

《原 著》

糖化低比重リポ蛋白 (Glycosylated LDL) の代謝動態に関する基礎的研究

栢 森 亮*

要旨 低比重リポ蛋白 (Low Density Lipoprotein: LDL) は動脈硬化の促進因子の一つに挙げられ、糖尿病では血中の糖化 LDL が増加することが指摘されている。

著者は糖化 LDL の代謝を明らかにする目的で、糖化 LDL の細胞に対する結合能および家兎の血中からの消失曲線について検討した。

糖化 LDL は、健常人の血漿から超遠心法で得た LDL に D-グルコースを試験管内で非酵素的に反応させて作製した。LDL と糖の結合は、混和直後から直線的に増加し、12 日後に飽和に達した。培養細胞に対する糖化 LDL の結合能は、native LDL に比べて低値を示した。また、家兎での血中消失速度 ($T_{1/2}$) は、糖化 LDL が 85 時間であるのに対し native LDL は 10 時間であり、糖化 LDL の血中消失が遅延することが判明した。

ヒト血中の糖化 LDL は、*m-aminophenyl* ボロン酸アフィニティー・カラム法により測定した。糖尿病患者 (21 名) の糖化 LDL 値は $10.6 \pm 3.0\%$ 、健常者 (18 名) では $5.25 \pm 1.1\%$ であった。対象者 (39 名) における血中の糖化 LDL 値と血糖値との間には、有意の相関 ($r=0.87, p<0.001$) が認められた。また、血中の糖化 LDL 値とグリコ・ヘモグロビン A_1 値との間にも、正の相関 ($r=0.68$) が認められた。

以上の成績から、血中の糖化 LDL 値は血糖の上昇により増加することが結論された。

I. 緒 言

糖尿病では血管合併症、すなわち冠動脈硬化や全身の動脈硬化の合併が高いことが報告¹⁾されている。この原因として糖尿病に伴う脂質代謝異常、特に低比重リポ蛋白 (Low Density Lipoprotein; LDL) の上昇することが重要な因子²⁾として指摘されている。

最近、糖尿病では生体内の比較的半減期の長い蛋白に対して、糖が非酵素的に結合して糖化 (Glycosylated; 「Glc・」と略す) 蛋白が生成されることが報告^{3~9)}されており、この現象が LDL に

も起こりうること¹⁰⁾が明らかにされている。生体内で Glc・LDL が生成されると LDL の本来の機能が失われ、血中では LDL クリアランスが遅れる。このため血中 LDL の高値が持続し、このことを介して動脈硬化を促進するのではないか¹¹⁾と考えられるようになった。

そこで著者は、Glc・LDL の基本的な代謝動態を明らかにする目的で、1) Glc・LDL と native LDL の血中クリアランスの比較、2) 糖尿病患者群と健常者群との Glc・LDL 値の比較、3) Glc・LDL 値と血糖値およびグリコ・ヘモグロビン A_1 値との相関の有無、について検討した。

II. 実験材料および方法

1. Glc・LDL の測定

(1) LDL の単離

健常人の男子から早朝空腹時に 1 mM EDTA・2Na を添加した注射筒で採血し、直ちに血漿を分

* 新潟大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科
受付：元年 6 月 22 日

最終稿受付：元年 9 月 19 日

別刷請求先：新潟市旭町通り 2 番町 746 番地 (〒951)
新潟大学医療技術短期大学部
診療放射線技術学科

栢 森 亮

離した。ヒト LDL の分離は Ogata ら¹²⁾の方法に従った。すなわち、遠心管に血漿 5 ml を入れ、これに NaBr 粉末を加えて比重 (density: d) 1.30 にし、この血漿の上に前もって調整した NaBr 溶液 d=1.21 を 5 ml, d=1.06 を 15 ml, さらに蒸留水 (いすれも 0.001% EDTA・2Na を含む) 8 ml を重層したのち、51,900×g (65P7 型、ローター; RPS-27-2: 日立工機製) で 16 時間 (15°C) 遠心した。その後、遠心管の上端から 1.5 ml ずつ分取した。

次に、比重 1.02~1.063 の分画をプール (10 ml) し、NaBr 粉末を加えて d=1.30 に調整した。この上に d=1.06 の NaBr 溶液 23 ml を重層し、再度 167,500×g (ローター; RPV-50) で 4 時間遠心後、上清を回収した。このようにして単離した LDL は、セルロース膜チューブ (日本メディカルサイエンス) に封入し、生理食塩水中で 24 時間 (4°C) 透析した。透析後の LDL は、0.24 μm のフィルター (DISMIC-25; TOYO) で無菌化し、実験に供するまで 4°C にて保存した。

(2) Glc・LDL の作製と測定

ヒト・LDL (1 mg/ml) の入った試験管に 0.27, 0.54, 1.07 μmol の [³H]Glucose (D-[6-³H(N)]-Glucose, 比放射能; 1.12 TBq (30.2 Ci)/mM; Amersham) を加え、37°C で無菌的に反応させることにより、糖と LDL を非酵素的に結合させた。一方、比較検討のために LDL (1 mg/ml) に [³H]-Glucose (1.07 μmol) および還元剤 [NaBH₃ CN; (Aldrich) 12.5 mg/ml] を加えて糖と LDL を結合させた。

各溶液は 3, 6, 9, 12, 16 時間反応させた後、セルロース膜チューブに封入し、生理食塩水中にて 48 時間 (4°C) 透析を行った。試料は液体シンチレーションカウンター (Aloka) で計測し、さらに蛋白定量 (Bio-Rad Protein Assay: USA) を行ってから、[³H]Glucose と結合した LDL の割合 (Glucose; nM/LDL; mg) を求めた。

(3) Glc・LDL のヨウ素標識

ヨウ素標識に用いた Glc・LDL は、リン酸-食塩緩衝液 (PBS; 0.2 M, pH 7.4) で調整した LDL (15 mg/ml) と溶解した D-Glucose (半井化学)

80 mM として混和した。ミリポアフィルターを通して無菌的な状態とし、37°C、14 日間反応させた後、セルロース膜に封入して生理食塩水中で 48 時間 (4°C) 透析を行って作成した。

Glc・LDL ならびに LDL のヨウ素標識は、おののの 37 MBq (1.0 mCi) の Na¹²⁵I と Na¹³¹I [Amersham; (England)] を用い、クロラミン T 法¹³⁾ で行った。標識反応液からの ¹²⁵I-Glc・LDL および ¹³¹I-LDL の精製は、Sephadex G-200 (Pharmacia) を充填したカラム (1.2×45 cm) を用い、バルビタール緩衝液 (0.05 M, pH 8.6, 1 mM EDTA・2Na を含む) によるゲル濃過法で行った。

2. Glc・LDL の代謝動態

(1) 培養細胞での in vitro 実験

実験には健常ヒト皮膚から得た線維芽細胞 (human skin fibroblast) を使用した。培養は、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む DME 培地 (Dulbecco's Modified Eagles; 日本純薬) を用い、37°C に保持した 5% 炭酸ガス培養器で行った。細胞は組織培養用ディッシュ (35 mm; FALCON) に 6×10⁵ 個/2 ml を播種して 4 日間培養を行った後、実験前日には FCS を除いた DME 培地に変換した。

培養細胞への ¹²⁵I-Glc・LDL と ¹³¹I-LDL の結合能は、Goldstein ら¹⁴⁾ の方法に従って測定した。すなわち、培地に氷冷した ¹²⁵I-Glc・LDL 2 ml (25,000 cpm) 加え、4°C で反応させた。反応終了後、直ちに氷冷した 2% BSA (Bovine Serum Albumin) を含むトリス-塩酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.4) で 5 回洗浄し、さらに BSA を含まない緩衝液で 1 回洗浄した。

次に、氷冷した遊離液 [4% デキストラン硫酸を含む 0.01 M HEPES (三光純薬) pH 7.4] 2 ml を加え、再度 4°C で 1 時間反応させた。遊離液は全量回収し、そのうちの 1 ml をウェル型シンチレーションカウンターで計測し、¹²⁵I-Glc・LDL の培養細胞への結合能を求めた。¹³¹I-LDL の結合能についても同様の手順で測定した。

(2) 家兎における in vivo 実験

家兎 (New Zealand White: 体重 2~3.2 kg) には、前処置として 200 倍に希釈したルゴール液を

吸水瓶に入れ、実験の 5 日前から摂取させた。 ^{125}I -Glc・LDL と ^{131}I -LDL は、0.5 ml ずつ混合し、家兎の左耳翼（後耳介）静脈内へ投与した。投与直後ならびに経時的に右後耳介静脈から 1 ml ずつヘパリン (Novo) 添加の注射筒で採血し、直ちに遠心 (3,000 rpm) して血漿を分離した。血漿中の ^{125}I と ^{131}I は、ウエル型シンチレーション検出器に接続したマルチ・チャンネル波高分析器 (type 35; CANBERRA, USA) を用いて分離測定した。 ^{131}I の ^{125}I に対する補正是、 ^{125}I のエネルギー設定域で得たカウントから ^{131}I が混入するカウント寄与分を減じることによって行った。経時的な採血で得た試料中のカウントを投与直後に得られたカウントで除して血中消失曲線を求めた。

(3) ヒト血中の Glc・LDL の測定

治療歴のない糖尿病患者 21 名 [男性 13 名、女性 8 名；年齢 62.3 ± 8.3 歳 (平均 \pm 標準偏差)] と健常者 18 名 (男性 12 名、女性 6 名；年齢 58.2 ± 9.5 歳) を対象とした。

血中 Glc・LDL は、早朝空腹時の血漿から単離した LDL を生理食塩水中で透析した後、ボロン酸アフィニティー・クロマトグラフィ法を用いて測定した。すなわち、カラム (1 × 6 cm) に GLYCO-GEL B (PIERCE; USA) 1 ml を充填し、吸着緩衝液 [0.05 M MgCl_2 , 0.5 M NaCl を含む 0.25 M Sodium Acetate (pH 8.5)] で平衡化し、これに LDL 0.4 ml を添加した。

室温で吸着緩衝液 9.6 ml を流し非 Glc・LDL を溶出後、引続きゲルに吸着した Glc・LDL を溶出緩衝液 [0.05 M EDTA · 2Na, 0.2 M Sorbitol を含む 0.1 M トリス-塩酸 (pH 8.5)] 4 ml で溶出した。Glc・LDL 値の算出は、溶出緩衝液分画およびカラムに添加した LDL のコレステロール含量を発色試薬 (Cholesterol C-test; WAKO) と分光光度計 (日立：波長 505 nm) を用いて測定し、Glc・LDL/LDL (%) として求めた。

なお、血中グリコ・ヘモグロビン A_1 の測定は、高速液体クロマト装置 (京都第一科学) で行った。

III. 結 果

1. Glc・LDL の測定

(1) LDL の単離に関する検討

血漿より超遠心密度浮上法で得たリポ蛋白の遠心像を Fig. 1 に示した。コレステロールおよび蛋白の定量では、いずれも分画 1, 8, 18 の場所にピークを認めた。これら 3 分画中のリポ蛋白の同定と血漿からの LDL 精製はアガロース電気泳動法で検討した (Fig. 2)。分画 1 (B) の溶液は、陰極側からアポ B (LDL), Pre-B, アルブミンの位置におのおの単一のバンドが認められた。また分画 8 (C) ではアポ B (LDL) とアルブミン、さらには分画 18 (D) ではアポ A (HDL) とアルブミンが混在していた。Fig. 2, E は、分画 8 (C) の溶液を再度遠心したものであり、泳動像からはアルブミンのバンドは認められなかった。以上の事実より、血漿からの LDL の単離には再遠心法を採用した。

(2) LDL と糖の結合に関する検討

LDL に対する糖の結合について、 $\text{NaBH}_3 \text{CN}$ を添加した群と添加しない群との差を試験管内で検討した (Fig. 3)。非酵素的な結合は、反応の早期から認められ、12 日でほぼ飽和に達した。

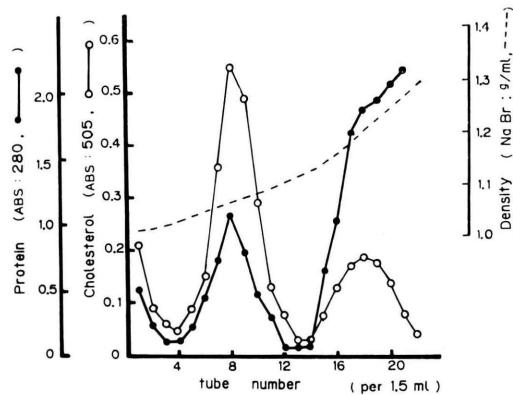


Fig. 1 Density gradient ultracentrifugation of human plasma. After centrifugation, the gradient was divided into 22 units (1.5 ml per fraction). Measurements of protein and cholesterol was determined by Bio-Rad protein assay and Total Cholesterol kit.

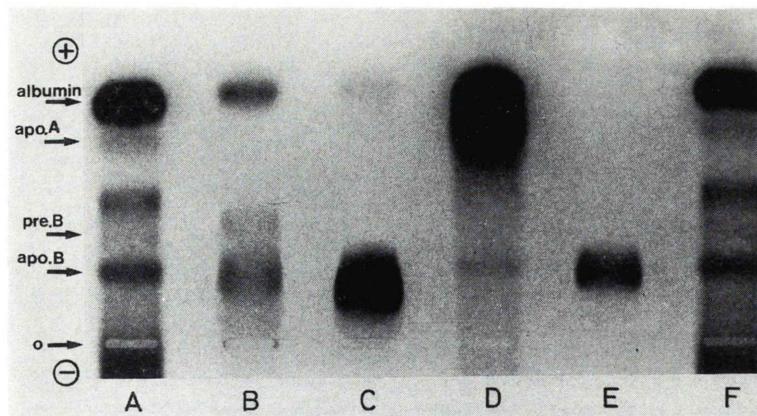


Fig. 2 Agarose-gel electrophoretic patterns of the lipoprotein in fraction tube-number after ultracentrifugation. A and F: normal plasma, B: fraction No. 1, C: No. 8, D: No. 18. E is lipoprotein after re-ultracentrifugation from fraction No. 8. Electrophoresis was carried out in 0.05 M barbital buffer (pH 8.6) at room temperature for 40 minutes.

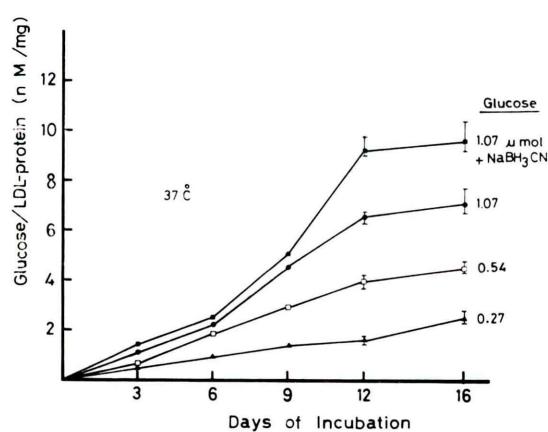


Fig. 3 Time dependent incorporation of $[^3\text{H}]\text{-glucose}$ on human LDL. LDL with a protein content of 1 mg was incubated at 37°C in 2 ml PBS (0.1 M, pH 7.4) containing 0.27, 0.54 and 1.07 μmol [6- $^3\text{H}(\text{N})$]-D-glucose. After incubation, a sample of each of the above-mentioned solutions was dialyzed using 0.15 M NaCl solution and measured for radioactivity by a liquid scintillation counter.

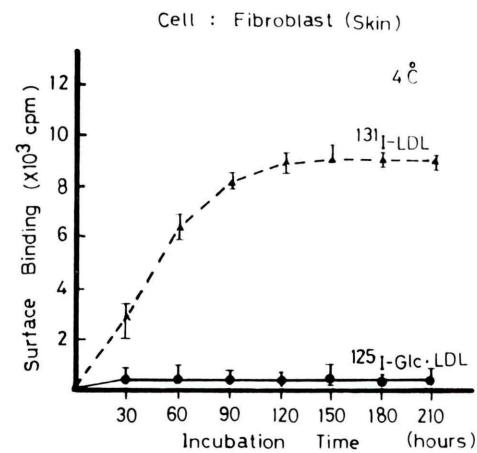


Fig. 4 Binding of human ^{125}I -Glc·LDL and ^{131}I -LDL to human skin fibroblast in culture. Monolayer cell was incubated with 5% lipoprotein-deficient serum in DME at 4°C with ^{125}I -Glc·LDL and ^{131}I -LDL, respectively. The cells were then washed once with 0.05 M Tris-HCl buffer without albumin, reacted with 2 ml solution containing 4% dextran sulfate in 0.05 M HEPES for 1 hour and finally quantitatively transferred to test tubes for the assay of radioactive iodine.

また、LDL と糖の結合は糖濃度が 0.27, 0.54, 1.07 μmol と高くなるにつれて増加し、糖濃度に依存することが判明した。

一方、 NaBH_3CN を添加した酵素的な糖結合も、非酵素的結合と同様の傾向であったが、結合能は非酵素的反応群に比べて高い結果が得られた。

2. Glc・LDL の代謝動態に関する検討

(1) 培養細胞に対する結合能

ヒト線維芽細胞に対する ^{125}I -Glc・LDL と ^{131}I -LDL の結合能を検討した (Fig. 4)。

^{125}I -Glc・LDL の細胞への結合は低く、反応時間を長くしても同様の結果であった。

しかし、 ^{131}I -LDL の結合は、反応後の時間の経過とともに直線的に増加し、90分後で飽和に達した。

(2) 血中消失曲線に関する検討

家兎における ^{125}I -Glc・LDL と ^{131}I -LDL の血中消失曲線を Fig. 5 に示した。

^{125}I -Glc・LDL の血中濃度は投与直後から緩徐に減少し、血中半減期 ($T_{1/2}$ 値) は 85 時間 (3.54 日) であった。

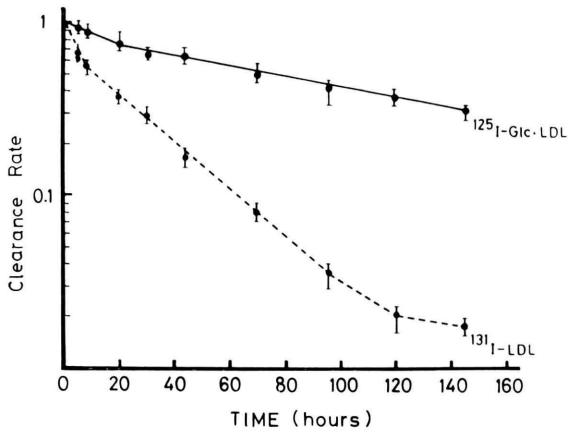


Fig. 5 Comparison of the clearance rate between Glc-LDL (closed line) and control LDL (dotted line) in NZW rabbit. Equal parts of ^{125}I -Glc-LDL and ^{131}I -LDL were simultaneously injected into the external ear vein. Serial samples of plasma were counted by a multichannel gamma spectrometer.

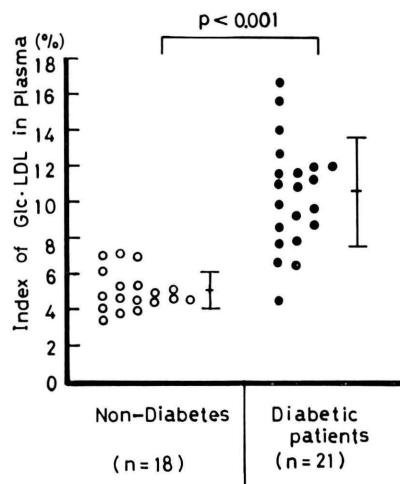


Fig. 6 The level of glycosylated LDL in plasma from non-diabetes ($n=18$) and diabetic patients ($n=21$) measured by *m*-aminophenylboronic acid column. The mean \pm one standard deviation is shown on the right-side of each group.

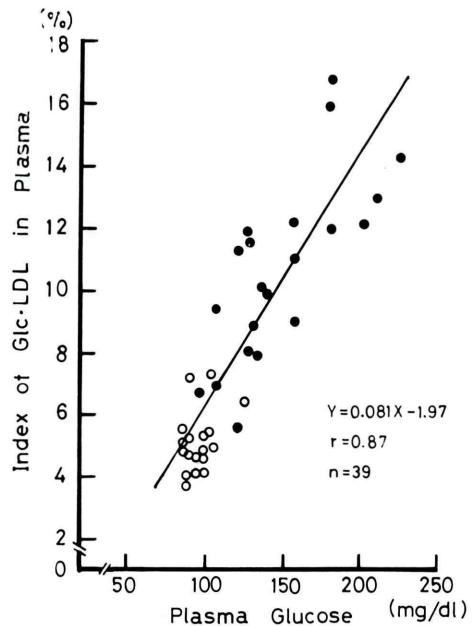


Fig. 7 Relationship between glycosylated LDL (%) and plasma glucose (mg/dl) at time of sampling. Open circles represent non-diabetes values and closed circles, values for diabetic patients. The coefficient of correlation for all patients is 0.87.

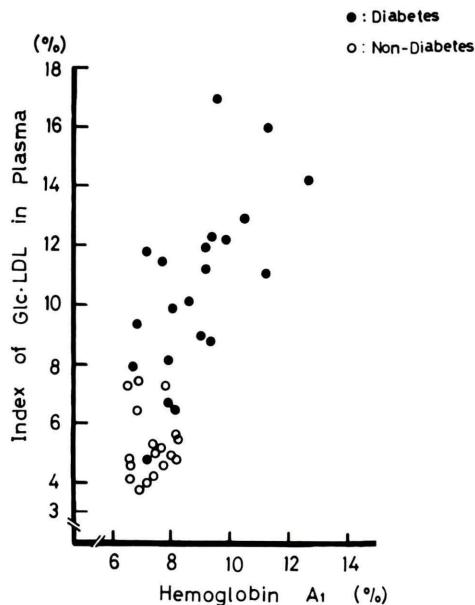


Fig. 8 Relationship between glycosylated LDL(%) and hemoglobin A₁ (%) at time of sampling. The coefficient of correlation for all patients is 0.68.

一方, ¹³¹I-LDL では投与直後から急激に減少し, T_{1/2} 値は10時間であった。

(3) Glc·LDL の臨床的検討

健常者18名の Glc·LDL 値は 3.7 から 7.4% に分布し, 平均±標準偏差は $5.25 \pm 1.1\%$ であった。一方, 糖尿病患者21名の Glc·LDL 値は 4.1 から 16.9% に分布し, 平均±標準偏差は $10.63 \pm 3.0\%$ であった。糖尿病患者の Glc·LDL 値は, 対照群(健常者)に比べて有意 ($p < 0.001$) に高い成績が得られた (Fig. 6)。

次に, 対象者 39 名における Glc·LDL 値(%)と血糖値 (plasma glucose) との関係を検討した (Fig. 7)。両者の間には, 統計的に有意な正の相関 ($r = +0.87$; $Y = 0.081X - 1.97$, $p < 0.001$) を認めた。同様に, Glc·LDL 値とグリコ・ヘモグロビン A₁ 値との間にも正の相関 ($r = +0.68$) が認められた (Fig. 8)。

IV. 考 察

LDL はアポ B を最も多く含み, 動脈硬化促進

作用の強いリポ蛋白と考えられている。このアポ B は分子量の違う B-100 が肝臓¹⁵⁾, B-48 が小腸¹⁶⁾でそれぞれ合成され, トリグリセリド等の脂質を含んだ超低比重リポ蛋白 (VLDL) として血中に放出される。血中の VLDL は, 肝外性のリポ蛋白リバーゼの作用を受けてアポ B, コレステロール, リン脂質を含む LDL に変換され¹⁷⁾, さらには末梢細胞膜に存在する LDL 受容体と結合¹⁸⁾してコレステロールとともに細胞内に取り込まれることが明らかにされている。

そこで, 著者は LDL に糖が結合した, いわゆる Glc·LDL の代謝動態を明らかにするために一連の実験を行った。まず, LDL と糖の結合状況を知るために, [³H]Glucose と単離した LDL とを試験管内で反応させた。その結果, LDL に対する糖の結合は反応の早期(数日)から認められ, LDL は容易に糖化されることが判明した。この LDL への糖結合に関して Gonen ら¹⁹⁾は, 著者と同様の方法で作製した Glc·LDL を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分析し, アポ B のリジン・イプシロンアミノ基への糖化を認め報告した。したがって, 著者が使用した Glc·LDL においても, 同じアミノ基部位に糖化が起きていることが十分考えられる。

次に, 標識 (¹²⁵I) Glc·LDL と (¹³¹I) LDL を用い, ヒト培養細胞への結合能を検討したところ, Glc·LDL が native LDL に比べて著明に低いことが判明した。Hiramatsu ら²⁰⁾は, 培養細胞を用いて Glc·LDL の結合能と細胞内代謝を検討し, 細胞膜への結合は native LDL に比べて低下すること, 細胞内での異化が認められないことを報告しており, 著者の成績と一致する。

そこで, Glc·LDL が細胞に結合しない機序が問題となる。Weisgraber ら²¹⁾は, 細胞への結合にはアポ B のリジン基の存在が重要であると報告している。この成績を基に考察すると, アポ B のリジン基への糖化が細胞膜受容体への結合阻害を起こす大きな要因となっている可能性が推察される。

さらに, 著者が家兎を用いて Glc·LDL の代謝動態を検討したところ, Glc·LDL の血中クリア

ラヌスは native LDL に比べて 8.5 倍遅延することが確かめられた。

以上の実験成績から、Glc・LDL は細胞への結合能が低く、LDL への糖化の程度が強いほど代謝が遅れる。このために血中の Glc・LDL の高値が持続するものと考えられた。

著者は、ヒト血中 Glc・LDL 値をボロン酸アフィニティー・カラム法で測定し、臨床的検討を行った。糖尿病患者群の血中 Glc・LDL 値は、対照群に比べ有意に高値を示した。この成績は坂井ら²²⁾、早川ら²³⁾の報告と一致している。しかし著者は、血中 Glc・LDL 値と血糖値との関係を検討し、血中 Glc・LDL 値が血糖値と統計学的に有意な正の相関を示すことを明らかにした。さらに血中 Glc・LDL 値とグリコ・ヘモグロビン A_I 値との間にも正の相関を認めた。以上の事実から、血中 Glc・LDL 値の上昇は高血糖状態の持続を反映しているものと考えられた。

臨床的には、LDL が高値を示す家族性高コレステロール血症 (IIa 型) 患者に冠動脈硬化の発生率が高い²⁴⁾ことや糖尿病患者に血管性病変が多い¹⁾とする報告と糖尿病患者の血中 Glc・LDL が高値を示した成績から考え合わせると、Glc・LDL が動脈硬化を促進している可能性が高いことが推測される。

血中 Glc・LDL 値と動脈硬化症との関連性を明らかにするためには、Glc・LDL の簡便な定量測定法を確立する必要がある。著者の Glc・LDL 測定法には、LDL を超遠心法で血漿から単離する必要がありルーチン化に難点がある。今後は抗ヒト Glc・LDL 抗体を用いた、より簡便な測定法の開発が必要だと言える。

V. 結 語

1) 糖化 (glycosylated) LDL は、試験管内でヒト・LDL と D-グルコースを混和させるだけで反応時間の早期から生成し、その量は糖濃度および反応時間に比例して増加した。

2) ヒト線維芽細胞に対する Glc・LDL と native LDL の結合能を比較検討した。native

LDL との結合は反応直後から認められたのに対し、Glc・LDL との結合は著しく低下していた。

3) 家兎の静脈内に ¹³¹I-LDL と ¹²⁵I-Glc・LDL を同時投与し、経時的な血中消失について検討した。その結果、native LDL に比し、Glc・LDL の血中消失が著明に遅延することが判明した。

4) ボロン酸アフィニティー・カラム法を用い、ヒト血中 Glc・LDL 値 (指標；%) を測定した結果、

(1) 糖尿病患者群の血中 Glc・LDL 値は、対照群に比べて明らかに高値を示した。

(2) Glc・LDL 値と血糖値との間には有意な相関があり、またグリコ・ヘモグロビン A_I 値との間にも相関が認められた。

5) 以上のことから、血中 Glc・LDL の値は血糖値に左右され、その値の上昇は高血糖状態の持続を反映していることが示唆された。

謝辞：ご指導、ご校閲をいただいた新潟大学医学部放射線医学教室・酒井邦夫教授に深謝します。

また研究にご協力いただいた本学科・西村義孝教授、信楽園病院・平沢由平研究部長、山田幸男内科部長、尾方文雄博士、大島博技師長に感謝します。

文 献

- 1) 後藤由夫：糖尿病と動脈硬化。動脈硬化 **14**: 247-258, 1986
- 2) 河原玲子、雨宮禎子、古守知典、他：糖尿病におけるリボ蛋白およびアポ蛋白の年齢別、動脈硬化の検討。動脈硬化 **14**: 631-638, 1986
- 3) Gabby KH, Sosenko JM, Banuchi GA, et al: Glycosylated hemoglobins; increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients. Diabetes **28**: 337-340, 1979
- 4) Dolhofer R, Wieland OH: Glycosylation of serum albumin; elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. FEBS Lett **103**: 282-286, 1979
- 5) Witztum JL, Fisher M, Pietro T, et al: Non-enzymatic glucosylation of high-density lipoprotein accelerates its catabolism in guinea pigs. Diabetes **31**: 1029-1032, 1982
- 6) Kohn RR, Cerami A, Monnier VM: Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. Diabetes **33**: 57-59, 1984
- 7) Ney KA, Pasqua JJ, Colley KJ, et al: In vitro preparation of nonenzymatically glucosylated human transferrin, α_2 -macroglobulin and fibrinogen

- with preservation of function. *Diabetes* **34**: 462-470, 1985
- 8) Curtiss JK, Witztum JL: Plasma apolipoproteins A_I, A_{II}, B, C_I, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* **34**: 452-461, 1985
- 9) Kaneshige H: Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* **36**: 822-828, 1987
- 10) Schleicher E, Deufel T, Wieland OH: Nonenzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. *FEBS Lett* **129**: 1-4, 1981
- 11) Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, et al: Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* **31**: 283-291, 1982
- 12) Ogata F, Hirasawa Y: Free fatty acids alter the electrophoretic mobility of serum lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **107**: 417-421, 1982
- 13) 柏森 亮, 山田幸男, 伊藤正毅, 他: N末端抗血清を用いた Parathyroid Hormone の Radioimmunoassay. *日内分泌会誌* **55**: 1372-1383, 1979
- 14) Goldstein JL, Brown MS: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts; comparison of cells from normal subject and from patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **249**: 5133-5162, 1974
- 15) Cardin AD, Price CA, Hirose N, et al: Structural organization of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins; comparison to B-48 of chylomicrons and very low density lipoproteins. *J Biol Chem* **35**: 16744-16748, 1986
- 16) Innerarity TL, Young SG, Poksay KS, et al: Structural relationship of human apolipoprotein B48 to apolipoprotein B100. *J Clin Invest* **80**: 1794-1798, 1987
- 17) Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI: Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res* **19**: 667-687, 1978
- 18) Brown MS, Goldstein JL: Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* **191**: 150-154, 1976
- 19) Gonen B, Baenziger J, Schonfeld G, et al: Nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro; effects on cell-interactive properties. *Diabetes* **30**: 875-878, 1981
- 20) Hiramatsu K, Bierman EL, Chait A: Metabolism of low-density lipoprotein from patients with diabetic hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts. *Diabetes* **34**: 8-14, 1985
- 21) Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW: Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* **253**: 9053-9062, 1978
- 22) 坂井健誌, 武田三昭, 道下一郎, 他: Affinity chromatography による glycosylated-lipoprotein の測定. *糖尿病* **27**: 459, 1984
- 23) 早川道彦, 岩田芳郎, 葛谷文男: Glycosylated β -lipoprotein に関する研究; その測定と代謝, 血管壁に対する作用の検討. *動脈硬化* **14**: 31-35, 1986
- 24) 馬渕 宏, 吉村 陽: 家族性高コレステロール血症の冠動脈病変. *動脈硬化* **13**: 809-811, 1985

Summary

A Fundamental Study on the Metabolism of Glycosylated Low-Density Lipoprotein

Ryo KAYAMORI

Department of Radiology, College of Biomedical Technology, Niigata University

Low-density lipoprotein (LDL) is considered to be one of the accelerating factors in atherosclerosis. Recently, it has been pointed out that nonenzymatically glycosylated LDL (Glc·LDL) is increased in the blood of diabetic patients. In this study, the binding ability of Glc·LDL to culturer cells and its clearance rate in New Zealand White rabbits were examined to the purpose of elucidating those metabolism.

Human LDL was taken from healthy subjects and prepared by the ultracentrifugation method, then was glycosylated in vitro by adding [D]glucose. The incorporation of covalently bound glucose increased linearly from beginning and get to the plateau after 12 days of incubation.

Surface binding of ^{125}I -Glc·LDL to cultured human fibroblasts was low degree compared to

that of native ^{131}I -LDL. The clearance rate of ^{125}I -Glc·LDL in rabbits was slower than that of native ^{131}I -LDL. The half-time for Glc·LDL was 85 hours, and for native LDL the time was 10 hours.

Finally, Glc·LDL in human plasma was measured by a *m*-aminophenylboronic acid affinity column. Preliminary data revealed that the Glc·LDL level was $10.6 \pm 3.0\%$ in diabetic patients ($n=21$) and $5.25 \pm 1.1\%$ in non-diabetes ($n=18$). The relationships between Glc·LDL and glucose in human plasma for all patients ($n=39$) showed linearity and the correlation coefficient was about 0.87 ($p<0.001$).

Key words: Glycosylated LDL, Metabolism, Boronic acid affinity chromatography.