

non-HDL 等血中脂質評価指針及び脂質標準化システムの構築と基盤整備に関する研究

研究分担者 西村 邦宏 国立循環器病研究センター 予防医学・疫学情報部室長

研究要旨

循環器疾患の発症リスクを予測するスコアである Framingham Risk Score の発表以降も新たな CHD リスク要因が指摘されている。また日本人における循環器発症リスクは欧米人と大きくことなり、喫煙率もアジア人で高いことが知られている。日本人の発症リスクに関して先行研究は農村部のデータを中心としており、一般に都市部住民より循環器発症リスクの低いことが知られている。日本人の循環器疾患発症リスクの予測のために吹田研究のデータ（5886 人）の 1989 年から 2007 年までのフォローアップデータにより、フラミンガムリスクスコアに習った予測スコア（吹田スコア）を開発した。慢性腎臓病の有無、を含めた場合のリスクスコア診断能改善についても検討した。解析には Cox 比例ハザードモデルによる調整ハザード比を用い、変数選択には stepwise 法を用いた。更に LDL のカテゴリー分類を動脈硬化学会ガイドラインの 2012 年版に基づき分類を行った。

フラミンガムスコアに含まれる変数、および CKD はすべて有意な予測因子となった。吹田スコアはフラミンガムスコアより有意に良好な CHD の予測能を示し、CKD をカテゴリーとして加えた場合により有効であった。オリジナルのフラミンガムスコアは特にリスクの高い対象者で心リスクを過剰に予測していた。

A. 研究目的—燃え尽き症候群に関して

フラミンガム研究は、古典的リスクによる 10 年間の冠動脈疾患発症のリスクスコアを発表しており、広く臨床応用されている。(Circulation. 1998;97:1837-1847) しかし、99% が白人であるコホートによるため、他の人種には必ずしも当てはまらず、リスクの低い国では過大評価となることが知られている。(Eur Heart J. 2003;24:937-945)。日本人では、発症のリスクが欧米人に比べて低いことから、過大評価の程度が大きいことが予想されるが、これまで日本人に対して、フラミンガムリスクスコアの妥当性に関して検討は行われてい

なかった。今回我々は吹田研究のデータを用いた同種のリスクスコアを作成し、フラミンガムスコアと比較して、その予測精度を検討した。

B. 研究方法

吹田研究は、1989 年より 12200 人の吹田市民をランダム抽出し同意を得た 30 才から 79 才の参加者 6485 人を 1989 年から 1994 年にかけてベースライン調査を行い、その後フラミンガム研究と同じく 2 年ごとの追跡調査を行っている。今回は追跡を行った 5,866 人の参観者(男性 2,788、女性 3,078)の追跡データをもとに研究を行った。

総コレステロール、HDL、TG、空腹時血糖、血圧、喫煙歴、Creを用いた。

年齢、Creにより次のようにeGFRを計算した

$$\begin{aligned} \text{eGFR (ml/min/1.73 m}^2\text{)} &= \\ 0.881 \cdot 186 \cdot \text{age}^{-0.203} \cdot \text{Cre}^{-1.154} &\text{ (for men)} \\ \text{eGFR} &= 0.881 \cdot 186 \cdot \text{age}^{-0.203} \cdot \text{Cre}^{-1.154} \\ &\cdot 0.742 \text{ (for women).} \end{aligned}$$

CKD stage はK/DOQI clinical practice guidelinesにより計算し、CKDは次のように分類した。

Stage 3 CKD (eGFR 30–60 ml/min/1.73m²)

Stage 4 / 5 CKD (eGFR <30ml/min/1.73m²).

これに加えて、Freidewald式によるLDLをもとに、コックス比例ハザードモデルを作成した。10年間の発症リスクに関しては、次の式を用いて発症確率を計算した。

$$\text{式 1 } P=1-S(t) \hat{\exp}(X, M) \quad f(X, M) = \beta_1 \cdot (X_1 - M_1) + \dots + \beta_n \cdot (X_n - M_n),$$

S(t)は吹田コホートにおける生存関数、;

$\beta_1 \dots \beta_n$ はコックスモデルによる回帰係数であり、 $M_1 \dots M_n$ は吹田研究における各リスクファクターの平均値である。

予測精度に関しては、コックスモデルのC-statisticsと、モデルのd Bayesian information criteria (BIC)により比較した。更にCKDを変数に組み入れた場合など予測性能向上にかんして、臨床的な再分類向上の程度を、より正確に診断能を測定できるnet reclassification improvement (NRI)を用いて分類した。(Clinical chemistry, 2008;54:17-23)

C. 研究結果

リスクスコアの作成

吹田研究の参加者の特性を表1に示した。表2にCKDを加えた吹田研究によるコ

ックスモデルの回帰係数を示した。オリジナルのFRSにくらべ、高血圧のリスクにより大きな重みがあり、日本人のリスクにおいて、高血圧の比重が高いことが示唆された。LDL、HDLのカットオフに関しては、日本動脈硬化学会のガイドラインに準じた。この回帰係数を10倍し、各参加者の測定値に掛けた値を合算した後、10分の1に割り戻して式1に代入し発症確率を計算したものをもとに、臨床用に簡易に10年後の発症確率を計算できるスコアを開発した(吹田スコア)(表2)。

LDLを用いた吹田スコアのC-statistics(生存解析におけるAUCに相当)は0.831であった。これはTCを用いたスコアと同様の結果であった。(P=0.0256)。

CKDを用いた場合と用いない場合のC-statisticsは前者が若干高く、(0.835 vs. 0.833)。NRIでは約40%精度が向上していた。

フラミンガムリスクスコアとの比較

図1に吹田研究とフラミンガム研究の絶対リスクの差を示す。吹田研究の発症率がフラミンガムコホートにくらべ、非常に低いことがわかる。フラミンガムコホートの発症率は1000人年あたり8.94であるのに対して、吹田研究では2.81である。

図2に、フラミンガムスコア(FRS)、吹田研究の平均値により補正したフラミンガムスコア(recalibrated FRS)、吹田スコアと実際の発症確率を示す。

Hosmer-Lemeshow chi² testにより比較を行うと、FRS、recalibrated FRSの予測精度は吹田スコアに比べて有意に低かった。(both p < 0.001)。実際の発症確率にくらべて、吹田研究のリスクの平均値で補正した

場合、もっともリスクの高いグループで、13.9%発症確率を過大評価していた。オリジナルのFRSでは14.5%過大評価していた。それに対して、吹田スコアと実際の発症確率には有意な差はなかった。(p=0.18) 各分位で一番大きくずれた場合でも2%以内の差であった

D. 考察

今回の研究で、日本人を対象としたCKDをリスク因子として含む、新しい冠動脈疾患発症のリスクスコアを開発した。NIPPON DATA 80のリスクスコアが、死亡をアウトカムとしているのに対して、発症をアウトカムしていることから、補完する役割を果たすと考えられる。日本人は、フラミンガム研究の対象より循環器疾患の発症リスクが低いことから、フラミンガムリスクスコアを用いた場合には、過大評価となることを日本人に置いて初めて、定量的に示すことができた。吹田研究のリスクの平均値で補正した場合を含めても、吹田スコアはより良好な予測能をしめし、更に従来のリスクスコアに含まれないCKDを予測因子として組み入れることが有用であることを示せた。

本研究については、J Athero Thromb にアクセプトとされており、近日公開予定である。

E. 結論

吹田スコアはフラミンガムスコアより有意に良好なCHDの予測能を示し、CKDをカテゴリとして加えた場合により有効であった。オリジナルのフラミンガムスコアは特にリスクの高い対象者で心リスクを過剰に予測していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Yokoyama Yoko, Nishimura K. et al. Vegetarian diets associated with lower blood pressure. JAMA Internal Medicine. (in press)
- 2)Sasaki Yoshihito, Nishimura K. et al. Association of Antenatal Corticosteroids and the Mode of Delivery with the Mortality and Morbidity of Infants Weighing Less than 1500 g at Birth in Japan. Neonatology. (in press)
- 3)Nishimura K, Okamura T, et al. Predicting Coronary Heart Disease by Using Risk Factor Categories for a Japanese Urban Population and Comparison with the Framingham Risk Score: Suita Study J Athero Thromb (in press)
- 4)Miyashita F, Yokota C, Nishimura K, Amano T, Inoue Y, Shigehatake Y, Sakamoto Y, Tani S, Narazaki H, Toyoda K, Nakazawa K, Minematsu K. The Effectiveness of a Stroke Educational Activity Performed by a Schoolteacher for Junior High School Students. J Stroke Cereb D 2014. Epub ahead 2014/01/07.
- 5)Noguchi T, Kawasaki T, Tanaka A, Yasuda S, Goto Y, Ishihara M, Nishimura K, Miyamoto Y, Node K, Koga N. High-Intensity Signals in Coronary Plaques on Non-contrast T1-Weighted Magnetic Resonance Imaging as a Novel Determinant of Coronary Events. J Am Coll Cardiol. 2013. Epub 2013/12/19.
- 6)Shinjo H, Sato W, Imai E, Kosugi T, Hayashi H, Nishimura K, Nishiwaki K, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S.

- Comparison of Kidney Disease: Improving Global Outcomes and Acute Kidney Injury Network criteria for assessing patients in intensive care units. *Clin Exp Nephrol*. 2013. Epub ahead 2013/11/28
- 7) Iihara K, Nishimura K, Kada A, Nakagawara J, Toyoda K, Ogasawara K, Ono J, Shiokawa Y, Aruga T, Miyachi S, Nagata I, Matsuda S, Ishikawa KB, Suzuki A, Mori H, Nakamura F, Collaborators JAS. The Impact of Comprehensive Stroke Care Capacity on the Hospital Volume of Stroke Interventions: A Nationwide Study in Japan: J-ASPECT Study. *J Stro Cereb D* 2013. Epub ahead 2013/10/10
- 8) Ishii D, Satow T, Murao K, Nishimura K, Iihara K. Efficacy of Cilostazol in Prevention of Bradycardia during Carotid Artery Stenting. *J Stro Cereb D* 2013. Epub ahead 2013/07/10.
- 9) Tatsumi Y, Watanabe M, Kokubo Y, Nishimura K, Higashiyama A, Okamura T, Okayama A, Miyamoto Y. Effect of age on the association between waist-to-height ratio and incidence of cardiovascular disease: the Suita study. *J Epidemiol*. 23(5), 351-9, 2013.
- 10) Sekikawa A, Willcox BJ, Usui T, Carr JJ, Barinas-Mitchell EJ, Masaki KH, Watanabe M, Tracy RP, Bertololet MH, Evans RW, Nishimura K, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, Miyamoto Y. Do differences in risk factors explain the lower rates of coronary heart disease in Japanese versus U.S. women? *J Women Health*. 22(11), 966-77, 2013.
- 11) Ohnishi H, Iihara K, Kaku Y, Yamauchi K, Fukuda K, Nishimura K, Nakai M, Satow T, Nakajima N, Ikegawa M. Haptoglobin phenotype predicts cerebral vasospasm and clinical deterioration after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Stro Cereb D* 22(4), 520-6, 2013.
- 12) Nakamura K, Miura K, Nakagawa H, Okamura T, Okuda N, Nishimura K, Yasumura S, Sakata K, Hidaka H, Okayama A. Treated and untreated hypertension, hospitalization, and medical expenditure: an epidemiological study in 314 622 beneficiaries of the medical insurance system in Japan. *J Hypertension*. 31(5), 1032-42, 2013.
- 13) Mori K, Ishida T, Yasuda T, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Hasokawa M, Nakajima H, Haraguchi Y, Sun L, Shinohara M, Toh R, Nishimura K, Hirata KI. Fasting serum concentration of apolipoprotein B48 represents residual risks in patients with new-onset and chronic coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 421C, 51-6, 2013..
- 14) 32) 三井田孝、西村邦宏. LDL コレステロール直接法の現在の課題. 『脂質異常症-基礎・臨床研究の最新知見-』, 東京, 日本臨床社), 日本臨床, 71(Suppl 3), p439-443, 2013.
- * 下線論文は主要論文なので、「研究成果の刊行に関する一覧表」に掲載する。

2. 学会発表

ISC 2014 2014.2.14 San diego

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 吹田研究の参加者特性

	Men	Women
	(n=2796)	(n=2725)
Age(years, mean±SD)	56.1±13.3	54.5±12.9
DM (%)	6	5.8
Current Smoking (%)	49.67	11.91
Blood pressure (mmHg, %)		
Optimal (SBP<120, DBP<80)	30.74	41.68
Normal (SBP<130, DBP<85)	19.31	17.30
High normal(SBP<140, DBP<90)	17.98	15.69
Stage I (SBP<160, DBP <100)	20.39	15.94
Stage II to IV (SBP<160, DBP≥100)	11.59	9.40
Total cholesterol (mg/dl, %)		
<160	10.12	6.88
160-199	39.75	30.52
200-239	37.41	39.60
240-279	10.98	18.51
≥280	1.74	4.49
LDL cholesterol (mg/dl, %)		
130<	55.54	45.78
130-159	28.19	30.86
>160	16.26	23.34
HDL cholesterol (mg/dl, %)		
<35	11.40	3.28
35-44	28.71	16.36
45-49	15.87	12.25
50-59	23.82	29.95
≥60	20.20	38.14
Creatinine (mg/dl, mean±SD)	0.91±0.21	0.69±0.22
eGFR (mean±SD)	64.7±24.9	90.6±29.3
CKD(≥Stage 3) (%)	46.2	11.3

表2 吹田研究によるコックスモデルの回帰係数

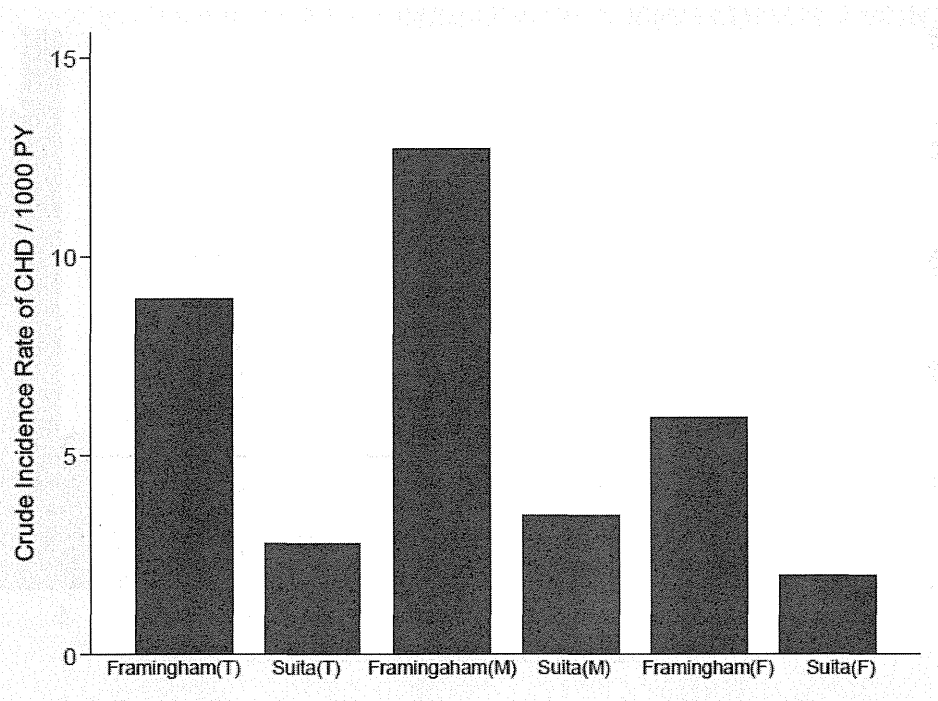
	β	HR	P-value	95% CI
Age ,years	0.0760078	1.08	<0.001	1.06 -1.10
Female	-0.6619839	0.52	<0.001	0.36-0.74
Smoking	0.5031949	1.65	0.002	1.20 -2.28
DM	0.5533678	1.74	0.031	1.05-2.88
Blood Pressure				
Optimal	-0.6763825	0.51	0.005	0.32-0.82
Normal and high normal	Referent	Referent	Referent	Referent
Stage 1 hypertension	0.4189501	1.52	0.019	1.07-2.16
Stage 2 hypertension	0.5935986	1.81	0.001	1.22-2.68
LDL(mg/dl)				
100<	Referent	Referent	Referent	Referent
100-140	0.5319015	1.70	0.039	1.03-2.81
140-160	0.6837867	1.98	0.015	1.14-3.43
160-180	1.021015	2.78	<0.001	1.57-4.91
Over 180	1.128479	3.09	<0.001	1.69-5.66
HDL(mg/dl)				
<40	Referent	Referent	Referent	Referent
40-59	-0.4730423	0.62	0.005	0.45-0.87
>=60	-0.5822414	0.56	0.007	0.37-0.85
CKD				
Stage 3	0.2893668	1.34	0.071	0.98-1.83
Stage 4 or 5	1.388216	4.01	0.008	1.43-11.25

表 3 CKD を含む 10 年間の冠動脈疾患の発症リスクスコア

Risk Factor	
Variable	Score
Age	
35-44	30
45-54	38
55-64	45
65-69	51
>=70	53
Female	-7
Current Smoker	5
DM	6
Blood pressure	
Optimal Blood pressure	-7
Stage 1 hypertension	4
Stage2 hypertension	6
LDL(mg/dl)	
<100	0
100-139	5
140-159	7
160-179	10
>=180	11
HDL(mg/dl)	
<40	0
40-59	-5
>=60	-6
CKD	
eGFR>60	0
Stage 3	3
Stage 4 or 5	14
Total Score	A

Predicted Probability of CHD in 10 years	
Total Score	Probability (%)
35<=	<1
36-40	1
41-45	2
46-50	3
51-55	5
56-60	9
61-65	14
66-70	22
71<	>28

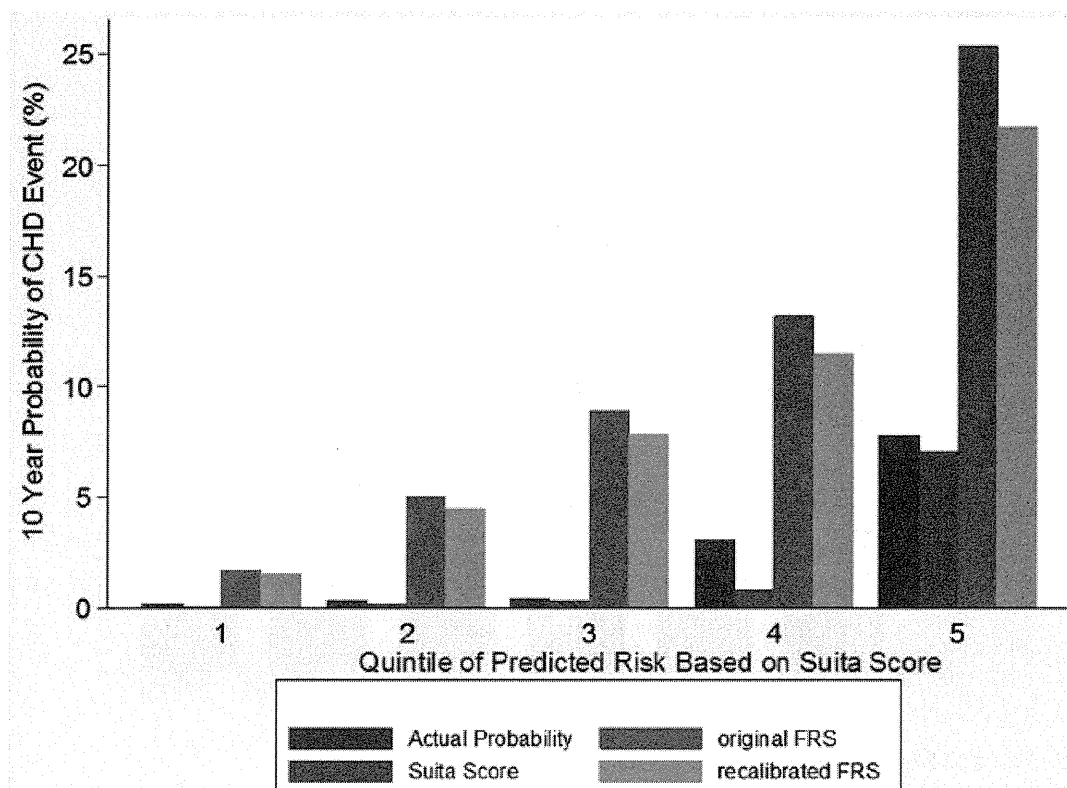
図1 吹田研究



フラミンガム研究のデータは Wilson の論文による

CHD, coronary heart disease; PY, person years; Framingham(T), total Framingham cohort; Framingham(M), Framingham cohort male; Framingham(F), Framingham cohort female; Suita(T), total Suita cohort; Suita (M), Suita cohort male; Suita (F), Suita cohort female;

図2 吹田研究参加者とリスクスコアによる予測発症確率の比較



Graphical presentation of actual 10-year risk of cardiac outcomes in Suita cohort along with predicted risk, Framingham risk function with and without recalibration for means of Suita cohort stratified by quintile of predicted Suita cohort risk. The Suita participants were divided into quintiles of 10-year CHD risk predicted by the Suita score functions with CKD in Table 3. In each quintile, mean predicted 10 year probabilities and actual probabilities were estimated. Suita Score, Suita score with CKD in table 3. FRS, Framingham risk score. CHD, coronary heart disease.

厚生労働科学研究費補助金 (non-HDL等血中脂質評価指針及び脂質標準化システムの構築と基盤整備に関する研究)

分担研究報告書

「non-HDL-C値とレムナントコレステロールおよびカイロミクロンレムナント蓄積を定量的に示すアポ蛋白B-48濃度との相関」

分担研究者 山下静也 大阪大学大学院医学系研究科
総合地域医療学寄附講座 教授

研究要旨

nonHDL-C(非HDLコレステロール値)はLDL-Cとレムナントコレステロールを含んでおり、そのいずれも動脈硬化リスクを反映することからより適切なリスク評価マーカーとして提案されている。しかしながら後者は小腸由来のカイロミクロンが水解されて産生したカイロミクロンレムナント(CM-R)と肝臓由来のVLDLレムナントの両者を含んでおり、今までそれぞれを独立して検討することが困難であった。近年の分子生物学的・組織学的検討によりこのCM-Rは動脈硬化プラークの形成・進展に強く関与しており、我々はこのCM-Rの定量的マーカーであるアポB-48濃度測定を実用化した。様々な臨床症例での検討を継続的に行っているが、空腹時アポB48濃度は頸動脈内中膜複合体肥厚度や冠動脈狭窄罹患率と強く相関し、その高値は動脈硬化性疾患の発症に強くかかわっている事を突き止めた。今年度の検討では、まずCM-Rの健常者におけるスクリーニングを目指し検診例で空腹時アポB-48濃度を検討した。アポB-48濃度は、男性・閉経女性、BMI25kg/m²以上、脂質異常症およびメタボリックシンドローム(MetS)患者で有意に高値であり、これらのリスク因子数の増加に相関して上昇した。さらに脂質異常のない健常例では基準値上限;5.7 µg/mL、基準範囲(平均±1.96SD);0.74-5.65 µg/mLと判明した。さらに、nonHDL-C値とレムナントコレステロール値(RemL-C値)および空腹時アポB-48値との相関について検討した結果、nonHDL-C値はTC値・LDL-C値と強い相関を示し、TG値・RemL-C値と軽度の相関を示すがapoB-48との相関は見られるもののきわめて弱く、nonHDL-C値は内因性レムナントの蓄積を示すマーカーであることが判明した。

共同研究者

大阪大学保健センター 准教授 西田 誠
大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座 特任助教 増田大作
大阪大学医学部附属病院 臨床検査部 花田浩之
東京慈恵会医科大学 臨床医学研究所 客員教授 多田紀夫
東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 教授 吉田博
セントマーガレット病院 健康管理センター 新井俊彦

A. 研究目的

虚血性心疾患のリスクファクターである空腹時高TG血症の背景にTGリッチリポ蛋白 (TRL、小腸由来のカイロミクロン[CM]および肝臓由来のVLDL)の増加が存在している。TRLがリポ蛋白リパーゼにより水解され形成されるレムナントには2種類存在し、小腸CM由来のカイロミクロンレムナント(CM-R)および肝臓VLDL由来のVLDLレムナントが含まれている。これらレムナントは血管壁に直接浸潤し、マクロファージの泡沫化や血小板凝集能の促進作用を有し動脈硬化惹起性を有している。レムナントの評価にはレムナントコレステロール (RLP-C、RemL-C) 測定がすでに確立されているが、これはCM-RおよびVLDL-Rを合わせて測定することになりそれぞれ単独での評価が今まで不可能であった。しかし、頸動脈の剥離術後の動脈硬化プラークを組織学的に検討した研究では、血中のアポB-48含有リポ蛋白：アポB-100含有リポ蛋白の粒子数の比は1:100と圧倒的にVLDLが多数であるにもかかわらず組織中の粒子数はほぼ1:1とCM-Rの動脈硬化惹起性への強い関与を示す結果が得られており、CM-Rの定量的評価系の確立が求められていた。そこで、我々は世界に先駆けてCM1粒子に1分子存在するアポB-48の測定系を開発した(ELISA法¹・CLEIA法²)。アポB-48濃度は食後高脂血症患者(IIb型高脂血症³やCD36欠損症⁴、やカイロミクロン蓄積を有する患者¹)で有意に高値をみとめた。また、空腹時アポB-48濃度は食後のTG値の推移と強く相関する食後高脂血症のマーカーであり⁵、空腹時TG値正常群(100<TG<150 mg/dl)において頸動脈内膜中膜複合体の肥厚度と相関する事を見だし⁶、さらにアポB-48/TGが家族性III型高脂血症の診断に有用であることを発見した⁷。さらに昨年度の検討では、冠動脈に有意狭窄を有する患者では空腹時アポB-48値が有意に高値であり、この他のマーカーと比較して最も強く罹患率に相関し、さらに空腹時アポB-48の高値は他の動脈硬化性疾患リスク因子(高TG、低HDL-C、高HbA1c、低アディポネクチン血症)と重複するとより冠動脈疾患罹患率を有意に上昇させることが判明した⁸。以上のことから、CM-Rの蓄積を反映する空腹時アポB-48濃度は、動脈硬化惹起性を有するCM-Rの蓄積に強く相関することが判明した。

これまでの検討の対象は食後高脂血症や虚血性心疾患等既に進行した病態における検討が中心であり、これらの病態ではその平均値もすでに上昇している事が予想される。これに反して、健康診断等比較的病的な状態になる以前の病態における動脈硬化惹起性の判断のためのアポB-48濃度測定には、これらほとんど病的な異常を有さない集団における正常範囲(upper limitおよびreference interval)の決定が必須である。このことから、今回は検診受診者を対象として空腹時アポB-48濃度を検討する事とした。さらに、今回の研究班での健康事項であるnonHDL-C値はLDL-Cとレムナントコレステロールの両者を含んでおり、さらに後者はCM-RおよびVLDL-Rの両者を含んでおりそれぞれのレムナントがどの程度相関しているかを検討できなかった背景がある。そこで、我々の開発したアポB-48濃度測定、RemL-C濃度測定を用いて健康診断例におけるnon-HDL-C値との相関について検討を行うこととした。

¹ J Lipid Res. 2003;44:1256-1262. ² Clin Chim Acta. 2012;413:160-165. ³ Eur J Clin Invest. 2009;39(8):689-98. ⁴ J Lipid Res, 2009;50(5):999-1011. ⁵ J Atheroscler Thromb. 2011;18:1062-70. ⁶ Atherosclerosis. 2011;218:226-32. ⁷ J Atheroscler. Thromb. 2012;19(9):862-71. ⁸ Eur J Clin Invest. 2012;42(9):992-9

(倫理面への配慮)

本研究の内容は大阪大学医学部附属病院、大阪大学保健センター、慈恵医大柏病院の各IRBにて承認され、測定データ及び生体材料は匿名化され研究終了時に破棄された。被験者に不利益が生じた場合には同意撤回及び相談可能とした。

B. 研究方法

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

大阪大学医学部附属病院・大阪大学保健センター・慈恵医大柏病院・セントマーガレット病院に年1回の健康診断目的に受診した、なんらかの投薬のなされていない連続516症例を対象としすべてから文書にて試験内容に対する承諾を得た。BMI、ウェスト周囲径、血圧および空腹時LDL-C、中性脂肪(TG)、HDL-CおよびアポB-48濃度を測定した。アポB-48濃度は年齢・閉経前後・脂質代謝異

常の有無(LDL-C ≥ 140 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL, HDL-C < 40 mg/dLのいずれか)、metabolic syndrome(MetS)の有無およびそれぞれのリスク因子数によって比較した。さらに、この検討の結果確認された、脂質代謝異常を有さない332例のアポB-48濃度の分布を平均値 ± 2.58 standard deviation(SD)を外れる値を除外することをを繰り返してアポB-48濃度の基準値上限、基準範囲(平均 ± 1.96 SD)を決定した。

2. 空腹時アポB-48濃度・RemL-C値とnonHDL-C値の関連の検討

大阪大学保健センターに健康診断で受信した連続99症例に対して文書による同意を得て試験を行った。健診において採血された血清の残余を用いて血清アポB-48濃度、RemL-C濃度を測定した。これと、健診項目として測定された各患者のBMI、血圧、空腹時TC、中性脂肪(TG)、HDL-C、RemL-CおよびアポB-48濃度を測定し、Friedwald式によりLDL-C値を、nonHDL-C値をTC-HDL-Cにより、apoB-48/TG値を計算した。この上で、TC、TG、HDL-C、LDL-C、RemL-C、アポB-48濃度とnonHDL-C値の関連を検討した。さらに全体をnonHDL-C・TG・アポB-48濃度の大小で4分位に分け、それぞれにおけるTC・LDL-C・TG・HDL-C・nonHDL-C・RemL-C・アポB-48濃度の分布に関して比較した。

C. 研究結果

1. 健康な日本人における空腹時アポB-48濃度の基準範囲の決定

空腹時アポB-48濃度は男性で高値であり(3.8 \pm 3.3 μ g/mL vs 2.4 \pm 1.9 μ g/mL, $p < 0.001$)(図1-1)、BMI25kg/m²以上(4.4 \pm 3.7 μ g/mL vs 2.8 \pm 2.4 μ g/mL, $p < 0.001$)およびMetS患者(6.5 \pm 4.3 μ g/mL vs 3.0 \pm 2.6 μ g/mL, $p < 0.001$)において有意に高値であった(図1-2)。さらにアポB-48濃度は脂質異常やMetSのリスク因子の増加に相関して上昇していた(図1-3)。さらに、脂質代謝異常を有さない332例を用いてアポB-48濃度の平均値 ± 2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返した結果、空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mL、平均値は2.04 μ g/mL、平均 ± 1.96 SDの基準範囲は0.74-5.65 μ g/mLと判明した。以上の結果から正常脂質代謝の者のCLEIA法による空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mLと推定された。

2. 空腹時アポB-48濃度とeGFR低下・蛋白尿増加の関連の検討

健康診断での参加者99名全体の測定結果を表2に示す。測定結果によりnonHDL-C濃度と他項目の関連を検討すると、TC、LDL-C濃度との相関はR2値も0.8を超えており強い相関が認められた(図2)。しかしながら、RemL-C濃度・TG濃度との相関はその傾向がみられるものの弱い相関しかなく、またHDL-C濃度との逆相関もさらに弱いものであった。また、アポB-48濃度との相関は全く見られないわけではないが相関は極めて弱く、nonHDL-C値とアポB-48濃度との間には関連は見いだせなかった(図2、図3-1)。これに関しては、それぞれの項目のカットオフ値(TC:220、LDL-C:140、TG:150、HDL-C:40 mg/dl)で2群に分けた場合、そのいずれかの群においてより強い相関を示すことはなかった。さらに、nonHDL-C・TG・アポB-48濃度により全体を4群に分けて他項目の濃度変化を検討したが、TG値上昇と相関するのはRemL-C・アポB-48濃度(図3-2)、アポB-48濃度と相関するのは同じくTG・RemL-C濃度であり(図3-3)、nonHDL-C濃度には影響を与えなかった。

D. 考察

今回の検討では空腹時アポB-48濃度のスクリーニングにおける基準値の決定を目指して健常例における空腹時アポB-48濃度の分布を検討し、さらに近年動脈硬化性疾患の独立したリスクであるとする報告が集積しつつあるnonHDL-C濃度とカイロミクロンレムナント蓄積を示すアポB-48濃度の間に相関があるか否かについて検討した。

まず、基準値の検討では、4施設から516症例の登録を得た。従来との検討と同様に、空腹時アポB-48濃度の分布は男性および閉経後女性において高値であり、女性ホルモンのレムナント蓄積リスクの低下作用を示唆する結果であった。さらに脂質代謝以上や肥満、メタボリックシンドロームの存在はアポB-48濃度を上昇させるが、その異常リスクが1個でも存在するとアポB-48濃度上昇に影響を与えるため、正常値の検討には脂質代謝異常を有さない健常例(332例)を用いた。アポB-48濃度の平均値 ± 2.58 standard deviation (SD)の除外を繰り返すことにより得られた結果は基準値上限は5.7 μ g/mL(基準範囲;0.74-5.65 μ g/mL)であった。昨年の検討では、冠動脈疾患

罹患率でのアポB-48のcut-off値は4.34 μ g/ml(sensitivity, 0.82; 1-specificity, 0.33; predictive positive value, 79; predictive negative value, 61)であり、今回の基準値上限よりも低い結果であった。この事はアポB-48濃度の上昇で示されるCM-Rの蓄積は検診で正常に判断される集団においても認められており、冠動脈リスク評価に関して更なる評価項目の検討が必要である事が示唆された。現在、動脈硬化性疾患ガイドラインで示されている脂質異常の基準値上限ではこれらCM-Rの蓄積で表される潜在的な動脈硬化リスクを有する群のスクリーニングには不向きであり、今回のアポB-48濃度などより適切なスクリーニングマーカーの開発が急がれる。

さらに、今回は動脈硬化惹起性に直接影響を与えるマーカーとして様々な臨床検討結果が蓄積しつつあるLDLおよびレムナントを量的に推定できるnonHDL-C濃度とCM-R蓄積を示すアポB-48濃度の素管について検討を行った。レムナントの動脈硬化惹起性においてカイロミクロンレムナントの蓄積は近年その強い動脈硬化惹起性から注目を集めている。また組織学的な検討においてもプラークへの易蓄積性が示されており、nonHDL-C値で示されるレムナントコレステロールの上昇とアポB-48の間に相関があることが予想された。しかし、今回の99例の健康診断例との相関検討においてはnonHDL-C濃度とアポB-48濃度との相関は見られておらず、他のマーカーの影響を除くべくカットオフ値以下の基準値範囲内で検討しても相関は見られなかった。この原因としては、アポB-48濃度はアポB-100濃度の100分の1程度しかなく血中のカイロミクロンレムナントの存在はnonHDL-C濃度との相関に関してはほとんど影響を与えていないことが示唆された。しかし、nonHDL-C濃度は他のTC・LDL-C濃度やRemL-C濃度と強い相関が示されており、nonHDL-C濃度であらわされるLDL-C値・レムナントコレステロール濃度の上昇をよく反映していることが確認できた。また、空腹時TG濃度との相関も認められたことから、内因性のTGリッチリポ蛋白であるVLDL由来のVLDLレムナント

との相関が強いことが示唆された。すなわち、nonHDL-C濃度はLDLの増加と内因性のレムナント蓄積を示すマーカーであると示唆された。今後、このnonHDL-C濃度とアポB-48濃度の動脈硬化惹起性の有用性に関する検討を目的に頸動脈エコーでのIMT肥厚度や冠動脈狭窄の有病率・心血管イベントのとの相関を検討しいずれのマーカーがより動脈硬化惹起性を予見できるかを検討することが望まれる。

E. 結論

脂質異常を有さない健常者における空腹時アポB-48濃度の基準値上限は5.7 μ g/mL(基準範囲;0.74-5.65 μ g/mL)であった。またnonHDL-C値はTC・LDL-C・TG・RemL-C濃度との相関が強いがアポB-48濃度との相関は極めて低く、LDLの増加と内因性のレムナント蓄積を示すマーカーであると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda D, Nishida M, Arai T, Hanada H, Yoshida H, Yamauchi-Takahara K, Mori-yama T, Tada N and Yamashita S. Reference Interval of Apolipoprotein B-48 Concentration in Healthy Japanese Individuals (J Atheroscler Thromb印刷中)

*下線論文は主要論文なので、「研究成果の刊行に関する一覧表」に掲載する。

2. 学会発表

European Atherosclerosis Society(H25)
日本循環器学会学術集会(H25)
日本動脈硬化学会学術集会(H25)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

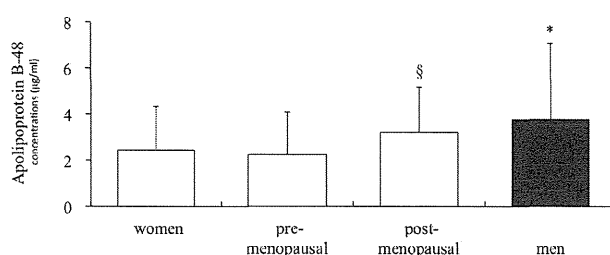
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表1 参加者脂質・糖質代謝項目の結果

	Mean ± SD	Reference Interval
Men/Women	284/232	
Age (year)	42±10(42±11)	
post-menopausal	48/232	
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.3	22.0 – 22.7
Waist circ. (cm)	91.1 ± 5.6	90.0 – 92.2
sBP (mmHg)	115.9 ± 14.6	114.6 – 117.2
dBP (mmHg)	73.2 ± 11.3	72.2 – 74.2
TC (mg/dL)	199 ± 31	196.0 – 201.6
TG (mg/dL)	94 ± 69	87.7 – 99.7
HDL-C (mg/dL)	65 ± 15	63.1 – 65.9
LDL-C (mg/dL)	121 ± 29	118.1 – 123.3
FPG (mg/dL)	87 ± 13	86.2 – 88.5
HbA1c (iDS) (%)	5.0 ± 0.5	4.9 – 5.1

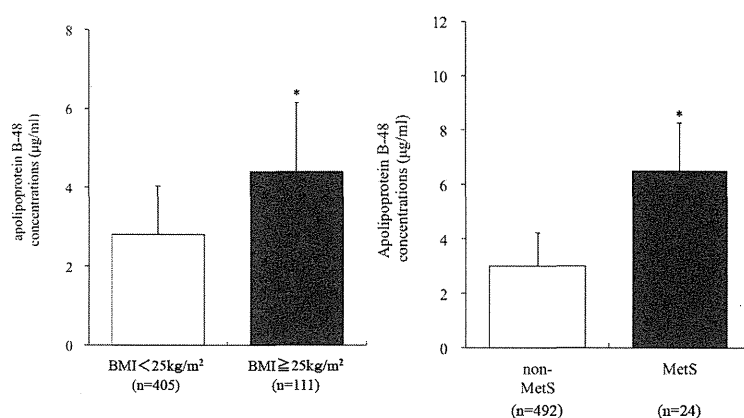
	Number of Patients
BMI ≥25 kg/m ²	111 (21.5 %)
BMI <25 kg/m ²	405 (78.5 %)
Hypertension	47 (9.1 %)
high BP status	103 (20.0 %)
high FPG	10 (1.9 %)
Number of Abnormal Factors for Dyslipidemia	
0	337 (65.3 %)
1	138 (26.7 %)
2	37 (7.2 %)
3	4 (0.8 %)
Number of Risk Factors for Metabolic Syndrome (MetS)	
0	303 (58.7 %)
1	135 (26.2 %)
2	53 (10.3 %)
3	24 (4.6 %)
4	1 (0.2 %)

図1-1 性差と閉経前後の比較



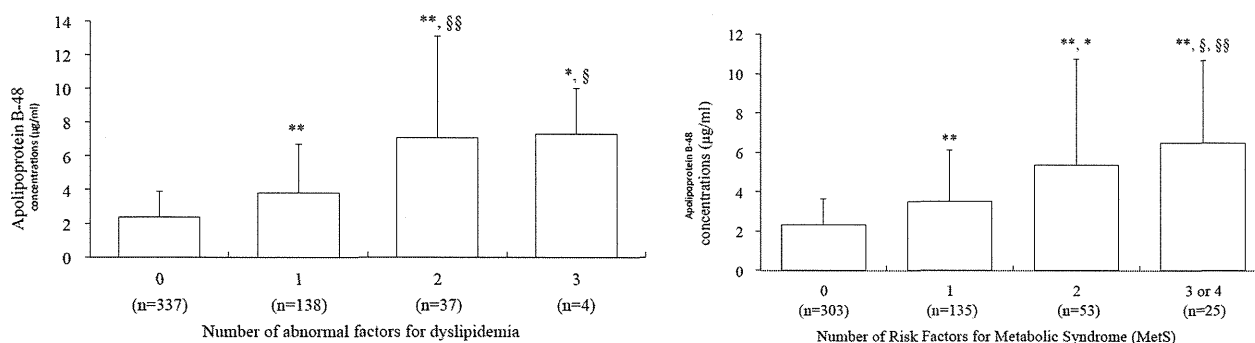
(* p<0.001 against women, § p<0.001 against pre-menopausal women, assessed by Mann-Whitney U test)

図1-2 BMI値・MetSとアポB-48濃度の関係



(* p<0.001 assessed by Mann-Whitney U test)

図1-3 脂質異常因子数・MetS 因子数とアポB-48濃度の分布



(* p<0.01, ** p<0.001 against cases with no abnormal factor, § p<0.05, §§ p<0.001 against cases with 1 abnormal factor, assessed by Mann-Whitney U test)

表2 参加者のプロフィール

sex	(m:f)	70 vs 29
BMI	(kg/m ²)	23.5 ± 3.5
waist circumstanes	(cm)	79.7 ± 10.3
systolic BP	(mmHg)	119.1 ± 14.9
diastolic BP	(mmHg)	76.2 ± 12.0
visceral fat area	(cm ²)	81.9 ± 47.5
TC(total cholesterol)	(mg/dl)	197.5 ± 33.3
TG	(mg/dl)	90.1 ± 59.9
HDL-C	(mg/dl)	64.6 ± 15.4
Non HDL-C	(mg/dl)	132.9 ± 35.9
LDL-C	(mg/dl)	114.9 ± 35.9
TG	(mg/dl)	90.1 ± 59.9
apoB-48	(μg/ml)	3.5 ± 2.9
apoB-48/TG		0.041 ± 0.020
FPG	(mg/dl)	87.6 ± 7.9
HbA1c	(%)	5.0 ± 0.5

図2 nonHDL-C値と他の測定項目との相関

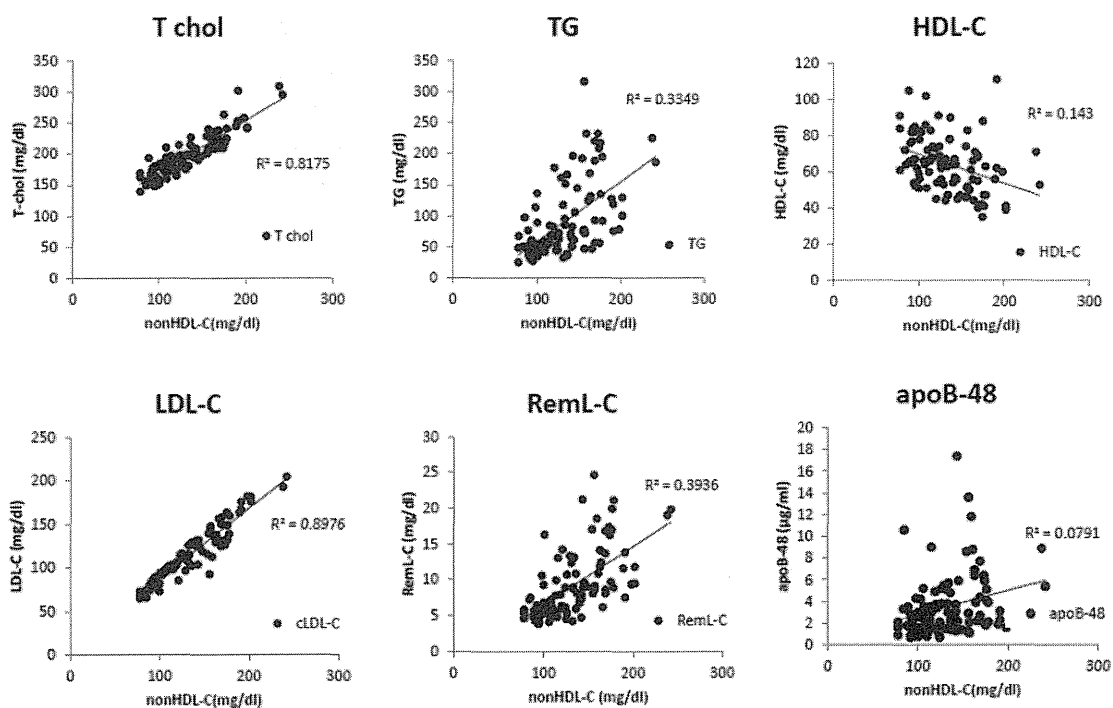


図 3-1 nonHDL-C 値による 4 分位各群における測定項目の比較

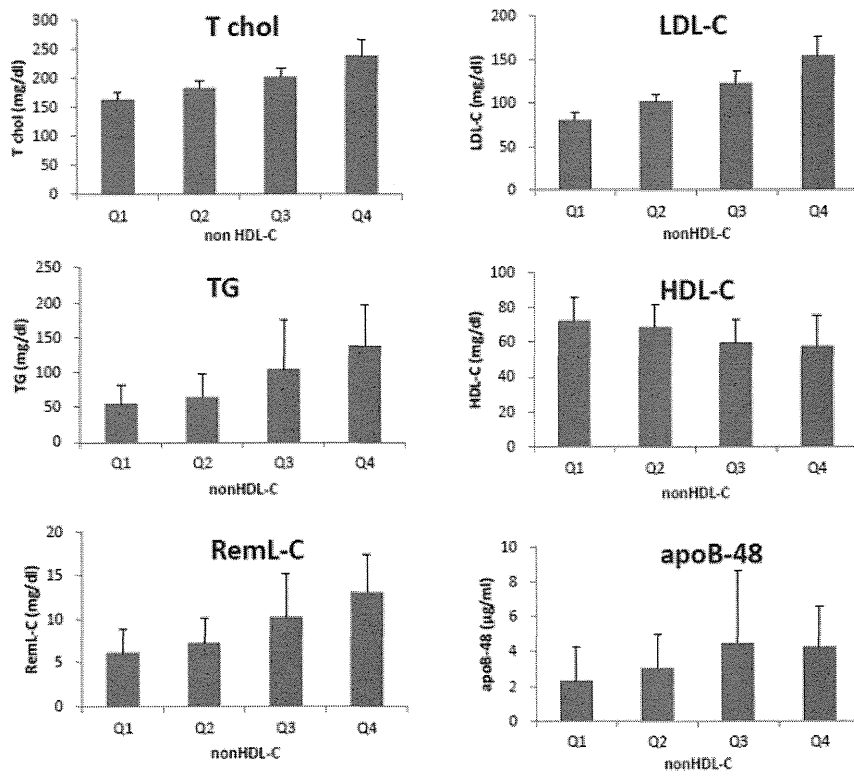


図 3-2 TG 値による 4 分位各群における測定項目の比較

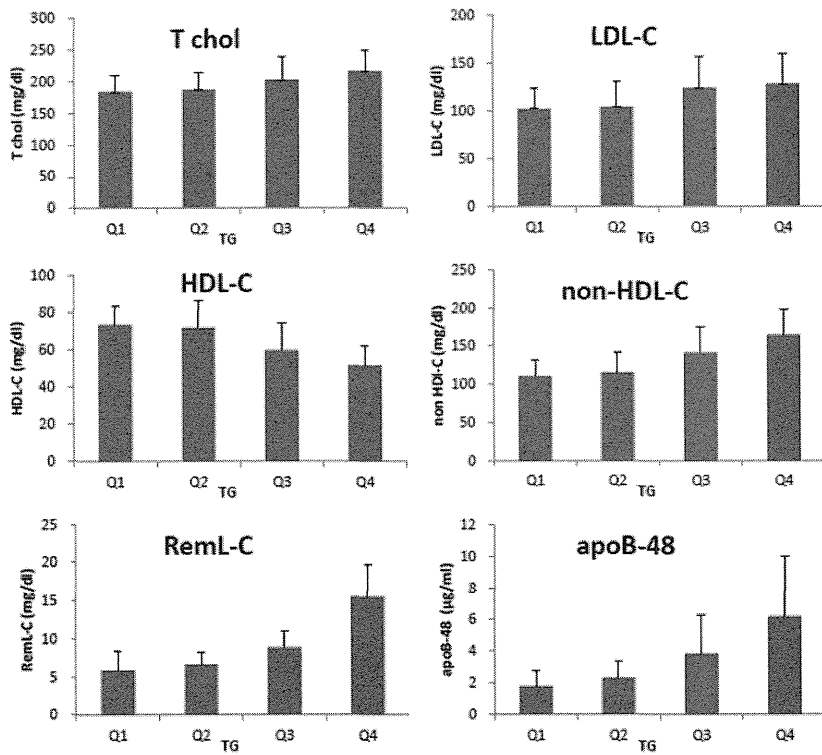
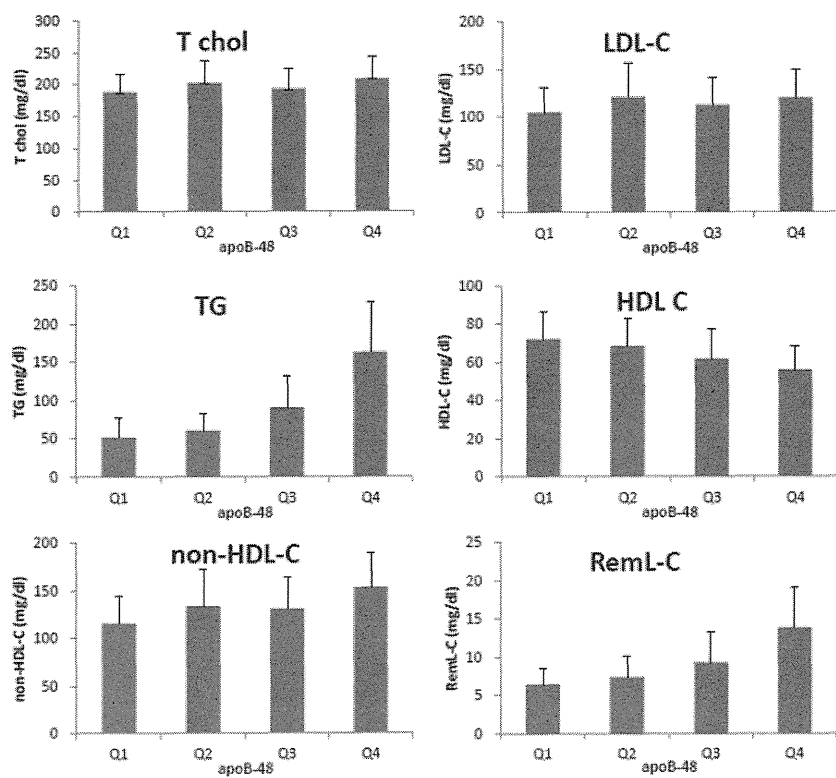


図 3-3 TG 値による 4 分位各群における測定項目の比較



分担研究報告書

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策政策研究事業)
non-HDL 等血中脂質評価指針及び脂質標準化システムの構築と基盤整備に関する研究

LDL コレステロールの基準分析法(Beta Quantification 法)の測定精度について

研究分担者 中村 雅一 国立循環器病研究センター予防健診部 脂質基準分析室 室長
研究分担者 西村 邦宏 国立循環器病研究センター予防医学・疫学情報部 室長
研究分担者 宮本 恵宏 国立循環器病研究センター予防健診部・研究開発基盤センター
予防医学疫学情報部 部長

研究要旨

脂質異常症の診断基準は、LDL コレステロール(LDL-C)が中心であることは疫学調査研究のみならず、治療エビデンスのメタ解析等からも明らかにされている。このことから、LDL-C の測定は重要な課題である。LDL-C の測定は超遠心法を含む複雑な測定系で構成されていることにより、日常分析には馴染まない。高い測定技術が要求されるので、どこの分析室でも容易に正確な測定結果が得られないなど、測定上の課題を抱えている。この課題を克服するための切り札として、1998 年頃から、わが国の試薬メーカーは血清と試薬を混合して反応させるという単純な操作で、自動分析装置を使い、10 分程度の短時間で LDL-C を直接的に測定する簡便法を次々と開発し、世界中の臨床検査で使われるようになった。米国は、LDL-C にもっとも関心の高い国である。このことを受けて、米国の Miller らは、わが国発の 8 つの LDL-C 直接法の試薬とキャリブレーターを使用して精密性と正確性を検討したが(1)、稀なりが蛋白異常症が少なからず含まれており、日常臨床での LDL-C の直接法の性能評価には必ずしも適切ではなかった。その後、三井田らは、わが国の患者に適合できるような検体を選択して LDL-C の直接法の再評価を行っているが(2)、この研究では検体数の不足、トリグリセライドの濃度による影響、食後採血の問題など幾つかの課題を残した。本研究においては、これらの課題を克服するための研究が実施される。

LDL-C の正確な目標値を決定する基準分析法は、Beta Quantification(BQ)法とされている。分担研究者らの所属する国立循環器病研究センターの脂質基準分析室は、米国の Centers for Disease Control and Prevention(CDC)が主催している Cholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)に 1992 年から正式加盟しており、1997 年 5 月から今日まで 15 年間にわたり、継続して BQ 法の標準化を行ってきた。BQ 法は、これまでに大規模疫学共同研究や臨床試験等において、LDL-C の目標値を提供する役目を担ってきた。しかしながら、本法の測定精度の実態についての研究報告は極めて少ない。そこで、われわれはこの空白を埋める目的で、15 年間の標準化成績を集計し、論文化して Clinica Chimica Acta に投稿し、2014 年 02 月 22 日に受理された(3)。本分担研究報告書では、LDL-C の基準分析法である BQ 法の測定精度について記述する。

A. 研究目的

LDL-C の 基 準 分 析 法 は 、 Beta

Quantification(BQ)法とされている。国立循環器病研究センターの脂質基準分析室は、米国の

Centers for Disease Control and Prevention(CDC)が主催するCholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)に参加している正式のメンバーである。このネットワークを通じて、1997年5月から今日まで15年間にわたり、継続してBQ法の標準化を行ってきた。BQ法は、これまでに大規模疫学共同研究や臨床試験等において、LDL-Cの目標値を提供する役目を担ってきた。しかしながら、本法の測定精度の実態についての論文や学会報告は極めて少ない。そこで、われわれは、BQ法の測定精度を明らかにする目的で、これまでの標準化成績を集計し、論文化した。分担研究報告書では、LDL-Cの基準分析法であるBQ法の測定精度を中心に述べる。

B. 研究方法

本研究班の1年目に当たる平成25年度内に行った研究課題とその主な内容は、以下のとおりである。

【脂質標準化システムの構築】

脂質標準化システムは、CDCが実施しているシステムとネットワーク分析室(国立循環器病研究センター)が実施しているシステムに大別することができ、いずれも試薬メーカーと臨床検査室を対象に運用中である。

【BQ法に対する最新の評価成績】

本研究班では約100人を対象に採血を実施して、HDLコレステロール(HDL-C)とLDL-Cの正確な測定値をBQ法で求める予定である。この測定に備えて、国立循環器病研究センターの脂質基準分析室ではBQ法の測定準備が完了している。2013年10月に実施されたCDCによるBQ法に対する最新の評価成績を、表1に示した。

【BQ法の基本的な測定精度について】

BQ法が初めて適用された疫学研究は、米国で実施されたLipid Research Clinics Programにおいてである。BQ法は、欧米やわが国の大規模疫学共同研究や臨床試験の場でLDL-Cの目標値として提供されてきた。文献調査をしたところ、BQ法が一体

どの程度の性能を発揮できるのかについて、学会報告や論文での発表が非常に少ないことが判明した。そこで、1997年05月から2012年10月までの15年間に測定された70回のサーベイで用いられた計280検体の分析において得られた標準化成績を集計して、論文化し、BQ法の基本性能を明らかにした。その研究結果を表2、表3、図1(A, B, C)、図2、及び、図3(D, E, F)に示した。

C. D. 研究結果と考察

【脂質標準化システムの構築】

① CDCが実施しているシステム：試薬メーカーを対象とする脂質標準化システムは、CDCのweb site(<http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.html>)に掲載されている。その内容は、総コレステロールではTotal cholesterol certification protocol for manufacturers-revised-(October 2004)、HDLコレステロールではHDL cholesterol certification protocol for manufacturers (November 2002)、LDLコレステロールではLDL cholesterol certification protocol for manufacturers (June 2006)として公開されている。国立循環器病研究センターを通じて、試薬メーカーを対象とする標準化プログラムにより標準化を実施し、判定基準を満たした試薬メーカーの名称等は、CDCのweb siteにおいて総コレステロールではAnalytical systems certified for total cholesterol、HDLコレステロールではAnalytical systems certified for HDL cholesterol、LDLコレステロールではAnalytical systems certified for LDL cholesterolとして公表されている。次に、臨床検査室を対象とする脂質標準化システムは、総コレステロールのみであり、その内容はCertification protocol for clinical laboratories (May 2004)で公開されている。国立循環器病研究センターを通じて、臨床検査室を対象とする標準化プログラムにより標準化を実施し、判定基準を満たしたわが国の臨床検査室の名称等は、List of international clinical laboratories certified for total cholesterolとしてCDCで公表されている。

② 国立循環器病研究センターが実施しているシステム：試薬メーカーを対象とする脂質の標準化は、CDCのプログラムと同じものが適用されている。次に、臨床検査室を対象とする脂質標準化シ