

Characteristics and Mechanisms of Changes in Lipoprotein Properties of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7894

遺伝性高脂血症家兎のリポ蛋白の特徴と その成因に関する研究

金沢大学医学部附属病院第二内科学講座 (主任: 竹田亮祐教授)

若 杉 隆 伸

(昭和61年 8月30日受付)

遺伝性高脂血症家兎 (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, WHHL 家兎) のリポ蛋白の特徴および家族性高コレステロール血症のリポ蛋白との異同を明らかにすることが、本研究の第1の目的である。第2の目的は、WHHL 家兎における超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) およびアポリポ蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 増加の成因を検討することである。ハーベルらの方法に従って、リポ蛋白の超速心分析を行った結果、WHHL 家兎が家族性高コレステロール血症と異なる主な点は、次の諸点であった。中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白の増加比率 (15~20 倍) が家族性高コレステロール血症 (2~3 倍) に比べ著明に大きいこと、VLDL は家族性高コレステロール血症では正常ないし軽度増加であるのに対し、WHHL 家兎では著明に増加 (約26倍) していたこと、WHHL 家兎のヘテロ接合体は軽度のリポ蛋白増加しか示さないこと、などであった。血清アポリポ蛋白濃度を一次元免疫拡散法で測定すると、WHHL 家兎ではアポリポ蛋白 B が 14 倍、apoE が 90 倍以上に著明に増加していたが、家族性高コレステロール血症では、それぞれ 2 倍、1.5 倍の増加であった。WHHL 家兎で認められた VLDL 増加の機序に関して、2つの検討を行った。まず、レムナント代謝に関わる apoE の検討では、等電点電気泳動による apoE イソ蛋白に欠損や組成変化は認められなかった。次に、VLDL 中のトリグリセライドを分解するリパーゼ活性をクラウスらの方法で測定した。コレステロール含有飼料負荷家兎では、リポ蛋白リパーゼ活性が 2.1 倍、肝性リパーゼ活性は 3 倍に上昇していた。WHHL 家兎では、肝性リパーゼ活性は 3.1 倍に上昇していたが、リポ蛋白リパーゼ活性の上昇はなかった。apoE 合成量の指標として、肝の apoE 伝令 RNA 量を、ドットプロットング・ハイブリダイゼーション法で測定した。正常家兎に比べ、WHHL 家兎肝の apoE 伝令 RNA 量は 2 倍に増加していた。WHHL 家兎は家族性高コレステロール血症の良いモデル動物であるが、低比重リポ蛋白受容体障害以外の異常も存在した。

Key words Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, lipoprotein properties, apolipoprotein E, messenger RNA, postheparin lipolytic activities

遺伝性高脂血症家兎 (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, WHHL 家兎) は、高コレステロール血症を呈し、指趾関節部の黄色腫や粥状硬化症を発生することが報告されている¹⁻³⁾。その原因は、線維芽細胞⁴⁾、肝細胞⁵⁾、副腎細胞膜⁷⁾で証明されたように、低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受容体の遺伝的な欠損であるとされている。WHHL 家兎

の症状や LDL 受容体の異常は、家族性高コレステロール血症の臨床的特徴⁸⁻¹²⁾や遺伝的異常¹²⁾に類似している。従って WHHL 家兎は家族性高コレステロール血症のモデル動物とされている。しかしながら WHHL 家兎のリポ蛋白像を家族性高コレステロール血症と比較検討した報告はなく、WHHL 家兎の特徴が明確にされていない。コレステロール含有飼料を与

Abbreviations: apoB, apoC, apoE, apolipoprotein B, C, and E, respectively; bp, base pairs; cDNA, complementary DNA; C-fed, cholesterol-fed (rabbit); C-fed-1, C-fed-2, C-fed-4, and C-fed-6, rabbits fed 100 g/day of 1% cholesterol chow diet for one, two, four, and six weeks, respectively; FFA, free fatty acid; HDL, high density lipoprotein; HTGL, hepatic

えた家兎 (cholesterol-fed 家兎, C-fed 家兎) では、肝の LDL 受容体機能が低下し、高コレステロール血症や、動脈硬化症を発生する^{13,14)}。WHHL 家兎のリポ蛋白像を、類似の異常を示す C-fed 家兎と詳細に比較検討した報告もない、そこで、本研究では、LDL 受容体障害を有する家族性高コレステロール血症、WHHL 家兎、C-fed 家兎のリポ蛋白像を比較検討し、WHHL 家兎のリポ蛋白像の特徴を明らかにし、家族性高コレステロール血症のリポ蛋白像との異同を明らかにすることを第 1 の目的とした。

家族性高コレステロール血症では、超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) はほぼ正常であるのに比べ、WHHL 家兎では VLDL が著明に増加していた。この VLDL の差が両者の相違点として重要と考えられた。WHHL 家兎における VLDL 増加の機序として、LDL 受容体障害における VLDL 代謝の低下しか報告されていない^{15,16)}。ヒトでは、リパーゼ活性の欠損による I 型高脂血症¹⁷⁾や、アポリポ蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) の異常による III 型高脂血症¹⁸⁾で、比重の低いリポ蛋白の増加が知られているにも拘わらず、WHHL 家兎のリパーゼ活性や apoE に関する検討はなされていない。WHHL 家兎の VLDL 増加に、リパーゼ活性や apoE の異常が関与するかどうかを検討することが、本研究の第 2 の目的である。

対象および方法

I. 対 象

1. ヒト

未治療ヘテロ接合体性家族性高コレステロール血症患者 15 例 (男 9 例, 女 6 例) で、リポ蛋白の超遠心分析とアポリポ蛋白濃度の測定を同時に行った。なお、家族性高コレステロール血症の診断は馬瀨らの方法^{10,19)}に基づいて行った。正常ヒト群は、下記の条件全てを満たした 16 例 (男 10 例, 女 6 例) である。虚血性心疾患・肝疾患・腎疾患・内分泌疾患・+10%以上の肥満・糖尿病を有さないこと、血清総コレステロール濃度 230 mg/dl 以下、血清トリグリセライド濃度 150 mg/dl 以下であること、リポ蛋白の超遠心分析とアポリポ蛋白濃度の測定が同時になされたこと、である

2. 家兎

1) 家兎の起源と飼料

ホモ接合体性 WHHL 家兎は、神戸大学渡辺嘉雄博

士より提供された。ヘテロ接合体性 WHHL 家兎は、ホモ接合体性 WHHL 家兎に正常な日本種白色家兎 (三共ラボ・サービス, 富山) をかけあわせて作成した。標準家兎飼料 (Type ORC-4, オリエンタル酵母工業, 東京) を 1 日 100 g, 1 週間与えた後に、ホモあるいはヘテロ接合体性 WHHL 家兎を使用した。なお、本論文では、WHHL 家兎はヘテロ接合体性 WHHL 家兎 (ヘテロ WHHL 家兎) と断わらない限り、ホモ接合体である。

正常家兎 (normal rabbit, NR) は、日本種白色家兎に標準家兎飼料を 1 日 100 g, 1 週間与えたものである。C-fed 家兎は、日本種白色家兎に 1%コレステロール含有飼料 (特別注文製品, オリエンタル酵母工業) を 1 日 100 g, 後記の期間与えて作成した。

上記各種の家兎を 12 時間以上絶食させた後に、抗凝固剤を加えずに採血あるいは後記の実験に使用した。

2) 各実験で使用した家兎の種類と数

実験 1 のリポ蛋白超遠心分析および実験 2 で使用した家兎は同一個体である。WHHL 家兎は雄 8 羽を用い WHHL 群, また、NR は雄 8 羽を用い NR 群とした。C-fed 家兎は、1%コレステロール含有飼料を 1 週間与えた雄 4 羽を C-fed 家兎-1 (C-fed-1) 群とし、2 週間与えた雄 6 羽, 4 週間与えた雄 5 羽をそれぞれ C-fed-2 群, C-fed-4 群とした。実験 1 のアポリポ蛋白測定に供した NR (雌雄各 2 羽), ヘテロ WHHL 家兎 (雄 3 羽), ホモ WHHL 家兎 (雌雄各 2 羽) は、実験 1 の超遠心分析を行った家兎とは別個体である。

実験 3 では、実験 1 および 2 とは別個体の日本種白色家兎を使用した。NR 群は雄 8 羽, C-fed-6 群は 1%コレステロール含有飼料を 6 週間与えた雄 8 羽である。WHHL 家兎は実験 1 および 2 で使用した雄 8 羽のうちの 5 羽を用い、これを実験 3 の WHHL 群とした。

実験 4 では、実験 1, 2 および 3 とは別個体の日本種白色家兎および WHHL 家兎を使用した。NR 群は雌雄各 2 羽, WHHL 群は雄 1 羽, 雌 2 羽である。

II. 方 法

1. リポ蛋白脂質の測定

リポ蛋白の超遠心分析はハーベルらの方法²⁰⁾に従って、ベックマン社 (アメリカ) 製超遠心機 L8-55 および同社製ローター-50.3 Ti を用いて行った。血清を、VLDL (比重 $d < 1.006$ g/ml, 10°C, 40,000 rpm, 20 時

triglyceride lipase; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase; mRNA, messenger RNA; NR, normal rabbits; PHLA, postheparin lipolytic activity; VLDL, very low density lipoprotein; WHHL, Watanabe heritable hyperlipidemic (rabbit).

間), 中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) ($1.006 \text{ g/ml} < d < 1.019 \text{ g/ml}$, 10°C , 40,000 rpm, 30 時間), LDL ($1.019 \text{ g/ml} < d < 1.063 \text{ g/ml}$, 10°C , 40,000 rpm, 30 時間) および高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, HDL) ($d > 1.063 \text{ g/ml}$) に分離した。カイロミクロンは分離しなかった。血清および各リポ蛋白分画の総コレステロールは酵素法²¹⁾によるデタミナー-TC (協和メデックス, 東京), リン脂質は酵素法²²⁾による PL キット-K (日本商事, 大阪) を用いて測定した。トリグリセライドは, ヒトでは酵素法²³⁾によるリピドス・エース (東洋紡, 大阪) を用い, 家兎ではアセチルアセトン法²⁴⁾によるトリグリ S 栄研 (栄研化学, 東京) を用いて測定した。

2. アポリポ蛋白濃度の測定

血清アポリポ蛋白は, 一次元免疫拡散法²⁵⁾による諸キット (第 1 化学, 東京) を用いて測定した。

上記キットは, ヒトのアポリポ蛋白に対する抗体を使用している。家兎のアポリポ蛋白 B (apolipoprotein B, apoB) および apoE が, 上記抗体と反応することを次のような方法で確認した。下記 3 種類の検体を apoB 測定用プレートの試料穴に注入し, 沈降輪の有無を観察した。3 種類の検体は, ①無処理の家兎血清, ②VLDL, IDL, LDL をヘパリン-マンガン法²⁶⁾で沈澱させた血清, ③超遠心法で得た VLDL を後記の方法で脱脂し, アポ VLDL 沈澱を 10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), pH 8.6 に溶解した検体, である。家兎 VLDL を脱脂後, 内径 2 mm のガラス管内に作成した 8 M 尿素 (シュワルツ/マン社, 規格 Ultrapure) を含む 10% ポリアクリルアミドゲルでディスク電気泳動²⁷⁾を行った。泳動後のポリアクリルアミドゲルを 1% アガロースゲルに埋没した。ポリアクリルアミドゲルに並行に試料溝をつくり, 抗ヒト apoE 抗体を注入した。沈降線の部位と, 同時に電気泳動し, クマシーブルーで染色したポリアクリルアミドゲルの蛋白位置とを比較した。

3. アポ VLDL の等電点電気泳動

超遠心で得た VLDL に比重 1.006 g/ml の塩化ナトリウム溶液を加え, 10°C , 40,000 rpm, 20 時間の再超遠心を行って洗浄した。VLDL の蛋白量をローリー変法^{27), 28)}で測定した。蛋白量として 250~300 μg 相当の VLDL を, 5 容量のアセトン・エタノール混液 (容量比 1 : 1) で 2 回, ジエチルエーテルで 1 回の脱脂²⁹⁾を行い, アポ VLDL を沈澱として得た。窒素流下で風乾後, 8 M 尿素, 10 mM dithiothreitol を含む, 10 mM Tris, pH 8.6 に溶かした。0.2% methylene-bis(acrylamide), 8 M 尿素, 2% ampholine (pH 4-6) (LKB 社, スウェーデン) を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲ

ルに上記アポ VLDL 溶液を重層し, 4°C , 150 V, 16 時間の等電点電気泳動²⁹⁾を行った。クマシーブルーで染色し, 波長 550 nm で吸光度を走査記録した。各ピーク下の面積を求め, apoE およびアポリポ蛋白 C (apolipoprotein C, apoC) のそれぞれの分画の, apoE または apoC 全体に占める百分率と, apoE/apoC 比を計算した。

等電点電気泳動における, apoE および apoC の泳動位置は, 次のような方法で確認した。アポ VLDL を前節の方法でディスク電気泳動を行った。クマシーブルーで染色して, apoE および apoC の位置¹⁴⁾を確認した。同時に泳動した別のゲルより, apoE および apoC に相当する部分を切り取り, 等電点電気泳動用ゲルに載せて泳動した。pI は, 等電点電気泳動後のゲルを 2 mm 長に細切りし, 10 mM 塩化カリウム溶液 2 ml に入れて測定した。

4. リパーゼ活性の測定

家兎に体重 1 kg あたり 100 単位のヘパリンを耳辺縁静脈より静注し, 10 分後に氷冷した試験管に耳動脈より 3 ml 採血した。直ちに, 4°C で遠心して血漿を分離し, -80°C で保存した。

ヘパリン静注後リパーゼ活性 (postheparin lipolytic activity, PHLA) は, クラウスらの方法³⁰⁾に従い次のような方法で測定した。トリオレイン (シグマケミカル社) 113 μmoles , 遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) を含まないウシアルブミン (同社) 200 mg, 1% トリトン X-100 0.6 ml, 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.194 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.6) 11.4 ml に, glycerol tri [1-¹⁴C] oleate (アマシャム社, 56.6 mCi/mmol) 2 μCi を加え, 超音波で懸濁したものを基質とした。総 PHLA は, 基質と同じ緩衝液 75 μl に検体 25 μl を加え, 27°C に 10 分間孵置した後, 基質 0.9 ml を加え, さらに 60 分間孵置した。ショッツらの方法³¹⁾に従い, 0.1 N 水酸化カリウム溶液で遊離した脂肪酸を抽出し, ¹⁴C の計数率を測定した。肝性リパーゼ (hepatic triglyceride lipase, HTGL) は, 測定系に硫酸プロタミン 3 mg を加えて測定した。リポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase, LPL) は, 総 PHLA より HTGL を差し引いて算出した。

5. 肝の apoE 伝令 RNA の測定

イ) プローブの作成

ヒト apoE に対する相補鎖 DNA (complementary DNA, cDNA) を含むプラスミド³²⁾の DNA を, 制限酵素 PstI (宝酒造, 京都) で切断し, 5% ポリアクリルアミド平板ゲルで電気泳動した。759 番より 915 番³³⁾に相当する 157 ベースペア (base pair, bp) のバンドを切り出し, 蒸留水で抽出・精製した。M13 ク

ローニングキット (アマシャム社) を用い、同キット記載の方法で、先に精製した cDNA 断片をファージ M13 mp9 の Pst I 部位にくみこんだ。このファージで大腸菌 JM103 株を形質転換した。ピルンボイムの方法³⁴⁾でファージの複製型 DNA を採取し、これの制限酵素による切断パターンより伝令 RNA (messenger RNA, mRNA) と同じ核酸配列をもつ順鎖 DNA がくみこまれたクローンを選択した。

大腸菌培養液よりファージを 2.1% ポリエチレングリコール 6000 で沈澱させ、フェノールで除蛋白して 1 本鎖 DNA を得た。この DNA を 0.8% アガロースゲルで電気泳動して、ファージ DNA を精製した。この DNA よりプローブを作る方法³⁵⁾を、以下に略述する。前記 DNA に 17 塩基の M13 プライマー (ファルマシア社) をアニーリングした。デオキシ GTP, デオキシ TTP, デオキシ ATP, [α -³²P] デオキシ CTP (アマシャム社) を加え、DNA ポリメラーゼ、クレンウ断片 (ファルマシア社) を使用して相補鎖 DNA を合成した。制限酵素 HindIII で切断後、90% ホルムアミド溶液を加え、100°C で 5 分間加熱して 1 本鎖に解離させた。事前通電で加熱しておいた 7 M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミド平板ゲルで電気泳動した。オートラジオグラフィを行って目的とするバンドの位置を確認し、ゲルを切り出して抽出しプローブとした。

2) 肝 apoE-mRNA 量の測定

家兎肝よりグアニジン塩酸法³⁶⁾で RNA を抽出した。RNA 量はオルシノール反応³⁷⁾で定量した。

肝 RNA 10 μ g にホルムアルデヒドを 1 M になるように加え、55°C、15 分間加熱した。3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸 3 ナトリウム溶液を 10 倍量加えた。平均孔径 0.2 μ m のニトロセルロース・フィルター (シュライヒャー・シュエル社、西独) に直径 4 mm の円形になるようにプロットングし、80°C で 2 時間加熱固定した³⁸⁾。1.5 M 塩化ナトリウム、0.15 M クエン酸 3 ナトリウム、0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% ウシアルブミン、サケ精子 DNA (50 μ g/ml) の溶液 5.2 ml に、プローブ 2×10^6 cpm 相当量を加えた後、ニトロセルロースフィルターを入れ、65°C、22 時間ハイブリダイゼーションを行った。15 mM 塩化ナトリウム、1.5 mM クエン酸 3 ナトリウム溶液中で、55°C、15 分間洗浄³⁹⁾した。-80°C、48 時間オートラジオグラフィを行い、プロットングしてない部分にはプローブの明らかな残存のないことを確認した。その後、プロットングした部分を中心に 7 \times 7 mm 大にニトロセルロースフィルターを切った。切片中の核酸を 0.5 N 塩酸 0.1 ml で 90°C、2 時間加水分解した後、酢酸エチル 0.2 ml を加えてフィルターを

溶かした。液体シンチレーター ACS II (アマシャム社) 5 ml を加え、計数率を測定した。プローブの鋳型としてファージ DNA を同様に処理して検量線を作り、apoE mRNA 量を算出した。

6. 統計処理は、スチューデントの t 検定、一元配置分散分析、ウィルコクソンの順位和検定、クラスカル・ワリスの H 検定、ボンフェロニ法多重比較、単相関分析法を使用した。

成 績

I. 実験 1 家族性高コレステロール血症、C-fed 家兎、WHHL 家兎のリポ蛋白およびアポ蛋白の特徴と比較

1. 家族性高コレステロール血症の血清およびリポ蛋白脂質 (表 1)

血清コレステロール値は、正常ヒト群の約 2 倍に上昇していた。リポ蛋白別にみると、LDL コレステロール値の増加が最も著明であり、しかも全例で認められた。VLDL および IDL コレステロール値は、平均値の有意の上昇は認められたが、正常値 (正常ヒト群の平均値 + 2SD 以下) を示す例も多数 (それぞれ、12 例、6 例) 認めた。HDL コレステロール値は、正常ヒト群と差がなかった。

血清および IDL、LDL のトリグリセライド値は上昇していたが、VLDL および HDL トリグリセライド値は正常ヒト群と差がなかった。

血清および IDL、LDL のリン脂質値は上昇し、VLDL および HDL リン脂質値には変化がなかった。

2. C-fed 家兎の血清およびリポ蛋白脂質 (表 2)

血清コレステロール値は、NR 群に比べ著明に高く、しかも経時的に増加した。リポ蛋白別にみると、VLDL、IDL、LDL が著明に増加していた。比重の小さいリポ蛋白ほど増加の程度が大きく、しかも、著明な経時的増加を認めた。HDL コレステロール値は、NR 群に比べ、C-fed-1 群では不変、C-fed-2 群および C-fed-4 群では増加していた。

コレステロール値の大きな変化に対し、トリグリセライド値にはわずかな変化しか認めなかった。リン脂質値の変化の様相はコレステロール値の変化に類似していたが、その程度は軽度であった。

3. WHHL 家兎の血清およびリポ蛋白脂質 (表 2)

血清コレステロール値は、NR 群の約 11 倍の高値を示し、VLDL、IDL および LDL 分画で増加していた。C-fed 家兎と異なり、比重の小さい分画ほど増加程度が著明ということにはなかった。家族性高コレステロール血症とも異なり、VLDL コレステロール値の増加が全個体で認められ、その増加程度 (26 倍) は LDL (18 倍)

Table 1. Serum and lipoprotein lipid levels of normal and familial hypercholesterolemic subjects.

		Normal	Familial Hypercholesterolemia	t-test
Total Cholesterol (mg/dl)	Serum	168±26 (16)	339±51 (15)	p<0.001
	VLDL	12± 7	22± 9	p<0.01
	IDL	5± 2	16±11	p<0.001
	LDL	77±23	215±42	p<0.001
	HDL	55±17	50±11	ns
Triglyceride (mg/dl)	Serum	82±31	114±45	p<0.05
	VLDL	37±26	38±33	ns
	IDL	7± 3	11± 6	p<0.05
	LDL	13± 4	30±10	p<0.001
	HDL	15± 3	16± 3	ns
Phospholipid (mg/dl)	Serum	180±31	246±54	p<0.001
	VLDL	13± 8	17±10	ns
	IDL	5± 2	13± 9	p<0.01
	LDL	53±14	138±29	p<0.001
	HDL	108±27	94±21	ns

Values are mean±SD(n). ns; not significant.

Table 2. Serum and lipoprotein lipid levels of normal, C-fed-1, C-fed-2, C-fed-4, and WHHL rabbits.

		Normal	C-fed-1	C-fed-2	C-fed-4	WHHL	ANOVA
Total Cholesterol (mg/dl)	Serum	58±19(8)	517±160(4) b	891±230(6) c	1657±392(5)c	609±224(8) c	p<0.01
	VLDL	6± 3	120± 62	203± 95 b	603±172 c	157±100 a	p<0.01
	IDL	5± 4	97± 38 b	198± 60 c	351± 62 c	75± 25 b	p<0.01
	LDL	17±12	228± 59 a	286± 52 c	341± 82 c	312±188 c	p<0.01
	HDL	24± 4	22± 3	34± 3 c	34± 9 c	10± 4 c	p<0.01
Triglyceride (mg/dl)	Serum	63±19	33± 20	47± 25	61± 21	509±333 c	p<0.01
	VLDL	20± 7	12± 10	12± 10	29± 10	228±183 c	p<0.01
	IDL	6± 4	5± 2	10± 4	11± 4	48± 33 c	p<0.01
	LDL	13± 8	10± 5	13± 7	13± 5	166± 55 c	p<0.01
	HDL	14± 2	7± 4 c	9± 3 a	8± 3 b	7± 2 c	p<0.01
Phospholipid (mg/dl)	Serum	85±14	205± 66	373± 81 c	650±190 c	414±128 c	p<0.01
	VLDL	9± 3	37± 19	80± 47	176± 52 c	98± 64 b	p<0.01
	IDL	5± 3	36± 15 a	80± 25 c	131± 28 c	48± 18 c	p<0.01
	LDL	14± 9	92± 25	126± 28 c	143± 39 c	203± 89 c	p<0.01
	HDL	56± 7	45± 9 a	46± 5 a	65± 6 a	38± 3 c	p<0.01

Values are mean±SD(n). After the one way analysis of variance (ANOVA), simultaneous multiple comparisons between normal rabbits and other rabbits were done by Bonferroni's method. a, p<0.05; b, p<0.01; c, p<0.001.

より著明であった。HDL コレステロール値は NR 群の 1/2 に減少していた。

血清および VLDL, IDL, LDL トリグリセライド値の著明な増加があり、家族性高コレステロール血症や C-fed 家兎とは全く異なっていた。リン脂質値の増加は、トリグリセライドとほぼ同程度であった。

血清アポリポ蛋白の測定に使用した正常家兎とヘテロ WHHL 家兎の血清およびリポ蛋白脂質値を表 3 に示した。コレステロール値には有意な差はなかったが、血清および VLDL, IDL, HDL トリグリセライド値が、ヘテロ WHHL 家兎では有意に上昇していた。

4. 家族性コレステロール血症のリポ蛋白の脂質組成 (表 4)

正常ヒト群に比べ、コレステロール/トリグリセライド比およびコレステロール/リン脂質比が、比重の小さい分画で上昇していた。HDL 分画では、正常ヒト群と差を認めなかった。

5. 家兎のリポ蛋白の脂質組成 (表 5)

C-fed 家兎では、いずれのリポ蛋白もコレステロールに富む組成に変化していた。リポ蛋白コレステロール値は経時的に上昇した (表 2) が、脂質比には経時的変動の傾向を認めなかった。

WHHL 家兎では、NR 群に比べ、VLDL, IDL, LDL 各分画の脂質比が、有意ではないが上昇していた。

C-fed 家兎の脂質比は著明に大きく、家族性高コレステロール血症 (表 4) や WHHL 家兎とは全く異

Table 3. Serum and lipoprotein lipid levels of normal and heterozygous WHHL (Hetero. WHHL) rabbits.

		Normal	Hetero. WHHL	t-test
Total Cholesterol (mg/dl)	Serum	40±9 (4)	49±14 (3)	ns
	VLDL	2±1	5±5	ns
	IDL	1±0.3	3±3	ns
	LDL	3±4	4±5	ns
	HDL	23±5	22±6	ns
Triglyceride (mg/dl)	Serum	59±9	106±28	p<0.01
	VLDL	23±5	42±9	p<0.05
	IDL	3±1	9±2	p<0.01
	LDL	10±2	13±4	ns
	HDL	24±1	31±2	p<0.001

Values are mean±SD(n). ns; not significant.

Table 4. Cholesterol/triglyceride and cholesterol/phospholipid ratios of each lipoprotein fractions in normal and familial hypercholesterolemic subjects.

		Normal	Familial Hypercholesterolemia	Wilcoxon's test
Cholesterol/Triglyceride ratio	VLDL	0.36±0.12 (16)	0.95±0.70 (15)	p<0.01
	IDL	0.80±0.27	1.51±0.68	p<0.01
	LDL	6.10±1.90	7.69±2.58	ns
	HDL	3.89±1.71	3.24±1.02	ns
Cholesterol/Phospholipid ratio	VLDL	1.05±0.48	1.54±0.69	ns
	IDL	1.28±1.25	1.54±0.96	ns
	LDL	1.42±0.10	1.56±0.08	p<0.01
	HDL	0.51±0.05	0.53±0.10	ns

Values are mean±SD(n). ns; not significant.

なっていた。

6. 家族性高コレステロール血症のアポリポ蛋白濃度 (表 6)

apoB および apoE が正常ヒト群より有意に増加していた。apoB と、VLDL, IDL および LDL コレステロール値との間には、それぞれ、 $r=0.62, 0.70, 0.86$ の有意 (全て $p<0.001$) の正の相関関係があった。apoE とこれらアポリポ蛋白コレステロール値との間にも有意 (それぞれ、 $p<0.05, p<0.05, p<0.001$) の正の相関関係 (それぞれ、 $r=0.42, 0.42, 0.59$) を認めた。他のアポリポ蛋白濃度は、正常ヒト群と差を認めなかった。

7. WHHL 家兎のアポリポ蛋白濃度

家兎 apoB, apoE と抗ヒトアポリポ蛋白抗体との反応性の有無を次のような方法で調べた。apoB を含む家兎全血清は、抗ヒト apoB 抗体を含むアガロースゲ

ル中で沈降輪を形成した (図 1-a)。ヘパリン-マンガン法²⁶⁾で apoB を含む VLDL, IDL および LDL を沈降させた上清は、上記ゲル中で沈降輪を作らなかった (図 1-a)。脱脂して得たアポ VLDL にラウリル硫酸ナトリウムなどを含まない液を加えると、apoE, apoC などは溶出するが、apoB は溶出しな。この溶液も前記ゲル中で沈降輪を作らなかった (図 1-a)。アポ VLDL を電気泳動したポリアクリルアミドゲルをアガロースゲルに埋め、二元免疫拡散を行うと、apoE に対応する位置だけに沈降線を形成した (図 1-b)。以上より、家兎 apoB, apoE は抗ヒトアポリポ蛋白抗体と反応することが確認できた。

表 6 に示すように、ヘテロおよびホモ WHHL 家兎の血清 apoB 濃度は、NR 群に比べ、それぞれ 1.3 倍、14.2 倍に増加していた。NR 群では、apoE 濃度は検出感度以下だった。ヘテロ WHHL 家兎に比べ、ホモ

Table 5. Cholesterol/triglyceride and cholesterol/phospholipid ratios of each lipoprotein fractions in normal, C-fed-1, C-fed-2 C-fed-4, and WHHL rabbits.

		Normal	C-fed-1	C-fed-2	C-fed-4	WHHL	H-test
Cholesterol/ Triglyceride ratio	VLDL	0.28±0.11(8)	28.8 ±37.8(4) b	26.5 ±17.9(6) c	21.5 ±6.0 (5) c	0.74±0.23(8)	$p<0.01$
	IDL	0.83±0.19	31.7 ±23.4 b	23.6 ± 7.8 b	35.0 ±6.7 c	1.95±0.98	$p<0.01$
	LDL	1.13±0.32	30.5 ±18.1 b	26.9 ± 9.3 c	28.4 ±6.1 b	1.98±1.20	$p<0.01$
	HDL	1.76±0.28	4.16± 2.33	4.83± 2.44 a	4.73±1.92 a	1.54±0.66	$p<0.01$
Cholesterol/ Phospholipid ratio	VLDL	0.64±0.27	3.49± 1.26 b	2.65± 0.75 b	3.42±0.04 c	1.58±0.29	$p<0.01$
	IDL	1.15±0.18	2.79± 0.41 c	2.48± 0.18 b	2.69±0.12 c	1.60±0.30	$p<0.01$
	LDL	1.20±0.20	2.51± 0.32 b	2.28± 0.16 b	2.40±0.08 c	1.49±0.23	$p<0.01$
	HDL	0.42±0.04	0.49± 0.08	0.80± 0.12 b	0.54±0.10	0.27±0.12	$p<0.01$

Values are mean±SD(n). After the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by rank, simultaneous multiple comparisons between normal rabbits and other rabbits were done by Bonferroni's method. a, $p<0.05$; b, $p<0.01$; c, $p<0.001$.

Table 6. Apolipoprotein concentrations of normal human, familial hypercholesterolemic patients, normal rabbits, heterozygous WHHL (Hetero. WHHL) and homozygous WHHL rabbits (Homo. WHHL).

	Normal Human	Familial Hypercholesterolemia	t-test	Normal Rabbit	Hetero. WHHL	Homo. WHHL	p-value
Apolipoprotein A-I	147 ±32(6)	135 ±25(5)	ns	ND	ND	ND	
Apolipoprotein A-II	36 ± 9	32 ± 8	ns	ND	ND	ND	
Apolipoprotein B	83 ±18	170 ±31	$p<0.001$	100±27(4)	127±29(3)	1420±224(4)c	<0.01 (ANOVA)
Apolipoprotein C-II	3.0± 0.9	3.4 ± 1.2	ns	ND	ND	ND	
Apolipoprotein C-III	7.4± 3.0	8.2 ± 1.8	ns	ND	ND	ND	
Apolipoprotein E	3.6± 1.4	5.4 ± 1.6	$p<0.01$	ND	0.58±0.04	51.9± 9.3	<0.01 (t-test)

Values are mean±SD(n). ND, not detected. ns, not significant. After the one way analysis of variance (ANOVA), simultaneous multiple comparisons between normal rabbits and other rabbits were done by Bonferroni's method. c, $p<0.001$.

WHHL 家兎の血清 apoE 濃度は著明に増加していた。他のアポリポ蛋白測定用アガロースゲル中では、沈降輪は形成されなかった。

8. 家族性高コレステロール血症, C-fed 家兎および WHHL 家兎のリポ蛋白の比較

表7には、家族性高コレステロール血症における値は、正常ヒト群の何倍であったか、C-fed 家兎各群や WHHL 家兎における値は、正常家兎群の何倍であったかを示した。

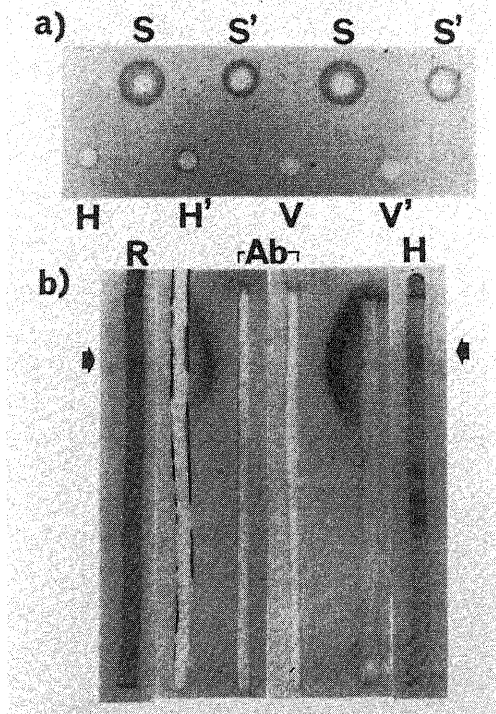


Fig. 1. Reactivities of anti-human apolipoprotein antibodies with rabbit apolipoproteins.

a) Reactivity of anti-apoB antibody. Ten or five (wells with a prime "'") microliters of samples were applied to agarose gel containing anti-human apoB antibody. Samples were rabbit whole serum (S, S'), HDL fraction obtained by precipitating VLDL, IDL and LDL by Heparin-Mn²⁺ method (H, H'), and apoVLDL solubilized in 10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl, pH 8.6 (V, V').

b) Reactivity of anti-apoE antibody. ApoVLDL of rabbit (R) or human (H) were electrophoresed in 10% polyacrylamide gel containing 8 M urea, and then diffused in 1% agarose gel against anti-human apoE antibody (Ab). Arrows indicate the rabbit apoE band in the polyacrylamide gel.

脂質比の上昇程度で比較すると、家族性高コレステロール血症と WHHL 家兎の間には殆んど差はなかった。即ち、いずれも比重の小さいリポ蛋白では正常対照よりも軽度にコレステロールに富む脂質組成を示した。C-fed 家兎リポ蛋白の脂質比は著明に上昇しており、他とは全く異なっていた。

リポ蛋白量を各リポ蛋白コレステロール値で評価すると、次のような結果であった。家族性高コレステロール血症では、VLDL, IDL および LDL の増加が認められた。増加した量を考慮すると、LDL の約 2.8 倍の増加が主体であった。WHHL 家兎が家族性高コレステロール血症と異なる点は、リポ蛋白の増加比率が顕著に大きいこと、LDL よりも VLDL が著明に増加していたこと、であった。C-fed 家兎のリポ蛋白コレステロール値増加の様相は WHHL 家兎に類似していた。

家族性高コレステロール血症では apoB の増加比率が apoE より大きい値であった。WHHL 家兎では、apoE の増加比率の方が著明と考えられ、apoB, apoE とも家族性高コレステロール血症における増加比率より大きい値であった。

II. 実験2 一家兎アポ VLDL の等電点電気泳動

1. apoE および apoC の泳動部位の同定

家兎のアポ VLDL をディスク電気泳動し (図 2-a), apoE および apoC に相当する部位¹⁾のゲルを切り出した。これを等電点電気泳動用ゲルに乗せて泳動し、apoE および apoC の位置を確認した (図 2-a)。両アポ蛋白とも家兎アルブミンとは重ならなかった。家兎 apoE は、ヒト apoE よりやや酸性側に泳動され、その pI は 5.4~5.7 であった。家兎 apoC は、ヒト apoC とほぼ同じ位置に泳動され、その pI は 4.4~5.2 であった (図 2-b)。apoE, apoC ともそれぞれ 6 本のイソ蛋白バンドが認められ、図 2-b に示したように、酸性側よりそれぞれ E-1~E-6, C-1~C-6 と命名した。図 2-c に示したように、WHHL 家兎と正常家兎とは類似していたが、C-fed 家兎では、apoE に比べ apoC が少ないようにみえた。ゲルを波長 550 nm で走査すると、図 2-d のような結果が得られ、先に述べた方法で各イソ蛋白の相対量を計算した。

2. 家兎のアポ VLDL 組成 (表 8)

H 検定の結果、E-1, E-2, E-4, E-6 および apoC の全てのイソ蛋白で有意の変動が認められた。ボンフェロニ法で NR 群との間に有意の差をもつ群を調べた。C-fed 各群に共通する apoE イソ蛋白の異常はなく、WHHL 家兎の apoE イソ蛋白も NR 群と有意に異なるものはなかった。

C-fed 家兎の全ての群で、C-5 は NR 群より有意に増加していた。C-5 量と VLDL コレステロール値との

間には有意 ($p < 0.001$) の正の相関関係 ($r_s = 0.74$) が認められた。他の apoC イソ蛋白については、C-fed 各群に共通する変化は認めなかった。apoC のいずれのイソ蛋白に関しても、WHHL 群と NR 群との間には

有意な差は認めなかった。

apoE/apoC 比は、C-fed-2 群と C-fed-4 群で有意に上昇していたが、WHHL 群と NR 群との間には有意な差はなかった。

Table 7. Comparison between lipoprotein profiles of familial hypercholesterolemic patients and those of rabbits.

		Familial Hyperchole- sterolemia	C-fed-1	C-fed-2	C-fed-4	WHHL
VLDL	Cholesterol	1.83*	20.0	33.8	100.5	26.2
	Triglyceride	1.03	0.60	0.60	1.45	11.4
	Phospholipid	1.31	4.11	8.89	19.6	10.9
	Cholesterol/ Triglyceride	2.64	102.9	94.6	76.8	2.64
	Cholesterol/ Phospholipid	1.47	5.45	4.14	5.34	2.47
IDL	Cholesterol	3.20	19.40	39.6	70.2	15.0
	Triglyceride	1.57	0.83	1.67	1.83	8.0
	Phospholipid	2.60	7.20	16.0	26.2	9.6
	Cholesterol/ Triglyceride	1.89	38.2	28.4	42.2	2.35
	Cholesterol/ Phospholipid	1.20	2.43	2.16	2.34	1.39
LDL	Cholesterol	2.79	13.4	16.8	20.1	18.4
	Triglyceride	2.31	0.77	1.00	1.00	12.8
	Phospholipid	2.60	6.57	9.00	10.2	14.5
	Cholesterol/ Triglyceride	1.26	27.0	23.8	25.1	1.75
	Cholesterol/ Phospholipid	1.10	2.09	1.9	2.00	1.2
HDL	Cholesterol	0.91	0.92	1.50	1.50	0.42
	Triglyceride	1.07	0.50	0.64	0.57	0.50
	Phospholipid	0.87	0.80	0.82	1.16	0.68
	Cholesterol/ Triglyceride	0.83	2.36	2.74	2.69	0.88
	Cholesterol/ Phospholipid	1.04	1.17	1.90	1.29	0.64
ApoB		2.05				Hetero 1.27 Homo 14.2
ApoE		1.50				Hetero vs. Homo 89.5

The values in this table were calculated by dividing mean levels of diseased subjects (familial hypercholesterolemic patients, C-fed rabbits, and WHHL rabbits) by mean levels of normal controls. For example, the value (1.83) of VLDL-cholesterol of familial hypercholesterolemia, which has an asterisk(*) in this table, was calculated by dividing the mean level of VLDL-cholesterol of familial hypercholesterolemia (22 mg/dl) by the mean level of VLDL-cholesterol of normal human subjects (12 mg/dl). An exception was the value of WHHL apoE (89.5), which was the ratio of mean level of apoE in homozygous WHHL rabbits versus that in heterozygous WHHL rabbits.

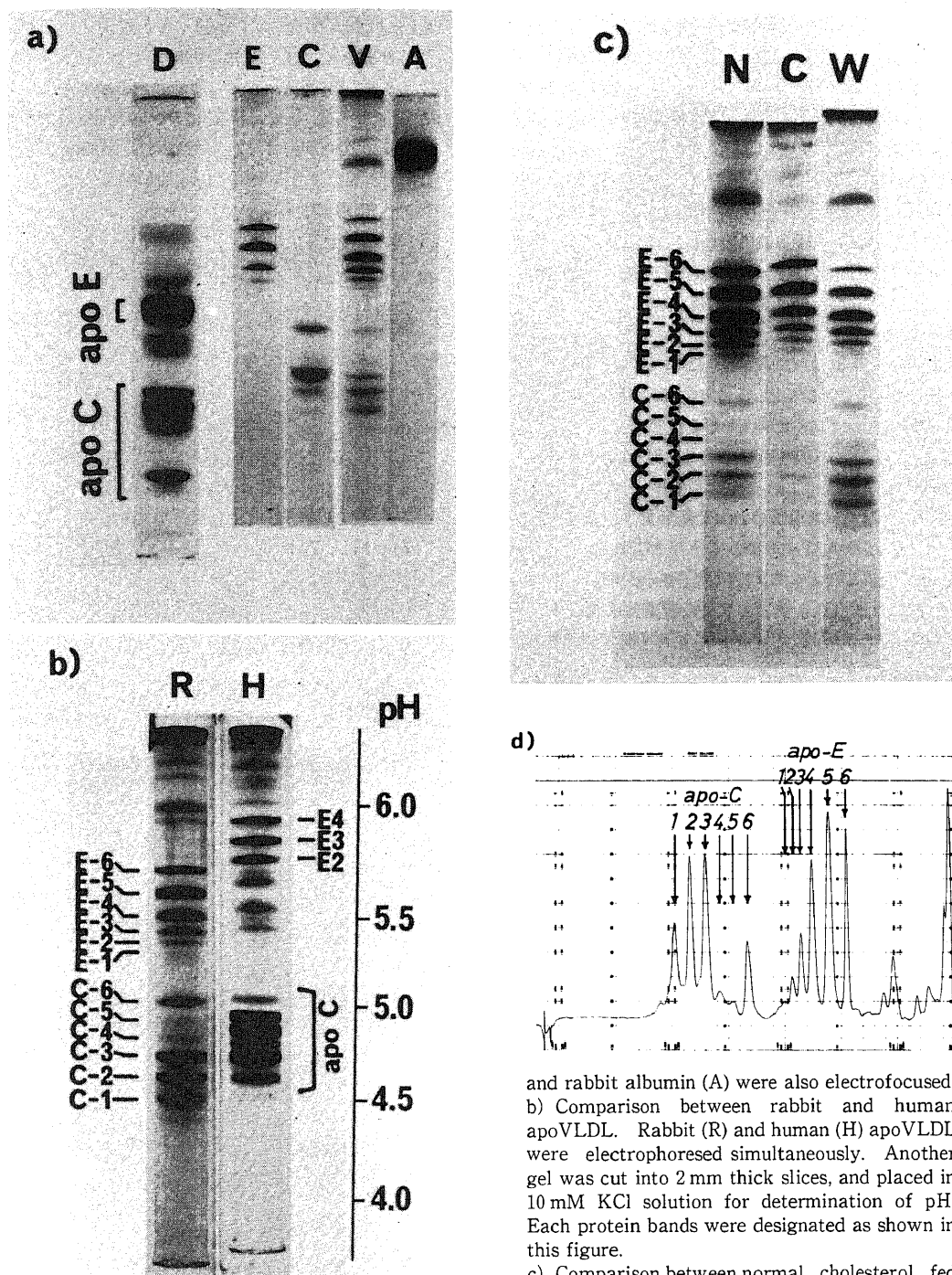


Fig.2. Isoelectric focusing pattern of rabbit apoVLDL.

a) Identification of protein bands. Rabbit's apoVLDL was applied to polyacrylamide gel disc electrophoresis (D). ApoE (E) and apoC (C) sliced from the unstained parallel gel were electrofocused. For comparison, apoVLDL (V)

and rabbit albumin (A) were also electrofocused. b) Comparison between rabbit and human apoVLDL. Rabbit (R) and human (H) apoVLDL were electrofocused simultaneously. Another gel was cut into 2 mm thick slices, and placed in 10 mM KCl solution for determination of pH. Each protein bands were designated as shown in this figure.

c) Comparison between normal, cholesterol fed and WHHL rabbits. ApoVLDL samples from a normal rabbits (N), a rabbit fed 1% cholesterol chow diet (C) and a WHHL rabbit (W) were electrofocused simultaneously.

d) Optical density scanning. The gel designated as "R" in the former figure (figure 2-b) was scanned at 550 nm.

III. 実験3—家兎のヘパリン静注後リパーゼ活性

NR群, C-fed-6群およびWHHL群のHTGL活性は,それぞれ 0.9 ± 0.4 (平均値 \pm SD), 2.6 ± 0.7 , 2.7 ± 0.8 μ moles FFA/ml/hrであった. 各群のLPL活性は,それぞれ 5.4 ± 1.7 , 11.5 ± 1.8 , 5.6 ± 1.5 μ moles FFA/ml/hrであった. 分散分析の結果, HTGL活性, LPL活性とも有意 (ともに $p < 0.001$) の変動を示した. ポンフェロニ法多重比較の結果, HTGL活性はC-fed-6群およびWHHL群とNR群との間, LPL活性ではC-fed-6群と他2群との間に有意 (いずれも $p < 0.01$) の差があった.

C-fed-6群およびNR群について, C-5量とHTGL活性またはLPL活性との間の相関関係の有無を調べた. いずれの活性も, C-5量との間に有意 (ともに, $p < 0.01$) の正の相関関係 (それぞれ, $r = 0.83$, 0.89) を示した.

IV. 実験4—家兎肝のapoE伝令RNA量

apoE cDNA断片をくみこんだM13mp9で大腸菌を形質転換したところ, 15個のクローンが得られた. 任意の10個のクローンより得た複製型DNAをPstIで切断し, 5%ポリアクリルアミド平板ゲルで電気泳動した. 図3-aに示すように, 右端のapoE cDNA断片と同じ長さを示すバンドが得られ, これら10クローンは全てapoE cDNA断片を有することが確認できた.

apoE cDNA断片, M13mp9の制限酵素切断部位を検討したところ, 次のような特徴があった. 図4-aに示すように, mRNA³⁹と同じ塩基配列の順鎖DNAには5'末端近くにStuI切断部位があったが, M13mp9にはStuI切断部位はなかった. 一方, M13mp9にはPstI切断部位より5'側にHind III切断部位, 3'側にはAccI切断部位があったが, apoE cDNA断片にはHind IIIやAccIによる切断部位はなかった.

以上の特徴より次のような制限酵素切断パターンが考えられた. Hind IIIとStuIによる2重切断を行うと, M13mp9に順鎖がくみこまれた場合は約7400 bpと20 bpの2本になる (図4-bの上段左側). M13mp9に相補鎖がくみこまれた場合は, 図4-b下段左側に示したように約7200 bpと約160 bpの2本になる. AccIとStuIによる2重切断の場合は, 順鎖がくみこまれていれば約7200 bpと約150 bpの2本 (図4-b上段右側) に, 相補鎖がくみこまれていれば約7400 bpと10 bpの2本 (図4-b下段右側) になる.

前記10クローンをHind IIIとStuIによる2重切断をしたところ, 図3-bのような結果が得られた. 前述した切断パターンより判断すると, 半数は順鎖, 半数は相補鎖をもっていた. 図3-bの左端より7番目のクローンより得た複製型DNAを, PstIのみ, Hind IIIとStuI, AccIとStuIで切断した. 図3-c

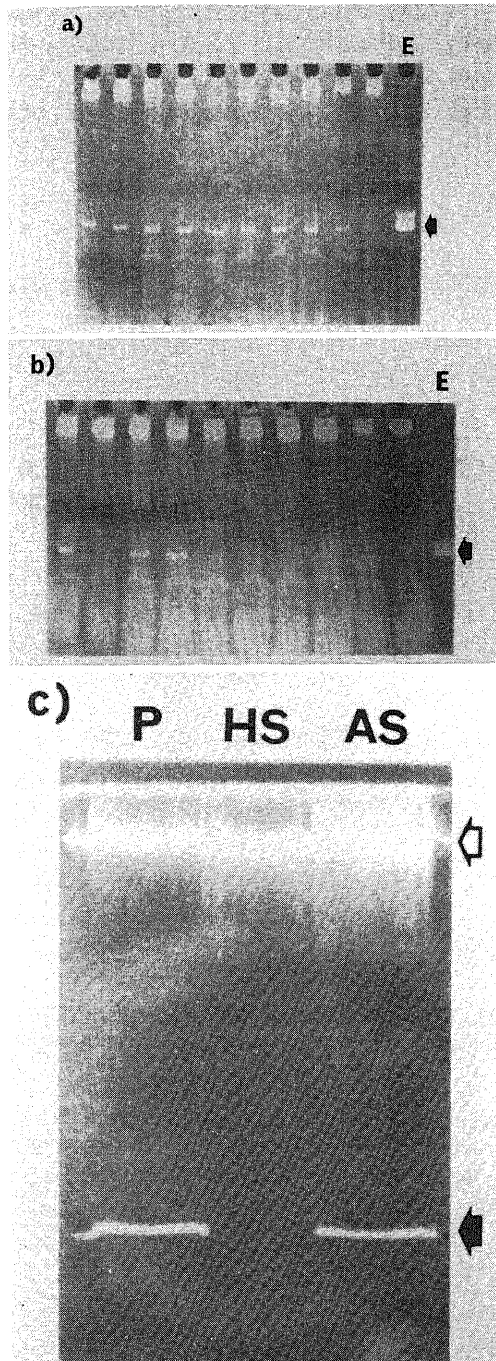
Table 8. The relative proportions of apoE and apoC isoproteins in normal, C-fed-1, C-fed-2, C-fed-4, and WHHL rabbits.

	Normal	C-fed-1	C-fed-2	C-fed-4	WHHL	H-test
C-1	10.2 \pm 5.2(8)	16.6 \pm 3.8(4)	8.8 \pm 6.7(6)	8.8 \pm 1.5(5)	7.1 \pm 3.5(8)	$p < 0.05$
C-2	36.8 \pm 11.8	29.8 \pm 4.7	14.3 \pm 1.0 b	27.0 \pm 1.9	28.7 \pm 9.6	$p < 0.01$
C-3	34.7 \pm 9.3	21.5 \pm 3.4	25.9 \pm 3.7	20.1 \pm 5.1 a	32.7 \pm 11.1	$p < 0.05$
C-4	7.1 \pm 4.3	11.2 \pm 2.7	37.8 \pm 4.1 c	13.0 \pm 6.9	3.5 \pm 2.8	$p < 0.001$
C-5	2.1 \pm 1.1	13.8 \pm 4.1 b	8.7 \pm 1.6 a	15.9 \pm 4.4 c	4.7 \pm 3.3	$p < 0.001$
C-6	11.3 \pm 11.4	6.0 \pm 2.9	4.6 \pm 1.6	19.3 \pm 9.2	23.4 \pm 9.5	$p < 0.01$
(%)						
E-1	0.93 \pm 1.09	1.70 \pm 0.35	0.08 \pm 0.08	0.84 \pm 0.28	0.79 \pm 0.46	$p < 0.05$
E-2	3.5 \pm 4.4	5.8 \pm 1.1 a	2.4 \pm 1.4	3.8 \pm 1.0	2.5 \pm 0.7	$p < 0.05$
E-3	12.9 \pm 8.7	12.8 \pm 1.4	9.0 \pm 1.6	9.1 \pm 1.6	7.9 \pm 2.1	ns
E-4	17.2 \pm 6.3	24.7 \pm 0.7 a	20.8 \pm 2.0	23.3 \pm 1.2	19.5 \pm 5.1	$p < 0.05$
E-5	35.8 \pm 6.0	35.0 \pm 2.2	34.7 \pm 2.4	37.6 \pm 1.9	37.0 \pm 2.8	ns
E-6	29.7 \pm 4.8	20.1 \pm 2.2	33.1 \pm 3.0	25.4 \pm 3.1	32.3 \pm 6.1	$p < 0.01$
(%)						
E/C ratio	3.72 \pm 2.12	18.6 \pm 9.7	25.0 \pm 6.8 b	31.0 \pm 6.7 c	7.99 \pm 6.82	$p < 0.001$

Values are mean \pm SD(n). After the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by rank, simultaneous multiple comparisons between normal and other rabbits were done by Bonferroni's method. a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$.

のような切断パターンが得られ、このクローンは順鎖 DNA をもつことが確認された。以後、このクローンに対する相補鎖をプローブとして使用した。

M13mp9 および肝 RNA (10 μ g) をドット・ブロッティングし、 32 P 標識プローブをハイブリッドさせた



ニトロセルロースフィルターのオートラジオグラフィを図5に示す。右側3列が肝RNAである。正常家兎由来の上方4行より、WHHL家兎由来の下方3行の方が黒化度の強い感じがあるが明瞭でない。方法の項で述べたように、各ドットの計数率を測定し、apoE mRNA量を定量した。NR群 3.7 ± 2.4 pg/ μ g of liver RNA (平均値 \pm SD) に対し、WHHL群では 8.1 ± 1.9 pg/ μ g of liver RNAであった。両群間には有意 ($p < 0.05$) な差を認めた。

考 察

表1に示したように、家族性高コレステロール血症のリポ蛋白異常の特徴は、LDLの増加であり^{9-10,12)}、VLDLは軽度の増加を示すのみである。この特徴は、本研究の対象としたヘテロ接合体のみでなく、ホモ接合体においても同様に認められている^{9,11,12)}。一方、WHHL家兎では、表2に示したように、LDL増加のみならず、VLDLの著明な増加も認められた。このVLDLの増加は、家族性高コレステロール血症と異なるWHHL家兎の特徴の1つと考えられる。表7に示した結果は、リポ蛋白の増加比率が大きいこともWHHL家兎の特徴の1つであることを明らかにした。ただし、LDLコレステロール値の増加比率については、次のように考えることもできた。表1および表2より、ヒトのLDLコレステロールの正常値は、家兎の正常値の約4.5倍であった。従って、家族性高コレステロール血症とWHHL家兎との間のLDLコレステロール増加比率の差は、ヒトと家兎との正常値の差

Fig. 3. The M13 mp9 clone containing human apoE cDNA fragment,

a) Identification of clones-1. Replicative form DNA of ten M13 mp9 clones were digested by a restriction endonuclease, "Pst I", and electrophoresed in 5% polyacrylamide gel. ApoE cDNA fragment, which was inserted into Pst I site of M13 mp9, was electrophoresed in lane E. and is indicated by an arrow.

b) Identification of clones-2. Same samples as figure 3-a were digested by two restriction endonucleases, Hind III and Stu I, and electrophoresed in 5% polyacrylamide gel. See the legend to figure 3-a for the lane E and an arrow.

c) The template clone for the probe. The seventh sample from the left in figure 3-a was electrophoresed after digestion by Pst I only (lane P), Hind III and Stu I (lane HS), and Acc I and Stu I (lane AS). Open and closed arrows show DNA fragments of approximately 7300 bp and 150 bp long, respectively.

を反映していると考えることができた。

家族性高コレステロール血症では、LDL 受容体異常のために、LDL の代謝速度が低下し⁴²⁾、LDL が血中に滞留する。血漿交換療法で LDL を除去すると LDL の脂質比が正常化すること⁴²⁾より、表 4 に示したような LDL 脂質比の異常^{9,42)}は、LDL の血中滞留時間が延長することによる 2 次的な変化とされている⁴²⁾。表 4 に示した VLDL⁴³⁾や IDL⁴¹⁾の脂質比の変化も LDL 同様

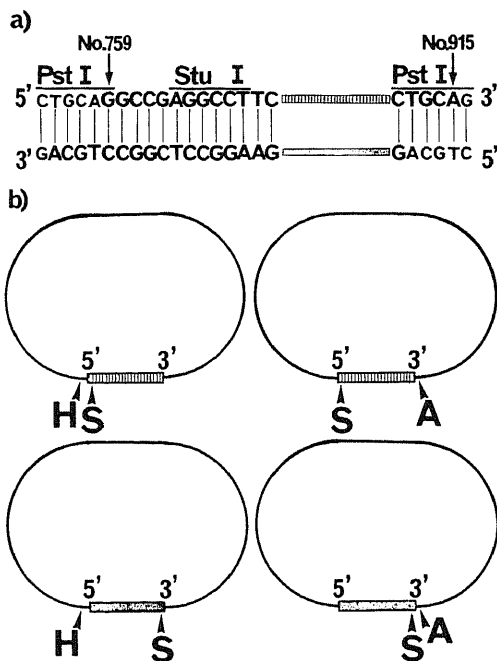


Fig. 4. The recognition sites of restriction endonucleases in apoE cDNA fragment and M13 mp9 clones.

a) Recognition sites. The sites of PstI and StuI in apoE cDNA fragment are overlined to the upper strand, which is the general strand. The lower strand is the complementary strand. The hatched and shadowed boxes denote nucleotides which are not listed here. Nucleotides denoted by large letters and boxes are inserted into the PstI site of M13 mp9. The first and last nucleotides of the general strand inserted in mp9 are numbered according to J. W. McLean, et al³⁹⁾. b) Expected double digestion pattern of clones. The hatched and shadowed boxes denote the general and complementary strand, respectively. These strands are inserted in PstI site of mp9 (solid line), and their directions are indicated in this figure. Arrows show the recognition sites of restriction endonucleases, HindIII (H), StuI (S), and AccI (A).

に 2 次的な変化と考えられる。その詳細な機序は不明であるが、LDL 受容体障害のために血中に滞留した VLDL⁴⁰⁾や IDL⁴¹⁾は、リパーゼ作用によってトリグリセライドの一部を失うことが一因と考えられる。表 7 に示したように、WHHL 家兎リポ蛋白の脂質比の上昇比率は、家族性高コレステロール血症に類似していた。このことは、表 5 に示した WHHL 家兎の脂質比変化も、家族性高コレステロール血症と同様に、リポ蛋白が滞留する^{15,16)}ための 2 次的な変化であることを示唆している。WHHL 家兎では、VLDL の脂質組成の変化に、肝より分泌されるコレステロールが約 3 倍に増加している⁴⁴⁾ことも関与していると考えられる。

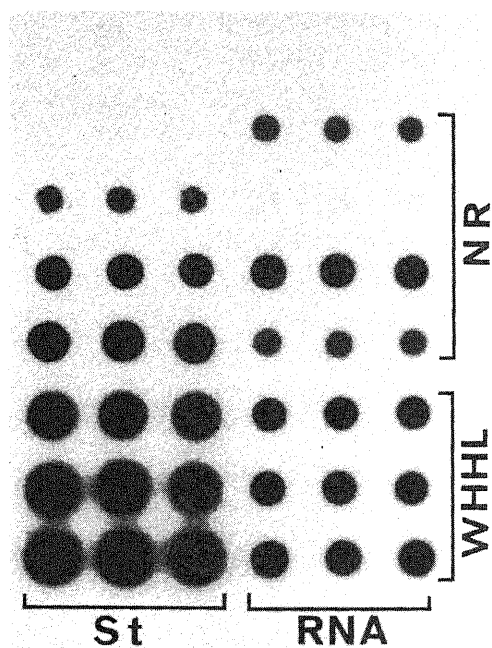


Fig. 5. Measurement of apoE messenger RNA. Total RNA were prepared from livers of normal (NR) and WHHL rabbits. Ten micrograms of each RNA samples were dot-blotted onto a nitrocellulose filter, and hybridized with the ³²P-labelled probe made from a mp9 clone containing human apoE DNA. The filter was exposed to a X-ray film. The template mp9 DNA was also dot-blotted onto the same filter and hybridized for constructing a standard line (St). The amount of M13 mp9 DNA were 0, 23, 69, 138, 230, 345, and 460 picograms from the top to the bottom of this figure. All samples were blotted by triplicate.

表3に示したように、ヘテロ WHHL 家兎における脂質の増加はわずかであり⁴⁵⁾、ホモ WHHL 家兎で確認された異常が極めて軽度に出現したものと考えられる。ヘテロ接合体における異常遺伝子の効果は、ヒトと家兎では全く異なっていた。この違いも、家族性高コレステロール血症と異なる WHHL 家兎の特徴の1つと考えられる。

C-fed 家兎では、WHHL 家兎と同じく肝 LDL 受容体は機能していない¹³⁾。表5に示したように、C-fed 家兎のリポ蛋白脂質組成は、WHHL 家兎とは全く異なることが明らかとなった。この事実は、C-fed 家兎には LDL 受容体以外の異常もあることを示唆していた。カイロミクロンレムナントのコレステロールエステルが VLDL の主な構成成分とされ⁴⁶⁾、肝のコレステロール分泌量が14倍に増加していた⁴⁷⁾と報告されている。このような VLDL 合成段階での変化が、C-fed 家兎におけるリポ蛋白脂質組成変化の重要な原因の1つと考えられる。

ミラーら⁴⁸⁾は、正常家兎に LDL プールの8.4倍量のヒト LDL を静注することによって、マクロファージにコレステロールを負荷し、HDL コレステロール値が経時的に上昇することを報告した。彼らは、HDL コレステロール値の上昇は、末梢より肝へのコレステロール逆輸送を反映するものであると述べている。C-fed 家兎では、異常にコレステロールに富む(表5)リポ蛋白が、種々の組織のマクロファージに摂取される^{48,49)}。従って、C-fed 家兎で HDL コレステロールが増加したという結果は、コレステロールの多くなったマクロファージより肝へのコレステロール逆輸送が亢進したことを示している。WHHL 家兎では、動脈壁や腱鞘の他にはコレステロールの沈着がない⁴⁹⁾とされている。C-fed 家兎と WHHL 家兎とのコレステロール沈着の分布の違いが、両家兎の HDL コレステロール値の差として表現された可能性がある。

血清トリグリセライド値は、家族性高コレステロール血症ではほぼ正常⁸⁻¹²⁾(表1)であるのに対し、WHHL 家兎では著しい高値¹⁻³⁾(表2)を示すことが、両者の違いとして指摘されている。この差異は、リポ蛋白脂質組成の種差による、即ち、ヒトに比べ家兎 LDL はトリグリセライドに富むため、LDL 増加に伴い血清トリグリセライド値が上昇すると説明されている³⁾。この成因論は、表2に示したような、WHHL 家兎における VLDL の著明な増加を考慮してなく、適当なものとは考えられなかった。前述したように、VLDL の増加は、家族性高コレステロール血症と異なる WHHL 家兎の特徴として顕著であり、高トリグリセライド血症の原因としても重要と考えられる。VLDL

が増加する機序については、LDL 受容体障害による VLDL 代謝速度の低下^{15,16)}の他にはあまり論じられていない。VLDL 増加の機序について次に考察する。

表5に示したように、WHHL 家兎の VLDL の組成は、コレステロールが増加しており、レムナントに類似していた。レムナントの増加するヒト疾患の代表は、原発性III型高リポ蛋白血症である¹⁹⁾。この疾患では、apoE のアミノ酸の変化のために、肝におけるレムナントとり込みが低下し、血中に増加する¹⁹⁾。apoE の異常は、等電点電気泳動で apoE イソ蛋白の1つの欠損^{29,50)}として確認できる。表8に示す等電点電気泳動の結果は、WHHL 家兎の apoE イソ蛋白には異常のないことを明らかとした。家兎肝には、LDL 受容体の他に、apoE を結合蛋白とするカイロミクロン受容体が存在し、後者の受容体は WHHL 家兎でも正常に機能している⁵¹⁾。レムナント受容体と apoE の両者を必要とする代謝経路は、WHHL 家兎でも正常と考えられ、VLDL 増加の原因ではないと考えられる。

肝より分泌された VLDL は、血管内皮細胞に結合した LPL によってトリグリセライドが分解され、IDL に変換される。正常家兎では IDL の90%は LDL 受容体を介して肝に摂取される¹⁵⁾が、WHHL 家兎では全ての IDL が LDL に変換される¹⁵⁾。この変換には HTGL が関与するといわれている⁵²⁾。WHHL 家兎では、停滞した IDL⁴¹⁾を LDL に代謝するために HTGL 活性が亢進したと考えられる。WHHL 家兎の LPL 活性は正常家兎と同レベルであったが、VLDL の著明な増加を考慮すると相対的な活性低下とも考えられる。WHHL 家兎では、LDL 受容体欠損のために停滞した VLDL を十分に代謝できず、VLDL をさらに増加させる原因になったと推測した。C-fed 家兎では、停滞している VLDL のトリグリセライドを、アポ C-5 増加(表8)に伴って活性の亢進した LPL が分解した。その結果、C-fed 家兎では、コレステロール/トリグリセライド比が上昇したと考えられる。

apoB および apoE は、LDL 受容体との結合能を有しており、LDL 受容体欠損によって血中濃度が増加する。WHHL 家兎の肝 apoB 分泌量は正常である⁴⁴⁾こと、表7に示したように、apoB の増加比率はリポ蛋白コレステロール値の増加比率とほぼ同じであること、以上より、apoB 血中濃度の増加は LDL 受容体欠損で説明できる。表7に示したように、apoB に比べ apoE の増加比率は著明に大きいことより、肝などの apoE 合成量の増加が予想された。WHHL 家兎肝において、apoE mRNA 量が約2倍に増加していたという結果は、apoE 合成量は少なくとも2倍以上に増加していることを示している。WHHL 家兎肝におけるコレス

テロール合成⁴⁴⁾や apoE 合成の増加が、VLDL 合成量の増加をきたし、LPL 活性の相対的低下や肝 LDL 受容体の欠損⁴⁷⁾が VLDL 代謝を低下させ、これらの結果として、血中 VLDL や apoE の著明な増加をきたしたものと推測した。

結 論

WHHL 家兎のリポ蛋白の特徴を家族性高コレステロール血症と比較したところ、次の結果が明らかとなった。

1) IDL および LDL の増加は両者に共通して認められたが、増加比率は WHHL 家兎で著明に大きい値であった。

2) 家族性高コレステロール血症では、VLDL は正常または軽度の増加であったが、WHHL 家兎では、全個体で VLDL の著明な増加が認められた。

3) 家族性高コレステロール血症では、ヘテロ接合体においても高 LDL 血症を認めたが、WHHL 家兎では軽度の VLDL および IDL の増加を認めるのみであった。

4) apoB および apoE の増加は両者に共通して認められたが、増加比率は WHHL 家兎で著明に大きい値であった。

WHHL 家兎における VLDL および apoE の著明な増加の成因について検討したところ、次の結果を得た。

1) VLDL のアポ E およびアポ C のイソ蛋白組成には変化なかった。

2) LPL 活性の相対的低下が認められた。

3) 肝の apoE mRNA 量は、正常家兎の約 2 倍に増加していた。

WHHL 家兎は、家族性高コレステロール血症の良いモデル動物であるが、リポ蛋白像に相違する点があり、LDL 受容体欠損以外の異常も存在することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深謝致します。さらに、本研究を当初より直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部内科学第 2 講座馬淵宏助教授に心から謝意を表します。また、多大な御協力を頂きました金沢大学第 2 内科第 1 研究室の各位に感謝致します。WHHL 家兎を御提供賜りました神戸大学渡辺嘉雄博士に心より感謝致します。

文 献

1) Kondo, T. and Watanabe, Y.: A heritable hyperlipidemic rabbit. *Exp. Anim. (Tokyo)*, **24**, 89-

94 (1975).

2) Watanabe, Y.: Serial inbleeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbits). *Atherosclerosis*, **36**, 261-268 (1980).

3) Havel, R. J., Kita, T., Kotite, L., Kane, J. P., Hamilton, R. L., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Concentration and composition of lipoproteins in blood plasma of the WHHL rabbit. An animal model of human familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*, **2**, 467-474 (1982).

4) Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, Y.: WHHL-rabbit: A low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett.*, **118**, 81-84 (1980).

5) Shimada, Y., Tanzawa, K., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, Y.: Biochemical characterization of skin fibroblast derived from WHHL-rabbit, a notable animal model for familial hypercholesterolemia. *Eur. J. Biochem.*, **118**, 557-564 (1981).

6) Attie, A. D., Pittman, R. C., Watanabe, Y. and Steinberg, D.: Low density lipoprotein receptor deficiency in cultured hepatocytes of the WHHL-rabbit. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9789-9792 (1981).

7) Kita, T., Brown, M. S., Watanabe, Y. and Goldstein, J. L.: Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL-rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2268-2272 (1981).

8) 馬淵 宏: 動脈硬化症の新しい診断と治療(五島雄一郎, 後藤由夫編), 第 1 版, 94-109 頁, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1985.

9) Mabuchi, H., Tatami, R., Ueda, K., Ueda, R., Haba, T., Kametani, T., Watanabe, A., Wakasugi, T., Itoh, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S. and Takeda, R.: Serum lipid and lipoprotein levels in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **32**, 435-444 (1979).

10) Mabuchi, H., Itoh, S., Haba, T., Ueda, K., Ueda, R., Tatami, R., Kametani, T., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Takeda, R. and Takegoshi, T.: Discrimination of familial hypercholesterolemia and secondary hypercholesterolemia by Achilles' tendon thickness. *Atherosclerosis*, **28**, 61-68 (1977).

- 11) **Mabuchi, H., Tatami, R., Haba, T., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Itoh, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Takeda, R. and Takesita, H.** : Homozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *Am. J. Med.*, **65**, 290-297 (1978).
- 12) **Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** : Familial hypercholesterolemia, 672-712, J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein and M. S. Brown (ed.), *The metabolic basis of inherited disease*, 5th ed., McGraw-Hill Book Co., New York, 1983.
- 13) **Kovanen, P. T., Brown, M. S., Basu, S. K., Bilheimer, D. W. and Goldstein, J. L.** : Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors : A mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 1396-1400 (1981).
- 14) **Shore, V. G., Shore, B. and Hart, R. G.** : Changes in apolipoproteins and properties of rabbit very low density lipoproteins on induction of cholesterolemia. *Biochemistry*, **13**, 1579-1584 (1974).
- 15) **Kita, T., Brown, M. S., Bilheimer, D. W. and Goldstein, J. L.** : Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL-rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 5693-5697 (1982).
- 16) **Bilheimer, D. W., Watanabe, Y. and Kita, T.** : Impaired receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in the WHHL-rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 3305-3309 (1982).
- 17) **Nikkila, E. A.** : Familial lipoprotein lipase deficiency and related disorders of chylomicron metabolism. 622-642, J.B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein and M. S. Brown (ed.), *The metabolic basis of inherited disease*, 5th ed., McGraw-Hill Book Co., New York, 1983.
- 18) **Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Fredrickson, D. S.** : Familial type 3 hyperlipoproteinemia, 655-671, J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein and M. S. Brown (ed.), *The metabolic basis of inherited disease*, 5th ed., McGraw-Hill Book Co., New York, 1983.
- 19) 馬淵 宏・多々見良三・上田幸生・上田良成・羽場利博・亀谷富夫・伊藤清吾・小泉順二・宮元 進・太田正之・竹田亮祐・竹越忠美 : 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について. *日老医誌*, **14**, 475-479 (1977).
- 20) **Havel, R. J., Eder, H. J. and Bragdon, J. H.** : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 21) **Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C.** : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475 (1974).
- 22) **Takayama, M., Ito, S., Nagasaki, T. and Tanimizu, I.** : A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta.*, **79**, 93-98 (1977).
- 23) 仁科甫啓 : 中性脂肪. *臨床検査*, **22**, 1304-1305 (1978).
- 24) **Fletcher, M. J.** : A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta.*, **22**, 393-397 (1968).
- 25) **Goto, Y., Akanuma, Y., Harano, Y., Hata, Y., Itakura, H., Kajinuma, G., Kawabe, M., Koga, S., Kuzuya, F., Maruhama, Y., Matsuzawa, Y., Murai, A., Murase, T., Naito, C., Nakai, T., Noma, A., Saito, Y., Sasaki, J., Takeuchi, N., Tamachi, H., Uzawa, H., Yamamoto, A., Yamazaki, S., Yasugi, T. and Yukawa, S.** : Determination of serum apolipoproteins, A-I, A-II, B, C-II, C-III and E in normolipidemic healthy Japanese subjects ; determined by SRID method. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **1**, 73-88 (1986).
- 26) **Burstein, M. and Scholnik, H. R.** : Lipoprotein-polyanion-metal interactions. *Adv. Lipid Res.*, **11**, 67-108 (1973).
- 27) **Kane, J. P.** : A rapid electrophoretic technique for identification of subunit species of apoproteins in serum lipoproteins. *Anal. Biochem.*, **53**, 350-364 (1973).
- 28) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 29) **Warnick, G. R., Mayfield, C., Albers, J. J. and Hazzard, W. R.** : Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin. Chem.*, **25**, 279-284 (1979).

- 30) **Krauss, R. M., Windmueller, H. G., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S.** : Selective measurement of two different triglyceride lipase activities in rat postheparin plasma. *J. Lipid Res.*, **14**, 286-295, (1973).
- 31) **Schotz, M. C., Garfinkel, A. S., Huebotter, R. J. and Stewart, J. E.** : A rapid assay for lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.*, **11**, 68-69 (1970).
- 32) 武田三昭・梶波康二・伊藤英章・坂井健志・道下一郎・嘉門信雄・吉村 陽・若杉隆伸・馬淵 宏・竹田亮祐 : ヒトアポ E cDNA のクローン化とアポ E 遺伝子の検討. *動脈硬化*, **13**, 843-847 (1985).
- 33) **McLean, J. W., Elshourbagy, N. A., Chang, D. J., Mahley, R. W. and Taylor, J. M.** : Human apolipoprotein E mRNA. *J. Biol. Chem.*, **259**, 6498-6504 (1984).
- 34) **Birnboim, H. C. and Doly, J.** : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523 (1979).
- 35) **Newman, T. C., Dawson, P. A., Rudel, L. L. and Williams, D. L.** : Quantification of apolipoprotein E mRNA in the liver and peripheral tissues of nonhuman primates. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2452-2457 (1985).
- 36) **Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.** : Isolation of biologically active RNA from sources enriched in RNase. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299 (1979).
- 37) **Kabat, E. A. and Mayer, M. M.** : Experimental immunochemistry, 2nd ed., p526-537, Thomas Books Inc., Springfield, (1961).
- 38) **Elshourbagy, N. A., Liao, W. S., Mahley, R. W. and Taylor, J. M.** : Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 203-207 (1985).
- 39) **Huang, S., Bock, S. C., Feinstein, S. I. and Breslow J. L.** : Human apolipoprotein B cDNA clone isolation and demonstration that liver apolipoprotein B mRNA is 22 kilobases in length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 6825-6829 (1985).
- 40) **Janus, E. D., Nicoll, A., Wootton, R., Turner, P. R., Magill, P. J. and Lewis, B.** : Quantitative studies of very low density lipoprotein: conversion to low density lipoprotein in normal controls and primary hyperlipidemic states and the role of direct secretion of low density lipoprotein in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **10**, 149-159 (1980).
- 41) **Soutar, A. K., Myant, N. B. and Thompson, G. R.** : The metabolism of very low density and intermediate density lipoproteins in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **43**, 217-231 (1982).
- 42) **Jadhav, A. V. and Thompson, G. R.** : Reversible abnormalities of low density lipoprotein composition in familial hypercholesterolemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **9**, 63-67 (1979).
- 43) 竹越忠美・亀谷富夫・追分久憲・井村 優・竹内伸夫・篠崎公秀・西野知一・宮元 進・馬淵 宏 : 家族性高コレステロール血症における HDL subfraction の検討. *動脈硬化*, **9**, 167-171 (1981).
- 44) **MacKinnon, A. M., Savage, J., Gibson, R. A. and Barter, P. J.** : Secretion of lipoproteins from the liver of normal and Watanabe heritable hypolipidemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 6096-6100 (1983).
- 45) **Goldstein, J. L., Kita, T., and Brown M. S.** : Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **309**, 288-296 (1983).
- 46) **Ross, A. C. and Zilversmit, D. B.** : Chylomicron remnant cholesteryl esters as the major constituent of very low density lipoproteins in plasma of cholesterol-fed rabbits. *J. Lipid Res.*, **18**, 169-181 (1977).
- 47) **MacKinnon, A. M., Savage, J., Gibson, R. A. and Barter, P. J.** : Secretion of cholesteryl ester-enriched very low density lipoproteins by the liver of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **54**, 145-155 (1985).
- 48) **Miller, N. E., Ville, A. L. and Crook, D.** : Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high-density lipoprotein in rabbit. *Nature*, **314**, 109-111 (1985).
- 49) **Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y. and Brown, M. S.** : Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*, **3**, 87-101 (1983).
- 50) **Utermann, G., Albrecht, G. and Steinmetz, A.** : Polymorphism of apolipoprotein E. I.

Methodological aspects and diagnosis of hyperlipoproteinemia type III without ultracentrifugation. *Clin. Genet.*, **14**, 351-358 (1978).

51) Kita, T., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Watanabe, Y., Hornick, C. A. and Havel, R. J.: Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL

rabbits: A mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 3623-3627 (1982).

52) Eisenberg, S. and Levy, R. I.: Lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid Res.*, **13**, 1-84 (1975).

Characteristics and Mechanisms of Changes in Lipoprotein Properties of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. Takanobu Wakasugi, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 —*J. Jusen Med. Soc.*, **95**, 730—747 (1986)

Key words: Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, lipoprotein properties, apolipoprotein E, messenger RNA, postheparin lipolytic activities

Abstract

The present study was performed to compare the lipoprotein abnormalities of Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits with those of familial hypercholesterolemic patients, and to examine mechanisms producing the lipoprotein abnormalities of WHHL rabbits. WHHL rabbits showed marked (15-20 times) elevation of cholesterol-rich intermediate density and low density lipoprotein (LDL) levels, while familial hypercholesterolemic patients showed only twice or threefold elevation. All the rabbits showed marked (26 times) elevations of very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol levels, whereas a few familial hypercholesterolemic patients showed slight increases. The lipid levels of heterozygous WHHL rabbits were almost normal. The increment of apolipoprotein E (apoE) levels (more than 90 times) were much greater than that of apolipoprotein B (apoB) levels (14 times) in WHHL rabbits, whereas in familial hypercholesterolemic patients the increment of apoB levels (twofold) was greater than that of apoE levels (1.5 times). Two experiments were performed in order to study the mechanisms increasing VLDL levels. There was no difference between WHHL and normal rabbits in the apoE isoprotein pattern examined by isoelectric focusing electrophoresis. Rabbits fed on 1% cholesterol chow, whose lipoprotein cholesterol levels were increased and lipoprotein triglyceride levels were normal, showed 2.1 times elevation of the activities of lipoprotein lipase (LPL) and 3.0 times elevation of hepatic triglyceride lipase (HTGL). In WHHL rabbits, the activity of LPL was not increased, while that of HTGL increased by 3.1 times. Thus the activity of LPL in WHHL rabbit was considered to be relatively low. The amounts of apoE messenger RNA in rabbit livers were measured by dot-blotting of RNA prepared by the guanidine-HCl procedure and hybridization with the ³²P-labelled probe made from a M13 mp9 clone containing human apoE DNA. The amounts of apoE messenger RNA in WHHL rabbits were increased twofold compared with normal rabbits. This increment might have stimulated apoE synthesis and elevated plasma apoE levels. In conclusion, although the WHHL rabbit is a good animal model of familial hypercholesterolemia, there are several differences in the lipoprotein and apolipoprotein abnormalities other than those resulting from the LDL receptor defect.