

食品の機能性成分としてのパントテン酸誘導体の
脂質低下作用に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科
動物応用科学専攻 食品科学

DA0301 勝俣 学

食品の機能性成分としてのパントテン酸誘導体の
脂質低下作用に関する研究

麻布大学大学院獣医学研究科
動物応用科学専攻 食品科学

DA0301 勝俣 学

目 次

緒 論

1. 研究の背景 1
2. 研究の目的 9

第 1 章 各種動物の血中・肝脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的 19
2. 材料および方法 19
3. 結果 21
4. 考察 24
5. 要約 25

第 2 章 高コレステロール飼料飼育動物の脂質動態に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的 27
2. 材料および方法 27
3. 結果 29
4. 考察 42
5. 要約 45

第 3 章 実験的高コレステロール・トリグリセリド血症に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的 46
2. 材料および方法 46
3. 結果 47
4. 考察 50
5. 要約 52

第4章 実験的高トリグリセリド血症・脂肪肝に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的	53
2. 材料および方法	53
3. 結果	55
4. 考察	60
5. 要約	63

第5章 PaSSO_3Ca の脂質低下の作用機序

第1節 高コレステロール飼料飼育ラットを用いた PaSSO_3Ca のコレステロール低下の作用機序

1. 目的	64
2. 材料および方法	64
3. 結果	68
4. 考察	74
5. 要約	76

第2節 正常飼料飼育ラットのコレステロール代謝に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的	77
2. 材料および方法	77
3. 結果	80
4. 考察	87
5. 要約	89

第3節 PaSSO_3Ca のラットに対するトリグリセリド低下の作用機序

1. 目的	91
2. 材料および方法	91
3. 結果	96
4. 考察	104
5. 要約	107

総括	109
謝辞	115
参考文献	116

本文中に記載の略語は次の根拠によるものとした。

略号	英文用語	用語
ACAT	acyl CoA cholesterol acyltransferase	アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ
Ach	acetyl choline	アセチルコリン
ACP	acyl carrier protein	アシルキャリアープロテイン
ACTH	adrenocorticotrophic hormone	副腎皮質ホルモン
acyl-CoA	acyl coenzyme A	アシル-コエンザイムA
AHA	American Heart Association	米国心臓協会
AI	atherogenic index	動脈硬化指数
7 α -OHase	cholesterol 7 α hydroxylase	コレステロール7 α ハイドロキシラーゼ
Apo	apoprotein	アポタンパク
ATP	adenosine triphosphate	アデノシントリリン酸
AX	alloxan	アロキサン
BA	bile acid	胆汁酸
BW	body weight	体重
CA	sodium cholate	コール酸ナトリウム
c-AMP	adenosine monophosphate	サイクリックAMP
CAT	carnitine acyl-CoA transferase	カルニチン-アシルCoAトランスフェラーゼ
CE	esterified cholesterol (cholesteryl ester)	エステル型コレステロール (コレステリルエステル)
CEase	cholesterol esterase	コレステロールエステラーゼ
CETP	cholesteryl ester transfer protein	コレステリルエステル転送タンパク
CH	cholesterol	コレステロール
CM	chyromicron	カイロマイクロン
CoA	coenzymeA	コエンザイムA
DBED	dibenzylethylenediamine	ジベンジルエチレンジアミン
Dp-CoA	dephosphoCoA	デホスホCoA
Dp-CoASSO ₃ H	dephosphoCoA-S-sulfonic acid	デホスホCoA-S-スルホン酸
ED	estradiol	エストラジオール
EN	ethionine	エチオニン
ET	ethanol	エタノール
FC	free cholesterol	遊離コレステロール
FFA	free fatty acid	脂肪酸 (遊離脂肪酸)
FW	fructose	果糖
G3P	glycerol-3-phosphate	グリセロール-3-リン酸
GL	glucose	グルコース
HCD	high cholesterol diet	高CH飼料
HDL	high density lipoprotein	高比重リポタンパク
HDL/T	HDL-CH/total-CH	HDL-CH/総CH
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA
hr	hour	時間
HSL	hormone sensitive lipase	ホルモン感受性リパーゼ
HTGL	hepatic triglyceride lipase	肝性トリグリセリドリパーゼ
IDL	intermediate density lipoprotein	中間比重リポタンパク
IHD	ischemic heart disease	虚血性心疾患
IL	intralipos	イントラリポス
LBF	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> factor	乳酸菌増殖因子
LCAT	lecithin cholesterol acyltransferase	レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ
LDL	low density lipoprotein	低比重リポタンパク
LPL	lipoprotein lipase	リポプロテインリパーゼ
M	molar	モル
MA	mevalonic acid	メバロン酸
Mix	mixture	混合物
OA	orotinic acid	オロチン酸
OO	olive oil	オリーブオイル
PaA	pantothenic acid	パントテン酸
PaSH	pantetheine	パンテテイン
PaSS	pantethine	パンテチン
PaSSO ₃ Ca	Calcium D-pantetheine-S-sulfonate	パンテテイン-S-スルホン酸カルシウム

略号	英文用語	用語
PaSSO ₃ H	D-pantetheine-S-sulfonic acid	D-パンテテイン-S-スルホン酸
PaSSO ₃ Na	sodium D-pantetheine-S-sulfonate	パンテテイン-S-スルホン酸ナトリウム
PHLA	post heparin lipolytic activity	ポストヘパリン脂肪分解活性
PHP	post heparin plasma	ポストヘパリン血漿
PL	phospholipid	リン脂質
P-PaA	4'-phosphopantothenic acid	4'-ホスホパントテン酸
P-PaSH	4'-phosphopantetheine	4'-ホスホパンテテイン
P-PaSS	4'-phosphopantethine	4'-ホスホパンテチン
P-PaSSO ₃ H	4'-phosphopantetheine-S-sulfonic acid	4'-ホスホパンテテイン-S-スルホン酸
PTU	6- <i>n</i> -propyl-2-thiourasil	6- <i>n</i> -プロピル-2-チオウラシル
RCT	reverse CH transport	コレステロール逆転送
TC	tetracycline	テトラサイクリン
T-CH	total cholesterol	総コレステロール
(T-HDL)-CH	(total minus HDL)-cholesterol	(総コレステロール-HDL)-コレステロール
TG	triglyceride	トリグリセリド
VLDL	very low density lipoprotein	超低比重リポタンパク
(VLDL+LDL)-CH	(VLDL plus LDL)-cholesterol	(VLDL+LDL)-コレステロール

緒論

1. 研究の背景

1-1 食品の保健的機能の研究

食肉および臓器類などの副産物は、生命活動に必要としている成分（脂質、タンパク質、ミネラル、ビタミン）や、生体機能（免疫系、内分泌系、神経系、循環系）を維持・調節するための成分を含有している。古来より疾病や外傷などの際、罹患している部位と同じ部位の筋肉や臓器を食することで、その治癒を図ることができると考えられたり、臓器粉末が漢方薬として利用されていることから、食肉^{1,3)}、その副産物⁴⁾、加工品⁴⁾などが生体調節機能を有することは十分に期待されることである。また、食肉は古くから、その栄養性が高く評価されてきた。後に、嗜好性や保健的機能が食品の評価要因となるに至り、それぞれ一次～三次機能と称されるようになった（表1）。

表1. 食品の機能

一次機能	基本的栄養性
二次機能	嗜好性（味、香り、外観）
三次機能	保健的栄養性（生体調節機能）

近年、特にこの食品の保健的機能（三次機能）に対する関心が高まり、多くの研究が行われるとともに、その成果を生かした食品が次々と登場してきた。農林水産省においても、2004年8月に発表された「食品機能性研究の推進方針」⁵⁾の中で、患者数が多い生活習慣病（糖尿病、高脂血症、高血圧など）について、疾病リスクの高い者および患者を対象とした効果の高い機能性食品の提供を重点化方向にすることを示している。現在では、三次機能を備えた食品を「機能性食品」と呼んでいる。そのような生理機能を有する物質は、はじめ植物由来のもの（緑黄色野菜のβ-カロチン、大豆イソフラボン^{6,7)}、ブルーベリーのアントシアニン⁸⁾）、次に牛乳・乳製品の分野で活発に行われ、ラクトリペプチド（血圧降下作用）^{9,10)}、カゼインホスホペプチド（カルシウム吸収促進）などが開発された。一方、同じ畜産食品の範疇でも、食肉分野での研究は最近になって食肉中に含まれる機能性物質の探索を中心に活

発に行われるようになった。その中で、牛骨格筋に多く含まれるカルノシン（抗酸化作用、運動能力向上作用）^{11,12}、L-カルニチン¹³、鶏骨格筋に多く含まれるアンセリン（運動能力向上作用、抗酸化作用）¹¹、その他、グルタチオン（抗酸化作用）¹⁴、タウリン（肝機能改善作用）¹⁵、クレアチン（抗酸化作用）¹⁶、共役リノール酸¹⁷などの生理活性が発見された。

この中でも特に、L-カルニチン、共役リノール酸は注目を浴びている物質である。L-カルニチンは、食肉には比較的多く含まれ、特に牛肉には多い（130mg/100g程度）。この物質は、脂肪酸（free fatty acid, FFA）の分解を促進することによりトリグリセリド(triglyceride, TG)の蓄積を抑制し、脂肪肝の生成を予防するのに役立つとされている。また、スタミナ維持や疲労回復にも効果があるため^{16,18,19}、スポーツ飲料の素材としても利用されている。欧米では、L-カルニチンを含むダイエット用サプリメントも市販されている。

共役リノール酸は、リノール酸の幾何学異性体であり、反芻動物の脂肪に多く含まれる。反芻胃に棲息する微生物は、リノール酸を共役リノール酸に変換し、生成した共役リノール酸は乳房や筋肉に移行する。このため、牛乳や牛肉は共役リノール酸をもっとも多く含む食品となっている。共役リノール酸は抗がん作用・抗動脈硬化作用¹⁷を持つことで注目されている。

このように、食肉の分野では、近年になってようやく食肉の摂取と健康との関係に注目した研究が増えつつある状況である。

1-2 特定保健用食品の現状²⁰

特定保健用食品とは、食生活において特定の保健の目的で摂取する者に対し、その摂取によって当該保健の目的が期待できる旨の表示をする食品であり、栄養改善法第12条第1項に基づき、厚生労働大臣の許可を受けなければならないものとして、平成3年9月1日からスタートした。現在、許可されている特定保健用食品の内訳は、(1) お腹の調子を整える食品、(2) コレステロール (cholesterol, CH) が高めの方の食品、(3) CHが高めの方、お腹の調子が気になる方の食品、(4) 血圧が高めの方の食品、(5) ミネラルの吸収を助ける食品、

(6) ミネラルの吸収を助け、お腹の調子が気になる方の食品、(7) むし歯の原因になりにくい食品、(8) 歯を丈夫で健康にする食品、(9) 血糖値が気になりはじめた方の食品、(10) 食後の血中 TG が上昇しにくく、身体に脂肪が付きにくい食品、(11) 食後の血中 TG が上昇しにくい、また CH や TG が気になる方の食品、(12) 食後の血清 TG が上昇しにくい食品の 12 項目に分類されている (厚生労働省ホームページ²¹⁾ に記載)。このうち動脈硬化性疾患と関連のある食品は、上記番号の 2、3、9~12 の 6 項目となっており、90 食品が認められている。この分野への注目がいかに大きいかが伺われる。

こうした高脂血症の食事療法に関する特定保健用食品の多くが、大豆タンパク、リン脂質 (phospholipid, PL) 結合大豆ペプチドと水溶性食物繊維の低分子化アルギン酸ナトリウム、サイリウム種皮由来の食物繊維、キトサンで、その他、植物ステロール(エステル)、ジアシルグリセロール、グロビタンパク分解物からなるものである。大豆タンパクによる CH 低下作用については多くの報告²²⁾がある。その機序については、分解された大豆タンパクのペプチドが腸管内で胆汁酸を吸着し、胆汁酸の再吸収を抑制するためと、食事由来の CH の腸管での吸収抑制などが考えられている。低分子化アルギン酸ナトリウム、サイリウム種皮、キトサンなどの食物繊維の CH 低下作用についても、大豆タンパクと同様の機序が考えられている。植物ステロールの CH 低下作用については、American Heart Association (AHA) のガイドラインで取り上げられていることもあり、注目を集めている。植物ステロールの作用は、食事由来の CH の腸管での吸収抑制である。一方、ジアシルグリセロールとグロビタンパク分解物の血清脂質に及ぼす影響は、食後の血中 TG の上昇抑制である。近年、食後に見られるカイロマイクロン (chylomicron, CM) の増加を主体とした血中 TG の増加を食後高脂血症として、動脈硬化の一因子と捉えるようになってきている。ジアシルグリセロールは腸管で吸収されにくく、食後高脂血症を起こしにくい脂肪として注目されている。

また、動脈硬化性疾患の発症には、酸化リポタンパクの関与が考えられていることから、動脈硬化の予防にビタミン E、ビタミン C、カロテノイド、ポリフェノールなどの抗酸化物

が注目を集めている。

食後の血糖値を下げる食品としては、難消化性デキストリンを中心に小麦アルブミン、ギャバ葉ポリフェノール、豆鼓エキス、L-アラビノースの5種類が成分として、20品目が認められている。また、血圧に関与するものとして、サーデンペプチド、カゼインデカペプチド、ラクトトリペプチド、かつお節オリゴペプチドなどのペプチドがあり、これらは、アンジオテンシン変換酵素阻害による血圧低下を期待するものである。現在23品目が認められている。

このように、動脈硬化性疾患に関連する特定保健用食品として、多数の品目が認められている。これらは、高脂血症、高血圧、糖尿病などの予防に密接に関連しているが、治療薬として認められているわけではなく、あくまでも各自の判断で利用する食品である。

1-3 脂質代謝異常と虚血性心疾患 (Ishemic Heart Disease, IHD) の関係

わが国においては食生活の欧米化とモータリゼーションの発達により、高脂血症、高血圧、糖尿病、痛風、肥満などに代表される生活習慣病が増加し、大きな社会問題となっている。いずれの病態も IHD のリスクファクターと呼ばれ、心筋梗塞の発症率の上昇をもたらすこととなる。疫学的に心筋梗塞の発症との因果関係が明らかなリスクファクターは、血中 CH、特に低比重リポタンパク (low density lipoprotein : LDL)-CH である。LDL が変性し、動脈硬化促進的なりポタンパクとなるからである。様々な介入実験から、食事療法、運動療法や薬物療法により LDL-CH 値を低下させると心疾患の発生を予防し得ることが明らかになっている²³⁻²⁵⁾。動脈硬化症は、多くのリスクファクターにより発症・進展する。これまでの多くの基礎および臨床研究から、脂質代謝と動脈硬化症とが密接に関連することは明らかである。

主な血清脂質には CH、TG、PL、FFA があり、それらの中で臨床的に問題となる脂質は、血清 CH、血清 TG で、脂質代謝異常はそれらの脂質の量により高 CH 血症、高 TG 血症に分類される。しかし、現在では脂質代謝異常を検討する際、リポタンパク中の脂質量や質の変化を捉えることの重要性が提唱²⁶⁾されている。

脂質は、それだけでは水に不溶であるため、血中ではタンパク質と結合し存在する。このタンパク質をリポタンパクと言い、比重により CM、超低比重リポタンパク (very low density lipoprotein, VLDL)、中間比重リポタンパク (intermediate density lipoprotein, IDL)、LDL、そして高比重リポタンパク (high density lipoprotein, HDL) に分類される。その中でも前述した LDL とともに、HDL が多大な関心を集めるようになった。その理由として、臨床的あるいは疫学的研究により血清 HDL 濃度と動脈硬化疾患発生率との間に強い負の相関があることが明らかにされた²⁷⁾ことによる。この血清 HDL 濃度が高いと動脈硬化が起こりにくく、それが低いと動脈硬化が進展し易いという大変興味ある事実は、CH 逆転送 (reverse CH transport, RCT) の概念の確立と、コレステリルエステル転送タンパク (cholesteryl ester transfer protein, CETP) の発見により裏付けられている²⁸⁾。すなわち、末梢細胞から遊離 CH (free cholesterol, FC) の形で引き抜かれた CH は HDL 上でレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) の作用でエステル化され、コレステリルエステル (cholesteryl ester, CE) として HDL 内部に保持される。このようにして、HDL は CE 含量を増加しながら成熟し、最終的には肝臓へと転送される。その過程は 3 種類あり、HDL 粒子自身が全体として肝臓に取り込まれる過程と、HDL の CE が選択的に肝臓に取り込まれる過程と、HDL の CE が CETP の作用によってアポ B 含有リポタンパク (VLDL, IDL, LDL) へと転送され、こうして HDL から CE を受け取ったアポ B 含有リポタンパクが LDL 受容体やレムナント受容体を介して肝臓に取り込まれることによって、結果的に HDL の CE が肝臓に転送されることになる間接的な過程である。ヒトにおいてはこの CETP を介する HDL-CH の肝臓への転送過程が HDL 代謝および CH 逆転送において重要であることが明らかになっている (図 1 および図 2)。

一方、TG は主にグルコースから解糖系により代謝されて生成したグリセロール 3-リン酸 (G3P) から、ホスファチジン酸経路で合成される。肝臓で合成された TG のほとんどは VLDL の形で分泌される。基質となるアシル-コエンザイム A (acyl coenzyme A, acyl-CoA) の

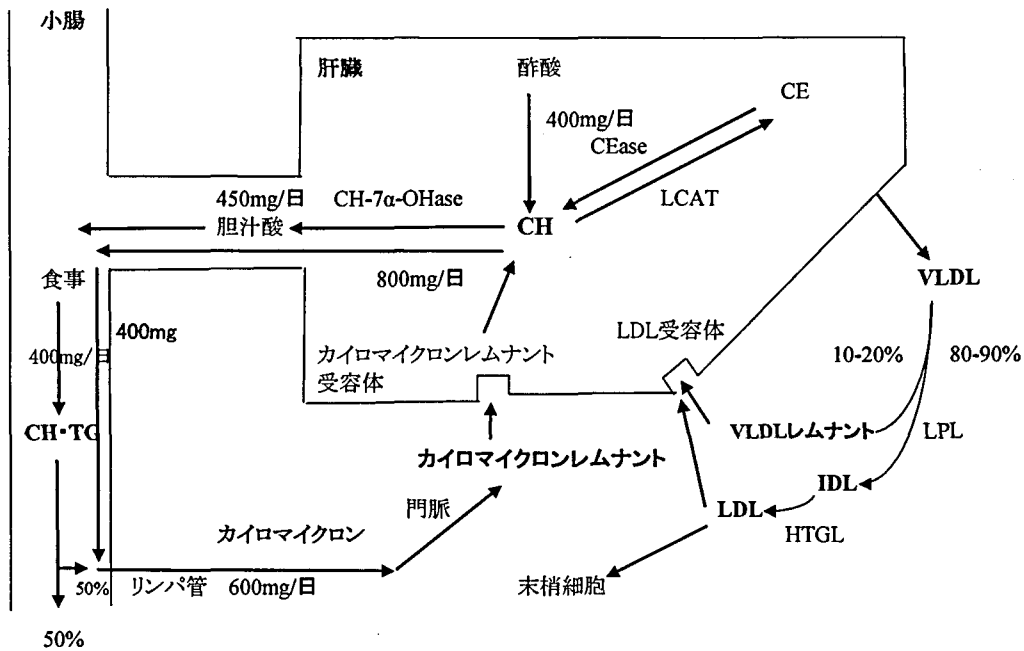


図1. 生体内のコレステロール代謝²⁶⁾を改変

CH:遊離型コレステロール、CE:エステル型コレステロール、CEase:コレステロールエステラーゼ
 ACAT:アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ、7α-OHase:コレステロール7α-ヒドロキシラーゼ

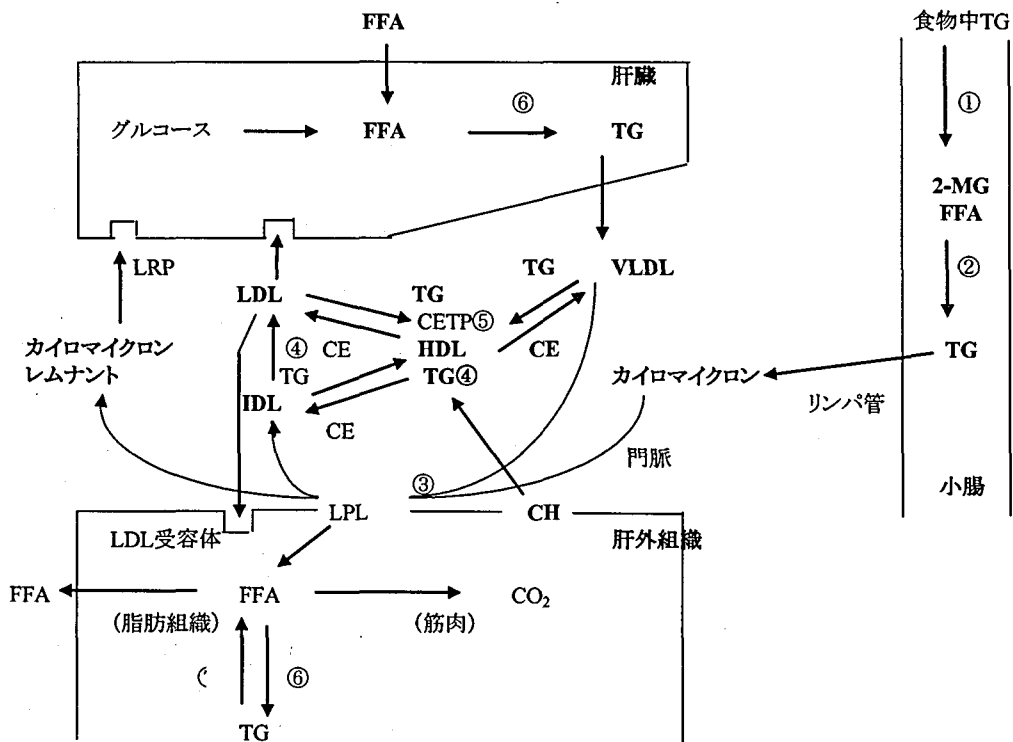


図2. 生体内のトリグリセリドの代謝と臓器間輸送²⁷⁾を改変

①膵リパーゼ、②TG合成(モノアシルグリセロール経路)、③リポプロテインリパーゼ、④肝性リパーゼ
 ⑤コレステロールエステル転送蛋白、⑥TG合成(ホスファチジン酸経路)、⑦ホルモン感受性リパーゼ

アシル基は、主に次の3つの経路で供給される：① *de novo* 脂肪酸合成、② TG リッチリ

ポタンパクにリポプロテインリパーゼ (lipoprotein lipase, LPL) が作用して生成した FFA、③ 脂肪組織の貯蔵 TG がホルモン感受性リパーゼ (hormone sensitive lipase, HSL) により分解されて生成した FFA、ヒトでは②と③が主である。血液中に入った TG の分解は、LPL と肝性 TG リパーゼ (hepatic triglyceride lipase, HTGL) によって行われる。

LPL の最も重要な役割は、小腸から消化吸収された食事由来の TG を運搬する CM および肝臓で合成分泌された TG を運搬する VLDL の TG 水解である。小腸から胸管を経て循環血中に流入したアポタンパク B48 を含む CM は、LPL の活性発現に必要な因子であるアポタンパク C-II を HDL 粒子から受け取り、成熟 CM となる。この TG は、LPL によって大部分 FFA とグリセロールに水解され、表層のアポタンパク (A,C,E など) や PL は HDL 粒子に転送され、粒子サイズの小さい CE に富むカイロマイクロソームになる。カイロマイクロソームは、肝臓のアポタンパク E を認識するレムナントリセプターによって取り込まれ処理される。肝臓から分泌された VLDL の大部分も LPL によって FFA とグリセロールに水解され、表層のアポタンパク (C, E など) やリン脂質は HDL 粒子に転送され、粒子サイズが小型化した IDL 粒子となる。IDL 粒子はアポタンパク C-II 含量が低いいため LPL の基質となりにくく、IDL の TG は HTGL によって水解され、LDL 粒子になる。CM や VLDL の TG が LPL により水解されて生じた FFA は脂肪細胞に取り込まれ、再び内因性の TG へ再合成されて貯蔵される。この TG は必要に応じて HSL の作用を受け、FFA となり、循環血中に放出されアルブミンと複合体を形成して肝臓に取り込まれ、FFA は β -酸化でエネルギー源として利用され再び TG に再合成され、VLDL 粒子の成分として分泌される。CM や VLDL が LPL の作用を受け、TG を失い粒子サイズが小さくなる時、余剰のアポタンパクや PL は円盤状の原始 HDL に転送され、HDL 粒子形成が促進される。原始 HDL は細胞の余剰の CH や各リポタンパクの CH を引き抜き、表面の CH は HDL 粒子中に存在する LCAT の作用によって CE に変換され粒子の中心部に移行する。CE に富む HDL は CM や VLDL と接触し、HDL 粒子中に存在する CETP の作用によって HDL 粒子は TG を受け取るとともに

CE を CM や VLDL に転送する。これらの過程で HDL 粒子形態は次第に球状になり、TG と CE に富む HDL₃ へと成長していく。HDL₃ はさらに LCAT や CETP 作用により HDL₂ へと変換し、最終的には肝臓の HDL リセプターに認識されて処理される。これら HDL 粒子による CH の転送は LDL 粒子とは逆で、末梢組織から肝臓へと転送されているので CH の逆転送と呼ばれている。HTGL は、HDL 代謝において HDL₂→HDL₃ への変換を促進して HDL₃ 量を増加させ、結果的に末梢組織から肝臓への CH 逆転送を促進する働きをしている²⁹⁾。

このように、IHD のリスクファクターである脂質代謝異常、特に高脂血症、高 LDL 血症ならびに低 HDL 血症を可能な限り早期に発見し対処することは、虚血性心疾患を予防する上で非常に重要なことと言える。

わが国における脳卒中、IHD および循環器疾患のリスクファクターの現状を把握する目的で、2000 年 11 月に第 5 次循環器疾患基礎調査³⁰⁾が全国の 30 歳以上の男女計 8,357 人を対象に実施された。これによると、血清 CH 値は、1980 年から 1990 年にかけて、各性、年齢層で 10~15mg/dl の上昇が観察されたが、1990 年から 2000 年にかけては、男性でほぼ横ばいから、30~50 歳代では若干 (3~4mg/dl) の増加傾向、女性ではむしろ低下傾向にあった。このことから、日本人成人の CH 値の上昇傾向は止まりつつあると思われる。医師より高脂血症といわれた者の 1/3 以上が食事や運動の指導を受けており、脂肪や CH の多い食べ物を控えたり、体重を減らすようにしている者も多い。医療機関や地域保健などで行われるこのような非薬物的な介入も、集団での CH 値の低下に貢献していると述べている。しかし、食生活などの世代間の差を考えると、これらの介入のない小児期、青春期における「食育」の必要性が考えられる。これについては、国民が健全な心身を培い豊かな人間性を育む食育を推進するため、施策を総合的かつ計画的に推進することを目的とし「食育基本法」が平成 17 年 6 月 10 日に成立し、7 月 15 日に施行された。内閣府³¹⁾、農林水産省³²⁾、厚生労働省²¹⁾、文部科学省³³⁾が、生活習慣病を防ぐため小児期、青春期より、食育活動を家庭、地域、行政の三位一体で推進することを提唱している。

2. 研究の目的

2-1 パントテン酸研究の歴史

パントテン酸 (pantothenic acid, PaA) に関する初期の研究は、他の多くのビタミンと同様に微生物を含めて各種の生物の生育因子あるいはヒトにおける欠乏症治癒効果などを対象として行われてきた。PaA の生体内での機能の解明は 1947 年、Lipmann らのアセチル化を行う酵素の補酵素 coenzyme A (CoA) に PaA が含まれているという発見³⁴⁾により急速に発展した。彼らは、この物質をハト肝臓より分離・精製し、その構造を決定した³⁵⁾。さらに、Moffatt と Khorana は、CoA の全化学合成に成功し、その構造を確定的なものにした³⁶⁾。Lynen と Reichert (1951) によって、アセチル CoA (acetyl CoA) が発見されるに及び、PaA の生理作用がほとんど CoA の機能との関連で解釈されるようになった³⁷⁾。その後、FFA の生合成に必要なアシルキャリアプロテイン (acyl carrier protein, ACP) の活性基として、4'-ホスホパンテテイン (4'-phospho-pantetheine, P-PaSH) の形で含まれていることが、Majerus らによって明らかにされ³⁸⁾、PaA の生体内での役割はいつそう注目されるようになった。

天然において PaA は、CoA や ACP 以外にも、PaA から CoA までの生合成の中間体などの誘導体として見出されている。古くは Snell らが、乳酸菌の一種である *Lactobacillus bulgaricus* や *Lactobacillus helveticus* の生育因子、すなわち、*Lactobacillus bulgaricus* factor (LBF) がパンテテイン (pantetheine, PaSH) であることを見出している³⁹⁾。乳酸菌中に存在する PaA の形態について、Germinario ら⁴⁰⁾の *L. plantarum* 中の結合型 PaA の研究によれば、大部分が 4'-ホスホパントテン酸 (4'-phosphopantothenic acid, P-PaA) であるという。動物では、PaA は生合成されないが、植物、酵母、大腸菌などにおいては³⁵⁾、 α -ケトイソ吉草酸より、ケトパントイン酸、さらにパントイン酸へと合成される (図 3)。パントイン酸はリン酸化され

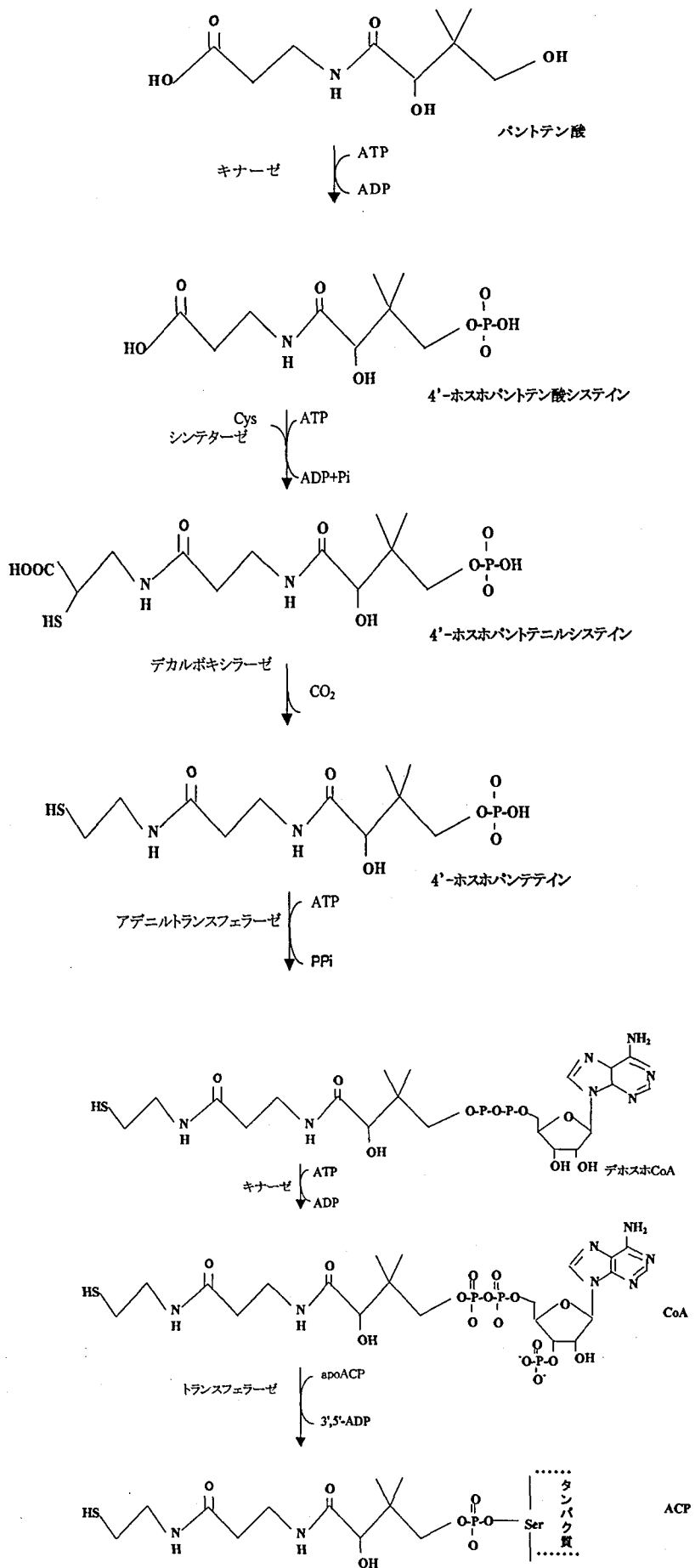


図3. パントテン酸からCoA・ACPの生合成経路

パントイル ATP が生成され、酵素反応で β -アラニンと縮合して PaA が生成される。

すべての動物組織では、食物から得た PaA から CoA を合成する能力をもっている。

それぞれの組織で CoA 合成の律速段階になっている反応は、PaA から P-PaA に進むリン酸化の反応であり、これを司るのはパントテン酸キナーゼである⁴¹⁾。1 分子の PaA から 1 分子の CoA を合成するために 4 分子の ATP を必要とする。ACP は、P-PaSH 残基を持っているが、これは 4'-ホスホパンテテイン-アポ ACP-トランスフェラーゼの作用で、CoA から転移されたものである(図 4)⁴²⁾。

動物における CoA の分解については、まだその機構が解明されていない点もあるが、原則的には、CoA 生合成の逆反応をたどると考えられている。

PaA の代謝機能として第一にあげられることは、アシル基の転移である。CoA、ACP とも、PaSH を含む酵素はすべて、アシル基転移反応の活性部位として P-PaSH の遊離の SH 基を用い、その機能は、結局アシルグループのキャリアとして働いていることになる。CoA は、アシルグループと高エネルギー結合で、チオエステル型をしている。これらのアシル誘導体は、縮合・添加反応、アシル基転移反応、電子求核反応など多くの代謝反応に関与している。

これらの中で最も重要なものは acetyl CoA であり、この物質は、FFA、アミノ酸および炭水化物の代謝によって生成し、TCA サイクルに入ることができるので、3 大栄養素からのエネルギー生産にとって重要な働きをしている。FFA がミトコンドリア膜を通過するには、acyl CoA のままでは通過できないので、膜間腔において、いったん、カルニチン-アシル CoA トランスフェラーゼ (carnitine acyl-CoA transferase, CAT) の作用でアシル-カルニチンエステルとなり、この形ではじめて膜を通過することができる(図 4)⁴³⁾。 β -酸化がなされているミトコンドリア・マトリックス内部で再び FFA は acyl CoA となり、 β -酸化を受ける。このように、CoA は脂肪の代謝との関連は深く、この他にも、FFA 生合成、TG の合成時には、FFA が CoA で活性化される必要があり、FFA の β -酸化では主役的役割を果たしている(図 4)。CoA は、CH の合成、ステロイド系ホルモンの代謝にも関わっている。

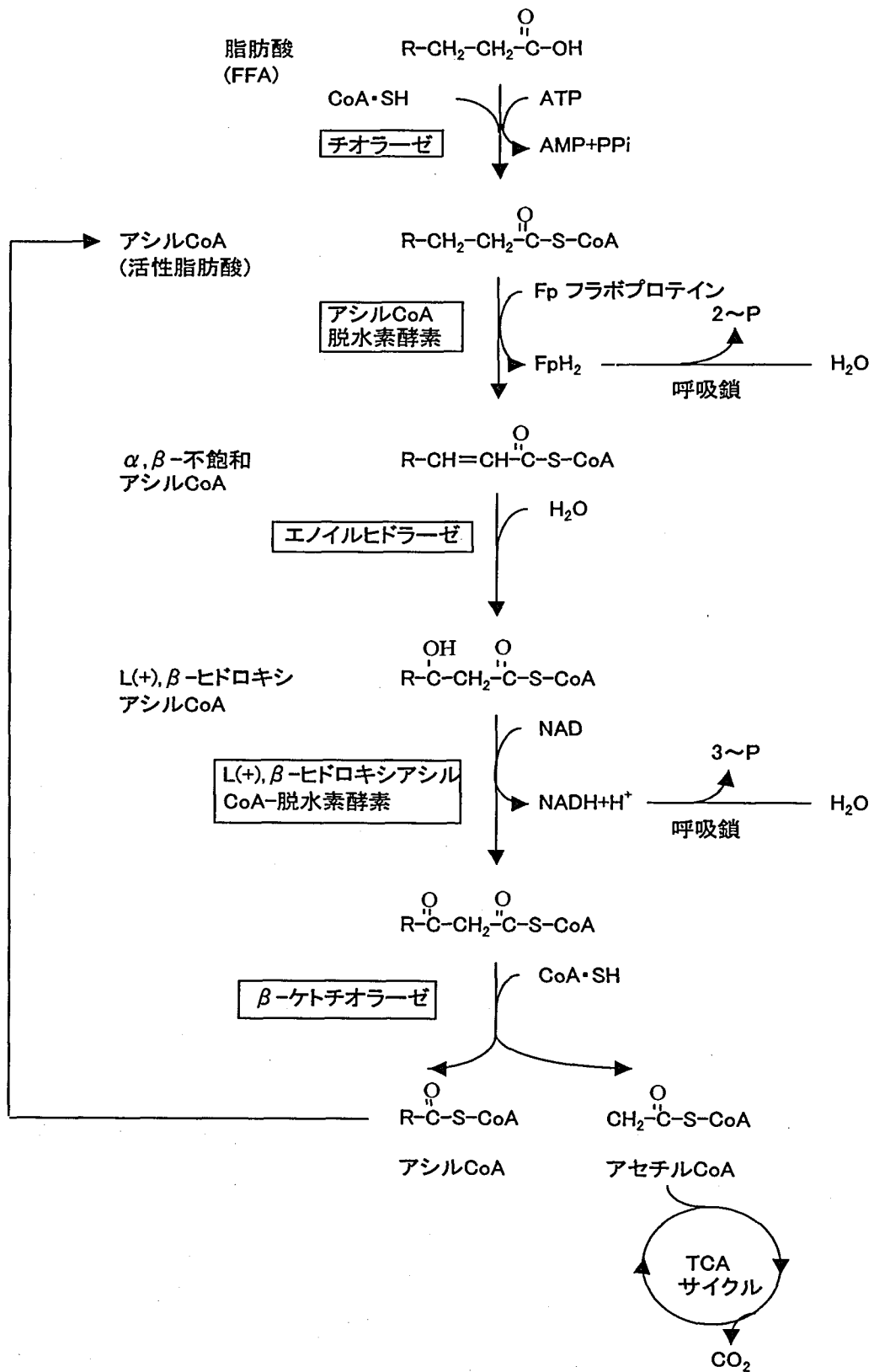


図4. 脂肪酸のβ-酸化

PaA の欠乏では、外観的症候として成長停止、体重減少、皮膚炎、脱毛などが見られる。特に、皮膚は一般に CoA 需要が高く、皮膚炎患者では血中 PaA 含量が低下している⁴⁴⁾。PaA 欠乏によるアセチルコリン (acetylcholine, Ach) 生成能の低下、ステロイド性ホルモン生産能の低下、副腎の障害などが皮膚炎の理由として考えられている。病理解剖的所見としては、十二指腸潰瘍などの消化管の障害、脂肪肝、副腎の壊死などが見られる。脂質代謝に及ぼす影響として、必須 FFA を含む長鎖 FFA の鎖長延長 (chain elongation) に障害が見られたり⁴⁵⁾、また脂質過酸化が増大することが知られている⁴⁶⁾。その他、PaA 欠乏マウスでは、動作が粗暴化し、脚の疼痛を思わせる痙攣を伴った失調歩行など神経系の障害が見られる。これは、神経刺激の chemical mediator としての Ach の再合成に CoA が必要なことから、Ach の欠乏が原因と考えられている⁴⁷⁾。

副腎は肝臓について PaA 含量が高く、PaA の欠乏は、副腎の肥大、壊死あるいは出血を起こすことが古くから知られている。これらの症候は、副腎におけるステロイドホルモンの生成・分泌の障害による⁴⁸⁾。Greenberg⁴⁹⁾、Glick と Twedt⁵⁰⁾らは、シロネズミの副腎における CoA 分布に対する PaA および ACTH (adrenocorticotrophic hormone, 副腎皮質ホルモン) 投与の影響を検討し、ACTH 投与はステロイドホルモンの産生部位である副腎皮質のすべての層 (球状層、索状層、網状層) で遊離型 PaA を減少させるが、索状層における結合型 PaA (CoA) を選択的にかつ顕著に増加させることを明らかにした。索状層は PaA を欠乏させたとき、最も急速に CH の消失の起こる場所であり、また出血性壊死の最も起こりやすい場所でもある。このことから、副腎皮質の索状層は ACTH の刺激に対して最も感受性の高い活発な機能を持つ部位であることが伺える。PaA 欠乏動物が各種のストレス、例えば寒冷、低酸素圧、遊泳、薬物 (ホルマリン) に対する抵抗力の弱いことは副腎機能を通して解釈され、また、PaA 欠乏動物における塩類および水分代謝の障害も脳下垂体-副腎系の障害を介するとされている⁵¹⁾。

近年、アルコール症が世界的に増加し、これらの患者についての栄養学的研究も増えてい

る。急性アルコール症の血液あるいは血清中の PaA 関連物質のレベルが低いことがよく知られており⁵²⁾、しばしば脂肪肝と付随して発見されることがある。また慢性のアルコール症でも、肝臓中 PaA 関連物質の低下がみられ⁵³⁾、極端な脂肪肝が伴うことが多い。アルコール症では肝臓への PaA 関連物質の貯蔵が妨げられている可能性が示唆される。アルコール症では、血流中の PaA レベルが正常者の数倍もあるにも関わらず、肝臓中のそれは低下していることが観察されている⁵⁴⁾。

2-2 パンテテイン-S-スルホン酸カルシウムの化学的性質および生理作用

新しい機能性食品となりうる物質を生み出すため、著者は食肉あるいは食品に含まれる成分あるいはその誘導体について調査を行い、牛、豚、鶏の肝臓中に多く含まれる PaA の誘導体であるパンテテイン-S-スルホン酸 (D-Pantetheine-S-sulfonic acid, PaSSO₃H) に注目した。PaSSO₃H は図 5 に構造式を示すように分子内にスルホン酸基を含有する分子量 358.4 の PaA 誘導体である。PaSSO₃H の Ca 塩であるパンテテイン-S-スルホン酸カルシウム (calcium D-pantetheine-S-sulfonate, PaSSO₃Ca) は、白色～微黄色の粉末で水に溶けやすくエタノールには極めて溶けにくく、クロロホルムにはほとんど溶けない化合物である。工業的にも PaA とブンテ塩より収率よく一段階の反応で生産する方法が確立している。

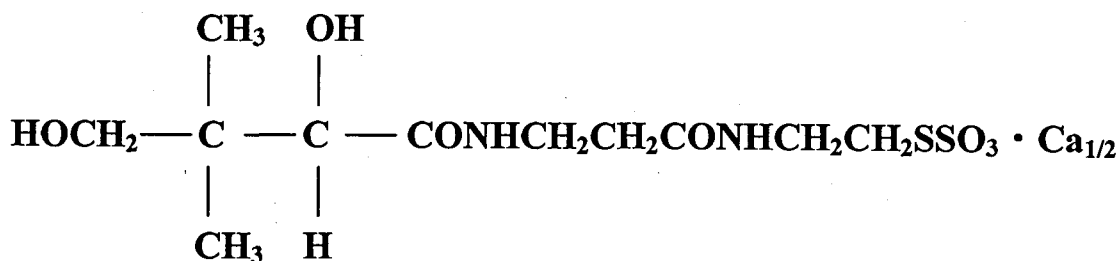


図 5. パンテテイン-S-スルホン酸 Ca の構造式

乳幼児の下痢症治療法の1つとして、古くから欧米、特にヨーロッパでは、ニンジン、リンゴ、バナナ、いなが豆などが使用されており、特殊な妙味のある効果を発揮することが経験的に認められている。これらが日本でも太田らにより広く乳幼児の下痢症に使用され、サルファ剤や抗生物質とは全く異なる治療法であることが確認⁵⁴⁾されている。それらの野菜や果物を下痢症の患者に与えると、まもなく容積の多い有形便を排泄することから、その作用機序の主役はペクチンとリグニンの膨化作用、吸着作用、コロイド粒子による腸管上皮細胞の保護収斂作用ならびに緩衝作用であろうと言われていた⁵⁵⁾。しかし、1908年「モローのリンゴ療法」で有名なモローは、ニンジンスープが有効な原因の1つは腸内細菌叢の変動であるとし、消化不良症と腸内細菌との関係は大腸菌の腸内増殖が重要な意義を持っていることを示唆した⁵⁶⁾。黒宮は、ニンジン、リンゴ、バナナなどがヒトの腸内ビフィズス菌を旺盛に増殖させることを確認している⁵⁷⁾。ニンジンをはじめとする野菜や果物中のビフィズス菌増殖促進物質の検索は、東京医科歯科大学小児科と東京大学薬学部とが数10年にわたる共同研究の結果、人参からPaSH類縁物質をビフィズス因子として見出している。それは、4'-ホスホパンテテイン-S-スルホン酸(4'-phosphopantetheine -S-sulfonic acid, P-PaSSO₃H)、P-PaSH、PaSH、ホスホパンテチン(phosphopantethine, P-PaSS)、パンテチン(pantethine, PaSS)、PaSSO₃H、3'-デホスホ-CoA-S-スルホン酸(3'-dephospho-coenzyme A-S-sulfonic acid, Dp-CoASSO₃H)などである⁵⁸⁾。ビフィズス菌の中には、PaAを利用するものとPaSH類縁物質を要求するものがあり、後者はPaAからCoAに至る段階で作られる物質であり、それらがビタミンとして利用されるものであることが知られている⁵⁹⁾。

このようにPaSSO₃Hは、はじめビフィズス菌の生育を *in vitro* で促進すること⁶⁰⁾、乳幼児のミルクに添加することにより、小腸内のビフィズス菌数を増加させることが⁶¹⁾明らかとなり、ニンジンのビフィズス因子中のビタミン活性物質としてその構造が確定した⁵⁸⁾。また、PaSSO₃Hは、*Bifidobacterium bifidum* N4株を用いた実験により、図6に示すような経路で、PaSHとなり、P-PaSHを経て⁵⁸⁾、エネルギー代謝⁶²⁾、アセチル化作用⁶³⁾、また、FFA

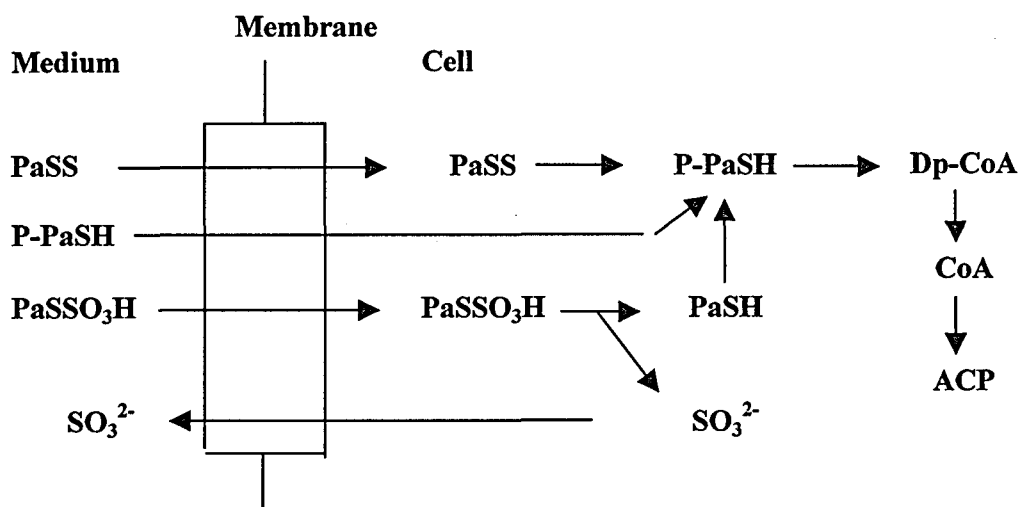


図6. ビフィズス菌におけるPaSSO₃Hの代謝経路

PaSS : pantethine P-PaSH : 4'-phosphopantetheine PaSH : pantetheine
Dp-CoA : dephospho-CoA CoA : coenzymeA ACP : acyl carrier protein

のβ酸化⁶⁴⁾に重要な役割を有するCoAおよびACPを生成することが明らかにされた³⁷⁾。

動物細胞には多くのPaA誘導体が存在しており⁶²⁾、PaAからCoAが合成される⁶⁴⁾。また、今回の実験において対照物質として用いたパンテチン(PaSS)は、PaAにシステアミン(H₂NCH₂CH₂SH)が結合した化合物であるPaSHが2分子ジスルフィド結合した化合物である。現在、臨床的に高脂血症や、それを伴う糖尿病、冠動脈硬化症などに広く用いられ、血清CHやTGの降下作用が報告されている⁶⁵⁾。また、IHDの危険因子であるHDL-CHの低下を抑制あるいは上昇させることにより、動脈硬化を起りにくくするという⁶⁶⁾でも注目を浴びている化合物である。PaSSの脂質低下作用機序についても多くの報告があり、HDLの増加については、LPLおよびLCAT活性増強に基づくVLDL-HDL経路の促進⁶⁷⁾、アポタンパクA-1(ApoproteinA-1, ApoA-1)合成の促進⁶⁵⁾によることがわかっている。TGの低下については、PaSSより合成されたCoAによるFFAのβ酸化の亢進⁶⁸⁾、LPLの活性化⁶⁹⁾に起因していると言われている。そして、実際、高CH飼料飼育ウサギに投与した場合、動脈硬化を抑制することがCarraraら⁷⁰⁾によって示されている。

2-3 研究の目的

PaSS については上述のように多くの報告が見られるが、PaSSO₃H の脂質代謝に影響を及ぼすという知見は、現在全く得られていない。しかし、前述した図 6 の *Bifidobacterium bifidum* N4 株を用いた実験結果で明らかなように PaSSO₃H は、P-PaSH 以降 PaSS と同様の変化をたどっている。

PaSSO₃H が、動物においてもビフィズス菌での経路と同様な代謝で CoA を生じる可能性や、これと構造類似の PaSS が、ヒトの高脂血症治療のため臨床的に使用されている点を考えると、脂質代謝に対して影響を及ぼすことが充分推定される。また、スルホン酸基を含有することにより、PaSS とは異なった効果が期待できる。

以上の見地から、PaSSO₃H の脂質代謝に及ぼす影響について以下の検討を行った。PaSSO₃H は粘稠性が高く結晶化が困難なので、検討にはそのカルシウム塩である PaSSO₃Ca を用いた。

第 1 章では、PaSSO₃Ca のマウス、ラット、ハムスター、ウズラの血清・肝脂質への影響を検討した。第 2 章では、高 CH 飼料で飼育したマウス、ラット、ハムスター、ウズラ、ウサギの血清・肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を検討した。ウズラ、ウサギについては動脈硬化に及ぼす影響についても検討を行った。第 3 章では、卵黄投与、PTU 投与による甲状腺機能低下、トライトン高脂血症ラットの脂質代謝に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を検討した。第 4 章では、イントラリポス、オリーブオイル、フルクトース、アロキササン、エタノール（急性的・慢性的）、エチオニン、オロチン酸、テトラサイクリン処置により実験的高 TG 血症・脂肪肝ラットを作成し、これらのモデルでの PaSSO₃Ca の作用を検討した。第 5 章では、ラットを用い PaSSO₃Ca が血清 CH 低下作用を示した 1%CH (0.5% コール酸ナトリウム、sodium cholate、CA) 含有飼料飼育条件で CH 低下の作用機序を、CH 低下作用を示さなかった市販飼料で飼育した条件でなぜ血清 CH 低下を示さなかったか、また TG 低下の作用機序についても検討を行った。

動物実験は、東京薬科大学実験動物倫理規定により、動物の苦痛を極力考慮した状態で実施した。

第1章 各種動物の血中・肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

1. 目的

PaSSO₃Ca については、動物・ヒトに対して脂質低下作用を有するという知見は現在までに全く報告されていない。しかし、同族化合物である PaSS に関しては、clofibrate⁷¹⁾、pravastatin⁷²⁾、probucol⁷³⁾などの CH 合成阻害剤、cholestylamine⁷⁴⁾のような CH 異化促進剤と異なり、作用が非常に緩和で市販飼料で飼育した（正常飼料）ラット（正常ラット）に投与しても血清 CH、TG の低下作用は弱いという報告⁷⁵⁾がなされている。その作用の緩和さから脂質低下剤というよりも脂質代謝改善剤という分類がなされている。また、PaSS には脂質低下作用に関し種差が存在し、高 CH 飼料飼育ラットに対する作用は緩和であり⁶⁶⁾、高 CH 飼料飼育ウサギ⁷⁰⁾、高脂血症ヒト⁶⁵⁾に対しては脂質低下作用を有することが知られている。他にもいくつかの脂質低下剤において種差、性差の存在が報告されている⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

そこで、本章では PaSSO₃Ca の血中、肝脂質に及ぼす影響について、マウス、ラット、ハムスターおよびウズラの4種の動物を用い種差の存在の有無を検討し、特にラットに関しては性差についても検討した。ハムスター、ウズラについては血清リポタンパクを分離し、各分画に対する PaSSO₃Ca の影響を PaSS と比較検討した。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物および飼育方法

脂質代謝の正常な雄性 ddY 系マウス（体重約 30g）、雄性 Wistar 系ラット（体重約 120g）、雄性 Golden 系ハムスター（体重約 80g）、雄性日本ウズラ（体重約 80g）を使用した。性差の実験では、雌雄 Sprague-Dawley 系ラット（体重約 160g）を使用した。動物はすべて（株）埼玉実験動物供給所（葛飾、埼玉）より入手し、東京薬科大学実験動物飼育施設にて飼育した。飼料は日本クレア（株）（目黒、東京）製 CE-2、飲料水は水道水を使用し、それぞれ自由摂取

させた。ウズラは、ウズラ飼育用粉末飼料を1日10g制限摂取させた。これらの飼料を正常飼料とし、これらの飼料で飼育した動物を正常動物とした。飼育室は温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 前後に調節され、照明の点灯は7:00から19:00まで行った。

2-2. 試薬

PaSS と PaSSO_3Ca は相互薬工(株) (相模原、神奈川) 製、他の試薬は特級品を使用した。

2-3. PaA 誘導体投与

マウスとラットには、 PaSSO_3Ca および対照化合物の PaSS をそれぞれ、PaA 量として同量になるように 1,361 および 1,000mg/kg/BW、1日1回、2週間経口投与した。ハムスターとウズラの実験では、食餌中に PaSSO_3Ca または PaSS を 1.36%と 1%の割合で添加し、ハムスターで4および8週間、ウズラで7週間投与した。

2-4. 血液・肝臓の採取および脂質の測定

マウスはエーテル麻酔下、ヘパリン・生理食塩水で洗浄した注射器で心臓採血した。ラット、ハムスターはエーテル麻酔下、断頭採血した。ウズラはエーテル麻酔下、翼下静脈より定期的に採血し、最終採血は心臓より行った。採取した血液から遠心分離により、血清あるいは血漿を得た。すべての動物で開腹後、眼科バサミで肝臓を摘出採取した。肝臓から 0.25M ショ糖液で調製した肝臓の 10%ホモジネートを調製し、脂質測定に供した。血清(血漿)中コレステロール(CH)は酵素法⁷⁹⁾、トリグリセリド(TG)は GPO-*p*-クロルフェノール法⁸⁰⁾、リン脂質(PL)は酵素法⁸¹⁾、脂肪酸(FFA)は Doncombe 法⁸²⁾ および High Density Lipoprotein (HDL) -CH はヘパリン・マンガン結合沈殿法⁸³⁾を用い定量した。以下に簡略に測定法の原理を示す。

CHの酵素法では、試料中の CE をコレステロールエステラーゼで FC に分解し、もともと試料中に存在する FC と分解で生じた FC をコレステロールオキシダーゼで酸化すると Δ^4 -コレステノンと過酸化水素が生成する。この過酸化水素に 4-アミノアンチピリンとフェノールを反応させ、生成した赤色キノン色素の 505nm の吸光度を測定することにより、CH

を比色定量した。

TG の GPO-*p*-クロルフェノール法は、試料中の TG に LPL を作用させ、グリセリンと FFA に分解し、生成したグリセリンを、ATP およびグリセロキナーゼの作用でグリセロール-3-リン酸とし、さらにグリセロール-3-リン酸オキシダーゼの作用で酸化させ、ジヒドロキシアセトンリン酸と過酸化水素を生成させる。この過酸化水素から CH の酵素法と同様に赤色キノンを生成させ、505nm の吸光度を測定した。

PL の酵素法 (コリンオキシダーゼ・フェノール法) は、PL にホスホリパーゼ D を反応させ、生成したコリンをコリンオキシダーゼでベタインと過酸化水素に分解する。この過酸化水素から CH の酵素法と同様に赤色キノンを生成させ、505nm の吸光度を測定した。

FFA は、試料に硫酸銅試薬と抽出液を加え振とうすると、試料中の FFA はタンパク質との結合が切れると同時に銅塩となって抽出液中に移行分離される。これに発色試液 (バソクプロイン) を加えると、銅はバソクプロインと特異的に結合し、キレート化合物を生成し、黄褐色を呈するので、480nm の吸光度を測定した。

HDL-CH のヘパリン・マンガン結合沈殿法は、試料にヘパリンとマンガンを含む沈殿試液を加え、HDL 以外のリポタンパクを選択的に沈殿させ、上清中の CH を酵素法により測定した。

2-5. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し、student's の *t*-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

マウスに2週間投与した時の血漿および肝脂質に及ぼす両 PaA 誘導体の影響を表 1-1 に示した。PaSSO₃Ca 投与群 はマウスの血漿 CH、TG、PL の各量を有意に低下させた。PaSS 投与群では変化はなかった。一方、肝臓中の脂質については、CH に影響せず、TG が上昇傾向を示した。PaSS 投与でも同様の結果が得られた。

表1-1. 正常マウスの血漿・肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響(2週間投与後)

群	血漿脂質 (mg/dl)			肝脂質 (mg/g·liver)	
	CH	TG	PL	CH	TG
正常	116.6±10.8 (100)	141.7±29.9 (100)	205.6±23.1 (100)	2.6±0.6 (100)	4.0±2.0 (100)
PaSSO ₃ Ca	84.2±11.8**** (72)	97.3±30.0** (69)	150.0±23.6**** (73)	2.6±0.3 (100)	5.4±1.5 (135)
PaSS	114.5±6.2 (98)	127.0±19.8 (90)	189.6±14.7 (92)	2.2±0.5 (85)	5.1±1.8 (128)

正常群に対する有意差有り. p<0.05(**), p<0.01(****).

(): 正常群の値を100とした場合の割合.

次に Wistar 系ラットに2週間投与した実験では、両 PaA 誘導体で TG のみ有意に低下した(表 1-2)。肝臓では、PaSSO₃Ca 投与群は CH, TG の有意な低下、FFA の低下傾向、PL の有意な上昇を示した(表 1-2)。PaSS 投与群では PL が PaSSO₃Ca 投与群と同様に有意な上昇を示し、CH に変化なく、TG は上昇傾向を、FFA は低下傾向を示した(表 1-2)。

表1-2. 正常ラットの血清脂質および肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響(2週間投与後)

群	血清脂質					肝脂質			
	CH (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)	HDL-CH (mg/dl)	CH (mg/g·liver)	TG (mg/g·liver)	PL (mg/g·liver)	FFA (mEq/g·liver)
正常	93.1±1.9 (100)	210.8±25.2 (100)	108.5±3.0 (100)	0.60±0.08 (100)	62.7±8.8 (100)	4.2±0.3 (100)	6.0±0.8 (100)	31.1±3.0 (100)	5.5±1.8 (100)
PaSSO ₃ Ca	99.3±7.9 (107)	131.7±34.0*** (62)	107.5±10.6 (99)	0.61±0.16 (102)	62.6±8.6 (100)	3.7±0.5*** (88)	5.3±0.6*** (88)	39.1±3.0**** (126)	4.0±0.5 (73)
PaSS	103.8±9.6 (111)	142.1±63.8 (67)	108.9±7.1 (100)	0.53±0.09 (88)	63.3±9.3 (101)	4.6±0.4 (110)	7.2±1.3 (120)	41.9±2.3# (135)	4.5±1.0 (82)

正常群に対する有意差有り. p<0.02(***), p<0.01(****), p<0.001(#).

(): 正常群の値を100とした場合の割合.

表 1-3 にハムスターの血清・肝脂質に対する PaSSO₃Ca 投与の影響を示した。血清 Total (T)-CH が PaSSO₃Ca の4週投与により、有意に低下した。これは HDL-CH および T-HDL で求めた (VLDL+LDL) -CH 両分画の CH の低下による。HDL-CH も減少したが、T-CH に対する HDL-CH の比率である HDL/T (%) は上昇した。よって、(VLDL+LDL) -CH / HDL-CH で求められる動脈硬化指数 (Atherogenic Index, AI) は有意な改善を示した。PaSSO₃Ca は TG, PL も有意に低下させた。PaSS でも同様な傾向を示した。PaSSO₃Ca は肝臓中の CH を有意に低下させ、TG も低下させる傾向を示した。両 PaA 誘導体の8週投与では、血清中の

各測定パラメーターに対する低下作用が多少強まる傾向にあった。肝臓では PaSSO₃Ca で 4週投与と同様の傾向を示し、また、PaSS は CH を有意に低下させ、TG を上昇させる傾向にあった。

表1-3. 正常ハムスターの血清脂質・リポ蛋白および肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

群	投与期間 (週間)	血清脂質							肝脂質	
		Total (T)-CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	HDL/T (%)	(T-HDL)-CH (mg/dl)	AI	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	CH (mg/g·liver)	TG (mg/g·liver)
正常	4	156.3±49.2 (100)	62.9±14.1 (100)	41.3±5.8 (100)	93.5±37.1 (100)	1.46±0.34 (100)	285.5±79.8 (100)	241.7±65.5 (100)	7.6±2.1 (100)	5.3±0.9 (100)
	8	203.5±17.5 (100)	64.9±6.3 (100)	32.2±4.8 (100)	138.5±20.7 (100)	2.17±0.48 (100)	356.0±140.6 (100)	307.6±47.6 (100)	4.4±0.4 (100)	5.4±0.8 (100)
PaSSO ₃ Ca	4	116.8±10.9** (75)	56.7±6.8** (90)	48.6±4.4** (118)	66.1±8.5 (71)	1.07±0.19** (73)	190.7±38.1** (67)	214.1±24.9** (89)	3.6±0.5**** (47)	4.1±0.7 (77)
	8	91.0±31.6# (45)	39.6±10.1 (61)	44.5±4.5# (138)	51.4±21.9# (37)	1.27±0.23**** (59)	150.8±33.3# (42)	163.5±45.9# (53)	3.6±0.4**** (82)	4.8±0.4 (89)
PaSS	4	92.1±11.4**** (59)	45.7±5.5** (73)	49.8±5.1** (121)	46.5±9.2** (50)	1.03±0.21** (71)	178.0±43.3** (62)	189.5±25.7 (78)	3.9±0.9**** (51)	4.0±0.4 (75)
	8	114.8±19.6# (56)	44.3±6.7 (68)	38.9±5.3** (121)	70.5±15.2# (51)	1.60±0.30** (74)	330.4±94.8 (93)	212.2±39.7**** (69)	2.6±0.1# (59)	7.1±2.0 (131)

正常群に対する有意差有り。 p<0.05 (**), p<0.01 (****), p<0.001 (#).
(): 正常群の値を100とした場合の割合。

ウズラへの 3 週投与では、PaSSO₃Ca で血清 CH が有意な低下を示した以外大きな変化はなかった (表 1-4)。7 週では、両 PaA 誘導体で血清 TG が上昇傾向を示し、他の脂質に影響を示さなかった (表 1-4)。11 週まで投与を行ったが、同様の結果であった (データ省略)。

表1-4. 正常日本ウズラの血清脂質・リポ蛋白に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

群	投与期間 (週間)	Total (T)-CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	HDL/T (%)	(T-HDL)-CH (mg/dl)	AI	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)
正常	3	242.7±16.3 (100)	136.4±31.3 (100)	55.9±10.0 (100)	106.3±21.7 (100)	0.84±0.32 (100)	N.T.	N.T.
	7	217.9±21.7 (100)	147.5±32.5 (100)	67.5±12.3 (100)	70.4±25.5 (100)	0.53±0.30 (100)	96.9±12.6 (100)	403.2±37.6 (100)
PaSSO ₃ Ca	3	204.8±43.5* (84)	111.8±39.1 (82)	53.9±10.1 (96)	98.1±23.2 (92)	0.91±0.35 (108)	N.T.	N.T.
	7	198.8±21.8 (91)	138.3±42.8 (94)	65.9±11.9 (98)	68.5±20.6 (97)	0.55±0.24 (104)	112.5±28.8 (116)	402.2±11.2 (100)
PaSS	3	240.5±32.1 (99)	141.1±32.3 (103)	58.4±8.5 (104)	99.4±20.4 (94)	0.74±0.25 (88)	N.T.	N.T.
	7	226.2±9.9 (104)	146.1±14.9 (99)	64.3±8.2 (95)	81.9±21.5 (116)	0.57±0.19 (108)	140.1±45.9 (145)	401.8±12.9 (100)

正常群に対する有意差有り。 p<0.10 (*).

(): 正常群の値を100とした場合の割合。 N.T. : Not tested.

SD 系ラットを用いた性差の実験では、雄で両 PaA 誘導体投与により、血清 FFA が有意に

上昇し、PaSS 投与群で TG が有意に上昇した (表 1-5)。一方、雌では PaSSO₃Ca は血清 TG, PL, HDL-CH を有意に上昇させ、血清 CH と FFA を上昇させる傾向を示した。PaSS でも同様の傾向を示した。雄の肝臓では、PaSSO₃Ca 投与により TG が有意に低下し、PL は有意に上昇した (表 1-5)。一方、雌では PL が有意に上昇し、CH は上昇傾向を、TG は低下傾向を示した。PaSS では TG が上昇傾向を示した以外、PaSSO₃Ca と同様な結果となった。

表1-5. 雌雄SD系ラットの血清脂質および肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響(2週間投与後)

群	血清脂質					肝脂質		
	CH (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)	HDL-CH (mg/dl)	CH (mg/g·liver)	TG (mg/g·liver)	PL (mg/g·liver)
雄性								
正常	45.8±4.7 (100)	52.2±17.5 (100)	92.1±10.6 (100)	0.43±0.17 (100)	36.6±5.1 (100)	5.9±1.1 (100)	4.4±1.1 (100)	40.9±7.7 (100)
PaSSO ₃ Ca	43.9±6.7 (96)	57.3±19.7 (110)	100.2±19.9 (109)	0.74±0.13****	38.7±5.2 (106)	6.7±1.0 (114)	2.6±1.0***	52.4±4.9***
PaSS	52.4±7.2 (114)	89.7±36.1**	109.2±18.2 (119)	0.98±0.29****	39.6±5.9 (108)	7.3±0.7**	3.1±1.0 (70)	51.7±6.2**
雌性								
正常	51.1±6.4 (100)	50.1±6.6 (100)	98.3±11.3 (100)	0.60±0.08 (100)	37.9±6.2 (100)	6.5±1.0 (100)	4.8±1.5 (100)	42.8±4.2 (100)
PaSSO ₃ Ca	56.8±10.9 (111)	72.5±14.6****	120.2±16.9***	0.68±0.11 (113)	47.3±8.6**	7.9±1.5 (122)	4.1±1.5 (85)	53.0±6.9****
PaSS	51.8±8.4 (101)	71.5±14.3****	109.9±9.1 (112)	0.71±0.11 (118)	42.9±4.3 (113)	7.6±0.8 (117)	6.7±1.8 (140)	53.6±3.8#

正常群に対する有意差有り. p<0.05(**), p<0.02(***), p<0.01(****), p<0.001(#).

(): 正常群の値を100%とした場合の割合.

4. 考 察

今回、PaSSO₃Ca の脂質低下作用の有無に関し、各種動物を使用し検討した。血清 CH の低下作用がマウス、ハムスター、ウズラで、また、血清 TG 低下作用がマウス、ラット (雄性 Wistar 系)、ハムスターで確認された。これらの作用はハムスターで最も強力に現れた。このように、PaSSO₃Ca には脂質低下作用があることが初めて示された。また、種差が見られた理由としては、第一に動物種による脂質代謝の違い⁸⁴⁻⁸⁶、例えば、脂質吸収能、コレステロール合成能、胆汁酸合成能の差、脂質代謝関連酵素活性などが各動物種間で相違すること、第二にリノレン酸⁸⁷、ビタミン E 誘導体⁸⁸あるいはセサミン⁸⁹に見られるように、薬物自体に対する種による感受性の違いが考えられる。Spady ら⁹⁰はハムスターの脂質代謝が

ヒトに似ていることを報告しているが、著者の結果もハムスターの正常飼料飼育時の血清脂質値が比較的高い点、また、リポタンパク組成がヒトに類似している点において、ハムスターが脂質代謝に影響する化合物のスクリーニングに適していることを示している。

また、性差の影響という点で、雌雄 Sprague-Dawley 系ラットを使用し検討した。女性の閉経後に血清 CH、TG の上昇および HDL-CH の低下を伴う脂質代謝異常が多発することが知られており⁹¹⁾、これは女性ホルモンであるエストラジオール (estradiol, ED) 分泌の減少によることが知られている⁹¹⁾。性差の実験では、 PaSSO_3Ca がこのような高脂血症に対し何らかの影響を及ぼす可能性があるかを検討した。雄の血清脂質に対する両 PaA 誘導体の影響は少なく、雌の脂質に大きな影響を与えた。女性ホルモンである ED には脂質上昇の抑制効果が知られており⁹²⁾、 PaSSO_3Ca に ED 分泌を経由した脂質代謝への影響が示唆される結果となった。

対照化合物として使用した PaSS については、その脂質低下の作用機序は、FFA の β -酸化の亢進による⁹³⁾とされている。今回の実験において、マウス、ラット、ハムスターへの PaSSO_3Ca 投与で PaSS 投与よりも強力な TG 低下作用を示していた。これは PaSSO_3Ca が β -酸化亢進以外の、TG 合成阻害、TG 分解亢進などの脂質低下作用点にも働きかけていることを示唆する結果である。

飼猫、犬などペット動物の食餌の高カロリー化により、ヒトの成人病と同様に、脂質上昇による動脈硬化や脳梗塞が発生している。家畜では、牛の周産期に脂肪肝が多発し、繁殖障害や乳房炎発症の引き金になるとされている^{94,95)}。これらの課題を解決するために、 PaSSO_3Ca のような TG に対する低下作用が強力な化合物の適用が必要と思われる。

5. 要約

PaA 誘導体である PaSSO_3Ca の脂質低下作用を PaSS と比較検討した。 PaSSO_3Ca は各種動物に対し、脂質低下作用を有していた。また脂質低下作用に関し、種差が存在するかをマウ

ス、ラット、ハムスターおよびウズラを用いて検討した結果、血清 CH 低下作用は、マウス、ハムスターおよびウズラで観察され、ラットでは見られなかった。その CH 低下作用はハムスターで最も強かった。血清 TG 低下作用は、マウス、ラットおよびハムスターで観察され、ウズラでは観察されなかった。作用の強さはハムスターで最も強力であった。血清中のリポタンパク組成についても検討を行った。両 PaA 誘導体はハムスターの(T-HDL)-CH を減少させ、AI を改善した。このように、PaSSO₃Ca の脂質低下作用には種差が存在することが示された。性差については、Sprague-Dawley 系ラットで検討し、雄の血清脂質に対する PaA 誘導体の影響は少なく、雌の血清脂質およびリポタンパク中の脂質に大きな影響を与えていた。したがって PaSSO₃Ca の脂質への作用には性差が存在することが示された。

第2章 高コレステロール飼料飼育動物の脂質動態に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

1. 目的

前章で、PaSSO₃Ca の各種動物に対する脂質低下作用を検討し、PaSSO₃Ca がマウス、ハムスターおよびウズラに対し、脂質低下作用を有することを明らかにした。

脂質低下作用を検討する場合、正常動物を対象とするばかりでなく、ヒトの場合と同様に、食餌中から CH を過剰に摂取したときの、化合物の影響を検討しなければならない。

そこで今回は、高 CH 飼料飼育動物の脂質動態に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を調べるため、マウス、ラット、ハムスター、ウズラおよびウサギを実験動物として用い、動物の週齢、飼育期間、食餌中の CH 含量、CA 添加量を変化させ、高 CH 飼料飼育動物の脂質動態に及ぼすそれらの影響を検討し、同時にそれらの条件下での PaSSO₃Ca の脂質動態に及ぼす影響を検討した。

血中の CH、TG を減少させる最終的な目的は、動脈硬化を防ぎ、虚血性心疾患の発症を抑制することにある。そこで本章では、ウズラ、ウサギについては動脈硬化に及ぼす PaSSO₃Ca の影響について合わせて検討した。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物および飼育方法

供試動物は、埼玉県実験動物供給所から購入し、温度 25±2°C、湿度 50±5%、照明は 12 時間毎の明暗サイクル（明時 7:00～9:00）に調節された動物室で飼育した。

1) マウス：雄性 ddY 系マウス、体重 20g 前後および 32g 前後のものを 1 群 5 匹ずつ使用した。飼料は正常群では日本クレア(株) 製、CE-2、高 CH 群では CE-2 をベースに 1%CH および 0.5%CA を添加した食餌（高 CH 飼料）で 2 週間自由摂取させた。飲料水としては水道水を用い自由摂取させた。

- 2) ラット：雄性 Wistar 系ラット、体重 120g 前後のものを 1 群 5 匹ずつ使用した。飼料は正常群では CE-2、高 CH 群では CE-2 をベースに 1%CH を添加した飼料（高 CH 飼料）で 2 および 4 週間、1%CH および 0.5%CA を添加した飼料（高 CH 飼料）で 1 および 2 週間飼育した。その他の飼育条件はマウスと同様に行った。
- 3) ハムスター：雄性 Golden 系ハムスター、体重 80g 前後のものを 1 群 5 匹ずつ使用した。飼料は正常群では CE-2、高 CH 群では CE-2 をベースに 1%CH および 0.5%CA を添加した飼料（高 CH 飼料）で 1 週間、1%CH および 0.2%CA を添加した飼料（高 CH 飼料）で 3 週間飼育した。他の飼育条件はマウスと同様に行った。
- 4) ウズラ：雄性日本ウズラ、体重 80g を使用した。飼料はウズラ産卵用粉末飼料（日本クレア製）で飼育したものを正常群とし、高 CH 群では正常群の飼料に 0.5%CH および 0.1%CA を添加した飼料（高 CH 飼料）を 1 日 10g 制限摂取させ 18 週間飼育した。その他の飼育条件はマウスと同様に行った。
- 5) ウサギ：雄性 New Zealand 種、体重約 2-3kg を 1 群 5 匹ずつ使用した。飼料は正常群にはオリエンタル酵母工業(株)（板橋、東京）製、CR-4、高 CH 群には CR-4 をベースに 0.5%CH を添加した飼料（高 CH 飼料）で 30 日間飼育した。その他の条件はマウスと同様に行った。

2-2. 試薬

PaSS と PaSSO_3Ca は相互薬工(株) 製、他の試薬は特級品を使用した。脂質測定用キットは和光純薬工業(株)（大阪）製を用いた。

2-3. PaA 誘導体の投与

マウス、ラットでは、PaSS (400mg/ml)、 PaSSO_3Ca (544mg/ml) をそれぞれ 1,000 および 1,361mg/kg/BW の投与量で 1 日 1 回、高 CH 飼料飼育開始と同時に終了するまで、連続投与した。正常群には PaA 誘導体の代わりに水を投与した。但し、1%CH および 0.2%Na・CA 添加飼料で飼育したハムスターの実験およびウズラを用いた実験では食餌中に PaSS および PaSSO_3Ca をそれぞれ 1%、1.36%の割合で添加し、ウサギでは 0.5%CH 飼料に両 PaA 誘導体

を1%添加し、高CH飼料飼育開始と同時に終了するまで投与した。

2-4. 血液・肝臓の採取

マウスはヘパリン・生理食塩水溶液で洗った注射器で心臓採血し、3,000回転で20分間遠心して血漿を得た。ラット、ハムスターは断頭採血し、ウズラは翼下静脈、ウサギは耳静脈よりヘパリン処理した注射器を用い、必要量採血し、3,000回転で20分間遠心して血清あるいは血漿を得た。肝臓は採取後ただちに氷冷した0.25Mショ糖溶液あるいは0.9%NaCl液で洗浄後、細切し、Potter-Elvehjem type ホモジナイザーを用いて、0.25Mショ糖あるいは0.9%NaCl液にて10%ホモジネートを調製し、脂質の測定に供した。

2-5. 動脈の採取および染色

ウズラ、ウサギの実験ではすべての大動脈は大動脈弓より腸骨動脈の分岐部まで採取し、外膜をていねいに剥離し、切開後、SudanIIIにて染色後、トレーシングペーパーで脂質沈着した部分をトレースし、林らの方法⁹⁶⁾により、脂質沈着の度合いにより5段階に分け(grade 一, 士, +, ++, +++) 肉眼的に判定(表2-1)した。

表 2-1. 脂質沈着の判定基準

Grade	—	士	+	++	+++
脂質の沈着度合い(%)	0-5	5-10	10-30	30-50	50-100

2-6. 脂質の測定

血清(血漿)および肝臓中脂質は第1章の方法を用い測定した。

2-7. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し、student's の t-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

1) 1%CH+0.5%CA 含有飼料飼育マウスの血漿 CH に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

結果を表2-2に示した。血漿および肝臓中CHは、高CH飼料飼育により20gのマウスで

3.4 倍および 0.7 倍、32g のマウスでは 1.4 倍および 2.9 倍に上昇していた。両体重のマウスとも血漿 CH は両 PaA 投与により高 CH 群より上昇していた。

表2-2. 1%CH(0.5%CA)含有飼料飼育マウスの血漿・肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響(2週間投与後)

群	血漿 CH (mg/dl)		肝 CH (mg/g·liver)	
	20g ^{a)}	32g ^{a)}	20g ^{a)}	32g ^{a)}
正常	45.5±16.9	99.2±6.9	4.7±0.6	10.3±1.4
高CH	152.5±47.6	140.2±12.5	3.3±1.0	30.0±8.2
	(100)	(100)	(100) ^{c)}	(100)
PaSSO ₃ Ca	297.6±46.8 [#]	203.4±49.4 ^{****}	9.4±1.4 [#]	42.6±3.6
	(195)	(145)	(290)	(142)
PaSS	324.0±47.8 [#]	173.4±15.7	6.9±1.0 [#]	37.9±4.8
	(212)	(124)	(213)	(126)

a) 実験開始時の体重.

(): 高CH群を100とした場合のパーセント

高CH群に対する有意差有り: p<0.01(****), p<0.001(#).

2) 1%CH 含有飼料飼育ラットの血清、肝 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

結果を表 2-3 に示した。体重 120g 前後のラットを 1%CH 含有飼料で 2 週間飼育すると、Total-CH、(VLDL+LDL) -CH、AI は正常群に対し上昇し、HDL-CH、HDL/T は低下した。4 週間の高 CH 飼料飼育により、これらの値に対する影響は少なくなった。PaSS 投与群では、2、4 週間ともこれらの値に対し低下作用を示さなかったが、PaSSO₃Ca 投与群では 4 週間で有意な低下を示した。PaSSO₃Ca は 2 週で HDL-CH を上昇し、4 週で有意な上昇を示した。VLDL+LDL 分画中の CH は、高 CH 群で 2、4 週間とも正常群に対し、顕著な上昇を示し、4 週間では PaSSO₃Ca は上昇を有意に抑制していた。HDL/T は高 CH 群で顕著に低下し、PaA 誘導体群で上昇したが、PaSSO₃Ca の 4 週投与で顕著な上昇を示した。AI についても HDL/T と同様の結果となった。

肝 CH は正常群に対し、高 CH 飼料 2、4 週間の飼育でそれぞれ 3.3 倍、4.7 倍に上昇しており、2 週間では PaA 誘導体による影響はないが、4 週間では、両化合物とも有意な低下作用を示した。

表2-3. 1%CH含有飼料飼育ラットの血清脂質・リポタンパクおよび肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響(2および4週投与後)

群	処置 投与期間 (weeks)	血清CH (mg/dl)			HDL/T(%)	動脈硬化指数 (AI) [(A-B)/B]	肝 CH (mg/g liver)
		Total (A)	HDL (B)	VLDL+LDL ^{a)} (A-B)			
正常	2	66.0±7.0	55.4±4.8	10.6±13.3	83.9±13.3	0.2±0.0	5.1±0.4
	4	89.4±8.9	48.9±3.9	39.0±10.0	54.7±6.8	0.8±0.1	6.5±0.4
高CH	2	232.9±37.2	40.4±3.8	192.5±26.2	17.3±2.6	4.8±0.5	16.9±2.4
	4	141.2±13.2 (100)	48.9±2.7 (100)	93.8±9.5 (100)	34.6±3.2 (100)	1.9±0.2 (100)	30.3±2.9 (100)
PaSSO ₃ Ca	2	240.0±19.8 (103)	49.2±5.1 (122)	190.8±20.0 (99)	20.5±2.7*** (118)	3.9±0.5 (81)	16.2±1.0 (96)
	4	97.9±5.2** (69)	54.5±5.0** (111)	45.2±8.1** (48)	55.7±7.2** (161)	0.8±0.1**** (42)	20.9±3.0** (69)
PaSS	2	216.5±44.7 (93)	49.6±4.4 (123)	166.9±44.3 (87)	22.9±3.8**** (132)	3.4±0.7 (71)	15.0±0.6 (89)
	4	142.1±12.7 (101)	51.9±6.0 (106)	90.5±13.8 (96)	36.5±5.1 (105)	1.7±0.4 (89)	23.5±2.1** (78)

a) (VLDL+LDL)-CHは総CH値からHDL-CH値を差し引いた値とした。

():高CH群を100とした場合のパーセント

高CH群に対する有意差有り: p<0.05(**), p<0.02(***), p<0.01(****).

3) 1%CH+0.5%CA 含有飼料飼育ラットの血清 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

結果を表 2-4 に示した。1%CH+0.5%CA 含有飼料の 1 週間負荷により Total-CH は正常群の 4.4 倍まで、2 週間では 4.7 倍まで上昇していた。PaSS の 1 週間投与では高 CH 群の 145% と有意な上昇を示したが、PaSSO₃Ca 投与群では 65% と有意な低下作用を示した。2 週間でも 1 週間と同様、PaSS で上昇傾向、PaSSO₃Ca では 65.3% と有意な低下を示した。HDL-CH および HDL/T は 1, 2 週間とも正常群に比べ高 CH 群で顕著な減少を示した。HDL-CH に両 PaA 誘導体投与による影響は見られなかったが、HDL/T は、PaSSO₃Ca の 1, 2 週間投与により上昇する傾向にあり、PaSS の 1 週間投与により低下した。(VLDL+LDL) -CH および AI は 1, 2 週間とも高 CH 飼料飼育により正常群に対し顕著な上昇を示した。この上昇に対し PaSSO₃Ca は 1 週目の(VLDL+LDL)-CH を有意に低下し、1, 2 週目の AI を改善していた。PaSS ではこれら 2 つの値を改善しなかった。肝 CH は 1, 2 週間とも正常群に比較し高 CH 群で 3.8~6.8 倍高い値を示した。両 PaA 誘導体の 1 週間投与により高 CH 群より上昇したが、2 週間の投与で高 CH 群レベルまで低下した。

表2-4. 1%CH(0.5%CA)含有飼料飼育ラットの血清脂質・リポタンパクおよび肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響(1及び2週間投与)

群	処置 投与期間 (weeks)	血清CH (mg/dl)			HDL/T (%)	動脈硬化指数 (AI) [(A-B)/B]	肝 CH (mg/g liver)
		Total (A)	HDL (B)	VLDL+LDL ^{a)} (A-B)			
正常	1	87.6±6.9	58.6±6.8	29.0±6.9	66.9±6.7	0.5±0.1	6.1±0.6
	2	106.9±3.4	69.1±2.4	37.6±13.9	64.6±3.9	0.5±0.2	4.2±0.4
高CH	1	389.7±87.6	35.4±6.5	354.3±84.7	9.1±2.7	10.0±2.2	22.9±1.0
	2	498.9±108.4 (100)	34.9±7.0 (100)	464.0±109.9 (100)	7.1±2.5 (100)	13.3±3.6 (100)	25.1±0.8 (100)
PaSSO ₃ Ca	1	274.6±37.8** (70)	32.4±9.7 (92)	242.2±50.0** (68)	11.8±2.1 (130)	7.5±1.9** (75)	26.4±1.9** (115)
	2	325.2±154.5** (65)	36.3±2.8 (104)	288.9±158.6 (62)	11.2±5.0 (160)	8.0±3.6** (60)	23.0±6.2 (92)
PaSS	1	566.5±79.0*** (145)	30.5±11.3 (86)	536.0±90.3*** (151)	5.4±0.9*** (59)	17.6±4.7*** (176)	27.8±1.5** (121)
	2	638.3±206.5 (128)	31.1±3.4 (89)	607.2±199.0 (131)	4.9±2.0 (70)	19.5±5.5 (147)	24.8±5.2 (99)

a) (VLDL+LDL)-CHは総CH値からHDL-CH値を差し引いた値とした。
 (): 高CH群を100とした場合のパーセント
 高CH群に対する有意差有り: p<0.05(**), p<0.02(***), p<0.01(****).

4) 1%CH+0.5%CA 含有飼料飼育ハムスターの血清 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

結果を表 2-5 に示した。ハムスターを 1%CH+0.5%CA 含有飼料で 1 週間飼育すると、正常群に対し、Total-CH および(VLDL+LDL)-CH はそれぞれ 1.4 および 1.7 倍に上昇し、両化合物投与により、低下傾向を示した。HDL-CH は高 CH 群で約 10%低下し、PaSS 投与による変化はなかったが、PaSSO₃Ca で低下傾向を示した。HDL/T は高 CH 群により低下し、両化合物投与で上昇傾向にあり PaSS でその作用は強かった。AI は高 CH 群で正常群に比較し、1.5 倍に上昇し、これに対し、両化合物とも改善傾向を示したが PaSS でその作用が強力であった。肝 CH はラットを同じ組成の高 CH 飼料で同期間飼育した時(表 2-3)より強く上昇した。これに対し両化合物とも有意な低下を示したが、PaSSO₃Ca で顕著であった。

表2-5. 1%CH(0.5%CA)含有飼育ハムスターの血清脂質・リポタンパクおよび肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響(1週間投与後)

群	血清CH (mg/dl)			HDL/T (%)	動脈硬化指数 (AI) [(A-B)/B]	肝 CH (mg/g liver)
	Total (A)	HDL (B)	VLDL+LDL ^{a)} (A-B)			
正常	126.0±46.1	42.8±7.6	83.2±45.9	34.0±13.5	1.9±0.5	3.9±0.4
高CH	175.8±34.3 (100)	38.4±4.0 (100)	137.3±33.3 (100)	21.8±3.6 (100)	3.6±0.8 (100)	21.4±1.3 (100)
PaSSO ₃ Ca	139.1±34.4 (79)	34.3±6.8 (89)	104.8±33.7 (76)	24.7±6.0 (113)	3.1±1.0 (85)	6.5±0.7# (30)
PaSS	130.8±40.4 (74)	38.6±14.0 (101)	92.2±31.2 (67)	29.5±8.2 (135)	2.4±1.0 (67)	13.3±5.1**** (62)

a) (VLDL+LDL)-CHは総CH値からHDL-CH値を差し引いた値とした。
 (): 高CH群を100とした場合のパーセント
 高CH群に対する有意差有り: p<0.01(****), p<0.001(#).

5) 1%CH+0.2%CA 含有飼料飼育ハムスターの血清 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

結果を表 2-6 に示した。1%CH+0.2%CA 含有飼料で3週間飼育することにより Total-CH および(VLDL+LDL)-CH はそれぞれ正常群の 2.3 および 2.8 倍まで上昇した。両化合物はこの上昇を抑制した。HDL-CH は高 CH 飼料給与群で正常群に比較し上昇したが、HDL/T は顕著に低下した。両化合物投与により HDL-CH は更に低下し、PaSS 投与群では、HDL/T も減少する傾向を示した。AI は高 CH 群で正常群の 2.0 倍に上昇し、両化合物による改善は見られなかった。肝 CH は高 CH 群で正常群の 10.0 倍に上昇し、両化合物で顕著な低下を示していた。

表2-6. 1%CH(0.2%CA)含有飼料飼育ハムスターの血清脂質・リポタンパク質および肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響(3週間投与後)

群	血清CH (mg/dl)			HDL/T (%)	動脈硬化指数 (AI) [(A-B)/B]	肝 CH (mg/g liver)
	Total (A)	HDL (B)	VLDL+LDL ^{a)} (A-B)			
正常	105.3±13.5	45.2±4.2	60.0±10.1	42.9±2.9	1.3±0.2	4.1±0.7
高CH	238.3±25.2	67.5±14.8	170.1±16.8	28.3±4.1	2.5±0.6	40.8±5.0
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	190.2±22.6	52.1±5.5	138.1±17.4**	27.4±0.0	2.7±0.1	25.3±6.2 [#]
	(80)	(77)	(81)	(97)	(108)	(62)
PaSS	196.3±10.9****	44.4±7.4**	151.9±11.6	22.6±3.7	3.4±0.7	23.6±1.8 [#]
	(82)	(66)	(89)	(80)	(136)	(58)

a) (VLDL+LDL)-CHは総CH値からHDL-CH値を差し引いた値とした。
 (): 高CH群を100とした場合のパーセント
 高CH群に対する有意差有り: p<0.05(**), p<0.01(****), p<0.001(#).

6) 0.5%CH+0.1%CA 含有飼料飼育ウズラの血漿・肝 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

0.5%CH+0.1%CA 含有飼料にて飼育したウズラの血漿・肝 CH およびリポタンパクの経時的变化とそれに対する両 PaA 誘導体の影響を図 2-1～図 2-6 に示した。血漿 CH は高 CH 群の 4 週間目で正常群の 6.0 倍まで上昇し、以降 16 週間まで徐々に上昇を続け、18 週間目で低下した。この血漿 CH 上昇に対し、両化合物とも常に有意な低下を示した (図 2-1)。

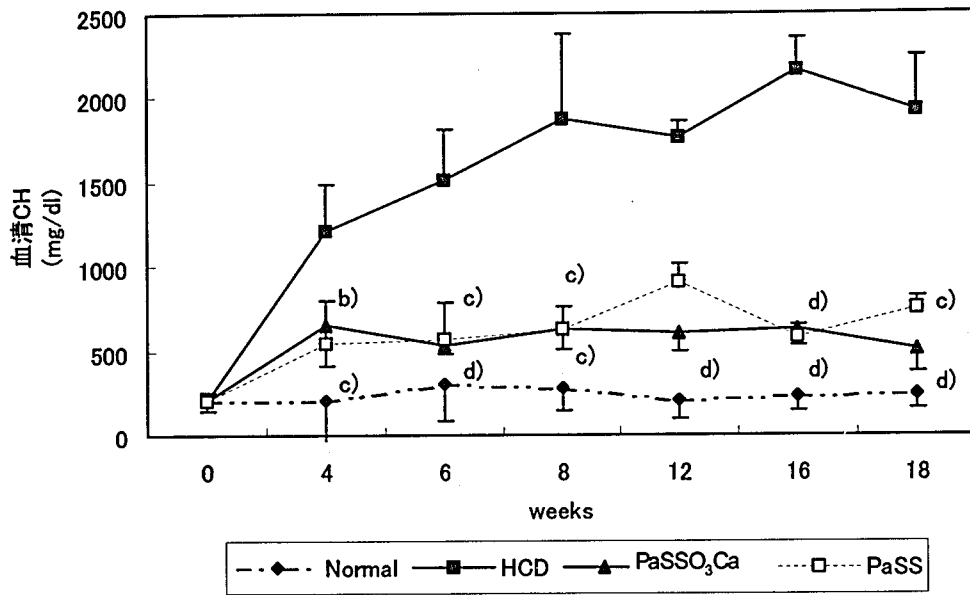


図2-1. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウズラの血漿CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05,c)p<0.01,d)p<0.001.

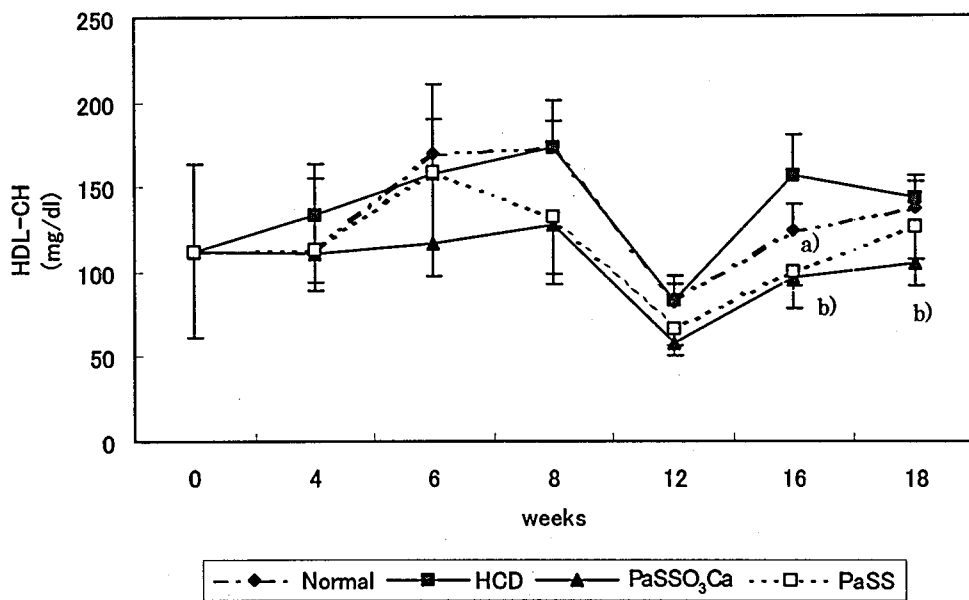


図2-2. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウズラの血漿HDL-CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: a)p<0.1, b)p<0.05.

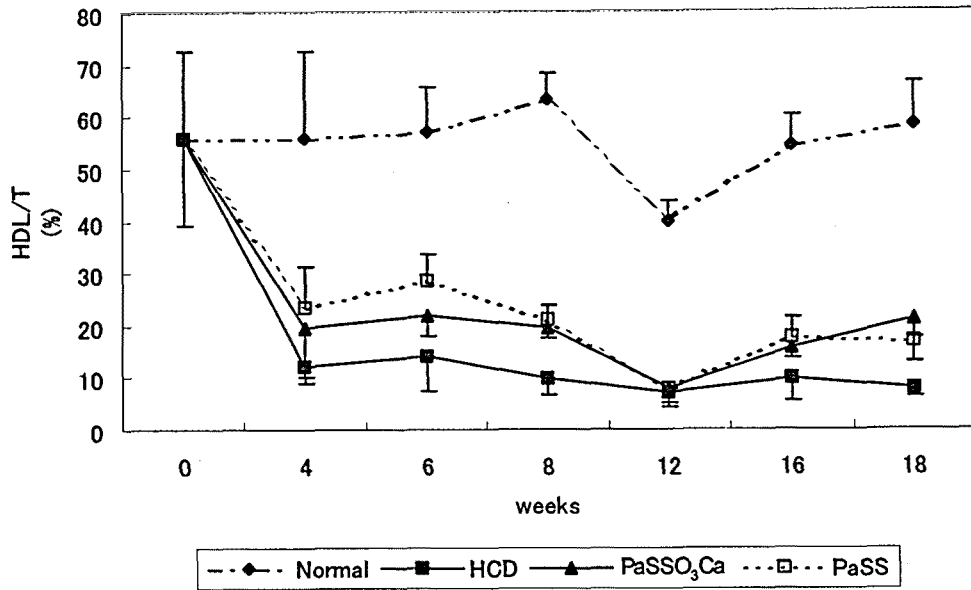


図2-3. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウズラの血漿HDL/Tに及ぼすPaSSO₃Caの影響

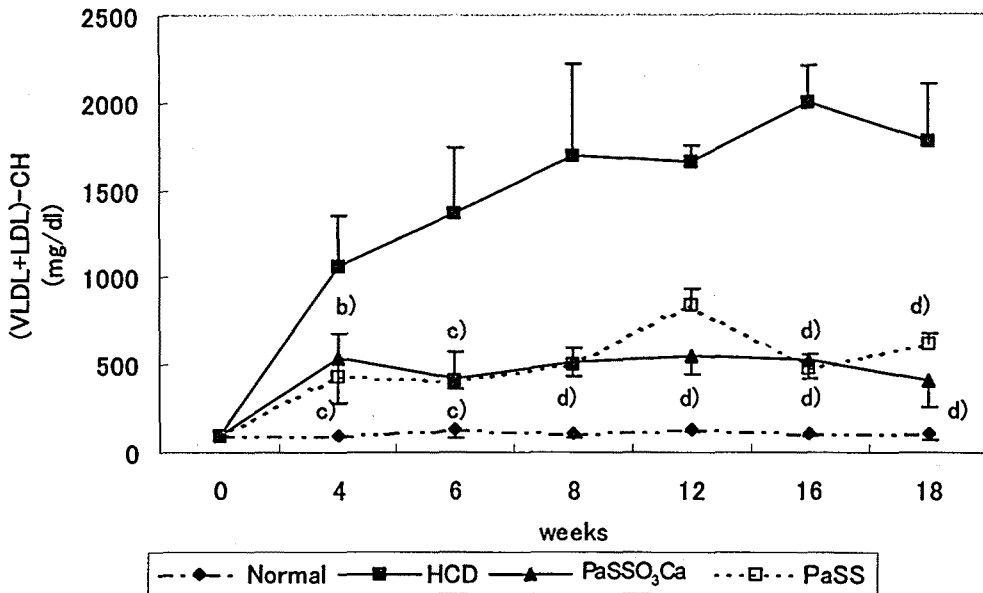


図2-4. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼育ウズラの血漿(VLDL+LDL)-CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05,c)p<0.01,d)p<0.001.

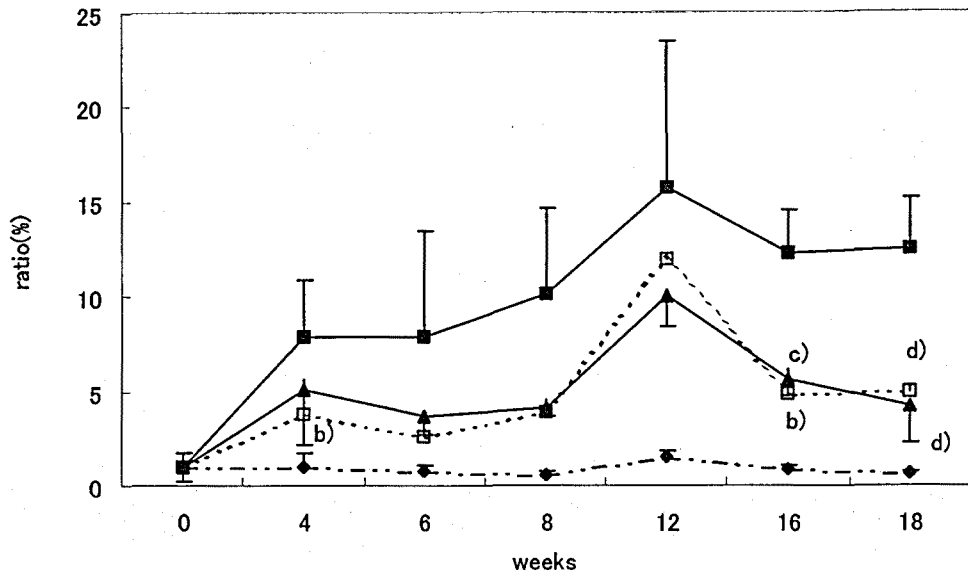


図2-5. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウズラの血漿AIに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05,c)p<0.01,d)p<0.001.

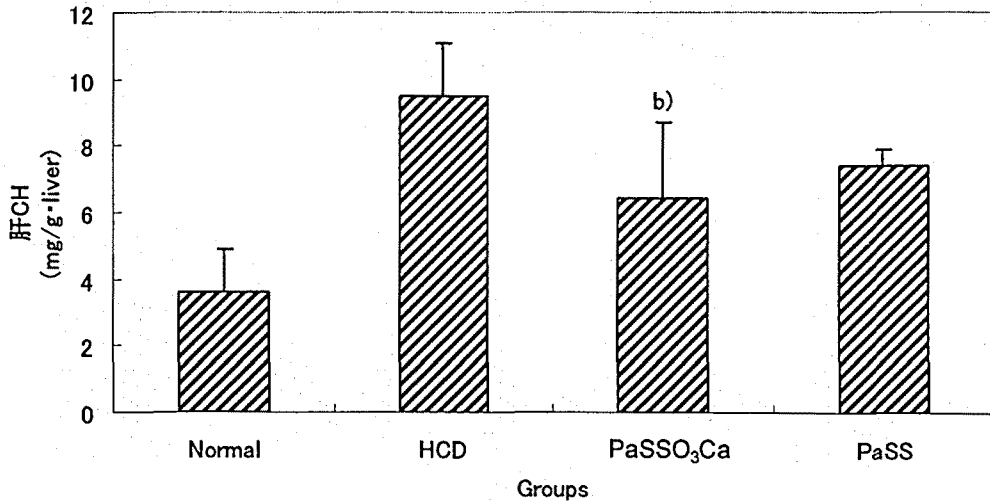


図2-6. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウズラの肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05.

HDL-CH (図 2-2) に対しては高 CH 飼料飼育による影響は少なく、両化合物群で低下傾向および有意な低下を示した。HDL/T は Total-CH の大幅な減少により両化合物群で改善した (図 2-3)。

Total-CH の減少は、主に VLDL+LDL 分画の CH の減少によった (図 2-4)。また、AI (図 2-5) は高 CH 群で上昇し、両化合物投与で改善した。18 週間目における肝 CH (図 2-6) は、高 CH 群で正常群の 3.0 倍まで上昇し、PaSS では低下傾向、PaSSO₃Ca では有意な低下を示した。

7) 0.5%CH 飼料飼育ウサギの血漿・肝 CH および lipoprotein に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

0.5%CH 含有飼料で飼育したウサギの血漿、肝 CH およびリポタンパクの経時的変化とそれに対する化合物の影響を 図 2-7~図 2-12 に示した。血漿 CH (図 2-7)は、高 CH 飼料飼育 10 日目で、すでに正常群の 22.8 倍と顕著な上昇を示し、以降 30 日目まで上昇し続けた。この CH 上昇に対し、PaSS 投与群は常に有意な低下を示した。一方 PaSSO₃Ca 投与群では常に低下傾向は示しているものの、有意差が見られたのは 21 日目のみであった。HDL-CH (図 2-8)は高 CH 飼料飼育による大きな影響はなく、30 日目で正常群の 2.5 倍程度の上昇であった。PaSS 投与群の 21 日、30 日目で HDL-CH の有意な低下が見られた。Total-CH の両化合物による低下は VLDL+LDL 分画の CH の減少によることがわかるが、その作用の強さは PaSS 投与群で強力であった (図 2-10)。AI は高 CH 群で正常群の 33.7~64.1 倍と顕著に上昇し、これに対し、PaSSO₃Ca 投与群のみ常に有意な低下を示した (図 2-11)。高 CH 飼料の 30 日負荷により肝 CH は正常群の 5.3 倍に上昇し、両化合物投与群とも有意な低下を示したが、PaSS 投与群の方が強力であった (図 2-12)。

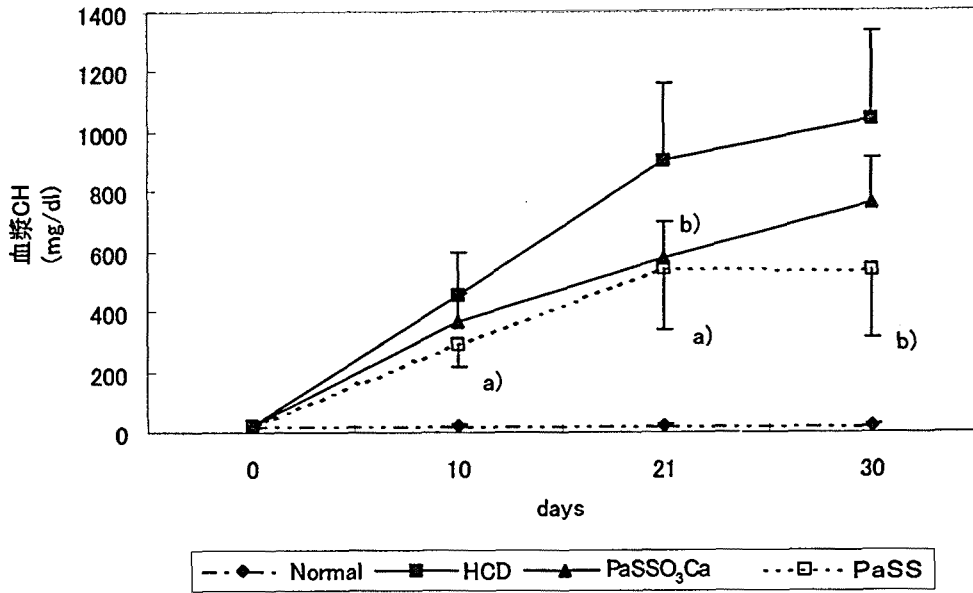


図2-7. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの血漿CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: a)p<0.1,b)p<0.05.

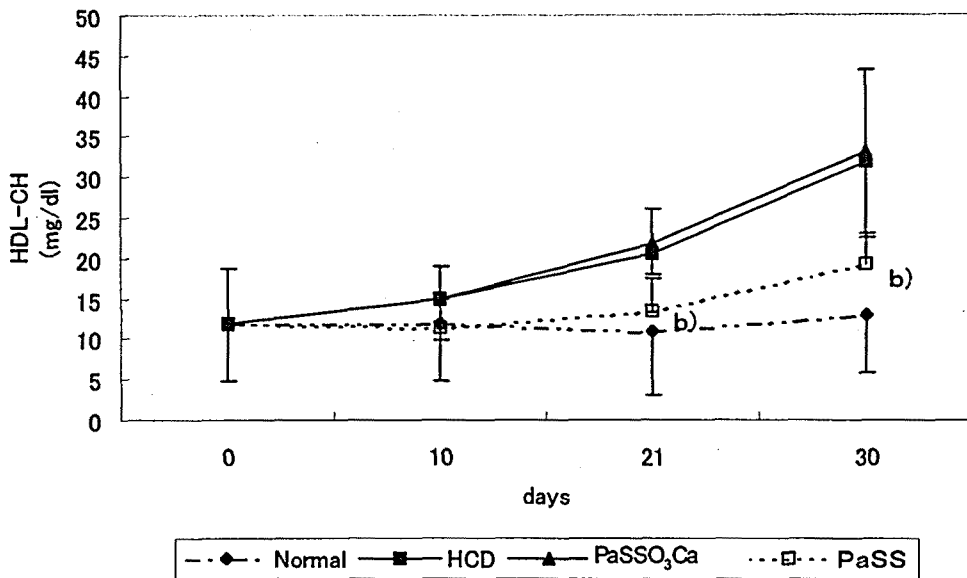


図2-8. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの血漿HDL-CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05.

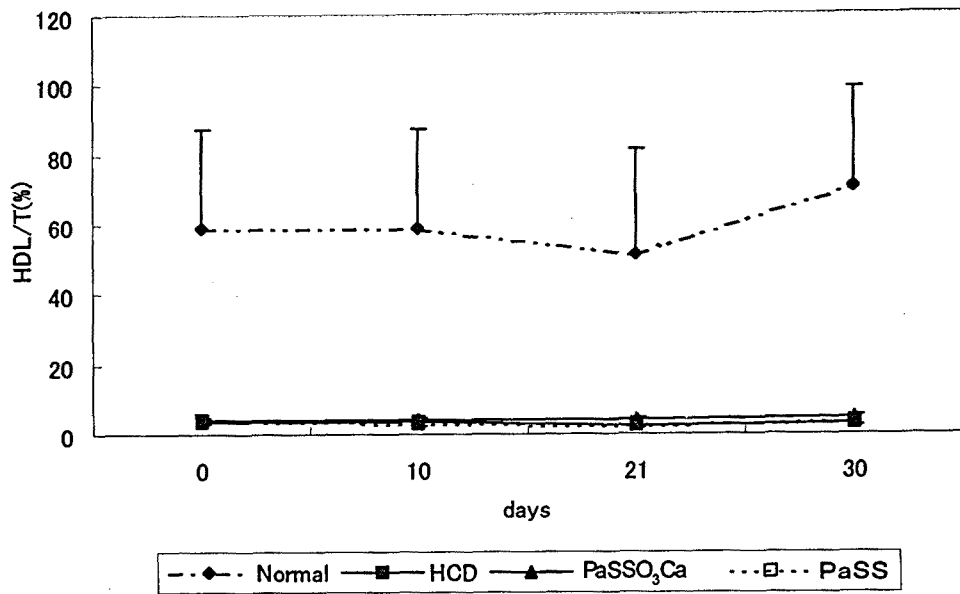


図2-9. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの血漿HDL/Tに及ぼすPaSSO₃Caの影響

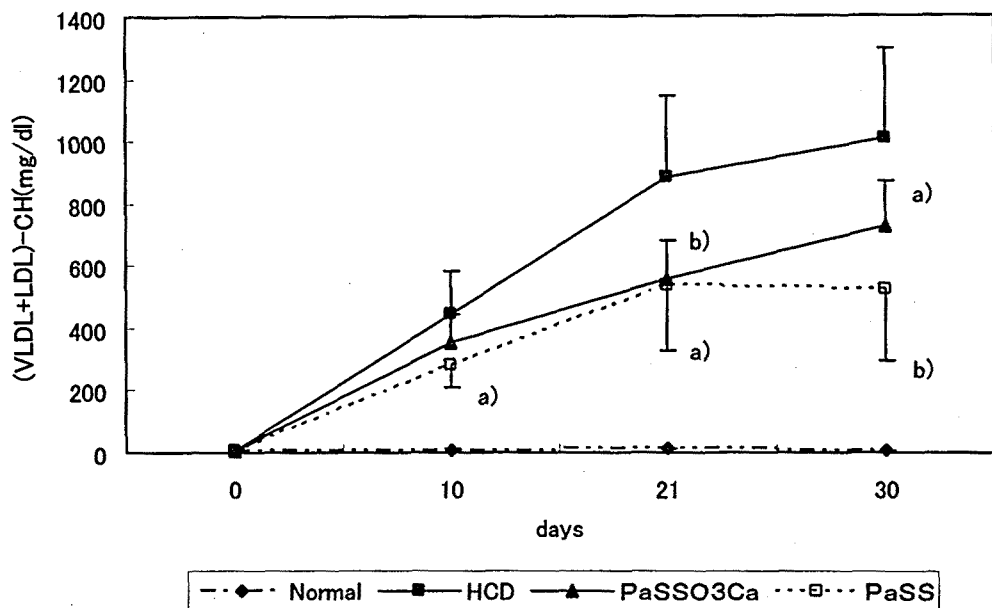


図2-10. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの血漿(VLDL+LDL)-CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: a)p<0.1,b)p<0.05.

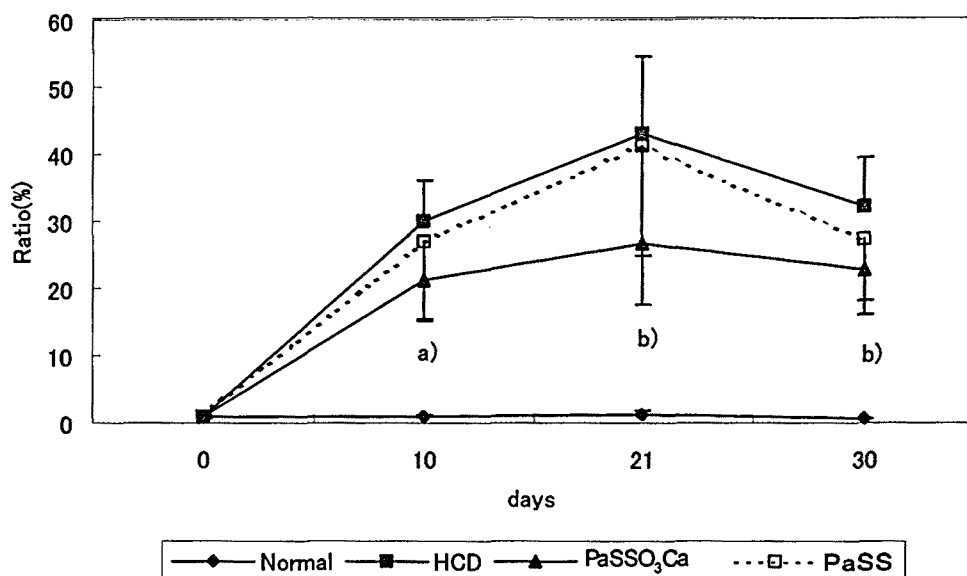


図2-11. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの血漿AIに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: a)p<0.1,b)p<0.05.

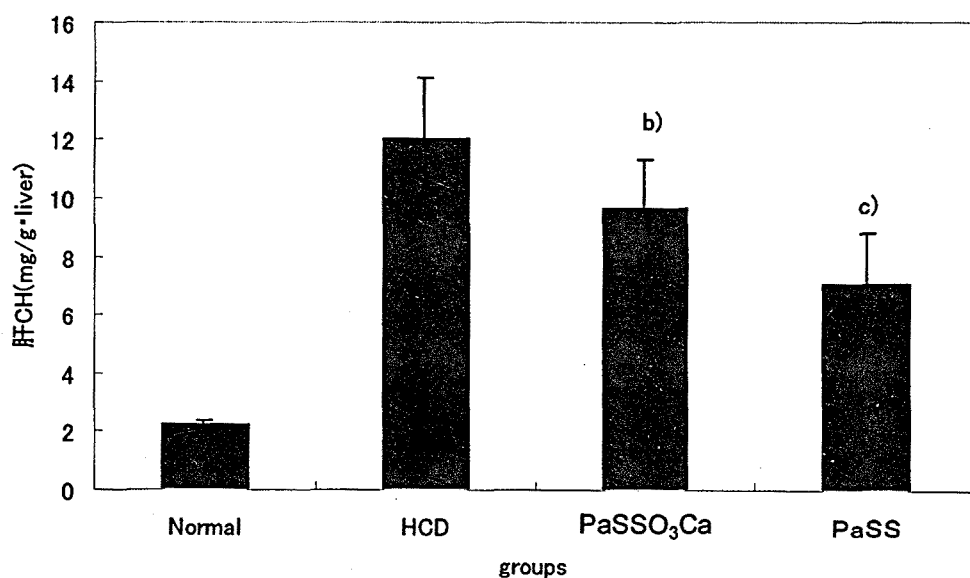


図2-12. 0.5%CH(0.1%CA)含有飼料飼育ウサギの肝CHに及ぼすPaSSO₃Caの影響
高CH群に対する有意差有り: b)p<0.05,c)p<0.001.

8) ウズラ・ウサギの動脈硬化に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

0.5%CH (0.1%CA) 含有飼料で、18 週間飼育したウズラの大動脈弓より腸骨下動脈分岐部までへの脂質沈着に及ぼす PaA 誘導体投与の影響を肉眼的に観察した。正常群では、動

脈への脂質沈着は全く見られなかった。高 CH 群では、大動脈弓より胸部大動脈部分への脂質沈着が観察された。PaSS 投与群では 2 例中 1 例にわずかな脂質沈着が、PaSSO₃Ca 群では大動脈弓部へのわずかな脂質沈着が 4 例中 2 例で観察された(表 2-7)。

0.5%CH 含有飼料で 30 日間飼育したウサギの大動脈弓、胸部大動脈への脂質沈着に及ぼす PaA 誘導体投与の影響を肉眼的に観察した。大動脈弓では、正常群では、すべて Grade (-) であったのに対し、高 CH 群では Grade (+++) が 3 例、Grade (++) が 1 例と、脂質沈着が進んでいた。これに対し、PaSS 投与群では Grade (+++) 1 例、(++) 1 例、(+) 2 例、(-) 1 例となった。1%PaSSO₃Ca 投与群では、Grade (++) が 2 例、Grade (+) が 2 例、Grade (±) が 1 例と、全く改善を示さない例は見られなかった。1.36%PaSSO₃Ca 投与群でも Grade (++) が 2 例、Grade (+) が 3 例と、脂質の沈着を少なからず改善していた(表 2-8)。胸部大動脈では、正常群はすべて Grade (-) であり、高 CH 群で、Grade (++) が 2 例、Grade (+) が 2 例となった。PaSS 投与群ではすべての Grade で 1 例ずつとなり、悪化している例が見られたが、PaSSO₃Ca 1%、1.36%ではそれぞれ Grade (+) が 3 例、3 例、Grade (+) が 2 例、0 例、Grade (-) が 0 例、2 例と改善傾向もしくは顕著な改善を示しているものが見られた (表 2-9)。

表2-7. ウズラ胸部大動脈への脂質沈着に及ぼすPaSSO₃Caの影響

Group \ Grade	-	±	+	++	+++
正常群	7	0	0	0	0
高CH群	0	2	2	1	1
PaSSO ₃ Ca(1.36%)群	2	2	0	0	0
PaSS(1%)群	1	1	0	0	0

表2-8. ウサギ大動脈弓への脂質沈着に及ぼすPaSSO₃Caの影響

Group \ Grade	-	±	+	++	+++
正常群	5	0	0	0	0
高CH群	0	0	0	1	3
PaSSO ₃ Ca(1%)群	0	1	2	2	0
PaSSO ₃ Ca(1.36%)群	0	0	0	3	2
PaSS(1%)群	1	0	2	1	1

表2-9. ウサギ胸部大動脈への脂質沈着に及ぼすPaSSO₃Caの影響

Group	Grade				
	—	±	+	++	+++
正常群	5	0	0	0	0
高CH群	0	0	2	2	0
PaSSO ₃ Ca(1%)群	0	2	3	0	0
PaSSO ₃ Ca(1.36%)群	2	0	3	0	0
PaSS(1%)群	1	1	1	1	1

4. 考 察

幼若マウスの方がCHに対する反応性が高かった(表 2-2)。この結果は、幼弱動物ほど血清脂質上昇が高いというラットにおける天正らの結果⁸⁶⁾と一致するものであった。両 PaA 誘導体はマウスに対し脂質低下作用はなく、血漿 CH は、高 CH 群よりも更に有意な上昇を示していた。この理由としては、第 1 に PaSSO₃Ca 自体による腸管からの CH 吸収の促進、第 2 に化合物により CH の異化が亢進し、胆汁酸が増加したため、二次的に腸管からの CH 吸収が増加した可能性が考えられる。

1%CH 含有飼料で 2 週間飼育したラットは、血清 CH の顕著な上昇を示し、4 週間目で低下していた(表 2-3)。ラット、マウスなどは CH を含む食餌では容易に高 CH 血症を生じ難い⁹⁷⁾と言われているが、体重 120g 以下の若いラットを用いれば、CA⁹⁸⁾、チオウラシル⁹⁹⁾などの添加なしでも高 CH 血症を生成できることが示された。また、4 週間目での血清 CH の低下は吸収量の限界による CH 吸収率の低下⁸⁶⁾、CH 生合成抑制¹⁰⁰⁾、CH 排泄の促進⁸⁵⁾など、ラットの高 CH 飼料飼育に対する防禦機構の活性化によると考えられる。PaSSO₃Ca は、4 週間の同時投与で血清 CH を低下させた。これは HDL-CH の軽度の上昇と (VLDL+LDL)-CH の有意な低下によるものであった。これは PaSSO₃Ca にラットの脂質上昇に対する防禦機構を更に活発化する作用のあることを示唆している。また、HDL-CH の高 CH 群での減少は、腸管に於いて吸収された CH が肝臓において apoprotein と結合し、VLDL や HDL を形成する際の共有の apoprotein である apoC が、VLDL 形成に多量に使用されたためと考えら

れる¹⁰¹⁾。PaSSO₃Ca はリポタンパク形成時の apoC を HDL 形成に利用の乱れを改善させることにより、HDL-CH を上昇することが考えられる。

次に 1%CH+0.5%CA 含有飼料で 1, 2 週間の飼育(表 2-4)では 1 週間で血清 CH が 4.4 倍、2 週間で 4.6 倍となり、CA 添加により、CH 吸収が上昇していることが考えられる。この上昇は (VLDL+LDL) -CH の顕著な上昇による(表 2-4)。これに対し PaSS では CH 負荷群より更に血清 CH が上昇し、PaSSO₃Ca で有意な低下を示している。この低下は (VLDL+LDL) -CH の低下によるものであった。HDL-CH は CH 吸収が 1%CH 飼育時より更に上昇したため、apoprotein 利用が悪化し¹⁰¹⁾、顕著な低下を示した。これに対し、両 PaA 誘導体投与群とも上昇は示さなかったが、HDL/T, AI は PaSSO₃Ca で顕著に改善しており(表 2-4)、この結果は PaSSO₃Ca にリポタンパク代謝改善効果の存在することを示している。

1%CH+0.5%CA 含有飼料で 1 週間飼育したハムスターでは血清 CH が 1.4 倍までしか上昇せず(表 2-5)、これはラットを同条件下で飼育した時(表 2-4)に比較し、低いものであった。それに対し、肝 CH の蓄積度合は 5.6 倍と同条件下のラットより高値を示した。また、この結果と、ハムスターでは体内 CH プールがラットよりも大きいこと⁸⁴⁾、異化排泄の過程がラットと異なっていること¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾を考え合わせると、両動物は CH の吸収能では大差ないが CH の体内組織への分布、血中からの CH 消失、CH の異化の点で差があり、ハムスターでは肝臓へ CH が蓄積されやすく、血中からの CH 消失が早く、そして CH の胆汁酸への変換が遅いことを示している。また、PaA 誘導体投与により血清、肝 CH は低下しており、両化合物の作用機序として CH 吸収抑制あるいは異化排泄の促進が示唆された。

1%CH+0.2%CA 含有飼料 3 週間飼育ハムスターにおいても血清 CH および肝 CH は上昇しており(表 2-6)、これは前条件よりも顕著なものであった(表 2-5)。PaSSO₃Ca の効果は血清および肝 CH に観察され、PaSSO₃Ca、PaSS とも有意な低下を示していた。この結果は前条件と同様の傾向であり、作用機序としても同様のことが示唆された。

データには示さなかったが、ウズラを 0.5%CH のみの食餌で 3 週間飼育した時の血漿 CH

値は正常ウズラの 1.4 倍にしか上昇しなかった。この反応性の悪さは老齡ラットを CH のみ添加した飼料で飼育した時と類似しており、脂質負荷に対し抵抗性¹⁰⁵⁾を示すことが考えられる。しかし、食餌中への CA 添加により血漿 CH は顕著な上昇を示し (図 2-1)、ウサギを高 CH 飼料で飼育した時と同等の血漿 CH 値を得ることができた (図 2-7)。両 PaA 誘導体投与群における血漿 CH 値の顕著な低下 (図 2-1) は、(VLDL+LDL) 分画の CH の大幅な低下 (図 2-4) と HDL-CH の軽度の低下 (図 2-2) に起因する。また、肝中 CH では両 PaA 誘導体群で同程度の低下を示した (図 2-6)。これらの結果は、PaSS と PaSSO₃Ca に程度の差はあるが、CH 吸収抑制、あるいは異化排泄促進作用のあることを示唆するものである。

ウサギの血漿 CH の正常値は極端に低く、CH の負荷によりその値は容易に 1,000mg/dl を超える (図 2-7)。またラットとは反対に HDL が少なく LDL が多い。このことはウサギが動脈硬化を起こしやすく、ラットでは起こりにくい⁸⁶⁾ことと関連して、興味深い点である。この理由の 1 つとしては、ラットでは脂質負荷に対し、LDL-receptor 数の減少や、endocytosis の低下により、CH の細胞内流入を強く抑制し¹⁰⁶⁾かつ HMG-CoA reductase 抑制などによる生合成低下¹⁰⁶⁾、胆汁酸生合成および排泄の増加¹⁰⁷⁾等の防禦機構を活発化させ、体内 CH pool size を上昇させないと考えられる。これに対し、ウサギでは CH 負荷に対し、胆汁酸合成を活発化できない、あるいは上記防禦機構が弱いため^{108,109)}、体内 CH pool size が増大することが考えられる。このように PaSSO₃Ca はラット、ハムスター、ウズラに対しては、CH 負荷に対する防禦機構を更に活性化させ脂質低下作用を示すが、ウサギではそれが弱いため、脂質低下作用が弱まることが示唆された。

ウズラの動脈への脂質沈着は、両 PaA 誘導体により顕著に改善しており (表 2-7)、これは、血清中 CH の低下 (図 2-1)、HDL/T の上昇 (図 2-3)、AI の両化合物による改善 (図 2-5) などによっても支持される結果であった。

ウサギは容易に動脈硬化を起こす。今回の実験においても 0.5%CH 含有飼料で 30 日飼育することにより動脈硬化を発症し、両 PaA 誘導体投与によりこれらの症状を改善している

ことがわかる (表 2-8, 9)。このことは、AI の改善 (図 2-11) とも一致するものであった。

このように、ウズラ、ウサギを用いた実験的動脈硬化症に対し、 PaSSO_3Ca は血清脂質、AI を低下あるいは改善することにより、動脈硬化の発症を抑制することが明らかになった。

5. 要約

マウスについては、体重 20g および 32g のものを用い高 CH 飼料飼育に対する反応性を調べた結果、幼若マウスの方が老齢マウスより反応性が高いことが示された。 PaSSO_3Ca および PaSS による CH 低下作用はなかった。

ラット (120g) を 1%CH のみ含む食餌で飼育した場合、血清 CH の上昇は持続せず、2 週間で正常群の 3.5 倍まで上昇したが、4 週間では 1.6 倍に低下した。この条件下で PaSSO_3Ca は 4 週目の血清 CH をさらに低下させ、両 PaA 誘導体は 4 週目の HDL-CH を上昇させた。1%CH に 0.5%CA を添加した飼料で 2 週間飼育すると、血清 CH は 4.5 倍まで上昇した。この条件下では PaSS は高 CH 群に比較し、血清 CH を上昇させたが PaSSO_3Ca 投与群では有意な低下を示した。

ハムスターを高 CH 飼料 (1%CH+0.5%CA 含有) で 1 週間飼育することにより、血清 CH は正常群の 1.4 倍、1%CH+0.2%CA 含有飼料で 3 週間飼育することにより 2.3 倍までの上昇にとどまった。両 PaA 誘導体投与により血清 CH は同程度低下していた。

ウズラを高 CH 飼料 (0.5%CH+0.1%CA 含有) で飼育すると血漿 CH は 4 週間で正常群の 6.0 倍に、以後 16 週間まで上昇し続け、18 週間で低下した。この上昇に対し両 PaA 誘導体とも顕著な低下作用を示した。

ウサギにおいては 0.5%CH 含有飼料で 10 日飼育で血漿 CH は正常群の 22.8 倍に上昇し、以後 30 日目まで上昇し続けた。血漿 CH の上昇に対し PaSS は観察期間中有意な低下を示したが、 PaSSO_3Ca では常に低下傾向を示し有意な低下は 21 日目のみであった。ウズラ、ウサギを高 CH 飼料で飼育し発症した動脈硬化に対し、両 PaA 誘導体は抑制する作用を示した。

第3章 実験的高コレステロール・トリグリセリド血症に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

1. 目的

第1章で、脂質代謝が正常な各種動物を用い、PaSSO₃Caの脂質低下作用について種差および性差が存在すること、また、第2章において、高CH飼料飼育動物に対してはマウスに無効で、ラット、ハムスター、ウズラ、ウサギに対して血清(血漿)CH低下作用を有することを示した。そこで今回はラットを用い、他の高CH血症・高TG血症モデルに対する作用を確認するため、外因性脂質負荷のモデルとして卵黄投与、甲状腺機能低下のモデルとして6*n*-プロピル-2-チオウラシル (PTU) を用い、高脂血症を誘発させ、PaSSO₃Caの脂質上昇抑制作用について、また、界面活性剤による高脂血症のモデルとしてTriton WR-1339[®]を用い、PaA誘導体を病態モデル誘発前に投与することにより、血清CH、TG上昇に対する抑制効果について検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物

榑埼玉実験動物供給所より入手した、雄性Wistar系ラット、体重120g前後のものを1群5匹で使用した。飼料はすべての群で日本クレア(榑)製CE-2、飲料水は水道水を用い自由摂取させた。飼育室は温度25±2℃に、湿度50±5%に調節され、照明は12時間の明暗サイクルとした(明時7:00~19:00)。

2-2. 試薬

PaSS、PaSSO₃Caは相互薬工(榑)製、PTUとTriton WR-1339[®] (Tyloxapol)はSigma Aldrich Japan(東京)製を使用した。他の試薬はすべて特級品を使用した。

2-3. 高脂血症モデルの作成

1) 卵黄投与ラット：卵黄投与およびPaA誘導体投与群では卵黄：卵白(3：1)溶液を2ml、

1日1回経口的に4週間投与した。

2) PTU 誘発甲状腺機能低下症ラット：PTU 投与群および両 PaA 誘導体投与群に分け、両群のラットにオリーブオイルに懸濁した PTU を 1mmole/kg・BW の投与量で1日1回経口的に2週間連続投与した。

3) Triton WR-1339[®]誘発高脂血症ラット：トライトン投与群および PaA 誘導体投与群には Triton WR-1339[®]を 400mg/kg を頸静脈より投与し、6時間後に安楽死させた。

2-4. PaA 誘導体投与

卵黄投与および PTU 投与ラットに対し、PaSS (400mg/ml)、PaSSO₃Ca (544mg/ml) をそれぞれ 1,000、1,361mg/kg/BW の投与量で1日1回実験期間中経口投与した。Triton 投与ラットでは、同投与量で1日1回 Triton 投与前に2週間経口投与した。

2-5. 試料の採取・血清および肝中脂質の測定

試料の採取、血清および肝脂質の測定は、第1章の方法により実施した。

2-6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し、student's の *t*-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

1) 卵黄投与ラットの血清脂質、リポタンパク組成および肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表 3-1 に示すように、4週間の卵黄投与により、HDL-CH 以外のすべての血清脂質量が上昇した。血清 CH は 1.2 倍に上昇し、PaSSO₃Ca 投与群のみ卵黄投与による血清 CH の上昇に対し、抑制する傾向を示した。血清 TG は 1.8 倍に上昇し、両 PaA 誘導体群とも有意な上昇抑制作用を示した。対照物質である PaSS に比較し、PaSSO₃Ca 投与の方が作用は強力であった。PL は 1.2 倍に上昇し、この上昇を両群抑制する傾向を示し、FFA は 1.5 倍に上昇し両群とも有意に抑制した。PaSSO₃Ca 投与群で作用が強く出た。血清 CH の上昇は (T-HDL) -CH で示した (VLDL+LDL) -CH の顕著な上昇 (1.8 倍) により PaSSO₃Ca 群のみ

(VLDL+LDL)-CH に対し、有意な上昇抑制作用を示した。卵黄投与により HDL-CH は正常群より減少し、両 PaA 誘導体投与による影響は見られなかった。HDL-CH の T-CH に対する割合を示す HDL/T は顕著に低下し、一方 PaSSO₃Ca 群ではこの低下を抑制した。AI についても、卵黄投与による上昇を PaSSO₃Ca で有意に抑制した。

表3-1. 卵黄投与ラットの血清脂質・リポ蛋白に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	Total(T)-CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	(T-HDL)-CH (mg/dl)	HDL/T (%)	AI	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)
正常	70.0±8.0	45.0±5.4	25.1±3.2	64.2±2.1	0.56±0.05	115.1±42.9	139.0±16.0	0.54±0.06
卵黄投与	81.5±8.4 (100)	37.4±2.4 (100)	44.0±8.9 (100)	46.3±5.8 (100)	1.17±0.29 (100)	205.2±42.3 (100)	166.9±16.0 (100)	0.83±0.14 (100)
PaSSO ₃ Ca	72.2±5.8* (89)	37.6±5.1 (101)	34.9±6.3** (79)	51.8±5.4 (112)	0.95±0.23 (81)	95.3±28.2**** (46)	148.2±5.9 (89)	0.48±0.09**** (58)
PaSS	79.2±9.8 (97)	37.2±2.9 (99)	41.6±6.9 (95)	47.6±4.7 (103)	1.11±0.20 (95)	117.3±21.9**** (57)	153.0±14.8 (92)	0.69±0.05* (83)

卵黄投与群に対する有意差有り。 p<0.1(*), p<0.05(**), p<0.01(****).

():卵黄投与群の値を100とした場合の割合。

肝臓中脂質への卵黄投与の影響は、TG が 1.6 倍に上昇したのみであった(表 3-2)。両 PaA 誘導体投与で卵黄投与による肝 TG の上昇を抑制し、PaSSO₃Ca 群で有意であった。肝 FFA は卵黄投与による影響はなく、両 PaA 投与群で卵黄投与群より低下しており、PaSS 投与群で有意であった。

表3-2. 卵黄投与ラットの肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	CH	TG	PL	FFA
	(mg/g·liver)	(mg/g·liver)	(mg/g·liver)	(μEq/g·liver)
正常	6.7±0.8	5.5±0.7	22.5±1.8	3.2±0.4
卵黄投与	7.0±0.5 (100)	8.7±2.7 (100)	25.9±2.4 (100)	3.0±0.3 (100)
PaSSO ₃ Ca	6.4±0.9 (91)	4.7±0.4**** (54)	26.1±1.7 (101)	2.7±0.3 (90)
PaSS	7.6±0.6 (109)	6.0±1.0* (69)	28.4±1.9 (110)	2.6±0.4*** (87)

卵黄投与群に対する有意差有り, p<0.1(*), p<0.05(**), p<0.01(****).

():卵黄投与群の値を100とした場合の割合。

2) PTU 誘発甲状腺機能低下時の血清脂質、リポタンパク組成および肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

PTU 誘発甲状腺機能低下時の血清脂質とリポタンパク組成に及ぼす影響を表 3-3 に示した。PTU (1mmole/kg) の 2 週間投与により血清 CH は 1.5 倍に上昇し、両 PaA 誘導体投与により PTU 投与による上昇が抑制された。その上昇抑制作用は PaSSO₃Ca 群で有意であった。(VLDL+LDL)-CH は PTU 投与により正常群の 2.2 倍に上昇し、HDL-CH は正常群の 80% まで低下した。両 PaA 誘導体投与群とも PTU 投与による (VLDL+LDL) -CH の上昇を抑制し、HDL-CH の低下を抑制したが、この作用は PaSSO₃Ca 投与群で顕著であった。HDL/T は PTU 投与により顕著に低下し、PaSS、PaSSO₃Ca により正常群レベルまで改善した。AI は PTU 投与で 2.8 倍に上昇し、両 PaA 誘導体で正常群レベルまで改善した。血清 TG、PL、FFA は PTU 投与で上昇し、両化合物でこの上昇に対し有意な抑制作用を示した。

表3-3. PTU誘発甲状腺機能低下ラットの血清脂質・リポ蛋白に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	Total(T)-CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	(T-HDL)-CH (mg/dl)	HDL/T (%)	AI	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)
正常	66.3±9.1	33.4±6.0	32.8±5.1	50.3±5.0	1.00±0.207	92.1±15.9	107.7±12.6	0.43±0.04
PTU投与	102.5±12.0 (100)	26.7±5.1 (100)	72.6±12.9 (100)	27.0±5.3 (100)	2.82±0.76 (100)	229.9±25.8 (100)	153.0±11.6 (100)	0.87±0.15 (100)
PaSSO ₃ Ca	85.1±6.6** (83)	46.1±6.7§ (173)	39.0±8.6**** (54)	54.4±8.6**** (201)	0.88±0.23**** (31)	80.3±17.0# (35)	119.1±11.6**** (78)	0.50±0.22**** (57)
PaSS	83.4±14.1 (81)	37.3±5.2**** (140)	46.1±15.7**** (64)	45.8±10.4** (170)	1.28±0.51*** (45)	86.3±8.7# (38)	110.5±12.8# (72)	0.42±0.10# (48)

PTU投与群に対する有意差有り。 p<0.05(**), p<0.02(***), p<0.01(****), p<0.001(#).

():PTU投与群の値を100とした場合の割合.

表3-4. PTU誘発甲状腺機能低下ラットの肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	CH (mg/g·liver)	TG (mg/g·liver)	PL (mg/g·liver)	FFA (μEq/g·liver)
正常	5.2±0.2	7.6±0.5	26.4±2.4	5.8±1.0
PTU投与	6.4±0.7 (100)	9.9±2.7 (100)	30.5±8.3 (100)	7.7±1.1 (100)
PaSSO ₃ Ca	5.3±0.3** (83)	11.6±1.1 (117)	30.1±2.0 (99)	4.8±1.0**** (62)
PaSS	6.1±0.7 (95)	10.3±2.5 (104)	37.3±7.2 (122)	4.4±0.9# (58)

PTU投与群に対する有意差有り。 p<0.05(**), p<0.01(****), p<0.001(#).

():PTU投与群の値を100とした場合の割合.

肝脂質はPTU投与により、すべて1.2~1.3倍程度に上昇した(表3-4)。肝CHのPTU投与による上昇に対して、PaSSO₃Ca投与群のみが正常群レベルに改善する作用を示した。TGの上昇に対しPaSSO₃Caは更に上昇する傾向に、PLではPaSS投与群で上昇傾向が見られた。FFAのPTU投与による上昇に対しては両PaA誘導体とも同程度の上昇抑制作用を示した。

3) Triton WR-1339[®]誘発高脂血症ラットの血清脂質及リポタンパク組成に及ぼすPaSSO₃Caの影響

表3-5に示すように、トライトン投与によりすべての血清脂質は正常群に比較し有意に上昇し、AIは顕著に上昇、HDL/Tは顕著に低下した。PaA誘導体投与群ではT-CH、TGの上昇を有意に抑制した。リポタンパク中のCHについては、HDL-CHは両PaA誘導体による有意な変化はなく、(VLDL+LDL)-CHに対し、両群で有意な上昇抑制作用を示した。HDL/Tのトライトン投与による低下に対し、PaSS投与群で有意な改善をPaSSO₃Ca投与群で改善傾向を示した。また、AIの上昇に対しても両PaA誘導体とも改善作用を示したが、PaSSで作用が顕著であった。

表3-5. Triton WR1339[®]誘発高脂血症ラットの血清脂質・リポ蛋白に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	Total(T)-CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	(T-HDL)-CH (mg/dl)	HDL/T (%)	AI	TG (mg/dl)	FFA (mEq/l)
正常	66.4±3.3	40.1±1.9	26.3±1.4	60.4±4.2	0.66±0.05	93.4±3.6	0.39±0.03
トライトン投与 (100)	273.8±7.6	90.3±2.1	183.5±6.25	33.0±2.8	2.03±0.18	2583.7±104.5	0.40±0.06
PaSSO ₃ Ca (83)	228.5±6.4****	84.1±4.2	144.4±4.9****	36.8±2.2	1.72±0.12**	1964.8±121.9****	0.46±0.04
PaSS (83)	228.2±2.4 [#]	98.3±4.9	129.9±3.3****	43.1±1.9****	1.32±0.14****	2015.8±180.6**	0.45±0.07

トライトン投与群に対する有意差有り。p<0.05(**), p<0.01(****), p<0.001(#).

(): トライトン投与群の値を100とした場合の割合。

4. 考察

卵黄は脂質に富んでおり、全卵1個当たりCHが0.3g、その他にPL、グリセライド、FFA

などが含まれている。ヒトでも卵を大量摂取させることにより血清 CH が上昇することが SPLITTER ら¹¹⁰⁾あるいは ROBERTS ら¹¹¹⁾やその他の研究者¹¹²⁻¹¹⁴⁾によって報告されている。今回ラットにおいても卵黄投与により血清脂質が上昇することが示された (表 3-1)。卵黄溶液 (75%) 2ml は CH 飼料に換算すると 0.15%CH 含有飼料に相当する。このような軽度な外因性脂質負荷に対し、PaSSO₃Ca は血清・肝脂質に対し上昇抑制作用を示した。この結果は PaSSO₃Ca が外因性脂質の吸収抑制あるいは異化排泄促進作用を有することを示唆している。

甲状腺機能低下時に、血中 CH、TG が上昇することが知られている。これは CH 合成が低下しているものの¹¹⁵⁾、LDL の異化が一層障害されており^{116,117)}、胆汁中への排泄も低下していること¹¹⁸⁾によると考えられる。また、TG に関して合成は正常に行われている¹¹⁹⁾が、Post Heparin Lipolytic Activity (PHLA) の低下¹²⁰⁾や、脂肪乳剤の静注による血中 TG 消失率の低下¹²¹⁾によっても示されるように異化が遅延する結果、高 CH、TG 血症を示すと言われている。今回の実験では、PTU 投与により血清脂質はすべて上昇し、HDL-CH、HDL/T の低下、(VLDL+LDL) -CH、AI の上昇も観察され (表 3-3)、リポタンパク代謝が悪化していることが示された。PaSSO₃Ca は PTU 投与により誘発した甲状腺機能低下時の脂質代謝異常を改善し、その作用は TG に対し顕著であった。これは PaSSO₃Ca が PHLA 上昇作用を介して TG の異化を亢進することを示唆している。

トライトン誘発高脂血症では血清 CH、TG の顕著な上昇が見られ、PaSSO₃Ca は両脂質を低下させていた (表 3-5)。現在、トライトン高脂血症作成のメカニズムは主として3つ考えられる。第一に VLDL のタンパクあるいは表面脂質部分と複合体を形成してリポタンパクリパーゼ (LPL) の作用を阻害し、TG の多い大型リポタンパクの異化を抑制する¹²²⁾機構、第二に肝臓からの TG 放出の促進^{123,124)}、第三に肝臓における CH 合成の亢進¹²⁵⁾である。PaSSO₃Ca はこの機構のいずれかの部分を促進あるいは抑制することにより、トライトンにより誘発される高 CH、TG 血症の発症を予防すると考えられる。

本実験結果から、PaSSO₃Ca は卵黄投与、甲状腺機能低下、Triton WR-1339[®]による誘発

時にラットに引き起こされる高 CH、TG 血症あるいはリポタンパク代謝異常に対し、CH 合成・吸収阻害、異化排泄の促進、TG の異化亢進作用を示すことが示唆された。

5. 要約

卵黄、6*n*-プロピル-2-チオウラシル (PTU)、Triton WR-1339[®]により誘発した高脂質血症ラットの血清脂質、リポタンパク組成および肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響について、PaSS を対照化合物として検討した。卵黄投与により正常群に比較し、血清総 CH、(T-HDL) -CH、AI、TG、PL、FFA、肝 CH、TG、PL が上昇し、HDL-CH、HDL/T が低下した。PaSS は血清 TG、FFA、肝 TG および FFA を、一方 PaSSO₃Ca は血清 T-CH、(T-HDL) -CH、TG、FFA および肝 TG の卵黄投与による上昇を有意に抑制した。HDL/T の卵黄投与による低下に対し、PaSSO₃Ca 群のみ上昇する傾向を示し、AI についても PaSSO₃Ca 群のみ上昇を抑制する傾向を示した。

高用量 (1mmole/kg) の PTU 投与で、正常群より血清 T-CH、(T-HDL) -CH、AI、TG、PL、FFA、肝 CH、TG、PL および FFA が上昇し、HDL-CH、HDL/T が低下した。これに対し、PaSS は (T-HDL) -CH、AI、TG、PL、FFA の上昇を有意に抑制し、T-CH に対し上昇を抑制する傾向を、また HDL-CH、HDL/T に対し有意な低下抑制作用を示した。PaSSO₃Ca は血清 T-CH、(T-HDL) -CH、AI、TG、PL、FFA の上昇を有意に抑制し、HDL-CH、HDL/T の低下を抑制した。Triton WR-1339[®]の投与により血清 T-CH、HDL-CH、(T-HDL) -CH、AI、TG は上昇し、HDL/T は低下した。これに対し、両 PaA 誘導体とも血清 T-CH、(T-HDL) -CH、AI、TG の上昇をいずれも有意に抑制する効果を示した。

第4章 実験的高トリグリセリド血症および脂肪肝ラットに及ぼす PaSSO₃Ca の影響

1. 目的

第1章で、PaSSO₃H が CoA になる可能性や、構造が類似している PaSS が人の高脂血症に使用されている点⁶⁵⁾に注目し、飼育用飼料で飼育したマウス、ラット、ハムスター、ウズラを用い脂質低下作用について検討した。その結果、PaSSO₃Ca は、マウス、ハムスター、ウズラで血清（血漿）CH を低下し、マウス、ラット、ハムスターで血清（血漿）TG 低下作用を示した。また、血清 TG 低下作用が、対照物質である PaSS よりも強力であることを見出した。高 TG 血症あるいは脂肪肝を発症する原因は数多く考えられる。また、実験的にそれらを作成する方法も様々で、それぞれのモデルにより薬物の脂質低下の作用機序を推察できる。そこでこの章では、脂肪乳剤 (IL)、果糖 (FW)、アロキサン (AX) を用い高 TG 血症ラットを、一方オロチン酸 (OA)、エチオニン (EN)、テトラサイクリン (TC)、エタノール (ET) 処置（慢性、急性）による脂肪肝ラットを作成し、血清、肝 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を検討し、その作用機序について考察した。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物

（株）埼玉実験動物供給所より入手した雄性 Wistar 系ラットを、1群5匹ずつ使用した。但し、EN 脂肪肝の実験では雌ラットのみとした。これは EN による脂肪肝が雌に特異的に起きるためである¹²⁶⁾。体重は IL の実験では 160g 前後、FW 高 TG 血症の実験では 180g 前後のものを、他の実験では 120g 前後のものを使用した。飼料は ET 慢性実験以外で日本クレア（株）製 CE-2 を、飲料水には FW 実験以外は水道水を自由摂取させた。また正常群には水道水を給水した。飼育室は温度 25±2℃、湿度 50±5% に調節され、照明は 12 時間毎の明暗サイクルとした（明時 7:00～19:00）。

2-2. 試薬

PaSS と PaSSO₃Ca は相互薬工(株)製、IL は旧ミドリ十字製薬(株) (東京) 製、TC は万有製薬(株) (東京) 製を供試した。他の試薬は特級品を使用した。

2-3. PaA 誘導体の投与

PaSS (400mg/ml・水道水)、PaSSO₃Ca (544mg/ml・水道水)はそれぞれ 1,000 および 1,361mg/kg/BW の投与量で、1日1回、IL 処置では1日、AX、OA、EN、TC および ET (急性) 処置では2週間、FW、ET (慢性) 処置では4週間、経口投与用ゾンデを用い経口投与した。

2-4. 高 TG 血症・脂肪肝の作成

- 1) IL 誘発高 TG 血症：PaA 誘導体を経口投与後、一定時間 (0、30 および 60 分後) に脂肪乳剤 IL3ml/kg を総頸静脈内に投与した。
- 2) FW 誘発高 TG 血症：PaA 誘導体投与と同時に、飲料水として 10%果糖水を 1日 40ml/ラットの量で 4週間給水した。
- 3) AX 誘発高 TG 血症：PaA 誘導体の最終投与 3 日前に 16 時間絶食下、AX を氷冷下生理食塩水に溶解し、ただちに 75mg/kg/ml・生理食塩水の投与量で総頸静脈内投与した。
- 4) OA 誘発脂肪肝：PaA 誘導体投与 9 日目より最終日まで OA を 5mg/100g・体重 (5mgOA/ml・0.2%重曹水) の割合で 1日 1回、腹腔内投与した。
- 5) EN 誘発脂肪肝：EN は PaA 誘導体最終投与 1日 および 3 日前に 125mg/kg の割合で 1日 2回腹腔内投与した。
- 6) TC 誘発脂肪肝：PaA 誘導体最終投与 2日 および 3 日前に TC を 250mg/kg の割合で 1日 2回、腹腔内投与した。
- 7) ET 誘発 (慢性) 脂肪肝：PaA 誘導体投与と同時に Lieber ら¹²⁷⁾ に準拠し表 4-1 に示す成分を含有した液体飼料を 1日約 80ml/ラットの割合で 4週間与えた。
- 8) ET 誘発 (急性) 脂肪肝：PaA 誘導体投与 12 日目より最終日まで 3回 40%ET 水溶液を

1ml/100g/BW の割合で PaA 誘導体投与と同時に経口投与した。

表4-1. 液体飼料の組成

組 成	対 照 飼 料 (g) ¹⁾
カゼイン・ソーダ	41.4
L-システイン	0.5
DL-メチオニン	0.3
砂糖 ²⁾	115.9
コーンオイル	8.5
オリーブオイル	28.5
ビタミンMix ³⁾	5
Hegsted salt ⁴⁾	10
ビタミンE	30mg
γ-カラジニン	2.5
リノール酸エチル	2.7

1) 蒸留水で最終 1リッター調整

2) アルコール飼料：砂糖24.9g+エタノール50g

3) パンビタン粉末、武田薬品工業

4) 水溶性塩混合物

2-5. 試料の採取

ラットは、PaA 最終投与後、IL 処置では 30 分後、FW、AX 処置では 1 時間後、その他の実験では 2 時間後、エーテル麻酔下、断頭採血し安楽死させた。血清および肝ホモジネートは第 1 章の方法により調製した。

2-6. 脂質および GL の測定

血清および肝臓中 TG は第 1 章の方法を用いて測定した。血清中 GL は Glucose oxidase 法¹²⁸⁾を用いたグルコース-B-テストワコー（和光純薬製）を用い測定した。

2-7. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し、student's の t-検定で有意差検定を行った。

3. 結 果

1) IL 誘発高 TG 血症ラットの血漿 TG に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

IL によって生ずる急性高 TG 血症に対する両 Pa 誘導体の影響を検討した。図 4-1 に示す

ように PaA 誘導体の前投与時間と血清 TG 量の関係を調べたところ、IL3ml/kg 静脈内投与 30 分後では血清 TG 量が $215.0 \pm 31.8 \text{ mg/dl}$ に対し、 PaSSO_3Ca では IL 投与と同時にあるいは投与前 30 分、60 分投与で有意な低下を示し、60 分前投与で最も強い血清 TG 上昇抑制作用を示した。また、PaSS 投与群でも投与前 30 分と 60 分で有意な上昇抑制作用が見られた。

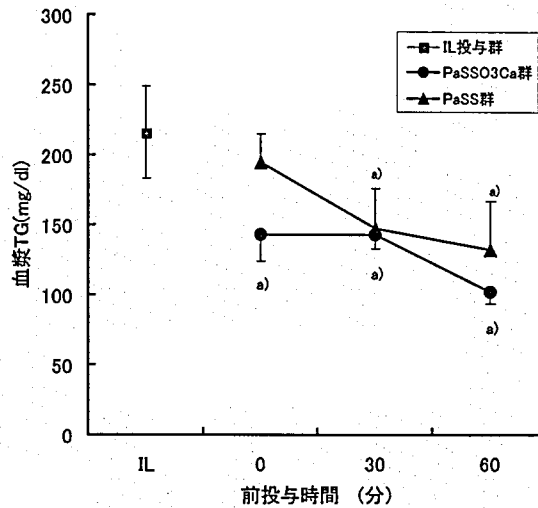


図4-1. 脂肪乳剤誘発高TG血症に及ぼす PaSSO_3Ca の影響
IL群に対する有意差有り, a) $p < 0.02$.

2) FW 誘発高 TG 血症ラットの血清・肝 TG に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

10%FW の 4 週間負荷により血清 TG は正常群に比し約 1.5 倍と高値であったが、 PaSSO_3Ca 投与群で TG 値の上昇が抑制された。一方、PaSS では上昇抑制効果は見られなかった (表 4-2)。肝中 TG は FW 処置群で低下し、両 PaA 誘導体による影響は見られなかった (表 4-2)。

表4-2. フルクトース誘発高TG血症ラットの血清脂質および肝脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	血清脂質				肝脂質		
	TG (mg/dl)	CH (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)	TG (mg/g·liver)	CH (mg/g·liver)	PL (mg/g·liver)
正常	75.3±4.3	61.2±5.8	106.6±7.8	1.123±0.122	8.9±0.5	5.9±0.3	65.5±3.8
フルクトース処置	115.1±26.7	81.2±11.3	146.5±8.9	1.008±0.132	7.7±0.5	5.8±1.8	57.5±2.0
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
PaSSO_3Ca	66.9±10.4****	79.1±8.2	136.3±11.3	0.682±0.106****	7.5±0.7	4.9±0.2	57.6±5.1
	(58)	(97)	(93)	(68)	(97)	(84)	(100)
PaSS	117.6±49.1	73.2±5.9	135.3±1.9**	0.893±0.304	7.6±0.8	6.2±0.6	61.6±2.8**
	(102)	(90)	(92)	(89)	(99)	(107)	(107)

フルクトース処置群に対する有意差有り, $p < 0.05$ (**), $p < 0.01$ (****).

():フルクトース処置群の値を100とした場合の割合.

3) AX 誘発糖尿ラットの血清 TG、GL に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

AX 処置により、血清の TG と GL はそれぞれ正常群の 4.7 と 9.0 倍に上昇した(表 4-3)。両 PaA 投与群では AX 処置による血清 TG 値の上昇を抑制する傾向がみられたが、GL に対し影響を与えなかった。

表4-3. アロキサン誘発糖尿ラットの血清TG・グルコースに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清TG (mg/dl)	血清GL (mg/dl)
正常	109.9±13.6	132.6±4.2
アロキサン処置	521.9±134.6	1182.0±196.7
	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	366.5±127.9	1228.3±184.6
	(70)	(104)
PaSS	363.8±38.2	1114.2±178.4
	(70)	(94)

():アロキサン処置群の値を100とした場合の割合.

4) OA 誘発脂肪肝ラットの肝・血清 TG に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

OA 処置により肝 TG は約 1.5 倍に上昇し、血清 TG に変化はなかった(表 4-4)。OA 処置による肝 TG の上昇を、両 PaA 誘導体とも同程度の作用の強さで有意に抑制した。血清 TG に対しては、両 PaA 誘導体とも影響を与えなかった。

表4-4. オロチン酸誘発脂肪肝ラットの血清・肝TGに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清TG (mg/dl)	肝TG (mg/g·liver)
正常	97.3±6.9	4.73±0.75
オロチン酸処置	101.8±11.8	6.44±1.07
	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	93.8±13.8	4.38±0.27**
	(92)	(68)
PaSS	91.3±15.2	4.11±0.40**
	(90)	(64)

オロチン酸処置群に対する有意差有り. p<0.05 (**).

():オロチン酸処置群の値を100とした場合の割合.

5) EN 誘発脂肪肝ラットの血清・肝 TG に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

EN 処置 1 および 3 日後の、血清および肝 TG 量に及ぼす PaA 誘導体の影響を表 4-5 と表 4-6 に示した。肝 TG は 1 日目で正常群の 2.7 倍と顕著な上昇を示し、3 日目で 1.6 倍に減少した (表 4-6)。これに対し PaA 誘導体投与群では 1 日目の肝 TG の上昇を PaSSO₃Ca 群のみ有意に抑制し、3 日目では両群とも有意な上昇抑制効果を示した。一方、血清 TG は EN 処置により投与 1 日目は上昇したが、3 日目で正常群の値まで回復した (表 4-5)。両 PaA 誘導体により、1 日目の上昇を抑制する傾向、3 日目では PaSSO₃Ca 群のみ有意な上昇抑制効果を示した。

表4-5. エチオニン誘発脂肪肝ラットの血清脂質に及ぼすPaSSO₃Caの効果 (EN処置1および3日後)

群	EN処置後期間 (日)	TG (mg/dl)	CH (mg/dl)	HDL-CH (mg/dl)	PL (mg/dl)	FFA (mEq/l)
正常	1	112.7±13.5	79.7±8.1	56.0±8.9	156.0±10.1	0.635±0.090
	3	131.2±19.3	73.4±10.3	50.5±5.1	148.4±8.1	0.359±0.037
エチオニン処置	1	187.6±41.9 (100)	52.4±6.5 (100)	38.1±4.9 (100)	122.3±17.6 (100)	1.196±0.357 (100)
	3	131.4±30.6 (100)	73.4±14.2 (100)	39.4±2.8 (100)	130.0±9.0 (100)	0.289±0.027 (100)
PaSSO ₃ Ca	1	148.5±22.4 (79)	68.9±11.2** (131)	47.9±9.2 (126)	147.1±22.1 (120)	1.261±0.239 (105)
	3	87.8±23.0** (67)	83.8±9.3** (114)	44.3±4.1 (112)	146.7±9.7** (113)	0.234±0.039*** (81)
PaSS	1	144.2±32.9 (77)	57.4±13.8 (110)	39.7±7.8 (104)	122.5±37.6 (100)	1.082±0.289 (90)
	3	138.0±33.5 (105)	73.2±8.4 (100)	39.9±3.4 (101)	136.7±9.3 (105)	0.369±0.054*** (128)

エチオニン処置群に対する有意差有り。 p<0.05(**), p<0.02(***).

():エチオニン処置群の1日および3日の値をそれぞれ100とした場合の割合。

表4-6. エチオニン誘発脂肪肝ラットの肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの効果 (EN処置1および3日後)

群	EN処置後期間 (日)	TG (mg/g·liver)	CH (mg/g·liver)	PL (mg/g·liver)	FFA (μEq/g·liver)
正常	1	8.50±0.83	7.45±0.28	30.68±1.53	6.21±0.32
	3	8.63±0.76	4.79±0.19	23.20±2.06	N.T.
エチオニン処置	1	22.64±3.70 (100)	7.37±0.71 (100)	31.13±1.71 (100)	4.98±0.47 (100)
	3	14.19±3.88 (100)	5.06±0.31 (100)	23.93±2.80 (100)	N.T.
PaSSO ₃ Ca	1	15.00±3.53*** (66)	9.01±0.61**** (122)	31.78±1.09 (102)	5.94±0.75** (119)
	3	8.42±1.24*** (59)	4.25±0.30**** (84)	23.01±1.81 (96)	N.T.
PaSS	1	19.81±3.09 (88)	8.76±0.97** (119)	32.65±6.50 (105)	5.70±0.98 (114)
	3	8.85±1.24*** (62)	4.40±0.70 (87)	23.83±2.66 (100)	N.T.

エチオニン処置群に対する有意差有り。 p<0.05(**), p<0.02(***), p<0.01(****).

():エチオニン処置群1日および3日の値をそれぞれ100とした場合の割合。 N.T.: Not tested.

6) TC 誘発脂肪肝ラットの肝 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表 4-7 に示すように、TC250mg/kg を 2 回腹腔内投与することにより肝 TG 量は約 5.6 倍まで上昇し、これに対し両 PaA 誘導体とも有意な上昇抑制効果を示した。血清 TG 量は TC 処置により顕著な低下を示し、PaSSO₃Ca 投与により上昇傾向が見られた。

表4-7. テトラサイクリン誘発脂肪肝ラットの血清・肝TGに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清 TG	肝TG
	(mg/dl)	(mg/g·liver)
正常	97.8±20.1	4.52±0.40
テトラサイクリン処置	38.4±7.8	25.32±3.58
	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	47.2±9.3	12.60±1.59****
	(123)	(50)
PaSS	41.0±8.3	16.74±5.18**
	(107)	(66)

テトラサイクリン処置群に対する有意差有り。p<0.05(**), p<0.01(****).

(): テトラサイクリン処置群の値を100とした場合の割合。

7) ET 誘発 (慢性) 脂肪肝ラットの肝および血清 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表 4-8 に示したように、肝 TG は 5%ET 含有飼料の 4 週間処置により正常群の約 1.2 倍まで軽度の上昇し、両 PaA 誘導体投与群で上昇を抑制する傾向を示した。一方血清 TG 量は ET 処置により約 1.8 倍に上昇し、両 PaA 投与群で有意な上昇抑制を示した。

表4-8. エタノール誘発脂肪肝ラットの血清・肝脂質に及ぼすPaSSO₃Caの影響(慢性)

群	血清脂質 (mg/dl)				肝脂質 (mg/g·liver)	
	TG	CH	HDL-CH	PL	TG	CH
正常	92.5±15.1	91.7±11.0	59.2±10.6	160.9±19.2	4.01±0.89	4.31±0.39
エタノール処置	161.1±38.7	83.7±13.5	43.0±6.0	160.7±20.5	4.95±1.00	3.76±0.18
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	69.2±7.2#	72.1±6.3	47.9±2.5	135.8±19.3	4.05±1.00	4.51±0.42****
	(43)	(86)	(111)	(85)	(82)	(120)
PaSS	112.6±10.8**	80.0±8.1	44.4±4.4	146.8±16.7	3.99±0.33	3.95±0.45
	(70)	(96)	(103)	(91)	(81)	(105)

エタノール処置群に対する有意差有り。p<0.05(**), p<0.01(****), p<0.001(#).

(): エタノール処置群の値を100とした場合の割合。

8) ET 誘発（急性）脂肪肝ラットの肝および血清 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表 4-9 に示したように、大量の ET 処置を 3 日間行うことにより肝臓および血清 TG はそれぞれ正常群の 1.9 倍と 2.4 倍に上昇した。肝 TG 量の上昇に対し、両 PaA 誘導体で同程度の作用の強さで有意な上昇抑制を示した。一方 ET 処置による血清 TG の上昇に対しては PaSS 投与群で上昇抑制傾向を、PaSSO₃Ca 投与群では有意な上昇抑制を示した。

表4-9. エタノール誘発脂肪肝ラットの血清・肝TGに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清TG	肝TG
	(mg/dl)	(mg/g·liver)
正常	71.9±13.8	5.8±0.6
エタノール処置	173.4±30.4	11.3±1.9
	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	119.2±31.1**	9.1±1.0**
	(69)	(80)
PaSS	149.0±36.7	8.6±1.3**
	(86)	(76)

エタノール処置群に対する有意差有り. p<0.05(**).

():エタノール処置群の値を100とした場合の割合.

4. 考察

実験動物による高 TG 血症と脂肪肝はその作用機序により表 4-10 のように分類される。各項目ごとに代表的なモデルを選択し、高 TG 血症と脂肪肝を実験的に作成し、それらに対する PaSSO₃Ca の作用を検討した。

表4-10. 作用機序による実験的高TG血症・脂肪肝の分類

作用機序	モデル作成物質
脂肪の酸化障害	エタノール(急性)
過栄養性脂肪肝	エタノール(慢性)
蛋白質合成障害による肝脂質の末梢への転送障害	テトラサイクリン
脂肪の合成亢進	フルクトース
VLDL合成亢進によるVLDL-TGの増加	フルクトース
外因性TG負荷(脂質吸収障害・代謝酵素亢進)	オリーブオイル 脂肪乳剤

IL による高 TG 血症は LPL 活性増強に基づく薬物^{129,130)}のスクリーニングに適しており、両 PaA 誘導体ともこの系で有効であったため (図 4-1)、LPL 活性増強のあることが示唆された。また PaSSO₃Ca は同時投与でも有効だが、前投与した方がより強力に作用し、この差は両 PaA の吸収量および体内での代謝の相違によるものと考えられる。

炭水化物による高 TG 血症¹³¹⁾は、肝臓における α -グリセロリン酸からの TG 合成亢進¹³²⁾や、VLDL 合成亢進による VLDL-TG の増加⁹²⁾によるとされている。10%FW をラットに 1 日 40ml、4 週間制限給水することにより、比較的緩和な条件で高 TG 血症を作成し両 PaA 誘導体の作用を調べた。その結果、4 週間の FW 処置による血清 TG 上昇を PaSSO₃Ca のみが抑制し (表 4-2)、一方肝 TG は FW 処置により上昇せず、両 PaA 誘導体による影響も見られなかった (表 4-2)。FW により肝 TG が上昇しなかったのは、肝臓における TG 合成亢進がこの条件下では軽度であったため、合成された TG が VLDL-TG として血中に放出されたためと推定される。PaSSO₃Ca は、肝臓より血中へ放出された VLDL-TG の異化を促進することにより、血清 TG 量を減少させると考えられる。

AX、ストレプトゾトシンにより誘発される実験的糖尿動物ではインシュリン作用の不足により脂肪組織からの脂肪酸動員増加¹³³⁾、また肝臓における TG 合成および分泌の亢進⁹²⁾が起り、また血中においては、TG 処理能の低下により血清 TG 値の著しい高値が生ずる¹³⁴⁾と言われている。今回の実験でも血清 TG 量は AX 処置により正常群の約 5 倍に上昇し、両 PaA 誘導体とも AX 処置による血清 TG の上昇を抑制する傾向が見られた (表 4-3)。このことは両 PaA 誘導体とも作用は弱い、脂肪酸動員、肝 TG 合成・分泌の亢進に対し阻害的に働き、また TG 処理能を亢進させる働きのあることを意味している。

OA は成長促進因子および抗脂肝性物質として知られている¹³⁵⁾が、大量投与により脂肪肝を呈することがわかった¹³⁶⁾。これは VLDL 合成低下¹³⁶⁾が原因とされている。今回の実験で肝 TG 量は OA 処置により軽度しか上昇しておらず、血清 TG 量は何ら影響を受けていない (表 4-4)。このことは OA による VLDL 合成低下は軽度であることを示している。こ

のような条件下で両 PaA 誘導体とも OA による肝 TG 上昇を同程度抑制しており (表 4-4)、両 PaA 誘導体に軽度な VLDL 合成低下を防止する作用があることを示している。

EN による脂肪肝は、必須アミノ酸であるメチオニンとの構造上の類似性からタンパク合成阻害が起こり、VLDL、LDL 生合成が低下することによる^{137,138)}。TC はタンパク合成阻害作用を有する抗生物質で、VLDL の肝臓からの放出を低下させるため脂肪肝を生成する¹³⁹⁾。EN の場合、VLDL の血中への放出過程は軽度しか阻害されていないものと思われ、血清 TG 量も肝 TG 量 (表 4-6) ほどではないが上昇していた (表 4-5)。一方、TC では VLDL 放出もかなり阻害を受け、血清 TG 値が顕著に低下した (表 4-7)。VLDL 放出阻害という点で TC が特異的であることがわかる。この 2 種類の物質によって誘発した脂肪肝に対して、両 PaA 誘導体とも肝 TG 上昇抑制作用を有していた (表 4-6,7)。その作用は特に PaSSO₃Ca で顕著であり、TC による脂肪肝では血清 TG 量の上昇も観察された (表 4-7)。このことは、PaSSO₃Ca に VLDL 合成や VLDL 放出を促進する作用があることを示唆する。

ET 誘発脂肪肝について、急性および慢性モデルを作成した。急性モデルでは、ET 自身の酸化により過剰の NADH が生成され、FFA の酸化を低下させる。また、FFA の合成およびエステル化の亢進、リポタンパク分泌の低下が報告されている¹²⁷⁾。慢性モデルの場合、栄養障害によるところが大きいと言われている^{140,141)}。急性、慢性 ET 負荷ラットともに PaSSO₃Ca は血清と肝 TG の上昇を顕著に抑制した (表 4-8, 9)。これは、PaSSO₃Ca が FFA のβ-酸化の亢進、TG 合成の抑制、リポタンパク分泌の亢進により、ET 誘発高 TG 血症および脂肪肝を改善することを示している。

以上のように、PaSSO₃Ca は肝臓における TG 合成の低下、TG 異化の促進、肝臓よりの TG 分泌の亢進作用により、各種薬物で誘発される高 TG 血症ならびに脂肪肝の発症を抑制することが示唆された。PaSS にも同様の作用が見られたが、IL 高 TG 血症 (図 4-1)・FW 高 TG 血症 (表 4-2)の血清 TG、EN 処置 1 日後の肝 TG および 3 日後の血清 TG (表 4-5,6)、ET (慢性) 負荷の血清 TG (表 4-8)、ET (急性) 負荷の血清 TG (表 4-9)においてその作用は

PaSSO₃Ca に比較し弱かった。このことは、両 PaA 誘導体とも作用点は同一であるが、その作用が PaSS で弱いことを示している。また、両 PaA 誘導体の体内での代謝の相違、腸管からの吸収量の違いなども原因として考えられる。

飼猫、犬などペット動物の食餌の高カロリー化により、人の成人病と同様に、脂質上昇による動脈硬化、脳梗塞が発症しており、家畜の分野では牛の周産期に脂肪肝が多発し、繁殖障害や乳房炎発症の引き金になると言われている^{94,95)}。これらの課題を解決するためには、PaSSO₃Ca のような TG に対し作用が強力な化合物の検討は有意義なことと思われる。

5. 要 約

脂肪乳剤によって生じた急性高 TG 血症に対し、PaSSO₃Ca、PaSS の前あるいは同時投与により血清 TG の上昇が有意に抑制された。10%果糖負荷時の血清 TG 上昇を PaSSO₃Ca は有意に抑制したが、PaSS で変化がなかった。アロキサン処置による糖尿ラットの血清 TG の上昇を両 PaA 誘導体で抑制する傾向を示した。オロチン酸処置による肝 TG の上昇を両化合物とも有意に抑制した。エチオニン(EN)処置 1 日後の肝 TG 量上昇を PaSSO₃Ca の 2 週間前投与により有意に抑制し、また PaSS の 2 週間前投与により上昇抑制傾向を示した。この時血清 TG 量も上昇し、両 PaA 誘導体で上昇抑制傾向を示した。EN 処置 3 日後では肝 TG 量は正常群の 1.6 倍に回復し、これに対し両化合物とも有意な上昇抑制効果を示した。この時、血清 TG 量は正常群のレベルまで回復し、PaSSO₃Ca のみ正常群の値より更に低下した。テトラサイクリン処置により上昇した肝 TG を両 PaA 誘導体とも有意に抑制した。5%エタノール(ET)飼料処置により血清および肝 TG は上昇し、肝 TG の上昇に対して両化合物で抑制傾向を示した。血清 TG の上昇に対し両 PaA 誘導体群とも有意な抑制効果を示し、その作用は PaSSO₃Ca で顕著であった。大量の ET 投与により脂肪肝、高 TG 血症が発症したが、血清 TG の上昇を、PaSSO₃Ca 群のみ有意に抑制し、また肝 TG の上昇を両 PaA 誘導体とも有意に抑制した。

第5章 PaSSO₃Ca の脂質低下作用の作用機序

第4章までに各種動物、各種条件下で検討した結果、PaSSO₃Ca 血清脂質および肝脂質低下作用を有し、ウズラおよびウサギの動脈硬化症の予防に有効であることが示された。

そこで本章では PaSSO₃Ca の脂質低下作用の作用機序を知るため、CH 低下作用を有する条件として 1%CH (0.5%CA) 含有飼料で 2 週間飼育ラットを、CH 低下作用を持たない条件として正常飼料飼育ラットを使用し、*in vitro*、*in vivo* での PaSSO₃Ca の CH 低下作用についてさらに検討した。TG についてはほとんどの条件下で低下作用を示したので、代表的な条件として正常飼料飼育ラット、テトラサイクリン処置ラットおよび高 CH 飼料飼育ラットを用い、PaSSO₃Ca の TG 低下の作用機序を *in vitro*、*in vivo* 実験系を用い調べた。

第1節 高コレステロール食飼育ラットにおける PaSSO₃Ca のコレステロール低下作用の機序

1. 目的

第2章において、高 CH 飼料で飼育した各種動物に対し PaSSO₃Ca の血清・肝 CH に及ぼす影響について検討した。PaSSO₃Ca はラット、ハムスター、ウズラおよびウサギに対し血清 CH 低下作用を示した。本実験では第2章で強力な脂質低下作用を示した 1%CH(0.5%CA) 含有飼料で 2 週間飼育したラットに、PaSSO₃Ca 投与の条件を用い、CH 代謝（吸収、異化排泄、生合成）に及ぼす影響について検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 実験動物

動物は特に記載しない限り、(株)埼玉実験動物供給所より入手した雄性 Wistar 系ラット、体重 120 g 前後のものを使用した。飼料は正常群では日本クレア社製 CE-2、高 CH 群では

CE-2 をベースに 1%CH、0.5%コール酸ナトリウム (CA) を添加した高 CH 飼料で 2 週間飼育した。その他の飼育条件は第 1 章の方法に準じて行った。

2-2. 試薬

PaSS、PaSSO₃Ca およびパンテテイン-S-スルホン酸ナトリウム (PaSSO₃Na) は相互薬工(株) 製、[1 α ,2 α -³H] cholesterol (57.0mCi/mmol)、[4-¹⁴C] cholesterol (60mCi/mmol)、[1-¹⁴C] sodium acetate (57mCi/ mmol)、[¹⁴C]-mevalonic acid DBED salt (50.1 μ Ci/mmol) および Aquasol-2 は New England Nuclear (Boston, MA) より購入した。他の試薬は特級品を使用した。

2-3. PaA 誘導体投与

特に記載しない限り、化合物は PaSS (400mg/ml)、PaSSO₃Ca (544mg/ml) をそれぞれ 1,000、1,361mg/kg の投与量で 1 日 1 回、高 CH 飼料飼育開始と同時に終了するまで連続経口投与した。正常群、高 CH 飼料飼育群には PaA 誘導体の代わりに水道水を与えた。

2-4. 放射性 CH 溶液の調製

Dual isotope^{142,143}法の実験における静脈内投与溶液は、[4-¹⁴C] -CH の 15.7 μ Ci (394 μ l) に 95%エタノール水溶液 (515.0 μ l) および 0.9%NaCl 溶液 (9.79ml) を加えたものを用いた。経口投与溶液は、[³H] -CH の 59.9 μ Ci (59.9 μ l) に非放射性 CH (105mg) を添加して激しく振盪混和した後、蒸留水で 35ml にメスアップしたものを用いた。

2-5. 実験方法

1) Dual isotope 法による CH の吸収、異化排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

動物は 1 群 5 匹ずつ使用し、正常飼料および高 CH 飼料で 12 日飼育した。PaA 誘導体は、PaSS (400mg/ml)、PaSSO₃Ca (544mg/ml) をそれぞれ 1,000 および 1,361mg/kg の投与量で 1 日 1 回、10 日間連続経口投与した。動物は最終 PaA 誘導体投与後、[4-¹⁴C]-CH (0.381 μ Ci/0.25ml/100g・体重) を尾静脈よりエーテル麻酔下投与し、速やかに [³H]-CH (1.712 μ Ci/1.0ml/100g・体重) を、経口投与用ゾンデを用い投与した。その後、48 時間まで経時的に尾静脈より必要量採血し血液中の放射能の測定に供した。最終採血後、ラットを麻

酔下 (ソムノペンチル ; 0.12ml/rat,i.p.) で開腹し、総胆管にカニューレ (Intramedie PE-10,Clay Adams) を挿入して流出する胆汁を 2 時間分採取した。胆汁採取後、直ちに腹部大動脈から自然放血した。

2) 胆汁中への胆汁酸・CH 排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

動物は 1 群 3 匹ずつ使用し、正常飼料および高 CH 飼料で 2 週間飼育した。PaA 誘導体最終投与後、ラットを麻醉下 (ソムノペンチル ; 0.12ml/rat,i.p.) で開腹し、総胆管にカニューレ (Intramedie PE-10,Clay Adams) を挿入して流出する胆汁を 6 時間分採取した。胆汁採取後、直ちに腹部大動脈から自然放血した。

3) LDL-rich serum 中の [¹⁴C]-CH の血中からの消失に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

体重 180 g 前後のラット 3 匹を使用し、高 CH 飼料で 2 週間飼育した後、生食水 : Tween80=20 : 1 に懸濁させた [4-¹⁴C]-CH を 30μCi/kg の割合で経口的に投与した。3 時間後心臓採血し、放射性の血清を得た。別に 1 群 5 匹を用いて高 CH 飼料で飼育したラットに PaA 誘導体最終投与後、この放射性血清を 2.2ml/rat (3,687,200dpm/rat) の割合で静脈内投与し、経時的に採血を行い血中放射能を測定した。

4) CH の糞中排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

動物は 1 群 4 匹ずつ使用した。PaA 誘導体最終投与後、生食水 : Tween80=20 : 1 に懸濁させた [4-¹⁴C]-CH を 4.5μCi/200 g の割合で経口投与し、3 日間のふんを 1 日分ずつ集め、乾燥させ、全量を粉末状に砕き、エタノール 50ml を加え 80°C の水浴中で 8 時間、脂質および胆汁酸の抽出を行った。これを 3 回繰り返す、3 回の抽出液を混ぜ一定量に濃縮した後、その 1ml をバイアル瓶に分取し、Aquasol-2 を 9ml 加え、ふん中放射能を測定した。

5) 酢酸からの CH 生合成に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

動物は 1 群 6 匹使用した。動物は PaA 誘導体最終投与前 12 時間絶食させ、PaA 誘導体最終投与 30 分後に [1-¹⁴C]-酢酸を 10μCi/100 g の割合で腹腔内投与し、1 時間後に安楽死させ、肝臓および血液を採取した。肝臓および血液より得た血清中の放射能の取り込みを測定した。

6)メバロン酸からの CH 生合成に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

動物は 1 群 4 匹使用した。動物は PaA 誘導体最終投与前 14 時間絶食させ、PaA 誘導体最終投与 30 分後 [¹⁴C]-メバロン酸 DBED 塩を 16.7 μ Ci/kg の割合で腹腔内投与し、1 時間後に安楽死させ、肝臓、小腸および血液を採取した。肝臓、小腸および血液より得た血清中の脂質への放射能の取込みを測定した。

2-6. 脂質および胆汁酸の測定

ラットより採取した血液は必要により、3,000 回転、20 分の遠心分離により血清を得、肝臓は 0.9%NaCl で 20%ホモジネートを調製した。第 1 章の方法を用い、血清中 CH⁷⁹⁾ および HDL (高比重リポタンパク) -CH⁸³⁾ を定量した。胆汁中胆汁酸は、酵素法¹⁴⁴⁾による測定キット (エンザバイル、第一化学薬品製) を用い測定した。

2-7. 組織中の放射能の測定

血液 (0.1ml)、血清 (0.25ml) および胆汁 (0.05ml) に 30%H₂O₂ を少量加え一夜放置し脱色した。その後 Folch 液¹⁴⁵⁾ を 1ml 加えよく攪拌し、シンチレーター (Aquasol-2) 8.5ml を加えて Aloka903 を用いて測定した。CH 生合成実験で得た肝臓の 20%ホモジネート 1ml に対し、Folch 液 3ml で 3 回脂質の抽出を行い、抽出液を 0.9%NaCl で 3 回洗浄した。この有機層を N₂ 気流下蒸発乾固し、Folch 液 100 μ l で再溶解し、脂質抽出液とした。この 25 μ l を総脂質画分、他の 25 μ l を薄層クロマトグラフィー (Whatman LK5DF) によりヘキサン : エチルエーテル : 酢酸 (80:20:1) を分離溶媒として展開し、CH、CH エステルを分離した。この部分を I₂ 蒸気により発色させ、液体シンチレーション用バイアルに掻き取り、Folch 液 1ml を加えよく混和した後、Aquasol-2 を 9ml 加えて放射能を測定した。

2-8. 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差で表示し、student's の *t*-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

1) Dual isotope による CH 吸収、異化排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

経口的に投与した[³H]-CHと静脈内投与した[¹⁴C]-CHの血中濃度の推移を図5-1に示す。血中[³H]濃度は正常群では9~24時間の間にピークを持つ緩やかな曲線となったが、高CH群では6時間後に最大吸収を示す鋭いピークを持つ曲線となった。図5-1より吸収量を計算したところ、高CH群で[³H]-CHの吸収は正常群の74%に減少し、両化合物による影響はなかった。一方、静脈内投与した[¹⁴C]-CHの血中濃度も正常群では緩やかな曲線となり、高CH群で6-9時間後にピークを持つ曲線となった(図5-2)。血中からの[¹⁴C]-CHの消失速度を9時間から24時間で計算すると、正常群で37.5(hr)、高CH群で12.6(hr)、PaSS群で18.9(hr)、PaSSO₃Ca群で10.7(hr)となり、PaSSO₃Ca投与により血中からの[¹⁴C]-CHの消失は軽度促進していることが示された。この結果は、PaSSO₃CaにCHの胆汁中またはふん中への胆汁酸、CHとしての排泄、臓器へのCHの分布を促進する作用のあることを示唆している。そこで、48時間後より2時間分の胆汁中へ排泄された[³H]、[¹⁴C]濃度と量を測定した(表5-1)。¹⁴C、³Hの濃度、量とも高CH群で増加していた。¹⁴Cの排泄濃度、量は両化合物により高CH群より増加していた。また、³Hの排泄濃度、量はPaSSでは低下傾向が見られたが、PaSSO₃Caでは増加していた。肝臓・血清への³H、¹⁴Cの分布に及ぼす両PaA誘導体の影響を表5-2に示した。肝臓および血清への残存放射活性は、PaA誘導体により変化ないか減少していた。この結果は、経口および静脈内投与されたCHが両PaA誘導体の作用によって、肝臓および血清からすみやかに排泄されることを示している。臓器への分布がなく、吸収の影響を受けない¹⁴C-CHの胆汁中への放射能の排泄が上昇したことで、PaSSO₃Caに胆汁中への胆汁酸、CH排泄促進作用が示された。

2) 胆汁中への胆汁酸・CH排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表5-1において、胆汁中への放射能の排泄が上昇していたことから、それが、胆汁酸

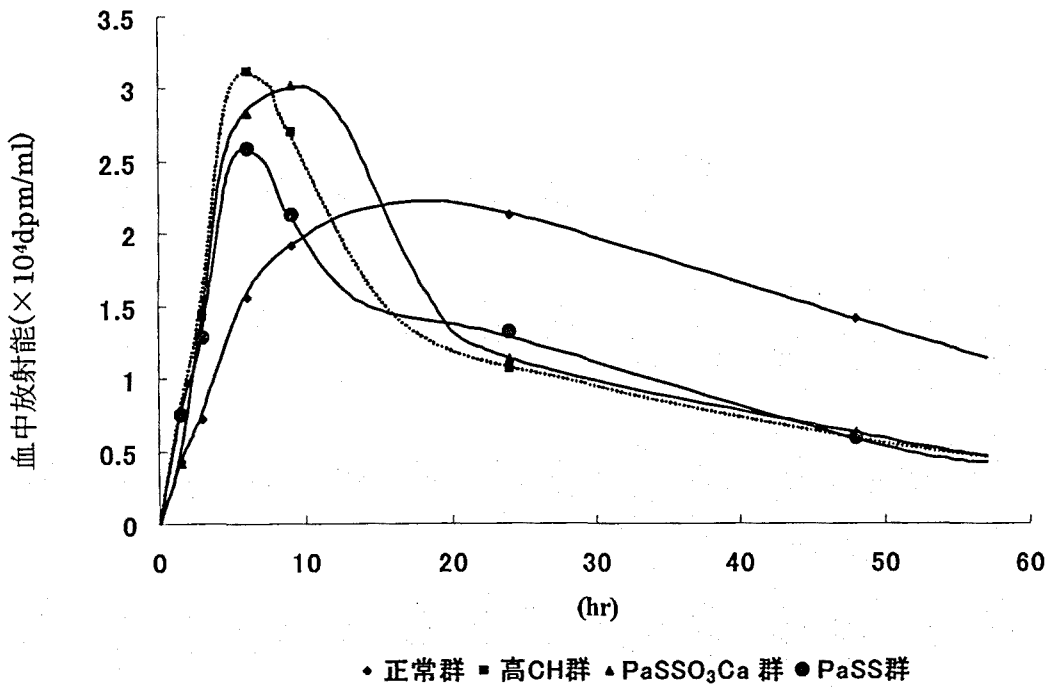


図 5-1. Dual isotope 法での血中³H濃度 (経口投与) の経時的変化に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

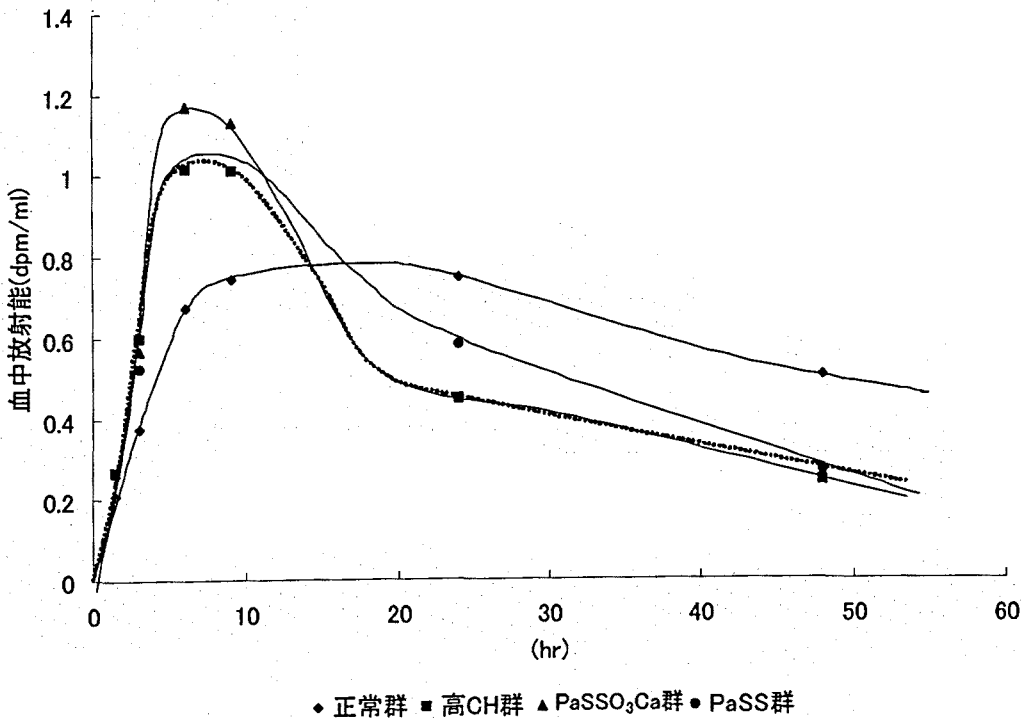


図 5-2. Dual isotope 法での血中¹⁴C濃度 (静脈内投与) の経時的変化に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表5-1. 胆汁中への ^{14}C ・ ^3H 標識胆汁酸およびコレステロール排泄に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	^{14}C -Excreted in bile juice		^3H -Excreted in bile juice	
	^{14}C dpm/ml・bile	dpm/2hr.	^3H dpm/ml・bile	dpm/2hr.
正常	10,614±1,568	17,490±5,107	23,762±2,245	39,991±9,372
高CH	11,376±2,116 (100)	24,733±10,257 (100)	33,351±9,745 (100)	72,216±32,667 (100)
PaSSO_3Ca	13,060±1,905 (115)	29,147±6,954 (118)	38,007±3,636 (114)	86,931±15,791 (120)
PaSS	12,890±2,254 (113)	28,535±14,966 (115)	30,114±8,427 (90)	69,560±47,457 (96)

() : 高CH群を100とした場合の割合。

表5-2. 肝臓・血清中に残存した放射能に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	Radioactivity-remained in liver(dpm/g)		Radioactivity-remained in serum(dpm/ml)	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
正常	78,978±26,181	34,169±8,089	10,781±1,935	4,741±509
高CH	94,326±11,233 (100)	42,940±7,032 (100)	13,558±1,911 (100)	5,549±801 (100)
PaSSO_3Ca	93,784±12,119 (99)	35,159±4,684 (82)	10,116±521 (75)	3,876±267 (70)
PaSS	78,254±13,707 (83)	33,427±6,553 (78)	10,163±1,565 (75)	4,383±604 (79)

() : 高CH群を100とした場合の割合。

表5-3. 血清脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	血清脂質 (mg/dl)	
	CH	HDL-CH
正常	74.2±3.1	54.4±2.9
高CH	300.1±61.7 (100)	40.6±3.4 (100)
PaSSO_3Ca	275.8±64.0 (92)	47.9±4.2 (118)
PaSS	270.4±54.3 (90)	46.4±6.2 (114)

() : 高CH群を100とした場合の割合

あるいはCHのどちらに由来するものか、検討した結果、表5-4に示すように、 PaSSO_3Ca により、胆汁酸の排泄が上昇しており、CH排泄には影響がなかった。

表5-4. 胆汁中への胆汁酸及びコレステロール排泄に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	胆汁中胆汁酸	胆汁中コレステロール
	mg/bile juice	mg/bile juice
正常	34.4	230.8
高CH	48.3	194.7
	(100)	(100)
PaSSO ₃ Ca	57.1	202.7
	(118)	(104)
PaSS	46.8	134.6
	(97)	(69)

データは3匹のラットの平均値。(): 高CH群を100とした場合の割合。

2) LDL-rich serum 中の[¹⁴C]-CH の血中からの消失に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

LDL-rich な血清中へ取り込ませた[¹⁴C]-CH を静脈内投与した際の血中からの消失に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を図 5-3 に示す。[¹⁴C]-CH の血中からの消失は二相性を示し、図 5-3 より求めた第一相の半減期($t_{1/2}$)は正常群で 13.1 ± 3.7 (min)、高 CH 群で 92.8 ± 20.3 (min)、PaSS 群で 85.8 ± 27.1 (min)、PaSSO₃Ca 群で 25.5 ± 15.5 (min) となり、CH の血中消失は第一相で遅延しており、PaSSO₃Ca はこれを短縮していることが確認された。一方、第二相の半減期 $t_{1/2}$ は正常群で 25.4 ± 8.2 (hr)、高 CH 群で 12.8 ± 0.6 (hr)、PaSS 群で 13.5 ± 1.3 (hr)、PaSSO₃Ca 群で 15.2 ± 3.3 (hr) となり、高 CH 飼料飼育により、CH の血中からの消失は第二相で促進され、PaA 誘導体投与による影響は見られなかった。Dual isotope 法による実験と今回の LDL-rich serum を用い実験より Dual isotope 法で静脈内投与した[¹⁴C]-CH の血中からの消失が、PaSSO₃Ca により促進されたのは、表 5-3 に示したように HDL-CH が両 PaA 誘導体で上昇傾向にあることにより、主に LDL 中の CH の消失が促進されたことに起因することが判明した。

3) CH のふん中排泄に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

CH のふん中排泄に及ぼす PaA 誘導体の影響を表 5-5 に示した。PaSS 群ではすべての期間で排泄された[¹⁴C]-CH 由来放射能は増加していた。PaSSO₃Ca 群では初めの 0-24 時間で変

化なく 24~72 時間で増加していた。よって、0~72 時間までの累積排泄量は両化合物群で増加していた。また、胆汁酸の腸肝循環を高 CH 群の 83% に軽度阻害していた。この結果は、 PaSSO_3Ca に CH のふん中排泄促進作用あるいは胆汁循環の阻害作用のあることを示している。

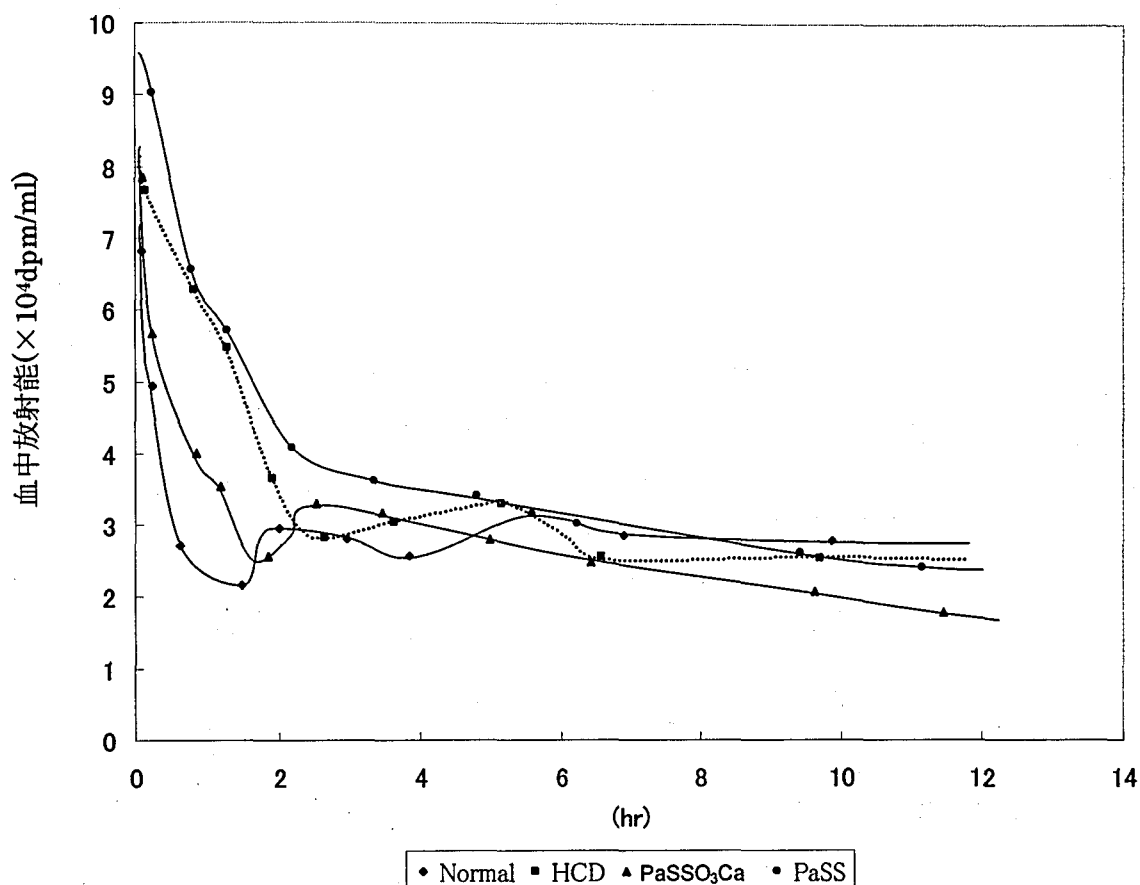


図 5-3. LDL-rich リポタンパク質の血中からの消失に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

表 5-5. ふん中への放射能の排泄に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	Radioactivity in feces (dpm/feces)			
	0-24hr	24-48hr	48-72hr	0-72hr
正常	652,793±208,323	605,129±71,200	365,908±92,215	1,623,829±304,779
高CH	718,838±423,884 (100)	474,879±128,459 (100)	234,470±45,700 (100)	1,430,686±296,796 (100)
PaSSO_3Ca	714,653±154,087 (99)	555,117±134,858 (117)	279,160±86,988 (119)	1,548,930±146,349 (108)
PaSS	839,200±110,057 (117)	499,987±254,969 (105)	313,312±82,315 (134)	1,652,499±380,567 (116)

() : 高CH群を100とした場合の割合

4) [¹⁴C]-酢酸からの CH 生合成に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

肝臓での [¹⁴C]-酢酸の総脂質への取り込みは高 CH 群で減少し、PaSS では変化なかったが、PaSSO₃Ca は投与により減少傾向を示していた(表 5-6)。肝臓での [¹⁴C]-酢酸 よりの [¹⁴C]-CH の合成は高 CH 群で減少し、両化合物投与により更に減少していたが、その作用は PaSSO₃Ca 群で強力であった。一方血清中への CH の取り込みは肝臓と同様、高 CH 群で顕著に減少し、両 PaA 投与による影響は見られなかった。

表5-6. 肝臓および血清での [¹⁴C]-酢酸からの CH 合成に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

群	肝脂質 (dpm/g·liver)		血清(dpm/ml)
	[¹⁴ C]-総脂質	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CH
正常	33,902±10,303	25,201±1,724	3,277±369
高CH	25,684±7,034 (100)	16,639±2,562 (100)	929±267 (100)
PaSSO ₃ Ca	22,056±7,664 (86)	11,614±3,320 (70)	1016±416 (109)
PaSS	26,676±17,514 (104)	13,821±2,092 (83)	1053±439 (113)

() : 高CH群を100とした場合の割合

5) [¹⁴C]-メバロン酸からの CH 生合成に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

肝臓での [¹⁴C]-メバロン酸の [¹⁴C]-遊離 CH への放射能の取り込みは高 CH 群で顕著に減少し、PaSS 投与により減少傾向にあったが、PaSSO₃Ca では変化なかった(表 5-7)。CH への取り込みに対する高 CH 飼料飼育の影響は少なく、PaSSO₃Ca 投与により顕著に減少していた。よって、CH+CE で求めた CH 生合成に対しては PaSSO₃Ca 群のみ低下傾向を示していた。CH 生合成の主要臓器である肝臓において、PaSSO₃Ca は酢酸よりの CH 生合成およびメバロン酸からの CH 生合成をほぼ同程度に抑制している。このことは、PaSSO₃Ca がメバロン酸以降の CH 生合成経路を阻害することを意味している。小腸では肝臓の約 20% の CH 合成活性が存在した。小腸での [¹⁴C]-メバロン酸よりの [¹⁴C]-遊離 CH の放射能の取り込みは高 CH 群で軽度に低下し、両 PaA 誘導体による影響はなかった。 [¹⁴C]-CE (エステル型 CH) への

取り込みは高 CH 飼料飼育による影響は見られず、両化合物により低下傾向を示した。よって、CH+CE より求めた CH 生合成に対しては PaSSO₃Ca 群のみ低下傾向を示した。一方、血清中への [¹⁴C]-CH の取り込みは高 CH 群で低下し、両 PaA 投与により上昇していた。 [¹⁴C]-CE への取り込みは CH 負荷により顕著に減少し、両化合物投与により上昇していた。よって CH+CE より求めた血清中への CH の取り込みは両化合物により上昇していた。

表5-7. 肝臓、小腸および血清での [¹⁴C]-メバロン酸からのCH合成に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	肝臓 (dpm/g·liver)			小腸 (dpm/g·intestine)			血清 (dpm/ml)		
	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CE	[¹⁴ C]-(C+CE)	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CE	[¹⁴ C]-(C+CE)	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CE	[¹⁴ C]-(C+CE)
正常	11,136±3,242	7,343±5,204	18,079±8,390	1,986±676	1,578±99	3,562±685	695±155	2,969±195	3,732±156
高CH	1,795±321 (100)	6,731±3,843 (100)	8,525±3,828 (100)	1,449±203 (100)	1,507±297 (100)	2,956±990 (100)	379±90 (100)	478±178 (100)	858±267 (100)
PaSSO ₃ Ca	1,661±417 (93)	4,100±1,918 (61)	5,761±2,103 (68)	1,192±255 (96)	1,161±201 (77)	2,553±409 (86)	519±31 (137)	617±109 (129)	1,136±104 (133)
PaSS	1,589±459 (89)	6,712±4,148 (100)	8,301±4,358 (97)	1,680±966 (116)	1,301±74 (86)	2,981±416 (101)	520±148 (137)	598±88 (125)	1,118±137 (130)

(): 高CH群を100とした場合の割合

CH:遊離型コレステロール, CE:エステル型コレステロール

4. 考察

Dual isotope 法による実験では、一度に吸収、異化排泄、臓器への分布を観察できる。経口投与した [³H]-CH の血中濃度の推移 (図 5-1) により、高 CH 群で CH の吸収は正常群の 74%に減少していた。これは、ラットの高 CH 飼料飼育に対する防御機構の活性化による吸収阻害であることがわかる。

一方、静脈内投与した [¹⁴C]-CH の血中濃度の推移により、CH の血中からの消失半減期は高 CH 群で正常時の約 85%まで短縮されており、これは過剰な CH を体内から排泄させようとするラットの高 CH 飼料飼育に対する防御機構の活性化^{84-86,100)} による結果である。

PaSSO₃Ca は高 CH 群の約 1/2 まで [¹⁴C]-CH の血中からの消失を短縮しており (図 5-2)、この結果は、PaSSO₃Ca に CH の胆汁中への排泄、ふん中への BA (腸肝循環の阻害)、CH としての排泄、臓器への CH の分布を促進する作用が有ることを示している。そこで、胆汁中

への放射能を測定したところ (表 5-1)、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 由来の放射能は高 CH 群で増加しており、 PaSSO_3Ca 群では高 CH 群より更に増加していた。高 CH 飼料飼育により胆汁中への BA、CH の排泄が促進していることを示している。また、 PaSSO_3Ca は $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 由来の放射能の臓器および血清への分布を変化させないか、減少させており (表 5-2)、吸収の影響を受けない $[^{14}\text{C}]$ -CH 由来の放射能の胆汁中への排泄を上昇させたことは、 PaSSO_3Ca に胆汁中への BA、CH 排泄促進作用があることを示している。さらに、BA あるいは CH を特定する実験を行ったところ (表 5-4)、胆汁中の BA を上昇させており、CH に影響を与えていなかった。これにより、 PaSSO_3Ca による胆汁酸生成の律速酵素である ¹⁴⁶⁾ cholesterol 7 α -hydroxylase (EC1.14.13.17) の活性化が示唆された。さらに、 PaSSO_3Ca はふん中への放射能の排泄も軽度であるが促進しており (表 5-5)、BA の腸肝循環を高 CH 群の 83% に軽度低下させた。 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{H}]$ -CH のふん中への排泄促進または BA の腸肝循環の阻害作用があることが示された。

CH は、酢酸から HMG-CoA、メバロン酸を経て数十段階の反応により生体内で合成される ¹⁴⁷⁾。高 CH 飼料飼育時には、CH 生合成の主要臓器 ¹⁴⁸⁾である肝臓での酢酸からの CH 生合成は正常群の 66% に抑制され (表 5-6)、メバロン酸からの CH 生合成は正常群の 47% に抑制されており (表 5-7)、メバロン酸以降の経路での阻害程度が強いことがわかる。 PaSSO_3Ca は、酢酸からの CH 合成およびメバロン酸からの CH 合成を肝臓において同程度阻害しており、この結果は、 PaSSO_3Ca がメバロン酸以降の CH 合成経路を阻害していることを示している。メバロン酸からの CH 合成については小腸についても行ったが、高 CH 飼料飼育および PaSSO_3Ca の影響は肝臓ほど大きく出ていなかった。高 CH 飼料飼育に対するラットの防禦機構の活性化は、主に肝臓における CH 生合成の抑制という形で現れることが知られており ⁸⁶⁾、今回の結果もそれを支持するものであった。

Dual isotope 法で静脈内投与した CH は非生理的であり、もっと生理的条件下で血中からの CH 消失を観察する場合、リポタンパクの形状をとった CH により行うべきである。そこで

高 CH 飼料で飼育したラットより採取した血清を使用し、血中からの CH 消失に及ぼす PaSSO_3Ca の影響を検討した。この血清には、(VLDL+LDL)-CH が 91%、HDL-CH が 9% 含まれている。 PaSSO_3Ca は、このように(VLDL+LDL)-CH rich な血清の CH の血中からの消失を促進する作用があることが示され (図 5-3)、これは Dual isotope 法において、静脈内投与した ^{14}C -CH の消失を早めた結果と一致するものであった。

第 2 章で示したように、この条件下では PaSSO_3Ca により(VLDL+LDL)-CH の低下、HDL-CH の軽度な上昇が観察された。今回の結果と考え合わせるとこの消失促進は、(VLDL+LDL)-画分の CH 消失促進であることが示された。

以上のように、 PaSSO_3Ca には高 CH 飼料飼育時の血清 CH 低下作用が観察されるが、これは CH 吸収に影響を与えず、CH の肝臓および血清への分布を減少させ、胆汁中への BA、CH の排泄および糞中への CH 排泄を促進させ、BA の腸肝循環の阻害作用、メバロン酸以降の CH 合成経路の阻害により、血中から(VLDL+LDL)-CH rich な CH の消失を促進する作用によることが判明した。

5. 要約

PaSSO_3Ca の血中 CH 低下作用が観察される条件である、1%CH(0.5%CA)含有飼料飼育ラットでの脂質低下の作用機序について検討した。Dual isotope 法による実験で、 PaSSO_3Ca は経口投与した ^3H -CH の腸管からの吸収および肝臓への ^3H -CH の分布に影響を与えず、血清中 ^3H -CH を減少させた。一方、静脈内投与した ^{14}C -CH の肝臓および血清への放射能の分布を減少させた。血中からの ^{14}C -CH の消失を軽度促進し、胆汁中への ^3H および ^{14}C 由来の放射能の排泄を増加させた。 PaSSO_3Ca は経口投与した ^{14}C -CH のふん中への排泄を促進し、BA の腸肝循環を軽度阻害した。 ^{14}C -酢酸および ^{14}C -メバロン酸からの ^{14}C -CH への取り込みを同程度の比率で阻害した。また、静脈内投与した ^{14}C でラベルした(VLDL+LDL)-CH の血中からの消失を促進した。

第2節 正常飼料飼育ラットのコレステロール代謝に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

1. 目的

第1章において脂質代謝の正常な各種動物を使用し、 PaSSO_3Ca 投与による血清脂質低下作用の有無、ならびに実験に用いた動物におけるその作用の種差と性差の有無について検討した。その結果、血清 CH 低下作用はマウス、ハムスター、ウズラで観察されたが、正常飼料飼育ラットでは観察されなかった。そこで今回、正常ラットを用い、 PaSSO_3Ca 投与によりラットの CH 代謝（吸収、異化排泄、生合成）に及ぼす影響について検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物および飼育方法

脂質代謝の正常な雄性 Wistar 系ラット（体重約 120g）を使用した。胸管リンパカニューレーション法による CH 吸収実験のみ体重 220~280g のラットを用いた。動物は埼玉実験動物（株）より入手し、東京薬科大学実験動物飼育施設にて飼育した。飼料は日本クレア製 CE-2、飲料水は水道水を使用し、特に指定しない限り、それぞれ自由摂取させた。飼育室は温度 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\% \pm 5\%$ に調節され、照明の点灯は 7:00 から 19:00 まで行った。

2-2. 試薬

PaSS 、 PaSSO_3Ca およびパンテテイン-S-スルホン酸ナトリウム (PaSSO_3Na) は相互薬工（株）製、 $[1\alpha, 2\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -cholesterol (57.0mCi/mmol)、 $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -cholesterol (60mCi/mmol)、 $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ sodium acetate (57mCi/mmol) および Aquasol-2 は New England Nuclear (Boston, MA) より購入した。他の試薬は特級品を使用した。

2-3. 放射性 CH 溶液の調製

Dual isotope^{142,143}法の実験における静脈内投与溶液は、 $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -CH の $15.7\mu\text{Ci}$ ($394\mu\text{l}$) に 95%エタノール水溶液 ($515.0\mu\text{l}$) および 0.9%NaCl 溶液 (9.79ml) を加えたものを用いた。

経口投与溶液は、 $[^3\text{H}]$ -CH の $59.9\mu\text{Ci}$ ($59.9\mu\text{l}$) に非放射性 CH (105mg) を添加し、激しく振盪混和した後、水で 35ml にメスアップしたものを用いた。

In situ 実験において使用した腸管内投与溶液は、 $[1\alpha,2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -CH ($47.0\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) $3\mu\text{Ci}$ 、 5mM モノオレインを含む 5% アラビアゴム液 1.2ml と PaA 誘導体液 1.5ml を超音波により乳化し調製した。この溶液 0.45ml と 50mM タウロデオキシコール酸 0.05ml を腸管内に投与した (投与液中に $0.5\mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]$ -CH、 2mM モノオレイン、 5mM タウロデオキシコール酸を含む)。

2-4. CH 代謝実験

1) CH の吸収・異化排泄および分布に及ぼす PaSSO_3Ca の影響 (Dual isotope 法)

動物は 1 群 5 匹ずつ使用した。PaA 誘導体は、PaSS ($400\text{mg}/\text{ml}$)、 PaSSO_3Ca ($544\text{mg}/\text{ml}$) をそれぞれ $1,000$ および $1,361\text{mg}/\text{kg}$ の投与量で 1 日 1 回、10 日間連続経口投与した。動物は、最終 PaA 誘導体投与後に $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -CH ($0.381\mu\text{Ci}/0.25\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{体重}$) を尾静脈よりエーテル麻酔下投与し、速やかに $[^3\text{H}]$ -CH ($1.712\mu\text{Ci}/1.0\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{体重}$) を経口投与用ゾンデを用い投与した。その後、48 時間まで経時的に尾静脈より必要量採血し血液中の放射能の測定に供した。最終採血後、ラットを麻酔下 (ソムノペンチル; $0.12\text{ml}/\text{rat}, \text{i.p.}$) で開腹し、総胆管にカニューレ (Intramedie PE-10, Clay Adams) を挿入して流出する胆汁を 2 時間分採取した。胆汁採取後、直ちに腹部大動脈から自然放血した。

2) 胸管リンパカニューレーション法¹⁴⁹⁾を用いた CH 吸収に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

① 絶食条件下での実験：一夜絶食させたラット 6 匹に生理食塩水 6ml を腹腔内投与し、約 45 分後にエーテル麻酔下、胸管リンパ・カニューレーションを実施した。10~20 分後にラットが覚醒した時、 15% CH/オリーブ油を $0.3\text{ ml}/\text{ラット}$ および PaA 誘導体を $5\text{ ml}/\text{kg}$ の割合で経口投与した。 PaSSO_3Ca は $1,361\text{mg}/5\text{ml}$ の濃度となるように生理食塩水に溶解し、正常群には生理食塩水のみ与えた。リンパ液は 2 時間間隔で 8 時間連続採取した。途中リンパ液採取開始より 4 時間後に生理食塩水 2ml を皮下投与した。リンパ液中の CH 濃度を測定した。

②摂食条件下での実験：摂食下、2)-①と同様の実験を行った。

3) *In situ* での腸管からの CH の取り込みに及ぼす PaSSO_3Ca の影響

動物は7週齢の雄性 Wistar 系ラットを1群4匹使用した。絶食ラットの空腸部位を約8mlの生理食塩水で4回洗浄し、約6cmの長さに縫合糸で固く結紮した。2-3で調製した放射性CH溶液0.5mlを空腸内投与し、30分後に腸管を摘出し、切開した後、約100mlの2mMデオキシコール酸で腸管をよく洗浄した。ろ紙を用い水分を除去し、20mlのFolch液(クロロホルム:メタノール=2:1)¹⁴⁵⁾で抽出し、放射能を測定した。なお、試験液はPaSS、 PaSSO_3Ca 、 PaSSO_3Na 、 CaCl_2 を2~200mMに調整した。

4) CH生合成に及ぼす PaSSO_3Ca の影響 (*in vivo*)

ラットは1群6匹使用した。PaA誘導体は、PaSS(400mg/ml)、 PaSSO_3Ca (544mg/ml)をそれぞれ1,000および1,361mg/kgの投与量で1日1回、2週間連続経口投与した。ラットはPaA誘導体最終投与前12時間絶食させ、最終投与30分後、 $[1-^{14}\text{C}]$ -酢酸を $10\mu\text{Ci}/0.25\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{BW}$ の割合で腹腔内投与し、その1時間後に採血および肝臓の採取を行った。

2-5. 脂質および胆汁酸の測定

ラットより採取した血液は、必要により3,000回転、20分の遠心分離で血清を得、肝臓は0.9%NaClで20%ホモジネートを調製した。第1章の方法を用い、血清中 $\text{CH}^{79)}$ および $\text{HDL-CH}^{83)}$ を定量した。胆汁中の胆汁酸は第5章第1節の方法を用い、酵素法¹⁴⁴⁾による測定キット(エンザバイル、第一化学薬品製)で定量した。

2-6. 組織中の放射能の測定

血液(0.1ml)、血清(0.25ml)および胆汁(0.05ml)に30% H_2O_2 を少量加え一夜放置し脱色した。その後Folch液¹⁴⁵⁾を1ml加えよく攪拌し、シンチレーター(Aquasol-2)8.5mlを加えAloka903を用いて測定した。CH生合成実験で得た肝臓の20%ホモジネート1mlに対し、Folch液3mlで3回脂質の抽出を行い、抽出液を0.9%NaClで3回洗浄した。この有機層を

N₂気流下で蒸発乾固し、Folch 液 100μl に再溶解して脂質抽出液とした。この 25μl を総脂質画分、他の 25μl を薄層クロマトグラフィー (Whatman LK5DF) によりヘキサン : エチルエーテル : 酢酸 (80:20:1) を分離溶媒として展開し、CH、CH エステルを分離した。この各画分を I₂ 蒸気により発色させ、液体シンチレーション用バイアルに掻き取り、Folch 液 1ml を加えてよく混和した後、Aquasol-2 を 9ml 加えて放射能を測定した。

2-7. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し、student's の *t*-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

10 日間両 PaA 誘導体を投与したラットに [³H] と [¹⁴C]-CH を投与した後の放射能の血中濃度を図 5-4 に示した。経口投与した [³H]-CH の吸収量は PaSSO₃Ca により軽度上昇する傾向にあった。一方、静脈内投与した [¹⁴C]-CH の 24~48 (hr) での血中からの半減期は、正常群で 163 (hr)、PaSS 群で 149 (hr)、PaSSO₃Ca 群で 132 (hr) となり、両化合物で CH の血中からの消失を早める傾向が見られた。静脈内投与した [¹⁴C]-CH の同時間での半減期に両 PaA 誘導体の影響は見られなかった。図 5-5 に図 5-4 より計算で求めた CH の累積吸収率に及ぼす両 PaA 誘導体の影響を示した。PaSS では吸収率にまったく影響を与えなかったが、PaSSO₃Ca 群では上昇する傾向が認められた。

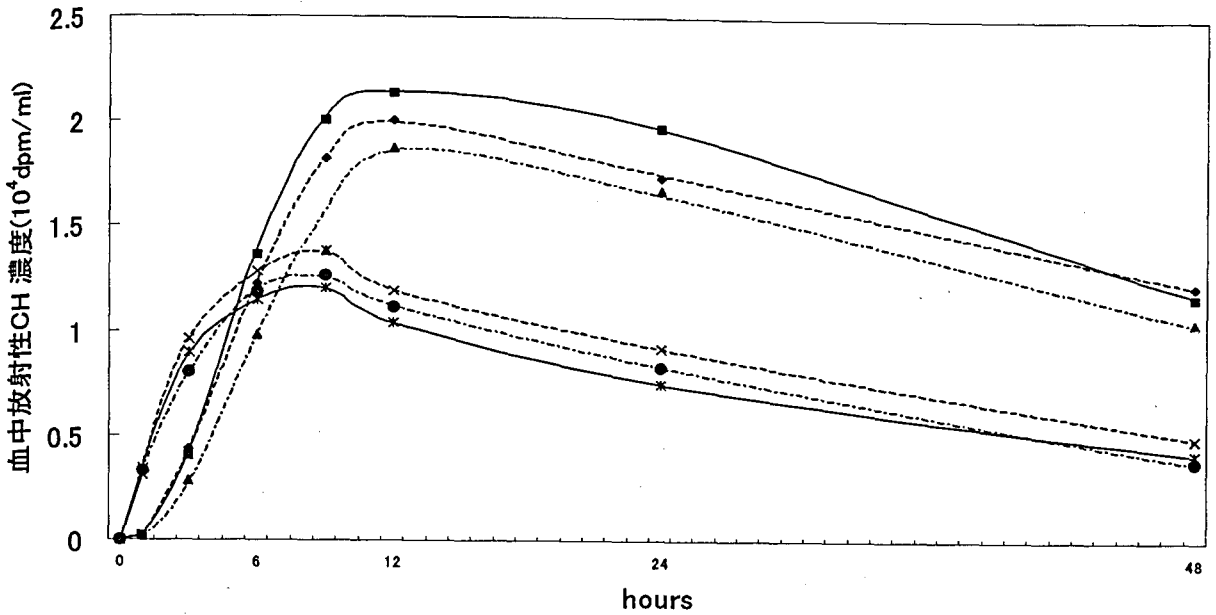


図5-1. PaSSO₃CaのCH吸収に及ぼす影響(Dual isotope法)

a) Data are expressed as Mean of 5 rats.

◆---◆ Normal p.o.(³H), ■——■ PaSSO₃Ca p.o.(³H), ▲---▲ PaSS p.o.(³H),
 ×---× Normal i.v.(¹⁴C), *——* PaSSO₃Ca i.v.(¹⁴C), ●---● PaSS i.v.(¹⁴C)

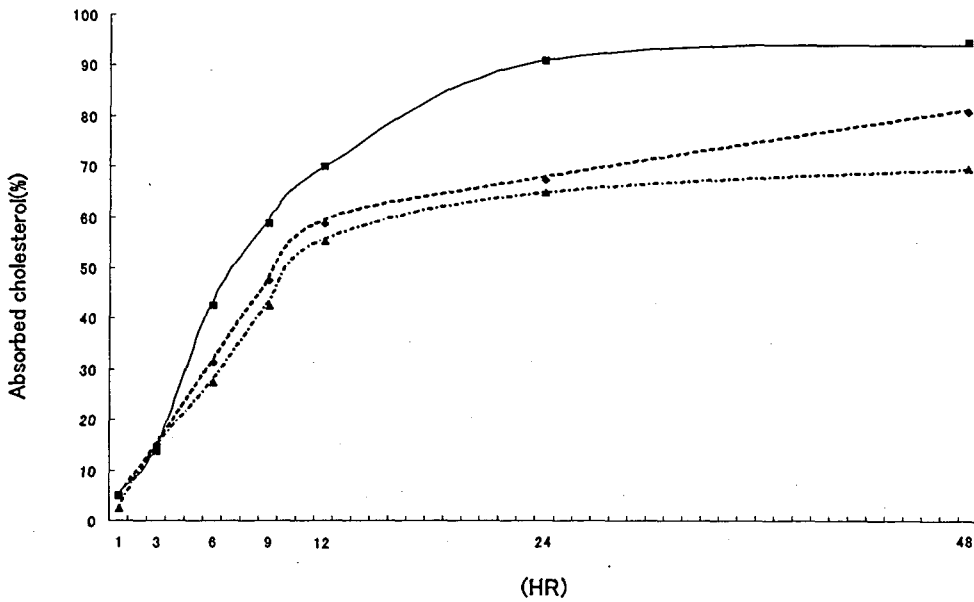


図5-2. PaSSO₃CaのCH吸収に及ぼす影響 (Dual isotopic法)

a) Data are expressed as Mean of 5 rats.

◆---◆ Normal p.o.(³H), ■——■ PaSSO₃Ca p.o.(³H), ▲---▲ PaSS p.o.(³H),

[¹⁴C]、[³H]-CH 投与 48 時間後から 2 時間分の胆汁中への [¹⁴C]、[³H] の排泄濃度と量に及ぼす PaA 誘導体の影響を表 5-8 に示した。静脈内投与された吸収のファクターが関与しない [¹⁴C]-CH 由来の放射能は、濃度、量とも PaSS で減少する傾向に、PaSSO₃Ca では上昇傾向

を示し、両 PaA 誘導体で異なった作用を示した。経口投与した ^3H -CH 由来の放射能についても同様の結果が得られた。

表5-8. 胆汁中への ^{14}C ・ ^3H 標識胆汁酸およびコレステロール排泄に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	^{14}C -Excreted in bile juice		^3H -Excreted in bile juice	
	^{14}C dpm/ml·bile	dpm/2hr.	^3H dpm/ml·bile	dpm/2hr.
正常	31,181±11,817 (100)	32,651±12,679 (100)	79,892±2,3620 (100)	82,557±17,976 (100)
PaSSO_3Ca	33,795±11,622 (108)	38,156±15,116 (117)	99,850±14,174 (125)	112,863±25,113 (137)
PaSS	26,702±8,915 (86)	27,945±11,461 (86)	65,205±16,251 (82)	61,913±17,258 (75)

() : 正常群を100とした場合の割合。

次に、胆汁中の非放射性胆汁酸と CH を測定した結果を表 5-9 に示した。胆汁酸、CH 量とも PaSS 群で減少し、 PaSSO_3Ca 群では胆汁酸が増加し、CH 量に変化なかった。

表5-9. 胆汁中への非標識胆汁酸及びコレステロール排泄に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	胆汁中胆汁酸	胆汁中コレステロール
	$\mu\text{g}/2\text{hr}$	$\mu\text{g}/2\text{hr}$
正常	120.9±18.2 (100)	213.8±99 (100)
PaSSO_3Ca	140.7±24.7 (116)	214.5±52.6 (100)
PaSS	97.9±20.4 (81)	165.2±49.2 (77)

() : 正常群を100とした場合の割合。

血清中に残存した放射性脂質濃度に及ぼす PaA 誘導体の影響を表 5-10 に示した。 ^{14}C -CH の血清中濃度に対し両 PaA とも大きな影響を与えなかった。HDL 分画中の ^{14}C -CH 濃度は PaSS 群で上昇傾向を示し、 PaSSO_3Ca 群で変化はなかった。HDL/T は両 PaA 誘導体で変化なく、AI は両群で改善する傾向を示した。

表5-10. 正常ラットの ^{14}C -血清CHに及ぼす PaSSO_3Ca の影響

群	^{14}C -血清脂質			
	^{14}C -CH(dpm/ml·serum) (A)	^{14}C -HDL-CH(dpm/ml·serum) (B)	HDL/T (%) (B/A)	AI [(A-B)/B]
正常	2,655±970 (100)	1,980±607 (100)	74.6±11.5 (100)	0.34±0.21 (100)
PaSSO_3Ca	2,543±985 (96)	1,940±748 (98)	76.3±4.0 (102)	0.31±0.08 (91)
PaSS	2,810±867 (106)	2,172±504 (110)	77.3±11.7 (104)	0.29±0.20 (85)

(): 正常群を100とした場合の割合。

図 5-6 および 7 に、絶食条件下での胸管カニューレション法による CH 吸収に及ぼす PaSSO_3Ca の影響を示した。リンパ液量は PaSSO_3Ca で正常群の 84% に、 CaCl_2 で 89% に減少した(図 5-6)。 PaSSO_3Ca 投与 8 時間までのリンパ液中への累積 CH は正常群の 56% に減少した。この作用は等モル量の CaCl_2 にも認められた(図 5-7)。

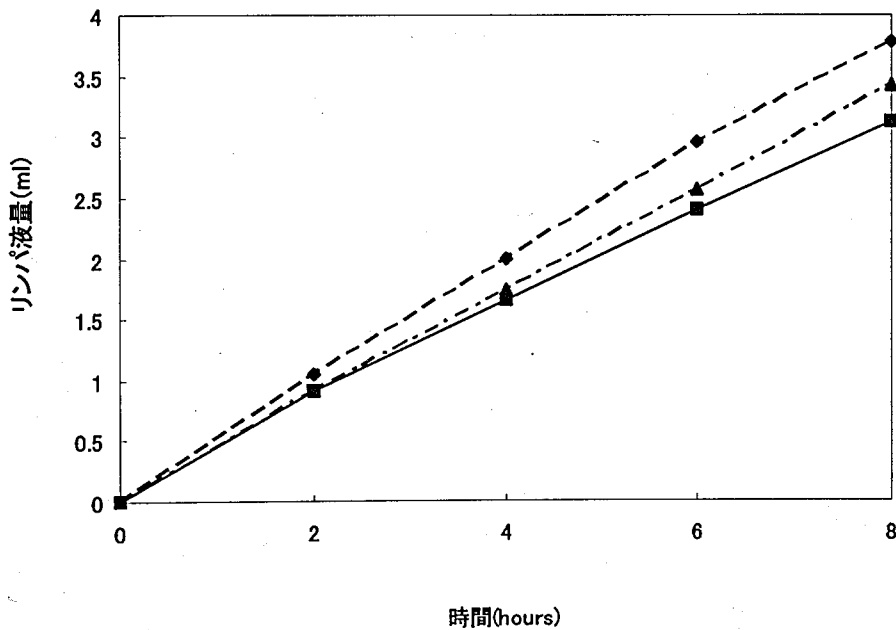


図5-6. 胸管リンパ中の蓄積リンパ液量に及ぼす PaSSO_3Ca の影響(絶食)

◆---◆ 正常群, ■—■ PaSSO_3Ca 群, ▲---▲ CaCl_2 群

一方、摂食下で同様の実験を行ったところ (図 5-9)、この作用は失われた。

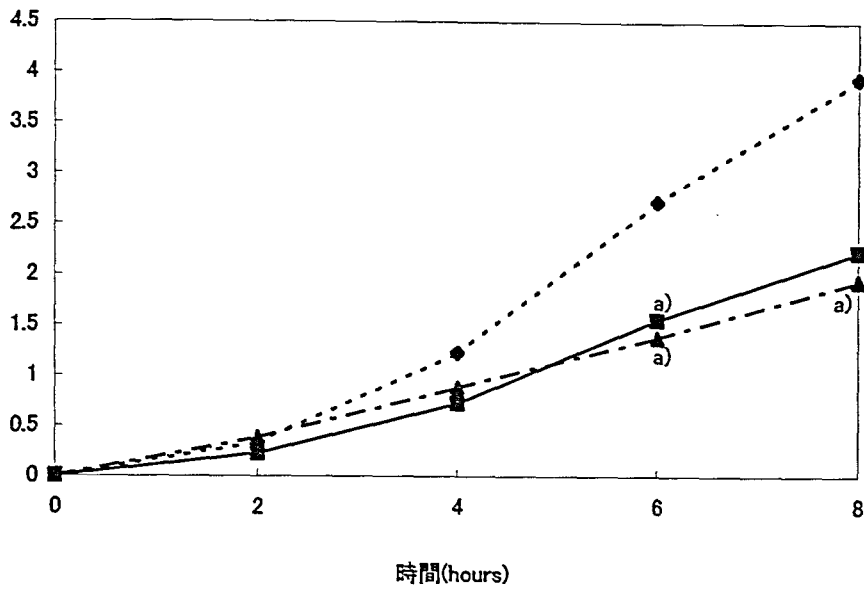


図5-7. 胸管リンパ中の蓄積CH吸収量に及ぼすPaSSO₃Caの影響 (絶食)
 ◆---◆ 正常群, ■—■ PaSSO₃Ca群, ▲---▲ CaCl₂群
 正常群に対する有意差有り : p<0.05.

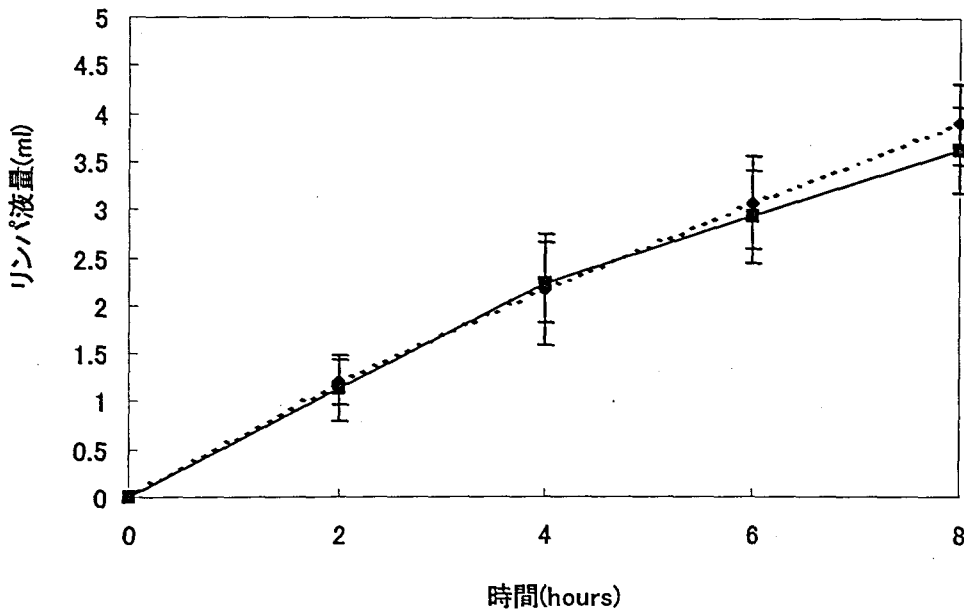


図5-8. 胸管リンパ中のリンパ液量に及ぼすPaSSO₃Caの影響 (摂食下)
 ◆---◆ 正常群, ■—■ PaSSO₃Ca群

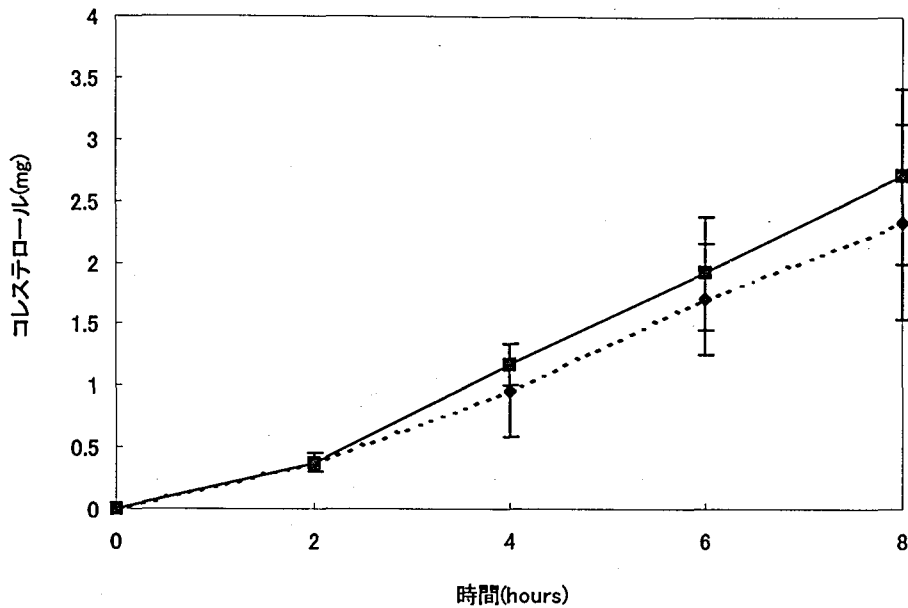


図5-9. 胸管リンパ中の蓄積CH量に及ぼすPaSSO₃Caの影響 (摂食下)
 ◆---◆ 正常群, ■—■ PaSSO₃Ca群

胸管カニューレシヨン法でCH吸収阻害を示したPaSSO₃Ca、CaCl₂およびPaSSO₃Naについて、*in situ*腸管ループ法を用い、更に詳細にCH吸収に及ぼす影響を検討した結果を図5-10に示した。PaSSO₃CaおよびCaCl₂群のCH吸収はそれぞれコントロールに対し、100mMで31%および4%、30mMで57%および79%、10mMで76%および87%であり、両群ともCH吸収に対し濃度依存的に抑制を示した。これに対し、PaSSO₃Na群ではコントロールに対し、100mMで145%、60mMで184%とCH吸収を促進する傾向を示した。PaSSはCH吸収に対して影響を与えなかった。

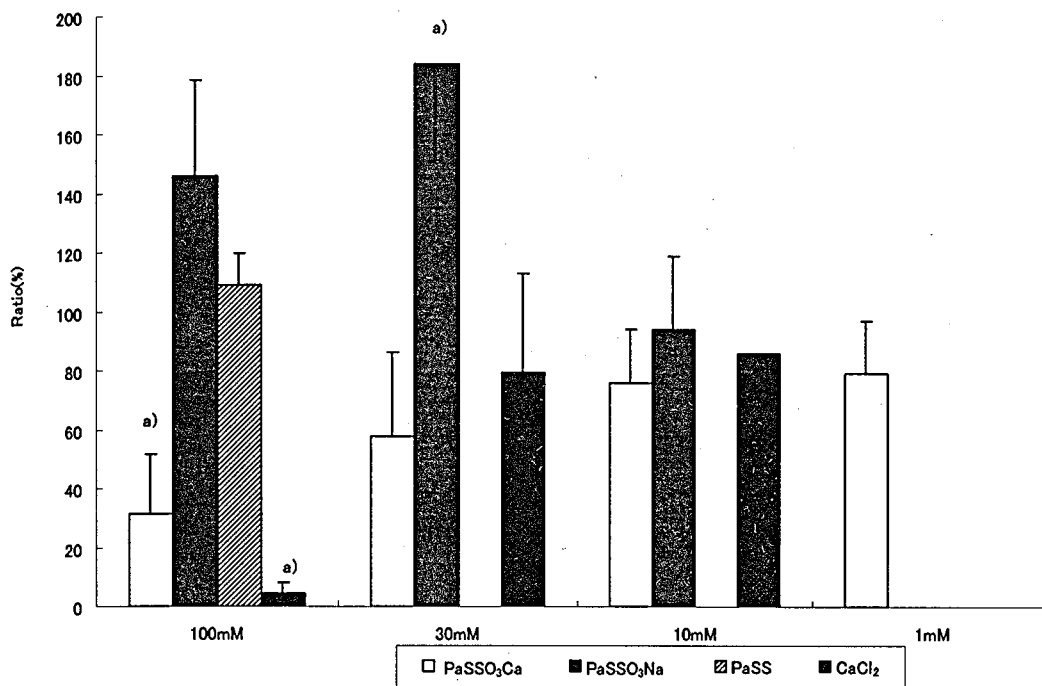


図5-10. *In situ* 腸管ループ法によるコレステロール吸収に及ぼすPaSSO₃Caの影響
 対照群に対する有意差有り, a) : p<0.05

肝臓での [¹⁴C]-酢酸の総脂質への放射能の取り込みは PaSS で上昇し、PaSSO₃Ca で変化はなかった (表 5-11)。遊離型 CH(FC)への取り込みは PaSS で変化なく、PaSSO₃Ca で軽度低下した。エステル型 CH (CE) への取り込みは、PaSSO₃Ca で低下し、PaSS で変化は認められなかった。よって、FC+CE で求めた CH 生合成活性は PaSSO₃Ca 群のみで低下していた。

表5-11. [¹⁴C]-酢酸から肝脂質への取り込みに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	[¹⁴ C]-肝脂質 (dpm/g·liver)			
	[¹⁴ C]-総脂質	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CE	[¹⁴ C]-(CH+CE)
正常	24166±941 (100)	3548±840 (100)	1481±164 (100)	5029±842 (100)
PaSSO ₃ Ca	23874±3128 (99)	2912±605 (82)	1360±238 (92)	4272±513 (85)
PaSS	31638±7111** (131)	3333±578 (94)	1400±189 (95)	4701±598 (93)

(): 正常群を100とした場合の割合

CH:遊離型コレステロール, CE:エステル型コレステロール

正常群に対する有意差有り, P<0.05(**)

一方、肝臓で [¹⁴C]-酢酸より合成された総脂質の血清中濃度は両 PaA 誘導体で軽度低

下傾向を示した。また、血清中 CH 濃度は PaSS で上昇、PaSSO₃Ca で低下していた(表 5-12)。

表5-12. [¹⁴C]-酢酸の血清脂質への取り込みに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	[¹⁴ C]-血清脂質 (dpm/ml·serum)			
	[¹⁴ C]-総脂質	[¹⁴ C]-CH	[¹⁴ C]-CE	[¹⁴ C]-(CH+CE)
正常	1471±611 (100)	308±48 (100)	313±95 (100)	621±128 (100)
PaSSO ₃ Ca	1330±537 (90)	252±41 (82)	310±43 (99)	561±80 (90)
PaSS	1378±440 (94)	340±64 (110)	346±89 (111)	686±143 (110)

() : 正常群を100とした場合の割合。

CH:遊離型コレステロール, CE:エステル型コレステロール

4. 考 察

生体に必要な CH は、食事 (外因性) と主に肝臓で内因的に合成される CH で賄われている⁸⁶⁾。この中で8割を占める内因性の CH に対する化合物の影響を調べることは重要である。CH の合成はアセチル CoA から数十段階の化合物を経て行われ⁸⁶⁾、3-Hydroxy-3-methyl CoA (HMG-CoA) よりメバロン酸を生成する HMG-CoA 還元酵素 (EC.1.1.1.34) の反応が律速と言われている¹⁵⁰⁾。In vivo での肝 CH 合成に対し、PaSSO₃Ca は抑制する傾向を示した (表 5-11)。この作用は、PaSSO₃Ca あるいはその代謝物による直接的な作用か、あるいは PaSSO₃Ca により CH 吸収が上昇したことに対するラットの防御機構^{84-86,100)}の亢進によるものと考えられるが、第3章で PaSSO₃Ca が TritonWR-1339^{B)} 負荷ラットの高 CH 血症を抑制する作用機序として、肝臓での CH 合成阻害を示唆しており、また、in vitro において強力な HMG-CoA 還元酵素阻害作用を示し¹⁵¹⁻¹⁵²⁾、臨床的にも高 CH 血症患者に使用され有効性が確立しているスタチン系脂質低下薬²²⁻²³⁾をラットに経口投与すると、血清 CH 低下作用を示さないという報告例¹⁵¹⁾を考えると、今回の結果は、PaSSO₃Ca あるいはその代謝物による直接的な作用による肝 CH 合成阻害と思われる。

また、肝臓で合成され血清中に放出された [¹⁴C]-CH およびエステル型 CH 濃度の和は、

PaSSO₃Ca 群で正常群の 90%に低下した (表 5-12)。この低下は、肝 CH 合成の障害度合 (正常群の 85%) と一致しており (表 5-11)、肝臓から血中への CH 放出の障害によらないことが判明した。

また、CH 代謝は上記の供給ルートに加え異化・排泄ルート⁹⁶⁾があり、互いに複雑な動的作用により CH の生理的濃度が維持されている。Dual isotope 法¹⁴²⁻¹⁴³⁾はこのうち腸管からの吸収、異化排泄を一度に観察でき、化合物の作用を見る上で好ましい。PaSSO₃Ca は CH 吸収を上昇させ (図 5-5)、異化排泄を促進 (表 5-8,9)、また血中からの CH 消失を軽度早めることが判明した (図 5-4)。胆汁中への排泄について CH に影響を与えず、胆汁酸は増加させていた (表 5-9)。この結果は、PaSSO₃Ca が 6*n*-propyl-2-thiourasil (PTU) 処置により甲状腺機能を低下させた高 CH 血症ラットに対し、CH 低下作用を示す作用機序として、胆汁中への胆汁酸排泄促進を示唆した第 3 章の結果と一致する。今回の結果と考え合わせると、PaSSO₃Ca に胆汁酸生成の律速酵素¹⁴⁶⁾である Cholesterol-7 α -hydroxylase (EC1.14.13.17) の上昇を介した胆汁酸生成の促進が示唆される。PaSSO₃Ca は第 1 章の結果⁹⁷⁾と同様、血清中の [¹⁴C]-CH、HDL-CH 濃度に影響を与えていなかったが、AI は改善していた (表 5-10)。PaSSO₃Ca は、経口投与した [³H]-CH の血中からの消失を早め (図 5-4)、静脈内投与した [¹⁴C]-CH の血中からの消失に影響を与えていない。経口投与した [³H]-CH は腸管においてミセルを形成し吸収され、カイロマイクロンとなり、リンパ経由で血中に放出され肝臓に戻るのに対し、静脈内投与投与した [¹⁴C]-CH は直接肝臓に取り込まれて VLDL となり、血中に再放出される。このリポタンパク形状の差により、LPL¹⁵³⁾や HTGL¹⁵⁴⁾などリポタンパク代謝を促進する酵素との結合性に差が生まれ、両放射性 CH の血中からの消失速度の差になったと考えられる。

CH 吸収については詳細な検討を加えた。 [¹⁴C] -CH を経口的に投与し血中の放射能の推移により吸収を観察する場合、そこには血中からの異化のファクターが関与し、より直接的に作用を見る場合、胸管カニューレーションによる実験が必要である。胸管カニューレーション法での吸収実験では、PaSSO₃Ca は絶食下吸収抑制作用を示し (図 5-7)、摂食下でその作用が

失われた (図 5-9)。また、絶食下における吸収抑制作用は等モルの CaCl_2 においても認められた (図 5-7)。摂食下で吸収抑制作用が失われるのは、小腸における CH 吸収部位に食餌の影響で PaSSO_3Ca が到達しないことが考えられる。

さらに、*in situ* 腸管ループ法を用いた吸収実験においても PaSSO_3Ca は CH 吸収抑制作用を示し、この吸収抑制の本体は PaSSO_3Ca 分子から解離した Ca^{2+} イオンであることが判明した (図 5-10)。CH の腸管からの吸収時には、胆汁酸が界面活性剤となり CH がミセルを形成することが必要であるが、この Ca^{2+} イオンがミセル形成を阻害していることが考えられる。胸管カニューレシヨンの実験および *in situ* ループ法の実験系において PaSSO_3Ca に CH 吸収抑制作用があるにも関わらず、 PaSSO_3Ca の 2 週間連投により CH の吸収が促進しているのは詳細な検討を待たなければならないが、 PaSSO_3Na に CH 吸収促進作用が観察されることを考えると、 PaSSO_3Ca の一部が腸管において PaSSO_3Na に変換するメカニズムが存在する可能性が示唆される。現在までに、腸管において Na イオンによって CH 吸収が促進されるという報告はないが、興味深い結果となった。

以上の結果により、 PaSSO_3Ca がラットに対し血清 CH 低下作用を示さない作用機序としては次のように考えることができる。すなわち、CH が腸管において PaSSO_3Ca より変換した PaSSO_3Na の作用で過剰に吸収されたため、血中 CH は正常群の CH レベルより一時的に上昇することが推定された。一方、 PaSSO_3Ca は吸収が上昇した CH を排除するため、胆汁中への胆汁酸排泄を促進し、肝 CH 合成が抑制され、血中では CH 消失が亢進して血中 CH は減少し、正常群ラットの CH レベルまで戻ることを明らかにした。このような作用がラット体内で起きているため PaSSO_3Ca は正常飼料飼育ラットに 2 週間投与しても血清 CH を低下させないことが示された。

5. 要 約

ラットの CH 代謝に及ぼす PaSSO_3Ca の影響 (吸収・異化排泄・生合成) について PaSS

を対照物質として検討した。Dual isotope 法を用いた実験では、 PaSSO_3Ca は経口投与後の CH 吸収量および吸収率を上昇させ、CH の血中からの消失を 24~48 時間で早め、胆汁中への胆汁酸の排泄を促進し、CH 排泄に影響を与えなかった。一方、静脈内投与した CH に対しては、血中からの消失に影響を与えず、胆汁中への放射性物質の排泄を促進していた。胸管リンパカニューレーション法を用いた CH 吸収実験では、 PaSSO_3Ca は絶食条件下で CH 吸収阻害作用を示し、摂食下では吸収阻害作用が消失した。腸管ループ法を用いた *in situ* での腸管からの CH 取り込みに対し、 PaSSO_3Ca は 10~100mM で濃度依存的に阻害した。またこの作用は、 PaSSO_3Ca の分子中に含まれる Ca^{2+} イオンがその本体であることが判明した。対照物質である PaSS にこの作用は見られなかった。また、 PaSSO_3Ca は $[^{14}\text{C}]$ -酢酸からの CH 生合成を軽度抑制した。

以上の結果より、 PaSSO_3Ca には CH 吸収抑制作用はあるが、これは Ca^{2+} イオンによるもので、摂食下その作用は消失する。また、 PaSSO_3Ca には弱い CH 生合成抑制、CH 異化排泄作用はあるが、腸管において PaSSO_3Ca から変化した PaSSO_3Na により CH 吸収も上昇するため、血清 CH は変化しないことが示された。

第3節. PaSSO_3Ca のラット血中および肝臓中のトリグリセリド低下作用の機序

1. 目的

第1章において、 PaSSO_3Ca の正常動物に対する脂質低下作用を検討し、 PaSSO_3Ca がマウス、ハムスター、ウズラに対し CH 低下作用を、またマウス、ラット、ハムスターに対し TG 低下作用を有することを明らかにした⁹⁶⁾。また、この実験で TG に対する作用が強かったため、更に TG に対する PaSSO_3Ca の作用を実験的高 TG 血症、脂肪肝ラットを作成し検討した。アロキサン、フルクトース、エタノールで誘発した高 TG 血症時の血清 TG を低下し、オロチン酸、エチオニン、テトラサイクリン、エタノールで誘発した脂肪肝の発症を抑制する作用があることを第4章において示した。そして、作用機序として脂肪酸酸化の亢進、肝脂質の末梢への転送促進、脂質の吸収阻害、脂質代謝関連酵素の活性亢進などが示唆された。

第4章の結果をまじえ、今回は、 PaSSO_3Ca の TG 低下の作用機序について作用点を明確にするため、詳細な検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 供試動物および飼育方法

特に記載しない限り、脂質代謝の正常な雄性 Wistar 系ラット（体重約 120g）を 1 群 5 匹使用した。胸管リンパカニュレーション法による TG 吸収実験のみ体重 220~280g のラットを用いた。動物は埼玉実験動物(株)より入手し、東京薬科大学実験動物飼育施設にて飼育した。飼料は特に記載しない限り、日本クレア製 CE-2、飲料水は水道水を使用し、特に指定しない限り、それぞれ自由摂取させた。飼育室は温度 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50\%\pm 5\%$ に調節され、照明の点灯は 7:00 から 19:00 まで行った。

2-2. 試薬

PaSS、PaSSO₃Ca は相互薬工(株) 製、[1-¹⁴C] 酢酸ナトリウム (57mCi/mmol) および Aquasol-2 は New England Nuclear (Boston, MA) より購入した。ノルエピネフリン (NE) は東京化成工業 (東京)、テトラサイクリン (TC) は万有製薬 (東京)、ヘパリンナトリウムはノボ ノルディスクファーマ (株) (東京)、イントラリポス[®]は旧ミドリ十字 (東京)、 α -ketoglutarate dehydrogenase はシグマ アルドリッチ ジャパン (東京) より購入し、他の試薬は特級品を使用した。

2-3. PaA 誘導体の投与

特に記載しない限り、PaSS (400mg/ml)、PaSSO₃Ca (544mg/ml) をそれぞれ 1,000 および 1,361mg/kg・体重の投与量で 1 日 1 回、2 週間連続経口投与した。正常群には PaA 誘導体の代わりに水を投与した。

2-4. TG 低下の作用機序に関する実験

1) TG の腸管からの吸収に及ぼす影響

PaA 誘導体最終投与後、オリーブオイルを 1ml/100g の投与量で経口投与し、摂食下、経時的に頸静脈より採血を行い血漿中の TG を定量した。

2) 胸管リンパカニューレーション法¹⁴⁹⁾を用いた TG 吸収に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

① 絶食条件下での実験：一夜絶食させたラット 6 匹に生理食塩水 6ml を腹腔内投与し、約 45 分後にエーテル麻酔下、胸管リンパカニューレーションを実施した。10~20 分後にラットが覚醒した時、15%CH/オリーブオイルを 0.3 ml/ラットおよび PaSSO₃Ca を 1,361mg/kg の割合で経口投与した。正常群には生理食塩水のみ与えた。リンパ液は 2 時間間隔で 8 時間連続採取した。途中リンパ液採取開始より 4 時間後に生理食塩水 2ml を皮下投与した。リンパ液中の TG 濃度を測定した。

② 摂食条件下での実験：摂食下、2)-①と同様の実験を行った。

3) 脂肪組織より血中への脂肪酸 (FFA) 遊離に及ぼす影響

① 絶食による FFA 遊離：PaA 誘導体最終投与 14 時間前から絶食を行い、最終投与 2 時間

後に安楽死させ血液を得て、その血液より血清を分離し、血清中 FFA を定量した。

② NE による FFA 遊離 : PaA 誘導体経口投与時の影響を観察した実験では、PaA 誘導体最終投与 2 時間後、NE100 μ g/kg を皮下投与し、30 分後安楽死させ、血液を得た。PaA 誘導体静脈投与の実験では、PaSSO₃Ca の 10 および 100mg/kg を 1 回静脈内投与し、30 分後に NE 100 μ g/kg を皮下投与し、30 分後に安楽死させ、血液を得た。得られた血液より血清を分離し、血清中 FFA を定量した。

4) [¹⁴C]-酢酸の TG, FFA, リン脂質 (PL) への放射能の取り込みに及ぼす影響

ラットは 1 群 6 匹使用した。ラットは PaA 誘導体最終投与前 12 時間絶食させ、最終投与 30 分後、[1-¹⁴C]-酢酸を 10 μ Ci/0.25ml/100g \cdot 体重の割合で腹腔内投与し、その 1 時間後に採血および肝臓の採取を行った。

5) 肝臓 CoenzymeA (CoA) プールに及ぼす影響

PaA 誘導体最終投与 2 時間後に殺鼠し、速やかに肝臓 CoA プール測定のためのサンプルを調製した¹⁵⁵⁾。

6) 血中からの外因性 TG の消失に及ぼす影響

PaA 誘導体最終投与 1 時間後に、イントラリポス[®]を 1ml/100g \cdot 体重の投与量で静脈内投与し、投与後経時的に頸静脈より採血し、血漿中 TG を測定した。

7) Post heparin lipolitic activity (PHLA) に及ぼす影響

PaA 誘導体最終投与後 1 時間後、ヘパリン 50U/kg を静脈内投与し、正確に 10 分後、3.8% クエン酸ナトリウム溶液で洗浄したシリンジを用い心臓採血した。氷冷下、3,000rpm、5 分間の遠心分離により血漿 (Post heparin plasma, PHP) を得て、PHLA の酵素源とした。

8) TG 代謝関連酵素活性に及ぼすの影響

① 1% コレステロール飼料飼育ラット

ラットは 1 群 4 匹使用した。食餌は正常飼料 CE-2 に 1% の割合で CH を混じた餌 (高 CH 飼料) を 2 週間与えた。PaA 誘導体は高 CH 飼料飼育開始と同時に 2 週間経口投与した。最

終投与 2 時間後、血清 TG および LCAT 測定用に血液を 1ml 採血し、血清を得た。その後、ヘパリンナトリウム溶液 50U/kg を静脈内投与し、正確に 10 分後、3.8%クエン酸ナトリウム溶液下、血液を採取した。血漿 (PHP) 中 lipoprotein lipase (LPL, EC3.1.1.34)、lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT, EC2.3.1.43) および hepatic triglyceride lipase (HTGL, EC3.1.1.3) の活性をそれぞれ測定した。

② TC 誘発脂肪肝ラット

PaA 誘導体最終投与 2 日前に、TC を 250mg/kg の割合で 1 日 2 回 PaA 誘導体投与と同時に腹腔内投与した。ラットは、PaA 誘導体最終投与 2 時間後に血清 TG 測定用に頸静脈より 0.5ml 採血した。その後、ヘパリンナトリウム溶液 50U/kg を静脈内投与し、正確に 10 分後、3.8%クエン酸ナトリウム溶液下、血液と肝臓を採取した。血漿中 LPL、HTGL、肝中 TG を定量した。

9) *In vitro* での TG 分解に及ぼす影響

TG rich serum(TGRS)はラットにオリーブオイルを 1ml/100 g の割合で経口投与後 2 時間の血液より得た血清(カイロマイクロン、VLDL が主成分)を用いた。PHP はラットにヘパリンナトリウム溶液 50mg/kg を静脈内投与し、正確に 10 分後クエン酸 Na 下心臓採血した血液より得た血漿を用いた。TGRS に各種濃度の PaSSO_3Ca を添加し、37°C で 10 分間ブレインキュベートした。その後 PHP 添加と同時に反応を開始させ、37°C で 1 時間反応を行った。反応前 (0 分)、反応開始後 30 分、1 時間で反応液を採取し、TG 量および LPL 活性を測定した。

2-5. 血液・肝臓の採取・測定

TG の吸収実験および血中からの外因性 TG 消失実験では、エーテル麻酔下、頸静脈よりヘパリン・生理食塩水で洗浄した注射器で必要量採血した。PHP を採取する実験では、クエン酸 Na で洗浄した注射器で心臓採血した。その他の実験では、エーテル麻酔下、断頭採血した。採取した血液は 3,000 回転で 20 分間遠心分離して血漿・血清を得た。肝臓は採取

後ただちに氷冷した 0.25M ショ糖あるいは 0.9%NaCl 液で洗浄後、細切し、Potter-Elvehjem type ホモジナイザーを用いて、0.25M ショ糖あるいは 0.9%NaCl 液で 10%あるいは 20%ホモジネートを調製し、脂質の測定に供した。

2-6. 脂質の測定

血清（血漿）および肝臓中脂質は第 1 章の方法を用い測定した。

2-7. CoA の測定

α -ketoglutarate dehydrogenase 法を用いた Sanadi ら¹⁵⁵⁾の方法により測定した。

2-8. 酵素活性の測定

PHLA は、ヘパリン静注後の血漿を用い LPL 活性測定法に準じて行った。LPL および HTGL は Nozaki ら¹⁵⁶⁾の方法を用いて分別定量した。

LCAT は血漿中 LCAT 測定用アナソルブ LCAT(第一化学薬品株式会社、東京)キットを用い測定した。

2-9. 組織中の放射能の測定

血清 (0.25ml) に 30% H_2O_2 を少量加え一夜放置し脱色した。その後 Folch 液 (クロロホルム : メタノール=2:1)¹⁴⁵⁾ を 1ml 加えよく攪拌し、シンチレーター (Aquasol-2) 8.5ml を加えて Aloka903 (アロカ株式会社、三鷹、東京) を用いて測定した。TG 生合成実験で得た肝臓の 20%ホモジネート 1ml に対し、Folch 液 3ml で 3 回脂質の抽出を行い、抽出液を 0.9% NaCl で 3 回洗浄した。この有機層を N_2 気流下蒸発乾固し、Folch 液 100 μ l で再溶解し、脂質抽出液とした。この 25 μ l を総脂質画分、他の 25 μ l を薄層クロマトグラフィー (Whatman LK5DF ワットマンジャパン KK、市ヶ谷、東京) によりヘキサン : エチルエーテル : 酢酸 (80:20:1) を分離溶媒として展開し、TG、FFA、PL を分離した。この部分を I_2 蒸気により発色させ、液体シンチレーション用バイアルに掻き取り、Folch 液 1ml を加えよく混和した後、Aquasol-2 を 9ml 加えて放射能を測定した。

2-10. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表示し, student's の *t*-検定で有意差検定を行った。

3. 結果

1) TG の腸管からの吸収に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

オリーブオイルのみ投与した対照群のラットにおけるオリーブオイルの吸収は 4 時間後に最大となり、以後徐々に低下していた(図 5-11)。PaSS、PaSSO₃Ca 投与により、オリーブオイルの吸収はそれぞれ対照群の 53%、47%まで低下していた。

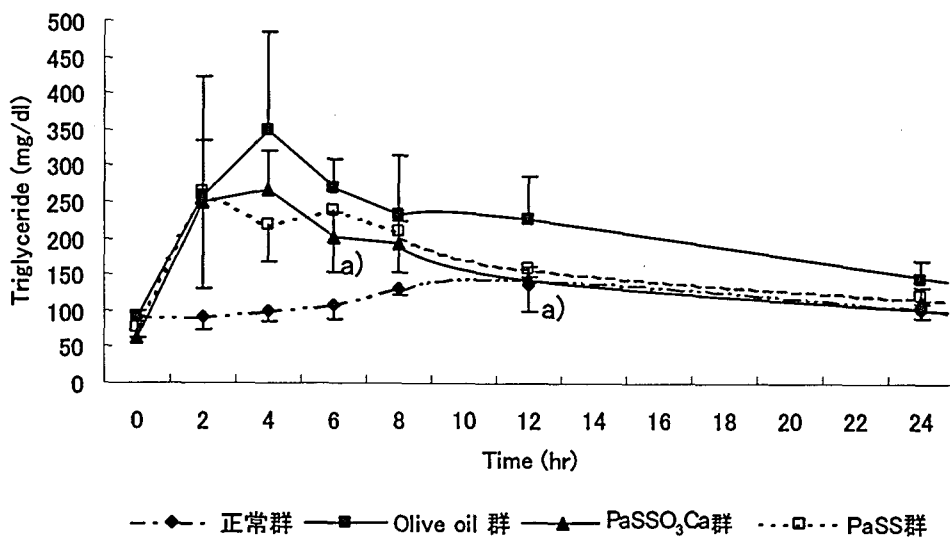


図 5-11 オリーブオイルの吸収に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

オリーブオイル群に対する有意差有り、a): $p < 0.05$.

2) 胸管カニューレーション法による TG 吸収に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

絶食下、胸管カニューレーションによる TG 吸収に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を図に示す。リンパ液量 (図 5-12) に PaA 誘導体投与の影響はなかった。リンパ液中への 8 時間までの累積 TG 量 (図 5-13) は PaSSO₃Ca 投与により、対照群の 45%に低下していた。PaSSO₃Ca と等モルの CaCl₂ にも同様に吸収抑制作用が見られた。摂食下、同様の実験を行ったところ、この作用は失われた (図 5-14、5-15)。

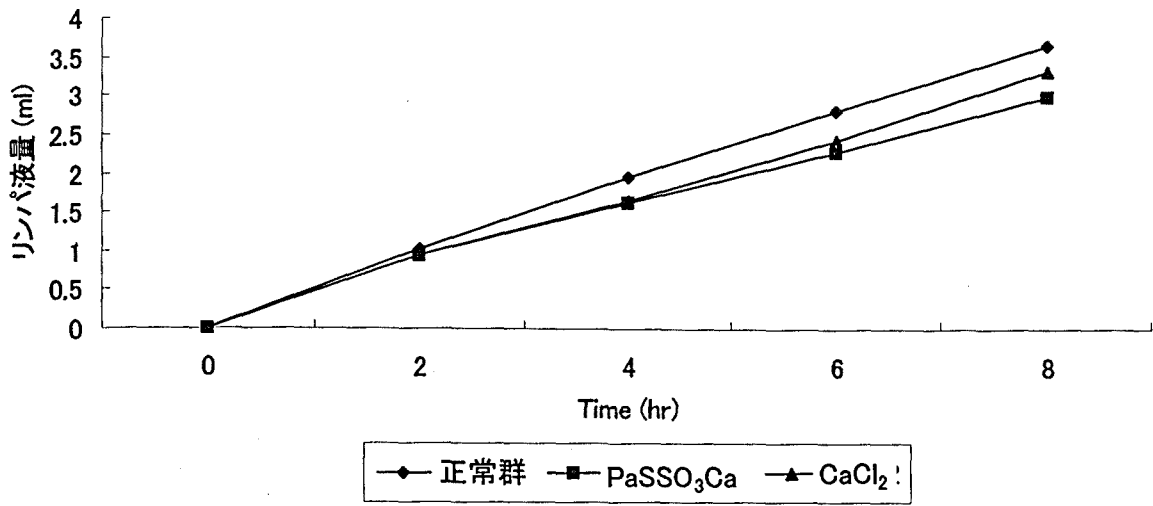


図 5-12 累積リンパ液量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響 (絶食下)

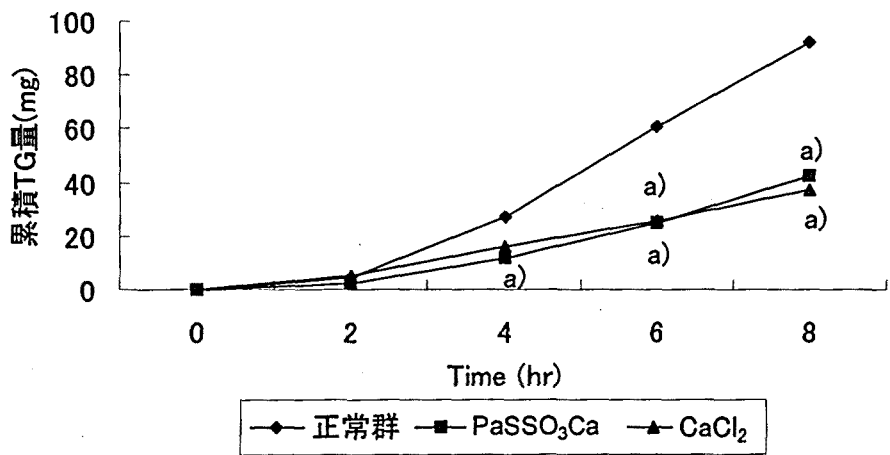


図 5-13 リンパ液中への累積 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響 (絶食下)

正常群に対する有意差有り : a) $p < 0.05$.

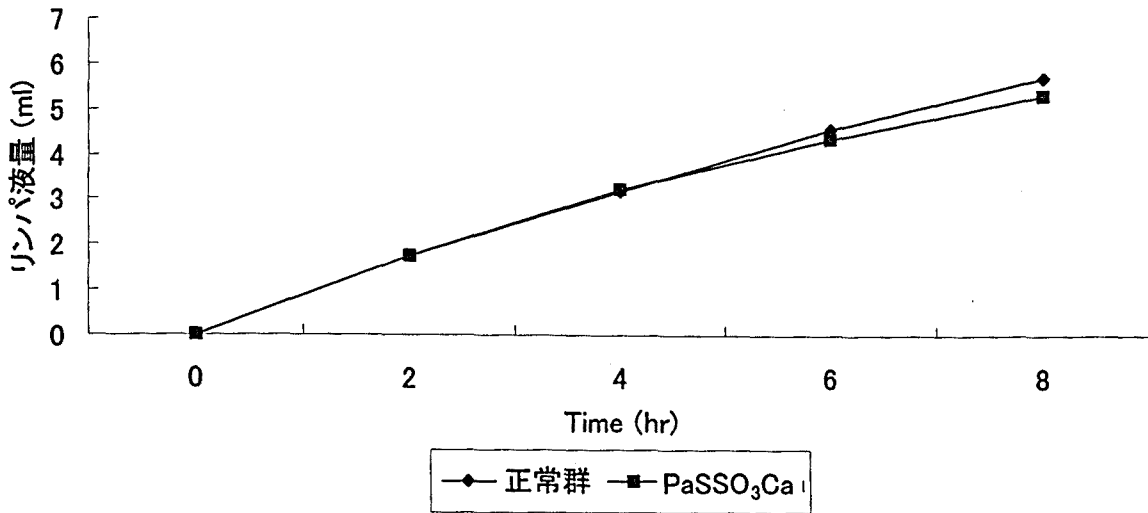


図 5-14 累積リンパ液量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響 (摂食下)

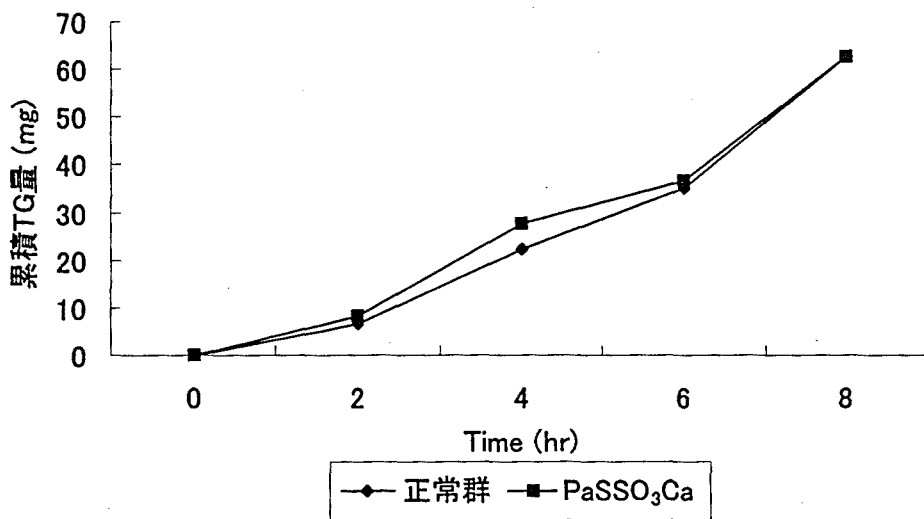


図 5-15 リンパ液中への累積 TG 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響 (摂食下)

3) 脂肪組織より血中への FFA 遊離に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表 5-13 に示すように、14 時間の絶食により血漿中 FFA は正常群レベルの 2.3 倍に上昇した。これに対し、PaSS の前投与 (経口) では全く作用を示さなかったが、PaSSO₃Ca の 2 週間前投与群 (経口) では FFA 上昇を抑制する作用があった。一方、NE の 10μg/kg 皮下投与によっても血漿中 FFA 遊出量は正常群レベルの 1.6 倍に上昇した。これに対しては、両 PaA

群とも有意な遊出抑制作用を示し、PaSSO₃Ca 群で作用が強力に出ていた。

次に、PaSSO₃Ca を単回静脈内投与した場合のNEによるFFA遊出に対する作用を調べた。

PaSSO₃Ca は、10 および 100mg/kg の静脈内投与により FFA 遊出抑制作用を示した。

表5-13. 絶食・ノルエピネフリン投与時の脂肪酸動員に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	投与量(mg/kg)	血清FFA(mEq/l)		
		絶食	Norepinephrine	Norepinephrine
正常		0.333±0.111	0.458±0.042	0.458±0.042
対照		0.774±0.182 (100)	0.733±0.065 (100)	0.686±0.040 (100)
PaSSO ₃ Ca	1,361(p.o.)	0.561±0.190** (73)	0.520±0.121**** (71)	N.T.
	10(i.v.)	N.T.	N.T.	0.514±0.045**** (75)
	1,000(i.v.)	N.T.	N.T.	0.560±0.071** (82)
PaSS	1,000(p.o.)	0.763±0.275 (99)	0.590±0.117** (81)	N.T.

対照群に対する有意差有り. p<0.05 (**), p<0.01 (****).

() : 対照群の値を100とした場合の割合. N.T.:not tested.

p.o. : 経口投与, i.v. : 静脈内投与

4) [¹⁴C]-酢酸より TG・FFA・PL への放射能の取り込みに及ぼす PaSSO₃Ca の影響

肝臓での[¹⁴C]-酢酸の TG への放射能の取り込みは、両 PaA 誘導体で有意に増加していた (表 5-14)。この結果は、肝臓において[¹⁴C]-酢酸より生成した FFA の TG へのエステル化が両化合物により亢進していることを示している。FFA への取り込みは、PaSSO₃Ca で減少傾向、PL への取り込みは PaSS で増加傾向を示した。血清においては、TG への放射能の取り込みが PaSS で減少し、FFA に対しては両化合物群で低下していたが、PaSSO₃Ca 群のみ有意であった。PL への取り込みは PaSS で増加傾向にあった。

表5-14. [¹⁴C]-酢酸から血清・肝脂質への放射能の取り込みに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	肝脂質 (dpm/g·liver)			血清脂質 (dpm/ml·serum)		
	TG	FFA	PL	TG	FFA	PL
正常	3,431±525 (100)	1,424±136 (100)	7,125±1,875 (100)	561±303 (100)	317±36 (100)	324±32 (100)
PaSSO ₃ Ca	4,515±513** (132)	1,200±173 (84)	7,785±1,271 (109)	576±199 (103)	250±44** (79)	316±31 (97)
PaSS	5,016±431# (146)	1,384±371 (97)	8,149±682 (114)	367±115 (66)	277±46 (87)	382±72 (118)

正常群に対する有意差有り. p<0.05 (**), p<0.001 (#).

(): 正常群の値を100とした場合の割合.

5) 肝臓中の CoA 量に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

正常ラットに2週間 PaA 誘導体を経口投与した後の肝臓中の CoA 量を測定した結果を表5-15に示す。肝臓中の総 CoA 量は PaSSO₃Ca 群で正常群の105%に上昇し、PaSS 群で88%に低下した。内訳では、PaSSO₃Ca で Free、Acetyl、Long chain acyl-CoA が増加傾向を示し、PaSS ではすべての CoA が減少していたが特に Long chain acyl-CoA が減少していた。

表5-15. 肝臓中CoA量に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	肝CoA量 (nmols/g·liver)			
	Total-CoA	Free-CoA	Acetyl-CoA	Long chain acyl-CoA
正常	170.0±8.5 (100)	95.3±18.4 (100)	4.0±2.7 (100)	70.7±23.8 (100)
PaSSO ₃ Ca	179.3±14.4 (105)	101.4±4.9 (106)	4.3±2.6 (108)	73.6±11.4 (104)
PaSS	149.9±20.4 (88)	89.1±6.8 (93)	3.7±0.9 (93)	57.1±10.8 (81)

(): 正常群の値を100とした場合の割合.

6) 血中からの外因性 TG の消失に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

血中からの外因性 TG の消失は正常群、PaA 誘導体投与群とも二相性を示し (図 5-16)、第一相の半減期はそれぞれ正常群 41.5±4.4 分に対し、PaSSO₃Ca で 25.1±3.6 分、PaSS で 30.8±3.6 分と PaA 誘導体投与群で正常群のそれぞれ 60%、74%まで短縮していた。

7) Post Heparin Lipolytic Activity (PHLA) に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

PHLA はヘパリン静注後血漿中に出現する TG 分解酵素活性の総和¹⁵⁷⁾を PHLA と言うが、

PHLA は PaSS、PaSSO₃Ca の 2 週間投与によりそれぞれ 144、179%まで顕著な上昇を示していた (表 5-16)。

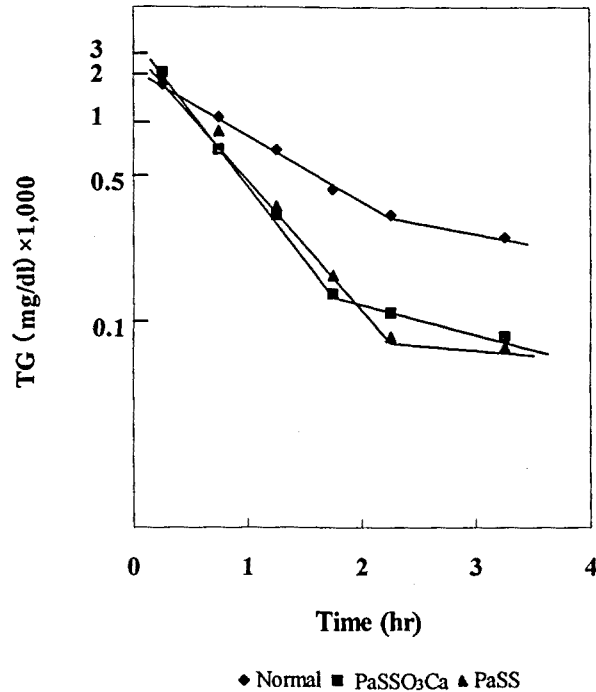


図 5-16. TG の血中からの消失に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

表5-16. 正常ラットのPHLAに及ぼすPaSSO₃Caの影響

	正常群	PaSSO ₃ Ca群	PaSS群
PHLA	0.235±0.037	0.421±0.114**	0.338±0.074
(μ mol/ml/min)	(100)	(179)	(144)

正常群に対する有意差有り. $p < 0.05$ (**).

(): 正常群の値を100とした場合の割合.

8) TG 代謝関連酵素活性に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

① 1%CH 飼料飼育ラット

この条件下では HDL-CH の上昇、TG の低下が観察されるため LCAT、LPL、HTGL に対する影響を検討した (表 5-17)。その結果、LCAT、HTGL 活性は PaSSO₃Ca 群のみ軽度上昇し、LPL 活性は両化合物群で上昇していた。

表5-17. 高CH飼料飼育ラットの血清・肝脂質代謝関連酵素活性に及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清LCAT	血清LPL	肝HTGL
	(U/ml)	(μ Eq/ml/hr)	(μ Eq/g·liver/min)
高CH	32.5±12.4 (100)	1.02±0.32 (100)	0.945±0.176 (100)
PaSSO ₃ Ca	38.1±8.9 (117)	1.67±0.73 (165)	1.121±0.108 (119)
PaSS	25.6±6.1 (79)	1.70±0.50 (167)	1.015±0.209 (107)

1%CH含有飼料で2週間飼育。() : 高CH群の値を100とした場合の割合.

② TC 誘発脂肪肝ラット

表 5-18 に示したように、肝 TG 量は TC 処置により正常群の約 6 倍まで上昇し、それに対し血清 TG は正常群の 40% まで低下していた。血清 TG に対し PaSSO₃Ca 群で上昇傾向に、肝 TG に対しては両化合物とも顕著な低下作用を示し、その作用は PaSSO₃Ca で強力であった。この時の TG 分解酵素である LPL と HTGL を測定したところ、PaSSO₃Ca で顕著な活性上昇を示し、PaSS では軽度な上昇のみが観察された。

表5-18. テトラサイクリン(TC)誘発脂肪肝ラットの血清・肝TGに及ぼすPaSSO₃Caの影響

群	血清 TG	肝TG	LPL	HTGL
	(mg/dl)	(mg/g·liver)	(μ Eq/ml/hr)	(μ Eq/g·liver/min)
正常	97.8±20.1	4.52±0.40	1.21±0.21	0.872±0.088
TC処置	38.4±7.8 (100)	25.32±3.58 (100)	1.08±0.23 (100)	0.547±0.079 (100)
PaSSO ₃ Ca	47.2±9.3 (123)	12.60±1.59# (50)	1.67±0.29**** (154)	0.664±0.126 (121)
PaSS	41.0±8.3 (107)	16.74±5.18** (66)	1.37±0.32 (127)	0.607±0.089 (111)

テトラサイクリン処置群に対する有意差有り。p<0.05(**), p<0.01(****), p<0.001(#).
() : テトラサイクリン処置群の値を100とした場合の割合.

9) *In vitro* での TG 分解に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

In vitro で TRS と Post heparin 血清を 1 時間インキュベートすることにより TG 濃度は 8mg/dl 減少した(図 5-17)。この反応溶液中に 10⁻²M から 10⁻⁸M の PaSSO₃Ca を添加した結果、

TGの分解が濃度依存的に促進された。この時のLPL活性を測定したところ、 10^{-4} 、 10^{-6} MのPaSSO₃Ca添加群で対照群以下の値を示した以外LPLは活性化されていた(図5-18)。

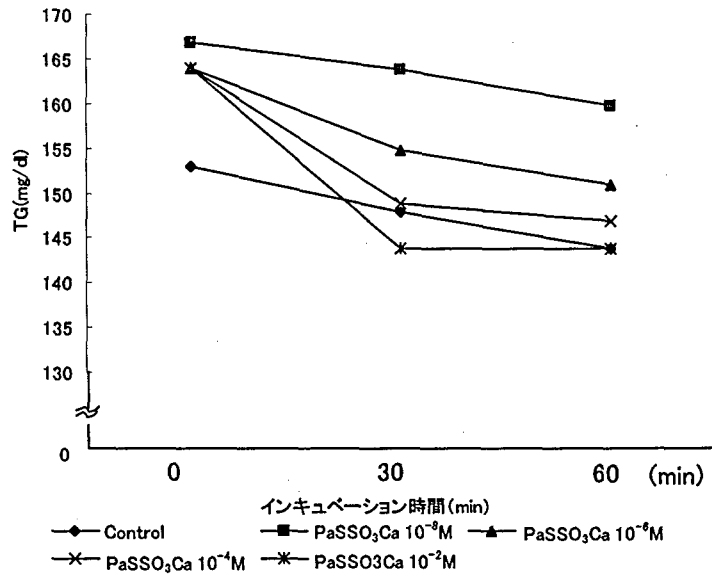


図5-17. *In vitro*でのTG分解に及ぼすPaSSO₃Caの影響

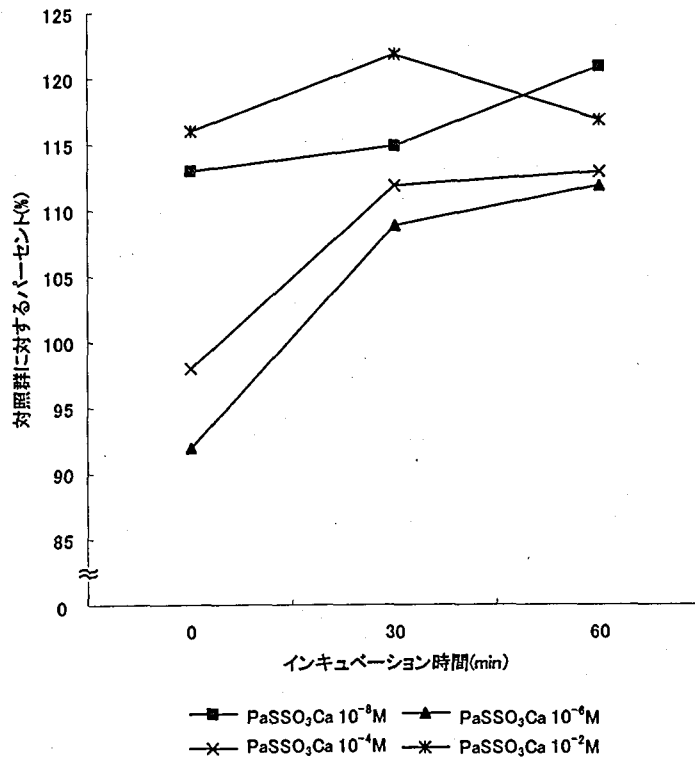


図5-18. *In vitro*でのTG分解酵素活性に及ぼすPaSSO₃Caの影響

4. 考 察

PaSSO₃Ca の TG 低下の作用機序について正常および病態ラットを用いて検討した。

TG の腸管からの吸収については、オリーブオイルの吸収および胸管リンパカニューレーションラットにより検討を行った。胸管カニューレーションラットの実験では、絶食条件下で PaSSO₃Ca および CaCl₂ に TG 吸収抑制作用が見られた (図 5-13)。この結果により、PaSSO₃Ca の脂質吸収抑制作用は Ca²⁺イオンによる作用であることが判明した。小腸における Ca²⁺イオンの TG 吸収抑制作用に関する報告は今までにない。ただし、胆汁酸が Ca²⁺イオンのキレート能を有することから、細胞間隙の構造上の変化をもたらし、水溶性薬物の吸収促進剤となりうるとの報告がある¹⁵⁸⁾。この胆汁酸の Ca²⁺キレート能と今回の Ca²⁺イオンの TG 吸収抑制作用から、次のことが示唆された。すなわち、TG 吸収には胆汁酸によるミセル形成が必要であるが、Ca²⁺イオンをキレートした胆汁酸はこのミセル形成に関わることができず、その結果、TG 吸収が抑制されたものと思われる。この TG 吸収抑制作用は摂食下で消失した (図 5-15) が、この理由として次のことが考えられる。摂食ラットの対照群の累積 TG 吸収量は絶食ラットの 67%と低く、摂食ラットにおいては脂質負荷 8 時間後、全例に胃内に餌が残存していた。これらのことは、負荷した脂質が胃内の餌によって吸収を妨げられた状態にある可能性がある。同様に PaSSO₃Ca の小腸への移行も胃内に残存している餌によって妨げられていることが考えられ、胆汁酸が Ca²⁺イオンを十分にキレートできない結果、ミセル形成に影響を及ぼしていないことが考えられた。一方、PaSSO₃Ca のオリーブオイルの吸収実験において (図 5-11) は、4 時間から 12 時間まで血中 TG の低下作用が見られた。このことは、PaSSO₃Ca にオリーブオイルの主成分である FFA の腸管吸収部位における TG への再合成の抑制、TG の吸収抑制作用あるいは吸収された TG の血中からの消失促進作用のあることを意味する。しかし、この実験は摂食下で行われており、胸管リンパカニューレーション法での結果を考え合わせると、異化の亢進が主作用であり、吸収抑制はあっても弱い作用であると思われる。

TG 分解に関与する酵素の 1 つに脂肪組織のホルモン感受性リパーゼ (HSL) があげられる。この酵素は、NE などのカテコールアミン投与^{159,160}、絶食時¹⁶¹、c-AMP 濃度の上昇により c-AMP 依存性プロテインキナーゼが活性化されることにより、リン酸化を受け活性化される。そして、脂肪組織の TG 分解を亢進し、血中への FFA 放出を増加させる。この FFA は肝臓へ流入し、肝臓での TG 合成が亢進する。FFA の動員を抑制する薬剤としてはニコチン酸が有名である¹⁶²。その作用は、c-AMP 濃度を低下させることにより酵素活性を抑制するためと言われている¹⁶³。PaSSO₃Ca の場合、c-AMP 依存性なのか直接酵素に作用するのかは詳細に検討する必要があるが、ホルモン感受性リパーゼの活性を低下させることにより FFA 動員を阻害していることが示された(表 5-13)。

次に合成系について検討を行った。¹⁴C-酢酸からの FFA 合成は弱く抑制されており、FFA から TG へのエステル化は逆に亢進していた(表 5-14)。第 4 章のフルクトース水負荷実験より、PaSSO₃Ca が α-グリセロリン酸からの TG 合成の抑制を示唆する結果を得ており、今回の実験と結果を異にするが、これは、フルクトース負荷時のように肝 TG が増加している状況¹³²においては PaSSO₃Ca は合成系に対して抑制的に作用するものと思われる。

PaSS に関する多くの報告はその TG 低下作用に関し、CoA の前駆物質であることにより¹⁶⁴、FFA の β-酸化の促進⁶⁸が主作用であると報告されている。しかし、今回の実験において、正常時には肝臓中の CoA pool に大きな変化のない(表 5-15)ことから、β-酸化の亢進による FFA の減少は考えにくい。しかし、PaA 欠乏ラットに PaSSO₃Ca を投与した TRASOV らの実験で、PaSSO₃Ca 投与により CoA 誘導体は対照群の約 4 倍以上に上昇したと報告¹⁶⁵しており、CoA 要求性の高まった状態においては、CoA を介在する β-酸化の促進は十分に考えることである。正常状態の動物細胞では、β-酸化やその他の反応に必要な CoA は食餌あるいは体内の PaA より充分量合成されていることを示唆している。

以上のように、PaSSO₃Ca の TG 低下は TG 異化が主作用であると思われるため、異化に関する実験を行った。ヘパリンを静注することによって組織から血中へと遊離してくる TG

分解酵素活性は PHLA と呼ばれていて、生体の総酵素量 (LPL と HTGL) を反映するものと考えられている¹⁶⁶⁾。今回の実験において PaSSO₃Ca は PHLA 活性を顕著に増加しており(表 5-16)、PaSSO₃Ca による TG 分解系酵素である LPL、HTGL の酵素量・活性の血中での上昇が示唆された。この成績は *in vivo* での Intralipos[®] の血中からの消失速度が PaSSO₃Ca により促進されている (図 5-16) 事実からも支持される。

PHLA の実験において、LPL、HTGL の分別定量の必要性が示唆された。そこで、TG 低下を示す条件下での LPL、HTGL 活性の変動を測定した(表 5-17)。1%CH 含有飼料で 2 週間飼育したラットに対し、PaSSO₃Ca は血清 TG の低下、HDL-CH の上昇を示した。PHLA 中の TG リパーゼには 2 種の isozyme すなわち LPL と HTGL が存在する¹⁶⁶⁾。LPL と HTGL はリポタンパク代謝の過程においてそれぞれ異なった機能的役割を分担していると考えられる。LPL は、CM、VLDL が末梢で異化を受ける最初のステップに関与し、これらのリポタンパクは TG を失って CH に比較的富んだ CM レムナントあるいは intermediate density lipoprotein(IDL)に代謝される¹⁶⁷⁾。一方、HTGL はこれらのリポタンパク中間代謝物が肝臓に取り込まれて処理する際の仲介をしている¹⁶⁸⁾。また、血清 TG 濃度と HDL-CH 濃度が負の相関を有し、CM や VLDL 代謝と HDL 代謝との密接な関係があること、すなわち、Patsch ら^{169,170)}は、ヒト血漿より得た VLDL と HDL₃ に牛乳より得た LPL を添加してインキュベートすると VLDL の lipolysis の過程に一致し、次第に HDL₃ に変化がおり、VLDL の CH、PL、タンパク部分が HDL₃ に移行を始め、そこで LCAT が作用することにより HDL₃ の組織に変化が起り、HDL₂ に近似したリポタンパクが生成されることを観察し、lipolysis の際遊離される VLDL の成分を HDL₃ が受取って HDL₂ になることを示した(VLDL-HDL 経路)。PaSSO₃Ca は、この経路において重要な働きをしている 3 種の酵素 LCAT、LPL、HTGL を活性化すること(表 5-17)により、VLDL-HDL 経路を促進させ TG 低下、HDL-CH 上昇を示すことが考えられる。

肝臓中で合成された TG は、VLDL によって肝臓から血中へと放出される。TC¹³⁹⁾、エチ

オニン¹³⁸⁾、オロチン酸¹³⁶⁾はこの VLDL 合成を阻害するため、肝臓より血中への TG の放出を抑制し、脂肪肝を形成させる。なかでも TC は特異的であった。第 4 章で、TC 脂肪肝抑制作用について PaSSO₃Ca の VLDL 分泌促進作用により肝 TG を減少させることを示唆した。今回の実験においても、肝 TG の顕著な低下と血清 TG の軽度な上昇が観察された(表 5-18)。同時に LPL、HTGL 活性を測定したところ、両酵素活性の上昇も観察され(表 5-18)、PaSSO₃Ca による肝 TG 量の減少は VLDL 分泌促進と LPL、HTGL 活性化の両者によることが明らかとなった。また、PaSSO₃Ca により血中に VLDL として放出された多量の TG により、本来血清 TG はさらに上昇しているはずであるが、LPL の 1.5 倍の活性上昇により軽度な上昇(123%)に留まっているものと思われる。

このように、TG 低下を示す各条件下において PaSSO₃Ca は LPL、HTGL を活性化していた。そこで *in vitro* において PaSSO₃Ca に LPL 活性化作用があるのかどうかを検討した。*In vitro* において TG rich serum (TGRS) を基質とし、PHP を酵素源としてこの反応液に各種濃度の PaSSO₃Ca を加えてインキュベートしたところ、TG 分解は濃度依存的に亢進され(図 5-17)、この時の LPL 活性も上昇していた(図 5-18)。LPL 活性を上昇させる薬剤として有名なものに Dextran sulfate (DS) がある¹⁷¹⁾。その作用は LPL の血管内皮細胞からの放出促進、VLDL-TG の水解促進によることが知られている。DS は VLDL とは直接結合せず、VLDL-LPL complex と結合し、LPL による VLDL-TG 水解の Vmax を高める。PaSSO₃Ca が *in vitro* において TG 分解の亢進と共に LPL 活性を上昇したのは、詳細な検討を待たなければならぬが、酵素とトリグリセリドの complex を作りやすくする、LPL の活性化因子であるアポ C-II と酵素を結合しやすくすることなどが考えられる。このように、LPL に対する PaSSO₃Ca の直接的な働きかけによることが示唆された。

5. 要 約

PaSSO₃Ca の TG 低下の作用機序について検討した。PaSSO₃Ca はオリーブオイル投与後の

血中 TG 濃度を観察期間中低下傾向を示した。胸管カニューレーション法による TG 吸収実験では、絶食下吸収抑制を示し、摂食下その作用は消失した。この作用は Ca^{2+} イオンにも見られた。絶食・NE による脂肪組織からの FFA 遊離を阻害した。肝臓における $[^{14}\text{C}]$ -酢酸から FFA 合成を軽度抑制し、FFA から TG、PL へのエステル化は促進していた。肝臓中の CoA プールを軽度上昇した。これは、Long chain acyl CoA の上昇によるものであった。血中からの外因性 TG の消失を第一層で促進していた。TC 脂肪肝時の肝臓から血中への TG 放出も促進していた。この時、LPL、HTGL 活性上昇が観察された。高 CH 飼料飼育ラットの LCAT、LPL、HTGL 活性を上昇した。*In vitro* で LPL 活性上昇を伴う TG 分解の亢進が見られた。以上の結果から、 PaSSO_3Ca の TG 低下は、lipoprotein lipase (LPL)、hepatic TG lipase (HTGL) 活性化による TG の異化亢進が主作用であり、VLDL の肝臓からの放出促進および FFA 動員の抑制も一部には影響を与えていることが明らかになった。

総括

PaSSO₃Ca の生理活性に関する従来の研究は、ビフィズス菌の成長促進因子として進められてきた。その研究の中に *Bifidobacterium bifidum* N4 株を用いた PaSSO₃Ca の代謝経路の実験がある (図 6)。この代謝経路において、PaSSO₃Ca は P-PaSH 以降 CoA まで PaSS と同様の代謝経路で代謝される。もし、動物体内においても同様の経路で代謝されるなら、PaSSO₃Ca にも PaSS と同様に脂質低下作用が存在する可能性が考えられる。著者は、以上のような見地から、PaSSO₃Ca の脂質低下作用およびその作用機序について検討を行った。

1) 各種動物の血中、肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

PaSSO₃Ca に脂質低下作用があることを示した。脂質低下作用に関し、種差が存在し、マウス・ハムスター・ウズラに対して、血中 CH 低下をまた、マウス、ラット、ハムスターには血中 TG 低下作用を示した。リポタンパク中の脂質に対しては、ハムスターの (VLDL+LDL)-CH を有意に低下し、HDL/T を有意に上昇させた。このような種差が見られた理由としては、動物種による血清脂質値の違い、リポタンパク組成の違い、脂質代謝の違い、およびリノレン酸、ビタミン E 誘導体あるいはセサミンに見られるように薬物への感受性の種による違いが考えられる。

2) PaSSO₃Ca の雌雄ラットの血清、肝脂質に及ぼす影響

ラットにおいて性差が観察され、雄の血清脂質およびリポタンパク中の脂質に対しては影響を与えなかったが、雌に対してはすべての血清脂質およびリポタンパク中脂質を上昇させ、特に HDL-CH の上昇が顕著であった。

3) 高 CH 飼料飼育時の血中、肝脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

マウス、ラット、ハムスター、ウズラおよびウサギを用いて検討した結果、PaSSO₃Ca の投与により、1%CH+0.5%CA 含有飼料で 2 週間飼育したマウスにおいては脂質低下作用を示さなかったが、ラットでは、1%CH 含有飼料飼育 4 週間で、また 1%CH+0.5%CA 含有飼料

飼育の場合は、1週間から2週間で、血清 CH 低下作用を示した。これは、その後アポ B 含有リポタンパクである超低比重リポタンパク (VLDL) +低比重リポタンパク (LDL) 画分の CH 低下によるものであることが明らかとなった。一方、ハムスターでは、ラット同様、高 CH 飼料 (1%CH+0.5%CA 含有飼料で1週間および1%CH+0.2%CA 含有飼料で3週間) 飼育による血清 CH 上昇に対し、 PaSSO_3Ca は低下傾向を示し、これは HDL および (VLDL+LDL) 両画分の CH 低下によるものであった。また、 PaSSO_3Ca により HDL/T は上昇、AI は減少した。他方、ウズラを 0.5%CH+0.1%CA 含有飼料で飼育すると、4週間で血清 CH は正常群の6倍に上昇し、16週間まで上昇し続けた。この上昇に対し、 PaSSO_3Ca は4週、6週、8週、12週、16週、18週で低下作用を示した。HDL-CH に対する PaSSO_3Ca の影響はなく、この CH の低下は(VLDL+LDL)画分の CH の低下によった。ウサギを 0.5%CH 含有飼料で30日間飼育すると、血漿 CH は上昇し続け、この上昇に対し PaSSO_3Ca は21日目に低下作用を示した。ウサギにおいても、ウズラと同様に、HDL-CH に対する PaSSO_3Ca の影響はなく、この CH の低下は(VLDL+LDL)画分の CH の低下によるものであった。外因性脂質を負荷したラット、ハムスター、ウズラおよびウサギの結果から、CH の吸収抑制や CH の異化・排泄促進が PaSSO_3Ca の脂質低下の要因として示唆された。

4) ウズラ・ウサギを用い高 CH 飼料飼育により作成した実験的動脈硬化症に対する PaSSO_3Ca の影響

ウズラ、ウサギの実験的動脈硬化症に対し、 PaSSO_3Ca は血清脂質値、AI を低下あるいは改善することにより動脈硬化の生成を抑制することが明らかになった。

5) 実験的高 CH・高 TG 血症ラットの血清脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

卵黄投与により正常群に比較し、血清 CH、(VLDL+LDL)-CH、AI、TG、遊離脂肪酸 (FFA) が上昇し、HDL-CH、HDL/T (HDL-CH/総 CH)が低下した。 PaSSO_3Ca は血清 CH、(VLDL+LDL)-CH、TG、および FFA の卵黄投与による上昇を抑制した。HDL/T の卵黄投与による低下に対し、 PaSSO_3Ca は上昇する傾向を示し、AI についても PaSSO_3Ca は上昇を抑制する傾向を

示した。卵黄投与モデルに対し脂質低下作用を示す物質の働きとしては、脂質吸収阻害ならびに吸収された脂質の異化・排泄の亢進が考えられ、 PaSSO_3Ca の脂質低下の要因として示唆された。PTU (6*n*-propyl-2-thiouracil)投与で、正常群より血清 CH、(VLDL+LDL) -CH、AI、TG、および FFA が上昇し、HDL-CH、HDL/T が低下した。これに対し PaSSO_3Ca は、血清 CH、(VLDL+LDL) -CH、AI、TG、FFA の上昇を有意に抑制し、HDL-CH、HDL/T の低下を抑制した。PTU 投与時には、CH 合成低下、LDL の異化の障害、胆汁酸の排泄障害が見られ、 PaSSO_3Ca はこれらを改善することにより PTU 投与時の高 CH 血症を抑制することが示唆された。また、TG に関して、TG 代謝酵素の低下による TG 異化の障害が原因で高 TG 血症を起こすことが認められているが、 PaSSO_3Ca は TG の異化を亢進することにより血清 TG 低下作用を示すことが、本研究で示唆された。Triton WR-1339[®]の処置により血清 CH、HDL-CH、(VLDL+LDL) -CH、AI、TG は上昇し、HDL/T は低下した。 PaSSO_3Ca は、血清 CH、(VLDL+LDL) -CH、AI、TG に対し、上昇抑制を示した。Triton WR-1339[®]による高 CH、TG 血症は、CH 合成の亢進および TG 分解酵素の阻害、TG の担送りポタンパクである VLDL の肝臓からの放出促進による。 PaSSO_3Ca はこれらの作用点に作用することにより血清 CH、TG 低下を示すことが示唆された。

6) 高 TG 血症・脂肪肝に及ぼす PaSSO_3Ca の影響

高 TG 血症・脂肪肝はその生成機序により、①FFA の酸化障害 (急性エタノール負荷)、②過栄養性脂肪肝 (慢性エタノール負荷)、③VLDL 合成障害による肝臓からの TG の血中への放出抑制 (テトラサイクリン、オロチン酸、エチオニン)、④脂肪の合成亢進 (フルクトース、アロキサン)、⑤VLDL 合成亢進 (フルクトース)、⑥外因性 TG 負荷 (オリーブオイル、イントラリポス)、⑦脂肪組織からの FFA 動員 (アロキサン)、⑧血中 TG 分解酵素活性の低下 (アロキサン、イントラリポス) に分類される。それぞれに括弧内に示す化合物により実験的に作成し、 PaSSO_3Ca の高 TG 血症、脂肪肝に対する効果について検討した。イントラリポス、オリーブオイル、フルクトース、アロキサン、エタノールで誘発した高 TG

血症、エタノール、エチオニン、オロチン酸、テトラサイクリンで誘発した脂肪肝に対して、 PaSSO_3Ca は低下作用を示すことが明らかになった。これにより、 PaSSO_3Ca に TG の異化亢進、TG 合成抑制、肝臓からの TG 分泌亢進作用、FFA の酸化亢進、脂肪組織からの脂肪酸動員抑制作用が作用機序として示唆された。

7) 高 CH 飼料飼育ラットにおける PaSSO_3Ca の CH 低下作用の機序

第 2 章における高 CH 飼料飼育動物の血清・肝脂質に対する PaSSO_3Ca の影響の実験結果から、血清 CH 低下作用を示した 1%CH (0.5%CA) 含有飼料で 2 週間飼育したラットを用いて検討した。その結果、 PaSSO_3Ca は CH の腸管での吸収に影響を与えず、吸収された CH については臓器へ分布させるのではなく、CH より BA への変換を促進することにより胆汁中、糞中への排泄を早め、BA の腸肝循環を阻害し、血中からの CH 消失を促進する。一方、肝臓においては、CH 生合成をメバロン酸以降で阻害することにより内因性 CH を減少させる。このように、 PaSSO_3Ca の血清 CH 低下作用の機序について解明した。

8) 正常飼料飼育ラットで PaSSO_3Ca に血清 CH 低下作用が観察されない機序

第 1 章において、正常飼料で飼育したラットに対し、 PaSSO_3Ca は 2 週間の投与によっても血清 CH 値に影響を与えなかった。この原因は、ラットにおいて PaSSO_3Ca 投与により CH の消化管からの吸収が上昇し、これにより血中 CH は正常値より一時的に上昇する。一方、肝臓において、肝 CH 生合成の軽度の抑制および胆汁中への胆汁酸の排泄が増加するため、血中 CH の肝臓への取り込みが促進し、血中からの CH 消失が促進されて血中 CH 値は減少し正常値に戻る。このような反応により PaSSO_3Ca は正常ラットの血清 CH 値に対して低下作用を持たないことが示唆された。

9) PaSSO_3Ca のラット血中および肝臓中の TG 低下作用の機序

TG の低下は、その異化が主たる原因であることが次の実験から明らかとなった。(1) 血清 TG 低下作用を示す高 CH 飼料飼育ラットの血清 lipoprotein lipase (LPL) と肝性 TG lipase (HTGL) の活性上昇、(2) 肝 TG 低下作用を示すテトラサイクリン脂肪肝の血清 LPL と HTGL

活性の上昇、(3) *in vitro* での TG 分解の、LPL 活性上昇を伴う亢進による。テトラサイクリン処置による血清 TG の低下を PaSSO_3Ca が防止したことにより、VLDL の肝からの放出促進、および絶食とノルエピネフリンの実験から FFA 動員の抑制も、TG 低下に一部影響を与えていることが明らかになった。

以上、本研究で得られた結果から、 PaSSO_3Ca はマウス、ハムスターおよびウズラに対し血清 CH、TG 低下作用を示し、高 CH 飼料で飼育したラット、ハムスター、ウズラおよびウサギに対しても CH 低下作用を示すことが明らかとなった。一方、 PaSSO_3Ca は卵黄負荷、PTU およびトライトンにより誘発した高脂血症に対しても血清 CH および TG 低下作用を示し、イントラリポス、オリーブオイル、フルクトース、アロキサン、エタノール、エチオニン、オロチン酸およびテトラサイクリンによって誘発される高 TG 血症、脂肪肝に対しても、TG 低下作用を示すことを明らかにした。CH 低下に関しては主に CH より BA への変換を促進および BA の腸肝循環を阻害することによる (図 1)。TG 低下に関しては TG 分解系の酵素活性を上昇させることによることが示唆された (図 2)。

このように、 PaSSO_3Ca の脂質低下作用とその作用機序を解明したことで、 PaSSO_3Ca の保健的機能が発掘できた。 PaSSO_3Ca を食肉などの食品あるいは家畜飼料に添加することで、既に含まれているパントテン酸誘導体としての含量を強化し、脂質低下作用を持つ機能性食品に応用可能である。また、摂取量に注意すべきであるが、ヒトに対し特定保健用食品あるいは栄養機能食品としてサプリメント等に適用することで、コレステロール・トリグリセリドが高いヒトへの応用が可能である。また第 4 章で述べたように、牛などの脂肪肝を防止するという副次的な効果も期待できる。このように、食品中に含まれるパントテン酸誘導体の機能性食品への応用を示唆できた。近年、食肉の摂取と健康との関係に注目した研究が世界的に増えつつある¹⁷²⁾。今後、食肉の摂取と健康の関係を科学的なアプローチによりさらに解明し客観的事実を人々に伝えることが、食品産業に携わるものとして重要な責務と考える。

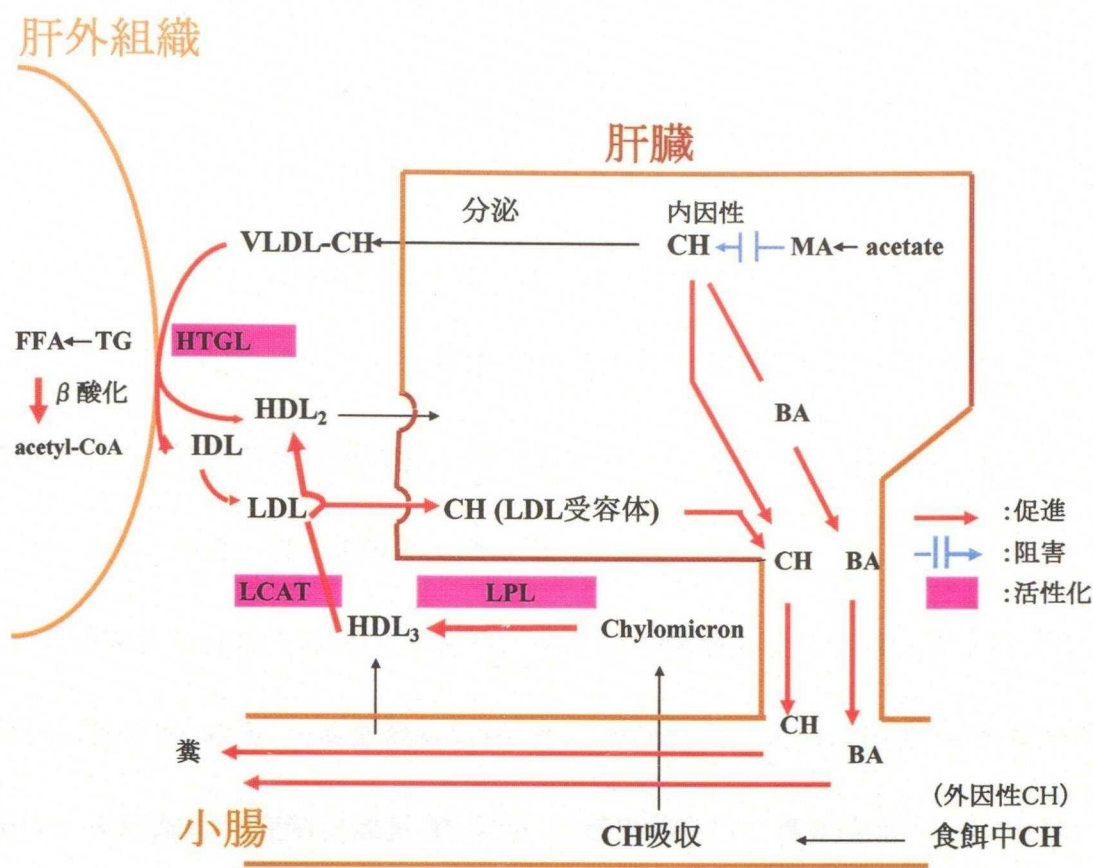


図1. PaSSO₃CaのCH低下のメカニズム

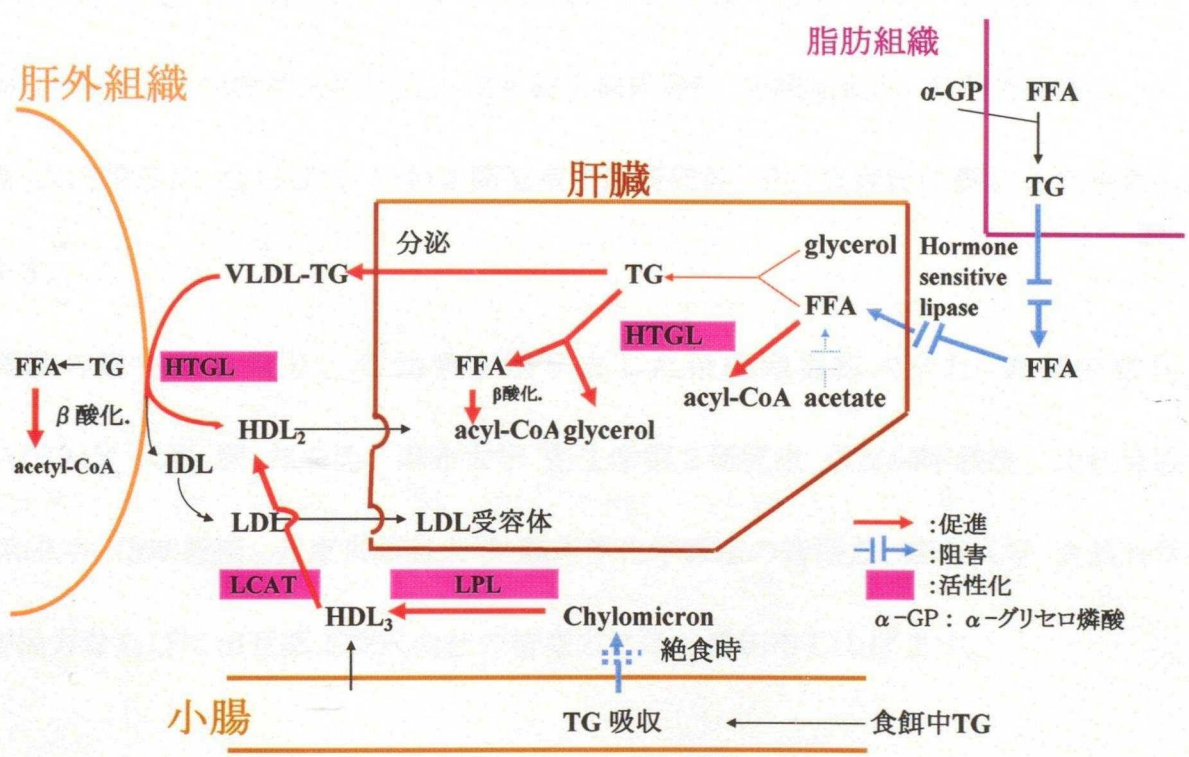


図2. PaSSO₃CaのTG低下のメカニズム

謝 辞

本研究にあたり、終始懇切なるご指導を賜りました恩師 麻布大学 食品科学研究室の坂田亮一教授、青森大学 須賀哲弥教授ならびに渡辺隆文教授に深く感謝申し上げます。学位審査の副査をお引き受け頂きました薬理学研究室の赤堀文昭教授、衛生学第一研究室の押田敏雄教授ならびに生化学研究室の鈴木嘉彦教授におかれてはご多忙にもかかわらず、有益なご指導、ご助言を頂き、深く感謝申し上げます。

また、本研究の機会を与えて下さり、多くのご鞭撻を頂いた相互薬工株式会社 元代表取締役社長 海老原 収氏、代表取締役会長 青木 匡氏、代表取締役社長 河野定光氏、監査役 大隈 巖氏、元取締役研究開発部長 内空闲 三郎氏ならびに株式会社ソーゴトレーディング代表取締役社長 酒井宏允氏に謹んで感謝の意を表します。

本研究をまとめるにあたり、種々のご教唆を頂きました麻布大学 永田致治名誉教授、実験動物学研究室 猪股智夫助教授、相互薬工株式会社 元開発顧問 太田明廣博士、経営管理部 大内晴彦氏 ならびに いわき開発室主席研究員 田代智康氏に衷心より感謝の意を表します。

実験の遂行にあたり、ご助言を賜りました帝国臓器株式会社 磯部充威氏、CTS ACADEMY 代表 積 邦夫氏、麻布大学 衛生学第2研究室 福安嗣昭教授、比較毒性学研究室 和久井 信助教授、元東京薬科大学 臨床生化学教室の皆様方、麻布大学 食品科学研究室の皆様方ならびに相互薬工株式会社の皆様方に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 林 利哉, 伊藤肇躬 (2000) 食肉の機能性. 食肉の科学, **41**, 121-126.
- 2) 有原圭三 (1998) 乳・肉・卵の機能性食品としての展開(1). 畜産の研究, **52**, 459-465.
- 3) 有原圭三 (1998) 乳・肉・卵の機能性食品としての展開(2). 畜産の研究, **52**, 575-584.
- 4) 本田和久, 鈴木美紀, 沼田正寛, 中村豊郎 (1998) 畜産副産物の酵素処理による食材化について, 日本畜産学会報, **69**, 392-399.
- 5) 農林水産技術会議事務局, 東京 (2004) 食品機能性研究の推進方針—食生活による健康の維持・増進をめざして—. 1-28.
- 6) FRITZ, K., SEPPANEN, C.M., KURZER, M.S., *et al.* (2003) The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutritional Research*, **23**, 479-487.
- 7) 福井 寛 (1998) 健康食品素材の効果的利用, 骨粗しょう症予防に期待される大豆イソフラボン. 食品と科学, **40**, 83-88.
- 8) 須田郁夫 (2002) 有色農産物の機能性を科学する アントシアニン・プロアントシアニジン含有農作物の機能性と利用. 農林水産技術研究ジャーナル, **25**, 30-35.
- 9) 中村康則 (2001) 乳酸菌,腸内フローラと健康 II 「カルピス酸乳」の血圧降下作用とその利用. 食品工業, **44**, 30-34.
- 10) 平原恒男 (1999) ラクトトリペプチドとは? その科学的データと健康強調表示. 食品健康科学セミナー, **4**, 32-38.
- 11) 佐藤三佳子, 清水宗茂, 藤田浩太郎, 森松文毅 (2002) 食肉中カルノシンおよびアンセリンの運動能力向上作用. 食肉の科学, **43**, 109-112.
- 12) DECHER, E.A., CRUM, A.D. (1993) Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Science*, **34**, 245-253.
- 13) 若松純一, 長尾哲二, 沼田正寛, 他 (1997) 牛肉の抗疲労効果について, 日本畜産学会誌, **68**, 579-586.
- 14) INOUE, M., NOBUKUNI, Y., ANDO, Y., MORINO, Y. (1986) Interorgan metabolism of glutathione as the defence mechanism against oxidative stress. In *Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants*. TANABE, T., SAKAI, B., HOOK, J. ed. p.51-60, Elsevier, North-Holland.

- 15) MATSUYAMA, Y., MORITA, T., HIGUCHI, M., *et al.* (1983) The effect of taurine administration on patients with acute hepatitis. *Progress in Clinical and Biological Research*, **125**, 461-468.
- 16) LAWLER, J.M., BARNES, W.S., WU, G., SONG, W., DEMAREE, S. (2002) Direct Antioxidant Properties of Creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**, 47-52.
- 17) 山内 清, 河原 聡, 竹之山慎一 (1999) 食肉の共役リノール酸 (CLA)と CLA の生理作用. *食肉の科学*, **40**, 139 -142.
- 18) SHIMURA, S., HASEGAWA, T. (1993) Changes of lipid concentrations in liver and serum by administration of carnitine added diets in rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **55**, 845-847.
- 19) SECCOMBE, D.W., JAMES, L., HAHN, P., JONES, E. (1987) L-carnitine treatment in the hyperlipidemic rabbit. *Metabolism*, **36**, 1192-1196.
- 20) 近藤和雄, 桜井智香 (2002) 特定保健用食品, 別冊・医学のあゆみ, 高脂血症と動脈硬化, **1**, 258-268.
- 21) 厚生労働省ホームページ, <http://www.mhlw.go.jp/>
- 22) 下山田真 (2003) 大豆成分の複合相互作用による食品機能発現に関する基礎・応用研究. *日本食品科学工学会誌*, **50**, 445-450.
- 23) THE KYUSHU LIPID INTERVENTION STUDY GROUP (1996) A coronary primary intervention study of Japanese men: study design, implementation and baseline data. *Journal of Atherosclerosis Thrombosis*, **3**, 95-104.
- 24) THE LONG-TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHAEMIC DISEASE (LIPID) STUDY GROUP (1998) Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *New England Journal of Medicine*, **339**, 1349-1357.
- 25) SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, **344**, 1383-1389.
- 26) 島田和典, 埜野浩司 (1999) リポ蛋白代謝にかかわる酵素および転送蛋白に関する最近の知見. *日本臨床*, **57**, 2717-2722.
- 27) GORDON, T., CASTELLI W.P., HJORTLAND, M.C, KANNEL, W.B, DAWBER, T.R. (1977) High

- density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study, *American Journal of Medicine*, **62**, 707-714.
- 28) 酒井尚彦 (2002) コレステロール逆転送と脂質転送蛋白—CETP と PLTP—. 別冊・医学のあゆみ, 高脂血症と動脈硬化, **1**, 60-66.
- 29) 池田康行, 高木敦子 (2002) LPL と HTGL. 別冊・医学のあゆみ, 高脂血症と動脈硬化, **1**, 37-45.
- 30) 厚生労働省, 第5次循環器疾患基礎調査報告 (2002).
- 31) 内閣府ホームページ, <http://www.cao.go.jp/>
- 32) 農林水産省ホームページ, <http://www.maff.go.jp/syokuiku/index/html>
- 33) 文部科学省ホームページ, <http://www.mext.go.jp/>
- 34) LIPMANN, F., KAPLAN, N., NOVELLI, G.D., TUTTLE, L.C., GUIRARD, B.M. (1947) Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative. *The Journal of Biological Chemistry*, **167**, 869-70.
- 35) LIPMANN, F. (1954) Development of the acetylation problem, a personal account. *Science*, **120**, 855-865.
- 36) MOFFATT, J.G., KHORANA, H.G. (1959) The total synthesis of coenzyme A. *Journal of American Chemical Society*. **81**, 1265.
- 37) LYNEN, F., REICHERT, E. (1951) The chemical structure of "activated acetic acid". *Z. Angew. Chem*, **63**, 47-48.
- 38) MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R. (1965) Acyl carrier protein. IV. The identification of 4'-phosphopantetheine as the prosthetic group of the acyl carrier protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **53**, 410-417.
- 39) SNELL, E.E., BROWN, G.M., PETERS, V.J., CRAIG, J.A., WITTLE, E.L., MOORE, J.A., MCGLOHON, V.M., BIRD, O.D. (1950) Chemical nature and synthesis of the *Lactobacillus Bulgaricus* factor. *Journal of American Chemical*, **72**, 5349-5350.
- 40) GERMINARIO, J.R., WALLER, J.R. (1976) Phosphopantothenic acid—the major product of pantothenic acid accumulation and significant growth stimulation in *Lactobacillus plantarum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **22**, 347-353.
- 41) OLSON, R.E. (1970) Pantothenic acid. *Present Knowledge in Nutrition* (BROWN, M.ed.), 6th Ed., 208-211, ILSI Press.

- 42) PRESCOTT, D.J., VAGELOS, P.R. (1972) Acyl carrier protein, *Advances In Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (MEISTER, A.ed.), Vol.36, 269, JOHN WILEY & SONS, New York.
- 43) FRITZ, I.B. (1963) Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Advances in Lipid Research*, **1**, 286-334.
- 44) 乾 毅 (1960) 皮膚科領域におけるパントテン酸代謝, *医学研究*, **30**, 678-686.
- 45) 木村修一, 小柳達男 (1967) 脂質代謝におよぼすパントテン酸の影響, *栄養と食糧*, **20**, 128-129.
- 46) KIMURA, S., FURUKAWA, Y., WAKASUGI, J., ISHIHARA, Y., NAKAYAMA, A. (1980) Antagonism of L(-) pantothenic acid on lipid metabolism in animals. *Journal of Nutritional Science of Vitaminology*, **26**, 113-117.
- 47) NACHMANSOHN, D., WILSON, I. B. (1951). The enzymatic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Advances In Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **12**, 259-339.
- 48) FIDANZA, A., QUINTILIANI, M. (1965) Effetti metabolici Dell'acido pantotenico e colesterolo surrenalico, *Bollettino della societa italiana dibiologia sperimentale*, **41**, 308-310.
- 49) GREENBERG, L.J., Glick, D. (1958) Quantitative histochemical distribution of coenzyme A in the rat adrenal in various functional states. *Endocrinology*, **63**, 909-915.
- 50) TWEDT, R.M., GLICK, D. (1960) Quantitative histochemical distribution of free and bound pantothenate in the rat adrenal and the response to ACTH. *Endocrinology*, **67**, 547-550.
- 51) MAURICE, D.M., FIDANZA, A. (1952) I rapporti della permeabilita nell'uovo di gallina studiata con Br-82. *Bollettino della Societa italiana dibiologia sperimentale*, **28**, 682-684.
- 52) DASTUR, D.K., SANTHADEVI, N., QUADROS, E.V., AVARI, F.C., WADIA, N.H., DESAI, M.N., BHARUCHA, E.P. (1976). The B-vitamins in malnutrition with alcoholism. A model of intervitamin relationships. *The British Journal of Nutrition*, **36**, 143-159.
- 53) BAKER, H., FRANK, O., ZIFFER, H., GOLDFARB, S., LEEVY, C.M., SOBOTKA, H. (1964) Effect of hepatic disease on liver B-complex vitamin titers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **14**, 1-6.
- 54) LEEVY, C.M., GEORGE, W.S., ZIFFER, H., BAKER, H. (1960). Pantothenic acid, fatty liver and alcoholism. *The Journal of Clinical Investigation*, **39**, 1005.
- 55) GLANZMANN (1949) Einf. In die Kinderh., **3**, aufl.s.218,223.

- 56) MORO, E. (1908) Karottensuppe bei Ernährungsstörungen der Säuglinge. Münchener Medizinische Wochenschrift, **55**, 1637-1640.
- 57) 黒宮瑞枝 (1960) 消化不良症に対する滓物質とくに粉末人参の作用機序に関する知見補遺, お茶の水医学雑誌, **8**, 88-102.
- 58) NAKAMURA, H., TAMURA, Z. (1972) Growth Responses of *Bifidobacterium bifidum* to S-sulfonic acid-type pantetheine related compounds. Japanese Journal of Microbiology, **16**, 239-242.
- 59) LIPMANN, F., KAPLAN, N.O. (1947) Chemistry and distribution of the coenzyme for acetylation (Coenzyme A), Federation Proceedings, **6**, 272.
- 60) YOSHIOKA, M., TAMURA, Z. (1971) Bifidus Factors in carrot. II. The structure of the factor in fraction IV. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. **19**, 178-185.
- 61) 太田敬三, 本間 道, 小山武夫ほか (1971) 人工栄養児における腸管内ビフィズス菌の増殖に対する Pantethine の効果. 日本小児科学会雑誌, **75**, 1003-1016.
- 62) TAHILIANI, A.G., BEINLICH, C.J. (1991) Pantothenic acid in health and disease. Vitamins and Hormones, **46**, 165-228.
- 63) KAPLAN, N.O., LIPMAN, F. (1948) The assay and distribution of coenzymeA, The Journal of biochemistry, **174**, 37-44.
- 64) ABIKO, Y. (1975) Metabolism of sulfur compounds, Metabolic pathways. GREENBERG, D.M. ed. vol.7, Acad. Press. London, NY. 1-15.
- 65) ARSENIO, L., BODRIA, P., MAGNATI, G., *et al.* (1986) Effectiveness of long-term treatment with pantethine in patients with dyslipidemia. Clinical Therapy, **8**, 537-545.
- 66) SHINOMIYA, M., MATSUOKA, N., SHIRAI, K.*et al.* (1980) Effect of pantethine on cholesterol ester metabolism in rat arterial wall. Atherosclerosis, **36**, 75-80.
- 67) BERTOLINI, S., DONATI, C., ELICIO, N., *et al.* (1986) Lipoprotein changes induced by pantethine in hyperlipoproteinemic patients: adults and children. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, **24**, 630-637.
- 68) MORISAKI, N., MATSUOKA, N., SAITO, Y., *et al.* (1983) Effects of pantethine and its metabolites on fatty acid oxidation in rat liver mitochondria. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, **141**, 33-39.
- 69) NOMA, A., KITA, M., OKAMIYA, T. (1984) Effect of pantethine on post-heparin plasma lipolytic

- activities and adipose tissue lipoprotein lipase in rats. *Hormone and Metabolic Research*, **16**, 233-236.
- 70) CARRARA, P., MATTURRI, L., GALBUSSERA, M., *et al.* (1984) Pantethine reduces plasma cholesterol and the severity of arterial lesions in experimental hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, **53**, 255-264.
- 71) GRUNDY, S.M., AHRENS JR, E.H, SALEN, G., SCHREIBMAN, P.H., NESTEL, P.J. (1972) Mechanisms of action of clofibrate on cholesterol metabolism in patients with hyperlipidemia. *Journal of Lipid Research*, **13**, 531-551.
- 72) REIHNÉR, E., RUDLING, M., STAHLBERG, D., BERGLUND, L., EWERTH, S., BJORKHEM, I., EINARSSON, K., ANGELIN, B. (1980) Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. *The New England Journal of Medicine*, **323**, 224-228.
- 73) 岡本良三, 高野新二, 羽溪 真, 築谷 学, 渡辺嘉雄, 富川宗博, 俵 克彦, 若杉潤一郎 (1984) 遺伝性高脂血ウサギ(WHHL rabbit)のリポ蛋白代謝に対する Probucol の作用. *動脈硬化*, **12**, 863-867.
- 74) VAHOUNY, G.V., SATCHITHANANDAM, S., CASSIDY, M.M., LIGHTFOOT, F.B., FURDA, I. (1983) Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat. *American Journal of Clinical Nutrition*, **38**, 278-284.
- 75) BOCOS, C., HERRERA, E. (1998) Pantethine stimulates lipolysis in adipose tissue and inhibits cholesterol and fatty acid synthesis in liver and intestinal mucosa in the normolipidemic rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **6**, 59-66.
- 76) KREY, G., BRAISSANT, O., L'HORSET, F., KALKHOVEN, E., PERROUD, M., PARKER, M.G., WAHLI, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*, **11**, 779-791.
- 77) DIX, K. J., COLEMAN, D.P., JEFFCOAT, A.R. (1999) Comparative metabolism and disposition of gemfibrozil in male and female Sprague-Dawley rats and Syrian golden hamsters. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 138-146.

- 78) BLAIR, R.M., APPT, S.E., BENNETAU-PELISSERO, C., CLARKSON, T.B., ANTHONY, M.S., LAMOTHE, V., POTTER, S.M. (2002) Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in Golden Syrian F₁B hybrid hamsters. *The Journal of Nutrition*, **132**, 3585-3591.
- 79) ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G., *et al.* (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, **20**, 470-475.
- 80) SPAYD, R.W., BRUSCHI, B., BURDICK, B.A., *et al.* (1978) Multilayer film element for clinical analysis: applications to representative chemical determination. *Clinical Chemistry*, **24**, 1343-1350.
- 81) TAKAYAMA, M., ITOH, S., NAGASAKI, T., *et al.* (1977) A new enzymatic method for determination of serum choline containing phospholipids. *International Journal of Clinical Chemistry*, **79**, 93-98.
- 82) DUNCOMBE, W.G. (1964) The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clinica Chimica Acta*, **9**, 122-125.
- 83) 内藤周幸 (1975) アメリカにおける血漿脂質ならびにリポ蛋白測定法の標準化, *医学のあゆみ*, **94**, 359-362.
- 84) DIETSCHY, J.M., TURLEY, S.D., SPADY, D.K. (1993) Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal-species including humans. *Journal of Lipid Research*, **34**, 1637-1659.
- 85) PEET, D.J., TURLEY, S.D., MA, W., *et al.* (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell*, **93**, 693-704.
- 86) TENSHO, A., SHIMIZU, I., TAKENAKA, T., *et al.* (1972) Acutely-induced dietary hypercholesterolemia in rat. *YAKUGAKU ZASSHI*, **92**, 879-885.
- 87) DEDECKERE, E.A., VANAMELSVOORT, J.M., MCNEILL, G.P., *et al.* (1999) Effects of conjugated linoleic acids (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *British Journal of Nutrition*, **82**, 309-317.
- 88) QURESHI, A.A., BRADLOW, B.A., BRACE, L., *et al.* (1995) Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids*, **30**, 1171-1177.
- 89) HIROSE, N., INOUE, T., NISHIHARA, K., *et al.* (1991) Inhibition of cholesterol absorption and

synthesis in rats by sesamin. *Journal of Lipid Research*, **32**, 629-638.

- 90) SPADY, D.K., WOOLLETT, L.A., DIETSCHY, J.M., *et al.* (1993) Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. *Annual Review of Nutrition*, **13**, 355-381.
- 91) URABE, M., YAMAMOTO, T., KASHIWAGI, T., *et al.* (1996) Effect of estrogen replacement therapy on hepatic triglyceride lipase, lipoprotein lipase including apolipoprotein E in climacteric and elderly women. *Endocrine Journal*, **43**, 737-742.
- 92) 小竹英俊 (2001) 脂質・リポ蛋白代謝の分子機構. VLDL. *日本臨床*, **59**, 54-60.
- 93) 奥田拓道 (1978) パンテチンと脂質代謝. 第2回パンテチンシンポジウム, 39-44.
- 94) 宮本 亨, 金沢美孝, 村田英夫 (1993) 牛肝細胞の初代培養法, *家畜生化研報*. **30**, 57-64.
- 95) 岡本真平, 重信隆夫, 小笠原卓, 他 (1990) 搾乳牛における重度脂肪肝の発生要因の検討. *家畜診療*, **326**, 25-30.
- 96) 林 元英, 鈴木常正, 浅野恭一, 他 (1977) Pentaerythritol tetranicotinate(SK-1)の薬理学的研究(第1報)ウサギ実験的動脈硬化症に対する予防および治療効果. *応用薬理*, **14**, 599-622.
- 97) NAKAYAMA, S., SAKASHITA, M., NISHIMURA, T., *et al.* (1981) Variation of lipids in rats fed a cholesterol diet. *Folia pharmacol japan*, **78**, 91-107.
- 98) TIMMS, A.R., KELLY, L.A., HO, R.S., TRAPOLD, J.H. (1969) Laboratory studies of 1-methyl-4-piperidyl- *bis*(*p*-chlorophenoxy) acetate (SaH42-348). *Biochemical Pharmacology*, **18**, 1861-1871.
- 99) RIDGWAY, N.D., DOLPHIN, P.J. (1985) Serum activity and hepatic secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase in experimental hypothyroidism and hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, **26**, 1300-1313.
- 100) SHAPIRO, D.J., RODWELL, V.W. (1971) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and cholesterol synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **246**, 3210-3216.
- 101) HAVEL, R.J., KANE, J.D. (1995) Structure and metabolism of lipoprotein, in: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.C., SLY, W.S. *et al. eds.* The metabolic and molecular basis of inherited disease, 7th edition. McGraw-Hill, USA., 1841-1851.
- 102) MICHAEL, A.B., JENNIFER, S.B., DAVID, A.W., *et al.* (2000) Interactive effects of dietary

- cholesterol and different saturated fatty acids on lipoprotein metabolism in the hamster. *British Journal of Nutrition*, **84**, 439-447.
- 103) SAKAI, N. (2002) Cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipid transfer protein (PLTP). *Hyperlipemia and Arteriosclerosis*, MABUCHI, H., ed.vol.1, 60-66.
- 104) SPADY, D.K., DIETSCHY, J.M. (1985) Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 4526-4530.
- 105) HAVEL, R.J., KANE, J.R. (1973) Apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipidemia in man. *Journal of Clinical Investigation*, **52**, 1841-1851.
- 106) LIANG, K., VAZIRI, N.D. (1997) Gene expression of LDL-receptor, HMG-CoA reductase and cholesterol-7alpha-hydroxylase in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **12**, 1381-1386.
- 107) YOSHIKAWA, T., SHIMANO, H., AMEMIYA-KUDO, M. *et al.* (2001) Identification of liver X receptor -retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1C gene promoter. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 2991-3000.
- 108) JOAN, C.V., CRISTINA, P., MARTA, A., *et al.* (1999) Different effect of simvastatin and atorvastatin on key enzymes involved in VLDL synthesis and catabolism in high fat/cholesterol fed rabbits. *British Journal of Pharmacology*, **127**, 1479-1485.
- 109) MA, P.T.S., GIL, G., SUDHOF, T.C. *et al.* (1986) Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 8370-8374.
- 110) SPLITTER, S., MICHAELS, G.D., SCHLIERF, G., *et al.* (1968) Evaluation of the effects of egg yolk lipids on plasma lipids in human subjects. *Metabolism-Clinical and Experimental*, **17**, 1129-1139.
- 111) ROBERTS, S.L., MCMURRY, M.P., CONNER, W.E. (1981) Does egg feeding (i.e., dietary cholesterol) affect plasma cholesterol levels in humans? results of double-blind study. *American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 2092-2099.
- 112) BEYNEN, A.C., KATAN, M.B. (1985) Reproducibility of variations between humans in the

- response of serum cholesterol to cessation of egg consumption. *Atherosclerosis*, **57**, 19-31.
- 113) FLYNN, M.A., NOLPH, G.B., FLYNN, I.C., *et al.* (1979) Effect of dietary egg on human serum cholesterol and triglycerides. *American Journal of Clinical Nutrition*, **32**, 1051-1057.
- 114) LICHTENSTEIN, A.H., AUSMAN, L.M., CARRASC, W., *et al.* (1994) Hypercholesterolemic effect of dietary cholesterol in diets enriched in polyunsaturated and saturated fat. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **14**, 168-175.
- 115) MIURA, S., IITAKA, M., YOSHIMURA, H., *et al.* (1994) Disturbed lipid metabolism in patients with sub-clinical hypothyroidism: effect of L-thyroxine therapy. *Archives of International Medicine*, **33**, 413-417.
- 116) MARTINEZ-TRIGUERO, M.L., HERNANDEZ-MYARES, A., NGUYEN, T.T., *et al.* (1998) Effect of thyroid hormone replacement on lipoprotein(a), lipids, and apolipoproteins in subjects with hypothyroidism. *Mayo Clinic Proceedings*, **73**, 837-841.
- 117) SUSANNE, U.T., ERIC, S., BERND, G., *et al.* (2000) The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, **141**, 3057-3064.
- 118) GEBHARD, R.L., PRIGGE, W.F. (1992) Thyroid hormone differentially augments biliary sterol secretion in the rat. II. The chronic bile fistula model. *Journal of Lipid Research*, **33**, 1467-1473.
- 119) EAGELKEN, S.F., EATON, R.P. (1980) Thyroid hormone-induced dissociation between plasma triglyceride and cholesterol regulation in the rat. *Endocrinology*, **107**, 208-214.
- 120) WEINTRAUB, M., ITAMAR, G., YANA, T., *et al.* (1999) Thyroxine replacement therapy enhances clearance of chylomicron remnants in patients with hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 2532-2536.
- 121) ASAMI, T., CIOMARTAN, T., UCHIYAMA, M., *et al.* (1999) Thyroxine inversely regulates serum intermediate density lipoprotein levels in children with congenital hypothyroidism. *Pediatrics International*, **41**, 266-269.
- 122) BORENSTAJU, J., ROSE, M.S., KOTLAR, T.J. (1976) The inhibition *in vivo* of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity by Triton WR1339. *Biochemical Journal*, **156**, 539-543.
- 123) EMMISON, N., ZAMMIT, V.A., AGIUS, L. (1992) Triacylglycerol accumulation and secretion in hepatocyte cultures. Effects of insulin, albumin and Triton WR1339. *Biochemical Journal*, **285**,

655-660.

- 124) HERMIER, D., HALES, P., BRINDLEY, D.N. (1991) Effects of the lipase inhibitors, Triton WR1339 and tetrahydrolipstatin, on the synthesis and secretion of lipids by rat hepatocytes. *FEBS Letters*, **286**, 186-188.
- 125) SPADY, D.K., WILLARD, M.N., MEIDELL, R.S. (2000) Role of acyl-coenzyme A : cholesterol acyl-transferase-1 in the control of hepatic very low density lipoprotein secretion and low density lipoprotein receptor expression in the mouse and hamster. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27005-27012.
- 126) GRATAGLIANO, I., VENDERNALE, G., CARACENI, P. (2000) Starvation impairs antioxidant defense in fatty liver of rats fed a choline-deficient diet. *Journal of Nutrition*, **130**, 2131-2136.
- 127) LIEBER, C.S., DECARLI, L.M. (1974) An experimental model of alcohol feeding and liver injury in the baboon. *Journal of Medical Primatology*, **3**, 153-163.
- 128) LOTT, J.A., TURNER, K. (1975) Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clinical Chemistry*, **21**, 1754-1760.
- 129) LAMARCHE, B., UFFELMAN, K.D., CARPENTIER, A., *et al.* (1999) Triglyceride enrichment of HDL- enhances in vivo metabolic clearance of HDL apoA-I in healthy men. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 1191-1199.
- 130) WAREBURG, H., BISERTE, G., JAILLARD, J., *et al.* (1966) Comparative study of kinetics of plasma clearing of two emulsions of lipids injectable in man and animal. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, **160**, 1234-1238.
- 131) KAUFMANN, N.A., POZNANSKI, R., BLONDHEIM, S.H., *et al.* (1967) Comparison of effects of fructose, sucrose, glucose, and starch on serum lipids in patients with hypertriglyceridemia and normal subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, **20**, 131-132.
- 132) KUO, P.T., FENG, L., COHEN, N.N., *et al.* (1967) Dietary carbohydrates in hyperlipemia (hyperglyceridemia): hepatic and adipose tissue lipogenic activities. *American Journal of Clinical Nutrition*, **20**, 116-125.
- 133) 多田紀夫 (1999) 高レムナントリポ蛋白質血症. *医薬ジャーナル*. **35**, 3118-3122.
- 134) WINDMULLER, H.G., MCDANIEL, E.G., SPAETH, A. (1965) Orotic acid-induced fatty liver. Metabolic studies in conventional and germ-free rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,

- 135) 望月 聡, 宮本安紀子, 萩原美和子, 他 (2001) オロチン酸投与によるラット脂肪肝に対する大麦焼酎粕の抑制効果. 日本醸造学会誌, **96**, 559-563.
- 136) 後藤浩彦, 山下修司, 牧田登之. (1998) デヒドロエピアンドロステロンおよびフェノバルビタールの単独あるいは併用投与による雄ラットにおけるオロチン酸誘導脂肪肝の防止. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**, 513-517.
- 137) HERSCHEL, S., ETHEL, V. (1969) Influence of ethionine choline-deficiency fatty liver. *Journal of Nutrition*, **97**, 419-430.
- 138) UCHIDA, E., KATOH, N., TAKAHASHI, K. (1992) Induction of fatty liver in cows by ethionine administration and concomitant decrease of serum apolipoproteins B-100 and A-I concentrations. *American Journal Veterinary Research*, **53**, 2053-2042.
- 139) DEBOYSER, D., GOETHALS, F., KRACK, G., *et al.* (1989) Investigation into mechanism of tetracycline-induced steatosis: study in isolated hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **97**, 473-479.
- 140) LIEBER, C.S., DECARLI, L.M. (1976) Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Federation Proceedings*, **35**, 1232-1236.
- 141) SILER, S.Q., NESSE, R.A., PARKS, E.J., *et al.* (1998) VLDL-triglyceride production after alcohol ingestion, studied using [2-¹³C₁] glycerol. *Journal of Lipid Research*, **39**, 2319-2328.
- 142) ZILVERSMIT, D.B. (1972) A single blood sample dual isotope method for the measurement of cholesterol absorption in rats. *Proceedings Society Experimental Biology and Medicine*, **140**, 862-865.
- 143) ZILVERSMIT, D.B., HUGHES, L.B. (1974) Validation of a dual-isotope plasma ratio method for measurement of cholesterol absorption in rats. *Journal of Lipid Research*, **15**, 465-473.
- 144) 藤原啓子 (1989) 肝胆道系疾患における血中胆汁酸の臨床検査. *臨床病理*, **37**, 1114-1121.
- 145) FOLCH, J., LESS, M. (1951) Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **19**, 807-812.
- 146) LI, Y.C., WANG, D.P., CHIANG, J.Y.L. (1990) Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 12012-12019.

- 147) 前場良太, 島崎弘幸 (2001) 脂質・リポ蛋白代謝の分子機構, コレステロール. 日本臨床, **59**(2), 14-20.
- 148) ALBERTS, A.W., CHEN, J., KURON, G., *et al.* (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 3957-3961.
- 149) BOLLMAN, J.L., CAIN, J.C., GRINDLAY, J.H. (1948) Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of the rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **33**, 1349-1352.
- 150) GOLDSTEIN, J., BROWN, M. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **343**, 425-430.
- 151) ENDO, A., KURODA, M., TANZAWA, K. (1976) Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters*, **72**, 323-326.
- 152) ENDO, A., KURODA, M., TSUJITA, Y., *et al.* (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium Citrinum*. *Journal of Antibiotics*, **29**, 1346-1348.
- 153) 大久保実 (2001) 脂質・リポ蛋白代謝の分子機構, リポ蛋白リパーゼ, 日本臨床, **59**, 193-199.
- 154) 大久保実 (2001) 脂質・リポ蛋白代謝の分子機構, 肝性トリグリセリドリパーゼ, 日本臨床, **59**, 200-204.
- 155) SANADI, D.R. (1969) α -Ketoglutarate dehydrogenase from pig heart, In: *Methods in Enzymology: Citric Acid Cycle*, edited by LOWENSTEIN, J.M., New York: Academic, vol. XIII, 52-55.
- 156) NOZAKI, S., KUDO, M., MATSUZAWA, Y. *et al.* (1984) Sensitive non-radioisotopic method for measuring lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in post-heparin plasma. *Clinical Chemistry*, **30**, 748-751.
- 157) ASSMANN, G., KRAUSS, R.M., FREDRICKSON, D.S., *et al.* (1973) Positional specificity of triglyceride lipases in post-heparin plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **248**, 7184-7190.
- 158) MURAKAMI, T., SASAKI, Y., YAMAJO, R. *et al.* (1984) Effect of bile salts on the rectal

- absorption of sodium ampicillin in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **32**, 1948-1955.
- 159) BELFRAGE, P., FREDRIKSON, G., OLSSON, H., *et al.* (1985) Molecular mechanisms for hormonal control of adipose tissue lipolysis. *International Journal of Obesity*, **9**, 129–135.
- 160) HOLM, C., OSTERLUND, T., LAURELL, H., *et al.* (2000) Molecular mechanisms regulating hormone sensitive lipase and lipolysis. *Annual Review of Nutrition*, **20**, 365–393.
- 161) SZTALRYD, C., KRAEMER, F.B. (1994) Regulation of hormone-sensitive lipase during fasting. *American Journal of Physiology*, **266**, E179-185.
- 162) TAVINTHARAN, S., KASHYAP, M.L. (2001) The benefits of niacin in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Report*, **3**, 74–82.
- 163) BLECHER, M., MERLINO, N.S., RO'ANE, J.T. (1968) Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methyl xanthines, and nicotinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **243**, 3973-3977.
- 164) ONO, S., KAMEDA, K., ABIKO, Y. (1974) Metabolism of pantethine in the rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **20**, 203-213.
- 165) TARASOV, I.A., SHEIBAK, V.M., MOISEENOK, A.G. (1985) Adrenal cortex functional activity in pantothenate deficiency and the administration of the vitamin or its derivatives. *Voprosy Pitaniia*, **4**, 51-54.
- 166) KRAUSS, R.M., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. (1974) Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. *The Journal of Clinical Investigation*, **54**, 1107- 1124.
- 167) QIU, S., BERGERON, N., KOTITE, L., *et al.* (1998) Metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein B in hepatic lipase-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, **39**, 1661–1668.
- 168) SANTAMARINA-FOJO, S., HAUDENSCHILD, C., AMAR, M. (1998) The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, **9**, 211–219.
- 169) MOWRI, H-O., PATSCH, W., SMITH, L.C., *et al.* (1992) Different reactivities of high density lipoprotein₂ subfraction with hepatic lipase. *Journal of Lipid Research*, **33**, 1269-1279.
- 170) PATSCH, J.R., PRASAD, S., GOTTO, A.M.JR., *et al.* (1984) Postprandial lipemia: a key for the conversion of high density lipoprotein₂ into high density lipoprotein₃ by hepatic lipase. *The Journal of Clinical Investigation*, **74**, 2017-2023.

- 171) MABUCHI, H., KOIZUMI, J., SHIMIZU, M., *et al* . (1998) Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *The American Journal of Cardiology*, **82**, 1489-1495.
- 172) JIMENEZ-COLMENERO, F., CARBALLO, J., COFRADES, S. (2001) Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, **59**, 5-13.