〔シンポジウム：電気泳動による変性 LDL の分析と臨床的意義〕

PAG 電気泳動法による small dense LDL 測定 of 臨床的有用性

藤田誠一・森脇貴美・角谷勇実・宮崎真美・片山善章

SUMMARY

Small dense LDL is oxidized easily compared with LDL of the large particle diameter. Small dense LDL gave strongly rise to cause arteriosclerosis. Usually, human serum is ultra-centrifuged to measure the size of LDL particle, and the obtained LDL fraction is analyzed by gradient gel electrophoresis (GGE). The GGE method is very difficult in clinical laboratory. However, the method of using Lipophor can be done very handily. The separation analysis of the lipoprotein by the electrophoretic method which uses PAG will be expected of a clinical application as a risk factor of various diseases including arteriosclerosis with degenerated LDL which makes small dense LDL and oxidized LDL. A relative mobility for the LDL fraction showed the tendency to long in patient's serum of high concentration of triglyceride and Apo B. In each case with hyperlipidemia, diabetes, cardiac infarction, arteriosclerosis, cerebral infarction, and angina, abnormal rate of RM value admitted high to be tended intentionally compared with the healthy person group. The RM value especially tended to high for IIb and IV type of hyperlipidemia. As for the relation of mobility (RM) by the electrophoretic method compared with LDL-Chol/LDL-apoB which had been used as an index of small dense LDL for the LDL fraction, the relation of the reverse-correlation was admitted. Therefore, the method by the electrophoretic method of small dense LDL is very clinical usefull.

Key words: small dense LDL, PAG electrophoresis, arteriosclerosis.

はじめに

動脈硬化の原因として血漿リポ蛋白の代謝異常は、重要な要因の一つである。変性リポ蛋白は、その質的異常を示したものであり、糖化 LDL、酸化 LDL、レムナントリポ蛋白など、LDL の heterogeneity の存在が従来より知られていた¹⁻³⁾。

LDL は変性などの変化を介して内皮細胞に接着因子を発現させ、単球の接着を促進する。侵入した単球はサイトカインを放出するとともにマクロファージ化し、内皮下に侵入した LDL およびその代謝物を取り込む。次にマクロファージはレムナント・リポ蛋白や変性 LDL を取り込み細胞内に脂質を蓄積させ、コレステロールに富む泡沫細胞を形成^{4,5)} し、最終的粥状動脈硬化へと進展する。

また、近年生活習慣の変化により高脂血症を基盤とする動脈硬化性疾患が増加し、その関心が高まっている。これまでの疫学調査においてコレステロールが高値、HDL-コレステロール (HDL-C) が低値は虚血性心疾患の危険因子とされていたが、高トリグリセリド血症が独立した危険因子であるという認識が強くなっている。高トリグリセリド血症において密度の高い LDL すなわち small dense LDL の増加が起こる。この small dense LDL は、大粒子径の LDL に比べて易酸化性を有し、酸化 LDL はマクロファージを泡沫化し動脈硬化の進展に関与し、特に動脈硬化惹起作用が強いことが知られている^{6,7)}。

従来、この LDL の粒子サイズを測定するのには、血清を超遠心分離し、得られた LDL 画分を Krauss⁸⁾ らの密度勾配電気泳動法 (gradient gel electrophoresis; GGE) に

Clinical usefulness of small dense LDL measurement by PAG electrophoretic method.

Seiichi Fujita, Kimi Moriwaki, Isami Kakutani, Masami Miyazaki, Yoshiaki Katayama; 国立循環器病センター臨床検査部

Correspondence address: Seiichi Fujita, Laboratory of Clinical Chemistry, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fuji-shirodai, Suita 565-8565, Japan.

第 52 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

より解析している。また、この方法の操作の煩雑さから HPLC での分析も試みられている。

しかし今回我々は上記方法ではなく一般の臨床検査の場で行える方法として、ポリアクリルアミドゲル (PAG) を用いたディスクゲル (リポフォー：常光) およびスラブゲル (マルチゲル：第一化学) による LDL の相対移動度を small dense LDL の指標として測定した。

この方法としては、三島ら⁹⁾も GGE を用いる LDL 粒子サイズ測定法としての日常検査法は非常に困難であるが、リポフォーを用いる臨床応用は非常に簡便に行えると報告している。

また三島ら¹⁰⁾は脂質代謝異常の合併症である NIDDM において薬剤の血清脂質や LDL 粒子サイズにおよぼす影

響をリポフォーを用いて解析している。

試薬および方法

電気泳動法は、ディスク電気泳動法としてはポリアクリルアミド DISC 電気泳動法であるリポフォーシステム (常光), スラブ電気泳動法としてリポ蛋白分析用ポリアクリルアミドグラジエントゲルプレート (マルチゲルリポ; 第一化学) を用いた。マルチゲルリポは 2.4~15.2% ポリアクリルアミドのグラジエントゲルプレートを用いた電気泳動法であり、血清 10 μ l と検体処理液 (31% シュークロース, 0.06% EDTA 2 Na, 0.01% BPB) 45 μ l を混和し、ゲル当たり 25 mA 定電流に設定し、約 2 時間泳動する。ズダンブラック染色液に一夜程度振盪し、脱色、乾燥す

Fig. 1. リポ蛋白電気泳動法による LDL の移動度の測定.

Fig. 2. 電気泳動法によるリポ蛋白画分の移動度の測定.

る。泳動後の LDL の粒子サイズ評価法として、VLDL から LDL 先端までの距離は、各々、同一ゲル内に泳動したサイズマーカーとの相対移動度でその粒子サイズを推定した。一方、リポフォーシシステムは、血清 25 μ l と試料ゲル 200 μ l (ズダンブラックによる前染色) を混和後、光重合 30~45 分後、ゲル管当たり 3 mA 定電流に設定し、約 60 分泳動する。泳動後、LDL の粒子サイズ評価法として、VLDL から LDL までの相対移動度でその粒子サイズを推定した。

操作手順を Fig. 1 に示し、実際の泳動図を Fig. 2 に示した。

対 象

当センターで受診した患者検体 (30 代から 80 代) を用いて以下のように分類した。

母集団の総数は 1,217 例 (男性 555 例, 女性 662 例) で、さらに母集団より肝機能および腎機能が当センターの基準内であった検体を抽出群 I (総数 939 例, 男性 370 例, 女性 569 例で母集団の 77.2%), さらに抽出群 I より総コレステロール (TC) とトリグリセライド (TG) が当センターの基準範囲内であった検体を抽出群 II (総数 527 例, 男性 201 例, 女性 326 例で母集団の 43.3%) とした。

結 果

1. 健常人の RM 値

PAG ディスク電気泳動 (リポフォー) による母集団 (1,217 例) で RM 値 (mean $\pm$ SD) は 0.38 ± 0.032 であった。また抽出群 I (939 例) では 0.37 ± 0.029 であ

た。抽出群 II (527 例) では 0.036 ± 0.025 であった (Fig. 3)。すでに三島⁹⁾らが small dense LDL の存在が示唆される値としている 0.4 をカットオフ値としているのによく一致している。

また、職員検診検体 250 例について測定した結果が

Fig. 3. リポフォーによる各群の RM 値のヒストグラム。

RM値が 0.39を越えた検体

	TG	TG	HDL	RM
1	263	144	46	0.40
2	171	160	55	0.40
3	208	133	49	0.40
4	144	82	50	0.40
5	211	58	66	0.40
6	219	141	50	0.40
7	221	83	88	0.41
8	220	149	44	0.40
⑨	218	63	60	0.41
10	207	109	57	0.40
11	176	133	49	0.40
基準範囲	130~220	30~130	40~68	<0.40

Fig. 4. リポフォーによる職員検診検体における RM 値。

Fig. 4 である。RM 値の平均値は 0.37 であった。この中で RM 値が 0.39 を超えたのはわずか 11 例であった。これらの 11 例の中で例えば 9 番の検体のように TC, TG, HDL-C が正常であっても RM 値が 0.41 と異常である場合があり、従来のように量的に測定していると見逃す脂質の異常をこのように質的に測定することで解明できる例がある。泳動図からも明らかなように、9 番の検体の LDL 画分はより HDL 側に泳動されていることがわかる。したがって、LDL が small dense LDL あるいは酸化されて荷電の影響を受けている可能性があることもわかる。

2. 入院患者における RM 値の比較

Fig. 5 に示したように、抽出群 II (527 例) を対照群として当センターの動脈硬化代謝内科 (617 例), CCU (377 例), SCU (473 例) の各病棟の患者群との比較を行った。

Fig. 5. リポフォーによる入院患者における RM 値の比較。

RM 値 (mean±SD) は動脈硬化代謝内科で 0.37±0.034, CCU で 0.38±0.057, SCU で 0.37±0.033 であった。また、各群の RM 値が 0.4 を超える異常率をみると抽出群 II で 10.1%, 動脈硬化代謝内科で 19.8%, CCU で 25.2%, SCU で 12.5% であった。

3. 各種疾患の RM 値

Fig. 6 に示したように三島らが small dense LDL の存在が示唆される値としている 0.4 をカットオフ値とした時、健常人においては異常率が 5.5% であったのに対し、高脂血症、動脈硬化症、狭心症で異常率が 50% 以上であった。たとえば高脂血症は 61.9% と異常率が高いことが確認できた。

4. 高脂血症型別による RM 値の比較

Fig. 7 に示したように高脂血症を型別に分類し、各群での RM 値が 0.4 を超える異常率をみた。この中では IIb, IV 型での異常率が高く、IIa 型も異常率は高かった。高脂血症 IIb 型, IV 型分類においては高頻度に RM 値は高値を示したが、RM 値と脂質濃度との関係については small dense LDL が高トリグリセリド血症で高頻度に認められること、LDL 内コレステロールの比率が減少し、Apo B に富んでいると言われるように、RM 値は TG ($r=0.538$, $p<0.001$), Apo B ($r=0.583$, $p<0.001$), HDL-C ($r=-0.460$, $p<0.001$) と有意な相関性が認められた。

5. マルチゲルによる健常人および各種疾患における RM 値

Fig. 8 に示したように、リポフォーとの相関関係によりマルチゲルにおけるカットオフ値の参考値を求めた。マルチゲルによる健常人 44 例の RM 値 (mean±SD) は 1.109±0.109 であり、リポフォーとの相関関係から 1.23 をカットオフ値とした時、健常人では異常率が 15.9% で

Fig. 6. リポフォーによる各種疾患の Rf 値。

Fig. 7. リポフォーによる高脂血症型別による Rf 値.

Fig. 8. 健常人および各種疾患におけるマルチゲルによる Rf 値.

あったのに対し、高脂血症、糖尿病、脳梗塞、狭心症では異常率が60%以上であった。

まとめ

最近、糖尿病の合併症である動脈硬化症の発症過程において、VLDLやカイロミクロンなどTG-richリポ蛋白の血中での中間代謝産物であるレムナントリポ蛋白の存在が注目を集めている。VLDLやカイロミクロンなどのTG-richリポ蛋白は巨大であるため血管壁細胞には取り込まれないが、LPLの作用を受けて生じたレムナントリポ蛋白は小型化するため、細胞に取り込まれやすいと考えられている。また、レムナントリポ蛋白はTGを運搬するリポ蛋白であると同時にコレステロールを運搬するため、マクロファージ(Mφ)に取り込まれて泡沫化を促進することから、レムナントによって動脈壁内膜中に運び込まれるコレステロール総量はLDLによるものより多いとされて

いる。

一方、非糖尿病患者ではレムナントは速やかに代謝され、血中に長く存在することはない。逆に糖尿病患者では、インスリン作用不全による末梢でのLPL活性の低下あるいはレムナント受容体活性の低下などによりレムナントの代謝が著しく障害され、血中に停滞する。

Small dense LDLや酸化LDL等を代表とする変性LDLのPAGを用いた電気泳動法によるリポ蛋白の分離分析は、動脈硬化をはじめとして種々の疾患の危険因子として今後臨床応用が期待されている。

このことは、例えば糖尿病に合併する高脂血症は糖尿病のタイプや血糖コントロール状態によって影響を受ける。非糖尿病患者に比べ、糖尿病患者では高中性脂肪(TG)血症を呈するIV型、IIb型の出現頻度が高い。一方、総コレステロール(TC)が高値を呈するIIa型高脂血症の割合も増加してきている。病型を1型糖尿病と2型糖尿病に

大別すると、2型糖尿病では1型糖尿病に比べ高脂血症の合併が多い。2型糖尿病に伴う脂質代謝異常は高TG血症、低HDLコレステロール（HDL-C）血症が特徴的であり、リポ蛋白としてVLDLが増加する頻度が高い。これは内臓脂肪由来の多量のFFAが肝に流入することよりVLDL合成が促進される一方、末梢でのインスリン作用不足によりTGを加水分解するLPL活性が低下し、TG-richリポ蛋白の異化傷害が生じるためである。その結果、TG-richリポ蛋白の中間代謝産物であるレムナントの増加やsmall dense LDLの出現、HDL-Cの低下が促進され、動脈硬化の発症、進展に関与しているものと考えられる^{11,12)}。

以上をまとめると、

1. 血清中性脂肪、Apo Bの高値検体ではLDL画分の相対移動度が大きくなる傾向にあった。すなわち、血清中性脂肪、Apo Bの高値検体ではsmall dense LDLの指標であるLDL画分の移動度（RM）の大きい画分の出現頻度が高くなる傾向にあった。

2. Small dense LDLの指標であるRM値を用いることにより、健常者群に比し、高脂血症、糖尿病、心筋梗塞、動脈硬化、脳梗塞、狭心症、その他の心疾患、の各症例が有意に高値傾向にあることを認めた。

3. 高脂血症型別分類では、small dense LDLの指標であるRM値は健常者群に比し高値傾向にあったが、特にIIb、IV型で高値傾向にあった。

4. 従来よりsmall dense LDLの指標として用いられてきたLDL-Chol/LDL-apoB比との関係では、電気泳動法によるLDL画分の移動度（Rf）との間には逆相関の関係を認めた。

従来より動脈硬化性疾患の発症は、血清コレステロールの上昇、すなわち高LDL血症が最大の危険因子であることが、疫学、臨床研究、動物実験、大規模介入試験などの結果として示されている。

しかし、心筋梗塞や脳梗塞を発症した患者の血清脂質を見ると、必ずしも全例が高コレステロール血症の合併症というわけではなく、むしろHDL-コレステロールが低い例やTGが軽度～中等度上昇している例がよくある。例えば、心筋梗塞や脳梗塞は必ずしも高コレステロール血症がなくても発症していることがある。

すなわち、既に述べたように糖尿病などで脂質が変性を受け、量的に正常であっても質的に異常である場合には代謝異常が予想される。このような場合、従来の通常の測定では、この異常を確認することはできず、リポ蛋白のディ

スク電気泳動や変性リポ蛋白の測定を行ってこそ判明する。ここにディスク電気泳動を用いてのリポ蛋白の分析、small dense LDLなど変性リポ蛋白分析の臨床的有用性がある。

文 献

- 1) Adams GH, Schumaker VN. Polydispersity of human low-density lipoprotein. *Ann NY Acad Sci* 1969; 164: 351-64.
- 2) Hammond MG, Fisher WR. The characterization of a discrete series of low density lipoprotein in the disease, hyper-pre β -lipoproteinemia. *J Biol Chem* 1971; 246: 5454-64.
- 3) Shen MS, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoprotein in normal human subject. *J Lipid Res* 1981; 22: 236-44.
- 4) Cybulsky ML, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-91.
- 5) Kume N, Cybulsky ML, Gimbrone MA Jr. Lyso-phosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.
- 6) Sniderman AD, Kwiterovich PO. Hyperapobeta-apoproteinemia: A model to stretch and test the risk factor hypothesis. Latent. In: DeGenné JL, Polonovski J, Paoletti R, editors. *Dyslipoproteinemias and Atherosclerosis*. New York: Raven Press, 1984: 135-145.
- 7) Rand ML, Harfenist EJ, Murray RK. Plasma proteins, immunoglobulins and blood coagulation. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry* (24th ed.). Stanford: Prentice-Hall Int. Inc., 1996: 721-732.
- 8) Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.
- 9) 三島康男, 安藤 充, 久山文子, 石岡達司, 木畑正義. 簡便のPAG電気泳動キット（LipoPhor system）を用いたLDL粒子サイズの推定：LipoPrint LDL systemとの比較. *動脈硬化* 1997; 25: 67-70.
- 10) 三島康男, 久山文子, 安藤 充, 石岡達司, 木畑正義. 脂質代謝異常合併NIDDMに対するシロスタゾールの血清脂質およびLDL粒子サイズにおよぼす影響. *動脈硬化* 1999; 27: 17-22.
- 11) Reaven RM, Greenfield MS. Diabetic hypertriglyceridemia: Evidence for three clinical syndromes. *Diabetes* 1981; 30 (suppl. 2 A): 66-75.
- 12) Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD. Effect of diabetes and obesity on basal and diet-induced activity. *J Clin Invest* 1975; 56: 1108-17.