<原 著>

陳旧性脳硬塞患者における高比重リポ蛋白質のアポ E

池田 裕 清水 映二 前田 次郎

虎谷 佳幸* 坂本 健一*

<要 約> Mahley らは高比重リポ蛋白質 (以下 HDL) の抗動脈硬化作用には HDL-with apo E が重要な役割を果たしていることを提唱したが, Bittolo Bon らは心筋硬塞生存者の HDL の apo E (以下 HDL-E) が有意に低濃度であることを示して, この説を臨床面から支持した. ところで陳旧性脳硬塞患者 (以下 OCI) の HDL-E についての報告はないようである. そこで, OCI を対象に免疫固定電気泳動法を応用して開発した定量法で HDL-E を測定した. 対照との比較で, OCI の HDL のコレステロール (以下 HDL-C) と apo A-I は低く, apo B, apo B/apo A-I (以下 B/A-I) および atherogenic index (以下 A.I.) は高い. そして OCI の HDL-E は, その濃度も全 apo E に対する比 (以下 HDL-E 比) も, HDL の蛋白質や脂質に対する相対含量比も対照より有意に低くて, Bittolo Bon らの成績に一致した. この成績から, apo E が異常に減少した HDL ではその抗動脈硬化機能が減弱している可能性が示唆された. さらに新たな知見として, HDL-E 比と動脈硬化の risk factor の指標とされている B/A-I や A.I. との間に負の相関関係が, negative-risk factor の指標とされている HDL-C や apo A-I との間に相関関係が認められた. また, HDL-E 比と apo B との間に負の相関関係をみいだしたことから, HDL-with apo E が低比重リポ蛋白質 (以下 LDL) レセプターに競合結合する結果, 高 LDL 血症を惹起するかも知れないという危惧は解消した. 以上から, HDL-E 比が臨床的な negative-atherogenic index として有用であることが示唆された.

Key words : HDL-E 比, 抗動脈硬化指標, 脳硬塞, HDL-with apo E

1. 緒 言

近年, HDL を apo E の有無によって分類して機能を評価する傾向がある. Mahley ら¹⁾によると, HDL-with apo E は LDL レセプターに¹²⁵I-LDL と競合して結合するが, HDL-without apo E にはその機能がないことから, HDL のこのような抗動脈硬化的機能には apo E の存在が必要であろうと考えられている. そしてこの説を臨床面から肯定する報告として, Bittolo Bon ら²⁾は, 心筋硬塞生存者では正脂血にコントロールされていても HDL-E は有意に低下していることを示した. だが脳硬塞患者の HDL-E を測定した報告はないようである. そこで, OCI 患者の HDL-E を測定して同年齢層の対照のものと比較し, さらに従来から提唱されてきた動脈硬化の指標との関連性を検討することで, HDL-E について抗動脈硬化的指標としての評

価をも試みた.

2. 対 象

対象は, 1 年から 8 年前に脳硬塞による入院治療歴がある, 50 歳から 70 歳の, 有意な肝臓や腎臓の機能障害を認めない, インスリンや血糖降下剤で治療中の糖尿病患者を除いた男性 10 例と女性 10 例である. この OCI 群の血清脂質レベルは, コレステロール (以下 Chol) が 250mg/dl 以下, トリグリセライド (以下 TG) が 150mg/dl 以下の正脂血レベルにコントロールされていた. 同年齢層の正脂血の健康な男性 10 例と女性 10 例を対照群とした.

3. 方 法

採血は早朝空腹時におこなって, 得た血清を 7℃ に保存して 2 日以内に検査した. Chol と TG は酵素法で測り, apo A-I, apo B, apo E は単純免疫拡散法による測定プレート (第一化学) で測った. HDL 分画はリンタングステン酸二塩化マグネシウムによる沈降法によって分取した. HDL-E は免疫固定電気泳動法を応

H. Ikeda, E. Shimizu, J. Maeda : 和歌山県立医科大学検査診断学

* Y. Toratani, K. Sakamoto : 和歌山労災病院内科
受付日. 1987. 4. 15.

用した HDL-apo E 定量法³⁾で測定した。A.I.は総 Chol と HDL-C との差を HDL-C で割って求めた。測定結果は Mean±S.D.で表示し、推計学的処理は Student's t-test によった。

4. 成 績

1. Apo E のリポ蛋白質間分布図 (以下 apo E profile) (図 1)

α リポ蛋白質 (以下 α LP) と pre-β LP の間に独立した apo E 分画 (矢印) が HDL-E で、対照の分画に比較して OCI の HDL-E 分画は明白に小さい。

2. 対照と OCI の脂質, apo, 動脈硬化指標のレベルの比較 (表 1)

対照のレベルに比較して、OCI の Chol 濃度には差がないが TG は有意に高く、HDL-C と apo A-I は有意に低濃度であり、apo B は有意に高濃度であるが apo E 濃度については高い傾向はあっても有意差は認められなかった。A.I.および B/A-I については、OCI の方が対照よりも有意に高値であった。

3. HDL-E 比の比較 (図 2)

血清 apo E 濃度中に占める HDL-E の分画比を示す HDL-E 比 (HDL-E×100/total apo E, %) と HDL-E 濃度は、対照では42.1±6.4%と1.4±0.3mg/dl であ

図 1 Apo E profile
デンストグラフ A はリポ蛋白質電気泳動図で、1 は β リポ蛋白質、2 は pre-β リポ蛋白質、3 は α リポ蛋白質。B と C は免疫固定電気泳動後に蛋白染色した apo E profile で、矢印は HDL-E の分画を示す。B は対照から、C は脳梗塞患者から得た。

表 1 脳梗塞患者の脂質, apo, 動脈硬化的指標

C は対照, OCI は陳旧性脳梗塞患者, * = p < 0.001 in comparison with control

	no.	TC mg/dl	TG mg/dl	HDL-C mg/dl	apo A-I mg/dl	apo B mg/dl	apo E mg/dl	A. I.	B/A-I
OCI	20	195 ± 24	116 * ± 27	31 * ± 7	106 * ± 10	115 * ± 15	4.0 ± 0.8	5.2 * ± 1.2	1.09 * ± 0.14
C	20	190 ± 24	80 ± 20	49 ± 6	135 ± 11	85 ± 17	3.5 ± 0.6	2.6 ± 0.6	0.63 ± 0.11

図 2 脳梗塞患者の HDL-E
C は対照, OCI は陳旧性脳梗塞患者, * = p < 0.001 in comparison with control

図3 HDL-E比とHDL-Cの相関図(左)とHDL-E比とapo A-Iの相関図(右)

図4 HDL-E比とA.I.の相関図(左)とHDL-E比とB/A-Iの相関図(右)

るのに対して、OCIでは $16.8 \pm 7.2\%$ と $0.6 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ で、有意に低い。また、HDL-Eとapo A-Iの比(以下HDL-E/A-I, %)と、HDL-EとHDL-Cの比(以下HDL-E/HDL-C, %)についても同様の有意差を認めた。

4. HDL-E比とHDL-C濃度の相関性、およびHDL-E比とapo A-I濃度の相関性(図3)

OCI 20例と対照20例の群において、HDL-E比とHDL-Cとの間に、およびHDL-E比とapo A-Iとの間に有意な相関関係が認められた。

5. HDL-E比とA.I.の相関性、およびHDL-E比とB/A-Iとの相関性(図4)

HDL-E比とA.I.との間に、およびHDL-E比とB/A-Iとの間に有意な負の相関関係が認められた。

6. HDL-E比とapo B濃度の相関性(図5)

HDL-E比とapo Bとの間に有意な負の相関関係が認められた。

5. 考 察

動脈硬化と高脂血症の関連性は古くから言及されてきたが、Goldstein and BrownのLDL-pathway説⁴⁾に

図5 HDL-E比とapo Bの相関図

来、apo B含有リポ蛋白質(chylomicron, 超低比重リポ蛋白質, 中間比重リポ蛋白質, LDL)が動脈硬化のrisk factorとして認識されている⁵⁾⁶⁾。一方、Miller and Miller⁷⁾がHDLと動脈硬化を基盤とした虚血性心疾患の発生との間に負相関関係がみられることから、HDLが抗動脈硬化的機能を有する可能性を提唱してからは、HDLをnegative-risk factorとして評価した研究が数多く報告されてきた⁸⁾。そしてMahleyらは、典型的なHDLであるHDL-without apo Eが末梢細胞膜からCholを受けとり、LCATの働きでこれをエステル化して粒子内に移動させる際にapo Eを受けとってHDL-with apo Eとなるが、その大部分は肝臓のapo E, apo B, Eレセプターに取り込まれて代謝され、Cholは胆汁酸として排泄され⁹⁾、また一方ではHDL-with apo EがLDLレセプター(apo B, Eレセプター)に対してLDLと競合して結合するという¹⁾。そこで、HDLの抗動脈硬化作用としての、末梢組織からCholを肝臓へreverse cholesterol transportする役割と、末梢細胞におけるLDLレセプターへのLDL取り込みを抑制する役割に関して、HDL-with apo Eの重要性が認識されるようになった。しかしながら、HDL-Eを測定するに際して、超遠心分離操作でHDLからapo Eが離脱したり¹⁰⁾、これに代る分離法としてのゲル濾過クロマトグラフでは多数検体処理が困難だし、希釈された検体のapo E定量にはRIA法を導入せざるを得ないなどの事情もあるため、実際に動脈硬化性疾患を対象としてHDL-Eを測定した臨床研究は僅かしかない。はじめて、動脈硬化を基盤として発症すると考えられる心筋梗塞の生存者のHDL-Eが³⁾、1984年にBittolo Bon ²⁾によって報告さ

れたが、彼らは沈降法によって上清として分離した HDL の apo E をロケット免疫電気泳動で定量している。

著者らが用いた測定法、つまり、抗 apo E 抗血清を用いた免疫固定電気泳動で得た apo E profile (図1) では、apo E は apo B 含有リポ蛋白質に分布する他に、これらと HDL-without apo E である α LP との間に独立して存在した(矢印)。これが HDL-E であり、デンストメトリーして得たその分画比に血清 apo E 濃度を乗じて HDL-E 濃度として計算する訳だが、この定量法についての再現性や濃度希釈における直線性などは、臨床検査法として満足できるものであった³⁾。

この研究の対象は、脳梗塞の明白な症候と生化学的検査所見や CT 所見を呈した既応がある、50歳から70歳の高齢層の男性10例と女性10例であるが、全例有意な肝臓腎臓機能障害は認めない。また、糖尿病患者では周知のごとく carbohydrate-induced hypertriglyceridemia を呈して mid band が高頻度に出現したり¹¹⁾、脂質・apo 代謝障害が合併するので、食事療法でコントロールしきれない例は除外してある。また、脂質レベルは、特に男性例では Chol が正常域でも TG が高値であったが、Chol は 250mg/dl, TG は 150mg/dl 以下の群に限定した。この OCI 群の脂質や apo レベルを調べた結果は、動脈硬化性疾患患者を対象とした諸家の研究業績^{2)(5)~8)(12)~14)}と同様の成績であり、つまり対照のレベルに比較して OCI では正脂血にコントロールされていても、HDL-C と apo A-I が有意に低くて、apo B や B/A-I および A.I. が有意に高レベルであった。そして OCI の HDL-E は、その濃度も分画比も、さらには HDL の蛋白質量や脂質量に対する相対含量比を意味する HDL-E/A-I や HDL-E/HDL-C も対照よりも有意に低レベルであった。この成績は、正脂血陳旧性心筋梗塞患者を対象とした Bittolo Bon らの成績と一致するものである。この知見は、冠動脈と脳動脈の区別なく、動脈硬化を基盤とする硬塞群には HDL への apo E 分布障害が存在する事実を明白にしたものである。そして、apo E が異常に減少している HDL では、その抗動脈硬化作用が減弱している可能性を示唆するものでもあり、Bittolo Bon の研究と同様に、Mahley らの説を臨床的に肯定するものであろう。さらに、本研究の新たな知見として、高脂血症の際にも、高 TG 血症に伴う血清 apo E 濃度の上昇¹³⁾の影響を受けない HDL-E 比と、前述の諸家の業績から動脈硬化の risk factor の指標と考えられている apo

B, B/A-I, A.I. との間に負の相関がみいだされ、また、negative-risk factor の指標とされている HDL-C や apo A-I との間には正の相関関係がみいだされた。さらに、HDL-with apo E が優先的に LDL レセプターに競合結合するために生理的な LDL 代謝が抑制されて高 LDL 血症を惹起しかねない、いいかえると HDL-with apo E が動脈硬化促進の方向に働くのではないかという危惧は、LDL の主要構成 apo でレセプターを認識する apo B 濃度と HDL-E 比との間に負の相関関係が証明されたことから解消するだろう。以上から、HDL-E 比は臨床的な negative-atherogenic index として有用と評価されるだろうと考察した。

ただし、HDL-E 比は有意の肝障害を反映して増大し、HDL-C と負相関するし¹⁵⁾、甲状腺機能異常症では甲状腺ホルモン濃度と相関して変動する¹⁶⁾ので、このような合併症を有する例での臨床判断には注意しなければならない。また、動脈硬化性疾患で HDL-E 比が減少する理由について言及するためには、LPL 欠損症における HDL への apo E 分布欠如に近い減少の報告¹⁷⁾や、デキストラン硫酸静注や人工透析治療後の LPL 活性賦活時に HDL-E 比が増大した著者らの経験¹⁸⁾を手掛かりに、今後の検討をまたねばならない。

6. 結 論

1. OCI の HDL-E はその濃度も分画比も、対照よりも有意に低い。
2. HDL-E 比は動脈硬化の risk factor の指標である B/A-I や A.I. と負の密な相関を、negative-risk factor の指標である HDL-C や apo A-I と密な相関を呈する。
3. HDL-E 比と apo B との間に負の相関関係がみいだされたことから、HDL-with apo E が高 LDL 血症を惹起するとは考えがたい。

以上の知見から、HDL-E 比は臨床的な negative-atherogenic index として期待できるだろう。

文 献

- 1) Mahley RW, Innerarity TL: Interaction of canine and swine lipoproteins with the low density lipoprotein receptor of fibroblasts as correlated with heparin/manganese precipitability. J Biol Chem 252: 3980-3986, 1977.
- 2) Bon Bittolo G, Cazzolato G, Saccardi M, Kostner GM, Avogaro P: Total plasma apo E and

- high density lipoprotein apo E in survivors of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 53 : 69—75, 1984.
- 3) 池田 裕 : 免疫固定電気泳動法を応用した HDL-apo E 定量法. *臨床検査* 30 : 1139—1142, 1986.
- 4) Goldstein JL, Brown MS : The LDL pathway in human fibroblasts: A receptor-mediated mechanism for the regulation of cholesterol metabolism. *Current Topics Cellular Regulation* 11 : 147—181, 1976.
- 5) Goldstein JL, Schrott HG, Harrard WR, Bierman EL, Motulsky AG : Hyperlipidemia in coronary heart disease. *J Clin Invest* 52 : 1533—1577, 1973.
- 6) Bierman EL, Eisenberg S, Stein O, Stein Y : Very low density lipoprotein remnant particles: Uptake by aortic smooth muscle in culture. *Biochim Biophys Acta* 329 : 163—169, 1973.
- 7) Miller GJ, Miller NE : Plasma-high-density-lipoprotein concentration and the development of ischemic heart-disease. *Lancet* I : 16—19, 1975.
- 8) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham Study. *Am J Med* 62 : 707—714, 1977.
- 9) Mahley RW : Atherogenic hyperlipidemia. *Med Clin N Amer* 66 : 375—402, 1982.
- 10) Mackie A, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J : Concentration and distribution of human plasma apolipoprotein E. *Clin Chim Acta* 116 : 35—45, 1981.
- 11) 池田 裕 : 糖尿病における Mid-band の出現についての考察. *医療* 31 : 37—45, 1977.
- 12) Whayne TF, Alaopovic P, Curry MD, Lee ET, Anderson PS, Schechter E : Plasma apolipoprotein B and VLDL-, and LDL-, and HDL-cholesterol as risk factors in the development of coronary artery disease in male patients examined by angiography. *Atherosclerosis* 39 : 411—424, 1981.
- 13) Tan MH, Weldon KL, Albers JJ, Cheung MC, Havel RJ, Vigne JL : Serum HDL-cholesterol, apo A-I and apo E levels in patients with abnormal coronary arteries. *Clin Invest Med* 3 : 225—232, 1980.
- 14) 篠宮正樹, 斉藤 康, 吉田 尚, 山下道隆, 大島仁士 : 冠動脈撮影による狭窄所見とアポ蛋白. *Ther Res* 3 : 439—442, 1985.
- 15) 池田 裕, 前田次郎 : 急性肝炎患者における α_2 -apo E. 肝臓 投稿中.
- 16) 池田 裕 : 甲状腺機能と α_2 -アポ蛋白 E の関連性. *衛生検査* 35 : 1631—1635, 1986.
- 17) 山田信博, 村勢敏郎, 赤沼安夫, 小坂樹徳, 呉東進, 佐久間真樹 : ゲル濾過法による血漿アポ E の分析. *動脈硬化* 10 : 965—966, 1982.
- 18) Ikeda H, Maeda J : The specificity and the clinical significance of the profile of the apolipoprotein E, determined by quantitative immunofixation electrophoresis. *Jap J Med* 25 : 405, 1986.

Abstract

Apolipoprotein E in High-Density Lipoprotein in Patients with Old Cerebral Infarction

Hiroshi Ikeda*, Eiji Shimizu*, Jiro Maeda*,
Yoshiyuki Toratani** and Kenichi Sakamoto**

Mahley et al had proposed that HDL-with apo E would play important roles in protective or anti-atherosclerotic functions of HDL, that is, in reverse cholesterol transporting to liver from peripheral tissues and in competing with LDL for binding to LDL-receptors. And Bittolo Bon et al. in 1984 reported for the first time that apo E concentration in HDL in survivors of myocardial infarction was significantly lower than that in controls. But apo E in HDL (HDL-E) in patients with old cerebral infarction (OCI) as the atherosclerotic subjects was not yet determined. So, in order to estimate whether HDL-E could be clinically expected to be one of the anti-atherogenic index, HDL-E in OCI was determined in this study by Ikeda's method using quantitative immunofixation electrophoresis, by which HDL-E was detected for the first time at near the α_2 -globulin region behind α lipoprotein (that is, HDL-without apo E). Samples were sera acquired in fasting from normolipidemic, aged 50—70 years old, 10 male and 10 female OCI without hepatobiliary disorders and age-matched healthy controls, and were examined as to triglycerides, cholesterol, apo A-I, apo B and apo E, in addition to determination of HDL-E. Cholesterol in HDL (HDL-C) and apo A-I were lower, and apo B, apo B/apo A-I ratio (B/A-I) and atherogenic index (A.I.) [(cholesterol - HDL-C)/HDL-C]

were significantly higher in OCI than in controls. No significant difference in serum levels of apo E between two groups was observed, but HDL-E concentrations (0.6 ± 0.2 vs 1.4 ± 0.3 mg/dl, $p < 0.001$), HDL-E ratios (HDL-E $\times$ 100/serum apo E, %) (16.8 ± 7.2 vs $42.1 \pm 6.4\%$, $p < 0.001$), ratios of HDL-E/apo A-I (0.5 ± 0.2 vs $1.1 \pm 0.2\%$, $p < 0.001$) and ratios of HDL-E/HDL-C (1.9 ± 0.7 vs $2.8 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$) were significantly lower in OCI than in controls. Therefore, this result would reveal the disturbance of distribution of apo E to HDL in atherosclerotic subjects as OCI. In other words, it would be suggested from this result that anti-atherosclerotic functions of HDL in which apo E abnormally decreased would be weakened, as well as Bittolo Bon's speculation. And, as new information the significant reverse correlation between HDL-E ratios and levels of apo B which was main apolipoprotein of LDL was recognized in this study, so the information would clear the suspicion that HDL-with apo E might induce to be atherogenic hyper-low-density lipoproteinemia because of competing with LDL for natural binding to receptors. And more, HDL-E ratios significantly correlated with negative-atherogenic parameters of HDL-C and apo A-I, and inversely correlated with atherogenic parameters of B/A-I and A.I.. The results in this paper suggest that HDL-E ratio would be able to be evaluated as a negative-atherogenic index.

key words: HDL-E ratio, negative-atherogenic index, HDL-with apo E, cerebral infarction
(Jpn J Geriatr 24: 561—566, 1987)

* Department of Laboratory Medicine, Wakayama Medical College

** Department of Internal Medicine, Wakayama-Rosai Hospital