

高インスリン血症動物モデルにおける
動脈硬化促進についての実験的検討

久保 幸

高インスリン血症動物モデルにおける
動脈硬化促進についての実験的検討

久 保 淑 幸

目 次

研究の目的	3
研究の方法	5
結果	11
考察	
(1) 実験モデルについての考察	18
(2) インスリン持続皮下注が全身の様々な因子に与える影響について	20
(3) インスリンの動脈硬化に与える影響について	22
(4) 本実験の問題点	23
(5) 総括	24
結語	26
参考文献	27
図の説明	30

【研究の目的】

本邦における動脈硬化性疾患の増加が強調されてからすでに久しい。これは、主として食生活・生活習慣の欧米化にともない、肥満・高血圧・糖尿病・喫煙などの危険因子が増大したことによるとされている。この危険因子の一つとして1960年代より高インスリン血症が議論されてきた。1921年のインスリンの発見と臨床への応用は糖尿病の治療という点で人類に大きな福音をもたらした。そして、これを境に糖尿病患者の死因は大きく変化した。すなわち、それまで50%以上を占めていた糖尿病性昏睡が数パーセント以下に減少した。変わって心、脳、腎症、その他の血管障害が急増し1950年以降は70~80パーセントを占めるに至った。以来、多くの疫学的研究がインスリン、高インスリン血症と動脈硬化性疾患についての因果関係を指摘し、独立した危険因子であるとする報告も示された(1-9)。しかし、1980年代より、動脈硬化の危険因子としてあらたにインスリン抵抗性という概念が提唱されるようになった。これは、高血圧、肥満、高コレステロール血症などの危険因子の複数が一人の患者に重複して発症し、そして、これらの患者に共通して高血糖と高インスリン血症が見られるという病態である。1988年、Reavenは耐糖能異常、高VLDL-トリグリセリド血症、低HDL-コレステロール血症、高血圧、高インスリン血症が重複しやすいことから、これをシンドロームXと呼び虚血性心疾患の危険因子として注目した(10)。Kaplanは1989年に耐糖能低下、高血圧、高トリグリセリド血症、上半身肥満の4者を危険因子として取り上げ、deadly quartetと呼んだ(11)。彼らはこれらの危険因子の共通の基盤に高インスリン血症ないしインスリン抵抗性があると考えた。そしてこれらの概念は広く受け入れられるところとなった。こうしてインスリン抵抗性と動脈硬化の間に密接な関係

が示されたが、インスリン抵抗性がどのように動脈硬化を発症させるのかというメカニズムは未だ明らかではない。特に、インスリン抵抗性を示す個体においてはインスリンに対する反応性の低下に基づく「インスリンの作用不全」と代償的に生じる高インスリン血症による「インスリンの過剰作用」という全く相反する現象がみられる(12)。すなわち、インスリン抵抗性が動脈硬化の危険因子として重要になるほど、従来からの指摘通り高インスリン血症がインスリンの過剰作用として動脈硬化を促進するのか、逆にインスリンの作用不足が原因となっているのかを改めて検証する必要があるが生じている。

そこで我々は、以下の点を目的として、今回の研究を行った。

- 1) インスリン抵抗性のない高インスリン血症動物モデルを作成すること。
- 2) この動物モデルにおいて動脈硬化形成が促進されることを確認すること。
- 3) この動物モデルにおいて動脈硬化形成に関与する諸因子がどのように影響を受けるかを調べること。

目的1)、2)を達することにより初めて、インスリンはその過剰作用として動脈硬化を促進するという結論を得ることができる。

【研究の方法】

実験動物

高脂肪食による動脈硬化発生モデルとして既に確立している Gottingen 系の CSK-Miniature Swine (ミニブタ、雌、7カ月齢、19~20 kg) を用いた (13, 14)。これらを個別の金属ケージ内で飼育した。ケージは 1 日 1 回清掃した。飼料は通常ブタ飼料 500g (2000 Kcal) を 1 日 1 回午前 8 時から 9 時の間に給餌した。水は自由飲水とした。

インスリンの調整

インスリンはブタインスリン結晶 (Life Technologies, Inc.) を用いた。これを塩酸を加え pH=2 とした PBS に溶解し 80 u/ml (結晶 1mg = 26 u で換算) に調整した後、濾過滅菌した。このインスリン液は用時調整とした。

以下の各実験において、必要に応じて随時採血し、血液生化学データを測定した。

血液採取

動物用鎮静剤 azaperon (三共) 4 mg/kg を筋注後、右前胸部より前大静脈に中心静脈カテーテルを留置した。カテーテルは同部で縫合固定した後、背部へ誘導し、ミニブタの視界の外で操作が可能になるように固定した。予備実験からカテーテルの長期留置は感染および血栓形成の危険があるため留置期間は 2 週間を限度とし、必要に応じて刺入した。末梢血はこのカテーテルより

採取し 3000rpm 15 分間の遠心により血清を得た。血清の保存は-80℃で行った。

血液生化学データ測定

血中インスリン濃度(IRI)はシオノリアインスリンキット(塩野義製薬)を使用しラジオイムノアッセイ法で測定した(16)。インスリン抗体はRIA・PEG(polyethylene glycol)法で測定した。グルコース濃度(17)、血液生化学値はDry-Chem法(Fuji Dry Chem autoanalyzer(富士メディカルシステムズ))で酵素法により測定した(18)(19)。リポ蛋白の分画は超遠心法で行った(20)(21)。

リポ蛋白リパーゼ(LPL)活性値は基質法で測定した。血中カテコラミン濃度はHPLC法で、血中グルカゴン濃度はRIA法で測定した。

(実験-1) インスリン投与法の検討(ミニブタ3頭を用いた。)

i) 皮下注による投与

ミニブタの背部を剃毛、消毒し、23G針を用いて皮下注した。皮下注は1日1回給餌直前に行い、皮下注後経時的に採血し血中インスリン濃度を測定した。投与するインスリンの量は0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0u/kgと増量していったが、連続投与による影響を除外するため中2日おいて増量した。

ii) 持続皮下注による投与(fig. 1)

皮下注による投与終了後、2週間の間隔を置いて持続皮下注を行った。持続注入には微量注入ポンプ(ニプロ SP-3HQ)と専用のシリンジおよびチューブを用いた。チューブの先端に1インチの23G針をセットし、剃毛、消毒し

たミニブタの背部の皮下に刺入した。感染予防のためイソジンゲル少量を刺入部に塗布し粘着テープで固定した。注入ポンプ本体は衝撃や水分から保護するため防水性の緩衝剤で包み、医療用ネットで背部に固定した。インスリン投与量は0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 u/kg/day と増量していった。各量2日ずつ連続して増量した。

(実験-2) インスリン持続皮下注の動脈に与える影響の検討(通常飼料の場合)

ミニブタ6頭を使用した。インスリン群3頭と対照群3頭に分けた。インスリン群にはブタインスリン2.0 u/kg/day を、対照群にはPBSを24時間持続注入した。インスリンの補充は毎週2回、シリンジ、チューブ、穿刺針の交換は毎週1回行った。持続注入は実験期間中(6カ月間)継続した。

インスリン抵抗性測定

SSPG(Steady State Plasma Glucose)法により各ミニブタのインスリン感受性(インスリン抵抗性)を測定した。Somatostatin(ペプチド研究所)125 μ g 静注後、somatostatin(250 μ g/h)、glucose(6 mg/kg/min)、insulin (0.77 mu/kg/min)を輸液ポンプにて持続静注し、30、60、90、120分後に採血し血中グルコース値を測定した。(22)

6カ月目にPentbarubital Sodium 8 mg/kg 静注による全身麻酔下に放血屠殺後解剖し、動脈および主要臓器を採取した。病理組織学的検討は常法に従って薄切標本を作成し、H.E.およびE.V.G.染色を施して観察した。

(実験-3) インスリン持続皮下注の動脈に与える影響の検討(動脈硬化誘導飼料の場合)

ミニブタ 12 頭を用いた。これをインスリン群 6 頭と対照群 6 頭に分けた。すべてのミニブタに 15%牛脂と 1.5%コレステロールを添加した飼料 500 g (約 2000 kcal) を 1 日 1 回給餌して食餌性の動脈硬化を誘発した。インスリン群にはブタインスリン 2.0 u/kg/day を、対照群には PBS を 24 時間持続注入した (13) (15)。持続注入は実験期間中 (6 カ月間) 継続した。

(実験-3) では経過中以下の実験を行った。

血圧測定 (fig. 2)

血圧の測定は、早朝給餌前安静時にミニブタをスリング上に懸架した状態で、尾根部にマンシェットを巻き尾動脈の拍動を、ダイナマップ TM1846SXP で測定した。測定は 1 頭あたり 1 回につき 5 回以上行いその平均値を測定値とした。

インスリン抵抗性測定

実験開始 3 カ月目と 6 カ月目に SSPG 法 (前述) により各ミニブタのインスリン感受性 (インスリン抵抗性) を測定した。

全身麻酔下における生検

実験開始3カ月目に気管挿管による全身麻酔下に左外腸骨動脈を生検した。Azaperon (三共) 4 mg/kg を筋注後、Pentbarubital Sodium (ダイナボット) を静注し気管内挿管を行った。全身麻酔の維持には isoflurane (ダイナボット) と笑気の混合ガスを使用した。左側腹部より腹膜外到達法で終末大動脈にいたり左外腸骨動脈を確認し、これを約 2 cm 採取した。術後感染予防として cephpirom sulfate (中外製薬) 0.5 g/day を 3 日間静注した。外腸骨動脈採取により同側の後肢に跛行や萎縮などの虚血症状は出現しなかった。

やはり 6 カ月目に全身麻酔下に放血屠殺後解剖し、動脈および主要臓器を採取した。採取した血管標本は 10% バッファーホルマリンで固定後オイルレッド-O で染色し内腔表面を観察した。また病理組織学的検討についても (実験-2) と同様に行い、さらに冠状動脈を免疫組織学的に平滑筋とマクロファージ・モノサイト系細胞を染め分けるため HHF35、RAM11 をそれぞれ使用した。

実験データは 1 群 3 頭より得られた場合その平均値で、1 群 6 頭より得られた場合 mean \pm SD (standard deviation) で表した。統計学的検定には、反復測定分散分析法、共分散分析法および t-検定法を用いた。p < 0.05 をもって有意差とした。

【結果】

実験期間中いずれのミニブタも感染症などの疾病や突然死を引き起こすことなく経過した。

(実験-1) インスリン投与法の検討

fig. 3 にインスリン皮下注時の IRI 値の変化を示す。0.5 u/kg 以上の皮下注で注射後 IRI 値の上昇が見られる。1.0u/kg 以上の投与ではピーク値に差はなくなる。注射後 4 時間以降は IRI 値は急速に低下し、6 時間でほぼコントロールと等しくなる。

インスリン持続皮下注時の場合 2.5 u/kg/day 以上となると低血糖発作で痙攣、昏倒を起こした。グルコース投与により速やかに回復したが、投与量の限界は 2.0 u/kg/day であった。fig. 4 に 2.0 u/kg/day の持続皮下注時の IRI 値とグルコース値の変化を示す。給餌後 2 時間まではコントロールの IRI 値の方が高値を示すが、それ以外ではインスリン群の方が安定して高インスリン血症を示した。逆にグルコース値はインスリン群の方が低値となる時間が長時間続いた。

(実験-2) インスリン持続皮下注の動脈に与える影響の検討 (通常飼料の場合)

実験 3 カ月目に測定した SSPG 値を fig. 5 に示す。SSPG 法では somatostatin により内因性のインスリンおよびグルカゴン分泌を抑制し、体

重あたり一定量のインスリンとグルコースを注入する。検査開始 90 分以降に血中グルコース値およびインスリン値が一定になるとされ、この時点での恒常血糖値 (SSPG) により糖代謝に対するインスリン感受性を評価するものである。Somatostatin 以外にはエピネフリンやプロプラノロールが用いられる。本実験では 120 分値でインスリン群 116.0mg/dl 、対照群 100.3mg/dl とほぼ等しい値を示した。

fig. 6 にインスリン群の、fig. 7 に対照群の冠状動脈の組織学的所見を示す。インスリン群の一部において初期のアテローム様の変化と考えられる部分が見られる。

(実験-3) インスリン持続皮下注の動脈に与える影響の検討 (動脈硬化誘発飼料の場合)

(1) 体重の変化 (fig. 8)

ミニブタの体重は、両群とも経日的に均等に増加した。実験開始時にインスリン群 $19.5 \pm 0.5\text{ kg}$ 、対照群 $19.4 \pm 0.4\text{ kg}$ であったが 6 カ月後にはそれぞれ $43.4 \pm 2.5\text{ kg}$ 、 $41.0 \pm 2.0\text{ kg}$ となった。両群間に有意差を認めなかった。

(2) 空腹時インスリン値の変化 (fig. 9)

実験開始時の空腹時インスリン値はインスリン群で $5.4 \sim 8.0$ (6.8 ± 1.7) $\mu\text{ u/ml}$ 、対照群では $6.0 \sim 18.3$ (9.8 ± 4.4) であった。対照群ではその後 $8.4 \pm 4.5 \sim 12.7 \pm 6.3$ $\mu\text{ u/ml}$ の間で推移したが、インスリン群はインスリン投与開始と同時に高値を示し $50.1 \pm 20.9 \sim 66.9 \pm 19.5$ $\mu\text{ u/ml}$ と対照群

と比較して高値を示し実験期間中維持された。

(3) 血中 IRI 値と血中グルコース値の日内変動 (fig. 10)

実験開始 6 週間目の血中 IRI 値の日内変動は、給餌後のインスリン分泌相で対照群がインスリン群より高値を示した ($113.7 \sim 125.3$ vs. $93.5 \sim 99.1 \mu\text{u/ml}$) が、それ以外はイ群が対照群より常に高値を示し高インスリン血症を維持した。 ($52.8 \sim 88.3$ vs. $9.7 \sim 29.3 \mu\text{u/ml}$)

血中グルコース値は IRI 値に対応を示した。すなわち、インスリン群では空腹時グルコース値はと対照群の $79.5 \pm 10.4 \text{ mg/dl}$ に比して低値を示したが給餌後 6 時間までは逆に高値を示した。給餌後 8 時間以後は、高インスリン血症を示すインスリン群では $42.5 \sim 68.7 \text{ mg/dl}$ と、対照群の $81.7 \sim 90.2 \text{ mg/dl}$ に比較して低値を示した。この傾向は実験開始 12、18、20 週間目でも同様に観察された。なお、実験期間中インスリン抗体の出現は両群において認めなかった。

(4) 血清脂質

4-a) 総コレステロール値 (fig. 11)

総コレステロール値は実験 4 日目より両群とも上昇し高値を示した。6 週間目にイ群は $996 \pm 72.5 \text{ mg/dl}$ に達し、対照群の $734 \pm 46.3 \text{ mg/dl}$ に比べて有意に高かった。この有意差は実験後半には縮小し有意差も消失したが、インスリン群で高値である傾向は実験期間中維持された。

4-b) トリグリセライド値 (fig. 12)

トリグリセライド値は実験開始時インスリン群で 35.4 ± 7.1 mg/dl、
対照群で 30.3 ± 6.8 mg/dl であった。実験開始後も両群ともこれと同様の値で
推移し、両群間に差異を認めなかった。

4-c) リポ蛋白分画 (fig. 13)

総コレステロールのリポ蛋白分画は実験開始後 10 週後に測定した。イ
ンスリン群では 対照群に比較して HDL (75.7 vs. 86.0 mg/dl) が低く、VLDL・カイロ
ミクロン (38.0 vs. 15.6 mg/dl) および LDL (629.1 vs. 407.3 mg/dl) が
高い傾向がみられたが有意ではなかった。また、LPL (lipoprotein lipase) 活
性値についても両群に有意差を認めなかった。

(5) 血中カテコラミン濃度・グルカゴン濃度 (fig. 14)

実験前、実験開始 3 カ月後、6 カ月後に測定した結果を図に示す。イン
スリン群においてアドレナリンとグルカゴンが実験経過とともに上昇する傾向
が見られたが、対照群との間にはいずれも有意差を認めなかった。

(6) インスリン感受性 (インスリン抵抗性) (fig. 15)

本実験においては、実験開始 3 カ月後と 6 カ月後に SSPG の測定を行
った。いずれの測定においても、90 分までは血糖値の変動が見られたがそれ以
降は安定した値を示した。変動はインスリン群に比べて対照群でより顕著であ
った。120 分後の SSPG 値は、3 カ月後のインスリン群で 117.7 ± 20.3 mg/dl、
対照群で 134.7 ± 12.7 mg/dl、6 カ月後ではそれぞれ 96.7 ± 12.5 mg/dl、
 100.3 ± 16.5 mg/dl といずれも有意差はなく、インスリン群の方がわずかに低
値を示した。この結果は、本実験系においてはインスリンを長期に投与しても

少なくとも対照群以上のインスリン抵抗性が生じなかったことを意味した。

(7) 血圧 (fig. 16)

収縮期血圧の変化を示す。実験開始時にインスリン群 122.6 ± 16.5 mmHg に対し対照群 121.0 ± 11.1 mmHg であった。しかし、以後いずれの測定においてもインスリン群は対照群に比べ低値を示した。実験開始 5 カ月後に測定したデータはインスリン群 121.8 ± 4.2 mmHg、対照群 140.5 ± 7.3 mmHg であった。この一連の測定は群間に有意差を認めた。疫学的には一般に高インスリン血症群に高血圧が認められるとされているが、本実験はこれと反対の結果を示した。

(8) 生検標本 (fig. 17)

3 カ月後の生検で得られた外腸骨動脈の組織学的所見 (H.E.染色) を示す。インスリン群では泡沫細胞の集簇による著明な内膜肥厚と内弾性板に沿った石灰化を認めたが、対照群では病理組織学的な変化を認めなかった。

(9) 解剖標本

6 カ月後の解剖標本で主要な動脈に以下に示す変化が肉眼的に認められた。すなわち、インスリン群の胸部大動脈でほぼ全面にわたる著明な脂肪線条の形成を認めたが、対照群では肋間動脈の分岐部に弱い脂肪線条を形成するのみであった (fig. 18、上：インスリン群、下：対照群)。また、オイルレッド-O 染色ではインスリン群に強い脂肪沈着を認めた (fig. 19、同)。インスリン群の腹部大動脈～終末大動脈では著明な粥腫の形成とこれによる内腔の狭窄

を認めたが、対照群では粥腫の形成がなく、わずかに脂肪線条を認めたのみであった (fig. 20、同)。インスリン群の冠状動脈には高度の狭窄を認めたが対照群では狭窄がなかった。

病理組織学的には対照群の各動脈は軽度の内膜肥厚を認めるのみであったがインスリン群では石灰化を伴う強い内膜肥厚を認め、動脈硬化は生検時の所見より著明に進行していた。特に、冠状動脈においてこの差は顕著で、対照群では中間型 plaque による軽度の内膜肥厚が中心であるのに対し、インスリン群では極めて厚い繊維性 plaque を認めるものや、lipid-rich plaque を認めるもの、また ruptured plaque のような complicated plaque も認められ、内腔の狭窄をきたすものも見られた (fig. 21 : インスリン群、fig. 22 : 対照群)。両群においてこの血管断面における I/M 比を比較したのが fig. 23 であるが、対照群の 0.15 ± 0.06 に対し、インスリン群は 1.56 ± 1.11 と明らかな有意差を認めた。またこの冠状動脈の組織標本を免疫組織学的に平滑筋とマクロファージ・モノサイト系細胞を染め分けた図を示す (fig. 24、HHF35 にて平滑筋を、RAM11 にてマクロファージ・モノサイト系細胞を染色した)。今回発症したアテロームはその大部分が脂肪を多量に含むマクロファージ・モノサイト系細胞により形成されていることが示唆された。この染色に用いた抗体は抗ブタ抗体ではなくそれぞれ抗ヒト、抗ラット抗体であるため断定はできないが、本実験で生じた動脈硬化巣の組成を示唆するには十分である。

肝臓・膵臓・腎臓・網膜などの主要な臓器も組織学的に検索したが、両群ともに microangiopathy などの糖尿病性変化をはじめとして、病的な変化を認めなかった。

【考察】

(1) 実験モデルについての考察

1-a) 実験動物の選択

ブタは解剖学的にも生理学的にもヒトによく類似した面を持つ実験動物として古くから種々の研究分野で利用されてきた。しかし、その大きな体型と性質から各種の実験を行う上で困難を伴うことが多かった。ミニブタはこのような問題点を解決するため、ブタ本来の性質を失わずに小型化された実験動物として多くの系統が開発された。今回使用した Gottingen 系のミニブタはその中でも最も小さい部類に属する。

血管系、特に動脈についてもミニブタでは、走行、分岐、組織学的構築（弾性型動脈と筋型動脈）の分布状態などにおいてヒトに比較的近いとされている。また、加齢により動脈硬化が自然発症し、コレステロール負荷によりこれが加速されること、また弾性型動脈に Fatty streak が好発し、筋型動脈には Fibrous plaque が生じやすい点などもヒトに類似している。

このような点から、動脈硬化の発生実験に用いる実験動物としての利点は大きいと考えられるが、大動物であることに変わりはなく実験スペース、飼料などの維持費の面で大きな負担を強いられる。

ところが、今回の実験ではこのミニブタの大きさが以下の点で非常に大きな利点になった。すなわち、

- 1) 微量注入ポンプを使用するのに適切な体格であったこと。
- 2) 中心静脈にカテーテルを留置することが可能で、これを採血や抗生剤の静脈内投与、SSPG 法におけるインスリン等の静脈内注入などに利用できたこと。特に採血は無侵襲下に実施できたため、カテコラミン測定などでは非常に有効で

あった。

3) 多量の採血が可能で、各種データの測定が可能であったこと。

これに加えて投与するインスリンに関して、現在では精製されたブタインスリンが入手可能であり、これを使用することで抗インスリン抗体を生成させることなく長期的な実験が可能であった。

以上のように、ミニブタを実験動物として選択したことは今回の実験において不可欠な要素であった。

1-b) 高インスリン血症モデルとしての妥当性

これまでに行われてきたインスリンを動物に投与する実験の多くは以下の問題点を持つ。

(i) 異種インスリン投与の問題

(ii) 投与方法の問題

今回の実験のように長期にわたり安定した高インスリン血症状態を維持するためにはこれらの問題点を解決する必要があった。

(i)に関しては前述のごとくブタインスリンを使用することで解決可能であった。

(ii)については多くの実験がインスリンを筋注、または皮下注している(23)。

我々も(実験-1)においてこれを試み経時的にインスリン濃度を測定した。その結果、2.0 u/kg を皮下注した場合、1 時間後に 214.5 μ u/ml まで上昇するが、その後急速に下降した。50 μ u/ml 以上の高インスリン濃度を維持できるのは 4 時間が限度であり、6 時間後には皮下注前値に復していた。そこで、持続注入ポンプを使用する方法を採用し、fig. 4、fig. 10に見られるようなより持続的で安定した高インスリン血症状態を実現することができた。給餌後のイ

ンスリン分泌相において対照群の方が高インスリン血症を示したが、これは持続的な外因性インスリンの投与が内因性インスリンの分泌を抑制したためと考えられた。持続注入ポンプのかわりに、浸透圧ポンプを使用した報告も見られたが、持続的な使用は10日から2週間が限度で、我々の方法のように6カ月（あるいはそれ以上）もの長期間安定した高いレベルの高インスリン血症状態を維持させる方法は見あたらない。この（実験-1）によって、インスリンの投与方法が確立したおかげで、これに続く（実験-2）（実験-3）が可能となった。（実験-2）ではインスリンを長期的に投与し、ブタ個体のインスリン感受性に差が生じるかどうかを検討した。（実験-1）ではインスリンの高値に対応して血糖値が低下した。インスリンに対する感受性が低下していないことを示唆していたが、これを（実験-2）のSSPG法で確認できた。すなわち今回のモデルはインスリン抵抗性のない高インスリン血症モデルということができ、本研究の第一の目的を達成したことになる。このモデルは、高インスリン血症におけるインスリンの過剰作用の再現に適当であると考えられる。

（2）インスリン持続皮下注が全身の様々な因子に与える影響について

2-a) 内分泌作用に与える影響

外因性のインスリンを投与することで生体内の様々な因子に影響を及ぼすことが考えられた。まず、インスリンの growth factor 様の作用に注目して体重の変化を追跡したが、両群に差は生じなかった。また、インスリン拮抗ホルモンとしてグルカゴンとカテコラミン3種を測定した。その結果、グルカゴンとアドレナリンがインスリン投与によって上昇する傾向を示したが、やはり両群に有意差は生じなかった。長期にわたる微量注入がこれらに与える影

響を最小限にとどめたと考えられるが、検討症例数が各群 6 例と少数であるためなお検討を要すると考えられた。

2-b) 血圧に与える影響

動脈硬化の危険因子という点で高インスリン血症と高血圧は同一の個体に存在することがしばしばであり、高インスリン血症による血圧上昇の仮説がいくつも提唱された。すなわち、インスリンによる尿中 Na の再吸収亢進、血中カテコラミンの増加、陽イオン交換ポンプの活性化による細胞内 Na、Ca 濃度の上昇が血管収縮反応を増強させる、などであるがいずれも決定打に欠けた。実験的には、ラットに対するインスリンの投与は血圧を上昇させるとした報告をいくつか認めるが犬に投与した場合は認めないと言う報告がある。ところが、最近になってインスリン抵抗性の概念が確立されるに従い、逆の解釈も試みられるようになった。インスリンそのものの血管拡張作用や交感神経抑制作用に注目し、インスリンの作用不全こそが高血圧をもたらすとする解釈である。われわれの実験結果はこの様に解釈すれば一応説明はできる。インスリンのように multi-functional なホルモンの作用は様々な解釈が可能であり、時として全く逆の仮説が定着することもあり得る。これは、インスリン抵抗性という概念を導入した以上、これと因果関係のある現象一つ一つについてその原因がインスリンの作用不足にあるのか、それとも代償性に増加したインスリンの過剰作用によるものなのかを再検証する必要があるということの意味する。今回の高インスリン血症状態で血圧が低下するという結果については、この実験はインスリンの持続投与方法に新しい試みを行ったため、比較検討の材料に乏しい。今後同様な追試が行われ、いかなる評価を受けるのかを待ちたい。

2-c) 脂質代謝に与える影響

インスリン抵抗性症候群における脂質代謝異常については以下のよう
に、多くの現象が観察されている。

高インスリン血症が肝臓での VLDL-TG の合成を促進し、高 TG 血症を惹起するといわれる。また、末梢組織では、LPL 活性が抑制されており、VLDL の除去が低下することも VLDL 上昇の一因と考えられている。さらに、肝臓の HMG-CoA reductase 活性の亢進を介してのコレステロール生合成の増加および VLDL から LDL への代謝亢進などが総コレステロール値、LDL-コレステロール値の増加をもたらすとされている。一方、インスリン作用不全の点からは、小腸アシル-CoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) 活性が亢進し食餌性脂肪、コレステロールの吸収が増加し、血漿カイロミクロン濃度が上昇するとされている。LDL レセプター活性低下による LDL の上昇も考えられている。これらの高脂血症は、逆にインスリン抵抗性を増悪させ悪循環を形成するという。家族性高コレステロール血漿のモデル動物である WHHL 家兎では空腹時インスリン値が高くグルコース静脈投与に対するインスリン反応は高反応であった。しかし、いずれの報告も高コレステロール血症よりも高 TG 血症が強調されており、高コレステロール血症が進行し TG に有意差を認めなかった我々の実験結果とは一致しない (24-26)。この点については、インスリンの投与方法、高インスリン血症の持続時間、食餌性のコレステロール負荷など多くの因子が関与することで結果に相違が生じたものと考ええる。我々としても引き続き、本モデルにおいて脂質代謝異常 (高コレステロール血症) の原因を究明していく必要があると考えている (27-29)。

(3) インスリンの動脈硬化に与える影響について

(実験-2)においてインスリン群の冠状動脈にわずかではあるが初期のアテローム様変化を認めた。これにより、インスリンの直接作用として、動脈硬化が発生した可能性が高くなった。今回使用したミニブタは、高脂肪、高コレステロール食により動脈硬化を誘発することが知られている。そこで、これを利用してインスリンの動脈硬化惹起性を一層明らかにする目的で(実験-3)を行った。結果は予測通りとなった。インスリン群では実験開始3カ月目の外腸骨動脈生検においてすでに、肉眼的には脂肪線条を、組織学的には内膜肥厚と石灰化を認めている。この外腸骨動脈の変化は更に3カ月後の解剖時には著明に進行し、粥腫を形成し内腔の狭窄をきたすに至った。ところが胸部大動脈では強いコレステロール沈着と内腔一面の脂肪線条は認めたが粥腫の形成はなく部位によって動脈硬化巣の形成され易さに違いがある可能性が示唆された。この差異の原因としては今後動脈の組織学的構築(弾性型動脈と筋型動脈)の違いを検討する必要があると考えている。中でも筋型動脈である冠状動脈における動脈硬化巣の形成は著明で、強い内腔の狭窄をきたすもの、内弾性板などの血管構築を破壊するものまで見られた。冠状動脈であるだけに虚血性心疾患発症の危険性が高かったと思われる(30-33)。このように、今回の実験モデルはインスリン抵抗性のない高インスリン血症の再現という点では成功した。そしてこのモデルにおいて動脈硬化進行したことより、インスリンがその過剰作用として動脈硬化巣の形成を促進することが強く示唆された(34-35)。しかし、インスリンは multifunctional なホルモンであるがために間接的な影響も多く、これらをすべてを除外することは非常に困難である。今回の実験で

言えばまず、血糖の低下があげられる。そして、先に述べたように血中カテコラミン濃度についてもまだ結論が得られていない。これらが、動脈硬化の形成に影響を与えていることも否定できない。この点については今後の研究に待たねばならず、今回はインスリンの直接作用が動脈硬化を促進する可能性を強く示唆するにとどまらざるを得ない。

(4) 本実験の問題点

4-a) 高脂肪、高コレステロール飼料の投与

(実験-3)は動脈硬化誘発のため高脂肪、高コレステロール飼料を投与しており、高コレステロール血症状態をを意図的に作成した上で行われた。そのため今回観察された結果が、(極端な)高コレステロール血症状態においてのみ発現されうる可能性は当然考慮せねばならない。しかし、(実験-2)で示された結果と合わせることでインスリンが高コレステロール血症状態に依存せず単独で動脈硬化を促進させるという今回の結論は十分導くことが可能である。

4-b) 外因性インスリンと内因性インスリンの問題

前述のように本実験では外因性インスリンの影響しか評価できない。内因性インスリンの分泌能は逆に抑制されていると考えられる。インスリン抵抗性を示す個体における高インスリン血症は内因性インスリンによるものであるから、今回の実験がこの状態を正確に再現していないと言う反論は当然起こり得る。内因性インスリンによる高インスリン血症については阿部らのラットにおける移植モデルが知られている。内因性インスリンと外因性インスリンの違いがどのような影響を及ぼすかについては今回は検討していない。

(5) 総括

本実験は動脈硬化におけるインスリン仮説、すなわちインスリンに直接的な動脈硬化惹起性があるとする仮定に基づき実施された。このインスリン仮説は Helsinki study, Paris study, Busselton study などの疫学的研究をもとに提唱されている。さらに、アロキサンによって作成された糖尿病動物モデルをインスリンで治療した場合に動脈硬化が発症したという実験結果この仮説を支持した。しかし、これらの説はインスリン抵抗性という概念が導入される以前に生まれている。一方、インスリンノーマ患者で動脈硬化の進展がなかったとする報告がインスリン仮説を否定するデータとして取り上げられており、状況は混沌としている。この問題を解決するキーワードとして「インスリン抵抗性の組織選択性」を考えたい。すなわち、組織別、臓器別にインスリンの感受性が異なり、感受性を示す組織、臓器と抵抗性を示す組織、臓器が一個体に共存するという状態である。前述した脂質代謝に及ぼすインスリンの影響の考察において、肝での VLDL-TG 合成はインスリン感受性が高くなることで、小腸での脂質吸収はインスリン抵抗性が強くなることで促進されるという両面からの解釈を必要とした。今後このような両面からの評価はインスリン抵抗性に関わるあらゆる現象について検討されねばならない。その結果、本実験で示したインスリンの直接作用による血圧低下というような現象を矛盾なく説明できるようにする。

本実験においてはインスリンが動脈硬化を促進する機序は高コレステロールを介する可能性が示唆されたのみであり、今後の研究の課題となる。一つの手がかりとして、冠状動脈のアテロームはその大部分が脂肪を多量に含む

マクロファージ・モノサイト系細胞により形成されていることが示唆された。
今後このリンパ球・マクロファージ系細胞の機能という点からも研究を進める
必要を認めている。

インスリンはインスリン受容体後その分岐した細胞内情報伝達経路を
経て糖代謝以外にも多くの作用を持つため、いずれの細胞内情報伝達経路が動
脈硬化促進と関連するかを解明することが必要である。同時に、糖尿病のイン
スリン治療に関しては、糖代謝異常補正のためのインスリン注射が、他方では
動脈硬化のリスクを増大している可能性もあるため、インスリン投与量をより
厳密にコントロールする必要性も検討されねばならない。

【結語】

1) ミニブタにインスリンを持続皮下注することによりインスリン抵抗性を有しない高インスリン血症動物モデルを作成した。

2) インスリン抵抗性における動脈硬化は、インスリンの作用不全ではなく、インスリンの直接的な作用で引き起こされることが示唆された。

3) インスリン抵抗性に関与するその他の諸病態についてもインスリン作用の両面から検討しなければならない。

4) 本モデルはインスリン抵抗性に関連する病態の解明に有用である。

【参考文献】

1. Ducimetiere, P., E. Eschwege, L. Papoz, J. L. Richard, J. R. Claude, G. Rosselin. 1980. Relationship of plasma insulin levels to the incidence of myocardial infarction and coronary heart disease mortality in a middle-aged population. *Diabetologia* 19:205-210.
2. Tzagournis, M., R. Chilles, J. M. Ryan, T. G. Skillman. 1968. Interrelationship of hyperinsulinism and hypertriglyceridemia in young patients with coronary heart disease. *Circulation* 38:1156-1163.
3. Bao, W., S. R. Srinivasan, G. S. Berenson. 1996. Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. *Circulation* 93:54-59.
4. Stout, R. W. 1969. Insulin and atheroma. *Lancet* 7605:1078-1080.
5. Santen, R. J., P. W. Willis III, S. S. Fajans, A. A. Mich. 1972. Atherosclerosis in Diabetes Mellitus. *Arch. Intern. Med.* 130:833-843.
6. Pyörälä, K. 1979. Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: Results from two population studies in Finland. *Diabetes Care.* 2 (2):131-141.
7. Welborn, T. A., K. Wearne. 1979. Coronary heart disease incidence and cardiovascular mortality in Busseton with reference to glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care.* 2 (2):154-160.
8. Perry, I. J., S. G. Wannamethee, P. H. Whincup. 1996. Serum insulin and incident coronary heart disease in middle-aged British men. *Am J*

Epidemiol. 144(3):224-234.

9. Despres, J. P., B. Lamarche, P. Mauriege. 1996. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *New Eng J Med.* 334:952-957.

10. Reaven, G. M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607.

11. Kaplan, N. N. 1989. The deadly quartet. *Arch. Intern. Med.* 49:1514-1520.

12. Moller, D. E., J. S. Flier. 1991. Insulin resistance. *New Eng. J. Med.* 325:938-948.

13. Tanigawa, M., I. Akaike, J. Adachi. 1986. Gottingen miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Exp. Anim.* 35: 47-57.

14. Weingand, K. W. 1989. A model of postprandial hyperinsulinemia in miniature swine. *Lab. Anim. Sci.* 39:394-399.

15. Tanigawa, M., J. Adachi, K. Mochizuki. 1986. Histological study on the arterial wall of Gottingen miniature swine. *Exp. Anim.* 35:35-45.

16. Yalow, R. S., S. A. Berson. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39:1157-1175.

17. Okubo, A., S. Kamei, M. Ymanaka, F. Arai, M. Kitajima, A. Kondo. 1981. Plasma glucose concentrations of whole blood, as determined with a multilayer-Film analytical element. *Clin Chem* 27:1287-1290.

18. Charles, C., L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, P. C. Fu. 1974. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. chem.* 20:470-475.

19. Bucolo, G., H. David. 1973. Quantative determination of serum tryglycerides by the use of enzymes. Clin. Chem. 19:476-479.
20. Kostner, G., R. Paoletti. 1991. Laboratory Procedure. Am. J. Cardiol. 68:26A-29A
21. Reitman, J., R. W. Mahley. 1979. Changes induced in the lipoproteins of Yucatan miniature swine cholesterol feeding. Biochem. Biophys. Acta 575:446-457.
22. Harano, Y., H. Hidaka, K. Takatsuki. 1978. Glucose, insulin, and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity in vivo. Metabolism. 27(Suppl):1449-1452.
23. Stout. R. W. 1990. Insulin and atheroma. Diabetes Care. 13:631-654
24. Steiner, G., M. Vranic. 1982. Hyperinsulinemia and hypertruglyceridemia, a vicious cycle with atherogenic potential. International Journal of Obesity 6 Suppl. 1:117-124.
25. Olefsky, J. M., J. W. Farquhar, G. M. Reaven. 1974. Reappraisal of the role of insulin in hypertriglyceridemia Am. J. Med. 57:551-560.
26. Reaven. G. M., M. S. Greenfield. 1981. Diabetic hypertriglyceridemia. Diabetes 30:66-75
27. Tominaga, M. 1995. Risk factor : Diabetes mellitus Jpn. J. Clin. Pathol 43:111-116.
28. The DCCT Research Group. 1993 The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long- term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. New Eng. J. Med. 329:977-986.

29. Krolewski, A. S., J. H. Warram. 1994. Epidemiology of late complications of diabetes. In: Joslin's Diabetes Mellitus. 13th ed. Lea & Febiger, Pennsylvania. 605-619
30. Chait, A., E. L. Bierman. 1994. Pathogenesis of macrovascular disease in diabetes. In: Joslin's Diabetes Mellitus. 13th ed. Lea & Febiger, Pennsylvania. 648-664.
31. Sasaki, A., K. Kamado, N. Horiuchi. 1976. A changing pattern of causes of death in Japanese diabetes. J. Jpn. Diab. Soc. 19:692-703
32. Langberg, R. 1971. Diabetes mellitus mortality in the united states 1950-67. In: Public Health Service Publication No.1000, Series 20, No.10. US Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. 1-41.
33. Harris, M. I., P. S. Entmacher. 1985. Mortality from diabetes. In: Diabetes in America August. National Diabetes Data Group. US Dept of Health and Human services, Public Health Service National Institute of Health, NIH publication 85-1468. ppXXIX1-48.
34. Bao, W., S. R. Srinivasan, G.S. Berenson. 1996. Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. The Bogalusa heart study. Circulation 93:54-59.
35. Zavaroni, I., E. Bonora, M. Pagliara. 1989. Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. New Eng. J. Med. 320:702-706.

【図の説明】

- (fig. 1) 持続皮下注によるインスリンの投与方法
- (fig. 2) 血圧測定方法
- (fig. 3) インスリン皮下注時の血中インスリン濃度
- (fig. 4) インスリン持続皮下注時の血中インスリン濃度とグルコース濃度（普通飼料の場合）
- (fig. 5) 通常飼料を投与した場合の SSPG (Steady State Plasma Glucose) 値
- (fig. 6) 冠状動脈の組織学的所見（通常飼料・インスリン群）
- (fig. 7) 冠状動脈の組織学的所見（通常飼料・対照群）
- (fig. 8) 体重の変化
- (fig. 9) 空腹時インスリン値の変化。
- (fig. 10) インスリン持続皮下注時の血中インスリン濃度とグルコース濃度（動脈硬化誘発飼料の場合）
- (fig. 11) 空腹時総コレステロール値の変化
- (fig. 12) 空腹時トリグリセライド値の変化
- (fig. 13) 総コレステロールのリポ蛋白分画
- (fig. 14) 血中カテコラミン濃度・グルカゴン濃度
- (fig. 15) 動脈硬化誘発飼料を投与した場合の SSPG 値
- (fig. 16) 収縮期血圧の変化
- (fig. 17) 外腸骨動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・生検標本・H.E.染色）。

- (fig. 18) 胸部大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖標本）
- (fig. 19) 胸部大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖標本・オイル
レッド-O 染色）
- (fig. 20) 腹部大動脈～終末大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖
標本）
- (fig. 21) 冠状動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・インスリン群・解
剖標本・EVG.染色）
- (fig. 22) 冠状動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・対照群・解剖標本・
EVG.染色）
- (fig. 23) I / M 比の比較。両群に有意差を認めた
- (fig. 24) 冠状動脈の免疫組織学的染色

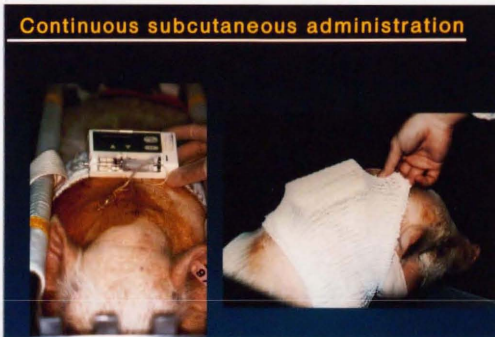


fig. 1 持続皮下注によるインスリンの投与方法

微量注入ポンプ（ニプロ SP-3HQ）と専用のシリンジおよびチューブを用いた。チューブの先端に23G針をセットし、背部の皮下に刺入した。注入ポンプ本体は衝撃や水分から保護するため防水性の緩衝剤で包み、医療用ネットで背部に固定した。

血圧測定法

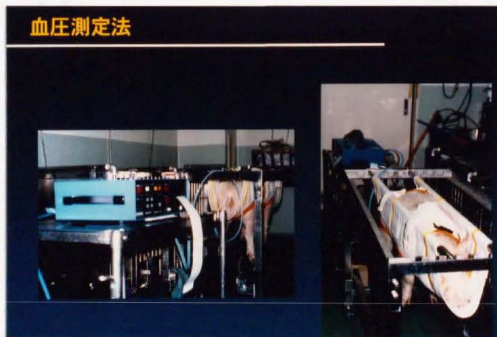


fig. 2 血圧測定方法

ミニプタをスリング上に懸架した状態で、尾根部にマンシェットを巻き尾動脈の拍動を、ダイナマップTM1846SXPで測定した。

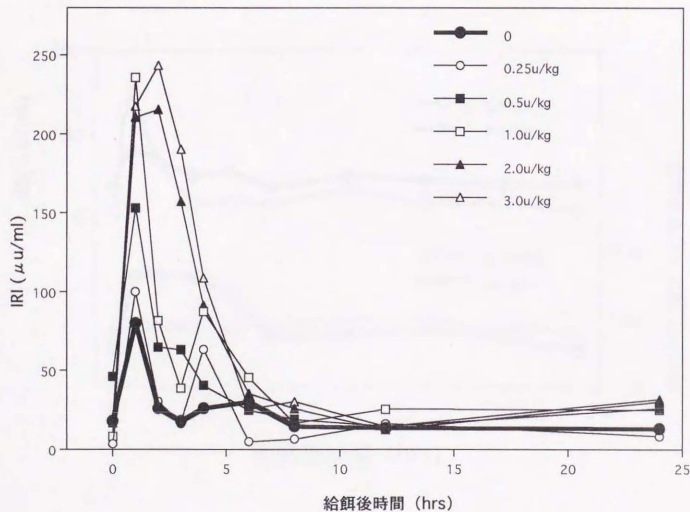


fig.3 インスリン皮下注時の血中インスリン濃度

インスリンを皮下注 (oneshot) した場合の血中インスリン濃度の経時的変化を示す。0.5u/kg以上の皮下注で注射後IRI値の上昇が見られる。注射後4時間以降はIRI値は急速に低下し、6時間でほぼコントロールと等しくなる。(n = 3)

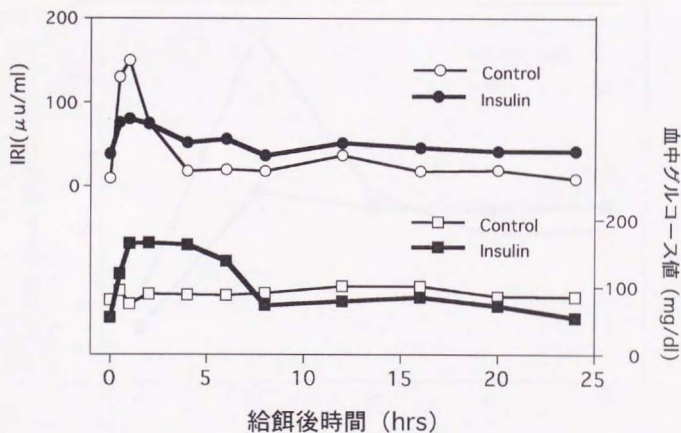


fig.4 インスリン持続皮下注時の血中インスリン濃度とグルコース濃度
(普通飼料の場合)

2.0 u/kg/dayの持続皮下注時のIRI値とグルコース値の変化を示す。(各群 n = 3 による検討のため、平均値のみで表示した。)

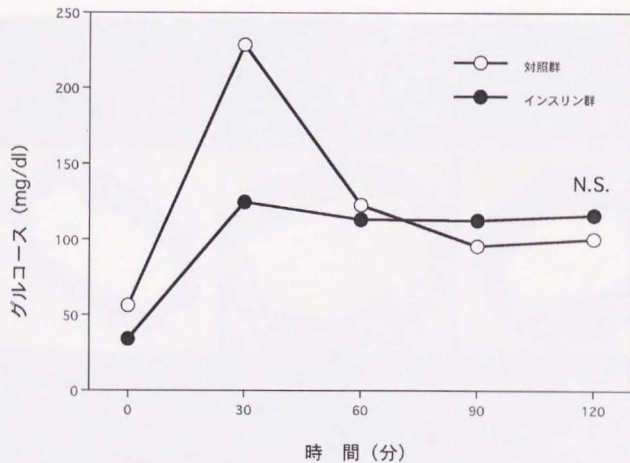


fig.5 通常飼料を投与した場合のSSPG (Steady State Plasma Glucose) 値
各群 $n = 3$ 。120分値 (SSPG値) では有意差を認めなかった。

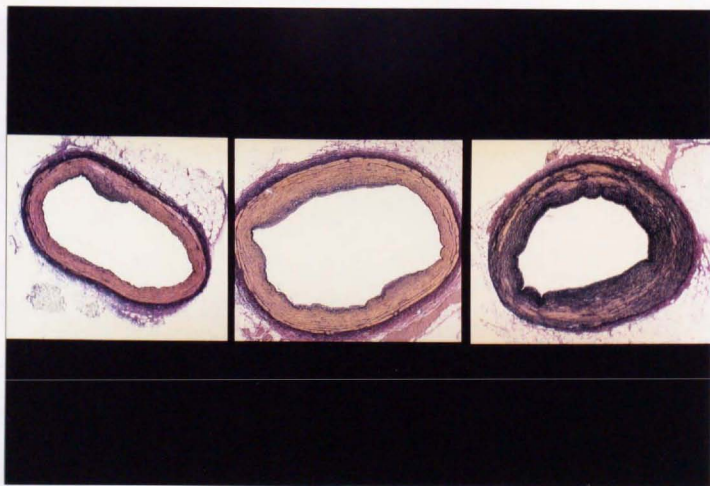


fig. 6 冠状動脈の組織学的所見（通常飼料・インスリン群）

一部に初期のアテローム様の変化と考えられる部分が見られる。

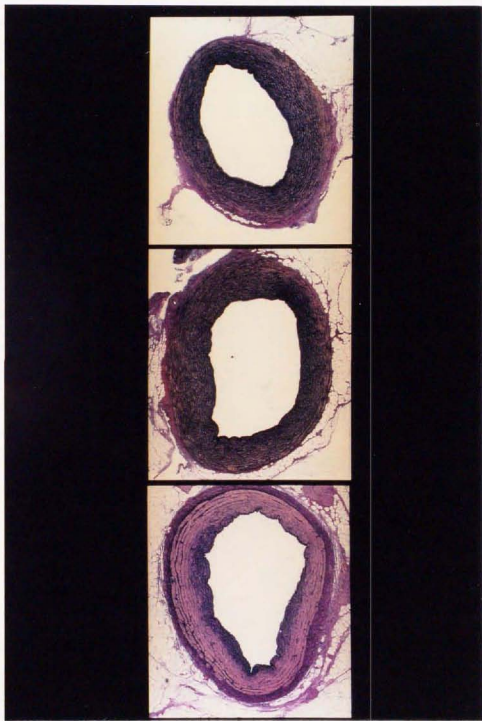


fig. 7 冠状動脈の組織学的所見（通常飼料・対照群）

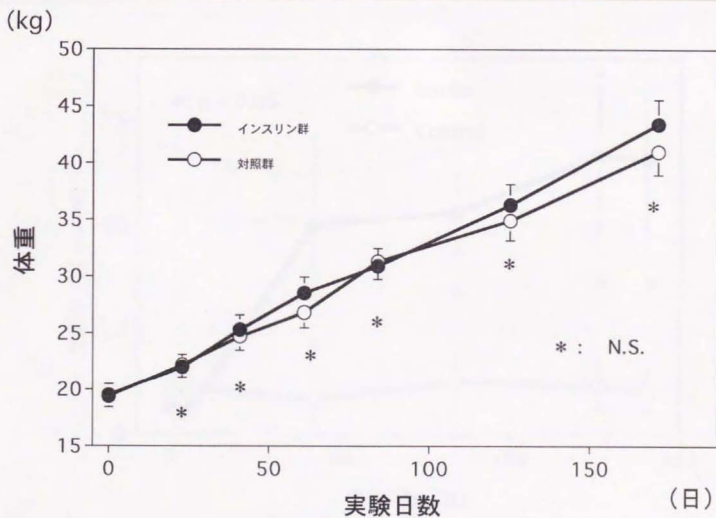


fig. 8 体重の変化

各群 $n = 6$ 。両群とも経日的に均等に増加した。6カ月後にはインスリン群 43.4 ± 2.5 kg、対照群 41.0 ± 2.0 kg となった。いずれの測定点においても両群間に有意差を認めなかった。

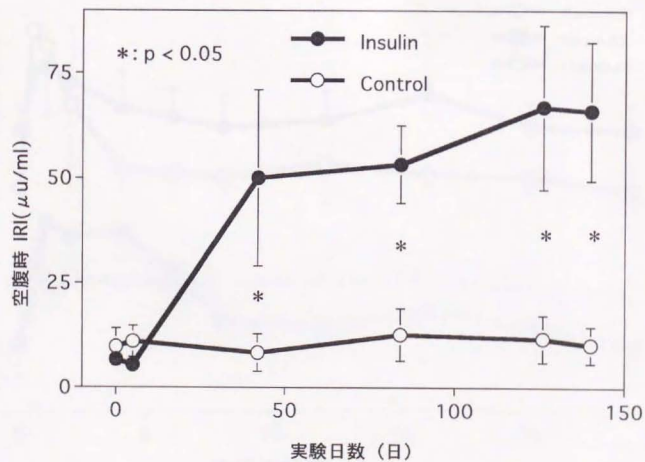


Fig. 9 空腹時インスリン値の変化

各群 $n = 6$ 。インスリン群では実験期間中空腹時インスリン値の高値が維持された。

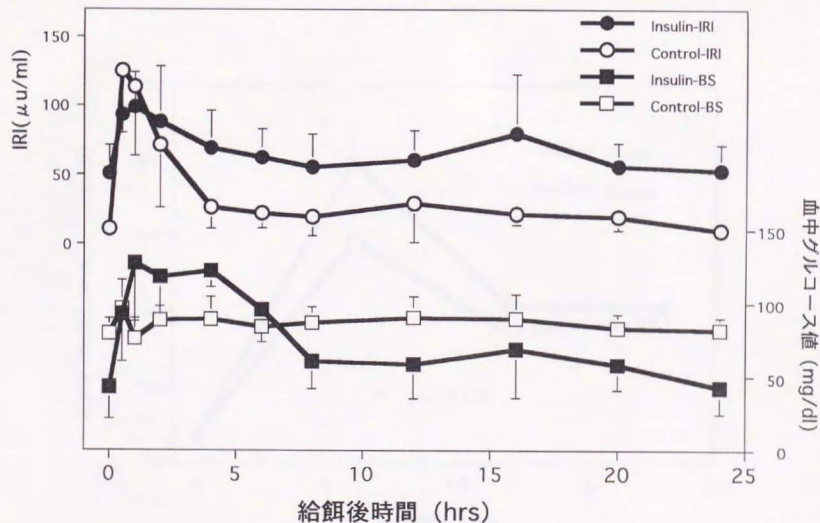


Fig. 10 インスリン持続皮下注時の血中インスリン濃度とグルコース濃度
(動脈硬化誘発飼料の場合)

実験開始6週間目に測定。各群 $n=6$ 。インスリン群において高インスリン血症を示し、グルコース値が低下している。この傾向は実験開始12、18、20週間目でも同様に観察された。

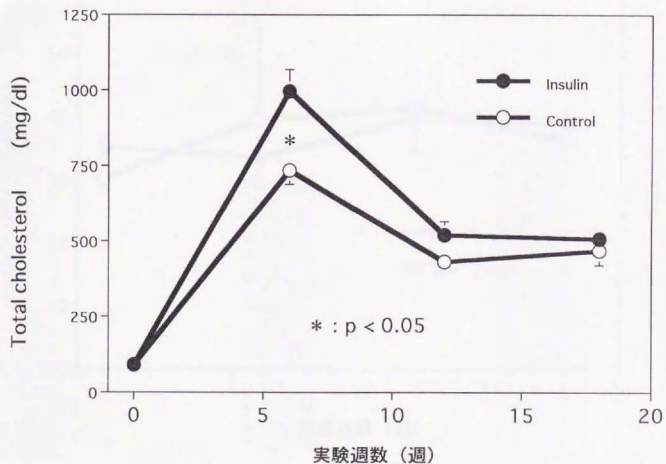


Fig. 11 空腹時総コレステロール値の変化

各群 $n = 6$ 。総コレステロール値は実験4日目より両群とも上昇し高値を示した。インスリン群で高値である傾向は実験期間中維持された。

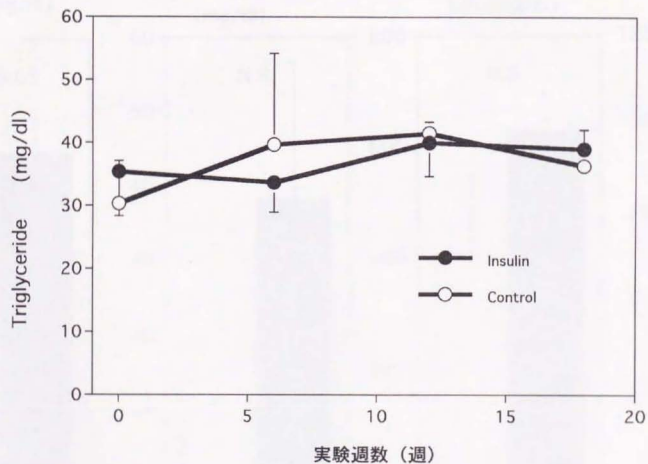


Fig. 12 空腹時トリグリセライド値の変化

各群 $n = 6$ 。両群間に有意差を認めなかった。

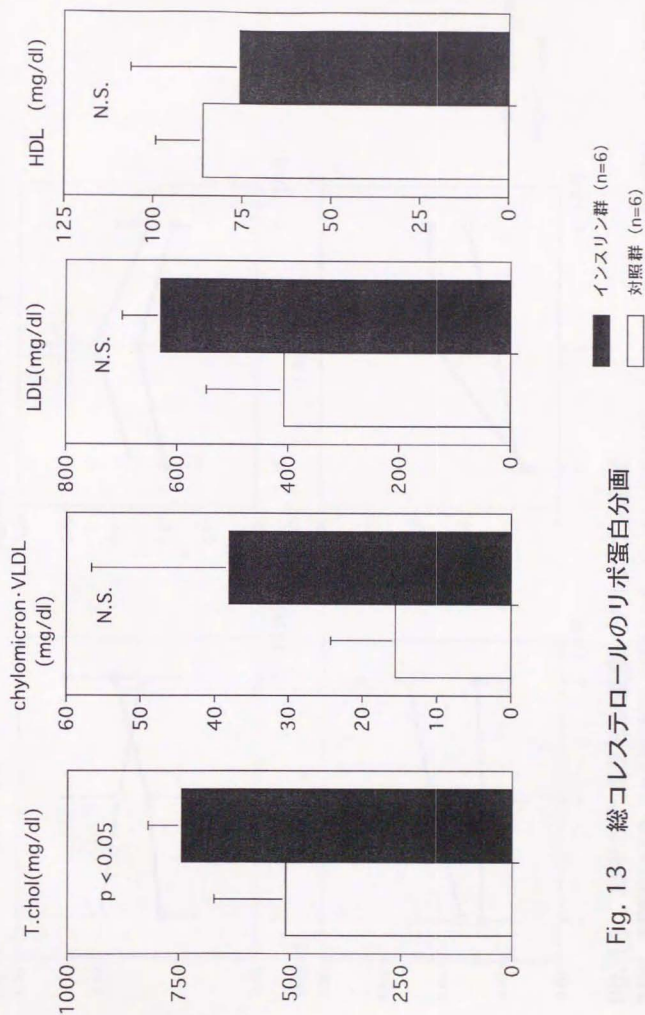


Fig. 13 総コレステロールのリポ蛋白分画

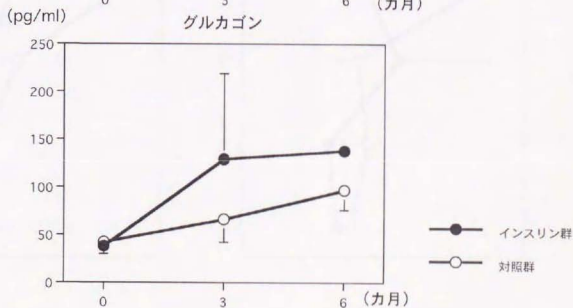
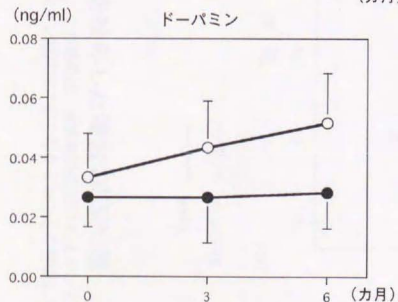
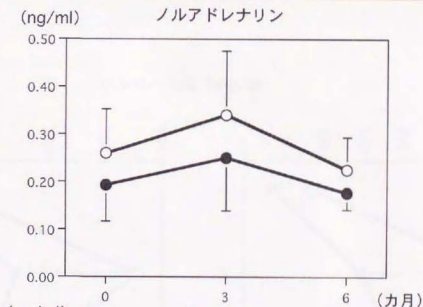
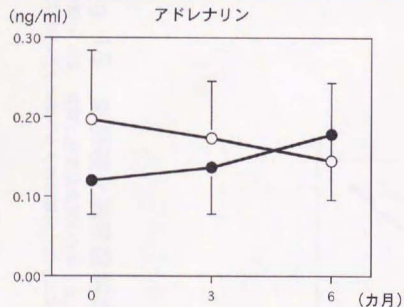


fig. 14 血中カテコラミン濃度・グルカゴン濃度

実験前、実験開始3カ月後、6カ月後に測定した結果を示す。インスリン群においてアドレナリンとグルカゴンが実験経過とともに上昇する傾向が見られたが、いずれも有意差を認めなかった。

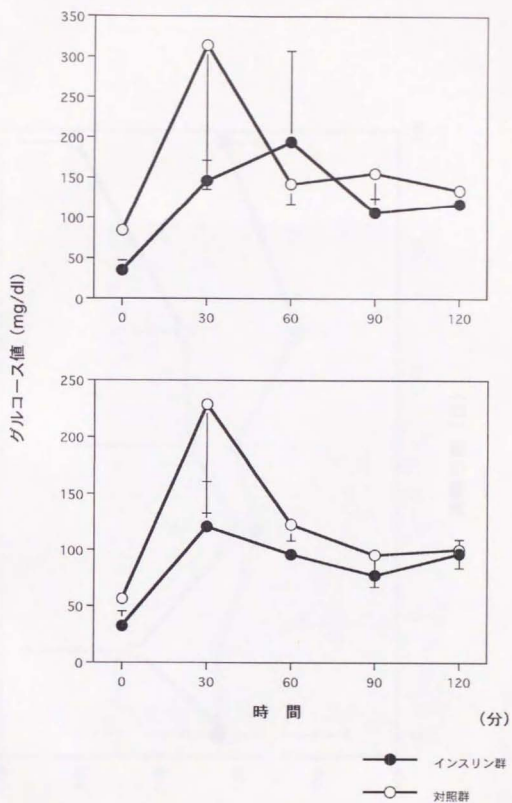


fig. 15 動脈硬化誘発飼料を投与した場合のSSPG値

各群 $n = 6$ 。両群に有意差を認めなかった。この結果は、本実験系においてはインスリンを長期に投与しても少なくとも対照群以上のインスリン抵抗性が生じなかったことを意味した。

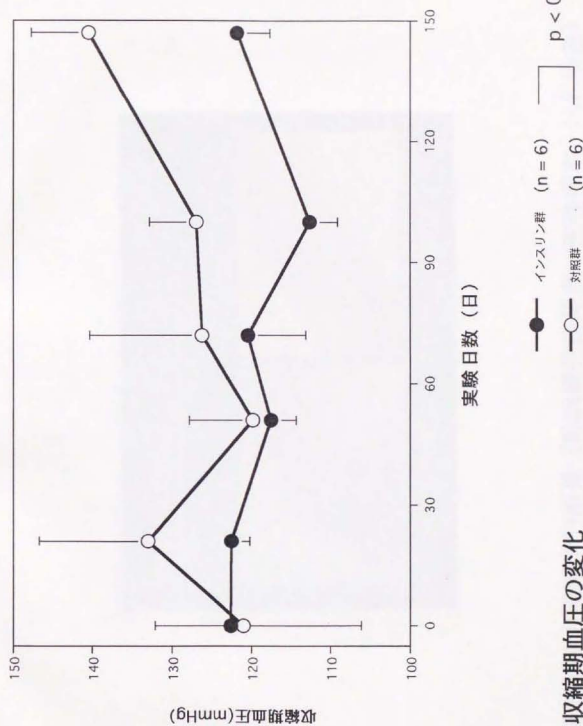
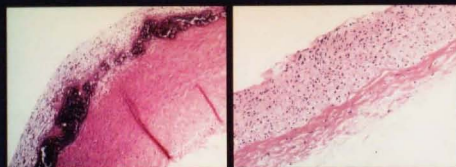


fig. 16 収縮期血圧の変化

生検標本の比較



インスリン群

対照群

fig. 17 外腸骨動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・生検標本・H.E.染色）

3カ月後の生検で採取。インスリン群では泡沫細胞の集簇による著明な内膜肥厚と内弾性板に沿った石灰化を認めたが、対照群では病理組織学的な変化を認めなかった。



fig. 18 胸部大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖標本）

6 カ月後の解剖標本。インスリン群の胸部大動脈でほぼ全面にわたる著明な脂肪線条の形成を認めたが、対照群では肋間動脈の分岐部に弱い脂肪線条を形成するのみであった（上：インスリン群、下：対照群）。



fig. 19 胸部大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖標本・オイルレッド-O染色）

6 カ月後の解剖標本。インスリン群に強い脂肪沈着を認めた。（上：インスリン群、下：対照群）



fig. 20 腹部大動脈～終末大動脈の肉眼的所見（動脈硬化誘発食・解剖標本）

インスリン群では著明な粥腫の形成とこれによる内腔の狭窄を認めたが、対照群では粥腫の形成がなく、わずかに脂肪線条を認めたのみであった。（上：インスリン群、下：対照群）



fig. 21 冠状動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・インスリン群・解剖標本・EVG.染色）
 極めて厚い繊維性plaqueを認めるものや、lipid-rich plaqueを認めるもの、またruptured plaqueのようなcomplicated plaqueも認められ、
 内腔の狭窄をきたすものも見られた。

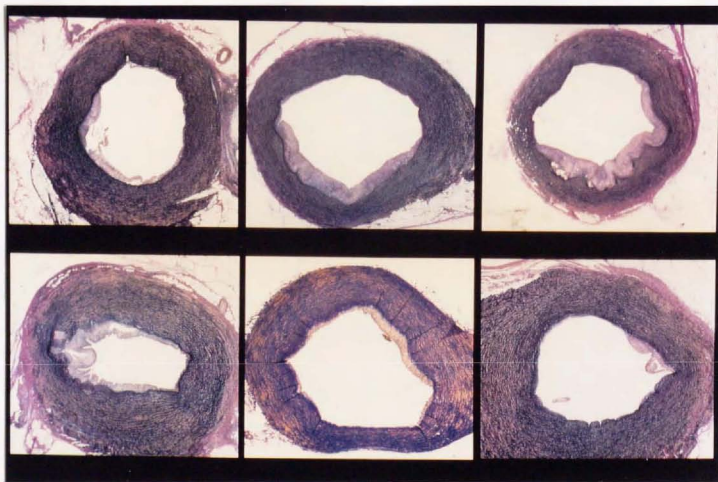


fig. 22 冠状動脈の組織学的所見（動脈硬化誘発食・対照群・解剖標本・EVG.染色）
インスリン群に比較して、動脈硬化の進行は軽度である。

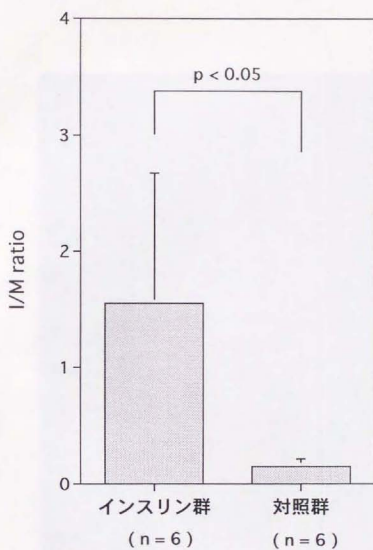


fig. 23 I / M 比の比較

冠状動脈の免疫組織学的検討



HHF35

RAM11

fig. 24 冠状動脈の免疫組織学的所見

HHF35にて平滑筋を、RAM11にてマクロファージ・モノサイト系細胞を染色した。アテロームはその大部分が脂肪を多量に含むマクロファージ・モノサイト系細胞により形成されていることが示唆された。



