

## 特集

# 脂質測定値の標準化と精度維持

企画: 中村雅一

*Nakamura Masakazu*

大阪府立健康科学センター脂質基準分析室ディレクター

高脂血症治療において、脂質管理目標は、総コレステロール値200mg/dL未満、LDLコレステロール値120mg/dL未満、トリグリセライド値は150mg/dL未満、HDLコレステロール値40mg/dL以上とされている。

言うまでもなく、これら脂質値は治療効果を判定する重要な指標となり、検査施設によって測定値が異なったり、同一施設内でも毎回の正確さが違っていたりすれば、適切な治療は実現できない。それは脂質値に関連した臨床試験を実施するうえでも同様で、脂質値を“正確”に、しかも“精密”に測定することが不可欠である。

そのため欧米では、40年以上も前から、基準分析法を中心にした脂質値の標準化に取り組んできた。また、WHO(世界保健機関)の要請により、米国CDC(疾病対策予防センター)と、日本を含めた8カ国の国際的なネットワークが構築されている。わが国でこの国際ネットワークに参加し脂質の標準化に貢献しているのは、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室である。

本特集では、同基準分析室の活動および脂質標準化プログラムの概説を中心に据え、関係者のコメントを添えながら標準化の重要性を述べる。(編集部)

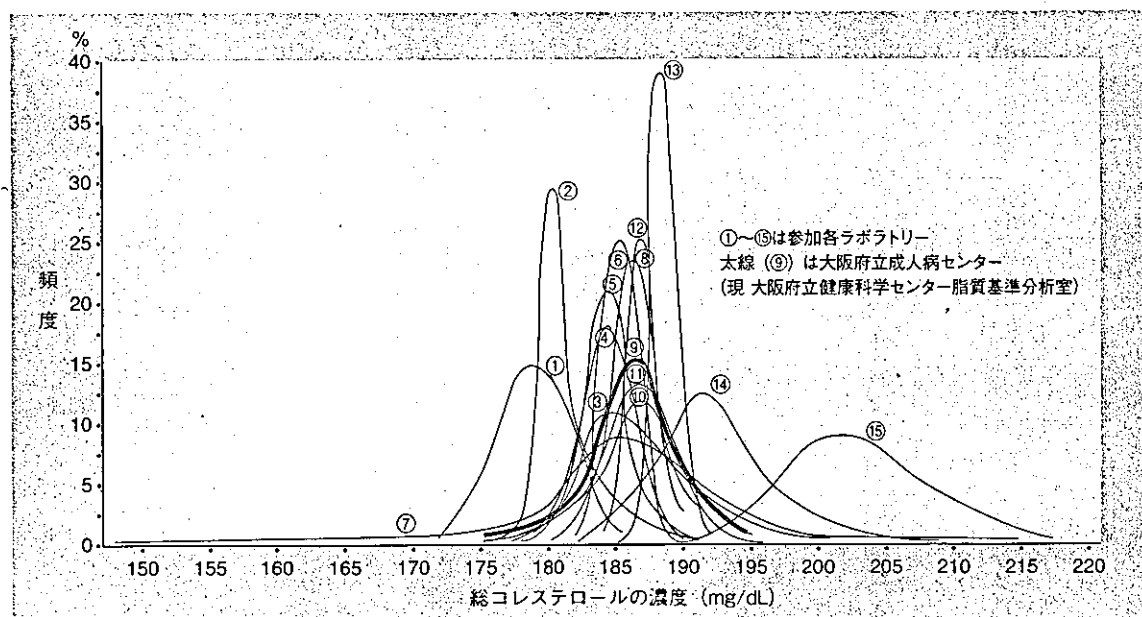


図1 わが国(1980年代初頭)における血清総コレステロール値の精度管理成績 -参加15ラボラトリーの測定値の分布-(日循協誌1986;21:318)

# 1. 標準化とは何か

健康診断の結果には、当然のごとく脂質値が含まれている。受検者は検査値と基準値を見比べ、一喜一憂する。数カ月前、「こんなにおかしいコレステロール基準」という記事が『週刊朝日(2004.2.13)』に掲載され、論議を呼んだ。「コレステロールの数値目標の基準が低すぎるのではないか、数値を下げると本当に心筋梗塞を防げるのか、必要のない人にも低下薬(スタチン類)を飲ませて巨額の医療費が無駄になっていないか」と、同誌編集部が問題提起を行ったのである。日ごろ、コレステロール値の高さに苦慮している者にとっては、やるせない話である。

小特集は“脂質値”がテーマであるが、この記事のようにコレステロールの基準値を問題にするのではないことを、まず明記しておきたい。基準値の線引き以前の問題、すなわち脂質測定の正確さ、精密さにかかわる“標準化と精度維持”がテーマである。なぜなら、標準化がなされていない多施設の検査値から推計された基準値では信頼性が低く、日常診療に耐えうるものにはなりにくいからである。

ところで、脂質値は施設間で本当に差があるのだろうか。

## ◆現状の脂質測定値は施設間で約10%の差◆

前頁の図1は、筑波大学名誉教授で大阪府立健康科学センター顧問の小町喜男氏が示してくれた、1980年代初頭に行われた血清総コレステロール値の精度管理成績である。太線が大阪府立成人病センターで、参加15施設のほとんどが185mg/dL前後に集中している。しかし、そのなかには測定値が大きく異なる、つまり正確度に問題がある所、あるいは測定値の分布の幅が広い、つまり精密度に問題がある所なども、散見された。

防衛医科大学校名誉教授の中村治雄氏も、標準化の必要性を痛感しているひとりである。

「埼玉県で主要な約40の病院に、サンプルとなる凍結血清を送り、測定してもらったことがある。200mg/dLであるべきコレステロール値が、ある施設では240mg/dLであったり、160mg/dLであったり、かなりのバラツキがあった。各施設でひとりの患者のコレステロール値の変動をみるだけなら問題はそれほど大きくないが、臨床試験を実施するには障

壁となる。」

脂質値に関し、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室のディレクターの中村雅一氏によれば、現在はこれほどではないものの、施設間で5~10%程度の差は出るという。

## ◆サーベイから標準化へ◆

施設間のバラツキを調べる、ここまでならサーベイである。例えば日本医師会は、脂質値に限らず、臨床検査値全般について、臨床検査精度管理調査を1967年から実施している。

では、サーベイと標準化は、どのように違うのか。

臨床検査における精度管理は、評価を行う主体によって2つに分けられる。つまり、検査室をもつ施設独自で評価する内部精度管理と、第三者機関による評価を受ける外部精度管理である。前者の主な目的は、測定値の精密さ(再現性)の維持とその管理に、後者のそれは測定値の正確さにある。測定値の精密さや正確さを客観的に評価するための手段として、各種測定値の品質管理システムが考案されている。

評価手段を、検査室のもつ技術のレベルに応じて3段階に分類すると、以下ようになる。

第1段階： 測定項目全般を対象とした測定精度のアウトラインを把握するための精度管理調査(サーベイ、quality control survey)。

第2段階： 特定の検査項目を重点的に技術的な習練度向上を目指した熟達度試験(proficiency testing program)。

第3段階： 長期間にわたる臨床試験や疫学研究を対象とした正確度と互換性を図るための標準化(standardization)。

中村雅一氏は、しばしば混同されがちなサーベイと標準化について、「2つは意図する役割が異なっている。疫学研究でリスクファクターとなる検査値、例えば動脈硬化のリスクファクターとされる脂質値に対しては第3段階の標準化は不可欠であるが、リスクファクターほどの意義をもたないが、診断や治療に欠かせない検査項目は第1段階のサーベイで十分である。」

## 脂質の標準化はなぜ必要か

大阪府立健康科学センター

中村雅一

Nakamura Masakazu

佐藤眞一

Sato Shin-ichi

嶋本 喬

Shimamoto Takashi

脂質の標準化はなぜ必要か、その主な理由として、次の3つを挙げることが出来るであろう。

### ①動脈硬化性疾患診療ガイドラインとの関連性

わが国における動脈硬化性疾患診療ガイドライン(2002年版)によれば、スクリーニングのための高脂血症の診断基準(血清脂質値:空腹時採血)は、総コレステロール値が220 mg/dL以上、HDLコレステロール値が40 mg/dL未満、LDLコレステロール値が140 mg/dL以上、トリグリセライド値が150 mg/dL以上と規定されている。この診断基準は、欧米のガイドラインとも類似性が高い。脂質の測定値は診断や治療をする際の重要な指標であり、検査施設によって測定値が異なったり(正確度の問題)、同一施設内でも測定値の再現性が悪かったりすれば(精密度の問題)、適正な診療は期待できない。仮に、総コレステロール値が3%高く測定されたときを考えると、本来214mg/dLで健常と判定される人の血清が誤って220mg/dLと測定され、これにガイドラインを適用した場合、高脂血症と診断されてしまう危険性がある。測定側におけるこのようなミスを防ぐ意味において、検査施設における継続的な脂質の標準化が必要である。

さらに、標準化が全国の検査室に普及して精密度と正確度が安定化すると、施設間で検査データを共有化できるとされており、採血と医療費の面で患者負担の軽減に役立つことも期待される。

### ②研究成果の論文化

長年にわたる内外の疫学研究や臨床試験は、心血管系疾患の発症に関与する重要なリスクファクターや新しい知見を次々と明らかにしてきた。リスクファクターでは、Lp(a)、レムナトリポ蛋白、ホモシステイン、small dense LDL、C反応蛋白、血清アミロイドA蛋白、催凝固因子(t-PA、プラスミノゲン活性化因子インヒビター1、フィブリノーゲン)などである。研究を通じて抽出されたリスクファクターや新知見は最終的に論文化され、世界に公表されるであろう。そのとき、仮に測定成績が正確性に欠け、共同研究に参加し

た施設間での比較可能性にも耐えられないものであるとすれば、長年の営々たる努力と研究にかけた経費は、一挙に吹き飛んでしまうことにもなりかねない。

しばしば混同されるが、精度管理調査と標準化は、その果たす役割がそれぞれ異なる。欧米の学術雑誌にこれまで発表された心血管系疾患に関する研究成果の約70%が、研究の最初から最終まで米国CDC(疾病対策予防センター)の脂質標準化プログラムに参加しており、正確性と互換性が保証された成績を使って解析する方法を探ることが一般化している。欧米諸国では、標準化が研究の基礎として重要であると認識されている証拠である。CDCによる標準化を徹底化したケースは、LRC-CPPT(Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial)、MRFIT(Multiple Risk Factor Intervention Trial)、CARE(Cholesterol and Recurrent Events)、WOSCOPS(West of Scotland Coronary Prevention Study)など、枚挙にいとまがない。わが国の学術研究の多くが、標準化の必要性和重要性をきちんと認識しているとはいえない傾向にある。標準化によるエビデンスがわが国発の研究成果に明確に示されていないことが、欧米の学術雑誌に掲載される機会を自ら小さくしているのではないだろうか。

### ③国民健康・栄養調査(循環器疾患基礎調査)における測定精度の長期観測とNHANESとの互換性

大阪府立健康科学センターは、厚生労働省によって毎年11月に実施される国民健康・栄養調査と、過去3回(1980年、1990年、2000年)の循環器疾患基礎調査に協力し、CDCの判定基準に照らして脂質の測定精度の長期観測をモニターしてきた。その結果、国民のコレステロール値やHDLコレステロール値の経年変動を国際基準で正確に追跡することが出来、米国の国民健康・栄養調査であるNHANES(National Health and Nutrition Examination Survey)とも相互比較することを可能とした。このように、国際レベルでの標準化は、国による健康状況や疾病動態に関する長期観測の基礎資料としても有用である。

◆標準化の原則◆

これまで述べてきたように、標準化は付加価値をつけることでもあり、その目標は次の3つである(表1)。

- ①測定値が国際的な互換性 (comparability)をもつこと
- ②測定値が正確 (accuracy) であること
- ③測定値が精密 (precision) であること

「サーベイでは、外部精度管理の本来の目的である互換性と正確性という、標準化の根幹にかかわる問題が真正面から取り上げられていないのではないかと、中村氏は指摘する。

一方、「精密性に関しては、今日の測定技術や機器の進歩により十分な成果が得られていると思われるので、検査室の内部精度管理で得られる標準偏差や変動係数を信頼してもよいのではないかと、サーベイの果たす役割を評価する(表2)。

わが国において、標準化という用語がしばしば規格化や標準的測定法の策定などと混同されてははいないだろうか。

日本臨床化学会標準品情報専門委員会の定義では、標準化 (standardization) とは、「標準を設定し、これを活用する組織的行為」とされる。つまり、この組織的行為とは、伝達性とトレーサビリティの組み込まれた標準化プログラムを現実に運用して、標準化を図る行為となる(伝達性とトレーサビリティについては後述)。

標準化を実施するには、下記の6つの原則が重要である。

- ①基準分析法の運用
- ②標準物質の存在
- ③標準化プログラムの運用
- ④新鮮血清の使用
- ⑤測定成績の解析ソフトの開発

- 1 国際的な互換性  
わが国の成績はどの程度世界に通用するのか
- 2 正確性  
疫学研究、臨床試験、臨床検査  
動脈硬化性疾患診療ガイドライン  
検査データの共有化の可能性
- 3 精密性  
検査室内部の精度管理を信頼する

⑥測定精度の判定基準の確立

これらの原則がうまく機能して初めて、標準化という組織的行為が、本来の機能を発揮するという。これらのなかで、特に③の標準化プログラムと⑥の判定基準は重要である。

◆米国の例◆

米国におけるコレステロール値の標準化を例にとり、説明してみよう。米国では、40年以上も前から、心筋梗塞や脳卒中などの心血管系疾患の制圧と予防に、国レベルで取り組んできた。Framingham Heart Disease Epidemiology Studyをはじめ、多くの疫学研究がなされ、脂質の標準化を求める声も強かった。米国初の脂質標準化プログラムは、1961年に構築されたCooperative Cholesterol Standardization Program (CCSP)で、後にCDC-NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) Lipid Standardization Program (LSP)に発展して、今日に至っている。

現在、CDCの標準化という組織的行為は、次の2つの脂質標準化プログラムにより具体化されている(図2)。

表2 標準化とサーベイの比較

比較項目	標準化 (Standardization)	精度管理調査 (Survey)
①基準分析法	あり	なし
②標準物質	あり	なし
③標準化プログラム	あり	なし
④試料	新鮮血清	製造血清 (新鮮血清もあり)
⑤解析ソフト	あり	なし
⑥判定基準	あり	なし
(7) 目標値	あり	サーベイ参加者の合意値
(8) 対象項目	限定的	全般的 (多項目)



tute of Standards and Technology) が担当する Isotope Dilution/ Gas Chromatography/Mass Spectrometry 法による絶対基準分析法 (definitive method) と、保健社会福祉省 (U. S. Department of Health and Human Services) に属する CDC が担当する Abell-Kendall 法による実用基準分析法 (reference method) の2つが、相互補完的な関係で使用されている。

コレステロールの基盤で確定された正確性は、標準物質や血清などの被検物と標準化プログラムという媒体を通じて、①コレステロールの測定体系のうえで高位 (基準分析法) の正確さを順次下位 (比較対照法、日常分析法など) のものに合わせていく伝達性 (transferability) と、②測定体系のうえでより高い正確さに下位から次々と合わせていくトレーサビリティ (traceability) という、それぞれ逆方向の2つの経路によって、確保されていく (図3、4)。

つまり、欧米における標準化は、以上のように厳密な条件を満たすものに限定して用いられている。すなわち、標準化の目標が、第1に正確性、第2に国際的な互換性に力点が置かれているのである。そのため、今後増加が見込まれる国際共同研究では、1国の内部での標準化では不十分であり、国際的な連携へと進展して、国際的なネットワークが形成される必要性が容易に理解できよう。

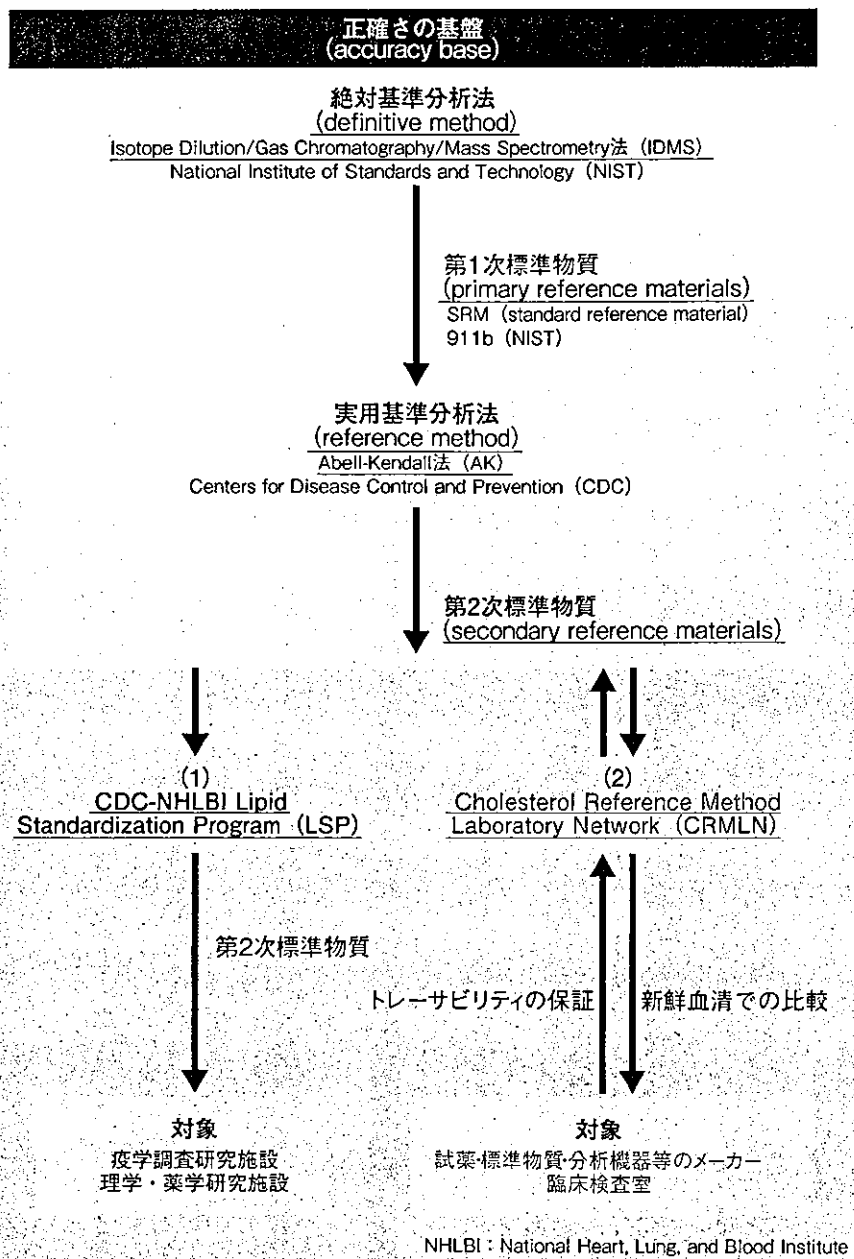


図3 米国における総コレステロール値の正確度の伝達システム

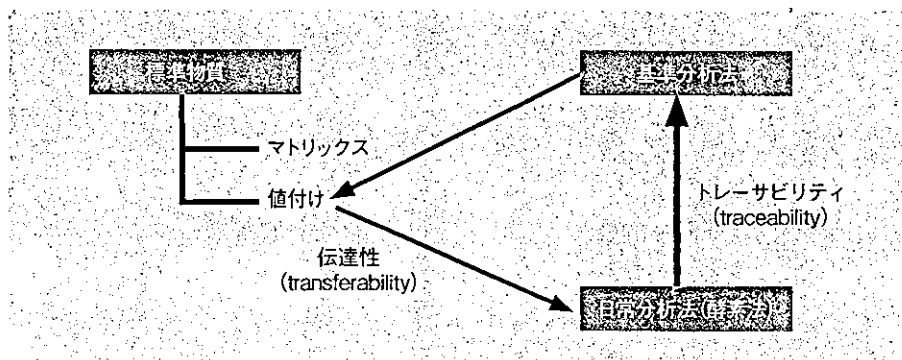


図4 標準物質と基準分析法、日常分析法 (酵素法) の相互関連

## 2. 脂質標準化の国際ネットワーク

国際的な脂質標準化プログラムとして、現在、着実に成果をあげているシステムに、CDC(疾病対策予防センター)が組織するUS National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)がある。CRMLNは、2004年6月現在、わが国も含め世界8カ国の合計10の基準分析室から構成されている(表3)。

### ◆主な対象は試薬・標準物質・分析機器などのメーカー◆

CDCは単独で標準化を実施するのではなく、次の組織などから支援と協力を受けている。

- ① 米国政府の商務省に所属するNIST(National Institute of Standards and Technology)
- ② 健康社会福祉省に所属するNHLBI(National Heart, Lung, and Blood Institute)
- ③ 学術組織であるAACCC(American Association for Clinical Chemistry: 米国臨床化学会)
- ④ 学術組織であるNCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)

またCDCは、WHO(世界保健機関)の協力機関(WHO Collaborating Center)としての指定を受け、専門的指導機関として世界的に貢献する。

このCRMLNでは、標準化は検量用標準血清と試薬を組み合わせて市販し、その製品に責任をもつ試薬メーカーを通じて、エンドユーザーである臨床検査室に波及させるのが最も効果的であるとの考えから、プロトコルが作成されている(表4)。したがって、欧米における標準化の対象は試薬・標準物質・分析機器を含めたメーカーである。

表4に示すように、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、トリグリセライドの4項目ともメーカーを対象とした標準化プログラム(Phase-3)が整備されているが、臨床検査室を対象にしたプロトコルは、総コレステロールに限られている(Phase-1)。

プロトコルを通じて得られる成果には高度な統計解析が行われ、判定基準を満たせば国際的な効力をもつ認証書が授与される。米国では、メーカーに対し、認証書の取得はFDA(米国食品医薬品局)による製品販売認可条件のひとつとされている。

Phase-3による標準化の成果は、CDCのホームページ(<http://www.cdc.gov/nceh/dls/crmln/crmln.htm>)に公表される。

表3 CRMLN参加基準分析室(2004年6月現在)

米国グループ:	NWLRL, Northwest Lipid Research Laboratories, Seattle, WA PBRF, Pacific Biometrics Research Foundation, Seattle, WA WCLR, Wadsworth Center for Laboratories and Research, Albany, NY
外国グループ:	LRL, Lipid Reference Laboratory, Rotterdam, The Netherlands (オランダ) OMC, 大阪府立健康科学センター (日本、大阪) IB, Institute of Biochemistry, Glasgow, UK (イギリス) CEQAL, Canadian External Quality Assessment Laboratory, Vancouver, Canada (カナダ) HSR, H.S. Raffaele, Milano, Italy (イタリア) FBA, Fundación Bioquímica Argentina, La Plata, Argentina (アルゼンチン) BIG, Beijing Institute of Geriatrics (中国、北京)

CRMLN: US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network

表4 CRMLNの標準化プログラム

メーカー	Phase	項目	測定方法	標準物質	国際標準化プロトコル	NCEPの判定値		
						正確度	精密度	総合誤差
メーカー	3	TC	Abell-Kendall法	CDC Frozen Pools NIST SRM909	総コレステロール用標準化プロトコル (Nov 2002)	±3% RV	CV ≤ 3%	≤ 8.9%
メーカー	3	HDL	DCM	CDC Frozen Pools	HDLコレステロール用標準化プロトコル (Nov 2002)	±5% RV	CV ≤ 4%	≤ 13%
メーカー	3	LDL	BQ法	CDC Frozen Pools	LDLコレステロール用標準化プロトコル (Jan 2003)	±4% RV	CV ≤ 4%	≤ 12%
メーカー	3	TG	DCM	CDC Frozen Pools	トリグリセリド用標準化プロトコル (Dec 2003)	±5% RV	CV ≤ 5%	≤ 15%
臨床検査室	1	TC	Abell-Kendall法	CDC Frozen Pools NIST SRM909	総コレステロール用標準化プロトコル (June 1994)	±3% RV	CV ≤ 3%	≤ 8.9%

CRMLN : US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network

DCM : Designated Comparison Method (比較対照法)

NCEP : National Cholesterol Education Program  
(米国コレステロール教育プログラム)

RV : Reference Value (目標値)

BQ : Beta-Quantification

NIST : National Institute of Standards and Technology

SRM : Standard Reference Material (標準物質)

CV : Coefficient of Variation (変動係数)

## COMMENT : 試薬メーカーから

# 脂質標準化の認証取得は 世界共通のものさしを得ること

日野浩一

Hino Koichi

第一化学薬品株式会社検査薬営業統括部  
マーケティング部プロダクトマネージャー

### ●脂質標準化プログラムは世界共通のものさし

当社は1995年、世界に先駆けてLDLコレステロール(LDL-C)の直接法による試薬を完成させた。従来、煩雑な操作を必要とする超遠心法や計算式による推定値を使用していたが、この開発により汎用の自動分析装置での測定が可能になった。

私たち試薬メーカーが販売戦略を決定する際に、脂質標準化プログラムの存在は大きな意味をもっている。試薬メーカーにとって脂質標準化プログラムは、グリニッジ天文台の標準時計のようなものだ。この共通のものさしによって、試薬を開発する際の精度の調整が容易になる。もしプログラムがなければ、各社でそれぞれのものさしを構築しなければならない。また、当社は欧米にディストリビューターを擁しており、米国CDC(疾病対策予防センター)の標準化を受けることは不可欠である。海外での販売にも、この脂質標準化の認証取得は大きな武器となっている。

また、いったん脂質の標準化を受けると、有効期限が2年間と定められている。したがって、2年に1回、認証試験を受けることになり、正確度の再確認が出来、精度の維持が可能になる。

### ●試薬メーカー向けの国際標準化プロトコル

US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)の国際標準化プロトコルは、トレーサビリティ (traceability:追跡可能性)を実行するために、正確度の判定に重点が置かれている。試薬メーカーを対象にしたプロトコルはフルサイズ版 (Phase-3)で、TC、HDLコレステロール (HDL-C)、LDL-Cが対象項目である。標準化用の血清は、われわれメーカー側が新鮮血清を準備し、基準分析室に発送することになっている。

判定基準は、TCについて正確度は±3%以内、精密度 (CV)が3%以下、総合誤差 (TE) 8.9%以下と決められ、HDL-Cについては順に±5%以内、4%以下、13%以下となり、LDL-Cに関しては順に±4%以内、4%以下、12%以下と定められている。

当社がCRMLNの認証を受けたことで、顧客には、「小社の製品を使用すれば、CDCが推奨している値が出る」と説明でき、顧客獲得のための付加価値を得た。また、当社の試薬が100%のシェアを占めているわけではないので、同様のメーカーすべてが脂質標準化を受けることにより、どのメーカーの試薬、自動分析装置を使用しても適正な脂質の値が得られることになり、患者さんのメリットにもなる。



### 3. 大阪府立健康科学センター 脂質基準分析室の役割

大阪府立健康科学センターは、2001年7月に開設された市民の健康づくりの拠点施設である。隣接する大阪府立成人病センターに所属していた集団検診第一部が中核となり、同センターに発展したという。この移設を契機に、米国CDC(疾病対策予防センター)が組織するUS National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)に所属する脂質基準分析室が同センターの6階に新設され、脂質標準化の認証試験が大阪府の正式業務のひとつとなった。

#### ◆1975年からWHO/CDC脂質標準化プログラムに参加◆

大阪府立成人病センターの旧集団検診第一部は、1975年、4月からWHO/CDC Cooperative Cholesterol-Triglyceride Standardization Program (CCTSP)に参加が認められた。1977年に総コレステロール、その翌年にトリグリセライドに関して、CDCの標準化を達成し、脂質標準化検査室(International Reference Laboratory)の認定を受けた。

脂質標準化検査室としての資格を得た各国の疫学研究施設は、独自の脂質標準化プログラムを構築し、運用している。成人病センターも循環器疾患の研究の一環として脂質の標準化を行い、班研究の標準化で使用される疫学研究の脂質標準化プログラムを独自に考案している。

CCTSPは1981年にいったん役割を終え、CDC-NHLBI(National Heart,Lung,and Blood Institute)Lipid Standardization Programに引き継がれた。

#### ◆1992年からCRMLNに参加◆

大阪府立健康科学センター脂質基準分析室(当時、大阪府立成人病センター集団検診第一部)は1992年7月から、CDCが組織するCRMLNの参加施設として登録されている(<http://www.cdc.gov/nceh/dls/crmln/memberlabs.htm>)。CRMLNのメンバーとなった脂質基準分析室は、世界中の臨床検査室および試薬メーカーに対して、総コレステロール(TC)、HDLコレステロール(HDL-C)、LDLコレステロール(LDL-C)の認証資格をもつ。

表5のように、臨床検査室を主な対象にしているのはTC(Phase-1)のみである。これは、6濃度、3測定日分の凍結血清を試料とする脂質標準化プロトコルで、同じサンプルを臨床検査室と基準分析室の両方で測定して、臨床検査室の測定精度(正確度、精密度)を判定する。凍結血清を準備するのは、臨床検査室側にあるのが特筆すべき点である。

#### ◆健康科学センターにおける基準分析法の精度◆

CRMLNの脂質基準分析室は、2カ月間に1回のペースで、CDCから測定精度の検定を受けなければならない。検定試験の合格が、臨床検査室や試薬メーカーに対する認証資格を維持できる要件である。基準分析室としての有効期間はわずか2カ月にすぎない。合格の基準は、総コレステロールの正確度が $\pm 1.0\%$ 以内、精密度はCVで1.0%以下とされている。

健康科学センターの測定精度は、1992年7月から2003年7月までの11年間にCDCから送付された濃度未知の血清2,136検体をAbell-Kendall(AK)法で測定し、正確度はCDCに対して% Biasで+0.04%( $n=2,136$ )、絶対% Biasで+0.18%( $n=2,136$ )、精密度はCVで0.21%( $n=2,136$ )で、CDCの認定基準を十分満たすものであった。

同脂質基準分析室の中村雅一氏は、「もし当センターがCDCの認定基準にパスできなければ、CRMLN参加基準分析室は日本から消滅してしまう。米国やその他の国のメンバーに認証を依頼せねばならず、臨床研究にとっては障害となる」と、その重責を十分理解している。

CRMLNの脂質標準化プロトコルにはカバーしていない脂質があるため、同センター脂質基準分析室の中村雅一氏は、「臨床検査室を対象にした脂質標準化の枠を拡大するため、当センターでは検査室が対応しやすいタイプのHDL-CとLDL-Cの標準化プログラム(Phase-2)を独自に開発し、全国的な要望に応じている」と、説明する。

Phase-2は、6濃度・1測定日分の新鮮な非凍結の(原則)個人血清を検体とする標準化プログラムである。Phase-1とPhase-2の内容は、同センターのホームページ(<http://www.kenkoukagaku.jp>)を参照されたい。

Phase-1およびPhase-3の認証書はCDCから、Phase-2のそれは同センターの名前で発行される。

中村雅一氏は、「わが国の臨床試験や疫学研究の成績が国際的に通用するよう、少しでも寄与したい」と、語る。

表5 CDC/CRMLN/健康科学センターによる脂質標準化プロトコルの構造

Phase	Scope	① 標準化の希望施設	② 標準化の希望地域	③ 検査項目	④ 申込方法	⑤ 検査方法	⑥ 標準物質	⑦ 標準化プロトコル
1	ミニサイズ	CDC/CRMLN /健康科学センター	臨床検査室 世界	TC	常時受付	Abell-Kendall法	NIST SRM 911b	CDC/CRMLNで開発
2	ミニサイズ	健康科学センター	臨床検査室 アジア諸国	HDL-C	予約制	DCM	NIST SRM 911b	健康科学センターで開発
				LDL-C		BQ法		
				TG	未定	DCM	NIST SRM 1595	
3	フルサイズ	CDC/CRMLN /健康科学センター	試薬メーカー 臨床検査室も 参加できます 世界	TC	予約制	Abell-Kendall法	NIST SRM 911b	CDC/CRMLNで開発
				HDL-C		DCM		
				LDL-C	BQ法			
				TG	未定	DCM	NIST SRM 1595	

Phase	① 標準化の希望施設	② 標準化の希望地域	③ 検査項目			④ 検査方法	⑤ 標準物質	⑥ 有効期間	⑦ 費用
			精度	CV	検出限界				
1	標準化希望施設で新鮮血清を準備し、大阪へ発送 ・6濃度 (2重測定/検体) ・要測定日数: 3日 ・凍結輸送可	CDC/CRMLN で開発	±3%以内	3%以下	0.975 以上		6カ月	CDC/ CRMLN	26,000円 (300ドル)
2	臨床検査室で準備する場合と健康科学センターで準備する場合の2コースがあります ・6濃度 (4重測定/検体) ・要測定日数: 1日 ・冷蔵輸送 (TGは凍結輸送可)	健康科学センター で開発	±5%以内	4%以下			1年	健康科学 センター	36,000円 (360ドル)
			±4%以内	4%以下					42,000円 (420ドル)
			±5%以内	5%以下					未定
3	試薬メーカーで新鮮血清を準備し、大阪へ発送 ・40検体以上 (2重測定/検体) ・要測定日数: 1カ月間 1回/週 計5回測定 ・TCとTGは凍結輸送可 ・HDL-CとLDL-Cは冷蔵輸送	CDC/CRMLN で開発	±3%以内	3%以下		8.9%以下	2年	CDC/ CRMLN	352,000円 (3,200ドル)
			±5%以内	4%以下		13%以下			440,000円 (4,000ドル)
			±4%以内	4%以下		12%以下			440,000円 (4,000ドル)
			±5%以内	5%以下		15%以下			未定

CDC: Centers for Disease Control and Prevention  
CRMLN: US Cholesterol Reference Method Laboratory Network  
健康科学センター: 大阪府立健康科学センター  
NIST: National Institute of Standards and Technology

SRM: Standard Reference Material  
NCEP: National Cholesterol Education Program  
DCM: Designated Comparison Method (比較対照法)  
BQ: Beta-Quantification

## 臨床家の標準化に対する理解が不十分

小町喜男

*Komachi Yoshio*

大阪府立健康科学センター顧問・筑波大学名誉教授

先般、『週刊朝日』でコレステロールの基準値の問題が提起されたが、私たちは30年以上も前から「脳出血の患者のコレステロール値は低く、心筋梗塞の患者のほうは高い。コレステロール値が低すぎると脳出血が起こりやすい」と主張してきた。私たちは、主張する脂質値の信頼を得るために、米国の脂質標準化プログラムに参加する必要があった。私の名前でプログラムに登録したので認証書は私の名前であったが、実際に測定を担当してくれたのは脂質基準分析室ディレクターの中村雅一氏である。今夏、米国CDC(疾病対策予防センター)から表彰されるとのこと、大変喜ばしい。

### ●1970年代初頭：世界に理解されなかった日本の特殊性

1971年ころ、ジュネーブに十数カ国が集まり、脳卒中の診断基準を検討した。各国が種々の症例を呈示し合い、それぞれ全症例の診断を行い、照合した。各国の診断が一致しているか判断するために、私たちは同一症例を何回か繰り返し呈示したりもした。いわば診断の標準化で、そこで初めて日本の脳卒中の診断基準が欧米諸国と変わらないことが明らかになり、これによって、日本人に脳卒中の多いことが世界的に認められたのである。

それまでは、心筋梗塞を脳卒中と取り違えていないかと疑われたり、日本国内でさえ、ある研究者が県庁所在地は脳卒中死亡率が低く距離が離れるほど高くなるから、都会より農村に脳卒中が多いのは診断がいい加減だからだ、というような論文を発表したりしていた。つまり、世界的に標準化された診断基準がなかったため、とんでもない誤解をされていた。

私が国際的な脂質標準化プログラムに参加するよう助言を受けたのは、メリーランド大学医学部に留学中の富永祐民氏からだ。彼の指導教授はミネソタ大学のBlackburn教授(循環器疾患の疫学研究)と交流があり、彼はBlackburn教授からCDCが世界的に脂質の標準化を行うという情報を得た。当時、脂質値の高低を議論するといっても、測定施設によって差があった。自動分析装置などなかった時代であり、測定者どうしが互いに「相手の測定方法が悪い」と言い合っているような状態であった。脂質に関する日本人の特徴、

つまり日本人のコレステロール値は欧米人と比較して何度測定しても低いということ、世界に認めさせたかった。

それ以前にも、私たちはBlackburn教授と親交があったので、米国における心疾患に関する疫学調査がNIH(国立衛生研究所)を中心に組織されたLipid Research Clinics(LRC) Programの外部精度管理システムを利用して、脂質の標準化を実施していることは聞いていた。しかし、当初の脂質標準化プログラムは、LRC Programに参加する北米の12の疫学研究施設に限られていた。その後、標準化された疫学調査成績が発表されるにつれ、脂質測定の標準化が世界的に注目されだし、国際的なプログラムへと発展した。

### ●臨床家の標準化に対する認識が低い

私は、検査や診断にかかわる標準化の必要性について、本来なら理解すべき臨床家が十分に認識できていないことがあるという印象をもっている。循環器疫学の研究者として以前よりその必要性を説いてきたが、現在でもあまり変わっていない。最近も、知っていてしかるべき研究者から、「標準化とは何か」という問い合わせを受けたところだ。

国際的な標準化の例に、ミネソタコードによる心電図の判定がある。これは、百いくつに分類された心電図所見を数字の並びによって表現する、世界共通のコードである。当初、日本の研究者たちの関心は低く、WHO(世界保健機関)経由で大阪府立成人病センターに紹介されてきたので、私が日本で初めて採用した。現在は、心電図の機械にコード分類のソフトが組み込まれていることが多く、集団検診などのスクリーニングで大量のデータを処理するのに有用である。

脂質の標準化を実施し始めた当初、周囲の理解が不十分であったので、スペース、機材、人員など、すべてにおいて問題が多かった。CDCが脂質の標準化を推進し、これを受けて合格していない論文は世界の一流誌には掲載されにくいという状況になってきたので、徐々にではあるが整備されている。理解も広まっているが、まだまだ不十分である。

大阪府立健康科学センターは、日本で唯一のCDCから認証を受けた脂質標準化検査室なので、認証依頼が集中してもよいように、体制を整えている。

## 4. 標準化と臨床研究

### ◆欧米の臨床研究では標準化の実施が一般的◆

CDC(疾病対策予防センター)の基準分析法で設定された正確度や血清の目標値は、基礎的な調査、疫学共同研究、長期臨床試験などの基準として欧米諸国に普及し、世界的には評価が定着した感がある。例を挙げると、20年以上も前にJAMAに発表された臨床試験MRFIT(Multiple Risk Factor Intervention Trial)の論文には、“In 1972 and 1973, awards from the NHLI(later the National Heart, Lung, and Blood Institute, or NHLBI) were made to 22 clinical centers, a coordinating center, a laboratory center, a laboratory standardization center, and two electrocardiograph centers.”と記載され、CDC-NHLBI Lipid Standardization Programによる標準化がなされたこ

とが明示されている。また1995年11月にThe New England Journal of Medicineに掲載された臨床試験WOSCOPS(West of Scotland Coronary Prevention Study)の論文には、Laboratory Analysesの記述に“The laboratory was certified through the Lipid Standardization Program of the Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta.”が含まれている。

欧米の著名な学術雑誌にこれまで発表された心血管系疾患に関する臨床試験成績の約70%が、CDCの脂質標準化を受けているという。一方、わが国の学術研究のいくつかは、標準化の必要性と重要性に十分配慮しているとはいいがたい現状がある。中村氏は、臨床試験に投入された努力が無駄になると、危惧している。

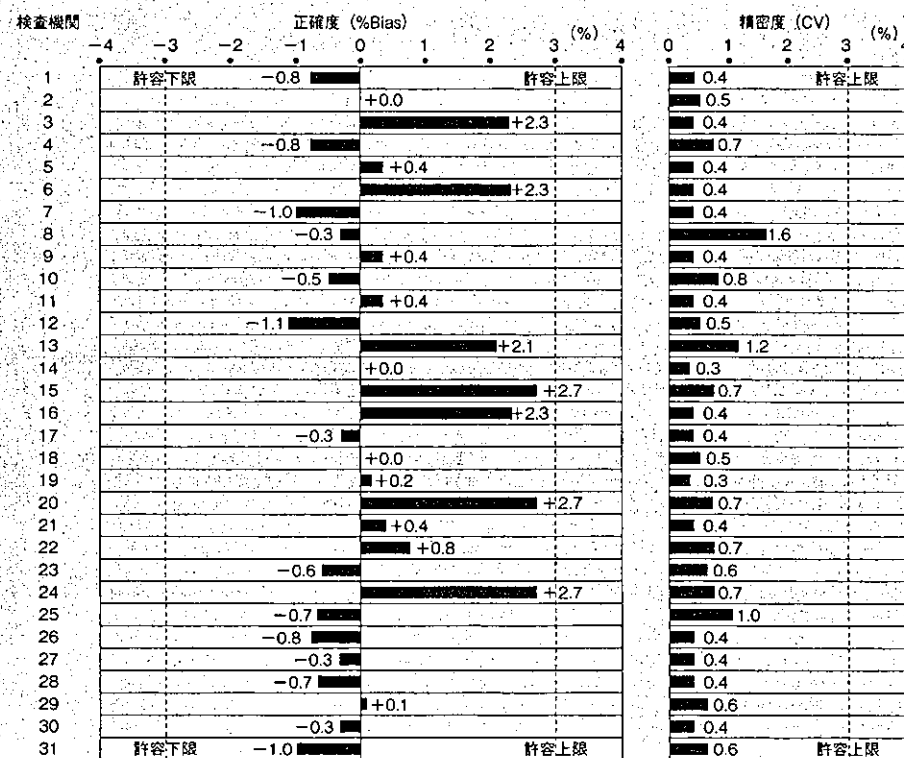


図5 1研究班における総コレステロール(Phase-1)の測定精度(中村雅一ほか:Pharma Medica 2003;21(9):29より引用)

◆CDCに参加臨床試験を報告◆

大阪府立健康科学センター脂質基準分析室が標準化の努力を行った臨床研究には、国立循環器病センターから委託された「9指-3循環器疾患に対する新しい危険因子及びその評価方法に関する研究」および「12公-1動脈硬化性疾患の動向、スクリーニング法及び危険因子との関連に関する研究」がある。ここでは、総コレステロール、HDLコレステロールの標準化と、疫学的に新しい検査手技の頸動脈超音波検査と、マルチプルリスクファクター症候群に関連してインスリン抵抗性に取り組んだ。特に頸動脈超音波検査については、「頸動脈エコーによる動脈硬化性病変のガイドライン(案)」という成果の一端を担えた。

CRMLNの参加施設でもある同脂質基準分析室には、CDCから毎年、参加している臨床研究の問い合わせがある。例えば、現在進行中のPhase IIIの臨床研究「脳血管疾患の再発に対する高脂血症治療薬HMG-CoA還元酵素阻害薬の予防効果に関する研究(J-STARS)」は、臨床試験名とともに主任研究者の名前が、CDCに登録されているという。

図5と図6は、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室のデータから、ある研究班における総コレステロール

(Phase-1)とHDLコレステロール(Phase-2)の測定精度を、検査機関別に正確度と精密度に分けて示したものである。図5の総コレステロールでは、この研究班に登録されている44施設の検査機関中31施設(70.5%)が標準化状況にあることが示されている。測定精度を構成する正確度を基準分析法の目標値に対する% Biasで、また精密度を変動係数(CV)で表した場合、この研究班における総コレステロールの平均% Biasは+0.34%(n=31)、平均CVは0.57%(n=31)であり、参加施設全体での正確度の最大値と最小値の幅は3.9%であった。一方、HDLコレステロール(図6)では、登録された44施設中29施設(65.9%)が標準化を達成し、その測定精度は平均% Biasが+0.14%(n=29)、平均CVは1.14%(n=29)であった。また、全参加施設における正確度の最大値と最小値の幅は7.6%であった。

以上のように、測定値の正確度も精密度もともに判定基準を満たしているため、この研究班の測定精度は十分であり、国際的な互換性があると判断された。これが、国際標準化の一例であり、その成果である。論文執筆時にその事実を記載すれば、欧米諸国の研究者にも共通の理解が得られるであろう。

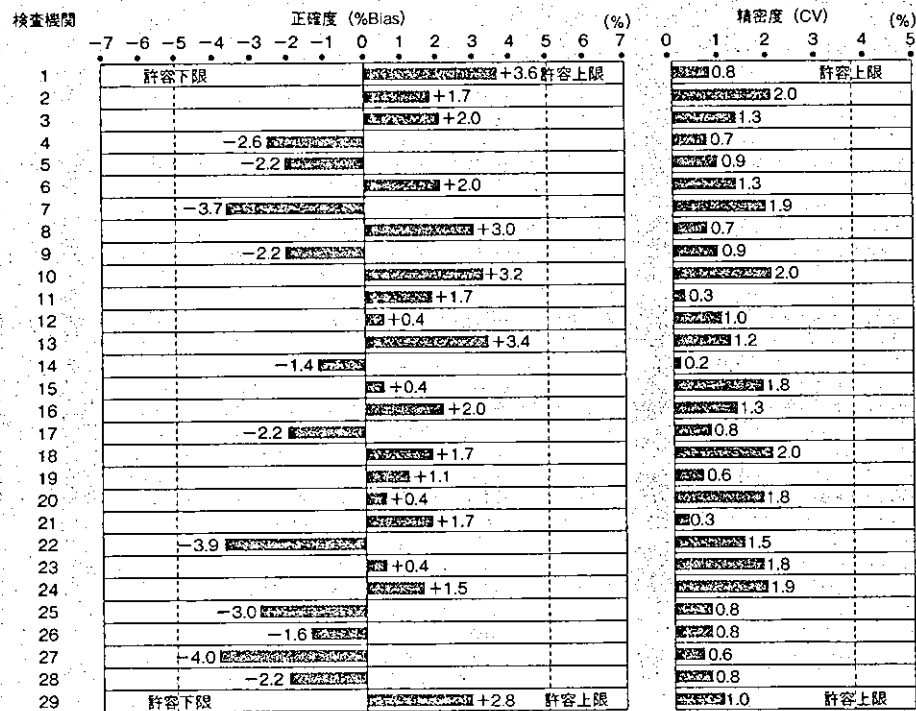


図6 1研究班におけるHDLコレステロール(Phase-2)の測定精度(中村雅一ほか:Pharma Medica 2003;21(9):29より引用)

## 臨床研究や臨床上の議論に必須となる脂質の標準化

松本昌泰

Matsumoto Masayasu

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻  
病態探究医科学講座脳神経内科学教授

私は現在、「脳血管疾患の再発に対する高脂血症治療薬HMG-CoA還元酵素阻害薬の予防効果に関する研究(J-STARS)」の主任研究者として、臨床試験を進行している。そのため、脂質測定値の標準化を、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室に依頼した。参加施設すべてに脂質の標準化を行うにあたり、かなりの予算を割いた。脂質の標準化に関する理解が広まっているとはいええない現状で、その予算配分にはかなりの困難を要した。

## ●研修医時代に知った施設間の格差

大阪大学医学部附属病院に勤務していたころ、国立循環器病センターが中心となって行った「動脈硬化性疾患の動向、スクリーニング法及び危険因子との関連に関する研究」に参加した。そのとき、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室の中村雅一氏から、脂質測定値の標準化について伺った。特に米国CDC(疾病対策予防センター)が予算を出して国際的なネットワークであるCRMLN(Cholesterol Reference Method Laboratory Network)を組織していること、脂質の標準化を行っていない臨床試験結果は海外の一流誌に掲載を許可されないことを聞き、多少の驚きとともに大いに得心した。

というのは、私は研修医時代にある先生から、「阪大病院の感覚でワーファリンを処方すると、他のいくつかの病院では、出血が多いような印象がある」と、臨床検査値における施設間の格差についても聞いていたからである。

## ●ワーファリンのモニタリングで知った国際的な標準化

同様に国際的な標準化に関し、私の専門領域で身近なものにWHO(国際保健機関)によるPT(プロトロンピン時間)-INR(International Normalized Ratio)の採用があった。現在、ワーファリンによるコントロールの指標として、TT(トロンプテスト)、PT(Racio)、PT-INRが用いられている。わ

が国では、ワーファリンのモニタリングのために開発され、取り扱いが簡便なTTが普及しているが、臨床試験などでは施設間で格差が存在することが問題となっている。

一方PT-INRは、それまでのPT(Racio)のもつ問題点や施設間や試薬間の格差を是正するために考案されたものである。PT-INRは1982年にWHOに採用され、1984年には国際血液学会標準化委員会、国際血栓止血学会標準化委員会によって“経口抗凝固療法ガイドライン”が作成されるまでに至った。日本には1985年に紹介されたが、TTが普及していたこと、多国間移動の多いEUなどと異なり施設間の格差による混乱が生じていなかったため、それほど関心も高まらず広まりもしなかった。最近になってようやく、学会発表や論文投稿にPT-INR結果の記載が一般的になってきた。

同一施設内における日常診療ではあまり問題にはならないが、臨床試験や臨床研究を実施するうえでは、施設間や試薬・測定機器間の格差の是正は大きな課題である。

## ●国際拠点としての米国CDC(疾病対策予防センター)

標準化の重要性とともに私が強調したいのは、標準化の国際的な拠点として機能する米国CDCである。CDCといえば、まず感染症対策が想起されるが、国際的なネットワークの参加施設となった大阪府立健康科学センター脂質基準分析室に対して、年6回の検体の送付をはじめ、少なからぬ資金を投入している。これは、WHOの協力機関に指定されているからともいえるが、久山町研究に多大な援助を行ったNIH(国立衛生研究所)と同様、米国の疫学研究に対する関心の高さがうかがえる。

近年、新薬の認可、薬物投与量の設定などにおいて、人種差が問題にされ、欧米のデータがわが国にそのまま流用できるかどうか議論されている。その議論のためにも、脂質値をはじめ、臨床検査値の標準化は重要であろう。

# LDL コレステロールの実用基準分析法を開発

櫻林郁之介

*Sakurabayashi Ikunosuke*

自治医科大学附属大宮センター臨床検査部教授

動脈硬化性疾患のリスクファクターとして、LDLコレステロール (LDL-C)、いわゆる悪玉コレステロールは、総コレステロールとともに重要視されてきた。近年までLDL-Cは計算式を用いて間接的に算出していたが、日本のメーカーが試薬を開発し、自動分析装置により直接LDL-Cが測定できるようになった。その後、他の会社も追随したので、世界で数社の測定キットが使用されている。

## ●求められる簡便な実用基準分析法

LDL-C測定において自動分析装置が利用可能になったことは臨床検査を行う者にとっては福音ではあるものの、採用した測定キットによってLDL-C測定値が異なるという報告も散見される。そのため、測定値を標準化する実用基準分析法 (reference method) の必要性が浮上してきた。米国においては、CDC (疾病対策予防センター) のLDL-C測定法が、NCEP (National Cholesterol Education Program) のLDL-C測定値の判定基準として使用されている。あるいは、CDCが組織するCRMLN (Cholesterol Reference Method Laboratory Network) では、試薬などのメーカー向けの実用基準分析法として、Beta-Quantification (BQ) 法がある。しかし、これら2法で高精度を得るためには技術、労力や特別な器具・試薬を必要とし、一般の検査室には適さない。そこで、日本臨床検査医学会の標準委員会脂質・リポ蛋白ワーキンググループ、福祉・医療技術振興会などが中心となって、実用的な基準分析法の開発を行った。福祉・医療技術振興会は、私が責任者を務める非営利団体で、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室の中村雅一氏も所属している。これまで種々な標準物質などの研究・開発に取り組んできた。

## ●LDL-Cのもつ測定の困難さ

私たちは数年前にもHDLコレステロールの実用基準分

析法を開発した。しかし残念ながら、米国にその必要性を認めさせることが出来ず、臨床検査医学領域で著名な雑誌 *Clinical Chemistry* に論文が掲載されなかった。今回のLDL-Cの測定法に関する論文は、ぜひとも採用されることを願っている。

LDL-Cの測定で難しいのは、方法論ではなくて、純粋にLDL-Cに限って測るのか、それとも異常なLDL-Cも一緒に含めるのかという問題である。私たちの目的は動脈硬化を促進する因子を求めることであるが、動脈硬化を促進するような異常なLDL-Cも測定するかどうかで、研究者の意見が分かれる。そのあたりで、私たちの論文が掲載されるかどうか、決まってくるであろう。また、日常的に使用可能な実用基準分析法の必要性を、米国が理解するかどうかということにもかかっている。

朗報といえば、沈殿法に使用する非常に質の高い試薬が完成しつつあり、米国が関心をもっていることである。さらにコレステロールの一般的な測定系は酵素法であるが、最近、日本人が精度の高い酵素法を開発し、*Clinical Chemistry* に論文が採用された。私たちはその方法をLDL-C測定にも踏襲している。私たちが現在使用している質の高い沈殿剤、そして精度の高いLDL-Cの測定系の2つがうまく一緒になれば、良い結果が出ると考えている。

臨床検査値のなかでも脂質は重要な意味をもつ。その事実是一般の人々にもかなり浸透していて、自分のコレステロール値を知らない人はほとんどいない。動脈硬化性疾患のみならず、他の疾患に対する影響も解明されつつある。例えば総コレステロール値が160mg/dL未満の65歳以上の高齢者は、精神神経疾患にかかりやすいという、東京都老人総合研究所のデータも出ている。標準化された脂質測定値を使用した研究成果が期待されている。

## 長期間の健診結果を比較するには 標準化と精度維持が重要

中村治雄

Nakamura Haruo

三越厚生事業団常務理事・防衛医科大学校名譽教授

私たちはこの2004年5月、コレステロール値の変動、および脳卒中あるいは心臓病の発症率について、薬物治療の有無による差を検討するための、約8,000例を対象にしたメガスタディを終了した。この一部の結果を英文誌に投稿したところ、参加施設は脂質の標準化を行ったかという問い合わせがあった。われわれはきちんと標準化を受け1施設で集中測定していたので、問題はなかった。

### ●日常診療と標準化

私が常務理事を務める三越厚生事業団の三越診療所は約4年前、防衛医科大学校から移ってきた時点で、大阪府立健康科学センター脂質基準分析室に依頼し、脂質の標準化を受けた。診療所レベルの検査室で認証を受けているのは、全国で1,500程度と聞いている。

当施設では、患者さんが紹介されてきた場合、紹介状に脂質の検査結果が添付されていたとしても、インフォームドコンセントを行ったうえで再検査を実施している。脂質値を改めて測定すると、薬物治療が必要だといわれていた患者さんでも経過観察だけでよい場合や、その逆のケースなど、紹介先の結果と食い違うことが少なくない。脂質の真の値を知るために、必ず当施設の測定結果を重視している。

ひとりの患者さんを同一施設内で長期間診療する場合など、日常診療では標準化を受けていなくてもあまり不都合は感じない。しかし、薬物治療を行うかどうかの判断では、標準化を受けていない施設では患者さんに不利益が生じるかもしれない。

一般の実地医家は診療所内に検査室を設置していることは極めて少なく、(株)エスアールエルや(株)ビー・エム・エルなど、一般の臨床検査会社に依頼することが多いと思う。臨床検査会社は当然標準化を受けているから、まず問題はないといえる。

### ●標準化と精度維持が重要

当診療所は標準化を受けた時点では、臨床検査結果の精度の確保という面でそれほど困難さを感じなかった。しかし、その精度を維持することに、かなり労力が必要であった。なぜなら、年2回、同様の検査を受け合格しなくてはならないからである。特に分析機器のメーカーを変更した際には、その時点で合格するかどうか、少々不安があった。検査技師が検体を同様に測定したとしても試薬や測定機器が異なれば、違う結果が出る可能性も否定できなかったからである。ドイツのメーカーだったが、そのメーカーでも初めてのことで、無事認証されたことを安堵した。

健康診断・人間ドックなどでは、脂質の標準化への配慮より、測定の効率性や原価を優先しがちである。正直なところ、より測定単価の低いものへと傾きがちだ。同一施設あるいは多施設にかかわらず、長期にわたる健診結果を比較する際に、標準化を受けていないと、その個人の脂質値の変動か、精度維持がなされていないがための差なのか、見分けがつかない。ただ測定していればフォローできるというわけではなく、他年度とも比較できるように、標準化と精度維持は実施されている必要がある。

臨床検査会社や健診センターなどは、脂質の標準化を受けているという事実が、ある意味で付加価値になるので問題はないが、大学附属病院など、本来きちんと標準化されるべき研究施設が受けていないという印象がある。私が防衛医科大学校に勤務していた時に行った埼玉県内の調査では、測定値にかなりのバラツキがあった。薬物治療の開始時期や治療効果の判断では、標準化されていることが不可欠だ。今春、『週刊朝日』で話題になった基準値などの設定には、特に重要である。



# Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1) in Adenosine Diphosphate-Activated Platelet Adhesion to Human Brain Microvascular Endothelial Cells Under Flow In Vitro

NORIO TANAHASHI<sup>1</sup>, YOSHIAKI ITOH<sup>1</sup>, HIDEKI SATOH<sup>1</sup>, TAKATO ABE<sup>1</sup>,  
HIDETAKA TAKEDA<sup>1</sup>, MINORU TOMITA<sup>1</sup>, and TATSUYA SAWAMURA<sup>2</sup>

*Key words.* Platelet adhesion, Human brain microvascular endothelial cell, Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, Video-enhanced contrast microscopy, Adenosine diphosphate

## Introduction

We previously observed that activated platelets adhered to human brain microvascular endothelial cells (HBEC) under flow in vitro using video enhanced contrast (VEC) microscopy [1], and we showed that a platelet glycoprotein (GP)IIb/IIIa antagonist ameliorated platelet adhesion to HBEC [2]. The molecular mechanism of platelet adhesion to endothelial cells is still not fully clarified. Recently, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) was identified in endothelial cells [3] and platelets [4]. It was also found that negative phospholipids exposed at the surface of platelets on activation are epitopes of LOX-1 [5], and LOX-1 could work as an adhesion molecule for platelets. The purpose of the present study was to examine the role of LOX-1 in platelet adhesion to HBEC.

---

<sup>1</sup>Department of Neurology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>2</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8566, Japan

## Methods

Human brain microvascular endothelial cells in the third passage were purchased (Applied Cell Biology Research Institute, USA). They were cultured with medium (HuMedia-EG, Kurabo, Japan) and at the end of the fourth passage, the cells were disseminated at a concentration of 5000 cells/cm<sup>2</sup> on glass slides coated with collagen. After 5–7 days, when the cells were confluent, they were used for the experiment. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) were prepared from venous blood from normal adult volunteers. Platelet-rich plasma was diluted with PPP to give a final concentration of 300 000/μl. To evaluate platelet adhesion at high magnification, we employed a VEC microscopy system, which consisted of an inverted Nomarski microscope (Axiovert 135, Carl Zeiss, Germany), objective lenses for differential interference contrast, insertion lenses, and a halogen lamp. For image analysis, a charge-coupled device (CCD) camera (C3077, Hamamatsu Photonics, Japan), an image analyzer (Argus-10, Hamamatsu Photonics), and an S-VHS video recorder were used. This VEC microscopy system enabled us to observe cells on a slide glass at a maximum magnification of ×12 000. On the microscope stage, a slide glass with endothelial cells in an observation chamber was mounted. Perfusate was pumped from one end to fill the chamber. The drainage was collected from the other end, so that perfusate flowed over the endothelial cells at a constant rate. To quantify the degree of platelet adhesion to HBEC, the number of adhering platelets in a field 30 μm in length and breadth was counted. One hundred consecutive fields (10 × 10) were counted and the average number was calculated. In the case of platelet clusters, only the superficial platelets were counted. A large mass of more than 100 platelets was counted as 100 platelets. In the control group (*n* = 7), HBECs were cultured on a coverglass and put in the observation chamber for VEC microscopy. Then, PRP was superfused with an infusion pump at a low shear rate (10/s) for 30 min and washed out. Interaction between platelets and endothelial cells was observed by VEC microscopy and the number of platelets that adhered to HBEC was calculated. In the adenosine diphosphate (ADP) group (*n* = 7), PRP with ADP (2 μM) was superfused for 30 min and platelet adhesion to HBEC was observed. In the anti-LOX-1 group (*n* = 5), PRP with ADP (2 μM) plus JTX92 (10 μg/ml; antihuman LOX-1 antibody) was superfused for 30 min and platelet adhesion to HBEC was observed.

## Results

In the control group, platelet adhesion to HBEC was rarely seen. However, ADP-stimulated platelets adhered to HBEC (Fig. 1). As shown in Fig. 2, anti-human LOX-1 antibody inhibited adhesion of ADP-activated platelets to

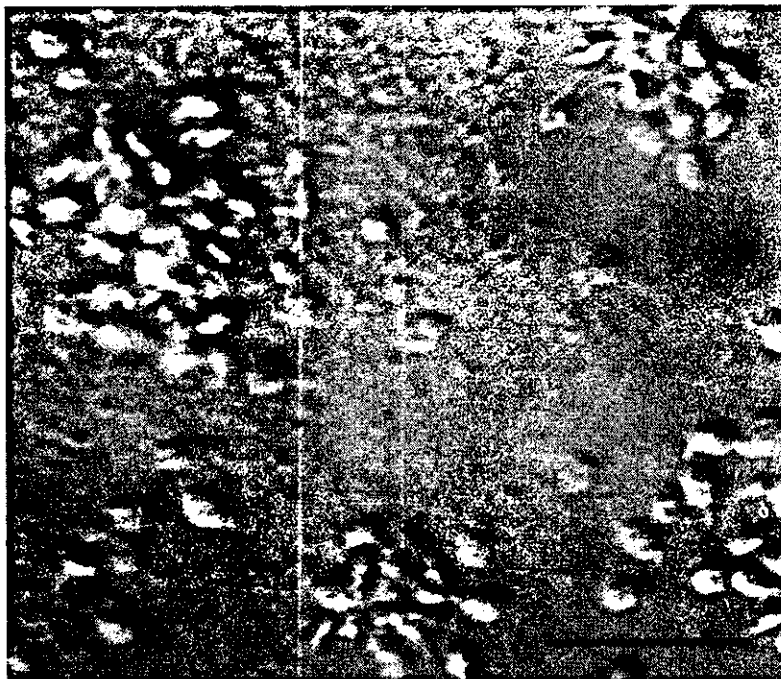


FIG. 1. The adhesion of platelets on HBEC was clearly seen in the adenosine diphosphate (ADP) group. Microaggregates of platelets were also seen. Scale bar = 10  $\mu$ m



FIG. 2. Platelet adhesion was rarely seen in the anti-LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) antibody group. Scale bar = 10  $\mu$ m

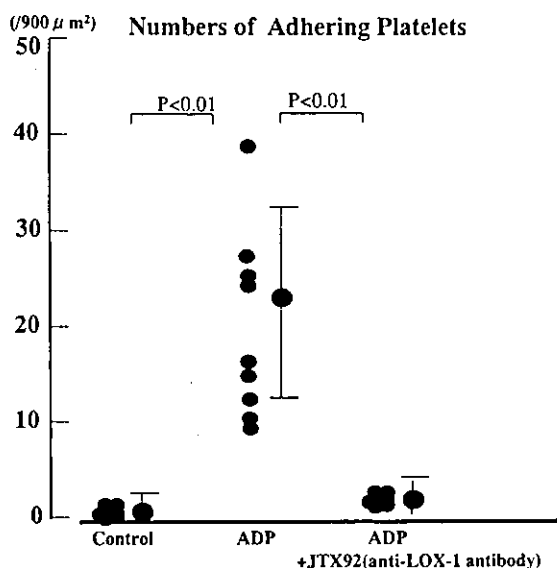


FIG. 3. Number of platelets adhering to endothelial cells after washout in each group. The average numbers of adhering platelets in the anti-LOX-1 antibody group was significantly ( $P < 0.01$  by Student's *t*-test) smaller than in the ADP group

HBEC. Figure 3 shows a comparison of the number of adhering platelets among groups. The average number of platelets adhering and aggregating to endothelial cells was  $0.3 \pm 0.6/900\mu\text{m}^2$  in the control group,  $22.3 \pm 10.4/900\mu\text{m}^2$  in the ADP group ( $P < 0.01$  vs control group), and  $1.8 \pm 2.5/900\mu\text{m}^2$  in the antihuman LOX-1 antibody group ( $P < 0.01$  vs ADP group).

## Discussion

The present study showed that LOX-1 is closely related to the molecular mechanism of activated platelet adhesion to HBEC under flow in vitro, and might work as an adhesion molecule for platelets. We previously reported that GPIIb/IIIa receptor and P-selectin play important roles in platelet adhesion to HBEC [2,6]. We consider LOX-1 might be a third mechanism for activated platelet adhesion to HBEC under flow. Upon activation, platelets could adhere to HBEC through GPIIb/IIIa receptor, P-selectin or LOX-1. Kakutani et al [5] verified that negatively charged phospholipids exposed on the surface of activated platelets are epitopes for LOX-1, and Shimaoka et al [7] found that LOX-1 supports cell adhesion to fibronectin in an integrin-independent manner. We need further studies to clarify in detail the role of LOX-1 in the molecular mechanisms of activated platelet adhesion to HBEC. Antihuman LOX-1 antibody significantly reduced activated platelet adhesion to HBEC at a low-flow state in vitro, indicating that LOX-1 plays an important role in activated platelet adhesion to HBEC.