

## ラット血漿におけるコレステロールのエステル化： コレステロール, コール酸投与の影響

菅野, 道広  
九州大学農学部食糧化学工学科栄養化学教室

Portman, Oscar, W  
Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oregon, U.S.A.

<https://doi.org/10.15017/22963>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 22 (2), pp.157-172, 1966-04. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## ラット血漿におけるコレステロールのエステル化

コレステロール, コール酸投与の影響

菅野道広\*・Oscar W. Portman

Cholesterol esterification by rat plasma *in vitro*

Effect of dietary cholesterol and cholic acid

Michihiro Sugano and O. W. Portman

Sperry<sup>25)</sup> が最初に血清におけるコレステロールの酵素的エステル化を観察して以来, この酵素について多くの研究がなされてきた。<sup>5)</sup> 最近 Glomset らは,<sup>6,8)</sup> このエステル化反応が血漿の脂肪酸転位酵素により触媒され, 転位された脂肪酸の大部分が血漿レシチンの C<sub>2</sub>-位の脂肪酸に由来することを見出している。この場合, 血漿のトリグリセリドもまた飽和酸の供与体となると報告しているが, Shah ら<sup>23)</sup> の研究によると脂肪酸供与体としてのトリグリセリドの役割はリン脂質に比べ極めて低いようである。遊離脂肪酸あるいは脂肪酸・CoA はエステル化されない。<sup>9)</sup> このように血漿のコレステロールエステル化反応に対しリン脂質は脂肪酸供与体として, また新生したコレステロール・エステルの脂肪酸組成の上に極めて重要な働きをもつ。血漿を含め, 一般に種々の組織のリン脂質の C<sub>2</sub>-位( $\beta$ 位)の脂肪酸は不飽和酸に富んでいる。<sup>10,11)</sup> 血漿のコレステロールエステルもまた高濃度の高度不飽和酸を含んでいることからリン脂質のこの反応に及ぼす影響がうかがわれる。リン脂質の  $\beta$ 位脂肪酸を加水分解し, リゾリン脂質を生成するホスホリパーゼAを作用させると, 血漿でのコレステロール・エステル化反応は殆んど完全に抑えられる。<sup>21,23)</sup> 血漿のリン脂質は一般的には高密度リポ蛋白質中に多く存在しているが, エステル化酵素活性もこの区分で高い。<sup>7,20,22)</sup> したがってこのリポ蛋白質の構造を破損するような試薬(例えば Group-A Streptococcus の抽出物<sup>20,22)</sup>)を作用させるとリン脂質の利用が容易になり酵素活性は高くなる。

血漿のこの酵素は肝臓において生成されるものであつて, 肝臓の損傷,<sup>16)</sup> あるいは肝臓摘除<sup>17)</sup>によつてその活性を低下する。しかしながら血漿と肝臓におけるコレステロール・エステル化酵素反応の機作は全く異

なつている。肝臓は遊離脂肪酸を CoA, ATP の存在下でエステル化しうるが,<sup>9)</sup> グリセリド態の脂肪酸をエステル化し得ない。<sup>8)</sup> 血漿, 肝臓のエステル化酵素の性質を比較した場合, 脂肪酸特異性の点でも大きな差異がある。*In vitro* でのラット血漿のエステル化酵素はアラキドン酸を優先的にエステル化し, モノ不飽和酸, 飽和酸では弱い。一方肝臓ではモノ不飽和酸が特異的にエステル化される。<sup>20)</sup> *In vivo* でもほぼ同様の結果が得られている。<sup>20)</sup> 一方, リポ蛋白質態のコレステロール-4-C<sup>14</sup> をラットに静注して, 肝臓と血液のコレステロールエステル中の C<sup>14</sup> 濃度 (specific activity) を追究してみると, 注射数時間内では血漿の C<sup>14</sup> 活性は肝臓のそれよりかなり高く, 6~12 時間後平衡に達する。<sup>20)</sup>

以上の点を考慮してみると, 血漿のコレステロール・エステル化酵素それ自体が, 血漿のコレステロールエステルのレベルと組成に大きな役割を演じていることがうかがわれる。さらに, 血漿のコレステロールエステルを構成している脂肪酸の組成を比較した場合, 同一組成の食餌を投与しても動物種によつて異なることが知られている。例えばラットでは血漿のコレステロールエステル中 45~60% がアラキドン酸エステルであるのに比べ, *Cebus monkey* では約 20% しか含まれていない。<sup>18)</sup> 両動物の他の組織ではこのような顕著な差は認められない。この事実も血漿のコレステロール・エステル化酵素の役割の一端を示すものであろう。

高度不飽和酸, 恐らくは必須脂肪酸が血漿・肝臓のコレステロールの代謝に重要な役割をもつことは周知の事実である。従つて, 上述の血漿のコレステロール・エステル化酵素の性質から判断して, 食餌中の脂肪の性状, 血漿あるいは肝臓のコレステロールのレベル・脂肪酸の組成その他の因子が, この酵素に影響を及ぼすことが考えられる。事実, 血漿におけるコレステ

\* 食糧化学工学科栄養化学教室

ロールのエステル化の rate は, "essential hypercholesterolemia" (本態性高コレステロール血症) ではしばしば高く, hypothyroidism (甲状腺機能低下症) を伴う hyperlipemia (高脂血症) では低いことが報告されている。<sup>4)</sup> また著者らは, 必須脂肪酸欠乏ラット血漿ではこの酵素活性がかなり高くなり, かつ血液循環系からのコレステロールエステルの消失も速やかであることを観察した。<sup>20)</sup>

これらの観察を基にしてみると, 血漿のコレステロール・エステル化酵素の活性に及ぼす食餌因子, とくに必須脂肪酸, コレステロールの効果を追究することは興味があると思われる。本研究ではトウモロコシ油あるいは完全に水添したココナツ油にコレステロールおよびコール酸を添加した飼料を摂取したラット血漿のコレステロール・エステル化活性, 新生した各エステル中の C<sup>14</sup> の分布, およびエステル化された脂肪酸の性状などを比較検討したので報告したい。

## 実験材料および方法

### 1. 実験動物および飼料組成

体重約 40g の雄白ネズミ (Holtzman Co, Madison, Wisconsin) を 1 匹宛飼養カゴに入れ, 実験食と水は自由に与えた。ラットは次の 4 群にわけた:

第 I 群; トウモロコシ油区

Table 1. Composition of basal diet used.  
(weight percent)

Dextrose	72
Casein (defatted)	18
Salt mixture <sup>1)</sup>	4
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	1
Fats	5

1) The salt mixture "Hegsted" contained: calcium carbonate, 13.60g; dipotassium phosphate, 16.31g; monocalcium phosphate, 3.41g; magnesium sulfate, 4.71g; sodium chloride, 7.14g; ferric chloride, 1.20g; potassium iodide, 37mg; manganous sulfate, 167mg; copper sulfate 10mg; zinc chloride, 10mg.

2) The vitamin mixture contained: thiamine HCl, 200mg; riboflavin, 200mg; pyridoxine HCl, 200mg; niacin, 600mg; calcium pantothenate, 800mg; choline chloride, 40g; biotin, 4mg; inositol, 4mg; folic acid 8mg; ascorbic acid, 2.4g; methionine, 100g; cyanocobalamin, 1.6mg; vitamin A acetate (1,000,000 IU/g), 200mg; calciferol, 8mg; alpha-tocopherol, 4g; menadione, 20mg; and glucose to make a total weight of 1,000g.

第 II 群; トウモロコシ油+コレステロール+コール酸区

第 III 群; 水添ココナツ油区

第 VI 群; 水添ココナツ油+コレステロール+コール酸区

基本飼料の組成は Table 1 に示す通りである。コール酸はコレステロールの吸収をよくし, 血漿—肝臓系におけるコレステロールのレベルにより顕著な差を与えるため添加した。<sup>14)</sup>

### 2. 血漿におけるコレステロールのエステル化反応の測定法

斬首により採血し, ヘパリンを含む氷冷したチューブにとり, 0°C で 30 分遠心分離してヘパリン血漿を調製した。血漿, 血清間で酵素活性に差は認められない。

コレステロール-4-C<sup>14</sup> の石油エーテル(沸点 30—60°C) 溶液を, 稀塩酸で予じめ洗滌した Celite 545 と混和し, 窒素気流中で溶媒を蒸発させる<sup>1)</sup>。通常 Celite 100 mg にコレステロール-4-C<sup>14</sup> 3 μg (8.6 μg/μc) を添加し, 1 ml の血漿と共に 37°C で 5 時間 incubation した。

### 3. 脂質成分の分析法

Incubation 終了後, 反応容器内容を 0°C で遠心分離し Celite を除き, 上澄の一定容をとり 20 倍容のクロロホルム:メタノール(2:1, v/v) で抽出し, 抽出液を 20% 容の水で洗滌した。<sup>26)</sup> 37°C, 5 時間の incubation 中, コレステロールの環状構造には変化はなく, 遊離型とすれば C<sup>14</sup> 活性のすべてがジギトニドとして沈殿する。脂質抽出液をシリカゲルカラムにかけ, コレステロールエステルを分別した。内径 0.8 cm のカラムに約 6~7 g のシリカゲル (Mallinckrodt, Silicic acid, 100 mesh) をつめ, 予じめ 1 カラム容のメタノールおよびエチル・エーテル, 2 カラム容のリグロインでこの順に洗滌したのち試料のリグロイン溶液を負荷した。コレステロールエステルの溶出は 2% エチル・エーテルのリグロイン溶液で行なつた。溶出成分の確認は放射性的遊離コレステロールおよびエステル型コレステロール, 中性脂肪で行なつた。

コレステロールエステル区分を鹼化して脂肪酸を遊離化し, メタノール:硫酸:ベンゼン(10:0.1:0.1, v/v) 混合液中で 2 時間還流してメチルエステルとし, ガスクロマトグラフィーによつて脂肪酸を分別定量した。直径 5 mm, 長さ 1.8 m のカラムにエチレングライコール・ポリサクシネート (Chromosorb W に 16% 添加したもの) をつめ, カラム温度 190°C, アルゴンガス流 60 ml/分の条件下で, Argon Ionization

Detector で各ピークを検出した。ガスクロマトグラム上の各ピークは標準品で同定し、定量は、Triangulation 法によつた。

コレステロールエステルはさらに薄層クロマトグラフィーによつて、いくつかのエステル成分に分離した<sup>19,23,26</sup>。シリカゲルG (Merck製) の 250 m $\mu$  の薄層プレートに、試料を適当な幅に連続スポットし、シクロヘキサン；ベンゼン (3.5:1, v/v) で約 18 cm 展開した。この溶媒の組成は展開温度によつて調節する必要がある。夏期にはベンゼンの割合を減らして (4.5:1, v/v) 極性の低いものにし、冬期では 2.8:1 の位ものが良い。いずれの場合も、飽和酸の Rf が 0.4~

0.5 になるように調節すればよい分離が得られる。展開後風乾し、溶媒を蒸発させ、ヨード蒸気にあつて夫々のコレステロールエステルを検出した。この方法によつて、Fig. 1 に示したように、正常のラット血漿のコレステロールは、飽和酸、モノ不飽和酸、ジ不飽和酸、テトラ不飽和酸および、より高度の不飽和酸のエステルに分別できる。最も移動度の低い高度不飽和酸の量は通常きわめて少ないので本実験ではテトラ不飽和酸エステルと合一してとりあつた。必須脂肪酸欠乏ラットの血漿の場合、モノ不飽和酸の増加はきわめて顕著であり、これに反しジおよびテトラ不飽和酸は減少し、欠乏食摂取期間の延長と共にアイコサトリ

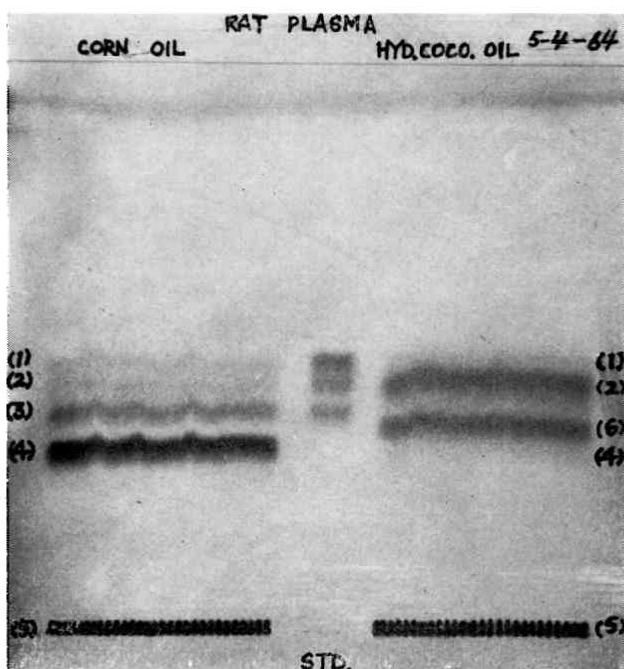


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of plasma cholesterol esters.

Plasma cholesterol esterol esters were separated into the subcomponents by thin-layer chromatography using a 250 m $\mu$  layer of Silica Gel G (Merck) and a solvent system of cyclohexane: benzene (3.5:1, v/v) at 18 to 22°C. Left: plasma from rats on a corn oil diet. Right: plasma from rats on a hydrogenated coconut oil diet.

- (1) : saturated esters; palmitate, stearate and myristate.
- (2) : monoenoic esters; oleate and palmitoleate.
- (3) : dienoic esters; linoleate and trace amount of linolenate.
- (4) : tetraenoic esters; arachidonate.
- (5) : origin; contained triglycerides, free cholesterol and phospholipids.
- (5) : trienoic ester; eicosatrienoate (only plasma from essential fatty acid deficient rat contained the eicosatrienoate ester), and trace amount of linoleate.

Std. means standard mixture of cholesteryl palmitate, oleate, and linoleate.

エン・エステル (C<sub>20:3</sub>) が増加する。このためモノ不飽和酸からジ不飽和酸を分離することは難しく、またテストラ不飽和酸と C<sub>20:3</sub> 酸エステルを分別することも困難である (Fig. 1 参照)。

#### 4. Incubation 中にエステル化された コレステロール量の定量

Incubation 終了後の脂質抽出液を薄層クロマトグラフィックによって遊離およびエステル型コレステロールに分別した。この場合、シクロヘキサン：ベンゼン (5:1, v/v) を用い約 10 cm 展開した。両区

分中の C<sup>14</sup> 活性を測定し、エステル中の C<sup>14</sup> の % を計算した。C<sup>14</sup> の活性は、ヨード蒸気で両区分を検出したのち、80°C に加温してヨードをとばし、脱色したのちシンチレーション用バイアルにシリカゲルを直接けずり落とし、これにシンチレーション液を加え計測した。シンチレーション液の組成は；1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzen, 50 mg ; 2,5-diphenyloxazole, 4 g をトルエン 1 l に溶解。

Incubation 中にエステル化されたコレステロールの量は次式によつて求めた。

$$\frac{\% \text{ radioactivity in ester form} \times \text{free cholesterol originally in flask}}{100 \times \text{plasma volume (ml)}}$$

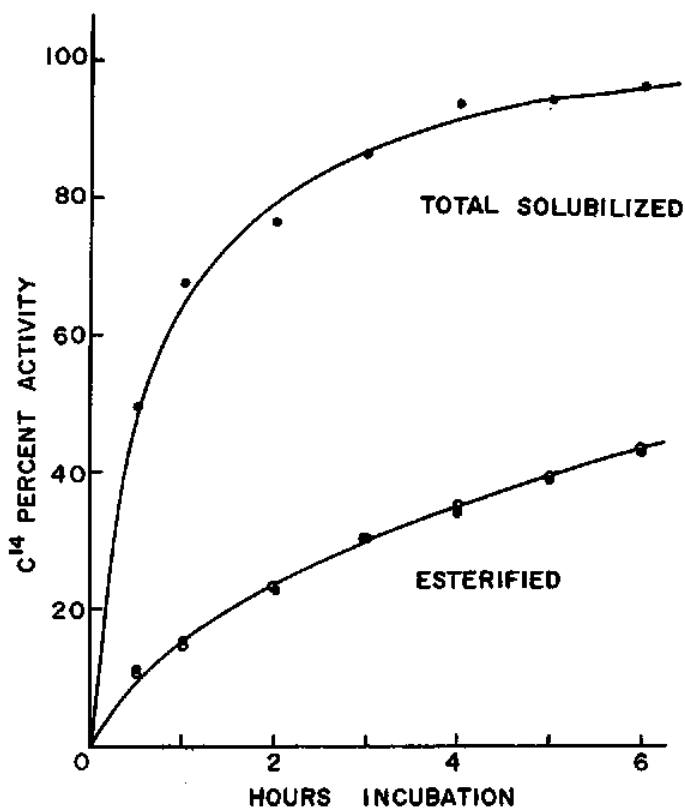


Fig. 2. The rate of solubilization and esterification of cholesterol-4-C<sup>14</sup> on Celite 545 by rat plasma *in vitro*.

One ml of plasma was incubated with 0.3  $\mu$ c of cholesterol-4-C<sup>14</sup> on Celite 545 (100 mg) at 37°C for periods indicated.

- ; calculated on the basis of radioactivity,
- ; determined by the decrease in free cholesterol.

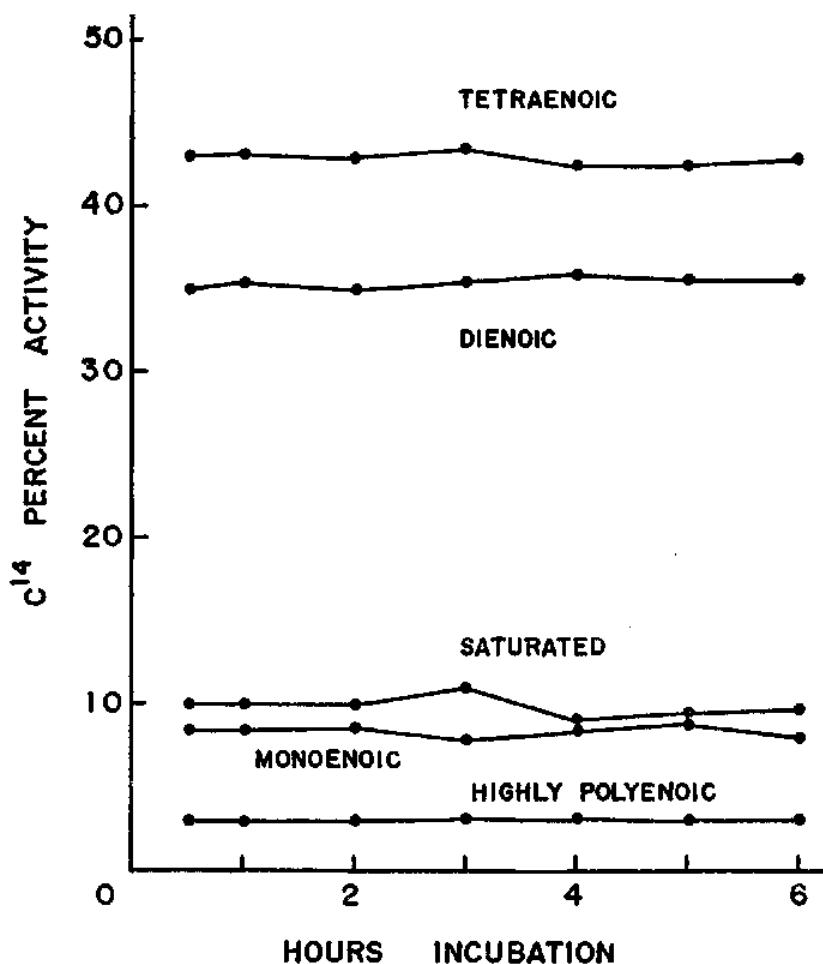


Fig. 3. Distribution of radiocholesterol in subclasses of plasma cholesterol esters. After the plasma incubation, cholesterol esters were separated by thin-layer chromatography into sub-components and radioactivity counted. Plasma was harvested from the rat fed on a chow diet. The highly polyenoic ester means fatty acid esters of cholesterol polar than the arachidonate ester on the chromatogram.

このようにして得た量は、incubation中に減少した遊離コレステロールを化学的に定量<sup>27)</sup>した結果ときわめてよく一致した。Fig. 2に示すとおりである。Incubation中に全コレステロールの量は不変であり、endogenous (血漿中のコレステロール)と exogenous (添加したコレステロール-C<sup>14</sup>)のコレステロールの変化が一致したことから、少なくとも 37°C, 5時間の incubation中に、新生したコレステロールエステルの水解は起っていないことが示された。しかし、コレステロールエステル間で interexchange 反応が起っていないという直接証明はない。

Fig. 3に薄層クロマトで分離したコレステロール

エステル各成分中の C<sup>14</sup>の多分布が、経時的に殆んど変化がないことを示した。この結果は、市販の配合飼料 (Purina Rat Chow) を与えたラットについて得たものを一例として示した。

## 結 果

### 1. 食餌脂肪およびコレステロール・コール酸投与の血漿におけるコレステロールのエステル化に及ぼす影響

4種の実験食を1, 2, 4および6週間摂取したラット血漿のコレステロール値を Fig. 4に示した。コレ

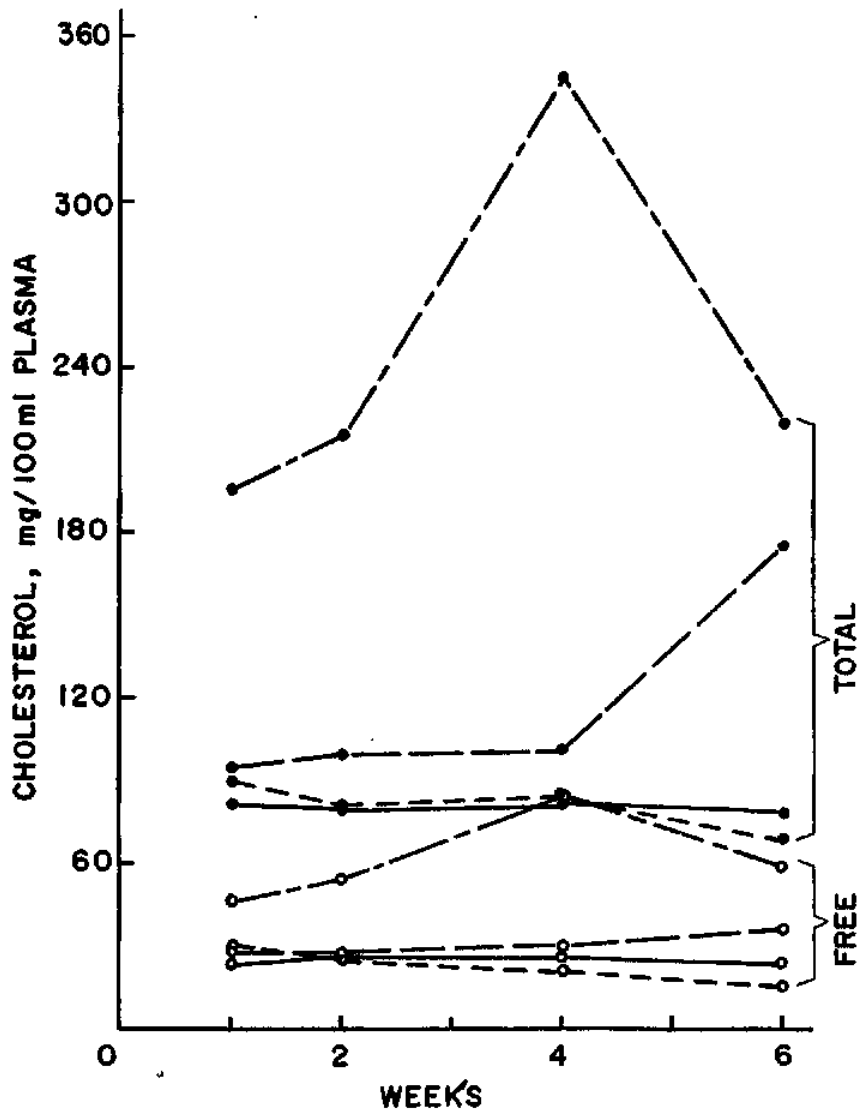


Fig. 4. Plasma concentration of cholesterol as a function of the duration of feeding various diets. Two rats were sacrificed at 2 weeks on diets, and 3 rats thereafter.

●—●; corn oil ●—●; corn oil + cholesterol + cholic acid, ●—●; hydrogenated coconut oil, ●—●; hydrogenated coconut oil + cholesterol + cholic acid.

ステロールを摂取した場合、高度不飽和酸の血漿コレステロールのレベル低下効果は明白であつた。第IV群のコレステロール・レベルは4週間目にピークをもち、以後低下したのに反し、第II群では4週以後急激に上昇した。このようなコレステロール濃度の変化は、Hegstedら<sup>14)</sup>の結果とよく一致した。必須脂肪酸欠乏食をとつた第III群では非常にゆるやかではある

がコレステロール濃度は経時すれば徐々に低下した。各群のラット血漿における遊離型コレステロールの濃度変化は全コレステロールのそれとほぼ同様の傾向を示した。

Fig. 5 に示したように、各群のラット血漿における *in vitro* でのコレステロールのエステル化は、そのコレステロール・レベルとほぼ逆の関係がある。すな

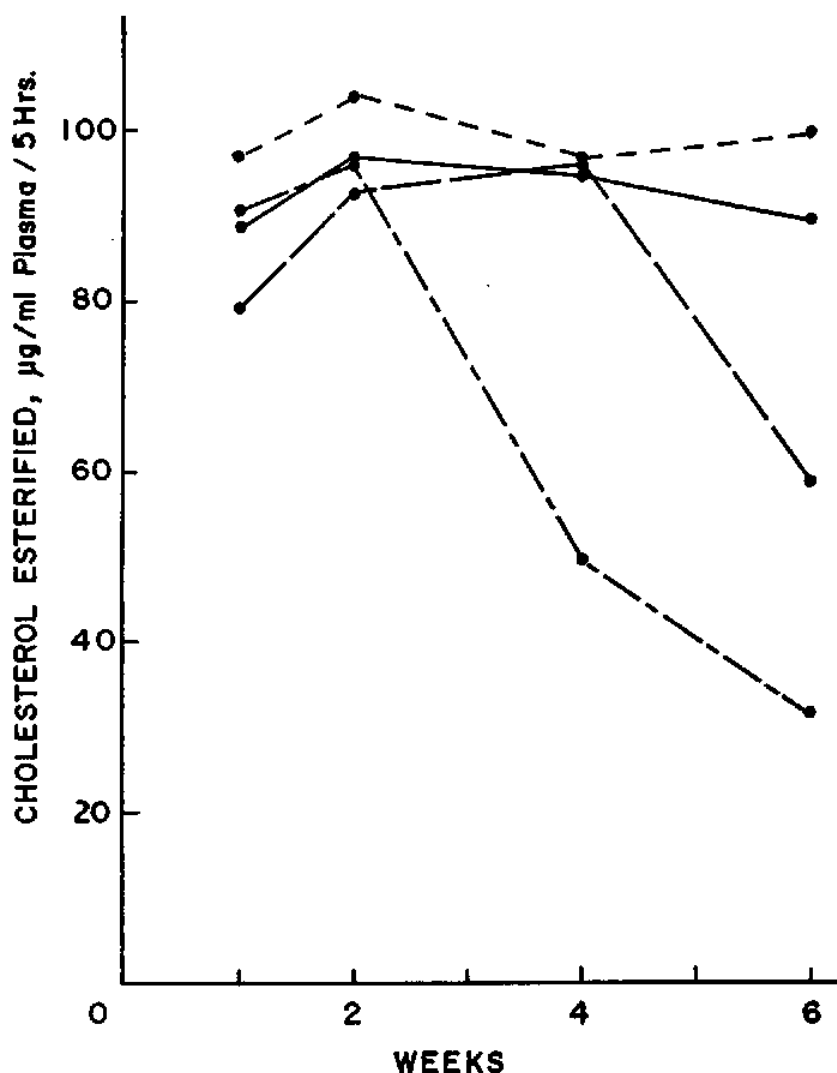


Fig. 5. Cholesterol esterification activity of plasma *in vitro* as a function of the duration of feeding various diets. ●—●; corn oil, ●---●; corn oil + cholesterol + cholic acid, ●····●; hydrogenated coconut oil, ●-·-·-●; hydrogenated coconut oil + cholesterol + cholic acid.

わち、コレステロールの濃度が高い血漿ではエステル化活性は低いようであった。第IV群の血漿の酵素活性は例外で、そのコレステロール・レベルが4~6週の間急激に低くなったにもかかわらず酵素活性はなお低下の傾向にあつた。

第III群血漿の活性は、必須脂肪酸を摂つた第I群よりやや高い値をもち、この傾向はこれより長期(10~20週)必須脂肪酸欠乏飼料を摂つたラットではより顕著であつた<sup>20)</sup>。飽和、不飽和脂肪のいずれを摂取して

も、コレステロール、コル酸の添加は血漿のエステル化活性を低下させた。しかしコレステロール、コル酸を投与した第II群と第IV群を比較すると、前者でかなり高いエステル化能が観察され、このことは必須脂肪酸の血漿コレステロール濃度低下効果の一因を示唆する。

## 2. Incubation 中に生成した種々のコレステロールエステル中の C<sup>14</sup> の分布

Fig. 6, 7 に前記のようにして薄層クロマトグラ



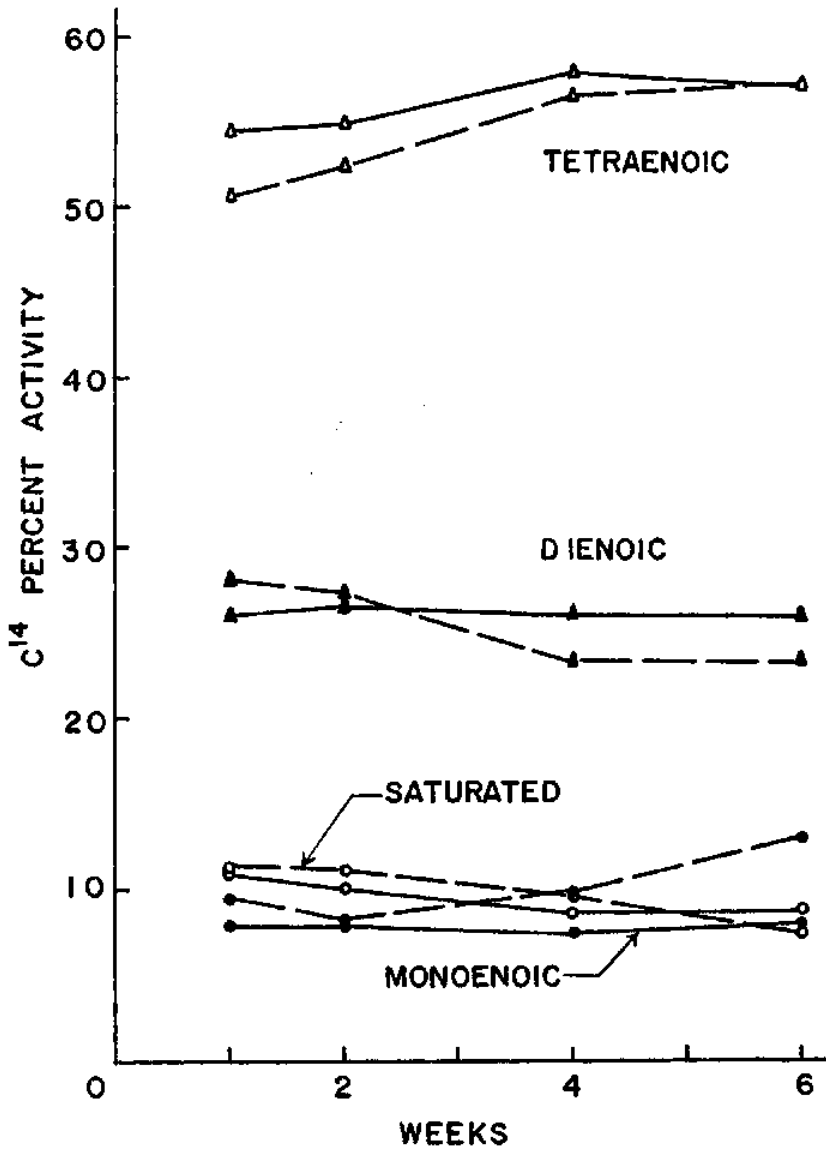


Fig. 6. Distribution of C<sup>14</sup>-cholesterol in subclasses of cholesterol esters as a function of the duration on various diets. — ; corn oil, - - - ; corn oil + cholesterol + cholic acid.

フィーによつて分別したコレステロールの各種脂肪酸エステル中のC<sup>14</sup>の%分布をしめた。

第I群の血漿で、*in vitro*で生成したコレステロールエステルの放射能のパターンは、第II群の結果とよく類似した。しかし次の区分でかなりの差があつた。すなはち、第II群のリノール酸および飽和酸エステルのC<sup>14</sup>-活性はコレステロール・コール酸食期間の延長とともにやや低下し、モノ不飽和酸エステル区分の

活性は増加の傾向にあつた (Fig. 6)。

第III, IV群では第I, II群ときわめて異なるC<sup>14</sup>分布を示したが、C<sup>14</sup>の%分布は全実験期間を通じ第III, IV群間で同様の傾向を示した。モノ不飽和酸エステル区分中のC<sup>14</sup>は経時的に増加し、トリおよびテトラ不飽和酸では低下した。全活性の50~80%はモノ不飽和酸エステル区分で占められたが、このエステルは必須脂肪酸欠乏ラットの血漿のコレステロールエス

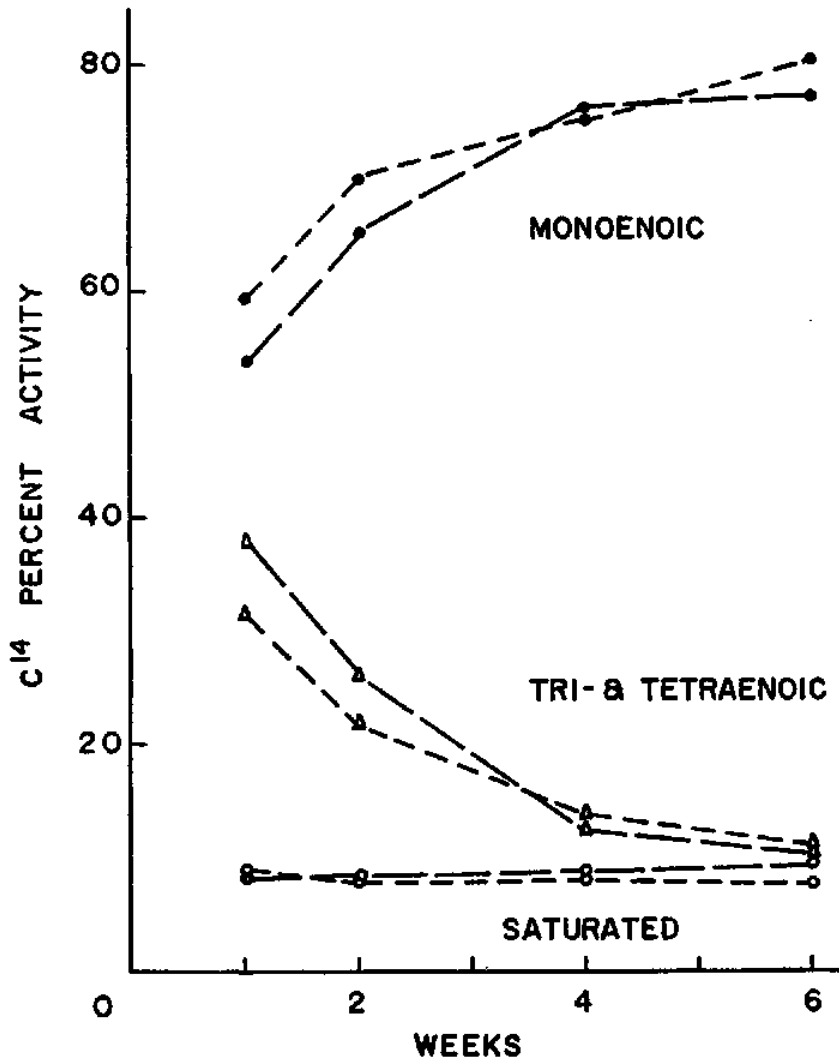


Fig. 7. Distribution of C<sup>14</sup>-cholesterol in subclasses of cholesterol esters as a function of the duration on various diets. ----- ; hydrogenated coconut oil, - - - - ; hydrogenated coconut oil + cholesterol + cholic acid.

テル中に特異的に蓄積することはよく知られている。

### 3. 基質・生成物の濃度と酵素活性の関係

必須脂肪酸欠乏ラットの血漿におけるエステル化活性の変化に関し、基質（コレステロールおよびリン脂質）と生成物（コレステロールエステル）の反応系中の濃度の、この酵素活性に及ぼす影響をしらべるために、いわゆる“Common Substrate”法を用いて追究した。<sup>10)</sup> 60°Cで30分間窒素気流中で加熱し、エステル化活性を失活させた血漿を Celite 545 にのせたコレステロール-4-C<sup>14</sup>とともに37°Cでincubation

した後の上澄を基質として用いた。この基質が血漿におけるコレステロールのエステル化反応に際し優れた基質となることは詳細に報告した。<sup>10)</sup> 活性血漿（加熱してないもの）0.2 ml.を上記の如くして得た基質0.1~1.0 mlと37°Cで3時間incubationした（最終液量を1.2 mlとなるように0.1 Mリン酸カリ緩衝液、pH 7.4を加えた）。

Fig. 8に結果を示したが、ラベルした基質濃度の増加とともに酵素活性はわずかながら上昇した。従つて、活性血漿の酵素活性が、反応液系中の基質、生成

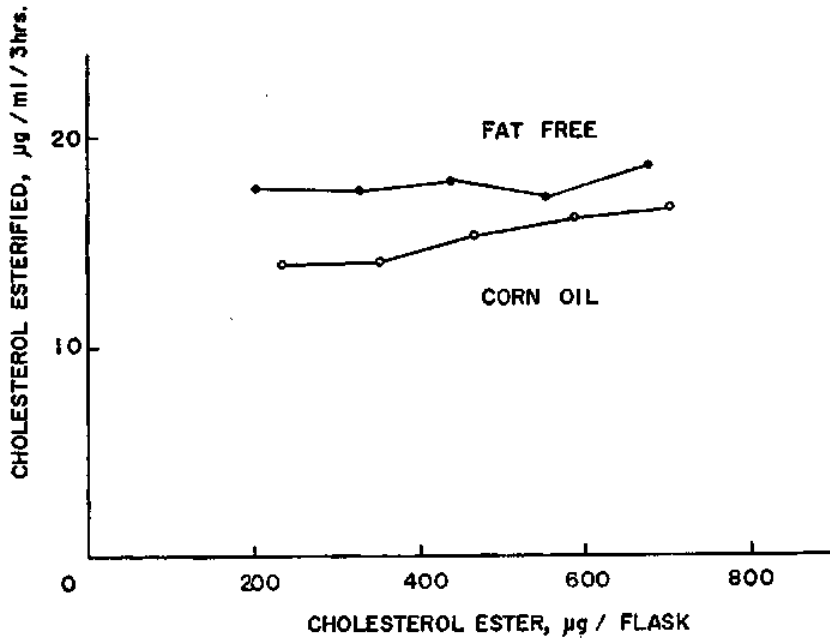


Fig. 8. Relationship between level of substrate (cholesterol) or product (cholesterol ester) and esterification activity. Two-tenths ml of unheated plasma was used in all flask containing a 1.0 ml addition as varying mixtures of inactivated plasma (containing cholesterol-4-C<sup>14</sup>) from rats fed chow diet and 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4.

物の濃度で抑えられることは考え難い。つまり、必須脂肪酸欠乏によるラット血漿のコレステロール・エステル化酵素活性の増加、あるいはコレステロール・コル酸食によるエステル化能の低下は血漿のコレステロールのレベルからだけでは説明され難い。Fig. 8 に示した結果はトウモロコシ油 (5%) あるいは無脂肪飼料を 8 週間摂取したラットから得たものであり、無脂肪食ラットでは Celite 法におけると同様高い活性を示した。基質は保存食ラットより得た。

#### 4. 血漿のコレステロールエステルの脂肪酸組成

6 週間 4 種の実験食を摂取した各群のラット血漿のコレステロールエステルの脂肪酸組成を Table 2 に示した。% で比較した場合第 II 群では第 I 群と比べアラキドン酸の減少が著しい。これに反しオレイン酸、パルミトオレイン酸が著増した。血漿のコレステロールエステルの濃度は第 II 群では著増しているが、血漿 1 ml あたりのアラキドン酸エステルの絶対量に換算しても第 I 群、第 II 群でそれぞれ 264 µg, 115 µg で、かなりの差が認められた。

第 III 群ではアラキドン酸量は極めて少なく C<sub>20</sub> の

トリ不飽和酸の蓄積が認められ、またパルミトオレイン酸、オレイン酸の量が多い。第 IV 群では第 III 群に比べアラキドン酸、C<sub>20</sub> トリ不飽和酸量はともに極めて少なく、モノ不飽和酸が激増した。コレステロール・コル酸を摂取した場合、投与脂肪が全く異なついても、コレステロールエステルの脂肪酸組成にはかなりの共通点があることがわかる。

#### 5. Incubation 前後におけるコレステロールエステルの脂肪酸組成の変化——エステル化された脂肪酸の性状

ラット血漿のコレステロール・エステル化酵素の活性は必ずしも血漿のコレステロール濃度のみ影響されないことを先に記した。またラット血漿におけるコレステロールのエステル化の脂肪酸特異性の研究で、この酵素はアラキドン酸を特異的に優先してエステル化することが認められた。<sup>28)</sup> したがって、この酵素活性に及ぼす種々の要因の一つとして考えられる incubation 中にエステル化された脂肪酸の性状をしらべるため次のような実験を行なった。

すなはち、incubation 前後のコレステロールエス

Table 2. Fatty acid composition of plasma cholesterol esters and the nature of fatty acids transesterified to plasma cholesterol during the incubation.<sup>1)</sup>

(Percent of total fatty acids)

	14:0 <sup>2)</sup>	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4
Group I <sup>3)</sup>										
Pre	1.7	—	18.8	4.3	1.6	10.2	18.5	tr.	—	42.7
Post	2.0	—	18.6	4.5	1.8	9.2	19.5	tr.	—	43.2
Increase, % <sup>4)</sup>	3.7	—	16.7	5.3	3.3	2.9	24.5	—	—	43.7
Group II										
Pre	1.4	3.8	14.7	15.1	0.3	40.4	15.7	tr.	—	7.1
Post	0.9	0.2	12.2	14.2	0.8	46.9	15.2	tr.	—	9.0
Increase, %	3.1	* <sup>5)</sup>	12.8	0	3.2	61.9	2.8	—	—	16.4
Group III										
Pre	2.4	1.1	16.4	27.2	1.3	25.2	1.9	1.1	15.5	6.8
Post	3.8	0.2	17.5	26.6	2.0	25.8	2.1	0.9	15.1	5.2
Increase, %	10.1	*	21.3	21.3	5.2	26.5	3.4	0	12.3	0
Group IV										
Pre	2.8	0.7	23.2	19.3	1.8	50.9	0.2	0.1	0.4	0.1
Post	1.3	0.1	24.6	19.1	1.6	52.1	0.2	0.1	0.5	0.2
Increase, %	*	*	42.3	4.8	*	49.2	0	0.5	1.6	1.6

- 1) Mean of 3 rats per group, 6 weeks on experimental diets.
- 2) First figure indicates carbon number and the second indicates number of double bond. Small amounts of fatty acids unidentified was present in addition to the fatty acids described here.
- 3) Group I; corn oil, Group II; corn oil+cholesterol+cholic acid, Group III; hydrogenated coconut oil, Group IV; hydrogenated coconut oil+cholesterol+cholic acid.
- 4) Weight percentage of total fatty acids transesterified to cholesterol assuming exchange to be minor in comparison with net transfer. The total amount of fatty acids transesterified to cholesterol calculated on the basis of increases in esterified cholesterol during the plasma incubation at 37°C for 5 hours.
- 5) This indicates the decrease in the relative amount of the fatty acid ester of cholesterol during the plasma incubation.

テルの脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーによつてしらべた。Interexchange による脂肪酸の組成変化は、エステル化された量に比較して無視できる位少ないと推定して、エステル化された種々の脂肪酸の量は incubation 前後でのコレステロールエステルの差から求めた。結果は Table 2 に併記したが、これらの研究は実験食を6週間摂取したラットについて行なつた。

まずコレステロールエステルを構成する脂肪酸の組成(重量%)を incubation 前後で比較した。第I群では incubation 中にオレイン酸は減少し、リノール酸は増加した。この結果は保存食をとつたラットでの Glomset の結果<sup>6)</sup>とよく一致するが、飽和酸量にははっきりした変化はなかつた。第II群ではオレイン酸は増加し、パルミチン酸は減少した。第III群、第IV群では incubation 前後で脂肪酸組成に著しい変化はなく、ただ第IV群でオレイン酸がわずかに増加するようであつた。

ついで incubation 中に増加した脂肪酸の性状をし

らべた。第I群では incubation 中に増加した脂肪酸の65%以上は高度不飽和脂肪酸(リノール酸、アラキドン酸)で占められていた。またかなりの量の(17%)のパルミチン酸の増加がみられたが、他の脂肪酸の増加は僅少であつた。第II群では、これに反し増加した脂肪酸の60%以上はオレイン酸でみられ、アラキドン酸、パルミチン酸の増加も認められたが、リノール酸量は殆んど変化しなかつた。

第III群では必須脂肪酸欠乏に特異的な C<sub>20:3</sub> 酸を除いて、高度不飽和酸の増加はなく、モノ不飽和酸(オレイン酸、パルミトオレイン酸)、飽和酸(パルミチン酸)での増加は著しく、約70%を占めた。この傾向は第IV群では更に顕著で、オレイン酸およびパルミチン酸の増加のみ観察され、両者で全増加の90%以上を占めた。

Glomset<sup>6)</sup>は *in vitro* でコレステロールにエステル化された脂肪酸の組成は、血漿のリン脂質の C<sub>2</sub> 位の脂肪酸組成とよく類似することを報告している。した

がつて、Table 2 に示した各脂肪酸の増加から、リン脂質の C<sub>2</sub> 位の脂肪酸組成も推測できる。

以上の結果から血漿脂質の脂肪酸組成が、エステル化酵素の活性に大きな影響をおよぼすことがうかがわれる。第I群と比べた場合に、第II群でのエステル化活性が著るしく低いことは、第II群血漿中のアラキドン酸のレベルが第I群と比べ極めて低いことに一因があると考えられる。何故なら、ラット血漿ではアラキドン酸をエステル化する活性が非常に高く、したがつ

てそのエステルの代謝は速やかであると考えられるからである。<sup>20)</sup>

#### 6. 新生した コレステロールエステルの Specific Activity

種々の食餌を与えた場合のラット血漿のコレステロール・エステル化酵素の脂肪酸特異性を追究した。Incubation 中にエステル化された C<sup>14</sup>-コレステロールの量は前記したように各群によつて大差があるので、specific activity は次のように表示することにした。

$$\text{Specific activity} = \frac{\% \text{C}^{14} \text{ activity in each cholesterol ester fraction}}{\% \text{ composition of corresponding cholesterol ester fatty acids}}$$

実験期間4週および6週での上記のように定義した specific activity 値を Table 3 に示した。

Specific activity は各群で heterogeneous であることがわかる。In vitro でのラット血漿におけるコレステロール・エステル化活性とこの specific activity 値には大変興味ある相関があるようである。すなわち、第I群と第II群を比較した場合、実験食4週間では酵素活性には大差がなく、また specific activity にも差はない、しかし6週間後になると第II群ではエステル化活性は第I群に比べ著るしく低下し、同時にアラキドン酸エステルの specific activity がきわめて高くなる。つまりラット血漿のエステル化活性にアラキドン酸が重要な役割を演ずることを示唆する。他

方モノ不飽和酸の specific activity は実験食6週間後の第II群でその脂肪酸量の著増の結果第I群の約1/3になっている。

飽和脂肪あるいは、それにコレステロール・コール酸を加えた飼料を摂取した場合には、specific activity のパターンは第I、II群と極めて異なっている。最も顕著なのはモノ不飽和酸の区分で、第I、第II群と比べ約3~5倍の高い specific activity 値をもっている。一方第III群ではトリ、テトラ不飽和酸の specific activity が低いのに比べ、第IV群では非常に高く、ちょうど第I群と第II群の関係によく類似する。

Table 3. Specific activity of cholesterol esters after incubation of plasma with cholesterol-4-C<sup>14</sup>.<sup>1)</sup>

	Cholesterol esters <sup>2)</sup>				
	Saturated	Monoenoic	Dienoic	Trienoic	Tetraenoic
( $\frac{\text{C}^{14}\text{-activity} \text{ -- } \% \text{ in specific band}}{\text{Fatty acid} \text{ -- } \% \text{ of ester cholesterol fatty acids}}$ )					
Cholesterol esters <sup>2)</sup>					
Corn oil (Group I)					
4 weeks	0.56	0.30	1.30		1.45
6 weeks	0.40	0.57	1.32		1.30
Corn oil + cholesterol + cholic acid (Group II)					
4 weeks	0.64	0.38	1.20		1.92
6 weeks	0.53	0.20	1.47		6.27
Hydrogenated coconut oil (Group III)					
4 weeks	0.43		1.30		0.69
6 weeks	0.34		1.48		0.51
Hydrogenated coconut oil + cholesterol + cholic acid (Group IV)					
4 weeks	0.25		1.11		9.10
6 weeks	0.35		1.09		15.00

1) Mean of 3 rats per group.

2) Saturated esters of cholesterol contain the palmitate, stearate and myristate esters, Monounsaturated; oleate and palmitoleate esters, dienoic; linoleate ester, trienoic; eicosatrienoic acid ester, tetraenoic; arachidonate ester. Only rats which had received hydrogenated coconut oil diets contained eicosatrienoic acid esters.

Incubation 後のコレステロールエステル中の必須脂肪酸(リノール酸, リノレイン酸, アラキドン酸)のレベルを Table 4 に示したが, この表と酵素活性を比較すればわかるように, 高度不飽和酸がラット血漿のエステル化活性に重要な役割を持つことが再確認されよう。

Table 4. Essential fatty acid contents of plasma cholesterol esters.<sup>1)</sup>  
(Percent of total fatty acids)

Week	Group <sup>2)</sup>	I	II	III	IV
4		59.3	48.6	14.7	2.2
6		62.9	24.2	8.3	0.4

- 1) Fatty acid composition analyzed after the plasma incubation at 37°C for 5 hours. Mean of 3 rats per group per each experimental period. Essential fatty acids include linolic, linolenic, and arachidonic acids.
- 2) Group I; corn oil diet, group II; corn oil + cholesterol + cholic acid, group III; hydrogenated coconut oil, group IV; hydrogenated coconut oil + cholesterol + cholic acid.

## 考 察

コレステロール・コール酸を授与した場合に, 血漿の胆汁酸のレベルが高くなることは当然考えられる。Sperry<sup>25)</sup> は胆汁酸が血漿のコレステロール・エステル化酵素の活性を阻害することを報じているので, コレステロール・コール酸をとつたラット血漿でのエステル化活性の低下が, 血漿の胆汁酸濃度の上昇によるのではないかと推察された。6週間実験食を摂取したラット血漿中の胆汁酸濃度を半定量的に測定したが,<sup>15)</sup> Sperry がコレステロールのエステル化阻害を観察した場合の濃度よりはるかに低かつた。したがって, 胆汁酸のレベルが, 酵素作用に影響を及ぼすにしても, 本実験の結果は, そのレベル変化だけでは説明されない。

種々の原因による肝臓機能の低下によつて, 血漿のエステル化酵素の活性が, 低下することが報告されている。<sup>4, 16)</sup> 一方, コレステロール, とくに飽和脂肪との同時摂取は肝臓脂肪を著増させる。血漿のエステル化酵素は肝臓に起源することが知られているから,<sup>9)</sup> このような肝臓脂肪の蓄積(とくに必須脂肪酸欠乏の場合のモノ不飽和酸, C<sub>20</sub> のトリ不飽和酸の増加)ならびに肝臓の細胞構造の変化(たとえばミトコンドリア膜の変化<sup>12, 13, 24)</sup>)等が肝臓におけるこの酵素の生成, あ

るいは血中への放出に影響を及ぼすことが考えられた。また, 血漿のエステル化酵素活性の大半は高密度リポ蛋白質とともに存在するが,<sup>7, 28-31)</sup> 種々の原因による血漿の脂質成分, とくにコレステロール, トリグリセリドなどの増加は, 主に低密度リポ蛋白質での増加によることは周知の事実である。したがって, この両リポ蛋白質の相対的かつ絶対的レベルが, 血漿の酵素活性に影響することは当然推測される。

第 I, 第 II 群を比較した場合, 血漿のコレステロールエステルの脂肪酸中アラキドン酸量のコレステロール・コール酸食による減少は著しい (Table 2 参照)。肝臓と比べて血漿のコレステロールエステルがより高度不飽和酸に富むことや, 血液-肝臓系におけるアラキドン酸エステルの速かな動移<sup>29)</sup> などから, 高度不飽和酸の血漿のコレステロールエステルの代謝に対する役割の特異性がかうがわれる。Morin ら<sup>17)</sup> は棉実油飼料にコレステロールを添加することによつて, ラット肝臓におけるコレステロールのアラキドン酸エステルの生成が増加することを報じている。コレステロールの負荷は, 肝臓におけるアラキドン酸エステルの生成を増し, 同時に血中への移動もますと考えている。著者らの本研究では, 6週間実験飼料をとつた場合, コレステロール・コール酸を摂取した第 II 群では, トウモロコシ油だけの第 I 群に比べエステル化能は約 1/2 に低下し, 同時にコレステロールエステル中のアラキドン酸の絶対量も 1/2 であり, モノ不飽和酸エステルのそれは約 10 倍であつた。これらの結果から, ラット血漿におけるコレステロールのエステル化反応でアラキドン酸エステルの生成が特異的に優位に行なわれ, モノ不飽和酸エステルの生成が比較的低いことを考えると,<sup>29)</sup> 必須脂肪酸含有油脂と同時にコレステロール・コール酸を摂取した場合でのエステル化能の低下も説明づけられよう。また肝臓からのこの酵素の放出程度の違いにもよるであろう。<sup>29)</sup>

必須脂肪酸欠乏食ラットでは肝臓における血漿酵素の生成, ならびに血中への放出が早められ, その結果必須脂肪酸欠乏食ラットの血漿のエステル化酵素の活性が高まると考えられる結果を先に得た。<sup>20)</sup> 必須脂肪酸欠乏食にコレステロール・コール酸を添加すると酵素活性は著しく低下した。この場合必須脂肪酸欠乏に特異的な C<sub>20</sub> トリ不飽和酸エステルの血漿中の含量は著しく低下し, モノ不飽和酸が著増した。これらのことから, 血漿のエステル化酵素が, 血漿の, そして恐らくは肝臓脂質の脂肪酸組成によつてもかなり影響されることがわかる。

第 I, II 群ラット血漿により *in vitro* で生成したコレステロールエステルの specific activity ( $C^{14}$  %/脂肪酸 %) を 6 週間と比較してみると, 第 II 群ではアラキドン酸エステルの specific activity は第 I 群の約 5 倍高いことが認められた. Fig. 3 に示した  $C^{14}$  のコレステロールエステル中の分布が経時的に不変であることを考慮すれば, 血漿におけるコレステロールのエステル化に際し, アラキドン酸エステルの生成が特異的に優先することが再確認できよう. 一方飽和脂肪を摂取したラットの血漿ではモノ不飽和酸エステルの specific activity は不飽和脂肪を摂ったラットの結果と比べかなり高い. また第 IV 群では第 II 群におけると同様に高度不飽和酸エステルの specific activity が著るしく高くなつた. この点も血漿におけるコレステロールのエステル化と脂肪酸特異性の関係の一端を示唆する. 必須脂肪酸欠乏は肝臓から血液への酵素の放出を速やかにするようであつたが,<sup>20)</sup> この場合, 血漿の酵素は必須脂肪酸を摂った場合とは逆に, モノ不飽和酸をより特異的にエステル化する能力をもつようであつた.

先にラット血漿におけるコレステロール・エステル化反応の脂肪酸特異性の研究で, 著者はリポ蛋白質態コレステロール-4- $C^{14}$  を静注した直後, 血漿のコレステロールのアラキドン酸エステルが高い specific activity をもつことを報告した.<sup>20)</sup> 一方肝臓でも注射直後で (1 時間まで) アラキドン酸は高い specific activity をもち, 後には低くなることを認めた. この結果は, 肝臓の, 恐らくは endoplasmic reticulum においてコレステロールのアラキドン酸エステルを優先的に生成し速やかに血流へ放出する系があることを示唆している.<sup>20)</sup> これに反し, 血漿の飽和, モノ不飽和酸エステルの specific activity は低く肝のそれは高い. 以上の結果および血漿のコレステロールエステルの脂肪酸組成から判断して, 血漿のコレステロール・エステル化酵素それ自体の血漿のコレステロールエステルのレベルと脂肪酸組成の保持に対する重要性がうかがわれた.

他方, 必須脂肪酸欠乏脂にコレステロール・コール酸を添加した飼料をとつた第 IV 群では, 飽和脂肪だけの第 III 群と比べ, 血漿のエステル化活性は低下し, 同時に  $C_{20}$  トリ不飽和酸の血漿のコレステロールエステル中のレベルも低下した. つまり血漿, 肝臓の脂肪酸組成, そして恐らくは肝臓の細胞構造と酵素活性の深い関連性を示唆する.

なお以上の研究では, 体内コレステロールのレベル

を, コレステロール無添加区との差をより顕著にするため,<sup>14)</sup> コール酸を同時投与した. したがつて, コレステロールだけあるいはコール酸だけ添加した場合の結果については論ずることができず, 結果の解釈にはいくらか制限がある. この点については目下研究中である.

## 総 括

*In vitro* におけるコレステロールの酵素的エステル化反応を, トウモロコシ油あるいは水添したココナツ油にコレステロールおよびコール酸を添加した飼料, あるいは無添加の飼料を摂ったラットの血漿について経時的に追究した.

1. 水添したココナツ油を投与すると, トウモロコシ油の場合と比べ血漿のコレステロールのレベルはやや低下し, エステル化能はわづかなら高くなつた.

2. 水添ココナツ油にコレステロール, コール酸を同時に添加すると, トウモロコシ油に添加した場合よりかなり低い酵素活性を示した. いずれの場合も, コレステロール, コール酸無添加と比べ酵素活性は著しく低かつた.

3. コレステロール, コール酸とトウモロコシ油あるいは水添ココナツ油の組み合わせは, 血漿中の高度不飽和酸エステル量を著しく減少させた. 血漿をコレステロール-4- $C^{14}$  と incubation した場合, 新生したこれら高度不飽和酸エステルの specific activity は著しく高くなつた.

4. 肝臓の機能のみならず, 血漿のコレステロール・エステル化酵素そのものが血漿のコレステロールエステルの代謝に大きな役割を演ずることが推測された. また食餌脂肪, ひいては血漿 (そして恐らくは肝臓) の脂肪組成が, この酵素の活性に大きな影響を及ぼすことが示された. 実験条件下におけるラット血漿のコレステロール・エステル化酵素の活性変化の要因について検討を加え考察を行なつた.

この研究は 1962—64 年, Postdoctoral Research Fellow として米岡 Harvard University, School of Public Health, Department of Nutrition で行なつたものの一部である. 著者の一人 O. W. Portman は現在 Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oregon, U.S.A. にて研究に従事である.

## 文 献

- 1) Avigan, J. (1959) J. Biol. Chem., 234, 787.

- 2) Barron, E.J., and Hanahan, D. J. (1958) J. Biol. Chem., **231**, 493.
- 3) Bennett, J. R. (1963) Biochim. Biophys. Acta, **70**, 465.
- 4) Brot, N., Lossow, W. J., and Chaikoff, I. L. (1962) J. Lipid Res., **3**, 413.
- 5) Cook, R. P. (1958) in "Cholesterol, Chemistry, and Pathology" (R. P. Cook, ed.) p. 145-180, Academic Press, New York.
- 6) Glomset, J. A. (1962) Biochim. Biophys. Acta, **65**, 128.
- 7) Glomset, J. A. (1963) Biochim. Biophys. Acta, **70**, 389.
- 8) Glomset, J. A., Parker F., Tjaden, M., and Williams, R. H. (1962) Biochim. Biophys. Acta, **58**, 398.
- 9) Goodman, D. S., Deykin, D., and Shiratori, T. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 1335.
- 10) Hanahan, D. J., Brockenhoff, H., and Barron, E. J. (1960) J. Biol. Chem., **235**, 1917.
- 11) Hanahan, D. J., Watts, R., and Papajohn, D. (1960) J. Lipid Res., **1**, 421.
- 12) Hayashida, T., and Portman, O. W. (1960) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **103**, 656.
- 13) Hayashida, T., and Portman, O. W. (1960) J. Nutrition, **81**, 103.
- 14) Hegsted, D. M., Andrus, S. B., Gotsis, A., and Portman, O. W. (1957) J. Nutrition, **64**, 571.
- 15) Josephson, B. (1935) Biochem. J., **29**, 1918.
- 16) Lossow, W. J., Shah, S. N., Brot, N., and Chaikoff, I. L. (1963) Biochim. Biophys. Acta, **70**, 593.
- 17) Morin, R. J., Bernick, S., Mead, J. F., and Alfin-Slater, R. B. (1962) J. Lipid Res., **3**, 432.
- 18) Portman, O. W., and Sinisterra, L. (1957) J. Exptl. Med., **106**, 727.
- 19) Portman, O. W., and Sugano, M. (1964) Arch. Biochem. Biophys., **105**, 532.
- 20) Rowen, R. (1961) J. Exptl. Med., **114**, 807.
- 21) Rowen, R. (1964) Biochim. Biophys. Acta, **84**, 761.
- 22) Rowen, R., and Martin, J. (1963) Biochim. Biophys. Acta, **70**, 396.
- 23) Shah, S. N., Lossow, W. J., and Chaikoff, I. L. (1964) Biochim. Biophys. Acta, **84**, 176.
- 24) Smith, J.A., and DeLuca, H. F. (1964) J. Cell. Biol., **21**, 15.
- 25) Sperry, W. M. (1935) J. Biol. Chem., **111**, 467.
- 26) Sperry, W.M., and Brand, F. C. (1955) J. Biol. Chem., **213**, 69.
- 27) Sperry, W. M. and Webb, W. (1950) J. Biol. Chem., **187**, 97.
- 28) Sugano, M. and Portman, O. W. (1964) Arch. Biochem. Biophys., **107**, 341.
- 29) Sugano, M. and Portman, O. W. (1965) Arch. Biochem. Biophys., **109**, 302.
- 30) 菅野道広, 知念 功, 和田正太 (1965) 日農化大会講演要旨, p. 127.
- 31) 和田正太, 菅野道広, 知念 功 (1965) 栄養と食糧, **18**, 17.

### SUMMARY

Enzymatic esterification *in vitro* of cholesterol by plasma was compared at timed intervals with rats fed on diets containing corn oil or hydrogenated coconut oil with or without the combination of cholesterol and cholic acid.

Feeding the completely saturated coconut oil resulted in slightly decreased levels of plasma cholesterol and higher levels of cholesterol esterifying activity than was present in rats fed corn oil. The combination of corn oil with cholesterol and cholic acid resulted in lower levels of plasma cholesterol and higher enzymatic activity than the combination of hydrogenated coconut oil and cholesterol and cholic acid.

The nature of fatty acids transesterified during the incubation was remarkably different in each group. In rats fed corn oil and cholesterol and cholic acid more than 70 % of the increase in fatty acids transferred were saturated and monounsaturated in contrast to a value of about 70 % polyunsaturated acids for rats fed corn oil alone. Feeding hydrogenated coconut oil alone or with cholesterol and cholic acid resulted in remarkable increases in saturated and monounsaturated acids during the plasma incubation.

The combination of cholesterol and cholic acid with corn oil or with hydrogenated coconut oil produced a remarkable decrease in plasma polyunsaturated acid esters. The fatty acid specificity of cholesterol esterification by rat plasma was significantly heterogeneous in every groups, and there were high specific activities of the polyunsaturated acid esters after incubation with cholesterol-4-C<sup>14</sup>.

It was suggested that plasma cholesterol esterifying activity itself as well as the liver func-



---

tions would have a possible significance on the metabolism of plasma cholesterol esters. Discussions were made on factors influencing the plasma cholesterol esterifying activity in rat plasma.