高脂質血症と動脈硬化*

——特に血管壁 lipase を中心に——

白井厚治** 松岡信夫** 斎藤康**
熊谷朗** 村岡俊春*** 奥田拓道***

目 的

動脈硬化症では、動脈壁に主として cholesterol ester が蓄積してくることがすでに報告されている¹⁾。一方 triglyceride は cholesterol ester に比べて沈着しにくいといわれている。このことは血管壁に lipase が大量に存在していること、また substrate inhibition がかりにくい酵素であることなどが報告されている²⁾。私共は血管壁の lipase の調節機構について検討している。

すでに私共は Ca イオンが血管壁 lipase 活性を亢進させることを報告した³⁾。すでに奥田らは肝を用いた実験から肝 esterase がある修飾を受けることにより lipase に変換することを報告している¹⁰⁾。そこで血管壁内 lipase の調節機構を明らかにする目的で血中の non specific esterase と血管壁の lipase との関係について検討したので報告する。

実験方法

実験材料 Tributyrin は和光純薬, triolein-¹⁴C は日本放射性同位元素協会より購入した。Sephadex G-200, DEAE Sephadex は Pharmacia 社, DEAE cellulose は生化学工業製のものを使用した。

Esterase 活性測定 エタノールに溶解した tributyrin 0.05 ml (10 μ moles) を基質とし, pH 8.0 0.06 M カリウムリン酸緩衝液 0.045 ml に酵素液

0.5 ml を加え 37°C 1 時間インキュベートし 5% TCA 1ml にて反応を停止させ、遠心後上清の glycerol を、Kohn の方法⁴⁾で測定した。

蛋白は Lowry 法で測定した⁵⁾。

ラット血中 Esterase の精製 体重約 200 g のウィスター系雄ラットをネブタール麻酔下に下大静脈より Heparin 採血し血漿を硫酸分画で 35% ~60% 分画をとり更に Sephadex G-200, DEAE Sephadex A-50, DEAE cellulose, Sephadex G-200 順次行い精製した。

ポリアクリルアミドディスク電気泳動 精製した酵素は、Davis の方法⁶⁾に従いポリアクリルアミドディスク電気泳動を行い、又、エステラーゼ活性は α -naphthyl-acetate を基質とし、Holmes and Master らの方法⁷⁾によって染色した。

血中 Esterase 添加による血管壁の Lipase 活性の測定 Fig. 3 のごとく約 200 g のウィスター系雄ラットをネブタール麻酔下で開腹し heparin 500 単位を静注後脱血し大動脈弓より腸骨動脈まで動脈を摘出し細切した。更にヘパリン溶液 (500 単位/ml) 中で、37°C, 15分 incubation した後、4°C 生理食塩水で洗い、動脈壁 slice を調整した。この組織湿重量 30 mg に対し精製した esterase 0.2ml (360 μ moles/hr) と Krebs-Ringer phosphate buffer 0.1 ml を加え 37°C 45 分間 preincubation をした後 triolein-¹⁴C-emulsion (5.4 mg Trioleate-1-¹⁴C (2 μ Ci/ μ mole) 0.9 ml 1% Triton X-100, 0.3 ml 5% 牛アルブミン, 0.8 ml 2M Tris-HCl 緩衝液 pH 8.2, 7 ml 蒸留水を加え, 3 分間超音波処理) 0.1 ml を添加し 37°C 60 分 incubation し, Arlens の方法⁸⁾によって水解された脂肪酸の放射活性を

* 1977 年 5 月第 9 回日本動脈硬化学会において発表

** 千葉大学第 2 内科

*** 愛媛大学第 2 医化学

Fig. 1 Effect of Agricultural Pesticide on Serum Esterase and Triglyceride (300 Persons)

Purification steps	Specific activity	Total activity
Original serum	67.3 (1.00)	102.666 (100%)
Ammonium sulfate fraction (35-60%)	115.9 (1.72)	62.125 (60.5%)
Sephadex G-200 (1)	257.0 (3.82)	16.964 (16.0%)
DEAE sephadex-50	8180.8 (121.5)	13.974 (14.0%)
DEAE cellulose	146250.0 (2173.0)	11.768 (11.0%)
Sephadex G-200 (2)	220071.0 (3279.0)	11.472 (11.0%)

Fig. 2 Purification of Esterase in Rat Serum

Fig. 3 Examination on Conversion of Esterase to Lipase

Fig. 4 Effect of Purified Serum Esterase on Lipase Activity in Rat Arterial Wall Slices

ト動脈壁 slice に精製した esterase を添加し pre-incubation 37°C 45 分した後、武内らの方法⁹⁾に従って lipase 染色を行なった。

結果と考察

測定した。

血中 Esterase 添加による血管壁の Lipase 活性の組織染色 上記と同様に処理して調整したラッ

Lipase は、水に不溶な長鎖中性脂肪を分解し esterase は水に、可溶な短鎖の中性脂肪を分解すると定義されている。すでに奥田らによって肝臓

の esterase と lipase とは密接な関係のあることが報告されている¹⁰⁾。そこで私共は血中 nonspecific esterase とヘパリン静脈後の lipase との関係について検討した。まず lipase と血中 esterase が密接な関係のあることを推測させる臨床知見を得た。愛媛県吉田町の住民検診で血中 esterase を調べた。農薬散布後の血中 esterase は散布前に比べて著明に低下していることが認められ esterase の低下率の高いものほど血中 triglyceride が高い傾向にあることが認められた (Fig. 1)。このことは triglyceride を分解する lipase と esterase とは密接な関係のあることを示唆している。そこで血管壁を用い lipase と esterase の関係について検討した。そのためにまずラット血中 esterase の精製を行った。Fig. 2 はその精製表である。35~60% 硫酸分画で約 80% の回収があり、比活性は 1.7 倍に Sephadex G-200 では 3.8 倍、DEAE Sephadex A-50 で 120 倍、DEAE Cellulose で 2173 倍に更に Sephadex G-200 では 3279 倍に精製された。この酵素標品はポリアクリルアミドディスク電気泳動で活性に一致して蛋白染色で単一バンドを示した。尚この酵素標品には lipase 活性 (triolein 分解活性) は認められなかった。次にこの精製された esterase を用い血管壁 lipase との関係について検討した。Fig. 4 に示すように heparin 処理によって血管壁から lipase 活性が約 50% 取り除かれた。これに先に精製した esterase を添加したとこ

ろリパーゼ活性の回復がみとめられ、一方熱処理をした esterase を添加しても lipase 活性の上昇はみられなかった。以上の事実は血中 esterase が血管壁内で何らかの修飾を受けることにより lipase 活性を示すようになることが推測された。

ま と め

血中の nonspecific esterase の生理的意義は不明な点が多い。今回私共は血中 esterase は血管壁において lipase に変換しうることを推測させる成績を得た。今後更に変換の細胞内局在、変換の機構、及び両酵素の免疫学的同一性等について検討を加えなければならない。

文 献

- 1) Weinhouse, S. and Hirsch, E. F.: Arch. Pathol., **29**: 31 (1940).
- 2) 高野達哉: C. de Duve: 医のあゆみ **86**: 6, 299 (1973).
- 3) 松岡信夫, 斎藤 康, 熊谷 朗, 奥田拓道: XIII 日本臨床代謝学会 (1977).
- 4) Kohn, E. D.: J. Biol. Chem. **215**: 1 (1955).
- 5) Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem. **193**: 265 (1951).
- 6) Davis, B. J. and Anon, N. Y.: Acad. Sci. **121**: 404 (1964).
- 7) Holmes, R. S. and Masters, C. J.: Biochim. Biophys. Acta., **151**: 147 (1968).
- 8) Arlens, J. Lipid. Research, **13**: 63 (1972).
- 9) 武内忠男: 酵素組織化学 6 版 朝倉書店 258 (1972).
- 10) H. Okuda, S. Fujii: J. Biochem., **61**: 377 (1968).

質問 内藤周幸 (東京大学第一内科)

ヘパリンで動脈壁を洗った後, esterase と incubation した場合, 対照はどのようにされたか。incubation 中に動脈壁で esterase と関係なく LPL が生産された可能性はないか。

回答 斎藤 康

ヘパリン処理した動脈壁切片では、精製したエステラーゼを添加しない時、リパーゼ活性の出現はみられません。エステラーゼを熱処理して添加した場合にもリパーゼ活性の出現はみられません。

Summary

Hyperlipidemia and Atherosclerosis (Especially Concerned with Arterial Wall Lipase)

Kohji SHIRAI, Nobuo MATSUOKA, Yasushi SAITO, Akira KUMAGAI,
Toshiharu MURAOKA* and Hiromichi OKUDA*

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba

*Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University, Ehime

The physiological significance of serum non-specific carboxyl esterase (tributyltin hydrolase) is not clearly understood. Cucuianu et al. reported that esterase was closely related to triglyceride metabolism¹⁾. Furthermore, Okuda et al. reported that nonspecific esterase might be converted to lipase (ediol hydrolysis activity) in rat liver²⁾. To clarify the relationship between serum nonspecific esterase and triglyceride metabolism, such as hypertriglyceridemia and triglyceride hydrolysis in arterial wall, the experiments were carried out in humans and rats.

In the clinical investigation of 500 farmers at Yoshida Machi in Ehime prefecture, serum triglyceride concentrations of the farmers increased after a period of sprinkling agricultural pesticide. Serum nonspecific carboxyl esterase decreased reciprocally with the increase in triglyceride concentration. These results suggest that serum nonspecific esterase might play a role of triglyceride hydrolysis. When serum nonspecific esterase, which was purified by the method of $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ fractionation, Sephadex G-200 and DEAE Sephadex A-50 column chromatography to show a single band of protein in disc electrophoresis, was

incubated with slices of rat aorta which had been treated with heparin to remove lipase, a greater extent of lipase (triolein hydrolase) activity was observed than that of the heparin treated aorta and the same extent as that of none treated aorta. Serum nonspecific esterase had no effect when it was treated in boiling water. The same results were confirmed not only chemically but also histochemically.

These results suggested that serum nonspecific carboxyl esterase might be converted to lipase in aorta.

Further studies are now in progress to clarify the relationship between nonspecific carboxyl esterase and lipase, such as localization of nonspecific esterase and lipase in the subcellular fraction, and immunological identification of nonspecific esterase and lipase.

1) Cucuianu, M. et al.: Clin. Chem. Acta, **59**: 19 (1975).

2) Okuda, H. & Fuji, S.: J. Biochem., **64**: 377 (1968).

Key words: nonspecific carboxyl esterase, lipase, arterial wall, triglyceride hydrolysis