

学位申請論文

高速液体クロマトグラフィーによる
新規リポタンパク質分析法の開発

平成 29 年 9 月

眞仁田 大輔

略語一覧

ACE	angiotensin convertin enzyme: アンジオテンシン変換酵素
AEX	anion exchange: 陰イオン交換
ALT	alanine transaminase: アラニンアミノ基転移酵素
ARB	angiotensin II receptor blocker: アンジオテンシン II 受容体拮抗薬
AST	aspartate transaminase: アスパラギン酸アミノ基転移酵素
Apo (a)	apolipoprotein (a): アポリポタンパク質 (a)
BSA	bovine serum albumin: 牛血清アルブミン
BMI	body mass index: ボディマス指数
C	cholesterol: コレステロール
CAD	coronary artery disease: 冠状動脈疾患
CDC	Centers for Disease Control and Prevention: 米国疾病管理予防センター
CETP	cholesteryl ester transfer protein: コレステリルエステル転送タンパク質
CHD	coronary heart disease: 冠状動脈性心疾患
CKD	chronic kidney disease: 慢性腎疾患
CM	chylomicron: カイロミクロン
Cr	creatinine: クレアチニン
CRF	chronic renal failure: 慢性腎不全
CV	coefficients of variation: 変動係数
CVD	cardio vascular disease: 心血管疾患

dBP	diastolic blood pressure: 拡張期血圧
DEAE	diethylaminoethyl: ジエチルアミノエチル
eGFR	estimated glomerularfiltration rate: 推算糸球体濾過量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay: 酵素結合免疫測定法
FH	familiai hypercholesterolemia: 家族性脂質異常症
FPG	fasting plasma glucose: 空腹時血糖
FRS	Framingham risk score: フラミンガムリスクスコア
HbA1c	hemoglobin A 1c: ヘモグロビン A 1c
HDL	high-density lipoprotein: 高比重リポタンパク質
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl- coenzyme A: ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A
HPLC	high performance liquid chromatography: 高速液体クロマトグラフィー
IDL	intermediate-density lipoprotein: 中間比重リポタンパク質
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative: 腎臓病予後改善対策
LDL	low-density lipoprotein: 低比重リポタンパク質
LRPs	LDL receptor-related proteins: LDL 受容体関連タンパク質
Lp(a)	lipoprotein (a): リポプロテイン (a)、リポタンパク質 (a)
LPL	lipoprotein lipase: リポタンパク質リパーゼ
NKF	National Kidney Foundation: 米国腎臓財団
ODS	octadecylsilyl: オクタデシルシリル
rAEX-HPLC	rapid AEX-HPLC: 迅速 AEX-HPLC 法

RLP-C	remnant-like particle cholesterol: レムナント様リポタンパク質コレステロール
rS	Spearman's rank correlation coefficient: スピアマンの順位相関係数
sBP	systolic blood pressure: 収縮期血圧
SD	standard deviation: 標準偏差
TC	total cholesterol: 総コレステロール
TG	triglyceride: トリグリセリド、中性脂肪
VLDL	very low-density lipoprotein: 超低比重リポタンパク質
WHO	World Health Organization: 世界保健機構

要旨

低比重リポタンパク質 (LDL) 中のコレステロール (LDL-C) 値の上昇は、動脈硬化症進展のリスク因子であり、冠状動脈性心疾患 (CHD) の発症確率を高める。一方、高比重リポタンパク質 (HDL) 中のコレステロール (HDL-C) 値の上昇は、動脈硬化性疾患の予防に関与する。LDL は酸化を受けることで血管内膜に浸潤し、マクロファージによる貪食を受けて泡沫化を誘導し、プラークを形成する。プラークは、繊維被膜の亀裂や血流の増加等により破裂を引き起こす。プラーク破裂により血栓が形成され、血栓の巨大化により血管狭窄が起こり、最終的に心筋梗塞を誘発する。その一方で、HDL はコレステロール引き抜き能を有し、抹消組織のコレステロールを肝臓に引き戻す役割を担うとともに、抗酸化能を有すると考えられている。さらに、トリグリセリド (TG) 含有比率が高いリポタンパク質である中間比重リポタンパク質 (IDL) や超低比重リポタンパク質 (VLDL) は、動脈硬化性疾患発症の危険因子と考えられているが、HDL や LDL と比較して動脈硬化性疾患発症への寄与度は十分に明らかにされていない。脂質異常症の原疾患の特定や動脈硬化性疾患発症予防のために、リポタンパク質の分画比率を把握することは重要である。さらに主要なリポタンパク質以外にも、Lipoprotein (a) {Lp(a)} は血栓形成促進作用などを有するため、動脈硬化を進展させる危険因子として注目されている。

リポタンパク質は、超遠心分離法を用いて比重により分類され、比重 (密度) に応じた分類の名称が設定されている。現在でも、超遠心分離法はリポタンパク質の基準的な分離・分析法として、研究用途で使われている。しかしながら、超遠心分離法は操作が煩雑で時間も要し、さらに必要とする検体量も多く臨床検査として広く用いられていない。リ

ポタンパク質分画の臨床検査では電気泳動法が広く使用されている。電気泳動法は比較的簡便ではあるが、超遠心分離法に比べて分離能が低く、脂質異常を持つ一部の糖尿病患者でLDLとVLDLの分離不良が生じる。これらの背景から日常の検査で使用可能な、迅速で高精度なリポタンパク質測定法の確立が望まれている。

α -Tocopherol、 γ -tocopherol を主とするビタミン E は疎水性ビタミンの一種で、抗酸化能を有することが知られている。これらは血中ではリポタンパク質に取り込まれることによって運搬されている。リポタンパク質の抗酸化能や LDL の酸化機構にリポタンパク質中のビタミン E が大きく関与する可能性が考えられている。

リポタンパク質分画の検査では、迅速で簡便な方法が存在しないため、IDL や VLDL と動脈硬化性疾患発症の関連性について評価が進んでいないという課題があった。また、CM や Lp(a) 中のコレステロールに関しても簡便に定量する方法がなく、臨床的な有用性が検証されていない。さらに、リポタンパク質中のビタミン E は抗酸化能を有し、リポタンパク質の酸化を抑制すると考えられているが、簡便な測定方法が存在しないため、その関連性は明らかになっていない。これらの課題から、リポタンパク質やリポタンパク質中のビタミン E の測定に対して、迅速で簡便な測定法の開発が望まれていた。

本研究では、超遠心分離法に匹敵する分離能を有し、電気泳動法のように日常の臨床検査に適用できるリポタンパク質の迅速な分離・分析法を創出することを目的として迅速な陰イオン交換液体クロマトグラフィー (rapid AEX-HPLC: rAEX-HPLC) による分析法の研究開発に着手した。また本分析法を応用し、HDL、LDL、IDL、VLDL に加えて、

カイロミクロン (CM) や Lp(a) を測定する精密分析法を開発しその臨床的な有用性を評価した。また、リポタンパク質中ビタミン E の自動分析法を開発し、健常群と脂質異常症患者群でのリポタンパク質中のビタミン E 量との関連性を評価した。

本論文では、第 1 章 序 で、これら研究の背景を説明し、第 2 章で、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた rAEX-HPLC の開発について記載した。第 3 章で、rAEX-HPLC を応用し、Lp(a) を含むリポタンパク質 6 分画中のコレステロールと心疾患発症リスクスコアとの関連性について記載した。第 4 章で、陰イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを組み合わせたリポタンパク質中ビタミン E の自動分析システムの開発と臨床有用性の評価について記載した。最後に第 5 章に結論と総括を記載した。

はじめに、rAEX-HPLC 法の研究を実施した。カラムサイズや検体注入量の最適化の検討により、従来の測定時間と比較して大幅に短縮し、一検体あたり 5.2 分で測定が可能となった。本法による測定結果は、基準法の超遠心法と高い相関性を有し、再現性も良好であった。本研究では、健常人群、境界域高 LDL-C 血症群、脂質異常症群の 3 群に関して rAEX-HPLC の測定を実施し、リポタンパク質 5 分画中のコレステロール濃度によるリポタンパク質プロファイル評価を実施した。このプロファイル評価の結果から、境界域高 LDL-C 血症患者群と健常人群で、IDL-C と VLDL-C に関して有意な相違があることを明らかにし、IDL-C や VLDL-C が境界域 LDL-C 血症患者の臨床評価に有用である可能性が示唆された。

次に、rAEX-HPLC を応用し、CM、Lp(a) を含むリポタンパク質 6 分画中のコレステロールと CHD 発症リスクスコアとの関連性について検討した。日本人の健常男性 161

名を対象に、rAEX-HPLC によりリポタンパク質 6 分画中のコレステロールを測定した。得られたリポタンパク質プロファイル結果と年齢、慢性腎疾患の検査マーカーである推算糸球体濾過量 (eGFR) 、そして日本人を対象とした 3 つの CHD リスクスコアである NIPPON DATA リスク、久山リスク、そして吹田スコアとを比較した。eGFR は、AEX-HPLC における LDL-C、IDL-C、VLDL-C、そして CM-C と負の相関を示し、VLDL-C のみが独立して有意に eGFR と負の相関を示すことが明らかとなった。3 つの心疾患リスクスコアはいずれも、CM-C とそれぞれ有意な正の相関を示した。これらの結果から日本人健常男性において、VLDL-C は早期の腎疾患で上昇し、また CM-C が心疾患リスクを推測するマーカーとなりうることが示唆された。

最後にリポタンパク質中のビタミン E (α -tocopherol、 γ -tocopherol) の自動分析システムの開発と臨床有用性の評価を実施した。AEX-HPLC により、血中のリポタンパク質を HDL、LDL (IDL を含む)、そして VLDL の 3 つに分画し、逆相クロマトグラフィーで各リポタンパク質中の α -tocopherol、 γ -tocopherol に分離し、それらを蛍光検出器で定量した。本法の測定結果は、従来法に対して高い相関を示し、再現性も良好であった。VLDL 中のコレステロールあたりの α -tocopherol、 γ -tocopherol 比は健常群で脂質異常症群と比較して有意に高値であることが明らかとなった。本法によるリポタンパク質中のビタミン E 測定が臨床検査として有用である可能性が示唆された。

本研究で開発した測定法はそれぞれ高い分離性能を有し、従来法と良好な相関を示した。今後、冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患、糖尿病、慢性腎症などの診療や治療に対する検査法として適用可能だと考えられる。

目 次

第 1 章 序	12
1.1 動脈硬化性疾患と心疾患	12
1.2 リポタンパク質と脂質異常症	17
1.3 残余リスクとしてのリポタンパク質	20
1.4 リポタンパク質の分析法	20
1.5 Lipoprotein (a) と冠動脈疾患.....	23
1.6 心疾患リスクスコア	23
1.7 リポタンパク質の酸化と抗酸化	25
1.8 本研究の目的.....	26
第 2 章 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた迅速なリポタンパク質分析法の開発	28
第 1 項 背景.....	28
第 2 項 方法.....	30
2-1 対象	30
2-2 Rapid AEX-HPLC 法	31
2-3 性能確認試験	32
2-4 超遠心分離	32
2-5 電気泳動法	32

2-6 統計解析	33
第3項 結果.....	34
3-1 Rapid AEX-HPLC の分析条件設定	34
3-2 Rapid AEX-HPLC 法によるリポタンパク質分画の確認.....	38
3-3 超遠心分離法と rAEX-HPLC 法のリポタンパク質中コレステロール量の相関.....	40
3-4 電気泳動法と rAEX-HPLC 法における VLDL-C と CM-C の相関.....	42
3-5 Rapid AEX-HPLC の基本性能試験	44
3-6 健常群、境界域高 LDL-C 血症群、脂質異常症群のリポタンパク質プロファイル評価	45
第4項 考察.....	48
第3章 リポタンパク質 6分画中のコレステロールと心疾患発症リスクスコア	51
第1項 背景.....	51
第2項 方法.....	53
2-1 対象	53
2-2 血液検査	54
2-3 AEX-HPLC 法.....	54
2-4 リスクスコアの算出.....	55
2-5 統計解析	55
第3項 結果.....	57
3-1 AEX-HPLC (6分画) の分析条件設定.....	57

3-2	リポタンパク質プロファイルと年齢群の比較	60
3-3	リポタンパク質プロファイルと各種検査項目との比較検討	64
3-4	吹田スコア分類群と各種検査項目との比較検討	66
3-5	腎機能マーカー分類群と各種検査項目との比較検討	68
3-6	腎機能マーカー分類群と各種検査項目との比較検討	70
第4項	考察	71
第4章	リポタンパク質分画中ビタミンE測定法の開発	77
第1項	背景	77
第2項	方法	79
2-1	対象	79
2-2	ビタミンE自動分析法	79
2-3	超遠心分離法	80
2-4	ビタミンEの従来測定法とLDL酸化時間の測定	80
第3項	結果	81
3-1	ビタミンE全自動定量法の分析条件の設定	81
3-2	クロマトグラム	85
3-3	基本性能試験	87
3-4	従来法との相関	92

3-5 健常者群、脂質異常症患者群に対する自動分析システムによる γ - 及び α -tocopherol の比較.....	95
第4項 考察.....	97
第5章 総括.....	101
参考文献.....	104
謝辞.....	124

第 1 章 序

1.1 動脈硬化性疾患と心疾患

平成 27 年度の厚生労働省による人口動態統計月報年計によると、日本国での死亡率は死亡順位別に、悪性新生物: 28.7%、心疾患: 15.2 %、肺炎: 9.4 %、脳血管疾患: 8.7%、老衰: 6.6% と報告されている。¹(図 1.1) つまり、心筋梗塞や脳梗塞をはじめとする動脈硬化性疾患に代表される心・血管病の死亡率は、約 25 % にのぼる。また、加齢とともに動脈硬化性疾患発症率とそれに伴う死亡率は高まることが報告されており、少子高齢化が進む日本国において動脈硬化性疾患の発症予防は極めて重要な課題である。²⁻⁶

動脈硬化は、動脈の血管壁が厚くなる、または固くなることにより血液の循環が悪化する症状である。⁶ 動脈硬化によって引き起こされる心機能不全、血液送液不全、そして血管破断等が単独または組み合わさることで、心不全、心肥大、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血などを誘発すると考えられている。⁶ 血液中の過剰な低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein, LDL) や超低比重リポタンパク質 (very low-density lipoprotein, VLDL) は、酸化などの変性を受けることで血管壁に侵入し、マクロファージによる貪食を受ける。貪食を繰り返したマクロファージは泡沫化が誘導され、初期の動脈硬化巣を形成する。さらに動脈硬化巣は、長期にわたるコレステロール蓄積、血管平滑細胞の増殖、細胞外繊維組織の形成、石灰化などが加わって、進行した粥状硬化巣 (粥腫) を形成すると考えられている。^{6,7} (図 1.2) このような LDL の酸化から引き起こされる粥腫の形成機序は酸化 LDL 仮説とよばれる。^{7,8} 粥腫により血管内膜にプラークとよばれる内膜肥厚巣が形成され、内腔の狭小化や閉塞がもたらされる。さらに脂質に富むプラークは、繊

維被膜の亀裂や血流の増加等により破裂を起こしやすい。冠動脈におけるプラーク破裂は、破裂部で血栓が形成され内腔閉塞を誘発し、その結果として急性心筋梗塞を引き起こす。⁶(図 1.3) 疫学研究により、動脈硬化性疾患の主要な危険因子として、家族歴、加齢、喫煙歴、高血圧、糖尿病、慢性心疾患、そして脂質異常症が報告されている。^{5,6} 米国フラミンガムで 1948 年に開始された前向きコホート研究であるフラミンガム研究で、冠状動脈性心疾患 (coronary heart disease, CHD) の危険因子として、脂質異常、高血圧、喫煙が統計学的に三大危険因子として同定された。^{2, 9, 10} さらに、血中のコレステロール (cholesterol, C) の上昇が冠動脈疾患 (coronary artery disease, CAD) 発症リスクの上昇に関連すること、高比重リポタンパク質 (high-density lipoprotein, HDL) コレステロール (HDL-C) 値の低下、LDL コレステロール (LDL-C) 値の上昇が CAD の発症に関連することが示された。¹⁰⁻¹² また、数多くの研究によりヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A (hydroxymethylglutaryl- coenzyme A, HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であるスタチンによって、LDL-C を低下させることが CAD の発症を抑制することが示された。¹³⁻¹⁵ 日本動脈硬化学会では、日本国内での研究結果をもとに、動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版の中で、動脈硬化発症リスクを判断するために、脂質異常症の診断基準を設定している。⁵ 高 LDL コレステロール血症、低 HDL コレステロール血症、そして高トリグリセリド (TG) 血症は、空腹時採血による血中の LDL-C、HDL-C、TG の値をもとに診断される。⁵

このように血中の LDL-C、HDL-C を測定することは、動脈硬化性疾患の予防や治療、薬物療法の経過観察に必須である。

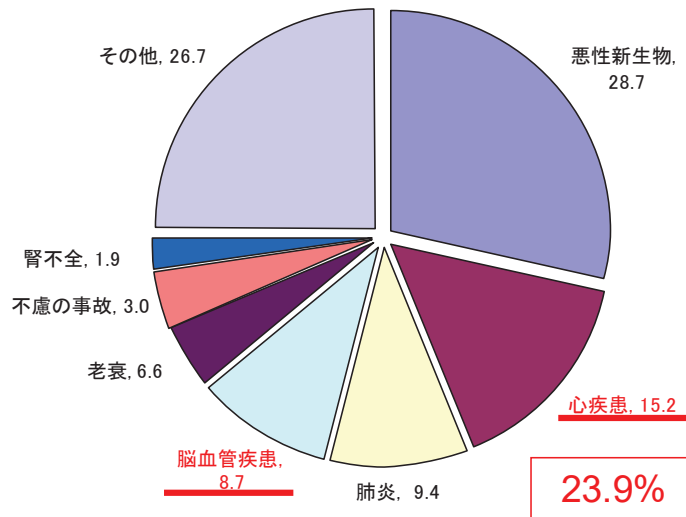


図1.1 日本の主な死因別死亡率

平成 27 年人口動態統計月報年計(厚生労働省)より一部改変
 心筋梗塞や脳梗塞がその多くを占める心疾患および脳血管疾患による死亡は、合わせて全体の約 24% となる。

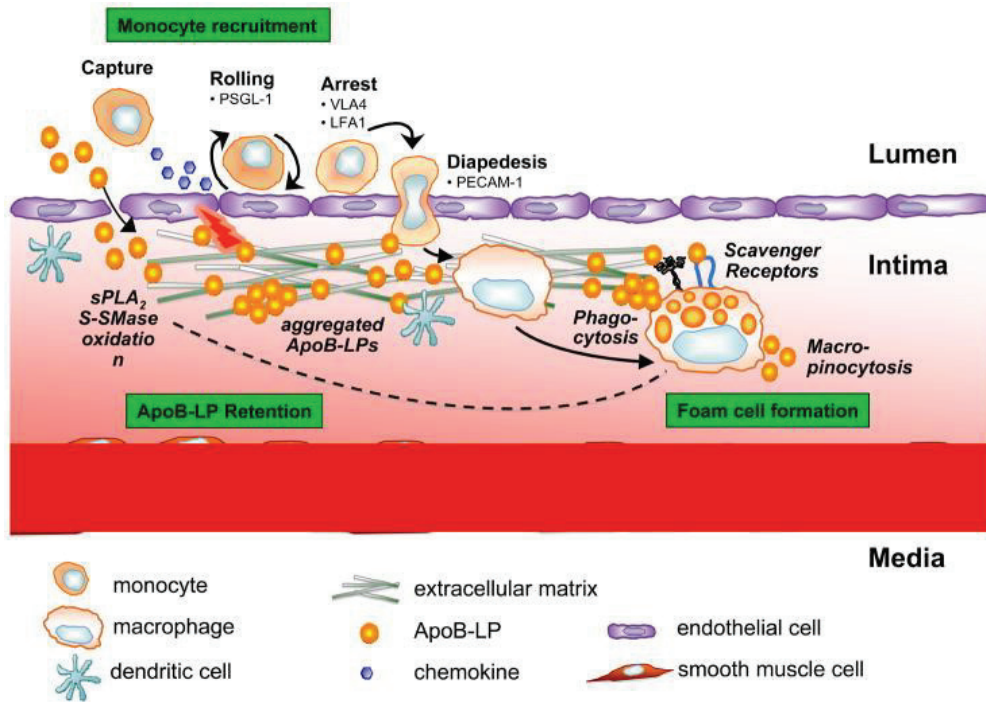


図 1.2 動脈硬化病変の形成

アポリポタンパク質 B を有する LDL や VLDL 等のリポタンパク質が酸化されることで血管壁に侵入し、マクロファージによる貪食を受けて泡沫化細胞が血管壁内で蓄積することにより動脈硬化病変が形成される。 Moore KJ, et al. Cell 2011;145; 341 より引用

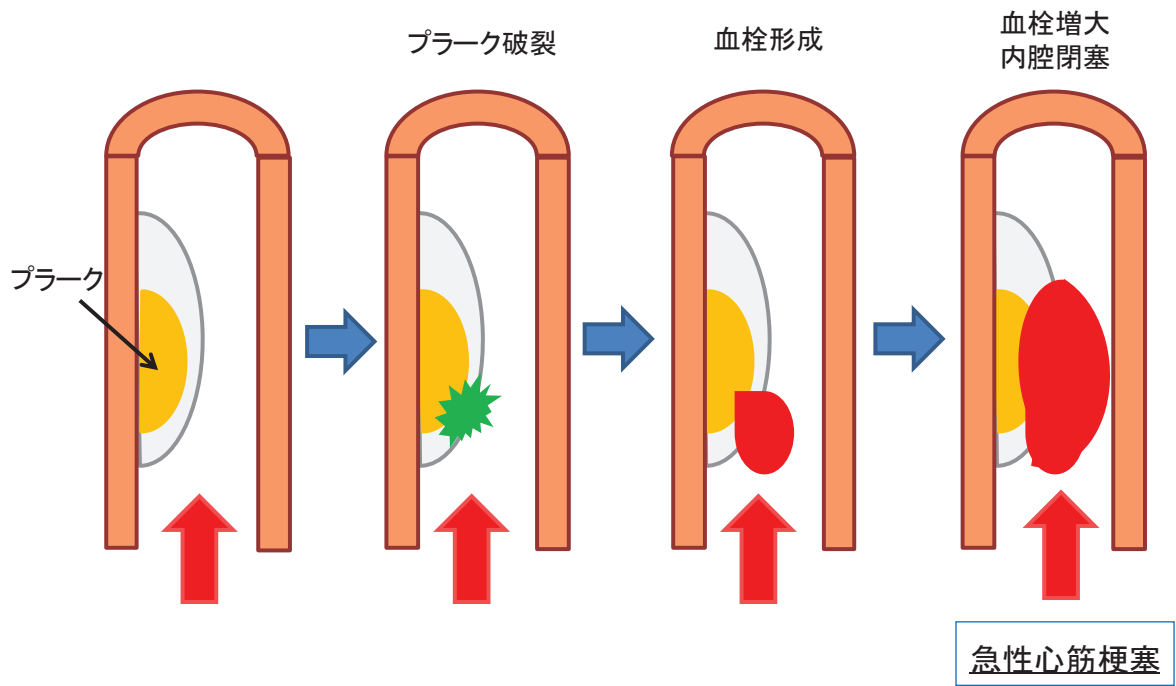


図 1.3 急性冠症候群のメカニズム

コレステロールに富む粥腫は構造的に脆い不安定性プラークを形成し、破裂すると血栓を生じて血管が閉塞し、心筋梗塞などの急性冠症候群を発症させる。

1.2 リポタンパク質と脂質異常症

リポタンパク質は、主に血中に存在する粒子で、TG、コレステロールエステル、遊離コレステロール、リン脂質等の脂質とアポリポタンパク質と呼ばれるタンパク質から構成される。¹⁶ リポタンパク質はその比重により、HDL ($1.063 < d < 1.21 \text{ kg/L}$)、LDL ($1.019 < d < 1.063 \text{ kg/L}$)、中間比重リポタンパク質 (intermediate-density lipoprotein, IDL) ($1.006 < d < 1.019 \text{ kg/L}$)、VLDL ($0.96 < d < 1.006 \text{ kg/L}$)、そしてカイロミクロン (chylomicron, CM) ($d < 0.96 \text{ kg/L}$) の主として5つに分類される。¹⁶ さらにそれぞれのリポタンパク質は、詳細な分類により、亜分画とよばれるサブクラスが存在する。例えば、HDL は、HDL2 ($1.063 < d < 1.125 \text{ kg/L}$)、HDL3 ($1.125 < d < 1.21 \text{ kg/L}$) そして、アポリポタンパク質 (Apo) E の含有比が高い高 ApoE HDL 等が存在し、亜分画の機能や役割はそれぞれで異なると考えられている。^{16,17} また、他のリポタンパク質として、Lipoprotein (a) {Lp(a)} が存在する。リポタンパク質は、比重だけでなく脂質の構成比率、粒子径、構成されるアポリポタンパク質の種類が異なっている。¹⁶(図 1.4) リポタンパク質代謝の概要を図 1.5 に示した。VLDL は肝臓で合成され、血中に放出され、リポタンパク質リパーゼ (lipoprotein lipase, LPL) により IDL に代謝され、肝性リパーゼにより速やかに LDL に代謝される。⁶ LDL は肝臓で合成されたコレステロールを抹消組織に運ぶ役割を担う。LDL と一部の IDL は LDL 受容体により肝臓に取り込まれ分解される。⁶ 一方で HDL は、抹消組織からコレステロールを引き抜き、HDL 受容体により肝臓に取り込まれるとともに、肝臓にコレステロールを引き戻す役割を担っている。⁶ さらに HDL は、コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) の働きによって LDL、IDL、VLDL から TG を引き抜き、コレステロールを受け渡すコレステ

ロール逆転送能を有す。¹⁸ 遺伝、食習慣、運動不足、肥満などを原因として、リポタンパク質の存在量や酵素活性の低下に伴い、リポタンパク質の存在比率が変化する。この存在量や存在比率の変化が脂質異常症の発症メカニズムとなっている。

		CM	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
比重		~0.95	0.95~1.006	1.006~1.019	1.019~1.125	1.063~1.125	1.125~1.210
直径 (nm)		75~1000	30~80	20.2~30.0	20.0~20.2	8.5~10.0	7.0~8.5
組成 (%)	トリグリセライド	84	50	23	11	4.5	4.1
	遊離コレステロール	2	7	9	8	5.4	2.9
	コレステロールエステル	5	12	29	37	16	12
	リン脂質	7	18	19	22	30	23
	タンパク質	2	8	19	21	41	55
アポタンパク質		B48, A-I, A-IV C, E	B100, C, E	B100, C, E	B100	A-I, A-II, C, E	A-I, A-II, C, E

図 1.4 リポタンパク質の比重と組成

リポタンパク質の組成やアポリポタンパク質は、各リポタンパク質で異なる。CM は 1 粒子あたり 1 分子の ApoB48 を含有するリポタンパク質であり、これらのリポタンパク質の中で最も大きく、比重も軽い。各リポタンパク質には、亜分画とよばれるサブクラスが存在すると考えられており、HDL では HDL2 や HDL3 といった亜分画が存在する。亜分画は比重や組成が異なる他、機能も異なると考えられている。

慢性疾患薬物治療法のツボ 脂質異常症[第 2 版] (日本医事新報社) から引用した。

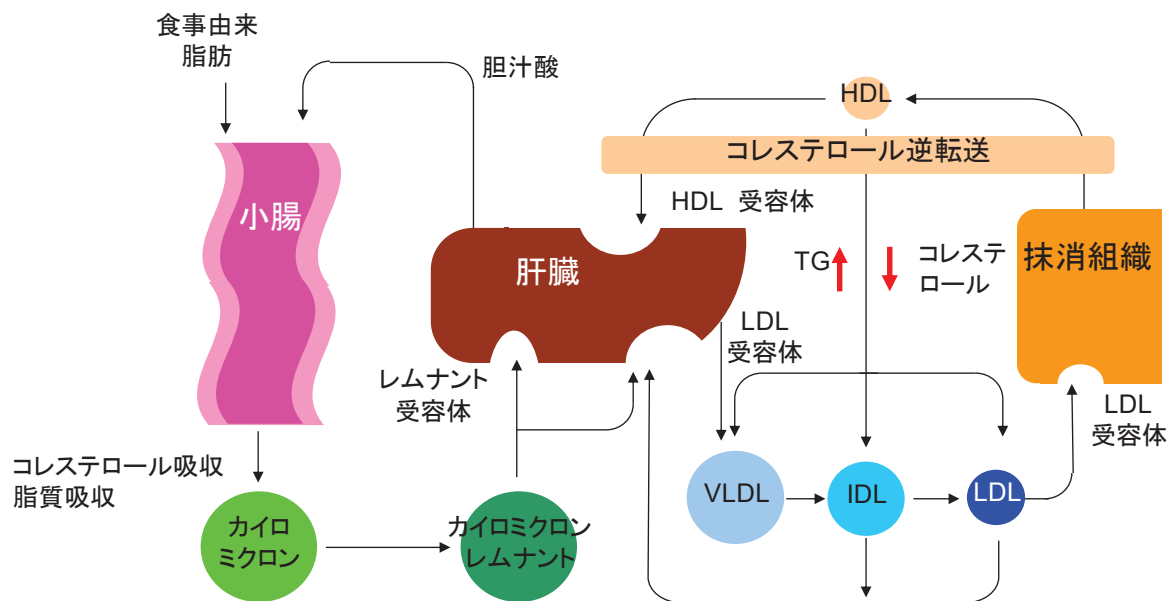


図 1.5 リポタンパク質代謝の概略

CM は食事由来の脂質を運搬するリポタンパク質であり、組織のエネルギー源となる TG を運搬する。VLDL は肝臓で合成され、CM と同様に TG を主に運搬する。代謝されて生じる LDL は各組織にコレステロールを供給する作用を有する。HDL は抹消組織からのコレステロールを引き抜くコレステロール逆転送に関与するリポタンパク質である。

動脈硬化予防のための脂質異常症治療ガイド 2013 年版を基に作成した。

1.3 残余リスクとしてのリポタンパク質

スタチンに代表される HMG-CoA 還元酵素阻害剤の開発により、LDL-C の低下が冠動脈疾患の予防に大きく貢献することが明らかにされた。¹³⁻¹⁵ 日本国を含め世界中で数多くの疫学研究によりスタチンが LDL-C の低下をもたらし、冠動脈疾患死や脳卒中発症等の減少に大きく寄与することが報告されている。その一方で、スタチン等の冠動脈疾患死の抑制はおおむね 3 割程度であり、スタチンの LDL-C 低下だけでは抑制することができない冠動脈疾患リスク (残余リスク) が存在すると考えられている。¹⁹ 残余リスクとして、小粒径で ApoB の存在比が大きい small dense LDL、レムナントリポタンパク質、高 TG リポタンパク質である VLDL、IDL やカイロミクロンレムナント、Lp(a) などが報告されているが、簡便で標準化された測定方法が存在しないため、動脈硬化性疾患との関連性についても未解明な部分も多い。^{5, 20-22}

1.4 リポタンパク質の分析法

リポタンパク質は、これまでに超遠心分離法、電気泳動法、そして HPLC を用いて分画され、研究が進められてきた。

Harvel らは、血中のリポタンパク質をその比重の違いによって、超遠心分離を用いて分画した。^{23,24} 超遠心分離法は、現在でもリポタンパク質分画の基準分析法となっている。²⁵⁻³¹

超遠心分離法では、比重の小さい CM から VLDL、IDL、LDL、そして HDL と段階的に連続して分画する必要がある。また、1 検体あたり多くの血清量を要し、多大な時

間がかかり、一度に多くの検体数を処理できないという欠点がある。²⁵

他のリポタンパク質分画分析法として、電気泳動法が用いられている。³² 主としてリポタンパク質の荷電の違いにより分離を行うアガロースゲル電気泳動法と、主としてリポタンパク質の分子サイズの違いにより分離を行うポリアクリルアミドゲル (PAG) 電気泳動法が存在し、保険診療として臨床使用されている。³³⁻³⁵ これらの電気泳動法は脂質と結合する色素によりリポタンパク質を検出する他、コレステロールや TG を染色してリポタンパク質を検出する方法も存在する。³⁴ 電気泳動法は、比較的簡便な検査である一方で、糖尿病患者検体や高TG血症検体の測定において一部分離不良がみられるという欠点も存在する。³²

原、岡崎らはゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、詳細なリポタンパク質分画を分析することに成功している。^{36,37} ゲル濾過クロマトグラフィーにおいても LDL や VLDL の分離が十分でない場合もある。³⁷ 廣渡らは、イオン交換クロマトグラフィーによるリポタンパク質分画法を開発した。^{32,38,39} 陰イオン交換カラムを用い、溶離液としてカオトロピック効果のある過塩素酸ナトリウム塩を使用することで、リポタンパク質を非常に高精度に分離可能することに成功している。³⁸ 陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX-HPLC) はカラムにより、HDL、LDL、IDL、VLDL、そして Other {Other のピークには、CM、カイロミクロンレムナン、Lp(a) が含まれると考えられる} の5つのリポタンパク質分画に分離し、コレステロール染色により、各リポタンパク質分画中のコレステロール値が定量可能である。³⁹ また、そのコレステロール値は超遠心分離法によって得られた各リポタンパク質分画中のコレステロールと高い相関を有することを報告している。³⁹ このように、本分析法は高い分離能を有

す一方で、一測定あたり20分を要し、臨床検査として広く使用されるためには処理能力が十分ではないという課題があった。このような背景から、IDL-C や VLDL-C を対象とした臨床研究は、これら測定法が抱える課題によって十分に進んでいない。

1.5 Lipoprotein (a) と冠動脈疾患

IDL や VLDL 等は、超遠心法による比重による分類わけがされた一方で、Lipoprotein(a) [Lp(a)] は超遠心法で分画することができないリポタンパク質である。Lp(a) は、LDL 粒子にアポリポタンパク質 (a) [Apo(a)] が結合したリポタンパク質であり、その比重は HDL と LDL の比重にまたがって広く分布する。⁴⁰ Apo(a) は線溶性のプラスミノゲンに似たタンパク質構造を持ち、プラスミノゲン活性を阻害すると考えられている。⁴¹ また、Lp(a) は LDL 同様に動脈硬化病巣への蓄積が確認され、CHD 発症のリスクマーカーとして考えられている。⁴² 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 では、Lp(a) はレムナントリポタンパク質、アポリポタンパク質 B と同様に CHD のリスク因子として位置づけられている。⁵

Lp(a) 値は遺伝的に決定されるが、家族性脂質異常症 (familial hypercholesterolemia, FH) 患者や腎障害でも上昇することが報告されている。^{43,44} また、最近の研究で、FH 患者において Lp(a) は、CHD の重要な予測因子と報告されている。⁴⁵ Lp(a) の測定法として、免疫反応に基づいた Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法やラテックス免疫比濁法等が広く用いられてきた。これらの試薬は、Apo(a) のクリングル IV-2 の繰り返し構造を認識する抗体を用いており、Apo (a) の表現型の違いが Lp(a) の測定結果に影響を与えると考えられている。⁴⁶

1.6 心疾患リスクスコア

米国の疫学研究であるフラミンガム研究の成果として、1998 年に 10 年間の CHD

発症を予測可能なフラミンガムリスクスコア (FRS) が報告された。² FRS は年齢、性別、総コレステロール値 (TC)、HDL-C、収縮期血圧、糖尿病の有無、喫煙の有無をスコア化し、その合計値を用いて CHD 発症リスクを判断する。² フラミンガム研究では、欧米人を対象としているが、日本人は心疾患イベント発症率に関して欧米人の 三分の一程度で大きく異なることから日本人への適用は限定的であった。⁴ 日本人を対象とした研究では、1980 年からの循環器疾患基礎調査の追跡研究である NIPPON DATA80 による冠動脈疾患死亡リスクチャート (NIPPON DATA リスク) が報告されている。³ 本リスクチャートは、今後 10 年間の CAD 死亡確率を評価している。³ また、動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版では、本リスクチャートを基にした冠動脈疾患絶対リスクチャートが掲載され現在臨床的に用いられている。⁵ 一方で、これらリスクチャートでは死亡確率を評価しているため、CAD の発症リスクを予測することはできない。

久山町研究は、福岡県久山町の比較的農村部の地域住民を対象に、50 年間以上にわたり生活習慣病 (脳卒中・虚血性心疾患、悪性腫瘍・認知症など) の発症を観察した前向き疫学調査である。⁴⁷ 久山町研究の研究データから、10 年間の CVD 発症確率を推定するための心血管疾患リスク予測モデル(久山リスク) が報告されている。⁴⁸ 久山リスクでは、年齢、性別、収縮期血圧、糖尿病の有無、LDL-C、HDL-C、喫煙の 7 つの因子を用いて CVD 発症リスクを算出する。⁴⁸

吹田研究は大阪府吹田市の比較的都市部の一般住民を対象とした疫学研究である。吹田研究のデータをもとに 10 年間の CHD 発症確率を推定するためのリスクスコアである吹田スコアが報告されている。⁴ 吹田スコアでは、年齢、性別、喫煙、糖尿病の有

無、血圧、HDL-C、LDL-C、慢性腎臓病 (CKD) の 8 つの因子を用いて CHD 発症リスクを算出する。⁴ CKD の評価として検査マーカーである推算 GFR (eGFR) の値を用いていることが大きな特徴となっている。CKD は現在非常に注目度が高く、有病者数も多い。CKD は糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病と合併し、動脈硬化症の進展にも関与する。⁵

1.7 リポタンパク質の酸化と抗酸化

ApoB を含有する LDL や VLDL 等のリポタンパク質は、酸化されることで血管壁に侵入し、マクロファージによる貪食を受け、泡沫細胞を形成する。泡沫細胞は血管壁内でさらに蓄積することにより動脈硬化病巣が形成される。⁶⁻⁸ リポタンパク質の酸化は生体内で酸化ストレスを受けることによって生成され、マクロファージや内皮細胞から生成される活性酸素やそれに由来する遊離基によりリポタンパク質内の脂質、ApoB のアミノ酸部分が酸化すると考えられている。¹⁶ その中で、ビタミン E は重要な脂溶性の抗酸化物質であり、ヒトの血中では α - および γ -tocopherol が主として存在する。⁴⁹⁻⁵⁰ (図 1.6) これまでの研究で、ビタミン E の摂取により、リポタンパク質中のビタミン E が増加することで VLDL や LDL の酸化が抑制されることが報告されている。⁵¹⁻⁵⁴ 従って、ビタミン E の摂取は LDL の酸化を抑制し、血管内皮におけるマクロファージの泡沫化を抑制すると考えられる。^{54,55} 実際に、ApoE 欠損マウスではビタミン E の摂取により動脈硬化の発症が減少している。⁵⁶ いくつかのヒトを対象とした臨床研究では、ビタミン E の摂取により CAD の発症リスクが減少したという報告がある一方で、ビタミン E 摂取と発症リスクに影響

響はないという報告もある。⁵⁷これらの研究では、リポタンパク質中のビタミン E は定量されていないため血中のビタミン E とリポタンパク質の酸化や動脈硬化との関連を評価するためにも簡便なリポタンパク質中のビタミン E 定量法が望まれていた。

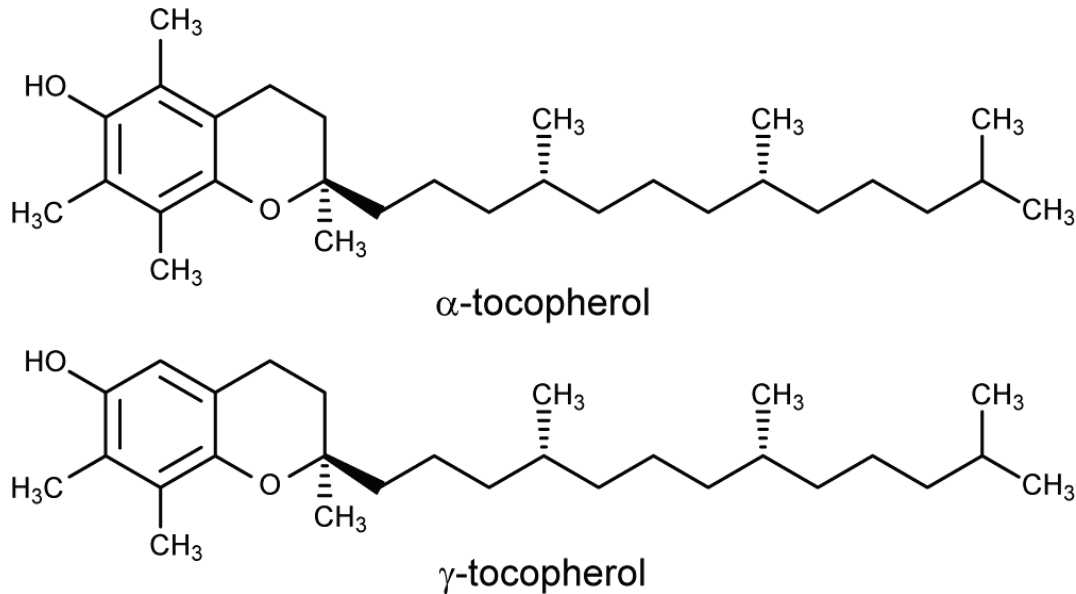


図 1.6 ビタミン E (α 、 γ -tocopherol) の構造式

Tocopherol の構造式を示した。Tocopherol には、 α 、 β 、 γ 、 δ -tocopherol が存在する。ヒトの血液中には、主に α 、及び γ -tocopherol が存在する。

1.8 本研究の目的

リポタンパク質分析では、迅速かつ簡便で分離性能の良い検査法が存在していなかった。第 2 章では、日常検査として使用可能な迅速なリポタンパク質分析法の開発を目的とし、従来研究が十分に行われていなかった IDL や VLDL の臨床的な有用性を評価した。また、Lp(a) に関してもその測定法は標準化されておらず動脈硬化症との関連性で未解明な部分も多い。第 3 章では、Lp(a) 中のコレステロール量を測定可能な、リ

ポタンパク質 4 分画 (HDL、LDL、IDL、VLDL) の他に CM 及び Lp(a) を加えたリポタンパク質 6 分画中のコレステロールを定量可能な分析法を開発することを目的とした。CM-C や Lp(a)-C の臨床的な有用性を評価した。さらに、リポタンパク質の酸化では、酸化 LDL の測定が行われているが、その測定には標準法が存在しない。第 4 章では、リポタンパク質酸化の指標として、還元物質であるビタミン E に注目し、リポタンパク質分画中のビタミン E を全自動で定量可能なシステムの開発を目指した。そして、各リポタンパク質中のビタミン E と脂質異常症との関連性について評価した。

本研究は、高速液体クロマトグラフィーを原理としたリポタンパク質またはその構成物質の測定法を開発し、動脈硬化性疾患あるいはそのリスク因子である脂質異常症の検査法としての有用性を評価したものである。

第 2 章 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた迅速なリポタンパク質分析法の開発

第 1 項 背景

血中 LDL-C の上昇は、動脈硬化進展のリスク因子であり、冠動脈疾患の発症率を上昇させることが明らかになっている。^{58, 59} 一方で、HDL-C は動脈硬化進行の負のリスク因子であり、HDL-C の低下により冠動脈疾患の発症率が高まると考えられている。^{12, 60} さらに IDL や VLDL そして CM の上昇も冠動脈疾患のリスクに関与すると考えられている。⁶¹⁻⁶³ 脂質異常症は原発性（遺伝性）または脂質代謝異常の続発性に分類され、いずれも動脈硬化症の危険因子である。脂質異常症の表現型分類である WHO 分類はリポタンパク質上昇パターンに基づいた生化学的な分類法として臨床で用いられている。（表 2.1）^{16, 64} 従って、詳細なリポタンパク質分析は重要な臨床情報を提供し、脂質異常症の予防や治療に大きく貢献する。

従来、リポタンパク質分画は超遠心法により分離されてきたが、使用する血清量が多く、また分析に時間がかかるという課題があった。²³ これまでに、AEX-HPLC 法を原理としたリポタンパク質分画法を開発し、その分析結果は超遠心法と優れた相関性を有することを報告してきた。³⁹ その一方で AEX-HPLC 法でも一検体あたり 20 分以上測定時間を要するため、日常検査で使用されるには十分な処理能力ではなかった。

このような課題を背景とし、日常検査で使用可能なリポタンパク質分画法として迅速

な AEX-HPLC システム (rapid AEX-HPLC: rAEX-HPLC) の開発に着手した。続いて rAEX-HPLC の基本性能評価を実施した。最後に、rAEX-HPLC 法を用いて脂質異常症患者、境界域高 LDL 血症患者、そして健常者のリポタンパク質プロファイルの評価を実施した。

表 2.1 WHO の脂質異常症の表現型分類

	I型	IIa型	IIb型	III型	IV型	V型
血中に増加している リポタンパク質	CM	LDL	LDL VLDL	IDL	VLDL	CM VLDL
血清脂質	TC ↑ TG ↑↑↑	TC ↑~↑↑ TG →	TC ↑ TG ↑	TC ↑ TG ↑↑	TC →~↑ TG ↑↑	TC ↑ TG ↑↑↑

脂質異常症(高脂血症)を診断、治療するうえで、増加しているリポタンパク質が何かを把握することが重要である。増加しているリポタンパク質をもとに高脂血症を分類したものが WHO の高脂血症分類である。文献 16 より一部改変

第2項 方法

2-1 対象

本研究は、慈恵会医科大学及び東ソー株式会社バイオサイエンス事業部による倫理委員会の承認のもと実施された。採血は同意書による確認のもとに実施され、個人名を削除し別の符号で管理されて検討した。

超遠心分離法との相関を確認するために血清 35 検体を東ソー株式会社東京研究所に勤務する健常人ボランティア (男性 31 人、女性 4 人、年齢: 56.5 ± 16.4 歳、TC: 236.8 ± 48.8 mg/dL、TG: 250.5 ± 147.8 mg/dL) から得た。VLDL と CM 層 (比重 $d < 1.006$ g/mL) を超遠心分離法によって分離評価するため、高 TG 血症の 40 検体を慈恵会医科大学附属柏病院に通院した患者 (男性 24 人、女性 16 人、年齢: 55.8 ± 15.5 歳、TC: 221.3 ± 49.7 mg/dL、TG: 941.1 ± 546.8 mg/dL) から得た。

空腹時採血により血清 141 検体を東ソー株式会社東京研究所に勤務する健常人ボランティアより得た。採血時点で薬物治療中でなく、心臓、肝臓、糖尿病などの疾病の診断がない者を対象とした。それらを以下の 3 つの群に群分けした。Group-1: 健常群 (LDL-C < 120 mg/dL、HDL-C ≥ 40 mg/dL、かつ TG < 150 mg/dL)、Group-2: 境界域高 LDL コレステロール血症群 ($120 \leq$ LDL-C < 140 mg/dL、HDL-C ≥ 40 mg/dL、かつ TG < 150 mg/dL)、そして Group-3: 脂質異常症群 (LDL-C ≥ 140 mg/dL、HDL-C < 40 mg/dL、または TG ≥ 150 mg/dL) とした。日本動脈硬化学会における動脈硬化性疾患予防のためのガイドラインでは、脂質異常症の診断基準として LDL-C ≥ 140 mg/dL、HDL-C < 40 mg/dL、または TG ≥ 150 mg/dL として定義され、境界域高 LDL コレステ

ロール血症群は、 $120 \leq \text{LDL-C} < 140 \text{ mg/dL}$ で定義されている。⁵

2-2 Rapid AEX-HPLC 法

分析時間の短縮のために、従来の測定条件を見直し、rAEX-HPLC 法の検討を実施した。^{39, 65, 66} 本研究では、rAEX-HPLC システムを新規設計し、HLC-729LP2 (東ソー株式会社、東京) として開発した。HLC-729LP2 は、ポンプ、オートサンプラー、カラムオーブン、リアクター、可視検出器から構成された。リポタンパク質プロファイルの測定及び各種検討は HLC-729 LP2 を使用した。コレステロール反応試薬は HLC-テスト「TOSOH」リポプロパック (東ソー株式会社、東京) を用いた。カラム充填剤には、非多孔性で diethylaminoethyl (DEAE) 基を有する直径が $2.5 \mu\text{m}$ のポリマー系ゲルを開発した。カラムは、カラムサイズが $2.5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ のステンレスカラムである TSKgel Lipopropak-AEX II (東ソー株式会社、東京) を新規設計し、使用した。各種リポタンパク質を、それぞれの表面に有する負電荷とカラム充填剤にある正電荷との相互作用により吸着させ、溶離液によって分離を行う。測定には、リポタンパク質中のコレステロールを酵素反応によって発色するポストカラム法で行った。コレステロールエステルはコレステロールエステラーゼにより遊離脂肪酸と遊離コレステロールに分解し、生じた遊離コレステロールとともに存在した遊離コレステロールを、コレステロールオキシダーゼで分解し、過酸化水素を生成させた。生成した過酸化水素を用いてペルオキシダーゼによりキノン色素を生じさせ、 590 nm の波長で検出することでコレステロール量を求めた。コレステロール

濃度が既知である標準品の検出強度から換算式を作成し、溶出された各リポタンパク質分画中のコレステロール濃度を換算した。

2-3 性能確認試験

希釈直線性を確認するため、東京慈恵会医科大学附属柏病院で採取した脂質異常症患者検体（男性、49歳、TC: 143 mg/dL、TG: 272 mg/dL、HDL-C: 40.9 mg/dL、LDL-C: 77.2 mg/dL、IDL-C: 11.1 mg/dL、VLDL-C: 28.6 mg/dL、Other-C: 15.9 mg/dL）を使用した。希釈液として 5% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 溶液を使用した。日内同時再現性と日差再現性は、凍結ヒトプール血清 (TC: 281 mg/dL、TG: 179mg/dL) を使用した。

2-4 超遠心分離

過去の報告に基づいて、超遠心分離を実施した。²³分画の比重は、VLDLとCM層: $d < 1.006$ g/mL、IDL層: $1.006 < d < 1.019$ g/mL、LDL層: $1.019 < d < 1.063$ g/mL、HDL層: $1.063 < d < 1.182$ g/mL とした。遠心分離機は、Himac CS100GXII (日立工機株式会社、東京)、ローターは S58A-0112 (日立工機株式会社、東京) を使用した。

2-5 電気泳動法

リポタンパク質分画 (アガロース電気泳動法)、リポタンパク質分画 {ポリアクリルアミドゲルディスク (PAG) 法}、コレステロール分画 (アガロース電気泳動法) の測定は、株式会社エスアールエル(東京) に委託した。

2-6 統計解析

測定結果は平均値±標準偏差 (standard deviation, SD) で表した。有意水準は $p < 0.05$ を有意とみなした。多群同時比較は Bartlett 検定に基づき一元配置分析または Kruskal-Wallis 検定で評価した。二群間検定は、F 検定に基づき t 検定 (Student's t test) または Mann-Whitney 検定で評価した。相関は Pearson の相関係数により評価した。特定要因の因果関係解析には、複数の独立変数を含む逐次多重ロジスティック回帰分析で評価した。統計解析は、Stat Flex Ver 6.0 (アーテック) を使用した。

第3項 結果

3-1 Rapid AEX-HPLC の分析条件設定

リポタンパク質を迅速に分画するために、分析カラムの最適化を実施した。検討により 2.5 mmID x 10 mm のカラムサイズを採用した。カラム充填剤には、非多孔性で diethylaminoethyl (DEAE) 基を有する平均直径が 2.5 μm のポリマー系のゲルを新規に設計した。非多孔性のゲルを用いることで、分離性能を向上することが可能であり、時間短縮にも貢献すると考えられた。また、本カラムは、従来法のカラムサイズ 4.6 mmID x 20 mm から小さくすることで、ピークの広がりを小さくし、検出感度を上げることが可能になった。その結果、注入量低減も可能になり、従来の 3.5 μL から 1.0 μL まで低減させた。注入量の削減は、カラム洗浄時間の短縮やカラムの長寿命化に大きく貢献する。ステップグラジエントの 5 段階目の溶出では、Other 画分を溶出させるとともに、カラムの洗浄工程を兼ねる。その後カラム平衡化段階を設ける。カラム洗浄工程では、4 段階目の溶出と比べて塩濃度を急激に上昇させ、その後のカラム平衡化段階では急激に下降させる必要がある。従来法の 2 液混合系では、5 段階目の洗浄工程と平衡化段階を安定して実施するためにそれぞれの段階で時間を要していた。これらの時間を削減するために、rAEX-HPLC 法では、カラム洗浄の専用溶離液を設け、溶離液第 1 液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)、溶離液第 2 液 (50 mM Tris-HCl + 250 mM 過塩素酸ナトリウム (NaClO_4), pH 7.5)、そして溶離液第 3 液 (400 mM NaClO_4 , pH 7.5) による 3 液混合によるステップグラジエント溶出のシステムとした。溶離液や反応液はポンプにより送液され流速を早めることで測定時間の短縮に寄与する。その一方で、流速を早めることはカラム

の圧力上昇、クロマトグラムの分離不良、そして溶離液や反応液の消費量増加に寄与する。日常の臨床現場で利用される場合、コスト削減の観点からもカラムの使用耐久性を向上させ、溶離液や反応液の消費量を抑える必要がある。従来法に比べて rAEX-HPLC 法では流速を低く設定 (溶離液 3 液合計 0.625 mL/min、反応液 0.25mL/min) し、一検体あたりの測定に必要な溶離液と反応液の使用量を、従来比で約 20% および約 16% まで削減した。本研究では、表 2.3 に示す溶出条件を設定した。従来法と rAEX-HPLC 法のクロマトパターン例と塩濃度の推移を図 2.2 に示した。従来法では一検体あたり 20 分の分析時間を要していたが、rAEX-HPLC 法では、一検体あたり 5.2 分にまで測定時間を短縮することができた。

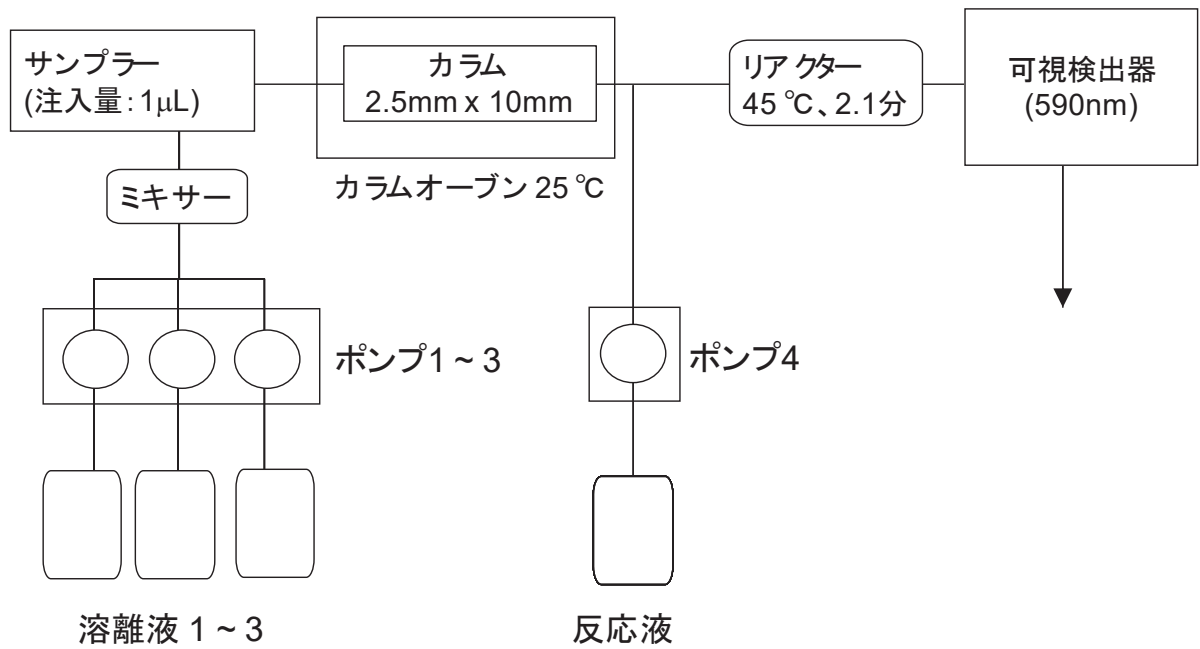


図 2.1 Rapid AEX-HPLC 法のシステム概略

過塩素酸ナトリウム濃度が異なる 3 種類の溶離液を 3 つのポンプで送液した。3 液の合計流量は 0.625 mL/min で一定とした。ミキサーにより十分に混合し、1.0 μL の血清検体が自動注入され、カラムに送液される。カラムは 25°C で一定に温調されており、陰イオン交換により各リポタンパク質を分離した。反応液はポンプにより 0.25 mL/min で一定に送液され、カラムから溶出されたリポタンパク質中のコレステロールを染色した。45°C で一定に温調されたリアクターで十分な反応をさせた後、検出器でコレステロール由来の吸光を検出した。

表 2.2 従来法と rAEX-HPLC 法の仕様

		従来法	rAEX-HPLC 法
測定時間		20.0 分/検体	5.2 分/検体
注入量		3.5 μ L	1.0 μ L
カラム	カラムサイズ	4.6 mm ID \times 20 mm	2.5 mm ID \times 10 mm
	充填剤	ポリマー系、DEAE 基	ポリマー系、DEAE 基
	充填剤の平均粒径	2.5 μ m	2.5 μ m
溶離液	溶離液数	2	3
	グラジエント方法	ステップグラジエント	ステップグラジエント
	流速	0.800 mL/分	0.625 mL/分
反応液	流速	0.400 mL/分	0.25 mL/分
反応条件	反応温度	37 $^{\circ}$ C	45 $^{\circ}$ C
	時間	5.0 分	2.1 分
検出条件	検出波長	600 nm	590 nm
	光源	ハロゲンランプ	LED

表 2.3 Rapid AEX-HPLC 法における溶離液 1 液、溶離液 2 液、溶離液 3 液のステッ

プグラジエント溶出条件

試料注入からの 経過時間 (分)	混合比率 (%)			過塩素酸ナトリウム 濃度 (mM)	備考
	溶離液第1液	溶離液第2液	溶離液第3液		
0.00	59.5	40.5	0.0	101.25	
1.05	51.5	48.5	0.0	121.25	
2.22	48.0	52.0	0.0	130.00	
3.00	20.0	80.0	0.0	200.00	
3.76	0.0	0.0	100.0	400.00	兼 洗浄工程
4.22	85.0	15.0	0.0	37.50	兼 平衡化工程

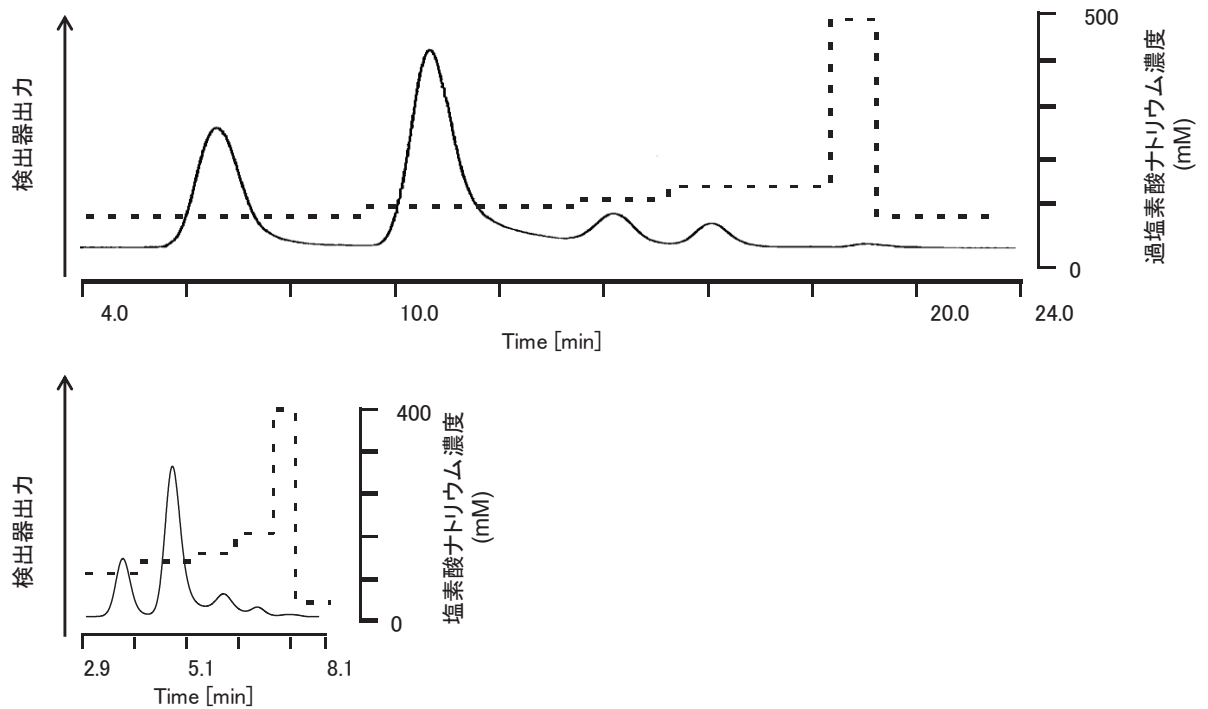


図 2.2 従来法と rAEX-HPLC 法のクロマトパターン例と塩濃度の推移

従来法と rAEX-HPLC 法で同じ検体を測定した。クロマトグラムを実線で、塩濃度の変化を点線で示した。Rapid AEX-HPLC 法では、検体注入から検出器まで約 2.9 分を要した。2.9 分に検出データの収集を開始し、注入から 5.2 分後の 8.1 分に終了した。検体注入から 5.2 分後に次の検体を注入した。連続した測定を実施することで、一検体あたり 5.2 分で測定可能であった。

3-2 Rapid AEX-HPLC 法によるリポタンパク質分画の確認

健常人血清を用いて、rAEX-HPLC 法で分析した結果、図 2.3 (e) で示されるように 5 つのピークを有するクロマトグラムを得た。ピークの溶出時間は、3.8 分、4.9 分、6.0 分、6.8 分、そして 7.3 分であった。次に、同じ健常人血清を用いて超遠心分離により分画し、各分画を同様に rAEX-HPLC 法で測定を実施した。超遠心分離による VLDL + CM 分画 ($d < 1.006 \text{ g/mL}$) は、図 2.3 (d) で示されるように 2 つのピークが見られ、

溶出時間は 6.2 分と 6.8 分であった。IDL 分画 ($1.006 < d < 1.019 \text{ g/mL}$) は、1 つのピークが見られ、6.0 分であった {図 2.3 (c)}。LDL 分画 ($1.019 < d < 1.063 \text{ g/mL}$) は、1 つのピークが見られ、4.9 分であった {図 2.3 (b)}。HDL 分画 ($d > 1.063 \text{ g/mL}$) は、2 つのピークが見られ、主要なピークの溶出時間は 3.8 分、もう一方のピークは 7.4 分であった {図 2.3 (a)}。次にヒト血漿からアフィニティークロマトグラフィーで精製された Lp(a) (Biomedical technologies Inc., USA) を rAEX-HPLC 法で測定した。その結果、単一のピークが検出され、その溶出時間は 7.4 分であった {図 2.3 (f)}。

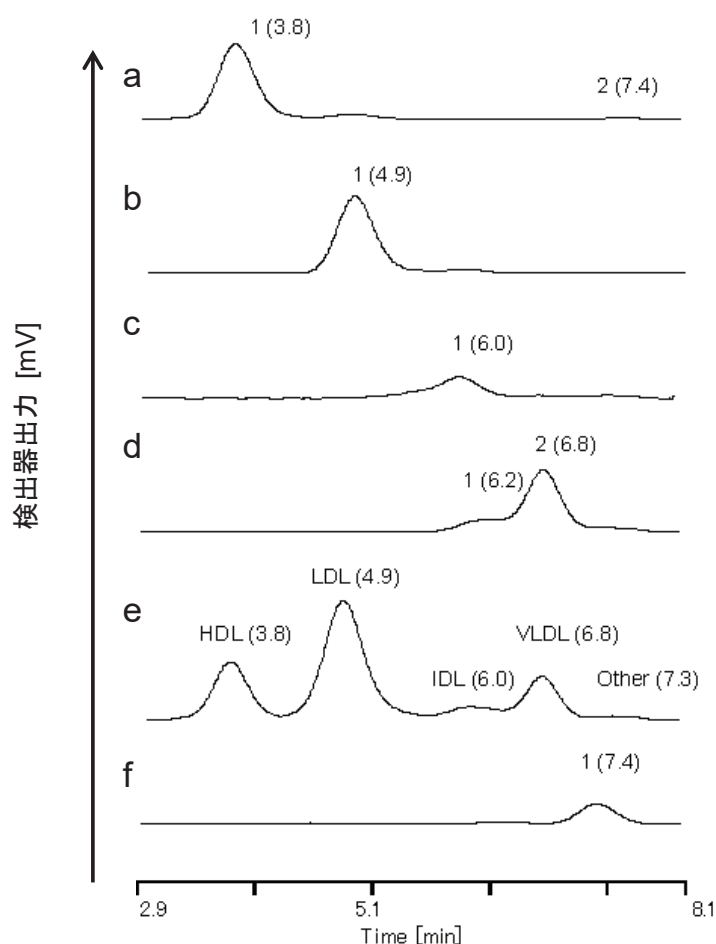


図 2.3 超遠心によるリポタンパク質分画または Lp(a) 精製品の AEX-HPLC 法の

測定結果

3-3 超遠心分離法と rAEX-HPLC 法のリポタンパク質中コレステロール量の相関

Lp(a) の影響をできる限り除外するため、Lp(a) タンパク質量 {Lp(a)-mass} の値が 30 mg/dL 以下の検体を用いて評価した。35 検体の脂質異常症患者血清を超遠心分離により、VLDL+CM、IDL、LDL、HDL に分画した。各分画は、TC 測定用試薬「セロテック」TCHO-CL (セロテック株式会社、北海道) によりそれぞれの分画中のコレステロール量を定量した。また、同検体を rAEX-HPLC 法で測定し、リポタンパク質 5 分画のコレステロール量を測定し、超遠心法との相関を確認した。超遠心分離における VLDL+CM に対し、rAEX-HPLC 法における VLDL と Other の和で比較した。各分画の相関を図 2.4 に示した。HDL-C、LDL-C、IDL-C、そして VLDL-C + CM-C (VLDL-C + Other-C) の相関はそれぞれ $y = 0.924x + 0.133$ (相関係数: $r = 0.971$)、 $y = 0.990x + 7.992$ ($r = 0.918$)、 $y = 0.584x + 7.675$ ($r = 0.584$)、 $y = 0.868x + 2.505$ ($r = 0.935$) であった。

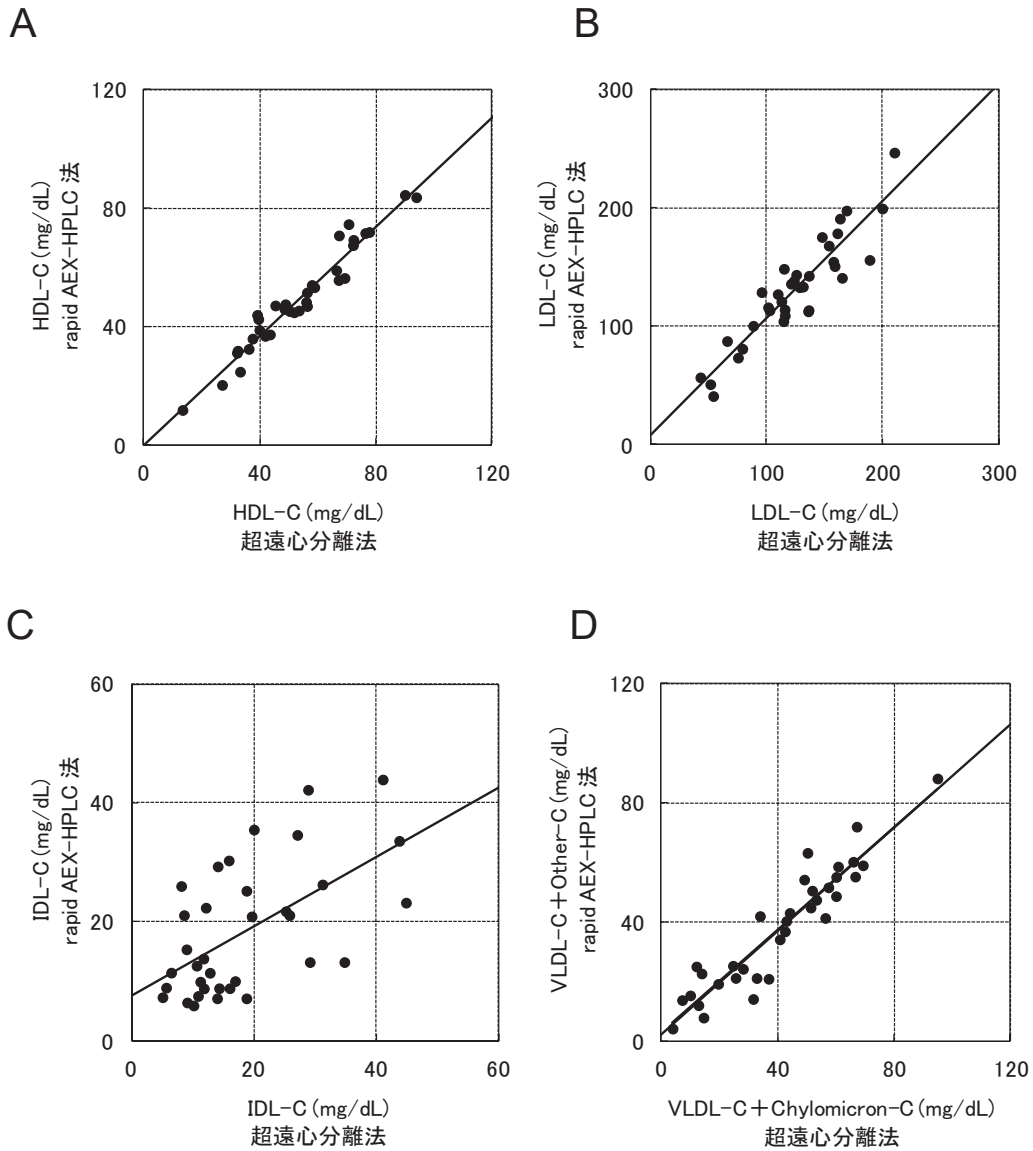


図 2.4 超遠心法とrAEX-HPLC 法の相関

超遠心分離により得られたリポタンパク質分画のコレステロール定量値を x 軸に、rAEX-HPLC 法で測定された各リポタンパク質分画中のコレステロール量を y 軸に示した。超遠心では、比重 $d < 1.006$ の分画として、VLDLとCMを合わせた分画とし、rAEX-HPLC では、VLDL-CとCMが含まれる Other-C の和で比較した。

3-4 電気泳動法と rAEX-HPLC 法における VLDL-C と CM-C の相関

原発性の I 型および V 型の未治療の脂質異常症患者を除いて、空腹時の血中 CM 量はほとんど存在しないと考えられている。また、CM は水よりも軽い比重 ($d < 0.95$ g/mL) であり、超遠心で VLDL と CM を精度よく分離することは難しい。VLDL と CM の比重 $d = 1.006$ g/mL 溶液中の浮上係数 (Sf) はそれぞれ Sf : 20 – 400 と Sf > 400 である。浮上係数の差と超遠心法を利用して、CM と VLDL を分離する方法が存在するが、精密にそれらを分離することは不可能である。このような背景から、rAEX-HPLC 法の Other ピークに占める CM の含量比を精確に確認することは困難である。

アガロースゲル電気泳動法はリポタンパク質を分離する方法で通常 4 つのピーク： α ピーク、 β ピーク、Pre β ピーク、そして原点ピークで分離され、それぞれ主として HDL、LDL、VLDL、CM に相当すると報告されている。^{67,68} また rAEX-HPLC 法の Other ピークは Lp(a) と CM の和に相当すると考えられる。^{39,65,66} アガロースゲル電気泳動法の β ピークと原点ピークの比と rAEX-HPLC 法の VLDL ピークや Other ピークとの相関を確認することで rAEX-HPLC 法における VLDL と CM 量の妥当性が検証できると考えた。VLDL や CM 存在比が大きいとされる高 TG 血症の 40 検体を超遠心分離し、VLDL+CM 分画 ($d < 1.006$ g/mL) を得た。続いて分画をアガロースゲル電気泳動と rAEX-HPLC で測定、コレステロール検出し、Pre β ピークと原点ピークの比率と VLDL-C と Other-C の比率を比較した。VLDL-C の相関は、 $y = 1.064 x - 0.177$ ($r = 0.987$)、CM-C の相関は $y = 0.383 x + 3.163$ ($r = 0.904$) であった。{図 2.5 (a)、(b)} 同一検体での VLDL+CM 分画のアガロースゲル電気泳動法と rAEX-HPLC 法のパターンを図

2.6 (a)、(b) に例示した。

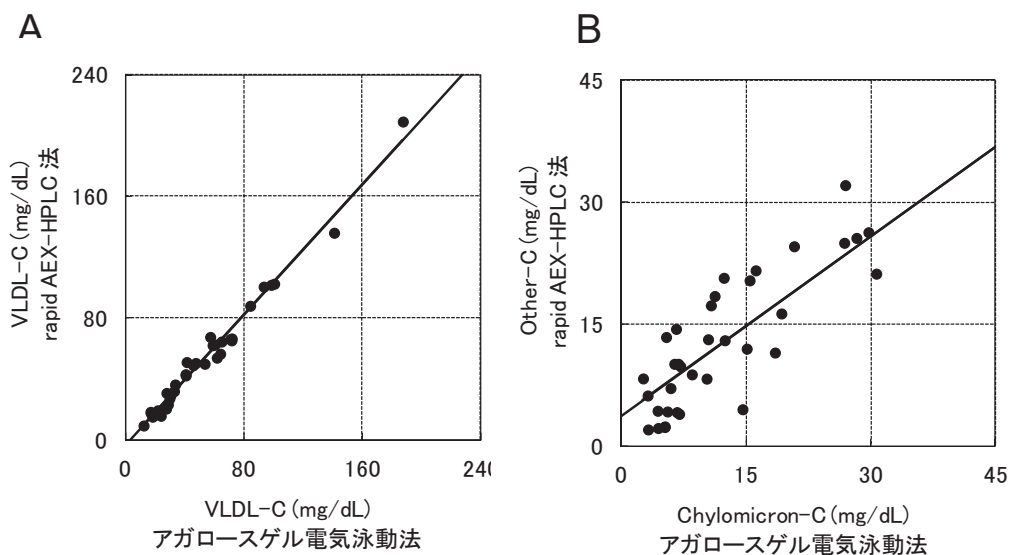


図 2.5 Rapid AEX-HPLC による VLDL+CM 分画 ($d < 1.006 \text{ g/mL}$) の測定結果とアガロースゲル電気泳動法の相関

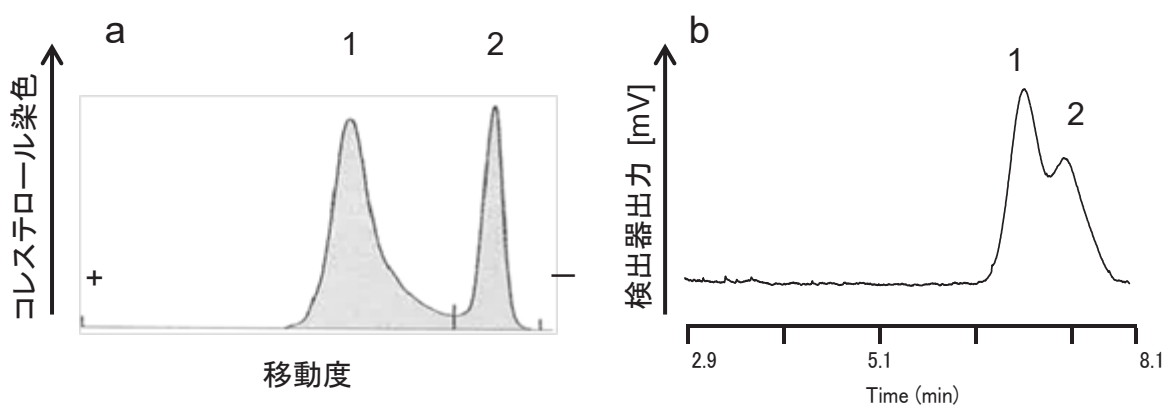


図 2.6 VLDL+CM 分画 ($d < 1.006 \text{ g/mL}$) のアガロースゲル電気泳動法の泳動パターンと rAEX-HPLC によるクロマトグラムの一例

3-5 Rapid AEX-HPLC の基本性能試験

Rapid AEX-HPLC 法の基本性能を確認するために希釈直線性試験、日内同時再現性試験、そして日差再現性試験を実施した。希釈直線性試験は、検体を 5 倍まで希釈し、各リポタンパク質中のコレステロールについてそれぞれの希釈率と濃度の関係が比例しているかを確認した。日内同時再現性試験は、同一の検体を 10 回連続で測定し、各リポタンパク質中のコレステロールについて繰り返し再現性を確認した。日差再現性試験は異なる 10 日間で測定し、各リポタンパク質中のコレステロールについて繰り返し再現性を確認した。

希釈直線性試験では、脂質異常症検体を使用した。5% BSA 溶液を希釈液として、検体を 2 倍、3 倍、4 倍、そして 5 倍に希釈した。HDL-C、LDL-C、IDL-C、VLDL-C、そして Other-C の理論値と実測値との相関におけるそれぞれの相関係数は、1.000、0.999、1.000、1.000、そして 0.999 であった。再現性試験の結果は表 2.4 にまとめた。各分画の面積比に関して、同時再現性は CV(%) が 0.61 ~ 4.14%、日差再現性は 1.30 ~ 8.38% の範囲であった。各分画のコレステロール濃度に関して、同時再現性は CV(%) が 0.33 ~ 4.31%、日差再現性は 2.37 ~ 9.19% の範囲であった。

表 2.4 Rapid AEX-HPLC の測定による日差再現性と同時再現性

リポタンパク質	リポタンパク質比率 (面積比率) (%)						コレステロール濃度 (mg/dL)					
	日差再現性 (n=10)			同時再現性 (n=10)			日差再現性 (n=10)			同時再現性 (n=10)		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
	%	%	%	%	%	%	mg/dL	%	mg/dL	%	mg/dL	%
HDL	12.6	0.61	4.84	12.8	0.08	0.61	37.9	1.74	4.60	38.4	0.25	0.65
LDL	66.9	0.87	1.30	66.7	0.11	0.17	201.0	4.76	2.37	200.5	0.66	0.33
IDL	7.5	0.21	2.82	7.2	0.08	1.11	22.4	0.73	3.27	21.7	0.27	1.25
VLDL	11.6	0.50	4.31	11.8	0.09	0.74	34.8	1.46	4.20	35.4	0.20	0.57
Other	1.4	0.12	8.38	1.5	0.06	4.14	4.2	0.39	9.19	4.4	0.19	4.31

リポタンパク質分画比率と、各リポタンパク質中のコレステロール濃度に対して再現性を評価した。CV:変動係数、SD:標準偏差

3-6 健常群、境界域高 LDL-C 血症群、脂質異常症群のリポタンパク質プロファイル評価

Rapid AEX-HPLC により測定された IDL-C や VLDL-C の臨床有用性を確認するため、健常群、境界域高 LDL-C 血症群、そして脂質異常症群の 3 群で評価を実施した。

境界域高 LDL-C 血症は、動脈硬化予防のためのガイドライン 2012 年版で定義されている病態であり、脂質異常症と診断されない健常状態ではあるが脂質異常症への進行に注意を要する状態とされている。⁵ 脂質異常症は、HDL-C < 40 mg/dL、LDL-C \geq 140 mg/dL、または TG > 150 mg/dL の診断基準範囲が設けられ、いずれか一つ以上にあてはまる状態とされる。⁵ 一方で健常群は、HDL-C \geq 40 mg/dL、LDL-C < 120 mg/dL、そして TG < 150 mg/dL とされる。⁵ 境界域高 LDL-C 血症は LDL-C の値が 120 – 139 mg/dL で診断され、HDL-C および TG に関しては健常群と同等の診断基準に基づく。⁵ 健常群を Group-1、境界域高 LDL-C 血症群を Group-2、そして脂質異常症群を Group-3 とした。

慢性疾病の診断がない日本人男性 141 名を対象とした。年齢、Body mass index (BMI)、血圧、血液検査データは表 2.5 であった。直接法で測定した HDL-C は Group-3 と比較して Group-1 で有意に高値であった。BMI、TC、TG、そして直接法で測定された LDL-C は Group-3 と比較して Group-1 で有意に低値であった。さらに rAEX-HPLC で測定されたリポタンパク質プロファイルでは、HDL-C で Group-3 と比較して Group-1 で有意に高値であり、LDL-C、IDL-C、VLDL-C、そして Other-C で Group-3 と比較して Group-1 で有意に低値であった。次に、健常群と境界域高 LDL-C 血症群の比較を行った。年齢、収縮期血圧、拡張期血圧、TC、TG そして血糖で Group-1 は Group-2 より低値であった。Rapid AEX-HPLC で測定された LDL-C、IDL-C、そして VLDL-C は、Group-1 は Group-2 より有意に低値であった。

表 2.5 3 群の検査データとリポタンパク質プロファイル

		全体	Group-1 (健常群)	Group-2 (境界型高LDL-C血症群)	Group-3 (脂質異常症群)		
対象数		141	65	33	43		
検査データ							
年齢	(years)	41.2 ± 9.4	38.9 ± 10.0	45.1 ± 8.4	(b)	41.8 ± 8.3	
BMI	(kg/cm ²)	22.8 ± 2.6	21.8 ± 2.4	22.9 ± 2.4	(a)	24.2 ± 2.6	(c)
dBP	(mmHg)	74.3 ± 10.6	71.5 ± 9.0	78.9 ± 13.2	(b)	75.1 ± 9.6	
sBP	(mmHg)	114.3 ± 12.8	112.0 ± 11.6	117.8 ± 14.4	(a)	115.3 ± 13.0	
FPG	(mg/dL)	87.2 ± 8.8	86.5 ± 7.1	86.6 ± 10.5		88.7 ± 9.6	
HbA1c	(%)	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.4		5.3 ± 0.4	
AST	(IU/L)	22.2 ± 6.8	21.4 ± 6.3	21.2 ± 6.9		24.4 ± 7.1	(a)
ALT	(IU/L)	23.8 ± 15.4	20.2 ± 9.8	22.1 ± 10.3		30.6 ± 22.2	(b)
eGFR	(mL/min/1.73m ²)	85.8 ± 13.0	88.3 ± 13.9	81.1 ± 10.9	(a)	85.6 ± 12.3	
脂質項目							
TC	(mg/dL)	194.8 ± 29.2	171.9 ± 21.9	206.5 ± 10.1	(c)	220.3 ± 21.3	(c)
HDL-C	(mg/dL)	57.8 ± 12.2	61.7 ± 12.3	58.7 ± 9.4		51.3 ± 11.3	(c)
LDL-C (Friedewald)	(mg/dL)	118.4 ± 27.1	97.5 ± 14.7	130.2 ± 5.4	(c)	141.1 ± 28.0	(c)
TG	(mg/dL)	92.4 ± 58.9	63.7 ± 26.5	87.8 ± 30.3	(c)	139.4 ± 79.2	(c)
リポタンパク質プロファイル (rapid AEX-HPLC)							
HDL-C	(mg/dL)	56.0 ± 13.2	59.8 ± 13.9	56.0 ± 10.2		50.3 ± 12.4	(c)
LDL-C	(mg/dL)	110.0 ± 27.5	97.8 ± 25.3	116.2 ± 12.7	(c)	123.8 ± 31.2	(c)
IDL-C	(mg/dL)	8.5 ± 2.7	7.4 ± 2.3	9.3 ± 1.8	(c)	9.6 ± 3.2	(c)
VLDL-C	(mg/dL)	24.2 ± 19.4	19.8 ± 23.8	22.4 ± 7.4	(c)	32.2 ± 15.9	(c)
Other-C	(mg/dL)	3.1 ± 1.5	3.4 ± 1.7	2.5 ± 0.7	(a)	3.3 ± 1.3	
Total cholesterol	(mg/dL)	201.9 ± 35.6	188.1 ± 38.5	206.4 ± 18.1	(c)	219.3 ± 33.2	(c)

データは平均値±SD で示した。

BMI, ボディマス指数; sBP, 収縮期血圧; dBP, 拡張期血圧; AST, Aspartate transaminase ;

ALT, Alanine transaminase; FPG, 空腹時血糖; HbA1c, ヘモグロビン A1c; Cr, クレアチニン;

eGFR, 推算 glomerular filtration rate。

統計解析は、Student's t-test または Mann-Whitney U-test を使用した。

Group-1 (健常群) に対して、確率 P が、^aP<0.05、^bP<0.01、^cP<0.001 を有意な差として評価した。

第4項 考察

IDL や VLDL は、LDL 同様に動脈硬化症の進行や心疾患発症に関与する。⁶¹⁻⁶³ 動脈硬化性疾患の進展予防のためにリポタンパク質を詳細に分析することは重要である。基準法である超遠心分離法は、IDL や VLDL を含む主要なリポタンパク質分画分析が可能である。²³ その一方で、測定に多くの検体量が必要であり、また測定時間が長いことが大きな課題であった。

本研究では、AEX-HPLC 法を原理とする迅速なリポタンパク質分析法を開発し、その性能を評価した。本測定により、HDL、LDL、IDL、VLDL、そして Other {CM と Lp(a) が含まれる} の 5 つの主要リポタンパク質が測定可能となった。分析時間を短縮するために、カラムサイズの最適化、検体注入量の低減、反応条件の最適化等を実施した。測定時間は、一検体あたり 5.2 分まで短縮可能であった。さらに送液流速を低く保つことで溶離液と反応液の使用量を従来条件と比較して、20% および 16% まで削減した。以上により本法は研究用途だけでなく、臨床現場の日常的な検査として使用可能であると考えられる。本法は、診断 {脂質異常症のタイプ決定 (WHO 分類)} が正確に行えることから、最適な治療方法の選択が可能であること、血中のリポタンパク質含量比率を正確に把握できることにより適切な治療の実施が可能であること、そして既存法に比べて迅速で測定精度が優れることなどが評価され、2014 年 7 月に新規測定項目として保険収載された。⁶⁹

超遠心分離法により得られた HDL、LDL、IDL、そして VLDL+CM 画分それぞれの主要ピークの溶出時間は、健常人血清を AEX-HPLC で測定することで得られたクロマトグラム の 4 つのピークに相当した。(図 2.3 a-e) さらにヒト血清から単離した Lp(a)

精製品を測定した結果、健常人血清を rAEX-HPLC で測定した際の Other ピークに対応することがわかった。(図 2.3 f) 超遠心分離法の HDL 画分 ($d > 1.063$ g/mL) には比重が 1.040 - 1.125 g/mL である Lp(a) の多くの部分が含まれていると考えられる。⁷⁰ それゆえ、超遠心分離法による HDL 画分を rAEX-HPLC で測定した際の微小ピーク (溶出時間: 7.4 分) は、Lp(a) のピークだと考えられる。これらの結果から、rAEX-HPLC はこれまでに報告した従来の AEX-HPLC と同等な性能を持つことが示唆された。血清リポタンパク質分画 (HDL、LDL、IDL、そして VLDL+CM) 中のコレステロール濃度に関して、rAEX-HPLC と超遠心分離の測定結果は、良好な相関を示した。さらに VLDL と CM 画分に関して、rAEX-HPLC 測定による VLDL-C と Other-C は、アガロースゲル電気泳動による VLDL-C と CM-C とそれぞれ相関を示した。健常人血清を用いた rAEX-HPLC 測定による評価では、各リポタンパク質中のコレステロール濃度は良好な希釈直線性があり、高い再現正確性を有していることが示唆された。

本研究では、健常群 (Group-1)、境界域高 LDL コレステロール血症群 (Group-2)、脂質異常症群 (Group-3) の 3 群に関して rAEX-HPLC の測定によるリポタンパク質 5 分画中のコレステロール濃度によるリポタンパク質プロファイル評価を行った。Group-1 の HDL-C の値分布は、 59.8 ± 13.9 mg/dL であり、過去に報告された一般的な日本人分布値 (55 ± 14 mg/dL) と同等であった。⁷¹ 過去の報告では、Ⅲ型脂質異常症とコントロール群に関して、IDL-C 濃度の検討を実施している。このコントロール群で 7.7 ± 3.9 mg/dL であるのに対し、Ⅲ型脂質異常症患者群では、 42.5 ± 19.3 mg/dL と報告している。⁷² 本研究で Group-1 の IDL-C 濃度は 7.4 ± 2.3 mg/dL であり、これまでの報

告と大きく相違がない結果となった。

低 HDL-C 血症や高 LDL-C 血症は、冠動脈疾患の発症リスクに大きく関与することが報告され、いくつかの研究では IDL や VLDL が動脈硬化性疾患に関与することが報告されているが、LDL に比べて動脈硬化性疾患への寄与度などは明らかになっていない。本研究では、Group-2 と Group-1 で、IDL-C と VLDL-C に関して有意な相違があることが明らかとなった。これらの結果から IDL-C や VLDL-C が初期の脂質代謝異常である境界域 LDL-C 血症患者の臨床評価に有用である可能性が示唆された。測定時間の短縮により従来法と比較して、より多くの検体を処理することが可能になった。大規模な臨床研究にも用いることができ、新たな臨床的な知見が得られると期待している。

第3章 リポタンパク質 6分画中のコレステロールと心疾患発症リスクスコア

第1項 背景

国内外の多くの疫学研究により、LDL-Cの増加がCHDのリスク因子であることが示された。⁵⁸その結果、LDL-Cの値は、脂質異常症の治療や予防の主要な指標としてみなされている。^{5, 73}

これまでの研究で、LDL以外のリポタンパク質と心疾患リスクの関連性も報告されてきた。VLDLはフラミンガム研究により、心疾患イベントの予測因子となることが明らかにされ、IDL-CはCHDの重症度と関連することが示された。^{62, 74}Ⅲ型脂質異常症では、IDL-Cが高値となることが報告され、CKD患者でIDLやVLDLなどの高TGリポタンパク質が高値傾向を示すことが報告された。^{72, 75}さらに透析を伴う腎疾患患者は有意にIDL-Cが高値となることが示された。⁷⁶このように主要リポタンパク質である、HDL、LDL、IDL、VLDLの臨床的な有用性が示されてきており、それらを測定する重要性が高まっている。その一方で、比重により分類されないその他のリポタンパク質であるLp(a)も心疾患との関連が報告されている。⁴²そこでrAEX-HPLCによるリポタンパク質分画を応用し、6つのリポタンパク質 {HDL、LDL、IDL、VLDL、CM、そしてLp(a)} の分画法を構築し、各リポタンパク質中コレステロール量の測定を試みた。

これまでの報告では、リポタンパク質中のコレステロール量と年齢の関係が報告されている。米国フラミンガム研究では、年齢毎のHDL-C、LDL-C、そしてVLDL-Cの平均値とパーセンタイルがそれぞれ報告されている。⁷⁷新井らは、日本人を対象とした10歳ご

との年齢区で、TC、HDL-C、LDL-C、remnant-like particle cholesterol (RLP-C)、そして TG 値を評価し、年齢とこれらの検査値の関連性を報告している。⁷¹

フラミンガムリスクスコア (FRS) は、フラミンガム研究により 10 年間の心疾患発症確率を推定するために開発された。^{2,78} 一方で、フラミンガム研究は主として米国の白色人種を対象にした研究であり、心筋梗塞発症率が欧米人と比較して約 30% である日本人に FRS を適用すると CHD 発症確率が高めに算出されるという問題点があった。⁷⁹⁻⁸¹ 日本人を対象にしたものでは、NIPPON DATA 80 研究を基にした 10 年間の心疾患死確率を推定する NIPPON DATA リスクがある。³ また、久山町研究に基づいた 10 年間の心血管疾患 (CVD) 発症確率を推定するための Hisayama リスクが報告されている。⁴⁸ 最近では、吹田研究に基づく 10 年間の CHD 発症確率を推定するための吹田スコアが報告されている。⁴ 吹田スコアは、心疾患リスク因子として、CKD を考慮して算出されることに特徴がある。⁴

本章における研究は、rAEX-HPLC によるリポタンパク質分画を応用し、6 つのリポタンパク質 {HDL、LDL、IDL、VLDL、CM、そして Lp(a)} の分画法を構築すること。そして日本人健常男性を対象に血中リポタンパク質分画中コレステロール量を定量し、年齢との関連と 3 つのリスクスコア (NIPPON DATA リスク、久山リスク、そして吹田スコア) との関連を評価することを目的とした。

第2項 方法

2-1 対象

東ソー株式会社東京研究所に勤務する従業員を対象にボランティア採血を実施した。検体採取の採血は同意書による確認のもとに実施され、個人名を削除し別の符号で管理されて検討を実施した。本研究は、東ソー株式会社バイオサイエンス事業部の倫理委員会の承認を得て実施された。本研究では、疾患の診断の無い健常者 161 人の男性を対象に研究を実施した。対象者は以下の条件を満たすことを確認した。血圧に関して、日本高血圧学会発行「高血圧治療ガイドライン 2014」を参照し、収縮期血圧 (systolic blood pressure: sBP) が 140 mmHg 未満かつ拡張期血圧 (diastolic blood pressure: dBP) が 90 mmHg 未満を健常域とした。腎機能に関しては、日本腎臓学会発行「エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2013」を参照し、推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) が 60 mL/min/1.73m² 以上を健常域とした。脂質異常に関しては、日本動脈硬化学会発行「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版」に基づき、TG が 150 mg/dL 以下、HDL-C が 40mg/dL 以上、かつ LDL-C が 140 mg/dL 以下を健常域とした。糖尿病に関しては、日本糖尿病学会発行「糖尿病診療ガイドライン 2013」に基づき、FPG が 110 mg/dL 以下、かつ HbA1c が 6.5% 未満を基準域とした。肝機能に関して、日本人間ドック学会発行「人間ドック判定・指導ガイドライン 2012」を参照し、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (Aspartate transaminase: AST) とアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (Alanine transaminase: ALT) がそれぞれ 30 U/L 未満であることを健常域とした。

2-2 血液検査

AST、ALT、クレアチニン (Cr) の測定は、Cica Liquid AST、Cica Liquid ALT、Cica Liquid-S Cre (関東化学) を用いて酵素法により測定した。血中 eGFR の値は日本腎臓学会が推奨する算定式で Cr 値から算出した {eGFR (男性)= $194 \times \text{Cr}^{-1.094} \times \text{Age}^{-0.287}$ }。TG、TC、HDL-C、そして LDL-C はそれぞれ Pureauto S TG-N、Cholestest CHO、Cholestest N HDL、そして Cholestest LDL (積水メディカル) を用いて測定した。血糖は GA08 (A&T)、HbA1c は HLC-723G8 (東ソー) で測定した。Non HDL-C は、TC から HDL-C を引いて算出した。Lp(a)-mass の値は、ラテックス凝集比濁法を原理とする Lp(a)-Latex (デンカ生研) を用いて測定した。

2-3 AEX-HPLC 法

AEX-HPLC (6 分画) 法は、rAEX-HPLC 法を応用し、血清中のリポタンパク質を HDL、LDL、IDL、VLDL、CM、そして Lp(a) の 6 つに分画し、それぞれのリポタンパク質中のコレステロールを定量する。AEX-HPLC (6 分画) 法は rAEX-HPLC システムである HLC-729LP2 (東ソー株式会社、東京) を改良して検討した。HLC-729LP2 は、ポンプ、オートサンプラー、カラムオーブン、リアクター、可視検出器から構成された。リポタンパク質プロファイルの測定及び各種検討は、改良した HLC-729 LP2 を使用した。コレステロール反応試薬は HLC-テスト「TOSOH」リポプロパック (東ソー株式会社、東京) を用いた。カラム充填剤には、rAEX-HPLC で用いた非多孔性で diethylaminoethyl (DEAE)

基を有する直径が 2.5 μm のポリマー系ゲルを使用した。カラムは、カラムサイズが 3.0 mm \times 15 mm のステンレスカラムを新規設計し、使用した。

2-4 リスクスコアの算出

10 年間の CHD 死確率 (NIPPON DATA リスク) は NIPPON DATA リスクアセスメントチャートに基づいて、性別、年齢、収縮期血圧 (sBP)、TC、空腹時血糖 (FPG)、そして喫煙習慣から読み取った。³ NIPPON DATA リスクでは、40 歳以上を対象に算出するため、本研究では 39 歳以下の対象は除外した。

10 年間の CVD 発症確率 (久山リスク) は、性別、年齢、sBP、喫煙習慣、LDL-C、そして HDL-C により算出した。⁴⁸ 久山リスクでは、40 歳以上を対象に算出するため、本研究では 39 歳以下の対象は除外した。

10 年間の CHD 発症確率 (吹田スコア) は、性別、年齢、LDL-C、HDL-C、血圧、糖尿病、喫煙習慣、そして CKD ステージから算出した。⁴ CKD ステージは eGFR 値により求めた。⁴ 吹田スコアでは、35 歳以上を対象に算出するため、本研究では 34 歳以下の対象は除外した。

2-5 統計解析

測定結果は平均値 \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) で表した。有意水準は $p < 0.05$ を有意とみなした。多群同時比較は Bartlett 検定に基づき一元配置分析 (パラメトリック検定) または Kruskai-Wallis 検定 (ノンパラメトリック検定) で評価した。二群間

検定は、F 検定に基づき t 検定 (パラメトリック検定) または Mann-Whitney 検定 (ノンパラメトリック検定) で評価した。相関は Pearson の相関係数により評価した。特定要因の因果関係解析には、複数の独立変数を含む逐次多重ロジスティック回帰分析で評価した。統計解析は、Stat Flex Ver 6.0 (アーテック) を使用した。

第3項 結果

3-1 AEX-HPLC (6分画) の分析条件設定

Rapid AEX-HPLC では、血清中のリポタンパク質を HDL、LDL、IDL、VLDL そして Other に分画し、それぞれのリポタンパク質中のコレステロールを定量した。Other には、CM および Lp(a) が含まれるが、測定時間を延長させることで Other 分画を CM と Lp(a) に分画可能だと考えた。AEX-HPLC (6分画) 法は、rAEX-HPLC 法を応用し、血清中のリポタンパク質を HDL、LDL、IDL、VLDL、CM、そして Lp(a) の 6 つに分画し、それぞれのリポタンパク質中のコレステロールを定量した。AEX-HPLC (6分画) 法のシステム概略図を図 3.1 に示した。一検体あたり 10.0 分で測定が可能であった。CM と Lp(a) の測定感度を得るために、検体注入量を rAEX-HPLC より増やし、4.0 μ L とした。それに伴い、カラムサイズを見直し、3.0 mmID x 15 mm のカラムを採用した。

本システムでは、塩濃度が異なる 2 つの溶離液をステップグラジエントで混合比を変化させ、徐々に塩濃度を上昇させることで、リポタンパク質の表面電荷の違いにより段階的に溶出させた。6 つの段階を設けることで、順番に HDL、LDL、IDL、VLDL、CM、そして Lp(a) に分画した。6 段階目の溶出では、Lp(a) 画分を溶出させるとともに、カラムの洗浄工程を兼ねた。溶離液第 1 液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5)、溶離液第 2 液 {50 mM Tris-HCl + 500 mM 過塩素酸ナトリウム, pH 7.5} による 2 液混合によるグラジエント溶出のシステムとした。本法の溶出条件を、表 3.1 に示した。AEX-HPLC (6分画) 法のクロマトパターン例と塩濃度の推移を図 3.2 に示した。本測定で得られた Lp(a)-C はラテックス凝集比濁法で得られた Lp(a) mass の値と良好な相関を示した。(図 3.3)

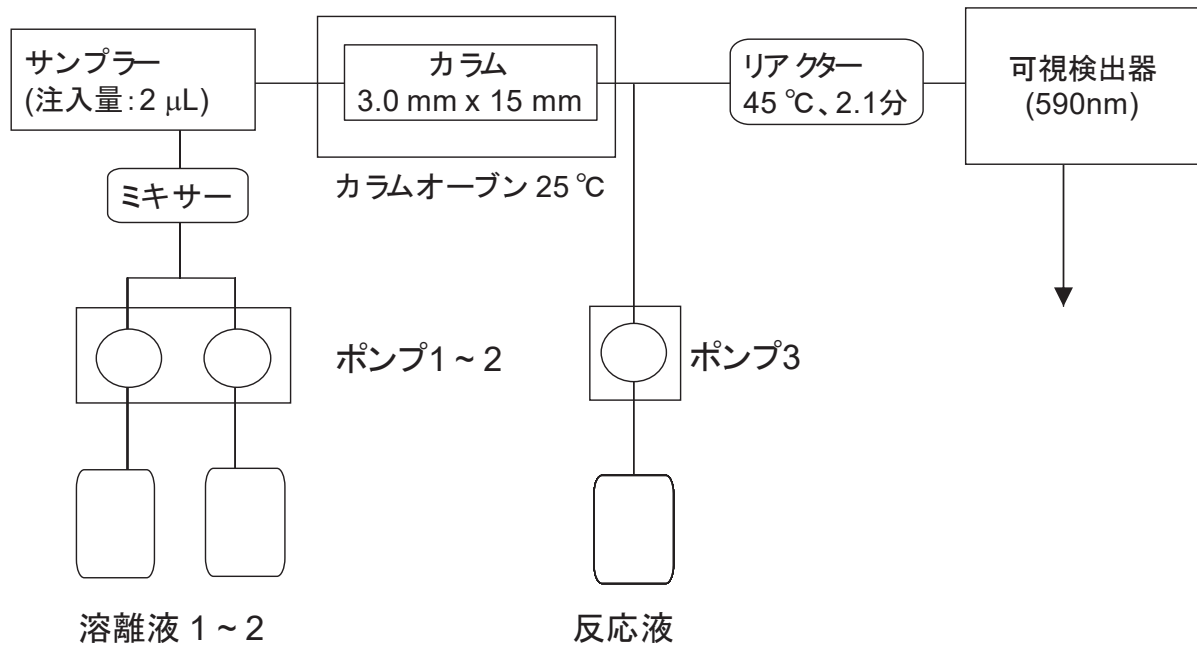


図 3.1 AEX-HPLC (6 分画) のシステム概略図

過塩素酸ナトリウム濃度が異なる 2 種類の溶離液を 2 つのポンプで送液した。2 液の合計流量は 0.50 mL/min で一定とした。ミキサーにより十分に混合し、2 µL の血清検体が自動注入され、カラムに送液される。カラムは 25°C で一定に温調されており、陰イオン交換により各リポタンパク質を分離した。反応液はポンプにより 0.20 mL/min で一定に送液され、カラムから溶出されたリポタンパク質中のコレステロールを染色した。45 °C で一定に温調されたリアクターで十分な反応をさせた後、検出器でコレステロールの波形を検出した。

表 3.1 AEX-HPLC (6 分画) における溶離液 1 液、溶離液 2 液のグラジエント溶出条件

試料注入からの 経過時間 (分)	混合比率 (%)		過塩素酸ナトリウム 濃度 (mM)	備考
	溶離液第1液	溶離液第2液		
0.00	78.5	21.5	107.50	
2.00	74.2	25.8	129.00	
4.00	73.5	26.5	132.50	
5.50	65.0	35.0	175.00	
7.50	55.0	45.0	225.00	
10.00	0.0	100.0	500.00	兼 洗浄工程
12.50	90.0	10.0	50.00	兼 平衡化工程

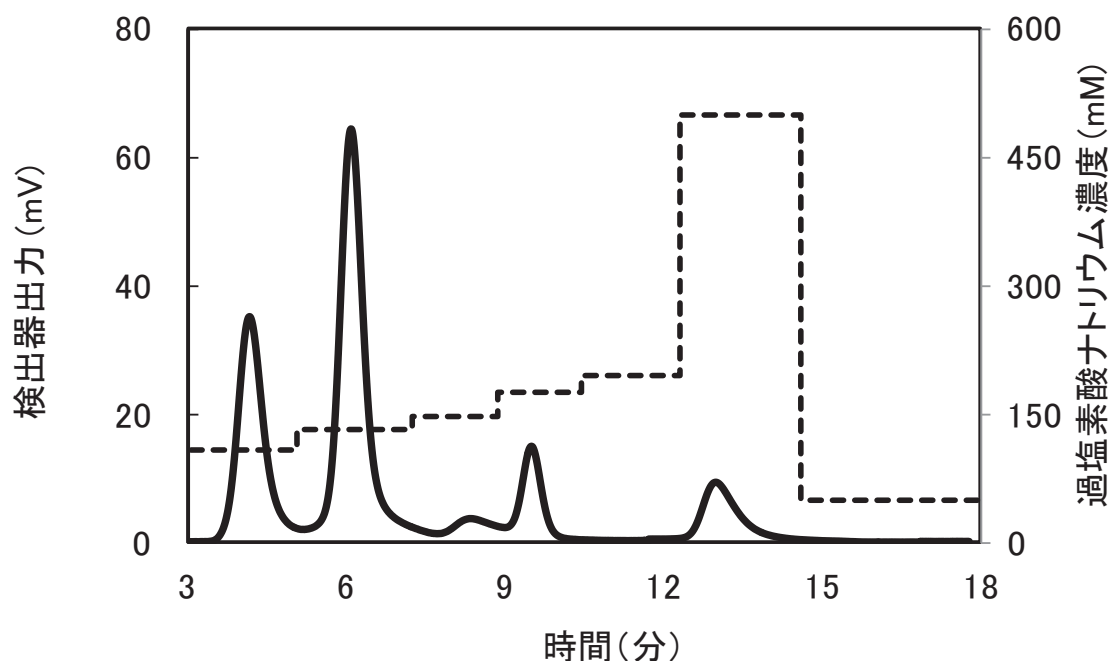


図 3.2 AEX-HPLC (6 分画) 法のクロマトパターン例と塩濃度の推移

Lp(a) が比較的高値の代表的なクロマトグラムを例示した。クロマトパターンを実線で示した。注入直後からの過塩素酸ナトリウム濃度の変化を点線で示した。クロマトパターンは検体注入から検出器まで約 3 分を要した。3 分に検出データの収集を開始し、注入から 15 分後の 18 分に終了した。検体注入から 15 分後に次の検体を注入した。連続した測定を実施することで、一検体あたり 15 分で測定可能であった。

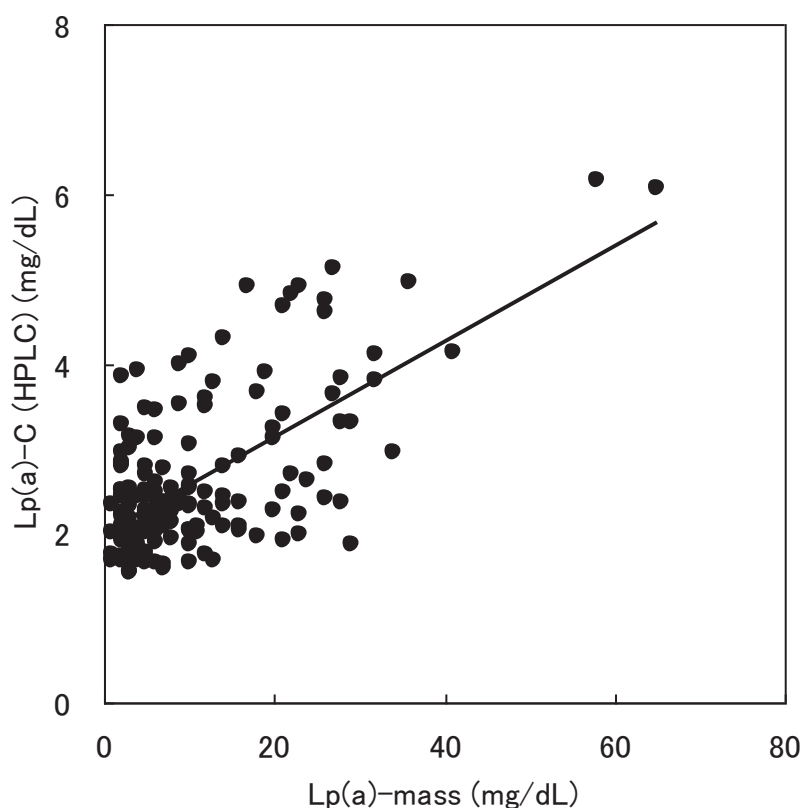


図 3.3 Lp(a) mass と Lp(a)-C の相関

x 軸に Lp(a) mass、y 軸に Lp(a)-C とした。相関式 $y = 0.0563x + 2.001$ 、相関係数 $r = 0.6447$ であった。対象数は 161 検体で、確率 $P < 0.0001$ であった。

3-2 リポタンパク質プロファイルと年齢群の比較

研究対象 (161 名、男性) は年齢により 5 群 (G1: 20-29 歳、28 名; G2: 30-39 歳、55 名; G3: 40-49 歳、39 名; G4: 50-59 歳、31 名; G5: 60-69 歳、8 名) に分けた。測定データは、表 3.2 にまとめた。血清脂質項目では、直接法等で測定した TC、TG、non-HDL-C、そして LDL-C に関して年齢群で有意な相違が認められた。血清脂質以外の検査項目では、sBP、dBP、ALT、eGFR、FPG、そして HbA1c が年齢群で有意な相違が認められた。

AEX-HPLC によるリポタンパク質中のコレステロールの測定項目では、LDL-C、VLDL-C、そしてCM-Cに関して、年齢群で有意な相違が認められた。一方で、HDL-C、IDL-C、そしてLp(a)-Cで有意な相違を認めなかった。本研究による日本人男性を対象としたHDL-C、LDL-C、IDL-C、VLDL-C、CM-C、そしてLp(a)-Cの範囲は、それぞれ 69.2 ± 12.7 、 101.5 ± 18.1 、 8.7 ± 2.5 、 18.5 ± 7.5 、 0.4 ± 0.9 、そして 2.6 ± 0.9 mg/dLであった。図3.4は、各年齢群でのリポタンパク質中のコレステロール量と2群間比較の結果を示した。HDL-C、Lp(a)-C、そしてLp(a) massの値は、いずれの2群間でも有意な差は確認されなかった。LDL-Cの有意差は、G1とG2、G1とG3、G1とG4、G1とG5そしてG2とG3で確認された。IDL-Cの有意差は、G1とG3そしてG1とG4で確認された。VLDL-Cの有意差は、G1とG2、G1とG3、G1とG4、そしてG2とG4で確認された。CM-Cの有意差は、G1とG2、G1とG3、G2とG5、そしてG3とG5で確認された。NIPPON DATA リスク、久山リスク、そして吹田スコアは、年齢群に対して有意差が認められた。

表 3.2 各年齢群の検査データとリポタンパク質プロファイル

		全体 n = 161	20代: G1 n=28	30代: G2 n=55	40代: G3 n=39	50代: G4 n=31	60代: G5 n=8	P
年齢	years	40.8 ± 11	27.0 ± 1.4	34.1 ± 3	44.5 ± 2.8	54.7 ± 2.8	62.8 ± 1.4	<0.0001
BMI	kg/cm ²	21.9 ± 2.1	21.4 ± 2.4	21.7 ± 2.1	22.4 ± 1.9	22.2 ± 2.1	21.4 ± 2.1	NS
sBP	mmHg	113.7 ± 10.8	110.4 ± 9.5	110.8 ± 9.7	115.9 ± 11.1	118.3 ± 9.8	115.8 ± 16.1	<0.01
dBp	mmHg	69.6 ± 9.0	65.1 ± 7.7	67.6 ± 7.3	71.2 ± 9.3	75 ± 9.5	72.3 ± 9.9	<0.0001
喫煙	n, %	31 (19.2%)	4 (14.3%)	11 (20.0%)	6 (15.4%)	9 (29.0%)	1 (12.5%)	
AST	IU/L	19.6 ± 3.7	18.4 ± 3.8	19.3 ± 3.4	20.1 ± 3.8	20.6 ± 4.4	18.6 ± 2.5	NS
ALT	IU/L	17.9 ± 4.7	16.6 ± 5.4	18.6 ± 4.3	18.7 ± 4.7	17.6 ± 4.2	14.1 ± 3.7	<0.05
FPG	mg/dL	87.0 ± 6.6	83.5 ± 5.5	85.6 ± 6	88.6 ± 5.9	89.2 ± 8	91.8 ± 4.6	<0.0005
HbA1c	%	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2	<0.0001
Cr	mg/dL	0.836 ± 0.1	0.843 ± 0.094	0.849 ± 0.118	0.827 ± 0.082	0.827 ± 0.09	0.796 ± 0.109	NS
eGFR	mL/min/1.73m ²	83.9 ± 12.7	92.0 ± 11.1	86.6 ± 14.2	81.3 ± 9.3	77.4 ± 10	77.2 ± 10.6	<0.0001
リスクスコア								
吹田スコア*1	%	1.17 ± 0.47		1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.39 ± 0.67	1.63 ± 0.74	<0.0001
Nippon Data リスク*2	%	0.60 ± 0.32			0.50 ± 0.00	0.53 ± 0.13	1.43 ± 0.54	<0.0001
久山リスク*2	%	5.13 ± 2.44			3.23 ± 0.64	6.61 ± 1.71	9.2 ± 1.99	<0.0001
脂質検査データ								
HDL-C	mg/dL	63.4 ± 12.0	61.4 ± 8.8	63.5 ± 11.7	63.8 ± 12.8	64 ± 14.2	63.9 ± 13.2	NS
LDL-C	mg/dL	106.6 ± 20.2	92.6 ± 15.4	104.4 ± 20.3	111.6 ± 20.1	114.8 ± 18.8	117.9 ± 15.4	<0.0001
TC	mg/dL	183.2 ± 24.6	165.6 ± 19.8	180.5 ± 25.7	189.1 ± 24.3	194 ± 19.6	196.1 ± 12.3	<0.0001
TG	mg/dL	71.9 ± 26.3	58.2 ± 18.8	68.9 ± 27.2	75.0 ± 21.7	83.4 ± 28.5	81.4 ± 31.9	<0.005
Lp(a)-mass	mg/dL	10.9 ± 10.5	9.1 ± 7.7	11.6 ± 9.5	9.3 ± 9.2	12.4 ± 12.8	15.2 ± 22.1	NS
non-HDL	mg/dL	119.8 ± 22.0	104.2 ± 16.4	116.2 ± 21.9	125.4 ± 21.4	130 ± 19.6	132.3 ± 18.0	<0.0001
リポタンパク質プロファイル (AEX-HPLC)								
HDL-C	mg/dL	62.9 ± 12.7	60.6 ± 8.6	63.0 ± 12.7	64.2 ± 14.3	63.0 ± 14.1	61.7 ± 13.4	NS
LDL-C	mg/dL	101.5 ± 18.1	88.8 ± 13.2	99.5 ± 18.6	107.5 ± 18.8	107.6 ± 14.9	111.2 ± 12.9	<0.0001
IDL-C	mg/dL	8.7 ± 2.5	7.7 ± 2.6	8.8 ± 2.7	9.2 ± 2.2	9.2 ± 1.9	8.2 ± 2.3	NS
VLDL-C	mg/dL	18.5 ± 7.5	14.1 ± 4.7	18.1 ± 7.7	20.1 ± 7.4	21.6 ± 7.9	18.3 ± 7.3	<0.005
CM-C	mg/dL	0.4 ± 0.9	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 1.2	0.5 ± 1.3	0.4 ± 0.2	<0.01
Lp (a)-C	mg/dL	2.6 ± 0.9	2.6 ± 0.9	2.7 ± 1.3	2.6 ± 0.9	2.6 ± 1	3.0 ± 1.4	NS
TC	mg/dL	194.7 ± 25.9	174.1 ± 18.3	192.3 ± 28.1	204 ± 24.9	204.5 ± 19.8	202.8 ± 12.9	<0.0001

数値は、平均値±SD で示した。有意差がないことを NS で表した。BMI, ボディマス指数; sBP, 収縮期血圧; dBp, 拡張期血圧; AST, Aspartate transaminase ; ALT, Alanine transaminase; FPG, 空腹時血糖; HbA1c, ヘモグロビン A1c; Cr, クレアチニン; eGFR, 推算 glomerularfiltration rate。

*1 吹田スコアは 34 歳以下の検体を除いて解析した。

*2 NIPPON Data リスク と久山リスクは 39 歳以下の検体を除いて解析した。

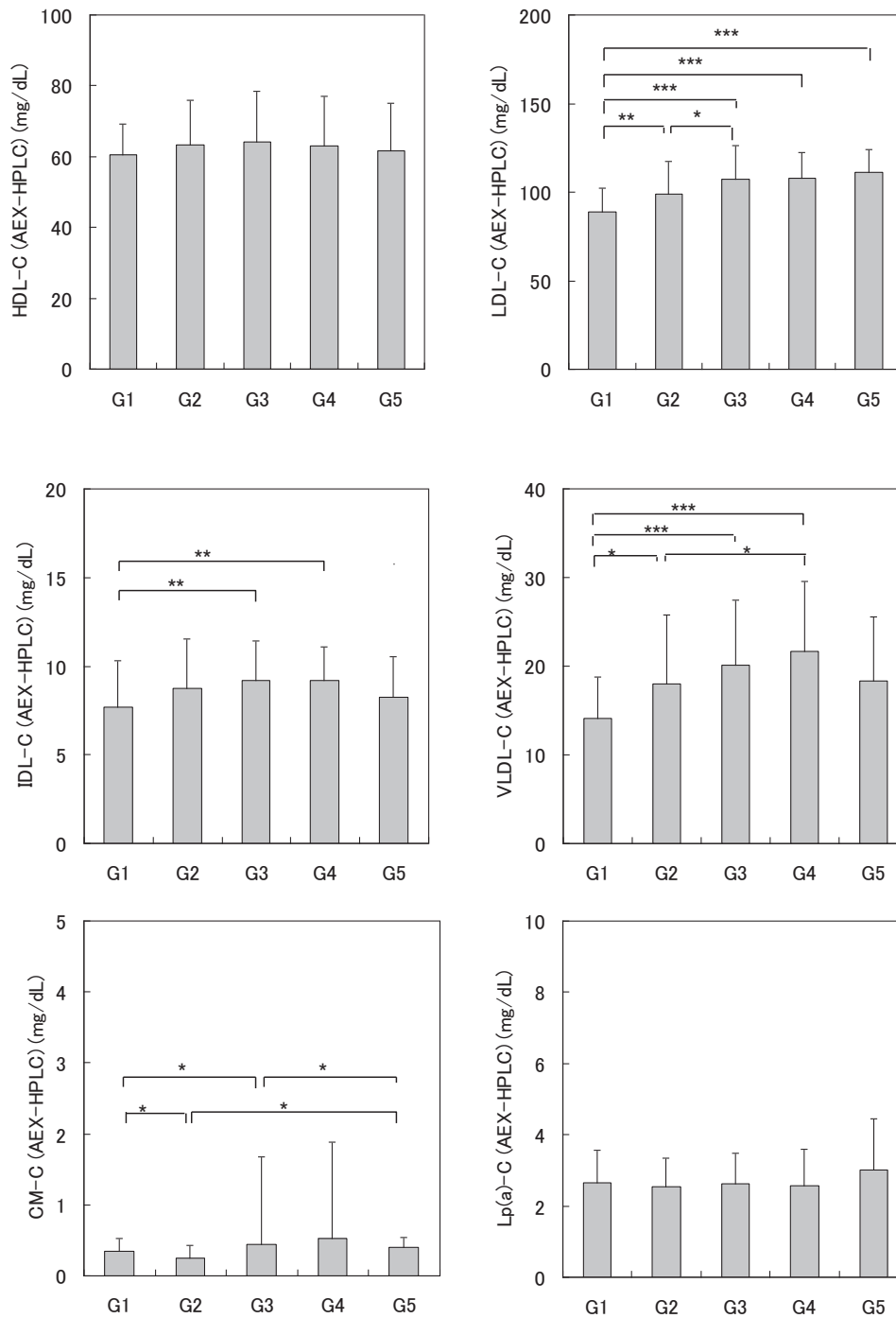


図 3.4 AEX-HPLC による 6 分画中のコレステロール濃度と年齢群間の比較

HDL-C、LDL-C、IDL-C、VLDL-C、CM-C、そして Lp(a)-C に関して、各年代群の比較を実施した。表 3.2 の数値を用いた。すべての群間比較は、 F 検定に基づき、 t 検定または Mann-Whitney 検定で評価した。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

3-3 リポタンパク質プロファイルと各種検査項目との比較検討

AEX-HPLC (6 分画) により測定されたリポタンパク質中のコレステロール値と他の検査項目との相関を表 3.3 に示した。相関の有意差は確率: $P < 0.05$ とした。HDL-C は、BMI と負の相関関係を示した。LDL-C は BMI、sBP、dBP、FPG、そして吹田スコアと正の相関関係を示し、eGFR と負の相関関係を示した。IDL-C は、BMI と正の相関関係を、eGFR と負の相関関係を示した。VLDL-C は、BMI、sBP、dBP と正の相関関係を示し、eGFR と負の相関関係を示した。CM-C は、BMI、sBP、NIPPON Data リスク、久山リスク、そして吹田スコアと正の相関関係を示した。その一方で、Lp(a)-C および Lp(a) mass は、いずれの項目とも有意な相関関係を示さなかった。Non-HDL-C は BMI、sBP、dBP、FPG、そして吹田スコアと正の相関関係を示し、eGFR と負の相関関係を示した。

表 3.3 リポタンパク質と臨床検査マーカーとの相関

		年齢	BMI	sBP	dBP	AST	ALT	FPG	HbA1c	Cr	eGFR	吹田 スコア*1	NIPPON DATAリスク*2	久山リスク *2
対象数		161										103	77	77
Lp(a)-mass	rS	-0.008	-0.018	0.073	0.067	0.105	0.098	0.054	-0.057	0.066	-0.058	0.099	-0.042	0.171
	P values	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
non-HDL-C	rS	0.407	0.346	0.34	0.319	0.038	0.137	0.218	0.103	0.166	-0.33	0.292	0.049	0.073
	P values	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	NS	NS	<0.01	NS	<0.05	<0.0001	<0.005	NS	NS
リポタンパク質プロファイル (AEX-HPLC)														
HDL-C	rS	0.056	-0.253	-0.083	-0.02	0.151	-0.013	0.11	0.043	-0.154	0.111	-0.043	-0.065	-0.057
	P values	NS	<0.005	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LDL-C	rS	0.364	0.302	0.308	0.286	0.044	0.087	0.187	0.108	0.088	-0.238	0.202	0.007	-0.044
	P values	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0005	NS	NS	<0.05	NS	NS	<0.005	<0.05	NS	NS
IDL-C	rS	0.213	0.193	0.102	0.064	-0.08	0.046	0.096	0.059	0.178	-0.258	-0.176	-0.123	-0.151
	P values	<0.01	<0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0.05	<0.001	NS	NS	NS
VLDL-C	rS	0.294	0.239	0.203	0.17	-0.12	0.121	0.033	0.108	0.265	-0.349	0.013	-0.136	-0.078
	P values	<0.005	<0.005	<0.01	<0.05	NS	NS	NS	NS	<0.001	<0.0001	NS	NS	NS
CM-C	rS	0.083	0.186	0.18	0.119	0.017	0.081	0.093	0.03	0.134	-0.16	0.29	0.242	0.279
	P values	NS	<0.05	<0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0.05	<0.005	<0.005	<0.005
Lp(a)-C	rS	-0.009	-0.001	0.121	0.08	0.22	0.154	0.095	-0.013	0.05	-0.055	0.016	0.041	0.036
	P values	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

有意差がないことを NS で表した。BMI, ボディマス指数; sBP, 収縮期血圧; dBP, 拡張期血圧; AST, Aspartate transaminase ; ALT, Alanine transaminase; FPG,空腹時血糖; HbA1c, ヘモグロビン A1c; Cr, クレアチニン; eGFR, 推算 glomerularfiltration rate。

統計解析は、Spearman's の順位相関係数 (Spearman's rank correlation coefficient: rS) で評価した。

*1 吹田スコアは、34 歳以下は取り除いて評価した。

*2 NIPPON DATA リスクと久山リスクは 39 歳以下を取り除いて評価した。

3-4 吹田スコア分類群と各種検査項目との比較検討

吹田スコアの値を基に群分け (0% 群:71 名、1% 群:19 名、2% 群:9 名、3% 群: 4 名) を実施し、AEX-HPLC によるリポタンパク質分画コレステロールや各種検査項目結果と吹田スコアの関係性を評価した。(表 3.4) 年齢、sBP、dBP、そして HbA1c は吹田スコア分類群で有意差が認められた。日常検査法による LDL-C、TC、そして non-HDL-C は、吹田スコア分類群で有意差が認められた。AEX-HPLC によるリポタンパク質分画中のコレステロール測定では、CM-C のみが吹田スコア分類群で有意差が認められた。

表 3.4 吹田スコア分類群における検査データとリポタンパク質プロファイル

吹田スコア		0%	1%	2%	3%	P
対象数 *1		n = 71	n = 19	n = 9	n = 4	
年齢	years	43 ± 5.7	54.8 ± 6.1	59.1 ± 3.7	58 ± 3.6	<0.0001
BMI	kg/cm ²	22.1 ± 1.9	22.4 ± 2.7	21.9 ± 1.5	22 ± 2.7	NS
sBP	mmHg	113.2 ± 10	117.7 ± 12.6	124 ± 7.4	132.5 ± 2.5	<0.0005
dBP	mmHg	69 ± 8.1	74.1 ± 10.5	81.6 ± 7	80.5 ± 7.7	<0.0001
喫煙	n, %	16 (23%)	4 (21%)	2 (22%)	3 (75%)	
AST	IU/L	19.5 ± 3.6	20.4 ± 4.4	21.2 ± 3.8	20.3 ± 1	NS
ALT	IU/L	18.9 ± 4.6	17.1 ± 5.2	17.7 ± 3.2	13.5 ± 2.4	NS
FPG	mg/dL	87.6 ± 6.3	91.8 ± 6.9	89.4 ± 6.2	91.8 ± 5.5	NS
HbA1c	%	5.2 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.1	5.3 ± 0.3	<0.05
Cr	mg/dL	0.84 ± 0.093	0.831 ± 0.101	0.827 ± 0.102	0.822 ± 0.1	NS
eGFR	mL/min/1.73m ²	81.1 ± 10.3	76.7 ± 10.7	75.2 ± 10.1	75.8 ± 9.4	NS
脂質検査データ						
HDL-C	mg/dL	63.2 ± 11.5	64.8 ± 14	66.9 ± 16.1	58.8 ± 10.3	NS
LDL-C	mg/dL	108 ± 19.3	119.7 ± 14.8	117.8 ± 13.7	127.5 ± 13.5	<0.05
TC	mg/dL	184.9 ± 23.3	198.8 ± 12.6	199 ± 17.3	202.5 ± 6.8	<0.05
TG	mg/dL	75.2 ± 25.3	80.2 ± 21.5	84.9 ± 35.1	93.3 ± 45.6	NS
Lp(a)-mass	mg/dL	9.9 ± 8.9	13.4 ± 15.2	15.9 ± 19.4	9 ± 5.6	NS
non-HDL-C	mg/dL	121.7 ± 20.9	134 ± 15.3	132.1 ± 16.2	143.8 ± 14.5	<0.05
リポタンパク質プロファイル (AEX-HPLC)						
HDL-C	mg/dL	63.3 ± 12.8	63.3 ± 14.5	64.4 ± 14.4	55.9 ± 10.9	NS
LDL-C	mg/dL	103.7 ± 18.1	111.1 ± 13.4	110.6 ± 12.4	118.6 ± 9.2	NS
IDL-C	mg/dL	9.4 ± 2.1	8.6 ± 2.1	8.5 ± 2.2	8.8 ± 0.8	NS
VLDL-C	mg/dL	20.1 ± 7.4	20.4 ± 8.1	20.5 ± 9.4	21.2 ± 9.3	NS
CM-C	mg/dL	0.3 ± 0.9	0.7 ± 1.7	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.3	<0.05
Lp (a)-C	mg/dL	2.6 ± 0.9	2.5 ± 1	2.9 ± 1.4	3.1 ± 0.8	NS
TC	mg/dL	199.5 ± 24.4	206.6 ± 15.6	207.1 ± 18.9	208 ± 9.3	<0.05

数値は、平均値±SD で示した。有意差がないことを NS で表した。BMI, ボディマス指数; sBP, 収縮期血圧; dBP, 拡張期血圧; AST, Aspartate transaminase ; ALT, Alanine transaminase; FPG, 空腹時血糖; HbA1c, ヘモグロビン A1c; Cr, クレアチニン; eGFR, 推算 glomerularfiltration rate。

統計解析は、Kruskal-Wallis 検定または一元配置分析により評価した。

*1 吹田スコア は、34 歳以下は取り除いて評価した。

3-5 腎機能マーカー分類群と各種検査項目との比較検討

続いて本研究の対象を eGFR の値に基づく三分位群 {T1 (低群; eGFR 60.2 – 76.3 mL/min/1.73m²、53 名)、T2 (中群; eGFR 76.6 – 88.4 mL/min/1.73m²、54 名)、T3 (高群; eGFR 88.7 – 117.1 mL/min/1.73m²、54 名)} に区分した。各群のデータは表 3.5 に示した。年齢、BMI、そして sBP が eGFR 分位群で有意差が認められた。脂質検査の項目では、LDL-C、TC、TG、そして non-HDL-C が eGFR 分位群で有意差が認められた。AEX-HPLC によるリポタンパク質分画中のコレステロール測定では、LDL-C、IDL-C、そして VLDL-C が eGFR 分位群で有意差が認められた。

表 3.5 eGFR による 3 分位群における検査データとリポタンパク質プロファイル

		T1 (低群)	T2 (中群)	T3 (高群)	P
eGFR 濃度 (mL/min/1.73m ²)		60.2 - 76.3	76.6 - 88.4	88.7 - 117.1	
対象数 (35 over *1)		n = 53 (n = 42)	n = 54 (n = 44)	n = 54 (n = 17)	
年齢	years	45.3 ± 10.5	42.8 ± 10.2	34.3 ± 9.1	<0.0001
BMI	kg/cm ²	22.4 ± 1.8	22 ± 2.1	21.3 ± 2.3	<0.05
sBP	mmHg	115.6 ± 10.9	114.8 ± 10.4	110.8 ± 10.6	<0.05
dBP	mmHg	70.3 ± 9.2	70.7 ± 8.6	67.9 ± 9.1	NS
喫煙	n, %	12 (22.6%)	10 (18.5%)	9 (16.7%)	
AST	IU/L	20.51 ± 3.79	19 ± 3.8	19.2 ± 3.5	NS
ALT	IU/L	18.55 ± 4.66	17.9 ± 4.5	17.1 ± 4.9	NS
FPG	mg/dL	88 ± 7.03	87.7 ± 6.4	85.2 ± 6.3	NS
HbA1c	%	5.3 ± 0.4	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	NS
Cr	mg/dL	0.935 ± 0.065	0.829 ± 0.06	0.745 ± 0.062	<0.0001
eGFR	mL/min/1.73m ²	70.7 ± 3.9	82 ± 3.2	98.5 ± 7.9	<0.0001
吹田スコア*1	%	0.41 ± 0.87	0.59 ± 0.87	0.38 ± 0.73	NS
脂質検査データ					
HDL-C	mg/dL	62 ± 12.8	66.1 ± 10.8	62.1 ± 12	NS
LDL-C	mg/dL	111 ± 18.3	110.2 ± 19	98.5 ± 21.1	<0.005
TC	mg/dL	188.2 ± 20.9	188.8 ± 23.5	172.7 ± 26.1	<0.0005
TG	mg/dL	81.1 ± 27.7	74 ± 24.7	60.7 ± 22.4	<0.0005
Lp(a)-mass	mg/dL	11.8 ± 11	10.1 ± 8.7	10.7 ± 11.6	NS
non-HDL-C	mg/dL	126.2 ± 20.1	122.7 ± 20.3	110.6 ± 22.7	<0.0005
リポタンパク質プロファイル (AEX-HPLC)					
HDL-C	mg/dL	60.9 ± 13.7	65 ± 10.8	62.7 ± 13.4	NS
LDL-C	mg/dL	105 ± 16.4	104.3 ± 18.4	95.4 ± 18	<0.01
IDL-C	mg/dL	9.4 ± 2.3	9.1 ± 2.3	7.8 ± 2.5	<0.005
VLDL-C	mg/dL	21.5 ± 8	19 ± 6.9	15.2 ± 6.3	<0.0001
CM-C	mg/dL	0.4 ± 1.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 1	NS
Lp (a)-C	mg/dL	2.7 ± 0.9	2.4 ± 0.7	2.7 ± 1.1	NS
TC	mg/dL	199.9 ± 22.2	200 ± 24.5	184.2 ± 27.9	<0.005

数値は、平均値±SD で示した。有意差がないことを NS で表した。BMI, ボディマス指数; sBP, 収縮期血圧; dBP, 拡張期血圧; AST, Aspartate transaminase ; ALT, Alanine transaminase; FPG,空腹時血糖; HbA1c, ヘモグロビン A1c; Cr, クレアチニン; eGFR, 推算 glomerularfiltration rate。

統計解析は、Kruskal-Wallis 検定または一元配置分析により評価した。

*1 吹田スコア は、34 歳以下は取り除いて評価した。

3-6 腎機能マーカー分類群と各種検査項目との比較検討

最後に eGFR の値に対するリポタンパク質プロファイルの影響を確認するために、重回帰分析を実施した。交絡因子として eGFR の減少に相関を有する BMI (P = 0.0042) を用いた。重回帰分析では、VLDL-C 値が BMI と独立して eGFR の減少に影響を与えることが示唆された (表 3.6)。

表 3.6 eGFR と他のパラメータにおける重回帰分析

	回帰係数 (β)	t	P
BMI (kg/m ²)	-0.7046	1.55254	0.1225
HDL-C (mg/dL)	-		
LDL-C (mg/dL)	-0.1106	1.96497	0.0512
IDL-C (mg/dL)	-		
VLDL-C (mg/dL)	0.4738	3.56106	<0.0005
CM-C (mg/dL)	-		
Lp(a)-C (mg/dL)	-		

eGFR に関して多変量解析を実施した。モデルとして BMI とリポタンパク質分画を因子として評価した。限界 P 値は 0.20 で設定した。

第4項 考察

これまでに、HDL-C、LDL-C、VLDL-C、そしてTCが年齢と関係すると報告されてきた。新井らの研究では、日本人を対象にTC、HDL-C、LDL-C、TG、そしてRLP-Cに関して年齢区毎の平均値と標準偏差を示した。⁷¹ この際のHDL-CとLDL-Cは直接法を使用した。⁷¹ Abottらは、1971年から1975年にかけてフラミンガム研究の中で超遠心分離によるリポタンパク質分画を実施し、HDL-C、LDL-CそしてVLDL-Cに関して、年齢、性別、ホルモン製剤投与の関係を報告した。⁷⁷ 図3.5に本研究結果と、新井らが報告した日本人の結果、そしてフラミンガム研究の結果における、HDL-C、LDL-C、そしてVLDL-Cの比較を示した。^{71,77} 過去の報告結果は、いずれもLDL-CとしてIDL-Cを含めていることから、AEX-HPLCの結果では、LDL-CとIDL-Cの和を用いてLDL-Cと比較した。脂質異常症などの疾患も含む一般的な日本人を代表する研究である新井らの報告と比較すると、HDL-C、LDL-Cは年齢に対して同じような傾向を示し、値も同等であることが分かった。フラミンガム研究との比較でも、HDL-C、LDL-C、そしてVLDL-Cは年齢との傾向は一致しているが、AEX-HPLCの値は、HDL-Cは高値傾向であり、LDL-CとVLDL-Cは低値傾向であった。この乖離の原因は、フラミンガム研究に含まれる脂質異常症患者の割合が高かったためと想定されるが、今後より大きな集団を対象とした研究で明らかにする必要があると考える。

本研究の結果から、Lp(a)-C値は年齢と有意な関連を示さないことが確認された。Lp(a)量は主に遺伝学的に決定されるという報告があり、Lp(a)-Cは、健常者では年齢に対してほとんど影響されないと考えられる。⁸³ Lp(a) massの測定にLp(a)-LATEX(デンカ

生研株式会社、東京) を用いたが、この試薬は標準法と比較的よく相関し、25 以上のクリンゲルIVドメインを含む apo (a) アイソフォームの影響を受けにくいという報告がある。⁴⁶ 本研究の対象では、Lp(a)-C は非常に狭い範囲の分布(2.6 ± 0.9 mg/dL) を示したが、その状況でも Lp(a) mass の値と良好な相関を示していた (図 3.3)。Lp(a)-C は過去にいくつかの測定法が報告されている。Nauck らは超遠心分離法とアガロースゲル電気泳動法を組み合わせた Lp(a)-C を報告している。⁸⁴ Sheman らは Lp(a) を他のリポタンパク質から精製するためにレクチンを用いた分析法を報告している。⁸⁵ 今後、これら分析法と AEX-HPLC 法による Lp(a)-C の測定とを比較していく必要があると考える。これまでの研究により、Lp(a) が高値であることや低分子 apo (a) の存在は、動脈硬化性疾患のリスク因子であると報告されている。^{42, 85, 86} 健常人の Lp(a)-C 値は年齢間でほとんど差がなく、糖尿病、CKD、CHD の診断マーカーと有意な相関が見られなかった。(表 3.3) 脂質異常症の検体を用いて、これらの Lp(a)-C の結果を評価する必要があると考える。

高 TG リポタンパク質である IDL や VLDL の上昇は CKD の発症に関係すると報告されている。⁷⁵ CKD のステージは、米国腎臓財団 (National Kidney Foundation: NKF) の腎臓病予後改善対策 (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative: K/DOQI) の診断ガイドラインによって定義されている。⁷⁵ 本研究では LDL-C、IDL-C、VLDL-C そして CM-C が腎障害マーカーである eGFR と有意な負の相関を示した。(表 3.3) 多重解析では、VLDL-C が eGFR の独立した説明因子と示された。(表 3.4) 庄司らは CKD の腎透析患者では、IDL-C や VLDL-C が健常者と比較して有意に高値であることを報告した。⁷⁶ VLDL 受容体は、VLDL と結合し、血中からの VLDL の代謝に関与する。⁸⁷

VLDL 受容体の mRNA やタンパク質は外科的な腎部分切除や副甲状腺部分切除の腎障害モデルマウスで発現量が低下すると報告された。⁸⁸

さらに肝性リパーゼの遺伝子発現は慢性腎不全 (CRF) モデルラットで抑制され、肝性リパーゼの発現も CRF ラットでは低下した。^{89,90} 早期の CKD では VLDL 受容体の発現調節は、血中 VLDL の増加や VLDL 代謝の低下を導く。⁹¹ 加えて、腎臓における早期の動脈硬化は、CKD 患者において腎内細小血管障害や腎障害を引き起こすと考えられている。⁹² 過去の報告では、IDL や VLDL が動脈硬化の進展に寄与することが示された。^{93,94} 従って、VLDL-C 値の上昇により、健常人の腎機能を推測することができる可能性がある。今後、高血圧症、糖尿病、そして脂質異常症の患者を対象として、VLDL-C がそれぞれの対象においても eGFR と関連を示すのか明らかにする必要がある。

吹田スコアは日本人を対象とした 10 年間の CHD 発症リスクを推測するために開発され、冠危険因子として CKD を含めていることが特徴である。⁴ 吹田スコアは、FRS と比較して、10 年間の CHD 発症率がかなり低くなっており、健常な日本人で CHD 発症を推測するために FRS より適していることが示唆される。⁴ Spearman の順位相関の解析では、吹田スコアは年齢 ($P<0.0001$)、sBP ($P<0.0001$)、dBP ($P<0.0001$)、FPG ($P<0.01$)、HbA1c ($P<0.05$)、eGFR ($P<0.05$)、そして LDL-C ($P<0.05$) と有意な相関を示した一方で、HDL-C は示さなかった。CM-C は、NIPPON DATA リスクや久山リスクと同様に吹田スコアで有意な相関 ($P=0.003$) を示した。さらに CM-C は吹田スコアによる層別群で有意差を示した。直接法で測定される LDL-C は IDL-C を含み、AEX-HPLC 法で測定される LDL-C は IDL-C を含まないため、吹田スコアによる層別群の解析では、直接法の

LDL-C のみで有意差が見られたと考えられる。カイロミクロンレムナントは動脈硬化性疾患のリスク因子だと報告されている。^{23, 61, 95} CM はコレステロール含有比がほとんどないとされるが、カイロミクロンレムナントは CM と比較してコレステロール含有比が高い。⁹⁶ 本研究では、AEX-HPLC により CM 中のコレステロールを測定しているため、カイロミクロンレムナントのコレステロールを主に評価していると考えられる。カイロミクロンレムナントを含むレムナント粒子は動脈壁に浸潤することが可能でアテローム性動脈硬化発生リスクを増加させると報告されている。^{97, 98} LDL 受容体関連タンパク質 (LDL receptor-related proteins: LRP) は LDL 受容体遺伝子ファミリーに属し、IDL やカイロミクロンレムナントを含むリガンドの受容体である。^{89, 99} 藤岡らは、カイロミクロンレムナントが LDL 受容体や LRP によって調整されることを明らかにした。¹⁰⁰ カイロミクロンレムナント値の上昇は LRP の機能低下によって引き起こされる可能性がある。

本研究で、AEX-HPLC によって測定された CM-C が健常男性で CHD 発症リスクを推測するマーカーとなりうることが示唆された。西村らは、とりわけ CHD 未発症の日本人において、FRS は CHD の発症リスクを大きく見積もると報告し、吹田スコアでは、男性において高血圧や低 HDL-C に関するリスクの重みづけをフラミンガム研究よりも大きくしている。⁴ そのために健常人では IDL-C や VLDL-C が吹田スコアと有意な関連性が見られないと考えられる。Non-HDL-C は、LDL-C、IDL-C、VLDL-C、CM-C が含まれる。¹⁰¹ 表 3.3 に示すように吹田スコアは non-HDL-C と相関しているが、これは LDL-C や CM-C が大きく関与していると考えられる。

本研究では2つの限界が存在する。まず、吹田スコアが 1% の群で CM-C のばら

つきが大きいことである (0.7 ± 1.7 mg/dL)。もう一方は、吹田研究では CKD 患者を対象に含んでいるが、本研究では CKD 患者を評価していないことである。NIPPON DATA リスクは NIPPON DATA 80 研究に基づいた 10 年間の CHD 死を推測するリスクアセスメントチャートである。³ 久山リスクは久山町研究に基づく 10 年間の CVD 発症を推測するために開発された。⁴⁸ NIPPON DATA リスクと久山リスクでは吹田スコアと同様に年齢群で有意差が認められた。さらに同様に、CM-C と有意な相関が確認された。対照的に non-HDL-C と有意な相関を認めなかった。吹田スコアと CM-C や non-HDL-C との関連性を詳細に明らかにするために各種疾患患者を含めた大規模な臨床研究が必要である。

本章では、日本人健常男性を対象にし、LDL-C、VLDL-C そして CM-C が年齢で有意差があること、HDL-C、IDL-C、Lp(a)-C では有意差がないことを明らかにした。VLDL-C は eGFR と有意な相関を有することを明らかにした。CM-C と吹田スコアの関連性を明らかにした。これらの結果から、血中の VLDL-C 濃度は早期の腎機能障害を評価できる可能性が示唆された。また CM-C の上昇が日本人健常男性において早期の CHD リスクとなる可能性が示唆されたが更なる研究が必要である。

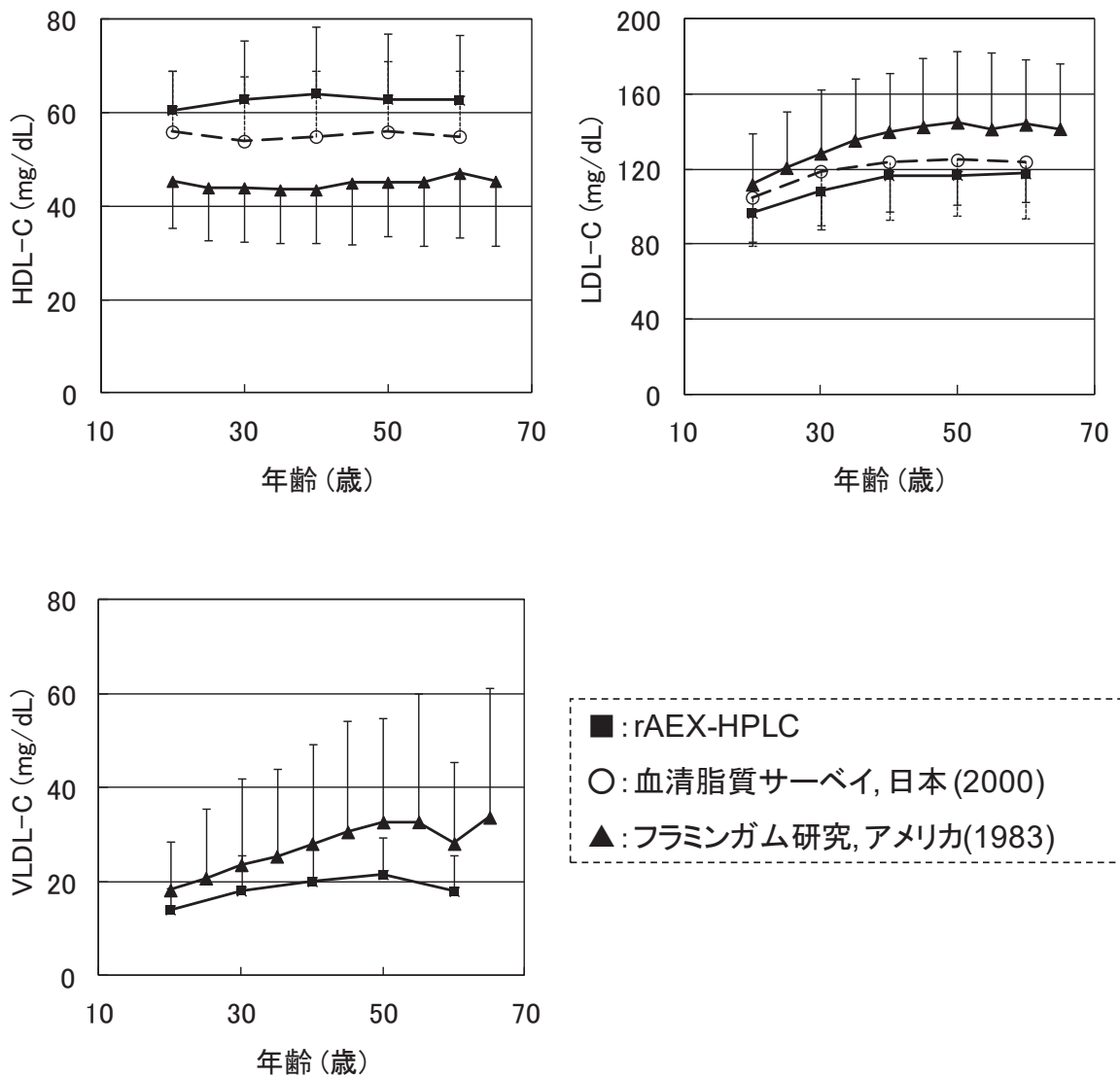


図 3.5 HDL、LDL (LDL+IDL)、そして VLDL 中のコレステロールと年齢との関連性

■は、本研究で AEX-HPLC 法により得られた測定結果を示した。○は、2005 年に新井らによって報告された日本人の血清脂質サーベイの結果を示した。⁷¹▲は 1982 年に Abott らによって報告されたフラミンガム研究の結果を示した。⁷⁷過去の研究では LDL は広義の LDL であるため、AEX-HPLC 法では、LDL-C と IDL-C の和を用いた。

第4章 リポタンパク質分画中ビタミン E 測定法の開発

第1項 背景

冠動脈疾患の主な原因病態である動脈硬化症は、血管壁における慢性炎症性疾患である。動脈硬化病巣の血管内皮では LDL 等の ApoB 含有リポタンパク質が酸化変性し蓄積される。¹⁰²⁻¹⁰⁶ 単球は、接着分子や炎症性サイトカインによる誘導によって生じたケモカインによって、内皮細胞に吸着する。¹⁰⁴ 続いて単球は内皮空間に浸潤し、マクロファージへと分化する。さらに酸化された LDL (酸化 LDL) は、マクロファージの泡沫細胞への分化を誘導する。^{102-104, 107} 内皮における泡沫細胞の蓄積は、早期の動脈硬化病態や動脈硬化の進行に寄与する。¹⁰²

ビタミン E 同族体の中で、ヒト血中では γ - および α -tocopherol が主として存在し、それらは主要な疎水性還元物質である。疎水性物質である tocopherol は、血中ではリポタンパク質により運搬される。これまでの研究で、ビタミン E の摂取によりリポタンパク質中のビタミン E が増加することで VLDL や LDL の酸化が抑制されることが報告されている。⁵¹⁻⁵⁴ 従って、ビタミン E の摂取は LDL の酸化を抑制し、内皮におけるマクロファージの泡沫化を抑制すると考えられる。^{54,55} 実際に、ApoE 欠損マウスではビタミン E の摂取により動脈硬化の発症が抑制された。⁵⁶ 人を対象とした臨床研究では、ビタミン E の摂取により冠動脈性心疾患の発症リスクが減少したという報告がある一方で、他の研究ではビタミン E 摂取と心疾患発症リスクに影響はないという報告もある。⁵⁷ これらの研究では、リポタンパク質中のビタミン E は測定されていない。その理由として、従来リポタンパク

質分画中のビタミン E の測定は、超遠心法による分離、*n*-ヘキサンによる抽出、そして逆相クロマトグラフィーの測定を必要とし、非常に複雑な方法を用いて実施される必要があり、多くの検体を測定できないという課題があった。^{30, 108}

本研究では、血漿中の HDL、LDL、そして VLDL 中のビタミン E 量を自動で定量可能な新しい検査法を開発した。そして本システムを用いて、健常者と脂質異常症患者の血中ビタミン E 量の測定を実施し、ビタミン E と脂質異常症の関連について検討した。

第2項 方法

2-1 対象

東ソー株式会社東京研究所に勤務する投薬治療中でない従業員を対象とした。検体採取の採血は同意書による確認のもとに実施され、個人名を削除し別の符号で管理されて検討を実施した。本研究は、東ソー株式会社バイオサイエンス事業部の倫理委員会の承認を得て実施された。健常者 (38 名)、脂質異常症患者 (31 名) に関して、日本動脈硬化学会発行「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版」に基づき、TG が 150 mg/dL 以下、HDL-C が 40mg/dL 以上、かつ LDL-C が 140 mg/dL 以下を健常者とした。⁵

2-2 ビタミン E 自動分析法

AEX-HPLC を用いたリポタンパク質分画法 (HDL、LDL、VLDL の三分画) と逆相 HPLC を組み合わせた全自動分析システムを構築し、血中の γ - および α -tocopherol を定量可能とした。ポンプとして、DP-8020 (東ソー株式会社、東京)、オートサンプラーとして AS-8020 (東ソー株式会社)、蛍光検出器として FS-8020 (東ソー株式会社、東京) (励起波長: 295 nm、蛍光波長: 330 nm) を使用した。切り替えバルブ、カラムオープンは新規に設計した。陰イオン交換カラム (カラム 1) は、DEAE-NPR、カラムサイズ 4.0 mmID \times 15 mm (東ソー株式会社、東京) を逆相プレカラム (カラム 2) は、octadecylsilyl (ODS) 基を有するカラム ODS-80Ts、4.6 mmID \times 35 mm (東ソー株式会社、東京)、逆相カラム

(カラム 3) は、ODS-80Ts、4.6 mmID×75 mm (東ソー株式会社、東京) を使用した。各リポタンパク質分画中のコレステロール濃度の測定は rAEX-HPLC で測定した。

2-3 超遠心分離法

過去の報告に基づいて、超遠心分離法を実施した。^{18,23} 分画の比重は、VLDL と CM 層: $d < 1.006$ g/mL、LDL 層 (IDL 層を含む): $1.006 < d < 1.063$ g/mL、HDL 層: $1.063 < d < 1.210$ g/mL、タンパク質層: $d > 1.210$ g/mL とした。遠心分離機は、SCP70H2 (日立工機、東京)、ローターは RP55T (日立工機株式会社、東京) を使用した。

2-4 ビタミン E の従来測定法と LDL 酸化時間の測定

従来法として、過去の報告に基づいた方法で実施した。¹⁰⁹ HDL 分画、LDL 分画、そして VLDL 分画は血漿から超遠心分離法によって取得した。内部標準物質として、 δ -tocopherol を使用した。*n*-ヘキサン抽出により有機層を採取し、窒素雰囲気化で蒸発させ、エタノールによって再溶解させた。続いて、逆相カラム ODS-80Ts、4.6 mmID×150 mm (東ソー株式会社)、溶離液 (83.5% ethanol、25 mM sodium perchlorate、0.025 mM 硝酸)、そして蛍光検出器 FS-8020 (励起波長: 295 nm、蛍光波長: 330 nm、東ソー株式会社) による逆相クロマトグラフィーで tocopherol を分離、定量した。

LDL の酸化反応は過去の報告に従い実施した。^{109,110} EDTA 非含有リン酸緩衝液で LDL 分画を透析し、硫酸銅 (II) (終濃度 2 μ M) を添加し、37°C で測定した。LDL の酸化によるジエン基形成は波長 234 nm の吸光変化で観察し、ラグタイムを測定した。

第3項 結果

3-1 ビタミン E 全自動定量法の分析条件の設定

ビタミン E 自動分析法のシステム概略を 図 4.1 に示した 陰イオン交換カラム (カラム 1) は、DEAE-NPR、カラムサイズ 4.0 mmID×15 mm (東ソー株式会社、東京) を、溶離液として、溶離液第 1 液 (50mM Tris-HCl、pH 7.5) と溶離液第 2 液 (50 mM Tris-HCl + 500 mM 過塩素酸ナトリウム (NaClO₄)、pH 7.5) を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーで分析をした。血漿サンプル 7 μL を自動注入し、DEAE-NPR カラムと 2 つの塩濃度が異なる溶離液により HDL、LDL (LDL+IDL)、VLDL の 3 つに分画した。リポタンパク質を分離するステップグラジエント条件は、表 4.1 の通りとした。逆相プレカラム (カラム 2) は、octadecylsilyl (ODS) 基を有するカラム ODS-80Ts、4.6 mmID×35 mm (東ソー株式会社、東京)、逆相カラム (カラム 3) は、ODS-80Ts、4.6 mmID×75 mm (東ソー株式会社、東京) を、溶離液として、溶離液第 3 液 (30.0% エタノール、25 mM 過塩素酸ナトリウム) と溶離液第 4 液 (83.5% エタノール、25 mM 過塩素酸ナトリウム、0.025 mM 硝酸) を用いて、逆相クロマトグラフィーで分析を行った。検出器は、蛍光検出器 (FS-8020) (東ソー株式会社、東京) を用いた。2.5 mL サンプルループとカラム 2 は切換バルブ 1 (MV1) の ON 状態で接続された。MV1 の制御方法は表 4.2 に示した。カラム 1 から溶出された各リポタンパク質分画は界面活性剤と有機溶媒を含む希釈液 (70% エタノール+ 1% TritonX-100) と混合し、ビタミン E を遊離させた。これによりカラム 1 で分離されたリポタンパク質分画をサンプルループに滞留させた。

ビタミン E を含む分解されたリポタンパク質は、HDL が 5.3 – 14.3 分に、LDL が

20.3 – 29.3 分に、そして VLDL が 35.3 – 59.3 分にカラム 2 へ注入された。カラム 2 とカラム 3 は、切換バルブ 2 (MV2) の ON 状態で接続された。バルブ切り換えにより、逆相カラム (カラム 2) にサンプルを注入し、溶離液第 3 液 (30% エタノール) により粗精製した。MV2 の制御方法は表 4.2 に示した。HDL、LDL、そして VLDL の各リポタンパク質中のビタミン E が、7.3 – 16.3 分、22.3 – 31.3 分、そして 37.3 – 61.3 分にそれぞれカラム 3 に注入された。切換バルブ 2 (MV2) により逆相カラム (カラム 3) に送液し、溶離液第 4 液 (83.5% エタノール) で精製し、最後に蛍光検出器で検出した。結果が得られるまで一検体あたり 55 分の時間を要した。

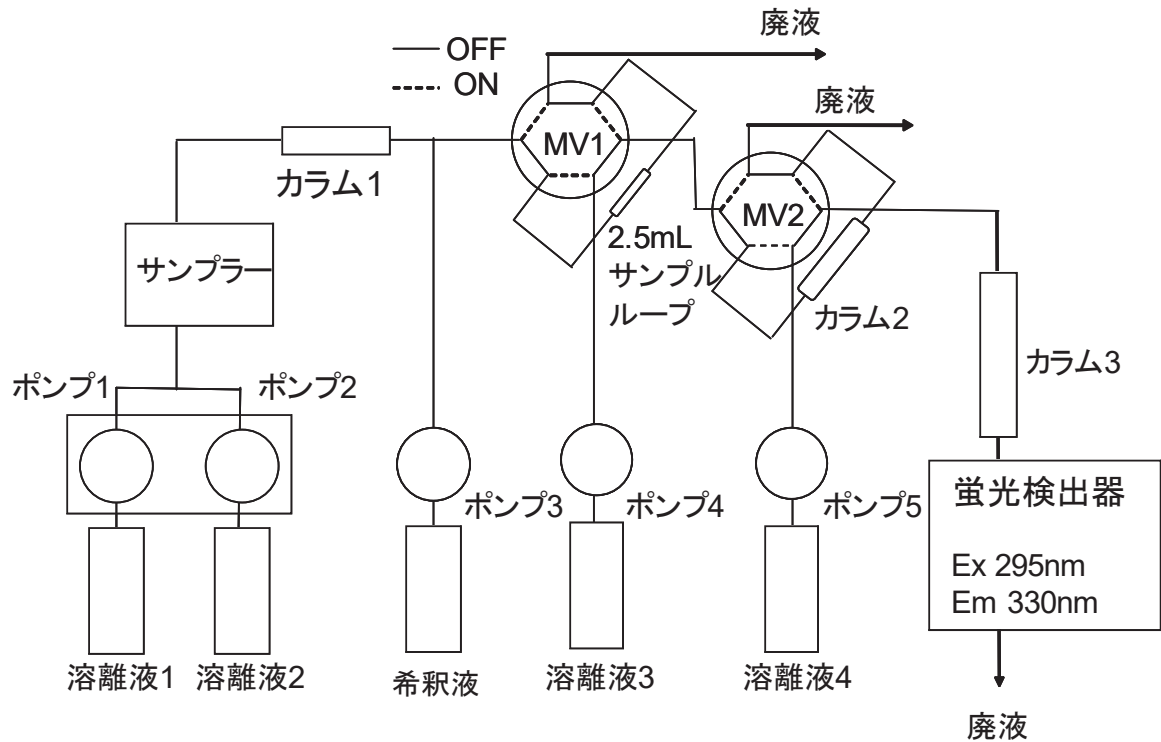


図 4.1 リポタンパク質中のビタミン E 測定のための自動分析システム概略図

AEX-HPLC 部は、2 つの溶離液を送液する 2 つのポンプ、オートサンプラー、陰イオン交換カラムで構成された。合計流速は 0.25 mL/min で一定とし、2 つの溶離液は過塩素酸ナトリウム濃度が異なるものとした。カラム 1 でリポタンパク質を分離した後、界面活性剤を含む希釈液と混合させた。ポンプ 3 の流速は 0.25 mL/min であった。逆相クロマトグラフィー部では、2 本のカラムを使用し、2 つの溶離液を使用した。流路は 2 つの切り換えバルブ (MV) によって制御された。ポンプの送液流速は、それぞれ 1.5 mL/min とした。検出は蛍光検出器を使用した。励起波長 (Ex) は 295 nm、蛍光波長 (Em) は 330 nm とした。

表 4.1 溶離液のグラジエント溶出条件

時間 (分)	溶離液第1液 (%)	溶離液第2液 (%)	グラジエント条件 S: ステップグラジエント L: リニアグラジエント
0.0	81.0	19.0	S
2.0	81.0	19.0	S
5.0	90.0	10.0	L
15.0	74.0	26.0	S
17.0	74.0	26.0	S
20.0	90.0	10.0	L
30.0	67.0	33.0	S
32.0	67.0	33.0	S
35.0	90.0	10.0	L
45.0	0.0	100.0	S
47.0	90.0	10.0	S

表 4.2 切換バルブの制御パラメータ

時間 (分)	MV1	MV2
0.0	ON	ON
0.3	OFF	
1.0		OFF
5.3	ON	
7.3		ON
14.3	OFF	
16.3		OFF
20.3	ON	
22.3		ON
29.3	OFF	
31.3		OFF
35.3	ON	
37.3		ON
60.0		

3-2 クロマトグラム

超遠心分離により得た HDL 分画、LDL 分画、VLDL 分画、そしてボトムフラクション、および血漿検体に対する、新測定法のクロマトグラムを図 4.2 Aa~e に示した。血漿検体では 6 つのピークが検出された (図 4.2 Ae)。HDL 分画、LDL 分画、VLDL 分画のクロマトグラムでは、15 - 20 分、30 - 35 分、そして 45 - 45 分にそれぞれ 2 つのピークが検出された。(図 4.2 Aa-c) ボトムフラクションからはピークが検出されなかった。(図 4.2 Ad) 続いて、血漿検体に γ - 及び α -tocopherol 試料を添加後に測定を実施した。図 4.2 Ba は血漿に γ -tocopherol 試料を添加したもので、図 4.2 Bb は血漿に α -tocopherol 試料を添加したもので、そして図 4.2 Bc は元の血漿のクロマトパターンを示した。従って、溶出が早いピーク (ピーク 1) と溶出が遅いピーク (ピーク 2) は、それぞれリポタンパク質中の γ - 及び α -tocopherol を検出していることが示唆された。(図 4.2 B)

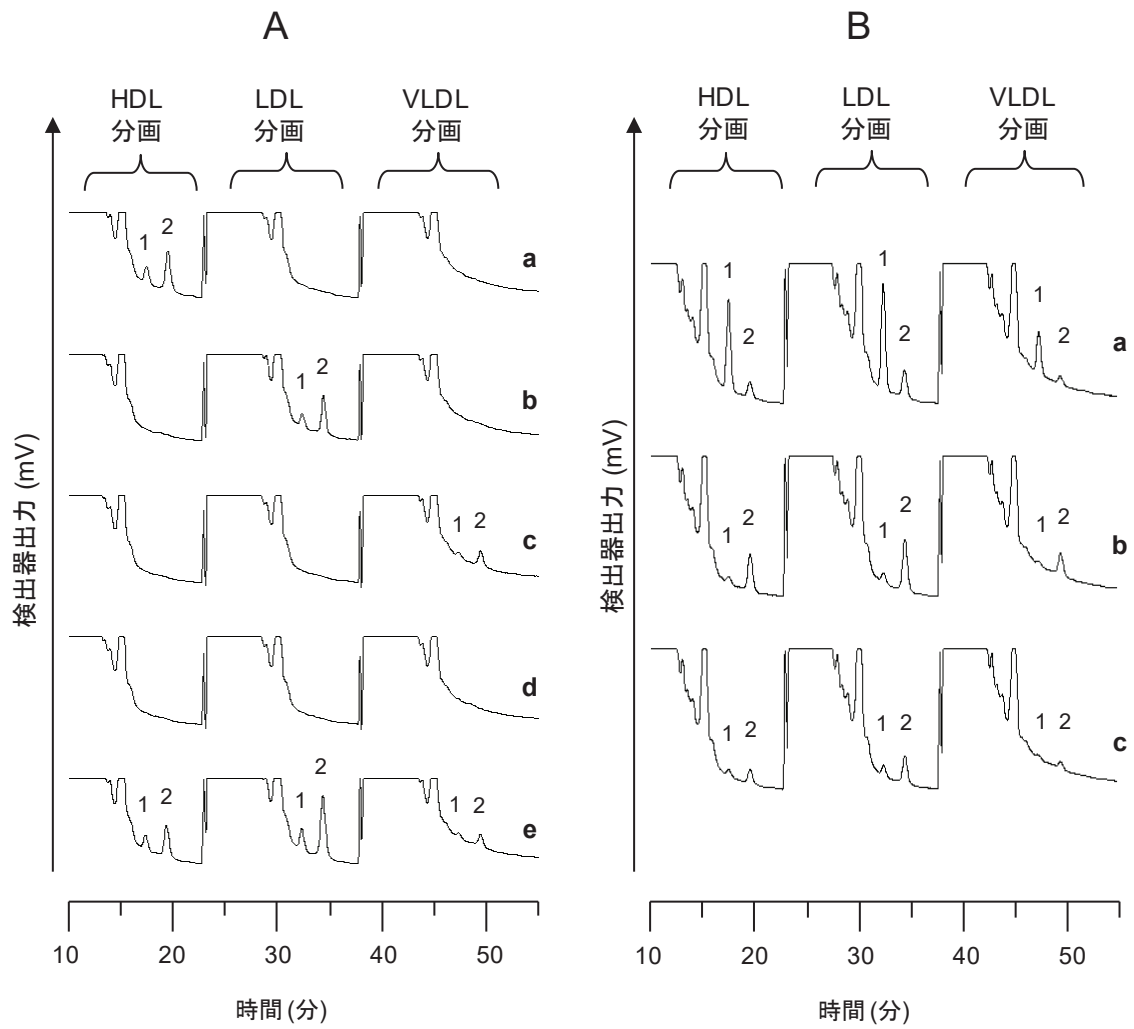


図 4.2 HDL、LDL、VLDL、ボトムフラクション、そして γ -及び α -tocopherol 添加血漿のクロマトグラム

3-3 基本性能試験

ビタミンE自動分析法の基本的な性能評価として、希釈直線性試験、同時再現性試験、日差再現性試験、そして添加回収試験を実施した。血漿は、サンプル-3 {男性、32歳、TC = 4.78 mmol/L (184.8 mg/dL)、TG=3.61 mmol/L (319.8 mg/dL)}、サンプル-4 {男性、53歳、TC = 4.55 mmol/L (175.9 mg/dL)、TG=0.95 mmol/L (84.2 mg/dL)}、サンプル-5 {男性、56歳、TC = 5.02 mmol/L (194.1 mg/dL)、TG=1.86 mmol/L (164.8 mg/dL)}、そしてサンプル-6 {男性、45歳、TC = 5.43 mmol/L (210.0 mg/dL)、TG=1.83 mmol/L (162.1 mg/dL)} を用いた。

希釈直線性は、5倍まで希釈を実施し、各リポタンパク分画中の tocopherol に関してピーク高さで評価した。結果を図 4.3 に示した。HDL、LDL、そして VLDL 中の γ - 及び α -tocopherol のいずれにおいても 5倍までの希釈直線性は良好であった。

同時再現性と日差再現性は表 4.3 に示した。同時再現性の変動係数は 4.73 - 12.84 % で、日差再現性の変動係数は 7.00 - 14.73 % であった。

添加回収試験として、元の血漿から HDL、LDL、そして VLDL 分画を超遠心により採取し、それらをそれぞれ血漿に添加後、ビタミン E 自動分析システムで測定した。 γ - 及び α -tocopherol の回収率はそれぞれ 92 - 109%、90 - 114% であった (表 4.4)。

10個の血漿検体に関して、 γ - 及び α -tocopherol のそれぞれの総量とビタミン E 自動分析システムにおける γ - 及び α -tocopherol のそれぞれの合計量を比較した。血漿の、 γ - 及び α -tocopherol のそれぞれの総量の測定は、HPLC 法により実施し、株式会社エスアールエルに測定を委託した。 γ - 及び α -tocopherol に関して回収率の平均値と標準偏差はそれぞれ $85 \pm 8\%$ 、 $93 \pm 5\%$ であった。(表 4.5、表 4.6) これらの結

果より、本法は HDL、LDL、そして VLDL 中の γ - 及び α -tocopherol 濃度を定量評価
することができると考えられた。

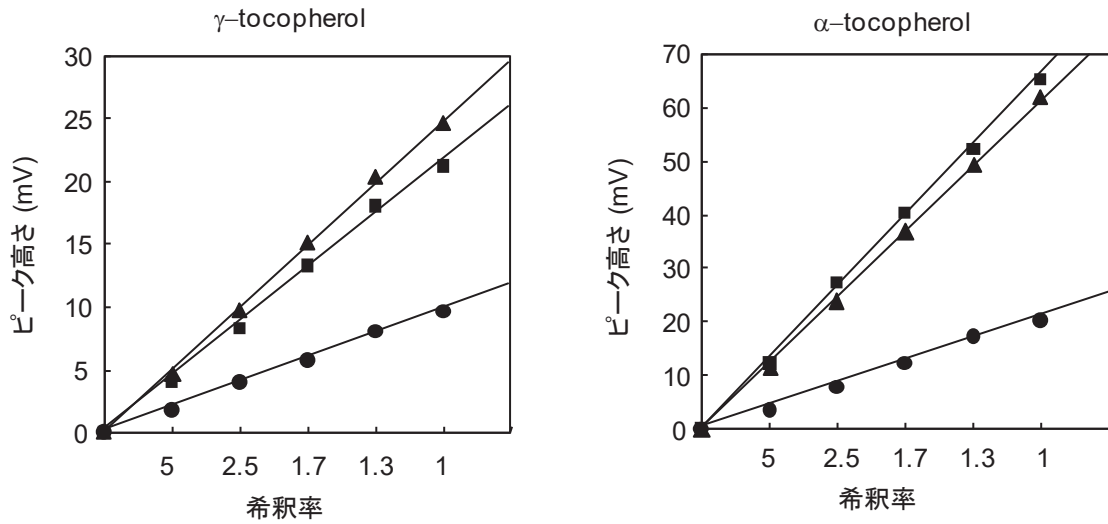


図 4.3 ビタミン E 自動測定法の希釈直線性

γ - 及び α -tocopherol に関して、5 倍希釈およびブランクの希釈直線性を評価した。HDL、
LDL、そして VLDL の各 tocopherol をそれぞれ●、■、そして▲であらわした。それぞれの
tocopherol はピーク高さで評価した。

表 4.3 ビタミン E 自動分析システムの同時再現性と日差再現性

		日差再現性 (n=10)			同時再現性 (n=10)		
		Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
		($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	(%)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	(%)
サンプル-4	γ -tocopherol (HDL)	0.74	0.07	9.15	0.78	0.05	5.94
	α -tocopherol (HDL)	6.70	0.47	7.00	7.09	0.46	6.53
	γ -tocopherol (LDL)	0.68	0.06	9.19	0.70	0.05	7.51
	α -tocopherol (LDL)	7.04	0.58	8.21	7.27	0.45	6.23
	γ -tocopherol (VLDL)	0.30	0.04	14.73	0.32	0.04	12.84
	α -tocopherol (VLDL)	2.52	0.23	8.99	2.69	0.22	8.20
サンプル-5	γ -tocopherol (HDL)	0.78	0.08	9.73	0.74	0.04	5.54
	α -tocopherol (HDL)	5.29	0.50	9.44	5.22	0.26	5.05
	γ -tocopherol (LDL)	1.05	0.09	8.79	1.04	0.05	4.73
	α -tocopherol (LDL)	8.73	0.69	7.93	9.07	0.57	6.30
	γ -tocopherol (VLDL)	0.73	0.07	9.15	0.73	0.05	6.31
	α -tocopherol (VLDL)	6.37	0.60	9.39	6.65	0.39	5.84

表 4.4 ビタミン E 自動分析システムの添加回収試験

	血漿中濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	添加量 ($\mu\text{mol/L}$)	実測量 ($\mu\text{mol/L}$)	回収率 (%)
γ -tocopherol (HDL)	0.53	0.21	0.20	92
		0.32	0.33	101
		0.43	0.44	102
α -tocopherol (HDL)	3.86	2.22	2.01	90
		3.33	3.74	112
		4.44	4.92	111
γ -tocopherol (LDL)	0.80	0.52	0.49	93
		0.79	0.77	98
		1.05	1.14	109
α -tocopherol (LDL)	9.33	7.27	6.91	95
		10.90	11.68	107
		14.54	16.64	114
γ -tocopherol (VLDL)	0.45	0.59	0.54	92
		0.88	0.92	104
		1.18	1.23	105
α -tocopherol (VLDL)	5.64	14.81	16.07	108
		22.41	24.10	108
		32.42	32.14	99

表 4.5 血漿中の γ -tocopherol 総量とビタミン E 自動分析システムによる

γ -tocopherol 合計量の回収試験

検体 No.	γ -tocopherol				血漿中 濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	回収率 (%)
	HDL ($\mu\text{mol/L}$)	LDL ($\mu\text{mol/L}$)	VLDL ($\mu\text{mol/L}$)	合計 (HDL+LDL+VLDL) ($\mu\text{mol/L}$)		
1	1.18	0.93	0.37	2.49	2.84	87
2	0.90	0.78	0.20	1.88	2.35	80
3	1.81	1.20	0.35	3.36	4.39	76
4	0.45	0.79	0.41	1.65	1.73	95
5	0.93	0.84	0.29	2.05	2.16	95
6	1.38	0.88	0.28	2.54	3.40	75
7	1.11	1.02	0.40	2.53	2.82	90
8	1.13	1.22	0.46	2.81	3.01	93
9	0.93	1.09	0.43	2.45	3.21	76
10	0.77	0.89	0.71	2.37	2.90	82
Mean	1.06	0.96	0.39	2.41	2.88	85
SD	0.37	0.16	0.14	0.48	0.73	8

表 4.6 血漿中の α -tocopherol 総量とビタミン E 自動分析システムによる

α -tocopherol 合計量の回収試験

検体 No.	α -tocopherol				血漿中 濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	回収率 (%)
	HDL ($\mu\text{mol/L}$)	LDL ($\mu\text{mol/L}$)	VLDL ($\mu\text{mol/L}$)	合計 (HDL+LDL+VLDL) ($\mu\text{mol/L}$)		
1	6.18	6.66	2.00	14.83	14.98	99
2	8.65	9.95	2.34	20.94	22.86	92
3	9.68	7.34	1.75	18.77	20.55	91
4	3.47	8.86	4.20	16.53	17.28	96
5	6.99	10.09	2.67	19.75	20.32	97
6	11.66	9.43	3.50	24.59	26.71	92
7	8.84	10.25	2.83	21.93	22.58	97
8	7.45	10.22	3.21	20.88	21.16	99
9	7.20	10.59	3.35	21.14	24.67	86
10	4.61	8.56	5.43	18.60	21.81	85
Mean	7.47	9.19	3.13	19.79	21.29	93
SD	2.40	1.33	1.09	2.78	3.38	5

3-4 従来法との相関

従来法として、リポタンパク質中のビタミン E (γ - 及び α -tocopherol) の測定は、超遠心法によりリポタンパク質を分画し、それぞれの分画から n -ヘキサンを用いてビタミン E を抽出し、抽出物を逆相クロマトグラフィーで測定を実施した。リポタンパク質中の γ - 及び α -tocopherol の測定として、30 検体を用いて、自動分析システムによる測定を実施し、従来法の測定結果と比較した。(図 4.4)

従来法では、超遠心法を用いるため多検体処理が不可能であり、一度の検討は 6 検体で実施した。超遠心を実施し、ビタミン E の定量値を得るまで 5 日間を要した。30 検体を処理するのに合計 1 ケ月以上を要した。その一方で、自動分析システムでは、前処理の必要がなく、1 検体あたり 60 分の分析時間で測定が可能であった。

ビタミン E 自動分析法と従来法の相関は良好であり、自動分析システムによる HDL、LDL、VLDL 中の γ - 及び α -tocopherol の測定値は従来法の定量値と同等であった。加えて、LDL 分画中の γ - 及び α -tocopherol/cholesterol 比は $2 \mu\text{mol/L}$ の CuSO_4 による LDL の酸化反応のラグタイムと有意な相関が確認された。(図 4.5)

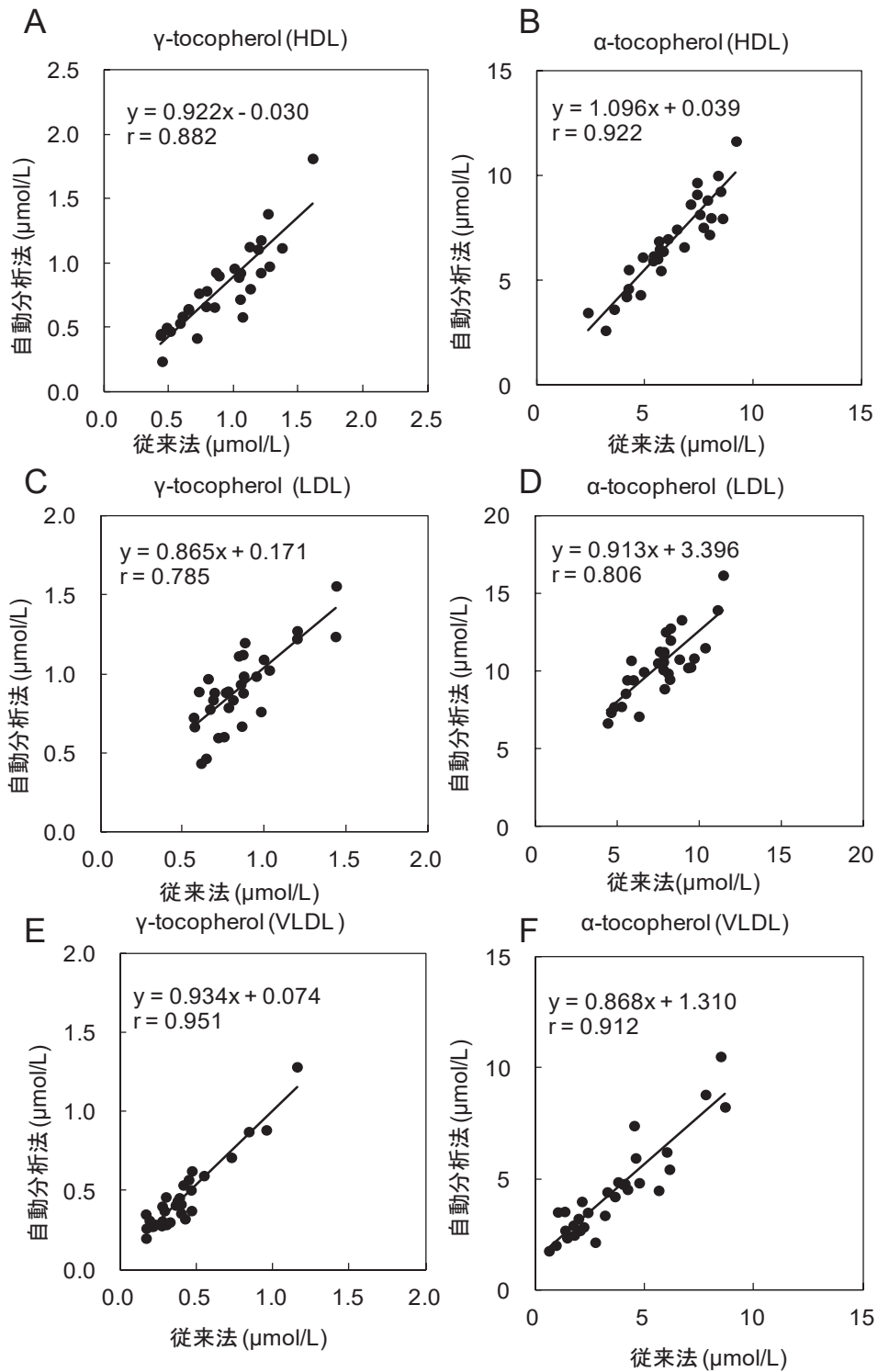


図 4.4 自動分析システムと従来法におけるリポタンパク質分画中の γ - 及び α -tocopherol 値の相関

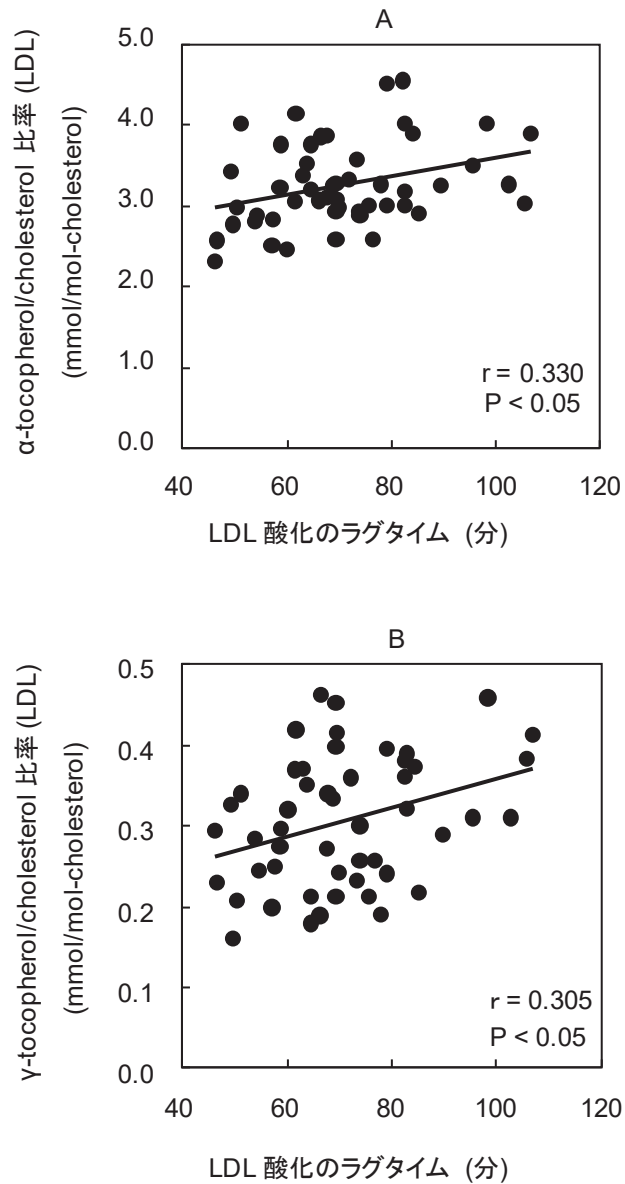


図 4.5 LDL の酸化反応によるラグタイムと LDL 中の γ - 及び α -tocopherol/cholesterol 比の相関

LDL の酸化反応によるラグタイムは 50 検体の超遠心分離で得られた LDL を用いて測定した。(male/female = 37/13、age = 52.8 ± 13.8 歳、TC = 195.6 ± 25.9 mg/dL、TG = 111.6 ± 54.0 mg/dL)

3-5 健常者群、脂質異常症患者群に対する自動分析システムによる γ - 及び α -tocopherol の比較

投薬治療を行っていないボランティア 69 名の検体でビタミン E 自動分析システムによる γ - 及び α -tocopherol の測定を実施した。表 4.7 に特性データと tocopherol のデータを示した。健常者群 (38 名) と脂質異常症患者群 (31 名) は、動脈硬化予防のためのガイドライン 2012 年の診断基準に従って群分けした。⁵ VLDL 中の γ - 及び α -tocopherol/cholesterol 比は、脂質異常症患者群より健常群で有意に高値となり、LDL または HDL 中の γ - 及び α -tocopherol/cholesterol 比では有意差が認められなかった。さらに、VLDL 中の γ - tocopherol と α -tocopherol の比は、脂質異常症患者群より健常群で有意に高値であった。

表 4.7 ボランティア検体の特性データとトコフェロール値

	合計 (n=69)			健常群 (n=38)			脂質異常群 (n=31)			P
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	
年齢 (year)	39.4	±	8.0	39.4	±	9.1	39.5	±	6.6	NS
BMI (kg/m ²)	22.9	±	2.6	21.7	±	2.1	24.4	±	2.4	<0.00001
sBP (mmHg)	110.9	±	12.1	108.0	±	10.9	114.6	±	114.6	<0.05
dBp (mmHg)	71.6	±	8.9	68.8	±	7.2	75.0	±	9.7	<0.001
TC (mmol/L)	5.06	±	0.83	4.55	±	0.59	5.70	±	0.70	<0.00001
TG (mmol/L)	1.37	±	1.79	0.68	±	0.25	2.21	±	2.42	<0.00001
HDL-C (mmol/L)	1.49	±	0.37	1.64	±	0.34	1.31	±	0.34	<0.0005
LDL-C (mmol/L)	3.30	±	0.90	0.87	±	0.53	3.93	±	0.87	<0.00001
VLDL-C (mmol/L)	0.44	±	0.61	0.19	±	0.09	0.74	±	0.81	<0.00001
γ-tocopherol (HDL) (mmol/mol-cholesterol)	0.62	±	0.19	0.59	±	0.16	0.65	±	0.23	NS
α-tocopherol (HDL) (mmol/mol-cholesterol)	5.20	±	0.84	5.20	±	0.83	5.20	±	0.87	NS
γ-tocopherol (LDL) (mmol/mol-cholesterol)	0.32	±	0.11	0.32	±	0.09	0.32	±	0.13	NS
α-tocopherol (LDL) (mmol/mol-cholesterol)	3.23	±	0.60	3.25	±	0.62	3.20	±	0.60	NS
γ-tocopherol (VLDL) (mmol/mol-cholesterol)	1.74	±	0.84	2.18	±	0.79	1.20	±	0.53	<0.00001
α-tocopherol (VLDL) (mmol/mol-cholesterol)	12.74	±	3.88	13.83	±	4.49	11.39	±	2.40	<0.05
γ/α-tocopherol (HDL) (mol/mol)	0.116	±	0.034	0.110	±	0.030	0.122	±	0.038	NS
γ/α-tocopherol (LDL) (mol/mol)	0.097	±	0.029	0.095	±	0.025	0.098	±	0.034	NS
γ/α-tocopherol (VLDL) (mol/mol)	0.133	±	0.055	0.158	±	0.052	0.103	±	0.041	<0.00005

有意差がないことを NS で表した。

第4項 考察

酸化 LDL は LDL から派生し、血管壁の内皮細胞に蓄積されることでマクロファージによる泡沫化細胞を形成し、プラークを形成する。¹⁰²⁻¹⁰⁴ (図 1.2) LDL の酸化は、*in vitro* で血液細胞を銅イオン存在下で静置することで誘導され、ジエン形成反応を連続的に観察することで計測できる。^{109, 110} LDL 酸化の感受性はジエン化反応曲線の傾きにおける接線の切片で表されるラグタイムによって示される。^{109, 110} これまでの研究で、ビタミン E の経口摂取により LDL 中のビタミン E 量が増加し、LDL 酸化のラグタイムが遅延したと報告された。⁵³

酸化 LDL は、一様な物質ではなく、様々な種類の化学修飾を脂質や apo B に受けた物質の総称である。冠動脈疾患のバイオマーカーである酸化 LDL の測定法は、異なるモノクローナル抗体 mAb-DLH3、mAb-E06、mAb-4E6、そして mAb-1H11 を用いることで開発された。これらの抗体はフォスファチジルコリンの酸化、フォスフォルコリンの酸化、アルデヒド化 apoB、そしてマロンジアルデヒド化 apoB をそれぞれ認識する。^{8, 111, 112} mAb-4E6 抗体による酸化 LDL 測定では、安定狭心症患者で対照群と比較して有意に高値であり、その一方 mAb-1H11 を用いた酸化 LDL 測定では、対照群と比較して有意差がないことが報告された。¹¹² 酸化 LDL の測定は CAD リスクのバイオマーカーとして有用である一方で、用いる抗体の多様性により測定結果に影響や変化が生じることが問題である。

ビタミン E はリポタンパク質中に含まれる主要な疎水性抗酸化物質の一つである。したがって、血中 LDL の抗酸化能を測定することで、酸化 LDL の測定と同様に動脈硬

化の進展を推測することができると考えた。LDL 中のビタミン E の定量は、従来法では超遠心分離や *n*-ヘキサンによる抽出、そして逆相クロマトグラフィーによる分析を実施する必要があり、非常に煩雑であった。¹⁰⁸ Haidari らは、従来法を使用して、CAD 患者の LDL 中のビタミン E が対照群と比較して低値であることを示した。¹⁰⁸ 従来法では、用手法操作が多く、多検体を同時に処理することが困難であり、また使用する検体量も多いという欠点が存在し、LDL 以外のリポタンパク質中のビタミン E に関する評価が十分に行われていなかった。本研究では、リポタンパク質中のビタミン E を全自動で定量可能な正確かつ迅速な測定法を確立した。本法は、LDL だけでなく、HDL や VLDL 中のビタミン E が同時に定量可能であり、測定に使用する検体量はわずか 7 μ L であった。本法で定量されたビタミン E 量は、従来法と比較して有意な相関関係を示した (相関係数 $r = 0.785 - 0.951$)。Carr らは従来法を用いた測定で、血中 α -tocopherol 量と比較してリポタンパク質分画中の α -tocopherol 総量の回収率は $88 \pm 2\%$ であったと報告した。¹¹³ リポタンパク質分画中の総 α -tocopherol の回収率は、本法では $93 \pm 5\%$ であった。また本研究で得られた LDL 中のビタミン E 値は、LDL 酸化のラグタイムと有意に相関した。これまでに、リコペン含量の高い野菜の摂取により LDL 中のリコペンが増加し、LDL の酸化が抑制されたと報告された。¹¹⁴ LDL の酸化抑制はビタミン E に加え、リコペンなどの他の抗酸化物質の影響も受ける可能性がある。

これまでの研究により、健常男性の VLDL 中の α -tocopherol 値は 15% の低脂肪かつ高炭水化物食の食事によって上昇し、tocopherol の分解率が低下することが報告されている。¹¹⁵ VLDL 一粒子あたりの α -tocopherol 量は 66 mol と推定され、LDL 一粒

子あたりでは、8 - 12 mol と報告されている。¹¹⁵ LDL においてコレステロールあたりの α -tocoherol 比は、CAD 患者群で 2.4 ± 1.0 mmol/mol で、健常群で 2.9 ± 1.1 mmol/mol であることが報告されている。¹⁰⁸ 本研究では、ボランティア検体の HDL、LDL、そして VLDL に関して各コレステロールあたりの γ -tocoherol 比を求めた結果、それぞれ 0.62 ± 0.19 、 0.32 ± 0.11 、 1.74 ± 0.84 mmol/mol であった。また、各コレステロールあたりの α -tocoherol 比は、それぞれ 5.20 ± 0.84 、 3.23 ± 0.60 、 12.74 ± 3.88 mmol/mol であった。また、健常群と脂質異常症群でそれぞれの値を比較した。(表 4.7) その結果、VLDL 中のコレステロールあたりの γ -tocoherol と α -tocoherol の比が脂質異常症群で健常群と比較して有意に低値となることを明らかにした。

ビタミン E 摂取による CAD 予防の研究が数多く報告されているが、その有用性については議論が分かれるところである。⁵⁷ ビタミン E の効果が不確定と考えられる要因の一つは、薬剤との併用であり、特に降圧剤の影響が考えられる。例えば、アンジオテンシン変換酵素 (angiotensin-convertin-enzyme: ACE) 阻害薬、交感神経 β 受容体遮断薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (angiotensinII-receptor blocker: ARB) などに関して、これらがビタミン E の効果を抑制している可能性がある。これらの降圧剤は、血圧を正常化させる一方、LDL 中のビタミン E 量を増加させるとともに LDL 酸化のラグタイムの遅延を生じさせる。^{116,117} 従って、降圧剤の服用により、薬剤の影響によるビタミン E 量の増加や抗酸化効果の向上が得られている可能性が示唆される。CAD 患者に対するビタミン E 摂取や降圧剤の服用と、各リポタンパク質中のビタミン E 量を比較することで新たな知見が得られると考える。

本研究では、AEX-HPLC、逆相クロマトグラフィー、そして蛍光検出を組み合わせた自動分析システムによる HDL、LDL、そしてVLDL 中の γ -tocoherol と α -tocoherol の定量法を報告した。本法は、再現性、希釈直線性、回収率の検証で良好な結果を示した。また従来法と良好な相関を示す迅速で簡便な自動分析システムであった。これらの結果により、本法が臨床化学の場で、迅速かつ高精度に γ -tocoherol と α -tocoherol の値が測定可能であると考ええる。

第5章 総括

1948年に開始された疫学研究であるフラミンガム研究は、今なお循環器疾患研究に多大な影響を与え続けている。フラミンガム研究では血清コレステロール値の上昇が冠動脈疾患発症リスクの増加と関連するという仮説を証明するとともに、HDL-Cの低値やLDL-Cの高値がCADの原因として見いだされた。さらにスタチンの開発に端をなすLDL-C低下療法は、動脈硬化性疾患の発症抑制に大きく貢献してきた。その一方で、スタチンのLDL-C低下にもかかわらず7割の患者において動脈硬化性疾患発症リスクが残されているという課題がある。LDL-Cが動脈硬化性疾患発症リスクにかかわることは明らかだが、LDL-C以外のリスク因子(残余リスク)の解明が求められている。残余リスクには、酸化LDL、small dense LDL、Lp(a)、IDLやVLDLなどが報告されている。酸化LDLは、その測定を目的として、複数の測定試薬が開発されている。測定試薬毎にLDLの変性を認識する抗体が異なっており、標準法が確立できていない。また、small dense LDLをはじめとするLDL亜分画に関しても測定法の開発が期待されている。自動分析装置で測定が可能なsmall dense LDL測定試薬の開発も進んでいる。

2016年1月より、日本でもプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシ9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: PCSK9)阻害薬の製造販売承認がされた。PCSK9はLDL受容体分解促進タンパク質であり、本薬はヒト型モノクローナル抗体製剤であり、PCSK9とLDL受容体の結合を阻害することで、LDL受容体の分解を抑え、血中LDL-Cの肝細胞内への取り込みを促進する作用を持つ。これまでに各国の臨床研究に

より著しいスタチンの併用により LDL-C の低下とともに、CAD 発症リスクの低下が報告された。スタチンの併用による LDL-C 低下率は、スタチンの単独投与と比較して大きく上回るものであり、LDL-C の低下と動脈硬化性疾患発症の関連性がさらに詳細に明らかになると期待される。また、PCSK9 阻害薬の投与により Lp(a) の低下が起こることが観察されている。

このような背景のもと本研究では、IDL や VLDL を評価するために rAEX-HPLC を開発した。HDL-C や LDL-C と同等に評価を実施するため、コレステロールを定量するシステムとして IDL-C や VLDL-C を測定可能とした。本法を用いることで迅速で高精度にリポタンパク質を分画することが可能になった。本システムによる測定は、2014 年 7 月よりリポ蛋白分画 (HPLC 法) として保険収載された。今後幅広く使用されることで、IDL-C や VLDL-C の臨床的な有用性が明らかになり、動脈硬化性疾患の治療や予防に貢献することを期待している。

Lp(a) は残余リスクとして、また PCSK9 阻害薬の影響を受ける因子として注目されている。さらに最近の研究で、FH 患者において Lp(a) は、CHD の重要な予測因子と報告されている。本研究では rAEX-HPLC の応用により、CM-C と Lp(a)-C を含めた分画法の検討を実施した。本法により測定される Lp(a)-C が Lp(a) を評価する新たな手段になると考えており、新たな臨床的な知見が得られることを期待している。さらに AEX-HPLC は様々な応用が可能であり、本研究ではリポタンパク質中のビタミン E を迅速かつ簡便に測定する自動分析システムについて報告した。抗酸化物質としてのビタミン E、酸化 LDL、または薬効の評価に有用な手法であると考えている。今後の方針として、

AEX-HPLC 法で、HDL や LDL をそれぞれ詳細に分画することが可能であると考えている。リポタンパク質の亜分画とよばれるサブクラスまで分画することで特徴の異なる亜分画を評価可能であると期待できる。例えば HDL には亜分画により抗酸化作用が異なると考えられており、また small dense LDL は LDL の亜分画の一つだと考えられる。

高速液体クロマトグラフィーを原理としたこれら分析法により、動脈硬化性疾患あるいは脂質異常症の発症メカニズムの解明や検査法としての有用性が明らかになることを目指し、研究を引き続き実施する。

参考文献

1. 平成 27 年(2015)人口動態統計(確定数)の概況、厚生労働省、2015
2. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation*, 1998, 97(18), 1837-1847
3. NIPPON DATA 80 Research Group: Risk assessment chart for death from cardiovascular disease based on a 19-year follow-up study of a Japanese representative population, *Circ J*, 2006, 70(10), 1249-1255
4. Nishimura K, Okamura T, Watanabe M, Nakai M, Higashiyama A, Kokubo Y, Okayama A, Miyamoto Y: Predicting Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories for a Japanese Urban Population, and Comparison with the Framingham Risk Score: The Suita Study, *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(9), 1138-1139
5. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版、日本動脈硬化学会、2012
6. 動脈硬化性疾患予防のための脂質異常症治療ガイド 2013 年版、日本動脈硬化学会、2013
7. Witztum JL, Steinberg D: The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?, *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11(3-4), 93-102
8. Itabe H, Ueda M: Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications, *J Atheroscler Thromb*, 2007, 14(1), 1-11
9. Dawber TR, Moore FE, Mann GV: Coronary heart disease in the Framingham study, *Am J Public Health Nations Health*, 1957, 47(4 Pt 2), 4-24

10. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study, *Ann Intern Med*, 1961, 55, 33-50
11. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM: Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease, The Framingham study, *Ann Intern Med*, 1971, 74, 1-12
12. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, *Am J Med*, 1977, 62(5), 707-714
13. Endo A: The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors, *J Lipid Res*, 1992, 33 (11), 1569-1582
14. Scandinavian simvastatin survival study group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease; the Scandinavian simvastatin survival study (4S), *Lancet*, 1994, 344 (8934), 1383-1389
15. Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, Nakaya N, Nishimoto S, Muranaka M, Yamamoto A, Mizuno K, Ohashi Y: MEGA Study Group. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial, *Lancet*, 2006, 30; 368(9542), 1155-1163
16. 寺本 民生:慢性疾患薬物療法のツボ脂質異常症第 2 版、日本医事新報社、2009
17. Thuren T, Weisgraber KH, Sisson P, Waite M: Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins, *Biochemistry*, 1992, 31 (8), 2332-2338

18. de Grooth, GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA: A review of CETP and its relation to atherosclerosis, *J lipid res*, 2004, 45(11), 1967-1974
19. Sampson UK, Fazio S, Linton MF: Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges, 2012, *Curr Atheroscler Rep*, 2012, 14 (1), 1-10
20. Bayturan O, Kapadia S, Nicholls SJ, Tuzcus EM, Shao M, Uno K, Shreevatsa A, Lavoie AJ, Wolski K, Schoenhagen P, Nissen SE: Clinical predictors of plaque progression despite very low levels of low-density lipoprotein cholesterol, *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55 (24), 2736-2742
21. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despre JP: Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study, *Circulation*, 1997, 95(1), 69-75
22. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgemuth J, Ridker PM, Mora S: Lipoprotein (a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosvastatin), *Circulation*, 2014, 129 (6), 635-642
23. Havel RJ, Eder HA, Bragdom FH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J Clin Invest*, 1955, 34 (9), 1345-1353

24. 原一郎: 12 リポタンパク質, 生化学実験講座 3 脂質の化学, 1974, 441-460
25. Warnick GR, Cheung MC: Measurement and Clinical Significance of High-Density Lipoprotein Subclasses, HANDBOOK OF LIPOPROTEIN TESTING 2nd Edition, 2000, 311-328
26. Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S: A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects, 2012, 225 (1), 208-215
27. Miida, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S: Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects, *Atherosclerosis*, 2014, 233 (1), 253-259
28. Miida T, Nishimura K, Hirayama S, Miyamoto Y, Nakamura M, Masuda D, Yamashita S, Ushiyama M, Komori T, Fujita N, Yokoyama S, Teramoto T: Homogeneous Assays for LDL-C and HDL-C are Reliable in Both the Postprandial and Fasting State, *J Atheroscler Thromb*, 2017 Mar 17, doi: 10.5551/jat.40006.

29. Nakamura M, Yokoyama S, Kayamori Y, Iso H, Kitamura A, Okamura T, Kiyama M, Noda H, Nishimura K, Nakai M, Koyama I, Dasti M, Vesper HW, Teramoto T, Miyamoto Y: HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method, *Clin Chim Acta*, 2015, 1 (439), 185-190
30. Nakamura M, Iso H, Kitamura A, Imano H, Kiyama M, Yokoyama S, Kayamori Y, Koyama I, Nishimura K, Nakai M, Dasti M, Vesper HW, Teramoto T, Miyamoto Y: Total cholesterol performance of Abell-Levy-Brodie-Kendall reference measurement procedure: Certification of Japanese in-vitro diagnostic assay manufacturers through CDC's Cholesterol Reference Method Laboratory Network, *Clin Chim Acta*, 2015, 20 (445), 127-132
31. Nakamura M, Kayamori Y, Iso H, Kitamura A, Kiyama M, Koyama I, Nishimura K, Nakai M, Noda H, Dasti M, Vesper HW, Miyamoto Y: LDL cholesterol performance of beta quantification reference measurement procedure, *Clin Chim Acta*, 2014, 20(431), 288-293
32. Hirowatari Y: Research and development of anion-exchange chromatographic method for measurement of cholesterol levels of lipoprotein classes and comparison with electrophoretic methods, *生物試料分析*, 2014, 37 (5), 321-328
33. Papadopoulos NM: Hyperlipoproteinemia phenotype determination by agarose gel electrophoresis updated, *Clin Chem*, 1978, 24 (2), 227-229

34. 大井絹枝, 櫻井裕子, 森下芳孝, 登 勉: 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る特殊なパターンの分類と臨床的意義, *J Electrophoresis*, 2003, 47, 161-168
35. Frings CS, Foster LB, Cohen PS: Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel, *Clin Chem*, 1971, 17 (2), 111-114
36. Hara I, Okazaki M: High-performance liquid chromatography of serum lipoproteins, *Methods Enzymol*, 1986, 129, 57-78
37. Okazaki M, Hara I: Analysis of cholesterol in high density lipoprotein subfractions by high performance liquid chromatography, *J Biochem*, 1980, 88 (4), 1215-1218
38. Hirowatari Y, Kurosawa H, Yoshida H, Doumitu KI, Tada N: Analysis method for lipoproteins by high-performance liquid chromatography with sulfopropyl-ligand column and magnesium ion-containing eluents, *Anal Biochem*, 2002, 308 (2), 336-342
39. Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Doumitu KI, Tada N: Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent, *J lipid Res*, 2003, 44 (7), 1404-1412
40. Becker L, Cook PM, Koschinsky ML : Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation, *Biochemistry*, 2004, 43, 9978-9988

41. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM: cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen, *Nature*, 1987, 330 (6144), 132-137

42. The Emerging Risk Factors Collaboration, Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J: Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality, *JAMA*, 2009, 302 (4), 412-423

43. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G : Apolipoprotein(a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolaemia, *Lancet*, 1990, 335 (8702), 1360–1363

44. Takegoshi T, Haba T, Hirai JI, Kitoh C, Saga T, Yamazaki Y, Mabuchi H : Alterations of lipoprotein (a) in patients with diabetic nephropathy, *Atherosclerosis*, 1990, 83 (1), 99-100

45. Alonso R, Andres E, Mata N, Fuentes-Jiménez F, Badimón L, López-Miranda J, Padró T, Muñoz O, Díaz-Díaz JL, Mauri M, Ordovás JM, Mata P; SAFEHEART Investigators: Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor of cardiovascular disease independent of the type of LDL receptor mutation, *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63 (19), 1982-1989

46. Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, Kennedy H, Giaculli F, Berg K, Couderc R, Dati F, Rifai N, Sakurabayashi I, Tate JR, Steinmetz A : Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a), Clin Chem, 2000, 46 (12), 1956-1967

47. Fujishima M1, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Yoshitake T, Diabetes and cardiovascular disease in a prospective population survey in Japan: The Hisayama Study, Diabetes, 1996, 45 Suppl 3, S14-16

48. Arima H, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Tanizaki Y, Fukuhara M, Matsumura K, Iida M, Kiyohara Y: Development and validation of a cardiovascular risk prediction model for Japanese: the Hisayama study, Hypertens Res, 2009, 32 (12), 1119-1122

49. Chow CK: Distribution of tocopherols in human plasma and red blood cells, Am J Clin Nutr, 1975, 28 (7), 756-760

50. Behrens WA, Madère R, Alpha- and gamma tocopherol concentrations in human serum, J Am Coll Nutr, 1985, 5 (1), 91-96

51. Nadeem N, Woodside JV, Kelly S, Allister R, Young IS, McEneny J: The two faces of α - and γ -tocopherols: an in vitro and ex vivo investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation, J Nutr Biochem, 2012, 23 (7), 845–851

52. Wen Y, Killalea S, Norris LA, Cooke T, Feely J: Vitamin E supplementation in in hyperlipidemic patients: effect of increasing doses on in vitro and in vivo low-density lipoprotein oxidation, *Eur J Clin Invest*, 1999, 29, 1027–1034
53. Suzukawa M, Ishikawa T, Yoshida H, Nakamura H: Effect of in-vivo supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein to oxidative modification, *J Am Coll Nutr*, 1995, 14 (1), 46–52
54. Suzukawa M, Abbey M, Clifton P, Nestel PJ: Effects of supplementing with vitamin E on the uptake of low density lipoprotein and the stimulation of cholesteryl ester formation in macrophages, *Atherosclerosis*, 1994, 110 (1), 77–86
55. Huang ZG, Liang C, Han SF, Wu ZG: Vitamin E ameliorates ox-LDL-induced foam cells formation through modulating the activities of oxidative stress-induced NF- κ B pathway, *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1-2), 11–19
56. Praticò D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA: Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice, *Nat Med*, 1998, 4 (10), 1189–1192
57. Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL, Nutrition Committee of the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease, *Circulation*, 2004, 110 (5), 637–641

58. Anderson KM, Castelli WP, Levy D: Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study, *JAMA*, 1987, 257, 2176-2180
59. Imano H, Noda H, Kitamura A, Sato S, Kiyama M, Sankai T, Ohira T, Nakamura M, Yamagishi K, Ikeda A, Shimamoto T, Iso H: Low-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease among Japanese men and women: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS), *Prev Med*, 2011, 52 (5), 381-386
60. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC, Treating to New Targets Investigators: HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events, *N Engl J Med*, 2007, 357 (13), 1301-1310
61. Karpe F: Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis, *J Intern Med*, 1999, 246 (4), 341-355
62. Liu J, Sempos CT, Donahue RP, Dorn J, Trevisan M, Grundy SM: Non-High-Density Lipoprotein and Very-Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Their Risk Predictive Values in Coronary Heart Disease, *Am J Cardiol*, 2006, 98, 1363-1368
63. Takeichi S, Yukawa N, Nakajima Y, Osawa M, Saito T, Sato Y, Sanibadi AR, Adachi M, Wang T, Nakajima K: Association of plasma triglyceride-rich lipoprotein remnants with coronary atherosclerosis in cases of sudden cardiac death, *Atherosclerosis*, 1999, 142 (2), 309-315

64. Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, Fejfar Z, Fredrickson DS, Strasser T:
Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias, Bull World Health Organ,
1970, 43 (6), 891-915
65. Kostner GM, Ibovnik A, Holzer H, Grillhofer H: Preparation of a stable fresh frozen
primary lipoprotein[a] (Lp[a]) standard, J Lipid Res, 1999, 40 (12), 2255-2263
66. Ito K, Yoshida H, Yanai H, Kurosawa H, Sato R, Manita D, Hirowatari Y, Tada N:
Relevance of intermediate-density lipoprotein cholesterol to Framingham risk score of
coronary heart disease in middle-aged men with increased non-HDL cholesterol, Int J
Cardiol, 2013, 168 (4), 3853-3858
67. Nakajima K, Hinman J, Pfaffinger D, Edelstein C, Scanu AM. Changes in plasma
triglyceride levels shift lipoprotein(a) density in parallel with that of LDL independently of
apolipoprotein(a) size, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21 (7), 1238-1243
68. Noble RP: Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel, J Lipid Res,
1968, 9 (6), 693-700
69. 厚生労働省保険局, 保医発 0628 第 1 号, 2013 年 6 月 28 日
70. Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Shimura Y, Yanai H, Tada N: Analysis of
cholesterol levels in lipoprotein(a) with anion-exchange chromatography, J Lipid Res, 2010,
51 (5), 1237-1243

71. Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y, Saito Y, Yamada N, Oikawa S, Mabuchi H, Teramoto T, Sasaki J, Nakaya N, Itakura H, Ishikawa Y, Ouchi Y, Horibe H, Kita T: Serum lipid survey and its recent trend in the general Japanese population in 2000, *J Atheroscler Thromb*, 2005, 12 (2), 98-106
72. Todo Y, Kobayashi J, Higashikata T, Kawashiri M, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H: Detailed analysis of serum lipids and lipoproteins from Japanese type III hyperlipoproteinemia with apolipoprotein E2/2 phenotype, *Clin Chim Acta*, 2004, 348 (1-2), 35-40
73. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC, Watson K, Wilson PWF: 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults, *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63, 2889-2934

74. Tatami R, Mabuchi H, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, Ito S, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Nakayama A, Kanaya H, Oiwake H, Genda A, Takeda R:
Intermediate-density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease, *Circulation*, 1981, 64(6), 1174-1184
75. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) Group: K/DOQI clinical practice guidelines for management of dyslipidemias in patients with kidney disease, *Am J Kidney Dis*, 2003, 41, (1-4), S1-91
76. Shoji T, Nishizawa Y, Kawagishi T, Kawasaki K, Taniwaki H, Tabata T, Inoue T, Morii H: Intermediate-density lipoprotein as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients, *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9, 1277-1284
77. Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, LaRue C: Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes, The Framingham study. *Arteriosclerosis*, 1983, 3, 260-272
78. Wilson PWF, Castelli WP, Kannel WB: Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol*, 1987, 59(14), 91G-94G
79. D'Agostino, Sr RB, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P: Validation of the Framingham Coronary Heart Disease Prediction Scores, *JAMA*, 2001, 286(2), 180-187

80. Thomsen TF, McGee D, Davidsen M, Jørgensen T: A cross-validation of risk-scores for coronary heart disease mortality based on data from the Glostrup Population Studies and Framingham Heart Study. *Int J Epidemiol*, 2002, 31(4), 817-822

81. Hense H-W, Schulte H, Löwel H, Assmann G, Keil U: Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany--results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts, *Eur Heart J*, 2003, 24(10), 937-945

83. Berglund L, Ramakrishnan R: Lipoprotein(a): An elusive cardiovascular risk factor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12), 2219-2226

84. Nauck M, Winkler K, Wittmann C, Mayer H, Luley C, März W, Wieland H: Direct determination of lipoprotein(a) cholesterol by ultracentrifugation and agarose gel electrophoresis with enzymatic staining for cholesterol, *Clin Chem*, 1995, 41(5), 731-738

85. Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PWF, Castelli WP, Ordovas JM, Schaefer EJ: Lipoprotein(a)-Cholesterol and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study, *Clin Chem*, 1999, 47(7), 1039-1046

86. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W: Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Circulation*, 2001, 104, 1108-1113

87. Takahashi S, Warabayashi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T: Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity, *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89, 9252-9256
88. Liang K, Oveisi F, Vaziri ND: Role of secondary hyperparathyroidism in the genesis of hypertriglyceridemia and VLDL receptor deficiency in chronic renal failure, *Kidney Int*, 1998, 53, 626-630
89. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: Role of excess parathyroid hormone, *J Clin Invest*, 1996, 97, 2167-2173
90. Vaziri ND, Liang K: Down-regulation of tissue lipoprotein lipase in experimental chronic renal failure, *Kidney Int*, 1996, 50, 1928-1935
91. Vaziri ND: Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290, F262-F272
92. Chade AR, Lerman A, Lerman LO: Kidney in Early Atherosclerosis, *Hypertension*, 2005, 45, 104-1049
93. Mack WJ, Krauss R, Hodis HN: Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS): treatment effects and relation to coronary angiographic progression, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16, 697-704

94. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Liu C, Selzer RH, Krauss RM:
Intermediate-Density Lipoproteins and Progression of Carotid Arterial Wall Intima-Media
Thickness, *Circulation*, 1997, 95, 2022-2026
95. Yu KC, Mamo JC: Chylomicron-remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity:
a possible mechanism of cell death in atherosclerosis, *Clin Sci (Lond)*, 2000, 98(2),
183-192
96. Watts GF, Ooi EMM, Chan DC: Demystifying the management of
hypertriglyceridaemia, *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10(11), 648-661
97. Dominiczak MH: Apolipoprotein and Lipoproteins in Human Plasma. HANDBOOK
OF LIPOPROTEIN TESTING 2nd Ed, ed by Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH,
pp1-29, AACC Press, Washington DC, USA, 2000
98. Byrne CD: Triglyceride-rich lipoproteins: are links with atherosclerosis mediated by a
procoagulant and proinflammatory phenotype?, *Atherosclerosis*, 1999, 145, 1-15
99. Mokuno H, Brady S, Kotite S, Herz J, Havel RJ: Effect of the 39-kDa
receptor-associated protein on the hepatic uptake and endocytosis of chylomicron remnants
and low density lipoproteins in the rat, *J Biol Chem*, 1994, 269, 13238-13243
100. Fujioka Y, Cooper AD, Fong LG: Multiple processes are involved in the uptake of
chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages, *J Lipid Res*, 1998, 39, 2339-2349

101. Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB: Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men, *Circulation*, 2005, 112(22), 3375-3383
102. Moore KJ, Tabas I: The cellular biology of macrophages in atherosclerosis, *Cell*, 2011, 145, 341-355
103. Steinberg D: Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime, *Nat Med*, 2002, 8, 1211-1217
104. Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis: the road ahead, *Cell*, 2001, 104, 503-516
105. Oorni K, Posio P, Ala-Korpela M, Jauhiainen M, Kovanen PT: Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25, 1678-1683
106. Orekhov AN, Tertov VV, Pokrovsky SN, Adamova IYu, Martsenyuk ON, Lyakishev AA, Smirnov VN: Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis, *Circ Res*, 1988, 62, 421-429
107. Whitman SC, Sawyez CG, Miller DB, Wolfe BM, Huff MW: Oxidized type IV hypertriglyceridemic VLDL-remnants cause greater macrophage cholesteryl ester accumulation than oxidized LDL, *J Lipid Res*, 1998, 39, 1008-1020

108. Haidari M, Javadi E, Kadkhodae M, Sanati A: Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease, *Clin Chem*, 2001, 47, 1234-1240
109. Teissier E, Walters-Laporte E, Duhem C, Luc G, Fruchart JC, Duriez P: Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins, *Clin Chem*, 1996, 42, 430-435
110. Yoshida H, Ishikawa T, Nakamura H: Vitamin E/lipid peroxide ratio and susceptibility of LDL to oxidative modification in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 1438-1446
110. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN: Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein, *Clin Chem*, 1992, 38, 2066-2072
111. Tsimikas S, Lau HK, Han KR, Shortal B, Miller ER, Segev A, Curtiss LK, Witztum JL, Strauss BH: Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a): short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein, *Circulation*, 2004, 109, 3164-3170

112. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D: Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease, *Circulation*, 1998, 98, 1487-1494
113. Carr TP, Traber MG, Haines JL, Kayden HJ, Parks JS, Rudel LL: Interrelationships of alpha-tocopherol with plasma lipoproteins in African green monkeys: effects of dietary fats, *J Lipid Res*, 1993, 34, 1863-1871
114. Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincée H, Adam S, Wever J, Müller H, Rechkemmer G: Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men, *J Nutr*, 200, 130, 2200-2206
115. Parks EJ, Dare D, Frazier KB, Hellerstein MK, Neese RA, Hughes E, Traber MG: Dependence of plasma α -tocopherol flux on very low-density triglyceride clearance in humans, *Free Radic Biol Med*, 200, 29, 1151-1159
116. Quiñones-Galvan A, Pucciarelli A, Fratta-Pasini A, Garbin U, Franzoni F, Galetta F, Natali A, Cominacini L, Ferrannini E: Effective blood pressure treatment improves LDL-cholesterol susceptibility to oxidation in patients with essential hypertension, *J Intern Med*, 2001, 250, 322-326
117. Khan BV, Navalkar S, Khan QA, Rahman ST, Parthasarathy S: Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates the vascular oxidative state in patients with coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38, 1662-1667

118. Schumaker VN, Puppione DL: Sequential flotation ultracentrifugation, *Methods Enzymol*, 1986, 128, 155-170

謝辞

本論文は筆者が東ソー株式会社バイオサイエンス事業部開発部に在籍中の研究結果を東京理科大学大学院理工学研究科応用生物科学専攻にて論文としてまとめたものである。

本論文の作成にあたり、格別なるご指導とご助言を賜り、本論文の主査をしていただきました東京理科大学工学部応用生物科学科教授 田口 速男先生に心より御礼申し上げます。

東京理科大学工学部応用生物科学科准教授 倉持 幸司先生には貴重な時間を割いてご指導とご助言を賜り、また本論文の副査をしていただきました。心より御礼申し上げます。

本論文の副査をしていただき、適切なご助言をいただきました東京理科大学工学部応用生物科学科教授 和田 直之先生、同学部先端科学科教授 酒井 秀樹先生、同大学薬学部薬学科教授 東 達也先生に心より御礼申し上げます。

本論文の作成と学位取得の機会を与えて頂き、終始多大なご指導ご鞭撻を賜りました元東京理科大学工学部応用生物科学科教授 菅原 二三男先生に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始多大なご指導ご鞭撻を賜りました埼玉県立大学准教授 廣渡 祐史先生（元東ソー株式会社所属）に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始多大なご指導ご鞭撻を賜りました柏市立介護老人保健施

設はみんぐ施設長 多田 紀夫先生、東京慈恵会医科大学教授・東京慈恵会医科大学
附属柏病院副院長 吉田 博先生、ならびに、元東京慈恵会医科大学附属柏病院中央
検査部係長 黒沢 秀夫先生に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えて頂き、多大なるご協力を賜りました東ソ
ー株式会社および東ソーハイテック株式会社の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。
特にボランティア採血にご協力いただきました方々に感謝いたします。

最後に、終始支え続けてくれた両親ならびに妻の英里と長男の伊吹に感謝いたしま
す。

眞仁田 大輔

