

日本人の冠動脈粥状硬化の病理形態像 —画像解析のための基礎解析—

Fundamental Morphological Analysis of Coronary Artery Atherosclerosis of Japanese for Reading the Image

春田 裕典¹ 三俣 昌子^{2,*} 高橋 理恵² 廣 高史¹ 平山 篤志¹

Hironori HARUTA, MD¹, Masako MITSUMATA, MD, PhD^{2,*}, Rie TAKAHASHI², Takahumi HIRO, MD, PhD, FJCC¹,
Atsushi HIRAYAMA, MD, PhD, FJCC¹

¹ 日本大学医学部内科学系・循環器内科学分野, ² 同 病態病理学系・病理学分野

要 約

- 目的** 心筋梗塞の主原因である冠動脈粥状硬化の画像を組織レベルまで詳細に読み解くために、まず日本人の冠動脈の粥状硬化の形態変化を各年代を追って観察した。次に、これを大動脈および頸動脈の粥状硬化像と比較して冠動脈特有の病態を探索した。
- 方法** 54例(平均48.0±27.1歳)のヒト冠動脈、胸部大動脈、総頸動脈の病理形態像を年代を追って、一般染色、酸化抗体である抗4-HNEおよび抗4-HHE抗体を用いた免疫染色とWestern blottingで解析した。
- 結果** 大動脈ではatheromaやnecrotic coreは40~49歳に出現し、加齢とともに増大したが、冠動脈では大動脈よりも早期にatheromaが出現し、加齢による増大は認めなかった。頸動脈の加齢に伴う変化は冠動脈と大動脈の中間に位置した。fibrous plaqueとcalcium coreは冠動脈の発生率が高く、necrotic coreは大動脈に好発し、冠動脈は大動脈より硬い病変が多く、大動脈はより進行した病変が高頻度に発症した。HNEは主に内膜のマクロファージに、HHEは粥腫のcoreに発現頻度が高く、両者は非病変血管には認めなかった。冠動脈では胸部大動脈に比べ若年からHNE、HHE陽性例がみられたが、加齢に伴った増加は認めず、胸部大動脈より発現頻度は少なかった。Western blottingでは冠動脈、大動脈ともに、DITとアテローム間でHHEとHNEの発現量に差はなかった。
- 結論** 臓器により粥状硬化の発生年齢、進行、病変の形態は異なり、冠動脈は胸部大動脈より早期に酸化マクロファージやatheromaが出現したが、大動脈と異なり加齢による病変の進展は乏しく、硬い病変を形成した。若年の酸化マクロファージ出現抑制が、虚血性心疾患予防の鍵を握るとされる。

<Keywords> 粥状硬化
冠動脈
病理形態像

日本人
酸化

J Cardiol Jpn Ed 2013; 8: 39 – 49

目 的

心筋梗塞、脳卒中、大動脈瘤、下肢の閉塞性動脈硬化など循環器疾患の主な原因は動脈硬化である。その診断、治療法を選択には動脈の画像解析が必須であるため、解析機器や解析ソフトの開発は急速な進歩を見せている。しかし、いまだ病変の組織構成を十分にとらえることができない。さらに、動脈硬化の画像を組織レベルまで詳細に読み解くためには、機器やソフトの開発と同時に医療従事者が画像解読能を養

わねばならない。そこで日本人の心筋梗塞の主原因である冠動脈粥状硬化を深く理解してその画像を詳細に読み解くために、まず冠動脈の粥状硬化を年代を追って観察した。次に、これを大動脈および頸動脈の粥状硬化と比較して、人体全体の粥状硬化を把握すると同時に冠動脈特有の病態を探索した。

対象と方法

1. 症 例

過去の剖検標本を用いた。10歳ごとに動脈を分類し、原則的に各年代5症例以上を検討した。ただし、10~29歳、90~99歳の剖検症例は少なかった。症例は全54症例(男性37例、女性17例、平均年齢は48.0±27.1歳)である。主疾患は悪性

* 日本大学医学部病態病理学系・病理学分野

173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1

E-mail: masakom@med.nihon-u.ac.jp

2011年12月21日受付, 2012年6月8日改訂, 2012年6月12日受理

腫瘍, 心血管疾患, 肺炎の順に多かった. 動脈硬化の危険因子は高血圧, 喫煙歴の順で多かった. 検討したすべての症例は日本大学の規定にのっとって患者縁者から承諾を得た症例である.

2. 検索部位

検討した動脈は冠動脈, 胸部大動脈, 総頸動脈である. 胸部大動脈と左右総頸動脈は各1カ所, 冠動脈は左前下降枝, 左回旋枝, 右冠動脈から各々1カ所組織を切り出して観察した. 剖検診断のために組織がすでに切り出されており, すべての症例において採取部位を厳密に規定することは不可能であった. そこで検体採取に際しては以下の点に留意した. 胸部大動脈は, 肉眼的に粥状硬化が強い部位を切り出した. 冠動脈は, 原則として起始部より約1 cmの部位から切り出した. 総頸動脈は, 多数の病変を検討するために可能なかぎり中枢側を切り出した.

3. 一般染色

ホルマリンで固定された動脈から切り出した組織片を5 μm に薄切し, hematoxylin and eosin 染色 (HE), Elastic van Gieson 染色 (EVG), Masson trichrome 染色 (MT), von Kossa 反応を行った.

4. 免疫染色

病巣の酸化状態を観察するために, 各年代を含む合計31例に対して免疫染色を施行した. 用いた抗体は2種で, 両者ともに, 高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスを受けて生成する酸化二次生成物が蛋白質と結合した化合物に対して, 高い特異性を示す抗体である. 一つの抗体は酸化二次生成物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) -蛋白質化合物に対する抗体 (抗4-HNEモノクローナル抗体, 日油株式会社) で, 他は酸化二次生成物である4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール-蛋白質化合物に対する抗体 (抗4-HHEモノクローナル抗体, 日油株式会社) である. HNE免疫染色はVECTASTAIN[®] ABC-AP kitを用い, 仕様書に従い抗原抗体反応を行った. 発色にはVECTOR REDを用いた. HHE免疫染色はperoxidase法で抗体を反応させ, 発色にはDABを用いた. 一部の例はVECTASTAIN[®] ABC-AP kitを用いて抗原抗体反応を行い, 発色にVECTOR REDを用いた. 陽性反応の有無と部位, 病変の進行度や年齢とHHEとHNE発現の比較を行った.

5. Western blotting

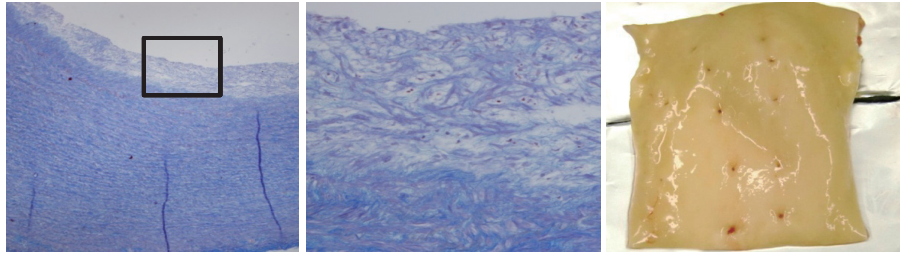
大動脈のびまん性内膜肥厚11サンプル, アテローム斑10サンプル, 冠動脈のびまん性内膜肥厚8サンプル, アテローム斑8サンプルを用いて酸化二次生成物-蛋白質化合物の定量を行った. 抗体はmouse anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) monoclonal antibody (HNEJ-2, Abcam Plc.) と mouse anti-human HHEX monoclonal antibody (HHEX, Bio Matrix Research Inc.)を用いた. 組織をSDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.0% SDS, 0.002% BPB, 10% glycerol) 中で破碎後, 4,000 rpm, 10分間遠心, その上清を15,000 rpm, 15分間遠心した. 遠心上清を破碎後, 15,000 rpm, 15分間遠心し, 遠心上清の25 μg または30 μg /wellの蛋白質を, 10% SDS-polyacrylamide gel (10% acrylamide, 0.4 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.04% TEMED) を用いて電気泳動した. 分離した蛋白質をnitrocelluloseまたはpolyvinylidene fluoride膜に転写し, 膜を1次抗体, 2次抗体である抗マウスIgG抗体と反応させた. 目的の蛋白質の検出にはECL Advance Western blotting detection kit (GE Healthcare) を用いた. 化学発光はLight-Capture AE-6972で検出し, CS Analyzer Version 2.07 softwareで解析した. internal controlとして用いた β -actinの検出にはmouse anti- β -actin monoclonal antibodyを用いた.

結 果

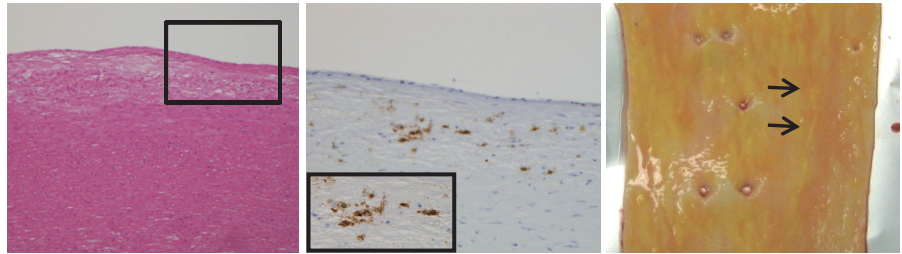
1. 病変の組織学的分類

動脈の形態を組織学的に以下の7つに分類した(図1). ①病変を認めない: 内膜肥厚も動脈硬化病変も認めないもの. ②びまん性内膜肥厚 (diffuse intimal thickening: DIT): 全周性に均一の厚さに内膜が肥厚した状態で主に線維で構成される. 加齢に伴う生理的な変化と考える人も多い. ③脂肪線条 (fatty streaks): 内膜に脂質を含有したマクロファージが小さく集合して点在し, しばしば細胞外間質にも脂質沈着をみる. 血管を開いて内皮面を肉眼で見ると黄色の細い流れのような線条が内皮下に透けて見える. ④線維性プラーク (fibrous plaques): 内膜が局所的に隆起した病変で, 線維と内膜平滑筋細胞が構成成分の主体をなし, 線維間にはプロテオグリカンが増加している. 粥腫は認めない. ⑤アテローム斑 (atheroma): 偏在性に内膜が隆起した病変で, 隆起の中心に組織壊死物, 脂質を含有する粥腫があり, その内皮側表面は線維性被膜でおおわれる. 壊死物は下記の⑥よりも少なく

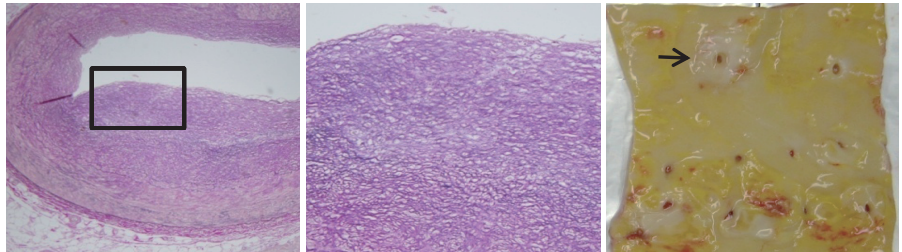
びまん性内膜肥厚
(diffuse intimal thickening : DIT)



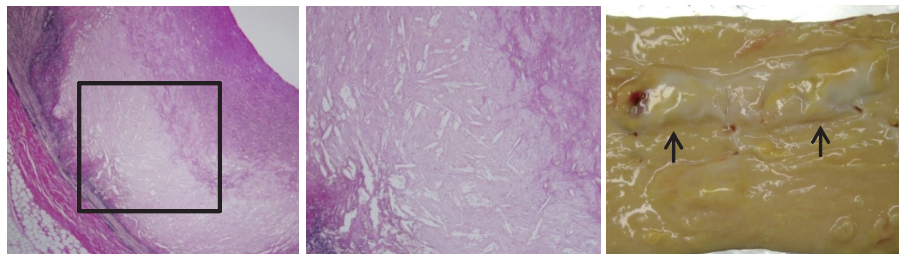
脂肪線条
(fatty streaks)



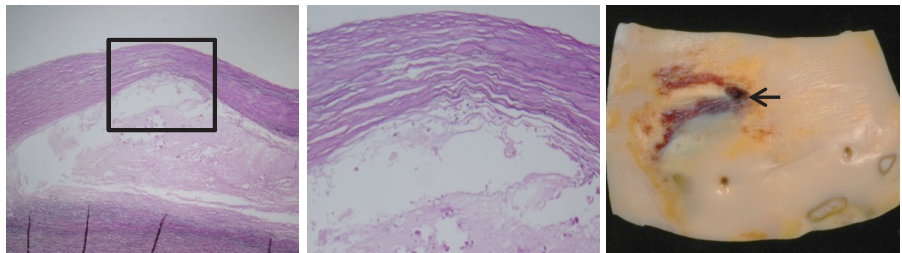
線維性プラーク
(fibrous plaques)



アテローム斑
(atheroma)



壊死性コア
(necrotic core)



石灰化コア
(calcium core)

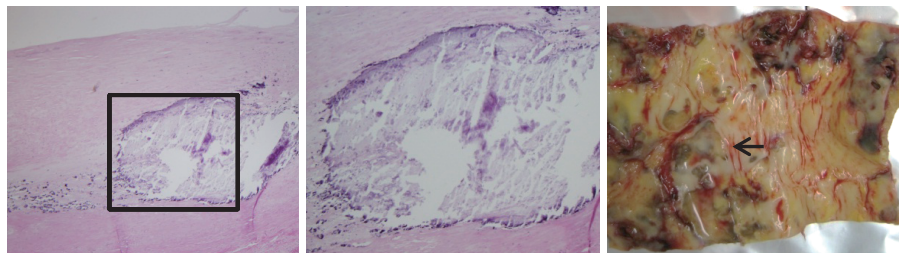


図1 大動脈の各病変の組織学的分類.

左：組織像，弱拡大．中央：組織像，左の四角部分の強拡大像．右：肉眼像，矢印は病変を示す．びまん性内膜肥厚はMT染色，脂肪線条の中央はマクロファージに対する免疫染色（茶色，挿入画像は強拡大像），他はHE染色．

表1 動脈病変の数と頻度.

	年 齢 (歳)										陽性検体数 (%)
	0~9	10~19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	80~89	90~99	
胸部大動脈											
DIT	6	0	0	4	6	1	0	1	0	0	18 (36%)
Fatty streaks	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	4 (8%)
Fibrous plaques	0	0	0	0	1	3	1	1	2	0	8 (16%)
Atheroma	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	5 (10%)
Necrotic core	0	0	0	0	1	1	1	3	2	3	11 (22%)
Calcium core	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2 (4%)
計	8	0	1	7	11	5	5	5	5	3	50検体 (症例)
冠動脈											
DIT	12	0	2	19	18	5	2	4	4	3	69 (50%)
Fatty streaks	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2 (1.4%)
Fibrous plaques	0	0	0	3	10	7	4	0	5	0	29 (21%)
Atheroma	0	0	0	2	2	2	2	1	2	1	12 (8.7%)
Necrotic core	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2 (1.4%)
Calcium core	0	0	0	0	1	0	1	7	3	2	14 (10%)
計	15	2	3	24	35	15	10	14	14	6	138検体
総頸動脈											
DIT	5	0	2	6	3	5	3	5	4	2	35 (48%)
Fatty streaks	0	0	0	2	3	0	1	0	0	0	6 (8.2%)
Fibrous plaques	0	0	0	0	2	0	0	0	3	1	6 (8.2%)
Atheroma	0	0	0	0	1	3	3	1	1	1	10 (14%)
Necrotic core	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2 (2.7%)
Calcium core	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 (1.4%)
計	8	0	2	8	14	10	10	9	8	4	73検体

粥状硬化がより軽い変化である。⑥壊死性コア (necrotic core)：偏在性隆起の中心部の粥腫が大きく、⑤より多くの壊死物を含有し、通常、線維性被膜はアテローム斑よりも薄く粥腫破綻を起こしやすい病変で、アテローム斑よりも進行した病変である。⑦石灰化コア (calcium core)：偏在性の内膜隆起が主として石灰化とその周囲の線維増生によって形成され、多くが塊状の石灰を認め、マクロファージ浸潤や脂質沈着は乏しい病変とした。②～⑥までは数字が大きいものほど粥状硬化の進行度が高いと考えられるが、⑦の発生機序

は解明されていない。脂肪線条とアテローム斑など2種以上の病変が混在している場合には、より進行度の高いほうに分類した。

2. 大動脈・冠動脈・頸動脈の対比

冠動脈の粥状硬化の画像を組織レベルまで理解するために、心筋梗塞の原因血管である冠動脈の組織像を年代を追って観察した。しかし、この冠動脈の変化は通常小さい範囲に限局して生じ、ヒトの粥状硬化の形成を年代を追って質的に

冠動脈

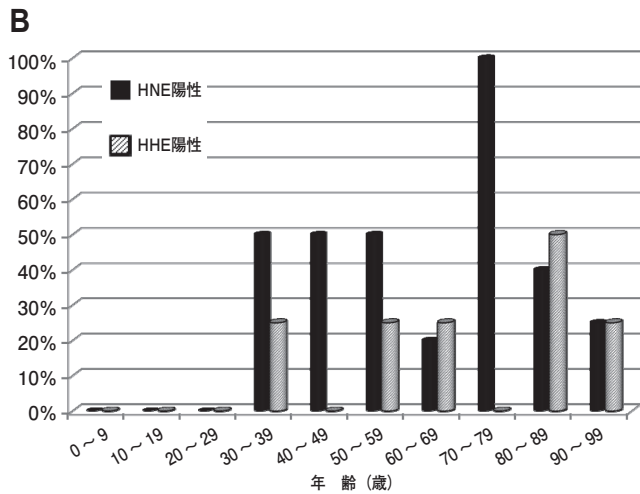
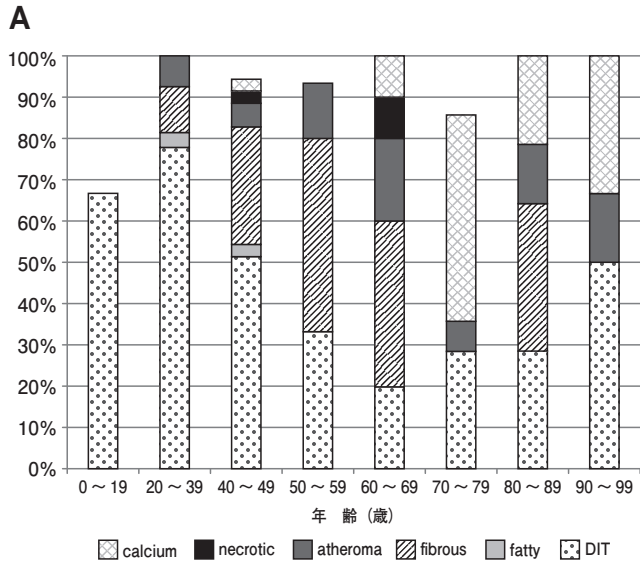


図2 冠動脈の病変の経年的変化 (A) と過酸化脂質の発現 (B). A: 検体総数に占める病変の割合, B: 各年齢におけるHHEまたはHNEを認めたサンプル数の割合.

理解するためには病変が小さすぎる. そこで, 広い範囲に病変が広がる大動脈の粥状硬化を検討し, この変化を冠動脈変化と対比して冠動脈特有の変化を探索した. また, 臨床的に, 患者の粥状硬化の有無・進行度などを評価するためには頸動脈の画像がよく使われる. そこで頸動脈の組織変化が冠動脈病変とどの程度相関するかを検討した.

1) 病変の加齢に伴う進展

冠動脈は左前下降枝, 左回旋枝, 右冠動脈の3枝すべてを包括してまとめて図を作成した. 図の縦軸は検体総数に占め

胸部大動脈

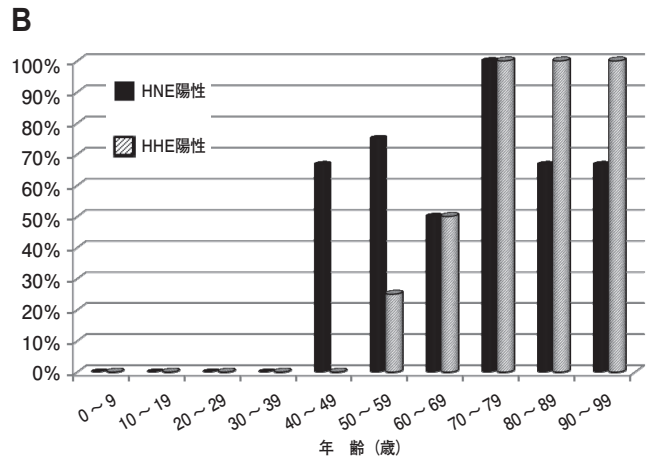
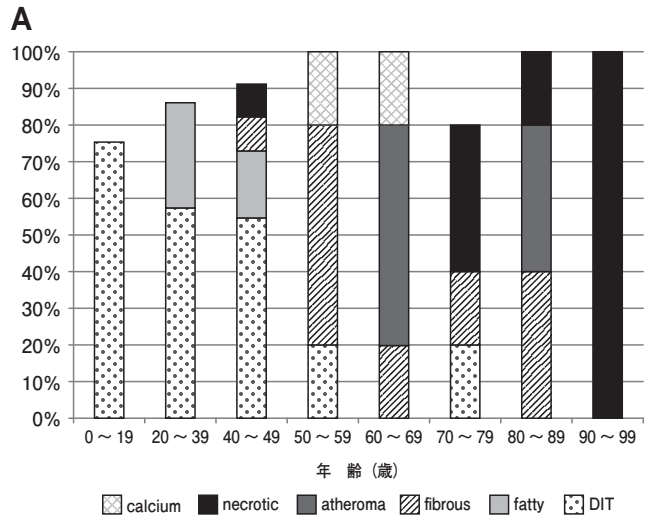


図3 胸部大動脈の病変の経年的変化 (A) と過酸化脂質の発現 (B). A: 検体総数に占める病変の割合, B: 各年齢におけるHHEまたはHNEを認めたサンプル数の割合.

る病変の割合を示し, 表1に実数を示す. 冠動脈 (図2) と胸部大動脈 (図3) を比較すると, ①両者ともに9歳以下にDITが出現した. ②両者ともに20~39歳にfatty streakが出現した. ただし20歳代で冠動脈にfatty streakを認めたのは1例のみであった. ③atheromaやnecrotic coreは, 大動脈に比べ冠動脈でより早期に出現し, 30~39歳に認められ, 大動脈では40~49歳に出現した. ④大動脈も冠動脈もともに, 加齢に従いatheromaなどの進行した動脈硬化病変を認めたが, 60歳代以降では, 大動脈ではatheromaとnecrotic coreの進行した病変が年代を重ねるに従い増加するが, 冠動脈にはこの増加は認めなかった. 石灰化は大動脈に比し冠動脈で

総頸動脈

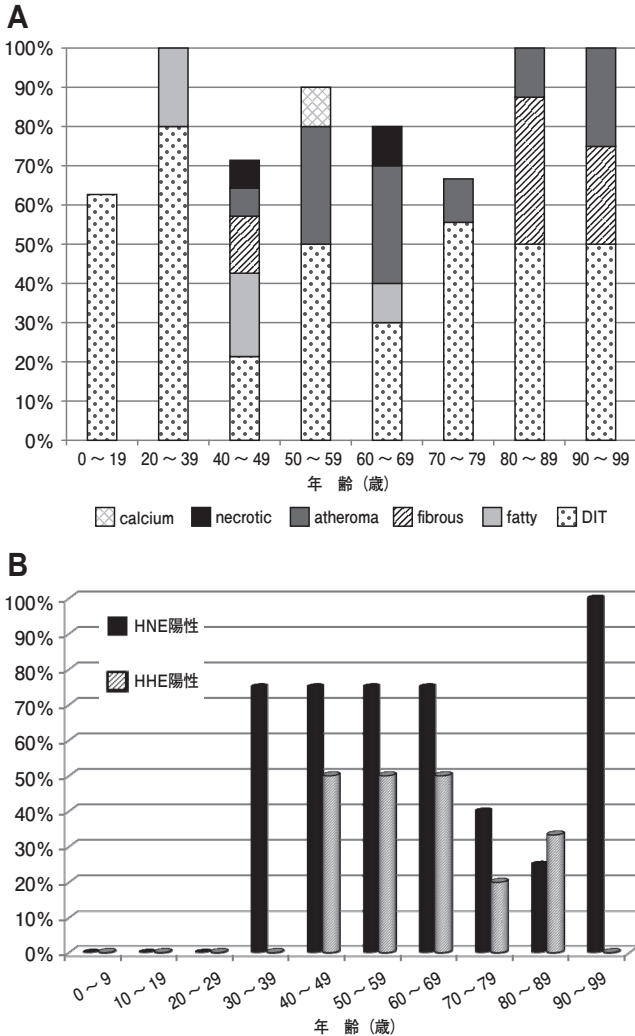


図4 総頸動脈の病変の経年的変化 (A) と過酸化脂質の発現 (B). A: 検体総数に占める病変の割合, B: 各年齢におけるHNEまたはHNEを認めたサンプル数の割合.

高頻度に発現し、70歳以上で特に多く認めた。頸動脈は冠動脈と大動脈の中間に位置した。すなわち、大動脈と同様に冠動脈より遅れて40~49歳に進行病変が出現したが、病変の進行度は50歳代でプラトーに達し、大動脈のような高度病変は少なかった。さらに、本研究では病変は左右の一侧に発生し、両側が侵されることはほとんどなかった。しかし、本研究では総頸動脈の中枢部のみを検討対象としており、粥状硬化の発生しやすい内・外頸動脈分岐部は検討していない。血管樹全体の大規模調査がより望まれる (図4)。

2) 病変の質と進行度

組織学的に分類した病変ごとに、その発症率 (検体総数に対する変化を認めた検体数の割合) を動脈間で対比した。以下の結果はすべての年代を合計して得た数である (表1)。

①冠動脈と胸部大動脈を対比すると、DITは胸部大動脈が50検体中36%に、冠動脈は50%に認められ冠動脈が多い。fibrous plaqueは大動脈が16%、冠動脈が21%に認められ冠動脈が多い。atheromaは大動脈が10%、冠動脈が8.7%でほぼ同一。necrotic coreは大動脈が22%、冠動脈が1.4%に認められ大動脈が多い。calcium coreは大動脈が4%に、冠動脈が10%に認められ冠動脈が多い。以上、特徴的な点は、冠動脈はfibrous plaqueとcalcium coreなどの硬い病変が多く、大動脈はnecrotic coreなど進行した病変が高頻度に発症していたことであった。②総頸動脈の重症度は大動脈と冠動脈の中間に位置した。

3) 性差

粥状硬化の発症率は男女間に大きな差は認めなかった。

3. 酸化二次生成物と蛋白質化合物の発現

粥状硬化の発症や進展に過酸化機構が大きく作用するといわれている。そこで大動脈、冠動脈、頸動脈の各病巣における過酸化脂質の発現を検討し比較した。

1) 発現部位

HNEは主に内膜のマクロファージの細胞質に陽性であったが、粥腫には必ずしも認めず、fatty streak, atheroma, necrotic coreにおける沈着度に差はなかった。HNEとは異なり、HHEは粥腫内に沈着頻度が高かった。粥腫周囲のマクロファージの細胞質内にも沈着をみたが、その頻度はHNEよりも低かった。さらに、atheroma直上をおおうfibrous cap内のマクロファージの細胞質にも、HNEは陽性であったがHHEは陰性であった (図5)。前述した7種類の変化において、HNE、HHE沈着が認められたサンプル数を表2に示す。表2の結果は胸部大動脈、冠動脈、総頸動脈を合計した数である。病変の占める割合を括弧内に示す。まとめると、①非病変血管にはHNEもHHEも沈着していなかった。②HNEは早期動脈硬化病変であるDITとfatty streaksにすでに沈着をみたが、HHEはほとんどが陰性であった (図5)。③HHEは病変が進行してatheromaやnecrotic coreが形成されると高頻度に発現した。

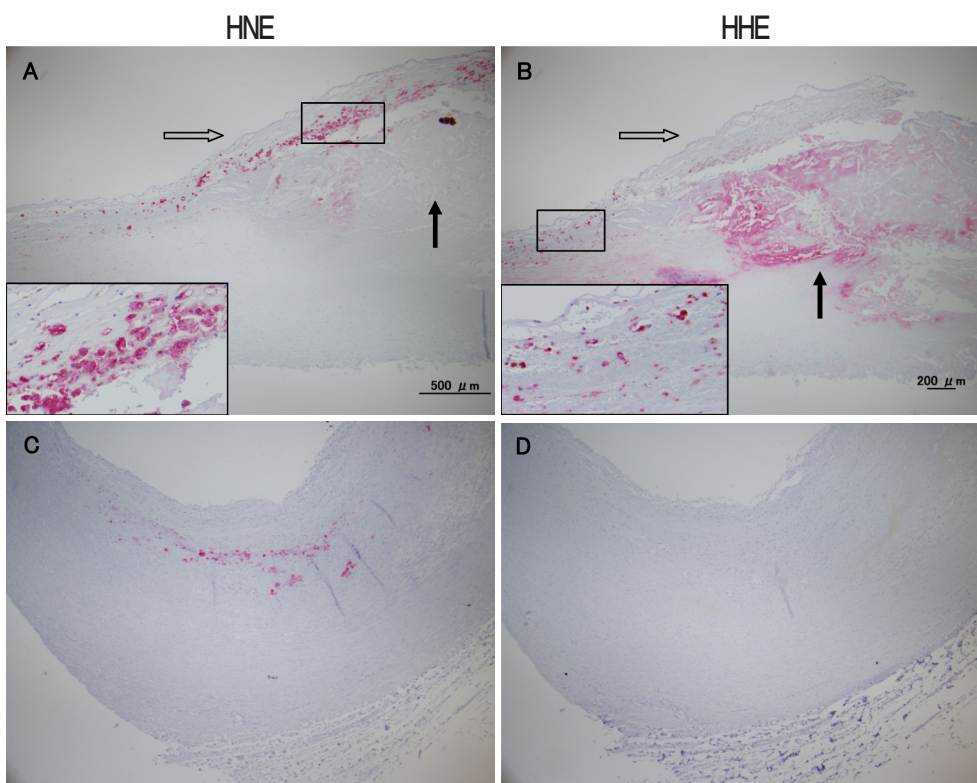


図5 HNE (A, C) とHHE (B, D) の免疫染色像。

A, B: 粥腫. 白矢印は fibrous cap, 黒矢印は necrotic core 領域を指す. 挿入画像は四角の領域におけるマクロファージの強拡大像. C, D: fatty streak.

表2 HNE, HHE沈着が認められたサンプル数.

病変	HNE (%)	HHE (%)
病変なし	0/3 (0)	0/3 (0)
DIT	6/29 (21)	0/30 (0)
Fatty streaks	6/7 (85)	1/7 (14)
Fibrous plaques	6/17 (35)	4/16 (25)
Atheroma	18/23 (78)	12/23 (52)
Necrotic core	5/7 (71)	6/7 (86)
Calcium core	6/10 (60)	2/8 (25)

2) 病変の加齢に伴う変化

各年齢におけるHHEまたはHNEを認めたサンプル数の割合を図2~4の下段に示す. 冠動脈では胸部大動脈に比べ若年から(30~39歳)HNE, HHE陽性例がみられた. しかし加齢に伴った増加傾向は認めず, 70歳代を除くと, HHE,

HNEともに陽性例は30歳代と変わらなかった. また, 40歳以上の全年齢を通して胸部大動脈より発現数は少なかった. 胸部大動脈ではHHEに比しHNEのほうが早期(40~49歳)に陽性になる. HHEはHNEよりも10歳遅れて陽性になる. HHE発現は50~70歳代に増加し, その後プラトーになった. 総頸動脈ではHNEは早期に出現し30~69歳のほぼ70%の例に陽性所見をみた. 発現頻度は冠動脈より高い. しかし, 冠動脈と同様に, 胸部大動脈のような加齢に伴う陽性例の増加は認めなかった. 40~69歳ではHHE, HNEともに冠動脈よりも発現頻度が高かった.

3) 性差

HHE, HNEともに陽性例に男女差は認めなかった.

4) Western blotting

大動脈と冠動脈は同じ結果であった. すなわち, DITもアテローム斑とともに, HNEとHHE抗体に反応するバンドを分子量37 kDaと50 kDaの間に認めた. HNE, HHEともにバンドの多くは1本だが2本以上認めるサンプルもあった.

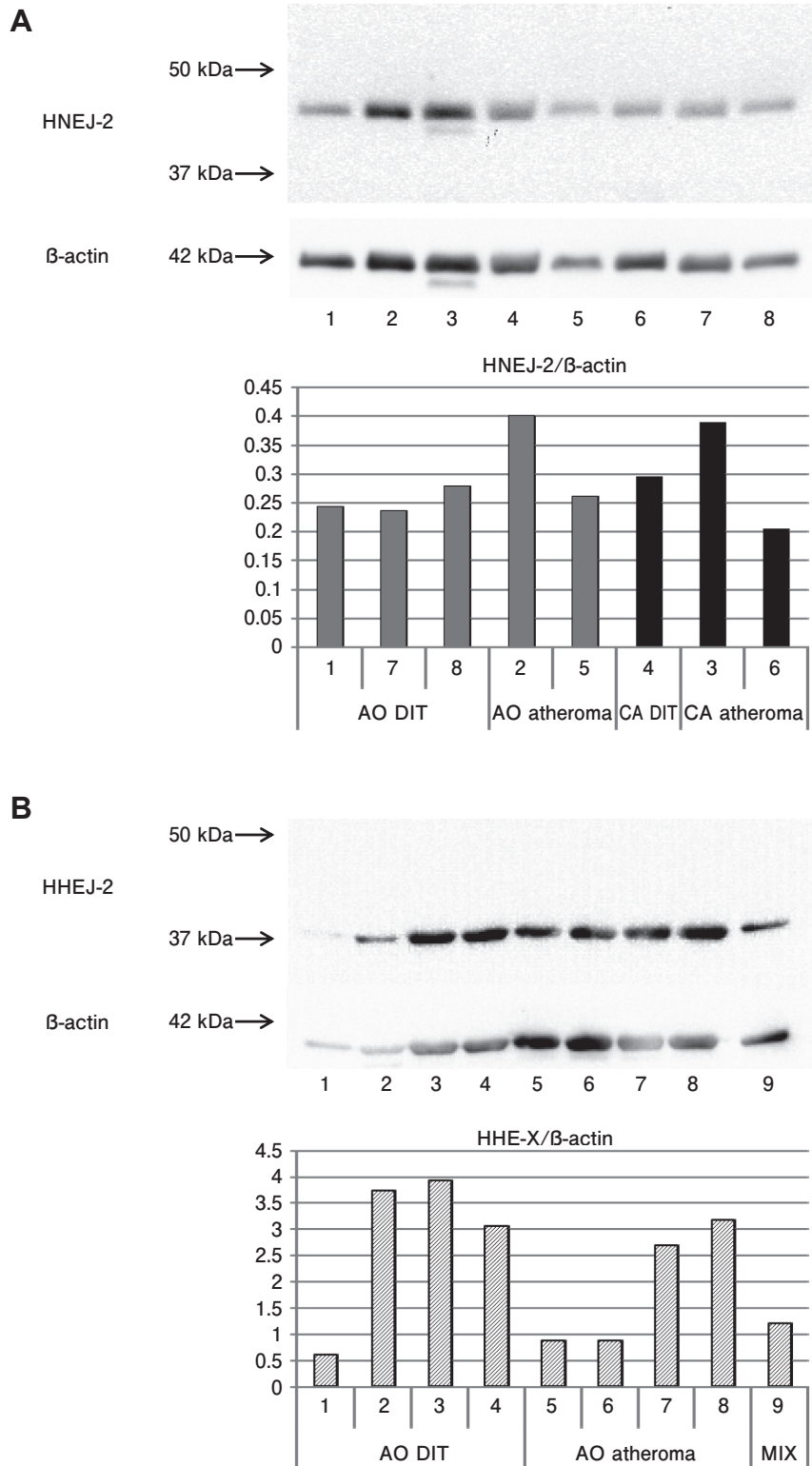


図6 Western blotting.
HNE (A), HHE (B) の発現バンドを画像解析し、対照の β -actin と対比して棒グラフで表す。
AO : 胸部大動脈, CA : 冠動脈, MIX : 複数の粥腫を混合した陽性対照。

HHEもHNEもともに、DITとアテローム斑の間で発現量に差があるとはいえなかった(図6)。

考 察

1. 病変の進行と加齢に伴う進展

粥状硬化症は内膜から始まる。病変の進行を年代を追って考察すると、ヒトの血管では、人体の発育に伴ってびまん性の内膜肥厚が生じる(DIT)¹⁾。この肥厚を土台として粥状硬化は発生し、脂質を含有したマクロファージが肥厚内膜の内皮下に散見されるようになる。やがて、脂質含有マクロファージは増加して小集合を形成し、マクロファージ間の間質にも脂質が認められるようになり、肉眼的に内皮下に線状の黄色の筋が現れる。これを脂肪線条と呼ぶ。脂質を含有したマクロファージは、冠動脈でも、また大動脈においても10歳代ですでに出現しているといわれている²⁾。本調査では、脂肪線条は20歳代に冠動脈に出現していたが1例のみで、冠動脈も大動脈も脂肪線条以上の病変は30歳代から始まっていた。しかし、1988年と2000年の日本人若年者(39歳以下)の大規模調査報告書(各々2,856, 1,253剖検例)では、脂肪線条は冠動脈も大動脈も19歳以下にすでに出現していた^{3,4)}。われわれも対象症例数を増やす必要がある。病変が進むと線維成分が集積したfibrous plaquesや、隆起の内部にesterified cholesterolやfree cholesterolからなる脂肪成分や⁵⁾壊死が蓄積した粥腫を認めるようになる。壊死物の量はさまざまで、多量の壊死を伴うnecrotic coreもしばしば認める。このatheromaとnecrotic coreは日本人では冠動脈・大動脈ともに39歳以下の若年者に認めることは非常にまれで、40歳以降に発生頻度が増す。オランダでは日本人より10歳若く病変が進展し、腹部大動脈260症例の研究においては30~40歳からatheromaは急増する⁶⁾。本研究では60歳代以降の大動脈ではatheromaとnecrotic coreの進行した病変が加齢に伴い増加するのに対し、冠動脈ではこの増加は認めなかった。Dijkらも大動脈ではわれわれと同様の結果を得ているが、冠動脈は検討しておらず⁶⁾。調べたかぎりでは、われわれのように若年者から高齢者にわたって年代ごとに大動脈と冠動脈の病変の進展を比較した報告はない。冠動脈と大動脈の病変の発症年齢や形態の相違には、両動脈の血管の組織構成、直径、走行と分岐、血管が付着する構造物(拍動する心臓vs.脊柱)、血圧や血流動態の相違に加えて血管を構成する細胞の機能の相違も関与すると思われる。

カルシウムの粉状の小さい粒子(microcalcification deposits)は脂質沈着物やマクロファージに隣接して病変の早期から認められる。粥状硬化が進展するに従い血管壁へのカルシウム沈着は増強することが多く、進展した粥腫では小さい粒子とともに大きいカルシウムの塊を認めるようになる。本研究では石灰化は大動脈に比し冠動脈で高頻度に発現し、70歳以上で特に多く認めた。しかし、その機序はわかっていない。近年、カルシウム沈着誘発因子と誘発抑制因子が多数発見されたことにより、血管壁内で能動的にカルシウム産生が進行すると推測されている。たとえば、H₂O₂、LDL、acetylated LDL、高グルコース、leptinなどの粥状硬化促進因子は血管平滑筋細胞にCbfal、BMP-2、Msx2、Sox9などの遺伝子を発現誘導して、平滑筋細胞を骨細胞へ形質変換させるといわれている。一方、肝で産生され血中に放出されるfetuin-Aは、平滑筋細胞のカルシウム沈着作用を抑制する^{7,8)}。また、動脈の石灰化がどのようにして心筋梗塞や脳循環障害の発症に影響を及ぼすのかもわかっていないが、カルシウム沈着が動脈の狭窄、壁の弾力性の消失、壁張力のゆがみ、血流の乱れを招いて粥腫の破綻、粥腫内出血、血流障害を招くと推測されている。

2. 酸化二次生成物と蛋白質化合物の発現態度

粥状硬化の発症や進展に過酸化機構が大きく作用する。そこで大動脈、冠動脈、頸動脈の各病巣における過酸化脂質の発現を検討し比較した。HNEは主に内膜のマクロファージの細胞質に存在した。この結果は他の研究に一致する⁹⁾。HNEは粥腫のcoreには認めがたく、よってfatty streaks, atheroma, necrotic coreにおける沈着度に差はなかった。HNEは細胞膜に存在するアラキドン酸やリノール酸がフリーラジカルに曝露されると形成される。HNEは蛋白のアミノ酸残基と共有結合して蛋白を修飾し、多くの蛋白が修飾を受けて機能が障害される。この結果HNEは粥状硬化、メタボリック症候群、脳卒中、心筋梗塞、腎糸球体硬化症、Alzheimer病の発症や進展にかかわるといわれている^{10,11)}。たとえば、HNEはapoBに結合しLDLを酸化し¹²⁾、マクロファージのclass A scavenger receptors発現を増強してマクロファージを泡沫化させる¹³⁾。他方、細胞内シグナル伝達にも一役を担う。HNEはASK1 kinaseを活性化してjun-N-terminal kinaseを活性化し平滑筋細胞などの細胞増殖を促進するといわれている^{10,14)}。

他方、本例ではHNEとは異なりHHEはcoreを含む粥腫に沈着頻度が高かった。粥腫周辺のマクロファージの細胞質内にも沈着をみたが、その頻度はHNEよりも低かった。ヒト粥状硬化におけるHHE発現に関する報告は非常に少ない。HHEは、心血管疾患に対して抑制的に作用するeicosapentaenoic acidやdocosahexaenoic acidなどの長鎖n-3多価不飽和脂肪酸が酸化されて形成され、HNEと同様に有害な脂質過氧化物と考えられている¹⁵⁾。HHEはDNA、蛋白、リン脂質と結合し、粥状硬化巣のマクロファージ¹⁶⁾や糖尿病患者の網膜に存在する¹⁷⁾。内皮細胞に対してはアポトーシスシグナルを誘導して死を招く¹⁸⁾。われわれの知るかぎりでは、多数のヒトの粥状硬化におけるHHEとHNEの発現を検討した報告は本研究以外にない。31症例を用いた本研究では、非病変血管にはHNEもHHEも認めず、HNEは早期動脈硬化病変であるfatty streaksにはすでに沈着をみたが、HHEはほとんどが陰性であった。HHEは病変が進行してatheromaやnecrotic coreが形成されると、高頻度に発現した。冠動脈と他の動脈を比較すると、冠動脈の発現頻度が最も低く、大動脈の発現頻度が最も高く、頸動脈は両者の中間を示した。また大動脈と異なり、冠動脈や頸動脈は加齢とともに発現が増加しなかった。一般に大動脈は、冠動脈に比べより重篤で大きな病変をより多く形成する。前述の結果は、HHEの発現が病変の重症度や大きさと関連し、HNEの発現は病変の活動性に関連する可能性を示唆する。

Western blottingでHHEとHNEの定量を試みたが、大動脈でも冠動脈においてもDITと粥状硬化で発現量に差は認めなかった。これは免疫染色の結果と異なる。ヒトの粥状硬化のHHE、HNE発現を測定した報告は非常に乏しい。その理由として、特異抗体不足、細胞骨格、アルブミンを含む分子量や構造の異なる無数の蛋白がHHE、HNEで修飾されるために、これらすべてを定量することは現時点では困難なことが挙げられる。

3. 本研究の問題点

従来指摘されてきたように、病理解剖検体を検討材料に用いる場合は常に複数の問題を伴う。調査部位が限定されること、健常人の突然死ではなく、疾患を抱えて死亡した症例に対象が限定されること、若年者の症例が少ない点、死後の蛋白や遺伝子発現変化を伴うことなどである。それにもかかわらず、貴重な病理解剖症例を検討し報告することは、医療に

深く貢献するとわれわれは考えて、本研究を行った。

文 献

- 1) 池田フミ, 吉田洋二, 田村康二. ヒト冠動脈硬化の進展における膠原線維と内膜平滑筋細胞の役割. 動脈硬化 1992; 20: 89-99.
- 2) Sakurai I, Miyakawa K, Komatsu A, Sawada T. Atherosclerosis in Japanese youth with reference to differences between each artery. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 598: 410-417.
- 3) Tanaka K, Masuda J, Imamura T, Sueishi K, Nakashima T, Sakurai I, Shozawa T, Hosoda Y, Yoshida Y, Nishiyama Y, Yutani C, Hatano S. A nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* 1988; 72: 143-156.
- 4) 今北正美, 由谷親夫, 櫻井勇, 住吉昭信, 渡辺照男, 三俣昌子, 楠美嘉晃, 片山正一, 真能正幸, 馬場俊六, 万波俊文, 益田順一, 居石克夫, 田中健蔵. 日本の若年者における粥状硬化病変の進展—多施設における病理形態学的調査—. 動脈硬化 2000; 27: 213-221.
- 5) Malcom GT, McMahan CA, McGill HC Jr, Herderick EE, Tracy RE, Troxclair DA, Strong JP. Associations of arterial tissue lipids with coronary heart disease risk factors in young people. *Atherosclerosis* 2009; 203: 515-521.
- 6) Dijk RA, Virmani R, Thusen JH, Schaapherder AF, Lindeman JHN. The natural history of aortic atherosclerosis: A systematic histopathological evaluation of peri-renal region. *Atherosclerosis* 2010; 210: 100-106.
- 7) Serrano CV Jr, Oranges M, Brunaldi V, Soeiro AM, Torres TA, Nicolau JC, Ramires JAF. Skeletonized coronary arteries: pathophysiological and clinical aspects of vascular calcification. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 143-151.
- 8) Guzman RJ. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification. *J Vasc Surg* 2007; 45: 57A-63A.
- 9) Kumagai T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Uchida K. A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* 2004; 279: 48389-48396.
- 10) Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 2009; 44: 625-633.
- 11) Leonarduzzi G, Chiarotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 1044-1049.
- 12) Negre-Salvayre A, Vieira O, Escargueil-Blanc I, Salvayre R. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 251-261.
- 13) Yun MR, Im DS, Lee SJ, Woo JW, Hong KW, Bae SS, Kim CD. 4-hydroxynonenal contributes to macrophage foam cell formation through increased expression of class A

- scavenger receptor at the level of transcription. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 177-183.
- 14) Kakishita H, Hattori Y. Vascular smooth muscle cell activation and growth by 4-hydroxynonenal. *Life Sci* 2001; 69: 689-697.
 - 15) Ishikado A, Nishio Y, Morino K, Ugi S, Kondo H, Makino T, Kashiwagi A, Maegawa H. Low concentration of 4-hydroxy hexenal increase heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402: 99-104.
 - 16) Yamada S, Funada T, Shibata N, Kobayashi M, Kawai Y, Tatsuda E, Furuhata A, Uchida K. Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2004; 45: 626-634.
 - 17) Bacot S, Bernoud-Hubac N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Ponsin G, Lagarde M, Guichardant M: Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxyl-alkenals. *J Lipid Res* 2007; 48: 816-825.
 - 18) Lee JY, Je JH, Kim DH, Chung SW, Zou Y, Kim ND, Yoo MAe, Baik HS, Yu BP, Chung HY. Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal. *Eur. J Biochem* 2004; 271: 1339-1347.