

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm SEM for the isometric tension studies. Statistical analysis was performed with one factor ANOVA for vascular relaxation, lipid profile, body weight and protein expression, and other parameters were analyzed by a two-way ANOVA followed by an appropriate post-hoc test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Body weight and plasma levels of cholesterol, triglyceride and glucose

Body weights of TGL and TGH were significantly lower than those of JW, but there was no difference between TGH and TGL (Table 1). Total cholesterol levels in TGH and TGL were remarkably higher than in JW, however there was no significant difference in total cholesterol level between TGL and TGH (Table 1). Plasma triglyceride levels of TGH were markedly higher compared with JW and TGL (Table 1). The plasma levels of fasting glucose were not different among the three groups.

Macroscopic evaluation of fatty streak formation

No plaques were observed in the rings from JW rabbits. In the descending thoracic aortic rings from WHHL, fatty streaks were formed, but there was no significant difference in the percentages of the plaque areas between TGH ($32.5 \pm 1.4\%$, $n = 71$ rings) and TGL ($28.8 \pm 1.5\%$, $n = 61$ rings).

Microscopic evaluation of fatty streak formation

We made microscopic comparisons of smooth muscle cell proliferation, macrophage infiltration, and collagen deposition in atheroma of TGL and TGH. The percent area in atheroma of smooth muscle

Table 1
Body weight and plasma levels of total cholesterol, triglyceride and glucose in JW, TGL and TGH

	JW	TGL	TGH
Body weight (kg)	2.53 ± 0.58 ($n=19$)	$2.29 \pm 0.07^*$ ($n=11$)	$2.08 \pm 0.07^{**}$ ($n=12$)
Total cholesterol (mg/dl)	59 ± 5 ($n=10$)	$1081 \pm 59^\#$ ($n=11$)	$1465 \pm 167^\#$ ($n=12$)
Triglyceride (mg/dl)	63 ± 8 ($n=10$)	191 ± 12 ($n=11$)	$2764 \pm 413^{\#\dagger}$ ($n=12$)
Fasting glucose (mg/dl)	160 ± 16 ($n=10$)	149 ± 4 ($n=11$)	149 ± 8 ($n=12$)

Values are mean \pm SEM.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

$\#$ $P < 0.0001$ vs. JW.

\dagger $P < 0.0001$ vs. TGL.

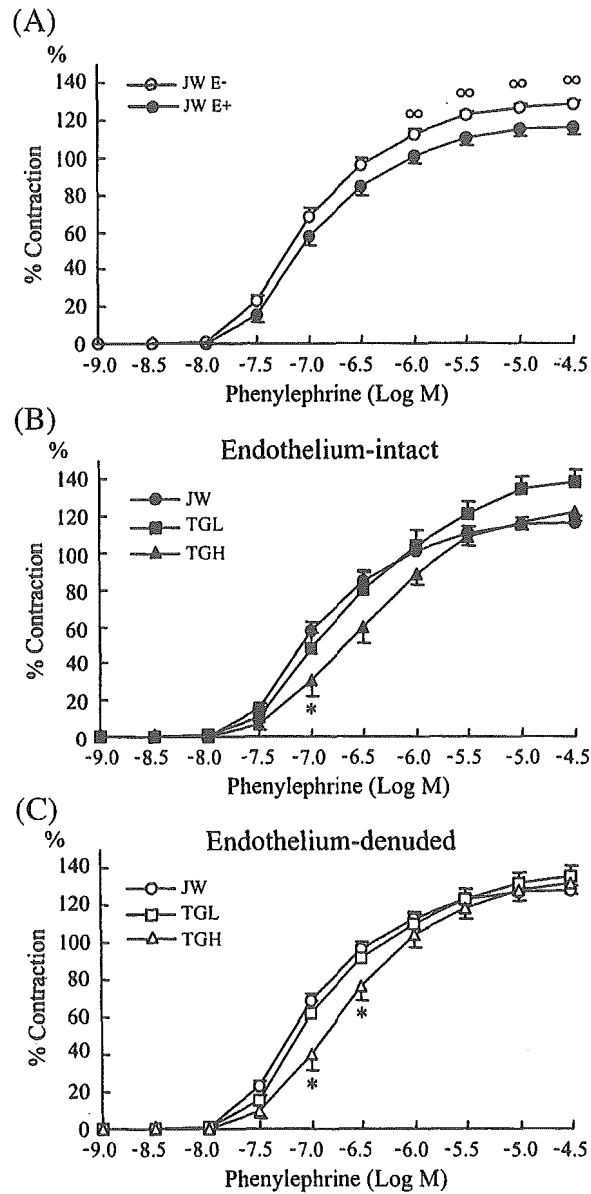


Fig. 1. Phenylephrine-induced contraction of thoracic aortic rings from JW (circles), TGL (squares) and TGH (triangles). Filled symbols and open symbols indicates aortic rings with intact and denuded endothelium, respectively. Contraction was expressed as percentage of the maximal contraction produced by high potassium. Each concentration-response curve was plotted by taking the respective mean \pm SEM values from at least 8 separate experiments for each group. E, endothelium. ∞ , significant difference compared with endothelium-intact rings ($P < 0.05$). *, significant difference compared with aortic rings from JW ($P < 0.05$).

cells, macrophage and collagen were similar in TGL and TGH (smooth muscle cell; $21.9 \pm 2.1\%$ vs. $17.3 \pm 1.7\%$; macrophage, $20.0 \pm 3.4\%$ vs. $15.1 \pm 2.1\%$; collagen, $31.9 \pm 2.0\%$ vs. $27.8 \pm 1.6\%$ in TGL and TGH, respectively). Total cell numbers of the media were similar in TGL and TGH ($2580 \pm 120 /\text{mm}^2$ and $2580 \pm 60 /\text{mm}^2$, respectively). There was no significant difference in medial thickness between TGL and TGH ($251 \pm 12 \mu\text{m}$ and $252 \pm 10 \mu\text{m}$, respectively). Furthermore, total fractional fibrosis in the media was not different in TGL and TGH ($34.2 \pm 0.5\%$ and $28.4 \pm 0.3\%$, respectively).

Comparison of contractile response to phenylephrine

No differences in contraction induced by high potassium solution were detected among JW, TGH and TGL. In JW, the contractile response to phenylephrine was significantly augmented in denuded rings compared with intact rings (Fig. 1A and Table 2). However in TGH and TGL, there was no difference in phenylephrine-induced contraction between endothelium-denuded and -intact rings. The cumulative concentration-response curve to phenylephrine in TGH was shifted to the right compared with JW in both endothelium-intact and -denuded rings, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1B and C). In endothelium-denuded rings, the EC_{50} value of phenylephrine-induced contraction was also lower in TGH than JW (Table 2). However, there was no significant difference in the EC_{50} values between JW and TGL.

Table 2
Contractile and relaxing responses in JW, TGL and TGH

Stimulations		E	JW	TGL	TGH
Phenylephrine Hydrochloride	max contraction (%)	+	116.3 ± 3.7^a	130.5 ± 3.8	122.3 ± 4.8
	EC_{50} (10^{-7} M)	+	1.2 ± 0.2	3.2 ± 1.0	$3.2 \pm 1.1^*$
	max contraction (%)	-	128.6 ± 2.2	135.9 ± 4.9	132.2 ± 5.6
	EC_{50} (10^{-7} M)	-	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.3	$2.4 \pm 0.5^*$
Angiotensin II	max contraction (%)	+	73.2 ± 6.7	$37.0 \pm 7.1^{**}$	$24.4 \pm 5.8^{**}$
	EC_{50} (10^{-9} M)	+	2.1 ± 1.0	3.3 ± 1.4	3.7 ± 0.6
	max contraction (%)	-	85.5 ± 2.3	$48.2 \pm 6.4^{**}$	$35.1 \pm 6.5^{**}$
	EC_{50} (10^{-9} M)	-	0.9 ± 0.3	3.0 ± 0.9	$3.9 \pm 1.0^*$
Acetylcholine	max relaxation (%)	+	83.5 ± 2.7	79.9 ± 5.3	$59.1 \pm 5.7^{**,\dagger}$
	EC_{50} (10^{-8} M)	+	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.9	6.3 ± 1.6
A23187	max relaxation (%)	+	96.0 ± 2.0	91.4 ± 4.7	$74.5 \pm 6.5^*$
	EC_{50} (10^{-9} M)	+	2.7 ± 1.6	7.8 ± 3.7	2.6 ± 0.6
Sodium Nitroprusside	max relaxation (%)	-	106.8 ± 2.5	105.0 ± 2.1	104.0 ± 1.7
	EC_{50} (10^{-9} M)	-	13.5 ± 5.5	4.6 ± 1.3	4.9 ± 1.2
Isoproterenol	max relaxation (%)	-	95.2 ± 2.6	91.0 ± 4.9	$75.1 \pm 4.1^{**,\dagger}$
	EC_{50} (10^{-8} M)	-	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.4	4.2 ± 1.5

Values are reported as mean \pm SEM. E, endothelium.

^a $P < 0.05$ vs. endothelium-denuded rings.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$ vs. JW.

[†] $P < 0.05$ vs. TGL.

Comparison of contractile responses to angiotensin II

In JW, TGL and TGH, contraction elicited by angiotensin II were similar in endothelium-denuded and -intact rings (Fig. 2 and Table 2). Contractile responses to angiotensin II were significantly impaired in TGH and TGL compared to JW, while there was no significant difference in angiotensin II-induced contraction between TGH and TGL (Fig. 2 and Table 2).

Comparison of endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and calcium ionophore A23187

Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was attenuated in aortas from TGH compared with those from JW and TGL, but there was no difference between JW and TGL (Fig. 3A). In the aortic segments obtained from TGH, maximal relaxation to acetylcholine was markedly

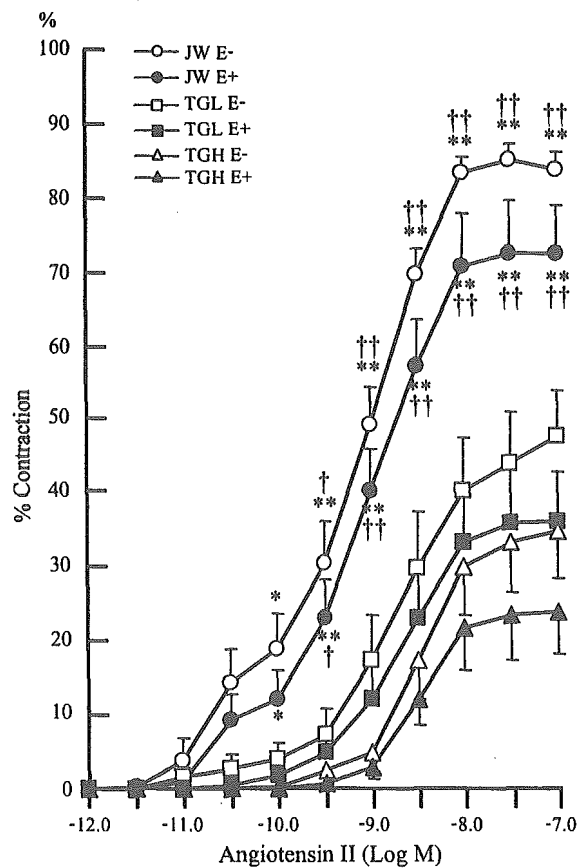


Fig. 2. Angiotensin II-induced contraction of thoracic aortic rings from JW, TGL and TGH. Contraction was expressed as percentage of the maximal contraction produced by high potassium. The results are mean \pm SEM values from at least 8 separate experiments in each group. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 2. † and ††, significant difference compared with aortic rings from TGL ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). * and **, significant difference compared with aortic rings from TGH ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

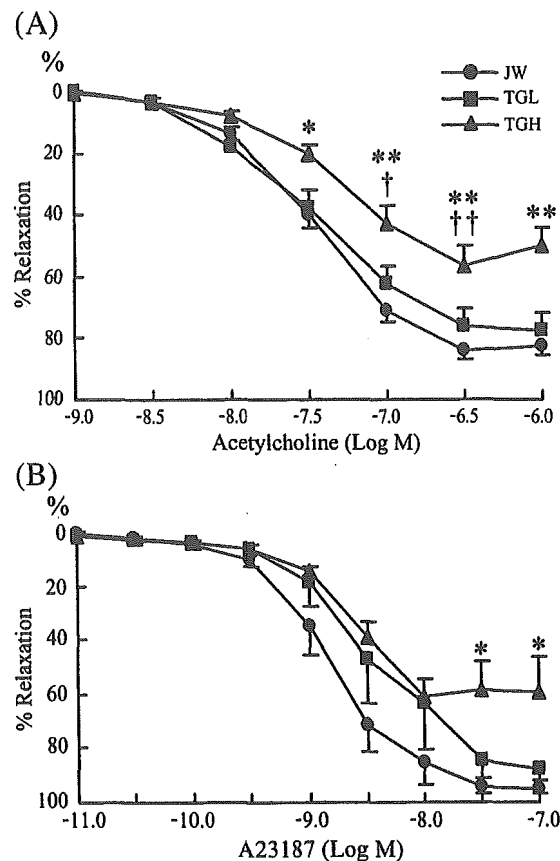


Fig. 3. Acetylcholine (A) and calcium ionophore A23187 (B)-induced relaxing responses in thoracic aortic rings with intact endothelium from JW, TGL, and TGH. Data are mean \pm SEM values from at least 8 separate experiments. * and **, significant difference compared with aortic rings from JW ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). † and ††, significant difference compared with aortic rings from TGL ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

attenuated compared with those from TGL and JW (Table 2). Responses to another endothelium-dependent vasodilator, calcium ionophore A23187, were also reduced in TGH compared to those in JW (Fig. 3B). The level of maximum relaxation by calcium ionophore A23187 in TGH was significantly lower than that in JW, but there was no significant difference between TGL and JW (Table 2).

Comparison of endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside

To determine whether decreased response to NO was involved in diminished endothelium-dependent relaxation in TGH, we compared concentration-response curves evoked by the NO donor, sodium nitroprusside. Relaxing responses elicited by sodium nitroprusside were similar in JW, TGL and TGH (Fig. 4A and Table 2).

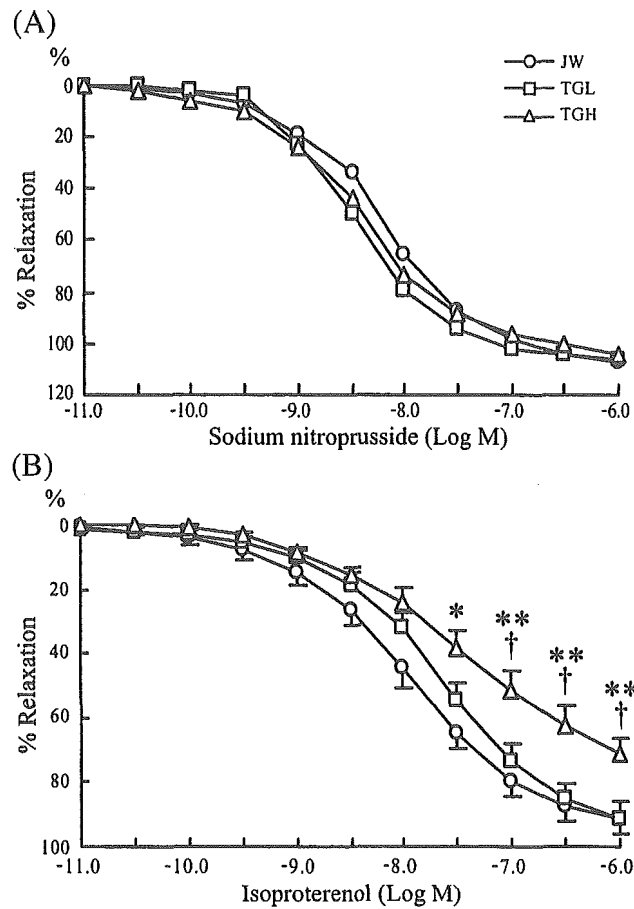


Fig. 4. Sodium nitroprusside (A)- and isoproterenol (B)-induced relaxing responses in thoracic aortic rings without endothelium from JW, TGL and TGH. Abbreviations and symbols are the same as in Fig. 4.

Comparison of endothelium-independent relaxation in response to isoproterenol

The nonselective β agonist, isoproterenol, produced concentration-dependent relaxation of intact rings. The relaxing response induced by isoproterenol was significantly attenuated in TGH compared with JW and TGH (Fig. 4B). Maximal relaxation induced by isoproterenol in TGH was significantly diminished compared to those in JW and TGL, while there was no significant difference between JW and TGL (Table 2).

Protein expressions of angiotensin II type-1 receptor and NOS3

Protein expressions of angiotensin II type-1 receptor and NOS3 were examined. The expression of angiotensin II type-1 receptor was increased 1.5- and 2.6- fold in TGL and TGH, respectively, compared with JW. The expression of angiotensin II type-1 receptor was significantly increased only in TGH,

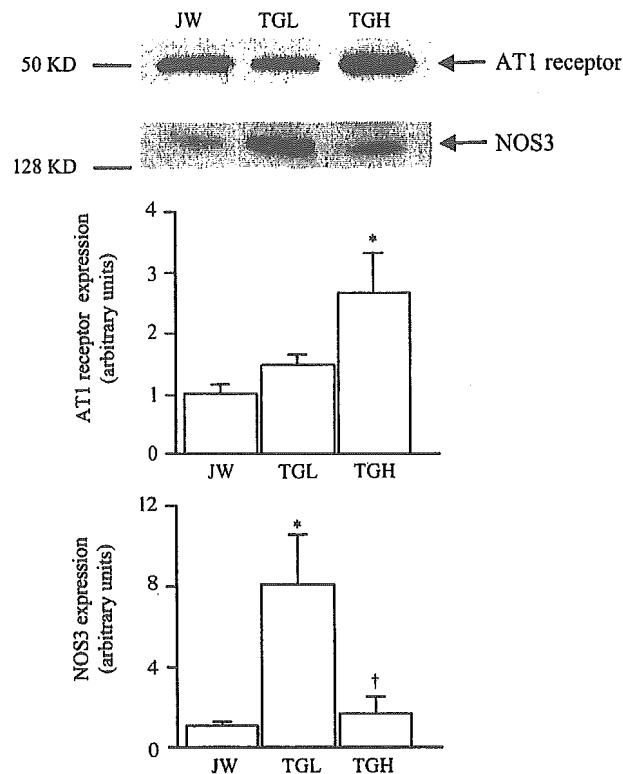


Fig. 5. Representative Western blots and densitometric data of angiotensin II type-1 (AT1) receptor and NOS3 in JW, TGL and TGH. *, significant difference compared with JW ($P < 0.05$). †, significant difference compared with TGL ($P < 0.05$).

when compared with JW (Fig. 5). NOS3 expression in aorta was significantly increased in TGL compared with JW, while in TGH it was significantly attenuated compared with TGL (Fig. 5).

Discussion

In this study, isometric tension studies using isolated aortic rings with comparable areas of atherosclerotic plaque demonstrated that hypertriglyceridemia attenuated endothelium-dependent relaxation which was associated with decreased EDRF release, and impaired medial smooth muscle cell function accompanied by decreased NOS3 and increased angiotensin II type-1 receptor expression.

Many lines of evidence suggest that hypertriglyceridemia is a marker of increased risk for coronary heart disease (Egger et al., 1999; Rosenson, 1999). Many studies have shown that very low-density lipoprotein (VLDL) produces remnant lipoprotein or small dense LDL, and triglyceride-rich lipoproteins accumulate in endothelial cells (Rosenson, 1999). Hypertriglyceridemic VLDL causes down-regulation of tissue plasminogen activator and surface localized-plasmin generation, and increases plasminogen activator inhibitor-I (Stiko-Rahm et al., 1990). Thus, hypertriglyceridemia causes a prothrombotic state, which can contribute to induction of the atherogenic state in vascular wall (Dichtl et al., 1999; Nagornev and Rabinovich, 1998). Growing evidence has demonstrated that flow-mediated

vasodilatation is impaired in patients with hypertriglyceridemia (de Man et al., 2000; Egger et al., 1999; Inoue et al., 1998; Lupattelli et al., 2000). However, the potential mechanisms for vascular dysfunction induced by chronic hypertriglyceridemia have yet to be defined.

We successfully segregated two lines of WHHL with severely high (TGH) and moderately high (TGL) levels of serum triglyceride. Plasma levels of total cholesterol were not significantly different between TGH and TGL, and plasma levels of glucose were similar in JW, TGL and TGH. In this study, plaque qualities such as smooth muscle cell infiltration, macrophage infiltration, and collagen deposition were similar between TGL and TGH. Moreover in our pilot study, in the young state, there was no significant difference between TGH and TGL in coronary stenosis. This study is the first to report that more prominent vascular dysfunction occurs in the presence of combined hyperlipidemia as compared with hypercholesterolemia alone, as was shown in combined hyperlipidemic rabbit.

In this study using aged 3 to 4 month old rabbits, it was found that endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was attenuated in TGH compared with JW and TGL. Moreover, relaxation to the more potent endothelium-dependent vasodilator, calcium ionophore A23187 (Kolodgie et al., 1990), was also attenuated in TGH compared to JW. Several studies have demonstrated that hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction (Habib et al., 1986; Verbeuren et al., 1986); however, in this study, endothelium-dependent relaxation was similar in JW and TGL. One possible explanation for this difference is that WHHL are hyperlipidemic from birth and may have adapted to high cholesterol environment (Kolodgie et al., 1990). It has been reported that NOS3 expression in both mRNA and protein levels in WHHL aortas are increased (Kanazawa et al., 1996). Thus, increased expression of NOS3 was contributed to preservation of endothelium-dependent relaxation in TGL. In our present study, endothelium-mediated vasodilatation was decreased in TGH, whereas relaxation evoked by sodium nitroprusside, an endothelium-independent vasodilator, was similar in JW, TGL and TGH. These results indicated that the response to NO was similar in JW, TGL and TGH, but production of EDRF was attenuated in TGH. Moreover, at an early stage of atherosclerosis, hypertriglyceridemia in addition to hypercholesterolemia is necessary to induce vascular endothelial dysfunction that is involved in vasorelaxation (Hirono et al., 1996; Lundman et al., 2001a; Ross, 1993; Tagawa et al., 1991).

Both decreased (Dam et al., 1997) and enhanced (Yang et al., 1998) contractions elicited by angiotensin II in hypercholesterolemic rabbits have been reported. One possible explanation for these contrasting results is that vascular size and/or percentage of plaque area vary among the various studies. In the present study, responses to angiotensin II were similarly attenuated in TGH and TGL, suggesting that in TGH and TGL medial smooth muscle cells were impaired by hypercholesterolemia. However, the expression of angiotensin II type-1 receptor in aorta was increased in TGH compared with JW, and contraction to phenylephrine was attenuated only in TGH, but not TGL, compared to JW. It has been reported that expression of angiotensin II type-1 receptor is increased in the aorta of hyperlipidemic animals (Yang et al., 1998), and angiotensin II type-1 receptor mediated-signaling pathways contributed to vascular dysfunction. These results indicated that hypertriglyceridemia also evokes smooth muscle cell dysfunction more prominently. The angiotensin II type-2 receptors are thought to have an effect opposite to that of angiotensin II type-1 receptors and play a pivotal role in anti-neointimal formation (Akishita et al., 2000) and vascular relaxation (Israel et al., 2000) through, in part, NO production. The angiotensin II type-2 receptors are expressed in fetal condition, and are re-expressed in certain pathological conditions such as inflammation and vascular injury (Akishita et al., 2000). Therefore, changes in angiotensin II type-2 receptor expression may be one explanation for the impairment of contraction evoked by angiotensin II in TGL and TGH.

We found that relaxation elicited by isoproterenol was reduced in rings from TGH compared with JW and TGL, but there was no significant difference between JW and TGL. Recently, cAMP-dependent NO release pathways have been reported in the endothelium (Zhang and Hintze, 2001). Since in the present study we used denuded rings to investigate relaxation evoked by isoproterenol, the reduced relaxation to isoproterenol in TGH may represent a medial smooth muscle dysfunction. Several studies demonstrated that the cAMP-mediated vasodilator mechanism was not altered in WHHL (Hirata et al., 1992). However in aortic smooth muscle cells obtained from hypercholesterolemic rabbits, basal and NaF-stimulated cAMP generation were decreased, and induction of oxidized LDL in rabbits inhibited cAMP-mediated vasodilatation (Galle et al., 1992; Schmidt et al., 1993). These data suggest that hypertriglyceridemia also impairs smooth muscle cell function. Similar to endothelial dysfunction, hypercholesterolemia alone did not induce α 1- and β -adrenergic dysfunction, and combined dyslipidemia was necessary to induce them in aortas from young rabbits.

In conclusion, our studies using aortas from TGH demonstrated that both endothelium-dependent and -independent relaxation responses were impaired, and smooth muscle contractile responses were also attenuated. These vascular dysfunctions were the first to appear in the atherogenic state. These observations support the concept that hypertriglyceridemia accelerates functional impairment of endothelial and smooth muscle cells induced by hypercholesterolemia.

Acknowledgements

We thank Mr. Eiji Tsuchida and Ms. Yurika Abe for their technical assistance. This study was supported in part by grant-in-aid for Scientific Research (No. 14570635) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan and grants from The Naito Foundation, Japan Foundation of Cardiovascular Research, and The Japan Heart Foundation Research Grant.

References

- Akishita, M., Horiuchi, M., Yamada, H., Zhang, L., Shirakami, G., Tamura, K., Ouchi, Y., Dzau, V.J., 2000. Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiological Genomics* 2 (1), 13–20.
- Castelli, W.P., Doyle, J.T., Gordon, T., Hames, C.G., Hjortland, M.C., Hulley, S.B., Kagan, A., Zukel, W.J., 1977. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* 55 (5), 767–772.
- Dam, J.P., Vleeming, W., Riezebos, J., Post, M.J., Porsius, A.J., Wemer, J., 1997. Effects of hypercholesterolemia on the contractions to angiotensin II in the isolated aorta and iliac artery of the rabbit: role of arachidonic acid metabolites. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 30 (1), 118–123.
- de Man, F.H., Weverling-Rijnsburger, A.W., van der Laarse, A., Smelt, A.H., Jukema, J.W., Blauw, G.J., 2000. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20 (3), 744–750.
- Dichtl, W., Nilsson, L., Goncalves, I., Ares, M.P.S., Banfi, C., Calara, F., Hamsten, A., Eriksson, P., Nilsson, J., 1999. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells. *Circulation* 84 (9), 1085–1094.
- Egger, M., Smith, G.D., Pfluger, D., Altpeter, E., Elwood, P.C., 1999. Triglyceride as a risk factor for ischaemic heart disease in British men: effect of adjusting for measurement error. *Atherosclerosis* 143 (2), 275–284.
- Fujii, K., Umamoto, S., Fujii, A., Yonezawa, T., Sakumura, T., Matsuzaki, M., 1999. Angiotensin II type 1 receptor

- antagonist downregulates nonmuscle myosin heavy chains in spontaneously hypertensive rat aorta. *Hypertension* 33 (4), 975–980.
- Galle, J., Bauersachs, J., Busse, R., Bassenge, E., 1992. Inhibition of cyclic AMP- and cyclic GMP-mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins. *Arteriosclerosis Thrombosis* 12 (2), 180–186.
- Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., Dawber, T.R., 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *American Journal of Medicine* 62 (5), 707–714.
- Habib, J.B., Bossaller, C., Wells, S., Williams, C., Morrisett, J.D., Henry, P.D., 1986. Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker. *Circulation Research* 58 (2), 305–309.
- Hirata, K., Akita, H., Yokoyama, M., Watanabe, Y., 1992. Impaired vasodilatory response to atrial natriuretic peptide during atherosclerosis progression. *Arteriosclerosis Thrombosis* 12 (1), 99–105.
- Hirono, O., Kubota, I., Shiga, R., Abe, S., Terashita, K., Tomoike, H., 1996. Impaired hyperemic response of forearm vessels in patients with coronary artery disease. A non-invasive evaluation. *Japanese Heart Journal* 37 (6), 837–846.
- Hulley, S.B., Rosenman, R.H., Bawol, R.D., Brand, R.J., 1980. Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease. *New England Journal of Medicine* 302 (25), 1383–1389.
- Inoue, T., Saniabadi, A.R., Matsunaga, R., Hoshi, K., Yaguchi, I., Morooka, S., 1998. Impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced coronary artery relaxation in patients with high serum remnant lipoprotein particles. *Atherosclerosis* 139 (2), 363–367.
- Israel, A., Cierco, M., Sosa, B., 2000. Angiotensin AT(2) receptors mediate vasodepressor response to footshock in rats. Role of kinins, nitric oxide and prostaglandins. *European Journal of Pharmacology* 394 (1), 103–108.
- Kanazawa, K., Kawashima, S., Mikami, S., Miwa, Y., Hirata, K., Suematsu, M., Hayashi, Y., Itoh, H., Yokoyama, M., 1996. Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *American Journal of Pathology* 148 (6), 1949–1956.
- Kolodgie, F.D., Virmani, R., Rice, H.E., Mergner, W.J., 1990. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation Research* 66 (4), 1112–1126.
- Lundman, P., Eriksson, M.J., Stuhlinger, M., Cooke, J.P., Hamsten, A., Tornvall, P., 2001a. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *Journal of the American College of Cardiology* 38 (1), 111–116.
- Lundman, P., Tornvall, P., Nilsson, L., Pernow, J., 2001b. A triglyceride-rich fat emulsion and free fatty acids but not very low density lipoproteins impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis* 159 (1), 35–41.
- Lupattelli, G., Lombardini, R., Schillaci, G., Ciuffetti, G., Marchesi, S., Siepi, D., Mannarino, E., 2000. Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia: association with small, dense LDL cholesterol particles. *American Heart Journal* 140 (3), 521–526.
- Nagornev, V.A., Rabinovich, V.S., 1998. Can endothelial cells accumulate lipids? *Atherosclerosis* 136 (1), 197–198.
- Rosenson, R.S., 1999. Hypertriglyceridemia and coronary heart disease risk. *Cardiol Review* 7 (6), 342–348.
- Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (6423), 801–809.
- Schmidt, K., Klatt, P., Mayer, B., 1993. Hypercholesterolemia is associated with a reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. *Arteriosclerosis Thrombosis* 13 (8), 1159–1163.
- Shiomi, M., Ito, T., Tsukada, T., Yata, T., Ueda, M., 1994. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study. *Arteriosclerosis Thrombosis* 14 (6), 931–937.
- Stiko-Rahm, A., Wiman, B., Hamsten, A., Nilsson, J., 1990. Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 10 (6), 1067–1073.
- Takasaki, S., Zhang, C., Ito, T., Tomoike, H., 1999. Does association of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia augment aortic atherosclerosis? *Supplement to Circulation* 100 (18), 1-698.
- Tagawa, H., Tomoike, H., Nakamura, M., 1991. Putative mechanisms of the impairment of endothelium-dependent relaxation of the aorta with atheromatous plaque in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation Research* 68 (2), 330–337.
- Tagawa, H., Tomoike, H., Mitsuoka, W., Satoh, S., Kuga, T., Shimokawa, H., Nakamura, M., Takeshita, A., 1993. Hyperreactivity of aortic smooth muscle to serotonin is related to the presence of atheroma in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Cardiovascular Research* 27 (12), 2164–2169.
- Verbeuren, T.J., Jordaens, F.H., Zonnekeyn, L.L., Van Hove, C.E., Coene, M.C., Herman, A.G., 1986. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circulation Research* 58 (4), 552–564.

- Yang, B.C., Phillips, M.I., Mohuczy, D., Meng, H., Shen, L., Mehta, P., Mehta, J.L., 1998. Increased angiotensin II type I receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 18 (9), 1433–1439.
- Zhang, X., Hintze, T.H., 2001. cAMP signal transduction cascade, a novel pathway for the regulation of endothelial nitric oxide production in coronary blood vessels. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 21 (5), 797–803.

遺伝性高中性脂肪血症家兎における 動脈硬化病変の進展および大腿動脈圧

下田智子, 石幡 明*, 伊藤恒賢**, 大和田一雄**,
會田智美, 利 美賀子, 片野由美

山形大学医学部看護学科臨床看護学講座

*山形大学医学部器官機能統御学講座腫瘍分子医科学分野

**山形大学医学部動物実験施設

(平成16年10月13日受理)

要 旨

高コレステロール血症は、粥状動脈硬化の形成に密接に関わっている^{1),2)}。その一方で、高コレステロール血症に合併した高中性脂肪血症が、動脈硬化の進展にどのような役割を果たしているのかについては、まだ一定の見解が得られていない。山形大学医学部動物実験施設では、Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits を中性脂肪値にしたがって選抜交配することにより、中性脂肪が高値の群 (high-triglyceride rabbit: TGH) と低値の群 (low-triglyceride rabbit: TGL) の2系統の遺伝疾患モデルを樹立した。そこで、本研究では TGH の動脈硬化病変の分布と循環動態について検討した。

実験には、24ヶ月齢の日本白色家兎 (Japanese White rabbit: JW) と TGH を用いた。摘出した大動脈の動脈硬化病変を、Elastica-Masson trichrome 染色により検討した。また、ケタミンとキシラジンの静脈内投与による持続麻酔下において、大腿動脈圧を測定した。大腿静脈に挿入したカニューレより、NO 合成酵素阻害薬である N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を投与し、血圧の経時的変化を測定した。

JW では、検討した大動脈のいずれの部位でも、全く動脈硬化病変を認めなかった。一方、TGH では大動脈弓部に顕著な動脈硬化病変を認めた。定常時血圧は、JW と TGH の間に有意な差はなかった。しかし、TGH の脈圧は、JW よりも有意に大きかった。また、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の投与によって、JW、TGH いずれにおいても血圧が有意に上昇した。しかし、L-NAME 投与後の血圧上昇率には、JW と TGH の間に明らかな差は認められなかった。以上の結果から、TGH の大動脈では動脈硬化が進展していること、それにより血管壁の弾性低下をきたし脈圧を増大させることが示唆された。

キーワード：高脂血症、中性脂肪、動脈硬化、血圧、NO

緒 言

動脈硬化症は、虚血性心疾患や脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などの虚血性血管障害の主要な原因である。動脈硬化症の発症・進展には多くの因子が関与しており、なかでも高コレステロール血症に代表される血中脂質異常は、現在までに立証されている危険因子の一つである^{1,2)}。さまざまな疫学調査³⁾や高脂血症患者²⁾および疾患モデル動物の解析⁴⁾などにより、その粥状動脈硬化発症・進展への関与が証明されている。しかしながら、血中脂質の中でも中性脂肪の上昇と血管壁での脂質の蓄積との関連は、必ずしも明解ではなく⁵⁾、高中性脂肪血症による動脈硬化症の発症・進展機序に関しては、未だ確固たる結論は得られていない。

粥状動脈硬化病変は、組織学的にみると、脂肪線条 (fatty streak)、線維性硬斑 (fibrous plaque) を経て、石灰化や血栓付着を伴った進行性病変へと進展し血管内腔の閉塞をきたす。これは、単球がスカベンジャー受容体を発現するマクロファージに分化し、酸化 LDL などの変性 LDL を取り込んで泡沫細胞となり、線条脂質沈着巣を形成することによる^{6,7)}。コレステロールは、最終的には低比重リポ蛋白 (LDL) として血液中に運搬されるので、脂質の中でもコレステロールが、動脈硬化発症の初期において重要な役割を担うと考えられている。さらに、高脂血症では、組織学的な動脈硬化発症に加えて、血管機能の低下がおこる。これは、酸化 LDL、 β VLDL のようなリポ蛋白が内皮依存性弛緩反応を低下させることによる⁷⁾。すなわち、血管内で停滞した LDL は、局所の酸化ストレスにより変性して酸化 LDL となり、血管内皮細胞機能障害をもたらす⁷⁾。血管内皮依存性弛緩反応は、内皮細胞に存在する一酸化窒素合成酵素 (eNOS) から産生される NO により生じる⁸⁾。動脈硬化症や高脂血症では、酸化 LDL による血管内皮障害の結果、eNOS から産生さ

れる NO が減少することにより、内皮依存性血管弛緩反応が低下する^{7,8)}と考えられる。

コレステロールの重要性に比較して、中性脂肪の動脈硬化危険因子としての役割は、これまで十分な評価がなされてこなかった。その理由は、①中性脂肪それ自体は粥状動脈硬化病変に蓄積されないこと⁹⁾、②著しい高中性脂肪血症を呈する高脂血症においても、粥状動脈硬化は軽度だったとの報告があること⁹⁾、などによる。一方、中性脂肪含有リポ蛋白であるいわゆるレムナントリポ蛋白は、加水分解後に容易に血管内皮細胞下に侵入して粥状動脈硬化に関係する¹⁰⁾。その際、レムナントリポ蛋白は、LDL とは異なり変性を受けることなくマクロファージの受容体 (LRP, VLDL 受容体, アポ B48 受容体など) を介して取り込まれ、マクロファージの泡沫細胞化に働く。しかしながら、中性脂肪は加水分解されて蓄積されないまま消失することも報告されている⁹⁾。

山形大学医学部器官病態統御学講座、循環・呼吸・腎臓内科学分野と山形大学医学部動物実験施設では、遺伝性高コレステロール血症家兔を中性脂肪値にしたがって繰り返し選抜交配し、中性脂肪が高値 (TG>500mg/dl) の群 (high-triglyceride group; TGH) と低値 (TG<250mg/dl) の群 (low-triglyceride group; TGL) の2系統の遺伝疾患モデルの樹立に成功した¹¹⁾。この遺伝疾患モデル動物の基礎的循環動態については明らかにされていない。そこで本研究では、高中性脂肪血症家兔 (TGH) の動脈硬化病変の分布および循環動態について検討した。

材料と方法

実験には、24ヶ月齢の Japanese White rabbits (JW) (♂, 体重 3.7 ± 0.1 kg, $n=5$)、TGH rabbits (TGH) (♂, 体重 2.5 ± 0.02 kg, $n=6$) を用いた。本実験は、山形大学医学部動物実験指針¹²⁾、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和

48年法律第105号)、実験動物の使用及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)を遵守して行った。

1. 組織学的検討: 大動脈を摘出した後、I: 心臓起始部から総頸動脈分岐部までの部位(大動脈弓部)、II: 総頸動脈分岐部から肋間動脈分岐部までの部位(胸部大動脈上部)、III: 肋間動脈分岐部付近の部位(胸部大動脈中部)、IV: 横隔膜付近の部位(胸部大動脈下部)の4カ所に分け(図1, 右)、24時間10%ホルマリン溶液で固定した。固定後の大動脈は、Hematoxylin-Eosin染色およびElastic-Masson trichrome染色を行い、それらの組織像をAdobe Photoshopを用いてFilm Scanner(Nikon; LS 1000)で読み込んだ。画像解析にはNIH Imageを用いて、動脈硬化面積〔(肥厚内膜面積/平滑筋内膜で囲まれた面積)×100〕を計算した。

2. 血圧測定: ketamine (0.11mg/kg/min, i.v.)とxylazine (0.02 mg/kg/min, i.v.)の静脈内投与により麻酔を行った。さらに、大腿動脈にカニューレを挿入し、圧トランスデューサーを用いて持続的に血圧を測定し、Thermal Array Recorder (NIHON KOHDEN; RTA 1200M)に記録した。また、大腿静脈に留置したカニューレよりNO合成酵素阻害薬であるN^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 26 mg/kg)を投与し、それによる血圧の経時的変化を測定した。

使用薬物

実験には、ketamine hydrochloride (三共, 東京)、xylazine (バイエル, 東京)、N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いた。

統計処理

得られたデータは、正規分布の検定を行い、

正規分布の確認後に、対応のないStudent's *t*-test (等分散の場合)あるいはWelch's *t*-test (等分散でない場合)を用いて検定した。また、血圧変化率の比較には、ノンパラメトリック検定であるMann-Whitney's U testを用いた。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で表示した。P<0.05をもって有意差があると判定した。

結 果

1. 大動脈における動脈硬化病変(図1, 図2)

図1は、JWとTGHの大動脈における動脈硬化病変の顕微鏡写真を示している。JWでは、検討したいずれの部位においても動脈硬化病変は認められなかった。一方、TGHでは、検討したほとんどの部位において動脈硬化病変を認め、特に大動脈弓部において病変が顕著であった(図1)。動脈硬化病変の分布率をNIH Imageを用いて解析したところ、JWでは検討した部位に硬化巣は全く見られなかったのに対し、TGHの動脈硬化分布率は、大動脈弓部52.9±6.8%、胸部大動脈上部48.7±6.3%、胸部大動脈中部31.3±7.5%、胸部大動脈下部20.9±9.2%であった(図2)。

JWでは、検討したいずれの部位においても、単層の内皮細胞が脱落せずに血管内腔を覆っていた。その直下に整然と内弾性板があり内膜肥厚は全く生じていなかった。また、マクロファージや泡沫細胞は観察されなかった。一方TGHでは、内皮細胞が一部で脱落しているのが観察された。粥状硬化部では、膠原線維の豊富な線維性内膜肥厚の進行が見られ、内弾性板が途切れて断絶している箇所も認められた。さらに、中膜平滑筋細胞が内弾性板を越えて内膜へ遊走、侵入して増殖している像も観察された。TGHでは、動脈硬化部位内膜においてマクロファージおよび大型化した泡沫細胞が多数見られた。

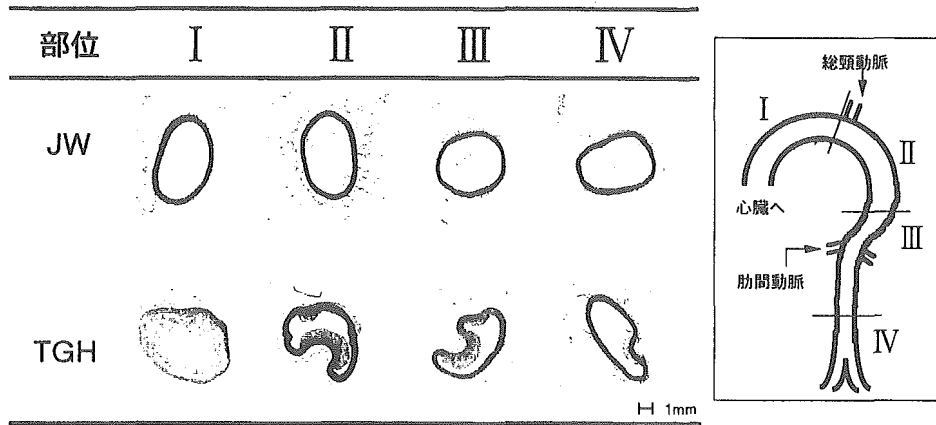


図1. 大動脈における動脈硬化病変の比較
 左図の上段は Japanese White rabbits (JW)、下段は TGH rabbits (TGH) の大動脈における動脈硬化病変の顕微鏡写真を示したものである。I: 大動脈弓部 (心臓起始部から総頸動脈分岐部までの部位)、II: 胸部大動脈上部 (総頸動脈分岐部から肋間動脈分岐部までの部位)、III: 胸部大動脈中部 (肋間動脈分岐部付近の部位)、IV: 胸部大動脈下部 (横隔膜付近の部位) を示している。右図は I~IV の各部位を示している。

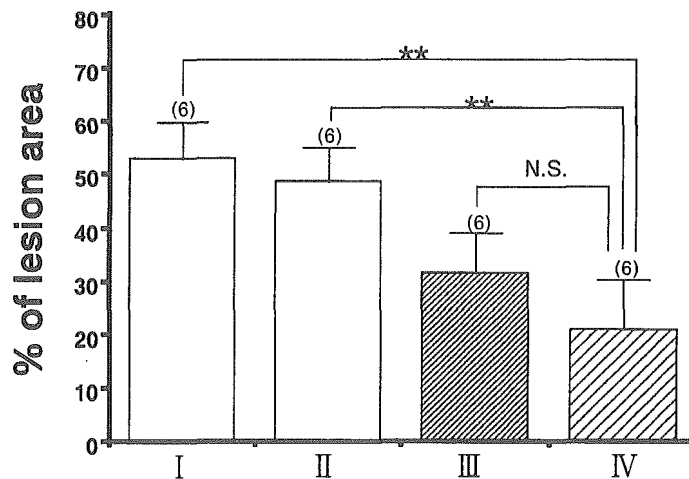


図2. 動脈硬化病変の NIH Image による解析
 グラフの値は、% of lesion area = (肥厚内膜面積 / 血管平滑内膜で囲まれた面積) × 100 で示したものである。この解析には Image editing software Adobe Photoshop と NIH Image を用い、値は平均±標準誤差で表している。
 I: 大動脈弓部 (心臓起始部から総頸動脈分岐部までに部位)
 II: 胸部大動脈上部 (総頸動脈分岐部から肋間動脈分岐部までの部位)
 III: 胸部大動脈中部 (肋間動脈分岐部付近の部位)
 IV: 胸部大動脈下部 (横隔膜付近の部位)
 **P<0.01 (vs. 胸部大動脈下部) N.S.: not significant () 内は実験例数。

2. 大腿動脈圧

なかった。

(1) 定常時血圧 (図3)

JW と TGH の定常時血圧は、それぞれ拡張期血圧 $69.0 \pm 6.9 \text{ mmHg}$ 、 $63.3 \pm 2.8 \text{ mmHg}$ 、収縮期血圧 $88.5 \pm 6.4 \text{ mmHg}$ 、 $105.8 \pm 4.8 \text{ mmHg}$ 、平均血圧 $75.5 \pm 6.5 \text{ mmHg}$ 、 $77.5 \pm 2.6 \text{ mmHg}$ であった。これらの値には、JW と TGH 間で有意差はみられなかった。しかし、JW の脈圧は $19.6 \pm 3.5 \text{ mmHg}$ だったのに対し、TGH では $40.5 \pm 5.6 \text{ mmHg}$ であり、JW よりも TGH のほうが有意に増大した。

考 察

高コレステロール血症に代表される血中脂質異常は、動脈硬化発症の危険因子の一つである。さらに、高中性脂肪血症が冠動脈疾患の発症にどのように関与するのかについて、欧米およびわが国において研究が進められてきた^{1,2)}。しかし、中性脂肪の上昇と血管壁で生じる脂質の蓄積との関連は明確ではなく³⁾、高中性脂肪血症がどのような機序で動脈硬化を発症するのか、また動脈硬化の進展にどの程度関与するのかは不明である。

(2) L-NAME による血圧の変化 (図4)

NO の血圧への関与を検討するために L-NAME による平均血圧の変化をみた。L-NAME 投与前の平均血圧は JW では $85.5 \pm 6.3 \text{ mmHg}$ 、TGH では $88.6 \pm 4.8 \text{ mmHg}$ であったのに対し、L-NAME 投与10分後の平均血圧は、JW では $101.6 \pm 2.4 \text{ mmHg}$ 、TGH では $110.6 \pm 6.9 \text{ mmHg}$ であった。このように L-NAME によって、JW と TGH いずれにおいても血圧が有意に上昇した。また、その血圧上昇率は、JW では $121.5 \pm 8.4\%$ 、TGH では $125.1 \pm 3.5\%$ であり、両群間で変化率に差はみられ

本研究では、新しく樹立された遺伝性高中性脂肪血症家兔を用いて、その基礎的特性を明らかにする目的で、①大動脈における動脈硬化病変の分布、②遺伝性高中性脂肪血症家兔の循環動態について検討した。

大動脈における動脈硬化病変

JW では、検討したいずれの部位においてもマクロファージ・泡沫細胞は見られず、単層の内皮細胞が血管内腔を覆っていた。TGH では、

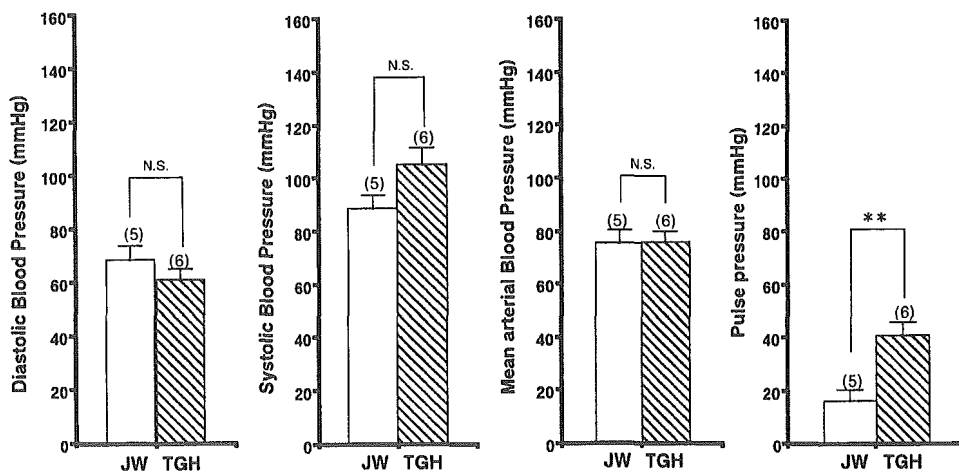


図3. 定常時血圧

グラフの値は、左から拡張期血圧、収縮期血圧、平均血圧、脈圧の実数値を示し、値は平均値±標準誤差で表している。** $P < 0.01$ (JW vs. TGH) N.S.: not significant ()内は実験例数。

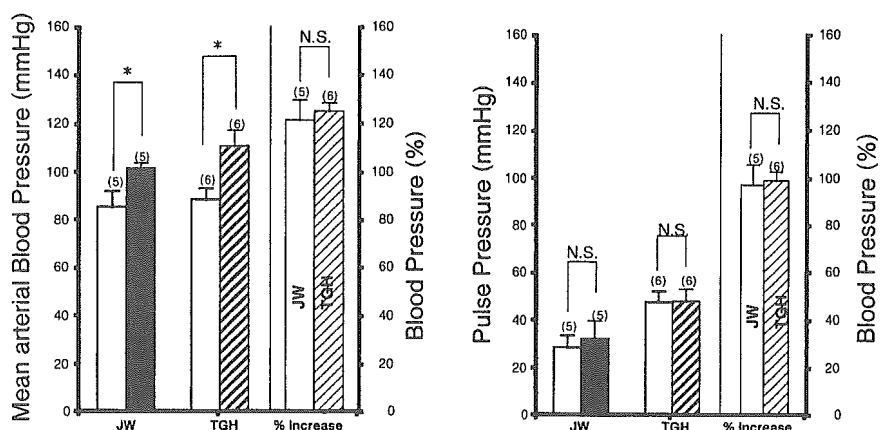


図4. L-NAME による血圧の変化

グラフの値は、左から平均血圧と脈圧の実数値と血圧変化率を表している。血圧変化率とは、L-NAME 投与前の血圧を100%とし、L-NAME 投与10分後の血圧変化率を示した。値は平均値±標準誤差で表している。

* $P < 0.05$ (vs. L-NAME 投与10分後の血圧) N.S.: not significant () 内は実験例数。

□ : JW の L-NAME 投与前の血圧

□ : TGH の L-NAME 投与前の血圧

■ : JW の L-NAME 投与10分後の血圧

■ : TGH の L-NAME 投与10分後の血圧

□ : JW rabbits の血圧変化率

□ : TGH rabbits の血圧変化率

内皮細胞の脱落、線維性内膜肥厚の進行、中膜平滑筋細胞の内膜下への遊走・増殖、多数の泡沫細胞が見られた。以上の結果は、TGH においては、内皮細胞の機能異常に伴って血液中の単球・マクロファージが内膜下に侵入し、変性脂質等を貪食して泡沫細胞化し、さらに種々の増殖因子やサイトカインを産生して中膜平滑筋の遊走・増殖を促進し、粥状硬化病変を形成するという一連の過程が進行していることを示唆するものと考えている。

本研究の TGH (24ヶ月齢) で得られた結果は、22ヶ月齢の WHHL の大動脈で見られた動脈硬化病変の進展¹⁹⁾と類似していた。また、TGH では、動脈硬化病変は大動脈弓部から胸部大動脈にかけて広範囲にみられたが、大動脈弓部にもっとも強く認められた。WHHL においても、動脈硬化病変は大動脈弓部と細動脈分岐部に形成される傾向がある¹⁹⁾。その理由のひとつとして、動脈分岐部付近での血液の流れ

に、乱流が生じやすいことが挙げられる。

定常時における大腿動脈圧

持続麻酔下の大腿動脈圧を測定した結果、定常時の収縮期・拡張期・平均血圧のいずれにおいても、JW と TGH 間に有意差は認められなかった。これらの結果は、TGH と同様に粥状動脈硬化の進展している WHHL と JW の定常時血圧に有意差を認めなかったという報告¹⁴⁾と一致している。このように各パラメータには有意差がなかったものの、TGH の脈圧は、JW に比較して有意に増大していた。同様に、WHHL においても加齢に伴い脈圧が増大するという報告がある¹⁸⁾。さらに、LDL 受容体欠損により高脂血症を引き起こす Kurosawa and Kusanagi-Hypercholesterolemic (KHC) rabbits においても、24ヶ月齢の大動脈弓部に動脈硬化病変を認め、10ヶ月齢の KHC と比較して24ヶ月齢では脈圧が増大したとの報告がある¹⁷⁾。したがって、本研究で明らかになった TGH における脈

圧増加は、動脈硬化によって大血管の弾力性が低下していることが原因であろう。動脈硬化が進展すれば大血管の弾性低下をきたし、さらに脈圧を増大させることが報告されている^{15),16)}。脈圧増加は、動脈壁に大きな負荷をあたえることにより血管構造変化を引き起こす可能性が高い。そのため、動脈硬化が進展するとさらに大動脈弾性が低下する。このような悪循環の結果、収縮期血圧が上昇し、拡張期血圧が低下してくるものと考えられる。

大腿動脈圧の調節における NO の関与

血管内皮細胞は、NO を介して循環調節および血管壁の恒常性維持に寄与し、その機能障害は動脈硬化の発症・進展に深く関与する⁷⁾。高脂血症では、組織学的に動脈硬化性変化がほとんど認められない初期段階でも、血管内皮依存性弛緩反応の障害がおこる¹⁹⁾。これは、酸化 LDL 等のリポ蛋白が血管内皮傷害を発生する結果、血管内皮依存性弛緩反応が低下するからである¹⁹⁾。

動脈硬化症の進展とともに内皮依存性血管弛緩反応が低下する^{7),8)}。実際に WHHL では、血漿 NO 値が JW よりも有意に低下していること¹⁴⁾や内皮依存性弛緩反応の減弱が報告されている²¹⁾。内皮依存性弛緩反応の減弱は、内皮細胞障害により NO の産生が減少することが原因のひとつと考えられる。定常状態での内皮由来 NO 生成を抑制することによって、血管の緊張が亢進し、血圧が上昇する可能性がある。そこで本研究では、TGH および JW において、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の血圧に対する影響を調べることにより、定常状態での NO 生成状態を比較検討した。その結果、L-NAME を投与することによって、JW の収縮期血圧は約 16 mmHg 上昇した。一方、定常状態における NO 生成が少ないために、L-NAME 投与による血管収縮反応は減弱するだろうと予想された TGH においても、収縮期血圧は約 22 mmHg 上昇した。この L-NAME 投与による血圧上昇には、JW と TGH 間で有意差はなかつ

た。本研究では、血中 NO 濃度の測定は行っていないが、L-NAME 投与による血圧上昇反応に差が認められなかったことから、TGH においても十分な量の NO が産生されている可能性がある。生体内で NO を生成する NO 合成酵素には、3 タイプのアイソフォーム、すなわち神経型 NO 合成酵素 (nNOS; NOS1)、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS; NOS2)、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS; NOS3) が知られている。nNOS は、中枢神経細胞、末梢神経細胞、膝臓β細胞などに存在し、細胞内カルシウム濃度依存性に活性調節される。iNOS は、サイトカインやリポ多糖類などにより発現誘導される酵素で、肝細胞、マクロファージ、消化管上皮、血管平滑筋細胞、グリア細胞等に存在し、カルシウム濃度非依存性である。eNOS は、おもに血管内皮細胞に存在し、その活性は、細胞内カルシウム濃度あるいは酵素のリン酸化によって調節される²²⁾。Shishido ら²³⁾の報告によると、TGH の大動脈における eNOS 蛋白および mRNA 発現は JW と同程度であるが、TGH の摘出血管標本ではアセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が減弱している。このことから、TGH では、eNOS の量と eNOS から産生される NO の量は相関していないことが示唆される。TGH では、動脈硬化病変の形成に関与するマクロファージや増殖した平滑筋細胞において iNOS が誘導、活性化されているため、それらが局所における NO の産生・放出を増加させている可能性¹⁹⁾が挙げられる。したがって TGH においては、内皮細胞の NO 産生能の変化のみならずマクロファージや血管平滑筋から産生される NO の関与を検討することも重要であろう。

本研究で用いた動物の血中コレステロール値を測定した結果、JW では 58.2 ± 5.1 mg/dl、TGH では 442.7 ± 27.7 mg/dl であった。また、中性脂肪値は、JW では 63.1 ± 8.0 mg/dl、TGH では 446.0 ± 35.2 mg/dl であった。このように TGH では、血中コレステロールおよび中性脂肪のいずれも、JW よりも数倍高値を示した。

同様に、若齢（3-4ヶ月齢）のウサギと比較した Shishido ら²³⁾の報告でも、TGH の血中コレステロール値と中性脂肪値は JW よりも高値であった。このことから、TGH で観察された動脈硬化病変が高中性脂肪血症によるのか、それとも高コレステロール血症に合併した高中性脂肪血症によるのかを明らかにするには、24ヶ月齢の TGH と TGL を比較検討する必要がある。この問題については、今後 TGL を用いて明らかにしていく予定である。

本研究の結果から、TGH では動脈硬化病変が著明に進行しており、TGH で見られる血中の脂質異常が動脈硬化症の発症・進展における重要な危険要因であることが示唆された。本学で新しく樹立された遺伝性高中性脂肪血症モデル家兎である TGH は、脂質代謝異常、特に中性脂肪と動脈硬化発症との関連を研究するうえで、今後益々有用な動物モデルとなると考えられる。

本研究は、文部科学省平成15年度COE研究補助金（山形大学医学部、分担研究班：#03COE117（旧）心血管機能統御学，#03COE126臨床看護学科）および（財）慢性疾患・リハビリテーション研究振興財団平成15年度研究助成金（A.I.）によって行なわれた。

文 献

1. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Yadong H: High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124 Suppl 1: S11-S20
2. Iso H, Naito Y, Sato S, Kitamura A, Okamura T, Sankai T et al.: Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 490-499
3. Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y, Enomoto M: Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. *Atherosclerosis* 2001; 157: 75-84
4. Shiomi M, Ito T, Shiraishi M, Watanabe Y: Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: Risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1992; 96: 43-52
5. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Eng J Med* 1976; 295 (7): 396-377
6. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362 (6423): 801-809
7. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD: Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 160-162
8. Ooboshi H, Toyoda K, Faraci FM, Lang MG, Heistad DD: Improvement of relaxation in an atherosclerotic artery by gene transfer of endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1752-1758
9. 後藤田貴也：粥状動脈硬化進展における高脂血症の関与 最新医学 2001; 56(6) : 1144-1150
10. Mahley RW, Ji ZS: Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16
11. Takasaki S, Zhang C, Ito T, Tomoike H: Does association of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia augment aortic atherosclerosis? *Supplement to Circulation* 1999; 100(18): I-698
12. 「山形大学医学部動物実験指針」の解説. 山形大学医学部;平成13年1月 : 1-2
13. Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Ueda M: Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ.

- Arterioscler Thromb 1994; 14: 931-937
14. Yamada S, Ito T, Adachi J, Ueno Y, Shiomi M: Decreased arterial responses in WHHL rabbits, an animal model of spontaneous hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Exp Anim* 2002; 51(5): 493-499
 15. Dart AM, Bronwym A: Pulse pressure – A review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 975-984
 16. Ryan, SM, Waack BJ, Weno BL, Heistad DD: Increases in pulse pressure impair acetylcholine-induced vascular relaxation. *Am J Physiol* 1995; 268: H359-H363
 17. Katsuda S, Hasegawa M, Kusanagi M, Shimizu T: Comparison of pulse-wave velocity in different aortic regions in relation to the extent and severity of atherosclerosis between young and older Kurosawa and Kusanagi-Hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Clin Sci* 2000; 99: 393-404
 18. Hasegawa M, Watanabe Y :Rheological properties of the thoracic aorta in normal and WHHL rabbits. *Biorheology* 1988; 25(1-2) : 147-156
 19. Tagawa H, Tomoike H, Nakamura M: Putative mechanisms of the impairment of endothelium-dependent relaxation of the aorta with atheromatous plaque in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 1991; 68: 330-337
 20. Holm P, Korsgard N, Shalmi M, Andersen HL, Hougaard P, Skouby SO, Stender S: Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. *J Clin Invest* 1997; 100: 821-828
 21. Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suemitsu M, et al.: Endothelial Constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 1996; 148: 1949-1956
 22. Furchugott RE, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-2018
 23. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y, Takasaki S, Miyamoto T, Itoh M, Takahashi H, Kubota I, Ito T, Katano Y, Wakabayashi I, Tomoike H: Chronic hypertriglyceridemia in young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth function. *Life Sci* 2004; 74: 1487-1501