遺伝性高脂血症ウサギ (WHHL-rabbit) における動脈硬化性病変に及ぼす高酸素ならびに低酸素吸入の影響*

末 広 厚 夫** 岡 本 良 三** 築 谷 学**
羽 溪 真** 藤 野 基 博** 高 野 新 二**
福 崎 恒** 渡 辺 嘉 雄***

I. 緒 言

動脈硬化の成因は複雑多岐にわたっているが、1944年、Hueper が anoxemia theory¹⁾ を提唱して以来、動脈硬化の発症に動脈壁の組織低酸素状態が関与していることが報告されている。近年では、多量の喫煙者に心筋梗塞の発生率が高いこと²⁾や、病理学的検索でも喫煙量と冠動脈の粥状硬化性病変との間に関連性のあること³⁾から、特にこの問題は注目されている。実験的には、コレステロール添加食飼育ウサギでは、高濃度酸素の吸入は血中脂質の低下作用とともに大動脈粥状硬化病変の軽減を来し^{4,5)}、低濃度酸素の吸入は血中脂質の上昇作用とともに大動脈病変の増強を来すこと^{6,7)}が報告されているが、その作用機序はいまだ解明されていない。

われわれも、コレステロール添加食飼育ウサギにおける高酸素吸入の影響についてすでに報告⁸⁾したが、本実験では、生下時より高脂血状態で経時的変動のない遺伝性高脂血症ウサギ (WHHL-rabbit)⁹⁾を用いて、低酸素および高酸素吸入の影響について観察した。

II. 対象および方法

年齢的にまだ大動脈病変が生じていないとみなされる 64~96 日齢の雄の WHHL-rabbit 15 羽を用いた。飼料として、ウサギ用固形飼料 ORC-4

(オリエンタル酵母製) を 1 日に 100g 与え、水は自由に飲ませた。これら 15 羽のウサギを 3 群に分け、5 羽には 40% 酸素 (高酸素群)、6 羽には 10% 酸素 (低酸素群) を吸入し、4 羽は room air (対照群) に保った。40% 酸素、10% 酸素吸入はウサギをプラスチックケージに入れ、それぞれ純酸素あるいは純窒素を毎分 3~6 l 吸入し、ケージ内の酸素濃度をおのおの 40%、10% に保つことにより行った。これらの吸入は 1 日に 5 時間、週に 5 日行い、8 週間観察した。実験期間中 2 週間ごとに空腹時採血を行い、血漿コレステロール、中性脂肪を測定した。血漿コレステロールは Zurkowski 変法、中性脂肪は酵素法で測定した。

8 週間の実験終了後、ウサギをペントバルビタールで麻酔後、大動脈を起始部より腸骨動脈分岐部まで摘出し、長軸方向に切開した。ズダン染色を施した後、ズダン嗜好性病変および大動脈の輪郭をトレースし、病変の程度を大動脈内膜全面に対する面積比 (%) で評価した。

観察結果は mean ± S.E. で示し、各群間の差の統計学的検定には student's t-test を用いた。

III. 結 果

動脈血酸素分圧は、おのおの 1 時間の 40% 酸素吸入後で 191 ± 3 mmHg、10% 酸素吸入後で 62 ± 2 mmHg に達し、その後は経時的に著変を示さなかった。ウサギの食餌摂取量および体重の増加には各群間に差を認めなかった。

1. 血漿脂質の経過的変動

血漿コレステロール値は、高酸素群では前値

* 1982年7月、第14回日本動脈硬化学会において発表

** 神戸大学医学部第一内科

*** 同 動物実験施設

368±16 mg/dl で、以後2週目で軽度の増加傾向を示したが、4, 6, 8週目では前値とほぼ同じ値を示した。低酸素群では前値 408±42mg/dl で、以後経過的にほとんど変動を示さなかった。対照群では前値 448±53 mg/dl で、以後経過的な変動を示さなかった (Fig. 1)。実験期間中の各個体の平均血漿コレステロール値は、高酸素群 389±25 mg/dl, 低酸素群 415±15 mg/dl, 対照群 411±16 mg/dl で、各群間に有意差は認められなかった。

血漿中性脂肪値は、高酸素群では前値 307±29 mg/dl で、以後ほとんど変動を示さなかった。低酸素群では前値 349±43 mg/dl で、2, 4週目で増加を示したが、6, 8週目では前値に復した。対照群では前値 340±43 mg/dl で、以後変動を示さなかった (Fig. 2)。実験期間中の平均血漿中性脂肪値は、高酸素群 279±29 mg/dl, 低酸素群 427±13 mg/dl, 対照群 297±44 mg/dl で、低酸素群では高酸素群および対照群に比し高値を示した。

2. 大動脈病変

ズダン嗜好性病変の程度を面積比で示すと、高酸素群 6.9±1.9%, 低酸素群 11.8±0.6%, 対照群 8.8±2.8% で、対照群に比し高酸素群では病変程度が軽く、低酸素群では強い傾向を認め、高酸素

Fig. 1 Effects of systemic hyperoxia and hypoxia on the plasma cholesterol levels in WHHL-rabbits.

○ 40%O₂ ● 10%O₂ ■ Control

群と低酸素群の間には統計学的に有意差($p < 0.05$)が認められた (Fig. 3)。

3. 血漿脂質値と病変程度の関係

病変程度と各個体の実験期間中の平均血漿脂質値との関係を検討した。

血漿コレステロール値と大動脈病変の関係をみると、病変が10%以下のところには高酸素群が多く認められるが、病変程度と脂質値の間には $r = 0.35$ で有意な相関関係は認められなかった (Fig. 4 左)。

血漿中性脂肪値と大動脈病変の関係をみると、

Fig. 2 Effects of systemic hyperoxia and hypoxia on the plasma triglyceride levels in WHHL-rabbits.

○ 40%O₂ ● 10%O₂ ■ Control

Fig. 3 Effect of systemic hyperoxia and hypoxia on the extent of the aortic sudanophilic lesions.

○ 40%O₂ ● 10%O₂ ■ Control

Fig. 4 Correlation between the extent of the aortic sudanophilic lesions and the plasma levels of cholesterol or triglycerides.

○ 40% O₂ ● 10% O₂ ■ Control

病変が10%以下のところには高酸素群が多く認められるが、病変程度と脂質値の間には $r=0.36$ で有意な相関関係は認められなかった (Fig. 4 右)。

IV. 考 察

1944年, Heurper は, 動脈硬化発生の基本的メカニズムとして血管壁の低酸素状態が関与していることを提唱した¹⁾。粥状動脈硬化性変化を来す主な場である内膜および中膜内層は, 外膜の栄養血管の支配を受けず, 酸素および栄養素は血管内腔からの拡散により供給されるという構造的特徴を有しており, 物理的あるいは代謝的要因の変動により容易に低酸素状態に陥る^{1,10)}と考えられる。この点に関しては, 高脂血症に際し, 酸素拡散の障害や¹¹⁾, 血液酸素飽和度の低下¹²⁾の報告があり, また, 高脂血症により動脈硬化性変化を来した大動脈の内膜の酸素消費は亢進している¹³⁾との報告もみられる。これらの機序により, 高脂血症時には血管壁に低酸素状態が生じ, 動脈硬化の発生に与る可能性があると考えられる。

高酸素および低酸素吸入の動脈硬化生成に及ぼす報告は少ない。酸素吸入の血中コレステロール低下作用および動脈硬化抑制作用は Altschul らにより初めて報告⁴⁾され, その後, Kjeldsen ら⁵⁾は, 2% コレステロール添加飼育ウサギに28%酸

素を10週間吸入させると, 大動脈粥状硬化性病変が軽減することを観察し, その際, 酸素吸入群では血中コレステロールおよび中性脂肪が軽度低下傾向を示したと報告している。一方, 低酸素吸入の動脈硬化促進作用に関しては, Myasnikov⁷⁾は, 食餌性高脂血ウサギに12%酸素を4か月間間歇的に吸入させ, 非吸入群に比し血中コレステロールの著増とともに冠動脈および大動脈の lipidosis が増加されることを報告した。また Kjeldsen ら⁶⁾は, 2% コレステロール添加飼育ウサギに10%低酸素を8週間吸入させ, 非吸入群に比し血中コレステロールは20%, 中性脂肪は100%の増加を認めるとともに, 大動脈壁のコレステロール含量は3倍, 中性脂肪は2倍の増加を認めた。Kjeldsen らは, 血中脂質の変動に比し動脈壁脂質の変動が著明であることから, 高酸素および低酸素吸入の動脈硬化抑制あるいは促進作用は, 血管内皮の透過性または血管壁内の脂質代謝に酸素分圧が影響を与える結果と考えた。しかし, これら食餌性高脂血ウサギを使用した実験では, 血中脂質値の変動が低酸素吸入では特に著明であること, われわれの行った実験でも食餌性高脂血ウサギに高酸素および低酸素を吸入させた際に低酸素群では高酸素群に比し血漿コレステロール値ならびに中性脂肪値が上昇すること¹⁴⁾, また, 一酸化炭素吸入実験

で血中脂質を対照とそろえた場合、大動脈病変の程度も対照と差がなくなるとの報告^{13,15,16)}のあることなどを考慮すると、主に血中脂質値の変動を介して、高酸素および低酸素血症が動脈硬化病変を抑制あるいは促進した可能性は否定できない。

一方、本実験に使用した WHHL-rabbit は、食餌性高脂血ウサギの場合と異なり、高酸素あるいは低酸素吸入によっても動脈硬化促進作用が最も強いとみなされる血漿コレステロール値には経時的に有意の変動を来さず、また、各群間にも差を認めなかった。それにもかかわらず、大動脈病変は高酸素群では軽減され、低酸素群では増強されていたことは、血中脂質値の変動を介する以外に、大動脈内膜の脂質蓄積や粥状硬化の発生に酸素分圧が直接影響を及ぼすことを示すものと解される。なお、低酸素群では血漿中性脂肪値が有意に高値を示したが、血漿中性脂肪値と大動脈病変程度との間に、血漿コレステロール値の場合と同様有意な相関関係が認められなかったことから、病因の発生要因を血漿中性脂肪値の上昇のみに帰することはできない。

以上より、高酸素および低酸素の吸入による酸素分圧の変動は直接的に血管壁に作用し、組織低酸素を助長もしくは改善することにより、動脈硬化病変の生成に影響を与えたものと推論した。

V. 結 論

高酸素および低酸素の吸入が血中脂質および動脈硬化の生成に及ぼす影響を明らかにするため、2~3 か月齢の雄の WHHL-rabbit を使用し、6羽に40%酸素(高酸素群)を、5羽には10%酸素(低酸素群)を間歇的に8週間にわたり吸入させた。収入を行わない4羽を対照とし、以下の結果を得た。

1) 血漿コレステロール値は、高酸素および低酸素吸入によって変動せず、各群間に差を認めなかった。

2) 血漿中性脂肪値は、低酸素群でのみ上昇を認め、対照群および高酸素群に比し高値を示した。

3) 大動脈病変の程度は、高酸素群で軽く、低酸素群で高度であった。

4) 実験期間中の平均血漿脂質値と大動脈病変

の程度との間には有意な相関関係を認めなかった
以上の結果から、高酸素および低酸素の吸入は血中脂質の変動を介さずに、主として血管壁に作用して粥状硬化性病変の生成を抑制あるいは促進するものと推論した。

文 献

- 1) Hueper, W. C.: Atherosclerosis: The anoxemia theory. Arch. Pathol., **38**: 173-181, 245-285 (1944).
- 2) Doyle, J. T., Dawber, T. R., Kannel, W. B., Kinch, S. H. and Kahn, H. A.: The relationship of cigarette smoking to coronary heart disease. J.A.M.A., **190**: 886-890 (1964).
- 3) Auerbach, O., Hammond, E. C. and Garfinkel, L.: Smoking in relation to atherosclerosis of the coronary arteries. New Eng. J. Med., **273**: 775-779 (1965).
- 4) Altschul, R. and Herman, I. H.: Influence of oxygen inhalation on cholesterol metabolism. Arch. Biochem. Biophys., **51**: 308-309 (1954).
- 5) Kjeldsen, K., Astrup, P. and Wanstrup, J.: Reversal of rabbit atheromatosis by hyperoxia. J. Atheroscler. Res., **10**: 173-178 (1969).
- 6) Kjeldsen, K., Wanstrup, J. and Astrup, P.: Enhancing influence of arterial hypoxia on the development of atheromatosis in cholesterol-fed rabbits. J. Atheroscler. Res., **8**: 835-845 (1968).
- 7) Myasnicov, A. L.: Influence of some factors on development of experimental atherosclerosis. Circulation, **17**: 99-113 (1958).
- 8) 羽溪 真, 築谷 学, 末広厚夫, 今井直昭, 堀 康郎, 野々村明彦, 高野新二, 岡本良三, 福崎 恒, 藤野基博: 動脈硬化発生初期因子に関する研究: 高コレステロール食飼育ウサギにおける高酸素吸入の影響. 動脈硬化, **9**: 401-407 (1981).
- 9) Watanabe, Y.: Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). Atherosclerosis, **36**: 261-268 (1980).
- 10) Robertson, A. L.: Oxygen requirements of the human arterial intima in atherogenesis. In C. H. Miras, A. N. Howard and R. Paoletti (Eds.), Progress in biochemical pharmacology—Recent advances in atherosclerosis, **4**: Karger, New York, pp. 305-316 (1968).
- 11) Joyner, C. R., Horwitz, O. and Williams, P. G.: The effect of lipemia upon tissue oxygen tension in man. Circulation, **22**: 901-907 (1960).
- 12) Talbott, G. D. and Frayser, R.: Hyperlipidemia: A cause of decreased oxygen saturation. Nature, **200**, 684 (1963).
- 13) Whereat, A. F.: Oxygen consumption of normal and atherosclerotic intima. Circulation Res., **9**: 571-575 (1961).

- 14) 羽溪 真, 今井直昭, 堀 康郎, 高野新二, 岡本良三, 福崎 恒: 動脈硬化症に関する研究: 高コレステロール食飼育家兎における低酸素および高酸素負荷の影響. 日本老年医学会雑誌, **16**: 329 (1979).
- 15) Davies, R. F., Topping, D. L. and Turner, D. M.: The effect of intermittent carbon monoxide exposure on experimental atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis*, **24**: 527-536 (1976).
- 16) Webster, W. S., Clarkson, T. B. and Lofland, H. B.: Carbon monoxide-aggravated atherosclerosis in the squirrel monkey. *Exp. Molec. Path.*, **13**: 36-50 (1968).

Summary

The Effects of Systemic Hyperoxia and Hypoxia on Atherogenesis in the Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit (WHHL-Rabbit)

Atsuo SUEHIRO*, Ryoza OKAMOTO*, Manabu TSUKITANI*, Makoto HATANI*,
Motohiro FUJINO*, Shinji TAKANO*, Yoshio WATANABE** and Hisashi FUKUZAKI*

*First Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

**Institute for Experimental Animals, Kobe University School of Medicine

The present study was carried out to investigate the effects of systemic hyperoxia and hypoxia on plasma lipids and atherogenesis in WHHL-rabbits which showed marked hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia from birth.

Of 15 male WHHL-rabbits (2–3 months old), six rabbits were exposed to 40% oxygen (hyperoxic) and five were exposed to 10% oxygen (hypoxic) for five hours daily on five days of each week for eight weeks. Four rabbits without such exposure were used as controls. The results were as follows:

1) The levels of plasma cholesterol were not affected significantly by the hyperoxic and hypoxic exposure throughout the experimental period. Therefore, the average plasma cholesterol levels in the three groups indicated almost the same values.

2) The levels of plasma triglycerides increased significantly by systemic hypoxia but were not affected by hyperoxia, and the average plasma

triglyceride values were higher in the hypoxic rabbits than in the hyperoxic or control rabbits.

3) The ratio of the area of sudanophilic lesions to the total intimal area of the aorta were lower in the hyperoxic rabbits, and higher in the hypoxic rabbits than in the controls. The differences between the hyperoxic and hypoxic groups were significant.

4) There were no significant correlations between the extent of the aortic lesions and the levels of plasma cholesterol or triglycerides.

From these results, it is suggested that the progress of atherosclerotic changes of the aorta is suppressed or promoted by systemic hyperoxia or hypoxia, respectively, not through the changes in the plasma lipid levels, but through the direct effects on the aortic wall.

Key words: hypoxia, hyperoxia, hyperlipidemia, atherosclerosis, Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit (WHHL-rabbit).