

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591542
 研究課題名（和文） 動脈硬化と内弾性板の加齢性断裂：その発生・修復・破綻過程の超微構造解析
 研究課題名（英文） Age-related rupture of internal elastic lamina in atherosclerosis: ultrastructural analysis of its occurrence and healing.
 研究代表者
 大塚 愛二 (OHTSUKA AIJI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：50168986

研究成果の概要（和文）：

我々は、まず初めにギ酸消化法と血管鋳型法を組み合わせた新しい走査型電子顕微鏡観察法を開発した。この方法により、細動脈・細静脈など微小な血管の弾性線維構造ですら三次元で詳細に明らかにすることができた。さらにこの方法により、壊れた内弾性板の三次元構造を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

At first, we newly developed scanning electron microscopy technique using a formic acid digestion with vascular casts, which revealed, in detail, the three-dimensional (3D) architecture of delicate elastic fibers in small vessels. This method could successfully visualize the three-dimensional architecture of elastic fibers in small various sized of blood vessels, even arterioles and venules. Furthermore, the new method revealed the 3D architectures of corrupted internal elastic lamina.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：弾性線維、動脈硬化症、内弾性板、走査型電子顕微鏡、血管鋳型法、消化法

1. 研究開始当初の背景

(1) 弾性線維は血管壁に多量に存在し、血管壁に弾性を与え循環動態に大きくかかわっている。また逆に循環動態に応じて弾性線維構造はリモデリングすると言われている。

(2) 弾性線維は血管壁の機能に応じた、特徴的な線維構造をとる。例えば、弾性動脈の中

膜弾性板の数は、動物種に関係なく血圧に応じて決められていることが知られている。

(3) 周囲の環境が異常になること、例えば高血圧状態の長期継続や、また加齢により構造がリモデリングされる。

(4) このように環境に応じた構造をとる弾

性線維であるが、それを観察するために弾性線維以外の組織を消化し走査型電子顕微鏡で観察する方法が以前から行われてきた。これは弾性線維主成分のエラスチン蛋白が他のタンパク質に比べ熱・酸・アルカリなどに安定である性質を利用している。

(5) この消化法では、弾性線維が豊富で丈夫な大動脈（弾性動脈）のみが観察可能であったが、それは末梢血管の弾性線維は少ない為、消化中に破損するからである。そのため小さな組織や弾性線維が少ない組織では観察は成功しておらず詳細は不明であった。

(6) また他の組織学的手段、例えば透過型電子顕微鏡などを用いても弾性線維構造体である弾性板は固く密な構造であるため十分に観察できない。

(7) 我々は血管鋳型樹脂を血管内腔に注入し、それを支柱として組織消化を行う方法を開発することにした(血管鋳型注入消化法)。その方法によりすべてのレベルの内皮下弾性線維構造を詳細に観察した。

(8) rat の腹側尾動脈は加齢性に内弾性板の断裂が生じる。内弾性板の断裂は動脈硬化症の診断の所見として知られている。

(9) 我々が開発した血管鋳型注入消化法を用い、内弾性板断裂の詳細を解析する。

2. 研究の目的

(1) 正常部における血管壁弾性線維三次元構造を大動脈から細動脈に至るまで網羅的に明らかにする。

(2) 我々が作成しているギ酸消化法試料がエラスチン単体であることを証明する。

(3) 加齢性に破損した内弾性板の詳細な三次元構造、破損パターンを研究することで破損の原因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血管壁弾性線維 3 次元構造

① 走査型電子顕微鏡試料作製観察

Wistar 系ラット 5 週齢を使用し、血管鋳型注入後消化試料を作製した。筋性動脈から細動脈までの内皮下弾性線維構造を走査型電子顕微鏡で観察した。深麻酔下で胸大動脈よりカニキュレを挿入し、リンゲル液で血管内の血液を洗浄した後、メルコックス樹脂を注入した。室温で十分に樹脂が重合固化した後、下腹壁動静脈とその末梢部が含まれるように

前腹壁を切り出し、リン酸緩衝液に保存した。その試料を 10%ギ酸で 45°C36 時間、消化を行った。さらに 90%ギ酸で 45°C24 時間消化を行った後、緩衝液で洗浄した。試料の固定はタンニン-オスミウム法で行われた。最終的に凍結乾燥を施行し走査型電子顕微鏡 (S-4800, Hitachi, 本学共同実験室設置) で観察をした。

② 走査型電子顕微鏡観察画像データ解析

走査型電子顕微鏡試料より得られた画像データを、Photoshop CS3 を用いて弾性線維を黒、その他を白とする 2 値化処理を行った。次にその白と黒の割合を血管径ごとに Image J を使用して計算した。動脈系 50 画像、静脈系 30 画像解析した。

(2) 透過型電子顕微鏡による観察

ラットの胸大動脈よりカニキュレーションし、リンゲル液で血管内の血液を洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。下腹壁動静脈とその末梢部が含まれるように前腹壁を切り出し細切し、リン酸緩衝 2% グルタルアルデヒド液に保存した。試料はオスミウム後固定、アルコール置換を経てエポキシ樹脂に包埋した。ウルトラマイクロームで薄切した試料をタンニン酸-ウラン・鉛染色を施し、透過型電子顕微鏡 (H-7650, Hitachi, 本学共同実験室設置) で観察した。

(3) アミノ酸分析

走査型電子顕微鏡試料作製と同様の方法で尾動脈（筋性動脈）を消化し弾性線維を抽出した。その試料は 110°C の 6mol/l 塩酸で 48 時間加水分解した。その加水分解された試料のアミノ酸分析組成を分析した。

(4) Wistar 系ラットは 8 週齢以降、内弾性板が加齢性に破損することが報告されている。特に尾動脈に高率に観察されるため、尾動脈の血管鋳型注入後消化試料を作製し観察した。

4. 研究成果

(1) われわれが開発した 3 次元弾性線維観察法は細動脈、細静脈に至るまで破損することなく描出することに成功した。それによると血管壁内皮下弾性線維は基本的にはメッシュ構造で、血流方向長軸に太い線維とそれを繋ぐ細い線維から成ることが判明した。またこのメッシュ構造は太い血管になるに従って蜂巢構造になることが観察された。この長軸の太い線維と細い線維は約 50nm の弾性線維の束から成っていることが高倍率で観察された。

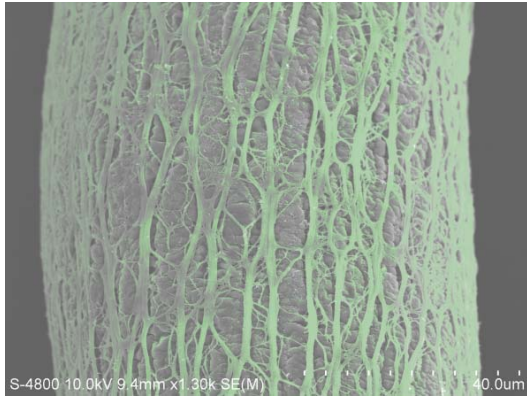


図1 細動脈の弾性線維（緑色が弾性線維）

(2) 上記のメッシュ構造を2値化しメッシュの密度を数値化したところ、血管直径とメッシュ密度は正の相関関係にあることがわかった。これは動脈系、静脈系どちらとも当てはまる。しかし動脈系の密度は30%から100%まで変化し、径に対する密度の変化の割合は大きいのに比べ、静脈系では密度は30%から60%までしか幅が無く、変化の割合も小さいという違いがあった。

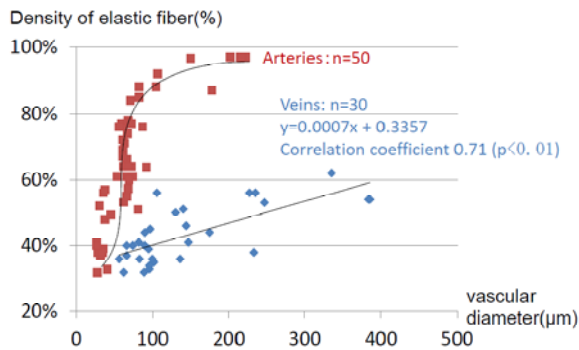


図2 弾性線維密度と血管径の関係

(3) 透過型電子顕微鏡試料では走査型電子顕微鏡試料と同程度の径の内皮下弾性線維束を観察することができたが、線維束が密なため詳細な細線維構築を明らかにすることはできなかった（図3, 4）。

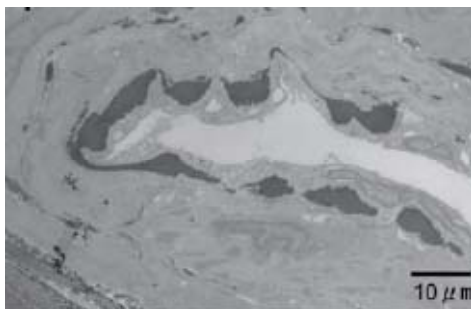


図3 血管壁弾性線維 弱拡大

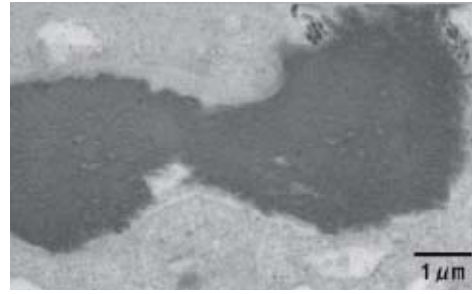


図4 血管壁弾性線維 強拡大

(4) 我々が走査型電子顕微鏡で観察した弾性線維構造物のアミノ酸組成はエラスチン蛋白のアミノ酸組成とほぼ一致した。つまり我々が観察していたものは弾性線維の主成分であるエラスチン蛋白のみであることが証明された

Amino Acid	Elastin with Digestion Treatment	Insoluble Elastin from Bovine ^a	Insoluble Elastin from Porcine ^a
Asp	8.81	6	6
Thr	17.78	9	14
Ser	16.61	9	11
Glu	22.14	16	19
Gly	346.91	330	330
Ala	213.63	228	234
Val	110.59	132	120
Met	0.34	0	0
Ile	23.63	24	18
Leu	59.96	60	54
Tyr	21.09	6	16
Phe	24.86	30	33
His	1.35	1	1
Lys	4.73	3	6
Ide+	0.88		
Des	1.32	15	3
Arg	9.51	6	6
Hyp	11.97	8	11
Pro	103.04	116	117

図5 アミノ酸組成 右から作成試料、ウシ不溶性エラスチン、ブタ不溶性エラスチン

(1)～(4)は論文 (Shinaoka et al., 2013) に発表掲載された。

(5) 弾性線維断裂部の弾性線維構造を血管鑄型注入後消化法にて観察した。断裂部は規則的に壊れており、それは弾性線維の三次元構造に由来する脆弱性によるものではないかと考えられた。また断裂部には残存した弾性線維が存在し、断裂部を支えていることが示唆されている。

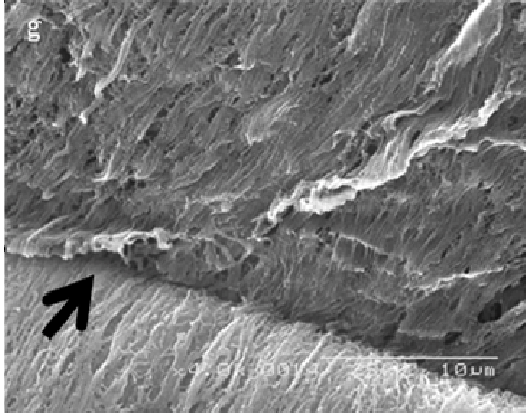


図 6 断裂部弾性線維 矢印以下が正常部弾性板、以上が断裂部の残存弾性線維。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Shinaoka A, Momota R, Shiratsuchi E, Kosaka M, Kumagishi K, Nakahara R, Naito I, Ohtsuka A: Architecture of the subendothelial elastic fibers of small blood vessels and variations in vascular type and size. *Microscopy and Microanalysis* 19(2): 406-414, 2013, 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 品岡 玲、百田龍輔、熊岸加苗、小阪美津子、中原龍一、内藤一郎、大塚愛二：微小血管の内皮下弾性線維の走査電子顕微鏡観察～血管の種類とサイズに応じた変化。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会／山梨／2012 年 3 月 27 日
- ② 品岡 玲、百田龍輔、小阪美津子、内藤一郎、中原龍一、大塚愛二：微小血管内皮下弾性線維構造と血行動態の関係／／第 43 回日本結合組織学会・第 58 回マトリックス研究会 合同学術集会／大分／2011 年 6 月 11 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/anatomy/hm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 愛二 (OHTSUKA AIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50168986

(2) 研究分担者

田口 勇仁 (TAGUCHI TAKEHITO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：70188134

百田 龍輔 (MOMOTA RYUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80263557