

2

2. 診断 運動耐容能の評価

財団法人日本心臓血圧研究振興会附属榊原記念病院 副院長 伊東春樹 循環器内科 部長 長山雅俊

はじめに

従来より心機能不全の重症度として心拍出量、左室駆出分画などが用いられてきたが、これら安静時の心機能指標は、必ずしも心不全患者の活動能力と相関しないことが知られている。

一方、慢性心不全患者では労作時呼吸困難感や易疲労感などの症状のため運動耐容能の低下が見られ、これを評価するため、New York Heart Association (NYHA) の心機能分類や身体活動指数 (specific activity scale : SAS) が用いられてきた。これらは患者の自覚的な身体活動能力に基づいている点で重要であるが、定量性や客観性に欠ける。従って心不全患者における心予備能や活動能力、あるいは生活の質 (quality of life ; QOL) を客観的かつ定量的に評価するためには運動負荷試験が必要となる。特に 1991 年 Mancini ら¹⁾ が心移植適応基準に最高酸素摂取量 (peak $\dot{V}O_2$) の導入を提唱して以来、心不全の臨床における運動負荷試験の有用性が確立した。

1. 慢性心不全患者の運動制限因子

運動制限は慢性心不全患者の病態を特徴付ける重要な症候であり、易疲労性と呼吸困難感が主たる症状である。

その運動制限因子は、

- ①心拍出量の減少や貧血による酸素輸送量の制限、
- ②換気亢進や肺毛細管圧上昇、化学受容体の感受性亢進、呼吸筋疲労などによる息切れや呼

吸困難感、

- ③骨格筋肉量減少、酸素利用能低下や筋力低下などがあり、これらはいずれも易疲労性や労作時息切れなどを引き起こし、運動耐容能を低下させる。

酸素輸送量の減少は心機能障害発生時の主たる制限因子であり、比較的軽症の慢性心不全例での運動制限因子は健常例と同様に酸素輸送能 (≡心拍出量) であるが、重症の慢性心不全例では末梢の酸素利用能、すなわち活動筋の質と量が運動制限因子と考えられている。

これらは薬物療法の運動耐容能に対する急性効果を見ると理解しやすい。NYHA Class II ~ III の比較的軽症の慢性心不全に PDE 阻害薬を投与すると心拍出量の増加に伴い運動耐容能は改善するが²⁾、重症の心不全に対して塩酸ドブタミンを投与し、心拍出量を増加させても運動耐容能は改善しない³⁾。また罹病期間の長い僧帽弁狭窄症に対して経皮的僧帽弁交連切開術 (percutaneous transluminal mitral commissurotomy : PTMC) を行って心拍出量を増加させても運動能は改善しない事実⁴⁾ は、前述のように運動制限因子は心ポンプ機能ばかりでなく骨格筋など末梢の要素によって異なることを裏付けている。

慢性心不全の運動耐容能評価

1. 6分間歩行試験

特殊な設備が不要で、簡便な運動耐容能評価

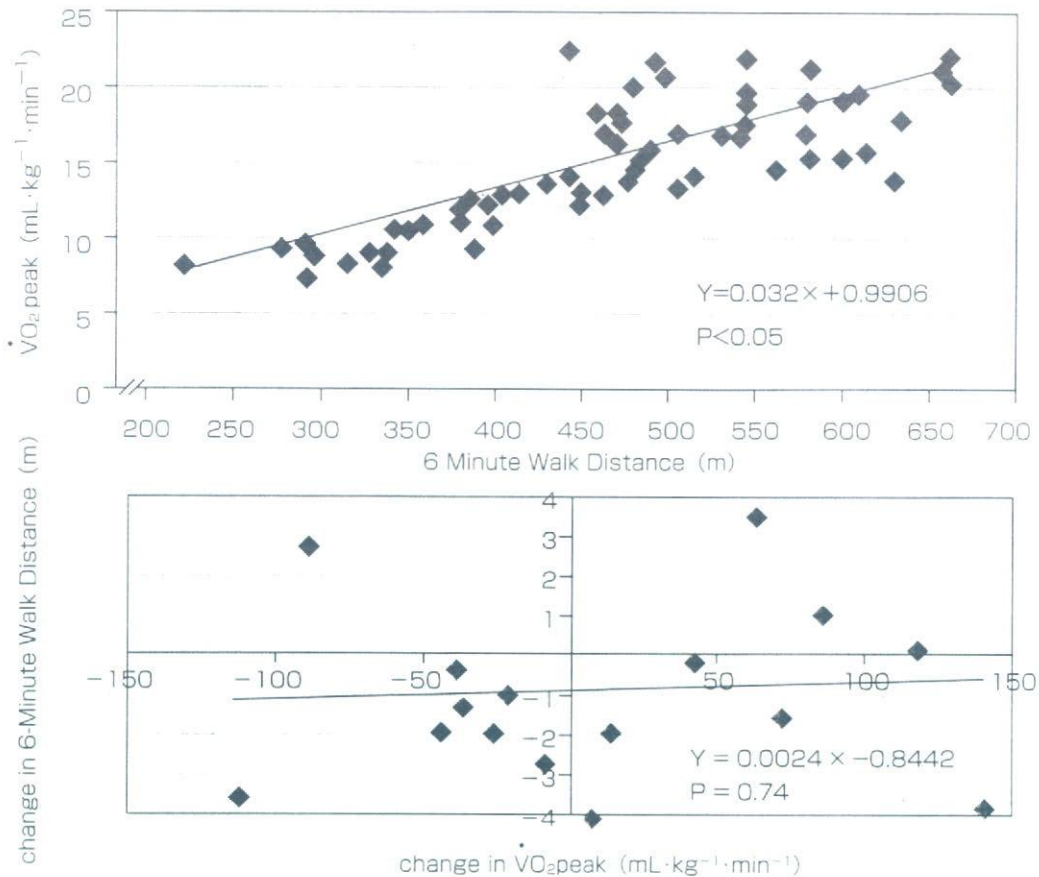


図1 最大運動能と6分間歩行距離との関係

peak $\dot{V}O_2$ と6-min walk は横断的には有意な正相関があるが(上段)、個々の患者でのそれぞれの変化量にはまったく関連はない(下段)。従って、治療の効果判定などには不向きとされる⁷⁾

として呼吸不全の患者で良く用いられてきた方法で、一定時間の最大努力による歩行可能距離を測定する方法である。多くは6分間を採用し、できる限り長い距離を歩くよう被験者に指示する。つまり、基本的には最大負荷試験の1つである。横断的検討ではこの検査で得られた歩行距離とNYHA心機能分類やPeak $\dot{V}O_2$ と相関するとされる⁵⁾。SOLVED (Studies of Left Ventricular Dysfunction) のsub-studyでも、6分間歩行試験の安全性が確認され、歩行距離が300m以下の患者の死亡率10.23%に比べ、450m以上の患者では2.99%と有意に死亡率が

低かったとしている⁶⁾。

しかし、この指標は「最大負荷試験」といいながら、患者はいつもの歩行速度で歩く傾向があり、実は「亜最大負荷試験」であること、再現性が低く最初の3~6回は検査のたびに歩行距離が延長すること、途中で声をかけたり励ましたりすると、明らかに距離が延長すること、従って絶対値には施設間差があり、1人の患者の運動能の変化を見るには不適當などの指摘がある(図1)⁷⁾。さらに、心不全治療薬の二重盲検比較試験においても30件中29件で6分間歩行試験では有意差が出なかった⁸⁾。

2. 心肺運動負荷試験

心不全患者の運動能力を定量的に評価するには、トレッドミルもしくは自転車エルゴメータを用い、呼気ガス分析を併用した心肺運動負荷試験を行う。トレッドミル、エルゴメータのいずれにおいても、最大運動まで8分から10分で到達するプロトコルを選択する。虚血性心疾患のスクリーニングに一般的に用いられている多段階漸増運動負荷法のBruce法は、一段階ごとの負荷量の漸増幅が大きく、第1ステージですでに酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) として約17~18 mL/min/kg (約5METs) 相当の負荷がかかるので、心不全患者には適さない。また換気指標はステージごとに大きく変化するので、呼気ガス分析を目的とした負荷試験としては不向きである。そこで、心不全例にはランプ負荷試験 (ramp protocol: 直線的漸増負荷) を用いる。これは運動強度を直線的に増加させる負荷法で、酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$)、心拍数や血圧の変化が連続的になり、急激な変化がないので安全性も高い。実際には、自転車エルゴメータの場合、0~20 watts、4分間のwarming upに続いて、6秒または3秒に1 watt ずつ増加させる方法を用いる。また、トレッドミルを用いる場合には、速度と傾斜の増加量を組み合わせて運動強度が直線的になるように設計された、トレッドミルランププロトコルを用いる⁹⁾。

1) 最高酸素摂取量 (peak $\dot{V}O_2$ または maximum $\dot{V}O_2$) と最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$ max または maximal $\dot{V}O_2$)

最高酸素摂取量 (peak $\dot{V}O_2$) は特定の運動負荷試験で得られた最大の酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) である。しかし運動終点は検者や被検者の主観に依存するため peak $\dot{V}O_2$ は必ずしも客観的指

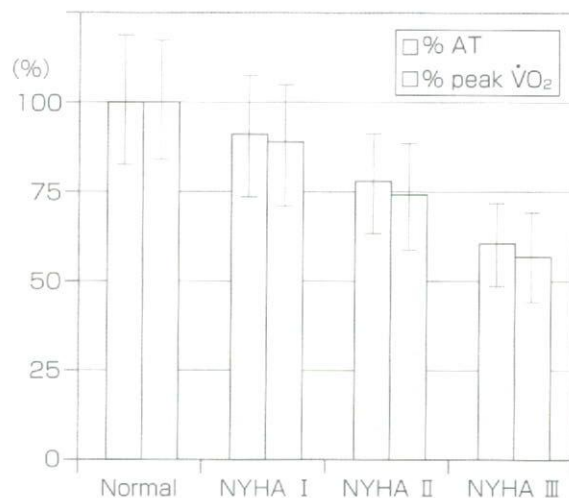


図2 成人健常人の予測ATおよび予測peak $\dot{V}O_2$ に対する実測値の割合

健常者と心疾患患者 (NYHA 心機能分類 I~III) との関連を示す。心不全の程度が強いほど%ATと%peak $\dot{V}O_2$ は低下する (文献3 より引用)

標とはいえ、その評価には負荷中止に至った理由を十分に考慮する必要がある。一方、最大酸素摂取量 $\dot{V}O_2$ max (maximal $\dot{V}O_2$) は負荷量の増加にもかかわらず $\dot{V}O_2$ が増加し得ない状態、すなわち $\dot{V}O_2$ の頭打ちの状態 (leveling off) となった時点での $\dot{V}O_2$ と定義され、個体の持つ最大運動能力を示す客観的指標である。しかし疾患を有する患者で $\dot{V}O_2$ max が得られる強度まで負荷を増量させることは困難なことが多く、臨床では $\dot{V}O_2$ max の代用として peak $\dot{V}O_2$ が用いられている。Peak $\dot{V}O_2$ は年齢、性別に影響されるため、運動耐容能の評価にはそれらを補正した予測 Peak $\dot{V}O_2$ に対する実測値の割合 (% Peak $\dot{V}O_2$) で評価するほうが望ましい (図2)¹⁰⁾。

Peak $\dot{V}O_2$ は活動筋への酸素輸送能と活動筋での酸素利用能により決定される。前者は主に心拍出予備力と血管拡張能、血液の酸素含有量により、後者は活動筋の量と有気的代謝能など

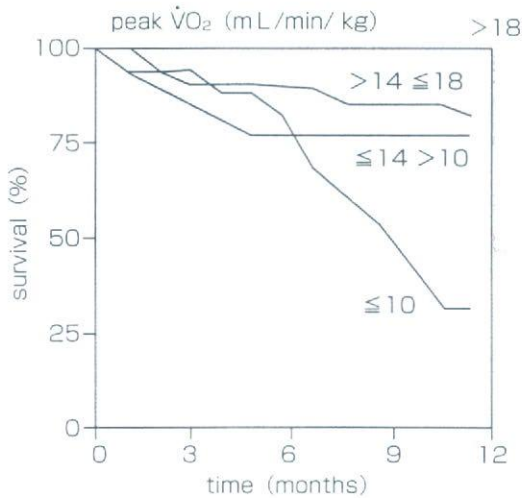


図3 慢性心不全患者におけるpeak $\dot{V}O_2$ と生命予後
(文献1より引用)

に依存する。すなわち心不全患者では peak $\dot{V}O_2$ や AT が低下する機序として、運動中の心拍出量の増加不良、血管内皮障害による血管拡張能の低下、静脈圧の上昇、運動制限による活動筋の筋肉量の減少、慢性の低灌流状態に起因する活動筋ミトコンドリアの数ならびに質の変化、活動筋のエネルギー代謝にかかわる酸化的リン酸化酵素などの酵素活性の低下などが考えられる。また peak $\dot{V}O_2$ が低いほど予後不良であり (図3)、心移植の適応基準の最も重要な指標として用いられている¹¹⁾。

2) AT : anaerobic threshold

ATの基本的概念は Wasserman ら¹¹⁾により「有气的代謝に無气的代謝が加わり、それに関係したガス交換の変化が生じる直前の運動強度または酸素摂取量」と定義されている。すなわち、 O_2 は代謝経路のなかで電子伝達系に入り、 O_2 供給が十分な状態では解糖系により産生されたピルビン酸がアセチル CoA になり TCA 回路 - 電子伝達系で H_2O と CO_2 に分解

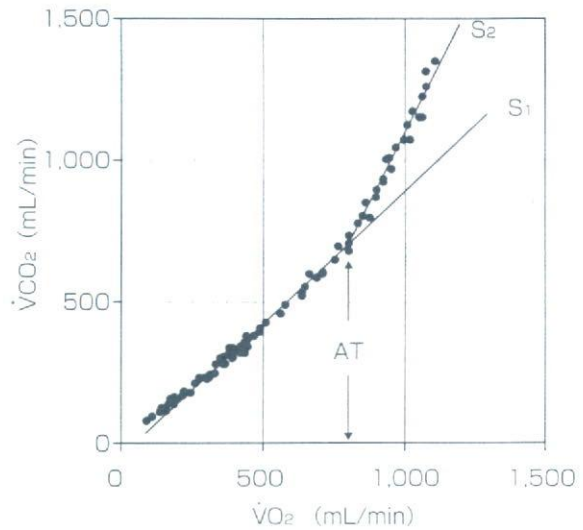


図4 直線的漸増負荷中の酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) と二酸化炭素排出量 ($\dot{V}CO_2$) の関係 (V-slope 法)

される。しかし、運動強度が高くなると、解糖系でのエネルギー代謝亢進により無气的代謝が加わり、ピルビン酸が乳酸になり、乳酸が重炭酸イオン (HCO_3^-) で緩衝されて CO_2 を生じ、二酸化炭素排出量 ($\dot{V}CO_2$) が増加する。AT を求める方法の一つとして V-slope 法¹²⁾ が用いられ、 $\dot{V}O_2$ の増加に対する $\dot{V}CO_2$ の増加率が急峻になる時点の $\dot{V}O_2$ が AT となる (図4)。

ATの正常値は健常例においても年齢、性別、負荷方法により異なる。トレッドミルの方がエルゴメータ負荷よりも10~20%高く、同じ運動様式では男性が女性よりも高く、年齢とともに低下する。年齢、性差で補正した予測ATに対する実測値の割合(%AT)は、NYHA機能分類とよく相関し、心不全が重症化するほど低値を示す¹⁰⁾ (図2)。ATは健常座業成人の場合、最大運動能のおよそ50~60%にあたり、臨床的には日常の活動レベルを表す指標として用いられる。ATレベルの運動は、運動に必要なエネルギーが有气的代謝で供給されるた

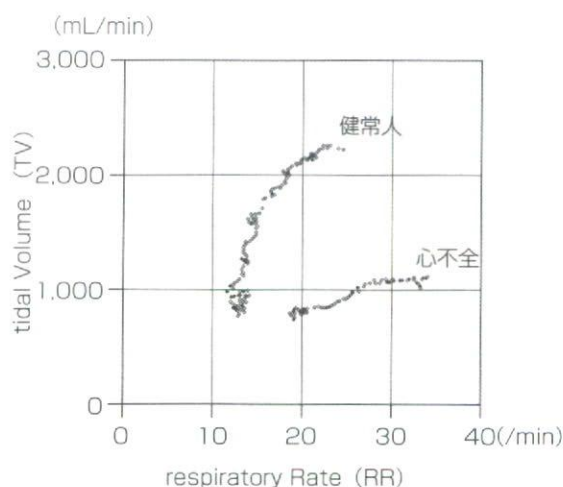


図5 心不全患者におけるrapid and shallow breathing
慢性心不全患者では健常例に比べ運動中の1回換気量の増加は少なく、呼吸数の増加が強い。前者には肺毛細管圧の上昇によるコンプライアンス低下などが関与し、後者には不十分な1回換気量に対する代償機転、J receptor や化学受容体を介する換気中枢刺激などが関与していると考えられる

め長時間運動を継続することができ、カテコラミンの著しい上昇がないため不整脈や著明な血圧上昇が起こりにくい、心筋酸素消費量の増加が少ない、心疾患患者でも左室駆出率の低下が少ない、エネルギー源として脂質の利用が多いなどの理由で心臓リハビリテーションや生活習慣病での運動療法の運動処方に積極的に利用されている。

3) $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope

二酸化炭素排出量 ($\dot{V}CO_2$) の増加に対する換気量 ($\dot{V}E$) の増加率、すなわち換気効率を表す $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope は、心不全が重症になるほど高値を示し、slope が高い症例ほど生命予後が不良であることが報告され^{13, 14)}、近年注目されている指標である。健康人における $\dot{V}E$ は呼吸代償点 (respiratory compensation point; RC point) 以下では動脈血炭酸ガス分圧 ($PaCO_2$)

により調節される。心不全では呼吸パターンの変化と肺の換気血流不均衡が増大し、死腔換気量 ($\dot{V}D$) が増加するにつれて slope は急峻となる。すなわち、心不全では運動中の肺毛細管圧の上昇や肺胞壁・間質の浮腫などによるコンプライアンスの低下を招き、1回換気量の増加を妨げる。そこで $\dot{V}E$ を増加させるためには呼吸数を増加させ、いわゆる浅く早い呼吸 (rapid and shallow breathing pattern) となって、解剖学的死腔に起因する $\dot{V}D$ が増加する (図5)。一方、心不全症例の換気血流不均衡を増大させる因子としては運動中の心拍出量が十分に増加し得ないことによる肺血流量の増加不良⁷⁾ や、血管内皮細胞における一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 合成能の低下により血管拡張能が低下することなどが知られている¹⁵⁾。また Ponikowski ら¹⁶⁾ は、運動耐容能が保持されている ($peak \dot{V}O_2 > 18 mL/min/kg$) 慢性心不全症例においても、 $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope が高値 (> 34) である症例は予後不良であることを報告し、われわれも $\dot{V}E$ - $\dot{V}CO_2$ slope が 40 以上の例ではそれ以下の例に比べて明らかに予後が悪いことを示した (図6)¹⁷⁾。

4) $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$

自転車エルゴメータを用いた ramp 負荷試験で、負荷量 (仕事率) に対する $\dot{V}O_2$ の増加率として算出される。運動中の心拍出量増加の程度、また有気的な運動の効率を表す。年齢や体格による影響は少なく、正常値は 20W/min の ramp 負荷で約 10.4 mL/min/W であるが、異なった ramp プロトコル (漸増負荷強度) 間では比較ができない¹⁸⁾。われわれは心不全患者 (EF < 50%) を平均 1,889 日間追跡したところ、10W/min の ramp 負荷で $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR <$

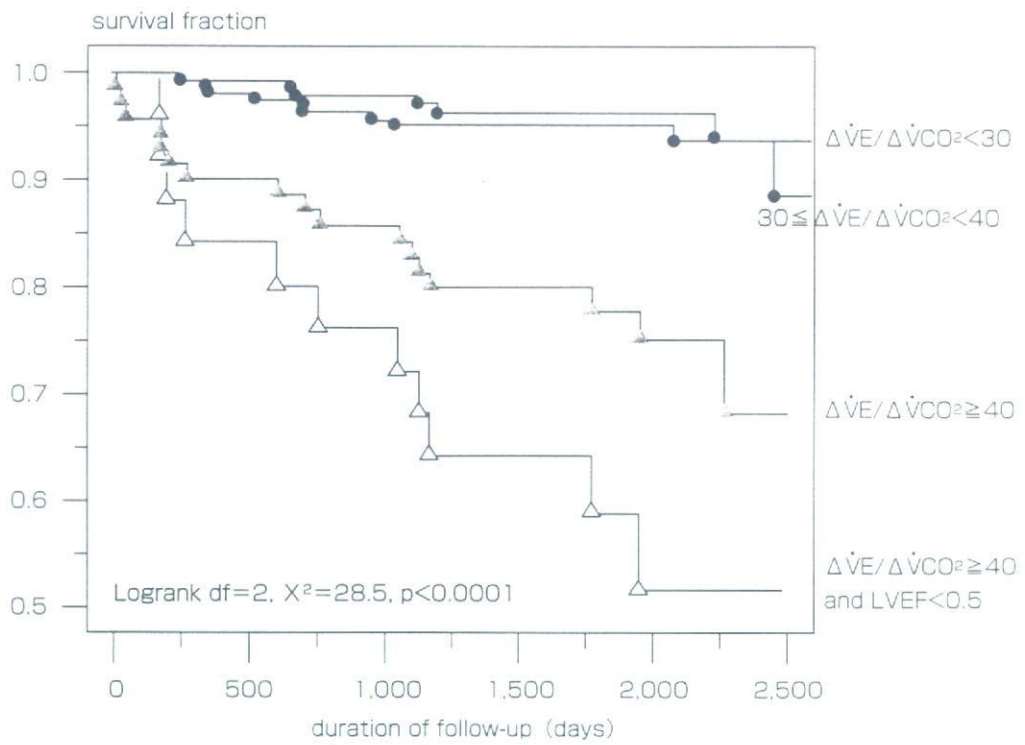


図6 $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope と生命予後 (文献17より引用)

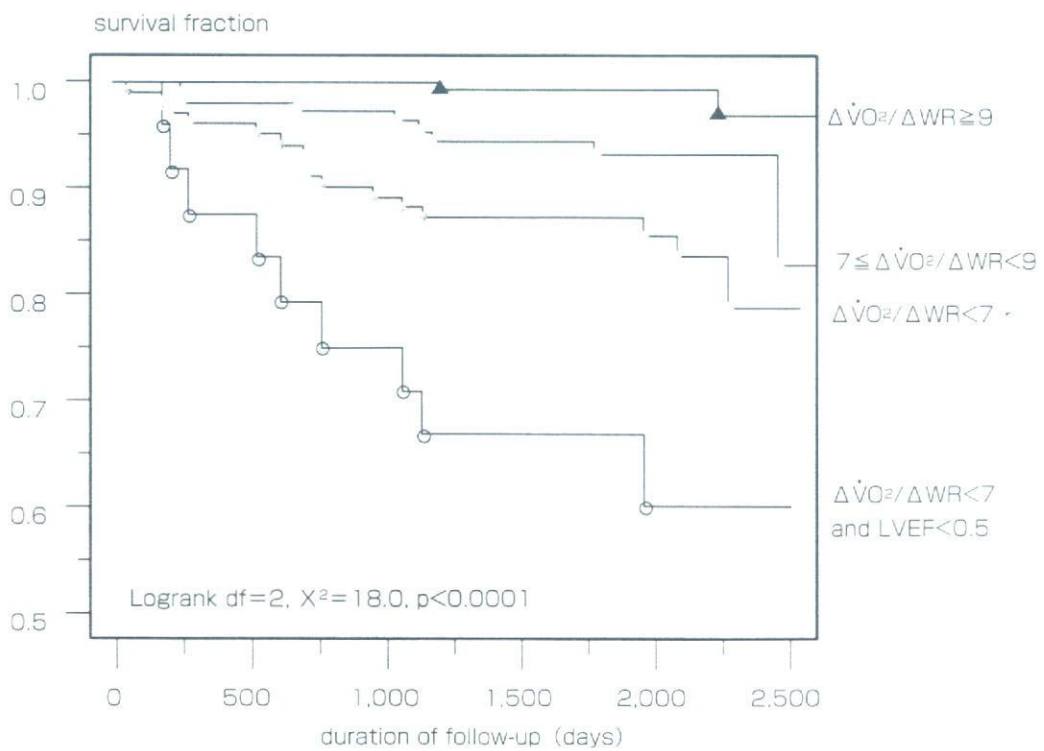


図7 $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$ と生命予後の関係 (文献19より引用)

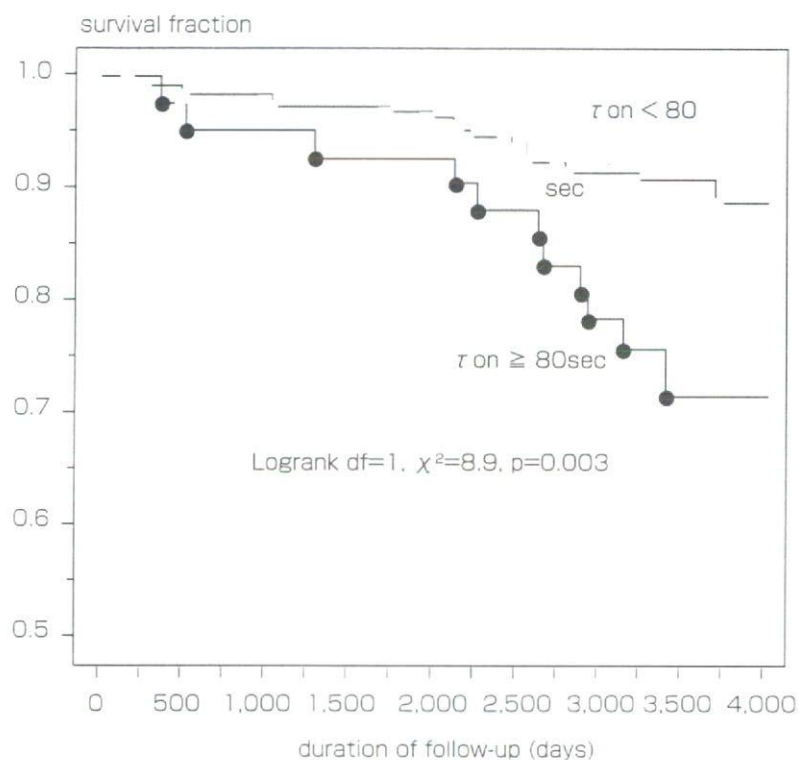


図8 運動開始時の時定数 (τ_{on}) と生命予後との関係 (文献21より引用)

7mL/min/W の場合生存率は62.5%と著明に低下し, peak $\dot{V}O_2$ や $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope と同様に心不全の生命予後を規定する因子であると報告している (図7)¹⁹⁾.

5) 酸素摂取量立ち上がり時定数 (τ_{on} , time constant of $\dot{V}O_2$)

一段階負荷試験における運動開始時の $\dot{V}O_2$ の増加は時間的推移から3相に区分され, 第I相は運動負荷開始後約15~20秒間の急速増加の時間, 第II相は $\dot{V}O_2$ が2~3分間かけて指数関数的に増加する時期, 第III相はその後の定常状態もしくは $\dot{V}O_2$ が徐々に増加する時期である。運動開始から定常状態に達するまでの $\dot{V}O_2$ 増加曲線に対し1次の指数回帰を行い, $1/e$ (約63%) に達するまでの時間が時定数 (τ_{on}) である。心血管機能応答特性を表す指

標として用いられ, peak $\dot{V}O_2$ や最大負荷量とも負の相関を示す²⁰⁾。また, 本邦において心疾患患者を対象とした検討では, $\tau_{on} \geq 80$ sec と著明に延長している場合10年生存率は71.7%と予後不良であることが報告されている (図8)²¹⁾。

おわりに

運動耐容能の評価は, 慢性心不全の病態の本質に迫る手法であるがゆえ, 重症度評価, 予後判定, 治療効果の評価などにき

わめて重要である。特に呼気ガス分析を併用した心肺運動負荷試験から得られる種々の指標は, 運動中の呼吸循環動態のみならず, 心不全患者の予後推定や運動療法の基準, 日常の活動能力や心移植をはじめとする手術適応の決定など, 多方面に利用されるようになった。最近では自覚的 maximum 負荷を必要とする検査よりむしろ亜最大負荷から指標を得る努力がなされている。AT, $\dot{V}E$ vs. $\dot{V}CO_2$ slope, $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$, τ_{on} などは, peak $\dot{V}O_2$ とは異なり最大負荷を必要とせず, 心予備能や予後を反映する有用な指標である。日常臨床では運動負荷試験から得られた各指標の持つ意味を十分に理解しながら, 総合的に評価することが望まれる。

参考文献

1) Mancini, DM. et al. Value of peak exercise oxygen

- consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation*, 83, 1991, 778-86.
- 2) Itoh H. et al. Effects of enoximone on exercise tolerance in patients with mild to moderate heart failure. *Am J Cardiol*. 68, 1991, 360-4
 - 3) Maskin, CS. et al. Failure of dobutamine to increase exercise capacity despite hemodynamic improvement in severe chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 51, 1983, 177-82.
 - 4) Tanabe, Y. et al. Acute effect of percutaneous transvenous mitral commissurotomy on ventilatory and hemodynamic responses to exercise. Pathophysiological basis for early symptomatic improvement. *Circulation*. 88, 1993, 1770-8.
 - 5) Lipkin, DO. et al. Six minute walking test for assessing exercise capacity in chronic heart failure. *Br Med J*. 29, 1986, 653-5
 - 6) Bittner, V. et al. Prediction of mortality and morbidity with a 6-minute walk test in patients with left ventricular dysfunction; SOLVD investigators. *JAMA*. 270, 1993, 1702-7
 - 7) Cheetham, C. et al. The 6-minute walk test does not detect changes in functional capacity of patients awaiting cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 24, 2005, 848-53.
 - 8) Olsson, LG. et al. Six minute walk test as an outcome measure for the assessment of treatment in randomized, blind intervention trials of chronic heart failure : a systematic review. *Eur Heart J*. 26, 2005, 778-93.
 - 9) 山本雅庸. トレッドミル ramp 負荷のための酸素摂取量予測式と臨床応用. *臨床生理*. 23, 1993, 1-13.
 - 10) Itoh, H. et al. Evaluation of severity of heart failure using ventilatory gas analysis. *Circulation*. 80 Suppl II, 1990, II -31-7.
 - 11) Wasserman, K. et al. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*. 35, 1973, 236-43.
 - 12) Beaver, WL. et al. A new method for detecting the anaerobic threshold by gas exchange. *J Appl Physiol*. 60, 1986, 2020-7.
 - 13) Sullivan, MJ. et al. Increased exercise ventilation in patients with chronic heart failure : intact ventilatory control despite hemodynamic and pulmonary abnormalities. *Circulation*. 77, 1988, 552-9.
 - 14) Chua, TP. et al. Clinical correlates and prognostic significance of the ventilatory response to exercise in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 29, 1997, 1585-90.
 - 15) Adachi, H. et al. Nitric oxide production during exercise in chronic heart failure. *Am Heart J*. 134, 1997, 196-202.
 - 16) Ponikowski, P. et al. Enhanced ventilatory response to exercise in patients with chronic heart failure and preserved exercise tolerance: marker of abnormal cardiorespiratory reflex control and predictor of poor prognosis. *Circulation*. 103, 2001, 967-72.
 - 17) Koike, A. et al. Prognostic power of ventilatory responses during submaximal exercise in patients with chronic heart disease. *Chest*. 121, 2002, 1581-8.
 - 18) Hansen, JE. et al. Relation of oxygen uptake to work rate in normal men and men with circulatory disorders. *Am J Cardiol*. 59, 1987, 669-74.
 - 19) Koike, A. et al. Evaluation of exercise capacity using submaximal exercise at a constant work rate in patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 91, 1995, 1719-24.
 - 20) Koike, A. et al. Prognostic significance of cardiopulmonary exercise testing for 10-year survival in patients with mild to moderate heart failure. *Jpn Circ J*. 64, 2000, 915-20.

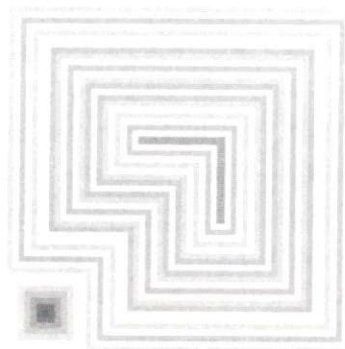
運動負荷検査 は必要か

伊東春樹

財団法人日本心臓血圧研究振興会附属榊原病院・榊原記念クリニック副院長

前田知子

財団法人日本心臓血圧研究振興会附属榊原病院



運動負荷試験はなぜ必要か

ヒトは2本足で歩いてはじめてヒトといえます。すなわち、運動することを前提とした生物であり、同時に、動くことによりその生命が維持されます。したがって、各種疾病の病態生理を理解するためには、単にベッドに寝ている状態での生理学的指標だけでは不十分で、運動している状態での評価が必要です。とくに最大運動耐容能は、健常例や心疾患例を問わず、もっとも強力な予後推定指標とされています。

最近では、心疾患に対する運動療法の有用性が理解され、多くの循環器医は「適度な運動」を患者に勧めるようになりました。しかし、患者にとっては、日常生活でどのくらいまで動いてよいか、「適度な運動」とは何をどこまですべきかなど、具体的な指導が必要です。そこで、運動負荷試験を行なって安全で有効な運動をするための運動処方が必要となります。現在、運動負荷試験は健常例やアスリートでの体力測定、トレーニング指導はもとより、心疾患の鑑別診断、重症度評価、治療方法の選択、手術的適応決定、治療効果判定、運動処方、スポーツへの参加許可条件など、きわめて多くの分野で利用されています。

表1 循環器領域での運動負荷試験の目的

- ・胸痛を有するかまたは冠動脈疾患を疑う患者の診断
- ・循環器疾患の重症度および予後の推定
- ・薬物または外科治療の効果判定
- ・潜在性冠動脈疾患の診断
- ・高血圧症の早期発見
- ・うっ血性心不全の評価
- ・不整脈の評価
- ・運動耐容能の評価と運動処方の決定
- ・先天性心疾患の評価
- ・ライフスタイル変化のための動機づけ

[文献1より]

運動負荷試験の目的

運動負荷試験は、循環器領域ではさまざまな目的のために行なわれます(表1)。このなかで一般臨床の場でもっとも行なわれているものが、胸痛の鑑別診断の一つとしての労作性狭心症診断です。

労作性狭心症の診断には、客観的な虚血の証明や典型的な狭心症状の誘発が必須であるため、後に述べる禁忌を除いて運動負荷試験は重要です。

運動負荷試験の種類と方法

運動負荷試験は、①運動の形態または使用する負荷装置、②測定する項目、③どの程度

の運動をさせるか、の三つにより分類されます。前者による分類では、定時間歩行（6分間歩行試験など）、マスター階段負荷、トレッドミル負荷、サイクルエルゴメータ負荷、などがあり、測定指標からは運動負荷心電図や心肺運動負荷試験（呼気ガス分析併用）、運動負荷 RI シンチグラフィ、運動負荷エコー図などがあります。さらに運動終点の決め方により、症候限界性最大負荷試験と亜最大（最大下）負荷試験があります。

●運動の形態と負荷装置

運動には、歩行、ランニングや水泳のように、筋肉の長さを変えながらリズムカルに行なう等張性運動（isotonic exercise）と、重量挙げ、筋力トレーニングのように筋肉の長さを変えずに荷重や重りを保持するような等尺性運動（isometric exercise）の二つがあります。

この二つの運動様式による循環系の反応は異なっており、等張性運動は、負荷量の増加に従い収縮期血圧、心拍数、酸素摂取量（ $\dot{V}O_2$ ）のいずれもが直線的に増加するのに対し、等尺性運動では負荷量の増加によって心拍数と $\dot{V}O_2$ の増加はごくわずかであるものの、収縮期血圧がいちじるしく増加するとされています。すなわち等尺性運動では血圧の反応が顕著ですが、全体的な負荷量としては大きくないことが示唆されます²⁾。等尺性運動負荷は、心カテーテル試験時に負荷中の血行動態を測定する場合などに行なわれ、通常の狭心症の虚血誘発にはあまり適しません。

心不全や呼吸不全による運動耐容能低下の評価に、一定時間内に最大限遠くまで歩かせる歩行試験が用いられることがあります。時間としては6分間がよく用いられ、50m程度の廊下とストップウォッチがあれば実施可能です。しかし、試験結果は検者の励まし方などにより変わるので、施設間の差が大きく、再現性に乏しいことから、汎用されるまでに

はいたっていません。

●測定項目

虚血性心疾患の診断では、運動負荷心電図と同時に放射性同位元素を用いた運動負荷 RI シンチグラフィによる心筋灌流や、運動負荷心エコー図による左室壁運動異常の検出による虚血の診断も一般的になりました。それらについては専門書にゆずり、ここではもっとも基本的な運動負荷心電図と心肺運動負荷試験について解説します。

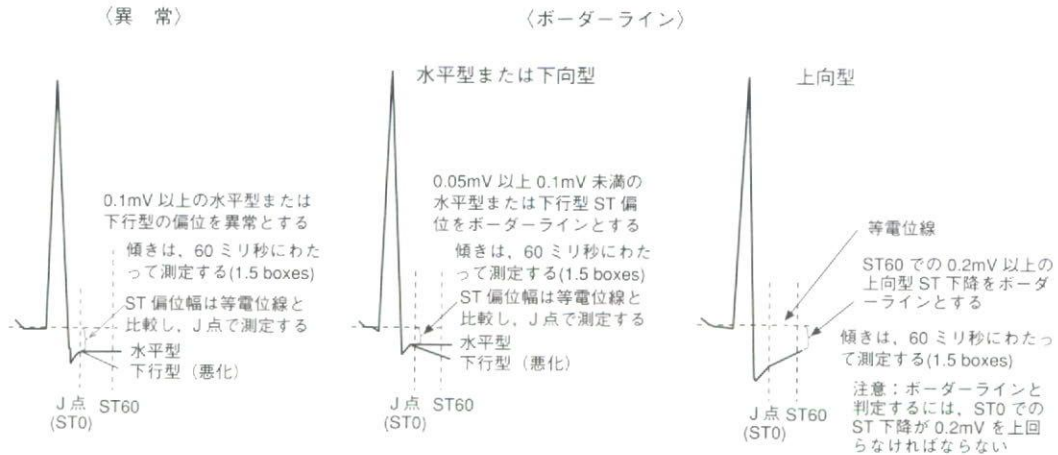
1) 心電図

心電図は、後述するほかの運動負荷試験においても安全性や心拍数測定のためにモニターされ、虚血性心疾患の診断には不可欠の測定項目です。

運動負荷試験による虚血の判定基準としては、心電図の ST 部分の下降がもっとも用いられています。ST の計測は J 点から 60 ミリ秒の点で行なわれます。健常者の負荷心電図においても心拍数の上昇にともない ST 下降がみられ、これを Junctional 型（J 型）ST 低下（図 1）といい、後に述べる虚血性のもとは区別されます。J 型の場合、やや上に凹であり、J 点より 60 ミリ秒の点では基線に近いところまで回復していることが多いです。一般に虚血性とされるのは horizontal（水平）型、および down sloping または sagging（下向）型であり、通常は J 点で基線から 1 mm 以上の下降を陽性ととります。

ST 低下以外の運動負荷試験の陽性基準には、ST 上昇、陰性 U 波の出現、運動誘発性不整脈などがあげられます。ST 上昇は、運動にともなう冠動脈の完全閉塞、運動誘発性の冠れん縮を示している場合もありますが、陳旧性梗塞部位の ST 上昇は左室壁運動異常にともなってみられるとされ、かならずしも虚血を反映しません。これに対して陰性 U 波は、虚血以外ではおこりにくく、特異度の高い所見とされます。運動誘発性の不整脈に

図1 ST 偏位の評価



上向型や水平型ではJ点から60ミリ秒の時点で、基線からどのくらい下がったかを計測するが、安静時ですでにSTが基線より低下している場合には、安静時との差をとる。下降型ではJ点で同様に計測する。水平型・下行型が虚血性変化とされ、上向型の場合、60ミリ秒のところで2mm以上の低下が見られれば、ボーダーラインとする（診断の感度は上がるが、特異度は低い）

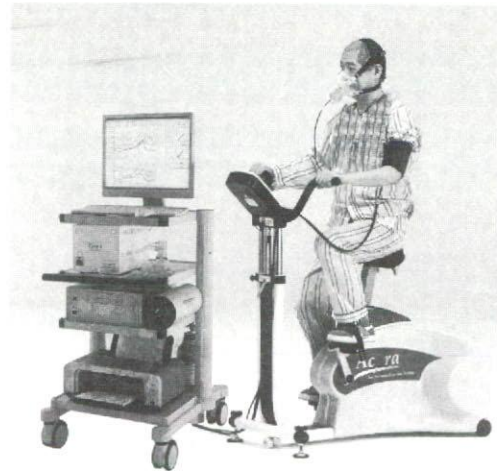
[文献8より]

関しては、健常者においても出現することが知られており、虚血によるものとはかぎりません。ことに拡張型心筋症においては心室性不整脈、とくに心室性期外収縮や心室頻拍の運動時出現率が高く、生命予後と密接に関連しています。

2) 換気諸量

最近、連続呼気ガス分析を併用した心肺運動負荷試験 (cardiopulmonary exercise test ; CPX, CPET) が汎用されるようになりました (図2)。運動中には肺循環、体循環の血管拡張によって1回換気量、1回拍出量、酸素利用が増加します。大気中の酸素は体内に移行し、最終的にミトコンドリアでエネルギー代謝に利用され、その結果、産生された二酸化炭素は、逆の経路により大気中に排出されます。この一連の生理学的な関係を、心肺運動負荷試験から推測できます。なかでも酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) は、エネルギー代謝量、運動強度などの指標となります。また Fick の式 ($\dot{V}O_2 = \text{動静脈酸素含有量較差} \times \text{心拍出量}$) より、 $\dot{V}O_2$ は動静脈酸素含有量較差が一定であれば、心拍出量と比例するので、心

図2 心肺運動負荷試験

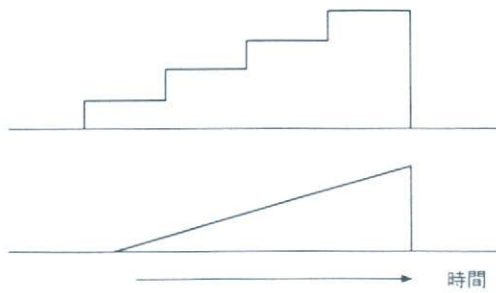


左は連続呼気ガス分析装置で、リアルタイムで呼気ガス諸量をモニターに表示する。右のサーボモータ型サイクルエルゴメータは、-50Wから+600Wまで広範囲の運動負荷を高精度で実施できる

ポンプ機能の指標となりえます。

CPX では ramp 負荷 (直線的漸増負荷法 ; 図3) が用いられます。通常、エルゴメータを用いて、毎分10~40watts の割合で運動強度を増加させます。心不全症例では10watts/分の直線的漸増負荷法を用いること

図3 多段階漸増負荷と ramp 負荷



上段は、Bruce のプロトコールなど、虚血誘発のために用いられているプロトコールだが、心肺運動負荷試験では下段のように運動強度を直線的に増加させるプロトコールを用い、呼気ガス分析指標の推移や変曲点を求める

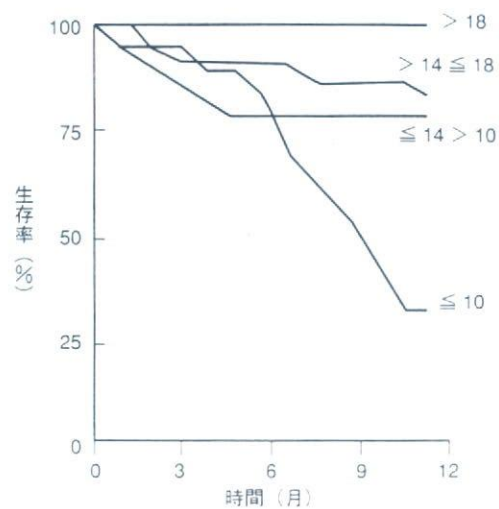
が多いですが、仕事率増加に対して、ある一定の時定数をもって各パラメータが遅れて追従します。

Ramp 負荷中の呼気ガス指標のおもな変曲点としては、乳酸産生が顕著になり血中乳酸が増加し、運動強度 ($\dot{V}O_2$) に対し $\dot{V}CO_2$ や分時換気量 ($\dot{V}E$) がより急峻に増加する運動強度、すなわち有気的代謝に無気的代謝が加わる点 AT (嫌気性代謝域値) と、その乳酸に対する緩衝系 (おもに重炭酸イオン) が不十分になって過換気をはじめまる点、すなわち呼吸性代償開始点 (RC point) があります。Ramp 負荷試験中の指標としては、開始時の酸素摂取量時定数 (τ_{on})、AT、 $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$ 、 $\dot{V}E$ vs $\dot{V}CO_2$ slope、呼吸性代償開始点の呼気終末に酸化炭素分圧 (PETCO₂ at RC)、最高酸素摂取量 (peak $\dot{V}O_2$)、回復期酸素摂取量時定数 (τ_{off})、などがあります。詳細は他書にゆずり、ここではおもな四つの指標について解説します。

① peak $\dot{V}O_2$

peak $\dot{V}O_2$ は、最大心拍出量と最大動脈酸素含有量較差の積で表わされ、中枢のポンプ機能と末梢の酸素利用能の両者により決定される指標です。検査が検者または被検者の主観で中止されるため、客観性に欠ける欠点がありますが、心疾患の重症度とよく相関し、

図4 心不全患者における peak $\dot{V}O_2$ と生命予後



心不全患者においては心機能指標よりも peak $\dot{V}O_2$ (ml/kg)のほうが生命予後指標として有用である [文献4より]

予後判定の指標として有用です。健常例はもとより、重症心不全患者の予後をよく反映するので (図4)、米国では心移植の適応決定のもっとも重要な指標として用いられています²⁾。

② AT

AT は有気的代謝能の上限を示し、最大負荷試験を必要としない客観的運動耐容能指標として³⁾、また、運動療法における運動強度の基準として汎用されています。各種治療法によって日常の活動レベルが上がると、peak $\dot{V}O_2$ より比較的早期から改善するので、治療効果判定に役立ちます。

③ $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$

サイクルエルゴメータでの試験によって得られる指標であり、末梢の運動筋への酸素輸送 (心拍出量) の増加程度を示しています。またこの指標は、摂取された O₂ の運動筋への分配の程度にも影響されます。すなわち、摂取された O₂ が優先的に運動筋へ分配されれば個体全体としての $\dot{V}O_2$ は運動強度の割に減少し、 $\Delta \dot{V}O_2 / \Delta WR$ は低下します⁴⁾。また運動中に虚血が誘発されると、心機能の

低下を反映して低下します。

④ $\dot{V}E$ vs $\dot{V}CO_2$ slope

$\dot{V}CO_2$ に対する $\dot{V}E$ の増加の割合を示し、心不全では運動中の心拍出量増加不良や末梢の化学受容体感受性亢進などによる死腔換気量増加によって増加します。労作時息ぎれなどの心不全に特徴的な症状と関係があるとされ、生命予後と密接に関係しています⁷⁾。

運動負荷試験の禁忌

運動負荷試験は、表 2⁸⁾ に示すような病態では禁忌であり、負荷試験が可能な状態まで病態をコントロールするまでは行なってはなりません。当然ながら、心筋梗塞発症期や急性心膜炎、急性心筋炎などでは、運動を行なうことによって重症不整脈やポンプ失調などの致命的合併症が起こりうるため、病態が落ち着くまでは負荷試験のみならず運動自体が制限されます。また、コントロール不良の心室頻拍、心室細動などの不整脈、重症大動脈狭窄、解離性大動脈瘤、肺塞栓症、コントロールされていない心不全においても運動負荷は禁忌です。実際に運動負荷試験時を行なうときには、病歴の確認、問診や身体所見、安静時の心電図や胸部単純 X 線などによって、これらの病態を見逃さないようにすることが重要です。

<文 献>

- 1) Ellestad MH: Indications. In: Stress testing: Principles and practice, edition 4, F.A. DAVIS COMPANY, Philadelphia, 1996, p111-119
- 2) 谷口興一: 等尺性負荷試験. 水野 康, 福田市蔵編: 循環器負荷試験法—理論と実際 改訂第 2 版, 診断と治療社, 1988, p330-360
- 3) 川久保清: 運動負荷心電図—その方法と読み方. 医学書院, 2000, p15
- 4) Mancini DM et al: Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory

表 2 運動負荷試験の絶対的禁忌と相対的禁忌

絶対的禁忌

- ・急性心筋梗塞 (発症後 2 日以内)
- ・高リスクな不安定狭心症
- ・血行動態障害の症状をひきおこすコントロール不能の不整脈
- ・活動型心内膜炎
- ・症状をとまなう重症の大動脈狭窄
- ・非代償性症候性心不全
- ・急性肺塞栓または肺梗塞
- ・運動能力に影響を与える、または運動により悪化する可能性のある心臓以外の急性障害 (感染症、腎不全、甲状腺中毒症など)
- ・急性心筋炎または急性心膜炎
- ・試験を安全かつ適切に実施することができないような身体障害
- ・同意取得不能

相対的禁忌*

- ・左冠動脈主幹部狭窄またはそれに相当するもの
- ・中等度の狭窄性弁膜症
- ・電解質異常
- ・頻脈性不整脈または徐脈性不整脈
- ・心室拍動数コントロール不能の心房細動
- ・肥大型心筋症
- ・試験への協力が不可能な精神障害
- ・高度の房室ブロック

* 運動負荷試験による利益がリスクを上回る場合は、相対的禁忌であっても試験の実施可 [文献 8 より]

patients with heart failure. Circulation 83: 778-786, 1991

5) Itoh H et al: Evaluation of severity of heart failure using ventilatory gas analysis. Circulation 81(Suppl II): II31-II37, 1990

6) Itoh H et al: Oxygen uptake: Work rate relationship in patients with heart failure. Sato Y, Poortmans J, Hashimoto I, Oshida Y (eds): Integration of medical and sports sciences, Med Sport Sci 37: 374-380, Basel, Karger, 1992

7) Koike A et al: Prognostic power of ventilatory responses during submaximal exercise in patients with chronic heart disease. Chest 121: 1581-1588, 2002

8) Fletcher GF et al: Exercise standards for testing and training: A statement for health-care professionals from the American Heart Association. Circulation 104: 1694-1740, 2001

[いとう・はるき/循環器科]

[まえだ・ともこ/循環器科]



ELSEVIER

ORIGINAL ARTICLE

**JOURNAL of
CARDIOLOGY**

Official Journal of the Japanese College of Cardiology

www.elsevier.com/locate/jjcc

Serum levels of remnant lipoprotein cholesterol and oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary artery disease

Makoto Hiki (MD), Kazunori Shimada (MD, FJCC)*, Hirotohi Ohmura (MD), Takashi Kiyanagi (MD), Atsumi Kume (MD), Katsuhiko Sumiyoshi (PhD), Kosuke Fukao (MD), Nao Inoue (PhD), Hiroshi Mokuno (MD), Tetsuro Miyazaki (MD), Hiroyuki Daida (MD, FJCC)

Department of Cardiovascular Medicine, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

Received 28 June 2008; received in revised form 18 September 2008; accepted 30 September 2008
Available online 25 November 2008

KEYWORDS

Coronary artery disease;
Lipoproteins;
Lipoproteins;
LDL

Summary

Background: Oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) and remnant lipoprotein play a crucial role in the development of atherosclerosis. Recently, a novel method for measuring remnant cholesterol levels (remnant lipoproteins cholesterol homogenous assay: RemL-C) has been established. However, the correlation between OxLDL and remnant lipoprotein, including RemL-C, has not been fully investigated.

Methods: We enrolled 25 consecutive patients with documented coronary artery disease (CAD) and 20 controls. Remnant-like particle cholesterol (RPL-C) and RemL-C were used to determine the levels of remnant lipoprotein cholesterol. Serum levels of malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) and OxLDL using a monoclonal antibody DLH3 (OxPC) were used to measure the concentration of circulating OxLDL.

Results: The CAD group had high levels of fasting glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1c), and low levels of high-density lipoprotein cholesterol compared with the control group. Serum levels of total cholesterol or LDL cholesterol were not significantly different between the two groups. The levels of RemL-C ($p=0.035$), MDA-LDL ($p=0.018$), and MDA-LDL/LDL-C ($p=0.036$) in the CAD group were significantly higher than those in the control group. The levels of RPL-C tended to be higher in the CAD group than those in the control group ($p=0.096$). Positive correlations were demonstrated between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL (RPL-C and MDA-LDL/LDL-C, $r=0.45$, $p=0.0024$, RPL-C and OxPC, $r=0.51$, $p=0.0005$, RemL-C and MDA-LDL/LDL-C, $r=0.42$, $p=0.0044$, RemL-C and OxPC, $r=0.43$, $p=0.0043$).

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5802 1056; fax: +81 3 5689 0627.
E-mail address: shimakaz@juntendo.ac.jp (K. Shimada).

Similar trends were observed in non-diabetic subjects and in subjects without metabolic syndrome. Positive correlations were also observed between RLP-C and RemL-C ($r=0.94$, $p<0.0001$) and between MDA-LDL/LDL-C and OxPC ($r=0.40$, $p=0.0074$).

Conclusions: These results suggest that the association between high levels of remnant lipoprotein cholesterol and high OxLDL levels might be linked to atherogenesis in patients with CAD.

© 2008 Japanese College of Cardiology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Introduction

Remnant lipoproteins, which are produced by hydrolysis of chylomicrons and very low-density lipoproteins, are thought to be atherogenic [1,2]. Remnant lipoproteins, not only activate surface molecules of monocytes and endothelial cells, but also induce foam cell formation and proliferation of smooth muscle cells [2]. Indeed, high levels of remnant-like particles cholesterol (RLP-C) determined by a widely used method, are considered to be a coronary risk factor and a predictor of cardiovascular events independent of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in healthy subjects and patients with coronary artery disease (CAD) [3–6].

Oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) plays a crucial role in atherogenesis via a number of initiative and accelerative functions, including adherence induction between endothelial cells and monocytes, recruitment of monocyte-derived macrophages into the vessel wall, and foam cell formation of macrophages [7–9]. Previous reports have shown that the level of circulating OxLDL is a marker for identifying patients with CAD or coronary spastic angina [10–12], and has a positive relationship with acute coronary syndromes [13,14]. Moreover, we and other groups demonstrated that high levels of OxLDL are independent predictors of future cardiovascular events in apparently healthy subjects and patients with CAD [15–18].

Until now, several methodologies have been available for determining the levels of remnant lipoprotein cholesterol as well as circulating OxLDL [8,9,19]. In the present study, we measured the levels of remnant lipoprotein cholesterol determined by RLP-C and a recently established method (remnant lipoproteins cholesterol homogenous assay: RemL-C), malondialdehyde-modified (MDA)-LDL, and oxidized phosphatidylcholine (OxPC) in patients with CAD and control subjects. Moreover,

we assessed each correlation between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL in those subjects.

Methods

Subjects

We enrolled 25 consecutive patients who underwent diagnostic angiography at Juntendo University between August 2006 and October 2006, and 20 controls who had no clinical history of CAD and hospitalization at the same period. All patients had documented CAD defined as more than 50% stenosis in at least one major coronary artery. Patients with acute coronary syndrome and/or ongoing congestive heart failure were excluded. Control subjects had no abnormal electrocardiographic finding and no evidence of coronary ischemia examined by stress cardiac testing at our outpatient clinic. Subjects who had liver and/or renal dysfunction, or were taking medications, including insulin, lipid-lowering drugs, and vitamin E were also excluded. All subjects gave written informed consent and the Ethical Committee of the Institution approved this study.

Blood sampling and biochemical analysis

Whole blood samples were drawn after overnight fasting. Serum levels of total cholesterol, triglyceride (TG), HDL cholesterol, and high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), were measured by standard methods. LDL cholesterol values were measured by the direct assay (Sekisui Medical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Serum levels of RLP-C were measured by widely using an immunoaffinity mixed gel containing anti-apolipoprotein A-1 and anti-apolipoprotein B-100 monoclonal antibodies method (JIMRO II, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan), as previously described [3,20,21]. RemL-C, which has recently been established, was

also employed in this study (Kyowa Medex Co., Ltd., Tokyo, Japan). In brief, RemL-C utilizes a selective solubilizing and degradative method by using surfactant and phospholipase-D. After this reaction, released cholesterol was measured enzymatically [22]. The levels of malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) recognized by the monoclonal antibody, ML25, and OxPC defined by the monoclonal antibody, DLH3, were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, as we and other groups previously reported [8,16,17,23,24].

Statistical analysis

Statistical intergroup differences were analyzed by the Chi-square test and the Student's *t*-test. Correlation between the two parameters was determined by simple linear regression analysis. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Characteristics of the study subjects

The characteristics of the subjects are shown in Table 1. There was no significant difference in body mass index, prevalence of hypertension, smoking history, or family history, between the two groups. The CAD group had a higher prevalence of diabetes mellitus ($p=0.012$) and metabolic syndrome ($p=0.005$) defined by the Evaluation Committee of Diagnostic Criteria for Metabolic syndrome [25], and significantly lower levels of HDL cholesterol ($p=0.003$) than the control group. The levels of fasting glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1c) in the CAD group were significantly higher than in the control group ($p=0.019$, $p=0.001$, respectively). Total cholesterol and LDL cholesterol levels were not significantly different between the two groups.

Comparison of RLP-C, RemL-C, MDA-LDL, and Ox-PC between the two groups

As shown in Fig. 1, the CAD group had significantly higher levels of RemL-C than the control group (12.3 ± 9.0 mg/dl vs. 7.4 ± 5.1 mg/dl, $p=0.035$). The level of RLP-C tended to be higher in the CAD group than that in the control group (9.1 ± 8.6 mg/dl vs. 5.7 ± 3.3 mg/dl, $p=0.096$). As demonstrated in Fig. 2, the level of MDA-LDL and the ratio of MDA-LDL to LDL cholesterol (MDA-LDL/LDL-C) were significantly higher than those in the control group (181 ± 53 IU/l vs. 147 ± 36 IU/l,

$p=0.018$; 1.36 ± 0.36 vs. 1.16 ± 0.21 , $p=0.036$, respectively). There was no significant difference of Ox-PC level between the two groups (9.5 ± 6.9 IU/l vs. 8.0 ± 2.9 IU/l, $p=0.38$).

The levels of RLP-C (6.6 ± 3.5 mg/dl vs. 4.5 ± 1.8 mg/dl, $p=0.050$) and RemL-C (9.0 ± 5.2 mg/dl vs. 5.9 ± 3.7 mg/dl, $p=0.066$) tended to be higher in the CAD group than in the control group even in subjects without metabolic syndrome. The levels of RLP-C (6.9 ± 3.1 mg/dl vs. 5.4 ± 3.2 mg/dl, $p=0.1$) and RemL-C (9.9 ± 4.7 mg/dl vs. 7.0 ± 4.9 mg/dl, $p=0.085$) tended to be higher in the CAD group than in the control group in subjects without diabetes. The levels of MDA-LDL were significantly higher in the CAD group than in the control group in the subjects without diabetes (193 ± 61 IU/l vs. 144 ± 36 IU/l, $p=0.0065$).

Associations between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL

As shown in Fig. 3, the levels of RLP-C were positively correlated with MDA-LDL/LDL-C ($r=0.45$, $p=0.0024$) and OxPC ($r=0.51$, $p=0.0005$) in all subjects. The serum levels of RemL-C were also positively correlated with MDA-LDL/LDL-C ($r=0.42$, $p=0.0044$) and OxPC ($r=0.43$, $p=0.0043$) in all subjects. The positive correlations between RLP-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.43$, $p=0.030$), RLP-C and OxPC ($r=0.53$, $p=0.0062$), RemL-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.46$, $p=0.019$), and RemL-C and OxPC ($r=0.53$, $p=0.0059$) were also observed in the CAD group. The trends of positive correlations between RLP-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.40$, $p=0.08$), and RemL-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.31$, $p=0.1$) were observed in the control group.

The positive correlations between levels of RLP-C and OxPC ($r=0.34$, $p=0.057$), between levels of RLP-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.47$, $p=0.0048$), between levels of RemL-C and OxPC ($r=0.32$, $p=0.071$), and between levels of RemL-C and MDA-LDL/LDL-C ($r=0.42$, $p=0.013$), were observed in non-diabetic patients as well as in all subjects (Fig. 4).

Correlations between each measurement of remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL

As demonstrated in Fig. 5, a strong correlation was observed between RLP-C and RemL-C levels ($r=0.94$, $p<0.0001$). The MDA-LDL/LDL-C levels were positively correlated with OxPC ($r=0.40$, $p=0.0074$).

Table 1 Patient characteristics.

	Control	CAD	p-Value
Number	20	25	
Age (years)	58 ± 12	64 ± 12	0.126
Male (%)	16 (80)	23 (92)	0.239
BMI (kg/m ²)	24.5 ± 4.8	24.6 ± 2.4	0.935
Hypertension (%)	11 (55)	19 (76)	0.138
Diabetes mellitus (%)	1 (5)	10 (40)	0.012
Metabolic syndrome (%)	3 (15)	14 (56)	0.005
Smokers (%)	10 (50)	16 (64)	0.448
Family history (%)	3 (15)	5 (20)	0.922
Number of diseased vessels			
One (%)	—	9 (36)	
Two (%)	—	10 (40)	
Three (%)	—	6 (24)	
Gensini score	—	52.9 ± 48.6	
TC (mg/dl)	215 ± 28	220 ± 32	0.587
TG (mg/dl)	125 ± 89	189 ± 130	0.066
HDL-C (mg/dl)	60 ± 14	46 ± 16	0.003
LDL-C (mg/dl)	127 ± 27	135 ± 27	0.343
FBS (mg/dl)	99 ± 12	120 ± 36	0.019
HbA1c (%)	5.2 ± 0.5	6.3 ± 1.2	0.001
hs-CRP (mg/dl)	0.097 ± 0.152	0.133 ± 0.118	0.409

Data are mean ± S.D. CAD, coronary artery disease; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; FBS, fasting blood sugar; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

Discussion

This study demonstrated that: (1) patients with CAD had high levels of remnant lipoprotein cholesterol, especially when measured by RemL-C method; (2) CAD patients had high levels of MDA-LDL; (3) the serum levels of remnant lipoprotein cholesterol were positively correlated with OxLDL, suggesting that the association between high levels of remnant lipoprotein cholesterol and high OxLDL levels might be linked to atherogenesis in patients with CAD.

Recent prospective studies and meta-analysis clearly demonstrated that a high level of TG is an independent predictor for CAD independent of other cardiovascular risk factors [6,26–28]. Indeed, the deterioration of TG-rich lipoproteins, such as remnant lipoproteins, is frequently observed in high risk patients for CAD, such as patients with metabolic syndrome and/or diabetes [29–31]. Therefore, it is important to establish assays for the measurement of remnant lipoprotein. Four methods, including ultracentrifugation, polyacrylamide

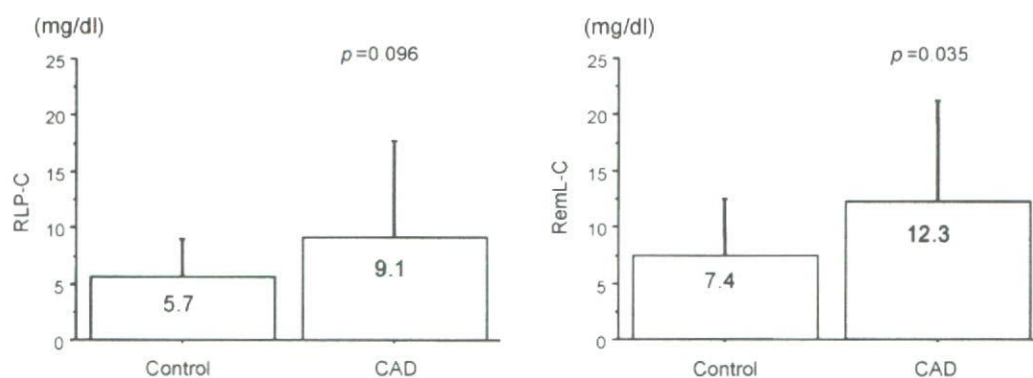


Figure 1 Comparison of serum levels of remnant lipoprotein cholesterol between the control and the CAD groups: CAD, coronary artery disease; RLP-C, remnant-like particle-cholesterol; RemL-C, remnant lipoproteins cholesterol homogeneous assay-cholesterol.

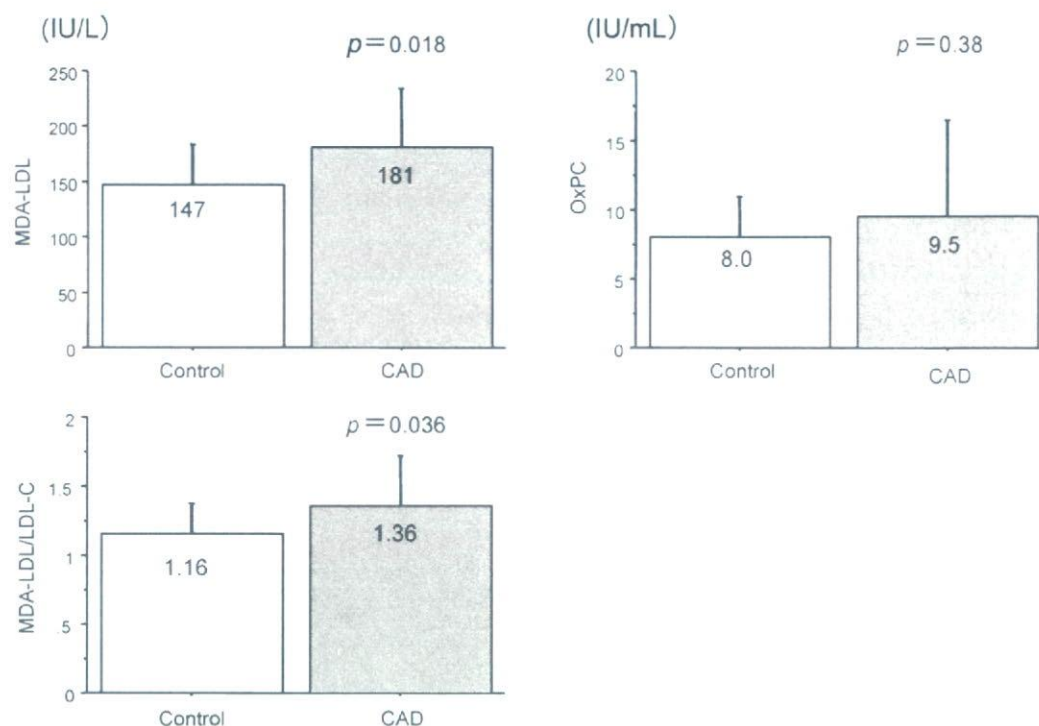


Figure 2 Comparison of serum levels of OxLDL between the control and the CAD groups: CAD, coronary artery disease; OxLDL, oxidized low-density lipoprotein; MDA, malondialdehyde; OxPC, oxidized phosphatidylcholine.

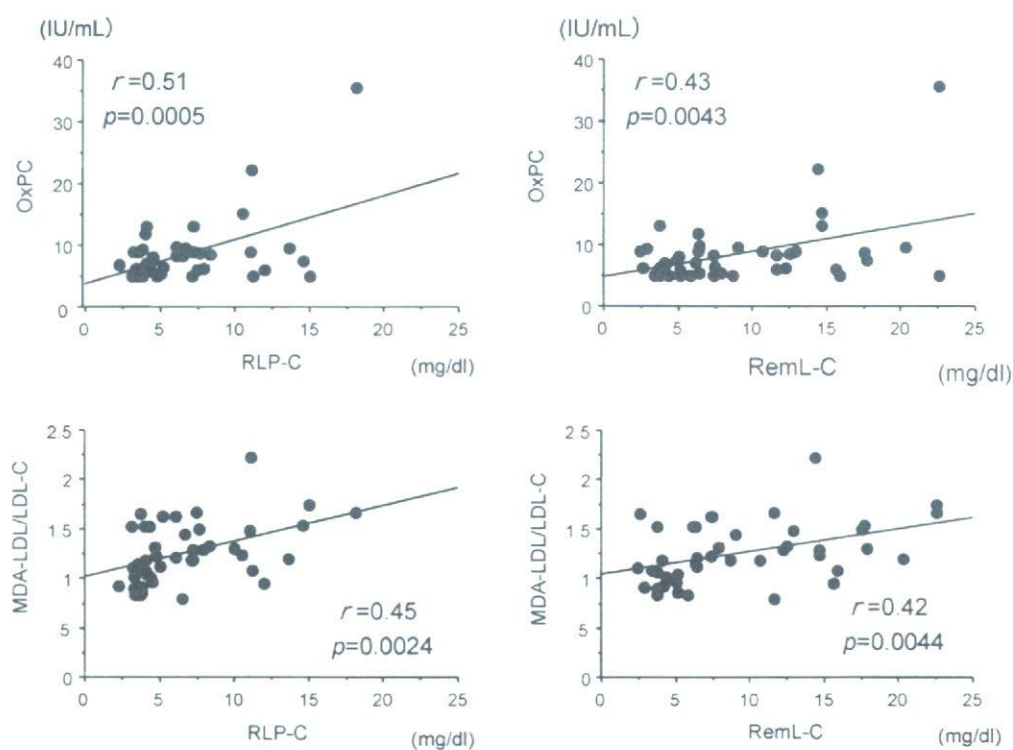


Figure 3 Correlations between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL in all subjects: RLP-C, remnant-like particle-cholesterol; RemL-C, remnant lipoproteins cholesterol homogeneous assay-cholesterol; OxLDL, oxidized low-density lipoprotein; MDA, malondialdehyde; OxPC, oxidized phosphatidylcholine.

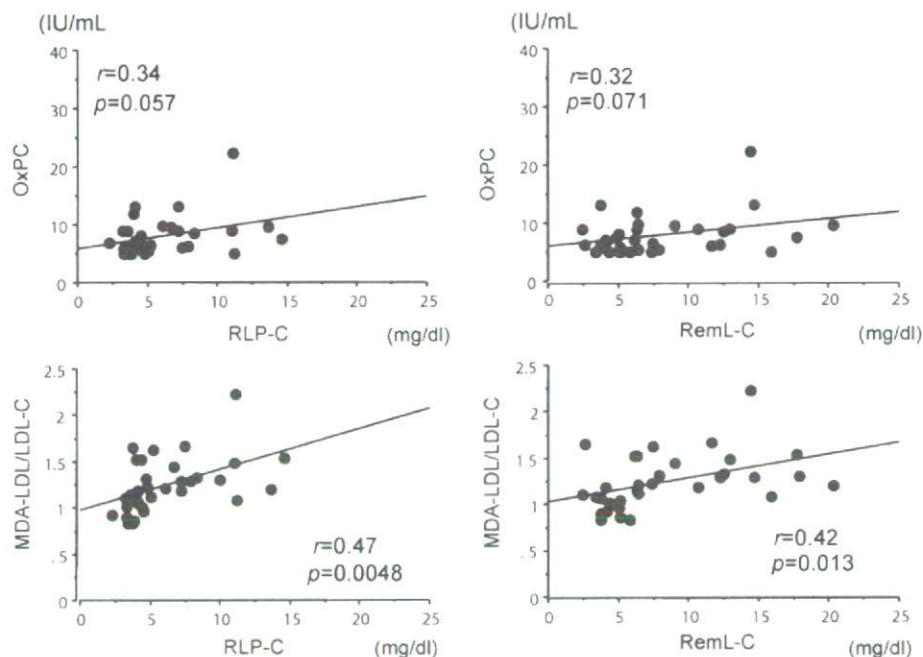


Figure 4 Correlations between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL in non-diabetic patients: RLP-C, remnant-like particle-cholesterol; RemL-C, remnant lipoproteins cholesterol homogeneous assay-cholesterol; OxLDL, oxidized low-density lipoprotein; MDA, malondialdehyde; OxPC, oxidized phosphatidylcholine.

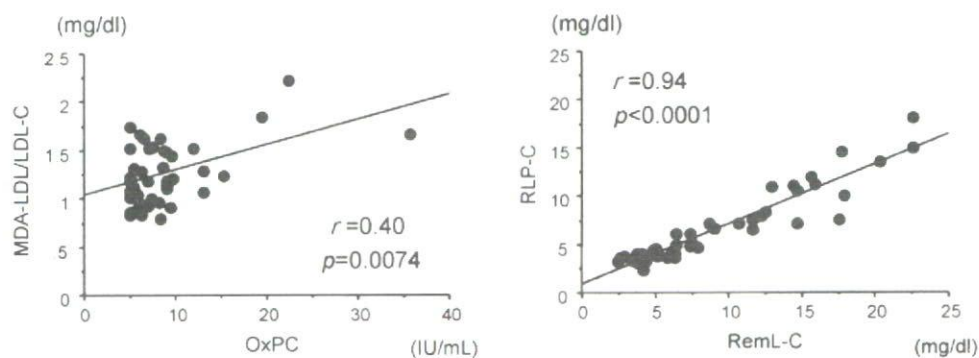


Figure 5 Correlations between each measurement of remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL: RLP-C, remnant-like particle-cholesterol; RemL-C, remnant lipoproteins cholesterol homogeneous assay-cholesterol; OxLDL, oxidized low-density lipoprotein; MDA, malondialdehyde; OxPC, oxidized phosphatidylcholine.

gel electrophoresis, RLP-C, and automated analysis of RemL-C, are available for determining remnant lipoproteins levels. The former two methods have some limitations for widespread use in the clinical setting, as they are time- and labor-intensive, complicated to perform, and are complex to quantify. In contrast, the latter two methods, especially RLP-C, are commonly used to measure remnant lipoprotein cholesterol. The correlation between RLP-C and RemL-C levels was consistent with the previous study ($r=0.95$) [22], however, serum levels of RemL-C, but not RLP-C, were significantly

higher in patients with CAD than in the control subjects. One reason for this difference may be due to the small sample number of the present study. Another explanation might be derived from the difference in the method of measurement. The widely used RLP-C assay measures cholesterol levels in the heterogeneous unbound fraction of anti-apoA1 and anti-apoB-100 antibodies utilizing immuno-affinity methodology [3,20,21]. In contrast, the RemL-C assay, which can be carried out by an automated analyzer, utilizes selective agents, such as surfactant and phospholipase-D, for the determination of

remnant lipoproteins [22]. The RemL-C assay might be sensitive enough to identify high-risk subjects, such as patients with CAD.

Oxidative modification of LDL plays a crucial role in the pathogenesis of initiation and progression of atherosclerosis [7–9]. Until recently, several bioassay systems, such as MDA-LDL recognized by a monoclonal antibody, ML25, OxPC determined by the monoclonal antibody, DLH3, and OxLDL utilizing monoclonal antibodies, 4E6 and E06, for the measurement of circulating OxLDL have been developed [8,19,23,32,33]. In the present study, the serum levels of MDA-LDL, but not OxPC, were significantly higher in patients with CAD than in the control subjects. This finding may be caused by the difference in OxLDL determination measured from the use of different antibodies. ML25 for detecting MDA recognizes part of a lipid peroxide product [23], and DLH3 for determining OxPC levels specifically recognizes oxidized phosphatidylcholine [34]. Indeed, a modest correlation between MDA-LDL and OxPC levels was observed in this study (Fig. 3). Further analyses, including a large number of subjects, are needed to investigate the differences and clinical significance of each method.

The result of positive correlations between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL levels was a novel finding in the present study. Although the precise mechanism of these correlations is uncertain, the following possibilities are raised. Holvoet et al. reported that metabolic syndrome was associated with higher levels of OxLDL [35]. These authors also demonstrated the OxLDL levels positively correlated with waist circumstances, serum TG, insulin, and glucose levels, and were negatively correlated with levels of HDL cholesterol [35]. This study found positive correlations not only between body mass index and remnant cholesterol levels, but also between body mass index and OxLDL levels in the present subjects (data not shown). The levels of total cholesterol and LDL cholesterol in the present study were identical between the two groups. The features of the current patients with CAD might be represented by metabolic syndrome. It was reported that metabolic syndrome shows reduced concentrations of antioxidant vitamins [36]. In addition, the high levels of small dense LDL, which is more susceptible to oxidative stress, appear to be proportional to the degree of deterioration of TG rich lipoproteins, such as remnant particles, in metabolic syndrome [37]. However, the results of the present study have consistency regardless of diabetes or metabolic syndrome. Further studies are needed to clarify the reason of these correlations. Another possibility is that enhanced oxidative stress could be induced by

low-grade inflammation in subjects with abdominal obesity [38,39]. These indirect mechanisms may be linked to positive correlations between remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL levels.

The mechanics and kinetics of OxLDL in the blood stream remain unclear. It is possible that OxLDL might be partly released from atherosclerotic plaques in not only the coronary arteries, but also in the systemic arteries. The levels of OxLDL correlated with plaque morphology, especially macrophage-rich plaque [40], and the amount of OxLDL in the coronary plaque [41]. These results suggest that circulating OxLDL may be released from the atherosclerotic lesions. In the present study, there were no significant associations between remnant lipoprotein cholesterol, OxLDL, and number of diseased vessels. Then, we assessed correlations between remnant lipoprotein cholesterol, OxLDL, and extent of CAD defined by Gensini score [42]. The levels of OxPC were positively correlated with Gensini score. In addition, the trend of positive associations between RLP-C and Gensini score and between RemL-C and Gensini score were observed in the CAD group (data not shown). These results could explain the possibility that OxLDL might be partly released from atherosclerotic lesions.

There are several limitations to the current study. First, this investigation was a small sample-size study. However, this is, to the best of our knowledge, the first report to demonstrate the correlations of remnant lipoprotein cholesterol and OxLDL determined by different measurement methods. Studies with larger sample sizes are required to confirm these results. Secondly, the serum levels of other oxidative and inflammatory markers except hsCRP were not measured. It has been proposed that LDL oxidation may be part of local and systemic inflammatory reaction [43]. Thirdly, there were no significant differences in total or LDL cholesterol between the CAD patients and the control subjects. Therefore the results of the present study may not be representative of all patients with CAD.

In conclusion, this study showed that the association between high levels of remnant lipoprotein cholesterol and high OxLDL levels might be linked to atherogenesis in patients with CAD.

References

- [1] Havel RJ. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:102–9.
- [2] Kawakami A, Yoshida M. Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:73–6.