

【第 118 回成医学会総会宿題報告】

レムナントリポ蛋白の同定ならびに代謝動態と 動脈硬化症発症との関連性

東京慈恵会医科大学附属柏病院総合診療部

多 田 紀 夫

CHARACTERIZATION AND METABOLISM OF REMNANT LIPOPROTEINS SEPARATED WITH HUMAN ANTI-APOLIPOPROTEIN B-100 AND ANTI-APOLIPOPROTEIN AI MONOCLONAL ANTIBODY-COUPLED IMMUNOAFFINITY MIXED GELS AND THEIR ATHEROGENICITY

Norio TADA

Department of General Medicine, Kashiwa Hospital, The Jikei University School of Medicine

Remnant lipoprotein particles are recognized as being atherogenic. I separated lipoproteins directly from serum in the unbound fraction of immunoaffinity mixed gel coupled with monoclonal antibodies against apolipoprotein (apo) B-100 and apo AI. Characterization of these lipoproteins revealed that they contained apo B-48, were rich in apo E and AIV, were large in size, had a heparin-bound property, a high triglyceride content, and a high cholesterol/protein ratio. They were thus named remnant-like lipoprotein particles (RLP). Incorporation of [¹⁴C]-labeled cholesteryl oleate into rat peritoneal macrophages was significantly greater during incubation with RLP than with native very-low-density lipoprotein (VLDL) or native low-density lipoprotein, and was comparable to that with oxidized low-density lipoprotein. These results suggest that RLP separated with immunoaffinity mixed gels are atherogenic lipoproteins. In a cross-sectional trial of 132 subjects, the incidence of an RLP cholesterol level greater than 5 mg/dL was 0% in subjects with normolipidemia but was 9%, 65%, and 55% in patients with type IIa, IIb, and IV hyperlipidemia, respectively, and 100% in patients with type III or V hyperlipidemia. Treatment with three different hypolipidemic agents (simvastatin, bezafibrate, and ethyl icosapentate) decreased cholesterol and triglyceride in RLP (RLP-C and RLP-TG, respectively). However, the reduction rate of RLP-C and RLP-TG was significantly different with bezafibrate, a finding that suggests that RLP is a substrate of lipoprotein lipase.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 155-69)

Key words: remnant lipoproteins, hyperlipidemia, atherogenic lipoproteins, immunoaffinity gels, hypolipidemic agents

I. 結 言

粥状動脈硬化症発生における血清コレステロールならびに低比重リポ蛋白 (LDL) コレステロール (LDL-C) 高値の関与については、近年数多く

報告されている介入試験の結果¹⁾からも、最早疑問の余地はないといえる。2001年5月に発表された米国コレステロール教育プログラム (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)²⁾ では血清コレステロール高値を是正することの重要性が

改めて提言され、とくに LDL-C 値は 100 mg/dl 未満が至適であるとされる。

一方、血清トリグリセライド (TG) 値については動脈造影法を用いた成績などから冠動脈疾患 (CAD) の独立した危険因子としての意義が認識されつつあるが³⁾、疫学的には明確な結論は得られていない⁴⁾⁻⁷⁾。この理由として、血清 TG 値は容易に食事の影響を受けやすく測定値に再現性が低いこと、ならびに標準偏差が高く統計的解析の有意差検定において不利が生じることに加え、必ずしもすべての高 TG 血症が CAD 発症・進展に関与しているとは限らないことがあげられる。実際、高 TG 血症を来す疾患のうち家族性複合型高脂血症、家族性 III 型高脂血症、糖尿病性高 TG 血症では CAD の続発が高頻度に見られるが、家族性高 TG 血症の家系での冠動脈疾患罹患率はコントロール群に比較して多いとはいえず⁸⁾、血中にカイロミクロン (CM) が増加して著明な高 TG 血症を呈する I 型高脂血症においても CAD 発症頻度は決して高くない⁹⁾。

高 TG 血症を粥状動脈硬化症発生の関連性の中で捉える時、高 TG 血症に随伴する高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロール (HDL-C) の低下、小型・高比重 LDL (small dense LDL) の増加、レムナントリポ蛋白の増加、血液凝固機構の亢進、食後高脂血症などの関与があげられ、冠動脈疾患を高頻度に合併する Syndrome X¹⁰⁾ などのいわゆる multiple metabolic syndrome における徴候の一つとしての高 TG 血症の重要性も認識されている。

なかでも近年、CM や超低比重リポ蛋白 (VLDL) などの TG rich リポ蛋白の血中での中間代謝産物であるレムナントリポ蛋白の増加が動脈硬化性疾患発症に深く関与していることが明らかとなり¹¹⁾⁻¹⁵⁾、日常臨床において高 TG 血症を呈する症例の中からレムナントリポ蛋白高値症例を識別する方法の確立が求められている。

これまで、我々は heparin affinity column を用いて VLDL の heterogeneity を検索し、同カラムにて VLDL がアポ蛋白 E (アポ E)-poor VLDL とアポ E-rich VLDL に分画され、アポ E-rich VLDL がアポ E-poor VLDL よりも細胞親和性が強く、アポ E-rich VLDL が動脈硬化促進性リ

ポ蛋白であること¹⁶⁾¹⁷⁾、さらにアポ E-poor VLDL とアポ E-rich VLDL が precursor-product の関係にあることを報告し、heparin affinity column を用いて分画し得たアポ E-rich VLDL が肝由来レムナントリポ蛋白であることを報告してきた¹⁸⁾¹⁹⁾。その後、より臨床の場で用いられやすい簡便なレムナントリポ蛋白測定法を探索するなかで、抗ヒトアポ A1 と抗ヒトアポ B-100 に対するモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティ混合ゲルを作成し、これら 2 つのモノクローナル抗体に結合しないリポ蛋白、すなわちイムノアフィニティ混合ゲルの pass 分画として流出するリポ蛋白に注目し、この pass 分画リポ蛋白とレムナントリポ蛋白との相同性について検討してきた。そしてこの分画に流出するリポ蛋白を remnant-like particles (RLP) と命名した。本稿では我々がこれまで行ってきた RLP の characterization ならびに各種脂質低下薬投与における RLP の代謝反応性の検討の中から得た成果をまとめ、新たな RLP 測定の臨床応用への足がかりとするものである。

II. 対象と方法

1. リポ蛋白の分離

V 型高脂血症患者から早朝空腹時採血をし、超遠心法にてリポ蛋白を分画した。CM (Sf > 400) は血清 10 ml を Hitachi RPS 55T swinging bucket rotor を用いて 17°C 下にて 30 分間超遠心 (20,000×g) することにて採取し、buffer A (0.15 M NaCl in Tris-HCl with 1 mM EDTA, pH 7.4) を溶媒とし超遠心法にて 1 回洗浄したのち実験に供した。CM 分取後の血清から Hitachi RP 55T angle rotor を用いて 4°C 下にてそれぞれ 20 時間、24 時間、40 時間にわたり sequential に超遠心することにより VLDL ($d < 1.006$ g/ml), LDL ($1.006 < d < 1.063$ g/ml), HDL ($1.063 < d < 1.21$ g/ml) を分取した。こうして分取されたりポ蛋白をそれぞれの至適比重液にて超遠心機を用いて再度洗浄し、さらに buffer A にて透析したのち実験に供した。

2. イムノアフィニティ混合ゲルによる RLP の分画 (RLP の調整的分画法)

以前報告された方法にてマウス腹腔内において

ヒト抗アポ A1 モノクローナル抗体 (H-12) とヒト抗アポ B-100 抗体 (JI-H) を作成し, CNBr activated Sepharose 4B にこれらの抗体を conjugate することにて抗アポ A1 あるいは抗アポ B-100 イムノアフィニティゲルを作成した²⁰⁾²¹⁾. それぞれのイムノアフィニティゲルのアポ A1 あるいはアポ B-100 に対する結合能はそれぞれ 0.43 ならびに 1.47 mg/ml of gel であった. これら 2 種のイムノアフィニティゲルを 1 対 1 (vol/vol) の割合で混合してアポ A1 ならびにアポ B-100 の両者に結合能をもつイムノアフィニティ混合ゲルを作成した.

RLP を調整的に分画するためには 20 ml のイムノアフィニティ混合ゲルを担体としたカラムを用いた. すなわち, 2 名の V 型高脂血症患者 (patient 1 and patient 2) からそれぞれ超遠心法にて分取した 2 ml の CM, あるいは VLDL をイムノアフィニティ混合ゲルカラムに添加. その後, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 にて展開することにて, カラムの pass 分画である RLP を調整分取した. カラムを同展開液にて充分洗浄したのち, こんどは 1 M 酢酸, 0.5 M NaCl を展開液とし流出してきた bound 分画リポ蛋白 (以降 bound 分画) を採取した. この bound 分画を中和するため半容量 (vol/vol) の 3.5 M Tris-HCl を直ちに加えたのち, buffer A にて透析した. こうして得られたカラムの pass (unbound) 分画である RLP と bound 分画を超遠心法 (40,000 rpm, 20 時間, 4°C. Hitachi 55P-72) を用いて, 以降の実験に有益な濃度 (約 1 mg/ml) にまでそれぞれ濃縮した.

3. RLP 中の脂質測定法 (RLP の分析的分画法)

RLP の意義を臨床的見地から検定する目的にて以前報告した方法により²⁰⁾ RLP の分析的分画測定を行った. すなわち, 5 μ l の血清あるいはリポ蛋白サンプルを前述のアポ A1, アポ B イムノアフィニティ混合ゲル 50 μ l を含む 300 μ l のゲル展開液 (buffer A) に添加 (Fig. 1). サンプル添加後, この混合ゲルを室温にて 30 分間ゆるやかに振盪. 10 分間静置にてアポ A1 ならびにアポ B-100 含有リポ蛋白を結合したイムノアフィニティ混合ゲルが沈殿したのち, 結合せずに浮遊している RLP を含有する上清を 50 μ l 採取し, 採取液中のコレステロールをメルコテスト, トリグリセラ

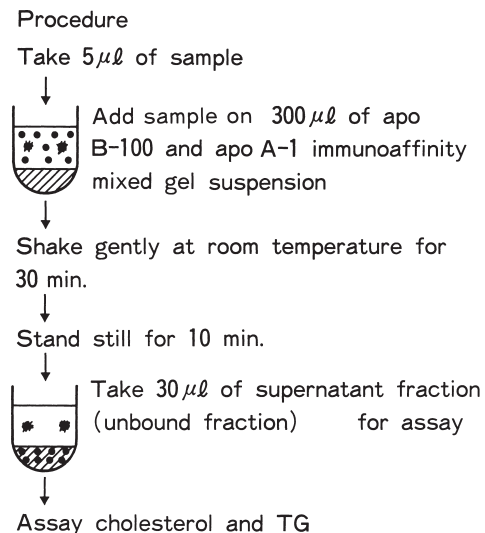


Fig. 1. Assay method for measurement of remnant-like particles (RLP).

イドをメルコリピッドにて測定し, それぞれ RLP-コレステロール (RLP-C), RLP-トリグリセライド (RLP-TG) とした.

4. RLP のヘパリン結合性の検定

血清中の RLP-C 濃度が 5 mg/dl 以上を示す 10 症例からの血清を 0.05 M NaCl pH 7.4 にて平衡した等量の Heparin-Sepharose 6B (Pharmacia Japan, Tokyo) に混和静置後 (30 分, 37°C) 上清血清中の RLP-C 濃度を再度測定した. かくして, 静置前後の血清中 RLP-C 濃度をモニターとして RLP のヘパリン結合能を検定した.

5. マクロファージへの cholesteryl oleate 取り込みの検定

Goldstein らの方法²²⁾ を用いて, マクロファージへの cholesteryl oleate 取り込みに対する RLP の作用を検討した. すなわち, 培養ラット腹腔マクロファージを 24 well の培養プレートに 1 well あたり 2×10^6 個調整し, 2 時間 37°C にて培養. 浮遊細胞を除去後, このマクロファージと VLDL より分取した RLP (VLDL-RLP) を 5% リポ蛋白フリー血清と 50 μ g/ml の gentamicin にて調整した 0.1 ml の [¹⁴C]-oleate (1 μ Ci/well) 入りの培養液 RPMI-1640 (Hazelton Biologics, St. Lenexa, KS) にて 37°C 下, 24 時間培養した. RLP の対照として total-VLDL, native-LDL, 酸化 LDL を用いて同様の培養を行った.

24時間の培養終了後、2 ml のイソプロパノールをそれぞれの well に添加し、マクロファージ内の脂質の抽出を開始した。内部スタンダードとしてヘキサン：イソプロパノール (3:2) に溶解した [^3H] cholesteryl oleate (50 μg : 25,000 dpm), cold oleic acid と cold cholesteryl oleate を各 well に添加後、マクロファージ中の脂質抽出物を薄層クロマトグラフィーにて展開した。展開後 cholesteryl ester 分画を収集し、液体シンチレーションカウンターにて同分画の [^{14}C] と [^3H] を測定し、マクロファージへの cholesteryl oleate 取り込みを観察した。なお、酸化 LDL の作成は、超遠心法にて LDL を分取後 EDTA を除いた生理的食塩水にて 24 時間透析し、その後 25 μM CuSO_4 の存在下にて 12 時間 37°C にて培養することにて行い、アーガーロースリポ蛋白電気泳動にて泳動度の変化を示すことにて酸化 LDL であることを確認した²³⁾。

6. 臨床面からのアプローチ

RLP の臨床的意義を検討するために 2 通りの方法を試みた。その 1 つは外来通院中の 132 名の患者を対象とした断面調査であり、血清脂質、血清アポ蛋白と RLP 脂質との関連性を検討し、各タイプの高脂血症における RLP 出現の動向を検討した。

2 つ目の検討法はコホート調査であり、それぞれ異なる作用機序を持つ 3 種の血清脂質低下薬を投与した際の RLP-C, RLP-TG が示す変化を観察し、この変化の解析により RLP の持つ性質を検討した。ここで用いた薬剤は細胞内コレステロール合成の律速酵素である HMG CoA 還元酵素を阻害することにて細胞内コレステロール濃度を低下し、そのため発現する LDL 受容体活性亢進により血清 LDL-C を低下する薬理作用を主作用とする HMG CoA 還元酵素阻害薬 simvastatin, PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) のリガンドとなり、リポ蛋白リパーゼ活性を増加する薬理作用を主作用とするフィブラート系薬剤 bezafibrate, 肝での TG 合成を阻害して VLDL 生成を抑制する薬理作用を主作用とする ethyl icosapentate (EPA) である。Simvastatin (5 mg/日) を 31 名の高脂血症患者 (IIa 型高脂血症 20 名, IIb 型高脂血症 11 名) を

対象として, bezafibrate (400 mg/日) を 28 名の高脂血症患者 (IIa 型高脂血症 10 名, IIb 型高脂血症 10 名, III 型高脂血症 1 名, IV 型高脂血症 6 名, V 型高脂血症 1 名) を対象として, EPA (1,800 mg/日) を 28 名の高脂血症患者 (IIa 型高脂血症 10 名, IIb 型高脂血症 10 名, III 型高脂血症 1 名, IV 型高脂血症 6 名, V 型高脂血症 1 名) を対象として, それぞれ 4~12 週間投与し, 投与前後の血清脂質ならびに RLP-C, RLP-TG 値の変化を検討した。

これらの臨床試験において採血はインフォームドコンセントのうえ, すべて少なくとも 12 時間以上の断食ののちの早朝空腹時とした。

7. その他の方法

蛋白濃度は Lowry 法²⁴⁾ にて測定した。血清脂質ならびに HDL-C は酵素法にて測定し, 血清アポ蛋白測定は免疫比濁法 (Apo Auto 2 Daiichi series, Daiichi Pure Chemicals, Tokyo) にて測定した。各リポ蛋白分画中のアポ蛋白組成の検定は 4/20% ポリアクリルアミド-SDS ゲル密度勾配電気泳動法²⁵⁾ にて行ない, Coomassie brilliant blue にて同定染色した。RLP の粒子サイズは高速液体クロマトグラフィー (HPLC, Toso, Tokyo) にて TSK GEL G5000PW (600 mm \times 7.5 mm, Toso, Tokyo) をカラムとして用い, 粒子中のコレステロールを Kyowa Medex kit (TC 555, Kyowa, Tokyo) によりモニター (吸光度 550 nm) することで検定した²⁶⁾。

8. 統計解析

得られた成績の統計処理において平均値の差の検定は Student の paired あるいは non paired *t*-test を用い, 相関解析は Linear regression analysis にて検定した。有意差の検定において $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

III. 結 果

1. 基礎的解析結果

1) RLP の粒子サイズ

RLP の粒子サイズを示す HPLC パターンを Fig. 2 に示す。Figure 上, 実線は 2 名の V 型高脂血症患者 (patient 1 and patient 2) から得た血清をそれぞれ HPLC に添加して得た血清リポ蛋白の流出パターンをコレステロールモニターにて表

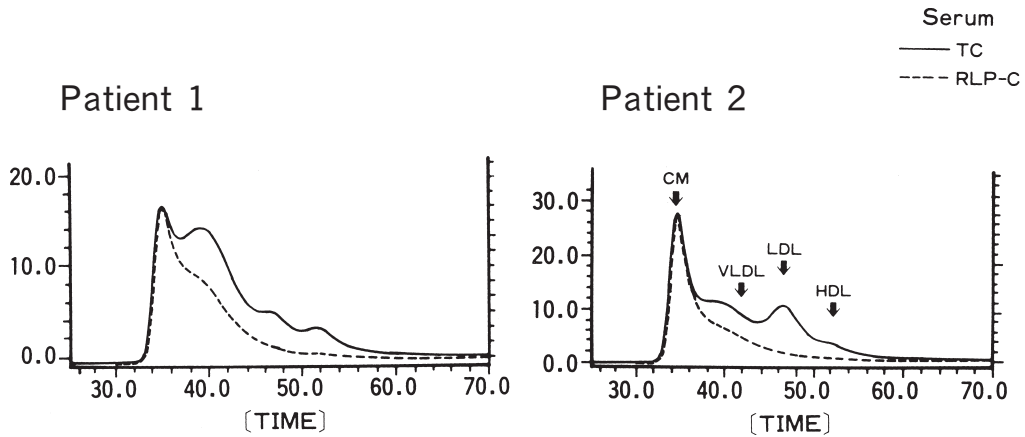


Fig. 2. HPLC eluting profile of the remnant-like particles (RLP) Solid lines show eluting profile of serum lipoproteins and broken lines show that of RLP, monitored by cholesterol concentration.

しており、左から CM, VLDL, LDL, HDL と粒子サイズの大きいものから順に描出される。破線は同じ患者血清から直接調整分画した RLP を HPLC に添加し、同様にコレステロールにてモニターした流出パターンを表している。この成績から RLP 粒子サイズは多様性を示し、RLP は CM から VLDL, LDL サイズまで様々な粒子サイズのリポ蛋白の集合体であることがわかる。しかし、その分布は CM, VLDL と同サイズの大型リポ蛋白に偏りを示している。実際、本稿に成績は呈示していないが negative stain 法²⁷⁾ を用いた電顕像でもイムノアフィニティ混合ゲルの unbound 分画である RLP は bound 分画リポ蛋白よりも粒子サイズが大きいことが確かめられた。

2) RLP の構成成分

上記 2 名の V 型高脂血症患者 (patient 1 and patient 2) の CM ならびに VLDL をそれぞれイムノアフィニティ混合ゲルに添加して得られた unbound 分画すなわち CM-RLP, VLDL-RLP とそれぞれの bound 分画リポ蛋白のアポ蛋白組成を Fig. 3 に示す。Unbound 分画である RLP は腸由来アポ蛋白であるアポ B-48 とアポ A IV を含有し、アポ E 含有量が bound 分画リポ蛋白よりも豊富であったがアポ A-I の存在は確認しえなかった。一方、CM-bound 分画にはアポ A-I が存在し、VLDL-bound 分画にはアポ B-48 はなくアポ B-100 が豊富であることが確認された。これらの成績は RLP のアポ蛋白組成がレムナントリポ

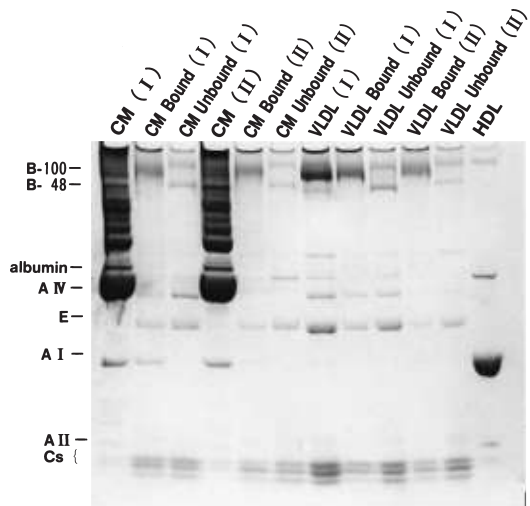


Fig. 3. Apolipoprotein composition of remnant-like particles (unbound fraction) on 5/20 gradient SDS polyacrylamide gel.

The unbound fraction, that is RLP, in CM and VLDL had apo B-48 and apo A IV and was rich in apo E but lacked in apo A I, whereas the bound fraction of CM to the affinity mixed gels had apo A I but no apo B-48 and was rich in apo B-100.

CM: chylomicron, VLDL: very low density lipoprotein

I: samples from patient 1, II: samples from patient 2

蛋白²⁸⁾ の蛋白組成と近似していることを示している。

RLP の脂質組成を Table 1 に示す。2 名の V 型高脂血症患者を解析した結果、CM-RLP ならび

Table 1. Composition of RLP in chylomicron and VLDL

Composition	Patient I						Patient II					
	TC	TG	PL	Protein	TC/ TG	TC/ Protein	TC	TG	PL	Protein	TC/ TG	TC/ Protein
	%						%					
CM unbound (RLP)	7.9	76.8	7.9	7.5	0.10	1.1	6.0	83.3	6.0	4.8	0.07	1.25
CM bound	7.9	66.0	13.2	12.9	0.12	0.61	7.2	72.5	7.2	13.0	0.10	0.56
VLDL unbound (RLP)	9.4	72.2	10.5	7.9	0.13	1.19	8.7	74.2	10.3	6.8	0.12	1.28
VLDL bound	9.7	64.5	13.4	12.4	0.15	0.78	8.5	67.9	11.3	12.3	0.13	0.69

TC : cholesterol, TG : triglyceride, PL : phospholipid

に VLDL-RLP ではそれぞれの bound 分画と同様に TG 含有量が高く、一方コレステロール/蛋白比がそれぞれ bound 分画に比べて約 2 倍であった。このことは RLP が TG rich リポ蛋白であるとともにコレステロール rich なリポ蛋白であることを示している。

3) ヘパリン親和性

RLP のヘパリン親和性 (結合能) についての成績を Table 2 に示す。方法の項で述べた手技にてヘパリンアフィニティカラムである Heparin-Sepharose 6B と混和孵置前後の血清 RLP-C を測定したところ、孵置後の血清からの RLP-C 検出は一部の症例 (症例 No 1, No 6) を除いてみられなかった。このことは RLP に強いヘパリン結合

Table 2. Affinity of remnant-like particles (RLP) to heparin

Subject Number	RLP-C (mg/dl)		Affinity to heparin (%)
	before	after	
1	75	11	85.3
2	22	0	100
3	14	0	100
4	39	0	100
5	15	0	100
6	108	83	23.1
7	116	0	100
8	95	0	100
9	50	0	100
10	125	0	100

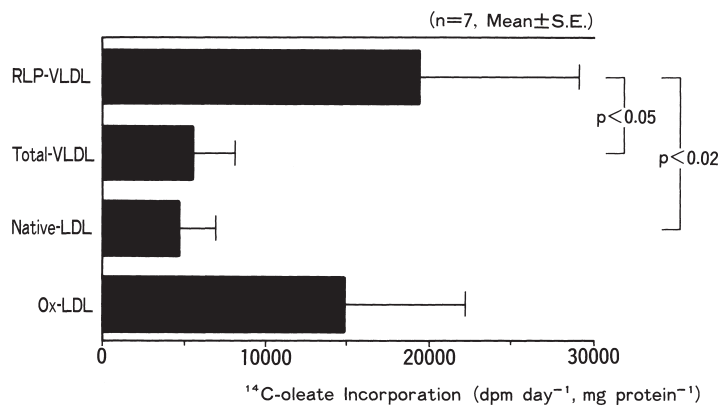


Fig. 4. Incorporation of [¹⁴C]-oleate into cholesteryl esters in the cultured rat peritoneal macrophages.

Rat peritoneal macrophages were incubated with remnant-like particles (RLP) and 0.1 ml of [¹⁴C]-oleate (1 μCi/well) in RPMI-1640 supplemented with 5% LPDS for 24 hours at 37°C. As controls, total VLDL, native LDL and oxidized LDL were incubated with peritoneal macrophages in the same manner.

RLP-VLDL : RLP separated from VLDL

Native-LDL : unmodified LDL, Ox-LDL : oxidatively modified LDL

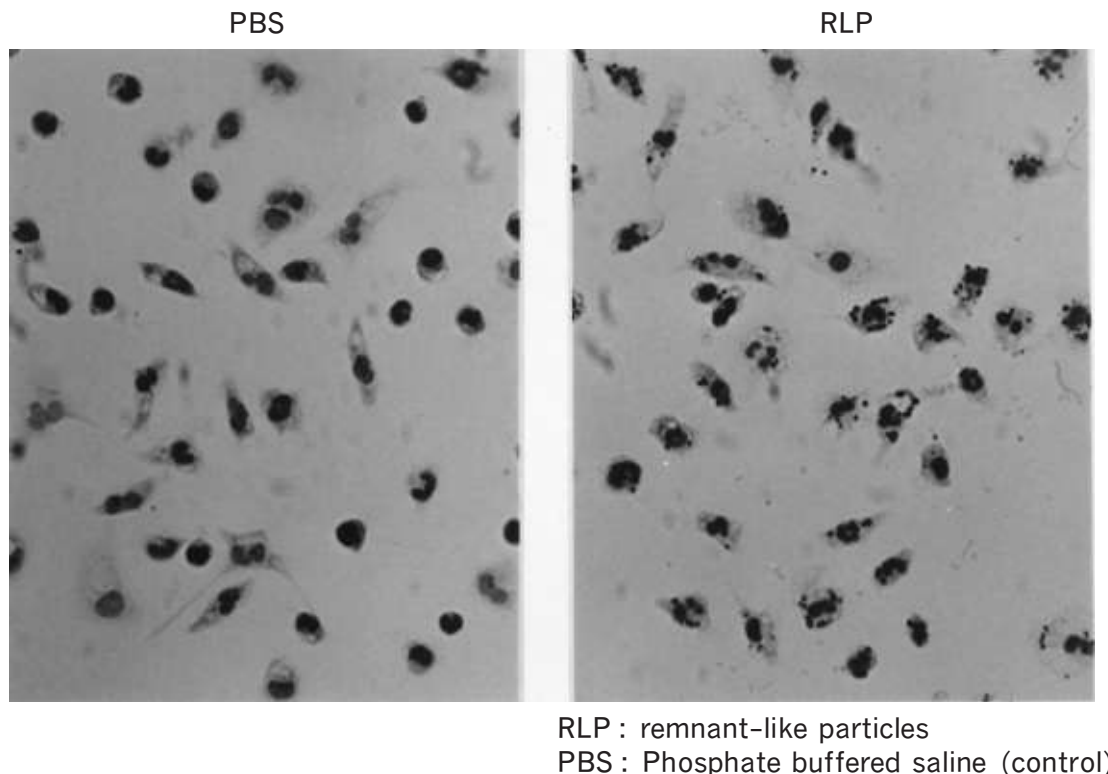


Fig. 5. Rat peritoneal macrophages incubated with remnant-like particles (RLP)
 Rat peritoneal macrophages incubated with RLP from VLDL show lipid deposition in their cells.
 Right panel: macrophages incubated with RLP. See, red colored lipid droplet by the lipid staining. Left panel: macrophages incubated with phosphate buffered saline (PBS) as control.

能があることを示している。

4) マクロファージへの cholesteryl oleate の取り込み

培養ラット腹腔マクロファージへの cholesteryl oleate の取り込みに対する RLP の及ぼす影響を Fig. 4 に示す。VLDL から分画した RLP (VLDL-RLP) はプラークを形成する泡沫細胞の前駆細胞であるマクロファージへの cholesteryl oleate の取り込みを増加し、この作用は total VLDL や native LDL よりも強く、動脈硬化惹起リポ蛋白と目される酸化変性 LDL とほぼ同程度の効果を示した。実際、RLP と共に培養したラット腹腔マクロファージ内に脂肪滴の存在が脂肪染色にて確かめられた (Fig. 5)。

2. 臨床的解析結果

1) 断面調査

132 名を対象とした断面調査の結果、Table 3 の

ごとく血清 RLP-C 濃度は血清コレステロール、HDL-C とは相関性を示さず、血清 TG、血清アポ B、アポ CII、アポ CIII、アポ E 濃度との間に正の相関性が確認された (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。そして、なかでも血清アポ E 濃度との相関性が高かった ($r = 0.651$)。このことは、RLP-C 測定が TG に富みアポ E rich なリポ蛋白であるレムナント粒子の血清中濃度を反映していることを表している。一方、RLP-TG は血清 TG 値と間のあまりに強い相関性 ($r^2 = 0.953$) を示すため、臨床検査値として血清 TG 値を反映するのみの意義しか得られなかった (Fig. 6)。このことから、以後の検定は RLP-C 測定を中心に行った。RLP-C の cut-off 値を 5 mg/dl に設定したところ、Table 4 に示すごとく正脂血症者 41 名においては全員 cut-off 値未満の RLP-C 値を呈した。一方、IIa 型高脂血

症, IIb 型高脂血症, IV 型高脂血症高脂血症では RLP-C 5 mg/dl 以上の症例が, それぞれ 9%, 65%, 55% を占めた. Table には示していないが,

5 名の III 型高脂血症, 2 名の V 型高脂血症患者では全例が RLP-C 値 5 mg/dl 以上を呈した.

2) コホート調査

各種血清脂質低下薬投与による血清 RLP-C と血清 RLP-TG の変化を Table 5a, 5b, 5c に示す. LDL 受容体活性を亢進する薬理作用を持つ simvastatin (5 mg/日) を投与した 31 名の対象において (Table 5a), 血清 RLP-C は投与前 15 ± 3.0 mg/dl から投与後 7.0 ± 1.2 mg/dl と有意な低下を示し ($p < 0.001$), この血清 RLP-C の有意な低下は IIa 型高脂血症, IIb 型高脂血症ともに認められた (それぞれ $p < 0.001, p < 0.001$). 同薬剤投与により血清 RLP-TG も低下を示したが, 有意差は認められなかった. この試験において, 血清コレステロール, LDL-C も血清 RLP-C と同様, 本薬剤投与により全対象者ならびに IIa 型高脂血症と IIb 型高脂血症のいずれのサブグループにおいても有意な低下を示した (ともに $p < 0.001$). 一

Table 3. Correlation coefficient predicting RLP-C

Parameters	Coefficient	P value
Serum Cholesterol	-0.212	n.s.
Triglyceride	0.574	$p < 0.01$
HDL Cholesterol	-0.151	n.s.
Serum Apolipoproteins		
A I	0.248	n.s.
B	0.354	$p < 0.05$
C II	0.507	$p < 0.01$
C III	0.374	$p < 0.05$
E	0.651	$p < 0.01$

n.s.=not significant

Table shows the relationship between RLP-cholesterol (RLP-C) and other lipid parameters among subjects ($n=33$) whose RLP-C above 5 mg/dl.

Relationship between serum lipids and RLP-TG

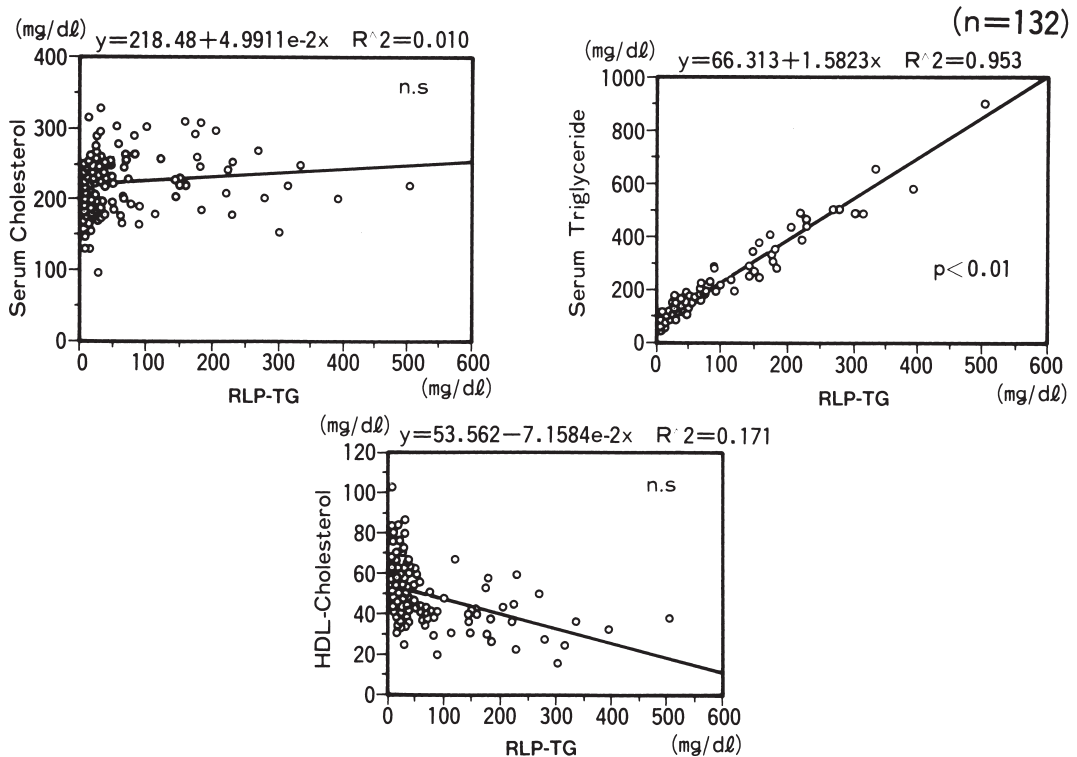


Fig. 6. Relationship between serum lipids and RLP-TG
 RLP-TG shows very strong correlation to serum triglyceride.

Table 4. Remnant-like particles cholesterol (RLP-C) in hyperlipidemia

	RLP-C		Incidence of subject with RLP-C above 5 mg/dl
	>5 mg/dl	≤5 mg/dl	
Normolipidemia	0	41	0
Hyperlipidemia		Subject number	%
type IIa	4	39	9
IIb	17	9	65
IV	12	10	55
Total	33	99	25

Table 5a. Changes in serum lipids, HDL-, LDL-cholesterol and RLP-lipids by the administration of simvastatin (mg/dl)

Phenotype	Serum		HDL-C	LDL-C	RLP-C	RLP-TG	
	Cholesterol	Triglyceride					
Total N=31	before	273±6.3	189±22	55±2.3	182±7.0	15±3.0	65±2.0
	after	220±6.8	141±12	56±2.5	137±7.0	7.0±1.2	34±7.1
IIa N=20	before	272±8.8	123±7.8	60±2.3	187±9.6	8.2±1.0	26±4.0
	after	224±9.9	106±9.2	62±2.7	141±10	6.5±0.8	18±3.4
IIb N=11	before	275±8.4	310±39	45±3.3	173±8.8	24±5.0	108±39
	after	214±6.8	203±18	45±3.0	128±7.6	10±1.9	51±12

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$, ***: $p < 0.01$, ****: $p < 0.001$

() Subject number

PLP-C: remnant-like lipoprotein particles cholesterol

RLP-TG: remnant-like lipoprotein particles triglyceride

M±SE

方, HDL-Cにはほとんど変化がみられなかった。

リポ蛋白リパーゼ活性を増加する薬理作用を持つ bezafibrate (400 mg/日) を投与した 28 名の対象において (Table 5b), 血清コレステロール, 血清 TG は有意に低下し (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.001$), HDL-C は有意に増加した ($p < 0.001$)。しかし, 血清 RLP-C の低下には有意性はなく, むしろ IIa 型高脂血症では bezafibrate 投与前後で 3.2 ± 0.7 mg/dl から 4.3 ± 0.6 mg/dl へと血清 RLP-C の増加がみられた。一方, 血清 RLP-TG は 99 ± 29 mg/dl から 31 ± 7.3 mg/dl と有意な低下を示した ($p < 0.02$)。IIa 型高脂血症と異なり, IIb 型高脂血症では bezafibrate 投与にて血清

RLP-C, RLP-TG ともに有意な低下を示した。症例数が少ないため投与前後の有意差検定はできなかったが, III 型高脂血症, V 型高脂血症ともに bezafibrate 投与にて血清 RLP-C と RLP-TG は顕著な低下を示した。

肝での TG 生成を抑制し VLDL の肝からの分泌を低下する薬理作用を持つ EPA (1,800 mg/日) を投与した 15 名の対象者において (Table 5c), EPA 投与前後の LDL-C, HDL-C には有意な変化が認められなかったが, 血清 RLP-C ならびに RLP-TG は有意な低下を示した (それぞれ 9.6 ± 2.0 mg/dl から 4.0 ± 0.7 mg/dl: $p < 0.01$, 63 ± 17 mg/dl から 25 ± 6.2 mg/dl: $p < 0.05$)。

Table 5b. Changes in serum lipids, HDL-C and RLP-lipids by the administration of bezafibrate (mg/dl)

Phenotype	Serum		HDL-C	RLP-C	RLP-TG	
	Cholesterol	Triglyceride				
Total N=28	before	256±7.1	274±45	51±2.3	13±3.4	99±29
	after	220±4.5	124±16	61±2.7	6±0.9	31±7.3
IIa N=10	before	262±6.3	114±7.5	57±3.6	3.2±0.7	20±4.2
	after	213±6.0	78±11	64±3.5	4.3±0.6	15±4.0
IIb N=10	before	266±7.6	254±34	52±3.6	9.4±1.8	71±16
	after	232±7.5	114±17	65±5.2	5.4±0.7	21±4.8
III N=1	before	375	378	53	49.5	154
	after	232	105	64	19.7	25.1
IV N=6	before	211±7.8	398±68	41±4.0	16±5.7	160±49
	after	204±10	213±52	48±4.4	8.7±2.6	75±27
V N=1	before	245	1,232	42	83.2	751
	after	158	160	57	2.5	21.8

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$, ***: $p < 0.01$, ****: $p < 0.001$ M±SE
 RLP-C: remnant-like lipoprotein particles cholesterol
 RLP-TG: remnant-like lipoprotein particles triglyceride

Table 5c. Changes in serum lipids, HDL-C, LDL-C and RLP-lipids by the administration of ethyl icosapentate (EPA) (mg/dl)

Phenotype	Serum		HDL-C	LDL-C	RLP-C	RLP-TG	
	Cholesterol	Triglyceride					
Total N=15	before	251±5.4	227±35	55±3.4	154±6.2	9.6±2.0	63±17
	after	230±8.3	139±21	56±3.1	146±8.0	4.0±0.7	25±6.2
IIa N=8	before	281±6.0	124±15	61±4.9	166±4.9	4.8±0.5	19.2±3.9
	after	228±13	97±15	60±4.9	149±10	3.1±0.6	14.7±1.2
IIb N=7	before	249±10	345±41	47±2.6	141±10	15±3.0	113±26
	after	232±10	187±33	51±3.0	144±12	5.0±1.1	37±11

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$, ***: $p < 0.01$ M±SE
 RLP-C: remnant-like lipoprotein particles cholesterol
 RLP-TG: remnant-like lipoprotein particles triglyceride

IV. 考 察

冠動脈疾患，脳血管障害の発症における血清脂質の関与は明らかであり，中でも LDL，レムナン トリボ蛋白，Lp(a)などのリボ蛋白は atherogenic なリボ蛋白として知られ，これらのリボ蛋白の把

握と血中濃度の適正化の必要性が唱えられている。特にレムナン トリボ蛋白は高脂血症以外の冠 危険因子である肥満，耐糖能異常との関連性も強 く¹⁵⁾²⁹⁾，生活習慣病という疾病概念の中でも関心 を集めているが，従来その定量的血中濃度の把握 が困難であった。

ここ数年にわたり、レムナント測定法の開発に携わり、RLP という臨床検査法の確立に関与してきたが、RLP の詳細な臨床的意義についての基礎的成績は未だ発表されていない。そこで今回、抗ヒトアポ B-100 と抗アポ AI モノクローナル抗体を利用して作成したイムノアフィニティ混合ゲルを用いて分画した RLP とレムナントリポ蛋白との相同性について粒子径、アポ蛋白組成、脂質組成、ヘパリン結合能、マクロファージのコレステロール蓄積に及ぼす影響などの物理化学的特性ならびに各タイプの高脂血症における発現頻度、様々の高脂血症治療薬に対する血中での変化などの臨床的特性を明らかとした。

レムナントリポ蛋白とは CM レムナントと VLDL レムナントを総称する呼び名である。CM レムナントと VLDL レムナントはともに TG ならびにコレステロールに富むアポ E-rich リポ蛋白であり、アポ B (CM レムナントはアポ B-48 と少量のアポ B-100 を含有し、VLDL レムナントはアポ B-100 のみを含有) を構造アポ蛋白とする共通点を持つ。小腸で生成され食事性脂肪を運搬する CM や肝で生成され内因性脂肪を運搬する VLDL などの TG rich リポ蛋白は血中に流入した後、毛細血管の内膜面に繫留しているリポ蛋白リパーゼ (LPL) などの酵素の働きによりリポ蛋白粒子中の TG やアポ C を失う一方アポ E を獲得するなどのリモデリングを受けて次第に小型化し、レムナントリポ蛋白に変換される。超遠心法にて $1.006 < d < 1.019$ g/ml の比重をもつリポ蛋白として分画される中間型リポ蛋白 (IDL) は VLDL レムナントの一つであり、ほぼ同意語に用いられるが、超遠心法で分画した VLDL の中にも実際 CM レムナントや VLDL レムナントが存在している。

すでに Campos ら³⁰⁾ は抗ヒトアポ B-100 モノクローナル抗体を利用したイムノアフィニティゲルを用いて pass 分画のリポ蛋白を同定しているが、この方法では pass 分画にアポ AI を有するリポ蛋白である CM や HDL も流出するという難点をもつ。そこで我々は pass 分画に流出する CM と HDL を除くため、アポ AI に対するモノクローナル抗体を利用して作成したイムノアフィニティゲルを抗アポ B-100 イムノアフィニティゲルと

混合してイムノアフィニティ混合ゲルを作成し、これを RLP の分離分画のために用いた。ここで用いた抗アポ AI イムノアフィニティゲルの特性についてはすでに別紙に報告した³¹⁾。

こうして作成されたイムノアフィニティ混合ゲルにて分画された CM-RLP (unbound 分画) のアポ蛋白組成は Fig. 2 に示すごとくであり、この成績から CM-RLP はアポ AI を持たず、アポ B-48³²⁾ に富む粒子であることが明らかとなった。一方、同患者から得られた CM の bound 分画として得られたリポ蛋白にはアポ AI の存在が確認され、アポ B-48 含量は低下していた。そして、このアポ B-48 は VLDL-RLP (unbound 分画) にも認められた。小腸由来アポ蛋白であるアポ AIV も CM-RLP だけでなく VLDL-RLP にもみられたことから、アポ B-48 の検出と合わせ VLDL 分画にも CM レムナントが混在していることが確認された。そして、これらの事象、ならびに CM、VLDL とともに RLP (unbound 分画) のアポ E 含量が bound 分画と比較して多いことから RLP のアポ蛋白組成はレムナントリポ蛋白のアポ蛋白組成と相同性を示すことが示唆された。

脂質組成の検索にて RLP は TG に富む粒子であることが判明した。CM や VLDL は TG を多量に含量するため、脂質組成のパーセント表示において TG の高含量が RLP と bound 分画の間のコレステロール含量の差を覆い隠す可能性もあるため、コレステロール/蛋白比を求めたところ、CM、VLDL いずれの分画においても RLP におけるコレステロール/蛋白比は bound 分画に較べ約 2 倍の値を呈し、RLP には比較的コレステロール含量が高いことが示された。Heparin affinity Sepharose 6B を用いた実験でも RLP にヘパリン結合能があることが示され、マクロファージを用いた実験においても RLP は酸化 LDL と同程度に細胞内にコレステリールエステル蓄積を助長する作用があることが示された。これらの成績は RLP とレムナントリポ蛋白との相同性をさらに支持するものであった。

132 名を対象とした断面調査にて RLP-C 値は血清コレステロール値、HDL-C 値とは有意な相関性を示さず、これらの値とはむしろ負の相関性がみられた。このことは RLP が LDL や HDL と

独立し、異なるリポ蛋白としての特性が強いことを支持する臨床成績を表しており、アポ B とアポ AI を持つリポ蛋白をモノクローナル抗体を用いて除外するという RLP の分離手法の確実性が臨床的成績においても確認された。また、RLP-C が正の相関性を示した血清 TG、アポ CII、アポ CIII、アポ E はいずれも CM や VLDL などの TG rich リポ蛋白の主たる構成成分であり、前述した RLP のアポ蛋白組成、脂質組成の検索での成績と一致する成績が臨床的解析によっても得られた。特にアポ E はこれら TG rich リポ蛋白の血中での中間代謝物質であるレムナントを特徴付けるアポ蛋白であり、RLP-C 測定値が血中レムナントリポ蛋白濃度を反映する値であることが支持された。一方、RLP の TG 濃度を表す RLP-TG も RLP の動態の一端を示す値ではあるが、RLP-TG はあまりに血清 TG との相関性が強く ($r^2 = 0.953$; Fig. 6)、血清中レムナントリポ蛋白を反映する値として不適当と考えられた。

正脂血症者では RLP-C 5 mg/dl 以上を示す症例はなく、実際レムナントリポ蛋白が増加する高脂血症である IIb 型、III 型、V 型高脂血症患者において高値を示すことから RLP-C の cut-off 値は 5 mg/dl 前後が適切と考えられたが、この cut-off 値の決定はさらに症例を増やし検討する必要がある。

LDL 受容体の機能不全で発症することの多い IIa 型高脂血症において、血清 TG 値は正常であっても RLP-C が 5 mg/dl 以上を示す症例が約 1 割を占めたことは (Table 4) レムナントリポ蛋白が粒子中に存在するアポ E をリガンドとして LDL 受容体を介して細胞異化されることから³³⁾³⁴⁾、非常に興味深い事柄である。そこで、細胞内コレステロール合成を阻害して LDL 受容体発現を誘導する薬理作用を持つ HMG CoA 還元酵素阻害薬である simvastatin 投与による RLP-C、RLP-TG の変化を観察した。あわせて、他の薬理作用をもって血清脂質異常を是正する bezafibrate (リポ蛋白リパーゼ賦活作用を持つ)、EPA (肝トリグリセライド合成低下による VLDL 分泌抑制作用を持つ) にも RLP-C、RLP-TG の変化を対照的に観察することとした。

その結果、simvastatin 投与にて IIa 型高脂血

症、IIb 型高脂血症とともに Table 5a に示すように LDL-C の有意な減少とともに RLP-C の有意な減少が認められ (それぞれ $p < 0.001$)、RLP はレムナントリポ蛋白と同様に LDL 受容体を介して異化される可能性が支持された。Fig. 7 は今回使用した 3 種の高脂血症治療薬の投与前後の RLP 脂質であるコレステロールと TG の変化率をそれぞれ図示したものである。Simvastatin 投与では IIa 型高脂血症においても、IIb 型高脂血症においても RLP-C、RLP-TG ともにほぼ同率の低下をしており、これは RLP が simvastatin にて誘導された LDL 受容体に結合して粒子のまま一体となって血中から消失するという仮説を支持する成績である。

一方、リポ蛋白リパーゼ活性を亢進する bezafibrate 投与では IIa 型高脂血症において、投与後の RLP-C はむしろ増加を示した。レムナントリポ蛋白は CM や VLDL が血中に流入した後、リポ蛋白リパーゼの作用により代謝を受け出現するリポ蛋白である。そのため、bezafibrate 投与によるリポ蛋白リパーゼ活性亢進によりレムナントリポ蛋白が増加したことが RLP-C の増加となって現れたとすることで説明される。Fig. 7 に示すごとく IIa 型高脂血症、IIb 型高脂血症ともに bezafibrate 投与にて生じる RLP-C と RLP-TG の変化率には有意な差がみられた。こうしたことから、bezafibrate 投与にて RLP は粒子組成を変えながら血中から消褪してゆくことが窺われる。しかも、この成績は RLP がリポ蛋白リパーゼの substrate となり、RLP 粒子中の TG はリポ蛋白リパーゼによって水解され粒子から離脱してゆくことを示している。今回成績を示していないが、我々は *in vitro* の系で RLP と post-heparin plasma をともに孵置する実験にて RLP がリポ蛋白リパーゼの substrate になることを確認している。

EPA 投与による RLP の低下においては、RLP-C の低下と RLP-TG の低下は同率であり (Fig. 7)、EPA 投与が血清 TG を低下するにもかかわらず、LDL-C、HDL-C には影響しないことから同薬投与による RLP-C の有意な低下は ($p < 0.01$) レムナントリポ蛋白の precursor である肝 VLDL の生成・分泌の低下によるものと考えられ

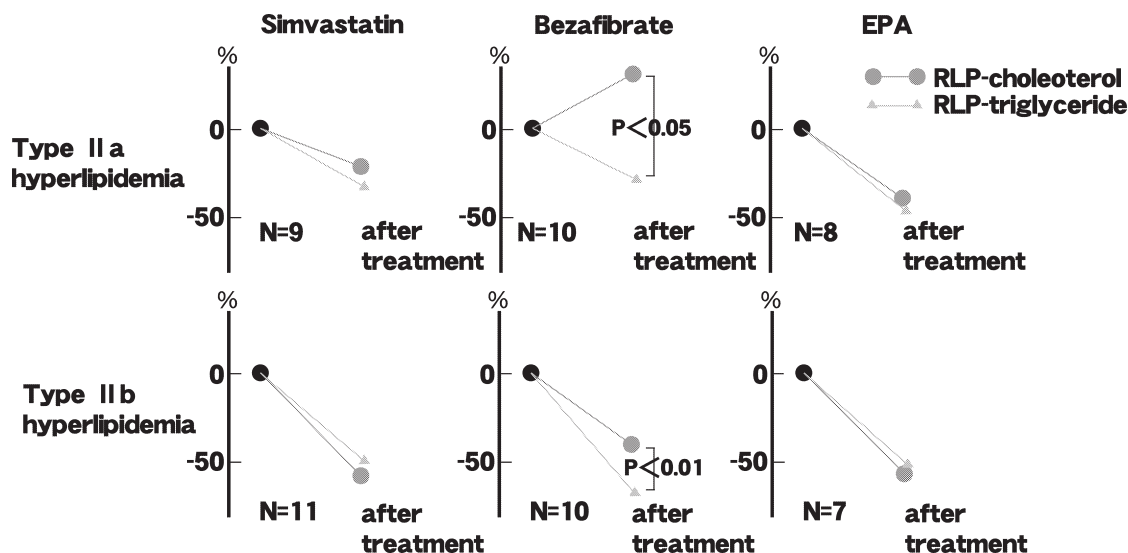


Fig. 7. Changes in reduction rate of cholesterol and triglyceride in RLP by using three different hypolipidemic agents.

The reduction rate of RLP-C and RLP-TG was similar by the use of simvastatin or EPA. However, RLP-C was increased after using bezafibrate in type IIa hyperlipidemia and reduction rate of RLP-C and RLP-TG was significantly different in both hyperlipidemic subjects administrated with bezafibrate.

る。

以上、今回、RLP とレムナントリポ蛋白との相同性について実験室レベルならびに臨床レベルの実験から検討し、RLP-C が血中レムナントリポ蛋白を反映する値であることを証明した。

V. 結 語

RLP についての最初の研究報告³⁵⁾ を発表してから 11 年が過ぎようとしている。近年、RLP についての諸家の報告も多くなり³⁶⁾³⁷⁾、RLP 測定が Framingham Heart Study などの疫学的研究³⁸⁾³⁹⁾ や VA-HIT⁴⁰⁾ などの大規模ランダム化プラセボ対照臨床試験の後解析⁴¹⁾ にも用いられるようになった。しかし RLP-C 測定がレムナントリポ蛋白を反映した値であることを基礎的見地から検定した論文はまだなく、今回の第 118 回成医会総会宿題報告を機会としてこれまでの我々が行ってきた研究の一部をまとめた。現在のところ、臨床の場において依然として RLP-C に代わりうる有用性を発揮するレムナントリポ蛋白定量法は開発されていない。今後期待される RLP-C 測定の臨床応用として RLP-C が食後高脂血症⁴²⁾ のサ

ロゲートマーカーとなりうることも考えられ、現在その検討も合わせて行っている^{43)~47)}。

稿を終わるに、これまでの研究を支えていただいた永野 允名誉教授、望月正武教授のご厚情に深謝するとともに、共同研究者である中村治雄防衛医科大学校名誉教授、斉藤俊光、深町 勇、中野隆光、中嶋克行をはじめとする日本抗体研究所の諸氏、ならびにかつて東京慈恵会医科大学青戸病院第 2 研究室とともに臨床、研究に勤しんできた石川俊次、鈴木直紀、加々美明彦、近藤和雄、阪本琢也、池脇克則、西出良一、岩崎雅文、望月恵子、阿久津敏江諸兄、諸氏のご助言に感謝するものです。

文 献

- 1) 多田紀夫. 高脂血症の治療と冠動脈疾患に関する大規模臨床成績. 現代医療 1999; 31: 2731-8.
- 2) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). JAMA 2001; 285: 2486-97.
- 3) 日本動脈硬化学会高脂血症診療ガイドライン検

- 討委員会. 日本動脈硬化学会高脂血症診療ガイドライン検討委員会報告 (1) 高脂血症診療ガイドライン: 1. 成人高脂血症の診断基準, 治療適用基準, 治療目標値. 動脈硬化 1997; 25: 1-34.
- 4) Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 2-14.
 - 5) Austin MA, Hokanson JE. Epidemiology of triglycerides, small dense low-density lipoprotein, and lipoprotein (a) as risk factors for coronary heart disease. *Med Clin North Am* 1994; 78: 99-115.
 - 6) Hamsten A. Hypertriglyceridemia, triglyceride-rich lipoproteins and coronary heart disease. *Ballière's Clin Endoc Metab* 1990; 4: 895-922.
 - 7) Hulley SB, Rosenman RH, Bawol RD, Brand RJ. Epidemiology as a guide to clinical decisions: the association between triglyceride and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1980; 302: 1383-9.
 - 8) Brunzell JD, Schrott HG, Motulsky AG, Bierman EL. Myocardial infarction in the familial forms of hypertriglyceridemia. *Metabolism* 1976; 25: 313-20.
 - 9) 多田紀夫. 原発性高カイロミクロン血症. 日臨 2001; 59 (Suppl 3): 13-21.
 - 10) 多田紀夫. 動脈硬化をターゲットとした代謝診療. *Syndrome X*. 内科 2000, 85: 448-53.
 - 11) Mahley RW. Atherogenic lipoproteins and coronary artery disease; concept derived from recent advances in cellular and molecular biology. *Circulation* 1985; 72: 943-8.
 - 12) Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, et al. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunoadsorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1767-74.
 - 13) Devaraj S, Vega G, Lange R, Grundy SM, Jialal I. Remnant-like particle cholesterol levels in patient with dysbetalipoproteinemia or coronary artery disease. *Am J Med* 1998; 104: 445-50.
 - 14) Mahley RW, Rall SC Jr. Type III hyperlipidemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 1953-80.
 - 15) 多田紀夫. 高レムナントリポ蛋白質血症. 日臨 2001; 59 (Suppl 3): 112-18.
 - 16) 多田紀夫, 石川俊次, 中村治雄, 永野 允, Nestel PJ, Fidge NH. 高 TG 血症における VLDL の heterogeneity と各 VLDL 分画の *in vitro* における細胞親和性 (VLDL_E の存在). 動脈硬化 1981; 9: 127-34.
 - 17) 多田紀夫. Very low density lipoprotein の heterogeneity とその代謝に関する研究. 慈恵医大誌 1982; 97: 553-69.
 - 18) Nestel P, Tada N, Billington T, Huff M, Fidge N. Changes in very low density lipoproteins with cholesterol loading in man. *Metabolism* 1982; 31: 398-405.
 - 19) Nestel P, Billington T, Tada N, Nugent P, Fidge N. Heterogeneity of very-low-density lipoprotein metabolism in hyperlipidemic subjects. *Metabolism* 1983; 32: 810-7.
 - 20) Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta* 1993; 223: 53-7.
 - 21) Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 1981; 73: 3-46.
 - 22) Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 1983; 98: 241-60.
 - 23) Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883-7.
 - 24) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Ranball RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
 - 25) 多田紀夫. アポ蛋白: 密度勾配電気泳動法. 臨検 1985; 29: 1416-21.
 - 26) Hara I, Okazaki M. High-performance liquid chromatography of serum lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 129: 57-78.
 - 27) Tada N, Nestel PJ, Fidge N, Campbell G. Abnormal apolipoprotein composition in alco-

- holic hepatitis. *Biochem Biophys Acta* 1981; 664: 207-20.
- 28) 多田紀夫. 知っておきたい200ワード. 現代医学用語集「レムナント粒子」, 医のあゆみ 1997; 181: 868-9.
- 29) 多田紀夫. 糖尿病に合併する高脂血症の治療. 最新医 2001; 56: 1207-13.
- 30) Campos E, Nakajima K, Tanaka A, Havel RJ. Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B 100. *J Lipid Res* 1992; 33: 369-80.
- 31) 多田紀夫, 平田文彦, 中村治雄. Monoclonal anti-apo AI affinity columnを用いたリポ蛋白の検討. 動脈硬化 1987; 15: 1089-96.
- 32) Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987; 50: 831-40.
- 33) Mahley RW, Ji Z-S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16.
- 34) 多田紀夫. レムナントリポ蛋白の動脈硬化発症メカニズム. 松澤佑次編集. 目でみる循環器病シリーズ: 冠危険因子. 東京: メジカルビュー社; 2000. p. 36-41.
- 35) 多田紀夫, 石川俊次, 望月恵子, 阪本琢也, 加々美明彦, 永野 允. 高脂血症における Lipo Z: 血清脂質, アポ蛋白と Lipo Z の関連性について. *Prog Med* 1990; 10(3): 722-6.
- 36) Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, et al. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998; 97: 2519-26.
- 37) Doi H, Kugiyama K, Oka H, Sugiyama S, Ogata N, Koide SI, et al. Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. *Circulation* 2000; 102: 670-6.
- 38) McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant lipoprotein cholesterol and triglyceride reference ranges from the Framingham Heart Study. *Clin Chem* 1998; 44: 1224-32.
- 39) McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 229-36.
- 40) Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-8.
- 41) Elam MB, Schaefer EJ, McNamara JR. Fasting and postprandial remnant-like particles (RLP) as a predictors of cardiovascular events in the VA-HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* 1999; 100: 1470.
- 42) 多田紀夫. 食後の高脂血症. 山本 章 編. トリグリセライド, HDL と動脈硬化. 大阪: フジメディカル出版; 2001. p. 213-28.
- 43) 池脇克則. 冠動脈硬化症における脂肪負荷後のリポ蛋白代謝の検討. 動脈硬化 1990; 18: 887-95.
- 44) 多田紀夫, 池脇克則. 食後高脂血症の診断法: 脂肪負荷試験に伴う血清脂質と RLP の変化: リポ蛋白分析からの解析. 動脈硬化 1998; 25: 361-70.
- 45) 多田紀夫. 食後高脂血症と高レムナント血症: 脂肪負荷試験の意義. 動脈硬化 2000; 27: 319-25.
- 46) 多田紀夫. 食後高脂血症についての研究: ベザフィブラートの効果. *Ther Res* 2000; 21: 2320-5.
- 47) Tada N, Watanabe H, Matsuo N, Tokimitsu I, Okazaki M. Dynamics of postprandial remnant-like lipoprotein particles in serum after loading of diacylglycerols. *Clin Chim Acta* 2001; 311: 109-7.