

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 藤井 麻衣子

### 論文題目

Histopathological characteristics of post-inflamed coronary arteries in Kawasaki disease-like vasculitis of rabbits

### 論文内容の要旨

緒言：川崎病は主に幼児が罹患し冠動脈を含む全身性の血管炎を引き起こす疾患である。急性期に冠動脈の拡大や瘤形成がなければその病勢は一過性であると考えられていたが、患者の累積に伴い、若年成人期から虚血性心疾患の発症率が高いことが示唆されており、近年では川崎病罹患は虚血性心疾患の危険因子の一つと疑われるようになってきている。臨床検査では内膜中膜肥厚、内膜機能障害などが多数報告されているが、川崎病遠隔期の病態はほとんど明らかになっていない。そこで申請者は、遠隔期の病態を明らかにするために、馬血清による川崎病類似冠動脈炎を引き起こしたウサギモデルを用いて、思春期にあたる遠隔期の冠動脈病変の組織学的検索を試みた。

方法：1995年に尾内らが作成した、離乳期の家兎に馬血清を2回投与する方法にアジュバントを先立って加え、川崎病類似アレルギー血管炎モデルを作成した。5週齢と7週齢で2回馬血清を10ml/kg 耳静脈から注射し、2回目の注射を第0病日とした。健常コントロール群には同量の生理食塩水を静注した。5週齢の1週前に0.5mlの Freund の完全アジュバントを同量の馬血清と混和して背部に皮下注した。観察の各病日の兎に耳静脈よりペントバルビタールナトリウム(100mg/kg)の静注で全身麻酔・心停止させた後、心臓を摘出した。摘出した心臓の上行大動脈に4%パラホルムアルデヒド PBS を3分間灌流させた後、半日浸漬した。その後左右の冠動脈の起始部を切り出してパラフィン包埋を行った。4 $\mu$ mの薄切標本作製し、HE染色、EVG染色を行った。プロテオグリカンの検出には alcian blue 染色(pH 2.5)を行った。血管径、内膜中膜の壁厚を測定し、その後、内膜厚/血管径および中膜厚/血管径比を求めた。続いて $\alpha$ -SMA と VCAM-1 または NF- $\kappa$ B の二重染色を行った。免疫染色に際しては、マウスモノクローナル抗 $\alpha$ -SMA抗体を一次抗体として、ヤギ抗マウス ALP 結合抗体を添加、ニューフクシン液で発色させた。VCAM-1の染色は pH 6.0 の 10mM クエン酸緩衝液で 98°C 30 分間賦活化処理後に mouse 抗 VCAM-1 抗体を用いて行い、NF- $\kappa$ B の染色は pH 9.0 の 1mM EDTA 含有 Tris-HCl 緩衝液による 98°C 30 分間の賦活化処理後に mouse 抗 NF- $\kappa$ B 抗体を用いて行った。2つ目の一次抗体を、horseradish ペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス抗体で処理して DAB で発色させた。こうして得られた検体を光学顕微鏡で観察し CCD カメラで撮像した。冠動脈の横断面において、100

$\mu\text{m}$  幅における  $\alpha$ -SMA 陽性細胞を計数した。そのうち VCAM-1 もしくは NF- $\kappa$ B を発現するものを計数し比を計算した。プロテオグリカンについては、NIH のソフト ImageJ を用いて二値化した後血管壁との面積比を計算した。NF- $\kappa$ B は、細胞質と核それぞれについて計測を行った。統計解析は SPSS を用いて行った。実験群と健常コントロール群との比較は 2 群間の場合は Mann-Whitney 検定を用い、3~4 群の場合には Kruskal-Wallis 検定を用いて行った。これらの検定結果を箱ひげ図を用いて表し、 $p < 0.05$  を統計学的に有意であるとした。

結果：血管炎群においては、急性期である第 7 病日には HE 染色で内膜から外膜の全層に炎症細胞浸潤を認め、EVG 染色では内膜肥厚と内弾性板の不整と血管壁の腫脹を認めた。炎症細胞は第 21 病日にはほぼ消褪していた。マクロファージの免疫染色を行うと、第 7 病日には陽性であったが第 90 病日には消失していた。急性期の内膜中膜の肥厚は時間経過につれて徐々に回復するも、遠隔期にも明らかな内膜肥厚が残存していた。血管平滑筋細胞が主体と考えられる  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は、数・密度共に増加しており、その増殖が示唆された。 $\alpha$ -SMA 陽性細胞が増殖し、細胞外基質が増生していることから、その活性化および向炎症性の性質を確認するため、VCAM-1 とその上流シグナルである可能性がある NF- $\kappa$ B の免疫染色を行った。その結果、血管炎群の内膜肥厚部、肥厚中膜において  $\alpha$ -SMA-VCAM-1 共陽性細胞、 $\alpha$ -SMA-NF- $\kappa$ B 共陽性細胞は共に有意に増加していた。NF- $\kappa$ B は健常細胞ではほとんど発現されていなかったが、血管炎群では細胞質、核共に有意に発現が増強していた。このことから、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞が活動を続けることによる血管壁リモデリングの遷延が示唆され、その指標となりうる血管壁の細胞外基質の貯留について検討した。Alcian blue 染色を行うと、血管炎群において、肥厚した内膜および中膜に経時的に明らかなプロテオグリカンの貯留をみとめた。古典的な粥状動脈硬化性病変とは異なり、本病変にはマクロファージ等の炎症細胞浸潤は殆ど認めなかった。これらの観察により、川崎病類似血管炎の後、プロテオグリカンの貯留や  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の増殖によって内膜が肥厚し、血管壁のリモデリングが進行することが示された。

考察；本研究で、川崎病類似血管炎の遠隔期にも、炎症によって引き起こされる内膜中膜肥厚が遷延していることが明らかになった。その向炎症性を支持しているのは増殖した  $\alpha$ -SMA 陽性細胞であり、炎症細胞は乏しかった。これは川崎病の剖検例で見られる所見とも矛盾しない。また、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞が産生したプロテオグリカンには、さらなる  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の増殖および細胞外基質の増生を促進する効果が報告されており、血清脂質と化学的に結合し、単球を誘引する性質をもつことが知られている。炎症細胞を中心とした粥状動脈硬化の発生とは異なり、あるいは相補的に活性化型の血管平滑筋細胞が主体となって動脈硬化が発生し進展しうると考えられた。川崎病遠隔期の患者の虚血性心疾患のリスクを軽減には、今後、血管平滑筋細胞をターゲットとして、血管リモデリングの病態を抑制することが重要と考えられた。