

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：奨励研究

研究期間：2023～2023

課題番号：23H05349

研究課題名 冠動脈疾患発症リスクの予測を目的とした赤血球リピドミクス解析法の開発

研究代表者

山崎 あずさ (YAMAZAKI, Azusa)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・臨床検査技師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：赤血球は血清と同程度のコレステロールを含み、血清リポタンパクとの間においてコレステロールの転送が行われていることから、脂質代謝に深く関与している。赤血球脂質含有量による脂質代謝異常症の詳細な解析のために、より簡便に測定可能な方法が必要である。本研究により、赤血球のコレステロール含有量を簡便かつ正確に測定する新たな方法が確立された。本測定法では、赤血球の体積あたり、または、赤血球1個あたりのコレステロール含有量が算出可能であり、これらは血清コレステロール濃度とは相関しない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤血球コレステロール含有量について冠動脈疾患との関連が示唆されている一方で、臨床検査で重要な測定法の妥当性については評価されておらず、正確性については問題がある。本研究により確立した測定法は、簡便かつより正確に測定が可能であり、血清脂質項目には反映されない脂質代謝異常の新たな指標となる可能性がある。既存の検査項目と組み合わせることで、血清脂質濃度測定のみでは反映されない冠動脈疾患のバイオマーカーとしての利用が期待される。

研究分野：臨床検査医学

キーワード：赤血球 コレステロール 臨床検査 脂質代謝

1. 研究の目的

脂質異常症の診断を目的に血清中のリポタンパクコレステロールが広く測定されているが、血液中の約半分を占める赤血球にも血清と同程度のコレステロールが含まれている。近年、我々は赤血球が高比重リポタンパクに多量のコレステロールを能動的に転送していることを報告し (Ohkawa R. et al. *J. Lipid Res.* 2020), 赤血球がコレステロールの動態に大きく関与していることを明らかにした。また、赤血球の脂質のほとんどが赤血球膜上に存在することから、赤血球に関連するコレステロールの指標として赤血球膜コレステロール含有量が測定されている。実際に、赤血球膜コレステロールは冠動脈疾患と正の相関があるという報告もされており (Namazi G. et al. *Cholesterol.* 2014), 赤血球コレステロール含有量測定が冠動脈疾患の予測につながる可能性がある。しかし、既報の赤血球脂質測定法は、赤血球膜から脂質を抽出し測定するなど煩雑な工程が多く、回収率も低いため、臨床への応用を実現するには多くの解決すべき課題がある。そこで本研究では、赤血球脂質量の臨床での測定を実現するため、煩雑な手順が不要となる、より簡便な方法を確立するとともに、健常者および患者検体の測定により、血清脂質などとの関連を調べ、本法の病態生理学的意義を明らかにする。

2. 研究成果

(1) 測定試料の前処理条件および安定性の検討

健常者から採取した全血をヘマトクリット (Ht) 20%, 40%, 60% に調整し、生理食塩水で 4 回洗浄を行い、その上清を回収し、コレステロール濃度を測定した。Ht が高いほど洗浄効率が低い傾向がみられたが、4 回目の洗浄上清は生理食塩水のコレステロール実測値と有意な差は認められなかった。全血を 4°C, 25°C, 37°C で 12 時間および 24 時間静置し、血球数を測定した後、洗浄赤血球を作製し、コレステロール含有量を測定した。4°C の静置では、赤血球コレステロール含有量に変化が見られなかったが、25°C・37°C の条件で赤血球コレステロール濃度が経時的に減少した。一方で、25°C・37°C の条件で赤血球の膨化が確認されたため、赤血球 1 個あたりのコレステロール量を算出したところ、明らかな減少は認められなかった。洗浄赤血球への血漿成分の混入は正誤差を与える要因であるが、Ht が 60% までであれば、4 回の洗浄により赤血球コレステロール含有量を測定する上で問題ないと考えられる。また、赤血球に含まれるコレステロールは血漿に放出されることが知られているが、赤血球の洗浄まで冷蔵で保管することで赤血球の膨化やコレステロールの放出などの影響を回避できることが示唆された。

(2) 測定法の評価およびヘモグロビン濃度による補正の検討

健常者から採取した血液から洗浄赤血球を作製し、洗浄赤血球に化学物質を添加することで Hb の影響を回避した測定法により赤血球コレステロール含有量を測定した。併行精度および室内再現精度を評価したところ、変動係数は 5% 以下であった (n=20)。また実際に想定される Hb 濃度において、良好な直線性が得られた。コレステロール標準品を測定試料に添加して測定をしたところ、99~102% の回収率となった。さらに、第 1 試薬添加後の吸光度より Hb 濃度を算出し、洗浄赤血球の回収率の補正を検討した。洗浄赤血球の回収率は $86.4 \pm 1.2\%$ であり、ヘマトクリット (Ht) 値による回収率 ($87.0 \pm 1.1\%$) と有意な差は認められなかった。洗浄赤血球の回収率が一定でない場合も想定される。Hb 濃度により実測値を補正することで、より正確な赤血球コレステロール濃度や赤血球 1 個あたりのコレステロール含有量が算出可能となり、これらが新たな指標となると考えられる。

(3) 健常者検体の解析

同様の方法にて、健常者検体を測定したところ、赤血球体積あたりのコレステロール濃度は男性 154.8 ± 2.9 mg/dL, 女性 155.9 ± 6.9 mg/dL であり、平均赤血球コレステロール含有量は男性 139.0 ± 5.2 fg/cell, 女性 140.8 ± 5.3 fg/cell であった。いずれも有意な男女差は認めなかった。

(4) 患者検体の解析

東京医科歯科大学病院検査部に検査依頼のあった患者 30 名 (男性 15 名, 女性 15 名, 平均年齢 64.7 ± 13.8) の EDTA-2K 加全血検体から洗浄赤血球を作製した (医学部倫理委員会承認済: M2016-049)。上記同様に赤血球コレステロール濃度を測定したところ、平均赤血球コレステロール濃度は 154.1 mg/dL (95% CI $150.9 - 157.3$ mg/dL), 平均赤血球コレステロール含有量は 143.5 fg/cell (95% CI $138.0 - 149.0$ fg/cell) であった。平均赤血球コレステロール含有量は中性脂肪と負の相関 ($r = -0.371$, $p = 0.044$), 平均赤血球容積 (MCV) と強い正の相関 ($r = 0.878$, $p < 0.001$), 赤血球数と負の相関 ($r = -0.446$, $p = 0.013$) が認められた。

今後、脂質異常症や糖尿病、赤血球関連疾患など疾患ごとの解析を行い、これらの指標の評価や臨床的有用性について検討を行っていく。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 あずさ, 市村 直也, 東田 修二, 大川 龍之介
2. 発表標題 赤血球コレステロール含有量を測定するための試料の前処理および安定性に関する検討
3. 学会等名 第55回日本医療検査科学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 あずさ, 渡部 芽以, 市村 直也, 東田 修二, 大川 龍之介
2. 発表標題 赤血球コレステロール含有量直接測定法の評価およびヘモグロビン濃度による補正の検討
3. 学会等名 第63回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 あずさ, 市村 直也, 東田 修二, 大川 龍之介
2. 発表標題 新たな測定法による赤血球コレステロール含有量と他の検査項目との関連
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
大川 龍之介	(OHKAWA Ryunosuke)