

研究ノート

ヒト心筋神経支配の免疫組織学的研究

——心筋梗塞剖検例を用いた S-100 β 染色の予備的報告——後藤香織¹⁾・武田淳史¹⁾・岡田了三²⁾Immuno-histochemical study on the innervation
in human myocardium—— A preliminary report of the S-100 β staining method applied
to the autopsy cases with myocardial infraction ——Kaori GOTO¹⁾, Atsushi TAKEDA¹⁾, Ryozo OKADA²⁾

1 緒 言

ヒト心臓における自律神経支配について見ると、交感神経は心臓の収縮性や電氣的興奮性の亢進、血圧上昇など生体にとって循環動態を維持することが主たる機能である。一方迷走神経は収縮性や興奮性を抑制するという機能をもっており、様々な刺激に対し心機能の対応に役立っている。

心臓が急性虚血にさらされると全身の交感神経系の緊張が生じ、血行動態を維持する方向に作用する。しかし虚血が発生した部位によっては迷走神経の反射性緊張が見られることがある。例えば心臓性突然死は交感神経緊張によって心拍数の増加、血圧上昇、冠状動脈収縮、血小板凝集能亢進が生じる結果と考えられる。一方、迷走神経は心臓にとって本来防御的に機能するが、重要な点は不整脈の発生には迷走神経緊張が関与しており、安静時や睡眠中の突然死発生にも大きく関与している。

胎児期の心臓には未だ自律神経は存在しておらず、発達に伴い徐々に神経支配が完成する¹⁾。心臓内の交感神経は部位によりその分布が異なり、心筋の外膜側で神経分布が豊富であることなどは知られているが、その制御機構は未だ十分には解明されていない。

S-100タンパクは1965年ウシ脳から分離された酸性タンパク質で、当初は神経組織特異タンパクとして認

識されていたが、現在では2個のEF-handを持つカルシウム結合性タンパク質で、現在までに20種類のサブファミリーが確認されている。S-100 β には神経突起の伸展、黒色腫細胞の増殖、カルシウムイオン流出刺激、アストロサイトおよび軸索の増殖、微小管形成阻害などの各種の機能が確認されている。また、S-100 β は種特異性が低く、凍結切片はもちろんの事、ホルマリン固定に対してもほぼ安定した抗原性を示すことから神経外胚葉由来細胞同定の免疫組織化学手法に用いる事が可能と考えられる。

このような神経支配の心臓組織内の分布と各種心臓疾患との関係を究明することは心臓研究において重要なことであると考えられる^{2,3)}。本学には群馬パース大学附属研究所岡田了三所長の1957年から1997年にわたり作成された剖検心病理組織標本コレクション⁴⁾が保存されている。この未染色プレパラートが現在広く行われている免疫組織化学的手法⁵⁻⁸⁾にて染色可能であれば、従来 of 心筋病変に神経支配の関与データを加える事により、新しい解釈が可能となると考える。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋標本に神経マーカーのS-100 β タンパクに対する抗体を用いた免疫組織学的染色を施行して新鮮・陳旧性心筋梗塞中の神経線維の観察を試みたので報告する。

1) 群馬パース大学保健科学部 2) 群馬パース大学附属研究所

2 方 法

2-1 標本の選出

岡田コレクション標本群の中から、死因が急性心筋梗塞による心臓の左心室心筋標本を6例、陳旧性心筋梗塞による心臓の標本を6例、死因が心筋梗塞と無関係の心疾患を有さないコントロール標本を10例無作為抽出した(年齢は52歳~75歳)。これらの標本はホルマリン固定パラフィン包埋後、マイクロトームで7ミクロンの連続切片に作成されており、ヘマトキシリン・エオジン、アザン、エラスチカ・ワンギーゾン染色および未染色標本連続切片を一組として冷暗所保存されている。これらを用いて、心筋組織内神経分布を免疫組織学的に検討した⁴⁾。

2-2 脱パラフィン処理

使用するパラフィン切片をキシレンに3分浸漬置換を3回、エタノール希釈系列~100%無水エタノール3分2回、95%エタノール3分2回、リン酸緩衝液(PBS)(Sigma, St.Louis, MO, USA)5分間1回~による浸漬置換を常温で行い脱パラフィン化した。

2-3 ペルオキシダーゼ処理

内因性ペルオキシダーゼを処理するために、3% H_2O_2 -メタノールに常温15分浸漬した。その後PBSにて5分3回常温で浸漬洗浄を繰り返した。

2-4 ブロッキング

ヤギ血清 (Vevtor Laboratories, Burlingame, CA, USA) 20倍希釈液を30分室温にて標本に載せてブロッキングを行った。

2-5 S-100 β 染色

標本の周囲の余分なブロッキング液を濾紙片にて吸い取り、100倍希釈 anti-monoclonal S-100 β (DAKO, Glostrup, Denmark) を滴下して切片上に載せた。ネガティブコントロールとして対照スライドを準備し、一次抗体の代わりに100倍ヤギ血清を滴下した。4°C30分湿度を保った箱の中で反応させた。その後PBSで常温5分3回の浸漬洗浄をおこなった。

2-6 2次染色および発色

標本の周囲の余分な水分を濾紙片にて吸い取り、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO MULTI

キット (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) を100 μ Lを切片上に滴下して、常温、30分で湿度を保った箱の中で静置して反応させた。

スライド上の切片周辺の溶液を注意深く拭き、シンプルステイン基質溶液100 μ Lを滴下し、常温で20分反応後、蒸留水で常温5分3回浸漬洗浄を行った。

2-7 観察

光学顕微鏡 (オリンパス、東京、日本) での観察のために、エタノール希釈系列およびキシレンにて脱水透徹後、封入して、観察をおこなった。

2-8 凍結切片の作成および染色

死後2時間以内に採取した新鮮組織 (正常心) をコンパウンド (Tissue-tek, Miles, USA) に埋包し液体窒素で凍結した標本をクライオスタットで10 μ に薄切

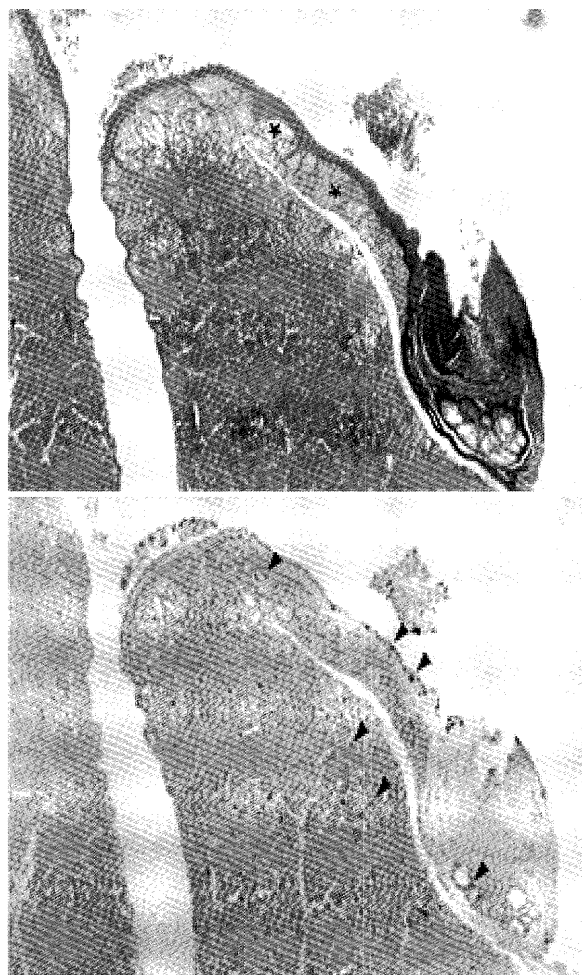


図1 正常心筋のアザン染色 (上) S-100 β (下) $\times 200$
上と下の写真は連続切片であり、上の*は刺激伝導系のプルキンエ細胞であり、心内膜側である。その下部の濃染色部は心筋組織の横断像である。下写真の矢印が S-100 β 染色部である。

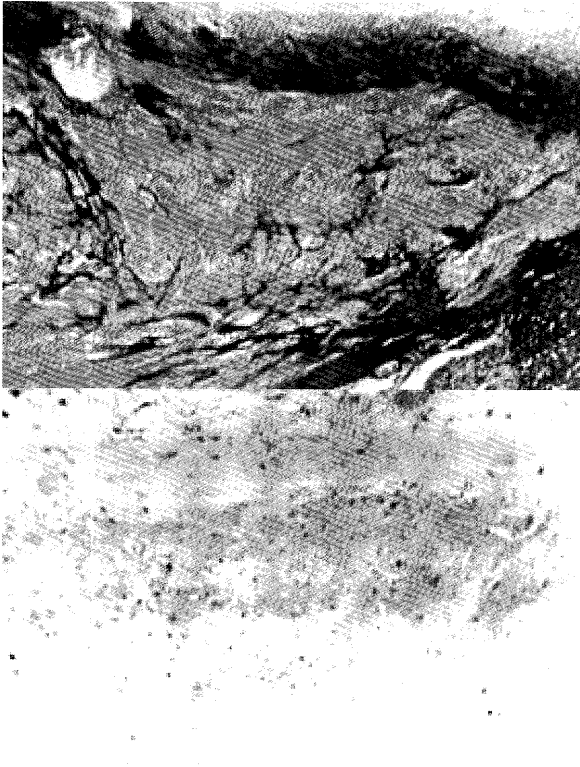


図2 急性心筋梗塞心筋のアザン染色 (上) S-100 β 染色像 (下) ($\times 400$)

した。これらは長崎大学河野浩章先生、矢野捷介先生に標本の提供のご協力をいただいた。これらのプレパラートは上記方法と同様に染色を行った。

3 結果と考察

正常心臓標本において、図1に示したように、S-100 β は心臓プルキンエ細胞網の一部、一般心筋組織中に点状に存在していた。特に、心内膜と心筋層との間、血管周囲に多く見られた。心筋細胞自体、血管内皮細胞、線維芽細胞は染色陰性であった。これらは正常心臓凍結切片標本においても同様の所見が得られた。

このことから岡田コレクションのパラフィン切片標本が、anti-S-100 β 抗体にて神経由来細胞が特異的に染色されたことより、パラフィン標本においても、神経支配検索に免疫組織化学的手法の適応が可能であることが確認できた。

新鮮心筋梗塞においては、核の消失や横紋の消失などが部分的に見られたが、S-100 β の染色は正常心との大きな違いを見いだすことができなかった。死んでしまった神経細胞のS-100 β が染色されているのかは解らず、心筋細胞の死と神経細胞の死滅に時間差があ

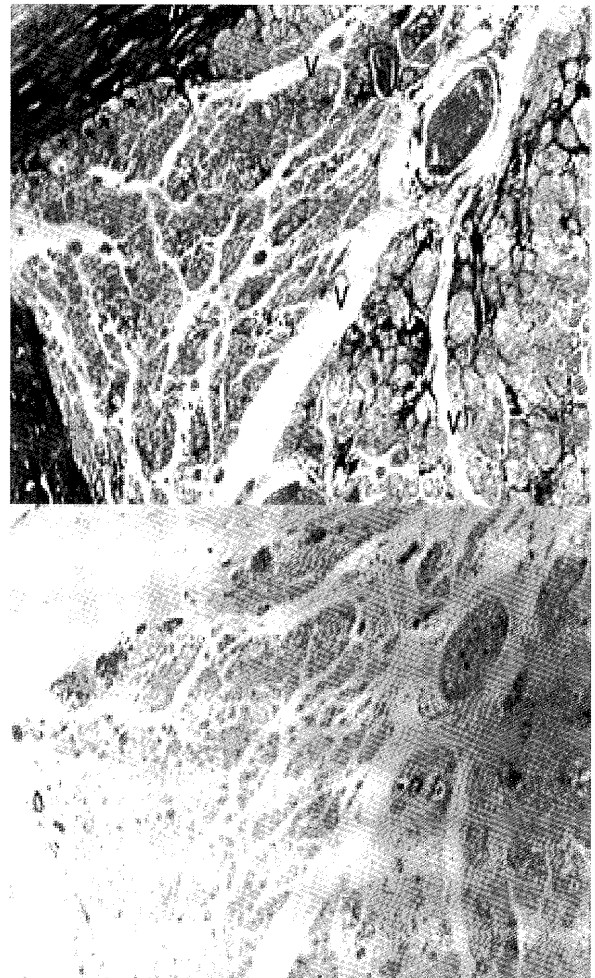


図3 陳旧性心筋梗塞部のアザン染色 (上) S-100 β 染色像 (下) ($\times 400$)

*はプルキンエ細胞 心筋が萎縮しており、正常心臓よりも心筋中のS-100 β の点状の染色が少ない。Vで示した部分は心筋梗塞内生き残り心筋萎縮によって出来た間隙。このような隙間には膠原線維が生成され青く染まっている部分が多く見られる。この部分にはS-100 β の染色がとりわけ少ない。

るのかは今後の検討課題と思われた。図3に示す陳旧性心筋梗塞部位においては、萎縮した心筋細胞の間質には膠原線維が多く観察され、この周囲にはS-100 β の陽性部位が特に少なかった。梗塞によって介在板において結合していた心筋細胞が失われると、生き残った心筋細胞の介在板付近の細胞質が筋細胞—筋細胞の構造から筋細胞—基質とリモデリングして線維組織と接することにより、収縮力や興奮の伝達が変わることが報告されている⁹⁾。このことから陳旧性心筋梗塞中の生き残り心筋周囲では神経筋接合部での神経枝の消失や短縮などの変化が考えられた。

今回の検討から、交感神経・迷走神経に特異的に存在する acetylcholinesterase と tyrosine hydroxylase

に対する抗体を用いて、免疫組織化学的手法で交感神経、迷走神経の分布や心筋細胞と神経の接合の特異性、心疾患時の神経系病変などを検討する将来的展望が可能であると考えられた。

参 考

- 1) 渡辺敏樹・松橋邦夫・高山 敏・森田 遙：胎生期ラット心臓における交感神経系の機能的発達に関する検討. 日本薬理学雑誌 1984年, 84(2) : 229-241
- 2) Kawano H., Sirai T., Kawano Y. and Okada R.: Morphological study of Vagal Innervation in Human Semilunar Valves Using a Histochemical Method. J.Circulation. Journal. 1996, 60 : 62-66
- 3) Kawano H., Okada R., Yano K.: Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. Hert Vessels. 2003, 18 : 32-39
- 4) 岡田了三：老研究者の覚え書き. 群馬パース看護短期大学紀要 1999年, 1(2) : 103-13. 2000年, 2(1) : 25-34, (2) : 105-16. 2001年, 3(1) : 35-50, (2) : 121-35. 2002年, 4(1) : 65-80, (2) : 221-40. 2003年, 5(1) : 185-205, (2) : 387-405. 2004年, 6(1) : 85-103, (2) : 125-96. 群馬パース大学紀要 2005年, No.1 : 61-82. 2006年, No.2 : 297-318. 2006年, No.3 : 389-415. 2007年, No.4 : 559-90.
- 5) 武田淳史・近藤照彦・浅見知市朗・澤田只夫・武田信彬：Catalyzed Signal Amplification法による急性心筋炎症例の心筋組織内微量抗原検索. 群馬パース看護短期大学紀要 2002年, 3(2) : 13-16.
- 6) 武田淳史：組織抗原の検出法（免疫組織化学）続心臓代謝実験法 六法出版 1998年 : 325-329
- 7) Park A., Armin S., Azarbal A., Lai A., Chen P. S., Fishbein C.: Distribution of cardiac nerves in patients with diabetes mellitus An immunohistochemical postmortem study of human hearts. Cardiovascular Pathology. 2002, 11 : 326-331.
- 8) Chow L.T.C., Chow S.S.M., Anderson R.H., Gosling J.A.; Autonomic Innervation of the Human Cardiac Conduction System: Changes from Infancy to Senility-An Immunohistochemical and Histochemical Analysis. Anatomical Record. 2001, 264 : 169-182.
- 9) 高松哲郎：梗塞周辺部における心筋細胞コミュニケーションのリモデリングと細胞移植. 松仁会医学誌 2001年, 40(1) : 1-11.

Abstract

Astrocyte-derived growth factors are known to promote survival and outgrowth of serotonergic neurons. One of their families, S100 is a calcium-binding protein composed of two subunits, and S-100 α and S-100 β are expressed selectively by specific cell types. We tried immuno-histochemical S-100 β staining to the thin sectioned specimens of formalin-fixed and paraffin-embedded myocardial materials. The materials were obtained from autopsy cases with myocardial infarction (MI) and without MI as control.

In control cases, positive S-100 β staining element assumed as nerve structure, was found around numbers of cells, including Schwann cells, Purkinje and working myocytes, and negative staining for myocyte, endothelial cell, fibrocyte and fibroblast. In MI cases, the positive S-100 β staining element was obtained with almost equal level as control only in fresh MI, but it was reduced in old MI. The evidence suggests that loss of autonomic nerve element was associated with myocyte necrosis due to ischemia.

Key ward: Innevation in human myocardium, S-100 β , Immuno-histochemical staining, Myocardial infarction