

学位論文題名

骨格筋における細動脈側、  
細静脈側毛細血管分布の適応性変化

学位論文内容の要旨

I. 緒言

毛細血管は、血液環流の場であるとともに、血液と組織の間における物質交換とガス交換の場であり、その分布は組織の代謝レベルに比例している。代謝が亢進した組織では、毛細血管網が発達することによって、酸素拡散距離の短縮や赤血球の毛細血管通過時間の延長がおり、組織への酸素供給に有利な適応が生じる。

成熟個体における毛細血管の新生は発芽型血管新生が主体であり、主に細静脈側の毛細血管から新生が起り、それが細動脈または細動脈側の毛細血管と連結することによって血管網を形成すると考えられている。一方、細動脈側では、細動脈平滑筋が既存の毛細血管に沿って増殖する「毛細血管の細動脈化(arterialization of capillary)」が個体の成長過程や血流量の増加によって促進されることが骨格筋において報告されている。

このことから、細動脈側と細静脈側毛細血管の分布の変化は、骨格筋組織への酸素供給系の適応性変化を考える際に非常に興味深いものと考えられる。これまで、運動トレーニングや寒冷環境への曝露などのように慢性的に骨格筋の代謝が亢進すると、骨格筋毛細血管網の発達が促進されることが報告されている。しかしながら、細動脈側と細静脈側毛細血管の分布の変化に関しては全く報告されていない。

本研究は、骨格筋毛細血管網、特に細動脈側、細静脈側毛細血管の分布の適応性変化を様々な適応過程において観察することを目的とし、持久的な運動トレーニング、短期間の寒冷曝露、寒冷環境下で継代飼育したラット及び  $\beta_2$ -アドレナリン受容体作動薬の投与によって筋肥大を引き起こした際の毛細血管網の変化を観察した。

II. 実験方法

すべての実験には Wistar 系の雄ラットを用いた。

1) 持久的トレーニング

トレーニング群にはトレッドミル走行運動を 1 日 1 時間、週 6 日で 6 週間負荷した。スピードは若年ラットが 10~22.5 m/min、中年ラットが 10~20 m/min であった。若年ラットには最後の 2 週間 7 度の傾斜をつけた。

2) 短期間の寒冷曝露

寒冷曝露群のラットは 8 週齢時から 4 週間、5°C の環境制御室で飼育した。対象群は 25°C の環境で飼育した。

3) 寒冷環境下継代飼育

寒冷下継代飼育(CG)群と脱順化(DCG)群は 5°C の寒冷環境で継代飼育し、CG 群は 68 世代寒冷環境で飼育した。DCG 群は 12 世代目に 24°C の環境に戻し、その後の 57 世代をこの環境で飼育した。対象群は 22°C の環境で飼育した。

#### 4) $\beta_2$ -アドレナリン受容体の作動薬(clenbuterol; CLB)の投与

CLB 投与群には粉末飼料に 2 mg/Kg の割合で clenbuterol hydrochloride を混ぜ、10 日間自由摂取させた。摂食量から算出した CLB 摂取量は若年投与群で 169、中年投与群で 102  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。

#### 5) 組織学的分析

毛細血管の分析のため、ヒラメ筋の横断切片(厚さ 16 $\mu\text{m}$ )に alkaline phosphatase (AP) と dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) の二重組織染色を行った。光学顕微鏡下で呈色の違いにより細動脈側(青色)、細静脈側(赤色)及び中間(紫色)毛細血管を弁別した。このデータから各毛細血管の毛細血管密度、毛細血管数と筋線維数の比(C:F 比)、毛細血管一本が担当する筋組織面積(capillary domain area; CDA)とその半径(Krogh's tissue cylinder radius; RAD)、及び毛細血管分布の均一性の指標である SDlog を算出した。また、この切片から筋線維横断面積も測定した。同じヒラメ筋のサンプルを用い、横断切片(厚さ 10 $\mu\text{m}$ )にコハク酸脱水素酵素(SDH)の組織染色を行った。

### III. 結果および考察

1) 持久的な運動トレーニングでは、成長期の若いラットではヒラメ筋の C:F 比の増加と細動脈側毛細血管数の増加が観察され、一方、中年のラットでは C:F 比は増加しないが細動脈側毛細血管数の増加が観察された。また、若年、中年ラットともにトレーニング後に酸素拡散距離が短縮していた。SDH 活性は若年、中年ラット共にトレーニング後に有意に増大していた。

2) 短期間寒冷曝露した実験では、骨格筋の C:F 比は増加しないが、細動脈側毛細血管の増加が観察され、酸素拡散距離も短縮していた。SDH 活性は寒冷曝露後に有意な増大を示した。また、このような変化は寒冷曝露時の熱産生に関与すると考えられる酸化能力の高い筋組織だけで観察された。

3) 寒冷環境下で継代飼育したラットでは、ヒラメ筋の全毛細血管数の増加と細動脈側毛細血管数の増加が観察され、酸素拡散距離も短縮していた。また、SDH 活性も有意に増大していた。

4)  $\beta_2$ -アドレナリン受容体の作動薬を投与して筋肥大を引き起こしたラットでは、心筋及び骨格筋において筋線維横断面積の増大に毛細血管数の増加が伴わず、全毛細血管密度や細動脈側、細静脈側毛細血管の密度が顕著に減少し、酸素拡散距離は延長していた。骨格筋の SDH 活性は有意に減少していた。

以上のことから、トレーニングした若年ラットや寒冷環境下で継代飼育したラットでは細静脈側からの毛細血管の新生と細動脈側からの終末細動脈の延長の両者が促進されていることが示唆された。細静脈側から新生した毛細血管が細動脈側へ成長する過程で、毛細血管の細動脈化が起これば、細動脈と連結する毛細血管数が増え、結果的に細動脈側毛細血管数が増加するものと考えられる。毛細血管の新生は、血流量増加による内皮細胞への機械的な刺激や、局所的な低酸素状態によって促進されることが知られている。また、毛細血管の細動脈化は、血管拡張による壁張力の増加や血流量の増加によって促進されることが知られている。このため、運動や寒冷順化による代謝亢進によって血管新生と毛細血管の細動脈化の両者が促進されるものと考えられる。また、トレーニングした中年のラットや短期間寒冷曝露したラットでは、毛細血管の新生はほとんどみられないが、細動脈の延長が促進されることが示唆された。実験的な筋肥大を起こした実験からは、毛細血管系の再構築には組織の代謝亢進が不可欠であることが示唆された。

### IV. 結論

本研究では毛細血管の細動脈側と細静脈側の分布を観察することによって、筋組織における毛細血管系の再構築をより明確に評価することができた。さらに、本研究で用いた

分析法を用いることにより、各種ストレスに対する骨格筋酸素供給系の経時的適応過程や適応のメカニズムを解明できると考える。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

## 骨格筋における細動脈側、 細静脈側毛細血管分布の適応性変化

運動トレーニングや寒冷環境への曝露などのように慢性的に骨格筋の代謝が亢進すると、骨格筋毛細血管網の発達が促進されることが知られている。しかしながら、細動脈側と細静脈側毛細血管の分布の変化に関してはこれまで全く報告されていない。本研究は、骨格筋毛細血管網、特に細動脈側、細静脈側毛細血管の分布の適応性変化を様々な適応過程において観察することを目的とし、持久的な運動トレーニング、短期間の寒冷曝露、寒冷環境下で継代飼育したラット及び $\beta_2$ -アドレナリン受容体作動薬の投与によって筋肥大を引き起こした際の毛細血管網の変化を観察した。持久的な運動トレーニングでは、成長期の若いラットではヒラメ筋の C:F 比の増加と細動脈側毛細血管数の増加が観察され、一方、中年のラットでは C:F 比は増加しないが細動脈側毛細血管数の増加が観察された。また、若年、中年ラットともにトレーニング後に酸素拡散距離が短縮していた。SDH 活性は若年、中年ラット共にトレーニング後に有意に増大していた。短期間寒冷曝露した実験では、骨格筋の C:F 比は増加しないが、細動脈側毛細血管の増加が観察され、酸素拡散距離も短縮していた。SDH 活性は寒冷曝露後に有意な増大を示した。また、このような変化は寒冷曝露時の熱産生に関与すると考えられる酸化能力の高い筋組織だけで観察された。寒冷環境下で継代飼育したラットでは、ヒラメ筋の全毛細血管数の増加と細動脈側毛細血管数の増加が観察され、酸素拡散距離も短縮していた。また、SDH 活性も有意に増大していた。 $\beta_2$ -アドレナリン受容体の作動薬を投与して筋肥大を引き起こしたラットでは、心筋及び骨格筋において筋線維横断面積の増大に毛細血管数の増加が伴わず、全毛細血管密度や細動脈側、細静脈側毛細血管の密度が顕著に減少し、酸素拡散距離は延長していた。骨格筋の SDH 活性は有意に減少していた。以上のことから、トレーニングした若年ラットや寒冷環境下で継代飼育したラットでは細静脈側からの毛細血管の新生と細動脈側からの

終末細動脈の延長の両者が促進されていることが示唆された。細静脈側から新生した毛細血管が細動脈側へ成長する過程で、毛細血管の細動脈化が起これば、細動脈と連結する毛細血管数が増え、結果的に細動脈側毛細血管数が増加するものと考えられる。毛細血管の新生は、血流量増加による内皮細胞への機械的な刺激や、局所的な低酸素状態によって促進されることが知られている。また、毛細血管の細動脈化は、血管拡張による壁張力の増加や血流量の増加によって促進されることが知られている。このため、運動や寒冷順化による代謝亢進によって血管新生と毛細血管の細動脈化の両者が促進されるものと考えられる。また、トレーニングした中年のラットや短期間寒冷曝露したラットでは、毛細血管の新生はほとんどみられないが、細動脈の延長が促進されることが示唆された。実験的な筋肥大を起こした実験からは、毛細血管系の再構築には組織の代謝亢進が不可欠であることが示唆された。

公開発表に際し、副査の本間教授から、毛細血管の染色性と機能に関する解釈について、運動トレーニング実験における対照群への食餌制限について、毛細血管増加の機序について、加齢に伴う細静脈側毛細血管増加の機序について、 $\beta_2$ -アゴニストの効果が長期間持続した際の毛細血管増加の可能性について、及び統計処理法の妥当性について質問があった。小山富康名誉教授からは、クレンブテロールの作用機序、クレンブテロールと運動負荷の相互作用について、毛細血管内皮細胞に存在する酵素系の生体内での作用について、クレンブテロールの高齢者リハビリテーションに対する有効性について、運動刺激が TGF- $\beta$  発現を誘発する可能性について質問があった。副査の阿部教授からは、毛細血管再構築を引き起こす二つの要因について、トレーニング後の筋線維断面積の縮小と筋重量の変化について、毛細血管支配領域の分析法について、寒冷下継代飼育ラットにおける遺伝的要因について、 $\beta_2$ -アゴニスト投与後の運動能力について質問があった。高野講師からは細動脈側毛細血管増加の機序について質問があった。主査の長嶋教授からは、毛細血管新生に対する血流量の影響について、寒冷地住民の骨格筋毛細血管網に関する先行研究について、クレンブテロール投与実験の背景について質問があった。これらの質問に対し、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献情報をもとに概ね妥当な回答を行った。

この論文は、毛細血管の細動脈側と細静脈側の分布を観察することによって、筋組織における毛細血管系の再構築をより明確に評価したことで高く評価され、今後、骨格筋酸素供給系の経時的適応過程や適応の機序を解明することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。