

博士(栄養学)学位論文

論文題目

一価不飽和脂肪酸がラットの糖代謝・
脂質代謝に及ぼす影響
—茶油及びオリーブ油を用いた検討—

1998年

指導教員 若林孝雄 教授

氏名 申 曼 珍

女子栄養大学

一価不飽和脂肪酸がラットの糖代謝・脂質代謝に及ぼす影響

①

博士（栄養学）学位論文

論文題目

一価不飽和脂肪酸がラットの糖代謝・
脂質代謝に及ぼす影響
－茶油及びオリーブ油を用いた検討－

Effect of dietary monounsaturated fatty acid on
metabolism of carbohydrate and lipid in the rats
－studies with tea oil and olive oil－

1998 年

指導教員 若林孝雄 教授

氏名 申 曼珍

女子栄養大学

目次

序章	1
第1章 目的及び研究計画	4
第1節 目的	4
第2節 対象及び方法	5
1. 対象	5
2. 実験飼料	5
3. 動物	7
4. 実験項目と方法	9
5. 統計分析	9
第3節 体重・内臓重量・飼料効率の成績	11
第2章 糖代謝・インスリン抵抗性	16
第1節 目的	16
第2節 方法	16
第3節 結果	17
第4節 考察	20
第3章 脂質代謝	25
第1節 目的	25
第2節 方法	26
1. リポ蛋白リパーゼ(LPL) 活性の測定	26
2. 血清リポ蛋白分画の方法	26
3. 血清及びリポ蛋白の脂質と脂肪酸組成の測定	27
4. 肝臓脂質含量の測定	27
第3節 結果	27
1. リポ蛋白リパーゼ (LPL) 活性	27
2. 血清リポ蛋白の脂質	31
3. 血清リポ蛋白の脂肪酸組成	36
4. 肝臓脂質含量	42
5. 相関関係	44

第4節 考察	53
1. 血清及び各リポ蛋白画分TC	55
2. 血清及び各リポ蛋白画分TG	56
3. 脂肪酸組成	56
4. 肝臓脂質含有量及び脂質代謝	58
5. 植物ステロール	60
6. 相関関係	63
第4章 LDL受容体	65
第1節 目的	65
第2節 方法	67
1. 膜分画蛋白質の分離及び測定	67
2. 泳動及びプロット方法	67
3. LDL受容体の定量化の方法	69
第3節 結果	72
第4節 考察	72
第5章 VLDL分泌速度とMTP活性	77
第1節 目的	77
第2節 方法	79
1. MTP活性の測定	79
2. VLDL分泌速度の測定	79
第3節 結果	80
1. MTP活性	80
2. VLDL分泌速度	80
第4節 考察	82
第6章 総括	85
第7章 結論	92
謝辞	94
文献	95

Table 目次

Table1-1. 飼料組成	6
Table1-2. 飼料の脂肪酸組成	8
Table1-3. 実験項目及び方法	10
Table1-4. 体重・内臓重量の比較	13
Table1-5. 飼料効率	14
Table3-1a~ d. 血清及びリポ蛋白分画の脂肪酸組成	37
Table3-2. 茶油とオリーブ油の植物ステロール	61
Table4-1. LDL受容体活性と血清及び肝脂質との相 関関係	74

Fig 目次

Fig.1-1 体重増加の比較	12
Fig.1-2 体重と飼料摂取量及び腹腔内脂肪量との 相関関係	15
Fig.2-1 基礎血糖・血漿インスリン濃度	18
Fig.2-2 SSPG 及び SSPI の結果	19
Fig.2-3 SSPG と腸間膜脂肪量との相関関係	21
Fig.2-4 インスリン抵抗性症候群	23
Fig.3-1 リポ蛋白分画の遠心分離法	28
Fig.3-2 肝臓脂質の抽出方法	29
Fig.3-3 LPL 活性の結果	30
Fig.3-4 血清及びリポ蛋白画分の TC	32
Fig.3-5 血清及びリポ蛋白画分の TG	34
Fig.3-6 血清 FFA 濃度	35
Fig.3-7 肝臓脂質含有量	43

Fig.3-8	FFA と飼料摂取量及び後腹膜脂肪量との 相関関係 -----	45
Fig.3-9	SSPI と FFA との相関関係 -----	46
Fig.3-10	SSPI と肝臓脂質含有量との相関関係 -----	47
Fig.3-11	SSPG と VLDL-C との相関関係 -----	48
Fig.3-12	血清TG 及び VLDL-TG と体重との相関 関係 -----	49
Fig.3-13	血清TG、VLDL-C、VLDL-TG、VLDL-PL と腹腔内脂肪量との相関関係 -----	51
Fig.3-14	血清TG、VLDL-C、VLDL-TG、VLDL-PL と肝臓重量との相関関係 -----	52
Fig.4-1	リポ蛋白代謝経路 -----	66
Fig.4-2	LDL 受容体測定に用いる肝組織の膜分画 ---	68
Fig.4-3	LDL 受容体測定に用いる SDS-PAGE 及び イノムプロット法 -----	70
Fig.4-4	LDL 受容体の泳動図 -----	71
Fig.4-5	LDL 受容体活性の比較 -----	73
Fig.5-1	VLDL 分泌速度の比較 -----	81

略記号一覧表

CE	cholesterol ester	コレステロールエステル
d	density	比重
FC	free cholesterol	遊離型コレステロール
FFA	free fatty acid	遊離脂肪酸
HDL	high density lipoprotein	高比重リポ蛋白
IDL	intermediate density lipoprotein	中間比重リポ蛋白
LDL	low density lipoprotein	低比重リポ蛋白
LPL	lipoprotein lipase	リポ蛋白リパーゼ
MTP	microsomal triglyceride transfer protein	ミクロソームトリグリセ リド転送蛋白
MUFA	monounsaturated fatty acid	一価不飽和脂肪酸
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus	インスリン非依存型糖尿病
PL	phospholipid	リン脂質
PUFA	polyunsaturated fatty acid	多価不飽和脂肪酸
SFA	saturated fatty acid	飽和脂肪酸
SSPG	steady-state plasma glucose	
SSPI	steady-state plasma insulin	
TC	total cholesterol	総コレステロール
TG	triglyceride	トリグリセリド
VLDL	very low density lipoprotein	超低比重リポ蛋白

脂肪酸名と記号

炭素数:二重結合数	英名	和名
8:0	Octanoic acid	オクタン酸
10:0	Decanoic acid	デカン酸
12:0	Lauric acid	ラウリン酸
14:0	Myristic acid	ミリスチン酸
16:0	Palmitic acid	パルミチン酸
16:1(n-7)	Palmitoleic acid	パルミトレイン酸
18:0	Stearic acid	ステアリン酸
18:1(n-9)	Oleic acid	オレイン酸
18:2(n-6)	Linoleic acid	リノール酸
18:3(n-3)	Linolenic acid	リノレン酸
20:0	Arachidic acid	アラキジン酸
20:1(n-9)	Icosenoic acid	イコセン酸
20:3(n-6)	Icosatrienoic acid	イコサトリエン酸
20:4(n-6)	Arachidonic acid	アラキドン酸
20:5(n-3)	Icosapentaenoic acid	イコサペンタエン酸
22:0	Behenic acid	ベヘン酸
22:6(n-3)	Docosahexaenoic acid	ドコサヘキサエン酸
24:0	Lignoceric acid	リグノセリン酸
24:1(n-9)	Tetracosenoic acid	テトラコセン酸

Abstract

Increased intake of dietary fat is in general associated with obesity, hyperlipidaemia, hypertension and impaired glucose tolerance, which are all major risk factors of coronary heart disease. However, olive oil-rich diet, rich in monounsaturated oleic acid, is known to be associated with decreased risk of coronary heart disease. In this study, investigated the effect of another oleic acid-rich oil, tea oil (oil of *Camelia oleifera* seed) in composition with olive oil on increase of body and adipose tissue weight, plasma lipoprotein profile and factors affecting lipoprotein metabolism, and insulin sensitivity, with polyunsaturated fatty acid-rich soybean oil and saturated fatty acid-rich palm oil as controls.

Sprague-Dawley rats, 7 weeks old, were fed high-fat diet containing 16%(w/w) of either soybean oil, olive oil, tea oil, or palm oil for 5 weeks. There were no differences in body weight, abdominal adipose tissue weight, and ratio of body weight increase to food consumption between different groups. Neither insulin sensitivity measured by steady-state plasma glucose (SSPG) method nor lipoprotein lipase (LPL) activity showed significant difference with different oils. Interestingly, SSPG levels were positively correlated with abdominal adipose tissue weight and very low density lipoproteins cholesterol (VLDL-C) when all groups were combined. Also, serum triglyceride (TG), VLDL-C and VLDL triglyceride (VLDL-TG) were positively correlated with abdominal adipose tissue weight and liver weight.

Serum cholesterol (TC) was lower with olive, tea, and palm oil than with soybean oil, and the changes were mostly due to decrease in HDL-cholesterol. Serum triglyceride tended to be higher with olive oil than with soybean oil, but there was no change with tea oil. VLDL-C and triacylglycerol increased with olive oil, but not with tea oil, while intermediate density lipoproteins (IDL) and low density lipoproteins (LDL) did not change in both cases, suggesting increased VLDL production and increased LDL clearance with olive oil and no such changes with tea oil. However, VLDL secretion measured by Triton WR-1339 method in a separate experiment revealed an increase in VLDL-C secretion rate but not that of VLDL-TG with both olive oil and tea oil. Liver membrane LDL receptor measured by Western blotting did not show significant difference between different oils. Fatty acid composition in serum and lipoprotein fraction closely reflected that of dietary oil, but the relation was most close in VLDL and less close in high density lipoproteins (HDL). These results suggest that oleic acid-rich diet affects lipoprotein profile by increasing both VLDL secretion and clearance of serum lipoproteins. Additionally, plant sterol content and composition in olive oil and tea oil were very different, suggesting profound effect of plant oil on serum lipide and lipoprotein profiles.

序章

高脂肪食は一般に高脂血症、肥満、糖尿病を増加させ、動脈硬化を促進するとされている。これに対し、オリーブ油を日常的に摂取している地中海地域では動脈硬化性疾患による死亡率が比較的少ないとの調査結果¹が出されてから、オリーブ油の主要脂肪酸である一価不飽和脂肪酸のオレイン酸が注目され、オリーブ油を用いて多くの研究が行われてきた²⁻⁷。オレイン酸は多価不飽和脂肪酸のリノール酸と同程度に血中コレステロール(TC)濃度を低下させるが、高比重リポ蛋白コレステロール(HDL-C)を下げず²⁻⁵、また、トリグリセリド(TG)濃度を低下させる^{2,8}点で多価不飽和脂肪酸より優れていると報告されている。これらの報告を踏まえて、一価不飽和脂肪酸は脂質代謝によい影響を与えるとして薦める勧告も出されている⁹。1994年に発表された地中海スタディも「高オレイン酸-低リノール酸-高 α -リノレン酸」が心疾患の二次予

防に非常に有効であるとしている¹⁰。日本でも、第5次改訂「日本人の栄養所要量」では一価不飽和脂肪酸の摂取比率を現状より増やすことを薦めている¹¹。ところが、一価不飽和脂肪酸に関する研究は飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸より遅れており、薦められる高オレイン酸油はまだ確定されていない¹²。一価不飽和脂肪酸に関する研究はオリーブ油を用いているものが多いが、今回、アジア原産であり、中国南部で多く用いられているオリーブ油と類似した脂肪酸組成をもちオレイン酸に富む茶油（*Camelia oleifera* Abel 種子油）に着目し、オリーブ油と比較しながら、茶油の糖代謝及び脂質代謝に及ぼす影響をラットを用いた動物実験で検討した。

第1章では、研究の目的、対象、方法及びラットの体重と飼料摂取の成績を述べる。第2章では、茶油の糖代謝に与える影響について検討する。第3章では、茶油の脂質代謝に与える影響について検討する。第4章と第5

章では、脂質代謝の結果を踏まえて、その機序に関与すると思われる低比重リポ蛋白(LDL)受容体、超低比重リポ蛋白(VLDL)分泌速度及びミクロソームトリグリセリド転送蛋白(MTP)について検討する。

第1章から第5章まで茶油を用いた研究で、一価不飽和脂肪酸について多角度的な検討を行う。

第1章 目的及び研究計画

第1節 目的

一価不飽和脂肪酸のオレイン酸に富む茶油は中国南部の一部地域（茶栽培地域）で食用油として消費されている。Dengら¹³による健康者における検討では、多価不飽和脂肪酸ではLDL-コレステロール（LDL-C）、HDL-コレステロール（HDL-C）が共に低下し、飽和脂肪酸ではTCは低下せずTGが上昇したのに対し、オレイン酸に富む茶油では、TC、LDL-C、TG共に低下し、HDL-Cは低下しなかった。また、Chenら¹⁴は茶油をサフラワー油、ラードと比較して、抗アテローム形成作用と抗酸化作用が認められたと報告している。茶油の糖代謝及び脂質代謝に及ぼす影響、とくに血清リポ蛋白分画、肝でのリポ蛋白の合成・分泌とその後の代謝の変動について、オリーブ油と詳細に比較した研究はまだ見られない。本研究では、これらの点について、多価不飽和脂肪酸を多く含む大豆油及び中鎖飽

和脂肪酸を多く含むヤシ油を対照にして、ラットを用いて検討した。

第2節 対象及び方法

1、対象

実験には4週齢のSprague-Dawley系の雄性ラットを日本チャールス・リバー(株)より購入して用いた。ラットは4群に分け、1群9匹ずつとし、同腹ラットを各群に均等配分した。飼育は、室温 $22.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0 \pm 5.0\%$ 、12時間明暗切り替えで行った。ラット用標準固形飼料で3週間飼育後、高脂肪の実験用飼料で5週間飼育し、水は自由摂取とした。

2、実験飼料

実験用飼料は油脂の含有量が標準飼料では重量比8%のところを16%に増加させた高脂肪食(Table 1-1)を油脂としてそれぞれ大豆油(SOY)、オリーブ油(OLIVE)、茶油(TEA)、ヤシ油(PALM)の4種類を用いて調製した。

Table1-1. Composition of the experimental diet. *

Ingredient	% (w/w)
Corn starch	30.75
Casein	20.00
α - Corn starch	13.20
Sucrose	10.00
Cellulose	5.00
Mineral mixture (AIN-93G)	1.00
L-cystine	0.30
Choline bitartrate	0.25
Oil	16.00

* from Oriental Yeast Co. Tokyo

これらの飼料はオリエンタル酵母工業（株）で製造され、粉末で供給された。冷蔵保存し、投与前に少量の水で練って団子状に調製し、毎日一匹あたり 22g の量で与え、残量を計測し、摂取量を算出した。大豆油、オリーブ油、ヤシ油はオリエンタル酵母工業（株）が調達したものを、茶油は中国福建省清流久立茶油製品会社の製品を飼料の製造に使用した。飼料の脂肪酸組成を Table 1-2（日本食品分析センター分析値）に示す。以下それぞれの食餌群を SOY 群、OLIVE 群、TEA 群、PALM 群とする。

3、動物

ラットの体重は毎週測定した。5 週間の実験期間最終日に一夜絶食後、ネンブタール麻酔下で腹部大動脈より採血して屠殺し、直ちに氷冷した 0.9% 食塩水を門脈から灌流脱血し、肝臓を採取した。肝は 3 倍量の 0.25M ショ糖液を加え、polytron を用いてホモジナイズし、-35℃ に冷凍保存した。血液は 3,500rpm、

Table.1-2 Fatty acid composition of the test diets (%w/w).*

Fatty Acid	Diet			
	Soy oil	Olive oil	Tea oil	Palm oil
8 : 0	---	---	---	7.1
10 : 0	---	---	---	5.9
12 : 0	---	---	---	46.4
14 : 0	0.2	0.1	0.2	18.2
16 : 0	10.6	10.5	8.7	10.0
16 : 1 (n-7)	---	0.8	---	---
18 : 0	4.3	3.6	2.3	3.3
18 : 1 (n-9)	23.7	78.0	79.6	7.0
18 : 2 (n-6)	53.0	5.4	7.9	1.9
18 : 3 (n-3)	6.7	0.7	0.5	---
20 : 0	0.4	0.4	---	---
20 : 1	0.2	0.2	0.5	---
total				
SFA	15.5	14.6	11.2	90.9
MUFA	23.9	79.0	80.1	7.0
PUFA	59.7	6.1	8.4	1.9

SFA: saturated fatty acid MUFA: monounsaturated fatty acid

PUFA: polyunsaturated fatty acid.

* from Japan Food Research Laboratories. by means of gas chromatography.

15分間遠心分離を行い、血清を採取した。

4、実験項目と方法

Table1-3に実験項目と方法を示す。糖代謝及びインスリン抵抗性に関しては steady-state plasma glucose(SSPG)及び steady-state plasma insulin(SSPI)を測定した。脂質代謝に関しては血清並びにリポ蛋白分画の脂質・脂肪酸組成、肝臓脂質含有量を測定し、リポ蛋白リパーゼ(LPL)活性、肝膜分画のLDL受容体、超低比重リポ蛋白(VLDL)分泌速度を測定した。

5、統計処理

測定値はすべて平均値±標準偏差(Mean±S.D.)で表し、多群間の有意差検定は分散が等しいとみなされた場合は一元分散分析(ANOVA)を用い、各群間の比較は分散分析 post hocテストのBonferroni法を用いた。分散が等しいとみなされない場合はクラスカル・ワーリス検定を用いた。

Table 1-3. Parameters determined in the study.

measurement	methods
Insulin resistance	Steady-state plasma glucose and insulin by insulin suppression test
Lipoprotein lipase (LPL) activity	Production of free fatty acid from triolein by post-heparin plasma, with or without 1M NaCl
Serum lipoprotein	Ultracentrifugation
Lipid composition of serum and lipoprotein	Enzyme immunoassay
Composition of fatty acid in serum and lipoprotein	Gas chromatography
Extraction of total lipid from liver	Folch's measure
LDL-receptor	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Secretion rates of VLDL	Western blot
	An increase in serum TC, TG concentrations after injection of Triton WR-1339

第3節 体重・内臓重量及び飼料効率の成績

実験全期間において、体重(Fig1-1)及び体重100g当たりの肝臓、心臓重量、腹腔内脂肪量(Table1-4)は各群の間に有意差が見られなかった。単位飼料摂取量あたりの体重増加量として算出した飼料効率(Table1-5)も各群の間に有意差が見られなかった。

体重と総飼料摂取量との間に有意に正相関(Fig.1-2 $p < 0.05$)を認め、群ごとにおいてはSOY群とTEA群では有意な相関が見られなかったのに対し、OLIVE群とPALM群では有意($p < 0.05$)であった。また、体重と腹腔内脂肪量との間にも正相関(Fig.1-2 $p < 0.0005$)を認めた。群ごとにおいてはOLIVE群($p = 0.0001$)とPALM群($P < 0.05$)では強く相関を示した。油脂の種類により、体重、脂肪蓄積の増加への寄与の度合いが異なる可能性があると思われるが、数を増やして検討する必要がある。

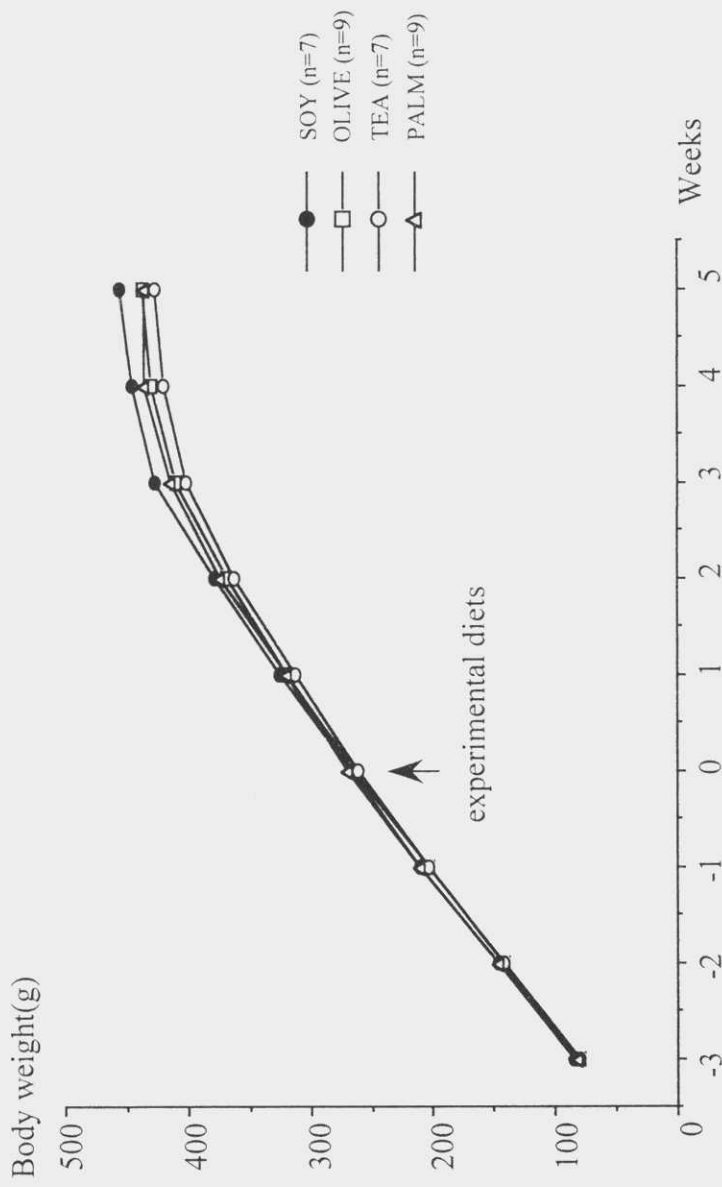


Fig.1-1 Change in body weight of rats on experimental diets containing 16%(w/w) different oils.
 Mean \pm S.D N.S

Table 1-4. Body weight, and relative weight of liver, heart and adipose tissues in rats after 5 weeks on experimental diets containing 16%(w/w) different oils.

	SOY (n=7)	OLIVE (n=9)	TEA (n=7)	PALM (n=9)
Body weight (g)	455.6 ± 30.7	436.8 ± 30.9	426.7 ± 29.6	435.6 ± 26.8
Body weight gain (g/day)	5.41 ± 0.78	4.96 ± 0.55	4.75 ± 0.47	4.77 ± 0.76
Liver weight (g/100g BW)	2.66 ± 0.21	2.80 ± 0.26	2.60 ± 0.22	2.58 ± 0.17
Heart weight (g/100g BW)	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Adipose tissues weight (g/100g BW)	4.36 ± 0.82	5.19 ± 0.99	4.63 ± 1.60	4.79 ± 0.82
Mean ± S.D	N.S			

Table 1-5. Food efficiency of the experimental diets (body weight gain g/g diet).

	1st Week	2nd Week	3rd Week	4th Week	5th Week	Average
SOY (n=7)	0.36 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.07	0.25 ± 0.04
OLIVE (n=9)	0.35 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.07	0.14 ± 0.06	0.05 ± 0.06	0.24 ± 0.02
TEA (n=7)	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.29 ± 0.07	0.14 ± 0.06	0.05 ± 0.06	0.24 ± 0.02
PALM (n=9)	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.08	0.27 ± 0.09	0.15 ± 0.05	-0.004 ± 0.15	0.23 ± 0.03

Mean ± S.D. N.S

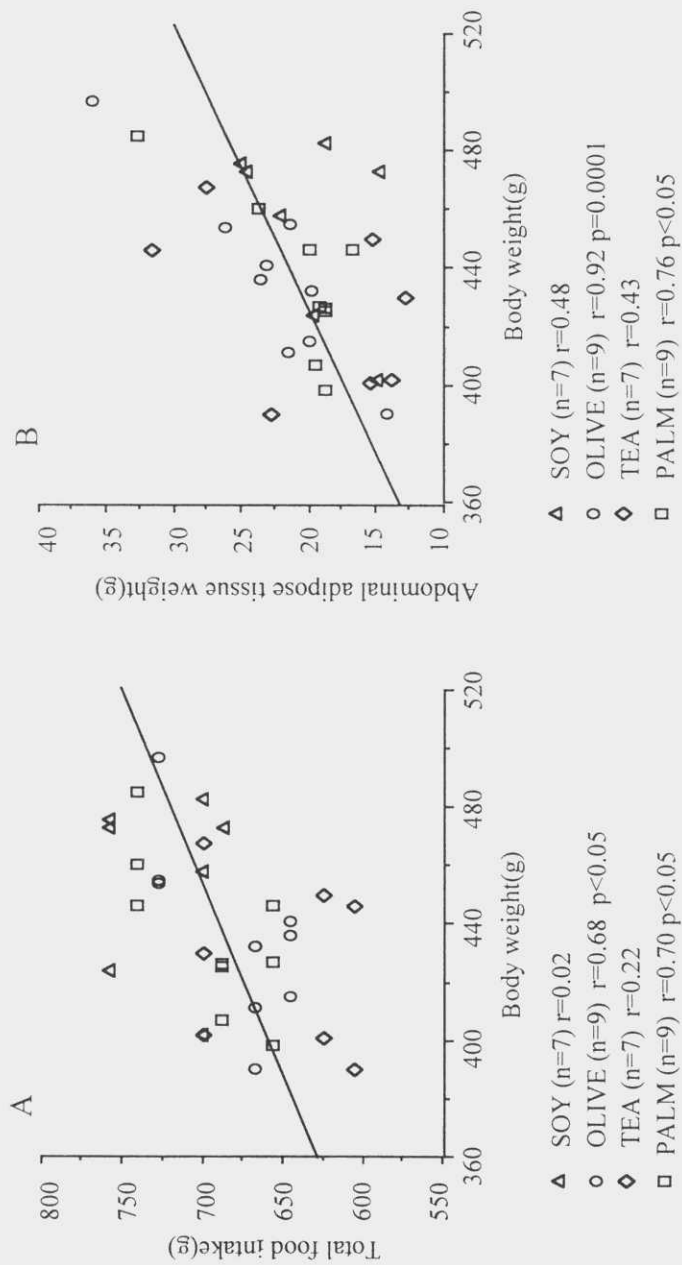


Fig.1-2 Relationship between the (A) body weight and total food intake
 $r=0.51$ $p<0.05$. $n=32$ (B) body weight and abdominal adipose
 tissue weight $r=0.58$ $p<0.0005$ $n=32$

第2章 糖代謝及びインスリン抵抗性

第1節 目的

高脂肪食は高血糖、高インスリン血症、インスリン感受性の低下を来すと言われている¹⁵。その後 DeFronzo ら¹⁶により肥満及びインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) においてはインスリン抵抗性の増強、高インスリン血症、脂質代謝異常、高血圧症が複合的に動脈硬化性疾患に係わるとしたインスリン抵抗性症候群の概念が提唱された。この様に過剰のカロリー摂取とインスリン抵抗性の関係が明らかにされたが、摂取油脂の脂肪酸組成が糖代謝及びインスリン抵抗性に及ぼす影響、特にオレイン酸に富む茶油の糖代謝への影響に関する報告はまだ見られず、第2章では茶油の糖代謝およびインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討する。

第2節 方法

第1章と同じ4種の油脂を用いた実験食で飼育して4週間後、insulin suppression

test¹⁷⁻¹⁸を行った。エピネフリン 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 、プロプラノロール 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 、インスリン 1.25mU/kg/min、グルコース 8mg/kg/minの混合液をネンブタール麻酔下で、ラットの鼠径静脈より2時間投与し、その前後の血糖及び血漿インスリン値を測定した。血糖はグルコースオキシダーゼ法、インスリンは2抗体法で測定した。投与前の血糖とインスリンは基礎値とし、投与後の血糖とインスリンは steady-state plasma glucose (SSPG) と steady-state plasma insulin (SSPI)とした。

第3節 結果

基礎血糖とインスリン値 (Fig.2-1)は各群間に差を認めなかった。

SSPG (Fig.2-2)は多群間有意差検定では有意な差を認めなかったが、群と群の間において、SOY群 ($200.3 \pm 23.3\text{mg}/\text{dl}$)と比較し、TEA群 ($220.7 \pm 28.2\text{mg}/\text{dl}$)では差がなく、OLIVE群 ($241.2 \pm 39.6\text{mg}/\text{dl}$)では有意に高

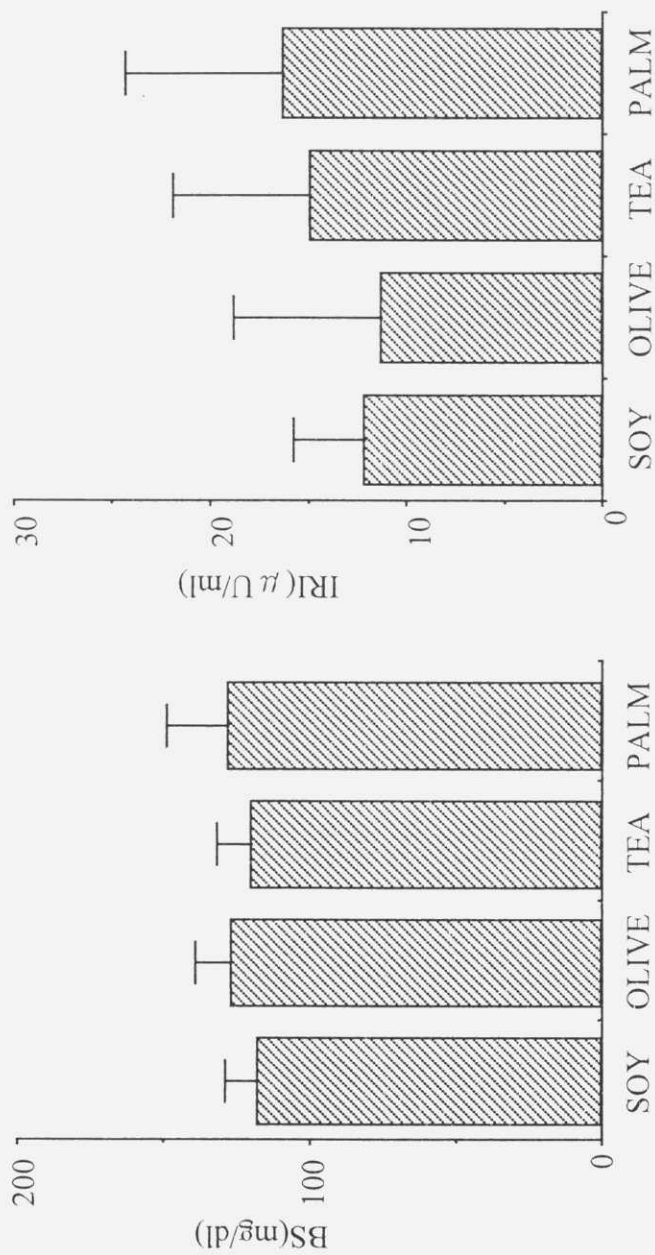


Fig.2-1 Plasma glucose (BS) and immuno reactive insulin (IRI) concentration of rats after 4 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) of the soybean (n=7), olive (n=9), tea (n=7), or palm (n=9) oil. Mean \pm S.D. N.S

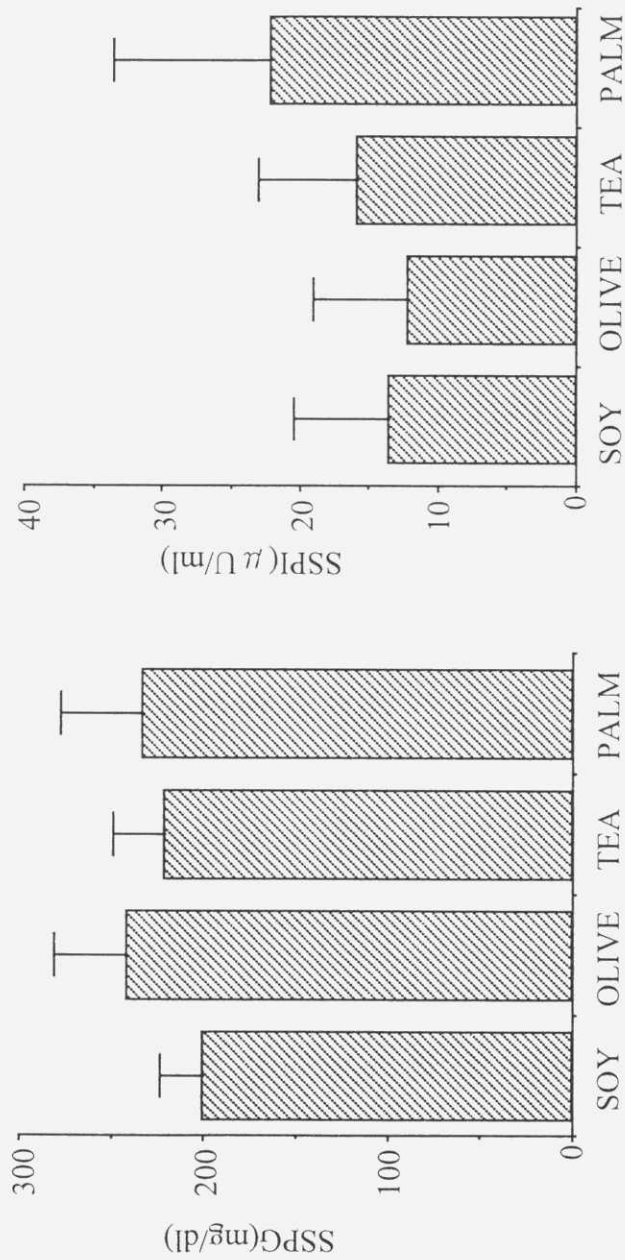


Fig.2-2 Steady-state plasma glucose (SSPG) and steady-state plasma insulin (SSPI) concentration in rats after 4 weeks on experimental diets containing 16%(w/w) of the soybean (n=7), olive (n=9), tea (n=7), or palm (n=9) oil. Mean \pm S.D

かった ($p=0.03$)。SSPI(Fig.2-2)は多群間有意差検定では有意な差を認めなかったが、群と群の間において、SOY群 ($13.5 \pm 6.8 \mu\text{U/ml}$) と比較した場合、他の群との間に有意差を認めなかったが、OLIVE群 ($12.2 \pm 6.9 \mu\text{U/ml}$) との比較では、TEA群 ($15.8 \pm 7.2 \mu\text{U/ml}$) では有意差がなく、PALM群 ($22.1 \pm 11.6 \mu\text{U/ml}$) では有意に高かった ($p=0.02$)。

一方、全ラットについて、SSPGと腸間膜脂肪量との間には有意の正相関 (Fig.2-3 $p<0.05$) を認めた。しかし、群ごとにおいては相関が認められなかった。

第4節 考察

動脈硬化性疾患危険因子の関連を説明する病態として Syndrom X¹⁹などの概念が提唱されている。1991年に DeFronzoら¹⁶がインスリン抵抗性症候群の概念を提唱し、カロリーの過剰摂取による肥満、または遺伝子的素因による NIDDM がインスリン抵抗性を引き起こし、その結果生ずる高インスリン血症に伴

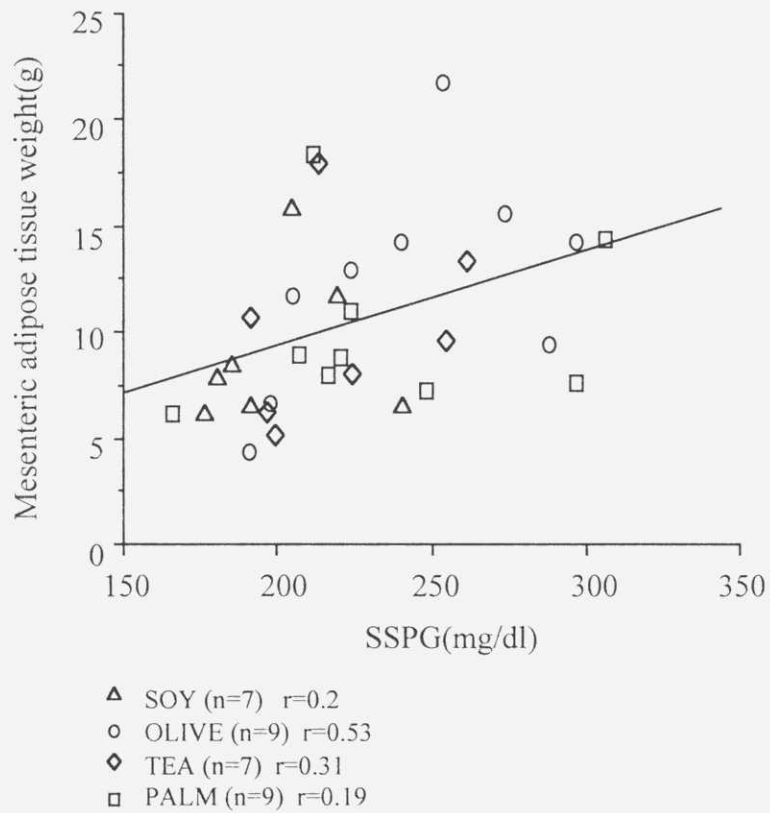


Fig.2-3 Relationship between the steady-state plasma glucose (SSPG) and mesenteric adipose tissue weight. $r=0.394$ $p<0.05$ $n=32$.

って、高血圧症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、HDL-コレステロールの低下が発生し、動脈硬化に至るとした(Fig.2-4)。インスリン抵抗性をもたらす原因の一つとして Slederら¹⁵も高脂肪食をあげている。インスリン抵抗性はインスリン投与時の血糖低下作用の減少、あるいはインスリン需要量の増大として認識される。本実験では insulin suppression test で内因性インスリン分泌を抑制した状態で外因性インスリンにより決まる血糖値を測定することでインスリン抵抗性を定量的に評価した。

今回の実験結果において、脂肪酸組成の異なる高脂肪食で4週間飼育したラットでは、4群の血糖とインスリンの基礎レベルは差がなく、脂肪酸組成の違いによる影響を認めなかった。Insulin suppression testの結果において、OLIVE群ではSSPIは低値であるにもかかわらずSSPGは高い傾向が見られ、インスリンの血糖低下作用が減少し、インスリ

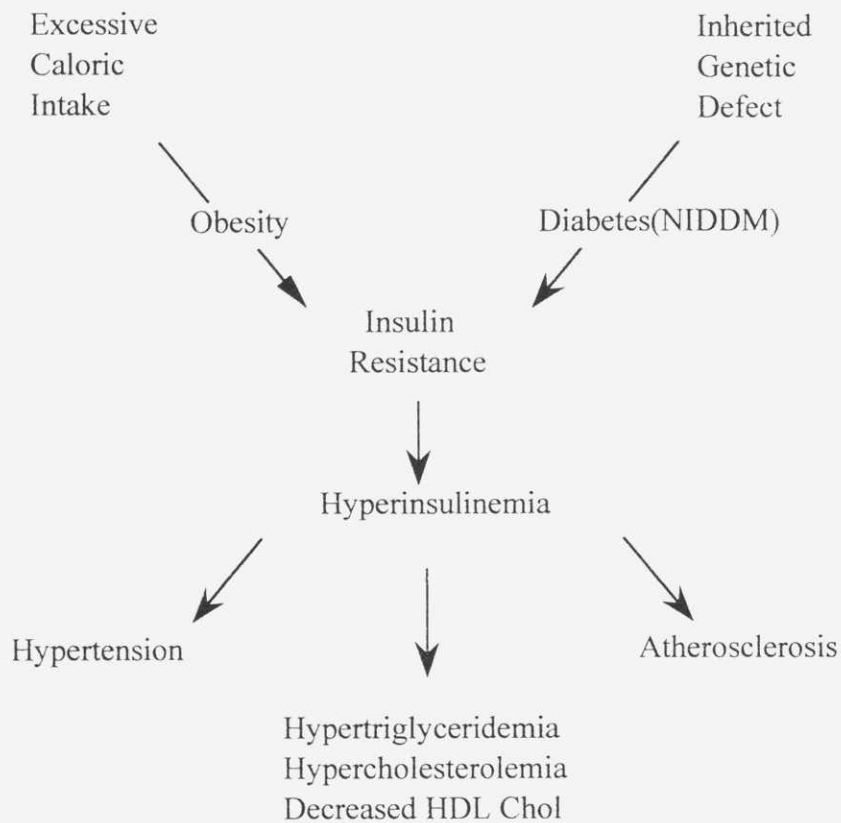


Fig.2-4. Syndrome of insulin resistance. Metabolic cascade leading from acquired (obesity) or inherited (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) insulin resistance to hyperinsulinemia and eventually to hypertension, abnormal plasma lipid profile, and atherosclerosis is depicted. HDL Chol, high-density lipoprotein cholesterol. (after DeFronzo R. A. and Ferrannini E. Diabetes Care 14:1991)¹⁶

ンの需要量が増加していると思われる。しかし、オレイン酸の含有量が類似している TEA 群ではこの違いが認められなかった。また、PALM 群では SSPG と SSPI は共に高く、インスリンのクリアランスと血糖低下作用がともに低い傾向にあると思われる。

高血糖、高インスリン血症の機序は、筋、脂肪組織でのインスリン抵抗性が生じ、インスリン作用が不足すると考えられている。今回の結果で、SSPG の上昇が腸間膜脂肪量の増加と相関していることは、インスリン感受性の低下が体脂肪の増加と関連している可能性を示唆した。

インスリン抵抗性の原因として遊離脂肪酸 (FFA) が重要な役割を占める可能性が示唆され²⁰、また、インスリン抵抗性は TG 代謝とも大きく関わっている。これらの関係に関しては第 3 章で検討する。

第3章 脂質代謝

第1節 目的

一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸は多価不飽和脂肪酸であるリノール酸と同程度に血中TC濃度を低下させるが、HDL-Cを下げず²⁻⁵、また、TG濃度を低下させる^{2,8}点で多価不飽和脂肪酸より優れていると報告されている。Dengら¹³のオレイン酸に富む茶油を用いた健常者における検討では、多価不飽和脂肪酸ではLDL-C、HDL-Cが共に低下し、飽和脂肪酸ではTCは低下せずTGが上昇したのに対し、茶油ではTC、LDL-C、TG共に低下し、HDL-Cは低下しなかったと報告されている。また、茶油をリノール酸に富むサフラワー油、飽和脂肪酸に富むラードと比較して、抗アテローム形成作用と抗酸化作用を認めたという報告¹⁴もある。茶油の脂質代謝、とくに血清リポ蛋白分画、肝でのリポ蛋白の合成、分泌とその後の代謝の変動について、また脂肪酸組成の類似したオリーブ油と詳細の比較した

研究はまだ見られない。第3章ではこれらのことについて検討した。

第2節 方法

1、リポ蛋白リパーゼ(LPL)活性の測定

第1章と同じ群について、高脂肪食負荷4週間後にリポ蛋白リパーゼ(LPL)活性の測定を行った。LPL活性は空腹時にノボヘパリン30 u/kgを静脈注射し、10分後に頸静脈叢より採血した血漿で測定した。LPL活性測定は、サンプルに Triolein から作成した人工基質を加え、37℃で1時間作用させ、遊離する脂肪酸を測定し、酵素活性値とした。肝性リパーゼとの分別は、1M NaClでLPL活性を抑制した²¹。

2、血清リポ蛋白の分画の方法

血清のリポ蛋白分画は Havel ら²²の方法に準じた超遠心法(SCP70H 日立)で、アングルローター(P50AT4 日立)を用いて4分画 [超低比重リポ蛋白(VLDL): $d < 1.006$ 、中間比重リポ蛋白(IDL): $d = 1.006 \sim 1.019$ 、低比重リポ

蛋白(LDL): $d=1.019\sim 1.063$ 、高比重リポ蛋白(HDL): $d=1.063\sim 1.210$]に分取した(Fig.3-1)。

3、血清及びリポ蛋白の脂質と脂肪酸組成の測定

血清並びに各リポ蛋白画分中のTC、TG、リン脂質(PL)の測定は、酵素法による市販キット(日本商事)を用い、FFAの測定はNEFA C-Test Wakoにより測定を行った。血清及び各リポ蛋白画分の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィー法により分析した。

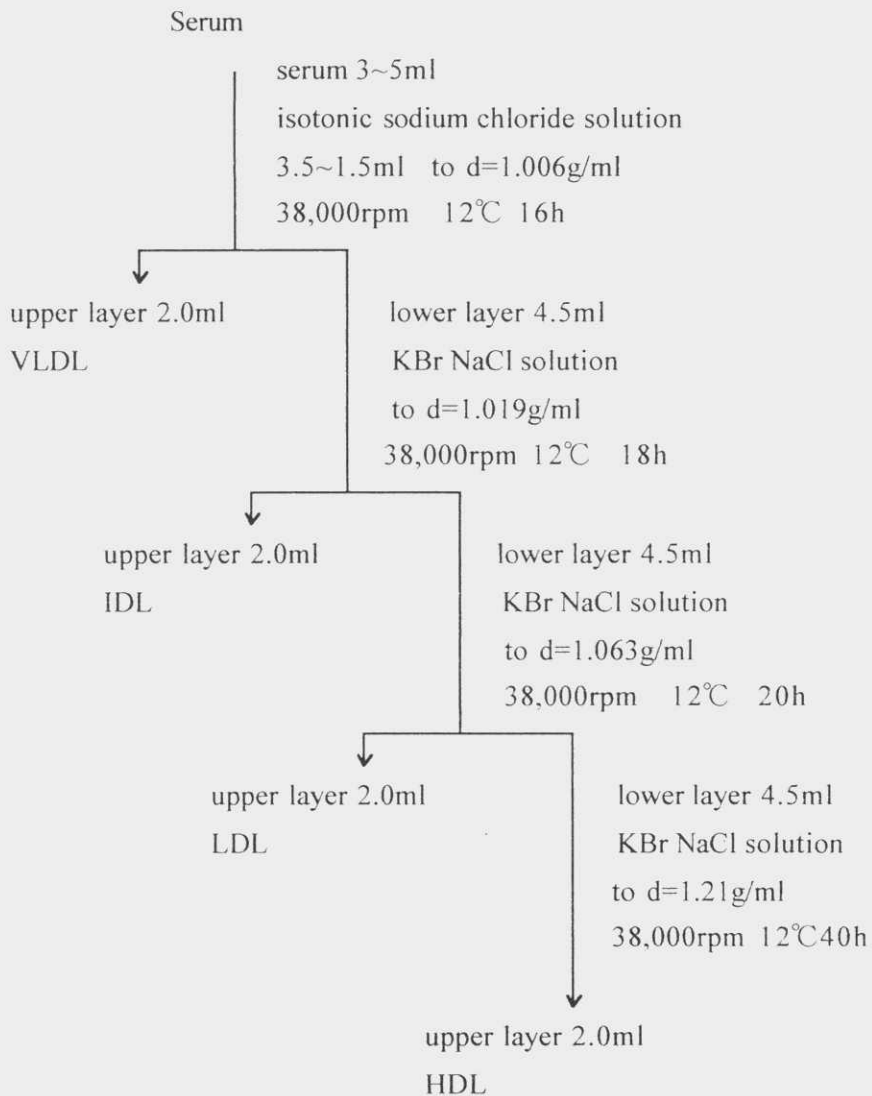
4、肝臓脂質の抽出および脂質含量の測定
肝ホモジネートからFolchら²³の方法(Fig.3-2)に準じて脂質抽出を行い、脂質含量は酵素法による市販キット(日本商事)を用いて測定した。

第3節 結果

1、リポ蛋白リパーゼ(LPL)活性

LPL活性(Fig3-3)はそれぞれSOY群 0.42 ± 0.18 、TEA群 0.44 ± 0.11 、OLIVE群 0.40 ± 0.10 、PALM群 0.45 ± 0.16 $\mu\text{Mol/ml/min}$

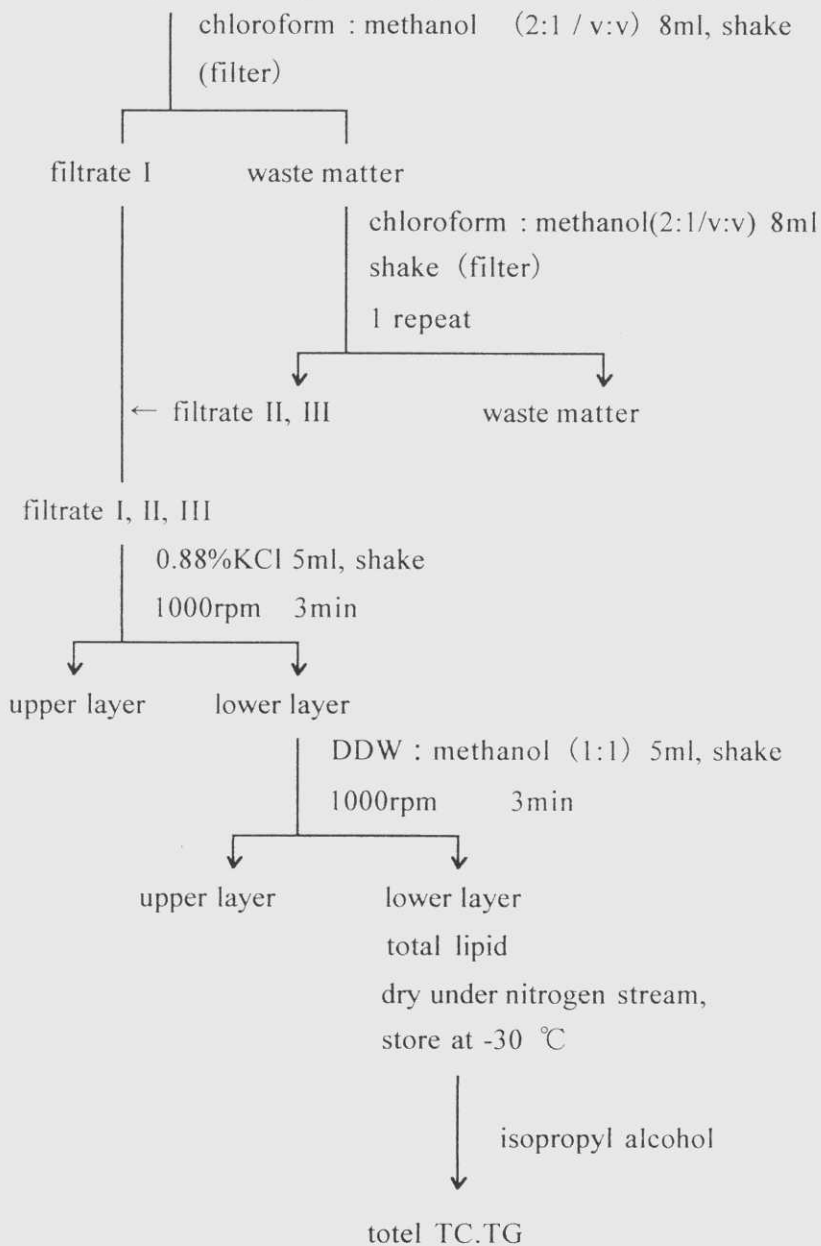
Fig.3-1. Separation method of serum lipoprotein by ultracentrifugation *



* Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. J Clin Invest 34:1955. ²²

Fig.3-2. Isolation and purification of total lipids from liver*

liver homogenate (0.25g liver weight, 50ml centrifuge tube)



DDW: Double distilled water

* Folch et al: J.Biol.Chem. 226:1957. ²³

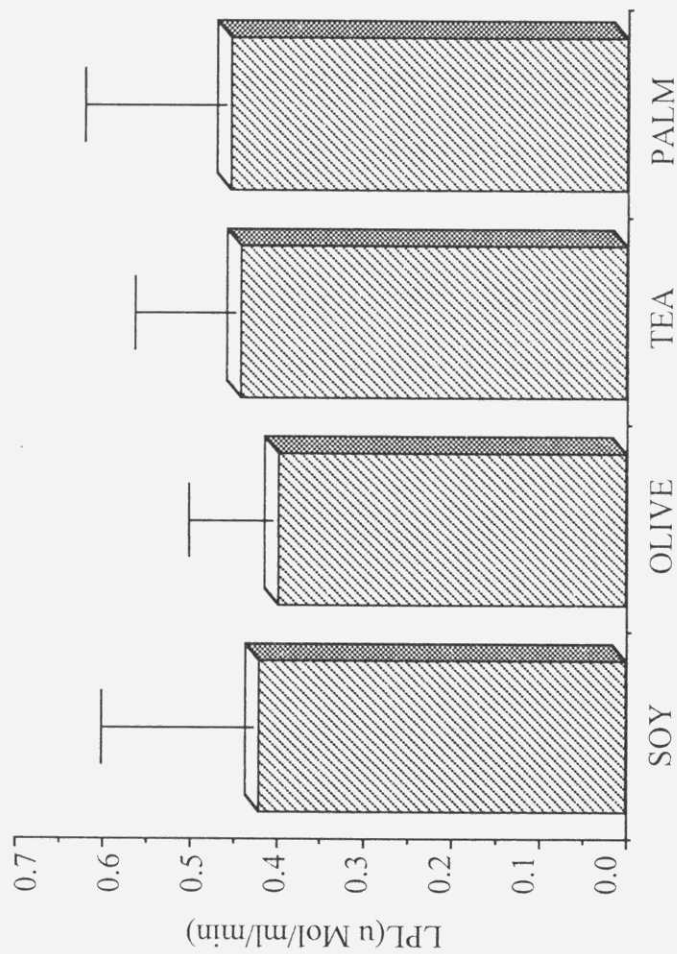


Fig.3-3. Lipoprotein lipase (LPL) activity of rats after 4 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) soybean(n=7), olive (n=9), tea (n=7),palm (n=9) oil. Mean±S.D N.S

と有意差を認めなかった。

2、血清リポ蛋白の脂質

血清ならびに各リポ蛋白画分における TC 含有量の測定結果を Fig.3-4 に示す。血清 TC は SOY 群 (62.4 ± 10.7 mg/dl) と比較して、OLIVE、TEA、PALM 群ともに有意に低値 (それぞれ 52.0 ± 9.1 、 47.5 ± 9.0 、 51.7 ± 11.5 mg/dl、 $P < 0.05$) を示した。TEA 群は OLIVE 群より低値であったが、両者間に有意差はなかった。HDL 画分でも血清 TC と全く同じ動向であり、同様に有意差が見られ、血清 TC の変動は主に HDL-C の変動を反映していた。OLIVE 群では、VLDL-C (9.2 ± 3.0 mg/dl) は他の群より有意に ($P < 0.05$) 高値であり、逆に、IDL、LDL は有意差を認めないが、低値であった。これに対し、TEA 群では、VLDL、IDL、LDL のいずれも SOY 群と有意差を認めなかった。一方、PALM 群では IDL 画分が有意 ($p < 0.05$) に低下し、LDL 画分で上昇傾向が見られた。

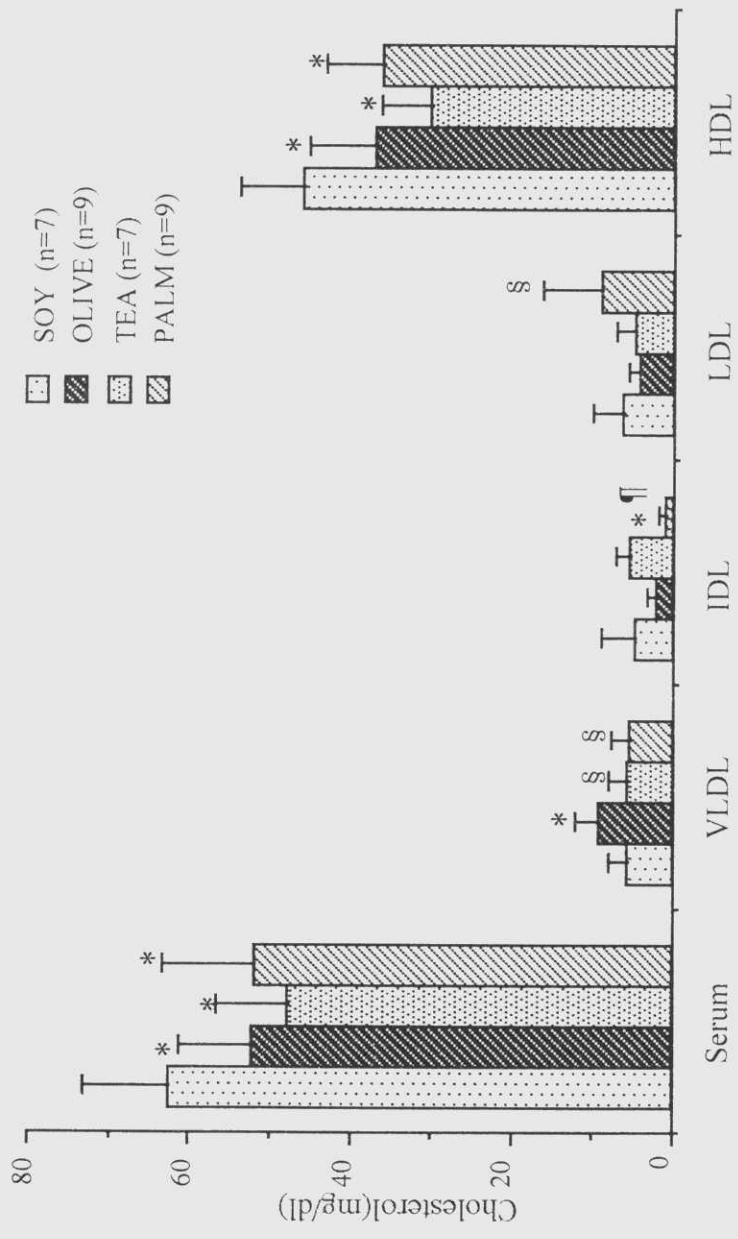


Fig3-4. Serum and lipoprotein cholesterol concentrations of rats after 5 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) different oils. Mean \pm S.D. * $p \leq 0.05$ v.s SOY § $p < 0.05$ v.s OLIVE ¶ $p < 0.05$ v.s TEA

血清ならびにリポ蛋白画分における TG 含有量の測定結果を Fig.3-5 に示す。血清 TG は、SOY 群 (42.1 ± 6.8 mg/dl) と比較して、OLIVE 群 (57.5 ± 24.2 mg/dl) では有意差 ($p=0.077$) はないが高値であるのに対し、TEA 群 (41.1 ± 15.2 mg/dl) では全く差がなかった。VLDL 画分でも、SOY 群 (29.8 ± 6.2 mg/dl) と比較して、OLIVE 群 (48.7 ± 25.1 mg/dl、 $P<0.05$) は有意に高値であるのに対し、TEA 群 (25.7 ± 8.4 mg/dl) は差がなかった。しかし、OLIVE 群と比較すると有意に低かった。血清 TG の変動は主に VLDL の変動を反映していた。IDL 画分では各群間に差がなく、LDL 画分では、SOY 群と比較して、OLIVE、TEA、PALM 群ともに差がなかったが、OLIVE 群 (2.7 ± 0.5 mg/dl) と比較すると PALM 群 (4.3 ± 1.4 mg/dl) のみ有意 ($P<0.01$) に高値であった。また、HDL 画分では各群間に変動がなかった。

血清 PL、血清 FFA (Fig3-6) については各

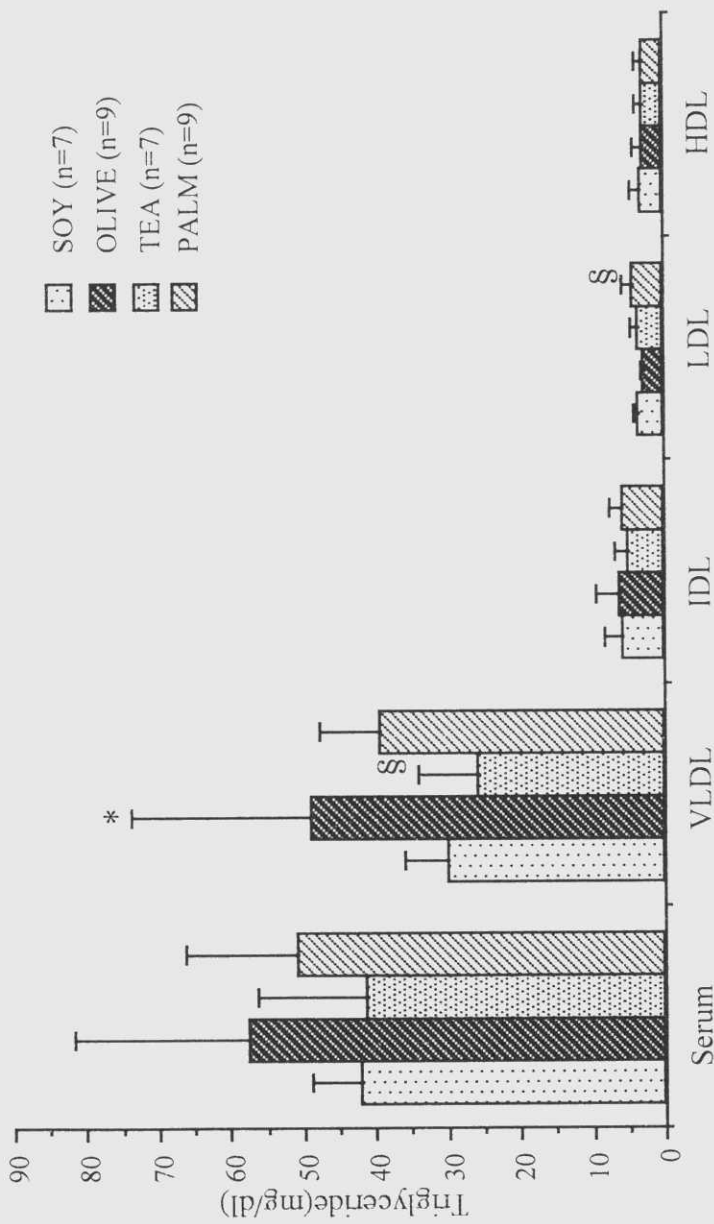


Fig3-5. Serum and lipoprotein triglycerides concentrations of rats after 5 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) different oils. Mean \pm S.D. * $p < 0.05$ v.s SOY § $p < 0.05$ v.s OLIVE

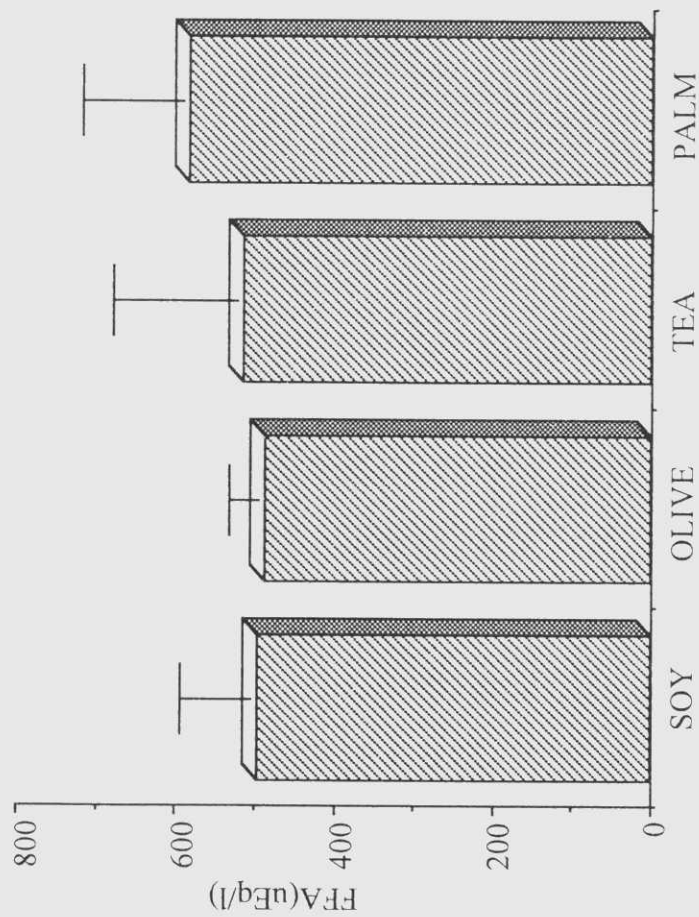


Fig.3-6. Serum free fatty acid (FFA) concentrations of rats after 5 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) soybean (n=7), olive (n=9), tea (n=7), palm (n=9) oil. Mean \pm S.D. N.S

群間に有意差はなかった。

3、血清リポ蛋白の脂肪酸組成

血清及び各リポ蛋白の脂肪酸組成は、食餌性油脂の脂肪酸組成の違いを強く反映したものであった(Table 3-1-a~d)。特に、VLDL画分では最もよく食餌性油脂の脂肪酸組成を反映し、HDL(Table 3-1-a)ではVLDL程には差が大きくなかった。

SOY群では、リノール酸(C18:2 n-6)は血清でも、VLDL、LDL、HDLいずれの画分でも他の群より高値を示したが、リノール酸の割合はVLDLで最も大きく、HDLで最も低かった。また、血清とVLDL画分ではアラキドン酸(C20:4)も他の群より高値であった。

OLIVE群とTEA群では、血清でもいずれのリポ蛋白画分でもオレイン酸(C18:1 n=9)が他の群より高い割合を示した。VLDL、LDL画分ではオレイン酸の占める割合が最も大きく、HDLではオレイン酸の割合が低下し、PALM群と同程度の割合であった。また、

Table 3-1-a. Fatty acid composition of the serum in rat

FAs	Group			
	SOY n=7	OLIVE n=9	TEA n=7	PALM n=9
C12:0	0.1±0.1	0.1±0.1	<0.01	1.2±0.1abc
C14:0	0.3±0.1	0.4±0.1	0.3±0	2.2±0.2 abc
C16:0	18.7±0.5	19.2±0.6	18.6±0.5	23.0±0.8 abc
C16:1(n-7)	0.5±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1	2.1±0.3 abc
C18:0	11.5±0.3	11.2±0.4	11.3±0.6	11.6±0.5
C18:1(n-9)	7.2±0.1	28.8±0.6 a	26.0±1.6 a	15.5±1.8 abc
C18:2(n-6)	20.9±0.5	6.9±0.4 a	7.0±0.5 a	10.8±1.3 abc
C18:3(n-3)	1.0±0.1	0.2±0 a	0.1±0 a	0.2±0 a
C20:3(n-6)	0.3±0	0.4±0 a'	0.3±0.1b'	0.7±0 abc
C20:4(n-6)	32.6±0.4	25.6±0.5 a	29.5±1.6 ab	25.9±1.6 a
C20:5(n-3)	0.3±0	0.2±0	0.1±0 ab'	0.2±0.1 a'
C22:0	0.3±0	0.2±0 a	0.2±0 ab	0.3±0 abc
C22:6(n-3)	3.3±0.2	2.8±0.1 a	2.6±0.2	3.2±0.4 bc
C24:0	0.7±0	0.5±0 a	0.5±0 b	0.7±0.1 a'bc
C24:1(n-9)	0.6±0	0.8±0.1 a	1.3±0.2 ab	0.7±0 bc
SFA	31.7±0.1	31.7±0.4	31.1±0.3 a'b'	39.0±0.5 abc
MUFA	8.4±0.2	30.6±0.5 a	28.0±1.5 ab	18.4±2.0 abc
PUFA	59.9±0.2	37.7±0.3 a	40.9±1.4 ab'	42.7±2.5 abc'

SFA: Saturated fatty acid MUFA: Monounsaturated fatty acid PUFA: Polyunsaturated fatty acid
 Mean±S.D a:p<0.0001 a':p<0.05 v.s SOY b:p<0.0001 b':p<0.05 v.s OLIVE c:p<0.0001 c':p<0.05 v.s TEA

Table 3-1-b. Fatty acid composition of the VLDL in rat

FAs	Group			
	SOY n=7	OLIVE n=9	TEA n=7	PALM n=9
C12:0	<0.01	0.1±0.1	<0.01	1.0±0.1 abc
C14:0	0.4±0	0.6±0.2	0.9±1.0	2.5±0.2 abc
C16:0	22.9±0.5	23.8±0.6	22.5±1.4	30.5±0.4 abc
C16:1(n-7)	0.7±0.1	1.1±0.1 a'	0.6±0.1 b'	3.2±0.4 abc
C18:0	6.9±0.1	6.1±0.3	7.8±1.4 b'	7.1±0.8 b'
C18:1(n-9)	14.2±0.3	49.4±1.6 a	46.5±2.0 ab'	29.7±2.2 abc
C18:2(n-6)	34.8±0.3	7.8±0.2 a	9.3±0.9 ab'	13.1±1.4 abc
C18:3(n-3)	2.1±0.2	0.3±0 a	0.3±0 a	0.4±0 a
C20:3(n-6)	0.3±0	0.2±0 a'	<0.01 ab	0.4±0 abc
C20:4(n-6)	10.7±0.6	6.6±0.4 a	8.8±1.0 ab	7.4±0.5 ab'c'
C20:5(n-3)	0.5±0	0.1±0.1 a	<0.01 ab'	<0.01 ab'
C22:0	0.4±0.1	0.1±0.1 a	<0.01 a	0.1±0.1 a
C22:6(n-3)	2.9±0.3	1.9±0.1 a'	1.6±0.3 a	2.7±0.8 b'c'
C24:0	0.6±0.1	0.1±0.2 a	<0.01 a	0.1±0.2 a
C24:1(n-9)	<0.01	0.1±0	<0.01	<0.01
SFA	31.3±0.7	30.8±0.6	31.2±3.2	41.3±0.4 abc
MUFA	14.9±0.2	50.9±1.3 a	47.4±2.0 ab'	33.0±2.4 abc
PUFA	53.9±0.9	18.4±0.9 a	21.5±1.5 ab'	25.8±2.0 abc

SFA: Saturated fatty acid MUFA: Monounsaturated fatty acid PUFA: Polyunsaturated fatty acid
 Mean±S.D a:p<0.0001 a':p<0.05 v.s SOY b:p<0.0001 b':p<0.05 v.s OLIVE c:p<0.0001 c':p<0.05 v.s TEA

Table3-1-c. Fatty acid composition of the LDL in rat

LDL	FAs	Group			
		SOY n=7	OLIVE n=9	TEA n=7	PALM n=9
	C12:0	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	C14:0	0.6±0.5	<0.01	<0.01	1.9±0.3 abc
	C16:0	18.2±2.0	19.2±1.9	18.2±1.7	21.6±1.5 a'b'c'
	C16:1(n-7)	0.6±0.4	<0.01	0.5±0.8 b'	2.1±0.1 a'b'c'
	C18:0	12.3±0.8	13.6±1.2 a'	11.9±0.6 b'	12.8±0.6 b'
	C18:1(n-9)	9.8±0.4	31.0±3.6 a	32.3±1.8 a	16.8±1.5
	C18:2(n-6)	18.1±3.5	8.5±1.2 a	7.4±0.5 a	11.8±0.9 ab'c
	C18:3(n-3)	0.2±0.4	<0.01	<0.01	<0.01
	C20:3(n-6)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	C20:4(n-6)	27.4±7.2	26.1±4.8	25.7±0.4	27.5±1.2
	C20:5(n-3)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	C22:0	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	C22:6(n-3)	1.8±1.7	1.0±1.6	0.8±0.9	3.2±0.5 a'b'c'
	C24:0	4.4±2.6	0.6±0.9 a	1.2±0.9 a'	4.4±2.6 a'
	C24:1(n-9)	2.0±2.4	<0.01	2.0±1.4 b'	0.5±0.7 a'c'
	SFA	40.2±10.3	33.4±1.8 a'	31.4±1.0 a'	38.0±1.7 c'
	MUFA	12.3±2.3	31.1±3.6 a	34.7±1.0 ab'	19.4±0.8 abc
	PUFA	47.6±12.6	35.7±5.5 a'	34.0±1.4 a'	42.8±2.4 b'c'

SFA: Saturated fatty acid MUFA: Monounsaturated fatty acid PUFA: Polyunsaturated fatty acid
 Mean±S.D. a:p<0.0001 a':p<0.05 v.s SOY b:p<0.0001 b':p<0.05 v.s OLIVE c:p<0.0001 c':p<0.05 v.s TEA

Table3-1-d. Fatty acid composition of the HDL in rat

FAs	Group			
	SOY n=7	OLIVE n=9	TEA n=7	PALM n=9
C12:0	<0.01	<0.01	<0.01	0.1±0.1 abc
C14:0	0.5±0.2	0.5±0.1	0.8±0.5	1.4±0.5 abc'
C16:0	14.5±1.5	14.7±3.3	15.0±0.8	20.2±8.1 a'b'c'
C16:1(n-7)	0.5±0.2	0.6±0.2	0.4±0.1 b'	1.7±0.4 abc
C18:0	9.6±0.5	11.9±1.7	9.4±0.6	15.8±5.2 a'b'c'
C18:1(n-9)	3.2±0.3	10.8±2.6 a	10.2±0.1 a	9.3±3.6 a
C18:2(n-6)	13.9±0.8	7.0±1.4 a	6.7±0.9 a	10.8±1.9 abc
C18:3(n-3)	0.1±0.1	<0.01 a'	<0.01 a'	<0.01 a'
C20:3(n-6)	0.1±0.1	0.2±0.2	0.2±0.2	0.6±0.4 a'b'c'
C20:3(n-9)	<0.01	0.8±0.1 a	0.5±0.1 ab'	0.3±0.3 a'b
C20:4(n-6)	51.6±1.2	47.4±7.2	50.4±2.1	33.9±15.8 a'b'c'
C20:5(n-3)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
C22:0	0.7±0.1	0.2±0.2 a	0.4±0.3 a'	0.4±0.3 a'b'
C22:6(n-3)	3.3±0.3	3.3±1.0	2.9±0.3	2.4±1.8
C24:0	1.4±0.1	1.3±0.2	1.1±0.1	2.0±0.8 a'b'c'
C24:1(n-9)	0.5±0.4	1.3±1.2 a'	2.2±0.5 ab'	0.8±0.6 b'c
SFA	26.7±2.3	28.5±4.8	26.6±1.5	39.9±14.3 a'b'c'
MUFA	4.2±0.3	12.8±2.6 a	12.8±0.5 a	11.8±3.2 a
PUFA	69.3±2.4	58.8±7.2	60.7±2.0	48.4±17.4 a'b'c'

SFA: Saturated fatty acid MUFA: Monounsaturated fatty acid PUFA: Polyunsaturated fatty acid
 Mean±S.D. a:p<0.0001 a':p<0.05 v.s SOY b:p<0.0001 b':p<0.05 v.s OLIVE c:p<0.0001 c':p<0.05 v.s TEA

LDL と HDL 画分ではアラキドン酸が多く、SOY 群と同程度の割合を占め、特に HDL では最も大きい割合を占めていた。TEA 群の OLIVE 群との違いとしては、テトラコセン酸 (C24:1) の割合が血清及び LDL、HDL で大きく、アラキドン酸 (C20:4) の割合が血清及び VLDL で大きかった。

PALM 群では、血清とリポ蛋白画分のいずれでもパルミチン酸 (C16:0) をはじめ、ラウリン酸 (C12:0)、ミリスチン酸 (C14:0) が他の群より高い割合を占めたが、LDL、HDL 画分では他の群との差が小さかった。HDL 画分においてはステアリン酸 (C18:0) は高値であった。また、食餌ではラウリン酸が大部分を占め、ミリスチン酸、パルミチン酸がそれより少ない割合を占めているが、血清、リポ蛋白ではパルミチン酸が最も多く、他の 2 者の割合は小さかった。さらに、一価不飽和脂肪酸はパルミトオレイン酸 (C16:1) とオレイン酸が OLIVE、TEA 群には及ばないが、SOY 群よ

りは多かった。多価不飽和脂肪酸では、HDL画分ではアラキドン酸が他の群よりは少ないものの、大きい割合を占めていた。

4、肝臓脂質含量

肝臓のTC、TG含有量を Fig.3-7 に示す。TC含有量はSOY群 ($3.29 \pm 0.83 \text{mg/g liver wet weight}$)と比較して、OLIVE群とTEA群 (5.36 ± 2.03 、 $4.77 \pm 1.36 \text{mg/g}$ 、 $p < 0.05$)は有意に高値を示したが、PALM群 ($3.70 \pm 1.60 \text{mg/g}$)はSOY群と有意差がなかった。TG(mg/g)含有量は各群間においては有意の差は見られなかったものの、OLIVE群はSOY群より高値であるのに対し、TEA群はOLIVE群より低く、SOY群よりやや低い値であった。PALM群 ($26.12 \pm 9.71 \text{mg/g}$)は高値であり、OLIVE群と同程度であった。OLIVE群では、SOY群より肝脂質含量が増加していたが、TEA群ではその増加は小さかった。PALM群では逆にTG含量のみ増加が見られ、他の群と動向が異なっていた。

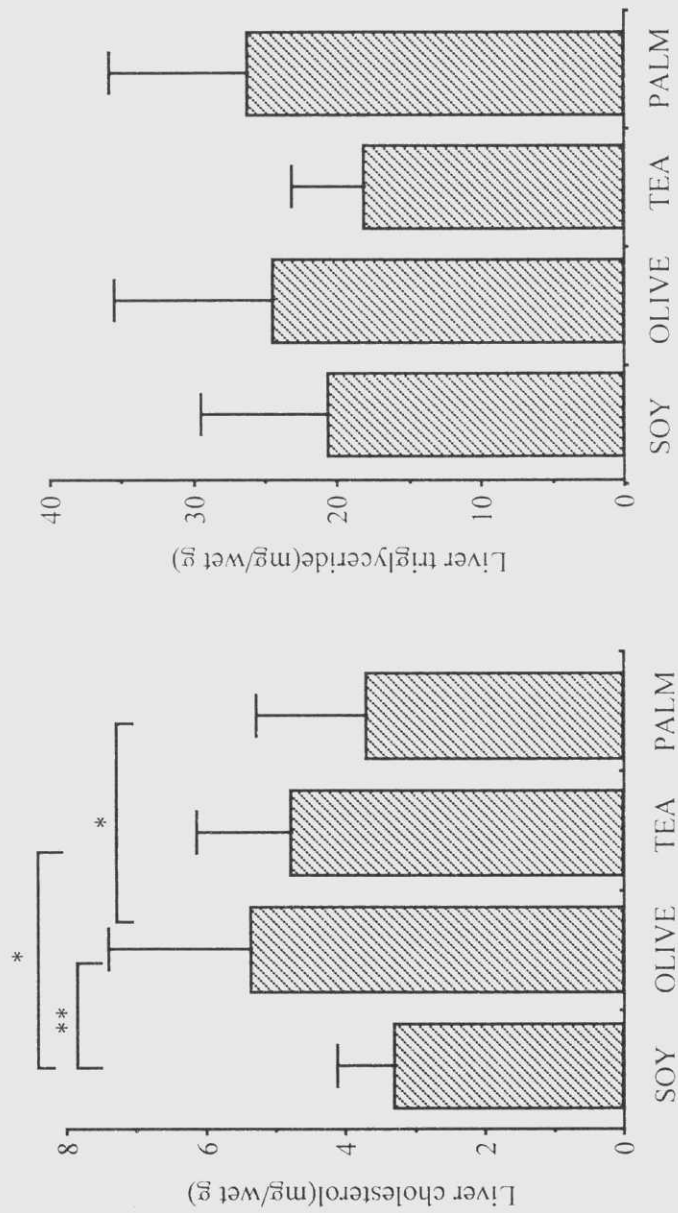


Fig3-7. Total cholesterol and triglyceride content in rat liver after 5 weeks on experimental diets containing 16%(w/w) of the soybean (n=7), olive (n=9), tea (n=7), palm (n=9) oil. Mean \pm S.D. * p<0.05 ** p=0.01

5、相関関係

1) 血中 FFA 濃度と飼料摂取量との間に正の相関傾向があり、後腹膜脂肪重量との間には有意の正相関 (Fig.3-8 $p < 0.05$) を認めた。然し、群ごとにおいては相関を認めなかった。

2) SSPI と FFA との間に正相関 (Fig.3-9 $p < 0.05$) が認められたが、各群においては、OLIVE 群のみ有意に相関が認められた ($p < 0.05$)。

3) SSPI と肝 TC 含有量との間に負の相関 (Fig.3-10 $p < 0.05$) を認めた。一方、TEA 群では有意ではないが他の群と逆の傾向が見られ、また、SSPI と肝 TG 含有量との間に正相関 (Fig.3-10 $p < 0.005$) を認めた。

4) SSPG と VLDL-C との間に正相関 (Fig.3-11 $p < 0.05$) を認めた。群ごとにおいては OLIVE 群のみ相関 ($p = 0.05$) が認められた。

5) 血清 TG、VLDL-TG と体重との間に正相関 (Fig.3-12 $p < 0.05$) を認めた。群ごとにおいては OLIVE 群のみ両者とも有意の相関が

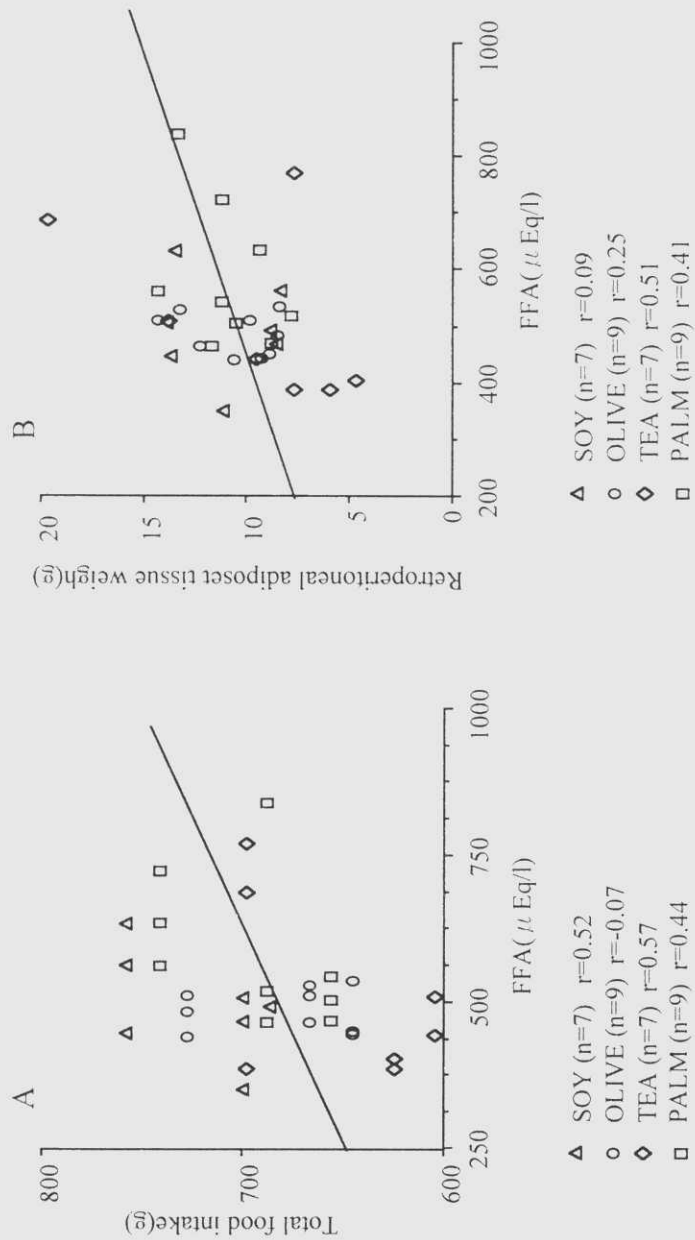


Fig.3-8 Relationship between the serum free fatty acid (FFA) and (A) total food intake $r=0.338$ $p=0.058$ $n=32$. (B) retroperitoneal adipose tissue weight $r=0.364$ $p<0.05$ $n=32$

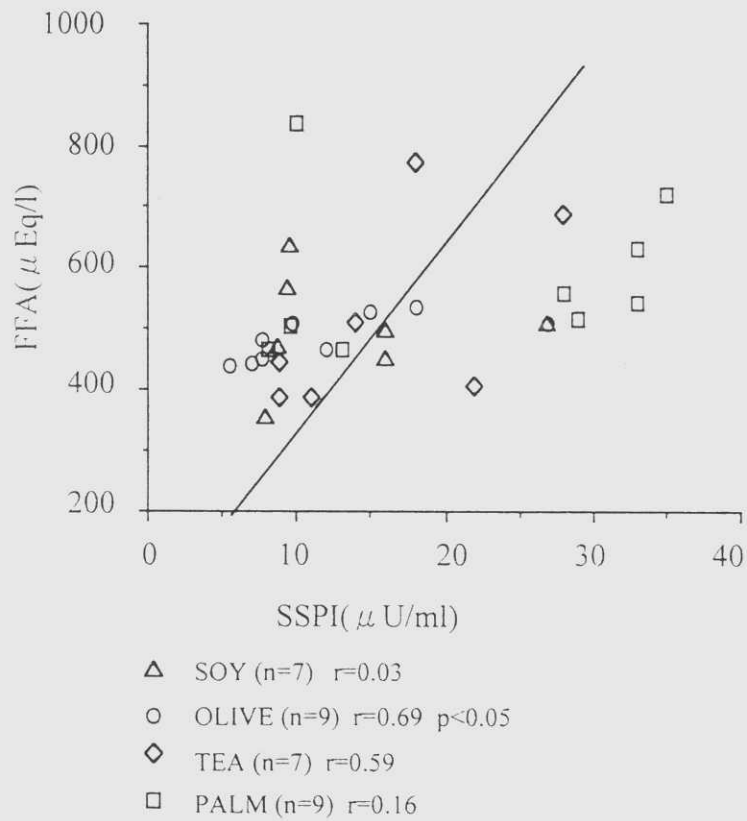


Fig.3-9 Relationship between the steady-state plasma insulin (SSPI) and serum free fatty acid (FFA) $r=0.401$ $p<0.05$ $n=32$.

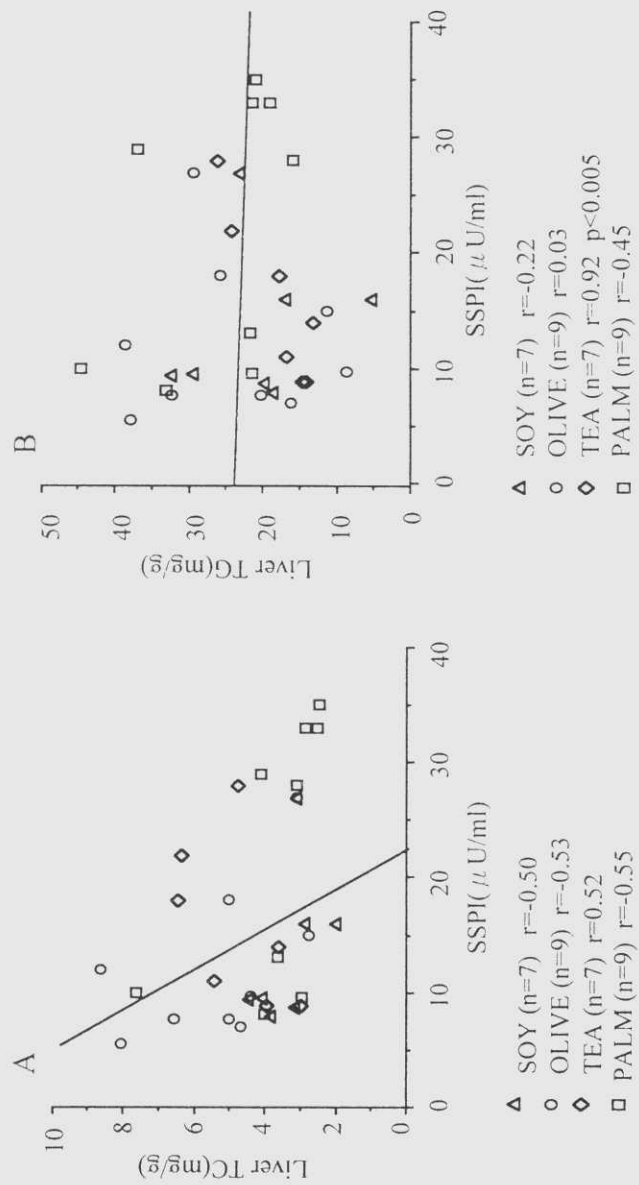


Fig.3-10 Relationship between the (A) steady--state plasma insulin (SSPI) and Liver cholesterol(TC) $r=0.373$ $p<0.05$ $n=32$. (B) SSPI and Liver triglycerides (TG) $r=-0.038$ N.S $n=32$

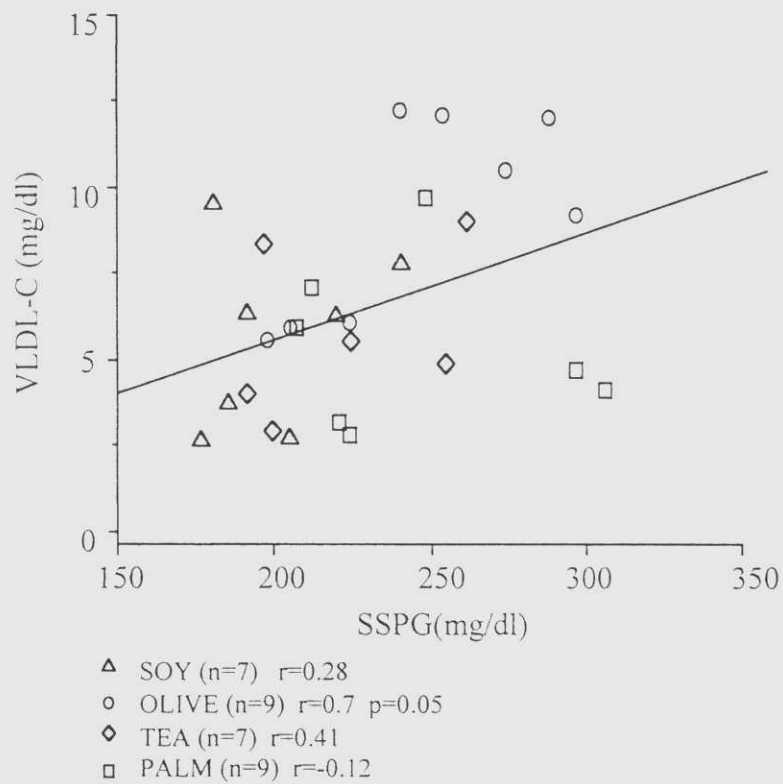


Fig.3-11 Relationship between the steady-state plasma glucose (SSPG) and very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C). $r=0.394$ $p<0.05$ $n=32$.

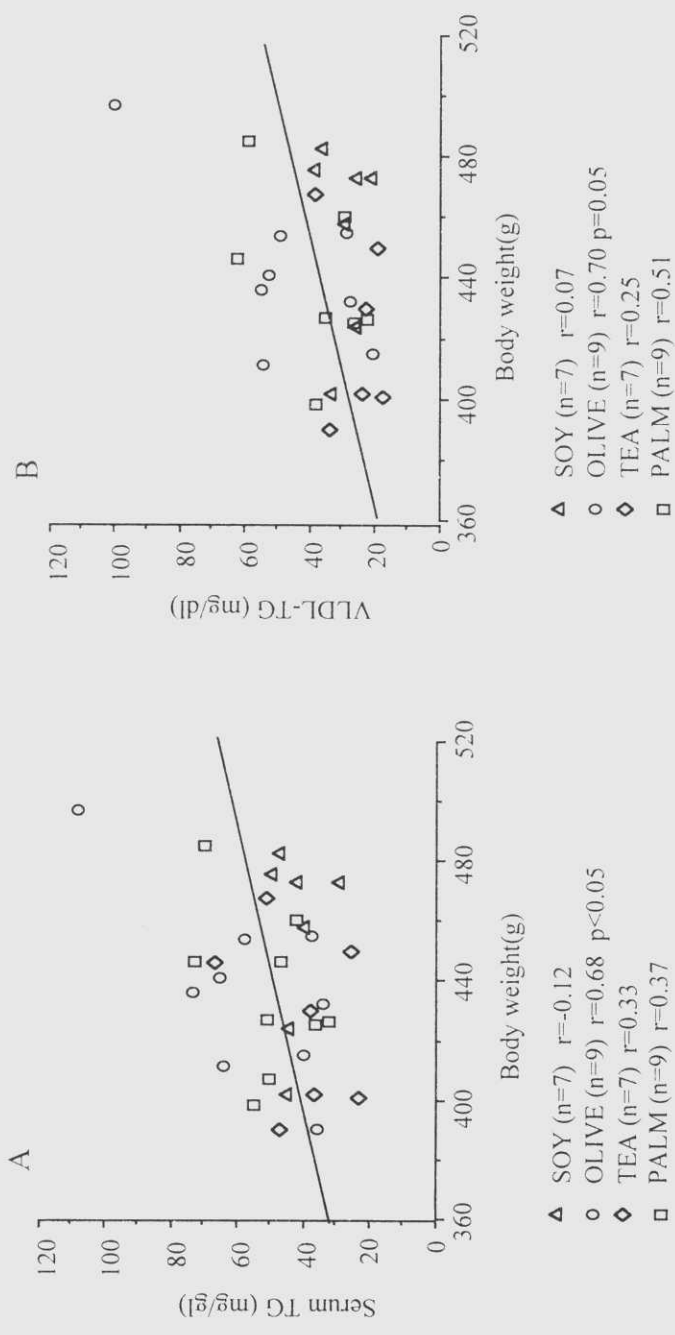


Fig.3-12 Relationship between the (A) body weight and serum triglycerides (TG) $r=0.345$ $p<0.05$ $n=32$. (B) body weight and very low density lipoprotein triglycerides (VLDL-TG) $r=0.392$ $p<0.05$ $n=32$

認められた。

6)血清 TG、VLDL-C、VLDL-TG、VLDL-PL と腹腔内脂肪量(g/100gBW)との間に有意に正相関を認めた(Fig.3-13)。群ごとにおいては、血清 TG 及び VLDL-TG と腹腔内脂肪量との間に OLIVE 群($p < 0.001$)と TEA 群($p \leq 0.01$)ではそれぞれ相関を認め、VLDL-PL と腹腔内脂肪量との間に OLIVE 群($p < 0.005$)と PALM 群($p < 0.05$)ではそれぞれ相関を認めた。

7)血清 TG、VLDL-C、VLDL-TG、VLDL-PL と肝臓重量との間に正相関を認めた(Fig.3-14)。群ごとにおいては、血清 TG 及び VLDL-TG と肝臓重量との間に OLIVE 群では強い相関($p \leq 0.0005$)があり、VLDL-PL と肝臓重量との間に OLIVE 群($p = 0.005$)と PALM 群($p < 0.05$)で相関を認めた。TEA 群では VLDL-C 及び VLDL-PL と肝臓重量との間に他の群と逆の傾向を示した。

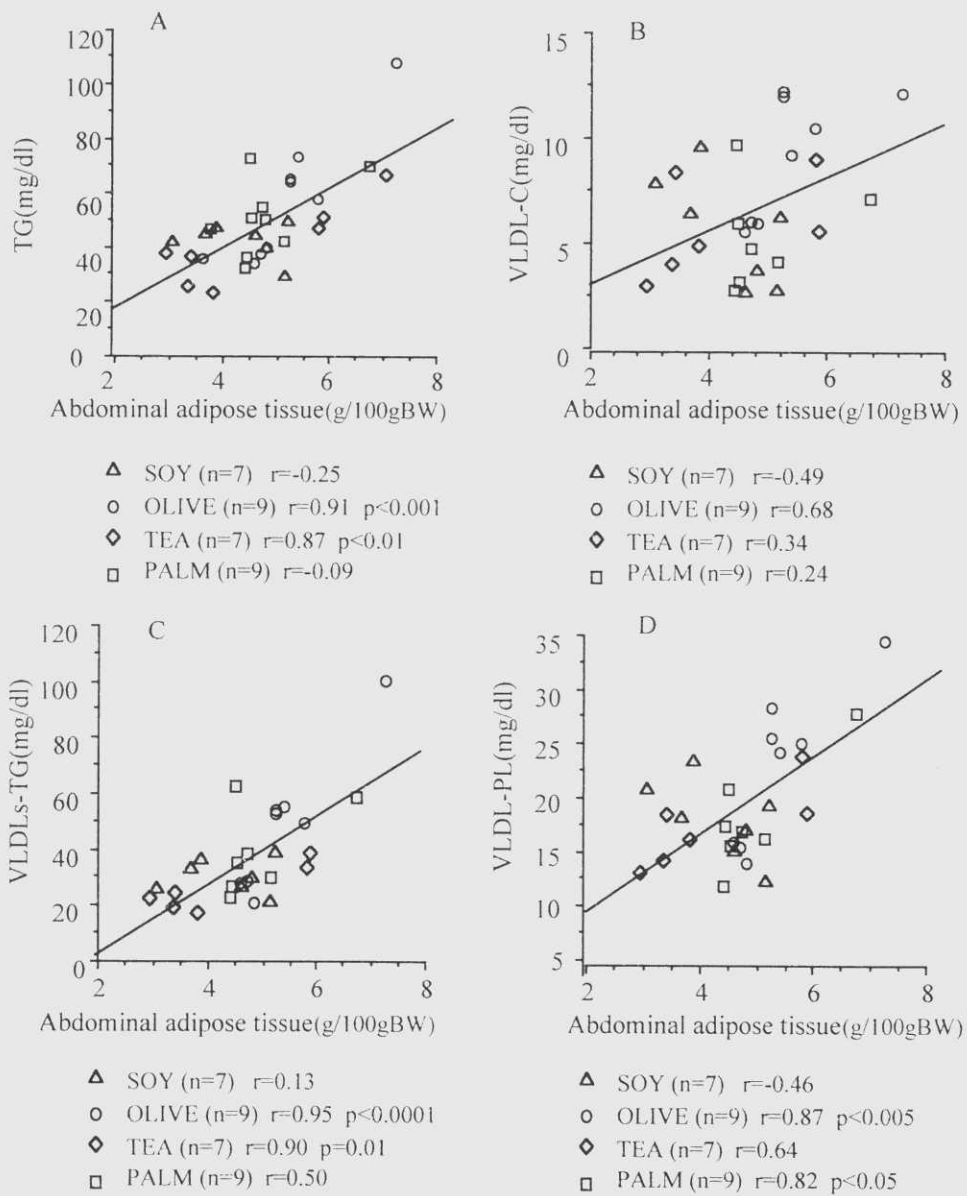


Fig.3-13 Relationship between the abdominal adipose tissue weight (g/100g BW) and (A) serum triglycerides(TG) $r=0.687$ $p<0.0001$ (B) very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) $r=0.384$ $p<0.05$ (C) very low density lipoprotein triglycerides(VLDL-TG) $r=0.702$ $p<0.0001$ (D) very low density lipoprotein phospholipid (VLDL-PL) $r=0.702$ $p<0.0001$ $n=32$

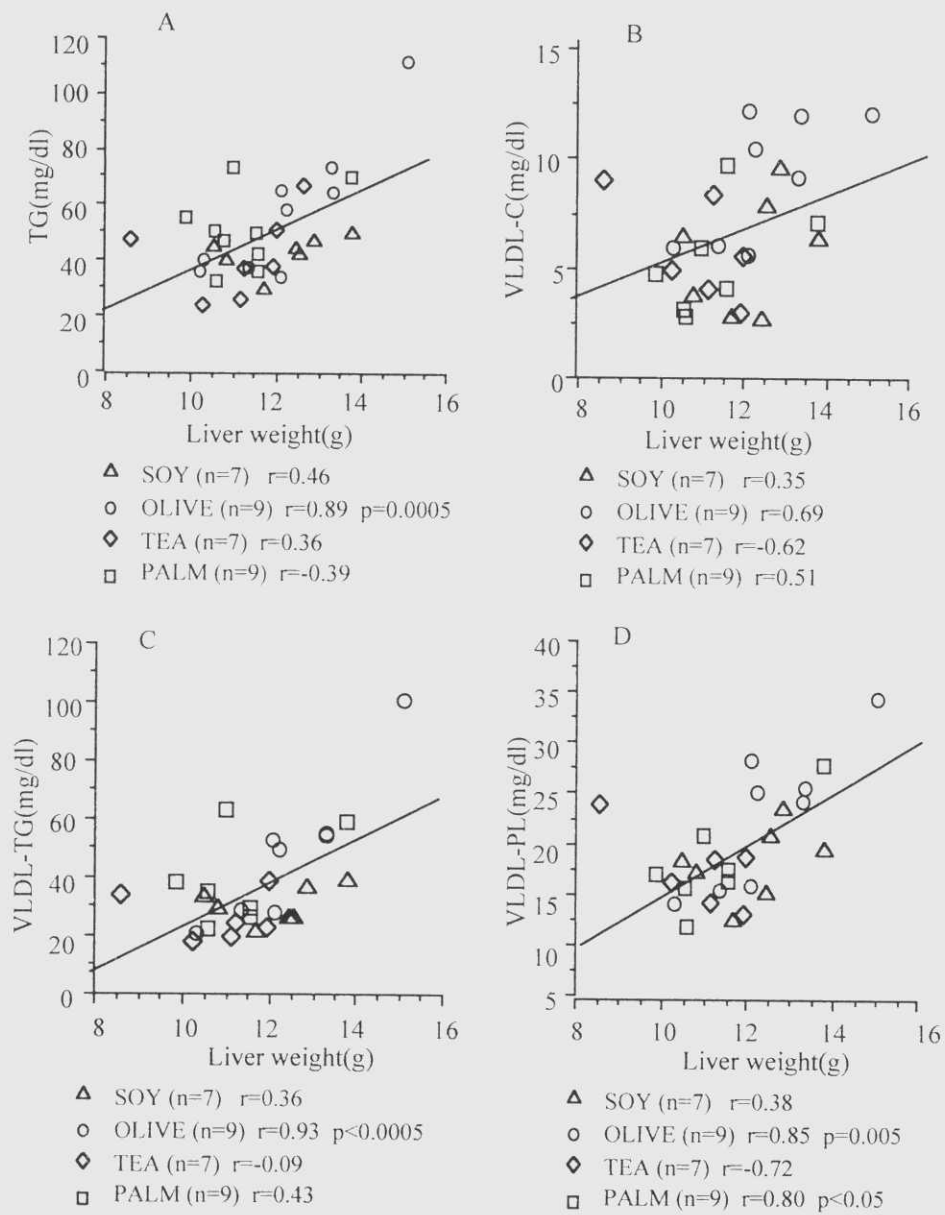


Fig.3-14 Relationship between the liver weight and (A) serum triglycerides (TG) $r=0.579$ $p<0.0005$ (B) very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) $r=0.422$ $p<0.05$ (C) very low density lipoprotein triglycerides (VLDL-TG) $r=0.590$ $p<0.001$ (D) very low density lipoprotein phospholipid (VLDL-PL) $r=0.59$ $p<0.001$

第4節 考察

従来、一価不飽和脂肪酸は血清脂質に対する影響がないとされていた²⁴。しかしながら、Mattsonら²⁵はTG正常者12名と高TG者8名を対象に、食事中的飽和脂肪酸の多いヤシ油を一価不飽和脂肪酸のオレイン酸の多いサフラワー油あるいは多価不飽和脂肪酸のリノール酸の多いサフラワー油のいずれかに置き換え、どちらの場合もLDL-Cを同程度に減少させることを示した。さらに、リノール酸ではHDL-Cが低下したが、オレイン酸ではHDL-Cは低下しなかった。Mataら³の健常者78名を対象に行った長期実験でも同様の結果が得られている。

オレイン酸の脂質代謝に与える影響の検討はオリーブ油を用いた研究が多く、オリーブ油摂取による血清TC、LDL-C濃度の低下が認められている²⁻⁶。しかし、石川ら²⁶のオレイン酸による血中コレステロールの低下はリノール酸に比べ弱く、Nydahlら²⁷の一価不飽

和脂肪酸が多価不飽和脂肪酸と同様 LDL-C とともに HDL-C も低下したとの報告もある。他には、高コレステロール食を負荷したウサギを対象にした実験では、飽和脂肪酸と比較して一価不飽和脂肪酸は VLDL-C を上昇させ、LDL-C を低下した⁷。若年者を対象にした短期負荷実験では、トリリノレイン酸とトリオレイン酸はともに血清 TC を低下させたが、HDL-C の変化が見られなかった²⁸などの報告があり、オレイン酸の脂質代謝に対する見解は統一されていない。

茶油に関しては、Deng ら¹³は条件の等しい健常者 118 名を三群に分け、茶油、多価不飽和脂肪酸を 60.4% 含む混合油 I (米ぬか油、落花生油、トウモロコシ油)、あるいは飽和脂肪酸を 62.6% 含む混合油 II (シュロ油、落花生油) のいずれかをそれぞれ 50g/day、40 日間投与する実験を行った。混合油 I では TC、LDL-C、HDL-C が共に低下し、混合油 II では TC の低下がなく、TG の上昇が見られたの

に対し、茶油では TC、LDL-C、TG が低下、HDL-C の低下はなかった。

1、血清並びにリポ蛋白質分 TC

今回の実験では、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸を多く含む大豆油と比較して、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸を多く含むオリーブ油あるいは茶油の負荷によって血清 TC が低下したが、血清 TC の低下は HDL-C の低下によるものであった。また、オリーブ油では VLDL-C の上昇も認められた。今回の実験結果は LDL-C の低下がない点と HDL-C の低下が認められた点で Mattson ら²⁵ 及び Mata ら⁴ の報告と異なった。一方、Nydaahl ら²⁷ の HDL-C も低下したとの報告、Nielsen ら⁷ の VLDL-C が上昇した報告と一致していた。オレイン酸は HDL-C を低下しないという報告はヒトを対象としているのが多い。しかし、ラットのリポ蛋白質分においては、HDL-C が血清 TC 中で主要な割合を占めている点で、リポ蛋白質代謝がヒトと異なっている。この点

については本節 4 でさらに記述する。本実験で HDL-C の低下による血清 TC の低下が認められたのはこの代謝特性の差によるものと考えられる。

2、血清並びにリポ蛋白画分 TG

一価不飽和脂肪酸は多価不飽和脂肪酸と同程度に血中 TG 濃度を低下させると報告されている⁸。これに反し、一価不飽和脂肪酸は TC を低下させるが、TG を低下させず²⁹⁻³⁰、大豆油より高い³¹、あるいはオレイン酸は TG の合成と分泌を増進させる³²との報告もある。本実験では、血清及びリポ蛋白画分の TG 値は OLIVE 群では SOY 群より血清 TG が高い傾向、VLDL-TG は有意に高値であったが、TEA 群では血清、VLDL とも TG は SOY 群と同程度で、上昇は認めなかった。ほぼ同量のオレイン酸を含むオリーブ油と茶油では異なる傾向であった。

3、脂肪酸組成

一般的に、食事から摂取された脂肪酸は体

内の脂肪酸組成に影響を与え、血清脂質中の脂肪酸組成は測定前数日間の短期の食事を反映すると言われている³³。本実験は十分に食事から摂取された脂肪酸を反映するように実験期間を設定している。

脂肪組織に蓄えられている TG の脂肪酸は主にパルミチン酸 (C16:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2) である。リノール酸はアラキドン酸の前駆体で、体内で合成されない必須脂肪酸である。SOY 群ではアラキドン酸の割合が最も高かったことは、リノール酸を多く摂取しているためである。また、OLIVE 群より TEA 群のほうが血清及び VLDL、HDL 画分でアラキドン酸が有意に高かったことは茶油にリノール酸が 2.5% 多く含まれているためと考えられる。

ヤシ油に含まれる飽和脂肪酸はラウリン酸 (C12:0) が最も多く、次にミリスチン酸 (C14:0) とパルミチン酸 (C16:0) である。パルミチン酸は体内で合成される脂肪酸であり³⁴、

PALM 群の血清及びリポ蛋白画分ではパルミチン酸が高い割合を占めている。ミリスチン酸とパルミチン酸は血漿 TC を上昇させる³⁵⁻³⁶。また、ラウリン酸も血漿 TC 上昇をもたらし、長鎖飽和脂肪酸のミリスチン酸及びパルミチン酸と類似した血清脂質への影響を示す³⁷。一方、トリパルミチン酸は若年成人での短期負荷では血清 TC に変化を与えなかった²⁸。本実験において、PALM 群では血清 TC が高値を示さなかったものの、LDL-C が高い値で、OLIVE 群とは有意差を示した。

4. 肝臓脂質含有量及び脂質代謝

VLDL は肝で合成され、TG の運搬に働いている³⁸。VLDL は LPL の働きで TG を除去され IDL となり、最終的には LDL に変化する。LPL は血清脂質分解活性の最も重要な作用をもち、TG に富むリポ蛋白であるカイロミクロンと VLDL の異化に中心的に関与している³⁹。さらに、ラットにおいては、HDL から VLDL、LDL へコレステロールエステルを転送するコ

レステロールエステル転送蛋白(CETP)が欠けているため、VLDL、LDLのTC量は肝から分泌された時点の含有量が保存されると考えられる。従って、ヒトなどCETP活性の存在する場合と異なり、ラットではVLDL、LDLのコレステロールは、肝からの分泌とその後の肝などへの取り込みの2つのパラメーターだけで決まると考えられる。OLIVE群ではVLDL-CとVLDL-TGが上昇し、LPL活性には差がないことより、VLDL産生が亢進していると考えられた。VLDLの合成は肝臓へ流入する遊離脂肪酸の増加することにより促進され、また、肝で内因性の脂肪酸の合成速度が増加することでも促進される。血清FFAには差がなかったことより、肝での内因性合成速度の増加と考えられる。一方、VLDL産生の上昇が血中濃度の上昇にもかかわらず、IDL、LDL-Cが低値を示したことから、LDLのクリアランスが亢進していることが示唆された。TEA群においてはこれらの変化は認め

られなかった。OLIVE群とTEA群で肝臓TC含有量が高かったこと、VLDL分泌の上昇にもかかわらず、血清TCが低値であることと併せて、オレイン酸により、TCの肝臓への取り込みが上昇している可能性が考えられた。

また、肝臓のTG含有量はOLIVE群がやや高値であるが、その差は血清レベルほど著しくなかった。OLIVE群では肝臓からのVLDL-TGの分泌速度が大きいとも考えられる。これらのことからTG代謝においては、同じオレイン酸を豊富に含有するオリーブ油と茶油の代謝機序が異なることが示唆される。

5、植物ステロール

脂肪酸組成の類似したオリーブ油と茶油でリポ蛋白の脂質組成に大きな差が認められたため、油脂の脂肪酸以外の成分に差があることが原因である可能性を考え、植物ステロールの含有量を日本食品分析センターに依頼し、ガスクロマトグラフ法で測定してもらった (Table3-2)。オリーブ油では植物ステロール

Table3-2. Composition of plant sterols in olive oil and tea oil.

	Olive oil *	Tea oil **
Total sterols(mg/kg)	1500	600
Conresterol (%)		0.6
Brassicasterol (%)		0.1
Campesterol (%)	3.2	0.7
Stigmasterol (%)	1.0	0.8
Sitosterol (%)	94.0	
Isofucosterol (%)		4.5
7-Stigmastanol (%)	<0.5	56.6
Avenasterol (%)	<0.5	6.7
7-Ergostenol (%)		2.5
Spinasterol (%)		27.5

* Olive oil data by Perez-Jimenez et al : Am J Clin Nutr 62:1995.⁴⁰

** Tea oil data by Japan Food Research Laboratories. by means of gas chromatography.

の含有量は 1500mg/kg で茶油の 600mg/kg より 2.5 倍多かった。オリーブ油ではシトステロールが 94%を占めているに対し、茶油では 7-スチグマステノールが 56.6%、スピナステロールが 27.5%を占めていた。オリーブ油と茶油では植物ステロールの組成、含量に大きな違いが認められた。

オリーブ油と茶油に含まれる植物ステロールの種類、量は全く異なっており、この植物ステロールの差が脂肪酸組成が類似するオリーブ油と茶油で血清脂質、リポ蛋白に大きな差が生じた原因である可能性がある。Perez-Jimenezら⁴⁰はオレイン酸に富むサフラワ油をオリーブ油と比較した研究で、トリグリセリドには差がなく LDL-C に差を認め、その原因として植物ステロールの含有量と組成が大きく違っていたことを指摘している。シトステロールを含まない油脂は極めて少ない。茶油に多く含有する 7-スチグマステノールはスチグマステロールの水素により合成

され、大豆油に含まれる。次に茶油に多く含有されるスピナステロールはハウレン草などの植物に分布しており、接触還元によりステグマステロールとなる⁴¹。茶油のこの特有の植物ステロール組成とその代謝に与える影響は興味深い新たな課題である。

5、相関関係

高脂肪食は高 FFA 血症を起こし、FFA の上昇はインスリン感受性を低下させる¹⁵。今回の実験成績において、飼料摂取量の多い、腹腔内脂肪量の多いラットは FFA が高値を示し、SSPI の上昇も伴っている。また、SSPG の上昇は腸間膜脂肪量の増加と相関している。この成績はインスリン感受性の低下が体脂肪量の増加、FFA の上昇と共に存在することを示した。インスリン感受性の低下によって、脂肪組織の分解が亢進するとともに血中 FFA が上昇し、肝 TG 産生分泌が増加する¹⁵。今回、TEA 群のみ SSPI と肝 TG 含有量との間に正相関であることを確認した。

体脂肪量と血清 TG とは強い相関関係を有するとされ⁴²⁻⁴³、血清 TG、VLDL-TG は体重の増加と相関し、体重の増加に伴いは血清 TG と VLDL-TG も次第に上昇することが認められた。体脂肪量の増加とともに、血清 TG 及び VLDL 画分脂質の上昇、VLDL の産生が亢進することが確認された。TG 産生に関しては OLIVE 群と TEA 群ではより強く認められて、体脂肪量と VLDL 合成量とが相関していることを反映しているためと思われる。また、肝臓重量と血清 TG 及び VLDL 画分脂質との間には正の相関を認め、肝臓重量が大きいほど血清 TG、特に VLDL-TG が上昇し、TG 分泌量は肝の体積と関連していることが考えられる。しかし、OLIVE 群ではそれらの相関がはっきりと示されているが、TEA 群では VLDL-C と VLDL-PL においては相関を認めなかった。さらに検討する必要があると思われる。

第4章 LDL受容体

第1節 目的

血清リポ蛋白代謝経路⁴⁴(Fig.4-1)において、肝で合成されたTC及びTGはVLDLとして放出され、末梢組織に到達する。LPLの働きでTGが放出されることによりVLDLはより小さい粒子IDLとなり、肝性リパーゼ(HTGL)でさらに分解され、LDLに転換され、LDL受容体を介してふたたび肝臓に取り込まれ、一部のLDLは末梢組織にTCを提供する。その運搬過程にLDL受容体が重要な役割を果たし、血清TC濃度は肝LDL受容体によりコントロールされ、LDL受容体に異常があれば高LDL血症となる⁴⁵。今回のラットを用いた脂質代謝検索の結果において、OLIVE群ではVLDL-C、VLDL-TGが上昇し、LPL活性には差がなく、VLDL産生が亢進していると考えられた。IDL-C、LDL-Cが低値を示し、LDLのクリアランスも亢進していることが示

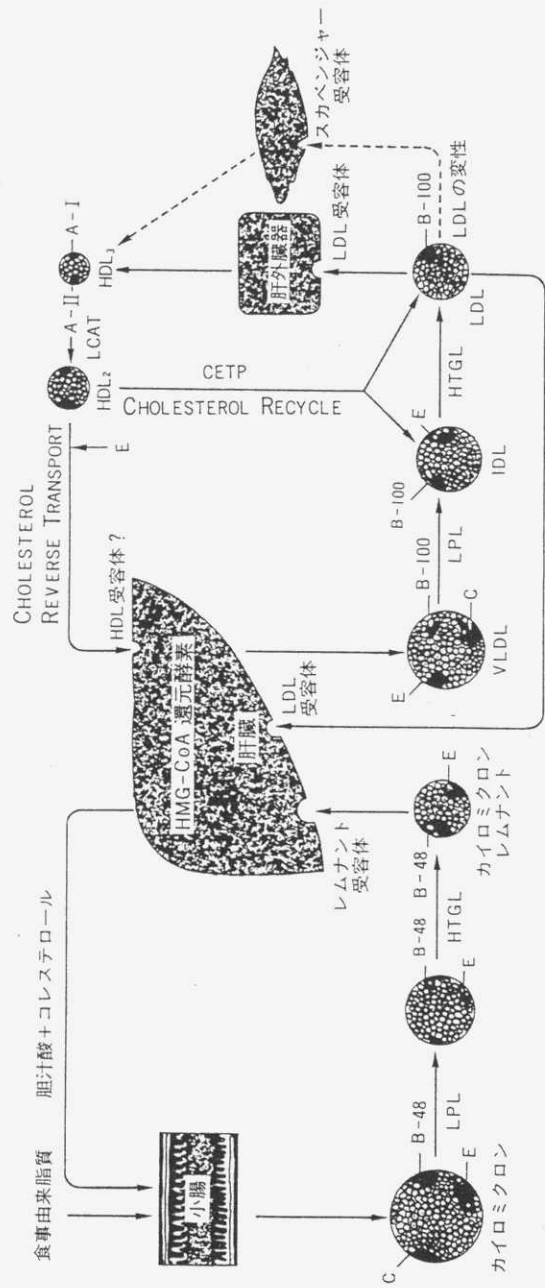


Fig.4-1 血清リポ蛋白代謝経路. (馬淵 宏: LDL の代謝. The Lipid 3:1990)⁵⁰

された。一方、TEA 群では肝 TC 含有量が上昇したが、VLDL-C、VLDL-TG は上昇せず、IDL-C は OLIVE 群より高値を示した。PALM 群では LDL-C、LDL-TG 共に OLIVE 群より有意に高値を示した。これらの結果をもたらす原因の一つとして LDL 受容体の変化が考えられるので、肝ホモジネートを用いて LDL 受容体蛋白質の発現について検討した。

第 2 節、方法

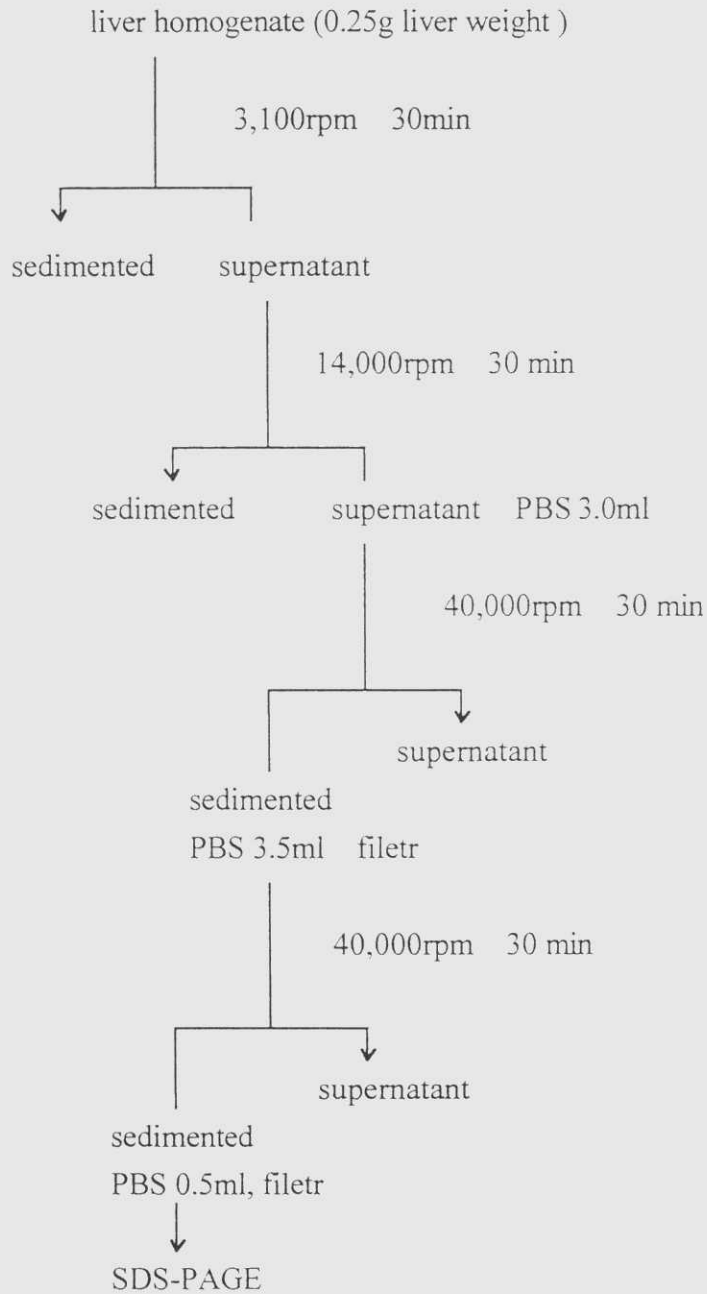
1、膜分画蛋白質の分離及び測定

本実験で -35°C に保存してあった肝ホモジネートを氷水浴で溶解し、Fig.4-2 に示した方法により膜分画の分離を行った。超遠心は SCP70H 日立、アングルローター(P50AT4 日立)を使用した。膜分画の蛋白質は Bio-Rad DC Protein Assay で測定した。

2、泳動及びブロット

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法ゲルから膜へブロットしてから膜面の蛋白質(SDS-PAGE)⁴⁶を用いて泳動を行った。泳動

Fig.4-2 Outline of the methodology for isolating the LDL receptor



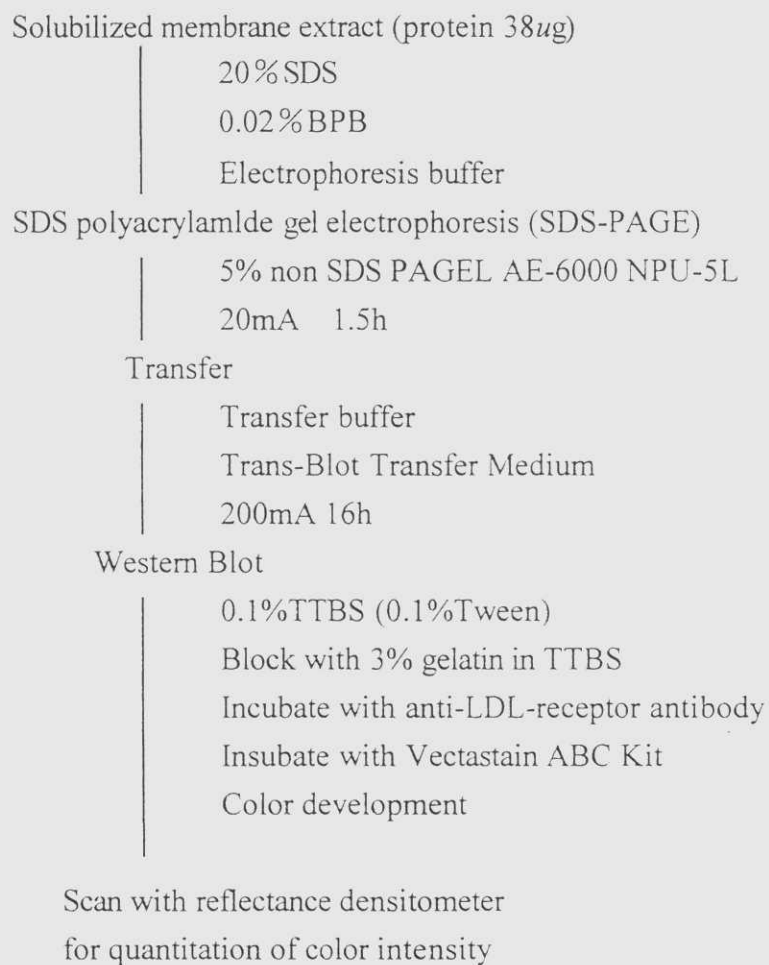
を免疫学的に検出するイムノブロット法⁴⁷ (Fig4-3)を用いて、LDL受容体の発現の検出を行った。抗LDL受容体抗体としてOncogene Science社製のLDL-R(Ab-1)抗体を用いて、LDL受容体を可視化した。

バッファ及び溶液の組成：1) Electrophoresis buffer: 175mM Glycine, 25mM Tris-base, 0.1% SDS (PH8.3); 2) Transfer buffer: 192mM Glycine, 25mM Tris-base, 20% Methanol, 0.1% SDS (PH8.3); 3) TTBS: 0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20 (PH7.5); 4) Blocking beffer: TTBS, 3% Gelatin.

3、LDL受容体の定量化の方法

ブロットした膜をヒューレットパッカー社製フラットベットスキャナ、Desk Scanで取り込み、デンスイトグラフソフト(ATTO社)で120kDaと160kDaに相当するバンドの濃度と面積を計測した(Fig4-4)。コントロールサンプルに対する比率をLDL受容体の検出量とし統計処理をした。

Fig.4-3 Outline of the methodology for visualizing the LDL receptor*



* SDS-PAGE : U.K.Laemmli Nature 227:1970 ⁴⁶
Immunoblot technique : 今井利夫. 日本臨床 53:1995 ⁴⁷

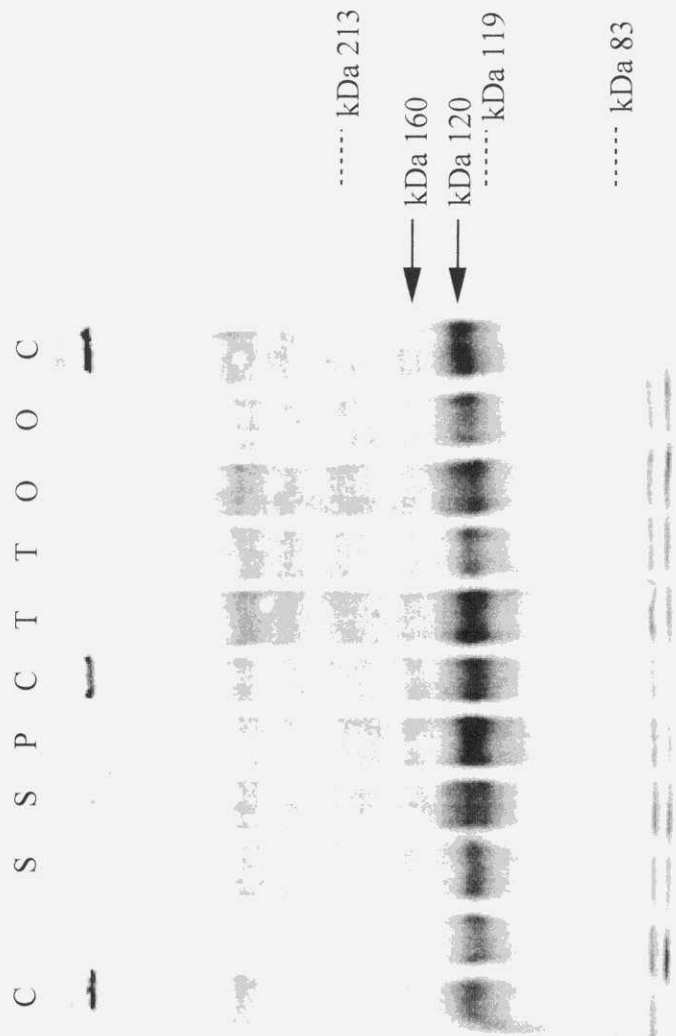


Fig.4-4 An example of western blot of LDL receptor with anti-LDL receptor antibody.
 lane C: control sample; lane S: soybean; lane O: olive; lane T: tea; lane P: palm.

第3節 結果

SOY 群と比較して、各群に LDL 受容体蛋白質の発現の差を認めなかった(Fig4-5)。

Table4-1 に肝 LDL 受容体(120kDa)量と体重、飼料摂取量、血清及び肝脂質との相関を示す。肝 LDL 受容体量は、ラット体重及び腹腔内脂肪量との間には OLIVE 群のみ負の相関を認め、飼料摂取量との間に OLIVE 群、PALM 群では負の相関であった。血清 TC との間には PALM 群には正の相関を示したが、TEA 群では負の傾向であった。VLDL-C とは TEA 群のみ負の相関、LDL-C とは SOY 群、PALM 群では正相関が認められ、血清 LDL-TG、LDL-PL との間に TEA 群以外の SOY 群、OLIVE 群、PALM 群には正の相関であった。肝脂質との間に相関が認められなかった。

第4節 考察

LDL 受容体は血中コレステロール運搬体の LDL と結合し、TC を細胞内に取り込む働きをしている。120kDa の precursor receptor

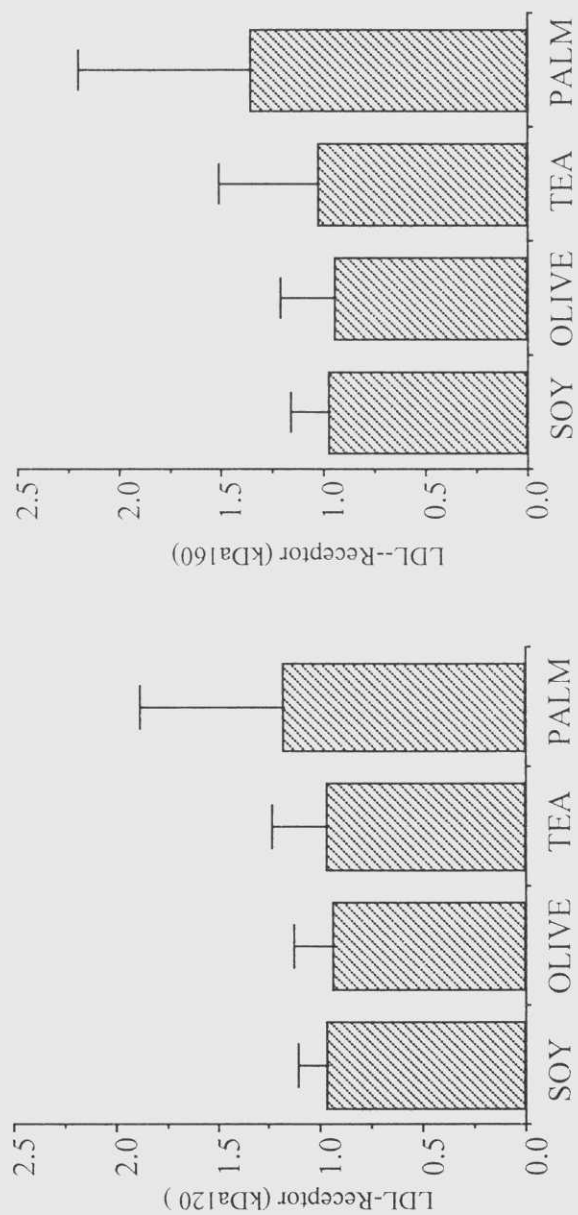


Fig.4-5 Liver LDL receptor of rats after 5weeks on experimental diets containing 16% (w/w) of the soybean (n=7), olive (n=9), tea (n=7), palm (n=9)oil.
Mean ± S.D N.S

Table4-1. Correlation coefficient of low density lipoprotein receptor (120-kDa) and serum and liver lipid.
(r values)

	SOY (n=7)	OLIVE (n=9)	TEA (n=7)	PALM (n=9)	Total (n=32)
Body weight	-0.56	-0.87 b	0.32	0.65	-0.39 a
Food	-0.33	-0.73 a	-0.12	-0.67a	-0.34
Adipose tissues weight	-0.16	-0.69 a	-0.45	-0.29	-0.42 a
Serum total cholesterol	0.47	-0.08	-0.50	0.80 a	0.32
Serum VLDL cholesterol	-0.16	-0.27	-0.84 a	-0.27	-0.30
Serum LDL cholesterol	0.79 a	0.32	0.47	0.88 a	0.78 c
Serum HDL cholesterol	0.53	-0.21	0.003	0.58	0.18
Serum triglyceride	-0.07	-0.44	-0.67	-0.01	-0.15
Serum LDLtriglyceride	0.80 a	0.73 a	-0.17	0.79 a	0.58 b
Serum LDLphospholipid	0.80 a	0.86 a	0.28	0.94 b	0.84 c
Liver weight	-0.72	-0.48	0.08	-0.55	-0.36 a
Liver cholesterol	-0.18	-0.10	0.24	-0.06	-0.09
Liver triglyceride	0.09	-0.44	0.38	0.06	0.05

a: p<0.05 b: p<0.001 c: p<0.0001

と 160kDa の mature receptor⁴⁸がある。

脂肪酸組成の異なる高脂肪食でラットを 5 週間飼育した後、LDL 受容体量には各群間に有意の差を認めなかった。正常ラットの場合、短期間の負荷では脂肪酸組成の差による LDL 受容体への影響は著しくないとと思われる。

OLIVE 群において肝 LDL 受容体量と体重及び腹腔内脂肪量との間に負の相関を認める一方で、血清 LDL-C、LDL-TG が上昇してないことから、肝外組織の LDL 利用が亢進していると考えられ、今後、肝外臓器の測定を行う必要があると思われる。

LDL 受容体の欠損は血漿中の LDL 蓄積を招き、高コレステロール血症になるのが原発性高コレステロール血症の発症機序である⁴⁹。血清 TC 濃度は LDL 受容体によりコントロールされ、血清 TC 濃度と LDL-C 濃度は LDL 受容体との間に負の相関があると報告されている⁵⁰。今回の実験で血清 TC において TEA 群では負の相関傾向であるが、逆に PALM 群

ではそれに反する正の相関が認められた。
LDL-Cにおいて SOY群と PALM群ともに正の相関が認められ、LDL-TG、LDL-PLでは SOY群、OLIVE群、PALM群は有意に負の相関を認めたが、TEA群のみ相関が認められなかった。TEA群は他の群と異なる傾向を示し、さらに検討する必要があると思われる。

Nicolosiら⁵¹と Hennessyら⁵²は LDL受容体は肝臓の TC、TG含有量と逆相関すると報告したが、今回の実験ではこれらの相関が認められなかった。

第5章 MTP活性及びVLDL分泌速度

第1節 目的

Wetterauら⁵³が肝細胞内においてTG転送に係わるミクロソームトリグリセライド転送蛋白(microsomal triglyceride transfer protein: MTP)について初めて報告して以来、MTPは注目されている⁵⁴⁻⁵⁵。中性脂肪から分解されたFFAは肝細胞内においてacyl-CoA synthetase (ACS)などの酵素によってTGへと再び変換され、TGがMTPによって転送を受け、アポ蛋白Bと合わせてVLDLとして肝臓から分泌される。MTPの活性化が過栄養状態における高脂血症、動脈硬化の発症と進展において重要な意味を持つと言われている⁵⁶。

また、食事の脂質は小腸で吸収され、カイミクロンとして血中に入り、中性脂肪の大部分がLPLの働きにより分解され、残りがカイミクロンレムナントとなり、肝臓にレムナント受容体を介して取り込まれる。この脂

質を利用して肝臓から VLDL が分泌され、VLDL が TC、TG といった脂質を末梢組織に供給する働きをする。VLDL 合成が FFA や糖などの肝臓への流入の増加によって増加し⁵⁷、肝 TG やコレステロールエステル (EC) の合成速度は VLDL 分泌の速度を左右する。

今回脂肪酸組成の異なる高脂肪食をラットに 5 週間投与した後の脂質代謝の成績において、OLIVE 群では VLDL-C と VLDL-TG が上昇し、LPL 活性には差がなく、VLDL 産生が亢進していると推察されたが、TEA 群ではこれらの変化が認められなかった。また、肝臓脂質含有量において、OLIVE 群と TEA 群では肝 TC 含有量は高かったことから、オレイン酸の摂取によって、TC の肝臓への取り込みが上昇している可能性が考えられた。さらに、肝臓 TG 含有量は OLIVE 群が高い傾向であり、オリーブ油では肝臓での VLDL-TG の合成が亢進していると考えられる。これらのことを踏まえて、VLDL 分泌を促進する原

因のひとつとして MTP 活性を検討し、また、脂肪酸組成の異なる油脂負荷で VLDL 分泌速度に及ぼす影響を大豆油、オリーブ油、茶油を用いて検討した。

第 2 節 方法

1、MTP 活性の測定

本実験で -35°C に保存してあった肝ホモジネートを氷水浴で解凍し、 $3,000\text{rpm}$ で 15 分間遠心し、上清を採る。WAK-CHEMIE MEDICAL GMBH 社の Microsomal Transfer Protein Activity Kit (MTP Kit) を用いて、蛋白質量 $100\ \mu\text{g}$ に相当する検体に donor, acceptor 及び volume buffer (10mM tris , 150mM NaCl , $2\text{mM EDTA pH}7.4$) を合わせて $500\ \mu\text{l}$ に調製し、 37°C で 6 時間孵置前後に蛍光光度計で励起波長 465nm 、蛍光波長 535nm により MTP 活性を測定した。

2、VLDL 分泌速度の測定

対象、飼育及び飼料は本実験と同じ条件で大豆油、オリーブ油、茶油の 3 種類の油脂飼

料で飼育を行った。

リポ蛋白リパーゼ阻害作用のある Triton WR-1339(Tyloxapol) を 0.9%NaCl で 300 mg/ml に希釈し、一夜絶食したラットにネンブタール麻酔下で、600mg/kg body weight を静脈内投与し、投与前と投与後 60 分に採血し、血清 TC、TG 濃度を酵素法（日本商事）で測定した。一分間当たりの血清脂質濃度の上昇量を VLDL 分泌速度とした⁵⁸。

第3節 結果

1. MTP 活性の結果

0 時間より 6 時間加温後の蛍光上昇量が MTP 活性とされているが、今回の測定では 0 時間より 6 時間加温後の測定値が上昇しなかったため、MTP 活性について検討できなかった。

2. VLDL 分泌速度の結果

Fig.6-1 に VLDL-C、VLDL-TG 分泌速度を示す。VLDL-C 分泌速度は SOY 群 (0.26 ± 0.17 mg/dl/min) に比較して、OLIVE 群

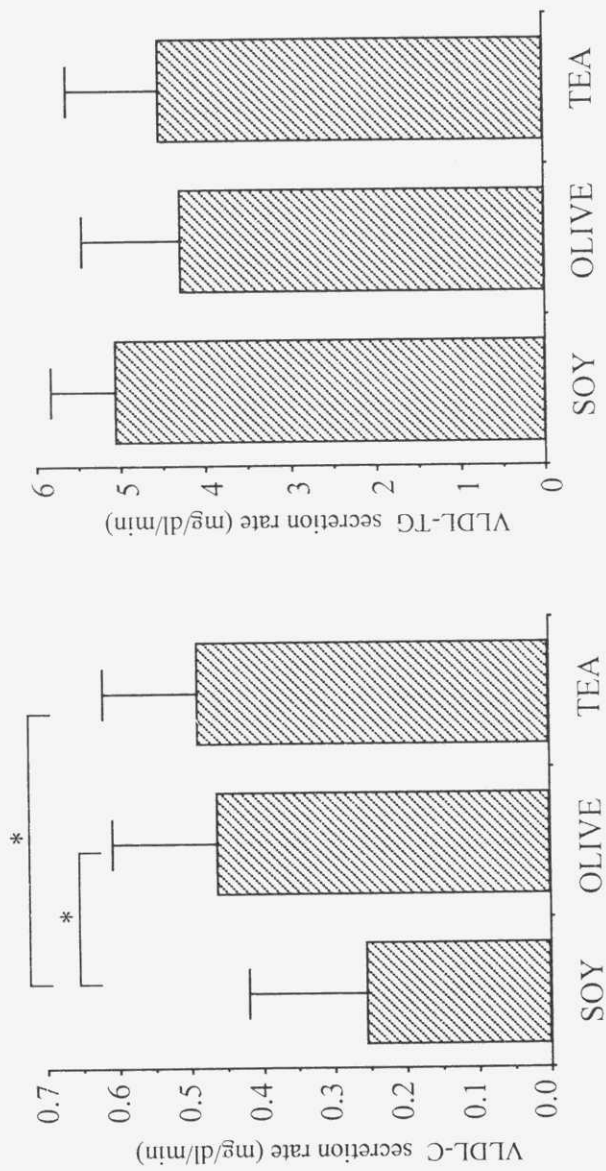


Fig.5-1 Secretion rates of VLDL cholesterol and triglyceride (VLDL-C, VLDL-TG) in rats after injection of Triton WR-1339, in rat after 4 weeks on experimental diets containing 16% (w/w) of the soybean (n=8), olive (n=8), tea (n=9) oil. Mean \pm S.D *p<0.01

(0.46 ± 0.15 mg/dl/min)と TEA 群 (0.49 ± 0.13 mg/dl/min)は有意 ($p < 0.01$)高値を示した。VLDL-TG 分泌速度は3群の間に差を認めなかった。

第4節 考察

脂肪酸組成の異なる食事で血清 VLDL-TG、肝 TG 含有量に差が認められ、その機序を検討するために MTP 活性の測定を行ったが有効な結果を得ることができず、結果について検討ができなかった。同キットを用いた測定の例、報告がみられないため、失敗例として検討した結果、原因について肝組織の抽出方法、試薬の使用量などが推測される。今後、既に報告のある MTPmRNA を測定する方法⁵⁹を用いて再検討する必要がある。

血清脂質はリポ蛋白に含まれて血中に存在している。リポ蛋白には脂質組成や種類の異なることで分画があり、VLDL では TG50%、コレステロールエステル(CE)15%及び遊離コ

レステロール (FC)7% (併せて TC22%)、PL18%が占めている。肝臓から VLDL が分泌され、VLDL がこれらの脂質を末梢組織に供給する。VLDL 分泌速度は TG 及び TC の合成速度に依存している。FFA や糖などの肝臓への流入が増加し、TG を多量に含有する粒子の大きい VLDL 合成が増加すると、高トリグリセリド血症を伴うことが多い。Boivin ら⁶⁰ は、高糖質食と比べ高脂肪食の TG 分泌速度が遅かったことから糖の摂取増加によって VLDL 分泌が増進することを確認した。Kasim ら⁶¹ は VLDL-TG のみならず、VLDL-遊離型コレステロール (VLDL-FC)、VLDL-PL も VLDL-TG と同様に変化していると報告した。

今回の実験においては、TG 分泌速度は変化を認めなかったが、TC 分泌速度は SOY 群より OLIVE 群と TEA 群が増進している。OLIVE 群では VLDL-C 及び肝 TC 含有量ともに上昇していたことと一致し、SOY 群より

VLDL 分泌が亢進していると考えられる。
TEA 群では血清 VLDL-C は上昇しなかった
が、肝 TC 含有量は高い傾向があり、VLDL
分泌が亢進傾向と同時に、LDL への転換も早
いと考えられる。

第6章 総括

[目的] 高脂肪食は肥満、耐糖能異常、高脂血症、動脈硬化などを来すが、脂肪酸組成によってその影響は異なることが知られている。これまで、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸を多く含むオリーブ油の動脈硬化防止への寄与が注目されて来た。今回、オリーブ油と同様にオレイン酸を豊富に含む茶油の糖代謝・脂質代謝に与える影響の検討をオリーブ油との比較研究として行い、多価不飽和脂肪酸に富む大豆油、飽和脂肪酸に富むヤシ油を対照とした。

[方法] 同腹雄性 SD ラットを4群にし、SOY、OLIVE、TEA、PALMの4種類の油脂を16%(w/w)を含有する実験食で5週間飼育した。4週後にヘパリン静注後血漿でLPLを測定し、SSPG及びSSPIを測定した。5週間後に採血し、血清及び各リポ蛋白画分脂質、肝脂質、肝組織のLDL-受容体の測定を行った。さらに、追加実験で、VLDL分泌速度の

測定を行った。

[結果]

1、体重の変化、肝臓、心臓及び腹腔内脂肪組織の重量、飼料摂取量、飼料効率はいずれの群の間にも差がなかった。体重と飼料摂取量及び腹腔脂肪量との間には正の相関を認め、特に OLIVE 群と PALM 群では相関がより強く認められた。

2、基礎血糖とインスリン値はいずれの群の間にも差を認めなかった。SSPG 及び SSPI は多群間有意差検定では有意の差を認めなかったが、群と群の間において、SSPG では SOY 群と比較して TEA 群では差がなかったが、OLIVE 群では有意に高かった。SSPI では OLIVE 群と比較して、TEA 群では差がなかったが、PALM 群では有意に高かった。全体においては、SSPG と腸間膜脂肪量との間には正の相関を認めた。

3、LPL 活性は群間に有意な差が認められなかった。

血清 TC は SOY 群より、OLIVE 群、TEA 群、PALM 群では有意に低下し、また、HDL-C にも同様に差を認めた。SOY 群と比較して、OLIVE 群では VLDL-C が有意に高く、IDL-C と LDL-C は低下傾向が見られたが、TEA 群ではこのような差がなかった。PALM 群では IDL-C が低下し、LDL-C が上昇した。血清 TG は、SOY 群と比較して TEA 群では差が認められなかったが、OLIVE 群では高い傾向を示し、VLDL-TG では、その差が有意であった。LDL-TG では OLIVE 群より PALM 群が有意に高値を示している。

FFA は各群の間に差が認められなかったが、全体では、FFA と飼料摂取量、後腹膜脂肪量及び SSPI との間には正の相関を認めた。

血清及びリポ蛋白の脂肪酸組成は食餌性油脂の脂肪酸組成の特性を強く反映したものであり、特に、VLDL では組成の類似性が著しかった。TEA 群は OLIVE 群よりアラキドン酸とテトラコセン酸の割合が大きかった。

肝 TC 含有量においては、SOY 群と比較して、TEA 群と OLIVE 群ともに有意に高値を示し、OLIVE 群ではより強く示している。

血清 TG 及び VLDL-TG と体重との間には正相関を認め、血清 TG 及び VLDL-C、VLDL-TG、VLDL-PL と腹腔内脂肪量及び肝臓重量との間には正の相関を認めた。

4、肝の LDL 受容体蛋白質の発現は各群に差を認めなかった。LDL 受容体量と体重、肝臓重量との間に負の相関を認め、LDL-C、LDL-TG、LDL-PL との間には正の相関を認めたが、各群では TEA のみ相関が認められなかった。

5、VLDL-C 分泌速度は SOY 群と比較して、OLIVE 群と TEA 群では有意に高値を示した。

[考察]

高脂肪食は肥満を来し、また、高脂血症、動脈硬化、糖尿病を促進する。今回の実験において、体重の増加は主に体脂肪量の増加であり、飼料摂取量と相関していた。体重、体

脂肪の増加に脂肪酸による差は認められなかった。

脂肪酸組成の異なる高脂肪食を負荷したラットでは、血糖、血漿インスリン濃度は群間に有意差がなく、SSPGとSSPIにも4群では有意差が認められなかったが、SSPGはSOY群と比べOLIVE群では上昇し、SSPIは他の群と比べPALM群では上昇を示した。飽和脂肪酸はインスリン感受性に悪影響を与えらると思われる。茶油の糖代謝及びインスリン感受性に及ぼす影響は大豆油との違いが認められなかった。全体では、SSPGと体脂肪量との間に正の相関を認め、体脂肪量の増加とインスリン感受性の低下に関連があると考えられた。

血清TC及びHDL-CがSOY群と比較して、TEA群、OLIVE群、PALM群では有意に低値を示し、OLIVE群でVLDL-Cが有意に高く、IDL、LDL-Cは低下傾向が認められた。オリーブ油ではVLDL産生が亢進し、IDL、LDL

のクリアランスが亢進していると考えられた。

血清 TG は SOY 群と比較して OLIVE 群では上昇傾向を示し、VLDL-TG は有意に上昇した。一方、TEA 群では SOY 群とは差がなかったが OLIVE 群より有意に低下した。

オリーブ油と脂肪酸組成の類似した茶油では血清脂質、リポ蛋白への作用にオリーブ油と異なった結果が得られ、茶油では VLDL-C、VLDL-TG はオリーブ油より有意に低く、オレイン酸含有量以外の要素も関与していると思われた。要素の一つは、オリーブ油と茶油の植物ステロールが大きく異なっていることと考えられ、今後の課題となる。

高脂肪食は FFA の上昇、インスリン抵抗性を引き起こす。今回のラットを用いた実験では、FFA と飼料摂取量、体内脂肪量および SSPI との間に相関を認め、インスリン抵抗性と FFA の上昇に関連のあることが示唆された。

LDL 受容体蛋白質の発現は各群に差を認め

なかった。血清 TC と LDL 脂質との相関関係は TEA 群は他の群と異なる傾向が見られた。

TC 分泌速度は SOY 群より OLIVE 群と TEA 群が上昇している。OLIVE 群では VLDL-C 及び肝 TC 含有量ともに上昇していたことと一致し、VLDL 分泌が亢進していると考えられる。TEA 群では血清 VLDL-C は上昇しなかったが、肝 TC 含有量は高い傾向があり、VLDL 分泌が亢進傾向と同時に、LDL への転換も早いと考えられる。

第7章 結論

オレイン酸が主成分で類似した脂肪酸組成を有する茶油とオリーブ油を用い大豆油をコントロールとして、高脂肪食がラットの糖代謝・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

1、高脂肪食を摂取する場合、脂肪の質にかかわらず、飼料摂取量が多くなるほど体重が増加し、FFAが高くなり、インスリン抵抗性が増加することが認められた。

2、脂肪酸組成の異なる油脂によりインスリン感受性に有意な変動を認めなかった。茶油と大豆油との違いを認めず、オリーブ油はインスリン需要量が増大する傾向であり、ヤシ油はインスリンのクリアランス能力が低い傾向と思われる。

3、オレイン酸は、血清 TC を低下させ、肝臓への TC を取り込み能力が高まっていると示し、また、VLDL 産生が亢進すると同時に、オリーブ油では IDL、LDL のクリアランスが亢進し、茶油では VLDL から IDL への転

換が速いと思われる。

4、脂質代謝においてはオリーブ油と茶油では異なった結果であった。オレイン酸以外に植物ステロール含有量と組成が異なっていることは要因のひとつと考えられる。

謝辞

本研究にあたり、始終懇切丁寧にご指導を頂きました女子栄養大学大学院若林孝雄教授に心から感謝申し上げます。

研究全体を遂行するにあたり長期に渡り懇切なご指導を賜り、研究環境を提供して下さいました埼玉医科大学第四内科片山茂裕教授、高橋慶一講師に深く感謝いたします。

基礎栄養学の立場から丁寧なご教示を頂きました女子栄養大学大学院長谷川恭子教授に心より感謝いたします。

実験全過程におきまして、ご協力いただきました埼玉医科大学第四内科研究室の方々、女子栄養大学内科学研究室の方々に深く感謝いたします。

文献

1. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The Diet and 15-Year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986;124: 903-915.
2. Baggio G, Pagnan A, Muraca M, Martini S, Opportuno A, Bonanome A, Ambrosio GB, Ferrari S, Guarini P, Piccolo D, Manzato E, Corrocher R, Crepaldi G. Olive-oil-enriched diet: effect on serum lipoprotein levels and biliary cholesterol saturation. *Am J Clin Nutr* 1988;47:960-964.
3. Mata P, Alvarez-Sala LA, Rubio MJ, Nuo J, Oya MD. Effects of long-term monounsaturated vs polyunsaturated enriched diets on lipoproteins in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1992;55:846-850.
4. Mata P, Garrido JA, Ordovas JM, Blazquez E, Alvarez-Sala LA, Rubio MJ, Alonso R, De Oya M. Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women. *Am J Clin Nutr* 1992;56:77-83.
5. De Bruin TWA, Brouwer CB, Trip M van LS, Jansen H, Erkelens DW. Different postprandial metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high-density lipoprotein conserving effect of olive oil. *Am J Clin Nutr* 1993;58:477-483.
6. Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N Engl J Med* 1989;321:436-441.
7. Nielsen BB, Leth-Espensen P, Nordestgaard BG, Foged E, Kjeldsen K, Stender S. Replacement of dietary saturated fat with monounsaturated fat: effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits clamped at the same

plasma cholesterol level. *British Journal of Nutrition* 1995;74: 509-521.

8. Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med* 1986;314: 745-748.

9. Grundy SM. Monounsaturated fatty acid and cholesterol metabolism: implications for dietary recommendations. *J. Nutr.* 1989;119:529-533.

10. Lorigeril M de, Renaud S, Mamele N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994; 343:1454-1459.

11. 厚生統計協会. 国民衛生の動向. 1994; p94.

12. 奥山治美. 飽食時代の脂質栄養指針. *脂質栄養学* 1997;6:6-42.

13. Deng PJ, Zhang YH, Huang JX, Huang ML, Zheng YH, Chui CG. A study of the effect of tea seed oil on serum lipid in normal adults. *Acta Nutrimenta Sinica* 1993;15:289-292.

14. Chen MF, Gu JF, Sun MT, Yang HB, Zhang SQ, Liu YJ. Effect of tea-seed oil on the atheromatic formation and its mechanism. *Acta Nutrimenta Sinica* 1996;18:13-19.

15. Sleder J, Chen YDI, Cully MD, Reaven GM. Hyper-insulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 1980;29: 303-305

16. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin Resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14: 173-194.

17. Shen SW, Reaven GM, Farquhar JW, Nakanishi RH. Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes. *J.Clin.Invest* 1970;49:2151-2160.

18. Wright DW, Hansen RI, Mondon CE, Reaven GM. Sucrose-induced

insulin resistance in the rat: modulation by exercise and diet. *Am J Clin Nutr* 1983;38:879-883.

19. Reaven GM. Banting lecture 1988, Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.

20. Boden G. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care* 1996;19:394-395.

21. 久城英人、高野圭以、福井巖. リポ蛋白リポアーゼ測定法. 臨床病理臨時増刊 特集 1975;21:110-123

22. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-1353.

23. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 1957;226:497-509.

24. Keys A, Anderson JT, Grande F. Serum cholesterol response to changes in the diet I. Iodine value of dietary fat versus 2S-P. *Metabolism* 1965;14:747-758.

25. Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 1985; 26: 194-202.

26. 石川俊次、加々美明彦、多田紀夫、白石弘美、林進、荒木達夫、森野真由美、宮島恵美子、中村治雄. 一価不飽和脂肪酸の血漿脂質、リポたんぱく、アポリポたんぱくに及ぼす影響. 臨床栄養. 1988;72,273-279

27. Nydahl MC, Gustafsson IB, Vessby B. Lipid-lowering diets enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids but low in saturated fatty acids have similar effects on serum lipid concentrations in hyperlipidemic patients. *Am J Clin Nutr* 1994;59:115-122.

28. 川端輝江、日田安寿美、鈴木政夫、長谷川恭子. トリオレイン、

トリパルミチン、トリストエアリン及びトリリノレインがヒト脂質代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌. 1994;47:184-193.

29. Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, Friedlander Y, Norman Y, Kaufmann NA, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins - the Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr* 1991;52:899-907.

30. Ruz-Gutiérrez V, Muriana FJG, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *Journal of Hypertension* 1996;14:1483-1490.

31. Brouwer CB, deBruin TWA, Jansen H, Erkelens DW. Different clearance of intravenously administered olive oil and soybean-oil emulsions: role of hepatic lipase. *Am.J.Clin.Nutr* 1993;57:533-539.

32. Frmont L, Gozzelino MT. Dietary sunflower oil reduces plasma and liver triacylglycerols in fasting rats and is associated with decreased liver microsomal phosphatidate phosphohydrolase activity. *Lipid* 1996;31:871-878.

33. Glatz JFC, Soffers AEMF, Katan MB. Fatty acid composition of serum cholesteryl esters and erythrocyte membranes as indicators of linoleic acid intake in man. *Am.J.Clin.Nutr* 1989;49:269-276.

34. 鹿山 光. 魚油における不飽和脂肪酸の代謝. *食の科学* 1989;38:25-32.

35. Keys A, Anderson JT, Grande F. Serum cholesterol response to changes in the diet. IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 1965;14:776-787.

36. Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am.J.Clin.Nutr* 1965;17:281-295.

37. 渋谷香織, 鈴川紀子, 奥津寿美子, 長谷川恭子. 構成脂肪酸の

異なる油脂の等エネルギー置換摂取(短期)が、健常女子学生の血中脂質に及ぼす影響。女子栄養大学紀要 1982; 13:19-33.

38. Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;128:3-41.

39. McLean LR, Demel RA, Socorro L, Shinomiya M, Jackson RL. Mechanism of action of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol* 1986; 129:738-763.

40. Perez-Jimenez F, Espino A, Lopez-Segura F, Blanco J, Ruiz-Gutierrez V, Prada JL, Lopez-Miranda J, Jimenez-Perez J, Ordovas JM. Lipoprotein concentrations in normolipidemic males consuming oleic acid-rich diets from two different sources: olive oil and oleic acid-rich sunflower oil. *Am J Clin Nutr* 1995;62:769-775.

41. 大木道則、大沢利昭、田中元治、千原秀昭. 化学大辞典. 東京化学同人 1989.

42. Connor SL, Connor WE, Sexton G, Calvin L, Bacon S. The effects of age, body weight and family relationships on plasma lipoproteins and lipids in men, women and children of randomly selected families. *Circulation* 1982;65:1290-1298.

43. Phillips NR, Havel RJ, Kane JP. Levels and interrelationships of serum and lipoprotein cholesterol and triglycerides. Association with adiposity and the consumption of ethanol, tobacco and beverages containing caffeine. *Arteriosclerosis* 1981;1:13-24.

44. Havel RJ, Kane JP. Introduction; Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In *The metabolic basis of inherited disease*, Sixth ed. ed by Scriver CR et al. McGraw-Hill, New York 1989; pp 1129-1138.

45. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.

46. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

47. 今井利夫. イノムプロット法. 日本臨床 1995;53:2119-2125.
48. Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL. Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.* 1983;258: 15261-15273.
49. Goldstein JL, Brown MS. Progress in Understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J.Lipid.Res.* 1984;25:1450-1461.
50. 馬淵宏. LDLの代謝. *The Lipid* 1990;1:20-27.
51. Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. *Arteriosclerosis* 1990;10:119-128.
52. Hennessy LK, Osada J, Ordovas JM, Nicolosi RJ, Stucchi AF, Brousseau ME, Schaefer EJ. Effects of dietary fats and cholesterol on liver lipid content and hepatic apolipoprotein A-I, B, and E and LDL receptor mRNA levels in cebus monkeys. *J.Lipid Res.* 1992;33:351-360.
53. Wetterau JR, Zilversmit DB. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chemistry and physics of lipid.* 1985;38:205-222.
54. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999-1001.
55. Bennett AJ, Bruce JS, Salter AM, White DA, Billett MA. Hepatic microsomal triglyceride transfer protein messenger RNA concentrations are increased by dietary cholesterol in hamsters. *FEBS Letters* 1996;394:247-250.
56. 石神真人、山下静也、船橋徹、栗山洋、荒金克己、下村伊一郎、竹村芳、松沢佑次. 高脂血症発症機序における Microsomal Triglyceride

Transfer Protein (MTP)の意義の検討. 動脈硬化 1997;24:533-540.

57. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J.Lipid Res.* 1987;28:613-628.

58. Otway S, Robinson DS. The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J.Physiol* 1967;190: pp321-332.

59. Lin MCM, Arbeeny C, Bergquist K, Kienzle B, Gordon DA, Wetterau JR. Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. *J.Biot.Chem.* 1994;269: 29138-29145.

60. Boivin A, Deshaies Y. Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metabolism* 1995;44:1540-1547.

61. Kasim SE, LeBoeuf RC, Khilnani S, Tallapaka L, Dayananda D, Jen KLC. Mechanisms of triglyceride-lowering effect of an HMG-CoA reductase inhibitor in a hypertriglyceridemic animal model, the Zucker obese rat. *J. Lipid.Res.* 1992;33:1-7.

