長期非顕性C欠乏モルモット の大動脈の変化について

藤 浪 隆 夫* 岡 戸 洪 太* 千 田 勝 二*
中 野 佐 上* 樋 口 礼 治* 中 山 広 一*
佐久間 長 彦* 林 勝 彦*

われわれは栄養学的な見地から動脈硬化症の成因を検討する目的でビタミンCをとり上げ、すでにC欠乏によってモルモットの血清脂質の増加、大動脈内皮細胞の変化と細胞間隙の離開がみられ、C欠乏食に5%重量の椰子油を加えて2週間の飼育により、大動脈に泡沫細胞の集簇による初期粥状硬化症がみられる結果を得ている¹⁾。このことから長期間の非顕性C欠乏状態を続けることにより、食餌性に脂質の負荷をすることなく粥状硬化症も発症しうのではないかと考えて今回の実験を行った。また、大動脈の血管壁代謝の一端をみる目的で、各種のHydrolase活性を測定した。

方 法

体重約300gの雄モルモットをクレア製C欠乏食で8週間飼育し、顕性C欠乏状態の発現を予防する目的で実験群にはC5mgを週2回、対照にはC50mgを皮下注射した。血液C含量は2,4-dinitrophenyl-hydrazine法²⁾、血清CholesterolをZack-Henrry法³⁾、中性脂肪はAcetyl acetone法⁴⁾によった。大動脈は外膜結合織を除去したのち弓部、胸部、腹部の3部分に分けてhomogenizeしたのち、Folchの方法に従い脂質を抽出し、血清脂質と同様の方法で大動脈の脂質含量を測定した。また血管壁のHydrolase活性は大動脈のHomogenateを用いてEsterase, LipaseはSelligmanのHaimovichらの変法⁵⁾で、AlkalineおよびAcid PhosphataseはSigma⁶⁾の方法で、5'-Nucl-

eotidaseはKirkの方法⁷⁾で、 β -Glucuronidaseは梶屋らの方法⁸⁾で測定した。また、組織学的にはHE, Elastica-Vangieson, Alcian Blue, Colloidal Iron, Sudan IIIなどの染色のほか、組織化学的にAlkaline PhosphataseはBurstoneらの方法⁹⁾、Acid PhosphataseはBarkaらの方法¹⁰⁾、 β -GlucuronidaseはHayashiら¹¹⁾の方法、5'-NucleotidaseはWachsteinの方法¹²⁾により酵素活性の局在を検討した。

結 果

血清C値はC欠乏群で対照より有意の低下がみられ、非顕性C欠乏状態にあることを示し、血清脂質ではとくに中性脂肪は有意の上昇がみられたが予期したほどの高脂血症はみられなかった(Table 1)。C欠乏群の大動脈はFig.1に示すごとく、内膜の線維性肥厚、中膜における弾力線維の蛇行、石灰沈着を伴う中膜病変がみられ、この部にAlcian BlueやColloidal Iron反応によりムコ多糖類の沈着が、Sudan III染色で内膜と中膜の病変部に脂質の沈着がみられた。これらの変化は主として弓部、胸部などのProximal Portionにみ

Table 1 Contents of blood ascorbic acid and serum lipids.

	Number of Animals	Ascorbic acid mg%	Cholesterol mg%	Triglyceride mg%
Vit. C Def.	8	0.39 $\pm$ 0.08	110 $\pm$ 18	104 $\pm$ 19
Control	8	0.78 $\pm$ 0.13	101 $\pm$ 17	88 $\pm$ 12

*名古屋市立大学医学部第1内科学教室

られ、腹部大動脈にはほとんどみられなかった。一部のC欠乏動物では冠動脈にも硬化性の変化を認めた。大動脈の Cholesterol, Triglyceride 含量も Table 2 のごとく大動脈弓部に高値であった。このように非顕性C欠乏状態により動脈硬化性変化がみられたことから、大動脈の数種の Hydrolase 活性について検討したが、Esterase, Lipase は大動脈弓部に対照と比べ有意の活性上昇がみられた。

Alkaline Phosphatase は組織化学的に内膜に活性の局在をみたが、対照群とその染色性に差はなく、Homogenate についても対照と差を認めなかった。また、Sigma 法による Acid Phosphatase はC欠乏モルモットの大動脈弓部に強い活性がみられ、Barka らの方法による組織化学的検索ではC欠乏群と対照群ともに内膜に陽性所見を認めたが、C欠乏群の方が強染した。しかし中膜病巣部

Fig. 1 A; Aortic lesion induced with chronic covert ascorbic acid deficiency. Elastic-Van-Gieson staining ($\times 100$).
B; Lipid deposits in the intima and calcified lesion in the media of the aorta from the deficient. Sudan III staining ($\times 100$).

に酵素活性は認めなかった。β-Glucuronidaseは全大動脈の Homogenate を用いて活性を測定したが、C欠乏動物の大動脈に有意に高い活性を認め、組織化学的には中膜病変部に強い活性がみられた。5'-Nucleotidasは大動脈弓部、胸部に高値を示し、組織化学的には中膜の病変部、および内膜に強い活性がみられた。

考 案

C欠乏により予期したほど著しい高脂血症はみられなかったが、血清脂質の上昇がみられた。C欠乏時の脂質の上昇には Lipoprotein Lipase 活性の低下¹⁾、肝での Cholesterol Cyclohexan Ring の Hydroxylation の障害による胆汁酸への排泄障害¹³⁾、副腎からの Cortisol の放出¹⁴⁾ による影響などが関与していると考えられる。大動脈の病変は

Cが生体内の Hydroxylation に関与していることから、Collagen, Elastin の変化も大きな役割をなすと考えられるが、組織学的にC欠乏動物の大動脈に線維化がみられ、大動脈の総 Hydroxyproline 量に著しい差がなかったこと¹⁵⁾ から実験条件での非顕性C欠乏では著しい Collagen の生成障害はなかったと考えるが、アミノ酸構成などの質的な変化についてはさらに検討を必要とする。また、C欠乏、特に動脈病変のみられる場合に大動脈の総ムコ多糖類量は増加がみられる¹⁵⁾。C欠乏時には大動脈内皮細胞の間隙離開がみられ、血漿成分の血管壁への浸潤の亢進があると考えられる。その結果として Ca イオンの存在下にリボ蛋白・酸性ムコ多糖類の不溶性複合体を生じて血管壁に沈着するのではないかと考える。C欠乏時の酸性ムコ多糖類の質的变化あるいはその調節因子

Table 2 Lipids content and hydrolase activities in the aorta.

	Number of Animals	A O R T A		
		Arch	Thoracic	Abdominal
CHOLESTEROL				
Deficient	8	0.73±0.23*	0.38±0.13	0.69±0.24
Control	8	0.38±0.15	0.45±0.16	0.53±0.25
TRIGLYCERIDE				
Deficient	8	0.72±0.41*	0.27±0.11	0.52±0.30
Control	8	0.24±0.10	0.31±0.15	0.32±0.11
ESTERASE: β-naphthol μg/mg N/hr.				
Deficient	9	102 ± 36*	66 ± 24	62 ± 24
Control	9	39 ± 17	68 ± 36	35 ± 14
LIPASE: β-naphthol μg/mg N/hr.				
Deficient	9	43 ± 23*	25 ± 9	28 ± 18
Control	9	16 ± 9	20 ± 7	20 ± 16
ALKALINE PHOSPHATASE: mMol p-nitrophenol/mg N				
Deficient	8	0.62±0.41	0.61±0.24	1.11±0.75
Control	7	0.56±0.23	0.98±0.41	0.84±0.43
ACID PHOSPHATASE: mMol p-nitrophenol/mg N				
Deficient	7	5.46±1.28*	3.29±1.26	3.59±2.12
Control	6	2.37±1.21	3.44±1.22	2.97±2.23
5'-NUCLEOTIDASE: μg P/mgN				
Deficient	7	41.51±22.22	43.64±29.07	50.62±31.76
Control	7	31.10±14.74	29.94±16.38	41.48±30.97
BETA-GLUCURONIDASE: μg p-nitrophenol/gm/hr. In whole Aorta.				
Deficient	7	407±98*		
Control	7	220±45		

* Significant difference by P<0.01

Fig. 2 Supposed mechanism of atherosclerosis with ascorbic acid deficiency.

については検討中である。血管壁の Esterase は短鎖脂酸を, Lipase は長鎖脂酸の水解に関与し⁵⁾, β -Glucuronidase は酸性ムコ多糖類の分解に関与するとされている¹⁶⁾。また Alkaline および Acid Phosphatase の意義については不明な点が多いが, 活性の増加は結合組織代謝の亢進を示すとも考えられている。5'-Nucleotidase は組織への石灰沈着に関与するとも考えられている¹⁷⁾。これらの酵素活性の変化は血管壁への脂質の浸潤, ムコ多糖類の増加など動脈硬化性変化に対する反応性の変化とも考えられるが, これらの Hydrolase が Lysosomal Enzyme であることから, 血管壁の自己融解が動脈硬化症の引金になりうるとも考える。C 欠乏による Lysosome 膜の脆弱性との関連は今後さらに検討を必要とするが, われわれは C 欠乏により惹起される動脈硬化の機序を Fig. 2 のごとく考えている。

ま と め

モルモットを非顕性 C 欠乏状態で 8 週間飼育することにより大動脈に内膜の肥厚, 中膜に石灰沈着を伴う硬化性病変がみられた。これらの変化は主に弓部, 胸部大動脈にみられ, 脂質の沈着を伴う。大動脈の Lipase, Esterase, Acid Phosphatase, 5'-Nucleotidase, β -Glucuronidase 活性の上昇がみられた。ヒトもモルモットと同様に L-Gulonolac-

tone Oxidase を欠き, 非顕性 C 欠乏状態が存在すると考えられ, 動脈硬化の成因にモルモットと同様の機序が働くのではないかと考えている。

(本研究の一部は代謝異常治療研究基金によった)

文 献

- 1) 藤浪隆夫, 岡戸洪太, 中野佐上, 中山広一, 樋口礼治, 佐久間長彦, 林 勝彦: ビタミン C 欠乏による動脈硬化症。動脈硬化, 2: 113 (1974)。
- 2) Rose J.H., Kuether C.A.: The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. J. Biol. Chem., 17: 399 (1943)。
- 3) 吉川春寿: 塩化鉄法による血清総コレステロールの定量法の検討。医学のあゆみ, 33: 375 (1960)。
- 4) Van Handle, E., Zilversmit, D.B.: Micromethod for the determination of serum triglyceride. J. Lab. Clin. Med., 50: 152 (1959)。
- 5) Maier, N., Haimovici, H.: Metabolism of arterial tissue with special reference to esterase and lipase. Proc. Soc. Exp. Biol., 118: 258 (1965)。
- 6) Sigma Chemical Co., St Louis, Mo. The colorimetric determination of phosphatase. Tech. B., 11: 104 (1961)。
- 7) Kirk, J.E.: The 5'-nucleotidase activity of human arterial tissue in individual of various ages. J. Gerontol., 14: 288 (1959)。
- 8) 榊屋富一, 延永 正, 加藤堅一: β -Glucuronidase の臨床。最新医学, 16: 70 (1961)。
- 9) Burstone, M.S.: Histochemical comparison of naphthol As-phosphates for the demonstration of phosphatases. J. Nat. Cancer Inst., 20: 601

- (1953).
- 10) Barka, T., Anderson, P.J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 741 (1962).
 - 11) Hayashi M., Nakajima Y., Fishman W.H.: The cytologic demonstration of β -glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin. *J. Histochem. Cytochem. Cytochem.*, **12**: 293 (1964).
 - 12) Wachstein, M.: Histochemical staining reactions of the normally functioning and abnormal kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**: 246 (1955).
 - 13) Ginter E., Babala J., Cerven J.: The effect of chronic hypovitaminosis C on the metabolism of cholesterol and atherogenesis in guinea pigs. *J. Atheroscler. Res.*, **10**: 341, (1969).
 - 14) 中野佐上, 千田勝二, 中山広一, 樋口礼治, 林勝彦, 佐久間長彦, 岡戸洪太, 藤浪隆夫: ビタミンC欠乏による動脈硬化症の研究, とくに副腎機能の変化について. 第16回日本老年病学会総会発表(1974).
 - 15) 樋口礼治, 佐久間長彦, 林勝彦, 中野佐上, 中山広一, 岡戸洪太, 藤浪隆夫, 岸川基明: 動脈硬化症に関する研究 第8報. 日循誌, **38**: 577, (1974).
 - 16) Zemlenyi, T.: Vascular enzymes and the relevance of their study to problems of atherosclerosis. *Med. Clin. North. Am.*, **58**: 293 (1974).
 - 17) Lutner, R.F., Wexler, B.C.: 5'-Nucleotidase activity in aortas of arteriosclerotic breeder rats. *Atherosclerosis*, **11**: 495 (1970).

質問 中村元臣 (九大循環器内科)

中膜変化は Vitamin C 欠乏によるものですか、それとも自然発生というか原因不明のものによると考えておられるのでしょうか。

回答 藤浪隆夫

中膜の病変は Spontane に動物にみられる動脈硬化の病変に似ていますが、対照群にはほとんど中膜病変の出現をみないのに対し、C欠乏群2週では出現しませんが、4週で16%、8週で66%にみられ、このような硬化性病変の出現にはC欠乏が関与しているものと考えます。

質問 沼野藤夫 (東医歯大3内科)

1) In vitro で血管壁代謝に対する直接影響を知らなかったことがありましたら御教示下さい。

回答 藤浪隆夫

Hydroxylase に対するビタミンの C の vitro における影響については検討していません。

質問 折茂 肇 (都養育院病院)

Vitamin C は collagen の maturation に関係していることが知られていますが、C欠乏モルモットでの aorta の collagen, elastin 代謝には変化が

ないでしょうか。

回答 樋口礼治

C欠乏8週における動脈壁の Hydroxyproline 量,あるいは Collagen の Cross Linkage に関与すると考えられる血清 MAO 値では差がなく、実際に用いた非顕性のC欠乏状態では collagen の生成に大きな障害はないと考えますが、さらに詳細な検討が必要と考えます。

質問 中島輝之 (久留米大病理)

1) 中膜障害がかなり強く石灰沈着がはっきりするようですが、これについてどうお考えですか。

2) 内皮の細胞間構造について検討なさっておられたらお教え下さい。

回答 藤浪隆夫

1) C欠乏モルモットには中膜に石灰沈着を認めます。その機序には副腎内カテコールアミン量あるいは尿中へのカテコラミン排泄量からみて、少なくともカテコラミンは関与しないものと考えます。

2) 先回の本学会に発表したごとく、C欠乏により内皮細胞間隙の離開がみられます。

Summary

Experimental Atherosclerosis with Chronic Covert Ascorbic Acid Deficiency

—with Special References to Hydrolase—

Takao FUJINAMI, Kota OKADO, Katsuji SENDA, Sagami NAKANO, Reiji HIGUCHI,
Koichi NAKAYAMA, Katsuhiko HAYASHI and Nagahiko SAKUMA

First Divison, Department of Internal Medicine,
Nagoya City University Medical School, Nagoya 467

Since vitamin C, ascorbic acid is essential for maintenance of the architecture and connective tissue metabolism of the aorta, the effects of chronic covert vitamin deficiency on serum lipids and the aorta were studied.

Male guinea pigs weighing about 300 grames were fed with scorbutic diet and supplemented 5mg of vitamin C twice a week to protect overt ascorbic acid deficiency. The control were fed with the same diet and administered 50mg of the vitamin on every other day. At the end of 8 weeks feeding, the animals were sacrificed after 24 hours fasting. Serum triglyceride was elevated in the deficient as compared with the control. In 66% of the deficient, white patchy plaques were observed in the arch and proximal portion of the aorta. Microscopic examinations

revealed that the lesions were composed of fibrous thickening of the intima with lipid accumulation and degenerative changes in the middle of the media accompanied by deposits of lipids, mucopolysaccharide and calcium as shown in Fig.1. Chemical determination and histochemical demonstration of hydrolases activities in the aorta revealed elevated activity of esterase, lipase, acid phosphatase and β -glucuronidase in the proximal portion of the aorta (shown in table 2).

These findings suggest that chronic ascorbic acid deficiency is a contributing factor in atherogenicity as shown in Fig.2.

Key words: Ascorbic Acid Deficiency, Experimental Atherosclerosis, Hydrolase