

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790527

研究課題名（和文） 臨床検査法として有用なトリグリセリド測定法の開発

研究課題名（英文） Development of a clinically useful method for measuring serum triglycerides

研究代表者

臼井 真一（USUI SHINICHI）

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：50346417

研究成果の概要（和文）：

本研究では、各種血清リポタンパク質に含まれるトリグリセリド(TG)を選択的に簡易測定する方法を検討した。その結果、測定に使用する酵素や界面活性剤の組合せを工夫することで、HDLに含まれるTGを選択的に測定できる可能性が見つかった。本法はさらなる改良を加えることで、臨床検査法としての実用化が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

In this research, I studied a simple method for determining triglycerides (TG) in each of serum lipoproteins. Potential possibilities, as a result, were found with a selective HDL-TG measurement, using a combination of suitable enzymes and detergents. This method, if further modified, may be available as a clinical laboratory testing

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：臨床化学検査

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：リポタンパク質，トリグリセリド，生化学検査，脂質検査

1. 研究開始当初の背景

近年、動脈硬化性の心血管疾患は世界的に見ても死因の上位を占めるようになってきており、その予防と治療は医療厚生分野において国民的課題である。その背景には、食生活やライフスタイルなどの生活習慣の変化や、それに付随して起こる高血圧、高脂血症（脂質異常症）、糖尿病などの生活習慣病の増加があると考えられている。

脂質代謝関連検査は心血管疾患のリスクを予測する検査としてその有用性は広く認知されており、米国National Cholesterol Education Programにおいても低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)の高値、高密度リポタンパク質コレステロール(HDL-C)の低値が虚血性心疾患の危険因子として提唱されている。一方、虚血性心疾患を有する患者は高トリグリセリド(TG)血症をしばしば伴っている場合

が多く、TG値が臨床的に動脈硬化性疾患の独立した危険因子として次第に認識されつつある。

2. 研究の目的

血中TG値は主にカイロミクロン(CM)，超低密度リポタンパク質(VLDL)，レムナントリポタンパク質などのTGに富むリポタンパク質の増減を反映するが，高TG血症では本来コレステロールに富む粒子であるLDLやHDLも，脂質転送タンパク質やリパーゼなどの作用を受けた結果，TGに富む粒子組成となる。この質的变化を受けたリポタンパク質はin vitroにおいて，レセプターとの結合能，細胞からのコレステロール搬出機構などに異常をきたしているという実験データが示されており，血中リポタンパク質代謝の異常を動脈硬化症のリスク因子としてとらえていく場合，その量的変化だけでなく質的变化が注目・指摘されている。

また，血中総TG値は食事由来のCM-TGの増加により食後高値となるため，食事の影響を受けやすく，測定値の評価が難しい。したがって，

「特定のリポタンパク質に含まれるTG量を測定すること」はこの臨床上の問題点を解決するための一手段になると考えられる。

本研究では，ヒト血中主要リポタンパク質(CM, VLDL, LDL, HDL)に含まれるTGの簡易定量分析法を検討し，既存の分析法と比較検討することで本法の測定精度を明らかにし，臨床検査法として用いることができる測定系の確立をめざすことを主目的とした。

3. 研究の方法

界面活性剤や化学試薬類を使って，特定のリポタンパク質に含まれるTGを選択的に比色定量する方法の検討を行った。具体的方法は以下の通りである。

(1) 測定原理

各リポタンパク質中のTGは，総TG測定で一般の臨床検査室で用いられている酵素法に基づいて検出した。酵素法では，まず，TGにリポタンパク質リパーゼ(LPL)を作用させてグリセロールを生成させ，生じたグリセロールにグリセロキナーゼとグリセロール-3-リン酸オキシダーゼを作用させ過酸化水素を生成させる。生じた過酸化水素はペルオキシダーゼ発色系により比色定量する。この反応ではLPLがすべてのリポタンパク質のTGに作用するため，特定のリポタンパク質内のTGを定量することができないが，何らかの方法によりTGの加水分解に選択性をもたせることが本研究の重要なポイントである。本研究でベースとして用いた試薬組成を表1に示す。

表1. 酵素試薬組成

	第一試薬	第二試薬
ペルオキシダーゼ	21.7 U/mL	5.0 U/mL
グリセロキナーゼ	2.6 U/mL	0.6 U/mL
グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ	13.0 U/mL	3.0 U/mL
MgCl ₂	8.7 mM	2.0 mM
ATP	17.8 mM	4.1 mM
TOOS	0.4 mg/mL	-
4-アミノアンチピリン	-	0.15 mg/mL
MOPS, pH7.0	87 mM	20 mM

(2) 精製リポタンパク質を用いた検討

超遠心法で分離した精製リポタンパク質に対する各種界面活性剤や化学試薬の反応性を調べることににより，目的のリポタンパク質のみを可溶化または不溶化する界面活性剤を探索した。超遠心機はOptima Max Ultracentrifuge(ベックマン)，ローターはTLA-110(ベックマン)を使用した。

(3) 分光光度計を用いた測定

第一試薬230 μ Lに生理食塩水760 μ L，試料10 μ L，および界面活性剤等を加えて良く攪拌し，37°Cで5分間反応させた(第一反応)。さらに加水分解酵素を予め適量加えた第二試薬230 μ L

を混和し、37°Cで5分間反応させ(第二反応)、波長550nmで吸光度を測定した。分光光度計は、UV-2550(島津製作所)を使用した。

(4) HPLCを用いた検討

カラムからの溶出液に上記(3)で調べた試薬(第一試薬, 第二試薬)をオンライン注入し、その溶出パターンから各リポタンパク質に対する試薬の反応性を確認した(図1)。ゲル濾過カラムはSuperose6HR (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いた。溶出バッファーは、10mMリン酸緩衝液(0.15M NaCl含有, pH7.4)を流速0.5mL/minで送液した。第一試薬および第二試薬は、流速0.15mL/minでそれぞれ送液した。試料は20倍希釈した血清を200 μ 注入し、得られるクロマトパターンから試薬の反応性を評価した。

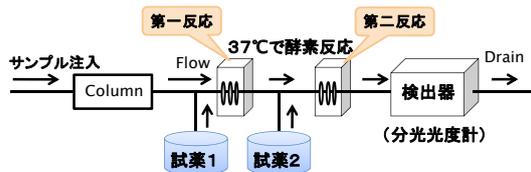


図1. HPLCシステム

4. 研究成果

(1) TG加水分解酵素の検討

研究方法の(1)に記載したように、TGの加水分解に選択性をもたせることが重要であると考え、各種加水分解酵素を使用して検討を行った。LPLは、LPL(No. 129-04501, 和光純薬)とLPL-314(東洋紡)を使用した。CEは、COE-313, COE-311, COE-301(いずれも、東洋紡)を使用した。LPL(和光純薬)での発色を100%として評価すると、図2に示すように酵素の種類によって各種リポタンパク質に対する発色率が異なることがわかった。特に、Pseudomonas由来のCOE-311やMicroorganism由来のCOE-313は、VLDLやIDLに比べHDLとLDLに対する反応が著しく低下した。

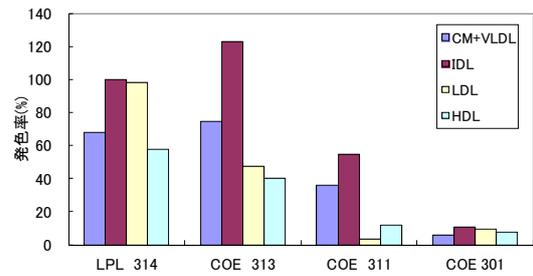


図2. 各種酵素の反応性

(2) 界面活性剤の検討

界面活性剤はTG測定で用いるグリセロキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、およびペルオキシダーゼの反応を阻害しないものを使用する必要があるため、試料にグリセロール溶液を使用して確認実験を行った。図3に示すように、非イオン性界面活性剤で良好な結果が得られ、95%以上の発色率が得られた界面活性剤は、エマルゲンLS-114(ポリオキシアルキレンアルキルエーテル)、エマルゲンLS-110, エマルゲンB66(ポリオキシエチレントリベンジルフェニルエーテル)、エマルゲンA60(ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル)、エマルゲンA90(ポリオキシエチレンジスチレン化フェニルエーテル)(いずれも、花王), Tyloxapol(シグマ)であった。このうち、LS-114, B66, A60の組合せが特に良好な結果が得られたので、この3種を以後の実験に用いた。B66とA60はこれまで、各種リポタンパク質のコレステロールを測定する際にしばしば利用されている界面活性剤であるが、LS-114については筆者の知る限りでは報告はない。



図3. 各種界面活性剤の発色に与える影響

(3) リポタンパク質分画に対する界面活性剤の影響

上記(1)で選択された加水分解酵素および(2)で選択された界面活性剤を用いて、特定のリポタンパク質に含まれるTGを測定する方法をさまざまな組合せで検討した結果、加水分解酵素にCOE-311、界面活性剤にLS-114、B66、A60を用いることで、HDL内のTGを選択的に測定できる可能性があるのではないかと考えた。

①HDL-TGの反応性

3種の界面活性剤を単独で用いた場合のHDL-TGに対する反応性を図4に示す。終濃度がLS-114では0.8%, A60とB66では3.9%の時に最もHDL-TGの発色を促進すると考えられた。

②nonHDL-TGの反応性

上記①と同様に、nonHDL分画(超遠心法で分離した $d < 1.063$ [kg/L]分画)に対する界面活性剤の影響を検討した。図5に示すように、終濃度がLS-114では0.8%, A60とB66では4.0%の時にHDL以外のリポタンパク質に対する発色を最も抑制すると考えられた。このうちLS-114は、nonHDL分画の発色を抑える効果が特に強かった。

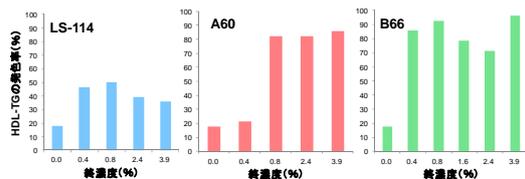


図4. 精製HDLに対する界面活性剤の影響

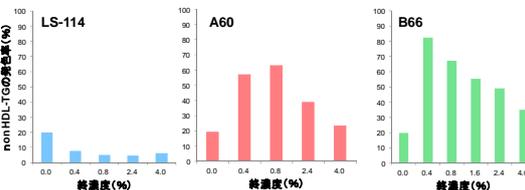


図5. nonHDL分画に対する界面活性剤の影響

(4) 界面活性剤の至適濃度の検討

上記(3)では、3種の界面活性剤を単独で使用して検討を行ったが、次に、これらの界面活性剤を混合して用いる場合の至適濃度を検討

し、反応選択性の向上を試みた。

まず、LS-114の終濃度を0.8%, B66の終濃度を1.6%に一旦固定し、A60の適当な濃度を検討した結果、A-60の終濃度0.8%が最も良好な結果が得られた(HDL-TG発色率80%, nonHDL-TG発色率12%)。次に、LS-114とA-60の終濃度をそれぞれ0.8%に固定し、B66の終濃度を検討すると、1.6%が最適であった(HDL-TG発色率80%, nonHDL-TG発色率12%)。

(5) HPLCによる検討

上記(4)で定めた界面活性剤の濃度を用いて、各リポタンパク質の反応性をHPLCにて確認した。図6に示すように、HDLは90%以上反応し、VLDLやLDLは十分に抑えられ良好な結果が得られた。

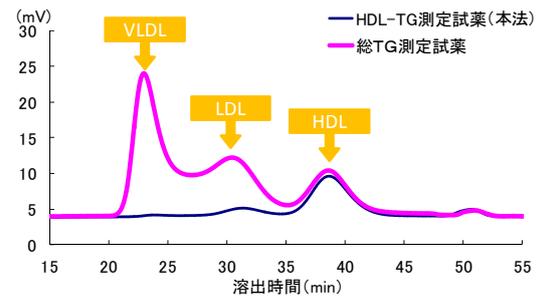


図6. HPLC測定で得られたクロマトパターン

(6) 従来法との比較

同意が得られた血清を13%ポリエチレングリコール処理して分離したHDL分画のTG値(従来法)を基準に、本法の定量性を評価した。血清(n=26)の脂質平均値は、総コレステロールが183mg/dL (132~245mg/dL)、総TGが167mg/dL (56~378mg/dL)、HDL-Cが40mg/dL (23~67mg/dL)、LDL-Cが103mg/dL (51~180mg/dL)であった。本法でのHDL-TG値(12.7±2.5 mg/dL)は従来法の測定値(12.0±2.5 mg/dL)と有意な差は認められなかったが(p=0.239)、相関係数が予想よりも小さかった(r=0.636, 図7)。しかし、血清総TG値やHDL-C値などの他の脂質値に依存したバイアスは認められな

かった。

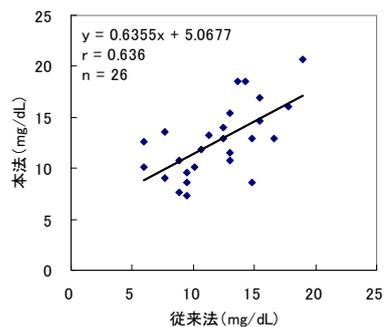


図7. 従来法との相関

(7) マイクロプレートフォーマットでの試み
上記(6)では、セルを用いた分光光度分析で測定を行ったため、多数検体処理には適していない。そのため、マイクロプレートフォーマットでの測定を試みたが、吸光度変化が小さく、感度の増強が必要であると考えられた。現在、蛍光性色素であるAmplex Red(インビトロジェン)を導入して高感度測定の検討を行っている。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 真一 (USUI SHINICHI)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：50346417

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者