

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590717

研究課題名(和文) HDL 亜分画コレステロールのホモジニアス法の開発と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Development of homogeneous assay for HDL cholesterol subfractions and assessment for clinical application

研究代表者

杉内 博幸 (Sugiuchi, Hiroyuki)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70435163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：我々はカチオン系界面活性剤とポリエチレングリコール修飾酵素をコレステロール測定系に加えるとHDL3-Cを選択的に可溶化することを見だし、分離操作が不要で簡便なHDL3-Cのホモジニアス測定法を開発した。尚、HDL2-Cは総HDL-Cから差し引いて求めることとした。本法の同時再現性は、HDL3-Cが10～30 mg/dlの範囲でCV%2.0%以下であり、本法と超遠心法との相関はn=20 回帰式 $y=0.884x+4.807$ 、 $r=0.841$ となった。本法は自動分析装置を用いてHDL3-Cを微量検体で簡便・迅速に測定できることから、動脈硬化性疾患の治療・予防に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that addition of the cationic surfactant and a polyethylene glycol modified enzyme to the cholesterol assay system selectively solubilizes HDL3-C. We then applied this knowledge to the development of a homogeneous HDL3-C assay that is simple and requires no separation processing. The repeatability of this method was found to be 2.0% or less by CV% for HDL3-C in the range of 10 to 30 mg/dl, and its coefficient of correlation with the subfraction by ultracentrifugation was $r=0.841$ with the regression equation $y=0.884x+4.807$ for $n=20$. The method can be embodied in an automatic analyzer for simple, fast measurement of HDL3-C using a minute amount of sample, and is expected to substantially contribute to the treatment and prevention of arteriosclerotic disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コレステロール HDL亜分画コレステロール ホモジニアス法 HDL2-コレステロール HDL3-コレステロール

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白 (HDL; high density lipoprotein) コレステロール (HDL-C) は、超遠心法により比重 1.063~1.21 の部分を分取したりポ蛋白であるが、これをさらに、比重 1.063~1.125 と 1.125~1.21 の亜分画に分けて、前者を HDL2、後者を HDL3 に分類し、HDL の抗動脈硬化作用に関する研究が行われてきた。その結果、動脈硬化層の大きさは HDL2-C と相関し、冠動脈心疾患や糖尿病では HDL2-C/HDL3-C の低下が認められることが報告された。これらの研究は、冠動脈心疾患のリスクとして HDL-C を測定することよりも HDL2-C、HDL3-C を測定するほうが臨床的に有用であることを示唆している。しかし、定量法は煩雑な超遠心法だけであり臨床的データが少ないため簡便な測定法の開発と共に今後の臨床データの蓄積が切望されている。

2. 研究の目的

筆者らは 10 数年前に、硫酸化 β -シクロデキストリンとポリエチレングリコール (PEG) 修飾酵素を用いた HDL-C ホモジニアス法や界面活性剤を用いた低比重リポ蛋白 (LDL; low density lipoprotein) コレステロール (LDL-C) ホモジニアス法を開発した。そこで、本研究では、これらのホモジニアス法の開発に取り組んできた経験と技術を駆使して、HDL2-C、HDL3-C が測定できる新しいホモジニアス法を開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試薬

Cholesterol esterase (CHE, 天野エンザイム社製) と cholesterol oxidase (CHOD, 天野エンザイム社製) Peroxidase (POD; Sigma-Aldrich Co.), PEG 6,000 は日本油脂 (株) を用いた。また、POD 系呈色反応に用いる水素供与体として、4-aminoantipyrine (4-AA, 埼京化成社製) と N-ethyl-N-(3-methyl-phenyl)-N'-succinylethylene diamine (EMSE, ダイトーケミックス社製) を用いた。

実験に用いた全ての界面活性剤は市販メーカーより恵与されたものを用いた。また、試薬の緩衝液としては、3-Morpholinopropane-sulfonic acid (MOPS) を同仁化学 (株) より購入した。その他の一般試薬は全て市販特級品を用いた。

(2) 試料

健常人ボランティア 50 名 (年齢 20~60 才, 男性 23 名, 女性 27 名) から採血を行った。また、熊本大学医学部附属病院 中央検査部に検査依頼があった 2 型糖尿病患者 27 名の血清を用いて HDL2-C 及び HDL3-C の臨床的有用性を検討した。検査項目としては、糖関連では、空腹時血糖 (FBG), 空腹時インスリン, HbA1c, 脂質関連では、総コレステロール (TC;

total cholesterol), トリグリセライド (TG; triglyceride), LDL-C, HDL-C, small dense LDL-C (sdLDL-C), レムナントコレステロール (RemL-C) を測定した。この場合の測定試薬は、いずれも市販キットを用いた。また、生理学的検査では、頸部エコーによる頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT), Body Mass Index (BMI) を測定した。尚、本研究は、熊本大学及び熊本保健科学大学の倫理審査委員会にて承認 (熊本大学 先進第 1468 号, 熊本保健科学大学 臨 25-3) を得て行った。

(3) PEG 修飾酵素の調製

PEG-CHE 及び PEG-CHOD は、活性化 PEG を CHE (78 U/g protein) 300mg, CHOD (12 U/g protein) 500mg を HEPES 緩衝液 10 mL に添加した溶液と混合, 15 分, 2 時間反応させ, 未反応の PEG を限外濾過後, 4℃ に保存した。

(4) HDL2 と HDL3 の分離

健常人ボランティアの新鮮血清から、超遠心を用いる Hatch and Lees の方法に従ってカイロミクロン (CM; chylomicron), 超低比重リポ蛋白 (VLDL; very low density lipoprotein), LDL, HDL, HDL2 及び HDL3 を分離した。分取した各リポ蛋白分画の TC, TG, HDL-C, LDL-C を酵素法で測定し, アポ蛋白 (A-I, A-II, B, C-II, C-III, E) を免疫比濁法 [積水メディカル (株)] にて測定した。表 1 に分離した各リポ蛋白分画の脂質濃度を示す。

表1 超遠心にて得られたリポ蛋白分画の脂質濃度

	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	Apo A1 (mg/dL)	Apo B (mg/dL)
VLDL	40.4	180.1	-0.1	15.5
LDL	133.2	18.1	-0.1	86.7
HDL	93.2	18.5	201.0	3.0
HDL2	83.1	16.3	148.3	3.4
HDL3	52.2	11.7	174.4	0.3

TC; total cholesterol, TG; triglyceride, VLDL; very low density lipoprotein, LDL; low density lipoprotein; HDL; high density lipoprotein

(5) 測定方法

HDL3-C 測定の試薬構成は、試薬 1: EMSE (1 mmol/L), MOPS buffer (50 mmol/L, pH 7.0), 試薬 2: PEG-CHE (4 U/L), PEG-CHOD (15 U/L), POD (20 U/L), 4-AA (2.5 mmol/L), 界面活性剤 (0.1 g/L), MOPS buffer (50 mmol/L, pH 7.0) から成る。血清 3 μ L に試薬 1 を 180 μ L を加え, 混和後, 37℃ で 5 分間インキュベートする。そのあと, 試薬 2 を 60 μ L 添加し 5 分間反応させ, 600/700 (主/副) nm の 2 波長測定を行った。尚, HDL2-C は, 総 HDL-C より差し引いて求めた。キャリブレーションは超遠心法で値付けされた管理血清を用いた。測定機器は、日立 7180 型自動分析装置 [日立製作所 (株)] を用いた。

(6) 界面活性剤の検討

超遠心分離の HDL, HDL2, HDL3, LDL, VLDL の 5 画分を対象として、264 種類の界面活性剤 [カチオン系 (n=18), アニオン系 (n=63), ノニオン系 (n=160), 両性イオン系 (n=1), その他 (n=22)] について HDL3-C 選択性を検討した。HDL3-C 選択性の高い界面活性剤をスクリーニングするために、各種界面活性剤の 0.2 g/L を含むコレステロール測定試薬を作成し、0.2 g/L Triton X を使用した場合を 100% とした場合の各リポ蛋白画分のコレステロールの相対反応性及び HDL3-C/HDL2-C を求めた。HDL 選択性の高い界面活性剤のスクリーニングには、便宜上、測定試薬の HDL, LDL, VLDL に対する反応の吸光度から計算した HDL 選択指数 (S/HDL) を用いた。S/HDL = (HDL/100) × [(HDL × 3)/(HDL + LDL + VLDL)]

4. 研究成果

(1) 界面活性剤の HDL3 選択性

アニオン系, ノニオン系, カチオン系界面活性剤が HDL-C 選択指数 (S/HDL) 高値を示した (図 1)。

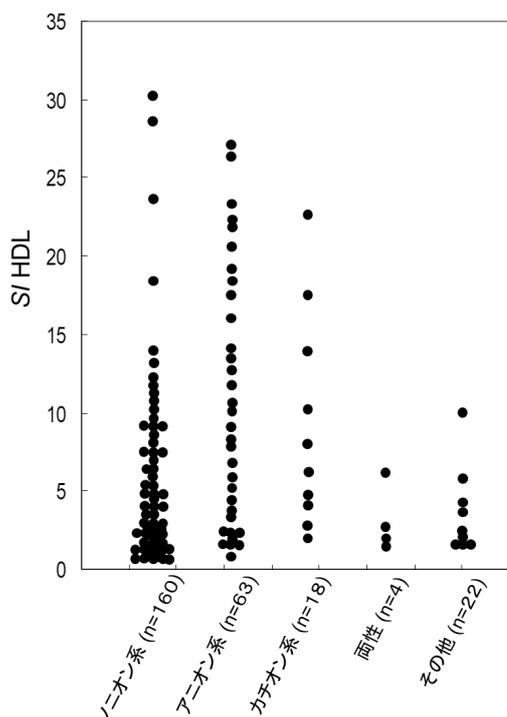


図 1 各種界面活性剤の HDL-C 選択性

このうち, LDL-C 及び VLDL-C の相対反応性が著しく低下し, HDL3-C/HDL2-C が 1.0 を超える界面活性剤として, カチオン性 (n=2), アニオン性 (n=2), ノニオン性 (n=1) を抽出した。次に, これらの界面活性剤の 0~0.3 g/L を含むコレステロール測定試薬を調製し, 各リポ蛋白画分を測定した。その結果, カチオン系界面活性剤の 0.1 g/L 濃度付近において, VLDL-C 15%, LDL-C 5%, HDL2-C 20%, HDL3-C 100% の相対反応性を示した。また,

0.2~0.3 g/L では VLDL-C, LDL-C が再び上昇する傾向が認められた (図 2)。このため, HDL3-C のホモジニアス法測定試薬には, カチオン系界面活性剤の 0.1 g/L を用いることにした。

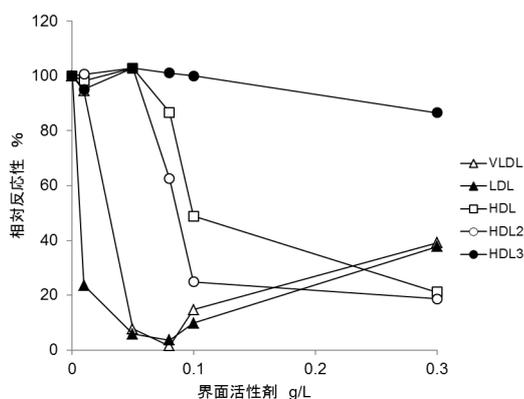


図 2 各リポ蛋白画分に対する界面活性剤の相対反応性

(2) リポ蛋白画分に対する修飾酵素の影響

測定系に PEG-CHE と PEG-CHOD を用いた場合の各リポ蛋白画分の反応性 (吸光度) を検討した。PEG-CHE 濃度 1.0~20.0 U/L を測定系に添加した場合の吸光度は, 5.0 U/L までは HDL3-C の上昇と HDL2-C の低下が認められ, HDL3-C と HDL2-C との反応性に差が生じたが, それ以上の濃度では HDL2-C が上昇する傾向があり HDL3-C との差が小さくなった。次に, PEG-CHE 濃度を 4.0 U/L に固定し, PEG-CHOD を 1.0~25.0 U/L を測定系に添加すると, HDL3-C 以外のリポ蛋白画分のコレステロールは 20.0 U/L までは低下が認められたがそれ以上の濃度では急速に上昇した。HDL3-C は, PEG-CHOD 濃度が 5.0~25.0 U/L では, 濃度の上昇と共に吸光度も上昇した。以上の結果から, 本法に用いる PEG-CHOD 濃度は HDL3-C と HDL2-C との吸光度差が最も大きい 15.0 U/L とした (図 3)。

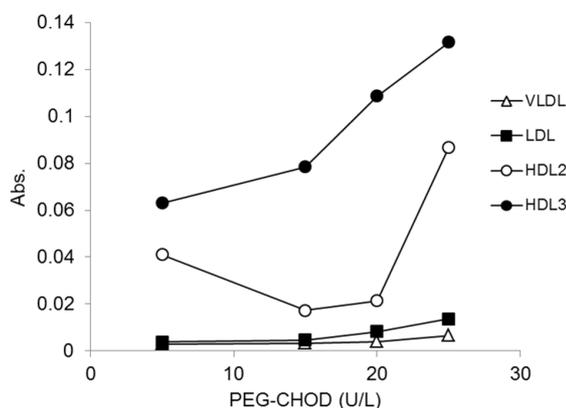


図 3 各リポ蛋白画分コレステロールに対する修飾酵素の影響

(3) 超遠心法との相関

健常人ボランティア 20 名から採血を行い、血清を超遠心法で HDL2 及び HDL3 を分離し、それぞれのコレステロール濃度を求めた。本法との相関は HDL2-C では 相関係数 $r=0.922$ 、回帰直線 $y=0.958x - 1.788$ となり (図 4-A)、HDL3-C では、相関係数 $r=0.841$ 、回帰直線 $y=0.884x + 4.807$ となった (図 4-B)。また、本法による 10 連続測定 の同時再現性は、HDL2-C, HDL3-C の測定値が 10 ~ 40 mg/dL の範囲で両方とも CV 2%以下であった。

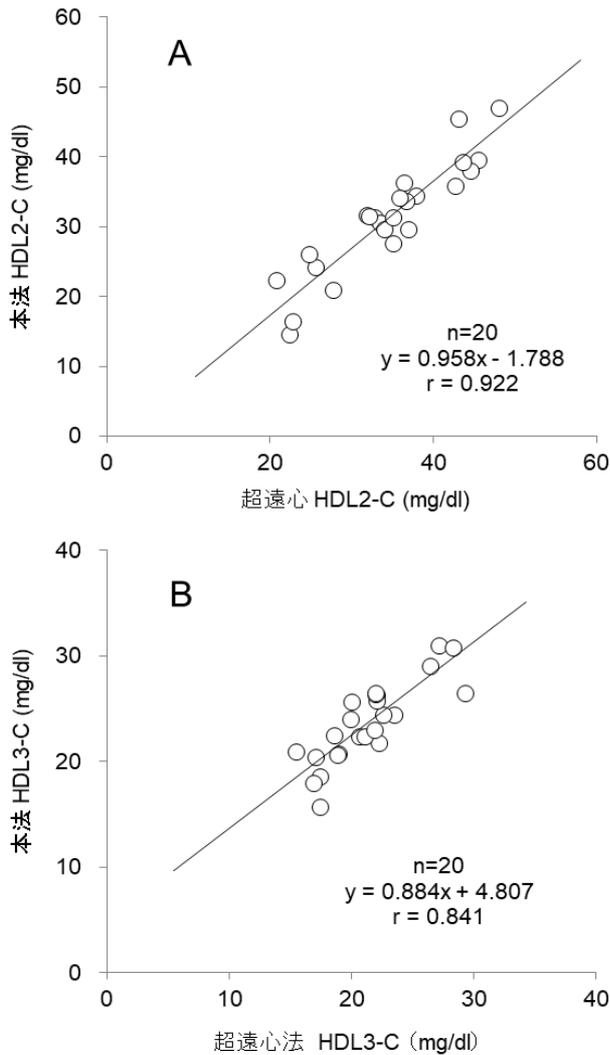


図 4 超遠心法と本法との相関 (A; HDL2-C, B; HDL3-C)

(4) 基準範囲

健常人ボランティア 50 名 (年齢 20 ~ 60 才, 男性 23 名, 女性 27 名) を対象として、本法による基準範囲を算出した (表 2)。HDL2-C の基準範囲は、男性; 平均値 \pm SD = 36.4 ± 15.3 mg/dL, 女性; 平均値 \pm SD = 47.1 ± 13.7 mg/dL で男女差が認められた ($p < 0.01$)。また、HDL3-C の基準範囲は男性; 平均値 \pm SD = 24.0 ± 5.0 mg/dL, 女性; 平均値 \pm SD = 24.2 ± 4.1 mg/dL で男女差は認められなかった。

表 2 HDL2-C, HDL3-C の基準範囲

	n	Mean	SD	基準範囲		
(mg/dL)						
HDL2-C	男	23	64.1	15.4	33.2 ~ 94.9	$p < 0.05$
	女	27	71.2	12.6	46.0 ~ 96.4	
	Total	50	68.2	14.2	39.8 ~ 96.5	
HDL3-C	男	23	24.0	5.0	14.1 ~ 34.0	NS
	女	27	24.2	4.1	15.9 ~ 32.4	
	Total	50	24.1	4.5	15.1 ~ 33.1	
HDL2-C	男	23	36.4	15.3	5.7 ~ 67.1	$p < 0.01$
	女	27	47.1	13.7	19.6 ~ 74.5	
	Total	50	42.2	15.3	11.5 ~ 72.8	
HDL2-C/ HDL3-C	男	23	1.9	0.4	1.1 ~ 2.7	NS
	女	27	2.1	0.5	1.2 ~ 3.1	
	Total	50	2.0	0.5	1.1 ~ 3.0	

(5) 糖尿病患者における HDL2-C, HDL3-C 測定の有用性

本法により糖尿病患者血清 27 例および健常人血清 20 例の HDL2-C/HDL3-C を比較した結果、糖尿病患者では、平均値 \pm SD = 2.12 ± 0.511 、健常人では平均値 \pm SD = 2.39 ± 0.400 となり、糖尿病患者の方が低値を示した ($p < 0.001$) (図 5)。さらに、糖代謝関連 (FBG, HbA1c, インスリン, HOMA-R)、脂質関連 (TC, TG, LDL-C, HDL-C, sdLDL-C, RemL-C)、生理学的検査 (IMT, BMI) との相関性を検討した (図 6)。その結果、TC, HDL-C とは正の相関が認められたが、TG, sdLDL-C, RemL-C, FBG, インスリン, BMI とは負の相関が認められた。

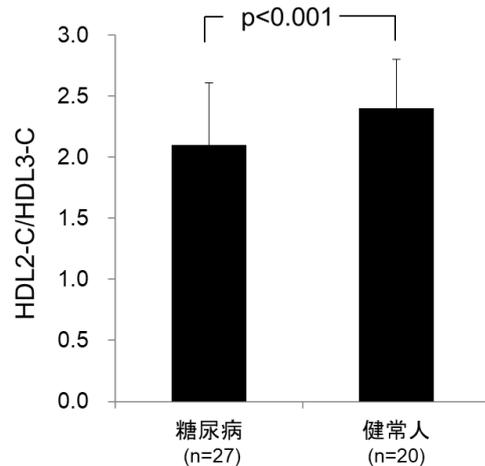


図 5 糖尿病患者及び健常人における HDL2-C/HDL3-C

(6) 本研究の成果と今後の展望

本法の HDL3-C と超遠心法との相関では、相関係数 (r) は 0.8 程度に止まっている。この原因としては、試薬中の修飾酵素の安定性や非特異性反応などが考えられる。今回は、過去の HDL-C 直接法開発の経験から修飾酵素のみを用いたが、未修飾酵素についても検討が必要と思われる。今後、試薬の実用化に向けて、これらの課題を早急に解決したい。また、本研究では 2 型糖尿病における HDL2-C,

HDL3-Cの臨床的有用性について検討した。その結果として、HDL2-C/HDL3-CはTC、HDL-Cとは正の相関が認められたが、TG、sdLDL-C、RemL-C、FBG、インスリン、BMIとは負の相関を示した。HDL2-C/HDL3-C比はHOMA-Rと負の相関を示したことより、2型糖尿病患者のイ

ンスリン抵抗性を評価するマーカーとしての可能性が強く示唆された。今後、さらに症例を蓄積して、HDL2-C及びHDL3-Cの臨床的有用性を検討したい。

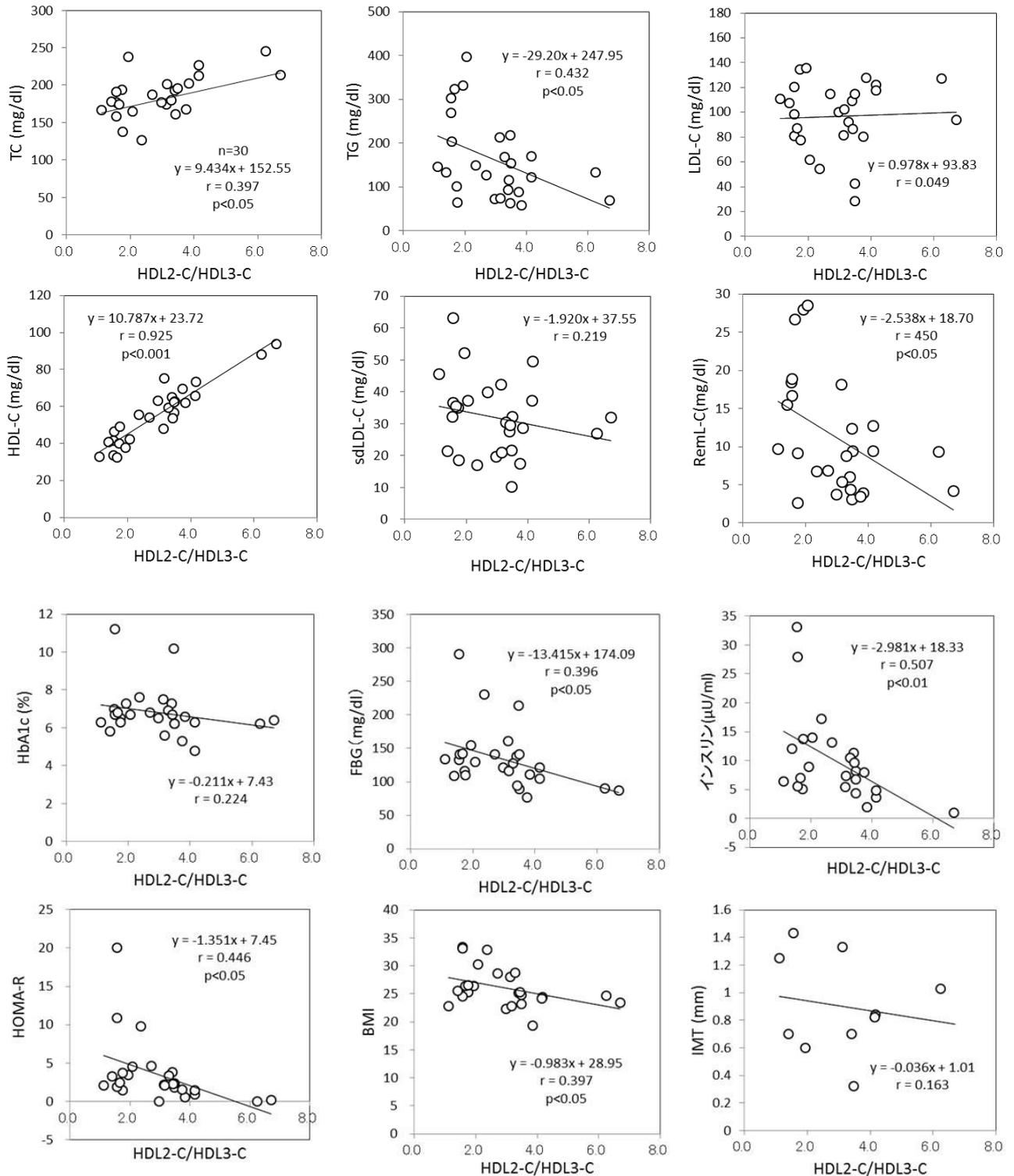


図6 糖尿病患者におけるHDL2-C/HDL3-Cと脂質，糖関連項目との相関

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) 松嶋和美, 杉内博幸, 眞部正弘. 血清の長期保存における high density lipoprotein 及び low density lipoprotein cholesterol 測定値の変動について. 保健科学研究誌 10; 7-18, 2013. (査読有り)
- 2) 杉内博幸, 松嶋和美, 秋吉保男, 前田香緒里, 安東由喜雄. HDL-C, LDL-C 直接法の開発とその後の展開. 臨床病理 60: 632-636, 2012.
- 3) 杉内博幸. HDL-コレステロール, LDL-コレステロールの直接法の原理と問題点について. 臨床検査 56 増刊号: 1200-1201, 2012.
- 4) 杉内博幸, 松嶋和美, 安東由喜雄. HDL-C 直接定量法-超遠心, 2 段階法との比較, 亜分画への発展を含む-. 臨床化学 41: 310-318, 2012
- 5) 杉内博幸, 松嶋和美, 安東由喜雄. リポ蛋白コレステロール直接法開発の最前線. 日本臨床検査自動化学会誌 38: 3-11, 2013.
- 6) 杉内博幸, 松嶋和美, 安東由喜雄. JSCC 勧告法は盤石か? - 課題と展望. 臨床検査 58; 209-216, 2015
- 7) 杉内博幸. 脂質異常(生化学及び免疫化学自動分析装置のための実践精度管理. 日本臨床検査自動化学会 38; 151-160, 2013.
- 8) Matsushima K, Sugiuchi H*, Anrakua K, Nishimura H, Manabeb M, Ikedab K, Andob Y, Kondo Y, Ishitsuka Y, Irikura M, Irie. Differences in reaction specificity toward lipoprotein X and abnormal LDL among six homogenous assays for LDL-cholesterol: Clin Chem acta 439: 29-37, 2015. *Corresponding author. (査読有り)
- 9) 杉内博幸. LDL-C の測定では検体を冷蔵で長期保存してはダメ!: Medical Technology (臨時増刊) 42: 1325-1327, 2014.
- 10) 杉内博幸. LDL-コレステロール直接法: 検査と技術 43: 207-215, 2015.

[学会発表](計 7 件)

- 1) 松嶋和美, 杉内博幸, 山内露子, 西村仁志, 池田勝義, 安東由喜雄. 新規 LDL コレステロール直接法試薬の検証および臨床応用. 第 44 回日本臨床検査自動化学会, 2012/10 横浜市(パシフィコ横浜・国際会議センター)
- 2) 松嶋和美, 杉内博幸, 山内露子, 池田勝

義, 石井規夫, 松村剛, 荒木栄一, 安東由喜雄. 2 型糖尿病における RemL-C の臨床的有用性について. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 2012/11 京都市(国際会議場)

- 3) 松嶋和美, 杉内博幸, 西村仁志, 山内露子, 池田勝義, 石井則夫, 松村剛, 荒木栄一, 安東由喜雄. 2 型糖尿病におけるレムナントコレステロール(RemL-C)の臨床応用について. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会. 2013/9 徳島市(あわぎんホール)
- 4) 松嶋和美, 杉内博幸, 石塚洋一, 入倉充, 入江徹美. 酵素を組み合わせた血清中スフィンゴミエリン測定法の基礎的検討. 第 45 回日本臨床検査自動化学会. 2013/10 横浜市(パシフィコ横浜・国際会議センター)
- 5) 永田和美(旧 松嶋), 杉内博幸, 石井則夫, 松村剛, 荒木栄一, 安東由喜雄. 2 型糖尿病における HDL 亜分画測定の臨床的意義について, 第 54 回日本臨床化学会年次学術集会. 2014/9 東京都(東京大学)
- 6) 永田和美(旧 松嶋), 杉内博幸, 石井則夫, 松村剛, 荒木栄一, 安東由喜雄. 2 型糖尿病における HDL 亜分画コレステロールとインスリン抵抗性との関連性について, 第 54 回日本臨床化学会年次学術集会, 2014/9 東京都(東京大学)

[図書](計 1 件)

- 1) 杉内博幸, 安楽健作. メディカルサイエンス「臨床化学検査学」. 人体の生化学検査の実際 - 生体分子の分析各論 2. 脂質, 近代出版, 編者 太田敏子他, pp 205-217, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉内 博幸 (Sugiuchi Hiroyuki)
熊本保健科学大学 医学検査学科 教授
研究者番号: 70435163

(2) 研究分担者

松嶋 和美 (Matsushima Kazumi)
熊本保健科学大学 医学検査学科 講師
研究者番号: 00369125

安楽 健作 (Anraku Kensaku)

熊本保健科学大学 医学検査学科 講師
研究者番号: 80389543

安東 由喜雄 (Ando Yukio)

熊本大学大学院 生命科学部病態情報解析学分野・教授
研究者番号: 20253742