

冠動脈疾患における虚血再灌流と酸化ストレス

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4518

冠動脈疾患における虚血再灌流と酸化ストレス

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学

(旧講座名：内科学第二)

(主任：馬淵 宏教授)

藤 井 浩 之

近年、生体内における酸化物質の測定が可能となり、酸化ストレスと虚血性心疾患など種々の病態との関係が解明されつつある。しかしながら、ヒトにおける虚血再灌流と酸化ストレスの関係については未だ不明な点が多い。そこで、著者は経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention, PCI) により酸化ストレスが増大するか否かについて血漿中酸化低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 値を指標に検討し、さらに他の血清脂質と血漿中酸化LDLとの関連性について検討した。冠動脈疾患患者132例 (急性冠症候群患者：42例, 安定狭心症患者：90例) を対象にPCIを施行し、その前、直後、24時間後に血漿中酸化LDL, 総コレステロール, LDLコレステロール, 高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロール, 中性脂肪, リポ蛋白 (a) を測定した。また、冠動脈造影上25%以上の狭窄を認めない50例を対照として、冠動脈造影の前で血漿中酸化LDLと前述の血清脂質を測定した。酸化LDL濃度は酸化ホスファチジルコリンを認識するDLH3抗体(ヒト粥状動脈硬化病巣を免疫源として得られたモノクローナル抗体) と抗ヒトアポB抗体によるサンドイッチELISA法により測定した。その結果、PCIを施行した132例のPCI前、直後、24時間後における酸化LDLの値はそれぞれ 15.2 ± 0.83 , 20.6 ± 0.99 , 16.2 ± 0.81 (unit/ml) であり、PCI直後の値はPCI前値よりも有意な増加を示した ($p < 0.0001$)。対照群では、冠動脈造影前後の血漿中酸化LDL値に差を認めなかった (13.7 ± 0.75 vs. 14.2 ± 0.78 unit/ml, NS)。PCI前の血漿中酸化LDLは、急性冠症候群が対照群よりも有意に高値であった (17.1 ± 1.58 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, $p < 0.05$)。一方、安定狭心症群におけるPCI前の酸化LDL値は、対照群と差がなかった (14.3 ± 0.95 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, NS)。血清脂質値はすべてPCI直後に減少し、24時間後にはほぼPCI前に近い値に復した。PCI後の血漿中酸化LDLの上昇にいかなる因子が関与しているかに関して、年齢、性、糖尿病、高血圧、冠疾患(急性冠症候群か安定狭心症か)、PCI前の血清脂質値[LDLコレステロール, HDLコレステロール, 中性脂肪, リポ蛋白 (a)] を独立変数として多変量解析を行った。その結果、酸化LDLの上昇を規定する因子は中性脂肪とHDLコレステロールであり、酸化LDLの増加は中性脂肪と正の相関 ($r=0.68$, $p < 0.0001$) を、HDLコレステロールとは負の相関 ($r=-0.32$, $p=0.0004$) を示した。

PCIにより血漿中酸化LDLの有意な上昇が認められたことから、ヒトにおける心筋虚血再灌流は酸化ストレスを増大させることが示唆された。また、HDLコレステロールは虚血・再灌流時の酸化ストレスに対して防御的に作用し、逆に中性脂肪は酸化ストレスの増大に関与している可能性が考えられた。

Key words angioplasty, HDL cholesterol, oxidized LDL, triglyceride

酸化低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) は動脈硬化発症の主たる原因物質であり、その発症から進展に至るまで重要な役割をはたしている^{1)~6)}。最近ではヒト血漿中の酸化LDL濃度や酸化LDLに対する抗体と冠動脈疾患との関連性が報告されている^{7)~9)}。特にスカベンジャーレセプターを含めた様々な酸化LDLに対する受容体が発見されており^{10)~13)}、これら受容体からのアプローチにより動脈硬化の発症および進展のメカニズムの解明が急速に進んでいる。しかしながら、LDLが生体内でどのように酸化され、代謝されていくのかその詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。

今日、経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary

intervention, PCI) は冠動脈疾患に対する確立された治療法である。バルーンを冠動脈内の動脈硬化病変で拡張することにより、プラークを破綻、圧縮させて動脈壁を伸展させるが、その際一時的なバルーンの拡張によって心筋は虚血に陥る。PCIによる心筋虚血によりフリーラジカルの産生や心筋障害が起こりうる^{14)~16)}が、PCIによる虚血再灌流で酸化ストレスが増大するか否か、その酸化ストレスに最も影響を及ぼしている因子は何か、酸化ストレスの増大の指標となり得るものはあるのか、など解明すべき点が多く残されている。

そこで著者はPCIをヒトにおける心筋虚血再灌流モデルと考え、PCIにより酸化ストレスが増大するか否かについて血漿中

平成14年11月29日受付, 平成15年1月27日受理

Abbreviations : CAD, coronary artery disease; HDL, high density lipoprotein; Lp (a), lipoprotein (a); LDL, low density lipoprotein; PCI, percutaneous coronary intervention

酸化LDL値を指標にその変動を検討し、さらに他の血清脂質や臨床的背景との関連性について検討を行った。

対象および方法

I. 対象

前向き研究法により、1998年8月から1999年3月までの間に登録された冠動脈疾患患者132例と対照者50例の計182例を対象とした。冠動脈疾患患者は急性冠症候群患者と安定狭心症患者に分類した。心電図で1mm以上のST上昇または下降を伴う胸痛患者を急性冠症候群と定義し、本症候群患者に対しては本人および家族の同意を得た後にカテーテル検査室に搬送して緊急PCIを施行した。さらにその中で、クレアチンキナーゼ-ミオグロビン (creatine kinase-myoglobin, CK-MB) 濃度が正常の5倍以上に上昇した症例を急性心筋梗塞と定義した。一方、労作時に心筋虚血所見が認められ、冠動脈造影上少なくとも75%以上の狭窄を有するものを安定狭心症と定義し、待機的PCIを行った。全てのPCIは単一血管、一病変に対して施行された。また、冠動脈造影上、主血管および主分岐血管に25%以上の狭窄を認めない症例を対照群とした。

II. 血液採取

カテーテル検査室でPCIの術前と術直後にカテーテルシースイントロデューサーより採血を行った。さらにPCIの24時間後に肘静脈から採血を行った。対照群では、冠動脈造影の前と直後にカテーテル検査室でカテーテルシースイントロデューサーから採血した。緊急例を除いて全ての採血は空腹時に行われた。

III. 血管形成術および冠動脈造影法

PCIは、通常行われる大腿動脈あるいは上腕動脈からのアプローチで行われた。PCI直前に100単位/kgのヘパリンを動脈より注入し、以後は1時間ごとに2,000単位を追加した。冠動脈造影は、PCIの前、直後に硝酸イソソルビド2mgを冠動脈内

に注入した後、少なくとも2方向で行った。術者は通常のバルーンで、造影上少なくとも25%未満の狭窄に拡張することを目標とした。冠動脈ステントは、冠動脈解離が起こり、急性冠閉塞が危惧される場合に救済措置として使用した。PCI直後に50%未満に拡張されていれば、造影上の成功と定義した。対照群では3,000単位のヘパリンを使用し、造影直前に硝酸イソソルビド2mgを冠動脈内に注入した。

IV. 酸化LDLの測定方法

血漿中酸化LDLは特殊なモノクローナル抗体DLH3とヒトのアポリポ蛋白B抗体を用いたサンドウィッチELISA法で測定した¹⁷⁾¹⁸⁾ (図1)。まず、測定の前に血漿サンプルを希釈緩衝液で250分の1に希釈した後、DLH3抗体が付着しているプレートでリン酸緩衝液と共に洗浄し、乾燥させた。それぞれのプレートに100 μ Lの希釈緩衝液を加えた後、20 μ Lに希釈した血液サンプル、あるいはキャリブレーションサンプルを加えよく混合し、37度で2時間加温した。次に緩衝液で5回洗浄した後、ホースラデッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) で標識されたヒトアポリポ蛋白B-100抗体を加えて、37度で1時間加温した。緩衝液で5回洗浄の後、100 μ Lのテトラメチルベンジン溶液を加え、さらに37度で30分間加温した。最後に反応を終息させるため1Mの硫酸を加えた後、MTP-120 Plate Reader (コロナ電子株式会社, 東京) を用いて450nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。血漿中酸化LDL濃度は、任意の単位 (unit/ml) で表すことにした。このELISA測定系における感度は1unit/mlまで測定可能で、変異係数は10%以下、再測定の正確性は90.6~103.8%である。血清の総コレステロール、高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) コレステロール、中性脂肪濃度は、通常行われている酵素法で測定した。LDLコレステロールは、Friedewaldの公式を用いて算出した¹⁹⁾。リポ蛋白 (a) [lipoprotein (a), Lp (a)]濃度は、一般的に用いられるモノクローナル抗体法で測定した (三和化学

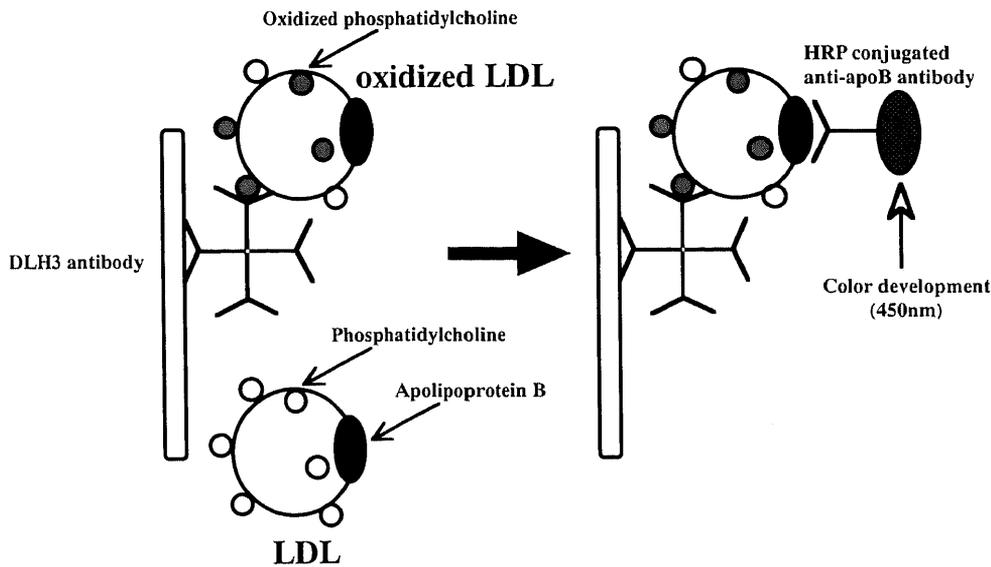


Fig. 1. Schematic illustration of measurement of oxidized LDL

A sandwich enzyme immunoassay (EIA) suitable for the measurement of human oxidized LDL was developed using the mouse monoclonal antibody FOH1a/DLH3. This antibody, specific for oxidized phosphatidylcholine, was used as the capture antibody, and a horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-human apolipoprotein B IgG was used for detection.

株式会社, 東京)²⁰⁾.

V. 統計処理

得られた結果は平均±標準誤差で表す。冠動脈疾患群と対照群における血漿中酸化LDLおよび血清脂質の比較には、Mann-Whitney Uテストを用いた。酸化LDLと血清脂質の変化の検定には、ノンパラメトリック解析 (Wilcoxon signed rank検定) を用いた。不連続変数にはカイ2乗テストを行った。酸化LDL値の変化に関与する独立因子の検定には、ステップワイズ回帰分

析を用いた。全ての統計解析はStatView Version 4.5 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, USA) を使用し、 $p<0.05$ を統計学的に有意とした。

成 績

I. 臨床的特徴

患者背景を表1に示す。冠動脈疾患患者132名のうち、急性冠症候群患者は42名で安定狭心症患者は90名であった。また、

Table 1. Clinical and Angiographic Characteristics of Patients with CAD and Control Subjects

	Control Subjects (n=50)	Patients with CAD (n=132)
Age (years)	65±11	65±13
Male/Female	25/25	101/31 [†]
Hypertension, n (%)	12 (20)	55 (38)*
Diabetes, n (%)	2 (3)	25 (21)*
Hyperlipidemia, n (%)	6 (10)	38 (33)*
Previous MI, n (%)	...	43 (33)*
Target vessel, (%)		
RCA	...	54 (41)
LAD	...	48 (36)
LCx	...	24 (18)
SVG	...	6 (5)
Lesion type		
(de novo/restenotic), n (%)	...	106 (80)/26 (20)
Stent implantation, n (%)	...	69 (52)

CAD, coronary artery disease; LAD, left anterior descending coronary artery; LCx=left circumflex artery; MI, myocardial infarction; RCA, right coronary artery; SVG=saphenous vein graft.

* $p<0.05$ vs control subjects, [†] $p<0.001$ vs control subjects.

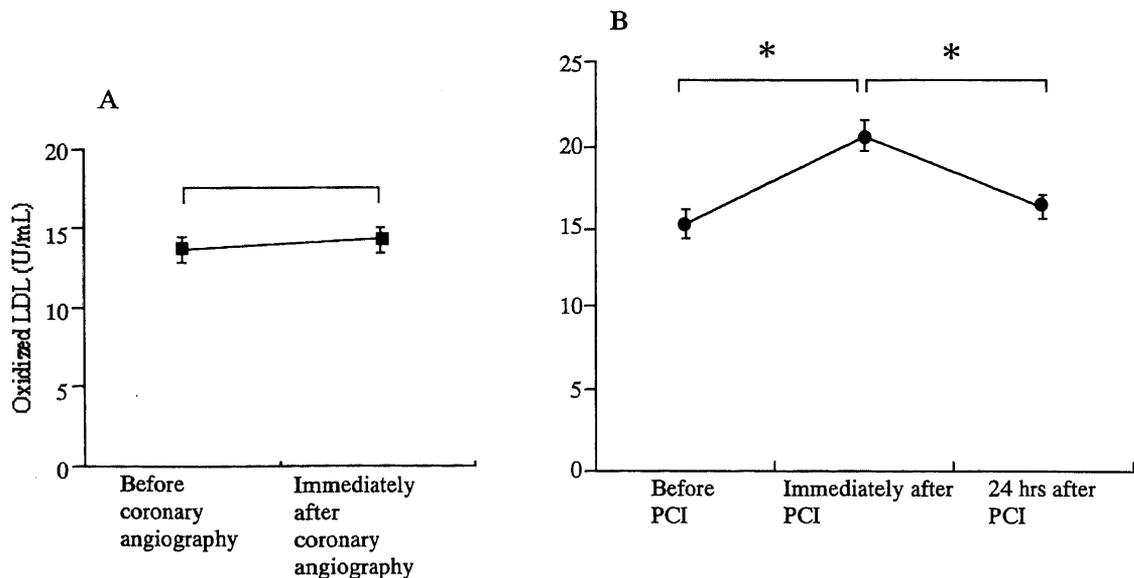


Fig. 2. (A) Changes in plasma oxidized LDL ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) before and immediately after coronary angiography in control subjects. There was no significant change in the oxidized LDL concentrations between before and immediately after coronary angiography in the controls (13.7 ± 0.75 vs. 14.2 ± 0.78). (B) Changes in plasma oxidized LDL ($\bar{X} \pm \text{SEM}$), before, immediately after, and 24 hours after PCI in patients with coronary artery disease. Plasma oxidized LDL concentrations in the coronary artery disease patients increased significantly, from 15.2 ± 0.83 at baseline to 20.6 ± 0.99 immediately after PCI ($p<0.0001$), and declined to preprocedural levels 24 hrs after PCI (16.2 ± 0.81).

急性冠症候群42名のうち31名は急性心筋梗塞患者であった。冠危険因子の高血圧、糖尿病、高脂血症は、対照群に比し冠動脈疾患患者群で高率であった。

II. 血漿中酸化LDL濃度 (PCI前および冠動脈造影前)

血漿中酸化LDL濃度は対照群よりも冠動脈疾患患者群において高い傾向にあったが、有意な差はなかった (15.2 ± 0.83 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, NS)。冠動脈疾患患者群のうち急性冠症候群患者では、対照群と比較して血漿中酸化LDL濃度が有意に高かった (17.1 ± 1.58 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, p<0.05)。それに対して、安定狭心症患者群の血漿中酸化LDL濃度は、対照群と差がなかった (14.3 ± 0.95 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, NS)。

III. PCIによる血漿中酸化LDL値の変化

対照群において冠動脈造影の前と直後では、血漿中酸化LDL濃度に差はなかった (図2A) (冠動脈造影前：13.7 ± 0.75, 直後：14.2 ± 0.78 unit/ml, NS)。一方、冠動脈疾患患者群における血漿中酸化LDL濃度は、PCI直後に有意に上昇し (PCI前：15.2 ± 0.83, PCI直後：20.6 ± 0.99 unit/ml, p<0.0001)、24時間後にはほぼPCI前値に復した (図2B)。PCI直後における血漿中酸化LDL濃度の有意な上昇は、急性冠症候群、安定狭心症患者群の両群において認められた (急性冠症候群：17.1 ± 1.58から24.0 ± 0.1.96 unit/mlへ上昇, p<0.0001)、(安定狭心症患者群：14.3 ± 0.95から19.0 ± 1.09 unit/mlへ上昇, p<0.0001)。さ

Table 2. Changes in Serum Lipids in Patients with CAD and Control Subjects

	Control Subjects (n=50)		Patients with CAD (n=132)		
	Before CAG	Immediately after CAG	Before PCI	Immediately after PCI	24 hrs after PCI
TC (mg/dl)	188.4 ± 39.1	157.5 ± 31.6 [‡]	199.7 ± 35.2*	173.2 ± 33.2 [¶]	187.9 ± 37.3
TG (mg/dl)	104.6 ± 43.0	52.9 ± 26.5 [‡]	149.3 ± 95.2 [†]	64.2 ± 56.3 [¶]	121.4 ± 77.5
HDL-C (mg/dl)	48.9 ± 14.9	42.3 ± 11.9 [‡]	41.0 ± 11.1 [†]	37.3 ± 12.2 [¶]	39.6 ± 11.2
LDL-C (mg/dl)	121.8 ± 35.8	107.5 ± 30.8 [‡]	131.0 ± 30.2*	123.7 ± 29.1 [¶]	124.3 ± 29.4
Lp (a) (mg/dl)	26.9 ± 21.2	23.6 ± 18.8 [‡]	30.4 ± 20.9*	27.4 ± 18.3 [¶]	30.3 ± 20.8

CAD, coronary artery disease. CAG=coronary angiography. PCI=percutaneous coronary intervention. Data are presented as $\bar{X} \pm SD$. *p<0.05 vs. before CAG. [†]p<0.001 vs. before CAG. [‡]p<0.0001 vs. before CAG. [¶]p<0.0001 vs. before PCI.

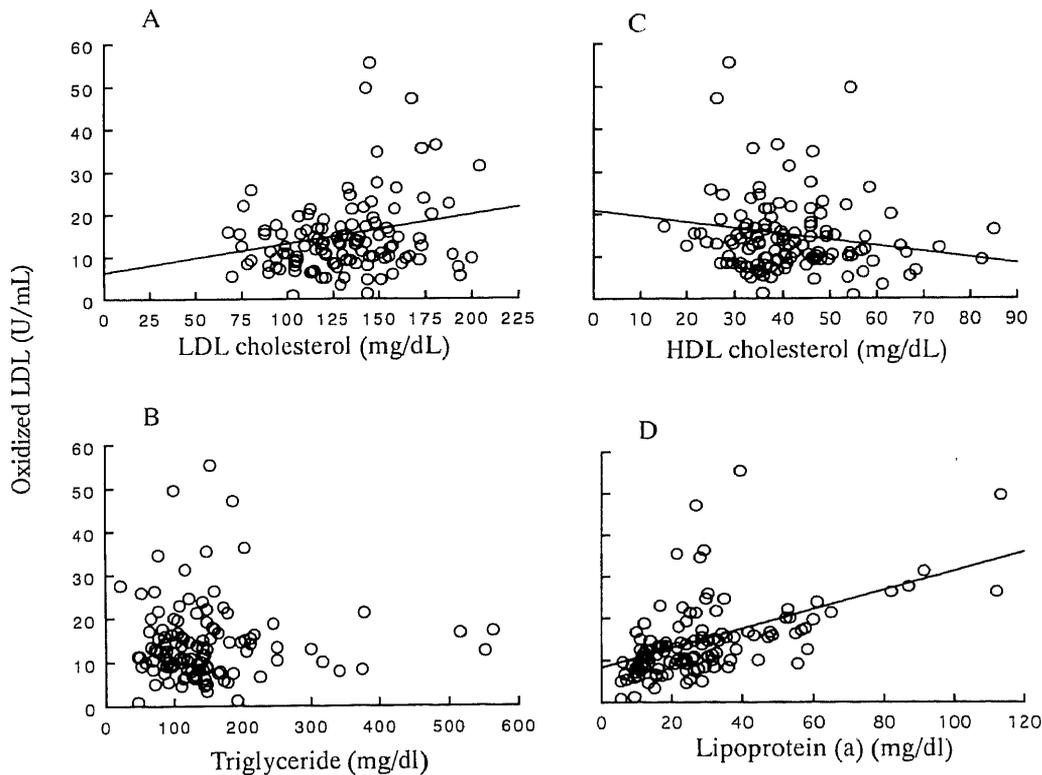


Fig. 3. Correlations between plasma oxidized LDL and preprocedural serum lipids in patients with coronary artery disease. (A) There was significant positive correlation between oxidized LDL and LDL cholesterol (r=0.22, p<0.05). (B) There was no correlation between oxidized LDL and triglyceride. (C) There was significant positive correlation between oxidized LDL and Lipoprotein (a) (r=0.50, p<0.0001). (D) Oxidized LDL concentrations were inversely associated with HDL cholesterol (r=-0.12, p<0.05).

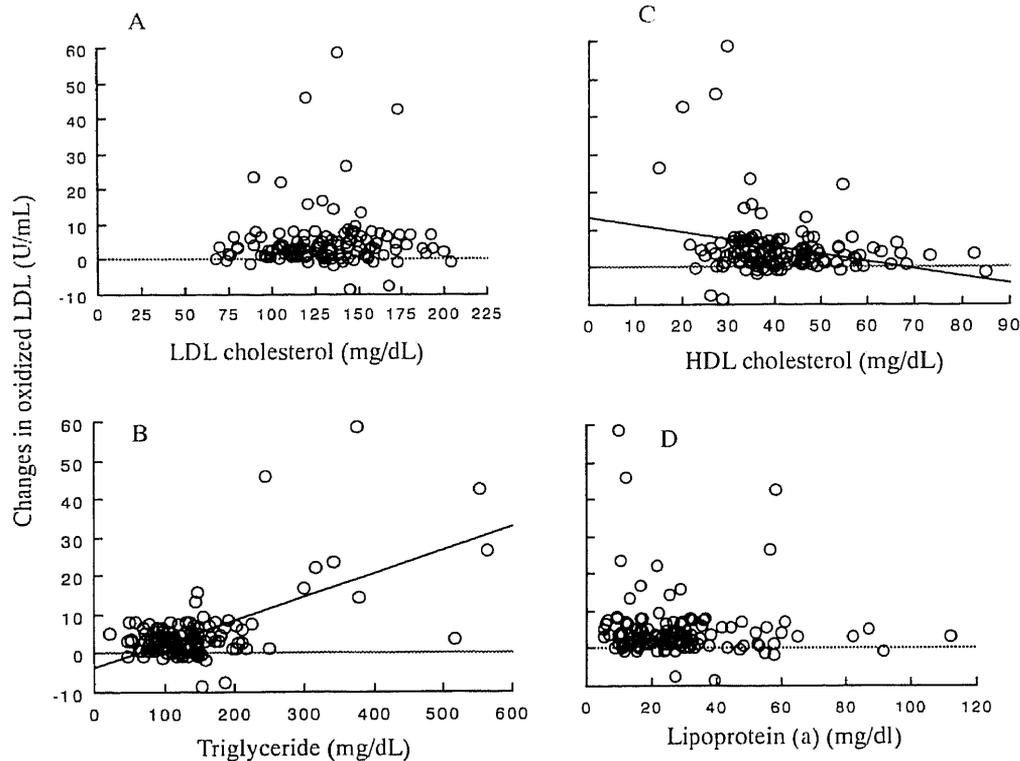


Fig. 4. Correlations between acute changes in plasma oxidized LDL and preprocedural serum lipids in patients with coronary artery disease

(A) There was no correlation between acute changes in oxidized LDL and LDL cholesterol. (B) Changes in oxidized LDL were positively associated with preprocedural triglyceride ($r=0.68$, $p<0.0001$). (C) Changes in oxidized LDL were inversely associated with preprocedural HDL cholesterol ($r=-0.32$, $p=0.0004$). (D) There was no correlation between acute changes in oxidized LDL and Lipoprotein (a).

らに、PCI直後の酸化LDL濃度は安定狭心症患者群より急性冠症候群患者のほうが有意に高値であった（急性冠症候群： 24.0 ± 1.96 ，安定狭心症患者群： 19.0 ± 1.09 unit/ml, $p<0.05$ ）。酸化LDL濃度は、24時間後には両群ともほぼPCI前値にまで低下した（急性冠症候群 18.0 ± 1.60 ，安定狭心症患者群 15.3 ± 0.91 unit/ml）。

IV. 血清脂質値

血清脂質値を表2に示す。総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロール、Lp (a) は、冠動脈疾患患者群において対照群よりも有意に高く、HDLコレステロールは冠動脈疾患群において有意に低値であった。全ての脂質値はPCI直後には有意に減少し、24時間後にはPCI前値に近い値へ復した。

V. 血漿中酸化LDLと脂質との関係

冠動脈疾患患者におけるPCI前の血漿中酸化LDLと血清脂質との関係を図3に示す。酸化LDL値とLDLコレステロール、酸化LDLとLp (a)の間にはそれぞれ有意な正の相関が認められた。また、酸化LDLとHDLコレステロールには、有意な負の相関が認められた。

冠動脈疾患患者群における酸化LDLのPCI前後の変動値と各脂質との関係を図4に示す。HDLコレステロールと酸化LDL値の増加には弱い負の相関が、中性脂肪と酸化LDL値の増加には中等度の正の相関が認められた。

酸化LDLの変化に関与している因子を決定するために10の独立因子（年齢、性差、高血圧、糖尿病、急性冠症候群、新規

病変（再狭窄を1としたなら再狭窄病変と記載）、LDLコレステロール値、HDLコレステロール値、中性脂肪値、LP (a) 値）を用いてステップワイズ回帰分析を行った。その結果、酸化LDL値の変化を予測しうるものは、PCI前におけるLDLコレステロールと中性脂肪値であった。さらに、急性冠症候群と安定狭心症患者群の二群についてそれぞれ同様にステップワイズ回帰分析を行った結果、安定狭心症患者群における酸化LDL値の予測因子はHDLコレステロールと中性脂肪であった。それに対し、急性冠症候群では中性脂肪のみが独立した予測因子であった。

考 察

I. 虚血再灌流と酸化LDLの変動

近年、PCIの術中に虚血再灌流によりフリーラジカルの産生が引き起こされると報告されている^{14)~16)}が、実際にLDLの酸化が起こるか否かに関しては不明であった。血中にはビタミンCや α -トコフェロールといった抗酸化物質が存在する。そのためLDL粒子が血中で酸化されて存在するといった可能性は考えにくく、血管壁の動脈硬化病変内に存在すると考えられていた。それに対して、血漿中のLDLのうち約10%が酸化されている可能性の報告もなされており^{21)~24)}、意見の一致をみていなかった。そこで、著者はPCIを虚血再灌流モデルと考え、PCIによる血漿中酸化LDL濃度の変化とその規定因子について検討を行った。その結果、血漿中酸化LDL濃度はPCI後に急性

冠症候群患者と安定狭心症患者の両者で有意に上昇した。さらに、酸化LDLのピーク値は安定狭心症患者よりも急性冠症候群患者で有意に高かった。これは、PCI前における酸化LDL値が急性冠症候群患者で既に高かったことと、PCI前の虚血がより強い酸化ストレスとして働いたためと考えられたが、急性冠症候群と安定狭心症群における酸化LDLの上昇の程度は非常に近い値であった。

動脈壁内におけるLDLの酸化は鉄や銅等の金属イオン、スーパーオキシド、リポオキシゲナーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、活性窒素種等によって引き起こされる⁵⁾。ヒト血中には数種類の抗酸化物質が存在している⁴⁾⁵⁾²⁵⁾にもかかわらず、PCIによる心筋虚血再灌流後にフリーラジカルが産生される^{14)~16)}。このPCIによって産生されたフリーラジカルが触媒となってLDLの酸化が血中で起こったものと推定された。

他方、PCI後の血漿中酸化LDLの上昇機序として、動脈壁からの流出の可能性も考えられる。PCIのバルーンによって動脈硬化プラークが破綻、圧縮された結果、動脈硬化層内の酸化LDLが血中に放出された可能性である。また、純粋なLDL粒子と酸化ホスファチジルコリンを混合したものはDLH 3抗体とアポB抗体とのサンドイッチELISA法で測定が可能である²⁰⁾。ために、酸化ホスファチジルコリンとLDLが反応した結果を測定している可能性も完全には否定できない。今後さらなる研究が必要と考えられる。

血清脂質値はすべてPCI直後に減少し、24時間後にPCI前値に近い値に復した。これらの値の減少は、輸液・造影剤による希釈のためと推定された。特に中性脂肪の減少が著しいが、これはPCIのみならず冠動脈造影後にも認められるためヘパリン添加によるリポ蛋白リパーゼの活性化が原因と考えられた。

図2に示すように、酸化LDL濃度は24時間後にはPCI前値近くにまで低下した。この理由として、いくつかの機序が考えられる。第一に、生体内では肝臓におけるクッパー細胞が特異な酸化LDLを認識し、動脈硬化の原因となる流血中の酸化LDLからの防御システムを構成している²³⁾。第二に、血漿中の酸化LDL粒子は動脈壁内膜へ侵入し、蓄積、変性される²⁴⁾ため、血漿中濃度が減少する。第三に、新しい酸化LDL受容体(レシチン様酸化LDL受容体-I)がヒトの動脈硬化病変で発見され、酸化LDLの取り込みから動脈硬化の進展に関与している可能性が示されている¹²⁾が、この酸化LDL受容体によって血中から除去される。これらの機序があいまって24時間後に酸化LDL濃度が低下したのと考えられた。

II. 虚血再灌流における酸化LDLの上昇と脂質の関係

今回の検討では、HDLコレステロールがPCI後の酸化LDLの上昇と逆相関を示した。この結果より、HDLコレステロールはLDLの酸化に対して抑制的に作用することが示唆される。HDLコレステロールは、金属イオンによるLDLの酸化を妨げることが実験的に証明されている²⁷⁾²⁸⁾。HDLコレステロールの表面には、アポリポ蛋白A-1²⁹⁾、血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ(platelet-activating factor acetylhydrolase)³⁰⁾、パラオキシソナーゼ³¹⁾³²⁾といった様々な分子が存在しており、これらによってHDLコレステロールは抗酸化能力を発揮しているものと考えられているが、今回得られた結果はこれを支持する成績と思われる。

一方、PCI後の酸化LDLの上昇と中性脂肪の間に正相関が認められた。リポ蛋白リパーゼはカイロミクロンや超低比重リ

ポ蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)に結合し、リポ蛋白中の中性脂肪を分解する酵素である。これまでにリポ蛋白リパーゼがLDLの酸化に関与している可能性が示唆されており^{33)~36)}、リポ蛋白リパーゼが脂肪分解するような状況下でもLDLの酸化は起こりうると報告されている³³⁾。リポ蛋白リパーゼは強い親和力で酸化LDLと結合し、血管内皮細胞に接着しており³⁴⁾、さらにJ774マクロファージを加えることにより酸化LDLとの結合、取り込みが顕著に増加を示す³⁵⁾。転写と酵素活性のレベルにおいて、リポ蛋白リパーゼは酸化LDLによってダウンレギュレーションされている³⁶⁾。これらの基礎的研究結果と著者の得た結果から、血清の中性脂肪はヒトにおいてLDLの酸化に影響を及ぼす主たる因子である可能性が高いものと推定される。

PCI後の再狭窄予防に抗酸化物質が有望であるとの報告があ^{37)~40)}。血管形成術を行った部位では内皮細胞が障害され、血小板や好中球が活性化されて、様々な反応性に富んだ中間物質が産生される⁴¹⁾。これらの酸化代謝産物は連鎖反応を引き起こし、血管内皮障害⁴²⁾やLDLの酸化¹⁾を引き起こす。酸化LDLによって活性化されたマクロファージや機能不全に陥った血管内皮から組織増殖を促進させる成長因子が放出される。このように、PCIによる酸化ストレスは再狭窄を引き起こす原因の一つと考えられる。これまでは酸化ストレスを定量的に測定し得る方法がなかったために、抗酸化治療を臨床的に評価し応用することができなかったが、今後本研究で用いた測定法の確立、普及により、新しい治療法の開発、確立に結びつく可能性がある。

III. 本研究の制限と臨床的重要性

本研究は、いくつかの制限を有している。第一に、酸化LDLをPCIの前、直後、24時間後の3回測定したが、酸化LDLのより詳細な時間経過は不明である。血漿中酸化LDLの代謝を考える上で、さらなる検討が必要と考えられた。第二に、抗酸化物質であるビタミンCやビタミンEの測定を行っていない。本研究に登録された対象に、ビタミン補充療法を受けているものはいなかったが、今後抗酸化物質がHDLコレステロールや中性脂肪に及ぼす影響等についても検討すべきと考えられた。

今回著者の得た結果は、臨床的に多くの重要性を含んでいる。酸化ストレスを評価するために、間接的にHDLコレステロールと中性脂肪を測定するという簡易方法を用いれば、虚血再灌流時の酸化ストレスを推定でき、より多くの冠動脈疾患患者における酸化ストレスと様々な臨床病態の関係を調査、検討することができる。さらに、虚血再灌流時に酸化LDLの上昇が生ずることが明らかになったが、LDLの酸化に影響を及ぼす種々の因子の研究をさらに発展させることにより、新しい抗酸化治療の基盤形成に役立つものと期待される。

結 論

1. PCIを施行した132例のPCI前、直後、24時間後における酸化LDLの値は 15.2 ± 0.83 , 20.6 ± 0.99 , 16.2 ± 0.81 (unit/ml)であり、PCI直後の値はPCI前値よりも有意な増加を示した($p < 0.0001$)。対照群では冠動脈造影の前後で血漿中酸化LDL値に差を認めなかった(13.7 ± 0.75 vs. 14.2 ± 0.78 unit/ml, NS) ことより、PCI直後における血漿中酸化LDL値の上昇はバルーンカテーテルによる侵襲、虚血再灌流であるものと推定された。

2. PCI前の血漿中酸化LDL値は、急性冠症候群が対照群よりも有意に高かった (17.1 ± 1.58 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, $p < 0.05$). それに対し、安定狭心症群におけるPCI前の酸化LDL値は対照群と差がなかった (14.3 ± 0.95 vs. 13.7 ± 0.75 unit/ml, NS).

3. PCI後の血漿中酸化LDL値の上昇に因する因子を検討するために、年齢、性別、糖尿病、高血圧、冠疾患(急性冠症候群あるいは安定狭心症)、PCI前の血清脂質値[LDLコレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、Lp (a)]を独立変数として多変量解析を行った。その結果、酸化LDLの上昇度を予測する因子は中性脂肪とHDLコレステロールであり、酸化LDLの増加は中性脂肪と正の相関 ($r=0.68$, $p < 0.0001$), HDLコレステロールとは負の相関 ($r=-0.32$, $p=0.0004$) を示した。

以上、PCIにより血漿中酸化LDL値の有意な上昇が認められたことから、ヒトにおける心筋虚血再灌流が酸化ストレスを増大させることが示唆された。また、HDLコレステロールは虚血再灌流時の酸化ストレスに対して防御的に作用し、逆に中性脂肪は酸化ストレスを増大させる方向で関与している可能性が考えられ、今後虚血性心疾患に対する抗酸化治療を考えるうえで有用な知見と考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師馬淵宏教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学清水賢巳助教授に心から謝意を表します。また御助言、御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学井野秀一講師に厚く御礼申し上げます。また多大なる御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学第四研究室の各位に感謝いたします。また、血液サンプル採取に際し御協力を頂いた横浜栄共済病院の元田 憲先生、道下一朗先生、梅田 研先生、三浦元宏先生に感謝いたします。また、血漿中酸化LDLの測定に際し御協力を頂いた益成利幸氏、佐野 守氏に感謝いたします。本研究の一部は第64回日本循環器学会学術集会(2000年、大阪)において発表した。

文 献

- 1) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 320: 915-924, 1989
- 2) Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792, 1991
- 3) Hamilton CA. Low-density lipoprotein and oxidized low-density lipoprotein: Their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 74: 55-72, 1997
- 4) Mosca L, Rubenfire M, Tarshis T, Tsai A, Pearson T. Clinical predictors of oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 80: 825-830, 1997
- 5) Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95: 1062-1071, 1997
- 6) Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141: 1-15, 1998
- 7) Holvoet P, Stassen JM, Cleemput JV, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low-density lipoprotein in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 100-107, 1998
- 8) Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen

D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndrome and coronary artery disease. *Circulation* 98: 1487-1494, 1998

- 9) Lehtimäki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H, Ylä-herttua, Luoma JS, Koivula T, Nikkari T. Autoantibody against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 23-27, 1999
- 10) Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1333-1339, 1999
- 11) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-77, 1997
- 12) Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99: 3110-3117, 1999
- 13) Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res* 84: 1043-1049, 1999
- 14) Grech ED, Bellamy CM, Jackson MJ, Muirhead RA, Faragher EB, Ramsdale DR. Free-radical activity after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 127: 1443-1449, 1994
- 15) Grech ED, Dodd NJF, Jackson MJ, Morrison WL, Faragher EB, Ramsdale DR. Evidence for free radical generation after primary percutaneous transluminal coronary angioplasty recanalization in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 77: 122-127, 1996
- 16) Reilly MP, Delanty N, Roy L, Rokach J, Callaghan PO, Crean P, Lawson JA, FitzGerald GA. Increased formation of the isoprostanes IPF2 α -I and 8-epi-prostaglandin F2 α in acute coronary angioplasty. Evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation* 96: 3314-3320, 1997
- 17) Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 1996; 37: 45-53, 1996
- 18) Shoji T, Nishikawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, Emoto M, Kawagishi T, Morii H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 148: 171-177, 2000
- 19) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin*

Chem 18: 499-502, 1972

20) Fujita S, Sano T, Katayama Y. Measurement of serum Lp (a) by COBAS MIRA using a latex immunoturbidimetric assay kit. *J Clin Lab Anal* 8: 385-390, 1994

21) Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 8: 79-87, 1998

22) Hodis HN, Kramsch DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang J, Peterson H, Sevanian A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *J Lipid Res* 35: 669-677, 1994

23) Van Berkel TJC, De Rijcke YB, Kruijt JK. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. *J Biol Chem* 266: 2282-2289, 1991

24) Juul K, Nielsen LB, Munkholm K, Stender S, Nordestgaard BG. Oxidation of plasma low-density lipoprotein accelerates its accumulation and degradation in the arterial wall in vivo. *Circulation* 94: 1698-1704, 1996

25) Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* 85: 9748-9752, 1988

26) Itabe H, Hosoya R, Karasawa K, Jimi S, Saku K, Takebayashi S, Imanaka T, Takano T. Metabolism of oxidized phosphatidylcholine formed in oxidized low density lipoprotein by lecithin-cholesterol acyltransferase. *J Biochem* 126: 153-161, 1999

27) Hessler JR, Robertson AL Jr, Chisolm GM. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 32: 213-229, 1979

28) Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1044: 275-283, 1990

29) Hayek T, Oiknine J, Dankner G, Brook JG, Aviram M. HDL apolipoprotein A-1 attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 721-725, 1995

30) Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 95: 774-782, 1995

31) Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durring PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104: 129-135, 1993

32) Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96: 2882-2891, 1995

33) Balagoparakrishna C, Paka L, Pillarisetti S, Goldberg IJ. Lipolysis-induced iron release from diferic transferin: possible role of lipoprotein lipase in LDL oxidation. *J Lipid Res* 40: 1347-1356, 1999

34) Auerbach BJ, Bisgaier CL, Wolle J, Saxena U. Oxidation of low density lipoproteins greatly enhances their association with lipoprotein lipase anchored to endothelial cell matrix. *J Biol Chem* 271: 1329-1335, 1996

35) Hendriks WL, Van der Boom H, Van Vark LC, Havekes LM. Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low-density lipoprotein by J774 macrophages. *Biochem J* 314: 563-568, 1996

36) Stengel D, Antonucci M, Gaoua W, Dachet C, Lesnik P, Hourton D, Ninio E, Chapman MJ, Griglio S. Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 18: 1172-1180, 1998

37) Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 132: 23-29, 1996

38) Tardif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, De Guise P. ProbucoI and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 337: 365-372, 1997

39) Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, Nakata Y, Ohshima S, Nishiyama S, Seki A, Kato K, Nishimura S, Kano H, Yamaguchi H. Effectiveness of an antioxidants in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the probucol angioplasty restenosis trial. *J Am Coll Cardiol* 30: 855-862, 1997

40) Rodes J, Cote G, Lesperance J, Bourassa MG, Doucet S, Bilodeau L, Bertrand OF, Harel F, Gallo R, Tardif JC. Prevention of restenosis after angioplasty in small coronary arteries with probucol. *Circulation* 97: 429-436, 1998

41) Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63: 381-389, 1988

42) Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 160-162, 1990

Correlation between ischemia-reperfusion and oxidative stress in patients with coronary artery disease Hiroyuki Fujii, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **112**, 2 – 10 (2003)

Key words angioplasty, HDL cholesterol, oxidized LDL, triglyceride

Abstract

The purpose of this study was to investigate the acute changes in plasma oxidized low density lipoprotein (LDL) after percutaneous coronary intervention (PCI) and to find their potential determinants. We studied 132 consecutive patients with coronary artery disease who successfully underwent PCI, and 50 control subjects. We measured plasma oxidized LDL before, immediately after, and 24 hours after PCI, and compared them with clinical variables including serum lipid levels. In control subjects, we measured plasma oxidized LDL before and immediately after diagnostic coronary angiography. In patients with coronary artery disease, plasma oxidized LDL levels (U/ml) increased significantly immediately after PCI (15.2 ± 0.83 to 20.6 ± 0.99 , $p < 0.0001$) and returned toward preprocedural levels after 24 hours (16.2 ± 0.81). In control subjects, there was no significant change immediately after coronary angiography (13.7 ± 0.75 vs. 14.2 ± 0.78 , NS). The increases of oxidized LDL levels were inversely correlated with baseline high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels ($r = -0.32$, $p = 0.0004$) and positively with baseline triglyceride levels ($r = 0.68$, $p < 0.0001$). A multivariate analysis also confirmed that baseline levels of HDL cholesterol and triglyceride predict the increase of plasma oxidized LDL levels after PCI. These findings suggest that plasma oxidized LDL concentrations increase during PCI and demonstrate that preprocedural levels of HDL cholesterol and triglyceride may be clinically useful indices for prediction of oxidant stress during PCI.