



Relationship between a glycoprotein acting as lipoprotein lipase inhibitor and arteriosclerosis

石井, 勝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1973-12-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0284

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000284>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	いし 石	い 井	まさる 勝 (兵庫県)
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	医	博	ろ 第 226 号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位授与の日付	昭和48年12月5日		
学位論文題目	Relationship between a Glycoprotein Acting as Lipoprotein Lipase Inhibitor and Arteriosclerosis (リポ蛋白リパーゼ阻害作用をもつ糖蛋白と動脈硬化症との関係)		

審 査 委 員	主 査	教 授	馬 場 茂 明		
		教 授	西 塚 泰 美	教 授	木 幡 陽
		教 授	友 松 達 弥		

論 文 内 容 の 要 旨

I) 研究目的

リポ蛋白—中性脂肪を水解するリポ蛋白リパーゼは、脂質特にカイロミクロン及び低密度、超低密度リポ蛋白中脂質の転送に重要な役割を果し、さらに加齢及び動脈硬化症に伴って血中リポ蛋白リパーゼ活性が低下すると報告されている。

加齢及び動脈硬化症に伴う血中リポ蛋白リパーゼ活性低下の原因は、種々の要因が考慮されるが、内因性リポ蛋白リパーゼ活性阻害物質の存在とその増加が最大の要因であると考え本研究を行った。その結果、リポ蛋白リパーゼ阻害作用をもつ α_2 -グロブリンに属するある種の糖蛋白と動脈硬化症との間に密接な関係を示す成績が得られたので、その要旨を下記する。

II) 研究材料及び方法

1) 血漿及び組織リポ蛋白リパーゼ (以下 L.P.L. と略す) 活性の測定法血漿 L.P.L. 活性は、基質として乳化トリグリセライド液 (Fatgen) 0.1 ml, 被検血漿 1 ml を pH 8.0 で 37°C, 60 分間 incubation して、その前後の遊離脂酸 (以下 F.F.A. と略す) を測定する。1 時間当り 0.1 μ M の F.F.A. を増加させる L.P.L. 活性を 1 単位とした。組織 L.P.L. 活性は、組織アセトン粉末をアンモニア液で 60 分間抽出した液 0.4 ml を L.P.L. 酵素液として用い、基質 (Fatgen) 0.1 ml, pH 8.5—10% 牛血清アルブミン液 0.4 ml, 0.5M 硫酸 0.1 ml を加え、37°C, 60 分間 incubation 後、その前後の F.F.A. を測定する。組織湿重量 1 g 当り 1 時間に 0.1 μ M の F.F.A. を増加させる L.P.L. 活性を 1 単位とした。

2) L.P.L. 阻害糖蛋白 (以下 INH-G と略す) の L.P.L. 活性阻害作用測定法硫酸デキストラン静注 30 分後ヒト血漿 1 ml を L.P.L. 酵素液とし INH-G 液 0.5 ml を加え、pH 8.0 で 37°C, 15 分 preincubation

後、基質 0.1ml を加え、60 分間 incubation して L.P.L 活性を測定する。対照として INH-G の代りに蒸留水を等量用いた。INH-G による L.P.L 活性減少百分率を阻害率とした。

3) 血清又は組織からの INH-G の抽出法

血清からの抽出法は、15 倍蒸留水稀釈血清を pH 5.7 に調整後遠心し、上清を pH 4.9 にした後 20 分間煮沸する。冷却後上清を濃縮遠心し、その上清に 4 倍容のエタノールを加え沈澱物を得る。さらに無水エーテルで洗滌して乾燥粉末として粗 INH-GS を得た。

組織からの抽出法は、15 倍容生食水添加組織ホモジネートを遠心、その上、清を透析後濾過する。濾液を pH 4.0 に調整し、40%, 60%, ついで 100% 飽和硫酸にて得られた沈澱物を脱塩し、凍結乾燥して粗 INH-GT を得た。血清はヒト、組織はイヌを用いた。

4) INH-GS の部分精製法

調製用寒天電気泳動法及びアンフォライト (pH 3~10) を用いたアンフォラインカラム中での等電点分画法により粗 INH-GS を分画分離して INH-GS を部分精製した。

5) INH-G 抗体の作製

粗 INH-GS 10mg をフロイント完全アジュバントを用いて、2 週間ごとに 3 回家兎に注射免疫して抗 INH-GS 家兎血清を作製した。

6) INH-GS 投与白鼠実験

粗 INH-GS 5mg 溶解生食液 0.1ml を朝夕各 1 回、生後 3 週間の雄性白鼠 5 匹の頸筋肉に毎日 10 週間注射した。対照白鼠には生食液 0.1ml を同様に 10 週間注射した。10 週後の組織 L.P.L 活性を測定し、ヘマトキシリンエオジン染色による組織標本を作製し、検鏡に供した。

III) 成 績

1) L.P.L. 阻害物質 (INH-G) の作用様式

1. INH-GS の血漿及び組織 L.P.L. 活性に及ぼす影響 (in vitro 及び in vivo)

血漿 L.P.L. 活性に対する粗 INH-GS の効果を in vitro で検討した。基質、L.P.L. 酵素液、粗 INH-GS の三者中二者を 15 分間 preincubation した後、残りの一者を添加、さらに 60 分間 incubation 後、L.P.L. 活性を測定した。

その結果、酵素液と INH-GS を preincubation した場合最高の阻害作用 (阻害率 48%) が認められ、INH-GS は L.P.L 活性に直接阻害作用をもつ結果を示した。

組織 L.P.L. 活性に対する粗 INH-GS の効果を in vitro で検討した。白鼠副睪脂 200mg を Krebs-Ringer 炭酸緩衝液 2ml 中で、37°C、60 分間 incubation した。粗 INH-GS 非添加の場合、Medium 中 F.F.A., L.P.L. 活性の増加、組織内 L.P.L. 活性の減少が見られたが、粗 INH-GS 2mg を添加した場合、Medium 中 F.F.A., L.P.L. 活性の増加はなく、組織内 L.P.L. 活性は測定不能低値となった。この結果、INH-GS は、in vitro で組織 L.P.L. 活性を直接阻害する成績を得た。

in vivo における粗 INH-GS の血漿及び組織 L.P.L. 活性阻害作用を白鼠を用いて証明した。白鼠に硫酸デキストランを腹腔内注射し、それと同時に粗 INH-GS (体重 100g 当り 10mg) を頸筋内注射した群、30 分、1、2、3 及び 6 時間後に注射した群を作製し、血漿、心筋、副睪脂、大動脈 L.P.L. 活性

を測定した。粗 INH-GS 注射後30分～3時間まで阻害作用が見られ、大動脈で75%の最大 L. P. L. 阻害を認めた。

2. 加齢と L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) の関係

若年者 (30才以下), 高齢者 (50才以上) 及び動脈硬化症患者血清から粗 INH-GS を抽出し、原血清 1 ml に相当する各粗 INH-GS の阻害作用を検討した。若年者 8 %, 高齢者 23 %, 動脈硬化症患者 35 % の阻害率が得られた。加齢及び動脈硬化症に伴い、粗 INH-GS の阻害活性が著明に増加する成績を得た。

3. 組織抽出 L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GT) の血漿 L. P. L. 活性阻害作用の各臓器から粗 INH-GT を抽出し、それぞれの血漿 L. P. L. 活性に対する阻害作用を *in vitro* で検討した。その結果、各粗 INH-GT 5 mg の阻害率は、肝 44.7 %, 大動脈 33 %, 心 31 %, 脳 22.3 %, 腎 8.2 % であった。

4. INH-GS 抗体の血漿 L. P. L. 活性に及ぼす影響

L. P. L. 阻害糖蛋白に対する抗体を家兎で作製し、粗 INH-GS の血漿 L. P. L. 阻害作用に対する抗体の影響を検討した。粗 INH-GS の L. P. L. 阻害作用は抗血清量の増加とともに減少し、0.1 ml 抗血清使用によって阻害作用は完全に消失した。

2) L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) の分析

1. INH-GS の部分精製

粗 INH-GS を調製用寒天電気泳動及び等電点分画法により部分精製した。電気泳動の結果 α_2 -グロブリン分画に蛋白質 1 mg 当り 43 % の強い阻害率を示し、等電点分画では P I 4.2 ~ 4.9 分画に蛋白 0.1 mg 当り 27 % の最大阻害率を示す部分精製標品を得た。

2. セルローズ・アセテート膜及び澱粉ゲル電気泳動及び免疫電気泳動による INH-GS の分析

等電点分画法により部分精製した標品を分析に供した。電気泳動により 4 ゾーンすなわちプレアルブミン、アルブミン及びセルローズ・アセテート膜では二つの α_2 -グロブリン分画、澱粉ゲル電気泳動ではポストアルブミン 1 及び 2 に分画された。粗 INH-GS 家兎抗血清を用いた免疫電気泳動像ではアルブミンと移動度の遅い α_2 -グロブリン分画、あるいはポストアルブミン 2 に一致した 2 本の沈降線が得られた。この結果、INH-GS は移動度の遅い α_2 -グロブリンあるいはポストアルブミン 2 に相当すると考察され、また PAS 染色により糖蛋白であることが証明された。

3) L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) 投与白鼠実験

II) 項に記した方法により粗 INH-GS 投与後の組織 L. P. L. 活性に及ぼす影響と、各臓器の病理組織学的検索を行なった。その結果、大動脈、心筋及び副腎脂 L. P. L. 活性は、生食注射対照群に比し、それぞれ 40 %, 35 %, 14 % の減少を示した。さらに大動脈、脾動脈壁に脂肪滴の浸潤が認められ、心、脾の小動脈に内膜の肥厚が観察された。

IV) 考察及び結語

血清 (ヒト) 及び組織 (イヌ) からリポ蛋白リパーゼ活性阻害作用をもつ糖蛋白を抽出して阻害様式を検討した。その結果、*in vitro* 実験で L. P. L. 直接阻害あるいは L. P. L. 作用部位阻害であるかの余地を残し、組織内 L. P. L. 放出阻害作用の可能性を示した。他方、*in vivo* 実験で血漿、組織 L. P. L. 活性を阻害し、特に大動脈で著明であった。

加齢、動脈硬化症と血中糖蛋白の関連性について、Shetler, Pearce らは加齢とともに血中蛋白結合ヘキソースの増加を、また Andreani が動脈硬化症と α_2 -グロブリン中の蛋白結合ヘキソースの増加を指摘している。本研究でも血清から抽出した L. P. L. 阻害糖蛋白は、若年者に比し、高齢者あるいは動脈硬化症患者では約 3～4 倍の阻害作用を示し、この糖蛋白の増加と加齢、動脈硬化症間に強い関連性を示唆する成績が得られた。

一方、各臓器から L. P. L. 阻害糖蛋白を抽出して組織分布を検討した結果、肝に最も多量存在し、最も強い阻害活性を示した。この成績は、血清糖蛋白合成が主に肝で行われ、しかも肝 L. P. L. 活性が極めて低い事実を反映していると考えられた。

血清から抽出した L. P. L. 阻害糖蛋白を等電点分画法により部分精製し、さらにゾーン電気泳動法及び粗 L. P. L. 阻害糖蛋白抗体を用いた免疫電気泳動法により本物質の分析を試みた。その結果、等電点 4.2～4.9 間の α_2 -グロブリンに属する酸性糖蛋白であることが判明したが、炎症性疾患、悪性腫瘍などに増加する既知血清糖蛋白に属しない物質であった。

粗 L. P. L. 阻害糖蛋白の白鼠長期投与実験の結果、大動脈及び心筋 L. P. L. 活性が著明に減少し、大動脈、脾動脈壁に脂肪浸潤を、心、脾動脈に内膜肥厚を惹起させた。この病理所見は、用いた標品が爽雜血清蛋白を含有するため、L. P. L. 阻害糖蛋白のみによると断定できないが、本研究での他の成績を考慮すれば、動脈硬化症の成立、進展にリポ蛋白リパーゼ阻害作用をもつ糖蛋白が深く関係していると結論できよう。

論文審査の結果の要旨

I) 本申請者は加齢及び動脈硬化症に伴う血中リポ蛋白リパーゼ活性低下の原因は、種々の要因が考慮されるが、内因性リポ蛋白リパーゼ活性阻害物質の存在とその増加が最大の要因であると考え本研究を行い、リポ蛋白リパーゼ阻害作用をもつ α_2 -グロブリンに属するある種の糖蛋白と動脈硬化症との間に密接な関係を示す成績が得られたので、その知見並びに動脈硬化症における意義について報告した。

II) 研究内容の概要についてのべると以下のごとくである。

1) L. P. L. 阻害物質 (INH-GS) の作用様式：

1. INH-GS の血漿及び組織 L. P. L. 活性に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。その結果、酵素液と INH-GS を preincubation した場合、最大の阻害作用 (阻害率 48%) が認められ INH-GS は L. P. L. 活性に直接阻害作用をもつ結果を示した。

また、組織 L. P. L. 活性に対する粗 INH-GS の効果は、*in vitro* で組織 L. P. L. 活性をも直接阻害する成績をえた。一方、*in vitro* における粗 INH-GS の血漿及び組織 L. P. L. 活性阻害作用を白鼠を用いて証明した。すなわち、血漿、心筋、副睪脂、大動脈 L. P. L. 活性は、粗 INH-GS 注射後 30 分～3 時間まで阻害作用が見られ、大動脈で 75% の最大 L. P. L. 阻害を認めた。

2) 加齢と L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) の関係

若年者 (30 才以下)、高齢者 (50 才以上) 及び動脈硬化症患者血清から粗 INH-GS を抽出し、原血清

1 mlに相当する各粗 INH-GS の阻害作用を検討し、若年者8%, 高齢者23%, 動脈硬化症患者35%の阻害率が得られた。すなわち、加齢及び動脈硬化症に伴い、粗 INH-GS の阻害活性が著明に増加する成績をえた。

3) 組織抽出 L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GT) の血漿 L. P. L. 活性阻害作用

犬の各臓器から粗 INH-GT を抽出し、それぞれの血漿 L. P. L. 活性に対する阻害作用を in vitro で検討した。その結果、各粗 INH-GT 5 mg の阻害率は、肝44.7%, 大動脈33%, 心31%, 脳22.3%, 腎 8.2% であった。

4) INH-GS 抗体の血漿 L. P. L. 活性に及ぼす影響 L. P. L. 阻害糖蛋白に対する抗体を家兎で作製し粗 INH-GS の血漿 L. P. L. 阻害作用に対する抗体の影響を検討した。粗 INH-GS の L. P. L. 阻害作用は抗血清量の増加とともに減少し、0.1ml抗血清使用によって阻害作用は完全に消失した。

2 L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) の分析

1) INH-GS の部分精製

粗 INH-GS を調製用寒天電気泳動及び等電点分画法により部分精製した。電気泳動の結果 α_2 -グロブリン分画に蛋白質 1 mg 当り43%の強い阻害率を示し、等電点分画では pH 4.2~ 4.9 分画に蛋白 0.1mg 当り27%の最大阻害率を示す部分精製標品を得た。

2) セルローズ・アセテート膜、澱粉ゲル電気泳動及び免疫電気泳動による INH-GS の分析

電気泳動により4ゾーンすなわちプレアルブミン、アルブミン及び、セルローズ・アセテート膜では二つの α_2 -グロブリン分画、澱粉ゲル電気泳動ではポストアルブミン1及び2に分画された。粗 INH-GS 家兎抗血清を用いた免疫電気泳動像ではアルブミンと易動度の遅い α_2 -グロブリン分画、あるいはポストアルブミン2に一致した2本の沈降線が得られた。この結果、INH-GS は易動度の遅い α_2 -グロブリンあるいはポストアルブミン2に相当すると考察され、また PAS 染色により糖蛋白であることが証明された。

3) L. P. L. 阻害糖蛋白 (INH-GS) 投与白鼠実験

大動脈、心筋及び副睪脂 L. P. L. 活性は、生食注射対照群に比し、それぞれ40%, 35%, 14%の減少を示した。さらに大動脈、脾動脈壁に脂肪滴の浸潤が認められ、心、脾の小動脈に内膜の肥厚が観察された。

Ⅲ) 以上の結果を総合すると、血清から抽出した L. P. L. 阻害糖蛋白は若年者に比し、高齢者あるいは動脈硬化症患者では約3~4倍の阻害作用を示し、この糖蛋白の増加と加齢、動脈硬化症間に強い関連性を示唆する成績が得られたと云える。

一方、各臓器から L. P. L. 阻害糖蛋白を抽出して組織分布を検討した結果、肝に最も多量存在し、最も強い阻害活性を示した。この成績は、血清糖蛋白合成が主に肝で行われ、しかも肝 L. P. L. 活性がきわめて低い事実を反映していると考察された。

血清から抽出した L. P. L. 阻害糖蛋白を等電点分画法により部分精製し、さらにゾーン電気泳動法及び粗 L. P. L. 阻害糖蛋白抗体を用いた免疫電気泳動法により本物質の分析を試みた結果、等電点 4.2~ 4.9 間の α_2 -グロブリンに属する酸性糖蛋白であることが判明したが、炎症性疾患、悪性腫瘍などに増加する既知血清糖蛋白に属しない物質であった。粗 L. P. L. 阻害糖蛋白の白鼠長期投与実験の結果大動脈及び心筋 L. P. L. 活性が著明に減少し、大動脈、脾動脈壁に脂肪浸潤を心、脾動脈に内膜肥厚を惹起させた。病

理所見は、用いた標品が爽雜血清蛋白を含有するため、L. P. L. 阻害糖蛋白のみによると断定できないが本研究では他の成績を考慮すれば、動脈硬化症の成立、進展にリポ蛋白リパーゼ阻害作用をもつ糖蛋白が深く関係していると結論できるとした。

以上の研究は、動脈硬化症の成立機序に脂質代謝異常の関与、特に脂酸動員機構の阻害を一因とする機序を解明したもので、臨床的にも動脈硬化の理解を容易ならしめるばかりでなく、治療上でも多くの示唆を与えた重要な研究である。

よって本研究者は医学博士の学位をうるに十分な資格を有するものと判定した。