

## 症例報告

# 高 HDL-C 血症例の追跡調査

浜松赤十字病院 検査部

青山清志, 塩見延広

同 内科

矢島 賢

### 要 旨

動脈硬化の予防に対して、脂質に対する検査法とその値は重要視されている。その動脈硬化症の危険因子のひとつに、血液中の脂質に含まれるリポ蛋白 (Lipoprotein: LP) 中の Small-dense-LDL があげられる<sup>1,2)</sup>。Small-dense-LDL を含め脂質の同定についての分析は、リポ蛋白が組成、比重、粒子サイズ、荷電などが異なる不均一な粒子群であるため、目的の粒子を判定するには苦慮するところがある<sup>3)</sup>。我々は、第10回院内学会での高 HDL-C 血症の症例を交えた HDL の機能と CETP の特徴についての発表後、本症例は Small-dense-LDL によって動脈硬化を促進させているのか否かに着目し、各検査法を絡めあわせながら動脈硬化の進捗について検討した。本症例は、現在も定期的に血液分析検査を施行しながら、経過観察を続けている。

### Key words

Atherosclerosis (粥状動脈硬化), hyper-HDL-cholesterolemia (高 HDL-C 血症), CETP (コレステロールエステル転送蛋白), Small-dense-LDL, Polyacrylamide gradient gel (PAGG)

## I. 緒 言

食生活やライフスタイルの変化に伴い、動脈硬化症は増加の一途を辿っている。動脈硬化はコレステロールを抱えた低比重リポ蛋白 (LDL) が<sup>3)</sup>、血液中で過剰に存在し酸化変性を帯びた場合、本来の代謝経路とは異なったスカベンジャー経路といわれる別のルートで血管内に取り込まれてしまうために、血管内壁が傷ついて構造的な変性を起こしていく状態 (図1) と理解されている<sup>4~6)</sup>。その動脈硬化症の進展につながる要因のひとつが Small-dense-LDL である。一方、高比重リポ蛋白 (以下、HDL-C) は、動脈壁を含む全身組織からコレステロールを取り去り、エステルなどの脂質を肝臓に転送して、動脈硬化の進行を止めたり、退縮させる働きがある。その中で高 HDL-C 血症は、当然ながら、動脈硬化防御機構としてコレステロール逆転送は円滑に行われている疾患であると捉えられていた。しかし高 HDL-C 血症の中に

は末梢部に脂質蓄積を伴い、合併症への移行を示す病態を生じやすいとの報告例<sup>7)</sup>もあったことから、我々は本症例において脂質分析に熟練技術と費用を要する超遠心脂質分析法を取り止め、ポリアクリルアミドグラジエントゲル (Polyacrylamide gradient gel (以下、PAGG)) を用いた電気泳動法によるリポ蛋白分画精密測定法を軸に、リポ蛋白の荷電の違いを利用したアガロース電気泳動法 (タイタンジェリリポ蛋白キット (ヘレナ研究所, J3045)) ほか簡便なる検査法を用いて、血中のリポ蛋白 (LP) の中に Small-dense-LDL が占める割合を分析することで動脈硬化の進捗を検討した。

## II. 症 例

54歳, 女性.

身体概要; 身長155cm・体重39kg・血圧137-82mmHg. 現病歴; アテプシン<sup>®</sup> (リファンピシン) 450mg/日, イスコチン<sup>®</sup> (イソニアチド) 300mg/日, エ

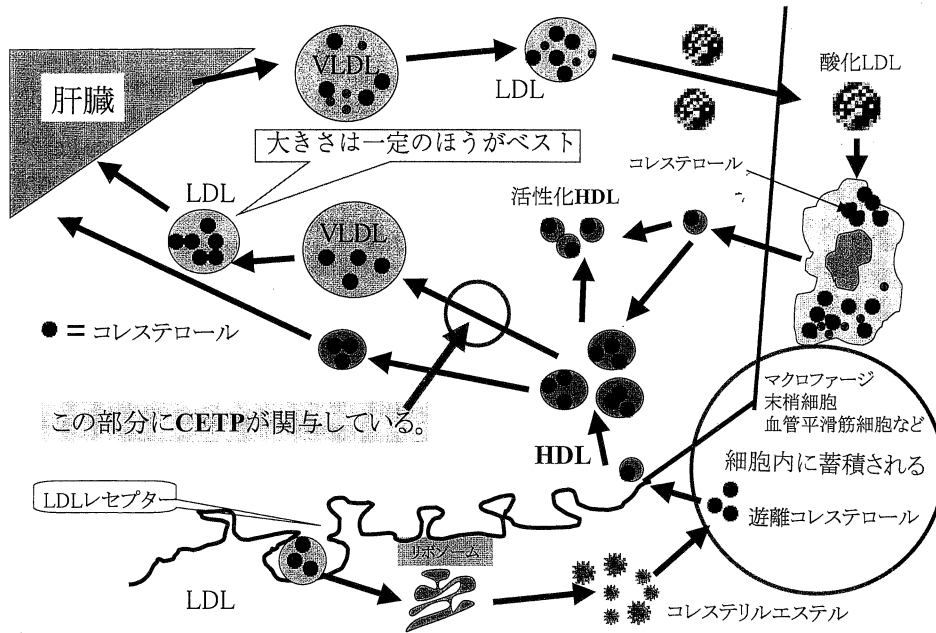


図1 脂質の代謝経路

サンプトール® (塩酸エタンプトール) 750mg/日の三種類の抗結核剤の内服を平成16年11月より開始し、平成17年7月に終了した。喫煙は日に10本程度、飲酒はビール750~1000ml/日で数年に渡る。総コレステロール値が300mg/dl以上を呈していたことから、HMG-CoA 阻害薬リバロ® (ピタバスタチン) 2mg/日の内服を平成17年2月から開始したが、その後、薬剤性の肝機能障害が疑われたため、リバロ投薬を平成17年4月下旬で中止した。平成17年6月にγ-GTP値が正常域高値の2倍を示したのを境に原発性胆汁性肝硬変の疑いがあると判断し、肝胆道系疾患に対する薬剤ウルソ® (ウルソデオキシコール酸) 600mg/日を開始した。同薬剤は現在も継続投与中である。虚血性心疾患、角膜輪混濁などの病態変化は現在も認めていない<sup>7)</sup>。

家族歴；母親；高脂血症。食事療法および高脂血症治療薬内服中である。

家族の検査測定値：(表1)

家族のLDL-C値はLDL-C間接法にてFriedewald式(F式)から換算した。

Friedewald式(F式)=

$$LDL-C = T-Cho - HDL-C - (TG/5)$$

検査所見；(表2)

平成17年1月の臨床検査のデータは、血清コレステロール値、HDL-C値共に高値を示していた。LDL-C値については正常域であった。動脈硬化の直接因子となるリポ蛋白群は正常域であったが、分画測定よりHDL-Cそのものに付随するアポ蛋白群のひとつ、アポA-1が正常域の2倍近く増加し、生体内のTGを抑えるためのApoC3も増加していた。動脈硬化の進行度合いの検討項目としての、アポ蛋白Eも増加の傾向を示していた。反面、HDL中のコレステロールをLDLに受け渡す役目をするコレステリルエステル転送蛋白(CETP)は低下していた。血圧脈波検査では、脈波伝播速度(bulbus Pulse Wave Velocity: baPWV)で右上肢から下肢までの伝播速度が正常域(<1400以下)の1.34倍を示し、左上肢から下肢までの伝播速度ではbaPWVは1.46倍と高値を示した。一方、足関節収縮期血圧を上腕収縮期血圧で割ったAnkle-Brachial Index: ABI<sup>8,9)</sup>の結果は、正常域内であった。Rich-VLDLの存在を明確にするためのアガロース電気泳動法による脂質解析では、HDL-Cを示す波形だけが正常の泳動波形に比べ高波形値を示していた(図2)。FriedricksonおよびWHOにより提唱された高

表1 家族歴および家族の検査測定値

検査項目	本人	母親	妹	弟	正常域
総コレステロール	345	174	248	240	150~219 mg/dl
中性脂肪	81	61	111	85	50~149 mg/dl
HDL-C	218	96	81	62	41~86 mg/dl(男性) 41~96 mg/dl(女性)
LDL-C	112	66	145	159	70~139 mg/dl (直接法測定)
LDL-C	110	65	144	161	70~139 mg/dl (間接法測定)

表2 臨床検査データ値

(平成17年1月)	<p>生化学・免疫検査：</p> <p>345 mg/dl 81 mg/dl 218 mg/dl 112 mg/dl 25 IU/L 12 IU/L 0.9 mg/dl 105 mg/dl (1.287)</p> <p>血液検査：</p> <p>3560 /<math>\mu</math>L 437x10<sup>4</sup> /<math>\mu</math>L 11.0 g/dl 34.7 % 79.4 fl 25.2 pg 31.7 % 34.9 x 10<sup>4</sup> /<math>\mu</math>L</p> <p>リポ蛋白分画測定：</p> <p>52.4 % ↑ 10 % 36.8 % 342 mg/dl ↑ 39.7 mg/dl ↑ 87 mg/dl 5.3 mg/dl ↑ 17.8 mg/dl ↑ 6.1 mg/dl ↑</p> <p>(-) 13.9 mg/dl 5.5 mg/dl 1.1 <math>\mu</math>g/ml</p> <p>1.25 1.28</p> <p>1877 2037</p>	<p>T-Cho T G HDL-C LDL-C AST(GOT) ALT(GPT) T-Bil Glucose LDL-C/Apo-B</p> <p>WBC RBC Hb Ht MCV MCH MCHC PLT</p> <p><math>\alpha</math> HDL Pre-<math>\beta</math> LDL <math>\beta</math> VLDL Apo A-I Apo A-II Apo B Apo C 2 Apo C 3 Apo E</p> <p>抗M2抗体 リポ蛋白 (a) RLP-C CETP蛋白量： 血圧脈波検査 (動脈の詰まり：A B I)</p> <p>Right Left (動脈の硬さ：b a P W V) Right Left</p>	<p>生化学・免疫検査：</p> <p>268 mg/dl 62 mg/dl 155 mg/dl 101 mg/dl 22 IU/L 14 IU/L 0.7 mg/dl 94 mg/dl (1.093) 正常域 (1.200以上)</p> <p>血液検査：</p> <p>5040 /<math>\mu</math>L 471x10<sup>4</sup> /<math>\mu</math>L 15.1 g/dl 44.2 % 93.8 fl 25.2 pg 32.1 % 24.0 x 10<sup>4</sup> /<math>\mu</math>L</p> <p>リポ蛋白分画測定：</p> <p>40.9 % ↑ (正常域：<math>\alpha</math> 31.5 - 51.5 %) 17.5 % (正常域：Pre-<math>\beta</math> LDL 2.6 - 24.6 %) 35.4 % (正常域：<math>\beta</math> VLDL 36.5 - 53.3 %) 297 mg/dl ↑ (正常域：126 - 165 mg/dl) 44.8 mg/dl ↑ (正常域：24.6 - 33.3 mg/dl) 92 mg/dl (正常域：66 - 101 mg/dl) 5.5 mg/dl ↑ (正常域：1.5 - 3.8 mg/dl) 17.5 mg/dl ↑ (正常域：5.4 - 9.0 mg/dl) 4.9 mg/dl ↑ (正常域：2.8 - 4.6 mg/dl)</p> <p>(-) 10.6 mg/dl (正常域：30 mg/dl以下) 6.0 mg/dl (正常域：7.5 mg/dl以下) 廃止の為、測定不可 (正常域：1.4-2.5 <math>\mu</math>g/ml以下)</p> <p>1.12 正常領域 0.9 - 1.3 1.12 正常領域 0.9 - 1.3</p> <p>1722 正常領域 &lt; 1400 cm/s 1824 正常領域 &lt; 1400 cm/s</p>	(平成17年10月)
-----------	--	---	---	------------

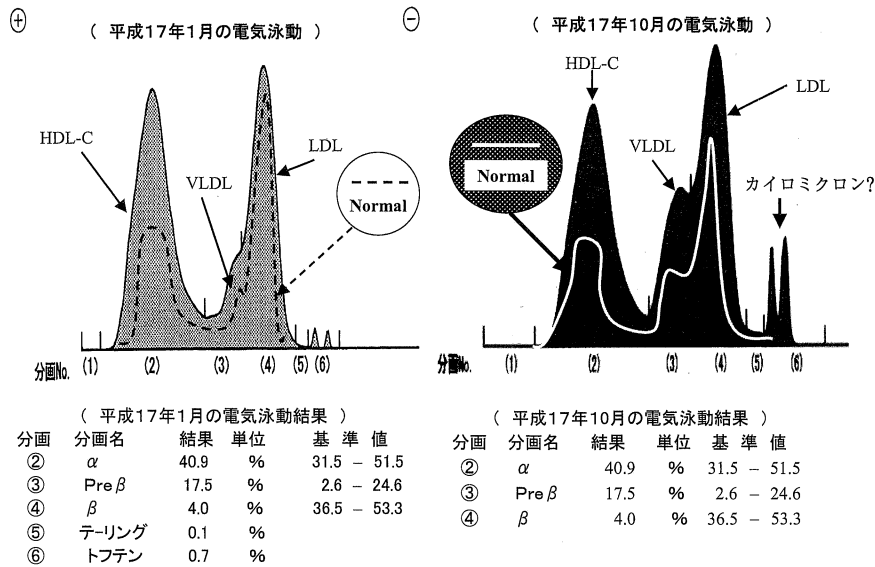


図2 電気泳動法によるアガロースゲル分画測定

Fredrickson の分類 (Type)	Normal	I	IIa	IIb	III	IV	V
コレステロール(mg/dl)	<220	<220	>220	>220	>220	<220	>200
トリグリセリド(mg/dl)	<150	>1000	<150	150-500	>150	150-1000	>1000
電気泳動パターン アガロース	origin → β → pre β → α → +	カイロミクロン →					→
PAGE サンプルゲル 分離ゲル	VLDL → LDL → HDL → +	→					→

バンドの濃度の比較: 染色濃度: ● > ● > ●

図3 泳動結果による Fredrickson の分類

脂質血症分類<sup>10)</sup>では、Type II a を示していた(図3)。通常、一般的な臨床検査では、LDLの粒子サイズを測定する方法はないが、LDLの小型化を推測することは可能である。その計算式は[LDL-C値/ApoB値]であり、割合が1.200以下であれば Small-dense-LDL の可能性を示唆する<sup>11)</sup>。本例についても LDL-C 値を血清 ApoB で除した後、その割合を求めたところ1.287の数字を呈していた。本例では Small-dense-LDL を呈し

ていると推測される1.200以下の基準域には当てはまらなかった。一方、PAGE を使用して LDL サイズを確認するための電気泳動法によるリポ蛋白分画精密測定法を行ったところ、波形②と④の間に MIDBAND を確認した(図4)。平成17年10月の臨床検査のデータでも血清中コレステロール値、HDL-C 値共に高値を示していた。LDL-C 値については正常域であった。動脈硬化の直接因子となるリポ蛋白群も正常域であった。分画測定よ

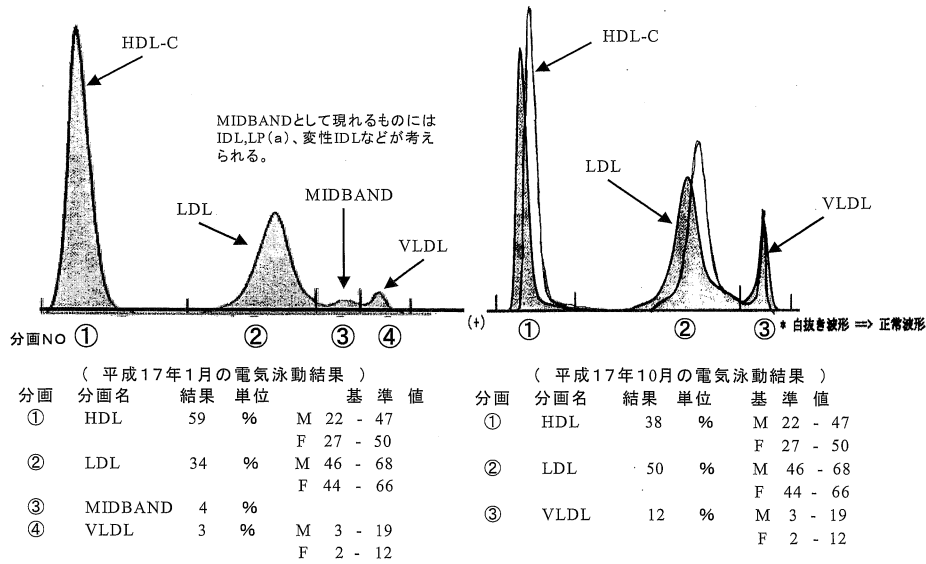


図4 電気泳動法によるリポ蛋白分画精密測定

リアポ A-1は前回同様に正常域の2倍近くであったが、平成16年1月のデータと比べ若干の低下傾向を示した。ApoA-II, ApoB, ApoC2は増加傾向を示し、ApoEは減少傾向を示していた。コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) は検査自体が廃止になっている為、測定できなかった。

血圧脈波検査 baPWV ならびに ABI の結果は前回よりも低い数値を示していた。また LDL-C 値/Apo-B 値は1.093と1.200以下の割合を示した。アガロース電気泳動法は、平成17年1月の結果と比べ、HDL-Cを示す波形はやや前回よりもピークが低下の傾向を示していたが、正常波形と比べると高波形であった。LDLを示すβ領域から以降にカイロミクロン領域と思われる部位に僅かながら二箇所波形を認めた。平成17年1月の泳動解析結果との比較では数値の有意差はなかった(図2)。再度、LDLサイズを確認するため、リポ蛋白分画精密測定法を行った。前回の検査でのMIDBANDの波形呈示は認められなかった(図4)。

### Ⅲ. 考 察

動脈硬化についての研究は近年大幅に進んでおり、1990年のCirculationとJAMAでは、Small-dense-LDLを惹起させる要因を持つ病例は、正常

のLDL粒子サイズを有する人に比べ、冠状動脈硬化性疾患(CHD)(図5, 図6)の発症が3倍も高率であることが報告されている<sup>12,13)</sup>。特にインスリンに抵抗性を示す2型糖尿病や肥満の方には、このSmall-dense-LDLが出現しやすいとAustinらは報告している<sup>14)</sup>。第10回院内学会では、高HDL-C血症の主な原因は、コレステロール逆転送系に関わりを持ち、その臨床的意義が注目されているコレステリルエステル転送蛋白(Cholesterylester Transfer Protein: CETP)とよばれる動脈硬化症に予防的に作用している蛋白の遺伝子変異によるものが最有力であること、CETP欠損症ではHDL-Cのみならず低比重リポ蛋白(LDL-C)<sup>15)</sup>にも質的異常をきたすことを報告した。本症例は、高TG血症、耐糖能の異常、高血圧の既往は認めなかった。続発性としての胆汁うっ滞性肝障害の他、長期大量飲酒(CETP活性低下)や種々の薬剤に起因する要因も、腹部超音波検査ほか各種の検査からは確認できなかった。しかしLDL-Cの小型化を数値上から推測する上でのLDL-C/ApoB値の割合では1.093の数値を呈しており、基準とする1.200以下を示していたことで平成17年度10月のPAGGの結果のなかでMIDBANDが泳動波形上に出現していなくても、LDLはSmall-dense-LDLに変化しているのでは

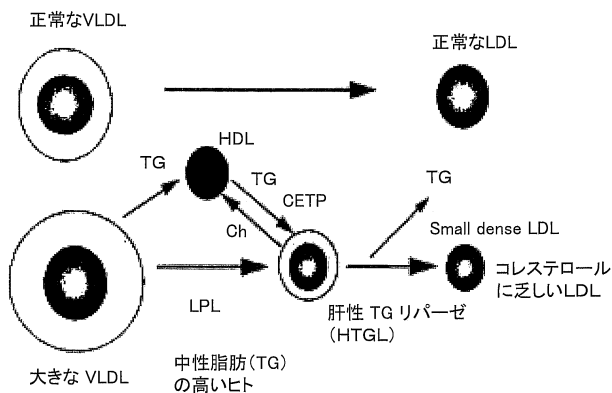


図5 高トリグリセライド (TG) 血症における Small dense LDL生成機序

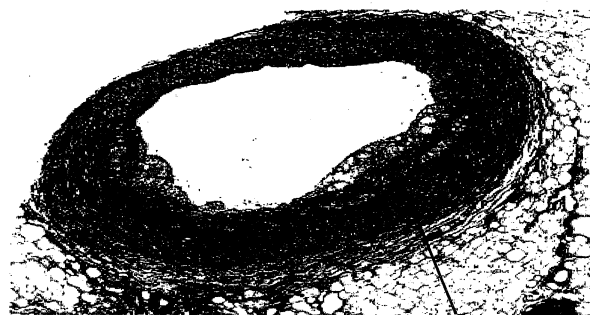


図6 アテローム性粥状硬化による血管 動脈硬化の進んだヒトの冠状動脈, 粥状硬化巣の形成, 平滑筋の増殖などがかさなり, 最終的には血管の内腔はつまってしまう。(写真提供:内藤 眞)

図6 アテローム性粥状硬化による血管

ないかという疑問が生じた。またもう一方では、血液中のコレステロールを VLDL が受け取り Rich VLDL に変化しているのではないかとも考えた。それらを明確にするため、今回我々は脂質分析に熟練技術と費用を要する超遠心脂質分析法を取り止め、保険診療上認められている三島ら<sup>11)</sup>が推奨する“リポ蛋白分画精密測定法”を主軸に、アガロース電気泳動法ほか簡便なる検査法を組み合わせることで LDL サイズの検討をおこなった。“リポ蛋白分画精密測定法”は“リポフォー”とよばれる均一な濃度の高分子ゲル物質、PAGG を用いており、分子ふるい効果を利用して分離する方法である。本法はリポ蛋白の粒子サイズにより分画されるため、IDL, LDL, HDL の粒子サイズによる分離が明確である。利点として LDL と TG リッチリポ蛋白 (VLDL, IDL ほか) との分画が明瞭なうえ、カイロミクロンレムナントと IDL の分画が出来ることも含めて、Small-dense-LDL の推定が可能である。反面、分画像の保管が難易であり、泳動終了後にはそのゲルをデジタル写真にて記憶媒体に保存しなければならない。また各脂質別の染色やアポ蛋白染色、アポ蛋白組成別の分画が出来ないことが問題であった。図の解析として、中間の LDL ピークが粒子サイズの大きい VLDL ピーク寄りであればノーマルサイズの LDL であり、HDL ピーク寄りであれば、Small-dense-LDL と推定される。また各波形の頂点から頂点までの距離、 $b/a$  が 0.400 以上であれば Small-

dense-LDL の存在が推定されるため、極めて簡易で有用な検査法と考えられる (図7)。結果として本症例では平成17年1月, 10月の両方共に <0.400以下の値を示した。もう一方のアガロース電気泳動法は、泳動ゲル自体が乾燥状態で保管できる。またデンストメトリが容易なうえ、精度や再現性に優れている。さらに Slow- $\alpha$  リポ蛋白ほかアポ蛋白組成の違いによる分画ができること、各脂質別の染色や免疫固定法によるアポ蛋白染色が可能であることが利点として報告されている。反面、ヘパリン検体では検査出来ず、カイロミクロンレムナントと  $\beta$ -リポ蛋白の分画が困難であることが欠点であるとも報告されている。“リポ蛋白分画精密測定法”と“アガロース電気泳動法”の利点と欠点については表3に記載する。今回は互いの利点をうまく利用して異常リポ蛋白脂

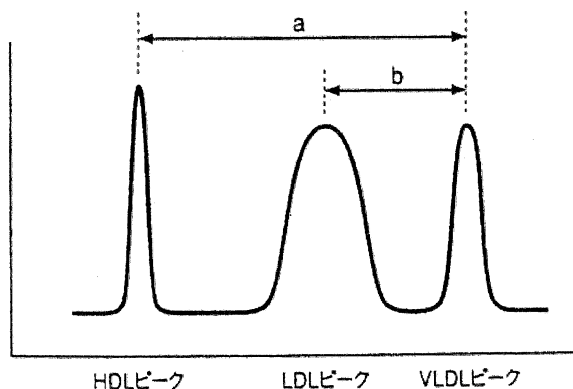


図7 LDL サイズの簡単な検出法

表3 アガロースとポリアクリルアミド電気泳動の特徴

アガロース電気泳動

利点:

- ①電気泳動後のゲルは乾燥して保管可能
- ②デンストメトリが容易で、精度、再現性に優れている
- ③Slow- $\alpha$ リポ蛋白などアポ蛋白組成の違いによる分画ができる
- ④各脂質別の染色や免疫固定法による蛋白染色が可能である
- ⑤ロケット電気泳動法や交差免疫電気泳動などによりアポ蛋白組成別の分画が可能である
- ⑥平板アポアクリルアミドゲルを用いて2次元電気泳動が出来る

欠点:

- ①Small-dense-LDLの検出ができない
- ②カイロミクロンレムナントと $\beta$ -リポ蛋白の分画が困難
- ③Pre- $\beta$ -リポ蛋白またはPre- $\beta$ -と $\beta$ -の中間の移動度をもつ(IDLなど)リポ蛋白が増加すると $\beta$ -リポ蛋白との分画が困難
- ④ヘパリン投与検体などで fast moving となり分画ができない

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

利点:

- ①LDLとTGリッチリポ蛋白(VLDL,IDLなど)との分画が明確である
- ②カイロミクロンレムナントとLDLの分画ができる
- ③高感度であるため粒子サイズのわずかの違いを検出できる
- ④Small-dense-LDLの検出やⅢ型高脂血症由来のリポ蛋白やIDLなどの検出が容易である

欠点:

- ①電気泳動後のゲル保管がむずかしい
- ②デンストメトリーの定量性はあまりない
- ③分画像の保管には写真撮影やイメージスキャナーまたはCCDカメラによるコンピュータへの入力が必要である
- ④各脂質別の染色やアポ蛋白染色、アポ蛋白組成別の分画などの応用がむずかしい

質の解析を推し進めた。一方、PAGGを使用せず臨床検査値からもLDLの小型化を推測することは可能であり、計算式や直接法で求めたLDL-C/Apo-B値が1.200以下であればSmall-dense-LDLの出現している可能性は高い。文献ではLDLの値が高値でないにも関わらず、血清アポBが高値を示す場合にはLDLが小型化していると判断してよいと報告されている<sup>16)</sup>。

これはSmall-dense-LDLが組成上コレステロールに乏しくアポBに富んでいるからである<sup>17)</sup>。本症例は平成17年10月の検査結果からはアガロース電気泳動法でもSlow- $\alpha$ リポ蛋白のブロードが認められず、リポ蛋白分画精密測定法でもMIDBANDは確認できなかった。よってSmall-dense-LDLの惹起の可能性は乏しいと考えられた。反面、LDLを示す $\beta$ 領域から以降のカイロミクロン領域と思われる部位に僅かながら2ヶ所に波形を認めたことで、VLDLは若干ではあるがRich VLDLに変化している可能性が推測された。

#### IV. 結 論

今回、高HDL-C血症の一症例において、動脈硬化症を惹起させる要因としてのSmall-dense-

LDLのチェックの脂質分析に熟練技術と費用を要する超遠心脂質分析法を外し、保険点数適応の認可がおりた高分子ゲル物質(PAGG)による電気泳動法とアガロース電気泳動法ほか各検査法を組み合わせ検討した<sup>17)</sup>。

今回の研究を通して、動脈硬化の指標としてSmall dense LDLや中間リポ蛋白(IDL)の存在を明確に確認するためには、アガロース電気泳動法のみならず、ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動法が有用と思われる。

#### 文 献

- 1) Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass and risk of coronary disease. *Curr Opin Lipidol* 1991 ; 4 : 248-252.
- 2) Krauss RM. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and Atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol* 1994 ; 5 : 339-349.
- 3) Matsuzawa Y, Yamashita S, Kameda K, et al. Marked hyper-HDL2-cholesterolemia associated with premature corneal opacity : A case report. *Atherosclerosis* 1984 ; 53 : 207-212.
- 4) Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F,

- et al. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites : A potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res* 1998 ; 39 : 1263-1273.
- 5) 平野賢一, 山下静也, 松沢佑次. 高HDL血症の atherogenicity に関する検討—コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) と肝性リパーゼ (HTGL) 両者の低下した高HDL血症の atherogenicity. *The Lipid* 1996 ; 7(4) : 404-408.
  - 6) 千葉仁志, 秋田治邦, 菅野剛史ほか. Complete cholesteryl ester transfer protein deficiency increases oxidized-LDL in plasma. *JPN J Clin Pathol* 1997 ; 45(1) : 55-57.
  - 7) 山下静也, 野崎秀一, 焦昇. 若年よりの角膜輪を伴った特異な高HDL—コレステロール血症. *動脈硬化* 1984 ; 12 : 153-159.
  - 8) Orchard TJ, Strandness DE Jr. Assessment of peripheral vascular disease in diabetes : report and recommendations of an international workshop sponsored by the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Circulation* 1993 ; 88 : 819-828.
  - 9) Jeffrey IW. Diagonosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities. *A Critical Review Circulation* 1996 ; 94 : 3026-3049.
  - 10) Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, et al. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull World Health Organ* 1970 ; 43 : 891-915.
  - 11) 三島康男, 安藤 充, 久山文子ほか. 簡便なPAG電気泳動キット (LipoPhor system) を用いた LDL 粒子サイズの推定 : LipoPrint LDL system との比較. *動脈硬化* 1997 ; 25 : 67-70.
  - 12) Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988 ; 260 : 1917-1921.
  - 13) Zambon A, Austin, MA, Brown BG, et al. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993 ; 13 : 147-153.
  - 14) Austin MA, King MC, Vranizan KM, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype : a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990 ; 82 : 495-506.
  - 15) Yamashita S, Matsuzawa Y, Okazaki M, et al. Small polydisperse low density lipoproteins on familial hyperalphalipoproteinemia with complete deficiency of cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis* 1988 ; 70 : 7-12.
  - 16) 武内 望, 佐伯修一. リポ蛋白の分離分析における超遠心法の評価と問題点—他の測定法との比較検討. *臨床病理* 1993 ; 41 : 750-758.
  - 17) McNamara JR, Small DM, Li Z, et al. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational change in apolipoprotein. *BJ Lipid Res* 1996 ; 37 : 1924-1935.