

The in vitro effects of chylomicron remnant and very low density lipoprotein remnant on platelet aggregation in blood obtained from healthy persons

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 望月, 雅恵 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1106

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 253号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	望月雅恵		
論文題目	<p>The <i>in vitro</i> effects of chylomicron remnant and very low density lipoprotein remnant on platelet aggregation in blood obtained from healthy persons (健康人から採取した VLDL レムナントとキロミクロンレムナントの血小板凝集に対する <i>in vitro</i> での影響)</p>		

博士(医学) 望月雅恵

論文題目

The *in vitro* effects of chylomicron remnant and very low density lipoprotein remnant on platelet aggregation in blood obtained from healthy persons

(健康人から採取したVLDLレムナントとキロミクロンレムナントの血小板凝集に対する*in vitro*での影響)

論文内容の要旨

[はじめに]

動脈硬化性疾患の発生に脂質代謝が大きな影響をもつことは多くの研究から明らかにされている。最近、動脈硬化の危険因子としてレムナントリポプロテインが注目されている。レムナントリポプロテインはキロミクロンと超低比重リポプロテイン (VLDL) からそれぞれ代謝されてできるキロミクロンレムナントとVLDLレムナントに代表されるが、コレステロールを多く含んでおり、マクロファージ等に取り込まれやすいことが知られている。そこで、キロミクロンレムナントとVLDLレムナントを用いて、血小板凝集能に対する*in vitro*での影響について調べた。

[材料ならびに方法]

健康人3人から200gの脂肪負荷3時間後に採血し、得られた血清をイムノアフィニティゲルカラムに通し、キロミクロンレムナントとVLDLレムナントを精製した。このイムノアフィニティゲルカラムは、抗アポリポプロテイン (アポ) B-100抗体、抗アポ A-I 抗体を含んでおり、アポ B-100、アポ A-I を含むVLDL、キロミクロン、低比重リポプロテイン (LDL) などのレムナントリポプロテイン以外のリポプロテインをカラム内に吸着させることにより、素通り分画としてレムナントリポプロテインを精製した。この精製したレムナントリポプロテインを、超遠心にかけて、さらにキロミクロンレムナントとVLDLレムナントとに分離した。

次に別の健康な7人から採取した血液 (全血、多血小板血漿 (PRP)) に精製したレムナントリポプロテインを加え、30分間の混合インキュベーション後にコラーゲンによる全血凝集、PRP凝集を測定した。全血凝集はエルマ2チャンネル血小板凝集計を用いて電気抵抗値を測定し、PRP凝集はルミ血小板凝集計を用いて透過度を測定し評価した。

[結果]

キロミクロンレムナントは、コラーゲンによる全血血小板凝集に影響を与えなかったが、VLDLレムナントは、最終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ で、コラーゲンによる全血血小板凝集を有意 ($p < 0.05$) に促進した。しかし、最終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ 以上のVLDLレムナントを加えた場合には凝集の促進はみられなかった。キロミクロンレムナントは、最終濃度1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ で、コラーゲンによるPRP血小板凝集を有意に促進し、VLDLレムナントは、最終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ で、コラーゲンによるPRP血小板凝集を有意に促進した。

[考察]

全血血小板凝集では、キロミクロンレムナントとの混合インキュベーションによる凝集の促進、PRP

血小板凝集ではキロミクロンレムナント、VLDLレムナントとの混合インキュベーションによる凝集の促進が認められた。キロミクロンレムナントのアテローム硬化促進作用は以前から注目されているが、今回 *in vitro* におけるキロミクロンレムナントの血小板凝集促進作用を認めることができた。さらに *in vitro* におけるVLDLレムナントの血小板凝集促進も認められ、レムナントリポプロテインの強い動脈硬化促進作用を裏付けるものとなった。しかし、レムナントリポプロテインの血小板凝集に対する影響は、個人差も大きいことながら、加えたレムナントリポプロテインの限られた濃度範囲でのみ促進が認められ、それ以上の濃度では促進は認められず、時によっては抑制さえ認められた。このことより、レムナントリポプロテインの血小板凝集に対する影響はその濃度によって、また個人によって効果が異なることがあると思われる。特に今回用いたのは脂肪負荷後に採血し精製したキロミクロンレムナント、VLDLレムナントであり、脂肪負荷せずに通常に測定されるレムナントリポプロテインとは性状が異なり、より血小板凝集惹起性に働いた可能性も考えられる。

〔結論〕

本実験により、全血、PRPのキロミクロンレムナント、VLDLレムナントとの混合インキュベーションによる血小板凝集の促進が認められた。

論文審査の結果の要旨

心筋梗塞、脳梗塞など血管の病変に原因をもつ疾患は増加している。とくに心筋梗塞や狭心症では血管壁の粥腫の破裂などにより、血液が固まり、血栓が出来ることが発症機序である。この粥腫はコレステロールを取り込んだマクロファージとその形骸を主体とし、そこに結合組織が増殖して形成されるとされている。

今までは酸化されたLDLコレステロールが、マクロファージにより貪食されるとされていた。最近、腸管から吸収された脂質を主体とするキロミクロンに血管壁のリポプロテインリパーゼ(LPL)が作用して出来るキロミクロンレムナントと、これが肝臓に取り込まれ、コレステロールを含む粒子として血中に出てくるVLDLから同様に作られるVLDLレムナントの作用が注目を集めている。その理由は血管壁の内皮細胞にはレムナントの受容体(LRP)があり、これによりコレステロールに富むキロミクロンレムナントやVLDLレムナントが細胞内に取り込まれ、マクロファージにより貪食されることが分かったからである。

最近、申請者の共同研究者の中島らはキロミクロンレムナントやVLDLレムナントとは反応せず、それ以外のリポタンパクと結合して、これを除去出来るモノクローナ抗体を見出した。申請者は、この方法を用いて正常人から両者のレムナントを分離して、これの血小板凝集に対する作用を検討した。

健康人に200gの脂肪負荷食を摂せた3時間後に採血し、イムノアフィニティゲルカラム法によりレムナントを分離、さらに超遠心法によりキロミクロンレムナントVLDLレムナントを分離した。一方健康人7名から採血した血液の全血とPRP(多血小板血漿)に精製したレムナントを加え、30分インキュベーションした後にコラーゲンによる全血凝集とPRP凝集を測定した。キロミクロンレムナントはコラーゲンによる全血凝集に影響を与えなかったが、VLDLレムナントは最終濃度5 μ g/mlで全血凝集を有意に促進した。さらに濃度を上げると、血小板凝集を抑制する傾向が見られた。キロミクロンレムナントは最終濃度1 μ g/ml、5 μ g/mlでPRP血小板凝集を有意に促進し、VLDLレムナントは最終濃度5 μ g/ml、10 μ g/mlで血小板凝集を有意に促進した。

今まではレムナントリポプロテインを簡単に分離する方法はなかっただけでなく、キロミクロンレムナントとVLDLレムナントを分離することも容易でなかったという理由でレムナントの血小板凝集にたいする作用の研究はほとんどなかった。申請者の共同研究者の中島らにより開発されたモノクローナル抗体を用いたアフィニティゲルカラムにより、この両者が他のリポプロテインと分離されるようになっただけでなく、二つのレムナントも互いに分離出来るようになった。この方法を用いることにより申請者は今回の研究で世界で最初に体系的にキロクロンレムナント、VLDLレムナントの血小板凝集にたいする作用を検討することが可能であった。

血栓の形成にはコレステロールを含む粥腫の形成が必須であるが、さらに血小板自体が高レムナント血で凝集を高める作用があるのであれば、血中レムナントの濃度を測定することや、その減少対策は、血栓症の予防と治療に重要な意味をもつことになる。申請者の研究はこの面において、動脈硬化形成時における血栓の誘発作用の機序の解明に一つのアプローチを示したことが論文審査委員会で評価された。

この研究に関連して、次のような質問を行った。

- 1) VLDL、LDLが血小板凝集させる機序について
- 2) 実験に用いたキロミクロンレムナントとVLDLレムナントの量は生理的範囲内か
- 3) 検体として用いた血小板の数は同じか
- 4) レムナントの分離は容易に出来るか
- 5) 検体とした用いた血液を得た健常人の食事制限について
- 6) VLDLレムナントが増加すれば、凝集能の亢進が低下するのはどういう機序か
- 7) 用いた実験系で血小板凝集能に及ぼす因子について
- 8) 全血の方がPRPよりも血小板凝集が著明であった理由は
- 9) VLDLレムナントとキロミクロンレムナントのreceptorはLDL receptorとどういう関係にあるか
- 10) マクロファージの動脈硬化における役割について

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久
副査 教授 大 野 龍 三 副査 講師 田 港 朝 彦