

乳脂肪を用いた脂肪負荷試験確立のための基礎研究(中間報告)

東京医科歯科大学第三内科 講師 田 中 明

1. 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。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である。

しかし、食後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。

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。

また、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(Remnant Like Particles、RLP)を開発し、臨床レベルでの測定を可能にした。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る(米国、Framingham Heart Studyの発表<Clinical chemistry, 1998>など)。

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、共通の負荷脂肪およびその量、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た。

2. 研究計画および方法

平成9年度は、健常例を対象に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。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(OFTT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(TC)、トリグリセリド(TG)、HDLコレステロール(HDL-C)、RLPコレステロール(RLP-C)、RLPトリグリセリド(RLP-TG)、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、30degree 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、少なくとも一カ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リスクを除外するため、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TC、RLP-C値の正常($TC < 220mg/dl$ 、 $RLP-C < 7.5mg/dl$)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-C、RLP-TGはじめ、各脂質値が比較検討された。

4) 負荷乳脂肪(OFTTクリーム)

試作された負荷試験用脂肪(上毛食品、群馬)OFTTクリームを使用した。1缶当たり総量200g、

脂肪量として70g。熱量341kcal/100g、コレステロール74mg/100g。構成、水分56.9%、脂肪32.9%、蛋白2.5%、炭水化物7.4%、ミネラル0.3%。脂肪酸構成、飽和脂肪酸64.1%、1価不飽和脂肪酸29.3%、多価不飽和脂肪酸3.5%、その他2.9%。脂肪量として30g/体表面積 m^2 が負荷された。

5) 血清脂質、アポ蛋白の測定

TCおよびTGは酵素法により測定した。HDL-C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-C値はFriedewaldの式を用いて計算した。

6) RLP-CおよびRLP-TGの測定

JIMRO-II(日本抗体研究所)測定キットを使用した。すなわち、抗アポA-Iおよび抗アポB-100モノクローナル抗体の混合ゲル300 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-C)およびトリグリセリド(RLP-TG)を測定した。カットオフ値は7.5mg/dlとした。

7) 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。

3. 結 果

1) CAD群および対照群の特徴の比較(表)

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 \pm 9歳、対照群65 \pm 11歳、BMIはCAD群23.5 \pm 3.2、対照群22.9 \pm 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)。

2) CAD群および対照群の負荷前の各脂質値の比較(表)

CAD群および対照群ともに、TCおよびRLP-C値の正常例(TC<220mg/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-CはCAD群3.6 \pm 1.2、対照群3.7 \pm 1.4mg/dl(p=0.6742)、RLP-TGはCAD群12.7 \pm 7.4、対照群11.9 \pm 7.4mg/dl(p=0.6545)、TCはCAD群181 \pm 24、対照群188 \pm 21mg/dl(p=0.2692)、HDL-CはCAD群36.6 \pm 12.8、対照群42.5 \pm 12.3mg/dl(p=0.0876)、TGはCAD群116 \pm 43、対照群109 \pm 37mg/dl(p=0.5721)、LDL-CはCAD群121 \pm 26、対照群123 \pm 22mg/dl(p=0.7401)、アポA-IはCAD群105 \pm 25、対照群115 \pm 20mg/dl(p=0.1272)、アポA-IIはCAD群28.4 \pm 6.6、対照群27.8 \pm 4.0mg/dl(p=0.6538)、アポBはCAD群98 \pm 20、対照群98 \pm 17mg/dl(p=0.9533)、アポC-IIはCAD群3.9 \pm 1.7、対照群3.5 \pm 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1)

CAD群および対照群の負荷前RLP-C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よりも有意な増加を認めた($p=0.0141$)。

同様に、CAD群および対照群の負荷前RLP-TG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よりも有意な増加を認めた($p=0.0031$)。

4) CAD群および対照群の負荷後TC、TGおよびHDL-C値の増加の比較(図2)

CAD群および対照群の負荷前TG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、対照群よりも有意な増加を認めた($p=0.0012$)。

負荷後のTCおよびHDL-C値の変化は両群で有意差を認めなかった(TC: $p=0.1157$ 、HDL-C: $p=0.6255$)。

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3)

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、アポBおよび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。

4. 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TC血症(高LDL-C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-C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-C血症を伴うとはかぎらず、高LDL-C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-C血症を伴わない例が少なくないことから、高LDL-C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(Framingham Heart Study、Clinical Chemistry、1998)。また、前年度の健常例を用いた検討により、RLPは脂肪負荷により著明な増加を認め、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TC値およびRLP-C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TC(LDL-C)、TG、HDL-C、RLP-C、RLP-TG、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-CおよびRLP-TG値の有意な増加を認めた。

この結果から、高LDL-C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、TG、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な増加を認めた。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

前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時間まで経過観察した方がより感度が増加すると思われた。

3) 負荷脂肪としてのOFTTクリーム の有用性

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。共同研究している他の施設から、健常例を対象に便通異常と脂肪負荷量との関係を検討した結果、17g/体表面積 m^2 以下では全く異常を認めないことが示された。

5. 結 論

高LDL-C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。

6. 結果の発表

今回の検討結果の1部は、1998年の日本動脈硬化学会総会(6月)、日本動脈硬化学会冬季大会(12月)、米国臨床生化学会(シンポジウム、8月)において、発表し、現在、論文投稿中である。

なお、健常例を対象とした平成9年度の検討結果は、Clin. Chim. Acta 275 : 43-52, 1998 (Tanaka A, et al : Measurement of postprandial remnant like particles (RLP) following a fat loading test) に発表された。

7. 今後の研究計画

われわれの例を含めた健常例、疾患例(CAD、糖尿病、肥満など)についての脂肪負荷試験の検討は、全国9施設で行われ、今後、研究会を通じて全体としての結果をまとめる予定である。

これまでの検討から、負荷脂肪量(OFTTクリーム)17g/体表面積 m^2 以下では便通異常が認められないことが示されたが、健常例で17g/体表面積 m^2 の脂肪負荷試験を行い、これまでの30g/体表面積 m^2 と比較する。

平成10年度から、スウェーデン、米国、カナダとの食後高脂血症に関する共同研究を開始しているが、これまでの検討から、日本人健常例のRLP値が欧米人に比較して低値であることが示されている。この原因を共同のプロトコルを用いた研究により解明する。この研究はすでに開始されており、一部は、1999年8月に米国臨床生化学会にて発表予定である。

CADについては、脂肪負荷試験で6時間まで経過観察したCAD例を増加し、4時間までの場合とRLPの感度を比較する。また、PTCA後の再狭窄の有無と脂肪負荷後のRLP増加との関連、複数回の冠動脈造影による冠動脈狭窄度の変化と脂肪負荷後のRLP増加との関連を検討する。

表 冠状動脈硬化症(CAD)群と対照群(Control)の特性の比較

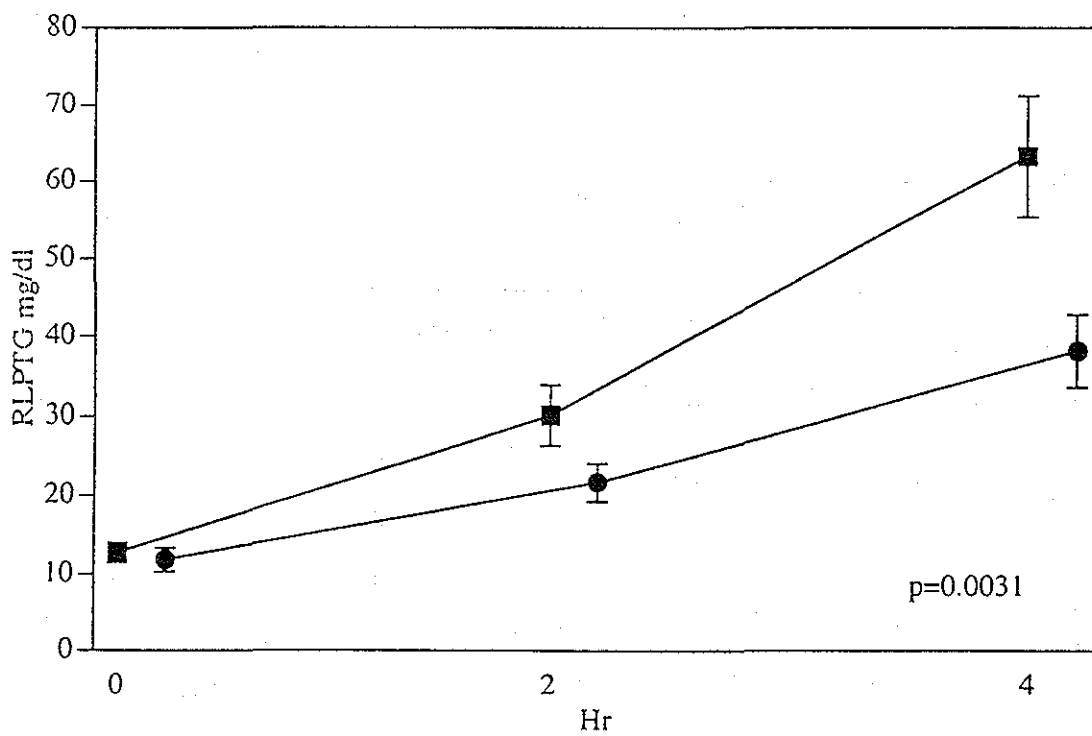
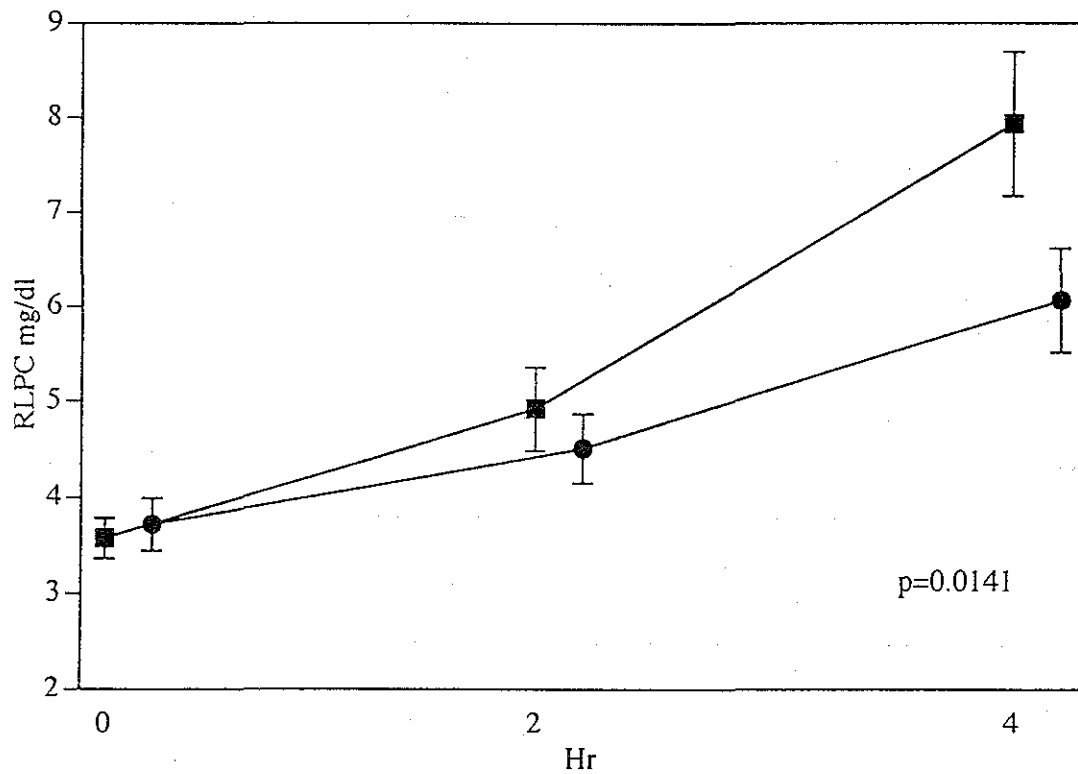
	CAD(n=33)	Control(n=24)	p
Age (yrs)	62±9	65±11	0.1602
Sex(M/F)	28/5	10/14	0.0014*
BMI	23.5±3.2	22.9±3.4	0.4835
Smoker	15	5	0.0908
Diabetes Mellitus	10	2	0.0549
RLP-C (mg/dl)	3.6±1.2	3.7±1.4	0.6742
RLP-TG (mg/dl)	12.7±7.4	11.9±7.4	0.6545
TC (mg/dl)	181±24	188±21	0.2692
TG (mg/dl)	116±43	109±37	0.5721
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

図1. 冠状動脈硬化症 (CAD) 群と対照群 (Control) における脂肪負荷前後のRLP-CおよびRLP-TGの変化



■ Coronary Artery Disease ● Control Mean±S.E.

図2. 冠状動脈硬化症(CAD)群と対照群(Control)における脂肪負荷前後のTC、TGおよびHDL-Cの変化

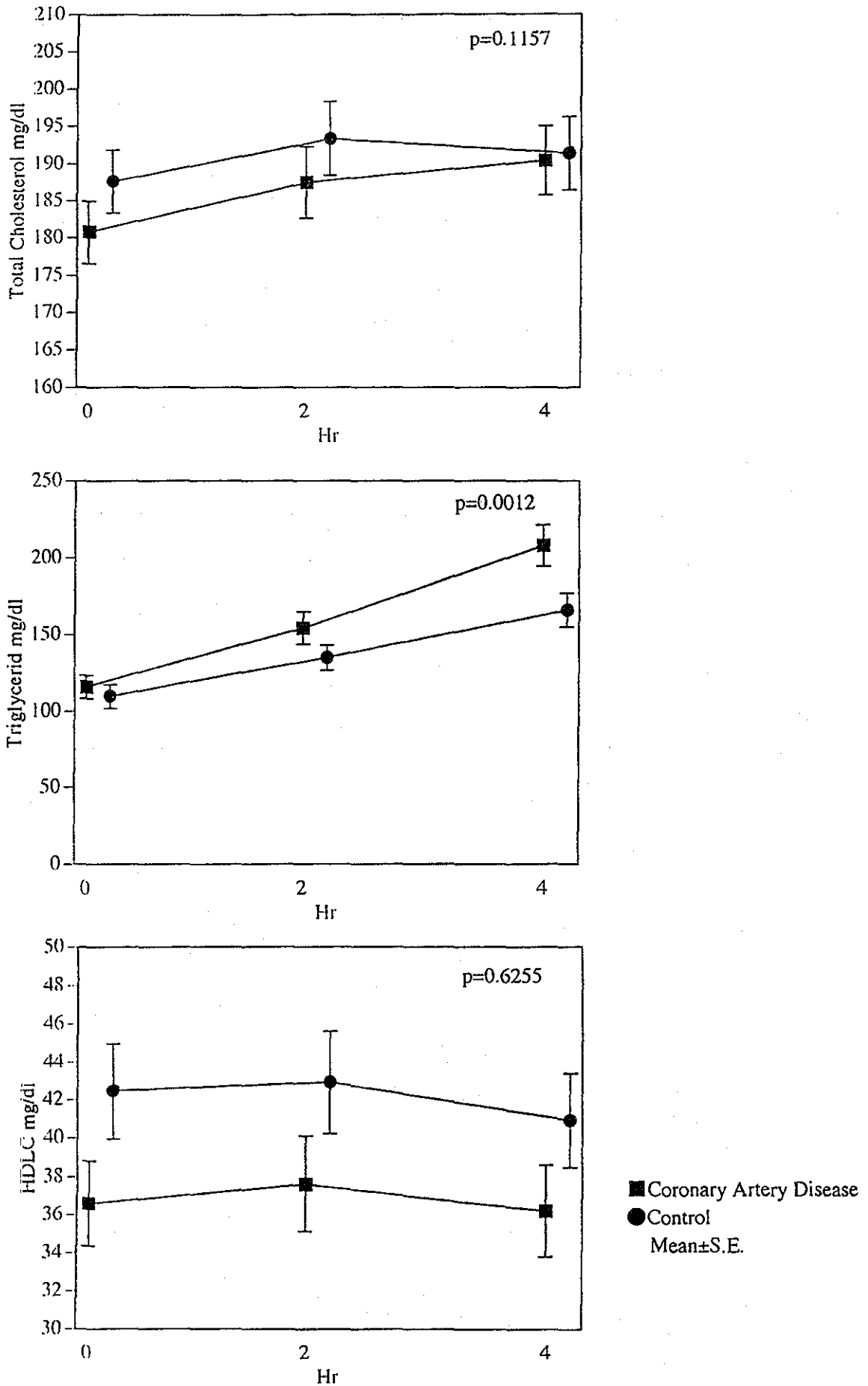


図3. 冠状動脈硬化症(CAD)群と対照群(Control)における脂肪負荷前後の各アポ蛋白値の変化

