

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590239
 研究課題名（和文） 動脈硬化発症における高トリグリセリド血症の重要性と治療法開発に向けた基礎的研究
 研究課題名（英文） The importance of hypertriglyceridemia in progress of atherosclerosis
 研究代表者
 片野 由美（KATANO YUMI）
 山形大学・医学部・教授
 研究者番号：70018696

研究成果の概要：遺伝性食後高 TG 血症家兔（PHT）では，血漿脂質は食後著明に増加し，リポ蛋白分画では，CM、VLDL の顕著な上昇，一方，総コレステロールの増加はわずかであること，糖代謝，インスリン抵抗性の悪化，血管内皮機能の障害，以上が認められた．食餌性高コレステロール血症ラットでは，血小板凝集反応は著明に亢進したが，アルコール除去赤ワインポリフェノール化合物の長期併用投与は，亢進した血小板凝集反応を著明に抑制し，また血管機能改善作用を示した．

交付額 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：トリグリセリド，脂質代謝，インスリン抵抗性，血管内皮細胞，血管平滑筋，ポリフェノール，遺伝性食後高 TG 血症家兔（PHT），食餌性高コレステロール血症ラット

1. 研究開始当初の背景

いわゆるメタボリックシンドロームは，インスリン抵抗性，高血圧，脂質代謝異常等を呈する病態で，冠動脈疾患や脳卒中のリスクが大きい．なかでも高コレステロール血症や高血糖が，粥状動脈硬化の発症・進展に密接にかかわっていることは良く知られている．一方，中性脂肪の関与については不明な点が多いが，最近，■ 高 TG 血症が，酸化ストレスを増加させ内皮機能障害をおこすこと，■ 高コレステロールと高 TG の相互作用も心筋梗塞の危険をさらに

増加させること等がわかり，高 TG 血症の動脈硬化促進因子としての役割に注目が集まっている．

最近我々は，脂質代謝異常による動脈硬化症を研究するために，遺伝性高中性脂肪血症モデル，すなわちコレステロールに加えて中性脂肪値が著明に高い（TGH）兔と低い（TGL）兔の開発に成功し，これら TGH と TGL 兔の血管機能，循環動態を比較検討した．その結果 TGH では，コレステロールのみが高い TGL 兔に比べ，内皮依存性血管弛緩反応が著明に低下すること，動脈硬化の促進，血管壁の弾性低下

を示唆する脈圧が有意に低下していることを見出した。しかし、このような機能変化がTGとコレステロールとの共同作用によるものか、中性脂肪単独によりもたらされるのかは明らかにはできなかった。申請者らは、中性脂肪の関与解明を目的に、疾患モデルの開発を進めてきた。その結果、絶食時の脂質は正常であるが、食後TGのみが顕著に増加する遺伝性食後高中性脂肪血症 (PHT) 兔の開発に成功した (平成14年日本・平成15年米国特許を取得)。そこで、この遺伝的にTGのみが高値を示すPHT兔を用いて、TGの役割を実験的に明らかにすることは、ヒトの動脈硬化性疾患を理解する上で非常に重要である。PHT

2. 研究の目的

(1) 本研究では新規に開発した PHT 兔および対照として JW を用いることにより、動脈硬化発症・進展における食後高中性脂肪血症の役割とその機序を明らかにする。(2) 赤ワイン含有ポリフェノール化合物の長期投与による動脈硬化症予防・改善の可能性を、今回は食餌性高コレステロール血症モデルラットを用いてを明らかにする。

3. 研究の方法

実験は、山形大学医学部動物実験指針を遵守して行った。

(1)【家兎を用いた実験方法】

実験には、8ヶ月齢(若齢)(, n = 4)と、39~40ヶ月齢(壮年期)の PHT (, n = 4)を用い、対応月齢の健常家兎(JW)と比較検討した。

血漿脂質および脂質分画測定: 食餌前と食餌開始18時間後に、耳動脈から採血、遠心後分離後、血漿TGと血漿総コレステロールを測定キットを用いて測定した。壮年期PHT(n=4)について、24時間の絶食後、食餌前と食餌15時間後の血漿TGと総コレステロールの脂質分画プロフィールをゲル濾過高速液体クロマトグラフィー・システム(Skylight Biotech Inc, 秋田)を用いて分析した。

血漿グルコースおよびインスリン測定:

食餌前と開始6、12、18、24時間後に、若齢および壮年期PHT(各n=4)から得られた血漿グルコースとインスリンを測定キットを用いて測定した。

血管機能実験: ペントバルビタール(37.5 mg/kg)麻酔下で摘出した胸部大動脈の中部を用いて幅2~3mm、内径4~5mmのリング標本作製した。その標本を混合ガス(95%O₂, 5%CO₂)を通気したKrebs-Henseleit液(37±0.1)を満たした10mlのorgan bathに懸垂、1gの

静止張力を負荷し、その収縮張力を等尺性張力トランスデューサー(7T-150-240, オリエンテック, 東京)を用いて測定した。実験には、血管内皮無傷標本と内皮除去標本を用いた。内皮細胞の有無はフェニレフリン(PE, 10⁻⁶ M)前収縮後アセチルコリン(Ach)の弛緩反応の有無により確認した。また、ニトロプルシド(10⁻¹¹ M 10⁻⁶ M), PE(10⁻⁸ M 10⁻⁴ M)の累積投与による反応を測定し、血管平滑筋機能の変化を検討した。

統計処理: 得られたデータは正規性の検定を行い、正規性分布の確認の後、対応のないStudent's *t*-test(等分散の場合)、またはWelch's *t*-test(等分散でない場合)を行った。また、血漿グルコースおよびインスリン濃度の比較には、paired *t*-testを行った。それぞれの値は全て平均値±標準誤差で示した。危険率p < 0.05の場合に有意差があるものとした。

(2)【ラットを用いた実験方法】

実験には雄性Fischer 344ラット(2~4ヶ月齢)を用いた。

食餌性高コレステロール血症モデルラットの作製およびRWPC投与方法: 通常の飼料に4%コレステロールを加えた飼料を調製した(日本配合飼料、愛知県)。この飼料で飼育したラットを食餌性高コレステロール血症モデルとした。またRWPCを長期投与するために、通常の飼料に4%コレステロールと約0.62%のRWPCを混合した飼料を調製(同上会社)した。RWPCを長期投与した場合の血管に対する作用を検討するためにラットを無作為に次の3群に分けた。(1)通常の餌で飼育した群を対照群(Cont群)(2)通常の餌に4%コレステロールを混合した餌で飼育した群をコレステロール群、(3)コレステロール群(HC群)の餌に約0.62%RWPCを混合した飼料で飼育した群をRWPC+コレステロール群(RWPC+HC群)とし、各々の餌で1, 2, 3ヶ月間飼育し実験に供した。したがって実験に用いる段階でのラットの月齢は2~4ヶ月齢であった。

摘出大動脈標本作製: ラットをエーテル麻酔下で頸椎脱臼後、摘出した胸部大動脈のリング標本作製し、約0.8gの静止張力を負荷し、家兎と同様の方法で収縮張力を測定した。実験には、血管内皮細胞無傷の標本と除去標本を用いた。

血小板凝集能測定: 採血および血漿採取: 腹腔内にヘパリンナトリウム投与後、エーテルで麻酔し下大静脈より採血した。採血用注射器にはあらかじめ3.8%クエン酸ナトリウムを入れ、血液凝固を抑制した(クエン酸

ナトリウムと血液の割合を0.5:9.5).これを血小板凝集能の実験に供した.

全血血小板凝集能測定:血小板凝集能は,全血血小板凝集能測定装置(WBA-4S,エム・シー・メディカル株式会社,東京)を用いて測定した.血小板凝集惹起物質としてADPを用いた.

血漿脂質測定:採血後遠心し,血漿を分離して脂質測定に用いた.血漿脂質(総コレステロール, TG, HDL)は,SpotchemEZ-4430¹⁶⁾(Arkray, Kyoto)を用いて測定した.

使用薬物:摘出血管標本を用いた実験: PE, Ach, Angiotensin II (AII, $10^{-7}M$), L-nitro-L-arginine (L-NAME) diclofenacを用いた.赤ワイン(CASTILLO DE ARMOUR, スペイン)を凍結乾燥し,アルコールを除去し(RWPC),これを飼料に混合した.またRWPCを蒸留水で1 g/mlに溶解したものを原液とし,機能実験に用いた.

組織学的検討:摘出血管標本を用いた実験:摘出した大動脈を固定,脱水,パラフィン包埋後,約3 μm 厚の切片を作成し,Hematoxylin-Eosin (HE)染色を行い,組織像は,Adobe Photoshopを用いて解析した.
血小板凝集実験:肝臓を10%ホルマリンで固定しパラフィン包埋した.その後,4 μm に薄切しHematoxylin-Eosin染色を行った.さらに,0.C.T Compoundに包埋した肝臓から,5 μm の凍結切片を作製しOil Red O染色を行った

統計処理:摘出血管標本を用いた実験:正規性の検定を行い,等分散の場合はStudent's t-test,等分散でない場合はWelch's t-testを用いて検定した.正規分布でない場合は,Mann-Whitney's U testを用いて検定をした.
血小板凝集実験:一元配置分散分析法(ANOVA)と多重比較検定を用いて検定を行った.

4. 研究成果

(1) 動脈硬化発症・進展における高トリグリセリド血症の関与

血漿脂質の食餌による変化とリポ蛋白分画解析:食餌による血漿中TGおよび総コレステロール濃度変化を,若齢および壮年期PHTにて比較検討した(図1).若齢PHTの血漿TGは,食餌前と比較し,18時間後において有意に増加していた.壮年期PHTにおいても,食餌前に比較し,食餌開始18時間後の血漿TGは増加し,その値は若齢PHTとほぼ同等であった(図1a).一方,血漿総コレステロールは,若齢PHT,壮年期PHTいずれに

おいても,食餌による変化はわずかしかみられなかった(図1b).壮年期PHTの,血漿TGおよびコレステロールリポ蛋白分画について検討した.

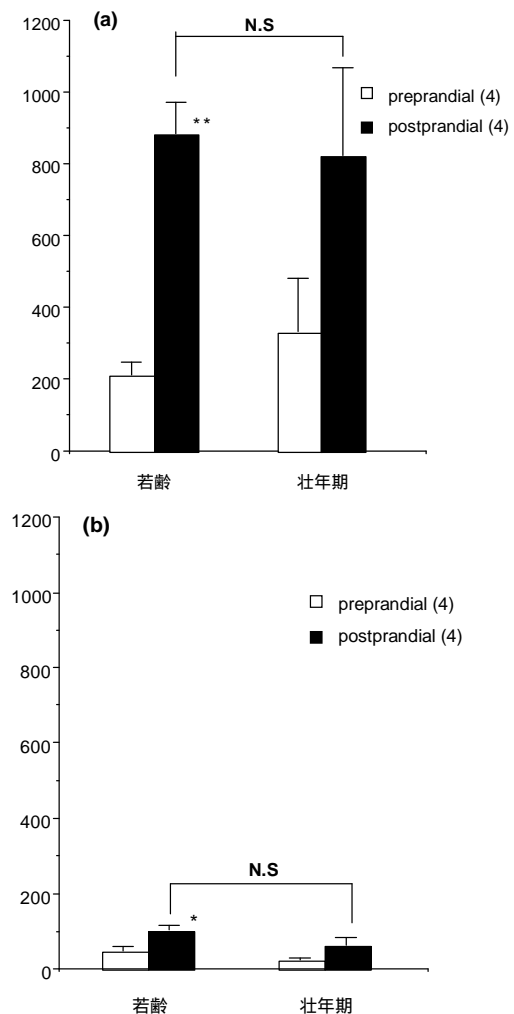


図1 (a) 血漿TG濃度,および(b) 血漿総コレステロール(TC)濃度の食餌による変化
左が若齢,右が壮年期を示す.値は平均値±標準誤差,()内は実験例数,preprandial:食餌前,postprandial:食餌開始18時間後.* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (vs. 食餌前),N.S.: not significant

TGのリポ蛋白分画では,カイロミクロン(CM)超低比重リポ蛋白(VLDL)が際だって高かった.低比重リポ蛋白(LDL)や高比重リポ蛋白(HDL)は食餌前後で変わらなかった.コレステロールのリポ蛋白の分画でも,CM,VLDLが増加していた.

血漿グルコース濃度およびインスリン濃度の日内変動:120gの餌を継続的に自由摂取させた場合の,食餌前,食餌開始6,12,18,24時間後の血漿グルコース濃度と血漿インスリン濃度を測定した.血漿グルコース濃度の日内変動において,若齢PHTは食餌前に比

較し、6時間後でやや上昇し、24時間後までやや高値を維持した。壮年期 PHT では、食餌前のグルコース濃度は若齢 PHT より高かった。その値は、18時間後まで上昇し、その後食餌前の値までもどった。

血漿インスリン濃度の日内変動では、若齢 PHT では6時間後に著明な上昇が見られたが、その後は食餌開始前と同程度の値であった。壮年期 PHT では、若齢より食餌開始前の濃度が高く、12時間後でピークとなったが、その後も正常より高い濃度のままであった。

PHT の形態学的特徴: 壮年期 PHT では、腹部周囲の局所的な脱毛が4羽中3羽に認められた。また、耳内部に黄色腫が4羽中2羽に観察された。開腹後の肉眼的所見では、腸間膜周囲から肝臓周囲にまで広範に脂肪蓄積が見られ、心臓周囲にも脂肪蓄積が認められた。さらに、胸部大動脈では、上行~弓部にかけて、血管周囲の脂肪蓄積が著しかった。

PHT の血管機能の変化: 高 TG 血症が長期にわたり続くことによる血管機能の変化について、壮年期 PHT を用いて検討した。

a) Ach による血管内皮由来弛緩因子を介した血管弛緩反応: 壮年期 PHT の内皮除去標本では、Ach による血管弛緩反応は惹起されなかった。内皮無傷標本では、Ach 10^{-8} M より弛緩が見られはじめ、 10^{-6} M で最大弛緩反応が得られた。その最大弛緩率は60%程度で、健康家兎に比べ弛緩反応は低下した。

b) NP による血管平滑筋弛緩反応: 健康、若齢と同様、壮年期 PHT の血管において、NP は内皮細胞の有無にかかわらず、濃度依存性に強い血管弛緩作用を惹起した。

c) PE による α_1 受容体を介した血管平滑筋収縮作用: PE は、内皮無傷および内皮除去標本ともに、 3×10^{-8} M より濃度依存性に強い収縮反応を示し、 10^{-4} M で最大収縮反応が得られた。その濃度反応曲線に内皮の有無による相違はなかった。

本研究により、高 TG 血症が長期持続することによって、1. 食後に上昇する TG 濃度に加齢変化は認められないこと、2. 糖代謝・インスリン抵抗性の悪化が見られること、3. 血管内皮の機能障害が認められること、以上が明らかになった。これらの病態は、メタリックシンドロームに合致する。さらに動脈硬化病変形成に高 TG がどのようにかかわっているかの詳細と PHT の循環機能を RWPC に改善効果を持つか否かについて現在実験中である。

(2) RWPC の動脈硬化発症・進展予防改善効果に関する研究

RWPC の長期投与による食餌性高コレステロール血症ラット血管機能の変化

高コレステロール血症による組織学的変化: 各群の組織切片を顕微鏡下に観察した結果、3群ともに血管内膜の肥厚やプラーク形成等の異常所見は認められなかった。

3群間の体重変化: 3群間の体重に、有意差は認められなかった。

AII の血管収縮作用に対する HC, RWPC の影響: AII の血管収縮張力は、いずれの群においても投与後ほぼ 2-3 分でピークに達し、その後速やかに回復した。RWPC + HC 群の血管収縮反応は、他の2群に比べ、有意に小さかった。

AII の血管収縮における血管弛緩因子の関与: AII の血管収縮作用に内皮由来の血管弛緩因子がどのように関与しているか検討した。

Cont 群の AII による血管収縮は L-NAME 存在下で増強し、diclofenac 存在下では有意に抑制された。HC 群の AII による血管収縮反応は、L-NAME 存在下で増強する傾向にあったものの、有意差は見られず、diclofenac にも影響されなかった。RWPC+HC 群の AII による血管収縮は、L-NAME 存在下では、有意に増強した。

食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対する RWPC 長期投与の効果

血小板凝集反応: Cont 群、HC 群、RWPC+HC 群すべてにおいて、血小板凝集反応は ADP 濃度依存性に亢進した(図2)。また HC 摂取期間が長いほど血小板凝集反応は亢進した。HC 投与群では、Cont 群に比べ血小板凝集反応は有意に亢進した。一方、RWPC + HC 群では、いずれの食餌摂取期間(1~3ヶ月)でも血小板凝集反応は抑制され、Cont 群と差は認められなかった。

血漿脂質: 1~3ヶ月間の HC 群投与群および RWPC+ HC 投与群の血漿総コレステロール、HDL は、Cont 群に比べ有意に増加した。しかし、HC 群と RWPC+ HC 群の間に差はなかった。

血漿 TG も、 HC 群と RWPC + HC 群では、Cont 群に比べ有意に増加し、HC 群と RWPC + HC 群の間に差はなかった。

組織学的検討: 各群のラット肝臓の Oil Red O 染色を行った結果、Cont 群では脂肪の沈着は認められなかった。一方、HC 群では、Cont 群に比べ脂肪の沈着が広範に認められた。同様に、RWPC + HC 群でも、Cont 群に比べ脂肪の沈着が広範に認められ、その程度は HC 群と同等であった。

本研究より，食餌性高コレステロール血症ラットにおいて異常に亢進した血小板凝集能は，RWPC の長期投与によって抑制されること，その抑制効果は血漿脂質の変化とは関連していないことが示唆された。

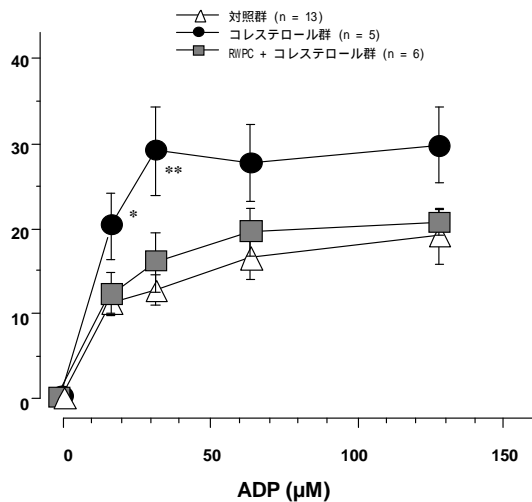


図2 ラット血小板凝集に対するコレステロールとRWPCの長期投与効果(1ヶ月投与例)* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (vs 対照群)

本課題に関する主な発表論文など

[雑誌論文](計2件)

小林優子, 山田晃子, 村田恵理, 清水良美, 利美賀子, 下田智子, 会田智美, 伊藤恒賢, 石幡明, 片野由美: 食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対する赤ワインポリフェノール成分長期摂取の効果. 山形医学, 26, 61-68, 2008 (査読有り)
 清水良美, 五十嵐祐子, 利美賀子, 会田智美, 下田智子, 石幡明, 片野由美: 赤ワイン凍結乾燥品の長期投与による食餌性高コレステロール血症ラット血管機能の変化. 未病システム学会雑誌, 14: 192-193, 2008 (査読有り)

[学会発表](計9件)

清水良美, 五十嵐祐子, 福田直樹, 伊藤恒賢, 石幡明, 片野由美. 遺伝性食後高中性脂肪血症ウサギにおけるインスリン抵抗性と血管機能の加齢変化. 第82回日本薬理学会年会. 横浜; 3月(2009)
 村田恵理, 三重堀亜矢, 山崎理美, 岩田宏紀, 森田真一, 石幡明, 片野由美: 血管弛緩作用を惹起する赤ワイン由来ポリフェノール化合物における有効成分の単離および分析. 第59回日本薬理学会北部会, 仙台; 9月(2008)

Kobayashi Y, Yamada A, Murata E, Kaga M, Shimoda T, Aida T, Ishihata A, Katano Y: Antioxidant effect of red wine polyphenolic compounds on dietary-induced hypercholesterolemic rats, J Pharmacol Sci, 106, Suppl, 267, 2008

Kobayashi Y, Ishihata A, Itoh T, Yamada A, Kaga M, Aida T, Shimoda T, Katano Y: Impact of red wine consumption on plasma lipid levels and platelet aggregation of hypercholesterolemic rats. 3rd International Conference on Polyphenols and Health, Nov (2007)

Katano Y, Ishihata A: Suppressive effect of red wine polyphenolic compounds on platelet aggregation in dietary-induced hypercholesterolemic rats. The 25th Annual Meeting of ISHR-Japanese Section. In Yokohama. 12. (2008) 9月2007

Kobayashi Y, Yamada A, Murata E, Kaga M, Shimoda T, Aida T, Ishihata A, Katano Y: Chronic administration of red wine polyphenolic compounds improve platelet function in dietary-induced hypercholesterolemic rats, J Pharmacol Sci, 103, Suppl 1, 147, 2007

Ishihata A, Katano Y: Functional and morphological changes in vessels of hypertriglyceridemic rabbits with normocholesterolemia. XIX World Congress of the ISHR (International Society for Heart Research), Italy Bologna, June 23~26 (2007)

Katano Y, Aida T, Simoda T, Kaga M, Murata E, Yamada A, Ishihata A: Effect of freeze-dried red wine on the coronary circulation of rats with cholesterol-rich diet, J Pharmacol Sci, 100(Suppl), 228, (2006)

[図書](計0件)

[産業財産権]

取得状況(計0件)

出願状況(計0件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片野 由美 (KATANO YUMI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号 : 70018696

(2) 研究分担者

石幡 明 (ISHIHATA AKIRA)
奥羽大学・薬学部・教授
研究者番号 : 40232326
伊藤 恒賢 (ITOH TSUNEKATA)
山形大学・医学部・実験動物施設助手
研究者番号 : 80241719