

〈特集〉 脂質代謝異常をめぐる最近の話題

トリグリセライドの代謝面より
 トリグリセリドリパーゼ
 特に肝性トリグリセリドリパーゼの測定法とその意義

金沢大学医学部第二内科

中 井 継 彦

(I) はじめに

1943年, Hahn P. F.¹⁾ によりイヌの食事性脂血症が, ヘパリン静注により軽快することが偶然発見され, 脂質清澄因子の存在が初めて示唆された。この事実はさらに Anderson N. G. ら²⁾, Anfinsen C. B. ら³⁾ により確認されるとともに, 1955年 Korn E. D.⁴⁾⁵⁾ により clearing factor, heparin-activated lipoprotein lipase という表題のもとにこの酵素がヘパリン静注後の血漿中に認められることおよびこの酵素の現在知られているいくつかの特徴が報告された。即ちカイロミクロン中のトリグリセリドを加水分解することができること, ヘパリンにより活性化されること, 高濃度 (0.5~1.0M) の食塩やプロタミンにより抑制されること, 脂肪酸のアクセプターが必要なこと等である。さらに心筋組織および脂肪組織にも存在することが報告された。Korn E. D. はさらに活性な基質はトリグリセリド-蛋白複合体でなければならない

と報告したがこれは後にこの酵素がヒトおよびラットにおいて超低比重リポ蛋白 (VLDL), 高比重リポ蛋白 (HDL) に含まれる活性化因子を必要とすることが Bier, D. M., Havel⁶⁾ R. J. および Whayne T. F. Jr, Felts J. M.⁷⁾ により示された。

近年アポ蛋白 (Apo) に関する知見が蓄積するとともに Apo C-II が最も重要な活性化因子であることが証明され⁸⁾, Apo C-II で活性化されるリポ蛋白リパーゼは LPL C-II と呼ばれている。Ganesan D. ら⁹⁾ は Apo C-I により活性化される LPL の存在を報告したが十分承認されているとは言えない。LPL についてはこのような活性化因子の他に抑制因子の存在も知られている。抑制因子としては ApoC-III, Apo E¹⁰⁾ が報告されているが, 生体内ではこれらの各種因子が同時に総合的に作用しているものと考えられる。

最近 Breckenridge W. C. ら¹¹⁾¹²⁾ により LPL の活性化因子である Apo C-II を遺伝性に欠損し, 高トリグリセリド (TG) 血症を呈した症例が報告され高 TG 血症の成因における LPL 活性化因子の重要性が再確認された。

近年トリグリセリドリパーゼ (TGL) に関する研究における重要な知見のひとつとしてヘパリン静注後血中へ遊出される TGL が heterogeneous であることが示された。LaRosa J. C. ら¹³⁾ をはじめとしてヘパリン静注により肝臓, 脂肪組織, 筋肉組織等より TGL が遊出され表

Physiological Role of Hepatic Triglyceride Lipase: Assay Method for Selective Measurement of Hepatic Triglyceride Lipase and its Regulation by Insulin

TSUGUHIKO NAKAI

The Second Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Kanazawa University,

13-1, Takaramachi, Kanazawa City

金沢大学医学部第二内科

(〒920 金沢市宝町13-1)

<特集> トリグリセリドリパーゼ 特に肝性トリグリセリドリパーゼの測定法とその意義

表 1 トリグリセリドリパーゼの特性と生理的役割

Enzymes	pH Optimum	Usual Assay	Activator	Inhibitor	Physiological Substrate	Physiological Function	Conditions Associated with Enzyme Abnormality
Lipoprotein lipase C-I	8.2-8.5	Intralipid or ¹⁴ C-triolein emulsion. Albumin.	C-I or serum	Sodium chloride (0.3-1.0M) Bile Salts Protamine Sulfate	Lipoprotein TG especially S _f > 400	Hydrolysis of TG in lipoproteins to facilitate uptake into the tissues and sequential degradation of lipoprotein particles	Type I (LPLC-I) (LPLC-II) Type-III (LPLC-II) Type V (LPLC-I) (LPLC-II) Contraceptive medication, hypothyroidism, diabetes mellitus (?)
Lipoprotein lipase C-II	8.2-8.5	- same -	C-II or serum	- same - C-III, A-I C-I, E	Lipoprotein TG especially S _f < 400		
Hepatic triglyceride lipase	8.5-9.5 (9.0)	-same- as above w/protamine sulfate and NaCl in the assay mixture or preincubated w/protamine sulfate	None High conc. of NaCl (1-3 M)	None Known	Not certain can hydrolyze lipoprotein TG	Not known	Decreased in liver disease, hyperthyroidism Increased during oxandrolone treatment
Hormone Sensitive lipase	7.4	¹⁴ C-triolein in gum arabic. Tissue is preincubated with epinephrine	Epinephrine prostaglandin growth hormone xanthines	Fluoride Cyanide	Stored TG in the cells, e.g., of adipose tissue heart (non-lipoprotein TG)	TG in stores of adipose tissue, heart, etc.	Clofibrate and nicotinic Acid suppress it.

1に示すようにその性状も異なることを明らかにしている。Krauss R. M. ら¹⁴⁾¹⁵⁾がpostheparin plasma 中の肝由来の TGL (H-TGL) と肝外性の TGL (LPL) の 1M NaCl や Protamine sulfate による抑制の有無を利用した分別定量法を報告して以来、両酵素の生理的役割を明らかにするために各種病態において総 postheparin lipolytic activity (PHLA) のみならず両酵素活性を分別定量する工夫が試みられている。著者は H-TGL 活性は総 PHLA の 50~60% を占めるにもかかわらず、その生体内における役割が未だ十分明らかにされていないことに注目し、この点を明らかにするために研究をすすめてきた。本論文では H-TGL の定量法、H-TGL の意義についての著者の成績特に H-TGL のホルモン(インスリン)による調節に関する成績を含めて内外の知見を概説し報告する。

(II) Postheparin plasma 中トリグリセリドリパーゼ活性測定法および LPL と H-TGL 活性の分別定量法

(1) トリグリセリドリパーゼ活性測定法

TGL 活性測定に用いられてきた方法は次の

3方法に大別することができる。①比濁法、②化学的方法、③ラジオアイソトープを用いる方法である。この3方法の概要については他の総説を参考にさせていただきたい¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。現在は Schotz M. C. らの方法¹⁹⁾に準じた [¹⁴C] Triolein を含む基質を用いて行うアイソトープ法が最も広く使用されている。著者はこの方法に準じて行っておりこの方法についてのいくつかの問題点について述べる。この方法においては [¹⁴C] Triolein の emulsion を基質として用いるが基質の調製法が酵素活性測定に大きな影響を与える。著者はアメリカの Oklahoma Medical Research Foundation 留学中に指導を受けた Ganesan D, Wayne T. F. Jr らの基質調製法⁹⁾を用いている。即ち 1ml assay mixture 中の基質内容は [¹⁴C]-Triolein 10 μ moles (110,000dpm), gum arabic 30mg, bovine serum albumin 60mg, ammonium sulfate 25 μ moles, phosphatidyl choline 50 μ g である。

まず [¹⁴C] Triolein を gum arabic と混合したのち、超音波破碎装置, Sonicator[®] (Heat Systems-Utrasonics Inc.) を用いて出力 60~70ワットにて氷冷しながら 1分間超音波破碎,

1 分間休止を3回くり返し行っている。その後 bovine serum albumin, ammonium sulfate, phosphatidyl choline を混合し 1M KOH にて pH 8.5 に合わせた後、0.5ml を基質液として用いる。基質液、酵素液、活性化因子 (通常は血清) または抑制因子をあわせて総量 1.0ml にて酵素反応を行っている。酵素反応は Dole 液 (イソプロピルアルコール:3N 硫酸 40:1) を加えて反応を停止し、反応終了後遊離された脂肪酸は Belfrage P. ら²⁰⁾ の liquid-liquid partition system の原理にもとづいた Schotz M.C. の方法で 0.1N KOH へ分離し、KOH の一部をとり放射活性を測定し酵素活性を算出する。この酵素反応に影響を与える因子として Ca^{++} イオン²¹⁾、ヘパリン²²⁾、phosphatidylcholine²³⁾²⁴⁾ 等が指摘されている。さらに重要なことは用いる detergent の種類であり、著者が用いている gum arabic の他には Triton X-100 等が用いられている。報告者により TGL 活性の絶対値の違いが認められるのは基質の差異によるところが大きいと考えられる。その他基質濃度、添加アルブミン濃度および種類、反応 pH 等をも含めて基質の内容については十分検討されなければならぬと考えられる。

このように人工基質を用いた場合と TG rich リポ蛋白 (カイロミクロン, VLDL 等) を用いた場合とでは差異が認められることがあり、時には人工基質および TG rich リポ蛋白の両者を用いて検討する必要があると考えられる。反応 pH は表 1 において示されているように、至適 pH は LPL が pH 8.2~8.5, H-TGL が pH 8.5~9.5 であり、両酵素に至適 pH の軽度の差異が認められ、研究者によっては LPL 測定のととき、H-TGL 測定のとときにより pH をも含めて基質の状態を各々の酵素に至適となるように調製して使用しているが著者は LPL と H-TGL とに対して同一の基質、pH は 8.5 を用いて行い、両酵素の分別の際には後に記載するような方法で行っている。

反応温度について Fredrickson D.S. ら NIH グループ¹⁴⁾は 27°C にて酵素活性が最大になるとし、27°C を反応に用いているが、温度の反応速度に対する影響については必ずしも一致した見解が得られておらず著者をも含めて現在一般的には 37°C が広く用いられている。反応時間は用いる基質量、酵素量 (postheparin plasma 量) に依存するが用いる基質にて種々の酵素量での反応時間経過を検討し直線性が得られる条件で酵素活性を測定する必要がある。

著者の用いている条件下においては図 1 のように ppostheparin plasma 100 μ l, 30 分間のインキュベーションまでは直線関係が得られたので現在著者はこの条件を用いている。

(2)ヘパリンによる TGL の組織からの遊出

(a) LPL, H-TGL の組織における存在様式 (図 2) LPL は脂肪組織、筋肉組織内の毛細血管内皮細胞の表面で働くと考えられている。例えば LPL は脂肪細胞で合成され、microtubular-microfilament system を介して脂肪細胞外、即ち内皮細胞下へ分泌され、内皮細胞膜の proteoglycan の蛋白成分の外側への拡散により血管内腔側へ運搬され、内皮細胞膜の外側へのびた多糖類と結合していると考えられている²⁵⁾²⁶⁾。血中へ遊出される H-TGL が肝細胞内のどの部位の酵素で、どのような形で存在しているかについては十分解明されていない。肝細胞内の TGL として報告されているものをまとめると表 2 のごとくである。即ちライソゾーム中の酸性リパーゼおよび細胞質や細胞膜に結合したアルカリ性リパーゼである。しかし postheparin plasma 中の H-TGL が肝細胞内のどのリパーゼと同一かについては結論されていない。

細胞内の TGL 特に LPL については 2 つの細胞内区画が存在すると考えられている²⁷⁾。1 つはヘパリン等により血管内へ遊出される機能区画で、もう 1 つは機能区画の前駆体である。この両者の割合は組織により異なると考えられて

<特集> トリグリセリドリパーゼ 特に肝性トリグリセリドリパーゼの測定法とその意義

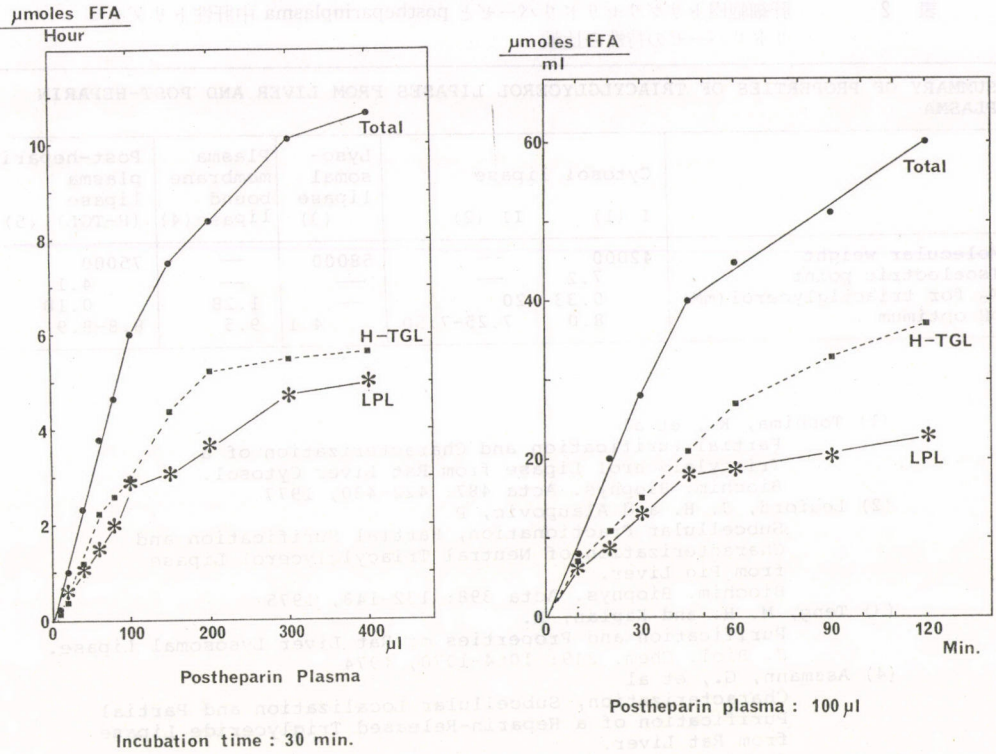
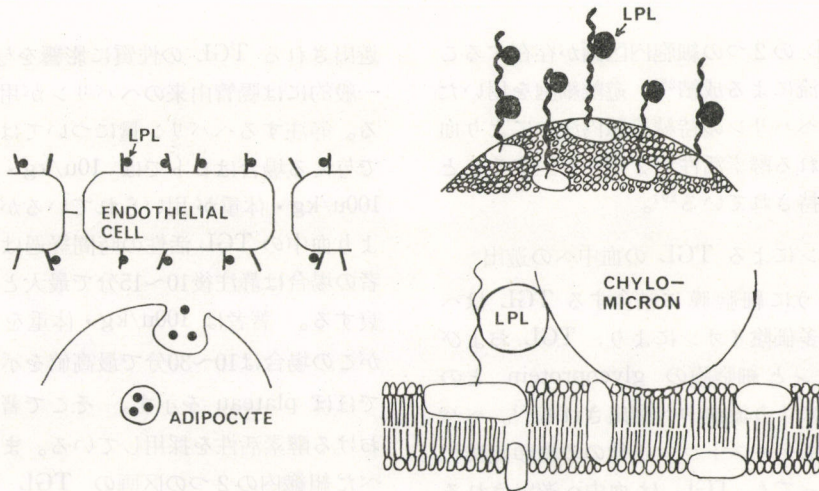


図 1 Postheparin Plasma 中 LPL および H-TGL 活性測定における血漿量 (酵素量) および反応時間と酵素活性との関係



左: 脂肪細胞からの LPL の分泌と内皮細胞膜表面への移動
 右上: 内皮細胞膜表面の LPL 右下: 内皮細胞膜表面の LPL (縦断面)

図 2 脂肪組織における LPL の存在様式²⁵⁾

表 2 肝細胞内トリグリセリドリパーゼと postheparinplasma 中肝性トリグリセリドリパーゼの特性の比較

SUMMARY OF PROPERTIES OF TRIACYLGLYCEROL LIPASES FROM LIVER AND POST-HEPARIN PLASMA

	Cytosol lipase		Lyso-somal lipase (3)	Plasma membrane bound lipase (4)	Post-heparin plasma lipase (H-TGL) (5)
	I (1)	II (2)			
Molecular weight	42000	—	58000	—	75000
Isoelectric point	7.2	—	—	—	4.1
K _m for triacylglycerol (mM)	0.33	20	—	1.28	0.10
pH optimum	8.0	7.25-7.50	4.1	9.5	8.8-8.9

- (1) Toshima, K., et al
Partial Purification and Characterization of a Triacylglycerol Lipase from Rat Liver Cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 487: 422-430, 1977
- (2) Ledford, J. H. and Alaupovic, P.
Subcellular Fractionation, Partial Purification and Characterization of Neutral Triacylglycerol Lipase from Pig Liver. *Biochim. Biophys. Acta* 398: 132-148, 1975
- (3) Teng, M. H. and Kaplan, A.
Purification and Properties of Rat Liver Lysosomal Lipase. *J. Biol. Chem.* 249: 1064-1070, 1974
- (4) Assmann, G., et al
Characterization, Subcellular Localization and Partial Purification of a Heparin-Released Triglyceride Lipase from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* 248: 1992-1999, 1973
- (5) Ehnholm, C., et al
Purification from Human Plasma of a Heparin Released Lipase with Activity Against Triglyceride and Phospholipids. *J. Biol. Chem.* 250: 6756-6761, 1975

いる。LPLの2つの細胞内区画が存在することは臓器灌流による成績²³⁾、遊離細胞を用いた成績およびヘパリンの持続静脈内注入により血中へ遊出される酵素活性が2相性を呈すること等により支持されている²⁹⁾。

(b)ヘパリンによる TGL の血中への遊出

前述のように細胞膜に結合する TGL はヘパリン等の多価陰イオンにより、TGL および多価陰イオンと細胞膜の glycoprotein との結合力の差により流血中へ引出される²⁵⁾。ヘパリンの他にもデキストランと他の多糖類硫酸化合物等によっても TGL は血中へ遊出されるが、臨床検査の目的のためにはもっぱらヘパリンが用いられている。用いるヘパリンの種類即ちヘパリンが精製された臓器(腸管または肺)も

遊出される TGL の性質に影響を与える³⁰⁾が、一般的には腸管由来のヘパリンが用いられている。静注するヘパリン量については one shot で与える場合はヒトでは 10u/kg・体重または 100u/kg・体重が用いられているが用いる量により血中の TGL 活性の時間経過は異なり、前者の場合は静注後10~15分で最大となり以後減衰する。著者は 100u/kg・体重を用いているがこの場合は10~30分で最高値を示し、60分までは plateau を示す。そこで著者は30分における酵素活性を採用している。また先きにおける組織内の2つの区画の TGL 活性の状態を知るためにヘパリンの持続点滴静注法についても報告されている。Brunzell J. D. ら³¹⁾は高 TG 血症を伴う糖尿病患者にヘパリン 60u/kg

体重を3～5時間かけて持続点滴し、血中 TGL 活性の変動を非糖尿高 TG 血症患者と比較した。ヘパリン点滴後期の TGL 活性は糖尿病患者で有意に低下していた。

(3) LPL と H-TGL の分別定量法

postheparin plasma から純化した LPL と H-TGL との分子特性について Augustin J. らにより詳細に報告されている⁷¹⁾。分子量は H-TGL (69,000) は LPL (67,000) より軽度に大きかったがアミノ酸組成、末端アミノ酸やトリプシン消化ペプチドマップは両者の間で差異が認められなかった。両酵素は約8%の糖質を含んでいる点も同じであり分子特性は酷似していた。しかし純化した酵素においても至適 pH, LPL の Apo C-II の必要性等の酵素の特徴は保たれていた。またヤギにおいて作成した抗体は各々特異的に沈澱させたので抗原決定基の違いはあると考えられる。LPL と H-TGL の分子構造が酷似しているにもかかわらず LPL が活性化因子として Apo C-II を必要とすることや 1M NaCl, protamine sulfate にて活性が抑制されること、一方 H-TGL においてはこのようなことが認められないこと、両酵素のヘパリンに対する結合力に違いがあること等がどのような修飾を受けて生ずるかは理解されていない。LPL と H-TGL との分別定量には上記のような両酵素の特性の違いを利用して行われている。即ち ① 1M NaCl または protamine sulfate により LPL 活性を抑制して行う方法¹⁴⁾、② Sepharose 4B にヘパリンをカップリングさせた affinity chromatography により異なった濃度の NaCl により両酵素を流出させる方法、即ち 0.72M NaCl で流出される H-TGL と 1.5M NaCl で流出される LPL とを分画する³²⁾³³⁾、③ H-TGL を②の方法で純化し、この H-TGL に対する抗体を使い選択的に H-TGL 活性を抑制して行う方法、である³⁴⁾。これら3方法は一長一短がある

と考えられるがその特長について述べる。

1M NaCl または protamine sulfate にて LPL を抑制して行う方法では TGL 活性が最大に抑制される濃度を用いても必ずしも LPL が100%抑制されない可能性があり、また基質作成に用いる detergent の種類により抑制力が異なり各報告者間の成績を比較する際に問題となる点である。heparin-Sepharose affinity chromatography を用いる方法は Boberg J. ら³⁵⁾により初めて報告され Applebaum D. M. ら³⁶⁾の報告をはじめとして用いられているが、この方法では全ての操作を厳密に低温下(4℃)にて行っても酵素活性の回収率が低く、特に LPL 分面の活性低下が著しい。LPL 分面の活性低下を防ぐために20%グリセロールを溶出バッファーに加えて行う方法も試みられているが、この方法にても必ずしも満足すべき成績が得がたい。しかし H-TGL 分面は著者の報告のように 1M NaCl を用いる方法と比較し 80～90%の回収率が認められている。

Huttunen J. K. ら³⁴⁾および Greten H. ら³⁷⁾により報告されて以来広く用いられるようになってきた方法は抗 H-TGL 血清を用いて行う方法である。この方法の特徴は前2者に比し特異性が高い点にあると言える。抗 H-TGL 血清は LPL 分面とは免疫学的にも交叉反応を認めずまた LPL 活性にも影響を与えない。問題点をあげるとすれば抗 H-TGL 血清の力価が用いる測定系においてどの程度(何%) postheparin plasma 中の H-TGL 活性を抑制し得るか評価がし難い。著者は抗血清の種々の量を用いて 100 μ l postheparin plasma 中の TGL 活性を最大に抑制し得る量を用いている。著者の測定系では 50～100 μ l の抗血清量にて postheparin plasma の TGL 活性が最大(約40～50%)に抑制されるとともにヘパリンカラムによる H-TGL 分面が最大に抑制されるので100または 200 μ l の抗血清量を用いて分別定量を行っている。

表 3 各種病態における血漿トリグリセリド, 総 PHLA, 血漿 LPL 活性, H-TGL 活性および各種代謝状態とホルモンの各種臓器における LPL と H-TGL 活性におよぼす影響³⁵⁾ (文献38より著者改変)

CHANGES IN SERUM TRIGLYCERIDES, TOTAL POSTHEPARIN LIPOLYTIC ACTIVITY (PHLA), PLASMA LIPOPROTEIN LIPASE AND HEPATIC TRIGLYCERIDE LIPASE IN VARIOUS CONDITIONS

Condition	Serum triglyceride	Total PHLA	Plasma lipoprotein lipase	Plasma hepatic triglyceride lipase
Exogenous familial hypertriglyceridemia	Increased	Decreased	Decreased or absent	Normal
Oxandrolone treatment	Decreased	Increased	Unchanged	Increased
Estrogen treatment	Increased	Decreased	Unchanged	Decreased
Diabetic hypertriglyceridemia				
Juvenile	Increased	Decreased or normal	Decreased	Variable
Adult-onset	Increased	Decreased or normal	Variable	Increased
Type III hyperlipoproteinemia	Increased	Decreased	Decreased	Decreased

EFFECT OF VARIOUS METABOLIC STATES AND HORMONES ON LIPOPROTEIN LIPASE OF DIFFERENT TISSUES AND HEPATIC TRIGLYCERIDE LIPASE

Metabolic state or hormone	Adipose tissue	Heart	Skeletal muscle	Lung	Mammary tissue	Liver
Fasting	Decreased	Increased	No change	No change	Not known	Decreased
Fed	Increased	Decreased	No change	No change	Not known	Increased
Lactating	Decreased	No change	Not known	No change	Increased	Not known
Insulin	Increased	No change	Not known	Not known	Not known	Increased
Glucagon	No change	Increased	Not known	Not known	Not known	Decreased?

(III) 各種疾患における postheparin plasma 中 TGL 活性

表3に示すように postheparin plasma の LPL と H-TGL との分別定量の成績および組織内の TGL 活性の成績から各種病態における LPL, H-TGL の動態や両酵素のホルモンの含めた調節因子が次第に解明されつつある³⁸⁾。しかし LPL の TG rich リポ蛋白代謝における役割についてはよく研究されてきたが, H-TGL が認識されてからまだその歴史が浅いこともあり, postheparin plasma 総 TGL 活性の50~60%を占めるにもかかわらず H-TGL のリポ蛋白代謝における役割およびその調節因子については十分理解されていない。H-TGL

はおそらく chylomicron または VLDL が LPL により代謝され chylomicron remnant または IDL (Intermediate density lipoprotein, $1.006 < d < 1.019 \text{g/ml}$) になったのち, これらが肝で取り込まれる際に作用するのではないかと考えられている²⁵⁾³⁹⁾。H-TGL 活性の低下する病態として甲状腺機能低下症⁴⁰⁾, 経口避妊薬(エストロゲン)服用者³⁶⁾, III型高リポ蛋白血症⁴¹⁾, 肝疾患⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾, 尿毒症⁴⁵⁾⁴⁶⁾が知られている。著者は H-TGL の生体内における役割の一端を明らかにすることを目的としてホルモン(特にインスリン)による H-TGL の調節機構を研究してきたが以下その成績について紹介する⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾。

(IV) インスリンによる H-TGLの調節

(A) 糖尿病ラットにおける実験成績

(1) Postheparin lipolytic activity (PHLA)

PHLA はヘパリン (Novo 社, ヘパリンナトリウム, 腸粘膜由来) を腎静脈分岐部より末梢部にて下大静脈へ静注後腹部大動脈より予め氷冷したヘパリン 2u/ml・血液を含む容器へ採血し, 血漿を 4℃にて遠心分離後 -20℃に凍結保存し, 1週以内に酵素活性を測定した。TGL 活性は前述の基質を用いて行い LPL と H-TGL の分別定量は主として 1M NaCl を用いる方法にて, また一部は heparin-Sepharose affinity chromatography または抗 H-TGI 血清を用いて行った。まず静注するヘパリン量および静注後の採血時間による LPL, H-TGL 活性の変動を検討した。ヘパリン 50u/250g・体重静注後 1, 3, 5, 10, 20分 に採血し酵素活性の推移を検索した。総活性は 3分にて最大 ($19.17 \pm 0.57 \mu\text{mol FFA/ml/h}$) となり 10分まで持続し 20分には低下した。ヘパリン静注後早期には H-TGL の割合がより大であり, 1分, 3分後の H-TGL の総活性に占める割合 ($68.3 \pm 1.8\%$) は 20分後の値との間に有意の差を認めた。静注するヘパリン量との関係はヘパリン 1, 5, 25, 50u/250g・体重を静注し 3分後に採血し検討した。総活性は 25u/250g・体重にて最大となり H-TGL は総活性の 59% であり, 50u/250g・体重に増量すると総活性は不変だが H-TGL の占める割合は 70% と増加した。より少量のヘパリン量では H-TGL の相対濃度は低値を示した。TGL のホルモンによる調節機構について検討するために以下の実験を行った。従来 LPL はインスリンにより調節されていると報告されているが, H-TGL のホルモンによる調節については知られていない。

まず絶食および非絶食の状態での H-TGL, LPL の動態について検討した。各群 5匹を 12, 24, 36時間絶食にし非絶食群と比較した。

絶食群では非絶食群に比し総活性は有意に減少し, H-TGL も絶対値, 相対値ともに減少した。一方 LPL は軽度ながら増加した。この実験よりラットにおいて H-TGL はインスリン, グルカゴン等により調節を受けていることが推定されたが, これを証明するためにストレプトゾトシン (STZ) による実験的糖尿病ラットにおける PHLA について検討した。糖尿病ラットは Junod A. ら⁵²⁾の方法に準じてウイスター系雄性ラットに STZ 65mg/kg・体重を静注し作成した。

STZ 糖尿病ラットの血糖値は短期 (STZ 注射後 3~7日) STZ ラットでは 300mg/100ml 以上, 長期 (STZ 注射後 4週) STZ ラットでは 400mg/100ml 以上で, 長期 STZ ラットでは血漿 IRI 値 ($4.8 \pm 1.6 \mu\text{U/ml}$) は対照ラット ($70.6 \pm 14.1 \mu\text{U/ml}$) に比し有意に低下していた。ラットの PHLA は H-TGL を最大に遊出させる条件即ち非絶食にて早朝ヘパリン 50u/250g・体重を静注後 3分 に採血し測定した。短期 STZ ラット (STZ 投与 3日後) では対照群に比し総 TGL 活性および H-TGL 活性は有意に低値であった。STZ ラットをインスリンにより治療した群では H-TGL 活性は対照群と比較し得るまで回復した。さらに heparin Sepharose affinity chromatography による分別定量法により検討した。0.72M NaCl で溶出されるピークの面積より計算した STZ ラットの H-TGL 活性は対照ラットの約 1/2 に低下していた。長期 STZ ラット (STZ 静注後 4週) の PHLA においては 1M NaCl を用いた分別定量法による成績では LPL, H-TGL ともに STZ ラット, 対照ラット間に有意の差を認めなかったが, 抗 H-TGL 血清を用いた成績では H-TGL 活性は STZ ラットで有意に低下していた。また抗 H-TGL 血清を用いた分別定量法による成績では H-TGL 活性と血漿 TG 値との間には有意の負の相関が認められた。

(2) 肝臓, 心筋ホモジネートの TGL 活性

まず組織内 TGL 活性の測定法について心筋組織を用いて検討した。従来組織内 TGL 活性の測定法としては acetone ether powder を用いる方法, 組織スライスを用いる方法およびホモジネートを用いる方法が報告されており, まずこの3方法について検討した。心筋の acetone ether powder の作成は Tan M. H. らの方法⁵³⁾ に準じて 0.05M $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ buffer, pH 8.1 を用いて行った。蛋白量と TGL 活性との間には正の相関が認められたが蛋白 1mg 当たりの TGL 活性は後に示すホモジネート中 TGL 活性に比し低値であった。

次に Lithell H. らの方法⁵⁴⁾ に準じて心筋スライスを 2.1M glycine を含む Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, pH 7.4, 1.5% bovine serum albumin, heparin 50u/ml とともにインキュベートし, メジウム中に放出された TGL 活性を測定した。37°C における TGL 放出の時間経過は 30分まで直線的に増加したが以降 120分までは TGL 放出速度は低下した。0°C においては TGL の有意の放出は認められなかった。

acetone ether powder 法およびスライス法は TGL 活性値の低値, そのばらつき, 操作に時間がかかること等必ずしも満足すべきものではなく, 次にホモジネート法について検討した。心筋ホモジナイズに用いるバッファーの TGL 活性値に与える影響について従来 acetone ether powder 作成やスライスを用いた実験およびホモジネートを用いた実験等において文献に記載されているバッファーのうち3種のバッファー即ち ① 2.1M glycine buffer, pH 8.3 ② 0.078M Tris-HCl buffer, pH 7.4 ③ 0.05M $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ buffer, pH 8.1 を用いて検討した。glycine buffer を用いてホモジネートを作成した場合最も TGL 活性は高く, Tris-HCl buffer, $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ buffer ではそれぞれ glycine buffer を用いた際の 4.1.6%, 34.0% であった。心筋ホモジ

ネートの TGL 活性は血清またはヘパリンの添加により増強され, NaCl の添加により抑制された。このことは従来報告されているように心筋 TGL が LPL の性格を有することを確認した。肝ホモジネートの TGL 活性の測定においても glycine buffer が最も有効であった。

また肝ホモジネート中 TGL 活性の一部は 1MNaCl により抑制されるとともに抗 H-TGL 血清にても TGL 活性を 100%抑制することが難しく, おそらく Bensadoun A. ら⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾ により報告されているように肝細胞内にも H-TGL の他に LPL 様性格をもった酵素の存在が示唆された。絶食の心筋 TGL 活性におよぼす影響についてみてみると, 12時間の絶食にて TGL 活性は非絶食ラットに比し高値となったが 48時間以上の絶食ではかえって酵素活性は低下した。絶食による心筋の TGL 活性の動態は表 3 に示すように脂肪細胞では絶食により TGL 活性が減少するのとは異なり同じ LPL でありながらホルモン調節機序が異なることが考えられ注目される。短期および長期 STZ ラットにおける心筋 TGL 活性はともに対照ラットに比し有意に低下していた。また長期 STZ ラットの心筋 TGL 活性と血漿 TG 値との間には有意の負の相関が認められた。長期 STZ ラットの肝ホモジネート中 TGL 活性の検討では対照ラットに比し有意に低下し, また TGL 活性と血清 TG 値との間にも有意の相関が認められた。

(3) 遊離肝細胞における TGL 活性

遊離肝細胞を用いる系は肝における各種の代謝実験に広く用いられている。著者もこの系を用いて HDL 代謝等の研究を行ってきた。

Berry M. N. と Friend D. S. の方法⁵⁸⁾ を著者が改変した方法⁵⁹⁾ にて得られた遊離肝細胞は形態学的には trypan blue で染まる細胞は 5%以下であり, 電子顕微鏡による観察でも細胞膜の villi をはじめとして細胞内小器官も十分保たれていた。また代謝的にも乳酸とピル

ビン酸からの糖新生も2時間までのインキュベーションで直線的増加が認められ、グルカゴン添加により糖新生は増強された。従って細胞膜のホルモンレセプターも intact の状態にあると考えられた。この遊離肝細胞を用いて H-TGL 代謝を検討した。(5~10)×10⁶ 個の遊離肝細胞を 30u/ml のヘパリンとともにインキュベートすると細胞からメジウム中への TGL の放出は最大であった。この条件下でメジウムへの TGL の放出をみると TGL 活性は nmoles FFA/h/10⁶ cells と低いながらもインキュベーション60分まで直線的に増加した。またこれに呼応して細胞内の TGL 活性は減少した。Thomas J. ら⁶⁰⁾ はコラゲナーゼ処理により得られた遊離肝細胞では TGL 活性は認められなかったと報告しているが最近 Sundaram G.S. ら⁶¹⁾ も著者と同じく有意の TGL 活性の変動を認め、この系の TGL 代謝研究における有用性を報告している。STZ ラットより調製した遊離肝細胞内の酵素活性およびヘパリンによりメジウム中へ遊出される酵素活性は対照の約 1/2 に減少していた。

(4) 成熟ラット初代培養肝細胞における TGL のインスリンによる調節

(a) 成熟ラット肝細胞の初代単層培養法と培養肝細胞の特徴⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾

前記の方法で得た遊離肝細胞(約(2.5~3.0)×10⁶)をコラーゲンをコーティングした培養皿(径 60mm)を用いて 2.5ml の無血清培地 HI/WO₅/BA₂₀₀₀ 中、37°C で湿潤した 5% CO₂/95% air の気相下に培養を開始した。培養開始後 4 時間に培地を交換した後実験に供した。なおすべての操作は無菌状態にて行った。培養12~24時間後の肝細胞は形態学的には明瞭な胞体および核が観察され、多角形の細胞が互いに密着し単層を形成し、電子顕微鏡では細胞膜、ミトコンドリア、小胞体等の微細構造はよく保たれ、また細胆管やデスモゾームも観察された。細胞の代謝活性の詳細については既に報

告した⁶²⁾⁶³⁾が代謝機能は少なくとも培養24~48時間までの培養細胞ではよく維持されていることが確認された。

(b) 培養肝細胞における H-TGL 酵素量および酵素活性⁶⁶⁾

培養肝細胞により新しく合成された H-TGL 量は培養液中に [¹⁴C] Leucine を添加し、培養後 H-TGL にとりこまれた放射活性により表わした。一定時間培養後 0.2N NaOH 2ml にて培養皿底より細胞を剝離し細胞浮遊液を超音波破碎した。500μl aliquot に 200μl の抗 H-TGL 家兎血清を加え 4°C、12時間静置後さらに抗家兎全血清ヤギ血清 200μl を加えて 4°C、12時間静置し、3,000xg、30分遠心して得た沈澱物を2回洗浄後沈澱物中の放射活性を測定した。酵素活性の測定には8個の培養皿底より 2.1M glycine buffer, pH 8.3 にて細胞を剝離し、超音波破碎後肝ホモジネート中 TGL 活性測定法に準じて測定した。培養肝細胞における H-TGL 量は少なくとも24時間まで培養時間とともに直線的に増加した。STZ ラットより調製した培養肝細胞において培養メジウム中へ添加したインスリンの Log₁₀ 濃度と培養6時間にて合成された酵素量との間には有意の正の相関が認められた。培養肝細胞内 H-TGL 活性は培養4時間にて最大となり10時間間まで plateau で以後漸減した。

予備実験では培養6時間での酵素活性に対してインスリン添加の効果は認められなかった。

(5) STZ ラットの血漿およびリポ蛋白分画中の脂質⁶¹⁾

血漿リポ蛋白の分析はラットを14時間絶食後血液を EDTA 1mg/ml 血液入り試験管に採血し、4°C にて血漿を分離後直ちに Beckman, L5-50 超遠心機および 40.3 型ローターを使用して Havel R. J. らの方法⁶⁷⁾ に準じた既報の方法⁶⁸⁾によりリポ蛋白分画を以下のごとく分離した。血漿 2.5ml に 1.006g/ml の NaCl を

重層し、10°Cにて105,000xg、22時間超遠心し tube slicer を用いて上清に VLDL を得た。さらに下層を KBr 溶液にて密度 1.063g/ml に合わせ、10°C、105,000xg、44時間超遠心を行い同様に tube slicer にて上清に低比重リポ蛋白 (LDL)、下層に HDL を得た。これらの血漿リポ蛋白各分画を 0.15M NaCl, 3mM EDTA に対して十分透析後原血漿とともにコレステロール (Ch), TG, 磷脂質の測定を行った。12時間絶食後の血漿 TG 値 (134.3 ± 46.3 mg/dl) は対照ラット (57.2 ± 20.8 mg/dl) に比し有意に高値を示した。早朝非絶食にて採血した血漿 Ch 値 (STZ ラット: 178.7 ± 68.1 , 対照ラット 85.4 ± 12.2 mg/dl) および TG 値 (STZ ラット: 585.8 ± 415.6 , 対照ラット: 90.6 ± 32.6 mg/dl) は STZ ラットにおいてともに有意に高値を示した。血漿リポ蛋白の分析では VLDL の著しい増加と軽度の HDL 増加が認められた。

このような異常リポ蛋白血症の成因に H-TGL の低下が関与している可能性が十分考えられ、今後さらにこの点を明らかにするために研究をすすめる予定である。

(B) 糖尿病患者における postheparin lipolytic activity⁴⁶⁾

糖尿病患者および正常対照の PHLA は14時間以上絶食後、早朝空腹時にヘパリン 100u/kg・体重静注後30分に採血したサンプルの TGL 活性をもって表わした。

TGL 活性の測定は前述の [¹⁴C] Triolein を含む基質を用いて行い、H-TGL と LPL の分別定量は 1M NaCl による酵素活性の抑制の有無を利用して行った。糖尿病患者を Irvine W. J. らの考え方⁶⁹⁾を参考にして D_a 群 (食事療法単独または経口剤療法の併用にてコントロールされた患者) と D_b 群 (治療にインスリンを必要とした患者) に分け正常対照群 (C群) と比較した。総 TGL 活性には C と D_a 群で有意の差が認められなかったが、C と D_b, D_a

と D_b 間での比較ではともに D_b 群で有意に低値であった。H-TGL 活性は糖尿病群で有意に低値であり、D_b 群で最も低かった。また LPL 活性は D_b 群で C 群に比し有意に低下していた。若年型糖尿病患者で治療前 H-TGL 活性が低下していたのがインスリン治療により回復した症例も認められた。糖尿病患者の PHLA において LPL と H-TGL とを分別定量した成績は Nikkilä E. A. ら⁷⁰⁾により報告されている。未治療のケトン性糖尿病では対照に比し LPL は44%減少し、インスリン治療により回復した。血清脂質の正常な成人型糖尿病患者では LPL の低下は認められないが高 TG 血症を合併する患者では LPL は26%低下していた。さらに LPL 活性は Log TG 濃度と有意の負の相関が認められた。一方 H-TGL については高 TG 血症を合併する成人型糖尿病患者において対照に比し有意に高値を示したが他の糖尿病患者では有意の差を認めなかった。また H-TGL は TG 除去率とは相関を認めなかったが VLDL-TG 産生率と有意の相関を示した。糖尿病の病態は複雑多様であるため対象とする患者の病態の違いにより各研究者の成績を比較することは難しい点がある。糖尿病患者の高 TG 血症に H-TGL がどのように関与しているかを検討することは重要な課題の一つと考えられる。

(C) まとめ

著者の今までの成績をまとめると表4のごとくである。インスリン欠乏糖尿病患者、短期および長期 STZ 糖尿病ラットの PHLA について、1M NaCl, heparin Sepharose affinity chromatography, 抗 H-TGL 血清を用いて H-TGL と LPL とを分別定量し検討したが、いずれも糖尿病群で H-TGL 活性が低下していた。また肝組織ホモジネート、遊離肝細胞を用いた成績でも糖尿病ラット肝において H-TGL 活性は低下していた。培養肝細胞において培地中にインスリンを添加することにより細

表4 ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける LPL と H-TGL の動態

	H-TGL	LPL
Postheparin lipolytic activity		
1 Insulin dependent diabetics	1M NaCl	➡
2 STZ rats		
3 days after STZ injection	1M NaCl	➡
5 days	1M NaCl	➡
7 days	1M NaCl	➡
3 days	Heparin column	n.s.
4 weeks	1M NaCl	n.s.
4 weeks	anti-H-TGL	n.s.
Tissue homogenate		
		➡ (Heart muscle)
Isolated liver parenchymal cells		
		➡
Cultured hepatocytes		
	Insulin increased	H-TGL.

胞内 H-TGL 量は増加した。

以上より H-TGL も LPL と同様インスリンにより調節されていると考えられ、糖尿病患者にみられる異常リポ蛋白血症の成因の一端を担っていると考えられた。

(V) おわりに

リポ蛋白代謝に重要な役割を果たしているトリグリセリドリパーゼの歴史的背景およびその測定法とくに LPL と H-TGL との分別定量法について述べた。トリグリセリドリパーゼ、特に H-TGL の役割については未だ不明な点が多いので、著者の H-TGL のインスリンによる調節についての成績を示した。H-TGL の生体内における役割を理解する一助になれば幸いである。

謝辞：御校閲をいただいた竹田亮祐教授および協同研究者の山田志郎、久津見恭典、玉井利孝、小林武嗣、林多喜王の諸氏に深謝致します。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費 277,225 (52年度), 367,124 (53年度) の援助によった。

文中に使用した略語

- LPL : Lipoprotein lipase (リポ蛋白リパーゼ)
 H-TGL : Hepatic triglyceride lipase
 (肝性トリグリセリドリパーゼ)
 TGL : Triglyceride lipase
 (トリグリセリドリパーゼ)
 PHLA : Postheparin lipolytic activity
 TG : トリグリセリド
 VLDL : Verylow density lipoprotein
 (超低比重リポ蛋白)
 HDL : High density lipoprotein
 (高比重リポ蛋白)
 STZ : Streptozotocin (ストレプトゾトシン)

文 献

- 1) D. F. Hahn : *Science*, **98**, 19 (1943)
- 2) N. G. Anderson and B. Fawcett : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 768 (1950)
- 3) C. B. Anfinsen, B. Edwin and R. K. Brown : *Science*, **115**, 583 (1952)
- 4) E. D. Korn : *J. Biol. Chem.*, **215**, 1 (1955)
- 5) E. D. Korn : *J. Biol. Chem.*, **215**, 15 (1955)
- 6) D. M. Bier and R. J. Havel : *J. Lipid Res.*, **11**, 565 (1970)
- 7) T. F. Whayne, Jr. and J. M. Felts : *Circ. Res.*, **27**, 941 (1970)
- 8) J. C. LaRosa, R. I. Levy, P. Herbert, et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 57 (1970)
- 9) D. Ganesan, R. H. Bradford, G. Ganesan, et al. : *J. Appl. Phys.*, **39**, 1022 (1975)
- 10) D. Ganesan, H. B. Bass, W. J. McConathy, et al. : *Metabolism*, **25**, 1189 (1976)
- 11) W. C. Breckenridge, J. A. Little, G. Steiner, et al. : *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1265 (1978)
- 12) D. W. Cox, W. C. Breckenridge and J. A. Little : *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1421 (1978)
- 13) J. C. LaRosa, R. I. Levy, H. G. Windmuller, et al. : *J. Lipid Res.*, **13**, 356 (1972)
- 14) R. M. Krauss, H. G. Winmueller, R. I. Levy, et al. : *J. Lipid Res.*, **14**, 286 (1973)
- 15) R. M. Krauss, R. I. Levy and D. S. Fredrickson : *J. Clin. Invest.*, **54**, 1107 (1974)

- 16) D. S. Fredrickson, K. Ono and L. L. Davis : *J. Lipid Res.*, **4**, 24 (1963)
- 17) 福井巖, 久城英人 : 臨床化学, **1**, 115 (1972)
- 18) T. F. Whayne, Jr. and J. F. Morelli : *Biochem. Med.*, **17**, 248 (1977)
- 19) M. C. Schotz, A. S. Garfinkel, R. J. Huebotter, et al. : *J. Lipid Res.*, **11**, 68 (1970)
- 20) P. Belfrage and M. Vaughan : *J. Lipid Res.*, **10**, 341 (1969)
- 21) T. F. Whayne, Jr. and J. M. Felts : *Circ. Res.* **28**, 649 (1971)
- 22) T. F. Whayne, Jr. and J. M. Felts : *Circ. Res.* **27**, 941 (1970)
- 23) J. Chung, A. M. Scanu and F. Reman : *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 116 (1973)
- 24) D. Ganesan and R. H. Bradford : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 544 (1971)
- 25) T. Olivecrona, G. Bengtsson, S.-E. Marklund, et al. : *Fed. Proc.*, **36**, 60 (1977)
- 26) T. Chajek, O. Stein and Y. Stein : *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 127 (1975)
- 27) A. S. Garfinkel and M. C. Schotz : *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 128 (1973)
- 28) E. Aktin and H. C. Meng : *Diabetes*, **21**, 149 (1972)
- 29) J. D. Brunzell, N. D. Smith, D. Porte, Jr., et al. : *J. Clin. Invest.*, **51**, 16a (1972)
- 30) D. Ganesan and H. B. Bass : *Artery*, **2**, 143 (1976)
- 31) J. D. Brunzell, D. Porte, Jr. and E. L. Bierman : *Metabolism*, **24**, 1123 (1975)
- 32) J. Boberg, J. Augustin, M. L. Baginsky, et al. : *J. Lipid Res.*, **18**, 544 (1977)
- 33) D. Ganesan and H. B. Bass : *FEBS Lett.*, **53**, 1 (1975)
- 34) J. K. Huttunen, C. Ehnholm, P. K. G. Kinunen, et al. : *Clin. Chim. Acta*, **63**, 335 (1975)
- 35) J. Boberg, J. Augustin, M. Baginsky, et al. : *Circulation*, **50**, III-21 (1974)
- 36) D. M. Applebaum, A. P. Goldberg, O. J. Pykalisto, et al. : *J. Clin. Invest.*, **59**, 601 (1977)
- 37) H. Greten, V. Laible, G. Zipperle, et al. : *Atherosclerosis*, **26**, 563 (1977)
- 38) M. G. Tan : *Can. Med. Assoc. J.*, **118**, 675 (1978)
- 39) C. J. Fielding and R. J. Havel : *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **101**, 225 (1977)
- 40) J. Jubelin, G. L. Van and J. Boyer : *J. Endocrinol.*, **76**, 369 (1978)
- 41) 中井継彦, 玉井利孝, 金谷法忍, 他 : 糖尿病, **21**, 169 (1978)
- 42) K. Bolzano, F. Krempler and F. Sandhofer : *Horm. Metab. Res.*, **7**, 238 (1975)
- 43) J. Sauar, S. Skrede and J. P. Blomhoff : *Clin. Chim. Acta*, **84**, 213 (1978)
- 44) M. Freeman, L. Kuiken, J. B. Ragland, et al. : *Lipids*, **12**, 443 (1977)
- 45) R. Mordasini, F. Frey, W. Flury, et al. : *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1362 (1977)
- 46) K. Bolzano, F. Krempler and F. Sandhofer : *Eur. J. Clin. Invest.*, **8**, 289 (1978)
- 47) 中井継彦, 玉井利孝, 小林武嗣, 他 : 脂質生化学研究, **19**, 107 (1977)
- 48) 中井継彦, 山田志郎, 玉井利孝, 他 : 日本臨床代謝学会記録, **15**, 55 (1978)
- 49) T. Nakai, S. Yamada, T. Tamai, et al. : *Metabolism*, **28**, 30 (1979)
- 50) 中井継彦 : 糖尿病, **22**, 1197 (1979)
- 51) 中井継彦, 山田志郎, 玉井利孝, 他 : 動脈硬化, 印刷中
- 52) A. Junod, A. E. Lambert, W. Stauffacher, et al. : *J. Clin. Invest.*, **48**, 2129 (1969)
- 53) M. H. Tan, T. Sata and R. J. Havel : *J. Lipid Res.*, **18**, 363 (1977)
- 54) H. Lithell and J. Boberg : *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 58 (1978)
- 55) P. A. Mayes and J. M. Felts : *Biochem. J.* **108**, 483 (1968)
- 56) A. Bensadoun and T. L. Koh : *J. Lipid Res.*, **18**, 768 (1977)
- 57) G. Ganesan, D. Ganesan and R. H. Bradford : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 390 (1976)
- 58) M. N. Berry and D. S. Friend : *J. Cell Biol.*, **43**, 506 (1969)
- 59) T. Nakai, P. S. Otto, D. L. Kennedy, et al. : *J. Biol. Chem.*, **251**, 4914 (1976)
- 60) J. Thomas, L. J. Debeer and G. P. Mannaerts : *Biochem. J.*, **172**, 177 (1978)
- 61) G. S. Sundaram, K. M. M. Shakir, G. Barnes, et al. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 7703 (1978)

＜特集＞トリグリセリドリパーゼ特に肝性トリグリセリドリパーゼの測定法とその意義

- 62) 山田志郎：金沢大学十全医学会雑誌，**87**，
758 (1978)
- 63) 山田志郎，中井継彦，玉井利孝，他：動脈硬化，**6**，481 (1979)
- 64) R. J. Bonney, J. E. Becker, P. R. Walker, et al. : *In Vitro*, **9**, 399 (1974)
- 65) D. M. Bissell, L. E. Hammaker and V. A. Meyer : *J. Cell Biol.* **59**, 722 (1973)
- 66) 久津見恭典，中井継彦，山田志郎，他：動脈硬化，印刷中
- 67) R. J. Havel, H. A. Eder and J. H. Bragdon : *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345 (1955)
- 68) 玉井利孝，中井継彦，竹田亮祐：動脈硬化，**6**，49 (1978)
- 69) W. J. Irvine, A. D. Toft, D. E. Holton, et al. : *Lancet*, **2**, 325 (1977)
- 70) E. A. Nikkilä, J. K. Huttunen and C. Ehnholm : *Diabetes*, **26**, 11 (1977)
- 71) J. Augustin, H. Freeze, P. Tejada, et al. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 2912 (1978)