

## 遺伝性高脂血症家兎における血漿トリグリセリド値と 動脈硬化病変の進展との関連

高崎聡, 伊藤恒賢\*, 友池仁暢\*\*

山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野

\*山形大学医学部附属動物実験施設

\*\*国立循環器病センター

(平成20年4月15日受理)

### 要 旨

**背景** : 高トリグリセリド血症は動脈硬化との関連が示唆されている。我々は遺伝性高コレステロール血症ウサギ (Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit) から、高度の高トリグリセリド血症 (TG>500 mg/dl) を示す系統 (TGH) と中等度の高トリグリセリド血症 (TG<250 mg/dl) の系統 (TGL) を分離した。これら2系統の動物モデルを用い、高トリグリセリド血症の程度の差による動脈硬化への影響について検討した。

**方法** : TGH21羽、TGL20羽について血清脂質および4、8、12ヶ月齢における動脈硬化を形態学的に解析した。

**結果** : 大動脈における粥状プラーク面積およびプラーク厚、冠動脈狭窄率は、TGH、TGLにおいてともに加齢とともに進行した。大動脈プラークはTGHでは大動脈弓部周辺に多いのに対し、TGLでは弓部から腹部大動脈にかけて比較的均等に分布していた。大動脈プラークの中心はマクロファージ由来の泡沫細胞とコレステリン結晶が集積しているのに対し、冠動脈狭窄部は線維筋性の増殖が主体であった。TGHの形質は常染色体優性遺伝を示すことが明らかになっている。TGHにおける大動脈プラーク分布の特徴はF2世代においても同様であった。

**結論** : 複合型高脂血症モデルにおいて動脈硬化プラークは大動脈および冠動脈に見られる。高度の高トリグリセリド血症は冠動脈硬化に対しては影響が少ないが、大動脈においては硬化巣の分布に影響を及ぼし、弓部において粥状プラークを形成しやすい。

**キーワード** : トリグリセリド、プラーク分布、WHHLウサギ、選択交配

## 緒 言

高コレステロール血症と動脈硬化との関連は数多くの実験動物モデルによる研究や大規模臨床研究で証明されている<sup>1)</sup>。一方血漿トリグリセリド値も冠動脈疾患のリスクと有意な相関があるが、その解釈は未だコンセンサスが得られていない。高トリグリセリド血症が動脈硬化性疾患におよぼす影響は、血栓形成促進やsmall dense LDL、低HDLコレステロール血症、食後高脂血症、インスリン抵抗性などが複雑に関連している可能性がある<sup>2)</sup>。近年では高トリグリセリド血症はメタボリック症候群の構成因子の一つとして注目されている<sup>3)</sup>。

ヒト疾患モデル動物は疾病の病態生理学的機序の解明において現在でも重要な役割を果たしている。高トリグリセリド血症の動物モデルについては家兎の選択交配による開発がある<sup>4)</sup>。また近年では遺伝性モデルのインスリン抵抗性を示した報告<sup>5)</sup>やトランスジェニック家兎の動脈硬化を検討した報告<sup>6)</sup>がある。しかしながら、これらの遺伝性疾患モデルは高度の高トリグリセリド血症を呈しておらず、またトリグリセリド血症と動脈硬化との関連について組織学的に厳密に検討されたものはない<sup>7)</sup>。我々は遺伝的に高コレステロール血症を示すワタナベウサギ (Watanabe heritable hyperlipidemic: WHHL) を選択交配することにより、高度の高トリグリセリド血症を呈する系統 (TGHタイプ >500 mg/dl) と比較的軽度の高トリグリセリド血症を呈する系統 (TGLタイプ <250 mg/dl) の2系統の分離に成功した。今回これらの遺伝性動物モデルを用い、大動脈および冠動脈における粥状硬化プラークの分布、大きさ、プラーク形成要素を定量的に評価し、さらに加齢による変化の検討を加えた。

## 対象と方法

## 遺伝性高トリグリセリド血症モデル (TGHおよびTGL)

本研究は山形大学医学部動物実験指針に基づき行われた。WHHLウサギは山形大学医学部附属病院動物実験施設内 (室温25°C、湿度40–60%) で飼育されたものを用いた。1日120 gのストックダイエツト (日本興産工業) を給餌し水分は自由に摂取可能な状態とした。WHHLウサギについて血清トリグリセリド値が高値群 (TG>500 mg/dl; TGH) と比較的 low 値群 (TG<250 mg/dl; TGL) をそれぞれの群内で選択交配を繰り返したところ、第5世代以降第9世代までTGHおよびTGLの出現率は100%となった。

## 形態学的検討と脂質解析

TGH 21羽とTGL 20羽について脂質解析と病理組織学的検討を行った。4ヶ月齢 (TGH 7, TGL 6)、8ヶ月齢 (TGH 7, TGL 8)、12ヶ月齢 (TGH 7, TGL 6) の時点で24時間絶食とした後、硫酸ペンタバルビタール (30–35 mg/kg 経静脈的投与) 麻酔下に採血を行った。その後失血により屠殺し、弓部大動脈から腸骨動脈分岐部まで摘出、10%ホルマリン溶液で24時間固定した。さらに心臓を摘出し直ちに上行大動脈にカニューレシオンし生理食塩水で冠動脈を還流した。その後バリウムとゼラチンを混合した水溶液を大動脈から一定の速度で注入、すぐに心臓全体を氷冷した後軟X線写真を撮影した。写真撮影後心臓も10%ホルマリン溶液で24時間固定した。

## 脂質解析

血漿コレステロール値および血漿トリグリセリド値はDinabot社製のVISIONアナライザーで酵素法にて測定した。

## 大動脈および冠動脈の肉眼的病理標本の作製

固定後、大動脈の粥状プラークをズダンⅢで染色した。摘出した大動脈全体を蒸留水で洗浄

後、50%エタノールにて30秒間前処理した後、ズダンⅢで飽和した70%エタノールに37℃ 1時間浸透、染色した。染色後写真撮影しAdobe Photoshop (Adobe System Inc.) およびNIH Imageを用いて大動脈内腔表面に対する粥状プラーク面積の割合を計測した。大動脈をそれぞれ弓部(第1肋間動脈まで)、胸部(腹腔動脈まで)、腹部(総腸骨動脈分岐部まで)に分け、部位毎にプラーク面積の割合を検討した。

冠動脈病変はバリウム・ゼラチン溶液注入後に撮影したX線写真で確認した。X線写真は最も高度の狭窄部位を見出すため、最低4方向から撮影した。X線写真上高度の狭窄病変は左右冠動脈とも入口部付近に認められた。

#### 大動脈および冠動脈の顕微鏡的病理標本の作製

大動脈は写真撮影後、弓部および腹部大動脈からそれぞれ肉眼的に最もプラーク面積の多い部位を切除し、99.5%エタノール溶液にてズダンⅢを脱色した。その後パラフィン包埋し3μmに薄切した。

心臓は全体をホルマリン固定した後、左右冠動脈入口部を含む組織片を切り出しパラフィン包埋した後、冠動脈に沿って300μm毎に3μmの連続切片を作製した。

薄切した切片を抗ウサギマクロファージマウスモノクローナル抗体(RAM11, DAKO Corp, USA)<sup>8)</sup>および抗ヒトα-smooth muscle actin抗体(1A4, DAKO A/S, Denmark)<sup>9)</sup>を用いて免疫染色した。各抗体を500倍希釈し室温で60分間インキュベート後、アビジン-ビオチン酵素複合体法(Vectastain Elite ABC kit (PK-6102, Vector Laboratories, INC., USA))を用い、ペルオキシダーゼ活性は、3,3'-ジミノベンジジン(110-09, Nacalai tesque Inc., Japan)(DAB法)にて評価した。同時に連続切片にてelastica GoldnerおよびAzan-Mallory染色も行った。

#### プラークの組織学的特徴

大動脈および冠動脈プラークの組織学的検討は塩見らの報告した方法<sup>10)</sup>を一部改変して行った。大動脈弓部と腹部大動脈の平均プラーク厚

はelastica Goldner染色標本において、(肥厚内腔面積)/(内弾性板長)で表した。冠動脈狭窄は同様にelastica Goldner染色標本において(内弾性板で囲まれた面積-内腔面積)/(内弾性板で囲まれた面積)で計算した。最も高度の狭窄を含む切片における冠動脈狭窄率を各々の冠動脈の狭窄度とした。

またプラークの構成成分としてマクロファージ、平滑筋細胞、コラーゲンについて定量的に検討した。マクロファージと平滑筋細胞の占有面積は免疫染色標本において、プラーク全体に対するジアミノベンジジン陽性の色が占める面積の割合をパーセンテージで表した。コラーゲンはAzan Mallory染色標本でコバルトブルーの線維成分とし同様に面積の割合で表した。画像解析はAdobe PhotoShop (Adobe System Inc.) およびNIH Imageを用いた。

#### TGHと野生型家兎との交配

第4世代のホモ接合体TGHと野生型である日本白色家兎とを交配し、ヘテロ接合体のF1世代を作成した。さらにF1世代間で交配を行い、33羽のF2世代を得、その内7羽が血漿コレステロール及びトリグリセリドが高値を示した(F2-TGH)。我々はF2世代の動脈硬化は野生型が交配に加わるにより第6世代のTGHより軽度になるとの仮説をたてた。これを検証するために、それぞれ18ヶ月齢のF2-TGH(n=5)と純粋に継代した第6世代TGH(n=5)の大動脈病変を上記と同様の方法で比較した。

#### 統計解析

データは平均±標準誤差で表した。プラークの大きさとプラーク構成成分における月齢間およびTGH、TGL間の比較は2-way ANOVAを用いた。大動脈および冠動脈硬化におけるTGH、TGL間の差はStudentのt検定で、月齢間の比較はScheffe検定で行った。P<0.05を統計学的に有意とした。

結 果

血漿脂質および体重

TGHとTGLの血漿脂質濃度と体重を表1に示す。体重は全月齢においてTGHよりもTGLの方が重かった。空腹時血漿トリグリセリド値はすべてのTGHで500 mg/dl以上であった。血漿コレステロール値はTGH、TGLともすべて500 mg/dl以上であった。

大動脈粥状硬化プラークの分布

図1Aに示すとおり、大動脈の粥状硬化プラークは肉眼的に明らかに確認することができ、大動脈弓部から腹部大動脈まで分布していた。プラークは加齢とともに拡大していた(図1B)。

TGHにおける弓部の平均プラーク面積の割合は4および12ヶ月齢でTGLより有意に大きかった(4ヶ月齢; 71±8 vs 41±9%, 12ヶ月齢; 94±1 vs 75±2%)。逆に腹部大動脈は8

表1. 血漿脂質値と体重

	TGH			TGL		
	CHOL(mg/dl)	TG(mg/dl)	BW(kg)	CHOL(mg/dl)	TG(mg/dl)	BW(kg)
4M	2363± 95 (n=7)	3840±170*	2.4±0.0*	1170±59 (n=6)	255±10	2.7±0.1
8M	1260±130 (n=7)	1564±296*	2.7±0.1*	977±55 (n=6)	245±34	3.1±0.1
12M	918± 76 (n=7)	1156±126*	2.7±0.1*	735±80 (n=6)	188±16	3.3±0.0

平均値±標準誤差 \*P<0.05 vs. TGL  
CHOL; コレステロール、TG; トリグリセリド、BW; 体重、M; 月齢

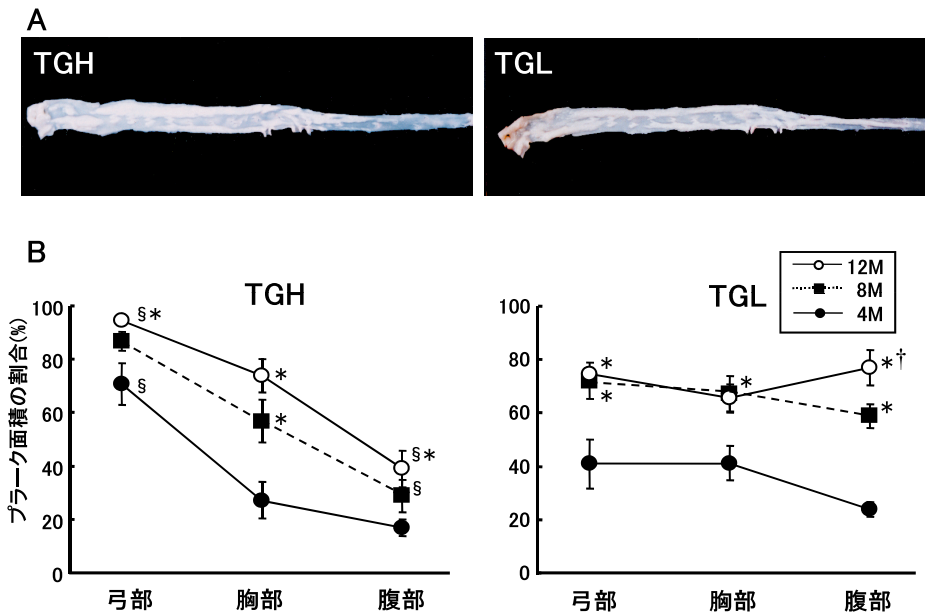


図1. 大動脈粥状プラークの分布 A: 左: TGH、右: TGL: いずれも8ヶ月齢 B: 大動脈の各部における粥状プラーク面積占有率。

§ p<0.05 vs. TGL群、\*p<0.05 vs. 4ヶ月齢、†p<0.05 vs. 8ヶ月齢

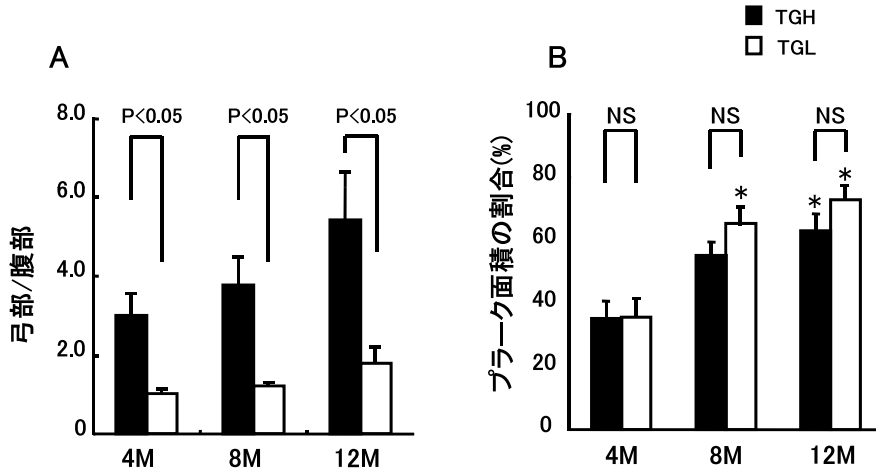


図2. A：大動脈弓部と腹部大動脈の粥状プラーク面積占有率の比 B：大動脈全体における粥状プラークの占有率  
\*p<0.05 vs. 4ヶ月齢

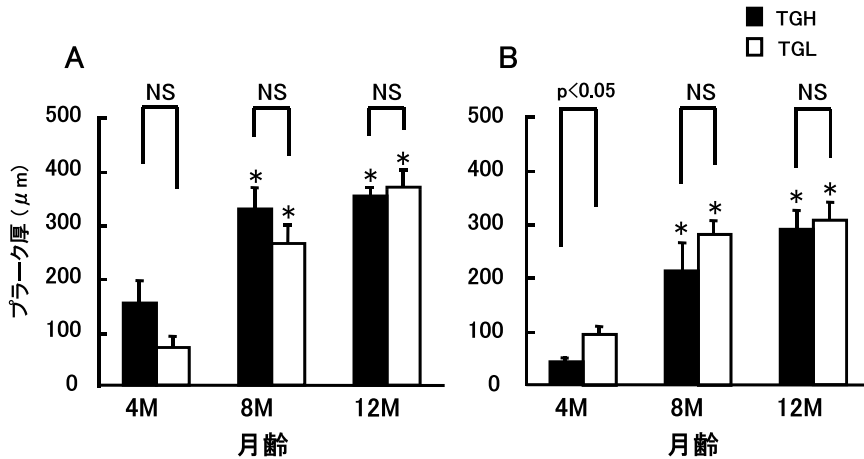


図3. 大動脈弓部の平均プラーク厚 A：大動脈弓部、B：腹部大動脈  
\*p<0.05 vs. 4ヶ月齢

および12ヶ月齢でTGHの方がTGLよりプラーク面積の範囲は有意に小さかった（8ヶ月齢； $29 \pm 6$  vs  $59 \pm 4$  %、12ヶ月齢； $39 \pm 17$  vs  $77 \pm 7$  %）（図1B）。胸部大動脈および大動脈全体ではTGH、TGL間に差はなかった（図1B、2B）。腹部大動脈に対する大動脈弓部のプラーク面積の割合の比はいずれの月齢でもTGHで有意に高値であった（図2A）。

大動脈弓部の平均プラーク厚（図3A）はTGH、TGLともに加齢とともに増大していたが、いずれの月齢でも両群間に差は認めなかった（4ヶ月齢； $154 \pm 38$  vs  $71 \pm 19$  μm、8ヶ月齢； $328 \pm 37$  vs  $264 \pm 34$  μm、12ヶ月齢； $351 \pm 19$  vs  $368 \pm 32$  μm）。腹部大動脈（図3B）では4ヶ月齢でのみTGLで有意にプラーク厚が大きかったが、8および12ヶ月齢では両群間に差

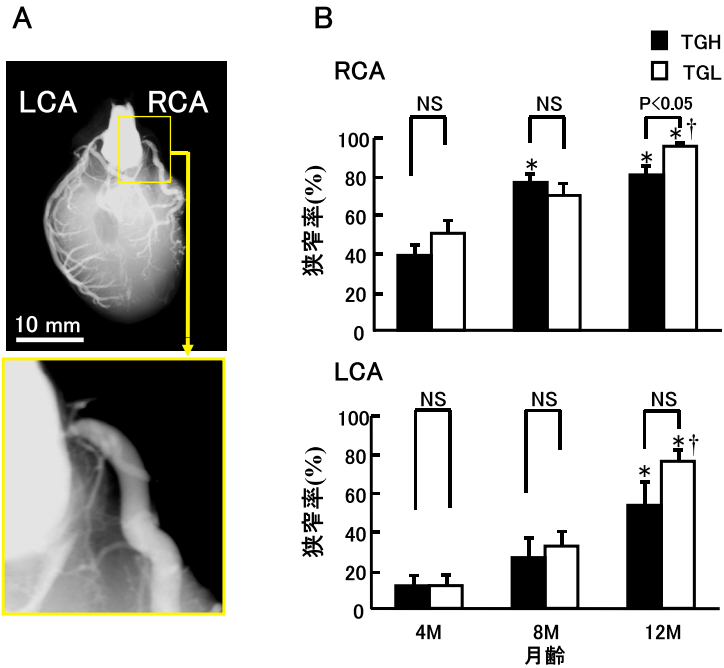


図4. 冠動脈硬化 A:冠動脈造影写真(12ヶ月齢TGH)。TGH、TGLともに高度の狭窄は冠動脈入口部に見られる。B:冠動脈狭窄率 \*p<0.05 vs. 4ヶ月齢、†p<0.05 vs. 8ヶ月齢 LCA; 左冠動、RCA; 右冠動脈

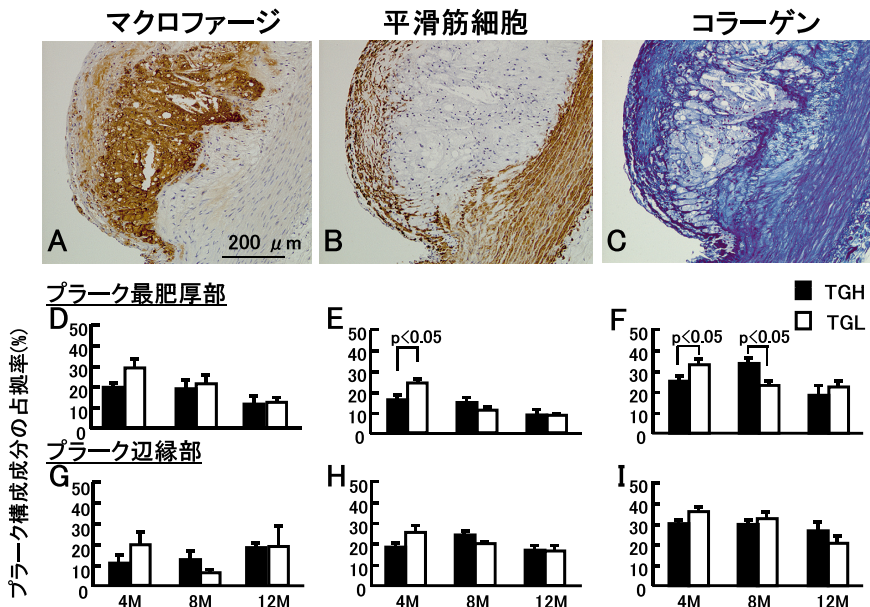


図5. 大動脈粥状プラーク内の構成成分 A~C:大動脈プラークの病理組織写真(8ヶ月齢TGL)。連続切片で以下の染色を行った。A:抗ウサギマクロファージ抗体(RAM11)、B:抗ヒトα-平滑筋アクチンモノクローナル抗体、C:Azan-Mallory染色。D~I:粥状プラーク内構成成分の占有率。D:G:Macrophages、E:H:平滑筋細胞、F:I:コラーゲン。

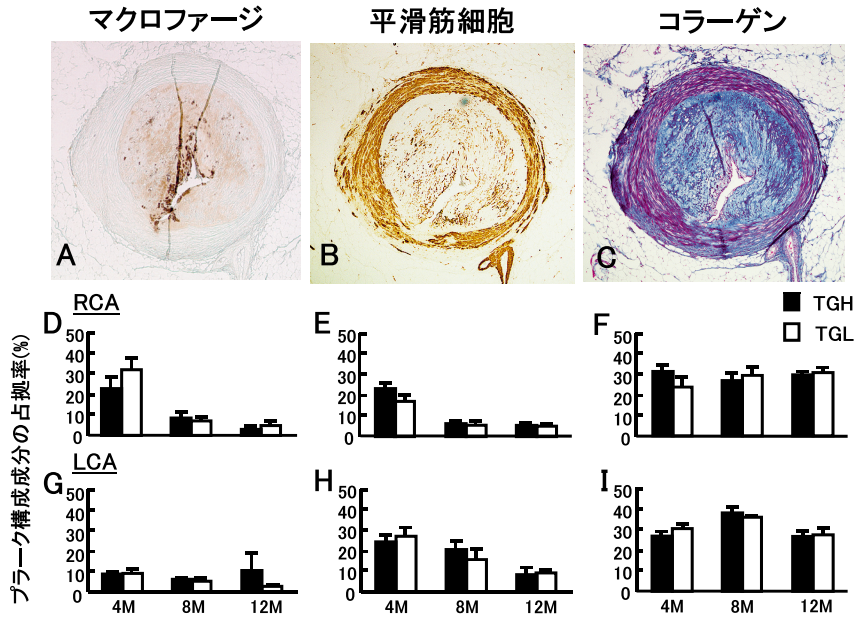


図6. 冠動脈プラーク内の構成成分 A～C: 冠動脈プラークの病理組織写真 (12ヶ月齢TGH、右冠動脈)。連続切片で以下の染色を行った。A: 抗ウサギマクロファージ抗体 (RAM11)、B: 抗ヒト $\alpha$ -平滑筋アクチンモノクローナル抗体、C: Azan-Mallory染色。D～I: 粥状プラーク内構成成分の占有率。D: G: Macrophages、E: H: 平滑筋細胞、F: I: コラーゲン。

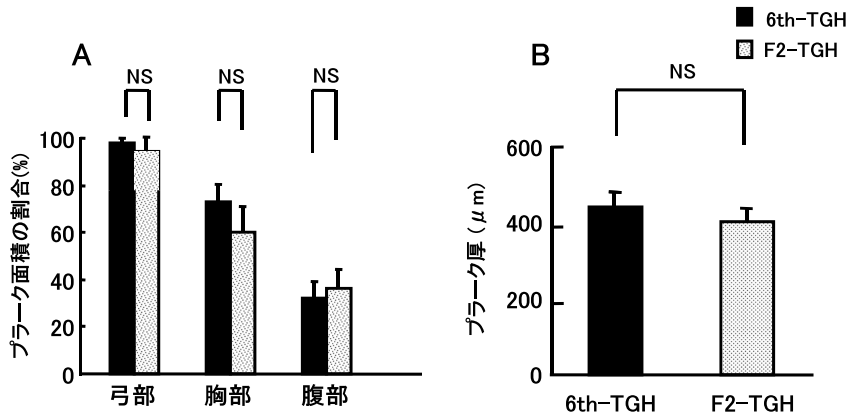


図7. A: 大動脈各部における粥状プラーク面積占有率、B: 大動脈弓部における平均粥状プラーク厚  
6th-TGH: 第6世代TGH、F2-TGH: 第4世代に野生型家兔を交配後F2世代で出現したTGH

は無かった (4ヶ月齢;  $41 \pm 11$  vs  $96 \pm 14 \mu$ m、8ヶ月齢;  $211 \pm 53$  vs  $282 \pm 27 \mu$ m、12ヶ月齢;  $289 \pm 34$  vs  $308 \pm 33 \mu$ m)。

#### 冠動脈狭窄病変

図4 Aに摘出後心臓 (12ヶ月齢TGH) の冠

動脈造影写真を示す。冠動脈狭窄病変は左右ともほぼ入口部に局限していた。左右冠動脈狭窄はTGH、TGLとも加齢とともに進行していた (図4 B)。狭窄度は左冠動脈よりも右冠動脈の方が高度であった。TGHとTGLとの比較で

は12ヶ月齢の右冠動脈でのみ有意差が見られた ( $80 \pm 5$  vs  $95 \pm 1\%$ ) (図4B)。

#### プラーク構成成分

図5上段に大動脈粥状硬化病変(8ヶ月齢TGL)の病理組織写真(A;マクロファージに対する抗体RAM11, B;  $\alpha$ -平滑筋アクチンに対する抗体1A4, C;コラーゲン染色のためのAzan Mallory染色)を示す。プラークの中心には泡沫化したマクロファージと細胞外コレステリン結晶を認め、その周囲を平滑筋と結合組織が被っている。プラークの部位による組成の差を検討するため、切片内でプラークの最も厚い部分およびプラークの辺縁を選び、TGH、TGL間で比較した。大動脈弓部においてはプラーク全体に対するマクロファージ、平滑筋細胞、コラーゲンの占める割合は、辺縁部のマクロファージを除いて(図5G)、TGH、TGLいずれも月齢とともに減少した(図5D, E, F, H, I)。4ヶ月齢において、最もプラークの厚い部分の平滑筋とコラーゲンはTGLよりもTGHで占拠率が低かった(平滑筋細胞;  $16.0 \pm 2.4$  vs  $24.2 \pm 2.4\%$ 、コラーゲン;  $25.3 \pm 2.1$  vs  $33.5 \pm 2.5\%$ ) (図5E, F)が、8ヶ月齢では逆にTGHの方が占拠率が高かった(平滑筋細胞;  $34.0 \pm 2.5$  vs  $23.4 \pm 1.9\%$ 、コラーゲン;  $25.3 \pm 2.1$  vs  $33.5 \pm 2.5\%$ ) (図5F)。大動脈の粥状プラーク組成にはTGH、TGL間で一定の傾向は見出せなかった。

図6(A, B, C)に右冠動脈の代表的な病理組織写真(12ヶ月齢TGHを示す。大動脈病変と対照的にマクロファージやコレステリン結晶は少なく、プラークの中層から深層にかけては平滑筋細胞とコラーゲンが主体である。TGH、TGLともに肥厚した内膜の主要な構成成分はコラーゲンであった(図6)。プラーク全体に占めるマクロファージの面積の割合は月齢とともに減少した(右冠動脈; 4ヶ月齢;  $22.9 \pm 5.6$  vs  $32.2 \pm 5.4\%$ 、8ヶ月齢;  $8.6 \pm 2.6$  vs  $7.3 \pm 1.4\%$ 、12ヶ月齢;  $3.1 \pm 1.5$  vs  $4.9 \pm 2.4\%$ 、左冠動脈; 4ヶ月齢;  $8.4 \pm 0.8$  vs  $9.2 \pm 1.9$

表2. 6th-TGHおよびF2-TGHの血漿脂質値

	CHOL	TGH
6th-TGH	1049±100	756±33
F2-TGH	897±55	799±51
平均値±標準誤差 (mg/dl)		
CHOL; コレステロール、TG; トリグリセリド		

%、8ヶ月齢;  $5.9 \pm 0.8$  vs  $5.5 \pm 1.4\%$ 、12ヶ月齢;  $10.2 \pm 8.6$  vs  $3.0 \pm 0.5\%$ )。平滑筋細胞もマクロファージと同様に月齢とともに面積の割合が減少した(右冠動脈; 4ヶ月齢;  $23.5 \pm 2.6$  vs  $17.2 \pm 2.9\%$ 、8ヶ月齢;  $6.5 \pm 1.0$  vs  $5.7 \pm 1.8\%$ 、12ヶ月齢;  $5.4 \pm 1.3$  vs  $5.0 \pm 0.8\%$ 、左冠動脈; 4ヶ月齢;  $24.7 \pm 3.4$  vs  $27.4 \pm 4.0\%$ 、8ヶ月齢;  $21.0 \pm 3.9$  vs  $16.2 \pm 5.0\%$ 、12ヶ月齢;  $8.7 \pm 3.5$  vs  $9.6 \pm 1.5\%$ )。4ヶ月齢の右冠動脈では左冠動脈よりもマクロファージの割合が大きかったが、加齢とともにその傾向は無くなった。TGH、TGL間ではマクロファージ、平滑筋細胞、コラーゲンのいずれも占有面積の割合に有意な差は無かった。

#### F2世代における動脈硬化病変の検討

動脈硬化および脂質異常症は多因子遺伝であるとされているが、TGHにおける多因子遺伝の役割を検討するために、F2世代における動脈硬化病変を検討した。第6世代TGHとF2世代との間に血漿脂質値に差は見られなかった(コレステロール;  $1049 \pm 100$  vs  $897 \pm 55$  mg/dl, トリグリセリド  $756 \pm 33$  vs  $799 \pm 51$ ) (表2)。大動脈内腔表面に対するプラーク面積(大動脈全体;  $62 \pm 8$  vs  $52 \pm 10\%$ )、大動脈弓部における平均プラーク厚( $444 \pm 28$  vs  $403 \pm 28 \mu\text{m}$ )とともに第6世代TGHとF2-TGH間で差は無かった(図7A, B)。F2-TGHの大動脈プラークの分布はTGHと同様の形態を示した。すなわち、大動脈弓部にプラークが大きく( $94.1 \pm 3.2\%$ )、腹部大動脈には比較的少なかった( $43.0 \pm 8.1\%$ )。



考 察

今回の我々の研究では遺伝性高脂血症ウサギにおいて4ヶ月齢で既に高度の動脈硬化が出現していることを示した。動脈硬化はTGH、TGLとも加齢とともに進行していた。高トリグリセリド血症の動脈硬化におよぼす影響はTGHにおいては腹部大動脈よりも大動脈弓部でより強く、この病変分布の違いはTGLでは見られなかった。冠動脈硬化は同心円状の狭窄を呈していたが、大動脈では分枝部などに強いプラーク形成を認め、同心円状の狭窄は呈していなかった。プラークの構成成分は大動脈ではマクロファージが優位であるのに対し、冠動脈では線維、筋成分が主体であった。この特徴はTGH、TGLで同様に認められた。TGHに野生型を交配して得られたF2世代のTGHでは、純粋に交配を続けたTGHと同様のプラーク分布が認められた。

ヒトの心血管疾患研究において遺伝子改変マウスの役割は大きい。ただしリポ蛋白の役割を検討する上で肝臓におけるリポ蛋白分泌の動物種による差を考慮する必要がある。ヒトおよびウサギの肝細胞はapo B-100リポ蛋白を含有するVLDLのみを分泌する<sup>11)</sup>。一方ラットの肝細胞はapo B-48およびapo B-100両方を分泌する<sup>12)</sup>。したがってヒトにおいて血漿トリグリセリド値の動脈硬化進展に及ぼす影響を検討する際に、ウサギの動物モデルはラットやマウスよりも適していると言える<sup>5)</sup>。しかしながら、これまでウサギでは高度の高トリグリセリド血症を示す動物モデルは存在しなかった。今回我々は遺伝性高トリグリセリド血症を示す2つの系統、TGH、TGLを分離することに成功した。TGHおよびTGLはWHHLウサギを選択交配して得られたものであるため、いずれの系統も高コレステロール血症を呈しており家族性混合型高脂血症の動物モデルと言えるかもしれない。

我々は高コレステロール血症に高度の高トリグリセリド血症が加わることにより動脈硬化が

促進されると推測した。高脂血症下ではウサギの粥状プラークは容易に形成されるため、今回4ヶ月齢と早期からプラークの分布を検討した。粥状プラークは大動脈、冠動脈とも既に4ヶ月齢からTGH、TGLいずれも見られた。加齢に伴う動脈硬化の進展はTGH、TGLで同様であった。我々はさらにTGH、TGL間で大動脈におけるプラークの大きさ、プラーク厚、冠動脈狭窄率に差がないことを示した。またプラークの構成成分にも違いがないことを明らかにした。これらのことから動脈硬化の形成、進展においては高コレステロール血症が主要な役割を果たしており、高度の高コレステロール血症存在下では高トリグリセリド血症の影響はマスクされる可能性が高いと考えられた。

しかし今回大動脈のプラーク分布についてはTGH、TGL間で明らかな相違が見られた。動脈硬化プラークの形成においては血行流体力学的要因が重要な役割を果たしていると推測されており<sup>13)</sup>、乱流が生じる血管分岐部などではプラークが形成されやすく<sup>14)</sup>、実際本研究でも図1に示すとおり胸部大動脈の肋間動脈入口部では明らかなプラーク形成が認められる。これにはやはり応力による接着分子発現への影響が関与していると推測され、これまでin vitroでの研究が詳細に行われている<sup>15), 16), 17), 18), 19)</sup>。しかし生体内において血流と接着分子がどのように関連しているか、またそれが動脈硬化の進展過程にどう影響しているかについては未だ不明な点が多い。一方高トリグリセリド血症と接着分子との関連についても各種の報告がある。Tingら<sup>20)</sup>は培養細胞においてトリグリセリドリッチリポ蛋白刺激下ではTNF- $\alpha$ 刺激により接着分子(VCAM-1、E-selectin)発現が亢進すると報告している。またSchmidt-Trucksassら<sup>21)</sup>はヒトにおいて高トリグリセリド血症下では血中の接着分子濃度が高値であったとしている。今回TGHにおいて大動脈弓部にプラーク形成が高度であり腹部大動脈では軽度であった原因として、高トリグリセリド血症に加え大動脈弓部で

の血液の乱流により接着分子の発現が亢進しプラーク形成が促進された可能性がある。一方腹部大動脈では血管が直線的で分枝が少なく乱流が生じにくいいため、接着分子の影響は小さくなりプラークも形成されにくいと考えられる。しかしこの機序では腹部大動脈においてTGLの方がプラーク面積が大きい理由を説明できない。高脂血症治療薬であるプロブコールはVCAM-1やM-CSFの発現を制御している<sup>22)</sup>が、上行大動脈ではプラーク形成を促進するのに対し、弓部から腹部大動脈においては逆に抗動脈硬化作用を有することが示すことがApo-E欠損マウスの実験で示されている<sup>23)</sup>。これらの報告や本研究で得られた知見は、局所の血流と血中脂質プロファイルおよびそれらの刺激による接着分子発現などプラーク形成に関連する反応は複雑であり、大動脈の部位によっても異なることを示唆しているのかもしれない。この問題の解明には今後更に詳細な研究が必要である。また今回検討は行っていないが、TGHはTGLと比較して大動脈弓部にプラーク形成が高度であったことから、脳血管障害の差についても検討する必要があると考えている。

動脈硬化の進展は多因子に規定される。我々は純粋に継代したTGHと野生型との交配後F2世代で出現したTGHとの間には動脈硬化に病理学的な違いがあるのではないかと推測した。今回の検討では2群間で血清脂質に差はなく、動脈硬化についてはプラークの範囲と厚さは同等であるのと同時に、プラーク分布は大動脈弓部に多く腹部で少ないというTGHに特徴的な傾向がF2世代においても見られた。これらのことから動脈硬化の程度やその分布においては血清脂質が主要な規定因子であり、特に動脈硬化プラークの分布においては血清トリグリセリド値が関与している可能性が示唆された。

結論として、遺伝性高コレステロール血症ウサギにおける血漿トリグリセリド値の差は冠動脈硬化には影響を与えないが大動脈粥状硬化プラークの分布に関連する。これらの傾向はF2

世代でも消失しないことから、動脈硬化の進展には環境要因が重要であることが示唆された。

## 謝 辞

本研究にあたり、動物実験の技術協力をいただいた土田英二先生、山形大学医学部附属動物実験施設のスタッフの皆様に深謝致します。本研究は文部科学省科学研究費(05557038, 07557052, 10307016)および厚生労働省助成金により行われた。

## 文 献

1. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497
2. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, et al.: A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1996; 276: 882-888
3. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al.: Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004; 110: 1245-1250
4. Beaty TH, Kwiterovich PO, Laville A, Lewis B: Genetic analysis of total cholesterol and triglycerides in a pedigree of St. Thomas rabbits. *J Lipid Res*. 1989; 30: 387-394
5. de Roos B, Caslake MJ, Ardern HA, Martin Benson G, Suckling KE, Packard CJ: Insulin resistance in the St. Thomas' mixed hyperlipidaemic (SMHL) rabbit, a model for familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001; 156: 249-254
6. Brousseau ME, Hoeg JM: Transgenic rabbits

- as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res* 1999; 40: 365-375
7. Seddon AM, Woolf N, La Ville A, Pittilo RM, Rowles PM, Turner PR, et al.: Hereditary hyperlipidemia and atherosclerosis in the rabbit due to overproduction of lipoproteins. II. Preliminary report of arterial pathology. *Atherosclerosis*. 1987; 7: 113-124
  8. Tsukada T, Rosenfeld M, Ross R, Gown AM: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions: use of monoclonal antibodies with Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis*. 1986; 6: 601-613
  9. Skalli O, Rospraz P, Trzeciak K, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*. 1986; 103: 2787-2796
  10. Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Ueda M: Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ: An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 931-937
  11. Arbeency CM, Meyers DS, Berquist KE, Gregg RE: Inhibition of fatty acid synthesis decreases very low density lipoprotein secretion in the hamster. *J Lipid Res* 1992;33:843-851
  12. Cartwright IJ, Hebbachi AM, Higgins JA: Transit and sorting of apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum and Golgi compartments of isolated hepatocytes from normal and orotic acid fed rats. *J Biol Chem* 1993; 268: 20937-20952
  13. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN: Hemodynamics and atherosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 1988; 112: 1018-1031
  14. Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Gimbrone MA: Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 2114-2117
  15. Chiu JJ, Chen LJ, Lee PL, Lee CI, Lo LW, Usami S, Chien S: Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells. *Blood*. 2003; 101: 2667-2674
  16. Nerem RM: Hemodynamics and the vascular endothelium. *J Biomech Eng*. 1993; 115: 510-514
  17. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995; 75: 519-590
  18. Traub O, Berk BC: Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 677-685
  19. Chien S, Li S, Shyy YJ: Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*. 1998; 3: 162-169
  20. Ting HJ, Stice JP, Schaff UY, Hui DY, Rutledge JC, Knowlton AA, et al: Triglyceride-rich proteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res*. 2007; 100: 381-390
  21. Schmidt-Trucksass AA, Baumstark MW, Daub C, Espenschied S, Grathwohl D, Berg A: Lipoprotein phenotype and adhesion molecules correlate with diurnal triglyceride profiles in patient with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2004; 14: 20-25
  22. Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W: Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 1289-1302
  23. Witting PK, Pettersson K, Letters J, Stocker R: Site-specific antiatherogenic effect of probucol in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: e26-e33

## **Relation Between Age and Atherosclerosis in Heritable Hypercholesterolemic Rabbits with Levels of Hypertriglyceridemia from Extereme to Mild Levels**

**Satoshi Takasaki, Tsunekata Ito\*, Hitonobu Tomoike\*\***

*Department of Cardiology, Pulmonology, and Nephrology, Yamagata University  
School of Medicine, Yamagata, Japan*

*\*Laboratory Animal Center, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan*

*\*\*National Cardiovascular Center, Osaka, Japan*

### **ABSTRACT**

**Background :** Hypertriglyceridemia relates to progression of atherosclerosis. We have segregated two lines of heritable hypertriglyceridemic rabbits from WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) rabbits; one with extremely high (TG>500 mg/dl; TGH strain) and the other with low level of hypertriglyceridemia (TG<250 mg/dl; TGL strain). We examined whether different levels of hypertriglyceridemia modifies progression of atherosclerosis macro- and microscopically.

**Methods and Results :** Twenty-one TGH and 20 TGL rabbits were used for lipid analysis and morphometry of atherosclerosis at 4, 8, and 12 months old. Plaque width (% of luminal surface) and thickness of the aorta, and percent stenosis of coronary artery progressed age-dependently during 4 to 12 months old in both TGH and TGL rabbits. Plaque located preferentially around the arch in TGH rabbits and evenly along the aorta in TGL rabbits. A core of the plaque included a cluster of macrophage-derived foam cells and cholesterol crystals in case of the aorta and was fibromuscular proliferation at the site of coronary stenosis. Preferential localization of the plaque toward the aortic arch of an inbred strain of TGH remained in F2 generation.

**Conclusions :** Atherosclerotic plaque expands along the aorta or coronary arteries in combined hyperlipidemic models and a high level of hypertriglyceridemia modifies the regional distribution of plaque toward the aortic arch.

**Key words :** WHHL rabbit, selective inbreeding, hyperlipidemia, plaque distribution