薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (12) 1173-1178 (1985)

**β -Aminopropionitrile によってラット大動脈に誘発される動脈硬化病変の
結合組織変化及び Cholesterol 蓄積部位について**

山口 優,* 国友 勝, 二川良子, 阪東芳雄
武庫川女子大学薬学部

**Connective Tissue Alterations and Cholesterol Accumulation Sites in
Atherosclerotic Aorta of Rats Induced by β -Aminopropionitrile**

YU YAMAGUCHI,* MASARU KUNITOMO, YOSHIKO FUTAGAWA
and YOSHIO BANDÔ

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa
Women's University, Edagawa-cho, Nishinomiya, 663, Japan*

(Received June 19, 1985)

Biochemical alterations of the connective tissue components and the cholesterol accumulation sites in atherosclerotic aorta, which were induced in rats fed with an atherogenic diet supplemented with 0.15% β -aminopropionitrile (BAPN) for 6 weeks, have been studied. There was a marked decrease in hydroxyproline and elastin-specific cross-linked amino acids, a marked increase in sulfate, and a marked decrease in the weight of residue after extraction from the aorta with boiling NaOH solution. These changes were also observed in animals treated with BAPN alone, suggesting that BAPN administration causes a reduction of total collagen and insoluble elastin, and an increase of glycosaminoglycan in the aorta. Of interest is an increase in aortic phosphorous content, but essentially no change in the calcium content. The cholesterol which was accumulated in the aorta of rats fed with a diet supplemented with high-cholesterol and BAPN was not present in the insoluble elastin fraction nor in the collagenase- and elastase-solubilized fractions of the aorta. The results suggest that such cholesterol accumulation does not result from a stable complex formation with arterial elastin, but presumably from deposition in the cells of the arterial wall.

Keywords— β -aminopropionitrile; high-cholesterol diet; atherosclerosis; cholesterol accumulation site; rat; elastin

緒 言

コラーゲン及びエラスチンは血管壁をはじめ、肺、皮膚などの結合組織の主な線維性タンパク質で、それぞれの可溶性前駆体の分子間架橋形成により生合成される。いずれの架橋形成にも一種の銅酵素である lysyl oxidase が重要な働きをしており、前駆体分子中の lysine や hydroxylysine 残基を酸化的脱アミノ化してアルデヒドを生成させるが、この反応が架橋形成過程における第一段階になっている。したがって、lysyl oxidase の阻害物質である β -aminopropionitrile (BAPN)¹⁾ やアルデヒド残基と特異的に縮合反応をする penicillamine²⁾ を幼若動物に摂取させるか、もしくは動物を銅欠乏状態³⁾ にするとコラーゲンやエラスチンの架橋形成が抑えられ、lathyrism として知られる病態が誘発される。Bouissou ら⁴⁾ はラットに少量の BAPN を長期間投与することにより慢性的 lathyrism と共に動脈硬化を発症させている。

著者らは前報⁵⁾ において、ラットを 0.15% BAPN 及び 1.5% cholesterol 添加飼料にて 6 週間と比較的短期間飼育するだけで、大動脈に一定のアテローム性動脈硬化が形成されると報告した。すなわち、病理組織学的に典型的な解離性動脈瘤及び泡沫細胞の存在を認め、生化学的検索により大動脈に著しい cholesterol の蓄積を認めた。

最近、ヒト動脈硬化やウサギの実験的動脈硬化病変部位に蓄積する脂質は主に動脈の結合組織、特にエラスチ

ンと安定な複合体を形成して存在することが報告されている。⁶⁻⁸⁾ 本報では前報に従いラットに BAPN 及び cholesterol を負荷して動脈硬化病変を生じさせ、大動脈における結合組織の変動を調べるとともに、蓄積した cholesterol の存在部位について検討したので報告する。

実験方法

1. 実験動物 3 週齢の SD 系雄性ラット (静岡実験動物農業協同組合) を用いた。

2. 飼料組成及び飼育条件 ラットを 4 群に分け、I 群 (対照群) には基礎飼料 (組成: ショ糖 63.2%, カゼイン 20%, 寒天 2%, トウモロコシ油 10%, vitamin mixture 0.8%, salt mixture 4%) を、II 群 (Chol. 群) には 1.5% cholesterol 及び 0.5% コール酸添加飼料を、III 群 (BAPN 群) には 0.15% BAPN 添加飼料を、IV 群 (BAPN+Chol. 群) には 0.15% BAPN, 1.5% cholesterol 及び 0.5% コール酸添加飼料を与えた。飼育期間は 6 週間とし、各飼料は IV 群の動物の摂取量に pair-feeding にて与え、水は自由に摂取させた。BAPN はフマル酸塩 (半井化学) を用いた。

3. 大動脈の摘出及び処理 実験終了 12 時間前から絶食を行った後、ether 麻酔下、放血死させ、大動脈 (胸部及び腹部大動脈) を摘出した。大動脈は凍結乾燥後、重量を秤量、細切し、chloroform-methanol (2:1 v/v) にて脱脂後分解フラスコ内に入れ、6N 塩酸を加え、窒素置換、封入後、105°C, 72 時間加水分解を行った。塩酸水解物は hydroxyproline, proline, 硫酸基、架橋アミノ酸残基 (cross-linked amino acids), カルシウム及び無機リンの測定に供した。架橋アミノ酸残基の分離は Starcher の方法⁹⁾ に準じて行った。すなわち、塩酸水解物の一部を分取し、塩酸を留去した後、ペーパークロマトグラフィーにかけ、BuOH-AcOH-H₂O (4:1:1 v/v) で 48 時間展開し、原点に残る極性の高いアミノ酸を水で抽出した。

4. 大動脈に蓄積した Cholesterol の存在部位の検討 ラットを上記飼育条件にて飼育した後、大動脈を摘出、湿重量を秤量後、Fig. 1 に示すように Kramsch の方法⁸⁾ を参考にして各抽出画分を得た。まず、大動脈を 0.25 M sucrose 溶液で細切し、遠沈してその抽出液 (sucrose extract) と残渣に分け、残渣には 0.1 N NaOH 溶液を加え、煮沸した後、再び遠沈し、抽出液 (NaOH extract) と脂質を含むエラスチン残渣 (nondefatted elastin) とに分離した。さらに、その残渣は乾燥重量を秤量した後、chloroform-methanol (2:1 v/v) にて脂質を抽出し、脱脂エラスチン (defatted elastin) とした。Sucrose extract 及び NaOH extract 中の脂質は ethanol-hexane (1:4 v/v) にて抽出した。それぞれの脂質抽出液は水洗し、溶媒を留去した後 cholesterol 含量を測定した。

一方、同様の飼育条件にて動脈硬化病変を起こさせた大動脈を Fig. 2 に示す Srinivasan らの方法¹⁰⁾ に従って collagenase (Cl. histolyticum, Type I, Sigma) 及び elastase (pig pancreas, 生化学工業) 処理を行い、得られた各可溶性画分中の脂質を ethanol-hexane (1:4 v/v) にて抽出し、また、残渣は chloroform-methanol (2:1 v/v) にて抽出し、それぞれの cholesterol 含量を測定した。

5. 測定方法 Hydroxyproline 及び proline は Rojickind らの方法,¹¹⁾ 無機リンは McClare の方法¹²⁾ に従い測定した。架橋アミノ酸残基はニンヒドリン反応を利用したシアナイド法¹³⁾ にて測定し、leucine 量に換算した。硫酸基は塩酸水解物を濃硝酸で湿式灰化した後 Antonopoulos の方法¹⁴⁾ の変法にて、すなわち benzidine の代わりに 2,7-diaminofluorene (半井化学) を用いて測定した。カルシウムは原子吸光光度計 (日立 180-60 型) を用いて測定した。Cholesterol は蛍光酵素法¹⁵⁾ により測定した。

6. 統計処理 得られた実験値は平均値±標準誤差で表示し、有意差の検定には student の t 検定を適用した。

Fig. 1. Separation Procedures of Elastin from Aorta

Fig. 2. Separation Procedures of Collagenase and Elastase Solubilized Fractions from Aorta

結果及び考察

1. 大動脈中の結合組織構成成分

コラーゲンの指標として hydroxyproline を，エラスチンの指標として架橋アミノ酸残基を，酸性ムコ多糖類の指標として硫酸基を測定した．ペーパークロマトグラフィーで原点に残る極性の強い架橋アミノ酸残基は，エラスチンのみに存在するピリジニウム架橋の desmosine 及び isodesmosine を主に含み，エラスチン量の変化に並行すると推測される．

Table I に示すように cholesterol のみを負荷した II 群と対照の I 群との間にはいずれの結合組織構成成分含量にも差がみられなかったが，BAPN を単独負荷した III 群では hydroxyproline 及び架橋アミノ酸残基含量に明らかな減少が認められ，ともに I 群の約 85% の値を示した．III 群の硫酸基含量は逆に I 群の 1.4 倍という著しい増加を示した．Hydroxyproline と同時に測定した proline 含量には I, III 群間で差は認められなかった．このような III 群にみられた変化は BAPN 及び cholesterol を併用した IV 群でもほぼ同様に認められたが，架橋アミノ酸残基含量に関しては III 群より減少する傾向がみられた．以上の BAPN 負荷によって大動脈に生じた結合組織構成成分の変化は総コラーゲン及び不溶性エラスチンの減少，酸性ムコ多糖類の増加を示唆している．すでに，BAPN の架橋形成障害作用により可溶性コラーゲン及び可溶性エラスチンが増加し，不溶性線維が減少すること，^{18,17)} 酸性ムコ多糖類が増加すること^{4b,18)}が知られている．したがって，不溶性エラスチン及び酸

TABLE I. Connective Tissue Component Contents in Aorta of Rats Fed a Diet Supplemented with Cholesterol and BAPN

	n	I (Cont.) 8	II (Chol.) 8	III (BAPN) 7	IV (BAPN+Chol.) 7
		mg/g dry weight of aorta			
Hydroxyproline		52.4 ±0.7	52.2 ±2.5	44.5 ±0.9 ^{a)}	46.5 ±1.0 ^{a)}
Proline		91.8 ±7.3	94.0 ±3.3	88.5 ±2.6	91.6 ±4.6
Cross-linked amino acid ^{b)}		7.49 ±0.46	8.79 ±0.45	6.67 ±0.45 ^{a)}	6.04 ±0.42 ^{a)}
Sulfate		11.4 ±0.5	12.3 ±0.8	15.7 ±0.5 ^{a)}	14.2 ±0.6 ^{a)}
Calcium		0.324±0.02	0.237±0.05	0.352±0.03	0.306±0.04
Phosphorus		0.946±0.02	0.962±0.02	1.29 ±0.09 ^{a)}	1.48 ±0.06 ^{a)}

Values are the mean±S.E. Significantly different from group I, (a) $p < 0.01$. b) Expressed as equivalent values to leucine.

性ムコ多糖類については従来の報告と同様の変動が認められた。総コラーゲンについては BAPN 投与によって変化しないという報告^{18,19)}及び減少するという報告^{19,20)}があり、必ずしも一致していない。今回の実験条件下では後者の報告と類似する結果が得られた。最近、BAPN が大動脈や肺のコラーゲン増加を顕著に抑制するという報告もある。^{21,22)} 酸性ムコ多糖類の増加に関しては BAPN による大動脈障害に対する一種の防衛反応と考えられ、¹⁶⁾ 平滑筋増殖による修復機構が働くためと推測されている。^{18a)}

Hosoda ら²³⁾は BAPN 及び cholesterol を負荷したラットの大動脈に石灰化が生じると報告している。そこで石灰化の指標となるカルシウム及び無機リンを測定した (Table I)。対照群 (I 群) に比べ BAPN を負荷した III, IV 群の無機リン含量には著しい増加が認められたが、カルシウム含量については各群で大きな変化は認められなかった。このように、今回の実験条件下では生化学的にみて石灰化の進行を証明することはできなかった。ただ、無機リンに有意な増加が認められたことは興味深い。

一般にヒトの動脈硬化や実験的動脈硬化のアテローム巣ではコラーゲン及びエラスチンが増加し、^{7,24)} 酸性ムコ多糖類は初期病変でわずかに増加、病変の進行につれて減少する²⁵⁾といわれている。したがって、今回得られた動脈硬化の結合組織の変化とは大きな差異が認められる。BAPN 及び cholesterol 負荷によって発症する動脈硬化には、通常、動脈瘤を伴うことから、BAPN の lathyrism 形成作用に起因する特有の結合組織変化が生じると考えられる。

2. 大動脈中のエラスチン含量及び Cholesterol の分布

アテローム性動脈硬化における cholesterol 蓄積は内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなどへのリポタンパクの取込み、すなわち泡沫細胞形成、あるいは結合組織である酸性ムコ多糖類^{10,26)}やエラスチン⁶⁻⁸⁾とのリポタンパク複合体形成によって起こると考えられている。そこで我々は BAPN 及び cholesterol 負荷によって大動脈に蓄積した cholesterol の存在部位について Kramsch⁹⁾ 及び Srinivasan ら¹⁰⁾の方法を用いて検討した。

まず、Fig. 1 の操作法に従いラット大動脈の不溶性エラスチン含量を測定した (Fig. 3)。脱脂前のエラスチン含量 (nondefatted elastin) は BAPN を負荷した III, IV 群で著しい減少を示し、I 群のそれぞれ 75%, 70% であった。脱脂後のエラスチン含量 (defatted elastin) について比較するとこの減少程度はさらに大きくなり、III 群で I 群の 66%, IV 群で 51% であった。BAPN によるエラスチン含量の減少は前述のエラスチンの指標として測定した架橋アミノ酸残基の結果とほぼ同様で、cholesterol の併用により増強される傾向が認められた。

次いで、大動脈を sucrose 及び NaOH 溶液により抽出した画分並びにエラスチン中の cholesterol 含量を測定した (Table II)。各群とも大動脈中の cholesterol は主として sucrose 及び NaOH 抽出画分に分布し、エラスチン画分中に含まれる cholesterol 量はわずかであった。大動脈に著明な cholesterol 蓄積を生じる IV 群の cholesterol 分布をみると、sucrose 及び NaOH 抽出画分中で対照群 (I 群) のそれぞれ 2.9 倍及び 2.3 倍と著しい増加を示した。NaOH 画分中には主な結合組織としてコラーゲンが含まれるので、コラーゲンと cholesterol との複合体形成が示唆されるが、NaOH による細胞破壊により cholesterol が増加したとも考えられる。一方、エラスチンと結合している脂質中の cholesterol 含量には差が認められなかったことから、大動脈に蓄積した cholesterol は、少なくともエラスチンとは複合体を形成していないことを示している。

この点をさらに確認するため大動脈を Srinivasan らの方法¹⁰⁾により抽出した各画分における cholesterol 含量を測定した (Table III)。I 群の大動脈中の cholesterol は 0.15 M NaCl 抽出液中にはほと

Fig. 3. Elastin Contents in Aorta Separated by the Procedures Described in Fig. 1

Significantly different from group I, (a) $p < 0.01$, (b) $p < 0.05$. □ nondefatted elastin, ■ defatted elastin.

TABLE II. Cholesterol Contents in Aorta Extractions of Rats Fed a Diet Supplemented with Cholesterol and BAPN

	I (Cont.) n 8	II (Chol.) 8	III (BAPN) 7	IV (BAPN+Chol.) 7
	mg/g wet weight of aorta			
Sucrose extract	0.802±0.064	0.982±0.029	1.22 ±0.04 ^{a)}	2.29 ±0.34 ^{a)}
NaOH extract	1.00 ±0.10	1.07 ±0.06	1.30 ±0.07	2.30 ±0.38 ^{b)}
Elastin	0.387±0.036	0.420±0.022	0.255±0.167	0.352±0.057

Values are the mean±S.E. Significantly different from group I, (a) $p<0.01$, b) $p<0.05$.
Aorta extractions were prepared by the procedures as described in the legend to Fig. 1.

TABLE III. Cholesterol Contents in Aorta Digestible Fractions Treated with Collagenase and Elastase

	I (Cont.) n 8	II (Chol.) 8	III (BAPN) 6	IV (BAPN+Chol.) 8
	mg/g wet weight of aorta			
NaCl extract	0.026±0.002	0.026±0.003	0.022±0.001	0.028±0.002
Collagenase digestible fraction	0.171±0.015	0.166±0.008	0.167±0.016	0.149±0.011
Elastase digestible fraction	0.307±0.028	0.295±0.017	0.228±0.023	0.220±0.012 ^{a)}
Residual tissue	1.71 ±0.08	1.67 ±0.05	1.81 ±0.16	3.15 ±0.36 ^{a)}

Values are the mean±S.E. Significantly different from group I, (a) $p<0.01$.
Aorta extractions were prepared by the procedures as described in the legend to Fig. 2.

んど存在しなかったが, collagenase 及び elastase 処理により消化したそれぞれの上澄画分中にはかなり認められ, 残査画分に最も多く存在した. 大動脈に著明な cholesterol 蓄積を生じる IV 群の各画分への cholesterol の分布をみると I 群に比べ elastase 消化画分に有意な減少が認められ, collagenase 消化画分には差がみられず, 残査部分で著しい増加が認められた. Srinivasan らはアテローム巣を有するウサギの大動脈を用いての同様の実験を行い, いずれの抽出画分においても cholesterol の著しい増加を認め, さらに, ウロン酸含量との関係から彼等は, 動脈壁におけるリポタンパク蓄積には酸性ムコ多糖類及び線維性結合組織が関与していることを明らかにした. しかし, 今回得られた結果では各抽出画分における cholesterol の増加は全く認められなかった. このことは少なくとも酸性ムコ多糖類, コラーゲン又はエラスチンと複合体を形成するリポタンパクの増加はないことを示唆している.

以上の結果より, BAPN 及び cholesterol 負荷により大動脈に蓄積する cholesterol は, 酸性ムコ多糖類, エラスチンやコラーゲンと複合体を形成しているのではなく, それ以外の部位に存在すると考えられる. Cholesterol の存在部位については推測の域をでないが, 病理組織学的検索によると中膜に泡沫細胞が多く認められる^{5,23)}ことから, cholesterol は平滑筋細胞やマクロファージなどの細胞内に貯蔵されている可能性が考えられる. このことを証明するためにはさらに詳細な生化学的検討が必要であろう.

結 語

ラットを 0.15% BAPN 及び 1.5% cholesterol 添加食にて 6 週間飼育すると大動脈にアテローム性動脈硬化が誘発するが, この大動脈に生じる結合組織の変化及び cholesterol の蓄積部位について検討し, 次の結果を得た.

大動脈の hydroxyproline 及び架橋アミノ酸残基含量の著しい減少, 硫酸基含量の著しい増加が認められた. また, 大動脈を NaOH 処理して得られるエラスチン画分にも顕著な減少が認められた. これらの変化は総コラーゲン及び不溶性エラスチン線維の減少及び酸性ムコ多糖類の増加を示唆しているが, BAPN の単独負荷でも

同様な変化がみとめられることから, BAPN の lathyrism 形成作用による特有の結合組織変化であると思われる。

大動脈の無機リン含量に有意な増加が認められるが, カルシウム含量には変化がみられなかったので, 今回の動脈硬化では少なくとも石灰化は進行していないと考えられる。

BAPN 及び cholesterol 負荷によって大動脈に蓄積する cholesterol は, 細胞質画分中に多く存在し, 大動脈を NaOH 処理した後のエラスチン画分中や, 大動脈を collagenase 及び elastase で消化した可溶性画分中には認められなかった。したがって, cholesterol は酸性ムコ多糖類, エラスチン, コラーゲンと安定な複合体を形成して細胞外に蓄積されるのではなく, それ以外の部位, おそらく, 動脈壁の細胞内に貯留され, いわゆる泡沫細胞を形成していると推察される。

引用文献

- 1) W. Dasler, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 196 (1955).
- 2) K. Deshmukh, M. E. Nimni, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1787 (1969).
- 3) B. L. O'Dell, B. C. Hardwick, G. Reynolds, J. E. Sagage, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 402 (1961).
- 4) a) H. Bouissou, M. Julian, M. Th. Pieraggi, *Gerontology*, **24**, 250 (1978); b) H. Bouissou, J. de Graeve, M. Julian, M. Th. Pieraggi, J. C. Thiers, *Pathol. Biol.*, **28**, 645 (1980).
- 5) 国友 勝, 山口 優, 二川良子, 森 直子, 阪東芳雄, *薬誌*, **104**, 1275 (1984).
- 6) A. Noma, T. Takahashi, K. Yamada, T. Wada, *Atherosclerosis*, **33**, 29 (1979); 瀬山義幸, 飯島洋美, 山下三郎, *動脈硬化*, **12**, 1457 (1984).
- 7) D. M. Kramsch, "Advances in Experimental Medicine and Biology," Vol. 109, ed. by D. Kritchevsky, R. Paoletti, W. L. Holmes, Plenum Press, Inc., New York and London, 1978, pp. 155—194.
- 8) D. M. Kramsch, C. Franzblau, W. Hollander, *J. Clin. Invest.*, **50**, 1666 (1971).
- 9) B. C. Starcher, *Anal. Biochem.*, **79**, 11 (1977).
- 10) S. R. Srinivasan, C. Yost, R. R. Bhandaru, B. Radhakrishnamurthy, G. S. Bernson, *Atherosclerosis*, **43**, 289 (1982).
- 11) M. Rojkind, E. González, *Anal. Biochem.*, **57**, 1 (1974).
- 12) C. W. F. McClare, *Anal. Biochem.*, **39**, 527 (1971).
- 13) E. W. Yenn, E. C. Cosking, *Analyst (London)*, **80**, 209 (1955).
- 14) C. A. Antonopoulos, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1521 (1962).
- 15) M. Kunitomo, Y. Yamaguchi, K. Matsushima, Y. Bandô, *Jpn. J. Pharmacol.*, **34**, 153 (1984).
- 16) 大塚勝弘, 釈 邦夫, 森 陽, *薬誌*, **94**, 438 (1974).
- 17) I. P. Ronchetti, C. Fornieri, I. Rastellani, G. M. Bressan, D. Volpin, *Exp. Mol. Pathol.*, **35**, 42 (1981); C. I. Levene, I. Bye, V. Saffiontti, *Br. J. Exp. Pathol.*, **49**, 152 (1968).
- 18) a) R. Alper, J. T. Prior, W. R. Ruegamer, *J. Atheroscler. Res.*, **8**, 787 (1968); b) Y. Hosoda, H. Iri, *Angiology*, **18**, 616 (1967).
- 19) K. Iwatsuki, G. J. Cardinale, S. Spector, S. Udenfriend, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 360 (1977).
- 20) P. J. Sheridan, L. G. Kozar, S. C. Benson, *Exp. Mol. Pathol.*, **30**, 315 (1979).
- 21) A. Ooshima, *Jpn. Circulation J.*, **41**, 912 (1977).
- 22) D. J. Riley, J. S. Kerr, R. A. Berg, B. D. Ianni, G. G. Pietra, N. H. Edelman, D. J. Prockop, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **125**, 67 (1982).
- 23) Y. Hosoda, M. Suzuki, *Pathol. Microbiol.*, **35**, 267 (1970).
- 24) G. M. Fisher, K. Cherian, M. L. Swain, *Atherosclerosis*, **39**, 463 (1981).
- 25) G. S. Berenson, S. R. Srinivasan, B. Radhakrishnamurthy, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **43**, 141 (1974).
- 26) S. R. Srinivasan, K. Yost, B. Radhakrishnamurthy, E. R. Dalferes, Jr., G. S. Berenson, *Atherosclerosis*, **36**, 25 (1980).