動脈硬化症における血漿磷脂質，とくに その各分画動態に関する研究

田 代 一 三 夫*

目的：動脈硬化症における血漿脂質に関する報告は主にコレステロール (=Chl) および C/P 比についてであり，磷脂質 (=Phl) 分画についての報告は少ない。われわれは本症血清 Phl 分画動態および 2, 3 の薬剤の影響について検討した。**方法：**脂質を Folch 法で抽出し，薄層クロマトグラフィー法で分画，Bartlett 法で燐を定量した。分画は原点より Lysolecithin (LLe), Sphingomyelin (=Sph), Lecithin (=L), Phosphatidylinositol + Phosphatidylserine (=PI), Phosphatidylethanolamine (=PE), Solvent Front [主に Phosphatidic Acid (=PA)] の 6 つに分けた。この方法は再現性よく回収率 92~96% であった。**結果：**20 才代健常男子の血漿総 Phl は 160 mg/dl で，中 L 70% を占め圧倒的に多く，以下 Sph 13%, LLe 6%, PI 2.9%, PE 3.2%, PA 1.5% であった。総 Phl 各分画とも 10 日間隔で有意に変動せず，比較的一定に保たれているようである。50 才代のものでもこれと有意差はなかったが，動脈硬化症ではこれより L, PE, PI および総 Phl が高値を示し，総 Chl, C/P 比も有意に高かった。本症と血液凝固性の関連を考えると，PI, PE が高値を示すことは興味深いものがある。これに Dextran sulfate (=DS) あるいは Ethynandrol (Et) を投与するに，前者では総 Phl, L 総 Chl は低下し，PI, PE は不変，後者では総 Chl, PI, C/P が低下し PE 総 Phl は不変であった。**断案：**1) 健常血清 Phl 中 L が 70% を占め，年齢および日による変動は総 Phl および各分画とも比較的少ない。2) 動脈硬化症では血清総 Phl, L, PI, PE, 総 Chl C/P 比が有意に高値を示した。3) DS および ET の血清 Phl に及ぼす影響を検討した。

序 論

動脈硬化症においては血漿コレステロールの高いものが多く，コレステロールが本症の病因になんらかの役割を演ずるものとして多数の報告が相次いでされた。しかし血漿コレステロールの正常値のものでも，臨床的または病理学的に著明な硬化像を示すものもある。それで磷脂質がなんらかの関係があるということから，C/P 比が問題にされるようになった。実際，動脈硬化症においては C/P 比が正常より高くなっている場合が多い。血漿磷脂質についてはまだその役割が十分に解明されていないが，これはコレステロールおよび中性脂肪 (Triglyceride) ならびに脂肪酸のごとく非極性，水に溶けない物質と異なり，極性脂質で，ある程度水に溶解する性質を有している。リポプロティンやカイロマイクロン等脂質とたんぱく結合体であって，両者を結合し他の脂質が血

漿中を移動するに便なごとく，水溶性となしていることが磷脂質の 1 つの役割と考えられている¹⁾。酒井²⁾は胆汁中の磷脂質が胆石症では減少し，その結果としてコレステロールが水に不溶となり析出しコレステロール結石の核を形成するとしている。このほか磷脂質は細胞の膜構造を作る重要な成分である。また Hokin & Hokin は腺外分泌細胞において，その外分泌だけを刺激してやると，細胞内 Inositol-phosphatide の増量が認められると報告し，細胞の膜を物質が通過するさい脂質がなんらかの役割を演じていることを示唆している。このように磷脂質は生体においてきわめて重要な役割を果たすものののに，これに関してはまだ十分な研究がすすんでいず，C/P 比に関して血漿総脂質燐を測定するに止まり，磷脂質の各分画がいかなる変動を示すのか十分なるデータに乏しい現状である。磷脂質は他の脂質と異なり，非常に多彩な形で存在し，現在なお未知な形が追求されている。さらにきわめて変質しやすい性質を有し，抽出時無色透明な溶液が暫時間で黄色に着色変質をきたすきわめて不安定な物質である。ために磷脂質の分画定量は

* I. Tashiro: 北海道大学医学部内科学第 3 講座 (主任 高杉年雄教授) : 札幌市北 14 条西 5 丁目。
受付: 1966 年 3 月 26 日。

困難なものであり、とくに多くの存在形を同時に分画定量することは至難の業である。したがってまだ普遍的分画定量法は確立されていない。アルミナカラム²⁾、シリカゲルカラム³⁾、ペーパークロマトグラフィー⁴⁾、DEAE-セルロースカラム⁷⁾、薄層クロマトグラフィー等多くの分析方法が用いられているが、1964 年 Skipski⁹⁾ は薄層クロマトグラフィーを用いて、血漿ならびに肝磷脂質の主要成分を分画定量する方法を発表した。私は本法につき検討したところ主要成分に関してはきわめて再現性よく、十分定量に耐える方法であることを認めたので、動脈硬化症における血漿磷脂質の動態を検討し、さらに 2, 3 の抗脂血剤の影響とその機作につき検討した。

試料ならびに方法

A. 試料

1) 臨床的研究には患者(文部省総合研究班による動脈硬化症の診断基準に基づいて動脈硬化症と診断されたもの)および健康者より早朝空腹時採血, EDTA を血液 1 ml 当り 1 mg の割りに加え、ただちに血漿を分離測定に供した。

2) 動物実験には 130~150 g 体重の雄, ウィスター系ラットを使用, 一晚空腹にしたのち, 数匹ずつ 4 群に分け 32P (Orthophosphate) 572,000 cpm/100 g 体重を腹腔内に注入したのち 1, 3, 5, 7 時間後に各群をそれぞれエーテル麻酔下に心穿刺で採血し, のちただちに肝を採り分析に供した。なおラットはすべてオリエンタル固形食で飼養し, 薬剤負荷群は同基本食に薬剤を粉末にして混じたもので飼養した。

B. 方法

1) 脂質の抽出: Folch 法⁹⁾ (Chloroform : Methanol = 2 : 1), 20 倍量で一晩室温で抽出し, 蒸留水 1/2 容で一度洗い, 3,000 rpm 10 分間遠沈して無色透明な下層を分析に供した。

2) 血漿 1 ml, 肝 1 g 湿重量より抽出したものをクロロホルムで 50 ml に希釈し, 1 ml を総脂質検定量用とし, 残りを Rotary-Evaporator で, 37°C 減圧下, 急速に濃縮したものを薄層クロマトグラフィーで分析した。このさい血漿の場合は 0.2~0.3 ml, 肝の場合は 1.5 ml に濃縮したが, ほとんど無色透明のままであった。

3) 薄層クロマトグラフィー (Skipski)^{8,10~13)} Kiesel-Gel H (Mallinckrodt 社製, 接着剤無添加) 40 g を

1 mM- Na_2CO_3 溶液で均等混和し, 硬質硝子プレート (20×20 cm または 5×20 cm) 上に 0.5 mm の厚さにひく。肉眼的に凹凸のないようにひくことが肝要である。applicator およびプレートは脂肪滴, 手垢のないように十分清洗しておかなければならない。薄層をひいたのち, 約 20 分静置後,

120°C	30 分
または 110°C	60 分

乾燥器中で乾燥活性化する。活性化が十分でないと当然分離がわるくなる。その後デンケイター中で約 2 時間放冷し, 使用する。一度に作製活性化したプレートは 1~2 週間使用に耐える。試料は下端より 2.5 cm のところに, 幅約 3 mm, 長さ約 2.5 cm の带状につける。前もって濃縮した試料を Microsyringe で 50 μl 正確につける。この中に燐がおよそ 10~20 μg 含有するくらいが良好なる分離を示すようである。同時に 5 μl を回収率検定のため, 別な試験管にとっておく。展開溶媒は Chloroform : Methanol : Glacial acetic acid : Water = 25 : 15 : 4 : 2 である。有機溶媒はすべて再蒸溜精製し, 氷酢酸は特級を用いる。展開槽は総硝子製とし, 内壁面を汚紙で囲い, 密閉し数時間室温で放置し, 展開液蒸気が十分飽和になるのをまわって, プレートをを入れる。展開液はプレートが下端より約 1 cm 浸る深さとする。展開時間は Skipski は平均 2 時間としているが, 同じ 10 cm 展開するのに, 私は平均 30 分で十分であった。展開距離は原点より 10 cm が適当である。展開後プレートを静かに取りだし, 室温で水平にし約 20 分放置, ヨード蒸気で 20 秒くらい染色し, 各スポットを針先で印をつける。30 分くらいさらに放置するとヨードはほとんど蒸発してしまふ。各分画の同定については, (a) 遊離アミノ基を有するものは Ninhydrin, (b) Choline 含有物は Dragen-Dorff 試薬, (c) その他を用い Skipski の報告どおりの結果をえた。ただし私の行なったものでは Phosphatidylinositol と Phosphatidylserine は同一分画に含まれた。すなわち原点に近い方より,

- ① Lysolecithin (=LLe)
- ② Sphingomyelin (=Sph)
- ③ Lecithin (=L)
- ④ Phosphatidylinositol + Phosphatidylserine (=PI)
- ⑤ Phosphatidylethanolamine (=PE)
- ⑥ Solvent front (Phosphatidic acid) (=PA)

の順であった。ヨード蒸気をとばしたのち, 各スポット

をかきとり，定量的に遠沈管に移し次の順序で再抽出する。

① 展開液	3 ml
② "	2 ml
③ Redist. methanol	2 ml
④ Methanol : Glacial acetic acid : Water = 94 : 1 : 5	2 ml

再抽出液を全部集め，溶媒をとばしたのち，Bartlett法¹⁴⁾で磷を定量する。本法では磷 0.4~5 μ g の間で正確に測定される。かくしてえられた磷量の各スポットの比と，前もって測定した総脂質磷量より，各磷脂質分画を計算した。本分析法によれば各分画の再現性きわめて良好で，薄層につけれ磷脂質の回収率も 92~96% であって，磷脂質の定量に十分使用しうることがわかった。

³²P 使用ラッセ試料については，同様に分画および総磷脂の放射能を G.M.-Counter で測定した。

4) Acetate-1-¹⁴C のラッセ肝スライスにおける取り込みは，³²P 使用実用実験と同様，対照群および薬物負荷群とも，一晚空腹とし断頭屠殺後，ただちに肝切片を作製，その 1 g を Krebs-Ringer-Phosphate Buffer 10 ml 中に入れ，Na-Acetate-1-¹⁴C 0.2 μ c とともに CO₂ 5%，O₂ 95% 気流下に 37°C，2 時間インキュベートし，その後組織を十分水洗し，脂質を抽出後，シリカゲルカラムにて分画，各分画の放射能を Gas-Flow Counter で測定した。コレステロールは Zak-Henry 法¹⁵⁾，トリグリセリドはけん化後，グリセリンを Hanahan 法¹⁶⁾，遊離脂肪酸は酸化法でそれぞれ定量した。

実験成績

20 才代健康者男子 5 例につき 10 日間隔で繰り返し採

血測定してみるに，総血漿磷脂質量は第 1 回目 153 mg/dl，第 2 回目 174 mg/dl であった。各分画をみるに，表 1 のごとくであった。次に年齢による変動をみるべく，50 才代健康男子 5 例の平均をみるに総磷脂質量は 170 mg/dl，各分画は表 1 のごとくであった。動脈硬化症患者 2 群（各 5 例）について分析してみると，表 2 および表 3 の薬物投与前のごとく，総磷脂質量で 239 mg/dl または 206 mg/dl であった。総コレステロールもまた総磷脂質と同様，動脈硬化症患者血漿で 327 または 276 mg/dl と正常群

図 1. 磷脂質分画定量操作

189 mg/dl より有意に上昇していた。C/P 比についても表 2, 3 のごとく正常群より有意に高かった。磷脂質分画については LLe, Sph 分画は正常群と有意差なく，PI, L, PE の 3 分画で本症患者血漿は高値を示していた。これら動脈硬化症群に Dextran sulfate (=DS) 600~900 mg/日，1 ヶ月間投与してみると（表 3），総磷脂質量では投与前 239 mg/dl であったものが，投与後 199 mg/dl と有意に低下した。各分画についてみるに投与前 64.63 μ g/ml-P であった L が投与後 51.02 μ g/ml-P と有意に低下したが，他の 5 分画はすべて著変を示さなかった。総コレステロールおよび C/P 比についても，投与前それぞれ 327 mg/dl，1.38 から投与後 242 mg/dl，1.22 となり，総コレステロールは有意の低下を示したが C/P 比は著変を認めなかった。これを図示すれば図 2, 3 のごとくである。別な動脈硬化症群 5 例について，たんぱく同化ホルモンである Ethyl-

図 2. MDS の血清脂質に対する影響

表 1. 血清磷脂質分画の日および年齢による変動

	I	II	III	I vs II	I または II vs III
総 Phl	153±6.2mg/dl	174±5.3	170±8.6	NS(P=0.05)	NS(P=0.05)
LLe	3.24±0.12μg/ml	4.08±0.34	4.20±0.53	" "	" "
Sph	7.80±0.45	8.72±1.06	10.70±1.53	" "	" "
L	45.35±1.40	48.65±2.86	47.80±2.41	" "	" "
PI	1.87±0.26	2.30±0.19	2.05±0.16	" "	" "
PE	2.34±0.33	2.83±0.34	2.20±0.23	" "	" "
PA	1.26±0.05	1.57±0.14	0.97±0.17	" "	" "

総Phl.: 総磷脂質量

分画 : 血清 1 ml 当りの磷脂質-P 量

I, II: 20 才代健常者同一群につき, 10 日間隔で 2 度測定し I, II とした。

III : 50 才代健常者群

(Mean±SE)

表 2. MDS 投与時の人血清 Chl および Phl の変動

(動脈硬化症群)

	正常値 (Pμg/ml)	MDS 投与前	MDS 投与後	正常対前値	前値対後値
LLe	4.20±0.53	5.01±0.52	4.78±0.19	NS(P=0.05)	NS(P=0.05)
Sph	10.70±1.53	13.81±2.00	11.99±1.10	NS "	NS "
L	47.80±2.41	64.63±5.20	51.02±2.80	S "	S "
PI	2.05±0.16	3.73±0.65	3.82±0.60	S "	NS "
PE	2.20±0.23	4.11±0.63	4.82±0.66	S "	NS "
PA	0.97±0.17	1.57±0.48	2.67±0.51	NS "	NS "
総 Phl	170±8.6mg/dl	239±16.1	199±12.5	S "	S "
総 Chl	189±11.4	327±28.6	242±22.9	S "	S "
C/P	1.05±0.04	1.38±0.09	1.22±0.15	S "	NS "
例数	5	5	5		

表 3. Ethylrardrol の人血清 Chl および Phl に及ぼす影響 (6~8 mg/日 10 日間)

(動脈硬化症群)

	正常値 (Pμg/ml)	投 与 前 値	投 与 後 値	正常対前値	前値対後値	P
LLe	4.20±0.53	4.50±0.22	6.69±0.49	NS	S	0.05
Sph	10.70±1.53	12.46±1.51	14.02±1.39	NS	NS	"
L	47.80±2.41	53.87±2.45	41.24±2.03	S	NS	"
PI	2.05±0.16	4.20±0.37	3.53±0.33	S	S	"
PE	2.20±0.23	5.18±0.58	4.96±0.78	S	NS	"
PA	0.97±0.17	1.81±0.29	2.68±0.16	S	S	"
総 Phl	170±9.1mg/dl	206±4.27	184±12.71	S	NS	"
総 Chl	189±11.4	276±10.62	214±8.75	S	S	"
C/P	1.05±0.04	1.34±0.06	1.16±0.04	S	S	"
例数	5	5	5

図 3. MDS の血漿リン脂質各分画に対する影響：動脈硬化または高血圧を有する患者について。
(6錠/day 投与期間 1 分月)

図 4. Ethynyl nadrol の人総血清 Chl, Phl および C/P に及ぼす影響
(6~8 mg/日 10 日間)

nandrol(=Et.) 4~6 mg/日、10 日間投与してみると、表 3、図 4、5 のごとくであった。すなわち、総磷脂質、総コレステロールおよび C/P 比は投与前 206 mg/dl、276 mg/dl、1.34 とそれぞれ正常群に比し有意に高値を示し、投与後では 184 mg/dl、214 mg/dl、1.16 と総磷脂質を除き両者は有意の低下を示した。各磷脂質分画についてみるに、投与前有意に高値を示した L, PI, PE, PA の中 PI, PA の両分画で有意の低下を示し、他の

PE, L および LLe, Sph の 4 分画は投与後で推計学的有意の変動を示さなかった。次に DS の磷脂質およびコレステロール代謝に及ぼす影響の機作を追求するために、 ^{32}P (Orthophosphate) および Acetate-1- ^{14}C を用いてそれぞれ、磷脂質およびコレステロールへの取り込みをみた。ラッテ腹腔内に ^{32}P 100 μC /100 g 体重を注入後、1, 3, 5, 7 時間後肝放射能を測定してみるに、図 6 のごとく、肝 1 g 当りの総磷脂質に対する総 CPM は対照群で 7 時間後まで直線的上昇を示した。血漿 dl 当りの総磷脂質に対する総 CPM は 1 時間後、trace であったが以後 7 時間まで直線的上昇を示した。specific activity-time curve についても図 7 のごとく、

肝、血漿共総 CPM 同様の直線の上昇を示した。次に各分画の specific activity についてみるに、対照群で表 4、図 8、9 のごとくであった。DS を 300 mg/匹/日、5 日間投与したラッテ群につき同様の分析を行なってみるに、図 6 のごとく、総 CPM は対照群の curve より明らかに下回り、しかも peak が 6 時間後附近にあるごとくであった。specific activity についても肝、血漿とも総 CPM と同様に対照群のそれより下回った。各分画の specific activity についても、表 4、図 8、9 のごとくであった。すなわち DS 処理群において 3 時間後で、LLe, Sph の両分画とも trace に放射能を検出するに止った。次に肝磷脂質量についてみるに、総磷脂質では脂質磷にして対照群 795 $\mu\text{g/g}$ -湿重量に対し、処理群では 443 $\mu\text{g/g}$ -湿重量と半減していた。

一方血漿では同じく脂質磷にして対照群 38.7 $\mu\text{g/ml}$ に対し 45.1 $\mu\text{g/ml}$ と著変を示さなかった。なお肝磷脂質各分画比については表 4 のごとく、対照群と処理群で著明な差を認めなかった。Acetate-1- ^{14}C の肝スライスにおける遊離コレステロールへの取り込みについては図 11 のごとく、対照群に比し、DS 処理群で明らかに低下を示していた。

表 4. 正常ラット腹腔内投与後の肝リン脂質各分画の Specific activity に対する MDS の影響

³² P 投与後 分 画	3 時 間 後		5 時 間 後	
	正 常	MDS 投与	正 常	MDS 投与
LLe	15.9 × 10 ³	Trace	42.5 × 10 ³	36.7 × 10 ³
S	16.9 "	"	20.9 "	16.5 "
L	49.2 "	37.8 × 10 ³	80.5 "	80.5 "
PI	27.8 "	24.2 "	36.3 "	39.0 "
PE	90.7 "	86.0 "	136.0 "	170.0 "
PA	15.8 "	15.2 "	8.9 "	27.2 "

³² P 投与後 分 画	ラ ッ ト 肝 リ ン 脂 質 各 分 画 値			
	正 常 値		M D S 処 理 後 値	
LLe	9.20(μgP/g)	1.15(%)	4.43(μgP/g)	1.00(%)
S	51.50	6.49	22.20	5.01
L	393.70	49.57	228.15	51.61
PI	101.00	12.71	58.10	13.13
PE	181.00	22.73	104.00	23.50
PA	58.60	7.37	25.42	5.75

図 5. Ethynandrol の人血清 Phl に及ぼす影響 (6~8 mg/日 10日間)

考 按

20 才代 健康男子血漿磷脂質量は、総量で 155~174 mg/dl, 平均 160 mg/dl であり、50 才代健康男子の正常値 170 mg/dl とは有意差を認めない。これは健康者においては、年齢による変動があまりないことを示すもの

と考えられる。また測定する日より、血漿磷脂質が変動を示すか否かについては、20 才代健康男子につき、10 日間隔で 2 度、同一群で測定してみるは、表 1 のごとく両者に有意差なく、血漿磷脂質量は年齢および日による変動は少なく、比較的一定に保たれているもののように思われ、各分画値についてみるに、20 才代健康男子では、L が 70% を占め圧倒的に多く、以下 Sph 13%, LLe 6%, PE 3.2%, PI 2.9%, PA 1.5% の順に少なくなっている。これらの各分画比について薄層クロマトグラフィーを使用した諸学者の報告と比較してみると、L

は Biezenski¹⁸⁾ 70.6%, Vikrot¹⁹⁾ 70%, Christian²¹⁾ 68.6% となし、Sph については Biezenski 16.6%, Christian 17.5% とし、LLe は Biezenski, Vilrot, Robinson²⁰⁾, Christian などはそれぞれ 0.5%, 5.9%, 12.5%, 5.2% としている。PE については Vikrot 3.0%, Robinson 4.4%, Christian 4.3% となし、PI は

図 6. ラット腹腔内投与 ^{32}P の総リン脂質への導入 図 7. 正常ラット腹腔内 ^{32}P 投与後の総リン脂質 Specific activity の推移に対する MDS の影響

Biezenski 2.5%, Renkonen 2%, Christian 2.5% とし, PA は Biezenski 3.2%, Biezenski 1.7% と報告している。総じて血漿磷脂質分画正常値に関しては他の報告者もだいたい一致しているが, 中にはかなり変動した値を報告している学者もある。これらは人種の違いにも関係することではあろうが, 測定法の十分な検討を要するものがあるように思われる。血漿磷脂質量は兎では食餌中の磷脂質によりあまり影響を受けないが, 食餌中のコレステロールを多くすると上昇すると Handel²²⁾ は報告している。これがただちに人に当てはまるとは限らないが, 人においてもこのような現象は十分推定されるものと考えられる。

図 8. 正常ラット腹腔内 ^{32}P 投与後, 肝リン脂質各分画 SA に対する MDS の影響 図 9. 正常ラット腹腔内 ^{32}P 投与後, 肝リン脂質各分画に対する MDS の影響

図 10. 正常総リン脂質に対する MDS の影響

図 11. ラット肝切片における Acetate-1-¹⁴C の各脂質分画への導入

さて臨床的診断に基づく動脈硬化症を有する患者群につき、血漿脂質量を分析してみるに、総量では 206~239 mg/dl と同年令対照群に比し有意に高値を示した。また各分画では L, PI, PE の 3 分画で有意に高値を示した。動脈硬化症患者に合併する虚血性疾患に関し動脈局所の変化のほか、血液凝固能の亢進が注目されているが、Hartrot²³⁾ は動脈硬化症と心筋硬塞の関係について仮説を立て、まず動脈壁にアテローム性変化を生じ、その上に血漿凝固性亢進が重なって、その部に血栓を形成するとし、ラッテを長期間高脂肪食で飼養して 25% に心筋硬塞を発生せしめた。著者³⁰⁾ も家兎に高脂肪食を 1 ヶ月間投与して高脂血症を発生せしめると、フィブリノーゲンの増量を認めた。Poole²⁴⁾、Rouser²⁵⁾ などは PE にトロンボプラスチン形成時間を短縮する作用があることを報じ、Mac Farlane et al. は PI にその活性を認めると反論している。そのほか脂質、とくに PI または PE に血液凝固性亢進作用を認める報告は多数あるが、脂質の PI, PE, L のいずれにその活性があるのか、または 2 つ以上に認めるのか、あるいは 2 つ以上の存在で (Bangham²⁷⁾) 活性を示すようになるのか等と言う点に関してはまだ一致した見解に到達していないようである。

Nothman²⁸⁾ は動脈硬化症患者 19 例につき血漿 PI, PE 分画を測定し、正常に比し 2~3 倍の増量を示したと報告している。私の実験でも PI, PE は本症において有意に高値を示した。本症において血漿脂質、とくに PI, PE が高値を示すことは、高率に合併する虚血性心疾患との関連が考慮され、きわめて興味深いものがある。このような動脈硬化症患者に対し DS (MDS 900~600 mg/日) を 1 ヶ月間投与すると、投与前高値を示し

た血漿総脂質、総コレステロールは有意の低下を示したが、C/P 比については有意の変動を認めなかった。血漿脂質の変動を検討する場合、総脂質量では、その分画変動を把握できないことは当然であるが、各分画中、約 70% を占める L 分画の変動が総量の変動に強い相関関係をもつであろうこともまた至極当然である。したがって総脂質量で変動または不変の場合は L 分画の変動または不変を示すと考えてもよいようである。DS 投与例においても、全例に L 分画の低下をきたしていた。しかしながら微小成分である PI, PE の両分画が投与前有意に高値を示し、DS 投与で不変のままであることは、前述のことと考え合わせると、DS が動脈硬化の病態生理学的変化をすべて是正するものでないことを示し、今後この点につきなお検討されなければならないものと考えられる。また別の動脈硬化症例に Et を投与してみるに、DS と同様総コレステロールは低下したが、総脂質量は L 分画とともに有意の変動を示さなかった。したがって当然のことながら C/P 比は有意の低下を示した、またこのさい、脂質分画についてみるに、投与前有意の高値を示した PI および PE の中 PI は有意の低下を示したが、PE は不変であり、LLe および PA は逆に上昇していた。この場合もまた PE は高値のままであり、本剤投与により、PE が血液凝固能亢進に関連をもつであろうことから、動脈硬化症に合併する硬塞予防には十分でないことを示唆するものと考えられる。

次いで DS の脂質およびコレステロール代謝に及ぼす影響の機作の一端を知るべく、³²P および Acetate-1-¹⁴C を用いて行なった実験では、まず ³²P を腹腔内に注入し経時的にラッテを屠殺し、血漿および肝の脂質に導入された放射能を測定してみた。DS 300 mg/匹/日の大量 5 日間投与した群では、肝および血漿脂質の radioactivity-time curve が対照群に比し明らかに低下しており、同様のことは肝 1 g 湿重量についての総脂質の sepecific activity-time curve についても認められた。このことは DS がラッテにおける脂質の turnover を低下させるものであることを示唆しており、脂質の生合成をある程度抑制する可能性があり、また胆汁中への排泄、異化促進の可能性も考えられるがさらに検討を要する問題であろう。次に肝脂質分画についてみるに DS 投与群では 3 時間後 LLe および Sph は放射能が微量しか検出されないことは対照群に比し大きな変化として注目されるが、その他の分画では明確な所見を

認めず，さらに詳細な検討を待ち度いとする。次いで肝および血漿磷脂質量についてみるに，対照群で 795 $\mu\text{g/g}$ 湿重量あった肝総磷脂質量が DS 処理群では，443 $\mu\text{g/g}$ 湿重量となっており，約 50% も低下している。一方血漿総磷脂質量は対照群 38.7 $\mu\text{g/ml}$ に対し処理群では 45.1 $\mu\text{g/ml}$ と著変を示さなかった。このことは肝に於ける磷脂質が DS 投与により合成抑制または異化促進により減少したものと推定される。これに対し血漿磷脂質が投与で著変を示さなかったのは，投与期間が短かいことによると思われるが，血中における磷脂質のもつ重要な役割から，血漿磷脂質量は一定に保たれるような機構が働いているのかも知れない。なお検討を要する問題であるがきわめて興味深いことでもある。肝ステイスにおける Acetate-1- ^{14}C の遊離コレステロールへの取り込みについてみるに，対照群に比し，遊離コレステロールの放射能は DS 処理群で約半分に低下している。これは DS が肝でのコレステロールの生合成を抑制することを示唆するものと考えられ，中村²⁹⁾ も ^{14}C でラベルした Mevalonic acid および Acetate-1- ^{14}C からの肝コレステロール生合成が抑制されるとのべている。動脈硬化症患者に DS を投与した場合，血漿コレステロールの低下をきたす機序に肝での合成の低下も関与しているであろうと考えられる。

結 語

1) 薄層クロマトグラフィー法による磷脂質の分画定量法を検討し，きわめて再現性よく，磷脂の回収率 92~96% をえ，血漿および肝の磷脂質量に用いた。

2) 本法を用い血漿磷脂質の分析するに，20 才代で総量 153~174 mg/dl ，平均 160 mg/dl であった。各分画については Lecithin が 70% を占め圧倒的に多く，以下 Sphingomyelin 13%，Lysolecithin 6%，Phosphatidylethanolamine 3.2%，Phosphatidylinositol+Phosphatidylserine 2.9%，(主として) Phosphatidic acid 1.5% の順であった。

3) 10 日間隔で 2 度測定し，日に依る変動は少ない事，および 20 才代と 50 才代との比較により，総量および各分画とも，年齢による変動も少ないことがわかった。

4) 動脈硬化症患者血漿では，総量および Lecithin，Phosphatidylinositol+Phosphatidylserine，Phosphatidylethanolamine の 3 分画で対照群に比し高値を示した。総コレステロールおよび C/P 比も有意の高値を示

した。

5) 本症において血漿磷脂質，総コレステロールおよび C/P 比に対する Dextran sulfate と Ethyl-nandrol の影響につき検討した。

6) Dextran sulfate の磷脂質およびコレステロール代謝に及ぼす影響の機作につき， ^{32}P 及び Acetate-1- ^{14}C を用いて検討し，磷脂質の turn over rate の抑制と肝でのコレステロール生合成抑制を示唆する結果をえ，これらが本剤の作用機序に関与しているものと考えられた。

執筆するにあたり終始ご懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜った恩師高杉年雄教授に深甚なる感謝の意を表す。

文 献 1) Ansell, G.B. & Hawthorne, J.N.: Stabilization of the chylomicron, Phospholipids (BBA Library Amsterdam), **3**: 18 3, 1964. 2) Analysis of intact phospholipids, *ibid.*, **3**: 44, 1964. 3) Chromatography on silicic acid, *ibid.*, **3**: 46, 1964. 4) Chromatography on paper, *ibid.*, **3**: 49, 1964. 5) 酒井幸男: 肝障害と脂質代謝，特に磷脂質について，日消会誌，**60**: 442, 1963. 6) Hokin, L.E. & Hokin, M.R.: Participation of a fat soluble substance in coagulation of the blood, *J. Physiol.*, **135**: 442, 1957. 7) Rouser, G., Colli, C. & Lieber, E.: Analytical fractionation of complex lipid mixtures, DEAE cellulose column chromatography combined with quantitative thin layer chromatography, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **41**: 836, 1964. 8) Skipski, V.P. et al.: Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography, *biochem. J.*, **90**: 374, 1964. 9) Folch, J. et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**: 497, 1957. 10) Mangold, H.K.: Thin layer chromatography of Lipids, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **38** (pt. III): 708, 1961. 11) Thin layer chromatography of Lipids, *ibid.*, **41**: 762, 1964. 12) Habermann, E. et al.: Bestimmung von Plasma-Phospholipiden nach Dünnschicht-Chromatographie, *Klin. Wschr.*, **39**: 39, 1961. 13) Rouser, G. et al.: Lipid composition

of beet brain, beef liver, and the Sea Anemone. Two Approaches to Quantitative Fractionation of Complex Lipid Mixtures, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **40**: 425, 1963. 14) Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.*, **234**: 466, 1959. 15) Zlatkis, A., Zak, B. & Bolye, A.J.: A new method for the direct determination of serum, *J. Lab. & Clin. Med.*, **41**: 486, 1953. 16) Hanahan, D.J.: Chemical nature of monophosphoinositides, *J. Biol. Chem.*, **231**: 813, 1958. 17) Bloor, W.J.: The determination of small amounts of lipid in blood plasma, *ibid.*, **77**: 53, 1928. 18) Biezenski, J.J.: Quantitation and preparation of phospholipids by elution following improved thin, Layer chromatography separation *Fed. Proc.*, **23**: 503, 1964. 19) Vikrot, O.: Plasma phospholipids in pregnancy, *Lancet*, **2**: 891, 1963. 20) Robinson, N. et al: Quantitative thin-layer chromatography of serum phospholipids, *Clin. Chem. Acta*, **8**: 385, 1963. 21) Christian, J.C. et al.: Thin-layer chromatographic analysis

of plasma phospholipids in essential familial hyperlipidemia, *J. Lab. Clin. Med.*, **5**: 756, 1964. 22) van Handel, E.V.: Non dependence of plasma phospholipids on dietary phospholipids in the Rabbit, *J. Atheroscler. Res.*, **1**: 121, 1961. 23) Hartroft, W.S. et al.: Pathogenesis of atherosclerosis and myocardial infarction, *Fed. Proc.*, **18**(pt. III): 36, 1959. 24) Poole, J.C.F.: Fat and Blood Coagulation, *Brit. Med. Bull.*, **14**: 253, 1958. 25) Rouser, G. et al.: Phospholipid structure and thromboplastic activity, *Biochem. Biophys. Acta*, **28**: 71, 1958. 26) Mac Farlane, R.G.: Participation of a fat soluble substance in coagulation of the blood, *J. Physiol.*, **99**: 7, 1958. 27) Bangham, A.D.: A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids, *Nature*, **192**: 1197, 1961. 28) Nothman, M.M.: Cephalins in the blood, *J. Amer. Med. Assoc.*, **179**: 40, 1962. 29) 中村治雄: 未発表. 30) 田代一三夫: 脂血症と血液凝との関係について, 道医誌投稿中.

Abstract

Studies on the Changes of Serum Phospholipid Fractions in Arteriosclerosis

Isao Tashiro*

In connection with the significant role of serum phospholipids in arteriosclerosis, the concentration of various phospholipids and cholesterol was estimated in sera of normal adult as well as of patients with arteriosclerosis.

Methods: Lipids were extracted from serum by the method of Floch and six phospholipids fractions (lysolecithin, sphingomyelin, lecithin, phosphatidyl-serine plus phosphatidyl-inositol, phosphatidyl-inositol, phosphatidyl-ethanolamine and phosphatidic acid) were separated by use of the thin layer chromatography of Skipski's Method modified by Tashiro. The fractionation was quantitatively performed, since the recovery of the individual lipids estimated from phosphorus was 92 to 96 per cent.

Results: (1) In normal adults, the content of the total phospholipids in serum was 160 mg/dl,

and the composition of individual phospholipids was also relatively constant at the age of 20 years as well as 50 years. Furthermore, the individual values of phospholipids were not significantly altered in sera collected every 10 days. (2) In serum of patients with arteriosclerosis, on the other hand, the concentration either of total phospholipids, lecithin, ph-ethanolamine, ph-inositol plus ph-serine, or total cholesterol, as well as the C/P ratio were significantly higher than those of normal serum. In view of the increased content of ph-inositol, -serine and -ethanolamine in serum, the blood coagulability must be considered as rather high in the arteriosclerotic. (3) When dextran sulfate was administered in patients with arteriosclerosis, the content of total phospholipids, lecithin and cholesterol was decreased, while the values of cholesterol, ph-inositol+ph-serine and C/P ratio were decreased by the administration of ethynandrol.

* The Third Department of Internal Medicine (Director: Professor Toshio Takasugi), Hokkaido University, School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan.