認められた。定量的検索においても上記成績が確認された。特徴的な microvilli の配列を示す内皮細胞は

対照群（4ヶ月：44.2%，8ヶ月：37.6%）に比し実験群（4ヶ月：72.7%，8ヶ月：85.4%）では有意（ $P < 0.001$ ）に高頻度に認められた。さらにその頻度は実験群においても4ヶ月に比し8ヶ月では有意（ $P < 0.001$ ）に高まった。

③ 内皮細胞吸飲能の検索：HRP 反応産物は pinocytotic vesicle あるいは vacuole 内のみに認め、細胞間橋・内皮下層には認めなかった。4°Cでの培養例では HRP 陰性で、又内因性 peroxidase は認めなかった。4ヶ月では対照実験両群間で HRP 反応産物の形態的差異は大きくなかつたが、8ヶ月では HRP の内皮細胞による取り込みは実験群の120分間培養例で、対照群に比し有意（ $P < 0.005$ ）の増加が観察された。一方腎摘群の血圧は $123 \pm 11 \text{ mmHg}$ で、対照として用いた45匹のマウスのそれ（ $102 \pm 7 \text{ mmHg}$ ）より有意（ $P < 0.001$ ）の高値を示した。これらの動物では内皮細胞吸飲能は対照群に比し実験群では10, 60, 120分間培養の各々で 30.5%，61.6%，68.4% と対照群のそれ（14.0%，39.0%，32.4%）に比し有意（ $P < 0.001$ ）に高値を示した。

考 案

マウスは近交系の入手が容易なことと寿命が比較的短い利点にもかかわらず動脈硬化症の研究に用いられることが多い。今回コレステロール添加食にて4～8ヶ月間飼育することにより比較的軽度な高コレステロール血症及び高血圧症を惹起し、動脈硬化症を電顕的に確認した。病変は主に modified SMC の増殖を主体とし細胞外の種々の成分、特に新生膠原線維・弾性組織及び基質の増加が特徴的であった。諸家の報告によれば肥厚した内膜に認められる modified SMC の由来を中膜に求めるものが多い。これに関して断裂・融解した弾性板と密に関連して認められた granulovescicular body の存在は興味深い。Trillo と Haust らはこれに elastase の存在を想定し SMC より分泌されるとしている。弾性板間隙を通じての中膜 SMC の移動と共に elastase の関与による弾性板の融解に伴う膠原線維の新生を通じて内膜の再構築が進行し、結果として内膜肥厚が完成される可能性が示唆された。又内皮細胞の microfilament の増加は動脈硬化症の初期変化の一つとして知られているが、最近これと内皮細胞の透過性の亢進との関連が注目されている。内皮細胞表面の microvilli の配列様式は実験群では対照群に比し際立った変化を示した。即ち、実験群では主に細胞間橋近傍の辺縁に偏位集簇即ち再配列した microvilli を有する細胞の頻度は対照群に比し有意に高かった。さらに実験群の4ヶ月と8ヶ月との間にも有意の差を認めた。現在 microvilli の性質及び機能に関してはほとんど明らかにされていないが、この結果は興味深い。さらに microvilli と密接に関連して浅い陥凹が認められたが、Schwartz 等はこれらと類似の構造物について報告し、caveole と考えている。今回の結果とではその配列に差はあるが、これらを勘案すると microvilli の再配列が動脈硬化症進展の過程に関連している可能性が示唆される。標識蛋白を用いた大小動脈の透過性の研究は多いが、in vitro での検索は少ない。実験群で8ヶ月において対照群に比し HRP の取り込みが有意に高かったことは、この間のコレステロール添加食飼育によるものと考えられ注目すべきことと思われる。一方腎摘群では実験群と対照群の間の差は一層明瞭で実験群ではほぼ2倍の HRP の取り込み増加を示した。これらより4ヶ月にわたる血圧上昇と軽度の高コレステ

ロール血症が *in vitro* での内皮細胞吸飮能に影響を与えることが示唆された。しかし *in vitro* での吸飮能の亢進と動脈硬化症との関係についてはさらに検討の余地があると思われる。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化症は内膜の肥厚とそこへの脂肪沈着によって特徴づけられる。しかしながら動脈硬化症の初期変化に関しては不明の点が多い。動脈硬化症のおこりにくいマウスを用いて、実験的大動脈硬化症の研究を行った。動脈硬化症が緩徐に進行し、その程度も軽く、初期変化の追跡には好適であった。そこで超微形態および内皮細胞の吸飮・貪飮能を指標としてその病変を解析した。

対象および方法

6 週令の BALB/C マウスを用いて実験を行った。

第1実験群：

1.5%コレステロール添加食にて飼育し、4ヶ月、8ヶ月で屠殺し、電顕的検索および *in vitro* での内皮細胞の吸飮・貪飮能の検索を行った。屠殺時に血漿コレステロール値を測定した。

第1対照群：

普通食を与え、第1実験群と同様の観察を行った。

第2実験群：

第1実験群のうち片側摘腎を行い、4ヶ月間 DOCA (20mg/kg) を週2回注射し、飲料水は 1% NaCl を与え、経時的に血圧を測定し、第1実験群と同様の観察を行った。

第2対照群：

第1対照群のマウスにつき、第2実験群と同様の処置を行った。

電顕的検索は動物を 1%グルタールにて灌流固定後、大動脈を 2 分し、一方を透過型、他方を走査型電顕的検索に供した。透過型電顕的検索はオスミウム酸で再固定後、通常の方法で標本を作成し、ウラン・鉛の 2 重染色後日立 HS-9 型電子顕微鏡で観察した。走査型電顕的観察は脱水・臨界的乾燥後金蒸着し、日立 S-700型電子顕微鏡にて観察した。内皮細胞表面の病変の定量的観察のためには最底 275 ヶの内皮細胞を検索し、統計学的解析を行った。

内皮細胞の吸飮・貪飮能の検索は動物を屠殺後、胸部大動脈を細切し、1 mg/ml の濃度で Horseradish peroxidase (HRP) を加えた培養液で 4°C あるいは 37°C で、10, 60, 120 分間培養し、グルタールアルデヒドで固定し、ベンチジン反応を行い透過型電子顕微鏡 (日立 HS-9 型) で観察した。10,000 倍拡大で観察し、HRP 陽性 vesicle を最低 200 個算し、その反応物の形態学特徴を定量的に解析した。

成績

1. 血漿コレステロール値は、第1実験群の 4ヶ月および 8ヶ月屠殺群でそれぞれ 130 ± 21 mg/dl および 94 ± 19 mg/dl、対照群のそれらは 104 ± 15 mg/dl および 76 ± 19 mg/dl で高値を示し、それぞれ、0.5%，5% の危険率で有意の差を示した。
2. 肉眼的および光顕的に第1実験群および対照群ともに大動脈の病変は殆んどなく、両群に差

はなかった。

3. 透過型電顕による観察：第1実験群ではコレステロール添加食投与後4ヶ月では、内皮細胞細胞質内に微細線維や微小空胞が増加し、時には最内層の弾性板の断裂融解を認めた。また中膜では、基底膜部で平滑筋細胞が増殖していた。8ヶ月後では上記変化に加えて膠厚線維および弾性組織も細胞外に増加し、内膜の肥厚が目立った。
4. 走査電顕による観察：細胞表面の微絨毛の配列は、対照群では細胞表面の%を覆う。第1実験群では血流方向で細胞の遠位端に集簇する傾向があり、残りの細胞表面では微絨毛を欠くことが多かった。また直径 $0.2\sim0.4\mu$ の浅い陥凹が、集簇した微絨毛と関連して認められた。このような配列を示す内皮細胞は対照群では4ヶ月、8ヶ月でそれぞれ44.2%，37.6%認められるのに対し、コレステロール添加食群ではそれぞれ72.7%，85.4%と著増し、その差は0.1%の危険率で有意であった。
5. 内皮細胞の吸飲・貪食能：HRP反応産物は吸飲空胞内および細胞質内空胞内に認め、コレステロール添加食8ヶ月投与群ではHRPの内皮細胞のとり込みは対照群に比し、0.5%の危険率で有意に増加していた。偏腎摘出し、コレステロールを添加した第2実験群では、偏腎摘出し通常食を与えた第2対照群に比し、このHRP吸飲・貪食能は定量的に約2倍に亢進していた。

考 察

マウスでは近交系の入手が容易なこと、寿命が比較的短い利点にも拘らず、動脈硬化症の研究に用いられることが多い。コレステロール添加食にて4～8ヶ月飼育することにより比較的軽度なコレステロール血症をおこし、形態学的にも電顕では明瞭な動脈硬化症を認めることができる。内皮細胞内の微小空胞の増加がある。中膜では平滑筋細胞の増加があり、これは断裂、融解した基底膜の部につよい。内皮細胞はin vitroで吸飲・貪食能の亢進があり、これはコレステロール添加食飼育8ヶ月後につよい。これは内皮細胞の透過性の亢進と関連があると考えられ、内皮細胞内の微小空胞の増加はこの形態学的所見と考えられる。内皮細胞表面の微絨毛の配列の変化も、動脈硬化症と密接な関係があると考えられる。本研究は動脈硬化症についてその初期像を研究したものであるが、従来用いられなかったマウスを用いて動脈硬化症を実験的におこし、微細構造を透過および走査電顕を用いて総合的に研究し、その初期像について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。