

ると、発症リスクが35倍まで跳ね上がる結果を示した。その1つひとつの程度は軽くても、その重なりが重要であることを示すものであった。したがって、日常診療上、高コレステロール血症は目につきその改善を考えるのは当然であるが、程度の軽い高血圧・高血糖・軽い肥満・高中性脂肪血症は見逃しがちである。WHOは、21世紀の初頭に新たなグローバルな世界に向けての健康政策を打ち出した。世界中の人々の死因の30%が心血管イベントであるとし、それをターゲットにした心血管イベントの予防を訴えたものである。つまり、生活習慣を是正（過栄養・運動不足）、すなわちメタボリックシンドローム引いては粥状動脈硬化の予防の重要性を強調するものである。

粥状動脈硬化の発症メカニズムは、すでにコレステロール、LDLを中心にその分子メカニズムが解明されつつあり、その基盤は炎症性血球細胞である単球・マクロファージ、リンパ球と血管構成細胞との反応、そこに介在する炎症性サイトカインとの刺激・応答の繰り返しと理解されている。そのトリガーの1つと考えられているのが、LDLであり、中でもLDLの酸化変性を受けた酸化LDLが本体であることはすでによく知られた事実である。さらに、高血圧など物理的刺激による血管構成細胞の刺激応答、血圧上昇に関与するアンジオテンシンⅡなどの液性因子による血管構成細胞の刺激応答、高血糖と血管構成細胞の刺激応答、インスリン抵抗性の影響についても粥状動脈硬化の発症メカニズムとしてそれぞれの研究が進められている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪がその上流に存在することはすでに述べたが、高血圧、高血糖・耐糖能異常、脂質代謝異常の合併は必ずしもすべての症例で一致して認められるものではない。すなわち、下流にジェネティックバリエーションがあり、表現形が異なっ

てくると考えられている。また冒頭で、メタボリックシンドロームは、脂肪細胞の機能異常が影響を与えると述べたが、脂肪細胞は種々のアディポサイトカインを分泌しており、血管構成細胞との反応が、血管病変を修飾している可能性が高く、メカニズムが解明されれば、その直接作用の是正も今後診療に取り入れられるであろう。したがって、メタボリックシンドローム、およびそれにより惹起される粥状動脈硬化の診療の基本は、生活習慣の是正が必須の条件であり、それで改善が十分でない場合には、個々の危険因子の是正を考える順番になる。近年、糖尿病の増加が著しく注目されているが、その内情は従来型の糖尿病が一挙に増加したのではなく、過栄養・運動不足による内臓脂肪の蓄積によりもたらされたメタボリックシンドロームの表現形としての糖尿病であり、その対応についても内臓脂肪のチェックが極めて重要であり、その是正が治療効果に及ぼす影響を考慮しながら日常臨床に取り組みなければならない。

現在までに解明された、粥状動脈硬化のメカニズムは、前述したように、低比重リポ蛋白(LDL)の受け皿であるLDL受容体の遺伝子異常によりもたらされる家族性高コレステロール血症(FH)が、高LDL-コレステロール血症と早発性粥状動脈硬化に基づく心筋梗塞症を引き起こすことから、その関係が明らかにされてきた。すなわち、酸化LDLと血管構成細胞との反応すなわち、接着分子・増殖因子の発現誘導、スカベンジャー受容体を介した泡沫細胞形成、種々の炎症性サイトカインの発現誘導や、単球・マクロファージ、リンパ球など炎症性血球細胞と血管構成細胞との反応、平滑筋細胞の増殖のメカニズムなど次々に解明されてきている。このような粥状動脈硬化病変の進展を基盤にして血管内腔狭窄が惹起され、心血管イベントの発症へと繋がるが、近年不安定ブ

ラークの破綻とそれに伴う血栓形成が直接的に心血管イベントに関わり、急性冠症候群と呼ばれるようになってきた。このように、LDL-コレステロールの蓄積、つまり量的問題はたしかであるが、最近、レムナントリポ蛋白, small denseLDL, 酸化LDLといったリポ蛋白の質的問題がクローズアップされている。レムナントリポ蛋白, small denseLDL, 酸化LDLといったリポ蛋白が不安定プラーク形成にも大きく関与しているというデータが蓄積されつつある。メタボリックシンドロームは基本的にインスリン抵抗性を伴うが、その結果リポ蛋白リパーゼの活性化が起こりにくく、レムナントリポ蛋白, small denseLDL, などが生じてくる。つまり、メタボリックシンドロームでは、リポ蛋白の質的变化が促進されやすくなることが次第に明らかにされてきた。高LDL-コレ

ステロール血症がもたらす、早発性動脈硬化の分子機序を基盤に、今後、メタボリックシンドロームによりもたらされる脂質代謝異常が如何なるメカニズムで粥状動脈硬化を引き起こすかが明らかにされるであろう。無論、高血圧・インスリン抵抗性・耐糖能異常がもたらす影響についても、それぞれの分野で研究されてきている成果の見直し、内臓脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの血管への直接作用を含めた、メタボリックシンドロームにおける、血管病変の発症・進展のメカニズムが解明されることを期待したい。メタボリックシンドロームのような common disease の解明は、WHO が示した 21 世紀の大きな命題である粥状動脈硬化性疾患の予防・診療には欠かせない研究課題であり、多くの若手研究者の努力に期待したい。

高脂血症治療薬

北 徹

薬剤の概説

高脂血症は、高血圧、糖尿病、喫煙などと並んで動脈硬化性疾患の重要な危険因子の1つである。その治療方針には、冠動脈疾患を合併しない場合の一次予防と、冠動脈疾患の既往がある場合の二次予防という2つの側面がある。日本動脈硬化学会が作成した動脈硬化性疾患診療ガイドライン2002年版では、一次予防、二次予防のいずれの場合でも、ライフスタイルの改善は基本的な位置づけとなるが、薬物療法はその上に到達目標を置いた積極的な治療が必要となる際に考慮すべきものであると治療方針を規定している。

二次予防にてスタチンによりLDL-コレステロールを積極的に下げることによって再発予防が可能なことは多くの大規模臨床試験が既に示している通りである。スタチンによる一・二次予防については表1に示す通りである。また、フィbrate系の薬剤効果についても予防効果が証明されている。

以下に各高脂血症薬の特徴と薬剤の選択基準について概説する。動脈硬化性疾患診療ガイドラインの薬効による分類を示す(表2)。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン)

スタチンはその作用機序が明確で、コレステロール合成の律速段階であるHMG-CoA還元酵素の基質特異的阻害薬であり、肝臓でのLDL受容体の誘導を起し、結果として血中LDL-コレステロール(LDL-C)の低下をも

たらず、家族性高コレステロール血症患者での効果が証明されて以来、現在最もLDL-Cを効果的に低下させる薬剤として用いられている。また、冠動脈性疾患の一次・二次予防にスタチンの効果が証明されている。一次予防試験では、WOSCOPS、AFCAPS/TexCAPSが代表的である。冠動脈イベントの発生が31-37%抑制されている。二次予防試験には、4S、CARE、LIPIDなどがある。冠動脈イベントの再発が24-34%抑制された。総じて、LDL-Cの低下効果は20-40%である。IDL、VLDLレムナントの低下効果、さらに肝臓でのコレステロール合成低下によるVLDLの合成分泌の抑制効果は、血清中性脂肪の低下をもたらず、その効果は10-20%である。最近ではスタチンの抗動脈硬化作用としてのpleiotropic作用が注目されている。

副作用は一般的な肝障害のほか、特に高齢者および腎機能障害者でCKの上昇や筋脱力などミオパチー様症状、横紋筋融解症が稀ながら報告されている。フィbrate系薬剤、ニコチン酸誘導体、シクロスポリン、エリスロマイシンなどの併用で、このリスクが増大するので要注意である。稀ではあるが、定期的問診による筋肉痛・筋肉のだるさなどと血液検査としてCKのチェックが必要である。

陰イオン交換樹脂(レジン)

コレステラミンは、基本的には陰イオン交換樹脂で、陰イオン交換樹脂の構造中のCl⁻が消化管内で胆汁酸と置き換わり、樹脂に胆汁酸が吸着し糞便中に排泄されるため、胆汁

V
循環器薬の使い方

S 283

表1 代表的な薬物治療介入試験の一覧

1次予防試験

試験名	介入薬剤	対象数 (治療/対照)	年齢 (歳)	期間 (年)	TC 低下率	主要 CHD イベント	CHD 死	全死	発表 年
WOSCOPS	Prava	3,302/3,293	45-64	4.9	-20%	-31%	-33%	-22%	1995
AFCAPS/TexCAPS	Lova	3,304/3,301	45-73	5.2	-18%	-37%	ns	ns	1998

2次予防試験

試験名	介入薬剤	対象数 (治療/対照)	年齢 (歳)	期間 (年)	TC 低下率	主要 CHD イベント	CHD 死	全死	発表 年
4S	Simva	2,221/2,223	35-70	5.4	-25%	-35%	-42%	-30%	1994
CARE	Prava	2,081/2,078	21-75	5	-20%	-25%	-24%	ns	1996
LIPID	Prava	4,512/4,502	31-75	6.1	-18%	-24%	-24%	-22%	1998
VA-HIT	Gemf	1,264/1,267	平均 64	5.1	-4%	-21%	ns	ns	1999
BIP	Bezaf	1,548/1,542	45-74	6.25	-4.5%	-39.5%*	ns	ns	2000

Prava: pravastatin, Lova: lovastatin, Simva: Simvastatin, Gemf: gemfibrozil, Bezaf: bezafibrate

ns: not significant CHD: 冠動脈疾患 *治療前の TG 値 ≥ 200 mg/dl の対象に限った場合

(日本動脈硬化学会 動脈硬化診療・疫学委員会編: 動脈硬化性疾患診療ガイドライン, 2002年版; 27, 表 11. より一部改変)

表2 高脂血症治療薬の薬効による分類

LDL コレス テロール低 下薬	HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン) 陰イオン交換樹脂(レジン) フィブラート系薬 ニコチン酸誘導体 プロブコール
トリグリセ リド低下薬	フィブラート系薬 ニコチン酸誘導体 イコサペント酸エチル
HDL コレス テロールを 上げる薬剤	フィブラート系薬 ニコチン酸誘導体 HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)

(日本動脈硬化学会 動脈硬化診療・疫学委員会編: 動脈硬化性疾患診療ガイドライン, 2002年版; 28, 表 12. より)

酸の腸肝循環が阻害される結果, 7 α -hydroxylase 活性が亢進し, 生体にとって必須の胆汁酸の合成が高まった結果, 肝内のコレステロール需要が高まる. 需要に応えるため, LDL-C を利用すべく, LDL 受容体の肝臓での合成を惹起し血中 LDL 値が低下するのが作用機序である. 同時に肝臓での HMG-CoA 還元酵素誘導を惹起するのでスタチンの併用は合理的である. 高脂血症治療薬として初めて冠動脈疾患の発症率を低下させることが大規模介入試験で証明された薬剤である. 大量粉末製剤でありコンプライアンスの問題

がつき回る. コレスチミドは日本で開発され, 錠剤もありコンプライアンスの向上が期待されている. これらレジンは軽度から重度まで適応があり, LDL-C の低下, HDL-C の上昇効果が確実に期待でき, 体内で吸収されないため安全性が高い.

副作用は, 腹部膨満, 便秘といった消化器症状が主である. 陰イオン交換樹脂はジギタリス, ワルファリン, サイアザイド系製剤, スタチンなどとの併用時における併用薬剤の吸着阻害が指摘されている.

プロブコール

本剤の LDL-C 低下効果は 15-20% で, 抗酸化作用を有する. 著者らは LDL の酸化が動脈硬化発症機序に重要な役割を演じていることを証明した. つまり, 家族性高コレステロール血症モデル WHHL ウサギを用いて, プロブコールの LDL に対する抗酸化作用を介した抗動脈硬化作用を証明した. また PCI 後の再狭窄を有意に抑制することが見出された. 最近, カナダでプロブコール類似の薬剤開発がなされその効果が発表されている.

ニコチン酸製剤

本剤の主要薬効は、末梢脂肪組織からの脂肪酸の動員抑制とともに、リポタンパクリパーゼの活性亢進作用によりVLDLの異化促進を促し、胆汁酸の排泄促進作用を有する。高中性脂肪血症、高コレステロール血症に有効である。またHDL-Cを上昇させる。ニコチン酸単剤投薬(3g/日)で血清中性脂肪値が26%低下する。15年間にわたる米国のCoronary Drug Projectの調査で、1975年臨床試験で冠動脈疾患の予防効果が証明されている。日本におけるニコチン酸誘導体の1日使用量は上限が1.5gであり、その効果が十分には期待できない可能性が指摘されている。またLp(a)の低下作用がある。

副作用の主たるものは、末梢血管拡張によるフラッシングである。また肝機能障害のある患者・消化性潰瘍の患者では慎重な投与が必要で、フラッシングには投薬量の漸増やアスピリンの併用などで症状を減少できる。

フィブレート系薬剤

血清中性脂肪低下に最も有効な薬剤である。主要な作用機序はVLDLの合成分泌抑制作用、末梢組織におけるリポタンパクリパーゼの活性促進によりVLDLの代謝促進作用、さらに胆汁中へのコレステロール排泄促進作用などがある。フィブレート系薬剤の作用の一部にはPPAR- α を介したものがあげられる。VLDL、レムナントの異化促進効果によりⅢ型、Ⅳ型、Ⅴ型に有効である。HDL-C上昇効果も強い。ベザフィブレートは30-40%の血清中性脂肪低下と総コレステロールを10%低下させる作用がある。Helsinki Heart Studyで冠動脈硬化疾患の一次予防が証明されている。フィブレートをを用いた二次予防試

験では、血清中性脂肪の低下が著明であり、冠動脈狭窄の進展抑制効果や冠動脈死、イベント抑制が証明されている。レムナント低下作用、HDL-C上昇作用の効果によると推定されている。ベザフィブレート、フェノフィブレートとも同等の効果が期待されるが、特徴はその半減期が長いことである。

主たる副作用は、腎機能障害患者に使用すると横紋筋融解症を引き起こしやすく、HMG-CoA還元酵素阻害薬との併用でその発現頻度が高まる。腎機能とCKの定期的検査を要する。アルブミンと結合するほかの製剤の作用を増強する。中でもワルファリンとの併用は、その抗凝固作用が強く発現するので注意を要する。

イコサペント酸エチル(EPA製剤)

高脂血症患者のコレステロール・中性脂肪値の有意な低下作用。コレステロール・中性脂肪の腸管吸収抑制効果、リポタンパクリパーゼの活性化によるリポタンパク代謝の活性化、肝臓でのコレステロール・中性脂肪の生合成活性の抑制による、VLDL合成の抑制効果などが、ラットの実験から示されている。抗血小板作用として血小板凝集能の抑制作用がある。

併用療法

単剤で目標に達しないケースには、単剤の増量あるいは作用機序の異なる薬剤の併用が考えられる。殊に二次予防においては単剤ではLDL-Cの目標値100mg/dlに達しないケースが出てくる。むろん副作用に注意しながらの低下療法になるが、日本ではスタチンとレジン、スタチンとフィブレート、スタチンとニコチン酸誘導体、スタチンとプロブコー

表3 日本で臨床使用可能な高脂血症治療薬

一般名	商品名	剤型・容量	用法・用量
HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)			
プラバスタチン	メバロチン	錠 5, 10 mg, 細粒 0.5, 1%	1日 10 mg, 分 1-2(1日 20 mg まで増量可)
シンバスタチン	リポバス	錠 5, 10, 20 mg	1日 1回 5 mg(LDL-コレステロール値の低下が不十分の場合: 1日 20 mg まで増量可)
フルバスタチン	ローコール	錠 10, 20, 30 mg	1日 1回 20-30 mg 夕食後(1日 60 mg まで増量可)
アトルバスタチン	リピトール	錠 5, 10 mg	1日 1回 10 mg(高コレステロール血症の場合: 1日 20 mg まで増量可, 家族性高コレステロール血症の場合: 1日 40 mg まで増量可)
陰イオン交換樹脂(レジン)			
コレステミド	コレバイン	顆粒 70%, ミニ粒 83% 錠 500 mg	1日 3 g, 分 2 朝・夕食後
コレステラミン	クエストラン	散 9 g 中無水物として 4 g	1回 9 g(無水物として 4 g)を 100 ml の水に混濁し, 1日 2-3回
プロブコール			
プロブコール	シレンスタール, ロレルコ	錠 250 mg, 細粒 50%	1日 500 mg, 分 2回
ニコチン酸製剤			
ニコモール	コレキサミン	錠 200 mg	1日 600-1,200 mg, 分 3
ニセリトロール	ベリシット	錠 125, 250 mg	1日 750 mg, 分 3
ニコチン酸トコフェロール	ユベラ N	ソフトカプセル 200 mg 細粒 40%	1日 300-600 mg, 分 3
	ユベラニコチネート	カプセル 100 mg	
フィブラート系薬剤			
クロフィブラート	ヒポセロール	カプセル 250, 500 mg	1日 750-1,500 mg, 分 2-3
クロフィブラートアルミニウム	アルフィブレート	細粒 50% カプセル 250 mg	1日 1,500 mg, 分 3
クリノフィブラート	リボクリン	錠 200 mg 細粒 40%	1日 600 mg, 分 3
ベザフィブラート	ベザトール SR, ベザリップ	錠 100, 200 mg(徐放)	1日 400 mg, 分 2(朝・夕)
フェノフィブラート	リバンチル	カプセル 100, 150 mg	1日 1回 200-300 mg 1日 300 mg まで
イコサペント酸エチル			
イコサペント酸エチル	エパデール	カプセル 300 mg S 300, 600, 900 mg	1日 1,800 mg, 分 3 食後(1回 900 mg まで増量可)

ル, プロブコールとニコチン酸誘導体の併用で有効性が公表されている。スタチンとフィブラートの併用で稀に横紋筋融解症を来した

報告があるが, そのうち半数以上が腎機能障害を伴っていた。くれぐれも, 腎機能のチェック, CK のチェックが必要である。

3. 動脈硬化の成り立ち

北 徹¹⁾

〔KEYWORDS〕 酸化 LDL, スカベンジャー受容体, マクロファージ, LOX-1

■ 粥状動脈硬化の初期病変

■ はじめに

生活習慣の欧米化に伴い、動物性脂肪を中心としたエネルギー摂取過多・運動不足に因るエネルギー消費不足により惹起される内臓脂肪蓄積を上流としたメタボリック症候群(高血圧, 耐糖能異常, 高脂血症, インスリン抵抗性などを主症状とする)が増加の一途をたどり, ひいては粥状動脈硬化を引き起こすことが明らかにされ, 臨床上解決すべき大きな命題となってきた。

一方, 粥状動脈硬化研究成果は, ウサギ, イヌ, ブタ, サルなどに高コレステロール食を与えることにより病理学的にコレステロールと粥状動脈硬化の関係を明らかにされ, ヒトにおいても, 低比重リポ蛋白(LDL)の受け皿である LDL 受容体の遺伝子異常によりもたらされる家族性高コレステロール血症(FH)が, 高 LDL-コレステロール血症と早発性粥状動脈硬化に基づく心筋梗塞症を引き起こすことから, その関係がヒトでも明らかにされてきた。高 LDL-コレステロール血症がもたらす, 早発性動脈硬化の機序を基礎に, 今後, メタボリック症候群がいかなるメカニズムで粥状動脈硬化を引き起こすかが明らかにされるであろう。

1979 年 Gerrity らは, ブタにコレステロール食を与え続けることにより, 粥状動脈硬化病変の成り立ちについて位相差電子顕微鏡を用いた観察を行った¹⁾。まず, 肉眼的に, 粥状動脈硬化には, 好発部位があり, そこに単球の接着が起こることを見いだした。単球は, 血管内皮細胞に発現した接着分子を介して, 血管内皮細胞に接着し²⁻⁵⁾, 血管内皮細胞と反応しながら, MCP-1 の濃度勾配を, その受容体 CXCR2 が感知しながら, 血管内膜に遊走し, そこで M-CSF と単球に存在する受容体 *c-fms* の働きによりマクロファージ(Mφ)に分化することが明らかにされてきた⁶⁾。Mφは, さらに酸化 LDL を取り込み泡沫化し, 泡沫細胞になり, その集簇が, いわゆる脂肪線条(fatty streak)である(図 1)。さらに, マクロファージの集簇に続いて T リンパ球が集簇することが明らかにされ, この事実は, 炎症細胞と血管構成細胞とサイトカインを交えた炎症反応が粥状動脈硬化の発症, 進展にかかわっていることを強く示唆するところとなった⁷⁾。すでに炎症性サイトカインによる血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, Mφの活性化が示されており今後この方面からの研究が発展すると思われる。

さて, 心筋梗塞(MI)は, 冠動脈硬化による管腔の狭窄によると考えられていたが, MI 患者の約 60%の人は, 狭窄が 50%あるいはそれ以下であることが明らかにされた(図 2)。つまり, MI の発症は, 泡沫細胞に富んだ粥腫の破裂による血

1) KITA Toru 京都大学大学院医学研究科 内科系内科学講座循環器内科学・教授

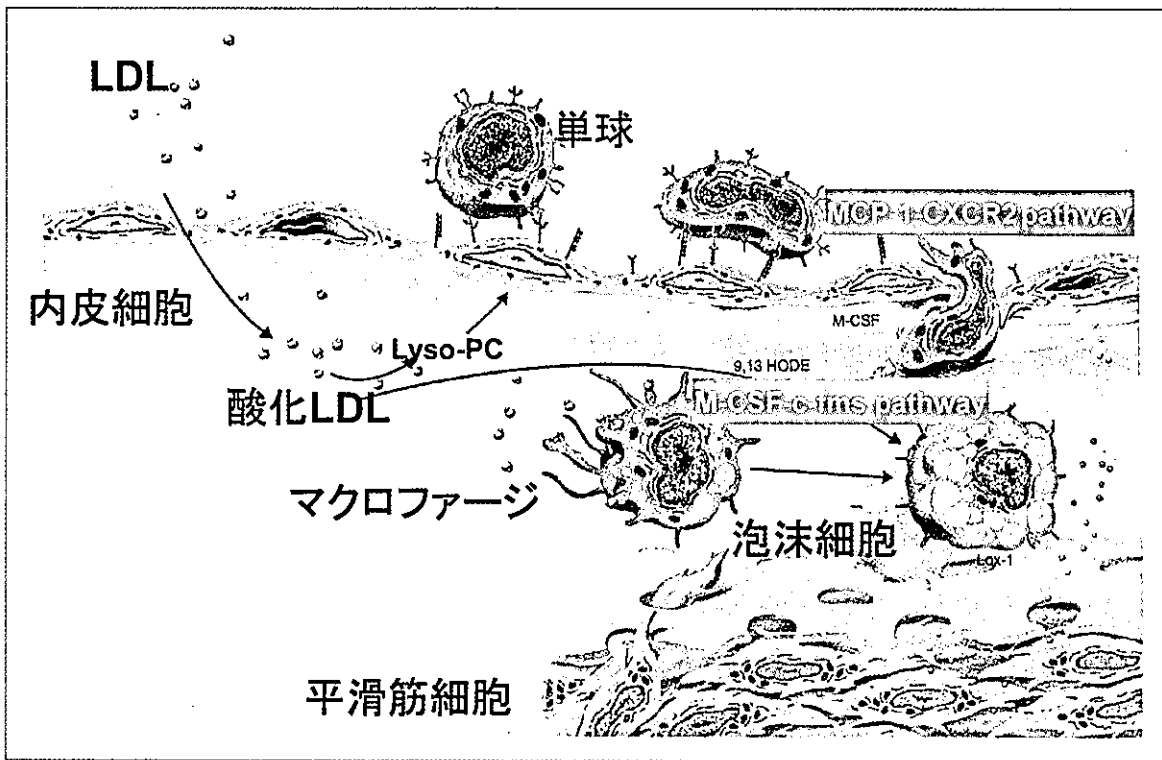


図1 血管内皮下の単球・マクロファージ・泡沫細胞化への過程

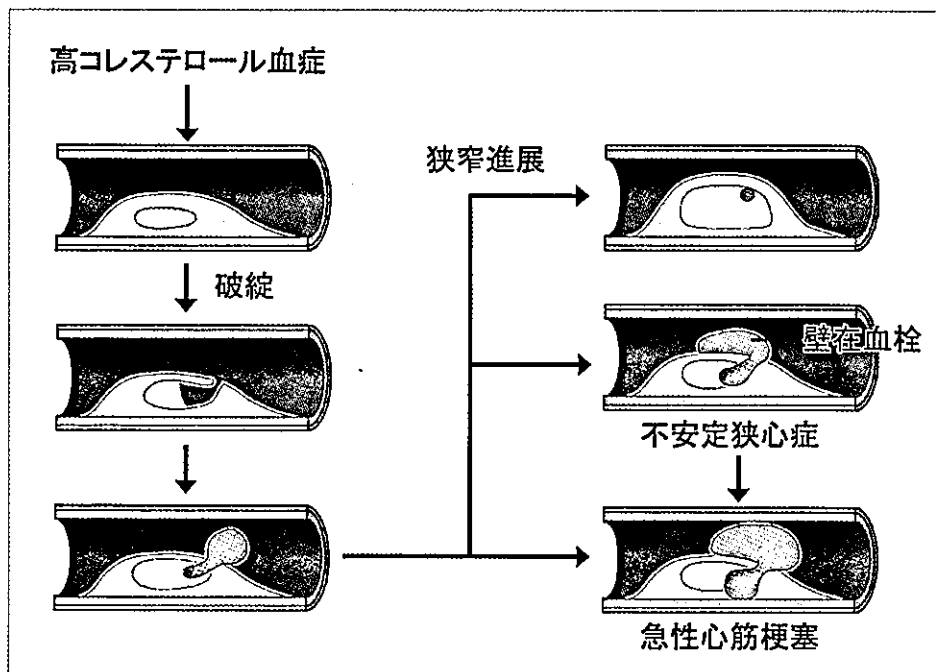


図2 粥腫の破綻・急性冠症候群の成り立ち
〔文献19〕から一部改変して引用

栓形成による血流遮断が直接の原因である。泡沫細胞はメタロプロテアーゼを大量に分泌し、その結果線維性肥厚を破壊することになる。またティッシュファクター(TF)を分泌し血栓形成を促す。したがって、その予防には炎症反応の抑制、

また泡沫細胞の原因である LDL の低下、あるいは後述する酸化 LDL の産生抑制が重要な治療法となる。

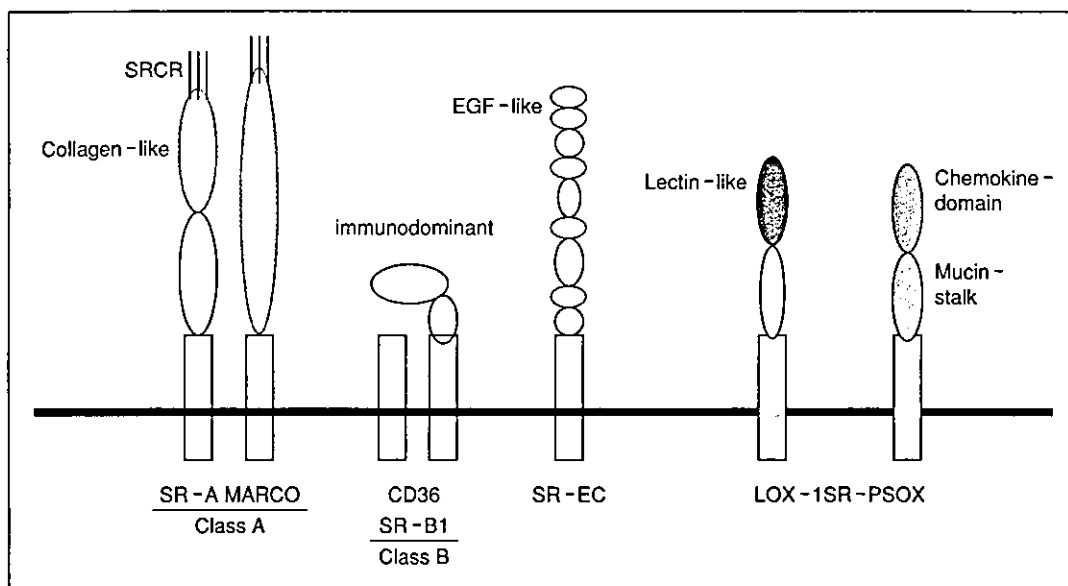


図3 酸化 LDL 受容体群

マクロファージの泡沫化

マクロファージは、LDLを取り込む LDL 受容体を発現していないにもかかわらず、胞体内には、LDL 由来のコレステルエステルを大量に取り込み泡沫化することが *in vivo*, *in vitro* の研究結果証明されてきた。この謎を解決したのが、Goldstein, Brownであり、Mφの性質を利用したものであった。つまり Mφは、陰性に帯電した物質を取り込む性質があることから、LDLを無水酢酸で処理し、LDLを全体として陰性帯電させたところ (acetyl LDL: 変性 LDL) Mφは、これを受容体を介して取り込み泡沫化することを明らかにし、スカベンジャー受容体と名づけた⁹⁾。しかしながら生体内には、acetyl LDLは存在せず、真の変性 LDLの存在が問われるところとなった。現在では、活性酸素などで脂質過酸化を受けた LDLつまり酸化 LDLが *in vivo* で存在する変性 LDLであることが証明されるに至った。どのような機構で、LDLが酸化を受けるのか詳細は不明であるが、*in vitro* の成果を考えると、血管壁で、単球、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などで作られた活性酸素が、LDLの脂質過酸化を引き起こすのではないかと考えられているが、その過程が *in vivo* で証明されたわ

けではない。また抗酸化剤であるプロブコールを FH モデル WHHL ウサギに投薬し続けたところ、粥状動脈硬化の進展をほぼ完全に抑制できたことから、間接的ではあるが、酸化 LDL の証明ができた⁹⁾。また、酸化 LDL のモノクローナル抗体で、病変部位に酸化 LDL の存在証明を行っているので、存在そのものは、疑う余地がないといえよう。Mφは、この酸化 LDL を少なくとも 6 種類のスカベンジャー受容体を介して取り込み泡沫化を起こしていることが知られている (図 3)^{10,11)}。Sawamura, Kume らは血管内皮細胞に酸化 LDL に対して特異的に結合する受容体 LOX-1 を見いだした¹²⁾。LOX-1, マクロファージにも存在するが、いずれの場合も炎症性サイトカイン TNF- α などにより誘導される。また血管内皮細胞の LOX-1 は shear stress にも反応することから、血管機能を制御することを示唆している。また粥状動脈硬化初期巣には LOX-1 は血管内皮細胞に、成熟病変ではマクロファージ、血管平滑筋細胞に発現することが明らかになった¹³⁾。最近 angiotensin-2 が LOX-1 を誘導することが明らかにされ、血管障害と LOX-1 の関係は今後明らかにされるであろう¹⁴⁾。

スカベンジャー受容体 Class A (CD 204) の knockout mouse の成績から、1つ1つの受容体ではなく、共同して泡沫化が行われているよう

ある。

PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)は、脂肪細胞の分化や細胞による脂質の取込みの調節に重要な役割をもっている。Evanceのグループは、泡沫細胞の起源である単球において、酸化LDLを介した様々な作用にPPAR- γ がどのようにかかわるかについて興味深い結果を発表した^{15,16)}。すなわち、LDLが酸化変性を受けることにより9-HODE, 13-HODEなどのような代謝産物が生成され、これらの代謝産物はマクロファージのPPAR- γ のアゴニストとして働くことにより、それがかかわる遺伝子群の発現を誘導する。そのなかの1つとしてCD-36のようなスカベンジャー受容体の発現を誘導することにより、酸化LDLの取り込みを増加させる。この結果は、マクロファージが酸化LDLを取り込み続ける機構を説明できることになった。

さらに、M ϕ は、酸化LDL以外にも、III型高脂血症の際に増加するレムナトリポ蛋白や β VLDLをそれに対する受容体を介して取り込み泡沫化する性質を持ち合わせている。したがって、III型高脂血症、糖尿病の血管病変は、少なくともmacroangiopathyに関しては、 β VLDLあるいはIDLなどレムナトリポ蛋白が血中に増加しており、これらが、M ϕ に取り込まれ、泡沫化することにより、粥状動脈硬化が進展すると考えてよさそうである。

酸化LDLの血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に対する作用

血管内皮細胞に、酸化LDLあるいは、リゾホスファチジルコリンを作用させると、血管平滑筋細胞の増殖因子である、HB-EGF, PDGF-A, B鎖の遺伝子発現が惹起されることが、Kumeらにより明らかにされてきた^{4,5)}。したがって、泡沫細胞化に続く、advanced lesionの中心をなす、血管平滑筋細胞の増殖に対しても、酸化LDLは、血管内皮細胞を介して作用しているといえよう。西らは、T細胞にリゾホスファチジルコリンを作用させるとHB-EGFを発現させることを見いだしている。この増殖因子の発現の詳細な機構は、これからの解明を待たねばならない

が、今後の課題といえよう。血管平滑筋細胞には、酸化LDLの受容体であるLOX-1が発現していることが証明され、酸化LDLがLOX-1に働くと血管平滑筋細胞のアポトーシスを惹起し、その機構にBAX, Bcl-2が関与することが示された。LOX-1, BAXは粥腫部位に共発現していることが示された¹⁷⁾。可溶性LOX-1が存在することが¹⁸⁾、急性冠症候群で上昇することが明らかになりつつある。また酸化LDLは血管平滑筋細胞に働くと、CD40, CD40L, マトリックスメタロプロテアーゼなどの発現を誘導することもよく知られている。

おわりに

以上述べてきたように、粥状動脈硬化の形成過程の分子機構を概説した。今後は、メタボリック症候群に代表される粥状動脈硬化に結果として陥る病態と炎症反応を中心として解明されてきた高LDL血症を中心とした病態に共通項があり、さらにそれぞれ独自の病態が絡み合って形成される病態の本質へと研究が発展することを期待している。

文 献

- 1) Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, et al : Dietary induced atherogenesis in swine. *Am J Pathol* 95 : 775-785, 1979
- 2) Ross R : The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 362 : 801-809, 1993
- 3) Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr : Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251 : 788-791, 1991
- 4) Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr : 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
- 5) Kume N, Gimbrone MA Jr : Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 93 : 907-911, 1994
- 6) Murayama T, Yokode M, Kata T, et al : Selective blockade of the c-fms signal transduction pathway by antagonistic monoclonal antibody prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation (in press)*

- 7) Ross R : Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 : 115-126, 1999
- 8) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, et al : Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 333-337, 1979
- 9) Kita T, Nagano Y, Yokode M, et al : Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 5928-5931, 1987
- 10) Arai H, Kita T, Mikami A, et al : Multiple receptors for modified low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages : Different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 159 : 1375, 1989
- 11) Kodama T, Freeman M, Rohrer L, et al : Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343 : 531-535, 1990
- 12) Sawamura T, Kume N, Kita T, et al : An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386 : 73-77, 1997
- 13) Kataoka H, Kume N, Kita T, et al : Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99 : 3110-3117, 1999
- 14) Kita T : Lox-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res* 84 : 1113-1115, 1999
- 15) Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, et al : Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR- γ . *Cell* 93 : 229-240, 1998
- 16) Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, et al : PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93 : 241-252, 1998
- 17) Kataoka H, Kume N, Kita T, et al : Oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) modulates Bax/Bcl-2 through lectin-like Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 955-960, 2001
- 18) Murase T, Kume N, Kita T, et al : Identification of soluble forms of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 20 : 715-720, 2000
- 19) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al : The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326 : 242-250, 1992



REGULAR ARTICLE

Effect of remnant-like particle on shear-induced platelet activation and its inhibition by antiplatelet agents

Masako Yamazaki*, Shinichiro Uchiyama, Yun Xiong, Takamitsu Nakano, Tomomi Nakamura, Makoto Iwata

Department of Neurology, Neurological Institute, Tokyo Women's Medical University, 8-1, Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Received 30 May 2004; received in revised form 15 August 2004; accepted 26 August 2004
Available online 18 November 2004

KEYWORDS

Remnant-like particles;
Platelet activation;
Shear stress;
Aspirin;
Cilostazol

Abstract Remnant-like particles (RLPs) have been reported to promote atherosclerosis and to have effects on platelet function. We studied the effects of RLP on shear-induced platelet activation and their inhibition by antiplatelet agents in vitro. RLP were separated using two monoclonal antibodies, anti apo B-100 and anti apo A-I. These RLP fractions were added to whole blood (WB) or platelet-rich plasma (PRP) in serial dilution of 1, 10 or 100 μg RLP triglyceride (TG) per ml of total sample volume. These samples were incubated, and then stimulated with a high shear stress of 108 dyn/cm^2 . Shear-induced platelet aggregation (SIPA) was calculated from the percentage of single platelet loss. P-selectin expression on platelet surface and platelet-derived microparticle (PMP) generation were measured before and after stimulation with shear stress using flow cytometer. SIPA was significantly enhanced by RLP in WB but not in PRP. This enhancing effect was not dose-dependent and was greatest at 10 μg TG/ml. P-selectin expression induced by shear stress was only enhanced by RLP at a concentration of 100 μg TG/ml in both WB and PRP, while generation of PMP induced by shear stress was only enhanced by RLP at a concentration of 100 μg TG/ml in WB. Aspirin inhibited only the enhancement of SIPA by RLPs, while cilostazol inhibited the enhancement of not only SIPA but also p-selectin expression and PMP generation by RLPs.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Triglycerides (TGs) have been proposed as a risk factor of atherosclerosis [1–6], although it remains

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3353 8111; fax: +81 3 5269 7324.

E-mail address: myamazak@nij.twmu.ac.jp (M. Yamazaki).

controversial because of the heterogeneity of triglyceride-rich lipoproteins. Plasma triglyceride is carried in a number of different lipoproteins such as chylomicrons (CM), large and small very low density lipoproteins (VLDL), and CM and VLDL remnants, whose ability to promote atherosclerosis is heterogeneous [1–4]. Within human plasma, CM of small intestinal origin and VLDL of hepatic origin are partially catabolised by the lipoprotein lipases to form the so-called CM and VLDL remnants, respectively [1–4]. Compared with nascent CM and VLDL, their remnants are believed to be more atherogenic, because smaller remnant particles can diverse into the arterial intima and are more likely to be retained by the heparan sulfate proteoglycans within the arterial intima than large CM and VLDL [1–4]. Remnants are rapidly taken up by various cell types, such as hepatic cells, macrophages and vascular cells including vascular smooth muscle cells, and impair endothelium-dependent vasorelaxation [7]. Clinical studies revealed that the level of lipoprotein remnants is closely related to the progression of the coronary artery lesion [6,8], and remnant-like particle (RLP)–cholesterol is a risk factor for coronary artery disease [9,10]. Furthermore, higher levels of RLP in fasting serum predict additional coronary events in patients with coronary artery disease independently of other risk factors [11]. Although the effects of plasma lipids on coronary artery disease and stroke differed [12], the level of RLP was also associated with intima-media thickness of the carotid artery [13–16], and also predicted an echolucent plaque [16], which is considered lipid-rich and rupture-prone. On the other hand, it has been reported that platelets from hyperlipoproteinaemic patients were abnormally sensitive to aggregation by collagen and adenosine diphosphate [17]. Platelet *p*-selectin expression [18] and CD63 expression [19], both of which indicate *in vivo* platelet activation, also increased in hypertriglyceridemia. It is possible that platelet activation in hyperlipidemia is caused directly by RLP to some extent because their effects on platelet function were reported in previous studies [20–24]. However, the effects of RLP on platelet aggregation were not consistent because of the difference in the methods, such as different samples, *i.e.*, whole blood (WB) or platelet-rich plasma (PRP), different ways to measure platelet aggregation, different agents for platelet stimulation, and different concentrations of remnants. Furthermore, RLPs themselves have been heterogeneous because of the differences in separation methods. RLPs can be identified and separated according to the differences in density, charge, size, specific lipid components, apolipo-

protein composition, and apolipoprotein immunospecificity [3,25]. In previous studies, RLPs of CM and VLDL have been reported not only to influence platelet aggregation induced by ADP or collagen [20–23] but also to induce platelet aggregation in the absence of platelet agonists [23,24]. In this study, we evaluated the effects of RLP on platelet activation induced by shear stress, which may play an important role in thrombogenesis at arterial bifurcation, stenosis, and spasms. We also studied the effects of antiplatelet agents, aspirin and cilostazol, on the enhancement of shear-induced platelet activation by RLP.

Materials and methods

Remnant-like particles preparation

RLPs of partially catabolised human plasma CM and VLDL were separated from CM and VLDL using two monoclonal antibodies, anti apo-B-100 (JI-H) and anti apo-A-I (H-12) bound to Sepharose 4B gel to form an immunoaffinity column [25,26]. Within the column, almost all lipoproteins containing apo-B-100 or apo-E including VLDL and low-density lipoprotein (LDL) adsorb to (JI-H)–gel, while CM and high-density lipoprotein (HDL) with apo A-I adsorb to (H-12)–gel. The unbound fraction is rich in apo-B-48, apo-E, and apoC-III. The lipoproteins in the unbound fraction represent primarily the VLDL remnants and CM remnants, which were previously described as RLP by Campos et al. [26].

Plasma was obtained from normal healthy subjects, in whom informed consent had been obtained, 2 h after lunch by immediate centrifugation at $1700\times g$ for 15 min at room temperature. Plasma was put into the affinity column, and, after 20 min, the unbound fraction was eluted with 10 mM of phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). The unbound fractions (RLP) were then transferred into Amicon Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA), centrifuged at $1700\times g$ at 4 °C, and concentrated to about 5–10% of the original volume. Total RLP cholesterol and RLP triglycerides were measured in each sample, and their amounts ranged from 0.3 to 1.7 mg/ml and from 5.3 to 9.4 mg/ml, respectively. Each sample was diluted with PBS serially to make RLP triglyceride 0.01, 0.1, and 1 mg/ml concentrations.

Blood collection and sample preparation

For the investigation of platelet activation, venous blood was collected from healthy volun-

teers who had not taken any antiplatelet drugs for two weeks prior to the study. Nine volumes of blood were anticoagulated with one volume of 3.8% trisodium citrate. An aliquot of the blood was used without any modifications, and another aliquot of the blood was centrifuged at $180\times g$ for 10 min to obtain PRP.

WB or PRP containing RLP-TG of 1, 10, or 100 μg per 1 ml of total sample volume, which we referred as 1, 10, or 100 μg TG/ml, respectively, was prepared by adding 50 μl of the serially diluted RLPs to 450 μl of WB or PRP. Each sample was incubated with RLP for 10 min, and then 400 μl of the sample was stimulated with shear stress of 108 dyn/cm^2 for 6 min by rotational cone-plate streaming chamber [27].

Measurement of shear-induced platelet aggregation

The extent of shear-induced platelet aggregation (SIPA) was quantified by measuring the loss of single platelets. The number of single platelets in each test was counted with the Microcellcounter F-800 (Sysmex, Kobe, Japan) immediately after the stimulation without fixation. Platelet count in an aliquot of each sample without shear stress was measured as the control count and the percent reduction in single platelet count was calculated from this value.

Flow cytometric analysis for platelet activation

Platelet activation was evaluated by flow cytometry [28–30]. For the measurements of both *p*-selectin expression on platelet surface and platelet-derived microparticle (PMP), each sample was incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD62p (Pharmingen, San Diego, CA, USA) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD42a (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). For the measurement of CD11b expression on polymorphonuclear leukocyte surface, each sample was incubated with PE-conjugated anti-CD45 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and FITC-conjugated anti-CD11b (Beckman Coulter). WB or PRP without stimulation was incubated with FITC-conjugated mouse immunoglobulin (Ig) G1 (Pharmingen) and PE-coupled mouse IgG1 (Pharmingen), which served as controls. Each sample was incubated with antibodies for 20 min at room temperature, and then diluted 10-fold in PBS containing paraformaldehyde at a final concentration of 1%. Adhesion molecules on the cell surface were analyzed by an EPICS XL

flow cytometer (Beckman Coulter). Platelets and PMP were identified as CD42a-positive cells and distinguished by their forward scatter. Polymorphonuclear leukocytes were identified with CD45-fluorescence and side scatter [31]. Five thousand individual platelets or polymorphonuclear leukocytes were examined for PE- or FITC- fluorescence, indicating the expression of *p*-selectin or CD11b, and the results were expressed as the mean fluorescence intensity of them. In the case of PMP, Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter), which contained 1000 beads/ μl , were added to each sample to calculate the PMP count contained in 1 μl of the sample. The effects of RLP were evaluated by the rate of change which was calculated by dividing the value with each concentration of RLP by the value without RLP.

Effects of antiplatelet agents

We examined the effects of antiplatelet agents on the enhancement of shear-induced platelet activation by RLP. After 10-min incubation with either 100 μM of aspirin or 10 μM of cilostazol (Pletaar, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan), which is a phosphodiesterase type 3 inhibitor, each sample was preincubated with RLP for another 10 min, and then stimulated with shear stress.

Statistical analysis

We used the repeated ANOVA for comparison using the StatView version 5.0, and $p < 0.05$ was used to indicate statistical significance.

Results

In WB, SIPA was enhanced by RLPs, although it was not dose-dependent, and it was greatest at 10 μg TG/ml (Fig. 1). In contrast, the enhancement of SIPA by RLP was not observed in PRP (Fig. 1). The enhancement of SIPA by 10 μg TG/ml of RLP in WB was inhibited by both aspirin and cilostazol (Fig. 2). Aspirin, at a concentration of 100 μM , inhibited the enhancement of SIPA by RLP. On the other hand, cilostazol inhibited both the enhancement of SIPA with RLP and the baseline of SIPA without RLPs at a concentration of 10 μM .

P-selectin expression induced by shear stress was enhanced by RLPs only at a concentration of 100 μg TG/ml in both WB and PRP (Fig. 3). Aspirin had no inhibitory effect on the enhancement of *p*-selectin expression by RLP, while cilostazol inhibited the enhancement (Fig. 4). PMP generation

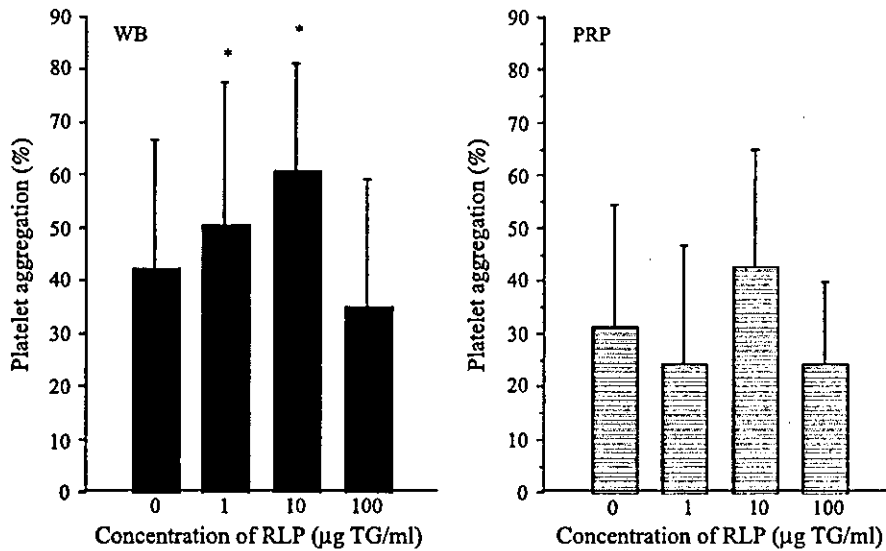


Figure 1 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on shear-induced platelet aggregation measured by loss of single platelet in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP; percentage). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

induced by shear stress was enhanced by RLP at a concentration of 100 $\mu\text{g TG/ml}$ only in WB (Fig. 5). Cilostazol inhibited the enhancement of PMP generation by RLP, but aspirin did not (Fig. 6). The enhancement of *p*-selectin expression was almost fully inhibited, while the enhancement of PMP generation was partially inhibited by cilostazol (Figs. 4 and 6).

Mac-1 expression on polymorphonuclear leukocyte which was induced by shear stress was slightly enhanced by RLPs at a concentration of 10 $\mu\text{g TG/ml}$

ml, but the difference was not significant (data not shown).

Discussion

In recent years, the pathophysiological role of CM and VLDL remnants in atherosclerotic process has been clarified in a number of clinical studies, and RLPs of CM and VLDL have been reported to influence platelet aggregation as well [20–24]. However, the effects of RLPs on platelet function did not show consistency in previous studies. Knöfler et al. [20] showed enhancement of ADP- and collagen-induced platelet aggregation by RLP in WB, which was measured by the impedance method, while they showed inhibition when examined in PRP measured by the turbidimetric method. On the other hand, Mochizuki et al. [22] showed enhancement of ADP- and collagen-induced platelet aggregation by RLPs both in WB measured by the impedance method and in PRP measured by the turbidimetric method.

In this study, we showed the stimulatory effect of RLPs on shear-induced platelet activation, which had not been evaluated in previous studies. We evaluated the effects of RLPs separated by their immunospecificity on shear-induced platelet activation because we thought that shear stress is an important physiological stimulation in the sites of arterial bifurcation, stenosis, and spasms. RLPs enhanced SIPA measured as the loss of single platelet in WB, but not in PRP at the concentration of 1 and 10 $\mu\text{g TG/ml}$. In contrast, 100 $\mu\text{g TG/ml}$ of

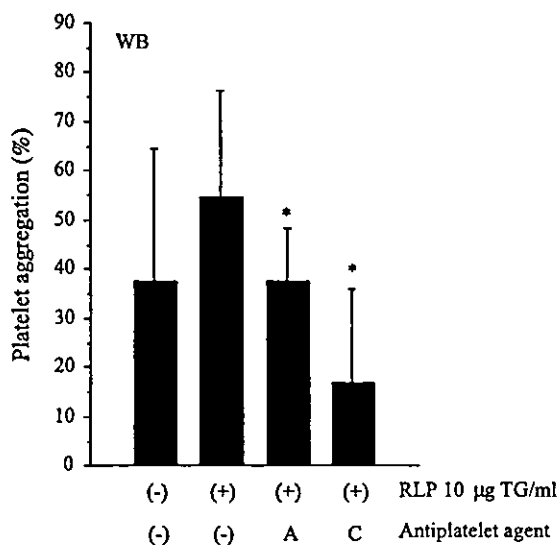


Figure 2 Effect of antiplatelet agents on shear-induced platelet aggregation enhanced by remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood. (–) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 μM ; (C) cilostazol 10 μM . Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

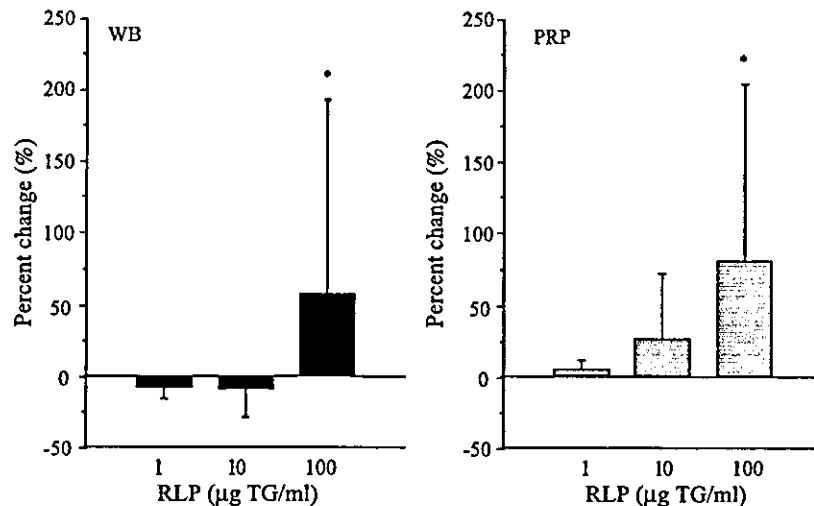


Figure 3 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on *p*-selectin expression in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

RLPs enhanced shear-induced *p*-selectin expression both in WB and PRP, while it enhanced shear-induced PMP generation in WB only. Our results that RLPs enhanced SIPA measured as the loss of single platelet in WB at low doses but not at high doses are in agreement with the report of Saniabadi et al. [23], although the modes of platelet activation are different. Namely, platelets were activated with ADP in their report, while platelets were activated by shear stress in our study. Moreover, neither *p*-selectin expression nor PMP formation was measured in their study.

Platelets have specific binding sites for lipoproteins [32]. Concerning the effects of lipoproteins on platelet function, it has been previously reported that thrombin-induced platelet activation is enhanced by VLDL, but is inhibited by HDL [33],

that occupation of cell-surface receptors by apo-E-rich HDL particles impaired platelet responsiveness to exogenous agonists [34], and that the binding of LDL to a G-protein-coupled receptor caused down-regulation and desensitization [35]. RLPs might interact with platelets directly and enhance platelet activation by shear stress. However, the fact that the effects of RLPs on platelet activation were different in WB and PRP indicates that RLPs might affect interaction between platelets and erythrocytes or leukocytes. RLPs are known to bind to and are taken up by a variety of cells [1,7,32,36,37]. It is known that apo E on the surface of RLP functions as a ligand for the uptake of RLPs by cells, and uptake of apo E-binding RLPs can profoundly alter the physiology of these cells [38]. Therefore, it is possible that RLP may bind to erythrocytes and/or

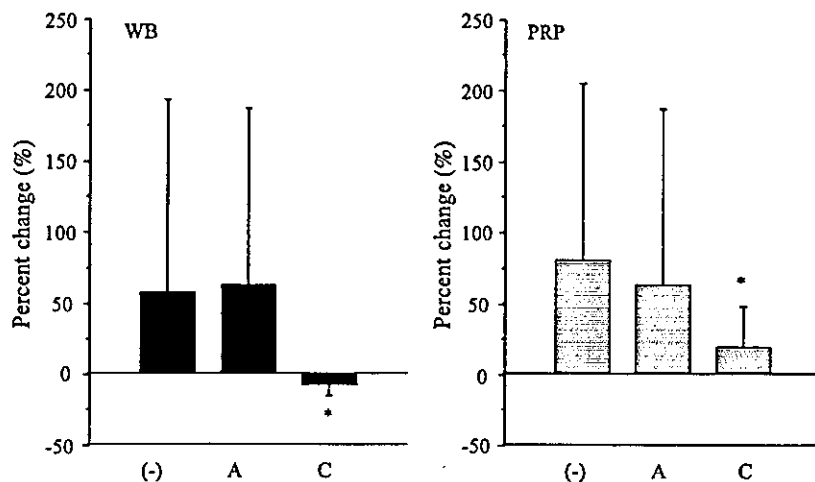


Figure 4 Effect of antiplatelet agents on *p*-selectin expression enhanced by 100 μ g triglyceride (TG)/ml of remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). (-) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 μ M; (C) cilostazol 10 μ M. Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

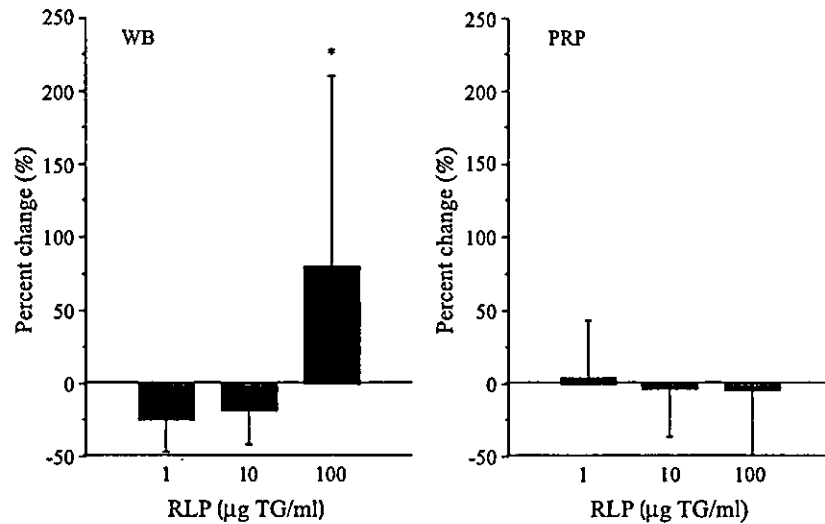


Figure 5 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on platelet-derived microparticle (PMP) in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

leukocytes and that it may induce changes of their membranes, which may lead to platelet binding to these cells. The reason why only low doses of RLPs enhanced SIPA remains uncertain. It is possible that high doses of RLPs caused the change of platelet surface to the extent of being difficult to aggregate. Even in that case, generation of PMP and *p*-selectin expression on the surface might still be increased because the mechanisms of release reaction are different from those of aggregation.

Concerning erythrocytes, Saniabadi et al. [23,24] showed interaction between platelets and erythrocytes in the presence of RLPs by scanning

electron microscopy. Doi et al. [7] reported that RLPs transformed the shape of red blood cells (RBCs) to echinocytes. In our study, RLPs enhanced SIPA and PMP formation only in WB, while enhancement of *p*-selectin expression was observed both in WB and PRP. The reason why only potentiation of *p*-selectin expression was observed in both WB and PRP remains to be determined. Platelet aggregation and activation are not necessarily correlated, and *p*-selectin expression and PMP formation reflect different steps of platelet activation. It might be possible that, because enhancement of shear-induced platelet activation by RLPs is more prominent in WB than in PRP, only *p*-selectin expression, which is a sensitive marker of platelet activation, can detect the potentiation of platelet activation by RLPs in PRP.

As to leukocytes, it has been reported that RLPs increase monocyte chemotaxis and adhesion [36] and expression of CD18 [37] and that they induce monocyte adhesion to vascular endothelium [37]. We failed to show the change of CD11b expression on polymorphonuclear leukocytes. It is of interest to know whether RLPs increase CD11b expression on monocytes because previous reports on the effects of RLPs on leukocytes were exclusively studied using monocytes [36,37]. Mac-1 (CD11b/CD18) is one of the ligands for fibrinogen, which thereby possibly mediate platelet-leukocyte adhesion partially. Therefore, it would be interesting to study whether RLPs activate platelets through the interaction with monocytes.

In our study, aspirin inhibited the enhancement of SIPA by RLPs but did not inhibit the enhancement of *p*-selectin expression and PMP generation by RLPs. On the other hand, cilostazol inhibited

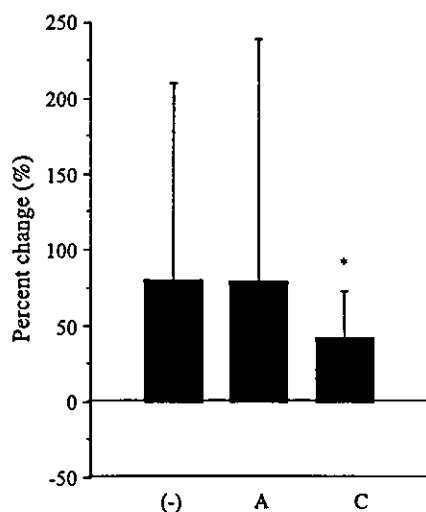


Figure 6 Effect of antiplatelet agents on platelet-derived microparticle (PMP) enhanced by 100 µg TG/ml remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood. (-) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 µM (C) cilostazol 10 µM. Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

the enhancement of not only SIPA but also *p*-selectin expression and PMP generation by RLPs. These results suggest that SIPA, *p*-selectin expression, and PMP generation induced by shear stress might be enhanced by RLPs through the different mechanisms.

Our result that enhancement of platelet aggregation by RLPs measured as the loss of single platelet in WB was more inhibited by cilostazol than by aspirin is consistent with the report of Saniabadi et al. [23,24]. However, they showed that cilostazol inhibited platelet activation induced by RLPs with or without ADP, while we showed that with shear stress. Moreover, we measured *p*-selectin expression and PMP formation, which were not examined by them. The enhancing effect was also inhibited by an ADP scavenger and antagonist [24], suggesting that ADP supplied by erythrocytes might have an important role in the enhancing mechanism. Cilostazol inhibits platelet aggregation induced by ADP through the inhibition of phosphodiesterase type 3, which is specific for adenylate cyclase [39]. It was reported that ADP released from RBCs plays an important role in SIPA [40]. Therefore, there is a possibility that cilostazol may inhibit the effect of RLPs by inhibiting platelet aggregation induced by ADP released from RBCs.

RLPs showed enhancing effects on shear-induced platelet activation at physiological concentration, although the mechanism of enhancement remains to be determined.

References

- [1] Havel RJ. Remnant lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:615–20.
- [2] Hodis HN. Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:2852–4.
- [3] Cohn JS, Marcoux C, Davignon J. Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2474–86.
- [4] Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 1995;141:153–8.
- [5] Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998;81(4A):138–7B.
- [6] Reardon MF, Nestel PJ, Craig IH, Harper RW. Lipoprotein predictors of the severity of coronary artery disease in men and women. *Circulation* 1985;71:881–8.
- [7] Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, et al. Membrane active lipids in remnant lipoproteins cause impairment of endothelium-dependent vasorelaxation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1918–24.
- [8] Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993;88:2762–70.
- [9] McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PWF, Ordovas JM, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001;154:229–36.
- [10] Devaraj S, Vega G, Lange R, Grundy SM, Jialal I. Remnant-like particle cholesterol levels in patients with dysbetalipoproteinemia or coronary artery disease. *Am J Med* 1998;104:445–50.
- [11] Kugiyama K, Doi H, Takazoe K, Kawano H, Soejima H, Mizuno H, et al. Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;99:2858–60.
- [12] Shahar E, Chmplew LE, Rosamond WD, Boland LL, Ballantyne CM, McGovern PG, et al. Plasma lipid profile and incident ischemic stroke. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke* 2003;34:623–31.
- [13] Karpe F, Boquist S, Tang R, Bond GM, Faire U, Hamsten A. Remnant lipoproteins are related to intima-media thickness of the carotid artery independently of LDL cholesterol and plasma triglycerides. *J Lipid Res* 2001;42:17–21.
- [14] Sharrett AR, et al. for the ARIC Investigators. Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with asymptomatic carotid artery atherosclerosis in middle-aged men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2122–9.
- [15] Ryu JE, Craven TE, Bond MG, Hagaman AP, Crouse III JR. Postprandial triglyceridemia and carotid atherosclerosis in middle-aged subjects. *Stroke* 1992;23:823–8.
- [16] Grønholdt MLM. Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2–13.
- [17] Riess H, Merk W, Falkner C, Hiller E. Increased risk in vitro platelet aggregation in hypertriglyceridemias. *Thromb Res* 1986;41:281–9.
- [18] Brøijersén A, Karpe F, Hamsten A, Goodall AH, Hjendahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet *p*-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis* 1998;137:107–13.
- [19] de Man FH, Nieuwland R, van der Laarse A, Romijn F, Smelt AHM, Gevers Leuven JA, et al. Activated platelets in patients with severe hypertriglyceridemia: effects of triglyceride-lowering therapy. *Atherosclerosis* 2000;152:407–14.
- [20] Knöfler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y, Takada A. Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res* 1995;78:161–71.
- [21] Orth M, Luley C, Wieland H. Effects of VLDL, chylomicrons, and chylomicron remnants on platelet aggregability. *Thromb Res* 1995;79:297–305.
- [22] Mochizuki M, Takada Y, Urano T, Nagai N, Nakano T, Nakajima K, et al. The in vitro effects of chylomicron remnant and very low density lipoprotein remnant on platelet aggregation in blood obtained from healthy persons. *Thromb Res* 1996;81:583–93.
- [23] Saniabadi AR, Umemura K, Shimoyama M, Adachi M, Nakano M, Nakashima M. Aggregation of human blood platelets by remnant like lipoprotein particles of plasma chylomicrons and very low density lipoprotein. *Thromb Haemost* 1997;77:996–1001.
- [24] Saniabadi AR, Umemura K, Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Adachi M, et al. Adenosine 5'-diphosphate as a factor in platelet aggregation induced by human plasma remnant like lipoproteins. *Life Sci* 1998;63:1065–74.
- [25] Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti

- apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta* 1993; 223:53–71.
- [26] Campos E, Nakajima K, Tanaka A, Havel RJ. Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B-100. *J Lipid Res* 1992;33:369–80.
- [27] Fukuyama M, Sakai K, Itagaki I, Kawano K, Murata M, Kawai Y, et al. Continuous measurement of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 1989;54:253–60.
- [28] Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M. Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thromb Res* 2001;104:197–205.
- [29] Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70:307–15.
- [30] Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75:128–38.
- [31] Nicholson JK, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996;26:16–21.
- [32] Surya II, Akkerman JWN. The influence of lipoproteins on blood platelets. *Am Heart J* 1993;125:272–5.
- [33] Aviram M, Brook JG. Characterization of the effect of plasma lipoproteins on platelet function in vitro. *Haemostasis* 1983;13:344–50.
- [34] Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J Lipid Res* 1989;30:831–40.
- [35] Pedreño J, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Badimón L, Masana L. Low-density lipoprotein (LDL) binds to a G-protein coupled receptor in human platelets. Evidence that the proaggregatory effect induced by LDL is modulated by down-regulation of binding sites and desensitization of its mediated signaling. *Atherosclerosis* 2001;155:99–112.
- [36] Lee C, Sigari F, Segrado T, Hörkkö S, Hama S, Subbaiah PV, et al. All apo-B-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1437–46.
- [37] Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Atrovastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under flow conditions. *Circ Res* 2002;91:263–71.
- [38] Saniabadi AR, Takeichi S, Yukawa N, Nakajima Y, Umemura K, Nakashima M. Apo E4/E3-rich remnant lipoproteins and platelet aggregation: a case report. *Thromb Haemost* 1998;79:878–9.
- [39] Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 1985;35(7A):1144–9.
- [40] Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Mannucci PM. Role of ADP in platelet aggregation at high shear stress: studies in a patients with congenital defect of platelet responses to ADP. *Br J Haematol* 1994;88:826–9.



(指定講演)

血栓形成からみた脳と心臓

東京女子医科大学 教授 内山真一郎

本日は、私の関心領域である血小板と凝固の活性化を中心に講演します。

血栓形成がどの程度脳血管障害の成因に関与しているか、最終的に抗血栓薬がどの程度臨床的な効果をもたらすかということについてお話しをしたいと思います。さらに、抗血栓療法の現時点での評価と、今後の展望についても触れてみたいと思います。

抗血栓療法を論ずる前に、一昨年、大阪大学の堀教授と自治医科大学保健科学の中村教授と共に、血栓性疾患と抗血栓療法の現況に関する全国調査を行いました。この調査は、1万例以上の母集団から無作為に抽出した3,357名にアンケート調査表を送付し、得られた回答(回収率53%)を解析しました。その結果、全国の推計受療患者数は、統計学的に10%以内の誤差で正確に反映しているだろうと我々は考えておりますが、現時点で脳梗塞患者は150万~180万人であり、心筋梗塞の73万~84万人の2倍以上存在するという結果が出ました。この比率は、アメリカ合衆国での脳梗塞と心筋梗塞の比率1対2のちょうど逆であり、いかに日本人は脳梗塞に罹患しやすい民族であるかということを示しています。高齢者の増加と共に脳梗塞患者は急激に増えており、脳卒中全体でも、2020年には現在の倍、300万人を超えるであろうと推測されております。

今まで全国の脳梗塞急性期患者の実態調査は行われたことがなかったわけですが、私達も協力させていただきましたが、国立循環器病セ

ンターの山口先生と峰松先生達を中心となって初めて全国の脳梗塞患者の実態が明らかにされました。このデータが出るまでは、日本人の脳梗塞の最大の特徴は、欧米人と違いラクナ梗塞が圧倒的に多く、全体の50%以上を占めているということが神話の如く信じられてきたわけですが、しかし、ラクナ梗塞とアテローム血栓性梗塞はほぼ30%づつと拮抗しており、心原性脳塞栓症も急激に増加しており20%を超えているという実態がこの調査で明らかになりました。実際我々の施設でも、今一番多いのはアテローム血栓性梗塞で、次いで心原性塞栓であり、ラクナ梗塞は最も頻度の少ない病型となっております。

臨床概念による病型分類においては、アテローム血栓性梗塞は、大血管の粥状硬化に起因する梗塞であり、血小板主体の血栓に起因するため再発予防には抗血小板療法の適応があると考えられています。心原性脳塞栓症は左心系あるいは、心臓の中を通過する塞栓、これは深部静脈血栓であるためこれらの塞栓源となる血栓はいずれもフィブリンを主体とする血栓であることから、再発予防における抗血栓療法のファーストチョイスは、原則として抗凝固療法の適応が考えられています。一方、ラクナ梗塞については、今までアテローム血栓性梗塞は large vessel disease、ラクナ梗塞は small vessel disease とされ、危険因子に関しましても対比的に論じられてきたわけですが、最近の国内外の疫学調査によりますと、ラクナ梗塞とアテロ