

Effects of Melinamide and Cholestyramine on Low Density Lipoprotein Metabolism in Cholesterol-fed 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/2297/7811

高コレステロール食飼育家兎の low density lipoprotein 代謝に及ぼすメリナミド及びコレステラミンの影響

金沢大学がん研究所内科学講座 (主任: 沢武紀雄教授)

金沢大学医学部第二内科学講座 (主任: 竹田亮祐教授)

酒 井 泰 征

(昭和60年7月6日受付)

血清コレステロール (cholesterol, 以下 Chol と略) の制御に低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, 以下 LDL と略) 受容体, 特に肝臓の LDL 受容体が重要な働きをなしていることが明らかにされつつある。今回の実験は, 高 Chol 食飼育家兎に脂質低下剤であるメリナミド及びコレステラミンを用いて, 腸管からの Chol 吸収を抑制した状態及び Chol が胆汁酸として肝臓から排泄されるのを促進した状態を作製し, 各々の条件における受容体を介する LDL 代謝, 特に肝臓の LDL 受容体の変化について検討した。正常食家兎 (n=5), 1% Chol 負荷食を6週間与え作製した高 Chol 家兎 (n=4), 及び1% Chol 負荷食に加え, メリナミド投与家兎 (n=5) 又はコレステラミン投与家兎 (n=4) を使用した。各群家兎に¹³¹I-LDL 及び¹²⁵I-methyl LDL を同時に静注し, in vivo で受容体を介する LDL 代謝を検討した。各臓器の受容体を介する LDL 取り込みも測定した。特に肝臓については, 肝細胞膜を調整し, 直接 LDL の受容体への結合量を測定した。高 Chol 食飼育家兎のベータ超低比重リポ蛋白 (β -very low density lipoprotein, 以下 β -VLDL と略) は高 Chol 食飼育6週後まで増加し, 中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, 以下 IDL と略) 及び LDL は2~4週後まで増加し, 以後 plateau 状態になった。メリナミド及びコレステラミン投与により高 Chol 食飼育家兎の β -VLDL, IDL 及び LDL 上昇は抑制され, 大動脈弓部の粥状硬化も各々91%, 94%抑制された。LDL の動態実験では LDL の総 fractional catabolic rate (以下 FCR と略) は高 Chol 食によって56%低下した。メリナミド及びコレステラミン投与によって低下した LDL の FCR は各々33%, 77%増加した。受容体を介する LDL の FCR は高 Chol 食によって88%低下した。またメリナミド及びコレステラミンにて各々3.4倍 (正常の40%), 5.9倍 (正常の69%) に増加した。受容体を介さない LDL の FCR は有意な変化を示さなかった。各臓器別の LDL 取り込みは, g 組織当たりでは副腎が, 一臓器としては, 肝臓が最大であった。高 Chol 食によって肝臓の LDL 取り込みは著減し, LDL 代謝に肝臓が重要な役割を果していることが確認された。肝細胞膜と LDL の結合実験では, 高 Chol 食によって EDTA 感受性結合が消失したが, メリナミド投与によって正常の29%まで回復した。EDTA 抵抗性結合は変化しなかった。以上, 高 Chol 食飼育家兎にメリナミド及びコレステラミンを用いて腸管からの Chol 吸収抑制状態及び肝臓からの Chol 排泄促進状態を作製すると, LDL の肝臓 EDTA 感受性結合が増加し, 高 Chol 食によって低下した受容体を介する LDL の FCR が増加することが示された。また, このような機序を介して, 血清 Chol 値は低下し, 粥状硬化の発生が抑制されることが明らかとなった。

Key words intestinal acyl CoA : cholesterol acyltransferase inhibitor, bile acid sequestrant, cholesterol-fed rabbit, receptor-mediated low density lipoprotein catabolism, hepatic EDTA-sensitive binding

家兎の高コレステロール (cholesterol, 以下 Chol と略) 食に対する血清リポ蛋白代謝の反応はヒトの血清

リポ蛋白代謝と比較的類似しているため, 標識したリポ蛋白代謝実験にしばしば用いられている。家兎で

Abbreviations: ACAT, acyl CoA : cholesterol acyltransferase; ACR, absolute catabolic rate; Chol, cholesterol; EDTA, ethylenediamine tetraacetate; FCR, fractional catabolic rate; HDL, high density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; LDL, low

は高 Chol 食によって、血清-Chol, 超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, 以下 VLDL と略) -Chol, 中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, 以下 IDL と略) -Chol 及び低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, 以下 LDL と略) -Chol が増加する²⁾⁻⁴⁾。この際増加する血清 VLDL 分画は、通常の pre- β とは異なる β 位に電気泳動され、動脈硬化促進作用が著しいリポ蛋白 (β -VLDL) である⁵⁾。 β -VLDL の上昇の原因は肝臓の β -VLDL 受容体の減少であり⁶⁾、IDL 及び LDL の上昇は肝臓の LDL 受容体の減少によるとされている⁷⁾⁸⁾。

胆汁酸排泄促進剤 (コレステラミン, コレステポール) は、胆汁酸の腸管排泄を増加させ、その結果、肝臓での Chol から胆汁酸への転換を促進し、Chol 需要を増加させる。胆汁酸排泄促進剤によって肝臓の LDL 受容体は増加するので、その結果血清 LDL の取り込みを介し、Chol の供給を受け、血中 Chol を低下させる⁹⁾¹⁰⁾。

最近、Chol 吸収における腸管壁細胞の acyl CoA : cholesterol acyltransferase (以下 ACAT と略) の重要性が報告されている¹¹⁾⁻¹⁵⁾。腸管壁細胞の ACAT 抑制剤であるメリナミドは、以前より知られている Chol 腸管吸収阻害剤とは作用機序の異なった強力な Chol 腸管吸収阻害剤である¹⁶⁾¹⁷⁾。

今回、著者は、高 Chol 食飼育家兎に作用機序の互に異なる脂質低下剤 (メリナミド及びコレステラミン) を与え、それぞれ腸管からの Chol 吸収抑制状態と肝臓からの Chol 排泄促進状態を作り、各々の状態がリポ蛋白代謝に及ぼす影響を 6 週間にわたって検討した。とくに LDL 受容体を介する経路とスカベンジャー経路の両経路より代謝される^{18)I}-LDL 及びスカベンジャー経路のみで代謝される^{125)I}-methyl LDL を用いて¹⁸⁾、上記の各々の状態が高 Chol 食飼育家兎の in vivo LDL 代謝に及ぼす影響を検討した。さらに臓器別の LDL 代謝を検討する目的で、各臓器の取り込みについても検討した。また肝臓については、LDL 受容体の観点からより詳細に検討するため肝細胞膜と^{125)I}-LDL の結合についても検討した。

対象及び方法

1. 動物及び飼料

2 kg 前後の雄性日本白色家兎 (三共ラボ・サービス株式会社・富山) を用いた。正常食は家兎飼料・Type ORC-4 (オリエンタル酵母工業株式会社・東京) を用

いた。1% Chol 負荷家兎飼料はオリエンタル酵母工業株式会社より求めた。1日 150 g の飼料を定期的に与え、水については自由に摂取させた。

2. 薬物及び投与法

メリナミド (住友製薬株式会社・大阪) 及びコレステラミン (プリストル・マイヤー株式会社・東京) の精製標品を使用した。家兎に飼料を与えた後、メリナミド 500 mg/日又はコレステラミン 2 g/日をそれぞれネラトン・カテーテルにて経口的に与えた。

3. 血清リポ蛋白の調整

24~48 時間絶食後、家兎血液を耳動脈より採取し、Havel らの方法¹⁹⁾に従いリポ蛋白分画を新鮮血清より超速心法にて分離後測定した。標識 LDL の作製には、まず、正常家兎より 48 時間絶食後採血し、超速心法にて、血清の $1.025 < d < 1.050$ の LDL 分画を採取し、4°C で 0.15 M NaCl, 0.01% ethylenediamine tetraacetate (以下 EDTA と略), pH 7.4 にて 24 時間透析後標識に付した。LDL の標識は ICl 法²⁰⁾にて^{125)I}又は^{131)I}で行った。非結合ヨードを Sephadex G-50 クロマトグラフィにて取り除き、その後 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA, pH 7.4 にて一昼夜透析後使用した。10% 三塩化酢酸 (trichloroacetic acid, 以下 TCA と略) にて標識されたものの 95% が沈殿した。クロロホルム:メタノールにて標識されたものの 3% が抽出された。

Methyl LDL は Weisgraber, Mahley らの方法¹⁸⁾の 60 分反応系にて作製し、作製後 1 週間以内に使用した。

4. 線維芽細胞における LDL の代謝実験

正常家兎線維芽細胞を正常家兎皮膚より採取し、プラズマクロット法に従い初代培養し、5% 炭酸ガス孵卵器にて 10% 胎児ウシ血清を含んだ Dulbecco 変法 Eagle 培地にて継代培養した。実験を継代培養 5~10 代の間で行ない、実験 1 週間前より線維芽細胞を直径 60 mm シャーレ (Falcon) に $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 個植え込み、実験の 48 時間前に 10% リポ蛋白欠除血清を含む培地に替え実験を行った。37°C における^{125)I}-LDL の分解は羽場らの方法²¹⁾で測定した。すなわち各濃度における^{125)I}-LDL 又は^{125)I}-methyl LDL を培養液に入れ、37°C にて 6 時間培養した。次いで培養液を取り出し、TCA で沈殿しない分画の遊離ヨードを KI と H₂O₂ 及び CHCl₃ で抽出し、残りの分画をアポ蛋白の分解されたアミノ酸分画としてカウントし、分解リポ蛋白量として表わした。

density lipoprotein; TCA, trichloro-acetic acid; TG, triglyceride; VLDL, very low density lipoprotein; WHHL, Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.

5. 大動脈粥状硬化巣の形態学的検討

6週間飼育し、LDLの代謝実験後、大動脈を切り出し、長軸方向に切開後、外膜組織を剝離した。大動脈は10%中性ホルマリンで24時間固定後 Sudan IVで染色した²²⁾。粥状硬化巣部をキャノラ Eで複写後、プランメーターで面積を測定し、大動脈全体に占める割合を百分率で表わした²³⁾。薬物の効果を、高Chol食飼育家兎と比較して、粥状硬化巣の面積の減少率で表現した。さらに固定された動脈片を4μmの厚さに切り、Collagen-Van Gieson 染色にて結合織を染色し、硬化巣、内膜及び中膜の変化をそれぞれの群間で比較検討した。

6. In vivo の LDL 代謝実験

放射性ヨードの甲状腺への取り込みを防ぐため、実験2日前より実験中にかけて0.1g/l KIを飲料水に加えた。約10μCiの¹³¹I-LDL(比活性300~400cpm/ng LDL)と約10μCiの¹²⁵I-methyl LDL(比活性300~400cpm/ng LDL)を耳静脈より注射した。その5分後に対側耳血管より採取し、0分とした。以後順に指定の時間に1~2mlの血液を採取した。注射後5分目に採血した血漿中の放射活性より希釈法にて血漿量を算出した。¹³¹I及び¹²⁵Iの血漿消失曲線より Matthewsの2プールのモデル²⁴⁾により代謝パラメーターを算出した。

7. LDL 及び methyl LDL の組織及び臓器への取り込み

上述の実験の最後の採血後、家兎をペントバルビタール45mg/kgにて麻酔後、門脈より500mlの0.15M NaCl, 0.001M CaCl₂にて灌流し、頸動脈より脱血後、各臓器を取り出し、各組織の¹²⁵I, ¹³¹Iの放射活性を測定した。実験終了時の血漿中の apoLDL 量より¹³¹I-LDL 及び¹²⁵I-methyl LDLの比活性を求め(2000~8000cpm/mg LDL)、各組織への LDL 及び methyl LDLの取り込み量を求めた。In vitroの成績より methyl LDLの取り込みが LDL 受容体を介さない取り込みであることを確認しているため、LDLの取り込み量から methyl LDLの取り込み量を差し引いた値を LDL 受容体を介する特異的取り込みとした。各臓器全体への取り込み量は1g当たりの組織取り込み量と臓器重量の積より決定した。

8. 肝細胞膜分画の調整

In vivo 実験に使用しない家兎の肝をホモジナイズして、Kovanenらの方法²⁵⁾にて膜分画(8,000×g~100,000×gの分画)を調整し、膜分画ペレットを-80°Cに凍結した。実験当日、膜分画ペレットを緩衝液 A (20 mM NaCl, 0.62 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) に再度懸濁し、25 ゲージ注射針にて10回フ

ラッシュ後、20秒間2回ソニケートし、緩衝液 A にて10 mg/ml のタンパク量になるように希釈し使用した。

9. ¹²⁵I-LDL の肝細胞膜分画との結合実験

実験は Kovanen らの方法²⁵⁾に従って行った。すなわち EDTA 又は非標識 LDL の各条件下で、100 μg の肝細胞膜タンパクと各濃度の¹²⁵I-LDL を含む 80 μl の緩衝液 B (20 mM NaCl, 0.63 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, 20 mg ウシ血清アルブミン/ml, pH 8.0) をマイクロフュージチューブに入れ、氷水浴中で0°C60分間インキュベートした。膜結合¹²⁵I-LDL を Beckman 42.2 Ti ローターにて4°C100,000×gにて超遠心後、上清を吸引し、胎児ウシ血清を入れ再度超遠心した。同様の操作をくり返し、超遠心後、遠沈した分画の放射能を測定した。Kita らの報告²⁶⁾のように、EDTA 感受性結合は EDTA のない状態での結合量から、EDTA の存在する状態での結合量をひいた量とし、EDTA 抵抗性結合は EDTA の存在する状態での結合量から非標識 LDL の存在する状態での結合量を差し引いた量とした。EDTA 感受性結合の解離定数 (Kd) 及び最大結合量は Scatchard 法²⁷⁾により求めた。

10. その他の測定及び統計学的解析法

Chol, トリグリセリド (triglyceride, 以下 TG と略) は酵素法で測定した。タンパクは Lowry 法²⁸⁾にて測定した。

測定値の統計学的解析は paired 及び unpaired Student's t-test により行った。

成 績

1. 血清リポ蛋白分画の変化

正常食飼育家兎(正常食群)(n=5), 1%Chol 負荷食飼育家兎(Chol 食群)(n=4), 1%Chol 負荷食と500 mg/日のメリナミド投与家兎(メリナミド群)(n=5)及び1%Chol 負荷食と2g/日のコレステラミン投与家兎(コレステラミン群)(n=4)の4群について血清及びリポ蛋白 Chol, TG を6週にわたり測定した(図1, 表1)。血清 Chol は Chol 食群では徐々に増加し、6週後に最高となった。メリナミド群では4週後まで軽度増加したが、以後低下した。コレステラミン群では2週後軽度増加したが以後低下した。各群の TG は一部を除いて有意な変化を示さなかった。VLDL-Chol は Chol 食群では徐々に増加し、6週後で最高となった。メリナミド群では2週後に軽度増加したが、6週後に減少した。コレステラミン群では2週後に増加したが、6週後にはむしろ低下傾向であった。アガロース電気泳動では、Chol 食群の VLDL は β 位に位置したが、他群の VLDL は正常の pre-β 位にあ

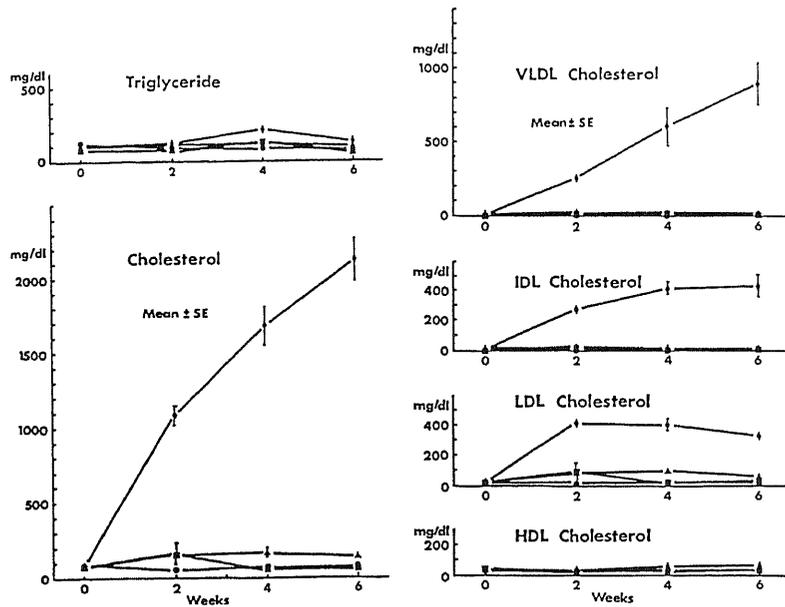


Fig. 1. Changes of serum and lipoprotein cholesterol levels in control chow-fed rabbits (●), cholesterol-fed rabbits (◆), cholesterol-fed rabbits with 500 mg/day of melinamide (▲), and cholesterol-fed rabbits with 2 g/day of cholestyramine (■).

Table 1. Changes of serum and lipoprotein cholesterol level in control chow-fed rabbits (n=5), cholesterol-fed rabbits (n=4), cholesterol-fed rabbits with 500 mg/day melinamide (n=5) and cholesterol-fed rabbits with 2g/day cholestyramine (n=4).

	Total Cholesterol (mg/dl)				LDL-Cholesterol (mg/dl)				
	0	2W	4W	6W	0	2W	4W	6W	
Control	79 ± 1	51 ± 1***	72 ± 17***	76 ± 17***	Control	19 ± 4	12 ± 0***	26 ± 12**	19 ± 5***
Chol-fed	82 ± 13	1089 ± 70	1685 ± 131	2130 ± 143	Chol-fed	18 ± 7	414 ± 25	402 ± 46	327 ± 17
Chol-fed + melinamide	68 ± 6	159 ± 74***	163 ± 38***	141 ± 13***	Chol-fed + melinamide	12 ± 3	76 ± 43***	89 ± 28***	53 ± 9***
Chol-fed + cholestyramine	77 ± 7	154 ± 74***	54 ± 5***	62 ± 21***	Chol-fed + cholestyramine	15 ± 2	90 ± 50**	19 ± 3***	29 ± 14***
	VLDL-Cholesterol (mg/dl)				HDL-Cholesterol (mg/dl)				
	0	2W	4W	6W	0	2W	4W	6W	
Control	7.5 ± 1.5	5.5 ± 0.5***	2.0 ± 0*	8.0 ± 2.1***	Control	26 ± 2	24 ± 0	34 ± 2	32 ± 5
Chol-fed	5.0 ± 0.7	251 ± 11	603 ± 135	893 ± 148	Chol-fed	33 ± 2	32 ± 4	54 ± 7	58 ± 5
Chol-fed + melinamide	8.2 ± 2.1	17 ± 5***	14 ± 4**	10 ± 2***	Chol-fed + melinamide	30 ± 3	25 ± 2	30 ± 5*	29 ± 3**
Chol-fed + cholestyramine	6.5 ± 1.5	12 ± 6***	10 ± 4**	5.3 ± 2.8***	Chol-fed + cholestyramine	44 ± 7	22 ± 5	15 ± 4**	22 ± 4***
	IDL-Cholesterol (mg/dl)				Triglyceride (mg/dl)				
	0	2W	4W	6W	0	2W	4W	6W	
Control	6.0 ± 0	3.0 ± 0***	1.0 ± 0***	5.2 ± 1.6***	Control	111 ± 9	89 ± 5	82 ± 8	71 ± 4
Chol-fed	4.0 ± 0.6	269 ± 9***	418 ± 47***	431 ± 77***	Chol-fed	98 ± 27	122 ± 19	209 ± 81	129 ± 13
Chol-fed + melinamide	4.2 ± 1.2	21 ± 13***	13 ± 6***	11 ± 2***	Chol-fed + melinamide	91 ± 24	112 ± 14	116 ± 15	97 ± 16
Chol-fed + cholestyramine	4.0 ± 0.6	15 ± 9***	4.3 ± 1.8***	3.0 ± 1.8***	Chol-fed + cholestyramine	77 ± 24	72 ± 3*	120 ± 29	53 ± 11**

* Significantly different from cholesterol-fed rabbits (p<0.05)

** Significantly different from cholesterol-fed rabbits (p<0.01)

*** Significantly different from cholesterol-fed rabbits (p<0.001)

Values are mean ± SED.

り, Chol 食群の VLDL の増加は主に β -VLDL の増加によると考えられた. IDL-Chol は Chol 食群では, 2 週, 4 週と増加したが, 6 週後はほとんど増加せず, 4 週後にほぼ plateau 状態に達していた. メリナミド群の IDL-Chol は VLDL-Chol と同様の動きを示した. コlestyramin 群の IDL-Chol も同様の動きであ

り, 高 Chol 食群と比較すると著しく低下した. LDL-Chol は Chol 食群では 2 週後に plateau に達し, 6 週

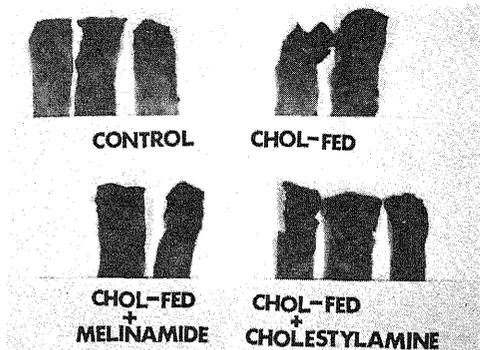


Fig. 2. Sudan stained endothelial surface of rabbit aortas from control chow-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits with melinamide, and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine.

Table 2. Atheromatous lesions of thoracic aortas from control chow-fed rabbits (n=3), cholesterol-fed rabbits (n=2), cholesterol-fed rabbits with melinamide (n=2), and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine (n=3)

	Intimal surface with Sudan-positive lesion (%)	Reduction by drugs(%)
	Range	
Control	0.37 (0-1.1)	-
Chol-fed	27.00 (18.3-35.7)	-
Chol-fed + Melinamide	2.35 (0.9-3.8)	91.3
Chol-fed + Cholestyramine	1.50 (1.1-2.1)	94.4

Areas of stained atheromatous lesions are expressed as % of total surface of thoracic aortas. The difference between area of stained lesions from drug-treated rabbits and cholesterol-fed rabbits is divided by area of stained lesion from cholesterol-fed rabbits. This ratio is expressed as reduction by drugs.

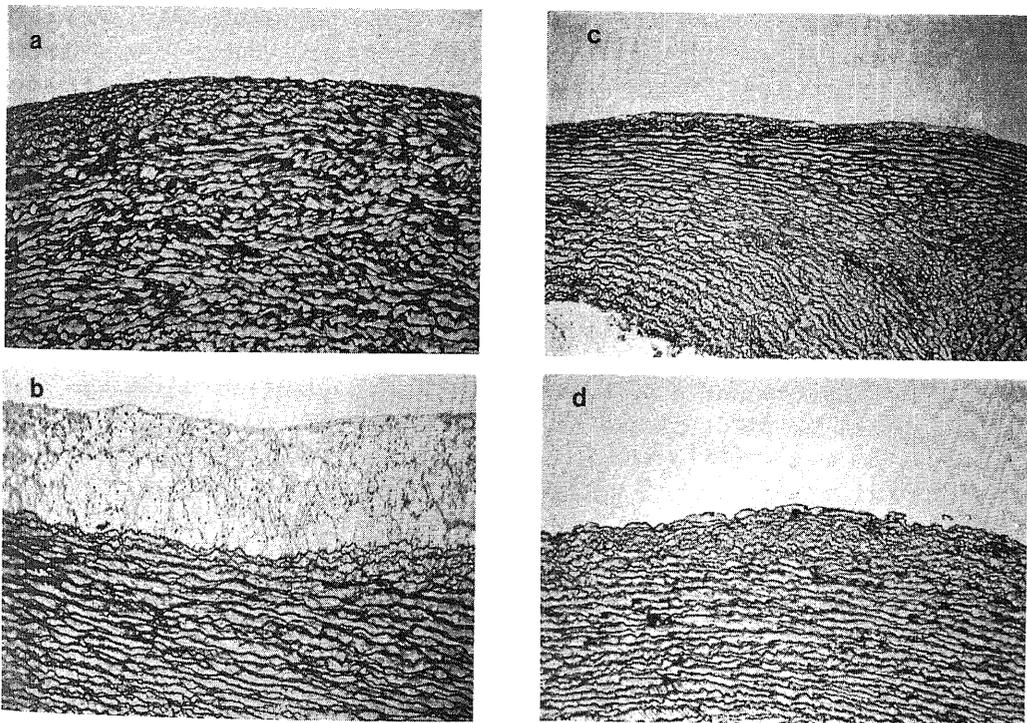


Fig. 3. Histological cross-sections of aortic arches from control chow-fed rabbits (a), cholesterol-fed rabbits (b), cholesterol-fed rabbits with melinamide (c), and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine (d).

後にはむしろ軽度低下した。メリナミド群の LDL-Chol は 4 週後まで増加したが、6 週後には軽度低下した。コレステラミン群では 2 週後に上昇したが、以後低下した。高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, 以下 HDL と略) -Chol は Chol 食群で軽度の上昇を示した。

2. 大動脈粥状硬化薬の変化

6 週後の粥状硬化の程度について検討した。Sudan IV 染色した大動脈を肉眼的に比較すると、図 2 に示すように Chol 食群で大動脈弓部に著しい粥状硬化を認めしたが、メリナミド群及びコレステラミン群ではほとんど認められなかった。プラニメーターによる面積測定では、メリナミド群及びコレステラミン群で各々 91%、94% の粥状硬化の減少が認められた (表 2)。Collagen-Van Gieson 染色した大動脈横断面を組織学的に比較すると、正常食群では内膜肥厚を認めないが (図 3 a), Chol 食群では内膜にアテローム性肥厚を認め、脂質に富んだ泡沫細胞が主体を占めている像が認められた (図 3 b)。メリナミド群では内膜の肥厚はわずかであり (図 3 c), コレステラミン群では内膜の肥厚は認められなかった (図 3 d)。

3. In vivo における LDL 代謝

メリナミド及びコレステラミンの Chol 低下作用における LDL 受容体の役割を明らかにする目的で、4 群について in vivo における LDL 代謝実験を行った (図 5)。図 4 に実験に使用した LDL 及び methyl LDL の線維芽細胞による分解量を示した。Methyl LDL の分解量は LDL の約 1/8 であり、methyl-LDL は LDL 受容体を介さないスカベンジャー経路のみで取り込まれ分解されると考えられた。図 5 に各群における ^{125}I -LDL 及び ^{125}I -methyl LDL の血中消失曲線を示し、この曲線から得られた代謝パラメーターを表 3 に示した。

受容体を介する LDL 代謝と受容体を介さない LDL 代謝の和を表わす LDL の fractional catabolic rate (以下 FCR と略) は、Chol 食群では正常食群の 44% に低下した。高 Chol 食によって低下した LDL 代謝はメリナミド及びコレステラミンによって正常食群の 58%、78% に増加した。受容体を介さない LDL 代謝を表わす methyl LDL の FCR には 4 群間で有意な変化を認めなかった。受容体を介する LDL 代謝を表わす LDL の FCR から methyl LDL の FCR を差し引いた値は Chol 食群、メリナミド群、コレステラミン群では各々正常食群の 12%、40%、68% であった。高 Chol 食によって著しく低下した受容体を介する LDL 代謝はメリナミド及びコレステラミンにて 244%、489% 増加した。総 LDL 代謝に対する受容体を介した LDL 代謝

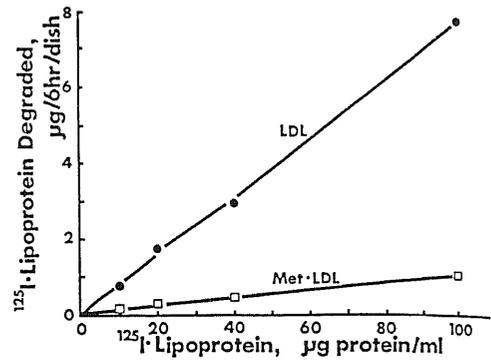


Fig. 4. Degradations of ^{125}I -LDL (●) and ^{125}I -methyl LDL (□) by rabbit fibroblasts. Each point represents the average of duplicate incubations.

の割合は正常食群、Chol 食群、メリナミド群及びコレステラミン群で各々、40%、11%、28%、36%であり、メリナミド、コレステラミン投与によって受容体を介する LDL 代謝の割合が増えていた (表 3)。

総 absolute catabolic rate (以下 ACR と略) は Chol 食群で最も高く、メリナミド群、コレステラミン群、正常食群の順に低下した。受容体を介する ACR は LDL の FCR と類似の傾向を示し、コレステラミン群で最も高く、正常食群、メリナミド群、Chol 食群の順に低下したが、有意差はなかった。受容体を介さない ACR は受容体を介する ACR とは逆の傾向であり、血中 LDL の高い群が増加していた (表 3)。

4. 血漿 apoLDL 値と apoLDL の代謝及び合成との関係

実験中のリポ蛋白状態が定常状態と考えると、apoLDL の ACR は apoLDL の合成量を表わすと考えられる²⁷⁾³¹⁾。合成の指標として apoLDL の ACR を、代謝の指標として apoLDL の FCR をとって、血漿 apoLDL 濃度との相関を検討すると、図 6 のように、ACR とは $r=0.767$, $p<0.001$ で正の相関、FCR とは $r=-0.664$, $p<0.01$ で負の相関が得られた。

5. 各臓器の LDL 取り込み

どの臓器が in vivo での LDL 代謝実験で認められた LDL 代謝を主に行なっているかを検索する目的で、各組織及び臓器の LDL 取り込みを検討した。Methyl LDL の取り込みを受容体を介さない取り込みとして、LDL の取り込みから methyl LDL の取り込みを差し引いた値を受容体を介する取り込みとして検討した。g 組織当たりでは副腎、脾臓、肝臓、の順に取り込みが多かった (図 7)。受容体を介する取り込みは各臓器とも Chol 食群で低下し、メリナミド群、コレステ

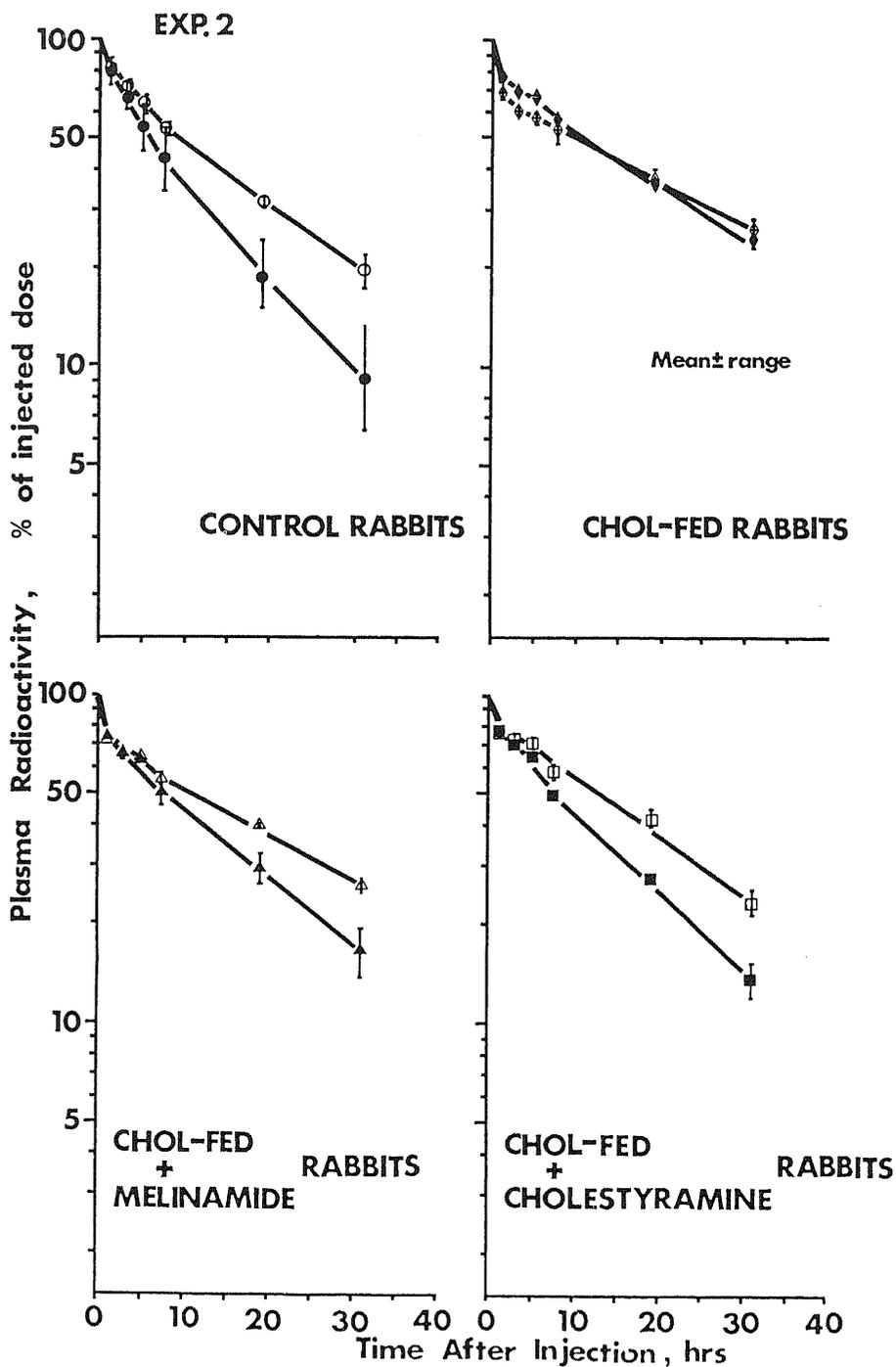


Fig. 5. Disappearances of plasma radioactivity after intravenous injection of ^{131}I -LDL and ^{125}I -methyl LDL in control chow-fed rabbits (\bullet, \circ), cholesterol-fed rabbits (\blacklozenge, \diamond), cholesterol-fed rabbits with melinamide ($\blacktriangle, \triangle$), and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine (\blacksquare, \square).

Table 3. Kinetic data for LDL and methyl LDL turnover in control chow-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits with melinamide and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine.

Rabbit	Weight kg	Plasma Volume ml	ApoLDL mg/dl	FCR, pools/day			ACR of ApoLDL, mg/kg/day			
				Total	Receptor- Independent	Receptor- Dependent	Total	Receptor- Independent	Receptor- Dependent	
Control										
Exp. 1	104	2.22	99	0.31	1.57	0.70	0.87	21.7	9.7	12.1
	105	2.36	106	0.44	1.16	0.95	0.21	22.8	18.8	4.0
Exp. 2	1	2.18	104	0.20	2.70	1.28	1.42	26.0	12.3	13.7
	2	2.30	119	0.35	1.69	1.43	0.26	30.9	26.1	4.7
	3	2.44	132	0.18	2.49	1.38	1.11	24.5	13.6	10.9
Mean±SE	2.30±0.05	112±6	0.30±0.05	1.92±0.29	1.15±0.14	0.77±0.24	25.2±1.6	16.1±2.9	9.1±2.0	
Chol-fed										
Exp. 1	107	2.42	95	1.95	0.58	0.47	0.11	44.6	36.1	8.5
	108	2.40	108	1.61	0.49	0.41	0.08	35.5	30.0	5.5
Exp. 2	202	2.52	82	1.72	1.22	1.16	0.06	68.3	64.9	3.4
	203	2.44	96	1.40	1.06	0.96	0.10	58.2	52.7	5.5
Mean±SE	2.45±0.03	95±5	1.67±0.11	0.84±0.18	0.75±0.18	0.09±0.01	51.7±7.2	45.9±7.9	5.7±1.0	
Chol-fed+Melinamide										
Exp. 1	109	2.12	81	1.04	0.90	0.57	0.33	35.7	22.6	13.1
	110	2.04	103	0.45	0.87	0.61	0.26	19.8	14.0	5.9
	111	2.10	96	0.79	0.93	0.79	0.14	33.4	28.4	5.0
Exp. 2	206	2.36	103	0.44	1.78	1.13	0.65	34.7	22.0	12.7
	208	2.46	104	1.04	1.14	0.99	0.15	50.0	43.5	6.5
Mean±SE	2.22±0.08	97±4	0.75±0.13	1.12±0.17	0.82±0.11	0.31±0.09	34.7±4.8	26.1±4.9	8.6±1.8	
Chol-fed+Cholestyramine										
Exp. 1	112	1.62	104	0.25	1.30	0.72	0.58	20.6	11.4	9.2
	113	1.90	106	0.20	1.26	0.91	0.35	13.7	9.9	3.8
Exp. 2	210	2.48	96	0.80	1.60	1.09	0.51	49.7	33.8	15.8
	211	2.64	162	0.32	1.81	1.15	0.66	35.7	22.7	13.0
Mean±SE	2.16±0.24	117±15	0.39±0.14	1.49±0.13	0.97±0.10	0.53±0.07	29.9±8.0	19.5±5.6	10.5±2.6	

• Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.05$)

*** Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.01$)

**** Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.001$)

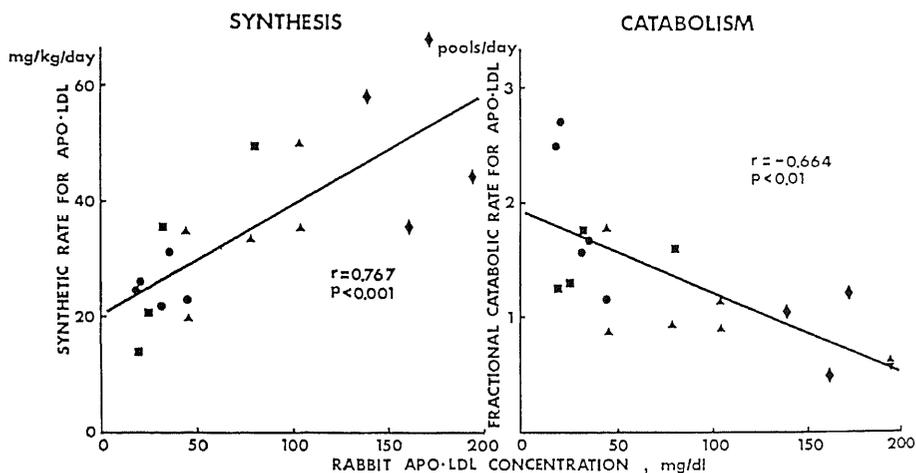


Fig. 6. The relationships between FCR, synthetic rate for apoLDL and plasma apoLDL concentrations in control chow-fed rabbits (●), cholesterol-fed rabbits (◆), cholesterol-fed rabbits with melinamide (▲), and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine (■).

ラミン群で改善していた。逆に受容体を介さない取り込みは、血漿 apoLDL 濃度の高い Chol 食群、メリナミド群で多かった。大動脈においても粥状硬化の多発した Chol 食群に受容体を介さない取り込みが多かった (図7)。

各臓器別では肝臓が最も大量の LDL を代謝した。受容体を介する取り込みは血漿 apoLDL 濃度の高い

Chol 食群で正常食群の 3% にまで抑制され、メリナミド群、コレステラミン群では正常の 51%, 53% であった。高 Chol 食によって著明に抑制された肝臓での取り込みは、メリナミド、コレステラミン投与によって増加した (図8)。

6. 肝細胞膜と¹²⁵I-LDL の結合

肝臓での LDL 受容体数を直接判定する目的で正常

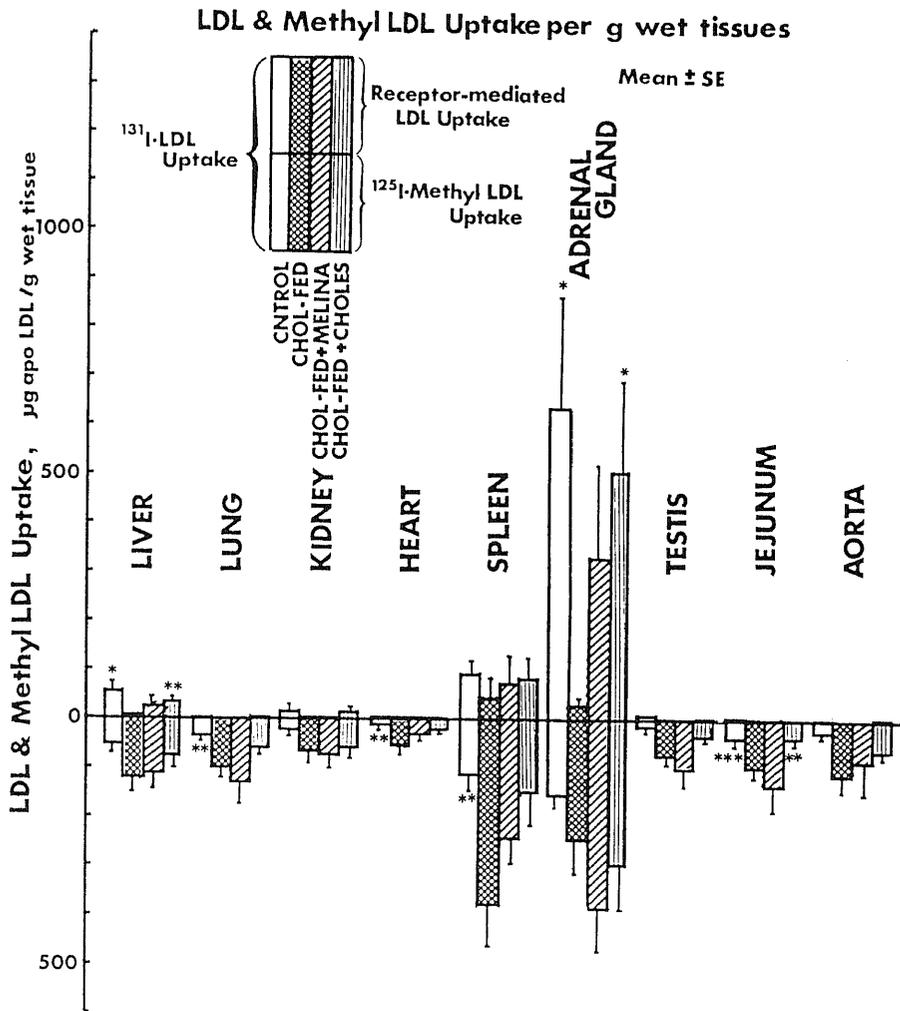


Fig. 7. ¹³¹I-LDL and ¹²⁵I-methyl LDL uptake per gram wet tissues from control chow-fed rabbits, cholesterol-fed rabbit, cholesterol-fed rabbits with melinamide, and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine.

Receptor-mediated LDL uptake is calculated as the difference between ¹³¹I-LDL uptake and ¹²⁵I-methyl LDL uptake.

*Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.05$)

**Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.02$)

***Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.01$)

食群, Chol 食群及びメリナミド群家兎から取り出した肝細胞膜分画の ^{125}I -LDL 結合を検討した. 図9に3群の家兎から得られた肝細胞膜分画と ^{125}I -LDLの結合

の飽和曲線を示した. 正常食群では総結合はEDTAにより一部抑制され, 非標識LDLによってさらに抑制された.

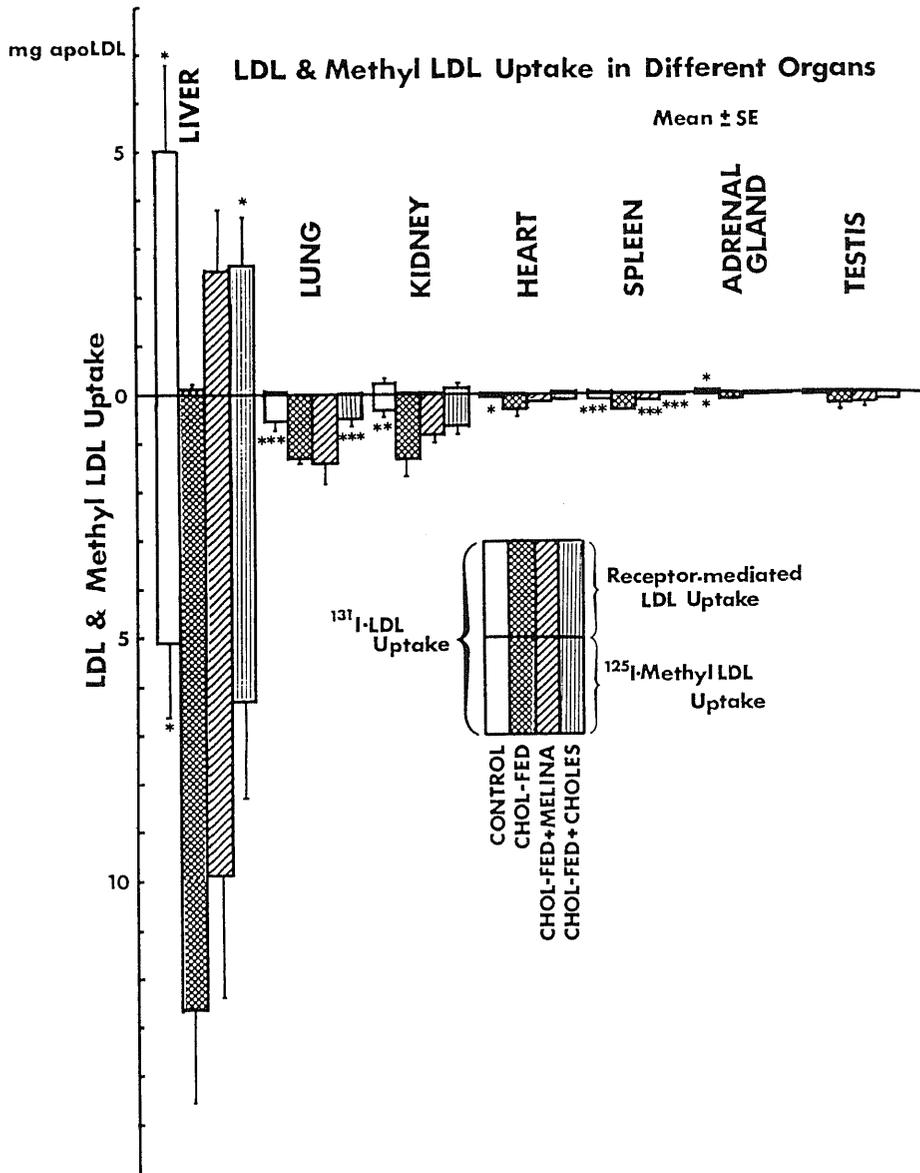


Fig. 8. ^{131}I -LDL and ^{125}I -methyl LDL uptake by organs from control chow-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits with melinamide, and cholesterol-fed rabbits with cholestyramine.

Receptor-mediated LDL uptake is calculated as the difference between ^{131}I -LDL uptake and ^{125}I -methyl LDL uptake.

*Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.05$)

**Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.02$)

***Significantly different from cholesterol-fed rabbits ($p < 0.01$)

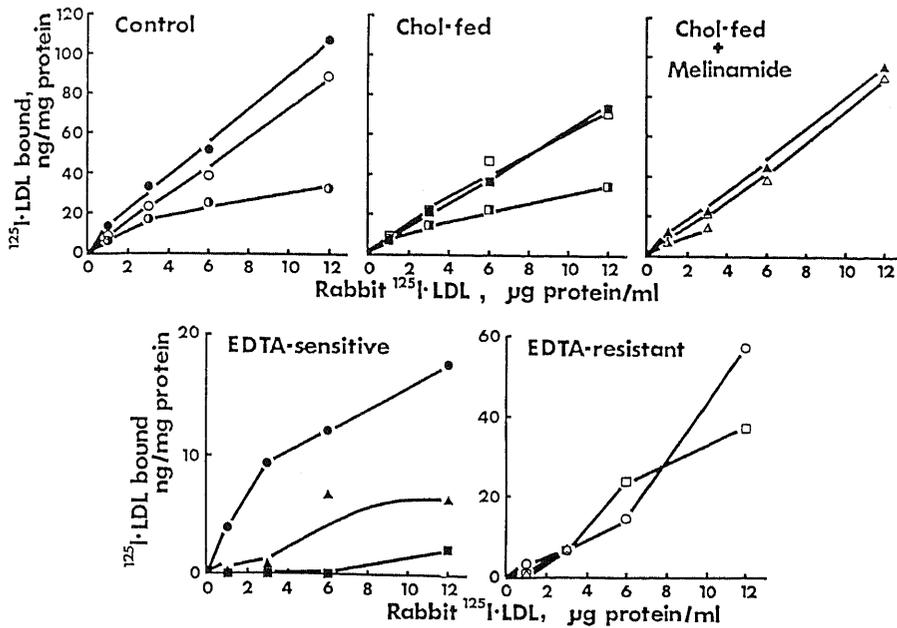


Fig. 9. Binding of ^{125}I -LDL to liver membranes from a control chow-fed rabbit, a cholesterol-fed rabbit, and a cholesterol-fed rabbit treated with melinamide.

Each assay tube contained $100\ \mu\text{g}$ of membrane protein and the indicated concentration of ^{125}I -LDL (493 cpm/ng protein) in the absence (●, ■, ▲) or presence of either 5 mM EDTA (○, □, △) or unlabelled rabbit LDL at 1 mg/ml (○, □, △).

Values represent the mean of two assays on a single set of membrane preparations.

Chol 食群では総結合は正常食群より低く、EDTA によっても抑制されず、非標識 LDL によって始めて抑制を受けた。メリナミド群では、EDTA によってわずかに抑制され、LDL によってさらに抑制された。EDTA 及び LDL によって抑制される結合を EDTA 感受性結合、EDTA によって抑制されず、LDL のみによって抑制される結合を EDTA 抵抗性結合とすると²⁶⁾、正常食群では飽和結合を示す EDTA 感受性結合が存在するが、Chol 食群では認められない。メリナミド群では、EDTA 感受性結合が認められ、高 Chol 食によって消失した EDTA 感受性結合が増加傾向を示した。EDTA 抵抗性結合は 3 群ともほぼ同様と思われた ($3\ \mu\text{g}$ LDL/ml の LDL 濃度における EDTA 抵抗性結合は正常食群で $6.3\ \text{ng/mg}$ 、Chol 食群で $6.4\ \text{ng/mg}$ 、メリナミド群で $6.3\ \text{ng/mg}$ であった)。

正常食群の EDTA 感受性結合を Scatchard 分析すると Kd は $5.2\ \mu\text{g/ml}$ で、最大結合は $24.2\ \text{ng/mg}$ であった。Chol 食群の EDTA 感受性結合はほぼ 0 であり、メリナミド群では、正確な Kd、最大結合は得られなかったが、飽和曲線より最大結合は約 $7\ \text{ng/mg}$ 程度と考えられた。

考 察

今回の実験は、作用機序の異なる脂質低下剤、即ち腸管壁細胞 ACAT 抑制剤と胆汁酸排泄促進剤を用いて、それぞれ腸管からの Chol 吸収が抑制された状態と、肝臓から胆汁酸として Chol 排泄が促進した状態を作製し、各々の状態が LDL 受容体活性の低下した高 Chol 食飼育家兔における LDL 代謝にどのような影響を与え、ひいては粥状硬化をどの程度抑制するかを検討するために行った。その結果、Chol の吸収を抑制した状態でも、Chol の排泄を促進した状態でも、これらの薬剤はともに低下した LDL 代謝を改善し、血清 IDL、LDL 及び β -VLDL を低下させ、粥状硬化を抑制することが判明した。

以下家兔の条件別に考察する。

1. 正常食飼育家兔のリポ蛋白代謝

著者は methyl LDL が LDL 受容体を介して取り込まれない事実を利用し¹⁸⁾、家兔における in vivo での LDL 代謝を検討した。表 3 に示したように正常食家兔では総 LDL 代謝のうち LDL 受容体を介する LDL 代謝の割合は 40% であった。Bilheimer ら²⁹⁾は正常家兔

における家兎 LDL の LDL 受容体を介する代謝は総 LDL 代謝の約 60% であり、ヒト LDL を使用した場合は約 40% と報告している。図 4 に示したように、in vitro の実験では、methyl LDL の取り込み分解は正常 LDL の約 1/8 であり、LDL 受容体を介する取り込みは起こらないものと考えられ、作製した methyl LDL は実験に使用可能と考えられた。家兎 LDL を使用した今回の実験では受容体を介する LDL 代謝の割合が従来の報告²⁹⁾³⁵⁾より低かったが、その原因としては、1) ¹²⁵I 及び ¹³¹I の分離測定が正確でないこと、2) 使用した LDL の変性などが考えられたが、明確な原因は不明であった。しかし今回の実験では各群とも同一条件で測定されており、薬剤の作用の判定には支障ないと思われる。

図 7、図 8 に示したように、受容体を介する LDL 代謝部位として、g 組織当たりでは副腎が、一臓器としては肝臓が最も大量の LDL を代謝していることが示された。近年、血清 Chol 値をコントロールする LDL 代謝に重要な臓器として肝臓が指摘されており^{10)30)~33)}、今回の結果もこれを支持する成績であった。さらに図 9 に示したように詳細に肝細胞膜と ¹²⁵I-LDL の結合を検討すると、他の報告²⁶⁾³⁴⁾³⁵⁾と同様に、特異的結合には EDTA 感受性結合と EDTA 抵抗性結合が存在した。EDTA 感受性結合の Kd は 5.2 μ g/ml で最大結合は 24.2 ng/mg であり、Kita ら²⁶⁾の示した値 (Kd が 1.4 μ g/ml で、最大結合が 39 ng/mg) と比較的近似していた。

2. 高 Chol 食飼育家兎のリポ蛋白代謝

表 3 に示したように in vivo の LDL 代謝実験で LDL 受容体を介する LDL 代謝は正常の 12% まで低下した。Slater らが行った高 Chol 食飼育家兎の実験⁶⁾では、受容体を介する LDL 代謝は高 Chol 食飼育 1 週間後には正常家兎の 17% に、12 週間後には 6% に低下しており、今回の実験では高 Chol 食飼育 6 週目で 12% であり、Slater らと一致する結果であった。これに対応して肝臓での受容体を介する LDL 取り込みは正常の 3% に低下していた。肝臓での EDTA 感受性結合もほぼ 0 であった。一方、LDL 受容体の低下に伴って、LDL の合成を表わす ACR は有意に増加していた。Kita ら⁷⁾は家兎の肝臓 LDL 受容体は VLDL、IDL も取り込むため、LDL 受容体欠損動物であるワタナベ遺伝性高脂血症家兎 (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, 以下 WHHL 家兎と略)⁴⁰⁾では、LDL の前駆体である IDL の取り込みも低下し、IDL が蓄積し、IDL から LDL への合成が増えると報告している。今回の高 Chol 食飼育家兎でも WHHL 家兎と同様の現象が生じていると推定される。すなわち、高 Chol 食飼育家

兎においても、LDL 受容体の低下に伴い IDL から LDL への合成が増加し、LDL の ACR が増加したのであろう。Packard ら³⁶⁾は、ヒトにおいても高 Chol 食によって受容体を介する LDL 代謝が低下し、同時に LDL の合成が増加していることを報告し、ヒトにおいても高 Chol 食によって家兎と同様のリポ蛋白代謝異常が起るとしている。

今回のリポ蛋白の変化で、VLDL-Chol は 6 週間まで増加しつづけるのに対し、IDL、LDL-Chol は 2~4 週で飽和状態になる点が注目される。正常の VLDL は大部分がリパーゼによって IDL から LDL になって代謝される⁷⁾³³⁾³⁷⁾。しかし、 β -VLDL、特に腸管由来の β -VLDL³⁹⁾はリパーゼに対する反応が悪く³⁸⁾、大部分が β -VLDL 又は β -VLDL シムナントとして、 β -VLDL 受容体⁹⁾又は LDL 受容体⁷⁾を介して肝臓に取り込まれる。高 Chol 食飼育家兎では、 β -VLDL 受容体は高 Chol 食飼育 1 週間で急速に約 60% 低下し、以後徐々に低下する⁶⁾。LDL 受容体も 1 週間後に 84% 低下してしまうこと⁸⁾を考えると、今回認められた β -VLDL の持続的上昇は β -VLDL の分解が徐々に低下したためではなく、分解がほぼ一定の低値を維持し、さらに β -VLDL の産生が持続的に増加したためと推定される。

VLDL は、リパーゼにより IDL、LDL となり、LDL 受容体を介して代謝される。IDL、LDL は 2~4 週間後に plateau に達する。plateau 状態では LDL 受容体の低下も、VLDL 産生もほぼ恒常状態になっている。高 Chol 食飼育家兎の LDL 受容体が正常の 12% であることを考慮すると、LDL 受容体に関して、高 Chol 食飼育家兎は LDL 受容体欠損動物である WHHL 家兎⁴⁰⁾に近い状態である。WHHL 家兎では、VLDL、IDL の肝臓への取り込みもわずかであり⁷⁾、リパーゼ異常がないかぎり、LDL-Chol 値は肝臓からの VLDL 産生量に比例するはずである。WHHL 家兎の LDL-Chol 値は 312 ± 188 mg/dl (mean \pm S.D)³⁾であり、高 Chol 食飼育 6 週後の家兎の LDL-Chol 値は 327 ± 17 mg/dl (mean \pm S.E) でありほぼ等しい。従って、高 Chol 食飼育家兎の肝臓からの VLDL 産生量は WHHL 家兎のそれとほぼ等しいと推定される。肝灌流実験によって WHHL 家兎の肝臓からの VLDL 産生量は正常家兎のそれとほぼ等しいことが証明されており、今回の結果と合わせて類推すると、高 Chol 食飼育家兎の肝臓からの VLDL 産生量は正常家兎のそれとほぼ等しいことになる。

以上の成績を要約すると、高 Chol 食飼育家兎におけるリポ蛋白異常の原因を、リポ蛋白産生の面から見ると、1) β -VLDL の持続的産生増加、2) 正常量の VLDL 産生の 2 点が、分解面では、1) β -VLDL 受容

体の低下⁶⁾, 2) LDL 受容体の低下の2点が考えられる。

3. メリナミドによる腸管 Chol 吸収抑制状態での高 Chol 食飼育家兔のリポ蛋白代謝

メリナミドは腸管 ACAT 抑制剤であり, 腸管からの Chol 吸収を阻害し, 脂質低下作用を示す。他の腸管 ACAT 抑制剤の LDL 代謝に及ぼす影響についての報告はない。腸管 ACAT 抑制剤と同様に腸管での Chol 吸収阻害作用を示すネオマイシン⁴¹⁾⁴²⁾のヒト LDL 代謝に及ぼす影響を検討した報告⁴³⁾では, apoLDL の合成が低下しており, 数例で apoLDL の FCR 亢進が認められている。図5, 表3に示したように, 今回の結果では, 腸管での Chol 吸収阻害により高 Chol 食飼育家兔の LDL 代謝が亢進し, LDL 合成も低下することが明確となった。また肝細胞膜の EDTA 感受性結合の増加が LDL 代謝の亢進をもたらすことも判明した。リポ蛋白の合成面では腸管からの Chol 吸収が減り, β -VLDL 合成の低下が推定された。一方, リポ蛋白の分解面では, LDL 受容体が増加し, β -VLDL, IDL 及び LDL の分解が亢進した結果, β -VLDL, IDL 及び LDL の低下をもたらしたと考えられた。

4. コレスチラミンによる肝臓からの Chol 排泄促進状態での高 Chol 食飼育家兔のリポ蛋白代謝

コレスチラミンは正常家兔及び Wheat Starch-Casein 食による高 Chol 家兔の LDL 代謝を亢進させ, 特に肝での EDTA 感受性結合を促進することによって血清 Chol 値を下げることで報告されている⁹⁾¹⁰⁾³⁴⁾。しかし, 高 Chol 食飼育家兔における LDL 代謝に及ぼすコレスチラミンの効果については今のところ報告がない。図8, 表3で示した様に, 今回の実験結果では, 本剤は高 Chol 食飼育家兔においても, 低下した LDL 代謝を亢進させ, 肝臓での LDL 受容体を介する LDL 取り込みを増加させ, 血清 Chol 値を低下させることが証明された。リポ蛋白の合成面では, コレスチラミンは Chol 吸収に直接影響を与えないので, 腸管からの β -VLDL 産生は増加した状態と推定される。分解面では, 受容体を介する LDL 代謝亢進のみでなく, Chao ら³⁴⁾が報告したように β -VLDL 代謝をも亢進させ, β -VLDL 合成増加を上回る分解によって, β -VLDL, IDL 及び LDL が低下したと思われた。

著者は, 図6に示したように, 血漿 apoLDL 値と apoLDL の FCR 及び合成の3者の関係について, 血漿 apoLDL 濃度が増加するにつれて, apoLDL の FCR が低下し, 同時に apoLDL の合成が増加することを示した。Kita らは WHHL 家兔において, その apoLDL 合成の亢進が肝臓からの VLDL 分泌亢進や直接の LDL 分泌の結果ではなく, LDL 受容体低下

に伴う IDL 貯留によって IDL から LDL への合成が増加し⁷⁾, apoLDL 合成が亢進することを示した。前述した結果のように肝臓からの VLDL 合成量は WHHL 家兔も高 Chol 食飼育家兔も正常家兔もほぼ等しいことより, 他の条件の家兔も VLDL 合成量はほぼ一定と推定され, 肝臓からの VLDL 分泌増加に伴う apoLDL 合成の増加はないと思われる。肝臓からの LDL の直接分泌に関しては不明であるが, WHHL 家兔と同様に LDL の直接分泌がないと仮定すると, 図6に示した相関結果より, すべての家兔において, LDL 代謝の低下に伴う apoLDL の合成亢進に LDL 受容体の低下に伴う IDL から LDL への合成亢進が関与していることが示唆される。すなわち, 家兔においては, 受容体を介する LDL 代謝低下の程度に応じて, IDL が貯留し, LDL 受容体の低下による LDL 貯留と IDL から LDL への合成増加の2つの機序によって apoLDL が増加するのである。

近年, リポ蛋白代謝の最終産物である LDL の代謝が, 血清 Chol 値の制御に重要な働きをなしていることが知られ始め³⁵⁾, LDL 代謝を亢進させる脂質低下剤の開発が望まれている。現在, 家兔の実験では, 肝臓からの胆汁酸排泄促進剤及び Chol の合成阻害剤である 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 抑制剤³⁶⁾の2者のみが LDL 代謝を亢進させる薬剤として知られている。今回の成績によって, 高 Chol 食飼育家兔においては腸管壁細胞 ACAT 抑制剤による腸管からの Chol 吸収抑制及びコレスチラミンによる肝臓からの Chol 排泄促進がともに高 Chol 食によって低下した LDL 代謝を亢進させることが判明した。

最近, 胆汁酸排泄促進剤と Chol 合成阻害剤の併用によって, LDL 代謝を一層亢進させ, 血清 Chol を低下させる治療が試みられている³⁷⁾⁴⁴⁾。今回の結果から, 上記薬剤に腸管 Chol 吸収抑制剤を併用することによって, さらに LDL 代謝を促進させ, より効果的に血清 Chol を低下させる可能性が考えられ, 今後の臨床的有用性が示唆された。

結 論

高 Chol 食飼育家兔にメリナミド及びコレスチラミンを用いて腸管からの Chol 吸収抑制状態と排泄促進状態を作製し, リポ蛋白変化, LDL 代謝に及ぼす影響及び抗動脈硬化作用を検討し, 以下の成績を得た。

1. 高 Chol 食飼育家兔の VLDL は β -VLDL が主であり, 高 Chol 食飼育6週後まで徐々に増加した。一方, IDL 及び LDL は徐々に増加したが, 高 Chol 食飼育後2~4週目に plateau に達した。HDL は軽度増

加した。

2. メリナミド及びコレステラミンによって高 Chol 食飼育家兎に認められた β -VLDL, IDL 及び LDL の上昇が抑制され、粥状硬化巣の発生も各々 91%, 94%抑制された。

3. LDL の動態実験では、コレステラミンによって、高 Chol 食で正常の 56%に低下した LDL の FCR が 77%増加した。メリナミドでは 33%増加した。受容体を介する LDL 代謝は高 Chol 食によって正常の 12%に低下し、コレステラミン及びメリナミドによって、各々 489%, 244%増加した。受容体を介さない LDL 代謝は変化しなかった。LDL 合成の指標となる LDL の ACR は正常食群、コレステラミン群、メリナミド群、高 Chol 食群の順に血清 Chol 値が上昇するにつれて高値傾向であった。

4. 血漿 apoLDL 値と LDL の FCR 及び ACR の相関を検討すると、血漿 apoLDL 値と LDL の FCR とは有意な負の相関を示し ($r = -0.664$, $p < 0.01$)、LDL の ACR とは有意な正の相関を示した ($r = 0.767$, $p < 0.001$)。

5. 高 Chol 食飼育家兎の肝細胞膜では肝臓 EDTA 感受性結合は消失していた。メリナミド投与によって肝臓 EDTA 感受性結合は正常の 29%に回復した。EDTA 抵抗性結合は高 Chol 食によっても、薬剤によっても変化しなかった。

以上の結果より腸管からの Chol 吸収抑制状態及び排泄促進状態はともに高 Chol 食によって低下した受容体を介する LDL 代謝を促進し、血清 Chol 値を低下させることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御校閲を賜りました沢武紀雄教授に心から深謝致します。また御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。さらに本研究に直接御指導、御助言を戴きました金沢大学医学部第二内科馬淵宏助教授ならびに多大な御協力を頂きました金沢大学医学部第二内科第一研究室の各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) Hornick, C. A., Kita, T., Hamilton, R. L., Kane, J. P. & Havel, R. J.: Secretion of lipoproteins from the liver of normal and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6096-6100 (1983).
- 2) Shore, V. G., Shore, B. & Hart, R. G.: Changes in apolipoproteins and properties of rabbit very low density lipoproteins on induction of

cholesteremia. Biochemistry, 13, 1579-1584 (1974).

3) Wakasugi, T., Mabuchi, H., Sakai, Y., Sakai, T., Yoshimura, A., Watanabe, A., Koizumi, J., Miyamoto, S., Takeda, R. & Watanabe, Y.: ApoVLDL of the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit and the cholesterol-fed rabbit. J. Lipid Res., 25, 246-253 (1984).

4) Ross, A. C. & 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).

5) Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Brown, M. S., Ho, Y. K. & Goldstein, J. L.: Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by β -very low density lipoproteins from cholesterol-fed animals of several species. J. Lipid Res., 21, 970-980 (1980).

6) Kovanen, P. T., Brown, M. S., Basu, S. K., Bilheimer, D. W. & 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).

7) Kita, T., Brown, M. S., Bilheimer, D. W. & 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).

8) Slater, H. R., Shepherd, J. & Packard, C. J.: Receptor-mediated catabolism and tissue uptake of human low density lipoprotein in the cholesterol-fed, atherosclerotic rabbit. Biochim. Biophys. Acta., 713, 435-445 (1982).

9) Shepherd, J., Packard, C. J., Bicker, S., Lawrie, V. & Morgan, H. G.: Cholestyramine promotes receptor-mediated low-density-lipoprotein catabolism. N. Engl. J. Med., 1219-1222 (1980).

10) Chao, Y., Yamin, T. & Alberts, A. W.: Catabolism of low density lipoproteins by perfused rabbit livers: cholestyramine promotes receptor-dependent hepatic catabolism of low density lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3983-3986 (1982).

11) Field, F. J., Cooper, A. D. & Erickson, S. K.:

- Regulation of rabbit intestinal acyl coenzyme A-cholesterol acyltransferase in vivo and in vitro. *Gastroenterology*, **83**, 873-880 (1982).
- 12) **Bhat, S. G. & Brockman, H. L.** : The role of cholesteryl ester hydrolysis and synthesis in cholesterol transport across rat intestinal mucosal membrane. A new concept. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 486-492 (1982).
- 13) **Gallo, L. L., Clark, S. B., Myers, S. & Vahouny, G. V.** : Cholesterol absorption in rat intestine: role of cholesterol esterase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.*, **25**, 604-612 (1984).
- 14) **Heider, J. G., Pickens, C. E. & Keiij, L. A.** : Role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *J. Lipid Res.*, **24**, 1127-1134 (1983).
- 15) **Clark, S. B. & Tercyak, A. M.** : Reduced cholesterol transmucosal transport in rat with inhibited mucosal acyl CoA: cholesterol acyltransferase and normal pancreatic function. *J. Lipid Res.*, **25**, 148-159 (1984).
- 16) 久取和一・中島 毅・広橋敏之・青野俊二: メリナミド (アルテス®) のコレステロール吸収阻害機構 (II) -コレステロールのエステル化に対する反応- 第16回日本動脈硬化学会総会プログラム, 抄録集, **78** (1984).
- 17) **Fukushima, H., Toki, K. & Nakatani, H.** : The effect of N-(α -methylbenzyl) linoleamide on experimental atherosclerosis in rabbits. *J. Atheroscler. Res.*, **9**, 57-60 (1969).
- 18) **Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W.** : Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **253**, 9053-9062 (1978).
- 19) **Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H.** : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 20) **Shepherd, J., Bedford, D. K. & Mogan, H. G.** : Radioiodination of human low density lipoproteins: a comparison of four methods. *Clin. Chem. Acta.*, **66**, 97-109 (1976).
- 21) **Haba, T., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Tatami, R., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Koizumi, J., Miyamoto, S. & Takeda, R.** : Effects of ML-236B (Compaction) on sterol synthesis and low density lipoprotein receptor activities in fibroblasts of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.*, **67**, 1532-1540 (1981).
- 22) **Holman, R. L., McGill, H. C., Strong, J. P. & Geer, J. C.** : Technics for studying atherosclerotic lesions. *Laboratory Investigation*, **7**, 42-47 (1958).
- 23) **Hata, T., Hower, J. & Insull, W. Jr.** : Cholesteryl ester-rich inclusions from human aortic fatty streak and fibrous plaque lesions of atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **75**, 423-456 (1974).
- 24) **Matthews, C. M. E.** : The theory of tracer experiments with ¹²⁵I-labelled plasma protein. *Phys. Med. Biol.*, **2**, 36-53 (1957).
- 25) **Kovanen, P. T., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** : Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11367-11373 (1979).
- 26) **Kita, T., Brown, M. S., Watanabe, Y. & Goldstein, J. L.** : Deficiency of low density lipoprotein receptor in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2268-2272 (1981).
- 27) **Scatchard, G.** : The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672 (1949).
- 28) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 29) **Bilheimer, D. W., Watanabe, Y. & 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).
- 30) **Slater, H. R., Packard, C. J., Bicker, S. & Shepherd, J.** : Effects of cholestyramine on receptor-mediated plasma clearance and tissue uptake of human low density lipoproteins in the rabbit. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10210-10213 (1980).
- 31) **Kovanen, P. T., Bilheimer, D. W., Goldstein, J. L., Jaramillo, J. J. & Brown, M. S.** : Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1194

-1198 (1981).

32) **Bilheimer, D. W., Goldstein, J. L., Grundy, S. M., Starzl, T. E. & Brown, M. S.**: Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, **27**, 1658-1664 (1984).

33) **Brown, M. S., Kovanen, P. T. & Goldstein, J. L.**: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, **212**, 628-635 (1981).

34) **Chao, Y., Yamin, T. & Alberts, A. W.**: Effects of cholestyramine on low density lipoprotein binding sites on liver membranes from rabbits with endogenous hypercholesterolemia induced by a wheat starch-casein diet. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3623-3627 (1982).

35) **Stoudemire, J. B., Renaud, G., Shames, D. M. & Havel, R. J.**: Impaired receptor-mediated catabolism of low density lipoproteins in fasted rabbits. *J. Lipid Res.*, **25**, 33-39 (1984).

36) **Packard, C. J., McKinney, L., Carr, K. & Shepherd, J.**: Cholesterol feeding increases low density lipoprotein synthesis. *J. Clin. Invest.*, **72**, 45-51 (1983).

37) **Goldstein, J. L., Kita, T. & Brown, M. S.**: Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, **309**, 288-296 (1983).

38) **Chung, B. H. & Segrest, J. P.**: Resistance of a very low density lipoprotein subpopulation from familial dysbetalipoproteinemia to in vitro lipolytic

conversion to the low density lipoprotein density fraction. *J. Lipid Res.*, **24**, 1148-1159 (1983).

39) **Fainaru, M., Mahley, R. W., Hamilton, R. L. & Innerarity, T. L.**: Structural and metabolic heterogeneity of β -very low density lipoproteins from cholesterol-fed dogs and from humans with type hyperlipoproteinemia. *J. Lipid Res.*, **23**, 702-714 (1982).

40) **Watanabe, Y.**: Serial inbreeding of rabbit with hereditary hyperlipidemia (WHHL-Rabbit). Incidence and development of atherosclerosis and xanthoma. *Atherosclerosis*, **22**, 293-297 (1975).

41) **Sedaghat, A., Samuel, P., Crouse, J. R. & Ahrens, Jr. E. H.**: Effects of neomycin on absorption, synthesis, and/or flux of cholesterol in man. *J. Clin. Invest.*, **55**, 12-21 (1975).

42) **Miettinen, T. A.**: Effect of neomycin alone and in combination with cholestyramine on serum cholesterol and fecal steroids in hypercholesterolemic subjects. *J. Clin. Invest.*, **64**, 1485-1493 (1979).

43) **Kesaniemi, Y. A. & Grundy, S. M.**: Turnover of low density lipoproteins during inhibition of cholesterol absorption by neomycin. *Arteriosclerosis*, **4**, 41-48 (1984).

44) **Mabuchi, H., Sakai, T., Sakai, Y., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Koizumi, J. & Takeda, R.**: Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia: Additive effects of compactin and cholestyramine. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 609-613 (1983).

Effects of Melinamide and Cholestyramine on Low Density Lipoprotein Metabolism in Cholesterol-fed Rabbits Yasuyuki Sakai, Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. Med. Soc.*, **94**, 707-723 (1985)

Key words: Intestinal acyl CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, Bile acid sequestrant, Cholesterol-fed rabbits, Receptor-mediated low density lipoprotein catabolism, Hepatic EDTA-sensitive binding

Abstract

It has been known that the low density lipoprotein (LDL) receptors, especially hepatic LDL receptors play an important role in regulating serum cholesterol levels. This study deals with the effects of decreased intestinal cholesterol absorption by melinamide, and increased hepatic cholesterol excretion by cholestyramine, on the receptor-mediated LDL catabolism and hepatic

LDL receptor activity in cholesterol-fed rabbits. Control chow-fed rabbits (n=5), 1% cholesterol-fed rabbits (n=4), 1% cholesterol-fed rabbits with melinamide (n=5), and 1% cholesterol-fed rabbits with cholestyramine (n=4) were used in this study. When ^{131}I -LDL and ^{125}I -methyl LDL were injected simultaneously into rabbits, kinetic parameters for LDL catabolism were measured. Various tissues were removed from rabbits at the end of the turnover study and the uptakes of ^{131}I -LDL and ^{125}I -methyl LDL were measured. Binding of ^{125}I -LDL to hepatic membranes prepared from control chow-fed rabbits, cholesterol-fed rabbits, and cholesterol-fed rabbits with melinamide was examined. In cholesterol-fed rabbits, β -very low density lipoprotein (β -VLDL) increased with time over 6 weeks after cholesterol feeding while intermediate density lipoprotein (IDL) and LDL levels increased with time and then reached a plateau state 2-4 weeks after cholesterol feeding. Melinamide and cholestyramine prevented increases in serum cholesterol, β -VLDL, IDL, and LDL, and then inhibited the formation of atheromatous plaque in cholesterol-fed rabbits by 91%, and 94%, respectively. LDL kinetic study showed that total fractional catabolic rate (FCR) for LDL in cholesterol-fed rabbits was reduced by 56%. Melinamide and cholestyramine increased the reduced FCR for LDL in cholesterol-fed rabbits by 33%, and 77% respectively. Receptor-dependent clearance of LDL in cholesterol-fed rabbits was reduced by 88% when compared with control chow-fed rabbits. Cholesterol-fed rabbits treated with melinamide and cholestyramine showed a 3.4 fold and a 5.4 fold increase of receptor-dependent catabolism of LDL, compared with cholesterol-fed rabbits, respectively. Neither cholesterol feeding nor the drugs significantly influenced the receptor-independent catabolism of LDL. When the tissue uptakes of LDL in rabbits were examined, the adrenal gland was most active in its uptake per gram weight, but, in terms of whole-organ, the liver was by far the major contributor to LDL clearance. The hepatic LDL uptake was greatly reduced by high-cholesterol diets. These results demonstrated that the liver played an important role in regulating the LDL catabolism. Binding of ^{125}I -LDL to hepatic membranes prepared from rabbit liver of control chow-fed, cholesterol-fed and cholesterol-fed with melinamide, was studied. EDTA-sensitive binding on liver membrane from a cholesterol-fed rabbit was abolished. Administration of melinamide restored EDTA-sensitive binding by 29% of normal binding. Neither cholesterol feeding nor melinamide affected the amounts of EDTA-resistant binding site. These results demonstrate that both decreased intestinal cholesterol absorption by melinamide, and increased hepatic cholesterol excretion by cholestyramine lower the serum cholesterol levels in cholesterol-fed rabbits by promoting catabolism of plasma LDL, especially by increasing a hepatic EDTA-sensitive binding of LDL, and then inhibit the atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.