

氏名（本籍）	眞仁田 大 輔（埼玉県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	乙第 1145 号
学位授与の日付	2017 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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

論文審査委員	（主査）教授 田口 速男
	教授 和田 直之 准教授 倉持 幸司
	教授 酒井 秀樹 教授 東 達也

論文内容の要旨

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）発症に強く関与することが知られている。一方で、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が誘導され、プラークを形成すると考えられている。このプラークの破裂により血管狭窄が起こり、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）が動脈硬化症の発症に関与すると考えられている。脂質異常症の原疾患の特定や動脈硬化性疾患の予防のために、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、動脈硬化を促進する危険因子として注目されている。

リポタンパク質は、超遠心分離法を適用し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、超遠心分離法は手技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、迅速で高精度なり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が、詳細は明らかになっていない。

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新たな分離・分析法を創出することを目的として陰イオン交換液体クロマトグラフィー (AEX-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、そしてリポタンパク質中ビタミン E の自動分析法を開発し、それらの臨床的有用性を評価した。

はじめに、迅速なりポタンパク質分析 (rapid AEX-HPLC) 法の開発研究を実施した。カラムサイズや検体注入量の最適化の検討により、一検体あたり 5.2 分で測定が可能となり、従来の測定時間と比較して大幅に短縮した。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 rapid AEX-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実施した。本研究から、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が確認され、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、迅速なりポタンパク質分析法を応用し、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、AEX-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、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 リスクチャート、久山リスクスコア、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のいずれにおいても、CM-Cとそれぞれ有意な相関を示した。これらの結果、日本人健常男性において、VLDL-Cは早期の腎疾患に発症リスクに関与すること、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)の分析法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測定した。本法の測定結果は、用手法の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は健常人群で脂質異常症患者群と比較して有意に高値であることが示された。本法によりリポタンパク質中のビタミンE測定により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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、陰イオン交換液相色谱法によるリポタンパク質及び関連生体分子の分析法に関する研究成果をまとめたものである。現状では、リポタンパク質の分析法は、研究用途においては超遠心分離法が利用されている。しかしながら、超遠心分離法は、分解能の上では優れているが、操作が煩雑であるとともに操作に多大な時間と労力を必要とする欠点をかかえている。この欠点のため、特に臨床検査用途には適していない。一方、臨床検査用途では、リポタンパク質分画として電気泳動法が利用されている。電気泳動法は、超遠心分離法とは逆に、操作においては簡便ではあるが、分離能が低いため、分析の範囲が大きく制限されるという欠点がある。こうした背景から、分解能と操作性のいずれにおいても優れた分析法の開発は、研究、臨床検査のいずれの面においても強いのぞまれる。本研究は、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析法を開発することを目的としている。

本論文は第1章から第5章までで構成されている。

第1章では、研究の背景、目的、到達目標が記載されている。従来のリポタンパク質及び関連生体物質の分析法に関して端的にまとめられている。本研究で新たな分析法を開発する意義やについても述べられている。

第 2 章では高速陰イオン交換液体クロマトグラフィーに関する研究成果がまとめられている。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 分での測定を実現させている。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、再現性も良好であり、これらの結果は高く評価できる。さらに本法の応用として、健常人群、境界域 LDL コレステロール血症群 (LDL: 低比重リポタンパク質コレステロール)、脂質異常症群の 3 群に関して高速陰イオン交換液体クロマトグラフィーによる測定を実施し、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ている。このプロファイル評価の結果から、境界域高 LDL コレステロール血症群と健常人群で、中間比重リポタンパク質コレステロール値と超低比重リポタンパク質コレステロール値に有意な違いが認められることを明らかにした。

第 3 章では、高速陰イオン交換液体クロマトグラフィーの応用として、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検討している。日本人の健常男性 161 名を対象に、陰イオン交換液体クロマトグラフィー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と 3 つの心疾患発症リスクスコアと比較した。その結果、推算糸球体濾過量は超低比重リポタンパク質コレステロールと有意に負の相関を示し、3 つの心疾患発症リスクスコアはカイロミクロンコレステロールと有意な正の相関を示すことを明らかにした。

第 4 章では、リポタンパク質中のビタミン E (α -トコフェロール、 δ -トコフェロール) の自動分析システムの開発と、臨床応用の可能性に関する研究成果がまとめられている。陰イオン交換液体クロマトグラフィーにより、血中のリポタンパク質を 3 つに分画した後、逆相クロマトグラフィーで各リポタンパク質中の α -トコフェロール、 δ -トコフェロールに定量した。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。超低比重リポタンパク質中のコレステロールあたりの α -トコフェロール、 δ -トコフェロール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という新規な知見を得ることができた。

第 5 章では、第 2 章～第 4 章で得られた研究成果やその過程で判明した問題点などをまとめている。また、本分析法で得られた分析結果に関する考察や、本分析法のさらなる応用法も記載している。

本研究で開発した測定法は、それぞれ操作の簡便性ととも、高い分離性能を有し、操作が煩雑で時間がかかる従来法と比較しても良好な相関を示した点は高く評価することができる。さらに、これらの測定法を用いることにより、新規な知見まで得るまでも至っている。これらの結果から、開発された新規な測定法は、今後、学術的な研究手法としてはもとより、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汎用されることが期待できる。以上の理由から本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものとして認める。