

## WHHL ウサギ粥状動脈硬化巣形成に関する研究 —冠動脈と大動脈の動脈硬化における比較—

大 谷 晴 美

広島大学医学部内科学第一講座 (主任: 梶山悟朗教授)

受付 平成12年1月11日

受理 平成12年2月9日

粥状動脈硬化の発生過程において, その主要な細胞構成成分として平滑筋細胞, マクロファージが, 細胞外構成成分としてコラーゲンがあげられる。本研究では, WHHL ウサギを用い冠動脈と大動脈の病変について, これらの構成成分を中心に進展度別にその細胞数や沈着量の比較検討を行った。

初期病変においては, 冠動脈では平滑筋細胞の増殖が優位であり, 大動脈ではマクロファージの増殖が優位であった。また, 初期では, アポトーシスはほとんど認められなかったが, 進行期でアポトーシスの関与している可能性があった。

コラーゲンは初期病変では, I型, III型, IV型を内膜全体に認めた。進行するにつれV型を全層にVI型を深層に認めた。コラーゲンの分布に冠動脈と大動脈では各段階で明らかな差は認めなかった。

このことから粥状動脈硬化性病変の発生過程において冠動脈と大動脈では平滑筋細胞とマクロファージの役割に違いがあることが示唆された。すなわち初期に冠動脈では平滑筋細胞の増殖が優位であり, 大動脈ではマクロファージの増殖が優位であったが, 病変の進行と共に両者は似た像を呈したことから, 冠動脈と大動脈では初期に平滑筋細胞とマクロファージの役割に違いがあることが重要な点であると考えられた。

**Key words** : WHHL ウサギ, 大動脈, 冠動脈, 粥状動脈硬化巣

粥状動脈硬化症に起因する虚血性心疾患や脳血管障害は, 近年日本人の死因の上位を占めており, その成因と治療法の解明が早急に望まれている。1973年に渡辺によって発見された実験動物である WHHLウサギ (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit) は, 高コレステロール血症や粥状動脈硬化症を自然発症するため, ヒトの家族性高コレステロール血症のモデル動物として, 広く動脈硬化症研究に使用されている<sup>10,32,33)</sup>。WHHL ウサギの病態像のうち, 形態学的変化が最も顕著なものは, 大動脈の粥状硬化性病変で, 生後2カ月齢頃から観察され, 5カ月齢にはほぼ全例で認められる。一方冠動脈病変は, 大動脈のそれより約2カ月遅い4カ月齢頃から観察され, その発生率も20カ月齢においても約70%と低い<sup>8)</sup>。この傾向は, 家族性高コレステロール血症の病態と類似しており, その理由については未だ解明されていない。

本研究は, 粥状動脈硬化に主たる役目を果たすと思われる平滑筋細胞やマクロファージ, および細胞間マトリックスであるコラーゲンI型, III型, IV型, V型, VI型を免疫組織化学的染色によって観察し, 同時にこれら細胞の活動性の指標である増殖細胞マーカーによる免疫組織化学的染色に加え, TUNNEL法によるアポトーシスの有無の観察を行い, 冠動脈と大動脈の粥状動脈硬化性病変の形成過程におけるこれらの細胞や細胞間マトリックスの関与の差異を探ることを目的として行った。

### 材 料 と 方 法

実験動物は, 神戸大学医学部動物実験施設より譲り受けた, WHHL ウサギを用いた。飼料は標準ウサギ食 (オリエンタル酵母製) を120 g/日与え, 飲料水は水 (ad libitum) を自由に与え飼育し, 10週から28週

までの14匹について検索を行った。

ウサギはペントバルビタール麻酔下に開腹し、大動脈と心臓を摘出した。摘出した心臓は塩見らの方法により、7個の切片に<sup>28)</sup>、大動脈は10個の切片に分割し、10%希釈ホルマリンで固定する切片と、凍結標本作成のため直ちにOCTコンパウンド(Miles Laboratories, Elkhart社)に包埋し液体窒素で急速凍結する切片に分割した。またホルマリン固定切片はパラフィン包埋し4 $\mu$ mの厚さの連続切片を作成し、HE染色、膠原線維観察のためのエラスチカワンギーソン染色を行った。

免疫染色は、抗ウサギマクロファージマウスモノクローナル抗体(RAM 11, Dako社)、抗ヒト平滑筋アクチンマウスモノクローナル抗体( $\alpha$  SMA, 1A4, Dako社)、抗PCNAマウスモノクローナル抗体(PCNA, PC 10, Dako社)、ヒトコラーゲンI型、III型、IV型、V型、VI型の各々に対するマウスモノクローナル抗体(Anticollagen I, III, IV, V, VI, 富士薬品)を用いた。

抗ウサギマクロファージマウスモノクローナル抗体、抗ヒト平滑筋アクチンマウスモノクローナル抗体、抗PCNAマウスモノクローナル抗体については、ホルマリン固定パラフィン包埋材料の薄切標本を用い、脱パラフィン後、ニチレイ社のヒストファインSAB-PO(M)キットを用いABC法で染色した。すなわち0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加メタノール処理を室温30分間行い、流水水洗後、10%正常ウサギ血清を室温で10分間反応させた。次に抗体を滴下し、4℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン標識抗マウス抗体と30分間反応させた後、PBSで洗浄し、次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで30分間反応させトリス緩衝液で洗浄した。DAB反応を行った後ヘマトキシリンで核染した。PCNA抗体の免疫染色ではマクロファージ抗体との二重染色を行い、ニューフクシンで赤く染色された細胞をマクロファージとした。

ヒトコラーゲンI型、III型、IV型、V型、VI型の各々に対するマウスモノクローナル抗体については、凍結材料を4 $\mu$ mの厚さに薄切し、-20℃のアセトンで5分間固定した。免疫染色は、ニチレイ社のヒストファインSAB-AP(M)キットを用いABC法で行った。すなわち流水水洗後、10%正常ウサギ血清を室温で10分間反応させ、次にモノクローナル抗体を滴下し、4℃で一晩反応させた。トリス緩衝液で洗浄後、ビオチン標識抗マウス抗体と30分間反応させ、トリス緩衝液で洗浄した。アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンで30分間反応させた後、トリス緩衝液で洗浄し、ニューフクシン反応液で発色した後、

風乾しヘマトキシリンで核染した。

アポトーシスの観察は、オンコー社のアポタックキットを用い、TUNNEL法で行った。すなわちホルマリン固定パラフィン包埋の薄切標本を用い、脱パラフィン後、蛋白消化処理および内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。平衡緩衝液を滴下後、作業用濃度TdT酵素を滴下した。反応停止後、抗ジゴキシゲニン・ペルオキシダーゼを滴下し反応させた。DABで発色し、ヘマトキシリンで核染を行った。

以上の染色結果と動脈硬化の程度を、内膜の肥厚部から以下の様に、初期、移行期、進行期の3期に分類し、これらの比較検討を行った。すなわち観察した動脈硬化程度が様々であり、以下の基準で進展度の分類を行った。初期病変：内膜肥厚部の平均が冠動脈と大動脈ともに10 $\mu$ m以下の病変。移行期病変：内膜肥厚部の平均が冠動脈では40~100 $\mu$ m、大動脈では100~250 $\mu$ mの病変。進行期病変：内膜肥厚部の平均が冠動脈では150 $\mu$ m以上、大動脈では300 $\mu$ m以上の病変。

また、一部の切片については、染色結果を定量的に評価するため、コンピューターに画像を取り込んでフォトショップ<sup>®</sup>、NIHイメージ<sup>®</sup>、MS-エクセル<sup>®</sup>を用い画像処理後定量測定を行った。増殖した平滑筋細胞の占める面積率は以下のようにして算出した。内膜肥厚部の面積を測定し、次にその病変部の中で抗ヒト平滑筋アクチンモノクローナル抗体陽性の平滑筋細胞が占める面積を測定した。平滑筋細胞が占める面積率は、(平滑筋細胞が占める面積/肥厚した内膜の面積)の比であらわした。同様に、マクロファージが占める面積率も求めた。コラーゲンに関してはエラスチカ・ワンギーソン染色の標本を用い、内膜肥厚部の面積を測定し、コラーゲンの面積は、その肥厚部の中で赤色に染色された部分の面積を測定し、その比を求めた。細胞外沈着物に関しては、HE染色で脂質沈着とみなされる部分やカルシウム塩の沈着部分の面積を求め、肥厚部の面積との比であらわした。

## 成 績

### 1) HE染色像(図1)

冠動脈、大動脈ともに初期病変では内弾性板は保持されていたが、移行期では内弾性板の一部に破壊がみられ、進行期では内弾性板が破壊されていた。移行期からは両動脈ともに細胞外に脂質の蓄積と思われる空胞を認めたが、特に大動脈の進行期ではコレステロール沈着を中間層から深層にかけて多数認めた。石灰化は冠動脈では全層にわたって粒状に認めたが、大動脈

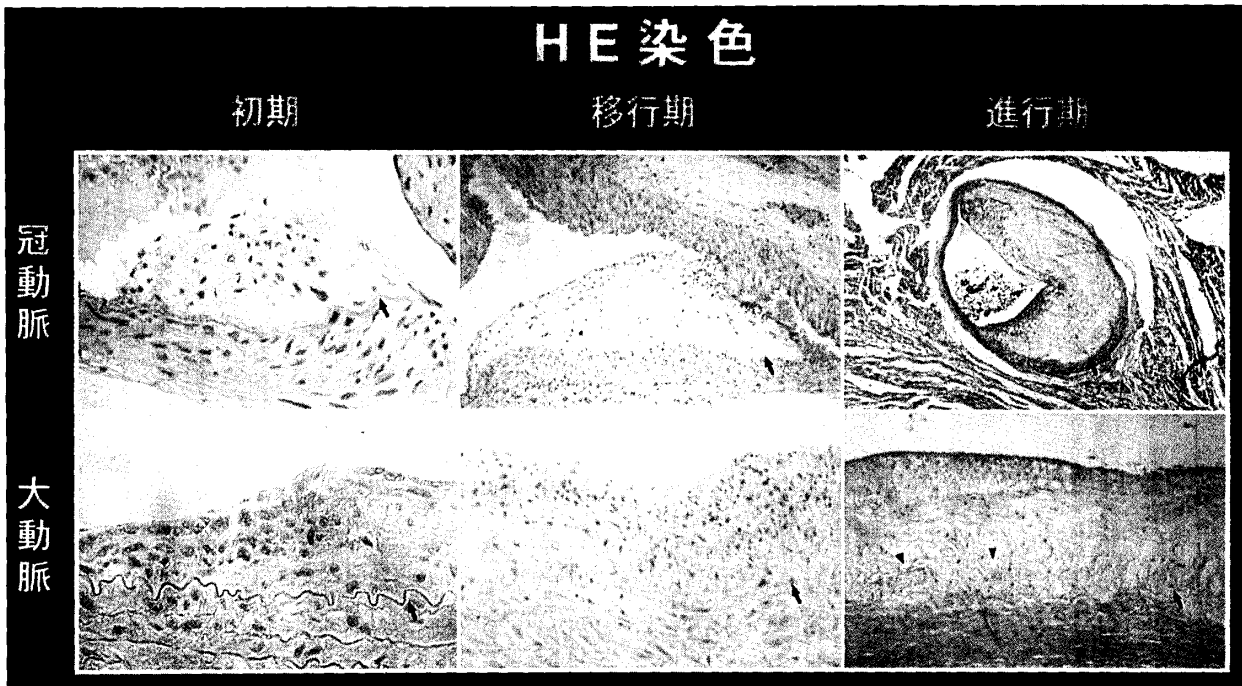


図1 動脈硬化巣の HE 染色

上段は冠動脈，下段は大動脈（以下の図でも同様）

初期病変では内弾性板（矢印↑）は保持されていたが，移行期では内弾性板の一部に破壊が見られ，進行期では内弾性板が破壊されていた。大動脈の進行期では細胞外に脂質の蓄積と思われる空胞を認めた。（矢印▲）

（左上×200，左下×200，中上×33，中下×66，右上×13.2，右下×33）

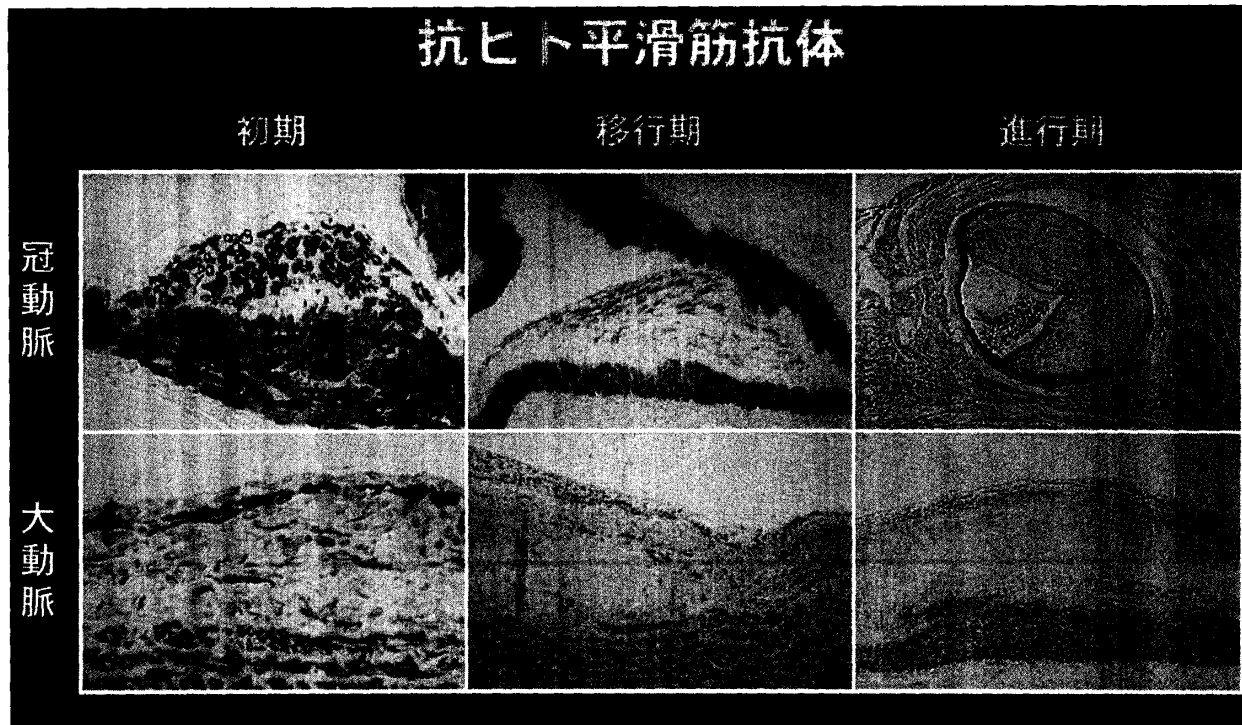


図2 抗ヒト平滑筋抗体 (anti- $\alpha$ SMA) による免疫染色

平滑筋細胞は茶色に染色されている。初期では冠動脈で多数の平滑筋細胞を認めた。大動脈では少数の紡錘型の平滑筋細胞を認めたのみであった。移行期では両動脈とも表層から中間層にかけて平滑筋細胞を認めた。進行期では，両動脈とも表層に平滑筋細胞を認め，中膜平滑筋の菲薄化や染色性の低下も一部認められた。

（左上×200，左下×200，中上×33，中下×66，右上×13.2，右下×33）

では深層に一塊となった構造も認められた。

## 2) 平滑筋細胞の動態 (図2)

冠動脈においては、初期から多数の平滑筋細胞がみられたが、大動脈では紡錘形の平滑筋細胞が少数みられるのみであった。移行期では冠動脈の表層から中間層にかけて平滑筋細胞を認めたが、大動脈では主に表層に平滑筋細胞を認めた。進行期では、両動脈とも表層に平滑筋細胞を認めた。また、一部では中膜の菲薄化や染色性の低下もみられ、中膜平滑筋細胞の質的な変化が示唆された。

## 3) マクロファージの動態 (図3)

冠動脈においては、初期ではごく少量のマクロファージしか認められなかった。一方大動脈では、病変部の大部分が泡沫化したマクロファージで占められた。移行期では、冠動脈の陽性細胞は主に表層に認め、大動脈では全層にわたってマクロファージを認めた。進行期では、冠動脈においても大動脈においても中間層に泡沫化したマクロファージを認めた。どの病期においても大動脈では、病変部の内弾性板を越えた付近にも

マクロファージが散見された。また、比較的進行した部位では、新生血管から供給されたと思われるマクロファージも認められた。

## 4) PCNA 染色と TUNNEL 法からみた細胞動態 (図4, 図5)

PCNA 陽性細胞は、冠動脈初期では増殖した内膜の表層部分に少数認めるのみだったが、大動脈では比較的細胞成分に富んだ細胞に多く認めた。進行期において冠動脈では増殖した内膜の表層部分や深層の泡沫化したマクロファージに PCNA 陽性細胞を認めたが、大動脈では全層に陽性細胞を認めた。(図4)

TUNNEL 陽性細胞は、大動脈において動脈硬化病変の進展に伴い増加する様子が認められた。冠動脈では認めなかった。(図5)

## 5) コラーゲンの動態 (図6-11)

EVG 染色では、冠動脈、大動脈ともに、初期から線維化が始まり、病変が進行するにつれてコラーゲンの量も増加していたが、初期と移行期では、冠動脈の方が大動脈に比べて線維化が進行していた。(図6)

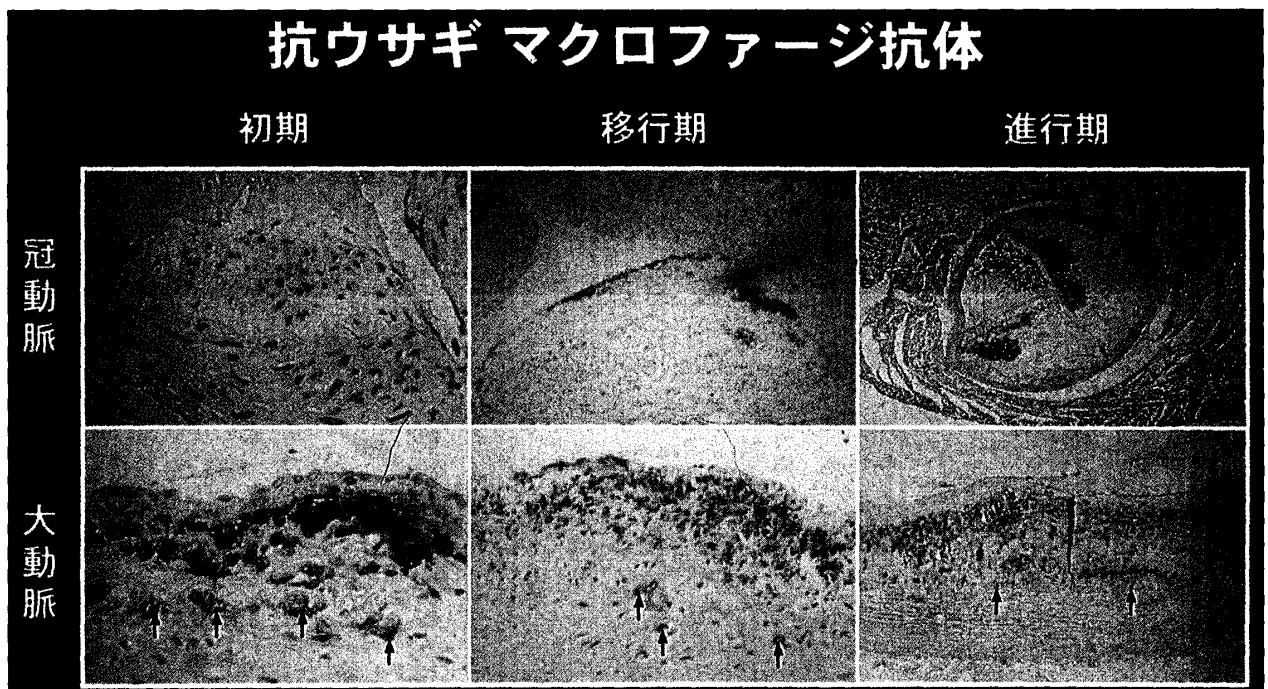


図3 抗ウサギマクロファージ抗体 (RAM 11) による免疫染色

マクロファージは茶色に染色されている。初期病変では冠動脈においてマクロファージを少数認めた。図に示した病変では陽性細胞を認めなかった。大動脈では、病変部の大部分が泡沫化したマクロファージで占められていた。移行期では冠動脈のマクロファージは主に表層に認めた。大動脈の移行期では全層にわたってマクロファージを認めた。進行期では冠動脈においても大動脈においても中間層から深層に泡沫化したマクロファージを認めた。どの病期においても大動脈では、病変部の内弾性板を越えた付近にもマクロファージが散見された。(矢印↑)

(左上×200, 左下×200, 中上×33, 中下×66, 右上×13.2, 右下×33)

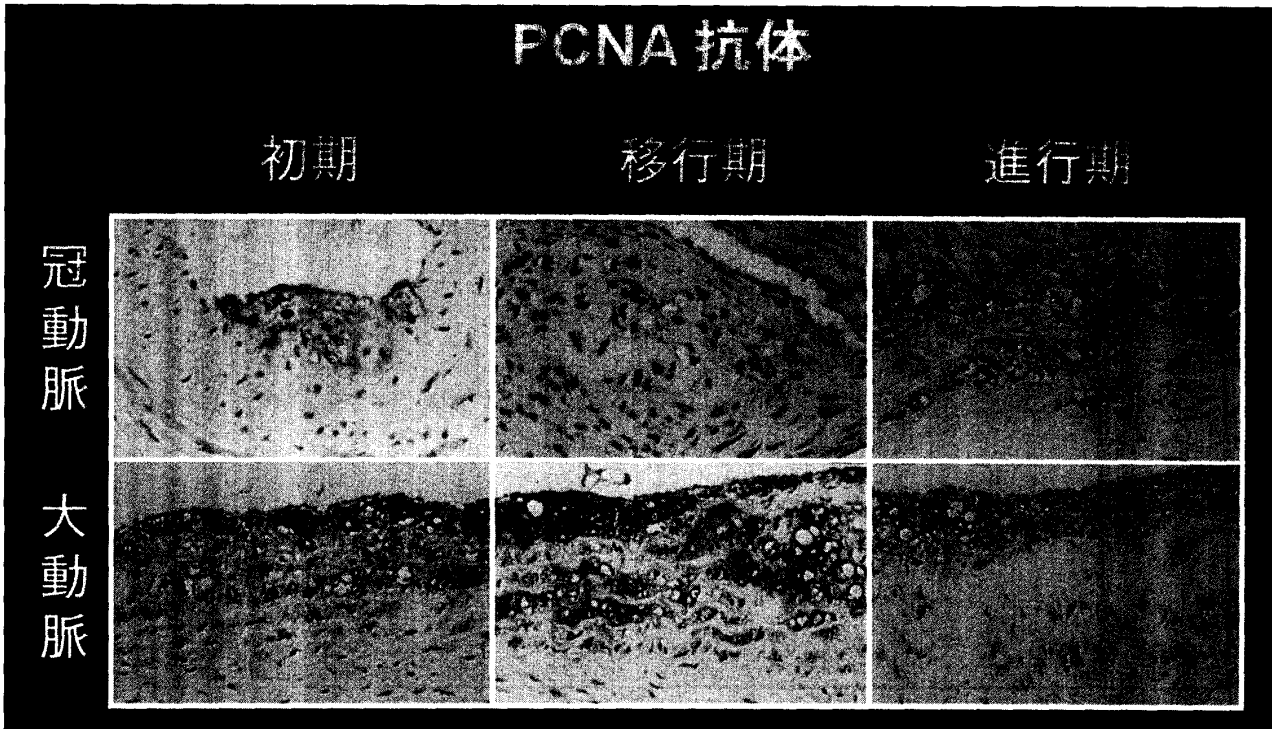


図4 PCNA抗体と抗ウサギマクロファージ抗体の免疫二重染色

PCNA抗体陽性細胞核は茶色に染まり、マクロファージの細胞質が赤色に染まっている。冠動脈初期では増殖した内膜のマクロファージにごく少数PCNA抗体陽性細胞を認めた。大動脈では初期病変から既にマクロファージが浸潤しており、多数のPCNA抗体陽性細胞を認めた。移行期では冠動脈で表層の細胞にPCNA抗体陽性細胞を認めたが、少数であった。大動脈では、増殖した内膜の表層から中間層にかけての多くの細胞がPCNA抗体陽性であった。進行期において冠動脈では増殖した内膜の表層部分や深層の泡沫化したマクロファージにPCNA抗体陽性を認めたが、大動脈では全層にPCNA抗体陽性細胞を認めた。PCNA抗体陽性細胞は冠動脈よりも大動脈に多く認めた。

(左上×200, 左下×132, 中上×200, 中下×132, 右上×200, 右下×66)

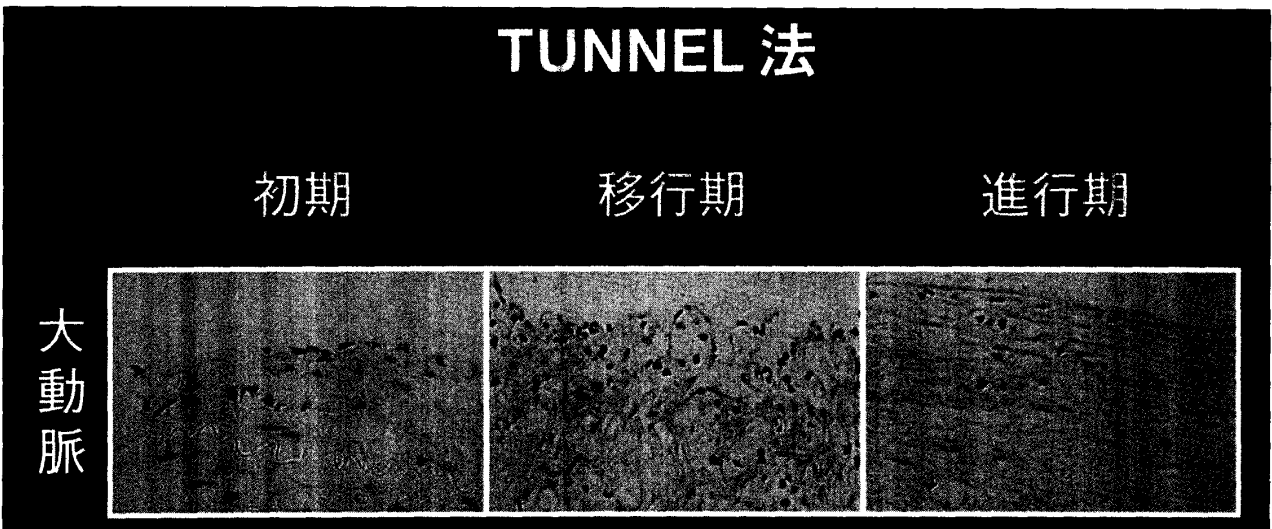


図5 TUNNEL法

TUNNEL陽性核は、茶色に染色されている。大動脈において、初期病変では、陽性細胞は認めなかった。移行期では表層から中間層の細胞に陽性細胞を認めた。進行期では表層から中間層にかけて陽性細胞を認めた。冠動脈では陽性細胞を認めなかったため提示しない。(×132)

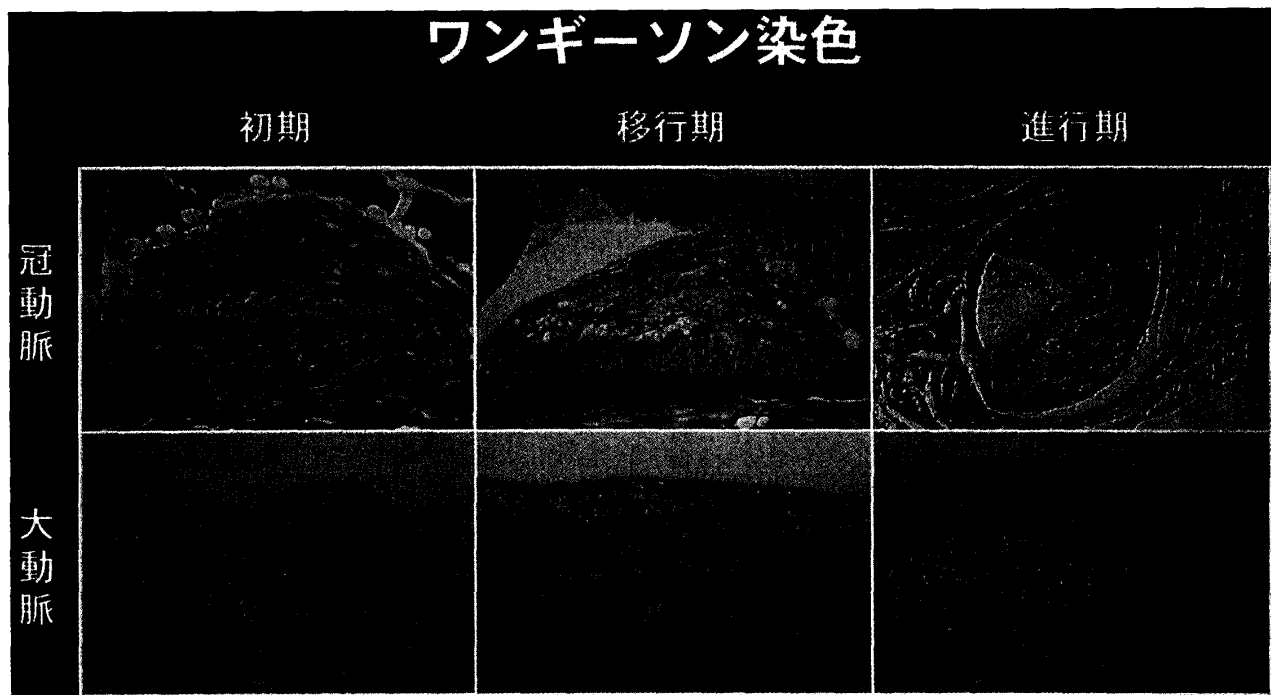


図6 ワンギーソン染色

膠原線維は赤色に染色されている。冠動脈においても、大動脈においても初期から線維化が始まり、病変が進行するにつれてコラーゲンの量も増加している像を認めた。初期と移行期では冠動脈の方が大動脈に比べて線維化が進行していた。

(左上×200, 左下×200, 中上×33, 中下×66, 右上×13.2, 右下×33)

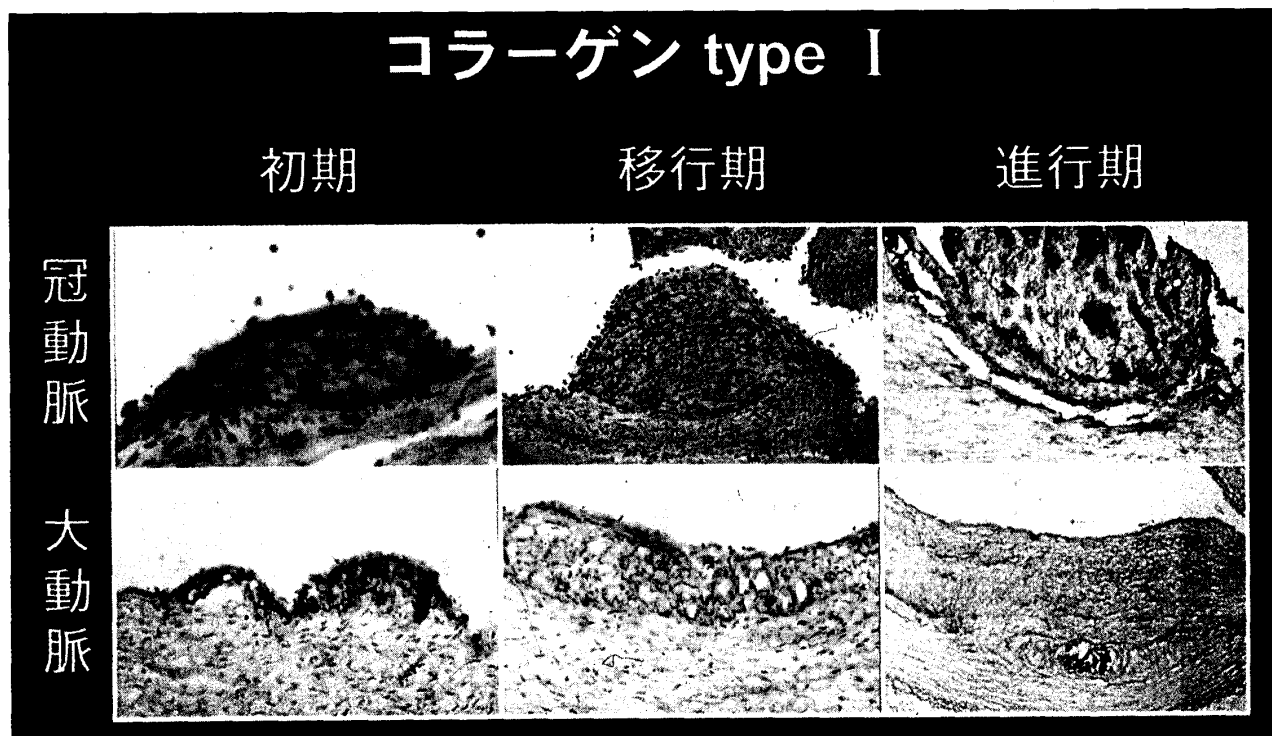


図7 コラーゲン I 型抗体の免疫染色

コラーゲン I 型線維は赤く染色されている。両動脈において、初期および移行期では、増殖した内膜全体に一樣に認め、中膜平滑筋層よりも強く染色された。両動脈とも進行期では増殖した内膜の表層から中間層にかけて主に認めた。

(左上×200, 左下×132, 中上×66, 中下×66, 右上×33, 右下×33)

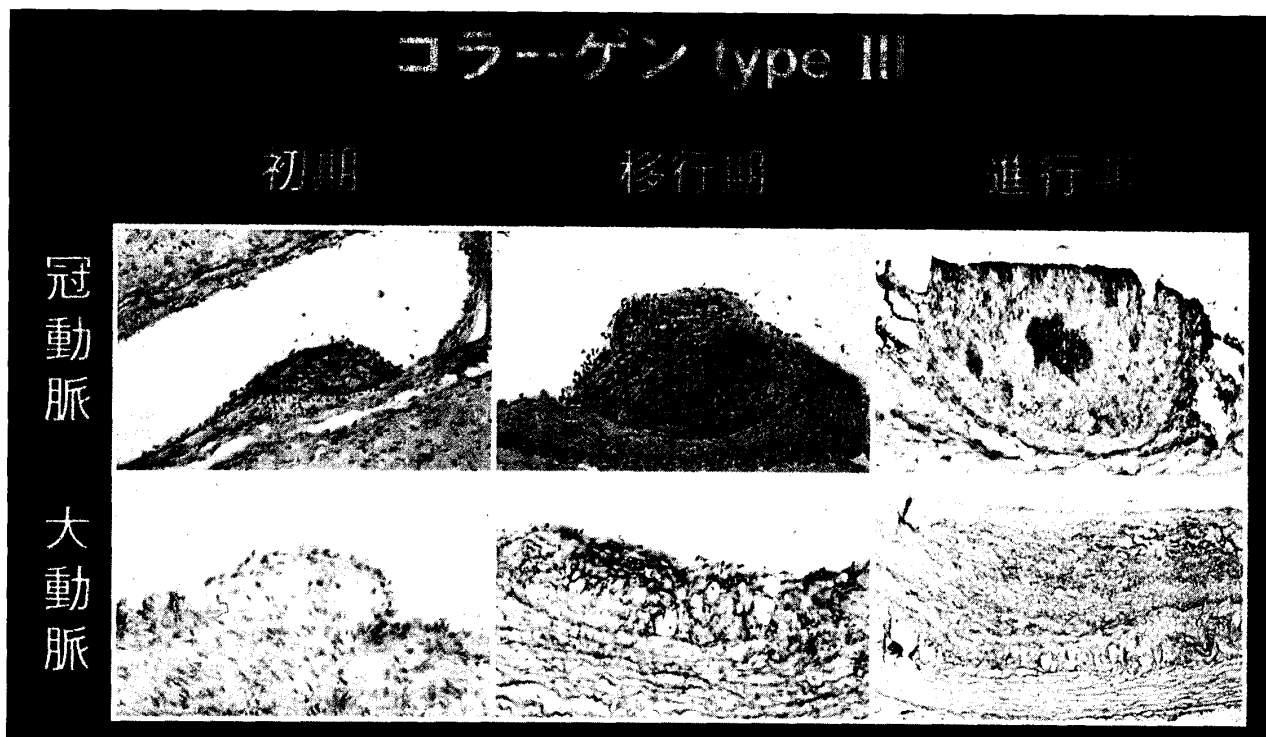


図8 コラーゲンⅢ型抗体の免疫染色

コラーゲンⅢ型線維は赤く染色されている。初期病変から内膜全体に認めた。移行期においても、増殖した内膜全体に認めたが、進行すると内膜の表層から中間層に多く認めた。冠動脈と大動脈では差を認めなかった。  
 (左上×66, 左下×132, 中上×66, 中下×66, 右上×33, 右下×33)

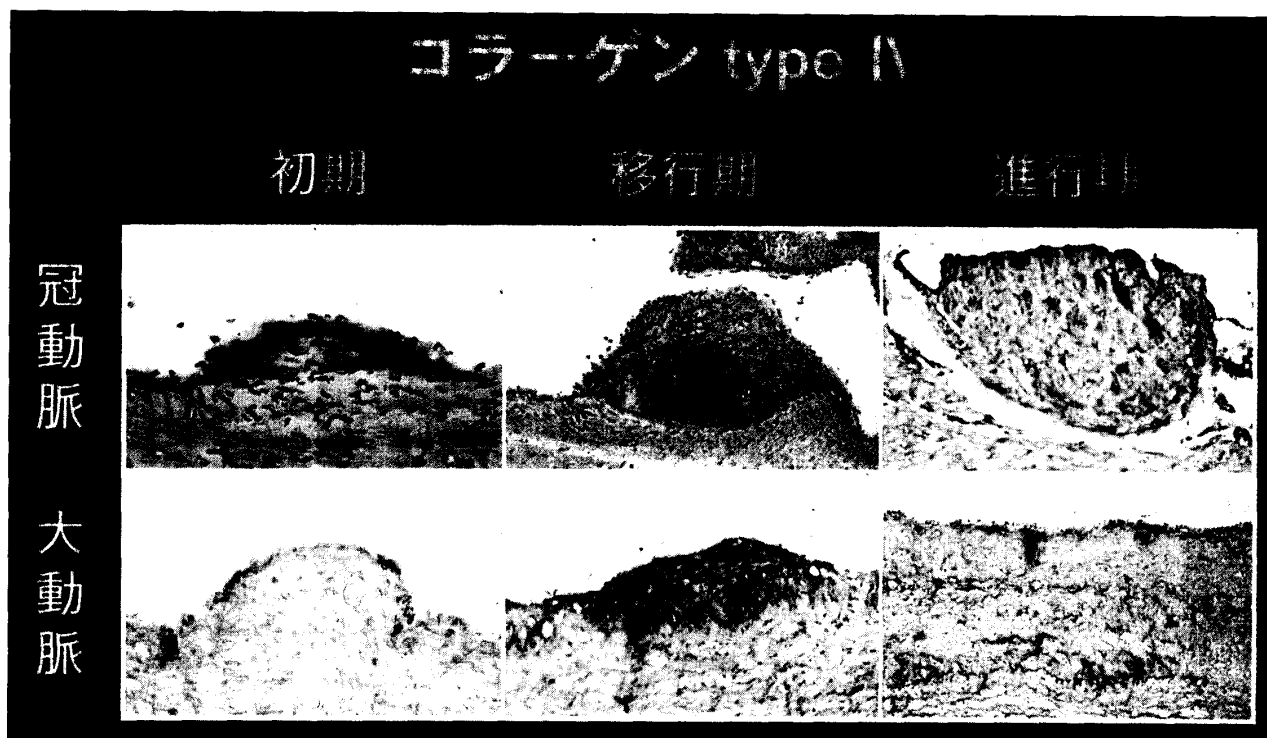


図9 コラーゲンⅣ型抗体の免疫染色

コラーゲンⅣ型線維は赤く染色されている。両動脈とも、中膜平滑筋層の間質と動脈硬化巣で染色された。動脈硬化巣では、初期より増殖した内膜全体に強陽性を認めた。移行期、進行期においても内膜全体に強く染まった。

(左上×200, 左下×132, 中上×66, 中下×66, 右上×33, 右下×33)

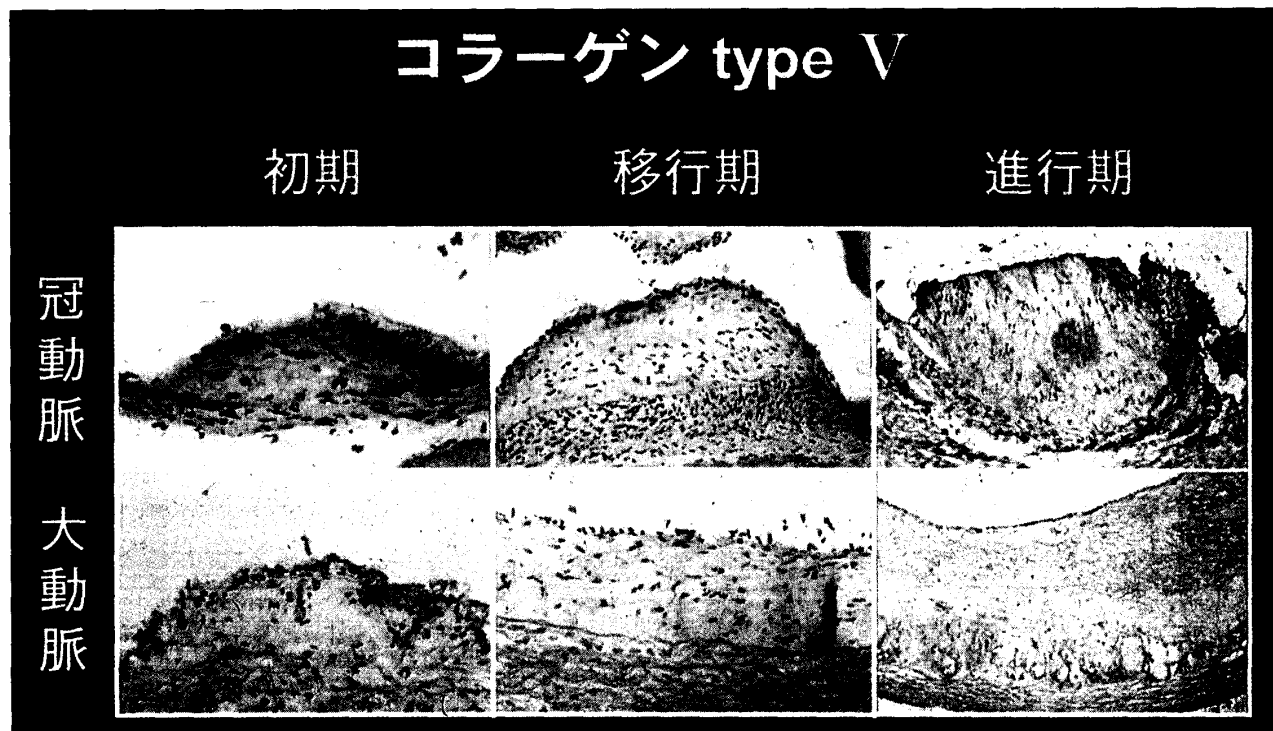


図10 コラーゲンV型抗体の免疫染色

コラーゲンV型線維は赤く染色されている。両動脈とも初期病変では増殖した内膜表層に少量認めたが、病変が進行するにつれ、増殖した内膜全体にも認めた。

(左上×200, 左下×132, 中上×100, 中下×100, 右上×33, 右下×33)

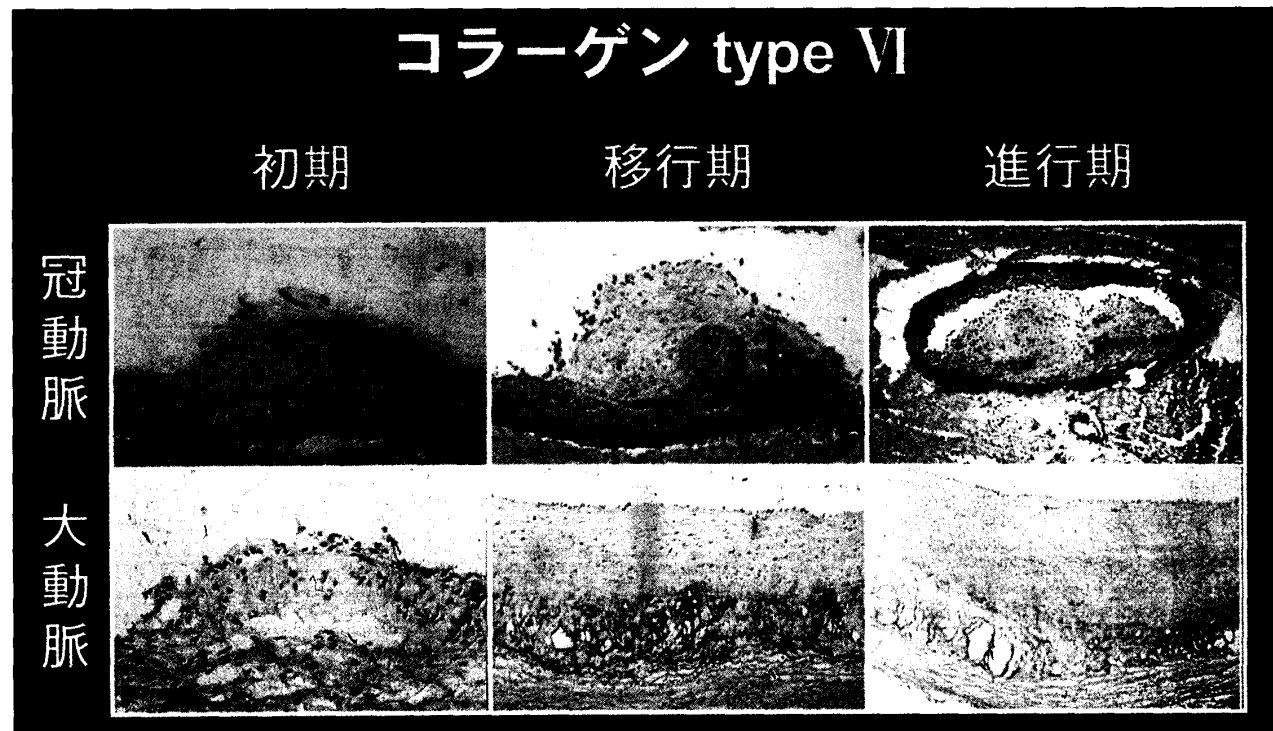


図11 コラーゲンVI型抗体の免疫染色

コラーゲンVI型線維は赤く染色されている。両動脈とも、血管外膜で陽性であったが、動脈硬化性病変の初期では認めなかった。移行期、進行期では、増殖した内膜の深層で内弾性板付近に局限して認めた。

(左上×200, 左下×132, 中上×66, 中下×66, 右上×13.2, 右下×33)



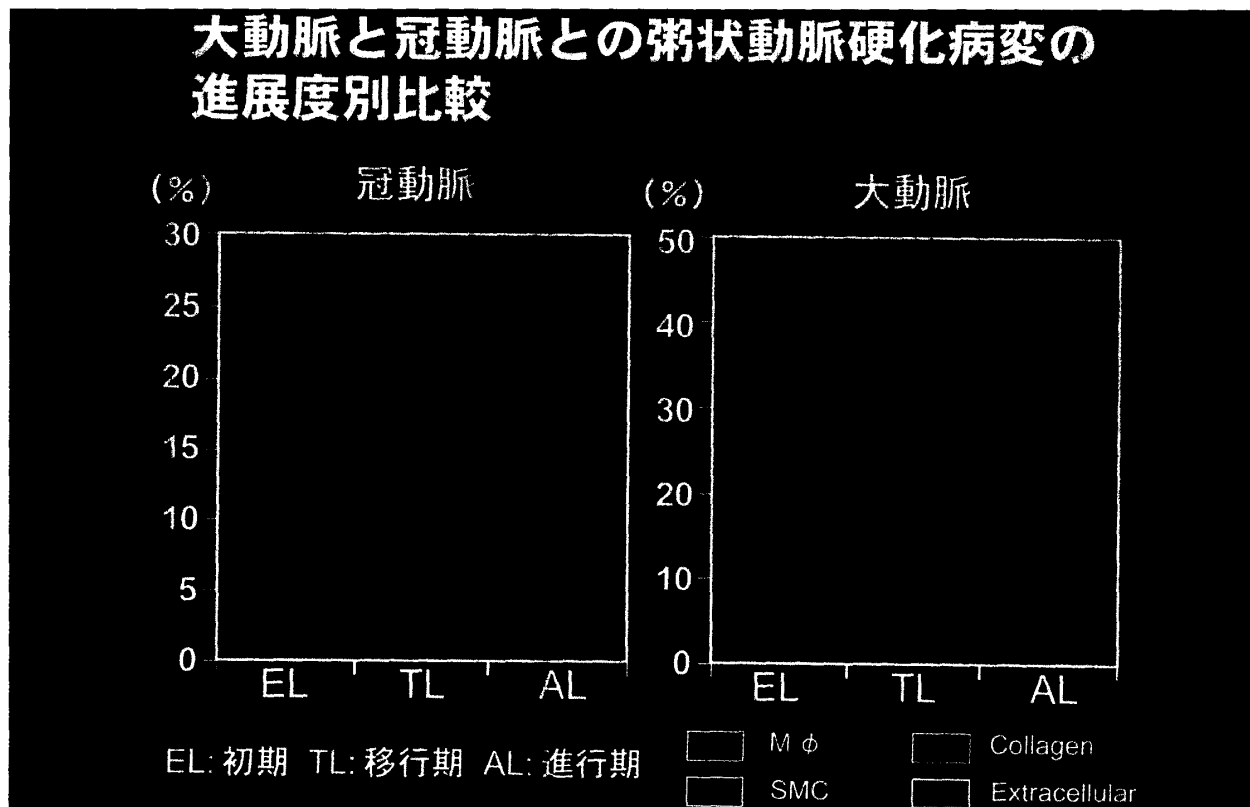


図12 WHHL ウサギの冠動脈と大動脈の細胞構成についてのグラフ

冠動脈病変では初期と移行期において、平滑筋細胞とコラーゲンの病変に占める割合が高値を示し、進行期には血管平滑筋の比率は低下したがコラーゲンの比率は変化なかった。一方、大動脈病変では初期と移行期においてマクロファージの病変に占める割合が高値を示し、進行期ではマクロファージの比率は低下した。コラーゲンの比率は進行期で増加し、血管平滑筋の比率は初期、移行期、進行期を通じて一定であった。進行期病変においては、冠動脈、大動脈におけるマクロファージ、血管平滑筋細胞、コラーゲンの比率は同程度となった。

I型コラーゲンは、冠動脈においても、大動脈においても、初期病変より認められた。その分布は、初期および移行期では、増殖した内膜全体に様に認め、中膜平滑筋層よりも内膜に多く含まれた。進行期では増殖した内膜の表層から中間層にかけて主に認め、深層では少量染まるのみであった。冠動脈と大動脈で分布に差は認めなかった。(図7)

III型コラーゲンは、I型と同様に初期病変から認められた。移行期においても、増殖した内膜全体に認められたが、進行期では内膜の表層から中間層に多く認められた。冠動脈と大動脈では差を認めなかった。(図8)

IV型コラーゲンは、通常中膜平滑筋層の間質にも認めるが、動脈硬化巣では、冠動脈においても、大動脈においても、初期病変より増殖した内膜全体に分布した。移行期、進行期においても内膜全体に存在し、中膜平滑筋層より多量に含まれるとみなした。その分布は冠動脈と大動脈で差は認められなかった。(図9)

V型コラーゲンは、初期では増殖した内膜表層に少

量認められたが、病変が進行するにつれ、増殖した内膜の全体に認められた。他のコラーゲンよりは染色性が弱く、含有量としては少ないとみなした。その分布は冠動脈と大動脈で差は認められなかった。(図10)

VI型コラーゲンは、冠動脈においても、大動脈においても、初期病変では認めなかった。移行期、進行期では、増殖した内膜の深層で内弾性板付近に局限して認められた。その分布は冠動脈と大動脈で差は認められなかった。(図11)

#### 6) 定量的検討 (図12)

冠動脈病変では初期と移行期において、平滑筋細胞とコラーゲンの病変に占める割合が高値を示し、進行期には血管平滑筋の比率は低下したがコラーゲンの比率は変化なかった。一方、大動脈病変では初期と移行期においてマクロファージの病変に占める割合が高値を示し、進行期ではマクロファージの比率は低下した。コラーゲンの比率は進行期で増加し、血管平滑筋の比率は初期、移行期、進行期を通じて一定であった。進

行期病変においては、冠動脈、大動脈におけるマクロファージ、血管平滑筋細胞、コラーゲンの比率は同じ程度となった。

## 考 案

WHHL ウサギの粥状動脈硬化病変のうち、大動脈病変については3カ月齢を過ぎればほとんど全例に認めることもあり、数多く研究がなされている。しかし、冠動脈病変については、WHHL ウサギの心筋梗塞好発系以外は発症率が低いこと、同ウサギの冠動脈の病変は肉眼的に観察するのは不可能で、形態学的所見はすべて顕微鏡下で観察を行わなくてはならず連続切片を用いた詳細な冠動脈病理組織研究報告は少ない。さらに今までなされた冠動脈の研究はホルマリンやブアン固定された材料が主であり、凍結切片による連続切片を用いたコラーゲンの解析は、今まであまりなされていない。

今回の検討では、冠動脈と大動脈では粥状動脈硬化症進展形式の違いがみられた。すなわち冠動脈粥状動脈硬化症では、血管平滑筋細胞の血管内膜下での増殖とコラーゲンの蓄積は初期病変から出現し、コラーゲンは脱分化血管平滑筋細胞から合成されたものと考えられた。初期病変にはマクロファージ蓄積もみられるがその割合は低い。冠動脈の初期病変の主体をなす血管平滑筋細胞増殖が従来から考えられているように、マクロファージ由来の増殖因子に依存したものか、あるいはマクロファージに依存しない血管平滑筋の血管内膜下への遊走・増殖機序によるものかは本研究からは明らかにできない<sup>13,27)</sup>。冠動脈硬化症の移行期・進展期では、血管平滑筋細胞の分布密度は低下し、マクロファージの分布密度は変化せず、粥状硬化巣での血管平滑筋細胞とマクロファージの細胞成分比率は等しくなる。この時期においては、血管平滑筋細胞の増殖・細胞死(アポトーシス)のバランスはアポトーシス優位となり、血管平滑筋細胞数が減少するものと予想される。冠動脈においては、初期・移行期・進行期においてコラーゲンの比率は変化しないので、動脈硬化初期に蓄積した細胞外マトリックスであるコラーゲンは移行期・進行期を通じて維持されるものと考えられる。さらに進行期になるとマクロファージ(泡沫細胞)もアポトーシスを起こすようになり、脂質沈着が明瞭になるものと考えられる。

大動脈においては、動脈硬化初期病変は血管内膜下へのマクロファージ蓄積が主体であり、移行期・進行期になるとその比率は低下する。血管平滑筋細胞の分布密度は初期・移行期・進行期を通じて不変である

が、コラーゲンの蓄積は病変の進展と共に増加する。コラーゲンの増加が粥腫の安定化に関与すると考えると、大動脈は冠動脈に比較して、ゆっくりと安定化が得られるように思われる。大動脈においても粥状動脈硬化病変の進展と共にアポトーシスを示す細胞がみられるようになるが、多くのアポトーシスを示す細胞はマクロファージであろうと考えられる。マクロファージのアポトーシスは粥状動脈硬化巣における脂質沈着を形成するものと考えられる。

本研究でみられた大動脈の粥状動脈硬化病変形成過程は、従来報告されている傷害反応仮説によくあてはまるが、冠動脈においては、やや様子が異なるように思われた<sup>25)</sup>。このような報告は以前にもなされており、冠動脈と大動脈での粥状動脈硬化病変形成過程の違いを冠動脈と大動脈の組織学的相違によるものであろうと結論している<sup>26)</sup>。ヒトにおいても内膜の肥厚は冠動脈に強いが、脂質沈着は冠動脈は遙かに軽度で大動脈に沈着があっても冠動脈には沈着がない例がかなり認められることが報告されている。さらにヒトの冠動脈と大動脈の病理学的比較において、大動脈病変の主要な構成成分はマクロファージであり、冠動脈では平滑筋細胞であることが報告されている<sup>16)</sup>。

ヒト動脈壁にはI型、III型、IV型、V型、VI型、VIII型の6種類のコラーゲンが分布し、大動脈では、乾燥重量の20%、中小動脈では40%含まれることが報告されている<sup>2)</sup>。Morton や Burleigh らによると、I型コラーゲンとIII型コラーゲンの比率は2~3対1で正常大動脈中膜やブラークでも同様であると報告している<sup>4,7,23)</sup>。今回の検討では、冠動脈においては、増生した内膜の方が、中膜より、I型、III型コラーゲンが多く含まれることが観察された。また、線維型コラーゲンであるI型およびIII型コラーゲンは動脈硬化症の初期・移行期・進行期の冠動脈内膜肥厚部に共存して分布するが、病変の進行と共にIV型、V型、VI型コラーゲンの増加がうかがわれた。またV型コラーゲンは粥腫の表層に、VI型コラーゲンは粥腫の深層に蓄積するという特徴が認められた。生化学的にもこのようなコラーゲンの増加が報告されており、これら沈着コラーゲンの程度の差と病変の進展とは密接に関連していると考えられる<sup>14,20,21,24)</sup>。Ross らは、平滑筋細胞間に多層性に認めるIV型コラーゲンが、隆起した病変部に加わる血行力学的圧力から細胞を保護するクッションの働きをしている可能性を指摘している<sup>26)</sup>。今回の検討ではVI型コラーゲンは進行と共に内膜深部に認めた。VI型コラーゲンは脆弱となっている病変深部の立体構造を保持するために、代償的に産生されているのかも

しれない<sup>12,15,30)</sup>。大動脈では、線維型コラーゲンであるI型コラーゲンはすべての時期の動脈内膜肥厚部に分布しIII型コラーゲンは移行期病変より出現した。病変の進展と共にIV型コラーゲンの増加が認められたが、V型およびVI型コラーゲンの出現は冠動脈に比較して少ないように思われた。

動脈硬化巣においては、進展過程のあらゆる段階でアポトーシスが生じていることが報告されている<sup>9,11)</sup>。また、プラークでは、アポトーシスに関係するFas, Bcl-2, Baxなどや癌抑制遺伝子p53などが発現しており、正常動脈壁の平滑筋細胞よりプラーク内の平滑筋細胞の方がアポトーシスを誘導されやすいことが報告されている<sup>3,17,31)</sup>。アテロームを有するヒト冠動脈の内膜と中膜においては、アテロームのないヒト冠動脈に比べて、血管平滑筋細胞のアポトーシスが亢進していることが示されている<sup>9)</sup>。

今回の検討では、冠動脈、大動脈で動脈硬化進展に伴い、TUNNEL陽性細胞が認められるようになることが観察された。血管平滑筋細胞やマクロファージの内膜下での増殖とアポトーシス死は粥状動脈硬化巣進展過程において、冠動脈、大動脈に共通してみられる現象であり、両者のバランスにおいて動脈硬化の進展が制御されていることも予想される。一方、急性心血管イベント発生は、脂質とマクロファージに富み、その周りの血管平滑筋細胞や細胞外マトリックスで形成される線維性被膜の薄い不安定プラークで起こりやすいことが指摘されている<sup>6)</sup>。泡沫化マクロファージが分泌するマトリックス分解酵素の働きで線維性被膜を破れやすくしているのではないと考えられている<sup>22)</sup>。また、血管平滑筋細胞がアポトーシスにより減少することが、プラーク破綻の引き金の一つになる可能性が示唆されている<sup>31)</sup>。血管平滑筋細胞およびマクロファージのアポトーシスは粥状動脈硬化巣進展に防御的に働く一方、病期においては、粥腫の破裂を伴う急性心イベント発症の原因にもなりうると考えられる<sup>1)</sup>。

本研究では、WHHLウサギにおいて冠動脈と大動脈の粥状動脈硬化巣形成過程における組織学的相違を見出したが、この組織形態学的違いが何故起こるのかについては不明であった。しかし、1つの可能性としては、Cybulskyらが高脂血症ウサギ、WHHLウサギの粥状動脈硬化巣の内皮細胞に、ヒトのVCAM-1に相当する接着分子の発現を報告しており<sup>5)</sup>、この発現が動脈硬化の結果ではなく原因であり、冠動脈と大動脈の内皮で、差がみられる可能性があることがあげられる<sup>27)</sup>。また、この相違が冠動脈にみられる急性心

イベントの起こしやすさと関連するか否かについては今後解明すべき興味深い研究テーマであると思われる。さらに、そのような研究から、急性心イベントの抑制手段として、現在広く用いられているコレステロール低下療法以外の新たな治療法の確立がなされることも期待される。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始懇切なる御指導を賜った恩師広島大学医学部内科学第一講座・梶山梧桐教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導を賜った広島大学医学部病理学第二講座・井内康輝教授と教室のみなさまに、また御指導を賜った広島大学医学部内科学第一講座・林幸三先生に深く感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

1. Aikawa, M., Rabkin, E., Okada, Y., Voglic, S. J., Clinton, S. K., Brinckerhoff, C. E., Sukhova, G. K. and Libby, P. 1998. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma. *Circulation* 97: 2433-2444.
2. Barnes, M. J. 1985. Collagens in atherosclerosis. *Collagen Rel. Res.* 5: 65-97.
3. Benett, M. R., Littlewood, T. D., Schwartz, S. M. and Weissberg, P. L. 1997. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circulation Research* 81: 591-599.
4. Burleigh, M. C., Briggs, A. D., Lendon, C. L., Davies, M. J., Born, G. V. R. and Richardson, P. D. 1992. Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis* 96: 71-81.
5. Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A., Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791.
6. Davies, M. J. 1996. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White lecture 1995. *Circulation* 94: 2013-2020.
7. Fleischmajer, R., MacDonald, E. D., Perlish, J. S., Burgeson, R. E. and Fisher, L. W. 1990. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J. Struct. Biol.* 105: 162-169.
8. 深見征治 1993. 家族性コレステロール血症の疾患

- モデル動物, WHHL rabbit について (2). 薬局 44 : 491-497.
9. **Geng, Y. and Libby, P.** 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Am. J. Pathol.* 147 : 251-266.
  10. **Goldstein, J. L., Kita, T. and Brown, M. S.** 1983. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 309 : 288-296.
  11. **Harada, K., Chen, Z., Ishibashi, S., Osuga, J., Yagyu, H., Ohashi, K., Yahagi, N., Shionoiri, F., Sun, L., Yazaki, Y. and Yamada, N.** 1997. Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic knockout mice. *Atherosclerosis* 135 : 235-239.
  12. **Henney, A. M., Wakeley, P. R., Davies, M. J., Foster, K., Hembry, R. Murphy, G. and Humphries, S.** 1991. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8154-8158.
  13. **Johnsson, A., Heldin, C., Wasteson, A., Westermark, B., Deuel, T. F., Huang, J. S., Seeburg, P. H., Gray, A., Ullrich, A., Scrace, G., Stroobant, P. and Waterfield, M. D.** 1984. The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3 : 921-928.
  14. **Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y. and Nakanishi, I.** 1992. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using Collagen type-specific antibodies. *Atheroscler. Thromb.* 12 : 494-502.
  15. **Kielty, C. M., Lees, M., Shuttleworth, C. A. and Woolley, D.** 1993. Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: Susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191 : 1230-1236.
  16. **Klurfeld, D. M.** 1985. Identification of foam cells in human atherosclerotic lesions as macrophages using monoclonal antibodies. *Arch Pathol. Lab. Med.* 109 : 445-449.
  17. **Kockx, M. M., De Meyer, R. Y., Muhring, J., Jacob, W., Bult, H. and Herman, A. G.** 1998. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97 : 2307-2315.
  18. **Kovanen, P. T., Kaartinen, M. and Paavonen, T.** 1995. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92 : 1084-1088.
  19. **Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr. and Libby, P.** 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 13 : 197-204.
  20. **Linsenmayer, T. F., Gibney, E., Igoe, F., Gordon, M. K., Fitch, J. M., Fessler, L.I. and Birk, D. E.** 1993. Type V collagen: Molecular structure and fibrillar organization of the chicken  $\alpha 1$  (v) NH<sub>2</sub>-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 121 : 1181-1189.
  21. **McCullagh, K. G. and Ehrhart, L. A.** 1974. Increased arterial collagen synthesis in experimental canine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 19 : 13-28.
  22. **Moreno, P. R., Falk, E., Palacios, I. F., Newell, J. B., Fuster, V. and Fallon, J. T.** 1994. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 90 : 775-778.
  23. **Morton, L. F. and Barnes, M. J.** 1982. Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III and V. *Atherosclerosis* 42 : 41-51.
  24. **Ooshima, A.** 1981. Collagen  $\alpha$  B chain: Increased proportion in human atherosclerosis. *Science* 213 : 666-668.
  25. **Ross, R.** 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 : 801-809.
  26. **Ross, R., Wight, T. N., Strandness, E. and Thiele, B.** 1984. Human atherosclerosis I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am. J. Pathol.* 114 : 79-93.
  27. **Shimokado, K., Raines, E. W., Madtes, D. K., Barrett, T. B., Benditt, E. P. and Ross, R.** 1985. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43 : 277-286.
  28. **Shiomi, M., Ito, T., Shiraishi, M. and Watanabe, Y.** 1992. Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: Risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 96 : 43-52.

29. **Shiomi, M., Ito, T., Tsukada, T., Yata, T. and Ueda, M.** 1994. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. *Arterioscler. Thromb.* **14** : 931–937.
30. **Stallcup, W. B., Dahlin, K. and Healy, P.** 1990. Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen. *J. Cell Biol.* **111** : 3177–3188.
31. **Takemura, G.** 1996. Ultrastructure of apoptosis of smooth muscle cells. *Circulation* **94** : 1787–1788.
32. **Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, H.** 1980. WHHL rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett.* **118** : 81–84.
33. **Watanabe, Y.** 1980. Serial inbreeding of rabbit with hereditary hyperlipidemia (WHHL-Rabbit). *Atherosclerosis* **36** : 261–268.

The Study on the Development of Atherosclerotic  
Lesions in the WHHL Rabbits  
– The Comparison of the Coronary and Aortic Atherosclerosis –

Harumi OHTANI

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

The differences in development of atherosclerosis between coronary artery and aorta in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits were investigated by immunohistochemical stained method. The areas of the major lesional components, smooth muscle cells, macrophages, collagen fibers, and extracellular lipid deposits, were measured with a color image analyzer. In the atherosclerotic lesions of the WHHL rabbit, at the early atherosclerotic stages, the smooth muscle cells were predominant in the coronary lesion and the macrophages were predominant in the aortic lesion. As for both, it presented a resembling image with the progress of the lesions. PCNA, the cell growth indicator, was stained in smooth muscle cells and macrophages of atherosclerotic lesions of coronary artery and aorta. In aorta, collagen type I, III, IV, V were stained at the lesions in early stage, and collagen type VI was stained in deep phase with the progress of the lesions. As the progress of atherosclerotic lesions, the apoptotic cells were increased in the both atherosclerotic lesions. These results were suggested that there was a difference in the role of the smooth muscle cells and the macrophages at the coronary artery and the aorta in the process of the development of atherosclerotic lesions.