

動脈硬化危険因子と血管内皮機能との関連

—超音波を用いた臨床的検討—

橋本正良

動脈硬化危険因子と血管内皮機能との関連  
—超音波を用いた臨床的検討—

橋本 正良

1. 背景および目的

2. 方法および結果 血流依存性血管拡張反応の基礎検討

研究1 各種動脈硬化危険因子(肥満を含む)と内皮依存性血管拡張反応との関係

研究2 女性ホルモンと内皮依存性血管拡張反応との関係

研究3 頸動脈内膜中膜肥厚と内皮依存性血管拡張反応との関係

3. 考察

4. 結論

5. 文献

用語リスト

EDRF; endothelium-derived relaxing factor

NO; nitric oxide

IMT; intima media thickness

%FMD; flow-mediated dilatation

%NTG; nitroglycerin-induced dilatation

BMI; body mass index

Pmax; thickness of maximum preperitoneal fat

Smin; thickness of minimum subcutaneous fat

BP; blood pressure

IRI; immunoreactive insulin

HDL; high density lipoprotein

LDL; low density lipoprotein

TG; triglyceride

S; subcutaneous

V; visceral

M; menstrual period

F; follicular phase just before ovulation

L; luteal phase

E2; estradiol

Prg; progesterone

TNF; tumor necrosis factor

PAI; plasminogen activator inhibitor

IDDM; insulin dependent diabetes mellitus

SSPG; steady state plasma glucose

Lp(a); lipoprotein (a)

ACE; angiotensin converting enzyme

L-NMMA; N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine

## 1. 背景および目的

血管内皮細胞は単に血管の内壁を覆い、血液成分と生体組織間を隔てているのみならず、多彩な生理的機能を有し、循環を中心とした生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが次第に明らかになってきた<sup>1-3</sup>。また血管の新生や発達、老化などの生理的現象のみならず、動脈硬化や血管形成術後の血管内面の修復などにも深く関与している。血管内皮細胞は Endothelium-derived relaxing factor (EDRF)、Prostacyclin などの血管拡張物質や Endothelin などの血管収縮物質を分泌し、血管の tonus の調節に深く関わっている。

血管内皮細胞の分泌する血管拡張物質の EDRF は現在 Nitric Oxide (NO) またはその関連物質と考えられている<sup>4-6</sup>。EDRF はアセチルコリンや shear stress などによってその産生が刺激され、産生された NO は血管平滑筋に作用し、soluble guanylate cyclase を活性化することで、細胞内の cyclic GMP レベルを上げ、血管平滑筋を弛緩させ血管拡張が惹起される。

動脈硬化症の早期病変として、血管内皮細胞の器質的または機能的異常があり、障害をもつ血管内皮細胞は NO の産生、放出が減少し、内皮依存性血管拡張反応が低下するといわれている。

血管内皮細胞の機能的異常を検出する方法は従来よりカテーテルを用いた侵襲的方法により、動脈内にアセチルコリン等を投与し、同血管の弛緩反応を検討

する方法が採られている<sup>8,9</sup>。しかし侵襲的方法ではその適応疾患の制限ならびに頻回の検査を行うことが難しい等の問題点があり、その臨床的適応には制限がある。近年、非侵襲的方法として、超音波装置を用いた方法が考案され、上腕動脈における血流依存性血管拡張反応を検討する方法として確立されている<sup>10-12</sup>。血流依存性血管拡張反応は shear stress によって血管内皮細胞から放出される血管拡張物質、特に NO によって引き起こされるとされており、超音波装置を用いたこの方法により患者への侵襲や苦痛を伴うことなく、また頻回の検査を実施することが可能となった。

本研究はこの超音波装置を用いた非侵襲的方法により、動脈硬化危険因子ならびに動脈硬化初期変化と血管内皮機能との関連を、血流依存性血管拡張反応を評価することにより検討を行った。

#### 研究1 各種動脈硬化危険因子(肥満を含む)と内皮依存性血管拡張反応との関係

小児における家族性高コレステロール血症患者ならびに成人喫煙者において内皮依存性血管拡張反応の低下が報告されている<sup>10,13</sup>。研究1では高脂血症、糖尿病、高血圧、現在喫煙習慣等を有する患者の、これら動脈硬化危険因子と内皮依存性血管拡張反応との関係を検討した。また同患者における動脈硬化危険因子の重複と内皮依存性血管拡張反応との関連を検討した。

さらに動脈硬化危険因子の中でも肥満は脂質代謝異常、耐糖能異常、高血圧など動脈硬化の危険因子と密接に関連し<sup>14-16</sup>、その発症、進展因子として重要である。肥満の中

でも、特に内臓脂肪型肥満が動脈硬化の危険因子として重要と考えられているが<sup>17-19</sup>、動脈硬化発症の機序は明らかではない。そこで内臓脂肪型肥満が血管内皮細胞機能にどのような影響を及ぼすかを臨床的に検討するために、超音波を用いて肥満者を内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満に分類し、内皮依存性血管拡張反応の検討を行った。

## 研究2 女性ホルモンと内皮依存性血管拡張反応との関係

Framingham Studyをはじめとする多くの疫学的研究により、動脈硬化性疾患の発症頻度には性差が存在し、特に閉経以前の女性は冠動脈疾患の発症が有意に低く、同年齢層での比較においても、閉経前女性の方が閉経後女性より冠動脈疾患の発症が有意に低いことが示されている<sup>23-25</sup>。また閉経後女性に対する女性ホルモン補充療法により動脈硬化性疾患の発症が約50%に抑えられるといった事実から<sup>24,25</sup>、エストロゲンが抗動脈硬化作用を有すると考えられる。動物実験モデルを用いた検討でもエストロゲンの抗動脈硬化作用が確認されている<sup>26,27</sup>。さらに最近になってエストロゲン受容体 $\beta$ の発現ならびにエストロゲン受容体 $\beta$ を介すると考えられる抗動脈硬化作用の一部が報告され<sup>28</sup>、エストロゲンの作用機序が次第に明らかになりつつある。女性ホルモン欠乏が動脈硬化危険因子として関与していると考えられる。

女性ホルモンの脂質代謝の改善といった動脈硬化のリスクファクターに対する作用に加えて、血管壁に対する直接作用も指摘されているが、詳細は不明である。閉経後女性の骨塩量減少に対して女性ホルモン補充療法が抑制効果のあることが知られ、治療に用



いられている。短期間の女性ホルモン補充療法で内皮依存性血管拡張反応が改善されることが報告されている<sup>29</sup>。そこで研究2では、骨塩量減少をきたした閉経後女性で女性ホルモン補充療法を受けている患者を対象とし、血管内皮機能がどのような影響を受けるかを中長期にわたり経時的に検討した。

また若年男女間での血管内皮機能の変化の検討を行うとともに、若年正常女性では月経周期に伴い女性ホルモンの変動が生理的に観察されるが、この月経周期に伴う内因性女性ホルモンの変動による血管内皮機能の変化の検討も併せて行った。

### 研究3 総頸動脈内膜中膜肥厚と内皮依存性血管拡張反応との関係

本研究において測定を行った血流依存性血管拡張反応は、血管の機能的側面の評価であり、実際の動脈硬化病変との関連の報告は少ない。血流依存性血管拡張反応と実際の動脈硬化性病変との関係を検討する必要がある。

頸動脈硬化症は従来より脳梗塞発生の危険因子と考えられ、頸動脈硬化症の非侵襲的検査法として超音波による内膜中膜複合体 (IMT) 肥厚の観察が行われている<sup>20</sup>。また頸動脈硬化症は脳梗塞発生のみならず、冠状動脈硬化の危険因子とも考えられ<sup>21</sup>、現在多くの施設で超音波による IMT の測定がなされている<sup>20,22</sup>。そこで研究3では臨床的に動脈硬化性疾患を有するか否かによって、総頸動脈 IMT に差があるか否かの検討と同時に形態学的な総頸動脈 IMT と機能的な上腕動脈の内皮依存性血管拡張反応との関連を検討した。

## 2. 方法および結果

### 血流依存性血管拡張反応の基礎検討

超音波装置を用いた血管内皮細胞機能評価方法として、前腕部分を5分間駆血し駆血を解除した後の上腕動脈の血流依存性血管拡張反応を検討することが行われている<sup>10,11</sup>。

本研究では血管内皮機能としてこの血流依存性血管拡張反応を用いた。

### 方法及び手順 (図 1)

被験者は室温の安定した検査室にてベッド上安静15-20分を保つ。検査中の血圧および脈拍をモニターするため、左上腕に自動血圧計を装着し、2分間隔の測定を行う。安静後右上腕動脈を7.5MHzの超音波プローブ(東芝SSA-270A)を用い長軸方向に血管を描出し、血管の最大径が認められる部位を保持する。続いて皮膚面に対して垂直にDopplerピー

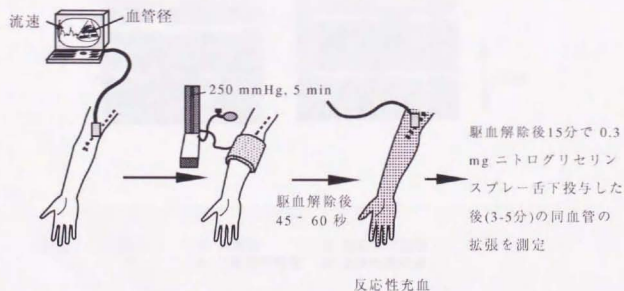
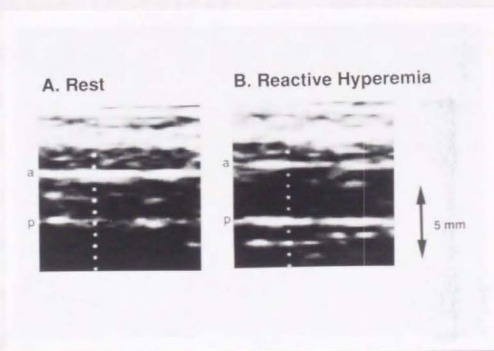


図 1 超音波による非侵襲的の血流依存性血管拡張反応の検査手順



ムを入れ上腕動脈を確認する。Dopplerビーム挿入後のM、Bモードにてそれぞれ流速と血管径をモニターする。右上腕動脈描出皮膚部位にマジックペンにて目印を入れる。続いて右前腕部分を血圧計マンシエットを用い250mmHgで駆血、5分後に駆血を即座に解除し、駆血解除後45-60秒後の反応性充血時の拡張血管における流速と血管径を計測する(図2に一例を示す)。

駆血解除後15分間は安静を保ち、血管径の回復の確認を行う。確認後、内皮非依存性血管拡張反応としてニトログリセリンの舌下スプレー(Myocor spray; 0.3mg/spray)を1回噴霧し、スプレー噴霧後3-5分における同血管の流速、血管径の計測を行う。



A: 安静時                      B: 反応性充血時  
a: 上腕動脈前壁              p: 上腕動脈後壁

図 2. 血流依存性血管拡張反応の一例

血流依存性血管拡張反応では血管径の変化のみを求めればよいが、前腕5分間駆血に伴う血流増加による負荷の程度として、駆血解除後15秒の相対的血流増加率を同時に求める。Dopplerビーム挿入後のMモード上に流速が示され、この流速を超音波上でトレースすることで平均流速が求められる。一方同時にモニターされるBモード上の血管径より、上腕動脈を円形と仮定し血管面積を求め、平均流速と血管面積を掛けあわすことにより血流量を求める。ただし、ここで求められた血流量は実測のものとは異なるため、安静時のものとの相対変化としてのみ用いた。

すべての超音波画像はSLV-RS7 (SONY) を用い、S-VHSビデオテープに録画した。計測はビデオテープに録画した画像を用い、心収縮、拡張に伴う血管の動揺性を避けるため、同時にモニターした心電図上のR波のピークに一致した拡張末期を用いた。上腕動脈の血管径測定には超音波画像上、同血管長軸断面における前壁、後壁の中膜、外膜の間点であるm-line (血管内面より血管壁の中膜、外膜でエコー強度が強く認められる、その中間点)を用い、4画像から求めた平均血管径を測定値として用いた<sup>30</sup>。なお従来の報告では本検査方法での測定は0.1-0.2mmまでは正確になされることが報告されている<sup>30-33</sup>。

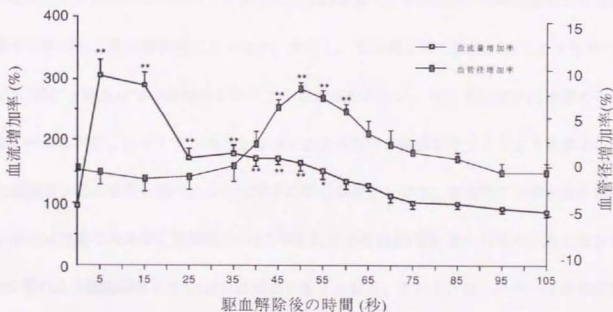
図3は基礎検討として、若年男性9人の右前腕部駆血解除後の上腕動脈血流量と血管径の安静時に対する割合を時間を追って計測した結果である。

血流量は駆血解除後一過性に増大し、その後経時的に減少する。一方血管径においては駆血解除後の一過性血流増加が刺激となり駆血解除後約45-60秒したところで安静時

に比較し有意に拡張することが確認された<sup>10</sup>。安静時血管径に対するその増加率を Flow-mediated dilatation (%FMD) とし、同様にニトログリセリンによる拡張の度合いを Nitroglycerin-induced dilatation (%NTG) とした。

我々の計測ではS-VHS ビデオテープに録画した同一測定画像の評価における6名の解析上の変動係数は %FMD で  $5.84 \pm 0.25\%$ 、%NTG で  $3.87 \pm 0.24\%$  であった。また本検査による再現性の検討を行うため8名の被験者に、1ヶ月の内に各々5回の本検査を実施しその測定値を検討した。その結果、本方法における再現性の変動係数は %FMD で  $9.77 \pm 0.82\%$ 、%NTG で  $7.24 \pm 0.49\%$  であった。

ニトログリセリンのプラセボ舌下噴霧を6名の男性被験者に投与したところ、血管の拡張は認められなかった。さらに前腕部分5分間駆血ということがニトログリセリン舌



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 安静時

図 3. 男性被験者 9名の駆血解除後の血流と血管径の増加率変化

下噴霧に影響を与える可能性を検討するため、5名の男性被験者に前腕駆血を行うことなしにニトログリセリン舌下噴霧による血管拡張の程度を検討したところ、前腕部分5分間駆血、駆血解除後15分のニトログリセリン舌下噴霧による血管拡張の程度と差は認められなかった。このことより15分という時間は血管がニトログリセリンに対する反応性に影響を与えないために十分な時間と判断した。またニトログリセリン舌下噴霧による血圧の変動は、2分間隔での対側上腕動脈の自動血圧計での測定では有意な変化は認められなかった。前腕部分5分間駆血による血流依存性血管拡張反応の全身への影響を検討するため、若年男性5人の左前腕部駆血解除後の右上腕動脈血流量と血管径の安静時に対する割合を計測したが、安静時のものと変化は認められなかった。

#### 本検査の危険性と留意点

本検査は非侵襲的方法として考案された方法であり、前腕部分の5分間駆血では現在まで合併症らしき問題は生じていない。ただし、長時間正座した際に生じる下肢の“しびれ”感が、駆血に伴い前腕部分に生じることは否めない。また本研究中には認められなかったものの、ニトログリセリン投与では全身血管の拡張を伴うことより低血圧、また頭痛が生じる場合もありうる。本検査の禁忌事項としては、被験者の同意が得られない場合は勿論であるが、前腕部分の5分間駆血が不可能な(被験者の恐怖心がある場合やDIC等の出血傾向がある場合)場合は禁忌と考えられる。またニトログリセリン使用の際は、ニトログリセリン投与が禁忌な疾患(重篤な低血圧、閉塞隅角緑内障等)を持つ被験

者は禁忌とされる。

本検査は動脈硬化症の初期の段階をスクリーニングする方法と考えられ、既に病理学的に形成された動脈硬化症の程度を査定する検査でないことを十分留意する必要がある。また本検査における血管拡張能の低下とアセチルコリン投与における冠動脈の反応性低下に相関が認められているものの<sup>34</sup>、上腕動脈という全身の動脈のなかの一部の血管のみを検査していることを忘れてはなるまい。

#### 本検査に影響を及ぼす要因

本検査方法の最大の弱点は検者間、検査施設間でのばらつき、すなわち変動係数が大きいことである。熟練した検者による一定した超音波測定法ならびに解析における計測法が必要である。検査手順上では一定の室温が保たれること、検査開始までに患者の十分な安静が必要である。日内変動や薬物服用による影響も考慮されるべきであり、本研究では午前中、空腹時、服薬前の検査を原則とした。

#### 統計解析

研究1、2、3ともに、すべての統計データは  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  で表現した。2群間での有意差検定は  $t$  検定で行った。3群間以上のデータは one-factor ANOVA にて解析し、有意差検定は Newman-Keuls' test にて行い、 $P < 0.05$  を有意とした。重回帰分析では独立変数中  $P < 0.05$  を有意とした。

研究1 各種動脈硬化危険因子(肥満を含む)と内皮依存性血管拡張反応との関係

対象および方法

対象は当科外来および入院患者で、臨床的に動脈硬化性疾患は有さないが、動脈硬化危険因子を有する102名(女性57名、男性45名、33-74歳、平均年齢 $56.8 \pm 1.0$ 歳;危険因子群)と臨床的に動脈硬化性疾患は有さず、動脈硬化危険因子も有さない40名(女性25名、男性15名、35-80歳、平均年齢 $55.5 \pm 1.6$ 歳;対照群)で、内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能としてNitroglycerin投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。血圧、血清脂質、空腹時血糖等を同時に測定した。

また肥満に関しては、未治療、無症候性肥満男性38名(BMI>26、19-64歳、平均年齢 $37.6 \pm 1.8$ 歳)と同年齢の非肥満男性23名(25-55歳、平均年齢 $37.3 \pm 1.9$ 歳)を対象とした。肥満男性の腹部正中線上剣状突起下に3.75MHzの超音波プローブ(東芝SSA-270A)を用い、超音波上Bモードにて皮下脂肪(S)と肝臓前面部

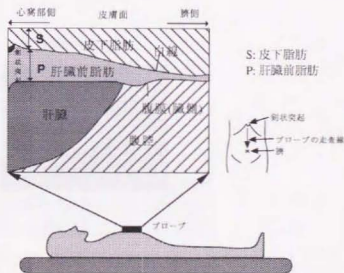
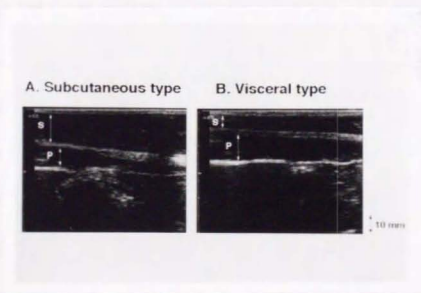


図1-1. 超音波法による腹部脂肪測定の方法(文献35より引用)



に付着する肝臓前脂肪(P)を確認する(図1-1)。その後Bモード上での皮下脂肪厚の最小値(Smin)と肝臓前面部の肝臓前脂肪厚の最大値(Pmax)を求める。求めたSminとPmaxから $Pmax/Smin$ を測定し、 $Pmax/Smin \geq 1$ を内臓脂肪型肥満(V)群、 $Pmax/Smin < 1$ を皮下脂肪型肥満(S)群とした。その結果23名はV群、15名はS群に分類された<sup>35</sup>(図1-1、図1-2参照)。図1-2でAはS群、BはV群の典型例であり、矢印は実際の測定部位を示す。Aでは著明な皮下脂肪の肥厚を認め、 $Pmax=11.9$ 、 $Smin=17.7$ 、 $Pmax/Smin=0.67$ で皮下脂肪型肥満を示し、Bでは著明な内臓脂肪の肥厚を認め、 $Pmax=14.2$ 、 $Smin=7.5$ 、 $Pmax/Smin=1.90$ で内臓脂肪型肥満を示す。

内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能としてNitroglycerin投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。同時に血圧、血清脂質、空腹時血糖、IRI等を測定した。



S: 皮下脂肪、P: 肝臓前脂肪

図1-2. 皮下脂肪型肥満(A)と内臓脂肪型肥満(B)の典型例

## 結果

対照群および危険因子群の臨床背景データを表 1-1 に示す。危険因子群では高脂血症患者が63名、糖尿病患者が21名、高血圧患者が46名、現在喫煙習慣のある者が42名存在した。危険因子群ではBMI、平均血圧、総コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値、HbA1c値において対照群に比

表 1-1. 対象群の基礎データおよび血液データ

	対照群 (n=40)	危険因子群 (n=102)
Age (yr)	55.5 ± 1.8	56.8 ± 1.0
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 ± 0.4	24.1 ± 0.4 **
Mean Blood Pressure (mmHg)	87 ± 1	95 ± 1 **
Total cholesterol (mg/dl)	201 ± 4	228 ± 4 **
HDL cholesterol (mg/dl)	52 ± 2	60 ± 2
Triglyceride (mg/dl)	97 ± 7	165 ± 18 **
Fasting plasma glucose (mg/dl)	94 ± 2	103 ± 2 **
Hemoglobin A1c (%)	5.3 ± 0.1	5.9 ± 0.1 **
Hyperlipidemia (%)	0	62
Diabetes (%)	0	21
Hypertension (%)	0	45
Current smokers (%)	0	41

\*\* P<0.01

べて有意に高い値を示した。超音波における測定値の安静時上腕動脈血管径、%FMD、%NTG、駆血解除後の血流増加率を表 1-2 に示す。安静時上腕動脈血管径、駆血解除後の血流増加率においては対

照群と危険因子群との間に有意差は認められなかった。表 1-2 から明らかなように対照群の%FMDは6.7 ± 0.5%、危険因子群の%FMDは4.9 ± 0.3%であり、危険因子群で有意な%FMDの低下を認めた (P<0.01)。一方、内皮非依存性血管拡張能としての %NTG は対照群で14.8 ± 0.6%、危険因子群

表 1-2. 超音波による各種測定値

	対照群 (n=40)	危険因子群 (n=102)
Vessel diameter at rest (mm)	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Flow-mediated dilatation (%FMD)	6.7 ± 0.5	4.9 ± 0.3 **
Nitroglycerin-induced dilatation (%NTG)	14.8 ± 0.6	13.3 ± 0.5
Forearm blood flow increase (%)	308 ± 19	285 ± 13

\*\* P<0.01

の %NTG は13.3 ± 0.5%であり、対照群と危険因子群との間に有意差は認められなかった。%FMD と %NTG の結果を図 1-3

に示す。

高脂血症、糖尿病、高血圧、  
現在喫煙習慣の4つの動脈硬化危  
険因子をとりあげ、これらの重  
複に伴う %FMD の変化を図 1-4

に示す。動脈硬化危険因子の重  
複数に伴って %FMD の低下が認  
められる。表1-3に示すように  
%FMD を従属変数とした際の重  
回帰分析の結果は年齢、安静時  
血管径、HbA1c値、空腹時血糖  
値の関与が有意であることが判

明した。

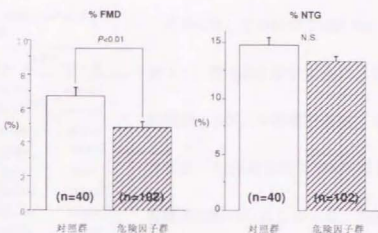


図 1-3. 対照群および危険因子群の %FMD と %NTG

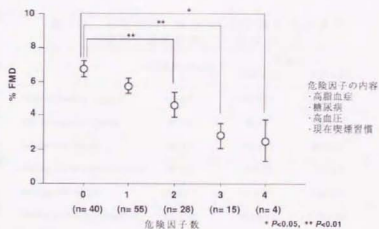


図 1-4. 危険因子数の累積と %FMD との関連

表 1-3. 危険因子群102名における %FMD を従属変数と  
した際の各項目の重回帰分析結果

従属変数	独立変数	標準回帰係数	P値
%FMD	Age	-0.29	0.004
	Vessel diameter at rest	-0.29	0.008
	Hemoglobin A1c	-0.30	0.02
	Fasting plasma glucose	0.27	0.03
	Triglyceride	-0.16	0.15
	HDL cholesterol	-0.09	0.38
	Total cholesterol	-0.08	0.39
	Body Mass Index	0.06	0.56
	Mean blood pressure	-0.05	0.60

表 1-4. 非肥満群、皮下脂肪型肥満群(S)および  
内臓脂肪型肥満群(V)の基礎データ

	非肥満群 (n = 23)	肥満群	
		S (n = 15)	V (n = 23)
Age (yr)	37.3 ± 1.9	37.9 ± 4.1	37.5 ± 1.5
Body Mass Index	22.5 ± 0.4	30.4 ± 1.1**	29.7 ± 0.5**
No. of smokers (%)	5 (22%)	5 (33%)	10 (43%)
Systolic blood pressure (mmHg)	117 ± 2	127 ± 5*	128 ± 3*
Diastolic blood pressure (mmHg)	71 ± 2	76 ± 3	78 ± 2
Pmax (mm)	n.d.	11.3 ± 0.9	15.2 ± 0.7**
Smin (mm)	n.d.	13.0 ± 0.7	9.6 ± 0.4**
Pmax/Smin	n.d.	0.86 ± 0.04	1.61 ± 0.07**

\*P<0.05 vs 非肥満群 \*\*P<0.01 vs 非肥満群 n.d., not determined.

\*\*P<0.01 vs 皮下脂肪型肥満群

収縮期血圧、拡張期血圧、安静時

上腕動脈血管径に有意差は認めら

れなかったが、総コレステロール

値、中性脂肪値ではS群に比べV

群が有意に高い値を示した。V群

の %FMD は 3.1 ± 0.4%、S群では

7.9 ± 0.5% であり、S群に比しV群

で %FMD は有意に低下していた (P<0.01)。しかし %NTG には両群間で有意差は認めら

表 1-6. 非肥満群、皮下脂肪型肥満群(S)および  
内臓脂肪型肥満群(V)の超音波による各種測定値

	非肥満群 (n = 23)	肥満群	
		S (n = 15)	V (n = 23)
Vessel diameter at rest (mm)	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.0 ± 0.1
Flow-mediated dilatation (%FMD)	6.9 ± 0.4	7.9 ± 0.5	3.1 ± 0.4***
Nitroglycerin-induced dilatation (%NTG)	16.1 ± 0.6	15.4 ± 1.0	14.7 ± 1.2
Forearm blood flow increase (%)	253 ± 25	310 ± 36	272 ± 26

\*\*P<0.01 vs 非肥満群 \*\*P<0.01 vs 皮下脂肪型肥満群

肥満に関しての研究では表 1-4、

表 1-5、表 1-6 に示すように、非

肥満群、S群、V群間で年齢、喫

煙者数、拡張期血圧では3群間で

有意差は認められなかった。肥満

の中でのS群、V群間ではBMI値、

表 1-5. 非肥満群、皮下脂肪型肥満群(S)および  
内臓脂肪型肥満群(V)の血液データ

	非肥満群 (n = 23)	肥満群	
		S (n = 15)	V (n = 23)
Total cholesterol (mg/dl)	196 ± 6	199 ± 10	227 ± 7**
HDL cholesterol (mg/dl)	59 ± 3	44 ± 3**	43 ± 2**
Triglyceride (mg/dl)	95 ± 7	149 ± 18	234 ± 41***
Fasting plasma glucose (mg/dl)	99 ± 2	102 ± 4	105 ± 4
Hemoglobin A1c (%)	5.0 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.2
Fasting plasma insulin (μU/ml)	5.9 ± 0.4	12.1 ± 3.0	11.9 ± 2.5
Free fatty acid (mEq/l)	0.40 ± 0.04	0.58 ± 0.05*	0.58 ± 0.05**

\*P<0.05 vs 非肥満群 \*\*P<0.01 vs 非肥満群

\*\*P<0.05 vs 皮下脂肪型肥満群 \*\*P<0.01 vs 皮下脂肪型肥満群

れなかった(図 1-5)。また %FMD

と Pmax/Smin の単相関を検討した

ところ、有意な負の相関を

(r=-0.70, P<0.01) を認めた(図 1-6)。

総コレステロール値と中性脂肪

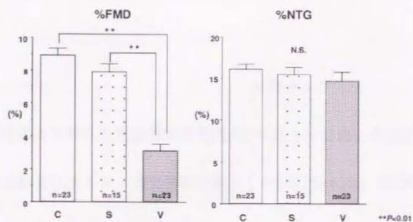


図 1-5. 非肥満群(C)、皮下脂肪型肥満群(S)および内臓脂肪型肥満群(V)の%FMDおよび%NTG

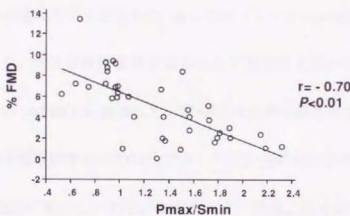


図 1-6. 肥満者38名における%FMDとPmax/Sminとの相関

表 1-7. 肥満者38名における%FMDを従属変数とした際の各項目の重回帰分析結果

従属変数	独立変数	標準回帰係数	P値
%FMD	Pmax/Smin	-0.65	<0.0001
	Total cholesterol	-0.28	0.28
	Vessel diameter at rest	-0.24	0.10
	Age	0.27	0.12
	Body Mass Index	0.21	0.14
	Free fatty acid	0.16	0.29
	HDL cholesterol	0.15	0.33
	Fasting plasma glucose	-0.11	0.47
	Mean blood pressure	-0.07	0.72
	Triglyceride	0.06	0.73
	Fasting plasma insulin	0.001	0.99

値も %FMD と有意な負の

相関を ( $r=-0.41, P<0.05$ 、

$r=-0.37, P<0.05$ ) 示した。

高コレステロール血症なら

びに高中性脂肪血症被験者

を除いても、3群間での

%FMD に関しては同様の

結果を得た。また喫煙者20

名を除いても同様であった。空

腹時血糖が120mg/dlを越える高

血糖被験者はS群で1名、V群で2

名存在したが、この3名を除いて

も、3群間での %FMD に関して

は同様の結果を得た。表 1-7に

示すように38名の肥満者にお

いて %FMD を従属変数とした

際の重回帰分析の結果は、

Pmax/Smin のみの関与が有意

であることが判明した。

## 研究2 女性ホルモンと内皮依存性血管拡張反応との関係

### 対象および方法

対象は当科外来受診患者で閉経後1年以上を経過した無症候性女性で、骨粗鬆症と診断され女性ホルモン補充療法を開始した8名(50-61歳、平均年齢 $54.8 \pm 1.4$ 歳)を対象とした。女性ホルモン補充療法としてはプレマリン(Conjugated estrogen) 0.625mgとプロベラ(Medroxyprogesterone acetate) 2.5mgを連日経口服用を基本とし、子宮筋腫により子宮摘出術を受けている患者1名に関してはプレマリン(Conjugated estrogen) 0.625mgの単剤投与とした。内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能としてNitroglycerin投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。計測時期は治療開始前、開始3ヶ月後、開始6ヶ月後、開始1年後とし、血圧、血清ホルモン濃度、血清脂質、空腹時血糖、血清NOx値等を同時に測定した。

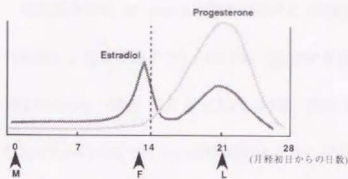
若年正常女性の月経周期による変動を検討した研究では、若年正常女性17名(21-32歳、平均年齢 $25.1 \pm 0.8$ 歳)、同年代の男性17名(22-31歳、平均年齢 $24.8 \pm 0.6$ 歳)を対象とした。内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能としてNitroglycerin投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。血圧、血清ホルモン濃度、血清脂質、空腹時血糖等を同時に測定した。女性の月経周期中の測定時期は、月経期M期(Estradiol、Progesterone共



に低値)、排卵期 F 期 (Estradiol 高値、Progesterone 低値)、黄体期 L 期 (Estradiol、Progesterone 共に高値) の 3 点を検討した (図 2-1)。な

お被験者の女性は、月経周期に対して学問的知識のある助産婦学校

の学生および研究室職員で同意の得られたものとした。被験者の女性は全員が未経産婦で、研究前少なくとも 3 ヶ月は規則的な月経周期の認められた者を対象とした。



M: during menstrual period, F: follicular phase just before ovulation, L: luteal phase

図 2-1. 正常月経周期における女性ホルモンの変動 (Speroff, L. の図を改変)

## 結果

被験者閉経後女性 8 名の基礎データと血液検査の結果を表 2-1 に示す。女性ホルモン補充療法開始後の各時期では、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1c において有意差は認められなかった。女性ホルモン補充療法開始後の血清 Estradiol 濃度は開

始 3 ヶ月以降では開始以前に比して明らかに上昇していた。血清 Progesterone 濃度は開始以前に比して明らかな上昇は認められなかった (表 2-1、図 2-2)。

表 2-1. 対象群の基礎データおよび血液データ

	Pre HRT (n=8)	HRT 3 months (n=6)	HRT 6 months (n=6)	HRT 12 months (n=6)
Age (yr)	54.8 ± 1.4			
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 ± 1.1			26.8 ± 1.8
Mean BP (mmHg)	86 ± 3	82 ± 5	76 ± 3	81 ± 3
Total cholesterol (mg/dl)	217 ± 12	219 ± 7	199 ± 8	192 ± 7
HDL cholesterol (mg/dl)	71 ± 7	84 ± 8	75 ± 6	71 ± 6
Triglyceride (mg/dl)	84 ± 7	83 ± 11	85 ± 16	85 ± 11
Fasting plasma glucose (mg/dl)	87 ± 3	84 ± 1	86 ± 2	85 ± 3
Hemoglobin A1c (%)	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.1
Estradiol (pg/ml)	2 ± 2	83 ± 17 **	78 ± 13 **	77 ± 21 **
Progesterone (ng/ml)	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1

\*\*P<0.01 vs Pre

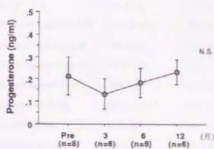
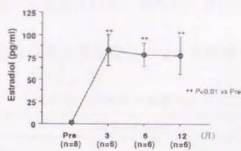


図 2-2. 女性ホルモン補充療法後の Estradiol と Progesterone の変化

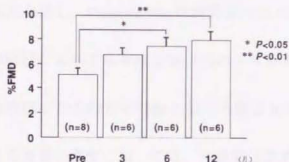


図 2-3. 女性ホルモン補充療法後の %FMD の変化

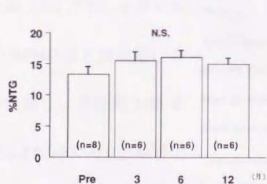


図 2-4. 女性ホルモン補充療法後の %NTG の変化

閉経後女性の %FMD は治療後経時的に増加傾向を示し、治療開始前で  $5.1 \pm 0.5\%$ 、開始 3ヶ月後で  $6.7 \pm 0.6\%$ 、開始 6ヶ月後で  $7.4 \pm 0.7\%$ 、開始 1年後で  $7.9 \pm 0.7\%$  であり、治療開始前に比し開始 6ヶ月後、開始 1年後で %FMD は有意に増加していた ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  図 2-3)。一方、%NTG は治療開始前で  $13.4 \pm 1.2\%$ 、開始 3ヶ月後で  $15.5 \pm 1.5\%$ 、開始 6ヶ月後で  $16.1 \pm 1.1\%$ 、開始 1年後で  $15.0 \pm 1.0\%$  であり、治療開始前に比し各時期で

有意差は認められなかった(図 2-4)。安静時における血清 NOx 値は図 2-5 に示すように治療開始前に比し開始 6ヶ月後、開始 1年後で有意に増加していた。

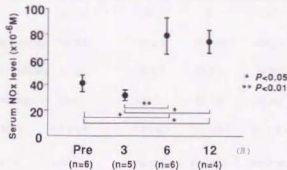


図 2-5. ホルモン補充療法後の血清 NOx 値の変化

若年正常女性17名、同年代の男性17名の基礎データと血液検査の結果を表2-2に示す。

正常女性群と男性群とでは正常範囲ではあるものの、男性の BMI が有意な高値を示し、

表 2-2. 対象群の基礎データおよび血液データ

Phase	正常男性群 (n=17)		正常女性群 (n=17)	
	—	M	F	L
Age (y)	24.8 ± 0.6	25.1 ± 0.6	—	—
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.5 ± 0.4**	20.3 ± 0.5	—	—
Total cholesterol (mg/dl)	169 ± 7.4	172 ± 6.4	174 ± 6.6	163 ± 7.2
HDL cholesterol (mg/dl)	62.9 ± 5.64	65.0 ± 3.16	66.7 ± 3.35	65.9 ± 3.10
LDL cholesterol (mg/dl)	90.9 ± 5.70	97.7 ± 4.34	96.4 ± 4.97	87.4 ± 5.17
Triglyceride (mg/dl)	75.2 ± 6.97**	48.0 ± 2.77	46.4 ± 3.46	49.9 ± 3.89
Estradiol (pg/mL)	31.2 ± 2.7	33.2 ± 3.4	172.2 ± 26.3 ††	145.4 ± 9.1††
Progesterone (ng/mL)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.06	1.0 ± 0.19	15.3 ± 1.5 ††

\*\* P < 0.01 vs M, F & L; †† P < 0.01 vs 男性群 and M; † P < 0.01 vs 男性群, M and F.  
M, during menstrual period; F, follicular phase just before ovulation; L, luteal phase

同様に正常範囲ではあるもの

の、男性群の中性脂肪値が女

性群のどの時期に比べても有

意な高値を示した。また女性

の月経周期による変動の中で

は Estradiol が排卵前期および

黄体期で月経期に比べ有意な

高値を示し、Progesterone は黄体期のみで有意な高値を示した。血圧は男性と女性のど

の時期においても有意な差は認められなかった。超音波による測定値では男性の安静時

血管径が女性のどの時期における径よりも有意に大きい値を示した。前腕5分間駆血に

よる負荷の程度においては、有意差は認められなかった(表2-3)。

### %FMD と %NTG の結果

を図 2-6 に示す。正常女性

の %FMD は月経周期によ

り変動し、月経期 M期は

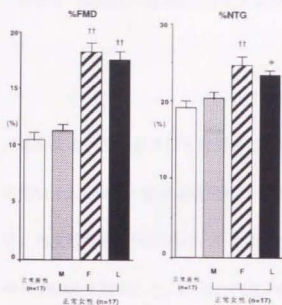
11.2 ± 0.6%であり、M期に

比べて排卵期 F期、更に

表 2-3. 対象群の血圧および超音波による各種測定値

Phase	正常男性群 (n=17)		正常女性群 (n=17)	
	—	M	F	L
Systolic blood pressure (mmHg)	114 ± 2	111 ± 2	110 ± 2	108 ± 2
Diastolic blood pressure (mmHg)	63 ± 2	70 ± 2	64 ± 2	64 ± 2
Mean blood pressure (mmHg)	80 ± 1	84 ± 2	80 ± 2	79 ± 2
Basal vessel diameter (mm)	4.4 ± 0.1**	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Increase in blood flow (%)	250 ± 26	249 ± 24	263 ± 27	294 ± 35

\*\* P < 0.01 vs M, F & L; M, during menstrual period; F, follicular phase just before ovulation; L, luteal phase



\*  $P < 0.05$  vs M; ††  $P < 0.01$  vs normal men and M  
 M, during menstrual period; F, follicular phase just before ovulation; L, luteal phase

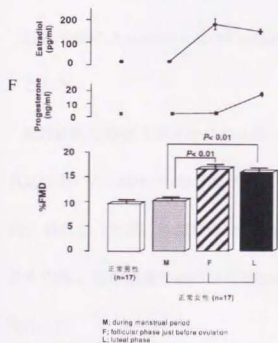
図 2-6. 性差および月経周期における %FMDと%NTGの変化

黄体期 L期では有意に上昇していた ( $18.2 \pm 0.8\%$ 、 $17.5 \pm 0.7\%$ ともにM期に比べて $P < 0.01$ )。

男性の %FMDは $10.6 \pm 0.8\%$ であり、女性の排卵期 F期、黄体期 L期より有意に小さく、月経期 M期と同程度であった。女性の排卵期 F期、黄体期 L期では %FMDに有意差は認められなかった。

一方、%NTGも月経周期により変動し、月経期 M期に比べて排卵期 F期、更に黄体期 L期では有意に上昇していたが、その上昇分は %FMD/%NTGで比較したところ、%FMDに比べて小さかった。男性の %NTG は女性の排卵期、黄体期 L期より有意に小さく、月経期 M期と同程度であった。

Estradiol、Progesterone 濃度の変化と %FMDの変化を図 2-7に示す。



M, during menstrual period  
 F, follicular phase just before ovulation  
 L, luteal phase

図 2-7. 性差および月経周期におけるホルモン変動と %FMDの変化

### 研究3 頸動脈内膜中膜肥厚と内皮依存性血管拡張反応との関係

#### 対象および方法

対象は当科外来および入院患者で、動脈硬化性疾患を有する男性34名(39-84歳、平均年齢 $61.1 \pm 2.0$ 歳)と動脈硬化性疾患を有さない男性33名(41-86歳、平均年齢 $57.0 \pm 1.6$ 歳)で、内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能として Nitroglycerin 投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。同時に血圧、血清脂質、空腹時血糖等を測定した。

#### 動脈硬化性疾患の内訳は

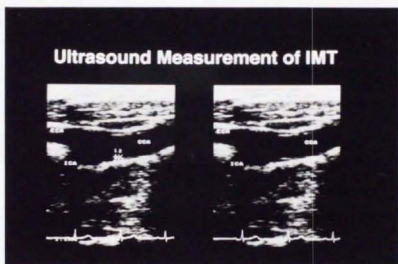
- 1) 心臓カテーテル検査により冠動脈の有意狭窄75%以上が確認された冠動脈硬化症または過去5年以内に心筋梗塞の既往を持つ症例
- 2) 臨床的に Arteriosclerotic obliteration (ASO) と診断された症例とした。

総頸動脈の超音波測定法は従来報告されている方法<sup>26,36</sup>により、血流依存性血管拡張反応で用いた7.5MHzの超音波プローブ(東芝SSA-270A)を用いた。右総頸動脈を長軸方向に描出し、内頸、外頸動脈分岐を確認し、頸動脈内膜中膜肥厚(IMT)として総頸動脈から内頸、外頸動脈分岐の近位部1cm以内の総頸動脈遠位壁における肥厚を求めた(図3-1)。

超音波画像はSLV-RS7(SONY)を用い、S-VHSビデオテープに録画した。計測はビデオ

オテープに録画した画像を用い、心収縮、拡張に伴う血管の動揺性を避けるため、同時にモニターした心電図上のR波のピークに一致させ拡張末期を用いた。

総頸動脈 IMT 測定における精度の検討では、S-VHS ビデオテープに録画した12名の被験者における、各々5回の測定によるIMTの変動係数は、 $4.20 \pm 0.67\%$ であった。



CCA: 総頸動脈 ECA: 外頸動脈 ICA: 内頸動脈

図 3-1. 総頸動脈の超音波像

超音波静止画像1画面につき4ポイントを計測し、2画面から求めた合計8ポイントの平均値を測定値として用いた。



## 結果

動脈硬化性疾患を有さない群と動脈硬化性疾患を有する群の基礎データと血液検査の結果を表 3-1 に示す。両群では年齢、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1c において有意差は認められなかった。動脈硬化性疾患を有さない群の中で

は9名は危険因子を持たず、高脂血症患者は13名、高血圧患者は15名、糖尿病患者は6名、喫煙者は13名であった。動脈硬化性疾患を有する群では虚

表 3-1. 対象群の基礎データおよび血液データ

	動脈硬化性疾患を有さない群 (n=33)	動脈硬化性疾患を有する群 (n=34)
Age (yr)	57.0 ± 1.6	61.1 ± 2.0
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	24.0 ± 0.7	24.0 ± 0.6
Mean blood pressure (mmHg)	96 ± 2	95 ± 2
Total cholesterol (mg/dl)	203 ± 5	201 ± 6
HDL cholesterol (mg/dl)	53 ± 3	46 ± 2
Triglyceride (mg/dl)	203 ± 46	174 ± 21
Fasting plasma glucose (mg/dl)	108 ± 5	113 ± 6
Hemoglobin A1c (%)	5.8 ± 0.2	6.0 ± 0.3
Regular NTG user (%)	3	88

血性心疾患における胸痛緩和等の臨床上の必要性から、約9割がニトロ製剤を定期的に処方されていた。一方、動脈硬化性疾患を有さない群では狭心症の疑いから、1名のみが定期的にニトロ製剤を服用していた。超音波における総頸動脈 IMT 測定値は動脈硬

化性疾患を有さない群では  $0.91 \pm 0.03 \text{mm}$ 、動脈硬化性疾患を有する群では  $1.02 \pm 0.04 \text{mm}$  と動脈硬化性疾患を有する群で有意な肥厚を認めた ( $P < 0.05$ 、図 3-2)。%FMD と %NTG の結果を図 3-3 に示す。%FMD は動脈硬化性疾患を有さない群では  $5.1 \pm 0.6\%$ 、動脈硬化性

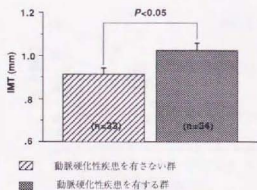


図 3-2. 動脈硬化性疾患を有さない群および有する群における超音波によるIMTの比較

疾患を有する群では $2.8 \pm 0.4\%$ であった。

また %NTG は動脈硬化性疾患を有さない群では $12.3 \pm 0.8\%$ 、動脈硬化性疾患を有する群では $7.8 \pm 0.7\%$ であった。

%FMD と %NTG の双方において動脈硬化性疾患を有する群が有意な低値を示した (共に  $P < 0.01$ )。図 3-4 は被検者 67 名

全員の総頸動脈 IMT と %FMD、%NTG の単相関を示す。左側の図は IMT と %FMD との相関で、IMT と %FMD とは有意な負の相関を認めた ( $r = -0.36$   $P < 0.01$ )。また右側の図は IMT と %NTG との相関で、IMT は %NTG とも有意な負の相関を認めた ( $r = -0.31$   $P < 0.05$ )。

図 3-5 は動脈硬化性疾患を有さない群と動脈硬化性疾患を有する群の 2 群に分けて、それぞれの群での IMT と %FMD、%NTG の単相関を検討した。上段の動脈硬化性疾患を

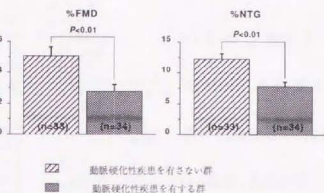


図 3-3. 動脈硬化性疾患を有さない群および有する群における %FMD と %NTG

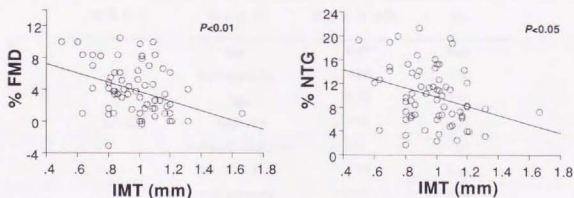


図 3-4. 被検者 67 名における IMT と %FMD、%NTG との単相関

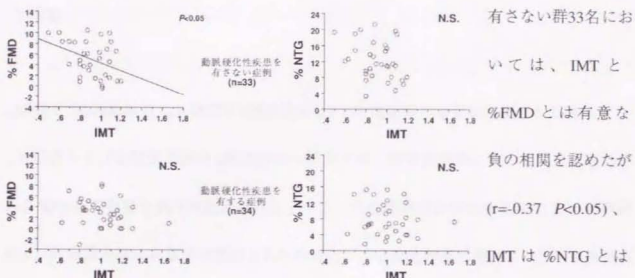


図 3-5. 動脈硬化性疾患を有する群と有さない群における IMT と %FMD、%NTG との単相関

硬化性疾患を有する群30名においては IMT は %FMD、%NTG との双方において有意な相関を認めなかった。

表 3-2 に %FMD を従属変数とした際の各項目の重回帰分析の結果を示す。この解析からは %FMD に対して IMT のみの関与が有意であることが判明した。

表 3-2. 被験者67名全員における %FMD を従属変数とした際の各項目の重回帰分析結果

従属変数	独立変数	標準回帰係数	P値
%FMD	IMT	-0.27	0.03
	Hemoglobin A1c	-0.38	0.07
	Age	-0.20	0.10
	Triglyceride	-0.20	0.15
	Fasting plasma glucose	0.23	0.24
	Body Mass Index	-0.13	0.30
	HDL cholesterol	0.11	0.38
	Total cholesterol	-0.04	0.76
	Mean blood pressure	0.02	0.84

### 3. 考察

#### 研究1 各種動脈硬化危険因子(肥満を含む)と内皮依存性血管拡張反応との関係

対照群および危険因子群の2群に分けた検討では、危険因子群において内皮依存性である%FMDの有意な低下が認められた。一方、内皮非依存性である%NTGには対照群および危険因子群に有意差は認められなかった。内皮機能評価に用いられている血流依存性血管拡張反応は従来より加齢により低下すること<sup>37)</sup>、安静時血管径と逆相関のあることが知られている<sup>11)</sup>。安静時血管径、年齢、さらに駆血解除後の血流増加率にも両群で差はないことより、危険因子群ではニトログリセリンによる血管の拡張能すなわち血管平滑筋レベルでの反応性変化を伴う以前に内皮機能低下が認められることが判明した。

臨床背景データからは危険因子群ではBMI、平均血圧、総コレステロール値、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1cにおいて対照群に比べて有意に高い値を示したが、重回帰分析の結果は年齢、安静時血管径、HbA1c値、空腹時血糖値の関与が有意であり、内皮機能に影響している可能性が示唆される。ただし研究1では危険因子群ではそれぞれの診断のついている症例はほとんどが薬物等により治療されており、薬物等が内皮機能に及ぼす影響は評価されていない。

高脂血症、糖尿病、高血圧、現在喫煙習慣の4つの動脈硬化危険因子の重複による%FMDの変化を図1-4に示した。個々の危険因子のみを有している患者は症例数が少なく、危険因子別の検討はできなかったものの、この4つの因子のいずれか1つでは、動脈

硬化危険因子を持たない群と比較しても有意差がなく、動脈硬化危険因子の重複数に伴って%FMDの低下が認められたことは興味深い。ところが、単に肥満を過体重の概念で動脈硬化危険因子の1つに加えてみても、動脈硬化危険因子の重複による%FMDの低下は認められなかった。肥満は脂質代謝異常、耐糖能異常、高血圧など動脈硬化の危険因子と密接に関連し、その発症、進展因子として重要であることが報告されている<sup>14-16,38,39</sup>。従来より上半身肥満者に動脈硬化発症が多く、下半身肥満者には少ないことが疫学上知られていたが、これらは上半身肥満、耐糖能異常、高中性脂肪血症、高血圧の4つが合併すると高率に動脈硬化性疾患を発症するすると考える、Kaplanの提唱する死の4重奏の概念を想起させる<sup>40</sup>。

近年の診断技術進歩により体内の脂肪の局在が、腹部CTやMRIまた超音波でもわかるようになってきた<sup>35,41,42</sup>。肥満の中でも、特に内臓脂肪型肥満が動脈硬化の危険因子として重要と考えられるようになってきたが、動脈硬化発症の機序は明らかではない。そこで内臓脂肪型肥満が血管内皮機能にどのような影響を及ぼすかを臨床的に検討するために、超音波を用いて肥満者を内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満に分け、内皮依存性血管拡張反応の検討を行った。その結果、内臓脂肪型肥満では明らかな内皮機能の低下が認められた。

Steinbergらは肥満者においてインスリン抵抗性が内皮機能と密接に関連していることを報告しているが<sup>43</sup>、この報告では肥満をその脂肪局在で分けてはいないものの、我々の想定する内臓脂肪型肥満者が多く含まれていた可能性がある。研究1では空腹時血糖、

Hb A1c、空腹時インスリンにおいては非肥満者対照群、皮下脂肪型肥満、内臓脂肪型肥満の3群において有意差はなかったが、経口ブドウ糖負荷試験や euglycemic clamp 法等のインスリン感受性検査を行っていないため、インスリン抵抗性関与の程度は評価できなかった。

脂肪細胞は近年 Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ <sup>44</sup>、Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1<sup>45-47</sup>、また von Willebrand factor<sup>48,49</sup>などの血管作動性物質を分泌する事実が判明してきた。これらの血管作動性物質が血管内皮機能に影響を与えていることは十分に測られる。TNF- $\alpha$ は内皮細胞の NO synthase mRNA レベルを抑制することが示されている<sup>50</sup>。局所での TNF- $\alpha$ が secondary mediators を産生し、筋組織におけるインスリン感受性に影響を与えている可能性もあると思われる。我々の被験者における血漿 TNF- $\alpha$ 値は総ての検体で測定感度以下であり、測定され得た血漿 PAI-1 値は3群間では有意差はなかったが、上半身肥満者において PAI-1 高値が認められたとする報告もある<sup>46</sup>。この PAI-1 高値は euglycemic clamp 法におけるインスリン感受性と負の相関があることも指摘され、インスリン抵抗性が血管内皮機能に影響を及ぼす可能性が示唆される。また長期間の高血糖状態が内皮機能に影響を与えることがヒト IDDM 患者において報告され<sup>51</sup>、長期間の高血糖状態に伴うインスリン抵抗性の増大が内皮機能に影響を与える可能性が示唆されている。いずれにせよ内臓脂肪型肥満での内皮機能低下を誘導する因子の解明にはさらなる研究が必要である。

脂肪局在による肥満者のタイプ別は Fujioka らにより臍レベルでの腹部 CT 断層像によ



る内臓脂肪と皮下脂肪面積比により分類する方法が報告されている<sup>17</sup>。しかしながらCT検査では被曝の問題、CT検査へのアクセスの問題があるため、我々は Suzukiらの報告に基づく、超音波法を用いた脂肪局在の分類を用いた<sup>35</sup>(図 1-1参照)。この方法は比較的簡便であり侵襲性も無く、Pmax と Smin の比 (Pmax/Smin) から肥満者を内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満とに分類する方法であり、Pmax/Smin が CT による面積比から求める V/S ratio と良く相関することが報告されている<sup>34</sup>。研究 1 で注目すべきことは皮下脂肪型肥満者の内皮機能が非肥満者の対照群とほぼ同等であった点である。

## 研究 2 女性ホルモンと内皮依存性血管拡張反応との関係

短期間の女性ホルモン補充療法が内皮機能に及ぼす影響の検討としては、Liebermanらによる平均年齢55歳の閉経後女性12人を対象にプラセボ、Estradiol 1mg, 2mg の9週間投与による Double-blind、placebo-controlled、cross-over trial の報告がある<sup>23</sup>。彼らは Estradiol 1mg, 2mgにて明らかな上腕動脈における血流依存性血管拡張反応の改善が、9週間という比較的短期間に認められたことを報告している。しかしながら、長期に渡る女性ホルモン補充療法において内皮機能改善が保たれるか否かは不明であった。研究 2 により少なくとも12ヶ月は内皮機能改善が保たれることが証明された。また少数例ではあるものの安静時血清 NOx値も女性ホルモン補充療法後6ヶ月より有意な高値を示した。

エストロゲンの作用機序に関しては脂質代謝改善等の動脈硬化のリスクファクターに対する作用と、動脈壁への直接作用に分けることができる。高コレステロール血症が動

脈硬化のリスクであることはよく知られた事実であるが、エストロゲンに血清コレステロールレベルを変動する作用があることが多くの報告より明らかになっている<sup>52-54</sup>。エストロゲンの投与により総コレステロールは低下する。またLDLコレステロールを低下させ、逆にHDLコレステロールを上昇させる。しかし被験者の閉経後女性8名においては女性ホルモン補充療法開始後の各時期では、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1cにおいて有意差は認められなかった。それゆえエストロゲンによる内皮機能の改善はこれら動脈硬化のリスクファクターに対する作用を介するものである可能性は低いと考えられる。

上述した動脈硬化のリスクを改善する作用の他に、エストロゲンは直接血管壁に作用して抗動脈硬化作用を発揮することも指摘されている。血管構成細胞にエストロゲン受容体が存在することは、エストロゲンの血管に対する直接作用を示唆するものと考えられる。Colburnらが培養大動脈内皮細胞に<sup>55</sup>、Nakaoらが培養大動脈平滑筋細胞に<sup>56</sup>、エストロゲンの結合部位があることを証明した。また遺伝子レベルでも血管平滑筋細胞にエストロゲン受容体が存在することが示されている。Kim-Schulzeらはヒト冠動脈ならびに臍帯静脈内皮細胞にエストロゲン受容体が存在することを報告している<sup>57</sup>。エストロゲンの血管壁に対する作用が、すべてエストロゲン受容体を介するか否かは不明であるが、エストロゲン受容体の存在はエストロゲンと血管との関係を考える上で大変意義深いと思われる。

血管内皮細胞は、内皮細胞由来弛緩因子 (Endothelium-derived relaxing factor, EDRF) を

産生し、血管の tonus の調節に関与している。EDRF は nitric oxide (NO) または NO 類似化合物 (nitrosotiol または nitrosoheme など) であると現在では考えられている。エストロゲンは内皮細胞からの NO 産生を増加させることで血管拡張に働くという報告が得られてきている<sup>58-60</sup>。高コレステロール食で飼育したサル<sup>61</sup>の冠動脈は内皮機能障害が認められるが、エストロゲンの投与がこの障害を防ぐという報告もある。この研究では冠動脈内にアセチルコリン (内皮細胞に対する NO 放出作用、中膜平滑筋に対する直接の収縮作用を有する) を注入し、血管径の変化を冠動脈造影で評価している。卵巣摘出後エストロゲン補充を行った群ではアセチルコリンにより血管拡張が認められたが、エストロゲン補充を行わなかった群では逆に血管収縮が起きている。同様の検討は臨床的にも行われており、Reis らは、冠動脈疾患を有する閉経後女性に対しエストロゲンの急性投与を行ったところ、アセチルコリンの冠動脈内投与に対する血管径の反応が改善したことを報告している<sup>61</sup>。これらの報告は研究 2 で得られた結果を十分支持するものと考えられる。

若年正常女性において、月経周期の変動に伴うエストロゲンの変化により、エストロゲンの高値時、上腕動脈の血流依存性血管拡張反応が増大することが判明した<sup>62</sup>。また男性においてはこの周期的変動は認められず、男性の %FMD は Estradiol、Progesterone 共に低値をとる女性の月経期のものに匹敵することも判明した。これらの現象が間接的にエストロゲンの中でも Estradiol によって引き起こされていると考えられるものの、その他の因子の関与も否定できない。Estradiol の antagonists や receptor blockers 等を使った

研究は行わなかったため、Estradiol が直接内皮機能の改善に関与したか否かは不明である。Miller や Vanhoutte らは Progesterone はイヌ冠動脈においてエストロゲンの作用に拮抗する作用を報告しているが<sup>63</sup>、我々の結果からは Progesterone のエストロゲン拮抗作用は認められなかった。

血流依存性血管拡張反応は shear stress によって内皮細胞から放出される血管拡張物質、特に一酸化窒素 NO によって引き起こされるとされている。Joannides らによって橈骨動脈における血流依存性血管拡張反応は NO 生成阻害薬の L-NMMA (NG-monomethyl L-arginine) によって拮抗されることが示されている<sup>64</sup>。また Hayashi らは内皮細胞の温存された rabbit 大動脈リング標本では基礎 NO 放出量はエストロゲン濃度により制御されていることを報告している<sup>65</sup>。これらのことから Estradiol が血流依存性血管拡張反応時の NO 産生促進ないしは分解抑制に関与している可能性が示唆されたものとする。NO 以外の血管拡張物質としては Prostacyclin が考えられるが、Prostacyclin 合成阻害剤の Indomethacin 投与が血管拡張に影響を与えなかったことを考えると、その関与は少ないと思われる<sup>66,67</sup>。

エストロゲンの内皮細胞を介した作用とは別に、エストロゲンが内皮非依存性血管拡張作用として直接血管平滑筋に作用して血管拡張を惹起するという報告も見られる。Jiang らは高 K、endothelin-1 などで前収縮させた摘出ウサギ冠動脈を用いて Estradiol の血管拡張作用を報告している<sup>68</sup>。これらの報告では内皮細胞の存在の有無は結果に影響を与えないことから、in vitro での Estradiol 急性投与による血管拡張作用は直接平滑筋に

作用したものであると考えられる。一方 Gilligan らは Estradiol 急性投与により動脈硬化のリスクファクターを持つ閉経後女性では内皮非依存性血管拡張作用が認められたが、正常女性では認められなかったことを報告している<sup>69</sup>。我々の検討では内皮非依存性血管拡張は内皮依存性のものと同様な変化を示したが、その増加分は内皮依存性血管拡張の度合いの方が大きく、エストロゲンが主として内皮依存性血管拡張に作用している可能性が示唆された。

### 研究3 頸動脈内膜中膜肥厚と内皮依存性血管拡張反応との関係

超音波による総頸動脈の内膜中膜複合体 (IMT) 肥厚の度合いは動脈硬化の形態的初期変化であり、IMT の程度を評価することにより、同じ筋性動脈である冠動脈など、全身の動脈硬化の程度を推定する指標とすることができるとされている<sup>70</sup>。実際、IMT 肥厚度は冠動脈疾患と軽度に関連していると報告されている<sup>25</sup>。研究3では実際に臨床的な動脈硬化性疾患を有するか否かによって、IMT および内皮機能に差があるか否かの検討を行った。また形態学的な総頸動脈 IMT と機能的な上腕動脈の内皮依存性血管拡張反応との関係を検討し、初期の総頸動脈硬化病変と上腕動脈の内皮依存性血管拡張反応との関係を検討した。

結果から明らかなように臨床的に動脈硬化性疾患を有する群において、動脈硬化性疾患を有さない群に比べて明らかな IMT の肥厚が認められた。これは Salonen らが報告した結果を裏付けるものである。同時に動脈硬化性疾患を有する群で内皮依存性である



%FMDの有意な低下が認められた。内皮非依存性である%NTGにおいても動脈硬化性疾患を有する群で有意な低下が認められた。動脈硬化血管では血管平滑筋増殖等により血管平滑筋レベルでの血管の反応性低下が認められる可能性が考えられる。さらに動脈硬化性疾患を有する群は臨床的必要性からニトログリセリンが検査以前に投与されているものが88%と9割近くも存在した。ニトログリセリンの定期的服用に伴う耐性の存在が、ニトログリセリンによる血管の拡張能すなわち血管平滑筋レベルでの反応性変化を伴い、%NTGの低下を招いた他の原因と考えられる。IMTと%FMD、%NTGそれぞれの単相関では両者とも有意な負の相関があった。そこで動脈硬化性疾患を有さない群と動脈硬化性疾患を有する群の2群に分けて検討を行ったところ、動脈硬化性疾患を有さない群33名では、内皮非依存性である%NTGにはIMTと相関を認めないにもかかわらず、IMTと%FMDには有意な負の相関を認めた。このことはニトログリセリンによる血管の拡張能すなわち血管平滑筋レベルでの反応性変化を伴う以前の段階で、内皮機能低下とIMTの肥厚が相関することを示唆するものである。重回帰分析での検討結果からも、IMT肥厚には%FMDの有意な関与があり、統計学的にもこの点を裏付ける証拠となり得よう。

IMTの肥厚を含めたブラークスコアを高めるものとしては、年齢、男性、高脂血症、糖尿病が有意な危険因子であることが示されている<sup>7)</sup>。376人の冠動脈造影を施行し、頸部動脈の超音波による評価を行った患者の検討では、単相関で頸動脈硬化と有意な関連をみたものは、年齢、冠動脈狭窄、高血圧、喫煙、左室肥大、中性脂肪値、冠動脈疾



患の既往、総コレステロール値であり、多変量解析で年齢、高血圧、喫煙、HDLコレステロール値、尿酸値、Type A score であることが報告されている<sup>72</sup>。また Suzuki らは肥満や糖尿病のない高血圧患者を対象とすると IMT は LDLコレステロール値、インスリン抵抗性の指標である SSPG 値とも有意の正相関を示し、多変量解析でも SSPG 値、収縮期血圧、HDLコレステロール値の関与が認められている<sup>73</sup>。そのほか Lp(a)<sup>74</sup>、TG-rich remnant が蓄積する食後高 TG 血症<sup>75</sup>、虚血性心疾患や心肥大が多いとされる ACE-DD genotype<sup>76</sup>が、頸動脈硬化の独立した危険因子とされている。

研究 3 での重回帰分析の検討では %FMD を従属変数とし、IMT、空腹時血糖、中性脂肪、BMI、年齢、平均血圧、総コレステロール、HbA1c、HDLコレステロールの 9 独立変数の中では IMT のみ有意な関与があった。また IMT を従属変数とし、%FMD、空腹時血糖、中性脂肪、BMI、年齢、平均血圧、総コレステロール、HbA1c、HDLコレステロールの 9 独立変数の中では %FMD のみ有意な関与があったものの、空腹時血糖値が  $P=0.08$  と傾向のあることが判明した。これに関して Suzuki らはインスリン抵抗性が IMT 肥厚の独立した危険因子と報告している<sup>73</sup>。空腹時血糖高値が直接インスリン抵抗性とは結び付かないものの、インスリン抵抗性が内皮機能と密接に関連している<sup>43</sup>ことを考えると、IMT 肥厚ならびに内皮機能低下の両者にインスリン抵抗性の存在が大きく関与している可能性が示唆される。研究 3 では右総頸動脈 IMT のみの観察を行ったが、被験者対象年齢が 60 歳と比較的若かったため、明らかなプラークを有する症例は存在しなかった。

頸動脈 Bモード超音波断層法を用いて、降圧剤や高脂血症治療薬による動脈硬化の進

展退縮研究が行われている。コレステロール吸収阻害剤であるコレステロールと、ニコチン酸誘導体であるナイアシンを併用した39人の薬物治療群を同数のプラセボ群と比較した Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study (CLAS) の報告では、薬物治療群で IMT の進展抑制がみられた<sup>77</sup>。Pravastatin Lipids and Atherosclerosis in the Carotid arteries (PLAC II) では冠動脈疾患を有し、IMT が1.3mm以上のアテローム性硬化層を一つ以上有する50-75歳の LDLコレステロール値の高い男女151例を対象とし、Pravastatin 二重盲検試験を行った。3年間における1年当たりの肥厚の進展は、プラセボ群と比べて総頸動脈で53.7%の抑制 ( $P=0.02$ ) がみられている<sup>78</sup>。

234人の男性を壁肥厚度スコアに基づいて4群に分け、冠動脈造影の所見との検討を行った研究では、冠動脈硬化の範囲が広いと頸動脈硬化が強いという臓器相関が報告されている<sup>79</sup>。Rotterdam 研究では55歳以上の970人の頸動脈超音波所見と Ankle to Arm Pressure Index (AAI) とを比較している。超音波0.1mmの IMT の増加は AAI の0.026の減少につながることを報告している<sup>80</sup>。以上の研究より頸動脈硬化は全身の動脈硬化の一部分症と考えられる。

IMT の肥厚 ならびに %FMD の低下がともに動脈硬化症の早期に認められる変化であり、可逆性の変化と考えれば、臨床的に動脈硬化性疾患発症以前に疾患候補群を見つねることが重要である。研究3で得られた結果は動脈硬化性疾患を有さない群はわずかに33名という少数の結果であり、健常者を含めての、動脈硬化性疾患発症以前の症例を増やして検討を行う必要があると考えられる。

#### 4. 結論

##### 研究 1

高脂血症、糖尿病、高血圧、現在喫煙習慣の4つの動脈硬化危険因子の重複数に伴って内皮機能の障害が認められた。内皮機能の障害には年齢、HbA1c値、空腹時血糖値の関与が有意であることが判明した。

内臓脂肪型肥満者における内皮依存性血管拡張反応は皮下脂肪型肥満者のそれに比べて低下しており、内皮機能の障害が内臓脂肪型肥満者において動脈硬化性疾患の多いことの原因の一つと考えられた。

##### 研究 2

閉経後女性で女性ホルモン補充療法を受けている患者における内皮依存性血管拡張能は治療経過とともに改善傾向を認め、治療期間中にその効果の減弱は認められなかった。閉経後女性に対する女性ホルモン補充療法による動脈硬化性疾患の発症抑制には、女性ホルモンの内皮機能改善が関与している可能性が示唆された。

内皮依存性血管拡張反応は女性の月経周期により変動し、月経期に比べて排卵期および黄体期で有意に上昇した。すなわち Estradiol 高値の時期に一致して内皮依存性血管拡張反応の増大が認められた。男性の内皮依存性血管拡張反応は女性の排卵期、黄体期より有意に小さく、月経期と同程度であった。内因性卵巣ホルモンの生理的変動、特に

Estradiol が、内皮機能に促進的に影響している可能性が示唆された。

### 研究 3

動脈硬化性疾患を有する群では動脈硬化性疾患を有さない群に比べて明らかな総頸動脈内膜中膜の肥厚と内皮機能の障害が認められた。動脈硬化性疾患を有さない群において総頸動脈内膜中膜の肥厚度と上腕動脈の内皮機能には負の相関が認められ、内皮機能障害と動脈硬化初期病変の形成の関連が示唆された。

以上、研究 1、研究 2、研究 3 に分けて動脈硬化危険因子ならびに動脈硬化初期変化と血管内皮機能との関連を検討し上記の結論を得た。本研究での超音波装置を用いた非侵襲的方法による内皮機能評価は、将来広く臨床応用が可能な検査であると考ええる。また上腕動脈における内皮機能が冠動脈におけるアセチルコリンの反応性とも良く相関することも報告されている<sup>34</sup>。

動脈硬化性疾患に陥る以前にこの検査を行うことで、未然に疾患発症を防ぐための動脈硬化リスク管理指導等を行うことも可能であり、また動脈硬化性疾患患者においては、服薬等による内皮機能の改善が長期予後に与える影響も検討可能になると考えられる。

## 5. 文献

1. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. [Review] [404 refs]. *Pharmacological Reviews* 1991;43:109-42.
2. Moncada S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. [Review] [56 refs]. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 1992;120:187-91.
3. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. [Review] [31 refs]. *Trends in Biochemical Sciences* 1992;17:399-402.
4. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. [Review] [108 refs]. *Faseb Journal* 1989;3:2007-18.
5. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
6. Myers PR, Minor RJ, Guerra RJ, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990;345:161-3.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. [Review] [127 refs]. *Nature* 1993;362:801-9.
8. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine* 1986;315:1046-51.
9. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan TJ, Ganz P, Selwyn AP. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress [see comments]. *New England Journal of Medicine* 1991;325:1551-6.
10. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-5.
11. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *British Heart Journal*



1995;74:247-53.

12. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997;78:22-7.

13. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-55.

14. Van IT. Obesity: adverse effects on health and longevity. [Review] [84 refs]. *American Journal of Clinical Nutrition* 1979;32:2723-33.

15. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-77.

16. Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Pekkanen J, Puska P. Body weight, cardiovascular risk factors, and coronary mortality. 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland. *Circulation* 1996;93:1372-9.

17. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: Clinical & Experimental* 1987;36:54-9.

18. Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, Hennes MI, Wilson CR, Gustafson AB, Kissebah AH. Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Annals of Internal Medicine* 1989;110:867-72.

19. Kanai H, Matsuzawa Y, Kotani K, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y, Fujioka S, Tokunaga K, Tarui S. Close correlation of intra-abdominal fat accumulation to hypertension in obese women. *Hypertension* 1990;16:484-90.

20. Adams MR, Clarkson TB, Kaplan JR, Koritnik DR. Experimental evidence in monkeys for beneficial effects of estrogen on coronary artery atherosclerosis. *Transplantation Proceedings* 1989;21:3662-4.

21. Cheng LP, Kuwahara M, Jacobsson J, Foegh ML. Inhibition of myointimal



hyperplasia and macrophage infiltration by estradiol in aorta allografts. *Transplantation* 1991;52:967-72.

22. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TJ, Lubahn DB, O'Donnell TJ, Korach KS, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nature Medicine* 1997;3:545-8.

23. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine* 1994;121:936-41.

24. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74:1399-406.

25. Adams MR, Nakagomi A, Keech A, Robinson J, McCredie R, Bailey BP, Freedman SB, Celermajor DS. Carotid intima-media thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease [see comments]. *Circulation* 1995;92:2127-34.

26. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. [Review] [32 refs]. *Circulation* 1993;87:1156-65.

27. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *New England Journal of Medicine* 1987;316:1105-10.

28. Bush TL, Barrett CE, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 1987;75:1102-9.

29. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study [see comments]. *New England Journal of Medicine* 1991;325:756-62.

30. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and

description of a computerized analysing system. [Review] [20 refs]. *Clinical Physiology* 1991;11:565-77.

31. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:50-5.

32. Salonen R, Salonen JT. Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. *Journal of Internal Medicine* 1991;229:225-31.

33. Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. Arterial wall thickness in familial hypercholesterolemia. Ultrasound measurement of intima-media thickness in the common carotid artery. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1992;12:70-7.

34. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology* 1995;26:1235-41.

35. Suzuki R, Watanabe S, Hirai Y, Akiyama K, Nishide T, Matsushima Y, Murayama H, Ohshima H, Shinomiya M, Shirai K, et al. Abdominal wall fat index, estimated by ultrasonography, for assessment of the ratio of visceral fat to subcutaneous fat in the abdomen. *American Journal of Medicine* 1993;95:309-14.

36. Salonen R, Salonen JT. Progression of carotid atherosclerosis and its determinants: a population-based ultrasonography study. *Atherosclerosis* 1990;81:33-40.

37. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *Journal of the American College of Cardiology* 1994;24:471-6.

38. Mann GV. The influence of obesity on health (first of two parts). [Review] [66 refs]. *New England Journal of Medicine* 1974;291:178-85.

39. Mann GV. The influence of obesity on health (second of two parts). [Review] [72

refs]. *New England Journal of Medicine* 1974;291:226-32.

40. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. [Review] [76 refs]. *Archives of Internal Medicine* 1989;149:1514-20.

41. Borkan GA, Gerzof SG, Robbins AH, Hults DE, Silbert CK, Silbert JE. Assessment of abdominal fat content by computed tomography. *American Journal of Clinical Nutrition* 1982;36:172-7.

42. Terry JG, Hinson WH, Evans GW, Schreiner PJ, Hagaman AP, Crouse Jr. Evaluation of magnetic resonance imaging for quantification of intraabdominal fat in human beings by spin-echo and inversion-recovery protocols. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995;62:297-301.

43. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97:2601-10.

44. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 1995;95:2409-15.

45. Cigolini M, Targher G, Bergamo AI, Tonoli M, Agostino G, De SG. Visceral fat accumulation and its relation to plasma hemostatic factors in healthy men. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 1996;16:368-74.

46. Landin K, Stigendal L, Eriksson E, Krotkiewski M, Risberg B, Tengborn L, Smith U. Abdominal obesity is associated with an impaired fibrinolytic activity and elevated plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism: Clinical & Experimental* 1990;39:1044-8.

47. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medicine* 1996;2:800-3.

48. Blann A. von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. [Review] [126 refs]. *British Journal of Biomedical Science* 1993;50:125-34.

49. Blann AD, Bushell D, Davies A, Faragher EB, Miller JP, McCollum CN. von Willebrand factor, the endothelium and obesity. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 1993;17:723-5.

50. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JJ, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation Research* 1993;73:205-9.

51. Makimattila S, Virkamaki A, Groop PH, Cockcroft J, Utriainen T, Fagerudd J, Yki JH. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1996;94:1276-82.

52. Rijkema AH, van, der, Sanden, Aa, Ruijs AH. Effects of post-menopausal oestrogen-progestogen replacement therapy on serum lipids and lipoproteins: a review. *Maturitas* 1990;12:259-85.

53. Lobo RA. Clinical review 27: Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. [Review] [7 refs]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1991;73:925-30.

54. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikaar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins [see comments]. *New England Journal of Medicine* 1991;325:1196-204.

55. Colburn P, Buonassisi V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. *Science* 1978;201:817-9.

56. Nakao J, Chang WC, Murota SI, Orimo H. Estradiol-binding sites in rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 1981;38:75-80.

57. Kim SS, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1996;94:1402-7.

58. Williams JK, Adams MR, Klopfenstein HS. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1990;81:1680-7.



59. Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1988;244:19-22.

60. Williams JK, Adams MR, Herrington DM, Clarkson TB. Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries [see comments]. *Journal of the American College of Cardiology* 1992;20:452-7.

61. Reis SE. Oestrogens attenuate abnormal coronary vasoreactivity in postmenopausal women [editorial]. [Review] [30 refs]. *Annals of Medicine* 1994;26:387-8.

62. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995;92:3431-5.

63. Miller VM, Vanhoutte PM. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *American Journal of Physiology* 1991;261:r1022-7.

64. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995;91:1314-9.

65. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:11259-63.

66. Holtz J, Forstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1984;6:1161-9.

67. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology* 1986;250:h1145-9.

68. Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole WP, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *British Journal of Pharmacology* 1991;104:1033-7.
69. Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon Rr. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1994;90:786-91.
70. Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1991;11:1245-9.
71. Handa N, Matsumoto M, Maeda H, Hougaku H, Ogawa S, Fukunaga R, Yoneda S, Kimura K, Kamada T. Ultrasonic evaluation of early carotid atherosclerosis. *Stroke* 1990;21:1567-72.
72. Crouse JR, Toole JF, McKinney WM, Dignan MB, Howard G, Kahl FR, McMahan MR, Harpold GH. Risk factors for extracranial carotid artery atherosclerosis. *Stroke* 1987;18:990-6.
73. Suzuki M, Shinozaki K, Kanazawa A, Hara Y, Hattori Y, Tsushima M, Harano Y. Insulin resistance as an independent risk factor for carotid wall thickening. *Hypertension* 1996;28:593-8.
74. Willeit J, Kiechl S, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Jarosch E, Mair A. Lipoprotein(a) and asymptomatic carotid artery disease. Evidence of a prominent role in the evolution of advanced carotid plaques: the Bruneck Study. *Stroke* 1995;26:1582-7.
75. Sharrett AR, Chambless LE, Heiss G, Paton CC, Patsch W. Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with asymptomatic carotid artery atherosclerosis in middle-aged men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 1995;15:2122-9.
76. Castellano M, Muiasan ML, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, Salvetti M, Porteri E, Bettoni G, Kreutz R, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. *Circulation* 1995;91:2721-4.



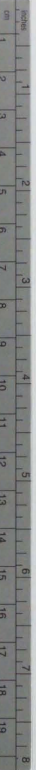
77. Blankenhorn DH, Selzer RH, Crawford DW, Barth JD, Liu CR, Liu CH, Mack WJ, Alaupovic P. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound [see comments]. *Circulation* 1993;88:20-8.

78. Crouse Jr, Byington RP, Bond MG, Espeland MA, Craven TE, Sprinkle JW, McGovern ME, Furberg CD. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II) [published erratum appears in *Am J Cardiol* 1995 Apr 15;75(12):862]. *American Journal of Cardiology* 1995;75:455-9.

79. Wofford JL, Kahl FR, Howard GR, McKinney WM, Toole JF, Crouse Jd. Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1991;11:1786-94.

80. Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1994;14:1885-91.





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
Light blue patch	Light cyan patch	Light green patch	Light yellow patch	Light red patch	Light magenta patch	White patch	Light skin patch	Light gray patch
Dark blue patch	Cyan patch	Green patch	Yellow patch	Red patch	Magenta patch	White patch	Dark skin patch	Black patch

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

