

酸化ストレスと動脈硬化

國友 勝

Oxidative Stress and Atherosclerosis

Masaru KUNITOMO

*School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
11-68 Koshien Kuban-cho, Nishinomiya City 663-8179, Japan*

(Received August 13, 2007)

Oxidative stress is a continuous level of oxidative damage in animal cells, which is caused by an overabundance of reactive oxygen species or a decline in antioxidant ability against them. Oxidative stress increases with individual risk factors of atherosclerosis such as obesity, hypertension, hyperlipidemia, diabetes and smoking. Thus, oxidative stress is considered to play a key role in the pathogenesis of atherosclerosis. This review discusses the relationship between oxidative stress and atherosclerosis based on findings from our research group. We have found that atherosclerotic lesions are formed in the aorta of mice fed a high-cholesterol and high-linoleic diet, in parallel with elevated serum lipid peroxide levels. This model is useful for primary screening of antiatherosclerotic agents with antioxidative activity. One notable factor in the development of atherosclerosis is oxidized low-density lipoprotein (OxLDL). In order to examine OxLDL levels in blood, we have developed anion-exchange HPLC methods using stepwise elution. Using these methods, we have found that OxLDL markedly increases in a rat model of metabolic syndrome, in animals exposed to cigarette smoke and in smokers in parallel with other oxidative stress markers. These oxidative stress markers have been attenuated by administration of several antioxidants. In addition, we have found that smoking accelerates atherogenesis in the aorta of apoE-deficient mice and this acceleration can be ameliorated by administration of vitamin E. These observations suggest that antioxidant supplementation may be an effective therapeutic strategy for metabolic syndrome and smoking-induced diseases in which elevated oxidative stress plays a pivotal role.

Key words—oxidative stress; atherosclerosis; oxidized low-density lipoprotein; smoking; metabolic syndrome; peroxynitrite

1. はじめに

酸素は、地球上で最も豊富な元素の1つであり、われわれが絶え間なく呼吸している空気の21%を占めている。哺乳動物は、生命維持に必要なエネルギー(ATP)を効率よく獲得するために酸素を利用している。すなわち、生体に取り込まれた酸素の大部分は、細胞内のミトコンドリアの呼吸鎖(電子伝達系の酸化リン酸化)によるATP産生に使われている。しかし、この酸化過程において酸素の約2%が化学反応性の極めて強いスーパーオキシドなどの活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)になる(Table 1)。生成したROSは体細胞を無差別

に損傷するが、生体にはROSに対抗する精巧な抗酸化防御機構や損傷された部位を修復する機構が備わっている。通常、生体分子への損傷は最小限に抑えられる。ROSを消去する抗酸化防御系としては、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素に加えグルタチオン、アスコルビン酸、トコフェロール、 β -カロテン、ポリフェノール類などの抗酸化物質がある(Table 1)。ROSの生成は、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生系ばかりでなく、アレルギーや炎症、殺菌過程における好中球やマクロファージの活性化によるNAD(P)Hオキシダーゼあるいはミエロペルオキシダーゼ(MPO)の活性化、虚血-再灌流時におけるキサンチンオキシダーゼの活性化などによっても促進される。また、生体は、大気汚染物質や紫外線、喫煙などによって生成するROSにも曝されている。

武庫川女子大学薬学部(〒663-8179 西宮市甲子園九番町11-68)

現住所: 〒659-0033 芦屋市高浜町3-1-724

e-mail: masaru@mukogawa-u.ac.jp

本総説は、平成18年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Table 1. Generation and Scavenging of Reactive Oxygen Species (ROS) in Biological System

Reactive oxygen species (ROS)	ROS generating system	Antioxidant defense system
Radical	Mitochondria electron-transfer system	Enzyme
Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$)	NAD(P)H oxidase	Superoxide dismutase (SOD)
Hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$)	Xanthine oxidase	Glutathione peroxidase
Hydroperoxy radical ($\text{HOO}\cdot$)	Cyclooxygenase	Catalase
Peroxyl radical (lipids) ($\text{LOO}\cdot$)	Lipoxygenase	Peroxidase
Alkoxy radical (lipids) ($\text{LO}\cdot$)	NO synthase	Non-enzyme
Nitrogen dioxide (NO_2)	Myeloperoxidase	Vitamin E
Nitric oxide ($\text{NO}\cdot$)		Vitamin C
Non-radical		β -carotene
Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)		Glutathione
Hydrogen peroxide (H_2O_2)		Flavonoid
Hydroperoxide (lipids) (LOOH)		CoQ10
Hypochlorous acid (HOCl)		Uric acid
Peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$)		Albumin
Alkyl peroxyxynitrate (RONOO)		Ceruloplasmin
Ozone (O_3)		Transferrin

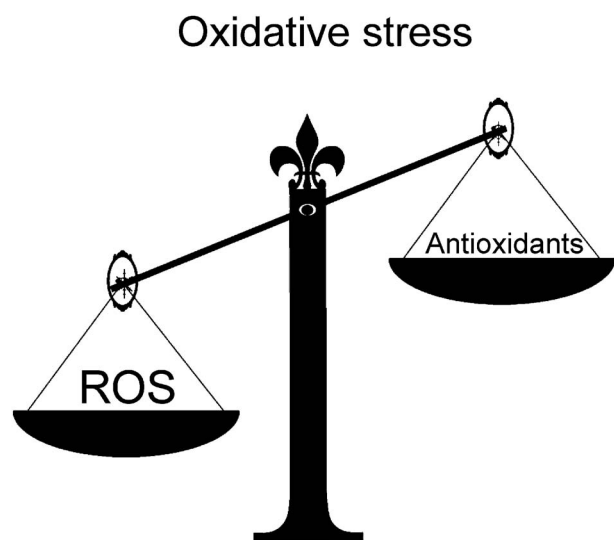
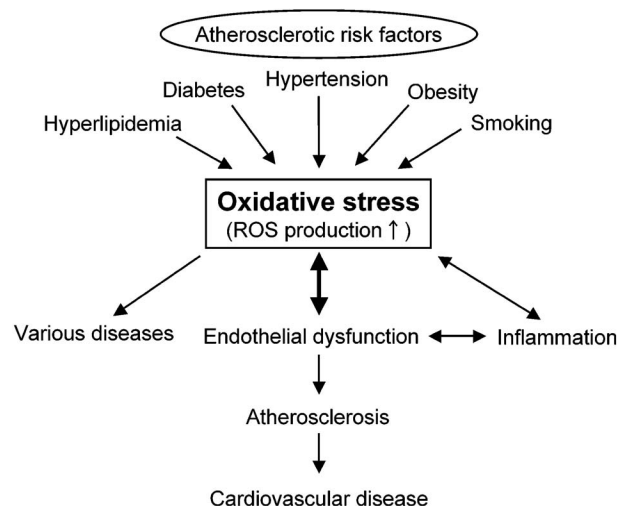


Fig. 1. Imbalance between Reactive Oxygen Species (ROS) Production and Antioxidant Defenses

「酸化ストレス」とは、生体における ROS の産生と抗酸化防御機構のバランスが崩れ、酸化に傾いた状態と定義されている (Fig. 1). すなわち、ROS の過剰産生または抗酸化能力の低下が酸化ストレスを招くことになる。ROS は、脂質、特にリン脂質や低比重リポタンパク (LDL) を酸化して過酸化脂質や酸化 LDL を生成し、また、タンパク質を酸化変性・失活させ、DNA の酸化損傷を引き起こす。それゆえ、酸化ストレスは、細胞・組織を傷害し、生体機能を障害することによって、動脈硬

Fig. 2. Atherosclerotic Risk Factors Promotes the Development of Cardiovascular Disease, which may Act *via* Oxidative Stress

化,¹⁻⁴⁾ がん,^{5,6)} 各種生活習慣病,⁷⁻⁹⁾ アルツハイマー,¹⁰⁾ パーキンソン病¹¹⁾ など多くの疾患の形成に関与し、また、老化を促進させるといわれている。

一方、高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満などの生活習慣病及び喫煙は、主な動脈硬化危険因子であるが、いずれの危険因子も生体の酸化ストレスを増大させることが明らかにされている。¹²⁻²⁰⁾ したがって、これら危険因子による酸化ストレスの増大が、動脈硬化形成に重要な役割を果たしていると考えられている (Fig. 2).

本総説は、筆者がこれまで追究してきた酸化ストレスと動脈硬化の関係について、その動機から現在に至るまでの成果を中心にまとめたものである。

2. リノール酸負荷による動脈硬化モデルの作製

2-1. 各種動脈硬化モデルの作製

動脈硬化症の発症機序を解明し、その予防薬や治療薬を開発するためには、動脈硬化の優れた動物モデルを作製することが必要である。動脈硬化の動物モデルとしては、以前から高コレステロール食を負荷するウサギモデルがよく知られている。ラット、マウス、モルモットは、動物の飼育、取り扱い、実験手技が容易で、投薬量が少なく済むなど実験動物として優れているが、高コレステロール食負荷のみでは動脈硬化を発症し難い。これら小動物に動脈硬化を発症させるためには、ビタミンD^{21,22)} β -アミノプロピオニトリル^{23,24)} アドリアマイシン²⁵⁾ 高食塩²⁶⁾などを併用する厳しい条件が必要である。

Viragら^{27,28)}は、高コレステロール食を負荷したラットにアジュバント関節炎を発症させると血管病変が起こることを報告している。この文献に触発され、筆者らも高コレステロールを負荷したラットの尾部基部に結核死菌の流動パラフィン懸濁液を皮下注射し、慢性炎症であるアジュバント関節炎を発症させたところ、アジュバント投与8週後の大動脈にコレステロールエステルの有意な蓄積が認められた(Fig. 3)²⁹⁾。この際、アジュバント関節炎発症に伴って血清中の過酸化脂質(thiobarbituric acid reactive substances: TBARSとして)値の増加することが明らかとなった³⁰⁾。同様の結果は、Yoshikawaら³¹⁾によっても報告されている。しかし、このような血中及び大動脈における脂質変化は、急性炎症のモデルであるカラゲニン足蹠浮腫ラットでは認められなかった。したがって、動脈硬化初期病変の発症には、慢性炎症時に増加する酸化ストレスが関わっている可能性が示唆された。事実、慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデスの患者では、脂質過酸化が亢進しており³²⁻³⁵⁾動脈硬化が形成され易い状態にあると報告されている³⁶⁾。

2-2. 過酸化脂質と動脈硬化

以上の知見に基づき、炎症によって生じる血中過酸化脂質の増加(酸化ストレスの増加)が動脈硬化形成に促進的に働いていると想定し、次の研究を進めた。まず、種々の不飽和度の異なる油脂を添加した高コレステ

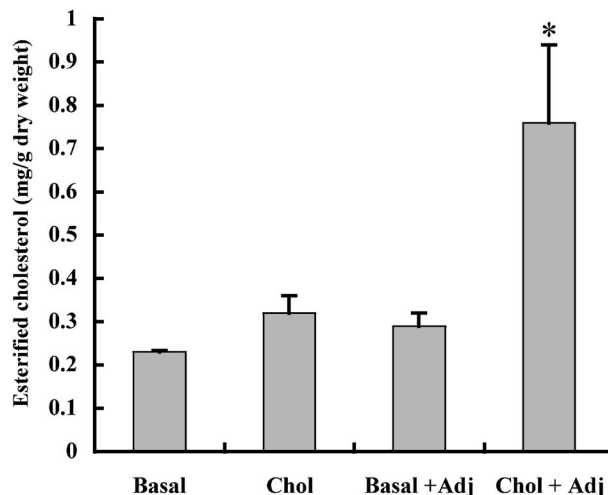


Fig. 3. Esterified Cholesterol Levels in Aorta of Rats Fed a 1.5% Cholesterol Diet and Treated with Adjuvant

Basal: fed a basal diet, Chol: fed a high-cholesterol diet, Adj: received adjuvant (*Mycobacterium butyricum*), Each value represents the mean \pm S.E. * $p < 0.05$, vs. Chol group.

ロール食をマウスに与え、飼育14週後の大動脈中に蓄積するコレステロールエステル値を比較した。その結果、コレステロールエステル値は、リノール酸>トウモロコシ油>ラード>ヤシ油を与えた動物群の順に高値を示した。これは食餌中の油脂の不飽和脂肪酸含有量の順でもあった(Fig. 4)。しかも、不飽和度の高い油脂負荷群ほど高い血清TBARS値を示し、また、血清TBARS値と大動脈コレステロールエステル値の間に正の相関が認められた³⁷⁾。そこで、筆者らは、それまで動脈硬化予防作用を有するとされていたリノール酸を用い、動脈硬化モデルの作製を試みた。10%リノール酸を添加した高コレステロール食でマウスを14週間飼育すると、血清TBARS値の増加とともに大動脈にコレステロールエステルの蓄積が起こり、組織学的にも大動脈弁付近に脂質沈着が認められた³⁸⁾。以上のように、マウスにリノール酸と高コレステロール食を負荷し、脂質過酸化を促進することにより動脈硬化モデルを作製することができた。

2-3. 動脈硬化マウスモデルの応用

筆者らの作製した動脈硬化マウスモデルを用い、抗酸化活性を有する物質の効果を検討し、プロブコール³⁸⁾ 茶カテキン³⁹⁾ マグネシウムイオン⁴⁰⁾及び冬虫夏草水抽出液⁴¹⁾に抗動脈硬化作用のあることを証明した(Fig. 5)。したがって、酸化ストレスが亢進している本動脈硬化モデルは、抗酸化物質の抗動脈硬化作

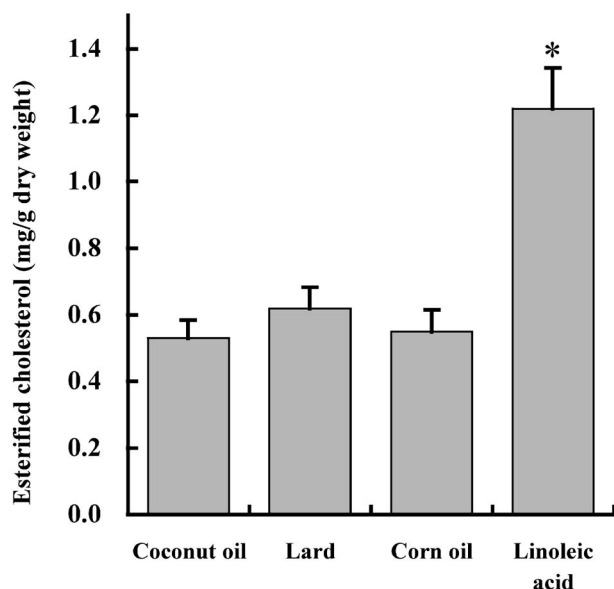


Fig. 4. Effects of Supplementation (10%) with Oils and Fats on Esterified Cholesterol Accumulation in Aorta of Mice Fed a High-cholesterol Diet for 14 Weeks

Each value represents the mean \pm S.E. * $p < 0.05$, vs. other oil and fat groups.

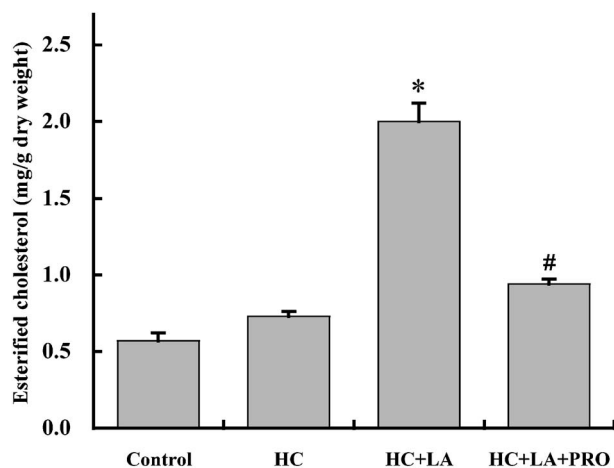


Fig. 5. Effects of Probulcol (PRO) on Esterified Cholesterol Accumulation in Aorta of Mice Fed a High-cholesterol Diet Containing Linoleic Acid (HC+LA)

Each value represents the mean \pm S.E. * $p < 0.05$, HC group vs. HC+LA group, # $p < 0.05$, HC+LA group vs. HC+LA+PRO group.

用をスクリーニングするには有用であると考えられる。

以上の結果から、血中過酸化脂質と動脈硬化形成の間に密接な関係があることが推察された。過酸化脂質の増加は、酸化 LDL の増加と関係しているように思われる。⁴²⁾ 酸化 LDL は、血管内皮細胞を障害し、また、マクロファージに限りなく取り込ま

れ、コレステロールを多量に蓄積した泡沫細胞を形成することによって動脈硬化の発症、進展に重要な役割を果たしていることが多くの研究者によって認められている。⁴³⁻⁴⁶⁾ 最近では、血中の酸化 LDL は、感受性の高い有用な冠動脈疾患のマーカーであるとされている。⁴⁷⁻⁵⁰⁾ それゆえ、酸化ストレスと酸化 LDL と動脈硬化の関係を解明するためには、どうしても酸化 LDL の血中動態を明らかにする必要がある。そこで、筆者らは、血中酸化 LDL の測定法の確立を試みた。

3. 酸化 LDL の測定法の確立

血中酸化 LDL の測定には、抗酸化 LDL モノクローナル抗体を用い、抗アポ B 抗体と組み合わせたサンドイッチ ELISA 法や競合 ELISA 法、ヒト血中の酸化 LDL の自己抗体の ELISA 法など、ELISA 法が主流となっている。酸化 LDL 中の免疫原としては、銅塩によって軽度に変性させた LDL やマロンジアルデヒド (MDA) 変性 LDL が用いられている。⁵¹⁻⁵³⁾ Itabe ら⁵⁴⁾ は、ヒト粥状動脈硬化巣を免疫原として得た酸化ホスファチジルコリンのモノクローナル抗体 DLH3 を用いて、酸化 LDL の高感度測定に成功している。しかし、ELISA 法では、抗体の違いによって異なる測定結果が得られる。^{55,56)} そこで、筆者らは、酸化変性度の極めて弱い LDL から強いものまでを測定できる方法を目指して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定法の開発に着手した。その結果、新鮮血漿又は血清を直接 HPLC カラムに注入することにより、各種リポタンパクの分離⁵⁷⁾ 及び酸化変性度の異なる LDL の亜分画分離⁵⁸⁻⁶²⁾ に成功し、簡便かつリアルタイムに血中 LDL の酸化変性状態を評価する方法を確立した (Fig. 6)。すなわち、塩化銅 (II) とウサギ血漿を反応させ、反応時間によって酸化度の異なる酸化 LDL を作製し、DAEA-グルコマンナゲル又はアニオン交換樹脂ゲルのカラムを用い、1 M NaCl とリン酸緩衝液の溶出液による段階溶出 stepwise elution により分離を行った (Fig. 7)。この方法は、酸化変性度の強い LDL ほどカラムに吸着し易いという性質を利用した分離法で、ラット、マウス、ヒトにも応用可能であった。また、たばこ煙水抽出液で変性させた LDL も銅塩で軽度に変性させた LDL と同様の分離パターンを示した (Fig. 8)。筆者らは、この HPLC 法を応用して、自然発

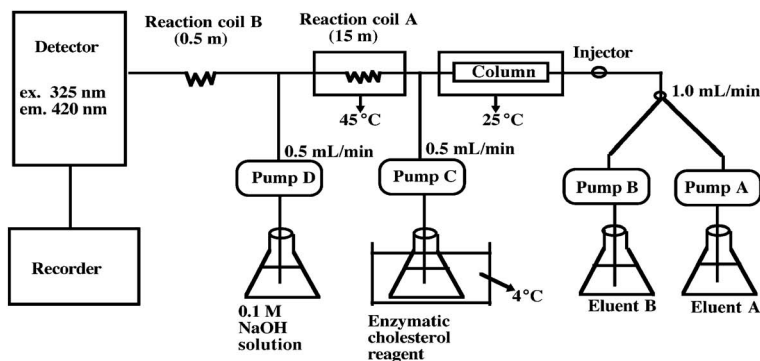


Fig. 6. Experimental Setup of Anion-exchange HPLC⁵⁷⁾

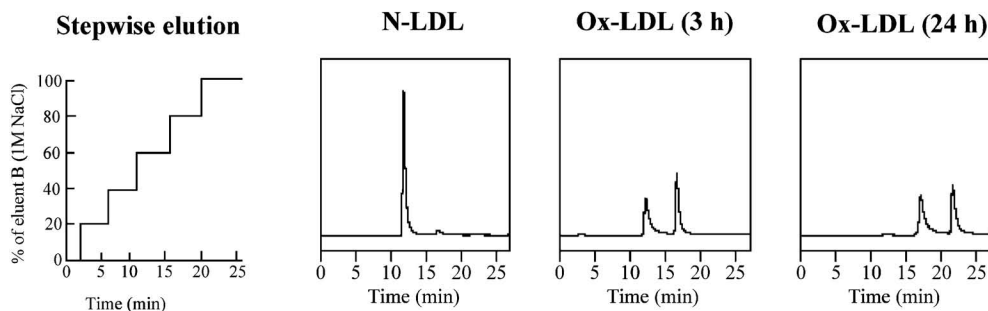


Fig. 7. Chromatograms of Native LDL (N-LDL) and Ox-LDLs by an Anion-exchange HPLC Methods Using Stepwise Elution. Ox-LDLs were prepared by incubation with $5 \mu\text{M}$ CuCl_2 for 3 and 24 h. Eluent B is 1 M NaCl containing 1 mM EDTA.

症高脂血症 (WHHL) ウサギの血漿が軽度に酸化変性していることを明らかにしている。⁶³⁾

4. 酸化ストレスマーカー

酸化ストレスの発現によって、生体の脂質、タンパク質、DNAが酸化障害されると、それぞれの酸化変性物質が血漿中や尿中に現れてくる。それらの特徴的物質は、酸化ストレスの強度を示すマーカーとして病態解析に有用である。現在、種々の酸化ストレスマーカーが種々の疾病診断に用いられている。⁶⁴⁾ 脂質の主な酸化ストレスマーカーとしては、脂質過酸化によって生じる比較的安定な分解終産物であるマロンジアルデヒド (MDA)、4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4HNE)、アクロレイン、イソプロスタン、特に F_2 イソプロスタンが用いられている。⁶⁵⁾ TBARS値は、MDAを測定した値で過酸化脂質を示す代表的指標として繁用されている。酸化LDLもまた重要な酸化ストレスマーカーの一つである。⁶⁶⁾ DNAの酸化損傷マーカーとしては、グアニン残基の酸化修飾によって生じる8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)が繁用されている。⁶⁷⁾ タンパク質の酸化ストレスマーカーとしては、好中

球やマクロファージ、血管内皮細胞において産生されるNOと O_2^- の反応で生成するパーオキシナイトライト (ONOO^-)がタンパク質チロシン残基をニトロ化することによって生じる3-ニトロチロシン、及びミエロペルオキシダーゼ (MPO)による H_2O_2 と Cl^- の反応で生じる次亜塩素酸 (HOCl)がチロシン残基をクロル化することによって生じる3-クロロチロシンがある (Fig. 9)。

5. メタボリックシンドロームと酸化ストレス

5-1. メタボリックシンドロームの病態

肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病は、主要な動脈硬化の危険因子である。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に伴って生じるインスリン抵抗性を共通の基盤として、高血圧、高血糖、高脂血症が同一患者に重複する症候群であり、そのような病態では心筋梗塞や狭心症など冠動脈疾患の発症が飛躍的に増大する。^{68,69)} 上記の動脈硬化危険因子は、それぞれ酸化ストレスを増大させることが報告されている。^{16,70-73)} 一方、酸化ストレスは、LDLの酸化、血管内皮細胞障害、炎症反応などを引き起こすことから、動脈硬化発症・進展に

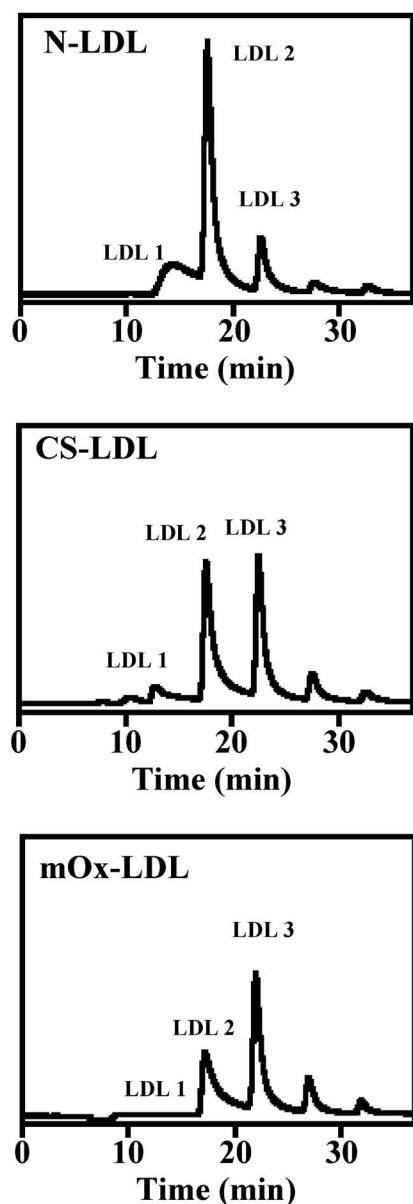


Fig. 8. Chromatograms of Native LDL (N-LDL), Cigarette Smoke-modified LDL (CS-LDL) and Mildly Oxidatively Modified LDL (mOx-LDL) by an Anion-exchange HPLC Methods Using Stepwise Elution

The degree of oxidative modification of LDL is great in order of LDL1, LDL2, LDL3.

中心的な役割を演じていると考えられている。したがって、動脈硬化危険因子の集積したメタボリックシンドロームでは、酸化ストレスが相乗的に増大することにより、動脈硬化の発症が強く促進されると推察される (Fig. 10)。事実、メタボリックシンドロームの患者では、血中に酸化ストレスマーカー^{17,74-76}及び炎症マーカー^{77,78}が増加し、内皮細胞が障害されていること⁷⁹が報告されている。最近では、アテローム硬化性心血管疾患患者の心血管イ

ベントを予測する信頼できる危険因子として炎症マーカーである高感度 C 反応性タンパク質 (hsCRP) の臨床的有用性が高まっている。^{80,81}

5-2. メタボリックシンドロームの動物モデル

筆者らは、高血圧自然発症ラット (SHR) に肥満形質遺伝子 (cp) を導入したコンジェニックラットである肥満・高血圧自然発症 SHR/NDmcr-cp (以下 SHR-cp と略) ラットを入手することができた。山本ら⁸²)は、SHR-cp ラットが、非肥満同胞ラットと比較して、肥満・高血圧に加え、血中コレステロール、中性脂肪及び遊離脂肪酸値、血糖値並びにインスリン値の顕著な増加を呈し、典型的なメタボリックシンドロームの病態を示すと報告している。そこで、筆者らは、SHR-cp ラットを長期間飼育し、メタボリックシンドローム様病態がどのような経時変化で発症するかを確認するとともに、血中に酸化ストレスマーカーや炎症マーカーが増加するか否かについて検討した。その結果、SHR-cp ラットは、予想通り対照動物の Wistar Kyoto (WKY) ラットに比べ、著しい肥満、高血圧、高血糖、高インスリン血症、高脂血症 (高コレステロール、高トリグリセライド、高遊離脂肪酸、高 LDL、高 VLDL、低 HDL) を示し、メタボリックシンドロームの典型的な症状を呈した。また、酸化ストレスマーカーである血清 TBARS 及び OxLDL 値 (LDL1 の減少と LDL2, LDL3 の増加) は、既に 6 週齢から高値を示し、8-OHdG 及び 3-ニトロチロシン値も加齢に伴い増加した。一方、ビタミン E 値は減少した。炎症マーカーの hsCRP 値は、少し遅れて 16-20 週齢で一過性に有意に増加した。3-クロロチロシン値は 3-ニトロチロシン値と同様の経時変化を示した (Fig. 11)。⁸³ 以上のような酸化ストレス及び炎症マーカーの増加は、自然発症高血圧ラット (SHR) の血中には認められなかった。このことは、動脈硬化危険因子の集積により相乗的に酸化ストレスが増大することを示唆している。3-クロロチロシンと 3-ニトロチロシンの生成は、酸化ストレスによる好中球やマクロファージの活性化によると推察される。

最近開発された SHRSP.Z-lepr^{fa}/IzmDmcr (SHRSP/ZF) ラットは、脳卒中易発症高血圧自然発症 (SHRSP) ラットに、コンジェニックの手法を用いて、高度な肥満を呈する Zucker fatty ラットのレブ

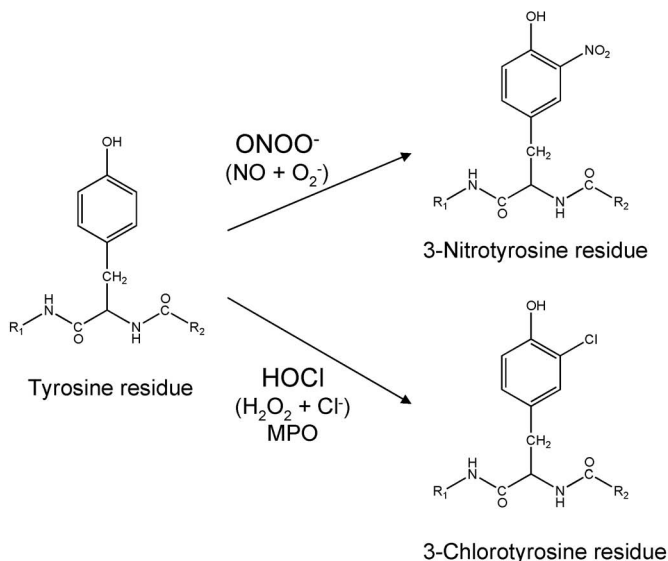


Fig. 9. Nitration and Chlorination of Tyrosine Residues in Proteins by Peroxynitrite (ONOO⁻) and Hypochlorous Acid (HOCl), Respectively, Produced by Activated Neutrophils, Macrophages and Endothelial Cells
MPO: myeloperoxidase.

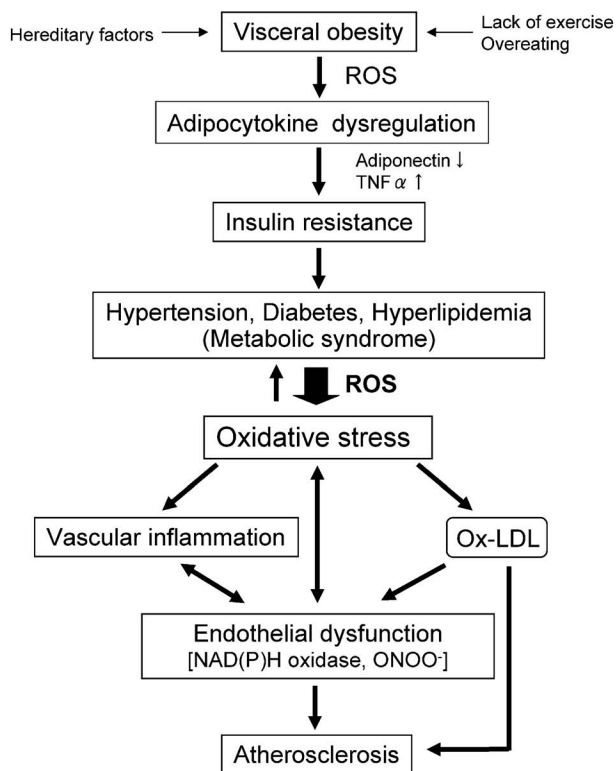


Fig. 10. The Association of Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis

チン受容体遺伝子変異を導入した、新たなメタボリックシンドロームモデルである。筆者らは、SHRSP/ZF ラットが SHR-cp ラットと類似した酸化ストレス増大及び炎症を発現することを認めてい

る。⁸⁴⁾

5-3. メタボリックシンドロームの抗酸化治療戦略
以上の結果から、酸化ストレス状態にあるメタボリックシンドロームの治療戦略として抗酸化物質の有用性が予測される。そこで、SHR-cp ラットに増大する酸化ストレス及び炎症マーカー、メタボリックシンドロームの個々の病態に及ぼす抗酸化剤投与の影響を検討した。抗酸化剤としては、ビタミンE、コエンザイム Q10 (CoQ10) 及びバナバ葉の成分コロソリン酸 (corosolic acid)⁸⁵⁾を用いた。また、アンジオテンシン II の AT₁ 受容体拮抗薬は、抗酸化剤ではないが、血管の NAD(P)H オキシダーゼ活性による ROS 産生を抑制することが報告されている^{86,87)}ことから、本実験ではテルミサルタンの影響も検討した。その結果、SHR-cp ラットに増加する酸化ストレス及び炎症マーカーに対し、使用したすべての抗酸化剤は抑制効果を示した。テルミサルタンも同様の傾向を示した。このような抗酸化剤の抑制効果は、SHR-cp ラットにおいて実際に酸化ストレスが増大していることを裏付けるものである。また、炎症マーカーが抗酸化剤投与で抑制されたことから、炎症反応は酸化ストレスによって引き起こされたと推察される。しかし、メタボリックシンドロームの個々の病態（動脈硬化の危険因子）に対する抗酸化剤の作用には違いがあり、ビタミン E が全く影響を及ぼさなかったのに対し、CoQ10

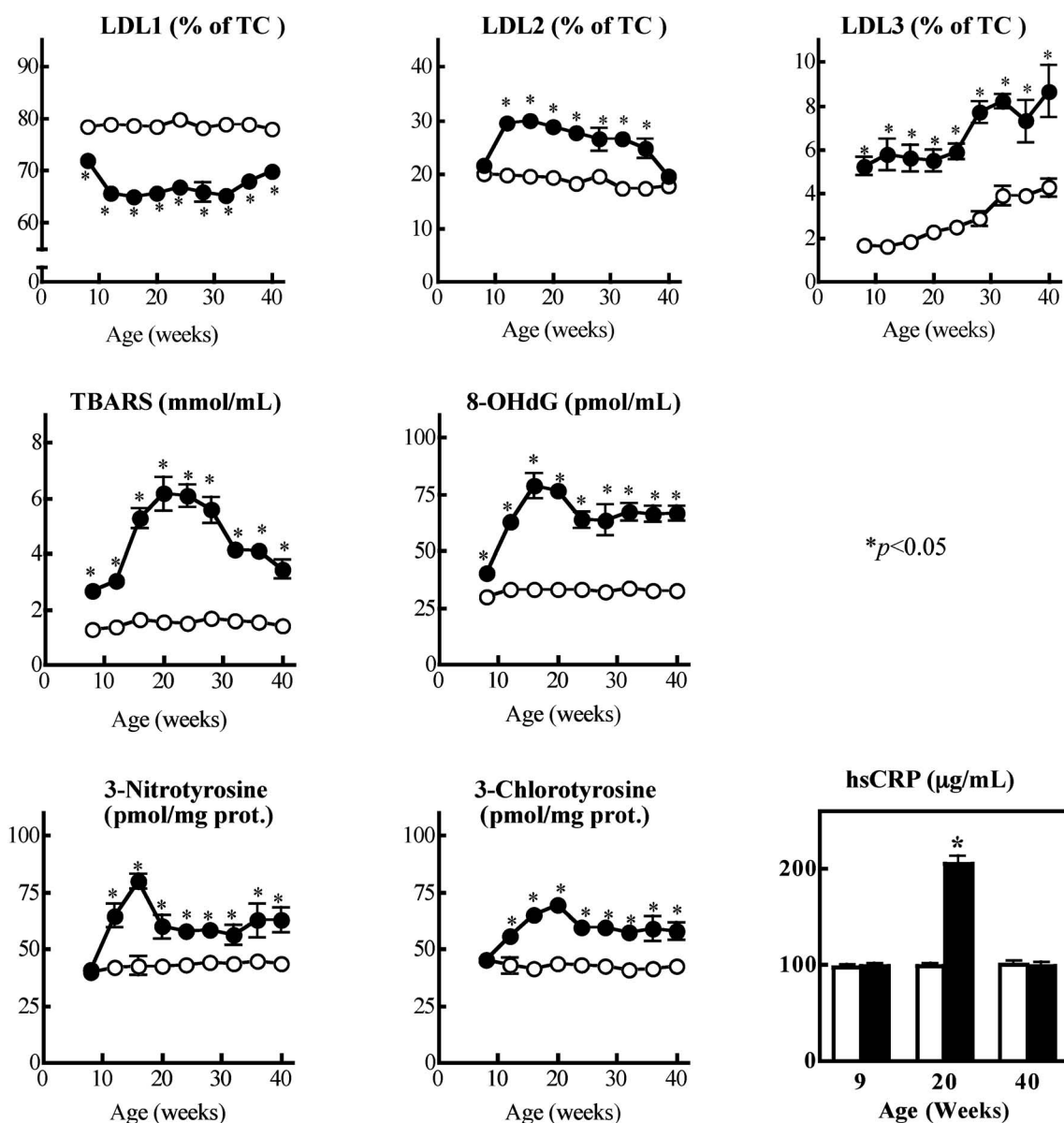


Fig. 11. Increased Oxidative Stress and Inflammation Markers in the Serum of SHR-cp Rats with Metabolic Syndrome Compared with Wistar-Kyoto Rats

Each value represents the mean \pm S.E. ○: Wistar-Kyoto rats, ●: SHR-cp rats.

は、降圧作用及びインスリン抵抗性改善作用を示し、⁸⁸⁾ コロソリン酸は、降圧作用と遊離脂肪酸低下作用を示した (Fig. 12).⁸⁹⁾ このように抗酸化剤によるメタボリックシンドロームの病態改善効果に違いが認められることから、今後、タイプの異なる抗酸化物質を用いて、より有効な物質を検索していく必要がある。

筆者らは、SHR-cp ラットは WKY ラットに比べ、大動脈及び腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応が減弱していることを明らかにしている。⁹⁰⁾ さらに、このような動脈における内皮依存性弛緩反応

の減弱が、CoQ10 及びテルミサルタンによって改善されることも明らかにしている (Fig. 13).⁹¹⁾ CoQ10 は、降圧作用を示すこと、⁹²⁾ 糖尿病患者の血圧を改善し、上腕動脈の内皮機能不全を改善することが報告されている。^{93,94)} したがって、本研究で認められた CoQ10 による血管機能改善効果は、メタボリックシンドロームのモデルラットで認められた降圧作用に関与しているかもしれない。一方、テルミサルタンによって血管内皮機能が改善されたことは、SHR-cp ラットの血管においてアンジオテンシン II の産生が高まり、NAD(P)H オキシダーゼ

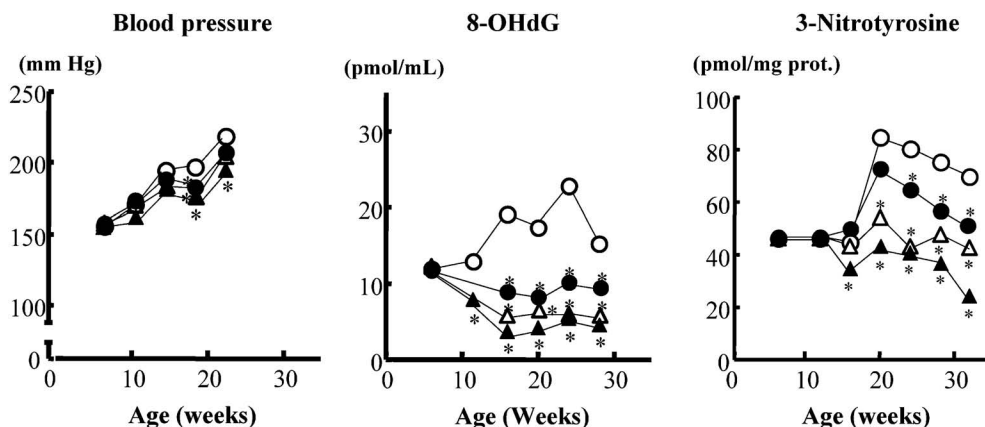


Fig. 12. Effects of CoQ10 Supplementation on the Increased Oxidative Stress and Blood Pressure in SHR-cp Rats with Metabolic Syndrome

Each value represents the mean ± S.E. **p* < 0.05 vs. Control group. ○: Control, ●: 0.07% CoQ10, △: 0.2% CoQ10, ▲: 0.7% CoQ10.

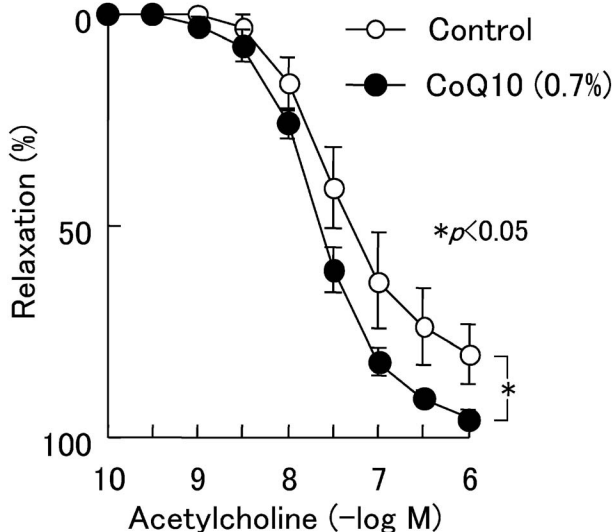


Fig. 13. Effects of CoQ10 (0.7%) Supplementation on Endothelium-dependent Relaxations Induced by Acetylcholine in Mesenteric Arteries of SHR-cp

Each value represents the mean ± S.E.

の活性化を介した ROS 産生によって酸化ストレスが増大していることを示している。恐らく、血管内皮細胞又は平滑筋細胞で生成する O₂ と eNOS によって生成される NO との反応によって形成される強力な酸化能とニトロ化能を持つ ONOO⁻ が内皮機能障害に大きな役割を果たしていると考えられる。事実、SHR-cp ラットの血管の 3-ニトロチロシン含量が WKY に比べ増加しており、その増加はテルミサルタン投与で減少することを明らかにしている。⁹¹⁾

以上の結果、酸化ストレスが高まっているメタリックシンドロームの予防、治療法として抗酸化剤

の投与は有望であると考えられる。

6. 喫煙と動脈硬化

喫煙と動脈硬化とを関係付ける数多くの基礎・臨床研究がなされてきたにも係わらず、喫煙による動脈硬化発症の機序はまだまだ十分に解明されていない。たばこ煙にはフリーラジカルなど多種のオキシダントが含まれていることから、筆者らは、喫煙と動脈硬化発症の接点に酸化ストレスが関わっているものと想定し研究を進めた。

6-1. たばこ煙水抽出液 (CSE) の *in vitro* 作用

横出ら⁹⁵⁾は、たばこ煙水抽出液と LDL を反応させて作製したたばこ変性 LDL が、マクロファージに容易に取り込まれ泡沫細胞化を促進することを報告している。筆者らも、たばこ煙中のニコチン及びタールをケンブリッジフィルターにて除去したガス相を PBS 溶液に通気して水抽出液 (CSE) を作製し、CSE と LDL との反応を試みた。その結果、CSE によって LDL の酸化変性ばかりでなく LDL アポタンパクのチロシン残基の 3-位にニトロ化が起こることを見出した。このように CSE が酸化及びニトロ化の両作用を持つことから、CSE 中に ONOO⁻ 類似反応物質の存在することが推察される (Fig. 14).^{96,97)} なぜなら、ONOO⁻ そのものは、極めて不安定で pH 7.4 において 1 分以内に分解されるからである。これに対し、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は室温で長時間安定である。また、*in vitro* 実験において、チロシンと ONOO⁻ を反応させたときの 3-ニトロチロシン生成速度は極めて速いのにに対し、CSE とチロシンの反応は徐々に進行

する（反応終了まで5時間以上）こと、さらに、ONOO⁻のスキャベンジャーである尿酸の存在下でONOO⁻の作用が消失するのに対し、ONOO⁻類似反応物質の作用は影響されないことなどから、CSE中のONOO⁻類似反応物質は、ONOO⁻自体やONOO⁻を徐々に放出するSIN-1(3-(4-morpholinyl)sydnominine)のような物質とは異なる構造を有すると推察される。

6-2. たばこ煙水抽出液 (CSE) の *in vivo* 作用

CSEを自然発症高脂血症(WHHL)ウサギに1日1回、長期間静脈内投与したところ、*in vitro*の実験と同様にLDLの酸化変性とニトロ化が亢進し、粥状動脈硬化巣の形成が促進された。⁹⁸⁾ また、これらの変化は、抗酸化作用を有するビタミンEやフルバスタチンの投与により効果的に抑制された(Fig. 15).^{99,100)} これらのことから、CSE中のONOO⁻類似反応物質は、全身の酸化ストレスを増大させ、動脈硬化を進展させると考えられる。

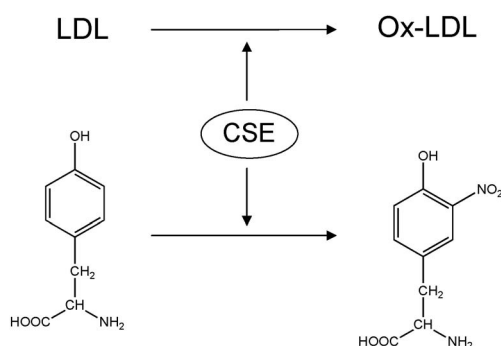


Fig. 14. Aqueous Extracts of Cigarette Smoke (CSE) Have Oxidative and Nitrate Abilities

6-3. CSE中のONOO⁻類似反応物質の組織膜透過性 喫煙による酸化ストレスの増大にCSEが関与しているとすれば、CSE中のONOO⁻類似反応物質が肺胞壁を通過できなければならない。

ONOO⁻は、赤血球膜や血小板膜を容易に透過して細胞内に拡散し、水に匹敵する透過性を示すことが報告されている。¹⁰¹⁾ そこで、基底膜(マトリゲル)及び摘出肺を用い、CSE中のONOO⁻類似反応物質の膜透過性を、ONOO⁻と比較して調べた。透過性は、マトリゲル又は肺胞壁を透過したのち、外液のチロシン溶液と反応して生じる3-ニトロチロシン濃度をHPLC-電気化学検出器にて測定することにより判定した。まず、基底膜の透過性は、ケモタキセル(クラボウ社製)を用い、すなわち、上層カップの孔径8 μ mのメンブレンフィルターにマトリゲルを薄層(50 μ m)にコーティングし、上室にCSE又はONOO⁻Na⁺塩を加え、下層にはチロシン溶液を入れた装置(Fig. 16)を用い

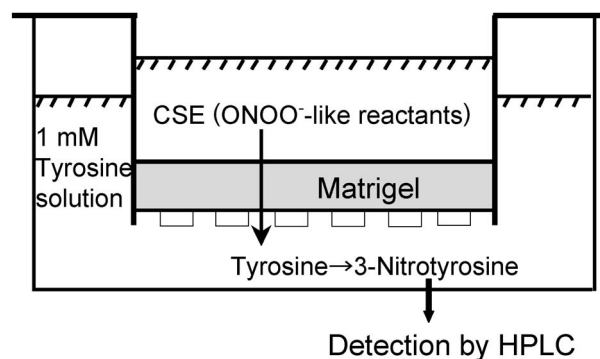


Fig. 16. The Experimental Schema for Connective Tissue Membrane Transport Using the Chemotaxicell Chamber

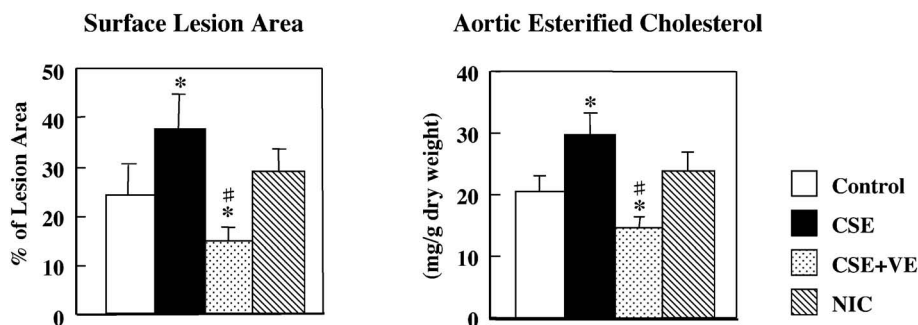


Fig. 15. Changes in the Ratio of the Surface Lesion Area to Surface Intimal Area and Esterified Cholesterol Contents in the Thoracic Aorta of WHHL Rabbits Treated with CSE (CSE Group) and Nicotine (NIC Group), and the Effects of Vitamin E Treatment on Those in CSE Group (CSE+VE Group)

Each value represents the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ vs. Control group, ** $p < 0.05$ CSE+VE group vs. CSE group.

て計測した。その結果、ONOO⁻ が瞬時に基底膜を透過したのに対し、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は遅いが持続的に膜を透過することが判明した (Fig. 17).¹⁰²⁾ ついで、ラット摘出肺標本の肺腔内空気を除いたのち、CSE 又は ONOO⁻ 溶液を肺内に注入し、肺外液への透過実験を行ったところ、基底膜を用いたときとほぼ同様の結果が得られた。¹⁰²⁾ これらのことから、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は持続的に肺胞壁を透過することが明らかとなった。

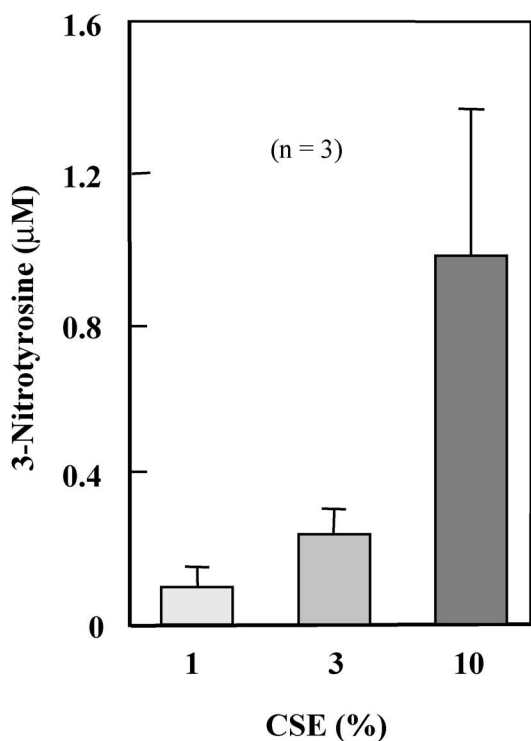


Fig. 17. Matrigel Membrane Permeability to Oxidants in CSE
Each value represents the mean ± S.E.

6-4. CSE の肺胞マクロファージ活性化作用
ラット肺胞マクロファージを摘出し、*in vitro* 実験において NO 産生を指標にてマクロファージ刺激活性を測定した。その結果、リポポリサッカライド (LPS) が顕著に NO 産生を増加したのに対し、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は、全く影響を及ぼさなかった。¹⁰²⁾ これらのことは、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質が肺胞壁を透過する際、肺胞マクロファージを刺激することなく、直接血中に移行することを示唆している。

6-5. CSE の血管内皮細胞障害作用 CSE は、ONOO⁻ 放出物質である SIN-1 及び ONOO⁻Na⁺ 塩と同様に、ブタ大動脈内皮細胞の caspase-3、-8 及び 9 の活性を著明に上昇させた (Fig. 18)。また、Bax 発現量を有意に増加させたが、Bcl-2 発現量には有意な変化を及ぼさず、Fas 発現量の減少傾向を示した。このように、CSE は培養内皮細胞のアポトーシスを誘導することが判明した。これら 3 種の被験物質によるアポトーシス誘導が SOD 前処置により抑制されたことから、アポトーシス誘導にスーパーオキシドが関与していることが示唆される。しかし、ONOO⁻ のスカベンジャーである尿酸前処置によって、SIN-1 及び ONOO⁻Na⁺ 塩によるアポトーシス誘導が抑制されたのに対し、CSE によるアポトーシス誘導は抑制されなかった。これらのことから、血中に到達した CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は、血管内皮細胞を障害することにより、動脈硬化形成に関与する可能性が強く示唆された。

6-6. 喫煙者の血中酸化ストレス増大作用 たばこ煙には、ROS を始め種々酸化物質など数多くのオキシダントが含まれている。喫煙により、過酸化

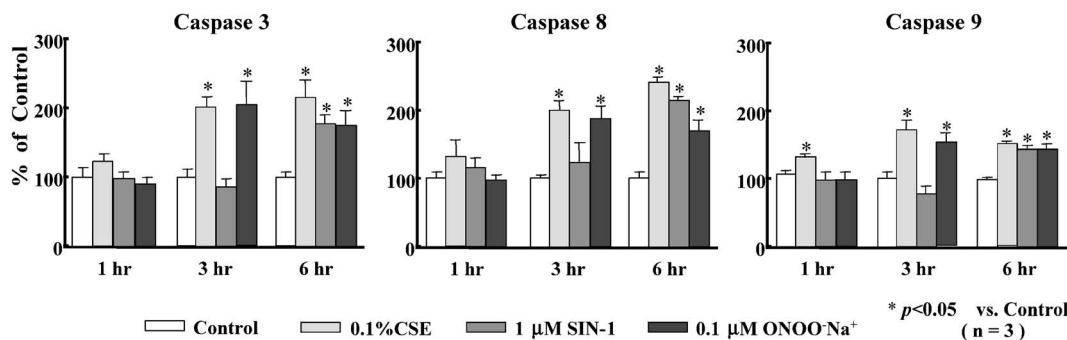


Fig. 18. Effects of CSE, SIN-1 and Sodium Peroxynitrite on Caspase Activity in Porcine Aorta Endothelial Cells
Each value represents the mean ± S.E.

脂質の上昇, 血管内皮細胞機能障害, 血管平滑筋 Rho-kinase の活性化, 酸化ストレスマーカーの上昇といった酸化ストレスによると思われる変化が起こる.¹⁰³⁻¹⁰⁵ そこで筆者らは, 喫煙者と非喫煙者の血漿中の酸化ストレスマーカーの違いを比較した. その結果, 非喫煙者に比べ喫煙者では, LDL の酸化変性が亢進し, TBARS, 8-OHdG 及び 3-ニトロチロシンが増加し (Fig. 19), 抗酸化物質のビタミン E が顕著に減少することが明らかになった.¹⁰⁶ このように喫煙者では酸化及びニトロ化が著しく亢進していることから, 喫煙による酸化ストレス上昇に ONOO⁻ あるいは ONOO⁻ 類似反応物質が強く関与していると考えられる. ただし, ONOO⁻ は極めて不安定であるが, 膜透過性が速やかであることから, 喫煙初期 (喫煙中) の酸化ストレス上昇に一部係わっている可能性がある. 本研究における注目すべき知見は, 喫煙者が 10 時間以上禁煙したあとに紙巻タバコ 1 本喫煙しただけで, 30 分後に 8-OHdG, 3-ニトロチロシン及び酸化 LDL の血漿中濃度が喫煙前に比べ顕著に増加したことである (Fig. 19).¹⁰⁶ このことは, 喫煙による酸化ストレスの増大が, 比較的速くかつ持続的に起こっていることを示唆している. タバコ煙中の ROS は, 反応性に富み, 抗酸化酵素によっても分解されるので, タバコ煙が初めに接触する口腔粘膜や肺組織を障害することがあっても, 血液に到達する以前に分解されるので, LDL の酸化や血管内皮細胞障害を及ぼすことはないと考えられる. それゆえ, 喫煙した場合, 酸化ストレスの上昇に関与するタバコ煙中のオ

キシダントの有力な候補として, ONOO⁻ 類似反応物質が挙げられる.

6-7. たばこ煙暴露による酸化ストレス増大
喫煙により速やかに酸化ストレスが増大することが明らかになったので, その機序を解明するため, ラットを用いて詳細に検討した. 紙巻タバコ (フロンティアライト) 8 本に点火し, その煙をアスピレーターにて緩やかに吸引し, ケンブリッジフィルターによりニコチンとタールを除去する装置を通して, そのガス相をラットに暴露させるボックスを設けた. この喫煙ボックスは 15 cm 立方の亚克力板製で, その一部にガスの通路口とラットの頭部のみが挿入できる半円形の孔が空いている (Fig. 20). ペントバルビタールで麻酔したラットの頭部のみを密着してボックスに挟み込み, ラット大腿静

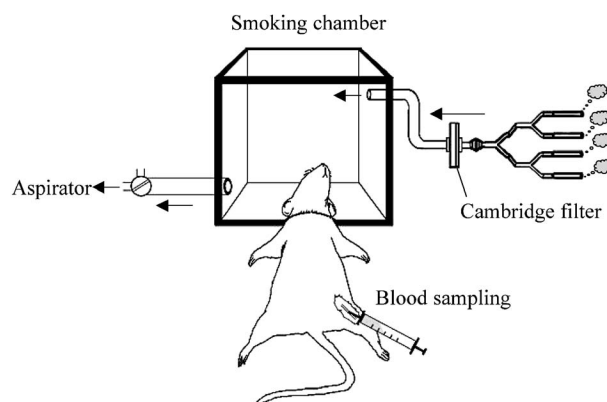


Fig. 20. Schematic Diagram of the Apparatus for Exposure of Cigarette Smoke

The smoking chamber is made of acrylic resin (15-cm cube). The Cambridge filter is used for elimination of nicotine and tars.

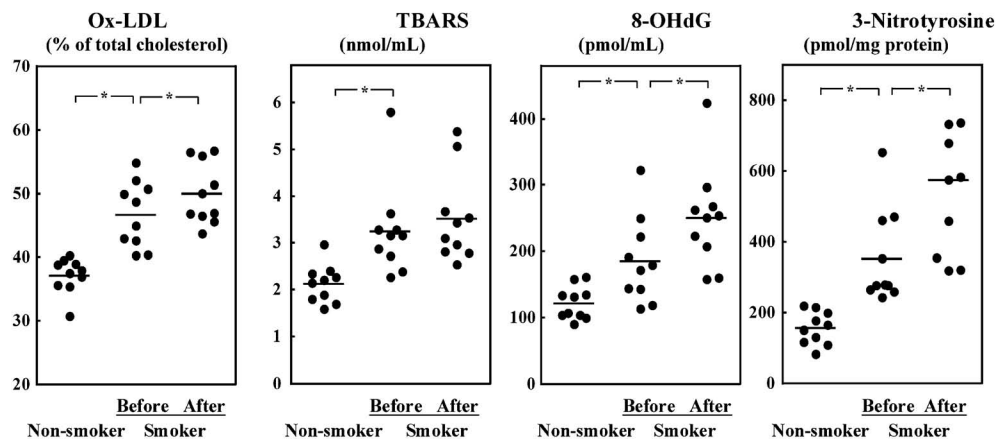


Fig. 19. Effects of Cigarette Smoking on the Levels of Plasma Ox-LDL, TBARS, 8-OHdG, and 3-Nitrotyrosine

Blood in smokers was collected after cessation of cigarette smoking for at least 10 h (Before) and then within 30 min after resumption of cigarette smoking (After). Each horizontal bar represents the mean. * $p < 0.05$.

脈にはカニューレを挿入し、たばこ煙暴露後経時的に採血、血清中の各種酸化ストレスマーカーを測定した。¹⁰⁰⁾ その結果、8本の紙巻たばこ煙のガス相の暴露及び30分後に同様の再暴露（計16本分の煙暴露）によって、血清中の8-OHdG、3-ニトロチロシン及び3-クロロチロシン濃度が暴露後5分後から有意に増加し始め、8-OHdGと3-ニトロチロシンは2時間後にピークとなり3時間以降まで持続した。一方、3-クロロチロシンは30分後にピークとなり以後減衰したが、再暴露による増加は全くみられなくなった（Fig. 21）。生体内で生じる3-クロロチロシンは、好中球やマクロファージに存在するMPOの唯一のバイオマーカーである。MPOは H_2O_2 と Cl^- から次亜塩素酸（HOCl）を生成するが、さらに NO_2^- と反応して NO_2Cl を生成することもある。¹⁰⁷⁾ それゆえ、MPOの活性化は、8-OHdG、3-ニトロチロシン、3-クロロチロシンのすべての生成を増加させる可能性がある。本実験において、血中の3-クロロチロシンが増加したことから、血清中のMPO活性（一部血中にも漏出する）を測定した。その結果、10分後にピークとなる一過性のMPO活性上昇が認められた。この活性上昇はMPO阻害薬アプロチニン（500 U/kg, *i.p.*）の前処置（たばこ煙吸入20分前）によって完全に抑制された。また、アプロチニン前処置によって、血清中の3-ニトロチロシンの上昇は初期変化のみ抑制され、3-クロロチロシンの上昇は完全に抑制された（Fig. 21）。MPOの活性化が一過性である理由とし

ては、酵素自身の酸化、ニトロ化又はクロル化により失活したのであろうと推察される。

以上の結果から、喫煙した場合、初期にMPO活性化が一過性に起こるが、主としてCSE中のONOO⁻類似反応物質が、肺胞壁を透過して血中に到達し、全身的に酸化ストレスを増大させると考えられる。

6-8. 喫煙によるアポE欠損マウスの動脈硬化促進作用 筆者らの最終目的は、喫煙が酸化ストレスを介して動脈硬化を発症・進展させることを証明することである。そこで、動脈硬化を自然発症するアポE欠損高脂血症（KOR）マウスを用い、たばこ煙暴露による動脈硬化形成に及ぼす影響を検討した。0.15%コレステロール添加食で飼育したKORマウス6匹を1辺13 cmの暴露ボックスに入れ、計12本分のたばこ煙（ケンブリッジフィルターを通してニコチンやタール等を除去したガス相）を15分掛けて吸煙させ、この操作を16週間行った。実験期間を通して、たばこ煙による体重の変化や血清コレステロール及び中性脂肪値に変化が認められなかったが、喫煙群のTBARS及び酸化LDL値は、非喫煙対照群に比べ有意な増加を示した（Fig. 22）。また、喫煙群の血清タンパク中の3-ニトロチロシン値は、非喫煙群に比べ著明に増加したが、3-クロロチロシン値には喫煙群と非喫煙群の間で差はみられなかった。以上の結果、喫煙により血中にONOO⁻類似反応物質によると思われる変化が認められた。しかし、喫煙によるMPOの関与は見い

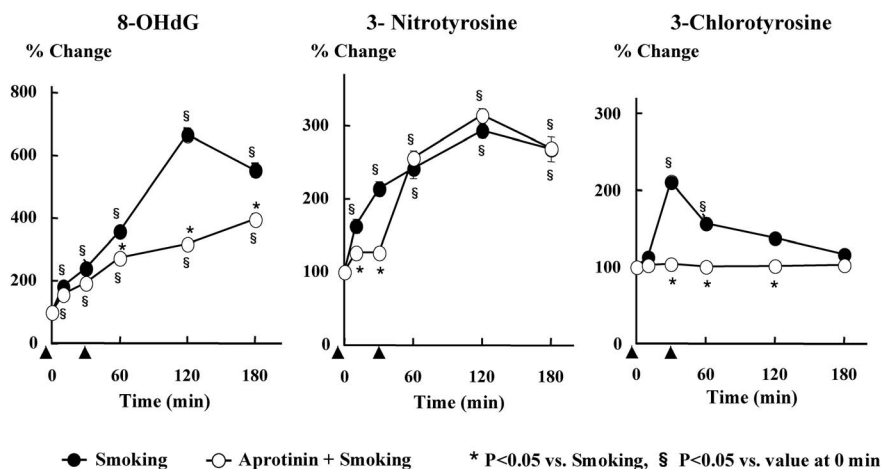


Fig. 21. Effect of Aprotinin, a MPO Inhibitor, on Increased Oxidative Stress Markers in the Serum of Rats Exposed to Gas Phase of Cigarette Smoke

Exposure to cigarette smoke was twice given to rats for 5 min from time shown in the triangle mark. Each value represents the mean \pm S.E.

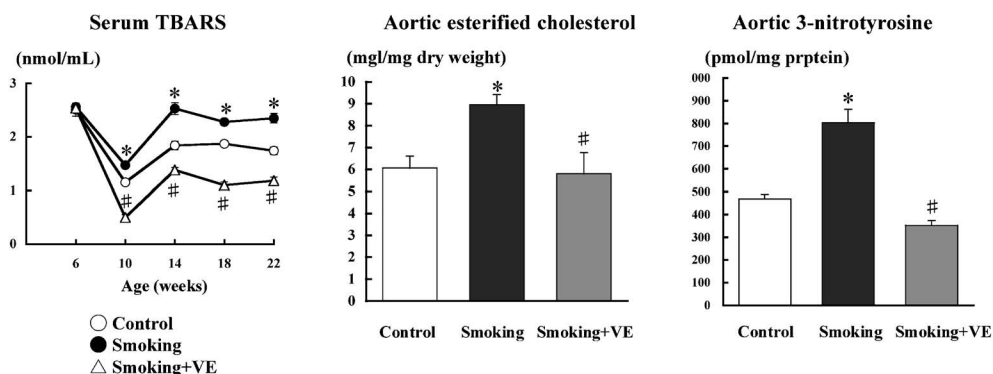


Fig. 22. Effects of Smoking and Vitamin E on Serum TBARS and Aortic Esterified Cholesterol and 3-Nitrotyrosine Levels in ApoE-deficient (KOR) Mice Fed a Diet Containing 0.15% Cholesterol

Each value represents the mean \pm S.E. * p <0.05, Smoking vs. Control, # p <0.05 Smoking + VE vs. Smoking.

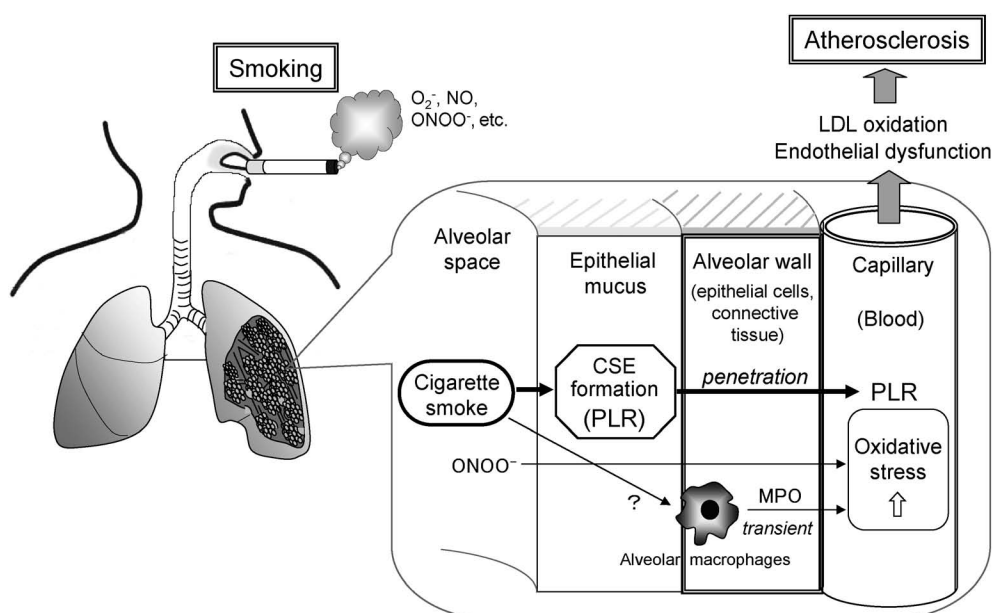


Fig. 23. A New Oxidative Stress Hypothesis of Atherosclerosis Caused by Cigarette Smoking
PLR: peroxynitrite-like reactants, CSE: aqueous extracts of cigarette smoke.

出せなかった。実験終了時において、非喫煙群の大動脈中のコレステロールエステル値（動脈硬化の指標）は、正常マウスの値より著しい高値を示していたが、喫煙群では非喫煙群に比べさらに有意な増加を示した。また、非喫煙群の大動脈中 3-ニトロチロシン値も正常マウスの値より高値を示していたが、喫煙群ではさらに有意な高値を示した。これらの喫煙によって生じる血清及び大動脈中の特徴的変化は、ビタミン E 投与により有意に抑制された (Fig. 22).¹⁰⁸⁾ 本研究は、喫煙によって、たばこ煙中のタールとニコチンを除いたガス相のオキシダントが、大動脈壁の傷害と脂質蓄積を促進させることを初めて明らかにした事実である。

6-9. 総括 以上の結果、喫煙すると、たばこ煙が気道や肺胞中の水分に溶解して CSE が生成する。CSE 中に存在する比較的安定な ONOO^- 類似反応物質が肺胞壁を緩やかに透過し血液中に到達して、徐々に LDL を酸化及びニトロ化により変性させ、さらに、血管内皮細胞の機能障害及び DNA の酸化損傷を引き起こすことによって、動脈硬化の発症・進展を促進させると考えられる (Fig. 23)。現在、たばこ煙中のオキシダント ONOO^- 類似反応物質の分離・同定を行っている。その結果を踏まえて、このオキシダントを特異的に消去する抗酸化物質の発見へと発展させたい。

7. まとめ

酸化ストレスは、LDL や細胞の脂質、タンパク質、DNA の酸化変性を促進し、血管内皮細胞を障害することによって動脈硬化を発症・進展させる。同様に、喫煙は、外因性酸化ストレスとして動脈硬化形成に深く関わっている。したがって、生活習慣病やメタボリックシンドローム、喫煙など酸化ストレスの上昇が関係する動脈硬化の予防・治療には抗酸化剤投与の有用性が期待される。

REFERENCES

- 1) Madamanchi N. R., Vendrov A., Runge M. S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 29–38 (2005).
- 2) Witztum J. L., *Lancet*, **344**, 793–795 (1994).
- 3) Betteridge D. J., *Metabolism*, **49** (2 Suppl 1), 3–8 (2000).
- 4) Pandya D. P., *Compr. Ther.*, **27**, 284–292 (2001).
- 5) Hwang E. S., Kim G. H., *Toxicology*, **229**, 1–10 (2007).
- 6) Halliwell B., *Biochem. J.*, **401**, 1–11 (2007).
- 7) Baynes J. W., *Diabetes*, **40**, 405–412 (1991).
- 8) Touyz R. M., *Hypertension*, **44**, 248–252 (2004).
- 9) Davi G., Alessandrini P., Mezzetti A., Minotti G., Bucciarelli T., Costantini R., Cipollone F., Bon G. B., Ciabattini G., Patrono C., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 3230–3235 (1997).
- 10) Harman D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **786**, 152–168 (1996).
- 11) Beal M. F., *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 797–803 (2002).
- 12) Jay D., Hitomi H., Griendling K. K., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 183–192 (2006).
- 13) Kishi T., Hirooka Y., Kimura Y., Ito K., Shimokawa H., Takeshita A., *Circulation*, **109**, 2357–2362 (2004).
- 14) Ceriello A., *Diabet. Med.*, **14**, S45–S49 (2004).
- 15) Inoue N., Ohara Y., Fukai T., Harrison D. G., Nishida K., *Am. J. Med. Sci.*, **315**, 424–427 (1998).
- 16) Reilly N. P., Pratico D., Delanty N., Diminno G., Tremoli E., Rader D., Kapoor S., Rokach J., Lawson J., Fitzgerald G. A., *Circulation*, **98**, 2822–2828 (1998).
- 17) Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., *J. Clin. Invest.*, **114**, 1752–1761 (2004).
- 18) Harrison D., Griendling K. K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H., *Am. J. Cardiol.*, **91**, 7A–11A (2003).
- 19) Zalba G., Fortuno A., Diez J., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 2686–2690 (2006).
- 20) Warnholtz A., Nickenig G., Schulz E., Macharzina R., Brasen J. H., Skatchkov M., Heitzer T., Stasch J. P., Griendling K. K., Harrison D. G., Bohm M., Meinertz T., Munzel T., *Circulation*, **99**, 2027–2033 (1999).
- 21) Kunitomo M., Kinoshita K., Bando Y., *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 718–723 (1981).
- 22) Kunitomo M., Takaoka K., Matsumoto J., Iwai H., Bando Y., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **81**, 275–283 (1983).
- 23) Kunitomo M., Yamaguchi Y., Matsushima K., Bando Y., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 1275–1280 (1984).
- 24) Yamaguchi Y., Yamada K., Kitagawa S., Kunitomo M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **54**, 187–196 (1990).
- 25) Kunitomo M., Yamaguchi Y., Matsushima K., Futagawa Y., Bando Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **39**, 323–329 (1985).
- 26) Yamaguchi Y., Kitagawa S., Kwon Y., Shinozuka K., Kunitomo M., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, S249–S250 (1995).
- 27) Virag S., Vertesi C., Welner I., *Ther. Hung.*, **24**, 142–144 (1976).
- 28) Virag S., Vertesi C., Welner I., *Ther. Hung.*, **24**, 137–141 (1976).
- 29) Kunitomo M., Yamaguchi Y., Futagawa Y., Hamaguchi Y., Bando Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **42**, 261–267 (1986).
- 30) Yamaguchi Y., Tanaka Y., Yamada K., Bando Y., Kunitomo M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **50**, 377–386 (1989).
- 31) Yoshikawa T., Tanaka H., Kondo M., *Biochem. Med.*, **33**, 320–326 (1985).
- 32) Fudman E. J., Till G. O., Fox I. H., *J. Rheumatol.*, **14**, 686–691 (1987).
- 33) Wade C. R., Jackson P. G., Highton J., van Rij A. M., *Clin. Chim. Acta*, **164**, 245–250

- (1987).
- 34) Libby P., Ridker P. M., Maseri A., *Circulation*, **105**, 1135–1143 (2002).
 - 35) Ames P. R., Alves J., Murat I., Isenberg D. A., Nourooz-Zadeh J., *Rheumatology* (Oxford), **38**, 529–534 (1999).
 - 36) Hahn B. H., Grossman J., Chen W., McMahon M., *J. Autoimmun.*, **28**, 69–75 (2007).
 - 37) Yamaguchi Y., Futagawa Y., Kunitomo M., Bando Y., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **91**, 61–69 (1988).
 - 38) Yamaguchi Y., Kitagawa S., Imaizumi N., Kunitomo M., Fujiwara M., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **30**, 169–175 (1993).
 - 39) Yamaguchi Y., Hayashi M., Yamazoe H., Kunitomo M., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **97**, 329–337 (1991).
 - 40) Yamaguchi Y., Kitagawa S., Kunitomo M., Fujiwara M., *Magnes. Res.*, **7**, 31–37 (1994).
 - 41) Yamaguchi Y., Kagota S., Nakamura K., Shinozuka K., Kunitomo M., *Phytother. Res.*, **14**, 650–652 (2000).
 - 42) Zorn-Pauly K., Schaffer P., Pelzmann B., Bernhart E., Wei G., Lang P., Ledinski G., Greilberger J., Koidl B., Jurgens G., *Cardiovasc. Res.*, **66**, 74–83 (2005).
 - 43) Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L., *N. Engl. J. Med.* **320**, 915–924 (1989).
 - 44) Quinn M. T., Parthasarathy S., Fong L. G., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2995–2998 (1987).
 - 45) Witztum J. L., Steinberg D., *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785–1792 (1991).
 - 46) Yokoyama M., *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 110–115 (2004).
 - 47) Toshima S., Hasegawa A., Kurabayashi M., Itabe H., Takano T., Sugano J., Shimamura K., Kimura J., Michishita I., Suzuki T., Nagai R., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2243–2247 (2000).
 - 48) Holvoet P., Vanhaecke J., Janssens S., Van de Werf F., Collen D., *Circulation*, **98**, 1487–1494 (1998).
 - 49) Faviou E., Vourli G., Nounopoulos C., Zachari A., Dionysiou-Asteriou A., *Free Radic. Res.*, **39**, 419–429 (2005).
 - 50) Fraley A. E., Tsimikas S., *Curr. Opin. Lipidol.*, **17**, 502–509 (2006).
 - 51) Wu R., Lefvert A. K., *Clin. Exp. Immunol.*, **102**, 174–180 (1995).
 - 52) Virella G., Virella I., Leman R. B., Pryor M. B., Lopes-Virella M. F., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **23**, 95–101 (1993).
 - 53) Craig W. Y., Raytcheva S. E., Poulin S. E., Ritchie R. F., *Ann. Clin. Biochem.*, **36**, 333–339 (1999).
 - 54) Itabe H., Yamamoto H., Imanaka T., Shimamura K., Uchiyama H., Kimura J., Sanaka T., Hata Y., Takano T., *J. Lipid Res.*, **37**, 45–53 (1996).
 - 55) Itabe H., Ueda M., *J. Atheroscler. Thromb.*, **14**, 1–11 (2007).
 - 56) Virella G., Lopes-Virella M. F., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 499–505 (2003).
 - 57) Haginaka J., Yamaguchi Y., Kunitomo M., *Anal. Biochem.*, **232**, 163–171 (1995).
 - 58) Yamaguchi Y., Kagota S., Kunitomo M., Haginaka J., *Atherosclerosis*, **139**, 323–331 (1998).
 - 59) Yamaguchi Y., Kunitomo M., Haginaka J., *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **716**, 57–64 (1998).
 - 60) Yamaguchi Y., Kagota S., Kunitomo M., Haginaka J., *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **731**, 223–229 (1999).
 - 61) Haginaka J., Yamaguchi Y., Kunitomo M., *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **751**, 161–167 (2001).
 - 62) Yamaguchi Y., Kunitomo M., Haginaka J., *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **781**, 313–330 (2002).
 - 63) Yamaguchi Y., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **8**, 255–260 (2000).
 - 64) Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A., *Clin. Chem.*, **52**, 601–623 (2006).
 - 65) Montuschi P., Barnes P. J., Roberts L. J., *FASEB J.*, **18**, 1791–1800 (2004).
 - 66) Holvoet P., Mertens A., Verhamme P., Bogaerts K., Beyens G., Verhaeghe R., Collen D., Muls E., Van de Werf F., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 844–848 (2001).
 - 67) Kasai H., *Mutat. Res.*, **387**, 147–163 (1997).
 - 68) Gami A. S., Witt B. J., Howard D. E., Erwin P. J., Gami L. A., Somers V. K., Montori V. M., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **49**, 403–414

- (2007).
- 69) Galassi A., Reynolds K., He J., *Am. J. Med.*, **119**, 812–819 (2006).
- 70) Keaney J. F. J., Larson M. G., Vasani R. S., Wilson P. W., Lipinska I., Corey D., Massaro J. M., Sutherland P., Vita J. A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 434–439 (2003).
- 71) Zalba G., Jose G. S., Moreno M. U., Fortuno M. A., Fortuno A., Beaumont F. J., Diez J., *Hypertension*, **38**, 1395–1399 (2001).
- 72) Griesmacher A., Kindhauser M., Andert S. E., Schreiner W., Toma C., Knoebl P., Pietschmann P., Prager R., Schnack C., Schernthaner G., *Am. J. Med.*, **98**, 469–475 (1995).
- 73) Ceriello A., Mercuri F., Quagliaro L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L., Taboga C., *Diabetologia*, **44**, 834–838 (2001).
- 74) Meigs J. B., Larson M. G., Fox C. S., Keaney J. F. J., Vasani R. S., Benjamin E. J., *Diabetes Care* (2007) (Epub ahead of print).
- 75) Sigurdardottir V., Fagerberg B., Hulthe J., *J. Intern. Med.*, **252**, 440–447 (2002).
- 76) Fujita K., Nishizawa H., Funahashi T., Shimomura I., Shimabukuro M., *Circ. J.*, **70**, 1437–1442 (2006).
- 77) Van Guilder G. P., Hoetzer G. L., Greiner J. J., Stauffer B. L., Desouza C. A., *Obesity*, **14**, 2127–2131 (2006).
- 78) Rutter M. K., Meigs J. B., Sullivan L. M., D’Agostino Sr. R. B., Wilson P. W., *Circulation*, **110**, 380–385 (2004).
- 79) Esposito K., Ciotola M., Schisano B., Misso L., Giannetti G., Ceriello A., Giugliano D., *J. Endocrinol. Invest.*, **29**, 791–795 (2006).
- 80) de Ferranti S. D., Rifai N., *Cardiovasc. Pathol.*, **16**, 14–21 (2007).
- 81) Ridker P. M., *Circulation*, **103**, 1813–1818 (2001).
- 82) Yamamoto J., Ikeda K., Nara Y., Yamori Y., *Himan Kenkyu*, **10**, 329–330 (2004).
- 83) Yamaguchi Y., Yoshikawa N., Kagota S., Nakamura K., Haginaka J., Kunitomo M., *Nitric Oxide*, **15**, 380–386 (2006).
- 84) Yamaguchi Y., Yoshikawa N., Nagae M., Kagota S., Haginaka J., Nakamura K., Kunitomo M., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (in press).
- 85) Fukushima M., Matsuyama F., Ueda N., Egawa K., Takemoto J., Kajimoto Y., Yonaha N., Miura T., Kaneko T., Nishi Y., Mitsui R., Fujita Y., Yamada Y., Seino Y., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **73**, 174–177 (2006).
- 86) Rueckschloss U., Quinn M. T., Holtz J., Morawietz H., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1845–1851 (2002).
- 87) Tsuda M., Iwai M., Li J. M., Li H. S., Min L. J., Ide A., Okumura M., Suzuki J., Mogi M., Suzuki H., Horiuchi M., *Hypertension*, **45**, 545–551 (2005).
- 88) Yamaguchi Y., Yoshikawa N., Harada A., Kagota S., Haginaka J., Nakamura K., Kunitomo M., *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 223P (2006).
- 89) Yamaguchi Y., Yamada K., Yoshikawa N., Nakamura K., Haginaka J., Kunitomo M., *Life Sci.*, **79**, 2474–2479 (2006).
- 90) Kagota S., Yamaguchi Y., Tanaka N., Kubota Y., Kobayashi K., Nejime N., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K., *Life Sci.*, **78**, 1187–1196 (2006).
- 91) Kagota S., Tada Y., Kubota Y., Nejime N., Yamaguchi Y., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K., *J. Cardiovas. Pharmacol.* (in press).
- 92) Rosenfeldt F. L., Haas S. J., Krum H., Hadji A., Ng K., Leong J. Y., Watts G. F., *J. Hum. Hypertens.*, **21**, 297–306 (2007).
- 93) Watts G. F., Playford D. A., Croft K. D., Ward N. C., Mori T. A., Burke V., *Diabetologia*, **45**, 420–426 (2002).
- 94) Hodgson J. M., Watts G. F., Playford D. A., Burke V., Croft K. D., *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, 1137–1142 (2002).
- 95) Yokode M., Kita T., Arai H., Kawai C., Narumiya S., Fujiwara M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2344–2348 (1988).
- 96) Yamaguchi Y., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 78–81 (2000).
- 97) Yamaguchi Y., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *FEBS Lett.*, **512**, 218–222 (2002).
- 98) Yamaguchi Y., Matsuno S., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *Atherosclerosis*, **156**, 109–117 (2001).
- 99) Yamaguchi Y., Matsuno S., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *Eur. J. Phar-*

- macol.*, **436**, 97–105 (2002).
- 100) Yamaguchi Y., Matsuno S., Kagota S., Haginaka J., Kunitomo M., *Atherosclerosis*, **172**, 259–265 (2004).
- 101) Lufitano M., Balazy M., *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 515–523 (2003).
- 102) Yamaguchi Y., Nasu F., Harada A., Kunitomo M., *J. Pharmacol. Sci.*, **103**, 275–282 (2007).
- 103) Harats D., Ben-Naim M., Dabach Y., Hollander G., Stein O., Stein Y., *Atherosclerosis*, **79**, 245–252 (1989).
- 104) Anazawa T., Dimayuga P. C., Li H., Tani S., Bradfield J., Chyu K. Y., Kaul S., Shah P. K., Cercek B., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1652–1658 (2004).
- 105) Noma K., Goto C., Nishioka K., Hara K., Kimura M., Umemura, T., Jitsuiki D., Nakagawa K., Oshima T., Chayama K., Yoshizumi M., Higashi Y., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2630–2635 (2005).
- 106) Yamaguchi Y., Haginaka J., Morimoto S., Fujioka Y., Kunitomo M., *Eur. J. Clin. Invest.*, **35**, 186–193 (2005).
- 107) Gaut J. P., Byun J., Tran H. D., Lauber W. M., Carroll J. A., Hotchkiss R. S., Belaouaj A., Heinecke J. W., *J. Clin. Invest.*, **109**, 1311–1319 (2002).
- 108) Yamaguchi Y., Yoshikawa N., Harada A., Kagota S., Haginaka J., Nakamura K., Kunitomo M., *J. Pharmacol. Sci.*, **103**, 247P (2007).