

動脈硬化における Cholesterol の蓄積 粥腫形成・進展機構の分子病理学的解析

高野達哉,* 板部洋之, 森 雅博, 木村順治, 中神啓仁,
佐藤隆一郎, 橋田亮一, 柳生靖子, 峰尾千恵子, 天沼喜美子,
今中常雄, 東 祐輔, 藤本康之, 藤田永子

Molecular Pathology in Atherosclerosis: The Mechanism How Cholesteryl Ester Accumulates in Atheromatous Aorta

Tatsuya TAKANO,* Hiroyuki ITABE, Masahiro MORI, Junji KIMURA, Keiji NAKAGAMI,
Ryuichiro SATO, Ryoichi HASHITA, Yasuko YAGYU, Chieko MINEO, Kimiko AMANUMA,
Tsuneo IMANAKA, Yusuke HIGASHI, Yasuyuki FUJIMOTO, and Eiko FUJITA
*Department of Molecular Pathology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,
432-44-3 Terada-cho, Hachioji City 193-0943, Japan*

(Received May 31, 2008)

To study how cholesterol accumulates in atheroma, novel monoclonal antibodies were developed, using crude homogenate of atheroma as immunogens. 212D monoclonal antibody recognizing extra cellular matrix with lipid-laden deposits was selected by histochemical staining. The antigen was deduced vitronectin from cDNA library. DLH3 monoclonal antibody recognizing oxidized LDL, epitope of which was 5- or 9-phosphatidylcholine. Significant correlations between oxidized LDL and coronary heart disease (CHD) patients were observed from clinical study. 256C monoclonal antibody recognizing atheromatous lesions in human aorta was selected. Epitope must be PC-cholesterol complex which may involve in foam cell rupture. Atherogenesis will be discussed from the aspects of these antibodies. Our working hypothesis is required to elucidate the mechanism. Denatured lipoproteins (either oxidized lipoprotein or ruptured foam cells) may induce atheroma. Oxidation of lipoprotein may be taken place both in foam cells and/or extra cellular matrix, and macrophage eliminate these denatured lipoproteins and become foam cells. The foam cells are ruptured by either apoptosis or necrosis afterward, and hydrophobic fragments of foam cells dispersed in extra cellular space, which destroys the function of biological membrane. Since biological function could be maintained by segregation of hydrophilic circumstances, macrophages uptake these fragmented material and oxidized lipoprotein to maintain the function. This vicious spiral may enhance chronically the atheroma.

Key words—atherosclerosis; foam cell; macrophage; monoclonal antibody; oxidized lipoprotein

1. はじめに

これまで動脈硬化の研究は形態病理学の立場から解析が進められてきた。1975年当時、動脈硬化壁に cholesteryl ester はなぜ蓄積するのか、オレイン酸に富む cholesteryl ester が動脈壁になぜ蓄積するのか、cholesteryl ester を蓄積する泡沫細胞はマクロファージ由来か、それとも平滑筋細胞由来なのかなど疑問の多いところであった。われわれはこの難

題を紐解くべく、分子病理学の観点からその突破口を開こうと考えた。しかし、ヒト動脈壁のホモジェネートの調製を試みたところ、動脈壁はゴムのようで、しかも、動脈硬化を起こした血管壁は石のように固く、ホモジェネートを調製することはほとんど不可能であった (Fig. 1)。

Cholesterol は生体膜にとって必須の脂質であるにも係わらず、なぜ動脈硬化時には過剰に蓄積し、粥腫を形成するのであろうか。この疑問に答えるべく①内皮細胞を培養し、リポタンパク質の透過モデルを作成することにした。また、過剰なりポタンパク質が動脈壁に蓄積する理由の1つとして、障害を受けた内皮細胞に血小板が粘着・凝集することによ

帝京大学薬学部病態生化学教室 (〒193-0943 東京都八王子市寺田町 432-44-3)

*e-mail: pdwcw853@ybb.ne.jp

平成20年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

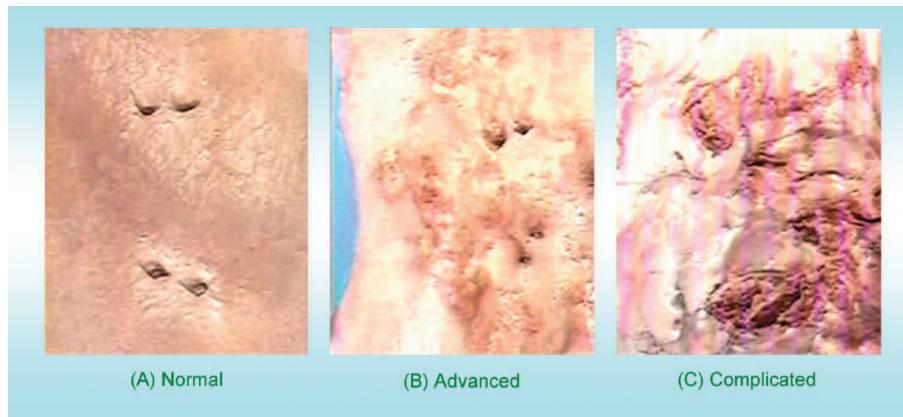


Fig. 1. Atheromatous Arterial Wall

(A) Normal aorta, (B) Advanced atheroma, (C) Complicated atheroma.

り透過性が亢進されるためであるとも言われていた。われわれは障害内皮細胞モデルを作成し、血小板の粘着・凝集による透過性への影響を検討することにした。②次に、粥状動脈硬化壁になぜ cholesteryl ester を蓄積した泡沫細胞が出現するのか。粥状動脈硬化症とは、後天的に cholesteryl ester の分解活性が低下している「cholesteryl ester 蓄積症」ではないかと作業仮説を立てその可能性を検討することにした。③また、泡沫細胞はマクロファージ由来かそれとも平滑筋細胞由来か。この疑問に答えるために、あらかじめ平滑筋細胞を培養し、そこに泡沫細胞を混合培養し、コマ撮りによる撮影をし、形態学に時間軸を加えるという新しい視点から展開した。④最後に、形態病理学で得られた知見と同じ土俵で討論できる分子病理学にはどのような手法があるか模索した。その手法の1つとして動脈硬化病巣のホモジェネートを抗原とし、動脈硬化病巣を認識するモノクローナル抗体を組織化学による染色により選別し、粥腫巣に蓄積する物質を生化学的に同定する道を開くことにした。その結果、酸化リポタンパク質を認識するモノクローナル抗体 (DLH3) を調製でき、酸化リポタンパク質が実際に生体内に局在していることを証明することができた。しかも、心疾患患者の血清中で高値を示すことが明らかになった。さらに、freecholesterol とリン脂質の複合体を認識するモノクローナル抗体 (256C) を調製し、泡沫細胞のアポトーシスとの関連を追求した。これらの知見はのちに、体外・体内診断薬への道を開くことになる。以上の研究により、これまで形態病理

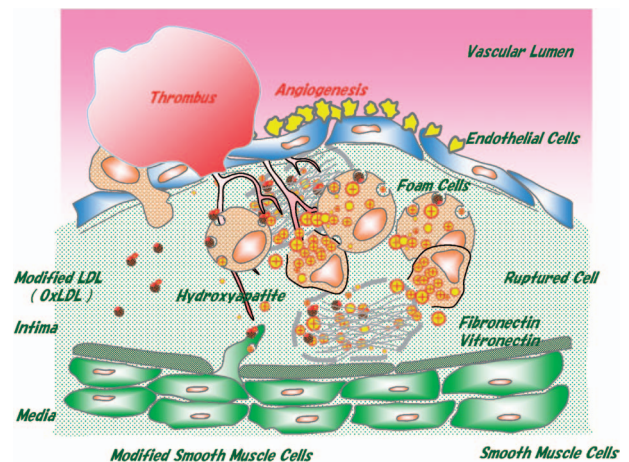


Fig. 2. Working Hypothesis of the Development of Atherosclerosis

Lipoproteins in the blood are transported through the arterial endothelium, then taken up by macrophages and smooth muscle cells to be degraded in the lysosomes. Excess lipoproteins are taken up by scavenger cells such as macrophages. The free cholesterol liberated from the lysosomes after hydrolysis of cholesteryl ester is re-esterified by microsomal ACAT enzyme, and accumulates in the cytoplasm as anisotropic lipid droplets. Some lipid droplets may be transferred directly from the phago-lysosomes to the cytoplasm with partial hydrolysis. Accumulation of excess lipids within the macrophages results in the transformation of macrophages into foam cells. The overloaded foam cells may rupture and release lipid droplets into the extracellular spaces. Extracellular lipids, which may be harmful to living tissue because of their hydrophobicity, are possibly removed and segregated by scavenger cells such as macrophages and modified smooth muscle cells to maintain a hydrophilic environment. The lipids which escape uptake by scavenger cells accumulate in the extracellular spaces of the arterial wall, and may be oxidized and cause additional harm to tissues. This article reviews the morphological and molecular pathological aspects of the mechanism of development of atherosclerosis. Recent advances in biochemical techniques should make it possible to elucidate more details of the mechanisms.

学の立場から進められてきた動脈硬化研究に、分子病理学的な手法の道が開かれたと考えている。

本論に入る前に、現在われわれが考えている動脈硬化発症機構に関する作業仮説を模式的に説明した

い。(Fig. 2).

2. 形態病理学から分子病理学へ

正常血管の構造を模式的に示す (Fig. 3).¹⁾ 動脈硬化時に蓄積する cholesterol は内皮細胞下の内膜に局在する泡沫細胞と細胞間に観察される (Fig. 4). 透過電子顕微鏡では, 細胞の胞体内に蓄積する脂質球は, 標本を固定する際に脱水され空胞となり, 泡沫細胞として観察される [Fig. 5(A)]. 急速凍結レプリカ像で観察してみると, 空胞に対応する部位にはシンバル状の脂質球が認められる [Fig. 5(B)]. この脂質球には, 限界膜に囲まれ残渣顆粒と, 100 nm filaments に囲まれた顆粒とが認められる.²⁾ さらに, 蔗糖密度勾配遠心法によりこの脂質

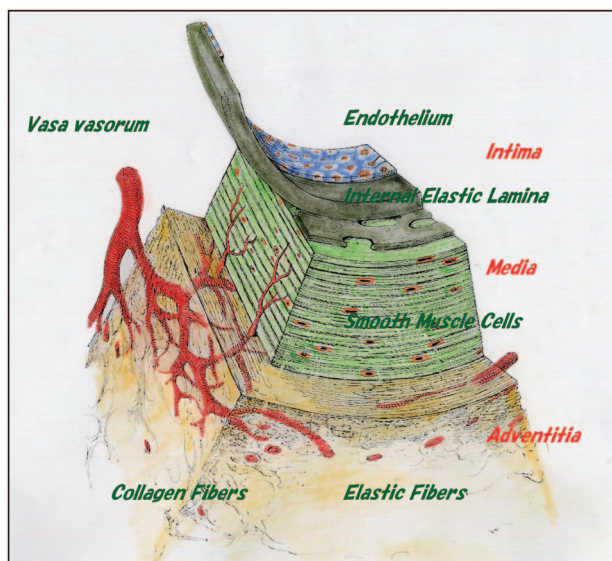


Fig. 3. Arterial Wall (model), Modified from Benditte, E. B

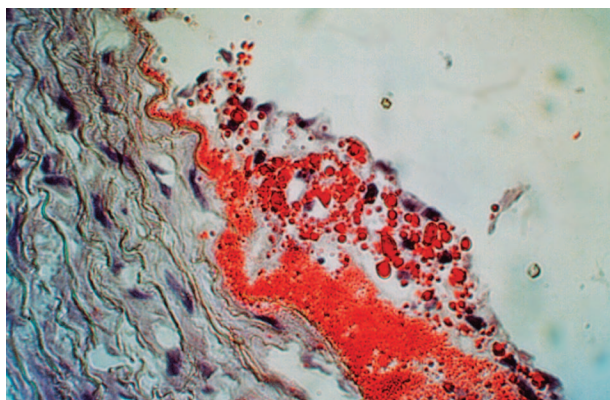


Fig. 4. Intracellular and Extracellular Lipid-deposits in Atherosclerotic Lesions are Stained with Oil-red O

球を分離し, 走査型電子顕微鏡で観察してみると, 0.2–7 μm [Fig. 6(A), (B)] の液晶構造体 [Fig. 6(C)] として認められる. この脂質球の 95% 以上は cholesteryl ester より構成され [Table 1.(A)], しかも, その脂肪酸の 57% 以上はオレイン酸である [Table 1(B)]. これらの知見から, 泡沫細胞の胞体内に観察される脂質球は主にオレイン酸からなる cholesteryl ester で, 液晶状構造を取ることが明らかになった.³⁾

3. 泡沫細胞に蓄積する Cholesterol はどこからくるのか

Cholesterol の担体としては, 血中 LDL (low

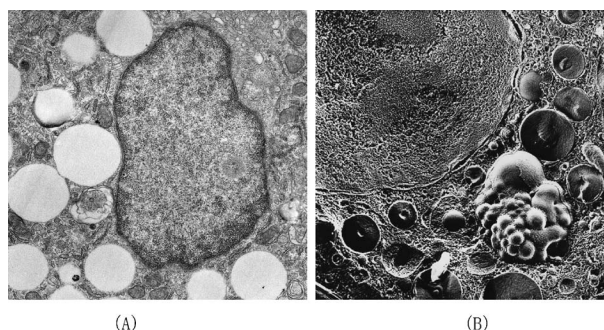


Fig. 5. Electron Micrograph of the Cytoplasm of a Foam Cell Prepared by the Thin Section Method

(A) Lipid droplets are observed as electron-lucent vacuoles because lipids were extracted during dehydration with alcohol. (B) Quick-Freeze replica of the perinuclear area of a foam cell. An organelle containing various sized granules is seen among onion-like droplets. Part of the membrane of the organelle shows an F-fracture face. The fractured face of some granular contents is smooth and that of others contains membrane particles.

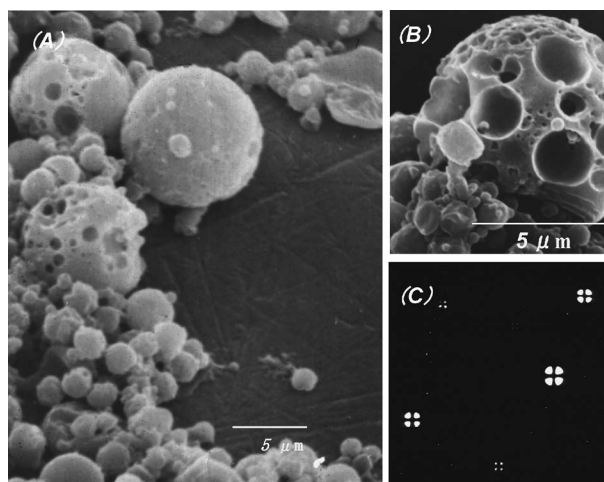


Fig. 6. Lipid Droplets Prepared by Flotation Sucrose Density Gradient Centrifugation (See also Fig. 16. peak A), 65-year-old man

(A, B) Scanning electron micrograph and (C) Polarized micrograph.

density lipoprotein) が知られている. Cholesterol は細胞膜の最も重要な構成成分であり, 絶えず LDL より血管壁細胞に補給されている. Cholesterol 量は多すぎても少なすぎても細胞に障害を与える. 常に一定量の cholesterol を動脈壁細胞に補給するためには, 内皮細胞の LDL 透過になんらかの制御機構があるはずである. 透過モデルを作成するために, 人工血管用ダクロン布上にコラーゲン type I (高分子研究所) をゲル化し, その上にブタ内皮細胞を膜状に培養した. 培養内皮細胞を光学顕微鏡下で観察すると, ダクロン布の折り目による濃淡の格子の上に内皮細胞が基盤目状に生育しているのが分

かる [Fig. 7(A)]. また, 走査型電子顕微鏡で観察すると, 内皮細胞は相互に密着し, 細胞表面には microvilli が認められ, 核に相当する部位が盛り上がって観察される [Fig. 7 (B)]. さらに, 透過型電子顕微鏡で観察すると, 細胞間には不完全ながら tight junction が形成され, 培養内皮細胞の下側 (basolateral) には pinocytic vesicles が認められる [Fig. 7(C)].⁴⁾ 内皮細胞間に tight junction が形成されると, イオンも細胞間を通過し難くなり, 内皮細胞層間の電気抵抗値は上昇するはずである. そこで, 細胞層間の電気抵抗値を測定した. 2つのセルの間に膜状に培養された内皮細胞を装着し, 培養しながら電気抵抗値の変化をモニターすると, 培養1日目頃から抵抗値は上昇し, 4日目頃までに安定した. 以後の LDL 透過実験には, 2日から4日培養の内皮細胞を用いることにした. RB (rhodamin B) で標識した LDL を上のセルに入れ, 下のセルに透過してくる RB-LDL をモニターする. RB-LDL は 37°C では内皮細胞層を透過するが, 4°C にすると透過は抑制される. 37°C から 4°C に温度を下げると透過は停止する (Fig. 8).⁵⁾ この知見から RB-LDL の内皮細胞層透過機構は温度に依存的であることが明らかになった. LDL の内皮細胞透過機構 (transcytosis) を模式的に示す (Fig. 9).

4. 内皮細胞障害部への血小板粘着・凝集は透過性にどのように影響するか

内皮細胞障害部への血小板の粘着・凝集は透過性を上昇すると信じられてきた. その理由は, ①Fig. 10 にみるように, 動脈硬化表層の内皮細胞障害部

Table 1. (A) Lipid Composition of Lipid Droplets, which is Consist of More Than 95% Cholesteryl Ester

A 液晶構造体の脂質組成	
Cholesteryl ester	95.7%
Triglyceride	2.3%
Free cholesterol	1.0%
Phospholipid	1.0%

(B) Fatty Acid Composition of Cholesteryl Ester in Lipid Droplets which is Consist of More Than 57% Oleic Acid.

B Cholesteryl ester の脂肪酸組成	
C20 : 4	1.0%
C18 : 0	10.5%
C18 : 1	57.6%
C18 : 2	6.1%
C18 : 3	2.0%
C16 : 0	20.7%
C16 : 1	2.0%

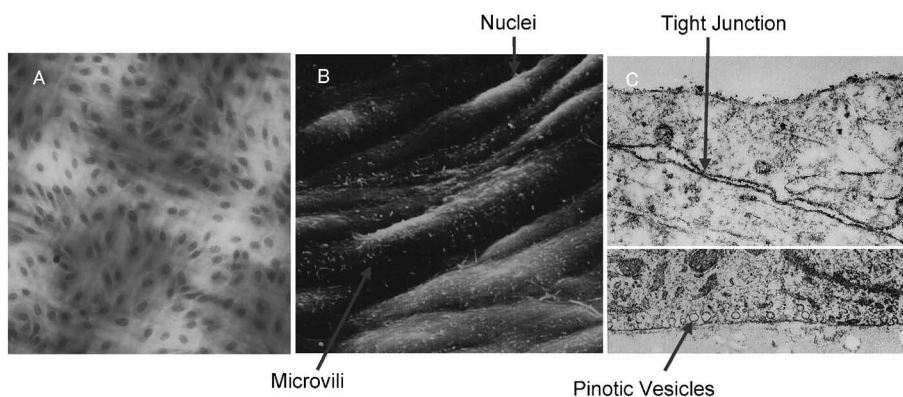


Fig. 7. Optical Micrograph of Porcine Arterial Endothelial Cells cultured on Collagen Gel supported by a Dacron Sheet.

(A) Cells were cultured for 2 days after seeding and stained with Giemsa. (B) Scanning electron micrograph. (C) Electron micrograph. Tight junctions are observed in the intracellular space. (D) Electron micrograph of porcine endothelial cells. The cells are resting on basement membrane. Here are many pinocytic vesicles along the apical side.

には血小板が結合している。②血小板には大量のセロトニンが存在し、血小板を投与すると血管透過性が上昇することがエバンスブルーで観察されることなどからである。そこで、内皮細胞剥離（障害）モデルを作製し、血小板の粘着と透過性の関係を探ることにした。コラーゲン (type I)、フィブリンノーゲン、フィブロネクチンで処理した人工血管用のダクロン布上にあらかじめテフロン製 O リングを置き、ブタ内皮細胞を培養した。内皮細胞培養後 O リングを取り除き、内皮細胞剥離モデルを作成す

る。内皮細胞剥離群には、血小板の粘着・凝集量を定量するために、あらかじめ ^{51}Cr で標識した血小板を用いて測定した [Fig. 11 (A)]. その結果予想通り、内皮細胞剥離部位への血小板の粘着・凝集を測定することができた [Fig. 11 (C), Fig. 12 (A)].⁶⁾ この系に stable PGI_2 (安定化プロスタサクリン: isocarbacyclin) を加えると、血小板の凝集は抑制されるが、粘着に抑制は認められない。内皮細胞剥離部への血小板粘着・凝集におよぼす各種プロスタグランジンの影響は、 $\text{stablePGI}_2 > \text{PGI}_2 > \text{PGE}_1 > \text{PGD}_2$ の順に、濃度依存的に抑制した [Fig. 12 (A)].

さらに、血小板の粘着・凝集と透過性との関連を FD (fluorescein dextran) を用いて測定を試みた。正常の内皮細胞群では [Fig. 12 (B) : intact EC], 培養 3 時間後で $2.4 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ とほとんど透過しな

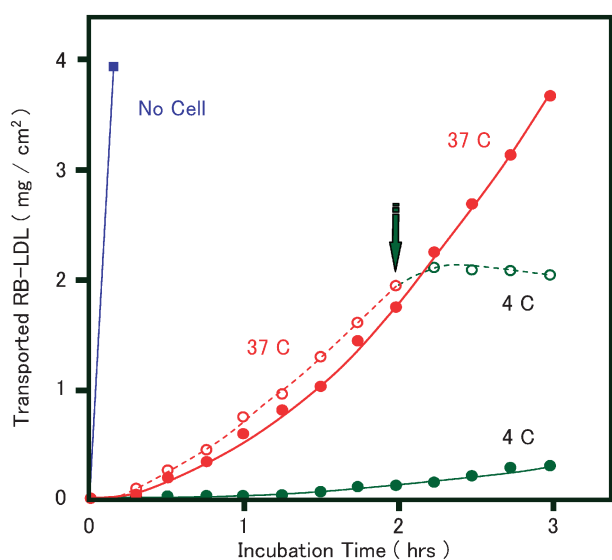


Fig. 8. Time Course of RB-LDL Transport
 RB-LDL (0.2 mg protein/ml) was introduced into the upper compartment and the RB-LDL transported through the endothelial monolayer to the lower compartment was monitored. Dacron sheet with gelated collagen (■—■); endothelial monolayer on the dacron sheet with gelated collagen at 37°C (●—●), at 4°C (●—●), and at 37°C for 2 h, then at 4°C (○—○). The temperature was reduced at the time indicated by the arrow (↓).



Fig. 10. Some Endothelial Cells were Injured and Adherence of Platelets were Observed on the Surface of Fatty Streak

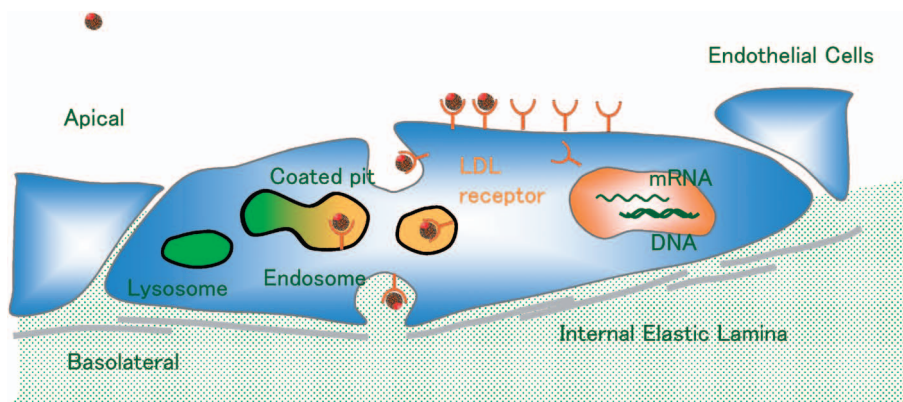


Fig. 9. LDL Transcytosis through Endothelial Monolayer (model)
 LDL binds to receptor located on the apical surface of endothelial cell to form coated pits. Some LDL transferred to basolateral area via endosome and some are degraded in lysosome. LDL receptors recycle to the apical surface of endothelial cell.

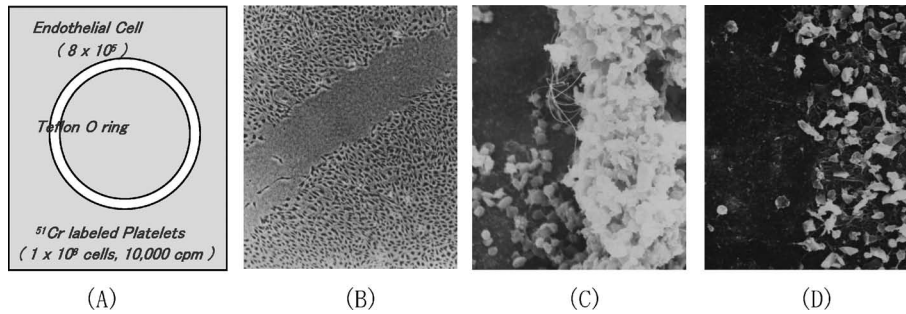


Fig. 11. Endothelial Cells were prepared from Porcine Arterial Wall.

(A) Acid soluble collagen type I was mixed with fibrinogen and fibronectin. The cells were cultured on the gel, in the presence of a teflon O-ring. Once the cell reached confluence, the teflon O-ring was removed. The endothelial monolayer was incubated with platelets at 37°C for an appropriate time, fixed with 10% formalin for 1 h, and washed several times with PBS (-). ^{51}Cr activity was measured with a gamma counter. (B) Optical micrograph of partially denuded porcine endothelial cells. (C) Scanning electron micrographs of platelets aggregated on a partially denuded endothelial monolayer. Platelets (1×10^8) were introduced and incubated for 2 h. Endothelial monolayer is left side and denuded area aggregated with platelets is right side. (D) Scanning electron micrographs of platelets adherent to denuded endothelial monolayer in the presence of isocarbacyclin which inhibits platelets aggregation but not adhesion.

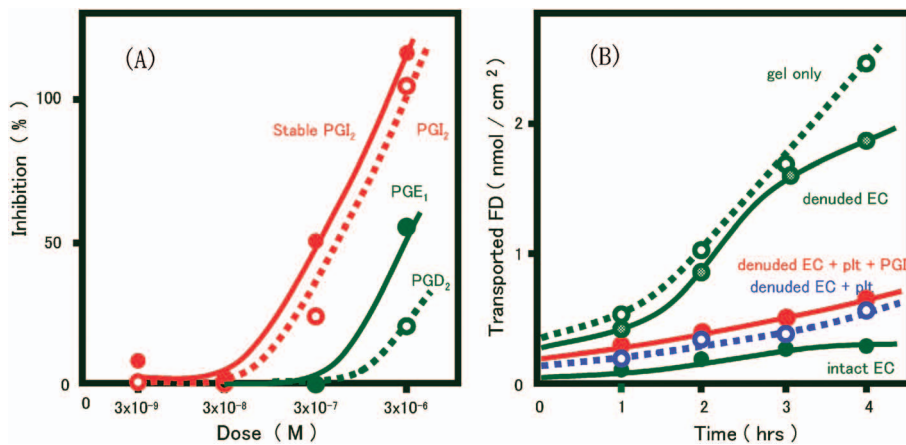


Fig. 12. Dose-response Curves of Prostaglandins

(A) The inhibitory effects (%) on fluorescein dextran (FD) transported in 2h in the presence of various concentrations of PCI_2 (●●), stable PGI_2 (○●), PGE_1 (●●) and PGD_2 (○●) are shown. (B) Effect of platelets and isocarbacyclin on FD transport through a partially denuded endothelial monolayer. FD transport was measured through an intact endothelial monolayer (●●), through a partially denuded endothelial monolayer in the absence (○●) or presence of platelets with (●●) or without (○●) isocarbacyclin (3×10^{-6}) and through a gel layer (○●). The values are mean \pm SD of three experiments.

い。内皮細胞を剥離したグループでは [Fig. 12 (B) : denuded EC] 3 時間後、 1.49 nmol/cm^2 と内皮細胞を培養していないとき (gel only) と同程度に透過した。剥離内皮細胞に血小板を加え、血小板の粘着・凝集が起こると、 3.9 nmol/cm^2 [Fig. 12 (B) : denuded EC+plt] と透過性は強く抑制された。⁷⁻⁹⁾ さらに、stable PGI_2 を加えると、透過性は 5.1 nmol/cm^2 と抑制されたまま [Fig. 12 (B) : denuded EC+plt+ PGI_2] であった。これらの結果から、内皮細胞障害時における LDL の透過機構に及ぼす血小板の役割は、次のように解釈された。動脈硬化壁表層にはしばしば内皮細胞が剥離し、血小板が粘着している様子が観察される (Fig. 10)。な

んらかの理由 (例えばウイルス感染、酸化リポタンパク質刺激など) により内皮細胞に障害あるいは剥離が生ずると、LDL の動脈壁内への透過性は増加する。内皮細胞障害・剥離部に粘着・凝集した血小板は、一種の「かさぶた」効果により透過性を抑制する [Fig. 13 (B)]. さらに、障害内皮細胞から分泌されるプロスタサイクリン (prostacyclin) により血小板の凝集を抑制される一方、粘着は抑制されないため、透過性の抑制は維持される [Fig. 13 (C)].^{10,11)} すなわち、内皮細胞に障害が生じた場合には、血小板の粘着により透過性はある程度抑制され、巧みに防御されているのであろう。これまで血小板が障害部に結合することによって透過性が充

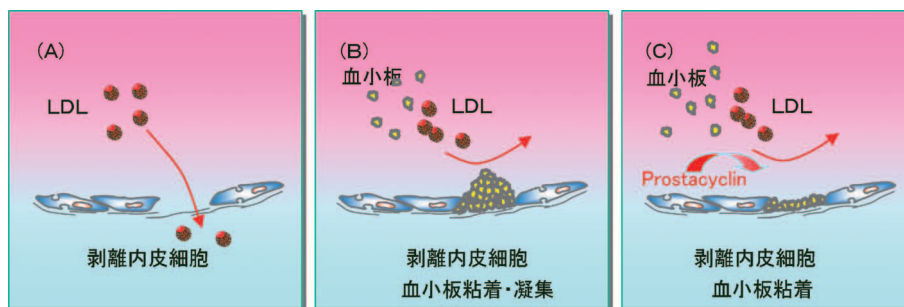


Fig. 13. Binding Platelets on Partially Denuded Endothelial Monolayer Suppress the Permeability (model)

(A) Fluorescent dextran (FD) transport is enhanced by a partially denuded endothelial monolayer. (B) Marked aggregation of platelets was observed at the denuded area by scanning electron microscopy. Adherent and aggregated platelets inhibit the transport by covering the denuded area. (C) Prostacyclin (PGI₂) inhibited platelet binding more than 80%, but little effect on the transport, suggesting that platelet adherence on the denuded area is sufficient to suppress the transport.

進されるとされてきたが、血小板の役割をもう一度見直す必要がある。

5. 泡沫細胞への Cholesterol の蓄積

C. de Duve は、「Wollman 症候群の患者は cholesteryl ester 分解酵素が先天的に肝臓で欠損している。その結果、cholesteryl ester が肝臓に蓄積しているのではないか。動脈硬化症は、cholesteryl ester 分解酵素が後天的に血管壁で低下した結果、cholesteryl ester が血管壁に蓄積する疾患ではないか」という作業仮説を提唱した。われわれは、「動脈壁 lysosome に cholesteryl ester 分解酵素が局在し、動脈硬化壁でその活性が低下している」ことを証明しようと試みた。Peters は血管壁から平滑筋細胞の分離を試み (Fig. 14),¹²⁾ 細胞分画を試みた。しかし、1 匹の家兎の血管壁からタンパク量にして 1 mg 相当量の細胞を分離するのが精一杯であった。そこで、より感度の高い cholesteryl ester 分解酵素活性測定法の確立を試みた。基質に taurocholate (胆汁酸の 1 つ) を加えてミセル化することにより約 50 倍以上に感度を上げることができた。しかも至適 pH は lysosome に特徴的な 4.25 で、 $K_m = 0.45 \mu M$ であった。¹³⁾

次に、動脈壁細胞内局在性を isopicnic 蔗糖密度勾配遠心法により検討したところ、acid cholesteryl esterase の比重は 1.17 (Fig. 15) となり、*N*-acetyl β -glucosaminidase (lysosome の指標) と一致した。また、cytochrome oxidase (mitochondria の指標) は比重: 1.18 とより重い比重に回収された。

さらに、lysosome の比重を小さくすることで知られている triton WR-1339 を家兎耳より静注し、24 時間後に賭殺、floatation isopicnic 蔗糖密度勾配

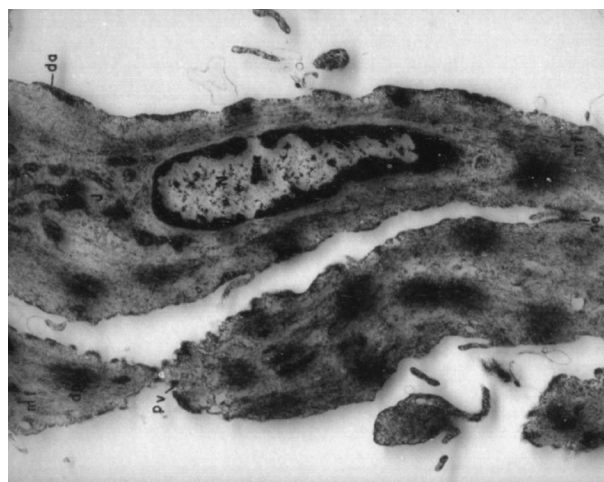


Fig. 14. Preparation of Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells
Arterial wall cut into pieces is incubated with collagenase, elastase and hyaluronidase for 3 h at 30°C. Undigested materials are removed through 4 folded gauze and cells are collected after centrifugation at 800 rpm for 10 min.

遠心法にて細胞分画を試みたところ、acid cholesteryl esterase と *N*-acetyl β -glucosaminidase の比重は 1.14 といずれも小さくなったが (Fig. 15),¹⁴⁾ α -glucosidase (microsome の指標) の比重は 1.17 のまま変化しなかった。これらの結果により、acid cholesteryl esterase は動脈壁細胞の lysosome 内に局在していることを確認することができた。¹²⁾

さらに、動脈硬化壁細胞の acid cholesteryl esterase 活性低下機構を調べることを目的として、動脈硬化壁細胞から lysosome の調製を試みた。¹⁵⁾ 動脈硬化壁よりホモジェネートを調製し、800 回転 10 分で動脈壁残渣を取り除いたのち、その上清を、蔗糖で比重 1.110 になるように調製して、比重 1.00 から 1.25 の蔗糖濃度勾配で、2500 回転 90 分間超遠心用スイングローターで遠心した。その結果、

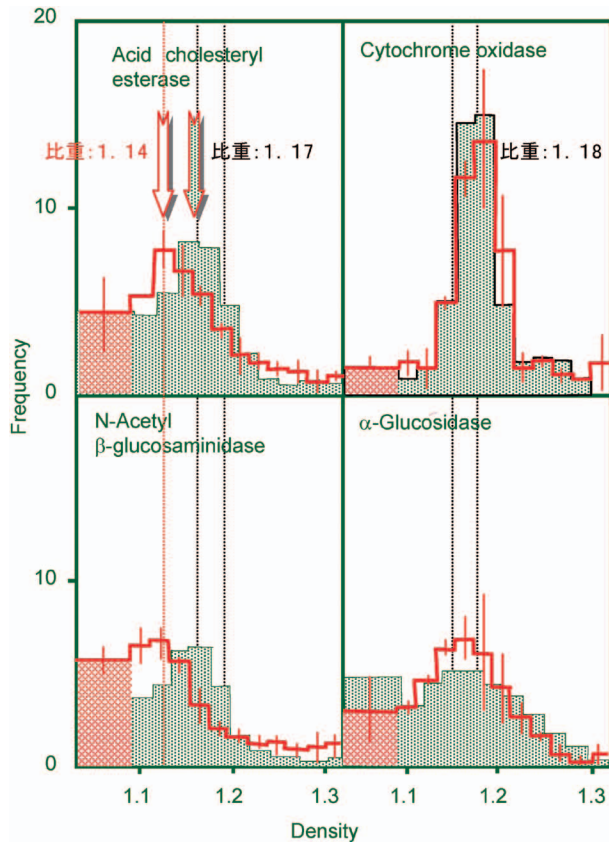


Fig. 15. Acid Cholesteryl Esterase in Arterial Cells Subfractionated by Linear Sucrose Density Gradient Centrifugation
Distribution of lysosomal marker enzymes are detected. The relative activity distribution is shown as a function of the gradient volume. The shaded area represents the applied layer of sample (triton WR-1339).

N-acetyl β -glucosaminidase の活性は Peak B (比重 1.05) に検出された [Fig. 16(A)]. この peak B は free cholesterol 並びにリン脂質の peak と一致し、サンプル調製の際に lysosome は崩壊し、lysosome の膜として回収されていたと結論した。事実、Peak B の透過電子顕微鏡像は膜構造を示し [Fig. 16(B)], しかも、acid cholesteryl esterase 活性は測定できないほど低下していたのである。一方 lysosome 内封入体と考えていた cholesteryl ester は、液晶状構造として peak A に回収されたのである [Fig. 16(A), Fig. 6(A), (B)].

Acid cholesteryl esterase 活性低下機構をさらに解析することを目的として、lysosome 膜の脂質組成の分析を試みた。その結果、動脈硬化壁より分離した lysosome 膜の free cholesterol 含量は正常 lysosome 膜の約 6 倍 (ヒト) から 11 倍に上昇していることが明らかになった [Table 2(A)]. また、free cholesterol の上昇に伴って、SM (sphingomyelin) も上昇している [Table 2(A)]. ここでは、常 lysosome 膜は、正常肝 lysosome 膜を対照とした。さらに、動脈硬化壁 lysosome 膜で著しく増加していた SM と絶対的含量の高い PC (phosphatidylcholine) の脂肪酸組成を分析したところ、いずれのリン脂質も、C16:0 (palmitate) の割合が増加していることが明らかになった [Table 2(B), (C)].¹⁶⁾

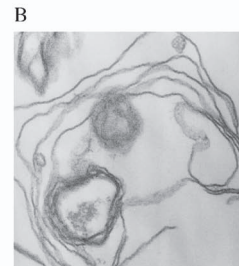
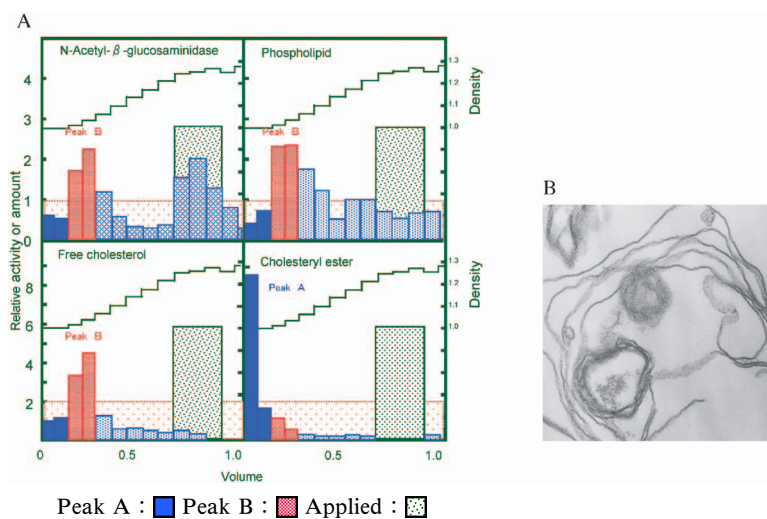


Fig. 16(A). Preparation of Low-density Lysosomal Membranes

The low-density lysosomal fraction was subfractionated by linear sucrose density gradient centrifugation. Low-density lysosomal membranes were recovered in the peak B in which phospholipids, free cholesterol and *N*-acetyl- β -glucosaminidase (lysosomal marker enzyme) were detected. Cholesteryl ester-rich lipid droplets were recovered in the peak A fraction. The shaded area represents the applied layer of sample.

Fig. 16(B). Electron Micrograph of Peak B

The low-density lysosomal membranes recovered in the Peak B of (A).

Table 2(A). Phospholipids and Cholesterol Composition of Light Lysosomal Membrane

	Normal	Atheroma	
		Human	Rabbit
lyso PC	0.9	9.0	6.0
SM	7.6	56.0	38.0
PC	41.4	34.0	48.0
lyso PE	2.9	—	—
PI	9.7	—	—
PS	3.0	1.0	—
PE	26.3	1.0	4.0
CL	4.0	—	4.0
Others	4.2	—	—
Free Chol*	0.295	1.79	3.3
Chol ester	—	5.79	1.4

* molar chol/P-lipid ratio.

Table 2(B). Fatty Acid Composition in Phospholipids of Light Lysosomal Membrane

	Normal	Atheroma
C14 : 0	3.4	—
C16 : 0	14.6	46.0
C18 : 0	27.4	10.5
C20 : 0	—	1.2
C22 : 0	—	2.0
C24 : 0	—	—
C16 : 1	1.7	0.8
C18 : 1	5.0	13.9
C24 : 1	—	—
C18 : 2	11.8	17.7
C20 : 4	22.3	4.5
C20 : 5	3.8	—
C22 : 6	10.0	3.3

Table 2(C). Fatty Acid Composition in Sphingomyelin of Light Lysosomal Membrane

	Normal	Atheroma
C14 : 0	4.2	—
C16 : 0	21.1	46.0
C18 : 0	8.3	6.3
C20 : 0	3.5	5.2
C22 : 0	8.1	7.0
C24 : 0	19.3	6.2
C16 : 1	8.2	—
C18 : 1	5.6	—
C24 : 1	14.2	21.7
C18 : 2	—	—
C20 : 4	—	5.5
C20 : 5	—	—
C22 : 6	—	—

さらに、acid cholesteryl esterase 活性に及ぼすこれら膜脂質組成の変化を調べるために、acid cholesteryl esterase の精製を試みた。精製の材料には、ラット肝 lysosome を用いた。¹⁷⁾ 本酵素を測定するための合成基質として、4-methylumbelliferyl oleate の合成を Koch Light Colnbrook Co., Ltd. に依頼した。本基質を用いることにより初めて acid cholesteryl esterase の精製に成功した [Fig. 17(A)].^{18,19)} また、cholesterol と PC (lecithin) でリポソームを調製し、acid cholesteryl esterase 活性に及ぼす PC の脂肪酸特異性を調べてみた。その結果、C14 : 0, C16 : 0, C18 : 0 等の飽和脂肪酸により活性は抑制され、C18 : 1, C18 : 2 等の不飽和脂肪酸では逆に活性化されることが明らかになった [Fig. 17(B)].¹¹⁾ Lysosome 膜のリン脂質では PC 含有量が最も高く、動脈硬化壁の lysosome 膜では SM が最も増加

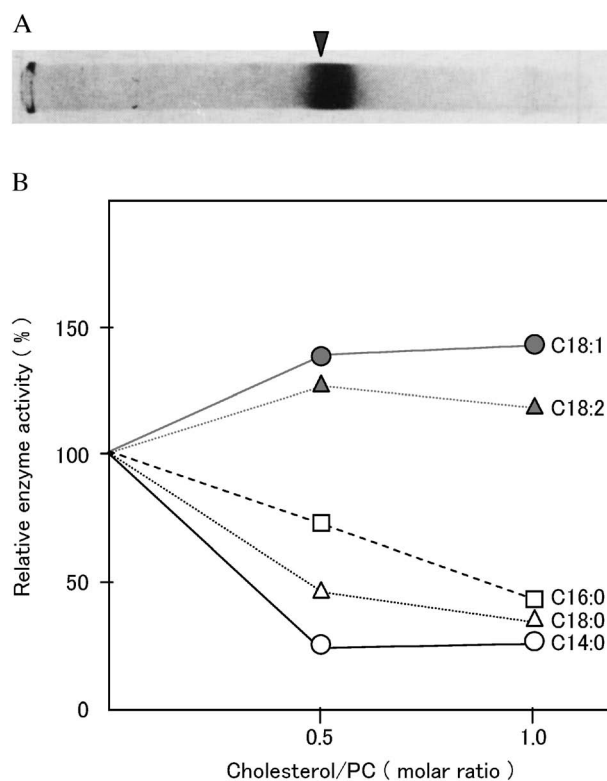


Fig. 17(A). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified Acid Cholesteryl Esterase

The sample was run on 7.5% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Molecular weight of the enzyme was determined to be 42 kDa (arrow).

Fig. 17(B). Effect of Liposome on Acid Cholesteryl Esterase Activity

Effect of fatty acid consisting of phosphatidyl choline (PC) on acid cholesteryl esterase is examined. C14 : 0, C16 : 0 and C18 : 0 which are rich in atheromatous lysosomal membrane inhibited the enzyme activity but C18 : 1 and C18 : 2 low in same counterpart activated.

している, しかも, cholesterol 存在下では, acid cholesteryl esterase 活性に抑制的に作用する C16:0 等の飽和脂肪酸が, 活性に促進的に作用する飽和脂肪酸よりも増加していることから判断すると, acid cholesteryl esterase 活性は動脈硬化壁の lysosome 膜で低下していると解釈した.²⁰⁻²⁸⁾

結論としては, ①動脈壁細胞 lysosome に acid cholesteryl esterase が存在する. ②動脈壁細胞 lysosome 膜の free cholesterol 量並びに SM 量に増加が認められる. ③精製 acid cholesteryl esterase の性質は膜依存型である. ④PC 並びに SM を構成する脂肪酸のうち, acid cholesteryl esterase 活性に抑制的に作用する飽和脂肪酸 (特に C16:0) が著しく増加している. これらの知見を総合すると, 「動脈硬化とは cholesteryl ester 分解酵素が後天的に低下した疾患である」という作業仮説を間接的に証明できたと考えている (Fig. 18).²⁹⁻³²⁾

6. 泡沫細胞の由来

形態病理学の立場から, 泡沫細胞はマクロファージ由来であるというのがそれまでの定説であった. その後, 泡沫細胞の胞体内に myofilament が観察されることから, 泡沫細胞は平滑筋細胞が変形した細胞 (変形平滑筋細胞) 由来であるという意見が浮上した. われわれは動脈硬化壁を細切し, コラゲナーゼ, エラスターゼ, ヒアルウロニダーゼで 30°C, 3 時間処理し, 5% CO₂ 気流下で泡沫細胞の分離調製に成功した [Fig. 19(A)]. しかし, この泡沫細胞は平滑筋細胞由来であるか, それともマクロファージ由来であるか, 形態からでは疑問の残るところであった. そこで, 映画によるコマ取り撮影により, 生化学と形態学の補完ができないかと考え, 泡沫細

胞の培養を試みた. 滅菌したニフトコの髄に動脈硬化壁をはさみ, カミソリの刃で薄く切り, explant 法で培養する. その結果, 胞体内に液晶状の封入体を抱えた泡沫細胞が進展してきた. この知見は, 液晶状の封入体は生きた泡沫細胞に存在し, 泡沫細胞を固定した際に液晶状構造体が産生されたのではないことを示唆している. しかも泡沫細胞が分裂するとき, 液晶は分裂後の 2 つの細胞にそれぞれ分割さ

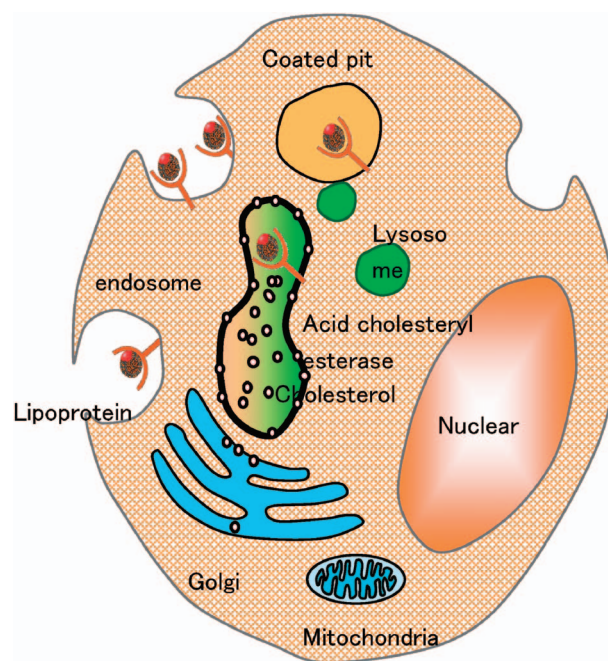


Fig. 18. Accumulation of Cholesteryl Ester in Foam Cells and Acid Cholesteryl Esterase (model)

Lysosomal membrane prepared from atheroma are rich in free cholesterol and C14:0, C16:0 and C18:0 rich in phosphatidyl choline. Acid cholesteryl esterase activity located on the membrane is suppressed by the lipid composition, suggesting that lysosomal acid cholesteryl esterase may suppress in the process of atherogenesis, consequently cholesteryl ester accumulates in atheroma.

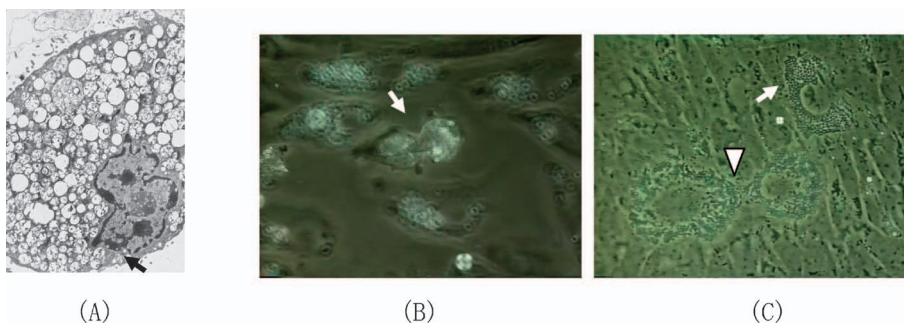


Fig. 19. Time-lapse Cinemicrophotograph of Lipid-laden Cells in the Presence of Normal Arterial Smooth Muscle Cells at 5-Minute Intervals

(A) Foam cell prepared from atherosclerotic aorta. (B) A lipid-laden cells were migrating through smooth muscle cell monolayer. A nucleus was migrating from right to left between the cells (arrowheads). (C) A foam cell sat between smooth muscle cell layer was also seen (arrow) under phase contrast microscopy.

れて認められる [Fig. 19(B)]. そこで、別途培養しておいた平滑筋細胞に泡沫細胞を加え混合培養を試みたところ、平滑筋細胞との間に構築しじつと動きを止めている平滑筋由来と思われる泡沫細胞と、平滑筋細胞の間隙を縫うような動きをするマクロファージ由来と思われる泡沫細胞とが観察された [Fig. 19(C)].^{33,34)} この結果から、泡沫細胞にはマクロファージ由来の細胞と変形平滑筋細胞由来の細胞とが存在していることが明らかになった。

7. 泡沫細胞の液晶構造はどのようにして形成されるか

Cholesterol は細胞膜の重要な構成成分であり、リポタンパク質によって血管壁細胞に補給されている。血中脂質量が増加したり（高脂血症）、血圧が上昇したり（高血圧）、あるいは内皮細胞に障害が生じたり（感染症）することによって、過剰なリポタンパク質あるいは変性リポタンパク質（例えば酸化リポタンパク質）が動脈壁内に流入してくると、

マクロファージはこれを排除し泡沫化する。大量のリポタンパク質を取り込むと、泡沫細胞に崩壊が生ずる。この様子は、電子顕微鏡像（透過、急速凍結レプリカ）下で観察される。²⁾ Figure 20(A)に内皮細胞下に崩壊しつつある泡沫細胞（細胞膜に連続性がない、細胞が平坦に染色されている）が認められる。Figure 20(B)には泡沫細胞の脂質球が細胞膜により覆われている死にかけた泡沫細胞が観察され、Fig. 20(C)では崩壊した泡沫細胞から生じたと思われる細胞膜で覆われた脂質球がコラーゲンの間に散在している。対応する部位を透過電子顕微鏡で観察してみると、コラーゲン（ムカデ状構造体）の間に脱水されて細胞膜を残したベジクルが観察される [Fig. 20(D)]. さらにマクロファージは、これらの細胞間物質を細胞内に取り込み泡沫化する [Fig. 20(E)].

培養平滑筋細胞に変性リポタンパク質（アセチル化 LDL）を取り込ませ培養を続けたところ、泡沫

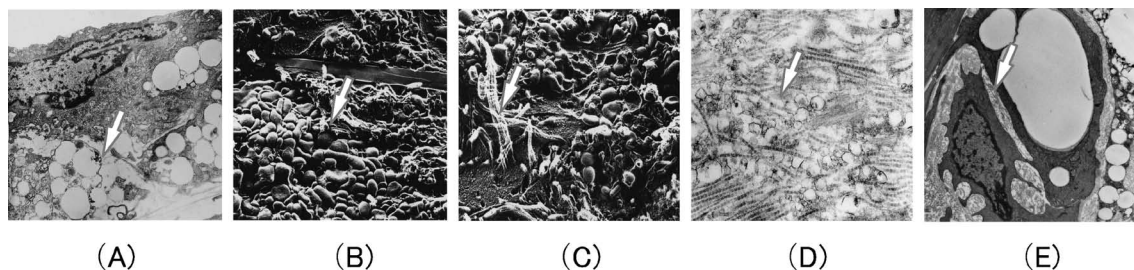


Fig. 20. Prepared by the Thin Section Method.

(A) rupturing foam cell (arrow) is seen in the lower left. (B) Prepared by the quick freeze etching method. Rupturing foam cell (arrow) is also seen an aggregation or vesicles in the lower left may be disrupted foam cells a plate crystal is seen. (C) Prepared by the quick-freeze, etching method. A large amount of lipid with a vesicular structure (arrow) is observed among collagen fibers. (D) Prepared by the thin section method. Lipids are observed as vesicles (arrow) and electron-lucent region among collagen fibers. (E) Electron micrograph of a lipid-laden cell in atherosclerotic aorta. Extracellular materials seem to be removed by these cells.

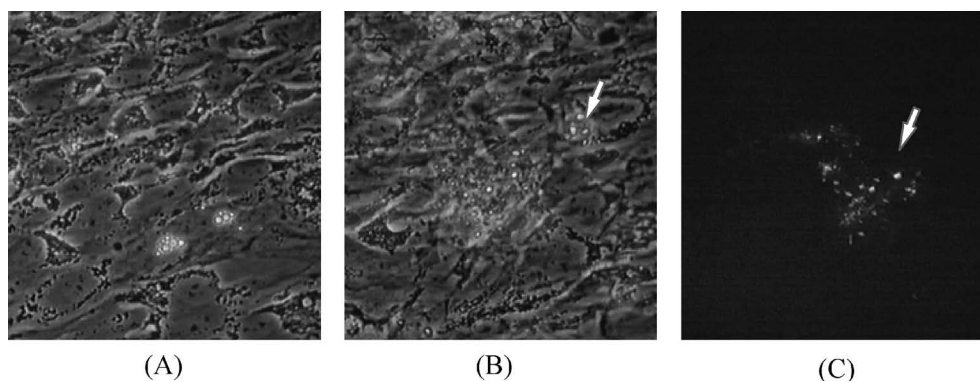


Fig. 21. Development of Anisotropic Liquid Crystal

(A) Porcine smooth muscle cells are cultured in the presence of acetylated LDL. (B) Foam cells derived smooth muscle cells were ruptured afterward. (C) Anisotropic liquid crystal developed in the same counterparts.

細胞に崩壊（動かなくなった泡沫細胞）が観察された [Fig. 21 (B)]. 動かなくなった細胞を偏光顕微鏡下で観察すると、液晶状構造が出現していた [Fig. 21 (C)]. 泡沫細胞内に液晶状の封入体が観察される理由は、泡沫細胞が崩壊することによって液晶状構造体が形成され、この液晶をマクロファージが細胞内に取り込んだためであろうと考えた.²³⁾ もしこの仮説が正しいとするならば、試験管内で作製した液晶をマクロファージに取り込ませれば、液晶構造体を細胞内に持つ泡沫細胞を実験的に作製することができるはずである。液晶は cholesteryl oleate を窒素ガス気流下で風乾し、アルブミン共存下で超音波処理をして調製し [Fig. 22 (A), (B)] マクロファージに与えると、速やかに細胞内に取り込み、液晶構造体を封入体とする泡沫細胞を人工的に形成することができた [Fig. 22 (C)]. しかも、40°C で培養したところ、cholesteryl oleate 液晶（液晶点が 39°C）十字像は消失した。この知見は、細胞内に取り込まれた液晶は分解されることなく、cholesteryl oleate 液晶のまま細胞内に局在していることを意味している。

8. 細胞間脂質蓄積部位を認識するモノクローナル抗体 (212D)

形態病理学で得られた知見を分子病理学の立場から同じ土俵の上で討論することを目的として、動脈硬化病巣のホモジェネートを抗原とし、動脈硬化病巣を認識する抗体を組織化学的染色により選別する

ことにした。これまでに調製したモノクローナル抗体を Table 3 に示す。本稿では①細胞間脂質蓄積部位を認識するモノクローナル抗体 (212D)、②酸化リポタンパク質を認識する抗体 (DLH3)、③アポトーシスに関連する抗体 (256C) に限定して述べ

Table 3. Monoclonal Antibodies Recognizing Atheromatous Lesions

Antibodies	Localization	Antigen	References
212D	Matrix with lipid Deposit	Vitronectin	Virchows Archive (1986) Am. J. Path. (1986) J. Biol. Chem. (1990)
201F 904G 104G	Lipid laden cells —	— Oxidized apolipoproteins	Virchows Archive (1986) Biochim. Biophys. Acta (1988)
DLH3	Lipid laden macrophage	Oxidized phosphatidylcholine	J. Biol. Chem. (1994) J. Lipid Res. (1996) J. Biol. Chem. (1996)
256C	Fatty streak	Phosphatidylcholine	J. Biol. Chem. (1999) J. Lipid Res. (2001)
DLH2	Macrophage matrix	MDA linked proteins	Biochim. Biophys. Acta (1988)

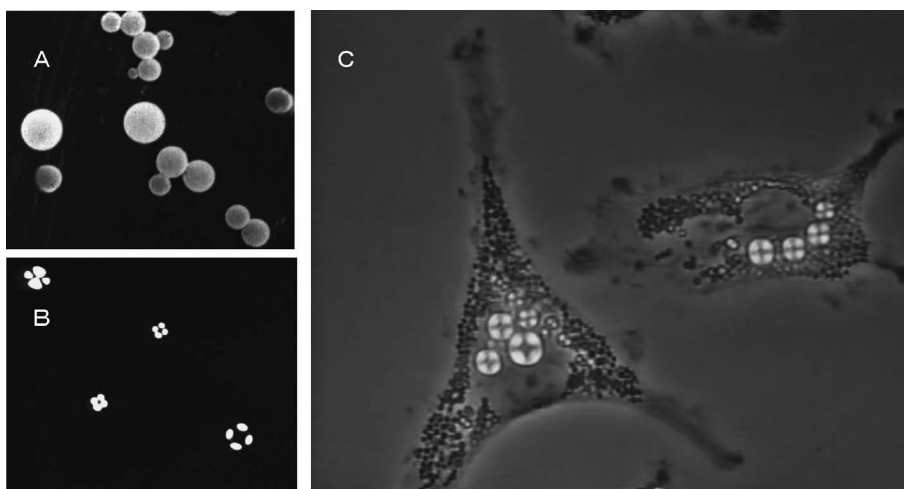


Fig. 22. To Prepare the Liquid Crystals, Cholesteryl Oleate was Dried under a Stream of N₂ Gas and Then Sonicated for 4 min at 80 ± 5°C

(A) Spheroids (0.1-3 μm diameter) are seen by scanning electron microscopy. (B) An anisotropic cross image on polarizing microscopy. (C) Macrophages were cultured in the presence of the liquid crystals, anisotropic liquid crystal laden macrophages were observed under 45 degree polarized microscopy.

ることにする。

モノクローナル抗体は、先天性動脈硬化症家兎 (WHHL) の動脈硬化病巣ホモジェネートを抗原としてマウス (BALB/c) を感作し、抗体産生リンパ球を調製した。このリンパ球とミエローマとでハイブリドーマを調製し、目的の細胞を組織化学染色により選別した (Fig. 23)。その結果、細胞間脂質蓄積部位を認識する抗体と、泡沫細胞を認識する抗体 (212D) を調製することに成功した。^{35,36} 細胞間脂質蓄積部位を認識する抗体 (212D) の抗原を特定するために、動脈硬化病巣より抗原物質を部分精製し、N末端の15アミノ酸残基を同定、アミノ酸残基に対応するcDNAから抗原の構造をウサギ由来のピトロネクチンであると推定した (Fig. 24)。³⁷ ここに「動脈硬化病巣のホモジェネートを抗原として用い、目的とする抗体を組織化学による染色により選別、抗体が認識する抗原物質を推定する」という分子病理学による新しい手法を展開できた。³⁸⁻⁴²

9. 酸化リポタンパク質を認識する抗体 (DLH3)

酸化リポタンパク質は内皮細胞を障害する、あるいはマクロファージの泡沫化を促進するため、動脈硬化発症に密接な係わりがあると指摘されていた。しかしながら、生体内に本当に酸化リポタンパク質

が存在しているのか確証は得られていなかった。われわれは酸化リポタンパク質を認識するモノクローナル抗体を調製することにより、動脈硬化病巣進展への係わりについて解析できればと期待した。抗酸化リポタンパク質抗体 (DLH3) の調製には、細胞間脂質蓄積部位を認識する抗体 (212D) と同様の

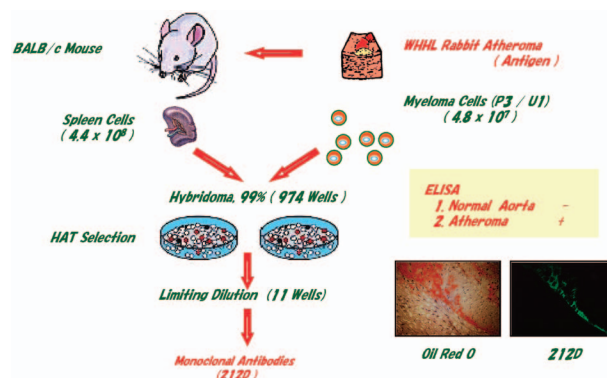


Fig. 23. Preparation of Monoclonal Antibodies Specific to Atherosclerotic Lesions were Carried Out

Spleen cells prepared from BALB/c mice sensitized with delipidated homogenates of atherosclerotic aorta from male homozygous WHHL rabbits were fused with P3/U1 myeloma. The hybridoma was examined for alkaline phosphatase activity by ELISA and were selected by immuno-histochemical staining. Clones producing monoclonal antibodies that stained atherosclerotic lesions but not normal aorta were selected. Finally, one clone producing antibody against extracellular materials (212D) was obtained after limiting dilution. The antibodies were of the IgG subclass.

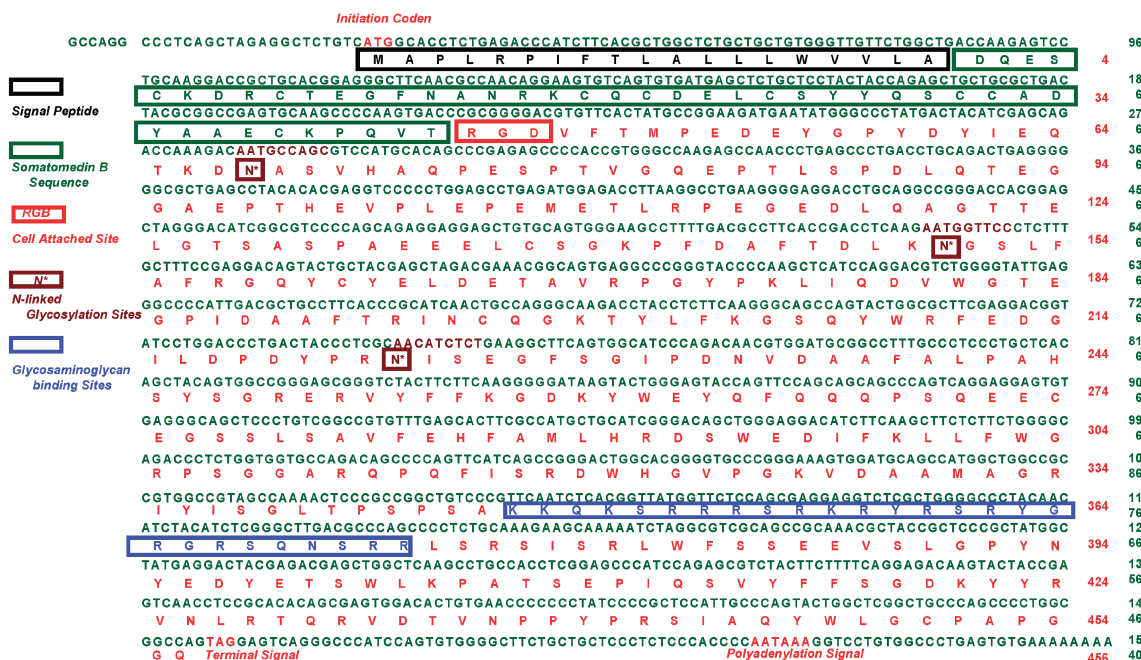


Fig. 24. Nucleotide Sequence and Predicted Amino Acid Sequence of cDNA of 212D Antigen

The nucleotide sequence was determined by the deoxynucleotide chain terminal method. Single-letter amino acid symbols are shown under the nucleotide sequence. The cell attachment site (Arg-Gly-Asp) and the glycosaminoglycan binding site are boxed. Possible N-linked glycosylation sites are indicated by an asterisk. The initiation codon (ATG) and polyadenylation signal, AATAAA, at the 3' end are indicated.

手順に従った。しかし今回は、抗原としてヒト動脈硬化病巣を用い、酸化 LDL を認識し、正常 LDL を認識しないハイブリドーマを選別した。^{43,44)}

ヒト動脈硬化病巣の組織化学染色により、酸化 LDL はマクロファージ由来の泡沫細胞に局在していることが分かった。しかも、抗 ApoB 抗体との二重染色により、DLH3 抗体の認識する抗原物質は ApoB の局在と一致していた (Fig. 25)。これらの知見により、DLH3 抗体は泡沫細胞に局在している酸化 LDL を認識していると結論した。また、DLH3 抗体が認識する抗原物質を同定するために、液体クロマトグラフィなどを用いて精製した抗

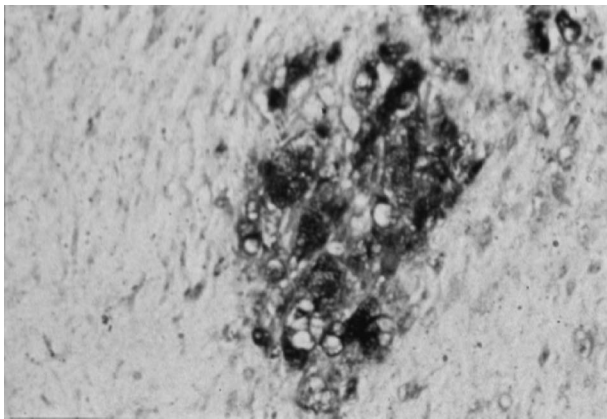


Fig. 25. Human Atheromatous Aorta are Stained by DLH3 (anti-oxLDL) and Anti-apo-B Antibodies
The location of both antibodies must be same (provided by Prof. Ueda.).

原物質を Laser desorption spectrum で解析したところ、抗原物質の 1 つは 9CHO-PC [1-Palmitoyl-2-(9-oxonononyl) PC] であると同定した (Fig. 26).⁴⁵⁾ これらの結果は酸化 LDL が動脈硬化病巣に存在していることを初めて示す知見となった。

ヒト血中酸化 LDL を測定してみると、正常値 (Control) は 112.4 ± 44.4 であり、一方心疾患グループ (CHD) では、 201.3 ± 90.5 と約 2 倍上昇していた [Fig. 27 (A)].⁴⁶⁻⁵³⁾ さらに、心疾患危険因子の ROC (Receiver Operating Characteristics Curve) (縦軸に相対的に心疾患になる頻度を、横軸に相対的に心疾患にならない頻度) をプロットすると Fig. 27 (B) のようになる。全く相関性がない場合には対角線上の直線になり、相関性が高いほど上に凸の曲線になる。結果として、心疾患の危険因子としては、酸化 LDL が最も高く、ついで ApoB, TG, 1/HDL, T-Chol の順になった。¹⁸⁾ この知見を踏まえて、協和メディクスから DLH3 抗体を用いた血中酸化 LDL の測定キットが製品化された。⁵⁴⁻⁵⁶⁾

10. 動脈硬化病巣表層を認識するモノクローナル抗体 (DLH3)、そして細胞死 (アポトーシス)

ヒト動脈硬化病巣の表層を認識するモノクローナル抗体を調製できれば、①抗体に治療薬を乗せれば DDS 治療につながる。②アイソトープなどの診断薬を乗せれば体内診断薬になる。③体内診断薬が開発されれば新薬の治療経過を追跡できるようになると期待した。しかし、ヒトを使つての実験は不可能

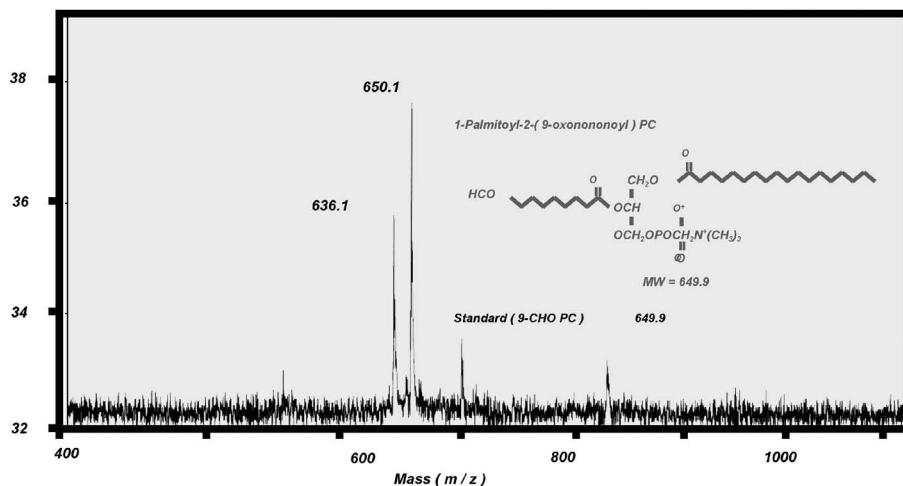


Fig. 26. FAB-MS Spectrum of the Products of the OsO₄/Periodate Treatment

Non-radioactive 1-palmitoyl-2-oleoyl PC and 1-stearoyl-2-arachidonoyl PC were treated with osmium tetroxide and sodium periodate. The products separated by TLC were subjected to FAB-MS analysis using sodium iodide as matrix. The product from 1-palmitoyl-2-oleoyl PC gave the molecular ions of $m/z = 650$ ($M+H^+$) together with $m/z = 672$ ($M+Na^+$). The molecular weight of 9-CHO PC is 649 which is one of the candidates of DLH3 antigen.

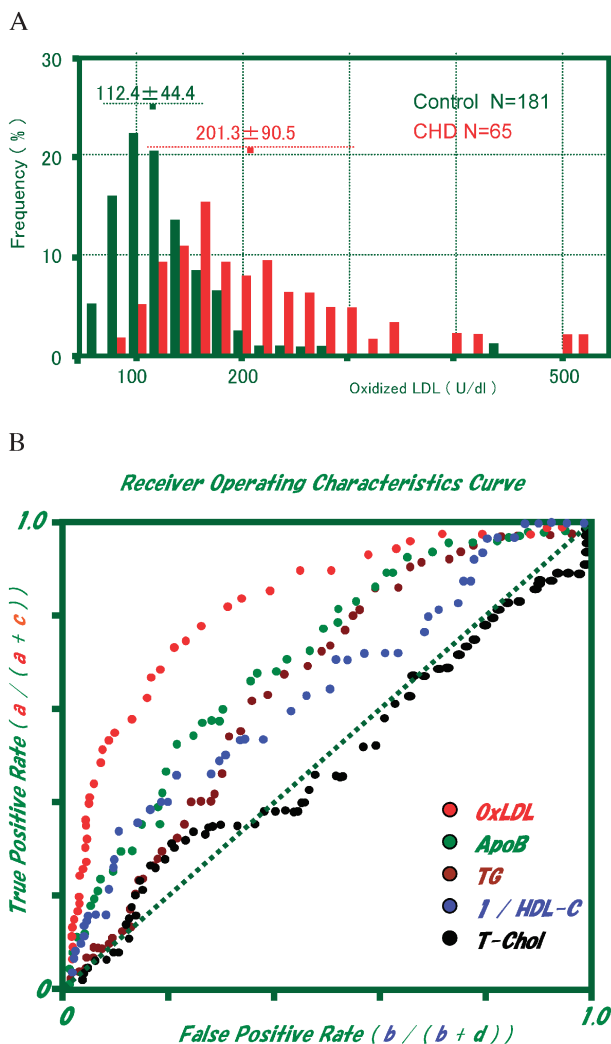


Fig. 27(A). Frequency of Coronary Heart Disease(CHD) and DLH3 Value
65 patients and 181 control.

Fig. 27(B). Receiver-operating Characteristic Curve Analysis of oxLDL Levels in Patients with Coronary Heart Disease (CHD)

Note that the performance of the assay as shown by the area under the curve is superior for oxLDL compared with total cholesterol (TC), triglyceride (TG), apoB, and 1/HDL levels.

に近い。家兎でこの条件を満たすための実験計画を立てる。①抗原にヒト動脈硬化病巣を用いる。②ウサギ動脈硬化病巣表層を認識する抗体を選別する。③選別された抗体がヒト動脈硬化病巣表層を認識することを確認する。④臨床応用時を考慮し、静注することを意識して、ヒト血中で反応する物質を検出しない。われわれは以上の条件を満たす抗体として 256C 抗体を選別することに成功した。¹²⁵I で直接標識した抗体をウサギ耳静脈より静注し、48 時間後賭殺、オートラジオグラムを撮ると、動脈硬化病

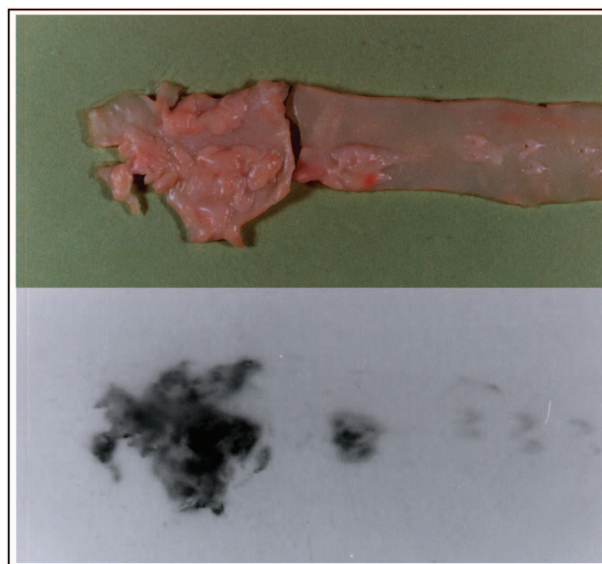


Fig. 28. Monoclonal Antibody (256 C) Recognizes Fatty Streaks of WHHL Rabbit Aorta *In Vivo*

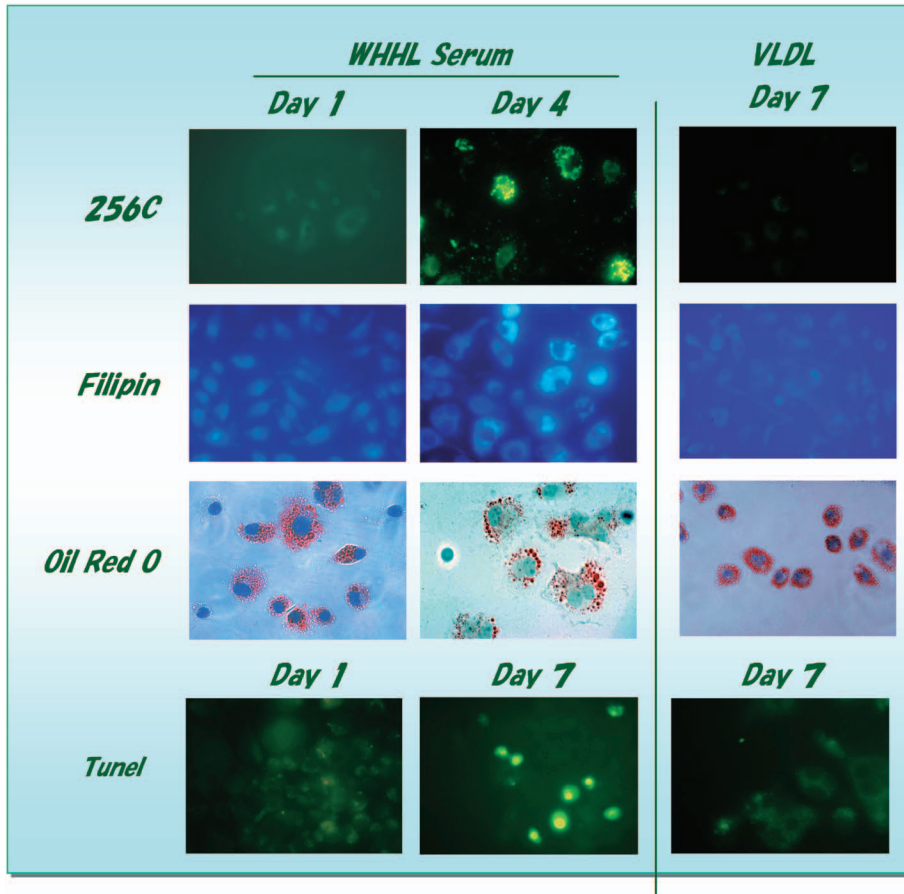
¹²⁵I-labeled the antibody (185 MBq, 1.5 mg) was injected into normal and WHHL rabbits through the ear vein. The rabbits were sacrificed 48 h after the injection, and the original features and autoradiogram of the aortas were taken.

巣表層に結合していることが分かる (Fig. 28)。この 256C 抗体が認識する抗原物質は、free cholesterol とリン脂質の複合体であることが明らかになった。^{57,58)} しかもこの複合体は、泡沫細胞のアポトーシスに係わっているらしい。WHHL 家兎血清存在下でマクロファージを培養すると泡沫化する (Fig. 29 : day 1)。さらに培養を続けると、泡沫細胞に崩壊 (アポトーシス) が認められる [Fig. 29(A) day 7 : tunnel, Fig. 29(C)]。しかも、256C 抗体が認識する free cholesterol とリン脂質の複合体も上昇する [Fig. 29 (A) day4 : 256 C]。このとき、free cholesterol を直接測定すると明らかに上昇する [Fig. 29(A) day4 : filipin, Fig. 29(B)] ことから、アポトーシスにより細胞死が誘導されていると結論した。²⁰⁾ しかし対照群に用いた VLDL では、泡沫化の誘導能もアポトーシス誘導もない [Fig. 29 (A), (B), (C)]。このような現象は一部のヒト高脂血症患者血清でも誘導される。

11. おわりに

われわれは形態病理学に、分子病理学の立場から解析を進めてきた。いま、われわれは動脈硬化発症・進展機構について以下のような作業仮説を立てて研究をしている (Fig. 2)。血中 LDL は内皮細胞

A



B

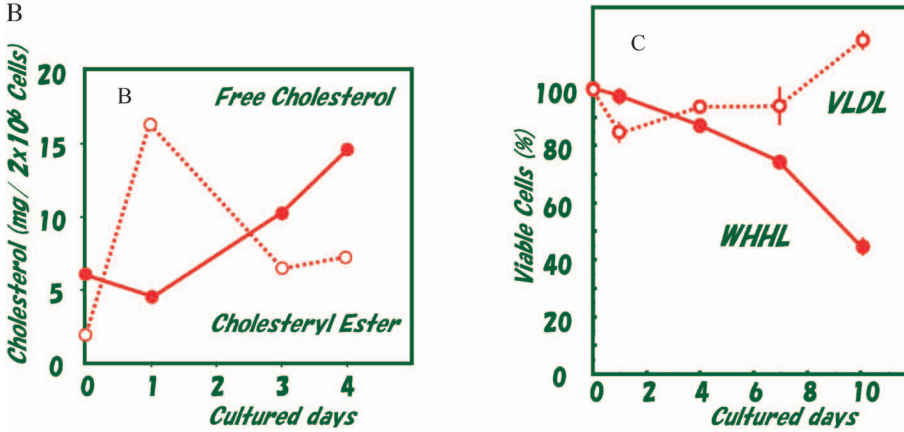


Fig. 29(A). Dying Foam Cells Cultured in the Presence of WHHL Rabbit Serum

(A) Stained by 256 C antibodies, (B) free cholesterol by fillipin, (C) by oil red O and by TUNEL method. Apoptotic cells stained using the TUNEL method were detected in the presence of WHHL rabbit serum, but not in the presence of VLDL.

Fig. 29(B). (A) Macrophages incubated with WHHL rabbits serum (final cholesterol concentration 50 μg/ml) for 24 hrs and maintained with medium up to 4days. FC (closed circle) and CE (open circle) were measured. (B) WHHL rabbit serum induced cell death (closed circle) but VLDL did not (open circle).

の transcytosis により動脈壁に進入し、その構成成分である cholesterol は細胞膜の構成成分として利用されている。一方、なんらかの理由で、例えば高

脂血症、高血圧症、内皮細胞障害などにより、過剰のリポタンパク質が動脈壁に流入すると、マクロファージはこれを細胞内に取り込み排除する。細胞内

に取り込まれたりリポタンパク質は lysosome で分解を受け, free cholesterol 並びに C16:0 をはじめとする飽和脂肪酸含量の高いリン脂質が lysosome 膜で増加する. その結果, lysosome 膜に結合している acid cholesteryl esterase の活性低下が生じ cholesteryl ester が蓄積する. 過剰のリポタンパク質が動脈壁に流入してくると, 泡沫細胞はさらに肥大化シアポトーシスなどにより崩壊する. 泡沫細胞の崩壊に伴って, 細胞膜の断片並びに泡沫細胞内に蓄えられていた脂質球は細胞間に放出される. 細胞間で液晶状の cholesteryl ester が形成され, マクロファージにより細胞内に取り込まれる. その結果, 液晶状の cholesteryl ester が胞体内に観察されるようになる. 動脈壁に流入するリポタンパク質量がさらに多くなると, あるいは泡沫細胞に崩壊が繰り返されると, 泡沫細胞の肥大化と崩壊が繰り返され (悪循環), 粥腫が形成されることになる.

生体は疎水性の生体膜により親水性の環境を隔離することによって維持されている. 疎水性の高い粥腫が形成されると, 生体膜の制御機構に破綻が生じ, 粥状動脈硬化症という疾患として観察される. 疎水性の高い細胞膜断片並びに脂質球が細胞間に散逸されないように, ビトロネクチンなどの細胞間物質が増加するのかもしれない.

現在では基礎医学研究も盛んになり, これまでの研究を振り返ってみると, この分野の進歩には目を見張るものがある. 厚生労働省の人口動態統計 (2007) によると, 脳血管疾患はわれわれが研究を始めた頃を頂点にして, また心疾患は 1995 年頃を頂点にして下降している. われわれの研究も, 微々であるがこの分野に多少なりとも貢献できたのではないかと思いたい.

謝辞 本原稿まとめるに当たり, 水野傳一東京大名譽教授, Christian de Duve, Rockefeller University, U.S.A. Prof. Emeritus, Timothy J. Peters, Prof. Emeritus, Univ. of London, 秦 葭哉杏林大名譽教授, 故小林米作 ヨネプロダクション社長, 中村元臣九州大名譽教授, 故古川欽一東京医大名譽教授, 吉田洋二山梨大元学長, 永井良三東京大教授, 上田真喜子大阪市大教授, 野島庄七東京大名譽教授, 石橋貞彦広島大医名誉教授, 井上圭三東京大名譽教授, 池上四郎帝京大名譽教授, 並びに高德桂三, 榎

本昌泰, 毛利裕臣, Gabor G. Ecsedi, 恵谷誠司, 故大熊勝治, 森山芳則, 本島清人, 林 秀敏, 鈴木利治, 本間光一, 山口真二, 平 郁子の各先生のご協力に熱く御礼申し上げます.

本研究は, 科学技術庁 ERATO, 厚生省副作用基金, 文科省 (文部省) 各種基盤研究 (基礎研究)・特定研究, 厚労省ヒューマンサイエンス, 医薬資源研究振興財団, 医科学応用記念財団, 上原記念財団, 小野記念財団, 加藤記念財団, 成人病医学振興財団記念財団, 武田記念科学振興財団, テルモ科学振興財団, 内藤記念科学振興財団, アズウェル, エーザイ, 興和薬品, 協和醗酵, 協和メディクス, 三共製薬, 第一製薬, 第一ラジオアイソトープ研究所, 帝人, 東レ, 日本メルクなどの助成により推進されました.

最後に, 本イラスト図を応援してくれた長女東子に, また, 原稿の校正をしてくれた妻尹代に感謝いたします.

REFERENCES

- 1) Benditte E. B., *Sci. Am.*, **236**, 74-85 (1977).
- 2) Amanuma K., Kanaseki T., Ikeuchi Y., Ohkuma S., Takano T., *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **410**, 231-238D (1986).
- 3) Takano T., Muto K., Imanaka T., Ohkuma S., *Biochem. Int.*, **4**, 485-492 (1982).
- 4) Hashida R., Anamizu C., Kimura J., Ohkuma S., Yoshida Y., Takano T., *Cell Struct. Funct.*, **11**, 31-42 (1986).
- 5) Hashida R., Anamizu C., Yagyu-Mizuno Y., Ohkuma S., Takano T., *Cell Struct. Funct.*, **11**, 343-349 (1986).
- 6) Yagyu Y., Hashida R., Iwasaki K., Mineo C., Imanaka, T., Takano T., *Thromb. Res.*, **64**, 733-744D (1991).
- 7) Yagyu Y., Mineo C., Imanaka T., Ikegami S., Takano T., *Thromb. Res.*, **66**, 215-222 (1992).
- 8) Kunii H., Yagyu Y., Maruyama Y., Imanaka T., Takano T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **2**, 37-40 (1995).
- 9) Mizuno-Yagyu Y., Hashida R., Mineo C., Ikegami S., Ohkuma S., Takano T., *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3809-3813 (1987).
- 10) Mineo C., Hashida R., Yagyu C., Takano T., *Microcirculation*, **1**, 623-624 (1987).

- 11) Takano T., Mineo C., Hashida R., Yagyu-Mizuno K., Nakagami K., Ohkuma S., *Role of Blood Flow Atherogenesis*, 231–236 (1987).
- 12) Peters T. J., Takano T., De Duve C., *Initiating Factors*, 197–214 (1972).
- 13) Takano T., Black W. J., Peters T. J., de Duve C., *J. Biol. Chem.*, **249**, 6732–6737 (1974).
- 14) Black W. J., Takano T., Peters T. J., *J. Cell Bio.* **59**, 26a (1973).
- 15) Takano T., Muto nK., Imanaka T., Ohkuma S., *Biochem. Int.*, **2**, 229–236 (1981).
- 16) Amanuma-Muto K., Kanaseki T., Imanaka T., Ohkuma S., Takano T., *Biochem. Int.*, **47**, 107–114 (1983).
- 17) Amanuma K., Okada J., Imanaka T., Ohkuma S., Takano T., *Biochem. Int.*, **11**, 349–355 (1985).
- 18) Imanaka T., Muto K., Ohkuma S., Takano T., *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 322–330 (1981).
- 19) Imanaka T., Muto K., Ohkuma S., Takano T., *FEBS Lett.*, **137**, 115–118 (1982).
- 20) Imanaka T., Amanuma-Muto K., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **93**, 1517–1521 (1983).
- 21) Imanaka T., Amanuma-Muto K., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **96**, 1089–1101 (1984).
- 22) Imanaka T., Yamaguchi M., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **98**, 927–931 (1985).
- 23) Imanaka T., Moriyama Y., Ecsedi G. G., Aoyagi T., Amanuma-Muto K., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **94**, 1017–1020 (1983).
- 24) Ecsedi G. G., Amanuma K., Imanaka T., Aoyagi T., Ohkuma S., Takano T., *Biochem. Int.*, **10**, 337–342 (1985).
- 25) Takeuchi R., Imanaka T., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **98**, 933–938 (1985).
- 26) Enomoto M., Nakagami K., Ohkuma S., Takano T., *J. Biochem.*, **101**, 933–938 (1987).
- 27) Mineo C., Kanasaki T., Enomoto M., Ohkuma S., Takano T., *Cell Struct. Funct.*, **13**, 435–443 (1988).
- 28) Mineo C., Kanaseki T., Imanaka T., Takano T., *Cell Struct. Funct.*, **17**, 191–196 (1992).
- 29) Takano T., Imanaka T., *Acta Histochem. Cytochem.*, **11**, 323–336 (1978).
- 30) Takano T., Kanaseki T., Amanuma K., Imanaka T., Ohkuma S., *Macrophage Biol.* 323–337 (1985).
- 31) Takano T., *Acta Pathol. Jpn.*, **42**, 625–631 (1992).
- 32) Takano T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **1**, S1–S5 (1994).
- 33) Takano T., Amanuma-Muto K., Imanaka T., Ohkuma S., *Acta Histochem. Cytochem.*, **17**, 421–426 (1984).
- 34) Takano T., Amanuma K., Kimura J. Kanaseki T., Ohkuma S., *Acta Histochem. Cytochem.*, **19**, 135–143 (1986).
- 35) Kimura J., Nakagami K., Amanuma K., Ohkuma S., Yoshida Y., Takano T., *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **410**, 1561–1564 (1986).
- 36) Nakagami K., Shimasaki O., Sato R., Komine Y., Ohkuma S., Takano T., *Am. J. Pathol.*, **135**, 93–100 (1989).
- 37) Sato R., Komine Y., Imanaka T., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **265**, 21232–21236 (1990).
- 38) Sato R., Mori M., Imanaka T., Takano T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **1**, S50–S54 (1994).
- 39) Mori M., Iwasaki K., Sato R., Komine Y., Imanaka T., Takano T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **748**, 524–525 (1995).
- 40) Mori M., Iwasaki K., Sato R., Komine Y., Itabe H., Imanaka T., Takano T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **3**, 25–31 (1996).
- 41) Sato R., Komine Y., Nakagami K., Imanaka T., Takano T., *Recent Prog. Atheroscler Res.* **598**, 517–519 (1990).
- 42) Takano T., Mineo C., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 385–413 (1990).
- 43) Itabe H., Takeshima E., Iwasaki H., Kimura J., Yoshida Y., Imanaka T., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15274–15279 (1994).
- 44) 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).
- 45) Itabe H., Yamamoto H., Suzuki M., Kawai Y., Nakagawa Y., Suzuki A., Imanaka T., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **271**, 33208–33217 (1996).
- 46) Itabe H., Sanaka T., Michishita I., Takano T., *Pathophysiol. Lipid Peroxides Related Free Radic.*, 13–24 (1998).
- 47) Itabe H., Jimi S., Kamimura S., Suzuki K.,

- Uesugi N., Imanaka T., Shijo H., Takano T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1406**, 28–39 (1998).
- 48) Itabe H., Hosoya R., Karasawa K., Jimi S., Saku K., Takebayashi S., Tmanaka T., Takano T., *J. Biochem.*, **126**, 153–161 (1999).
- 49) Kohno H., Sueshige N., Oguri K., Izumidate H., Masunari T., Kawamura M., Itabe H., Takano T., Hasegawa A., Nagai R., *Clin. Biochem.*, **33**, 243–253 (2000).
- 50) Itabe H., Suzuki K., Hosoya R., Mori M., Higashi Y., Fujimoto Y., Takano T., *Anal. Biochem.*, **285**, 151–155 (2000).
- 51) Itabe H., Suzuki K., Tsukamoto Y., Komatsu R., Ueda M., Mori M., Higashi Y., Takano T., *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 233–245 (2000).
- 52) 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).
- 53) Ehara S., Ueda M., Naruko T., Haze K., Itoh A., Otuka M., Komatsu R., Matsuo T., Itabe H., Takano T., Tsukamoto Y., Yoshiyama M., Takeuchi K., Yoshikawa J., Becker A. E., *Circulation*, **103**, 1955–1960 (2001).
- 54) Itabe H., Mori M., Fujimoto Y., Higashi Y., Takano T., *J. Biochem.*, **134**, 459–465 (2003).
- 55) Itabe H., Ueda M., Uno M., Takano T., *Int. Cong. Series*, **1262**, 87–90 (2004).
- 56) Itabe H., Takano T., *J. Atheroscler. Thromb.* **7**, 123–131 (2000).
- 57) Mori M., Itabe H., Takatoku K., Shima K., Inoue J., Nishiura M., Takahashi H., Ohtake H., Sato R., Higashi Y., Imanaka T., Ikegami S., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 24828–24837 (1999).
- 58) Mori M., Itabe H., Higashi Y., Fujimoto Y., Shiomi M., Yoshizumi M., Ouchi Y., Takano T., *J. Lipid Res.*, **42**, 1771–1781 (2001).