Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)

大動脈組織傷害の定量評価 II

—WKY 対比による酸性ムコ多糖, 糖蛋白の年齢推移—

長谷川元治 荒井 親雄 安部 信行
 福永 良文 竹内 光吉 斉藤 光代¹⁾
 高山 吉隆²⁾ 伊藤 浩行 岡本 耕造³⁾

<要 約> 岡本らにより開発された脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は発育早期より重症の高血圧を遺伝的, 家族的に認め, ほぼ90%に脳卒中を発症する. この高血圧性動脈病変を解明する一法として大動脈中膜構築素材を顕微分光測光法により組織化学的に定量し, Wistar Kyoto Rat (WKY) 対比のもとにその年齢傾向と障害特性を検討し本学会誌に報告した. 本稿では非線維性結合組織である酸性ムコ多糖, 糖蛋白について同様の方法で検索し検討した.

対象・方法: 対象は年齢35日から649日まで SHRSP134例, WKY51例計185例の大動脈胸部である. 酸性ムコ多糖は Alcian Blue, 糖蛋白は PAS で最大吸光度波長特性は608nm, 565nm で中膜含有量を測定した.

成績: 1. WKY51例, SHRSP134例の胸部大動脈中膜組織酸性ムコ多糖, 糖蛋白の年齢推移を MSP 法で定量比較検討した.

2. WKY の酸性ムコ多糖量の年代推移は生後より300日代まで動脈成長とともに増量, 400日以降漸減する.

3. SHRSP の酸性ムコ多糖の年齢推移は WKY と対照的なパターンを示し, 生後100日未満からすでに異常増量, 100日代, 200日代まで激減, 以後漸減傾向を示した.

4. WKY の糖蛋白年齢推移は生後100日代まで漸増, 200日代以降漸減と生理的加齢を示した.

5. SHRSP の糖蛋白年齢推移は, 100日未満から300日代にかけ急増し400日代, 500日代は不変か稍減量傾向を示した.

Key words: SHRSP, WKY, 顕微分光測光法, 大動脈酸性ムコ多糖, 糖蛋白

I. 緒 言

岡本らにより開発された脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, SHR SP)¹⁾¹⁰⁾は発育早期より重症の高血圧を遺伝的, 家族的に認め, ほぼ90%に脳卒中を発症する. この高血圧性動脈病変の病態を解明する一法として大動脈中膜構築素材を顕微分光測光法 (Micro-

spectrophotometry, MSP) により組織化学的に定量し²⁾³⁾, Wistar Kyoto Rat 対比のもとにその年齢傾向と障害特性をエラスチン, コラーゲン⁴⁾について検討し本学会誌に報告した.

本稿では非線維性結合組織として酸性ムコ多糖 (AMPS), 糖蛋白 (GP) について同対象, 同手法で検索した結果, SHRSP 動脈障害特性解明に有力な知見をえたので報告する.

II. 対象および方法

対象は年齢35日から649日まで SHRSP134例, WKY51例, 計185例の胸部大動脈である (表1). まず大動脈を10%ホルマリン固定後パラフィン包埋し, JB-4A Automicrotome ガラスナイフにて4 μ 横断組

M. Hasegawa, C. Arai, N. Abe, Y. Fukunaga, K. Takeuchi,

M. Saito: 東邦大学医学部臨床生理機能学

Y. Takayama: 同 ME 研究室

H. Ito, K. Okamoto: 近畿大学医学部第一病理

受付日. 1983. 10. 12.

表 1

Age(day)	SHRSP	WKY
— 99	10	5
100—199	31	19
200—299	28	13
300—399	26	8
400—499	27	5
500—599	9	0
600—	3	1
Total	134	51

組織切片を作製する。染色は酸性ムコ多糖 Alcian Blue, 糖蛋白 PAS (表 2, 図 1) で最大吸光度波長特性はそれぞれ 608nm, 565nm である。MSP 計測条件は対物レンズ 10×, 集光レンズ 10×, ピンホールターレット 2 で組織を 1 検体につき 20~30 点スキャンし, 測定した透過率をコンピューター処理し, pattern 分析後症例毎の平均吸光度 (%E), 偏差値 SD を算出した。

III. 成 績

組織学的考察 (写真 1)

AMPS について SHRSP, WKY 両群の組織学的特徴を代表年代別に概説すると, WKY の 100 日未満では中膜組織内に均一に分布し, その量は比較的希薄である。一方 SHRSP ではすでに濃染し, 幼時より異常増生がうかがわれる。100 日代になると, 前者は均一分布の上含量は漸増傾向を認める。後者では不均一に増量し部分的に染色の希薄な虚血巣を散見する様になる。

200 日代以上の WKY は動脈の成長, 成熟および生理的加齢により AMPS は均一に増量し, 300 日代で極量に達し以後漸減する。SHRSP では染色性の希薄あるいは染色されない部分が急増しはじめ, 400 日代以降では大部分消失し, 虚血, 壊死巣のひろがりは明らかである。

同様に GP について観察すると, WKY では主として弾力線維周囲に被膜様に均一分布し, 200 日以降弾力線維網の発達により, GP の分布もひろがるが加齢による形態的, 量的変化は著しくない。一方 SHRSP では 100 日未満ですでに含量は WKY を凌駕し, 以後加齢に伴い弾力線維間隙組織に不均一, 塊状に分布増量し, やがて多数の虚血, 壊死巣による空胞化を形成した後 400 日代から減量がみられる。

組織化学的定量

1. WKY 45 例について AMPS 量の年代推移を見ると, 生後より 300 日代まで 24.7%E から 29.3%E と動脈成長とともに増量し, 400 日代以降漸減 (27.0%E) する (図 2, 表 3)。

2. SHRSP 74 例の AMPS の年齢推移は WKY と対照的なパターンを示す。すなわち生後 100 日未満からすでに異常増量 (29.3%E) し, 100 日代, 200 日代まで激減 (22.4%E), 以後漸減傾向 (21.2~21.6%E) を示す。この SHRSP における一連の年齢傾向はおよそ 400 日代以下と 500 日代以上生存例での動脈障害の由来が異なるとの印象をうける (図 3, 表 3)。

3. AMPS 量の年代推移について WKY と SHRSP を比較すると, 100 日代を境に両群の量的関係が逆転

図 1

Acid Mucopolysaccharide

Glycoprotein

表 2

MSP による組織酸性ムコ多糖類(AMPS)の定量		
1. 標本の作製		
薄切 JB-4A type Automicrotome		
↓		
脱パラフィン		
↓		
水 洗		
↓		
0.3% CH ₃ COOH	2分	
↓		
アルシアンブル	60分	
↓		
水 洗	10分	
↓		
アルコール脱水		
↓		
透 徹		
↓		
封 入		
MSP による糖蛋白の定量		
1. 標本の作製 PAS 染色		
薄切 JB-4A type Automicrotome		
↓		
脱パラフィン		
↓		
蒸 留 水		
↓		
0.5%過沃素酸水溶液	5分	
↓		
水 洗	5分	
↓		
蒸 留 水		
↓		
SCHIFF 試薬	20分	
↓		
SO ₂ 洗浄液	2分ずつ3回	
↓		
蒸 留 水	5分	
↓		
アルコール		
↓		
透徹, 封入		

表 3 Acid Mucopolysaccharide

Age(day)	SHRSP		WKY		P
	N	%Extinction	N	%Extinction	
— 99	7	29.3±7.11	4	24.7±1.37	0.05
100—199	30	25.3±8.44	19	25.4±4.12	NS
200—299	28	22.4±5.61	8	26.4±3.79	NS
300—399	26	21.2±5.12	8	29.3±6.50	0.001
400—499	27	21.6±5.13	5	27.0±8.10	0.05
500—599	9	25.4±6.81			
600—	3	25.3±5.68

図 3 中膜酸性ムコ多糖類 (AMPS) の年齢分布 (胸部大動脈 SHRSP)

し、100日未満で WKY24.7%E に対し SHRSP29.3%E であったものが200日代以降前者が各年代で26.4%E29.3%E、27.0%E で推移するのにに対し後者は22.4%E、21.2%E、21.6%E と低値を示し、SHRSP の初期異常増生後著明な AMPS の破壊、減量がうかがい知ることができる (図 4、表 3)。

4. WKY49例の GP 年齢推移は生後100日代まで漸増(33.6~42.7%E)、200日代以降漸減(38.6~36.4%E)と生理的加齢を示すが年齢による変化は著しくない。前述の WKY の AMPS では300日代が極量である

図 2 中膜酸性ムコ多糖類 (AMPS) の年齢分布 (胸部大動脈 WKY)

図 4 中膜酸性ムコ多糖類 (AMPS) の年代推移 (胸部大動脈 WKY, SHRSP)

図5 中膜糖蛋白 (GP) の年齢分布 (胸部大動脈 WKY)

図7 中膜糖蛋白 (GP) の年代推移 (胸部大動脈 WKY, SHRSP)

表4 Glycoprotein

	SHRSP		WKY		P
	N	%Extinction	N	%Extinction	
Age(day)					
— 99	10	38.2±8.83	5	33.6±6.35	NS
100—199	31	46.1±8.37	19	42.7±5.40	NS
200—299	28	53.6±8.60	13	38.6±4.27	0.001
300—399	15	57.4±7.47	8	39.2±7.35	0.001
400—499	12	54.1±8.75	33	36.4±2.12	0.001
500—599	3	55.5±6.63			
600—	2	71.5±5.30			

が, GP の極量は100日代である点が相違する (図5, 表4)。

5. SHRSP101例の GP 年齢推移を見ると, 100日未満 (38.2%E) から300日代 (57.4%E) にかけて急増し400日代, 500日代は不変か稍減量 (54.1~55.5%E) 傾向を示す (図6, 表4)。

6. GP 量について WKY と SHRSP を比較すると, WKY の100日代を極量とする漸増, 漸減傾向に対し SHRSP は生後より WKY 量を上回り, 200日代以降各年代共 $p < 0.001$ で有意の増量を認めた (図7, 表4)。

図6 中膜糖蛋白 (GP) の年齢分布 (胸部大動脈 SHRSP)

IV. 考 察

本稿で対象とした WKY, SHRSP のエラスチン, コラーゲンについてはすでに検討し, 報告⁴⁾したが, 両成分とも WKY, SHRSP でそれぞれ同様の年齢推移を示した。すなわち WKY ではエラスチン100日代, コラーゲン200日代を極量とする漸増, 漸減の Pattern である。一方 SHRSP では生後100日代までに両成分とも WKY 量を凌駕し, 以後200日代までエラスチンは激減, 300日代までコラーゲンは急速に減量し, 高血圧性因子による線維性結合組織崩壊の著しいことをあきらかにした。今回観察, 定量した AMPS はエラスチン, コラーゲン年齢動態とはほぼ同様で100日未満の SHRSP 量は WKY 量をはるかに上回り, 200日代までに急速に減量する。動脈壁成分としてのムコ多糖類は酸性ムコ多糖でかつヒアルロン酸と考えて良い。Alcian Blue 染色法は選択的にヒアルロン酸と結合発色するので, MSP 法での定量値は酸性ムコ多糖類中の単一物質を見ているものと考えてさしつかえない。

一方 GP 年齢動態について見ると WKY は100日代を極量とする漸増, 漸減のパターンでエラスチン, コラーゲンの推移に極めて類似する。ところが SHRSP では前記3成分とは全く異なる特性を示し, 100日未満, 100日代で WKY 量をやや上回るが, 以後300日代まで急増し400日代以降高値のまま推移する。大島⁵⁾⁶⁾の報告によると PAS 染色で同様に発色し, MSP 計測上区別できないものに GP と Type V コラーゲンがあると言う。Type V コラーゲンは非線維性結合組織に属し, 動脈障害に際して増量することから, 今回の PAS 染色, GP 定量結果については十分配慮し, 例えば今後化学処理, 酵素処理をし, 2成分を区別して定量する必要があると考える。動脈構築素材のマトリックスから血管機能を分析すると弾力線維網 Elastic network

(エラスチン)は柔軟さ、しなやかさの特性を持ち、内圧 P (横軸), 弾性率 E (縦軸) から P-E 特性をみると低勾配のへ型で推移する。一方膠原細線維網 collagenous meshwork (コラーゲン) はエラスチンの $\times 10^2$ の硬さを持ち血管の高圧, 高張力に対する防御的役割を果たす。したがって P-E 特性は高勾配のへ型で推移する。したがってこのエラスチンとコラーゲンのマトリックスからの合成 P-E 特性は非線型 non-linear specificity となり、脈動血流にもっとも適合した血管機能の基本様式が形成される。

この線維性結合組織に対して非線維性結合組織 AMPS, GP はそれぞれゼラチン様, ニカワ様の生物化学的特性を持ち被膜様構造で、線維性結合組織、平滑筋細胞周囲に均一充填物質として存在する。その役割は種々の遊離成分の選択的流通機構を司り、血管代謝と機能安定化を果たす。

以上のごとき動脈結合組織 4 成分は異常高血圧を伴う SHRSP では完全に崩壊しその結果動脈の機能の低下, 血管代謝の異常が十分示唆される。SHRSP の動脈障害が高血圧によるとのもう一つの根拠は上記 4 成分とも 200 日代以前, 400 日代以後に死亡した例で組織所見と定量結果が連続した加齢傾向を示さないことである。すなわち 200 日代以前では組織障害の程度はより急激で著明である。一方 400 日以後の例では緩徐で中等度である。この相違は岡本¹⁾の報告から 200 日以内の死亡例は重篤な高血圧と高頻度の脳卒中を発症するのに対し, 400 日以上生存例は比較的緩徐な高血圧と低頻度の脳卒中であるとの内容からうかがい知ることができる。

今後、上記 4 成分の他に平滑筋細胞、細胞核、核 DNA、組織磷酸カルシウムについて検討し、高血圧モデル SHRSP での動脈障害を総合評価する予定である。

V. 結 語

1. WKY49 例, SHRSP101 例計 150 例の胸部大動脈中膜組織酸性ムコ多糖, 糖蛋白の年齢推移を MSP 法で定量比較検討した。

2. WKY の酸性ムコ多糖は 300 日代で極量に達し以後漸減, 糖蛋白は 100 日代で極量以後緩慢な年齢推移動

態を示した。

3. SHRSP の酸性ムコ多糖は 100 日未満で WKY より量のはるかに上回り, 200 日代まで急速に減量した。一方糖蛋白では前者と異なる特性を示し, 100 日代まで WKY 量よりやや上回るが以後 300 日代まで急増, 400 日代以降高値のまま推移する。

4. 動脈結合組織 4 成分は異常高血圧を伴う SHRSP では完全に崩壊しその結果動脈の機能の低下, 血管代謝の異常が十分示唆された。

文 献

- 1) Okamoto K: Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research* 34 : 35, 1974.
- 2) 長谷川元治, 他: 顕微分光測光法による生体素材の組織化学的定量法に関する研究。I—細胞核, 平滑筋細胞, 各種結合組織および磷酸カルシウムについて—。臨床病理 投稿中。
- 3) 阿部正威: Microspectrophotometry による動脈中膜組織エラスチンの定量法に関する研究。慈大医誌 90(5) : 574—591, 1975.
- 4) 長谷川元治, 他: Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP) 大動脈中膜結合組織傷害について—WKY 対比によるエラスチン, コラーゲンの年齢推移—。日本老年医学会雑誌 18(5) : 336—341, 1981.
- 5) Ohshima A: Collagen $\alpha\beta$ Chain: Increased proportion in human atherosclerosis. *Science* 213 : 666—668, 1981.
- 6) 大島 章: 動脈硬化症と血管結合組織代謝。第一回結合代謝談話会, ユーザイ, 1982, 7, 17.
- 7) Burton A.C: Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiol Rev* 34 : 619—643, 1954.
- 8) 長谷川元治: ヒト大動脈脈波速度に関する基礎的研究。慈医誌 85 : 742—760, 1970.
- 9) 吉村正蔵, 長谷川元治: 動脈下動脈の弾性特識と壁構築素材の関連について。脈管学 18 : 5, 1978.
- 10) 岡本耕造: 高血圧モデル動物の生成とそれによる研究の発展。病態生理 1(5) : 459—574, 1982.

Abstract

Determination of Aortic Medial Tissue Acid Mucopolysaccharide and Glycoprotein in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

Motoharu Hasegawa, Chikao Arai, Yoshibumi Fukunaga, Nobuyuki Abe, Kokichi Takeuchi, Mitsuyo Saito*, Yoshitaka Takayama**, Hiroyuki Ito and Kozo Okamoto***

1. According to the microspectrophotometric procedure changes by age of acid mucopolysaccharide and glycoprotein in media of thoracic aortae were studied in a quantitative comparison using —Wistar Kyoto Rats (WKY) and— Stroke-Prone spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP),— rats in total.

2. In WKY rats, acid mucopolysaccharide arrived at the maximal dose in the days of 300s and reduced gradually, while glycoprotein arrived at the maximal dose in the

days of 100s and then indicated gradual by age.

3. In SHRSP rats, acid mucopolysaccharide far exceeded that of WKY rats in amount within 100 days, and rapidly reduced by the days of 200s. On the other hand glycoprotein showed a different characteristic from that it exceed a little that of WKY rats in amount by the days off 100s, but after that rapidly increased toward the days of 300s and maintained such high value even after the days of 400s.

4. Four constituents in arterial connective tissue completely destructd in SHRSP rats accompanied with abnormal hypertension. As a result lowered arterial functions abnormal vasometabolism were suggested sufficiently.

Key words: *SHRSP, Aorta, AMPS, GP, Microspectrophotometry*

* Department of Clinical Functional Physiology, Faculty of Medicine, Toho University, Tokyo Japan

** Department of Medical Engineering, Faculty of Medicine, Toho University, Tokyo Japan

*** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kinki University, Osaka-Fu Japan