〔原 著〕

血清コレステロール分画・トリグリセライド分画同時測定による LDL 分画質的異常の検討

大井絹枝*・櫻井裕子**・登 勉*

SUMMARY

LDL fraction was qualitatively analyzed by simultaneous determination of serum cholesterol and triglyceride (TG) by agarose gel electrophoresis. Modified low density lipoprotein (LDL) showing faster electrophoretic mobility was easily distinguished from native LDL. Modification frequency is determined by a relative change of the mobility shift to the anode. Modification frequency greater 8 is defined as positive modified LDL. The modified LDL was found in 46.9% of 131 patients with higher level of TG and 4.1% of 147 patients with normal TG level. 73.4% of 53 patients with modified LDL had the level of TG ≥ 300 mg/dl. These data suggested that modified LDL was mostly consisted of small dense LDL with a high level of TG. However, the level of TG was decreased faster than that of modified LDL.

Key words: cholesterol fraction, triglyceride fraction, agarose gel electrophoresis, LDL fraction, modified LDL.

緒 言

動脈硬化の治療と予防の指標として、従来から総コレステロール (TC) と HDL コレステロール (HDL-C) が用いられてきたが、近年 LDL コレステロール (LDL-C) が重要視され、動脈硬化学会の高コレステロール血症患者の管理基準では LDL-C の値を用いるとしている¹⁾。また、健康診断や一般診療では、TC、トリグリセライド (TG)、HDL-C が測定され、異常と認めた場合のリポ蛋白分析には、簡便性から電気泳動法が用いられている²⁾。

1979 年、浦田らが感度の高いジホルマザン染色を用いて、リポ蛋白を電気泳動法により脂質分別定量を可能にし³⁾、さらに 1983 年に反応系を簡略化した改良試薬を作製し脂質分別定量法を確立した^{4,5)}。しかし、この方法は用手法であったことと、結果の判定を人によっていたこと

から広く普及するには至らなかった。

最近、浦田らの改良試薬に基づき自動電気泳動装置 REP を使用して、コレステロール分画とトリグリセライド分画を同時に測定し、各分画を定量化するとともに、コレステロール分画とトリグリセライド分画を重ね合わせる解析法が開発され、日常検査への応用が可能となった^{6,7)}。

コレステロール分画のうち、動脈硬化に対する最も重要な危険因子である LDL 分画は、今までは量的異常のみで診断されてきた。しかし、LDL は酸化、糖化など多様な修飾を受けるとマクロファージに効率よく取り込まれマクロファージを泡沫化し動脈硬化を引き起こすため、これら変性 LDL がより直接的な危険因子と考えられている⁸⁻¹⁰⁾。

最近、小粒子 LDL の危険性が注目されているが、小粒

Study on qualitative abnormality of LDL fraction by simultaneous determination of serum cholesterol and triglyceride fractions.

* Kinue Ohi, Tsutomu Nobori; 三重大学医学部臨床検査医学講座

** Yuko Sakurai; 同, 附属病院中央検査部

Correspondence address: Kinue Ohi, Department of Laboratory Medicine, Mie University School of Medicine, 2-174, Edobashi, Tsu 514-8507, Japan.

略号一覧: TC, total cholesterol; TG, triglyceride; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; REP, Rapid Electrophoresis Analyzer.

(受付 2000 年 9 月 29 日, 受理 2000 年 12 月 22 日, 刊行 2001 年 3 月 15 日)

子 LDL は TG 高値で出現しやすく, TG rich な小粒子 LDL は酸化を受けやすいと考えられている^{8,11)}. 酸化 LDL, 糖化 LDL など変性 LDL はすべて陰性荷電の増加または陽性荷電の減少により電気泳動の移動度が陽極側へ変化するために正常 LDL と区別することができる⁸⁾. 今回は, LDL の陽極側への変化を数値化する解析法¹²⁾により, 荷電量の変化した変性 LDL について検討した.

対象および方法

1. 対象

三重大学医学部附属病院入院・外来患者の正脂血症 (TC 125~220 mg/dl, TG 35~150 mg/dl) 99 例, 高脂血症 179 例. 正脂血症を 1 群とし, 高脂血症を, 2 群: TC 221 mg/dl 以上, TG 150 mg/dl 以下 48 例, 3 群: TC 220 mg/dl 以下, TG 151 mg/dl 以上 68 例, 4 群: TC 221 mg/dl 以上かつ TG 151 mg/dl 以上 63 例に分類した.

2. 測定方法

コレステロール分画およびトリグリセライド分画は, アガロースゲルを支持体とし, 自動電気泳動装置・REP (Helena Laboratories, Beaumont, TXS, USA) で電気泳動し, おのおのタイタンジェル S-コレステロール (ヘレナ研究所) およびタイタンジェル S-トリグリセライド (ヘレナ研究所) で染色し, HDL, VLDL, IDL, LDL, CM に分画した.

発色原理は, おのおの浦田らの報告した cholesterol dehydrogenase 法に基づくコレステロール分画試薬⁴⁾, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 法に基づくトリグリセライド分画試薬⁵⁾による反応によって生成したホルマザ

ン色素をデンストメトリーする方法である.

結果は, ヘレナ研究所のコレトリコンボで解析した. この方法はコレステロール分画およびトリグリセライド分画を用いて TC 値と TG 値から各分画中のコレステロールと TG の値を定量するとともに, 両分画のパターンを画面上で重ね合わせて高脂血症の型判定など脂質分画の詳細を判定する^{6,7)}.

変性 LDL はコレステロール分画を用いて算出した. 原点を基準とし, 正常 LDL までの距離を 100 として LDL 分画の陽極側への移動度の変化を数値化し, 正常 LDL に比べて何%変化しているかを変性度数として表した (Fig. 1). 変性度数 8 以上を変性 LDL 陽性とした¹²⁾.

結果

1. 変性 LDL と TG 値との関連

1 群では 99 例中 4 例 (4.0%) が変性 LDL 陽性, 2 群では 48 例中 2 例 (4.2%) であり, TG 正常では変性 LDL の出現は少なく, TC 値との関連は認められなかった. 3 群では 68 例中 31 例 (45.6%), 4 群では 63 例中 31 例 (49.2%) が変性 LDL 陽性であり, TG 高値では, TC 高値の 4 群のほうがやや陽性例の出現率が高かった.

3 群と 4 群において変性 LDL 陽性例と陰性例の TG 値の分布を比較すると, 陽性例では TG 高値に分布し, TG 200 mg/dl 未満は両群とも 9.7% (3/31) で少なく, 3 群では 58.1% (18/31), 4 群では 67.8% (21/31) が TG 300 mg/dl 以上に分布した. 陰性例では TG 200 mg/dl 未満が多く, 3 群 54.1% (20/37), 4 群 31.3% (10/32) であった. 陰性例の TG 300 mg/dl 以上は 3 群で 13.5%

Fig. 1. Schematic presentation of modification frequency.

Modification frequency indicates a samples variation in migration (cathodic or anodic) of LDL compared to a LDL standard. 0 LDL modification frequency standard was determined by the mean of migration distance from the origin to the peak of LDL in 10 samples from healthy donors under 35 years of age. Accordingly, the migration distance of normal LDL from the origin is calculated using controlled LDL modification frequency.

Fig. 2. Relationship between TG and modified LDL in group 3 and group 4.

(5/37), 4群で28.1% (9/32) であった(Fig. 2).

正脂血症と高脂血症を合わせた278例をTG値により分類し、変性LDL陽性率を図に示した(Fig. 3). 変性LDL陽性率はTG値とともに増加し、200~299 mg/dlで40.5% (17/42), TG 300~399 mg/dlで58.8% (10/17), TG 400~499 mg/dlで約87.5% (7/8) と上昇したが、500 mg/dl以上では78.6% (22/58) で変性LDL陽性率は上昇しなかった。

次に、TG値により分類し積算値で比較した。全例では変性LDL陽性率は24.5% (68/278) であったが、TG 151 mg/dl以上で区切ると47.3% (62/131) であり、TG 200 mg/dl以上で区切ると58.9% (56/95), TG 300 mg/dl以上で区切ると73.4% (39/53), TG 400 mg/dl以上で区切ると80.6% (29/36), TG 500 mg/dl以上で区切ると78.6% (22/23) であった。変性LDL陽性率はTG値とともに増加し、TG 300 mg/dl以上で変性LDL陽性率は73.4%と明らかに高率になったが、それ以上では変性LDL陽性率は上昇しなかった。

以上の結果から、TCと変性LDLの間にはTG正常ではほとんど相関を認めず、TGと変性LDL陽性率の間には強い相関が認められ、TG値の上昇とともに変性LDL陽性は増加した。

Fig. 3. Relationship between TG and modified LDL.

2. 高脂血症のタイプ (WHO の分類) との比較

高脂血症のタイプ (WHO の分類) を比較すると、1群では変性LDL陰性例 (以下、陰性例) でIIa 9例、その他1例、変性LDL陽性例 (以下、陽性例) でIIa 1例を認めた。2群では陰性例でIIa 30例、その他2例、陽性例でIIa 2例を認めた。3群、4群ではTG高値のためIIaは認めず、他のタイプは表のようになった。両群とも陽性例でIII, V, その他 (WHO の分類に当てはまらない高脂血症) が多く、IIb, IVは少ない傾向にあった (Table 1).

3. 低HDL-C血症との関連

低HDL-C血症 (HDL-C 40 mg/dl未満) の出現は、1群では変性LDL陰性例95例中30例、陽性例4例中2例、2群ではおのおの46例中7例、2例中1例であった。3群と4群での比較では、TG高値の3群・4群で低HDL-C血症が多かったが、陰性例と陽性例の間に大きな差を認めなかった。

4. 高LDL-C血症との関連

高LDL-C血症 (140 mg/dl以上) は1群では陰性例95例中22例 (23.2%), 陽性例4例中1例 (約25%), 2群ではおのおの46例中41例 (89.1%), 2例中2例 (約100%) であり、3群、4群での比較は表に示したようになった (Table 1). 1~4群すべての群で陰性例と陽性例の間に高LDL-C出現率の差を認めなかった。

5. 異常リポ蛋白・IDLの出現との関連

異常リポ蛋白の出現において、slow α HDL-Cを2群1例、Lp-Xを2群と4群で各1例認めたが、すべて変性LDLは陰性であった。全体にコレステロール分画・トリグリセライド分画ともに陽極側にパターンがシフトしている例 (変性度数35) を3群で1例認めたが、遊離脂肪酸との結合によるものであった。

Lp(a)はTGに比べTCの多いピークとして把握されるが、Lp(a)が低値の場合や移動度が変化した場合など、区別できない例も多い。明瞭に分離されないLp(a)および β VLDLを含めpre β - β 間のバンドをIDLとした。IDLの出現は、1群・2群が少なく (2~7%), 3群と4群で19~38% 認めたが、変性LDLとの関連は認められなかった。

6. LDL分画におけるTG値との関連

TG高値の3群、4群におけるLDL-TG%の平均値は

Table 1. Comparison of patients with and without modified LDL in group 3 and group 4.

Group	Modified LDL	Number of patients	Hyperlipidemia (WHO of classification)					Low HDL-C	High LDL-C	LDL-TG/TG	LDL-TG level
			IIb	III	IV	V	other	<40 mg/dl	$\geq$ 140 mg/dl	$\leq$ 1.20	$\geq$ 100 mg/dl
3	negative	37	3 (8.1%)	0 (0%)	32 (86.4%)	1 (2.7%)	1 (2.7%)	56.8%	24.3%	2 (5.4%)	2 (5.4%)
	positive	31	2 (6.5%)	1 (3.2%)	20 (64.5%)	2 (6.5%)	6 (19.4%)	77.4%	29.0%	7 (22.6%)	6 (19.4%)
4	negative	32	20 (62.5%)	1 (3.1%)	9 (28.1%)	0 (0%)	2 (6.3%)	37.5%	84.4%	2 (6.3%)	3 (9.4%)
	positive	31	17 (54.8%)	3 (9.7%)	5 (16.1%)	2 (6.5%)	4 (12.9%)	51.6%	83.9%	4 (12.9%)	13 (41.9%)

Fig. 4. Time course changes of TC and TG levels and modification frequency in 2 patients.

Fig. 5. Change in TC and TG fractions on electrophoretic patterns for 2 patients.
Black, cholesterol fraction ; Outline, triglyceride fraction ; Shaded, overlap region.

22~35%であるが、肝機能障害で HTGL (肝性トリグリセライドリパーゼ) の分泌が低下し、LDL 分画における TG が増加する異常 LDL では、LDL-TG%は極めて大きい。この異常 LDL は3群陰性例では認めず、陽性例で1例、4群陰性例3例、陽性例2例を認めたが、すべて LDL-TG 90%以上であり、4群陰性例の1例は Lp-X の出現を伴った。

一方、LDL 分画中の TC/TG と LDL-TG (mg/dl) では異常 LDL の影響が少ないので、この2項目で LDL 分画における TG の比較を行った。LDL 分画における TC/TG (1.20 以下) で比較すると、陽性例での出現が多い傾向にあった。LDL-TG (mg/dl) で比較すると、陽性例で高値例が多く、LDL-TG 100 mg/dl 以上の出現率は3群、4群とも陽性例で高かった (Table 1)。したがって、通常の LDL 分画における TG の増加が変性 LDL とよく関連し、TG rich な LDL は変性 LDL 出現の主な原因と考えられた。

7. 2 症例における TG・変性度数の経時的推移

短期間に TG 値が大きく変化した2症例で経時的推移をみた (Fig. 4, Fig. 5)。症例1では TG (mg/dl)・変性度数の変化は、331 (mg/dl)・17, 204 (mg/dl)・14, 135 (mg/dl)・-2, 143 (mg/dl)・-2 であり、測定前の TG は 887 mg/dl と高値であった。症例2では 422 (mg/dl)・48, 240 (mg/dl)・33, 242 (mg/dl)・32, 195 (mg/dl)・2 であり、測定前の TG は 1,003~7,800 mg/dl と極めて高値であった。

2 症例とも、TG の低下よりも変性 LDL の消失のほうが遅れる傾向にあった。TG が極めて高値を示した症例2では、変性度数の数値も極めて高い値から急速に低下した。

考 察

アガロースゲル電気泳動法によりコレステロール分画・トリグリセライド分画を同時に測定し、コレトリコンボ解析法により分析すると、両分画のパターンを並べて比較または重ね合わせることで、WHO の高脂血症の分類および Lp-X や slow- α HDL-C 等異常リポ蛋白の出現など脂質分画全体の把握が容易になる。

変性 LDL は多様な修飾を受けた LDL の総称であり、アセチル LDL、酸化 LDL、糖化 LDL、マロンジアルデヒド LDL 等が考えられ、アガロースゲル電気泳動法では正常な LDL に比べ陽性側へ移動度が変化する⁹⁾。アセチル LDL のような陰性荷電が増加した化学的に修飾された LDL は、マクロファージにコレステロール蓄積をうながすが^{9,10)}、アセチル LDL は、実際の生体内で存在する可能性は少なく⁹⁾、変性 LDL の多くは酸化 LDL、糖化 LDL、マロンジアルデヒド LDL であると考えられる。

今回は、変性 LDL の荷電量的変化による移動度の変化量を変性度数として数値化して、コレステロール分画のうち動脈硬化に対する危険因子として重要な LDL 分画の質的異常を検討した。その結果、荷電量的に変化した変性 LDL は TG と強い関連があると考えられた。

LDL サイズが小粒子化するに従い LDL 分画中のエステル型および遊離型コレステロールが減少し、TG が増加すると報告されており^{11,13,14)}、TG 値の上昇が LDL 小粒子化に密接に関連しているとの報告は多い^{8,11~15)}。自験例では、変性 LDL は TG 高値で高率に出現し、変性 LDL 陽性例では LDL 分画において TG の増加を認め、LDL 分画における TC/TG も低下しており、TG rich な小粒子 LDL であることが示唆された。

LDL 粒子サイズの測定は超遠心法または電子顕微鏡による判定が必須であるが、日常検査への利用は極めて困難である。その代用として、分子篩効果のあるポリアクリルアミドゲル電気泳動法も臨床的に LDL 粒子サイズの推定に應用されている。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるリポ蛋白分画の LDL 分画を、粒子サイズ推定の指標である RM 値 (HDL の移動度を 1.00 とした相対的な移動度) で判定した結果、TG 高値になるに従い LDL が小粒子化する結果を得た。糖尿病では合併症の認められない早期から軽度の小粒子 LDL が高率に出現し、その他の疾患では出現頻度は低かった。しかし、TG が高値になると疾患にかかわらず小粒子 LDL は高率に出現し、RM 値が上昇し LDL の小粒子化が認められた^{16~18)}。

LDL-C は変性 LDL 陽性例と陰性例で差を認めず、LDL-C 高値 (量的異常) は、変性 LDL 陽性例の出現 (質的異常) と必ずしも一致しなかった。

HDL-C は変性 LDL 陽性例で低く、大きな差は認められないものの低 HDL-C の出現率が高い。低 HDL-C 血症では、LDL 分画へのコレステロールの転送が少ないため、LDL 分画における TC/TG が低値となる。TG 高値例では、VLDL が増加して、TG の LDL への転送が増加し、変性 LDL 陽性例では、LDL 分画の TG 値は高値となり、TC/TG 比は低値となる。

荷電によって分離するアガロースゲル電気泳動による今回の検討で、変性 LDL の出現と TG 高値が密接に関連した原因は、TG rich な LDL は小粒子であり、小粒子 LDL は酸化されやすいこと^{9,15)} から酸化 LDL を生成し、その結果、LDL の陽極側へ移動して変性度数が増加し、変性 LDL 陽性になったと考えられた。しかし、血清 LDL 中の酸化 LDL の存在は微量であることから¹⁹⁾、この原因だけでは説明できないと考えられる。LDL 粒子に結合するアポ B 100 の分子量は大きく、分子数は1分子のアポ B 100 と正確に対応している²⁰⁾。LDL 粒子が小さくなくてもアポ B 100 の分子量・サイズは変わらず、LDL 粒子

が小さくなると両者の相対比は大きくなり、LDL 粒子表面でのアポ B 100 の立体構造が変化し荷電量が増加したと推定される。この仮説では、変性 LDL 出現例でも LDL 分画全体が1つのバンドであり、かなり大きく陽極側へシフトした例が多く認められることが解明できると考えられる。アガロースゲル電気泳動で TG rich な小粒子 LDL が陽極側へシフトして変性 LDL として把握されるのは、この2つの原因が混在しているが、後者のほうが主な原因と考えられた。

TG が高値から低下した例では、TG の低下よりも変性 LDL の消失のほうが遅れる傾向にあったが、TG が低下すると TG rich な小粒子 LDL が減少し変性 LDL が生成されなくなり、LDL が代謝されるに要する時間だけ遅れて変性 LDL が正常化したと考えられた。

今回検討した変性度数による変性 LDL は、日常検査が可能でスクリーニングとしては有用であるが、酸化 LDL、糖化 LDL、小粒子 LDL など修飾された LDL を区別なく把握するので、詳細な原因確定は今後の課題である。板部らはモノクローナル抗体を使用した酸化 LDL の微量定量法を開発したが¹⁹⁾、この方法では操作が煩雑で日常検査への応用は難しいが、今後、おのおの変性 LDL の簡便な微量定量法が普及すれば、変性 LDL の詳細がわかるようになり、動脈硬化等の診断・治療に役立つと考えられる。

文 献

- 1) 日本動脈硬化学会高脂血症診療ガイドライン検討委員会. 高脂血症診療ガイドライン動脈硬化. 1997; 25: 1-34.
- 2) 清島 満, 藤井秀比古. 高脂血症の診断プロトコル. Med Technol 1999; 27: 398-406.
- 3) 浦田武義, 櫻林郁之助, 河合 忠. 電気泳動法によるリポ蛋白-脂質の分別定量法. 臨床検査 1979; 9: 871-80.
- 4) Urata T, Sakurabayashi I, Kawai T. Determination of HDL- and LDL-cholesterol by cholesterol dehydrogenase. Clin Chem 1983; 29: 1173-4.
- 5) Urata T, Arai M, Shinohara R, Ishiguro I, Sakurabayashi I, Kawai T. Lipid and lipoprotein profiling by electrophoresis. The XII World Congress of Pathology (anatomic and clinical). Abstract, No. FP-3, Tokyo. 1983; p. 331
- 6) 貴堂としみ, 蔵田英明, 岩本珠美, 宇都宮一典, 松本明世, 田嶋尚子, 板倉弘重, 近藤和雄. アガロース電気泳動法によるリポ蛋白分析の臨床応用. The Lipid 1998; 9: 487-94.
- 7) 新しい脂質解析検査法『コレトリコンボ』. HELENA UPDATE JAPAN. 1998; 7: No. 4.
- 8) 吉田 博, 中村治雄. リポ蛋白-特殊型リポ蛋白とその生理的意義, 変性 LDL. 日本臨牀 1994; 52: 24-9.
- 9) 板部洋之, 高野達哉. 特集: 低比重リポ蛋白 (LDL) をめぐる最新の話, LDL の変性とその意義. Prog Med 1998; 18: 1903-13.
- 10) 興梠貴英, 杉山 暁, 和田洋一郎, 児玉龍彦. リポ蛋白受容体に関する最近の知見 スカベンジャー受容体ファミリー. 日本臨牀 1999; 57: 60-7.
- 11) 平野 勉, 芳野 原, 鹿住 敏. 特集: 低比重リポ蛋白 (LDL) をめぐる最新の話, LDL 粒子サイズと臨床的意義. Prog Med 1998; 18: 1915-20.
- 12) 変性 LDL について. HELENA UPDATE JAPAN. 1999; 5: No. 3.
- 13) McNamara JR, Small DM, Li Z, Schaefer EJ. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. J Lipid Res 1996; 37: 1924-35.
- 14) McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. Arterioscler Thromb 1992; 12: 1284-90.
- 15) DeJager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subclass resistance predominates in combined hyperlipidemia. J Lipid Res 1993; 34: 295-308.
- 16) 櫻井裕子, 大井絹枝, 奥山 理, 為田毅彦, 登 勉. 糖尿病最小血管合併症における mid-band と small dense LDL 出現の臨床的意義. 第 37 回日本臨床病理学会東海・北陸支部総会プログラム・抄録集. 1998; p. 19.
- 17) 大井絹枝, 櫻井裕子, 登 勉. 糖尿病におけるリポ蛋白分画精密測定・コレステロール分画・トリグリセライド分画の検討. 生物物理化学 1998; 42: 35.
- 18) 櫻井裕子, 大井絹枝, 登 勉. 各種疾患における mid-band と small dense LDL 出現頻度の比較検討. 第 38 回日本臨床病理学会東海・北陸支部総会プログラム・抄録集. 1999; p. 26.
- 19) Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. J Lipid Res 1996; 37: 45-57.
- 20) 横山信治. 特集: 低比重リポ蛋白 (LDL) をめぐる最新の話, LDL 粒子サイズと臨床的意義. Prog Med 1998; 18: 1877-81.

要 旨

アガロースゲル電気泳動法によるコレステロール分画・トリグリセライド分画同時解析法により、変性 LDL の検討を行った。変性 LDL は、陽極側への相対的移動度を数値化して変性度数とし、8 以上を陽性とした。変性 LDL は TG 高値で高率に出現し、LDL 分画において TG の増加を認めた。変性 LDL 出現の主な原因は TG 高値による TG rich な小粒子 LDL と考えられ、TG が高値から低下した例では TG の低下よりも変性 LDL の消失のほうが遅れる傾向にあった。