

画像解析による肺動脈幹中膜の加齢学的変化

宇月 美和^{*1} 岩崎 真弓^{*1} 伊藤 吉賢^{*1,*3}
大内 修二^{*1,*2} 及川 眞一^{*4} 澤井 高志^{*1}

要 旨: ヒトの肺動脈幹の中膜組織を組織定量的に検討した結果、加齢とともに弾性線維、平滑筋線維量の緩徐な増加、膠原線維の高度の増加をみた。中膜の内膜側では外膜側に比して膠原線維が増加する一方、弾性線維、平滑筋線維には減少が認められた。これに関連し内膜側では外膜側に比べ白血球、エラスターゼ、アポトーシスの発現の増加がみられた。以上より肺動脈幹においても中膜壁には加齢に伴う変化が起こっていることが証明された。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 659-666)

Key words: Pulmonary artery, Aging process, Analytical morphometry

はじめに

大動脈は一般的に加齢とともに硬化性変化が進行するが、その動脈硬化を促進させる因子としては加齢の他に高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙などが挙げられている。特に高血圧症の患者では、アテローム性変化を伴う内膜の肥厚や壁の線維化などが認められ、その機序としては血管壁に加わる張力による内皮細胞の障害、血漿成分の染み込み、血漿に含まれる酸化LDLの作用、それに反応するマクロファージの関与などが指摘されている。しかし、肺動脈では肺高血圧症以外に高度の硬化性病変をみることはほとんどなく、あまり関心も払われてこなかった。したがって、「肺動脈の加齢に伴う変化は？」と聞かれると、血管を長く扱ってきた研究者でも一瞬ためらうのではないと思われる。

肺動脈では心室中隔欠損症、心房中隔欠損症などの心奇形、さらには原発性の肺高血圧症あるいは膠原病や肺線維症などで肺動脈圧が上昇するような場合に、肺動脈の太い部分では内膜肥厚、中膜のムコイド変性、中等度の太さから小動脈にかけてのplexiform lesionや、angiomatoid lesionあるいは線維性内膜肥厚、さらに小血管(100 μ m以下)では、内皮細胞の障害による

と思われる血栓の形成や内膜の肥厚が認められる^{1,2)}。

大循環系では血圧の上昇が大動脈硬化の大きな原因の一つであるとするならば、血圧上昇のみられない肺動脈では、大動脈に比較して血圧の影響を無視した純粋な加齢的变化を把握しやすいのではないと思われる検討を行ってみた。もっとも、この検討は肺動脈の病的変化を解析する場合には基礎となるものであると考えられる。

検討の対象

0~90歳までの剖検例を対象に、画像解析装置を用いて肺動脈幹の壁を構成する成分のうち、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の重要な成分について加齢的な変化を組織定量的に検討した。この研究の解析は以下のように進めた。症例の選択については、肺の血管に与える因子については今のところはっきりしないため、明らかな肺高血圧症の症例や肺動脈幹を巻き込む肺癌の症例を除いては特に制限を設けなかった。肺動脈の検索には左右の分岐する直前のところを輪切りにして切り出した。したがって、今回の肺動脈は大動脈に相当する弾性型の太い動脈部分である。

免疫染色とE-G染色との比較

はじめに4%パラフォルム溶液で、3時間固定した後の試料でElastica-Goldne(E-G)染色と免疫染色の両方を行った。具体的には、抗トロポエラスチン抗体、抗

*1 岩手医科大学病理学第一講座

*2 岩手医科大学整形外科科学講座

*3 東京慈恵会医科大学整形外科科学講座

*4 日本医科大学内科学第三講座

2003年6月24日受理

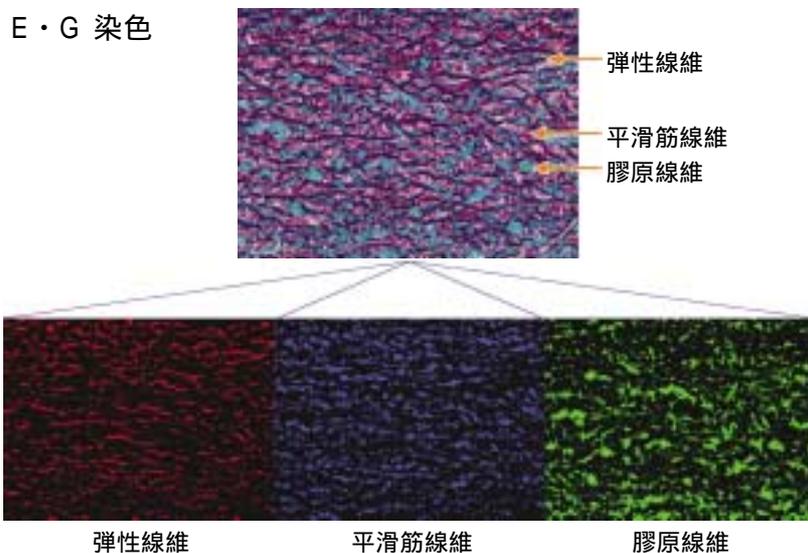


Figure 1 Image analyzer, IPAP-WIN, demonstrated the elastic fiber as red, smooth muscle fiber as blue and collagen fiber as green in a same field.

平滑筋抗体, 抗I型コラーゲン抗体を用いて免疫染色を施行し, 血管中膜における弾性線維, 平滑筋線維(組織), 膠原線維, それぞれの分布状態を確認した。次に, われわれが通常血管を観察するとき利用しているE-G染色を施行し, その染色のレゾルシン-フクシンと抗トロポエラスチン抗体の陽性部位, オレンジGと抗平滑筋抗体陽性部位, ライトグリーンと抗I型コラーゲン抗体陽性の面積を比較した。E-G染色は弾性線維, 平滑筋線維, 膠原線維を染め分ける古くからの方法であり, 検体の固定条件などにはあまり影響を受けないため, これまで保存してある大部分の検体が利用できる。E-G染色と免疫染色の両者の各成分の間に良好な正の相関が得られると, これまでに蓄積してあるパラフィンブロックやホルマリンに浸漬してある肺動脈の利用が可能となり, 逆に良好な正の相関が得られない場合は, E-G染色の意義づけを改めて検討すると同時に, 免疫組織化学のために試料を新たに収集し直さなければならない。E-G染色と免疫組織染色については, 2枚の連続切片を用いて, 1枚はE-G染色, 他方は免疫染色を施行し, 画像解析装置 Image Processor for Analytical Pathology-WIN(IPAP-WIN、住化テクノサービス株式会社)で, 同じ部位を測定したが, 各成分を赤, 緑, 青の3色に置換して測定できるため, 同時に弾性線維, 平滑筋線維, 膠原線維の測定も可能である

(Fig. 1)。しかし, 今回は慎重にということで, それぞれの成分を一つずつ測定して比較した(Fig. 2)。細かい手順は省略するが, 結果だけからいうと, 免疫染色とE-G染色の間では弾性線維は $r=0.82$, 平滑筋線維は $r=0.96$, 膠原線維は $r=0.73$ といずれも高い正の相関が得られ, E-G染色の各成分が免疫染色での弾性線維, 平滑筋線維, 膠原線維をそれぞれ表すことが明らかになった(Fig. 3, Fig. 4)。こうなると, 今までパラフィンブロックの形で保存してある症例だけでなく, ホルマリン固定してある過去の古い症例の肺動脈も切り出してE-G染色をすれば動脈の各成分の検討が可能となる。

肺動脈中膜の単位面積あたりの加齢的变化

さて, 準備が整ったので肺動脈の各成分の加齢変化を計測してみた。その結果, 興味深い所見が得られた。単位面積あたりの値でみると, 加齢に伴って膠原線維は増加するものの, 弾性線維と平滑筋線維は減少していく傾向にあった(Fig. 4, Fig. 5)。これは肺動脈の加齢に伴う変化であると思われる。また膠原線維に対して, 弾性線維ならびに平滑筋線維の単位面積あたりの面積は見事に逆相関する。

大動脈壁における加齢による変化はすでに報告されており, 内容的には弾性線維や平滑筋の減少, 膠原線

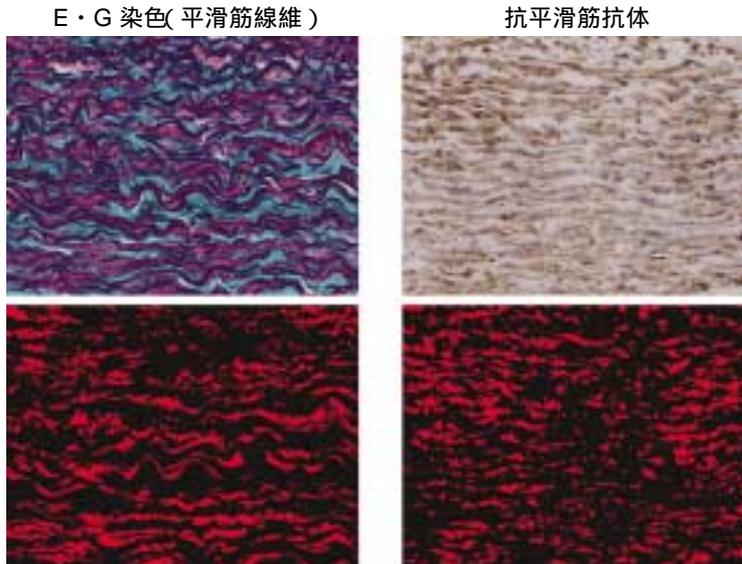


Figure 2 The picture shows the comparison of smooth muscle fiber expressed by orange G in Elastica-Goldner (E-G) staining and by anti-smooth muscle actin antibody in immunohistochemistry.

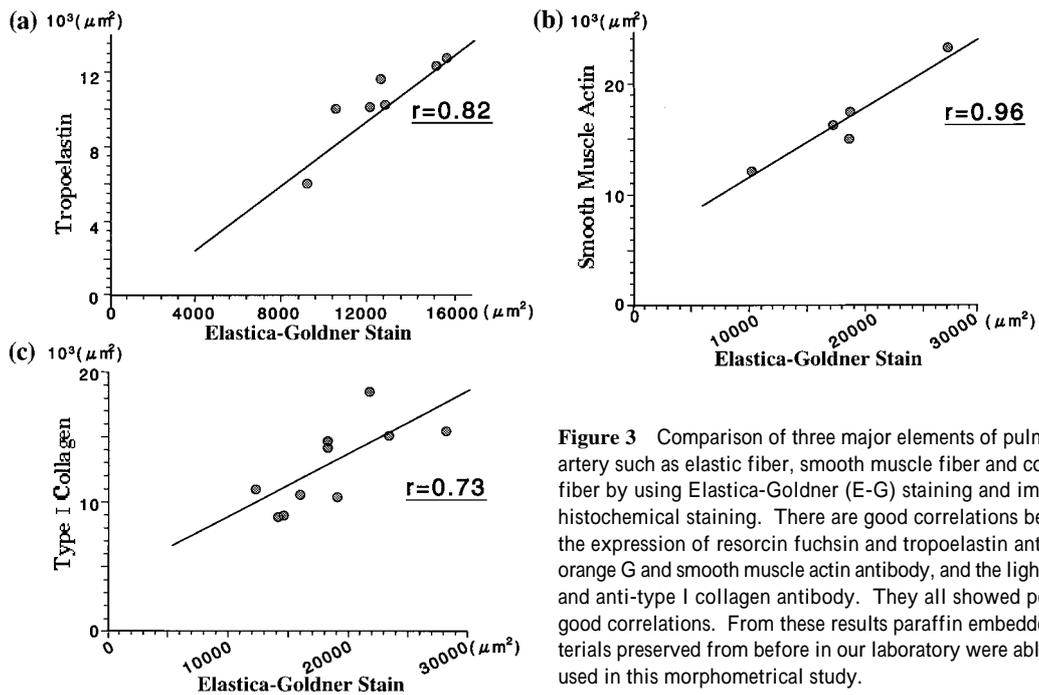


Figure 3 Comparison of three major elements of pulmonary artery such as elastic fiber, smooth muscle fiber and collagen fiber by using Elastica-Goldner (E-G) staining and immunohistochemical staining. There are good correlations between the expression of resorcin fuchsin and tropoelastin antibody, orange G and smooth muscle actin antibody, and the light green and anti-type I collagen antibody. They all showed positive good correlations. From these results paraffin embedded materials preserved from before in our laboratory were able to be used in this morphometrical study.

維の増加という今回の肺動脈の結果と同じような結果になっている^{3,4}。それでは平滑筋や弾性線維は加齢とともに失われていくのであろうかという疑問が生じるが、ヘマトキシリン-エオジン染色で標本を観察してみても、肺動脈中膜の平滑筋線維の変性やアポトーシス

の像ははっきりしない。

肺動脈中膜の割断面全体における加齢的变化

ここで気になったのが、単位面積あたりの値だけで成分の増減を評価してよいかということであった。そ

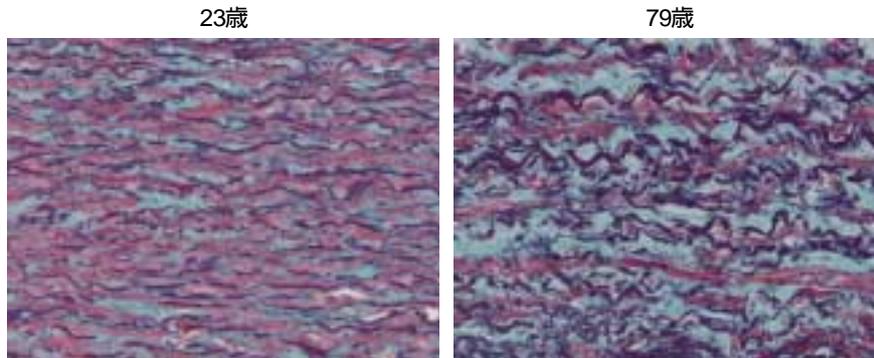


Figure 4 Age related change of collagen fiber in media of pulmonary artery in 23 and 79 year old.

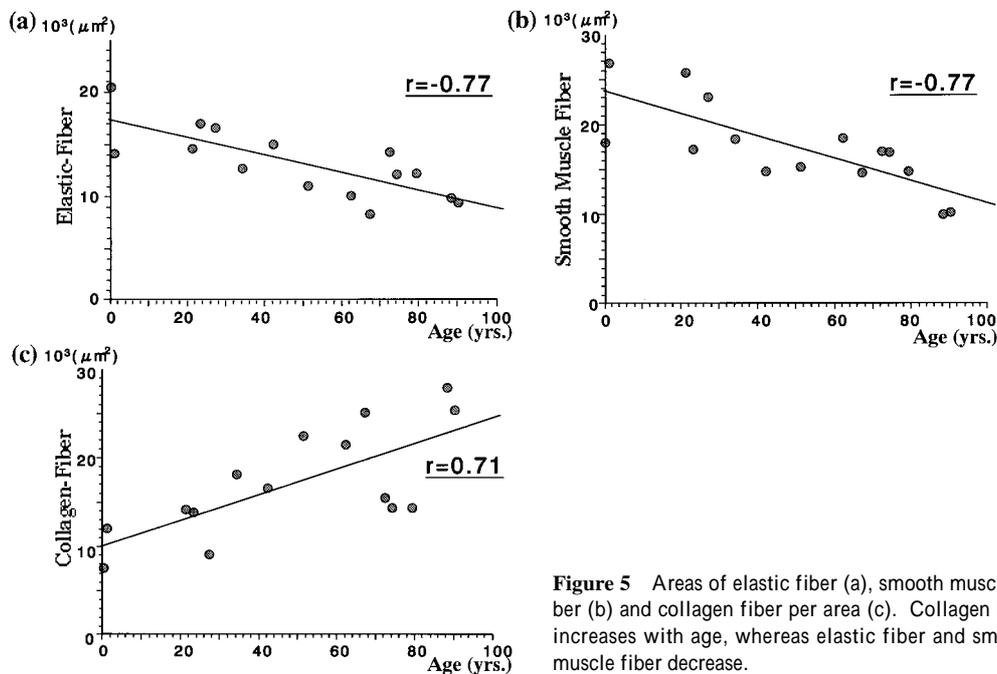


Figure 5 Areas of elastic fiber (a), smooth muscle fiber (b) and collagen fiber per area (c). Collagen fiber increases with age, whereas elastic fiber and smooth muscle fiber decrease.

こでわれわれは、血管の横断面上に表れる中膜の面積全体を測定し、各成分の全体の面積を求めた。その結果、次の点が明らかになった。まず肺動脈の中膜の断面面積全体は加齢とともに増加していた (Fig. 6)。この結果は、にわかには信じられないデータであったので、再度計測をやり直してみたが、結果は同じであった。それと同時にもう一つ明らかになったことは、血管の内腔が加齢とともに広がっている、つまり直径が大きくなっていることであった。この点については症例を増やしていく必要があるが、同じような傾向が大動脈

でもみられる現象であるということが分かった⁵⁾。そして、個々の成分について注目すると、これは予測されたことであるが、膠原線維は加齢とともに増加していき、注目すべき点は弾性線維や平滑筋線維も少しずつではあるが増加しており、減少しているわけではないということである (Fig. 7)。しかし、その増加の割合が膠原線維では非常に大きいのに対して、弾性線維や平滑筋線維はゆっくりであるため、膠原線維の増加に押されてしまって、弾性線維、平滑筋線維は、相対的には減少していくようにみえるということが明らかと

なった。これは、生化学的な扱いは単位蛋白量におけるそれぞれの成分を測定しているのに対し、形態学の場合はこのように単位面積でも全体の面積でも扱うことができるという強みの表れともいえる。

肺動脈中膜の内膜側、外膜側での比較

随分面倒な話になったが、さらに標本をじっくり観察していると、内膜のほうが外膜に比較してライトグリーン陽性の部分、つまり膠原線維の領域が広がっている。そこで肺動脈をFig. 8のように、内膜から外膜に向かってほぼ3等分して、中膜のなかで内膜寄りの領域と外膜寄りの領域について弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の面積を測定した。その結果、予測したとおり内膜寄りの中膜では、加齢とともに膠原線維が増加し、弾性線維と平滑筋線維は減少していく傾向を示した(Table 1)(Fig. 9)。ここでは少なくとも弾性線維、平滑筋線維は失われてくるのである。それでは、これを引き起こす原因は何であり、どのような機序で起こるのであろうか？

肺動脈中膜の変性を引き起こす要因

まず考えられるのは、最近いろいろな分野で注目されているアポトーシス^{6,7)}、その他に蛋白分解酵素を発現する顆粒球系細胞(LCA陽性細胞⁸⁾)とエラスチンを分解するエラスターゼ陽性細胞⁹⁾、そしてさまざまな

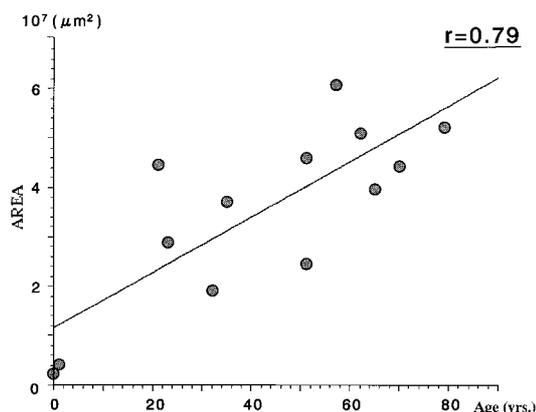


Figure 6 Age related change of media. An area of media from cross section increases with age.

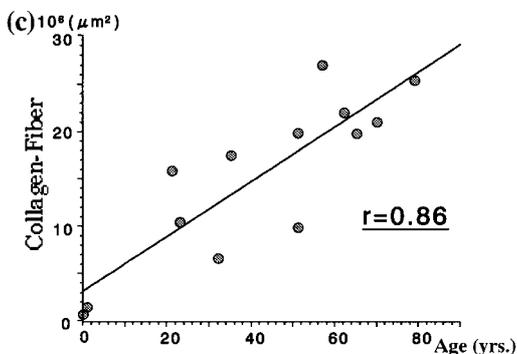
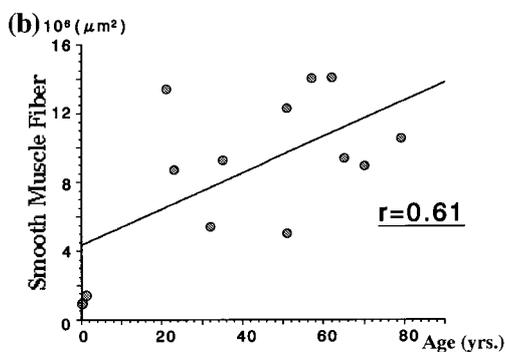
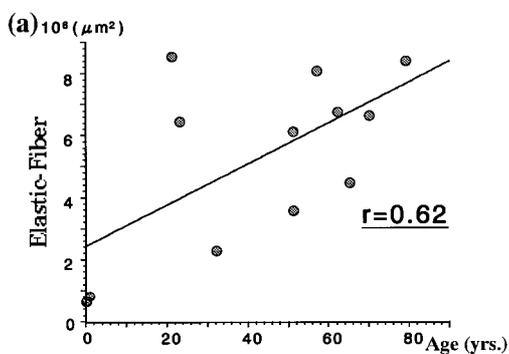


Figure 7 Total areas of elastic fiber, smooth muscle fiber and collagen fiber in a cross section of pulmonary artery. Not only collagen fiber, but also elastic fiber and smooth muscle fiber which decrease in per area also gradually increase with age in total area, because total areas of cross section increases with age.

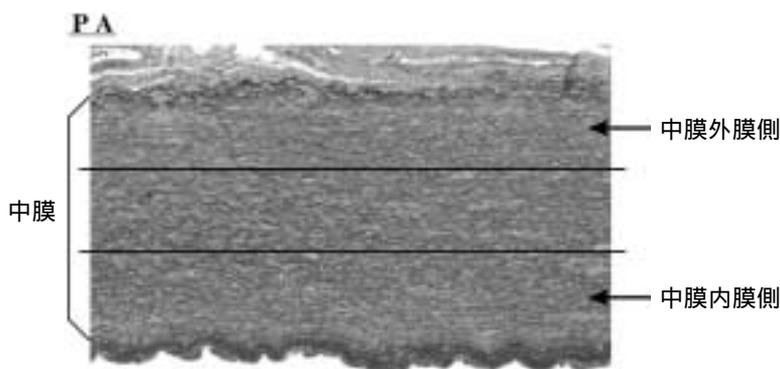


Figure 8 Schema of inner layer and outer layer of media. After drawing the two lines for dividing the media into three parts such as inner, medial and outer layers, in which we compared some parameters between the inner and outer layers.

Table 1 Comparison of areas of elastic fiber, smooth muscle fiber and collagen fiber in a third of inner layer and a third of outer layer of media of pulmonary artery. Collagen fiber increases with age, whereas elastic fiber and smooth muscle fiber decrease.

| | 弾性線維 | 平滑筋線維 | 膠原線維 |
|-----|------------|------------|------------|
| 内膜側 | 20471±3328 | 23483±4100 | 28577±5178 |
| 外膜側 | 22812±2682 | 25023±4410 | 26023±5775 |

(μm²)

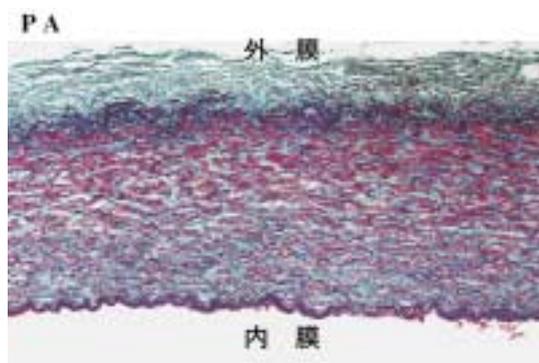


Figure 9 An area of collagen fiber in inner and outer layers of media in pulmonary artery. An area in inner layer increases with age compared with outer layer.

蛋白分解酵素を発現するマクロファージ (CD 68陽性細胞)^{10,11)}などである。さらにさまざまな成分を含む血漿成分の血管壁への染み込みも念頭に入れて抗アルブミン抗体で検討してみた。その結果、LCA, エラスターゼ, アポトーシス陽性の細胞の数は、中膜の内膜側が外膜側に比べて多かったが (Fig. 10 (Table 2)), それでも大動脈に比較してその数ははるかに少数であった。またアルブミンの染み込みも内膜のほうが明らかに強かった。しかし本当にこれだけの成分が肺動脈に変化を引き起こすのであろうかという疑問が生じる。大動脈の中膜筋細胞の変化について矢野は、平滑筋の変化にはdark, atrophy, intracytoplasmic granular, lipids in SMCなどのタイプがあり、そのなかで加齢とともに現れるdark smooth muscle cellは、実験的に循環障害が起こった

ときの平滑筋の像に類似していると述べている³⁾。古い文献になるが、単位面積でみた場合は平滑筋線維、弾性線維は加齢とともに減少し、膠原線維は増加するという報告が多い¹²⁾一方、生化学的な解析では膠原線維は増加あるいは一定の容積とまちまちである。

以上は大動脈でみられた結果であるが、今回のわれわれの肺動脈の結果もほぼこれと同じ結果を呈した。ヒトの寿命は70~80年と長い。悪性腫瘍や破壊性疾患のようなレベルで血管の障害因子が多量に発現したら、ヒトはあっという間に死んでしまう。したがって、肺動脈ではゆっくりではあるものの、加齢とともに弾性線維や平滑筋線維の変性は進行しており、代わって膠原線維の増加が起こっているといえる。それは金属疲労という現象にも似ているが、この加齢と

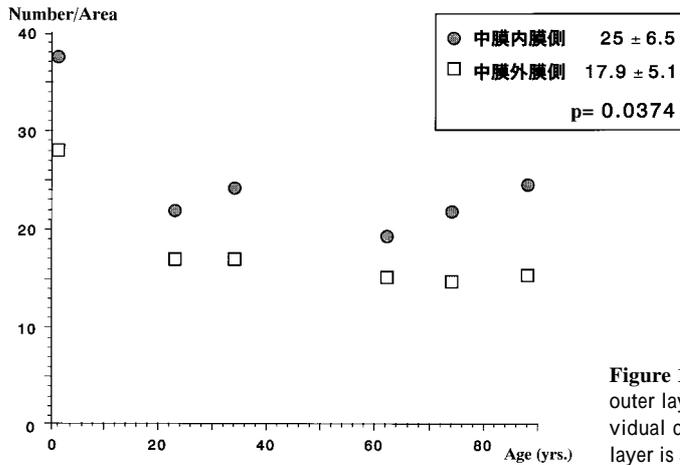


Figure 10 Comparison of apoptosis expressed in inner and outer layers. Although apoptosis is not so prominent in individual case in media, the number of apoptotic cells in inner layer is abundant than in outer layer.

Table 2 Comparison of the numbers of LCA, elastase, CD68 positive cells and apoptotic cells in inner and outer layers of media of pulmonary artery. LCA, elastase positive cells and apoptotic cells were dominant in number in a third of inner layer than in outer layer.

| | LCA (個数) | エラスターゼ (個数) | アポトーシス (個数) | CD68 (μm^2) |
|-----|-------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| 内膜側 | 1.65±0.7 | 0.28±0.19 | 25±6.5 | 550±289 |
| 外膜側 | 0.67±0.7 | 0.16±0.17 | 17.9±5.1 | 628±484 |

もにという言葉の科学的な解析が今後さらに必要となる。血行動態による肺動脈への影響をみる際に、このようにコントロールとしての加齢の変化を念頭に入れてみていくことが重要である。現在、私どもは肺高血圧症を対象に肺血管の変化を解析しているところであり、未だ最終的な結果は得られていないが、これについてはまた機会があれば報告したい。

「本研究の一部は文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業・先端医療研究センターの補助によるものである。」

文 献

1 Wagenvoort CA, Wagenvoort N: Pulmonary hypertension in cardiac left to right shunts, in "Pathology of pulmonary hypertension". ed. by CA Wagenvoort, Noeke Wagenvoort, WILEY MEDICAL Pub. New York, London, Sydney, Toronto. 1977, pp56-95.
 2 Mikami Y, Kurasono Y, Sawai T: Pulmonary hypertension

in sutopsy cases of mixed connective tissue disease. Jap J Rheum. 1996, **6**: 201-214.

3 矢野広志：人大動脈中膜の加齢的变化，久留米医誌．1973，**36**：1042-1095．
 4 坂本寛志：細胞外マトリックスの加齢的变化，現代医療．1991，**23**：2365-2370．
 5 高橋 徹
 6 Smith JD, McLean SD, Nakayama DK: Nitric oxide causes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. Journal of Surgical Research. 1998, **79**: 121-127.
 7 Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Fujii T, Luscher TF: Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Circulation. 1999, **100**: 2108-2112.
 8 Reape TJ, Groot PH: Chemokines and atherosclerosis. Atherosclerosis. 1999, **147**: 213-225.
 9 Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW: Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. Journal of Clinical Investigation. 1998, **102**: 1900-

- 1910.
- 10) Ohtsuki K, Hayase M, Akashi K, Kapiwoda S, Strauss HW: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. *Circulation*.2001, **104**: 203-208.
- 11) Kinard F, Jaworski K, Sergent-Engelen T, Goldstein D, Van Veldhoven PP, Holvoet P, Trouet A, Schneider YJ, Remacle C: Smooth muscle cells influence monocyte response to LDL as well as their adhesion and transmigration in a coculture model of the arterial wall. *Journal of Vascular Research*. 2001, **38**: 479-491, 2001.
- 12) Ahmed MM: Age and sex differences in the structure of the tunica media of the human aorta. *Acta Anatomica*. 1967, **66**: 45-58.

Age-related Change of Media of Large Pulmonary Artery by Morphometrical

Miwa Uzuki^{*1}, Mayumi Iwasaki^{*1}, Yoshitaka Itoh^{*1, *3}, Shuji Ouchi^{*1, *2}, Shinichi Oikawa^{*4}, and Takashi Sawai^{*1}

^{*1} Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine

^{*2} Department of Orthopedic Surgery, Iwate Medical University, School of Medicine

^{*3} Department of Orthopedic Surgery, Jikei University, School of Medicine

^{*4} Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Nippon Medical School

Key words: Pulmonary artery, Aging process, Analytical morphometry

We investigated the age-related changes of pulmonary artery by using image analytical morphometry. A total area of the cross section of pulmonary artery increased with age. Among the elements which comprise the vascular media, the volume of collagen fiber highly increased, while elastic fiber and smooth muscle fiber gradually increased with age. Further comparison of each element in the inner side of media with that of the outer side, the changes of inner side revealed increase in the collagen fiber with age and decrease in the elastic and smooth muscle fibers. In addition to the above results, the number of white blood cells, elastase and apoptosis positive cells increased in the inner side of media compared with the ones of outer side. These results suggest that the age-related changes occur in pulmonary artery caused by many insidious factors insidiously. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 659-666)