

生体異物及び過剰チロシンによる  
高コレステロール血症誘導に  
関する比較研究

名古屋大学図書	
和	991246

長岡 利

	目次	頁
緒論		1
第1編	過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導について	14
目的		15
第1章	過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導に対する食餌タンパク質, チロシンの影響及びチロシンによる高コレステロール血症の経時的変化	21
方法		22
結果		25
第2章	過剰チロシンの肝薬物代謝酵素及び尿・肝臓アスコルビン酸に対する影響	38
方法		39
結果		41
第3章	チロシン以外のアミノ酸の血清コレステロールに対する影響	43
方法		44
結果		45
考察		50

第2編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成系の変動	68
目的	69
第1章 生体異物及び過剰チロシンの $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した <i>in vivo</i> におけるコレステロール合成能に対する影響	74
方法	75
結果	77
第2章 生体異物及び過剰チロシンの肝臓 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase 活性に対する影響	80
方法	81
結果	84
考察	88
第3編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール分解系の変動	110
目的	111
第1章 生体異物の肝臓 cholesterol $7\alpha$ -hydroxylase 活性に対する影響	115

方法	116
結果	118
第2章 生体異物及び過剰チロシンの胆汁中胆汁酸及びコレステ ロールに対する影響	120
方法	121
結果	123
第3章 生体異物及び過剰チロシンの糞中胆汁酸及び中性ステロ イド排泄に対する影響	138
方法	139
結果	140
考察	142
第4編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の 誘導と数種のホルモンの変動	167
第1章 生体異物及び過剰チロシンの血清インシュリン、グルカ ゴンレベルに対する影響	168
目的	169
方法	173
結果	174
考察	176

第2章	生体異物及び過剰チロシンの血清コルチコステロンレベルに対する影響	181
	目的	182
	方法	184
	結果	185
	考察	186
第3章	生体異物及び過剰チロシンの血清甲状腺ホルモンレベルに対する影響及び甲状腺機能を変化させた場合の生体異物による高コレステロール血症誘導	190
	目的	191
	方法	194
	結果	197
	考察	202
第4章	生体異物及び過剰チロシンの血清脂質，肝臓及び筋肉グリコーゲン，尿中アスコルビン酸，カテコールアミン，ヒスタミン排泄に対する影響，生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する $\alpha$ ， $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の影響及びカテコールアミン注射による血清コレステロールに対する影響	213
	目的	214

方法	219
結果	230
考察	256
総合討論	267
要約	292
基本的実験方法	302
謝辞	339
引用文献	340

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Composition of the basal diet -----	24
2. Effect of dietary addition of tyrosine on serum and liver lipids in rats -----	31
3. Effect of dietary level of tyrosine and protein on food intake, body and liver weights in rats -----	32
4. Effect of dietary level of tyrosine and protein on serum lipids in rats -----	33
5. Effect of dietary level of tyrosine and protein on liver lipids in rats -----	34
6. Time course effect of excess tyrosine feeding on food intake, serum lipids and body and liver weights in rats -----	35
7. Effect of excess tyrosine on body and liver weights, food intake, serum cholesterol, liver ascorbic acid, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase and cytochrome c reductase activities, cytochrome P-450 and cytochrome b <sub>5</sub> in rats -----	42
8. Effect of excess amino acids other than tyrosine on food intake, body and liver weights in rats -----	48
9. Effect of excess amino acids other than tyrosine on serum cholesterol levels in rats -----	49
10. Effect of BHA chlorobutanol( Chloretone ), DDT or tyrosine on body, liver and intestinal weights and food intake, serum cholesterol and <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O incorporation into hepatic, intestinal and serum cholesterol in rats -----	79
11. Effect of BHA, chlorobutanol, DDT or tyrosine on body and liver weights, food intake, microsomal and serum cholesterol, hepatic HMG-CoA reductase activities in rats -----	86
12. Effect of dietary PCB on body and liver weights food intake, serum cholesterol and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in rats -----	119

Table	Page
13. Effect of PCB or excess tyrosine on body and liver weights and food intake, serum cholesterol and biliary steroids in rats -----	130
14. Effect of PCB or excess tyrosine on biliary bile acid composition in rats -----	131
15. Effect of PCB or excess tyrosine on biliary bile acid composition in rats -----	132
16. Effect of dietary PCB on body and liver weights and food intake, serum cholesterol and biliary steroids in rats -----	133
17. Effect of dietary PCB on biliary bile acid composition in rats -----	134
18. Effect of dietary PCB on biliary bile acid composition in rats -----	135
19. Effect of PCB or excess tyrosine on glycine and taurine conjugation ratio of biliary bile acid in rats -----	136
20. Effect of PCB or excess tyrosine on fecal steroid excretion in rats -----	141
21. Effect of PCB or excess tyrosine on serum insulin, glucagon, triiodothyronine ( T <sub>3</sub> ) and thyroxine( T <sub>4</sub> ) in rats -----	175
22. Effect of 2-thiouracil treatment on body and liver weights and serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB -----	200
23. Effect of thyroxine treatment on body and liver weights, food intake and serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB -----	201
24. Effect of dietary addition of tyrosine or PCB on epididymal adipose weight, serum free fatty acids, liver and muscle glycogen in rats -----	240
25. Effect of dietary addition of tyrosine or polychlorinated biphenyls ( PCB ) on serum and liver lipids, urinary ascorbic acid, histamine, norepinephrine, epinephrine and dopamine in rats ----	241



Table	Page
26. Effect of dietary addition of some xenobiotics on food intake, body and liver weights in rats -----	242
27. Effect of dietary addition of some xenobiotics on serum lipids in rats -----	243
28. Effect of dietary addition of some xenobiotics on food intake, body and liver weights, serum lipids in rats -----	244
29. Effect of chronic $\alpha$ -blocker treatment on growth, liver weight and adrenal weight in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls ( PCB ) or tyrosine -----	246
30. Effect of chronic $\alpha$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls ( PCB ) or tyrosine -	247
31. Effect of $\alpha$ -blocker treatment on growth, liver weight and urinary excretion of ascorbic acid in rats fed DDT-containing diet -----	248
32. Effect of $\alpha$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats fed DDT-containing diet -----	249
33. Effect of chronic $\beta$ -blocker treatment on food intake, body-weight, liver weights and serum cholesterol in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls ( PCB ) or tyrosine -----	250
34. Effect of $\beta$ -blocker treatment on growth, food intake liver weight and urinary excretion of ascorbic acid in rats fed DDT-containing diet -----	251
35. Effect of $\beta$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats fed DDT-containing diet -----	252
36. Effect of chronic $\alpha$ -blocker (tolazoline) treatment on body and liver weights, serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB -----	253
37. Effect of chronic $\alpha_1$ -blocker (prazosin) treatment on body and liver weights, serum cholesterol levels in rats given diet supplemented with PCB -----	254
38. Effect of norepinephrine or epinephrine on serum cholesterol in rats -----	255

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Time course effect of excess tyrosine feeding on liver weights in rats -----	36
2. Time course effect of excess tyrosine feeding on serum cholesterol in rats -----	37
3. Metabolic pathways of tyrosine -----	67
4. Interrelationships between the incorporation of $^3\text{H}_2\text{O}$ into liver cholesterol and HMG-CoA reductase activity in rats -----	87
5. Chromatogram of biliary bile acid composition -----	137
6. Effect of dietary addition of some xenobiotics on serum corticosterone in rats -----	245
7. Effect of dietary addition of some xenobiotics on urinary excretion of ascorbic acid in rats -----	245
8. Effect of dietary addition of some xenobiotics on urinary excretion of histamine in rats -----	245
9. Effect of dietary addition of some xenobiotics on urinary excretion of norepinephrine in rats -----	245
10. Effect of dietary addition of some xenobiotics on urinary excretion of epinephrine in rats -----	245
11. Effect of dietary addition of some xenobiotics on urinary excretion of dopamine in rats -----	245
12. Summary of cholesterol metabolism -----	291

## LIST OF ABBREVIATIONS

ACAT : acylCo-A:cholesterol acyltransferase

ACTH : Adrenocorticotropic hormone

BHA : 2-tert-butyl-4-methoxyphenol

BHT : 2,6-di-tert-butyl-*p*-cresol

DDT : 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FFA : free fatty acid

GC : gas chromatography

HDL : high density lipoprotein

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

HPLC : high-performance liquid chromatography

IDL : intermediate density lipoprotein

LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase

LDL : low density lipoprotein

LPL : lipoprotein lipase

NADP : nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

PCB : polychlorinated biphenyls

PL : phospholipid

T<sub>3</sub> : triiodothyronine

T<sub>4</sub> : thyroxine

TG : triglyceride

TRH : thyrotropin releasing hormone

TSH : thyroid stimulating hormone

VLDL : very low density lipoprotein

## 緒論

現在は、コレステロールの名称で知られている物質に関する最初の記述は、すでに、18世紀後半に、De Fourcroy によってなされており<sup>(1)</sup>、コレステロールは、人間の胆石から、Poullétier により、はじめて抽出されたとされている<sup>(1)</sup>。コレステロールという名称は、1816年 Chevreul がヒトの胆石に cholesterine (ギリシャ語 chole = bile, steros = solid) と命名したことに端を発する<sup>(1)</sup>。その後コレステリンは、アルコールであり、エステルを形成することから、1859年 Berthelot により、コレステロールと呼ばれるようになった<sup>(1)</sup>。そして、19世紀中頃までには、コレステロールは、単に胆石の成分のみならず、ヒトの血液中や脳などに存在することや種々の動物組織の構成成分として存在することが知られてきた。以来、コレステロールは、細胞膜や血中脂質などの構成要素、ステロイドホルモンや胆汁酸生合成の前駆体など、生体の正常な機能発現

に不可欠であるだけでなく、現在では、家族性高コレステロール血症などの遺伝病や心筋梗塞、脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発生の要因としても注目を集めるに至っている。したがって、コレステロールに関する研究は、従来から、各方面で活発になされてきたことは、言を待たない。

コレステロールの代謝は、家族性高コレステロール血症などに代表される遺伝的素因<sup>(2)</sup>、糖尿病や甲状腺機能低下症などの内分泌系の変動<sup>(3)(4)</sup>、さまざまなストレス<sup>(5)</sup>、日常生活に密接に関連した食事<sup>(6)</sup>あるいは、嗜好品<sup>(7)</sup>、運動<sup>(8)</sup>など多種多様な要因によって変動することが知られている。このようなさまざまな要因によるコレステロール代謝の変動は、現在では、後述するように、コレステロール代謝に関与するHMG-CoA reductaseなど種々の酵素活性の変動、LDLレセプターによる血漿リポタンパクの代謝変動などを通じて、分子レベルに至るまで、詳細かつ広範に評価検討さ

れているが、その端緒の1つは、Gofmanの超遠心による血漿リポタンパク分画の確立にある<sup>(9)</sup>。それ以来超遠心器の普及などにより、血漿リポタンパクに関する更に詳しい研究が進み、血中コレステロールの変動は、その密度によって分画されたHDLまたは、その亜分画、LDL、VLDLそれぞれの画分の変動、すなわち、血漿リポタンパクの変動として表現されるようになった。たわけである。このような分析技術の発展過程をたどりながら、先に述べた動脈硬化性疾患生成は、血中のLDL-コレステロールレベルの上昇などの血中脂質変動すなわち高脂血症と密接に関連すること<sup>(10)</sup>が、種々の病理学的成績や多くの疫学的調査成績によって、支持されている<sup>(11)</sup>。

近年、日本の食習慣が、欧米化するにつれて、日本人の血清脂質の平均値も上昇する傾向を示すとともに、日本においても、冠動脈硬化をはじめとする動脈硬化性疾患が増加し

ており、その元凶として高脂血症に対する社会的関心も高まってきたわけであるが、一口に、高脂血症といっても、成因により脂タンパクは、さまざまな様相を呈する。高脂血症は、家族性高コレステロール血症<sup>(2)</sup>など種々の遺伝的素因によって誘導される先天性リポタンパク代謝異常、すなわち一次性高脂血症と、腎疾患<sup>(13)</sup>、肝疾患<sup>(14)</sup>、糖尿病<sup>(3)</sup>、アルコール<sup>(7)</sup>、ストレス<sup>(5)</sup>などの広範な要因によって高脂血症が生成される後天性リポタンパク代謝異常、すなわち二次性高脂血症とに大別することも可能である。さらに、このような血清脂質の増加を示すいろいろなタイプの高脂血症は、リポタンパクの増加として把握され、Fredrickson 5<sup>(15)</sup>により、高リポタンパク血症の分類が提出され、これに基づいて、1970年WHOが高脂血症を phenotype (表現型)により、6型に分類し<sup>(16)</sup>、現在最も広く用いられている。本分類は、高HDL血症の例外を除いて、一次性高脂血症にも、二次

性高脂血症にも適応されているが、近年、これに変わるものとして、リポタンパク代謝に関する研究の発展にともない、成因・遺伝による分類(genotype)がなされつつある<sup>(17)</sup>。このことが、Gofman以後、さかんになつてきた血漿リポタンパク研究をさらに進展させる力になったことは言うまでもない。

高脂血症に関する研究は、人間の場合、このように高脂血症の多種多様な類型を整理する段階に至っているにもかかわらず、特にラットなどによる動物実験においては、比較的容易に生成されることもあり、外因性のコレステロール大量摂取によつてもたらされる高コレステロール血症が、広範に高脂血症の実験モデルとして用いられてきた<sup>(18)</sup>。しかしながら、高コレステロール血症は、実験動物でも、高コレステロール食によつてのみ誘導されるわけではない。すなわち、ある種の生体異物摂取<sup>(19)</sup>をはじめヒスチジン<sup>(20)</sup>やシスチン<sup>(21)</sup>などの過剰アミノ酸摂取、エタノール<sup>(22)</sup>



ビタミンC<sup>(23)</sup>、銅欠乏<sup>(24)</sup>や、甲状腺機能低下症などの内分泌異常<sup>(25)</sup>などにより、高コレステロール血症が生成されることが報告されている。この中で、我々は、これまで、ある種の Xenobiotics つまり、脂溶性の低分子化合物であり、環境化学物質の PCB や DDT、BHA や BHT などの抗酸化剤を含めた食品添加物などの生体異物が、ラットにおいて、高コレステロール血症を生成することを、報告してきた<sup>(19)</sup>。生体異物は、高コレステロール血症を生成するばかりではなく、その他にも後述するような、種々の代謝変動を引き起こすことが知られている。

生体異物は、一般に次のような2段階の反応を経由して極性を増し、主として尿中及び胆汁中に排泄される。反応の第1段階は、主に、酸化反応で、一部には、還元や加水分解などがあり、極性の増加が起こる。第2段階は、グルクロン酸、グリシン、硫酸その他と抱合体を作って、排泄されるものである。こ

の第1段階の反応は、肝ミクロソームのいわゆる薬物代謝酵素によつて触媒される。この酵素系は、基質特異性が低く、種々の生体異物によつて誘導される cytochrome P-450, 分子状酸素, NADPH により構成されている。さらに、肝ミクロソームの薬物代謝酵素の誘導は、種々の因子によつて影響を受けることが示されている。たとえば、年齢、性、系統、種による差異<sup>(26-28)</sup> やタンパク質<sup>(29)</sup> 及びビタミン A, リボフラビン, ビタミン C, ビタミン E などのビタミン, さらに, Ca, Mg, Fe, Cu, K, Zn, Cd, Pb などの因子による影響が報告されている<sup>(30)(31)</sup>。

このような種々の因子により変動する薬物代謝系で代謝される生体異物は、すでに述べたような高コレステロール血症生成や薬物代謝酵素誘導をはじめ<sup>(32)</sup>, 肝肥大<sup>(19)</sup>, 肝臓・尿中ビタミン C レベルの増加<sup>(32)</sup>, 肝臓ビタミン A<sup>(33)</sup>, ビタミン B<sub>1</sub><sup>(34)</sup>, ビタミン B<sub>2</sub><sup>(35)</sup>, ビタミン B<sub>6</sub><sup>(35)</sup>, ビタミン D<sup>(35)</sup>, ビタミン E<sup>(36)</sup> などの各

種ビタミンに対する影響のみならず、内分泌系<sup>(37)</sup>や過酸化脂質生成<sup>(36)</sup>などの複雑多岐にあたる代謝変動を誘導する。生体異物は脂溶性の低分子化合物であるという点の他は、生体異物個々においては、多種多様な生理作用を有するにもかかわらず、前述のように生体へさまざまなる影響を及ぼすという、影響の多様性もさることながら、生体異物自身の個々の持つ生理作用を越えて、あたかも、これが共通のシグナルを經由して生成されるごとく、高コレステロール血症生成や各種ビタミンに対する影響など、極めて共通的な代謝変動をもたらす点で非常に興味深い。

我々は、コレステロールに対する社会的関心が高まる中、生体異物による高コレステロール血症が、前述のごとく、生体異物の多くに共通的にみられる現象である点<sup>(19)</sup>、コレステロール大量摂取による高コレステロール血症とは対照的に、主としてこれが、体内でのコレステロール生合成の促進によるいわば、

内因性の高コレステロール血症である点<sup>(38)</sup>、  
外因性の高コレステロール血症を生成するコ  
レステロール大量摂取とは異なる。た血中リポ  
タンパク組成を示す点<sup>(39)</sup>などから、リポタン  
パクの代謝を含めたコレステロール代謝をよ  
りよく理解するための新しいタイプの高コレ  
ステロール血症の有用なモデルとして、生体  
異物による高コレステロール血症を位置づけ、  
生体異物による高コレステロール血症生成機  
構に深い関心を抱いてきたわけである。

以上述べてきたような視点から、我々は、  
ラットを用いた実験において、さまざまな生  
体異物による高コレステロール血症は、生体  
異物が、脂溶性の低分子物質であるという点、  
はもちろんのこと、コレステロール合成系や  
分解系の変動に関しても、共通した性質を有  
している可能性があるばかりではなく、高コ  
レステロール血症が生体異物の多くに共通し  
て観察される薬物代謝酵素の誘導という特徴  
を示さない、NaClの過剰摂取<sup>(40)</sup>、アミノ酸

過剰摂取<sup>(20)</sup>、各種ストレス<sup>(5)</sup>、各種内分泌異常<sup>(25)</sup>などの生体異物以外の因子によっても、誘導されることから、高コレステロール血症が生成される際には、ある種のホルモン分泌などの内的因子にも共通的な変動が誘導されていると考え、生体異物摂取自体により生じる“代謝的ストレス(ストレス応答)”が、高コレステロール血症生成と深くかかわり合いを持っているということ考えた。この考えは、Selye が述べているように<sup>(41)(42)</sup>、ストレスは、生体に加わった歪みを意味し、ストレッサーの種類にかかわらず、ある一定の生体応答を示すことに特徴があり、ストレッサーには、化学的ストレスとして薬物投与も含まれ、我々の扱っている生体異物などもこの分類に含まれると思われ<sup>(42)</sup>ることや、ストレス応答の1つに、血中コレステロール上昇作用も挙げられている<sup>(42)</sup>という立場から考えても、非常に興味深い。さらに、ストレス応答には、カテコールアミンやグルココルチコイドなどの

適応ホルモンが深く関与しているといわれており、このような点も考えあわせ、生体異物の場合も、その摂取自体が“代謝的ストレス”となつて、これに応答したカテコールアミン<sup>(43)</sup>などのコレステロール合成を促進するホルモンの共通的な変動などを介して、高コレステロール血症が生成されるという仮説を想定し、我々は、ストレス応答に密接に関連し、肝コレステロール合成を促進するカテコールアミンの生成母体であるチロシンをラットに投与することにより、生体異物などと同様に、高コレステロール血症を生成することを見出した。

以上のことから、生体異物及び過剰チロシンによつて誘導される高コレステロール血症が、血漿リポタンパクの組成変化やコレステロールの合成系及び分解系の変動に関しても共通性を有するばかりではなく、ともに、代謝的ストレスに応答したカテコールアミンなどのホルモンの共通的な変動を介して、生成

するという仮説に基づき、両者に内在するであろう共通の機構を解明するという目的のために、以下の点に、主眼を置き検討した。

- (1) チロシンによる高コレステロール血症の誘導に関する検討(第1編)
- (2) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成系の変動に関する検討(第2編)
- (3) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール分解系の変動に関する検討(第3編)
- (4) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導と数種のホルモンの変動に関する検討(第4編)

以上のような、生体異物及び過剰チロシンによつて誘導される高コレステロール血症に関する比較研究は、これら異なつた多種多様な化合物による高コレステロール血症誘導のメカニズムを統一的に説明するため、有用

な資料を提供するのみならず、現在めざましい発展を遂げつつあるが、まだ不明の点も多いリポタンパク代謝などを含めた、コレステロール代謝調節機構に関する基礎的知見を提供するとともに、人間を含めた他のさまざまな条件下で生成される高コレステロール血症、たとえば、種々のストレス、運動によるHDLの増加、アルコール摂取など現代の社会生活と密接に関連した問題への適用あるいは、その栄養的制御という面で寄与しうるものと思われる。



第1編 過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導について

## 目 的

一般に、過剰のアミノ酸をラットに投与すると、体重の抑制、食餌摂取量の減少など、いわゆる過剰障害を引き起こすことが知られている<sup>(44)</sup>。これらの影響は、アミノ酸個々によっても異なっている。チロシンも過剰に与えると、体重の抑制、チロシン毒性の特徴的な皮膚の浮腫や白内障<sup>(45)</sup>などが生成され、このチロシンによる過剰障害も、低タンパク食の場合に起こりやすいと言われている<sup>(46)</sup>。さらに、過剰アミノ酸摂取は、脂質代謝にも影響を及ぼすことが示されている。たとえば、ヒスチジン<sup>(20)</sup>、シスチン<sup>(21)</sup>などは、過剰にラットに投与すると、高コレステロール血症を引き起こすことが知られている。

一方、我々の研究室では、これまでに、生体異物すなわち、脂溶性低分子の合成化合物が、かなり一般的に、ラットの血清コレステロールを上昇させる作用のあることを、報告してきた<sup>(19)</sup>。これら PCB や DDT などは

じめ種々の化合物によつて、誘導される高コレステロール血症は、生体異物が脂溶性低分子物質であるという点はもちろんのこと、コレステロール合成系や分解系の変動に関しても、共通した性質を有している可能性があるばかりではなく、高コレステロール血症が、生体異物の多くに共通して観察される薬物代謝酵素の誘導という特徴を示さない、NaClの過剰摂取<sup>(40)</sup>、アミノ酸過剰摂取<sup>(20)</sup>、各種ストレス<sup>(5)</sup>、各種内分泌異常<sup>(25)</sup>などの生体異物以外の因子によつても、誘導されることから、高コレステロール血症が生成される際には、ある種のホルモン分泌などの内的因子にも共通的な変動が誘導されていると考えた。すなわち、生体異物の摂取がラットによつて、“代謝的ストレス”となり、それに応答したカテコールアミンなどのコレステロール合成を促進する<sup>(43)</sup>ホルモンの共通的な変動を介して、高コレステロール血症が生成されるという仮説を想定し、ストレス応答に密接に関連し、肝コ

レステロール合成を促進するカテコールアミンの生成母体である，チロシンをラットに投与することにより，生体異物と同様に，事実我々の研究室において，高コレステロール血症が生成されることを見出された。

そこで，まず第1に，ヒスチジン<sup>(47)</sup>やPCB<sup>(48)</sup>による高コレステロール血症は，高タンパクの方が生成しやすいという点から，タンパク質レベル及びチロシンレベルを変化させた場合のチロシンによる高コレステロール血症に対する影響について検討した。

第2に，PCB<sup>(49)</sup>やヒスチジン<sup>(50)</sup>による高コレステロール血症は，比較的長期間継続されることが認められる点や，PCBによる高コレステロール血症は，高コレステロール血症が生成されてから途中で，PCB投与を中断しても，なお継続されることが観察されている<sup>(51)</sup>が，ヒスチジンは，中断後6日以内に高コレステロール血症が認められなくなることも報告されている<sup>(20)</sup>ので，チロシンについ

とも、高コレステロール血症の継時的変化について検討した。

第3には、PCBやDDTなどの生体異物が血清コレステロールを上昇させる際には、同時に、肝薬物代謝酵素の誘導もほぼ共通して、認められる現象であることが知られている<sup>(52)</sup>。そこで、過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症生成時にも、肝薬物代謝酵素が誘導されるのかどうかを調べた。一方、生体異物の多くは、高コレステロール血症生成と同時に、アスコルビン酸の代謝にも影響を与えることが、古くから知られている<sup>(53)</sup>。すなわち、PCBやDDTなどの生体異物をラットに投与すると、尿中へのアスコルビン酸排泄が上昇したり、肝臓アスコルビン酸レベルが上昇したりする<sup>(52)</sup>。そこで、このようなアスコルビン酸の代謝への影響が、過剰チロシンでも観察されるのかどうかを検討した。

第4に、チロシン以外のアミノ酸の添加に

よって、高コレステロール血症が、生成されるということが報告されている。すなわち、ヒスチジン<sup>(20)</sup>をラットなどに投与することによって、高コレステロール血症が引き起こされることが報告されているし、Schmeisser<sup>(54)</sup>は、リジンをニワトリに過剰投与することにより、高コレステロール血症が生成されることを示している。また、Sugiyama<sup>(55)</sup>は、メチオニンは、ラットにおいて、1%コレステロール食を摂取した時に誘導される高コレステロール血症をさらに、増強させる作用があることを報告している。Yagasaki<sup>(56)</sup>も、低タンパク食にメチオニンを添加すると、高コレステロール血症が生成することを示している。さらに、チロシンを過剰にラットに投与することによっても、高コレステロール血症が生成されたことから、ラットの体内でフェニルアラニンは、phenylalanine hydroxylaseによってチロシンに代謝されるので、フェニルアラニンを過剰にラットに投与した場合にも、高コレス

テロール血症が生成されるのかどうか検討した。以上の理由から、チロシン以外のアミノ酸として、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジンについて検討した。

以上4点を主な目的として、実験を行った。

第1章 過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導に対する食餌タンパク質、チロシンの影響及びチロシンによる高コレステロール血症の経時的変化



## 方 法

実験[1][2]とも、実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いた。市販固型飼料(日本クレア社, CE-2)を3日間、次いで20%カゼイン飼料(基本飼料)を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。なお、水及び飼料は、自由摂取させた。実験飼料は、Table 1. (P. 24)に示されているものを、すべての実験において、基本飼料として用い、実験[1]では、飼料のタンパク質レベルは、10%、20%を用い、チロシンを10%カゼインに4%、8%、20%カゼインに8%、12%、15%それぞれ添加したものをを用いた。飼育期間は、14、28日間とした。実験[2]では、実験飼料は、20%カゼインに10%チロシンを添加したものをを用い、実験期間は、7、14、21日間とした。また、14日間チロシン食を与えた後、7日間、20%カゼイン食のみを与える実験も行った。解剖の24時間前より、無脂肪食を与えた。なお、チロシン及び無脂肪食調製の際の

食餌組成変化は、炭水化物（コーンスターチ：ショ糖 = 2 : 1）で補正した。実験期間の終了後、エーテル麻醉下でラットを解剖し、臓器から採血した。肝臓は、切除後、湿重量を測定し、当日分析する以外は、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。血液は、屠殺時に遠心分離し、血清を得て、分析に供した。血清コレステロールの測定は、Pearson <sup>(57)</sup> の方法で行った。血清HDL-コレステロールは、Ishikawa <sup>(58)</sup> の方法に従って測定した。血清トリグリセリドは、ベーリンガー・マンハイム社のキットを用いて、測定した<sup>(59)</sup>。肝臓脂質は、Folch <sup>(60)</sup> の方法で抽出し、総脂質は重量法で、肝臓コレステロールは、Pearson <sup>(57)</sup> の方法で、肝臓リン脂質は、Bartlett <sup>(61)</sup> の方法で求めた。肝臓トリグリセリドは、総脂質からコレステロールとリン脂質を差し引いて求めた。血清リン脂質は、キット（Phospholipid-Test Wako）を用いて測定した。<sup>(243)</sup>（基本的実験方法参照）

Table 1

Composition of the basal diet<sup>1</sup>

Component	Amount
	%
Casein	20.0
Corn starch	48.2
Sucrose	24.1
Corn oil	2.0
Salt mixture <sup>2</sup>	5.0
Vitamin mixture <sup>3</sup>	0.5
Choline chloride	0.2

- Each supplement was added as the expense of carbohydrates. Each carbohydrates were equally decreased. Dietary supplement (percent); L-tyrosine 4, 8, 10, 12, 15; BHA 0.5; BHT 0.2, 0.5; chloretone (chlorobutanol) 0.3, 0.5; DDT 0.05, 0.1; PCB 0.03.
- The salt mixture in the diet provided the following percentage composition:  $\text{CaCO}_3$ , 29.29;  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.43;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 34.31;  $\text{NaCl}$ , 25.06;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 9.98;  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.623;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.156;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.121;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.02;  $\text{KI}$ , 0.0005;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0025. (62).
- The water-soluble vitamin mixture provided in milligrams per 100 gm of diet: thiamine·HCl, 1.0, riboflavin, 1.0, nicotinic acid, 5.0; calcium pantothenate, 4.0; pyridoxine·HCl, 0.5; vitamin K (menadione), 0.1; biotin, 0.02; folic acid, 0.04; vitamin  $\text{B}_{12}$ , 0.004; inositol, 20.0. The vitamin mixture did not contain ascorbic acid. The fat-soluble vitamin mixture provided per 100 gm of diet: retinyl palmitate, 600IU; ergocalciferol, 1.5  $\mu\text{g}$ ; all-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate, 10 mg. (62).

## 結 果

実験[1]過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導に対する食餌タンパク質及びチロシンの影響

① 体重増加量, 食餌摂取量, 肝重量  
( Table 2, 3 ; P. 31, 32 )

10%カゼインに, 4%のチロシンを添加した飼料を与えて, 28日間飼育すると, 体重増加量は, 減少する傾向を示した。また, 肝重量は, 増加する傾向を示した。食餌摂取量は, 減少する傾向を示した。一方, 8%チロシン食で飼育すると, 食餌摂取量, 体重増加量とも減少し, チロシン毒性の特徴的な症状として, 白内障が生成し, 皮膚の浮腫も観察され, 肝重量も有意に上昇した。20%カゼインに, 8%のチロシンを添加した飼料で14日間あるいは, 28日間飼育した場合及び12%, 15%のチロシン食で28日間飼育した場合いずれも, 体重増加量, 食餌摂取量に, 顕著な変化は, 認められなかった。肝肥大は, 8%, 12%,

15%のチロシンを20%カゼインに添加した群でも観察され、チロシンレベルの上昇につれて、肝重量も増加した。

## ②血清脂質 ( Table 2,4 ; P. 31,33 )

10%カゼインに4%チロシンを添加した飼料で、28日間飼育した群では、血清コレステロールには、有意な上昇は認められず、8%のチロシンを10%カゼインに添加した群では、血清コレステロールは、有意に上昇した。その際の血清コレステロールの上昇は、LDL + VLDL画分よりも、HDL画分により多く認められた。一方、20%カゼインに8%、12%、15%のチロシンを添加した飼料をラットに投与すると、血清コレステロールは、有意に上昇した。その上昇は、チロシンレベルの上昇と平行していた。その際の血清コレステロールの上昇は、HDL画分、LDL + VLDL画分の両方に認められた。血清トリグリセリドは、10%カゼインに4%チロシンを添加した飼料で28日間飼育すると、低下する

傾向を示し、さらに、8%のチロシンの添加により、有意に低下した。20%カゼインに8%のチロシンを添加した食餌で、14日間飼育した場合には、低下する傾向が示された。また、28日間20%カゼインに8%チロシンを添加した飼料で飼育すると、血清トリグリセリドは、上昇する傾向を示したが、15%チロシンでは、低下する傾向を示した。血清リン脂質は、10%カゼインに、4%チロシンを添加した飼料で、28日間飼育すると、低下する傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、10%カゼインに8%チロシンを添加した群、20%カゼインに8%、12%、15%のチロシンを添加して、28日間飼育した群で、上昇する傾向が示された。

### ③ 肝脂質 (Table 5, P. 34)

肝総脂質は、10%カゼインに8%のチロシンを添加した飼料で28日間飼育した群で、組織1gあたりで表現すると、有意に減少した。しかし、肝全体で表現すると、肝総脂質は、

10%カゼインに、8%チロシンを添加した群では、顕著な変化は認められなかった。20%カゼインに8%のチロシンを添加した飼料で飼育した場合にも、組織1gあたりでは、減少する傾向を示し、12%、15%とチロシンの添加レベルを上昇させていくと、肝総脂質は、組織1gあたりで、チロシンレベルに依存して有意に減少した。しかし、肝全体で表現すると、減少傾向は見られたものの、有意差は認められなかった。肝トリグリセリドは、組織1gあたりでは、10%カゼインに8%のチロシンを添加した群で、有意に減少した。また、20%カゼインに8%チロシンを添加した場合には、組織1gあたりでは、減少する傾向が観察された。しかし、肝全体で表示すると、顕著な変化は認められなかった。さらに、12%、15%のチロシンを添加した場合には、組織1gあたりでも、肝全体で表示しても、有意に減少した。肝リン脂質は、組織1gあたりでは、顕著な変化は認められないものの、

肝全体では、チロシン添加を行なつた全ての群で肝リン脂質は、有意に増加した。すなわち、肝臓脂質で、チロシンにより、肝全体で顕著な低下が観察されたのは、トリグリセリドであり、増加したのは、リン脂質であった。実験[2]過剰チロシンによる高コレステロール血症の経時的変化

① 体重増加量、肝重量、食餌摂取量、血清脂質 (Table 6, P. 35)

チロシン過剰食を与えたラットにおける血清コレステロール上昇を経時的に調べる実験を行つてみると、体重増加量は、21日間の実験期間を通じて、対照群とチロシン群との間で、顕著な変化は認められなかった。1週目で肝肥大が観察され、3週目まで肝肥大は継続された。食餌摂取量は、全期間を通じてチロシン群と対照群との間に顕著な変化は、認められなかった。血清総コレステロールは、3週目まで継続して上昇し、2週目、3週目で対照群に比べて、有意に上昇した。さらに、



20%カゼイン食に10%チロシンを添加した食餌を14日間与えておいて、その動物にその後7日間は、20%カゼイン食(コントロール食)を与えて飼育すると、肝肥大が観察されなくなると同時に、血清コレステロール値も20%カゼイン食で3週間飼育した対照群とほぼ同様の値になった(Fig. 1, 2; P. 36, 37)。血清HDL-コレステロールは、1週目で対照群に比べて上昇する傾向を示し、2週目で、有意に上昇した。血清LDL+VLDL-コレステロールも、1週目、2週目で上昇する傾向が観察され、特に3週目でその変化が顕著であった。なお、Fig 1, 2の\*印は、各週における、対照群との有意差を示している。

(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

Table 2

Effect of dietary addition of tyrosine on serum and liver lipids in rats<sup>1,2,3</sup>

Measurement	Control (20% Casein)	Tyrosine (8 %)
Food intake, day 5 (g/day)	14.4±0.6	15.0±1.2
Body weight gains (g/14 days)	64.2±1.6	70.8±5.6
Liver weight (g/100 g B.W.)	4.53±0.06	5.48±0.11 <sup>***</sup>
Serum cholesterol (mg/dl)	104.2±6.2	131.7±5.3 <sup>**</sup>
Serum triglyceride (mg/dl)	162.4±18.7	134.3±17.9
Serum phospholipid (mg/dl)	236.5±11.3	235.3±6.0
Liver total lipids (mg/g tissue)	62.28±1.74	51.54±1.16 <sup>***</sup>
Liver cholesterol (mg/g tissue)	2.63±0.18	3.47±0.18 <sup>**</sup>
Liver triglyceride (mg/g tissue)	28.72±1.89	13.10±0.86 <sup>***</sup>
Liver phospholipid (mg/g tissue)	30.93±0.77	34.95±0.48 <sup>**</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

Table 3

Effect of dietary level of tyrosine and protein on food intake,  
body and liver weights in rats<sup>1,2,3</sup>

Group	Food intake day 8	Body weight gains	Liver weight
	g/day	g/28 days	g/100 g B.W.
Control(10% Casein)	15.7±0.4	91.3±4.5	3.83±0.16
Tyrosine(4%)	15.1±1.3	80.5±8.3	4.52±0.27
Control(10% Casein)	16.7±0.7	97.8±6.4	3.99±0.10
Tyrosine(8%)	8.1±0.9 <sup>***</sup>	10.0±11.6 <sup>***</sup>	5.61±0.19 <sup>***</sup>
Control(20% Casein)	13.5±0.7	115.2±5.4	4.33±0.11
Tyrosine(8%)	14.0±0.4	113.5±3.8	5.01±0.09 <sup>**</sup>
Tyrosine(12%)	13.8±0.6	113.5±3.7	5.03±0.11 <sup>**</sup>
Tyrosine(15%)	15.8±0.5	108.8±3.7	5.19±0.11 <sup>**</sup>

1. Feeding period was 28 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

Table 4

Effect of dietary level of tyrosine and protein on serum lipids in rats<sup>1,2,3</sup>

Group	Cholesterol	HDL-Chol.	LDL+VLDL-Chol.	Triglyceride	Phospholipid
	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Control (10% Casein)	106.3±5.6	N.D. <sup>4</sup>	N.D.	255.8±44.9	211.0±11.3
Tyrosine (4%)	112.1±5.3	N.D.	N.D.	191.1±39.1	187.1±5.3
Control (10% Casein)	87.4±1.9	55.5±2.4	31.8±3.6	180.7±9.0	201.4±6.2
Tyrosine (8%)	111.8±5.4 <sup>**</sup>	74.4±5.4 <sup>*</sup>	37.4±1.0	82.8±18.0 <sup>**</sup>	223.1±9.1
Control (20% Casein)	95.3±5.0	66.7±3.1	28.5±2.4	175.9±21.8	241.8±9.6
Tyrosine (8%)	119.0±8.7 <sup>*</sup>	64.5±6.7	54.6±4.6 <sup>***</sup>	186.9±19.0	245.9±13.2
Tyrosine (12%)	122.4±4.4 <sup>**</sup>	68.5±5.1	53.9±5.3 <sup>**</sup>	194.1±22.8	252.7±9.1
Tyrosine (15%)	130.5±4.4 <sup>***</sup>	81.0±7.6	49.4±4.2 <sup>**</sup>	144.2±11.4	262.0±11.7

1. Feeding period was 28 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

4. not determined.

Table 5

Effect of dietary level of tyrosine and protein on liver lipids in rats<sup>1,2,3</sup>

Group	Total lipids	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
	mg/g tissue	mg/g tissue	mg/g tissue	mg/g tissue
Control ( 10% Casein )	55.33±2.62	2.79±0.17	24.81±2.45	27.70±0.55
Tyrosine ( 8% )	42.02±0.96 <sup>***</sup>	1.64±0.10 <sup>***</sup>	12.69±1.62 <sup>**</sup>	27.70±0.72
-----				
Control ( 20% Casein )	54.20±0.60	2.12±0.11	23.31±0.96	28.76±0.73
Tyrosine ( 8% )	51.41±1.37	2.05±0.09	20.77±1.19	28.59±0.44
Tyrosine ( 12% )	48.53±1.68 <sup>**</sup>	2.09±0.09	16.21±1.55 <sup>**</sup>	30.22±0.75
Tyrosine ( 15% )	44.17±0.39 <sup>***</sup>	2.10±0.14	12.27±0.84 <sup>***</sup>	29.81±0.57

1. Feeding period was 28 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

(\* p &lt; 0.05, \*\* p &lt; 0.01, \*\*\* p &lt; 0.001)

Table 6

*Time course effect of excess tyrosine feeding on food intake, serum lipids and body and liver weights in rats (expt 1)<sup>1,2,3</sup>*

Group	Feeding schedule		Food intake d 6 g/d	Body wt gains g/7, 14 or 21 d	Liver wt g/100 g BW	Serum cholesterol		
	Tyr diet	Basal diet				Total	HDL cholesterol	LDL + VLDL cholesterol
	d	d				mg/dl		
A	0	0	—	—	4.05 ± 0.09 <sup>a</sup>	102.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	51.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	51.8 ± 1.4 <sup>ab</sup>
B	0	7	14.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	29.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.07 <sup>b</sup>	108.5 ± 3.2 <sup>ab</sup>	57.4 ± 3.7 <sup>b</sup>	51.1 ± 2.4 <sup>ab</sup>
C	7	0	14.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	28.7 ± 3.7 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.17 <sup>c</sup>	126.0 ± 8.1 <sup>bc</sup>	66.7 ± 5.1 <sup>bc</sup>	59.3 ± 3.8 <sup>b</sup>
D	0	14	14.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	59.7 ± 3.2 <sup>b</sup>	5.21 ± 0.12 <sup>b</sup>	104.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	54.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	48.7 ± 1.2 <sup>ab</sup>
E	14	0	15.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	57.2 ± 3.8 <sup>b</sup>	6.56 ± 0.20 <sup>d</sup>	132.0 ± 7.1 <sup>c</sup>	76.7 ± 5.9 <sup>c</sup>	55.4 ± 3.8 <sup>ab</sup>
F	0	21	15.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	97.8 ± 1.4 <sup>c</sup>	4.87 ± 0.07 <sup>ab</sup>	100.0 ± 4.6 <sup>a</sup>	52.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	47.3 ± 2.5 <sup>a</sup>
G	21	0	14.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	91.8 ± 6.9 <sup>c</sup>	5.74 ± 0.17 <sup>c</sup>	138.6 ± 9.6 <sup>c</sup>	50.4 ± 4.7 <sup>a</sup>	88.1 ± 5.8 <sup>c</sup>
H	14	7	15.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	94.5 ± 2.9 <sup>c</sup>	5.02 ± 0.06 <sup>ab</sup>	93.2 ± 5.0 <sup>a</sup>	48.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	45.0 ± 2.6 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Initial average body weight was about 90 g. Group A was killed on the day that test diets were provided to other groups, group B was fed basal diet for 7 d, group C was fed tyrosine diet (20% casein + 10% tyrosine) for 7 d, group D was fed basal diet for 14 d, group E was fed tyrosine diet for 14 d, group F was fed basal diet for 21 d, group G was fed tyrosine diet for 21 d, group H was fed tyrosine diet for 14 d and then basal diet for 7 d. <sup>2</sup>Values are means ± SEM of six rats per group. <sup>3</sup>Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

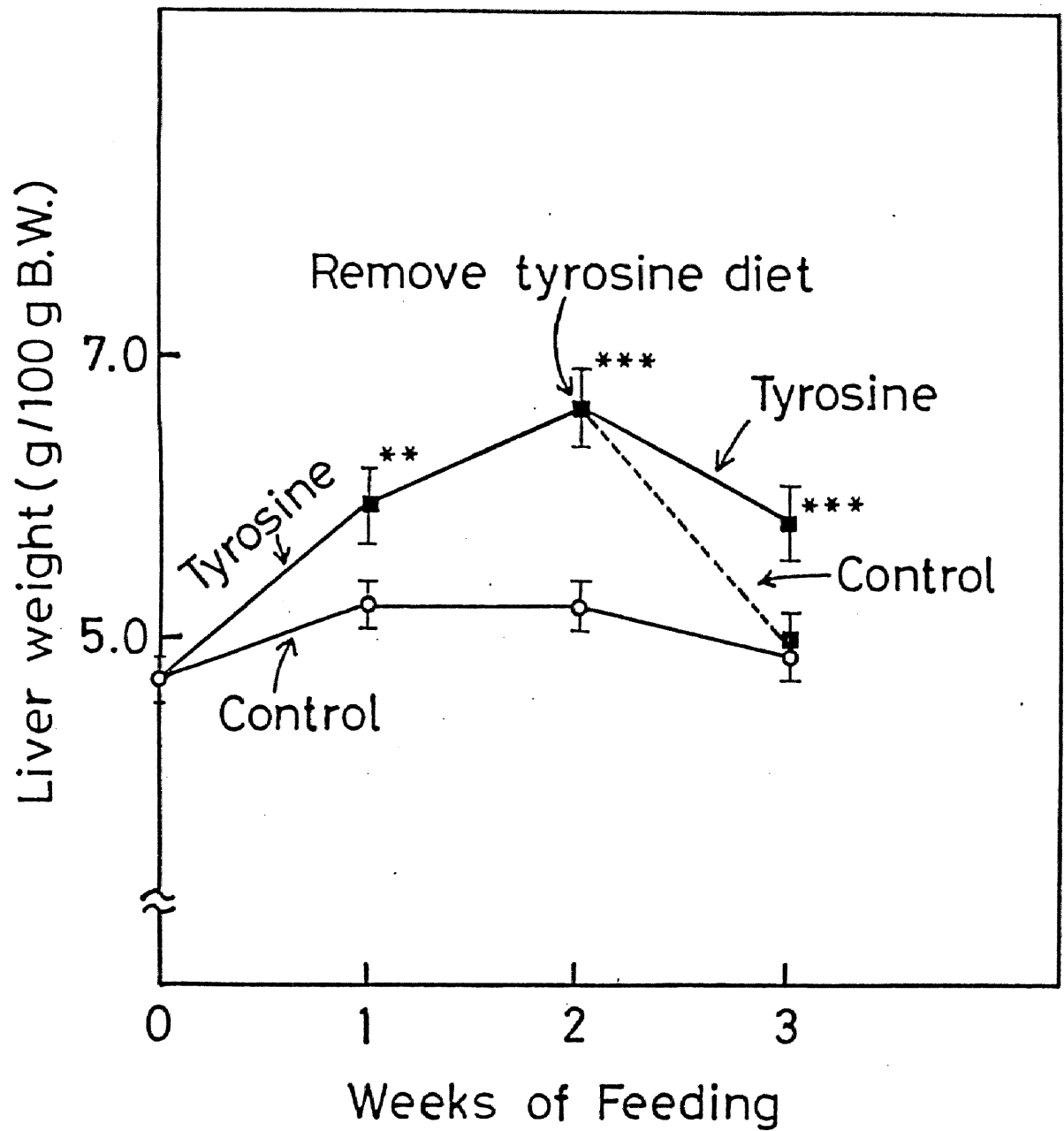


Figure 1

Time course effect of excess tyrosine feeding on liver weights in rats

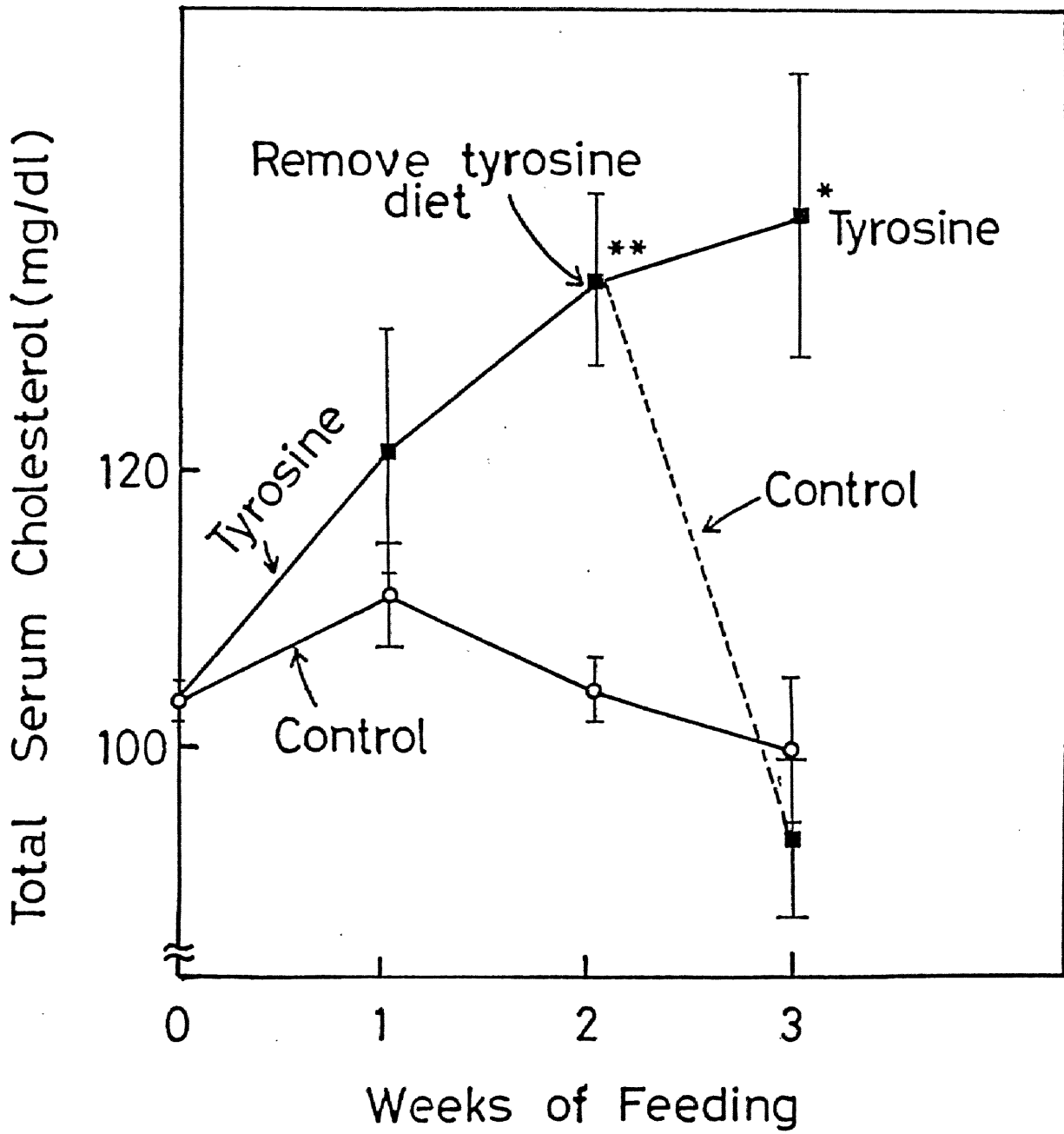


Figure 2

Time course effect of excess tyrosine feeding on serum cholesterol in rats



第2章 過剰チロシンの肝薬物代謝酵素及び尿・肝臓アスコルビン酸に対する影響

## 方法

実験動物として、初体重 90 g 前後の Wistar 系雄ラットを用い、実験飼料は、20% カゼインに 12% のチロシンを添加したものをを用いた。実験期間は 14 日間、水や飼料は、自由摂取させた。14 日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。なお、実験期間中、5% ヌタリン酸で 24 時間採尿し、尿中のアスコルビン酸を定量した。aniline hydroxylase 活性、aminopyrine N-demethylase 活性を測定するため、肝臓の一部(約 2 g)に、4 倍容の 1/5% KCl を含んだ 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジエネートを、 $10,000 \times g$   $2^{\circ}C$ 、15 分間遠心し、その上清を両酵素活性測定に用いた。なお、aniline hydroxylase 活性及び aminopyrine N-demethylase 活性の測定は、既報<sup>(32)</sup>に従って行った。肝ミクロソームは、 $10,000 \times g$  上清をさらに、1 時間  $105,000 \times g$  で遠心沈殿させ、1 mM EDTA

を含んだ 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁させ、ミクロソームの cytochrome P-450, b5 及び NADPH-cytochrome c reductase 活性を測定した。cytochrome P-450 と cytochrome b5 の測定は、既報<sup>(63)</sup>に従って行なった。NADPH-cytochrome c reductase 活性は、Williams と Kamin<sup>(64)</sup>の方法で測定した。血清コレステロールは、Pearson's<sup>(57)</sup>の方法で測定した。肝臓及び尿中アスコルビン酸は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法によって測定した<sup>(66)</sup>。(基本的実験方法参照)

## 結 果 (Table 7, 25 ; p. 42, 241)

ラットの血清コレステロールは, 12% クロシンを添加した食餌で14日間飼育すると, 有意に上昇し, 肝薬物代謝酵素の aniline hydroxylase 活性, aminopyrine N-demethylase 活性は, 組織1gあたりでは上昇する傾向が示され, 肝全体では有意に上昇した。肝 cytochrome P-450 とは, 組織1gあたりでも肝全体でも有意に上昇した。cytochrome c reductase 活性も, 肝全体で表示すると有意に上昇した。尿中アスコルビン酸の排泄は, おおむね上昇ではあるが, 有意差が認められた。肝臓アスコルビン酸は, 組織1gあたりでも肝全体で表示しても, クロシン添加で有意に上昇した。

Table 7

Effect of excess tyrosine on body and liver weights, food intake, serum cholesterol, liver ascorbic acid, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase and cytochrome c reductase activities, cytochrome P-450 and cytochrome b<sub>5</sub> in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet	
	Control (20% casein)	12% tyrosine
Body weight gains, g/14days	59.7±3.5	50.2±5.6
Food intake, day 6, g/day	14.9±0.3	14.0±1.0
Liver weight, g/100g B.W.	4.94±0.22	6.21±0.26**
Serum cholesterol, mg/dl	105.2±4.8	140.0±4.2***
Liver ascorbic acid		
μg/g liver	173.5±5.7	204.4±5.5**
mg/100g B.W.	0.85±0.04	1.27±0.08***
Aniline hydroxylase		
activity <sup>4</sup> /g liver	7.7±0.6	8.0±0.9
activity <sup>4</sup> /100g B.W.	37.7±2.1	48.9±4.5*
Aminopyrine N-demethylase		
activity <sup>4</sup> /g liver	54.7±3.5	56.0±2.4
activity <sup>4</sup> /100g B.W.	269.7±15.9	320.8±15.2*
Cytochrome c reductase		
activity <sup>5</sup> /g liver	1.41±0.02	1.40±0.07
activity <sup>5</sup> /100g B.W.	6.98±0.34	8.72±0.64*
Cytochrome P-450		
n moles/g liver	9.5±0.6	11.7±0.7*
n moles/100g B.W.	46.8±2.6	72.6±4.9***
Cytochrome b <sub>5</sub>		
n moles/g liver	5.3±0.5	7.0±0.5*
n moles/100g B.W.	23.6±2.1	43.2±3.7***

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means ± SEM of six rats per group.

B.W. body weight. 3. Statistical significance compared with control group.

(\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

4. n moles of product formed per minute.

5. μ moles of cytochrome c reduced per minute.

第3章 チロシン以外のアミノ酸の血清コレステロールに対する  
影響

## 方法

実験動物として、初体重 90g 前後の Wistar 系雄ラットを用いた。実験期間と実験飼料は、次に示すように行った。食餌タンパク質レベルは、すべて 20% カゼインとした。8% フェニルアラニン, 0.5%, 1.5% メチオニン (3 週間), 8% リジン, 5% ヒスタジン (4 週間)。3 週間及び 4 週間の実験期間の終了時に、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。肝臓は、切除後湿重量を測定し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。血清コレステロール, HDL-コレステロール, 肝脂質は、実験[1]と同様の方法 (p. 23) で分析した。(基本的実験方法参照)

## 結果

① 体重増加量, 食餌摂取量, 肝重量  
(Table 8, p. 48)

20%カゼインに, 5%のヒスチジンを添加して飼育したラットでは, 食餌摂取量, 体重増加量とも有意に減少した。肝重量は, 有意に上昇した。20%カゼインに8%のリジンを添加して飼育した場合にも, 体重増加量の有意な減少が認められた。肝重量には, 顕著な変化は認められなかった。20%カゼインに, 8%のフェニルアラニンを添加した飼料で飼育すると, 食餌摂取量, 体重増加量とも顕著な減少が観察された。しかしながら, 肝肥大が観察された。20%カゼインに, 0.5%のメチオニンを添加した飼料を与えたラットでは, 食餌摂取量, 体重増加量, 肝重量に顕著な変化は見られないものの, さらに, 1.5%のメチオニンを飼料に加えて飼育すると, 食餌摂取量, 体重増加量とも有意に減少した。



## ②血清脂質 (Table 9, p. 49)

20%カゼインに、5%のヒスチジンを添加した群では、28日間飼育後、血清コレステロールは、対照群と比べて有意に上昇した。この血清コレステロールの上昇は、HDL-コレステロール、LDL+VLDL-コレステロールの両画分に見られた。20%カゼインに8%のリジンを添加して、28日間飼育した場合には、血清コレステロールは有意に低下した。すなわち、リジン投与により、HDL-コレステロール、LDL+VLDL-コレステロールともに低下した。20%カゼインに8%フェニルアラニンを添加して、21日間飼育した場合には、血清コレステロールには、顕著な変化は認められなかった。さらに、血清コレステロールは、0.5%メチオニンを20%カゼインに添加して、21日間飼育すると、有意に上昇した。この血清コレステロールの上昇は、HDL-コレステロールの増加として表わされた。しかし、1.5%のメチオニン

を添加した場合には、血清総コレステロールは上昇する傾向を示したが、有意差は認められなかった。

Table 8

Effect of excess amino acids other than tyrosine on food intake, body and liver weights in rats<sup>1,2</sup>

Group	Food intake	Body weight	Liver weight
	day 18	gains	
	g/day	g/21days or g/28 days	g/100 g B.W.
Control(20% Casein) <sup>3</sup>	16.0±0.5	115.2±5.4	4.53±0.11
Histidine(5%)	13.0±0.6**	74.5±3.1***	6.51±0.14***
Control(20% Casein) <sup>3</sup>	17.9±0.6	136.5±4.2	4.65±0.11
Lysine(8%)	17.3±2.0	70.5±6.4***	4.89±0.15
Control(20% Casein) <sup>4</sup>	16.5±0.8	102.7±4.2	4.21±0.07
Phenylalanine(8%)	9.3±1.0***	16.0±4.8***	5.15±0.22**
Methionine(0.75%)	15.2±0.5	91.7±4.2	4.41±0.13
Methionine(1.5%)	12.4±0.3***	48.8±3.0***	4.38±0.11

1. Means ± SE. of 6 rats per group. 2. Statistical significance compared with control group. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)  
 3. Feeding period was 28 days. 4. Feeding period was 21 days.

Table 9

Effect of excess amino acids other than tyrosine on serum cholesterol levels in rats<sup>1,2</sup>

Group	Cholesterol	HDL-Chol.	LDL+VLDL-Chol.
	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Control(20% Casein) <sup>3</sup>	95.3±5.0	66.7±3.1	28.5±2.4
Histidine(5%)	188.4±8.0 <sup>***</sup>	142.5±6.9 <sup>***</sup>	45.9±2.2 <sup>***</sup>
Control(20% Casein) <sup>3</sup>	101.0±2.2	61.9±3.0	39.1±2.9
Lysine(8%)	73.3±3.4 <sup>***</sup>	48.2±2.3 <sup>**</sup>	25.1±1.4 <sup>**</sup>
Control(20% Casein) <sup>4</sup>	94.3±2.7	55.7±2.3	38.7±1.7
Phenylalanine(8%)	88.7±5.5	56.9±2.2	31.8±3.6
Methionine(0.75%)	109.3±1.8 <sup>***</sup>	71.5±2.7 <sup>**</sup>	37.9±2.7
Methionine(1.5%)	102.0±3.5	66.6±2.5 <sup>**</sup>	35.5±1.8

1. Means ± SE. of 6 rats per group. 2. Statistical significance compared with control group. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)  
 3. Feeding period was 28 days. 4. Feeding period was 21 days.

## 考 察

一般に、過剰のアミノ酸不均衡により、食餌摂取量が低下し、成長が抑制されたり<sup>(44)</sup>、代謝レベルでの変化などが起こり、時には種々の病理学的障害が発現し、死に至る場合さえあることが知られている。アミノ酸不均衡による障害は、Harper 氏<sup>(67)(68)</sup>により、imbalance, antagonism 及び toxicity の3つのタイプに分類されている。少量の制限アミノ酸の添加により回復するものを、imbalance、少量の構造類似のアミノ酸添加により回復するものを、antagonism、制限アミノ酸や構造類似のアミノ酸によつては回復せず、現象面で共通的な特徴を有しないものが、toxicity というふうに分類されているが、低タンパク食に単一のアミノ酸を過剰に添加したときに起こる不均衡は、一般に、toxicity として扱われるが、障害の強さは、アミノ酸の種類やその添加レベル、タンパク質の量や質、ビタミン含有量などによつて変化するばかりか、動物の系統、

性別, 週齡, 生理的條件, 飼育期間などによっても影響をうけることが知られている<sup>(44)(46)</sup>  
<sup>(67)</sup>。チロシン毒性に関しては, 幼ラットにチロシンを過剰に添加した低タンパク食を与えると, 成長や飼料摂取の抑制が起こるだけでなく, 目や四肢に特異的な障害すなわち, 細目にたり, 白内障を生成し<sup>(45)</sup>, やがて失明する。また下肢は, 赤く腫れ浮腫を起し, 死亡率も高まることも報告されている<sup>(68)</sup>。実際に, 実験[1]において, 8%チロシンを10%カゼインに添加して, 28日間飼育したラットにおいて, チロシンの過剰毒性の特徴である, 食餌摂取や成長の抑制, 白内障の生成, 下肢の腫れ及び浮腫が観察された。一方, この8%レベルのチロシンによる影響は, タンパク質レベルを10%から20%にすることによって, 著しく改善された。すなわち, 20%カゼインに8%のチロシンを添加して, 14日あるいは28日間飼育しても, チロシンによる障害は, 認められなかった。これは, 村松ら<sup>(46)</sup>の報告

とも一致している。次のようなことが主に、このタンパク質摂取の増加によるチロシン毒性の改善作用の理由として挙げられると思われる。①過剰チロシンの存在による食餌アミノ酸パターンの不均衡が、10%から20%へ、タンパクレベルを上昇させたことで、供給される多量の他のアミノ酸によって改善された。②タンパク摂取量の増加は、チロシンの分解に関連した酵素活性を増加させ、それによってチロシン代謝が促進された。このような、タンパク質による毒性軽減作用の他に、グリシン<sup>(45)</sup>、メチオニン<sup>(45)</sup>、スレオニン<sup>(45)</sup>など、特定のアミノ酸の添加によっても、チロシン毒性は軽減されることが知られている。

さらに、このようなチロシン過剰食によって引き起こされる、目や四肢の障害発現機構についても報告されている。このような障害がチロシン自身によるものなのか、チロシンの代謝物によるものなのかを明らかにするためには、チロシンの中間代謝物である、P-ヒド

ロキシフェニルピルビン酸 (PHPP) を低タンパク食にさまざまなレベルで添加しても、目や四肢の障害は、まったく観察されなかった<sup>(70)</sup>。したがって、PHPP やホモゲンチジン酸などチロシンの分解代謝物は、チロシン障害の発現に直接的にかかわりがないのかもしれない。また、Bakke<sup>(71)</sup> は、腸内細菌の作用により生成される揮発性フェノール類が、原因物質であるとしているが、この見解にも否定的な見方がある<sup>(46)</sup>。チロシンは、難水溶性であるため、血管内のチロシン濃度が異常に高まると不溶化し、これが末梢血管をふさぎ、組織の浮腫、壊死を起し、四肢の末端脱落につながるのかもしれない。奥村ら<sup>(72)</sup> は、実際に、高チロシン食を与えたヒナの脚の関節に不溶化したチロシンが沈着することを観察している。また、白内障生成機序に関して、Srivastava と Beutler<sup>(73)</sup> は、ウサギのレンズとチロシンと tyrosinase を含むメディウムでインキュベートすると、白内障を生ずることを示



し、これは生成したドーパキノンがレンズタンパク質と結合し、酸化されたレンズタンパク質が沈殿するからであるとする説を出している。

一方、チロシンの脂質代謝に及ぼす影響を見とみると、10%カゼインに4%チロシンを添加して、28日間飼育しても、体重抑制が見られないし、血清コレステロールは上昇しないが、10%カゼインに8%チロシンを添加して飼育すると、血清コレステロールは、上昇し、しかし、体重抑制が観察される。すなわち、10%カゼイン（低タンパク食）の場合は、体重増加量に影響を与えない程度のチロシンレベルでは、高コレステロール血症は生成されないのである。対照的に、20%カゼインに8%チロシンを添加して、14日あるいは28日間飼育した場合には、体重抑制なしで、高コレステロール血症が生成されることが明らかにされた。したがって、低タンパク食（10%カゼイン）に8%チロシンを添加して飼育す

ると、体重に強く影響され、高タンパク食（20%カゼイン）に8%チロシンを添加して飼育した場合は、体重抑制は観察されず、体重抑制が、みられないようなチロシンの添加量です。すでに、高コレステロール血症が引き起こされるので、チロシンによって誘導される高コレステロール血症は、低タンパク食よりも高タンパク食の方が起こりやすいものと思われた。このことから、PCB<sup>(48)</sup>やヒスチジン<sup>(47)</sup>によって誘導される高コレステロール血症も、高タンパク食の方が誘導されやすいという点で、これらが類似しているものと思われた。この理由は、高タンパクの方が、コレステロールの肝臓から血中への放出に関係するリポタンパクの合成が促進されやすいためか、あるいは、コレステロールの合成酵素の誘導などにも都合がよいものと思われる。対照的に、ラットのコレステロール大量摂取による外因性高コレステロール血症では、コレステロール低下作用が、高タンパクで引き起こされる

といわれている<sup>(174)</sup>ので、あるいは、高タンパク食摂取がコレステロール分解系にもかなり影響を及ぼしているのかもしれない。このような高タンパク食による影響が、チロシン、ヒスチジン、PCBを摂取した時に観察される高コレステロール血症とコレステロールによる高コレステロール血症とでは、まったく対照的である原因を詳細に検討することも興味深いものと思われる。

チロシンによって誘導される高コレステロール血症は、20%カゼインに8%、12%、15%とチロシンの添加レベルを上昇させるにつれて、血清コレステロールも上昇するので、チロシンの添加レベルの上昇によっても、影響されるのは明らかである。チロシンによって誘導される高コレステロール血症は、基本的には、HDL-コレステロール、LDL+VLDL-コレステロールの両方ともに上昇させるものであるが、総コレステロールに占める、HDL-コレステロールの割合は、食

餌中のチロシン量や飼育期間, タンパクレベルによっても若干違いが認められた。同様に, ヒスチジン<sup>(75)</sup>による高コレステロール血症は, 本実験においても, HDL-コレステロール, LDL+VLDL-コレステロールの両方とも上昇し, PCBなどの生体異物<sup>(19)</sup>をラットに投与した場合にも, HDL-コレステロール, LDL+VLDL-コレステロールの両方が上昇する。一方, コレステロール大量摂取による高コレステロール血症は, 相対的にHDL-コレステロールよりもLDL+VLDL-コレステロールが, より多く上昇するということが報告されている<sup>(39)</sup>。これらのことから, ヒスチジン過剰食, チロシン過剰食, PCBなどの生体異物による高コレステロール血症と, コレステロール摂取による高コレステロール血症とは, リポタンパク組成変化という点においても異なっていることが示唆された。

さらに, チロシンによる高コレステロール

血症の経時的変化を検討した実験から、チロシンによる高コレステロール血症は、3週間継続して観察された。また、2週間チロシン食で飼育し、その後1週間は、20%カゼインのコントロール食で飼育すると、肝肥大が抑制されると同時に、血清コレステロールも、3週間20%カゼイン食で飼育した対照群とほぼ同様の値に変化した。同様の現象が、ヒスチジンによる高コレステロール血症においても観察されている<sup>(20)</sup>。一方、PCBを用いた場合には、5日間20%カゼインに0.03% PCBを添加した食餌で飼育し、その後16日間は、20%カゼインのコントロール食で飼育しても、血清コレステロールは、21日間20%カゼインで飼育した対照群よりも、依然として高い値を示していた<sup>(51)</sup>。この違いは、チロシン、ヒスチジンなどのアミノ酸の方が、PCBよりも、すみやかに代謝されることによるものと思われた。

以上述べてきた、チロシンによる高コレス

テロール血症の誘導機構としては、①コレステロールの主な合成器官である肝臓・小腸でのコレステロール生合成及び肝から血中へのコレステロール放出の亢進。②コレステロール分解・排泄の減少すなわち、胆汁酸や中性ステロイド生成・排泄などの減少。③血中リポタンパクの分解の低下すなわち、血中HDLやLDL, VLDLなどのリポタンパクレセプターによる異化の低下。などが挙げられる。本研究でもこのうち①②については実際に検討し、また③についても、参考論文等により考察した。(①第2編, ②第3編, ③第2編参照)

過剰チロシンの摂取は、高コレステロール血症や肝肥大を引き起こすだけでなく、本研究で肝薬物代謝酵素である、cytochrome P-450, b5, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase, cytochrome c reductase も誘導することが新しく見出された。さらに、肝臓や尿中アスコルビン酸レベルを上昇させるという、アスコル

ビン酸の代謝にも影響を及ぼすことも観察された。チロシンの代謝は、(Fig. 3, p. 67)に示されている。チロシンは図のように、カテコールアミン、甲状腺ホルモンをはじめ多くの生理活性物質の前駆体であることは言うまでもないが、この図に示されたように、チロシン代謝の主経路は、tyrosine aminotransferaseによって、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸となり、さらに、4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenaseによって、ホモゲンチジン酸となり、後にTCAサイクルで代謝されるものである。これでは、なぜ過剰チロシンによって、肝臓・尿中アスコルビン酸レベルや肝薬物代謝酵素活性が上昇するのであるのか。チロシンの代謝経路の中で、アスコルビン酸が関与しているのは、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸から、ホモゲンチジン酸が生成される反応であり、正常なチロシンの酸化には、アスコルビン酸が必要であると報告されている<sup>(16)</sup>。このために、肝アスコルビン酸が過剰チロシン食

を与えたラットで上昇するのかもしれない。  
 また、過剰チロシンを与えたラットでは、薬  
 物代謝酵素の cytochrome P-450 , b5 , cytochrome  
 c reductase , aniline hydroxylase , aminopyrine N-  
 demethylase の誘導が観察された。 cytochrome  
 c reductase , aniline hydroxylase , aminopyrine N-  
 demethylase 活性の上昇については、組織 1g  
 あたりでは活性上昇が見られないことから、  
 チロシンによる肝肥大の影響も大きいものと思  
 われる。これまで、アスコルビン酸と肝薬  
 物代謝酵素との相互関係について、述べた報  
 告は数多い。その一例をあげると、Zannoni が  
 (177) は、cytochrome P-450 の活性の維持に、アスコ  
 ルビン酸が必要であることを報告している。  
 このようなことから、過剰チロシンによる肝  
 薬物代謝酵素の誘導と肝アスコルビン酸の上  
 昇とに、生体異物などに見られるような密接  
 な関連<sup>(32)</sup>があるのかもしれない。さらに、過  
 剰チロシンによって、cytochrome P-450 は、組織  
 1g あたりでも上昇するわけであるが、チロ



シンの代謝経路 (Fig. 3, P. 67) の中で, ミクロソームの cytochrome P-450 の関与する反応は, ラットでは現在知られていないのであり, この cytochrome P-450 の誘導が, チロシン自身によるものか, チロシンの代謝物によって引き起こされるのかは, 明らかではない。しかし, 事実, ウサギではチロシンの代謝物のチラミンが, ミクロソームの cytochrome P-450 様物質により代謝されるという報告<sup>(78)</sup> もあり, このことは, ラットによる過剰チロシンの cytochrome P-450 誘導の原因説明に何らかの示唆を与えるかもしれない。一方, チロシンによって高コレステロール血症が誘導される際には, コレステロールの合成が促進されるものと考えられるので (第2編参照), コレステロール合成・分解に cytochrome P-450 が関与するので, コレステロールの代謝に関連した, Cytochrome P-450 が誘導されているのかもしれない。いずれにしても, 過剰チロシンによる肝薬物代謝酵素の誘導という現象は, 非常に

興味深い。

一方、いままで生体異物<sup>(32)</sup>では、肝薬物代謝酵素の誘導と血清コレステロールの上昇とに相関があり、生体異物自身がミクロソームで代謝されることによるミクロソームの肥大が、高コレステロール血症生成にとって重要な因子であるとも考えられてきたが、たしかにチロシンにより、肝薬物代謝酵素は上昇するが、PCBやDDTなどと比較すると、かなり誘導の程度が小さく、さらに、チロシンの添加量がたいへん過剰であることを考慮すると、チロシンによる薬物代謝酵素の誘導能力は低いと思われる。また、薬物代謝酵素の誘導と血清コレステロールの上昇幅を比較検討した、我々のグループの成績(長岡・吉田未発表)から、肝薬物代謝酵素活性の上昇は、0.01%のDDTにより観察されるが、血清コレステロールは上昇せず、チロシン12%の場合と同程度の血清コレステロール上昇を得るためには、DDTは0.05%程度添加せね

ばならず、この時には、DDTによる肝薬物代謝酵素活性の上昇は、12%チロシンによって誘導されるよりもはるかに上昇していることを観察した。したがって、肝薬物代謝酵素の誘導とコレステロール上昇との関係は、チロシンの場合、生体異物とは異なり、チロシンによって誘導される高コレステロール血症をDDTなどのような薬物代謝酵素などの誘導にともなうミクロソームの肥大のみで、説明するのは困難であるかもしれない。この点から、後述するような、カテコールアミンなどのホルモンの変動などを考えていく必要があるかもしれない。(第4編参照)

チロシン以外のアミノ酸との比較検討から、ヒスチジンは、すでに述べたように、高コレステロール血症を誘導するわけであるが、これは、Solomon と Geison<sup>(20)</sup> や Aoyama<sup>(55)</sup> の報告と一致している。さらに、リジンは、ニクトリにおいて、高コレステロール血症を誘導することを、Schmeisser<sup>(54)</sup> が報告しているが、

ラットの場合、このような高コレステロール血症は引き起こされず、むしろ、血清コレステロールは低下した。この違いは種差あるいは、投与量の違いによるのか、他の原因によるのかは、明らかではない。さらに、メチオニンは、1%のコレステロール添加食に0.75%添加することにより、血清コレステロール上昇をさらに促進することが知られている<sup>(55)</sup>が、コレステロールを添加していない20%カゼイン食に、0.75%のメチオニンを添加した場合にも、若干の血清コレステロール上昇作用が認められた。しかし、1.5%では、総コレステロールに顕著な変化は認められず、20%カゼイン食におけるメチオニンのコレステロール上昇作用は、非常に限られた範囲で観察されるものなのかもしれない。また、フェニルアラニンは、体内で、phenylalanine hydroxylaseにより、水酸化され、チロシンになるが、フェニルアラニンを添加して飼育しても、高コレステロール血症は、生成されなかった。こ

の理由は明らかではないが、フェニルアラニンでは、肝肥大もチロシンほど見られず、また、食餌摂取量、体重増加量とも顕著に低下し、チロシンとフェニルアラニンとでは、コレステロール代謝に及ぼす影響も異なるのかもしれない。一方、過剰シスチンによる高コレステロール血症もラットで報告されており<sup>(21)</sup>、結局、ヒスチジン<sup>(79)(80)</sup>、シスチン<sup>(21)</sup>、チロシンなどの過剰アミノ酸により高コレステロール血症が、いずれも引き起こされ、それが、成る者とも肝コレステロールの合成促進などにより誘導されると考えられていることは、興味深い(第2編参照)。いずれにしても、今後、チロシンによる高コレステロール血症は、新しい高コレステロール血症のモデルとして、リポタンパクの代謝を含めたコレステロール代謝の調節機構の解明などに寄与するものと思われる。

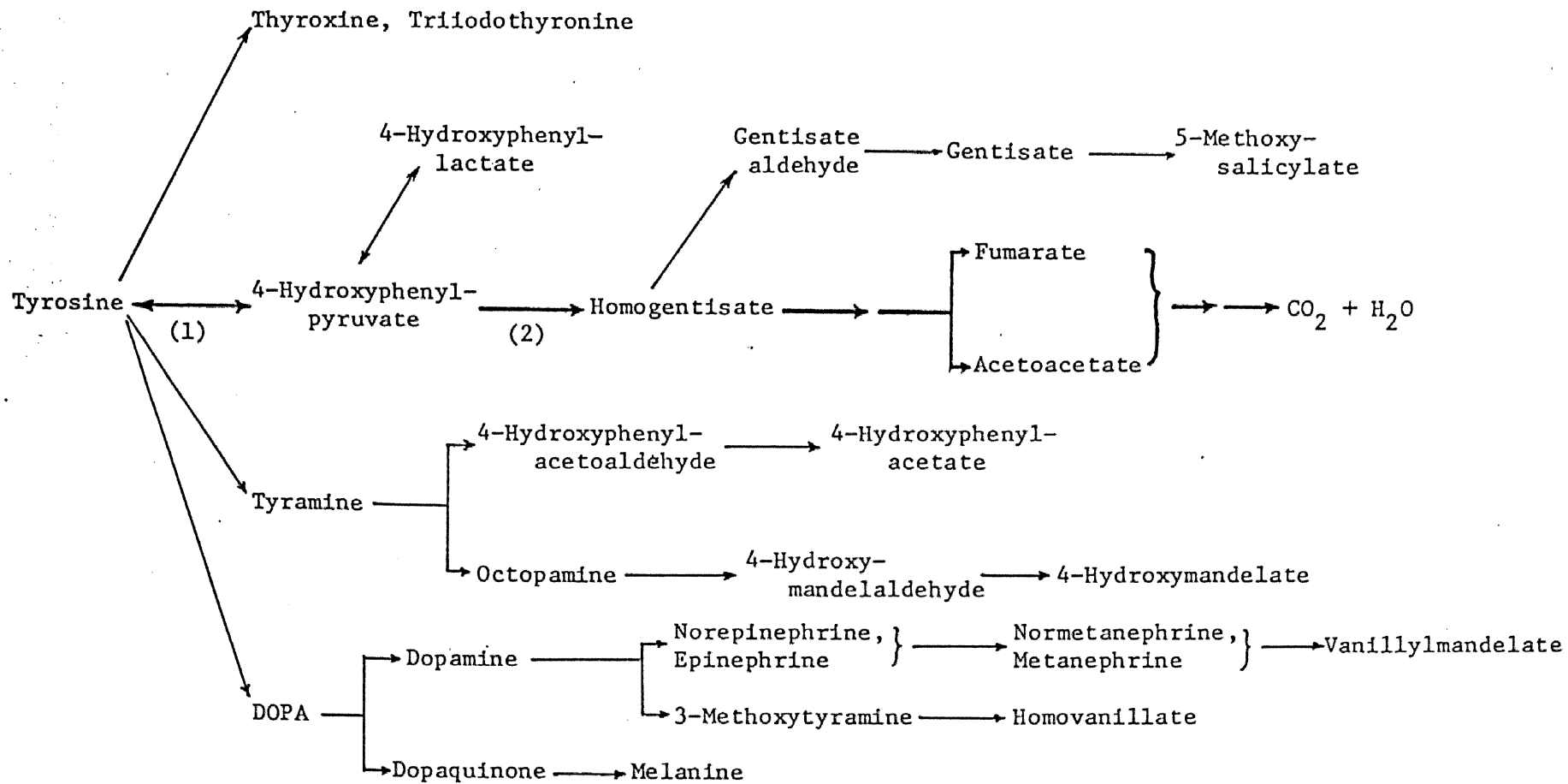


Figure 3

Metabolic pathways of tyrosine (Ref. 81)

(1) Tyrosine aminotransferase (EC 2.6.1.5)

(2) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)

67

第2編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生  
成時におけるコレステロール合成系の変動

## 目的

PCBやDDTなどの生体異物が、高コレステロール血症を生成することは、我々のグループ<sup>(19)</sup>やその他の研究者<sup>(58)(82)(83)</sup>によって報告されているが、これら種々の生体異物のうちPCBについてのみ、高コレステロール血症生成機構についての観察がなされている。すなわち、PCBを摂取した場合には、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した *in vivo* におけるコレステロール合成能、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性、ともに有意に上昇し<sup>(38)</sup>、PCBによる高コレステロール血症は、主に肝コレステロール合成が促進されたために、引き起こされるものと推論されている。しかしながら、PCB以外の生体異物に関する報告には、フェノバルビタール<sup>(84)(85)</sup>による HMG-CoA reductase 活性の上昇や、PCBなどと同様に高コレステロール血症を生成するカフェインについて、*in vivo* におけるコレステロール合成能を測定した成



績<sup>(86)</sup>があるが、非常に限られており、PCB以外の生体異物もPCBと同様の機構で高コレステロール血症を生成しているのかどうかについては、はっきりした結論が得られていない。さらに、ヒスチジンの場合、Qureshiら<sup>(80)</sup>は、5%ヒスチジンを与えたラット肝5000xg上清を用いて、 $[^{14}\text{C}]$ -酢酸を基質とし、肝臓でのコレステロール合成能が対照群に比べ、有意に上昇することを報告した。同様に、SolomonとGeison<sup>(79)</sup>は、ラットに5%ヒスチジン添加食を与え、 $[^{14}\text{C}]$ -酢酸などを基質とし、肝臓コレステロール合成の増加を示した。これらことから、ヒスチジンによる高コレステロール血症は、コレステロール合成促進の結果引き起こされているものと考えられている。さらに、アミノ酸過剰摂取では、ラットでシスチンが高コレステロール血症を引き起こすことが報告されており<sup>(21)</sup>、この場合も、肝臓のコレステロール合成促進により引き起こされていると推論されている。一方、第1

編で述べたように、過剰チロシンによっても、高コレステロール血症が生成されることが明らかにされた。

以上のことから、PCBやヒスチジン、シスチンの場合のように、PCB以外の生体異物としてすでに高コレステロール血症が生成されることが観察されている、クロロブタノール(クロレトン)、BHA、DDTや過剰チロシンについても、肝コレステロールの合成促進が引き起こされているのかどうかを調べるのに、*in vivo* におけるコレステロール合成能を $H_2O$ を用いて検討した。さらに、コレステロール合成の律速酵素は、ミクロソームのHMG-CoA reductase であるが、さまざまな条件において、この酵素活性の変化は、*in vivo*のコレステロール合成能とも、非常に相関しているとされている<sup>(87)</sup>。PCB<sup>(38)(82)</sup>やフェノバルビタール<sup>(84)(85)</sup>をラットに投与すると、肝HMG-CoA reductase 活性が上昇することは、すでに述べたとおりであるが、それ以

外の生体異物による肝 HMG-CoA reductase 活性の変動に関する報告は、極めて少ないものと思われる。また、過剰チロシンを与えたラットにおける HMG-CoA reductase 活性の変動についても報告されていない。そこで、in vivo のコレステロール合成とあわせて、HMG-CoA reductase 活性の PCB 以外の生体異物による変動と過剰チロシンによる変動とを比較検討した。さらに、コレステロールの生合成部位は、肝臓ばかりではなく、小腸でもある程度コレステロールは合成されている。Spady と Dietschy<sup>(88)</sup> は、いろいろな種の動物組織におけるコレステロール合成を、 $^3\text{H}_2\text{O}$  を用いて検討し、ラットでは、51% が肝臓、12% が小腸で合成されるとしている。以上のことより、小腸のコレステロール合成も検討するとともに、銅欠乏食を与えたラットに見られる高コレステロール血症では、肝臓から血中へのコレステロールの放出も促進されているという報告<sup>(89)</sup> もあるので、 $^3\text{H}_2\text{O}$  を用いて血液中のコ

レステロールへのとりこみもあわせて検討した。

第1章 生体異物及び過剰チロシンの $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した  
in vivoにおけるコレステロール合成能に対する  
影響

## 方法

実験動物として、初体重 90g 前後の Wistar 系雄ラットを用い、まず、1日絶食させつづいて、市販の固型飼料を3日間与えた。なお、水は自由摂取させた。1日絶食後から、明期 (A.M. 10:00 - P.M. 6:00) にのみ飼料を与える meal feeding を行った。なお、動物は meal feeding の条件に適応させるために、市販の固型飼料を3日間与えてから18日間は、20% カゼイン飼料を与えて、飼育した。その後、7日間 20% カゼインに 12% チロシン、0.1% DDT, 0.5% BHA, 0.3% クロロブタノール (クロレトン) をそれぞれ添加した食餌を実験食として与えた。実験食を与えて7日目の午後1時から、1頭あたり 0.25 ml 中に、 $1\text{mCi}$  の  $^3\text{H}_2\text{O}$  を腹腔内注射し、30分後、エーテル麻酔下でラットは、心臓採血により屠殺した。肝臓は、すばやく切除し、小腸 (回腸 + 空腸) は、すばやく切除した後、内容物を取り除いた。それぞれの組織を冷生理食塩水に

て洗淨し、水分を濾紙で除いた後、湿重量を測定し、アルミホイルで包んだ後、すばやく液体窒素で凍結し、分析まで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。保存後、肝臓2gに、2mlの15% KOH-エタノール溶液を加え、 $75^{\circ}\text{C}$ で2時間ケン化した。小腸は、全体約2gを同様に2mlの15% KOH-エタノール溶液を加えて、ケン化した。血清は、0.5mlを用い、0.5mlの15% KOH-エタノール溶液を加えて、ケン化した。ケン化後の試料は、基本的実験方法に述べた方法で、ジギトニン現殿性のステロールの3Hを測定した<sup>(90)</sup>。血清の全3H量は、血清の一部をとり、10倍に希釈したものを100 $\mu\text{l}$ にBrayのシンチレーターを加え測定した。血清コレステロールは、Siedel 5<sup>(91)</sup>の方法により、酵素法で測定した。(基本的実験方法参照)

## 結果 (Table 10, P. 79)

7日間の実験期間において、12%チロシン、0.3%クロロブタノール(クロレトン)、0.1%DDTを添加した飼料で飼育したラットでは、体重増加量には、対照群と比べて顕著な差は見られなかった。一方、0.5%BHAを添加した飼料を与えたラットでは、体重増加量は、わずかながらあるが対照群と比べて有意に低下した。食餌摂取量には、それぞれの生体異物あるいはチロシン添加群において、対照群と比べて顕著な差は認められなかった。対照群と比べて、肝重量、血清コレステロールの有意な上昇がDDT、クロロブタノール(クロレトン)、BHA、過剰チロシン群で共通して観察された。小腸重量には、対照群と比べて顕著な差は認められなかった。肝臓ジギトニン双殿性ステロール(DPS)への30分間の3Hの取り込みは、組織1gあたりでは、対照群と比べて、DDT、BHA、クロロブタノール(クロレトン)、過剰チロシン



群において顕著な差は認められなかったが、組織全体で表現すると、0.1% DDT, 12% クロシンを投与したラットにおいて、有意に上昇した。その他の生体異物についても同様に、上昇する傾向が観察された。小腸ジギトニン<sup>3</sup>H 次殿性ステロール (DPS) への30分間の<sup>3</sup>H の取り込みは、組織1g あたりで表示しても、組織全体で表示しても、対照群と比べて、DDT, クロロブタノール (クロレトン), BHA あるいは過剰クロシン群において、顕著な差は認められなかった。血清中のジギトニン<sup>3</sup>H 次殿性ステロール (DPS) への30分間の<sup>3</sup>H の取り込みは、対照群と比べて、DDT, BHA, クロロブタノール (クロレトン) あるいは過剰クロシンによって上昇する傾向が示されたが、有意差は認められなかった。

Table 10

*Effect of BHA, chlorobutanol (Chloretone), DDT or tyrosine on body, liver and intestinal weights and food intake, serum cholesterol and  $^3\text{H}_2\text{O}$  incorporation into hepatic, intestinal and serum cholesterol in rats (expt 2)<sup>1,2,3</sup>*

Measure	Diet				
	Control (20% casein)	BHA (0.5%)	Chlorobutanol (0.3%)	DDT (0.1%)	Tyrosine (12%)
Body wt gains, g/7 d	14.3 ± 1.6 <sup>b</sup>	9.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	13.0 ± 1.8 <sup>b</sup>	13.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	14.3 ± 1.0 <sup>b</sup>
Food intake, d 6, g/d	10.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	10.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
Liver wt, g/100 g BW	4.00 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.83 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.07 ± 0.06 <sup>c</sup>	5.05 ± 0.06 <sup>b</sup>
Intestinal wt, g/100 g BW	1.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.09 <sup>a</sup>
Serum cholesterol, mg/dl	88.7 ± 3.2 <sup>a</sup>	106.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	107.1 ± 4.5 <sup>b</sup>	131.3 ± 6.0 <sup>c</sup>	106.0 ± 2.2 <sup>b</sup>
<i><math>^3\text{H}_2\text{O}</math> incorporation into</i>					
<i>Hepatic cholesterol<sup>4</sup></i>					
Specific activity <sup>5</sup>	89.5 ± 11.8 <sup>a</sup>	115.5 ± 12.7 <sup>a</sup>	107.7 ± 9.9 <sup>a</sup>	131.5 ± 24.3 <sup>a</sup>	122.5 ± 11.6 <sup>a</sup>
Total dpm in liver cholesterol <sup>6</sup>	353.9 ± 39.6 <sup>a</sup>	570.3 ± 40.3 <sup>ab</sup>	525.4 ± 58.5 <sup>ab</sup>	817.1 ± 155.0 <sup>c</sup>	619.4 ± 61.7 <sup>b</sup>
<i>Intestinal cholesterol<sup>4</sup></i>					
Specific activity <sup>5</sup>	195.2 ± 17.8 <sup>a</sup>	183.7 ± 17.6 <sup>a</sup>	180.4 ± 8.1 <sup>a</sup>	175.3 ± 9.0 <sup>a</sup>	178.1 ± 18.5 <sup>a</sup>
Total dpm in intestinal cholesterol <sup>6</sup>	299.3 ± 25.8 <sup>a</sup>	294.9 ± 23.5 <sup>a</sup>	306.4 ± 10.3 <sup>a</sup>	283.0 ± 14.6 <sup>a</sup>	282.5 ± 16.6 <sup>a</sup>
Serum cholesterol, <sup>4</sup> dpm/ml	218.7 ± 21.8 <sup>a</sup>	234.3 ± 39.8 <sup>a</sup>	277.9 ± 53.9 <sup>a</sup>	248.1 ± 34.3 <sup>a</sup>	268.1 ± 61.9 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Day feeding (1000-1800) for 7 d. <sup>2</sup>Values are means ± SEM of seven rats per group. BW, body weight. <sup>3</sup>Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>4</sup>Measured as digitonin-precipitable sterols (DPS). <sup>5</sup>Specific activity = (dpm in cholesterol/g tissue) × (BW/100). <sup>6</sup>Total dpm in tissue cholesterol per 100 g BW = Specific activity × tissue weight × (100/BW).

第2章 生体異物及び過剰チロシンの肝臓 3-hydroxy  
3-methylglutaryl coenzyme  
A reductase 活性に対する影響

## 方法

1) 肝ミクロソームの調製<sup>(92)</sup>

実験動物として、初体重 90g 前後の Wistar 系雄ラットを用い、まず 1 日絶食させ、つづいて市販の固型飼料を 3 日間与えた。1 日絶食後から、明期 (A.M. 10:00 - P.M. 6:00) にのみ、飼料を与える meal feeding を行った。なお、動物は、meal feeding の条件に適応させるために、市販の固型飼料を 3 日間与えてから 18 日間は、20% カゼイン飼料を与えて、飼育した。その後、7 日間 20% カゼインに 12% クロシン、0.1% DDT、0.5% BHA、0.3% クロロブタノール (クロレトン) をそれぞれ添加した食餌を実験食として与えた。実験食を与えて 7 日目の午後 1 時から、エーテル麻酔下でラットは、心臓採血により屠殺した。直ちに、肝臓を切除し、冷生理食塩水にて洗浄し、肝臓の一部 (約 1.5g) に 4 倍容の 0.25M ショ糖、75mM ニコチンアミド、1mM DTT、2.5mM EDTA を含む、0.05M リン酸緩衝

液 (pH 7.0) を加え, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジエネートを,  $2^{\circ}\text{C}$   $12,500 \times g$  20分間遠心し, 得られた上清をさらに,  $2^{\circ}\text{C}$   $105,000 \times g$  60分間超遠心し, ミクロソームを調製し,  $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。

## 2) HMG-CoA の合成

DL-[3- $^{14}\text{C}$ ]HMG-anhydride は, Goldfarb と Pitot<sup>(93)</sup> の方法で合成し, それを Suzuki<sup>(94)</sup> の方法で [3- $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA に変換した。生成した DL-HMG-CoA の量は, Stegink と Coon<sup>(95)</sup> の方法で定量した。(基本的実験方法参照)

## 3) HMG-CoA reductase 活性の測定<sup>(92)</sup>

保存しておいた, ミクロソーム画分の酵素タンパクと DL-[3- $^{14}\text{C}$ ]HMG-CoA を NADPH の存在下で反応させ, 後処理で生成するメバロノラクトン中の放射エネルギーを定量することで, HMG-CoA reductase 活性を測定した。ミクロソームのコレステロール含有量は, Zlatkis と Zak<sup>(96)</sup> の方法で測定した。ミクロソームの

蛋白質は, Lowry <sup>(65)</sup> の方法で測定した。

(基本的実験方法参照)

## 結 果 ( Table 11 , P. 86 )

7日間の実験期間において, *in vivo* におけるコレステロール合成能を調べた実験と同様に, 0.5% BHA, 0.1% DDT, 0.3% クロロブタノール(クロレトン), 12% 4ロシンを飼料として与えたラットにおいて, 体重増加量は, BHA群のみ有意に低下した。食餌摂取量には, 対照群と比較して, BHA, DDT, クロロブタノール(クロレトン)あるいは, 過剰4ロシン群のいずれも, 顕著な変化は認められなかった。対照群と比べて, 肝重量, 血清コレステロールの有意な上昇が観察された。肝臓ミクロソームのコレステロール含量は, 0.3% クロロブタノール(クロレトン), 0.1% DDT を添加した飼料で飼育したラットで, 有意に上昇した。肝臓HMG-CoA reductase 活性は, 0.3% クロロブタノール(クロレトン)を添加した飼料で飼育したラットにおいて, mg 蛋白, 組織1gあたり, 肝全体のいずれで表示しても, 上昇する

傾向が見られるものの、有意差は認められなかったが、0.5% BHA, 0.1% DDT, 12% クロシンをそれぞれ添加した飼料で飼育したラットでは、肝臓 HMG-CoA reductase 活性は、mg 蛋白、組織 1g あたり、肝全体のいずれの表現をとっても、対照群と比べて、有意に上昇した。なお、 $^3\text{H}_2\text{O}$  を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能と肝 HMG-CoA reductase 活性の変動は、非常によく相関していることが示された。(Fig. 4, p. 87)

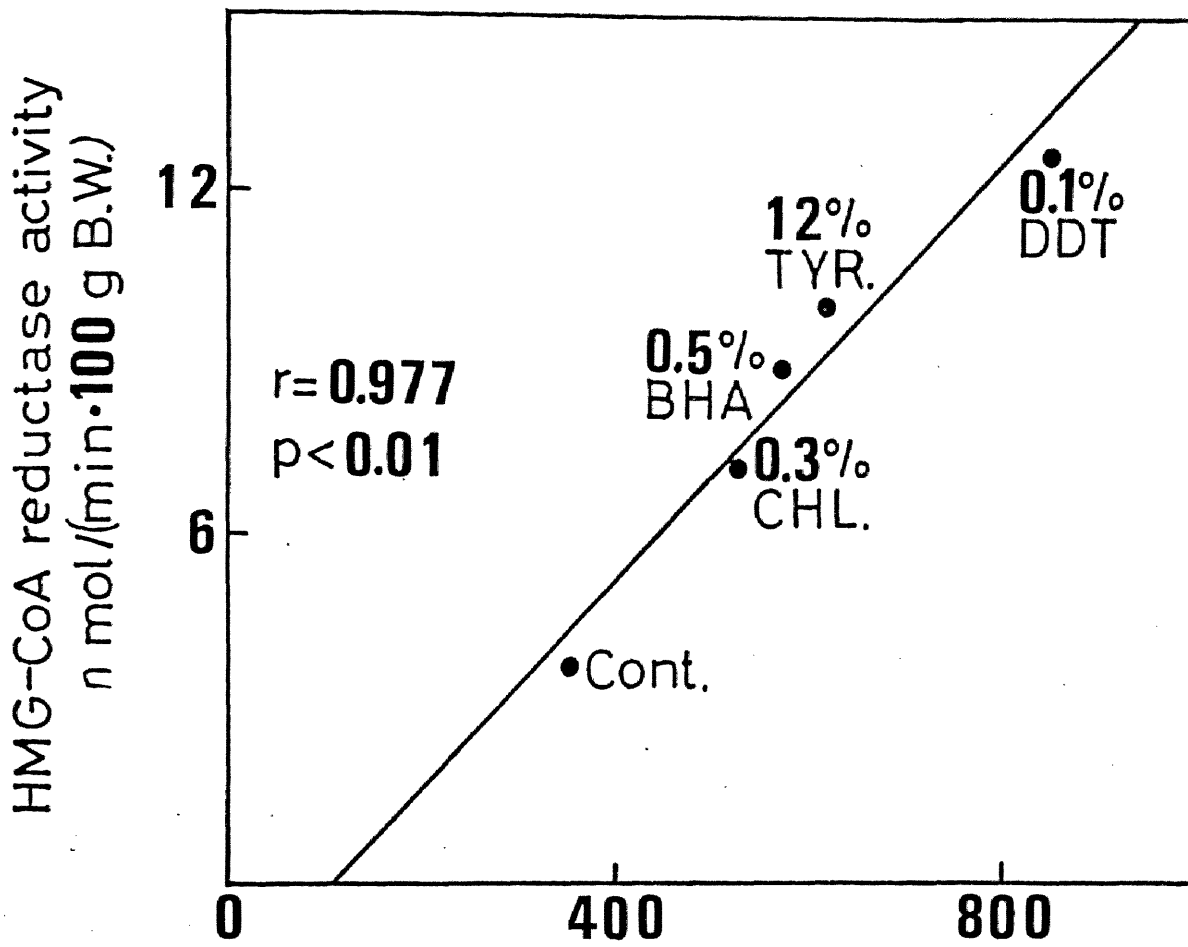


Table 11

*Effect of BHA, chlorobutanol, DDT or tyrosine on body and liver weights, food intake, microsomal and serum cholesterol, hepatic HMG-CoA reductase activities in rats (expt 3)<sup>1,2,3</sup>*

Measure	Diet				
	Control (20% casein)	BHA (0.5%)	Chlorobutanol (0.3%)	DDT (0.1%)	Tyrosine (12%)
Body wt gains, g/7 d	15.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	9.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.4 ± 1.6 <sup>b</sup>	15.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	16.4 ± 1.2 <sup>b</sup>
Food intake, d 6, g/d	10.3 ± 0.3 <sup>ab</sup>	8.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	10.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.7 <sup>ab</sup>	9.9 ± 0.6 <sup>ab</sup>
Liver wt, g/100 g BW	4.07 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.61 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.72 ± 0.10 <sup>b</sup>	6.29 ± 0.42 <sup>d</sup>	5.07 ± 0.12 <sup>c</sup>
Serum cholesterol, mg/dl	60.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	84.8 ± 4.2 <sup>b</sup>	95.4 ± 9.6 <sup>b</sup>	117.2 ± 8.6 <sup>c</sup>	94.3 ± 5.0 <sup>b</sup>
Liver microsomal cholesterol, µg/mg protein	36.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	37.0 ± 1.1 <sup>ab</sup>	39.1 ± 1.4 <sup>bc</sup>	40.5 ± 0.7 <sup>c</sup>	34.6 ± 0.6 <sup>a</sup>
Hepatic HMG-CoA reductase activity <sup>4</sup>					
pmol/(min · mg protein)	41.0 ± 4.3 <sup>a</sup>	73.4 ± 7.9 <sup>b</sup>	62.7 ± 17.7 <sup>ab</sup>	78.2 ± 10.7 <sup>b</sup>	83.6 ± 8.2 <sup>b</sup>
nmol/(min · g tissue)	1.02 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.37 <sup>ab</sup>	2.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.20 <sup>b</sup>
nmol/(min · 100 g BW)	3.73 ± 0.36 <sup>a</sup>	8.89 ± 1.87 <sup>bc</sup>	7.21 ± 1.71 <sup>ab</sup>	12.59 ± 1.70 <sup>c</sup>	9.96 ± 0.93 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup>Day feeding (1000–1800) for 7 d. <sup>2</sup>Values are means ± SEM of seven rats per group. BW, body weight. <sup>3</sup>Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). <sup>4</sup>Pico- or nanomoles of mevalonic acid produced.



The incorporation of  $^3\text{H}_2\text{O}$  into liver cholesterol dpm/100 g B.W.

Figure 4

Interrelationships between the incorporation of  $^3\text{H}_2\text{O}$  into liver cholesterol and HMG-CoA reductase activity in rats

## 考察

## 〔1〕実験方法について

今回、in vivo のコレステロール合成能を調べるために、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いたが、従来は、コレステロールへの取り込みを調べる場合、 $^{14}\text{C}$ で標識した酢酸等が使われることが多かった。しかし、Andersen と Dietschy<sup>(97)</sup> は、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いる方法が、他の前駆体による方法よりもかなりの利点を有しており、最も信頼性の高い方法であると報告している。さらに彼らは、 $^{14}\text{C}$ -酢酸を用いると、真の合成量に比べ、過小評価になりやすいとし、この理由として、次の3つの可能性を挙げている。①基質の細胞透過の段階が律速段階となる。②基質が、アセチル CoA に転換する段階が、律速段階となる。③基質または、基質からできるアセチル CoA の比活性が、細胞内のグルコースや脂肪酸に由来する内因性アセチル CoA によって希釈されて、小さくなる。このようなことから、今回の実験では、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いたわけであ

るが、 $^3\text{H}_2\text{O}$ の利点として、以下のことが挙げられている。①  $^3\text{H}_2\text{O}$ は、自由かつ、すみやかに細胞膜を透過するため、細胞内に存在する水の比活性は、すぐに細胞外の水の比活性と平衡化する。すなわち、 $^3\text{H}_2\text{O}$ の比放射能値は、細胞外の比放射能値と同じであると考えるよい。②  $^3\text{H}_2\text{O}$ は、 $^{14}\text{C}$ -酢酸などのように、それ以上、別の化合物に代謝される必要がない。③  $^3\text{H}$ は、直接に  $^3\text{H}_2\text{O}$ の形及び  $\text{NADPH}$ の  $\text{H}$ と平衡化して、コレステロール分子に取り込まれるので、アセチル  $\text{CoA}$ の“プールサイズ”をゆがめることがない。さらに、 $^3\text{H}$ がコレステロール中に取り込まれる率は、一定であり、アセチル  $\text{CoA}$ から、メバロン酸までに  $\text{NADPH}$ から10分子、メバロン酸からコレステロールまでに、 $\text{NADPH}$ から5分子、 $^3\text{H}_2\text{O}$ から直接に7分子取り込まれ、計22分子の  $\text{H}$ が  $^3\text{H}_2\text{O}$ 由来となることが報告されている<sup>(98)</sup>。以上の理由により、 $^3\text{H}_2\text{O}$ をコレステロール合成能測定のための、標識化合物として用いたわけである。

また、本研究では、給餌時間を午前10時から午後6時とした。コレステロール合成には、日周リズムがあることは、以前からよく知られている<sup>(99)</sup>。12時間の明暗交替下では、ラットの肝臓及び小腸のコレステロール合成は、暗期に上昇し、深夜に最高となり、明期に近づくにつれて下降する<sup>(100)</sup>。この暗期におけるコレステロール合成の上昇は、明暗よりもむしろ、摂食により制御されているということが、Edwards 5<sup>(101)</sup>によって報告されている。すなわち、ラットは夜行性の動物で、夜間摂食するが、Edwards 5は、明期に時間を制限して、食餌を与え、摂食によって、肝臓及び小腸のコレステロール合成が高まることを示した。これらの報告も参考の上、給餌時間を午前10時から午後6時として、コレステロール合成が最も高いと考えられる午後1時から解剖を行った。ラットは、解剖前1週間には、昼間のみの給餌に慣れ、給餌時間と共に、直ちに摂食を開始するようになった。

しかし、給餌時間が、自由摂取に比べて3分の1であるためか、体重増加量、食餌摂取量とも、やや少なくなるものの、血清コレステロールの上昇や肝肥大は、自由摂取の場合と全く同様に再現された。

## [2] 実験結果について

0.1% DDT, 0.3% クロロブタノール(クロレトン), 0.5% BHA, 12% チロシンを食餌として与えたラットにおける, *in vivo* のコレステロール合成能を $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて、測定したわけであるが、種々の生体異物及び過剰チロシンによって、組織1gあたりでは、有意な上昇は観察されないものの、肝全体で表現すると、0.1% DDT, 12% チロシンを添加したラットにおいて、有意に上昇し、また、0.5% BHA, 0.3% クロロブタノール(クロレトン)を添加して飼育したラットにおいても、上昇する傾向が認められた。これらのことは、高コレステロール血症生成時において、コレステロール合成促進は、肝肥大

と密接に関連しており、肝臓の肥大により、コレステロール合成の場が拡大され、コレステロール合成量が増加し、結果として、血清コレステロールが上昇することを示しているのかもしれない。その意味において、コレステロール合成促進時の肝肥大は、高コレステロール血症生成機構を考える上で重要な因子であろう。また、小腸のコレステロール合成能は、対照群とほぼ同様であった。血中のコレステロールへの $3H_2O$ の取り込みは、上昇する傾向を、種々の生体異物あるいは過剰チロシンで示しているが、銅欠乏時に生成される高コレステロール血症の場合<sup>(89)</sup>のように、肝臓で合成されたコレステロールは、すみやかに血中へ放出されているということも、あるいは高コレステロール血症の機構を考える上で、重要であるのかもしれない。

さらに、さまざまな生理的条件において、*in vivo* のコレステロール合成能と非常に相関していると言われる<sup>(87)</sup>、HMG-CoA reductase

活性を測定してみると、0.1% DDT, 0.5% BHA, 0.3% クロロブタノール(クロレトン), 12% チロシンを添加した飼料で飼育したラットにおいて、その活性は上昇した。

肝臓 HMG-CoA reductase 活性と、 $3H_2O$  を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能とは、非常によく相関していることが今回も示され、これは、Brown 氏<sup>(87)</sup>の報告と一致している。以上のことから、これが生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症は、主に肝臓におけるコレステロール合成促進により、引き起こされているものと思われ、この点においても、生体異物と過剰チロシンとの間に、共通性が認められた。さらに、コレステロールの合成促進は、ヒスチジン<sup>(79)(80)</sup> や シスチン<sup>(21)</sup> による高コレステロール血症においても観察されており、チロシンや生体異物との共通性という点で興味深い。

コレステロールの代謝は、さまざまな環境条件、ホルモンの変化、食餌条件などにより



変動することが報告されている。すなわち、生体異物<sup>(19)</sup>はもちろんのこと、ストレス<sup>(5)(102)</sup>、日内変動<sup>(99)</sup>などの環境条件の変化、インシュリン<sup>(103)</sup>、グルカゴン<sup>(104)</sup>、甲状腺ホルモン<sup>(105)</sup>、副腎皮質ホルモン<sup>(106)</sup>、カテコールアミン<sup>(43)</sup>などのホルモンの変化、食物繊維<sup>(107)</sup>、食餌脂肪<sup>(92)</sup>、絶食<sup>(102)</sup>、ビタミンC<sup>(23)</sup>などの食餌条件の変化や、喫煙<sup>(108)</sup>、運動<sup>(8)</sup>、X線<sup>(109)</sup>、また、高脂血症を合併する糖尿病<sup>(3)</sup>、甲状腺機能低下症<sup>(25)</sup>、Cushing症候群<sup>(110)</sup>など、非常に広範かつ多彩な要因により変動することが知られているわけである。

このような多種多様な要因によって変動するコレステロール代謝は、合目的性に従った巧妙な調節を受けている。コレステロール合成の律速段階がHMG-CoA reductase であることは、ほとんどすべての報告において、ほぼ例外なく認められるに至っている。したがって、コレステロールの代謝調節を考える上で、HMG CoA reductase の活性調節は、非常に重

要な位置を占めることになるわけである。

HMG-CoA reductase は、ミクロソームに存在する分子量 9,7000 の糖タンパクであるが<sup>(12)</sup>、この酵素活性は、次のような調節を受けることが知られている。すなわち、①転写レベルにおける、コレステロールやイソプレノイド生成物による負のフィードバック機構<sup>(111)</sup>。② HMG-CoA reductase mRNA 量の変化による、酵素蛋白の合成、分解の変化、そして、酵素蛋白の安定化<sup>(112)</sup>。③酵素-脂質の相互作用による触媒活性の調節<sup>(113)</sup>。④リン酸化-脱リン酸化による酵素活性の変化<sup>(114)</sup>。⑤SH化合物<sup>(115)</sup>、基質<sup>(116)</sup>などによる、膜の流動性やリン酸化による触媒活性の変化などである。

今回、DDTなどの生体異物も、PCBの場合と同様HMG-CoA reductase活性は、上昇したわけであるが、PCBによるHMG-CoA reductase活性の変化については、活性型、不活性型の比率すなわち、脱リン酸化型-リン酸化型の比率は一定のまま、酵素量が全体として

増加することが報告されている<sup>(117)</sup>。このことは、HMG-CoA reductase 活性の増減は、多くの場合、酵素タンパクの増減の結果として起こることと一致する<sup>(87)</sup>。また、Jenke<sup>(82)</sup>は、PCBを摂取したラットにおいて、HMG-CoA reductase 活性が上昇し、その mRNA レベルも上昇していることを報告している。これは、前述の②の調節に含まれると思われるが、PCBは、HMG-CoA reductase タンパクの合成の転写レベルに影響を及ぼしているわけである。このように考えると、今回実験で用いたチロシンやDDTなどの生体異物による活性上昇が、もし酵素タンパクの増加であるとすると、PCBの場合のように、HMG-CoA reductase の mRNA が上昇していることも考えられうる。しかしながら、PCBが、どのようなメカニズムを介して、mRNA 上昇をもたらしているのかについては、現在明らかではない。

一方、コレステロール生合成及び分解は、

前述のように、さまざまホルモンの調節を受けることも多数報告されており、このようなPCBなどの生体異物や過剰チロシンによる高コレステロール血症生成とさまざまホルモンの相互関係を考えることは、ごく当然のことであると思われるが、詳細については、(第4編)に譲ることとする。

次に、血中のリポタンパクの代謝と高コレステロール血症との関係について考えてみたい。哺乳動物の血清コレステロールは、脂質-タンパク質複合体(リポタンパク)として輸送されている。正常なヒトの血清リポタンパクは、密度が $1.21 \text{ g/ml}$ 以下の画分に存在し、それらは、トリグリセリド、リン脂質、エステル型コレステロール、遊離型コレステロールと数種類のタンパク質(アポタンパク)を含んでおり、化学組成や物理的性質を異にする数種類のリポタンパクに分類されているが、最も広範に用いられている分類は、リポタンパク粒子の密度によるものである。ヒトやラ

ットなどの血清には、カイロミクロン、超低密度リポタンパク (VLDL)、低密度リポタンパク (LDL) 及び高密度リポタンパク (HDL) などが存在する。しかし、各リポタンパク中のコレステロール含量などには、種差が認められ、成人の場合は、LDL画分に血中コレステロールのほぼ65%が存在するのと大きく異なり、<sup>(118)</sup> ラットでは、HDL画分に血中コレステロールの70%程度が存在することが知られている<sup>(134)</sup>。血中に存在する主要リポタンパクは、おおまかにTG rich リポタンパクとコレステロール rich リポタンパクに分けられる<sup>(119)(120)</sup>。(Fig. 12, P. 291) に示したが、TG rich リポタンパクは、その起源によつて主として、外因性または内因性TGの運搬体、すなわち、カイロミクロン(外因性TG)とVLDL(主として、内因性TG、一部外因性TG)とに分類される<sup>(119)(120)</sup>。カイロミクロンのリン脂質やタンパク質(アポB<sub>48</sub>, A-I, A-II)は主として、小腸で合成さ

れるが、コレステロールは、小腸粘膜細胞内で合成されたものと、食事や胆汁起源のものに由来する。肝で合成されるVLDLは、アポB<sub>100</sub>、B<sub>48</sub>およびEを主として含む。VLDLやカイロミクロンは、循環系で、毛細血管内皮細胞の細胞膜上に存在する lipoprotein lipase の作用を受け、トリグリセリドの3分の2を失う<sup>(119)(120)</sup>。この過程において、同時に表層成分もかなり除かれ、トリグリセリドに富む粒子は、元の密度がIDLと等しいレムナントへ変換され、さらに、カイロミクロンやVLDLの脂質やアポタンパクは、HDLの形成にも利用される<sup>(119)(120)</sup>。一方、肝臓や小腸などが、LDLを直接分泌するという証拠はないので、血中のLDLは、大部分は、VLDLの異化の過程で生成すると考えられている<sup>(119)(120)</sup>。肝臓<sup>(121)</sup>、繊維芽細胞<sup>(122)</sup>など多くの組織は、LDLを異化するLDL-レセプターを有しており、そのうち肝臓は、LDLの40~50%を異化すると報告されており<sup>(123)</sup>、LDL

の異化に関して重要な位置を占める。LDL-レセプターは、分子量164,000の酸性タンパク質である<sup>(2)</sup>。細胞あたりのLDL-レセプター数は、その細胞のコレステロールの必要性、食事、ホルモンなどの影響を受けることが知られている<sup>(119)</sup>。細胞表面のレセプターにLDLが結合すると、LDLを結合した部分の細胞膜は陥入して、LDLは細胞に取り込まれるが、その部分は、細胞膜から離れ *endocytic vesicle* となる。この過程は、*receptor-mediated endocytosis* と呼ばれ、この *endocytic vesicle* は、LDLをリソゾームに渡し、最終的に、LDLはリソゾームで分解される<sup>(122)</sup>。リソゾーム内のLDLから生成したコレステロールは、もちろん、細胞の増殖、保持や胆汁酸生成などに使われるわけであるが、余剰のコレステロールは、転写レベルにおいて、HMG-CoA reductase 蛋白の合成を抑制するばかりではなく<sup>(122)</sup>、コレステロールをエステル化する酵素 ACAT を活性化することにより、コレス

ロールエステルとして、細胞内に蓄積される<sup>(122)</sup>。また、レセプターの mRNA レベルを低下させることにより、LDL-レセプターの合成も低下させる<sup>(122)</sup>。後者の作用は、細胞がコレステロールの過剰蓄積を引き起こすことなく、代謝的に必要十分なコレステロールを供給するために、LDL-レセプター数を調節していることを意味する。

血清 HDL の起源は、少なくとも3種類ある。すなわち、肝臓と小腸の実質細胞から分泌される円板状の粒子（新生 HDL）や、小腸の上皮細胞から分泌される球型粒子およびトリグリセリドに富む粒子の表層成分などが前駆体となり生成されると考えられている<sup>(119)</sup><sup>(120)</sup>。

HDL は、*in vivo* では、組織からコレステロールを受けとったり、分解処理あるいは、再利用のために末梢組織から肝臓へコレステロールを転送する役割などを担っていると考えられている<sup>(127)</sup>。HDL の分解の場としての肝臓の重要性は、Eisenberg の<sup>(128)</sup>により、



$^{125}\text{I}$ でラベルしたラットHDLなどをラットに静注後、各臓器の放射活性を検索し、すべてのリポタンパクに関して、肝における放射活性は他の臓器に比べて5~15倍高いことが示されていることや Glass *ら*<sup>(129)</sup>も同様の結果を得ていることなどが、強調されている。HDLに対する高い親和性を持った結合部位、すなわち、HDL-レセプターは、肝臓<sup>(130)</sup>、繊維芽細胞<sup>(131)</sup>など、多くの組織で報告されている。前述のLDL-レセプターに比べるとHDL-レセプターによるHDLの異化機構の詳細は、不明な点も多いが、肝臓のHDLに対する高い親和性を有したレセプターによるHDLの異化過程は、LDL-レセプターによるLDLの異化過程とは、性質が異なっていることが示されている。すなわち、最近の研究において、Glass *ら*<sup>(133)</sup>は、肝培養細胞を用いて、コレステロールエステルの取り込みが、アポA-Iのそれよりも数倍高いことを示している。このことは、肝臓へのLDLな

どの取り込みが, intactな粒子として組織に取り込まれ, 続いてリソゾームで分解される知見と対照的である。このことから, 肝臓でHDLが, 取り込まれる前に先立って, 細胞表層でHDL粒子に部分的な変化が起こっているとも考えられており, Arbeeny<sup>(132)</sup>も, 環流肝を用いて, Glass<sup>(133)</sup>と類似した成績を得ている。いずれにしても, 肝臓がHDLの異化にとって重要な位置を占めることには, 異論はないものと思われる。またラットの場合, 血中コレステロールの70%程度がHDL画分にあるため, この意味でも, 我々は, HDLコレステロールも上昇するPCBなどの高コレステロール血症生成時における, HDLの異化の重要性を認識せねばならないと思われる。

以上, 特にリポタンパクレセプターなどによるコレステロールの代謝調節機構について, 説明してきたが, このような家族性高コレステロール血症誘導機構解明の研究<sup>(2)</sup>に端を発し,

その後得られた知見を利用して、最近、さまざまの条件下で生成される高コレステロール血症などのコレステロール代謝変動をリポタンパクレセプターとの関係から説明しようとする試みが行なわれている。たとえば、①高コレステロール食による高コレステロール血症に対する研究<sup>(2)</sup>。②カゼインや大豆タンパクなどのタンパク質の違いによるコレステロール代謝の変化<sup>(124)</sup>。③アスコルビン酸によるレセプター活性の変化<sup>(125)</sup>。④肝ガンによるレセプター調節の変化<sup>(126)</sup>。⑤銅欠乏による高コレステロール血症生成機序に関するもの<sup>(24)</sup>。などが報告されている。これらの報告の多くは、リポタンパクレセプターへのリポタンパクの結合量や結合の親和性の変化により、リポタンパクの異化の促進や低下がおこるといふ考え方であるが、それでは、PCBの場合はどうであろうか。

これまでも、述べてきたように、PCBやDDTなどの生体異物は、たしかに、肝のコレ

レステロール合成が促進されることは、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能の増加やコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性の上昇などから明らかであるが、はたして、肝コレステロール合成促進という原因のみで、この高コレステロール血症は説明できるのだろうか。① Jenke<sup>(82)</sup> は、PCB による HMG-CoA reductase 活性の上昇は、摂取9日目で最大となるが、42日目では対照群とほぼ同様の値を示すことを報告している。さらに、HMG-CoA reductase mRNA は、PCB による酵素活性の変動と同じ挙動を示し、PCB 摂取後42日目では、もはや mRNA レベルの上昇は観察されたいにもかかわらず、血清コレステロールは、42日目まで依然として上昇しつづけていることを観察している。②大豆タンパク質に PCB を添加した実験において、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能と肝 HMG-CoA reductase 活性

がともに上昇しない場合にも、高コレステロール血症が生成されることも観察されている（奥村・吉田未発表）。以上のようなことから、PCBによる高コレステロール血症は、合成促進のみでは、説明できないようにも思われる。今回の実験において、第3編でも述べるように、コレステロールの分解系についても検討したが、PCBによって、胆汁酸生成の律速酵素である cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は、組織あたりでは低下し、胆汁中の胆汁酸及び糞中への胆汁酸排泄は、減少する傾向が示された。また、中性ステロイドの糞中排泄は、上昇する傾向が観察された。このことから、総合的に考察すると、PCBによる高コレステロール血症生成時において、コレステロール異化には、顕著な変化は認められないことが示唆された（第3編参照）

これらのことから、PCBによる高コレステロール血症は、コレステロール合成に顕著な変化が見られないような状況においても、

長期継続されていることを理解するためには、  
RIを用いた体全体のコレステロールバラン  
スなどの検討が必要であると思うが、PCB  
により、糞中胆汁酸や中性ステロイド排泄が、  
低下するというようなコレステロール分解系  
の低下が顕著になるか、あるいはPCBの場  
合にも、血中リポタンパクの異化が抑制され  
るという可能性を考えることが必要であるか  
もしれない。もちろん、コレステロールの合  
成、胆汁酸や中性ステロイド排泄、血中リポ  
タンパクの異化などの変化が、PCBやチロ  
シンによる高コレステロール血症の場合にも、  
相互に複雑に関連し生成されているのかもし  
れないが、実際、ラットにおいて、銅欠乏に  
よって誘導される高コレステロール血症では、  
リポタンパクレセプターによるHDLの異化  
の低下が推察されており<sup>(24)</sup>、これがHDL-  
コレステロールを上昇させるタイプの高コレ  
ステロール血症についての研究ということ、  
HDL及びLDL+VLDL-コレステロ-

ルの上昇するPCBやチロシンと共通した面を有しているので、紹介し考察することとする。前述のごとく、HDLの分解も主に、リポタンパクレセプターによって行なわれ、特に肝臓におけるHDLの異化が重要であることが示されている。事実、リポタンパクの結合実験において、Lefevre<sup>5</sup>により、リポタンパクの結合がアポEに媒介されない、HDL-レセプターが同定されており<sup>(24)</sup>、結局、銅欠食で飼育したラットでは、肝臓でのHDLのリポタンパクレセプターへの結合の低下と、それにともなうHDL異化の低下が、HDL-コレステロールの増加をなわち、高コレステロール血症を誘導すると考えられている。リポタンパク組成や代謝には、種差がかなり認められている<sup>(2)(118)(120)</sup>が、このラットによる銅欠食の場合のような、HDL-コレステロールの上昇するタイプの高コレステロール血症に関する研究で得られた知見は、我々が、ラットで実験を、行っているということのみな

らず、過剰チロシンやPCBの場合もHDLコレステロールの上昇が観察されるという点でも共通しており、高コレステロール血症誘導機構を考える上で、重要であると思われる。



第3編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症  
生成時におけるコレステロール分解系の変動

## 目的

PCBやDDTなどの生体異物や過剰チロシンを与えたラットにおいて、高コレステロール血症が生成され、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した肝コレステロール合成能やコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA reductase活性が上昇することは、すでに述べたが、これでは、高コレステロール血症生成時において、コレステロール分解系は、どのように変動しているのであろうか。

胆汁酸は、最も代表的なコレステロール代謝物である。胆汁酸は、脂溶性成分の消化吸収に必要な成分であるが、一般的には、胆汁酸の合成は、体内からのコレステロールの除去と関連している。ラットでは、体内代謝性コレステロールの80~90%が肝臓で胆汁酸に転換される<sup>(134)</sup>。このことから、胆汁酸生合成能は、体内コレステロールの過剰蓄積の防止と深いかかわりを持っていると考えられている。実際、コレステロール分解系が抑制され

たために、高コレステロール血症が生成するケースが、ある種の家族性高コレステロール血症<sup>(135)(136)</sup>や甲状腺機能低下症<sup>(25)</sup>、糖尿病<sup>(137)</sup>などで、報告されている。したがって、高コレステロール血症生成機構を考える上で、コレステロール分解系を検討することは、非常に重要であると思われる。

さらに、コレステロールの $\alpha$ -水酸化すなわち、胆汁酸生成の律速段階の反応は、ある種の薬物の代謝のように、cytochrome P-450 とそれに関連した電子伝達系により行なわれる<sup>(138)</sup>。それゆえ、コレステロールと薬物代謝間の相互関係に関する研究が、この反応とその調節機構について、興味深い知見を与えるかもしれない。実際、肝小胞体の肥大と cytochrome P-450 の上昇を誘導するのに十分なレベルのフェノバルビタールの投与は、人間<sup>(139)</sup>、サル<sup>(140)</sup>、ハムスター<sup>(84)</sup>において、胆汁酸生成を増加させることが報告されている。cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性は、この生体異物の1つであ

るフェノバルビタール処理後、ハムスターの肝ミクロソームでは上昇した<sup>(84)</sup>が、ラットにおける cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性に対する、フェノバルビタールの影響に関しては、一致した見解が得られていない<sup>(141)(142)</sup>。このように、フェノバルビタールだけについては、若干の cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性に対する影響に関する報告があるものの、フェノバルビタール以外の生体異物の cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性に対する影響となると、さらに限られた知見しか得られていないのが現状である<sup>(143)(144)</sup>。

一方、PCBを含めて多くの生体異物は、胆汁中に排泄されることが示されている<sup>(145)</sup>。また、Williamsら<sup>(146)</sup>は、薬物の胆汁中への排泄についての、種々の検討から、動物の種類や薬物の構造により、その排泄量にかなり差があることを明らかにしている。これらの報告は、生体異物の分解排泄を考える上でも、胆汁排泄なども重要であることを示している。

また、フェノバルビタールは、胆汁酸のみ

ならず、胆汁生成を上昇させることも知られており<sup>(14)</sup>、この点でも、PCBなどの生体異物や過剰キノシン摂取が胆汁生成を上昇させるのかどうか、興味深い。

以上のことから、PCBや過剰キノシンによる高コレステロール血症生成時における、胆汁及び胆汁酸などの分泌、排泄、中性ステロイド排泄、胆汁酸生成の律速酵素である、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の変動などについて検討することを目的とした。

第1章 生体異物の肝臓cholesterol 7 $\alpha$   
-hydroxylase活性に対する影響

## 方法

1) 肝ミクロソームの調製<sup>(148)</sup>

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いた。市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験食は、20%カゼインに、0.03% PCB を添加したものをを用いた。なお、水及び飼料は自由摂取させた。14日間飼育後、エーテル麻酔下でラットは、A.M. 9:00 から心臓採血により屠殺した。直ちに、肝臓を除去し、冷0.25M ショ糖液にて、洗浄し、肝臓の一部(約1g)に、4倍容の30mM ニコチンアミド、1.0mM EDTA を含む0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4) を加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで、ホモジナイズした。ホモジエネートを、2°C 12,500 × g 20分間遠心し、得られた上清をさらに、2°C 105,000 × g 60分間超遠心し、ミクロソームを調製し、-80°C にて凍結保存した。

2) cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性の測定<sup>(148)(149)</sup>

基本的に、保存しておいた、マイクロソーム画分の酵素タンパクと  $7\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-cholesterol を NADPH の存在下で反応させ、生成する  $^3\text{H}_2\text{O}$  の放射エネルギーを測定することで、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性を求めた。(基本的実験方法参照)



## 結 果 (Table 12, P. 119)

14日間の実験期間において、0.03% PCB 添加群で、体重増加量、食餌摂取量とも、対照群と比べて、顕著な差は見られなかった。

PCB 群で、対照群と比べて、肝重量の有意な上昇が観察された。肝臓 cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は、組織1gあたりで表示すると、PCB 群で、対照群と比べて有意な減少が観察されるものの、肝臓全体で表現すると、対照群とほぼ同様の値であった。

Table 12

Effect of dietary PCB on body and liver weights, food intake, serum cholesterol and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in rats.<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet	
	Control (20% casein)	0.03% PCB
Body weight gains, g/14 days	64.2 $\pm$ 1.6	70.8 $\pm$ 5.6
Liver weight, g/100g B.W.	5.17 $\pm$ 0.11	7.94 $\pm$ 0.13 <sup>***</sup>
Food intake, day 6, g/day	14.4 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 1.2
Cholesterol 7 $\alpha$ - hydroxylase		
activity <sup>4</sup> /g liver	35.2 $\pm$ 1.7	22.6 $\pm$ 4.6 <sup>*</sup>
activity <sup>4</sup> / 100g B.W.	156.2 $\pm$ 7.8	166.5 $\pm$ 26.6

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means $\pm$ SEM of eight rats per group.

3. Statistical significance compared with control group. (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

4. n moles of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol produced per hour.

第2章 生体異物及び過剰チロシンの胆汁中胆汁酸及びコレステ  
ロールに対する影響

## 方法

[A]飼料を自由摂取 (*ad libitum*) した場合の実験

実験動物として、初体重 250~300g 前後の、Wistar 系雄ラットを用い、飼料及び水は、自由摂取させた。まず、市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。20%カゼインに12%チロシンまたは、0.03%PCBを添加し実験飼料とした。飼育期間は、14日間とした。

[B]飼料を *meal feeding* した場合の実験

実験動物として、初体重 250~300g 前後の、Wistar 系雄ラットを用い、まず1日絶食させ、つづいて市販の固型飼料を3日間与えた。1日絶食後から明期 (A.M. 10:00 ~ P.M. 6:00) にのみ飼料を与える *meal feeding* を行った。なお、水は自由摂取させた。動物は、*meal feeding* の条件に適応させるために、市販の固型飼料を3日間与えてから18日間は、20%カゼイン飼料を与えて飼育した。その後、14日間、20%カゼインに0.03%PCBを添加した飼料を

実験食として与えた。

実験[A][B]ともに、実験食を与えて、14日目の午後1時から、ネンブタール( $50\text{mg}/\text{kg B.W.}$ )を腹腔注射し、麻酔した。麻酔下で開腹し、手術により胆管にカニユーレを施した。カニユーレから胆汁を1時間集め、その後、心臓採血により屠殺した。胆汁は容量を測定し、分析まで $-20^\circ\text{C}$ で保存した。なお、[A]の場合は、条件をそろえるために、解剖当日午前9時に食餌を抜いた。[B]の場合は、解剖当日も meal feeding を継続した。胆汁中総胆汁酸は、Koss & <sup>(150)</sup>の方法により酵素法で分析した。また、胆汁中の胆汁酸組成は、Okuyama & <sup>(151)</sup>の方法により、NADHの生成量より胆汁酸を分画定量する固定化 $\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenase-HP LC法で測定した。胆汁及び血清のコレステロールは、酵素法<sup>(91)</sup>により測定した。  
(基本的実験方法参照)

## 結 果

14日間の実験期間において、[A][B]の実験結果をあわせて述べることにする。12%チロシン、0.03%PCBを添加した飼料を自由摂取させたラット及び0.03%PCBを含んだ飼料をmeal feedingで与えたラットでは、体重増加量、食餌摂取量とも、対照群と比べて、顕著な差はみられなかった。対照群と比べて、肝重量及び血清コレステロールの有意な上昇が自由摂取したPCB群、チロシン群、meal feedingしたPCB群で、いずれも観察された。(Table 13,16; P. 130,133)

胆汁流量は、自由摂取した実験において、PCB群、チロシン群ともに、対照群と比べて有意に上昇した。胆汁中総胆汁酸濃度は、自由摂取した場合、0.03%PCB群で対照群に比べて有意に低下し、12%チロシン群では顕著な変化は見られないが、胆汁流量と胆汁中総胆汁酸濃度との積で表現される胆汁中総胆汁酸分泌量は、0.03%PCB群で低下する

傾向が示されたが、有意差は見られず、チロシン群では、対照群に比べて有意な上昇が観察された (Table 13, p. 130)。以上のような PCB による胆汁流量、胆汁中総胆汁酸濃度及び分泌量など自由摂取の場合に観察された傾向は、meal feeding した PCB 群でも、胆汁中胆汁酸濃度が meal feeding の方が高いことを除いて、ほぼ同様に再現された (Table 16, p. 133)。胆汁中のコレステロール濃度は、自由摂取した場合には、PCB 群及びチロシン群とも、対照群に比べて有意に低下した。しかし、胆汁流量と胆汁中コレステロール濃度の積で表わされる、胆汁中コレステロール分泌量は、0.03% PCB を含んだ飼料で飼育したラットでは、対照群と比べて有意に減少し、12% チロシンを添加した飼料を与えたラットでは、対照群とほぼ同様の値を示した。このような PCB による胆汁中コレステロール濃度及び分泌量など自由摂取の場合に観察された傾向は、meal feeding した PCB 群でも、

胆汁中コレステロール濃度が meal feeding の方が高いことを除いて、ほぼ同様に再現された (Table 13, 16 ; p. 130, 136)。

次に、胆汁中の胆汁酸組成を HPLC で分析した結果であるが、ラット胆汁の典型的な胆汁酸組成分析の結果が、(Fig. 5, p. 137) に示されている。まず [A] の自由摂取した場合についてであるが、(Table 14, 15 ; p. 131, 132) 同定された胆汁酸は、TU DCA (タウロウルソデオキシコール酸)、GCA (グリココール酸)、TCA (タウロコール酸)、GDCA (グリコデオキシコール酸)、TDCA (タウロデオキシコール酸)、GCDCA (グリコケノデオキシコール酸)、TCDCA (タウロケノデオキシコール酸)、TLCA (タウロリソコール酸) である。胆汁中の二次胆汁酸である 7-ケトリソコール酸から生成される TU DCA 濃度は、0.03% PCB 及び 12% ケロシン添加群において、顕著な変化は見られないうが、TU DCA 分泌量は、両群と



も対照群に比べて上昇する傾向を示したが、有意差は認められなかった。一次胆汁酸のGCA濃度は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群でも低下する傾向を示したが、有意差は認められなかった。GCA分泌量は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群では、対照群とほぼ同様の値を示した。一次胆汁酸のTCA濃度は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群では対照群に比べて有意に上昇した。TCA分泌量は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群では対照群と比べて有意に上昇した。さらに、TCAは、同定された胆汁酸の中で量的に最大値を示した。二次胆汁酸GDCA濃度は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群でも低下する傾向が示されたが、有意差は認められなかった。GDCA分泌量は、PCB群で対照群と比べて有意に低下し、チロシン群では、対照群との間に顕著な差は認められなかった。

二次胆汁酸 T D C A 濃度は, P C B 群で対照群と比べて著減した。一方, チロシン群では, 対照群とほぼ同様の値を示した。T D C A 分泌量は, P C B 群で対照群と比べて顕著に低下したが, チロシン群では対照群に比べて有意な上昇が認められた。一次胆汁酸 G C D C A 濃度は, 対照群と比べて, チロシン群では有意な低下が見られ, P C B 群ではさらに顕著に低下した。G C D C A 分泌量は, P C B 群で対照群と比べて有意に低下し, チロシン群では対照群とほぼ同様の値を示した。一次胆汁酸 T C D C A 濃度は, 対照群と比べて, P C B 群, チロシン群ともに低下する傾向を示したが, 有意差は認められなかった。T C D C A 分泌量は, 対照群と比べて, P C B 群, チロシン群ともに上昇する傾向を示したが, 有意差は認められなかった。二次胆汁酸の T L C A 濃度は, 対照群と比べて, P C B 群, チロシン群ともに低下し, チロシン群では有意差が認められた。一方, 分泌量で表現する

と、対照群に比べて両群とも低下する傾向はあるものの、有意差は認められなかった。全体的に見ると、チロシンによる総胆汁酸分泌量の増加は、TCA, TDC A画分の増加として表わされた。一方、PCBは、分泌量においては、TSCA, TCDCA, TUDCA以外のすべての画分で対照群に比べて、有意な低下が観察された。また、同定された胆汁酸の中で、一次胆汁酸の方が二次胆汁酸よりも、濃度・分泌量とも明らかに多いことが示された。

また、胆汁酸のGCA/TCA比は、PCB群では顕著な変化はなく、対照群よりも、チロシン群では有意に低下した。GDCA/TDC A比は、チロシン群では顕著な変化はなく、対照群よりもPCB群では有意に上昇した。(Table 19, p. 136)

さらに、[B] meal feeding した場合の胆汁酸組成に対する影響についてであるが (Table 17, 18; p. 134, 135), TUDCA濃度及び分泌量の有意

な上昇がP C B群で、対照群に比べて観察された以外は、自由摂取の場合とほぼ同様の傾向が再現されているが、meal feedingの方が、自由摂取の条件よりも、総胆汁酸濃度が上昇していることから、それを反映して、HPLCで分離定量した、すべての個々の胆汁酸濃度及び分泌量ともに、meal feedingの場合の方が、自由摂取の場合よりも上昇が観察された。

Table 13

Effect of PCB or excess tyrosine on body and liver weights and food intake, serum cholesterol and biliary steroids in rats.<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet		
	Control(20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
Body weight gains, g/14 day	17.3±1.1 <sup>a</sup>	16.3±1.2 <sup>a</sup>	13.5±1.7 <sup>a</sup>
Food intake, day 6, g/day	15.7±0.4 <sup>a</sup>	14.0±0.4 <sup>a</sup>	13.8±0.6 <sup>a</sup>
Liver weight, g/100g B.W.	3.46±0.06 <sup>a</sup>	4.67±0.09 <sup>c</sup>	3.80±0.09 <sup>b</sup>
Serum cholesterol, mg/dl	107.1±1.8 <sup>a</sup>	150.7±4.4 <sup>b</sup>	138.4±4.3 <sup>b</sup>
Bile flow, ml/hr	0.57±0.03 <sup>a</sup>	0.80±0.05 <sup>b</sup>	0.83±0.04 <sup>b</sup>
Biliary cholesterol			
concentration, mg/dl	10.94±0.66 <sup>b</sup>	4.65±0.59 <sup>a</sup>	7.18±0.72 <sup>a</sup>
output, µg/hr/100g B.W.	20.53±1.36 <sup>b</sup>	11.62±0.87 <sup>a</sup>	19.60±1.50 <sup>b</sup>
Biliary bile acid			
concentration, µ moles/ml	20.80±1.07 <sup>b</sup>	14.20±1.04 <sup>a</sup>	21.90±1.24 <sup>b</sup>
output, µ moles/hr/100g B.W.	3.91±0.19 <sup>a</sup>	3.65±0.12 <sup>a</sup>	6.06±0.29 <sup>b</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means ± SEM of eleven rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different. (p < 0.05)

Table 14

Effect of PCB or excess tyrosine on biliary bile acid composition in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet		
	Control (20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
<b>TUDCA</b>			
concentration, n moles /ml	251.2±18.1 <sup>a</sup>	240.6±22.7 <sup>a</sup>	220.3±22.7 <sup>a</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	47.4±3.6 <sup>a</sup>	61.7±4.1 <sup>a</sup>	60.4±4.9 <sup>a</sup>
<b>GCA</b>			
concentration, n moles/ml	193.3±26.1 <sup>b</sup>	73.7±15.0 <sup>a</sup>	128.8±17.1 <sup>ab</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	36.3±5.2 <sup>b</sup>	18.3±2.6 <sup>a</sup>	35.9±4.7 <sup>b</sup>
<b>TCA</b>			
concentration, $\mu$ moles/ml	7.0±0.5 <sup>b</sup>	2.3±0.2 <sup>a</sup>	8.3±0.4 <sup>c</sup>
output, $\mu$ moles/hr/100g B.W.	1.3±0.2 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>a</sup>	2.3±0.2 <sup>c</sup>
<b>GCDCA</b>			
concentration, n moles/ml	66.0±9.4 <sup>c</sup>	21.0±3.0 <sup>a</sup>	47.0±6.3 <sup>b</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	12.9±2.0 <sup>b</sup>	4.5±0.1 <sup>a</sup>	12.8±1.4 <sup>b</sup>
<b>TCDCA</b>			
concentration, n moles/ml	420.5±29.1 <sup>a</sup>	329.0±24.3 <sup>a</sup>	322.9±35.3 <sup>a</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	79.9±6.6 <sup>a</sup>	85.4±4.6 <sup>a</sup>	88.6±8.0 <sup>a</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means±SEM of eleven rats per group.

3. Means within the same horizontal column that do not share a common superscript letter were significantly different.

( $p < 0.05$ )

Table 15

Effect of PCB or excess tyrosine on biliary bile acid composition in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet		
	Control (20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
<b>GDCA</b>			
concentration, n moles/ml	50.6±6.7 <sup>b</sup>	16.2±2.8 <sup>a</sup>	39.9±6.3 <sup>b</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	9.9±1.4 <sup>b</sup>	4.0±0.6 <sup>a</sup>	10.9±1.6 <sup>b</sup>
<b>TDCA</b>			
concentration, n moles/ml	816.3±136.0 <sup>b</sup>	129.0±17.0 <sup>a</sup>	803.0±113.7 <sup>b</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	156.4±27.0 <sup>b</sup>	32.4±3.1 <sup>a</sup>	218.6±29.0 <sup>c</sup>
<b>TLCA</b>			
concentration, n moles/ml	28.9±7.2 <sup>b</sup>	14.3±2.4 <sup>ab</sup>	12.9±2.5 <sup>a</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	5.5±1.5 <sup>a</sup>	3.7±0.7 <sup>a</sup>	3.5±0.6 <sup>a</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means±SEM of eleven rats per group.

3. Means within the same horizontal column that do not share a common superscript letter were significantly different.  
(p < 0.05)

Table 16

Effect of dietary PCB on body and liver weights and food intake, serum cholesterol and biliary steroids in rats.<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet	
	Control (20% casein)	0.03% PCB
Body weight gains, g/14 days	8.9±2.2	9.5±1.2
Food intake, day 6, g/day	11.2±0.6	12.0±1.2
Liver weight, g/100g B.W.	3.11±0.07	4.65±0.06 <sup>***</sup>
Serum cholesterol, mg/dl	118.4±4.7	173.8±8.6 <sup>***</sup>
Bile flow, ml/hr	0.50±0.02	0.72±0.08 <sup>*</sup>
Biliary cholesterol		
concentration, mg/dl	15.27±0.35	9.71±0.79 <sup>***</sup>
output, µg/hr/100g B.W.	29.92±0.77	23.58±2.44 <sup>*</sup>
Biliary bile acid		
concentration, µ moles/ml	41.03±1.32	29.22±3.11 <sup>***</sup>
output, µ moles/hr/100g B.W.	8.07±0.45	7.64±0.63

1. Day feeding (1000-1800) for 14 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.
3. Statistical significance compared with control group. (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)



Table 17

Effect of dietary PCB on biliary bile acid composition in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet	
	Control(20% casein)	0.03% PCB
TUDCA		
concentration, n moles/ml	558.2±25.5	863.0±84.8 <sup>***</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	110.0±6.3	228.5±21.5 <sup>***</sup>
GCA		
concentration, n moles/ml	549.0±26.0	314.3±64.5 <sup>**</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	108.1±6.3	88.4±23.7
TCA		
concentration, $\mu$ moles/ml	13.2±0.5	4.5±0.6 <sup>***</sup>
output, $\mu$ moles/hr/100g B.W.	2.6±0.1	1.2±0.1 <sup>***</sup>
GCDCA		
concentration, nmoles/ml	98.1±4.8	67.3±7.7 <sup>**</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	19.4±1.3	35.8±17.4
TCDCA		
concentration, $\mu$ moles/ml	2.4±0.1	2.0±0.2
output, $\mu$ moles/hr/100g B.W.	0.5±0.02	0.7±0.1

1. Day feeding (1000-1800) for 14 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.
3. Statistical significance compared with control group. (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

Table 18

Effect of dietary PCB on biliary bile acid composition in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet	
	Control(20% casein)	0.03% PCB
GDCA		
concentration, n moles/ml	119.7±11.5	30.9±3.2 <sup>***</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	23.4±1.2	8.9±1.4 <sup>***</sup>
TDCA		
concentration, μ moles/ml	2.17±0.23	0.31±0.03 <sup>***</sup>
output, μ moles/hr/100g B.W.	0.43±0.04	0.08±0.01 <sup>***</sup>
TLCA		
concentration, n moles/ml	54.4±4.1	35.3±6.5 <sup>*</sup>
output, n moles/hr/100g B.W.	10.6±0.8	10.0±2.5

1. Day feeding (1000-1800) for 14 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.
3. Statistical significance compared with control group. (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

Table 19

Effect of PCB or excess tyrosine on glycine and taurine conjugation ratio of biliary bile acids in rats. <sup>1,2,3</sup>

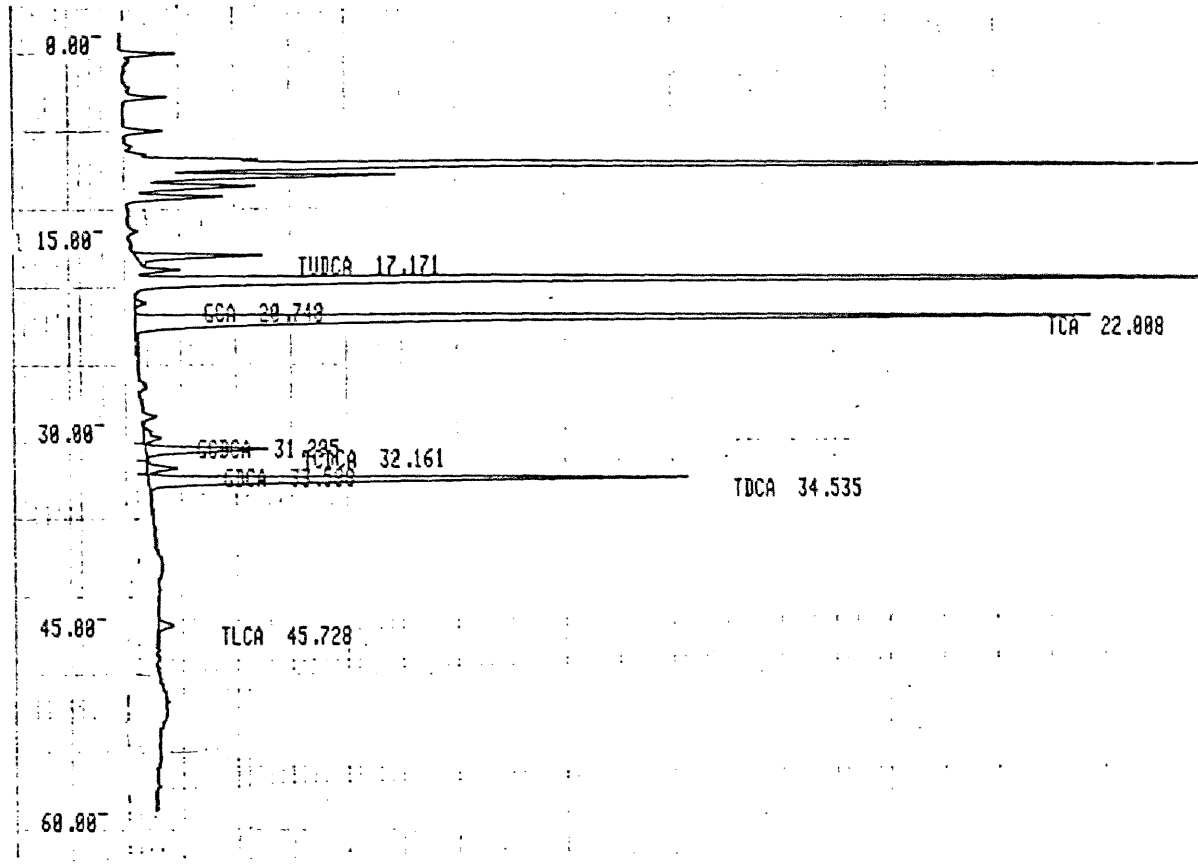
Measure	Diet		
	Control (20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
GCA/TCA ratio output	0.038±0.009 <sup>b</sup>	0.032±0.004 <sup>b</sup>	0.016±0.002 <sup>a</sup>
GDCA/TDCA ratio output	0.069±0.007 <sup>a</sup>	0.127±0.015 <sup>b</sup>	0.050±0.004 <sup>a</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means±SEM of eleven rats per group. 3. Means within the same horizontal column that do not share a common superscript letter were significantly different. ( $p < 0.05$ )

Figure 5

137

Chromatogram of biliary bile acid composition



Retention time

Abbreviations used as follows,

- TUDCA: tauroursodeoxycholic acid
- GCA: glycocholic acid
- TCA: taurocholic acid
- GCDCA: glycochenodeoxycholic acid
- TCDCA: taurochenodeoxycholic acid
- GDCA: glycodeoxycholic acid
- TDCA: taurodeoxycholic acid
- TLCA: tauroolithocholic acid

第3章 生体異物及び過剰チロシンの糞中胆汁酸及び中性ステロ  
イド排泄に対する影響

## 方法

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いた。市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験飼料は、20%カゼインに12%チロシン又は、0.03%PCBを添加したものをを用いた。なお、水及び飼料は自由摂取させた。14日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。なお、実験期間中、3日分の糞を採取した。

糞中の $3\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸は、Malchow-Møller <sup>(152)</sup>の方法で抽出し、Bruusgaard <sup>(153)</sup>の方法により、 $3\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenaseを用いて測定した。糞中の中性ステロイドは、Miettinen <sup>(154)</sup>の方法で、GCにより測定した。  
(基本的実験方法参照)

## 結 果 (Table 20, P. 141)

1日あたりの糞排泄量は、PCB群では、対照群とほぼ同様の値を示したが、チロシン群では、顕著な増加が認められた。糞中3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄量は、PCB群で対照群に比べて低下する傾向を示したが、チロシン群では対照群と比べて有意な上昇が観察された。なお、Tableには示していないが、糞中総胆汁酸排泄量も3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄量とほぼ同様の傾向が示されることから、GCによる分析から確認されている。糞中の中性ステロイドは、コレステロール排泄量について見ると、対照群と比べて、PCB群で有意に上昇したが、チロシン群では対照群と比べて、顕著な変化は認められなかった。一方、コプロスタノール排泄量は、対照群と比べて、PCB群では顕著な変化は見られないものの、チロシン群では、著減した。

Table 20

Effect of PCB or excess tyrosine on fecal steroid excretion in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet		
	Control (20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
Feces, g/day	0.43±0.03 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>	1.17±0.09 <sup>b</sup>
Neutral steroids, mg/day			
Coprostanol	2.06±0.41 <sup>b</sup>	2.06±0.15 <sup>b</sup>	0.49±0.11 <sup>a</sup>
Cholesterol	0.61±0.10 <sup>a</sup>	1.53±0.23 <sup>b</sup>	0.70±0.25 <sup>ab</sup>
Total	2.67±0.49 <sup>b</sup>	3.59±0.30 <sup>b</sup>	1.19±0.36 <sup>a</sup>
Acidic steroids <sup>4</sup> , μ moles/day	2.83±0.25 <sup>a</sup>	0.87±0.28 <sup>a</sup>	5.24±1.44 <sup>b</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are mean±SEM of six rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different. ( $p < 0.05$ )

4. 3α-hydroxy bile acids



## 考 察

胆汁酸の代謝は、現在では、種々の角度から検討されているが、数十年前 Bergström が、コレステロールの  $7\alpha$ -水酸化反応が、胆汁酸生合成の律速段階であるかもしれないということも提唱し、この考えに端を究し、コレステロールから一次胆汁酸への生合成過程を確立するための試みがなされるようになったわけである<sup>(155)</sup>。その後、ラベルしたコレステロールを用いて、コレステロールから胆汁酸の生成において、ステロイド核の  $7\alpha$ -水酸化が側鎖の酸化や開裂に先立って起こるので、コレステロールから  $7\alpha$ -水酸化コレステロールの生成が、胆汁酸生合成の最初の段階であることが示された<sup>(155)</sup>。さらに、この反応が、肝ミクロソームの酵素 cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase によって触媒され、胆汁酸生合成の律速段階であることが示されている<sup>(138)(155)</sup>。

胆汁酸の代謝は、生体異物<sup>(84)</sup>以外にも、いろいろな条件すなわち、コレステロール摂取<sup>(156)</sup>

絶食<sup>(141)</sup>, ビタミンC<sup>(23)</sup>などの食餌条件の変化をはじめ, 後述するような(第4編参照)ホルモンの変化などによっても, 変動することが知られているわけであるが, 今回測定した生体異物であるPCBの場合には, 胆汁酸合成の律速酵素といわれる cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は, 対照群と比べて, 組織1gあたりで有意に減少し, 肝全体で表示した場合には, 対照群とほぼ同様の値が示された。これは, フェノバルビタールの場合とは異なっている。すなわち, 生体異物の1種であるフェノバルビタールは, 肝小胞体の肥大や cytochrome P-450 の上昇を誘導するようなレベルの投与により, 人間<sup>(139)</sup>, サル<sup>(140)</sup>, ハムスター<sup>(84)</sup>において, 胆汁酸生成を増加させることが示されており, さらに, 人間<sup>(85)</sup>やハムスター<sup>(84)</sup>肝 cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性をフェノバルビタールが上昇させることも報告されている。しかしながら, ラットにおける, フェノバルビタールの cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性に対する影響に関

しては、必ずしも一致した結果が得られているわけではなく<sup>(141)(142)</sup>、ハムスターなどとは対照的に、Waxman<sup>(143)</sup>や Appleton<sup>(144)</sup>は、フェニバルビタールにより、むしろ cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は、低下することを報告している。さらに、Waxman<sup>(143)</sup>は、ラットにおいて、DDT、3-メチルコラントレン、 $\beta$ -ナフトフラボン、イソサフロールを用いた成績で、我々と同様に、これら生体異物が共通して、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性を低下させることも報告している。

肝 cytochrome P-450 を誘導するような生体異物が、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性を低下させるということは、このコレステロール $\alpha$ -水酸化が、ある種の薬物の代謝のように、cytochrome P-450 とそれに関連した電子伝達鎖で行なわれる<sup>(138)(155)</sup>という点からも興味深いことであるが、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase の誘導と cytochrome P-450 との関連についても、いくつか実験されている。たとえば、胆汁酸の腸肝循環を阻

害した場合、それにつづいて、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性の上昇が起こる<sup>(157)</sup>が、この上昇は、アクリノマイシンDの投与により阻害されることから、酵素タンパクの合成の増加によるものと考えられている<sup>(158)</sup>。さらに、この上昇が起こる際には、NADPH-cytochrome oxidoreductase 活性<sup>(155)</sup>、cytochrome P-450 の濃度<sup>(141)</sup>の増加は見られない。それ故、複合酵素系として知られる上記の構成要素の量的変化では、この cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性の増加は説明できない。このことは、フェノバルビタール、チロキシシン、コレスチラミン、3-メチルコラントレン投与など、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性に影響を与える条件において、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性の上昇と全 cytochrome P-450 量との間には、必ずしも相関性はないという知見<sup>(141)(142)</sup>と一致する。このようなことから、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase に対して、特異的な cytochrome P-450 の誘導という点に、関心が払われるようになったわけである。つまり、胆汁酸代謝経路が確立される

と、胆汁酸生成などに関与する水酸化反応は、互いに異なった性質を示すので、BjörkhemとDanielsson<sup>(159)</sup>は、胆汁酸生成などに関与する肝ミクロソームの cytochrome P-450 には、いくつかの異なった分子種があるのではないかということを提案し、その後、Boström 5<sup>(160)</sup>は、ウサギの肝ミクロソームの cytochrome P-450 分子種である cytochrome LM4 が、胆汁酸生成に関連していることを示した。さらに、BoströmとWikvall<sup>(161)</sup>は、基質特異性の異なる cytochrome P-450 LM4I と cytochrome P-450 LM4II という分画を得て、cytochrome P-450 LM4II が効率よくコレステロールの  $7\alpha$ -水酸化反応を触媒することを報告した。このことは、cytochrome P-450 LM4 の P-450 分子種は少なくとも2種類は存在し、胆汁酸生合成の異なる水酸化のための特異的な cytochrome P-450 分子種が存在するという概念を支持するものである。最近、Waxmanは、ラットを用いた実験において、この cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase の cytochrome P-450 の性質をラッ

ト肝ミクロソームの他の多くのよく性質のわかってい  
る, Xenobiotics 誘導性の肝 cytochrome P-450 と比較検討し, 4% コレステラミンを  
含んだ食餌の摂取により, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase  
活性は上昇したが, 肝ステロイドホルモン水酸化に  
関連した cytochrome P-450 酵素である, 2a, 2c, 3, PB-4  
の4つの酵素は, この処理では誘導されなかつた  
ことや, その他抗体を用いた阻害実験や諸酵素学的  
性質の検討から, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase に関  
与する cytochrome P-450 は, 他の9つのよく性質の  
わかってい, 肝 cytochrome P-450 とは誘導機構も,  
生化学, 免疫学的性質なども異なっていることを示した。  
以上のことも, 全 cytochrome P-450 の上昇と,  
cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase に特異的な cytochrome P-450  
の上昇とは, 必ずしも平行しては, 起らない  
ということを示し, これは, 今回の cytochrome P-450  
を顕著に上昇させるが, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase  
活性は組織1gあたりでは, 上昇しないという PCB  
の場合にも認められたも

のと思われる。

さらに、PCBによる高コレステロール血症生成という観点から、この cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の組織1gあたりの低下について考察すると、ミクロソームタンパクは、PCBで上昇する<sup>(32)</sup>ので、mg タンパクあたりで表現しても、酵素活性は、やはり低下するであろうが、このことは、たとえば、mg タンパクあたりの活性値を用いて、加齢に伴った血中コレステロール値の増加が、この cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の低下に原因していると推論されている例<sup>(162)</sup>や、生体異物の1つである3-メチルコラントレン<sup>(144)</sup>を与えた場合や甲状腺機能が低下した場合<sup>(25)</sup>の cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の低下は、高コレステロール血症生成に一因している可能性も示摘されており、これらの成績は、今回の我々の結果との類似性という点において、PCBによる高コレステロール血症を考える上でも興味深いものと思われる。

次に胆汁の組成についてであるが、これについては、Klassen と Watkins の総説<sup>(163)</sup>などに詳述されているが、胆汁の組成は、食餌内容、食後の経過時間、胆汁採取部位などにより異なり、日内変動もあるので、その意味では、胆汁組成は、一定しないが、胆汁酸は、胆汁中で最も大量に存在する有機物であるといえる。コレステロール代謝にも種差があることはすでに述べた<sup>(2)(120)</sup>が、胆汁酸の代謝にも種差がある<sup>(164)</sup>。ヒトの場合<sup>(151)</sup>、胆汁中胆汁酸は、CA, DCA, CDCA, UDCA, LCA および、これらのグリシン及ビタウリン抱合体計15種である。一方、ラットでは、胆汁中の主要な胆汁酸は、CAとCDCAである<sup>(164)</sup>。<sup>(165)</sup>これは、我々の今回の結果とも一致する。他に、LCA, DCA,  $\alpha, \beta, \omega$ -ムリコール酸, UDCA, ヒオデオキシコール酸などがラットの胆汁に含まれていることが示されている<sup>(156)(165)</sup>。今回同定された胆汁中胆汁酸は、標準試料や分泌量との関係などから、TCA



GCA, TCDC A, GCDC A, TDC A, GDC A, TUDC A, TLC A の 8 つであり、このように、胆汁中のグリシン、タウリン抱合型胆汁酸を分離定量した例は、人間では、すでに臨床的に用いられているものの<sup>(166)</sup>、ラットでは、ほとんど知られていない<sup>(167)</sup>。このような意味では、ラットの胆汁酸個々の代謝変化を理解する上で、今後ここで用いた、3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase-HPLC法は、有用であろう。さらに、今回の分析において、二次胆汁酸のうちDC Aは、LCAよりも、はるかによく腸管から吸収され、胆汁中にかなり存在するが、LCAは、極微量しかないという他の研究者の報告<sup>(156)(165)</sup>と一致する結果も得られた。

それでは、具体的な胆汁成分についてであるが、まずPCBの場合、胆汁流量は、有意に上昇した。これは、胆汁中のコレステロール、胆汁酸以外の成分の増加によるものと思われる。また、自由摂取と meal feeding とを

比較すると, meal feeding の場合は, 食物が胃の中にある時に解剖を行なっているわけであるが, 自由摂取の場合よりも, 胆汁中総胆汁酸濃度・分泌量とも上昇が観察され, これは, 食物の消化吸収に胆汁酸が必要であるための上昇と思われた。PCB の場合, 胆汁中総胆汁酸濃度は, 自由摂取でも, meal feeding でも, 対照群と比べて有意に減少し, 総胆汁酸分泌量は, 対照群と比べて減少する傾向が示されたが, 有意差は見られなかった。このような PCB の胆汁酸代謝への影響は, ハムスターを用いたフェノバルビタールの結果とは, 前述の cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の変化と同様, 異なったものとなっているが, Choe *et al.*<sup>(168)</sup> の, 我々も実際, 第4編で用いている BHT の結果と非常に類似している。また, このような胆汁中の胆汁酸濃度や分泌量に対する PCB の影響は, 前述した肝ミクロソームの cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の変動とも呼応しているものと思われた。

それでは、なぜ合成されたコレステロールは、すみやかに胆汁中に排泄されないのだろうか。Turley と Dietschy<sup>(169)</sup> は、胆汁中コレステロールに占める新しく合成されたコレステロールの比率は、肝コレステロール合成に関係するが、胆汁中コレステロールの総排泄量は、肝コレステロール合成とは、独立していて、しかも胆汁酸やリン脂質の排泄速度によって調節されていることを指摘しているので、コレステロール合成増加と胆汁中へのコレステロールの排泄は、必ずしも平行しないものと思われる。また、このような、PCBによる血中コレステロールの増加と胆汁中のコレステロール分泌量の減少は、Sugano<sup>(170)</sup> の、大豆タンパク質とカゼインの比較研究における、血中コレステロールレベルと胆汁中のコレステロールレベルの負の相関関係とも類似している。ともかく、PCBの場合は、コレステロールの胆汁酸への分解は、必ずしも促進されていないものと推論される。このことは、

PCBの場合、糞中の $3\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄及び総胆汁酸排泄(長岡・吉田未発表)とも減少する傾向を示しているという点、前述のcholesterol  $\alpha$ -hydroxylase活性のPCBによる変化から言っても、さほど矛盾がないように思われる。

もう少し、胆汁へのコレステロール排泄と高コレステロール血症との関係について、考えてみたいと思うが、一般的には、胆汁酸の合成は、体内からのコレステロールの除去と密接に関連している。ラットでは、体内代謝性コレステロールの80-90%が肝臓で胆汁酸に転換される<sup>(134)</sup>。ゆえに、胆汁酸生合成能は、体内コレステロールの過剰蓄積の防止と深い関係がありを持っていると考えられている。コレステロールが胆汁中へ排泄され、糞便中へ失われゆくとき、体内のコレステロールは減少するが、コレステロールの減少は、体内での合成、食餌中よりの吸収によって補われ、血清や組織のコレステロールは、ほぼ一定の

レベルに保持される。しかし、コレステロールより胆汁酸への代謝が障害されると、胆汁酸の排泄が低下するためコレステロールが蓄積し、その結果、高コレステロール血症が起こる場合がある<sup>(171)</sup>。家族性高コレステロール血症の1例では、コレステロールの合成は正常であり<sup>(135)</sup>、中性ステロイドの排泄は、さほど減少してはいないが、胆汁酸の糞中排泄が低下し、高コレステロール血症をきたすといわれており、その排泄量と血清コレステロールレベルのあいだには、逆相関関係がみられる<sup>(136)</sup>。また、ラットの例では、アロキサン糖尿病などにおいて、コレステロールの異化排泄が低下しており、この場合、コレステロールを大量に投与すると正常動物より負荷に対する反応は敏感であり、著明な高コレステロール血症が起こることが知られている<sup>(137)</sup>。以上のような、人間やラットの場合の胆汁へのコレステロール排泄や胆汁酸の糞中排泄などの低下を特徴とした高脂血症は、PCBによる

高コレステロール血症の場合と類似した点も若干認められるものの、胆汁酸や中性ステロイド排泄などを総合的に考えてみると、PCBの場合、高コレステロール血症生成時において、コレステロールの異化には、甲状腺機能低下時などに見られるような<sup>(25)</sup>顕著な変化は認められないことが示唆された。

それでは、チロシンの場合はどうであろうか。チロシンを、ラットに過剰に摂取させると、胆汁中の総胆汁酸濃度は、対照群とほぼ同様の値を示したが、胆汁流量で補正した、総胆汁酸分泌量は、チロシン群で対照群より有意に上昇した。これは、糞中の3-ヒドロキシ胆汁酸及び総胆汁酸排泄量(長岡・吉田未発表)の増加と対応しているものと思われる。また、糞の乾燥重量の増加は、チロシンを過剰に投与したことによる未消化のチロシンであると思われる。さらに、胆汁中のコレステロールは、分泌量で表示すると、対照群とほぼ同様の値を示した。対照群と比べて、コブ

ロスタノール排泄量が顕著な低下を示したことから、糞中の中性ステロイド排泄量は、有意に低下した。胆汁中のコレステロール分泌量は、対照群と顕著な変化がないにもかかわらず、糞中の中性ステロイド排泄量は、少ないことから、コレステロールからコプロスタノールへの転換が何らかの原因で阻害されているものと思われる。糞中の中性ステロイドの量や組成は、食事組成<sup>(170)</sup>や腸内細菌叢<sup>(172)</sup>によって、著しい違いがあることが知られているので、過剰チロシン摂取が腸内細菌叢に影響を与えるというのは、多いに有り得るだろう。チロシンの場合も、PCBの場合にすでに示したような血中リポタンパクのレセプターによる異化の低下なども高コレステロール血症生成に関与する可能性は否定できないが、チロシンの場合、第2編で述べたように、肝コレステロールの生合成が促進されているわけであり、以上のようなコレステロール分解系の変化とも考えあわせると、生成

したコレステロールは、中性ステロイドとして排泄されるよりも、胆汁酸形成により多く用いられ、その兩者よりも多くが、肝から血中にすみやかに放出され、高コレステロール血症を誘導するとも推論される。なお、過剰アミノ酸による高コレステロール血症の例として、前述したシスチンの場合<sup>(21)</sup>も胆汁酸生成が上昇していることが示されていることは、チロシン、シスチンとともに、難水溶性のアミノ酸であるということだけではなく、高コレステロール血症生成が、いずれも合成促進に起因しているという点でも共通しており、興味深い。

以上のことから、チロシンの場合にも、糞中の胆汁酸や中性ステロイド排泄などを、総合的に考えてみると、PCBと同様に、チロシンの場合も、コレステロールの異化には、顕著な変化は認められないことが明らかにされた。したがって、胆汁酸及び中性ステロイド排泄などを考慮したコレステロールの異化



は、PCB及び過剰ケロシンにより必ずしも顕著な変化は認められなことが示唆される。今後、体全体のコレステロールバランスなどをRIを用いて検討する必要があるが、PCBやケロシンの場合、甲状腺機能低下症<sup>(25)</sup>などの場合のように、コレステロールの分解が顕著に抑制されたために、それが主因となって、高コレステロール血症が生成されるということを、積極的に示す知見は得られなかった。

次に、胆汁中の胆汁酸組成を $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase - HPLC法で測定した結果であるが、PCB群では、総胆汁酸濃度は、対照群と比べて有意な低下が示され、さらに、総胆汁酸分泌量も低下傾向が示されたが、この低下は、分泌量で見ると、TUDCA, TLC A, TCDCA画分以外の胆汁酸の明確な低下として表わされた。しかし、総胆汁酸分泌量とHPLCで分離定量された個々の胆汁酸分泌量の総和から考えると、PCBの場合、

総胆汁酸分泌量は、減少する傾向を示すにとどまっているもので、単純に計算すると、HPLCで分離定量された以外の胆汁酸成分の分泌量が、対照群よりも上昇しているものと思われた。一方、チロシンの場合は、総胆汁酸分泌量は、対照群と比べて有意に上昇していた。これは、特にTCA, TDC Aの上昇として表わされているが、単純に計算すると、総胆汁酸分泌量の増加幅は、TCA, TDC A, それぞれの増加幅の和よりも多いので、HPLCで分離定量された以外の胆汁酸も、チロシン摂取により、分泌量が上昇しているものと思われる。

ラットの胆汁酸組成は、いま述べてきたとおりであり、胆汁中胆汁酸は、グリシン及びタウリン抱合して存在しているわけであるが、このグリシン、タウリン抱合胆汁酸比にも種差があることが示されている。グリシン(G):タウリン(T)抱合胆汁酸比は、ヒトでは、2~3.2:1, ラットでは、ほとんどタウリン抱合

体, モルモットでは, ほとんどグリシン抱合体であることなどが知られている<sup>(173)</sup>。また, ヒトなどでは, 胆汁中などにおいて, 遊離胆汁酸は, 肝・胆道障害時に微量に検出されるにすぎない<sup>(174)</sup>。このように, ラットでは, 胆汁中には, ほとんどがタウリンの抱合型胆汁酸として存在し, これは我々の結果と一致する。すなわち, CA, DCAで見ると, 0.02 ~ 0.13 の G/T 比を示した。抱合型胆汁酸の G/T 比は, 利用しうる, それぞれのアミノ酸プールの大きさや胆汁酸合成量などに左右され, 動物の種によっても, かなり差があることはすでに述べたとおりであるが, この G/T 比は, ヒトなどでは, 種々の条件で変動することが報告されている。たとえば, 人では, タウリンを大量に投与すれば, G/T 比は減少し, グリシンを大量に投与しても, この比は, ほとんど変化しないことが知られている<sup>(175)</sup>。また, 胆汁酸合成が増加する場合, たとえば, コレスチラミン投与では, タウリンプールが,

グリシンプールより比較的小さいため、タウリンの相対的欠乏を起こして、G/T比は、増加する<sup>(176)</sup>。また、回腸の炎症などでも、G/T比が増加することが示されている<sup>(177)</sup>。ラットを用いた、今回の我々の実験において、12%チロシン群では、対照群と比べて、GCA/TCA比は、有意に減少した。これは、チロシンによるCAの分泌量の増加のうち、GCAよりもTCAの方が相対的に増加する割合が高いことを示している。これは、前述のコレスチラミンの場合<sup>(176)</sup>とは一致しないが、理由は明らかではない。また、0.03%PCB群では、GDCA/TDCA比は、対照群と比べて有意に増加した。これは、PCBによるDCA分泌量の減少のうち、GDCAより、TDCAの方が相対的に減少割合が高いことを示している。いずれにしても、胆汁酸組成が、PCBや過剰チロシン摂取により変化した場合、CA、DCAに関しては、そのタウリン抱合型胆汁酸の方により強い影響が観察されており、興

味深い。

次に、薬物の胆汁中への排泄と胆汁生成についてであるが、胆汁酸は、脂肪を乳化し、脂肪の消化吸収のために重要な因子であり、胆汁は、肝からのコレステロールの分泌のための重要な担体であることは、前述したが、のみならず、生体異物をも含めた、多くの薬物、胆汁色素、ステロイドホルモンなども、ここから排泄される<sup>(145)(163)</sup>。

事実、吉村ら<sup>(178)</sup>は、一連のPCBの代謝に関する研究の中で、2,3,3',4'-テトラクロロジフェニル(TCB)代謝物の胆汁排泄について示れ、主代謝物(5-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCB)および副代謝物の1つである(3-ヒドロキシ-2,4,3',4'-TCB)は、ラット胆汁中より排泄され、そのうち、主代謝物の胆汁排泄量は、3日間で投与量の約の4%であり、未変化体の胆汁排泄は、全く認められなかったと報告している。

それでは、胆汁への薬物の排泄と胆汁生成

はどのような関連をもっているのでしょうか。  
 肝臓における胆汁の生成は、2つの過程によ  
 り、構成されていると考えられている<sup>(163)(168)</sup>。  
 すなわち、第1は、毛細胆管内に分泌される  
 胆汁酸や電解質などの浸透圧の変化によって  
 胆汁が胆管内へ分泌されるとするものであり、  
 つまり、胆汁酸依存性のものである。第2は、  
 胆汁酸非依存性の分泌であって、胆汁酸分泌  
 に依存することなく、毛細胆管内へ分泌され  
 るものである。この胆汁酸非依存性の胆汁生  
 成は、毛細胆管内へのナトリウムの能動輸送  
 に依存していると考えられている。ナトリウ  
 ム輸送は、一般に、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase によっ  
 て、哺乳動物の細胞では調節されているので、肝  
 細胞膜のこの酵素活性が、胆汁酸非依存性の胆  
 汁分泌を調節しているというものである。こ  
 こで、胆汁酸依存性、非依存性の2つの胆汁  
 分泌に関する具体例を示すと、BSP (p.164),  
 fluorescein, indocyanine green などは、胆汁へ  
 のこれらの物質の分泌速度に比例して、胆汁

流量を増加させる<sup>(168)</sup>。だから、これらの物質の胆汁分泌促進作用は、胆汁酸による胆汁分泌促進作用と同様、浸透圧による機構に依存しているものと考えられている。一方、フェニバルビタール、Spironolactone、Cortisolなどは、毛細胆管の胆汁の胆汁酸非依存性の画分の増加によって、胆汁流量を増加させることが示されている<sup>(168)</sup>。

さらに、ここで、胆汁中胆汁酸分泌量は、増加せず、胆汁の分泌量は、上昇させるPCBの場合と非常に類似した性質を示すことが報告されている、生体異物の一つであるBHTの場合について、紹介しよう。Choe<sup>(168)</sup>は、BHTを用いた実験を行ない、ラットにおいて、食餌への0.25%のBHT添加により、いっしょに静注したSulfobromophthalein (BS P)、Phenol-3,6-dibromphthalein disulfonate (DBS P)などの胆汁排泄が増加することや、この増加がBHTによる胆汁流量の増加と関連しているかもしれないということ、さらに、BHTに

よる胆汁流量の増加は、正味の細管を通じての分泌や、胆汁の再吸収の変化というよりもむしろ、肝の胆汁生成の増加であるうことを示している。そして、BHTによる胆汁流量の増加は、胆汁中の胆汁酸濃度、分泌量とも、BHT群で対照群と比べて、減少することから、胆汁への胆汁酸の排泄の増加のためではないことを示した。結局、胆汁流量と胆汁酸分泌速度の相関性やBHTの代謝物も胆汁分泌促進作用を持つことなどから、BHTによる胆汁流量の増加は、胆汁中へのBHTやBHT代謝物の分泌と関連した、浸透圧の変化による胆汁分泌促進作用によるものであると報告されている。このような我々も用いているBHTに関する知見は、胆汁酸分泌などにおけるPCBとの類似性のみならず、チロシンによっても胆汁流量が増加することから、PCBやチロシンによる胆汁分泌促進作用を理解する上で、たいへん興味深いと思われる。

また、生体異物の一つであるフェノバルビ



タールでは、前述の胆汁流量の増加とともに、BHTでも観察された、BSP, DBSP (前述 p. 164) などの胆汁排泄を促進することも示されており<sup>(163)</sup>、このような胆汁中への有機物の排泄促進作用は、薬物代謝酵素を誘導する他の生体異物たとえば、PCB<sup>(179)</sup>, DDT<sup>(179)</sup>, 3-メチルコラントレン<sup>(180)</sup>, ベンズピレン<sup>(180)</sup> などのT<sub>4</sub>(チロキシン)の胆汁排泄促進作用などにも共通して観察されている。T<sub>4</sub>に関する詳細は、第4編第3章に譲ることとするが、今後、このような生体異物による胆汁生成促進にともなう、ある種の有機物の胆汁排泄促進作用について検討することも興味深い問題であろう。

最後に、胆汁酸の代謝は、さまざまなホルモンの調節を受けることが示されているが、これについても、第4編に譲ることとする。

第4編 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の  
誘導と数種のホルモンの変動

第1章 生体異物及び過剰チロシンの血清インシュリン、グルカ  
ゴンレベルに対する影響

## 目的

コレステロールの生合成や分解が、種々の要因により調節されていることは、すでに指摘してきたとおりであるが、その中でさまざまのホルモンも、コレステロール代謝に影響を与えることが報告され、見過すことのできない要因の一つとなっている。まず始めに、膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌されるインシュリン及びβ細胞から分泌されるグルカゴンについて述べることにする。ラットにおいて、肝HMG-CoA reductase活性の日内変動にともなう増加は、β細胞の特異的破壊によるアロキサン<sup>(182)</sup>やストレプトゾトシン糖尿病では<sup>(183)</sup>、抑制されることが報告されている。また、人間においても、糖尿病では、血中コレステロールの増加を伴うことが、しばしば報告されている<sup>(3)</sup>。さらに肝培養細胞は、膵臓ホルモンに非常にsensitiveであることが知られている。GleelenとGibson<sup>(184)</sup>は、インシュリン存在下で、肝細胞を培養すると、[<sup>14</sup>C]-

酢酸などのコレステロールへの取り込み速度は上昇し、グルカゴンは、この取り込みを減少させることを報告しており、また、Gibson<sup>(103)</sup>のグループは、単離肝細胞の実験などにおいて、インシュリンは、HMG-CoA reductase 活性を上昇させ、グルカゴンやcAMPは、この酵素活性を低下させることを報告している<sup>(105)</sup>。このように、インシュリンのコレステロール合成促進作用は、肝培養細胞などで確かめられている。さらに、ラット肝ミクロソームのHMG-CoA reductase 活性は、インシュリンをラットに注射することによっても上昇し、グルカゴンは、これに拮抗することが示されている<sup>(104)</sup>。

一方、糖尿病に関しては、アロキサンなどによる実験的糖尿病ラットで、血中コレステロール値が増加し、食餌性コレステロールの負荷により、容易にしかも著しい高コレステロール血症が招来されることが示されている<sup>(131)</sup>。この場合、肝コレステロール合成は低下す

るが<sup>(186)</sup>、コール酸の生成は促進し、コール酸の胆汁への分泌及びプールサイズは増加し<sup>(137)</sup>、これらの変化は、インシュリン処理により、回復することが知られている。また、ヒト糖尿病のコレステロール・胆汁酸代謝についても報告されている<sup>(187)</sup>。このような作用の他に、インシュリンは、lipoprotein lipase (LPL) の活性調節に寄与し<sup>(188)</sup>、LPL活性を高めて、血清TGの異化を促進させたり、肝でVLDL合成を促進したり<sup>(189)</sup>、LDL-レセプター<sup>(119)</sup>によるリポタンパクの異化にも影響を及ぼすことが示されているわけである。

以上のように、糖代謝などに、密接に関連したインシュリン、グルカゴンの分泌やそのバランスの異常は、リポタンパクの代謝を含めたコレステロール代謝や胆汁酸の代謝にも顕著な影響を及ぼしており、PCBやチロシンなどによる高コレステロール血症生成機構とホルモンとの相互関係を考える上で、PCBやチロシン摂取によるインシュリンやグルカ

ゴンの血中レベルに対する影響は重要と思われ、検討することを目的とした。

## 方 法

実験は、実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いて行った。市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験飼料は、20%カゼインに、0.03% PCB あるいは、12%チロシンを添加したものをを用いた。飼育期間は、14日間で、水や飼料は自由摂取させた。14日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。なお、解剖当日は、食餌はそのまま解剖時まで自由摂取させ、午後1時から解剖した。

血清インシュリンは、石川<sup>(190)</sup>の方法により、Enzyme-immunoassayで定量し、グルカゴン<sup>(191)</sup>は、Iwasa<sup>(191)</sup>の方法により、Enzyme-immunoassayで測定した。(基本的実験方法参照)



## 結 果 (Table 21, p. 175)

20% カゼインに, 0.03% PCB を添加した飼料で 14 日間飼育した場合, 血清インシュリンレベルは, 対照群と比べて, 低下する傾向を示し, グルカゴンは, 対照群と比べて, 上昇する傾向を示した。一方, 12% のチロシンを添加した飼料で 14 日間飼育した場合にも, 血清インシュリンは, 対照群と比べて, PCB 群ほどではないが低下する傾向を示し, グルカゴンも, 対照群と比べて, PCB ほどではないが上昇する傾向が示された。

Table 21

Effect of PCB or excess tyrosine on serum insulin, glucagon, triiodothyronine ( $T_3$ ) and thyroxine ( $T_4$ ) in rats<sup>1,2,3</sup>

Measure	Diet		
	Control (20% casein)	0.03% PCB	12% Tyrosine
Serum insulin, $\mu$ U/ml	80.2 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>	51.0 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	61.5 $\pm$ 18.6 <sup>a</sup>
glucagon, pg/ml	52.0 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	91.4 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>	69.9 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>
$T_3$ , ng/dl	96.5 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	100.4 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	108.4 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>
$T_4$ , ng/dl	12.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	12.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are mean $\pm$ SEM of six rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different. ( $p < 0.05$ )

## 考 察

コレステロールの生合成や分解は、種々の因子により調節を受けているが、さまざまのホルモンも、コレステロール代謝に影響を及ぼすことが報告されている。Dugan <sup>(192)</sup> は、ラットでの各種内分泌臓器の摘出実験とそのホルモンの代償による実験を行い、糖尿病動物や下垂体摘出動物では、HMG-CoA reductase 活性が著しく低下し、日内変動も消失することを示した。その他、後述していくような、さまざまの実験により、甲状腺ホルモン、インシュリン、グルカゴン、カテコールアミン、副腎皮質ホルモン、性ホルモン、下垂体ホルモンなども、コレステロール代謝に影響することが示されており、これらの種々のホルモンの作用の協調などによって、コレステロールのホメオスタシスが保たれているとも考えられている。ラットにおいて、アロキサンやストレプトゾトシン投与によって生成される実験的糖尿病では、HMG-CoA reductase は低下

することが示されており<sup>(182)(183)</sup>、この場合に、  
HMG-Co A reductase 活性は、インシュリンの投  
与後、糖尿病動物でも、正常動物でも、すば  
やく上昇し、インシュリンと同時に、グルカ  
ゴンあるいは、ヒドロコルタゾンを注射する  
と、この上昇は見られないことが示されてい  
る<sup>(182)</sup>。ラットでは、HMG-Co A reductase は、イ  
ンシュリン投与により上昇し、グルカゴンは  
これに拮抗すると言われている<sup>(104)</sup>。さらに、  
肝培養細胞を用いた実験において、インシュ  
リンは、コレステロール合成を促進すること  
も示されており<sup>(184)</sup>、対照的にグルカゴンは、  
HMG-Co A reductase 活性などを低下させること  
が示されている<sup>(185)</sup>。Gibson が<sup>(103)</sup>のグループは、  
ラットの初代肝培養細胞を用いて、インシュ  
リンとグルカゴンの作用について検討してい  
るが、すでに第2編でも述べたように、HM  
G-Co A reductase は、リン酸化されると不活性  
型となる、リン酸化-脱リン酸化の調節を受  
けることが示されており<sup>(104)</sup>、彼らは、インシ

インシュリン処理により, HMG-CoA reductase の活性型の量だけでなく, 全酵素量に占める活性型の割合をも, 上昇しているのに対し, グルカゴンには, これらを低下させる作用があることを示している<sup>(103)</sup>。

以上のように, 大まかに言って, インシュリンは, コレステロール合成を促進し, 対照的にグルカゴンは, 抑制的に作用すると, 考えられる。今回 PCB や過剰チロシンを投与した実験においては, 血清インシュリンレベルは, 両群において対照群と比べて, 減少する傾向を示していた。生体内でホルモンは, さまざまな相互関係をもって, 標的細胞に影響を及ぼすので, インシュリン, グルカゴンの血中レベルだけで, PCB やチロシン摂取における肝などのコレステロール代謝変動を説明することは困難であると思われ, 現在のところ, この PCB やチロシンによる血清インシュリンの低下傾向とグルカゴンの上昇傾向が, どのような生理的意味を持つのかは,

明らかではない。しかし、PCBなどによっ  
て起こるHMG-CoA reductaseの活性上昇は、前  
述したように(第2編p.95)、リン酸型-脱  
リン酸型の比は、ほぼ一定で、酵素タンパク  
が上昇する変化であり<sup>(119)</sup>、さまざまの条件で、  
HMG-CoA reductase活性が変化する場合、全酵  
素量に対する活性型の割合は、ほぼ一定であ  
り、in vivoで、HMG-CoA reductase活性は、全  
酵素量の変化によって制御されていると考え  
られており<sup>(87)</sup>、PCBの場合は、インシュリ  
ン処理において認められる、活性型の増加のみ  
ならず、全酵素量に占める活性型の割合も増  
加させる場合とは<sup>(103)</sup>、様子が異なっており、  
今後詳細な検討が必要であろう。さらに、我  
々のグループでは、ストレプトゾトシン糖尿  
病ラットにPCBを与えた場合の血清コレス  
テロールの上昇は、糖尿病ではないラットに  
PCBを与えた場合よりも、大きいことを観  
察している。このことは、ストレプトゾトシ  
ンによって、インシュリンの分泌が阻害され

とも、PCBによる高コレステロール血症は生成されることを意味し、PCBによる高コレステロール血症生成に対するインシュリンの直接の寄与は、少ないようにも思われる。一方、血中グルカゴンレベルは、PCB、チロシン摂取により上昇する傾向を示しているが、もし、前述のようにグルカゴンには、HMG-CoA reductase 活性を抑制する作用<sup>(104)</sup>があるとなれば、少なくとも、PCBやチロシン過剰摂取により観察された肝HMG-CoA reductase 活性の上昇は、グルカゴンの血中レベルの上昇傾向を反映していないようにも思われ、今後さらなる検討が必要であろう。

第2章 生体異物及び過剰チロシンの血清コルチコステロンレベルに対する影響



## 目的

肝臓のコレステロール合成系に対するホルモンの影響が、さまざまに各度から検討されているが、副腎皮質ホルモンは特に、正常の HMG-CoA reductase 活性の日周リズムを維持するのに必要であるという報告があり、数多くの研究が行われてきた。すなわち、副腎摘出手術をしたラットにおいて、HMG-CoA reductase 活性の低下、日周リズムの消失<sup>(100)</sup>、あるいは、リズムは認められるものの、その上昇幅が有意に低下することが示されている<sup>(99)</sup>。さらに、Lin と Snodgrass<sup>(104)</sup> は、グルココルチコイドが、肝培養細胞において、HMG-CoA reductase 活性を上昇させることを示した。また、グルココルチコイド自身によっても、血清コレステロールが上昇することが、ラットなどで示されている<sup>(106)</sup>。

一方、胆汁酸生合成の律速酵素である肝臓の cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase は、HMG-CoA reductase と同様、日内変動を示し、ラットにおいて副腎摘

出により, cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の夜間の増加は消失し, コルチゾールの投与によりこの変化は回復されること<sup>(193)</sup>が示されている。したがって, 胆汁酸生成の日内変動も副腎皮質ホルモンの影響下にあると考えられている。さらに, ラットの肝臓の細胞培養を用いて, Graham <sup>(195)</sup> は, コルチゾールの添加によりタウロコール酸生成が促進されることを示した。すなわち, 肝コレステロールの生合成や胆汁酸代謝に, 副腎皮質ホルモンが顕著な影響を与えることが示されているので, このようなことから, PCB や過剰チロシンによる高コレステロール血症生成と副腎皮質ホルモンとの関連すなわち, 血清コルチコステロンレベルに及ぼす PCB や過剰チロシンによる影響を検討することを目的とした。

## 方法

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いた。市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験飼料は、20%カゼインに、0.03% PCB, 12% チロシン, 0.05% DDT, 0.3% クロロブタロール(クロレトン)あるいは、0.2% BHTをそれぞれ添加したものをを用いた。飼育期間は、28日間で、水や飼料は、自由摂取させた。28日間飼育後、ドライアイスによる麻酔下で、ラットを解剖し、心臓から採血した。なお、解剖は午後7時より行ない。解剖前24時間は、無脂肪食を与えて飼育した。血清コルチコステロンは、Gibbs<sup>(196)</sup>の方法に従って、蛍光法で分析した。(基本的実験方法参照)

## 結 果

血清コルチコステロンレベルは、20%カゼインに、0.03% PCB、12%チロシン、0.05% DDT、0.3% クロロブタール（クロレトン）あるいは、0.2% BHT をそれぞれ添加した飼料で、28日間飼育した場合、各群とも対照群と比べて、顕著な変化が認められなかった。（Table 25, p. 241 ; Fig. 6, p. 245）

## 考 察

ラットの肝臓や腸の HMG-CoA reductase は、  
ライトサイクルに応じた日内変動を示すこと  
が知られている<sup>(99)</sup>。副腎皮質ホルモンは、こ  
の HMG-CoA reductase 活性の日周リズムを維持  
するのに必要であると考えられているので、  
副腎皮質ホルモンと HMG-CoA reductase 活性と  
の関係は興味深いものと思われる<sup>(100)(93)</sup>。ラッ  
トでは、日内変動を示す血中コルチコステロ  
ン濃度は、調節された明暗条件に適応する。  
そして、HMG-CoA reductase 活性の最大値を示  
す数時間前に、コルチコステロン濃度は最大  
となる。Huber の<sup>(97)</sup> は、副腎摘出により、H  
MG Co A reductase 活性の日内変動は影響を受け  
ないことを示した。これとは対照的に、他の  
研究者の多くは、副腎摘出は HMG-CoA reductase  
活性を減少させ<sup>(100)</sup>、日周リズムも消失させたり  
、あるいは、リズムは認められるものの、  
その上昇幅が副腎摘出により、有意に低下す  
ることを示している<sup>(93)</sup>。さらに、Mitropoulos と

Balasubramaniam<sup>(193)</sup> は、ヒドロコルチゾンの副腎摘出ラットへの投与により、日周リズムの極大を示す時点では、副腎摘出により低下した活性が回復することを示した。この活性の上昇は、アクチノマイシンDを同時投与しておくくと阻害された。けれども、日周リズムが極小を示す時点の3時間前に、ヒドロコルチゾンを投与しても、活性の回復は見られなかったとし、このことから、彼らは、グルココルチコイドのみが活性の日周リズム維持に、必要であるわけではないと推論した。

さらに、グルココルチコイドを注射することによって、ラットなどで、高コレステロール血症が生成することが示されており<sup>(106)</sup>、ラットを用いた実験においては、血清HDL-コレステロールが上昇するとされている<sup>(106)</sup>。

一方、胆汁酸生合成の律速酵素である肝のcholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylaseも、肝のHMG-CoA reductaseと同様、日内変動を示し、副腎摘出ラットにおいて、胆汁酸生合成は著しく低下し、ヒドロ

コルチゾン投与により, Cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の副腎摘出による低下は回復され, 胆汁酸生成も回復すると報告されている<sup>(193)</sup>。また, 副腎摘出幼ラットにおいて, 総胆汁酸プールの減少が報告されている<sup>(198)</sup>。さらに, Graham<sup>(195)</sup> は, コルチゾールを培地中に添加した場合, 肝培養細胞におけるタウロコール酸の生成が著しく上昇することを示した。

以上のように, コレステロール生合成及び胆汁酸生成とグルココルチコイドとの密接な相互関係が数多く指摘されているわけであるが, 今回行った, PCB や過剰チロシンなどの摂取による高コレステロール血症の誘導とコルチコステロンとの関係を考えてみると, PCB などの生体異物や過剰チロシンの摂取は, 血清コルチコステロンレベルに顕著な影響を及ぼさなかったことから, 今後, 副腎摘出手術等の手法を用いて, コルチコステロンとコレステロール代謝との関連をさらに検討する必要があると思われるが, 少なくとも,

血中コルチコステロンレベルの変化から判断すると、コルチコステロン大量投与による、血中コレステロールの増加<sup>(106)</sup>やコルチコステロンの過剰分泌をともなう Cushing 症候群などにみられる高コレステロール血症<sup>(110)</sup>との類似性は示されなかった。



第3章 生体異物及び過剰チロシンの血清甲状腺ホルモンレベル  
に対する影響及び甲状腺機能を変化させた場合の生体異  
物による高コレステロール血症誘導

## 目的

古くから、コレステロールの代謝は、甲状腺の影響を受けていることが知られており、甲状腺機能低下症では、しばしば高コレステロール血症がみられることが指摘されている<sup>(25)</sup>。このようなことから、コレステロールや胆汁酸代謝について、種々のホルモンの中で甲状腺ホルモンの作用がもっとも広範に研究されていると言っても過言ではない。

甲状腺ホルモンは、コレステロール代謝に対して一般に促進的に作用し、コレステロール合成は促進し<sup>(105)</sup>、さらに、ラットへのチロキシン(T<sub>4</sub>)の投与は、cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性の上昇を引き起こし<sup>(141)</sup>、胆汁酸生合成も促進させることも示されている<sup>(199)</sup>。対照的に、甲状腺機能低下症、例えば、甲状腺摘出ラットなどでは、コレステロール合成の低下及び胆汁酸の生合成の抑制が観察されている<sup>(200)</sup>。

以上のような、コレステロールや胆汁酸代謝に対する甲状腺ホルモンの作用は、実際に、

Yagasaki 氏<sup>(56)</sup>による、メチオニンによる内因性の高コレステロール血症生成に対する、甲状腺ホルモンの関与という例や前出の銅欠乏によるHDL-コレステロールの上昇の場合、甲状腺機能の低下が、高コレステロール血症生成に一因しているものと推論されている例<sup>(201)</sup>などで、具体的に指摘されている。

一方、甲状腺ホルモンは、すでに第3編(P. 166)でも指摘したように、胆汁へ排泄されるが、PCBなど、ある種の生体異物は、血中の甲状腺ホルモンレベルの低下、甲状腺の肥大や胆汁へのチロキシン(T<sub>4</sub>)排泄増加などを引き起こす可能性のある"Goitrogen"であることが報告されており<sup>(202)(203)</sup>、今回のPCBを用いた実験においても、血中甲状腺ホルモンレベルなどに影響が現われる可能性が考えられる。

以上のように、"Goitrogen"であるPCBなどの生体異物による甲状腺ホルモンの代謝変化のみならず、コレステロールの合成系及び

分解系と甲状腺機能との関係が報告されており、今回の実験でも、甲状腺ホルモンとPCBや過剰チロシンによる高コレステロール血症生成との相互関係について、[1]血清甲状腺ホルモンレベルに対するPCB及び過剰チロシン摂取の影響。[2]甲状腺機能を2-チオウラシルを用いて、低下させた場合における、PCBによる高コレステロール血症の誘導。[3]甲状腺機能をチロキシン( $T_4$ )を用いて、亢進させた場合における、PCBによる高コレステロール血症の誘導。以上、主に3点から検討することを目的とした。

## 方法

(1) 血清トリヨードチロニン(T<sub>3</sub>), チロキシン(T<sub>4</sub>)レベルに対するPCB及び過剰チロシン摂取の影響

実験動物として, 初体重90g前後のWistar系雄ラットを用いた。市販の固型飼料を3日間, 次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後, 実験飼料に切り換えた。実験飼料は, 20%カゼインに0.03% PCBまたは, 12%チロシンを添加したものをを用いた。飼育期間は, 28日間で, 水や飼料は, 自由摂取させた。28日間飼育後, エーテル麻酔下でラットを解剖し, 心臓から採血した。なお, 解剖当日は, 食餌は, そのまま解剖時まで自由摂取させ, 午後1時から解剖した。

血清トリヨードチロニン(T<sub>3</sub>)は, 下田<sup>(204)</sup>の方法により, radioimmunoassayで, チロキシン(T<sub>4</sub>)は, 玉井<sup>(205)</sup>の方法により, radioimmunoassayでそれぞれ測定した。(基本的実験方法参照)

[2] 甲状腺機能を 2-4 オウラシルを用いて低下させた場合における, PCB による高コレステロール血症の誘導

実験動物として, 初体重 90g 前後の Wistar 系雄ラットを用い, 市販の固型飼料を 3 日間, 次いで 20% カゼイン飼料を 2 日間与えた後, 実験飼料に切り換えた。実験は, 20% カゼイン群, 20% カゼインに 0.2% 2-4 オウラシルを添加した群, 0.03% PCB を添加した群, 0.03% PCB と 0.2% 2-4 オウラシルの両方を添加した計 4 群で行った。飼育期間は, 14 日間で, 水や飼料は, 自由摂取させた。14 日間飼育後, エーテル麻酔下でラットを解剖し, 心臓から採血した。なお, 2-4 オウラシルによる食餌摂取量の低下が報告されている<sup>(56)</sup>ので, pair-feeding で実験を行った。また, 2-4 オウラシルの添加レベルは, 既報<sup>(56)</sup>を参考にして決定した。

血清コレステロールは, pearson の<sup>(57)</sup>の方法で測定した。

[3] 甲状腺機能をチロキシン(T<sub>4</sub>)を用いて、亢進させた場合における、PCBによる高コレステロール血症の誘導

実験動物として、初体重250g前後のWistar系雄ラットを用い、市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験は、20%カゼイン群、20%カゼインに0.03% PCBを添加した群、20%カゼインあるいは、20%カゼインに0.03% PCBを添加した飼料で飼育したそれぞれのラットに、毎日、チロキシン(T<sub>4</sub>) (4mg/100g B.W. /day) を14日間、午前10時から11時まで、腹腔注射した群の計4群で行った。飼育期間は、14日間で、水や飼料は、自由摂取させた。14日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。

血清コレステロールは、pearson's<sup>(57)</sup>の方法により測定した。なお、T<sub>4</sub>の投与量は、既報<sup>(206)</sup>を参考にして決定した。

## 結果

(1) 血清トリヨードチロニン ( $T_3$ ) およびチロキシン ( $T_4$ ) レベルに対する PCB 及び過剰チロシン摂取の影響 (Table 21, p. 175)

血清  $T_3$  レベルは, 0.03% PCB 添加群, 12% チロシン添加群において, 対照群と比べて変化はなく, さらに, 血清  $T_4$  レベルは, 12% チロシン群では, 対照群と比べて変化はなく, 一方, 0.03% PCB 群では, 著しく低下した。

(2) 甲状腺機能を 2-チオウラシルを用いて, 低下させた場合における, PCB による高コレステロール血症の誘導 (Table 22, p. 200) 食餌摂取量は, 自由摂取時よりも, 2-チオウラシル添加により低下したが, pair-feeding のため, 体重増加量は, 実験した4群間で, 顕著な差は見られなかった。肝重量は, 2-チオウラシル処理の有無にかかわらず, PCB 摂取により, 対照群に比べて有意に上昇した。さらに, 2-チオウラシル自身にも肝肥



大をもたらし作用があり、これは、20%カゼインに2-キオウラシルを添加した際に、より顕著に見られた。血清コレステロールは、2-キオウラシル単独投与により、対照群と比べて有意に上昇した。一方、PCBによる高コレステロール血症は、2-キオウラシル処理の有無にかかわらず生成された。また、0.03% PCBと2-キオウラシルを両方添加した群では、PCB単独の場合よりもさらに血清コレステロールの上昇が観察された。

[3] 甲状腺機能をチロキシン(T<sub>4</sub>)を用いて、亢進させた場合における、PCBによる高コレステロール血症の誘導 (Table 23, p. 201)

食餌摂取量及び体重増加量ともに、実験した4群間で顕著な差は見られなかった。肝重量は、チロキシン処理の有無にかかわらず、PCB摂取により対照群と比べて有意に増加した。チロキシン投与は、肝重量に対して顕著な影響を及ぼさなかった。血清コレステロ

ールは、20%カゼイン食を摂取した対照群と比べて、そのT<sub>4</sub>処理群で有意に低下した。しかし、PCBを摂取した場合には、20%カゼイン食を摂取した対照群へのT<sub>4</sub>処理により観察された、血清コレステロール低下作用は認められなかった。

Table 22

Effect of 2-thiouracil treatment on body and liver weights and serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains (g/14 days)	Liver weight (g/100g B.W.)	Serum cholesterol (mg/dl)
Pair-fed control(20% casein)	21.5±3.1 <sup>a</sup>	3.88±0.10 <sup>a</sup>	88.4±5.7 <sup>a</sup>
Pair-fed PCB (0.03%)	24.9±3.1 <sup>a</sup>	6.00±0.09 <sup>c</sup>	174.8±9.1 <sup>c</sup>
Pair-fed control (20% casein) +2-thiouracil (0.3%)	29.0±3.2 <sup>a</sup>	4.60±0.16 <sup>b</sup>	139.6±3.1 <sup>b</sup>
Ad lib. PCB(0.03%) +2-thiouracil (0.3%)	28.5±2.5 <sup>a</sup>	6.31±0.18 <sup>c</sup>	214.7±6.6 <sup>d</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.
3. Mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different. (p< 0.05)

Table 23

Effect of thyroxine treatment on body and liver weights, food intake and serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB.<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains (g/14 days)	Liver weight (g/100g B.W.)	Food intake (day 6, g/day)	Serum cholesterol (mg/dl)
Control (20% casein)	13.0±0.9 <sup>a</sup>	3.78±0.05 <sup>a</sup>	15.9±0.6 <sup>a</sup>	99.8±4.8 <sup>b</sup>
PCB (0.03%)	12.3±0.9 <sup>a</sup>	5.27±0.08 <sup>b</sup>	14.6±0.6 <sup>a</sup>	158.1±4.4 <sup>c</sup>
Control + T <sub>4</sub> <sup>*</sup>	12.1±0.8 <sup>a</sup>	3.43±0.07 <sup>a</sup>	16.1±0.8 <sup>a</sup>	79.8±3.7 <sup>a</sup>
PCB + T <sub>4</sub> <sup>*</sup>	14.5±0.5 <sup>a</sup>	5.26±0.12 <sup>b</sup>	15.9±0.6 <sup>a</sup>	173.1±3.9 <sup>c</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.

3. Means within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different. (p < 0.05)

\* T<sub>4</sub> (4 µg/100g B.W./day) was intraperitoneally injected.

## 考 察

PCB<sup>(179)</sup>をはじめ、DDT<sup>(179)</sup>、ベンズピレン<sup>(181)</sup>、3-メチルコラントレン<sup>(180)</sup>など、ある種の生体異物は、血中の甲状腺ホルモンレベルの低下、甲状腺肥大や胆汁へのチロキシン(T<sub>4</sub>)排泄増加などを引き起こす可能性のある、“Goitrogen”であることが報告されており<sup>(202)(203)</sup>、今回の我々の結果でも、PCBにより、血中のT<sub>4</sub>は顕著に減少した。これは、Bastomsky<sup>(202)</sup>やCollinsとCapen<sup>(203)</sup>の報告と一致する。対照的に、過剰チロキシン摂取は、血清T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>レベルに顕著な変化をもたらしなかった。

それでは、この生体異物であるPCBによる血中T<sub>4</sub>の減少は、どうして起こるのであるのか。Bastomskyは、T<sub>4</sub>は、胆汁中にグルクロン酸抱合されて排泄されるが、PCBは、この抱合排泄に関与するtyroxine UDP-glucronyl transferaseを誘導する<sup>(201)</sup>と同時に、胆汁流量を上昇させ<sup>(179)</sup>、T<sub>4</sub>の排泄を促進させ、血中T<sub>4</sub>レベルを低下させると推論した<sup>(202)</sup>。一方、CollinsとCapen<sup>(203)</sup>

は、遺伝的にチロキシンをグルクロン酸抱合できない Gunn ラットを用いて、PCB による甲状腺ホルモンに対する影響を検討し、Gunn ラットにおいても、PCB による血中チロキシンレベルの低下が観察されることから、胆汁中へのチロキシン排泄の増加以外に、電顕による検討の結果から、PCB により甲状腺機能障害が起り、結果として、甲状腺ホルモン分泌が阻害されていることを示した。

以上の Bastomsky や Collins と Capen の PCB による血清チロキシンレベルの減少に関する考察は、我々の結果にも重要な示唆を与えるものである。対照的に、過剰チロシンは、血清  $T_3$ ,  $T_4$  レベルに顕著な影響を及ぼすことなしに、高コレステロール血症を生成することから、今後、銅欠乏などで行なわれているような、甲状腺機能に関する、視床下部から分泌される TRH や脳下垂体から分泌される  $TSH$  の応答性の検討<sup>(201)</sup> も行なう必要はあるが、チロシンの場合、血中  $T_4$ ,  $T_3$  レベルの結果が

推論すると、甲状腺ホルモンと高コレステロール血症との間には、直接的な相互関係は認められないものと思われた。

甲状腺ホルモンは、コレステロール代謝に対して、一般に促進的に作用し<sup>(105)</sup>、種々の動物において、血中コレステロール低下作用が報告されており、たとえば、人間においては、血清コレステロールの低下は、LDL及びHDL画分中のコレステロールの低下を反映している<sup>(208)</sup>とされる報告もある。このような血清コレステロールの低下は、甲状腺ホルモンがコレステロールの生合成を促進させるにもかかわらず<sup>(208)</sup>起っており、これは、コレステロールの異化が合成を上まわって促進していることによるものと考えられている<sup>(208)</sup>。その機序としては、甲状腺ホルモンは、コレステロールの胆汁酸への変換を促進したり<sup>(141)(208)</sup>、Chaitら<sup>(209)</sup>により示されているように、甲状腺ホルモンがLDLの分解などを促進させることが考えられる。

このような甲状腺ホルモンとコレステロール代謝との相互関係は、ラットにおいても広範に研究されている。甲状腺機能とコレステロールの合成系及び分解系との関係も調べた Takeuchi が<sup>(25)</sup>の報告によると、胆汁酸生合成系は、コレステロール合成系に比べて、はるかに鋭敏に反応することが示されている。すなわち、甲状腺機能亢進作用のある甲状腺未投与群では、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性（分解系）は、低用量から反応し、用量の増加にともなって徐々に増加するのに対し、合成系は、高用量で初めて亢進が認められる。また、甲状腺機能低下剤であるチオウラシル投与群の変化を見ると、分解系は、低用量ですでに抑制されるのに、合成系は、高用量で初めて抑制されることが観察されている。したがって、甲状腺機能が低下した時に、高コレステロール血症が生成するのは、以上のような合成系と分解系との反応性の相違に原因するものと考えられている。このような、甲状腺機能低



下時におけるコレステロール分解系の低下は、Byers と Friedman<sup>(200)</sup> によっても示されている。以上の、甲状腺機能とコレステロール代謝との相互関係を示した知見は、今回の我々の2-オウラシルによる高コレステロール血症生成機構にも示唆を与えるものである。

一方、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性などに対する甲状腺ホルモンの影響のみならず、LDL-レセプターによるリポタンパクの異化に対する影響についても、報告されている。たとえば、人間においては、甲状腺機能低下時にIDLとLDL画分中のコレステロールがともに増加することが知られているが<sup>(4)</sup>、Walton<sup>(20)</sup> は、甲状腺機能低下時に血中LDLの増加を観察し、その際、<sup>131</sup>IでラベルしたLDLの血中半減期が延長していることを示し、このようなLDL異化の遅延は、LDL-レセプターによる分解の低下も一因しているものと、現在推定されている<sup>(140)(209)</sup>。

以上のような甲状腺ホルモンとコレステロ

ールバランスに関する知見から、今回我々の行った結果を考察してみると、2-4オウラシル投与により、甲状腺機能が低下した場合には、前述のごとく、高コレステロール血症が生成し、これは Yagasaki 5<sup>(56)</sup>の結果と一致する。さらに、PCBと2-4オウラシルの両方を投与した場合には、血清コレステロールの上昇は、PCB単独の場合よりもさらに増幅され、2-4オウラシル単独の上昇幅とPCB単独による血清コレステロールの上昇幅の和に、せまる上昇が観察された。これは、PCBと2-4オウラシルの血清コレステロール上昇が、互いに独立した機構で起こることを示唆しているのかもしれないが、今後、RIなどを用いたコレステロールバランスなどの検討が、その機構の解明には必要であろう。一方、Yagasaki 5<sup>(56)</sup>は、Xオニンによる高コレステロール血症生成には、甲状腺ホルモンが関与することを、2-4オウラシル投与によりXオニンの高コレステロール血症が観

察されなく存ることから推論したが、この点から今回の結果を考えると、少なくとも、彼らの報告しているメチオニンによる血清コレステロール上昇とPCBによる高コレステロール血症は生成機序が異なるものと思われる。

さらに、前述したように、PCB投与により血清T<sub>4</sub>レベルは著しく減少したわけであるが、このことは、CollinsとCapenの報告<sup>(203)</sup>などから、PCB群は甲状腺機能低下状態にあることを示すとも考えられるが、Bastomsky<sup>(204)</sup>は、T<sub>4</sub>の減少と同時に、TSHの上昇も観察しており、甲状腺ホルモンは、視床下部から分泌されるTRHさらに、脳下垂体から分泌されるTSHに反応して甲状腺から分泌されるので、PCBによる血中T<sub>4</sub>レベルの低下に反応した、合目的な生体の適応として、TSHの分泌上昇をとらえることも可能であろう。また、T<sub>3</sub>は、T<sub>4</sub>よりも速効性で作用効果も数倍大きいこと<sup>(211)</sup>から、T<sub>4</sub>レベルは減少しても、T<sub>3</sub>レベルはPCB投与により顕著な影響

を受けないことなどから、甲状腺機能を血中ホルモンレベルのみで考えるのは妥当ではないかもしれない。

次に、我々は、他の研究者と同様に、PCBによる血中 $T_4$ レベルの低下を観察したことや前述のコレステロール代謝と甲状腺ホルモンの関連から、 $T_4$ を直接投与したら、PCBによる血清コレステロールの上昇はどのようになるのかということを検討してみたわけである。チロキシンには、血清コレステロール低下作用があることは、すでに述べたとおりであるが<sup>(208)</sup>、事実、我々も20%カゼインのコントロール食を摂取させたラットに $T_4$ を投与することにより、血清コレステロールの有意な低下を観察した。このことは、チロキシン投与による胆汁酸生成の増加などに原因するものと推論しているが、この場合も Eriksson<sup>(212)</sup>が示しているように、 $T_4$ 投与により、ケノデオキシコール酸の胆汁中への分泌が進んでいるのかもしれない。対照的に、PCB食

を摂取させたラットにチロキシンを投与しても、20%カゼインのコントロール食を摂取させたラットで観察された、 $T_4$ による血清コレステロール低下作用は認められなかった。一見、血中 $T_4$ レベルの低下のみをみると、PCBによる高コレステロール血症は、甲状腺ホルモンの血中レベルが低下したために、コレステロールの異化が抑制され、生成されるとも思われるが、以上のように、チロキシン投与を行っても、依然としてPCBによる高コレステロール血症は誘導されるという今回の事実から、PCBによる血清チロキシンレベルの低下は、PCBによる高コレステロール血症生成には直接関与しないものと思われる。しかしながら、コントロール群(20%カゼイン食群)では見られた、 $T_4$ の血清コレステロール低下作用が、PCB群には観察されないことは、機構は明らかではないが興味深く、あるいは、PCB群では、 $T_4$ に対する応答性に変化が生じているのかもしれない。

結果的に、血中 $T_4$ レベルのPCB投与による低下とPCBによる高コレステロール血症生成とを直接結びつけるのは、今回の実験結果からは困難であろうが、第2・3編でも指摘したように、PCBによる高コレステロール血症生成機序に関して、コレステロール異化すおわち、リポタンパクのレセプターによる分解や胆汁酸生成の抑制も一因している可能性はあるわけであり、今後、PCBによる高コレステロール血症生成時において、RIを用いたコレステロールバランスなどの検討をした上で、詳細は議論されよう。事実、第2編でも紹介した、HDL-コレステロールの上昇する高コレステロール血症で知られる銅欠乏は<sup>(20)</sup>、HDLの肝リポタンパクレセプターによる異化の低下により誘導されていると考えられているが<sup>(24)</sup>、この際、TRHに応答する脳下垂体の機能は、銅欠乏により影響されないが、TSHに応答する甲状腺の機能が低下する二七も、高コレステロール血症生成に

関与する可能性が示唆されており<sup>(201)</sup>、PCBや  
キノシンの高コレステロール血症誘導機構を  
考える上で興味深い。

第4章 生体異物及び過剰チロシンの血清脂質，肝臓及び筋肉グリコーゲン，尿中アスコルビン酸，カテコールアミン，ヒスタミン排泄に対する影響，生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する $\alpha$ ， $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の影響及びカテコールアミン注射による血清コレステロールに対する影響



## 目的

かなり以前より、ストレスが血清脂質に影響を及ぼすことが、多くの研究者により報告されてきた<sup>(5)</sup>。現在、ストレスは、ちょうど物理学でスプリングの中に生ずる歪みを表現すると同様に、生物の体内に生じた歪みの状態を表現する抽象的な言葉で定義されている<sup>(42)</sup>。Selye は、ストレス学説の中で、体にストレスを起す作用因子をストレッサーあるいは、ストレス作用と呼んだが<sup>(42)</sup>、ストレッサーは、大きく分けて、以下に示すような4つに分類されている<sup>(42)</sup>。すなわち、①低温や高温暴露、X線などの物理的作用因子。②絶食やビタミンの欠乏、アルコール、薬物投与などの化学的作用因子。③細菌感染などの生物的作用因子。④心身症などを含めた生物の統合機序に大切な神経因子すなわち、精神的な作用因子、である。このような、ストレスの定義から広範な生物現象が、この範疇に入るわけである。生体にストレス作用が加わった

際の反応は、そのストレス作因がどのようなものであるとしても、その性質の如何にかかわらず、非特異的でしかも、一定の応答つまり、Selye らの主張するような全身適応症候群を示すことも知られている<sup>(41)(42)</sup>。要するに、ストレスに対する非特異的反応として、脳下垂体-副腎皮質系などが活性化され、分泌されたグルココルチコイドなどにより、生体の抵抗性が増すことも、その一つである。このようなストレスに対する生体の適応反応の一つには、血清コレステロールレベルの上昇が知られている。したがって、ストレスとコレステロール代謝は密接に関連しているものと考えられている<sup>(5)(102)</sup>。事実、ストレス<sup>(109)</sup>、アルコール<sup>(7)(22)</sup>、精神的ストレス<sup>(5)(102)</sup>、運動<sup>(8)</sup>なども、コレステロール代謝に対する影響が報告されており、この中でラットにおいて、精神的ストレス<sup>(109)</sup>である束縛ストレスは、HMG-CoA reductase 活性を上昇させたり、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した *in vivo*

における肝コレステロール合成能を上昇させることも示されている<sup>(87)(102)</sup>。

一方、ストレスに対する適応ホルモンの一つである、エピネフリンやノルエピネフリンなどのカテコールアミン自身にも、血清コレステロール上昇作用<sup>(213)</sup>、*in vivo*<sup>(214)</sup>や肝培養細胞を用いた系<sup>(43)</sup>などにおいて、肝HMG-CoA reductase活性を増加させる作用があることが示されている。

以上述べてきたような立場から、我々の実験系を考慮してみると、前述のストレス作用因の化学的作用因子に分類される、PCBや過剰チロシン摂取による代謝応答は、生体に歪みが生じた状態をなわち、ストレスに対する代謝応答であるとも考えられる。さらに、我々は、緒論でも述べたように(P. 9~12)、生体異物や過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症が、生体異物や過剰チロシンの摂取自体が“代謝的ストレス”となって、これに応答したカテコールアミン<sup>(43)</sup>などのコレ

ステロール合成を促進するホルモンの共通的存在変動などを介して生成されるという仮説を想定している。

以上のことから、PCBなどの生体異物やカテコールアミンの生成母体であるチロシン過剰摂取が、ストレスに関連し、コレステロール合成を促進させるカテコールアミンの尿中排泄にどのような影響を及ぼすのが検討した。さらに、カテコールアミンは、細胞膜の $\alpha$ 及び $\beta$ -受容体を介して、生理作用を発現すると言われているので、カテコールアミンの作用を、その受容体に拮抗することにより阻害することがわかっている、 $\alpha$ 及び $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤を投与した際の、PCBなどの生体異物や過剰チロシンによる高コレステロール血症誘導についても検討した。また、カテコールアミンは血中遊離脂肪酸レベル<sup>(215)</sup>やグリコーゲン代謝<sup>(216)</sup>に対する影響も示されているので、あわせて検討した。

一方、ラットにおいて、種々の物理的、化

学的ストレスは、ヒスタミンの尿中排泄を上昇させることが chatterjee <sup>(27)(28)</sup> によって報告されており、このようなヒスタミンに対する変化も PCB や過剰チロシン摂取により、引き起こされている可能性があるので、あわせて検討した。

以上、主に、PCB などの生体異物や過剰チロシン摂取による高コレステロール血症生成とカテコールアミン、ヒスタミンとの関連を検討することを目的とした。

## 方法

(1) PCB 及び 2,4-ジクロロキノリンの血清遊離脂肪酸、肝臓及び筋肉グリコーゲンに対する影響

実験動物として、初体重 90 g 前後の Wistar 系雄ラットを用い、市販の固型飼料を 3 日間、次いで 20% カゼイン飼料を 2 日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験飼料は、20% カゼインに、300 ppm PCB あるいは、10% 4-クロシンを添加したものをを用いた。飼育期間は、21 日間で、水や飼料は自由摂取させた。21 日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖し、心臓から採血した。なお、解剖当日は、食餌をそのまま解剖時まで、自由摂取させ、午後 1 時から解剖した。解剖後、肝臓・筋肉と精巢上体周囲脂肪組織を切除し、湿重量を測定した。

血清の遊離脂肪酸は、高橋ら<sup>(219)</sup>の方法により、酵素法で測定した。肝臓及び筋肉グリコーゲンは、Dubois ら<sup>(220)</sup>の方法により測定した。  
(基本的実験方法参照)

②生体異物及び過剰チロシンの血清脂質，尿中カテコールアミン，ヒスタミン及びアスコルビン酸排泄に対する影響

実験動物として，初体重90g前後のWistar系雄ラットを用い，市販の固型飼料を3日間，次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後，実験飼料に切り換えた。実験飼料は，20%カゼインに，0.03% PCB，12% チロシン，0.2% あるいは0.5% BHT，0.3% あるいは0.5% クロレトン(クロロブタノール)，0.05% あるいは0.1% DDTを，それぞれ別々に添加したものをを用いた。飼育期間は，14日間及び28日間で，水や飼料は自由摂取させた。14日間及び28日間飼育後，ドライアイス麻醉下でラットを解剖し，心臓から採血した。解剖は，午後7時より行ない，解剖前24時間は，無脂肪食を与えて飼育した。実験期間中20ml 0.1N HClで採尿し，尿中カテコールアミン排泄量は，電気化学的検出法を用いたHPLC (Yanako L-3200V) で分析した<sup>(221)</sup>。尿中のヒスタ

ミン排泄量は, Anton と Sayre <sup>(222)</sup> の方法に従い, 蛍光法で測定した。血清コレステロールは, Pearson <sup>(57)</sup> の方法で測定した。血清HDL-コレステロールは, Ishikawa <sup>(58)</sup> の方法で分析した。血清TGは, ベーリンガー・マンハイム社のキットを用いて測定した<sup>(59)</sup>。血清PLは, キット (Phospholipid-Test Wako) を用いて測定した<sup>(243)</sup>。尿中アスコルビン酸は, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法により測定した<sup>(66)</sup>。(基本的実験方法参照)



③生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する、 $\alpha$ 及び $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の影響

A. PCB, DDT及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する、 $\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤(フェノキシベンザミン)の影響

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用い、市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験は、14日間行ない、20%カゼイン群、20%カゼインに、0.03% PCB, 0.1% DDTあるいは、10%チロシンをそれぞれ添加した群、0.03% PCB, 0.1% DDTあるいは、10%チロシン群に、 $\alpha$ -遮断剤をそれぞれ投与した群をもうけた。 $\alpha$ -遮断剤(フェノキシベンザミン-塩酸塩)は、午前10時から11時に、15%エタノールを含んだ0.9% NaCl 溶液に溶かして、最初の7日間は、30mg/kg B.W./day, 残りの7日間は、

40 mg/kg B.W./day を 2.5 ml/kg B.W. の容量で、計 14 日間チューブにより経口投与した。α-遮断剤を投与しない群のラットには、15% エタールを含む 0.9% NaCl 溶液を、2.5 ml/kg B.W. の容量で投与した。α-遮断剤の投与により、食餌摂取量の減少が観察されたことから、実験は、pair-feeding で行った。なお、フェキシベンガミンの投与量は、既報<sup>(24)</sup>を参考にして決定した。14 日間飼育後、ドライアイス麻酔下でラットを解剖した。解剖後、肝臓及び副腎を切除し、湿重量を測定した。解剖当日は食餌を午前 10 時にぬき、3 時間絶食後、午後 1 時から解剖した。

血清コレステロールは、pearson 法<sup>(57)</sup>の方法で分析した。血清 HDL-コレステロールは、Ishikawa 法<sup>(58)</sup>の方法で分析した。

B. 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する、 $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤（プロプラノロール）の影響

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用い、市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験は、14日間行い、20%カゼイン群、20%カゼインに、0.03% PCB, 0.1% DDTあるいは、10%チロシンをそれぞれ添加した群、0.03% PCB, 0.1% DDTあるいは、10%チロシンを添加しさらに、 $\beta$ -遮断剤をそれぞれ投与した群をもうけた。 $\beta$ -遮断剤（プロプラノロール-塩酸塩）は、午前10時から11時に、0.9% NaCl 溶液に溶かして、毎日、14日間、35mg/kg B.W./day を 2.5ml/kg B.W. の容量で、チューブにより経口投与した。 $\beta$ -遮断剤を投与しない群のラットには、0.9% NaCl 溶液を、2.5ml/kg B.W. の容量で投与した。なお、プロ

プラノロールの投与量は、既報<sup>(24)</sup>を参考にし  
て決定した。14日間飼育後、ドライアイス麻  
酔下でラットを解剖した。解剖当日は、食餌  
を午前10時にぬき、3時間絶食後、午後1時  
から解剖した。また、水や飼料は自由摂取さ  
せて実験を行った。

血清コレステロールは、pearson<sup>(57)</sup>の方法  
で分析した。血清HDL-コレステロールは、  
Ishikawa<sup>(58)</sup>の方法で分析した。

### C. PCBによる高コレステロール血症に対 する、 $\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤 (トラゾリン)の影響

実験動物として、初体重90g前後のWistar  
系雄ラットを用い、市販の固型飼料を3日間、  
次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、  
実験飼料に切り換えた。実験は、10日間行い、  
20%カゼイン群、20%カゼイン群に $\alpha$ -遮断  
剤を投与した群、20%カゼインに、0.03%  
PCBを添加した群、0.03% PCBを添加

しさらに、 $\alpha$ -遮断剤を投与した群をもうけた。 $\alpha$ -遮断剤(トラゾリン-塩酸塩)は、午前10時から11時に、0.9% NaCl 溶液に溶かして、最初の4日間は、 $20\text{mg}/\text{kg B.W.}/\text{day}$ 、次の3日間は、 $30\text{mg}/\text{kg B.W.}/\text{day}$ 、残りの3日間は、 $40\text{mg}/\text{kg B.W.}/\text{day}$  を  $2.5\text{ml}/\text{kg B.W.}$  の容量で、皮下注射にて投与した。 $\alpha$ -遮断剤の投与により、食餌摂取量の減少が観察されたことから、実験は、pair-feedingで行った。なお、トラゾリンの投与量は、既報<sup>(214)</sup>を参考にして決定した。10日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖した。解剖当日は、食餌は元のまま解剖時まで、自由摂取させ、午後1時から解剖した。

血清コルステロールは、pearson<sup>(57)</sup>の方法で測定した。

なお、 $\alpha$ -遮断剤を投与しないう群のラットには、0.9% NaCl 溶液を  $2.5\text{ml}/\text{kg B.W.}$  の容量で皮下注射した。

## D. PCBによる高コレステロール血症に対する、 $\alpha_1$ -アドレナリン作動性遮断剤（プロゾシン）の影響

実験動物として、初体重90g前後のWistar系雄ラットを用い、市販の固型飼料を3日間、次いで20%カゼイン飼料を2日間与えた後、実験飼料に切り換えた。実験は、10日間行い、20%カゼイン群、20%カゼイン群に、 $\alpha_1$ -遮断剤を投与した群、20%カゼインに、0.03% PCBを添加した群、0.03% PCBを添加しさらに、 $\alpha_1$ -遮断剤を投与した群をもうけた。 $\alpha_1$ -遮断剤（プロゾシン-塩酸塩）は、午前10時から11時に、30%イタールを含む0.9% NaCl溶液に溶かして、最初の6日間、30mg/kg B.W./day、残りの4日間は、20mg/kg B.W./dayを2.5ml/kg B.W.の容量で、計10日間皮下注射にて投与した。 $\alpha_1$ -遮断剤を投与しない群のラットには、30%イタールを含んだ0.9% NaCl溶液を、2.5ml/kg B.W.の容量で皮下注射にて投与した。 $\alpha_1$ -遮断剤の投

とにより、食餌摂取量の減少が観察されたことから、実験は pair-feeding で行った。なお、プラゾシンの投与量は、既報<sup>(24)</sup>を参考にして決定した。10日間飼育後、エーテル麻酔下でラットを解剖した。解剖当日は、食餌をえのまま解剖時まで自由摂取させ、午後1時から解剖した。

血清コレステロールは、pearson<sup>(57)</sup>の方法により定量した。血清HDL-コレステロールは、Ishikawa &<sup>(58)</sup>の方法により分析した。

[4] ノルエピネフリン及びエピネフリン注射による血清コレステロールレベルに対する影響

実験は、実験動物として、初体重250g前後のWistar系雄ラットを用い、市販の固型飼料を摂取させに行った。ノルエピネフリン(2.0mg/kg B.W.)、エピネフリン(3.0mg/kg B.W.)をゴマ油に溶かし、2.5ml/kg B.W.の容量で、午後9時に皮下注射し、注射から12時間後に、ラットをエーテル麻酔下で解剖し、心臓から採血した。なお、カテコールアミンの投与量は、既報<sup>(24)</sup>を参考にして決定した。

血清コレステロールは、pearson<sup>(57)</sup>の方法で測定した。



## 結果

① PCB 及び 過剰チロシンの血清遊離脂肪酸、  
肝臓及び筋肉グリコーゲンに対する影響  
精巢上体周囲脂肪組織の重量は、10%チロ  
シン及び 300 ppm PCB の両群で、対照群と  
比べて減少する傾向を示した。血清の遊離脂  
肪酸レベルは、10%チロシン及び 300 ppm P  
CB の両群で、対照群と比べて増加する傾向  
を示した。肝臓のグリコーゲンは、組織 1g  
あたりで表示すると、対照群と比べて 10%チ  
ロシン群で減少する傾向を示し、300 ppm P  
CB 群では、有意に減少した。しかし、組織  
全体で表現すると、PCB 及びチロシンの両  
群で対照群と比べて、顕著な差は認められな  
かった。筋肉のグリコーゲンには、対照群と  
比べて、PCB やチロシンによる顕著な変化  
は認められなかった。(Table 24, p. 240)

(2) 生体異物及び過剰チロシンの血清脂質，尿中カテコールアミン，ヒスタミン排泄に対する影響

28日間飼育した，0.2% BHT群，0.3% クロレトン(クロロブタノール)群，0.05% DDT群，0.03% PCB群，12% チロシン群では，食餌摂取量，体重増加量には，対照群と比べて有意な差は認められなかったが，いずれも肝肥大が観察された。14日間飼育した場合，0.5% BHT群で，体重増加量の減少が認められたが，0.5% クロレトン(クロロブタノール)，0.1% DDT群では，体重増加量，食餌摂取量とも対照群と比べて，顕著な差は見られず，いずれも肝肥大が観察された。(Table 25, 26, 28; p. 241, 242, 244)

28日間飼育した，0.03% PCB群，12% チロシン群，0.2% BHT群，0.3% クロレトン(クロロブタノール)群，0.05% DDT群で，対照群と比べて，血清コレステロールの有意な上昇が観察された。また，同様に，

14日間飼育した, 0.5% BHT群, 0.5% クロレトン (クロロブタール) 群, 0.1% DDT群でも, 対照群と比べて, 血清コレステロールは有意に上昇した。

(Table 25, 27, 28 ; p. 241, 243, 244 )

0.2% BHT群, 0.3% クロレトン (クロロブタール) 群, 0.05% DDT群で観察される血清コレステロールの上昇は, HDL-コレステロール, LDL + VLDL-コレステロールの両画分の増加として表わされた。

(Table 27, p. 243 )

血清TGは, 対照群と比べて, 28日間飼育した12% ナロシン群で上昇する傾向を示し, 0.03% PCB群では, 対照群とほぼ同様の値が示され, クロレトン群, DDT群, BHT群では, 実験期間や添加レベルにかかわらず, いずれも, 対照群と比べて減少する傾向が示された。(Table 25, 27, 28 ; p. 241, 243, 244 )

血清PLは, 28日間飼育した, 0.2% BHT群, 0.3% クロレトン (クロロブタール)

群, 12% 4ロシン群で対照群に比べて, 上昇する傾向が示され, 0.03% PCB群, 0.05% DDT群では, 対照群と比べて有意に上昇した。(Table 25, 27 ; p. 241, 243 )

尿中1ルエピネフリン排泄量は, 0.03% PCB, 12% 4ロシン群, 0.5% クロレトン(クロロブタール)群, 0.1% DDT群, 0.5% BHT群で, 対照群と比べて有意に上昇した。尿中エピネフリン排泄量は, 0.5% BHT, 0.5% クロレトン(クロロブタール)群で, 対照群と比べて上昇する傾向を示し, 0.1% DDT群, 0.03% PCB群, 12% 4ロシン群で, 対照群と比べて有意に上昇した。尿中ドーパミン排泄量は, 0.03% PCB, 12% 4ロシン群, 0.1% DDT群, 0.5% クロレトン(クロロブタール)群, 0.5% BHT群で, 対照群と比べて有意に上昇した。(Table 25, p. 241 ; Fig. 7, 8, 9, p. 245 )

尿中ヒスタミン排泄量は, 0.03% PCB群, 12% 4ロシン群, 0.05% DDT群,

0.3% クロトン, 0.2% BHT 群で, 対照群と比べて有意に上昇した (Table 25 p.241 ; Fig 8 p. 245)。尿中アスコルビン酸排泄量は, 種々の生体異物及びクロシンにより対照群と比べて有意に上昇した (Table 25 p.241 ; Fig 7 p. 245)。

[3] 生体異物及び過剰クロシンによる高コレステロール血症に対する,  $\alpha$  及び  $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の影響

A. PCB, DDT 及び過剰クロシンによる高コレステロール血症に対する,  $\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤 (フェキシベンガミン) の影響

食餌摂取量は, 自由摂取時よりも, フェキシベンガミン処理により低下したが, pair-feeding のために, 14 日間の体重増加量には, クロシン群, PCB 群及び DDT 群あるいは, どのそれだけの群に,  $\alpha$ -遮断剤を投与した群と対照群との間に, 顕著な差は見られなかった。肝重量は, フェキシベンガミン処理の有無にかかわらず, PCB, DDT あるいは

は、チロシン摂取により、対照群と比べて、有意に上昇した。副腎の重量には、PCB、チロシン摂取あるいは $\alpha$ -遮断剤投与による顕著な影響は認められなかった。PCB、DDTによる血清コレステロール上昇は、フェノキシベンザミンの投与により、顕著に抑制された。チロシンの場合には、フェノキシベンザミンの投与により、高コレステロール血症は、もはや認められなかった。さらに、PCB、DDT及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対するフェノキシベンザミン投与の影響は、HDL-コレステロール及びLDL+VLDL-コレステロールの両画分の減少として表現された。さらに、DDTによる尿中アスコルビン酸排泄量の上昇は、フェノキシベンザミンの投与により、いっそう増幅された。(Table 29, 30, 31, 32 ; p. 246, 247, 248, 249)

B. 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症に対する、 $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤（プロプラノロール）の影響

食餌摂取量は、プロプラノロール処理やPCB, DDTあるいはチロシン添加の有無にかかわらず、すべての群間において顕著な差は認められなかった。肝重量は、プロプラノロール処理の有無にかかわらず、PCB, DDT及びチロシン過剰摂取により、対照群と比べて有意に上昇した。PCB, チロシンによる血清コレステロールの上昇は、プロプラノロールの投与により、さらに、増幅される傾向が示され、DDTの場合には、その増幅に有意差が示された。さらに、DDTによる高コレステロール血症に対する、プロプラノロール投与の影響は、HDL-コレステロール及びLDL+VLDL-コレステロールの両画分の増加として、表現された。0.1% DDTによる尿中アスコルビン酸排泄量の上昇

は、プロプラノロールの投与により、顕著に抑制された。(Table 33, 34, 35 ; p. 250, 251, 252 )

C. PCBによる高コレステロール血症に対する、 $\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤 (トラゾリン) の影響 (Table 36, p. 253 )

食餌摂取量は、自由摂取時よりも、トラゾリン処理により低下したが、pair-feedingのために、10日間の体重増加量は、PCB群あるいは、その $\alpha$ -遮断剤投与群、20%カゼイン食の対照群あるいは、その $\alpha$ -遮断剤投与群の4群間に顕著な差は認められなかった。肝重量は、トラゾリンの処理の有無にかかわらず、PCB摂取により対照群と比べて、有意に上昇した。トラゾリン自身は、肝重量に対して顕著な影響を及ぼさなかった。PCBによる血清コレステロールの上昇は、トラゾリン処理により、顕著に抑制された。対照群の血清コレステロールも若干ではあるが、有意にトラゾリン処理により低下した。



D. PCBによる高コレステロール血症に対する、 $\alpha_1$ -アドレナリン作動性遮断剤（プラゾシン）の影響 (Table 37, p. 254)

食餌摂取量は、自由摂取時よりも、プラゾシン処理により低下したが、pair-feedingのために、10日間の体重増加量には、対照群(20%カゼイン食群)にプラゾシンを投与した群のみ低下しているのを除いて、残りの3群間に顕著な差は認められなかった。肝重量は、プラゾシン処理の有無にかかわらず、PCB投与により、対照群に比べて有意に上昇した。プラゾシン自身にも、肝肥大をもたらす作用が認められ、PCB群にプラゾシンを投与した場合には、PCB単独による肝肥大を、さらに増強させた。PCBによる血清総コレステロールの上昇は、プラゾシン処理により、顕著に抑制された。対照群の血清総コレステロールも若干ではあるが、プラゾシン処理により有意に低下した。さらに、PCBによる高コレステロール血症に対する、プラゾシン投

与の影響は、HDL-コレステロール及び、LDL+VLDL-コレステロールの両画分の減少として表現された。

[4]ノルエピネフリン及びエピネフリン注射による血清コレステロールレベルに対する影響 (Table 38, p. 255)

ノルエピネフリン及びエピネフリン投与により、血清コレステロールは、対照群と比べて有意に上昇した。

Table 24

Effect of dietary addition of tyrosine or PCB on epididymal adipose weight, serum free fatty acids, liver and muscle glycogen in rats.<sup>1,2,3</sup>

Measurement	Control (20% casein)	Tyrosine (10%)	PCB (300 ppm)
Epididymal adipose tissue weight (g/100 g B.W.)	1.43±0.14 <sup>a</sup>	1.28±0.09 <sup>a</sup>	1.21±0.08 <sup>a</sup>
Serum free fatty acids (μEq/l)	490.8±95.2 <sup>a</sup>	579.1±124.5 <sup>a</sup>	667.5±138.4 <sup>a</sup>
Liver glycogen (mg/g tissue)	39.7±4.3 <sup>a</sup>	31.6±3.6 <sup>ab</sup>	26.8±2.9 <sup>b</sup>
(mg/100 g B.W.)	197.9±24.2 <sup>a</sup>	182.0±24.5 <sup>a</sup>	199.7±22.3 <sup>a</sup>
Muscle glycogen (mg/g tissue)	4.66±0.14 <sup>a</sup>	4.48±0.50 <sup>a</sup>	5.03±0.11 <sup>a</sup>

1. Feeding period was 21 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 25

*Effect of dietary addition of tyrosine or polychlorinated biphenyls (PCB) on serum and liver lipids, urinary ascorbic acid, histamine, norepinephrine, epinephrine and dopamine in rats*

(Mean values with their standard errors for six rats per group)

Dietary treatment...	Control (200 g casein/kg)		Tyrosine (120 g/kg)		PCB (0.3 g/kg)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Food intake, day 8 (g/d)	13.5 <sup>a</sup>	0.7	13.8 <sup>a</sup>	0.6	13.7 <sup>a</sup>	0.7
Body-wt gain (g/28 d)	115.2 <sup>a</sup>	5.4	113.5 <sup>a</sup>	3.7	109.3 <sup>a</sup>	6.0
Liver wt (g/kg body-wt)	43.3 <sup>a</sup>	1.1	50.3 <sup>b</sup>	1.1	66.7 <sup>c</sup>	1.1
Serum:						
Cholesterol (mg/l)	953 <sup>a</sup>	50	1224 <sup>b</sup>	44	2028 <sup>c</sup>	55
Triglyceride (mg/l)	1759 <sup>a</sup>	218	1941 <sup>a</sup>	228	1701 <sup>a</sup>	270
Phospholipid (mg/l)	2418 <sup>a</sup>	96	2527 <sup>a</sup>	91	3808 <sup>b</sup>	80
Corticosterone ( $\mu$ g/l)	452 <sup>a</sup>	45	409 <sup>a</sup>	28	337 <sup>a</sup>	43
Liver (mg/g liver):						
Total lipid	54.2 <sup>b</sup>	0.6	48.5 <sup>a</sup>	1.7	71.8 <sup>c</sup>	1.6
Cholesterol	2.1 <sup>a</sup>	0.1	2.1 <sup>a</sup>	0.1	3.4 <sup>b</sup>	0.2
Triglyceride	23.3 <sup>b</sup>	1.0	16.2 <sup>a</sup>	1.6	29.9 <sup>c</sup>	1.6
Phospholipid	28.8 <sup>a</sup>	0.7	30.2 <sup>a</sup>	0.8	38.5 <sup>b</sup>	0.5
Urinary (/kg body-wt per d):						
Ascorbic acid (mg)	1.3 <sup>a</sup>	0.1	3.8 <sup>b</sup>	0.8	100.7 <sup>c</sup>	8.5
Histamine ( $\mu$ g)	119.3 <sup>a</sup>	4.6	268.3 <sup>c</sup>	21.5	173.1 <sup>b</sup>	15.2
Norepinephrine ( $\mu$ g)	3.40 <sup>a</sup>	0.69	5.62 <sup>b</sup>	0.58	6.63 <sup>c</sup>	0.67
Epinephrine ( $\mu$ g)	1.16 <sup>a</sup>	0.16	1.86 <sup>b</sup>	0.21	1.96 <sup>b</sup>	0.21
Dopamine ( $\mu$ g)	12.0 <sup>a</sup>	5.3	82.7 <sup>c</sup>	15.3	38.4 <sup>b</sup>	6.2

<sup>a, b, c</sup> Mean values within the same horizontal row with unlike superscript letters were significantly different:  $P < 0.05$ .

Table 26

Effect of dietary addition of some xenobiotics on food intake, body and liver weights in rats<sup>1,2,3</sup>

Group	Food intake day 8	Body weight gains	Liver weight
	g/day	g/28 days	g/100 g B.W.
Control (20% Casein)	14.2±0.5	125.3±5.3	4.38±0.10
BHT (0.2%)	15.1±0.3	120.7±3.8	6.18±0.19 <sup>***</sup>
Chloretone (0.3%)	15.2±0.3	132.8±3.2	4.95±0.09 <sup>***</sup>
DDT (0.05%)	14.2±0.3	124.7±4.0	6.14±0.09 <sup>***</sup>

1. Feeding period was 28 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

Table 27

Effect of dietary addition of some xenobiotics on serum lipids in rats<sup>1,2,3</sup>

Group	Cholesterol	HDL-Chol.	LDL+VLDL-Chol.	Triglyceride	Phospholipid
	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Control ( 20% Casein )	96.3±6.7	57.8±4.0	38.5±2.7	184.3±38.1	224.2±8.6
BHT ( 0.2% )	114.5±2.5*	67.6±1.5	46.9±1.0*	89.0±10.5*	230.6±10.8
Chloretone ( 0.3% )	124.0±6.4**	76.8±4.0**	47.1±2.4*	148.8±24.9	256.1±15.9
DDT ( 0.05% )	131.4±2.1***	84.1±1.4***	47.3±0.8**	95.0±10.0*	269.0±2.9***

1. Feeding period was 28 days. 2. Means ± SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

243

Table 28

Effect of dietary addition of some xenobiotics on food intake, body and liver weights, serum lipids in rats<sup>1,2,3</sup>

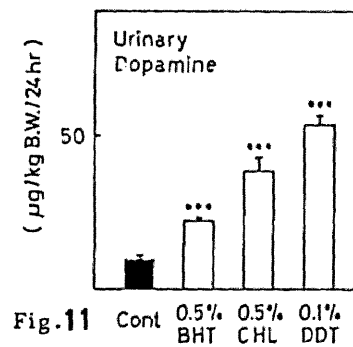
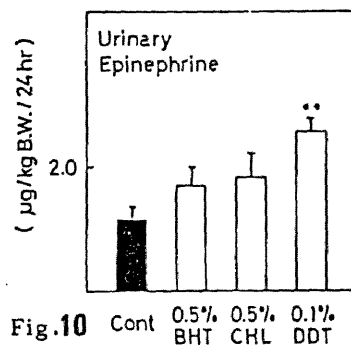
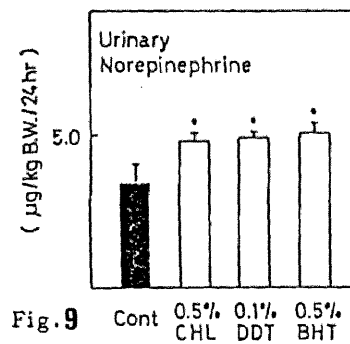
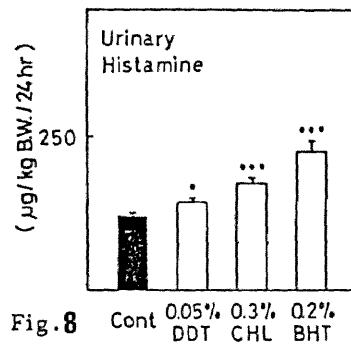
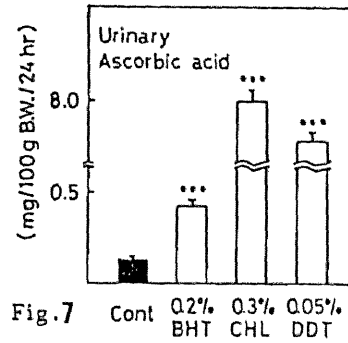
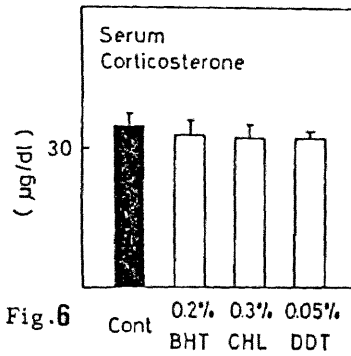
Group	Food intake day 10	Body weight gains	Liver weight	Cholesterol	Triglyceride
	g/day	g/14 days	g/100 g B.W.	mg/dl	mg/dl
Control ( 20% Casein )	14.9±0.53	67.3±2.51	4.45±0.08	140.0±3.3	168.4±22.8
BHT ( 0.5% )	14.3±0.72	41.3±2.26 <sup>***</sup>	6.22±0.08 <sup>***</sup>	122.3±4.3 <sup>*</sup>	55.1±4.9 <sup>***</sup>
Chloretone ( 0.5% )	15.2±0.50	71.5±3.49	4.78±0.10 <sup>*</sup>	128.7±4.2 <sup>**</sup>	131.8±17.8
DDT ( 0.1% )	15.2±0.40	62.8±0.87	6.38±0.16 <sup>***</sup>	154.5±6.0 <sup>***</sup>	80.7±3.5 <sup>**</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means ±SE. of 6 rats per group.

3. Statistical significance compared with control group.

( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 )

244



Effect of dietary addition of some xenobiotics on serum corticosterone (Fig. 6), urinary excretion of ascorbic acid (Fig. 7), histamine (Fig. 8), norepinephrine (Fig. 9), epinephrine (Fig. 10) and dopamine (Fig. 11) in rats. Cont: Control group, BHT: BHT group, CHL: chlorotone group, DDT: DDT group. Statistical significance compared with control group. ( $\cdot$   $p < 0.05$ ,  $\cdot\cdot$   $p < 0.01$ ,  $\cdot\cdot\cdot$   $p < 0.001$ )



Table 29

*Effect of chronic  $\alpha$ -blocker treatment on growth, liver weight and adrenal weight in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls (PCB) or tyrosine*  
(Mean values with their standard errors for six rats per group)

Group	Body-wt gain (g/14 d)		Liver wt (g/kg body-wt)		Adrenal wt (mg/kg body-wt)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Pair-fed control (200 g casein/kg)	38.2 <sup>a</sup>	1.5	42.7 <sup>a</sup>	0.3	193 <sup>a</sup>	5.6
Pair-fed PCB (0.3 g/kg)	38.2 <sup>a</sup>	2.0	68.2 <sup>b</sup>	1.4	190 <sup>a</sup>	6.3
<i>Ad lib.</i> PCB (0.3 g/kg) + $\alpha$ -blocker	37.2 <sup>a</sup>	2.1	68.9 <sup>b</sup>	1.5	189 <sup>a</sup>	8.0
Pair-fed control (200 g casein/kg)	41.0 <sup>a</sup>	3.2	42.6 <sup>a</sup>	1.1	187 <sup>a</sup>	7.7
Pair-fed tyrosine (100 g/kg)	40.2 <sup>a</sup>	3.6	51.1 <sup>b</sup>	2.7	190 <sup>a</sup>	8.5
<i>Ad lib.</i> tyrosine (100 g/kg) + $\alpha$ -blocker	40.8 <sup>a</sup>	4.3	50.0 <sup>b</sup>	1.1	181 <sup>a</sup>	5.7

<sup>a, b</sup> For each dietary supplement, mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different:  $P < 0.05$ .

Table 30

*Effect of chronic  $\alpha$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls (PCB) or tyrosine*

(Mean values with their standard errors for six rats per group)

Group	Total cholesterol (mg/l)		HDL-cholesterol (mg/l)		LDL + VLDL-cholesterol (mg/l)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Pair-fed control (200 g casein/kg)	943 <sup>a</sup>	56	588 <sup>a</sup>	53	355 <sup>a</sup>	28
Pair-fed PCB (0.3 g/kg)	2216 <sup>c</sup>	84	1267 <sup>c</sup>	89	949 <sup>c</sup>	65
<i>Ad lib.</i> PCB (0.3 g/kg) + $\alpha$ -blocker	1563 <sup>b</sup>	20	1052 <sup>b</sup>	39	550 <sup>b</sup>	36
Pair-fed control (200 g casein/kg)	1112 <sup>a</sup>	61	666 <sup>a</sup>	38	446 <sup>a</sup>	35
Pair-fed tyrosine (100 g/kg)	1483 <sup>b</sup>	131	911 <sup>b</sup>	126	572 <sup>b</sup>	32
<i>Ad lib.</i> tyrosine (100 g/kg) + $\alpha$ -blocker	1106 <sup>a</sup>	36	624 <sup>a</sup>	37	482 <sup>a</sup>	34

<sup>a, b, c</sup> For each dietary supplement, mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different:  $P < 0.05$ .

247

Table 31

Effect of  $\alpha$ -blocker treatment on growth, liver weight and urinary excretion of ascorbic acid in rats fed DDT-containing diet<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains	Liver weight	Urinary ascorbic acid
	g/14 days	g/100 g B.W.	mg/100 g B.W.
Pair-fed control (20% Casein)	38.3±2.43 <sup>a</sup>	4.19±0.08 <sup>a</sup>	0.13±0.02 <sup>a</sup>
Pair-fed DDT (0.1%)	35.7±1.50 <sup>a</sup>	6.63±0.14 <sup>b</sup>	4.32±0.47 <sup>b</sup>
Ad libitum DDT (0.1%)+ $\alpha$ -blocker <sup>4</sup>	36.3±3.98 <sup>a</sup>	7.31±0.10 <sup>c</sup>	6.21±0.91 <sup>c</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means  $\pm$  SE. of 6 rats per group.  
 3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different (  $p < 0.05$  ). 4. phenoxybenzamine hydrochloride

Table 32

Effect of  $\alpha$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats fed DDT-containing diet<sup>1,2,3</sup>

Group	Cholesterol	HDL-Chol.	LDL+VLDL-Chol.
	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Pair-fed control (20% Casein)	100.2±3.5 <sup>a</sup>	52.4±1.9 <sup>a</sup>	47.7±1.8 <sup>a</sup>
Pair-fed DDT (0.1%)	185.7±7.5 <sup>c</sup>	114.5±5.0 <sup>c</sup>	71.2±2.9 <sup>c</sup>
Ad libitum DDT (0.1%)+ $\alpha$ -blocker <sup>4</sup>	137.1±3.1 <sup>b</sup>	74.8±2.1 <sup>b</sup>	62.3±1.5 <sup>b</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means  $\pm$  SE. of 6 rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). 4. phenoxybenzamine hydrochloride

Table 33

*Effect of chronic  $\beta$ -blocker treatment on food intake, body-weight, liver weights and serum cholesterol in rats given diets supplemented with polychlorinated biphenyls (PCB) or tyrosine*

(Mean values with their standard errors for six rats per group)

Group	Food intake, day 12 (g/d)		Body-wt gain (g/14 d)		Liver wt (g/kg body-wt)		Cholesterol (mg/l)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Control (200 g casein/kg)	15.4 <sup>a</sup>	0.3	60.0 <sup>a</sup>	1.3	44.6 <sup>a</sup>	0.9	1013 <sup>a</sup>	38
PCB (0.3 g/kg)	14.1 <sup>a</sup>	0.6	56.7 <sup>a</sup>	2.5	67.8 <sup>c</sup>	1.6	2102 <sup>c</sup>	53
PCB (0.3 g/kg) + $\beta$ -blocker	14.9 <sup>a</sup>	0.4	58.3 <sup>a</sup>	1.9	70.3 <sup>c</sup>	1.4	2186 <sup>c</sup>	84
Tyrosine (100 g/kg)	15.4 <sup>a</sup>	0.5	60.3 <sup>a</sup>	1.6	53.8 <sup>b</sup>	1.4	1258 <sup>b</sup>	45
Tyrosine (100 g/kg) + $\beta$ -blocker	16.5 <sup>a</sup>	0.5	62.5 <sup>a</sup>	1.8	50.4 <sup>b</sup>	1.0	1308 <sup>b</sup>	68

<sup>a, b, c</sup> For each dietary supplement, mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different:  $P < 0.05$ .

Table 34

Effect of  $\beta$ -blocker treatment on growth, food intake, liver weight and urinary excretion of ascorbic acid in rats fed DDT-containing diet<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains	food intake, day 10	Liver weight	Urinary ascorbic acid
	g/14 days	g/day	g/100 g B.W.	mg/100 g B.W.
Control (20% Casein)	63.0 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	15.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.54 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
DDT (0.1%)	57.3 $\pm$ 2.97 <sup>a</sup>	14.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	6.74 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	5.26 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>
DDT (0.1%) + $\beta$ -blocker <sup>4</sup>	59.3 $\pm$ 3.79 <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	6.88 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.42 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means  $\pm$  SE. of 6 rats per group.  
 3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different (  $p < 0.05$  ). 4. dl-propranolol hydrochloride

Table 35

Effect of  $\beta$ -blocker treatment on serum cholesterol levels in rats fed DDT-containing diet<sup>1,2,3</sup>

Group	Cholesterol	HDL-Chol.	LDL+VLDL-Chol.
	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Control (20% Casein)	112.3 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	56.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	56.0 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
DDT (0.1%)	155.7 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	92.5 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	63.2 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
DDT (0.1%) + $\beta$ -blocker <sup>4</sup>	178.6 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	109.1 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	73.0 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>

1. Feeding period was 14 days. 2. Means  $\pm$  SE. of 6 rats per group.

3. Means within a column not followed by the same letter are significantly different (  $p < 0.05$  ). 4. dl-propranolol hydrochloride

Table 36

Effect of chronic  $\alpha$ -blocker (tolazoline) treatment on body and liver weights, serum cholesterol in rats given diet supplemented with PCB.<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains (g/10 days)	Liver weight (g/100g B.W.)	Serum cholesterol (mg/dl)
Pair-fed control (20% casein)	34.8±1.3 <sup>a</sup>	4.32±0.06 <sup>a</sup>	115.5±4.4 <sup>b</sup>
Pair-fed PCB (0.03%)	35.8±2.2 <sup>a</sup>	6.74±0.16 <sup>b</sup>	208.3±7.0 <sup>d</sup>
Pair-fed control (20% casein) + $\alpha$ -blocker <sup>4</sup>	33.9±2.1 <sup>a</sup>	4.32±0.09 <sup>a</sup>	90.6±5.2 <sup>a</sup>
Ad lib. PCB (0.03%) + $\alpha$ -blocker <sup>4</sup>	38.9±1.9 <sup>a</sup>	6.75±0.04 <sup>b</sup>	154.1±3.4 <sup>c</sup>

1. Feeding period was 10 days. 2. Values are means±SEM of eight rats per group.

3. Mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different. ( $p < 0.05$ )

4.  $\alpha$ -blocker (tolazoline hydrochloride) was subcutaneously injected.



Table 37

Effect of chronic  $\alpha_1$ -blocker (prazosin) treatment on body and liver weights, serum cholesterol levels in rats given diet supplemented with PCB<sup>1,2,3</sup>

Group	Body weight gains (g/10 days)	Liver weight (g/100g B.W.)	Serum total cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL+VLDL-cholesterol (mg/dl)
Pair-fed control (20% casein)	23.4±2.0 <sup>b</sup>	3.82±0.12 <sup>a</sup>	111.8±7.1 <sup>b</sup>	70.9±3.9 <sup>b</sup>	45.4±5.7 <sup>ab</sup>
Pair-fed PCB (0.03%)	24.6±2.7 <sup>b</sup>	5.97±0.14 <sup>c</sup>	187.9±7.3 <sup>c</sup>	129.4±6.0 <sup>c</sup>	64.4±5.8 <sup>c</sup>
Pair-fed control (20% casein)+ $\alpha_1$ -blocker <sup>4</sup>	15.7±1.7 <sup>a</sup>	4.45±0.10 <sup>b</sup>	90.0±1.5 <sup>a</sup>	49.6±3.7 <sup>a</sup>	40.4±4.3 <sup>a</sup>
Ad lib. PCB+ $\alpha_1$ -blocker <sup>4</sup>	26.3±2.1 <sup>b</sup>	6.57±0.15 <sup>d</sup>	112.5±2.1 <sup>b</sup>	59.2±2.2 <sup>a</sup>	53.3±2.5 <sup>bc</sup>

1. Feeding period was 10 days. 2. Values are mean±SEM of seven rats per group.

3. Mean values within the same vertical column with unlike superscript letters were significantly different. (p < 0.05)

4.  $\alpha_1$ -blocker (prazosin hydrochloride) was subcutaneously injected.

Table 38

Effect of norepinephrine or epinephrine on serum cholesterol in rats<sup>1,2</sup>

Group	Serum cholesterol (mg/dl)
Control	76.4±3.5
Norepinephrine <sup>3</sup> (2.0 mg/kg B.W.)	95.7±2.8**
Control	79.0±2.7
Epinephrine <sup>3</sup> (3.0 mg/kg B.W.)	108.8±4.0***

1. Values are means±SEM of eight rats per group. 2. Statistical significance compared with control group. (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001) 3. Norepinephrine or epinephrine in sesame oil was administered subcutaneously at 2100 hr. Animals were killed after being lightly anesthetized with ether 12 hr later.

## 考察

1927年 Cannon <sup>(223)</sup> によって、初めて提出されたストレスの概念は、その後、Selye <sup>(41)</sup> <sup>(42)</sup> により、生体は、ストレスが加わった際には、ストレスラーの性質如何にかかわらず、非特異的な生体防御反応を示すという形に発展した。ストレスに対する生体の適応に関与するホルモンは、副腎皮質ホルモン、成長ホルモン、ACTHなどがあげられ、交感神経-副腎髄質系より分泌されるノルエピネフリンやエピネフリンなどのカテコールアミンもその一つである。そして、現在様々なストレスに応答する交感神経及び副腎髄質系の活性の指標として、組織のカテコールアミンの代謝回転や血液及び尿のカテコールアミンレベル、カテコールアミンの代謝物の分析などが用いられている。今回測定した尿中のカテコールアミンの分析は、ある場合には、組織や血液のカテコールアミン分析よりも、より利用価値が高いことが示されている。すなわち、

① Kvetnansky と Mikulaj<sup>(224)</sup> や Kvetnansky<sup>(225)</sup> は、典型的な精神的ストレスラーとして、汎用されている束縛ストレスは、エピネフリンやノルエピネフリンの血中レベルの上昇と同時に、これらの尿中排泄量も上昇すること。さらに、

② Schwartz<sup>(226)</sup> は、高脂肪食が尿中のノルエピネフリンの増加と同時に、組織のノルエピネフリン代謝回転を上昇させること。をそれぞれ報告したが、これらのことは、実際尿中のカテコールアミン排泄量とその血中レベルとの相関性あるいは、組織カテコールアミン代謝回転との相関性とも、具体的に示すものである。一方、血中のカテコールアミンの分析も交感神経-副腎系の活性の測定に用いられるが、Hansen<sup>(227)</sup> も指摘しているように、血中のカテコールアミンレベルは、測定時における動物の姿勢の変化など、わずかな動物の状態の変化にすばやく、しかも敏感に反応することが知られている。さらに、カテコールアミンの尿中排泄量の分析は、交感神経-副

腎系より分泌されるノルエピネフリンやエピネフリン量のある一定期間での総和を評価できるといふ点でも、実際的で、しかも利用価値が高いとも考えられている。

実際の我々の分析において、化学的ストレッサーに分類されるPCB, DDTをはじめ種々の生体異物及び過剰チロシンの摂取により、事実、いずれの場合も、尿中のノルエピネフリンやエピネフリン、ドーパミンの排泄の上昇が観察された。これは、種々の生体異物あるいは過剰チロシンの摂取が、交感神経-副腎系の活性化をもたらしたことを示している。このような尿中のカテコールアミンの排泄上昇は、前述のように、組織のカテコールアミンの代謝回転とも、密接に相関しているという成績<sup>(224)</sup>もあり、今回の場合も、カテコールアミンの代謝回転の促進が起こっているのかもしれない。

一方、Agharanya と Wurtman<sup>(228)</sup> は、チロシンによる尿中カテコールアミン上昇を我々と

同様に観察し、チロシン投与により、交感神経-副腎髄質系のカテコールアミン生合成が増加し、その尿中排泄量が上昇することを示している。

このような、カテコールアミン変動の生理学的な意味や機構については、今後、さらに、検討する必要があるが、いずれにしても、PCBなどの生体異物や過剰チロシンの摂取は、これ自体が“代謝的ストレス”となって交感神経-副腎系からのカテコールアミン分泌を促進するものと思われた。

カテコールアミンは、脂質代謝や糖代謝などを含めた広範かつ多彩な代謝に関与することが示されている<sup>(43)(214)(215)(216)</sup>。エピネフリンやノルエピネフリンは、肝培養細胞において、<sup>14</sup>C-酢酸で測定したコレステロール合成能やHMG-CoA reductase 活性を上昇させることが示されている<sup>(43)</sup>。また、この実験でも示されている血中遊離脂肪酸レベルの増加は、ノルエピネフリンが、脂肪組織での、脂肪分解を

促進することを一因としていると言われており<sup>(25)</sup>、ノルエピネフリン注射は、肝HMG-CoA reductase 活性や<sup>14</sup>C-酢酸で測定した肝コレステロール合成能を上昇させることも報告されている<sup>(24)</sup>。カテコールアミンとコレステロール代謝との密接な関連が、これらの事実から推測されるが、実際、我々の実験においても、カテコールアミンの尿中排泄の上昇と同時に、第2編で示したような、HMG-CoA reductase 活性や<sup>3</sup>H<sub>2</sub>Oを用いて測定した肝コレステロール合成能の増加が種々の生体異物や過剰キノシン摂取により誘導されていることが示された。

以上のことは、緒論でも述べたような(p.9)仮説、すなわち、PCBなどの生体異物や過剰キノシンによる高コレステロール血症の生成とカテコールアミンの分泌との密接な相互関係を支持するものであるが、この仮説をさらに確実にするために、次の実験を行ったわけである。カテコールアミンは、標的組織の

細胞膜にある，各種アドレナリン性薬物に対する親和性により区別される $\alpha$ 及び $\beta$ -受容体を介して，生理作用を発現することか示されており，さらに，組織によっては，現在のところ， $\alpha$ 受容体は，さらに， $\alpha_1$ 及び $\alpha_2$ 受容体， $\beta$ -受容体は， $\beta_1$ 及び $\beta_2$ 受容体のサブタイプに分類され，カテコールアミンの作用する組織である肝臓<sup>(236)</sup>や脂肪組織<sup>(237)</sup>などでも， $\alpha$ -受容体， $\beta$ -受容体が，標識化合物との結合実験から同定されている。

だから，もし，前出の仮説どおり，PCBなどの生体異物や過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導に，カテコールアミンが何らかの関連をもつて作用していると考えれば，カテコールアミンの上記受容体と拮抗する薬物すなわち， $\alpha$ 及び $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の投与により，血清コレステロールの上昇は抑制されるはずである。事実，1-エピネフリンやエピネフリンなどの $\alpha$ -受容体刺激薬に対して，非競合的拮抗を示す



$\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤 フェノキシベンザミン投与は、PCBやDDTあるいは、クロシンによる血清コレステロールの上昇をいずれも明らかに抑制した。また、このようなフェノキシベンザミンによる降コレステロール作用は、 $\alpha$ -受容体を競合的に遮断するトラゾリンでも再現された。前述のごとく、 $\alpha$ -受容体は、 $\alpha_1$ 及び $\alpha_2$ のサブタイプに分かれているが、非選択性の $\alpha$ -遮断剤である、フェノキシベンザミンやトラゾリンなどにより観察された、高コレステロール血症に対する効果は、 $\alpha$ -受容体に対する選択的遮断剤であるプラゾシンの投与によっても誘導された。なお、このプラゾシンの作用は、Dall'aglio<sup>(238)</sup>によっても示されている。

以上のことは、種々の生体異物や過剰クロシン摂取により、カテコールアミンの尿中排泄量が増加する点、さらに、ノルエピネフリンやエピネフリンを直接ラットに注射しても高コレステロール血症が生成される点とあわ

せて、PCB や過剰チロシンなどによって誘導される高コレステロール血症生成とカテコールアミン分泌との密接な相互関係を示唆するとともに、前述の仮説を支持するものと思われる。

このようなストレスと高コレステロール血症生成との相互関係は、①人間などにおいて、種々のストレス時に観察される血中コレステロールの上昇<sup>(5)</sup>。②高コレステロール血症を誘導するカフェイン<sup>(86)</sup>も、カテコールアミンの尿中排泄を上昇させること<sup>(229)</sup>。③血清コレステロールを上昇させる化学的ストレスの1つであるアルコール<sup>(22)</sup>も、肝薬物代謝酵素を誘導するのみならず<sup>(270)</sup>、カテコールアミンの尿中排泄を上昇させる作用があること<sup>(231)</sup>。④運動は、HDL-コレステロールを上昇させる効果があることが指摘されているが、この際にもカテコールアミンとの関連が示されていること<sup>(8)</sup>。⑤ラットにおいて、高コレステロール血症が過剰NaCl摂取により生成し<sup>(40)</sup>

NaCl には、カテコールアミンの尿中排泄を増加させる効果が示されていること<sup>(232)</sup>。⑥種々のストレス状況下において、脳のカテコールアミンにも変化が認められることが報告されているが<sup>(233)</sup>、このような、ストレス時に観察されるものと、非常に類似したカテコールアミンの変化が、高コレステロール血症を生成するテイルドリン<sup>(234)</sup>や我々も使用しているDDT<sup>(235)</sup>を摂取したラットの脳にも生成すること。などが、すでに報告されており、これが一連の事実は、我々の結果との共通性という点で、非常に興味深い。

一方、生体異物によって、アスコルビン酸の尿中排泄や肝臓レベルが上昇したりすることは、すでに述べたが、さらに、Chatterjee<sup>(217)(218)</sup>は、さまざまなストレス状態をもち、化学的ストレスである薬物の投与や生物学的ストレスである細菌毒素の投与あるいは、単一の栄養素の摂取さらに、低温や高温などの物理的ストレスにより、組織ヒス

タミンの生成増加やヒスタミンの尿中排泄の増加が引き起こされ、このような場合に同時に大量のアスコルビン酸を投与すると、ヒスタミンの尿中排泄が減少することを示した。このような現象に対して、ヒスタミンは、毛細血管拡張、胃酸分泌促進などの薬理作用の他に、炎症をともなったアレルギー反応などへの関与も指摘されていることから、過剰のヒスタミンを解毒するための生体防御反応であろうと説明されている<sup>(239)</sup>。事実、ヒスタミンは、組織を用いた *in vitro* の実験において、アスコルビン酸と反応して、アスパラギン酸になる系が存在することが示されている<sup>(239)</sup>。このようなヒスタミンとアスコルビン酸との密接な相互関係は、束縛ストレスにおいても報告されている<sup>(240)</sup>。以上のことから、我々の実験においても、PCBをはじめ種々の生体異物や過剰チロシンの摂取それぞれがストレスとなり、ヒスタミンの尿中排泄を上昇させたものと思われる。さらに、ストレスに対する

生体応答の一つに、アスコルビン酸の代謝変動があることも示されているが<sup>(42)</sup>、今回の及びβ-アドレナリン作動性遮断剤のDDTによる尿中アスコルビン酸排泄量に対する影響は、機構は明らかではないが、カテコールアミンの分泌とアスコルビン酸排泄増加との密接な関連を示しているようにも考えられ、前出のアスコルビン酸と肝薬物代謝酵素あるいはヒスタミンとの相互関係とあわせて、今後興味深い問題となるであろう。

## 総合討論

最後に、本研究で得られた結果を解析し、

[1] 過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導

[2] 過剰チロシン及び生体異物による高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成系の変動

[3] 過剰チロシン及び生体異物による高コレステロール血症生成時におけるコレステロール分解系の変動

[4] 過剰チロシン及び生体異物による高コレステロール血症の誘導と数種のホルモンの変動

以上の4点に主眼を置き、今後の研究課題をも含めて、総合的に考察することとする。

[1] ある種のアミノ酸の過剰摂取により、食餌摂取量が低下したり、成長が抑制されたり<sup>(44)</sup>、種々の病理学的障害<sup>(68)</sup>が発現することばかりではなく、高コレステロール血症を生成することも知られており、ヒスチジン<sup>(20)</sup>、リジン<sup>(54)</sup>

シスチン<sup>(21)</sup>などで報告されてきた。今回我々は、これ以外に、チロシンによっても高コレステロール血症が誘導されることを、新たに見出したわけであるが、チロシンによっても誘導される高コレステロール血症に対する食餌タンパク質レベルの検討から、低タンパク食(10%カゼイン)に、8%チロシンを添加した、食餌で飼育した場合には、体重に強く影響され、チロシン過剰毒性の特徴である白内障や皮膚の壊死も観察された。一方、高タンパク食(20%カゼイン)に8%チロシンを添加して飼育した場合には、体重抑制は見られず、体重抑制が観察されないようなチロシンの添加レベルですでに、高コレステロール血症が誘導されるので、チロシンによっても誘導される高コレステロール血症は、低タンパク食よりも高タンパク食の方が、起りやすいものと思われた。この理由の解明には、タンパク質レベルの違いによる、コレステロールの肝臓から血中への放出などに関与するリ

ポタンパクの代謝を含めた、コレステロールの合成や分解排泄の詳細な検討が今後必要と思われるが、PCB<sup>(48)</sup>やヒスチジン<sup>(49)</sup>によって誘導される高コレステロール血症も高タンパク食の方が誘導されやすいという点でチロシンとの類似性が示唆され興味深い。

チロシンによる高コレステロール血症の経時的変化を検討した実験において、チロシンによる高コレステロール血症は、4週目まで継続して観察された。また、2週目までチロシン食で飼育し、その後1週間は、20%カゼインのコントロール食で飼育すると、肝肥大の抑制と同時にチロシンによる高コレステロール血症も消失した。同様の現象が、ヒスチジンによる高コレステロール血症においても観察されている<sup>(20)</sup>。一方、PCBを用いた場合には、5日間は、PCBを添加した飼料で飼育し、その後16日間は、20%カゼインのコントロール食で飼育しても、高コレステロール血症は観察された。この違いは、チロシ



ン、ヒスチジンなどのアミノ酸の方が、PCBよりも、すみやかに代謝されることによるものと思われた。

チロシンによる高コレステロール血症は、HDL-コレステロール、LDL+VLDL-コレステロールの両方ともに上昇させるタイプのものであり、この点において、コレステロール大量摂取による外因性高コレステロール血症とは異なり<sup>(39)</sup>、PCB<sup>(19)</sup>、ヒスチジン<sup>(35)</sup>による血中リポタンパク組成の変化と類似性が示された。

チロシン過剰摂取により、肝臓及び尿中アスコルビン酸レベルが上昇し、cytochrome P-450, cytochrome b5, cytochrome c reductase, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase 活性も上昇することが明らかにされた。しかし、血清コレステロールの上昇割合と肝薬物代謝酵素の上昇割合とを考慮し、PCBなどの生体異物にみられる組織1gあたりでも、肝薬物代謝酵素は著しく増加している場合と比較すると、チロシンの場

合、血清コレステロールの上昇割合に比して、肝薬物代謝酵素の上昇割合は、小さいことが示唆された。このことから、生体異物の場合に、すでに指摘されているような肝薬物代謝酵素活性の上昇と血清コレステロール上昇との正の相関<sup>(32)</sup>は、必ずしもチロシンによる高コレステロール血症には、あてはまらないことが示唆された。

ラットにおいて、チロシンによる肝薬物代謝酵素活性の上昇については、いままで知られていなかった事実であり、非常に興味深い。検討した薬物代謝酵素のうち、組織1gあたりでは、活性上昇が観察されないものもあることから、チロシンによる肝肥大の影響も大きいものと思われる。チロシンの代謝にミクロソームの cytochrome P-450 の関与する反応は、ラットでは現在知られていないのであり、この cytochrome P-450 の誘導がチロシン自身によるものか、チロシンの代謝物によるのかは、明らかではない。しかし、事実、ウサギでは

チロシンの代謝物のチラミンがミクロソームの cytochrome P-450 様物質により、代謝されるといふ報告もあり<sup>(78)</sup>、このことは、ラットにおける過剰チロシンの cytochrome P-450 誘導の原因解明に何らかの示唆を与えるかもしれない。一方、チロシンによって、高コレステロール血症が生成される際には、今回の成績から、コレステロール合成が促進されていると思われるので、コレステロール代謝に関連した、cytochrome P-450 が上昇している可能性も残され、今後検討が望まれる。さらに、チロシン代謝にアスコルビン酸は必須であるが<sup>(76)</sup>、のみならず、アスコルビン酸と肝薬物代謝酵素との相互関係について述べた報告も多く<sup>(77)</sup>、過剰チロシンの肝薬物代謝酵素誘導と肝アスコルビン酸の上昇とに生体異物などに見られるような密接な関連<sup>(32)</sup>があるのかもしれない。

(2) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成系の変動に関する検討から、コレステロ

ーL生合成の律速酵素である肝HMG CoA reductase 活性及び $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した、*in vivo* における肝コレステロール合成能は、DDT、クロレトン、BHA及び $\alpha$ 過剰チロシンにより、対照群と比べていずれも上昇した。しかしながら、小腸のコレステロール合成能には、顕著な変化は観察されなかった。以上のことは、PCB<sup>(38)</sup> やヒスチジン<sup>(80)</sup> の場合と同様に、DDT、クロレトン、BHA及び $\alpha$ 過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症は、いずれも、主に肝コレステロール合成が促進されたために、引き起こされていることを示唆するものと思われた。現在、さまざまな要因によるコレステロール代謝の変動は、上記のHMG CoA reductaseなどのコレステロール代謝に関与する諸酵素活性の変動、リポタンパクレセプターによる血漿リポタンパクの代謝変動などを通じて、非常に広範かつ詳細な検討が、多くの人により進められており、種々の条件で生成される高コレステロ

ール血症を含めたコレステロール代謝の変動は、リポタンパクが異化される細胞のリポタンパクレセプターへの血中リポタンパクの結合の変化などで説明されるケースが多い。たとえば、家族性高コレステロール血症<sup>(2)</sup>に代表される遺伝病をはじめ、インシュリン<sup>(119)</sup>などのホルモンのコレステロール代謝に対する作用、タンパク質のコレステロール代謝に及ぼす影響<sup>(124)</sup>、ビタミンCのコレステロール代謝に対する影響<sup>(125)</sup>、銅欠乏による高コレステロール血症<sup>(24)</sup>、高コレステロール食による高コレステロール血症<sup>(2)</sup>などであるが、PCBによって誘導される高コレステロール血症も以下に述べる点で、リポタンパクの異化すなわちレセプターによる分解などが、抑制される可能性が考えられる。① Jenke<sup>(82)</sup>は、PCBによるHMG-CoA reductase活性の上昇は、摂取9日目で最大となるが、PCB摂取後42日では、活性上昇は観察されないことを示した。さらに、HMG-CoA reductase mRNAレベルは、

PCBによる酵素活性の変動と同じ挙動を示し、PCB摂取後、42日では、もはや mRNA レベルの上昇は、観察されないうちもかかわらず、血清コレステロールは、42日目まで、依然として上昇レフづけていることを観察した。

②大豆タンパク質に PCB を添加した実験において、 $^3\text{H}_2\text{O}$  を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能と肝 HMG-CoA reductase 活性がともに上昇しない場合にも、高コレステロール血症が生成されることも観察されている(奥村・吉田未発表)。以上のことから、PCBによる高コレステロール血症は、合成促進のみでは、説明できないようにも思われる。したがって、後述するような、胆汁酸の生成・排泄などと併せて、リポタンパクレセプターなどによるリポタンパクの異化が、種々の生体異物や過剰チロシン摂取の際にどのように変動しているのかは、今後非常に興味深い点となる。事実、銅欠乏による高コレステロール血症は、肝での HDL の

リポタンパクレセプターへの結合の減少とこれにともなう、リポタンパクの異化の低下が原因で誘導されることが、Lefevre *s*<sup>(24)</sup> によって明らかにされており、PCBや過剰チロシンの場合と類似したHDL-コレステロールの上昇するタイプである銅欠乏によって得られた、このような知見は、我々が高コレステロール血症誘導機構を解明していく上で重要な示唆を与えるものである。

(3) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール分解系の変動に関する検討から、PCB摂取により、コレステロール分解系の律速酵素である肝 cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は、組織1gあたりでは、有意に減少し、組織全体では、顕著な変化は見られなかった。このことは、Waxman <sup>(143)</sup> や Appleton *s*<sup>(144)</sup> のフェノバルビタールやDDT, 3-メチルコラントレン,  $\beta$ -ナフトフラボン, イソサフロールなどの生体異物を用いて、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性を測定し

成績と類似している。このコレステロールの $\alpha$ -水酸化は、肝ミクロソームの cytochrome P-450 とこれに関連した電子伝達系で行なわれる<sup>(151)</sup>が、さまざま条件において、肝ミクロソームの全 cytochrome P-450 量の増加と cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性の増加とは、必ずしも平行して起こらないことが報告されている<sup>(141)(142)</sup>ことから、このことは、今回の cytochrome P-450 を顕著に誘導するが、cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 活性は組織1gあたりでは低下しているという PCB の場合にも適用されるものと思われる。

胆汁中総胆汁酸は、自由摂取の場合も、meal feeding の場合もともに、PCB 摂取により濃度は有意に低下したが、胆汁流量は有意に上昇したことから、総胆汁酸分泌量としては、対照群よりも低下する傾向が示された。胆汁中胆汁酸組成の変化は、総胆汁酸の変動を反映しており、PCB による胆汁酸分泌量の低下は、TUDCA, TLCA, TCDC A 以外の画分の胆汁酸の比較的明確な低下と



して表わされた。PCBの場合、胆汁中のコレステロールは、濃度・分泌量とも減少を示した。PCBによる胆汁流量の増加は、我々も用いているBHT<sup>(168)</sup>やDDT<sup>(171)</sup>においても観察されており、今回の我々の実験結果と共通性がみられた。また、BHTを用いたラットの実験において、Choe<sup>(168)</sup>は、BHTやBHTの代謝物が、胆汁に排泄される際に、浸透圧を変化させることにより、胆汁流量を増加させることを示しており、BHTと同様、胆汁流量を上昇させるPCBとの類似性から興味深い。

さらに、糞中の3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄量は、PCBにより減少する傾向を示した。このことは、cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性の組織1gあたりの低下とほぼ呼応しているものと思われた。中性ステロイドの糞中排泄は、PCBにより上昇する傾向を示したが、有意差は見られなかった。したがって、総合的に考えてみると、PCBの場合、高コレステロ

一ル血症生成時において，コレステロールの異化には顕著な変化は，認められなかった。

一方，チロシンの場合は，胆汁中総胆汁酸濃度は，対照群とほぼ同様で，胆汁流量には，有意な上昇が観察されたため，PCBとは対照的に，総胆汁酸分泌量としては，有意に上昇した。胆汁中のコレステロール濃度は，有意に低下したが，分泌量としては，対照群とほぼ同様であった。胆汁中胆汁酸組成は，チロシンの場合，総胆汁酸分泌量の増加を反映し，特にTCA，TDC A画分の上昇が観察された。糞中の3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄量は，胆汁中総胆汁酸分泌量の増加を反映して上昇したが，中性ステロイドの糞中排泄は，チロシンにより有意に低下した。すなわち，チロシン摂取の場合は，PCBとは対照的に胆汁酸生成及び排泄は，上昇するが，中性ステロイドの排泄が減少することが観察された。

以上のことから，チロシンの場合にも，糞中の胆汁酸や中性ステロイド排泄などを，総

合的に考えてみると、PCBと同様、チロシンの場合も、コレステロールの異化には、顕著な変化は認められなことが明らかにされた。したがって、胆汁酸及び中性ステロイド排泄などを考慮したコレステロールの異化には、PCB及び過剰チロシンにより必ずしも顕著な変化は認められなことが示唆される。今後、体全体のコレステロールバランスなどをRIを用いて検討する必要があるが、PCBやチロシンの場合、甲状腺機能低下症<sup>(25)</sup>などの場合のように、コレステロールの分解が顕著に抑制されたために、これが主因となって、高コレステロール血症が生成されるということも、積極的に示す知見は得られなかつた。

(4) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導と数種のホルモンの変動に関する検討から、インシュリン、グルカゴンの血中レベルには、PCB及び過剰チロシンによる顕著な影響は観察されなかつた。さ

らに、我々のグループにおける、ストレプトゾトシン糖尿ラットを用いた検討から、インシュリン分泌の阻害されている糖尿ラットにおいても、PCBによる高コレステロール血症は依然として観察されることから、PCBによる高コレステロール血症生成に対するインシュリンの直接の寄与は、少ないように思われた。

血清コルチコステロンレベルには、PCB、DDTなどの生体異物や過剰チロシンによる顕著な変化は観察されなかった。しかし、コルチコステロンは、高コレステロール血症を誘導する作用<sup>(106)</sup>やHMG-CoA reductase活性との関連が指摘されており<sup>(93)</sup>、今後、血中レベルだけでなく、副腎摘出動物などを用いた実験が、コルチコステロンと高コレステロール血症との相互関係をさらに理解するために必要であろう。しかしながら、少なくとも血中コルチコステロンレベルの結果から、コルチコステロン大量投与により生成されるHDL-

コレステロール上昇<sup>(106)</sup> やコルチコステロン過剰分泌をともなう Cushing 症候群などに見られる高コレステロール血症<sup>(110)</sup> との、類似性は示されなかった。

甲状腺ホルモンは、古くからコレステロール代謝への関連が指摘されている<sup>(25)</sup> が、チロシン過剰摂取により、血清  $T_3$ ,  $T_4$  レベルには顕著な変化は観察されなかった。対照的に、PCB 摂取により、 $T_3$  には顕著な影響は観察されないものの、 $T_4$  は、著明に減少した。このことは、PCB<sup>(179)</sup>, DDT<sup>(179)</sup> をはじめ、ある種の生体異物は、"Goitrogen" と呼ばれ、甲状腺肥大や血中甲状腺ホルモンレベルの低下を引き起こすことが指摘されており<sup>(202)</sup>、今回の成績もこれと一致する。このような PCB などによる血清  $T_4$  減少のメカニズムに関しては、今後詳細な検討が必要であろうが、Bastomsky は、PCB によって  $T_4$  の胆汁排泄に関与する thyroxine UDP-glucuronyl transferase が誘導されるとともに<sup>(207)</sup>、胆汁流量が増加し<sup>(179)</sup>、 $T_4$  排泄が

促進されるということを推論し、一方、Collins  
と Capen<sup>(203)</sup> は、PCB による甲状腺機能障害に  
ともなう甲状腺ホルモン分泌の阻害によって、  
血中  $T_4$  の減少が引き起こされるということを示  
している。以上のような、Bastomsky や Collins  
と Capen の  $T_4$  減少に関する考察は、我々の結果  
にも重要な示唆を与えるものである。

前述のごとく、PCB によって、血清  $T_4$  が  
減少したことから、PCB による高コレステ  
ロール血症生成と甲状腺ホルモンとの相互関  
係を想定し、PCB による高コレステロール  
血症誘導に対する  $T_4$  投与の影響を検討した結  
果、 $T_4$  投与によっても依然として、PCB に  
よる血清コレステロール上昇は観察された。  
したがって、PCB の場合も、甲状腺ホルモ  
ンの変動と高コレステロール血症生成とを結  
びつける積極的な証拠は、チロシンの場合と  
同様、得られなかった。しかし、PCB の場  
合に、 $T_4$  の応答性が変化している可能性も残り  
今後、興味深い問題となる。

生体異物による高コレステロール血症は、  
 んの摂取自体が、“代謝的ストレス”となつて、  
 んれに応答した、カテコールアミンなどのコ  
 レステロール合成を促進するホルモンの共通  
 的な変動などを介して、高コレステロール血  
 症が生成されるという仮説を想定し、ストレ  
 ス応答に密接に関連し、肝コレステロール合  
 成を促進するカテコールアミン<sup>(43)</sup>の生成母体  
 であるチロシンをラットに投与することによ  
 り、生体異物と同様に高コレステロール血症  
 が生成され、尿中カテコールアミン排泄が増  
 加することが見出された。さらに、PCB、  
 DDTなどの生体異物によつても、種々のス  
 トレス時<sup>(225)(231)</sup>やチロシンの場合と同様に、尿  
 中カテコールアミン排泄の上昇が観察された。  
 このことは、PCBなどの生体異物摂取も、  
 過剰チロシン摂取同様、生体にとってストレ  
 スであることを示唆する。

ストレスと高コレステロール血症生成との  
 相互関係については、①古くから、人間など

において、ストレスによる血清コレステロール上昇が観察されていること<sup>(5)</sup>。②生体異物の一種であるカフェインも高コレステロール血症を誘導する<sup>(86)</sup>が、この場合にも、カテコールアミンの尿中排泄が上昇していること<sup>(29)</sup>。③血清コレステロールを上昇させる化学的ストレスの1つであるアルコール<sup>(22)</sup>も、肝薬物代謝酵素を誘導する<sup>(230)</sup>のみならず、カテコールアミンの尿中排泄を上昇させること<sup>(231)</sup>。④運動は、HDL-コレステロールを上昇させる効果があることが指摘されているが、この際にも、カテコールアミンとの関連が示されていること<sup>(8)</sup>。ラットにおいて、高コレステロール血症が過剰NaCl投与により生成し<sup>(46)</sup>、この際カテコールアミンの尿中排泄も上昇していること<sup>(232)</sup>。⑤種々のストレス状況下において、脳のカテコールアミン代謝にも変化が認められることが報告されているが<sup>(233)</sup>、ストレス時に観察されるものと、非常に類似したカテコールアミンの変化が、高コレステロー



ル血症を生成するダイルドリン<sup>(234)</sup>や我々も使用しているDDT<sup>(235)</sup>を摂取したラット脳にも観察されること。などが、すでに報告されており、これら一連の事実は、我々の結果との共通性という点で非常に興味深い。

カテコールアミンは、脂質代謝や糖代謝などを含めた広範かつ多彩な代謝に関与することが知られている<sup>(43)(214)(215)(216)</sup>。エピネフリンやノルエピネフリンは、肝培養細胞において、 $[^{14}\text{C}]$ -酢酸で測定した、コレステロール合成能やHMG-CoA reductase 活性を上昇させることが示されている<sup>(43)</sup>。また、ノルエピネフリンの注射は、肝HMG-CoA reductase 活性や $[^{14}\text{C}]$ -酢酸からコレステロールへの取り込みを上昇させることも報告されており<sup>(25)</sup>、カテコールアミンとコレステロールの代謝との密接な関連が、これらのことから推測されるが、事実、我々の実験においても、カテコールアミンの尿中排泄の上昇と同時に、HMG-CoA reductase 活性や $^3\text{H}_2\text{O}$ を用いて測定した *in vivo* のコレス

テロール合成能の増加が種々の生体異物や過剰チロシン摂取により誘導されること示された。

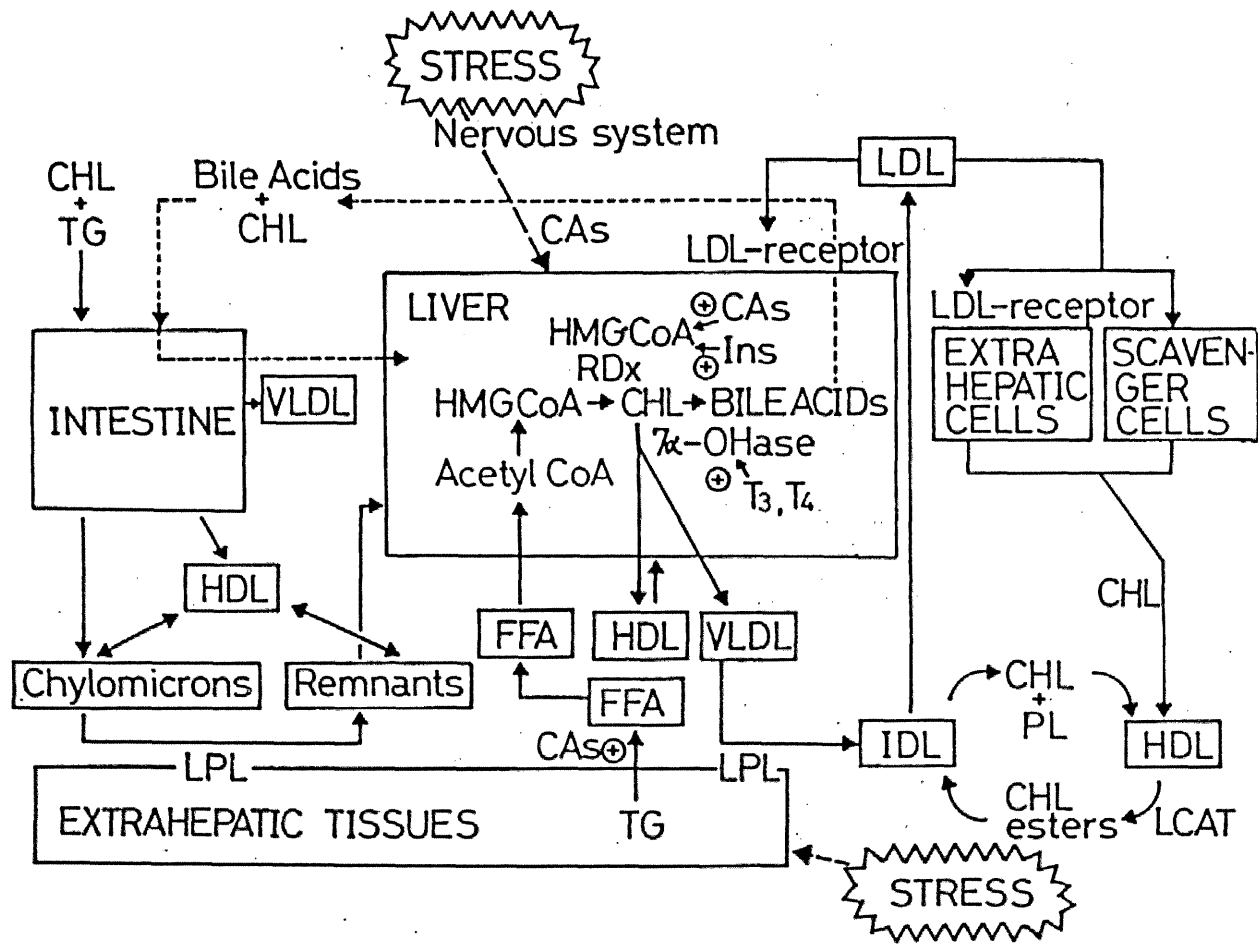
このことは、すでに述べた仮説 (p. 9~12), すなわち, PCBなどの生体異物や過剰チロシン摂取による高コレステロール血症の生成とカテコールアミンの分泌との密接な相互関係を想定させるものであるが, この仮説をさらに, 確実にするために, 次の実験を行ったわけである。すなわち, カテコールアミンは, 標的組織の細胞膜にある各種アドレナリン性薬物に対する親和性により区別される,  $\alpha$ , 及び  $\beta$  受容体を介して, 生理作用を発現することが示されている。したがって, もし, この仮説どおり, PCBなどの生体異物や過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導に, カテコールアミンが何らかの関連を持って作用しているとすれば, カテコールアミンの受容体と拮抗する薬物すなわち,  $\alpha$  及び,  $\beta$ -アドレナリン作動性遮断剤の投与により,

血清コレステロール上昇は、抑制されるはず  
がある。事実、ノルエピネフリンやエピネフ  
リンなどの $\alpha$ -受容体刺激薬に対して非競合的  
拮抗を示す $\alpha$ -アドレナリン作動性遮断剤のフ  
ェノキシベンザミン投与は、PCBやDDT  
あるいはキロシンによる血清コレステロール  
上昇をいずれも明らかに抑制した。また、二  
のような $\alpha$ -遮断剤による降コレステロール作  
用は、 $\alpha$ -受容体を競合的に遮断するトラゾリ  
ンでも再現された。前述のごとく、 $\alpha$ -受容体  
は、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ のサブタイプに分かれているが、  
非選択性の $\alpha$ -遮断剤であるフェノキシベンザ  
ミンやトラゾリンなどで見られた、高コレス  
テロール血症に対する効果は、 $\alpha$ -受容体に対  
する選択的遮断剤であるプラゾシンの投与に  
よっても誘導された。このプラゾシンの作用  
は、Dall'aglioによっても示されている<sup>(238)</sup>。以  
上のことは、種々の生体異物や過剰キロシン  
摂取により、カテコールアミンの尿中排泄が  
増加する点、さらに、ノルエピネフリンやエ

ピネフリンを直接ラットに注射しても、高コレステロール血症が生成される点とあわせて、PCBや過剰チロシンなどによって誘導される高コレステロール血症生成とカテコールアミン分泌との相互関係を示唆するとともに、前述の仮説が支持されるものと思われる。

最後に、この研究で得られた結果を参考に、前述したホルモンの作用(第4編参照)をも含めたコレステロール全般の代謝を(Fig.12, p.291)に示した。生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導機構に対する理解をさらに深めるためには、この図からも、今後、おごに指摘したように、リポタンパクレセプターによるリポタンパクの異化をはじめ、リポタンパクの代謝の詳細な検討が必要であろう。また、PCBや過剰チロシンがどのような作用機作を介して、コレステロール合成を促進するのかをさらに検討するとともに、コレステロール代謝に関与するカテコールアミンなどのホルモン自身が、どのような

機構を通じて合成を促進するのかという両者の比較検討が、高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成促進に寄与する要因のさらなる解析にとって必須となるであろう。しかしながら、今回の研究で得られた生体異物及び過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症に関する知見は、これら異なつた、多種多様な化合物による高コレステロール血症誘導メカニズムを統一的に説明するための有用な資料を提供するのみならず、現在めざましい発展を遂げつつあるが、まだ不明な点も多い、リポタンパクの代謝などを含めたコレステロール代謝調節機構に関する基礎的知見を提供するとともに、人間を含めた他の種々の条件下で生成される高コレステロール血症、たとえば、種々のストレス、運動によるHDLの増加、アルコール摂取など現代の社会生活と密接に関連した問題への適用あるいは、その栄養的制御という面で寄与しうるものと思われる。



Summary of cholesterol metabolism

CAS: catecholamines, HMG-CoA RDx: HMG-CoA reductase, CHL: cholesterol  
 Ins: insulin, 7α-OHase: cholesterol 7α-hydroxylase, ⊕ : Stimulates the process

Figure 12

## 要約

高コレステロール血症は、人間をはじめ、多くの動物種において、多種多様な要因によって生成されることが知られているが、本研究は、ラットにおける生体異物及び過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症に関する比較研究を通じて、両者に内在するであろう共通の機構を解明することを目的としている。得られた成果を以下に示す。

## (1) 過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導

過剰チロシンによる高コレステロール血症も、PCBやヒスチジンによって誘導される高コレステロール血症と同様に、肝肥大をともない、さらに低タンパク食よりも高タンパク食の方が、生成されやすいものと思われた。チロシンによる血清コレステロール上昇は、28日間継続して観察され、チロシンレベルの上昇に依存しており、さらにHDL-コレステ

テロール, LDL + VLDL - コレステロールの両方ともに上昇させるタイプのものではあった。このような血中リポタンパク組成の変動において, コレステロール大量摂取による外因性高コレステロール血症とは異なり, PCB, ヒスタジンによるその変化と類似性が示された。チロシン過剰摂取により, 肝臓及び尿中アスコルビン酸レベルが上昇し, 肝薬物代謝酵素である cytochrome P-450, cytochrome b5, cytochrome c reductase, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase 活性も上昇することを見出した。ラットにおいて, チロシンによる肝薬物代謝酵素活性の上昇については, いままで知られていなかった事実である。しかしながら, 血清コレステロールの上昇割合と肝薬物代謝酵素の上昇割合とを考慮し, PCBなどの生体異物の場合に観察されるような, 肝薬物代謝酵素は組織あたりでも著しく増加している事実と比較すると, チロシンの場合血清コレステロールの上昇割合に比べて, 肝薬物代謝酵



素の上昇割合は、小さいことが示唆された。他のアミノ酸との比較検討から、チロシン以外に、ヒスチジン、メチオニンにも血清コレステロール上昇作用があることが明らかとなった。

## (2) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール合成系の変動

コレステロール生合成の律速酵素である肝 HMG-CoA reductase 活性及び  $^3\text{H}_2\text{O}$  を用いて測定した *in vivo* における肝コレステロール合成能は、DDT、クロレトン、BHA 及び過剰チロシンにより、対照群に比べていずれも上昇した。しかしながら、小腸のコレステロール合成能には、顕著な変化は観察されなかった。以上のことは、PCB やヒスチジンの場合と同様に、DDT、クロレトン、BHA 及び過剰チロシンによって誘導される高コレステロール血症は、いずれも主に、肝コレ

ステロールの合成が促進されたために、引き起こされていることを示唆する。

(3) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成時におけるコレステロール分解系の変動

PCB摂取により、コレステロール分解系の律速酵素である肝 cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性は、組織 1g あたりでは、有意に減少し、組織全体では顕著な変化は見られなかった。胆汁中の胆汁酸は、自由摂取の場合も、meal feeding の場合もともに、PCB 摂取により濃度は有意に低下したが、胆汁流量は有意に上昇したことから、総胆汁酸分泌量としては、対照群よりも低下する傾向を示した。胆汁中胆汁酸組成の変化は、総胆汁酸の変動を反映しており、PCB による胆汁酸分泌量の低下は、TUDCA, TLCA, TCDC A 以外の画分の胆汁酸の比較的明確な低下として表わされた。PCB の場合、胆汁中のコレステ

ロールは、濃度・分泌量とも有意に減少を示した。さらに、糞中の $3\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸排泄量は、PCBにより減少する傾向を示した。このことは、cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase 活性の組織1gあたりの低下とほぼ呼応しているものと思われた。中性ステロイドの糞中排泄は、PCBにより上昇する傾向を示したが、有意差は認められなかった。したがって、総合的に考えてみると、PCBの場合、高コレステロール血症生成時において、コレステロール異化に顕著な変化は認められないことが示唆された。

一方、チロシンの場合は、胆汁中の胆汁酸濃度は、対照群とほぼ同様で、胆汁流量には有意な上昇が観察されたことから、PCBの場合とは対照的に、総胆汁酸分泌量としては、有意に上昇した。胆汁中のコレステロール濃度は、有意に低下したが、分泌量としては、対照群とほぼ同様であった。胆汁中胆汁酸組成は、チロシンの場合、総胆汁酸分泌量の増

加は、特にTCA, TDC A画分の上昇として表現された。糞中の3 $\alpha$ -セドロン胆汁酸は、胆汁中の総胆汁酸分岐量の増加を反映して、上昇したが、中性ステロイドの糞中排泄は、むしろチロシンにより、有意に減少した。すなわち、チロシン摂取の場合は、PCBとは対照的に胆汁酸生成及び排泄は、上昇するが、中性ステロイド排泄が著しく減少することから、この両者を総合的に考えてみると、PCBと同様に、チロシンの場合も、必ずしもコレステロール異化に顕著な変化は認められないことと示唆された。以上のことから、甲状腺機能低下症などの場合のように、コレステロールの異化が顕著に抑制されたために、これが主因となって、PCBや過剰チロシンによる高コレステロール血症が生成されているということも、積極的に示す知見は得られなかった。

#### (4) 生体異物及び過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導と数種のホルモンの変動

コレステロール代謝に影響を及ぼすことが知られているインシュリン、グルカゴンの血中レベルには、PCB及び過剰チロシンによる顕著な影響は観察されなかった。また、血清コルチコステロンレベルにも、PCB、DDTなどの生体異物や過剰チロシンによる顕著な変化は、観察されなかった。

甲状腺ホルモンは、古くからコレステロール代謝への関連が指摘されているが、チロシン過剰摂取により、血清 $T_3$ ・ $T_4$ レベルには、顕著な変化は観察されなかった。対照的に、PCB摂取により、 $T_3$ には顕著な影響は観察されないものの、 $T_4$ は著明に減少した。このことから、PCBによる高コレステロール血症生成と甲状腺ホルモンとの相互関係を想定し、PCBによる高コレステロール血症誘導に対する $T_4$ 投与の影響を検討した結果、 $T_4$ 投

よによっても、依然として、PCBによる血清コレステロール上昇は、観察された。以上のことから、PCBの場合も、甲状腺ホルモンの変動と高コレステロール血症生成とを結びつける積極的な証拠は、チロシンの場合と同様得られないことが明らかにされた。

生体異物による高コレステロール血症は、その摂取自体が、“代謝的ストレス”となつて、それに応答した、カテコールアミンなどのコレステロール合成を促進するホルモンの共通の変動を介して、生成されるという仮説を想定し、ストレス応答に密接に関連し、肝コレステロール合成を促進するカテコールアミンの生成母体であるチロシンをラットに投与することにより、生体異物と同様に高コレステロール血症が、生成され、尿中カテコールアミン排泄が増加することが見出された。さらに、PCB、DDTなどの生体異物によっても、種々のストレス時やチロシンなどの場合と同様に、尿中カテコールアミン排泄の上

昇が観察された。このことは、PCBなどの生体異物摂取も過剰チロシン摂取同様、生体にとってストレスであることを示唆する。さらに、カテコールアミンは細胞膜の $\alpha$ -及び $\beta$ -受容体を介して、生理作用を発現することが知られているが、カテコールアミンの $\alpha$ -受容体と拮抗する非選択性の $\alpha$ -遮断剤であるフェノキシベンザミンの投与は、過剰チロシンによる高コレステロール血症の誘導を抑制するとともに、PCBやDDTなどの生体異物による血清コレステロールの増加をも抑制することが明らかにされた。また、このフェノキシベンザミンで観察された現象は、非選択性 $\alpha$ -遮断剤であるトラゾリン及び $\alpha$ -選択性遮断剤であるプラゾシンによっても、ほぼ同様に再現された。さらに、カテコールアミンの注射によっても、高コレステロール血症は生成されることが明らかにされた。以上のことから、PCB及び過剰チロシンによる高コレステロール血症生成とカテコールアミン分泌との相

互関係が示唆されるとともに、前述の仮説が支持されるものと思われる。



## 基本的実験方法

はじめに

すべての実験を通じて、Wistar系雄ラット（静岡県実験動物農業協同組合）を、約22°Cの動物室で1匹ずつステンレス金網のケージに入れ、12時間の明暗交代下（明期8:00-20:00）で飼育した。

PCBは、アロクロール1248，四塩化物相当（三菱モンサント化成製），レーチロシンは、味の素株式会社より提供されたもの，BHA，クロレトン（クロロブタノール），BHT（片山化学製），DDT（アルドリッチ製）を実験に使用した。また，実験飼料は，Table 1 p. 24 に示されているものを，すべての実験を通じて基本飼料として用いた。

## [1]. 血清脂質の定量

1-1 血清総コレステロールの定量<sup>(57)</sup>

血清 0.1 ml, 氷酢酸 0.1 ml, p-トルエンスルホン酸溶液 (12g / 100 ml 酢酸) 0.5 ml, 無水酢酸 1.5 ml を順次加え, 攪拌せずに室温で放置して冷却した。濃硫酸 0.2 ml を加え, 充分に攪拌し室温で 20 分間放置後, 550 nm で吸光度を測定した。一方, 血清 0.1 ml に p-トルエンスルホン酸溶液 2.3 ml を加えたものを盲検とした。標準として血清のかわりに 1mg/ml コレステロール溶液 (酢酸溶液) を用い, 以下前記と同様な操作を行った。

1-2 血清総コレステロールの定量<sup>(91)</sup>

市販のキット (モノテスト・コレステロール, ベーリンガー・マンハイム山之内株式会社) を用いて測定した。

### 1-3 血清 HDL-コレステロールの定量<sup>(58)</sup>

血清 0.5 ml を先細遠心管にとり, 2 M  $MnCl_2$  水溶液 50 ml とヘパリン水溶液 (5000 IU/ml) 50 ml を加え,  $4^\circ C$  で 30 分間放置した。その後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上澄 0.4 ml を試験管にとった。これに 33% KOH 水溶液 0.3 ml, 95% エタノール 1.5 ml, 蒸留水 1.0 ml を加え,  $60^\circ C$  で 15 分間培養した。室温で冷却後, 5 ml のヘキサンを加え, 1 分間激しく攪拌し, ヘキサン層 2 ml を 2 本の試験管にとった。溶媒を蒸発させた後, 水 0.1 ml 加え, 先に記した Pearson<sup>(59)</sup> の方法によって測定した。

### 1-4 血清 TG の定量<sup>(59)</sup>

市販のキット (トリグリ・クイック・BMY, ヴーリンガー・マンハイム山之内株式会社) を用いて測定した。

1-5 血清PLの定量<sup>(243)</sup>

市販のキット (Phospholipid-Test wako, 和光純薬工業(株)) を用いて測定した。

1-6 血清FFAの定量<sup>(219)</sup>

高橋らの方法に基づく, 市販のキットにより測定した。(NEFA-E(Color), ヤトロン(株))

## [2]. 血清中のホルモンの定量

2-1 血清インシュリンの定量<sup>(190)</sup>

市販のキットによる Enzyme immunoassay で測定した。(EIA-INSULIN TEST-S, MBL(株))

2-2 血清グルカゴンの定量<sup>(191)</sup>

市販のキットによる Enzyme immunoassay で測定した。(Glucagon-Test wako, 和光純薬工業(株))

2-3 血清T<sub>3</sub>の定量<sup>(204)</sup>

市販のキット (T-3・リアビーズ) による Radio immunoassay で測定した。(ダイオボット(株))

2-4 血清 T<sub>4</sub> の定量<sup>(205)</sup>

市販のキット (T-4・リアビーズ) による Radioimmunoassay で測定した。(ダイナボット(株))

2-5 血清コルチコステロンの定量<sup>(196)</sup>

試験管に血清 0.2 ml をとり, ジクロロメタン 10 ml を加え, 30 秒間攪拌した後, 水層をアスピレーターで吸引除去し, 有機層 5 ml を別の試験管に移した。得られた有機層に, 7% 硫酸-エタール混液 2 ml を加え, 30 秒間攪拌した後, 室温で放置し, 二層に分離した後, 有機層をアスピレーターで吸引除去し, 硫酸層の 470 nm - 525 nm における蛍光度を 15 分後測定した。標準として (80 μg/dl) のコルチコステロン溶液 0.2 ml を用い, 上記と同様の操作を行った。

### (3). 肝臓脂質の抽出・精製・定量

#### 3-1 肝臓脂質の抽出・精製<sup>(60)</sup>

肝臓約2gを秤量し、抽出液(クロロホルム:メタノール=2:1)とともに、ホモジナイザーで磨碎した。これを50mlのメスフラスコに移し、一夜放置後定容し、これを濾過した。濾液は15mlを大試験管にとり、0.04%  $\text{CaCl}_2$  水溶液3mlを加え充分攪拌した。一夜放置後上層を除去し、クロロホルム:メタノール:水=3:48:47の組成の溶液3mlを加え充分攪拌した。一夜放置後上層を除去し、同様な操作を計3回繰り返して脂質の精製を行った。上層を最終的に除去した後、少量のメタノールを加えて上層を完全に消失させた。さらに、抽出液で洗いながら、25mlのメスフラスコに移し定容した。

#### 3-2 肝臓脂質の定量

あらかじめ秤量しておいた三角フラスコに、25mlに定容した試料を定量的に移し、溶媒を

ホットプレート上で除去した後，一夜乾熱器で乾熱し，デシケーターに入れ室温にモどし重量を測定した。三角フラスコの重量との差を総脂質量とした。

### 3-3 肝コレステロールの定量

25 ml に定容した試料から，2本の試験管に1 ml ずつとり，溶媒を蒸発させた。その後，水 0.1 ml を加え，先に記した Pearson<sup>(57)</sup> の方法に従って測定した。

### 3-4 肝PLの定量<sup>(61)</sup>

25 ml に定容した試料から，5 ml をケルダールフラスコにとった。60% 過塩素酸 1 ml を加え，160 ~ 170°C でフラスコ内の溶液が透明になるまで加熱した。室温で冷却後，約 10 ml の蒸留水で洗いながら，目盛り付き試験管に移した。沸騰水中で30分間加熱し，水道水で冷却後，蒸留水で 20 ml に定容した。この溶液中の無機リンを Bartlett の方法に

よって測定した。すなわち、この溶液 1 ml を試験管に取り、60% 過塩素酸 0.4 ml、アミドール試薬（アミドール 0.4 g と亜硫酸水素ナトリウム 8 g を蒸留水に溶かして 100 ml にしたものの）0.5 ml、3.3% モリブデン酸アンモニウム水溶液 0.5 ml、蒸留水 2.6 ml を加え、攪拌して 10 分後、720 nm の吸光度を測定した。標準としてリン酸ニホ素カリウムを用いた。

### 3-5 肝T<sub>G</sub>の定量

総脂質量からコレステロール量とリン脂質量を差し引いたものを、肝T<sub>G</sub>量とした。

### [4]. アスコルビン酸の定量

#### 4-1 尿中アスコルビン酸の定量<sup>(66)</sup>

ラットを代謝ケージに入れ、1日尿を5% ヌタリン酸水溶液約 20 ml を含むコニカルビーカーで採集した。さらに代謝ケージを5% ヌタリン酸水溶液で洗い、これを濾過してか



す試料とした。試料 1 ml を試験管にとり、これに 0.2% インドフェノール水溶液を約 1 分間放置しても紅色を保つまで滴下した。次に 5% ヌタリノ酸水溶液に溶かした 1%  $\text{SnCl}_2$  溶液 1 ml を加え、さらに 9N 硫酸に溶かした 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液 0.5 ml を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 3 時間放置した。その後試験管を氷水中で冷却しながら、85% 硫酸 2.5 ml を加え、充分に攪拌した後、室温で 30 分間放置した。一方、 $37^\circ\text{C}$  で 3 時間放置する以外は同様の操作を行なったものを対照とし、540 nm の吸光度を測定した。

#### 4-2 肝臓アスコルビン酸の定量<sup>(66)</sup>

肝臓約 0.5 g を正確に秤量し、20 倍容の 5% ヌタリノ酸水溶液とともに、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。3000 rpm 10 分間遠心分離した上澄を試料とした。試料 1 ml を試験管にとり、先に記した尿中アスコルビン酸の定量と同様の方法で測定した。

[5]. グリコーゲンの定量<sup>(220)</sup>

## 5-1 肝臓グリコーゲンの定量

あらかじめ30% KOH水溶液を3ml 入れておいた小試験管に、解剖時に、肝臓約10gを秤量して入れ、ガラス管付ゴム栓をして、20~30分間沸騰水中で加熱した。室温で、冷却した後、飽和硫酸ナトリウム水溶液0.5ml, エタノール5.5mlを加え、充分攪拌した後、遠心分離(25000rpm, 10分間)した。上清をデカンテーションで除き、沈殿に脱イオン水2mlを加えて攪拌し、エタノール2.5mlを加え、遠心分離した。再びデカンテーションで上清を除き、沈殿に水2ml, エタノール2.5mlを加えて充分攪拌した後、遠心分離し、グリコーゲンの沈殿を得た。グリコーゲンの沈殿に脱イオン水4mlを加え溶解させた後、そこから0.2mlをとり、脱イオン水で50mlに希釈した。この希釈液0.5mlに、5% フェノール水溶液0.5ml, 濃硫酸2.5mlを加え、直ちに激しく攪拌し、10分間

室温放置した後、インキュベーション ( $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ , 約15分間) して、その後  $490\text{nm}$  の吸光度を測定した。肝臓の試料のかわりに、グリコーゲン標準液 ( $60\mu\text{g}/\text{ml H}_2\text{O}$ )  $0.5\text{ml}$  及び脱イオン水  $0.5\text{ml}$  を用い、同様の操作によって測定したものを標準及びブランクとした。

## 5-2 筋肉グリコーゲンの定量

基本的には肝臓グリコーゲン (前記) の測定と同じ方法で測定した。しかし、筋肉中のグリコーゲン量は肝臓よりかなり低いので、グリコーゲンの沈殿に脱イオン水  $4\text{ml}$  を加えて溶解した後、そこから  $1\text{ml}$  とり、脱イオン水で  $50\text{ml}$  に希釈して、 $0.5\text{ml}$  を用いて測定した。

## [6]. ミクロソーム画分の成分の定量

### 6-1 ミクロソーム蛋白質の定量<sup>(65)</sup>

試験管に試料 (ミクロソーム画分の調製液  $0.1\text{ml}$  に  $0.1\text{N NaOH}$   $2\text{ml}$  を加えて、希釈

したものの) 0.5 ml とり, 試薬 (2g の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 0.1 N  $\text{NaOH}$  100 ml に溶かしたものと 1% 硫酸銅水溶液および 2% 酒石酸カリウム水溶液, 100:1:1 に当日調製したものの) 2.5 ml を加えて混和し,  $37^\circ\text{C}$  で 10 分間放置した。これにフェール試薬 0.25 ml を加え, 充分攪拌して,  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間放置した後, 500 nm の吸光度を測定した。標準として牛血清アルブミンを用いた。

## 6-2 ミクロソームのコレステロール含有量の定量<sup>(96)</sup>

Zlatkis と Zak の原理に基づく, 市販のキット (Cholesterol B-Test wako) で測定した。すなわち, P. 81, 321 の方法に従って得られた反応用酵素液 20  $\mu\text{l}$  に, 直接発色原液 A・B の混液 5 ml を加え, よく混和し 40 分間放置後, 550 nm で比色定量した。

## [7]. 肝薬物代謝酵素活性の測定

7-1 ミトコンドリア上清液及びミクロソーム画の調製<sup>(32)</sup>

肝臓約 2g を正確に秤量し、これに 4 倍容の 1.15% KCl・0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、氷冷しながらテフロンホモジナイザーで磨碎した。このホモジネートを 2°C、10,000 × g で 15 分間遠心分離し、ミトコンドリア上清液を得た。

このあと、このミトコンドリア上清液 4ml を、105,000 × g、2°C に 2、60 分間遠心分離し、ミクロソーム画分を沈殿させた。上清をデカンテーションで除去し、沈殿に 1mM EDTA を含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3ml を加え、テフロンホモジナイザーで懸濁した。

7-2 肝 aniline hydroxylase 活性の測定<sup>(32)</sup>

上記のミトコンドリア上清液 1ml を 30ml 三角フラスコ中の 5 μmoles aniline·HCl, 10 μmoles glucose-6-phosphate, 25 μmoles MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μmoles

NADP, 50  $\mu$ moles nicotinamide を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3 ml に加え, 37°C 20 分間振盪培養後, 2 ml の 20% TCA を加え, 3000 rpm 10 分間遠心分離し, その上清 2 ml に 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液 1 ml, 2% フェール水溶液 2 ml を加えた。その後 37°C 30 分間放置し, 640 nm の吸光度を測定した。なお盲検は, 37°C 20 分間振盪培養をしないもので行った。

### 7-3 肝 aminopyrine N-demethylase 活性の測定<sup>(32)</sup>

上記のミトコンドリア上清液 1 ml を 30 ml 三角フラスコ中の 5  $\mu$ moles aminopyrine, 10  $\mu$ moles glucose-6-phosphate, 25  $\mu$ moles  $\text{MgCl}_2$ , 0.65  $\mu$ moles NADP, 50  $\mu$ moles nicotinamide, 45  $\mu$ moles semicarbazide を含む 5 ml 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に加え, 37°C 20 分間振盪培養後, 15%  $\text{ZnSO}_4$  水溶液 2 ml, 飽和  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  溶液 2 ml を加え, 3000 rpm 10 分間遠心分離し,

その上清 5 ml に Nash 試薬 2 ml を加え、  
60°C 30 分間放置した。氷中冷却した後、  
濾過して沈殿を除き、415 nm で吸光度を測定した。  
なお、盲検は、基質溶液のかわりに脱イオン  
水を加えたもので行った。

#### 7-4 肝 cytochrome b<sub>5</sub> 及び cytochrome P-450 の含量測定<sup>(63)</sup>

前記のミクロソーム画分の 1.5 ml に、1 mM  
EDTA を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)  
3.5 ml を加えて希釈した。それを 2.5 ml グ  
ラズ本のキュベットに入れた。自記分光光度  
計で 500~400 nm を走査し、基本線を決  
定した。サンプル側のキュベットにのみ亜ジチオ  
ン酸ナトリウム数 mg を加え、よく混合した。  
再び 500~400 nm を走査し、吸光度の曲線  
を得た。cytochrome b<sub>5</sub> 含量は、光度の差 (423-  
500 nm) と分子吸光係数 ( $171 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) に  
より求めた。引き続き、亜ジチオン酸ナトリ  
ウム数 mg を今度は、対照側のキュベットに  
加え、

よく混合した。自記分光光度計で  $500-400\text{nm}$  をまた走査し、基本線を決定した。サンプル側のキュベットにのみ、一酸化炭素ガスを、20秒間程度泡立たせた後、再度  $500-400\text{nm}$  を走査し、吸光度の曲線を得た。cytochrome P-450 の含量は、光度差 ( $450-480\text{nm}$ ) と分子吸光係数 ( $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) により求めた。

#### 7-5 NADPH-cytochrome c reductase 活性の測定<sup>(64)</sup>

サンプル用と対照用の試験管を1本ずつ、 $25^{\circ}\text{C}$  の恒温槽に入れ、それぞれに KCN ( $3\text{ }\mu\text{moles/ml}$ )  $1\text{ml}$ , cytochrome c ( $927\text{ nmoles/ml}$ )  $0.5\text{ml}$ , ミクロソーム画分の調製液(前記)  $0.25\text{ml}$  に、 $1\text{mM}$  EDTA を含む  $0.05\text{M}$  リン酸緩衝液 (pH 7.4)  $2.25\text{ml}$  を加えて希釈した酵素液  $0.5\text{ml}$  を順次加え、1分30秒後に、対照の方に  $0.05\text{M}$  リン酸緩衝液 (pH 7.7)  $1\text{ml}$  を、2分後に、サンプルの方に NADPH ( $273\text{ nmoles/ml}$ )  $1\text{ml}$  を加えた。その後30秒間経てから、1分間自



記分光光度計で  $550 \text{ nm}$  の光度変化を記録した。NADPH-cytochrome c reductase 活性は、 $550 \text{ nm}$  の吸光度と分子吸光係数 ( $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) により求めた。この測定では、測定室は  $25^\circ \text{C}$  に保ち、ミクロゾーム画分の調製液以外の試薬も、 $25^\circ \text{C}$  の恒温槽に入れておいた。試薬はすべて  $0.05 \text{ M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 7$ ) の溶液とした。

[8].  $[3-^{14}\text{C}] \text{ HMG-CoA}$  の合成<sup>(93)(94)(95)</sup>

8-1 Cold HMG-anhydride の合成

HMG acid 約  $200 \text{ mg}$ , DCC (N,N'-dicyclohexyl carbodiimide) 約  $1 \text{ g}$  をサンプルビンに入れ、薬包紙でフタをした。フタは針で数ヶ所に穴をあけた。これをデシケーターに入れ、一晚減圧乾燥させた。デシケーターの乾燥剤としては  $\text{P}_2\text{O}_5$  を用いた。

乾燥させた HMG acid  $162 \text{ mg}$  ( $1 \text{ mmol}$ ) を  $30 \text{ mL}$  のナスフラスコに秤量し、 $2 \text{ mL}$  のアセトンに溶解させた。また、乾燥させた DCC  $309 \text{ mg}$  ( $1.5 \text{ eq}$ ) を  $5 \text{ mL}$  程度の遠心バイアル

に秤量し, 1 ml のアセトンを加え溶解させた。ナスフラスコの中の HMG acid に DCC / アセトン溶液を加え, バイアルをさらに 1 ml のアセトンで洗浄し, この洗浄もナスフラスコに加えた。このナスフラスコを密封し, 37 °C にて 2 時間 low speed にて振盪させ, 反応させた。反応終了後, ナスフラスコを氷中冷却し, 生成した DCU を完全に沈殿させた。その後, 冷却しておいた直径約 3 cm のロートと, 濾紙をクリップでとめ, 反応液を濾過した。残渣は冷アセトンで洗浄した。濾液は 20 ml のナスフラスコに受け, 減圧濃縮した。ここで生成した粗結晶に少量のベンゼンを加え, 100 °C のオイルバスで加熱, 溶解させ, ナスフラスコを薬包紙とコルク栓で密封し, 徐々に温度を下げ, 再結晶した。ピペットで溶媒を除去し, エバポレーターで溶媒を完全に除去した。次にナスフラスコに数ヶ所穴があいた薬包紙で栓をして, デシケーターで乾燥させた。

8-2 [3-<sup>14</sup>C] HMG-anhydride の合成

[3-<sup>14</sup>C] HMG acid (Amersham International plc, specific activity 58 mCi / mmol) の 0.72 mg をナス  
 フラスコに移し、凍結乾燥した。これに Cold  
 HMG acid 7.8 mg を加え 50 μmol としたものと  
 DCC 15.5 mg を (8-1) と同様に反応させた。

8-3 [3-<sup>14</sup>C] HMG-CoA の合成

CoASH (50 mg / ml distilled water) に, nitroprusside  
 / distilled water, 適当濃度) を数滴加え, 10%  
 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> により pH をアルカリ性にし, (この時  
 の液色はピンク色), これをピペットで [3-<sup>14</sup>C]  
 HMG-anhydride に添加する。反応中アルカリ  
 性に反応液を保つ。反応後, 過剰の CoASH  
 をなくすため, 液色ピンクを確認後 Cold の  
 HMG-anhydride を加え, 反応を終結した。最  
 後に, 酢酸溶液 (200 μl / ml) を加えて pH を  
 4~5 にした。反応液をペーパークロマトで  
 精製した。ペーパーには, Whatman 3MM を  
 用い, これを 1/4 に切り, 1枚に 200 μl の反

産液をスポットした。  $m\text{-BuOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$   
 $= 5 : 2 : 3$  溶媒で6時間展開した。ドラフト  
 で乾燥後, UV-X-ターで  $R_f$  0.31 付近の  
 生成物を確認し, その部分をハサミで切り取  
 った。このペーパーを2枚のガラス板ではさ  
 み,  $10\text{mM KH}_2\text{PO}_4$  を溶出液とし, チェンバー  
 でペレットに溶出させた。これをエッペン  
 ドルフ遠心管に集め,  $-20^\circ\text{C}$  で貯蔵した。

### [9]. 肝 HMG-CoA reductase 活性の測定<sup>(92)</sup>

p. 81 のように調製し, 保存しておいたミ  
 クロロームに, 氷冷下で  $10\text{mM DTT}$ ,  $0.02$   
 $\text{MEDTA}$  を含む  $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH } 7.2$ )  
 $1\text{mL}$  を加え, ホモジナイザー用テフロン棒  
 を用いて, ゆっくり懸濁させ反応用酵素液と  
 した。反応液は,  $10\ \mu\text{mol}$  リン酸カリ緩衝液  
 ( $\text{pH } 7.2$ ),  $1.0\ \mu\text{mol DTT}$ ,  $2\ \mu\text{mol EDTA}$ ,  
 $2\ \mu\text{mol NADPH}$ ,  $0.05\ \mu\text{mol DL-[3-}^{14}\text{C] HMG-CoA}$   
 ( $3922\ \text{dpm/nmol}$ ), ミクロロームタンパク (約  
 $250 \sim 500\ \mu\text{g}$ ) を含み, 総容量を  $100\ \mu\text{l}$  とした。

反応は、1.5 ml エッペンドルフ遠心管にて、  
37°C 15 分間振とうしながら行った。15 分後、  
20 ml 10 N HCl を加えて反応を終了させ、  
同時に 20 ml 5% メバロノラクトンを加え、  
さらに 30 分間 37°C で振盪した。10,000 rpm  
5 分間遠心分離し、上清 100 ml をシリカゲル  
プレート (メルク 60 F<sub>254</sub> 0.5 mm) にスポット  
した。同時に、26880 dpm / 30 ml の <sup>3</sup>H-メバロ  
ノラクトンを 30 ml と 5% メバロノラクトン  
20 ml をスポットした。ベンゼン : アセトン  
= 1 : 1 で展開後、I<sub>2</sub> 発色させ、標準の R<sub>f</sub>  
値 (0.6 ~ 0.7) と同じ箇所をかきとった。これを  
バイアルに移し、シンチレーター (オフト  
レン 100 g, PPO 4g/l エチオキサン) を加  
え、液体シンチレーションカウンターで測定  
した。

[10]. コレステロールに取り込まれた分量  
の測定<sup>(90)</sup>

10-1 肝臓コレステロールに取り込まれ  
た分量の測定

肝臓約2gを正確に秤量し、試験管に移し、  
15% KOH-エタノール溶液2.0 mlを加え、  
75°C 2時間ケン化した。冷却後、2 mlの石  
油エーテルを加え、充分に攪拌し、不ケン化  
物を抽出した。抽出後の石油エーテル層をパ  
スツールピペットで先細試験管に移した。こ  
の抽出を4回繰り返した後、30°Cに放置し、  
溶媒を除去した。0.1% コレステロール・ア  
セトン溶液0.5 ml、0.5% ジギトニン-50  
% エタノール溶液1.0 mlを加え、攪拌後、  
一晚4°Cで放置した。その後2000 rpm 10分間  
遠心分離し、上層を捨て、沈殿物にアセトン  
: エタノール = 1 : 1液を1.5 ml加え、攪  
拌した後、再び2000 rpm 10分間遠心分離し  
た。上層を捨てた後、沈殿物にエタノール  
1.5 mlを加え攪拌し、2000 rpm 10分間遠心

分離した。上層を捨て、窒素ガスで溶媒を除去した。これにメタノールを1.0 ml 加え攪拌後、定量的にバイアルに移した。これに、トルエン系シンチレーター (PPO 8g, POPOP 0.5g / ml トルエン) を加え、液体シンチレーションカウンターで $^3\text{H}$ 量を測定した。

### 10-2 小腸のコレステロールに取り込まれた $^3\text{H}$ 量の測定

組織に同量の15% KOH-エタノール溶液を加えて、以下は(10-1)と同様の方法に従って、測定した。

### 10-3 血液のコレステロールに取り込まれた $^3\text{H}$ 量の測定

0.5 ml の血清に0.5 ml の15% KOH-エタノール溶液を加えて、以下は(10-1)と同様の方法に従って、測定した。

### [11]. 肝 cholesterol $\alpha$ -hydroxylase 活性の測定

肝ミクロソームのこの活性は, Van Cantfort's<sup>(148)</sup>の方法に従って測定された。p. 116 のようにして得られた, 保存ミクロソームに氷冷下で, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 ml を加え, ホモジナイザー用テフロン棒を用いて, ゆっくり懸濁させ, 反应用酵素液とした。基質である [7( $n$ )- $^3$ H] コレステロール (specific activity  $12.54 \times 10^6$  dpm/n mol) は, 最終濃度 225  $\mu$ M にするようになり, Tween 80 (1.5  $\mu$ g/ml) の存在下で, Karaboyas と Koritz<sup>(149)</sup>の方法に従って可溶化された。反応液は, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 20 mM glucose-6-phosphate, 2 mM NADP, 1 I.U. glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM cysteamine, 4 mM  $MgCl_2$ , 上記基質及び反应用酵素液 20  $\mu$ l を含み, 総容量を 1 ml とした。反応は, 10 ml の三角フラスコにて, 37°C 30 分間振盪しながら行った。20% TCA 3 ml を加えて反応を終了させ, 反応液を先細の遠心管に移し, 2500 rpm 5 分間遠心分離



し、上清を別の三角フラスコに移し、オイルバス中約 $120^{\circ}\text{C}$ で蒸留した。蒸留で得られた $3\text{H}_2\text{O}$ の放射エネルギーを液体シンシレーションカウンターで測定した。

## [12]. 胆汁中のステロイドの定量

### 12-1 胆汁中のコレステロールの定量<sup>(91)</sup>

前述 p. 122 の方法に従って得られた胆汁 0.1 ml に、30% KOH 2 ml, エタール 3 ml を順次加え、充分に攪拌し、30分間 $75^{\circ}\text{C}$ でケン化した後、室温で冷却した。そして、5 ml のヘキサンを加え、1分間激しく攪拌した。このヘキサン抽出操作を計2回繰り返した後、ヘキサン層計 8 ml を試験管にとり、 $60^{\circ}\text{C}$ で放置し溶媒を除去した。蒸発乾固後、(1-2)の血清コレステロールの測定方法に従って定量した。

12-2 胆汁中の総胆汁酸の定量<sup>(150)</sup>

## a. 試薬

## ①. グリシン緩衝液 (1M; pH 9.5)

グリシン 2.5g, 硫酸ヒドラジン 0.87g, EDTA 0.2g を蒸留水に溶かし, 20 ml にした後, 2.5 N NaOH を用いて pH 9.5 に調整し, さらに蒸留水で, 100 ml にした。

②.  $3\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenase (1 unit/ml)

10 units/mg protein の場合は, protein 0.1 mg を緩衝液①, 1 ml に溶かした。

## ③. NAD 溶液 (50 mM)

NAD 40 mg を蒸留水 1 ml に溶かした。

## ④. 標準液

標準液は, 蒸留水に溶かしたタウロコール酸ナトリウム塩 (10  $\mu$ mole/ml) を用いた。

## b. 測定手順

p. 122 の方法に従って得られた胆汁を適当に (約 5 ~ 10 倍) 緩衝液①により希釈し, 之

の 20 ml 及び標準液 20  $\mu$ l を細試験管にとり、緩衝液 ① 600  $\mu$ l と NAD 溶液 ③ 10  $\mu$ l を加え、攪拌後、340 nm の吸光度をミクロセルにて測定し、この値を試料のブランクとした。反応液を再度細試験管にもどし、30 分間、30°C で放置した後、再度 340 nm の吸光度を測定し、ブランクとの差及び標準液の吸光度から胆汁酸量を求めた。

### 12-3 胆汁中の胆汁酸組成の分析<sup>(151)</sup>

#### a. 試薬及び装置

①. 30 mM 酢酸アンモニウム水溶液  
6.94 g 酢酸アンモニウムを蒸留水 3 l に溶解した。

#### ②. 溶離液 A

メタノール：アセトニトリル：30 mM 酢酸アンモニウム水溶液 = 3 : 3 : 4 の割合で混合し、さらに、0.45  $\mu$  のフィルターで濾過後、脱気して使用した。

## ③. 溶離液 B

メタノール : アセトニトリル : 30mM  
酢酸アンモニウム水溶液 = 2 : 2 :  
6 の割合で混合し, さらに, 0.45μ  
のフィルターで濾過後, 脱気して使  
用した。

## ④. 反応液

2.72g リン酸一カリウム, 744mg  
EDTA-Na<sub>2</sub>, 440mg NAD を蒸留水 2L  
に溶解後, 2-メルカプトエタノール  
0.9 ml を加え, 5N KOH で pH 7.8  
に調整した。さらに, 0.45μ のフィル  
ターで濾過後, 脱気した。

## ⑤. 分離カラム

Bilepak-II (日本分光(株))

## ⑥. 固定化酵素カラム

Enzymepak-HSD (日本分光(株))

## ⑦. HPLC

検出器 : FP-210, 反応液用ポンプ :

PG-350D, 溶離液用ポンプ : GP-A40,

と TRI ROTER-V, デガッサー: PG-3310

## b. 測定方法

p. 122 の方法に従って得られた, 胆汁 0.1 ml に エタノール 2.5 ml を加え, 攪拌し 85°C 1 分間放置し, 3000 rpm 5 分間遠心分離し, 液の上清を先細試験管に移した。この抽出操作を計 3 回繰り返した後, 得られたエタノール層は, 0.45 μ のフィルターで濾過し, それをエバポレーターで蒸発乾固した。蒸発乾固後, これにメタノール 1 ml を加えて溶解し, この 10 ~ 20 μl を用いて, NADH の生成量により胆汁酸を分画定量する固定化 3α-hydroxy steroid dehydrogenase - HPLC 法により, 胆汁中胆汁酸組成を分析した。

## [13]. 糞中のステロイドの抽出及び定量

13-1 糞中 3α-ヒドロキシ胆汁酸及び中性ステロイドの抽出方法<sup>(152)</sup>

乳鉢により粉碎した糞 200 mg を, 15 ml の其栓付試験管にとり, 酢酸-エタノール (10 ml

の50%酢酸水溶液と90mlのエタノールとの混液) 溶液2ml を加え、1分間激しく攪拌した後、3000rpm 5分間遠心分離した。上清を別の15ml 共栓付試験管に移した。この抽出操作を計3回繰り返した後、得られた約6mlの有機層は、窒素ガスにて除去された。これに、0.1N NaOH 2ml, 石油エーテル 2ml を加え、攪拌した後、3000rpm 2分間遠心分離した。分離後の上清を、後述(13-3)の中性ステロイドの測定に用いた。この抽出操作を計2回繰り返し、得られた下層に、1MHCl 2ml, 酢酸エーテル 2ml を加え、1分間激しく攪拌した後、3000rpm 5分間遠心分離した。分離後の上清を別の15ml 共栓付試験管に移した。この抽出操作を計2回繰り返した後、得られた上層は、窒素ガスにて除去された。これに、メタノール 1ml を加えて、残渣を溶解し、糞中3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸測定に用いた。

13-2 糞中  $3\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸の測定<sup>(153)</sup>  
 基本原理は、(12-2)の胆汁中の総胆汁酸と同様のものである。

a. 試薬

①. 0.02M トリス緩衝液

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 1.21g, EDTA 0.19g を蒸留水に溶かし, 希塩酸で pH7.2 に調整し, さらに蒸留水で 500 ml にした。

②.  $3\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenase (0.3 units/ml)

③. ヌタノール

④. 0.21M 抱水ヒドラジン溶液

⑤. 15 mM NAD 溶液

NAD 144mg を緩衝液①に溶解し, 12 ml にした。

⑥. 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  14.33g を蒸留水に溶解し, 200 ml にした。

⑦. 標準液

標準液は, ヌタノールに溶かした,

コール酸 ( $10 \mu\text{mole}/\text{ml}$ ) を用いた。

### b. 測定手順

(13-1, p. 331) に従って得られたメタロール 1 ml から 10 ml を小試験管にとり、これにメタロール 900  $\mu\text{l}$ , 0.21 M 抱水ヒドラーミン溶液 1000  $\mu\text{l}$ , 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液 700  $\mu\text{l}$ , 15 mM NAD 溶液 100  $\mu\text{l}$ , 3 $\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenase 溶液 300  $\mu\text{l}$  を順次加えて、25°C 40 分間放置後、340 nm の吸光度を測定し、同様の操作で得られた標準液の吸光度から検量線を作成し、胆汁酸量を求めた。

### 13-3 糞中の中性ステロイドの測定<sup>(154)</sup>

(13-1, p. 331) の糞中 3 $\alpha$ -ヒドロキシ胆汁酸の抽出過程で得られた、石油エーテル層約 4 ml を測定に用いた。この 4 ml を 10 ml のサンフォルビンに移し、エバポレーターで蒸発乾固させ、これにメタロール 1 ml, 内部標準として、5 $\alpha$ -コレスタン溶液 (酢酸エチル 100 ml に 5 mg の 5 $\alpha$ -コレスタンを溶かしたも



の) を 3~5 ml 加え, 残渣を溶解した後, 再び蒸発乾固させ, シリル化剤 (ピリジン 9 ml, ヘキサメチルジシラゾン 3 ml, トリメチルクロロシラン 1 ml の混液) 200  $\mu$ l を加えて, 1 時間放置後, この試料を用いてガスクロマトグラフィー (HITACHI 163 型 GC) により, コレステロール, コプロスタロールを分離定量した。

#### [14]. 尿中の生理活性アミンの定量

##### 14-1 尿中のヒスタミンの定量<sup>(222)</sup>

前述 p. 220 の方法に従って得られた尿 2 ml を 25 ml 共栓付遠心管にとり, 0.1 N HCl を 2 ml, リン酸ニカリウムを 3.5 g 順次加え, 充分攪拌した後, イソアミルアルコール (市販特級イソアミルアルコールをその各容の 1 N HCl で 1 回, 各容の蒸留水で 3 回洗浄したものの) 20 ml を加え, 5 分間激しく振盪した。二層に分離するまで試料を静置し, 上層から 18 ml を別の 50 ml 共栓付遠心管に移し, 0.01 N

HCl 4 ml, *n*-ヘプタン 13.5 ml を加え, 5 分間激しく振盪した。二層に分離するまで試料を静置し, 上層をアスピレーターで除去し, 下層の 3.5 ml を中太の試験管に移し, 10N NaOH 水溶液 0.5 ml, NaCl 2.5 g, 70% エタノール 20 ml を加え, 2 分間激しく攪拌した。二層に分離した後, 水層 2.5 ml を 25 ml 共栓付遠心管に移しとり, NaCl 0.94 g を加え, 30 秒間攪拌した後, イソアミルアルコール 20 ml を加え, 5 分間激しく振盪した。二層に分離した後, 上層 18 ml を 50 ml 共栓付遠心管に移しとり, 0.1N HCl 5 ml, *n*-ヘプタン 13.5 ml を加え, 5 分間激しく振盪した。二層に分離後, 上層をアスピレーターで除去し, 水層を 2 ml ずつ小試験管に分注し蛍光強度の測定に用いた。実際の測定は, 得られた水層 2 ml に, 1 N NaOH 水溶液 0.4 ml を加え攪拌した後, オーフタルアルデヒド試薬 (5 mg/ml x 4 ml) 0.1 ml を加え, すばやく攪拌した。次に室温で正確に 4 分間反応させた後, 2 M クエン酸水溶液 0.2 ml を加え, すば

よく攪拌し,  $358\text{ nm} - 446\text{ nm}$  の蛍光強度を測定した。サンプルブランクとして, 水層  $2\text{ ml}$  に,  $1\text{ N NaOH}$  水溶液  $0.4\text{ ml}$ ,  $2\text{ M}$  クエン酸水溶液  $0.2\text{ ml}$ ,  $\text{O-}$ フタルアルデヒド試薬  $0.1\text{ ml}$  をこの順で続けて加えて4分後, 測定したものを用了。試料尿  $2\text{ ml}$  に  $0.1\text{ N HCl}$   $2\text{ ml}$  を加える代わりに, ヒスタミン標準液 ( $1\mu\text{g/ml}$   $0.1\text{ N HCl}$ )  $1\text{ ml}$  に  $0.1\text{ N HCl}$   $3\text{ ml}$  を加え, 以下同様の操作を行なったものをスタンダードとした。蛍光強度の測定には, 日本分光 FP-550 型分光蛍光光度計を用了。

#### 14-2 尿中のカテコールアミンの定量<sup>(22/)</sup>

前述 p. 220 の方法に従って得られた尿  $4 \sim 10\text{ ml}$  を試験管にとり, 濃塩酸  $0.14 \sim 0.34\text{ ml}$  を加え,  $85^\circ\text{C}$  で30分間加熱した。これか  $3 \sim 9\text{ ml}$  を  $25\text{ ml}$  サンプルビンか遠心管に移しとり,  $\text{DHB A}$   $100\mu\text{l}$ ,  $0.1\text{ M}$  リン酸緩衝液 (pH 6.5)  $4\text{ ml}$ ,  $0.1\text{ M}$  亜硫酸水素ナトリウム  $100\mu\text{l}$ ,  $0.1\text{ M}$  EDTA  $100\mu\text{l}$  を加え,  $0.6\text{ N NaOH}$  を

摘出し、pHを6.5に調整した。次にあらかじめ0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化しておいたアンバーライトCG-50のマイクロカラムに、このpH6.5に調整した試料を流し、さらに、0.001M亜硫酸水素ナトリウム10ml、0.5N HCl 1mlを試料が流れ終わってから流した。その後、0.5N HCl 4mlで溶出し、それを25ml共栓付遠心管に採取した。採取液に、1Mトリス緩衝液(pH8.6) 4ml、0.1M亜硫酸水素ナトリウム100 $\mu$ l、0.1M EDTA 100 $\mu$ lを加え、0.6N NaOHを摘下して、pHを8.6に調整した。その後、アルミニウム70mgを入れ、おだやかに10分間振盪して、2500rpm 5分間遠心分離した。液層をアスピレーターで $\frac{2}{3}$ ほど除去し、次に0.01Mトリス緩衝液(pH7.4)を10ml、0.1M EDTA 100 $\mu$ lを加え、1分間振盪してから2500rpm 10分間遠心分離した。再度液層をアスピレーターで $\frac{2}{3}$ ほど除去し、0.01Mトリス緩衝液(pH7.4)を10ml、0.1M EDTA 100 $\mu$ lを加え、1分間振盪し

てから、2500 rpm 10分間遠心分離し、液相をアスピレーターで除去した後、エバポレーターで液相を完全に除去した。アルミナ層に0.2 N HCl 0.2 ml を加え、おだやかに10分間振盪し、2500 rpm 10分間遠心分離し、上層を試料液とした。柳本高速液体クロマトグラフィ- (生体モノアミン分析装置) Yanako L-3200V で分析した。L-3200V のカラムは、Yanapak ODS 4φ X 250 mm を用い、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.1) を0.45 μ のフィルターで濾過後、脱気して溶離液として用いた。

#### (15). 統計処理

実験結果の統計処理は、Student<sup>(241)</sup> の t-検定及び Duncan<sup>(242)</sup> の Multiple range test で行った。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な御指導を賜わりました吉田昭教授に心から感謝を申し上げます。

また、有益な御助言を賜わりました青山頼孝助教授、さらに様々な励ましと理解を賜わりました、横越英彦助手、堀尾文彦助手に深く感謝申し上げますとともに、共同研究者でありました、加藤光広氏、正木久典氏、宮崎仁志氏ならびに栄養化学研究室諸兄姉に深く感謝いたします。

## LITERATURE CITED

- (1) Henrik.D. "Cholesterol". In: Historical Introduction ( Robert, P.C., eds ), PP.1-14, ( 1958 )
- (2) Goldstein, J.L. & Brown, M.S. J.Lipid Res. 25, 1450 (1984)
- (3) Dunn, F.L., Pietri, A. & Raskin, P. Ann.Int.Med. 95, 426 (1981)
- (4) Walton, K.W., Campbell, D.H. & Tonks, E.A. Clin.Sci. 29, 199 (1965)
- (5) Thomas, C.B. & Murphy, E.A. J.Chron.Dis. 8, 661 (1958)
- (6) Carroll, K.K. Nutr.Rev. 36, 1 (1978)
- (7) Yano, k., Rhoads, G.G. & Kagan, A. New Engl.J.Med. 297, 405 (1977)
- (8) Lithell, H., Cedermark, M., Fröberg, J., Tesch, P. & Karlsson, J. Metabolism. 30, 1130 (1981)
- (9) Gofman, J.W., Lindgren, F.T., & Elliott, H.A. J.Biol.Chem. 179, 973 (1949)
- (10) Ross, R. & Glomset, J.A. New Engl.J.Med. 295, 369, 420 (1976)
- (11) Wissler, R.W. J.Atheroscler.Res. 8, 201 (1968)
- (12) Rhoads, G.G., Gulbrandsen, C.L. & Kagan, A. New Engl.J.Med. 294, 293 (1976)
- (13) Edwards, K.D.G. Prog.Biochem.Pharmacol. 7, 370 (1972)
- (14) Seidel, D., Alaupovic, P. & Furman. J.Clin.Invest. 48, 1211 (1969)
- (15) Fredrickson, D.S., Levy, R.I. & Lees, R.S. New Engl.J.Med. 276, 34, 94, 148, 215, 273 (1967)
- (16) Beaumont, J.L., Carlson, L.A., Cooper, G.R., Fejfar, Z., Fredrickson, D.S. & Strasser, J. Bull.WHO, 43, 891 (1970)
- (17) Motulsky, A.G. New Engl.J.Med. 294, 823 (1976)
- (18) Harry, D.S., Dini, M. & McIntyre, N. Biochim.Biophys.Acta. 296, 209 (1973)
- (19) Kato, N., & Yoshida, A. Nutr.Rep.Int. 23, 825 (1981)

- (20) Solomon, J.K. & Geison, R.L. *J. Nutr.* 108, 936 (1978)
- (21) Rukaj, A. & Sérougne, C. *Biochim. Biophys. Acta.* 753, 1 (1983)
- (22) Lakshmanan, M.R. & Veech, R.L. *J. Lipid Res.* 18, 325 (1977)
- (23) Holloway, D.E. & Rivers, J.M. *J. Nutr.* 111, 412 (1981)
- (24) Lefevre, M., Keen, C.L., Lönnnerdal, B., Hurley, L.S. & Schneeman, B.O. *J. Nutr.* 116, 1735 (1986)
- (25) Takeuchi, N., Ito, M., Uchida, K. & Yamamura, Y. *Biochem. J.* 148, 499 (1975)
- (26) Kato, R., Vassanelli, P., Frontino, G. & Chiesara, E. *Biochem. Pharmacol.* 13, 1037 (1964)
- (27) Vesell, E. *Advan. Pharmacol. Chemotherapy*, 7, 1 (1969)
- (28) Hucker, H.B. *Ann. Rev. Pharmacol.* 10, 99 (1970)
- (29) Oda, H., Matsuoka, S. & Yoshida, A. *J. Nutr.* 116, 1660 (1986)
- (30) Campbell, T.C. & Hayes, J.R. *Pharmacol. Rev.* 26, 171 (1974)
- (31) Miller, O.N. *Fed. Proc.* 35, 2459 (1976)
- (32) Kato, N., Tani, T. & Yoshida, A. *J. Nutr.* 111, 123 (1981)
- (33) Cecil, H.C., Harris, S.J., Bitman, J. & Fries, G.F. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 179 (1973)
- (34) Yagi, N., Kamohara, K. & Itokawa, Y. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 1119 (1979)
- (35) Innami, S. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 38, 1 (1985)
- (36) Kawai-Kobayashi, K. & Yoshida, A. *J. Nutr.* 116, 98 (1986)
- (37) Conny, A.H., Welch, R.M., Kuntzman, R. & Burns, J.J. *Clin. Pharmacol. Ther.* 8, 2 (1967)
- (38) Kato, N. & Yoshida, A. *Nutr. Rep. Int.* 21, 107 (1980)
- (39) Quazi, S., Yokogoshi, H. & Yoshida, A. *J. Nutr.* 113, 1109 (1983)
- (40) Dahl, L.K. *J. Exp. Med.* 112, 635 (1960)



- (41) Selye, H. *J. Clin. Endocr.* 6, 117 (1946)
- (42) 田多井吉之介, "ストレス" 創元社 (1980)
- (43) Edwards, P. A. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 188 (1975)
- (44) Danlel, R. G. & Waisman, H. A. *Growth.* 32, 255 (1968)
- (45) Alam, S. Q., Boctor, A. M., Rogers, Q. R. & Harper, A. E.  
*J. Nutr.* 93, 317 (1967)
- (46) Muramatsu, K., Takei, M. & Nakamura, K.  
*J. Nutr.* 105, 439 (1975)
- (47) Aoyama, Y., Yoshida, A. & Ashida, K.  
*Nutr. Rep. Int.* 28, 643 (1983)
- (48) Kato, N., Tani, T. & Yoshida, A. *J. Nutr.* 110, 1686 (1980)
- (49) Quazi, S., Takahata, M., Yokogoshi, H. & Yoshida, A.  
*Agric. Biol. Chem.* 48, 1581 (1984)
- (50) Harvey, P. W., Hunsaker, H. A. & Allen, K. G. D.  
*J. Nutr.* 111, 639 (1981)
- (51) Quazi, S., Yokogoshi, H. & Yoshida, A.  
*Nutr. Rep. Int.* 28, 1425 (1983)
- (52) Kato, N. & Yoshida, A. *Agric. Biol. Chem.* 43, 191 (1979)
- (53) Conney, A. H. & Burns, J. J. *Nature*, 184, 363 (1959)
- (54) Schmeisser, D. D., Kummerow, F. A. & Baker, D. H.  
*J. Nutr.* 113, 1777 (1983)
- (55) Sugiyama, K., Kushima, Y. & Muramatsu, K.  
*Agric. Biol. Chem.* 48, 2897 (1984)
- (56) Yagasaki, K., Ohsawa, N. & Funabiki, R.  
*Nutr. Rep. Int.* 33, 321 (1986)
- (57) Pearson, S., Stern, S. & McGavack, T. H.  
*Anal. Chem.* 25, 813 (1953)
- (58) Ishikawa, T. T., McNeely, S., Steiner, P. M., Glueck, C. J.,  
Mellies, M., Gardside, P. S. & McMillin, C.  
*Metabolism*, 27, 89 (1978)

- (59) Wahlefeld, A.W. " Triglycerides."  
Determination after enzymatic hydrolysis  
Methods of Enzymatic Analysis ( Bergmeyer, H.V.ed. )  
Vol.4, PP.1831-1935. Academic Press. New York. (1974)
- (60) Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H.  
J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
- (61) Bartlett, G.R. J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
- (62) Harper, A.E. J. Nutr. 68, 405 (1959)
- (63) La Du, B.N., Mandel, H.G. & Way, E.L.  
" 新しい薬物代謝学 " 廣川書店
- (64) Williams, C.H. & Kamin, H.J. J. Biol. Chem. 237, 587 (1962)
- (65) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.  
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (66) Ohara, T. Shokuhinbunseki Handbook, PP. 287-289,  
Kenpaku Co., Tokyo, (1973)
- (67) Harper, A.E. Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 1025 (1958)
- (68) Harper, A.E., Benevenga, N.T. & Wohlhueter, R.M.  
Physiol. Rev. 50, 428 (1970)
- (69) Sauberlich, H.E. J. Nutr. 75, 61 (1961)
- (70) Yamamoto, Y. & Muramatsu, K.  
Agric. Biol. Chem. 46, 1001 (1982)
- (71) Bakke, O.M. J. Nutr. 98, 217 (1969)
- (72) Okumura, J., Yamaguchi, K. & Yanaka, M.  
Jpn. Poult. Sci. 17, 256 (1980)
- (73) Srivastava, S.K. & Beutler, E. Biochem. J. 112, 421 (1969)
- (74) Leveille, G.A., Shockley, J.W. & Sauberlich, H.E.  
J. Nutr. 76, 321 (1962)
- (75) Oumura, E., Aoyama, Y. & Yoshida, A. Lipid, 21, 748 (1986)
- (76) La Du, B.N. & Zannoni, V.G. Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 175 (1961)
- (77) Rikans, L.E., Smith, C.R. & Zannoni, V.G.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 204, 702 (1978)

- (78) Lemberger, L., Kuntzman, R., Conney, A.H. & Burns, J.J.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 292 (1965)
- (79) Solomon, J.K. & Geison, R.L.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159, 44 (1978)
- (80) Qureshi, A.A., Solomon, J.K. & Eichelman, B.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159, 57 (1978)
- (81) Yanaka, M. Ph.D. Thesis, Nagoya University, Nagoya, Japan (1983)
- (82) Jenke, H.S. Biochim. Biophys. Acta. 837, 85 (1985)
- (83) Albro, P.W., Corbett, J.T., Harris, M. & Lauson, L.D.  
Chem. Biol. Interactions. 23, 315 (1978)
- (84) Schoenfield, L.J., Bonorris, G.G. & Ganz, P.  
J. Lab. Clin. Med. 82, 858 (1973)
- (85) Coyne, M.J., Bonorris, G.G., Goldstein, L.I.  
& Schoenfield, L.J. J. Lab. Clin. Med. 87, 281 (1976)
- (86) Fears, R. Br. J. Nutr. 39, 363 (1978)
- (87) Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Dietschy, J.M.  
J. Biol. Chem. 254, 5144 (1979)
- (88) Spady, D.K. & Dietschy, J.M. J. Lipid Res. 24, 303 (1983)
- (89) Allen, K.G.D. & Klevay, L.M. Life Sci. 22, 1691 (1978)
- (90) Turley, S.D., Andersen, J.M. & Dietschy, J.M.  
J. Lipid Res. 22, 551 (1981)
- (91) Siedel, J., Schlumberger, H., Klose, S., Ziegenhorn, J.  
& Wahlefeld, A.W. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 838 (1981)
- (92) Ide, T., Okamatsu, H. & Sugano, M. J. Nutr. 108, 601 (1978)
- (93) Goldfarb, S. & Pitot, H.C. J. Lipid Res. 12, 512 (1971)
- (94) Suzuki, H., Oba, K. & Uritani, I.  
Agric. Biol. Chem. 39, 1675 (1975)
- (95) Stegink, L.D. & Coon, M.J. J. Biol. Chem. 243, 5272 (1968)
- (96) Zlatkis, A. & Zak, B. Anal. Biochem. 29, 143 (1969)
- (97) Andersen, J.M. & Dietschy, J.M. J. Lipid Res. 20, 740 (1979)

- (98) Lakshmanan, M.R. & Veech, R.L. *J. Biol. Chem.* 252, 4667 (1977)
- (99) Shefer, S., Hauser, S., Laper, V. & Mosbach, E.H.  
*J. Lipid Res.* 13, 571 (1972)
- (100) Edwards, P.A. *J. Biol. Chem.* 248, 2912 (1973)
- (101) Edwards, P.A., Muroya, H. & Gould, R.G.  
*J. Lipid Res.* 13, 396 (1972)
- (102) Andersen, J.M. & Dietschy, J.M. *J. Biol. Chem.* 252, 3646 (1977)
- (103) Ingebritsen, T.S., Geelen, M.J.H., Parker, R.A., Evenson, K.J.  
& Gibson, D.M. *J. Biol. Chem.* 254, 9986 (1979)
- (104) Beg, Z.H., Stonik, J.A. & Bryan, B.H. Jr.  
*J. Biol. Chem.* 255, 8541 (1980)
- (105) Gries, F.A., Matschinsky, F. & Wieland, O.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 56, 615 (1962)
- (106) Mitamura, T. *Biochim. Biophys. Acta*, 917, 121 (1987)
- (107) Aoyama, Y., Ohmura, E., Yoshida, A. & Ashida, K.  
*Agric. Biol. Chem.* 49, 621 (1985)
- (108) Garrison, R.J., Kannel, W.B., Feinleib, M., Castelli, W.P.,  
McNamara, P.M. & Padgett, S.J. *Atherosclerosis*, 30, 17 (1978)
- (109) Gould, R.G., Bell, V.L. & Lilly, E.H.  
*Am. J. Physiol.* 196, 1231 (1959)
- (110) Havel, R.J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S.  
*Metabolic control and disease* (ed. P.K. Bondy  
& Rosenberg, L.E.) P. 393, W.B. Saunders Company (1980)
- (111) Chin, D.J., Gil, G., Russel, D.W., Liscum, L.,  
Luskey, K.L., Basu, S.K., Okayama, H., Berg, P., Goldstein, J.L.  
& Brown, M.S. *Nature*, 308, 613 (1984)
- (112) Liscum, L., Luskey, K.L., Chin, D.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L.  
& Brown, M.S. *J. Biol. Chem.* 258, 8450 (1983)
- (113) Mitropoulos, K.A. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 646 (1983)
- (114) Beg, Z.H., Stonik, J.A. & Brewer, H.B., Jr.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 488 (1984)
- (115) Roitelman, J. & Shechter, I. *J. Biol. Chem.* 259, 870 (1984)
- (116) Rogers, D.H. & Rudney, H. *J. Biol. Chem.* 257, 10650 (1982)

- (117) Quazi, S., Takahata, M., Horio, F. & Yoshida, A.  
Nutr. Rep. Int. 30, 617 (1984)
- (118) Tsang, R.C., Fallat, R.W. & Glueck, C.J.  
Pediatrics, 53, 458 (1974)
- (119) Brown, M.S., Kovanen, P.T. & Goldstein, J.L.  
Science, 212, 628 (1981)
- (120) Havel, R.J. Ann. Rev. Physiol. 48, 119 (1986)
- (121) Windler, E.E.T., Kovanen, P.T., Chao, Y.S., Brown, M.S.,  
Havel, R.J. & Goldstein, J.L. J. Biol. Chem. 255, 10464 (1980)
- (122) Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Sci. Am. 251, 58 (1984)
- (123) Pittman, R.C., Attie, A.D., Carew, T.E. & Steinberg, D.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5345 (1979)
- (124) Sirtori, C.R., Galli, G., Lovati, M.R., Carrara, P., Bosisio, E.  
& Kienle, M.G. J. Nutr. 114, 1493 (1984)
- (125) Aulinskas, T.H., Van der Westhuyzen, D.R. & Coetzee, G.A.  
Atherosclerosis, 47, 159 (1983)
- (126) Barnard, G.F., Erickson, S.K. & Cooper, A.D.  
Biochim. Biophys. Acta, 879, 301 (1986)
- (127) Reiser, R., Clark, D.A., Sorrels, M.F., Gibson, B.S.,  
Williams, M.C. & Wilson, F.H.  
J. Atheroscler. Res. 6, 565 (1966)
- (128) Eisenberg, S., Windmueller, H.G. & Levy, R.I.  
J. Lipid Res. 14, 446 (1973)
- (129) Glass, C., Pittman, R.C., Keller, G.A. & Steinberg, D.  
J. Biol. Chem. 258, 7161 (1983)
- (130) Kovanen, P.T., Brown, M.S. & Goldstein, J.L.  
J. Biol. Chem. 254, 11367 (1979)
- (131) Wu, J.D., Butler, J. & Bailey, J.M. J. Lipid Res. 20, 472 (1979)
- (132) Arbeeny, C.M., Rifici, V.A. & Eder, H.A.  
Biochim. Biophys. Acta, 917, 9 (1987)
- (133) Glass, C., Pittman, R.C., Weinstein, D.B. & Steinberg, D.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5435 (1983)

- (134) 菅野道廣, 今泉勝己 “コレステロール”  
三共出版
- (135) Hennes, A.R., Moore, M.Z. & Masters, Y.F.  
Metabolism. 11, 925 (1962)
- (136) Miettinen, T.A., Pelkonen, R., Nikkilä, E.A. & Heinonen, O.  
Acta Med. Scand. 182, 645 (1967)
- (137) Uchida, K., Takase, H., Kadowaki, M., Nomura, Y., Matsubara, T.  
& Takeuchi, N. Jap. J. Pharmacol. 29, 553 (1979)
- (138) Mynat, N.B. & Mitropoulos, K.A. J. Lipid Res. 18, 135 (1977)
- (139) Miller, N.E. & Nestel, P.J. Clin. Sci. Mol. Med. 45, 257 (1973)
- (140) Redinger, R.N. & Small, D.M. J. Clin. Invest. 52, 161 (1973)
- (141) Wada, F., Hirata, K., Nakao, K. & Sakamoto, Y.  
J. Biochem. 66, 699 (1969)
- (142) Balasubramaniam, S. & Mitropoulos, K.A.  
Biochem. Soc. Trans. 3, 964 (1975)
- (143) Waxman, D.J. Arch. Biochem. Biophys. 247, 335 (1986)
- (144) Appelton, B.S., Shriver, C.N., Arnrich, L. & Hathcock, J.N.  
Drug Nutr. Int. 1, 15 (1981)
- (145) Levine, W.G. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 81 (1978)
- (146) Williams, R.T., Millburn, P. & Smith, R.L.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 123, 110 (1965)
- (147) Klaassen, C.D. J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 743 (1971)
- (148) Van Cantfort, J., Renson, J. & Gielen, J.  
Eur. J. Biochem. 55, 23 (1975)
- (149) Karaboyas, G.C. & Koritz, S.B. Biochemistry, 4, 462 (1965)
- (150) Koss, F.W., Mayer, D. & Haindl, H.  
Enzymatic Analysis VIII Metabolites: Fatty Acid metabolism  
Bile Acids PP. 1886
- (151) Okuyama, S., Kokubun, N., Higashidate, S., Uemura, D.  
& Hirata, Y. Chem. Lett. 1443 (1979)

- (152) Malchow-Møller, A., Arffmann, S., Larusso, N.F. & Krag, E.  
Scand. J. Gastroenterol. 17, 331 (1982)
- (153) Bruusgaard, A., Sørensen, H., Gilhuus-Moe, C.C. & Skalhegg, B.A.  
Clin. Chim. Acta, 77, 387 (1977)
- (154) Miettinen, T.A., Ahrens, E.H. Jr. & Grundy, S.M.  
J. Lipid Res. 6, 411 (1965)
- (155) Gibbons, G.F., Mitropoulos, K.A. & Mynat, N.B.  
" Biochemistry of Cholesterol ". In: Regulation of  
synthesis and of further metabolism. P. 255-291 (1982)
- (156) Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Miyata, K. & Miyake, T.  
Endocr. Japon. 17, 499 (1970)
- (157) Danielsson, H., Einarsson, K. & Johansson, G.  
Eur. J. Biochem. 2, 44 (1967)
- (158) Einarsson, K. & Johansson, G. FEBS Lett. 1, 219 (1968)
- (159) Björkhem, I. & Danielsson, H. Mol. Cell. Biochem. 4, 79 (1974)
- (160) Boström, H., Hansson, R., Jönsson, K.H. & Wikvall, K.  
Eur. J. Biochem. 120, 29 (1981)
- (161) Boström, H. & Wikvall, K. J. Biol. Chem. 257, 11755 (1982)
- (162) Story, J.A. & Kritchevsky, D. Experientia, 30, 242 (1974)
- (163) Klaassen, C.D. & Watkins, J.B.  
Pharmacol. Rev. 36, 1-67 (1984)
- (164) Bergström, S. & Norman, A.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83, 71 (1953)
- (165) Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Takase, H. & Takeuchi, N.  
J. Biochem. 84, 1113 (1978)
- (166) Okuyama, S. Saishin-igaku, 37, 1907 (1982)
- (167) Hayashi, M. J. Chromatogr. 338, 195 (1985)
- (168) Choe, S.Y., Kim, H.M. & Yang, K.H.  
Drug Chem. Toxicol. 7, 149 (1984)
- (169) Turley, S.D. & Dietschy, J.M. J. Biol. Chem. 256, 2438 (1981)
- (170) Tanaka, K., Aso, B. & Sugano, M. J. Nutr. 114, 26 (1984)

- (171) Lindstedt, S. & Ahrens, E.H.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108, 286 (1961)
- (172) Danielsson, H. & Gustafsson, B.  
Arch. Biochem. Biophys. 83, 482 (1959)
- (173) Inokawa, S. Tokyo Tanabe Quarterly, 31, 89 (1980)
- (174) Sato, K., Shimada, H., Inamatsu, T., Fukazawa, T. & Noro, T.  
Igakuno-ayumi, 108, 348 (1979)
- (175) Sjövall, J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 676 (1959)
- (176) Garbutt, J.T. & Kenney, T.J. J. Clin. Invest. 51, 2781 (1972)
- (177) Hafkenschied, J.C.M. & Hectors, M.P.C.  
Clin. Chim. Acta, 65, 67 (1975)
- (178) Yoshimura, H., Yamamoto, H. & Kinoshita, H.  
Fukuoka Acta Med. 65, 12 (1974)
- (179) Bastomsky, C.H. Endocrinology, 95, 1150 (1974)
- (180) Bastomsky, C.H. & Papapetrou, P.D. J. Endocr. 56, 267 (1973)
- (181) Goldstein, J.A. & Taurog, A.  
Biochem. Pharmacol. 17, 1049 (1968)
- (182) Huber, J., Guder, W., Catzin, S. & Hamprecht, B.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 795 (1973)
- (183) Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Ness, G.C., Dugan, R.E.  
& Porter, J.W. Arch. Biochem. Biophys. 160, 387 (1974)
- (184) Geelen, M.J.H. & Gibson, D.M. FEBS Lett. 58, 334 (1975)
- (185) Beg, Z.H., Allmann, D.W. & Gibson, D.M.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1362 (1973)
- (186) Claremburg, R. & Chaikoff, I.L. Am. J. Physiol. 210, 37 (1966)
- (187) Sandek, C.D. & Brach, E.L. Diabetes, 27, 1059 (1978)
- (188) Rykälistö, O.J., Smith, P.H. & Brunzell, J.D.  
J. Clin. Invest. 56, 1108 (1975)
- (189) Woodside, W.F. & Heimberg, M. J. Biol. Chem. 251, 13 (1976)
- (190) 石川 栄治, 他 酵素, 免疫測定法 医学書院



- (191) Iwasa, S., Ueno, H., Miya, T., Wakimatsu, M.,  
Kondo, K. & Ohneda, A. *J. Biochem.* 86, 943 (1979)
- (192) Dugan, R.E., Ness, G.C., Lakshmanan, M.R., Nepokroeff, C.M.  
& Porter, J.W. *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 499 (1974)
- (193) Mitropoulos, K.A. & Balasubramaniam, S.  
*Biochem. J.* 160, 49 (1976)
- (194) Lin, R.C. & Snodgrass, P.J. *FEBS Lett.* 83, 89 (1977)
- (195) Graham, T.O., Van Thiel, D.H., Little, J.M. & Lester, R.  
*Am. J. Physiol.* 237, E177 (1979)
- (196) Gibbs, F.P. *Am. J. Physiol.* 219, 288 (1970)
- (197) Huber, J., Hamprecht, B., Miller, O.A. & Guder, W.  
*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 313 (1972)
- (198) Hassan, A.S., Yunker, R.L. & Subbiah, M.T.R.  
*Biol. Neonate*, 41, 110 (1982)
- (199) Weiss, S.B. & Marx, W. *J. Biol. Chem.* 213, 349 (1955)
- (200) Byers, S.O. & Friedman, M.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 551 (1973)
- (201) Alenn, D.K., Hassel, C.A. & Lei, K.Y.  
*J. Nutr.* 112, 2043 (1982)
- (202) Bastomsky, C.H. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 288 (1977)
- (203) Collins, W.T. Jr. & Capen, C.C. *Lab. Invest.* 43, 158 (1980)
- (204) 下田新一, 他  
薬理と治療 9 (5) 1947 (1981)
- (205) 玉井一, 他  
薬理と治療 9 (7) 2611 (1981)
- (206) Nejad, N.S. & Chaikoff, I.L. *Endocrinology*, 75, 396 (1964)
- (207) Bastomsky, C.H. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54, 23 (1976)
- (208) Abrams, J.J. & Grundy, S.M. *J. Lipid Res.* 22, 323 (1981)
- (209) Chait, A., Albers, J.J. & Bierman, E.L.  
*Clin. Res.* 26, 303 (1978)
- (210) Walton, K.W., Scott, P.J., Dykes, P.W. & Davies, J.W.L.  
*Clin. Sci.* 29, 217 (1965)

- (211) Lerman, J. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 13, 1341 (1953)
- (212) Eriksson, S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 582 (1957)
- (213) Kaplan, A., Jacques, S. & Gant, M. *Am. J. Physiol.* 191, 8 (1957)
- (214) Rajan, G. & Ramasarma, T. *Biochem. J.* 162, 493 (1977)
- (215) Feigelson, E. G., Pfaff, W. W., Karmen, A. & Steinberg, D. *J. Clin. Invest.* 40, 2171 (1961)
- (216) Exton, J. H. *J. Cyclic Nucl. Res.* 5, 277 (1979)
- (217) Subramanian, N., Nandi, B. K., Majumder, A. K. & Chatterjee, I. B. *Biochem. Pharmacol.* 23, 637 (1974)
- (218) Nandi, B. K., Subramanian, N., Majumder, A. K. & Chatterjee, I. B. *Biochem. Pharmacol.* 23, 643 (1974)
- (219) 高橋十郎, 藤井一寿, 林長蔵  
臨床化学 4 (2), 179 (1975)
- (220) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. *Anal. Chem.* 28, 350 (1956)
- (221) Kissinger, P. T., Bruntlett, C. S., Davis, G. C., Felice, L. J., Riggan, R. M. & Shoup, R. E. *Clin. Chem.* 23, 1449 (1977)
- (222) Anton, A. H. & Sayre, D. F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 285 (1969)
- (223) Cannon, W. B. & Britton, S. W. *Am. J. Physiol.* 79, 433 (1927)
- (224) Kvetnansky, R. & Mikulaj, L. *Endocrinology*, 87, 738 (1970)
- (225) Kvetnansky, R., Sun, C. L., Lake, C. R., Thoa, N. B., Torda, T. & Kopin, I. J. *Endocrinology*, 103, 1869 (1978)
- (226) Schwartz, J. H., Young, J. B. & Landsberg, L. *J. Clin. Invest.* 72, 361 (1983)
- (227) Hansen, B. C., Schielke, G. P., Jen, K. L. C., Wolfe, R. A., Movahed, H. & Pek, S. B. *Am. J. Physiol.* 242, E40 (1982)
- (228) Agraharany, J. C. & Wurtman, R. J. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3577 (1982)
- (229) Bellet, S., Roman, L., DeCastro, O., Kim, K. E. & Kershbaum, A. *Metabolism*, 18, 288 (1969)

- (230) Rubin, E., Hutterer, F. & Lieber, C.S. *Science*, 159, 1469 (1968)
- (231) Ogata, M., Mendelson, J.H., Mello, N.K. & Majchrowicz, E. *Psychosom. Med.* 33, 159 (1971)
- (232) Miura, Y., Kobayashi, K., Tomioka, H., Sakuma, H., Adachi, M. & Yoshinaga, K. *Saishin-igaku*, 34, 2345 (1979)
- (233) Rawat, A.K. *J. Neurochem.* 29, 915 (1974)
- (234) Sharma, R.P. *Life Sci.* 13, 1245 (1973)
- (235) Hrdina, P.D., Singhal, R.L., Peters, D.A.V. & Ling, G.M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 25, 276 (1973)
- (236) Graham, R.M., Hess, H.J. & Homcy, C.J. *J. Biol. Chem.* 257, 15174 (1982)
- (237) Pequery, R. & Giudicelli, Y. *FEBS Lett.* 116, 85 (1980)
- (238) Dall'aglio, E., Chang, H. & Reaven, G.M. *Metabolism*, 32, 510 (1983)
- (239) Chatterjee, I.B., Majumder, A.K., Nandi, B.K. & Subramanian, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 258, 24 (1975)
- (240) Nakano, K. & Suzuki, S. *J. Nutr.* 114, 1602 (1984)
- (241) Snedecor, G.W. & Cochran, W.G. *Statistical Methods (Japanese Translated Edition, Iwanami Pub. Inc. Tokyo)*, The Iowa State University Press, Ames, IA (1957)
- (242) Duncan, D.B. *Biometrics*, 13, 164 (1957)
- (243) Zilversmit, D.B. & Davis, A.K. *J. Lab. Clin. Med.* 35, 155 (1950)

## 報 文 目 録

1. Nagaoka, S., Aoyama, Y. & Yoshida, A.  
Effect of tyrosine and some other amino acids on serum  
level of cholesterol in rats.  
Nutrition Reports International, 31 (5) 1137-1148 (1985)
  
2. Nagaoka, S., Horio, F., Aoyama, Y. & Yoshida, A.  
Comparative studies on the hypercholesterolemia  
induced by some dietary xenobiotics in rats.  
Nutrition Reports International, 32 (4) 785-800 (1985)
  
3. Nagaoka, S., Masaki, H., Aoyama, Y. & Yoshida, A.  
Effects of excess dietary tyrosine or certain  
xenobiotics on the cholesterologenesis in rats.  
Journal of Nutrition, 116 (5) 726-732 (1986)
  
4. Nagaoka, S., Kato, M., Aoyama, Y. & Yoshida, A.  
Comparative studies on the hypercholesterolaemia induced  
by dietary excess tyrosine or polychlorinated biphenyls  
in rats.  
British Journal of Nutrition, 56 (2) 509-517 (1986)

## 参 考 論 文 目 録

1. Nagaoka, S., Hirasawa, M., Fukushima, K. & Tamura, G.  
Methyl viologen-linked nitrite reductase from bean roots.  
Agricultural and Biological Chemistry,  
48 (5) 1179-1188 (1984)