

## リポ蛋白質態コレステロール-4-C<sup>14</sup>の調製法および そのコレステロール代謝研究への応用

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/10.15017/22964>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 22 (2), pp.173-179, 1966-04. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## リポ蛋白質態コレステロール-4-C<sup>14</sup> の調製法 およびそのコレステロール代謝研究への応用

菅野道広・O. W. Portman

### A method for incorporating cholesterol-4-C<sup>14</sup> into lipoproteins *in vitro* and the use of the preparation for the turnover rate study of cholesterol

Michihiro Sugano and Oscar W. Portman

コレステロールの turnover rate の研究に際して、静注した場合生理的動行を示す種々のコレステロール-C<sup>14</sup> (あるいは-H<sup>3</sup>) 標品を調製することは、コレステロールが水不溶であるため非常に困難である。従来の研究では、懸濁溶液、乳化溶液 (表面活性剤などの使用)、超音波処理液などが用いられてきたが、いずれも静注した直後に放射能の生理的な消失曲線を与えなかつた。Porte, Havel<sup>1)</sup> は、アルブミン溶液にコレステロール-C<sup>14</sup> のアルコール溶液を瞬間的に混合して得た標品が犬の場合生理的消失曲線を与えることを報告しているが、静注直後の結果については詳しい実験を行なっていない (後述するが、彼らの方法で調製した標品をラットに静注しても注射直後では非生理的代謝曲線は得られなかつた)。

コレステロールは血液循環系内ではリポ蛋白質態として存在している。従つてその turnover rate 研究のためには血液系に存在すると同じ性状の標品を作ることが重要である。個体のコレステロールを血清と振とうした際に、そのごく少量が溶出することは古くから知られていたが<sup>2)</sup> この過程の詳細は全くわからず、かつ見過ごられていた。Avigan<sup>3)</sup> は、この点に注目して、コレステロールを含めて種々の固形脂質を血清リポ蛋白質中にとりこませる研究を行ない、脂質の *in vivo* での代謝実験に生理的動行を示す標品を得た。彼は血清を、種々の C<sup>14</sup>-脂質をのせた (coating) Celite と共に 37°C で振とうしてリポ蛋白質態の C<sup>14</sup>-脂質を得ている。

この際注意すべきことは、種々の動物血清をその体温附近で incubation すると、血清中に存在する酵素の作用でコレステロールのエステル化が起り、かなりの量がエステル型となる点である。<sup>13, 18)</sup> またリポ蛋白質におけるコレステロールの交換も起る。<sup>19)</sup> 従つて、

遊離コレステロールの代謝を研究するにあつてはこのエステル化活性をなくして、リポ蛋白質態の遊離の C<sup>14</sup>-コレステロール標品を得ることが必要である。

この報告では Avigan 法<sup>3)</sup> を応用して、固体のコレステロール-C<sup>14</sup> を遊離型のままで血漿のリポ蛋白質にとりこませる方法を考案した。得られた標品をラットに静注した場合、コレステロール-C<sup>14</sup> の血漿からの消失曲線は注射直後から生理的曲線を画き、コレステロールの代謝研究に広く利用しうることが認められた。

### 実験方法

#### リポ蛋白質態遊離型コレステロール-C<sup>14</sup> の調製法:

調製法の大要は Avigan 法<sup>3)</sup> に従つたが、次の点に注意した。まず、incubation 中にコレステロール-4-C<sup>14</sup> がエステル化されるのを防ぐため種々の-SH 試薬 (血漿中のエステル化酵素には-SH 基が含まれており、活性に不可欠である)<sup>20)</sup> の使用を試みた。いずれも比較的高濃度の添加が必要で、かつ過剰量の試薬を除去するのに比較的長時間の透析を要するので、標品調製法としては優れた方法とは思えない。固体コレステロールの溶出化にはかなり長時間の振とうを要するが、この間にリポ蛋白質中のコレステロールの転移が起り、同時にリポ蛋白質の物理・化学的性状に変化を及ぼすことも考えられる。血漿中のコレステロールエステル化酵素は血漿供与動物の体温附近に酵素活性の最適温度をもつが、かなりの低温 (たとえばラットでは 10°C) でも活性が認められる。以上のような点を考慮して、0°C で、Celite に coat したコレステロール-4-C<sup>14</sup> rocker type shaker (台面振とう機) で振とうした。一般的にはヘパリン血漿 15 ml に対しコレステロール-4-C<sup>14</sup> 25  $\mu$ c をのせた 1 g の Celite 545

(予じめ稀塩酸で洗滌したもの)と共に1夜振とうした。ついで Celite を遠沈して除き上澄を標品とした。静注の方法は、動物(ラット)をエーテルで軽く麻酔させ頸静脈に注入した。注射液量は体重150~200 gのラットに対し通常 1 ml (1  $\mu$ c 位)とした。注射5分後より経時的に尾部静脈より採血した。

#### 注射標品の検定:

まずクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) で標品より脂質を抽出し, Sperry, Brand 法<sup>10)</sup>によつて純化した抽出液をシリカゲル G の薄層クロマトグラフィ-にかけた。<sup>12,13)</sup> C<sup>14</sup>-活性の98%以上は遊離コ

レステロールの位置に存在し, 約1.7%がコレステロールエステル中に含まれていた。一般的には添加したコレステロール-C<sup>14</sup>の30~70%が溶出された。

ついで, 超速心法<sup>9)</sup>によつてリポ蛋白質を  $d < 1.063$  および  $1.063 < d < 1.21$  の2区分にわけ, 両区分中の C<sup>14</sup>濃度を測定した。血漿に溶出されたコレステロール-C<sup>14</sup>の全活性の殆んどすべてはリポ蛋白質として存在し, その大部分(80%以上)は  $1.063 < d < 1.21$  区分に含まれていた。  $d > 1.21$  から  $\beta$ -リポ蛋白質 ( $d < 1.063$ )へ shift した。37°Cで incubation した場合には通常逆の shift がみられた。

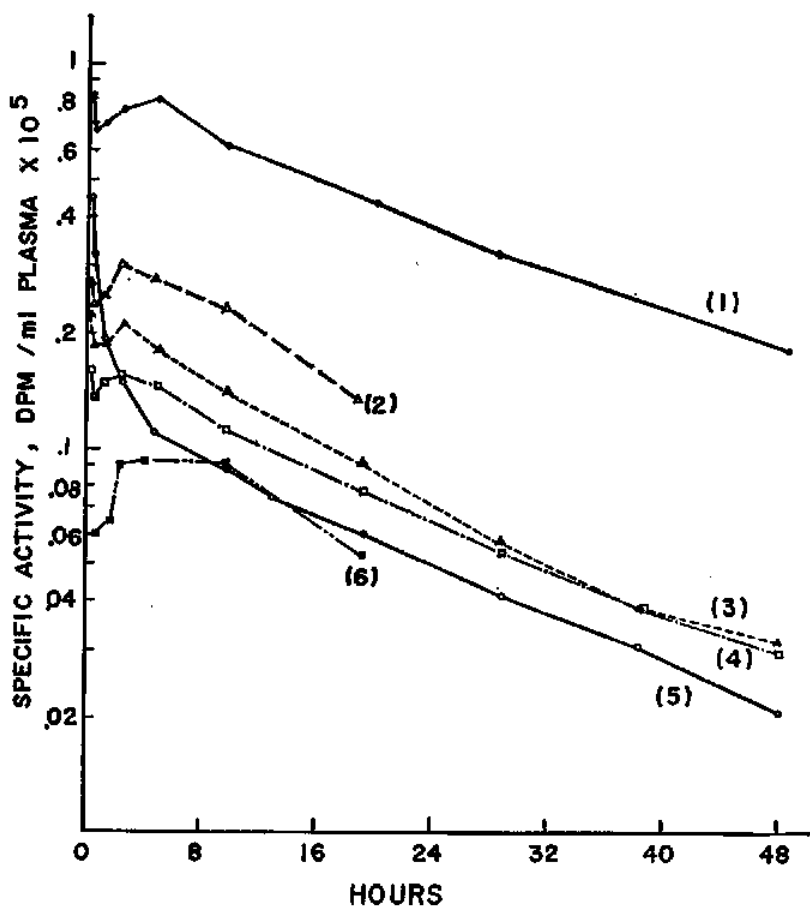


Fig. 1. Plasma concentration cholesterol-C<sup>14</sup> administered intravenously in various forms to rats.

- (1) Sonication of plasma with traces of cholesterol-4-C<sup>14</sup>.
- (2) Addition of cholesterol-4-C<sup>14</sup> in acetone to plasma or
- (3) heated plasma(60°C 30 min.),
- (4) Incubation of heated plasma with radiocholesterol on Celite.
- (5) Incubation of plasma with radiocholesterol on Celite at 0°C.
- (6) Stabilization of radiocholesterol with albumin.

コレステロールの定量は Sperry-Webb 法<sup>15)</sup>で、他の分析操作は前報に記した方法に従った。<sup>4,5)</sup>

### 結果および考察

#### 血漿からのコレステロール-4-C<sup>14</sup>の消失：

種々の方法で調製したコレステロール-C<sup>14</sup>標品をラットに静注して、血漿からの C<sup>14</sup>の消失曲線を求めた。実験方法に記した方法で調製したもの他、アルブミン複体<sup>9)</sup>、血漿または 60°C、30分加熱してエステル化酵素を失活させた血漿にコレステロール-C<sup>14</sup>のアセトン溶液を加えアセトンを蒸発させた標品、加熱血漿を Celite に coat したコレステロール-C<sup>14</sup>と incubation したもの（この方法でもかなりの量のコ

レステロール-C<sup>14</sup>の混合液を超音波処理したものなどを用いた。Fig. 1 に結果を示したが、低温 incubation 以外の標品では生理的なリポ蛋白質態コレステロール消失曲線は得られなかつた。すなはち、静注後最初の約10時間内で、血漿よりの C<sup>14</sup>の消失曲線はスムーズではなく、いくつかのピークが現れた。このような非生理的な消失は恐らく標品中に存在するコレステロール-C<sup>14</sup>が生理的に存在する血漿リポ蛋白質と異なる性状をもつことによると考えられる。0°Cで調製した標品では理想的なリポ蛋白質態コレステロールの消失曲線を示し、本標品中ではコレステロール-C<sup>14</sup>が生理的あるいはそれにきわめて近い状態で存在することを示した。

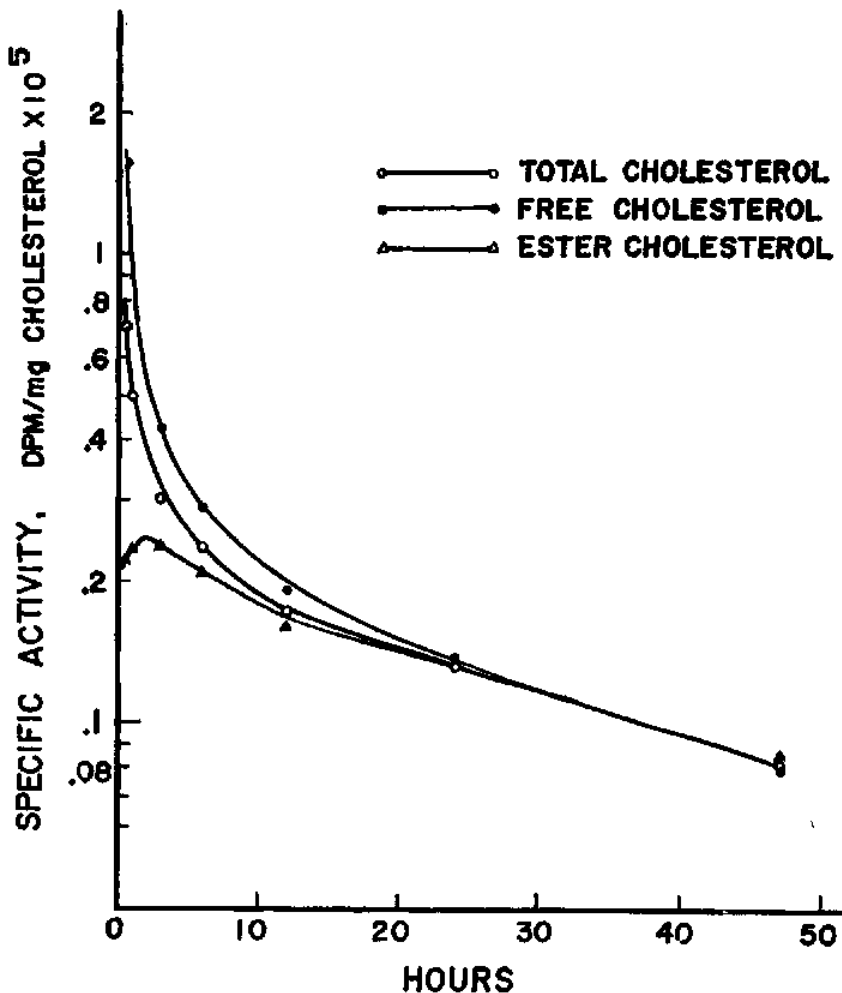


Fig. 2. Venous disappearance of C<sup>14</sup>, expressed as specific activity, after intravenous administration of lipoprotein bound free cholesterol-4-C<sup>14</sup> in rat.

### 静注したリポ蛋白質態 コレステロール- $C^{14}$ の種々の血液コレステロール成分との平衡：

前述したように、保存食を摂取しているラットの血漿を用いた場合溶出された全  $C^{14}$  活性の約1.7%がエステル型で存在したが、牛頸脂肪酸欠乏ラットの血漿の場合同一条件下で約3%がエステル型の中の  $C^{14}$  活性は、標品を静注した際に、血漿中のエステル型- $C^{14}$  の濃度には殆んど影響を及ぼさない。つまり、肝臓—血液におけるコレステロールエステル化酵素の活性はきわめて強く、僅少量のエステル型- $C^{14}$  の存在は無視できる。なお、通常体重 200 g のラットに 1.0  $\mu$ c (標品として 1.0 ml 内外)を静注し、各時間後に 0.1~0.2 ml を採血し、シンチレーションカウンターで  $C^{14}$  濃度を追跡すれば血漿中でのコレステロール- $C^{14}$  は十分経時的に追究できる。

Fig. 2 に本研究で用いた標品を静注した後の全コ

レステロール、遊離コレステロールおよびエステル型コレステロールの血漿よりの消失曲線を画いた。この曲線は、コレステロール生合成の前駆体である水溶性のメバロン酸塩- $C^{14}$  を注射したときの結果とよく類似する。<sup>10)</sup> 全コレステロールおよび遊離コレステロール中の  $C^{14}$  はほぼ同じ消失速度で減少した。エステル型は2時間後にピークをもち、以後漸時減少約して15~24時間後に遊離コレステロールと equilibrate された。

Fig. 3 に静注後経時的にラットを屠殺した場合の血液の種々の成分中でのコレステロール- $C^{14}$  の消失曲線を示す。 $\alpha$ -および  $\beta$ -リポ蛋白質中のコレステロール- $C^{14}$  の消失曲線は互によく一致し、かつ血漿のそれとも一致する。赤血中のコレステロールは、その大分(≒99%)が遊離型であるが、血漿のリポ蛋白質態コレステロール- $C^{14}$  との平衡は静注約6時間後に

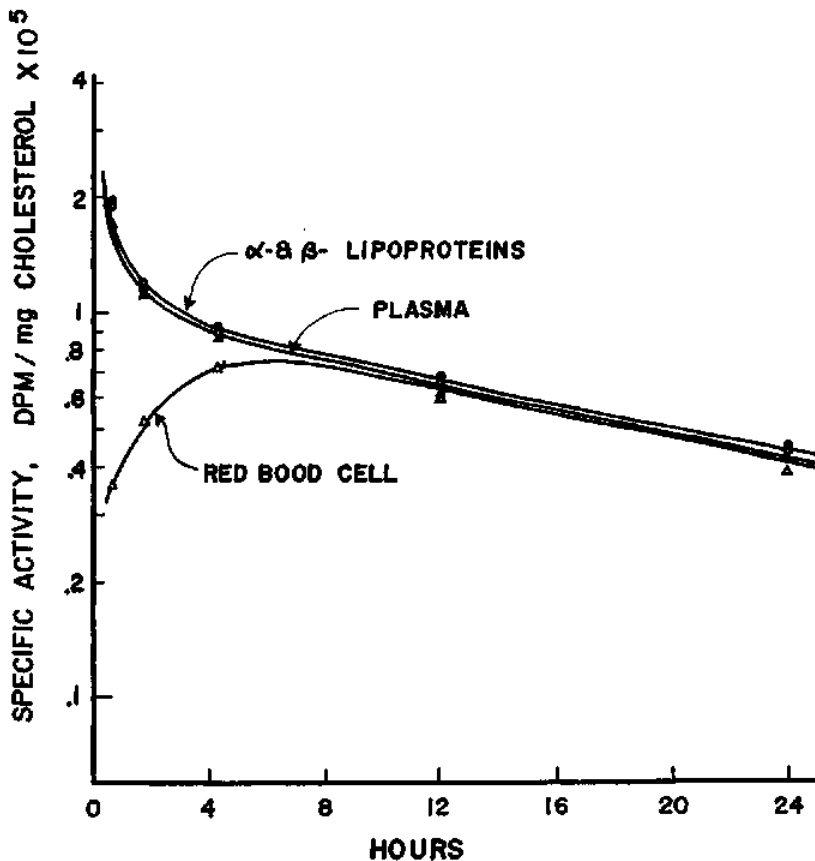


Fig. 3. Disappearance of  $C^{14}$  from subclasses of lipoproteins and red blood cells.

Since each point represents a separate rat, values are normalized to a constant dosage of radioactivity per unit body weight (1  $\mu$ c/100 g).

なされる。

このように個々の動物を経時的に屠殺して血液を得た場合でも、注射- $C^{14}$  量と体重に対する補正を加えれば消失曲線は一匹のラットから経時的に採血して得たものときわめてよく一致する。つまり用いたリポ蛋白質態コレステロール- $C^{14}$  が生理的性状をもち、かつ普辺性の高いものであることを示す。

**血漿のコレステロール- $C^{14}$  消失曲線の解析:**

Fig. 2 に示した血漿コレステロール- $C^{14}$  の消失曲線を一例にとつて解析した結果、この系は少なくとも3個の“compartment”よりなることが示された

(Fig. 4)。曲線は次式によつて表わされる。

$$X = C_1 e^{-b_1 t} + C_2 e^{-b_2 t} + C_3 e^{-b_3 t}$$

この系は Mathews によつて解析された“4 compartment mammillary system”に相当する。<sup>5,7)</sup>

Fig. 5 にその系を図示した。Central compartment ( $V_1$ ) は、血漿、血球中のコレステロールおよび肝臓の遊離コレステロールのようなきわめて交換(exchange)の速やかなコレステロールのプールに相当する。Compartment  $V_3$  と  $V_4$  は turnover rate が遅い他の血管外(extravascular)コレステロール・プールに相当する。Compartment  $V_2$  は主に排泄、お

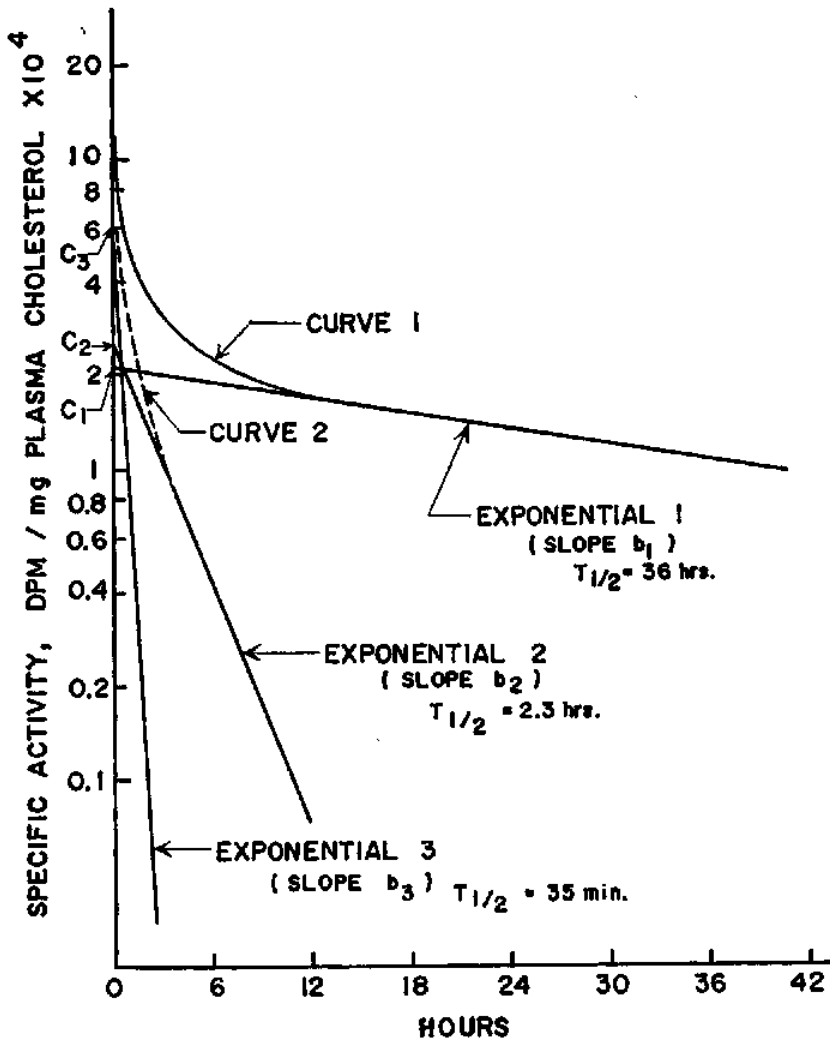


Fig. 4. Graphic resolution of the specific activity time curve of plasma cholesterol.

The curve appears to be resolved into components with slopes with slopes  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  and intercepts  $c_1$ ,  $c_2$ , and  $c_3$ , respectively.

よびコレステロールの移動交換がきわめて遅く且つ一方方向に限られ血管系 (intravascular) へもどつてこない系 (例えば central nervous 系) に相当する。つまり反応恒数  $K_{12}$  はコレステロールの排泄率 (excretory rate) と見なされる。

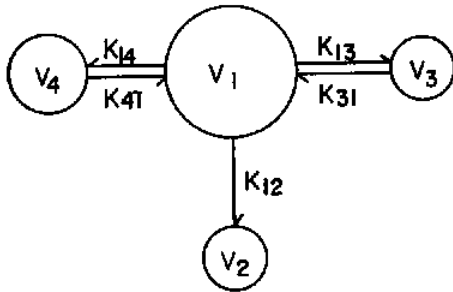


Fig. 5. Mammillary system of 4 compartments.

Compartment 1; Intravascular cholesterol (where cholesterol- $C^{14}$  was injected).

Compartment 2; Urine and faeces (excretory).

Compartment 3, 4; Extravascular cholesterol. The  $K$ 's are rate constants.

Fig. 4 に示したように、コレステロール- $C^{14}$  静注後の比較的短時間 (48時間以内) において、少なくとも3つの異なつた turnover time (half time) が算出された。すなはち、最も遅い区分の  $t_{1/2}=36$  時間、最も速やかな区分の  $t_{1/2}=35$  分、および中間の  $t_{1/2}=2.3$  時間である。本実験では静注後の比較的短時間内のコレステロール- $C^{14}$  の消失速度を求めたわけであるから、静注したコレステロール- $C^{14}$  が体内 pool のコレステロールと完全に equilibrate された時の excretory rate ( $K_{12}$ ) は求められない。またこれまでの血液-肝臓系での代謝研究では、リポ蛋白質態遊離型コレステロール  $C^{14}$  をラットに用いた報告がなく、上記の turnover time を対比することが困難である。<sup>8,14)</sup>

著者らは上記の方法で調製したりポ蛋白質態の遊離コレステロール- $C^{14}$  をコレステロール、特にエステル型の代謝に応用してすでに発表して<sup>17,18)</sup> さらにこの方法はエステル型コレステロール- $C^{14}$  の solubilization にも応用できる。この際血漿中に solubilize されるエステル型は非常に少ない (8%以下) が、 $C^{14}$ -活性の95%以上はリポ蛋白質態として存在する。<sup>10)</sup> また必須脂肪酸投与 (コーン油、およびリノール酸投与区) あるいは欠乏ラット (水添ココナツ

油、および無脂肪区) の血漿よりそれぞれ調製した標品をそれぞれのラットに再び静注した場合、注射後6~22時間における half time は前者で25~27時間、後者で18時間であつた<sup>11,18)</sup> “4-Mammillary compartment system” では、注射したコレステロール- $C^{14}$  の量 ( $D$ ) を  $C_1$  (Fig. 4 参照) で割つた値 ( $D/C_1$ ) は、投与量  $D$  が  $C_1$  で表わされる容積 (volume) によつて稀釈された割合を示す。静注長時間後におけるコレステロール- $C^{14}$  の血漿からの消失曲線の接線  $b_1$  の勾配は  $C^{14}$  が体内 pool コレステロールと equilibrate された際の excretory rate に相当するから、この比  $D/C_1$  は “exchangeable cholesterol pool” (ECP) と考えられる。したがつて必須脂肪酸欠乏のラットでは、 $C_1$  が必須脂肪酸投与ラットに比べ小さくなり、 $D$  を一定単位にとつて比較すると ECP の size も小さくなる。また接線  $b_1$  の勾配が大となるから、コレステロール- $C^{14}$  の排泄率も高くなるわけで Coaglio らの結果とよく一致する。<sup>4)</sup>

## 要 約

リポ蛋白質態遊離コレステロール- $C^{14}$  の調製法について記した。この標品をラットに静注した場合、血漿からの  $C^{14}$  の消失は注射直後より生理的曲線を画く。注射48時間後までの消失曲線は Matthews により解析された “4-compartment system” に相当した。エステル型コレステロールは静注12時間後で、また赤血球コレステロール (約99%は遊離型として存在する) 6時間以後に遊離コレステロールと equilibrate した。この標品は注射直後におけるコレステロール、とくに種々のコレステロール・エステル成分の代謝研究に応用の広いことが示された。

本研究は1962~64年、米同 Harvard University, School of Public Health, Department of Nutrition において Postdoctoral Research Fellow として行なつたものの一部である。著者の一人 O. W. Portman の現住所は、Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oregon である。

## 文 献

- 1) Avigan, J. (1958), *J. Biol. Chem.*, **234**, 787.
- 2) Bragdon, J. H., Havel, R. J., and Boyle, E. (1956), *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 36.
- 3) Casdorff, H. R., Juergens, J. L., Orvis, A. L., and Owen, C. A. Jr. (1963), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **112**, 191.

- 4) Coniglio, J. G., Blood, F. R., Youmans, W., Gibson, L., and Warnock, N. (1963), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **112**, 140.
- 5) Glomset, J. A. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 128.
- 6) Loeper, M., Lemaire, A., and Lesure, A. (1928), *Compt. rend. soc. biol.*, **98**, 101.
- 7) Matthews, C.M.E. (1957), *Physics in Med. & Biol.*, **2**, 36.
- 8) Phil, A., Blich, K., and Anker, H. S. (1950), *J. Biol. Chem.*, **183**, 441.
- 9) Porte, Jr., and Havel, R. J. (1961), *J. Lipid Res.*, **2**, 357.
- 10) Portman, O. W., and 菅野道広 (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 335.
- 11) Portman, O. W., and 菅野道広 (1964), *Fed. Proc.*, **23**, 553.
- 12) Portman, O. W., and 菅野道広 (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 532.
- 13) Rehnberg, C. S., and Nichols, A. V. (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 596.
- 14) Rittenberg, D., and Schoenheimer, R. (1937), *J. Biol. Chem.*, **121**, 235.
- 15) Sperry, W. M., and Brand, F. C. (1955), *J. Biol. Chem.*, **213**, 69.
- 16) Sperry, W. M., and Webb, M. (1950), *J. Biol. Chem.*, **187**, 97.
- 17) 菅野道広 and Portman, O. W. (1964), *Fed. Proc.*, **23**, 553.
- 18) 菅野道広 and Portman, O. W. (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 341.
- 19) 菅野道広 and Portman, O. W. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 302.

### Summary

A method is described for labeling plasma lipoprotein with radio-cholesterol. Almost all of the label is associated with high density lipoprotein as the free form. Lipoproteins labeled in this manner were injected intravenously into rats, and the distribution of cholesterol-4-C<sup>14</sup> was analyzed from a 24 to 48 hour study of plasmatic radioactivity, assuming a 4-compartment mammillary system. The venous disappearance curve of the radioactive cholesterol was physiological and was the type expected for free cholesterol in lipoproteins. The plasma cholesterol ester fraction was equilibrated within 12 hours after the intravenous administration of the label, and red blood cell cholesterol within 6 hours, with free cholesterol. It is indicated that the preparation prepared here can be applicable for the turnover study of cholesterol, particularly of the esterified form, in the blood-liver system.