

| | | | | |
|------------|---------------------------------|---------|---------|--------|
| 氏 名(本籍) | きの 木 | した 下 | みき 幹 | お 朗 |
| 学位の種類 | 博 士 (農 学) | | | |
| 学位記番号 | 農 博 第 5 0 2 号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平 成 7 年 3 月 24 日 | | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | | |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻 | | | |
| 学位論文題目 | 高脂血症におけるリポタンパク質脂質の 過酸化に関する研究 | | | |
| 論文審査委員(主査) | 教授 | 藤 本 | 健四郎 | |
| | 教授 | 目 黒 | 熙 | |
| | 教授 | 古 川 | 勇 次 | |
| | 助教授 | 宮 澤 | 陽 夫 | |

論文内容要旨

緒言

高脂血症（高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、複合型高脂血症）とくに高コレステロール血症と複合型高脂血症は、動脈硬化発症の主要な危険因子の1つとされる。すなわち、高脂血症によって血漿中に低密度リポタンパク質（LDL）と超低密度リポタンパク質（VLDL）が増えることにより、動脈硬化が引き起こされると考えられている。近年、動脈硬化の初期病巣にマクロファージ由来の泡沫化細胞が集簇していることが明らかになり、マクロファージの泡沫化が動脈硬化発症の有力な原因と考えられ、その泡沫化は、酸化変性したLDL（酸化LDL）がマクロファージのスカベンジャー受容体に取り込まれることで生じると考えられている。宮澤らは、化学発光-HPLC法を開発して、健常人の血漿中にリン脂質ヒドロパーオキシドが普遍的に50から200 nM存在することを明らかにしてきている。一方、酸化HDLでは泡沫細胞からのコレステロールの引き抜き能力が低下することが知られている。リン脂質は血漿リポタンパク質の表面に分布し、その主成分はホスファチジルコリンである。動脈硬化病巣から免疫して得られたモノクローナル抗体は酸化ホスファチジルコリンを認識し、*in vitro*実験ではリゾホスファチジルコリンでモノサイトのマクロファージ化が起きることなどから、血漿リン脂質すなわちリポタンパク質中のリン脂質の過酸化が動脈硬化の発症と進展の重要な因子と考えられた。同時に、リポタンパク質の脂質の過酸化を抑制する上で、抗酸化ビタミンであるビタミンEと、ビタミンC（アスコルビン酸）の血中での機能発現にも興味を持たれた。過酸化脂質と疾病の関係についてはこれまで多くの議論があるが、未だに明確な証拠は臨床試料については得られていない。また、高脂血症についても血漿過酸化脂質レベルの*in vivo*試料についての十分な知見は得られていない。

そこで、本研究では高脂血症（動脈硬化症を含む）における血漿中のリン脂質ヒドロパーオキシド（ホスファチジルコリンヒドロパーオキシド）の分布、構成脂肪酸およびビタミンE量を調査するとともに、PCOOHのリポタンパク質間での分布の違い、構成分子種を調べた。また動物実験で、血漿リポタンパク質の過酸化に与えるアスコルビン酸の影響を調べた。

第1章 高脂血症者の血漿ホスファチジルコリンハイドロパーオキシサイドの分布と高値

高脂血症者(90名、12歳~82歳、平均55歳)と健常者(40名、16歳~91歳、平均50歳)からEDTA採血で全血をえ、低温遠心分離(1000xg、4℃)して血漿を得た。血漿脂質は、クロロホルム-メタノール(0.002% プチルヒドロキシトルエンを含む)混液で抽出した。得られた血漿脂質をCL-HPLC(化学発光検出-高速液体クロマトグラフィー)に供し、リン脂質ハイドロパーオキシサイドを定量した。血漿 α -トコフェロールは蛍光-HPLC法で定量した。また、血漿トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質およびHDLコレステロールは、和光純薬製の市販キットで測定した。

その結果、高脂血症者の血漿PCOOHの平均値は350nMであり、健常者の平均値150nMと比較して、高脂血症者の方が有意に血漿PCOOHレベルが高いことをはじめて確認した(Fig.1、Table 1)。年齢別では高脂血症者の20-39歳で 207 ± 20 nM；40-59歳で 279 ± 23 nM；60-82歳で 370 ± 29 nMであり、一方、健常者の20-39歳で 133 ± 5 nM；40-59歳で 148 ± 1 nM；60-91歳で 178 ± 13 nMであった。高脂血症者、健常者とも高齢化とともに血漿PCOOH量が増加し、高脂血症者ではその増加が健常者より著しかった。また、冠状動脈造影検査を行った68人のうち、15人の動脈硬化症の発症が認められたが、発症者の方が血漿PCOOHレベルが有意に高かった(Table 2)。血漿脂質パラメーターで比較すると、血漿PCOOHとリン脂質量には相関が認められず、また血漿トリグリセリドやコレステロール量ともPCOOHは相関しなかった

(Fig.2、Fig.3)。高脂血症の表現型別の血漿PCOOHの分布量は、IIa型で 325 ± 34 nM、IIb型で 355 ± 31 nM、IV型で 370 ± 50 nMであり、コントロール群では 200 ± 10 nMであった(Table 1)。治療で血漿脂質値が正常化されたコントロール群の血漿PCOOH量、はすべて300nM以下に維持されていた(Table1、Fig.4)。

血漿の α -トコフェロール含量は、血漿当たりでは高脂血症者と健常者の間に差はなかった。しかし、血漿リン脂質に対する α -トコフェロールのモル比は、健常者が $12 \text{ mol} / 10^3 \text{ mol}$ リン脂質であったのに対し、高脂血症者では $8 \text{ mol} / 10^3 \text{ mol}$ リン脂

質であり、 α -トコフェロール量はリン脂質当たりで比較すると、健常者より高脂血症者で有意に低下することが認められた (Fig.6)。高脂血症者の血漿 α -トコフェロール含量は加齢とともに増える傾向があり (Fig.5)、血漿PCOOHの増加とともに α -トコフェロール含量も増加する傾向を示した (Fig.6)。高脂血症の表現型別の血漿 α -トコフェロール含量について、IIa、IIb、IV型およびコントロール群に分類した時の結果をTable 3に示す。表現型間では血漿当たりおよびリン脂質当たりともに差はなかったが、健常者より高脂血症者でリン脂質当たりの α -トコフェロール量が低値を示した (Table 3)。血漿ホスファチジルコリンの構成脂肪酸は、健常者で16:0、18:0、18:1 (n-9)、18:2 (n-6)、20:4 (n-6) および22:6 (n-3) であり、高脂血症者では健常者と比較して18:2と20:4が有意に減少していた (Table4)。

本研究で、高脂血症者の血漿PCOOH量は、健常者より有意に高いことがはじめてわかった。高脂血症者では、血漿リン脂質に対するPCOOH量の増加 (6×10^{-5} PCOOH/リン脂質 \rightarrow 12×10^{-5} PCOOH/リン脂質) が著しく、これはリポタンパク質分子あたりに換算しても、PCOOHが高脂血症では有意に増加していることを意味している。さらに、高脂血症者のうちでも動脈硬化の発症者の方が非発症者より、血漿PCOOHレベルが有意に高いことがはじめて定量的に明らかになった。高脂血症型で血漿PCOOH量の分布を調べると、治療で血漿コレステロールとトリグリセリド値が正常域にコントロールされた場合、血漿PCOOH量が300nM以下に維持されるケースが多かった。すなわち、血漿PCOOH含量の減少は動脈硬化発症の危険度の減少と正相関すると考えられた。血漿中の α -トコフェロール含量は、高脂血症者と健常者で差はなかったが、リン脂質当たりでは高脂血症者で低い傾向が認められた。このことは、リポタンパク質中の抗酸化成分の一つであるトコフェロール量が、健常者より高脂血症者で低下していることを示唆し、これは高脂血症者の血漿リポタンパク質が健常者のそれより過酸化を多く受けていることと直接関連すると思われた。

また、構成脂肪酸では、健常者と比較して18:2と20:4が減少していたことより、この2つの脂肪酸がPC分子中で過酸化の標的になっている可能性が考えられた。

第2章 高脂血症者の血漿リポタンパク質画分中のPCOOHの分布の特徴

第1章の研究で健常者より高脂血症者で、血漿PCOOH含量が有意に高いことが見いだされたので、本章では、リポタンパク質間でのPCOOHの分布の特徴を明らかにしようとした。

高脂血症者（平均年齢、55歳、n=15）から、EDTA採血により全血を得た。これを冷却遠心分離して血漿をえ、さらに超遠心段階浮上法(Fig.7)を用いて、血漿リポタンパク質をVLDL, IDL, LDL, HDL2, HDL3の5画分に分画した。それぞれのリポタンパク質画分から、脂質をクロロホルム-メタノール混液で抽出し、CL-HPLCに供してPCOOHを定量した。リポタンパク質のトコフェロール含量は蛍光-HPLC法で求め、トリグリセリド、総コレステロールおよびリン脂質は常法による比色法で定量した。

高脂血症者のリポタンパク質リン脂質あたりのPCOOH量はHDL2画分に最も多く、ついでIDL, HDL3, VLDL, LDLの順であることがはじめてわかった (Table 5)。また、リポタンパク質画分の間では、主要な構成脂肪酸に有意な差はなかったが、P/S比で示される不飽和度はHDL3が最も高かった (Table 6)。リポタンパク質中の脂溶性抗酸化成分である α -トコフェロールは、VLDLに最も多く、ついでIDLであったが、LDL, HDL2, HDL3の間に大きな差はなかった (Table 5)。各リポタンパク質画分について、PCOOH量と α -トコフェロール含量との相関を調べると、アポタンパク質Bを骨格タンパク質とするVLDL, IDLおよびLDLでは有意な相関は認められなかった (Fig.8)。しかし、アポタンパク質A-1を骨格成分とするHDL2とHDL3では、PCOOHとトコフェロール含量の間に強い正相関が見いだされた (Fig.9)。

本結果より、高脂血症では主にHDL2にPCOOHが多く蓄積していることがはじめて明らかになった。この知見は、PCOOHを多く含んでいる酸化変性したHDLでは、泡沫細胞からのコレステロールの引き抜き能力が低下すると考えられるため、このことが動脈硬化の発症とその進展に大きく関係すると推定された。

第3章 高HDL血症家系でのリポタンパク質におけるPCOOHの分布の特徴

高HDL血症は遺伝性の疾病であり、一般には長寿家系であると考えられている。しかし、表現型がホモの場合は逆に動脈硬化を誘発しやすいという報告もあり、いまだ統一の見解はなされていない。そこで本章では、高HDL血症家系について、家族間でのリポタンパク質におけるPCOOHの分布を調べた。

高HDL家系の家族6人（ホモ型2人、ヘテロ型2人、正常2人）および非血縁（配偶者）2人よりEDTA採血で血漿を得た（Table 7）。血漿の一部をアポタンパク質分画のためのアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し（Fig.10,11）、血漿リポタンパク質を、ApoB-100含有画分（VLDL,IDL,LDL）、ApoA-I含有-HDL（Lp-AI）、ApoA-II含有-HDL（Lp-A-I/A-II）の三画分に分画した。血漿および分画したリポタンパク質について、PCOOHはCL-HPLC法で、アポタンパク質は一元免疫拡散（SRID）法で、コレステロール、トリグリセリド、およびリン脂質は酵素法で、また、ビタミンEは蛍光-HPLC法で、それぞれ定量した。

家族内で比較すると、ホモ型のケースではヘテロおよび正常型より血漿PCOOH含量が著しく高いことがはじめて確認された（Table 8）。特に、ホモ型ではLp(AI/AII)画分にPCOOHが多く蓄積していることが特徴であった（Table 9）。以上の結果より、家族性の高HDL血症では、HDLのLp(AI/AII)画分にPCOOHが多く蓄積していることが明らかになり、前章の結果と考え合わせると、高脂血症の血漿PCOOHは、主にHDLに蓄積していると結論づけられた。

第4章 高脂血症者における血漿PCOOHの分子種

前章までの研究において、高脂血症者の血漿PCOOH値は健常者と比較して有意に高くかつ、HDL画分への分布が特徴的であることを明らかにしてきた。そこで本章ではさらに、高脂血症者の血漿およびリポタンパク質のPCOOHの分子種を調べた。

4-1 Isocratic-HPLCによるリン脂質クラスの分取条件の検討

逆相CL-HPLCに供するに当たり、リン脂質クラスを精度よく簡便、高純度かつ副

生物がない分画条件を検討した。その結果、 μ Bondapak-NH₂ (RCM-10, Waters) カラムを用い、ヘキサン-2-プロパノール-メタノール-水の溶媒系で、Isocraticに、PC、PEおよびSPM (スフィンゴミエリン) のそれぞれを分子種分析に供しうるレベルの高純度な画分に分離することにはじめて成功した (Fig.12,13)。

4-2 血漿PCOOHの分子種

健常者と高脂血症者の血漿PC画分 (PCOOHを含む) を、逆相CL-HPLCに供したときの化学発光クロマトグラムをFig.14 に示す。健常者、高脂血症者とも血漿中の主要なPCOOH分子種は16:0-18:2-OOH-PC、16:0-20:4-OOH-PC、18:0-18:2-OOH-PC および18:0-20:4-OOH-PCであった。高脂血症者では、18:2-OOH を含むPCOOH分子種の増加傾向が認められた。さらに、それぞれのリポタンパク質に分画してPCOOHの分子種を調べたが、リポタンパク質間のPCOOH分子種組成には大きな差はなく、全血漿と同様の組成であった。(Fig.15)。

第5章 アスコルビン酸摂取が血漿PCOOHに与える影響

アスコルビン酸は、ビタミンEとともに代表的な抗酸化ビタミンである。前章までの研究で、高脂血症者で血漿PCOOHが健常者より有意に高いことがわかったので、血漿中のアスコルビン酸量がリン脂質の過酸化に与える影響に興味をもち、ヒトと同様にアスコルビン酸合成能を欠くモルモットについて、摂取アスコルビン酸(AsA)量の血漿PCOOHレベルに与える影響を調べた。

5週令ハートレー系雄モルモットを4群に分け、飲料水1Lに、0mg (AsA-欠乏群、A)、50mg(低-AsA群、B)、500mg(コントロール群、C) および5000mg (過剰-AsA群、D) のAsAを添加し、22日間自由飲水させた。また飼料は、AsA欠乏食を自由摂取させた。その結果、実験飼育中のモルモットの体重増加は、AsA欠乏のA群と過剰AsAのD群で低く、最も高かったのはコントロールのC群であった (Fig.16)。また、AsA欠乏によって血漿脂質 (トリグリセリド、リン脂質、コレステロール) は、著しい増加を示した (Fig.17)。血漿AsA濃度は、摂取AsAを反映して

いた (Table 10)。モルモット血漿のリン脂質ヒドロパーオキシドは、ほとんどが PCOOHであったが、その濃度はコントロール群 ($27.2 \pm 5.0 \text{ nM}$)と比較して、AsA-欠乏群では3倍に増加し、低-ASA群とAsA-過剰群では1.5~2倍のPCOOHの増加が認められた (Table 10)。血漿 α -トコフェロール含量は、血漿リン脂質当りで比較するとAsA-欠乏群が最も低値であった (Table 10)。

本研究で、血漿中の過酸化脂質レベルがAsA摂取量に大きく影響されることがはじめて明らかになった。血漿PCOOHの増加は、高脂血症から動脈硬化への進展に密接に関与すると思われるが、本結果は、血漿中の抗酸化成分としてのAsAの重要な機能を示唆すると思われた。また、AsA欠乏は、高脂血症状態をもたらすとともに、動脈硬化の危険因子である血漿PCOOHの増加をきたすことをモルモットを用いた実験によって確認した。(Fig.18は、本研究結果を要約した。)

総括

本研究によって以下の新知見を得た。

1. 高脂血症者の血漿PCOOH量は、健常者より有意に高く、リポタンパク質分子あたりでもPCOOHは高脂血症で有意に増加していた。高脂血症者のうち動脈硬化発症者の方が非発症者より、血漿PCOOHレベルは有意に高かった。治療で血漿脂質値が正常域にコントロールされた場合、血漿PCOOH量が300nM以下に維持され、血漿PCOOHの減少は動脈硬化発症の危険度の減少と正相関し、血漿 α -トコフェロール量は、リン脂質当たりで高脂血症者で低く、これは、高脂血症の血漿リポタンパク質が健常者のそれより過酸化されやすいことと直接関連すると思われた。
2. 高脂血症では主にHDL2画分にPCOOHが多く蓄積していた。この知見は、PCOOHを多く含む酸化変性HDLでは、泡沫細胞からのコレステロールの引き抜き能力が低下するので、このことが動脈硬化の発症と進展に大きく関係すると推定した。
3. 家族性の高HDL血症ではホモ型においてHDLのLp(AI/AII)画分にPCOOHが多く蓄積していることが確認され、家族性高HDL血症においてもPCOOHのHDLへの蓄積が示唆された。
4. 高脂血症の血漿およびリポタンパク質の主なPCOOHの分子種は、18:2-OOHと20:4-OOHを含むものであり、その量は健常者より高値であった。
5. モルモットの実験で、アスコルビン酸欠乏は高脂血症状態をもたらすことによって血漿PCOOHの増大の原因になることを明らかにした。

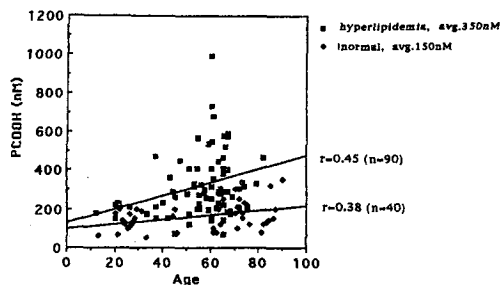


Fig. 1 Plasma PCOOH and age in hyperlipidemia

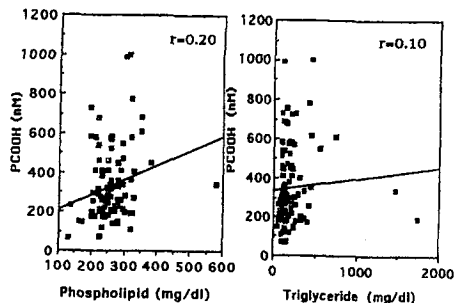


Fig. 2 Relationships of plasma PCOOH between phospholipid and triglyceride levels in hyperlipidemia

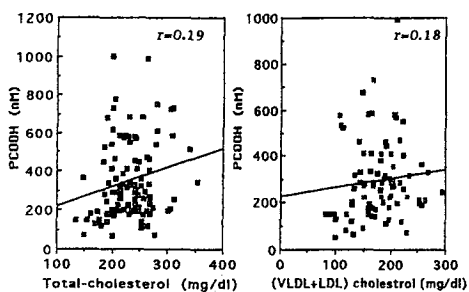


Fig. 3 Plasma PCOOH and cholesterol in hyperlipidemia

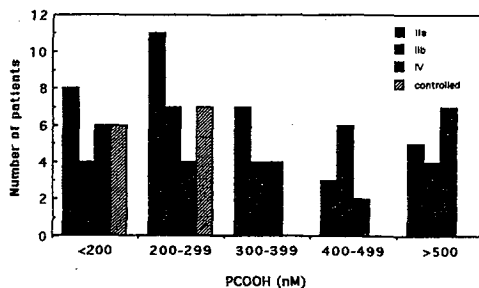


Fig. 4 Plasma PCOOH in hyperlipidemic types

Table 1 Plasma PCOOH levels in hyperlipidemic types

| types | PCOOH (nM) | |
|------------|------------------------------|---|
| II a | (n=32) 325 ± 34 ^a | II a: 高コレステロール型 (>220 mg/dl) |
| II b | (n=25) 355 ± 31 ^a | II b: 高コレステロール (>220 mg/dl) 高トリグリセリド型 (>150 mg/dl) |
| IV | (n=20) 370 ± 50 ^a | IV: 高トリグリセリド型 (>150 mg/dl) |
| controlled | (n=17) 200 ± 10 ^b | controlled: 治療により正常域にコントロール されている患者 (Chol<220, Tg<150) |
| Normal | (n=10) 150 ± 10 ^a | |

mean ± SE
a, b, c p<0.05

Table 2 Plasma PCOOH of atherogenesis in hyperlipidemia

| | PCOOH |
|--------------------------|-----------------------|
| Atherogenesis (n=15) | 370 ± 40 ^a |
| Non-Atherogenesis (n=53) | 290 ± 15 ^b |

means ± SE; a, b p<0.05

Table 3 Plasma α-tocopherol levels in hyperlipidemia

| Hyperlipidemic types | α-Tocopherol | |
|----------------------|--------------|----------------------------|
| | μM | mol/10 ⁹ mol PL |
| Normal(n=15) | 23 ± 2 | 12 ± 2 ^a |
| IIa(n=19) | 24 ± 2 | 7 ± 1 ^b |
| IIb(n=24) | 30 ± 3 | 8 ± 1 ^b |
| IV(n=14) | 24 ± 2 | 8 ± 1 ^b |
| controlled (n=13) | 25 ± 2 | 8 ± 1 ^b |

means ± SE; a, b p<0.05; PL, Phospholipid

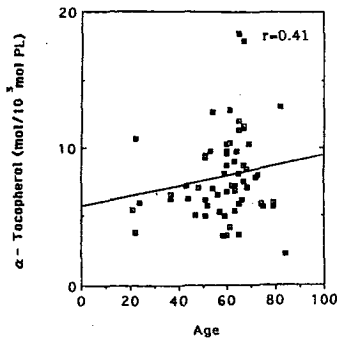


Fig.5 Relationship between plasma α -tocopherol and age in hyperlipidemia

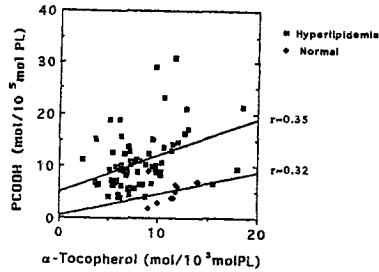


Fig. 6 Relationship between plasma PCOOH and α -tocopherol in hyperlipidemia PL, phospholipid.

Table 4 Fatty acid compositions of plasma PC in hyperlipidemic types (wt.%)

| Fatty acid | Hyperlipidemic types | | | | | |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Normal(n=10), | Total(n=46), | Ia(n=17), | Ib(n=14), | IV(n=8), | controlled(n=7) |
| 14:0 | 0.4±0.1 | 0.8±0.3 | 0.7±0.1 | 0.7±0.2 | 0.8±0.2 | 0.6±0.1 |
| 16:0 | 30.6±0.5 | 32.7±0.3 | 31.3±1.7 | 34.1±0.7 | 32.7±0.7 | 32.2±1.0 |
| 16:1 | 0.7±0.1 | 0.8±0.2 | 0.7±0.1 | 0.8±0.1 | 0.6±0.1 | 0.7±0.0 |
| 18:0 | 12.3±0.6 | 14.0±0.9 | 14.7±0.4 | 14.7±0.3 | 14.1±0.6 | 13.2±0.8 |
| 18:1 | 12.5±0.8 | 11.7±1.3 | 12.1±0.4 | 11.1±0.3 | 11.6±0.3 | 12.3±0.6 |
| 18:2(n=6) | 23.1±0.7 | 18.2±1.2 | 19.3±1.1 | 17.2±0.8 | 17.8±1.1 | 19.5±0.7 |
| 18:3(n=3) | 0.3±0.1 | 0.8±0.4 | 1.0±0.3 | 0.6±0.1 | 1.0±0.5 | 0.8±0.2 |
| 20:4(n=6) | 8.6±1.2 ^a | 6.5±0.7 ^b | 6.3±0.5 ^b | 6.7±0.4 ^b | 6.7±0.4 ^b | 5.2±0.3 ^b |
| 20:5(n=3) | 1.5±0.3 ^a | 3.7±0.9 ^b | 3.9±0.5 ^b | 3.3±0.4 ^b | 3.1±0.3 ^b | 4.1±0.5 ^b |
| 22:5(n=3) | 1.1±0.1 | 1.1±0.2 | 1.1±0.1 | 1.2±0.1 | 1.2±0.1 | 1.2±0.1 |
| 22:6(n=3) | 5.9±0.6 | 6.5±0.7 | 6.4±0.4 | 6.8±0.4 | 7.6±0.6 | 5.9±0.5 |
| others | 3.3±0.5 | 2.5±0.4 | 2.4±0.2 | 2.6±0.1 | 2.7±0.2 | 2.1±0.3 |

means ±SE a,b p<0.05; PC,phosphatidylcholine.

hyperlipidemia (28-88 age, avg. 55, n=15)

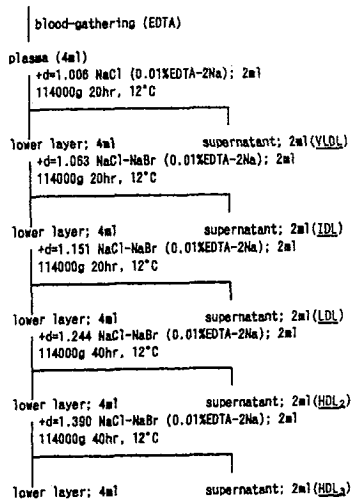


Fig.7 Separation of plasma lipoproteins

Table 5 PCOOH and α -tocopherol contents of plasma lipoproteins in patient with hyperlipidemia

| Lipoproteins | PCOOH (mol/10 ⁵ mol PL) | α -Tocopherol (mol/10 ⁵ mol PL) |
|------------------|------------------------------------|---|
| VLDL | 6.5±1.2 ^c | 6.8±1.8 ^b |
| IDL | 12.5±2.7 ^b | 4.7±1.7 ^b |
| LDL | 3.2±0.4 ^a | 2.5±0.3 ^a |
| HDL ₂ | 29.8±6.0 ^a | 2.4±0.5 ^a |
| HDL ₃ | 11.3±1.2 ^b | 2.1±0.3 ^a |

Mean±SE (n=15); a,b,c, p<0.05; PL, phospholipids

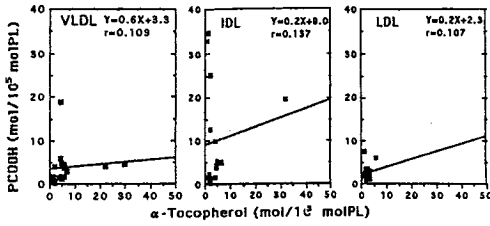


Fig. 8 Relationships between PCOOH and α -tocopherol of apoB-containing lipoproteins (VLDL, IDL, LDL) in hyperlipidemia

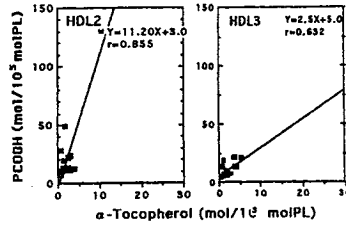


Fig.9 Relationships between PCOOH and α -tocopherol of apo A1-containing lipoproteins (HDL2,HDL3) in hyperlipidemia

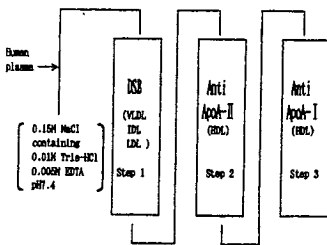
Table 6 Fatty acid compositions of PC in plasma lipoproteins in hyperlipidemia

| Fatty acid | VLDL | IDL | LDL | HDL ₂ | HDL ₃ |
|---------------|----------|----------|----------|------------------|------------------|
| | wt% | | | | |
| 16:0 | 39.1±1.5 | 40.0±1.5 | 35.2±0.9 | 35.1±1.3 | 33.5±0.8 |
| 16:1 | 0.3±0.1 | 0.3±0.1 | 0.1±0.1 | 0.2±0.1 | 0.1±0.1 |
| 18:0 | 17.0±0.6 | 17.9±0.6 | 15.3±0.5 | 15.9±0.6 | 15.2±0.4 |
| 18:1 | 10.8±0.3 | 9.7±0.8 | 11.1±0.2 | 10.5±0.2 | 10.5±0.3 |
| 18:2(n-6) | 17.3±1.3 | 16.3±1.0 | 19.4±1.2 | 18.8±1.0 | 18.2±0.9 |
| 18:3(n-3) | 0.3±0.1 | 0.5±0.3 | 0.3±0.1 | 0.4±0.1 | 0.7±0.5 |
| 20:3 | 1.7±0.3 | 1.2±0.2 | 2.2±0.2 | 2.1±0.2 | 2.0±0.2 |
| 20:4(AA n-6) | 5.6±0.5 | 6.6±1.1 | 6.5±0.3 | 7.3±0.5 | 8.2±0.4 |
| 20:5(EPA n-3) | 2.7±0.3 | 3.4±0.8 | 3.8±0.5 | 3.3±0.4 | 4.5±0.6 |
| 22:5(DPA n-3) | 0.9±0.1 | 0.8±0.1 | 0.9±0.1 | 1.0±0.1 | 1.1±0.1 |
| 22:6(DHA n-3) | 4.4±0.6 | 3.3±0.5 | 5.3±0.4 | 5.4±0.6 | 6.0±0.6 |
| P/S ratios | 0.49 | 0.47 | 0.62 | 0.62 | 0.68 |

Table 7 Phenotype and age in volunteers of familial high HDL hyperlipidemia

| No. | Phenotype | Age | Sex | Blood pressure |
|-----|-----------|-----|--------|----------------|
| | | | | mmHg |
| ① | hetero | 104 | female | 150/ 70 |
| ② | homo | 68 | female | 140/ 80 |
| ③ | normal | 79 | female | 150/ 80 |
| ④ | normal | 81 | female | 140/ 80 |
| ⑤ | homo | 62 | male | 160/ 108 |
| ⑥ | normal | 65 | male | 140/ 90 |
| ⑦ | hetero | 30 | female | 120/ 90 |
| ⑧ | normal | 61 | female | 160/ 92 |

mean±SE (n=15)



The adsorbed lipoprotein was removed by 5M NaSCN (pH 7.4) and desalted by Sephadex G-25 column. The eluted lipoprotein was detected by UV-280nm.

Fig.10 Diagrams of separation of apoproteins in affinity chromatography

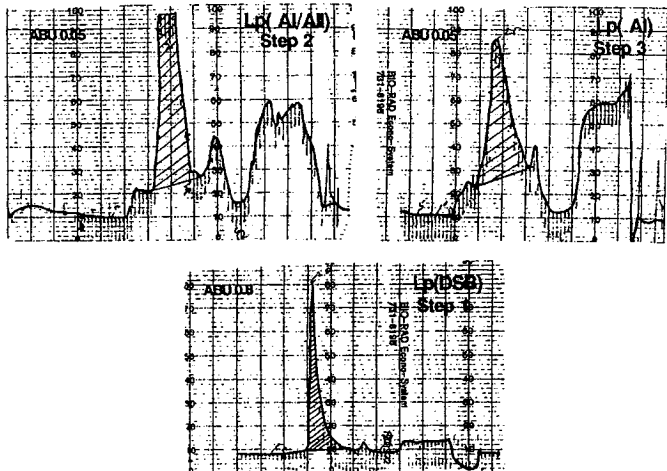


Fig.11 Affinity chromatograms of apoproteins in human plasma lipoproteins
Detected; UV280nm

Table 8 Plasma PCOOH contents in volunteers of familial high HDL Family

| Phenotypes | | | |
|------------|----------|---------|--------------|
| Homo | Hetero | Normal | Normal (非血緣) |
| PCOOH (nM) | | | |
| 517(68) | 215(104) | 208(81) | 340(65) |
| 900(62) | 180(30) | 215(61) | 463(79) |

(): age

Table 9 PCOOH Contents in lipoproteins of familial high HDL hyperlipidemia

| Lipoproteins | Phenotype | | | |
|---------------------------------|-----------|--------|--------|--------------|
| | Homo | Hetero | Normal | Normal (非血緣) |
| PCOOH mol/10 ⁵ molPL | | | | |
| DSB | 7, | 14, | 12, | 7 |
| Lp(AI) | 6, | 1, | 1, | 3 |
| Lp(AI/A2) | 23, | 1, | 5, | 5 |

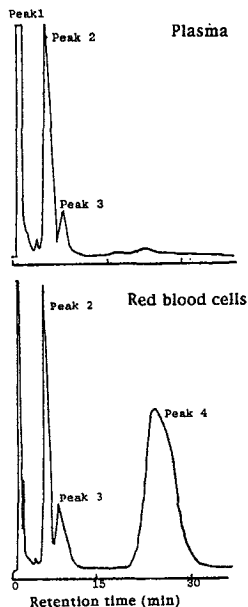


Fig.12 HPLC separation of phospholipid classes
peak 1, Neutral lipid; peak 2, PC; peak 3, SPM;
peak 4, PE.

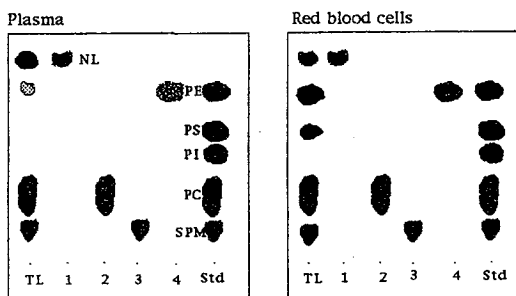


Fig. 13 TLC of phospholipid classes separated with HPLC of total lipid from human plasma and red blood cells
TL, total lipid; Std, standard phospholipid.

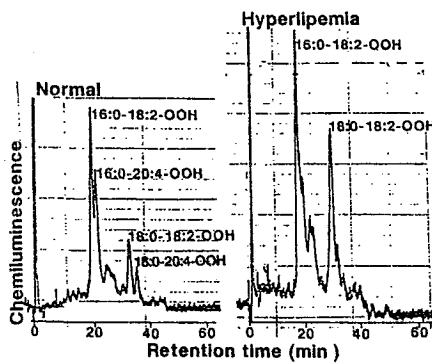


Fig.14 Reversed-phase CL-HPLC of plasma PCOOH

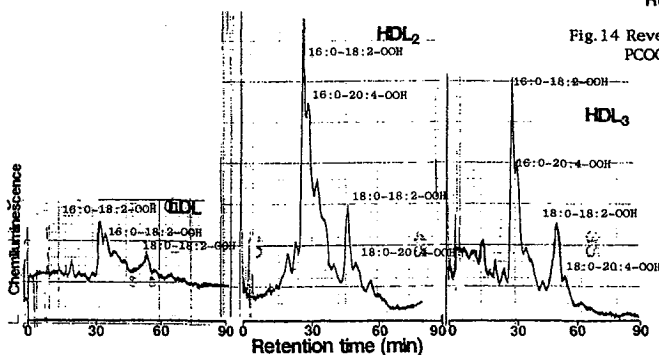


Fig.15 Reversed-phase CL-HPLC of PCOOH in plasma lipoproteins

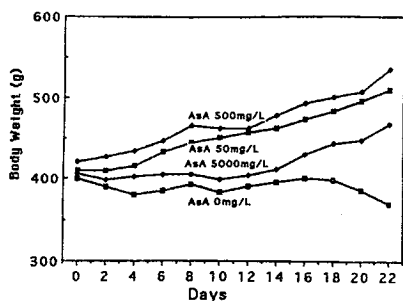


Fig.16 Body weight gains in guinea pigs with graded doses of ascorbic acid

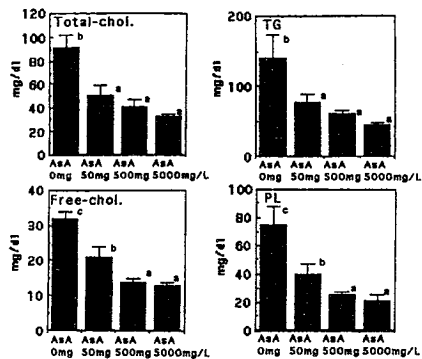


Fig.17 Plasma lipid profile in guinea pigs with graded doses of ascorbic acid
a, b, c, p<0.05

Table 10 Plasma PCOOH, ascorbic acid and α -tocopherol levels in guinea pigs with graded doses of ascorbic acid

| group | Ascorbic Acid (ug/ml) | PCOOH (nM) | α -Tocopherol (ug/ml) | α -Tocopherol (mol/10 ⁶ mol PL) |
|-------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|---|
| A | 1.1 \pm 0.3 ^a | 80.4 \pm 20.1 ^c | 0.5 \pm 0.1 ^b | 5.5 \pm 1.3 ^a |
| B | 1.9 \pm 0.4 ^a | 54.8 \pm 21.9 ^b | 0.4 \pm 0.1 ^a | 8.5 \pm 1.7 ^{a,b} |
| C | 8.4 \pm 1.8 ^b | 27.2 \pm 5.5 ^a | 0.3 \pm 0.04 ^a | 11.2 \pm 1.5 ^b |
| D | 8.9 \pm 1.0 ^b | 42.2 \pm 8.6 ^b | 0.3 \pm 0.03 ^a | 11.9 \pm 2.7 ^b |

Values are means \pm SD. Values with different superscript letters in a column are significantly different (p<0.05). The animals fed AsA-deficient diet were supplemented in the following dose: A, AsA 0mg/L; B, AsA 50mg/L; C, AsA 500mg/L; D, AsA 5000mg/L. PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide; PL, phospholipid.

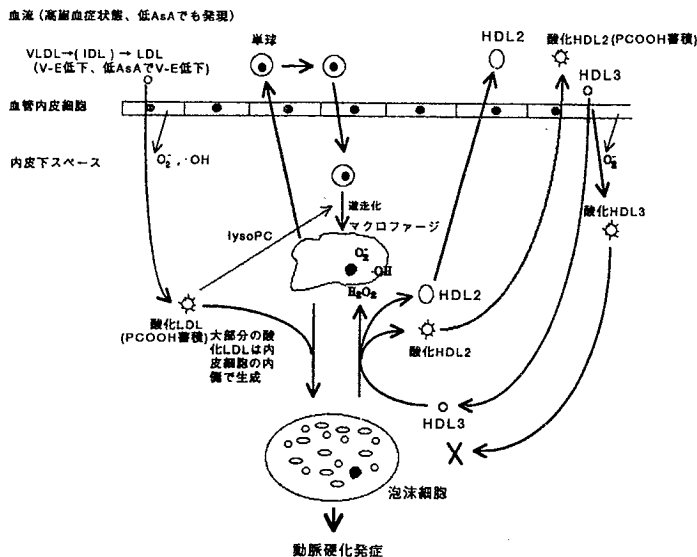


Fig.18 血漿PCOOHと高脂血症の関係

論文審査の要旨

血漿中のコレステロールやトリグリセリドが増加する高脂血症は、動脈硬化症の主要な危険因子とされている。高脂血症で増えた低密度リポタンパク質 (LDL) の中で、酸化変性した LDL がマクロファージに取り込まれ、泡沫化することが動脈硬化発症の原因と考えられており、リポタンパク質の過酸化が動脈硬化の発症と進展に深く関わっていると考えられる。本研究では、高脂血症においてどの程度血漿中のリン脂質の過酸化が進行しているかを新たに開発された化学発光-HPLC を用いて測定し、合わせてリポタンパク質間での分布やヒドロパーオキシド (過酸化脂質) の分子種組成、さらには抗酸化ビタミンとの関係を検討したものである。

主な知見はつぎの通りである。

1. 高脂血症者の血漿リン脂質ヒドロパーオキシドは健常者より有意に高く、さらに高脂血症者の中で、動脈硬化発症者は非発症者より高かった。また、治療で血漿脂質が正常域に制御された場合、血漿リン脂質ヒドロパーオキシドも低下した。血漿 α -トコフェロールは高脂血症者で低く、高脂血症者では血漿リポタンパク質が過酸化されやすいことが明らかになった。

2. 高脂血症者では、主に高密度リポタンパク質 (HDL) 2 画分に過酸化脂質が蓄積していた。酸化 HDL では、泡沫細胞からのコレステロールの引き抜き能力が低下するので、このことが動脈硬化症の進展に関係すると推定した。

3. 家族性高 HDL 症では、ホモ型において HDL に過酸化脂質が蓄積していた。

4. 高脂血症のリポタンパク質のヒドロパーオキシドの主な分子種は、リノール酸およびアラキドン酸の過酸化物であり、n-6 系が選択的に酸化されていた。

5. モルモットの実験で、アスコルビン酸欠乏は高脂血症状態をもたらし、血漿過酸化脂質が増大した。

以上のように、本研究は高脂血症におけるリン脂質ヒドロパーオキシドの蓄積を初めて確認するとともに、その詳細な分布を明らかにし、高脂血症発症機構の解明に大きく貢献するものであり、博士 (農学) の学位を授与するに値すると判定した。