

Localization and Quantification of Various Types of Myocardial Interstitial Collagen and Its Relation to Cardiac Function in Diabetes Mellitus and Non-Diabetes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8167

糖尿病心間質における型別コラーゲンの局在, および その定量的評価と心機能に及ぼす影響の検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

梅 田 研

(平成2年1月13日受付)

糖尿病心間質における型別コラーゲンの局在および, その定量的評価とその心機能におよぼす影響を検討するために, 糖尿病群 (type I および II), と非糖尿病群を対象に心内膜心筋生検により得られた心筋標本を特異的型別抗ヒトコラーゲン抗体を用いた免疫組織学的方法で染色し, 各型別コラーゲンの局在の検討および定量的な評価を行い, 心臓カテテル検査で得られた心機能の各指標との関係について検討した. 糖尿病群では, 非糖尿病群に比して一回心拍出係数 (stroke volume index, SI), および急速流入期流入量 (rapid filling volume index, RFVI) の有意な減少を認め, また左室拡張末期圧 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) は有意に上昇していた. 組織学的検討では糖尿病群において, 心筋細胞横径, 間質の線維化が有意に増加しており, 心筋の配列の乱れ度を示す離心率は有意に小であった. 糖尿病群と非糖尿病群では, 心筋間質における型別コラーゲンの局在部位に違いを認めなかったが, I 型, III 型, VI 型の各間質コラーゲンの局在にはそれぞれ違いが認められた. また型別コラーゲンの定量的検討の結果, 糖尿病群では非糖尿病群に比してIII型コラーゲンが有意に増加していた. 心機能と組織所見の対比検討では RFVI, 拡張末期容量係数 (end-diastolic volume index, EDVI) で除した RFVI (RFVI/EDVI), は間質線維化量といずれも負の相関関係を認めたが心筋細胞横径, 離心率とは有意の相関を認めなかった. 重回帰分析の結果 RFVI/EDVI には間質線維化量が最も大きく関与していた. RFVI はIII型コラーゲン量と, また RFVI/EDVI は, I およびIII型コラーゲン量と有意な負相関を示した. また, 左室駆出分画 (ejection fraction, EF) は, I およびVI型コラーゲン量と有意な負相関を示した. 以上より糖尿病ではその早期において拡張機能の低下が認められ, これには心筋間質におけるIII型コラーゲンの増加が関与しているものと考えられた. また心機能と各コラーゲンの関連性に関して, 拡張障害にはIおよびIII型の増加が, 収縮障害にはIおよびVI型コラーゲンの増加が関与する可能性が推測された.

Key words diabetic heart, various types of collagen, point-counting method, cardiac function

糖尿病では, 冠動脈硬化や高血圧により二次的な心筋障害が発生することは古くから知られている¹⁾. しかし, 近年これら冠動脈硬化や高血圧に起因しない心筋障害, いわゆる“糖尿病性心筋症”の存在が指摘されて注目されている²⁻⁵⁾. 動物実験⁶⁻¹²⁾, および臨床検査所見上¹³⁻²⁴⁾ 糖尿病心では, 収縮, 拡張機能の異常が

認められるという報告が多い. また, 糖尿病心の病理組織学的検討では, 心筋細胞の肥大, 間質の線維化の増加がみられたとする報告が多く²⁴⁾²⁵⁾⁻²⁸⁾, 心機能障害との関連が考えられる. 一方, 間質線維化の大部分をしめるコラーゲン線維には, 分子構造の異なる様々な型が存在し, その組織内分布や, 各種疾患での変化に

Abbreviations: DM, diabetic group; e, eccentricity; EDVI, end-diastolic volume index; EF, ejection fraction; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; ND, non-diabetic group; RFVI, rapid filling volume index; SI, stroke volume index

ついて多くの報告が認められる^{29)~34)}。特に骨格筋や心筋組織では、コラーゲンの質的、量的変化が収縮、弛緩といった筋組織の機能と関係することが知られ、生化学的手法^{35)~40)}、および電子顕微鏡を用いた超微細構造の解剖学的検討等⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾の多くの研究がみられる。著者は、糖尿病心間質における型別コラーゲンの局在、および各型別コラーゲンの定量的評価とその心機能に及ぼす影響の解明を目的とし、心内膜心筋生検法で得られた右室心筋組織標本で、I, III, IV, V, VI型抗ヒトコラーゲン抗体を用いた免疫組織学的手法により、心間質の型別コラーゲンの局在ならびにその定量的評価を行い、さらに心臓カテーテル検査で得られた心機能の指標との関係について検討した。

対象および方法

I. 対 象

心愁訴の精査目的に当科へ入院し、心臓カテーテル検査を施行するも冠動脈造影上有意狭窄を認めなかった糖尿病患者15名(男性9名, 女性6名, 平均年齢 46.3 ± 13.0 歳(mean $\pm$ SD))および心愁訴の精査目的に当科へ入院し、心臓カテーテル検査を含む各種心精査を施行するも異常を認めなかった非糖尿病群11名(男性7名, 女性4名, 平均年齢 48.1 ± 9.0 歳)を対象とした。なお心臓カテーテル検査時、心筋病変の存在

を疑い心室右室側の心内膜心筋生検を全例に施行した。二群間に年齢の有意差は認めなかった。高血圧, 腎不全, 膠原病等の心臓に影響を及ぼす他の疾患の合併例は対象より除外した。表1に対象とした糖尿病患者の臨床所見を示した。

II. 心臓カテーテル検査法

経皮的大腿動静脈穿刺法により、冠動脈造影, 左室造影を含む左右心臓カテーテル検査を施行した。心内圧, 大動脈圧の測定には、トランスデューサー746, Mingograf 82 (SIEMENS 社, 西独)を用い、平均圧は電気的積分回路にて算出した。

左室容積の解析は左室造影第一斜位像でピクチャーアナライザー $\Sigma 5 / E$ (Medical System Research Company, 東京)を用い Kennedy の面積一長軸法で左室拡張末期より1心拍にわたり60分の1秒毎の左室容積を算出し、左室拡張末期容積, 左室収縮末期容積から左室駆出率を求めた。また、得られた各左室容積をマイクロコンピュータに入力しフーリエ変換を用いて曲線近似して左室容積一時間曲線およびその1次, 2次微分曲線を作製し、急速流入期流入量, 緩徐流入期流入量, 心房収縮期流入量を算出した(図1)。なお、左室造影はシネアンギオ装置 Cardoscop-U (SIEMENS 社, 西独)を用い、35 mm シネフィルム60コマ/秒で記録した。

Table 1. Clinical features of 15 diabetic patients

	Age (yr)	Sex	Duration of DM (yr)	Treat- ment	FBS (mg/dl)	75gGTT 120 min (mg/dl)	HbA1c (%)	Retina (Scott)	Pr	Nephropathy		Neuropathy		
										Cr (mg/dl)	PSP15' (%)	ATR	Vibration	OD
1)	60	F	10	Drug (Glibenclamide)	248	488	6.8	IIIa	—	1.0	21		D	—
2)	43	F	13	Insulin	203	—	8.5	II	+	1.1	37	—	D	+
3)	54	M	8	Diet	266	452	11.1	0	—	1.2	40	+	D	—
4)	66	F	11	Diet	159	285	7.5	I	—	0.7	39	+	N	—
5)	46	M	6	Diet	186	419	8.4	Ia	—	0.9	47	+	N	—
6)	41	F	6	Diet	122	273	5.6	IIIb	—	0.9	43	—	D	—
7)	49	F	17	Insulin	270	—	—	IIIb	—	0.9	28		D	—
8)	45	M	2	Diet	158	267	5.7	0	—	1.0	37	+	N	—
9)	27	M	8	Insulin	233	—	—	0		0.8	46		—	—
10)	33	M	16	Insulin	110	379	13.2	IIa	—	0.8	45		D	—
11)	27	F	8	Insulin	247	—	10.4	II	+	0.6	37		—	—
12)	58	M	15	Diet	184	399	7.1	0	—	1.1	41	+	N	—
13)	49	M	0.5	Diet	168	354	9.7	0	—	1.2	46	+	D	—
14)	39	M	8	Insulin	188	—	2.6	III	2+	1.3	36	—	D	+
15)	67	M	2	Drug (Glibenclamide)	288	574	8.1	0	—	0.9	25	—	D	—

M, male; F, female; DM, diabetes mellitus; FBS, fasting blood sugar; GTT, glucose tolerance test; Pr, proteinuria; Cr, creatinine; PSP, phenolsulfonphthalein test; ATR, achilles tendon reflex; OD, orthostatic disturbance; N, normal; D, disturbed

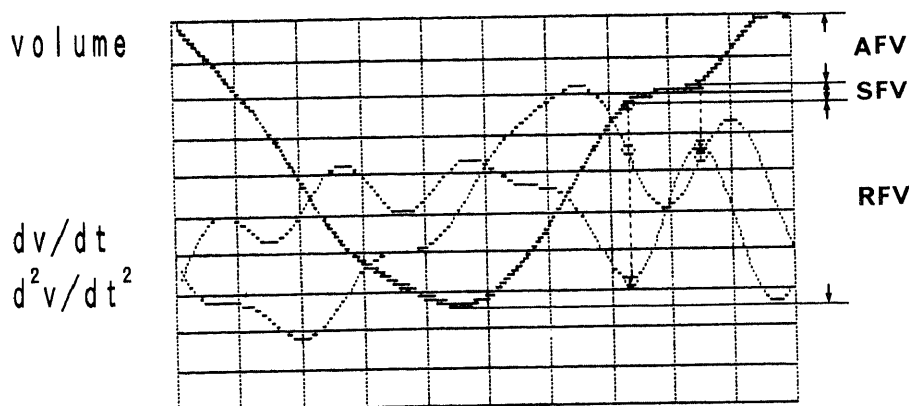


Fig. 1. Left ventricular time-volume curve reconstructed from Fourier analysis. From the peak of the second differential curve, the junctures between the rapid and slow filling phases and between the slow filling and atrial systolic phases were determined, and the rapid filling volume (RFV), the slow filling volume (SFV) and the filling volume during atrial systole (AFV) were calculated.

III. 心内膜心筋生検法

心臓カテーテル検査時に同時に施行した。右大腿静脈より今野・榊原式生検鉗子を用い、心室中隔右室側下部より心筋を採取した。

IV. 病理組織学的検査法

心内膜心筋生検により得られた標本は、直ちに10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋後、心筋細胞が縦断される面で4μmの厚さに薄切りし、各標本当り7つの連続切片を作製した。うち一つにヘマトキシリン・エオジン染色をまた一つにはマロリー・アザン染色を施し、他の5つは、抗コラーゲン抗体の染色に使用した。

1. 抗コラーゲン抗体による間接酵素抗体法

対象中の糖尿病群11例、非糖尿病群5例に対して抗コラーゲン抗体の染色を行った。ホルマリン固定組織のパラフィン切片に対して0.05% protease type XXIV (Sigma, USA) で37°C, 30分間処理した後、0.3%過酸化水素で非特異的反応を阻害した。金沢大学医学部第一病理学教室より提供を受けた抗I, III, IV, V, VI型コラーゲン抗体⁴⁰⁾を用いてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法⁴⁰⁾で免疫染色を行った。

2. 各型別コラーゲンの局在に関する検討

各症例のマロリー・アザン染色で認められた線維化を次の3群に分けた。(1) 筋内膜線維化 (endomysial fibrosis), 個々の心筋細胞を取り巻くように存在する線維化。(2) 筋周膜線維化 (perimysial fibrosis), 数個の心筋細胞からなる subunit の周囲に存在する線維化である。しばしばここには毛細血管が存在する。(3) 血

管周囲線維化 (perivascular fibrosis), 径が10μm から50μm の間の小動脈周囲の線維化と定義した。今回の検討では10μm 以下の血管は毛細血管と判定した。これら各々の領域における型別コラーゲンの分布を次の基準に従って検討した。(一), 染色の全く認められないもの。(1+), ごく僅かに染色の認められるもの。(2+), かなり強い染色を認めるもの。(3+) 強い染色を認めるもの。ここで、標本の固定や染色の良不良、さらには抗体の濃度等による影響を除外するために、標本中の心外膜を染色の基準として用いた。すなわち、心外膜と同程度に染まっている場合を(3+), 心外膜よりやや弱い染色を認める場合を(2+)とした。

3. 心筋細胞横径の測定

心筋細胞横径の測定は、ヘマトキシリン・エオジン染色の標本を用い、Baandrup ら⁴⁶⁾および Sekiguchi ら⁴⁷⁾の方法に準じ、心筋細胞の縦断面で核の存在する部位での横径を50個以上、400倍の倍率下で接眼マイクロメーターを用いて測定し、その平均値を求めた。計測の際、心内膜直下の細胞、筋収縮帯の強い細胞、胞体内に多量の変性物質が沈着していた細胞、および心筋細胞の分岐部に核が存在していたものは、測定より除外した。

4. 心筋間質線維化並びに型別コラーゲンの定量化

心筋間質線維化、および各型別コラーゲンの定量化はマロリー・アザン染色、および各型別コラーゲン染色の標本で点-計数法 (point-counting method)^{28,48)}にて行った。著者の方法は、各ポイント間距離が10μm の格子を用いて行い (図2), 心筋細胞および、マロ

リー・アザン染色では青く染まった間質線維化にあたるポイントを、各型別コラーゲン抗体による染色では褐色に染まったポイントを、計2000個以上測定し、間質線維化ならびに型別コラーゲンの占める割合を図3の式を用いて求めた。

5. 心筋細胞の配列の乱れ度の定量化

心筋細胞の配列の乱れ度を示す離心率は、Tezukaの方法⁴⁾に従った。すなわち直径300 μ mのアイピースを用いて15度間隔の直線を引き(図4)、各直線と交わる心筋細胞数を数え、全ての方向の交点数の平均に対する比を極座標上にプロットして楕円を算出し、その楕円の離心率を求めた。離心率は1に近いほど楕円から円に近づき配列の乱れが弱いことを意味する。1標本から3カ所の離心率を求め、その平均をその標本の離心率とした。

V. 検査法

成績はすべて平均値と標準偏差で示した。糖尿病群、非糖尿病群の各データの平均値の差の検討は、対応のない場合のt検定(unpaired t-test)を用い、組織学的データと心機能の諸指標との関係は、Pearsonの相関係数、回帰分析および重回帰分析を用いて検討した。危険率 $P < 0.05$ を有意差有りとして判定した。

成 績

I. 心機能の評価

表2に示すように糖尿病群(diabetic group, DM)では1回心拍出係数(stroke volume index, SI)が 50.0 ± 11 ml/m²/bと非糖尿病群(non-diabetic group, ND)の 59.3 ± 11 ml/m²/bに比して有意に小さく、急速流入期流入量(rapid filling volume index, RFVI)も

POINT-COUNTING METHOD

points were divided as follows

F: points lying on the interstitial fibrosis
M: points lying on the myocardial fibers
o: points lying on the other space

$$\text{percentage of fibrosis} = \frac{\text{number of F}}{(\text{number of F}) + (\text{number of M})} \times 100$$

number of F + number of M > 2000 points

Fig. 3. Point-counting method.

Table 2. Hemodynamic parameters of cardiac catheterization in non-diabetic group and diabetic group

	DM	ND	p value
No.	15	11	
M/F	9/6	7/4	
Age (years)	46.3 $\pm$ 13.0	48.1 $\pm$ 9.0	ns
EDVI (ml/m ²)	73.6 $\pm$ 20.5	81.6 $\pm$ 12.8	ns
ESVI (ml/m ²)	23.6 $\pm$ 12.8	22.5 $\pm$ 7.7	ns
SI (ml/m ² /b)	50.0 $\pm$ 11.2	59.3 $\pm$ 10.8	0.05
EF (%)	68.3 $\pm$ 8.3	72.1 $\pm$ 7.8	ns
RFVI (ml/m ²)	28.9 $\pm$ 8.1	38.1 $\pm$ 8.3	0.01
SFVI (ml/m ²)	8.4 $\pm$ 5.0	9.5 $\pm$ 4.3	ns
AFVI (ml/m ²)	12.7 $\pm$ 6.1	10.7 $\pm$ 4.4	ns
RFVI/EDVI	0.40 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.08	ns
SFVI/EDVI	0.14 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.05	ns
AFVI/EDVI	0.17 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.04	ns
LVEDP (mmHg)	10.2 $\pm$ 3.9	7.3 $\pm$ 1.8	0.05

ND, non-diabetic group; DM, diabetic group; EDVI, end-diastolic volume index; ESVI, end-systolic volume index; SI, stroke volume index; EF, ejection fraction; RFVI, rapid filling volume index; SFVI, slow filling volume index; AFVI, filling volume index during atrial systole; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure

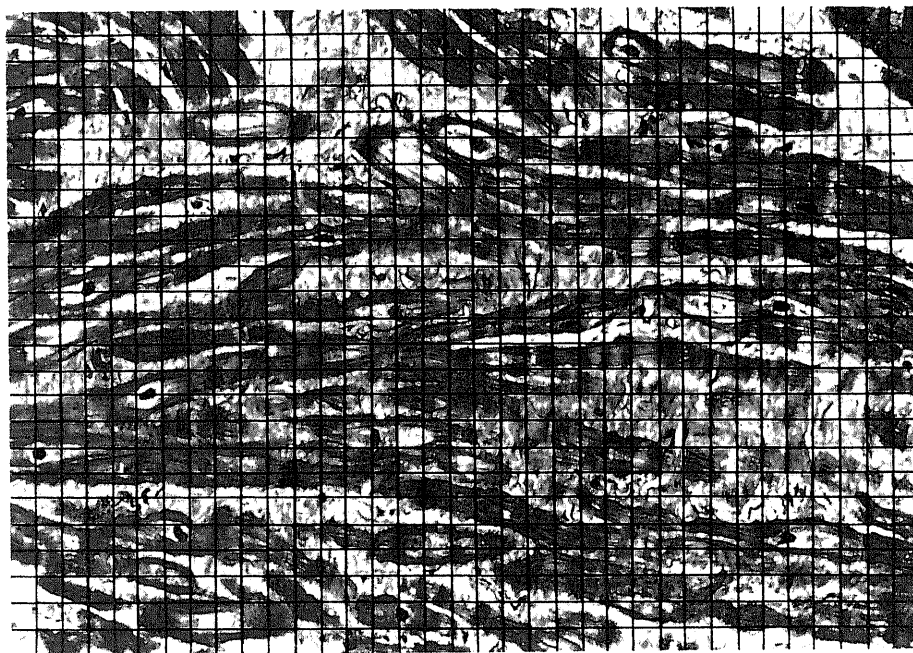


Fig. 2. Point-counting method using a square grid. The distance between parallel test lines is 10μ m. Mallory-Azan stain.

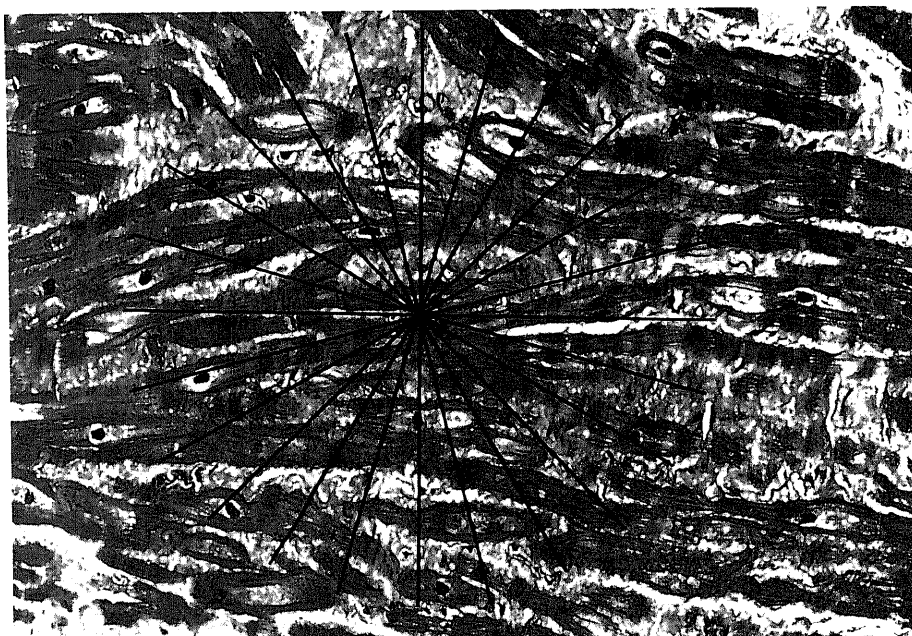


Fig. 4. Measurement of eccentricity. Radial test lines of equal length divide 2π into 24 equal angles of $\pi/12$.

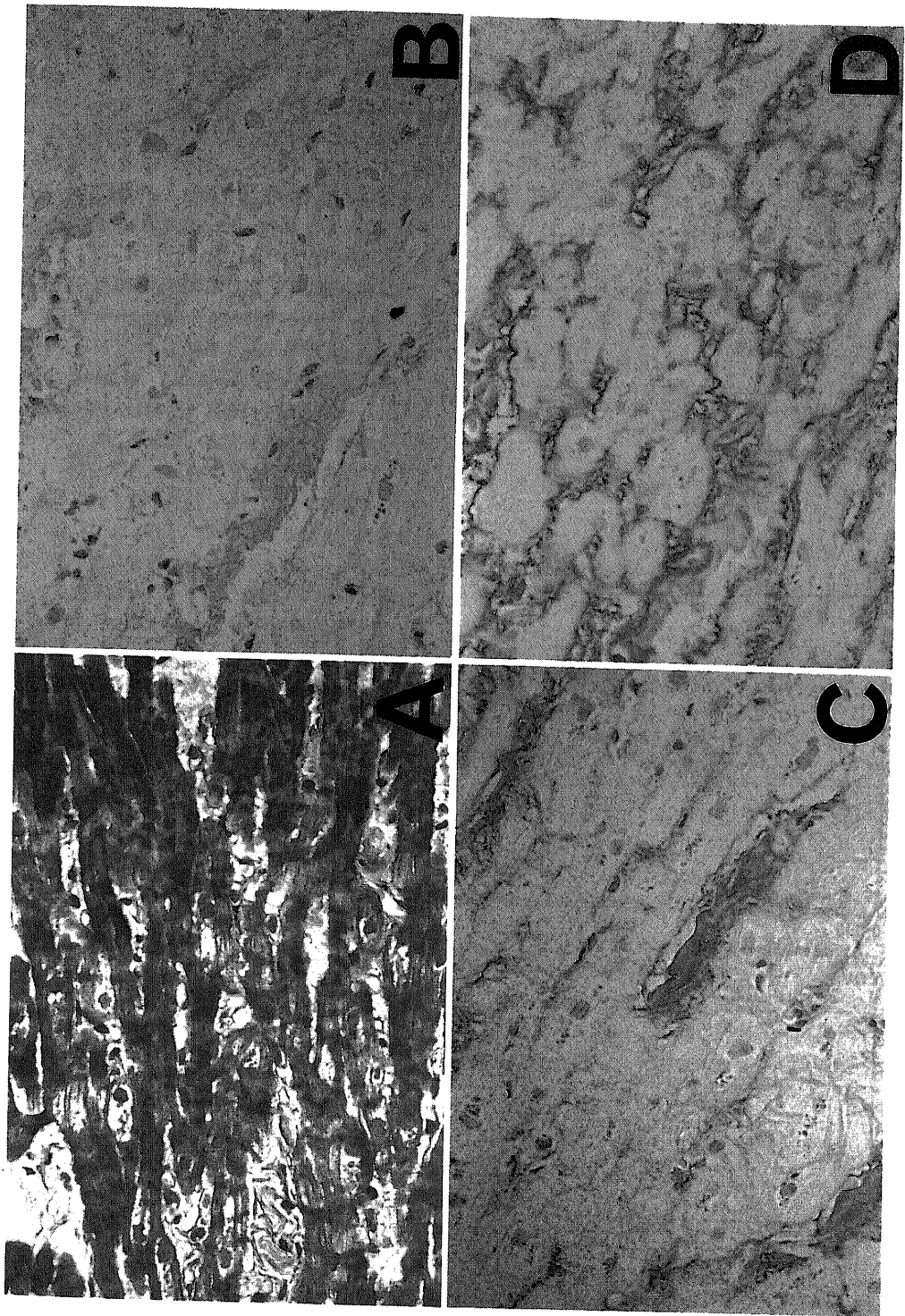


Fig. 5. Immunostaining for collagen types I (B), III (C) and VI (D). Type I collagen is present only in the perimysium. Type III collagen is present predominantly in the perimysium with faint staining of the endomysium. Type VI collagen is mainly confined to the endomysium. (A); Mallory-Azan stain.

Table 3. The distribution of collagen types I, III, VI

	I			III			VI		
	PM	EM	PV	PM	EM	PV	PM	EM	PV
(-)	3	13	0	0	3	0	3	0	0
(+)	5	2	1	1	3	0	7	0	3
(#)	8	2	4	3	8	0	5	3	2
(##)	2	1	1	14	4	6	3	15	1
	18	18	6	18	18	6	18	18	6

Staining pattern :

(-) not detectable; (+) trace; (#) moderate; (##) abundant

I, type I collagen; III, type III collagen; VI, type VI collagen

PM, perimysium; EM, endomysium; PV, perivascular

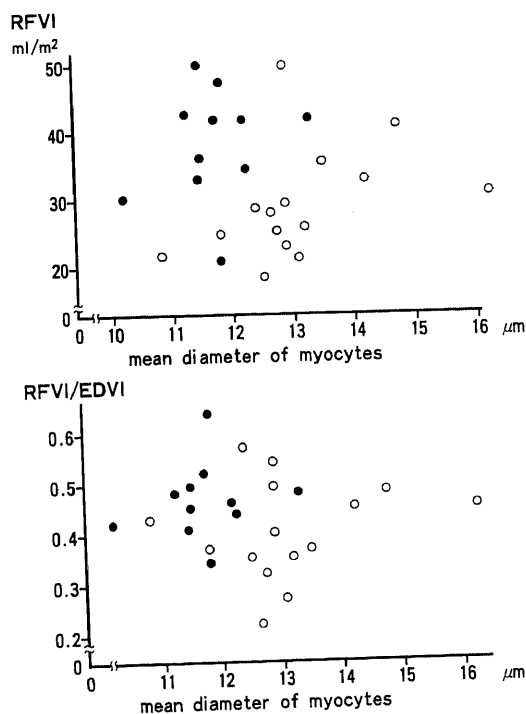


Fig. 6. Correlation between RFVI and RFVI/EDVI, and mean diameter of myocytes. There are no significant correlation between RFVI and RFVI/EDVI, and mean diameter of myocytes in ND and DM. ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as Table 2.

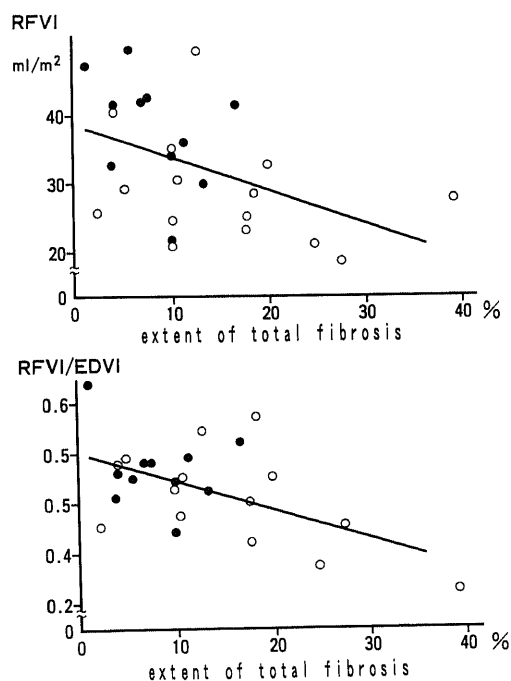


Fig. 7. Correlation between RFVI and RFVI/EDVI, and extent of total fibrosis. About RFVI (upper), the regression equation in ND and DM is $Y = -0.484X + 38.7$ and the coefficient of correlation is $r = -0.457$ ($p < 0.05$, $n = 26$). About RFVI/EDVI (lower), the regression equation in ND and DM is $Y = -0.057X + 0.5$ and the coefficient of correlation is $r = -0.543$ ($p < 0.01$, $n = 26$). —, regression line in ND and DM; ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as in Table 2.

DM 群が $28.9 \pm 8.1 \text{ ml/m}^2$ と ND 群 $38.1 \pm 8.3 \text{ ml/m}^2$ より有意に小であった。RFVI/EDVI は統計学的に有意ではなかったが DM 群 0.4 ± 0.1 , ND 群 0.47 ± 0.08 と DM 群が小さい傾向にあった。また左室拡張末期圧 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) が DM 群 $10.2 \pm 3.9 \text{ mmHg}$ と ND 群 $7.3 \pm 1.8 \text{ mmHg}$ より有意に高値であった。収縮期の指標である左室駆出率 (ejection fraction, EF) には差が認められなかった。

II. 右室心内膜下生検標本における組織学的検討

1. 型別コラーゲンの局在に関する検討

I 型コラーゲンは、筋周膜 (perimysium) および血管周囲 (perivascular) に強い染色を認めたが筋内膜 (endomysium) にはほとんど染色を認めなかった。III 型コラーゲンは、筋周膜、血管周囲に強い染色を、筋内膜にやや弱い染色を認めた。VI 型コラーゲンは、筋内膜に強い染色を認めたが、血管周囲、筋周膜の染色はこれに比して弱かった (表 3)。IV 型コラーゲンは、小血管内膜に弱い染色を認めるのみであり、間質にはほとんど染色を認めなかった。また、V 型コラーゲンはほとんど染色を認めなかった。代表例を図 5 に示す。

2. 組織学的指標の定量的評価に関する検討

表 4 に示すように、DM 群では、心筋細胞横径が $13.1 \pm 1.28 \mu\text{m}$ と ND 群 $11.7 \pm 0.76 \mu\text{m}$ に比して有意に大であり、また心筋の配列の乱れを示す離心率 (eccentricity, e) は DM 群が 0.91 ± 0.092 と ND 群

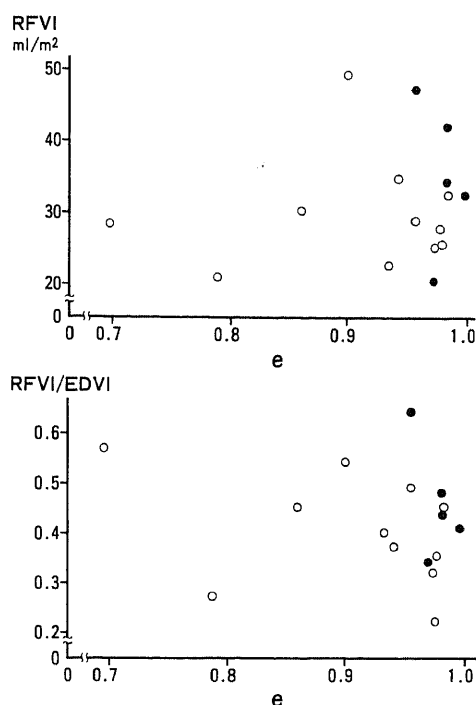


Fig. 8. Correlation between RFVI and RFVI/EDVI, and eccentricity (e). There are no significant correlation between RFVI and RFVI/EDVI, and index of disarrangement of myocytes in ND and DM. ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as Table 2.

Table 4. Histopathological parameters of endomyocardial biopsies in non-diabetic group and diabetic group

	Size of myocytes		Percentage of fibrosis				Eccentricity
	(μ m)	Azan (%)	I (%)	III (%)	VI (%)		
ND	11.7 $\pm$ 0.76	8.2 $\pm$ 4.6	3.7 $\pm$ 4.6	5.1 $\pm$ 4.9	19.2 $\pm$ 5.7	0.98 $\pm$ 0.015	
DM	13.1 $\pm$ 1.26	15.4 $\pm$ 9.9	10.1 $\pm$ 10.1	17.8 $\pm$ 8.5	22.1 $\pm$ 9.8	0.91 $\pm$ 0.092	
p value	0.01	0.05	ns	0.01	ns	0.05	

ND, non-diabetic group; DM, diabetic group; I, type I collagen; III collagen; VI, type VI collagen

Table 5. Multiple regression analysis

	R	p	Standard X1	coefficient X2	correlation X3
Y=RFVI/EDVI					
Y=0.972-0.0756X2-0.48X	0.68	0.05	0	-0.675	-0.356

X1, diameter of myocytes; X2, percentage of total fibrosis; X3, eccentricity

0.98±0.015より有意に小であった。心筋間質線維化の定量的評価では、マロリー・アザン染色による線維化(総%線維化)(DM 群15.4±9.9%, ND 群8.2±4.6%)およびIII型コラーゲン(DM 群17.8±8.5%, ND 群5.1±4.9%)でDM 群が有意に大であったが、I型およびVI型コラーゲンには有意差が認められなかった(表4)。

Ⅲ. 心機能と組織学的所見の対比検討

1. 拡張機能と組織学的所見の検討

拡張早期指標としてRFVIとRFVI/EDVIを用い、組織学的各指標との関係を検討した。RFVI, RFVI/EDVIの両者共に心筋細胞横径とは有意な相関を認めなかった(図6)。総%線維化と拡張早期指標との関係では、RFVI($r = -0.457$, $p < 0.05$), RFVI/EDVI($r = -0.543$, $p < 0.01$)共に有意の負の相関を認めた(図7)。eと拡張早期指標との関係では、RFVI, RFVI/EDVIともに有意な相関を認めなかった(図8)。拡張早期指標と組織所見の重回帰分析では(表5)、RFVI/EDVIとの間に重回帰係数 $R = 0.68$ ($p < 0.05$)の重相関関係を認めた。心筋細胞横径、総%線維化、離心率の標準偏回帰係数では総%線維化の比重が最も大であった。

次に拡張早期指標と型別コラーゲンの関係を示す。RFVIは、III型コラーゲンとの間に有意の負の相関を示したが($r = -0.505$, $p < 0.05$)、I型およびVI型コラーゲンとの間には有意の相関は認められなかった(図9)。また、RFVI/EDVIは、総%線維化($r = -0.543$, $p < 0.01$)、I型コラーゲン($r = -0.635$, $p < 0.01$)、およびIII型コラーゲン($r = -0.633$, $p < 0.01$)とそれぞれ有意の負の相関を示したが、VI型コラーゲンとの間には有意の相関はなかった(図10)。

2. 収縮機能と組織学的所見の対比検討

収縮機能の指標として、SIおよびEFを用いた。SIは、いずれの組織学的指標とも有意の相関を示さなかった。EFは、心筋細胞横径、総%線維化、および離心率のいずれとも相関を示さなかったが、I型コラーゲン($r = -0.510$, $p < 0.05$)およびVI型コラーゲン($r = -0.500$, $p < 0.05$)との間に有意の負の相関を認めた(図11)。

考 察

糖尿病では肥満、脂質代謝異常に加えて、腎症とともに進展してくる高血圧症等により冠動脈硬化が進行し易いことが疫学的に示されている¹⁾。一方糖尿病では冠動脈硬化を有しない例にも心筋障害が認められるという報告も多い。1972年にはRublerが²⁾、糖尿病性

腎糸球体硬化症で高血圧や冠動脈狭窄を認めない4例の剖検心において、心筋間質のびまん性線維化、心筋細胞肥大、心筋内小冠動脈の壁肥厚、酸性ムコポリサッカライドの沈着による内腔狭小化を認め、新しいタイプの心筋症として報告した。次いで1974年にはHambyが³⁾主幹冠動脈に病変のない剖検心において、小冠動脈周囲の線維化、血管内膜内皮細胞の増殖による架橋形成、心筋細胞肥大、間質線維化が認められる

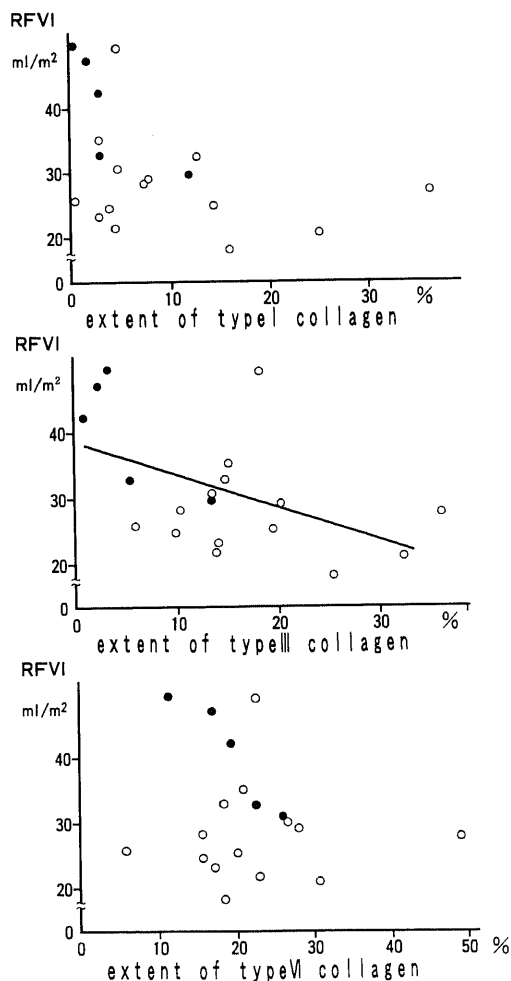


Fig.9. Correlation between RFVI and extent of various types of collagen. Statistically significant negative correlation is shown only between RFVI and extent of type III collagen. The regression equation in ND and DM is $Y = -0.51X + 38.6$ and the coefficient of correlation is $r = -0.505$ ($p < 0.05$, $n = 19$). —, regression line in ND and DM; ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as Table 2.

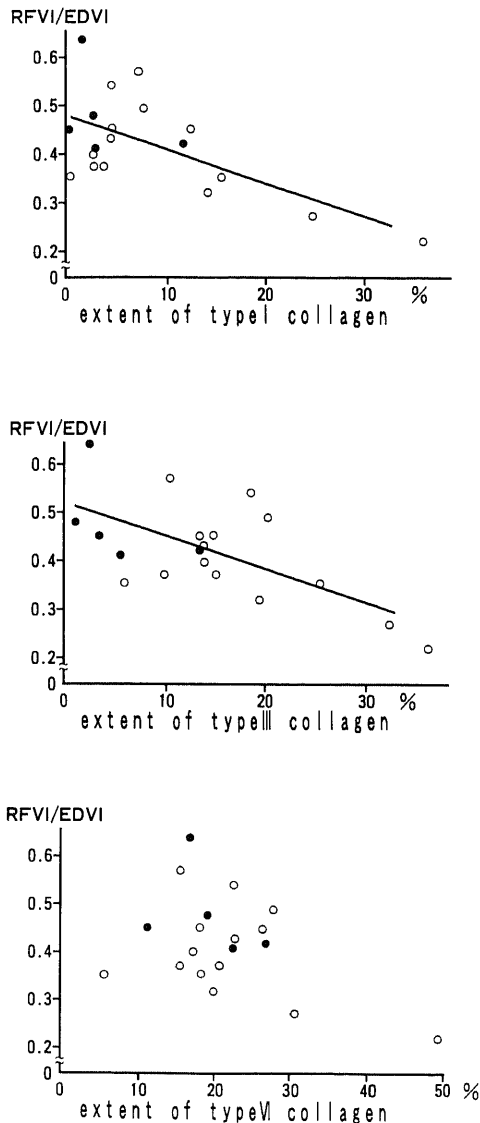


Fig. 10. Correlation between RFVI/EDVI and extent of various types of collagen. Statistically significant negative correlations are shown between RFVI/EDVI, and extent of type I and type III collagen. In type I collagen, the regression equation in ND and DM is $Y = -0.0069X + 0.48$ and the coefficient of correlation is $r = -0.635$ ($p < 0.01$, $n = 19$), and in type III collagen, the regression equation in ND and DM is $Y = -0.0067X + 0.52$ and the coefficient of correlation is $r = -0.633$ ($p < 0.01$, $n = 19$). In type VI collagen, there is no significant correlation in either group. —, regression line in ND and DM; ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as in Table 2.

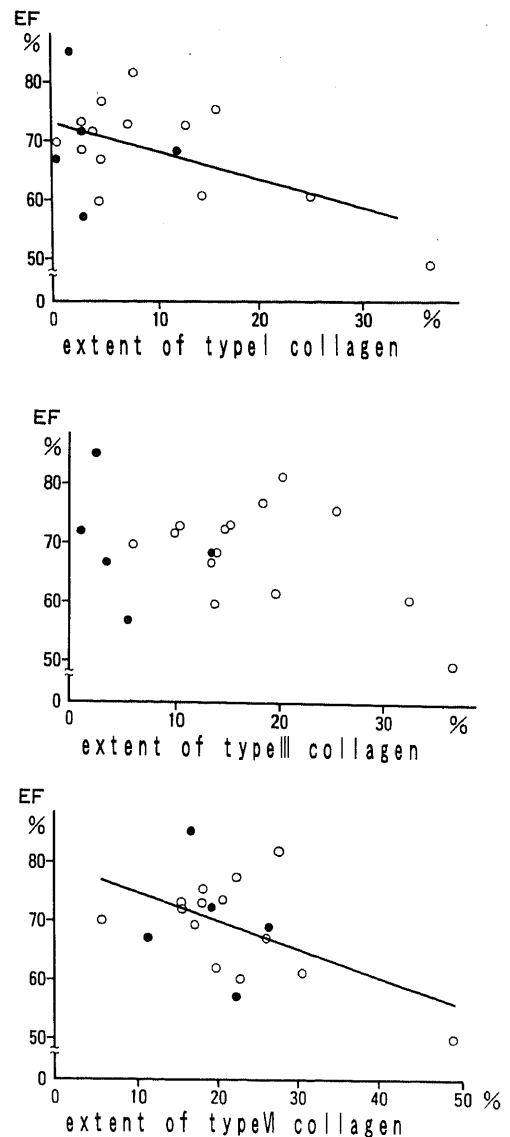


Fig. 11. Correlation between EF and extent of various types of collagen. Statistically significant negative correlations are shown between EF, and extent of type I and type VI collagen. In type I collagen, the regression equation in ND and DM is $Y = -0.46X + 73.1$ and the coefficient of correlation is $r = -0.51$ ($p < 0.05$, $n = 19$), and in type VI collagen, the regression equation in ND and DM is $Y = -0.48X + 79.4$ and the coefficient of correlation is $r = -0.50$ ($p < 0.05$, $n = 19$). In type III collagen, there is no significant correlation in either group. —, regression line in ND and DM; ●, ND; ○, DM. Abbreviations are the same as in Table 2.

ことから糖尿病では細小血管分枝の特異的病変を来すものと考え、これを“糖尿病性心筋症”と記載した。また、疫学的にも1974年の Framingham study で⁹⁾、糖尿病では冠動脈硬化、高血圧等の要因を除外しても、うっ血性心不全の発症が有意に多いと報告されている。以上のように糖尿病では、冠動脈狭窄を有さない例でも心筋障害が認められるとされ、本研究の目的はこのような症例についての検討である。しかし先にも述べたように、糖尿病では冠動脈硬化の合併も多くこれを除外するために、本研究では冠動脈造影検査にて造影上冠動脈に有意狭窄の無いことを確認出来たもののみを対象とした。

まず、糖尿病例と対照群の心機能の比較を行った。その結果、DM 群では、ND 群に比して、RFVI、および SI が有意に減少しており、LVEDP が、有意に上昇していた。また、RFVI/EDVI には有意差はなかったが、DM 群で小さい傾向を認めた。一方 EF には両群で有意差が認められなかった。すなわち、糖尿病群では、左室拡張障害が存在し、左室スティフネスの増大が認められたが収縮障害は認められなかった。

糖尿病における心機能障害については、心電図、心臓図¹⁴⁾¹⁵⁾、心エコー¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾および核医学的手法等²³⁾²⁶⁾²⁷⁾により様々な報告が認められる。しかし、冠動脈硬化の影響を完全に除外したものは少ない。Regan ら¹⁷⁾は、選択的冠動脈造影により冠動脈病変が認められなかった成人糖尿病12例の検討で、糖尿病症例では、左室拡張末期圧の上昇、左室拡張末期容積、一回心拍出量の減少、また後負荷増大により一回拍出量の上昇を伴わない左室拡張末期圧の上昇を認め、左室スティフネスが増加していることを示したが、左室駆出分画には変化がみられなかったと述べた。また、本邦では佐倉ら²⁸⁾が超音波パルス・ドプラ法を用い、拡張早期の各指標は細小血管障害のない時期より低下を示すのに対して、収縮能の指標は細小血管障害が進んだ例ではじめて低下することを示し、糖尿病心臓の病初期では、拡張障害のみが認められると述べた。今回の成績もこれらの記載と一致し、糖尿病では左室スティフネスが増大するが、収縮能には大きな変化を示さないという結果であった。

また、心室中隔右室側の心内膜下生検組織における検討では、DM 群では、ND 群に比して、心筋細胞横径、および総%線維化が有意に大きく、心筋細胞の配列の乱れ度を示す離心率は有意に小さかった。

Rubler³⁾、Hamby ら⁴⁾の報告にもみられるように、糖尿病心では、心筋細胞の肥大、間質の線維化、細小血管内腔の狭小化等組織学的異常を認めたとする報告が

多い。Ledet ら²⁹⁾は、12人の若い糖尿病患者の剖検心で点一計数法を用いて線維化を定量し、糖尿病では血管周囲線維化が有意に増加していると述べた。一方 Okada ら²⁷⁾は、冠動脈に有意狭窄のない12例の糖尿病患者剖検心で線維化を定量し、筋周膜線維化だけが糖尿病で有意に増加していると述べた。しかし、これら剖検心での検討では、病期としては終末期に偏りがちであり、また死亡にいたる過程での様々な修飾の影響を否定できない。これに対して、心筋生検標本での検討では、様々な病期、病態における組織所見が観察でき、また心機能との対比検討が可能である。Das ら²⁵⁾は、糖尿病症例の右室心内膜下生検の検討で12例中11例に間質の線維化増加が認められたと述べた。また、元田ら²⁴⁾は冠動脈狭窄を有さない糖尿病症例の右室心内膜下生検8例中、4例に心筋細胞肥大を、7例に間質の線維化を認めたと述べた。更に Nunoda ら²⁶⁾は、心筋生検組織で定量的評価を行い、糖尿病では対照に比して心筋細胞横径が有意に大きく、間質の線維化も有意に増加していると述べた。これらの報告および今回の結果より、糖尿病心では、末期ならずとも心筋細胞の肥大や、間質の線維化の増加、および心筋細胞の配列の乱れが認められるものと推定される。

次に、これらの組織学的異常が心機能に与える影響を明らかにするために組織所見と心機能の対比検討を行った。その結果、間質の総%線維化だけが拡張機能(RFVI、RFVI/EDVI)と有意の負相関を示し、心筋細胞横径および離心率は拡張機能と有意の相関を示さなかった。また、拡張機能(RFVI/EDVI)と心筋の組織所見についての重回帰分析では、組織所見の要因の中で、総%線維化の標準偏回帰係数が最も大きく、拡張機能障害に間質の総%線維化が最も大きな比重を占めていることが推測された。Regan ら⁷⁾は、アロキサン糖尿病犬では左室への生食注入時の LVEDP の上昇が大きく、心筋内のコラーゲン量が増加していることより、糖尿病における左室拡張障害の原因として心筋内のコラーゲンの増加をあげた。また、Borg ら⁴¹⁾⁴²⁾は、走査型電子顕微鏡を用い心内のコラーゲン組織を構造により分類し、数個の心筋細胞を囲むようにして存在するタイプのコラーゲン線維の量が拡張特性を決定すると述べている。

このように、心筋内の線維化は心機能に少なからず影響を与えているが、線維化の大部分を占めるコラーゲン線維には、分子構造の異なる様々な型が存在することが知られている。著者は間質線維化についてより深い考察を加えるために、I、III、IV、V、VI型抗コラーゲン抗体を用いた免疫組織学的方法で検討した。

はじめに各型別コラーゲンの局在を検討した。心筋生検組織では間質に I, III, VI 型コラーゲンの良好な染色を認めた。そして I 型コラーゲンがおもに筋周膜に染色を示したのに対し, III 型は筋周膜, 血管周囲に強く, そして筋内膜にやや弱い染色を示し, また VI 型コラーゲンは筋内膜に強い染色を認め, 各型別コラーゲンの組織内分布に違いが認められた。一方, IV 型コラーゲンは, 小血管の内膜側にわずかに染色を認めるのみであり, V 型コラーゲンはほとんど染色されなかった。糖尿病群と正常群の比較では型別コラーゲンの組織内分布に差は認められず, その局在部位に関して糖尿病の疾患特異性は明らかでなかった。I, および III 型コラーゲンは間質コラーゲンの代表的なものであり, 筋肉組織でもその組織内分布に関していくつかの報告が認められる。Durance ら⁵⁴⁾は雄牛の骨格筋で I 型は外筋周膜 (epimysium) に, III 型は筋周膜, 筋内膜に, それぞれ強い反応を認めたと述べた。Borg ら⁵⁵⁾は, ラットの新生児心で, I 型は筋周膜に少量を認めるのみであったのに対し III 型は筋周膜, 筋内膜に認められ心組織では III 型コラーゲンが優位であると述べた。また, Shekhonin ら⁵⁶⁾は, 正常人の剖検心で大きい筋束周囲や血管周囲では I, III 型の両方を認めるが, 個々の心筋細胞周囲には III 型コラーゲンは認められたが I 型は認められなかったと述べている。今回ヒトの右室心内膜下生検組織で認められた I および III 型コラーゲンの局在は今までの報告とほぼ同様であった。一方, VI 型コラーゲンに関しては, Hessel ら⁵⁷⁾が, モノクローナル抗体を用いた検討でヒト骨格筋では血管周囲, 筋周膜, 外筋周膜に反応を認めたと述べている。また, Linsenmayer らはトリ骨格筋で, 筋周膜では強い反応を認めたが, 筋内膜では反応を認めなかったとしている。今回の検討では, VI 型コラーゲンは筋内膜に強い染色を認めておりこれらの報告と相反する結果となった。また, 今回は IV および V 型コラーゲンは, 間質にはほとんど染色を認めなかったが, 心筋細胞周囲や心筋内小血管周囲にかなり強い染色を認めたという報告もあり, 今後の検討が必要と思われる。

各型別コラーゲンの定量的評価を DM 群と ND 群と比較したところ, III 型コラーゲンは DM 群で有意に増加していたが, I および VI 型コラーゲンには有意差が認められなかった。糖尿病症例の心筋生検組織をマロリー・アザン染色し光学顕微鏡で観察すると, おもに筋周膜に線状の線維化が増加していることに気付くことが多い。Okada ら⁵⁸⁾も糖尿病剖検例の検討で糖尿病心では筋周膜線維化のみが対照に比して有意に増加

していたと報告している。今回の結果から, 糖尿病で増加してくる筋周膜の線維化は主として III 型コラーゲンであろうと推測される。Medugorac ら⁵⁹⁾は, 実験的肥大心では III 型コラーゲンの増加を認めたとし, その原因として虚血による細胞障害をあげている。一方, Villee ら⁶⁰⁾は, ヒト皮膚由来の線維芽細胞の培養で, 培地中のブドウ糖濃度を上げると III 型コラーゲンの産生が増加することを示した。糖尿病では, 細小血管病変により虚血が起こることは十分に考えられるが, このように血糖値の上昇そのものがコラーゲン代謝に影響して来る可能性もある。一方, I 型コラーゲンは, 糖尿病症例で著しい増加を示すものもみられたが, DM 群であっても全く増加していない症例も多く, この結果として両群間に有意差が認められなかった。なお, DM 群で I 型コラーゲンの増加を示したものは心筋組織の鏡検上一見して著しい線維化を認め, 心筋細胞の変性も顕著な“組織学的重症例”であった。また VI 型コラーゲンは, DM 群, ND 群を問わず筋内膜に比較的良好な染色を認めた。次に型別コラーゲンの定量的評価と心機能の関係では, 拡張機能において RFVI が III 型コラーゲンとのみ有意の負の相関を, また RFVI/EDVI が I および III 型コラーゲンと負の相関を認めたが, いずれ指標も VI 型コラーゲンとは有意な相関を示さなかった。一方, 収縮機能を表す EF は, I および VI 型コラーゲンと有意の負の相関を示したが, III 型コラーゲンとは有意の相関を示さなかった。すなわち, I 型コラーゲンは収縮, 拡張の両者と相関し, III 型は主として拡張機能とまた VI 型は主として収縮機能と相関するという傾向が認められた。

型別コラーゲンと心機能の関係について検討した報告は見あたらないが, 抗コラーゲン抗体を用いた免疫電子顕微鏡による検討で, I 型は太い線維を, また III 型は細い線維を形成するという報告⁶¹⁾がある。また, III 型コラーゲンで形成される細かい網状の線維化は, I 型コラーゲンからなる太い線維より柔軟で引き延ばされ易いとされている⁶¹⁾。こういった分子構造上の理由や, 今回認められたような組織内での局在の相違によりコラーゲンの型により, それぞれ心機能に異なった影響を与えることが考えられる。

今回対象とした糖尿病症例は, 心愁訴は認めるが, 収縮機能の指標である EF は, 正常対照群と有意差を認めない心機能上は比較的軽症群と考えられる。しかし, RFVI の減少および LVEDP の上昇を認め, 拡張障害はすでにある程度進行しているものと思われる。そして, DM 群では III 型コラーゲンのみが有意に増加しており, さらに, RFVI と有意の負の相関を示し

た。以上より初期の DM 群の心機能障害の特徴は RFVI の減少に代表される拡張障害であり、これには心筋間質における III 型コラーゲンの増加が関係していると推論される。しかし、一方、著しい線維化を示す、組織学的重症例では I 型コラーゲンの増加が認められ、収縮機能の指標である EF と I 型コラーゲンとの間に有意の負の相関が認められたことより、更に心筋障害が進むに従い、I 型コラーゲンが増加し、収縮障害が出現することが予想された。著者は、うつ血性心不全を繰り返し死亡したが、冠動脈に異常を認めなかった糖尿病性心筋症と思われる 1 剖検例で、今回と同様な方法で抗コラーゲン抗体による染色を施行したが、この例では間質に I 型コラーゲンの強い染色を認めている。今回の検討では I 型コラーゲンが増加している症例の数が少なく、現段階では仮説の域をでないが今後十分な検討が必要と思われる。また、VI 型コラーゲンは、今回の検討では DM 群と ND 群で一定の傾向を示さなかった。EF と有意の相関を認めたことには、心筋細胞一つ一つを取り巻く筋内膜に主として存在することにより心機能に与える影響が大きいと推測された。

結 論

非糖尿病群 (ND 群)、糖尿病群 (type I および II) (DM 群) を対象に、心内圧測定、冠動脈造影、左心室造影を含む心臓カテーテル検査および心室中隔右室側心内膜心筋生検を施行し、特異的型別抗コラーゲン抗体による免疫組織学的手法を含めた組織学的検討により、心筋細胞横径、心筋細胞の配列の乱れ、心筋間質線維化、および型別コラーゲンの定量的評価を行い、各種心機能との関係について検討した。

1. DM 群では ND 群に比して、SI, RFVI の有意な減少および LVEDP の有意な上昇を認めた。

2. DM 群では ND 群に比して、心筋細胞横径、間質総%線維化の有意な増加を認め、また配列の乱れは有意に大であった。

3. DM 群と ND 群では型別コラーゲンの心筋組織内の局在に違いを認めなかったが、I, III, VI 型の各間質コラーゲンの間には局在に差が認められた。

4. DM 群では ND 群に比して、III 型コラーゲンの有意な増加を認めた。

5. RFVI, RFVI/EDVI は、間質総%線維化といずれも負の相関を示したが、心筋細胞横径、離心率とは有意な相関を示さなかった。重回帰分析の結果、RFVI/EDVI には間質総%線維化が最も大きく関与していた。

6. RFVI は III 型コラーゲン量と、RFVI/EDVI は、I および III 型コラーゲン量と有意な負相関を示した。また、EF は、I および VI 型コラーゲン量と有意な負相関を示した。

以上より、DM 群では拡張機能の低下が認められ、これには心筋間質での III 型コラーゲンの増加が大きく関与していると推定された。また、拡張障害には間質線維化、中でも I および III 型コラーゲンの増加が関係し、さらに収縮障害には I および VI 型コラーゲンの増加が関与する可能性が推定された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、終始、御指導頂きました金沢大学医学部第二内科講師、清水賢巳先生に深く感謝し、本研究の遂行に際し、多大なご協力を頂きました。金沢大学医学部第二内科循環器グループの各位に感謝致します。さらに、貴重な抗コラーゲン抗体を提供して頂き、また免疫組織学的検討に関して御指導、御教示を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室の中西功夫教授、岡田仁克助手に深く感謝致しますと共に、抗コラーゲン抗体の染色に御協力頂きました金沢大学医学部第一病理学教室の各位に心からお礼を申し上げます。

なお、本論文の要旨は、日本循環器学会第80回東海・第65回北陸合同地方会にて発表した。

文 献

- 1) Kannel, W. B. & McGree, D. L.: Diabetes and cardiovascular risk factors: The Framingham study. *Circulation*, 59, 8-13 (1979).
- 2) Blumenthal, H. T., Alex, M. & Goldengerg, S.: A study of lesions of the intramural coronary artery branches in diabetes mellitus. *Arch. Pathol.*, 70, 27-42 (1960).
- 3) Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W. & Grishman, A.: New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, 30, 595-602 (1972).
- 4) Hamby, R. I., Zoneraich, S. & Sherman, L.: Diabetic cardiomyopathy. *J. A. M. A.*, 229, 1749-1754 (1974).
- 5) Kannel, W. B., Hjortland, M. & Castelli, W. P.: Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am. J. Cardiol.*, 34, 29-34 (1974).
- 6) Fein, F. S., Kornstein, L. B., Strobeck, J. E., Capasso, J. M. & Sonnenblick, E. H.:

- Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.*, **47**, 922-933 (1980).
- 7) Regan, T. J., Ettinger, P. O., Khan, M. I., Jesrani, M. U., Lyons, M. M., Oldewurtel, H. A. & Weber, M.: Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs. *Circ. Res.*, **35**, 222-237 (1974).
 - 8) Regan, T. J., Wu, C. F., Yeh, C. K., Oldewurtel, H. A. & Haider, B.: Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. *Circ. Res.*, **49**, 1268-1277 (1981).
 - 9) Haider, B., Yeh, C. K., Thomas, G., Oldewurtel, H. A., Lyons, M. M. & Regan, T. J.: Influence of diabetes on the myocardium and coronary arteries of rhesus monkey fed an atherogenic diet. *Circ. Res.*, **49**, 1278-1288 (1981).
 - 10) Garber, D. W. & Neely, J. R.: Decreased myocardial function and myosin ATPase in hearts from diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **244**, H586-H591 (1983).
 - 11) Jackson, C. V., McGrath, G. M., Tahiliani, A. G., Vadlamudi, R. V. S. V. & McNeill, J. H.: A functional and ultrastructural analysis of experimental diabetic rat myocardium. *Diabetes*, **34**, 876-883 (1985).
 - 12) Bhimji, S., Godin, D. V. & McNeill, J. H.: Biochemical and functional changes in hearts from rabbits with diabetes. *Diabetologia*, **28**, 452-457 (1985).
 - 13) Ahmed, S. S., Jaferi, G. A., Narang, R. M. & Regan, T. J.: Preclinical abnormality of left ventricular function in diabetes mellitus. *Am. Heart J.*, **89**, 153-158 (1975).
 - 14) Zoneraich, S., Zoneraich, O. & Rhee, J. J.: Left ventricular performance in diabetic patients without clinical heart disease. *Chest*, **72**, 748-751 (1977).
 - 15) Seneviratne, B. I. B.: Diabetic cardiomyopathy: the preclinical phase. *Br. Med. J.*, **1**, 1444-1446 (1977).
 - 16) Sanderson, J. E., Brown, D. J., Rivellesse, A. & Kohner, E.: Diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young diabetics. *Br. Med. J.*, **1**, 404-407 (1978).
 - 17) Regan, T. J., Lyons, M. M., Ahmed, S. S., Levinson, G. E., Oldewurtel, H. A., Ahmad, M. R. & Haider, B.: Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **60**, 885-899 (1977).
 - 18) Shapiro, L. M., Leatherdale, B. A., Mackinnon, J. & Fletcher, R. F.: Left ventricular function in diabetes mellitus II: Relation between clinical features and left ventricular function. *Br. Heart J.*, **45**, 129-132 (1981).
 - 19) Shapiro, L. M.: Echocardiographic features of impaired ventricular function in diabetes mellitus. *Br. Heart J.*, **47**, 439-444 (1982).
 - 20) Goldweit, R. S., Borer, J. S., Jovanovic, L. G., Drexler, A. J., Hochreiter, C. A., Devereux, R. B. & Peterson, C. M.: Relation of hemoglobin A1 and blood glucose to cardiac function in diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.*, **56**, 642-646 (1985).
 - 21) Uusitupa, M., Siitonen, O., Pyorala, K. & Lansimies, E.: Left ventricular function in newly diagnosed non-insulin dependent (type 2) diabetics evaluated by systolic time intervals and echocardiography. *Acta. Med. Scand.*, **217**, 379-388 (1985).
 - 22) Margonato, A., Gerundini, P., Vicedomini, G., Gilardi, M. C., Pozza, G. & Fazio, F.: Abnormal cardiovascular response to exercise in young asymptomatic diabetic patients with retinopathy. *Am. Heart J.*, **112**, 554-560 (1986).
 - 23) Kahn, J. K., Zola, B., Juni, J. E. & Vinik, A. I.: Radionuclide assessment of left ventricular diastolic filling in diabetes mellitus with and without cardiac autonomic neuropathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **7**, 1303-1309 (1986).
 - 24) Airaksinen, K. E. J., Ikaheimo, M. J., Linnaluoto, M. K., Huikuri, H. V. & Takkunen, J. T.: Increased left atrial size relative to left ventricular size in young women with insulin dependent diabetes; a pre-clinical sign of the specific heart disease of diabetes? *Diabetes Res.*, **6**, 37-41 (1987).
 - 25) Ledet, T.: Diabetic cardiopathy. Quantitative histological studies of the heart from young juvenile diabetics. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. A*, **84**, 421-428 (1976).
 - 26) Nunoda, S., Genda, A., Sugihara, N., Nakayama, A., Mizuno, S. & Takeda, R.:

Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels*, **1**, 43-47 (1985).

27) Okada, R., Shimizu, M. & Kawai, S.: Morphological study of myocardial fibrosis in diabetes mellitus. *Jpn. Circ. J.*, **47**, 373 (1983).

28) Sutherland, C. G. G., Fisher, B. M., Frier, B. M., Dargie, H. J., More, I. A. R. & Lindop, G. B. M.: Endomyocardial biopsy pathology in insulin-dependent diabetic patients with abnormal ventricular function. *Histopathology*, **14**, 593-602 (1989).

29) Martinez-Hernandez, A. & Amenta, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.*, **48**, 656-677 (1983).

30) Mayne, R.: Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis*, **6**, 585-593 (1986).

31) Ooshima, A.: Collagen α B Chain. Increased proportion in human atherosclerosis. *Science*, **213**, 666-668 (1981).

32) Madri, J. A. & Furthmayr, H.: Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Human Pathol.*, **11**, 353-366 (1980).

33) Von der Mark, H., Aumailley, M., Wick, G., Fleishmajer, R. & Timpl, R.: Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 493-502 (1984).

34) Gibson, M. A. & Cleary, E. G.: Distribution of CL glycoprotein in tissue: An immunohistochemical study. *Coll. Rel. Res.*, **3**, 469-488 (1983).

35) Montfort, I. & Perez-Tamayo, R.: The muscle-collagen ratio in normal and hypertrophic human hearts. *Lab. Invest.*, **11**, 463-470 (1962).

36) Knorrung, J.: Effect of age on the collagen content of the normal rat myocardium. *Acta. Physiol. Scand.*, **79**, 216-225 (1970).

37) Bing, O. H. L., Matsushita, S., Fanburg, B. L. & Levine, H. J.: Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ. Res.*, **28**, 234-245 (1971).

38) McClain, P. E.: Characterization of cardiac muscle collagen. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2303-2311 (1974).

39) Iimoto, D. S., Covell, J. W. & Harper, E.:

Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ. Res.*, **63**, 399-408 (1988).

40) Medugorac, I. & Jacob, R.: Characterisation of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovasc. Res.*, **17**, 15-21 (1983).

41) Borg, T. K. & Caulfield, J. B.: The collagen matrix of the heart. *Fed. Proc.*, **40**, 2037-2041 (1981).

42) Borg, T. K., Ranson, W. F., Moslehy, F. A. & Caulfield, J. B.: Structural basis of ventricular stiffness. *Lab. Invest.*, **44**, 49-54 (1981).

43) Caulfield, J. B. & Borg, T. K.: The collagen network of the heart. *Lab. Invest.*, **40**, 364-372 (1979).

44) Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma. A light and electron-microscopic immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Human Pathol.*, **19**, 812-821 (1988).

45) Hus, S. M., Raine, L. & Fanger, H.: A comparative study of the PAP method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 734-738 (1981).

46) Baandrup, U. & Olsen, E. G. J.: Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. I: Morphological and morphometric aspects. *Br. heart J.*, **45**, 475-486 (1981).

47) Sekiguchi, M., Hiroe, M. & Morimoto, S.: On the standardization of histopathological diagnosis and semiquantitative assessment of the endomyocardium obtained by endomyocardial biopsy. *Bull. Heart Inst. Jpn.*, 55-85 (1979-1980).

48) 杉原範彦: 高血圧と肥大型心筋症の心筋間質線維化の定性的, 定量的対比検討および心機能に及ぼす影響の検討. *十全医学誌*, **97**, 478-495 (1988).

49) Tezuka, F.: Muscle fiber orientation in normal and hypertrophied hearts. *Tohoku, J. Exp. Med.*, **117**, 289-297 (1975).

50) 水野清雄: 糖尿病患者における潜在性心筋障害に関する検討. *十全医学誌*, **95**, 384-398 (1986).

51) 佐倉英一郎, 岡本光帥, 横手祐司, 島本博幸, 山形東吾, 網岡英世, 橋本正樹, 高橋路子, 土岡由紀

- 子, 松浦秀夫, 梶山梧朗: 糖尿病心の左室流入および駆出血流動態の分析. *Jpn. J. Med. Ultrasonics*, **13**, 416-424 (1986).
- 52) 元田 憲, 竹田亮祐, 水野清雄, 布田伸一, 五十嵐 豊, 分校久志, 多田 明, 久田欣一: 糖尿病性心筋症, *日本医事新報*, **3107**, 29-34 (1983).
- 53) Das, J. P., Mishra, R., Nayak, C. R., Mishra, H. & Basit, M. A.: Endomyocardial biopsy in diabetes mellitus. *Indian Heart J.*, **34**, 3-7 (1982).
- 54) Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J. & Bailey, A. J.: The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **79**, 248-252 (1977).
- 55) Borg, T. K., Gay, R. E. & Johnson, L. D.: Changes in the distribution of fibronectin and collagen during development of the neonatal rat heart. *Coll. Rel. Res.*, **2**, 211-218 (1982).
- 56) Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Idelson, G. L. & Koteliatsky V. E.: Participance of fibronectin and various collagen types in the formation of fibrous extracellular matrix in cardiosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **20**, 501-508 (1988).
- 57) Hesse, H. & Engvall, E.: Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3955-3961 (1984).
- 58) Linsenmayer, T. F., Mentzer, A., Irwin, M. H., Waldrep, N. K. & Mayne R.: Monoclonal antibody production and immunohistochemical identification as major connective tissue component of cornea and skeletal muscle. *Exp. cell. Res.*, **165**, 518-529 (1986).
- 59) Villee, D. B. & Powers, M. L.: Effect of glucose and insulin on collagen secretion by human skin fibroblast in vitro. *Nature.*, **268**, 156-158 (1977).
- 60) Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisher, L., Wiestner, M., Perlish, J. S. & Graves, P. N.: Ultrastructural identification of extension aminopropeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 7360-7364 (1981).
- 61) Miller, E. J.: Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. *Mol. Cell. Biochem.*, **130**, 165-192 (1975).

Localization and Quantification of Various Types of Myocardial Interstitial Collagen and Its Relation to Cardiac Function in Diabetes Mellitus and Non-Diabetes Ken Umeda, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 42—58, (1990)

Key words diabetic heart, various types of collagen, point-counting method, cardiac function

Abstract

The localization and the quantification of types I, III, IV, V and VI collagen in the biopsied myocardium of non-diabetic patients (ND) and diabetic patients (DM) was studied immunohistochemically using purified antibodies to those proteins. The extent of total fibrosis and various types of collagen were measured by the point-counting method. These data and other histopathological measurements were compared with several parameters of cardiac function obtained by cardiac catheterization. Indices of left ventricular function, the stroke volume index and the rapid filling volume index (RFVI) were significantly smaller in DM than in ND. Left ventricular end-diastolic pressure was significantly higher in DM. Histopathological parameters of biopsied myocardium showed that the mean diameters of myocytes in DM were larger than that of ND, that the percentage of fibrosis in DM was higher than that of ND and that the index of disarrangement of myocytes (eccentricity) in DM was smaller than that in ND. There was no disease-specific accumulation of collagen in DM. However the percentage of type III collagen in DM was significantly higher than that of ND. There were negative correlations between the percentage of fibrosis and RFVI, and RFVI/end-diastolic volume index (EDVI) respectively. Neither the mean diameter of myocytes nor eccentricity correlated with hemodynamic parameters. Multiple regression analysis revealed that standard coefficient correlation of percentage of fibrosis was most significant for RFVI/EDVI. There was significant negative correlation between the extent of type III collagen and RFVI. And significant negative correlations were found between the extent of type I collagen and RFVI/EDVI, and between that of type III collagen and RFVI/EDVI. The left ventricular ejection fraction negatively correlated with the extent of type I, and VI collagen. These results indicate that left ventricular chamber stiffness is increased in diabetic patients in the early phase of the disease and it relates closely to the accumulation of type III collagen in the interstitium of the heart. It is suggested that the diastolic dysfunction mainly relates to the increase of type I and III collagen, and the systolic dysfunction relates to the increase of type I and VI collagen.