

マウス冠状動脈炎部の拡張ならびに瘤形成機序に関する検討

(平成12年3月28日受付)

(平成12年10月11日受理)

東邦大学医学部附属大橋病院病理解剖学講座

大原関利章 高橋 啓 若山 恵 渋谷 和俊
山田 仁美 村田 久雄 直江 史郎

key words : Kawasaki disease, *Candida albicans*, vasculitis, pathology, aneurysm

要 旨

川崎病における冠状動脈瘤形成機序を理解する目的で、川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける瘤形成や拡張の有無、動脈拡張に関与する因子について病理組織学的検討を試みた。川崎病罹患児糞便から分離された *Candida albicans* より菌体抽出物を作製しマウス腹腔内へ接種、起始部を含む冠状動脈の連続切片を作製した。連続切片上で冠状動脈内径を計測し、動脈炎が認められた「動脈炎群」と冠状動脈炎の認められなかった「対照群」との間で内径値を比較した。その結果、動脈炎群では、冠状動脈起始部近傍に円筒状拡張が生じていることが確認された。さらに動脈拡張には、動脈炎に起因する内・外弾性板の断裂や中膜平滑筋細胞の消失による動脈壁の脆弱化が組織学的因子として関与している可能性が示唆された。

はじめに

川崎病¹⁾では、冠状動脈炎に基づく拡張性病変がしばしばみられる。これらは時に動脈瘤に至り、この血栓性閉塞による虚血性心疾患が、本症罹患児死因の大部分を占めている²⁾⁻⁴⁾。

一方、村田ら⁵⁾⁻⁷⁾は川崎病罹患児糞便より分離培養した *Candida albicans*(以下、*C. albicans*)菌体抽出物をマウス腹腔内に接種し、形態学的に川崎病の冠状動脈炎にきわめて類似する動脈炎を作することに成功した。我々は川崎病冠状動脈病変のモデルとしての確立を目指し、本実験系を用いて様々な検索を続けている。しかし、冠状動脈瘤形成や拡張の有無を単なる組織学的検索のみで確認することはマウスの様な小動物では困難であり、血管径計測に基づく詳細な検討が必要と考えてきた。これに対して、*Lactobacillus casei* を用いマウス冠状動脈炎を作製した Lehman⁸⁾⁹⁾をはじめとする従来の報告¹⁰⁾¹¹⁾では動脈瘤形成について言及してはいる

ものの、それらは単なる組織学的観察のみで感覚的に瘤形成ととらえているに過ぎなかった。そこで、本実験系の冠状動脈炎部における動脈瘤ないし動脈拡張の有無を形態学的に確認する為、冠状動脈の連続切片を作製し動脈径の計測を行った。さらに、動脈拡張に関わる組織学的諸因子について検討を加えた。

材料と方法

1. 使用動物

雄性 CD-1 マウス(4週齢, Charles River Japan 社, 厚木, n=11)を用いた。

2. *C. albicans* 菌体抽出物の作製

川崎病罹患児糞便から分離した *C. albicans* (MCLS-6) をサブロー 2% グルコースブイヨンにて 37℃, 72 時間静置培養。遠心分離し集菌後、菌体成分を 0.5 M KOH で抽出した。これを中和後、蒸留水で透析し、濃縮。エタノールを添加し析出させ、洗浄、乾燥し白色粉末状の物質を得た。本菌体抽出物を PBS に懸濁し 20 mg/ml となるように調製して実験に用いた。

3. 接種方法

懸濁液を 1 回当たり 0.2 ml (菌体抽出物 4 mg 相当) ずつ実験第 1 週および第 5 週にそれぞれ連続 5 日

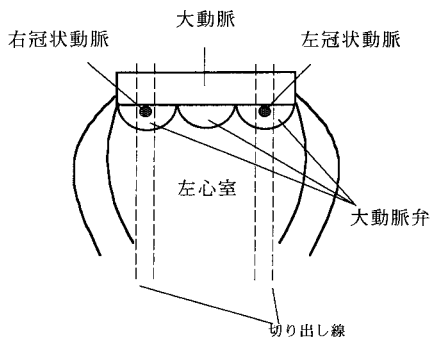


図1 冠状動脈の切り出し

左室前壁で左室から大動脈にわたる縦切開を加え、左室を開いた状態でホルマリン固定。実体顕微鏡下で冠状動脈起始部を確認しながら長軸方向に切り出した。

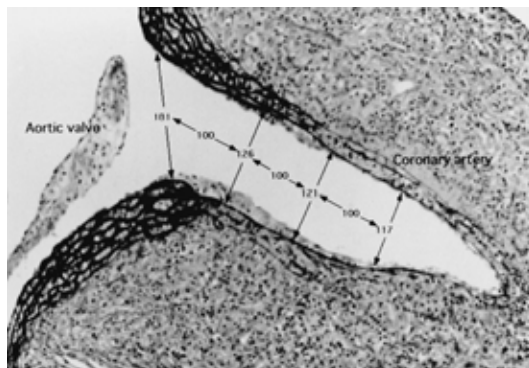


図2 冠状動脈内径計測方法

EvG染色を施した標本を用いて、冠状動脈起始部から100 μm毎に内弾性板と内弾性板との距離を計測した。

間マウス腹腔内に接種した。

4. 病理組織標本作製

第9週に心臓採血にて屠殺し、直ちに剖検。心臓を摘出し、左室前壁で左室から大動脈にわたる縦切開を加え、心臓を開いた状態で10%ホルマリン液にて固定した。血管径計測に際しては、血管を灌流固定あるいは加圧固定して検索するのが一般的であるが、川崎病剖検例や他の川崎病動脈炎モデル⁸⁾⁻¹¹⁾ではこれらの固定法が行われていないことから、本研究においても意識的に日常の固定法で処理することとした。また、動脈径と同時に冠状動脈起始部からの距離を正確に計測できるようにする為、実体顕微鏡下で冠状動脈起始部を確認しながら冠状動脈を長軸方向に切り出した(図1)。型の如く脱水、包埋し、起始部を含む厚さ4 μmの連続切片を作製してHematoxylin-eosin染色(HE)、elastica van Gieson染色(EvG)を交互に施した。

5. 病理組織学的検討

動脈炎発生の認められなかった5匹のマウスから得られた冠状動脈のうち、連続性の追跡が可能であった6本(左冠状動脈2本、右冠状動脈4本)を「対照群」とし、冠状動脈各部位の正常構造を観察した。一方、6匹のマウスから得られた7本の冠状動脈(左冠状動脈2本、右冠状動脈5本)では動脈炎発生がみられ、これらを「動脈炎群」とした。動脈炎群では、内膜、内弾性板、中膜、外弾性板、外膜等の血管構築の障害の程度と同部に出現した浸潤細胞の詳細について検討した。

6. 冠状動脈径の計測

EvG染色を施したすべての切片上で冠状動脈起始部から100 μm毎に心筋層内に入るまでの冠状動脈径を以下のように計測し両群間で比較した。すなわち、冠状動脈各部位における内弾性板と対側の内弾性板との距離を画像解析装置(BILD/2D, Computer Build社)を用いて計測し(図2)、同一部位における最大の計測値をもって「内径値」とした。また、検索に際し「冠状動脈起始部」とは、大動脈から冠状動脈への移行部で大動脈の中膜弾性線維が急激な屈曲を示す部位と定義した。

次に、マウス個体差や冠状動脈の左右差を除外するため、冠状動脈起始部内径値に対する各計測部内径値の比(各計測部内径値/起始部内径値)を「内径比」とし、相対的な内径の変化について両群間で比較検討した。

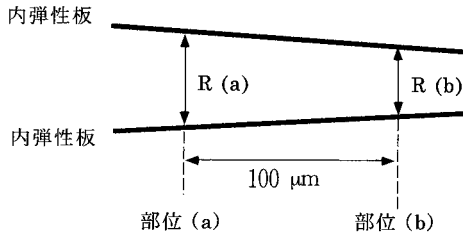
7. 内径変化率

動脈炎群において、隣接する2カ所の内径の変化の割合を以下の計算式で求め、前後2点間における拡張、狭小化の程度をより詳細に検討した。

内径変化率 = [(部位(a)における内径値) - (部位(a)より100 μm末梢部位(b)における内径値)] / (部位(a)における内径値) (図3)。

さらに、各計測部位の内径変化率と病理組織学的所見、特に血管拡張に大きく関与すると思われる、

- (a) 内弾性板の断裂、
- (b) 中膜平滑筋細胞の消失、
- (c) 外弾性板の断裂、
- (d) 外膜の高度の炎症細胞浸潤、



$$\text{内径変化率} = \frac{R(a) - R(b)}{R(a)}$$

図3 冠状動脈内径変化率

との関連を検討した。

成 績

1. 病理組織学的所見

対照群では、内膜は1層の内皮細胞と僅かな線維で構成され、内膜肥厚は認められなかった。大動脈にみられた十数層の中膜弾性線維は、冠状動脈起始部で急激にその数を減じ、冠状動脈の内弾性板ならびに外弾性板へと移行していた。中膜には1層から数層の平滑筋細胞の規則的な配列がみられた(図4)。

一方、動脈炎群では好中球、組織球、リンパ球を主とする炎症細胞浸潤が冠状動脈全層に及ぶ汎動脈炎の像が認められた。特に上記の炎症細胞浸潤と共に、内膜は細胞線維性に肥厚していた。内弾性板は伸展されるが、その多くは確認可能で、断裂は一部に限局してみられたにすぎなかった。中膜では平滑筋細胞が減少、消失していたが、浸潤した炎症細胞のためむしろ肥厚してみえた。なお、炎症細胞浸潤の高度な部位では、著しい外弾性板の断裂が認められた。外膜では、著明な炎症細胞浸潤をみる一方で、線維の増生も観察された(図5)。以上の変化は冠状動脈起始部でより顕著であるものの、心筋層外の冠状動脈全域にわたりびまん性に認められた。また、検索した7本の冠状動脈中3本では軽度ないし中等度のフィブリノイド壊死を伴っていた。

2. 内径値および内径比

内径値は動脈炎群、対照群ともに起始部から末梢に向かい漸減していた。両群共に動脈瘤を思わせる著明な限局性拡張は認められなかった。しかし、動脈炎群の内径値は全計測部位で対照群のそれよりも大きな値を示した(図6)。一方、内径比も動脈炎群の方が対照

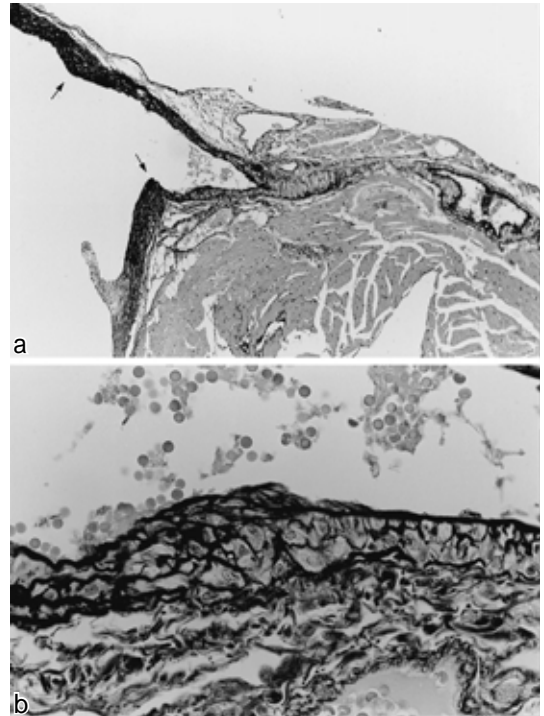


図4 対照群冠状動脈組織像

(a) 対照群冠状動脈, ×100 EvG染色
冠状動脈内径は起始部近傍で急激に減少し、心筋層内へ移行する。冠状動脈起始部を矢印で示す。
(b) 対照群冠状動脈, ×400 EvG染色
冠状動脈起始部では、大動脈から移行した中膜弾性線維が徐々に減少し、内弾性板および外弾性板に移行する。中膜には2~3層の平滑筋細胞の配列が認められる。

群よりも全ての部位で高値であった(図7)。特に、起始部近傍に着目した場合、対照群の冠状動脈は起始部から300μmの部位で内径比が 0.25 ± 0.12 (mean ± SD), つまり起始部内径のほぼ1/4の太さにまで急激に細くなり、これよりも末梢では緩徐に細くなるのに対して、動脈炎群では300μmを経てもなお 0.6 ± 0.12 の太さであり、起始部近傍における狭小化の程度は有意に軽度であった($p < 0.01$)。冠状動脈起始部近傍の血管拡張について模式化した図を示す(図8)。

3. 内径変化率

動脈炎群において冠状動脈各部位の内径変化率と病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、(a) 内弾性板の断裂がある場合の内径変化率は 0.06 ± 0.04 であるのに対し、断裂がない場合には 0.16 ± 0.11

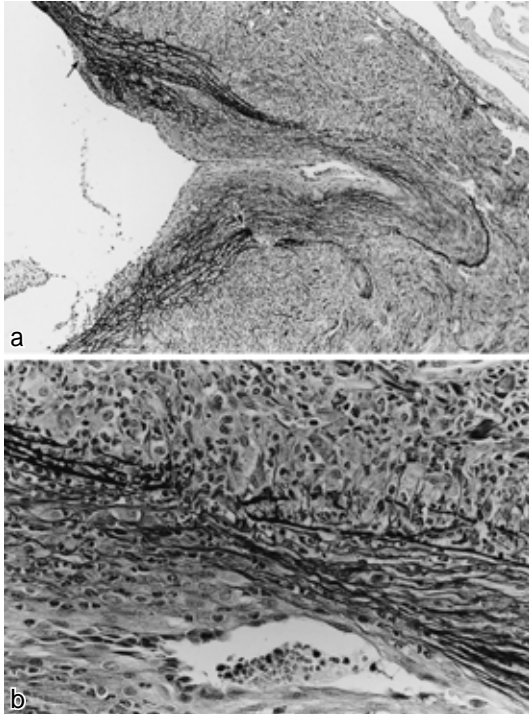


図5 動脈炎群冠状動脈組織像

(a) 動脈炎群冠状動脈, $\times 100$, EvG 染色

心筋層外冠状動脈に全層性汎血管炎が認められ, 内径は円筒状に拡張. 内膜の細胞線維性肥厚による内腔狭窄と内, 外弾性板の不規則な断裂がみられ, 外膜には炎症細胞浸潤と共に線維増生が認められる. 冠状動脈起始部を矢印で示す.

(b) 動脈炎群冠状動脈, $\times 400$, EvG 染色

好中球, 組織球, リンパ球浸潤が全層性にみられ, 内弾性板の一部断裂や外弾性板の不規則な断裂が認められる. 中膜の平滑筋細胞の消失がみられる.

であった. 以下, 順に内径変化率は, (b) 中膜平滑筋細胞の消失あり: 0.13 ± 0.09 なし: 0.19 ± 0.11 (c) 外弾性板の断裂あり: 0.10 ± 0.07 なし: 0.20 ± 0.11 (d) 外膜の高度な炎症細胞浸潤あり: 0.16 ± 0.11 なし: 0.18 ± 0.11 であった(図9). 以上のことから外弾性板の断裂, および中膜平滑筋細胞の消失がみられた部位で内径変化率は有意に低値を示し($p < 0.05$), 内弾性板の断裂がみられた場合に内径変化率は小さくなる傾向にあった. すなわち, これらの形態学的変化がある場合に拡張性変化が生じるといえる. しかし, 外膜の高度の炎症細胞浸潤の有無と内径変化率との間に明らかな関連性は認められなかった.

考 案

川崎病は, 系統的に血管炎が存在することがわかっており, 中でも冠状動脈炎に基づく動脈瘤形成が特徴的である. 我々は長年, 川崎病剖検例の病理組織学的検討を続ける一方で, 村田らが開発した *C. albicans* 菌体抽出物によるマウス系統的動脈炎モデルを用い様々な検討を行っている. 本動脈炎モデルでは, 川崎病と同様に冠状動脈が最も高頻度に侵襲され, この他に低頻度ながら腎動脈や精巣周囲の動脈, 腹部大動脈などが侵襲される. これらの動脈炎は組織学的に川崎病と極めて類似する増殖性肉芽腫性炎の像を呈する. しかし, 冠状動脈瘤あるいは拡張の有無について一枚の標本の単なる組織学的検索のみで言及することは, マウスの様な小動物では困難であり, 病変部血管径の計測に基づく詳細な検討が必要と考えてきた. *Lactobacillus casei* を用いマウス冠状動脈炎を作製した Lehman をはじめとする従来の報告では動脈瘤形成について言及してはいるものの, それらは単なる組織学的観察のみで感覚的に瘤形成ととらえているに過ぎなかった. そこで我々は, 本動脈炎モデルの病変部における冠状動脈瘤ないし拡張性変化の有無を確認する為, 冠状動脈の連続切片を用い, 動脈径計測に基づく詳細な検討を試みた. さらに, 拡張に関わる組織学的因子について検討を加えた.

血管径計測に際しては, 血管を灌流固定または加圧固定した上で, 血管が輪切りになるように標本作製する方法が一般的に用いられる. しかし, 川崎病剖検例や冠状動脈拡張をみたとされる他の川崎病動脈炎モデルの報告においてはこれらの固定法が行われていないことから, 今回の検討は日常の固定法で行うこととした. また, マウスの様な小動物で血管が輪切りになるように標本作製した場合, 血管径の計測は可能であっても冠状動脈起始部からの距離を正確に計測することは非常に困難となる. そこで, 本研究では冠状動脈を長軸方向に切り出し, その連続切片を作製することで内径と同時に冠状動脈起始部からの距離も正確に計測できるようにした. この方法により冠状動脈起始部からの連続的な観察が容易となり, 拡張の有無だけでなく拡張に関与する組織学的な因子についても検討することが可能となった.

実験の結果, 動脈炎群では明らかな瘤形成は認められないものの冠状動脈起始部から続く円筒状の拡張が生じていることが明らかとなった. 拡張が確認された部分では, 好中球, 組織球, リンパ球を主体とする汎

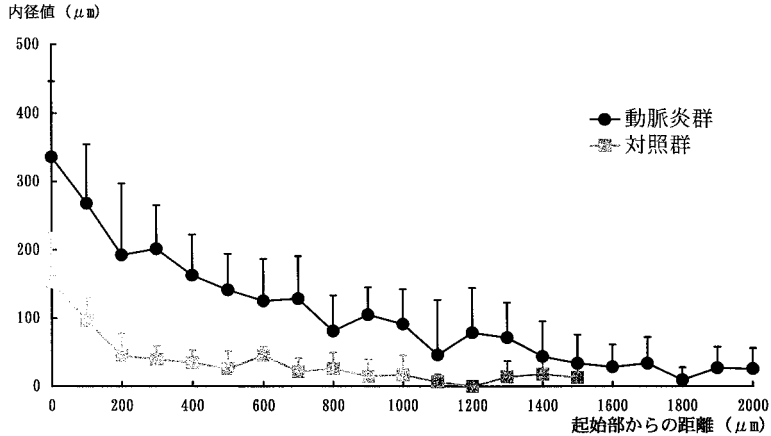


図6 冠状動脈内径平均値

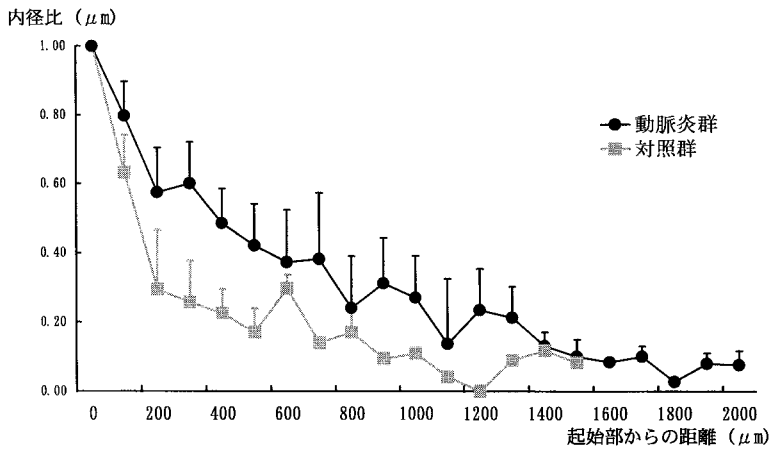


図7 冠状動脈内径比

動脈炎を呈しており、内弾性板の伸展と一部断裂、中膜平滑筋細胞の減少や消失、そして外弾性板の著明な断裂がみられた。また、外膜には著明な炎症細胞浸潤がある一方で線維の増生を認めた。以上の変化は心筋層外の冠状動脈全域に亘って観察された。

次に、隣接する2点の内径変化率を検討した。変化率がマイナスを示した場合は、末梢側が中枢側よりも太く、拡張性変化が存在することを意味し、プラスであった場合には、変化率が小さい程、冠状動脈狭小化の程度が軽度、つまり内径がそのまま保たれるということの意味する。今回の検索ではマイナス値はなかった。しかしながら、外弾性板の断裂、中膜平滑筋細胞の消失が生じていた部位の内径変化率は、これらの変化がない部位の内径変化率よりも有意に低値を示して

いた。また、内弾性板の断裂がみられた部位でも内径変化率は小さくなる傾向にあった。これらのことより本動脈炎モデルにおける冠状動脈拡張には、内外弾性板の断裂、中膜平滑筋細胞の消失による動脈壁の脆弱化が重要な因子となることが推測できた。

一方、川崎病における動脈瘤形成機序については増田ら^{(12)~(16)}の報告に詳しい。それによれば、動脈拡張は動脈の既存構築を破壊する強い汎動脈炎に起因し、特に内弾性板の離開、断裂が動脈の拡張に重要な因子になるという。また、川崎病で特徴的な「風船状拡張」と表現される嚢状動脈瘤の形成には、汎動脈炎が血管全周に及び、かつ分節状に生じることが必要である。

以上の事項をふまえ、本動脈炎誘発モデルと川崎病動脈炎との相違点について言及してみると、本モデル

でも川崎病と同様、心筋層外の冠状動脈に増殖性汎動脈炎が生じ、さらには軽度ながら動脈炎に起因する動脈の拡張がもたらされる。しかし、本モデルの拡張は起始部から連続する同心円状の円筒状拡張であり、川崎病でしばしばみられるような嚢状動脈瘤の形態をとることはなかった。拡張が軽度であった理由として本モデルでは、瘤形成に重要な因子と考えられる内弾性板の断裂が一部に限局しているのみで、そのほとんどは伸展にとどまっていること、外膜は著明な炎症細胞浸潤を認めると共に線維の増生を来しており、これが破綻に向いている動脈壁を外膜側から補強するように

働いている可能性があること等が挙げられる。さらに、血管壁にかかる張力は血管半径と血圧の積で表されるが、ヒトと比較して冠状動脈半径が小さく、血圧も低いマウスでは動脈壁にかかる張力はかなり小さいと考えられ、このことも拡張が軽度にとどまった理由のひとつであろう。また、いわゆる風船状拡張と表現される嚢状動脈瘤ではなく円筒状拡張を来した理由として、炎症が分節状ではなく心筋層外の冠状動脈の全域に亘って生じていたこと等が考えられる。さらに、冠状動脈拡張病変の発生部位も川崎病と本実験系では若干異なり、川崎病では冠状動脈病変が冠状動脈起始部よりもやや末梢から生じるのに対して、本実験系では冠状動脈起始部から始まる。この理由のひとつとして、ヒトとマウスの冠状動脈起始部における解剖学的差異を考えたい。すなわち、ヒトと比較してマウスでは弾性型動脈から筋型動脈への移行が急激に起こるため、冠状動脈起始部における中膜弾性線維が乏しく、拡張が起こりやすいものと考えられる。

結 論

C. albicans 菌体抽出物を用いたマウス動脈炎誘発モデルにおける冠状動脈拡張病変について検討した。本実験系では、川崎病にみられるような嚢状動脈瘤の形成は認められない。しかしながら、川崎病と同様の機序、すなわち動脈炎に起因する血管壁障害に基づく円筒状の拡張が生じていた。この動脈拡張には内、外弾性板の断裂と中膜平滑筋細胞の消失が関与していると推測された。マウスのような小動物においてこのような血管拡張を確認するためには単なる組織学的観察のみ

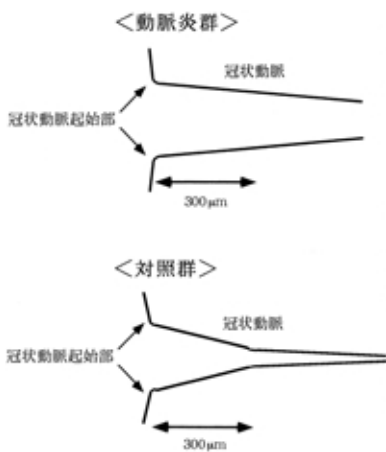


図8 冠状動脈拡張の模式図

動脈炎群では冠状動脈起始部近傍の拡張が認められる。

** p<0.01

* p<0.05

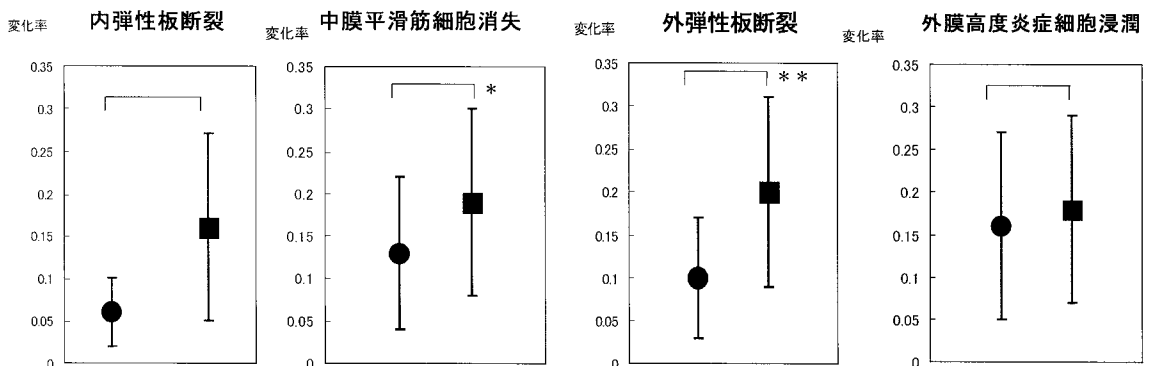


図9 内径変化率と組織学的所見

では不十分であり、血管径計測に基づく詳細な検討が必要であると考えられた。

本研究の一部は、平成9年度および11年度東邦大学医学部プロジェクト研究費(9-12, 11-45)によって遂行された。

文 献

- 1) 川崎富作：指趾の特異的落屑を伴う小児の急性熱性皮膚リンパ腺症候群(自験例50例の臨床的観察), アレルギー, 1967; 16: 178-222
- 2) 藤原兌子, 藤原久義：川崎病の死因と予後決定因子, 川崎病, 東京, 南江堂, 1988, pp 84-88
- 3) 高橋 啓, 直江史郎：川崎病の後遺症とその遠隔死亡に関する臨床病理, 病態生理, 1993; 12: 727-729
- 4) 浅地 聡, 高橋 啓, 直江史郎：川崎病, とくにその後遺病変における突然死の発生機序について, Mebio, 1990; 7: 66-71
- 5) 村田久雄：カンジダ抗原によるマウス実験的動脈炎 川崎病との関連において, 日本感染症学会誌, 1978; 52: 331-337
- 6) 直江史郎, 村田久雄, 跡部俊彦：川崎病の病因論と発症機転仮説, 真菌と川崎病, 小児内科, 1985; 17: 93-98
- 7) 跡部俊彦, 村田久雄：実験的動脈炎の発生機序に関する病理学的研究, 脈管学, 1987; 27: 625-633
- 8) Lehman TJA: Animal model of Kawasaki disease, KAWASAKI DISEASE, New York, ALAN R. LISS, INC, 1987; pp 149-157
- 9) Lehman TJA, Walker SM, Mahnovski V, et al: Coronary arteritis in mice following the systemic injection of Group B Lactobacillus casei cell walls in aqueous suspension, Arthritis and Rheumatism, 1985; 28: 652-659
- 10) Onouchi Z, Ikuta K, Nagamatsu K, et al: Coronary artery aneurysms develop in weanling rabbits with serum sickness but not in mature rabbits, An experimental model for Kawasaki disease in humans, Angiology, 1995; 46: 679-687
- 11) 吉野加津哉：川崎病モデルと考えられる実験的マウス血管炎について - その発生メカニズムと治療的試み -, Prog. Med., 1997; 17: 1765-1775
- 12) 増田弘毅, 直江史郎, 田中 昇：川崎病(MCLS)における冠状動脈の病理学的研究 特に冠状動脈炎と動脈瘤の形態発生の関連について, 脈管学, 1981; 21: 899-912
- 13) 直江史郎, 跡部俊彦, 増田弘毅, 田中 昇：川崎病 その動脈病変を中心として, 病理と臨床, 1983; 1: 1156-1166
- 14) Shiro N, Kei T, Hirotake M, et al: Kawasaki disease with particular emphasis on arterial lesions, Acta pathologica Japonica, 1991; 41: 785-797.
- 15) 高橋 啓, 増田弘毅, 直江史郎：冠動脈瘤の立体構築, 現代医療, 1993; 25: 2683-2686
- 16) 増田弘毅, 直江史郎, 田中 昇：川崎病動脈病変の三次元構築, 川崎病, 東京, 南江堂, 1988; pp 89-93

Coronary Aneurysm and Dilatation in Experimental Coronary Arteritis in Mice

Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Megumi Wakayama, Kazutoshi Shibuya,
Hitomi Yamada, Hisao Murata and Shiro Naoe
Department of Pathology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine

Kawasaki disease (KD) is the most frequently reported with systemic vasculitis in childhood. Coronary artery is the remarkably common site involved in KD, and arteritis occasionally leads to coronary dilatation or aneurysm. We have established a unique animal model of systemic vasculitis in mice, including coronary lesion, induced by an intraperitoneal injection of *Candida albicans* extract which produced from the yeast isolated from the faces of a patient with KD. This model has been accepted as the animal model of KD, because arteritis in this model resembles those in autopsy cases of KD. We have investigated pathological study about this model, however we have conceived that it is too difficult to confirm coronary dilatation or aneurysm in small animals like mice by only macroscopic and/or histological observation. Consequently we measure the caliber of coronary arteries and demonstrate the coronary dilatation. Furthermore it can be confirmed that disruption of external and/or internal elastic lamina and disappearance of smooth muscle cell of media caused by coronary arteritis may play an important role to induce coronary dilatation in this model.