

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(レンゼン)			
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brate系薬剤			
クロフィブラート	ヒPOSE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%	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
ニコチン酸エステル			
イコサベント酸エチル	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brate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

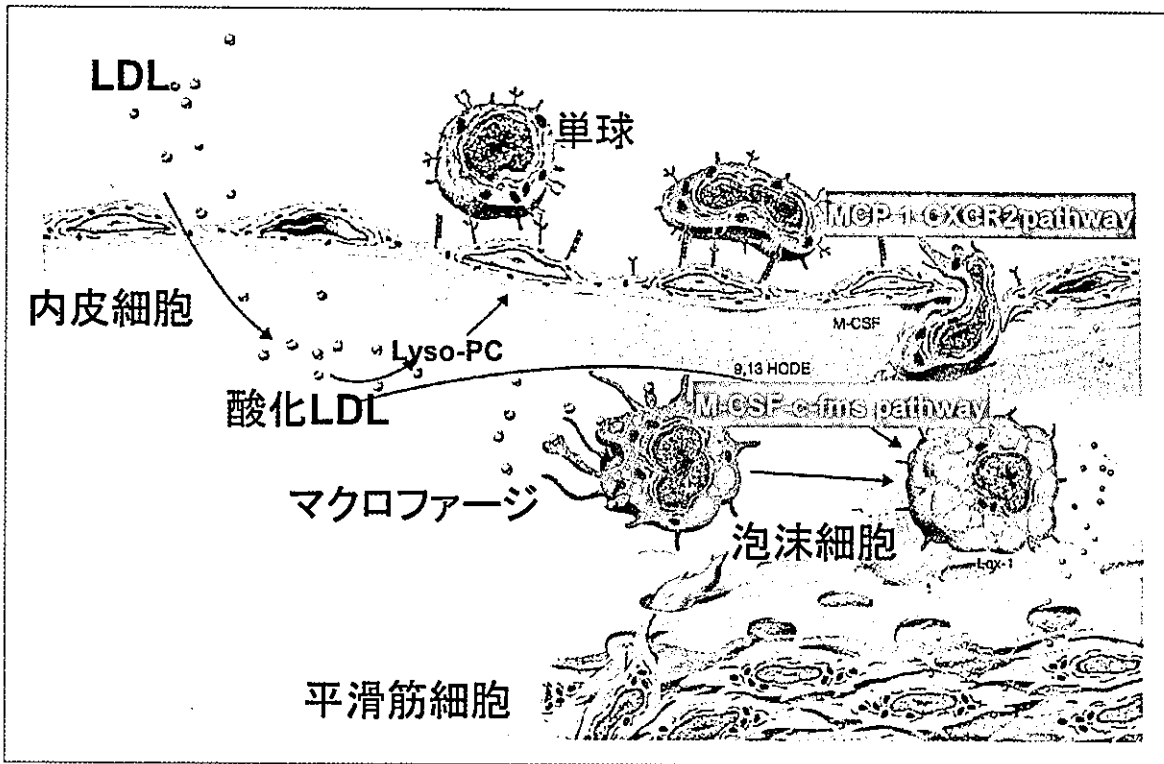


図1 血管内皮下の単球・マクロファージ・泡沫細胞化への過程

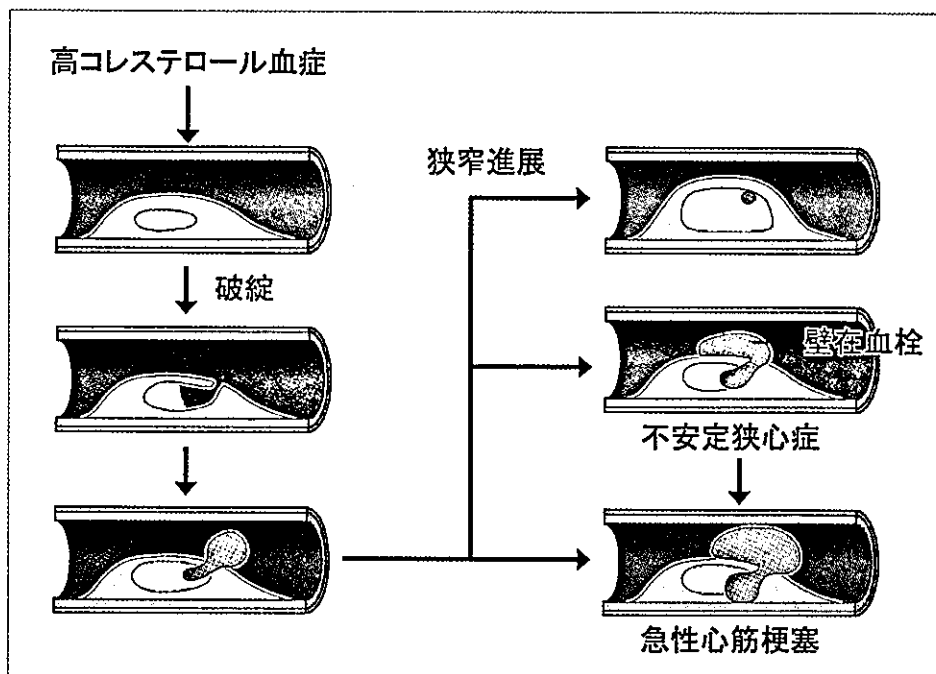


図2 粥腫の破綻・急性冠症候群の成り立ち
〔文献 19) から一部改変して引用〕

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。

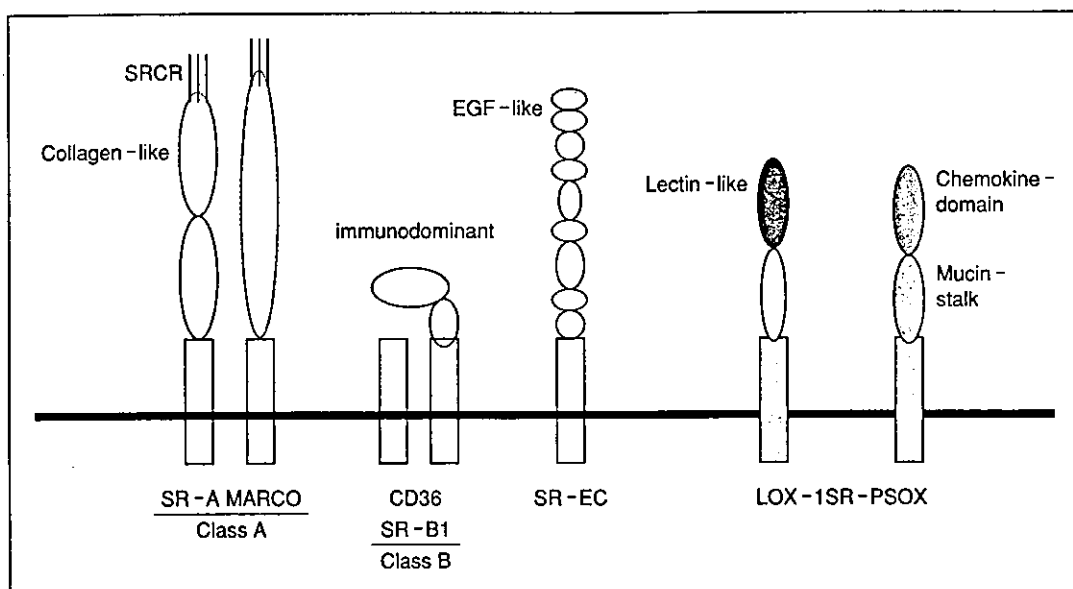


図3 酸化LDL受容体群

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* の成果を考え合わせると、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も、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ントリポ蛋白や 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などレムナン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. *Pros 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 (J1-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 (J1-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×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×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

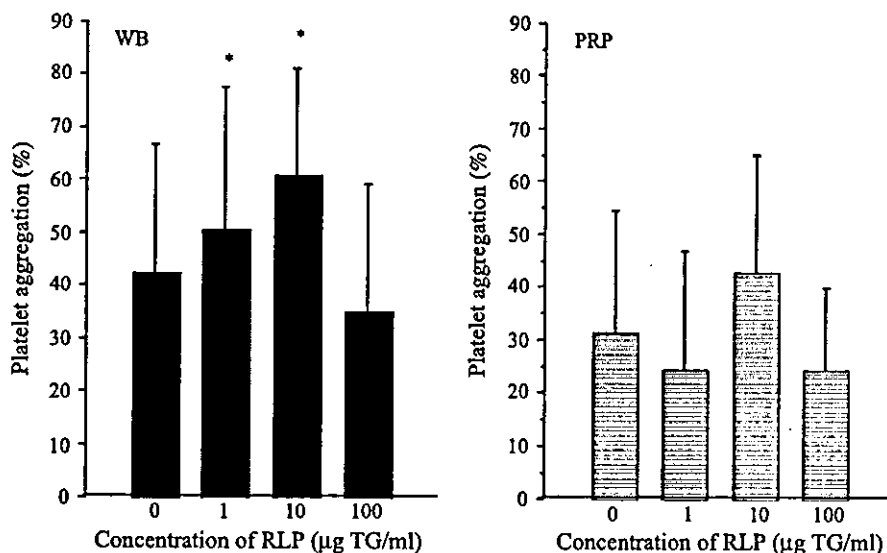


Figure 1 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on shear-induced platelet aggregation measured by loss of single platelet in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP; percentage). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

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, 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

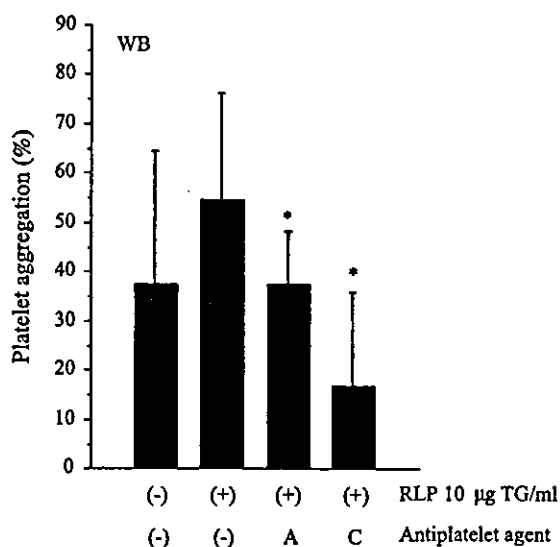


Figure 2 Effect of antiplatelet agents on shear-induced platelet aggregation enhanced by remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood. (–) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 μM ; (C) cilostazol 10 μM . Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

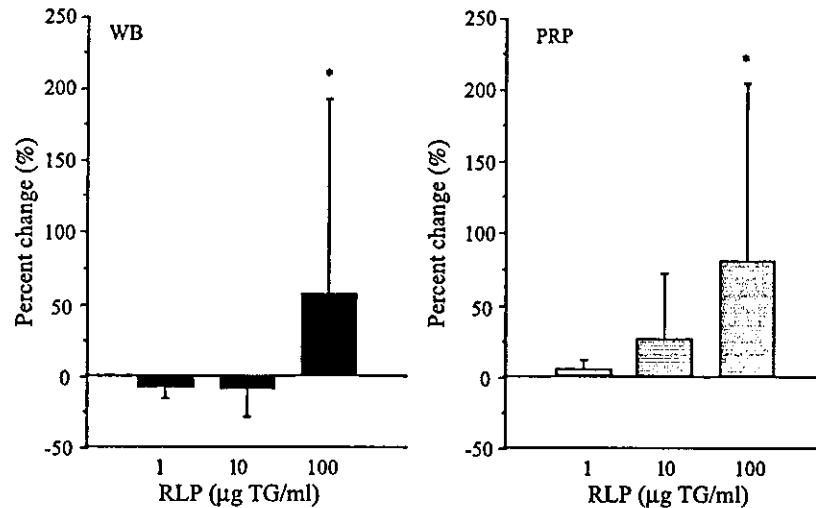


Figure 3 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on *p*-selectin expression in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

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

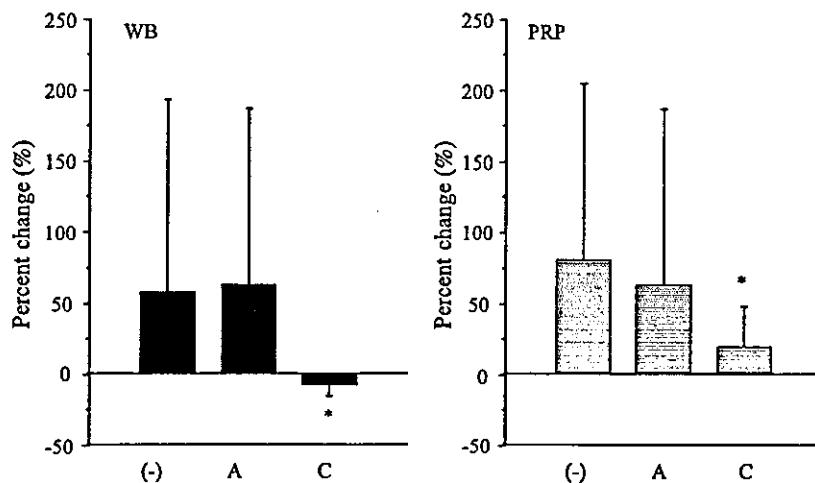


Figure 4 Effect of antiplatelet agents on *p*-selectin expression enhanced by 100 µg triglyceride (TG)/ml of remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). (-) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 µM; (C) cilostazol 10 µM. Each bar shows the value of mean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

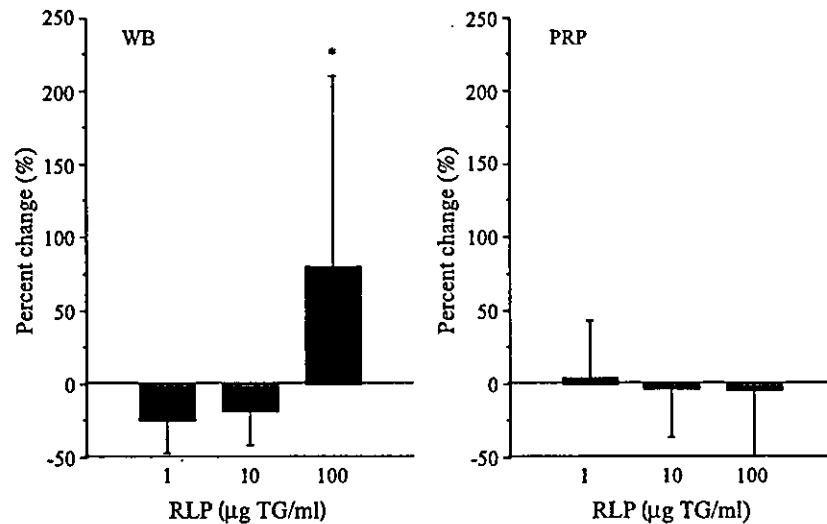


Figure 5 Effect of remnant-like lipoprotein particles (RLP) on platelet-derived microparticle (PMP) in whole blood (WB) and platelet-rich plasma (PRP). Each bar shows the value of mean \pm S.D. * p <0.05.

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

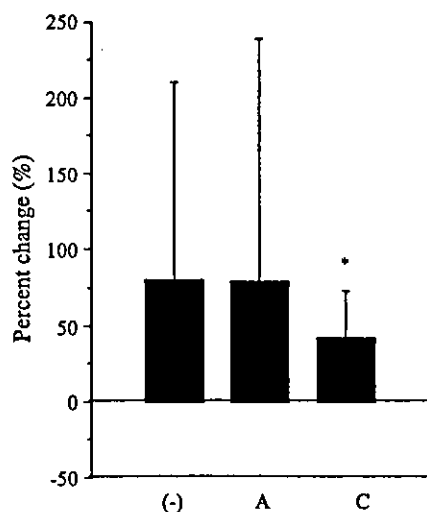


Figure 6 Effect of antiplatelet agents on platelet-derived microparticle (PMP) enhanced by 100 µg TG/ml remnant-like lipoprotein particles (RLP) in whole blood. (-) No antiplatelet agent; (A) aspirin 100 µM (C) cilostazol 10 µM. Each bar shows the value of mean \pm S.D. * p <0.05.

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):13B–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, Hjemdahl 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 H, 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, Segredo T, Hörrkö 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が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

Alterations of Platelet, Coagulation, and Fibrinolysis Markers in Patients with Ischemic Stroke

Subtype	Phase	Molecular markers				
		β -TG/PF4	F _{1,2}	TAT	FM	DD
Atherothrombotic	Acute	↑↑	↑	↑	↑	↑
	Subacute	↑	↑	→	→	→
	Chronic	↑	→	→	→	→
Cardioembolic	Acute	↑↑	↑	↑↑	↑	↑
	Subacute	→	↑	↑	↑↑	↑↑
Lacunar		→	→	→	→	→

↑ = increased; ↑↑ = extremely increased; → = unchanged

Uchiyama S et al: Semin Thromb Hemost Vol 23, No 6, 1997

表 1

ーム血栓性梗塞の危険因子の頻度には高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙のいずれも本質的に差のないことが報告されるようになりました。

虚血性脳卒中のメカニズムは、アテローム血栓性梗塞と心原性脳塞栓症及びラクナ梗塞の病型と対応させますと、アテローム血栓性梗塞の多くの原因は頸動脈病変にあり、かなり急性冠症候群と共通の病態であると考えられます。このことは、局所の血管閉塞というよりも塞栓性メカニズムが非常に重要であることを示唆しています。塞栓源となるプラークから塞栓子が頭蓋内に流れて行くことにより血管腔を閉塞して起こす梗塞が多いと考えられます。これが典型的なアテローム血栓性梗塞の成立機序だと思えます。

もう一つのタイプとして境界域梗塞あるいは終末域梗塞がありますが、高度の狭窄性病変を生じ、血行動態が変化して灌流圧が低下することによって各動脈の末梢に当る部位の虚血を生じるというタイプであります。

ラクナ梗塞は穿通枝そのものに問題があつて、深部の小梗塞を起こす場合と、アテローム血栓性梗塞のミニチュア版ともいふべき頭蓋内の動脈の粥状硬化によって、深部小梗塞をおこ

すタイプ (microatheroma) があると考えられます。

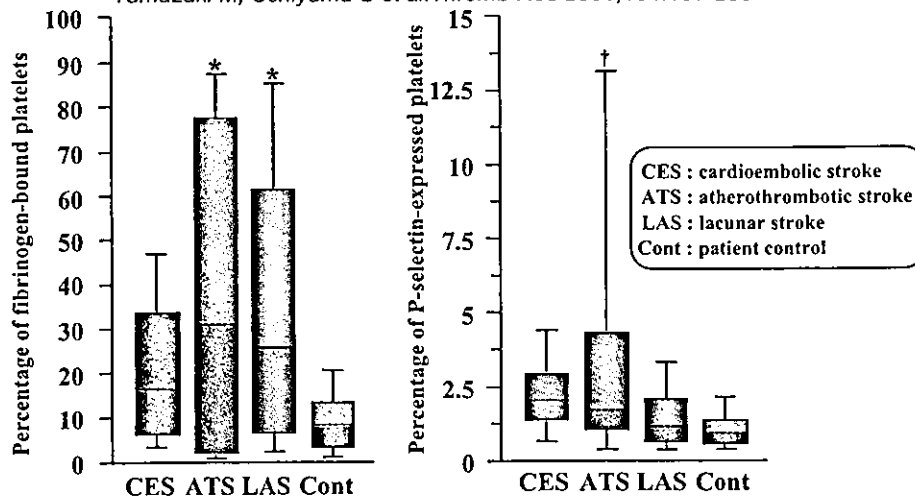
心原性脳塞栓症は、心房細動とか弁膜症あるいは左室血栓によって、何れもフィブリンを主体とする血栓が塞栓源になって脳梗塞を起こします。

虚血性脳血管障害患者の急性例における血小板凝固線溶系の分子マーカーを測定した結果を、病型、病期別に要約すると、アテローム血栓性梗塞の特徴は、全期間を通じて常に血小板活性化が認められ、恐らく underlying condition として血管壁と血小板との相互作用が反映されていると考えられます (表 1)。しかし、急性期に最も顕著な血小板の活性化が認められます。またアテローム血栓性脳梗塞、特に進行性脳卒中例では、しばしば軽度から中等症の凝固線溶系の活性化を伴います。即ち、凝固の亢進を伴うタイプの脳梗塞の診療をどうするかが、今、問題になっています。

また、心原性脳塞栓症の最大の特徴は、顕著な凝固線溶系の活性化があることですが、まず凝固系の活性化が起き、その後遅れて線溶系の活性化がピークを迎えるという時間経過をとるのが特徴です (表 1)。しかしながら、このよ

Platelet Fibrinogen Binding and P-Selectin Expression in Patients With Subtypes of Cerebral Infarction and Controls

Yamazaki M, Uchiyama S et al. *Thromb Res* 2001;104:197-205



The box plots display median values with 25th and 75th percentiles, and bar chart shows 10th and 90th percentiles.
* $p < 0.05$ compared with control † $p < 0.05$ compared with lacunar stroke

図1

うな凝固活性化を伴うと、必ず血小板活性化を伴います。血小板の活性化を生じるような病態では、必ずしも凝固活性化を伴わないが、凝固活性化を伴うような脳卒中の病型の場合、必ず同時に血小板の活性化を伴います。恐らくこのことはトロンピンが鍵を握っているのではないかと思います。

さらに、ラクナ梗塞は一部の症例で例外はありますが、グループとして見た場合は血小板凝固線溶系の活性化所見に乏しいといえます (表1)。

In^{111} tropolone という放射性同位元素を血小板にラベルして血小板寿命を測定した成績は、生体内での血栓形成の指標になると我々は考えております。アテローム血栓性脳梗塞や心原性脳塞栓症では異常に血小板寿命が短縮した症例が高率に認められ、動脈内あるいは心腔内での血栓形成による血小板の消費を反映していると考えられます。それに対し、ラクナ梗塞は一部の症例でごく僅かな短縮を認めるのみであります。

In^{111} tropolone を使った血小板寿命の測定は、多量の採血が必要で放射性同位元素でラベルし

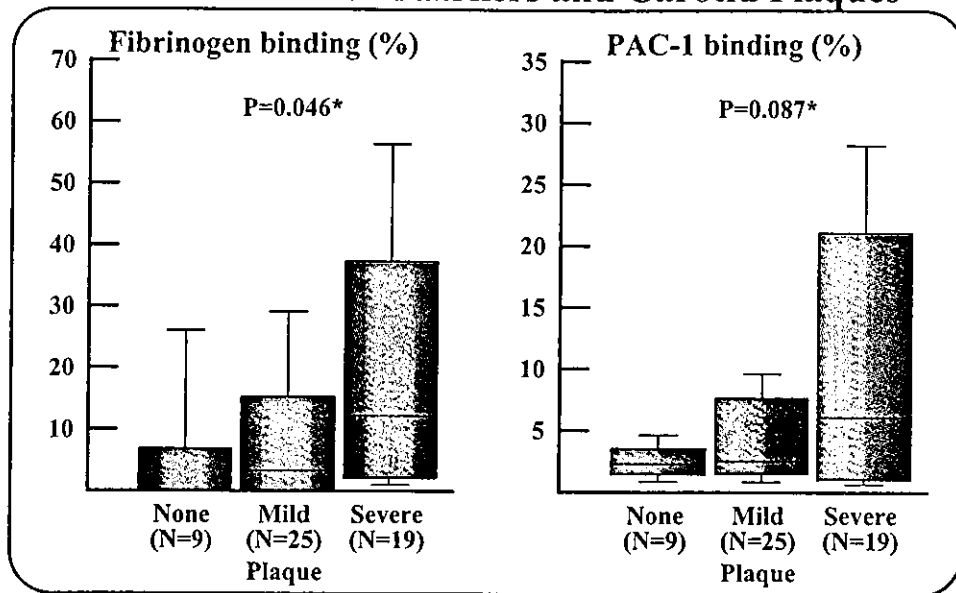
た自家血小板をまた患者さんに戻さなければならないため、臨床的に広く普及するような方法ではありませんが、最近我々はフローサイトメトリーを用いて網状血小板比率の測定を行い、血小板の kinetics の評価に使っています。

対照群に比べてラクナ梗塞群では明らかな傾向は認められませんが、アテローム血栓性脳梗塞では一部の患者さんに網状血小板の増加が認められます。しかし、このような所見が最も顕著に認められるのは、心原性脳塞栓症であり、対照群のみならず他の病型と比べても有意に網状血小板比率が増加しております。このことは、心腔内での活発な血栓形成による血小板消費を反映している所見ではないかと思っております。

最近、生体内での血栓形成にはずり応力による血小板の活性化が重要な役割を果たしていると考えられています。脳虚血患者のずり応力惹起血小板凝集 (SIPA) を測定した成績では、アテローム血栓性脳梗塞や TIA で有意に亢進が認められましたが、心原性脳塞栓症やラクナ梗塞では認められませんでした。

さらに、SIPA の強さと larger vWF マルチマ

Platelet Activation Markers and Carotid Plaques



*Kruskal-Wallis test

図 2

一の間には正相関する傾向が認められました。即ち、アテローム血栓性脳梗塞やTIAではSIPAが亢進していると共に、larger vWF マルチマーも増えていました。これがどうして増えるのかが今後の課題だと思いますが、一つには血管内皮細胞障害によるvWFの血中への放出量の増加が考えられますし、ずり応力そのものや生成されたトロンビンによって内皮が刺激されてvWFの放出が増えている可能性もあると思います。これに関しましては、最近TTPという病気が問題となっております。チクロピジンの副作用でも問題になりましたが、このような病態ではvWFを分解するcleaving protease (vWFPC) に対する抗体ができるためにvWFが分解されなくなり、larger vWF マルチマーが増えSIPAが亢進して血栓形成が起こり血小板が消費されるのではないかということが分ってきました。また、国立循環器病センターの疫学調査により、このvWF cleaving proteaseの遺伝子多型が脳梗塞の危険因子になっているのではないかという報告がなされて注目されております。

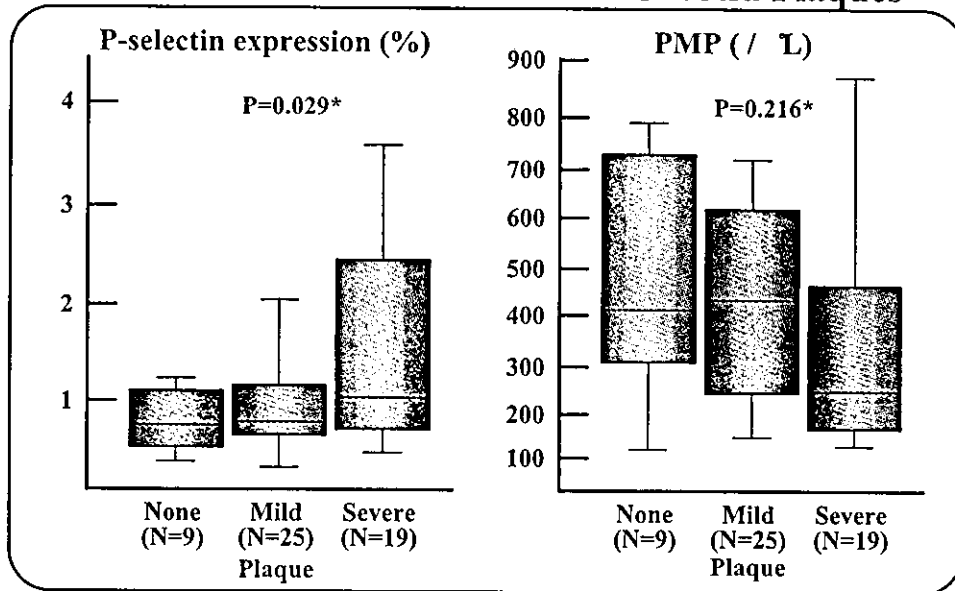
各脳虚血患者における血小板のフィブリノ

ゲン結合率とP-セレクチン発現率をフローサイトメトリーによって測定した成績ですが、フィブリノゲン結合率はアテローム血栓性脳梗塞やラクナ梗塞で有意に亢進しています(図1)。

従来の血小板機能検査では発見されませんでした。接着分子をターゲットにした感度と特異度に優れた個々の血小板の機能を測定することのできる方法が開発されていますが、このような測定法によりますと、ラクナ梗塞でも活性化血小板が検出できます(図1)。また、P-セレクチンの発現率を測定した結果、アテローム血栓性脳梗塞で最も有意に発現が認められ、血小板依存性疾患病態であることが分ります(図1)。

かつては、欧米人と違う日本人の特徴は、頸動脈病変は少なく頭蓋内病変が多いといわれていたのですが、最近日本でも急速に頸動脈病変が増えています。これは高齢者が増え、生活習慣病である高脂血症、糖尿病が増えていることと相関していると思います。頸動脈のDuplex Scanという装置を使い、B-modeの頸動脈エコーの縦断像と横断像ですが、この部分

Platelet Activation Markers with Carotid Plaques



*Kruskal-Wallis test

図3

にプラークが認められます。約60%の狭窄がある症例で、低輝度病変、ハイポエコーイックプラークがあります。このようなプラークはマクロファージの浸潤が豊富であるとか、粥腫内出血であるとか、炎症が起こっているような所見を反映していると考えられ、ラプチャーし易い不安定な、脳虚血イベントにも関連が深いプラークであることが指摘されております。

血小板と白血球の活性化マーカーをフローサイトメトリーで測定しておりますが、我々はその指標として、まず血小板のフィブリノゲン結合率、それからGP IIb/IIIaの活性化の指標であるPAC-1の結合率、血小板放出反応の指標であるP-セレクチンの発現率と血小板procoagulant活性の指標でありますマイクロパーティクル(PMP)の生成量、そして白血球の活性化の指標として顆粒球上のP-セレクチンの発現と顆粒球そのものの活性化を反映するMAC-1の発現率を測定しております。この成績は、血小板・白血球の活性化マーカーと頸動脈病変の存在の有無、あるいはその程度との相関を解析したわけではありますが、血小板・フィブリノゲン結合率に関しましては、シ

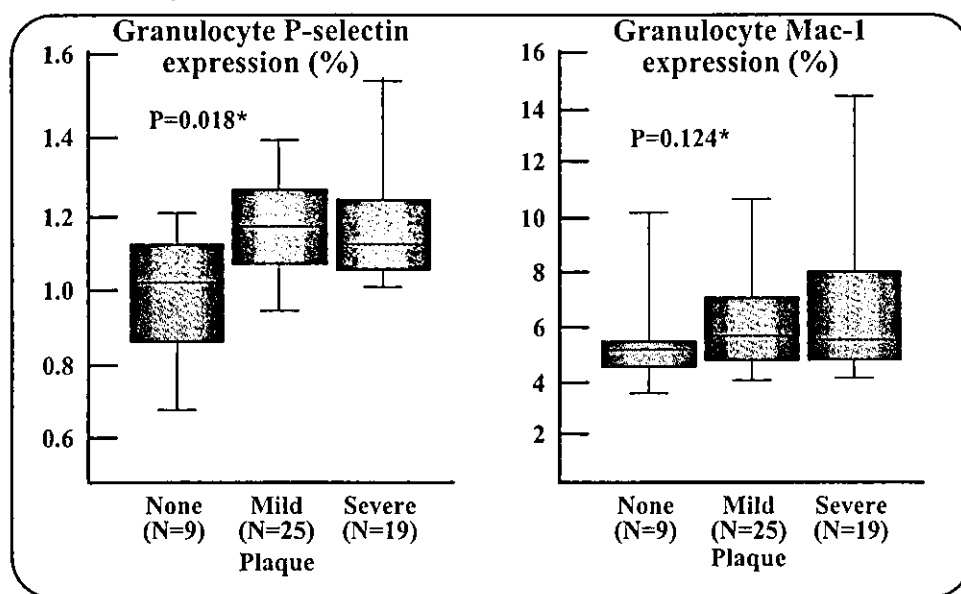
ビアなプラークの定義は70%以上の狭窄か、ハイポエコーイックリージョンがあるか、潰瘍を形成している病変と定義しておりますが、1.1mm以上のIMTの肥厚があるがシビアではないマイルドなプラークが認められる症例でも、フィブリノゲン結合率が高まっているという有意な相関が認められました(図2)。また、PAC-1の結合率もプラークの程度と共に結合率が上昇しているという傾向を認めております(図2)。

一方、P-セレクチンの発現率は、マイルドなプラークでは明らかな傾向を示しませんが、シビアなプラークは、有意に高まっているという傾向を認めております(図3)。PMPは、明らかな傾向が認められませんでした。

次に、白血球活性化マーカーは、プラークのない症例に比べて顆粒球のP-セレクチンの発現率が有意に高いという傾向が認められております(図4)。さらに、顆粒球のMAC-1の発現は有意ではありませんが、プラークの進展に従って白血球の活性化傾向が認められます(図4)。

このような観点から、先程の矢崎先生のイン

Leukocyte Activation Markers and Carotid Plaques



*Kruskal-Wallis test

図 4

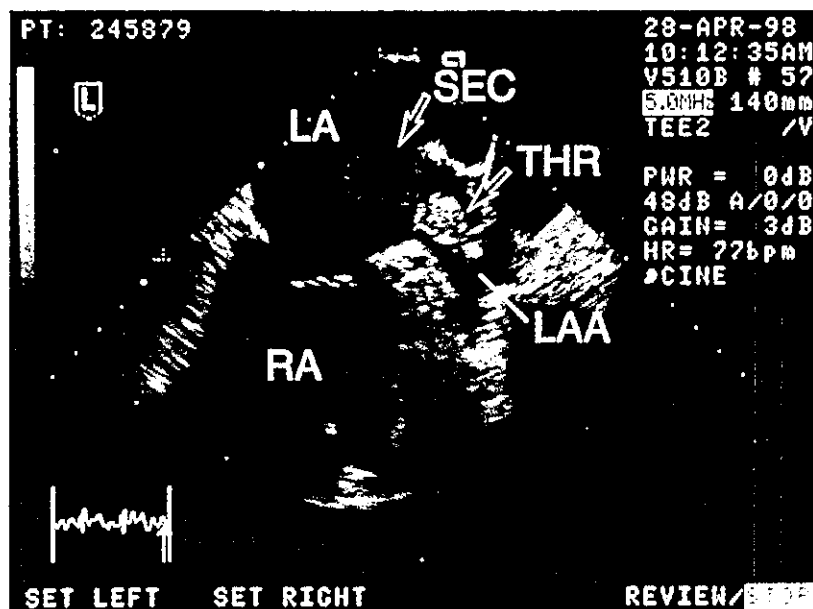


図 5

トログクッションでも話がありましたように、血栓形成と炎症反応とは非常に密接な関係があつて、両者のプロセスには、恐らく共通のパスウェイが存在すると思います。両方の病態が相俟ってプラークの成長、不安定化に繋がっている可能性があるのではないかと考えております。

次いで、心原性脳塞栓症の原因となる心疾患の3分の2以上を占めるのは、非弁膜症性心

房細動であります。それから最近、原因不明の脳卒中、特に若年性の脳卒中の原因として注目されているのが卵円孔開存であります。深部静脈血栓が増え、エコノミークラス症候群のように肺塞栓症を起こす人が問題となっておりますが、卵円孔開存がありますと、さらに起こすはずのない脳塞栓症まで起こしてしまいます。

画像診断の進歩によって、経食道心エコーで