

Clinical Implications of Glycosylated Low Density Lipoprotein-Evaluation of an Affinity Chromatography System for the Determination of Glycosylated Low Density Lipoprotein and its Role in the Development of Diabetic Angiopathy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8264

糖化低比重リポ蛋白の臨床的意義—アフィニティクロマトグラフィーによる測定法の検討ならびに糖尿病性血管障害進展への役割について

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

坂井健志

(平成3年2月18日受付)

糖化低比重リポ蛋白 (glycosylated low density lipoprotein, G-LDL) が糖尿病性血管障害進展に果たす役割を検討する目的で、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーを用いた G-LDL の分離を検討し、糖尿病患者における G-LDL を測定した。ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーの原理は、蛋白が非酵素的に糖化されると、1-デオキシフルクトシル (deoxyfructosyl) 誘導体となり、この誘導体に含まれるシス-ジオール (cis-diol) 基はアルカリ溶液中でほう素酸と可逆的な複合体を作る性質に基づいている。アガロースゲルにフェニールほう素酸を固定したアミノフェニールほう素酸アガロースゲルをカラム (ベッド容量0.7×5cm) に充填し、0.25M 酢酸アンモニウム、pH9.0 で平衡化した後、低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 溶液を添加し G-LDL を吸着させた。さらに0.25M 酢酸アンモニウム、pH9.0 でカラムに吸着しない LDL を洗い流し、次に0.25M 酢酸ナトリウム、pH5.5 で吸着した G-LDL を溶出した。G-LDL の分離は室温にて行った。添加した LDL 溶液の総蛋白量に対する、吸着溶出された蛋白量の比を求め G-LDL 値 (%) を算出した。蛋白量は Lowry 法で測定した。フルクトースはシス-ジオール基をもち、ほう素酸と最も安定した複合体を作るが、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーでは ^{14}C -フルクトースの放射活性の88.9%が分離された。分離された LDL が G-LDL であることはチオバルビツール酸 (thiobarbituric acid, TBA) 法によって確認された。合成した ^{14}C -G-LDL では放射活性の70%が分離された。TBA 法との定量性の相関も良好 ($r=0.914$, $p<0.001$) であった。糖尿病患者 (diabetes mellitus, DM) 47例、耐糖能障害者 (impaired glucose tolerance, IGT) 13例、健常者 (normal, N) 17例を対象として、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーにて G-LDL を測定した。DM 群の G-LDL 値 (%) (平均値±標準偏差) は $6.8 \pm 0.3\%$ で IGT 群の $4.8 \pm 0.2\%$ 、N 群の $3.9 \pm 0.3\%$ に比し有意 ($p<0.001$) に高値であった。また G-LDL 値は同日の空腹時血糖値 (fasting blood glucose, FBG) ($r=0.59$, $p<0.001$)、糖化ヘモグロビン値 (hemoglobin A_{1c}, HbA_{1c}) ($r=0.28$, $p<0.05$)、さらに1週間前の FBG ($r=0.51$, $p<0.05$) と有意に相関した。治療による FBG の低下に対し G-LDL 値の変化は HbA_{1c} 値の変化よりも早期におこった。糖尿病性の網膜症、腎症や虚血性心疾患を合併する患者と、これらの合併症を持たない患者では G-LDL 値に統計学的に有意の差はなかった。アフィニティクロマトグラフィーは血清の G-LDL の迅速な、かつ特異的な検出方法であり、また G-LDL は糖尿病性血管障害に病因的な役割を果たしている可能性が考えられた。

Key words glycosylation, low density lipoprotein, affinity chromatography, diabetes mellitus, Maillard reaction

Abbreviations: DM, diabetes mellitus; FBG, fasting blood glucose; G-LDL, glycosylated low density lipoprotein; HbA_{1c}, hemoglobin A_{1c}; HbA_{1c}, hemoglobin A_{1c}; IGT, impaired glucose tolerance; N, normal; TBA, thiobarbituric acid; VLDL, very low density lipoprotein

Maillard は、1912年にアミノ酸と還元糖の混合液を加熱すると褐色に着色する褐変現象 (browning) を報告し¹⁾、食品学者のあいだでは Maillard 反応として注目された。報告のなかで褐変現象は生体内でも起こりうる反応であると予言していたが、Rahbar により糖尿病患者でヘモグロビン A_{1c} と呼ばれる成分の増加が報告²⁾されるまで、生体内でのアミノ酸と還元糖の反応は注目されなかった。すなわち、ヘモグロビン A_{1c} はヘモグロビンのβ鎖N末端バリンにグルコースがアマドリ (Amadori) 転位した型で結合しており³⁾、一連の反応は非酵素的、非特異的に起こる⁴⁾ことが明らかにされたのである。アミノ酸と還元糖の非酵素的糖化 (non-enzymatic glycosylation) によりアマドリ転位化合物の生成される過程は、Maillard 反応の初期段階であり、ヘモグロビンだけでなく生体内のあらゆる蛋白について起こる^{5,6)}ことが判明した。それらのひとつに、コレステロール代謝の中心的なリポ蛋白である低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) の非酵素的糖化がある。Witztum ら⁷⁾は、糖化低比重リポ蛋白 (glycosylated low density lipoprotein, G-LDL) はヒト培養皮膚線維芽細胞において LDL リセプター経路⁸⁾による代謝を受けず、生体内での分画異化率 (fractional catabolic rate) が減少している成績に基き、LDL が非酵素的糖化を受けることにより、生理的な機能を失い、コレステロール代謝が影響されることを示唆した。

病理学的に動脈硬化の初期段階における特徴的な所見は、血漿の LDL に由来するエステル型コレステロールを胞体内に取り込んだ泡沫細胞が、血管内膜下へ出現することである⁹⁾。粥状動脈硬化初期病変においては、泡沫細胞の起源は血液中の単球から分化したマクロファージに由来するという考えが有力である。Goldstein ら¹⁰⁾は先の LDL リセプター経路とは別に、マクロファージは変性 LDL やβ-超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) に対して高親和性を持つリセプターを有し、大量の変性 LDL を取り込んで異化することを発見した。この変性 LDL の取り込みには LDL リセプター経路のようなフィードバック機構がなく、マクロファージが泡沫化することも証明された¹¹⁾。Goldstein らの変性 LDL はアセチル化という非生理的な、強い化学変化を受けた蛋白であり、果たして生体内で泡沫細胞の形成に関与する変性 LDL が存在するか否かは、動脈硬化の発症に関連して重大な問題となる。現在生体内で、生理的条件下で存在が認められている変性 LDL の1つは G-LDL である¹²⁾。一方糖尿病患者では健康人に比べて動脈硬化

性疾患の発症率が高く、この理由として糖尿病患者では血中グルコース濃度が高く、かつ血清リポ蛋白異常が高率に合併していることより、G-LDL を中心とした糖化リポ蛋白が、マクロファージの泡沫細胞化を介して動脈硬化促進に関与している可能性が推定できる。本研究では非酵素的に反応し生成された G-LDL (図1) を分離、定量するために、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィー (boronate affinity chromatography) を用いることを検討した。このアフィニティクロマトグラフィーはアミノ酸とグルコースのアマドリ転位化合物が構造内にシス-ジオール基を有し、この基は弱アルカリ条件下でほう素酸塩 (boronate) と直ちにエステルを形成し可逆的な結合体をつくり、酸性条件下では解離するという特質を利用している。さらに本方法を用い、糖尿病患者における G-LDL を測定し動脈硬化促進の危険因子としての G-LDL の臨床的意義を検討した。

対象および方法

I. ¹⁴C-フルクトースの分離

フルクトースはシス-ジオール基を有し、ほう素酸塩ともっとも安定した複合体を作る。アフィニティカラムの吸着回収効率を確かめるため、¹⁴C-フルクトース (D- [¹⁴C(U)] -fructose, 359mCi/mmol, New England Nuclear, Boston, USA) を用いて検討した。0.25M 酢酸アンモニウム、pH9.0 に溶解した ¹⁴C-フルクトース (13×10⁷ cpm/ml 0.7 μmol/ml) 1ml をカラムに添加した。吸着しないフルクトースを 0.25M 酢酸アンモニウム 15ml で洗い流した。次に 0.25 M 酢酸ナトリウム、pH5.5 20ml で、吸着したフルクトースを溶出した。酢酸アンモニウムおよび酢酸ナトリウムの流出液はそれぞれ 1ml ずつ分取し、各分画より 200 μl 取り、液体シンチレーションスペクトロメータ LSC 671 (Aloka, 東京) にて放射活性を測定した。

II. G-LDL の合成と分離

1. LDL の調整

早朝空腹時に採血し遠心分離した血清を、Havel ら¹³⁾の方法で分離用超遠心機 L8 と 50.3 Ti ローター (Beckman, Fullerton, USA) を用いて超遠心し、得た比重 (density, d)=1.019-1.063g/ml の分画を 0.15M NaCl に対して 4°C、12時間透析後 LDL 溶液として用いた。基礎的実験には d=1.020-1.050g/ml の分画を用いた。

2. G-LDL の合成

G-LDL は、健康者より分離した LDL (d=1.020-

1.050) 溶液と、Dulbecco リン酸塩緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS, 日水, 東京) に溶解したグルコースを、Day ら¹⁴⁾の方法に準じ37°Cで7日間、無菌的条件下に静置反応させ合成した。反応液を0.15M NaCl に対して24時間透析して遊離のグルコースを除いた。また ¹⁴C-G-LDL (12×10⁶ cpm/ml 蛋白量 0.53mg/ml) は、同じく健常者より分離精製した LDL 溶液と ¹⁴C-グルコース (D- [¹⁴C(U)] -glucose, 360mCi/mmol New England Nuclear) を同一条件下で反応させ合成した。

3. チオバルビタル酸 (thiobarbituric acid, TBA) 法による G-LDL 測定

TBA 法による G-LDL 測定は Pecoraro ら¹⁵⁾の方法に準じた。合成した G-LDL 溶液 1ml に 1M シュウ酸 0.5ml を加え100°Cで5時間加熱し加水分解した後、40%トリクロロ酢酸 0.5ml を加え、3000rpm 15分遠心し蛋白を沈殿させた。その上清 0.5ml に 0.05M TBA 0.5ml を加え、生成された 5-ハイドロキシメチルフルフラール (hydroxymethylfurfural, HMF) と40°Cの恒温槽にて30分間反応させた。発色した反応液の波長 433nm の吸光度 (A₄₃₃) を分光光度計 UV 200S (島津, 京都) で測定した。5-HMF を標準とし、G-LDL 値は LDL の蛋白 1mg 当りに生成された 5-HMF 量 (nmol of HMF/mg protein) で表した。

4. アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の分離、定量

ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の分離はすべて室温にて行った。アミノフェニルほう素酸アガロースゲル (aminophenyl boronate agarose gel, Glyco gel B[®], Pierce, Rockford, USA) をカラム (ベッド容量 0.7×3cm, 0.7×5cm または 0.7×10cm) に充填した。0.25M 酢酸アンモニウム, pH9.0 で平衡化後、同じ酢酸アン

モニウムに溶解した LDL 溶液を添加し、さらに酢酸アンモニウムで吸着しない LDL を洗い流した。次に 0.25M 酢酸ナトリウム, pH5.5 を加え、吸着された LDL を溶出した。酢酸アンモニウムおよび酢酸ナトリウムの流出液はそれぞれ 1ml ずつ分取した。各分画の蛋白量を Lowry 法で測定した。

III. アフィニティクロマトグラフィーによる血清中の G-LDL の測定

1. 対象

金沢大学第二内科及びその関連病院に入院中で、重篤な肝疾患、腎疾患、及び内分泌疾患を有しない、未治療または血糖コントロール不良の糖尿病患者 (diabetes mellitus, DM) 47例 (平均年齢 55.7±1.8歳, 平均±標準偏差), 検診で受診し 75g 糖負荷試験で正常型を示した正常者 (normal, N) 17例 (平均年齢 46.8±4.0歳) と、境界型を示した耐糖能障害者 (impaired glucose tolerance, IGT) 13例 (平均年齢 58.3±3.0歳) を対象とした。糖尿病患者のうち、安静時心電図において心筋の虚血及び壊死の認められるもの、狭心症を認めるものを虚血性心疾患 (ischemic heart disease, IHD) 合併例とした。

2. 測定条件

対象者の血清より分離した LDL 溶液 (d=1.019-1.063, 蛋白量 0.9-1.8mg/ml) 1ml を 3ml の 0.25 M 酢酸アンモニウムで希釈シカラムに添加した。アフィニティカラムのベッド容量は 0.7×5cm とした。吸着した LDL を溶出するために 0.25M 酢酸ナトリウム 10ml を流した。添加した LDL 溶液の総蛋白量に対する、酢酸ナトリウムで溶出された蛋白量の比を求め G-LDL 値 (%) を算出した。

IV. 糖化ヘモグロビンおよび脂質の測定

糖化ヘモグロビン (glycosylated hemoglobin, HbA_{1c}) 値はミニカラム法のモニター G カラム[®]

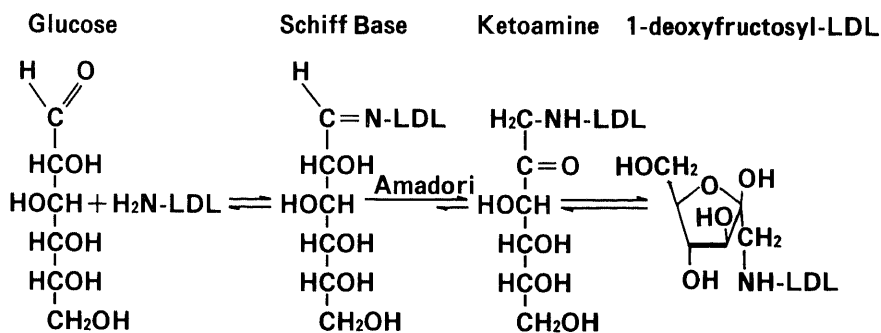


Fig.1. Reaction schema for nonenzymatic glycosylation of low density lipoprotein.

(BML, 東京)で測定した. 血清および LDL-コレステロール濃度は酵素法によるデタミネーターTC^R (協和メディカル, 東京)で, 血清トリグリセライド濃度は酵素法を用いたリピドスエース^R (東洋紡, 大阪)でそれぞれ測定した. G-LDL-コレステロール濃度は LDL-コレステロール濃度 (mg/dl) に G-LDL 値 (%) を乗じて算出した.

V. 統計学的処理

得られた数値はすべて平均値±標準偏差 (mean±SD) で示した. 二群間の平均値の差の検討には Student t 検定を用いた.

成 績

- I. ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる分離条件の検討
 1. ¹⁴C-フルクトースの分離と回収

[¹⁴C]-フルクトースの放射活性は88.9%が溶出回収されたが, 吸着しない分画にも若干放射活性を認めた (図2).

2. G-LDL の分離条件, 回収率

1) アフィニティクロマトグラフィーによる溶出蛋白の回収率

アフィニティカラムに添加する LDL の蛋白量, およびカラムの容量を決定するため, 2種類のベッド容量 (0.7×3cm, 0.7×5cm) のカラムと, 2種類の蛋白濃度 (0.9mg/ml, 1.8mg/ml) の LDL 溶液 1ml を用いて G-LDL を分離し, それぞれの溶出蛋白の回収率を求めた. 蛋白の回収率 (%) は, カラムに吸着しない LDL とカラムに吸着し溶出された LDL の蛋白量の和を, カラムに添加した LDL 溶液の総蛋白量で除し比を求めた. その結果蛋白の回収率は, ベッド容量 0.7×3cm のカラムに蛋白濃度 0.9mg/ml の LDL 溶

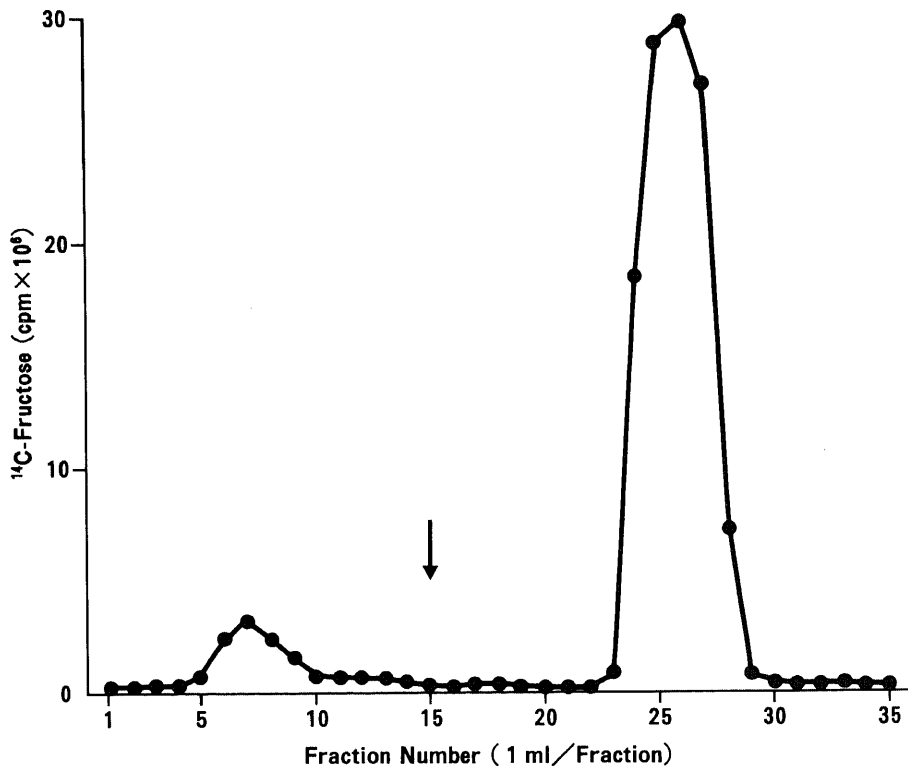


Fig. 2. Elution profile ¹⁴C-fructose by affinity chromatography. Fructose, with its coplanar cis-diol groups, forms the most stable complex with phenylboronic acid in alkaline solution. D-(¹⁴C (U))-fructose (359mci/mmol) in 0.25 M ammonium acetate, pH9.0, was applied to a column (bed volume, 0.7×5.0cm) of aminophenyl boronate agarose and washed with the same buffer. At the position indicated by an arrow, the buffer changed to 0.25M sodium acetate, pH5.5. The radioactivity was measured in each fraction (1ml-fraction).

液を添加した場合83%、1.8mg/ml の場合は74%であった。またベッド容量0.7×5cm のカラムに蛋白濃度0.9mg/ml の LDL 溶液を添加した場合は85%、1.8mg/ml の場合は79%であった。この結果より血清 G-LDL 測定の際はベッド容量は0.7×5cm、添加する LDL 溶液の蛋白濃度は0.9~1.8mg/ml となるよう調整した。

2) アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の分離と TBA 法による測定

健常者の血清より分離した LDL を、グルコース40mM と反応させ作製した合成 G-LDL 溶液1ml をベッド容量0.7×10cm のアフィニティカラムで分離したところ、0.25M 酢酸ナトリウム、pH5.5で溶出した分画に蛋白のピークが認められた。この蛋白のピークと TBA 法による 5-HMF 生成量のピークが重なった。以上よりこの蛋白のピークが G-LDL であると考えられた。0.25M 酢酸アンモニウム、pH9.0でカラムに吸着しない LDL を洗い流した分画にも TBA 法で 5-HMF の存在が認められた(図3)。

3) アフィニティクロマトグラフィーによる合成 [¹⁴C]-G-LDL の分離

健常者より分離精製した LDL 溶液と ¹⁴C-グルコースより作製した [¹⁴C]-G-LDL 1ml をアフィニティカラムで分離したところ、カラムに吸着し溶出された分画に放射活性の70%が認められ、蛋白も同時に認められた。カラムに吸着しない分画にも放射活性は30%認め

られた(図4)。吸着しない分画を再度アフィニティカラムに添加したところ、放射活性及び蛋白量の90%以上は吸着しない分画に回収された。

4) アフィニティクロマトグラフィーと TBA 法による G-LDL の定量性の相関

健常者より分離した LDL 溶液と種々の濃度のグルコース(0, 5, 10, 20, 40mM)より G-LDL を作製した。この合成 G-LDL 溶液1ml をアフィニティカラムに添加し G-LDL 値を測定したところ LDL と反応させるグルコースの濃度を0から40mM に変化させると G-LDL 値は4.5%から12.5%へと増加した(図5)。同時に同一の合成 G-LDL 溶液を加水分解し、生成した 5-HMF を TBA で発色させ波長 433nm の吸光度(A₄₃₃)を測定すると A₄₃₃ は0.054から0.400と増加し、両者の間には r=0.914 と有意(p<0.001)に高い正の相関があった(図6)。

II. ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の測定と臨床的意義の検討

1. 対象の臨床的背景

対象とした糖尿病(DM)群、耐糖能障害(IGT)群、正常(N)群の臨床的背景を表1に示す。平均年齢はN群で他の2群に比較してやや低い傾向にあったが有意差はなかった。FBG、HbA_{1c}値は、DM群、IGT群ともN群と比較して有意に高値であった。総コレステロール濃度、LDL-コレステロール濃度はDM群ではN群より有意に高値であったが、IGT群とN群の間に

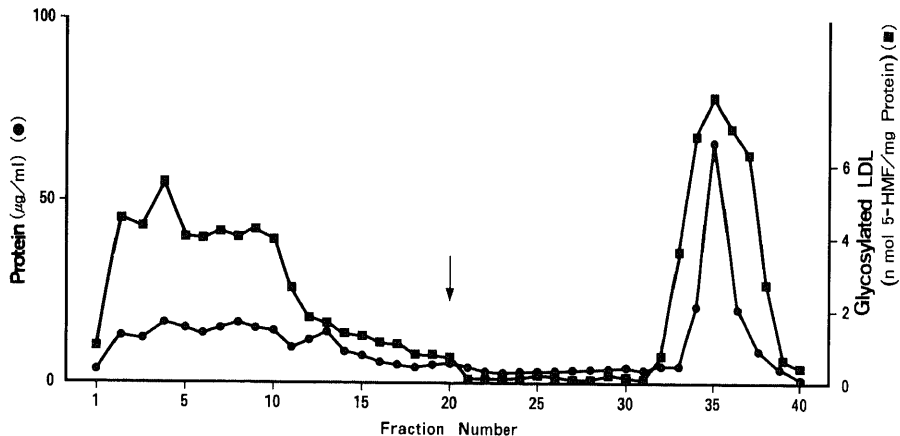


Fig. 3. Separation of G-LDL by affinity chromatography. G-LDL was prepared by the incubation of LDL and glucose for 7 days in the phosphate buffered saline at 37°C. G-LDL solution in 0.25M ammonium acetate, pH9.0, was applied to a column (0.7×5.0cm) of aminophenyl boronate agarose and washed with the same buffer. At the position indicated by an arrow, the buffer was changed to 0.25M sodium acetate, pH5.5. Protein concentration (●) was measured by the method of Lowry et. al, and G-LDL (■) was determined by the TBA method.

差はなかった。糖尿病患者においては網膜症 (retinopathy) の合併7例, 腎症 (nephropathy) の合併10例, 虚血性心疾患の合併10例であった。

2. 血清中の G-LDL 値と G-LDL-コレステロール濃度

DM 群の G-LDL 値は $6.8 \pm 0.3\%$ で IGT 群の $4.8 \pm 0.2\%$, N群の $3.9 \pm 0.3\%$ に比し有意 ($p < 0.001$) に高値であった。また G-LDL-コレステロール濃度も DM 群で $8.4 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ と, IGT 群の $5.3 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ や, N群の $4.0 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$ より有意 ($p < 0.01$, $p < 0.001$) に高値であった (図7)。

3. 血清 G-LDL 値と血液検査所見との相関

G-LDL 値は 1~2 週間前の FBG ($r = 0.51$, $p < 0.001$), および同時採血の FBG ($r = 0.59$, $p < 0.001$), と有意の相関があった (図8)。G-LDL-コレステロール値も 1~2 週間前の FBG ($r = 0.51$, $p < 0.001$), 同時採血の FBG ($r = 0.49$, $p < 0.001$) と有意

の相関があった (図9)。

G-LDL 値は同時採血の HbA₁ 値 ($r = 0.28$, $p < 0.05$) と有意の相関があったが, G-LDL-コレステロール濃度は HbA₁ 値と有意の相関はなかった (図10)。

G-LDL 値は血清総コレステロール濃度, LDL-コレステロール濃度, 血清トリグリセリド濃度とは有意の相関はなかった。

4. 血清 G-LDL 値と臨床症状との関係

糖尿病患者において, 網膜症, 腎症, 虚血性心疾患を合併する (+) 群とこれらを合併しない (-) 群で G-LDL 値を比較した。G-LDL 値は網膜症 (-) 群で $7.4 \pm 2.4\%$, (+) 群で $6.5 \pm 1.7\%$ であった。腎症 (-) 群では $6.7 \pm 2.1\%$ で, (+) 群では $7.7 \pm 2.5\%$ であった。また虚血性心疾患 (-) 群では $6.8 \pm 2.0\%$, (+) 群では $6.6 \pm 2.3\%$ といずれの合併症においても有意な差はなかった (図11)。さらに虚血性心疾患に脳梗塞, 一過性脳虚血発作を含めた動脈硬化性疾患を合併

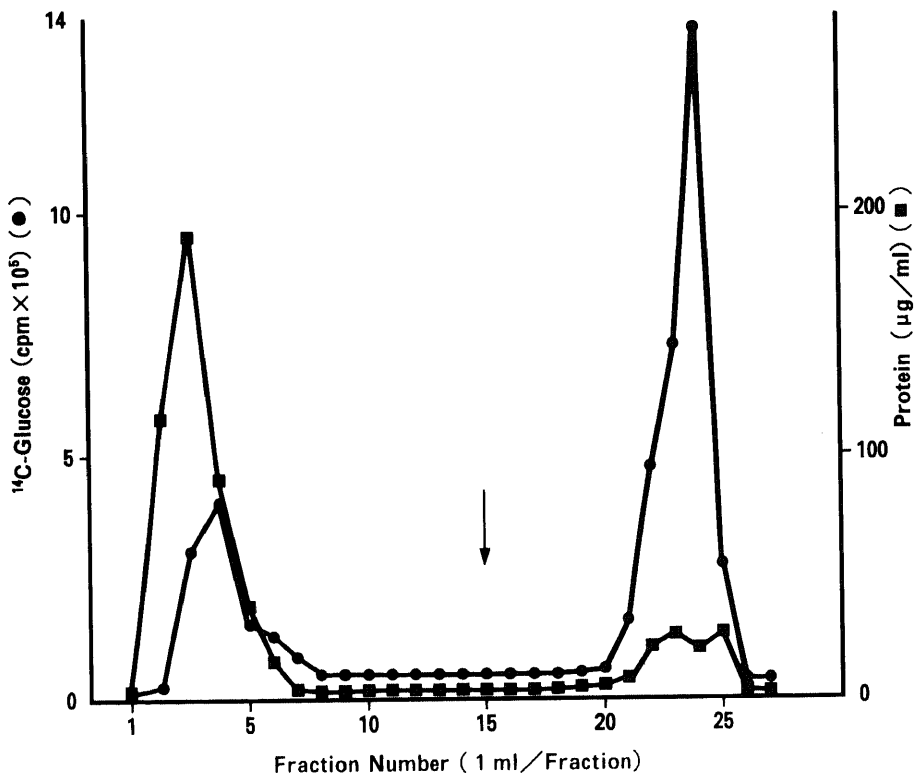


Fig. 4. Separation of ¹⁴C-glucose-LDL by boronate affinity chromatography. ¹⁴C-glucose-LDL was prepared as in the methods. 1ml of sample solution (12×10^6 cpm/ml, 0.53mg protein) in 0.25M ammonium acetate, pH9.0, was applied to a column (0.7×5.0cm) and washed with the same buffer. At the position indicated by an arrow, the buffer was changed to 0.25M sodium acetate, pH5.5. (■), protein concentration was; (●), radioactivity.

する群 (動脈硬化群) と合併しない群 (非動脈硬化群) に分けると、動脈硬化群の G-LDL 値は $7.5 \pm 0.3\%$ と非動脈硬化群の $7.0 \pm 0.3\%$ より高い傾向にあった。

5. 糖尿病治療と血清 G-LDL 値, HbA_{1c} 値および FBG の変化との対応

糖尿病のコントロールによる FBG 変化と G-LDL 値変化の対応をみたところ, コントロールを開始して FBG が前値 $188 \pm 25\text{mg/dl}$ から 2 週間後 $174 \pm 21\text{mg/dl}$ に低下した時点で, G-LDL 値は前値 $6.5 \pm 0.6\%$ から $5.6 \pm 0.6\%$ に有意 ($p < 0.05$) に低下した。4 週後 FBG が $152 \pm 18\text{mg/dl}$ と前値よりさらに有意 ($p < 0.05$) に低下した時点でも G-LDL 値は 2 週間後と変

わらず $5.5 \pm 0.5\%$ であった。HbA_{1c} 値の変化は前値 $8.8 \pm 0.8\%$ に対し 2 週後 $9.2 \pm 1.3\%$, 4 週後でも $8.8 \pm 0.7\%$ と有意な変化はみられなかった (図12)。

考 察

糖化された蛋白を分離検出する方法としてはイオン交換クロマトグラフィー¹⁰⁾があるが、もっとも簡便な方法として、糖化を受けた蛋白を弱酸で加熱し、生成された 5-ハイドロキシメチルフルフラール (hydroxymethylfurfural, HMF) を 2-チオバルビツール酸 (thiobarbituric acid, TBA) で比色定量する TBA

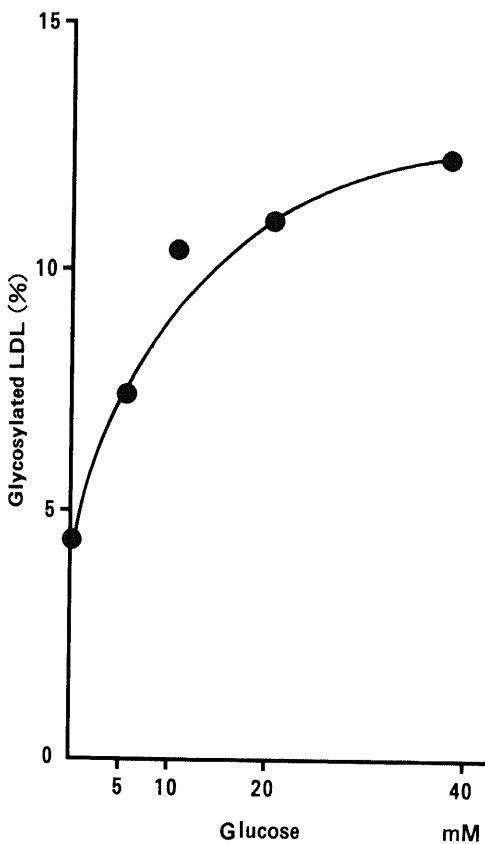


Fig. 5. Effect of glucose concentration on the glycosylation of low density lipoprotein. The incubation mixtures contained phosphate buffered saline, low density lipoprotein (12.7 mg of protein per ml) and either 0, 5, 10, 20 or 40mM glucose. The reaction mixtures were incubated under sterile conditions at 37°C for 7 days. The amounts of glycosylated low density lipoprotein were determined after affinity column chromatography separation.

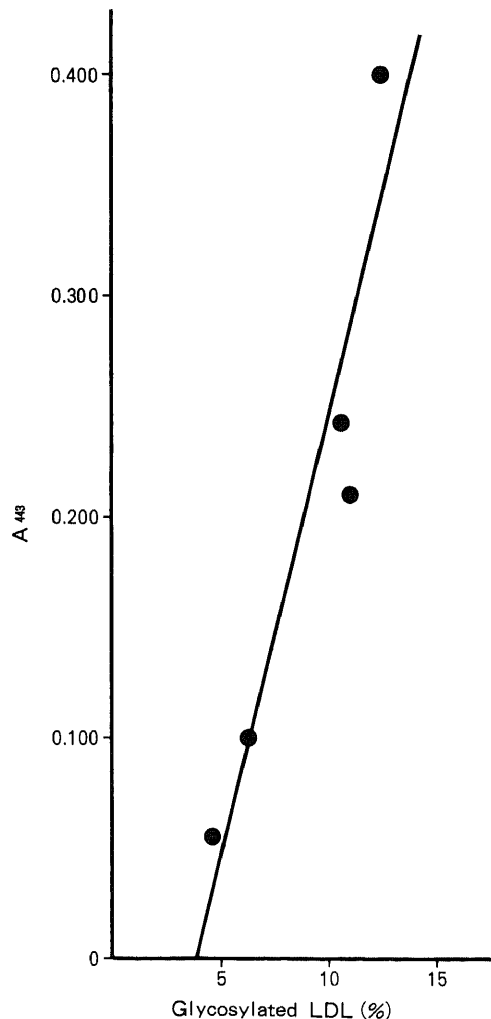


Fig. 6. Linear regression analysis of levels of glycosylated low density lipoprotein in the same samples obtained by affinity chromatography method and thiobarbituric acid assay. $y = 40x - 212$, $r = 0.914$, $p < 0.001$

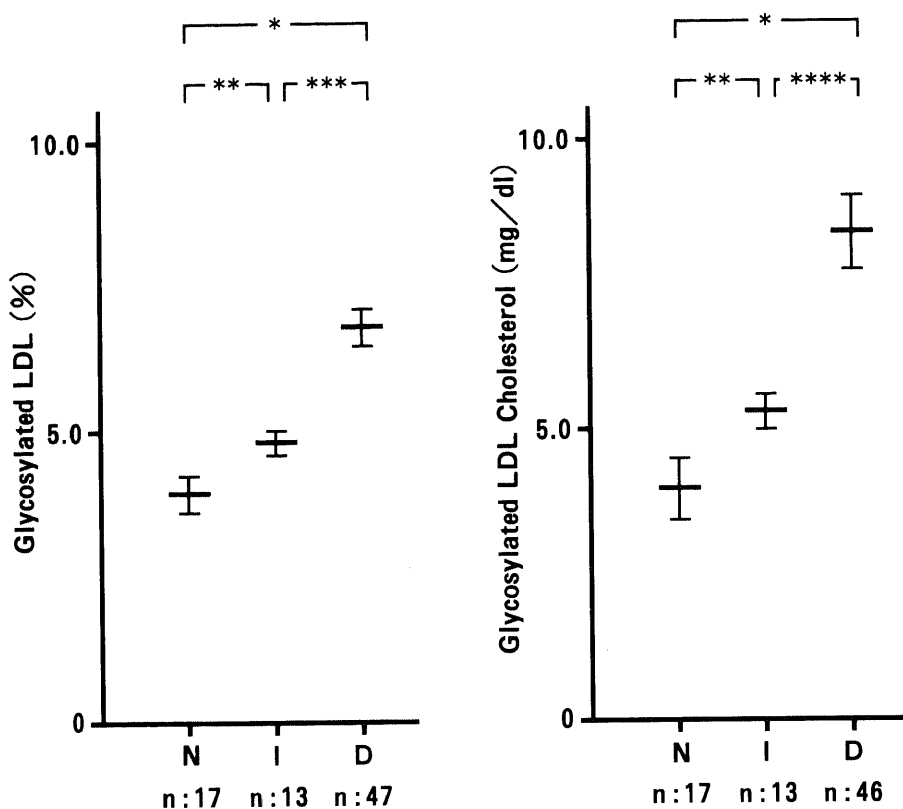


Fig. 7. Levels of glycosylated low density lipoprotein and glycosylated low density lipoprotein cholesterol in serum from diabetic (D), impaired glucose tolerance (I) and normal (N) subjects.

*, $p < 0.001$; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.01$;

Table 1. Characteristics of normal, IGT and diabetic subjects

	Diabetic	IGT	Normal
n	47	13	17
Age (yr)	55.7+1.8	58.3+3.0	46.8+4.0
Fasting blood glucose (mg/dl)	185.0+0.5*	107.2+3.6**	94.4+1.6
Glycosylated hemoglobin (%)	9.4+0.4*	6.8+0.7**	5.7+0.3
Total cholesterol (mg/dl)	219.9+5.7***	208.0+14.2	149.1+9.0
Low density lipoprotein cholesterol (mg/dl)	118.8+5.2***	115.8+8.7	96.7+7.3
Triglyceride (mg/dl)	146.3+14.2	121.2+12.1	93.3+12.9

The diagnosis of IGT and diabetes were based on current World Health Organization criteria. Normal range for glycosylated hemoglobin, 5.0–8.0%. Values are means \pm SD. IGT: impaired glucose tolerance.

* $P < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.02$, **** $p < 0.05$ vs. normal subjects.

法¹⁹⁾がある。今回著者はアフィニティクロマトグラフィーを利用して G-LDL を分離し、測定した。蛋白(アミノ酸)が非酵素的糖化 (non-enzymatic glycosylation) を受けるとアマドリ (Amadori) 転位生成物となる。アマドリ転位は不可逆的の反応であり、生成物は構造内にシス-デオール (cis-diol) 基を有する 1-デオキシフルクトシル (deoxyfructosyl) 誘導体となる²⁰⁾。アフィニティクロマトグラフィーの原理は、シス-デオール基が弱アルカリ条件下ではほう素酸塩 (boronate) と直ちにエステルを形成し可逆的な結合体を作るが、酸性条件では解離する特質を利用している。Weith ら¹⁹⁾ はアミノフェニールほう素酸塩 (aminophenyl boronate) をセルロースに結合させたアフィニティカラムを用い、シス-デオール基を有する核酸の分離に成功した。以後ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる糖化生成物の分離が検討され、尿中の糖化アミノ酸と糖化ペプチド (glycos-

ylated amino acid and peptides)²⁰⁾、糖化ヘモグロビン (glycosylated hemoglobin)²¹⁾、糖化アルブミン (glycosylated albumin)²²⁾ を測定する方法として報告されている。最初に Brownlee ら²⁰⁾ の方法に従い、アミノフェニールポリアクリルアミドゲル (aminophenyl polyacrylamid gel) を用いたが LDL 粒子とゲル粒子のサイズが一致しないため回収率が悪かったので、アミノフェニールほう素酸アガロースゲルを用い基礎的な検討を行った。健康者の LDL と市販のグルコースまたは ¹⁴C-グルコースより作製した合成 G-LDL をこのアフィニティクロマトグラフィー法で分離すると、G-LDL が吸着しないはずの分画にも約 30%の糖化蛋白が認められた。その理由は不明であるが、アフィニティカラムの吸着能力を越えたためでないことは吸着しない分画を再度カラムに添加しても放射活性の90%以上が同じ分画に残ることも明らかである。Trueb ら²³⁾、Higgins ら²⁴⁾もアフィニティカラム

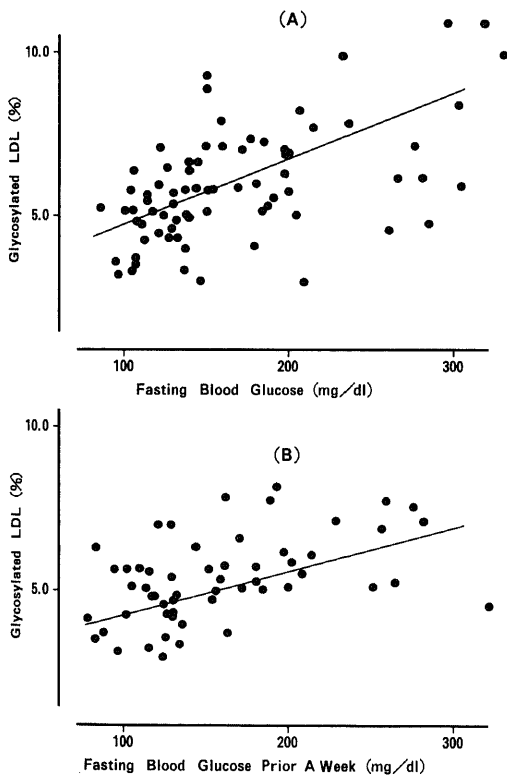


Fig. 8. Correlation between levels of glycosylated low density lipoproteins and (A) fasting blood glucose, and (B) fasting blood glucose prior a week.
A, $y=0.02x+2.8$, $r=0.59$, $p<0.001$; B, $y=0.01x+0.3$, $r=0.51$, $p<0.001$.

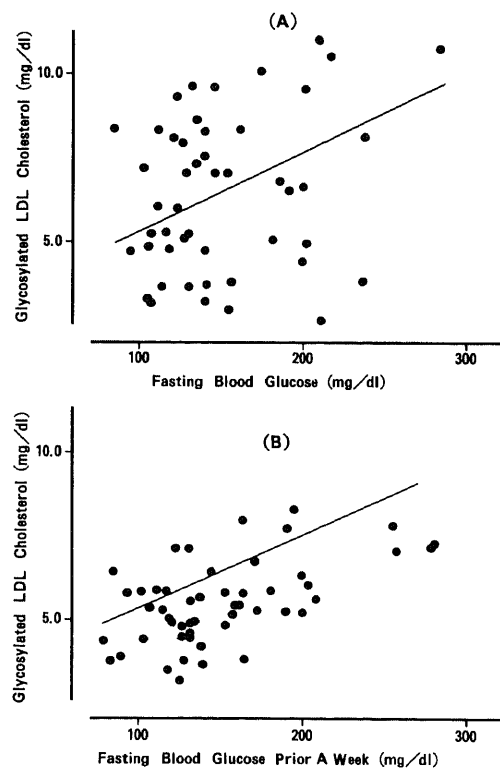


Fig. 9. Correlation between levels of glycosylated low density lipoprotein cholesterol and (A) fasting blood glucose, and (B) fasting blood glucose prior a week.
A, $y=0.03x+2.7$, $r=0.49$, $p<0.001$; B, $y=0.02x+3.3$, $r=0.51$, $p<0.001$.

を用いて糖化ヘモグロビンを分離した際に ^{14}C -グルコースに含まれる構造不明な放射活性を有する不純物がヘモグロビンと結合することを示唆した。従って合成 G-LDL を作製した場合にも、透析では分離できない放射活性を有する不純物と LDL のアポ蛋白 B が結合したり、シス-ジオール基をもたない構造の生成物が出来た可能性もある。また Shapiro ら²⁹⁾は生体外で作製した糖化ヘモグロビンと生体内で生成されたものとは、グルコースと結合するヘモグロビンの構造アミノ酸が必ずしも一致せず、かなりの差があることを認めており、これもまた原因のひとつと考えられる。

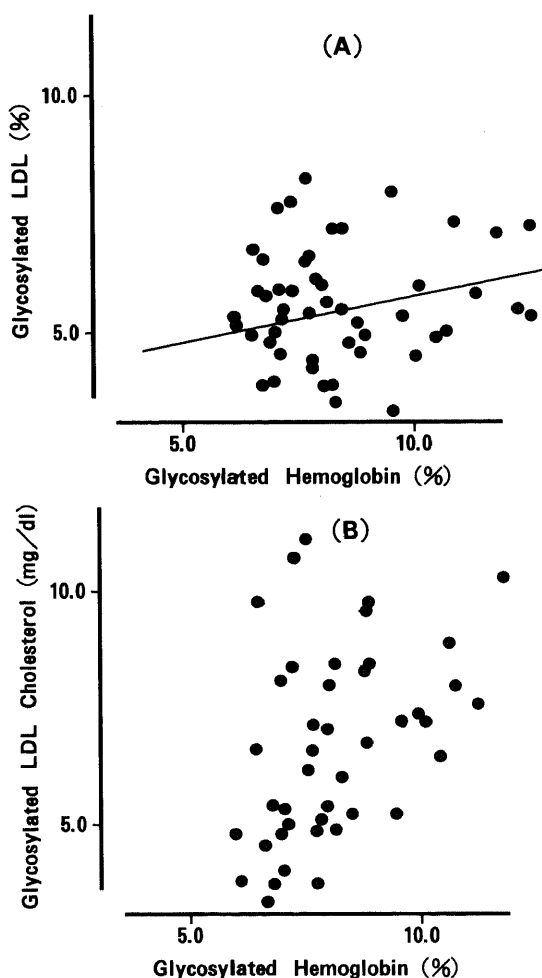


Fig.10. Correlation between levels of glycosylated hemoglobin and (A) glycosylated low density lipoproteins, and (B) glycosylated low density lipoprotein cholesterol.

A, $y=0.23x+3.5$, $r=0.28$, $p<0.05$; B, $y=0.28x+0.22$, ns, ns, not significant.

TBA 法による糖化蛋白の測定は共存する遊離の還元糖や、脂質過酸化物の干渉を受けるため、これらを注意深く除去するための複雑な操作が必要で標準化に難点があること¹⁷⁾、加水分解に長時間を要することなどの欠点が指摘されている。今回の実験でも LDL そのものの色調が干渉すること、標準とした 5-HMF が非常に吸水性が強く取扱いが困難であるなど難点があった。一方、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の分離は TBA 法に比較して操作が容易かつ迅速であること、糖化ヘモグロビンの測定に用いられる陽イオン交換樹脂カラムのように、厳密な温度条件の設定も必要とせず、ゲルの再生も容易であるなどの利点を有している。そして再現性もよく、蛋白の回収率も 72~85% と高く TBA 法とも高い相関性を示した。しかしアフィニティゲルのロット間で吸着力に差があるとの報告もあり²⁰⁾、測定法の標準化にはさらに検討を加える必要があると思われる。

糖尿病は膵からのインスリン分泌不全と組織のインスリン抵抗性のため、糖代謝のみならず蛋白および脂質代謝にも異常をきたし、網膜症、腎症など特有の微小血管障害と言われる血管障害を合併する疾患である。さらに冠動脈疾患や脳血管障害などの動脈硬化性血管障害の発症率が、非糖尿病患者に比べて 2~3 倍高い特徴がある^{27,28)}。動脈硬化性血管障害の成因としては糖尿病自体が独立した危険因子と見なす考え²⁹⁾もあるが、高血糖、高インスリン血症、肥満、血小板機能および凝固因子の異常など、糖尿病に特有な要因も考えられる³⁰⁾。また一般に動脈硬化症の成因と考えられている脂質代謝異常³¹⁾、高血圧症³²⁾なども合併しやすい。糖尿病に見られる脂質代謝異常、すなわちリポ蛋白代謝異常の特徴は³³⁾ II b 型、IV 型高脂血症といった高トリグリセライド血症であり、その発症のメカニズムは代償的な高インスリン血症による肝臓での超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)-トリグリセライドの分泌の亢進、血中遊離脂肪酸濃度の増加による肝臓でのトリグリセライドの合成亢進、そしてインスリンの絶対的不足によるリポ蛋白リパーゼ活性の低下による VLDL-トリグリセライドの異化障害、などが関与している。このような血清脂質の量的な異常とともに、リポ蛋白の質的な異常³⁴⁾として、コレステロールに富んだ VLDL の出現、レムナントや中間体の増加、トリグリセライドに富んだ LDL や高比重リポ蛋白の存在、そしてこれらのリポ蛋白の非酵素的糖化がある。

今回著者は、G-LDL について検討した。LDL の代謝は Goldstein ら⁸⁾により LDL レセプター経路として

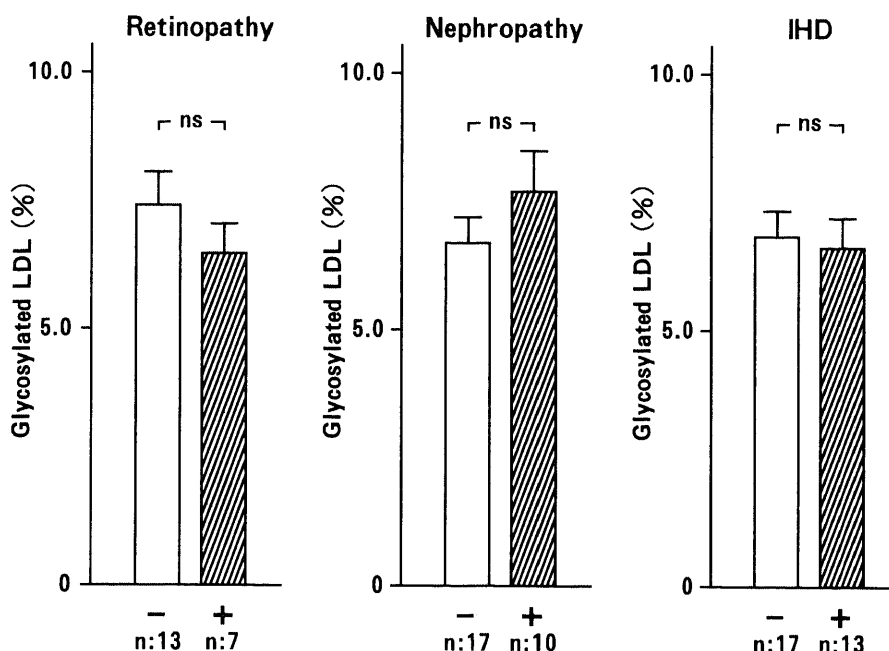


Fig.11. Levels of glycosylated low density lipoprotein in serum obtained from the diabetic subjects with retinopathy, nephropathy and ischemic heart disease (IHD).

No statistically significant differences between with (+) and without (-) complication were observed.

解明されたように、LDLの細胞内への取り込みは構成蛋白であるアポ蛋白Bと親和性を持つLDLリセプターを介して行われる。そして細胞内にコレステロールが供給されると細胞は余剰のコレステロールをコレステロールエステルとして蓄積し、また自己の持つコレステロール合成能を律速酵素であるハイドロキシメチルグルタリル補酵素A (hydroxy-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)還元酵素の段階で抑制し、さらにLDLリセプターの合成と細胞表面への再供給を減少させ、コレステロールの細胞内への流入を調節している。Witztumら⁷⁾は非酵素的糖化を受けたLDL (G-LDL)は、ヒト培養皮膚線維芽細胞において、正常なLDLリセプターを介した細胞内コレステロール代謝のフィードバック機構に影響を及ぼさず、さらにモルモットではG-LDLの分画異化率が減少している成績を示した。彼らはこの原因を、アポ蛋白Bの、LDLリセプターとの結合部位であるリジン残基が非酵素的糖化により修飾を受け、リセプターと結合できなくなったためであると結論した。非酵素的糖化は血糖に比例して程度が増すので、血糖のコントロールが不良なほど変性蛋白であるG-LDLが増加すると推測される。

しかし実際、糖尿病患者においてG-LDLがどのような臨床的意義を持つか検討した報告は少ない。そこで本研究では、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによりG-LDLを分離・定量し、糖尿病患者の血糖コントロールや合併症との相関を検討した。健康人のG-LDLの割合はLDL総量の $3.9 \pm 0.3\%$ であり、同じくほう素酸アフィニティクロマトグラフィーにより測定したJackら³⁸⁾の報告や、さらに複雑なクロマトグラフィーを用いたLyonsら³⁹⁾の報告とほぼ一致したが、糖化ヘモグロビンの $5.5 \sim 8.4\%$ ³⁷⁾や糖化アルブミンの $6.1 \pm 0.49\%$ ²⁹⁾よりは少ない。この差は各々の蛋白の血中半減期や血清中の絶対量が関与しているものと考えられる。G-LDLは同時採血の空腹時血糖値や1~2週間前の空腹時血糖値とよく相関したが、コレステロール値とは相関はなかった。また糖化ヘモグロビンとの相関は弱かった。さらに糖尿病の治療により血糖が低下し始めると、G-LDLは2週間後より低下するが、糖化ヘモグロビンが血糖の変化を反映するには1ヵ月以上が必要であった。今回の検討では、糖尿病患者における虚血性心疾患など動脈硬化性疾患や細小血管症の合併とG-LDLとの間に明確な関連性を見

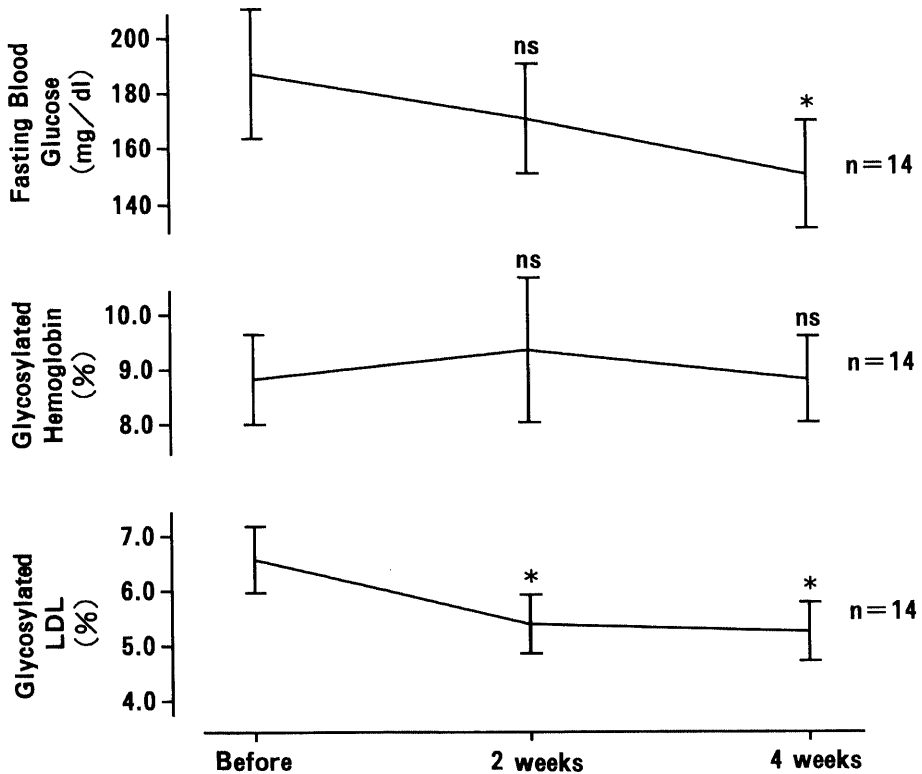


Fig.12. Changes in glycosylated low density lipoprotein, glycosylated hemoglobin levels, fasting blood glucose concentrations after clinical treatment.

* $p < 0.05$

い出すことはできなかった。

多くの疫学調査⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾によって、血清総コレステロールが耐糖能異常、高血圧、喫煙と同じように独立した虚血性心疾患の危険因子として重要であることが注目されている。血清総コレステロールの3/4以上を占めるLDLコレステロールが動脈硬化性疾患の発症に関与していると考えられているが、その発症機構については不明な点が多い。近年、病理学的に動脈硬化の初期段階における特徴的な所見³⁰は、エステル型コレステロールを主体とする脂肪を胞体内に取り込んだ泡沫細胞と呼ばれる細胞群の血管内膜下への出現であることが認められ、このコレステロールは多くの病理組織学的、生化学的、そして抗LDL(アポ蛋白B)抗体を使った免疫組織化学的研究⁴⁰により、血清のLDLに由来することが明らかにされている。泡沫細胞の起源は明確ではないで、少なくとも粥状動脈硬化初期病変においては単球から分化したマクロファージに由来する⁴¹という考えが有力である。しかしLDLリセプターを持たないマクロファージが、どの様にして脂質

を取り込み泡沫化するかが問題となってきた。Goldsteinら¹⁰はLDLの構成蛋白であるアポ蛋白B-100のリジン残基をアセチル化した場合に、マクロファージはLDLリセプターとは別のリセプターを介して取り込むことを生体外で見いだした。彼らはこの経路を変性したLDLを処理するものであろうと推測し、スカベンジャー経路と呼んだ。マクロファージはこのリセプターを介して大量の変性LDLを取り込んで異化するが、この経路にはLDLリセプター経路のようなフィードバック機構がなく、従ってマクロファージは泡沫細胞化することが証明された。このリセプターはアセチル化LDLだけでなくメチル化LDLなどの強い化学変化による変性LDLや β -VLDLに対しても高親和性を示すが、生体内に存在する変性LDLに対しても同様に作用するか否かは興味深い問題である。現在生体内で生理的条件下で存在が認められているのは糖化LDLと β -VLDLである。従って糖尿病患者における動脈硬化促進に糖化LDLがマクロファージの泡沫細胞化を介して関与している

可能性は容易に想像できる。また一方、マクロファージがアポ蛋白 E⁴⁰ やリポ蛋白リパーゼ⁴⁰ といったリポ蛋白代謝に関連した物質を合成・分泌していることが明らかにされたことにより一層注目を集めている。

Witztum ら⁴⁰ はある糖尿病患者において G-LDL の血中からのクリアランスが逆に亢進しているのを発見し、G-LDL に対する特異的な抗体の存在を示唆した。また G-LDL で免疫されたウサギでは、G-LDL のクリアランスは免疫されていないウサギより数倍亢進しており、その分解の場所は肝臓の網内系細胞であることを示し、G-LDL クリアランスの亢進は免疫機構を介したものであると推測した⁴⁰。しかし大動脈にはこの G-LDL と抗体の免疫複合体を特別に取り込む証拠は得られなかった。LDL が糖化されることにより、免疫原性を持ち血清蛋白だけでなく構造蛋白をも認識する自己抗体が産生されるとすると、糖尿病患者の血清中には免疫複合体が増加し、糖尿病における種々の合併症と関連していくことが予想される。糖尿病において G-LDL がどの程度動脈硬化の進展に関与しているかは不明であるが、リポ蛋白代謝を考える上で糖化の問題は重要であり、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の定量は有用な情報をもたらすと思われる。

結 論

糖尿病患者における動脈硬化促進のリスクファクターとして、糖化低比重リポ蛋白 (glycosylated low density lipoprotein, G-LDL) の臨床的意義を検討するため、ほう素酸アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL 分離・定量を検討した。さらに本方法を用い糖尿病患者における G-LDL を測定し、以下の結果を得た。

1. アミノフェニールほう素酸アガロースゲルを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより G-LDL が分離された。

2. 吸着条件は、0.25M 酢酸アンモニウム、pH9.0 で平衡化したカラムに LDL 溶液を添加し G-LDL を吸着させた。G-LDL の溶出には 0.25M 酢酸ナトリウム、pH5.5 を用いた。カラムのベッド容量は 0.7×5cm、添加する LDL の蛋白質は 0.9~1.8mg が適量であった。

3. アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL の回収率は TBA 法や ¹⁴C-G-LDL を用いて検討した結果、約 80% であった。

4. アフィニティクロマトグラフィーによる G-LDL 値 (%) は、カラムに添加した総 LDL 蛋白量

に対する、溶出された LDL 蛋白量の比を求め算出した。

5. 糖尿病 (DM) 群の G-LDL 値 (平均±標準偏差) は 6.8±0.3% で耐糖能障害 (IGT) 群の 4.8±0.2%、正常 (N) 群の 3.9±0.3% に比し有意 (p<0.001) に高値であった。また G-LDL-コレステロール濃度 (mg/dl) も DM 群で 8.4±0.3mg/dl と IGT 群の 5.3±0.3mg/dl や N 群の 4.0±0.5mg/dl より有意 (p<0.01, p<0.001) に高値であった。

6. G-LDL 値は 1~2 週間前の FBG (r=0.41, p<0.05)、および同日の FBG (r=0.53, p<0.001) と有意の相関を示した。G-LDL-コレステロール濃度も 1~2 週間前の FBG (r=0.46, p<0.001)、同日の FBG (r=0.41, p<0.001) との間に有意の相関が認められた。

7. G-LDL 値は同日の糖化ヘモグロビン値 (r=0.26, p<0.05) と有意の相関があったが、血清総コレステロール濃度、LDL-コレステロール濃度、血清トリグリセライド濃度とは有意の相関を示さなかった。

8. 糖尿病患者において、G-LDL 値は網膜症、腎症または虚血性心疾患のいずれの合併症の有無とも有意な差はなかった。

9. 糖尿病の治療により FBG が前値 188±25mg/dl から 2 週間後 174±21mg/dl に低下した時点で G-LDL は前値 6.5±0.6% から 5.6±0.6% に有意 (p<0.05) に低下した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜った恩師竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御教示下さった馬淵 宏金沢大学医学部第二内科助教授並びに小泉順二金沢大学医学部第二内科講師に深く感謝致します。さらに本研究の遂行に際し、多大な御協力を頂きました金沢大学医学部第二内科第一研究室の各位に深く感謝致します。

尚、本論文の要旨は、第 29 回日本糖尿病学会総会 (字部ワークショップ) において発表した。

文 献

- 1) Maillard, L. C.: Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodirue. C. R. Seances Soc. Biol., 154, 66-68 (1912).
- 2) Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chem. Acta, 22, 296-298 (1968).
- 3) Koenig, R. J., Blostein, S. H. & Cerami, A.: Structure of carbohydrate of hemoglobin A_{1c}.

- J. Biol. Chem., **252**, 2992-2997 (1977).
- 4) **Stevense, V. J., Vlassara, H., Abati, A. & Cerami, A.**: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J. Biol. Chem., **252**, 2998-3002 (1977).
- 5) **Kennedy, L. & Baynes, J. W.**: Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. Diabetologia, **26**, 93-98 (1984).
- 6) **Koenig, R. J., Stevens, V. J. & Cerami, A.**: Nonenzymatic glycosylation and browning of hemoglobin and other body proteins. J. Appl. Biochem., **2**, 431-438 (1980).
- 7) **Witztum, J. L., Mahoney, E. M., Branks, M. J., Fisher, M., Elam, R. & Steinberg, D.**: Nonenzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity. Diabetes, **31**, 283-291 (1982).
- 8) **Goldstein, J. L. & Brown, M. S.**: Binding and degradation of low density lipoproteins cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem., **249**, 5153-5162 (1974).
- 9) **Brown, M. S. & Goldstein, J. L.**: Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem., **52**, 223-261 (1983).
- 10) **Goldstein, J. L., Ho, T. K., Brown, M. S., Innerarity, T. L. & Mahlay, R. W.**: Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic carnine very low density lipoproteins. J. Biol. Chem., **255**, 1839-1848 (1980).
- 11) **Fogelman, A. F., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S. & Edwards, P. A.**: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2214-2218 (1980).
- 12) **Kim, H. J. & Kurup, I. V.**: Nonenzymatic glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence for in vitro and in vivo glucosylation. Metabolism, **31**, 348-353 (1982).
- 13) **Havel, R. J., Eder, H. A. Bragdon, J. H.**: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest., **34**, 1345-1353 (1955).
- 14) **Day, F. J., Thornburg, R. W., Thorps, S. R. & Baynes, J. W.**: Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo. J. Biol. Chem., **254**, 9394-9400 (1979).
- 15) **Pecoraro, R. E., Graf, R. J., Haltere, J. B., Beiter, H. & Porte, D. Jr.**: Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. Diabetes, **28**, 1120-1125 (1979).
- 16) **McDonald, M. J., Shapiro, R., Bleichman, M., Slowry, J. & Bunn, H. F.**: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. J. Biol. Chem., **253**, 2327-2332 (1978).
- 17) **Fluckiger, R. & Winterhalter, K. H.**: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. FEBS Lett., **71**, 356-360 (1976).
- 18) **Monnier, V. M., Stevens, V. J. & Cerami, A.**: Maillard reactions involving proteins and carbohydrates in vivo: relevance to diabetes mellitus and aging. Prog. Food Nutr. Sci., **5**, 315-327 (1981).
- 19) **Weith, L. H., Wiebers, J. L. & Gilham, P. T.**: Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components. Biochemistry, **9**, 4396-4401 (1970).
- 20) **Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A.**: Measurement of glycosylated amino acid and peptides from urine of diabetic patients using affinity chromatography. Diabetes, **29**, 1044-1047 (1980).
- 21) **Klenk, D. C., Hermanson, G. T., Krohn, R. I., Fujimoto, E. K. Mallia, A. K., Smith, P. K. England, J. D., Wiegmeier, H. M., Little, R. R. & Goldstein, D. E.**: Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. Clin. Chem., **28**, 2088-2094 (1982).
- 22) **中山秀隆, 萬田直紀, 小森克俊, 青木伸, 栗原義夫, 門田悟, 黒田義彦, 皆上宏俊, 小野百合, 牧田善二, 中川昌一**: Affinity chromatographyによる Glycosylated Albumin 測定の基礎的検討. 糖尿病, **25**, 963-968 (1982).

- 23) **Trueb, B., Holenstein, C. G., Fisher, R. W. & Winterhalter, K. H.:** Nonenzymatic glycosylation of proteins. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6717-6720 (1980).
- 24) **Higgins, P. J. & Bunn, H. F.:** Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5204-5208 (1981).
- 25) **Shadpiro, R., McManus, M. J., Zalut, C. & Bunn, H. F.:** Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3120-3127 (1981).
- 26) **Baynes, J. W., Bunn, H. F., Goldstein, D., Harris, M., Mattin, D. B., Peterson, C. & Winterhalter, K.:** National diabetes data group: Report of the expert committee on glycosylated hemoglobin. *Diabetes Care*, **7**, 602-606 (1984).
- 27) **Dawber, T. R., Wolf, Ph. A., Colton, Th. & Nicerson, R. J.:** Risk factors: Comparison of the biological data in myocardial and brain infarctions. K. J. Zulch, W. Kaufmann, K. A. Hosmann & V. Hosmann (eds.), *Brain and Heart Infarct*, 1st ed. p226-252, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- 28) 尾前照雄, 竹下司恭, 山口武典, 藤島正敏, 緒方殉, 仲村吉弘: 脳梗塞の成因. *日本老年病医学会雑誌*, **14**, 371-374 (1977).
- 29) **Pyke, D. A.:** Diabetes: The genetic connections. *Diabetologia*, **17**, 333-343 (1979).
- 30) 坂本信夫, 佐藤祐造: 老年者の動脈硬化—成因と対策—し: 糖尿病と動脈硬化. *Geriat. Med.*, **26**, 1649-1653 (1988).
- 31) **Saudek, C. D. & Eder, H. A.:** Lipid metabolism in diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, **66**, 843-852 (1979).
- 32) **Christlieb, A. R.:** The hypertension of diabetes. *Diabetes Care*, **5**, 50-58 (1982).
- 33) 坂井健志, 馬淵 宏, 竹田亮祐: 糖尿病とりポタンパク代謝. 1985糖尿病学 (小坂樹徳, 赤沼安夫編), 267-290 頁診断と治療社, 東京, 1985.
- 34) **Mahlay, R. W.:** Cellular and molecular biology of lipoprotein metabolism in atherosclerosis. *Diabetes*, **30**, Suppl. 60-65 (1981).
- 35) **Jack, C. M., Sheridan, B., Kennedy, L. & Stout, R. W.:** Non-enzymatic glycosylation of low-density lipoprotein. Results of an affinity chromatography method. *Diabetologia*, **31**, 126-128 (1988).
- 36) **Lyons, T. J., Baynes, J. W., Patric, J. S., Colwell, J. A. & Lopes-Virella, M. F.:** Glycosylation of low-density lipoprotein in patients with type 1 (insulin-dependant) diabetes: correlations with other parameters of glycemic control. *Diabetologia*, **29**, 685-689 (1986).
- 37) **Hall, P. M., Cook, J. G. H., Sheldon, J., Rutherford, S. M. & Gould, B. J.:** Glycosylated hemoglobins and glycosylated plasma proteins in the diagnosis of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, **7**, 147-150 (1984).
- 38) **Kennel, W. B., Castelli, W. P. & Gordon, T.:** Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.*, **90**, 85-91 (1979).
- 39) **Pooling Project Research group:** Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the pooling project. *J. Chronic Dis.*, **31**, 201-306 (1978).
- 40) **Woolf, N. & Pilkington, T. R. E.:** Immunohistochemical demonstration of lipoproteins in vessel walls. *J. Pathol. Bacteriol.*, **90**, 459-463 (1965).
- 41) **Gerrity, R. G.:** The role of the monocyte in atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **103**, 181-200 (1981).
- 42) **glantruco, S. H., Bradley, W., Gotto, A. M. Jr., Morriset, J. D. & Peavy, D. L.:** Hypertriglyceridemic very low density lipoproteins induce triglyceride synthesis and accumulation in mouse peritoneal macrophages. *J. Clin. Invest.*, **70**, 168-178 (1982).
- 43) **Lindquist, P., Lindquist, A. M. O., Witztum, J. L., Steinberg, D. & Little, J. A.:** The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9086-9092 (1983).
- 44) **Witztum, J. L., Steinbrecher, U. P., Kesaniemi, Y. A. & Fisher, M.:** Autoantibodies to glycosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3204-3208 (1984).
- 45) **Wiklund, O., Witztum, J. L., Carew, T. E., Pittman, R. C. & Steinberg, D.:** Turnover and

tissue site of degradation of glycosylated low density lipoprotein in normal and immunized rabbits. *J. Lipid Res.*, **28**, 1098-1109 (1987).

Clinical Implications of Glycosylated Low Density Lipoprotein-Evaluation of an Affinity Chromatography System for the Determination of Glycosylated Low Density Lipoprotein and its Role in the Development of Diabetic Angiopathy Takesi Sakai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **100**, 309—324 (1991)

Key words glycosylation, low density lipoprotein, affinity chromatography, diabetes mellitus
Maillard reaction

Abstract

To investigate the role of glycosylated low density lipoproteins (LDL) in the pathogenesis of diabetic angiopathy, amounts of glycosylated LDL were measured by a new method with a boronate affinity chromatography. The method is based on the observation that phenylboronate in alkaline solution forms a specific complex with cis-diol groups of sugars. Since the stable forms of nonenzymatic glycosylated products were known to be 1-deoxyfructosyl derivatives of proteins, aminophenyl boronate immobilized on agarose was utilized to separate and quantify the glycosylated LDL. Using an affinity column (bed volume 0.7×5.0 cm) of aminophenyl boronate agarose, 70% of radioactivity of synthetic ^{14}C -glycosylated LDL prepared in vitro was shown in the peak of glycosylated LDL which was separated from the non-glycosylated LDL. A good separation by the boronate affinity column chromatography of glycosylated LDL from non-glycosylated LDL was confirmed by thiobarbituric acid assay. The ratios of the glycosylated LDL to total LDL in the diabetic subjects were significantly higher ($p < 0.001$) than those in the control and in the impaired glucose tolerance subjects, and showed significant correlations with fasting blood glucose concentrations ($r = 0.59$, $p < 0.001$), fasting blood glucose concentrations a week prior ($r = 0.351$, $p < 0.001$) and levels of glycosylated hemoglobin ($r = 0.28$, $p < 0.05$). The changes in glycosylated LDL were accompanied by changes in blood glucose concentrations but not by the glycosylated hemoglobin. However there were no statistically significant differences in the levels of glycosylated LDL between the diabetic patients with retinopathy, nephropathy, or ischemic heart disease and those without these complications. It is concluded that the affinity chromatography system seems to be a useful method for rapid and specific determination of serum glycosylated LDL that may play a role in the pathogenesis of diabetic macroangiopathy.