

乳脂肪を用いた脂肪負荷試験確立のための基礎研究

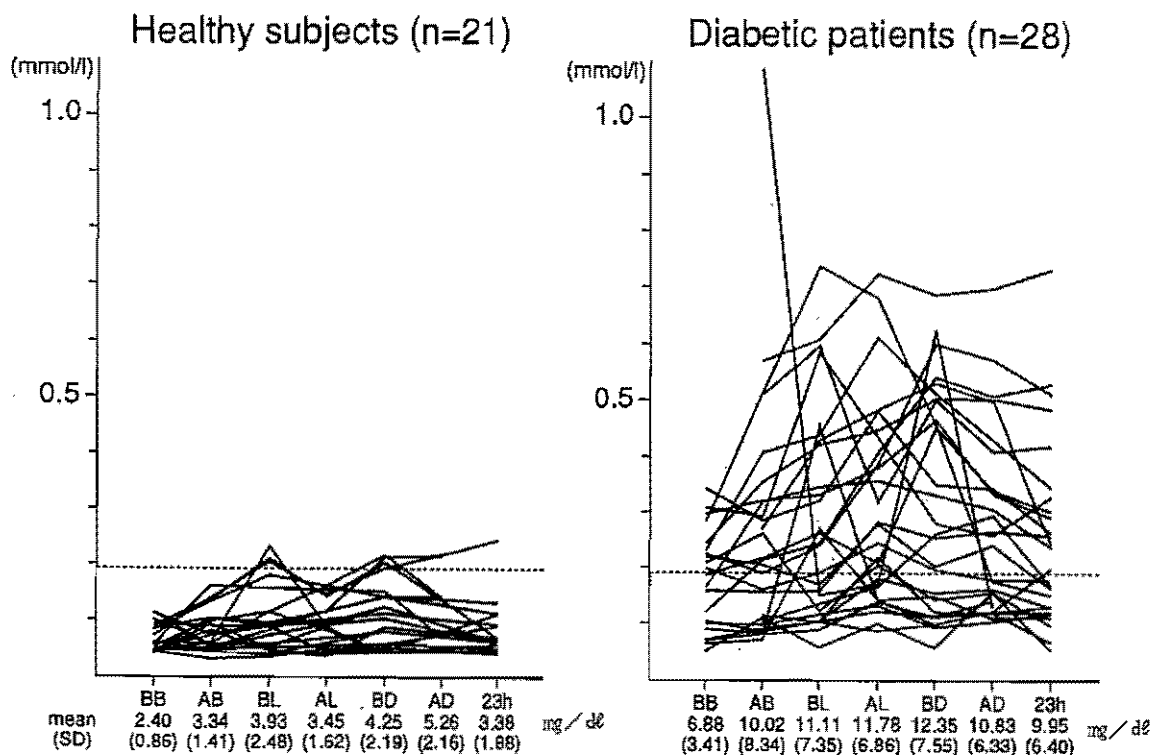
東京医科歯科大学第3内科 講師 田中 明

I 調査・研究の目的

ヒトは1日3回の食事の他に間食する機会も多く、また、糖尿病、動脈硬化性疾患例における脂質の日内変動の検討から、1日の生活時間の大部分(20時間以上)は食後の状態にあることが指摘されている。図1は、健常例21例(左)と2型糖尿病例28例(右)のレムナントの日内変動を示したものである。1日3回の食事前後と23時のRLPコレステロール値が測定されている。点線はRLPコレステロールのカットオフ値を示す。健常例ではカットオフ値を超える時間はわずかの時間で、変動が少ないのに比較して、糖尿病例では、朝食前値のみ低値となるが、他の時間は1日じゅう高値を維持していることが示されている。したがって、動脈硬化のリスクを評価する場合に、従来の空腹時の高脂血症のみでは不十分であり、食後の高脂血症の評価が重要であることは研究者の一致した意見となっている。

しかし、食後の高脂血症を動脈硬化のリスクとして評価しようとする試みは、国内外の多くの研究者によりなされてきたが、その評価方法が様々であるため、お互いの結果を比較、利用することができず、この分野の研究に著しい進歩が見られていないのが現状である。

Fig. 1 Daily profile of RLP cholesterol in healthy subjects and diabetic patients



食後高脂血症を評価するためには、脂肪負荷試験が有効な手段と考えられるが、負荷する脂肪も、卵、各種オイル類、生クリームなど様々で、負荷量も様々、測定する脂質の種類もコレステロール、トリグリセリド、レチニールパルミテイト、脂肪酸など様々で、測定時間も一定しておらず、今後、すべての研究者間に共通した脂肪負荷試験の確立が必要である。共通した脂肪負荷試験の確立は、食後高脂血症の共通した評価を可能にし、臨床レベルでの動脈硬化リスクの評価に有効な手段となることが期待できる。

われわれは、共通の脂肪負荷試験確立のために、缶詰めタイプの乳脂肪（OFTTクリーム）を試作品として用い、その有用性を検討している。表1は、OFTTクリームの組成を示す。カロリーは100g当たり341kcal、コレステロールは100g当たり74mg含有する。水分は重量パーセントで56.9%、脂肪は32.9%、蛋白は2.5%、炭水化物は7.4%、ミネラルは0.3%含有する。脂肪の種類としては、飽和脂肪酸を64.3%、1価の不飽和脂肪酸を29.3%、多価不飽和脂肪酸を3.5%含む。

一方、動脈硬化のリスクであるレムナントリポ蛋白は食後の変化が著明で、脂肪負荷試験の測定脂質として有用であることは指摘されていたが、その測定方法が容易ではなく、臨床レベルでの大量検体の処理は困難であった。しかし、われわれは、レムナントリポ蛋白を反映し、簡便に測定可能なレムナント様リポ蛋白（Remnat Like Particles、RLP）を開発

し、臨床レベルでの測定を可能にした(1-3)。動脈硬化リスクにおけるRLPの有用性は国際レベルでも評価されつつあり、平成11年7月に米国FDAによりレムナントの測定法として承認された(4)。

われわれは、RLPを脂肪負荷試験の測定脂質として、その有用性を検討している。

本研究の目的は、共通の負荷脂質およびその量、共通の測定脂質および測定時間で実施される脂肪負荷試験を確立するための基礎検討を行うことであるが、具体的には、負荷脂肪として試作された乳脂肪（OFTTクリーム）およびレムナントリポ蛋白を反映する、われわれの開発したレムナント様リポ蛋白（RLP）の測定脂質としての有用性を検討することである。全国共通の脂肪負荷試験が確立すれば、結果の比較検討が可能となり、食後高脂血症の共通の評価ができるようになる。また、臨床レベルでは、空腹時のみの高脂血症の評価よりも、脂肪負荷試験により、糖尿病におけるブドウ糖負荷試験と同様に、潜在的な、より感度の高い動脈硬化リスクの予知手段となることが期待される。

本研究の目的を達成するために、日本全国から9施設の大学と研究会を組織し共同研究をおこなっ

Table.1 Composition of OFTT cream

Energy	341 kcal/100g		
Cholesterol	74 mg/100g		
Component	% (w/v)		
Water	56.9		
Fat	32.9		
Protein	2.5		
Carbohydrate	7.4		
Mineral	0.3		
Composition of FFA	(%)		
C 4 : 0	4.2	C 10 : 1	0.3
C 6 : 0	2.2	C 14 : 1	1.8
C 8 : 0	1.2	C 16 : 1	2.3
C 10 : 0	2.7	C 18 : 1	24.9
C 12 : 0	3.0	MUFA	29.3
C 14 : 0	10.2	C 18 : 2	3.2
C 16 : 0	29.3	C 18 : 3	0.3
C 18 : 0	10.9	PUFA	3.5
C 20 : 0	0.6	others	2.9
SFA	64.3		

ているが、平成10年度からは、スウェーデンのカロリンスカ研究所、米国のカリフォルニア大学、アラバマ大学、カナダのモントリオール大学との国際共同研究も開始している。

最近、米国アラバマ大学との共同研究で、レムナントをはじめとするトリグリセリド・リッチ・リポ蛋白を取り込むマクロファージ上の新しいレセプターが発見され、その遺伝子構造が明らかにされた(5)。トリグリセリド・リッチ、リポ蛋白を取り込んだマクロファージは泡沫化し、動脈壁に蓄積され、動脈硬化初期巣を形成する。このレセプターの発見により、トリグリセリド・リッチ・リポ蛋白の動脈硬化発症メカニズムがより明確となった。

平成9年度は、主として健常例を対象に、平成10年度および平成11年度は疾患例を対象にOFTTクリームを用いて脂肪負荷試験を行い、RLPは脂肪負荷試験の測定脂質として有用であることを示した。

II 平成9年度の研究

平成9年度は、主として健常例を対象にOFTTクリームを用いて脂肪負荷試験を行い、RLPは脂肪負荷試験の測定脂質として有用であることを示した(6)。

1. プロトコール

健常ボランティア19例についてOFTTクリーム200g（1缶、脂肪70gを含む）を負荷し、負荷前、負荷後2、4、6、8時間に採血した。試験中は水分以外の摂取は禁止した。

それぞれの検体について、血中RLPコレステロール、RLPトリグリセリド、レチニール・パルミテイト、総コレステロール、総トリグリセリド、HDLコレステロール、アポ蛋白（アポA-I、A-II、B、C-II、C-III、E）血糖の測定を行った。また、アポEフェノタイプも測定した。

結果について、それぞれの検査項目の負荷後ピーク時間、負荷後の変動の大きさ、体表面積(m²)当たりに計算した脂肪負荷量と負荷後の変動の大きさとの関連、体表面積(m²)当たりに計算した脂肪負荷量と負荷後のピーク時間との関連を検討した。また、乳脂肪（OFTTクリーム）の副作用の有無、種類を検討した。

3ヶ月後に、19例のうち7例について、体表面積当たり30gの脂肪負荷により、同様の負荷試験を行い、それぞれの検査項目の再現性を検討した。

2. 検査法

総コレステロールおよび総トリグリセリドは酵素法、HDLコレステロールは直接法（HDL-C Auto第1化学）、アポ蛋白（アポA-I、A-II、B、C-II、C-III、E）は免疫比濁法、血糖はGlucose Oxidase法により測定した。アポEフェノタイプは等電点電気泳動法（Phenotyping Apo E IEF System）を用いた。

血中RLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドはJIMRO-II（日本抗体研究所）を用いた。すなわち、抗アポB-100および抗アポA-Iモノクローナル抗体の混合ゲル30 μ lに血清5 μ lを混合、60分間緩徐に振盪した後、15分間静置、上清（RLP分画）のコレステロール（RLPコレステロール）およびトリグリセリド（RLPトリグリセリド）を測定した。RLPコレステロールのカットオフ値は7.5mg/dlとした。

レチニールパルミテイトの測定は、6例について行った。すなわち、内標準物質としてビタミンK₁を含むエタノール2mlと血清100 μ lを混合。さらに、n-hexane 5mlを混合後、5分間振盪。n-hexane layerを分離、窒素ガスで乾燥後、100 μ lのエタノールに溶解し、HPLCにアプライした。吸光度325nmを測定した。

3. 対象

男性10例、女性9例の合計19例の健康ボランティアを対象とした。年齢は23~44歳（平均 \pm SD、28 \pm 6歳）。全例、総コレステロール<220mg/dl、総トリグリセリド<150mg/dl、HDLコレステロール>40mg/dl、血糖<100mg/dlであった。アポEフェノタイプはE3/3が12例、E3/4が6例、E2/3が1例であった。

4. 結果

OFTTクリーム負荷により、特に、副作用を認めなかった。

表2は負荷試験の各脂質の変動を示す。

Table. 2 Changes of each factor after OFTT cream load in healthy subjects

Sampling time	(Mean \pm SD)				
	0	2	4	6	8 hrs
RLP・C (mg/dl)	3.8 \pm 1.3	6.1 \pm 1.9 ^{***}	7.2 \pm 2.9 ^{***}	6.7 \pm 5.0 ^{**}	4.5 \pm 2.7
RLP・TG (mg/dl)	13.9 \pm 9.5	55.8 \pm 26.1 ^{***}	82.1 \pm 47.4 ^{***}	62.7 \pm 46.9 ^{***}	22.1 \pm 23.5 [*]
TC (mg/dl)	183 \pm 22	188 \pm 20 [*]	189 \pm 20 [*]	188 \pm 21 [*]	189 \pm 19 [*]
TG (mg/dl)	72 \pm 31	122 \pm 38 ^{***}	164 \pm 76 ^{***}	130 \pm 86 ^{**}	71 \pm 51
HDL・C (mg/dl)	63 \pm 14	64 \pm 16	61 \pm 14	62 \pm 15	65 \pm 15
Apo A I (mg/dl)	149 \pm 20	152 \pm 19	151 \pm 17	151 \pm 17	151 \pm 18
Apo A II (mg/dl)	33 \pm 3	35 \pm 4 ^{**}	35 \pm 4 ^{***}	35 \pm 4 ^{**}	34 \pm 3
Apo B (mg/dl)	72 \pm 15	73 \pm 14	74 \pm 14 [*]	73 \pm 15 [*]	73 \pm 14
Apo C II (mg/dl)	2.8 \pm 1.3	2.8 \pm 1.3	2.5 \pm 1.4 [*]	2.2 \pm 1.3 ^{***}	2.1 \pm 1.1 ^{***}
Apo C III (mg/dl)	8.7 \pm 3.8	8.7 \pm 3.6	8.0 \pm 3.1 [*]	7.2 \pm 3.1 ^{***}	6.8 \pm 2.9 ^{***}
Apo E (mg/dl)	4.6 \pm 1.5	4.8 \pm 1.7 [*]	4.8 \pm 1.5	4.5 \pm 1.4	4.2 \pm 1.5 ^{**}
Glucose (mg/dl)	86 \pm 8	85 \pm 8	86 \pm 8	84 \pm 6	85 \pm 8

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 v.s. 0 hr

(Wilcoxon Signed Rank Test)

1) 血清脂質、アポ蛋白および血糖の変化

RLPコレステロールは負荷前に比較して負荷後2、4、6時間値は有意増加を認めた。平均値の増加率は最大1.89（4時間後）と著明な増加を認めた。RLPトリグリセリドは負荷前に比較して負荷後2、4、6、8時間値は有意増加を認めた。平均値の増加率は最大5.91（4時間後）と著明な増加を認めた。RLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドは脂肪負荷後8時間でも負荷前値に戻らなかった（図2、図3）。

Fig. 2 Changes of serum RLP cholesterol concentration after OFTT cream load in 19 healthy subjects

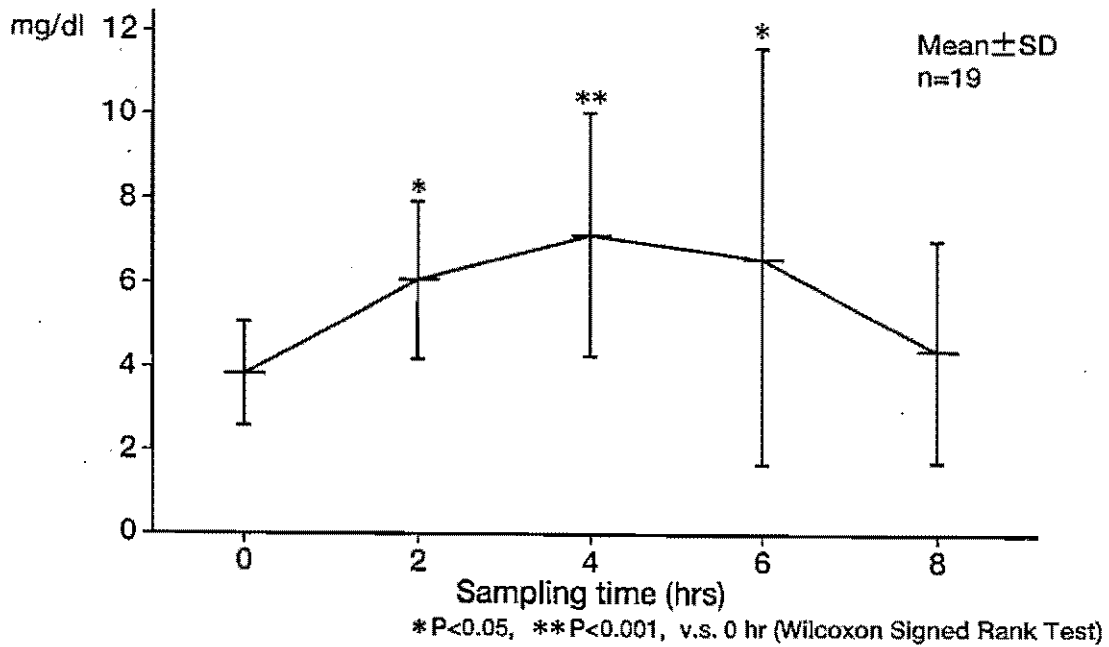
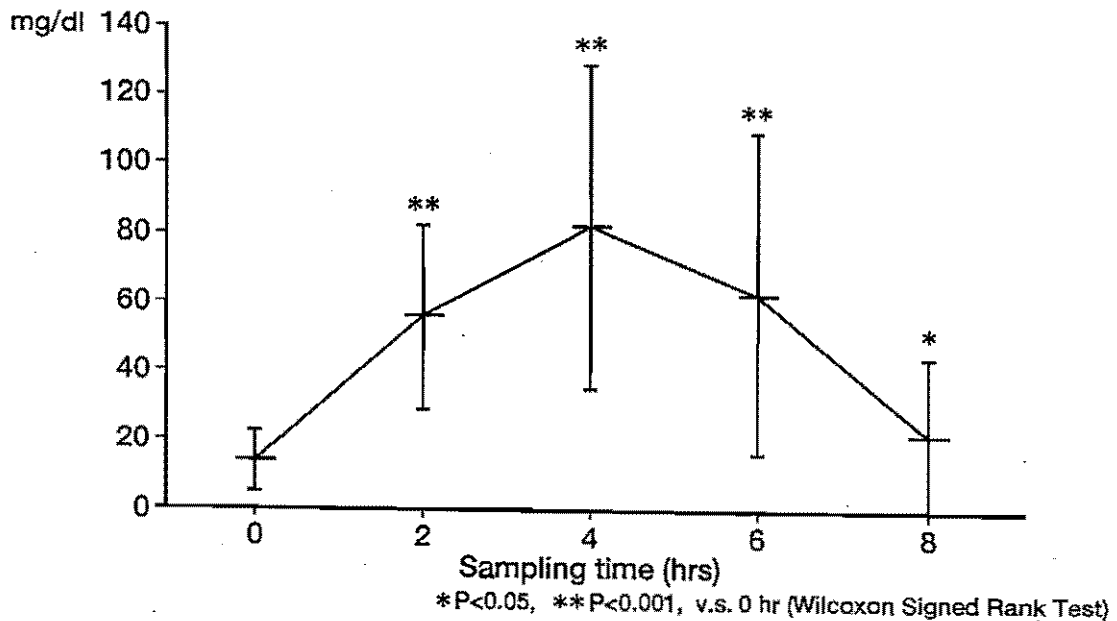


Fig. 3 Changes of serum RLP triglyceride concentration after OFTT cream load in 19 healthy subjects



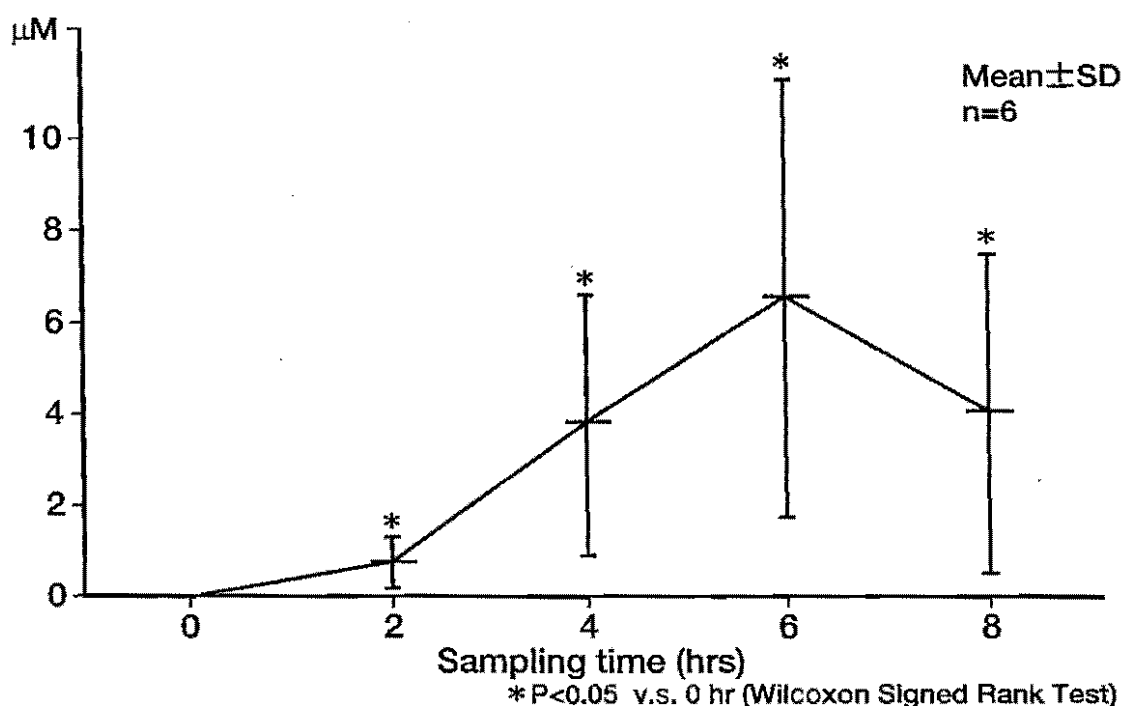
総コレステロールは負荷前に比較して負荷後2、4、6、8時間値は有意増加を認めたが、平均値の増加率は最大1.03（4および8時間後）と僅かであった。トリグリセリドは負荷前に比較して負荷後2、4、6、8時間値は有意増加を認めた。平均値の増加率は最大2.16（4時間後）と著明な増加を認めた。HDLコレステロールは脂肪負荷前後で有意変動を認めなかった。各アポ蛋白は脂肪負荷により、大きな変動を認めなかった。アポC-II、C-III、Eは負荷前に比較して負荷後有意低下を認めた。血糖値は脂肪負荷前後で有意変動を認めなかった。

脂肪負荷により大きな変動を示したのはRLPコレステロール、RLPトリグリセリドおよびトリグリセリド値で、いずれも4時間後にピーク値となった（図2、図3）。総コレステロール、トリグリセリド、HDLコレステロール、アポ蛋白は大きな変動を認めなかった。

2) レチニール・パルミテイトの変化

レチニール・パルミテイトは6時間後にピーク値となり（図4）、RLPコレステロール、RLPトリグリセリドおよびトリグリセリド値の変動とは異なり、代謝が異なることが示された。

Fig. 4 Changes of serum retinyl palmitate concentration after OFTT cream containing Vit. A load in 19 healthy subjects



3) 脂肪負荷量と負荷後ピーク時間の関係

体表面積(m²)当たりの脂肪負荷量とRLPコレステロール、RLPトリグリセリドおよびトリグリセリド値のピーク時間との相関は、それぞれ、 $r=0.32$ 、 0.34 、 0.18 と有意ではなかったが、いずれも正相関を認め、脂肪負荷量が多い程ピーク時間が遅くなることが示された。

4) RLPコレステロール、RLPトリグリセリドおよびトリグリセリドの再現性の検討

3ヶ月間隔で脂肪負荷試験を行った7例について、1回目および2回目のRLPコレステロール、

RLPトリグリセリドおよびトリグリセリドの負荷前、負荷後2、4、6、8時間値の総和の相関を検討した。結果は、それぞれ、 $r=0.525$ 、 0.455 、 0.345 と有意ではなかったが、トリグリセリドよりもRLPで高い相関係数を認めた。

5) アポEフェノタイプと血清脂質

アポE3/3群およびE3/4群における総コレステロール、総トリグリセリド、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド値を比較した。総コレステロール値は、E3/4群の負荷後4および6時間値はE3/3群よりも有意高値であった。総トリグリセリドは両群で差を認めなかった。RLPコレステロール値は、E3/4群の負荷前、負荷後4、6および8時間値はE3/3群よりも有意高値であった。RLPトリグリセリド値は、E3/4群の負荷後6時間値はE3/3群よりも有意高値であった。

5. 考察

1) 脂肪負荷試験測定脂質としてのRLPの有用性

19例の健康ボランティアを対象に、OFTTクリームを用いて脂肪負荷試験を行い、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド、レチニール・パルミテイト、総コレステロール、総トリグリセリド、HDLコレステロール、アポ蛋白（アポA-I、A-II、B、C-II、C-III、E）、血糖の変化を検討したが、負荷後に著明な増加を認めたのは、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド、レチニール・パルミテイトおよび総トリグリセリドであった。

このうち、総トリグリセリドは複数の構成要因を含むことから、動脈硬化の指標としてはふさわしくないと考える。すなわち、総トリグリセリド増加の原因として、トリグリセリド・リッチ・リポ蛋白であるカイロミクロン、VLDLおよび両者のレムナントの増加が考えられるが、動脈硬化のリスクとしてはレムナントが重要である(7)。動脈硬化のリスクであるレムナントを反映するRLPを測定する方が、トリグリセリド・リッチ・リポ蛋白全体を反映する総トリグリセリドを測定するよりも鋭敏であると考えられる。

RLPは動脈硬化のリスクであるレムナントを反映する(1-3)。高レムナント血症が動脈硬化のリスクであることは臨床検討および実験検討で確認されている(7、8)。また、高RLP血症自体の動脈硬化のリスクも報告されている(9、10)。

RLPは $5\mu\text{l}$ という少量の血清で、簡便に測定可能で、臨床レベルでの大量の検体処理が可能である。

RLPは動脈硬化のリスクであるレムナントを反映し、脂肪負荷後に著明な増加を認め、少量の血清で、簡便に測定可能で、測定項目の再現性の検討でも有用な結果をえたことから、脂肪負荷試験の測定脂質として有用であると考えられた。

レチニール・パルミテイトは脂肪負荷後に著明な増加を認めたが、ピーク時間が6時間後と、RLP、総トリグリセリドの4時間と異なり、代謝が異なることが考えられ、レムナントを反映す

るか疑問である。

総コレステロール、HDLコレステロール、アポ蛋白は脂肪負荷による変化が少なく、脂肪負荷試験の測定脂質としては有用性は低い。また、食後高脂血症としての重要性も低いと考えられた。

2) 脂肪負荷量および脂質測定時間

脂肪負荷量の多い程ピーク時間が遅くなった。体表面積(m^2)当たり30gでは、健常者ではRLPのピーク時間は4時間であった。動脈硬化性疾患例ではピーク時間は健常よりも遅くなるようである。したがって、体表面積(m^2)当たり30g負荷の場合、負荷後1回採血では、4時間以降にすると健常、疾患例の差が出やすくなるものと考えられる。

3) 負荷脂肪としてのOFTTクリームの有用性

19例の健康ボランティアを対象に、200g(脂肪量として70g)比較的大量の負荷を行ったが、特に、副作用は認められなかった。OFTTクリームの1価不飽和脂肪酸の含有率は29.3%であるが、共同研究施設での検討から、1価不飽和脂肪酸の含有量が多い程、負荷後のRLPの増加が著明になることが報告された。また、健常例で、便通異常と脂肪負荷量との関係が検討されたが、17g/体表面積 m^2 以下では、全く便通異常を認めないことが示された。

4) 食後高脂血症の重要性

脂肪負荷後8時間たってもRLPは負荷前値に戻らなかった。この結果からヒトの1日の生活の中で、空腹状態にあるのは朝食前の2~3時間にすぎないことが確認された。したがって、1日の大部分をしめる食後の高脂血症の動脈硬化リスクを評価することが重要であることが示唆された。

5) アポEフェノタイプとRLP

アポE3/3群およびE3/4群における総コレステロール、総トリグリセリド、RLPコレステロール、RLPトリグリセリドを比較した。アポEイソ蛋白E4と総コレステロール、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド増加の関連を認めた。また、ヒトの1日の生活の中で、空腹状態にあるのは朝食前の2~3時間にすぎないことが確認された。したがって、1日の大部分をしめる食後の高脂血症の動脈硬化リスクを評価することが重要であることが示唆された。

6. 結論

食後高脂血症の動脈硬化リスクとしてはレムナントが重要である。RLPはレムナントを反映し、少量の血清で、簡便に測定可能で、測定項目の再現性の検討でも有用な結果を得たことから、食後高脂血症の動脈硬化の指標として有用であると考えられた。

Ⅲ 平成10年度の研究

平成10年度は、冠状動脈造影を施行した120例を対象に、動脈硬化を評価する脂肪負荷試験の測定脂質として、また、食後高脂血症の指標としてRLPの有用性を検討するため、次のような脂肪負荷試験を行った。

1. プロトコール

冠状動脈造影を施行した連続した120例に、乳脂肪（OFITクリーム）を負荷（脂肪量として30g／体表面積 m^2 ）し、負荷前、負荷後2、4時間に採血した。サンプルは直ちに3,000rpm、15分で血清分離し4度Cに保存された。試験中は水分以外の摂取は禁止した。平成9年度の健常例を対象とした脂肪負荷試験は負荷後8時間まで変化を見たが、本年度の対象は冠状動脈硬化症例であるため、安全性を考慮して負荷後4時間までとした。対象患者には、試験内容を説明し、承諾を得た。

それぞれの検体について、総コレステロール、総トリグリセリド、HDLコレステロール、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド、アポ蛋白（アポA-I、A-II、B、C-II、C-III、E）の測定を行った。

2. 冠状動脈造影

大腿動脈によるSeldinger法を用いた。cine-filmsは少なくとも、30 degree right anterior obliqueと60 degree left anterior obliqueの2種類を用いて、冠状動脈の狭窄率を評価した。American Heart Association（AHA）の基準により、狭窄率25%未満を正常冠状動脈とした。また、少なくとも一ヶ所以上の冠状動脈に75%以上の狭窄を認めた例をCAD群とした。

3. 対象

冠状動脈造影を施行した連続した120例を対象とした。高LDLコレステロール血症のコレステロールを除外するため、また、食後のRLP増加のリスクを検討するために、120例の対象のうち、負荷前の総コレステロール、RLPコレステロール値の正常（総コレステロール $<220mg/dl$ 、RLPコレステロール $<7.5mg/dl$ ）例を選択した。その結果、冠状動脈造影で冠状動脈の狭窄を認めなかった正常冠状動脈群（対照群）24例と75%以上の有意冠状動脈狭窄を認めた冠状動脈硬化群（CAD群）33例が選択され、両群でRLPコレステロール、RLPトリグリセリド値をはじめ、各脂質値が比較検討された。

4. 血清脂質、アポ蛋白の測定

総コレステロールおよび総トリグリセリドは酵素法により測定した。HDLコレステロールは直接法（HDL-C Auto第一化学）、各アポ蛋白は免疫比濁法（第一化学）を用いた。LDLコレステロール

値はFriedewaldの式を用いて計算した。

RLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドはJIMRO-II（日本抗体研究所）測定キットを使用した。

5. 統計

CAD群および対照群における負荷前の男女比、糖尿病の頻度、喫煙者の頻度の差の検定はFisher's exact test、負荷前の年齢、Body Mass Index (BMI)、各脂質値の差の検定にはt-testを用いた。また、両群における各脂質値の負荷後増加率の差の検定にはrepeated measures ANOVAを用いた。P<0.05を有意とした。

6. 結果

1) CAD群および対照群の特徴の比較 (表3)

CAD群は33例中男性19、女性4例、対照群は24例中男性10、女性14例とCAD群で男性が多かった (p=0.0014)。年齢はCAD群62±9歳、対照群65±11歳、BMIはCAD群23.5±3.2、対照群22.9±3.4、喫煙者はCAD群は33例中15例、対照群は24例中5例、糖尿病例はCAD群は33例中10例、対照群は24例中2例と、いずれも両群で有意差を認めなかった (年齢：p=0.1602、BMI：p=0.4835、喫煙：p=0.0908、糖尿病：p=0.0549)。

Table. 3 Characteristics of patients with coronary artery disease and control

	CAD(n=33)	Control(n=24)	p
Age (yrs)	62±9	65±11	0.1602
Sex(M/F)	28/5	10/14	0.0014*
BMI	23.5±3.2	22.9±3.4	0.4835
Smoker	15	5	0.0908
Diabetes Mellitus	10	2	0.0549
RLP-C (mg/dl)	3.6±1.2	3.7±1.4	0.6742
RLP-TG (mg/dl)	12.7±7.4	11.9±7.4	0.6545
TC (mg/dl)	181±24	188±21	0.2692
TG (mg/dl)	116±43	109±37	0.5721
HDL-C (mg/dl)	37±13	43±12	0.0876
LDL-C (mg/dl)	121±26	123±22	0.7401
Apo A-I (mg/dl)	105±25	115±20	0.1272
Apo A-II (mg/dl)	28±7	28±4	0.6538
Apo B (mg/dl)	98±20	98±17	0.9533
Apo C-II (mg/dl)	3.9±1.7	3.5±1.2	0.3220
Apo C-III (mg/dl)	8.0±3.2	8.0±2.8	0.9902
Apo E (mg/dl)	4.8±1.3	4.9±1.3	0.6552

BMI : Body Mass Index

Mean ±SD

* Significant

2) CAD群および対照群の負荷前の各脂質値の比較 (表3)

CAD群および対照群ともに、総コレステロールおよびRLPコレステロール値の正常例 (TC<220 mg/dl、RLP-C<7.5mg/dl) を対象としたため、各脂質、アポ蛋白値の負荷前値に有意差を認めなかった。すなわち、RLPコレステロールはCAD群 3.6 ± 1.2 、対照群 3.7 ± 1.4 mg/dl ($p=0.6742$)、RLPトリグリセリドはCAD群 12.7 ± 7.4 、対照群 11.9 ± 7.4 mg/dl ($p=0.6545$)、総コレステロールはCAD群 181 ± 24 、対照群 188 ± 21 mg/dl ($p=0.2692$)、HDLコレステロールはCAD群 36.6 ± 12.8 、対照群 42.5 ± 12.3 mg/dl ($p=0.0876$)、総トリグリセリドはCAD群 116 ± 43 、対照群 109 ± 37 mg/dl ($p=0.5721$)、LDLコレステロールはCAD群 121 ± 26 、対照群 123 ± 22 mg/dl ($p=0.7401$)、アポA-IはCAD群 105 ± 25 、対照群 115 ± 20 mg/dl ($p=0.1272$)、アポA-IIはCAD群 28.4 ± 6.6 、対照群 27.8 ± 4.0 mg/dl ($p=0.6538$)、アポBはCAD群 98 ± 20 、対照群 98 ± 17 mg/dl ($p=0.9533$)、アポC-IIはCAD群 3.9 ± 1.7 、対照群 3.5 ± 1.2 mg/dl ($p=0.3220$)、アポC-IIIはCAD群 8.0 ± 3.2 、対照群 8.0 ± 2.8 mg/dl ($p=0.9902$)、アポEはCAD群 4.8 ± 1.3 、対照群 4.9 ± 1.3 mg/dl ($p=0.6552$)であった。

3) CAD群および対照群の負荷後RLP-CおよびRLP-TG値の増加の比較 (図5)

CAD群および対照群の負荷前RLPコレステロール値に有意差を認めなかったが、CAD群の負荷後2時間値は 4.9 ± 2.5 mg/dl (Mean \pm SD)、4時間値は 7.9 ± 4.4 mg/dlと、対照群の負荷後2時間値 4.5 ± 1.8 mg/dl、4時間値 6.1 ± 2.7 mg/dlよりも有意増加を認めた ($p=0.0141$)。

同様に、CAD群および対照群の負荷前RLPトリグリセリド値に有意差を認めなかったが、CAD群の負荷後2時間値は 30.1 ± 22.0 mg/dl、4時間値は 63.3 ± 45.5 mg/dlと、対照群の負荷後2時間値 21.7 ± 11.9 mg/dl、4時間値 38.2 ± 22.3 mg/dlよりも有意増加を認めた ($p=0.0031$)。

4) CAD群および対照群の負荷後総コレステロール、総トリグリセリドおよびHDLコレステロール値の増加の比較 (図6)

CAD群および対照群の総トリグリセリド負荷前値に有意差を認めなかったが、CAD群の負荷後2時間、4時間値は、対照群よりも有意増加を認めた ($p=0.0012$)。

負荷後の総コレステロールおよびHDLコレステロール値の変化は両群で有意差を認めなかった (総コレステロール： $p=0.1157$ 、HDLコレステロール： $p=0.6255$)。

5) CAD群および対照群の負荷後各アポ蛋白値の増加の比較 (図7)

負荷後のアポC-IIIおよびアポE値の変化は両群で有意差を認めた (アポC-III： $p=0.0001$ 、アポE： $p=0.0011$)。

負荷後のアポA-I、アポA-II、およびアポBおよびアポC-II値の変化は両群で有意差を認めなかった (アポA-I： $p=0.1366$ 、アポA-II： $p=0.1025$ 、アポB： $p=0.5411$ 、アポC-II： $p=0.1897$)。

6) OFTTクリーム安全性

OFTTクリーム負荷により、特に副作用を認めなかった。

Fig. 5 Changes of RLP cholesterol and RLP triglyceride after OFTT cream load in patients with coronary artery disease and control

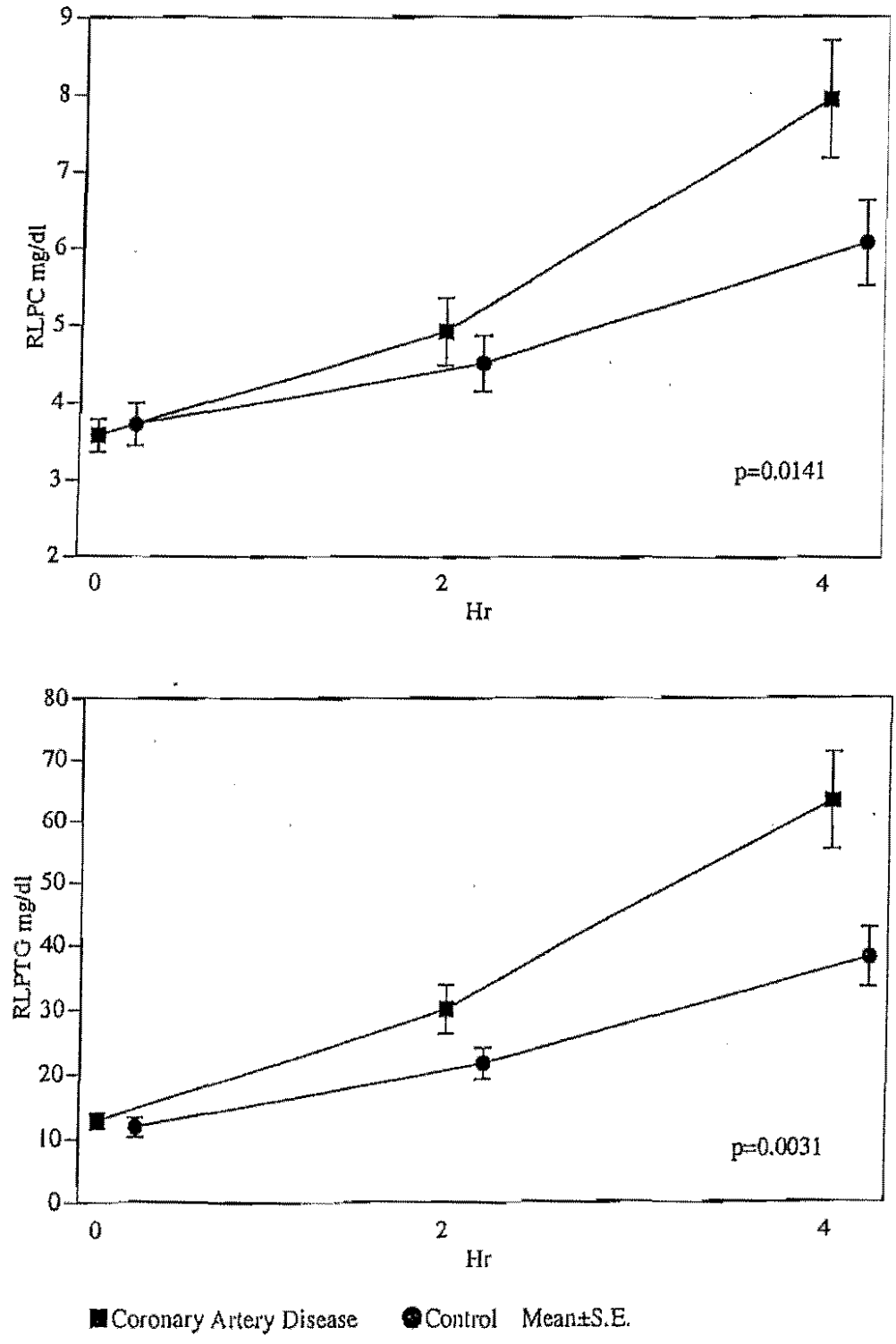


Fig. 6 Changes of total cholesterol, triglyceride and HDL cholesterol after OFTT cream load in patients with coronary artery disease and control

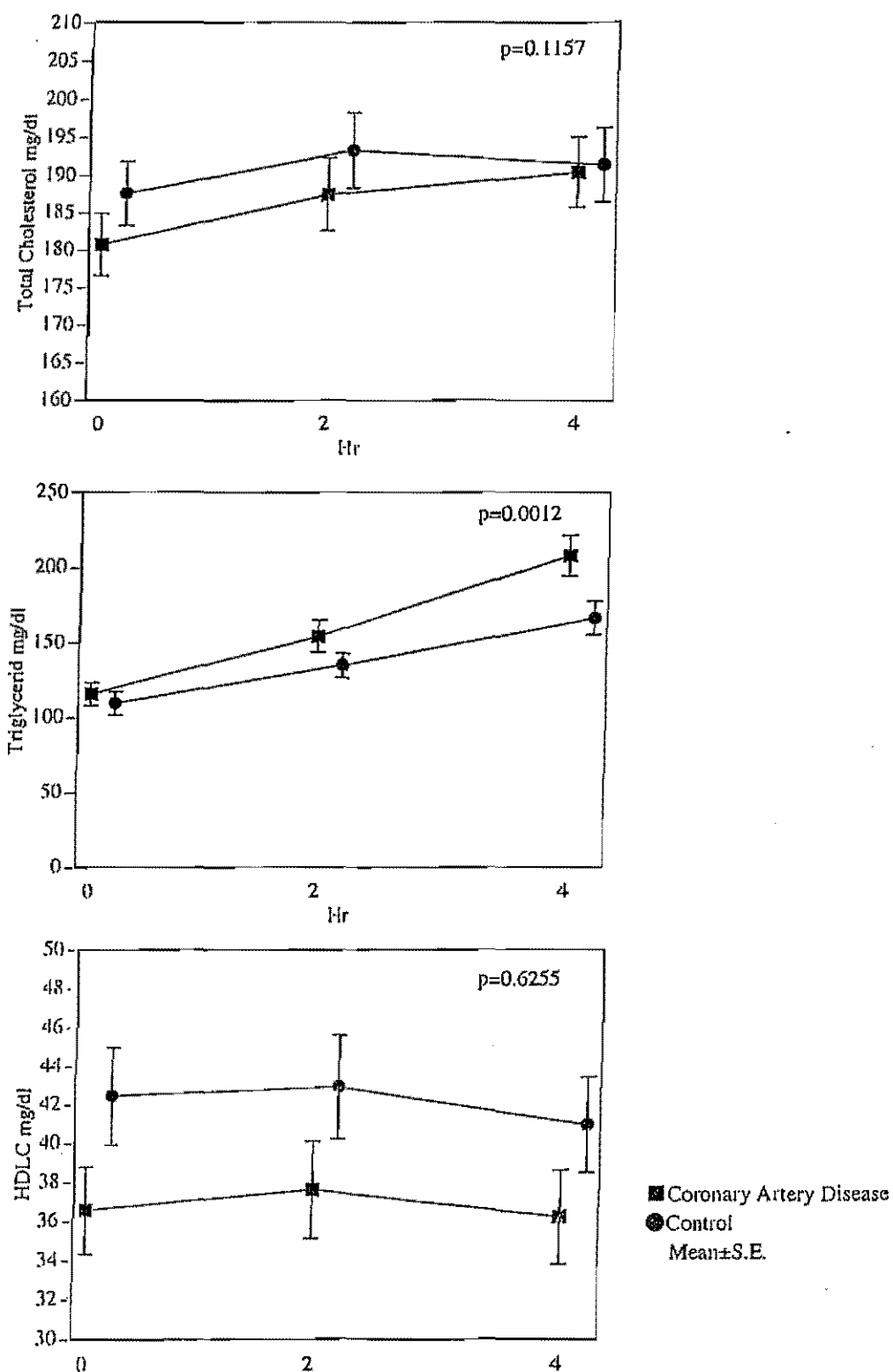
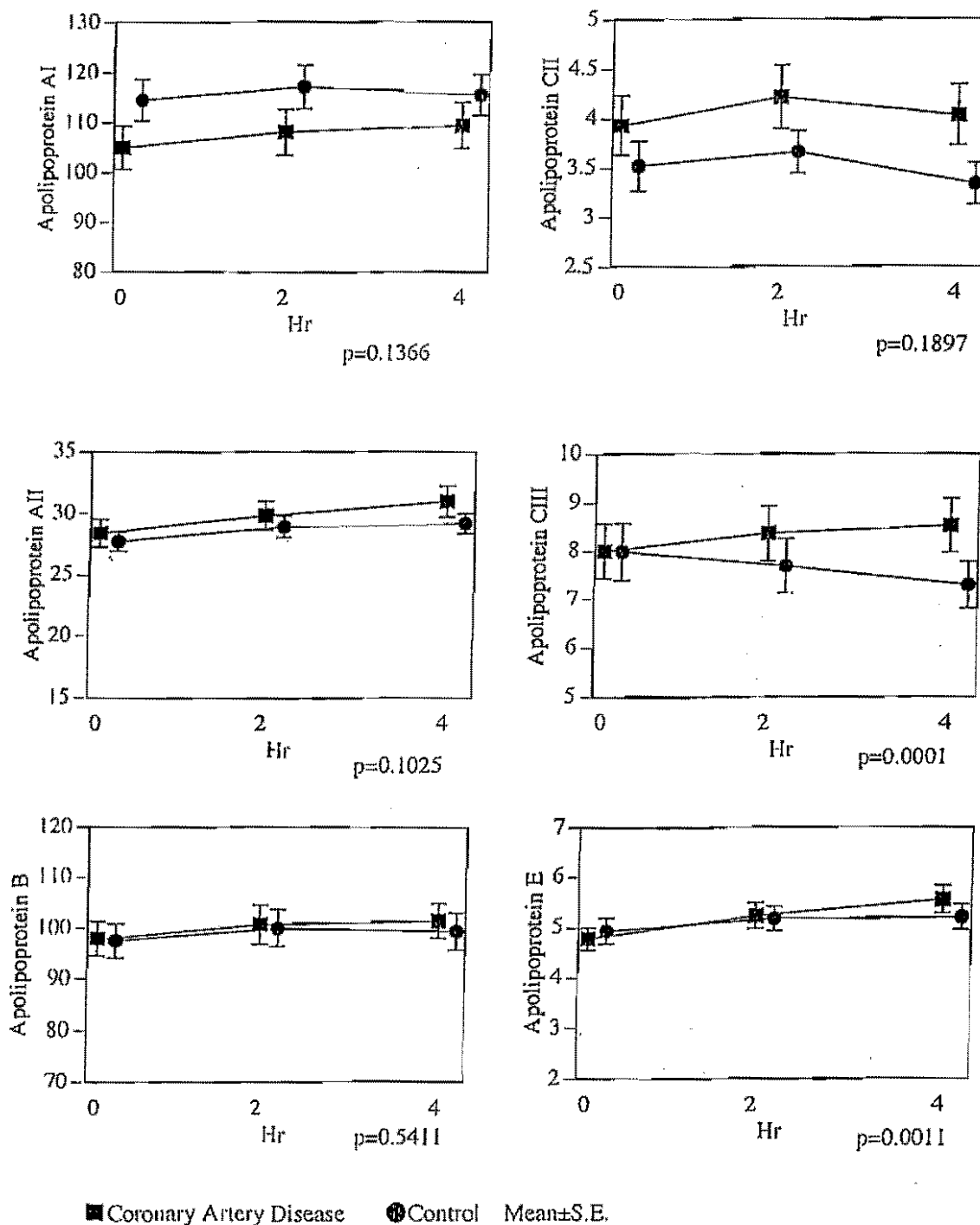


Fig. 7 Changes of each apolipoproteins after OFTT cream load in patients with coronary artery disease and control



7. 考察

1) 動脈硬化のリスクを評価する脂肪負荷試験測定脂質としてのRLPの有用性

米国、Framingham Heart Studyをはじめとする多くの大規模試験により、高総コレステロール血症（高LDLコレステロール血症）が冠状動脈硬化症（CAD）の発症頻度を増加させ、それを治療することによりCADの発症頻度を減少しうることが示され、高LDLコレステロール血症とCADとの関連性は確立した事実と考えられるようになった。しかし、CAD例のすべてが高LDLコレステ

ロール血症を伴うとはかぎらず、高LDLコレステロール血症を伴わないCAD例のリスクとしてわれわれはレムナントリポ蛋白に注目した。特に、わが国の心筋梗塞例は高LDLコレステロール血症を伴わない例が少なくないことから、高LDLコレステロール血症以外のリスクが重要であると考えられる。

レムナントリポ蛋白がCADのリスクとなることは、RLPを用いた検討を含めて多くの報告がある(7-10)。また、平成9年度の健常例を用いた検討により、RLPは脂肪負荷による著明な増加を認め、試験測定脂質として有用であることが示されたことから、本年度は空腹時ではなく、脂肪負荷後(食後)のRLPの増加がCADのリスクとなるか否かを検討した。

このような目的を検討するために、空腹時の総コレステロール値およびRLPコレステロール値の正常例を選択して、対象とした。

今回対象とした、CAD群および対照群において年齢、BMI、喫煙率、糖尿病合併率に有意差を認めず、また、負荷前の総コレステロール(LDLコレステロール)、総トリグリセリド、HDLコレステロール、RLPコレステロール、PLRトリグリセリド、各アポ蛋白値も有意差がなかった。それにもかかわらず、CAD群は対照群よりも負荷後にRLPコレステロールおよびRLPトリグリセリド値の有意増加を認めた。

この結果から、高LDLコレステロール血症を合併しない対象では、CADのリスクとしてレムナントリポ蛋白の増加が重要であり、レムナントリポ蛋白は空腹時が正常でも食後の増加がCADのリスクとなることが示された。

レムナントリポ蛋白は食後に著明な増加を認め、ヒトは1日の大部分が食後の状態にあることを考慮すると、食後のレムナントリポ蛋白の増加はCADの重要なリスクとなると考えられる。また、空腹時のみでなく、食後にレムナントリポ蛋白を測定することの重要性が認識された。

今回の検討で、総トリグリセリド、アポC-IIIおよびアポE値も、CAD群は対照群よりも脂肪負荷後に有意増加を認めた。これらの変化はレムナントリポ蛋白の変化を反映した結果と考えられる。

2) 脂肪測定時間とRLPリスクの感度

平成9年度の健常例では脂肪負荷後8時間までの経過を観察したが、今回は、対象がCAD例であったために、患者に与えるストレスを考慮して脂肪負荷後4時間までの経過を観察した。一部の対象で、負荷後6時間まで経過観察したが、4時間よりも6時間の方がCAD群と対照群のRLP値の差がより顕著になる傾向が認められ、食後高脂血症のリスクの評価をするには6時間まで経過観察の方がより感度が増加すると考えられた。

3) 負荷脂肪としてのOFTTクリームの有効性

今回、120例のCAD例を含む対象で、30g/体表面積 m^2 の脂肪を負荷したが、特に、副作用は認められなかった。

8. 結論

高LDLコレステロール血症を伴わないCADのリスクとしてレムナントリポ蛋白 (RLP) の増加が重要であることが示唆された。また、空腹時のみでなく、食後のレムナントリポ蛋白 (RLP) の増加がCADのリスクとなることが示唆された。レムナントリポ蛋白は食後に著名な増加を認め、ヒトは1日の大部分が食後の状態にあることを考慮すると、食後のレムナントリポ蛋白の評価が感度が高く重要であり、脂肪負荷試験での負荷後のRLP値測定が有用であることが示された。

IV 平成11年度の研究

平成11年度は、糖尿病例を対象として、特に、高インスリン血症とレムナントの関係を検討した。また、欧米と我が国で健常例のRLP値に差が指摘されていることから、日本とカナダの検体を同施設で測定し、差の原因を検討した。

1. 糖尿病例における高インスリン血症とレムナントの関係の検討

1) 対象

検診で糖尿病を指摘され受診、75g経口ブドウ糖負荷試験の結果、米国糖尿病協会 (ADA) の基準で糖尿病型と判定された症例のうちHbA1c<6.5%の症例を対象とした。対象のうち、閉経前の女性はホルモンの脂質代謝に及ぼす影響を考慮して除外した。また、腎症や網膜症などの糖尿病合併症を持つ症例も除外した。

75g経口ブドウ糖負荷試験2時間値の血中インスリン濃度 (IRI) が $80\mu\text{U/ml}$ 以上かつ負荷前、負荷後30、60、90、120、180分の各IRI値の合計 (ΣIRI) が $300\mu\text{U/ml}$ 以上であった15名を高インスリン血症群とした。また、同様に糖尿病型の症例の中で、2時間値IRI< $60\mu\text{U/ml}$ かつ ΣIRI < $250\mu\text{U/ml}$ を満たすものの中から、高インスリン血症群と年齢、性別をマッチさせた15名を選択し対照群とした。対象患者には、試験内容を説明し、承諾を得た。

2) プロトコール

各対象症例について、75g経口ブドウ糖負荷試験から1ヶ月以内に、OFITクリームを用いて、脂肪負荷試験を施行した。脂肪負荷試験は、12時間以上絶食後、OFITクリームを体表面積(m^2)当たり17g負荷し、負荷前、負荷後2時間、4時間に採血を行った。各検体について、総コレステロール、総トリグリセリド、HDLコレステロール、RLPコレステロール、RLPトリグリセリド、アポ蛋白 (アポA-I、A-II、B、C-II、C-III、E)、血糖、IRIの測定を行った。

総コレステロールおよび総トリグリセリドは酵素法により測定した。HDLコレステロールは直接法 (HDL-C Auto第一化学)、各アポ蛋白は免疫比濁法 (第一化学) を用いた。血糖値はGlucose Oxidase法、血中IRIは2抗体法を用いた。

RLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドはJIMRO-II（日本抗体研究所）測定キットを使用した。

また、健常5例において、OFTTクリームを体表面積(m²)当たり17g負荷し、負荷前、負荷後2時間、4時間、6時間に採血を行った結果と糖尿病例との比較を行った。

3) 結果

対象を表4に示す。年齢、性別、BMIに高インスリン群と対照群で差を認めなかった。高インスリン群のΣIRI値は449.8±39.8μU/ml（平均±SEM）と対照群197.7±16.0μU/mlと有意高値であった。また、高インスリン群のHbA1c値は5.0±0.1%（平均±SEM）と対照群5.4±0.2%と有意低値であった。

Table. 4 Clinical profiles of the subjects

	Hyperinsulinemia	Normoinsulinemia	
n.	15	15	NS
age (y.o.)	57.3±2.0	57.3±2.0	NS
gender (male/female)	9/6	9/6	NS
BMI (Kg/m ²)	25.5±0.7	24.6±0.6	NS
ΣIRI (μU/ml)	449.8±39.8	197.7±16.0	<0.0001
HbA1c (%)	5.0±0.1	5.4±0.2	0.048

means±SEM

ΣIRI is the sum of serum immunoreactive insulin concentration measured at fasting and 30, 60, 90, 120 and 180 minute after 75 gram oral glucose load.

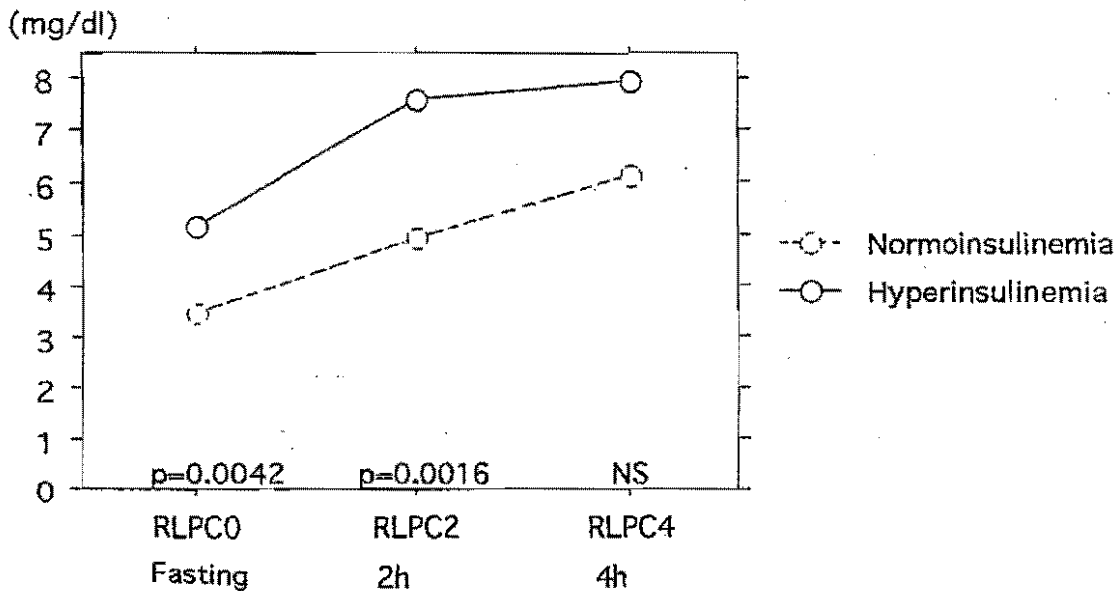
脂肪負荷試験各時間での脂質、血糖値、IRI値の変動を検討した。糖尿病例においても、RLPコレステロール、RLPトリグリセリドおよび総トリグリセリド値は、OFTTクリームによる脂肪負荷にて著明な増加を認めた。しかし、総コレステロール、HDLコレステロール、血糖の変動は少なかった。

以下に、高インスリン群および対照群の各値の変動を比較検討した。

総コレステロール値は、負荷前、負荷後2時間、4時間値ともに、高インスリン血症群で高値を示し、負荷後2時間、4時間値は有意であった。LDLコレステロール値、総トリグリセリド値およびRLPトリグリセリド値は、負荷前、負荷後2時間、4時間値ともに高インスリン血症群で高値を示したが、有意差を認めなかった。RLPコレステロール値は、負荷前、負荷後2時間、4時間値ともに、高インスリン血症群で高値を示し、負荷前、負荷後2時間値は有意であった（図8）。血糖値は、負荷前、負荷後2時間、4時間値ともに、高インスリン血症群で有意低値を示した。血中IRI値は、負荷前、負荷後2時間、4時間値ともに、高インスリン血症群で高値を示し、

負荷前、負荷後2時間値は有意であった。

Fig. 8 Changes of RLP cholesterol after OFTT cream load in diabetic patients with hyperinsulinemia and normoinsulinemia



総コレステロール、HDLコレステロール、総トリグリセリド、RLPトリグリセリド、血糖およびIRI値の△2時間後および△4時間後は、高インスリン群および対照群で有意差を認めなかった。RLPコレステロールは、高インスリン群の△2時間値は対照群よりも有意高値であった(図9)。

Fig. 9 Changes of Δ RLP cholesterol after OFTT cream load in diabetic patients with hyperinsulinemia and normoinsulinemia

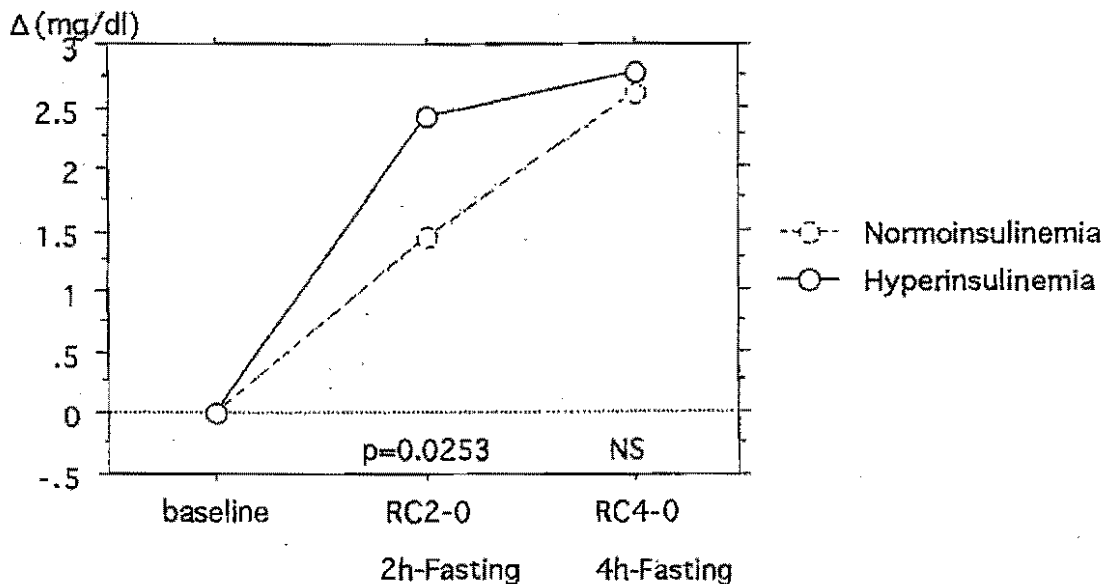


表5は、健常5例において、OFITクリームを体表面積(m²)当たり17g負荷し、負荷前、負荷後2時間、4時間、6時間に採血を行った結果の脂質変動を示す。RLPコレステロールおよびRLP

トリグリセリド値のピーク時間は脂肪負荷後2時間であった。糖尿病例では高インスリン群および対照群の両群ともにピーク時間は脂肪負荷後4時間であり、糖尿病例でのピーク時間の遅延を認めた。

Table. 5 Changes of each lipid after OFTT cream load (17g fat/m² body surface) in 5 healthy subjects

17g/m²体表面積当たりの脂肪負荷試験 (n=5) mg/dl

	負荷前	負荷後2時間	負荷後4時間	負荷後6時間	負荷後8時間
RLP-C	4.4±2.8	5.6±2.6*	4.9±2.7	5.0±4.0	3.9±2.5
RLP-TG	13.3±14.1	36.9±26.1*	25.8±19.9	27.8±38.0	11.2±16.7
TG	137±103	158±99*	140±96	129±113	98±90
TC	201±15	196±14	193±11	198±14	199±15
HDL-C	61±13	60±13	60±14	62±13	63±13
A-I	144±11	141±12	140±12	142±11	142±13
A-I I	27±5	27±5	26±5	27±4	27±5
B-	87±13	85±13	83±12	86±14	85±13
C-I I	3.2±0.7	3.1±0.9	2.8±1.0	2.6±1.0	2.6±1.0
C-I I I	9.8±2.7	9.4±2.5	8.6±2.0	8.5±2.5	8.4±2.4
E	3.8±1.0	3.8±0.6	3.8±0.7	3.8±0.9	3.8±0.9

Mean±SD

*peak time

4) 考察

糖尿病例においても、RLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドはOFITTクリームによる脂肪負荷後著明な増加を認め、脂肪負荷試験の測定脂質として有用であることが示唆された。また、糖尿病例でのRLPコレステロールおよびRLPトリグリセリドのピーク時間の遅延を認め、RLP代謝の遅延が示唆された。

HbA1c値6.5%以下の軽症糖尿病では、高インスリン血症例のRLPコレステロール値は、空腹時のみでなく脂肪負荷後においても対象に比較して高値を認め、高インスリン血症例の食後高レムナント血症による動脈硬化リスクの増加が示唆された。

2. 日本およびカナダの健常例におけるRLP値の比較

1) 目的

日本人健常例のRLPコレステロール値は北米人に比較して、50%近く低値であるとの報告が多い。今回、日本人とカナダ人において、RLPコレステロール値の特性に違いがあるか、測定法に違いがあるかを検討した。

2) 対象

糖尿病例を除外した正脂血症および高脂血症例で、日本人93例、カナダ人47例を対象とした。

3) プロトコール

早朝空腹時にEDTA採血し、血漿分離後直ちに-70℃で凍結した。カナダ人の検体は日本に送り、両国の検体ともに同一の研究室(日本抗体研究所)で測定した。RLPコレステロールはJIMRO IIキットを用いて測定した。総コレステロールおよび総トリグリセリドは酵素法により測定した。HDLコレステロールは直接法(HDL-C Auto第一化学)を用いた。

4) 結果

表6に、日本人およびカナダ人の脂質値の比較を示す。カナダ人の総コレステロール、総トリグリセリドおよびRLPコレステロール値は日本人よりも有意に高値を認めた。HDLコレステロールは両国で差を認めなかった。また、RLPコレステロール/総トリグリセリド比は両国とも0.04±0.02(平均±SD)で差を認めなかった。

Table. 6 Lipid profile of the subjects investigated

	Japanese (n=93)	Canadians (n=47)	P
TC (mg/dl)	206 ± 38	240 ± 59	< 0.01
TG (mg/dl)	102 ± 58	183 ± 91	< 0.01
HDL-C (mg/dl)	54 ± 17	54 ± 21	N.S.
RLP-C (mg/dl)	3.8 ± 2.2	7.6 ± 7.2	< 0.01
RLP-C/plasma TG	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	N.S.

All lipid and lipoprotein analysis were performed in Japan.

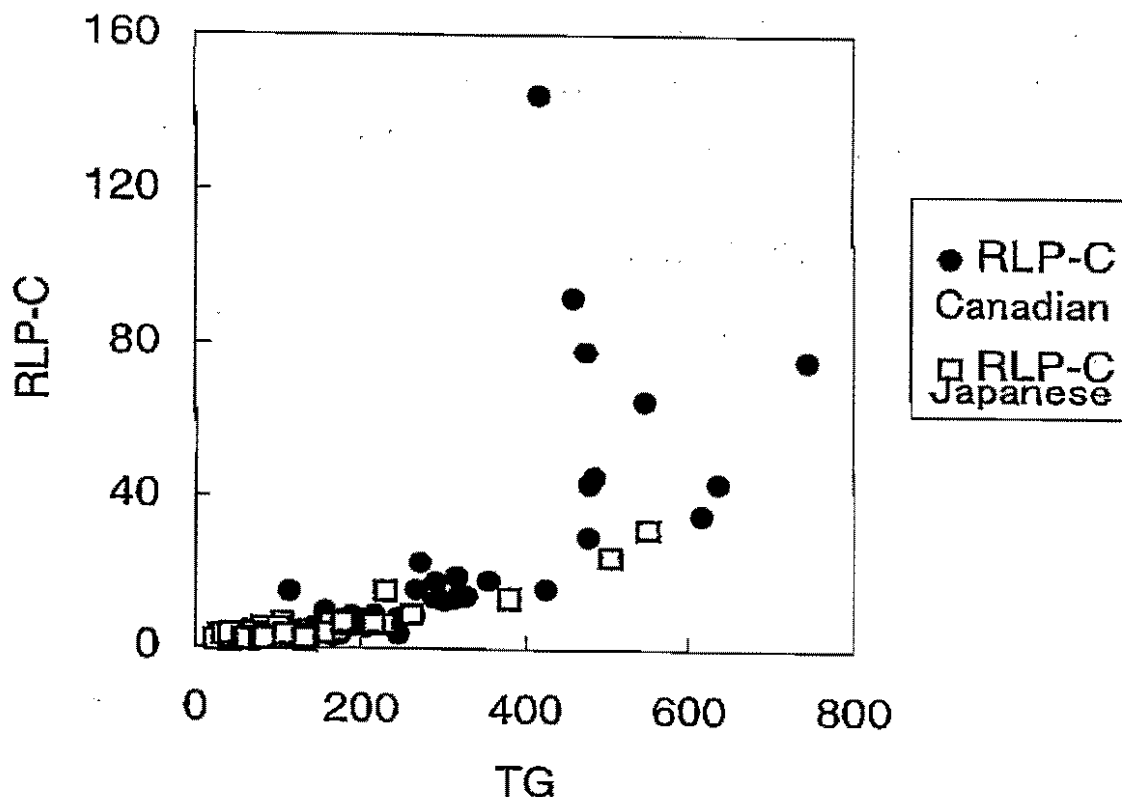
N.S. not significant

図10は日本人とカナダ人において、総トリグリセリドとRLPコレステロールの関連を比較したものであるが、総トリグリセリド値400mg/dl以下では両者の分布はほぼ一致していた。

5) 考察

日本人とカナダ人で、RLPコレステロール/総トリグリセリド比に差が認められなかったこと、総トリグリセリドとRLPコレステロールの関連を見た図で、ほぼ分布が一致したことから、両者のRLPコレステロールの特性に差はなく、日本人とカナダ人の健常者のRLPコレステロールの差は、カナダ人の総トリグリセリド高値を反映しているものと考えられた。

Fig. 10 Relationship between triglyceride and RLP cholesterol in Japanese and Canadian subjects



参考文献

- 1) Nakajima K, Saito T, Tamura A et al : Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A- I immunoaffinity mixed gel. Clin Chim Acta 223 : 53 - 71, 1993
- 2) Nakajima K, Okazaki M, Tanaka A, et al : Separation and determination of remnant-like particles in human serum using monoclonal antibodies to apo B-100 and apo A- I . J Clin Ligand Assay 19 : 177-183, 1996
- 3) Campos E, Nakajima K, Tanaka A, Havel RJ : Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B-100. J Lipid Res 33 : 369-380, 1992
- 4) Wang T, Nakajima K, Leary ET, et al. : Ratio of remnant-like particle-cholesterol to serum total triglycerides is effective alternative to ultracentrifugal and electrophoretic methods in the diagnosis of familial type III hyperlipoproteinemia
- 5) Brown ML, Ramprasad MP, Umada PK, Tanaka A, et al. : The human apolipoprotein B48 receptor (R) : cDNA sequence, expression, and atherosclerosis. Circulation (Suppl 1) 100 : 1-330, 1999

- 6) Tanaka A, Tomie N, Nakano T, et al. : Measurement of postprandial remnant-like particles (RLPs) following a fat-loading test. *Clin Chim Acta* 275 : 43-52, 1998
- 7) Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 88 : 2762-2770, 1993.
- 8) Havel RJ. : Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* : 102-109, 1994.
- 9) Tanaka A, Ejiri N, Fujinuma Y, et. al. : Remnant-like particles and restenosis of coronary arteries after PTCA. *Ann NY Acad Sci* 748 : 595-598, 1995.
- 10) Kawakami A, Tanaka A, Nakano T, et. al : Role of remnant lipoproteins in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* (in press)