

〈原著〉

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法を用いた リポ蛋白形状分類による脂質関連項目の予防医学的閾値の検討

立石 謹也¹⁾、太田 安彦¹⁾、宮川 朱美²⁾、天川 雅夫³⁾

Examination of prophylactic threshold of lipid-related items with the classification of lipoprotein patterns by polyacrylamide gel disc electrophoresis

Kinya Tateishi¹⁾, Yasuhiko Ohta¹⁾, Akemi Miyagawa²⁾ and Masao Amakawa³⁾

Summary We performed polyacrylamide gel electrophoresis to evaluate the quality of lipids contained in blood serum samples collected from participants of comprehensive health examinations, with the aim of confirming the validity of prophylactic thresholds of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), the arteriosclerotic index (AI), and LDL-C/HDL-C ratio (L/H ratio). We classified the lipoprotein profile by the polyacrylamide gel electrophoresis into the following four types (SAND classification); Type S (symmetric), Type A (asymmetric), Type N (nodular), and Type D (disrupted). The relationship between these lipid-related items and SAND classification was analyzed. The TC and LDL-C levels did not markedly vary among SAND-based types, making it difficult to make judgments regarding these items. As for the TG and HDL-C levels, AI, and L/H ratio, significant differences were observed between Type S and others, but the prophylactic thresholds calculated based on this were not consistent with those defined by the Japan Society of Ningen Dock or in the criteria for the diagnosis of metabolic syndrome.

Although the results confirmed the validity of 'hypertriglyceridemia and/or hypoalphalipoproteinemia' as a risk factor associated with metabolic syndrome specified in the criteria, it may be necessary to consider the relevance with the prophylactic thresholds.

Key words: Classification of lipoprotein patterns, Polyacrylamide gel disc electrophoresis, diagnosis of metabolic syndrome, Prophylactic threshold

¹⁾ 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科
〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1

²⁾ キナシ大林病院臨床検査科
〒761-8024 香川県高松市鬼無町藤井435-1

³⁾ 純真学園大学保健医療学部検査科学科
〒815-8510 福岡市南区筑紫丘1-1-1

¹⁾ Corresponding author: Kinya Tateishi, Department of
Medical Technology, Faculty of Health Sciences,
Kagawa Prefectural University of Health Sciences,
281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-
0123, Japan, E-mail: tateishi@chs.perf.kagawa.jp

受付日：2017年1月14日

採択日：2017年4月24日

I. 緒言

予防医学的閾値とは臨床判断値の1つで、「特定の疾患の発症リスクが高いと予測され、予防医学的な見地から一定の対応が必要とみなす判断値である。コホート研究の結果に基づき、検査値レベルと発症率の関係から、当該疾患の専門家の合意（コンセンサス）により設定されるもの」¹⁾である。人間ドック学会判定区分では総コレステロール（TC）140～199 mg/dL、中性脂肪（TG）30～149 mg/dL、高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C）40～119 mg/dL、低比重リポ蛋白コレステロール（LDL-C）60～119 mg/dLを異常なしとしている（2016年4月1日改訂²⁾）。また、メタボリックシンドロームの診断基準では、内臓脂肪（腹腔内脂肪）蓄積があること（ウエスト周囲径で男性 ≥ 85 cm、女性 ≥ 90 cm）を必須項目とし、加えて高TG血症（ ≥ 150 mg/dL）かつ/または低HDL-C（ < 40 mg/dL）、収縮期血圧 ≥ 130 mmHgかつ/または拡張期血圧 ≥ 85 mmHg、空腹時高血糖 ≥ 110 mg/dLのうち2項目以上となっている³⁾。加えて、人間ドックでは実際に（TC-HDL-C）/HDL-Cの式より計算で求められる動脈硬化指数（AI）が用いられるようになり、さらに近年ではLDH-C/HDL-C比（L/H比）に関する臨床的意義についての報告が多くなされている⁴⁾⁻⁷⁾。

そこで今回、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法（PAGE）を用いて、リポ蛋白分画を行い、デンシトグラムのリポ蛋白（特にLDL）の形状により4つの型に分類し、その結果からリポ蛋白の質を評価し、脂質関連4項目、AIおよびL/H比の予防医学的閾値が妥当であるかどうかを検討した。

II. 対象および方法

1. 対象

対象は日本臨床検査医学会会告⁸⁾を遵守し、当該施設の倫理委員会の承認を得たのち、インフォームド・コンセントにより承諾が確認された人間ドック受診者228名（男性158名、女性70名）の残存血清を用いて実施した。検体はすべて連結不可能匿名化した。

2. 方法

PAGEはリポフォー（常光）を用いて、製造者の指示に従って行った。得られたデンシトグラムのLDL部分の形状よりSAND分類し、LDLの質を評価した。PAGEによるリポ蛋白電気泳動パターンを分類する方法は、最初はMishimara⁹⁾によって提案された。本研究では分類方法をYoshidaraの方法¹⁰⁾に従って4つの型に分類した。すなわち、形状が左右対称であるものをS型（Symmetry Type）、非対称で超低比重リポ蛋白（VLDL）側に広い足を有するものをA型（Asymmetry Type）、LDLのスロープにmidbandが見られ始めるが、単独のピークにはなっていないものをN型（Nodular Type）、VLDLとLDLの間に連続成分（midband）が見られ、LDLの明確な波形がないものをD型（Disrupted Type）とし、S型をLDLの質が良好（正常型）と判定した（Fig. 1）。

脂質4項目の測定は日立7170形自動分析装置を用いて測定した。測定試薬はTCではT-CHO試薬・KL「コクサイ」（シスメックス）、TGはオートセラS TG-N（積水メディカル）、HDL-CはデタミナーL HDL-C（協和メデックス）、LDL-CはデタミナーL LDL-C（協和メデックス）を用いた。動脈硬化指数（AI）は、（TC-HDL-C）/HDL-Cの式より計算で求めた。また、L/H比はLDL-C / HDL-Cの式より求めた。すべての測定は採血当日および翌日に行った。人間ドック学会判定区分よりTCは140～199 mg/dL、TGは30～149 mg/dL、HDL-Cは40～119 mg/dL、LDL-Cは60～119 mg/dLを異常なしと判定した。

3. 統計学的分析

成績はmean \pm SDで表し、統計学的分析にはStatcel4（4steps エクセル統計第4版：柳井久江著、オーエムエス出版）を使用した。各群の測定値をMann-Whitney検定を用いて比較し、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

III. 結果

LDLのSAND分類型は、全体でS型96名（42.1%）、A型63名（27.6%）、N型49名（21.5%）、D型20名（8.8%）で、男性ではS型56名（35.4%）、A型49名（31.0%）、N型37名（23.4%）、D型16

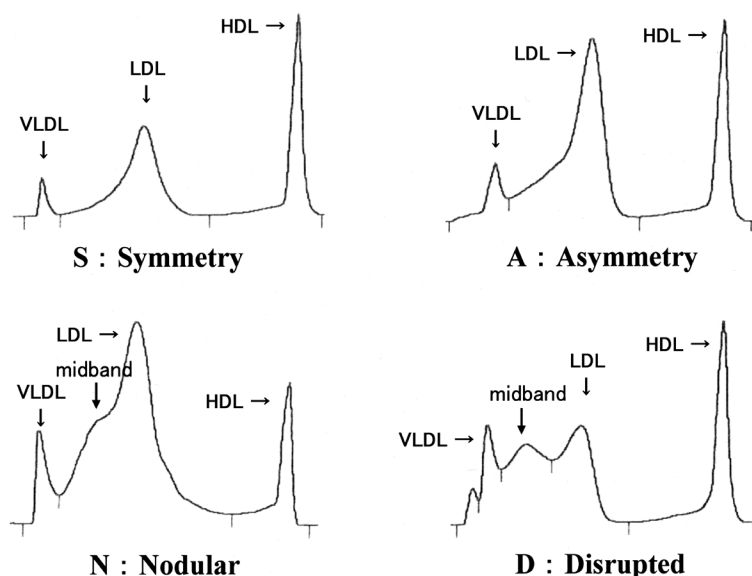


Fig. 1 SAND classification of lipoprotein patterns by polyacrylamide gel disc electrophoresis.

名 (10.1%)、女性ではS型39名 (55.7%)、A型14名 (20.0%)、N型12名 (17.1%)、D型4名 (5.7%) であり、女性のS型は男性より約20ポイント上回っていた。さらに、前述の日本人間ドック学会判定区分により4項目とも異常なしは全体で84名 (37.9%) であり、男性52名 (男性全体の32.9%)、女性32名 (女性全体の45.7%) であった。4項目とも異常なしの84名の中でS型は45名 (53.6%)、A型は17名 (20.2%)、N型は17名 (20.2%)、D型は5名 (6.0%) であった。

対象の各項目の測定値をTable 1に示した。TCならびにLDL-Cには性差は認められなかったが、TG、HDL-C、AIおよびL/H比で性差が認められた。

全体でのSAND分類別の各型での測定値、ならびに性差の見られた項目について男女別の測定値をTable 2に示した。性差の見られなかったTCは、S型との有意差は認められなかった。また、LDL-CではS型とA型で有意差が認められた ($P < 0.05$) が、N型およびD型とは有意差は

Table 1 Comparison of each measurements in gender

Items	Total objects	Male	Female
Number	228	158	70
Age (years)	49.0±9.5	48.7±9.2	49.7±10.4
TC (mg/dL)	196.1±35.7	194.5±35.0	199.7±37.3
TG (mg/dL)	114.5±66.1	128.9±67.7	82.1±48.8**
HDL-C (mg/dL)	61.7±16.2	57.1±14.2	72.3±15.6**
LDL-C (mg/dL)	123.7±33.7	125.2±33.4	120.4±34.3
AI	2.24±0.58	2.41±0.39	1.83±0.83**
L/H ratio	2.06±0.52	2.19±0.34	1.60±0.99**

Plus-minus values are means ± standard deviation.

The results of the significant difference verification by Mann-Whitney's U test is shown.

** $P < 0.001$ vs. Male

Table 2 Comparison of each measurements in SAND classification of lipoprotein patterns by polyacrylamide gel disc electrophoresis

Total objects					
		SAND Type			
		S	A	N	D
Number		96	63	49	20
Age	(years)	47.2±9.1	48.6±9.2	52.7±10.2*	49.8±9.2
TC	(mg/dL)	195.4±34.4	201.3±41.8	195.4±32.0	184.7±28.5
TG	(mg/dL)	81.1±41.9	138.9±75.7**	128.5±69.1**	164.0±46.4**
HDL-C	(mg/dL)	70.1±16.5	54.4±13.0**	57.3±11.3**	55.5±19.6**
LDL-C	(mg/dL)	118.4±30.7	133.4±39.6*	126.0±29.5	113.1±30.2
AI		1.90±0.72	2.93±1.37**	2.52±0.88**	2.54±0.99*
L/H ratio		1.79±0.66	2.63±1.17**	2.29±0.78**	2.24±0.89*

Male					
		SAND Type			
		S	A	N	D
Number		56	49	37	16
Age	(years)	46.7±9.0	47.6±9.8	50.5±10.8*	48.1±9.4
TC	(mg/dL)	192.3±31.5	196.1±46.8	196.8±43.8	181.9±30.7
TG	(mg/dL)	93.5±45.9	146.5±77.0**	136.4±64.6**	166.8±49.6**
HDL-C	(mg/dL)	65.5±15.3	52.0±13.2**	53.5±13.4**	48.6±7.7**
LDL-C	(mg/dL)	118.6±29.1	130.2±41.0*	130.0±38.0	116.3±31.9
AI		2.05±0.73	2.97±1.44**	2.84±1.28*	2.82±0.87*
L/H ratio		1.91±0.68	2.64±1.24**	2.55±1.12*	2.47±0.82*

Female					
		SAND Type			
		S	A	N	D
Number		40	14	12	4
Age	(years)	48.1±9.3	48.9±11.5	54.6±11.4	56.3±3.8
TC	(mg/dL)	200.1±38.4	201.0±40.2	199.3±36.6	195.5±13.1
TG	(mg/dL)	63.3±28.0	86.4±32.5*	115.0±76.0*	153.0±28.9
HDL-C	(mg/dL)	75.8±15.9	64.0±12.1*	64.5±8.7*	82.8±14.0
LDL-C	(mg/dL)	119.1±33.3	128.6±39.9	124.9±31.0	100.0±17.8
AI		1.71±0.65	2.25±0.82*	2.10±0.43*	1.43±0.50
L/H ratio		1.64±0.58	2.12±0.77*	1.93±0.41*	1.30±0.41

Plus-minus values are means ± standard deviation.

The results of the significant difference verification by Mann-Whitney' s U test is shown.

*P<0.05 vs. Type S, **P<0.001 vs. Type S

認められなかった。男性では、TG、HDL-C、AIおよびL/H比は、すべてS型とその他の型に有意差 (P<0.05 ~ P<0.001) が認められた。女性では、S型とA型およびN型との間に、TG、

HDL-C、AIおよびL/H比すべてで有意差 (P<0.05) が認められた。なお、女性でのD型は4名であり、データ数が少ないため信頼性が低いと考えられ、参考値程度に留めた。

Ⅳ. 考察

今回我々は、人間ドック受診者の血清を用いて、PAGEから求めたデンシトグラムでのLDLの形状よりSAND分類を行い、LDLの質を評価し、その結果から得られたデータをもとに、脂質関連項目の予防医学的閾値が妥当であるかどうかの検討を試みた。LDLの質はLDLの粒子径が均一にそろっている、つまり形状が左右対称であるS型（Symmetry Type）を良好と考え、midbandやsmall dense LDL等が認められるかどうかで判断した。

TCは各型における有意差がなく、TCの濃度

では判断がつかなかった。加えて、LDL-CでもS型とA型で有意差は認められたものの、N型およびD型では有意差はなく、LDL-Cの量だけでは質まで判定できないことがわかった。

TG、HDL-C、AIおよびL/H比を男女別にプロットしたものをFig. 2及びFig. 3に示した。TGの平均値は男性ではそれぞれ93.5、146.5、136.4、166.8 mg/dL、女性では63.3、86.4、115.0 mg/dLであり、TGでのSAND分類から考えられる境界は、男性では122 mg/dL、女性では83 mg/dLとなった。HDL-Cの平均値は男性ではそれぞれ65.5、52.0、53.5、48.6 mg/dLで、女性では75.8、64.0、64.5 mg/dLであり、HDL-Cでの境

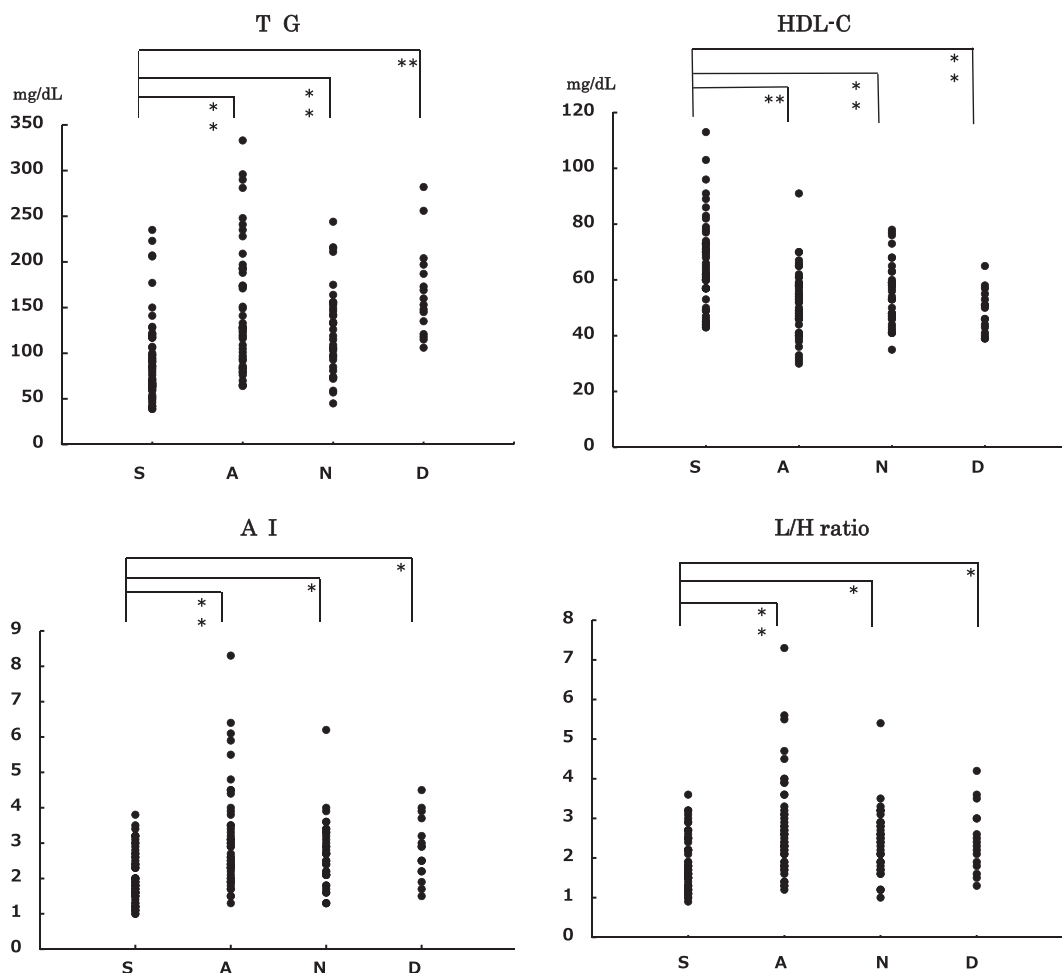


Fig. 2 Measured values in SAND classification of lipoprotein patterns by polyacrylamide gel disc electrophoresis in male. The results of the significant difference verification by Mann-Whitney' s U test is shown.

*P<0.05 vs. Type S, **P<0.001 vs. Type S

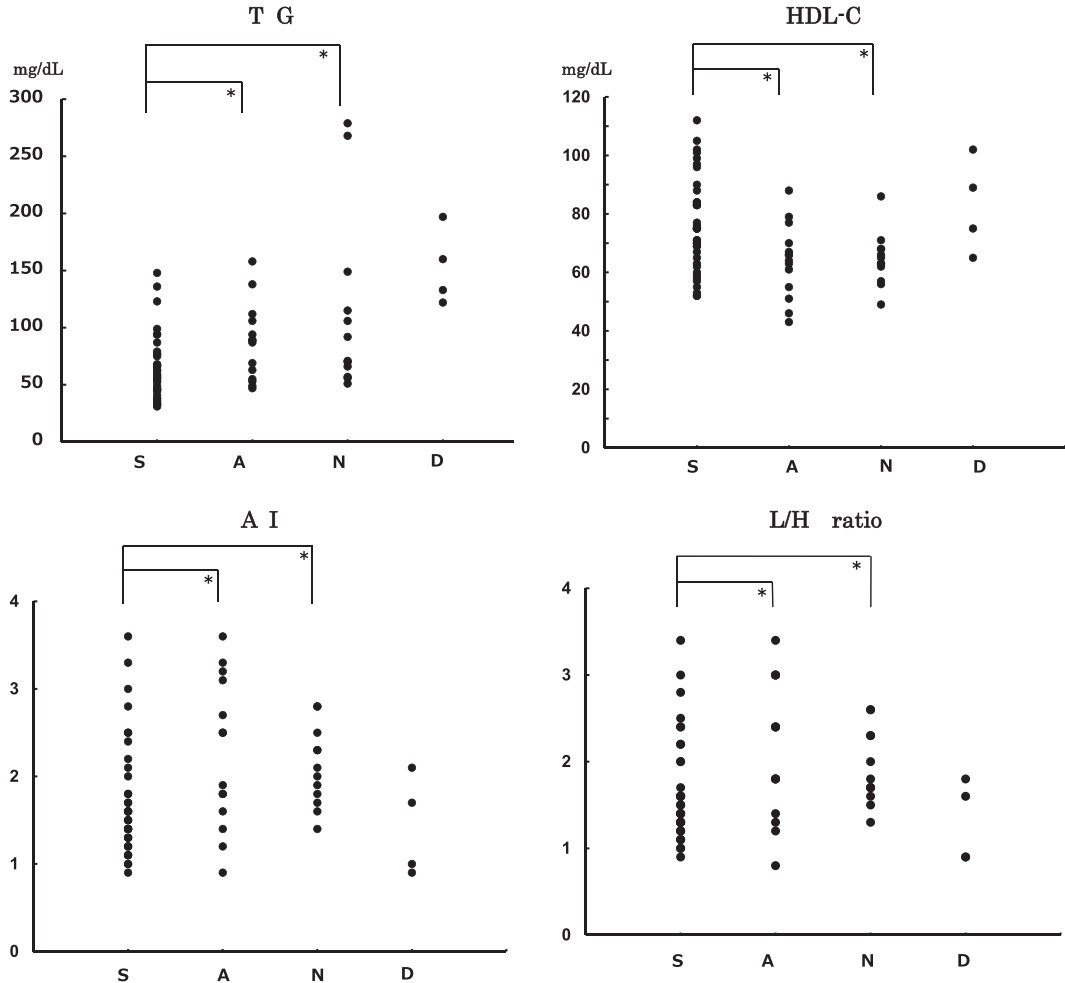


Fig. 3 Measured values in SAND classification of lipoprotein patterns by polyacrylamide gel disc electrophoresis in female.

The results of the significant difference verification by Mann-Whitney' s U test is shown.

*P<0.05 vs. Type S, **P<0.001 vs. Type S

界は男性58 mg/dL、女性70 mg/dLとなった。AIの平均値は男性ではそれぞれ2.05、2.97、2.84、2.82で、女性では1.71、2.25、2.10で、AIでの境界は男性2.5、女性1.9となった。L/H比は男性では1.91、2.64、2.55、2.47で、女性では1.64、2.12、1.93で、L/H比での境界は男性2.2、女性1.8となった。前述したように人間ドック学会判定区分では、TGは30～149 mg/dLである。これで判定すると、男性ではA型、N型の半分以上が正常として判定されるが、リポ蛋白の質から考えると、もう少し厳しくしても良いと思われる。また、女性ではほとんどが正常と判定

されるため、男女差を考慮すべきであり、今回の結果から、男性30～122 mg/dL、女性30～83 mg/dLが妥当である。HDL-Cも同じように、人間ドック学会判定区分では40～119 mg/dLであるが、男性7名だけが異常で、女性は異常者なしと判定される。リポ蛋白の質を考慮すると、男性58～119 mg/dL、女性70～119 mg/dLが妥当であると思われる。AIおよびL/H比は人間ドック学会判定区分には示されていないが、一般的にはともに2.5以下がよく用いられている。しかし、今回の研究で男女差が認められたため、男女別に設定されるべきであり、その値は、AI

では男性 $2.5 \leq$ 、女性 $1.9 \leq$ 、L/H比は男性 $2.5 \leq$ 、女性 $1.8 \leq$ が妥当であると考え。本研究においてAIおよびL/H比は、脂質異常を判断するための優れた指標になることが示唆された。しかしながら、L/H比に関しては、LDL-Cの測定方法について測定原理が試薬メーカー間で異なることが考えられ、日本動脈硬化学会では、中間比重リポ蛋白コレステロール (IDL-C) を含む広義のLDL-Cを測定することを推奨している¹¹⁾。このIDLはSAND分類のNおよびD型のmidbandとして表れている。本研究で用いたデータミナーL LDL-C (協和メデックス) 試薬は、杉内らによるとIDL分画の回収率が77%であり、他社に比べて回収率が高いと報告されている¹²⁾ので、本研究のL/H比は信頼性が高いと考えるが、LDL-C測定試薬は改良され、正確性が向上されているものがあるので、今後、これを用いて検討する必要がある。さらに、健常者のVLDLはTG-richなVLDL1が多く、脂質異常になるとコレステロール含量の比較的高いVLDL2が増加する。Zhaoらによると、PAGEにおいてVLDL2はVLDL1とLDLの間に位置するとされている¹³⁾。このことより、脂質異常者のmidbandにはVLDL2が含まれている可能性があり、したがって、このmidbandにはIDL以外にも種々の異常なりポ蛋白が含まれている可能性のあることが推測される。

V. 結語

本研究の結果より、リポ蛋白のSAND分類はリポ蛋白の質を評価する新しい臨床ツールとして有用であることが示唆された。さらにメタボリックシンドロームの診断基準や人間ドック判定区分である予防医学的閾値との関連性の検討が必要であると思われる。

文献

- 1) 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編；市原清志：基準範囲・臨床診断値。臨床検査のガイドラインJSLM2015, 11-20, 宇宙堂八木書店, 東京, 2015.
- 2) 基本検査項目／判定区分, 新判定区分PDF (平成28年4月改訂). 日本人間ドック学会 (オンライン), <http://www.ningen-dock.jp/other/inspection> (2016年12月22日)
- 3) メタボリックシンドロームの定義と診断基準. 日本内科学会雑誌, 94: 188-203, 2005.
- 4) Ina K, Hayashi T, Araki A, Kawashima S, Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Kubota K, Noda M, Noto H, Ding QF, Zhang J, Yu ZY, Yoon BK, Nomura H, Kuzuya M, and Japan CDM Group: Importance of high-density lipoprotein cholesterol levels in elderly diabetic individuals with type II b dyslipidemia: A 2-year survey of cardiovascular events. *Geriatr Gerontol Int*, 14: 806-810, 2014.
- 5) 木谷真悟：動脈硬化疾患におけるResidual riskの臨床的考察. 久留米醫學會雑誌, 75: 374-383, 2012.
- 6) 横井宏佳：急性冠症候群 (ACS) を未然に防ぐための脂質管理－量から質への転換：LDL-C/HDL-C比が意味するもの－. *Pharm Med*, 26: 173-177, 2008.
- 7) 菅田有紀子、辰巳文則、濱本純子、下田将司、俵本和仁、川崎史子、柱本 満、松木道裕、加来浩平：動脈硬化進展予知因子としてのLDL-C/HDL-C比の有用性. *医学と薬学*, 64: 191-197, 2010.
- 8) 臨床検査を終了した検体の業務, 教育, 研究のための使用について－日本臨床検査医学会の見解－. *臨床病理*, 58: 101-103, 2010.
- 9) Mishima Y, Ando M, Kuyama A, Ishioka T, and Kibata M: A simple method for identifying particle size of low-density lipoprotein using PAG electrophoresis: comparison between LipoPhor™ and LipoPrint LDL™ systems. *J Jpn Atheroscler Soc*, 25: 67-70, 1997.
- 10) Yoshida A, Kodama M, Nomura H, and Naito M: Classification of lipoprotein profile by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *Internal Medicine*, 42: 244-249, 2003.
- 11) 日本動脈硬化学会：動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版, 杏林舎, 東京, 2012.
- 12) 杉内博幸、眞部正弘、入江徹美、永田四郎、安東由喜雄、岡部紘明：HDL-CおよびLDL-Cホモジニアスアッセイのピットホール. *臨床病理*, 53: 138-143, 2005.
- 13) Zhao SP, Bastiaanse EM, Smelt AH, Gevers Leuven JA, Van der Laarse A, and Van' t Hooft FM: Separation of VLDL subfractions by density gradient ultracentrifugation. *J Lab Clin Med*, 125: 641-649, 1995.