血管内皮細胞接着分子と細胞間接着分子発現からみた静脈グラフト内膜肥厚における静脈弁と高コレステロール血症の影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 陳, 智群 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9409

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第2号　166－175（1999）

血管内皮細胞接着分子と細胞間接着分子発現からみた静脈グラフト内膜肥厚における静脈弁と高コレステロール血症の影響

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
陳　　智　群

冠動脈バイパス術後における自家静脈グラフトの内膜肥厚、粥状硬化はグラフト閉塞をきたす重要な問題である．とくに静脈グラフトの粥状硬化は動脈グラフトよりも急速に進行しやすく，その原因のひとつにグラフト内の静脈弁が挙げられている．粥状硬化病変の発生機序として動脈では細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) と血管内皮細胞接着分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) の発現の増加が報告されている．しかし静脈グラフトの内膜肥厚や内皮細胞における接着分子の発現に静脈弁が関与しているかは不明である．本研究では静脈グラフトのバイパスモデルを作成し，静脈弁周囲でのグラフト内膜肥厚と接着分子の発現を高コレステロール血症の有無に分けて検討した．対象はウサギ42羽を用いて静脈弁を有する左外頸静脈を採取後，静脈内血流が左内頸動脈の血流方向と一致するように静脈を逆転させて内頸動脈の一部と置換した．術後，通常食を与えた通常食群21羽と高コレステロール食を与えた高コレステロール食群21羽に分けて，1，2，3週間後に犠牲死させた．静脈グラフトを内頸動脈との吻合部とともに採取し，静脈弁周囲の病理組織学的評価および接着分子の発現を検討した．通常食群は静脈弁中枢側は14.8±3.2 μmから21.9±2.9 μm，弁末梢側は15.7±4.1 μmから27.8±4.8 μmに肥厚した．一方，高コレステロール群は弁中枢側で18.2±3.5 μmから116.2±14.8 μm，弁末梢側で22.8±2.1 μmから190.2±14.1 μmと有意に肥厚していた (p<0.05)．接着分子の発現は通常食群ではいずれの時点でもVCAM-1の発現は認めず，ICAM-1は3週間後に弁中枢側で0.8±0.5％，弁末梢側で2.1±0.8％のみ認めた．一方，高コレステロール食群はVCAM-1の発現が弁中枢側で5.6±1.3％から44.2±5.7％，弁末梢側で11.6±1.5％から60.0±11.5％と有意に増加し (p<0.05)，弁末梢部の方が有意に高度であった (p<0.05)．ICAM-1の発現は弁中枢側で5.4±0.8％から31.6±2.1％，弁末梢側で5.9±0.9％から56.6±1.9％で弁末梢側が有意に高度な発現を示した (p<0.05)．以上の結果から静脈グラフトの内膜肥厚は高コレステロール食群で顕著に発生し，その肥厚は静脈弁末梢側で発生しやすいことが明らかになった．ICAM-1およびVCAM-1の発現も内膜肥厚に一致して弁末梢部で高度に発現しており，内膜肥厚の発生機序への関与が示唆された．従って静脈グラフトの長期開存率を高めるには静脈弁の少ない静脈グラフトを使用し，コレステロール摂取量を制限することが重要である．

Key words vein valves, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, intimal hyperplasia, atherosclerosis

冠動脈バイパス術に用いる自家静脈グラフトの内膜肥厚，およびその後に出現する粥状硬化による閉塞は，術後に心筋虚血の再発をもたらす重要な問題である．Kalanら[1]により静脈グラフトの粥状硬化が報告されており，動脈よりも急速に進行しやすい[2]．これまで静脈グラフトの開存率は1年で80～90％，10年で50～70％と報告されており[3][4]，その閉塞原因として急性血栓閉塞，吻合部狭窄，グラフトの損傷，血流速度の低下，慢性粥状硬化等が考えられている．また閉塞時期により原因は異なり，術後2ヶ月までの亜急性期では血栓や内膜肥厚による閉塞，1年以上の中期または遠隔期では粥状硬化による閉塞と考えられている．

脈管の粥状硬化は初期段階で，血管内皮に単球，リンパ球が付着し[5][6]，それらの遊離を抑える接着分子が血管内皮細胞の表面に発現する．このうち免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する接着分子である血管内皮細胞接着分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) および細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) が単離，同定されている[7]．VCAM-1はα4/β1インテグリンである抗原VLA-4 (very late antigen-4) をリガンドとして内皮細胞と白血球を接着させ，炎症性サイトカインなどの刺激によって血管内皮細胞に発現する．一方，ICAM-1はβ2インテグリン分子に属するリンパ球機能に直接関与している抗原LFA-1 (lymphocyte function-related antigen-1) をリガンドとして単球，リンパ球を接着させ，通常の血管内皮細胞にも分布しサイトカインやずり応力 (shear

平成10年12月28日受付，平成11年2月9日受理

Abbreviations：ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL, interleukin; INF-γ, interferon-γ; LDL, low density lipoprotein; LFA-1, lymphocyte function-related antigen-1; PBS, phosphate-buffered saline; TNF, tumor necrosis factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VLA-4, very late antigen-4

stress) などの刺激により発現が増加する[8]．臨床例[9)10)]や動物実験[11)]の血管粥状硬化の内皮細胞においてICAM-1とVCAM-1の発現が認められているが，その初期段階における静脈弁周囲の内膜肥厚と内皮細胞における接着分子の発現との関係は未だ不明である．

また静脈グラフトとして用いられる大伏在静脈では一方向の血流しか許さない静脈弁が問題となる．一般に静脈グラフトを使用するときはグラフト内血流が静脈血の順行性血流と一致するように使用する．しかし静脈弁の存在がグラフトの閉塞原因であるとする報告があり[12)~14)]，その機序は静脈弁によるグラフト内血流の停滞やずり応力の発生によるとされている．

本研究では，このような静脈グラフトの静脈弁周囲を中心とした内膜肥厚と接着分子発現との関係について，通常食と粥状硬化を促進する高コレステロール食を与えたウサギに分けて比較検討した．

対象および方法

Ⅰ．実験動物

実験動物には体重3.0kgから3.6kgの42羽の成熟雄性日本白色ウサギを用いた．動物は“金沢大学宝町地区動物実験指針”に基づき取り扱った．塩酸ケタミン (三共，東京) 150mgと硫酸アトロピン (田辺，大阪) 0.5mgの筋肉内注射により麻酔導入した．術中の麻酔維持には，耳介の静脈に点滴路を確保し，ペントバルビタールナトリウム (田辺) 1mg/kg/時間を持続点滴した．術後は意識，呼吸に問題がないと判断されるまで十分に観察を行った．

Ⅱ．実験系の作成

実験動物の体位を右側臥位とし左側頸部を縦切開後，左外頸静脈を顔面静脈の分岐部頭側から心臓方向にかけて約5cmにわたり剥離した．ヘパリン (武田，東京) 200単位/kgを静脈内投与し，顔面静脈を結紮，切離した．併走する左総頸動脈を露出した後，顔面静脈分岐部を挟むように外頸静脈の頭側と心臓側を5cm離してブルドック血管鉗子で遮断した．顔面静脈の分岐部から約1cm離れた心臓側の外頸静脈を切断し，外頸静脈の心臓側断端は結紮した．次いで総頸動脈を3cm離して2箇所で遮断し，静脈の順行性血流が総頸動脈血流と一致するように外頸静脈頭側断端を反転させて総頸動脈と8-0 プロレン糸 (エチコン，東京) を用いて端側吻合した．吻合が終了した後，一時的に総頸動脈遮断を解除し，静脈グラフトに血液を満たし静脈弁を確認した．次に総頸動脈を再び遮断し約5mmほど切除した．動脈の長軸方向への自然な緊張を利用して動脈の頭側および心臓側の切断端を約2cmほど離し，総頸動脈の頭側断端は結紮し

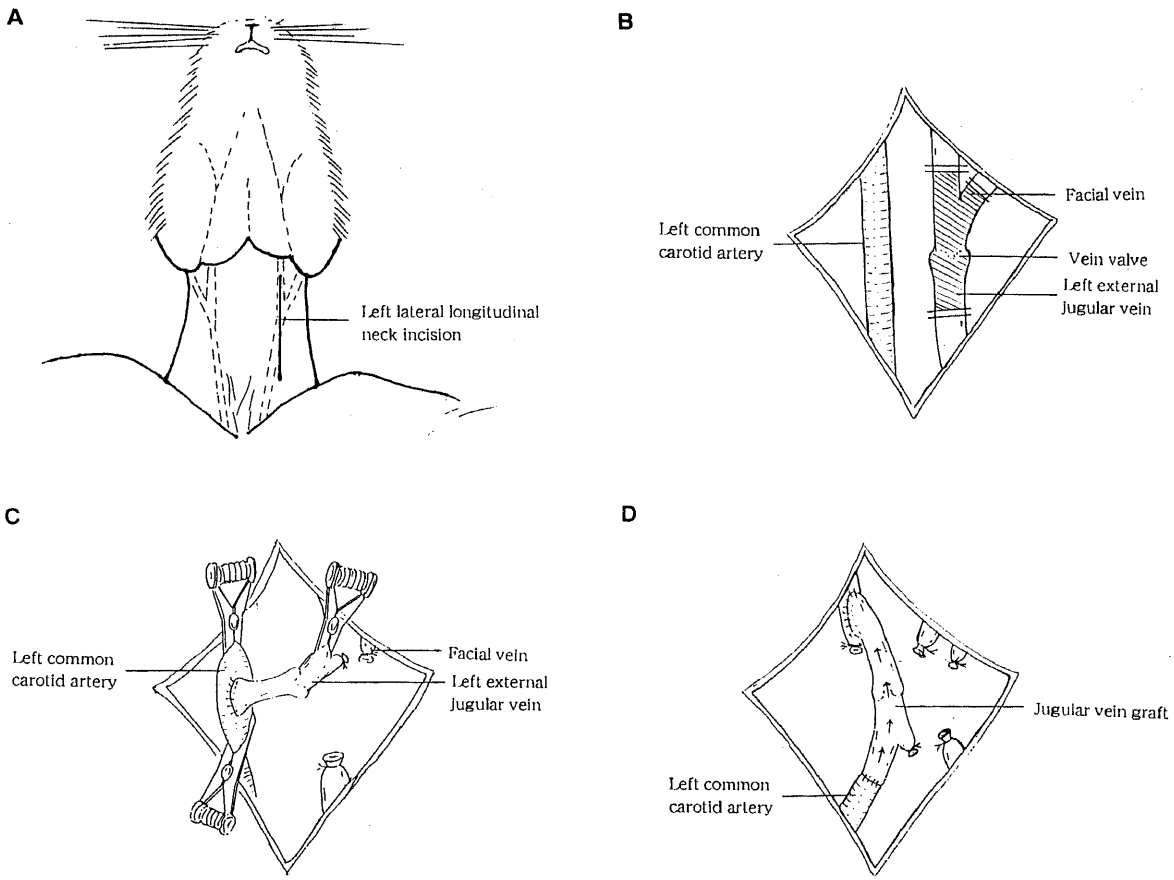

Fig. 1. Schematic drawing of surgical procedure. (A) Left lateral longitudinal neck incision; (B) Left common carotid artery and left external jugular vein were exposed on the left side of the neck; (C) With use of continuous 8-0 polypropylene sutures, end-to-side anastomosis (proximal end of jugular vein was anastomosed to the side of distal common carotid artery) was perfomed; (D) End-to-end anastomosis (distal end of jugular vein was anastomosed to the end of proximal common carotid artery) was perfomed. Reversed vein was interposed as a bypass graft in the common carotid artery. Arrow indicates direction of blood flow.

た．静脈グラフト長が2cmになるように外頚静脈を切離し，その頭側断端を結紮した．総頚動脈の心臓側断端と静脈グラフトの断端を8-0 プロレン糸を用いて端々吻合した．総頚動脈の遮断を解除すると静脈グラフト内血流は順行性に開通し，静脈グラフトによるバイパスモデルが作成された (図1)．

1．通常食群

静脈バイパスモデル作成後，対照としてウサギ21羽に通常食 (RM-3，船橋農場，千葉) の摂食を手術当日から開始させて通常食群とした．モデル作成後1週間目，2週間目，3週間目にそれぞれ7羽ずつ全身麻酔をかけて静脈グラフトを摘出後，犠牲死させた．

2．高コレステロール食群

粥状硬化を促進させるために，ウサギ21羽に高コレステロール添加食 (2％コレステロール含有RM-3，船橋農場) の摂食を手術当日から開始させ高コレステロール食群とした．モデル作成後1週間目，2週間目，3週間目にそれぞれ7羽ずつ通常食群と同様な方法で静脈グラフトを摘出し犠牲死させた．

Ⅲ．血液採取

実験モデル作成直後，1週間目，2週間目，3週間目に凝固促進分離剤入，血清生化学検査用採血管 (積水，大阪) を用いて耳朶静脈から血液採取を行い，血清コレステロール値とトリグリセライド値を測定した．測定には736形自動分析装置 (日立，東京) を使用した．

Ⅳ．組織学的検討

標本はバイパス作成部位を周囲組織から剥離し，グラフトの中枢側および末梢側吻合部をつけたまま静脈グラフトを完全に摘出した．静脈グラフトの中枢側および末梢側吻合部より2mm離れた部位から長さ3mmの静脈グラフト標本をそれぞれ採取した．中枢側吻合部近傍より採取した標本を静脈弁の中枢側標本，末梢側吻合部近傍から採取した標本を静脈弁の末梢側標本として組織学的検討を行った．

標本はO.C.T コンパウンド (Miles, Elkhart,USA) に包埋し，凍結したグラフト標本を4 μmの厚さに薄切し，シランコーテイングスライド (武藤化学，東京) に貼付し，15分間冷気にて乾燥させた後，アセトン (和光，大阪) にて10分間の固定を行った．通常のHE染色を施し，顕微鏡にて血管壁の構造を観察した．静脈グラフトの内膜から中膜と外膜の境界までの距離を静脈グラフトの血管壁厚として測定した．

Ⅴ．免疫組織化学的検討

免疫染色は，アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin complex-peroxidase, ABC) 法にて行った．O.C.T コンパウンドに包埋し，凍結したグラフト標本を4 μmの厚さに薄切し，シランコーテイングスライド (武藤化学) に貼付し，15分間冷気にて乾燥させた後，－20℃アセトン (和光) にて15分間の固定を行った．次にリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.5) (日水製薬，東京) に浸した後，内因性ペルオキシダーゼを阻害するため0.3%過酸化水素加メタノールに20分間浸透させて10分間水道水で洗浄した．非特異的反応を阻止するため，ウシ血清アルブミン (ダコ・ジャパン，京都) を室温にて20分間反応させた．一次抗体として抗VCAM-1 モノクローナル抗体 (マウス IgG1, クローン1.G11B; 大日本製薬，大阪) は100倍に希釈し，抗 ICAM-1 モノクローナル抗体 (マウス IgG1, クローン1A29；大日本製薬，大阪) は200倍に希釈して，4℃にてグラフト標本と一晩反応させた．次にPBSにて5分間3回洗浄し，二次抗体としてビオチン標識抗マウスおよび抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (ダコ・ジャパン) を室温にて30分間反応させ，PBSにて5分間3回洗浄後，ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコ・ジャパン) を室温にて30分間反応させた．PBSにて5分間3回洗浄後，0.03% 過酸化水素を加えた0.2％3, 31-ジアミノベンチジン四塩酸塩反応液 (和光) にて顕微鏡で発色状態を確認しながら5～7分間室温にて反応させた．水道水で10分間洗浄した後，ヘマトキシリンにて核染色を行った．全過程終了後，脱水，透徹を施行し，マリノール (武藤化学) にて封入し検鏡した．これらの染色の特異性は一次抗体をPBSで置換し，反応が陰性化することで確認した．

静脈グラフトの切片においてグラフト全周の総内皮細胞数と免疫染色陽性細胞数を算定し，免疫染色陽性細胞数を総内皮細胞数に対する比率で換算した．

Ⅵ．統計学的検討

得られた成績はすべてX±SDにて表記した．平均値の差の検定はFisher's の一元配置分散分析法を用いた．各群での中枢および末梢側での壁肥厚の比較には対応のあるStudent's の t検定を用いた．統計学的有意差は危険率5％未満をもって有意差

Table 1. Serum cholesterol and triglyceride concentrations in rabbits fed with standard and high-cholesterol diets

Time	Group	No. of rabbits	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
At the time of operation	NOR	7	24±5	34±5
	HCD	7	22±3	34±7
1 week after operation	NOR	7	27±4	37±6
	HCD	7	855±212*	41±14
2 weeks after operation	NOR	7	29±9	38±6
	HCD	7	1281±75*	45±9
3 weeks after operation	NOR	7	31±12	39±3
	HCD	7	1495±174*	47±13

NOR, normal group fed with a standard diet; HCD, hypercholesterolemic group fed with a high-cholesterol diet. These values are expressed as $\bar{x}$ ±SD. *P<0.05 compared to control (one-factor ANOVA).

Table 2. Difference in intimal thickness of proximal compared to distal to the vein valve regions in standard-diet rabbits

Time	No. of rabbits	Proximal (μm)	Distal (μm)	P Value
1 week after operation	7	14.8±3.2	15.7±4.1	NS
2 weeks after operation	7	19.1±4.3	22.4±5.4	NS
3 weeks after operation	7	21.9±2.9	27.8±4.8	NS

These values are expressed as $\bar{x}$ ±SD. NS, not significant.

Table 3. Difference in intimal thickness of proximal compared to distal to the vein valve regions in high-cholesterol diet rabbits

Time	No. of rabbits	Proximal (μm)	Distal (μm)	P Value
1 week after operation	7	18.2±3.5	22.8±2.1	<0.008
2 weeks after operation	7	77.5±4.2	117.2±5.7	<0.01
3 weeks after operation	7	116.2±14.8	190.2±14.1	<0.03

These values are expressed as $\bar{x}$ ±SD.

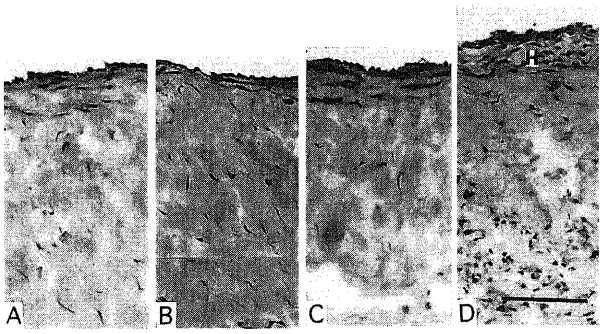

Fig. 2. A composite photomicrograph of a cross section of the wall of vein with standard diet. (A) At the time of operation. (B) At 1 week. (C) At 2 weeks. (C) At 3 weeks. H, intimal hyperplasia. ×200 in hematoxylin and eosin stain. Bar indicates 50 μm.

ありと判定した.

成　　績

Ⅰ. 血清コレステロールとトリグリセライド

通常食群と高コレステロール食群の血清コレステロールとトリグリセライドの値の推移を表1に示した. 1, 2, 3週間目の血清コレステロール値は, 通常食群で, それぞれ27±4mg/dl, 29±9mg/dl, 31±12 mg/dlであった. 高コレステロール食群で, それぞれ855±212mg/dl, 1281±75mg/dl, 1495±174 mg/dlであり, どの時点においても高コレステロール食群で有意に高値であった (P<0.05). 血清トリグリセライ

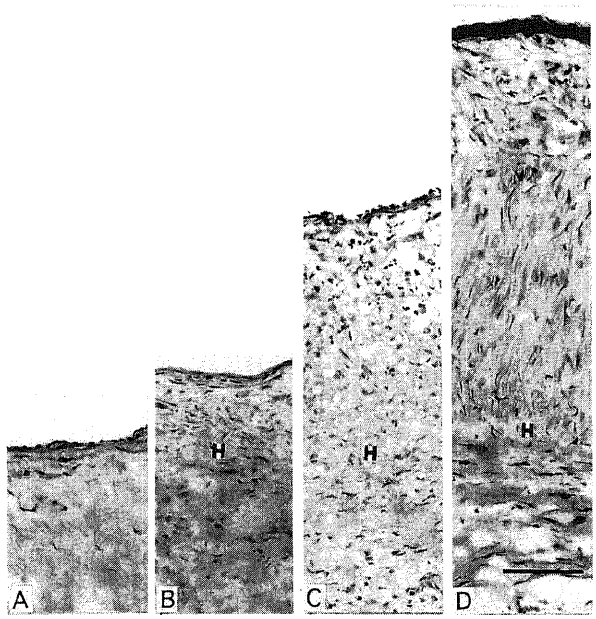

Fig. 3. A composite photomicrograph of a cross section of the wall of vein with high-cholesterol diet. (A) At the time of operation. (B) At 1 week. (C) At 2 weeks. (D) At 3 weeks. H, intimal hyperplasia. ×200 in hematoxylin and eosin stain. Bar indicates 50 μm.

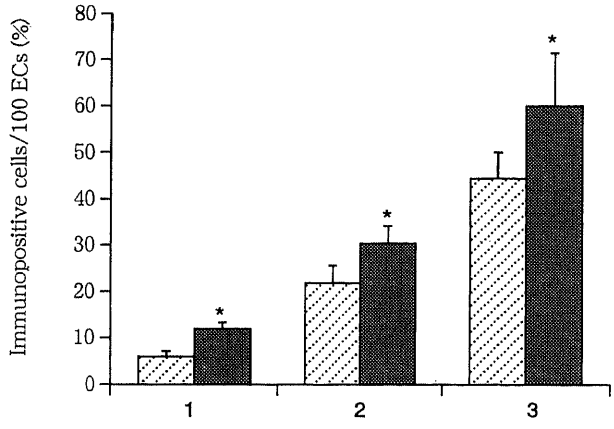

Fig. 4. Endothelial VCAM-1 expression rates in vein graft segments proximal and distal to the valves at 1, 2 and 3 weeks after bypass in rabbit with high-cholesterol diet. ▨, proximal segments; ■, distal segments. ECs, endothelial cells. * P<0.05 compared to proximal segments (Wilcoxon test). VCAM-1 expression was progressively increased with time and significantly higher in the section distal to the valve.

ド値はいずれの時点においても両群間に有意差はなかった.

Ⅱ. 病理組織学的所見

通常食群で1, 2, 3週間目の静脈弁中枢側の血管壁厚はそれぞれ14.8±3.2 μm, 19.1±4.3 μm, 21.9±2.9 μmであり, 弁末梢側の血管壁厚はそれぞれ15.7±4.1 μm, 22.4±5.4 μm, 27.8±4.8 μmであった (表2). 一方高コレステロール食群では1, 2, 3週間目の静脈弁中枢側の血管壁厚はそれぞれ18.2±3.5 μm, 77.5±4.2 μm, 116.2±14.8 μmであり, 経時的に有意に増加した ($p<0.05$). 静脈弁末梢側の血管壁厚はそれぞれ22.8±2.1 μm, 117.2±5.7 μm, 190.2±14.1 μmであり, いずれの時点においても弁中枢側と比して有意に増加していた ($P<0.05$) (表3). 通常食群の血管壁厚の増加は内膜過形成が主であり, コラーゲンと少量のエラスチンを伴う平滑筋細胞から構成されていた. 高コレステロール食群の内膜は通常食群に比べて有意に厚く, 主に平滑筋細胞から構成されていた. 両群とも内膜下層にはマクロファージは認めなかった (図2, 図3).

Ⅲ. 免疫組織学的所見

1. VCAM-1の発現

通常食群ではすべての時点でVCAM-1の発現はなく, 弁中枢

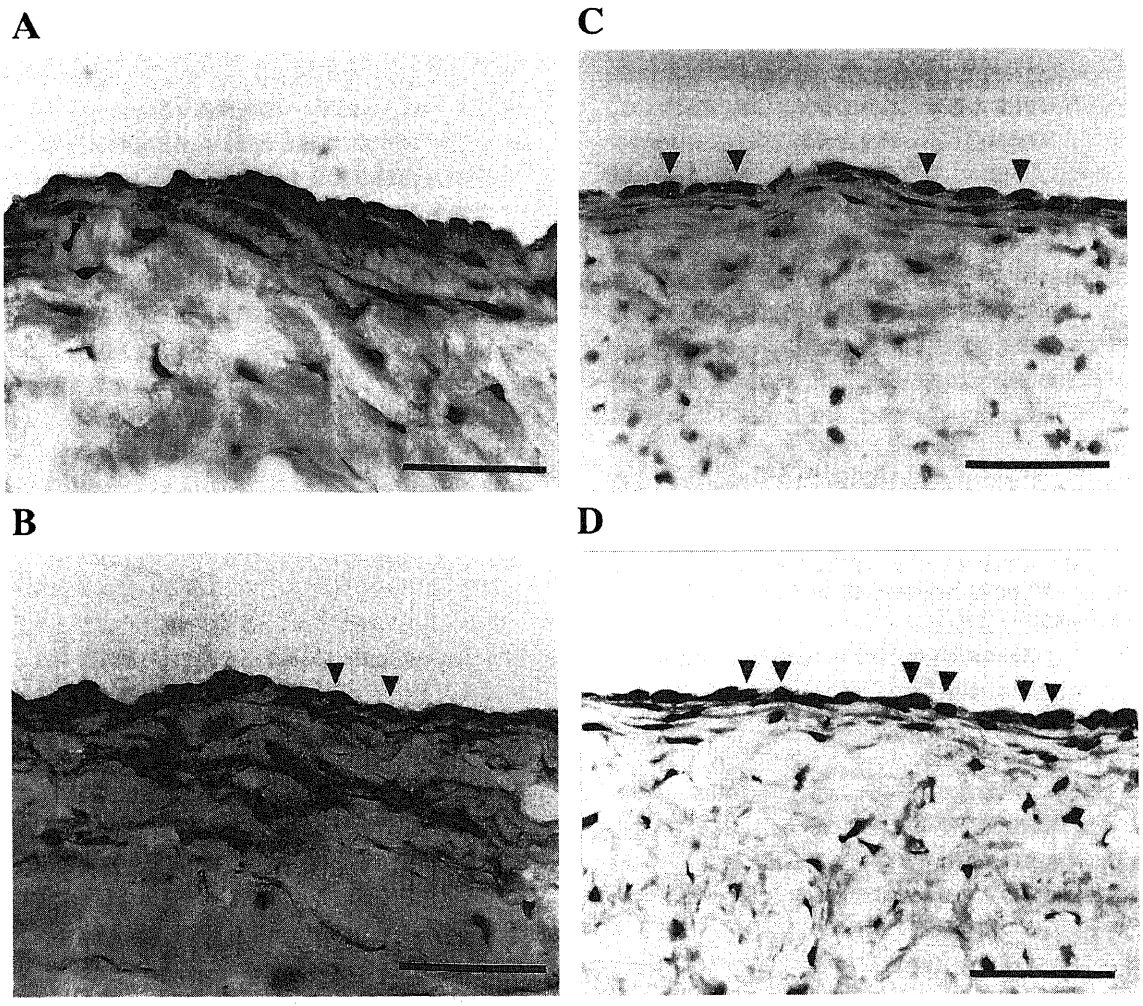

Fig. 5. Photomicrographs showing immunohistochemical staining for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in vein graft from rabbits that with either a standard or a high-cholesterol diet. Arrows indicate the VCAM-1 expression in vein graft endothelium. (A) After 1 week with the standard diet. ×400. (B) After 1 week with the high-cholesterol diet. ×400. (C) After 2 weeks with the high-cholesterol diet. ×400. (D) After 3 weeks with the high-cholesterol diet. ×400. Bars indicate 50 μm.

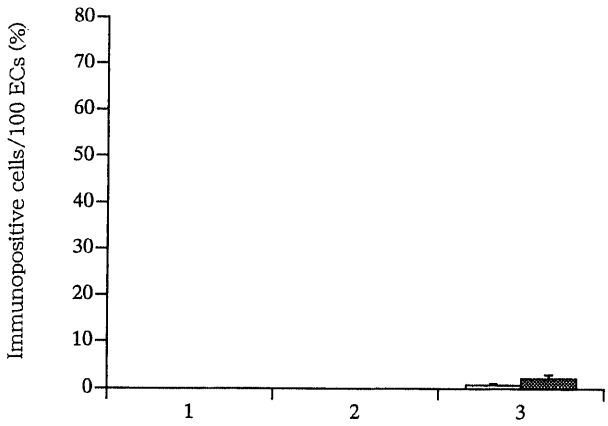

Fig. 6. Endothelial ICAM-1 expression rates in vein graft segments proximal and distal to the valves at 1, 2 and 3 weeks after bypass in rabbit with standard diet. ▨, proximal segments; ■, distal segments. ECs, endothelial cells.

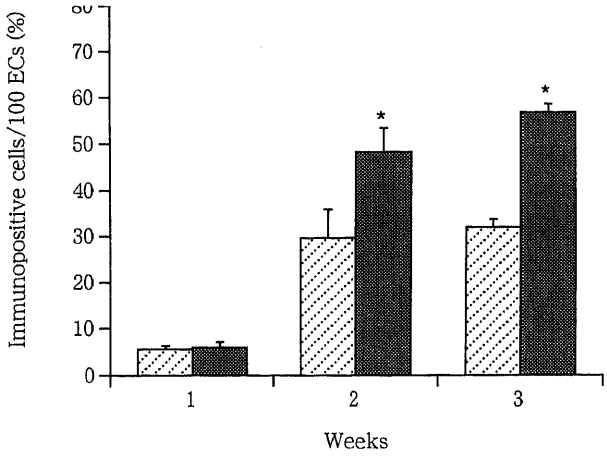

Fig. 7. Endothelial ICAM-1 expression rates in vein graft segments proximal and distal to the valves at 1, 2 and 3 weeks after bypass in rabbit with high-cholesterol diet. ▨, proximal segments; ■, distal segments. ECs, endothelial cells. * P<0.05 compared to proximal segments (Wilcoxon test).

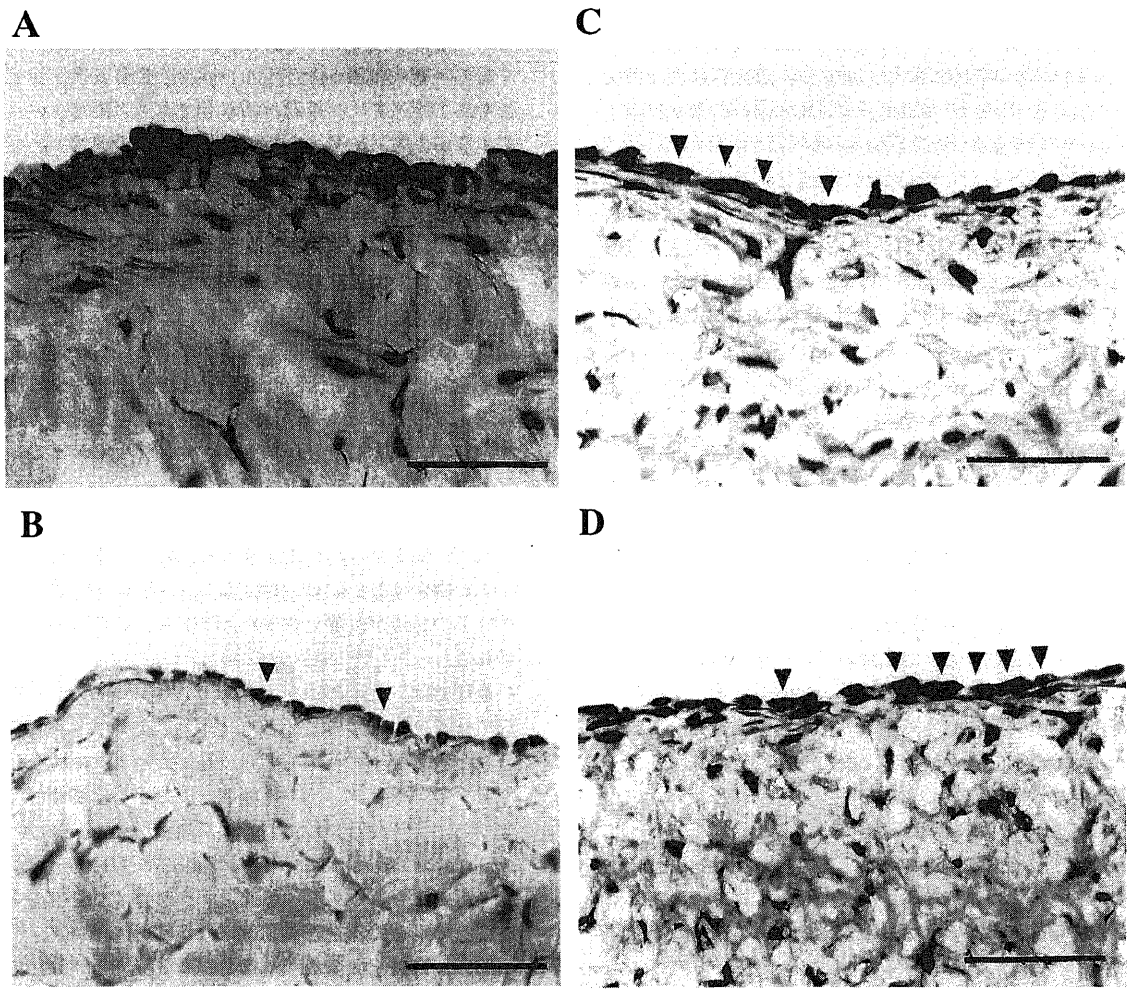

Fig. 8. Photomicrographs showing immunohistochemical staining for intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vein graft in rabbits that with either a standard or a high-cholesterol diet. Arrows indicate the ICAM-1 expression in vein graft endothelium. (A) After 1 week with the standard diet. ×400. (C) After 2 weeks with the high-cholesterol diet. ×400. (D) After 3 weeks with the high-cholesterol diet. ×400. Bars indicate 50 μm.

側，および弁末梢側に差がなかった．高コレステロール食群では1，2，3週間目でVCAM-1発現率が弁中枢側がそれぞれ5.6±1.3%, 21.7±3.6%, 44.2±5.7%，弁末梢側が11.6±1.5%, 30.1±3.7%, 60.0±11.5%であった (図4)．静脈弁の末梢側は中枢側に比べて有意にVCAM-1発現率が高度であった ($P<0.05$)．VCAM-1発現の一例を図5に示す．

2．ICAM-1の発現

通常食群では1，2週間目に認めず，3週間目のみICAM-1発現率が弁中枢側で0.8±0.5%，弁末梢側で2.1±0.8%であった (図6)．高コレステロール食群では弁中枢側，および弁末梢側ともにICAM-1の発現が1週間目で2または3個の細胞群として認められ，2および3週間目では数個の連続した細胞群として認められた．ICAM-1発現率は弁中枢側でそれぞれ5.4±0.8%, 29.4±6.5%, 31.6±2.1%であり，弁末梢側はそれぞれ5.9±0.9%, 48.0±5.3%, 56.6±1.9%であった (図7)．1週間目は弁中枢側と弁末梢側の発現に差はなかったが，2および3週間目では弁末梢側の方がICAM-1が高度に発現していた．ICAM-1発現の一例を図8に示す．

考　　察

動脈グラフトの長期開存性が確認された現在でも，依然として自家静脈グラフトは冠動脈バイパス術における重要なグラフト材料である．動脈グラフトには使用可能な動脈数の制限，血流供給能不足[15]等の問題があり，小口径人工血管は未だ開発段階である．静脈グラフトは自家組織である有利性及び採取長が制限されない特徴を有し，冠動脈バイパス術の大多数において使用されている．しかし静脈グラフトにおける最も重要な課題は動脈グラフトよりも低い遠隔期開存率である．静脈グラフトは動脈グラフトに比べて長期開存率が有意に低く[3]，冠動脈バイパス術後の遠隔成績を大きく左右している．このような静脈グラフトの開存性劣化の原因のひとつに動脈グラフトにない静脈固有の形態学的特性が関与する可能性がある．

静脈グラフト内の静脈弁がグラフト閉塞の一要因とする報告がある[16][17]．Bosherら[18]は生体内の実験動物において静脈弁が内膜増殖の進行に関与していることを明らかにした．Chauxら[19]は静脈グラフトの壁厚は時間とともに増加し，静脈弁の末梢側でより早く，高度に進行すると報告した．本研究でも静脈弁末梢部位での内膜肥厚が中枢部位より高度であり，静脈弁の存在が内膜肥厚に関与していることが示唆され，高コレステロール食を与えた場合に内膜肥厚がバイパス術後早期より起こっていることが確認された．冠動脈バイパス術に用いた静脈グラフトの静脈弁は術後1年でも機能し，長期間に渡って静脈グラフト内の血流動態に影響を与える[20]．とくに血管分岐部では乱流あるいは不規則な流れが生じるため粥状硬化の好発部位とされている．静脈弁の末梢でおこる壁圧の上昇，乱流の増加が粥状硬化の形成に大きく関与していること[21~23]が報告されている．本研究でも静脈弁の存在が血液の乱流を引き起こし，弁末梢部位の血管内皮にずり応力が生じたことにより内膜肥厚が発生したと推察され，静脈弁はグラフトの開存性に少なからず影響を及ぼすと考えられた．

1989年，Osbornら[24]は差異クローニング法 (differential cloning) を用いて，インターロイキン (interleukin, IL) －1，および腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) により活性化された内皮細胞よりcDNAライブラリーを作成し，ヒトリンパ腫細胞の接着を制御する分子としてVCAM-1をクローニングした．さらに，Riceら[25]は，$\alpha 4\beta 1$インテグリンVLA-4がVCAM-1のリガンドであることを明らかにした．一方，ICAM-1分子はLFA-1分子と結合する糖蛋白で，Igスーパーファミリーに属し[26]，血管内皮細胞，線維芽細胞，上皮細胞といった様々な非造血系細胞に発現して，IL-1、インターフェロン－γ (interferon-γ, INF-γ)，TNFなどにより強く制御されている．この分子は末梢血白血球でほとんど発現を認めないが，組織マクロファージやリンパ節濾胞中心のB細胞など活性化された細胞に強く発現する．

これらの接着分子は粥状硬化の初期段階で血管内皮細胞に発現し，単球，リンパ球が接着する．ICAM-1は通常の血管内皮細胞にも分布しているが，炎症部位や粥状硬化部位の血管内皮細胞ではその発現が増加する．一方，VCAM-1は正常な血管内皮細胞には認めないが，炎症部位や粥状硬化部位ではその発現を認める．これらの接着分子の発現増加により単球，Tリンパ球が接着した後，さらに単球ケモアトラクタントタンパク質－1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) や酸化低比重リポ蛋白 (low density lipoprotain, LDL) などの走化性因子の刺激により内膜下層に遊走する．内膜に浸潤した単球はマクロファージに分化し，スカベンジャー受容体を介して酸化変性したLDLを取り込み泡沫細胞化する[27][28]．マクロファージは血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor) やIL-1を産生し，平滑筋細胞の内膜への遊走や内膜での形質変換，増殖に関与している[29][30]．Tリンパ球は活性化された状態になり，INF-γ，IL-4を産生し，ICAM-1，VCAM-1の発現を誘導し，さらなる単球やリンパ球の内膜下層への浸潤を促進する．このように粥状硬化巣への単球／マクロファージ，リンパ球の集簇には多くの誘導因子のひとつとしてICAM-1，VCAM-1の接着分子が関与する可能性が考えられている．

その他に血清脂質も関与していることが示されている．LDLの酸化変性の過程で著明に増加したリン脂質リゾフォスファチデイルコリン (lysophosphatidylcholine) が培養血管内皮細胞に作用して，VCAM-1, ICAM-1の細胞表面での発現を選択的に増加させたことから，IL-1, TNFのようなサイトカインやエンドトキシンと明らかに異なる刺激であることが示された[31][32]．また酸化された脂肪酸がサイトカイン刺激によるVCAM-1の発現をさらに促進するとの報告もみられる[33]．本研究ではサイトカインの測定はしていないが，高コレステロール食のウサギで接着分子の発現が顕著であったことから，この機序の関与も示唆される．

最近では，血流に伴うずり応力 (shear stress) が内皮細胞を活性化させる刺激の一つと考えられている[34][35]．心臓から拍出された血液は運動エネルギーをもっているため，血管壁は拡張伸展や変形させようとする機械的な力を常に受けている．これは血行力学的応力とも呼ばれ，血流に起因する壁ずり応力 (wall shear stress) と血圧に基づく法線応力 (normal stress) がその主要なものである．最近，ずり応力は血管内皮細胞や平滑筋細胞の形態や機能を修飾することが明らかになってきた[36]．ヒトの粥状硬化病変はずり応力の高い部位よりも，むしろ低い部位に発生することが指摘された．また血流の停滞，剥離や乱流が生じることで，ずり応力の方向や強さが時間的・空間的に非定常であることが示された[22][37][38]．こうしたずり応力が引き起こす内皮細胞の機能変化は内皮下で起こる脂質や白血球の浸

潤，平滑筋細胞の増殖と関連することが示唆されている．静脈弁の末梢部位におけるずり応力の変化が本研究で認めた内膜肥厚に関与していると推察される．

今回粥状硬化を促進させるために高コレステロール血症モデルを作成したが，通常食群と比較して早期から高度に内膜肥厚が認められ，さらには接着分子の発現も促進されていた．このモデルで示された内膜肥厚の進行は高脂血症患者においても静脈グラフト開存率の劣化を引き起こすと考えられ，血清コレステロール値の上昇が静脈グラフト内膜過形成を促進することが示唆された．現在この問題の解決策として，高脂血症治療薬が静脈グラフトの長期開存率を高めることが示されている[39]．さらに，ウサギとヒトの種の違いはあるものの，静脈弁の存在は静脈グラフトの内膜肥厚の危険因子になることが示された．冠動脈バイパス術において，静脈グラフト内の弁数を減らすことが可能であり，この危険因子をひとつでも回避することで，静脈グラフトの長期開存成績の向上が期待できる．

結　　論

通常食または高コレステロール食を与えたウサギ42羽を用いて，バイパス術モデルを作成した．静脈グラフトの術後早期における病理免疫組織学的評価および接着分子の発現の検討をしたところ，以下の結論を得た．

1．静脈グラフトの血管壁肥厚を認めたが，高コレステロール食群の方が肥厚が高度に進行し，特に静脈弁末梢側のグラフト血管壁肥厚が顕著であった．高コレステロール食群の血管壁肥厚は主に平滑筋細胞から構成されており，通常食群と比較して粥状硬化病変へ進行しやすいことが推察された．

2．通常食群では全くVCAM-1の発現は認めず，ICAM-1の発現のみ3週間目で軽度に認め静脈弁の末梢側にて多く発現していた．高コレステロール食群では術後1週間目より静脈グラフトの内皮細胞にVCAM-1とICAM-1の発現を認め，3週間目までには高度な発現を示した．また静脈弁末梢側の方が弁中枢側よりも顕著なICAM-1の発現を示し，通常食群と比較しても高度であった．

以上の結果より，高コレステロール血症においては静脈グラフトの内膜肥厚とICAM-1やVCAM-1の発現は一致して静脈弁末梢側で発生しやすく高度であった．弁の少ない静脈グラフトの使用とコレステロール摂取量の制限はグラフト内膜肥厚の進行を遅延させ，静脈グラフトの長期開存成績を向上させる可能性がある．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，終始ご懇篤なる御指導，御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます．貴重なご指導頂きました川筋道雄助教授に深く御礼申し上げます．また統計学的処理に関して御指導を賜りました金沢大学衛生学講座谷井秀治助教授に心から感謝の意を表します．さらに実験の御指導，御教示を賜り，本研究にご協力いただきました外科学第一講座各位に深く感謝致します．また，病理標本作成に御協力頂いた田中洋子氏に深く感謝致します．

文　　献

1) Kalan JM, Robert WC. Morphologic findings in saphenous veins used as coronary arterial bypass conduits for longer than 1 year: necropsy analysis of 53 patients, 123 saphenous veins, and 1865 five-millimeter segments of veins. Am Heart J 119: 1164-1184, 1990

2) Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. Prog Cardiovasc Dis 34: 45-68, 1991

3) Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and future. J Am Coll Cardiol 17: 1081-1083, 1991

4) Grondin CM, Campeau L, Thornton JC. Coronary artery bypass grafting with saphenous vein. Circulation 79 (Suppl) : 124-129, 1989

5) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809, 1993

6) Hasson GK, Seifert PS. Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. Arterioscler Thromb 11: 745-750, 1991

7) Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. Am J Pathol 133: 426-433, 1988

8) Carlos T, Kovach N. Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial leucocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. Blood 77: 2266-2271, 1990

9) O'Brien KD, McDonald TO. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecular-1, and vascular cell adhesion molecular-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. Circulation 93: 672-682, 1996

10) Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecular during atherogenesis. Science 251: 788-791, 1991

11) Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science 251: 788-791, 1991

12) Whitney DG, Kahn EM, Estes JW. Valvular occlusion of the arterialized saphenous vein. Ann Surg 42: 879-887, 1976

13) Mills NL, Ochsner JL. Valvulotomy of valves in the saphenous vein graft before coronary artery bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 71: 87-89, 1976

14) Singh RN. Flow disturbance due to venous valves: a cause of graft failure. Cathet Cardiovasc Diagn 12: 35-48, 1986

15) Kawasuji M, Tedoriya T, Takemura H, Sakakibara N. Flow capacities of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg 56: 957-62, 1993

16) Mills NL. Saphenous vein graft valves:" the bed guys." Ann Thorac Surg 48: 613-614, 1989

17) Mills JL, Fujitani RM. The characteristics and anatomic distribution of lesions that cause reversed vein graft failure: a five-year prospective study. J Vasc Surg 17: 195-206, 1993

18) Bosher LP, Deck JD. Role of the venous valve in late segmental occlusion of vein grafts. J Surg Res 26: 437-446, 1979

19) Chaux A, Ruan XM. Influence of vein valves in the development of arteriosclerosis in venoarterial grafts in the rabbit. J Thorac Cardiovasc Surg 110: 1381-1390, 1995

20) Phillips SJ, Okies JR, Starr A. Improvement in forward coronary blood flow by using a reversed saphenous vein with a competent valve. Ann Thorac Surg 21:12-15, 1976

21) Walsh DB. Valvular obstruction of blood flow through saphenous veins. J Surg Res 42: 39-42, 1987
22) Thubrikar MJ, Robicsek F. Pressure trap created by vein valve closure and its role in graft stenosis. J Thorac Cardiovasc Surg 107:707-16, 1994
23) Davies PF, Remuzzi A. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. Proc Natl Acad Sci. 83: 2114-7, 1986
24) Osborn L, Hession C, Tizard R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell 59:1203-1211, 1989
25) Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/18-independent adhesion. J Exp Med 171 : 1369-1377, 1994
26) Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK. Induction by IL-1 and interferon-γ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J Immunol 137: 245-264, 1986
27) Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ. Lipoprotein oxdation and lipoprotein-induced cytotoxicity. Arteriosclerosis 3: 215-222, 1983
28) Catchart MK, Morel DW, Chisolm GM. Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic. J Leukoc Biol 38: 341-358, 1985
29) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. Science 362: 801-809, 1993
30) Valante AJ, Rozek MM, Sprague EA. Mechanismsin intimal monocyte-macrophage recruitment: A special role for monocyte chemotactic protein-1. Circulation 86: 20-25, 1992
31) Piotrowski JJ, Hunter GC, Eskelson CD. Lipid peroxidation: A possible factor in late graft failure of coronary artery bypass grafts. J Vasc Surg 13: 652-657, 1991
32) Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells.
J Clin Invest 90: 1138-1144, 1992
33) Ochi H, Kume N, Nishi E, Kita T. Elevated levels of cAMP inhibit protein kinase C independent mechanisms of endothelial platelet-derived growth factor-B chain and intercellular adhesion molecule-1 gene induction by lysophosphatidylcholine. Circ Res 77: 530-535, 1995
34) Tsuboi H, Ando J, Korenaga R. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 206: 988-996, 1995
35) Ando J, Tsubio H, Korenaga R. shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by down regulation VCAM-1 expression. Am J Physiol 267: C679-C687, 1994
36) Ando J, Kamiya A. Blood flow and vascular endothelial cell function. Front Med Biol Eng 5: 245-264, 1993
37) Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell: an endothelial paradigm. Circ Res 72: 239-245, 1993
38) 東 健彦，福島孝義．動脈硬化症研究の進歩，第4版，3-22頁，医歯薬出版，東京，1983
39) Blankenhorn DH, Nessim SA. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. J Am Med Assoc 257: 3233-3241, 1987

Effects of Vein Valves on Vein Graft Intimal Thickening Related to Endothelial Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in Rabbits Fed with Standard and High-Cholesterol Diets Chen ZhiQun, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 166 — 175 (1999)

Key words vein valves, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, intimal hyperplasia, atherosclerosis

Abstract

Late graft failure in coronary artery bypass grafting with a saphenous vein has been attributed to a combination of both intimal hyperplasia and atherosclerosis. Thus, saphenous vein grafts in humans have a markedly limited long-term patency rate compared to that of internal thoracic artery grafts. The presence of vein valves has been suspected to be a factor that influences the formation of atheromatous lesions. The expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) suggests that these molecules may play a role in the formation of atherosclerotic vessels. However, the factors responsible for the susceptibility are not completely understood. To test the hypothesis that vein valves may influence this process, we studied 42 rabbits with jugular vein grafts interposed into the carotid arterial circulation. We investigated the wall thickness and the endothelial expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the vein graft during the early phases of diet-induced atherogenesis in rabbits in vivo. Rabbits were fed either a standard diet or a high-cholesterol diet (containing 2% cholesterol) after surgery. Both groups were further divided in to three subgroups of seven rabbits that were sacrificed 1, 2, and 3 weeks after the operation. At postmortem examination, two 3 mm-segments, proximal

and distal to the vein valve, were harvested from each graft for histologic and immunohistochemical studies. They were stained by the ABC immunoperoxidase method using monoclonal antibodies against the VCAM-1 and ICAM-1. The wall thickness distal to the valve of vein grafts increased with time from 15.7 ± 4.1 μm to 27.8 ± 4.8 μm with a standard diet and from 22.8 ± 2.1 μm to 190.2 ± 14 μm with a high-choresterol diet. They also developed more severely in the segments distal to the valve than in the segments proximal to the valve ($p<0.05$) within 3 weeks with a high-cholesterol diet. VCAM-1 expression with a standard diet was consistently absent, although the expression rate was 12 % after 1 week with a high-cholesterol diet and this increased to 60% after 3 weeks. ICAM-1 expression at 1 and 2 weeks was absent with a standard diet, although weak ICAM-1 expression of 2% appeared at 3 weeks. On the other hand, ICAM-1 expression was increased to 6% after 1 week and increased to 57% after 3 weeks with a high-cholesterol diet. Both VCAM-1 and ICAM-1 expressions were significantly higher in the segments distal to the valve than in the segments proximal to the valve ($p<0.05$). Our findings confirmed that wall thickness of vein grafts developed more severely in segments distal to the valve than in segments proximal to the valve ($p<0.05$), especially with a high-cholesterol diet. In addition, the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the endothelium of vein grafts was significantly higher in the segments distal to the valve than in the segments proximal to the valve. In conclusion, intimal hyperplasia of the vein graft was inclined to occur at the segment distal to the valve, especially with high-cholesterol diet. In order to improve the vein graft patency, elimination of the valve in the vein graft and control of hypercholesterolemia are important.