



WHHLラビットヘテロ接合体のトリグリセライド代謝の観察

中, 芳子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):37-45

(Issue Date)

1997-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177380>



WHHLラビットヘテロ接合体の トリグリセライド代謝の観察

神戸大学医学部内科第二講座（指導：春日 雅人教授）

中 芳 子

（平成9年3月27日受付）

要 旨

LDLリセプターの欠損するWHHLラビットのヘテロ接合体（WHHLH）に果糖を投与し高トリグリセライド血症とし、LDLリセプターの半減した状態とコレステロール合成阻害剤の投与にてその活性を亢進させた状態がVLDL-トリグリセライドの代謝にいかなる効果をおよぼすかを観察し、in vivoでのトリグリセライド代謝におけるLDLリセプターの役割を検討した。WHHLHに果糖を投与すると血中トリグリセライドは有意に上昇した。血中トリグリセライドの代謝回転について観察すると、果糖非投与群と比較してトリグリセライド分泌率（TGSR）は不変であったことから、本群においては血中トリグリセライドの除去率（FCR）が低下していることが示された。一方、コントロールとした日本白色家兎ではこのような果糖投与によるトリグリセライドの代謝の変化は認めなかった。次に、この果糖負荷WHHLHにコレステロール合成阻害剤であるフルバスチンを投与したところ、血中トリグリセライドの低下のみならずTGSRの低下が認められたが、FCRは有意に上昇した。したがって本薬剤は肝臓におけるVLDL粒子の合成分泌を低下させることにより、血中トリグリセライドを低下せしめるものと考えられたが、同時に本薬剤による残存LDL-リセプターの活性増強によるVLDL-トリグリセライドの血管外への除去の促進も認められた。即ち、VLDL-トリグリセライドの血管外への除去にLDL-リセプター機能が深く関わっていることが明らかとなった。

緒 言

一般に高トリグリセライド血症の原因としては、トリグリセライドーリッチリポ蛋白の過剰生産、あるいはその血管外への除去障害のいずれか、または両者の合併の場合が考えられる。前者の例としては高インス

リン血症^{1, 2)}、や糖質の過剰摂取^{3, 4)}が考えられ、後者についてはまず①リポ蛋白リパーゼ（LPL）による末梢組織でのリポ蛋白粒子中のトリグリセライドの加水分解、②肝臓におけるレムナントリセプターによるレムナント粒子の取り込み⁵⁾、③肝臓におけるLDL-リセプターによる超低比重リポ蛋白（VLDL）粒子の取り込み⁶⁾、さらに、④肝臓以外の臓器におけるVLDL-リセプターによるVLDL粒子の取り組み⁷⁾、いずれかの障害によるものが想定される。しかしながら生体においてはトリグリセライドの血管外への除去について、どのシステムがどれだけの役割を演じているかは十分理解されていない。

一方、LDLリセプターの欠損するWHHLラビットは、高コレステロール血症および動脈硬化進展のモデルとして頻繁に利用されているが、そのレムナント代謝は障害されていないことが報告されている⁸⁾。また、そのヘテロ接合体（WHHLH）は通常の飼料では高コレステロール血症は発症せず、少量のコレステロール食にて高コレステロール血症となることが知られている⁹⁾。今回著者はこのWHHLHに果糖を投与することによって高トリグリセライド血症とし、LDLリセプター活性の半減した状態とコレステロール合成阻害剤の投与にてその活性を亢進させた状態がVLDL-トリグリセライドの代謝に対していかなる効果をおよぼすかを観察し、in vivoでのトリグリセライド代謝におけるLDLリセプターの役割を検討し、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

〔実験動物〕

WHHLヘテロ接合体（WHHLH）は5～6月齢の神戸大学医学部動物実験施設にて飼育されていたものを使用し、コントロールとして日本白色家兎（JW）を用いた。全ての動物は、換気15回/hr、室温 22±2

Key Words : WHHL, LDL リセプター, コレステロール合成阻害薬, TGSR, FCR

℃, 湿度50~60%, 12hrサイクルの明暗照明 (6:00 am/6:00pm) の条件下で飼育された。飼料は通常の固形飼料 (日本クレアCR-3) を与え, フルバスタチン (サンド薬品, 東京) は飲料水として蒸留水に溶解 (10mg/l) し, 連日2週間投与し, 果糖は10% 溶液を飲料水として自由に与えた。果糖摂取群では1日40.0±5.8gの果糖摂取が認められ, したがって摂取した飼料と果糖の割合はTable 1のごとくとなった。フルバスタチンは一羽当たり4.61±0.23mg/day (1.52±0.26mg/kg) の摂取が確認された。実験群は以下の7群を準備した。即ち, 1) 果糖投与WHHLH: FH群, 2) フルバスタチン投与WHHLH: XUH群, 3) 果糖+フルバスタチン投与WHHLH: FXUH群, 4) 水道水のみ投与WHHLH: WH群, 5) 果糖投与JW: FJ群, 6) フルバスタチン投与JW群, XUJ群, 7) 水道水のみ投与JW: WJ群とした。各実験群ともまず非絶食状態でヘパリン負荷後, リポ蛋白リパーゼ (LPL) 活性を測定し, さらに2週間の糖質および薬物投与を行ない, 空腹時採血を行なった後, トリグリセライド分泌率 (TGSR) を測定した¹⁰⁾。

〔実験方法〕

1) トリグリセライド代謝回転の観察

TGSRは即報のTriton法¹¹⁾により算定した。本法の信頼性については既に充分討議され報告されており, 本法と [³H]-あるいは [¹⁴C]-グリセロールを用いたトレーサー法によって各々求めたTG分泌率は, ほぼ同等であった^{12, 13)}。今回の研究で用いたトライトンWR1339 (半井化学, 京都) は, 血中からのトリグリセライドの除去を完全に阻止するため, 注射後少なくとも3~5時間血中トリグリセライドレベルは直線的に増加することが示されている^{14, 15)}。Triton WR1339を蒸留水 (400mg/ml) に溶解し, 各ラビットに耳介静脈 (1.3ml/kg) より投与し, 1時間後に対側の耳介静脈よりEDTA採血した。TGSRの算定は, 1分間あたりの血中トリグリセライド値の増加量とラビットの全循環血漿量(PV) との積で計算し, mg/minで表示した。さらに血中トリグリセライドレベルと体重から求めた血中トリグリセライドのプールサイズ(PV) から, fractional catabolic rate (FCR) を求めた¹⁶⁾。

$$\text{TGSR (mg/min)} = [\text{Tg (60)} - \text{Tg (0)}] \times \text{PV} / \text{min}$$

$$\text{Tg (60)} = \text{Tg値 (mg/ml)} \text{ (トライトン注射後60分)}$$

$$\text{Tg (0)} = \text{Tg値 (mg/ml)} \text{ (トライトン注射前)}$$

$$\text{PV (ml)} = \text{BW (g)} \times 0.0033$$

$$\text{FCR (min}^{-1}\text{)} = \text{TGSR (mg/min)} / \text{PV}$$

2) リポ蛋白分画

各リポ蛋白はサンプルをチューブに封入し, ベックマンL-8-55超遠心機 (Beckman Instrument, Fullerton, CA) を用いて超遠心法により超低比重リポ蛋白 (VLDL, $d < 1.006 \text{ g/ml}$), 低比重リポ蛋白 (LDL, $1.006 < d < 1.063 \text{ g/ml}$), 高比重リポ蛋白 (HDL, $1.063 < d < 1.21 \text{ g/ml}$) に分離し, その中に含まれる脂質を定量した。

Triton注射60分後のサンプルの一部をphosphate buffer (pH7.0) にて一昼夜透析し, Tritonを除去した後 $d = 1.006$ にてBeckman, 50Tiローターを用いて超遠心を行ない (39000rpm, 4℃, 16時間), 上層1.5mlをスライサーにて採取し, Triton注射後新たに分泌されたVLDL分画とした。

3) リポ蛋白リパーゼ活性 (LPL) の測定

LPL活性は各実験群の耳介よりヘパリン (1000U/Kg) を投与後に対側の静脈より採血し, LPL活性 (PHLA) を測定した。予備実験においてLPL活性はヘパリン負荷後2分後に最高に達し, 30分間持続する事が示されているので今回は10分後に採血を行なった。ヘパリン負荷後のサンプルは4℃で直ちに血清分離し, 酸素活性測定まで-20℃で凍結保存した。LPL活性と肝性リパーゼ (HL) の測定はNakaiらの方法¹⁷⁾に従い, 放射性標識されたトリグリセライド乳濁液を基質として用い, 加水分解により産生された放射性標識されたオレイン酸をBelfrage and Vaughanの方法¹⁸⁾で抽出した。HL活性の測定は1.0M NaClにより総リパーゼ活性からLPL活性のみを阻害し, 測定した。さらにリパーゼ活性はNilsson-Ehle and Schotz¹⁹⁾の方法で計算し, 1単位のリパーゼ活性は1ml中1時間に1 μ molの遊離脂肪酸を放出する能力で表示した。LPL活性は総リパーゼ活性からHL活性を減じ算定した。

4) アッセイ方法

血糖はグルコースオキシデース法によって, インシュリンはラジオイムノアッセイ (2抗体法²⁰⁾) によって測定し, 血中およびリポ蛋白中, さらにトライトン注射後のVLDL中, 各々のコレステロール, リン脂質, トリグリセライドは各々市販キット (コレステロール用にデタミナー736-TC-S, 協和メデックス, 東京, リン脂質用にデタミナー736-PL-S, 協和メデックス, トリグリセライド用にトリグリセライド-HRII, 和光純薬, 大阪) を用いて, 酸素法にて測定した。

5) 統計処理

尚, 有意差検定は, 2群間においては Mann-Whitney U testを, 多群間においてはANOVAを用い, $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結 果

まず、WHHLH及びJWラビットに飲料水として果糖を投与した場合、果糖の摂取量に応じて固形飼料の摂取が減少し、両群とも（FH、FJ）果糖非投与（WH、WJ）とほぼ同量のカロリー消費を示した（Table 1）。FH群はWH群に比して、空腹時血糖（FPG）とインスリンには変化を認めなかったが、血中トリグリセライドは有意に上昇し、コレステロールとリン脂質も上昇傾向を示した（Table 2, 3）。リポ蛋白分画の観察では、VLDL分画中の両脂質も上昇し、LDL分画ではトリグリセライドの増加を認めたが、HDL分画は不変であった（Table 3）。一方、この様な変化はFJ群には全く観察されなかった。次に血中トリグリセライドの代謝回転について観察してみると、FH群はWH群と比較して、トリグリセライド分泌率（TGSR）は不変であった。即ち、本群の血中トリグリセライドレベルの上昇から、本群においては血中トリグリセライドの除去率（FCR）が低下していることが示唆された（Table 4）。しかしながらヘパリン負荷後のLPLおよびHTGL活性は両群間で有意差を認めなかった（Table 5）。

次にFCRの低下したFH群にLDL-リセプター活性を高めると考えられているフルバスタチンを経口投与し（FXUH群）、トリグリセライドの代謝回転の変化を観察した。FXUH群はFH群に比較して、血糖、インスリンには変化を認めなかったが、血中トリグリセライドは有意に低下し、コレステロールも低下傾向を示した（Table 2, 3）。リポ蛋白分画についてはVLDL分画中の各脂質は低下し、LDL分画は不変で、

Table 1: 対照群と果糖投与群における飼料の組成ならびに一日摂取カロリー（各々、WHHLラビットヘテロ接合体および日本白色家兎を含む）

		対 照 群	果糖投与群
飼料組成	水 分 (%)	8.3	8.3
	粗 蛋 白 質 (%)	17.1	17.1
	粗 脂 肪 (%)	4.4	4.4
	粗 線 維 (%)	10.8	10.8
	粗 灰 分 (%)	8.8	8.8
	可溶性無窒素 (%)	50.8	50.8
飼 料 摂 取 量 (g)		120±10.4	80±12.4
果 糖 摂 取 量 (g)		0	40.0± 5.8
摂 取 カ ロ リ ー (Cal)		310.4±34.9	367±31.5

Table 2: 各実験群のn数 (n), 空腹時血糖 (FPG), インスリン (IRI)

	(n)	FPG(mg/dl)	IRI(ng/ml)
WJ	7	113.6± 5.9	0.30±0
FJ	7	127.8±19.0	0.42±0.15
WH	9	151.0±19.8	0.45±0.30
FH	8	134.8±16.6	0.60±0.49
FXUH	5	122.8± 3.1	0.50±0.31
XUH	5	127.0±11.9	0.45±0.10
XUJ	5	132.3±16.9	0.40±0.10

WJ: 日本白色家兎
 FJ: 10%果糖溶液投与日本白色家兎
 WH: WHHLラビットヘテロ接合体
 FH: 10%果糖溶液投与WHHLラビットヘテロ接合体
 FXUH: フルバスタチン(10mg/l)と10%果糖溶液を同時投与したWHHLラビットヘテロ接合体
 XUH: フルバスタチン(10mg/l)投与WHHLラビットヘテロ接合体
 XUJ: フルバスタチン(10mg/l)投与日本白色家兎

Table 3: 各実験群の各リポ蛋白分画におけるコレステロール、トリグリセライド

	Ch				Tg			
	Serum	HDL	LDL	VLDL	Serum	HDL	LDL	VLDL
WJ	31.5±11.3	13.9±6.8	12.5± 7.7	5.9±1.7	91.3±13.4	26.9± 3.7	22.4± 4.8	37.3±12.3
FJ	41.0±21.4	16.6±8.0	15.8±11.4	8.6±4.0	88.8±15.4	26.5± 5.2	23.9±13.1	38.4± 5.6
WH	28.0± 1.6	16.6±1.9	8.8± 2.8	2.6±1.1	36.8±3.3	15.8± 1.6	5.7± 1.8	15.3± 2.7
FH	31.8±10.6	10.5±0.9	11.6± 5.8	9.7±5.7☆	130.5±68.1☆	29.7± 6.9	31.6±22.3☆	69.2±41.7☆
FXUH	21.3± 6.2	11.2±5.6	8.4± 6.5	1.6±1.4※	65.8±25.0※	33.5±24.2	16.0± 6.8	16.2± 4.6※
XUH	22.0±1.3§	15.2±1.4	6.3± 2.3	1.9±1.1	30.6±3.1§	15.6± 1.5	4.0± 1.3	11.3± 2.2
XUJ	21.0±3.8*	13.5±2.0	4.1± 2.6	3.5±1.0	65.8±12.6*	27.1± 3.1	9.6± 3.8	29.1±10.6

WJ: 日本白色家兎
 FJ: 10%果糖溶液投与日本白色家兎
 WH: WHHLラビットヘテロ接合体
 FH: 10%果糖溶液投与WHHLラビットヘテロ接合体
 FXUH: フルバスタチン(10mg/l)と10%果糖溶液を同時投与したWHHLラビットヘテロ接合体
 XUH: フルバスタチン(10mg/l)投与WHHLラビットヘテロ接合体
 XUJ: フルバスタチン(10mg/l)投与日本白色家兎
 ☆: WH群に対して有意差あり (p<0.05)
 ※: FH群に対して有意差あり (p<0.05)
 §: WH群に対して有意差あり (p<0.05)
 *: WJ群に対して有意差あり (p<0.05)

Table 4: 各実験群のトライトンWR1339静注後のトリグリセライド分泌率(TGSR)と除去率(FCR)

	TGSR(mg/min)	FCR($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$)
WJ	2.22 $\pm$ 0.68	2.17 $\pm$ 0.65
FJ	2.06 $\pm$ 0.56	2.05 $\pm$ 0.21
WH	3.13 $\pm$ 1.25	6.18 $\pm$ 2.29
FH	3.28 $\pm$ 1.33	1.00 $\pm$ 0.12☆
FXUH	2.621 $\pm$ 0.34※	3.07 $\pm$ 1.67※
XUH	2.62 $\pm$ 0.50 §	3.69 $\pm$ 0.76
XUJ	1.50 $\pm$ 1.06 *	2.20 $\pm$ 1.48

WJ: 日本白色家兎

FJ: 10%果糖溶液投与日本白色家兎

WH: WHHLラビットヘテロ接合体

FH: 10%果糖溶液投与WHHLラビットヘテロ接合体

FXUH: フルバスタチン(10mg/l)と10%果糖溶液を同時投与したWHHLラビットヘテロ接合体

XUH: フルバスタチン(10mg/l)投与WHHLラビットヘテロ接合体

XUJ: フルバスタチン(10mg/l)投与日本白色家兎

☆: WH群に対して有意差あり($p < 0.05$)※: FH群に対して有意差あり($p < 0.05$)§: WH群に対して有意差あり($p < 0.05$)*: WJ群に対して有意差あり($p < 0.05$)

Table 5: 各実験群に対するヘパリン(1000U/Kg)静注後のリパーゼ活性(PHLA)

	LPL($\mu \text{ mol FFA/h/ml}$)	HTGL($\mu \text{ mol FFA/h/ml}$)
WJ	4.05 $\pm$ 0.44	5.58 $\pm$ 0.83
FJ	4.89 $\pm$ 0.85	5.60 $\pm$ 1.11
WH	4.27 $\pm$ 0.31	6.02 $\pm$ 0.92
FH	4.76 $\pm$ 0.78	5.82 $\pm$ 0.93
FXUH	4.24 $\pm$ 0.73	6.25 $\pm$ 1.18
XUH	5.23 $\pm$ 3.86	5.43 $\pm$ 0.62
XUJ	4.40 $\pm$ 2.55	3.90 $\pm$ 0.44

LPL: リポ蛋白リパーゼ

HTGL: 肝性トリグリセライドリパーゼ

HDL分画も変化がなかった (Table 3)。一方、血中トリグリセライド代謝回転の観察では、本群は FH 群に比べTGSRは有意な低下を示し、FCRの有意な上昇が認められた (Table 4)。しかしながらヘパリン負荷後のLPLおよびHTGL活性は不変であった (Table 5)。

最後にWH, WJ両群に各々フルバスタチンのみを投与し (XUH, XUJ), トリグリセライドの代謝回転を観察した結果を以下に示す。即ちXUH群ではWH群に比して、FPGとインスリンには変化を認めなかったが、血中トリグリセライド、コレステロールとも有意に低下した (Table 2, 3), リポ蛋白分画についてはVLDL分画中の各脂質は低下し、LDL分画においても同様の変化が見られた。HDL分画は不変であった (Table 3)。血中トリグリセライドの代謝回転の観察では、XUHはWH群に比べてTGSRは有意な低下を示し、FCRの上昇が認められた (Table

4)。しかるに両群間においてヘパリン負荷後のLPLおよびHTGL活性は不変であった (Table 5)。

XUJ群ではWJ群に比して、FPGとインスリンには変化を認めなかったが、血中トリグリセライド、コレステロールとも有意に低下した。リポ蛋白分画についてはVLDL分画中の各脂質は低下し、LPL分画においても同様の変化が見られた。HDL分画は不変であった。血中トリグリセライドの代謝回転の観察では、本群はWJ群に比べてTGSRは有意な低下を示し、FCRに有意な変化は認めなかった (Table 4)。両群間においてヘパリン負荷後のLPLおよびHTGL活性は不変であった (Table 5)。

尚、フルバスタチンを投与されたいずれの実験群も新たに肝臓から分泌されたVLDL粒子の脂質組成 (総脂質対3脂質の比) は非投与群と比べて変化は見られなかった。 (Table 6)。

Table 6: 各実験群のトライトンWR1339静注後新たに分泌されたVLDL粒子の脂質組成 (総脂質対3脂質の比)

	cholesterol(%)	triglyceride(%)	phospholipid(%)
WJ	16.5 $\pm$ 1.1	56.3 $\pm$ 3.4	27.4 $\pm$ 2.5
FJ	11.9 $\pm$ 2.3	61.6 $\pm$ 7.2	26.5 $\pm$ 5.0
WH	12.1 $\pm$ 4.8	64.3 $\pm$ 10.2	23.6 $\pm$ 5.5
FH	14.5 $\pm$ 2.9	61.1 $\pm$ 7.6	24.4 $\pm$ 5.0
FXUH	10.6 $\pm$ 1.2	65.1 $\pm$ 2.6	24.4 $\pm$ 1.6
XUH	12.3 $\pm$ 4.7	71.2 $\pm$ 7.0	16.5 $\pm$ 2.7
XUJ	15.2 $\pm$ 4.1	53.7 $\pm$ 8.8	31.1 $\pm$ 4.8

考 案

果糖の摂取がヒトだけでなく実験動物においても高トリグリセライド血症が引き起こされることが知られている¹³⁾。そのメカニズムとしては、果糖がブドウ糖に比べて肝臓に取り込まれやすく^{21, 22)}、さらに肝臓でのlipogenic enzymeを誘導し²³⁾、トリグリセライド合成が促進される。また、この過剰に合成されたトリグリセライドはサイズの大きな、トリグリセライドの豊富なVLDL粒子として血中に分泌され、高トリグリセライド血症が発症するものと理解される²⁴⁾。さらに、このトリグリセライドに富む、サイズの大きなVLDL粒子は、リポ蛋白リパーゼによる加水分解を受けにくく、血中に停滞し高トリグリセライド血症を助長するものと考えられる。この現象は著者らの研究グループが重症¹¹⁾、および軽症糖尿病ラット²⁵⁾、さらにインスリン抵抗性を示すZucker fattyラットにおいても確認している²⁶⁾。

今回の研究の目的のひとつは、LDLリセプター数の半減したWHHLラビットヘテロ接合体に、果糖を

投与し、高トリグリセライド血症を発症せしめ、LDLリセプターがいかにVLDL-トリグリセライドの代謝に関わっているかを明らかにするものである。血中トリグリセライドレベルは、トリグリセライドの血中への流入と血管外への除去とのバランスを反映するものである。本研究で用いたトライトンWR1339は静注することによって、末梢組織でのリポ蛋白リパーゼの作用を完全に阻止するため、注射後血中トリグリセライドレベルは直線的に上昇する^{10, 15)}。したがって、血中トリグリセライドの上昇率と体重から求めた循環血液量からトリグリセライドの分泌率(TGSR)が算定できる²⁷⁾。さらに本薬剤注射前の血中トリグリセライドレベルは生体での血中トリグリセライドの'steady state'を表すものと考えられることから、TGSRと体重および血中トリグリセライド値から求めた血中トリグリセライドプールサイズから、トリグリセライドのfractional catabolic rate (FCR)も算定できることとなる¹⁶⁾。本法によって求めたFCRとアイソトープを用いて得られたFCRとの間には極めて良好な相関が得られることが報告されている^{28, 29)}。さらに、内因性にアイソトープでラベルされたVLDL分画を血液中から取り出すには超遠心が必要であるが、この操作によってLDL受容体に対するリガンドであるアポ蛋白がVLDL粒子から脱落する事も報告されている³⁰⁾ことから、むしろこのトライトン法がアイソトープを用いた方法よりも、whole bodyのトリグリセライドの除去能を推定するにはより適切なものと考えられる。

今回、コントロールとして用いたJW群のみは果糖の投与によってトリグリセライド代謝に大きな変動が認められなかったことは興味深い。ウサギはヒトやラットと異なり、果糖投与によって肝におけるトリグリセライドの合成亢進が引き起こされないことが想定される。果糖投与に対する反応性の動物種間の差についての報告は見当たらず、また、今までの果糖による肝lipogenic enzymeの誘導についての研究²³⁾はマウスを用いて行われたもので、今後同様の研究をウサギを用いて行う事が必要と考えられる。一方WHHLヘテロ接合体では果糖投与により、高トリグリセライド血症が出現し、その原因としては、FCRの低下から、VLDL-トリグリセライドの血中からの除去障害によるものと考えられた。即ち、VLDLトリグリセライドの血管外への除去にLDLリセプターが関わっていることが示唆された。

WHHLラビットは1973年神戸大学の渡辺嘉雄博士によって発見され、継代飼育された遺伝性の高コレステロール血症ウサギで、その本態はLDLリセプターの欠

損であることが確認されており、その遺伝子異常の部位も明らかとなっている。本ラビットはヒトの家族性高コレステロール血症(Familial Hypercholesterolemia, FH)のモデルとして、すでに多くの研究がなされている。一方、WHHLのヘテロ接合体(WHHLH)はヒトのFHのヘテロ接合体と異なり、通常の飼料では高コレステロール血症を発症せず、少量のコレステロール負荷食によって高コレステロール血症を呈することが知られている。この事実はウサギではヒトと異なり通常のコレステロール摂取量では血中LDLの除去は正常ウサギの約1/2のリセプター活性でまかない得るものと理解される。

LDLリセプターはLDL粒子のみならずアポ蛋白Eを持つカイロミクロンレムナントを結合し、処理する能力を持つことが知られている³¹⁾。さらに本リセプターが欠失する場合はLDLリセプター関連蛋白[LDL receptor-related protein (LRP)]が代わりに作動することも確認されている⁵⁾。今回、WHHLH群においては果糖投与によって高トリグリセライド血症が出現したがPHLAが変化しなかったことより、末梢組織でのトリグリセライドの加水分解の低下は考えにくく、本ラビットはLDLリセプターによるトリグリセライドーリッチリポ蛋白粒子の処理の低下が引き起こされたものと推定される。即ち、LDLリセプターの活性が半減している時にLRPが完全にその代償機能を発揮し得ないものと理解される。

次に、我々はこの血中トリグリセライドのカタボリズムの障害のモデルとなる果糖負荷WHHLHにコレステロール合成阻害剤であるフルバスタチンを投与し、LDLリセプター活性を高めて、本ラビットにおけるVLDL-トリグリセライドの代謝回転を観察した。その結果、本薬剤投与にてVLDL-トリグリセライドの分泌が低下したが、血中トリグリセライドレベルの低下が著明なため、FCRの有意な上昇が認められた。即ち今回初めてLDLリセプターの活性化によるトリグリセライドーリッチリポ蛋白の処理の促進が認められた。

コレステロール合成阻害剤による血中コレステロールの低下は、細胞内コレステロールの合成の低下によりLDLリセプターが活性化され、それによってLDL粒子が細胞内に取り込まれることによって引き起こされることがよく知られている。一方、本系列薬剤による肝臓からのVLDL粒子の分泌抑制についてはすでに、in vitro³²⁾および in vivo^{33, 34)}での報告が認められる。今回の研究の結果もそれらと呼応するもので、ヒトにおける本系列の薬剤による血中トリグリセライドレベルの低下のひとつの説明となるものと考えられ

る。

すでに述べたごとくトライトン注射後VLDL粒子は本薬剤によってコーティングされるため、LDLの作用が阻害される³⁵⁾。したがって本薬剤投与後に出現するVLDL分画は肝臓から新たに分泌されたりポ蛋白粒子そのものを反映することになる³⁶⁾。本法は肝灌流法よりも、より生理的な肝臓からのリポ蛋白分泌反応を観察し得る手段と考えられる。今回フルバスタチンを投与されたいずれの実験群においても、トライトン投与後の $d < 1.006$ 分画の脂質組成が変化しなかったことより、フルバスタチンは新たに肝臓から分泌されたVLDL粒子の脂質組成を変化させることなく、その分泌量を抑制することにより血中脂質を低下し得るものと理解される。一方、Shiomiら¹⁵⁾はWHHLラビットホモ接合体に対して、コレステロール合成阻害剤のひとつであるプラバスタチンを投与し、今回と同じトライトン法にてVLDLの分泌の変化を観察しているが、彼等は本薬剤投与によってVLDL-コレステロールのみが低下しVLDL-トリグリセライドの分泌は変化しなかった事を報告している。観察した固体の差(WHHLホモ接合体とヘテロ接合体)、あるいは投与薬剤の差(プラバスタチン 50mg/kg 、フルバスタチン $1.52 \pm 0.26\text{mg/kg}$)のいずれかが異った結果の説明となるかもしれない。

結 論

①LDLリセプターの機能が半減していると考えられるWHHLラビットヘテロ接合体に果糖を投与すると血中トリグリセライドレベルが上昇し、その原因としてはトリグリセライドの血管外への除去によるものと考えられた。この様な変化はコントロールとした正常日本白色家兎には観察されず、したがってLDLリセプターがウサギの*in vivo*におけるトリグリセライドの代謝に深く関わっていることが推定された。②この果糖投与WHHLヘテロ接合体にフルバスタチンを投与すると、血中トリグリセライドのFCRは上昇した。したがって本薬剤によるLDLリセプターの活性化によるVLDLのカタボリズムの亢進が明らかとなった。③正常日本白色家兎およびWHHLヘテロ接合体にフルバスタチンを投与すると、いずれも血中トリグリセライド、およびコレステロールは有意に低下した。また、トリグリセライド分泌率も有意に低下した。即ち、これらの実験群においては、本薬剤は肝臓におけるVLDL粒子の合成分泌を低下させることによって、血中トリグリセライドを低下せしめるものと考えられた。すなわち、コレステロール合成阻害剤によ

る血中トリグリセライド低下の2つのメカニズム(①VLDLの合成分泌の抑制、および②LDLリセプターを介したVLDLの処理)が明らかになった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導、御校閲を賜りました恩師春日雅人教授に深く感謝いたします。また、LPL測定について御教示を賜った昭和大学第一内科平野勉先生、WHHLラビットヘテロ接合体を提供頂いた神戸大学医学部動物実験施設塩見 雅志助教授、および直接御指導頂いた東邦大学臨床検査医学芳野 原教授、さらに協力頂いた神戸大学第二内科脂質代謝研究班の諸先生に感謝いたします。

参考文献

1. Olefsky, H.M., Farquhar, J.W., Reaven, G.M.: Reappraisal of the role of insulin in hypertriglyceridemia. *Am. J. Med.* 57: 551-560, 1974.
2. Hallfrisch, J., Reiser, S., Prather, P.S.: Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose. *AM. J. Clin. Nutr.* 37: 740-748, 1983.
3. Reiser, S., Hallfrisch, J., Michaelis, O.E., Lazar, F.L., Mastin, R.E., Frather, E.S.: Isocaloric exchange of dietary starch and sucrose in humans. Effects of levels of fasting blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1659-1669, 1978.
4. Bar-On, H., Stein, Y.: Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J. Nutr.* 94: 95-105, 1968.
5. Willnow, T.E., Sheng, Z., Hertz, J.: Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264: 1471-1474, 1994.
6. Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerand, R.D., Hammer, R.E., Herz, J.: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92: 883-893, 1993.
7. Takahashi, S., Kawarabayashi, Y., Nakai, T., Sakai, J., Yamamoto, T.: Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low

- density receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 9252-9256, 1992.
8. Kita, T., Brown, M.S., Bilheimer, D.W., Goldstein, J.L. Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5693-5697, 1982.
 9. Kume, N., Kita, T., Mikami, A.: Induction of mRNA for low-density lipoprotein receptor in heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits treated with CS-514 (pravastatin) and cholestyramine. *Circulation* 79 : 1084-1090, 1989.
 10. Steiner, G., Heynes, F.J., Yoshino, G., Vranic, M.: Hyperinsulinemia and in vivo very-low-density lipoprotein triglyceride kinetics. *Am. J. Physiol.* 246 : E 187-E 192, 1984.
 11. Yoshino, G., Iwai, M., Kazumi, T., Matsushita, M., Morita, M., Iwatani, I., Baba, S.: Effect of dietary fructose on triglyceride turnover in streptozotocin-diabetic rats. *Atherosclerosis*. 79 : 41-46, 1989.
 12. Bird, M., Williams, M.A., Baker, N.: Triacylglycerol secretion in rats: validation of a tracer method employing radioactive glycerol. *J. Nutr.* 114 : 1978-1985, 1984.
 13. Kazumi, T., Vranic, M., Steiner, G.: Triglyceride kinetics: Effects of dietary glucose, sucrose, or fructose alone or with hyperinsulinemia. *Am. J. Physiol.* 250 : E 325-E330, 1986.
 14. Hornick, C.A., Kita, T., Hamilton, R.L., Kane, J.P., Havel, R.J.: Secretion of lipoproteins from the liver of normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 6096-6100, 1983.
 15. Shiomi, M., Itoh, T.: Pravastatin sodium, a competitive inhibitor of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase, decreases the cholesterol content of newly secreted very-low-density lipoprotein in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Metabolism* 43 : 559-564, 1994.
 16. Bird, M.I., Williams, M.A.: Triglycerol secretion in rats : Effects of essential fatty acids and influence of dietary sucrose, glucose or fructose. *J. Nutr.* 112 : 2267-2278, 1982.
 17. Nakai, T., Yamada, S., Tamai, T., Kobayashi, T., Hayashi, T., Takeda, R.: The effects of streptozotocin diabetes on hepatic triglyceride lipase activity in the rat. *Metabolism*. 28 : 30-40, 1979.
 18. Belfrage, P., Vaughan, M.: Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lipid Res.* 10 : 341-344, 1969.
 19. Nilsson-Ehle, P., Schots M.C.: A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* 17 : 536-541, 1976.
 20. Morgan, C.R., Lazarow, A.: Immunoassay of insulin: two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes*. 12 : 115-118, 1963.
 21. Topping, D.L., Mayes, P.A.: Comparative effects of fructose and glucose on the lipid and carbohydrate metabolism of perfused rat liver. *Br. J. Nutr.* 36 : 113-126, 1976.
 22. Higgins, H.L.: The rapidity with which alcohol and some sugars may serve as nutrients. *Am. J. Physiol.* 41 : 258-265, 1916.
 23. Spence, J.T., Pitot, H.C.: Induction of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. Relationship between lipogenesis and carbohydrate metabolism. *Eur. J. Biochem.* 128 : 15-20, 1982.
 24. Kazumi, T., Vranic, M., Steiner, G.: Changes in very low density lipoprotein particle size and production in response to sucrose feeding and hyperinsulinemia. *Endocrinology* 117 : 1145-1150, 1985.
 25. Yoshino, G., Matsushita, M., Iwai, M., Morita, M., Matsuba, K., Nagata, K., Maeda, E., Furukawa, S., Hirano, T., Kazumi, T.: Effect of mild diabetes and

- dietary fructose on very-low-density lipoprotein triglyceride turnover in rats. *Metabolism* 41 : 236-240, 1992.
26. Kazumi, T., Yoshino, G., Matsuba, K., Iwai, M., Iwatani, I., Matsushita, M., Kasama, T., Numano, F., Baba, S.: Effect of dietary glucose or fructose on the secretion rate and particle size of triglyceride-rich lipoproteins in Zucker fatty rats. *Metabolism* 40 : 962-966, 1991.
 27. Bagdade, J.D., Yee, E., Albers, J., Pykalisto, O.J.: Glucocorticoids and triglyceride transport; Effects on triglyceride secretion in rats, lipoprotein lipase and plasma lipoproteins in the rat. *Metabolism* 25 : 533-542, 1976.
 28. Hirano, T., Mamo, J.C.L., Poapst, M., Steiner, G.: Impaired very-low-density lipoprotein-triglyceride catabolism in acute and chronic fructose-fed rats. *Am. J. Physiol.* 256 : E559-E565, 1989.
 29. Furukawa, S., Hirano, T., Mamo, J.C.L., Nagano, S., Takahashi, T.: Catabolic defect of triglyceride is associated with abnormal very-low-density lipoprotein in experimental nephrosis. *Metabolism* 39 : 101-107, 1990.
 30. Herbert, P.N., Forte, T.M., Shulman, R.S.: Structural and compositional changes attending the ultracentrifugation of very low density lipoproteins. *Prep. Biochem.* 5 : 93-129, 1975.
 31. Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L., Brown, M.S.: The two-receptor model of lipoprotein clearance : tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 4431-4435, 1994.
 32. Cianfrone, K.M., Yasruel, Z., Rodriguez, M.A., : Regulation of apo B secretion from HepG2 cells: Evidence for critical role for cholesterol ester synthesis in the response to a fatty acid challenge. *J. Lipid Res.* 31 : 2045-2055, 1990.
 33. Arad, Y., Ramakrishnan, R., Ginsberg, H.N.: Lovastatin therapy reduces low density lipoprotein apo B levels in subjects with combined hyperlipidemia by reducing the production of apo B-containing lipoproteins. Implication for the pathophysiology of apo B production. *J. Lipid Res.* 30 : 567-582, 1990.
 34. Maeda, E., Yoshino, G., Matsushita, M., Nagata, K., Morita, M., Murata, Y., Naka, Y., Kazumi, T.: Effect of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor on triglyceride kinetics in chronically streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism* 42 : 52-57, 1993.
 35. Scots, M.C., A. Scanu, I.H. Page.: Effect of Triton on lipoprotein lipase of rat plasma. *Am. J. Physiol.* 188 : 399-402, 1957.
 36. Ishikawa, T., Fidge, N.: Changes in the concentration of plasma lipoproteins and apoproteins following the administration of Triton WR 1339 to rats. *J. Lipid Res.* 20 : 254-264, 1979.

Triglyceride metabolism in heterozygote of WHHL rabbit.

Yoshiko Naka

Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine,

Chuo-Ku, Kobe 650 Japan

(Director : Prof. Masato Kasuga)

The present study was conducted in order to examine the role of LDL receptor activity on VLDL-triglyceride metabolism in vivo. Fructose-feeding (10% in drinking water) for 2 weeks resulted in an elevated plasma triglyceride in heterozygote of WHHL rabbit (WHHLH) associated with suppressed fractional catabolic rate of plasma triglyceride. Whereas, Japanese white rabbit with normal LDL receptor activity showed no remarkable change in plasma triglyceride turnover after fructose-feeding, suggesting an involvement of LDL-receptor activity on triglyceride metabolism.

In order to stimulate cellular LDL-receptor activity, fluvastatin, a new HMG CoA reductase inhibitor, was orally administered to fructose-fed WHHLH ($1.52 \pm 0.26 \text{ mg/kg}$). Significant suppression of triglyceride secretion rate was observed after fluvastatin treatment. However, since plasma triglyceride level was markedly suppressed, fractional catabolic rate of plasma triglyceride was significantly elevated.

Thus, it is speculated that LDL-receptor activity was deeply involved in VLDL-triglyceride metabolism in rabbits.