【総 説】

4. 心筋梗塞好発 WHHL ウサギ, 病理所見と心電図所見

塩 見 雅 志 伊 藤 隆 山 田 悟 士
田 村 敏 昌

神戸大学医学部附属動物実験施設

Development of Myocardial Infarction—Prone WHHL Rabbits, Histopathological and Immunohistochemical Examination

Masashi SHIOMI, Takashi ITO, Satoshi YAMADA and Toshiaki TAMURA

Institute for Experimental Animals, Kobe University School of Medicine

Summary

Ischemic heart disease is important in developed countries. However, there are few suitable animal models for myocardial infarction. To develop myocardial infarction (MI)-prone WHHL rabbits, we have carried out selective breeding by using coronary atherosclerosis-prone WHHL rabbits in our colony since 1994. We used following indices for the selective breeding; 1) vulnerable coronary plaque, 2) severe coronary stenosis greater than the lumen area stenosis with the mean value plus the standard error value of the parents' generation, 3) plasma cholesterol levels above 800 mg/dl at 12 months old, and 4) occurrence of myocardial infarction. During the selective breeding, housing condition was maintained constant and rabbits were fed standard rabbit chaw. We did not treat rabbits especially except the selective breeding. At 1999, after the selective breeding, myocardial infarction was observed in 94% of rabbits deceased up to 35 months old. Age of 35 months old in rabbits corresponds to approximately 44 years old in human by calculation of their life span (75 years old in humans and 60 months old in experimental rabbits). In histological examination, many rabbits after the selective breeding showed findings of acute myocardial infarction alone or in combination with findings of old myocardial infarction. Myocardial lesions of MI-prone WHHL rabbits were observed mainly at the sub-endocardial region circumferentially, and about 60% rabbits showed transmural infarction in combination with subendocardial infarction. In some MI-prone WHHL rabbits, the profile of the electrocardiogram showed typical findings of myocardial infarction. The culprit coronary arteries had severe lumen area stenosis greater than 90% at about 20 serial sections prepared at 500 μ m interval. These findings of MI-prone WHHL rabbits resembled those of human multivessel disease. Atheromatous plaques of the coronary arteries of WHHL rabbits were changed from fibromuscular type to macrophage/extracellular lipid-rich type by the selective breeding. Many coronary plaques showed occlusion by macrophage accumulation at the superficial area of the plaque. In this case, denudation of the endothelial cells was observed. Some others showed thin fibromuscular cap with large lipid core. In this case, macrophages were detected at the border between the attenuated fibromuscular cap and the lipid core. This finding was considered as vulnerable plaque, which probably causes plaque rupture and consequent occlusive thrombus formation. However, we did not detect any plaque rupture or luminal thrombus in the coronary arteries. This suggests that we can examine which factors are important as trigger of plaque rupture by using MI-prone WHHL rabbits. We consider that MI-prone WHHL rabbits will contribute to studies of myocardial infarction.

はじめに

心疾患による死亡は国内では死因の第2位であり¹⁾、その約60%を占める心筋梗塞を主とする虚血性心疾患への対応の重要性が指摘されている。心筋梗塞の発症については、臨床データの集積によって、動脈硬化病変部位に生ずる血栓等による冠状動脈の閉塞が重要な役割を果たしていることが指摘されている。しかし、心筋梗塞を自然発症する適切なモデル動物が存在しないことから、心筋梗塞の発症メカニズムの詳細については解明されていない。

WHHL ウサギは、低比重リポタンパク (LDL) 受容体遺伝子の異常に基づく循環血液中の LDL の異化の遅延が原因して高コレステロール血症を呈し、離乳直後から大動脈や冠動脈等に動脈硬化病変を自然発症する^{2,3)}。神戸大学で維持している WHHL ウサギは、選抜交配によって冠動脈に高度の動脈硬化病変が発症する^{2,3)}。しかし、心筋梗塞の発症頻度は低く、発生した心筋病変は軽度であった。ヒトの高脂血症に対応させるため、当施設では選抜交配によって心筋梗塞を好発する WHHL ウサギの開発を1985年から継続してきたが、発生率の上昇は軽度であった。1994年から選抜の指標を変更することによって心筋梗塞の発生率が上昇し、1999年には心筋梗塞好発 WHHL ウサギを確立することができた。本稿では、心筋梗塞好発 WHHL ウサギの病理組織学的検討結果を中心に概説する。

選抜交配

急性冠症候群の原因として、冠動脈の動脈硬化病変が破綻して閉塞性血栓が生じる仮説が有力と考えられている⁴⁻⁶⁾。破綻した動脈硬化病変は、菲薄化した線維性被膜とその直下の大きなリピッドコア (脂質・マクロファージの蓄積) を特徴としている。動脈硬化病変破綻の仮説としては、マクロファージが分泌するプロテアーゼによる線維性被膜の分解、およびマクロファージやリンパ球が分泌するサイトカインによる平滑筋細胞のコラーゲン合成の抑制と、平滑筋細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしていると指摘されている。したがって、心筋梗塞好発 WHHL ウサギの開発においては、動脈硬化病変中にマクロファージが蓄積しやすい条件を採用することが重要と考えた。採用した選抜交配の指標は、1) マクロファージに富む冠動脈病変を有するウサギ、2) 12月齢における血清コレステロール値が800 mg/dl以上を示すウサギ、3) 冠

動脈の管腔狭窄率が親世代の平均値+標準誤差より高値を示すウサギ、4) 心筋梗塞を発症したウサギとした。これらの指標を元に繁殖に用いるウサギを選抜し、1994年から1999年まで5~7世代にわたって選抜交配を継続した (現在も継続中)。選抜交配の結果、心筋梗塞の発生率は、35月齢で94%に上昇した。選抜交配によって心筋梗塞の発生率が顕著に上昇したことは、心筋梗塞の発生に遺伝的背景を有する因子が関与していることを示唆している。なお、選抜交配の間の飼育管理は通常の実験用ウサギの飼育条件と同一であり、給与した飼料は通常の実験ウサギ用飼料であった。

心筋病変の病理組織学的解析

ウサギの心臓は突然死後16時間以内に採取し、固定液 (ホルマリンあるいはブアン氏固定液) に浸漬した。パラフィン包埋後500 μ m 間隔で薄切し、病理組織染色あるいは免疫組織化学染色を実施した。心筋梗塞好発 WHHL ウサギの心筋病変は心室内膜下領域に好発し、貫壁性病変は約60%に認められた。これらの所見はヒトの冠動脈複数枝病変に伴う心筋梗塞に類似している。Fig. 1 に、陳旧性心筋梗塞に急性心筋梗塞を併発した25月齢オスウサギの心臓の病理組織写真を示す。左心室には心内膜下に全周性の心筋病変が認められ、左室の側壁から後壁にかけておよび中隔壁の後壁近接部で菲薄化が認められる (Fig. 1 A)。責任冠動脈では狭窄率90%以上の病変が連続した20切片に認められた (Fig. 1 B)。線維化部分に隣接して心筋線維が残存している部位では、心筋線維の核の消失あるいは不明瞭化 (Fig. 1 C) が認められ、中隔壁の菲薄化部分では心筋線維の消失が認められた (Fig. 1 D)。また、心筋線維の横紋の消失、水腫様変化、波状走行、収縮体壊死等も認められた。これらの所見は急性心筋梗塞で認められる典型的な病理所見である。このウサギの死亡直前に計測した心電図では、ST-segment の上昇 (II 誘導, III 誘導, aVF 誘導) あるいは下降 (I 誘導, aVL 誘導) および異常 Q 波 (III 誘導, aVF 誘導) が認められた。以上の所見から、このウサギは陳旧性心筋梗塞に急性心筋梗塞を併発して死亡したと考えられ、選抜交配後に死亡した多くの WHHL ウサギが同様の病理所見を示した。

選抜交配後の WHHL ウサギの病理組織標本で陳旧性の心筋梗塞病変を示さないケースにおいては、心筋線維の横紋の消失、水腫様変化、波状走行、収縮体壊

Fig. 1 Microphotographs of the heart and coronary atheromatous plaque of a male WHHL rabbit aged 25 months. Elastic van Gieson staining. A, Histology of the heart section; B, The coronary plaque of the culprit circumflex artery; C, High magnification view of the region of the lateral wall of the left ventricle of Fig. 1A; D, High magnification view of the posterioseptom region of Fig. 1A.

死，ミオグロビンの消失，ならびに心筋細胞の核の消失，不明瞭化，萎縮等の心筋虚血急性期の所見が認められ，冠動脈に90%以上の管腔狭窄が認められた。

責任冠動脈の動脈硬化病変

心筋梗塞を発症した WHHL ウサギの冠動脈病変には2つのタイプが認められた。1つは動脈硬化病変表層へのマクロファージの集簇による内腔の閉塞であり，もう1つは内腔の完全閉塞は示さないが，菲薄化した線維性被膜とその直下の脂質とマクロファージからなる大きなリビッドコアを伴う病変である。前者の冠動脈病変の場合，免疫組織染色によって，マクロファージ集簇部分の内皮細胞の剝離が観察された。このことは，内皮細胞機能の低下によってマクロファージが集簇したこと，あるいはマクロファージの集簇によって内皮細胞機能が低下したことの両者が考えられ，動脈硬化の進展および心筋梗塞の発症において，冠動

脈内皮細胞機能の低下およびマクロファージの集簇が重要な役割を果していることが示唆される。後者の動脈硬化病変は，急性冠症候群の原因と考えられる典型的な不安定病変の特徴を示している。ヒトの場合，このような不安定病変が破綻して閉塞性血栓を誘発し，急性心筋梗塞に至ると考えられている⁴⁻⁶⁾。しかし，破綻のメカニズムについての証明はない。WHHL ウサギで認められた破綻していない不安定病変は，動脈硬化病変が破綻して血栓を生じるためには，病変の不安定化のみならず他の因子が関与している可能性を示唆している。心筋梗塞好発 WHHL ウサギは，動脈硬化病変の破綻のメカニズムの解明にも有用と考えられる。

選抜交配以前の WHHL ウサギにおいては，冠動脈病変は，マクロファージや細胞外蓄積脂質が少なく平滑筋細胞やコラーゲン線維に富む病変であった⁷⁾。し

かし、選抜交配によって、冠動脈病変は脂質成分に富む病変となり、ヒトの冠動脈病変により類似した病理組織像を示すようになった。選抜交配による成熟後の血清コレステロール値の上昇が冠動脈病変の進行と病変中の脂質成分の増加に関与しているのかもしれない。

ま と め

選抜交配によって心筋梗塞好発 WHHL ウサギを開発した。心筋梗塞好発 WHHL ウサギの心筋病変は、ヒトの冠動脈複数枝病変に基づく心筋梗塞に類似していた。この心筋梗塞好発 WHHL ウサギを用いて、冠動脈病変の破綻や血栓形成に関する因子を検索することによって、急性冠症候群の発症機序の解明に貢献できることが考えられる。さらに、心筋梗塞の予防や治療に関する研究にも、心筋梗塞好発 WHHL ウサギは有用と考える。

本研究の一部は三共株式会社からの研究費支援によって実施された。

文 献

- 1) 国民衛生の動向。厚生統計協会編。47：50-57 (2000)
- 2) Shiomi M. Outline of WHHL rabbit. <http://www.med.kobe-u.ac.jp/iea/whhl-1.html> (2002)
- 3) Shiomi M., Ito T., Shiraishi M., Watanabe Y. Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: Risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 96：43-52 (1992)
- 4) Falk E., Shah P.K., Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92：657-671 (1995)
- 5) Davies M.J. Stability and instability: Two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 94：2013-2020 (1996)
- 6) Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104：365-372 (2001)
- 7) Shiomi M., Ito T., Tsukada T., Yata T., Ueda M. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions differ; An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb* 14：931-937 (1994)