

各種脂肪摂取後 TG—リッチリポ蛋白の血漿 および細胞内代謝過程におよぼす影響

福井医科大学第3内科

中井 継彦 (研究代表者)

玉井 利孝 (協同研究者)

笈田 耕治 (")

(I) 研究目的および研究の社会的意義

本邦の男性、女性ともに平均寿命が延長し、欧米先進国を凌駕しつつある。死因の内訳として、結核、肺炎などの感染性疾患の著しい減少、脳血管疾患特に脳出血の減少が大きく寄与している。しかし、逆に虚血性心疾患による死亡率が漸増し、欧米型に近づこうとしている。その原因としては、日本人のライフスタイルの欧米化、とりわけ栄養素の摂取内容の推移が注目されている。総蛋白摂取に占める動物性蛋白質の割合および総脂肪摂取に占める動物性脂肪の割合が昭和20～30年代の20～30%から昭和57年には約50%に達している。植物油に含まれるリノール酸、リノレン酸などの必須脂肪酸が高脂血症を改善させるが、動物油脂に含まれる飽和脂肪酸は血中コレステロールを上昇させると報告されており、植物油摂取の有用性が啓蒙されている。

疫学的に、植物性脂肪が動物性脂肪よりも動脈硬化性疾患の惹起性が少ないとされ、植物性脂肪の使用が推奨されている。しかし、その詳細な機序に関しては未だ十分明らかにされていない。種々の脂肪を経口摂取すると、小腸にて消化吸収され、腸管リンパ管を経由して外因性血漿リポ蛋白として大循環に入る。外因性リポ蛋白は腸管由来であるから、ヒトではアポ蛋白 (apo) B-48 を含有するカイロミクロンとして小腸細胞より分泌され、末梢の毛細血管内皮細胞に存在するリポ蛋白リパーゼによりカイロミクロンのトリグリセライド (TG) が加水分解を受ける。その結果、カイロミクロンレムナントが形成されるが、肝細胞によって素早く取り込まれ、血中から処理される。しかし、摂取する脂肪の種類によ

て前述の TG-リッチリポ蛋白の代謝過程にいかなる差異が認められるかについては十分明らかにされておらず、本研究において、これらの課題を検討する。乳製品や油脂製品であるバター、マーガリンや生クリームを経口摂取し、被験者の血漿およびリポ蛋白分画中の各種脂質、各種アポ蛋白、apo B-48などを分析する。さらに、三種の脂肪摂取によって生じた血中の TG-リッチリポ蛋白を採取、調整し、レムナント代謝の主要細胞である培養肝脂肪と動脈硬化の発症、進展と密接に関連する培養動脈平滑筋細胞やマクロファージを用いて両者の相互反応性や細胞内リポ蛋白代謝過程におよぼす TG-リッチリポ蛋白の影響について検討する。

(II) 経口脂肪負荷における apo B-48 含有リポ蛋白代謝：生クリーム負荷テスト

TG-リッチリポ蛋白代謝には肝臓および小腸を介する2つの代謝経路が存在し、その調節には2種の apo B 亜分画、apo B-100 及び apo B-48 が重要な役割を果たしている。特にヒトにおいては apo B-100 は肝臓由来、apo B-48 は小腸由来とされ、その臓器特異性がリポ蛋白代謝マップの中で注目されている。著者らはこれまで高 TG 血症（原発性高脂血症あるいは糖尿病に伴う続発性高脂血症）患者における apo B 亜分画動態を検討し、VLDL の apo B-48 比（apo B-48 の apo B 全体に占める％）は TG リッチリポ蛋白、特に外因性の TG リッチリポ蛋白代謝と密接に関係し、apo B-48 比が各種病態における高 TG 血症の成因を検討する指標の一つとなり得ることを報告した。

高脂肪食の投与あるいは脂肪負荷試験（経口または経静脈）の目的は、外因性脂肪に対する個人の反応性を知ることとともに、外因性リポ蛋白およびアポ蛋白代謝変動を検討する際の有用な方法の一つである。本研究では経口脂肪1回大量投与を行い、外因性リポ蛋白代謝について、apo B-48 をとして検討するとともに、外因性脂肪に対する個人の反応性を規定する因子について検討した。

(1) 対象および方法

対象は25歳から43歳（平均30歳）の健常男子8名であり、空腹時血漿脂質およびアポ蛋白濃度は正常であった。約14時間絶食後の早朝空腹時に市販の生ク

クリーム200g (200ml) を3分以内に経口摂取させ、5時間後まで経時的に採血し分析した。血漿コレステロール (Ch), 血漿 TG およびリン脂質 (PL) はそれぞれ酵素法で測定した。血漿 apo A-I, A-II, B, C-II, C-III および E 濃度は SRID 法により測定した。リポ蛋白は既報の超遠心法により分析した。VLDL 中 apo-B 亜分画の分析は超遠心法により得られた VLDL を 1mM EDTA-2Na, pH8.2 で24時間十分に透析して試料とした。Bio-Rad 社製 Protean Cell を用いて、0.1% SDS 含有 3~15% gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を行い、VLDL アポ蛋白を分離した。apo B-100, B-48, E, A-IV, C群がそれぞれ分離された。apo B 亜分画の同定は LDL (apo B-100) との比較および bovine serum albumin の重合体を標準蛋白として計算した分子量より行った。Densitometer で測定し、apo B-48 の apo B 全体に占める% (B-48 比) を計算した。測定値は mean±SE で示した。脂肪負荷時の血漿脂質, リポ蛋白, アポ蛋白濃度および apo B-48 比の変動を負荷前の値と paired t test で検定した。なお、投与した生クリームの脂肪含有量は TG 102.8g, PL 7.4g, Ch 1.0g であった。

(2) 結果

空腹時の血漿脂質, リポ蛋白およびアポ蛋白濃度は Ch 184.3±9.0 mg/dl, TG 108.7±16.3 mg/dl, PL 197.9±5.9 mg/dl, HDL-Ch 64.3±2.4 mg/dl, apo A-I 135.5±8.5 mg/dl, apo A-II 29.8±1.2 mg/dl, apo B 72.7±5.7 mg/dl, apo C-II 3.1±0.4 mg/dl, apo C-III 8.1±0.6 mg/dl, apo E 3.7±0.1 mg/dl であった。脂肪負荷後血漿脂質はいずれも増加を示したが、特に血漿 TG の増加が著明であった。この増加の大部分は VLDL ($d < 1.006 \text{ g/ml}$) 分画の TG の増加によるものであったが、IDL-TG の増も認められた (Fig. 1)。血漿および VLDL-TG は60分より有意に増加を示し、IDL-TG はこれに遅れて120分より有意に増加した。しかし一方、TG の増加反応は個体差が大きいことが観察された。そこで脂質負荷に対する血漿 TG 反応の程度を評価するために Patsch らの方法に準じて血漿 TG の増加量を算出した。すなわち、脂肪負荷後1時間値より5時間値までの5個の血漿 TG 値をプロットし、そのうち最大値

2個の平均値と負荷前値との差を計算した。TG増加量 (mg/dl) = $(TG_{\max} + TG_{2nd}) / 2 - TG_0$ (TG_{\max} : 最大値, TG_{2nd} : 2番目に高い値, TG_0 : 前値)。これにもとづいて、血漿TGが185mg/dl以上増加した4例(185~328mg/dl)と増加が164mg/dl以下であった4例(65~164mg/dl)との2群に分けてそれぞれ高反応群(Hyper-responder: H群)および低反応群(Low-responder: L群)として以下の検討を行った。なお TG_{\max} はH群では323.6~569.4mg/dl, L群では127.8~259.1mg/dlであった。H群およびL群の臨床背景および空腹時脂質, リポ蛋白, アポ蛋白濃度は Table 1 のごとくであった。

H群とL群に分けた血漿TGの変動は Fig. 2 のごとくである。コレステロールの変動では血漿Chは120分から有意に増加した。一方, VLDL-Chは60分から有意な増加を示した。LDL-Ch, HDL-Chには有意な変動は認めなかった。しかし, HDL-ChをH群とL群に分けて検討するとH群において経時的な減少傾向がみられた。血漿PLは経時的に漸増した。血漿アポ蛋白濃度についてみると, apo A-Iおよびapo A-II濃度は脂肪負荷後それぞれ有意な変動を認めなかったが, apo A-I濃度はH群でL群に比べて低値であった。apo B濃度も脂肪負荷後に有意な変化を認めなかったが, H群においてL群に比して高値であった。血漿apo E濃度についてもほぼ同様の結果を得た。血漿apo C-IIおよびC-III濃度も脂肪負荷により有意な変動を認めなかったが apo B, apo Eと同様にH群においてL群に比し高値を示した。次に血漿TG増加反応と空腹時の血漿脂質, リポ蛋白, アポ蛋白濃度との間の相関関係について検討した。血漿TG増加反応は血漿TG ($r=0.87, p<0.005$), VLDL-TG ($r=0.81, p<0.01$), VLDL-Ch ($r=0.81, p<0.01$) および apo C-III ($r=0.71, p<0.05$) 濃度とそれぞれ有意な正の相関を示した。すなわち, 空腹時の血漿TG, VLDL脂質濃度あるいはapo C-III濃度が高いほど脂肪負荷後のTG増加反応が大であることが示された。

さらに, 経口脂肪負荷時のリポ蛋白変動におよぼす外因性リポ蛋白の影響をみるために apo B-48の変動を検討した。Fig. 3にB-48比の変動を示した。H群4例のB-48比の変動は脂肪負荷前平均4.6%であったが, 脂肪負荷後増加

し、60分で8.9%とピークに達した後、再び減少を示した。しかし、その変動は個体差が大であった。

(Ⅲ) 経口脂肪負荷に置ける apo B-48 含有リポ蛋白代謝：バターおよびマーガリン負荷テスト

(1) 対象および方法

対象は25歳から43歳の健常男子7名である。空腹時血漿脂質、リポ蛋白およびアポ蛋白濃度は、TG 108.8 ± 13.9 mg/dl, Ch 191.5 ± 11.0 mg/dl, PL 195.3 ± 6.5 mg/dl, HDL-Ch 63.6 ± 3.3 mg/dl, apo A-I 143.8 ± 2.6 mg/dl, apo A-II 32.3 ± 0.8 mg/dl, apo B 76.7 ± 6.6 mg/dl, apo C-II 32.3 ± 0.3 mg/dl, apo C-III 7.8 ± 0.5 mg/dl, apo E 4.0 ± 0.2 mg/dlであった。14時間絶食後の早朝空腹時に、バター〔粗脂肪81.0%, 脂肪酸組成(%) : C_{4:0} 4.2, C_{6:0} 2.3, C_{8:0} 1.2, C_{10:2} 2.6, C_{12:0} 2.8, C_{14:0} 10.9, C_{16:0} 31.0, C_{16:1} 25.5, C_{17:0} 10.5, C_{18:1} 1.3〕100 gあるいはマーガリン〔粗脂肪81.6%, 脂肪酸組成(%) : C_{12:0} 2.5, C_{14:0} 1.0, C_{16:0} 9.0, C_{18:0} 8.0, C_{18:1} 15.5, C_{18:2} 62.5, C_{18:3} 31.0, C_{20:0} 0.5, C_{21:1} 0.4〕100 gを食パン60 gとともに経口摂取させた。その後5時間まで経時的に採血し分析した。分析方法は前記と同様である。

(2) 結果

脂肪負荷後の血漿脂質はいずれも増加を示したが、とくに血漿 TG の増加が著明であった。脂肪負荷後の血漿およびリポ蛋白の TG 濃度の変動をみると (Fig. 4), 血漿 TG の増加の大部分は VLDL ($d < 1.006$ g/ml) 分画の増加によるものであった。バター負荷では、IDL-TG の増加もみられた。しかし、バター、マーガリン間で比較すると、リポ蛋白 TG 濃度に差を認めなかった。血漿およびリポ蛋白のコレステロール濃度の変動をみると (Fig. 5), いずれの負荷においても VLDL-Ch の有意な増加が認められたが、IDL, LDL, HDL 分画には明らかな変動は認められず、両者負荷の間でもリポ蛋白コレステロール濃度の差は認めなかった。血漿アポ蛋白濃度の変動は血漿脂質の変化に比し変化が少ないかあるいは認められず、両者負荷の比較でも一定の差異は認められな

かった。Fig. 6 に $d < 1.006 \text{ g/ml}$ 分画の apo B-48 比の変動を示した。脂肪負荷後増加し、ピークに達した後減少した。バター、マーガリン両者間で変動の様相に一定の差異を認めなかったが、個体差が大であることが示された。同様に、各対象における apo B-48 比の変動を Fig. 7 に示した。次に、外因性脂肪に対する個人の反応性に及ぼす apo B-48 代謝の影響を検討した。脂肪負荷に対する反応の程度の指標として、負荷後の血漿 TG の最大値および TG 増加量を用いた。apo B-48 比の前値は、TG の最大値、TG 増加量のいずれとも相関関係を示さなかったが、負荷後の apo B-48 比の最大値は、TG の最大値と有意な負の相関を示した（バター： $r = -0.75$, $p < 0.05$, マーガリン： $r = -0.86$, $p < 0.01$ ）（Fig. 8）。同様に apo B-48 比の最大値は、TG 増加量との間にも、マーガリンでは有意な負相関（ $r = -0.76$, $p < 0.05$ ）、バターでは有意ではないか負の相関傾向（ $r = -0.69$, ns）を示した。

(IV) 考 察

外因性リポ蛋白代謝を検討する手段の一つとして、各種脂肪負荷テストが行われ、外因性脂肪に対する反応性についての多くの実験結果が報告されている。外因性脂肪に対する個人の反応性を把握することは臨床的にもきわめて重要である。すなわち、食事性脂肪摂取と動脈硬化症との関連について明らかにされ、Zilversmit は、とくに食後の高脂血症状態と動脈硬化症との関連について述べている。カイロミクロンの血中での半減期は4.5分にすぎないので、最近ではカイロミクロンレムナント粒子が注目され、多くの臨床及び実験成績によって、カイロミクロンレムナント、VLDL レムナントが動脈硬化惹起に関与していることが示唆されてきた。apo B の面よりみると、小腸で吸収された脂質は小腸由来の apo B-48 とともにカイロミクロンとして分泌され、血中で TG の水解を受けた後、カイロミクロンレムナントとして肝臓に取り込まれる。すなわち、ヒトでは小腸は apo B 亜分画では主として apo B-48 を合成する。一方、ヒトの肝臓は apo B-100 のみを合成し、apo B-48 は合成しないと報告されている。以上ヒトでは apo B-100, apo B-48 合成の臓器特異性が明らかである。従って、外因性リポ蛋白

とくに、カイルミクロンレムナント代謝のマーカーとして apo B-48 を指標とすることは妥当であり、脂肪負荷後の apo B-48 の変動を検討することは外因性リポ蛋白代謝の研究に有用であると考えられる。

今回の研究では、正脂血症者において、apo B-48 を指標として脂肪負荷後の外因性リポ蛋白代謝を検討したところ、3種の脂肪の間では apo B-48 比の変動に明らかな差異は認められなかった。しかし、個体間の変動の差は大であり、apo B 亜分画代謝の個体差が示唆された。このことは、外因性リポ蛋白の処理の様相に個体差が大であることを示すものと言える。さらに、外因性脂肪に対する個人の反応性に及ぼす apo B 亜分画代謝の影響を検討すると、脂肪負荷に対する反応の大きさと apo B-48 比の最大値とは負の相関関係を示した。このことは、脂肪負荷後の TGリッチリポ蛋白の apo B-48 含量が高くなる個体ほどそのリポ蛋白粒子の血中からの除去がすみやかであることを示すものである。この結果はカイルミクロンレムナントの認識機構に apo B-48 が一部は間接的にせよ関連している可能性を示唆するものと考えられたが一掃の検討が必要である。

今後さらに、TG リッチリポ蛋白と各種細胞との相互反応性や細胞内リポ蛋白代謝過程におよぼす影響などについて研究を進める予定である。

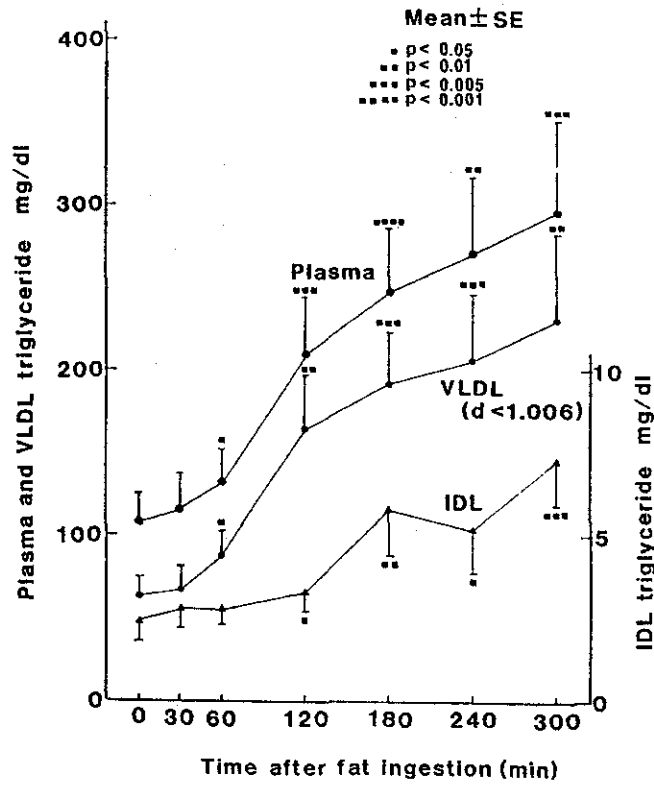


Fig. 1 Time course of triglyceride concentrations in original plasma, VLDL and IDL after fat ingestion.

Table 1 Clinical profile and plasma concentrations (mg/dl: mean±SE) of triglyceride (TG), cholesterol (Ch), phospholipid (PL), apolipoprotein (apo) A-I, A-II, B, C-II, C-III and E of the subjects investigated in the present study

	H group (n=4)	L group (n=4)
Age	34.0±3.2	25.5±0.5*
Weight (kg)	65.3±0.9	61.8±5.3
% Ideal weight	100.0±1.8	95.8±2.7
TG: Plasma	149.1±11.5	68.5±4.1**
VLDL	94.3±4.6	32.4±5.1**
IDL	2.8±1.0	2.0±0.8
LDL	—	—
HDL	—	—
Ch: Plasma	194.8±13.8	173.9±10.6
VLDL	13.2±1.0	4.5±1.0**
IDL	—	—
LDL	120.1±15.2	102.3±8.6
HDL	61.5±0.6	67.1±4.6
PL: Plasma	210.6±1.3	185.3±7.4*
Apo A-I	125.0±7.7	145.9±14.3
Apo A-II	28.4±1.7	31.3±1.6
Apo B	77.4±11.0	68.0±3.6
Apo C-II	3.7±0.6	2.5±0.2
Apo C-III	9.2±0.7	6.9±0.5*
Apo E	3.6±0.1	3.9±0.3

H group: hyper-responder

L group: lower-responder

*p<0.05, **p<0.001 vs. H group

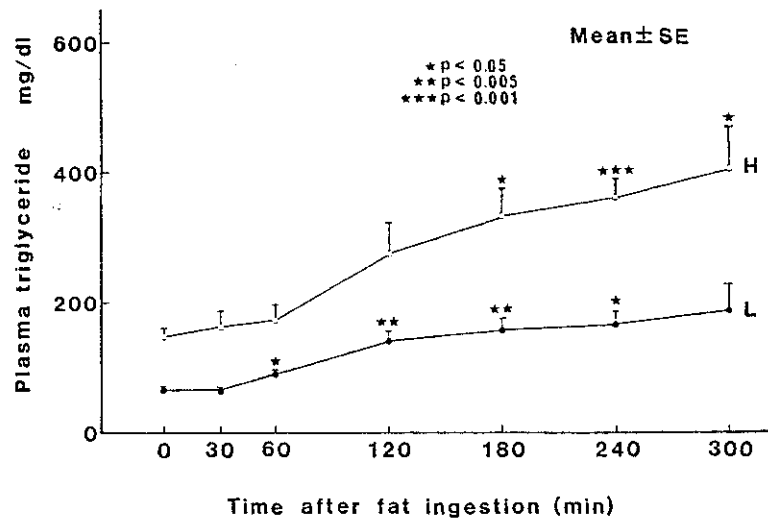


Fig. 2 Time course of plasma triglyceride concentration after fat ingestion. H: hyper-responder, L: lower-responder

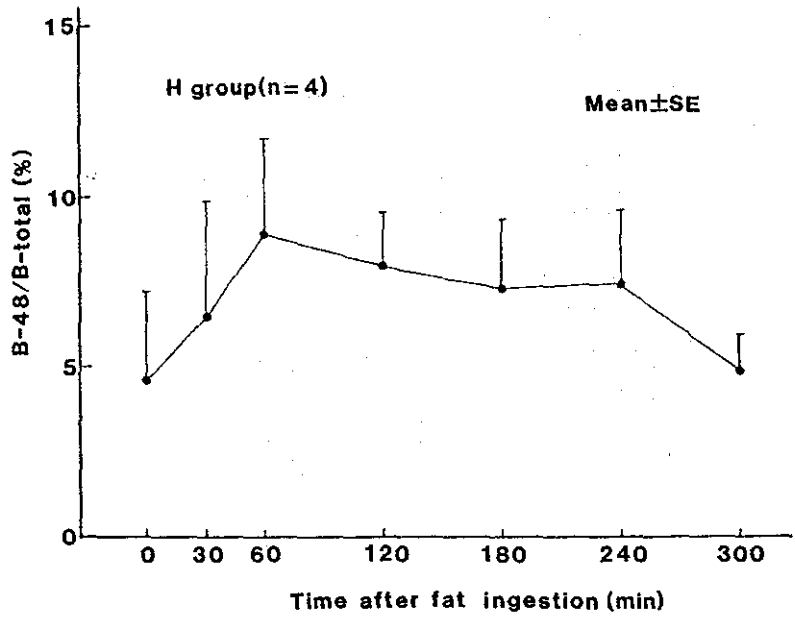


Fig. 3 Time course of apo B-48 ratio (percent apo B-48 in total apo B) after fat ingestion.

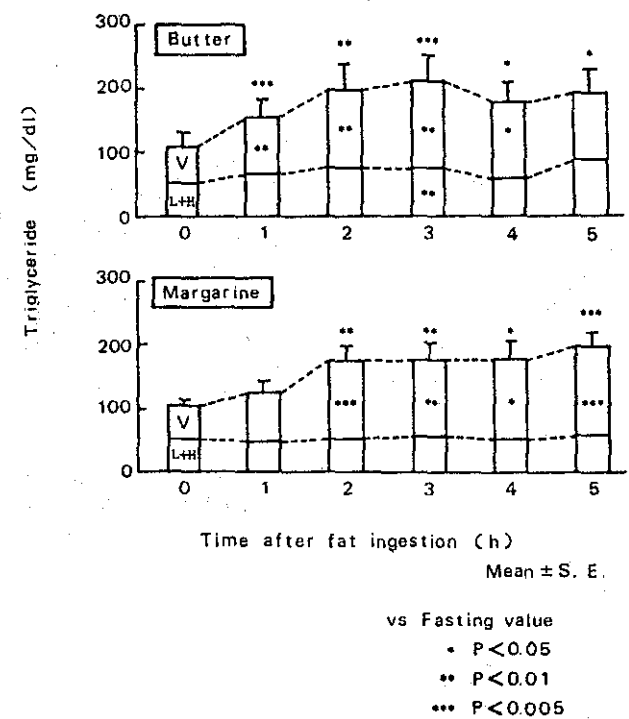


Fig. 4 Time course of plasma and lipoprotein triglyceride concentrations after butter and margarine ingestion.

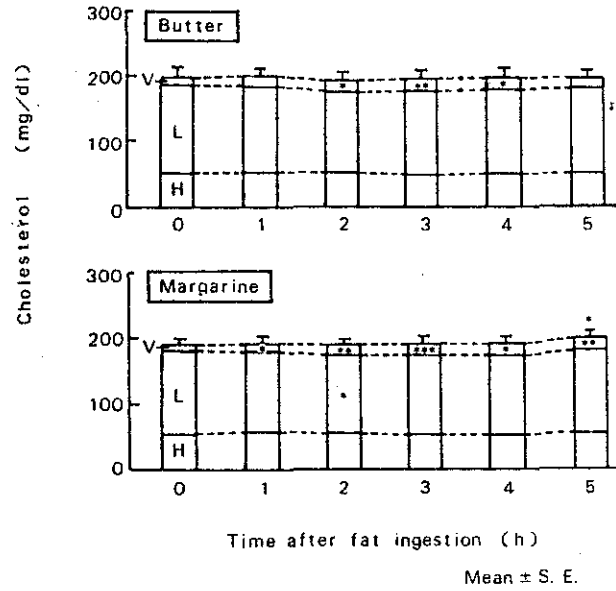


Fig. 5 Time course of plasma and lipoprotein cholesterol concentrations after butter and margarine ingestion.

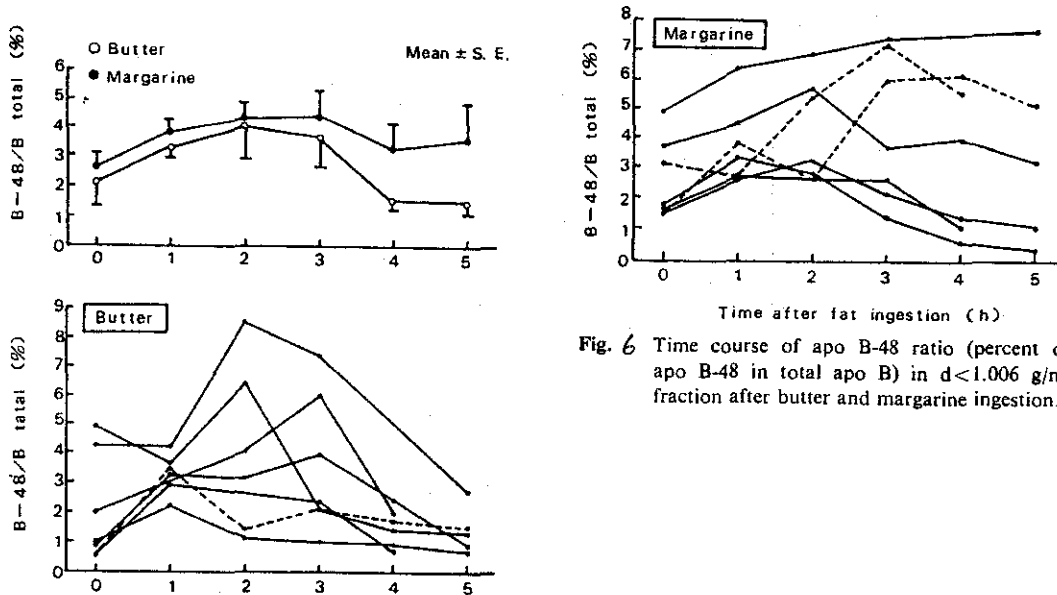


Fig. 6 Time course of apo B-48 ratio (percent of apo B-48 in total apo B) in $d < 1.006$ g/ml fraction after butter and margarine ingestion.

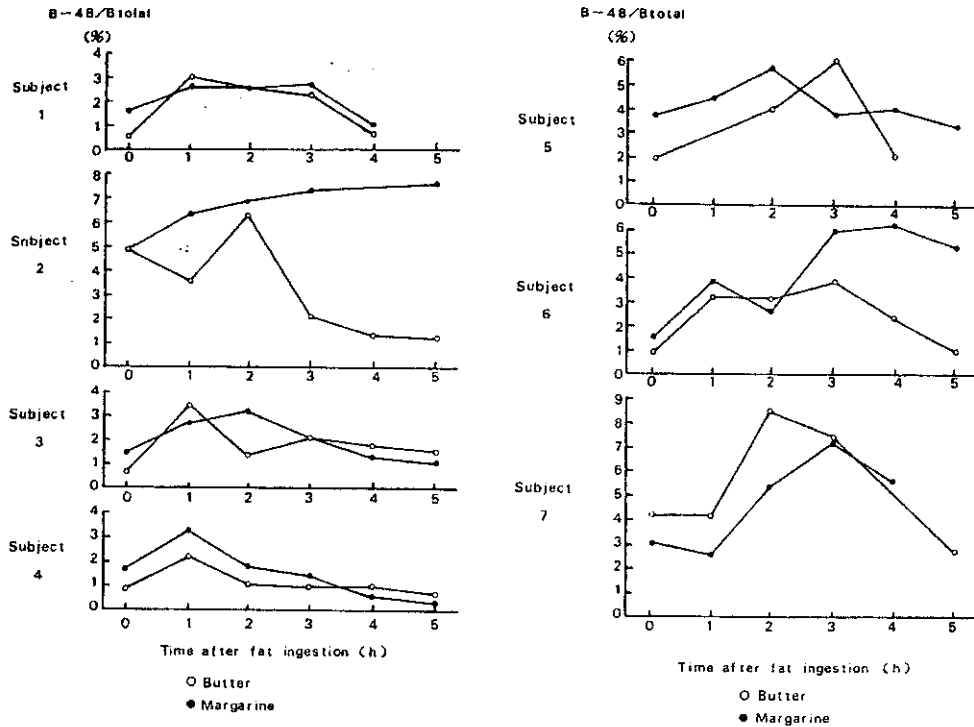


Fig. 7 Time course of apo B-48 ratio in $d < 1.006$ g/ml fraction after butter and margarine ingestion in the individual subjects of Table 1.

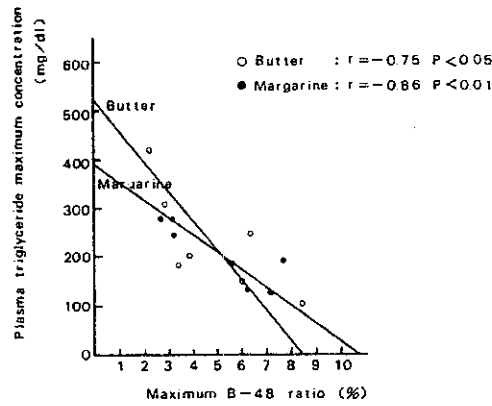


Fig. 8 Correlation between plasma triglyceride maximum concentrations and maximum B-48 ratios after butter and margarine ingestion.