

Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平田, 佳宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1504

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 227号	学位授与年月日	平成 7年12月22日
氏名	平田佳宏		
論文題目	<p>Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery (光増感反応による血栓モデルを用いたモルモット大腿動脈の実験的内膜肥厚の研究)</p>		

博士(医学) 平田佳宏

論文題目

Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery

(光増感反応による血栓モデルを用いたモルモット大腿動脈の実験的内膜肥厚の研究)

論文の内容の要旨

動脈硬化の成立過程において内膜肥厚は重要な位置を占めており、そのメカニズム解明は大きな課題である。この課題に答えるためには実験モデルが必要不可欠である。現在、内膜肥厚の実験モデルには物理的に擦過により内皮細胞のみでなく中膜に傷害を与えてできるタイプとの内皮細胞に損傷を与えてできるタイプがあり性質が異なることが示唆されており、後者のタイプの実験モデルに物理的に内膜のみを傷害することの困難さなどいくつかの問題点がある。本研究は内皮細胞を特異的に傷害することにより新しい内膜肥厚モデルを開発することを目的とした。つまり、ローズベンガル色素 (RB) と540 nmの波長の緑色光の光増感反応 (PIT法) を用い発生した活性酸素により内皮細胞を特異的に傷害しその部位に内膜肥厚を惹起し得るかどうかが、併せて、惹起しえるとすればその肥厚の性質はどのようなものかを考察したものである。

モルモット大腿動脈に PIT 法、つまり RB (10mg/kg) を静脈内投与し動脈の血流をレーザードップラー法により測定しながら直径3 mmのプロープ先端より緑色光を約7分間照射し血栓を形成させ30分間その状態に保った。血栓形成部位の内弾性板は組織学的検索により正常に保たれていた。その後、血栓を組織プラスミノゲンアクチベータ (3 mg/kg) を30分かけて静脈内投与することにより溶解した。血栓溶解部位の血管を1、3、6および9週後に採取し組織学的に観察した。その結果、1週後より内膜肥厚が起り始め、その断面積は3週後にプラトーに達した。

一方、中膜の断面積には観察期間中変化はみられなかった。新生した内膜の細胞を特定するために平滑筋の抗アクチンモノクローナル抗体を用いて検討した結果、免疫組織化学的染色から平滑筋細胞の存在が示唆された。

血栓形成部位の平滑筋細胞の増殖の動態を知るためプロモデオキシウリジン (30mg/kg) およびフルオロデオキシウリジン (3 mg/kg) を腹腔内に投与し DNA を標識し検討したところ、血栓溶解48時間後の動脈中膜で細胞が標識され1週後ではそれら標識細胞が内腔側に確認された。この結果は血栓溶解後48時間以内に内膜の平滑筋細胞が増殖を開始し、1週間以内に内腔側に遊走することを示唆していると考えられた。また、平滑筋細胞の増殖能を検討した結果、血栓溶解後1週後の新生内膜では細胞増殖が活発であるが3週後では内膜の増殖能は低下していた。

本モデルにおいて内膜肥厚に対する薬物の影響を知るためにアンギオテンシン変換酵素阻害薬であるシラザプリルを用いて検討した。シラザプリル (30mg/kg/day) の3週間の経口投与により新生内膜の面積は30%抑制され、本モデルの内膜新生にアンギオテンシンIIの関与が示唆された。

以上の結果から、PIT法を用い物理的刺激を与えずに内皮細胞を傷害し内膜肥厚を惹起する著者らの新しいモデルは血栓形成→中膜平滑筋の増殖開始→増殖した平滑筋の内腔側への遊走→新生内膜の増殖という一連の過程をたどることが示唆された。これらの知見から著者らの新しいモデルは肥厚に至る一連の過程の研究やその阻害薬の開発に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、冠動脈狭窄に対し PTCA による治療が広く行われているが重要な問題として内膜肥厚による再狭窄がある。現在、この内膜肥厚の実験モデルとしては物理的な方法としてバルーン法やナイロン線維による擦過法などがある。前者は内皮障害のみならず中膜に傷害を与え、後者は内皮傷害のみを起し得るが技術的な困難さを伴っている。

申請者は無侵襲的に新しい内膜肥厚モデルを開発する目的でローズベンガル色素 (RB) と 540 nm の波長の緑色光の光増感反応 (PIT 法) を用い一重項酸素を発生させ、それにより内皮細胞を特異的に傷害できる方法 (PIT 法) を応用し、その部位に内膜肥厚を惹起出来ることを証明した。また、このモデルを用い内膜肥厚の病態を解析した。

[対象及び方法]

実験の内容はモルモットの大腿動脈に PIT 法にて血栓を形成させ 30 分後に組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) を投与し血栓を溶解した。そして血栓溶解部位の血管を 1、3、6 及び 9 週後に観察した。血栓形成部位の平滑筋細胞の増殖・動態をみるため Br-及び F-デオキシウリジン腹腔内に投与し DNA を標識し S 期細胞の動態を解析した。

このモデルを用いたアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬であるシラザプリルの内膜肥厚抑制効果を検討した。

[結果]

1) PIT 法は内皮細胞傷害と血栓形成を惹起するがその部位の内弾性板は病理組織学的に正常であった。1 週後より内膜肥厚が起り始め 3 週後にプラトーに達した。中膜の断面積は変化しなかった。新生内膜内には抗平滑筋アクチン抗体、HHF-35 による免疫組織学的染色から平滑筋細胞の存在が示唆された。

2) 血栓溶解 48 時間後の動脈中膜で細胞の DNA が標識され、1 週後にはそれらが内膜側に観察された。平滑筋細胞の増殖能は 1 週後の新生内膜では活発であるが 3 週後では低下していた。

3) シラザプリルの 3 週間経口投与により新生内膜の面積は 30% 抑制された。

[結論]

PIT 法による内皮細胞傷害→血栓形成→中膜平滑筋の増殖→増殖した平滑筋の内腔側への遊走→新生内膜の増殖という一連の過程をたどることが示唆された。また、これらの過程が ACE 阻害薬であるシラザプリルにより阻止されることを証明した。

申請者らの新しいモデルは動脈硬化における内膜肥厚の研究や阻害薬の開発に有用であり、シラザプリルは再狭窄予防に有用な薬物であることも示されて、評価に値するとされた。

審査の過程において委員会は本論文の研究関連の領域について次のような質問を行った。

方法について

- 1) 産生された一重項酸素が照射域下流の血管内皮傷害を惹起しないか
- 2) ACE 阻害薬の経口投与法は Ad-Lib か、強制経口投与か
- 3) 血栓溶解に用いた tPA の濃度は適切か

4) モルモット大腿動脈を用いた理由、並びにその血管の内膜と血小板の特徴

関連事項について

- 1) シラザプリルは細胞増殖とマトリックス形成のどちらに有効に作用するのか
- 2) シラザプリルは何故、内膜肥厚を予防するのか
- 3) PTCR 後再肥厚の発症頻度
- 4) 他の ACE 阻害薬との比較
- 5) 他の血栓溶解剤 (scu-PA, スタフィロキナーゼ) と tPA の比較

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も充分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 馬 場 正 三

副査 副学長 山 崎 昇 副査 教授 吉 田 孝 人

副査 助教授 浦 野 哲 盟 副査 助教授 林 秀 晴