

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総合研究事業）
分担研究報告書

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 三井田 孝 順天堂大学大学院 臨床病態検査医学 教授

研究要旨

本年度は、LDL-C や non HDL-C を計算するために必要な HDL-C が直接法で正しく測定されているのかという点について、健常群 48 例、患者群 119 例(計 167 例)について検討した。

4 以下で保存した新鮮血清を使用し、CDC の基準法と我が国で市販されている 12 社の HDL-C 直接法を用いて、24 時間以内に HDL-C 測定した。その結果、一回測定の結果で、米国コレステロール教育プログラム (NCEP) の Total Error の基準を満たした試薬は、健常群で 9 社、患者群では 6 社だった。散布図や%バイアスプロットの結果を総合すると、12 社のうち明らかに 3 社の試薬は他の試薬と比較して正確性が劣っていた。

LDL-C 直接法の正確性の検討を行うための予備試験を行った。倫理委員会の承認を得られた参加施設から検体収集を開始する予定である。

A . 研究目的

「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版」では、LDL-C 直接法の正確性に問題が指摘されていることを受けて、原則として LDL-C を計算式で求めることと、トリグリセライド (TG) が 400mg/dL 以上か食後の採血の場合は non HDL-C で脂質異常症を管理することを勧告している。いずれの場合も、その計算に HDL-C の値が必要である。現在、ほとんどの施設において、HDL-C は直接法で測定されている。しかし、HDL-C の試薬は原理の異なるものが複数販売されており、その正確性は十分検証されていない。今年度は、(1)新鮮血清を用いて、HDL-C 直接法で測定した HDL-C 値が米国疾病管理予防センター (CDC) の基準法 (RMP

法)で測定した値と一致するのか、また(2)来年度以降の LDL-C と HDL-C 直接法の正確性の検討を行う体制を構築することを目的とした。

B . 研究方法

a) 検討 1 : HDL-C 直接法 (12 社) の正確性の検討

健常人 48 例、疾患群 119 例から、食後の絶食時間に関わらず静脈血を採取した。血清を分離後、4 以下に保って 24 時間以内に 12 社の HDL-C 直接法 (表 1) と RMP 法で HDL-C を測定した。RMP 法は、血清を 18°C, 105,000×g, 18.5 時間遠心し、比重 1.006 より軽い分画をチューブスライサーで除き、下層にヘパリン・マンガンを追加してアポ

表 1：検討 1 で使用した 12 社の HDL-C 直接法と分析機

会 社	試 薬 名	分 析 機
デンカ生研	A: HDL-EX "SEIKEN"	Hitachi 7170
和光	B: L-Type HDL-C M (2)	Hitachi 7170
シスメックス	C: HDL-C Reagent KL	Hitachi 7170
セロテック	D: [Serotec] HDL-L	Hitachi 7170
フレイヤ	E: Measure L HDL	Hitachi 7170
協和メデックス	F: MetaboLead HDL-C	Hitachi 7170
東洋紡	G: DIACOLOR・HDL	Hitachi 7170
シノテスト	H: Quick Auto Neo HDL-C	Hitachi 7170
積水メディカル	I: Cholestest N HDL	Hitachi 7170
オーソー	J: Vitros Chemistry Products dHDL Reagent	Vitros 5,1 FS
シーメンス	K: AHDL Flex reagent cartridge	Dimension RxL Max clinical chemistry system
ベックマン・コルター	L: HDL Cholesterol Reagent	UniCel DxC 600 System

B 含有リポ蛋白を除いた。1,500×g, 30 分間遠心して上清を得て、そのコレステロール濃度を Abell-Kendall 法で定量した。HDL-C 直接法による HDL-C の測定は、汎用機で使用可能な 8 社の試薬は Hitachi 7170 を用いて、それぞれの専用機でしか使用できない 4 社の試薬はそれぞれの分析機を用いて行った。

b) 検討 2：LDL-C と HDL-C 直接法の追加検討のための体制作り

来年度以降に行う LDL-C および HDL-C 直接法の正確性の検討は、現在我が国で使用されている試薬の約 9 割を占める 4 社（デンカ生研、和光、協和メデックス、積水メディカル）の試薬を対象とすることとした。先行研究のデータと合わせて解析ができるように、先行研究と同じ自動分析機（Hitachi 7170）で測定が可能な京都府立医大に協力を依頼した。プール血清を作成し、日差再現性、同時再現性、濃縮試験、

クロスコンタミネーション試験を実施した。（倫理面への配慮）

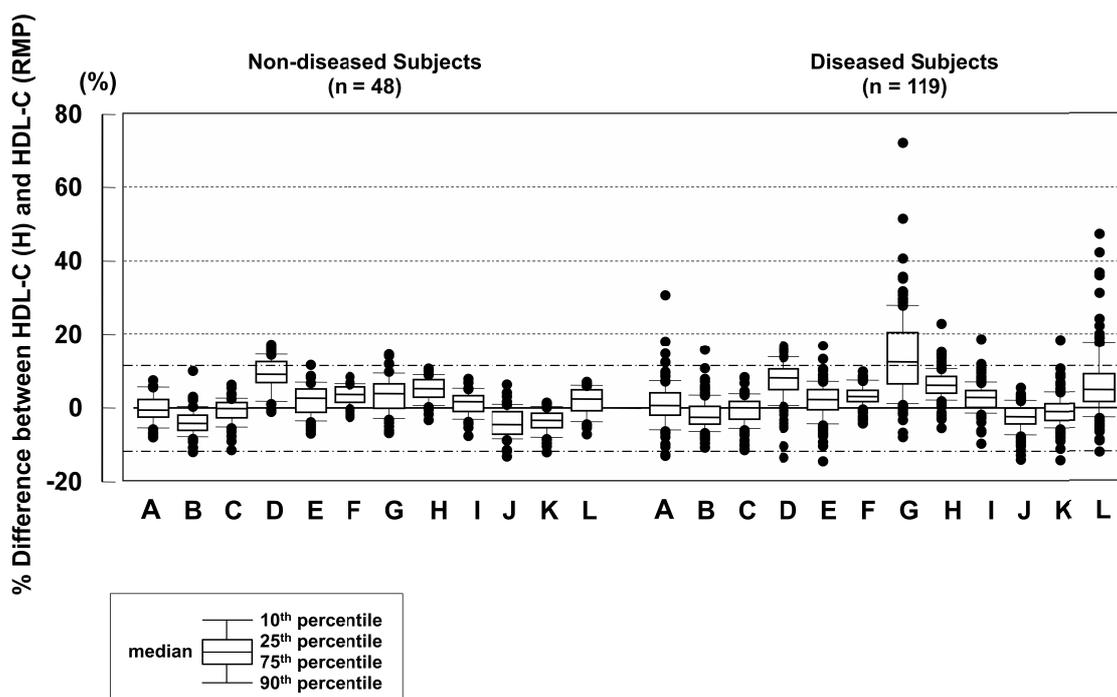
本検討は、Helsinki 宣言（2013 年改訂）に基づいて行った。健常群・患者群とも、個人情報を含むデータは連結不可能な匿名化を行い、解析に用いた。また、本研究のプロトコルは、大阪大学・国立循環器病研究センターの倫理委員会で承認を得た。順天堂大学では、現在両施設の承認書類を添付し、倫理委員会へ迅速審査の申請を行っている。

C．研究結果

a) 検討 1

健常群では、試薬 D を除き HDL-C 直接法試薬で測定した HDL-C [HDL-C(H)] と RMP で測定した HDL-C [HDL-C (RMP)] の差（%バイアス）は、ほとんどのサンプルで NCEP の基準の 13% 以内であった（図 1）。一方、疾患群では、特に試薬 G と試薬 L におい

図 1 : HDL-C (H) と HDL-C (RMP) の差 (%) の Box-および Wisker Plots



て、%バイアスが20%を越える検体が多かった。散布図と%バイアスプロットでは、特に疾患群でにおいて試薬Gと試薬Lの性能が不良であった(図2)。一回測定における Total Error は、試薬D、試薬G、試薬

Lを除いて90%以上のサンプルでNCEPの基準を満たしていた(表2)。満足すべき性能を持ったこれらの試薬では、食後検体や高TG血症の有無は、HDL-C (H)とHDL-C (RMP)の乖離には影響しなかった。

表 2 : 一回測定における NCEP の基準を満たす検体の割合

Group	Reagent											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Non-diseased subjects (n = 48)	100.0	97.9	97.9	62.5	97.9	100.0	100.0	100.0	100.0	89.6	95.8	91.6
Diseased subjects (n = 119)	93.2	99.1	97.4	75.6	96.6	100.0	43.7	92.4	97.5	94.1	97.4	68.1

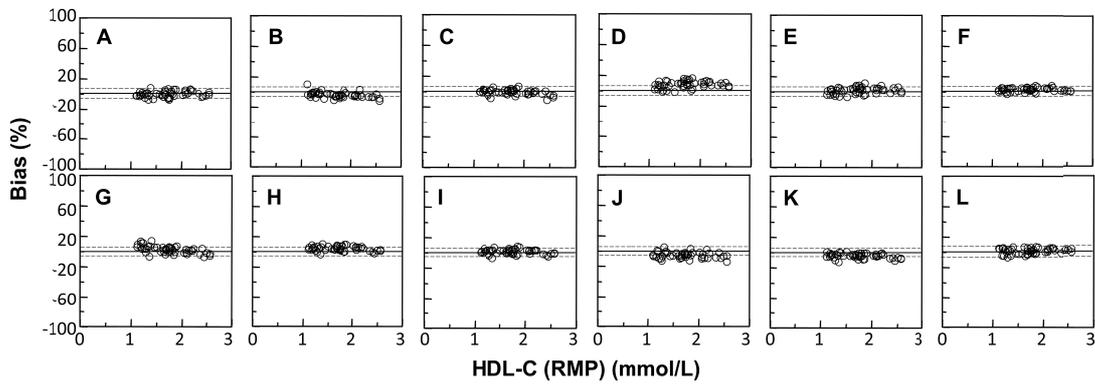
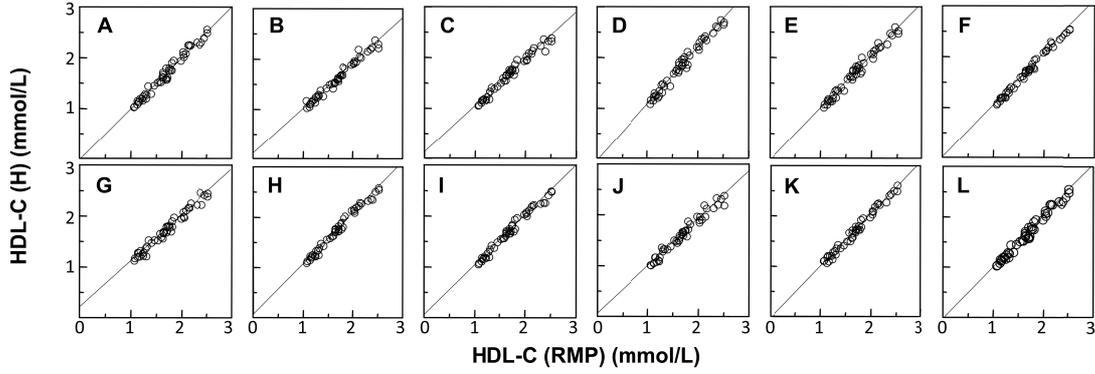
b) 検討 2

自家製プール血清の日差再現性と同時再現性を検討したところ、4社の試薬ともCV

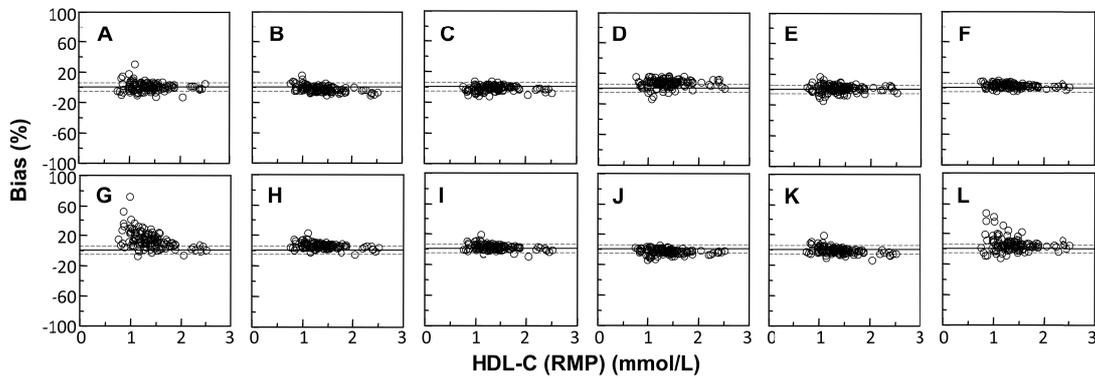
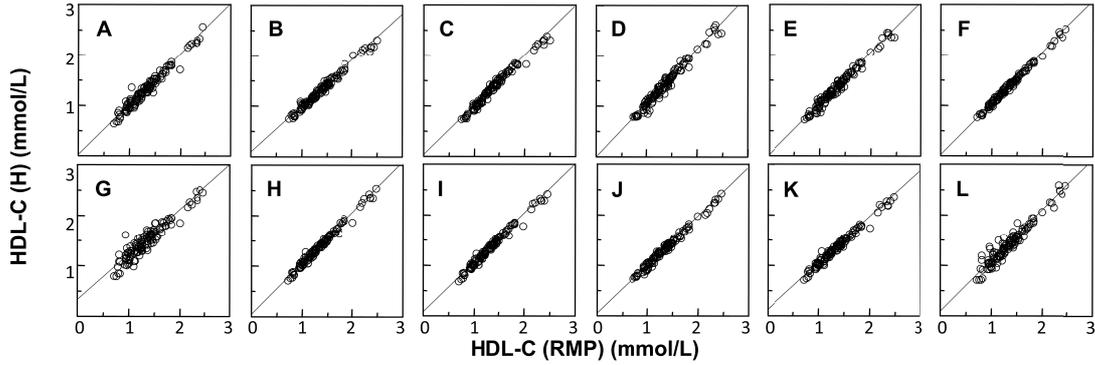
値が3%未満という目標値を達成した。次に、3重測定の間検体が濃縮されないか確認試験を行った。全項目を測定する時間

図 2 : HDL-C (H) と HDL-C (RPM) の散布図と % バイアスプロット

Non-diseased subjects (n = 48)



Diseased subjects (n = 119)



内に、明らかな値の変動はなかった。一方、クロスコンタミネーション試験では、酸性の洗浄液を使用した場合に試薬のキャリーオーバーが原因と思われるバラつきが発生した。そのため、洗浄液を酸性からアルカリ性のものに変更し、再度クロスコンタミネーション試験を行うことになった。

D．考察

HDL-C は、心血管イベントの確立した負の危険因子であり、さらに計算で求める LDL-C や non HDL-C の正確さにも影響する重要な検査である。今回の検討で、一部の試薬は性能が明らかに劣っており、臨床で使用するのに不適切であることがわかった。他の試薬については、HDL-C(RPM)と良好な相関が認められたが、回帰曲線の傾きにバラつきが認められ、今後の標準化の課題と考えられた。

一方、LDL-C 直接法については、先行研究で性能不良とされた試薬のうち、販売中止(1社)、試薬の改良(1社)、誤った値付けの修正(1社)が行われた。さらに別の会社は自社開発の試薬販売をやめ、性能の良かった他社の試薬を導入することが決まっている。このように LDL-C 直接法の標準化に向けて、少しずつ前進している。本研究で予定されている LDL-C 直接法の追加検討では、試薬販売の約 9 割を占める 4 社の LDL-C 試薬(うち 1 社は先行研究後に改良された試薬を使用)を対象として行う。予備検討が終了して平成 26 年 2 月に参加施設の倫理委員会の承認が得られたため、2 月 18 日よりサンプルの採取を開始した。

E．結論

HDL-C 直接法の試薬は、12 社中 3 社の試薬で性能が不良であったが、他の 9 社の試薬はほぼ満足できる正確性を示した。食事摂取や TG の値による影響も、ほぼないと考えられた。また、次年度に行う追加検討の予備試験では、試薬間の干渉が酸性洗浄液では防止できず、アルカリ性洗浄液を使用することで再検討を行うことになった。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

- 1) Jin L, Tabe Y, Lu H, Borthakur G, Miida T, Kantarjian H, Andreeff M, Konopleva M. Mechanisms of apoptosis induction by simultaneous inhibition of PI3K and FLT3-ITD in AML cells in the hypoxic bone marrow microenvironment. *Cancer Lett*, 329(1), 45-58, 2013.
- 2) Nagasaka H, Yorifuji T, Bandsma RHJ, Takatani T, Asano H, Mochizuki H, Takuwa M, Tsukahara H, Inui A, Tsunoda T, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Hirano K, Miida T, Ohtake A, Taguchi T, Miwa I. Sustained high plasma mannose less sensitive to fluctuating blood glucose in glycogen storage disease type Ia children. *J Inherit Metab Dis*, 36(1), 75-81, 2013.
- 3) Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Yoshino M, Sanayama Y,

- Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Takuwa M, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Sakamoto O, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ito T, Ohtake A, Yamato S, Miida T. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta*, 416, 54-59, 2013.
- 4) Nagasaka H, Miida T, Yorifuji T, Hirano K, Inui A, Fujisawa T, Okajima H, Hayashi H, Inomata Y. Metabolic improvements in intrahepatic porto-systemic venous shunt presenting various metabolic abnormalities by 4-phenylacetate. *Clin Chim Acta*, 419, 52-56, 2013.
- 5) Ueno T, Hirayama S, Ito M, Nishioka E, Fukushima Y, Satoh T, Idei M, Horiuchi Y, Shoji H, Ohmura H, Shimizu T, Miida T. Albumin concentration determined by the modified bromocresol purple method is superior to that by the bromocresol green method for assessing nutritional status in malnourished patients with inflammation. *Ann Clin Biochem*, 50(6), 576-584, 2013.
- 6) Zhanga M, Ito T, Li S, Misawa S, Kondo S, Miida T, Ohsaka A, Hiramatsu K. Analysis of Staphylococcal Cassette Chromosomemec in BD GeneOhm™ MRSA Assay negative strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(6), 2890-2891, 2013.
- 7) Hirayama S, Nakagawa S, Soda S, Kamimura Y, Nishioka E, Ueno T, Fukushima Y, Higuchi K, Inoue M, Seino U, Ohmura H, Yamato S, Miida T. Ezetimibe decreases serum oxidized cholesterol without impairing bile acid synthesis in Japanese hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, 230(1), 48-51, 2013.
- 8) Tabe Y, Shi YX, Zeng Z, Jin L, Shikami M, Hatanaka Y, Miida T, Hsu FJ, Andreeff M, Konopleva M. TGF- β -neutralizing antibody 1D11 enhances cytarabine-induced apoptosis in AML cells in the bone marrow microenvironment. *PLoS ONE*, 8(6), e62785. 2013.
- 9) Jin L, Tabe Y, Kojima K, Shikami M, Benito J, Ruvolo V, Wang RY, McQueen T, Ciurea SO, Miida T, Andreeff M, Konopleva M. PI3K inhibitor GDC-0941 enhances apoptotic effects of BH-3 mimetic ABT-737 in AML cells in the hypoxic bone marrow microenvironment. *J Mol Med (Berl)*, 91(12), 1383-1397, 2013.
- 10) Maenou I, Tabe Y, Bengtsson HI, Ishii K, Miyake K, Horiuchi Y, Idei M, Horii T, Satoh N, Miida T, Ohsaka A. Performance evaluation of the automated morphological analysis of erythrocytes by CellaVision DM96. *Clin Lab*, 59(11+12), 1413-1417, 2013.
- 11) Miida T, et al. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh

- samples from healthy and diseased subjects. Atherosclerosis 233:253-259, 2014
- 12) 三井田孝. LDL-コレステロールの測定法. —直接法とFriedewald式— 医学のあゆみ, 244(8), 693-695, 2013.
 - 13) 平山 哲、三井田孝. 脂質異常症と遺伝的素因. 臨床病理, 61(2), 159-166, 2013.
 - 14) 三井田孝. LDL-C 直接法の性能評価と標準化の動向. 臨床化学, 42(3), 271-272, 2013.
 - 15) 三井田孝. BNP の検査手技について. Medical Technology, 41(7), 803, 2013.
 - 16) 三井田孝、平山 哲. 脂質測定法の標準化. 臨床検査, 57(8), 845-851, 2013.
 - 17) 三井田孝、平山 哲. コレステロールの異常と病態生理. 臨床検査, 57(11), 1506-1511, 2013.
 - 18) 岡部恵見子、竹本 稔、中川沙織、内田大学、大和 進、平山 哲、三井田孝、小林一貴、横手幸太郎. 著明なアキレス腱肥厚を契機に発見された脳腱黄色腫の1例. Progress in Medicine, 33(7), 1659-1666, 2013.
 - 19) 飯原弘二、西村邦宏、嘉田晃子、中川原讓二、小笠原邦昭、小野純一、塩川芳昭、有賀徹、宮地茂、豊田一則、松田晋哉、永田泉、石川ベンジャミン光一、鈴木明文、森久恵、片岡大治、中村文明、Group J-AS. 【虚血性疾患の課題と展望】脳卒中急性期治療の課題 包括的脳卒中センターの整備に向けて. 脳神経外科ジャーナル, 22(9), 678-687, 2013.
 - 20) 三井田孝. Q4 LDL-C の測定法に計算式と直接法がありますがどう使い分ければよいでしょうか？違いと使い方を教えてください. (『動脈硬化性疾患予防のための脂質異常症治療ガイド 2013年版』, 第1版, 日本動脈硬化学会編, 東京, 杏林舎), p111, 2013.
 - 21) 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.
 - 22) 平山 哲、三井田孝. LDL コレステロール、HDL コレステロール、non HDL コレステロール. (『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), p400-404, 2013.
 - 23) 三井田孝、平山 哲. LDL-C 直接法と β -quantification法. (『動脈硬化のすべて』, 東京, 医歯薬出版), 医学のあゆみ, 245(13), p1146-1147, 2013.
 - 24) 三井田孝、平山 哲. F. 脂質の輸送と蓄積. (『人体の構造と機能及び疾病の成り立ち』, 改訂第2版, 香川靖雄、近藤和雄、石田 均、門脇 孝編, 東京, 南江堂), p163-165, 2013
 - 25) 平山 哲、三井田孝. G. コレステロールの合成・輸送・蓄積. (『人体の構造と機能及び疾病の成り立ち』, 改訂第2版, 香川靖雄、近藤和雄、石田 均、門脇 孝編, 東京, 南江堂), p165-169, 2013

26) 三井田孝. 酸化 LDL の測定とその意義. (『冠動脈疾患のパーフェクトマネジメント』, 伊藤 宏編, 東京, 南江堂), 89-91, 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

- 1) 三井田孝. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン (2012 年版) と脂質検査. 第 62 回日本医学検査学会, 高松市
- 2) 三井田孝. 脂質検査のトピックス - LDL-C 直接法を中心に -. 第 54 回人間ドック学術大会, 徳島市
- 3) 三井田孝. 脂質検査の標準化と問題点 - LDL-C 直接法を中心に -. 第 31 回日本臨床化学会甲信越支部総会, 八ヶ岳高原
- 4) 三井田孝. リポ蛋白定量の歩みと解決すべき問題点. 第 45 回日本動脈硬化化学会総会, 東京
- 5) 出居真由美、田部陽子、濱田千江子、井尾浩章、富野康日己、三井田孝. 血液像自動分析装置を用いた腹膜透析排液中の中皮細胞検出と腹膜機能予測. 第 56 回日本腎臓病学会学術総会, 2013, 東京
- 6) 平山 哲、上野 剛、昆 美香、三宅一徳、三井田孝. LDL-C 直接測定法における新鮮プール血清の保存安定性の検討. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, 2013, 徳島市
- 7) 中川沙織、平山 哲、木村晋也、三井田孝、大和 進. 血中イソプレノイドの LC-MS/MS 高感度定量. 第 53 回日

本臨床化学会年次学術集会, 2013, 徳島市

- 8) 上野 剛、平山 哲、西岡笑子、松川岳久、昆 美香、小野塚麻里、牧野真太郎、北村文彦、竹田 省、横山和仁、三井田孝. 妊娠時の貧血の経時的変化に及ぼす血清鉄および亜鉛の影響. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, 2013, 徳島市
- 9) 東海林宏道、村野弥生、松永展明、森真理、池野 充、吉川尚美、菅沼広樹、久田 研、清水俊明、上野 剛、平山哲、三井田孝. 早産時における出生時の脂質、アポリポ蛋白代謝と微量元素との関連. 第 49 回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会, 2013, 東京

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
なし