

PAGディスク電気泳動法(リポフォーAS)を用いたIDL、LDL、small dense LDLコレステロール値(mg/dL)の算出

○千葉泰世¹⁾、井上郁夫²⁾、久保田亮³⁾、松田武英¹⁾、後藤誠一⁴⁾、篠田雄一⁵⁾、栗田卓也²⁾、山崎哲資⁶⁾

1) (株)明日香特殊検査研究所、2) 埼玉医科大学 内分泌内科・糖尿病内科、
3) 埼玉県立大学 保健医療福祉学部、4) 明海大学 総合臨床医学講座 内科学分野、
5) 三郷中央総合病院、6) 熊谷外科病院

【目的】家族性複合型高脂血症(FCHL)の診断においてsmall dense LDL(sLDL)の出現をポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法で確認する必要があると当学会の「動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版, p82」に記載され、かつLDLコレステロール(LDLc)はFriedewaldの計算式(F式)を用いるよう推奨された。我々もnative LDL(nLDL)分画(RM値0.19-0.39)にTC定量値を掛けた値が、直接法のLDLc(積水)と高い相関があることを既に報告している¹⁾(図1)。sLDLは正脂血症にも多少存在するため、その基準範囲の設定が必要であると考えた。我々はリポフォーASを用いてIDL, nLDL, sLDL分画中の各リポ蛋白の粒子サイズを確認した上で、F式で求めた総LDLコレステロール値にLDL分画%を比例分配しIDLc, nLDLc, sLDLc値(mg/dL)を算出し、正脂血症者の基準範囲を求めた。先にも述べたが、IDLcとsLDLcを含まないnativeなLDLcを総LDLcと区別するため、nLDLcという表現を使用した(図2)。

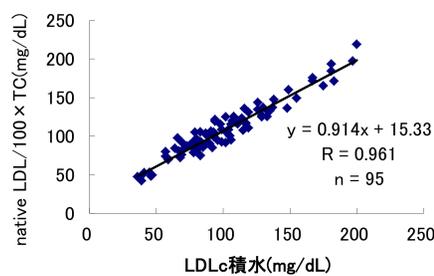


図1 native LDL分画-LDLc積水相関

積水のLDLcキットは他のキットに比べ、native LDLとよく相関する(井上郁夫ら、医学と薬学 2008; 60(3): 553-559)。

【方法と結果】

1. リポ蛋白粒子サイズの確認

カイロミクロン、カイロミクロンレムナントが存在しない脂質異常の患者血清(非連結化)をリポフォーASで泳動し、VLDL分画のピークを0、HDL分画のピークを1とした時のLDLの相対移動度(RM値)が0.10~0.18をIDL分画、0.19~0.39をnLDL分画、0.40以上をsLDL分画としたとき^{1,4)}の各分画をホーレトイルド(常光)でそれぞれ回収し²⁾、電子顕微鏡で各リポ蛋白粒子サイズを計測した。切り出したリポ蛋白の粒子サイズを電子顕微鏡で測定したところ、用いた脂質異常の患者血清中のIDL, nLDL, sLDLの主たるサイズのピークはそれぞれ35.7, 28.6, 25.0nmであった(図3-5)³⁾。完全にリポ蛋白の粒子(IDL, nLDL, sLDL)が回収されていることを確認するため、ホーレトイルド(常光)でそれぞれ回収した後のゲルを図6に示した。またデータには示さなかったが数名の患者血清をホーレトイルドで回収後、電子顕微鏡および光散乱粒子径分布測定装置(LA-960堀場製作所)で測定したところ、sLDLの主たるサイズは、24-25nmであった。

本研究は熊谷外科病院治験審査委員会の承認のもとに実施した。

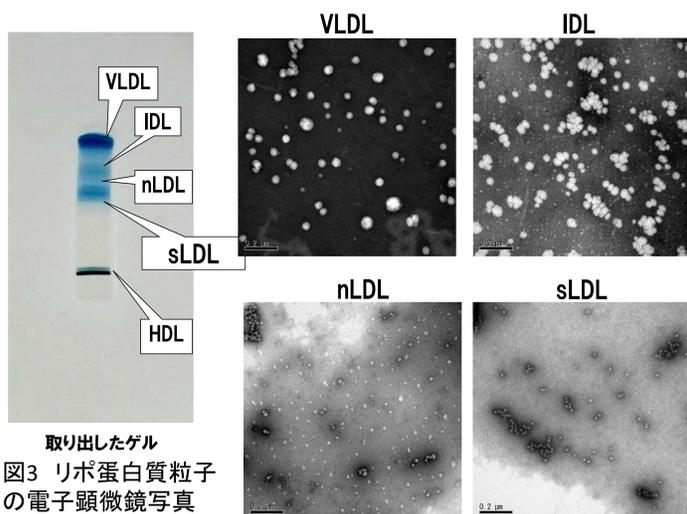


図3 リポ蛋白質粒子の電子顕微鏡写真

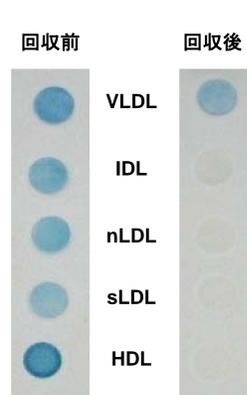


図6 リポ蛋白の回収前後

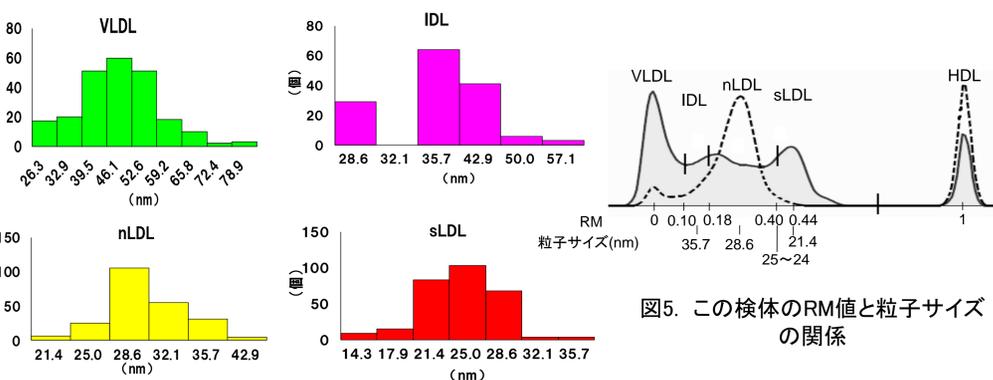


図5 この検体のRM値と粒子サイズの関係

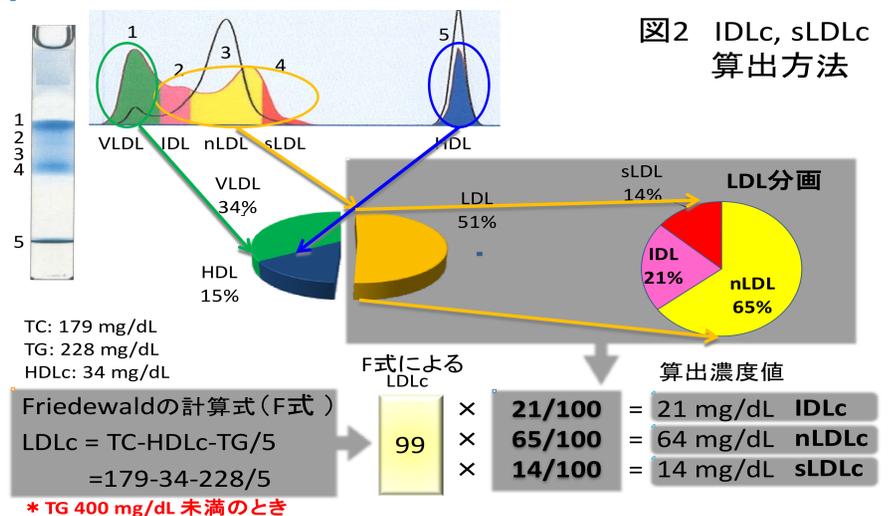


図2 IDLc, sLDLc算出方法

2. 正脂血症者の基準範囲

正脂血症者血清(TC<220, TG<150でかつIDLとsLDLを認めない群)119名の各LDL分画%にF式で求めた総LDLc値を比例配分し、IDLc, nLDLc, sLDLc値(mg/dL)を求めた。抄録は125名としたが、これはF式によるLDLcが140mg/dL以上の人が6名含まれていたため訂正した。リポフォーASを用いて正脂血症者のIDLc, nLDLc, sLDLc値(mg/dL)を求めたところ、それぞれ6.6±1.7, 100.9±14.9, 1.4±1.2となった(表1)。

表1. 正脂血症におけるIDLc・nLDLc・sLDLcの基準値

各分画におけるコレステロール値(mg/dL)		n=119	
平均値±SD (範囲)		《参考》分画(%)	
IDLc	6.6±1.7 (2~10)	IDL	2~5
nLDLc	100.9±14.9 (60~128)	nLDL	56~69
sLDLc	1.4±1.2 (0~5)	sLDL	0~3

※IDL, nLDLおよびsLDL分画(%)については以前我々が報告したもの⁵⁾を参考に示した。

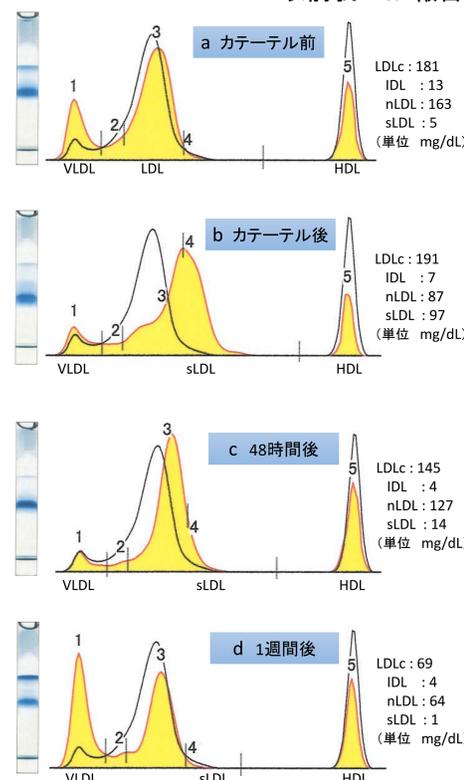


図7 心カテーテル後のリポ蛋白質の経時的変化

【まとめ】

BachorikらがF式の値は比重1.006以上のコレステロール含有リポ蛋白からHDLコレステロール値を引いた値と一致していると報告していることと⁶⁾、リポフォーASによる分画は粒子サイズを表していることから、F式で求めた総LDLc値は全LDL分画%に一致し、かつIDL, nLDL, sLDL分画%を比例配分することでIDLc, nLDLc, sLDLc値が得られると考えられる。本法によるsLDLcの健常参考値は5mg/dL以下となり、これより多い場合は、sLDLcありとなる。以上よりカットオフ値を適切に評価すれば、FCHLの診断に活用できると考えている。

筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者は株式会社明日香特殊検査研究所に雇用されている。

【sLDLcを測定する際の注意事項】

心カテーテルを実施した患者では一過性にsLDLが出現する(図7-b,c)。そこで、判定は心カテーテル後1週間程度経過した後の結果から行う必要があると思われる(図7-d)。これは治療の際に用いたヘパリンによる大量のリポ蛋白リパーゼ(LPL)放出が関与し、リポ蛋白が変化している可能性があるからである。

【引用】

- 井上郁夫:ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動(PAGE)法のススメ. 日本医事新報 2011;4527:51-58.
- 戸塚光哉他:糖尿病合併症におけるFast β リポ蛋白の意義. 糖尿病 1997;40:503-510.
- 千葉泰世他:ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法を用いた正脂血症中のリポ蛋白分画の性状の調査研究(第2報). Progress in Medicine 2014; 34(6):1091-1096.
- 三島康男他: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との比較. 動脈硬化 1997;25:67-70.
- 金澤敏行他:ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法を用いた正脂血症中のリポ蛋白分画の性状の調査研究. Progress in Medicine 2012; 32:673-675.
- Bachorik PS, et al National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol. Clin Chem 1995; 41(10):1414-1420.