コレステロール投与家兎血小板の脂肪酸構成*

鵜 沢 春 生** 中 村 勇 久**

関 義 憲** 前 田 英 雄**

Key words : Hypercholesterolemia, Platelet, Fatty acid composition, Rabbit experiment

血小板が動脈硬化の pathogenesis や動脈硬化性疾患の発症に重要な役割を演じていることは明らかなところである。血小板の脂質と血液凝固や血栓形成過程との関係を対象とした研究には数多いものがある。最近 Lees¹⁾によると家族性高コレステロール血症例の血小板は ADP, Collagen および Epinephrine に対して正常人の血小板を凝集させる量のそれぞれ $1/3$, $1/3$ および $1/25$ で充分凝集し、総核酸物質の放出は 3 ~ 6 倍であった。しかし血小板第 3 および第 4 因子の放出や粘着能、血餅退縮能は正常であるとしている。そしてこの成績から Cooper ら²⁾ は正常血小板に *in vitro* でコレステロールを incorporate させたところ ADP に対しては 15 倍、Epinephrine に対して 35 倍に凝集性がたかまり、incorporate されたコレステロールは膜成分に主に存在していたと報告した。膜のコレステロールが凝集能に大きな関係のあることは疑いのないところであろう。

高度不飽和脂肪酸の投与が血小板凝集を抑制することは以前から知られていたが、1975 年 8 月の第 4 回国際栄養学会で Unilever Research の Hornstra³⁾ はなかば *in vivo* 的な方法でノ-

ル酸とおそらくはリノレン酸は anti-thrombotic であり、trans-isomer も cis-isomer とおなじような態度をとるとしている。凝固因子としての磷脂質の脂肪酸構成に関する Marcus の数多い研究がかならずしも明快な結論を得ていないのに対してこのような成績は、凝集能の立場からみたという点で注目される。食餌による血小板脂肪酸構成の変化に関する研究は Miras⁴⁾ のものがあり、彼はブタにオリーブ油を主とする高脂肪食と高含水炭素食を投与して、もっとも目立った変化は血小板磷脂質脂肪酸におけるアラキドン酸の減少であったとしている。今回私共はもっとも汎用されているコレステロール投与家兎における血小板脂肪酸構成を追究した。

この研究の動機となったもう一つの理由は、すでに報告⁵⁾ した脳血栓の血小板磷脂質、脂肪酸構成に関する成績である。すなわち伊東⁵⁾、納富⁶⁾ によって、血小板の磷脂質構成とその脂肪酸構成が検討され、脳血栓症と対照健康者の磷脂質組成に大きな差がないことが判った (表 1)。そこで各磷脂質分画の脂肪酸構成をみたところ phosphatidylethanolamine (PE) でアラキドン酸とパルミチン酸に最大のバラツキがみられ、ア

Table 1 Composition of Phospholipids of Human Platelets (%)

	No. of Cases	PE†	PC	SM†	Others
Control	10	26.2 ± 0.7	43.4 ± 1.7	20.8 ± 0.6	9.6 ± 1.5
Cerebral Infarction	11	27.4 ± 1.0	43.2 ± 1.8	18.7 ± 1.0	10.7 ± 1.7

† $p < 0.001$

* Fatty acid composition of platelet total lipid of cholesterol fed rabbit. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 27, 1975).

** 熊本大学体質医学研究所人体質学研究部 [〒862 熊本市九品寺 4-24-1], Haruo UZAWA, Nobuhisa, NAKA-MURA, Yoshinori KO & Hideo MAEDA: Department of Geriatrics, Institute of Constitutional Medicine, Kumamoto University, Kumamoto, Japan 862.

Table 2 Fatty acid Composition of Platelet Total Lipid

Species No	Fatty acid (wt. %)									
	16:0 (DMA)	16:0	16:1	18:0 (DMA)	18:0	18:1	18:2	18:3(w3) 20:1(w9)	20:4	others
Rabbit 1	0.8	20.9	2.0	0.8	12.7	31.0	17.3	5.2	5.9	3.3
	0.9	19.6	2.4	0.5	13.6	30.9	17.3	4.7	6.8	3.3
	1.7	22.2	1.2	0.9	19.1	21.7	17.6	3.1	8.5	4.1
Rat 1	1.3	26.9	1.2	1.0	14.2	21.4	11.9	2.4	17.0	2.7
	0.9	28.0	1.5	0.6	16.8	22.3	8.5	2.5	15.8	3.1
	1.1	30.4	1.5	1.0	13.0	21.9	11.3	3.0	14.7	2.1
	1.8	27.9	0.8	1.9	15.1	14.4	10.6	1.2	25.1	1.3
Human Iwai	2.3	18.7	1.8	2.2	18.1	21.6	7.8	1.4	24.5	1.6
	2.3	18.1	0.9	2.3	18.5	21.4	7.5	1.4	26.1	1.4

ラキドン酸は phosphatidyl choline (PC) にもあったが, Sphingomyelin にはなく, (この他の分画は量的に少なかったし, 同定も困難であったので行っていない) 結局, 血小板総脂質の脂酸構成をみればよいということが判った. そして, 脳血栓では若年健常者に対してその血小板のアラキドン酸は有意に低下しており, これに対してパルミチン酸は有意に増加していた. 対象として脳血栓のみをとりあげているので, 他の動脈硬化性疾患々者でどうなっているかはいまだ行われていないが, 今後検討し, 単にバラツキにすぎないのかどうかを明らかにしたい. さて, コレステロール投与家兎の血小板脂酸構成を検討する前に, まず, ヒト, 家兎およびラットの血小板脂質の脂酸構成を検討した(表2) ヒトはかねてアラキドン酸が高いので, 2例しか行っていない. 家兎とラットは市販のものを, 飼育せずに直ちに材料とした. 表2で明らかにように, 家兎では18:2が20:4に比し高く, 17%と5%となっており, ヒトではこの逆に8%弱とほぼ25%であり, ラットはこの中間に位していた. 動脈硬化症になりやすいといわれる, 家兎がこのようなヒトとちがった高度不飽和脂酸の分布を示したことは上述のような理由から興味のあるところである.

家兎のコレステロール投与実験は Newzealand White に1%コレステロール添加 RC-5を投与した. RC-5 はオリエンタル酵母工業株式会社の飼育用ペレットで 100g 中, 粗蛋白約 23

%, 粗脂肪約 5% であり, その脂肪の脂肪酸構成は 16:0 16.8%, 16:1 2.3%, 18:0 2.8%, 18:1 12.1%, 18:2 39.3% および 18:3 26.7% と多価不飽和脂酸に富んでおり, 植物性のものであるとされている. 血小板は耳介動脈から血液 9vol:1vol ACD で採血, PRP をとり, modified Tyrode solution で洗滌して得たものを, sonicator 破碎または dry ice で freeze and thaw を3回くりかえして, Folch's method で, その脂質を抽出, BF₃ methanol でメチル化した. 多価不飽和脂酸の酸化を防ぐためすべて N₂ gas 気流下で行った. ガスクロマトグラフィーの条件は図1に示した. またその pattern は, 図のように 14:0 DMA から始まる, いくつかの peaks となっている. 文献のおよび reference fatty acid の retention time による同定によって図のように各 peak を定めた.

投与家兎は 1% Ccolesterol RC-5 3羽, RC-5のみを3羽として, 体重, 摂食量, 血清 total cholesterol, 血清 triglycerides, 血小板を追究した. 体重は実験開始後6か月でコレステロール群は10%減少, 対照群は15%増加, 血清 total cholesterol は対照群では 37mg/100ml, コレステロール群はいずれも >1,000mg/100ml, 血清 triglycerides はコレステロール群実験前 93, 後 226, 対照群でそれぞれ 100および 83mg/100ml であった. 血小板数は実験5~6か月間しか計測されていないが, 図2のように, 両群間に大きな差はなかった. 計数は Brecher-Cronkite 法

Shimazu GC-3BF Gaschromatograph (Hydrogen
Flame Ionization Detector)
Column: glass, 2,000 mm length, 3mm ϕ .
Temperature: Column.....190°C
Detector.....220°C
Inj. Port.....220°C
Packing Material: 15% DEGS, Shimalite W (AW)
60-80 mesh.

Fig. 1 Gas-liquid chromatogram of rabbit platelet fatty acid. Gas-liquid chromatograph and the conditions are indicated in the figure.

Fig. 2 Platelet count of the rabbits studied. : Basic diet group, : Cholesterol-supplemented diet group. Platelet count was determined by Brecher-Cronkite method.

Fig. 3 Platelet fatty acid composition (wt %) of the rabbits studied. The difference between these two groups was not significant.

によった。家兎血小板の脂肪酸構成は図3に示すようになった。コレステロール投与家兎において、oleic acid (18:1) が低く、linoleic acid (18:2)が高いようであるが、有意差ではなかった。以上の結果はコレステロール添加が血小板脂肪酸構成には大きな影響を及ぼすものでないことを示すものと考えられる。

ここで今後の問題として残るのは、購入直後の家兎血小板脂肪酸構成で18:2が17%もあったことで、RC-5という比較的高度不飽和脂肪酸にとむ脂肪が投与されているにもかかわらず、6か月飼育で18:2が低下したということで、この点を明らかにするため、家兎について経時的にその血小板脂肪酸構成を追求すべきである。また血小板の凝集性、血小板のコレステロール量も同時に追究されなくてはならない。

文 献

- 1) Carvalho, A.C.A., Coleman, R.W. and Lees, R. S.: Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.*, **290**; 434, 1975.
- 2) Shattil, S. J., Anaya-Galindo, R., Bennett, J., Colman, R.W. and Cooper, R.J.: Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. *J. Clin. Invest.*, **55**; 636, 1975.
- 3) Hornstra, G. and Vergroesen, A.J.: Dietary factors in arterial thrombosis, Xth International Congress of Nutrition Abstract p. 48, 1975.
- 4) Andreoli, V.M. and Miras, C.J.: Platelet lipids: Effect of a high fat or a high carbohydrate diet in pig plasma and platelet fatty acid composition. *Life Science*, **10**(II); 481, 1971.
- 5) 鷗沢春生: 脳血栓における血小板脂質. 臨床病理, **21**(8); 684, 1973.

<ABSTRACT>

Fatty Acid Composition of Platelet Total Lipid of Cholesterol Fed Rabbit

by

Haruo UZAWA, Nobuhisa NAKAMURA,
Yoshinori KO and Hideo MAEDA

from

Department of Geriatrics, Institute of Constitutional Medicine, Kumamoto University,

Kumamoto, Japan.

Platelet fatty acid composition (wt %) of human, rat, and rabbit were studied. The results were as follows:

Fatty acid	16:0	18:0	18:1	18:2	20:4
Rabbit(n=3)	20.9	15.1	27.9	17.4	7.1
Rat (n=4)	28.3	14.8	19.9	10.6	18.3
Human(n=2)	18.4	18.3	21.5	7.7	25.3

(Fatty acids whose wt% higher than 10% were listed.)

In rabbit platelet fatty acid composition, the arachidonic acid (20:4) was lowest and the linoleic acid (18:2) was highest among those of the three species. The results of previous study on the platelet fatty acid composition of rabbit fed cholesterol-supplemented diet for six months were also reported. In the study the basic diet (RC-5) and the cholesterol-supplemented diet were obtained from Oriental Kōbo Kōgyo Co., Tokyo. Ingredients of RC-5 were as follows: Crude fat 4.8g, crude protein 22.8g, and water soluble non-nitrogenous substance 46.2g in 100g. Fatty acid composition of the fat was 16:0, 16.8%, 16:1, 2.3%, 18:0, 2.8%, 18:1, 12.1%, 18:2, 39.3%, and 18:3, 26.7%. The body weight, the serum total cholesterol, and the serum triglycerides of the two groups (the rabbits fed basic diet only and the rabbits fed cholesterol-supplemented diet) before and six months of experiment were as follows:

	Basic diet group	Cholesterol-supplemented diet group
Number of animals	3	3
Body weight (kg.)		
Before	3.95	4.4
6 months	4.53	4.0
Serum total cholesterol (mg/100ml)		
Before	trace	trace
6 months	37	>1000
Serum triglycerides (mg/100ml)		
Before	100	93
6 months	83	226

The platelet fatty acid composition of the two groups at six months experiment were as follows:

	Basic diet	Cholesterol-supplemented diet
16:0 DMA	6.7±2.0	6.7±1.4
16:0	19.3±3.7	19.2±4.6
16:1	12.0±3.2	11.7±4.4
18:0 DMA	15.0±5.7	15.5±4.3
18:0	11.5±0.7	13.4±3.1
18:1	27.9±5.8	23.8±7.1
18:2	5.9±1.0	9.7±2.7

(Figures indicate mean ± SEM.)

The platelet fatty acid composition of the cholesterol-supplemented diet group was not significantly different from that of the basic diet group.