

厚生労働科学研究費補助金（non-HDL等血中脂質評価指針及び脂質標準化システムの構築と基盤整備に関する研究）

分担研究報告書

「non-HDL-C値とレムナントコレステロールおよびカイロミクロンレムナント蓄積を定量的に示すアポ蛋白B-48濃度との相関」

**分担研究者 山下静也 大阪大学大学院医学系研究科
総合地域医療学寄附講座 教授**

研究要旨

nonHDL-C(非HDLコレステロール値)はLDL-Cとレムナントコレステロールを含んであり、そのいずれも動脈硬化リスクを反映することからより適切なリスク評価マーカーとして提案されている。しかしながら後者は小腸由来のカイロミクロンが水解されて産生したカイロミクロンレムナント(CM-R)と肝臓由来のVLDLレムナントの両者を含んでおり、今までそれぞれを独立して検討することが困難であった。近年の分子生物学的・組織学的検討によりこのCM-Rは動脈硬化プラークの形成・進展に強く関与しており、我々はこのCM-Rの定量的マーカーであるアポB-48濃度測定を実用化した。様々な臨床症例での検討を継続的に行っているが、空腹時アポB48濃度は頸動脈内膜中膜複合体肥厚度や冠動脈狭窄罹患率と強く相関し、その高値は動脈硬化性疾患の発症に強くかかわっている事を突き止めた。今年度の検討では、まずCM-Rの健常者におけるスクリーニングを目指し検診例で空腹時アポB-48濃度を検討した。アポB-48濃度は、男性・閉経女性、BMI $25\text{kg}/\text{m}^2$ 以上、脂質異常症およびメタボリックシンドローム(MetS)患者で有意に高値であり、これらのリスク因子数の増加に相関して上昇した。さらに脂質異常のない健常例では基準値上限; $5.7\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、基準範囲(平均 $\pm 1.96\text{SD}$); $0.74\text{-}5.65\ \mu\text{g}/\text{mL}$ と判明した。さらに、nonHDL-C値とレムナントコレステロール値(RemL-C値)および空腹時アポB-48値との相関について検討した結果、nonHDL-C値はTC値・LDL-C値と強い相関を示し、TG値・RemL-C値と軽度の相関を示すがapoB-48との相関は見られるもののきわめて弱く、nonHDL-C値は内因性レムナントの蓄積を示すマーカーであることが判明した。

共同研究者

大阪大学保健センター 准教授 西田 誠
大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座 特任助教 増田大作
大阪大学医学部附属病院 臨床検査部 花田浩之
東京慈恵会医科大学 臨床医学研究所 客員教授 多田紀夫
東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 教授 吉田博
セントマーガレット病院 健康管理センター 新井俊彦

A . 研究目的

虚血性心疾患のリスクファクターである空腹時高TG血症の背景にTGリッチリポ蛋白(TRL、小腸由来のカイロミクロン[CM]および肝臓由来のVLDL)の増加が存在している。TRLがリポ蛋白リパーゼにより水解され形成されるレムナントには2種類存在し、小腸CM由来のカイロミクロンレムナント(CM-R)および肝臓VLDL由来のVLDLレムナントが含まれている。これらレムナントは血管壁に直接浸潤し、マクロファージの泡沫化や血小板凝集能の促進作用を有し動脈硬化惹起性を有している。レムナントの評価にはレムナントコレステロール(RLP-C、RemL-C)測定がすでに確立されているが、これはCM-RおよびVLDL-Rを合わせて測定することになりそれぞれ単独での評価が今まで不可能であった。しかし、頸動脈の剥離術後の動脈硬化プラークを組織学的に検討した研究では、血中のアポB-48含有リポ蛋白：アポB-100含有リポ蛋白の粒子数の比は1:100と圧倒的にVLDLが多数であるにもかかわらず組織中の粒子数はほぼ1:1とCM-Rの動脈硬化惹起性への強い関与を示す結果が得られており、CM-Rの定量的評価系の確立が求められていた。そこで、我々は世界に先駆けてCM1粒子に1分子存在するアポB-48の測定系を開発した(ELISA法¹・CLEIA法²)。アポB-48濃度は食後高脂血症患者(IIb型高脂血症³やCD36欠損症⁴、やカイロミクロン蓄積を有する患者¹)で有意に高値をみとめた。また、空腹時アポB-48濃度は食後のTG値の推移と強く相関する食後高脂血症のマーカーであり⁵、空腹時TG値正常群(100<TG<150 mg/dl)において頸動脈内膜中膜複合体の肥厚度と相関する事を見だし⁶、さらにアポB-48/TGが家族性型高脂血症の診断に有用であることを発見した⁷。さらに昨年度の検討では、冠動脈に有意狭窄を有する患者では空腹時アポB48値が有意に高値であり、この他のマーカーと比較して最も強く罹患率に相関し、さらに空腹時アポB-48の高値は他の動脈硬化性疾患リスク因子(高TG、低HDL-C、高HbA1c、低アディポネクチン血症)と重複するとより冠動脈疾患罹患率を有意に上昇させることが判明した⁸。以上のことから、CM-Rの蓄積を反映する空腹時アポB-48濃度は、動脈硬化惹起性を有するCM-Rの蓄積に強く相関することが判明した。

これまでの検討の対象は食後高脂血症や虚血性心疾患等既に進行した病態における検討が中心であり、これらの病態ではその平均値もすでに上昇している事が予想される。これに反して、健康診断等比較的病的な状態になる以前の病態における動脈硬化惹起性の判断のためのアポB-48濃度測定には、これらほとんど病的な異常を有さない集団における正常範囲(upper limitおよびreference interval)の決定が必須である。このことから、今回は検診受診者を対象として空腹時アポB-48濃度を検討する事とした。さらに、今回の研究班での健康事項であるnonHDL-C値はLDL-Cとレムナントコレステロールの両者を含んでおり、さらに後者はCM-RおよびVLDL-Rの両者を含んでおりそれぞれのレムナントがどの程度相関しているかを検討できなかった背景がある。そこで、我々の開発したアポB-48濃度測定、RemL-C濃度測定を用いて健康診断例におけるnon-HDL-C値との相関について検討を行うこととした。

¹ J Lipid Res. 2003;44:1256-1262. ² Clin Chim Acta. 2012;413:160-165. ³ Eur J Clin Invest. 2009;39(8):689-98. ⁴ J Lipid Res, 2009;50(5):999-1011. ⁵ J Atheroscler Thromb. 2011;18:1062-70. ⁶ Atherosclerosis. 2011;218:226-32. ⁷ J Atheroscler. Thromb. 2012;19(9):862-71. ⁸ Eur J Clin Invest. 2012;42(9):992-9

(倫理面への配慮)

本研究の内容は大阪大学医学部附属病院、大阪大学保健センター、慈恵医大柏病院の各IRBにて承認され、測定データ及び生体材料は匿名化され研究終了時に破棄された。被験者に不利益が生じた場合には同意撤回及び相談可能とした。

B . 研究方法

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

大阪大学医学部附属病院・大阪大学保健センター・慈恵医大柏病院・セントマーガレット病院に年1回の健康診断目的に受診した、なんらかの投薬のなされていない連続516症例を対象としすべてから文書にて試験内容に対する承諾を得た。BMI、ウェスト周囲径、血圧および空腹時LDL-C、中性脂肪(TG)、HDL-CおよびアポB-48濃度を測定した。アポB-48濃度は年齢・閉経前後・脂質代謝異

常の有無(LDL-C 140mg/dL, TG 150mg/dL, HDL-C <40mg/dLのいずれか)、metabolic syndrome(MetS)の有無およびそれぞれのリスク因子数によって比較した。さらに、この検討の結果確認された、脂質代謝異常を有さない1332例のアポB-48濃度の分布を平均値 \pm 2.58 standard deviation(SD)を外れる値を除外することをを繰り返しアポB-48濃度の基準値上限、基準範囲(平均 \pm 1.96SD)を決定した。

2. 空腹時アポB-48濃度・RemL-C値とnonHDL-C値の相関の検討

大阪大学保健センターに健康診断で受信した連続99症例に対して文書による同意を得て試験を行った。健診において採血された血清の残余を用いて血清アポB-48濃度、RemL-C濃度を測定した。これと、健診項目として測定された各患者のBMI、血圧、空腹時TC、中性脂肪(TG)、HDL-C、RemL-CおよびアポB-48濃度を測定し、Friedwald式によりLDL-C値を、nonHDL-C値をTC-HDL-Cにより、apoB-48/TG値を計算した。この上で、TC、TG、HDL-C、LDL-C、RemL-C、アポB-48濃度とnonHDL-C値の相関を検討した。さらに全体をnonHDL-C・TG・アポB-48濃度の大小で4分位に分け、それぞれにおけるTC・LDL-C・TG・HDL-C・nonHDL-C・RemL-C・アポB-48濃度の分布に関して比較した。

C. 研究結果

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

空腹時アポB-48濃度は男性で高値であり(3.8 \pm 3.3 μ g/mL vs 2.4 \pm 1.9 μ g/mL, p <0.001)(図1-1)、BMI25kg/m²以上(4.4 \pm 3.7 μ g/mL vs 2.8 \pm 2.4 μ g/mL, p <0.001)およびMetS患者(6.5 \pm 4.3 μ g/mL vs 3.0 \pm 2.6 μ g/mL, p <0.001)において有意に高値であった(図1-2)。さらにアポB-48濃度は脂質異常やMetSのリスク因子の増加に相関して上昇していた(図1-3)。さらに、脂質代謝異常を有さない1332例を用いアポB-48濃度の平均値 \pm 2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返した結果、空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mL、平均値は2.04 μ g/mL、平均 \pm 1.96SDの基準範囲は0.74-5.65 μ g/mLと判明した。以上の結果から正常脂質代謝の者のCLEIA法による空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mLと推定された。

2. 空腹時アポB-48濃度とeGFR低下・蛋白尿増加の相関の検討

健康診断での参加者99名全体の測定結果を表2に示す。測定結果によりnonHDL-C濃度と他項目の相関を検討すると、TC、LDL-C濃度との相関はR2値も0.8を超えており強い相関が認められた(図2)。しかしながら、RemL-C濃度・TG濃度との相関はその傾向がみられるものの弱い相関しかなく、またHDL-C濃度との逆相関もさらに弱いものであった。また、アポB-48濃度との相関は全く見られないわけではないが相関は極めて弱く、nonHDL-C値とアポB-48濃度との間には関連は見いだせなかった(図2、図3-1)。これに関しては、それぞれの項目のカットオフ値(TC:220、LDL-C:140、TG:150、HDL-C:40 mg/dl)で2群に分けた場合、そのいずれかの群においてより強い相関を示すことはなかった。さらに、nonHDL-C・TG・アポB-48濃度により全体を4群に分けて他項目の濃度変化を検討したが、TG値上昇と相関するのはRemL-C・アポB-48濃度(図3-2)、アポB-48濃度と相関するのは同じくTG・RemL-C濃度であり(図3-3)、nonHDL-C濃度には影響を与えなかった。

D. 考察

今回の検討では空腹時アポB-48濃度のスクリーニングにおける基準値の決定を目指して健常例における空腹時アポB-48濃度の分布を検討し、さらに近年動脈硬化性疾患の独立したリスクであるとする報告が集積しつつあるnonHDL-C濃度とカイロミクロンレムナント蓄積を示すアポB-48濃度の間に関係があるか否かについて検討した。

まず、基準値の検討では、4施設から516症例の登録を得た。従来 of 検討と同様に、空腹時アポB-48濃度の分布は男性および閉経後女性において高値であり、女性ホルモンのレムナント蓄積リスクの低下作用を示唆する結果であった。さらに脂質代謝以上や肥満、メタボリックシンドロームの存在はアポB-48濃度を上昇させるが、その異常リスクが1個でも存在するとアポB-48濃度上昇に影響を与えるため、正常値の検討には脂質代謝異常を有さない健常例(332例)を用いた。アポB-48濃度の平均値 \pm 2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返すことにより得られた結果は基準値上限は5.7 μ g/mL(基準範囲;0.74-5.65 μ g/mL)であった。昨年の検討では、冠動脈疾患

罹患率でのアポB-48のcut-off値は4.34 μ g/ml(sensitivity, 0.82; 1-specificity, 0.33; predictive positive value, 79; predictive negative value, 61)であり、今回の基準値上限よりも低い結果であった。この事はアポB-48濃度の上昇で示されるCM-Rの蓄積は検診で正常に判断される集団においても認められており、冠動脈リスク評価に関して更なる評価項目の検討が必要である事が示唆された。現在、動脈硬化性疾患ガイドラインで示されている脂質異常の基準値上限ではこれらCM-Rの蓄積で表される潜在的な動脈硬化リスクを有する群のスクリーニングには不向きであり、今回のアポB-48濃度などより適切なスクリーニングマーカーの開発が急がれる。

さらに、今回は動脈硬化惹起性に直接影響を与えるマーカーとして様々な臨床検討結果が蓄積しつつあるLDLおよびレムナントを量的に推定できるnonHDL-C濃度とCM-R蓄積を示すアポB-48濃度の素管について検討を行った。レムナントの動脈硬化惹起性においてカイロミクロンレムナントの蓄積は近年その強い動脈硬化惹起性から注目を集めている。また組織学的な検討においてもプラークへの易蓄積性が示されており、nonHDL-C値で示されるレムナントコレステロールの上昇とアポB-48の間に相関があることが予想された。しかし、今回の99例の健康診断例との相関検討においてはnonHDL-C濃度とアポB-48濃度との相関は見られておらず、他のマーカーの影響を除くべくカットオフ値以下の基準値範囲内で検討しても相関は見られなかった。この原因としては、アポB-48濃度はアポB-100濃度の100分の1程度しかなく血中のカイロミクロンレムナントの存在はnonHDL-C濃度との相関に関してはほとんど影響を与えていないことが示唆された。しかし、nonHDL-C濃度は他のTC・LDL-C濃度やRemL-C濃度と強い相関が示されており、nonHDL-C濃度であらわされるLDL-C値・レムナントコレステロール濃度の上昇をよく反映していることが確認できた。また、空腹時TG濃度との相関も認められたことから、内因性のTGリッチリポ蛋白であるVLDL由来のVLDLレムナント

との相関が強いことが示唆された。すなわち、nonHDL-C濃度はLDLの増加と内因性のレムナント蓄積を示すマーカーであると示唆された。今後、このnonHDL-C濃度とアポB-48濃度の動脈硬化惹起性の有用性に関する検討を目的に頸動脈エコーでのIMT肥厚度や冠動脈狭窄の有病率・心血管イベントのとの相関を検討しいずれのマーカーがより動脈硬化惹起性を予見できるかを検討することが望まれる。

E . 結論

脂質異常を有さない健常者における空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mL (基準範囲;0.74-5.65 μ g/mL)であった。またnonHDL-C値はTC・LDL-C・TG・RemL-C濃度との相関が強いがアポB-48濃度との相関は極めて低く、LDLの増加と内因性のレムナント蓄積を示すマーカーであると示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda D, Nishida M, Arai T, Hanada H, Yoshida H, Yamauchi-Takahara K, Mori-yama T, Tada N and Yamashita S. Reference Interval of Apolipoprotein B-48 Concentration in Healthy Japanese Individuals (J Atheroscler Thromb印刷中)

* 下線論文は主要論文なので、「研究成果の刊行に関する一覧表」に掲載する。

2. 学会発表

European Atherosclerosis Society(H25)
日本循環器学会学術集会(H25)
日本動脈硬化学会学術集会(H25)

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

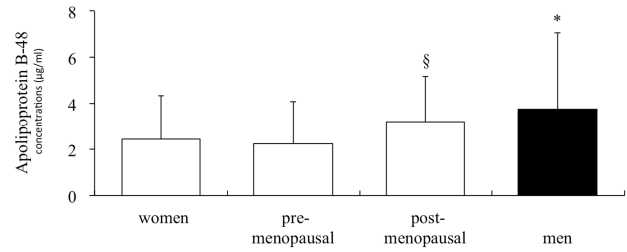
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表1 参加者脂質・糖質代謝項目の結果

	Mean ± SD	Reference Interval
Men/Women	284/232	
Age (year)	42±10/42±11	
post-menopausal	48/232	
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.3	22.0 – 22.7
Waist circ. (cm)	91.1 ± 5.6	90.0 – 92.2
sBP (mmHg)	115.9 ± 14.6	114.6 – 117.2
dBp (mmHg)	73.2 ± 11.3	72.2 – 74.2
TC (mg/dL)	199 ± 31	196.0 – 201.6
TG (mg/dL)	94 ± 69	87.7 – 99.7
HDL-C (mg/dL)	65 ± 15	63.1 – 65.9
LDL-C (mg/dL)	121 ± 29	118.1 – 123.3
FBG (mg/dL)	87 ± 13	86.2 – 88.5
HbA1c (JDS) (%)	5.0 ± 0.5	4.9 – 5.1

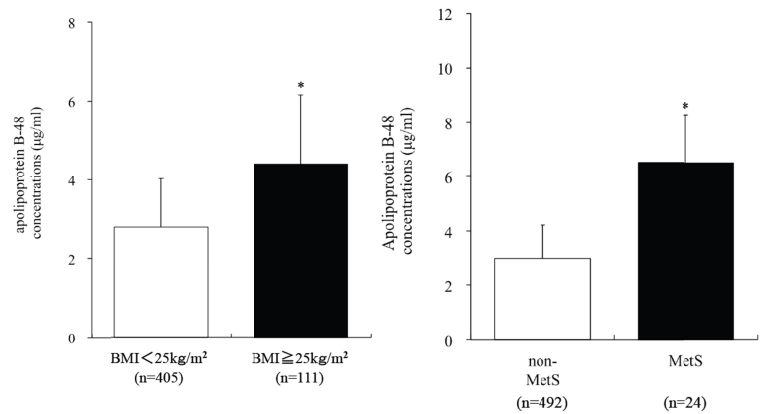
	Number of Patients
BMI ≥25 kg/m ²	111 (21.5%)
BMI <25 kg/m ²	405 (78.5%)
Hypertension	47 (9.1%)
high BP status	103 (20.0%)
high FPG	10 (1.9%)
Number of Abnormal Factors for Dyslipidemia	
0	337 (65.3%)
1	138 (26.7%)
2	37 (7.2%)
3	4 (0.8%)
Number of Risk Factors for Metabolic Syndrome (MetS)	
0	303 (58.7%)
1	135 (26.2%)
2	53 (10.3%)
3	24 (4.6%)
4	1 (0.2%)

図1-1 性差と閉経前後の比較



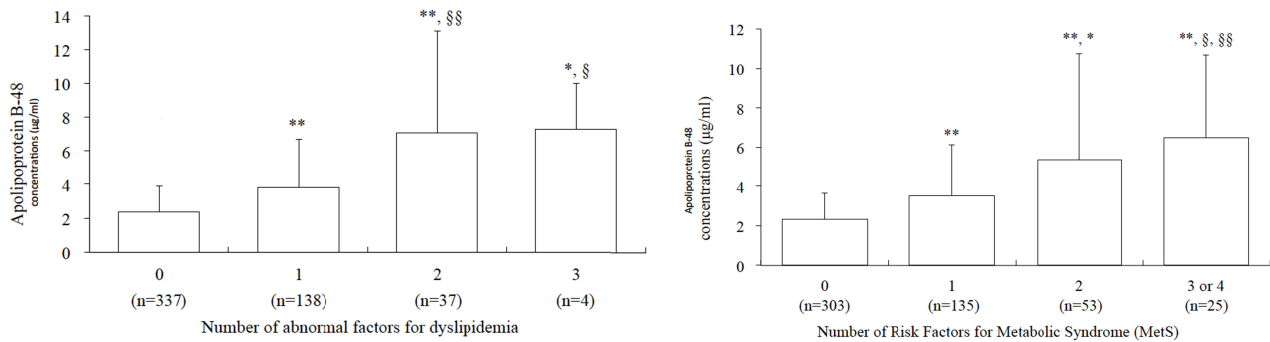
(* p<0.001 against women, § p<0.001 against pre-menopausal women, assessed by Mann-Whitney U test)

図1-2 BMI値・MetSとアポB-48濃度の関係



(* p<0.001 assessed by Mann-Whitney U test)

図1-3 脂質異常因子数・MetS 因子数とアポB-48濃度の分布



(* p<0.01, ** p<0.001 against cases with no abnormal factor, § p<0.05, §§ p<0.001 against cases with 1 abnormal factor, assessed by Mann-Whitney U test)

表2 参加者のプロフィール

sex	(m:f)	70 vs 29
BMI	(kg/m ²)	23.5 ± 3.5
waist circumstanes	(cm)	79.7 ± 10.3
systolic BP	(mmHg)	119.1 ± 14.9
diastolic BP	(mmHg)	76.2 ± 12.0
visceral fat area	(cm ²)	81.9 ± 47.5
TC(total cholesterol)	(mg/dl)	197.5 ± 33.3
TG	(mg/dl)	90.1 ± 59.9
HDL-C	(mg/dl)	64.6 ± 15.4
Non HDL-C	(mg/dl)	132.9 ± 35.9
LDL-C	(mg/dl)	114.9 ± 35.9
TG	(mg/dl)	90.1 ± 59.9
apoB-48	(μg/ml)	3.5 ± 2.9
apoB-48/TG		0.041 ± 0.020
FPG	(mg/dl)	87.6 ± 7.9
HbA1c	(%)	5.0 ± 0.5

図2 nonHDL-C 値と他の測定項目との相関

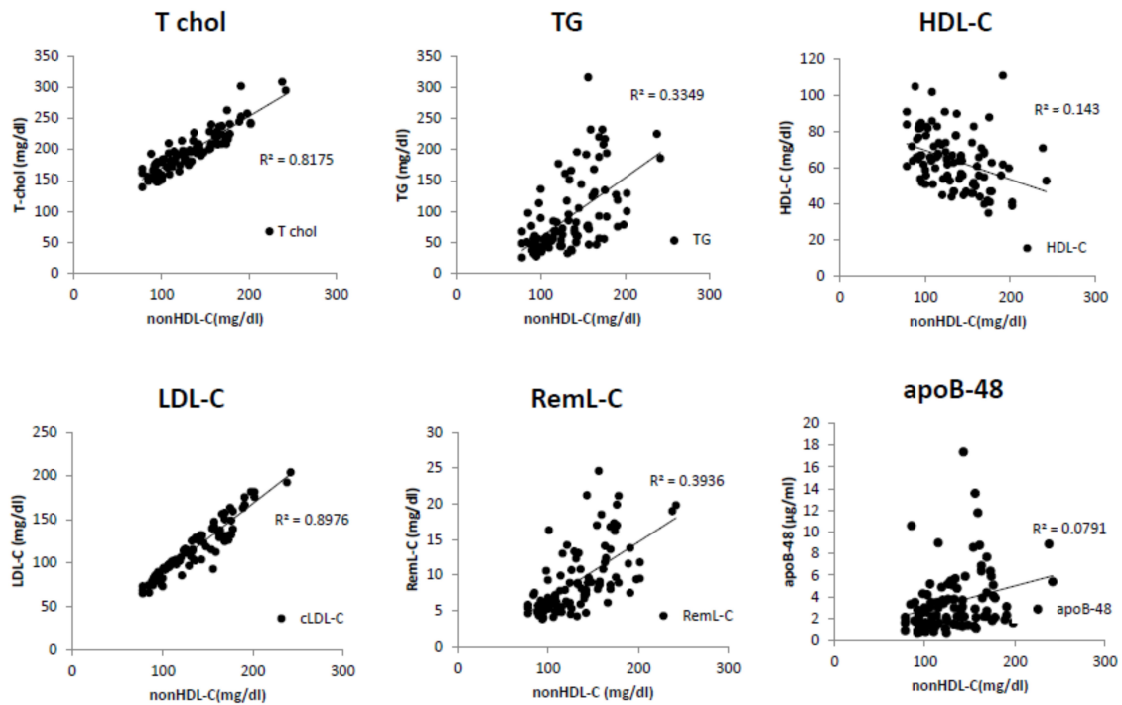


図 3-1 nonHDL-C 値による 4 分位各群における測定項目の比較

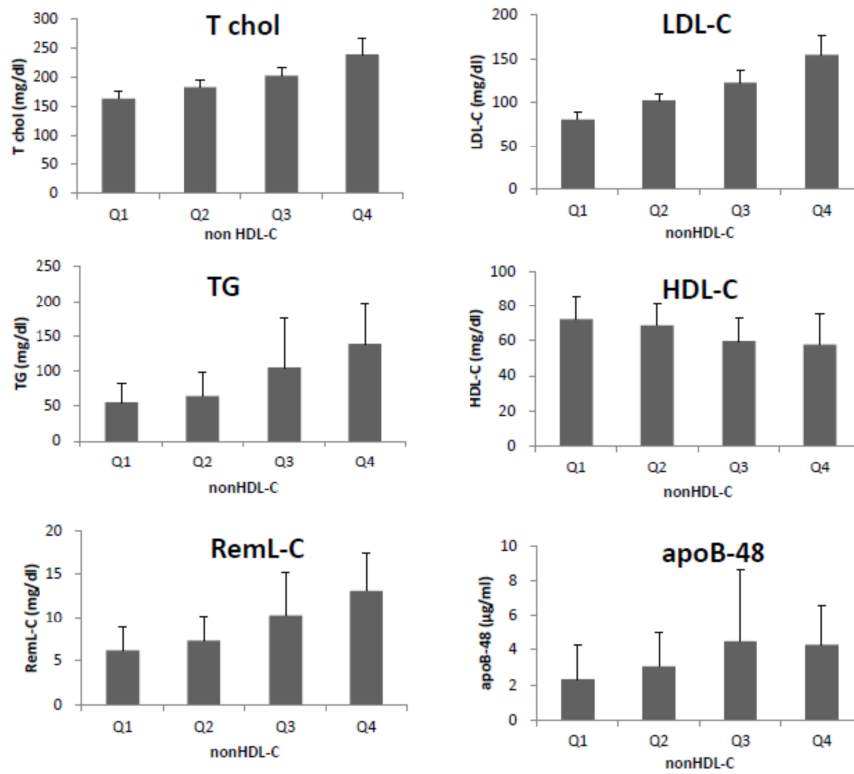


図 3-2 TG 値による 4 分位各群における測定項目の比較

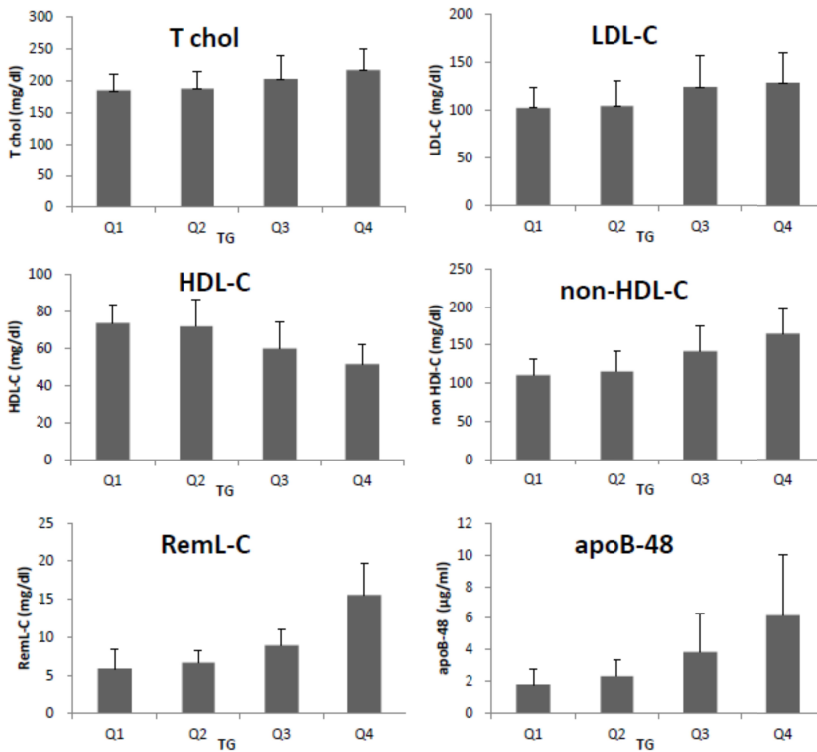


図 3-3 TG 値による 4 分位各群における測定項目の比較

