

水泳トレーニングがラットの
血清リポ蛋白とヘパリン静注後血清
のリパーゼ活性に及ぼす影響

スポーツ医学専修
朝野 聡

(論文指導教員：南谷和利)

昭和58年 3月 4日

論文審査委員

石河利寛

石田詢子

山口正弘

Abbreviations in the text

HDL	= high-density lipoprotein
LDL	= low-density lipoprotein
VLDL	= very low-density lipoprotein
LPL	= lipoprotein lipase
H-TGL	= hepatic triglycerides lipase
LCAT	= lecithin-cholesterol acyltransferase
PHLA	= postheparin lipolytic activity

目次		頁
I.	緒言	1
II.	関連文献の考証	4
	1. リポ蛋白の構造と分類	4
	2. リポ蛋白の代謝	6
	3. リポ蛋白代謝の関連酵素	11
	4. 身体運動とリポ蛋白	15
III.	実験方法	20
	1. 被験動物	20
	2. 水泳トレーニング実験計画	20
	3. 採血方法と血清処理	21
	4. 血清脂質の測定	22
	5. 電気泳動法によるリポ蛋白分 析	23
	1) 血清リポ蛋白分画パターン の測定	23
	2) 血清リポ蛋白コレステロール の測定	23
	6. 電気泳動法による血清蛋白分	24

析

7. 超遠心法による血清リポ蛋白 24

分析

8. ヘパリン静注後のリパーゼ活 25

性 (Postheparin Lipolytic Activity :

PHLA) の測定

IV. 実験結果 27

1. ヒトとラットの血清リポ蛋白 27

分画パターン

1) ヒトの血清リポ蛋白分画パタ 28

ーン

2) ラットの血清リポ蛋白分画パ 29

ターン

2. 水泳トレーニングに伴う変化 30

1) ラットの体重変化 30

2) 血清脂質 31

3) 血清リポ蛋白 31

a. 血清リポ蛋白分画パター 31

ン

b. 血清リポ蛋白分画ユレス 32

テロール

4)ヘパリン静注後のリパーゼ活	33
性 (PHLA)	

V. 考察	35
-------	----

1. ヒトとラットの血清リポ蛋白	35
パターンの相違	

2. 水泳トレーニングと血清リポ	38
蛋白の代謝	

IV. 結論	45
--------	----

IV. 要約	46
--------	----

謝辞	48
----	----

引用文献

英文抄録

I. 緒言

血液中の脂質は、蛋白質と結合し、「リポ蛋白質」として存在している。このリポ蛋白質は、粒子を構成する脂質と蛋白質の量やその割合によつて、さまざまな生理作用を持つている。

疫学的には、高比重リポ蛋白質 (High-density Lipoprotein : HDL) コレステロール濃度が高いほど、冠状動脈硬化性心疾患の罹患率が低いことが報告されている⁽¹⁹⁾。また、低比重リポ蛋白質 (Low-density Lipoprotein : LDL) コレステロールと超低比重リポ蛋白質 (Very Low-density Lipoprotein : VLDL) トリグリセリド濃度の増加が⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾動脈硬化を促進することが報告されている⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾。

これらのリポ蛋白質に対する運動の効果として、持久的なトレーニングが、HDL コレステロール濃度を増加⁽⁵⁾⁽¹³⁾⁽⁴⁷⁾⁽²³⁾させ、LDL コレステロール濃度を減少⁽⁴⁾⁽¹³⁾させることが報告されている⁽⁴⁾⁽¹³⁾。このように身体運動は血清リポ蛋白質のパターンを良好にすることから、冠状動脈硬化性心疾患の

予防あるいは改善のために推奨されている。

しかし、トレーニングにも関わらず LDL
コレステロールや HDL コレステロールの濃度
が変化しなかったとの報告もあり⁴⁾、特に、運
動が HDL コレステロールを変化させるメカニ
ズムについての詳細は明らかにならずに
いる。

Nikkilä⁵⁾らは、脂肪組織のリポ蛋白質リパーゼ
(Lipoprotein Lipase: LPL)の活性と HDL コレ
ステロール濃度との間に正の相関関係があるこ
とを見出した。さらに、長距離走者が両方と
も高いレベルにあることを見出し、持続的な
トレーニングにより LPL の活性が亢進し、
HDL コレステロール濃度を上昇させていると
考えた。

しかし、LPL を含むリポ蛋白質の代謝に関連
した酵素のトレーニングによる変化が、血清
リポ蛋白質パターンにどのような影響を与え、
その関連性については十分な知見が得られ
ていない。

本研究は、持続性トレーニングによるリポ

蛋白分画パターンの変化を調べるとともに、この分画パターンに影響を及ぼすと考えられる酵素活性の変化との関連性について検討することを目的とした。

ヒトを対象とする場合、血清リポ蛋白分画パターンに影響を及ぼす因子(喫煙、アルコール摂取、食物摂取による個体差など)の排除が困難であり、また、酵素活性測定のためのヘパリン静注の悪影響を考慮し、ラットを被験動物とした。しかし、リポ蛋白代謝の分析法は、今まで主としてヒトを対象として臨床方面で開発利用されてきたため、そのまま実験動物に適用できない。そのため、ラット血清の分析条件をも検討して以下の実験を行った。

II. 関連文献の考証

1. リポ蛋白の構造と分類

水に不溶の脂質を血液中に溶解させ、体内の諸細胞がこれを利用することができるようになるために、生体は脂質を蛋白質と結合させて複合体としている。この脂質と蛋白の複合体がリポ蛋白である。

リポ蛋白は疎水性の脂質を核として、蛋白がそのまわりを取り囲んだ形をとり、ほとんどの粒子が球型をしていて、このリポ蛋白を構成している蛋白は、アポ蛋白、あるいはアポリポ蛋白と呼ばれており、その種類は、AからFまで10数種類が報告されている⁴⁹⁾。

これらのアポ蛋白と各種脂質が組み合わさって構成されるリポ蛋白粒子は、その直径が約5000 Åから100 Åに至るまで連続的に分布しており、それぞれ比重も異なる⁷⁾。

1949年、Gofman¹⁷⁾らは超遠心分析法を用いて、浮上係数(Sf)によるリポ蛋白の分類を報

告した。

これを基にして、リポ蛋白は比重によつて HDL, LDL, VLDL, カイロミクロンの4つに大別されている。また、浮紙電気泳動法により、 α , β , pre β リポ蛋白, カイロミクロンの4つに分類され、 α リポ蛋白は HDL, β リポ蛋白は LDL, pre β リポ蛋白は VLDL と、それぞれが超遠心法による分類に対応している²⁹⁾。

このように分類されたリポ蛋白分画は、それぞれ、その粒子を構成するアポ蛋白の種類が類似しており、結合する脂質の種類や割合も類似している。したがつて、それぞれの分画の代謝や生理作用が特徴的であり、各種脂質の血液中での動態や代謝に関する情報が提供される⁴⁹⁾。

実際は、アポ蛋白と脂質の組み合わせが異なるリポ蛋白粒子が、同一範囲内の比重で分けられた分画内に存在することになる。したがつて、同一分画内において、各リポ蛋白粒子の代謝や生理作用は不均一であることも指

摘⁵²⁾され⁵²⁾ている。

2. リポ蛋白の代謝

リポ蛋白は、本来、脂質の運搬体としての役割を持つ⁵³⁾ている。HDL, LDL, VLDLは、体内で生合成された脂質を運搬しているリポ蛋白であり、内因性リポ蛋白と呼ば⁵⁴⁾れている。

これに対し、食餌由来の脂質すなわち外因性脂質は、腸管で合成されるカイロミクロンによ⁵⁵⁾り、リンパ液あるいは血液中を運搬され⁵⁵⁾ており、カイロミクロンは、外因性リポ蛋白と呼ば⁵⁶⁾れている。

Schaefer⁵⁷⁾らは、カイロミクロンを形成する脂質の95%以上はトリグリセリドであり、それを担うアポ蛋白は、アポA-I, A-II, B, C-I, C-II, C-III, D, E, および一部のアルブミンであることを報告している。また、Kostner⁵⁸⁾とHolasek⁵⁹⁾は、カイロミクロンのアポ蛋白は、アポCが66%, アポBが22%, アポAが12%であったことを報告している。

しかし、Havel²⁷⁾らは、腸管で合成されたばかりのカイロミクロンには、アポCの存在が認められなかったことを報告している。このことより、カイロミクロンは、リンパ液あるいは血液中でアポCを持ったHDLに接触し、アポCを獲得し、その結果、LPLによるトリグリセリドの水解を受けると理解されている。

さらに、Jackson³⁰⁾らによつて、カイロミクロンはこの水解を受けた後に、肝臓に取り込まれることが報告されている。

VLDLは、肝臓および小腸で合成されるが、カイロミクロンの合成過程と類似しており、両者とも、トリグリセリドリッチリポ蛋白(Triglycerides Rich Lipoprotein)とも呼ばれている³¹⁾。

VLDLは、LPLによつてその中にあるトリグリセリドが水解を受け、そのほとんど全てがLDLに変化していくことが、GoldsteinとBrown¹⁸⁾によつて説明されている。彼らは、この代謝の間に99%のトリグリセリド、85%以上の遊離コレステロールおよびリン脂質、アポCお

よびアポEもほとんど除去されるが、アポBの量は変化しないことを認め、1個のVLDLから1個のLDLが生成することを示唆した。

また、LDLは、粒子を構成する脂質成分の大部分がコレステロールであることより、コレステロールリッチリポ蛋白 (Cholesterol Rich Lipoprotein) とも呼ばれている⁵¹⁾。

LDLの異化については、Smiderman⁵²⁾らが肝臓を摘出したブタと正常のブタの両者において、 ^{125}I -LDLの異化を比較し、肝摘出を行なったブタの方がLDLの異化がむしろ亢進していたことから、肝臓がLDLの異化部位ではないことを証明している。一方、GoldsteinとBrown¹⁸⁾は、ヒトの皮膚線維芽細胞の組織培養において線維芽細胞がLDLを取り込み、異化することを認め、LDLが肝以外の末梢組織において異化されることを示した。この取り込みは、LDLリセプターを介して行われ、コレステロールを細胞内に取り込んだりして細胞膜を構成するための重要な役割を果たしている。この経

路による LDL の代謝は、LDL pathway と呼ばれて
いる。

以上のように、VLDL, LDL は、コレステロ
ールを肝臓から末梢の組織へと運搬する役割
を担っており、血液中に両者が過剰に存在す
る状態は、動脈硬化の促進因子となることが
示唆されている。⁴⁷⁾ 馬淵⁴³⁾らは、LDL が特異的に
増加する家族性高コレステロール血症では、
虚血性心疾患の頻度が一般人の10倍以上であ
ったことから、LDL が最も動脈硬化促進作用
が強いことを示唆している。

VLDL, LDL が動脈硬化の促進因子となるこ
とに対し、HDL は抗動脈硬化作用を持つて
いることが示唆されており、HDL と動脈硬化
に関する研究は生化学的基礎、あるいは疫学
的な方面からの多くの研究者によってもなされ
ている。¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾¹³⁾

Radding⁵³⁾らは、ラット肝組織切片において〔
¹⁴C〕Lencine のリポ蛋白の取り込みを検討し、
肝臓で HDL が合成されていることを報告した。

また、Windmueller⁸¹⁾らは、小腸、盲腸および口側結腸を腸間膜とともに取り出し、^{3H} Lysine を含む灌流液で血管系を5時間灌流することにより、HDLアポ蛋白が腸管で合成され²²⁾ていることを示した。さらに、Hamilton, Green²⁰⁾らは、肝臓および腸管で合成されるHDLは、その生合成時には円盤形をしており、90%以上が極性脂質と蛋白で構成されていることを報告した。

一方、TallとSmall⁸⁷⁾は、「リン脂質および水溶性のアポ蛋白が一緒にカイロミクロンからHDLに転送される」、「ラット心臓灌流によるVLDLトリグリセリドの水解により、VLDL中に存在していたリン脂質とアポCを含む円盤状HDLが形成される」、「LPLはカイロミクロンおよびVLDLのトリグリセリドを選択的に除去することにより、リポ蛋白の中心の縮小をきたす」などの実験事実をまとめ、トリグリセリドリッチリポ蛋白からHDLの前駆体が生成される経路のあることを提示した。

したがって、HDLは他のリポ蛋白と異なり、
 肝臓および腸管から直接に合成される系と、
 トリグリセリドリッチリポ蛋白がLPLによ
 る水解を受けた時に付随的に合成される系
 の2種がある。このようにして合成されたHDL
 は、血液中でレシチン・コレステロール・ア
 シルトランスフェラーゼ (Lecithin-Cholesterol-
 acyltransferase : LCAT) の作用により、動脈壁
 などの末梢組織から遊離コレステロールを受
 け取りHDL自身へエステル型コレステロール
 として取り込み、肝臓へコレステロールを運
 搬する作用を持つていることを Glomset¹⁶⁾ は示
 唆している。また、HDLに多量に含まれてい
 るアポA-IはLCATの活性化作用を持ち、その
 他にHDLに含まれていいるアポC-IやアポD¹⁸⁾
 LCATの活性化作用を持つていることを Soutar
 が示している。

3. リポ蛋白代謝の関連酵素

1943年、Hahn²¹⁾ はヘパリンの静注によつて、

イヌの食餌性高脂血症が、すみやかに清澄化する現象を見出した。

その後、この現象が高脂血血清の清澄化作用をもつリパーゼの出現によることが明らかにされ、清澄因子 (clearing factor) と呼ばれた。²⁸⁾ Kane³¹⁾らは、この清澄因子がリポ蛋白の状態のトリグリセリドを水解することから、リポ蛋白リパーゼと名付けた。

一方、近年になり、Krauss³⁴⁾らによりヘパリン静注後のリパーゼ活性は、肝外性のリポ蛋白リパーゼ (LPL) と肝性トリグリセリドリパーゼ (Hepatic-Triglycerides Lipase: H-TGL) の二種類を含むことが見出された。

LPLは、脂肪組織や心筋に多く、骨格筋、乳腺、肺にも存在し、これらの組織の毛細管壁に付着していることがKane³¹⁾らによつて報告されている。また、LaRosa³⁸⁾らはLPLがVLDLとHDLに含まれる活性化因子を必要とし、さらにアポC-IIが最も重要な活性化因子であることを示した。

このアポC-IIは、カイロミクロンやVLDLがLPLによつてトリグリセリドの水解を受ける時に、HDLとの間で転送されることをHavel²⁷⁾らが証明した。

これらのことから、LPLは血液中のトリグリセリドを調節してゐると考えられ、高脂血症の成因や治療に関連して注目されてゐる。

一方、H-TGLは、肝臓由来のリパーゼであり、リポ蛋白の代謝に関与してゐる²⁷⁾。しかしその生理的意義はまだよくわかってゐない。

Kuusi²⁷⁾らは、HDLの亜分画にH-TGLが深く関与してゐることを示唆してゐる。また、Krauss²⁷⁾らは、各種の高脂血症患者のヘパリン静注後血漿のH-TGLが選択的に低下してゐることを見出した。同時に彼らは、リポ蛋白の分析も行ない、患者血漿中にトリグリセリドの多いLDLが増加してゐることを観察した。このことから、H-TGLがVLDLの中間代謝産物の処理に関与してゐることが示唆されてゐる。

LPLとH-TGLの両酵素の分別定量法として

は、(1) 1 M NaCl または protamin sulfate により、LPL 活性を抑制して行う方法²⁴⁾、(2) heparin sepharose affinity chromatography による方法⁴⁸⁾、(3) 抗H-TGL 血清を用いて行う方法²⁷⁾などが試みられている。

Huttner²⁸⁾らは、LPL と H-TGL の分別測定から性や年齢によつて、これらに差のあることを報告している。すなわち、LPL は女性が男性よりも高く、H-TGL については逆に男性の方が高かった。そして、LPL は加齢に伴い低下する傾向にあった。

以上、2つの酵素はトリグリセリドを水解し、リポ蛋白のトリグリセリドの代謝に関与している。他方、リポ蛋白のコレステロールの代謝に深く関与している酵素には、LCATがある。

Glomset¹⁵⁾は、LCAT の作用により血中のコレステロールエステルが形成されることを明らかにした。Soutar⁵⁸⁾は、ヒト血清のアポ蛋白と、LCAT の関係を検討し、アポA-I とアポC-II に

LCAT活性化作用があることを見出し、アポA-II, アポC-II, アポC-IIIにはLCAT活性化作用はなく、むしろアポA-IによるLCAT活性化作用はアポA-II, アポC-IIによって阻害されると報告している。

また、家族性LCAT欠損症の患者の検査より、コレステロールエステルとリゾレシチンの減少と遊離コレステロールとレシチンの増加が認められた。さらに、LCATの作用を受けない円盤状HDLに類似した小分子のHDLが見出されている¹⁾。

4. 身体運動とリポ蛋白

Carlson¹⁰⁾らは、90kmのスキーレースに参加した競技者を対象とした測定から、VLDLとHDLコレステロール濃度の減少を見出した。

Wood¹²⁾らは、前年に週当たり25km以上走っている平均年齢47歳の男子ランナー41名と同世代の比較対象者743名の血漿リポ蛋白の測定を行なった。その結果、ランナーは、LDLコ

レステロール濃度が有意に減少しており、
HDLコレステロール濃度が有意に増加したこ
とを報告している。

LehtonenとViikari³⁹⁾は、週当たり4回ないしそ
れ以上の頻度で、少なくとも週当たり25km以
上ランニングあるいはスキーを規則的に行な
っている平均44歳の男子23名(Aグループ)、
そのコントロールとして、平均47歳の健康な
男子15名(Bグループ)および週当たり25km
未満の運動を行なっている平均22歳の男子10
名(Cグループ)のHDLコレステロールを比
較したところ、Aグループが、Bグループあ
およびCグループのいずれのグループよりも有
意に高かったことを報告している。

さらに、Lopez⁴²⁾らは、平均22歳の13名の男子
学生の血清脂質およびリポ蛋白に及ぼす運動
の効果を検討した。彼らは、ジョギング、自
転車こぎ、および体操からなる30分間の運動
を週4回の頻度で7週間に行なうトレーニング
させ、トレーニングによつてLDLコレス

テロール濃度、およびVLDLの有意な低下を示し、HDLは約14%上昇したことを報告している。

以上の報告や、その他の横断的研究あるいは、トレーニング前後の縦断的研究から身体運動により、血清トリグリセリドとVLDLトリグリセリドの減少^{4), 5), 47), 60)}あるいは不変⁴⁾、LDLコレステロールの減少^{4), 13)}あるいは不変^{4), 5), 60)}、HDLコレステロールの増加^{5), 13), 47), 23)}あるいは不変⁴⁾が報告されている。

これらの事実に対し⁵⁰⁾ Nikkiläらは、短距離走者と長距離走者の脂肪組織のLPL活性とHDLコレステロール濃度を測定し、脂肪組織のLPL活性とHDLコレステロール濃度の間に有意な正の相関関係があることを示し、さらに長距離走者が、両方とも有意に高いレベルにあることを報告している。彼らは、このことから、トレーニングによるHDLコレステロール濃度の増加とVLDLトリグリセリド濃度の減少を説明している。

一方、Kozłowski⁵¹⁾らは、イヌにおいて、3時

間のトレッドミル走行中の骨格筋(大腿四頭筋)のLPL活性を測定した。彼らは、LPL活性が最初の1時間でプラトーに達し、運動終了後1時間でもとのレベルに減⁴¹⁾らしたことを報告した。また、Lithell⁴¹⁾らは、85kmのスキー走行を行なうことにより、骨格筋のLPL活性は220%まで上昇したことを報告している。

さらに、Borensztajn⁶⁾らは、ラットに3ヵ月間のトレーニングを行なわせ骨格筋LPLと心筋LPLの活性を測定した。トレーニングは、トレッドミル走行を週当たり5日行ない、10分間毎に30秒間の急走を入れて120分間行なわれた。このトレーニングの結果、骨格筋LPLは2~4.5倍に増加しており、心筋LPLにおいては活性の増加が認められなかった。Askew³⁾らも、同様な報告をしている。

これに対し、Marniemi⁷⁵⁾らは、異なる強度のトレーニングを行なっている28名の男性について、脂肪組織LPL活性とヘパリン静注後の血漿のLPLとH-TGLの活性を測定し、ユニ

トロール群と比較検討した。このより、脂肪組織LPLはトレーニング群が増加している傾向にあり、トレーニング強度別に分類すると、トレーニング強度に伴い増加傾向にあることを見出した。また、ヘパリン静注後の血漿のLPL活性は、コントロール群との間に差は見られず、H-TGLの活性が有意に低下していた。

Ⅲ. 実験方法

1. 被験動物

5週齢の Sprague Dawley 系雄ラットを、本研究において使用した。

飼育は、 $30 \times 40 \times 15$ 、および $26 \times 39 \times 16$ cm の大きさの飼育用ケージにおいて行ない、1ケージに3~6匹のラットを入れた。水と固型飼料(オリエンタル酵母MF)は、ラットが自由に摂取できるようにして与えた。

飼育場所は、順天堂大学習志野校舎環境衛生学実験動物舎であり、動物舎の温度、湿度および日照時間等の管理は行なわれなかった。尚、ラットの飼育期間は、昭和57年9月20日から11月26日までの2ヵ月間であった。

2. 水泳トレーニング実験計画

購入された5週齢のラットは、1週間の予備飼育の後、無作為に2群に分けられた。各群の平均体重は、 155.1 ± 12.3 g, $146.6 \pm$

11.8gであり、両群間に統計的に有意な差がないことを確認した。前者の群をコントロール群として、ケージ内だけで通常の飼育をし、後者の群はトレーニング群として、遊泳による水泳トレーニングを行なわせた。

水泳トレーニングは、水位を45cmに保ち、60×80×60cmの大きさの水槽で行なった。水温は、 $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ に保たれるように、水流ポンプと温度コントローラーにより管理した。また、水泳時間は10～120分まで次第に延長していき、トレーニングは、週当たり6回の頻度で、12週間にわたって行なった。

3. 採血方法と血清処理

12時間以上絶食中のラットをエーテル麻酔下で、胸部切開し、心穿刺により採血した。

採血した血液は、採血から12時間以内に遠心器 (Model KS-5000 P, KUBOTA) により、毎分3000回転で血清に分離した。得られた血清は、 4°C で保存し、採血後3日以内に各種

の測定を行なった。

また、ラットとヒトの血清リポ蛋白の比較についで検討するために、健常な被験者1名から採血を行ない、同様にし得られた血清についで測定を行なった。

4. 血清脂質の測定

血清トリグリセリドと血清総コレステロールの濃度を測定した。

血清トリグリセリド濃度は、TG-キット-GN (日本商事) を用いて測定した。検体0.02 ml に発色試薬3.0 ml を加え、37℃で15分間発色反応させ、分光光度計 (UV-140-02, 島津製作所) によって、波長505 nm でその吸光度を測定した。

また、血清総コレステロール濃度は、TC-キット-K (日本商事) を用いて測定した。検体0.02 ml に発色試薬3.0 ml を加え、37℃で15分間発色反応させ、分光光度計により、波長500 nm でその吸光度を測定した。

5. 電気泳動法によるリポ蛋白分析

1) 血清リポ蛋白分画パターンへの測定

Lipoprotein Electrophoresis System ; Fat Red 7B (Gelman) を用い、セルロース・アセテート膜 (Separaphore III ; Gelman) を支持体とし、検体を 150 V の定電圧で 30 分間泳動を行なった。分離されたリポ蛋白分画の脂質部分を Fat Red 7B 液により 15 分間染色し、蒸留水中で 3 ~ 5 分間脱色し、デンストメーター (Model DCD-16 ; Gelman) を用いて、波長 525 nm で測定した。

2) 血清リポ蛋白コレステロールの測定

スーパ-エ-12X・HDLコレステロールキット (Helena Laboratories) を用い、セルロース・アセテート膜 (Titan III-HDL ; Helena Laboratories) を支持体とし、検体を 150 V の定電圧で 35 分間泳動した。分離されたリポ蛋白分画にコレステロール発色試薬を加え、37°C で 25 分間反応させ、デンストメーターを用いて波長 505 nm で測定した。さらに、各分画

の百分率と、同検体から別に求めた血清総コレステロール濃度から、各リポ蛋白分画中のコレステロール濃度を算出した。

6. 電気泳動法による血清蛋白分析

血清リポ蛋白分画パターンの測定(項(p. 24-1.))で前述した泳動条件で、検体を泳動したセルロース・アセテート膜を、ボンソーS液(Gelman)で染色し、5%酢酸溶液で脱色固定した。これをデニシトメーターにより波長525nmで測定した。

7. 超遠心法による血清リポ蛋白分析

Chungら¹¹⁾の方法に従って、血清リポ蛋白の超遠心分析を行なった。

検体の血清に臭化カリウム(KBr)を加え、比重を1.30に調整し、遠心チューブに入れ、これに比重1.006の塩化ナトリウム(NaCl)溶液を重ねた。このチューブを垂直ローター(PR750T; 日立)に装着し、超遠心器(

70P-73 ; 日立) を用いて、150 分間超遠心を行なった。

遠心終了後、試料を Density Gradient Fractionator (DGF-U ; 日立) を用いて分取した。同時に UV モニター (UV-DIRECTOR UVLOG-5III ; 応用分光) を用いて、280 nm の吸収を測定し、ペン書きレコーダー (056 ; 日立) によって記録した。また、分取された各分画の比重は、アッベ屈折計 (中村製作所) を用いて測定した。

8. ヘパリン静注後のリパーゼ活性 (Post-heparin Lipolytic Activity : PHLA) の測定

PHLA 測定のための採血は、Nakai らの²⁵⁾の方法と同様に、ラット体重 250 g 当たり 50 単位のヘパリンを静注してから 30 分後に行なった。また、ヘパリンの静注は、ラット尾静脈より行なった。

PHLA の測定は、久城らの²⁶⁾の方法を一部修正して行なった。ヘパリン静注後の血清 0.2 ml

を、^{注)}37℃の活性化基質緩衝液1.0 ml中で作用させる際の反応時間を検討し、10分値と20分値の間に直線関係のあることを確認した。この10分間の反応時間において生成した脂肪酸をクロロホルムで抽出し、発色させ、分光光度計により、波長480 nmで比色定量した。その量から、リパーゼ活性 ($\mu\text{mole FFA/ml/min}$) を求めた。

注) 活性化基質緩衝液 (pH 8.5)

ウシアルブミン 2g をアセチル緩衝液 (0.1M NH_4OH 液 11 容と 0.1M NH_4Cl 液 25 容を混和する) 90 ml に溶解し、Intralipid (大豆油) 10 ml を加えて基質緩衝液とする。

この基質緩衝液に正常ラット血清を 10:1 の割合で混和し、37℃で 1 時間活性化させたもの。

IV. 実験結果

1. ヒトとラットの血清リポ蛋白分画パターン

1) ヒトの血清リポ蛋白分画パターン

ヒト血清はセルロース・アセテート膜を支持体として電気泳動を行なうと、 α リポ蛋白分画は、血清蛋白分画の α -1グロブリン領域に泳動される。また、 β と $pre\beta$ リポ蛋白分画は、それぞれ血清蛋白分画の β , α -2グロブリン領域に泳動される⁽⁴⁾。

ヒト血清をセルロース・アセテート膜電気泳動法により、分析した結果を図Iの下部に示した。同図中の実線が示すように、ヒトの血清リポ蛋白パターンは、 α , $pre\beta$, β の3分画として得られた。

また、同一の泳動条件で得られた血清蛋白分画のパターンを同図中に破線で示した(図I)。血清蛋白分画は陽極側より、アルブミン, α -1グロブリン, α -2グロブリン, β グ

ロブリン, とグロブリンの5分画が得られた。血清リポ蛋白と血清蛋白の各分画を比較すると、それぞれの電気泳動上の位置関係は、前述の事実と一致していたことを確認した。

一方、ヒトの血清リポ蛋白においては、電気泳動法による α , pre β , β の各分画が、それぞれ、超遠心法による分類のHDL, VLDL, LDLに相当する²⁴⁾。そこで、ヒトの血清リポ蛋白を超遠心法により分離し、電気泳動法の分画との対比を行なった。

図2に、超遠心法によるヒトの血清リポ蛋白分画を示した。超遠心法によつて、ヒトの血清リポ蛋白分画は比重の異なる3分画が得られた。これらの分画を電気泳動法で分析すると、HDL分画が α 分画に泳動された。

2) ラットの血清リポ蛋白分画パターン

ラット血清をセルロース・アセテート膜電気泳動法により、分析した結果を図1の上部に示した。図中の実線が示すように、ラット

の血清リポ蛋白パターンが3分画として得られたが、ヒトのパターンとは異なっていた。同一の泳動条件で得られた血清蛋白分画のパターンを同図中に破線で示した。ラットの血清蛋白分画のパターンは、ヒトのそれとは異なっており、アルブミン分画の泳動距離が短かった。ラットの血清リポ蛋白と血清蛋白の各分画を比較すると、それぞれの電気泳動上の位置関係はヒトの場合とは異なっており、リポ蛋白の1分画が、アルブミンより陽極側へ先行して存在した。さらに、リポ蛋白分画の脂質組成を検討するためにリポ蛋白エステルロールの分析を行った。これにより、アルブミンよりも先行したリポ蛋白の分画には、コレステロールが多く含まれていることを確認した。

また、ラット血清において超遠心法による血清リポ蛋白の分離を行ない、その結果を図示した。これによって得られた各分画を電気泳動法において分析すると、ラット血清

の最も比重の高いリポ蛋白分画は、電気泳動法において最も陽極側に泳動された。

これらの結果と、Yokoi⁽⁴⁾らの方法から本研究では、電気泳動法によるラットのリポ蛋白分画を陽極側から、 α , $pre\beta$, β とした。

2. 水泳トレーニングに伴う変化

1) ラットの体重変化

トレーニング期間中のトレーニングの影響を観察するために、ラット体重の変化を測定した。図4に、水泳トレーニングの進行とそれに伴うラット体重の変化を示した。

水泳トレーニングが開始されてから6週目(12週齢時)の体重は、トレーニング群(331.3 ± 27.2 g)が、コントロール群(373.5 ± 33.3 g)よりも少なく、その差は統計的に有意であった($p < 0.01$)。以後、水泳時間が増加していくと、両群間の差は次第に大きくなる傾向にあった。

2) 血清脂質

水泳トレーニングによる血清脂質の濃度の変化を観察するために、血清トリグリセリド濃度と血清コレステロール濃度を測定した。その結果を表1に示した。

血清トリグリセリド濃度は、トレーニング群 (14.33 ± 3.22 mg/dl) がコントロール群 (25.79 ± 3.09 mg/dl) に比べて有意に低値を示した ($p < 0.01$)。血清総コレステロール濃度はトレーニングによつて、9.5%の減少を示したが、統計的に有意ではなかった。

3) 血清リポ蛋白

a. 血清リポ蛋白分画パターン

脂質代謝をリポ蛋白代謝の点から検討するために、血清リポ蛋白分画パターンを測定し、その結果を表2に示した。

α , $pre\beta$ 分画は、各々、トレーニング群がコントロール群よりも増加の傾向にあったが、両群の差は統計的に有意ではなかった。 β 分

画は、トレーニング群 ($9.62 \pm 2.91\%$) が、
コントロール群 ($19.49 \pm 3.64\%$) よりも有意
に低値であった ($p < 0.05$)。

b. 血清リポ蛋白分画コレステロール

水泳トレーニングによるリポ蛋白分画中の
脂質組成の変化を観察するために、リポ蛋白
分画コレステロールを測定した。また、ヘパ
リン静注の影響を確認するために、ヘパリン
静注後の血清 (p.h.) についても同様の測定
を行なった。これらの結果を表3に示した。

ヘパリンを静注していない正常状態で採血
されたラット血清 (norm.) の測定では、各リ
ポ蛋白分画コレステロール濃度にトレーニン
グの影響が観察されなかった。

コントロール群におけるヘパリン静注がリ
ポ蛋白パターンに及ぼす影響を見るために、
norm. 血清と p.h. 血清を比較した。αリポ蛋白
分画ではそのコレステロール濃度において、
norm. 血清 ($15.32 \pm 4.83 \text{ mg/dl}$) に比べて p.h. 血
清 ($32.89 \pm 6.96 \text{ mg/dl}$) が約2倍に増加してあ

り、その差は統計的に有意であった ($p < 0.01$)。逆には、pre β リポ蛋白分画では、norm. 血清 ($22.96 \pm 5.26 \text{ mg/dl}$) に比べて p.h. 血清 ($9.15 \pm 2.51 \text{ mg/dl}$) が、 $1/2$ 以下に減少しており、その差は統計的に有意であった ($p < 0.001$)。

一方、トレーニング群では、 α リポ蛋白分画において p.h. 血清 ($14.97 \pm 1.00 \text{ mg/dl}$) が、norm. 血清 ($13.53 \pm 3.72 \text{ mg/dl}$) に比べて 10.6% 増加していったが、統計的に有意ではなかった。pre β リポ蛋白分画においては、p.h. 血清 ($15.31 \pm 1.72 \text{ mg/dl}$) が norm. 血清 ($18.64 \pm 2.34 \text{ mg/dl}$) に比べて 17.9% の減少を示し、その差は統計的に有意であった ($p < 0.05$)。

すなわち、ヘパリン静注による血清リポ蛋白分画コレステロール濃度の変化は、コントロール群の方がトレーニング群よりも大きかった。

4) ヘパリン静注後のリパーゼ活性 (PHLA)

ヘパリン静注によつて血液中に出現したり

パーゼの活性値を図5に示した。

両群の平均値は、それぞれ 1.88 ± 0.06 ,
 0.82 ± 0.31 ($\mu\text{mole FFA/ml/min}$) であり、ト
ーニング群に著しい活性の低下が見出された。
両群間の差は統計的に有意であった ($p < 0.001$)。

また、測定された PHLA 値と p.h. 血清のリポ
蛋白分画コレステロール濃度との関係を見る
ために、それぞれの相関係数を算出した。図
6 および 7 に示されるように、 α リポ蛋白分
画コレステロール濃度と PHLA 値には、有意な
正の相関関係があった ($r = 0.77$; $p < 0.05$)。
一方、pre β リポ蛋白分画コレステロール濃度
との間には、有意な負の相関関係があった ($r = -0.71$; $p < 0.05$)。

▽. 考察

1. ヒトとラットの血清リポ蛋白パターン
の相違

服部²⁵⁾は、ラットの血清リポ蛋白パターンがヒトや他の実験動物とは異なり、アルブミンよりさらに陽極側にコレステロールを含んだリポ蛋白分画があることを報告している。

この報告に一致して、アルブミンより陽極側に先行したリポ蛋白の存在を確認した。また、このリポ蛋白分画はコレステロールを多く含んでいた。しかし、このリポ蛋白分画が比重で分類されたリポ蛋白分画のどれに相当するかは、解明されていない。

実際に超遠心法において、ヒトとラットの血清リポ蛋白を分析した結果、得られた3分画の比重はそれぞれ一致していた(図2, 3)。さらに、その試料を分取し電気泳動を行なった結果、ヒトとラットの血清リポ蛋白の最も

比重の高い分画は、最も陽極側に泳動された。これらの結果は、本研究で α 分画としたり β 蛋白分画が、HDLであることを支持している。

一方、表3に示されているように、ヘパリン静注による各 β 蛋白分画のコレステロール濃度の変化が認められている。これは、ヘパリン静注によつて血中に遊離したリパーゼの作用によるものであり、このリパーゼには、LPLとH-TGLの2種が存在することが知られている。これらのリパーゼは、 β 蛋白のトリグリセリドを水解する²⁹⁾。したがつて、ヘパリンの影響の大きい β 蛋白分画は、トリグリセリドリッチ β 蛋白のカイロミクロンやVLDLである。TallとSmall³⁹⁾は、トリグリセリドリッチ β 蛋白がLPLによつて分解される時には、円盤状HDLが生成されると述べている。

表3に示されるように、ヘパリン静注による β 蛋白分画コレステロール濃度の減少と α 蛋白分画コレステロール濃度の増

加を認めた。また、図6, 7に示されるように、p.h.血清においてPHLAは、 α リポ蛋白分画コレステロール濃度との間に有意な正の相関関係があり、pre β リポ蛋白分画コレステロール濃度との間には有意な負の相関関係があった。

以上のことから、ヘパリンの静注により血中に遊離したLPLとH-TGLの作用によつて、pre β リポ蛋白分画のコレステロールが α リポ蛋白分画に移行したことが考えられる。したがつて、ラットのpre β リポ蛋白は、トリグリセリドリッチリポ蛋白のVLDLであり、 α リポ蛋白はHDLであることが考えられる。

すなわち、電気泳動法によるリポ蛋白分画は、比重で分類されたリポ蛋白分画と対応することから、ラットの場合でもいえると考えられる。

しかし、血清蛋白と血清リポ蛋白の電気泳動上の位置関係におけるヒトとラットの違いが、どのような原因によるものかは解明され

まいない。セルロース・アセテート膜電気泳動法は、ヒトを対象とした臨床検査用に開発されたものであり、ラット血清に適した泳動条件などを検討し、その分析には慎重を要すると考えられる。

2. 水泳トレーニングと血清リポ蛋白の代謝
 小動物のトレーニング実験は、従来より動物用トレッドミルや水泳が多く用いられている。水泳トレーニングは、装置の簡便さ、一度に多数の動物を扱える等の利点がある。しかし、その運動強度の一定性や運動量の定量化が困難である。

ラットにとって、重りをつけない状態での水泳は、至適な水温では60時間以上可能であり、運動強度としては軽度⁽¹²⁾である。McArdle⁽⁴⁶⁾は、重りをつけない状態での水泳の平均酸素消費量は、安静時の2.7倍に相当することを報告している。したがって、本研究で用いた水泳トレーニングの強度は、ラットにとって

軽度であったと考えられる。

この水泳トレーニングが脂質代謝に及ぼす影響をみるための指標として、血清トリグリセリド濃度と血清総コレステロール濃度を測定した。血清トリグリセリド濃度は、トレーニングにより減少した。血清トリグリセリドは、身体運動のエネルギー源の一部であり、持続性トレーニングによりその濃度は減少することが報告されている⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾。これらの結果は本研究の結果と一致している。

Nikkilä⁽⁵⁰⁾らは、トレーニングによる血清トリグリセリド濃度の低下を次のように説明している。頻繁なトレーニングにより、筋および脂肪組織のトリグリセリドの低下を生じ、適応的にLPLの活性が高くなり、そのため血中トリグリセリドからの取込みが増加する。これらの結果として、血清トリグリセリド濃度の低下が起こると考えた。

また、BrunzellとBierman⁽⁹⁾は、血清イニシユリン濃度の低下により、血清トリグリセリド

濃度の低下を説明している。

一方、血清総コレステロール濃度は水泳トレーニングによつて、9.5%の減少を示したが、統計的に有意な減少ではなかった。

これまでの研究報告では、持久性トレーニングによる血清コレステロール濃度の変化は減少⁴⁾⁴⁰⁾、あるいは不変⁴²⁾⁴³⁾とさまざまに報告されている。血清コレステロールは、筋活動のためのエネルギー源とほならな⁴²⁾ることから、トレーニングの影響は反映されにくいと考えられる。

トレーニングがリポ蛋白粒子に及ぼす影響を見るために、リポ蛋白分画のパターンを測定した。その結果、βリポ蛋白の減少が観察された(表2)。このことから、トレーニングによつて、リポ蛋白粒子の構成脂質の量とその割合が変化していることが示唆される。

また、各リポ蛋白分画のコレステロール濃度は、トレーニングによる変化がなかった(表3)。このことは、血清総コレステロール

濃度が変化しなかったことと合わせて考えると、本研究の水泳トレーニングは、コレステロールの代謝に大きな影響を与えていなかったと考えられる。

一方、p.h.血清においては、トレーニング群とコントロール群の各リポ蛋白分画コレステロール濃度に差が見出された。これはヘパリンによって遊離するリパーゼの影響によると考えられる。表3に示されるように、ヘパリン静注によるリポ蛋白分画コレステロール濃度の変化は、トレーニング群に比べて、コントロール群の方が大きかった。この変化の違いは、ヘパリン静注によって遊離するリパーゼの活性すなわちPHLAの違いによると考えられる。この結果に一致して、PHLA値はトレーニング群に比べてコントロール群が、有意に高い値を示した(図5)。

リポ蛋白の分画パターンとそれに関連する酵素について Nikkilä⁽⁴⁾らは、HDLコレステロール濃度と脂肪組織LPL活性値との間に正の相

関関係があったことを報告している。このことから彼らは、リポ蛋白のトリグリセリドの水解に関係する酵素LPLにより、HDLコレステロール濃度が調節されていると考えた。さらに、彼らは長距離走者が高レベルのHDLコレステロール濃度と脂肪組織LPL活性を持つていることを見出し、持続的トレーニングによりLPL活性が亢進し、それに伴ってHDLコレステロール濃度が上昇すると考えた。

また、Borensztajn⁶⁾らは、ラットにトレッドミル走行によるトレーニングを行わせ、骨格筋のLPL活性が増加したことを報告している。

ところで、PHLAはLPLとH-TGLの活性の和であり、H-TGLの活性が50~60%を占めている。したがって、LPLの活性値を直接表わしてはいない。つまり、水泳トレーニングによるLPL活性の変化は知ることができない。

しかし、Borensztajn⁶⁾らの報告からすると、本研究における水泳トレーニングによるLPLの活性は、軽度の増加あるいは、不変であったこと

が予想される。

一方、Marniemi⁴⁵⁾らは、水泳やラニニング、サッカーなどの異なるトレーニングを行なっている28人の男性について検討した結果、ヘパリン静注後の血漿LPL活性は、トレーニングによる変化はないが、H-TGL活性は低下し、脂肪組織のLPL活性は増加の傾向を示したことを報告している。

このことを考慮すれば、水泳トレーニングによるPHLA値の低下は、H-TGLの活性の低下によっても生ずることが説明できる。また、H-TGLは、軽度のトレーニングで低下することが予想される。

しかし、H-TGLの生理的意義は、まだ明らかにならずはいない。

Kuusi²⁷⁾らは、H-TGLがLDLとHDLコレステロールの取り込みに関与していることを示し、さらに、HDLの亜分画であるHDL₂分画とHDL₃分画の移行に作用する可能性を示唆している。

水泳トレーニングが、PHLA値を有意に低

下させたことは、明らかに LPL および H-TGL の活性に影響を及ぼしていることを示唆している。しかし、リポ蛋白コレステロールのパターンには、その影響が見出されなかった。

トレーニングによる LPL および H-TGL の変化が、リポ蛋白コレステロールパターンに変化を与えるほど大きくなかったことが一因として考えられる。しかし、H-TGL の活性の変化がリポ蛋白代謝に及ぼす影響は、まだ明らかとなっていないため、このことは説明が困難である。

Ⅵ. 結論

ラットに、週当たり6日、12週間の持続的水泳トレーニングを行なった結果、血清トリグリセリド濃度とβリポ蛋白が減少し、ヘパリン静注後のリパーゼ活性は低下した。血清総コレステロール濃度と血清リポ蛋白の各分画中のコレステロール濃度にはトレーニングによる変化が認められなかった。このことから、トレーニングによつて、リポ蛋白分画の変化が認められない場合でも、ヘパリン静注後のリパーゼ活性は変化しえあり、LPLおよびHTGLの活性が変化しえいることが示唆された。

Ⅳ. 要約

持久性トレニングが血清リポ蛋白とその代謝に関わる酵素に及ぼす影響をみるためにラットに週当たり6日、12週間の水泳トレニングを行なわせ、血清脂質、血清リポ蛋白、およびヘパリン静注後のリパーゼ活性値を検討した。合わせて、電気泳動法により分析されたラット血清リポ蛋白分画について若干の検討を加えた。その結果を以下に示す。

- 1) 電気泳動において、アルブミンより陽極側に先行するリポ蛋白分画は他の分画に比べ最も比重が高かった。
- 2) 本研究において、陽極側より α 、pre β 、 β とした各リポ蛋白分画は、ヘパリン静注により、pre β リポ蛋白コレステロール濃度が減少し、 α リポ蛋白コレステロール濃度が増加した。
- 3) 水泳トレニングによつて、血清トリグリセリド濃度と β リポ蛋白が有意に減

少しした。

4) 血清総コレステロール濃度と血清リポ蛋白の各分画中のコレステロール濃度はトレニングによる変化がなかった。

5) ヘパリン静注後のリパーゼ活性は、トレニングによって有意に低下した。

以上の結果から、低強度のトレニングによっても、リポ蛋白コレステロール濃度に変化がない場合でもヘパリン静注後のリパーゼ活性は変化しており、LPLおよびH-TGLの活性が変化していることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本論文作成中、多方面にわたって適切なる御指導、御助言を賜わりました本学生化学研究室、化学研究室、保健体育研究室、医学部中央機器室、国立栄養研究所、ならびに市川市健康増進センターの方に、深く感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Alaupovic, P., W.J. McConathy, M.D. Curry, H.N. Magnani, H. Torsvik, K. Berg and E. Gjone: Apolipoproteins and lipoprotein families in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Scand.J.clin.Lab.Invest., 33(Suppl.137):83-87(1974)
- 2) Anderson, N.G. and B. Fawcett: An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. Pro.Soc.Exp.Biol.Med., 74:768-771(1950)
- 3) Askew, E.W., G.L. Dohm, R.L. Huston, T.W. Sneed and R.P. Dowdy: Response of rat tissue lipases to physical training and exercise. Pro.Soc.Exp.Biol.Med., 141:123-129(1972)
- 4) Berg, A., J. Keul, G. Ringwald, B. Deus and K. Wybitul: Physical performance and serum cholesterol fractions in healthy young man. Clinica Chimica Acta., 106:325-330(1980)
- 5) Birk, T., A. Quan, R. Schroeder, D. Wight and T. Fahey: Effects of different exercise intensities and durations on selected lipoproteins, lipids and body composition. Med.Sci.Sports., 13:97(1981)
- 6) Borensztahn, J., M.S. Rone, S.P. Babirak, J.A. McGarr and L.B. Oscari: Effect of exercise on lipoprotein lipase activity in rat heart and skeletal muscle. Am.J.Physiol., 229:394-397(1975)
- 7) Bragdon, J.H., R.J. Havel and E. Boyle: Human serum lipoproteins. J.Lab.Clin.Med., 48:36-42(1956)
- 8) Brown, R.K., E. Boyle and C.B. Anfinsen: The enzymatic transformation of lipoproteins. J.Biol.Chem., 204:423-434(1953)
- 9) Brunzell, J.D. and E.L. Bierman: Plasma triglyceride and insulin levels in familial hypertriglyceridemia. Ann.Intern.Med., 87:198-199(1977)

- 10) Carlson, L.A. and F. Mossfeld: Acute effects of prolonged, heavy exercise on the concentration of plasma lipids and lipoproteins in man. Acta physiol. scand., 62:51-59 (1964)
- 11) Chung, B.H., T. Wilkinson, J.C. Geer and J.P. Segrest: Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. J. Lipid Res., 21:284-291 (1980)
- 12) Dawson, C.A. and S.M. Horvath: Swimming in small laboratory animals. Med. Sci. Sports., 2:51-78 (1970)
- 13) Dufaux, B., G. Schmitz, G. Assmann and W. Hollmann: Plasma lipoproteins and physical activity. International conference on sports medicine. Muscle in sports. Utrecht 1981. Int. J. Sports Med., 3(Suppl.1):58-60 (1982)
- 14) "Gelman lipoprotein electrophoresis system" Technical Bulletin 28. Gelman Instrument Company: Michigan (1978)
- 15) Glomset, J.A.: The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. Biochim. Biophys. Acta., 65:128-135 (1962)
- 16) Glomset, J.A.: High-density lipoproteins in human health and disease. Adv. Intern. Med., 25:91-116 (1980)
- 17) Gofman, J.W., F.T. Lindgren and H. Elliott: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. J. Biol. Chem., 179:973-979 (1949)
- 18) Goldstein, J.L. and M.S. Brown: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Ann. Rev. Biochem., 46:897-930 (1977)
- 19) Gordon, J.A., W.P. Castelli, M.C. Hjorland, W.B. Kannel, T.R. Dawber: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. Am. J. Med., 62:707-714 (1977)

- 20) Green, P.H.R., A.R. Tall and R.M. Glickman: Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. J. Clin. Invest., 61:528-534 (1978)
- 21) Hahn, P.F.: Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. Science., 98:19-20 (1943)
- 22) Hamilton, R.L., M.C. Williams, C.J. Fielding and R.J. Havel: Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. J. Clin. Invest., 58:667-680 (1976)
- 23) Hartung, G.H., W.G. Squires and A.M. Gotto, Jr.: Effect of exercise training on plasma high-density lipoprotein cholesterol in coronary disease patients. Am. Heart J., 101:181-184 (1981)
- 24) Hatch, F. and R.S. Lees: Advances in lipid research, vol. 6. Academic Press: New York (1968)
- 25) 服部康弘: HDL-コレステロール. 谷本義文編 実験動物の電気泳動法, 60-64, ヘルテ研究所: 浦和 (1982)
- 26) Havel, R.J., B. Pernow and N.L. Jones: Uptake and release of free fatty acids and other metabolites in the legs of exercising men. J. Appl. Physiol., 23:90-96 (1967)
- 27) Havel, R.J., J.P. Kane and M.L. Kashyap: Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J. Clin. Invest., 52:32-38 (1973)
- 28) Huttunen, J.K., C. Ehnholm, M. Kekki and E.A. Nikkilä: Post-heparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in normal subjects and in patients with hypertriglyceridaemia: correlations to sex, age and various parameters of triglyceride metabolism. Clin. Sci. Mol. Med., 50:249-260 (1976)
- 29) Huttunen, J.K., C. Ehnholm, P.K.J. Kinnunen and E.A. Nikkilä: An immunochemical method for the selective measurement of two triglyceride lipases in human postheparin plasma. Clinica Chimica Acta., 63:335-347 (1975)

- 30) Jackson, R.L., J.D. Morrisett and A.M. Gotto, Jr.: Lipoprotein structure and metabolism. Physiol. Rev., 56:259-316 (1976)
- 31) Kane, J.P., D.A. Hardman and H.E. Paulus: Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77:2465-2469 (1980)
- 32) Kostner, G. and A. Holasek: Characterization and quantitation of the apolipoproteins from human chyle chylomicrons. Biochemistry., 11:1217-1223 (1972)
- 33) Kozlowski, S., L. Budohoski, E. Pohoska and K. Nazar: Lipoprotein lipase activity in the skeletal muscle during physical exercise in dogs. Pflügers Arch., 382:105-107 (1979)
- 34) Krauss, R.M., H.G. Windmueller, R.I. Levy and D.S. Fredrickson: Selective measurement of two different triglyceride lipase activities in rat postheparin plasma. J. Lipid Res., 14:286-295 (1973)
- 35) Krauss, R.M., R.I. Levy and D.S. Fredrickson: Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. J. Clin. Invest., 54:1107-1124 (1974)
- 36) 久城英人, 高野圭以, 福井巖: リポ蛋白リパーゼ測定法. 臨床病理, 特 21: 110-123 (1973)
- 37) Kuusi, T., P.K.J. Kinnunen and E.A. Nikkilä: Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins in vivo. FEBS Letters., 104:384-388 (1979)
- 38) LaRosa, J.C., R.I. Levy, P. Herbert, S.E. Lux and D.S. Fredrickson: A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41:57-62 (1970)
- 39) Lehtonen, A. and J. Viikari: Serum triglycerides and cholesterol and serum high-density lipoprotein cholesterol in highly physically active men. Acta Med Scand., 204:111-114 (1978)

- 40) Lipson, L.C., R.O. Bonow, E.J. Schaefer, H.B. Brewer, F.T. Lindgren: Effect of exercise conditioning on plasma high density lipoproteins and other lipoproteins. Atherosclerosis., 37:529-538 (1980)
- 41) Lithell, H., K. Hellsing, G. Lundqvist and P. Malmberg: Lipoprotein-lipase activity of human skeletal-muscle and adipose tissue after intensive physical exercise. Acta physiol. scand., 105:312-315 (1979)
- 42) Lopez-S, A., R. Vial, L. Balart and G. Arroyave: Effect of exercise and physical fitness on serum lipids and lipoproteins. Atherosclerosis., 20:1-9 (1974)
- 43) 馬淵 宏: 家族性高コレステロール血症の虚血性心疾患とアキレス腱厚. 心臓., 9: 417 (1977)
- 44) Mahley, R.W.: Atherogenic hyperlipoproteinemia. Med. Clin. North Amer., 66:375-402 (1982)
- 45) Marniemi, J., P. Peltonen, I. Vuori and E. Hietanen: Lipoprotein lipase of human postheparin plasma and adipose tissue in relation to physical training. Acta Physiol. Scand., 110:131-135 (1980)
- 46) McArdle, W.D.: Metabolic stress of endurance swimming in the laboratory rat. J. Appl. Physiol., 22:50-54 (1967)
- 47) Melish, J., D. Bronstein, R. Gross, D. Dann, J. White, H. Hunt and W.V. Brown: Effect of exercise training in type II hyperlipoproteinemia. Circulation., 57 and 58 (Suppl. II):38 (1978)
- 48) Nakai, T., S. Yamada, T. Tamai, T. Kobayashi, T. Hayashi and R. Takeda: The effects of streptozotocin diabetes on hepatic triglyceride lipase activity in the rat. Metabolism., 28:30-40 (1979)
- 49) 中村 治雄: リポ蛋白の代謝. 臨床検査., 25:741-749 (1981)

- 50) Nikkilä, E.A., M-R. Taskinen, S. Rehunen and M. Härkönen: Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of runners: relation to serum lipoproteins. Metabolism., 27: 1661-1671 (1978)
- 51) Nilsson-Ehle, P., A.S. Garfinkel and M.C. Schotz: Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. Ann. Rev. Biochem., 49: 667-693 (1980)
- 52) Paganan, A.: Polymorphic apoprotein E in very low density lipoprotein. Atherosclerosis., 35: 351-357 (1980)
- 53) Radding, C.M., J.H. Bragdon and D. Steinberg: The synthesis of low- and high-density lipoproteins by rat liver in vitro. Biochim. Biophys. Acta., 30: 443-444 (1958)
- 54) Schaefer, E.J., L.L. Jenkins, H.B. Brewer, Jr.: Human chylomicron apolipoprotein metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80: 405-412 (1978)
- 55) Shibayama, H. and H. Ebashi: A study on the effect of long-term physical training of adult men. Bull. Physical. Fitt. Res. Inst., 34: 1-9 (1976)
- 56) Siegel, W., G. Blomqvist and J.H. Mitchell: Effects of a quantitated physical training program on middle-aged sedentary men. Circulation., 41: 19-29 (1970)
- 57) Sniderman, A.D., T.H. Carew, J.G. Chandler and S. Steinberg: Paradoxical increase in rate of catabolism of low-density lipoproteins after hepatectomy. Science., 183: 526-528 (1974)
- 58) Souter, A.K.: Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. Biochemistry., 14: 3057-3065 (1975)
- 59) Tall, A.R. and D.M. Small: Current concepts Plasma high-density lipoproteins. New Eng. J. Med., 30: 1232-1236 (1978)

- 60) Webster, W.A., D.P. Smith, J.C. LaRosa, R. Muesing and P.K. Wilson: Effect of twelve weeks of jogging on serum lipoproteins of middle-aged men. Med. Sci. Sports., 10:55 (1978)
- 61) Windmueller, H.G., P.N. Herbert and R.I. Levy: Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. J. Lipid Res., 14:215-223 (1973)
- 62) Wood, P.D., W. Haskell, H. Klein, S. Lewis, M.P. Stern and J.W. Farquhar: The distribution of plasma lipoproteins in middle-aged male runners. Metabolism., 25:1249-1257 (1976)
- 63) Wood, P.D., W.L. Haskell, M.P. Stern, S. Lewis and C. Perry: Plasma lipoprotein distributions in male and female runners. Ann. N. T. Acad. Sci., 30:748-763 (1977)
- 64) Yokoi, F., Y. Igarashi and R. Suzue: Effects of ethionine feeding on fatty liver and plasma lipoprotein fractions in rats. J. Nutr., 112:405-409 (1980)

Table 1: Serum triglycerides, total-cholesterol concentrations and body weight of training and control groups.

GROUP	Triglycerides (mg/dl)	Total- cholesterol (mg/dl)	Body weight (g)
TRAINING (N = 6)	14.33** ±3.22	43.07 ±3.16	322.50*** ±24.11
CONTROL (N = 6)	25.79 ±3.09	47.60 ±6.71	401.67 ±26.08

Values are means ± SD. Significant difference between the two groups: $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$.

Table 2: Electrophoretic lipoproteins of training and control groups.

GROUP	Lipoprotein fractions		
	Alpha	Pre-beta	Beta
TRAINING (N = 6)	42.77 ±4.12	47.60 ±3.76	9.62* ±2.91
CONTROL (N = 6)	36.66 ±6.82	43.85 ±4.14	19.49 ±3.64

Values are means ± SD in percentage. Significant difference between the two groups: $P < 0.05^*$.

Table 3: Lipoproteins cholesterol from normal serum and postheparin serum in training and control groups.

GROUP	Lipoprotein fractions			
	Alpha	Pre-beta	Beta	
TRAINING	norm. (N=6)	13.53 ± 3.72 (31.15 ± 6.99)	18.64 ± 2.34 (43.56 ± 6.60)	10.90 ± 1.55 (25.28 ± 3.00)
	p.h. (N=4)	14.97 ± 1.00 (34.48 ± 1.82)	15.31 ± 1.72 (35.32 ± 6.40)	13.52 ± 4.16 (30.20 ± 7.43)
CONTROL	norm. (N=6)	15.32 ± 4.83 (32.40 ± 9.08)	22.26 ± 5.26 (46.42 ± 6.82)	10.01 ± 2.23 (21.17 ± 4.28)
	p.h. (N=4)	32.89 ± 6.96 (59.64 ± 9.08)	9.15 ± 2.51 (16.34 ± 1.89)	12.88 ± 3.15 (24.01 ± 6.55)

"Norm." indicates normal serum, and "p.h." indicates postheparin serum. Values are means ± SD in mg/dl. Significant difference between the two groups: P < 0.05*, P < 0.01**, P < 0.001***.

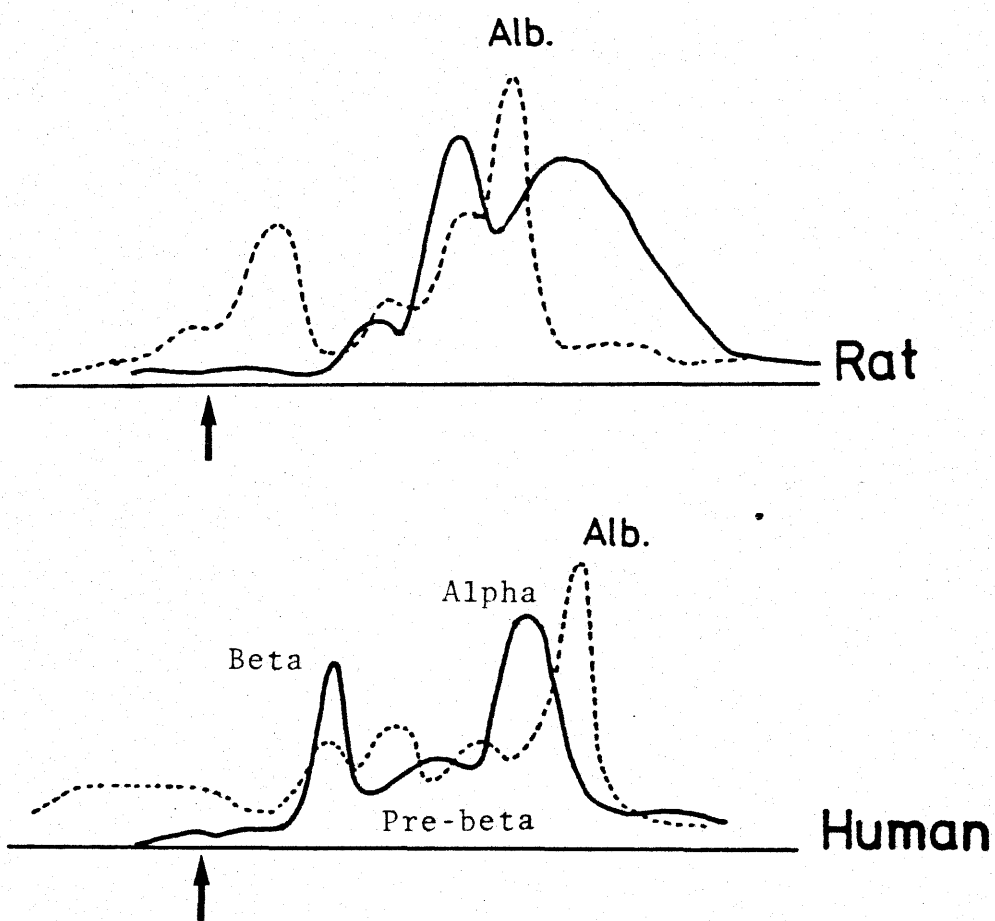


Fig. 1: Patterns of lipoproteins (solid line) and proteins (broken line) in serum of rat and human. The arrows mark the points of application. "Alb." means albumin fraction.

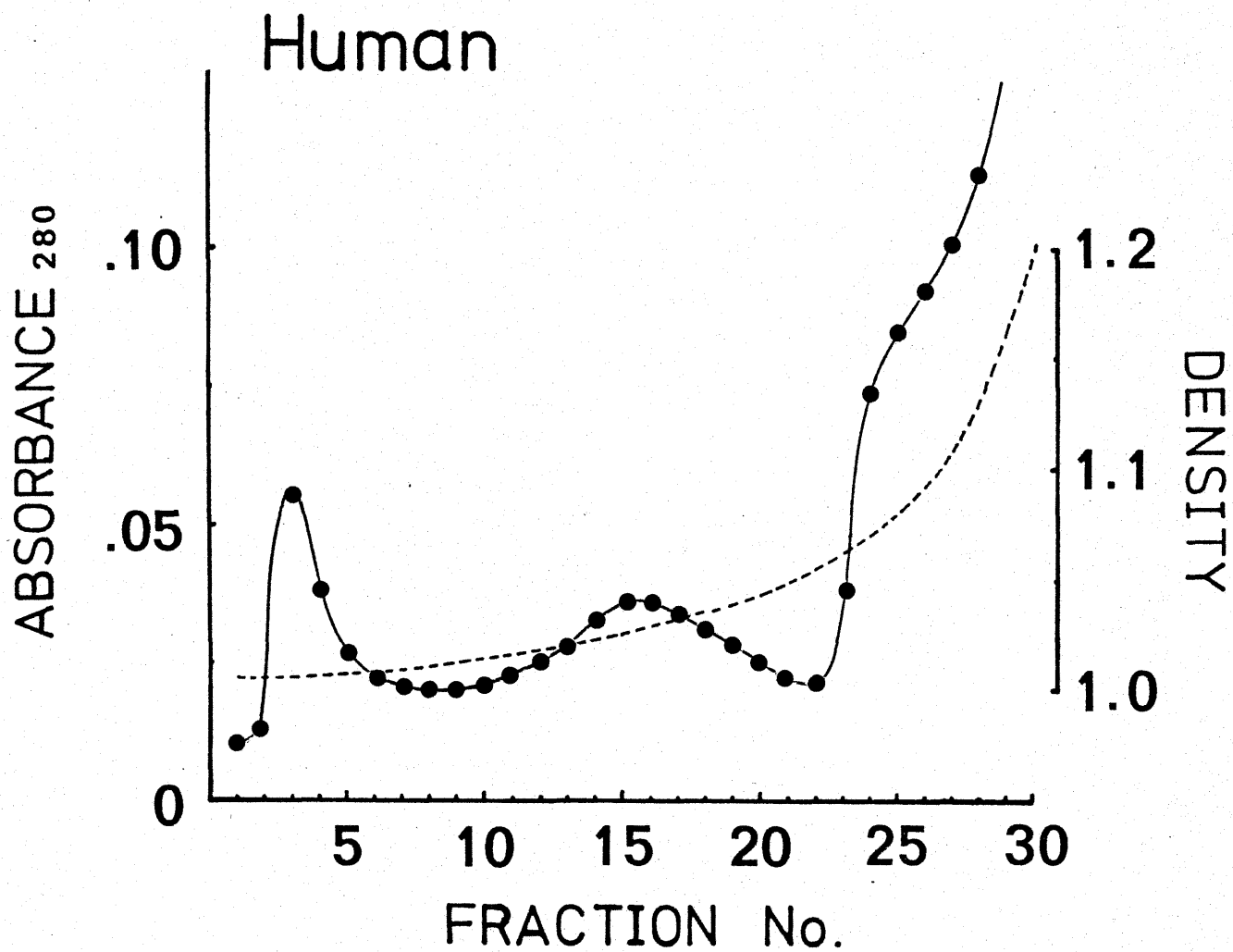


Fig. 2: Lipoprotein ultracentrifugation of human serum. The solid line indicates lipoprotein pattern (HDL, LDL and VLDL) and the broken line indicates density of lipoprotein fractions.

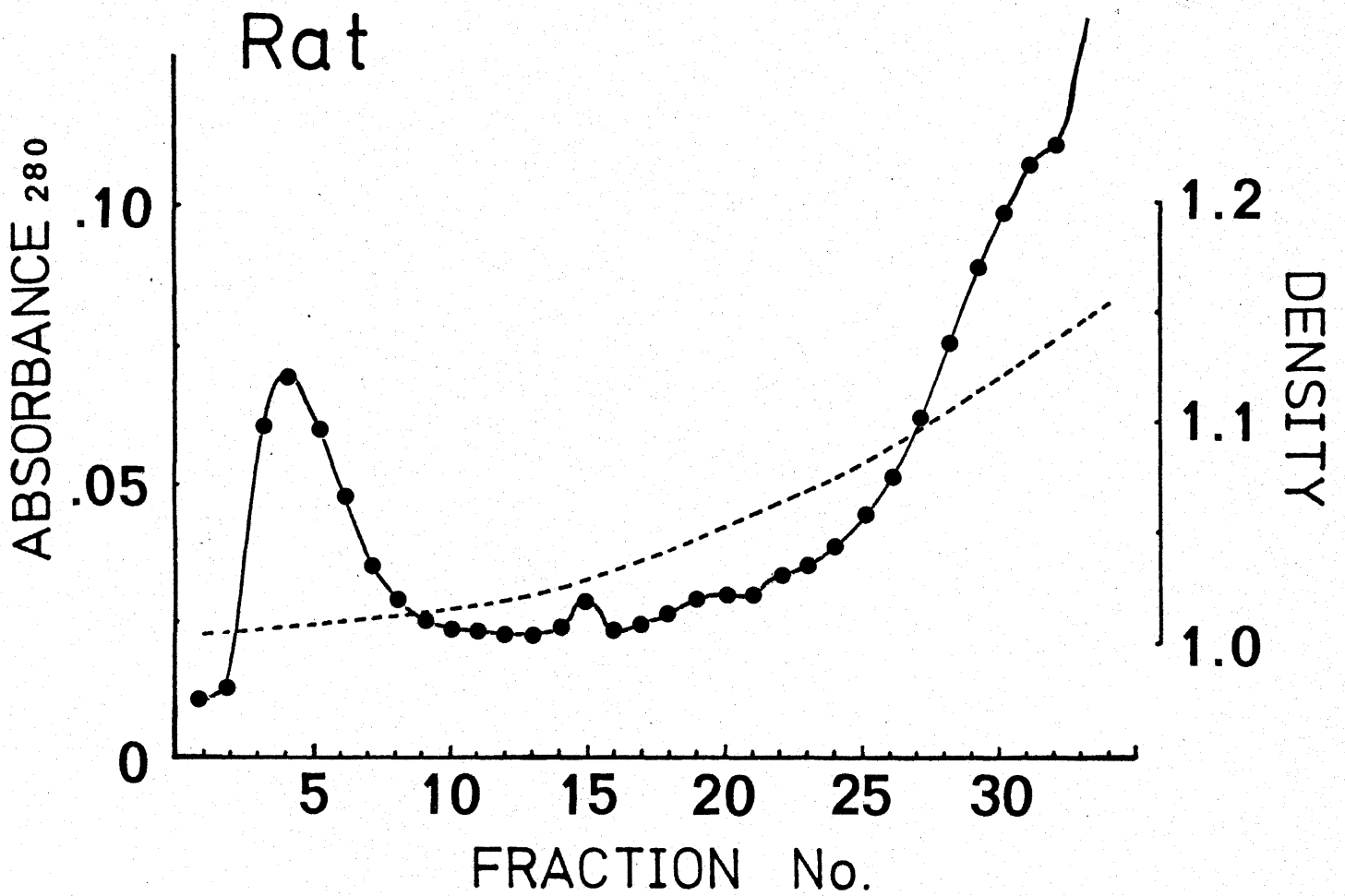


Fig. 3: Lipoprotein ultracentrifugation of rat serum. The solid line indicates lipoprotein pattern (HDL, LDL and VLDL) and the broken line indicates density of lipoprotein fractions.

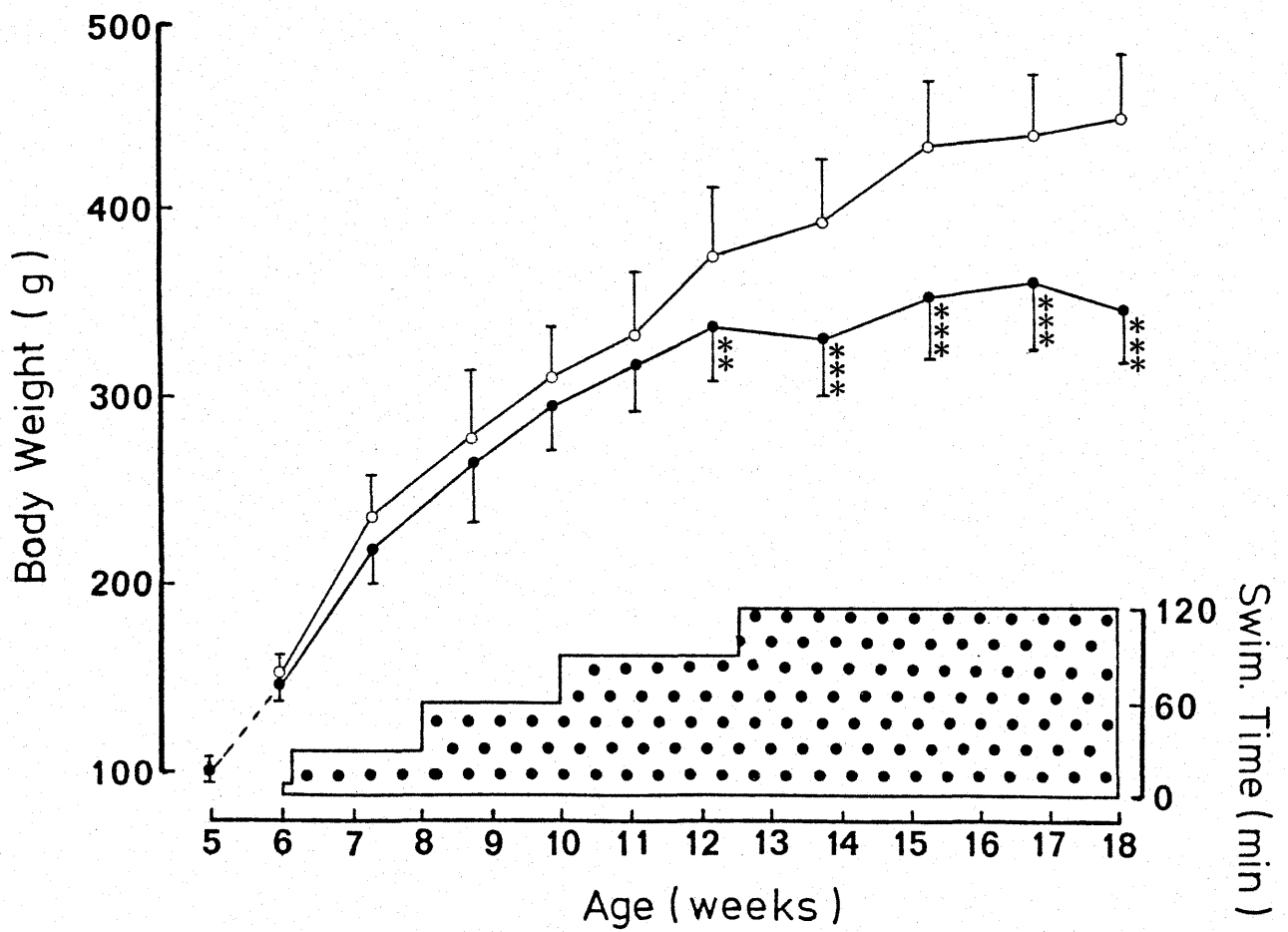


Fig. 4: Swimming program and body weight of control (-○-) and training (-●-) groups. Significant difference between the two groups: $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$.

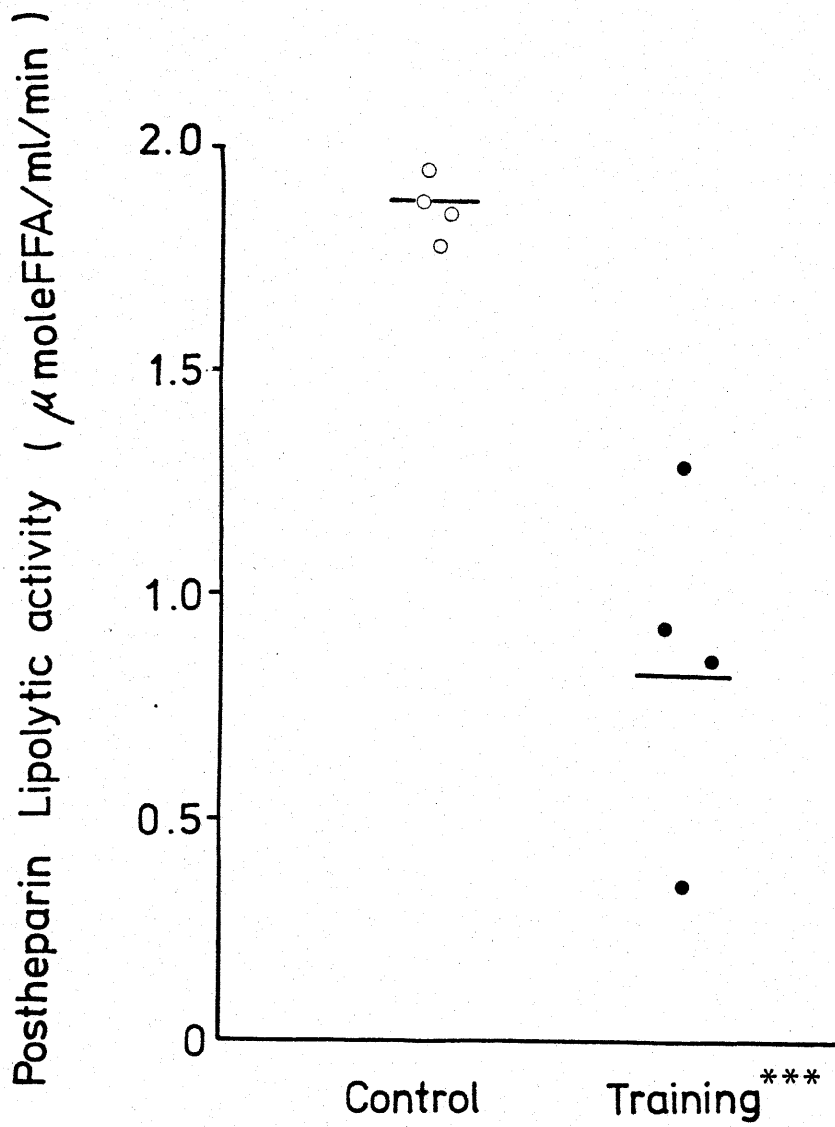


Fig. 5: Postheparin lipolytic activity of control and training groups ($P < 0.01$).

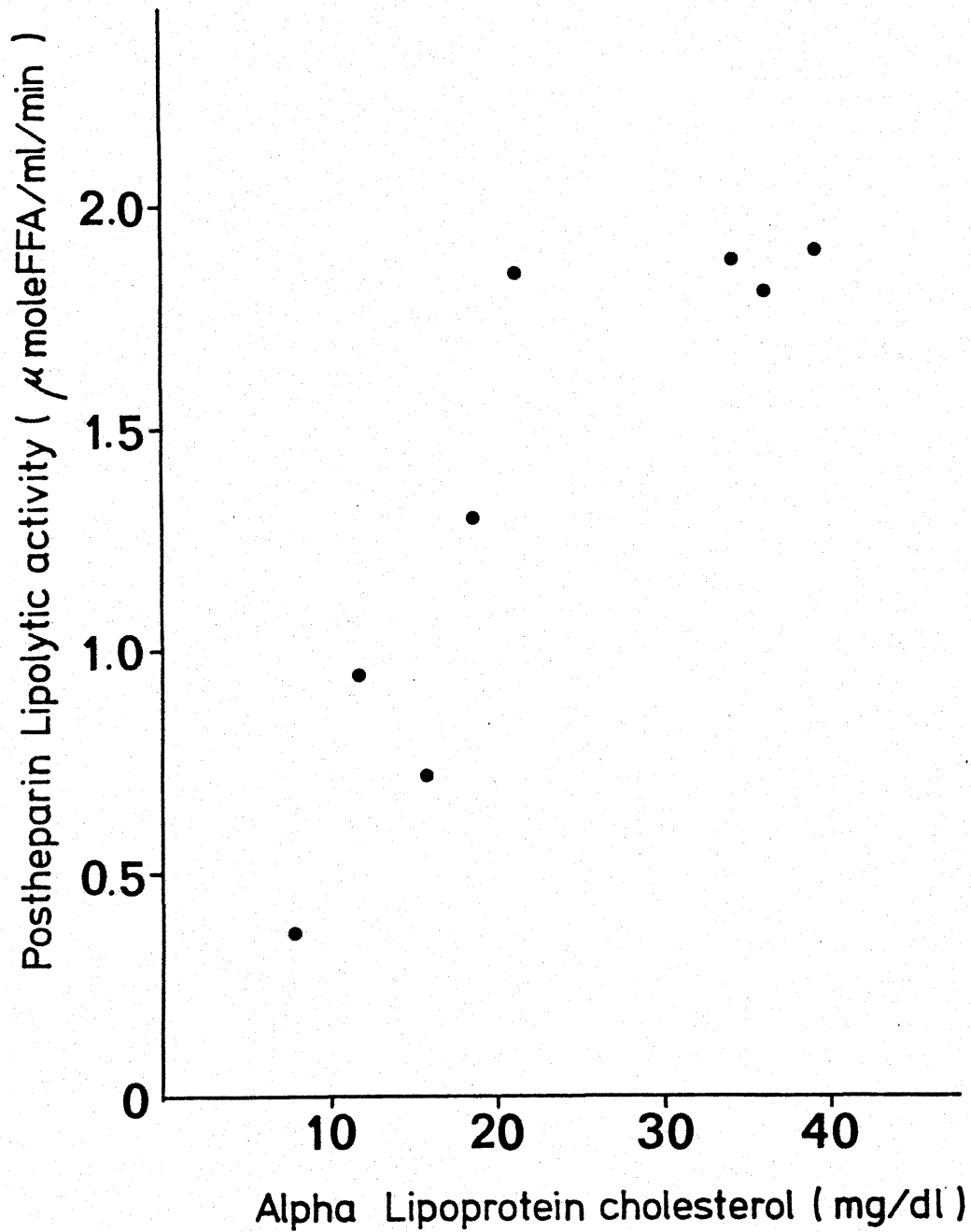


Fig. 6: Relationships between postheparin lipolytic activity and alpha lipoprotein cholesterol concentration ($r=0.77$; $P<0.05$).

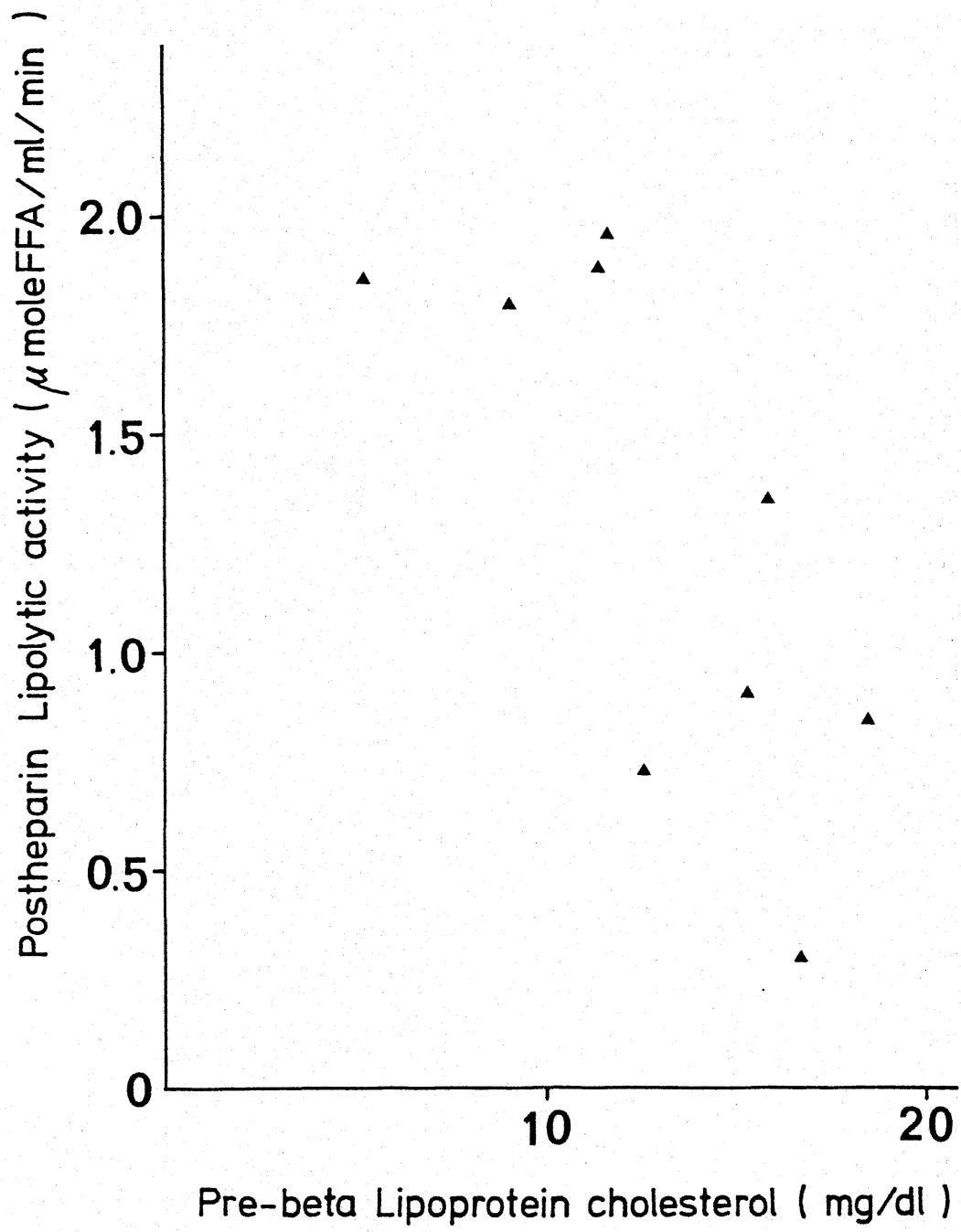


Fig. 7: Relationships between postheparin lipolytic activity and pre-beta lipoprotein cholesterol concentration ($r=-0.71$; $p < 0.05$)

Summary

The effects of endurance swimming on the serum lipoproteins and the postheparin serum lipolytic activity in rats

Satoshi Asano

The purpose of this study was to investigate the effects of endurance training on the serum lipoproteins and lipolytic enzymes. The training group was trained to swim 6 days per week for 12 weeks with increased progressively swimming time. After completion of the training program, serum lipids, lipoproteins and postheparin lipolytic activities were measured. In addition, electrophoretic lipoprotein fractions were examined in rat serum. The results were as follows:

- 1) The top fraction which electrophoretically exceeded the albumin band toward the anode had the highest density among the the lipoprotein fractions in rat serum.
- 2) The lipoprotein fractions in rat serum were named alpha, pre-beta and beta in this experiment. The administration of heparin induced decrease of pre-beta lipoprotein cholesterol and increase of alpha lipoprotein cholesterol.
- 3) The training group had significantly lower levels of serum triglycerides and beta lipoprotein than the control group.
- 4) No changes were observed in serum total-cholesterol and lipoprotein cholesterol levels in spite of swimming training.
- 5) Postheparin lipolytic activity decreased significantly as a result of swimming training.

These findings suggest that training of low intensity induced changes of postheparin lipolytic activity, LPL and H-TGL activity, even though lipoproteins cholesterol concentration did not change.