

Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 近藤, 明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1645

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	医博論第 368号	学位授与年月日	平成14年 9月20日
氏名	近藤 明		
論文題目	Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL (マロンジアルデヒド修飾低比重リポ蛋白(LDL)によって評価した血中の中性脂肪濃度と LDL 粒子サイズとの関係)		

博士(医学) 近藤 明

論文題目

Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL
(マロンジアルデヒド修飾低比重リポ蛋白(LDL)によって評価した血中の中性脂肪濃度と LDL 粒子サイズとの関係)

論文の内容の要旨

[はじめに]

近年心筋梗塞の危険因子として、小粒子化した低比重リポ蛋白(小粒子 LDL)が注目されている。すなわち、Austin らは LDL サイズが 25.5nm 以上の正常な LDL を主としてもつ人(パターン A)に対して、25.5nm 未満の小粒子 LDL を主としてもつ患者群を心筋梗塞のリスクが高いパターン B として区別した。

この小粒子 LDL は、LDL 受容体との親和性が低下するため、血中の半減期が遅延すること、さらには同 LDL 中の抗酸化物質が正常な LDL より低下していることから、酸化を受けやすいと考えられている。これらの知見は動脈硬化の発症メカニズムとして提唱されている酸化 LDL 仮説にもよく合致している。この LDL の小粒子化は、高中性脂肪(TG)血症を伴う場合が多いことから、両者の関係を LDL の酸化という面から評価することは、動脈硬化発症のもう一つの危険因子である高 TG 血症の関与を理解する上でも有用であると考えられた。そこで、これら二つの危険因子を酸化 LDL の一種であるマロンジアルデヒド(MDA)修飾 LDL(MDA-LDL)との関係から評価し直した。

[患者ならびに方法]

①健常人42名、糖尿病(DM)患者49名及びDMを伴わない高TG血症42名から得た血清を試料として用いた。②LDLの粒子サイズの測定は、2-15%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにて電気泳動後、オイルレッドOによる脂質染色を行い、さらに泳動像をコンピュータに取り込み解析を行った。LDLサイズは、試料から得られたLDLの主ピークの位置をコントロール血清中のLDLの泳動位置と比較することによって求めた。③酸化LDLの指標は、固相にMDA-LDLに対する抗体を結合させ、酵素を標識した抗アポB抗体で検出するサンドイッチELISA法によって測定した値を用いた。④任意に抽出した4人の患者血清より、超遠心法にて正常なLDL($1.019 < \text{比重}(d) < 1.040 \text{kg/L}$)と小粒子LDLに相当する高比重LDL($1.040 < d < 1.063$)とを精製し、それぞれのMDAを指標とした過酸化脂質量を測定した。

[結果および考察]

LDLサイズは、健常人に比し高TG血症患者で有意に小粒子化していた。一方DM患者でも小粒子化の傾向は認められたものの有意差はなかった。血中TG及びMDA-LDL値は、いずれも健常人に比し、患者群で有意に高値を示した。次いで、すべての検討対象者を血中のTG濃度とLDLサイズの違いから、それぞれ4つの範囲に区分けし、各グループのMDA-LDL値を比較した。その結果、健常人の中でも、LDLサイズ(ϕ)が $25.5 \leq \phi < 26.5 \text{nm}$ 、TG濃度が $\text{TG} \leq 150 \text{mg/dl}$ のグループを基準として、各グループのMDA-LDL値を比較したとき、LDLサイズが25.5nmより小さく、尚且つTG濃度が150mg/dlを超えるグループで、有意にMDA-LDL値が高くなっていることが明らかとなった。

さらに、すべての検討対象者をLDLサイズだけから4つのグループに区分けし、それぞれのグループ

内で、健常人、DM患者、高TG血症患者群のMDA-LDL値を比較した。その結果、いずれのLDLサイズのグループにおいても、DM患者群と高TG血症患者群のMDA-LDL値は健常人に比し、高値を示していることが分かった。このとき、健常人のLDLサイズが $25.5 \leq \phi < 26.5 \text{nm}$ のグループを基準として、各疾患群中の脂質パラメーター(MDA-LDL、総コレステロール(TC)、HDL-C、TG及びアポリポタンパクB(アポB))の濃度についても比較した。DM患者群と高TG血症患者群のいずれの群においても、LDLサイズが25.5nmより小粒子化した領域で、健常人の基準範囲内の濃度を示す脂質パラメーターと有意な差が確認できたのは、MDA-LDLのみであった。

このように、LDLの小粒子化とMDA-LDL値からみたLDLの酸化とは、密接な関係にあることがわかった。そこで、小粒子化したLDLが正常のLDLよりも酸化が亢進していることを裏付けるため、超速心法によってLDLを正常なLDLと小粒子LDLとに分画し、両分画中の過酸化脂質の量を比較した。

任意に抽出した4人の患者からLDLを分画して比較したところ、いずれの場合も正常なLDL分画よりも小粒子LDL分画の方が過酸化脂質の量が多いことが分かった。同検討結果は、上記の小粒子LDLとMDA-LDL値との関係を良く反映するものであった。

[結論]

血中MDA-LDL値からTG濃度とLDLサイズとの関係を評価したとき、LDLサイズが25.5nm未満で、TG濃度が150mg/dlより高くなると、正常者(LDLサイズ $25.5 \leq \phi < 26.5 \text{nm}$ 、TG濃度 $\text{TG} \leq 150 \text{mg/dl}$)に比し、MDA-LDL値が有意に高くなっていることが明らかになった。このことは、LDLサイズが25.5nm未満で、TG濃度が150mg/dlより高くなることが、LDLの酸化抵抗性の限界を超えることを示していると考えられた。さらにこれらの結果は、Austinらという心筋梗塞のリスクが高くなるパターンBと正常者のパターンAとの境界点がLDLサイズでは25.5nmにあるという報告ともよく一致していた。

論文審査の結果の要旨

一般に、動脈硬化と低比重リポ蛋白(LDL)の関連が知られている。さらに、近年Austinらは、小粒子化したLDL(小粒子LDL)に注目し、LDLサイズが25.5nm以上の正常なLDLを主としてもつ人(パターンA)に対して、25.5nm未満の小粒子LDLを主としてもつ人をパターンBとして分類し、このグループでは心筋梗塞発生率が高いことを報告した。

この小粒子LDLは、LDL受容体との親和性が低下するため、血中の半減期が遅延すること、さらには同LDL中の抗酸化物質が正常なLDLより低下していることから、酸化を受けやすいと考えられている。もしそうなら、酸化LDLが動脈硬化をより発症させるという仮説にも合致することになる。また高中性脂肪(TG)血症の場合、LDLの小粒子化を伴う場合が多いことから、両者の関係をLDLの酸化という面から評価することは、動脈硬化との相関を理解する上でも有用であると考えられた。そこで、今回小粒子化LDL及び血中TG濃度と酸化LDLの一つであるマロンジアルデヒド(MDA)修飾LDL(MDA-LDL)との関係を明らかにした。

健常人42名、糖尿病(DM)患者49名、DMを伴わない高TG血症42名から得た血清を試料として用いた。LDLサイズの測定は、2-15%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにて電気泳動し、オイルレッドOによる脂質染色を行い、電気泳動の易動度から粒子サイズを決定した。この際、サイズの異なる蛋白コート金粒子を標準サイズ物質として用いたことがより正確なサイズの決定に役立ったと思われる。酸化LDL

の一つである MDA-LDL の測定は、オリジナルな方法を用いている。まず、精製 LDL に MDA 修飾し、これを抗原としてモノクロナル抗 MDA-LDL 抗体を得た。MDA-LDL 量の測定は、固相に抗 MDA-LDL 抗体を結合させ、サンプルを結合させ、その後、酵素を標識した抗アポ B 抗体で検出するサンドイッチ ELISA 法によって測定した。本 MDA-LDL 測定法は、抗 MDA-LDL 抗体の特異性が高く、さらに抗アポ B 抗体とサンドイッチすることにより、MDA-LDL 測定値が信頼できる実験系となっている。

解析して得た結果は、以下のとおりである。まず、LDL サイズの小粒子化は高 TG 血症患者で有意に認められたが、DM 患者には有意差が認められなかった。また、血中 MDA-LDL 値及び TG 値は DM、高 TG 患者群で有意に高値を示した。次いで、すべての検討対象者を LDL サイズと血中 TG 濃度からグループ分けし、各グループでの MDA-LDL 値を比較検討したところ、LDL サイズが 25.5nm より小さく、かつ TG 濃度が 150mg/dl を超えるグループで、有意に MDA-LDL 値が高くなっていることが明らかになった。

また、すべての検討対象者を LDL サイズだけから 4 つのグループに分け、それぞれのグループ内で、健常人、DM 患者、高 TG 患者群の MDA-LDL 値を比較した。その結果、いずれの LDL サイズのグループにおいても、DM 患者群と高 TG 血症患者群の MDA-LDL 値は健常人に比し、高値を示していることが分かった。

さらに、小粒子化 LDL では酸化 LDL が多いという仮説を検証するために、超遠心密度勾配法により、正常 LDL と小粒子化 LDL を分画して、それぞれの LDL 当たりの MDA 化を測定したところ、小粒子 LDL が正常 LDL より高値を示すことが再確認できた。

このように、申請者は脂質代謝異常を示す DM、高 TG 患者において LDL サイズが小粒子化し、酸化の一つである MDA 化が亢進していることを初めて示しており、審査委員会はこの点を大きく評価した。また、酸化 LDL の一つである MDA-LDL 値が動脈硬化判定のマーカーになる可能性も示唆している点にも注目した。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) LDL サイズ測定の際のばらつき具合は
- 2) MDA は LDL のどこに結合しているか
- 3) 生体内にある他の酸化 LDL は
- 4) 酸化 LDL とスカベンジャー受容体の関係は
- 5) 抗 MDA-LDL 抗体は LDL 特異的か
- 6) Austin のいうパターン A とパターン B とは
- 7) TG が LDL を小粒子化するメカニズムは
- 8) なぜ、グラディエントゲルを使ったか
- 9) 血清サンプルはどのような条件で集められたか
- 10) LDL サイズは日により変動するか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、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 三浦直行
副査 中村浩淑 副査 寺田 肇