

カルシウム摂取量と動脈硬化

—カルシウム摂取量と酸化低比重リポ蛋白(LDL)との関連について—

大阪市立大学医学部第二内科 助教授 西 沢 良 記
庄 司 哲 雄
絵 本 正 憲
川 岸 隆 彦
教 授 森 井 浩 世

要 旨

動脈硬化と骨粗鬆症との関連が以前から指摘されているが、これら二つの病態を関係づけている要因については十分理解されていない。今回、カルシウム摂取量の動脈硬化への影響をみるため、カルシウム摂取量と酸化LDLおよび他の危険因子との関連を検討した。

対象は、虚血性心疾患や末梢動脈疾患のない検診受診者271名で、カルシウム摂取量の調査を行った。酸化LDLについては、血漿より分離したLDLの試験管内被酸化性(LDL Lag time)、血漿酸化LDL濃度(oxLDL)、IgGクラスの血清抗酸化LDL自己抗体価(oxLDL Ab)を測定した。また、超音波Bモード法により、頸動脈内膜中膜肥厚度(CA-IMT)を計測し、動脈硬化の指標とした。

カルシウム摂取量はLDL Lag timeやoxLDL Abとは有意な関連を示さなかったが、血漿oxLDL濃度とは弱い負の相関傾向を示した。血漿oxLDL濃度に影響する因子を重回帰分析すると、年齢とLDLコレステロールが正の、カルシウム摂取量が負の有意な関連を示した。また、カルシウム摂取量はHDLコレステロールと有意な正相関を示し、この関係は重回帰分析においても有意であった。CA-IMTに影響する因子を重回帰分析したところ、年齢、血圧、NonHDLコレステロールが正の、HDLコレステロールが負の関連を示したが、カルシウム摂取量の独立した関与は認められなかった。

以上より、カルシウム摂取量の多いものほど血漿oxLDL濃度が低く、HDLコレステロールが高いことが示された。今回の成績から、十分なカルシウム摂取は、単に骨粗鬆症のみではなく、動脈硬化に対しても好影響を及ぼしうるものと考えられた。

緒 言

動脈硬化の発症進展における血漿リポ蛋白の意義は確立され、リポ蛋白のうち、低比重リポ蛋白(LDL)の動脈硬化促進性が重要視され、酸化変性がLDLの動脈硬化促進性を更に増すことが注目されている。LDLは動脈壁内皮下腔で酸化され、マクロファージのスカベンジャー受容体、CD36、マクロサイアリンなどの酸化LDL受容体により取り込まれ、マクロファージの泡沫細胞化、従って動脈硬化

病変の形成を促進させる。

LDLの酸化をヒトで評価する方法として、血清過酸化脂質の測定が試みられるが、測定法によっては特異性に問題があると指摘されている。血漿からLDLを分離し、試験管内酸化に対する抵抗性をみる方法[1]も報告されているが、生体内の状態をどの程度反映するのか不明である。酸化変性したLDLは新たな抗原性を獲得し、それに対する液性および細胞性免疫反応が誘導されるため、血清中の抗酸化LDL自己抗体価を測定する方法が、生体内でのLDLの酸化についての情報となると期待されている。冠動脈疾患[2]、重症の頸動脈硬化症[3]、早発性末梢動脈硬化症[4]の患者で、抗酸化LDL自己抗体価の上昇が報告されている。更に最近になり、酸化LDLに存在する酸化フォスファチジルコリンを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体が作成され[5]、これを用いた高感度ELISA[6]により、血漿中の酸化LDLが検出可能になっている。

ところで、骨粗鬆症と動脈硬化症がしばしば併存することが、以前から指摘されており、骨代謝あるいは関連因子と動脈硬化との相互関連が示唆されている。例えば、骨代謝が大きく変化する慢性腎不全患者では、カルシウム・リン代謝や骨代謝が脂質代謝[7]、動脈壁肥厚度[8,9]と密接に関連していることが示されている。骨粗鬆症の予防として十分量のカルシウム摂取が奨励されるが、現在のところカルシウム摂取量と血清脂質、LDLの酸化変性、動脈硬化との関係は、必ずしも明らかではない。

今回の研究では、カルシウム摂取量が骨粗鬆症以外の疾患、特に動脈硬化症に対して関与しうる可能性を検討する目的で、カルシウム摂取量と酸化LDLや他の動脈硬化危険因子との関連を検討した。

対象と方法

■対象

大阪地区の健康増進プログラムへの参加者のうち、虚血性心疾患がなく末梢動脈硬化症のない者から希望者を募り、271名が本研究に参加した(表1)。

■栄養摂取調査

独自に作成した質問票を用いて各自の平均的な食品摂取状況を調査し、パーソナルコンピュータを用いて集計し、日本食品成分表(四訂)に基づきカルシウム摂取量を算定した。

■採血

朝空腹時に採血を行い、血清およびEDTA血漿を分離し、以下の測定に供した。

■血清脂質濃度

総コレステロール、トリグリセライドは市販のキットを用い酵素法で測定した。HDLコレステロールは、沈殿法により上清のコレステロールを酵素法で測定して求めた。

■LDLの試験管内酸化抵抗性の測定

LDLの試験管内酸化抵抗性はEsterbauerらの方法[1]にて求めた。EDTA血漿からLDL分画(比重1.019~1.063g/mL)を段階的超速心法にて分離し、EDTA不含PBSにて透析した。最終濃度がLDL

50 μ g蛋白/mL、硫酸銅2 μ mol/LになるようにPBS溶液を調整し、石英セルの中で37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、234nmの吸光度を経時的にモニターした。吸光度が急激に上昇するまでの時間(Lag time)を測定した。

■血漿酸化LDL濃度測定

血漿中の酸化LDLは酸化LDLを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体[5]を用いたELISA [6](ベッセルリサーチラボラトリー社、群馬県)により定量した。マウスモノクローナル抗体を固相化した96穴プレートに血漿を添加し、酸化LDLをプレートに捕捉した。十分な洗浄の後、酵素標識抗ヒトアポBポリクローナル抗体を添加した。洗浄後、発色基質を添加し発色させ、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで計測した。標準曲線から、酸化LDL濃度を求めた。

■血清抗酸化LDL自己抗体価測定

血清抗酸化LDL自己抗体価はBiomedica社(オーストリア)製のELISAを用いて測定した。まず、銅イオンにより酸化させたLDLが固相化された96穴プレートに、予め希釈された血清を添加し、酸化LDLを認識する抗体をプレートに結合させた。十分に洗浄したのち、酵素標識抗ヒトIgGポリクローナル抗体を添加した。十分に洗浄したのち、発色基質を添加し発色させ、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで計測した。標準曲線から、血清の抗酸化LDL自己抗体価を求めた。

■頸動脈内膜中膜肥厚度(CA-IMT)計測

頸動脈内膜中膜肥厚度(CA-IMT)は、超音波Bモード断層法[8,9]により計測した。

■統計解析

調査したデータはパーソナルコンピューターにて集計し、平均値 \pm 標準偏差(SD)と範囲にて要約した。群間の平均値の差は、分散分析により検定した。変数どうしの関連は、単回帰あるいは重回帰分析により検定した。いずれの場合も、危険率 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

■カルシウム摂取量

カルシウム摂取量の現状について、男女比較を図1に示す。男性では 670 ± 189 mg/day(平均 \pm 標準偏差)であったのに対し、女性では 773 ± 240 mg/dayであり、女性でよりカルシウム摂取量が多かった($P = 0.0003$)。

カルシウム摂取量の年齢による変化を図2に示す。男女とも高齢者ほどカルシウム摂取量が増加していた(男、 $P = 0.011$; 女、 $P = 0.013$)。

■頸動脈内膜中膜肥厚度

動脈硬化の指標として計測したCA-IMTは、年齢と有意な正の相関関係を示した($r = 0.222$ 、 $P = 0.0003$; 図3)。

■カルシウム摂取量と酸化LDL諸指標との関係

カルシウム摂取が動脈硬化に与える影響をみるため、カルシウム摂取量と酸化LDL諸指標との関係を重回帰分析した(図4)。カルシウム摂取量は、LDLの試験管内酸化のLag timeや血清oxLDL Ab価とは有意な相関を示さなかった。一方、カルシウム摂取量と血漿oxLDL濃度との間に負の相関傾向($r = -0.11$, $P = 0.07$)が認められたが、統計学的にはボーダーラインの有意水準であった。

血漿oxLDL濃度は種々の要因により影響されると考えられるため、血漿酸化LDL濃度に影響する因子を重回帰分析により検討した(表2)。血漿酸化LDL濃度は、年齢およびLDLコレステロール値と独立した正の関連性を示し、またカルシウム摂取量と負の独立した関連性を示した。

■カルシウム摂取量と動脈硬化危険因子との関係

カルシウム摂取量と動脈硬化の危険因子との関係を重回帰分析した(表3)。カルシウム摂取量は血圧やNonHDLレベルとは有意な相関を示さなかったが、喫煙指数($p = -0.120$, $P < 0.05$)やHDLコレステロール($r = -0.164$, $P = 0.007$)と有意な正相関を示した。

カルシウム摂取量とHDLコレステロールとの関連の独立性を検討するために、重回帰分析を行った(表4)。HDLコレステロールとカルシウム摂取量との間に、年齢、性別、喫煙、Body mass index (BMI)、ウエスト/ヒップ比(W/H比)とは独立した、有意な関連が認められた。

■頸動脈内中膜肥厚度に影響する因子の重回帰分析

カルシウム摂取が動脈硬化へ与える影響をみるために、CA-IMTに影響を与える因子を重回帰分析した(表5)。その結果、年齢、収縮期血圧、NonHDLが独立した正の関与を示し、HDLが独立した負の関与を示したが、カルシウム摂取量とCA-IMTとの関係は有意ではなかった。

考 察

本研究では、カルシウム摂取が動脈硬化を抑制する可能性について、カルシウム摂取とCA-IMTおよび酸化LDL関連の諸指標との関係を、明らかな動脈硬化症をもたない検診受診者にて検討した。カルシウム摂取量の多いものほど血漿oxLDL濃度が低値であり、またHDLコレステロールが高値でかつ喫煙指数が低いとの関係が認められた。従って、十分なカルシウム摂取は動脈硬化の負の危険因子となる可能性が示唆された。

本研究の特徴のひとつは、酸化LDL関連の指標として、血漿oxLDL濃度、血清oxLDL Ab、血漿LDLの試験管内酸化抵抗性(Lag time)を同時に検討していることである。これらの諸指標の臨床的意義は必ずしも明らかではない。動脈壁局所のoxLDLは動脈硬化の病因として重要視されているが、血中の微量のoxLDLが直接に動脈硬化を促進しているとは考えにくい。むしろ、動脈壁のoxLDLが血中にback diffusionしている可能性が高い。実際、冠動脈疾患のうちでもischemic eventを生じているAcute coronary syndrome患者で特に顕著な血漿oxLDL濃度の上昇が認められている[10]。また、血清oxLDL Abは、冠動脈疾患、慢性閉塞性動脈硬化症、頸動脈硬化症の患者で上昇しているとの報告があり、酸化LDL

に対する免疫応答が亢進していることを反映しているものと考えられている。LDLの試験管内酸化のLag timeは、LDLが動脈壁にしみ込んだ後、局所で酸化されるとき酸化抵抗性を表していると考えられており、Lag timeの短縮は動脈硬化に不利であるとされている。今回の271名の健常者における断面的研究では、CA-IMTはこれら3つの指標のいずれとも有意で独立した関連を示さなかった。動脈の形態的变化は数十年におよぶ経過の蓄積を表すため、断面調査では有意な関連が検出できなかった可能性がある。更に大規模な調査を実施するか、経年的検討を行う必要があるのかもしれない。

しかしながら、血漿oxLDL濃度に影響する因子として、年齢が正の関連を示し、血清oxLDL Ab価とカルシウム摂取量が負の関連を示したことが注目される。血漿のoxLDLが動脈壁からのback diffusionを表している[10]とすると、血漿oxLDL濃度と血清oxLDL Ab価との逆相関から、血中のoxLDLのクリアランスにoxLDL Abが関与している可能性が考えられる。実験動物において、血中に投与されたoxLDLは速やかに肝臓に取り込まれ、その大部分はKupffer細胞に取り込まれる[11]。Kupffer細胞はClass A Scavenger受容体(SR-A)以外に、oxLDLとoxLDL Abの免疫複合体を認識するIgG Fc受容体ももっている[12]。SR-Aのノックアウトマウスでは血中からのoxLDLのクリアランスが低下していない[11]ことから、oxLDL AbがoxLDLのクリアランスに関与していることが考えられ、今回の成績もこの仮説を支持するものである。

また、カルシウム摂取量と血漿oxLDL濃度の逆相関から、カルシウム摂取が動脈からのoxLDL back diffusionまたはoxLDLのクリアランスのいずれかに関係していることが示唆される。現在のところ、カルシウムと動脈壁プラーク安定性やKupffer細胞機能との関連は不明であるが、カルシウムが動脈壁のプラーク安定性に関与しているとする、十分なカルシウム摂取が動脈硬化によるeventに対して抑制的に作用する可能性があり、今後の重要な検討課題となると考えられる。

本研究では、カルシウム摂取量は男性より女性で多く、女性では高齢者ほど多いとの関係が有意であり、通常の食生活から予想されるのとは一見逆の結果のように思われる。しかしながら、骨粗鬆症に対する関心は男性より女性が高く、若年より高齢で高まるため、高齢女性でより積極的にカルシウムが摂取されていることを反映していると考えられる。

今回の調査では、カルシウム摂取量は喫煙指数と有意な逆相関を、HDLコレステロールと有意な正相関を示した。これらの機序として、カルシウム摂取量が女性で多く、女性で喫煙が少ないこと、女性でHDLコレステロールが高いことがあって、見かけ上の関係をみている可能性はある。しかしながら、カルシウム摂取量とHDLコレステロールとの正相関関係は、重回帰分析にて年齢、性別、喫煙、体脂肪(BMI)、体脂肪分布(W/H比)を考慮しても、有意で独立したものであった。摂取されたカルシウム、あるいはカルシウムとともに摂取された何らかの栄養素がHDLコレステロールを上昇させている可能性がある。ベルギーからの報告[13]では、血中25(OH)D3レベルがHDLコレステロールやアポA-Iと正の相関を示しており、また、我々[7]は、慢性腎不全透析患者の血中イオン化カルシウム濃度とHDL代謝関連の肝性トリグリセライドリパーゼ(HTGL)やレシチンアシル転位酵素(LCAT)活性が関連することを示しており、カルシウムとHDL代謝の関連が示唆されている。

以上、本研究ではカルシウム摂取量と動脈硬化あるいはその危険因子との関連を検討し、カルシウム摂取量と血漿oxLDL濃度やHDLコレステロールとの独立した関連を見いだした。その機序は必ずしも明らかではないが、カルシウム摂取と動脈硬化の関連について、今後更なる研究が期待される。

文 献

1. Esterbauer H, et al. *J Lipid Res* 28 : 495-509, 1987
2. Virella G, et al. *Int J Clin Lab Res* 23 : 95-101, 1993
3. Maggi E, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14 : 1892-1899, 1994
4. Bergmark C, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 441-445, 1995
5. Itabe H, et al, *J Biol Chem* 269 : 15274-15279, 1994
6. Itabe H, et al, *J Lipid Res* 37 : 45-53, 1996
7. Shoji T, Nishizawa Y, et al. *Kidney Int* 41 : 1653-1661, 1992
8. Kawagishi T, Nishizawa Y, et al. *Kidney int* 48 : 820-826, 1995
9. Nishizawa Y, Morii H. *Osteoporos Int* 7(Suppl. 3) : S188-S192, 1997
10. Holvoet P, et al. *Circulation* 98 : 1487-1494, 1998
11. Ling WH, et al. *J Clin Invest* 100 : 244-252, 1997
12. Lopes-Virella MF, et al. *Atherosclerosis* 135 : 161-170, 1997
13. Auwerx J, et al. *Arterioscler Thromb* 12 : 671, 1992

表1 対象のプロフィール

	平均±標準偏差 (範囲)
人数 (男/女)	271 (99/172)
年齢 (歳)	54.2±9.7 (24-77)
喫煙指数 (本数・年)	167±335 (0-2000)
収縮期血圧(mmHg)	128±19 (89-182)
拡張期血圧(mmHg)	82±44 (53-113)
総コレステロール(mg/dL)	208±34 (112-336)
トリグリセライド(mg/dL)	112±72 (31-574)
HDLコレステロール(mg/dL)	65±18 (32-134)
NonHDLコレステロール(mg/dL)	143±36 (64-264)

表2 血漿酸化LDL濃度に影響を与える因子の重回帰分析

説明変数	標準偏回帰係数 (β)
年齢	0.147*
性別 (女=1 ; 男=2)	-0.040
喫煙指数	0.021
HDLコレステロール	0.093
LDLコレステロール	0.199*
カルシウム摂取量	-0.171**
寄与率 (R^2)	0.118***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$

表3 Ca摂取量と動脈硬化危険因子との単相関

	相関係数(r)	危険率(P)
収縮期血圧	0.033	0.592
喫煙指数	-0.120	0.049
総コレステロール	0.115	0.059
トリグリセライド	-0.037	0.549
HDLコレステロール	0.164	0.007
NonHDLコレステロール	0.030	0.621

表4 HDLコレステロールに影響を与える因子の重回帰分析

説明変数	標準偏回帰係数 (β)
年齢	-0.009
性別 (女=1 ; 男=2)	-0.035
喫煙指数	-0.142*
BMI	-0.161**
W/H比	-0.235**
カルシウム摂取量	0.135*
寄与率 (R^2)	0.200***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$

表5 CA-IMTに影響を与える因子の重回帰分析

説明変数	標準偏回帰係数 (β)
年齢	0.164**
性別 (女=1 ; 男=2)	0.029
喫煙指数	0.061
収縮期血圧	0.115*
HDLコレステロール	-0.122 [#]
NonHDLコレステロール	0.130*
カルシウム摂取量	0.055
寄与率 (R^2)	0.123***

* $P=0.06$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$

図1 男女別カルシウム摂取量の分布

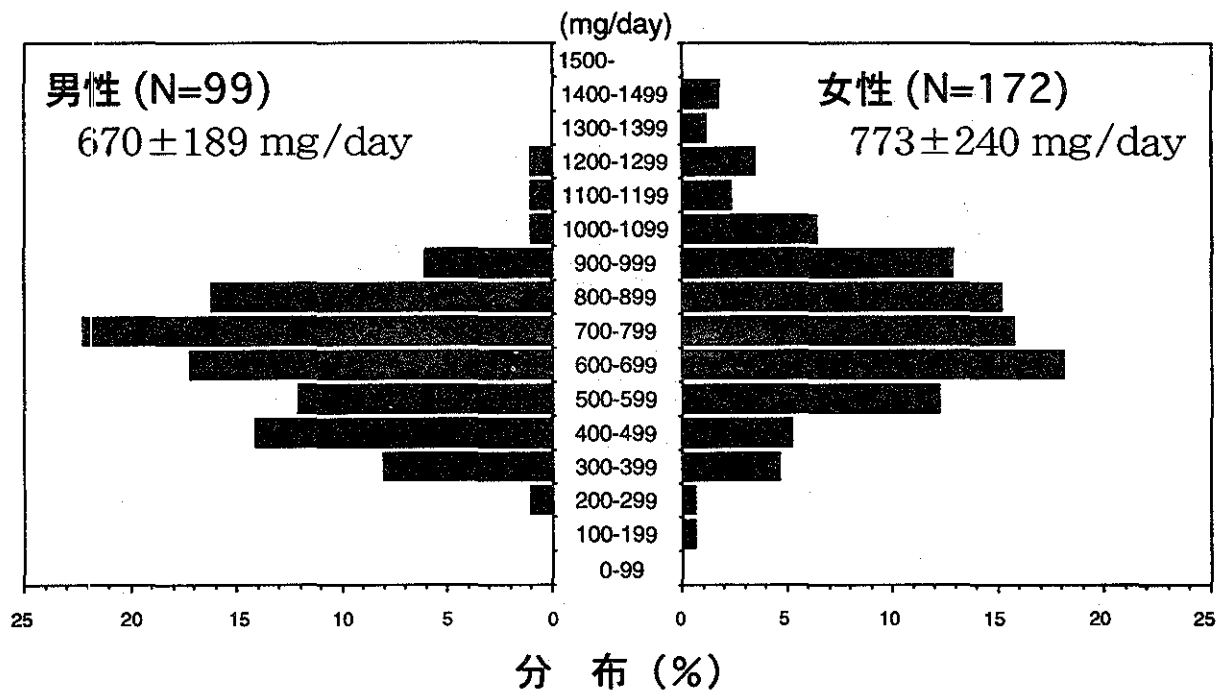


図2 年齢とカルシウム摂取量の関係

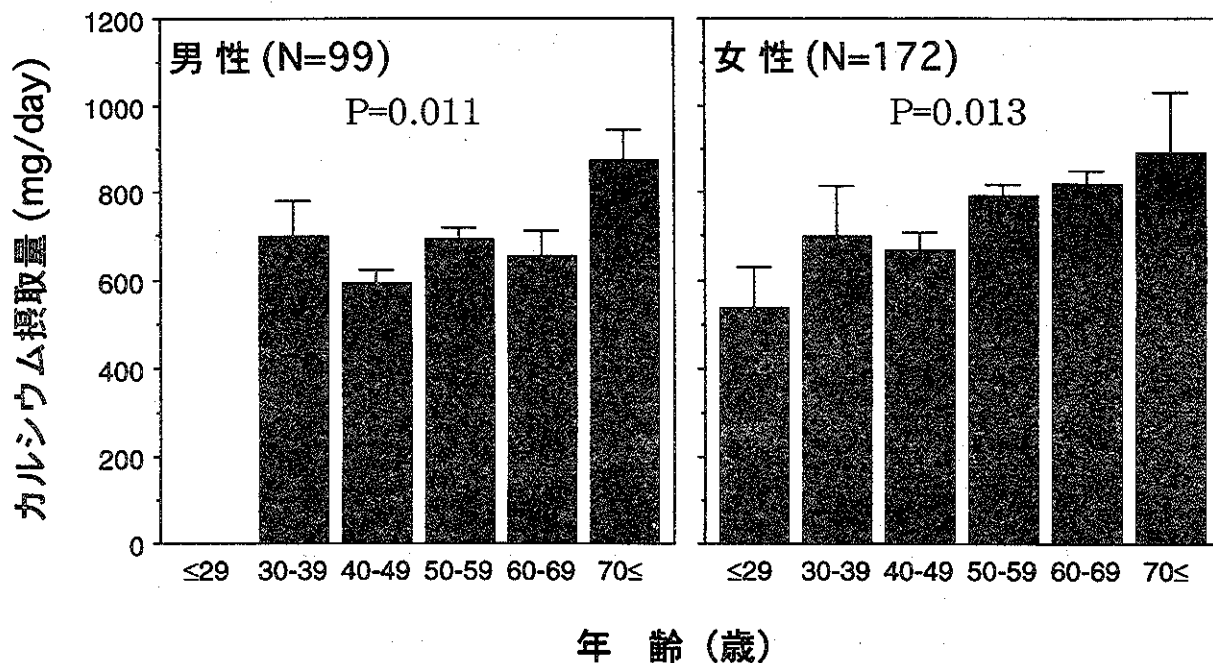


図3 頸動脈内膜中膜肥厚度(CA-IMT)と年齢の関係

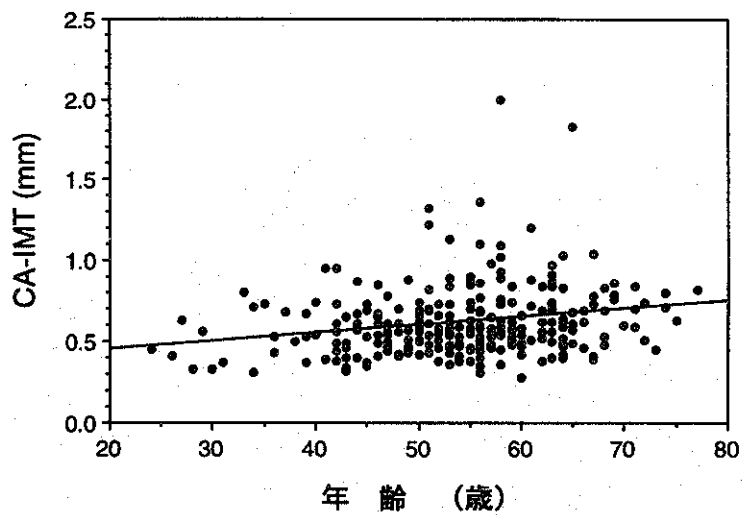


図4 カルシウム摂取量と酸化LDL関連諸指標の関係

