

論文内容の要旨

氏名	にし おひろ し 西 尾 博 至
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 6 0 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Qualitative analysis of midband lipoproteins, remnant and lipoprotein (a), by agarose gel electrophoresis and differential staining of lipids (アガロースゲル分染電気泳動法を用いたミッドバンドリポ蛋白の質的解析)
論文審査委員 (主査)	教授 古 田 格
(副主査)	教授 戸 村 隆 訓
(副主査)	教授 青 木 矩 彦

【目的】

従来の PAGE やアガロースゲル電気泳動法で pre-β分画とβ分画の間に泳動されるリポ蛋白は、midband リポ蛋白と呼ばれ、動脈硬化の危険因子とされる VLDL-remnant (IDL)、CM-remnant および酸化 LDL を代表とする変性 LDL など、異常リポ蛋白の存在が推定される。更に動脈硬化の危険因子の一つである Lp(a) も同部分に泳動されるため、midband リポ蛋白は動脈硬化および心血管疾患に強く関与していると考えられている。midband リポ蛋白の特性を明確にすることは、臨床に重要であるが、従来法では困難である。しかしながら Chol-Trig Combo™ (コレトリコンボ) を用いれば、コンピューター画面上で CHOL と TG の電気泳動波形を同時に組み合わせることにより、midband リポ蛋白の質的特性を明確にすることができる。本研究は、同法を用いて、従来法では不可能であった midband リポ蛋白の質的解析を行うことを目的とした。

【方法】

未治療かつ他疾患を有さない、PAGE で midband リポ蛋白を認めた高脂血症患者 50 例を対象とした。検体は食後 12 時間以上の空腹時に採取し、保存方法は Sigalov の報告に従い、コレトリコンボによる脂質解析を行った。代表的 IDL 例と高 Lp(a) 症例も同法で解析を行い、後者には抗アポ (a) 染色も施行した。Lp(a) と midband-CHOL/TG の相関は ROC 解析、二群間の比較には Student's-t 検定を行った。

【結果】

保存検体においては、保存期間により泳動波形、CHOL/TG の脂質構成とも差は見られず、IDL・Lp(a) はともに pre-β直前に泳動された。コレトリコンボでの解析の結果、midband リポ蛋白は大きく TG-rich と TG-poor な二つのパターンに分けられ、前者は IDL 例、後者は高 Lp(a) 例と酷似していた。Midband-CHOL/TG と Lp(a) との相関を ROC 解析したところ、cut-off 値 0.5、sensitivity 78.3%、specificity 92.6% であった。そこで対象症例を TG-rich midband 33 例 (CHOL/TG<0.5) と TG-poor midband 17 例 (CHOL/TG>0.5) の二群に分け、特性を比較した結果、TG-rich グループでは TG が高く、HDL-CHOL、apoA1/A2、Lp(a) が低かった。コレトリコンボによる脂質解析では TG-rich グループで α-TG、β-TG、pre-β-TG、pre-β-CHOL が高く、α-CHOL、α-CHOL/TG、β-CHOL/TG、pre-β-CHOL/TG が低かった。

【考察】

コレトリコンボは各リポ蛋白中の CHOL および TG の脂質構成を解析する事ができるため、従来の PAGE などでは成しえなかつたリポ蛋白の質的異常を同定する事ができる。特に atherogenic な種々のリポ蛋白を含む midband リポ蛋白の解析では、CHOL/TG 比 0.5 を用いることにより、VLDL-remnant (IDL) と Lp(a) の増加を推定しうる事ができた。ただ本法が RLP-C や Lp(a) といった確立された心血管危険因子を凌駕するとは考えない。しかしながら、リポ蛋白代謝全体をスクリーニングしうる検査として、二次的に RLP-C や Lp(a) を測定すれば、医療経済的にも有用な検査となると考えられた。今後の問題点としては、本法を用いて酸化 LDL など変性 LDL を同定しうる手法が開発されれば、より臨床に有用なシステムとなりうると考える。

論文審査結果の要旨

脂質と動脈硬化との関係についての研究は、約100年の歴史があるが、脂質分析が可能になると、最初にコレステロールが注目され、さらにリポ蛋白の分析が進むに従い、低比重リポ蛋白(LDL)がより密接に動脈硬化と関係するリポ蛋白として注目されてきた。近年では、LDLに加えて酸化LDLなどの変性LDLの存在が明らかとなり、これらは動脈硬化惹起性粒子として注目されている。またカイロマイクロン(CM)やVLDLなどの中性脂肪を多く含むリポ蛋白の中間代謝産物であるカイロミクロン-remnantやVLDL-remnant(IDL)などのレムナントも強い動脈硬化惹起性を有すると推定されており、レムナントを測定する測定法が近年開発されてきた。

現在、日常臨床検査で適用可能なリポ蛋白分画測定法としては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)やアガロース電気泳動法などがある。これらの電気泳動でpre-β分画とβ分画の間に泳動されるリポ蛋白は、midbandリポ蛋白と呼ばれ、動脈硬化の危険因子としてのVLDL-remnant、CM-remnantおよびLp(a)などの存在が推定される。このmidbandリポ蛋白の組成を明らかにすることは、臨床的意義付けを行う上で重要であり、現在も研究が継続されている。

今回の研究では、コンピューター画面上でCHOLとTGの電気泳動波形を同時に組み合わせることが可能な、Chol/Trig Combo™(コレトリコンボ)を用いて、従来法では困難であったmidbandリポ蛋白の質的解析がなされた。

研究の対象としたのは、未治療であり、糖尿病、肝疾患、腎疾患や虚血性心疾患などを有さないPAGEでmidbandを認めた50症例

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2004年 12月 日 公表予定	出版物名 Acta Medica Kinki University Vol.29 No.2
	公 表 内 容	2004年 12月 日 掲載予定
	全 文	

である。なお、研究を行う前に、研究主旨について説明し、同意を得ている。測定を行うには、採血条件や検査材料の保管が測定誤差要因となるため、検体採取は空腹時採血（食後 12 時間以上）で行い、血清は Sigalov らの方法により、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

測定に使用したコレトリコンボは、アガロースゲルを支持体とした自動電気泳動装置であり、HDL、VLDL や LDL など泳動分離し、次に、各リポ蛋白分画に含まれる CHOL や TG を酵素染色法により染色する独自の方法である。ちなみに、各分画における同時再現性 ( $n=24$ ) による精度検討では、それらの CV は 1~5% 内にあった。

検体の保存による影響を知るために、一週間後と四週間後の保存検体（正常）で本法による解析を行ったが、保存により泳動位、泳動波形や CHOL、TG 組成には変化はなかった。さらに、典型的な高 IDL 例と高 Lp (a) 例の検体でも同様にコレトリコンボによる解析を行い、IDL や Lp (a) が midband へ泳動されることを確認した。また統計学的手法として、Lp (a) と midband-CHOL / TG との相関には ROC (Receiver Operating Characteristics) 解析、二群間に比較には Student's-t 検定を用いて、精度の検討や有意差の比較を行った。

コレトリコンボによる解析の結果、midband は TG-rich と TG-poor の 2 つのパターンに分けられ、TG-rich 例は IDL 例、TG-poor 例は高 Lp (a) 例と近似していた。これより、midband-CHOL / TG と Lp (a) との相関を ROC 解析したところ、cut-off 0.5 において、感度 78.3%、特異度 92.6% であった。よって midband リポ蛋白は CHOL と TG の量的比 (0.5) から、高 VLDL-remnant (IDL) を推定しうる TG-rich 群 (midband CHOL / TG < 0.5) と高 Lp(a) を推定しうる TG-poor 群 (midband CHOL / TG > 0.5) に区別することができた。

さらに、TG-rich 群 33 例と TG-poor 群 17 例において、TG、TC や NEFA などの脂質、HDL-CHOL、各種アポ蛋白やコレトリコンボによる各脂質分画 (CHOL、TG、比率) などを測定し、二群間における有意差の検討を行った。その結果、二群間では TG ( $p < 0.001$ )、HDL-CHOL ( $p < 0.05$ )、Lp (a) ( $p < 0.0001$ )、apoAI/AII ( $p < 0.05$ ) や pre- $\beta$ -CHOL ( $p < 0.0001$ )、pre- $\beta$ -TG ( $p < 0.0005$ )、 $\beta$ -TG ( $p < 0.05$ )、 $\alpha$ -CHOL ( $p < 0.05$ )、 $\alpha$ -TG ( $p < 0.005$ ) などにおいて有意差が得られた。

これらの結果から、本法は midband のみならず、 $\alpha$ 、pre- $\beta$  および  $\beta$  分画の CHOL や TG の脂質構成を知ることが可能であり、従来の PAGE 法では困難であったリポ蛋白の粒子レベルでの質的異常を同定する事ができる。本研究においては、atherogenic なリポ蛋白を含む midband リポ蛋白を解析し、CHOL / TG 比 0.5 の判定点を用いることにより、現在、学問的に注目されている VLDL-remnant (IDL) と Lp (a) との関係性を明らかにしたことに意義があり、リポ蛋白の代謝異常やレムナントリポ蛋白のスクリーニング検査として、臨床検査への応用が期待できる研究である。

以上の点から本論文は医学博士の学位を授与するに値するものと認められた。