

# 粥状動脈硬化における過酸化リン脂質生成の分子機構

東北大学大学院農学研究科 教授 宮澤陽夫

## 要 旨

粥状動脈硬化における過酸化リン脂質 (PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide) 生成の分子機構を明らかにする目的で、ウサギへの食餌性コレステロール負荷実験を行った。コレステロール食によりウサギの血中のPCOOHは著明に増加し、大動脈弓部の動脈硬化病変組織でも過酸化リン脂質の蓄積を認めた。この過酸化リン脂質の増加が、粥状動脈硬化形成の分子機構に深く関与し、さらに肝臓や腎臓など臓器組織の膜脂質過酸化をも誘発することが確認された。血中過酸化リン脂質の測定は、生体の酸化ストレスを評価するための好適な指標であることが示された。

## 1 はじめに

虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患は、我国で年々増加の傾向にある。これは、食生活の欧米化や運動不足、摂取カロリー過剰により、高脂血症や糖尿病、肥満といった危険因子が増えているからである。なかでも高脂血症、特に高コレステロール血症は、粥状動脈硬化の最も重要な危険因子であることが多くの疫学調査で示されている<sup>[1-3]</sup>。Framingham Heart Studyはその中で最も大規模な疫学調査であり、虚血性心疾患と血清コレステロールには正の相関があることを示し、とくにLDLコレステロール値の増加とHDLコレステロール値の減少が虚血性心疾患の原因であることを示唆した<sup>[4-6]</sup>。

粥状動脈硬化の初期には、細胞内にコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞が血管内皮下に集簇する。このような泡沫細胞の起源は、大部分が血中の単球由来のマクロファージである。血管壁内に侵入したマクロファージは、通常のLDL受容体ではなく、スカベンジャー受容体により変性したLDLを無制限に取り込み<sup>[7]</sup>、脂肪線条 (fatty streak) と呼ばれる初期病変を形成する。この様な変性LDLの中で、生体内に存在するものとして、酸化LDL (OxLDL) が注目されている<sup>[8,9]</sup>。我々は、リポタンパク粒子が酸化変性を受ける過程で、リポタンパク粒子を構成する脂質の過酸化が動脈硬化の発症に重要なステップの一つであると考えている。なぜなら、OxLDLによるアテローム生成作用のほとんどが、酸化された脂質成分に起因するからである<sup>[10,11]</sup>。特にリン脂質の一種であるホスファチジルコリン (PC) は、リポタンパク粒子の表面に局在し、かつ不飽和脂肪酸を多く含むので、酸化を受けやすい。PCの酸化第一次生成物であるホスファチジルコリンヒドロパーオキシド (PCOOH) は、それ自体、細胞傷害性を持つ可能性がある。また、PCOOHからはリゾホスファチジルコリン (lyso-PC) やアルデヒドが生成する。OxLDLそのものや、OxLDLの中に生じたPCOOH、Lyso-PCは、

血管内皮細胞の機能を障害し、それが動脈硬化の発症の原因になることが示唆されている。例えば、白血球接着分子や平滑筋細胞増殖因子の発現誘導<sup>[12]</sup>、内皮細胞の遊走<sup>[13]</sup>、アポトーシスの誘導<sup>[14]</sup>などである。また、OxLDL中のPCOOHが分解されて生じるアルデヒドは、apo-B100のlysine残基を修飾し<sup>[11]</sup>、その結果、OxLDLは粒子全体の陰性荷電が増加し、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ、最終的に粥状動脈硬化病変を形成する。以上のことから、粥状動脈硬化におけるPCOOH生成の重要性に関心が持たれた。本研究では、粥状動脈硬化の発症、進展および抑制におけるリン脂質ヒドロパーオキシドの分子機構を解明する目的で、ヒトにリポタンパク質代謝が類似するウサギにコレステロール食を与えた場合の膜脂質に対する酸化ストレス発生を証明しようとした。

コレステロール負荷ウサギは粥状動脈硬化発症の代表的なモデル動物の一つである。それは、ヒトの血漿コレステロール濃度の増加は、粥状動脈硬化発症の最大の危険因子であることが、多くの疫学調査により認められているからである<sup>[1-6]</sup>。この血中脂質濃度の増加とともに、近年、リポタンパク粒子の酸化変性が動脈硬化発症の直接的な原因であることがわかってきた<sup>[7, 8, 10]</sup>。我々は、リポタンパク粒子が酸化変性を受ける過程で、リポタンパク粒子を構成する脂質の過酸化が動脈硬化の発症に重要なステップの一つであると考えている。これまでに、コレステロール負荷ウサギの生体内脂質過酸化に関する研究は、数多く報告されている<sup>[15-17]</sup>。しかし、これらの報告はチオバルビツール酸(TBA)法による脂質過酸化の評価がほとんどである。TBAは、脂質過酸化の第一次生成物である脂質ヒドロパーオキシドに対する特異性が低い<sup>[18, 19]</sup>。また、TBAはアルデヒドやプロスタグランジン類とも反応するため、過酸化脂質に対する選択性が低い<sup>[19]</sup>。したがって、生体過酸化脂質の定量にTBAは有用でない。脂質過酸化の指標として、リポタンパク粒子を構成している脂質がどれぐらい酸化されているのかを証明するには、膜表面のリン脂質のヒドロパーオキシドを定量する必要がある。宮澤らは、過酸化リン脂質を高感度かつ特異的に評価できるCL-HPLCで、高脂血症患者の血漿では、加齢および脂質濃度の増加とともにリン脂質の過酸化が亢進し、血漿ホスファチジルコリンヒドロパーオキシド濃度が増加することを明らかにした<sup>[20]</sup>。本研究では、過酸化リン脂質の生成と粥状動脈硬化発症との因果関係を明らかにする目的で、粥状動脈硬化の研究に広く用いられているコレステロール負荷ウサギの血漿に、過酸化リン脂質がどれぐらい蓄積しているのかを明らかにしようとした。また、動脈硬化病変組織と、脂質代謝の中心的な臓器である肝臓および腎臓へのリン脂質ヒドロパーオキシドの蓄積を検証して、血中過酸化脂質の増大による他臓器組織への脂質過酸化の伝播を確認しようとした。

## 2 実験方法

### (1) 実験動物と飼育条件

日本白色家兎 (n=10; 12週齢、体重約2 kg、雄) を、日本エスエルシー(株)から購入し、普通食群

(n=5) と1%コレステロール食群 (n=5) に分けた。

動物は温度23℃前後、1日12時間の明暗サイクルの条件下で、個別ケージで飼育した。実験用固形飼料は船橋農場(株)から購入し、普通食群にはウサギ用飼料RM-4を、1%コレステロール食群には、RM-4に1%コレステロールを添加した飼料を1日100gずつ与え、8週間飼育した。

## (2) 実験手順

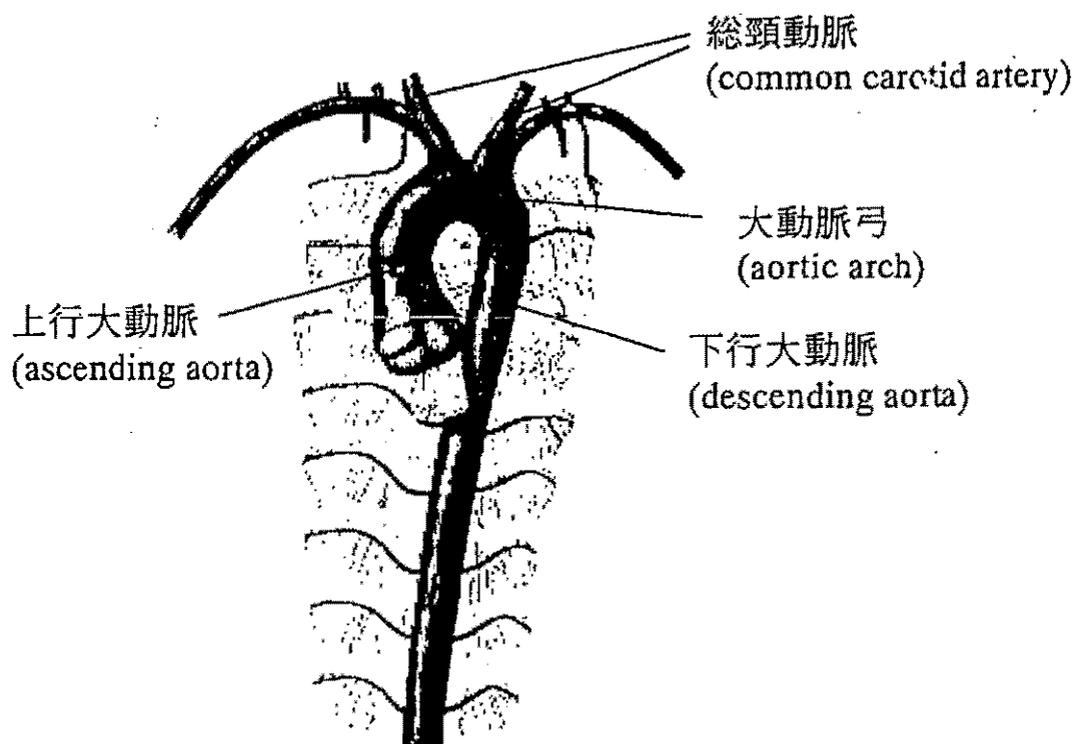
飼育開始時、4週目および8週目に、一晚絶食後、耳静脈より採血を行った。生化学データ測定用にヘパリン採血(3ml)と、過酸化脂質測定用に0.1%EDTA (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate) 採血(7ml)し、血漿は冷却遠心機(3000rpm, 10min, 4℃)で血液から分離した。

8週間の飼育後、全てのウサギをネンブタール麻酔下(50mg/kg)で心臓採血し、大動脈弓部(心臓から2cm)、肝臓、腎臓を摘出し、素早くドライアイスで凍結後、-80℃で保存した。24時間後、全ての組織サンプルを4倍量(w/v)の0.15M NaClでホモジナイズし、使用するまで-80℃で保存した。

## (3) 血漿脂質の測定

血漿総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロール、及びトリグリセリドは、コレステロールE-テスト、LDLコレステロールテスト、HDLコレステロールテスト、及びトリグリセリドE-テストキット(和光純薬工業(株))を用いて酵素比色法で測定した。血漿総脂質は、クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)を用いて、Folch法<sup>[21]</sup>により抽出した。

## *Anatomical position of arteries*



リン脂質濃度はパートレット法<sup>[22]</sup>にて測定した。これは、脂質を分解して脂質分子中の有機リンを全て無機リンに誘導し、その無機リンを比色定量する方法である。すなわち、抽出脂質（血漿0.1ml当量）を試験管に分注し、60%過塩素酸水溶液を0.4mlを加え、ブロックヒーターを用いて、200℃にて2時間加熱した。室温まで冷却後、水を4.2ml、5%モリブデン酸アンモニウム水溶液を0.2ml、アミドール溶液を0.2mlを加え攪拌し、100℃にて15分加熱した。再度室温まで冷却後、830nmにて比色定量を行った。

#### (4) 組織中の脂質測定

組織ホモジネートからの脂質抽出は、抗酸化剤として0.002% (w/v) ブチルヒドロキシトルエン (BHT) を含むクロロホルム/メタノール (2 : 1, v/v) を用いて、Folch法にて血漿と同様に行った。

各組織のコレステロールは酵素法<sup>[23]</sup>で測定した。これはコレステロールオキシダーゼがコレステロールの3位のヒドロキシル基を脱水素する際に生じる過酸化水素を、ペルオキシターゼと共役させ蛍光物質に誘導し、蛍光定量する方法である。すなわち、150  $\mu$ g当量を30  $\mu$ lのイソプロピルアルコールに溶かして試験管に分注し、酵素液を0.5ml加え攪拌し、37℃にて30分間加温した。この酵素液は、コレステロールオキシダーゼ (0.3U/ml)、コレステロールエステラーゼ (0.3U/ml)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (30U/ml)、コール酸ナトリウム (5 mM)、ポリエチレングリコール6000 (0.17 mM)、p-ヒドロキシフェニル酢酸 (0.15mg/ml)、PBS (pH7.0; 0.05M) を含む溶液である。反応後、0.5 N NaOHを1 ml加え反応を停止させ、励起波長 (Ex) 325nm、蛍光波長 (Em) 425nmにて1時間以内に測定した。標品はコレステロールを30  $\mu$ lのイソプロピルアルコールに溶かし、試料と同様に行い検量線を作成した。トリグリセライドは、組織10mg当量を試験管に分注し、0.05% Triton X-100で可溶化後、血漿と同様にトリグリセライドE-テストを用いて酵素比色法で測定した。リン脂質は組織6 mg当量を試験管に分注後、血漿と同様にパートレット法にて測定した。

#### (5) 過酸化リン脂質の測定

化学発光-高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) により、血漿、大動脈弓部、肝臓、腎臓の抽出脂質のホスファチジルコリンハイドロパーオキシド (PCOOH) とホスファチジルエタノールアミンハイドロパーオキシド (PEOOH) を測定した。このCL-HPLC装置は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と化学発光検出器 (CL) を組み合わせたものである<sup>[24-26]</sup>。HPLCにより、ホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) を他の脂質成分より分離後、別のポンプから送り込まれる発光試薬と反応させ、ハイドロパーオキシド基由来の化学発光を検出した。

なお、PCOOH標品は、L- $\alpha$ -phosphatidylcholine  $\beta$ -oleyl- $\gamma$ -palmitoyl (Sigma) の光酸化により調製し、CL-HPLC法で検量線を作成した。

CL-HPLCの測定条件を以下に示した。

- ・ HPLCポンプ : 880-PU (日本分光工業社製)
- ・ HPLCカラム : Finepak SIL-NH2, 4.6mmID×250mm (日本分光工業社製)

- ・ 移動相 : イソプロピルアルコール/メタノール/水 (130/45/25, v/v/v) 流速: 1.0 ml/min
- ・ カラムオープン : 860-CO (日本分光工業社製) 温度: 40°C
- ・ UV検出器 : 875-UV (日本分光工業社製) 検出波長: 210nm
- ・ 発光試薬 : 50mMホウ酸緩衝液 (pH10) に 2  $\mu$ Mのルミノール (和光純薬工業株) と 25  $\mu$ Mのチトクロームc (Sigma, type VI) を溶解して作成 流速: 1.8ml/min
- ・ 化学発光検出器 : CLD-100 (東北電子産業社製)
- ・ 記録計 : クロマトコーダー21 (システムインストルメンツ社製)

0.5mlの血漿から、クロロホルム/メタノール (2 : 1) を用いて、Folch法により脂質抽出し、エバポレーターで濃縮乾固後、100  $\mu$ lのクロロホルム/メタノール (2 : 1) に溶解し、その内40  $\mu$ lをCL-HPLCに供した。

組織の場合は、20%ホモジネートを1 ml (200mg当量) 分取し、血漿と同様に脂質抽出、濃縮後、400  $\mu$ lのクロロホルム/メタノール (2 : 1) に溶解し、その内40  $\mu$ l (20mg当量) をCL-HPLCに供した。

#### (6) チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) の測定

血漿のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) は、1,1,3,3-テトラメトキシプロパンを標品として、八木法<sup>[27]</sup>にて測定した。血漿10  $\mu$ lに、1/12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を2 ml、10%リントングステン酸水溶液を250  $\mu$ l加え、攪拌、遠心分離 (3000rpm, 10min) した。上清を除去した後、1/12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を1 ml、10%リントングステン酸水溶液を150  $\mu$ l加え、攪拌、再び遠心分離 (3000rpm, 10min) した。上清を除去し、水を1 ml、0.67%TBA水溶液を500  $\mu$ l加え、攪拌し、沸騰湯浴中に60分間保った。冷却後、n-ブタノールを2.5ml加えて1分間攪拌し、遠心分離 (3000rpm, 10 min) した。上層を励起波長 (Ex) 515 nm、蛍光波長 (Em) 553nmの蛍光測定に供した。標品は50  $\mu$ lの標準液と1.95mlの水、ブランクは2 mlの水をそれぞれねじ口試験管に入れ、沸騰湯浴中に60分間保つ操作から試料と同様に行った。

組織のTBARSは、Ohkawa法<sup>[28]</sup>を改変した方法<sup>[29]</sup>に従い定量した。すなわち、ねじ口試験管に20%ホモジネートを0.2ml分取し、8.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を0.2ml、酢酸緩衝液 (pH3.5) を1.5ml、0.8%BHT酢酸緩衝液を50  $\mu$ l、0.8%TBA水溶液を1.5ml、および水を0.6mlこの順に加えて密栓し、攪拌した。氷中で1時間保った後、沸騰湯浴中で1時間保ち、氷で冷却し、水を1.0 ml、n-ブタノール/ピリジン (15 : 1, v/v) を5.0ml加えて混和した。その後、遠心分離 (3000rpm, 10min) し、上層の532nmの吸光度を測定した。ブランクは試料の代わりに水を0.2ml入れて同様の処理を行った。

#### (7) 8-ヒドロキシ2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の測定

組織中DNAの酸化傷害マーカー<sup>[30, 31]</sup>として、8-ヒドロキシ2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の測定を行った。1 mlの20%組織ホモジネート (大動脈弓部、肝臓、腎臓) から、核酸抽出キットであるSepa Gene (三光純薬株) を用いてDNAを抽出した。このDNA (about400  $\mu$ g) は200  $\mu$ lの1 mM

EDTA (pH8.0) に溶かした。なお、DNA濃度は、 $A_{260}=1.0$ を $50 \mu\text{g DNA/ml}$ として定量した。DNAは $95^\circ\text{C}$ にて5分間加熱し、変性させ、 $25 \mu\text{l}$ の $P_1$ ヌクレアーゼ (40IU, Sigma) を加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。次に $4 \mu\text{l}$ のアルカリフォスファターゼ (15IU, Sigma) と $16 \mu\text{l}$ の1 M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) を加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。この加水分解溶液を遠心 ( $10000\text{rpm}$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) 後、上清をELISAキットである8-OHdG check (日本老化制御研究所) に供した。

#### (8) $\alpha$ -トコフェロールの定量

0.1mlの血漿に、内部標準として1 nmol 2,2,5,7,8-ペンタメトキシ-6-ヒドロキシクロマンを含む2.0mlのエタノールを添加後、5.0mlのn-ヘキサンにより脂質を抽出し、蛍光HPLCにより測定した<sup>[32, 33]</sup>。組織の場合は、0.2mlの20%ホモジネートに、上記の内部標準、6%ピロガロール-エタノール (w/v) 溶液を1 mlを加えてよく混和し、60%KOH水溶液を $200 \mu\text{l}$ 加えて $70^\circ\text{C}$ で30分間けん化後、血漿と同様にヘキサン抽出を行い、分析試料とした。

HPLCの測定条件を以下に示した。

- ・ HPLCポンプ : 880-PU (日本分光工業社製)
- ・ HPLCカラム : Finepak SIL, 4.6mmID×250mm (日本分光工業社製)
- ・ 移動相 : n-ヘキサン/イソプロピルアルコール (995/5, v/v)  
流速 1.2 ml/min
- ・ 蛍光検出器 : RF-10AXL (島津製作所株式会社)  
励起波長 : 298nm  
蛍光波長 : 325nm
- ・ 記録計 : クロマトコーダー21 (システムインスツルメンツ社製)

#### (9) 組織学的分析

大動脈弓部 (心臓から1 cm) を摘出後、0.15 M NaClで洗浄し、50%ホルマリンで一晩固定後、パラフィン包埋した。マイクロームにより $5 \mu\text{m}$ の厚さに切り出し、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行った。まず、脱塩水で洗浄後、ヘマトキシリン液にて核を染色した (5分間)。脱塩水で洗浄後、エオジン液にて細胞質と繊維を染色した (10分間)。最後に脱塩水で洗浄し、脱水後、樹脂封入剤にて封入した。

#### (10) 統計処理

データはMean±SEで表し、Mann-WhitneyのU検定にて解析した。

### 3 実験結果

#### (1) 大動脈弓部の粥状動脈硬化病変

Fig.1-1には、ウサギの大動脈弓部の断面図を示した。1%コレステロール食群のすべてのウサギの大動脈弓部のに内膜の肥厚が見られ、粥状動脈硬化巣が形成されていることが確認された。

## (2) ウサギ血漿中の脂質組成の変化

ウサギ血漿中のトータルコレステロール (TC)、LDLコレステロール (LDL-C)、HDLコレステロール (HDL-C)、トリグリセライド (TG)、リン脂質 (PL) の変化をTable 1-1に示した。コレステロール負荷により、TC、LDL-C、HDL-C、PLのいずれも大きく増加した。また、TGも8週目には有意に増加した。

## (3) ウサギ血漿中の過酸化リン脂質とTBARSの変化

ウサギ血漿中のPCOOHとTBARSの変化をTable 1-2に示した。血漿PCOOH値は、コレステロール負荷により、4週目で有意に増加し、8週目には、普通食群の約4倍に増加した。ウサギ血漿中のTBARSも、コレステロール負荷により有意に増加したが、4週目以降はプラトーに至った。

## (4) ウサギ血漿中の $\alpha$ -トコフェロールの変化

ウサギ血漿中の $\alpha$ -トコフェロールの変化をTable 1-3に示した。コレステロール負荷による血漿脂質量の増加に伴い、 $\alpha$ -トコフェロール濃度も有意に増加した。

## (5) ウサギ組織の脂質組成

ウサギ組織（大動脈弓部、肝臓、腎臓）のコレステロール、トリグリセライド、リン脂質量をTable 1-4に示した。コレステロール負荷により、大動脈弓部、肝臓、腎臓に、コレステロールとトリグリセライドが、蓄積することが明らかになった。一方、リン脂質は全ての組織で両群間の違いは認められなかった。

## (6) ウサギ組織の過酸化リン脂質

ウサギ組織（大動脈弓部、肝臓、腎臓）の過酸化リン脂質をTable 1-5に示した。組織中には、ホスファチジルコリンハイドロパーオキシド (PCOOH) と、ホスファチジルエタノールアミンハイドロパーオキシド (PEOOH) の両方が存在した。大動脈弓部では、コレステロール負荷により、PCOOHとPEOOHの両方が有意に増加していた。肝臓では、コレステロール負荷により、PCOOHが有意に増加し、PEOOHも増加傾向にあったが統計的に有意差は認められなかった。腎臓では、コレステロール負荷により、PCOOH、PEOOHとも有意に増加した。

## (7) ウサギ組織のTBARS、8-OHdGおよび $\alpha$ -トコフェロール

ウサギ組織のTBARS、8-OHdGおよび $\alpha$ -トコフェロールをTable 1-6に示した。大動脈弓部のTBARSは、コレステロール負荷により増加傾向にあったが統計的に有意差は認められなかった。肝臓と腎臓のTBARSは、コレステロール負荷により有意に増加した。DNAの酸化傷害のマーカーである8-OHdGは、全ての組織で両群間に差は認められなかった。組織中の主要な抗酸化物質である $\alpha$ -トコフェロールは、組織によって違いが見られた。大動脈弓部では、コレステロール負荷により有意に増加したが、肝臓と腎臓では、両群間に差は認められなかった。

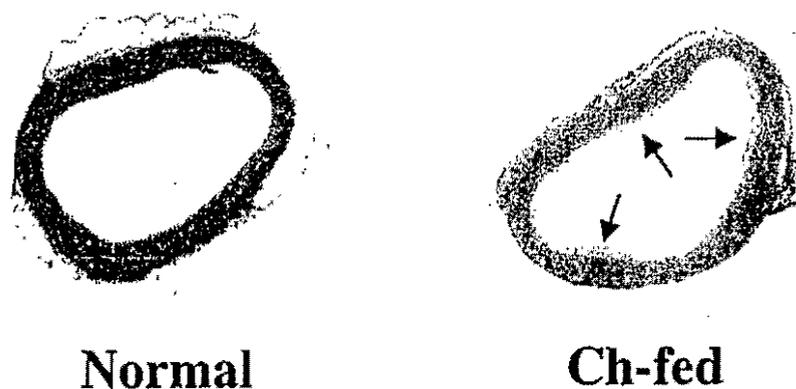


Fig. 1-1 Atherosclerotic lesion of rabbit aorta (hematoxylin-eosin staining).  
 Normal: Normal diet group  
 Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

Table 1-1  
 Change in plasma lipid composition of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

Group	0w	4w	8w
<i>Total cholesterol (mg/dl)</i>			
Normal	51.8 ± 4.7	48.6 ± 4.3	39.0 ± 5.1
Ch-fed	58.0 ± 6.2	2109.0 ± 91.4*	2648.0 ± 205.2*
<i>LDL cholesterol (mg/dl)</i>			
Normal	17.4 ± 2.6	16.4 ± 2.7	10.4 ± 4.7
Ch-fed	21.0 ± 4.0	701.2 ± 41.2*	874.2 ± 86.4*
<i>HDL cholesterol (mg/dl)</i>			
Normal	35.0 ± 1.6	31.4 ± 0.8	28.8 ± 2.3
Ch-fed	38.0 ± 1.6	82.9 ± 7.0*	90.3 ± 10.9*
<i>Triglycerides (mg/dl)</i>			
Normal	30.0 ± 4.2	31.2 ± 7.4	26.4 ± 5.2
Ch-fed	33.0 ± 1.6	52.2 ± 13.4*	78.0 ± 9.6*
<i>Phospholipids (mg/dl)</i>			
Normal	137.2 ± 8.1	139.5 ± 6.0	137.8 ± 7.3
Ch-fed	135.0 ± 16.7	771.2 ± 46.6*	866.5 ± 43.4*

Values are mean ± SE of five values for each group.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$ .

Table 1-2

Change in plasma PCOOH and TBARS levels of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

	Group	0w	4w	8w
<b>PCOOH</b> pmol/ml	Normal	49.7 ± 5.5	53.4 ± 1.5	59.8 ± 4.7
	Ch-fed	49.4 ± 3.9	135.8 ± 14.7*	240.4 ± 11.0*
$\mu$ mol/mol PL	Normal	29.4 ± 2.5	31.7 ± 2.1	35.7 ± 2.9
	Ch-fed	29.1 ± 3.6	14.8 ± 2.2*	23.0 ± 1.7*
<b>TBARS</b> nmol/ml	Normal	2.65 ± 0.22	2.48 ± 0.27	2.86 ± 0.36
	Ch-fed	2.80 ± 0.13	4.22 ± 0.17*	4.34 ± 0.23*
mmol/mol PL	Normal	1.59 ± 0.14	1.48 ± 0.22	1.73 ± 0.26
	Ch-fed	1.65 ± 0.18	0.46 ± 0.05*	0.41 ± 0.03*

Values are mean ± SE of five values for each group. PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide; PL: phospholipids; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$

Table 1-3

Change in plasma  $\alpha$ -tocopherol concentration of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

	Group	0w	4w	8w
nmol/ml	Normal	2.21 ± 0.48	2.01 ± 0.29	2.07 ± 0.49
	Ch-fed	2.25 ± 0.25	11.99 ± 1.79*	14.38 ± 1.83*
mmol/mol PL	Normal	1.34 ± 0.33	1.19 ± 0.18	1.18 ± 0.25
	Ch-fed	1.35 ± 0.28	1.26 ± 0.18	1.38 ± 0.23

Values are mean ± SE of five values for each group. PL: phospholipids.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$

Table 1-4  
Tissue lipid composition of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

Group	Aortic arch	Liver	Kidney
<i>Cholesterol (μmol/g protein)</i>			
Normal	220.18 ± 24.83	33.30 ± 2.52	40.46 ± 6.25
Ch-fed	409.44 ± 30.65*	369.40 ± 19.43*	105.76 ± 3.67*
<i>Triglycerides (μmol/g protein)</i>			
Normal	89.22 ± 9.76	17.91 ± 2.36	17.97 ± 1.97
Ch-fed	139.93 ± 14.79*	32.26 ± 2.88*	30.94 ± 4.20*
<i>Phospholipids (μmol/g protein)</i>			
Normal	102.35 ± 6.46	150.32 ± 21.95	130.91 ± 10.95
Ch-fed	102.97 ± 9.78	178.39 ± 37.62	128.83 ± 4.82

Values are mean ± SE of five values for each group.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$ .

Table 1-5  
Tissue phospholipid hydroperoxides concentration of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

Group	Aortic arch	Liver	Kidney
<i>PCOOH</i>			
nmol/g protein			
Normal	42.31 ± 1.35	10.87 ± 1.24	9.45 ± 2.06
Ch-fed	85.54 ± 7.77*	19.75 ± 2.47*	20.17 ± 0.86*
μmol/mol PL			
Normal	552.5 ± 58.6	114.3 ± 10.3	209.5 ± 51.1
Ch-fed	1105.3 ± 82.7*	165.8 ± 21.6*	466.5 ± 11.0*
<i>PEOOH</i>			
nmol/g protein			
Normal	8.91 ± 1.95	4.51 ± 0.61	5.67 ± 1.84
Ch-fed	36.33 ± 5.60*	8.24 ± 1.76	13.11 ± 2.07*
μmol/mol PL			
Normal	124.2 ± 36.9	43.3 ± 5.7	133.4 ± 43.6
Ch-fed	447.0 ± 137.8*	51.8 ± 10.7	289.7 ± 38.2

Values are mean ± SE of five values for each group. PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide; PEOOH: phosphatidylethanolamine hydroperoxide; PL: phospholipids.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$ .

Table 1-6

TBARS, 8-OHdG and  $\alpha$ -tocopherol contents in the tissue of normal and 1% cholesterol-loaded rabbits

	Group	Aortic arch	Liver	Kidney
<b>TBARS</b>				
$\mu\text{mol/g protein}$	Normal	4.66 $\pm$ 1.06	1.13 $\pm$ 0.24	1.36 $\pm$ 0.16
	Ch-fed	6.80 $\pm$ 1.66	2.56 $\pm$ 0.38*	2.01 $\pm$ 0.16*
mmol/mol PL	Normal	46.66 $\pm$ 11.73	7.19 $\pm$ 0.73	10.49 $\pm$ 1.04
	Ch-fed	63.22 $\pm$ 10.87	16.18 $\pm$ 3.63*	15.67 $\pm$ 1.18*
<b>8-OHdG</b>				
mg/g DNA	Normal	0.37 $\pm$ 0.12	0.19 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.05
	Ch-fed	0.36 $\pm$ 0.23	0.17 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.05
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>				
$\mu\text{mol/g protein}$	Normal	0.70 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01	0.086 $\pm$ 0.007
	Ch-fed	1.00 $\pm$ 0.15*	0.14 $\pm$ 0.04	0.061 $\pm$ 0.017
mmol/mol PL	Normal	6.87 $\pm$ 0.21	0.97 $\pm$ 0.24	0.69 $\pm$ 0.11
	Ch-fed	9.70 $\pm$ 1.00*	0.94 $\pm$ 0.34	0.46 $\pm$ 0.12

Values are mean  $\pm$  SE of five values for each group. 8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; PL: phospholipids; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

Normal: Normal diet group

Ch-fed: 1% Cholesterol diet group

\*  $p < 0.05$ .

#### 4 考察

血漿中に最も多く存在する過酸化リン脂質であるPCOOHは、脂質過酸化の正確な指標である。今回の研究では、粥状動脈硬化の研究に最もよく使われているモデルの一つであるコレステロール負荷ウサギの血漿PCOOH濃度が、コントロールウサギに比べ有意に増加することが示された。食餌性コレステロールの脂質過酸化に対する影響をウサギで調べた研究は数多くあるが、脂質過酸化の第一次生成物である脂質ヒドロパーオキシドに関する研究はほとんどされていない。生体内での脂質過酸化の指標として最もよく使われている方法はTBA法である。しかしTBA法は、脂質過酸化の第一次生成物である脂質ヒドロパーオキシドに対する特異性が低い。それゆえ粥状動脈硬化の研究のために、血漿や組織の酸化傷害を評価するには難しい場合がある。今回、膜リン脂質の過酸化を評価するためにCL-HPLCにより、血漿リポタンパクの酸化の指標であるPCOOHを測定した。なぜなら、PCはリポタンパク粒子の表面に局在しているため、PCOOHの増加は血漿リポタンパクの酸化を直接反映するからである。また、PCOOHの分解により、反応性の高いアルデヒドやカルボニル化合物、Lyso-PCが生成し、血管内皮細胞の機能を障害し<sup>[12-14]</sup>、粥状動脈硬化の発症に重要な役割を果たす。

よって、PCOOHの生成が粥状動脈硬化の発症の根底にあると考えた。

では、なぜ食餌性のコレステロールにより、血漿中のPCOOH濃度が増加したのだろうか？当研究室の木下は、ヒト血漿PCOOHが加齢とともに増加し、高脂血症者では健常者に比べ有意に増加することを報告している<sup>[20]</sup>。これによると、高脂血症のフェノタイプに関係なく、血漿中の脂質量の増加に伴い、血漿中のPCOOHも増加している。今回の研究では、コレステロール負荷ウサギの血漿では、コレステロールだけでなく、TGやPLも増加することを示した。これは、レムナントという、コレステロールとトリグリセライドの両方を多く含んだりポタンパクが増加したためである。この血漿中の増加がコレステロール食により血漿PCOOH濃度が増加した理由かもしれない。また、今回CL-HPLCで測定したPCOOHは8週目にもさらに増加したが、TBARSは4週でプラトーに達した。この違いの理由は過酸化脂質はヒドロパーオキシドの状態に蓄積すること、それから測定法の特異性の違いによる可能性が考えられた。したがって、生体内の酸化ストレスを正確に評価するにはヒドロパーオキシド量を定量することが重要であると考えられた。

今回、ウサギ大動脈の動脈硬化病変部位に、リン脂質ヒドロパーオキシド（PLOOH）が蓄積していることを示した。1952年、Glavindは、動脈硬化病変部位に脂質過酸化物が蓄積することを報告した<sup>[34]</sup>。彼らは、病変が進行するにつれ、過酸化脂質量も増加することを認めている。また、Piotrowskiは、動脈硬化病変部位に最も多く存在する脂質過酸化物は、リン脂質の過酸化物であると報告している<sup>[35]</sup>。しかし、ここで重要なことは、動脈硬化巣に過酸化リン脂質が蓄積しているにも関わらず、膜リン脂質の過酸化を抑制すると信じられているトコフェロールもまた、動脈硬化巣に豊富に存在していることである。多くの疫学的調査<sup>[36, 37]</sup>により、抗酸化ビタミンであるトコフェロールは、抗動脈硬化作用を有するとされている。しかし、トコフェロールが脂質過酸化を抑制する分子メカニズムは、完全に明らかにされたわけではない。Stockerは、動脈硬化巣の脂質量とトコフェロール量は正相関することを報告している<sup>[38]</sup>。本研究においても、動脈硬化巣への脂質の蓄積とトコフェロールの蓄積を示した。トコフェロールの代謝と脂質過酸化抑制による粥状動脈硬化抑制作用に関するさらなる研究が必要であろう。

今回の研究では、コレステロール食により動脈硬化病変部位だけでなく、肝臓や腎臓にもPLOOHが蓄積することが明らかになった。これは、血漿で増加したPCOOHが膜リン脂質の過酸化を介してPLOOHとして蓄積したと考えられる。また、8週間のコレステロール食により引き起こされた高脂血症が、臓器への脂質の沈着を引き起こし、それが脂質過酸化をさらに促進した可能性も考えられた。高脂血症では、血漿リポタンパクの増加に伴い血漿PCOOH濃度が増加し、組織へのPLOOHの蓄積を引き起こし、脂質過酸化を介して粥状動脈硬化の進展や、臓器障害を引き起こすかもしれない。実際、高脂血症は、粥状動脈硬化や脂肪肝、さらにはLipid nephrotoxicityを引き起こす。脂質沈着に伴う脂質過酸化が、臓器障害に関係するのかもしれない。

膜リン脂質の過酸化が、DNAの酸化変性に影響するのかを明らかにするために、DNAの酸化傷害マーカー<sup>[30, 31]</sup>として一般的な、8-OHdGの定量を行った。コレステロール食群では、膜リン脂質の過酸

化が進行しているにも関わらず、8-OHdGは、両群間に差は認められなかった。これは、DNAは修飾酵素により保護されており、脂質よりも酸化傷害を受けにくいからだと考えられた。よって、動脈硬化の発症における酸化ストレスの指標としては、8-OHdGよりも過酸化リン脂質の方が有用であろう。最近、F<sub>2</sub>イソプロスタンが、生体内でのアラキドン酸の過酸化物として発見された<sup>[39]</sup>。Reillyは、高脂血症患者では、尿中に排出されるF<sub>2</sub>イソプロスタン濃度が、健常者に比べ有意に高いことを示した<sup>[40]</sup>。Gniwottaは、ヒトの動脈硬化病変には、正常の血管に比べ、約20倍もイソプロスタンが蓄積することを報告している<sup>[41]</sup>。Morrowは、膜リン脂質の過酸化によりリン脂質を含むイソプロスタンがラット肝臓に存在することを発見した<sup>[42]</sup>。また、板部らは、ホスファチジルコリンの酸化物を特異的に認識する酸化LDL抗体を確立した<sup>[43]</sup>。彼らは、血漿中の酸化LDL濃度と血漿総コレステロール値は相関せず、LDLの酸化の程度は血漿コレステロール濃度とは関係しないと報告している。このように、粥状動脈硬化の発症メカニズムを明らかにしようと、高脂血症とリン脂質の過酸化との関係についての多くの研究が試みられているが、そのメカニズムは完全には解明されていない。結論として、血漿PCOOH濃度を評価することが、膜リン脂質の過酸化を介した粥状動脈硬化発症の分子メカニズムを理解するために非常に有用であることが明確になった。

## 5 参考文献

1. Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HG, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1973; 52: 1533-43.
2. Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HG, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52: 1544-68.
3. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, Mcnamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and risk of coronary heart disease. *Ann Intern Med* 1974; 74: 1-12.
4. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 1987; 257: 2176-80.
5. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-14.
6. Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1985; 110: 1100-7.
7. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.

8. Parthasarathy S, Rankin SM. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog Lipid Res* 1992; 31: 127-43.
9. Hertzuala SY, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Joseph SB, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84: 1086-95.
10. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883-7.
11. Gilotte KL, Horkko S, Witztum JL, Steinberg D. Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 2000; 41: 824-33.
12. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induce mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.
13. Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508.
14. Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 1998; 273: 9681-7.
15. Boccio GD, Lapenna D, Pqrreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccrullo F. Aortic antioxidant defense mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990; 81: 127-35.
16. Heinle H, Liebich H. The influence of diet-induced hypercholesterolemia on the degree of oxidation of glutathione in rabbit aorta. *Atherosclerosis* 1980; 37: 637-40.
17. Kang MH, Kawai Y, Naito M, Osawa T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *J Nutr* 1999; 129: 1885-90.
18. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
19. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-40.
20. Kinoshita M, Oikawa S, Hayasaka K, Sekikawa A, Nagashima T, Toyota T, Miyazawa T. Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin Chem* 2000; 46: 822-8.
21. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.

22. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234: 466-8.
23. Heider JG, Boyett RL. The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture. *J Lipid Res* 1978; 19: 514-8.
24. Miyazawa T, Fujimoto K, Suzuki T, Yasuda K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994; 233: 324-32.
25. Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K, Yasuda K. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J Lipid Res* 1992; 33: 1051-9.
26. Miyazawa T. Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 209-17.
27. Yagi K. A simple fluorometer assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976; 15: 212-6.
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8
29. Kikugawa K, Kojima T, Yamaki S, Kosugi H. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal Biochem* 1992; 202: 249-55.
30. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4533-7.
31. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 211-6.
32. Buttriss JL, Diplock AT. High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods Enzymol* 1984; 105: 131-8.
33. Lang JK, Gohil K, Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem* 1986; 157: 106-16.
34. Glavind J, Hartman S, Clemensen J, Jessen KE, Damt H. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1952; 30: 1-6.
35. Piotrowski JJ, Shah S, Alexander JJ. Mature human atherosclerotic plaque contains peroxidized phosphatidylcholine as a major lipid peroxide. *Life Sciences* 1996; 58: 735-40.
36. Odeh RM, Cornish LA. Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis. *Pharmacotherapy* 1995; 15: 648-59.
37. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised

- controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease. *Lancet* 1996; 347: 718-86.
38. Witting P, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Wagberg M, Stocker R. Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest* 1999; 104: 213-20.
  39. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9383-7.
  40. Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. Increased formation of distinct F<sub>2</sub> isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 2822-8.
  41. Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Kuhn H. Prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds, F<sub>2</sub>-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arter Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3236-41.
  42. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10721-5.
  43. Itabe H, Takeshima E, Iwasaki H, Kimura J, Oshida Y, Imanaka Y, Takano T. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesion. *J Biol Chem* 1994; 269: 15274-9.